

# CONTENIDO DE CERAS EPICUTICULARES EN GENOTIPOS DE SORGO COMO RESPUESTA AL ESTRES HIDRICO

## EPICUTICULAR WAXES CONTENT IN SORGHUM GENOTYPES IN RESPONSE TO WATER STRESS

Sergio Castro Nava<sup>1</sup> y Alfredo J. Huerta<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se estudiaron 20 genotipos de sorgo para grano (*Sorghum bicolor* L. Moench) con el objeto de evaluar el efecto del estrés hídrico sobre el contenido de ceras epicuticulares, en experimentos realizados durante 1991. Se tomaron muestras de hojas después de ocurrida la antesis para la extracción de ceras con cloroformo y realizar la estimación por el método colorimétrico. Se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre genotipos, con rangos de 0.88 a 1.51 mg dm<sup>-2</sup> y de 0.65 a 2.14 mg dm<sup>-2</sup> para riego y sequía, respectivamente. La correlación entre el contenido de ceras epicuticulares en ambas condiciones y la relación sequía-riego fue de  $r = 0.72^{**}$ . Mientras que al considerar solo el contenido de ceras bajo sequía y la relación sequía-riego el valor de correlación aumentó a  $r = 0.90^{**}$ . Se concluyó la existencia de variabilidad genética en el contenido de ceras epicuticulares y que su incremento es una respuesta de las plantas a la sequía, que depende tanto del genotipo como de la severidad del factor.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

*Sorghum bicolor*, riego-sequía, ceras epicuticulares, variabilidad.

### SUMMARY

Twenty genotypes of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) were studied with respect to the responses of leaf epicuticular waxes to drought during 1991. Leaf samples which were taken after anthesis

were analyzed for epicuticular wax content by extraction with chloroform and colorimetric analysis. Highly significant differences in leaf epicuticular wax content were found between genotypes. Wax content varied from 0.88 to 1.51 mg dm<sup>-2</sup> under irrigation and from 0.65 to 2.14 mg dm<sup>-2</sup> under drought conditions. A correlation coefficient of 0.72<sup>\*\*</sup> between the average (average of drought + irrigation) wax content for each of the 20 genotypes and the drought/irrigation wax content ratio was found also it was found a correlation coefficient of 0.90<sup>\*\*</sup> between the wax content under drought for each genotype and the drought/irrigation wax content ratio. We conclude that the increase in epicuticular wax content is a response to drought and the degree of response depends of the genotype and drought severity.

### ADITIONAL INDEX WORDS

*Sorghum bicolor*, well watered-water stressed, epicuticular waxes, variability.

### INTRODUCCION

El agua es uno de los factores más importantes en la distribución de la vegetación sobre la tierra; las diferencias existentes en la vegetación debidas a su disponibilidad son impresionantes. El estudio del agua, como constituyente y favorecedor de procesos fisiológicos y bioquímicos, en la planta es de trascendental importancia para conocer el papel que tiene dicho elemento en el desarrollo del organismo.

Muchas plantas atraviezan por períodos de sequía durante alguna etapa de su desarrollo y su sobrevivencia a menudo depende de la habilidad de sus órganos aéreos para prevenir daños por deshidratación. Cuando

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Tamaulipas. C.P. 87149. Cd. Victoria, Tamps.

<sup>2</sup> Botany Department. Miami University. 45056. Oxford, Ohio. USA.

el déficit de agua es lo suficientemente severo, se induce en la planta el cierre de los estomas, por lo que, el grado de pérdida de agua está determinado directamente por la conductancia de la cutícula al vapor de agua (Jordan *et al.*, 1984).

Esta conductancia es controlada por características morfológicas, anatómicas y químicas. Algunas, o todas ellas son alteradas por la exposición a algún estrés del ambiente. En algunas especies una de las formas de aclimatación al estrés de agua es el incremento de ceras sobre la cutícula. En sorgo, se ha encontrado que el contenido de ceras es un componente efectivo de la resistencia a la sequía; ya que disminuye la transpiración cuticular (Chatterton *et al.*, 1975). Otro resultado de la presencia de altas concentraciones de estas ceras es la de incrementar la reflexión de la radiación solar, reduciendo por tanto el calentamiento de la hoja (Blum, 1975a).

El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de ceras epicuticulares en 20 genotipos de sorgo bajo condiciones de estrés hídrico.

## REVISION DE LITERATURA

La resistencia a la sequía es un fenómeno muy complejo que involucra diversos mecanismos de la planta. Se han citado aspectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos como estrategias de mejoramiento para esta característica. Una planta puede ser más resistente a la sequía si mantiene alto su potencial hídrico, esto se puede lograr de dos formas: 1. Por medio de mecanismos que contribuyan a reducir la pérdida de agua, como incremento en la resistencia de los estomas, reducción del área foliar, incremento de cera en la epicutícula e incremento en la resistencia cuticular; 2. Por medio de mecanismos que le permitan mantener elevado el nivel de absorción de agua, incremento en la densidad y

profundidad de la raíz (Turner y Jones, 1980). Sin embargo, el mejoramiento genético para la resistencia de la sequía vía selección para caracteres fisiológicos ha sido una tarea difícil, primero porque el clima en algunas regiones agrícolas es muy variable año con año y segundo porque no existen metodologías para que los mecanismos fisiológicos puedan ser rutinariamente evaluados en un alto número de genotipos en programas de mejoramiento de plantas (Jordan *et al.*, 1983).

Una de las formas más obvias de aclimatación al estrés de agua es el aumento en la cantidad de ceras depositadas dentro y sobre la cutícula, ya que la función esencial de las ceras epicuticulares es la de aumentar la eficiencia del control de la pérdida de agua mediante la reducción de la transpiración cuticular (Jordan *et al.*, 1984). Diversas investigaciones señalan la existencia de variabilidad genética en el contenido de ceras epicuticulares en algunas especies como el maíz (Dube *et al.*, 1975), arroz (O'Toole y Cruz, 1983; O'Toole *et al.*, 1979), avena (Bengston *et al.*, 1978), trigo (Clarke y McCaig, 1982; Johnson *et al.*, 1983) y sorgo (Blum, 1975; Ebercon *et al.*, 1977; Jordan *et al.*, 1983; Jordan *et al.*, 1984).

Para el caso de sorgo, se ha encontrado que existen genotipos que difieren en la acumulación de ceras epicuticulares (Jordan *et al.*, 1983). Las diferencias en el contenido de estas ceras entre ambientes húmedos y secos es casi tan grande como las diferencias genéticas entre genotipos en un ambiente en particular; por lo que el incremento de ceras epicuticulares como respuesta al estrés de agua, podría ser utilizado como un criterio de selección para identificar genotipos resistentes a la sequía (Bengston *et al.*, 1978).

La deposición de cera epicuticular sobre la lámina de hoja y el tallo del sorgo

incrementa la reflexión de energía causando una reducción en la radiación neta sobre el dosel. Esto reduce la transpiración cuticular y mejora el control estomatal sobre la transpiración. Además, promueve un uso eficiente del agua en términos del intercambio de carbono y transpiración (Chatterton *et al.*, 1975). Existe una correlación entre la transpiración y el contenido de ceras epicuticulares bajo sequía, experimentando cambios en el contenido de sus carbohidratos como un reflejo de las alteraciones en su metabolismo (Jordan *et al.*, 1979). Un excesivo depósito de cera en el sorgo incrementa la reflectancia de la radiación visible e infrarroja (Blum, 1975 a) y provoca una disminución de la radiación neta y de la transpiración cuticular en el campo, por lo que la cantidad de ceras epicuticulares son un componente efectivo de la resistencia a sequía (mecanismo de evasión) en sorgo (Blum, 1975 b).

La variación en el contenido de ceras epicuticulares en la hoja de cultivares de sorgo es desconocida, sin embargo cualquier intento de investigar esta variación o mejorar el contenido de ceras está limitado por la metodología disponible (Ebercon *et al.*, 1977).

La presencia de ceras epicuticulares en los genotipos de sorgo se ha señalado como una característica controlada por dos genes, bloom (Bm) y bloom (H) los cuales son completamente dominantes sobre bloomless (bm) y sparse bloom (h) (Ayyangar *et al.*, 1937; Ayyangar y Ponnaiya, 1941). Sin embargo, recientemente se demostró mediante una clasificación visual de progenitores, F<sub>1</sub> y poblaciones F<sub>2</sub> que más genes están involucrados (Paterson *et al.*, 1982). En un estudio realizado en líneas isogénicas que difieren en el gene Bm se encontró que el efecto del genotipo BmBm sobre las ceras epicuticulares contribuye a la resistencia a la sequía en plantas de sorgo, manifestada en un completo control sobre la transpiración y

una reducción de la carga de energía solar sobre las plantas y el consecuente incremento en el potencial hídrico de la hoja (Blum, 1975 a).

Se ha sugerido a los mejoradores de sorgo el desarrollar líneas progenitoras que contengan los mismos genes (Bm o H) para facilitar la formación de híbridos bloomless o sparse-bloom (Peterson *et al.*, 1982). EL caracter bloom tiene la ventaja de que puede permitir mayor eficiencia en el uso del agua del suelo de las plantas que lo poseen (Chatterton *et al.*, 1975).

Por otra parte, se ha observado que bajo condiciones de lluvia intensiva o riego por aspersión, el contenido de ceras epicuticulares puede reducirse debido a que algunas de las escamas pueden ser lavadas de la superficie de las hojas (Ebercon *et al.* 1977).

## MATERIALES Y METODOS

En este estudio se evaluaron 18 líneas experimentales de sorgo y dos híbridos comerciales con la finalidad de conocer el contenido de ceras epicuticulares en las hojas, bajo condiciones de estrés hídrico. La investigación se realizó durante el ciclo tardío de 1991 en el Campo Experimental "Las Aguilas", localizado en el km 43 de la carretera Victoria-Matamoros, ubicado en el municipio de Padilla, Tamps. a una altura de 152 msnm en un suelo migajón arenoso.

Los genotipos se evaluaron bajo un diseño experimental de bloques al azar con 20 tratamientos y 3 repeticiones bajo el esquema riego-sequía. La siembra se realizó el 20 de agosto de 1991, fertilizando el suelo con la dosis 140-60-00. La condición de sequía se dió cuando se alcanzó el punto de marchitez permanente (PMP), en ese momento se realizó la toma de las muestras para la determinación del contenido de ceras epicuticulares. La unidad experimental fue de un surco de 5 m de largo y una separación de

0.80 m ajustando a una densidad de población de 250,000 plantas por hectárea.

La investigación consistió en determinar el contenido de ceras epicuticulares en 20 genotipos de sorgo (ver Cuadro 1) por el método colorimétrico, sugerido por Ebercon *et al.*, (1977). EL método consiste en la extracción de cera con cloroformo utilizando muestras de hojas de una área de 30 cm<sup>2</sup> contando ambos lados de la hoja. Cada muestra se sumergió en 15 ml de cloroformo durante 15 segundos, se evaporó el cloroformo en baño maría y se dejó enfriar. Se agregaron 5 ml de reactivo preparado previamente, utilizando 20 g de bicromato de potasio disuelto en 40 ml de agua destilada y mezclado en 1 l de ácido sulfúrico. Posteriormente, las muestras se colocaron en agua hirviendo durante 30 minutos, se dejaron enfriar y se agregaron 12 ml de agua destilada para la formación de color y se dejó enfriar. Después se hicieron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 590 nm de longitud de onda. Las transformaciones de color al contenido de ceras se hicieron con soluciones estandar de concentración conocida de polyethylene glycol (PEG).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas en el contenido de ceras epicuticulares ( $P < 0.01$ ) entre genotipos y diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre la condición de riego y sequía. En este grupo de genotipos se observó una variación en el contenido de ceras de 0.88 mg dm<sup>-2</sup> a 1.51 mg dm<sup>-2</sup> bajo la condición de riego y una variación de 0.65 mg dm<sup>-2</sup> a 2.14 mg dm<sup>-2</sup> para la condición de sequía.

Considerando los promedios para los genotipos en cada una de las condiciones, se observó un incremento del 65.83% del contenido de ceras epicuticulares (Cuadro 2)

Cuadro 1. Genotipos de sorgo utilizados para el estudio del contenido de ceras epicuticulares en Padilla, Tamps. 1991.

Genotipo	Origen
RB 3030	INIFAP
RB 3006	INIFAP
SC 86	PMMFS-FAUANL <sup>1</sup>
SC 152	PMMFS-FAUANL
SC 150	PMMFS-FAUANL
SC 129	PMS UAT-UANL <sup>2</sup>
SC 8	PMMFS-FAUANL
SC 125	PMS UAT-UANL
SC 256	PMMFS-FAUANL
SC 222	PMMFS-FAUANL
SC 239	PMMFS-FAUANL
SC 118	PMS UAT-UANL
SC 268	PMMFS-FAUANL
SC 244	PMMFS-FAUANL
SC 134	PMS UAT-UANL
SC 123	PMS UAT-UANL
SC 126	PMS UAT-UANL
SC 119	PMS UAT-UANL
SC 30	PMMFS-FAUANL
SC 124	PMS UAT-UANL

<sup>1</sup> PMMFS-FAUANL = Programa de mejoramiento de maíz, frijol y sorgo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

<sup>2</sup> PMS UAT-UANL = Programa de mejoramiento de sorgo interinstitucional entre la Universidad Autónoma de Tamaulipas y la Universidad Autónoma de Nuevo León.

cuando los genotipos fueron sometidos a un estrés hídrico. Esto se interpreta como una característica adaptativa de las plantas a condiciones ambientales, como es la falta de agua para un desarrollo normal (Jordan *et al.*, 1983). Sin embargo, esto depende del genotipo, ya que éstos tuvieron un comportamiento diferente, inclusive siete de ellos mostraron una disminución en el contenido de ceras epicuticulares, siendo más marcada

Cuadro 2. Contenido de ceras epicuticulares (CCE) y relación sequía/riego (S/R) de 20 genotipos de sorgo en Padilla, Tamps., 1991.

Genotipo	CCE (mg dm <sup>-2</sup> )		Promedio	S/R
	Riego	Sequía		
RB 3030	1.04 <sup>1</sup>	0.65	0.85 a	0.63 a <sup>2</sup>
SC 86	1.17	0.81	0.99 abc	0.69 a
SC 152	0.97	0.70	0.84 a	0.72 a
SC 150	1.06	0.81	0.94 a	0.76 a
SC 129	1.04	0.86	0.96 ab	0.83 a
SC 8	1.51	1.26	1.39 abcde	0.83 a
SC 125	1.07	0.97	1.02 abcde	0.91 a
SC 126	1.18	1.11	1.15 abcde	0.94 a
SC 222	0.95	0.96	0.96 ab	1.01 ab
SC 239	1.13	1.18	1.16 abcde	1.04 ab
SC 118	1.06	1.11	1.09 abcde	1.05 ab
SC 268	1.09	1.17	1.13 abcde	1.07 ab
SC 244	1.06	1.18	1.12 abcde	1.11 ab
SC 123	1.05	1.18	1.12 abcde	1.12 ab
SC 256	1.23	1.44	1.34 abcde	1.17 ab
SC 134	1.35	1.58	1.47 de	1.17 ab
SC 119	1.05	1.33	1.19 abcde	1.27 abc
SC 30	1.47	2.14	1.18 e	1.46 bc
RB 3006	1.06	1.74	1.40 bcde	1.64 bc
SC 124	0.88	1.62	1.25 abcde	1.84 c
Promedio	1.31 a	1.99 b	1.16	

<sup>1</sup> Promedios de 3 repeticiones.

<sup>2</sup> Promedios seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

en el genotipo RB 3030 con un promedio de 35%. Por otra parte, 12 genotipos incrementaron su contenido de ceras epicuticulares bajo condiciones de sequía desde 2 a 91%, correspondiendo este último promedio para el genotipo SC 124 (Cuadro 2). Esto muestra la variabilidad genética que existe para esta característica entre los genotipos como respuesta a condiciones de humedad deficiente. Lo anterior coincide con resultados obtenidos por Jordan *et al.* (1984), quienes señalaron que algunos genotipos de sorgo exhiben diferentes respuestas al ambiente, el

que promueve la acumulación de ceras epicuticulares y que las diferencias encontradas entre ambientes húmedos y secos son casi tan grandes como las diferencias entre genotipos en un solo ambiente.

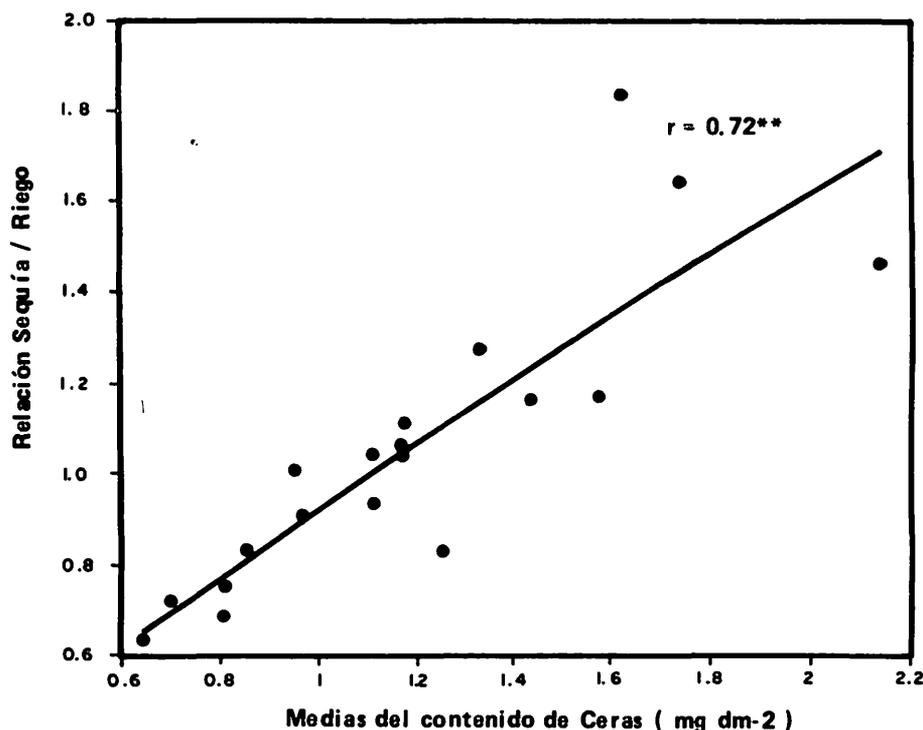
Se han encontrado variaciones genotípicas para el contenido de ceras epicuticulares en sorgo (Jordan *et al.*, 1983; Blum, 1975; Ebercon *et al.*, 1977). Por lo tanto, este tipo de adaptación, expresado como un incremento en el contenido de ceras epicuticulares puede ser utilizado como un criterio de

selección para identificar genotipos resistentes a la sequía como lo señalaron Bengston *et al.*, (1978).

En este grupo de genotipos se encontró un rango de  $0.99 \text{ mg dm}^{-2}$  entre el genotipo de mayor y menor contenido de ceras epicuticulares en ambas condiciones, en cambio para la condición de sequía hubo un rango de  $1.49 \text{ mg dm}^{-2}$  entre el genotipo de mayor y menor contenido de ceras epicuticulares. En ambos casos, el genotipo de menor contenido de ceras epicuticulares fue RB 3030, mientras que el de mayor contenido fue el genotipo SC 30. El genotipo SC 30 fue más consistente en su comportamiento en ambas condiciones ya que bajo condiciones de riego fue uno de los más altos en el contenido de ceras con un promedio de  $1.47 \text{ mg dm}^{-2}$ ,

mientras que bajo sequía tuvo el mejor comportamiento con un promedio de  $2.14 \text{ mg dm}^{-2}$ .

Con los valores observados para el contenido de ceras epicuticulares en los 20 genotipos estudiados y para ambas condiciones, se realizó un análisis de regresión entre estos valores y la relación sequía-riego (Figura 1). Se encontró un valor de  $r = 0.72^{**}$ , el cual indica que algunos genotipos responden al estrés hídrico acumulando ceras. Esto se interpreta como una adaptación de la planta al medio (Chatterton *et al.*, 1975). Se ha señalado que esta característica adaptativa sirve como mediación entre el sistema acuoso de la planta y el medio seco de la atmósfera (O'Toole *et al.*, 1979).



**Figura 1.** Regresión lineal entre la media del contenido de ceras epicuticulares de 20 genotipos de sorgo y la relación sequía/riego. Las medias para los genotipos fueron derivadas de las condiciones de riego y sequía.

También se hizo un análisis de regresión entre los promedios del contenido de ceras epicuticulares bajo condiciones de sequía y la relación sequía-riego. En este análisis se encontró un valor de  $r = 0.90^{**}$ , lo cual reafirma las diferentes respuestas de los genotipos al estrés de humedad (Figura 2). Lo anterior indica la posibilidad de seleccionar genotipos con un alto contenido de ceras epicuticulares bajo condiciones de sequía. Sin embargo, se ha señalado que en algunos pero no en todos los casos, el contenido de las ceras epicuticulares estuvo relacionado con diferencias en las resistencias a la sequía entre cultivares como lo señalaron O'Toole *et al.* (1979). No obstante estos resultados, se deben considerar además del contenido de ceras epicuticulares la radiación reflejada que también se encuentra involucrada con la resistencia a la sequía al reducir la transpi-

ración cuticular y en la eficiencia en el uso del agua (Blum 1975a).

La condición de estrés a la que fueron sometidos los genotipos en el campo se puede observar en el Cuadro 3, en el cual se muestra la cantidad de agua de lluvia durante el ciclo de cultivo. Se observa una acumulación de agua de 230.2 mm y el período más crítico coincidió con la etapa en donde fueron tomadas las muestras para la extracción de ceras.

### CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta investigación se concluye lo siguiente:

Existe variabilidad genética para el contenido de ceras epicuticulares, siendo el

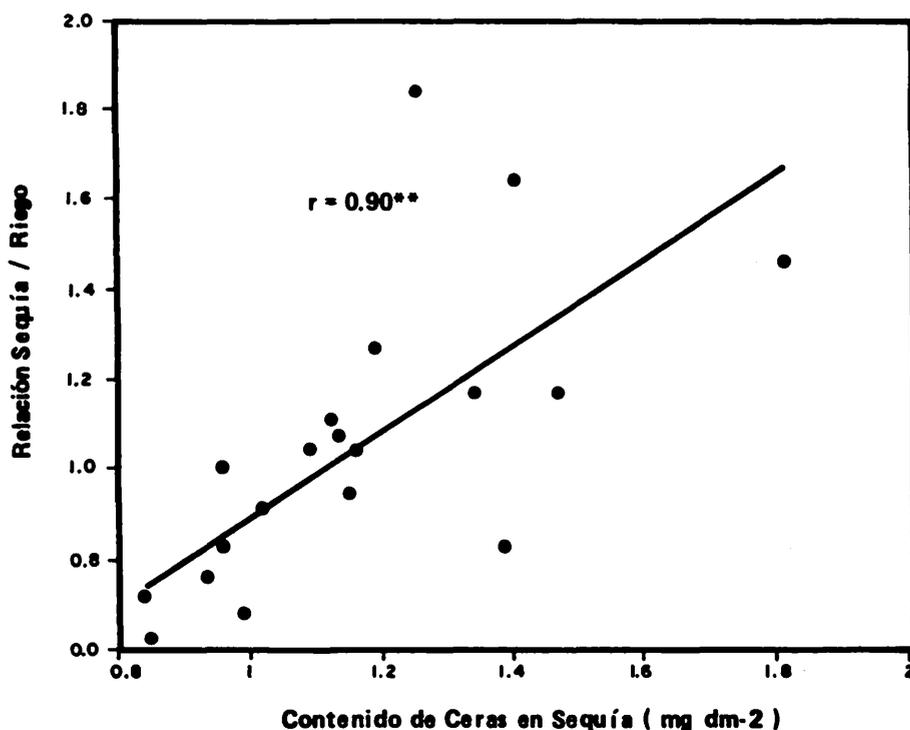


Figura 2. Regresión lineal entre el contenido de ceras epicuticulares de 20 genotipos de sorgo bajo sequía y la relación sequía/riego.

Cuadro 3. Temperatura media y precipitación ocurrida durante el ciclo del cultivo en Padilla, Tamps. 1991.

Mes	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)
Agosto	37.8	77.8 <sup>1</sup>
Septiembre	21.3	137.2
Octubre	19.4	6.2 <sup>2</sup>
Noviembre	13.1	3.0
Diciembre	12.5	6.0
Total		230.2

<sup>1</sup> Fecha de siembra: 20 de Agosto.

<sup>2</sup> Toma de muestras: 26 de Octubre.

genotipo SC 30 el de mayor acumulación en condiciones de sequía.

El contenido de ceras epicuticulares se incremento bajo condiciones de estrés como consecuencia de una adaptación de la planta el medio.

El contenido de ceras epicuticulares es una característica que en combinación con otras que esten relacionadas con la resistencia a la sequía puede ser útil para seleccionar genotipos resistentes.

## BIBLIOGRAFIA

- Ayyangar, G.N.R., V.P. Rao, A.K. Nambiar and B.N.X. Ponnaiya. 1973. The occurrence and inheritance of waxy bloom in sorghum. Proc. Indian Acad. Sci. 5B : 4-25.
- \_\_\_\_\_, and B.M.X Ponnaiya. 1941. The occurrence and inheritance of a bloomless sorghum. Curr. Sci. 10:408-409.
- Bengston, C., S. Larsson and C. Liljenberg. 1978. Effects of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. Physiol. Plant. 44:319-324.
- Blum, A. 1975a. Effect of the Bm gene on epicuticular wax and the water relations of *Sorghum bicolor*. Israel. J.Bot. 24:50
- \_\_\_\_\_. 1975b. Effect of the Bm gene on epicuticular wax deposition and spectral characteristics of sorghum leaves. SABRAO J. 7:45-52.
- Chatterton, N. J., W. W. Hann, J. B. Powell and D. R. Lee. 1975. Photosynthesis and transpiration of bloom and bloomless sorghum. Can. J. Plant Sci. 55:641-643
- Clark, J. M. and T. N. McCaig. 1982. Exsised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. Can J. Plant Sci. 62:571-578.
- Dube, P. A., K. R. Stevenson, G. M. Thurtell and R. B. Hunter. 1975. Effects in the dark and cuticular resistance to water vapor diffusion of two corn inbreds. Can J. Plant Sci. 55:565-572.
- Ebercon, A., A. Blum and W. R. Jordan. 1977. A rapid colorimetric method for epicuticular wax content of sorghum leaves. Crop Sci. 17:179-180.
- Johnson, D. A., R. A. Richards and N. C. Turner. 1983. Yield, water relations, gas exchange and surface reflectances of near isogenic wheat lines differing in glaucousness. Crop Sci. 23:318-325.
- Jordan, W. R., M. McCray and F. R. Miller. 1979. Compensatory growth in the crown root system of sorghum. Agron. J. 71:803-806.
- \_\_\_\_\_, P. J. Shouse, A. Blum, F. R. Miller and R. L. Monk. 1984. Environmental physiology of sorghum. II.-Epicuticular wax load and cuticular transpiration. Crop Sci. 24:1168-1173.
- \_\_\_\_\_, R. L. Monk, F. R. Miller, D. T. Rosenow, L. E. Clark and P. J. Shouse. 1983. Environmental physiology of sorghum. I.-Environmental and genetic control of epicuticular wax load. Crop Sci. 23:552-558.

O'Toole, J. C., R. T. Cruz and J. N. Seiber. 1979. Epicuticular wax and cuticular resistance in rice. *Physiol. Plant.* 47:239-244.

\_\_\_\_\_ and R. T. Cruz. 1983. Genotypic variation in epicuticular wax of rice. *Crop Sci.* 23:329-394.

Peterson, G. C., K. Suksayretrup and D. E. Weibel. 1982. Inheritance of some bloomless and sparse-bloom mutants in sorghum. *Crop Sci.* 22:63-67.

Turner, N.C. and N.M. Jones. 1980. Turgor and maintenance by osmotic adjustment. A review and evaluation. In: *Adaptation of plants to water and temperature stress.* N.C. Turner and P.J. Kramer (Eds.), John Wiley and Sons. N.Y. pp. 22-43.