

Original**Aclimatización en casa de cultivo de plantas *in vitro* de *Morus alba* variedad Acorazonada****Acclimatization in vitro plant cultivation of Morusalba variety Acorazonada**

Ing. Ricardo Gómez Machado. Ingeniero Agrónomo. Instructor. Universidad de Granma. Cuba. [rgomezm@udg.co.cu] 

Dr. C. Jorge Liusvert Pérez Pérez. Doctor en Ciencias Agrícolas. Profesor Titular. Universidad de Granma. Cuba. [jperez@udg.co.cu] 

Recibido: 20/05/2020 | **Aceptado:** 24/09/2020

Resumen

Se desarrollan investigaciones para la propagación *in vitro* de la morera, sin embargo, existe baja supervivencia de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización. La investigación tuvo objetivo de incrementar la supervivencia y calidad de las plantas *in vitro* de morera variedad Acorazonada durante la fase de aclimatización. Se evaluaron mezclas de sustratos: 1) suelo Pardo Sialítico 100 % (control), 2) Humus de lombriz 85 % + Zeolita 15 %, 3) Estiércol vacuno 85 % + Zeolita 15 %, 4) Estiércol ovino 85 % + Zeolita 15 %; luego las plantas *in vitro* se clasificaron según rangos de tamaños: 1): 1,0-3,0 cm; 2): 3,1-5,0 cm; 3): 5,1-7,0 cm). Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Con el empleo de la mezcla de sustrato dos y el uso de plantas con tamaños de 5,1 a 7,0 cm, se obtuvo un 85 % de supervivencia, además se incrementó la altura de la planta, número, largo y ancho de las hojas, sin diferencias significativas con respecto al tratamiento tres durante la aclimatización de las plantas procedentes del cultivo *in vitro*.

Palabras clave: adaptación; estiércoles; humus de lombriz; vitroplantas; zeolita

Abstract

Research works have been carried out for the *in vitro* propagation of mulberry; however, there is low survival of *in vitro* plants in the acclimatization phase. The objective of the research was to increase the survival and quality of the *in vitro* plants of mulberry variety Acorazonada during the acclimatization phase. Substrates mixtures were evaluated: 1) Cambisol soil 100 % (control), 2) earthworm humus 85 % + zeolite 15 %, 3) bovine manure 85 % + zeolite 15 %, 4) sheep manure 85 % + zeolite 15%; then the *in vitro* plants were classified

according to size ranges: 1): 1.0-3.0 cm; 2): 3.1-5.0 cm; 3): 5.1-7.0 cm). A completely randomized experimental design and Tukey test ($p \leq 0.05$) were used. With the use of substrate mixture two and the use of plants with sizes from 5.1 to 7.0 cm, a survival 85 % was obtained; in addition the height of the plant, number, length and width was increased of the leaves, without significant differences with respect to treatment three during the acclimatization of plants from *in vitro* culture.

Key words: adaptation; manure; earthworm humus; vitroplants; zeolite

Introducción

La propagación de la morera se realiza generalmente por estaca; sin embargo, en dependencia de la variedad existen ciertos aspectos, como la baja tasa de multiplicación y de supervivencia, que limitan la propagación de esta especie vegetal con fines productivos (Castro y Ramírez, 2010). Además está limitada a ciertos meses del año y en algunos genotipos se logra un número reducido de plantas, debido a la pobre frecuencia de enraizamiento Desai, Desai, Mankad, Patel, Patil, y Narayanan (2018). Los estudios relacionados con la aclimatación de plantas de morera provenientes de cultivo de tejidos son escasos y resulta importante evaluar prácticas de manejo de la nutrición que hayan resultado efectivas y sostenibles en otros cultivos Pentón, Reynaldo, Martín, Rivera, y Oropesa (2011). Borges, Barrios, Chávez, y Avendaño (2014). que garanticen la aclimatización eficiente de las plantas procedentes del cultivo *in vitro*, donde expresen altos niveles de supervivencia, con un adecuado crecimiento y desarrollo en condiciones *ex vitro* en casas de cultivo.

No obstante, unos de los problemas identificados en estos sistemas de micropropagación, es la fase de aclimatización dada la baja supervivencia de las plantas de morera en condiciones *ex vitro* Vijayan, Jayarama, Tikader, y Saratchnadra, (2014). Esto se relaciona con factores como la temperatura, calidad de los sustratos, calidad del material vegetal, la humedad relativa y el sustrato Moran (2008).

El presente trabajo se realiza con el objetivo de incrementar la supervivencia y calidad las plantas *in vitro* de morera durante la fase de aclimatización.

Población y muestra

La investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG), en la Universidad de Granma, en el período de 2019 - 2020.

Se tomaron plantas cultivadas *in vitro* de morera variedad Acorazonada. Las plántulas se retiraron de los frascos de cultivo, después de 45 días en fase de enraizamiento. Estas fueron lavadas con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo; luego trasladadas a la casa de cultivo en bandejas de plástico con una película de agua para evitar la deshidratación.

Los experimentos realizados en condiciones *ex vitro* tuvieron un orden consecutivo, cada uno con un tamaño de muestra de 20 plantas, cada una representó una réplica experimental.

Materiales y métodos

La aclimatización se realizó en bandejas de polieturano, colocadas en la casa de cultivo que cuenta con una cubierta protectora de color negro para reducir la intensidad luminosa entre $70-80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura diaria $35-40 \text{ }^\circ\text{C}$ y 10-11 horas de luz solar.

Los abonos orgánicos utilizados como sustratos fueron tamizados para lograr una uniformidad en el tamaño de las partículas y eliminar los restos de materiales indeseables. Se incluyó zeolita natural proveniente del yacimiento “Loma Blanca”, localidad de San Andrés, provincia Holguín.

Para proteger las plantas de posibles daños por deshidratación, durante los primeros cinco días de cultivo *ex vitro*, fueron cubiertas de manera individual con frascos de vidrio, colocados con una ligera inclinación para permitir la circulación de aire. El riego se realizó días alternos, de manera manual con ayuda de una regadera.

Efecto del tipo de sustrato en la aclimatización de plantas *in vitro* de morera.

El experimento se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de diferentes tipos de sustratos en la aclimatización de plantas de morera provenientes del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

En la casa de cultivo se montaron cuatro tratamientos: T1) control que contenía suelo Pardo Sialítico Carbonatado (100 %), T2) Humus de lombriz (85%) + Zeolita (15 %); T3) Estiércol vacuno (85 %) + Zeolita (15 %); T4) Estiércol ovino (85 %) + Zeolita (15 %).

Cada tratamiento estuvo constituido por 20 plántulas, con una longitud entre 1,0 a 7,0 cm y dos a cuatro hojas. Estas procedían de la fase de enraizamiento *in vitro*, donde permanecieron 45 días en un medio de cultivo con las sales Murashige y Skoog (1962), ácido indolbutírico $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, tiamina $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, mioinositol 100 mg.l^{-1} , sacarosa 20 g.l^{-1} , agar $6,0 \text{ g.l}^{-1}$ y $\text{pH}= 5,7$.

A los 15 y 30 días de cultivo se determinó: supervivencia (%), altura de la planta (cm), longitud y ancho de la hoja (cm), número de hojas, y número de yemas. Las variables medibles expresadas en centímetros se determinaron con ayuda de una regla milimetrada. El porcentaje de supervivencia se conoció a partir del número de plantas que se mantenían vivas en el momento de evaluación según la fórmula matemática:

$$\text{supervivencia (\%)} = \frac{\text{Plantas vivas}}{\text{Total de plantas iniciales}} \times 100$$

Influencia del estado de desarrollo de las plantas *in vitro* en la aclimatización

Con el objetivo de determinar la influencia del estado de desarrollo de las plantas *in vitro* de morera en la aclimatización, estas fueron clasificadas en tres rangos según su longitud: 1): 1,0-3,1 cm; 2): 3,1-5,0 cm; 3): 5,1-7,0 cm. Luego se colocaron en la mezcla de sustrato que contenía la combinación de humus de lombriz (85 %) y zeolita (15 %).

Antes de la plantación en el sustrato, se evaluó en cada tratamiento: altura de la planta, longitud y ancho de la hoja, número de hojas. Luego a los 5, 10, 15 y 20 días de cultivo en condiciones *ex vitro*, se evaluó la supervivencia (%); mientras que a los 15 y 30 días se determinó la altura de las plantas, número de hojas, longitud y ancho de la hoja.

Análisis de los resultados

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado dada las condiciones de homogeneidad en que se desarrolló la investigación, y se aplicó un análisis de varianza de clasificación simple en las variables evaluadas.

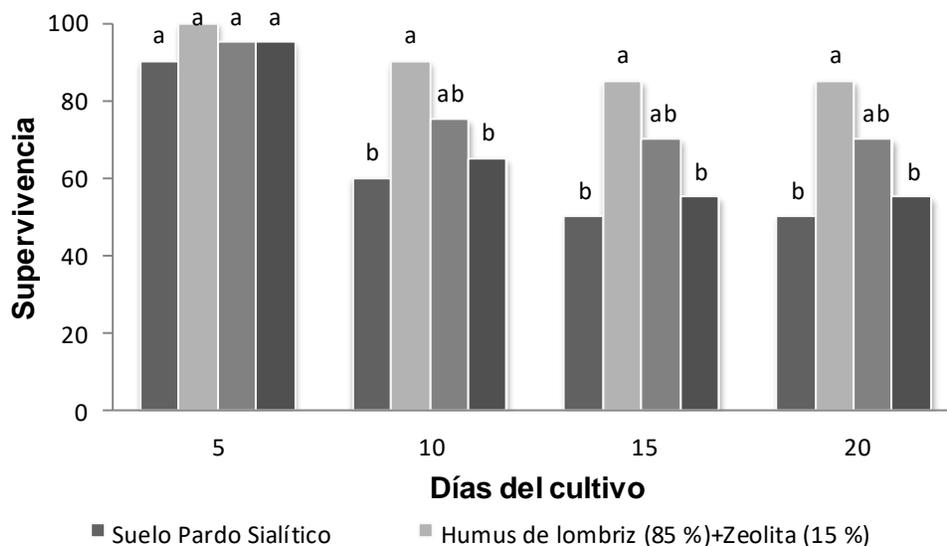
Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov y la homogeneidad de varianzas según la prueba de Levene. Para la comparación múltiple de medias de los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). El procesamiento estadístico de los datos se realizó con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 15 para Windows.

Efecto del tipo de sustrato en la aclimatización de plantas *in vitro* de morera.

En todos los tratamientos se observó que en el momento del trasplante las plántulas estaban débiles. Después de una semana de transferidas comenzaron a crecer y de manera gradual comenzaron a manifestar las características de la variedad como el

color verde oscuro, hojas de forma acorazonada, totalmente extendidas y sin malformaciones fenotípicas en la planta.

Las plantas aclimatadas comenzaron a incrementar en tamaño y número de hojas, indicadores evaluados a los 15 días de cultivo. Como se muestra, hubo una influencia de las mezclas de sustratos en la supervivencia de las plantas de morera en condiciones *ex vitro* (Figura 1).



Letras diferentes en las barras en un mismo día de cultivo difieren significativamente según la prueba de Tukey $p < 0,05$

Figura 1. Respuesta de las plantas de morera variedad Acorazonada en diferentes sustratos a los 30 días en condiciones de cultivo *ex vitro*

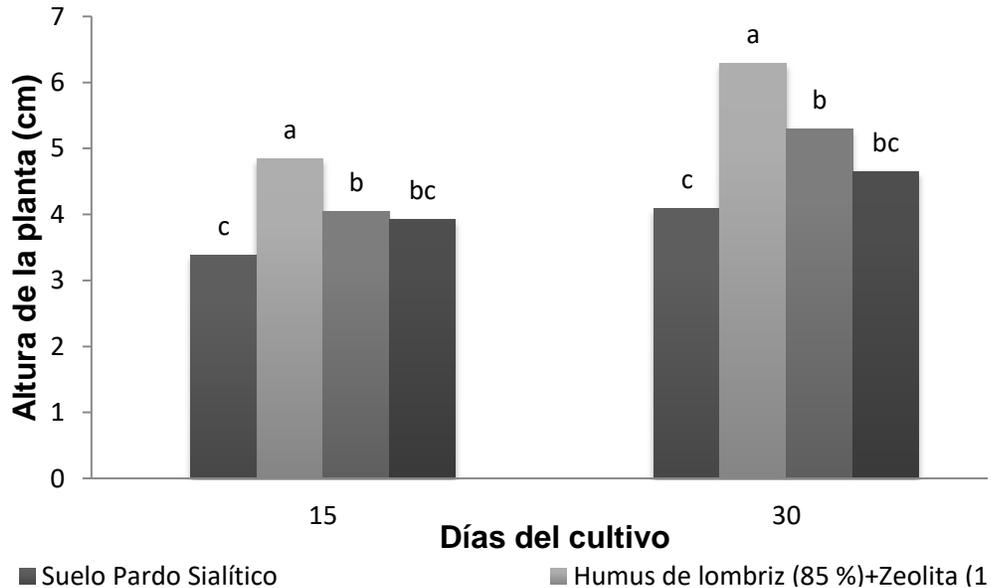
Los máximos valores de supervivencia de las plantas, fueron registrados en el tratamiento dos a partir de los 10 días de evaluación sin diferencias significativa con el tratamiento tres y así se mantuvo hasta los 20 días (Figura 1).

Según Rezaei y Rahmati (2020), lograron un 90 % de supervivencia en plántulas de *Morus alba* que fueron colocadas en un sustrato estéril que contenía una mezcla (1:1) de perlita con turba de coco, colocadas en cámaras de crecimiento por 30 días.

Por su parte Rohela, Jogam, Shabnam, Shkla, Abbagani, Kamili (2020). refieren un 84 % de supervivencia en *M. alba* variedad Chinese white. Según estos autores, brotes enraizados *in vitro* fueron colocados en una solución con las sales MS (50 %) durante dos horas; luego para lograr su endurecimiento fueron cultivados en condiciones *in vitro* en potes plásticos que contenían una mezcla de sustrato (1:1:2) con estiércol, arena y suelo de jardín, e irrigados con las sales MS

(50 %); después de dos semanas de cultivo, fueron transferidos a condiciones de campo.

Referente a la variable altura de la planta, se observó que el tratamiento dos superó significativamente al resto de los tratamientos a los 15 y 30 días de cultivo en condiciones de casa de cultivo. Como era de esperar al aumentar el tiempo de cultivo también se logró un incremento en la altura de las plantas (Figura 2).



Letras diferentes en las barras en un mismo día de cultivo difieren significativamente según la prueba de Tukey $p < 0,05$

Figura 2. Respuesta de las plantas *in vitro* de morera variedad Acorazonada en la altura de la planta en diferentes sustratos a los 15 y 30 días en condiciones de cultivo *ex vitro*

Estos resultados pueden estar asociados al tipo de sustrato y su composición nutricional. En la literatura científica consultada, investigadores como Díaz, Medina, Latife, Digonzelli, y Sosa (2004). abordan que el humus de lombriz como componente del sustrato tiene características necesarias para hacer más eficiente el proceso de aclimatización porque sirve de sostén a la planta y favorece la absorción de macronutrientes esenciales. Además, la zeolita permite un mejor crecimiento y desarrollo de las raíces, dado por una mayor aireación, favorece la absorción de nutrientes por la planta y el mejor suministro de agua, lo que conduce a obtener una planta de excelente calidad fisiológica en la fase de aclimatización Urbina, Baca, Núñez, Colinas, Colinas, Tijerina, (2006). Resultados similares describieron Salas, Agramonte, Jiménez, Pérez, Collado, Barbón, La O, Fera, y Chávez (2011). al combinar 15 % de zeolita y 85 % de humus de lombriz como sustrato en la fase de aclimatización, donde lograron más de un 90,0 % de supervivencia de las plantas de *Morus alba* L. variedad Criolla, de alta calidad en

términos de una mayor altura de la planta como material de plantación para la fase de campo.

En cuanto a las variables número, ancho y largo de la hoja se observó que las plantas tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos analizados e incrementándose a los 30 días. En la variable número de hojas, se observó que los mayores resultados se obtuvieron en el tratamiento dos pero sin diferencias significativas con el tratamiento tres a los 30 días. En la variable largo de la hoja, el tratamiento dos superó significativamente al resto de los tratamientos a los 15 días de cultivo en casa de cultivo (Tabla 1).

En todos los tratamientos se observó un incremento en la emisión de hojas nuevas, con diferencias significativas entre ellos, y con diferencias en el número, ancho y el largo de las hojas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tipo de sustrato en la respuesta del número, ancho y largo de la hoja de los brotes de morera

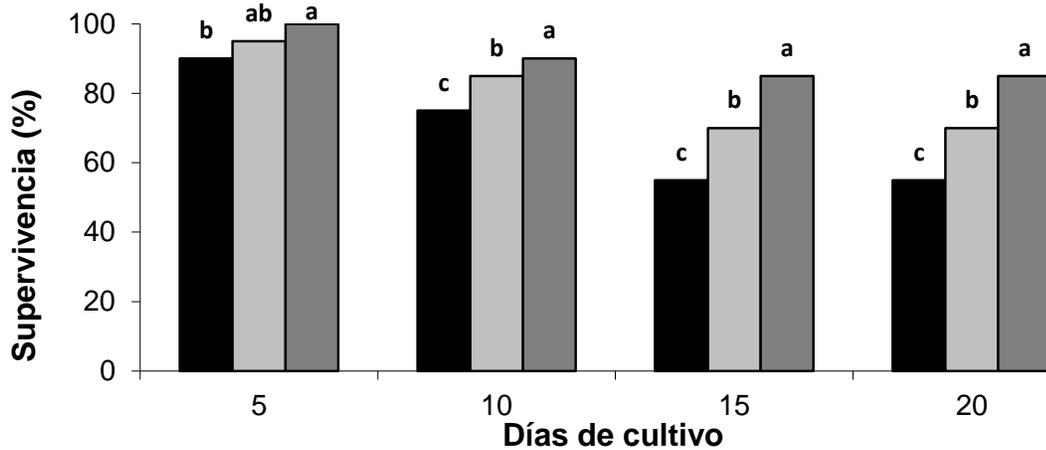
Tratamientos	Número hoja		Ancho de la hoja		Largo de la hoja	
	15	30 días	15	30 días	15	30 días
Suelo Pardo Sialítico	2,50b	2,92 c	5,38c	7,11c	9,24 c	10,88c
Humus de lombriz (85 %) + Zeolita (15 %)	3,93a	4,67a	8,11a	13,45a	11,26a	18,12a
Estiércol vacuno (85 %)+Zeolita (15 %)	3,14b	4,07ab	6,89b	9,51b	10,49a	13,09b
Estiércol ovino (85 %) +Suelo (15 %)	2,59b	3,77b	6,13bc	8,48bc	10,14b	12,45b
E.E	0,17	0,20	0,25	0,38	0,24	0,38

Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Tukey $p < 0,05$

La mayoría de los estudios del tejido foliar de las plantas que provienen de condiciones *in vitro* refieren que el mesófilo de estas hojas posee un tejido en empalizada poco desarrollado, generalmente formado por una sola capa de células y en lo fundamental compuesto por tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares (Soares y Savonitti, 2016).

Influencia del estado de desarrollo de las plantas *in vitro* en la aclimatización.

Se observó una influencia directa en los niveles de supervivencia con diferencias significativas entre los tratamientos analizados. El tratamiento tres que se corresponde con los brotes de mayor longitud, difirió significativamente del resto de los tratamientos, excepto del tratamiento dos a los cinco días de cultivo, con una eficiencia en los niveles de supervivencia superiores al 80 % después de 15 días de cultivo. Por el contrario, el tratamiento con plántulas de 1,0 a 3,0 cm de longitud, tenían valores de supervivencia inferiores al 60 % después de 15 y 20 días de cultivo (Figura 3).



Letras diferentes en las barras en un mismo día de cultivo difieren significativamente según la prueba de Tukey $p < 0,05$

Figura 3. Influencia de la longitud de las plántulas en la supervivencia durante la aclimatización *ex vitro* de morera variedad Acorazonada

La respuesta observada en plántulas con la mayor longitud evaluada, pueden considerarse aceptables para las condiciones en las que se desarrolló el experimento. Además pudiera ser atribuida a que habían alcanzado un mayor desarrollo morfo-fisiológico que permitió una mejor adaptación a las condiciones de estrés durante la aclimatización. En este sentido, Salas *et al.* (2011) consideran que las condiciones de cultivo en las cuales se desarrolla el proceso de aclimatización, son determinantes para obtener altos valores de supervivencia.

En las variables altura de la planta y número de hojas, se observó que las plantas mantuvieron diferencias significativas entre las longitudes evaluadas con el mayor valor superior a los seis centímetros en el tratamiento con la mayor longitud obtenida del cultivo *in vitro* (Tabla 2).

Mientras que se evidenció la formación de hojas nuevas en todos los tratamientos, cuyo número se mantuvo entre tres y cuatro hojas, alcanzando alrededor de cinco hojas a los 30 días pero sin diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3;

mientras que en el tratamiento uno el número de hojas fue inferior lo que se corresponde con su estado de desarrollo (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia de la longitud de los brotes en la altura de las plantas y número de hojas en la aclimatización *ex vitro* de morera variedad Acorazonada

Longitud de los brotes (cm)	Altura de la planta (cm)			Número de hojas		
	0	15	30 días	0	15	30 días
1,0 - 3,0	1,86 c	2,19 c	3,61 c	2,75 b	2,73 b	3,55 b
3,1 – 5,0	3,68 b	4,25 b	5,01 b	3,30 ab	3,79 a	4,21 ab
5,1 – 7,0	5,51 a	5,19 a	6,28 a	3,75 a	3,53 a	4,65 a
E.E	0,18	0,17	0,16	0,18	0,16	0,17

Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Tukey $p < 0,05$

El reducido número de hojas está en correspondencia con el corto periodo de tiempo evaluado y que generalmente las hojas formadas *in vitro* se caen durante o después de un corto tiempo de aclimatización *ex vitro* para ser remplazadas por nuevas hojas formadas *ex vitro*, como ocurrió en el primer tratamiento al comparar el número de hojas a los 0 y 15 días del trasplante.

Estos resultados difieren de los descritos por Espinosa, Silva, Bahi, y Romero (2019), quienes constataron que las plantas de menor tamaño, fueron las que alcanzaron los mayores incrementos en longitud (5,38 cm) y número de hojas, lo que indica que fueron capaces de recuperarse más rápido del estrés inicial originado por el trasplante a condiciones *ex vitro* y reiniciar el crecimiento y desarrollo en un menor tiempo, en comparación con las de mayor tamaño.

Respecto a las variables ancho y largo de las hojas se observaron diferencias significativas entre los tratamientos analizados y como era de esperar su crecimiento se incrementó al aumentar el tiempo de cultivo (Tabla 3).

Los mayores resultados se obtuvieron en el tratamiento que incluyó los brotes de mayor longitud. Esto está relacionado con el mayor desarrollo morfológico y una mayor contenido de sustancias de reserva que permitió a los brotes una mejor adaptación a las condiciones de estrés (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia de la longitud de los brotes en el ancho y largo de las hojas en la aclimatación *ex vitro* de morera variedad Acorazonada

Longitud de los brotes (cm)	Ancho de las hojas (cm)			Largo de las hojas (cm)		
	0	15	30 días	0	15	30 días
1,0 - 3,0	2,21 b	4,47 c	6,19 c	2,64 b	7,10 c	9,10 c
3,1 – 5,0	2,83 a	7,64 b	9,30 b	3,31 a	11,41 a	12,80 b
5,1 – 7,0	3,06 a	8,29 a	13,54 a	3,50 a	11,09 a	18,32 a
E.E	0,08	0,30	0,34	0,07	0,33	0,38

Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Tukey $p < 0,05$

Al emplear plantas con un menor desarrollo, sus hojas son reemplazadas por nuevas hojas al ser estas poco funcionales lo que influyó en que tuvieran un menor tamaño en el momento de las evaluaciones con respecto a las plantas procedentes del cultivo *in vitro* con una mayor desarrollo morfológico.

Esto está en correspondencia con otros estudios del tejido foliar de las plantas que provienen de condiciones *in vitro*, que refieren que el mesófilo de estas hojas posee un tejido en empalizada poco desarrollado, generalmente formado por una sola capa de células y en lo fundamental compuesto por tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares Molina, González, Fundora, Abdulnour, Desjardins, y Escalona, (2008).

Conclusiones

1. Se logró un 85 % de supervivencia de las plantas de morera variedad Acorazonada con empleo del sustrato humus de lombriz 85 % + Zeolita 15 % durante la aclimatación en condiciones *ex vitro*.
2. El uso de plantas con una longitud entre 5,1 a 7,0 cm, favoreció su crecimiento y desarrollo durante la aclimatación en condiciones de casa de cultivo.

Referencias bibliográficas

- Borges, J.A., Barrios, M., Chávez, A. y Avendaño, R. (2014). *Efecto de la fertilización foliar con humus de lombriz líquido durante el aviveramiento de la morera (Morus alba L.)*. Bioagro, 26 (3): 159-164.

- Castro-Ramírez, A. (2010). *Cultivo de morera (Morus spp) y su uso en la alimentación animal*. A. Castro-Ramírez y E. Orozco-Barrantes (eds). San José, Costa Rica: Publicaciones, INTA.
- Desai, S., Desai, P., Mankad, M., Patel, A., Patil, G. y Narayanan S. (2018). *Development of micropropagation protocol for Morus nigra L. (black mulberry) through axillary buds*. International Journal of Chemical Studies, 6 (2): 585-589.
- Díaz, L.P., Medina, L.F., Latife, J., Digonzelli, P.A. y Sosa SB (2004). *Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz*. RIA. 33 (2): 115-128.
- Espinosa, A., Silva, J.J., Bahi, M. y Romero D. (2019). *Influencia del tamaño de las plantas in vitro y tipo de sustrato en la aclimatación de Morus alba L.* Pastos y Forrajes, 42 (1): 23-29.
- Molina, L., González, J., Fundora, Z., Abdulnour, J., Desjardins, Y. y Escalona, M. (2008). *Aclimatización in vitro y ex vitro: Una estrategia para mejorar la productividad de la micropropagación de plantas*. Revista Revive: Biotecnología, 15:15.
- Morán, P. (2008). *Implementación de técnicas de aclimatización para plantas micropropagadas de Vid (Vitis vinifera L.)*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Pentón, G., Reynaldo, I., Martín, G.J., Rivera, R. y Oropesa K. (2011). *Uso del EcoMic® y el producto bioactivo PectiMorf® en el establecimiento de dos especies forrajeras*. Pastos y Forrajes, 34 (3): 281-294.
- Rezaei, M.S. y Rahmati, M. (2020). *Effects of thidiazuron on in vitro shoot regeneration of Morus alba*. BioTechnologia, 101 (1): 55–61.
- Rohela G., Jogam P., Mir M., Shabnam A., Shkla P., Abbagani S., Kamili A. (2020). *Indirect regeneration and genetic fidelity analysis of acclimated plantlets through SCoT and ISSR markers in Morus alba L. cv. Chinese white*. Biotechnology Reports, 25: e00417.
- Salas, B., Agramonte, D., Barbón, R., Jiménez, F., Collado, R., Pérez, M., Gutiérrez, O. (2005). *Propagación in vitro de Morus alba L. en medio de cultivo semisólido*. Biotecnología Vegetal, 5 (2): 81 – 87.
- Salas, J., Agramonte, D., Jiménez, F., Pérez, M., Collado, R., Barbón, R., La O, M., Feria, M. y Chávez M. (2011). *Propagación de plantas de Morus alba var.*

Criolla con el uso de sistemas de inmersión temporal. Biotecnología Vegetal, 11 (2): 77-88.

Soares, B. y Savonitti, V. (2016). *Enraizamento in vitro e aclimatização ex vitro de cultivares de cítricos*. Revista de Ciencia Agrarias., 59 (2): 144-151.

Urbina E., Baca G., Núñez R., Colinas R., Colinas M., Tijerina L. (2006). *Cultivo hidropónico de plántulas de jitomate en zeolita cargada con K^{1+} , Ca^{2+} o Mg^{2+} y diferente granulometría*. Agrociencia, 40 (4): 419-429.

Vijayan, K., Jayarama, P., Tikader, A. y Saratchnadra, B. (2014). *Biotechnology of mulberry (Morus L.) - An appraisal*. Emir. J. Food Agric., 26 (6): 472-496.