

## La patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España\*

M.<sup>a</sup> C. MUÑOZ LÓPEZ y A. RUPÉREZ CUELLAR

En los últimos veinte años hemos desarrollado nuestros trabajos muy particularmente en el inventario y estudio de la flora micológica de la encina (*Quercus ilex* L.). Otros autores también han demostrado interés en el tema, y el resultado ha sido llegar al conocimiento de una serie de hongos que, por su comportamiento, pueden considerarse como posibles patógenos.

Quedan muchos aspectos de constatación de patogeneidad que están siendo actualmente objeto de diversos estudios. Esta presentación es un adelanto que permite catalogar, al menos como sospechosas, algunas especies de hongos que, en los últimos años, están apareciendo frecuentemente en nuestros encinares. Estos hongos se presentan asociados con chancros, y con la muerte progresiva de ramas e incluso de todo el árbol. Su peligrosidad real ha sido sometida a discusión por diferentes especialistas.

M.<sup>a</sup> C. MUÑOZ LÓPEZ. Subdirección General de Sanidad Vegetal. Madrid.

A. RUPÉREZ CUELLAR. Cátedra de Zoología y Patología Forestales. E.U.I.T. Forestal. Universidad Politécnica de Madrid.

### INTRODUCCION

Una revisión bibliográfica realizada en profundidad recientemente sobre la micoflora de *Quercus ilex* L. recoge 293 especies de hongos en esta matriz citadas por distintos especialistas desde las primeras descripciones de Saccardo en 1882, hasta nuestros días (ARREGUI NOGUER 1985). De esta relación, 25 especies pertenecen a la clase Myxomycetes, 51 a la clase Deuteromycetes, 64 a la clase Ascomycetes, y 153 a la clase Basidiomycetes.

Dentro de este extenso número de citas encontramos hongos con comportamiento muy variado, desde el *patógeno primario*, capaz de producir graves daños, hasta el *saprofita*, que vive a expensas de la materia orgánica muerta, pasando por modos de acción intermedios entre el uno y el otro, que el especialista debe tener en cuenta por su potencial peligrosidad.

También se incluyen especies que son claramente beneficiosas como el caso de los hongos de micorriza del orden Tuberales (TORRES JUAN 1985).

De otros muchos hongos se desconoce su comportamiento real en la actualidad, al no detectarse con frecuencia, y tratarse de citas relativamente antiguas, de gran valor taxonó-

\* Comunicación presentada al Seminario sobre dehesas y sistemas agrosilvopastorales similares, organizado por el Secretario Internacional del Programa MAB de UNESCO celebrado en Madrid del 30 de Marzo al 2 de Abril 1987.

mico, pero que no incluyen su aspecto patológico.

Teniendo en cuenta que la encina es un árbol de comportamiento robusto, la incidencia de enfermedades ha sido en general poco considerable, lo que ha dado lugar a que se le haya dedicado poca atención desde el punto de vista fitopatológico.

En mayor o menor grado, la encina ha superado con relativa facilidad la aparición de micosis más o menos localizadas que, salvo excepciones, afectaban a escaso número de individuos.

Pero lógicamente todo tiene un límite, y aún esta especie tan resistente y austera en requerimientos, puede verse envuelta en delicadas situaciones cuando aparecen epifitias notables, derivadas en la mayoría de los casos de condiciones climáticas extremas como puede ser la sequía; o como consecuencia de la acción del hombre con tratamientos selvícolas erróneos (RUPÉREZ 1957), aspecto éste que es tratado específicamente en otra ponencia presentada a este seminario.

Presentamos aquí una revisión de aquellos hongos que se han detectado en los últimos años con una frecuencia importante, y siempre asociados con seca parcial o total de pies, afectando a extensiones francamente preocupantes.

El material vegetal examinado se ha analizado en el Laboratorio de Diagnóstico de la Subdirección General de Sanidad Vegetal, y en la Cátedra de Zoología y Patología Forestales de la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal de Madrid.

Las muestras han sido remitidas a estos Centros por los propios propietarios de los encinares, por los Servicios de Protección de los Vegetales de las Comunidades Autónomas, y una buena parte de ellas han sido recogidas en prospecciones personales.

Las áreas de estudio principales han sido las provincias de Alicante, Avila, Ciudad Real, Huelva, Madrid, Toledo y Zaragoza.

La selección de especies que vamos a considerar, la hemos realizado basándonos en diag-

nósticos personales de las mismas y en citas recientes de otros especialistas en el tema, y en razón de la importancia que desde el punto de vista fitopatológico tienen en la actualidad en nuestros encinares, siendo conscientes de que quedan muchos aspectos por clarificar, por lo que nos encontramos todavía a medio camino en el conocimiento de la peligrosidad real de estos hongos, así como de otros que, por el momento, no han sido abordados.

Por otra parte, estos estudios que se están llevando a cabo, se encuentran dentro de un proyecto más extenso que abarca la fitopatología de otras Quercíneas, en cuyas prospecciones periódicas se realiza un estudio exhaustivo para vigilar estrechamente la introducción en España de *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt, importante patógeno vascular que figura en las listas A<sub>1</sub> de organismos en cuarentena en Europa. Este hongo causa una grave traqueomicosis en los robles de América del Norte, y su aparición en nuestro país sería catastrófica para nuestras especies.

## MATERIALES Y METODOS

A partir del muestreo de distintas partes del árbol, que presentaban alteraciones, se ha procedido al aislamiento de los agentes involucrados mediante su estudio estructural directo en preparaciones microscópicas, o bien procediendo según las técnicas clásicas en micología por cultivo en medios a base de agar, principalmente agar malta (Malt extract Agar Oxoid), estudiando posteriormente las colonias obtenidas.

## RESULTADOS

Se relacionan a continuación los hongos que en estas prospecciones han aparecido con mayor frecuencia, desarrollando posteriormente algunos aspectos de aquellas especies que consideramos de mayor interés.

---

 Clase Deuteromycetes

## Orden Sphaeropsidales

## Fam. Sphaeropsidaceae

*Cytospora ambiens* Sacc*Diplodia* spp.

## Orden Melanconiales

## Fam. Melanconiaceae

*Coryneum microstictum* Berk et Br.*Coryneum kunzei* Corda*Coryneum elevatum* (Riess) Sutton

## Clase Ascomycetes

## Orden Dothideales

## Fam. Capnodiaceae

*Capnodium quercinum* (Perst.) Berk et Desm.

## Orden Sphaeriales

## Fam. Xylariaceae

*Hypoxilon mediterraneum* (de Not) Hill.

## Orden Thaprinales

## Fam. Taphrinaceae

*Taphrina kruchii* (Vuill.) Schroet.

## Orden Diaporthaceae

## Fam. Diaporthaceae

*Pseudovalsa umbonata* (Tul.) Sacc.

## Clase Basidiomycetes

## Orden Hymenomycetales

## Fam. Agaricaceae

*Armillaria mellea* Quèl*Clitocybe tabescens* Bres.

## Fam. Polyporaceae

*Coryolus versicolor* (L ex FR.) Quèl*Fistulina hepatica* (Schaeff) Fries*Fomes fomentarius* (L ex Fr.) Kickx*Ganoderma applanatum* (Pers. ex Valls) Pat.*Phellinus dryadeus* Pat.*Phellinus igniarius* (L ex Fr.) Quèl*Phellinus robustus* (Karst) Bourd et Galz*Polyporus quercinus* (Krombh.) Tries*Polyporus sulphureus* Buill.*Polyporus igniarius* Fr.*Poria versipora* (Pers.) Baxt*Spongipellis spumeus* (Sow ex Fr.) Pat

## Fam. Thelephoraceae

*Stereum frustulosum* Pers.*Stereum gausapatum* Fr.*Stereum hirsutum* (Willd.) Fr.



Fig. 1 y 2.—Síntomas de encinas afectadas por *Diplodia* sp.

Dentro de la clase Deuteromycetes vamos a referirnos por orden de importancia en primer lugar al género *Diplodia*.

Desde el verano de 1978 y particularmente a partir de 1980 hasta la actualidad se observó por primera vez en encinares de la provincia de Huelva, seca distal de ramas acompañadas de una fuerte defoliación que en algunos pies era total. Los primeros síntomas de las hojas se traducen por un cambio de coloración hacia el marrón atabacado, permaneciendo durante unos quince días en el árbol para posteriormente caer. Las ramas afectadas aparecen

puntisecas, progresando rápidamente la muerte de la corteza y el cambium hacia la inserción en ramas más gruesas y tronco. (Figs. 1 y 2).

Estas ramas presentan resquebrajaduras longitudinales y anulares de la corteza y zonas de la misma deprimidas constituyendo chancros de distinto tamaño. En cortes transversales se observa un oscurecimiento del leño hacia el marrón-rojizo acompañados de una estríación más oscura y radial de la madera. En el árbol, por debajo de las zonas chancrosas, a menudo se observa una proliferación de chupones o ramillas adventicias nuevas, de escasa viabilidad que no tardan en secarse igualmente.

En los análisis de laboratorio se comprobó la existencia de numerosos cuerpos de fructificación de color negro irrumpiendo a través de los radios del leño y de las fendas corticales. (Figs. 3 y 4).

El estroma, inmerso en los tejidos del huésped está constituido por tejido pseudoparenquimatoso. Los picnidios aparecen organizados unilocularmente en algunos casos, mientras que en otros son multiloculares (Fig. 5), con unas medidas de  $200-220 \times 230-250 \mu$  (Figs. 6 y 7). Los conidios, de dos tipos, o estados de maduración: hialinos, unicelulares ovoides de  $25-30 \times 20 \mu$  y bicelulares con un tabique mediano y una ligerísima estrangulación a nivel del septo, de color oscuro y midiendo  $30-35 \mu \times 20 \mu$  (Figs. 8, 9 y 10). Las colonias en medio de cultivo presentan un micelio blanco que vira posteriormente a gris. En cortes transversales de tejido vascular, se ha observado la presencia del micelio de hongo y de conidios a varios cms. de distancia de los chancros.

Con estos datos asignamos provisionalmente este hongo al género *Diplodia*, encontrando en la bibliografía dos especies muy próximas *Diplodia quercus* Fuckel y *Diplodia quercinea* Westendorp, citadas por diversos autores en Europa y Estados Unidos, asociadas a chancros y seca de ramas en otras especies del género *Quercus* (RUPÉREZ y MUÑOZ, 1980).

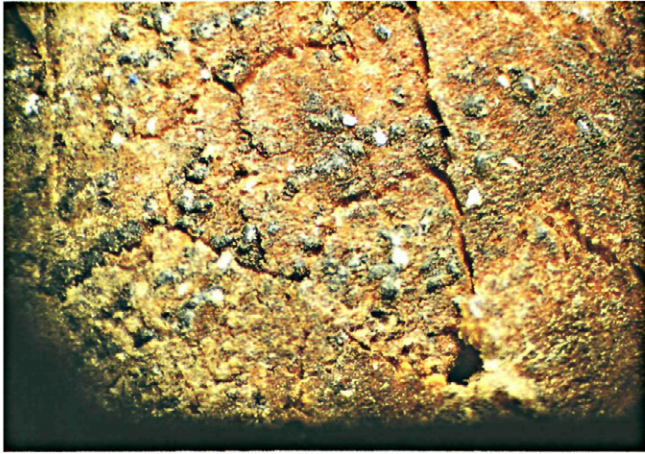


Fig. 3 y 4.—Picnidios de *Diplodia* sp. emergiendo de la madera

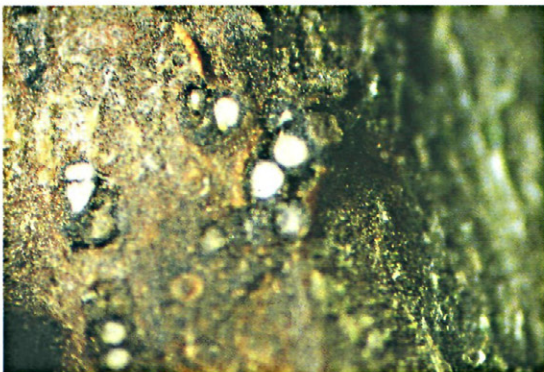


Fig. 5.—Sección transversal de los picnidios de *Diplodia* sp. al binocular en organización multilocular.

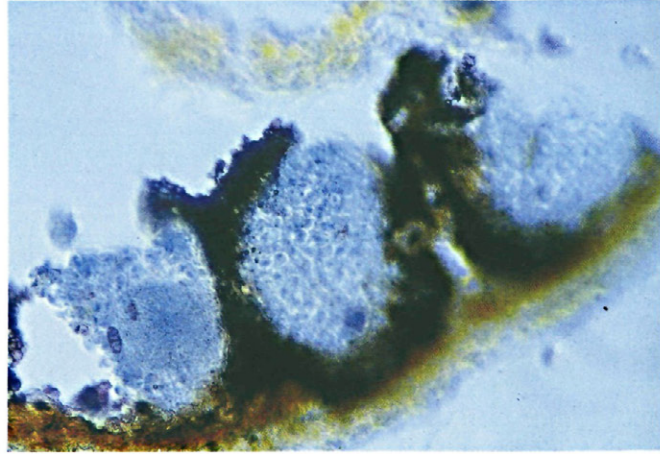


Fig. 6.—Sección transversal de los loculos al M/O con masas de conidios inmaduros.

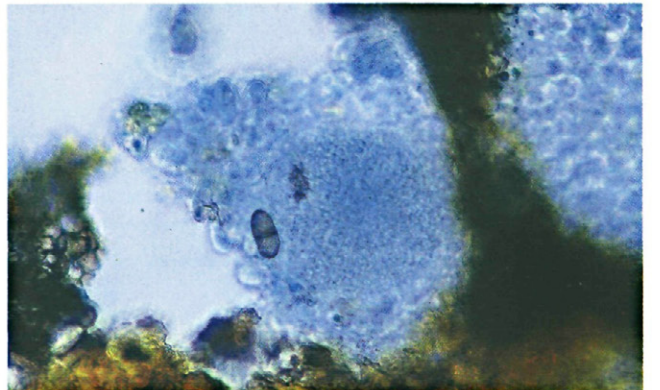


Fig. 7.—Detalle de la sección de un lóculo con un conidio maduro.

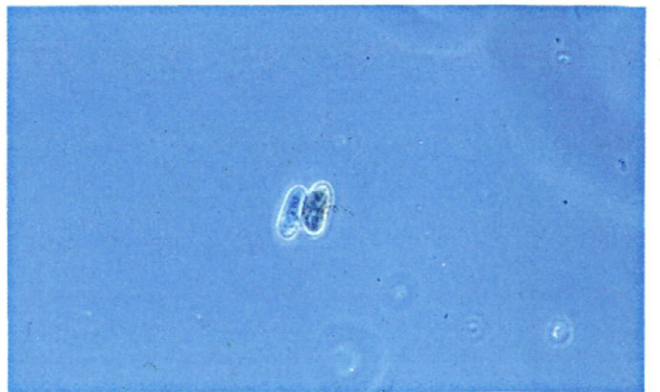


Fig. 8.—Conidios unicelulares en diferente estado de maduración.

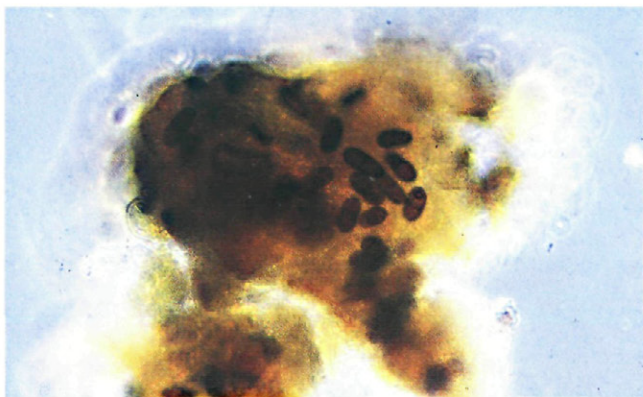


Fig. 9.—Conidios maduros tabicados.



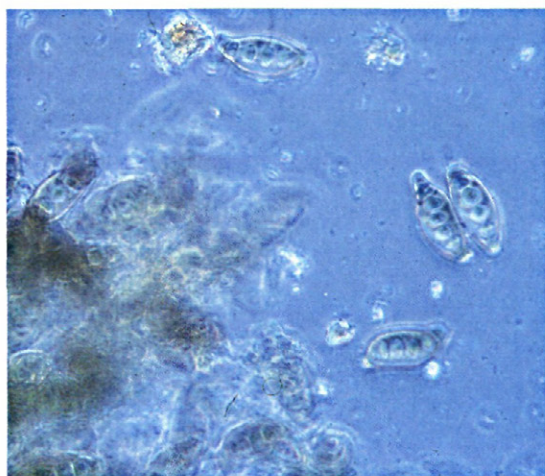
Fig. 10.—Detalle de un conidio bicelular.

Los aislamientos de *Diplodia* se han sucedido en estos últimos años en todas las provincias muestreadas, coincidiendo siempre con la sintomatología anteriormente descrita.

*Cytospora ambiens* Sacc. aparece frecuentemente asociada al anterior, colonizando ramillas muertas por *Diplodia* y rodeando los chancros que produce ésta.

De la misma forma sucede con diversas especies de *Coryneum*, particularmente *Coryneum kunzei* Corda y *Coryneum elevatum*, cuyos acérvulos proliferan sobre las ramillas secas. *C. kunzei* presenta conidios oscuros con un número de septos variable entre 3 y 7 y

unas medidas de  $36-37 \times 7-18 \mu$ . *Coryneum elevatum* tiene conidios oscuros con 4 a 6 pseudoseptos y unas medidas de  $40-60 \times 19-24 \mu$  (Fig. 11). Se ha aislado también su forma sexuada *Pseudovalsia umbonata* (Tul) Sacc, cuyas ascosporas tienen de 3 a 5 septos, con las células centrales oscuras y las apicales hialinas y un tamaño de  $35-55 \times 13-18 \mu$  (Fig. 12). En principio se piensa que tanto *Cytospora* como *Coryneum* son agentes de colonización secundarios.

Fig. 11.—Conidios de *Coryneum elevatum*.Fig. 12.—Asca y ascosporas de *Pseudovalsia umbonata*.

Sobre hojas es frecuente *Coryneum microstictum* produciendo manchas marrones esféricas u ovaladas confluyentes (Fig. 13). Los conidios presentan 3 tabiques con dos células apicales hialinas y las centrales amarillentas (Fig. 14). Las medidas obtenidas han sido  $5-6 \times 15-17,5 \mu$ .

*Capnodium quercinum* (Perst.) Berk et Desm., clásico hongo de fumagina, aparece casi siempre en los muestreos en mayor o menor intensidad, asociado con la presencia de insectos chupadores. Su papel en general es poco relevante, salvo excepciones en que por su abundancia afecta al metabolismo normal del



Fig. 13.—Moteado de las hojas producido por *Coryneum microstictum*.

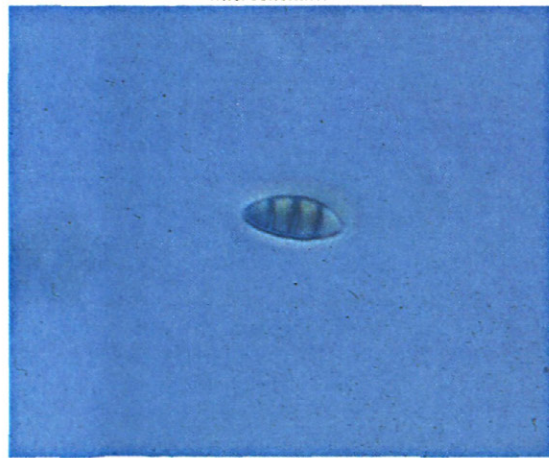


Fig. 14.—Conidio de *Coryneum microstictum*.

árbol al dificultar seriamente el intercambio gaseoso.

*Hypoxilon mediterraneum* (de Not) Hill. clásico parásito facultativo del alcornoque en nuestro país (TORRES JUAN 1969), caracterizado por los estromas carbonosos que produce sobre los que se desarrollan los cuerpos de reproducción sexuales, y por su estado anamorfo *Botrytis sylvatica* Mal., cuyo comportamiento en la propagación del hongo es discutido. Es citado recientemente por otros especialistas como causante de muerte de pies de encina (TORRES JUAN 1985). En nuestros muestreos, por el momento, no lo hemos detectado, si bien estamos trabajando con muestras procedentes del norte de la provincia de Madrid que presentan chancros incipientes, acompañados por exudaciones y oscurecimiento del leño que en principio coinciden con la sintomatología inicial de un ataque de *Hypoxilon* procediéndose actualmente al aislamiento e identificación del agente causal. En estas mismas muestras se ha detectado *Cytospora ambiens* Sacc, *Coryneum kunzei* Corda y *Coryneum elevatum* sobre ramillas finas muertas y rodeando a los pequeños chancros anteriormente citados. No se ha detectado en este caso *Diplodia*.

*Taphrina kruchii* (Vuill.) Schroet, caracterizado por sus ascas libres (Fig. 15), no encerradas en cuerpo de fructificación como en



Fig. 15.—Ascas de *Taphrina kruchii*.

otros ascomicetos, es el agente causal de las "escobas de bruja" en las encinas (RUPÉREZ 1957, TORRES JUAN 1958). Las sintomatología típica es la superproducción de ramillas cortas producidas por la excitación de las yemas axilares como consecuencia de la actividad hiperplásica del micelio del hongo. Las ramillas permanecen agrupadas masivamente, bien erigidas o con geotropismo negativo. Las hojas adquieren una tonalidad verde amarillenta que destaca del resto del follaje. Un pequeñísimo moteado indica la producción de ascas dispuestas de forma similar a las células de un parénquima en empalizada. El micelio es perenne todo el año manteniéndose en el parénquima cortical, lo que da lugar a la reproducción de la enfermedad durante años consecutivos, adquiriendo las "escobas de bruja" dimensiones considerables. Las ramas afectadas vegetan mal y terminan por morir.

En estos dos últimos años hemos observado ataques intensos en algunos encinares, por lo que pensamos que en estos momentos hay un resurgimiento de esta enfermedad, después de unos años en los que se había observado su disminución paulatina (TORRES JUAN 1964).

*Armillaria mellea* Quèl. produce la pudrición agárica radicular, una de las enfermedades más frecuentes en las encinas. Sin embargo, nosotros la hemos detectado en particular en jardines y terrenos urbanizados, donde las encinas vegetan mal, rodeadas de césped que continuamente es sometido a riegos por aspersión, lo que da lugar a un encharcamiento continuo del terreno, favoreciéndose así el desarrollo de este hongo, que por otra parte no es muy común en suelos típicos de encinar.

Por último mencionaremos algunos de los hongos lignívoros que producen diversos tipos de pudriciones. *Polyporus sulfureus* Buill., *Polyporus igniarius* Fr., *Fistulina hepatica* Schaeff ex Fr. producen pudrición cúbica, roja o parda. *Clyocybe tabescens* Fr., *Schizophyllum commune* FR., *Coryolus versicolor* Quèl., *Pora versipora* (Perst) Baxt., *Phellinus* spp., producen pudrición fibrosa blanca. *Stereum frustulosum* Pers. *Stereum hirsutum*

(Willd ex Fr.), *Stereum gausapatum* Fr., producen pudrición alveolar o tubular.

Estos hongos son importantes en el caso de las encina porque su implantación está muy relacionada con las labores de poda habituales, sobre todo en el caso de podas desmesuradas en las que no se tiene la precaución de proteger posteriormente los cortes. La colonización por los diversos hongos lignívoros en estos casos da lugar a una alteración rápida de la madera (RUPÉREZ 1957).

## DISCUSION

De los resultados obtenidos reflejados anteriormente, exceptuando el complejo *Diplodia-Coryneum-Cytospora*, los restantes hongos han sido citados con anterioridad en nuestro país por distintos especialistas, constatándose en nuestro trabajo la persistencia en la actualidad de sus daños.

Por lo que respecta al género *Diplodia* y al complejo que forma con el género *Coryneum* y el género *Cytospora*, es interesante resaltar que ROLAND (1945) atribuye una traqueomicosis de los robles al género *Diplodia*. Posteriormente BOYCE (1961) realiza una descripción muy completa en cuanto a sintomatología sobre *Quercus rubra* afectado por chancros y seca de ramas, atribuyéndolos a *Sphaeropsis quercina* (= *Diplodia longispora*). Este mismo autor refleja la problemática de taxonomía que existe entre los géneros *Sphaeropsis*, *Macrophoma*, *Diplodia* y *Botryodiplodia*, cuya similitud genera una considerable confusión de nomenclatura.

GOIDANICH (1964) cita a *Diplodia quercina* como responsable de una grave enfermedad de los robles en Bélgica durante la década de 1940 a 1950, y a *Sphaeropsis quercina* (= *Diplodia longispora*) como agente de chancros en ramas y troncos del género *Quercus*. *Diplodia quercus* y *Diplodia quercina* asociados a secas de ramas son citadas por LANIER et al. (1976).

La detección del género *Diplodia* en nuestro país en 1978 (RUPÉREZ y MUÑOZ 1980)



coincide con observaciones posteriores realizadas en otros países por distintos especialistas.

Así, HECHT-POINAR et al. (1981) aislan en California sobre *Quercus agrifolia* afectados por una sintomatología similar a la observada en las encinas españolas, un hongo al que provisionalmente denominan *Diplodia quercina*, comprobando su patogenia en inoculaciones sobre robles sanos. Otra cita esporádica de *Diplodia quercus* es recogida de KOWALESKI (1983).

Más recientemente *Botrydioplodia gallae* es considerado por CROGHAN y ROBBINS (1986) como agente asociado a chancros y mortalidad de ramas ("dieback") en Michigan (U.S.A.) sobre distintas especies de robles, observando también como hongos asociados a *Coryneum kunzei* y *Cytospora*.

Por último, VAJNA (1986) aisla *Diplodia mutila* en Hungría produciendo chancros de ramas y dieback en *Quercus petraea* aportando unas descripciones muy completas del hongo desde el punto de vista estructural y aclarando aspectos problemáticos de su taxonomía.

Todos estos trabajos reflejan de una forma u otra la incidencia que el género *Diplodia* puede tener sobre las especies del género *Quercus*, demostrándose así que la circunstancia de su aparición en España no se puede considerar como un hecho aislado, sino que por el contrario existen en estos momentos

una serie de factores que de alguna manera están favoreciendo la expansión de estas especies que producen una sintomatología tan definida.

## CONCLUSIONES

La mayoría de los hongos que afectan a las encinas son consecuencia de una serie de factores que favorecen su proliferación.

Así, el vareado de las encinas para la montanera produce reinfecciones continuas del hongo *Taphrina kruchii*. Las podas desmesuradas favorecen la implantación de los distintos hongos de pudrición. Las herramientas utilizadas en estas labores puede infectar árboles sanos por *Diplodia* e *Hypoxylon*. Estos hongos además ven potenciada su agresividad con situaciones de falta de vigor del arbolado como consecuencia de condiciones climáticas extremas, como puede ser en estos momentos la sequía.

Las encinas situadas en zonas ajardinadas y sometidas a encharcamientos continuos se ven afectadas tarde o temprano por *Armillaria mellea*.

Por otra parte, y con relación al complejo *Diplodia-Coryneum-Cytospora*, en estos momentos se prosiguen los estudios encaminados a clarificar su patogenia y posición sistemática, así como su incidencia en otras áreas geográficas de nuestro país aún no prospectadas.

## ABSTRACT

MUÑOZ, M.C. y RUPÉREZ, A., 1987. La Patología de la encina (*Quercus ilex* L.) en España. Bol. San. Veg. Plagas, 13 (2): 203-212.

During the last twenty years we had been dealing with the inventory and study of the micological flora of the evergreen oak (*Quercus ilex* L.). Some other research workers had been also interested in this subject and as a consequence, a long series of fungi that may be considered as potential pathogens, due to their behaviour had been surveyed.

Many other aspects of their pathogenicity and its confirmation as pathogens, that were left over in the past, are now the aims of new research. This paper is a advancement that permits to catalogue some species of fungi, at least as suspicious, that are showing oftenly in our green oak stands during the last fat last few years. These fungi are related to the presence of cankers, to the dieback of the branches and even to the death of the trees. Its real danger has been discussed by various specialists.

## BIBLIOGRAFIA

- ARREGUI NOGUER, A. (1985). *Flora micológica y patogénesis de las encinas*. Trabajo Fin de Carrera. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal.
- BOYCE, J.S. (1961). *Forest Pathology*, Ed. Mac Graw Hill, New York.
- CROGHAN, C.F., ROBBINS, K. (1986). Cankers caused by *Botryodiplodia gallae* associated with Oak Sprout Mortality in Michigan. *Plant Disease*, 70 (1): 76-77.
- GOIDANICH, G. (1964). *Manuale di Patologia Vegetale* vol. II. Ed. Agricole Bologna.
- HECHT-POINAR, E., BRITTON, J., PARMETER, J.R. (1981). Dieback of Oaks in California. *Plant Disease*, 65: 281.
- KOWALSKI, T. von (1983). Vorkommen von Pilzen in durch Luftverunreinigung geschädigten wäldern im Oberschlesischen und krakaner Industriegebiet. IX. Mykoflora von *Quercus robur* L. und *Q. rubra* L., *Eur. J. For. Path.*, 13: 46-59.
- LANIER, L., JOLY, P., BONDOUX, P., BELLEMERE, A. (1976). *Mycologie et Pathologie Forestieres*. Ed. Masson, Paris.
- OLIVA, M., MOLINAS, M.L. (1984). Incidencia de *Hypoxylon mediterraneum* en los alcornoques gerundenses. *Bol. Estac. Central Ecol. ICONA*, 13 (25): 9-16.
- ROLAND, G. (1945). Etude faite sur une trachéomycose du Chêne occasionée par un *Diplodia Parasitica*, 1: 11-36.
- RUPÉREZ, A. (1957). *La encina y sus tratamientos*. Gráficas Manero, Madrid.
- RUPÉREZ, A., MUÑOZ, C. (1980). Grave enfermedad de las encinas. *Bol. Ser. Plagas*, 6 (1): 107.
- TORRES JUAN, J. (1958). Enfermedad de las "escobas de bruja" en las encinas. *Bol. Serv. Plagas Forest.* Año 1 n.º 2.
- TORRES JUAN, J. (1964). Principales enfermedades que atacan a las frondosas en España. *Serv. Plagas Forest. Ministerio de Agricultura, Madrid.*
- TORRES JUAN, J. (1969). Grave enfermedad del alcornoque en España. *Bol. Serv. Plagas Forest.* Año XI n.º 22.
- TORRES JUAN, J. (1975). *Patología Forestal*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Madrid.
- TORRES JUAN, J. (1985). El *Hypoxylon mediterraneum* (De Not) Mill y su comportamiento en los encinares y alcornoques andaluces. *Bol. Ser. Plagas*, vol. II n.º 2.
- VAJNA, L. (1986). Branch canker and dieback of sessile oak (*Quercus petraea*) in Hungary caused by *Diplodia mutila*. I. Identification of the pathogen. *Eur. J. For. Path.*, 16: 223-229.