Respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de feijões comum e caupi submetidas à deficiência hídrica

Aline Alves Ferreira Lima⁽¹⁾, Rafaela Figueiredo de Santana⁽²⁾ e Arthur Dyego do Nascimento Silva⁽³⁾

1,2,3 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe. Av. Engº. Gentil Tavares da Motta, 1166, Bairro Getúlio Vargas - Aracaju – SE, CEP: 49.055-260. alineafl@gmail.com (1), rafinha-figueiredo@hotmail.com (2), ad.n.silva@hotmail.com (3).

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de analisar respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walph.] submetidas à deficiência hídrica. As análises ecofisiológicas foram realizadas em casa de vegetação, sendo mensurados o potencial hídrico foliar, a fotossíntese líquida e as eficiências de transpiração e de uso da água. As análises bioquímicas abrangeram dosagens dos teores de prolina e açúcares solúveis. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial 3X2, sendo duas cultivares do gênero *Vigna* (Marataoã e Gurguéia) e uma do gênero *Phaseolus* (Radiante), dois níveis de suprimento hídrico (capacidade de campo e sem irrigação) e quatro repetições por tratamento. As análises ecofisiológicas revelaram melhor desempenho das cultivares de feijão caupi nas eficiências de transpiração e do uso da água, além de um maior potencial fotossintético. Sob aspecto bioquímico, foi evidenciada a ocorrência de ajustamento osmótico em todas as cultivares, porém com diferentes intensidades. As cultivares Marataoã e Gurguéia demonstram maior resistência à deficiência hídrica, apresentando portanto, maiores probabilidades de sucesso adaptativo em regiões com baixos índices pluviométricos.

Palavras-chave: Phaseolus vulgaris, Vigna unguiculata, ajustamento osmótico, resistência à seca.

1. INTRODUÇÃO

As pesquisas agronômicas têm suas bases na compreensão das respostas dos vegetais ao ambiente. Tais respostas constituem a matéria-prima de um ramo da Botânica chamado Ecofisiologia Vegetal. Através dos estudos ecofisiológicos é possível, por exemplo, avaliar e compreender mecanismos de resistência ou tolerância à seca. A partir da compreensão desses mecanismos pode-se comparar as respostas dos diferentes materiais produzidos através dos programas de melhoramento genético e indicar aquele com maiores possibilidades de sucesso adaptativo e reprodutivo nos mais diversos agroecossistemas.

O feijão constitui um dos principais produtos da agricultura familiar brasileira, sendo produzido geralmente em cultivos de sequeiro, os quais propiciam a ocorrência de deficiência hídrica em algum estádio do desenvolvimento. Tal fato torna-se potencialmente significativo na região Nordeste onde é cultivada a safra da seca, segundo o calendário agrícola do feijão (Ferreira *et al.*, 2002).

Partindo do exposto nos parágrafos anteriores, este trabalho teve o objetivo de analisar respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walph.] submetidas à deficiência hídrica, indicando aquela com maiores possibilidades de adaptação para o plantio em regiões com baixos índices pluviométricos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Em condições naturais ou agricultáveis, as plantas estão frequentemente expostas a estresses. De forma geral, estresse pode ser definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. O conceito de estresse está relacionado ao de tolerância ao estresse, que é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável (Kerbauy, 2004). De acordo com a sua natureza, os estresses podem ser classificados em bióticos e abióticos. Os estresses bióticos são resultantes da ação de outros organismos vivos. Já os estresses abióticos são resultantes do excesso ou déficit de algum fator físico ou químico do meio ambiente.

A disponibilidade de água é um dos fatores ambientais que mais influenciam a produtividade vegetal. A água utilizada pelas plantas na fotossíntese é absorvida pelas raízes e transportada para a parte aérea juntamente com os nutrientes, através dos vasos lenhosos ou xilema. A intensidade da deficiência hídrica depende do órgão ou do tecido alvo, do estádio de desenvolvimento da planta e da cultivar em questão. Levados em consideração esses fatores, a cultivar pode manifestar resistência ou susceptibilidade. A ocorrência de déficit hídrico provoca diminuição da produtividade justamente por inviabilizar o processo fotossintético, uma vez que a água, além de ser componente básico da reação, também é responsável pela manutenção da transpiração, essencial para a permeabilidade do gás carbônico no mesófilo foliar (Buchanan *et al.*, 2000). Um dos primeiros efeitos do déficit hídrico nas plantas vasculares manifesta-se sobre os estômatos. Em geral, sob deficiência hídrica, a queda da taxa de fotossíntese pode ser relacionada com a limitação das trocas gasosas, conseqüência do fechamento dos estômatos em resposta a um decréscimo no potencial hídrico foliar (Oliveira *et al.*, 2002).

As respostas dos vegetais à deficiência hídrica incluem muitas vezes alterações bioquímicas em nível celular (Floss, 2004). O acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos em resposta às condições estressantes de salinidade e baixa disponibilidade de água é um importante mecanismo desenvolvido pelas plantas que toleram a seca com baixo potencial hídrico (Nepomuceno *et al.*, 2001). Este mecanismo, denominado ajustamento osmótico, tem sido verificado em várias espécies, sendo considerado um dos mais eficazes para manutenção da turgescência celular, permitindo principalmente a manutenção da abertura estomática e fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo (Kramer, 1993).

3. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, no município de São Cristóvão-SE. Foram avaliadas três cultivares de feijão, sendo duas da espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walph ('Marataoã' e 'Gurguéia'), cujas sementes foram obtidas através da EMBRAPA Meio-norte (Teresina-PI); e uma da espécie *Phaseolus vulgaris* L.('Radiante'), com sementes oriundas da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros (Aracaju-SE). O plantio das cultivares foi inicialmente realizado em sementeiras (25/06/07), havendo transplante das plântulas para vasos plásticos com capacidade aproximada de 10 L após quinze dias. Houve distribuição de duas plântulas por vaso. As regas foram realizadas diariamente, mantendo-se o solo em capacidade de campo. Como substrato, foi utilizado planossolo, coletado em Maio de 2007 no Povoado Cacimba Nova (38°2'35'"W; 10°43'46'"S), município de Poço Verde, Região semi-árida do Estado de Sergipe. O solo coletado foi submetido à análise de fertilidade completa no Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe – ITPS, obtendo-se as seguintes características: pH em água -6,4; matéria orgânica- 32 g/dm³; P- 9 ppm; K- 0,74 cmolc/dm³; Al ³+- 0,0 cmolc/dm³; Ca ²+- 7,04 cmolc/dm³ e Mg²+- 1,65 cmolc/dm³.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 3X2 (três cultivares e dois níveis hídricos), sendo duas cultivares do gênero *Vigna* e uma do gênero

Phaseolus, dois níveis de suprimento hídrico (capacidade de campo e supressão da irrigação) e quatro repetições por tratamento. A supressão hídrica foi iniciada 38 dias após a semeadura, no estádio vegetativo que antecede a floração. As cultivares foram submetidas a análises ecofisiológicas e bioquímicas, realizadas em dias alternados entre 02 e 10/08/07. As plantas submetidas ao déficit hídrico foram reidratadas tão logo apresentaram taxa fotossintética nula para a verificação da capacidade de restabelecimento dos valores observados no grupo controle.

As análises ecofisiológicas compreenderam potencial hídrico foliar (Ψ_w) , taxas de fotossíntese líquida (A) e transpiração (E), a condutância estomática (g_s) . As duas últimas variáveis citadas foram utilizadas para o cálculo da eficiência instantânea de transpiração, em função da relação A/E, e a eficiência intrínseca do uso da água, em função da relação A/g_s . As medições foram realizadas entre 9 e 10 horas da manhã. Os valores de Ψ_w foram obtidos através de uma bomba de pressão modelo 3005 (Santa Bárbara Soil Moisture, USA). Para determinação de A, E, g_s foi utilizado um analisador de gases por infravermelho portátil (IRGA) modelo CIRAS-2 (PPSystems Hitchin, UK). A radiação fotossinteticamente ativa utilizada foi de aproximadamente 1800 μ mol m-2 s-1.

As análises bioquímicas compreenderam dosagens de prolina e açúcares solúveis, de acordo com os métodos de Bates, *et al* (1973) e Ashwell (1957), respectivamente. Foram coletadas folhas totalmente expandidas próximas à região apical, a partir das quais foram obtidos os discos usados nas referidas análises. As folhas foram coletadas no mesmo momento da realização das análises ecofisiológicas.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. As interações significativas foram analisadas mediante teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Os dados foram analisados com o auxílio do software BioEstat, versão 4.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suspensão da irrigação ocasionou redução nos valores de potencial hídrico foliar em todas as cultivares analisadas. As médias apresentaram diferenças significativas a partir do quarto dia após a supressão hídrica, acentuando-se no sexto dia. Os menores valores foram alcançados em plantas não irrigadas da cultivar Radiante (figura 1C), pertencente à espécie *Phaseolus vulgaris*. Após a reidratação houve restabelecimento do Ψ_w a valores semelhantes aos das plantas irrigadas. Nenhuma das cultivares alcançou valores de potencial hídrico inferiores a -1,9 MPa, considerado um limite aproximado para que haja recuperação no feijoeiro. Tal fato pode explicar a retomada do Ψ_w a valores próximos aos observados no grupo controle pós reidratação. Segundo Taiz e Zeiger (2004), plantas com potenciais hídricos foliares entre -1 e -2 Mpa denotam deficiência hídrica moderada e relativa resistência à seca. Dentro dessa perspectiva, apesar de a cultivar Radiante ter alcançado os menores valores de potencial hídrico quando comparada às cultivares Marataoã e Gurguéia, os resultados observados não foram significativamente díspares a ponto de desqualificá-la nesse parâmetro como uma opção viável de cultivo.

A taxa fotossintética (figura 2) apresentou o mesmo padrão do potencial hídrico, com reduções significativas a partir do quarto dia de supressão hídrica e recuperação completa pós reidratação. Vários pesquisadores acreditam que tal diminuição se deve ao fechamento estomático, com conseqüente restrição à difusão de gás carbônico. Entretanto Tezara *et al.* (1999), em estudo realizado com girassóis, afirmaram que a diminuição da síntese de adenosina trifosfato (ATP) e Ribulose bifosfato (RuBP), responsáveis pelo metabolismo do gás carbônico no Ciclo da Calvin, seriam os verdadeiros responsáveis pela diminuição da fotossíntese. Em outras palavras, a queda da taxa fotossintética estaria atrelada diretamente à falta de carbono fotossintetizável, o que explicaria a manutenção temporária de *A*, mesmo com uma condutância estomática reduzida, através da utilização do carbono ainda disponível na planta.

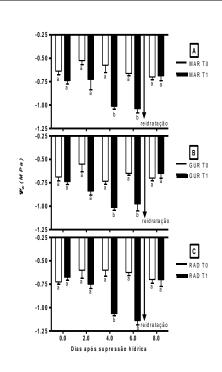


Figura 1 – Potencial hídrico foliar (Ψ_w) em cultivares de V. unguiculata L. (A e B) e P. vulgaris L. (C) sob capacidade de campo (T0) e deficiência hídrica (T1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

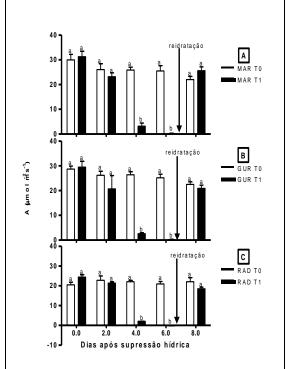


Figura 2 – Taxa fotossintética líquida (A) em cultivares de V. unguiculata L. (A e B) e P. vulgarisL(C) sob capacidade de campo (T0) e deficiência hídrica (T1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A retomada de taxas fotossintéticas a valores semelhantes ao grupo controle antes mesmo da completa recuperação do fluxo estomático pós reidratação estaria relacionada com a uma rápida retomada da produção de ATPsintetase e RuBP, com conseqüente otimização da utilização do carbono já existente nas plantas. Outro ponto relevante a ser citado refere-se à superioridade nos valores da taxa fotossíntética nas plantas irrigadas das cultivares pertencentes à espécie *Vigna unguiculata* em relação à cultivar Radiante (*Phaseolus vulgaris*), o que suscita a existência de um maior potencial fotossintético e, portanto um maior potencial produtivo nas cultivares de feijão caupi.

As médias referentes à eficiência instantânea de transpiração (figura 3) nas cultivares Marataoã e Gurguéia só sofreram redução significativa no sexto dia de supressão. Na Radiante, as reduções significativas foram observadas a partir do quarto dia. Esses resultados coincidem com taxas fotossintéticas praticamente nulas e potenciais hídricos abaixo de – 1,00 MPa. Após reidratação houve recuperação em todas as cultivares analisadas. Anyia e Herzog (2004) encontraram resultados semelhantes em experimento realizado em casa de vegetação na Universidade de Berlin, ao analisarem cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walph. submetidas à restrição hídrica. Nesse estudo houve reduções significativas desse parâmetro nas cultivares UCR1340, Vita 7, UCR328, Lagreen e RCXAC.

No que concerne à eficiência intrínseca do uso da água (figura 4), as cultivares demonstraram comportamento um tanto quanto diferenciado. Na Marataoã (figura 4A), até o quarto dia de supressão houve uma tendência de aumento da A/g_s nas plantas submetidas à deficiência hídrica, configurando a continuidade da produção fotossintética mesmo com reduzidos níveis de

condutância estomática. No quarto dia, foram evidenciadas médias significativamente superiores no grupo T1 em relação ao grupo controle-T0. No sexto dia de supressão hídrica, com a redução mais intensa da condutância estomática e consequente diminuição da taxa fotossintética houve queda significativa da A/g_s nas plantas não irrigadas em relação ao grupo controle. Na cultivar Gurguéia (figura 4B) houve similar tendência de aumento da A/g_s relatada na cultivar Marataoã, entretanto com superioridade significativa do grupo T1 em relação ao controle já a partir do segundo dia de supressão hídrica. Os incrementos observados na eficiência do uso da água observados nas duas cultivares de V. unguiculata foram aproximadamente três vezes maiores que os valores observados no início do experimento. No período de deficiência hídrica mais intensa, o comportamento também foi semelhante ao Marataoã com queda na média das plantas do grupo T1 em relação ao controle. Segundo Chaves et al. (2003), muitas plantas tendem a apresentar aumentos na eficiência do uso da água quando o estresse hídrico é moderado. Esse aumento é resultado da relação não-linear entre a assimilação do carbono e a condutância estomática, isto é, perda de água acontecendo antes e mais intensamente do que a inibição da fotossíntese. Incrementos significativos na eficiência intrínseca do uso da água, como os observados nas cultivares de V. unguiculata, foram observados em linhagens de soja analisadas por Costa (2003). Na cultivar Radiante (figura 4C) não se verificou a mesma tendência de aumento da A/g_s observada nas cultivares pertencentes à espécie V. unguiculata, sendo observada uma queda significativa nas plantas submetidas à deficiência hídrica no período de déficit mais intenso em razão da completa nulidade da taxa fotossintética. Após a reidratação as plantas do grupo T1 de todos as cultivares analisadas apresentaram médias de A/g_s superiores às observadas no grupo controle.

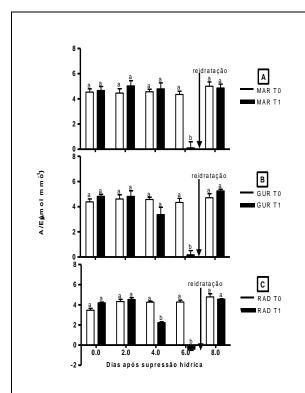


Figura 3 – Eficiência instantânea de transpiração (A/E) em cultivares de V. unguiculata L. (A e B) e P. vulgaris L. (C) sob capacidade de campo (T0) e deficiência hídrica (T1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

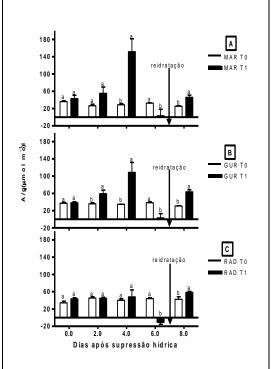


Figura 4 – Eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) em cultivares de V. unguiculata L. $(A \ e \ B)$ e P. vulgaris L. (C) sob capacidade de campo (T0) e deficiência hídrica (T1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os teores de prolina (figura 5), de maneira geral, apresentaram uma tendência de aumento nas cultivares analisadas, o que sugere a existência de ajustamento osmótico, em maior ou menor grau, de acordo com os resultados que se seguem. Na cultivar Marataoã (figura 5A), o aumento no quantitativo desse aminoácido só foi significativo no sexto dia de supressão hídrica, quando foi alcançado valor três vezes maior em relação ao início do experimento. O ajuste osmótico mais expressivo, em função do aumento da concentração foliar de prolina, ocorreu na cultivar Gurguéia (figura 5B) na qual as médias no grupo T1 passaram a ser significativamente superiores ao grupo controle a partir do quarto dia de supressão hídrica, intensificando-se no sexto dia. Na cultivar Radiante (figura 5C), só houve diferença significativa no sexto dia de supressão hídrica. Após reidratação houve restabelecimento de valores semelhantes ao grupo T0 nesta cultivar. Nas cultivares Marataoã e Gurguéia, apesar de terem sido verificadas reduções, as 48 h pós irrigação não foram suficientes para o restabelecimento da equidade entre plantas dos grupos T0 e T1. Tal fato se deve provavelmente a lenta degradação desse aminoácido frente ao quantitativo acumulado durante o período de deficiência hídrica. Segundo Costa et al. (2008), a deficiência hídrica causa diminuição do potencial hídrico foliar. Em contrapartida há o aumento do teor de prolina para que ocorra o ajustamento osmótico e a defesa da planta contra a desidratação.

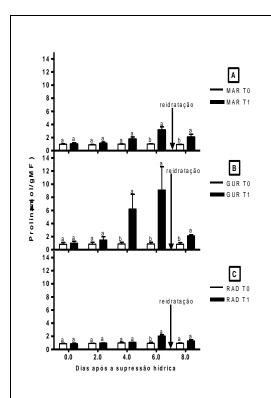


Figura 5 – Teor de prolina em cultivares de *V. unguiculata* L. (A e B) e *P. vulgaris* L. (C) sob capacidade de campo (T0) e deficiência hídrica (T1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

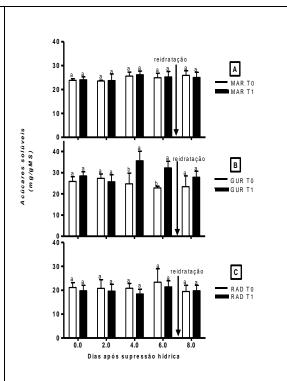


Figura 6 – Teor de açúcares solúveis em *V. unguiculata* L. (A e B) e *P. vulgaris* L. (C) sob capacidade de campo (T0) e deficiência hídrica (T1). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os teores de açúcares solúveis só variaram significativamente na cultivar Gurguéia (figura 6 B). Foram observados aumentos significativos nas médias das plantas submetidas à deficiência hídrica a partir do quarto dia de supressão, persistindo no sexto dia. Isso significa que, nessa cultivar, as moléculas de água se ligam aos carboidratos com finalidade de manter o nível de

água na folha e induzir o ajustamento osmótico. Tal fato vem a corroborar a maior tendência desta cultivar a realização de ajustamento osmótico, entretanto a prolina parece ser o soluto mais compatível com esse papel, devido a uma maior magnitude no incremento desse aminoácido (figura 5B). Aumentos significativos nos teores de açúcares solúveis foram encontrados por Souza et al. (2004) e Oliveira Neto et al. (2006) em experimentos realizados com as cultivares de Vigna unguiculata Vita-7 e Sempre Verde, respectivamente. Após reidratação, as plantas irrigadas e as que sofreram deficiência hídrica apresentaram teores de açúcares solúveis semelhantes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1. O status hídrico das cultivares, mensurado através do potencial hídrico foliar, não revela grandes distorções no comportamento fisiológico entre as cultivares;
- 2. As cultivares de *Vigna unguiculata* submetidas à deficiência hídrica apresentam melhor desempenho no que concerne à eficiência instantânea de transpiração e a eficiência intrínseca do uso da água quando comparadas com a cultivar da espécie *P. Vulgaris*, além de um maior potencial fotossintético;
- 3. Nas três cultivares analisadas observa-se a ocorrência de ajustamento osmótico, entretanto, na cultivar Gurguéia o processo é quantitativamente mais intenso e tem a participação de dois solutos, a prolina e os açúcares solúveis;
- 4. A análise comparativa interespecífica dos resultados revela um maior potencial de adaptabilidade a ambientes com restrição hídrica para as cultivares de *Vigna unguiculata*, Marataoã e Gurguéia.

6. REFERÊNCIAS

ANYIA, A.O.; HERZOG, H. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. **European Journal of Agronomy** .v.20, p.327–339, 2004.

ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugar. In: Methods in Enzymology, volume III. Eds. S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press, p.73-105, 1957.

BATES, L. S.; WALDESM, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L.Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.1408p.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from the genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v.30, p. 239-264, 2003.

COSTA, R. C. L.; LOBATO, A.K.da S.; OLIVEIRA NETO, C.F.de; MAIA, P.S.P.; ALVES, G. A. R. LAUGHINGHOUSE, D.H. Biochemical and Physiological in Two *Vigna uguiculata* (L.) Walp. Cultivars Under Water Stress. **Journal of Agronomy**, v. 7, p. 98-101, 2008.

COSTA, A.C. Respostas fisiológicas de duas linhagens de soja à atmosfera enriquecida com CO2 e à restrição hídrica. 2003. 36p. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERREIRA, C. M, DEL PELOSO, M. J., FARIA, L. C. de. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002.47p.

FLOSS, E.L. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê**. Passo Fundo: UPF, 2004, 528p.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 2004.

KRAMER, P.J. Water relations of plants and soils. London: Academic Press, 1993, 495p.

NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância á seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.23, p.12-18, 2001.

OLIVEIRA, M.A.J.; BOVI, M.L.A.; MACHADO, E.C.; GOMES, M.M. DE A. HABERMANN, G.; RODRIGUES, J.D. Fotossíntese, condutância estomática, e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agricola**, v.59, n.01, p.59-63, 2002.

OLIVEIRA-NETO, C. F; LOBATO, A. K. S. e COSTA, R. C. L. Teor de carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de feijão-caupi sob estresse hídrico. **Congresso Nacional de Feijão-Caupi: Tecnologias para o agronegócio: anais** / CONAC, I Congresso Nacional de Feijão-Caupi, VI Reunião Nacional de Feijão-Caupi, Teresina, PI, 2006. CD-ROM.

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGOA, A. M. M. A; SILVEIRA., J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany.** v.51, p. 45–56, 2004.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. A água e as células vegetais. In: TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 61-74.

TEZARA, W.; MITCHELL, V.J.; DRISCOIL, S.D.; LAWLOR, D.W.Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling fator and ATP. **Nature,**v.401, p. 914-917, 1999.