

## EFECTO DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*) SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y TRANSPIRACIÓN FOLIAR DEL BANANO (*Musa sp. AAA, cv. Valery*)<sup>1/</sup>

Martín Hidalgo\*, Ana Tapia\*\*, Werner Rodríguez<sup>2/\*\*</sup>, Edgardo Serrano\*\*\*

**Palabras clave:** banano, Sigatoka negra, fotosíntesis foliar, transpiración foliar, Costa Rica.

**Keywords:** banana, black sigatoka, leaf photosynthesis, leaf transpiration, Costa Rica.

Recibido: 04/10/05

Aceptado: 24/01/06

### RESUMEN

Con el propósito de relacionar el ataque de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) con las tasas fotosintética y de transpiración foliares, se sembraron rebrotes del tercer ciclo de producción de una plantación del cv. Valery en potes plásticos de 4 litros. Las plantas se mantuvieron dentro de un invernadero a humedad relativa y temperatura del 90% y 27°C, respectivamente. Al emitir 6 hojas, las 4 más jóvenes fueron inoculadas con conidios de *M. fijiensis* a partir de cultivos monospóricos de aislamientos silvestres. Dos riegos diarios por aspersión mantuvieron una película de agua sobre las hojas. Se aplicó una suspensión de 150000 conidios ml<sup>-1</sup> sobre el envés de las hojas utilizando un aerógrafo, en 2 fechas con un intervalo de 30 días entre ellas, para obtener diferentes grados de severidad y estadios de la enfermedad en hojas de diferentes edades. Tanto la determinación visual del porcentaje de severidad como la del estadio de desarrollo de la enfermedad, fueron llevadas a cabo en los 6,25 cm<sup>2</sup> del área foliar cubierta por la cubeta del medidor infrarrojo de gases, utilizado para determinar las tasas fotosintéticas y transpiratorias foliares. La tasa fotosintética neta foliar (Fn;  $\mu\text{moles de CO}_2$  reducidos por m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)

### ABSTRACT

**Black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) effect on banana (*Musa sp. AAA, cv. Valery*) leaf photosynthesis and transpiration.** With the aim of relating Black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) attack to leaf photosynthetic and transpiration rates, suckers from a third production cycle cv. Valery plantation were planted in 4-liter plastic pots. Plants were kept in a greenhouse at 90% relative humidity and 27°C. When 6 leaves were emitted, the 4 youngest leaves were inoculated with *M. fijiensis* conidiospores coming from a wild type monosporic culture. Two daily sprinkler irrigations produced a film of water covering leaves. A 150000 conidia ml<sup>-1</sup> suspension was applied on abaxial leaf surfaces using an airbrush 2 times, 30 days apart, to obtain different severity grades and symptoms of the disease in leaves of different ages. Both visual severity percentages, as well as disease development stage determinations, were carried out on the 6.25 cm<sup>2</sup> leaf area covered by the infrared gas analyzer leaf chamber, used to determine photosynthetic and transpiration leaf rates. Leaf net photosynthetic rate (Pn;  $\mu\text{mol CO}_2$  reduced by m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) declined as both severity percentages

1/ Este trabajo forma parte de la tesis de Licenciatura del primer autor. Sede del Atlántico, Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: wernerr@racsa.co.cr

\* Sede del Atlántico, Universidad de Costa Rica. Actualmente, en el Centro de Investigaciones en Café, Costa Rica.

\*\* Sede del Atlántico, Universidad de Costa Rica.

\*\*\* Dirección de Investigaciones, CORBANA S.A., Costa Rica.

decaió con el incremento del porcentaje de severidad ( $F_n = -0,1517x + 6,845$ ;  $R^2 = 0,72$ ) y el estadio de la enfermedad ( $F_n = -1,62x + 8,36$ ;  $R^2 = 0,60$ ). El impacto del patógeno sobre la tasa transpiratoria foliar ( $E$ ;  $\text{mmoles de agua m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) fue relativamente menor, como lo mostró la regresión de  $E$  contra el porcentaje de severidad ( $E = -0,0122x + 2,429$ ;  $R^2 = 0,11$ ).

( $P_n = -0,1517x + 6,845$ ;  $R^2 = 0,72$ ) and disease stage increased ( $P_n = -1,62x + 8,36$ ;  $R^2 = 0,60$ ). Pathogen impact on leaf transpiration rate ( $E$ ;  $\text{mmoles water m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was relatively lower, as regression of  $E$  against severity percentage showed ( $E = -0,0122x + 2,429$ ;  $R^2 = 0,11$ ).

## INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*, es el principal problema fitopatológico del cultivo del banano y el plátano en América, Asia y África (Carlier *et al.* 2000, Lepoivre *et al.* 2003, Marín *et al.* 2003). Debido a sus características biológicas de mayor producción de ascósporas, mayor número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos, la Sigatoka negra logra rápidamente predominar sobre otras enfermedades foliares del banano menos agresivas (Romero 2003). En Costa Rica, los costos del combate de la enfermedad pueden alcanzar los  $\$1500 \text{ h}^{-1} \text{ año}^{-1}$  y amenazan seriamente la competitividad de la industria (Jones 2003). La Sigatoka negra deteriora el área foliar de la planta, retrasa la floración y la cosecha y reduce tanto el llenado del racimo como la vida verde de la fruta (Craenen y Ortiz 2003).

A diferencia de la respiración, la tasa de fotosíntesis aparente, generalmente decrece en las hojas infectadas (Daly 1976). Las esporas de *Mycosphaerella fijiensis* germinan especialmente sobre la superficie abaxial de las hojas, penetran con sus hifas los estomas e inician con ello un proceso rápido de colonización del mesófilo foliar en los genotipos susceptibles (Meredith y Laurence 1970). La penetración mecánica del ostiolo por parte del hongo compromete el proceso de la fotosíntesis al reducir la conductividad estomática de la cual depende la tasa fotosintética (Belalcázar y Merchán 1991). Esta vía de entrada de *M. fijiensis* a las hojas ocurre aun en los

cultivares que muestran una alta resistencia a la enfermedad (Lepoivre *et al.* 2003).

En las enfermedades foliares, cada uno de los procesos que gobiernan el flujo de carbono vegetal (fotosíntesis, respiración, transporte) pueden ser afectados, con el resultado final de favorecer la economía del carbono del parásito involucrado (Daly 1976). Adicionalmente, se ha argumentado que *M. fijiensis* produce una toxina que afecta a la planta (Molina y Krausz 1989). Sin embargo, no existe evidencia experimental acerca del rol de estos metabolitos del hongo, y su efecto es considerado secundario en el contexto de esta patogénesis (Lepoivre *et al.* 2003).

La información disponible acerca del efecto de la Sigatoka negra sobre la tasa fotosintética foliar es escasa. El objetivo de la presente investigación consistió en relacionar cuantitativamente y bajo condiciones controladas, el desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra con las tasas de fotosíntesis y transpiración foliares. El conocimiento de esta relación podría contribuir a mejorar la estrategia de combate de la enfermedad en el futuro y a dilucidar la relación hospedero-patógeno, un conocimiento necesario para la selección racional de genotipos resistentes (Lepoivre *et al.* 2003, Simmonds y Smartt 1999).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio y material experimental

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero de la Universidad de Costa Rica (Turrialba,

9° 53' N 83° 38' O, a 646 msnm) bajo iluminación natural y condiciones controladas de humedad relativa (80-100%), riego (2 aspersiones diarias) y temperatura (25-27°C) con ayuda de un aire acondicionado y un equipo de riego por aspersión regulado por un "timer". Las 30 plantas utilizadas se obtuvieron a partir de rebrotes apicales uniformes, de 0,5 kg en promedio, provenientes del tercer ciclo de producción de una plantación del cv. Valery propiedad del Centro de Investigaciones Agrícolas de CORBANA. Los rebrotes se sembraron en potes plásticos de 4,0 l que contenían suelo de textura franca y recibieron riegos diarios para restaurar periódicamente la condición de capacidad de campo del suelo. Las plantas fueron fertilizadas a la siembra con 20 g pote<sup>-1</sup> de la fórmula 10-30-10 y con 20 g adicionales de urea 2 meses después de la siembra.

### Origen y manejo del inóculo

Cuando las plantas emitieron 6 hojas en el invernadero, las 4 hojas más jóvenes fueron inoculadas a partir de cultivos monospóricos de una población silvestre de *M. fijiensis* proveniente de San Carlos, Alajuela. La producción de conidios siguió la metodología propuesta por Mourichon *et al.* 1987. Esta consistió en descargar ascósporas a partir de material afectado por la Sigatoka negra tras un periodo de incubación de 72 h, uniendo secciones de tejido foliar a trozos de papel bond blanco y sumergiéndolas por 5 min en agua destilada. Posteriormente, cada trozo de papel con el tejido se colocó sobre la cara inferior de la tapa de los platos de Petri con el haz orientado hacia el agar-agua al 2,5% que contenían los platos, durante 30 min. Las ascósporas así descargadas sobre la superficie del medio fueron incubadas por 24 h a temperatura ambiente para facilitar su germinación. Con ayuda de un estereoscopio y una microaguja las esporas germinadas fueron trasladadas a un medio Agar-V8 modificado (180 ml de jugo V8, 2 g de CaCO<sub>3</sub>, 20 g de agar y 820 ml de agua l<sup>-1</sup>). Los platos se incubaron a una temperatura de 25 a 27 °C y bajo luz continua durante un periodo de 12 a 20 días. Transcurrido ese tiempo, las esporas habían formado un estroma

esférico que fue dividido y trozos pequeños del mismo colocados en platos de Petri con el medio V8 durante 12 días bajo las mismas condiciones de temperatura y luz mencionadas anteriormente. Después de 12 días, 10 gotas con una suspensión de conidios (Tween al 0,05%) procedentes de las colonias, formadas a partir de los trozos de micelio, fueron aplicadas a platos de Petri con el medio agar V8, los cuales se mantuvieron durante 10-12 días con luz continua y a temperatura ambiente (20-23°C). Posteriormente, se inundaron los platos con 10 ml de Tween al 0,05% y se rasparon suavemente con un pincel de pelo de camello para desprender los conidios necesarios para inocular las hojas. La concentración de conidios por mililitro se calculó con ayuda de un hematocímetro. No se llevó a cabo un proceso de filtración y, por lo tanto, también hubo partes de micelio en la suspensión. Este paso concluyó la producción de los conidios necesarios para la inoculación de las plantas.

### Inoculación de las plantas y determinación de las variables de respuesta

Para garantizar la inoculación, se aplicó una suspensión de 150.000 conidios ml<sup>-1</sup> sobre el envés de las 4 hojas más jóvenes de las 30 plantas utilizando un aerógrafo (Hobby Sagola, modelo Badger 250), con el que se disparó la suspensión en forma de microgotas a presión constante. La inoculación de las plantas se realizó en 2 fechas separadas por un intervalo de 30 días en las 4 hojas; para obtener una gradiente de severidad, sobre la cual determinar el intercambio de gases bajo las condiciones estables impuestas por el invernadero. Tanto la determinación visual del porcentaje de severidad como la del estadio de desarrollo de la enfermedad (conforme a la escala de Meredith y Laurence 1969) fueron llevadas a cabo en los 6,25 cm<sup>2</sup> del área foliar cubierta por la cubeta del medidor infrarrojo de gases (Leaf Chamber Analyzer, modelo LCA4, Advanced Development Company, Inglaterra), utilizado para determinar el intercambio de gases, concretamente, la tasa fotosintética foliar ( $\mu$ moles de CO<sub>2</sub> fijados m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y la tasa transpiratoria (moles de agua transpirados m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Este equipo fue

calibrado conforme a las especificaciones del fabricante. En todos los casos, la cubeta se colocó en la sección media del semilimbo izquierdo de las hojas, sin modificar su posición, en hojas de diferentes edades pero que mostraban una misma severidad. En las 2 fechas, las mediciones de fotosíntesis y transpiración se llevaron a cabo entre las 8 y 10 a.m. Cada punto de observación en las hojas fue medido un mínimo de 2 veces en cada una de las 2 fechas. Los datos fueron registrados con el acumulador de datos del instrumento tras un mínimo de 45 segundos de estabilización en 2 fechas espaciadas 10 días entre sí y analizados con ayuda del procedimiento Reg del programa SAS v8.1. No se empleó un diseño experimental con tratamientos.

## RESULTADOS

Los primeros síntomas de la enfermedad y las primeras manchas comenzaron a ser evidentes entre los 10 y 14 días y a los 25 días después de realizada la inoculación, respectivamente. La radiación fotosintéticamente activa incidente sobre las hojas fue, en promedio de 942 ( $s=1$ ) y 227 ( $s=102$ )  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en la primera y segunda medición, respectivamente. Como muestra la figura 1a, la tasa fotosintética neta foliar (Fn) decayó con el incremento de la severidad y alcanzó valores inferiores a cero a partir del 45%. El mismo comportamiento fue hallado al regresionar la fotosíntesis neta contra el estadio de la enfermedad, obteniéndose valores negativos de fotosíntesis neta por encima del estadio 5 de severidad (Figura 1b). El impacto de la enfermedad sobre la tasa transpiratoria (E) fue relativamente menor, como lo mostró la regresión de la tasa transpiratoria contra el porcentaje de severidad (Figura 2). Todos estos modelos de regresión lineal ( $P > F=0,001$ ) y sus respectivos parámetros resultaron significativos ( $P > t=0,0001$ ).

## DISCUSIÓN

El éxito de un parásito hemibiotrófico como *Mycosphaerella fijiensis* depende de su

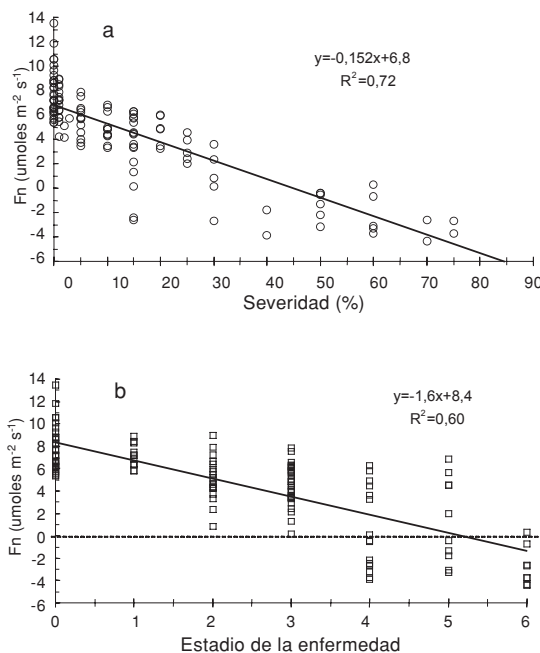


Fig. 1. Fotosíntesis neta foliar (Fn) del cv. Valery de banano sometido a una gradiente de Sigatoka negra. (a) Fn en función del porcentaje de severidad ( $Pr > F=0,001$ ). Los errores estándar de los parámetros de pendiente e intersección son 0,00843 y 0,22707, respectivamente. (b) Fn en función del estadio de la enfermedad ( $Pr > F=0,001$ ). Los errores estándar de los parámetros de pendiente e intersección son 0,12006 y 0,36654, respectivamente.

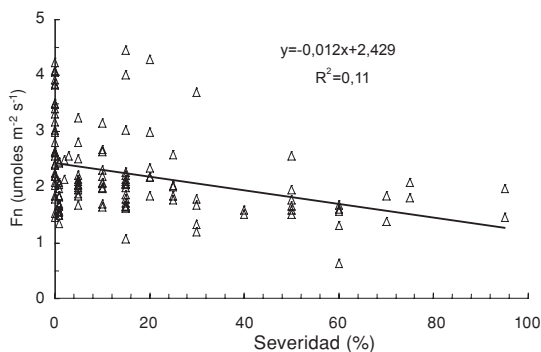


Fig. 2. Tasa transpiratoria foliar (E) del cultivar Valery en función de un gradiente de Sigatoka negra expresado como porcentaje de severidad ( $Pr > F=0,001$ ). Los errores estándar de los parámetros de la pendiente e intersección son 0,00298 y 0,08015, respectivamente.

capacidad para crear una economía del carbono favorable para su crecimiento y esporulación (Daly 1976). El patógeno logra este objetivo modificando el patrón de transporte de fotoasimilados y transformando el tejido invadido en un sumidero. Sin embargo, en este proceso de apropiación de fotoasimilados, el patógeno destruye tejido fotosintético (Meredith y Laurence 1970), provoca el aumento de la tasa respiratoria foliar (Daly 1976) y reduce la conductividad estomática (Belalcázar y Merchán 1991), todo lo cual contribuye a explicar la caída de la Fn y E observadas (Figuras 1 y 2). La menor caída relativa de E con respecto a Fn, en función del porcentaje de severidad (-0,012 y -0,152, respectivamente), sugiere que el aumento de la resistencia a la salida del agua por los estomas, como consecuencia de la presencia de las hifas del hongo, es pequeño y que la respiración inducida por el patógeno, probablemente afecta el balance de carbono y, por ende, a la Fn. Además, como consecuencia de su diferente masa, las moléculas de agua se desplazan 1,6 veces más rápido que las de CO<sub>2</sub> a través del aire (Taiz y Zeiger 2002), por lo que una reducción de la conductividad estomática siempre afectará en mayor medida a la tasa fotosintética que a la transpiratoria.

En el caso particular del banano, los cultivares con alta resistencia a *M. fijiensis* son precisamente aquellos con los genes necesarios para provocar una muerte celular programada (Craenen y Ortiz 2003), que impide al hongo apropiarse de los fotoasimilados de un área creciente de tejido foliar por colapso del transporte simplástico. La mayor respiración de los tejidos foliares también provoca una reducción de su fotosíntesis neta. Generalmente, se ha considerado que el aumento de la respiración está directamente ligado con la expresión de resistencia a enfermedades; esto debido a que los tejidos que muestran una respuesta hipersensible poseen una mayor actividad de las oxidasas y peroxidasas que liberan carbono ya fijado.

Consecuentemente, el ataque del patógeno reduce la proporción de fotoasimilados disponibles para la planta y, por ende, su crecimiento y

producción de área foliar decaen. En general, se establece para cada variedad y condición ecofisiológica un número mínimo de hojas necesarias para garantizar un rendimiento (Robinson *et al.* 1992) y una vida verde de la fruta aceptable (Stover 1980). La retroalimentación positiva que existe entre la radiación interceptada, el crecimiento del cultivo y la formación del área foliar durante el estado de crecimiento vegetativo (Blackman 1919), probablemente agrava el efecto negativo de la enfermedad sobre la economía del carbono del cultivo, al aumentarse la demanda simultánea de fotoasimilados por parte de varios sumideros.

Aparte del aumento de la resistencia al paso del CO<sub>2</sub> impuesto por la obstrucción parcial de los ostiolos con hifas del hongo (Belalcázar y Merchán 1991), la caída de la tasa fotosintética foliar en función del porcentaje de severidad de la Sigatoka negra (Figura 1), probablemente es consecuencia del aumento de la respiración foliar, debida al costo energético que representa la defensa de la planta contra el patógeno, efecto que se acentúa con la producción de estructuras reproductivas por parte del hongo (Arauz 1998). Adicionalmente, los patógenos pueden reducir la cantidad de la ribulosa bifosfato carboxilasa oxidasa (Rubisco), destruir la cadena transportadora de electrones, alterar las relaciones hídricas foliares y consumir directamente proteínas y carbohidratos (Daly 1976, Taiz y Zeiger 2002). Todo lo anterior también contribuye a explicar la caída de la Fn observada conforme aumentó la severidad de la Sigatoka negra.

Las regresiones halladas podrían resultar útiles como punto de partida en el diseño de umbrales y estrategias de monitoreo de la enfermedad. No obstante, para ello sería indispensable avanzar en la cuantificación del efecto de la severidad de la enfermedad sobre la Fn en condiciones de campo y en plantas adultas representativas de diferentes estados fenológicos. Puesto que los estudios acerca de los mecanismos de resistencia del género *Musa* a *M. fijiensis* han evidenciado correlaciones negativas entre el tiempo de incubación y la densidad estomática abaxial en poliploides, y correlaciones positivas

entre la acumulación de cera epicuticular y el tiempo de incubación tanto en híbridos diploides como poliploides (Craenen y Ortiz 2003), también convendría evaluar la tasa fotosintética foliar en una gama amplia de genotipos con diferencias en cuanto a esas características. Ese trabajo ampliaría la efectividad de un programa de mejoramiento genético que, como lo indican Simmonds y Smartt 1999, siempre debe basarse en un conocimiento profundo de la relación hospedero-patógeno.

### AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigaciones de CORBANA S.A. por el financiamiento, asesoría y apoyo logístico facilitado para la realización de esta investigación.

### LITERATURA CITADA

- ARAUZ L.F. 1998. Fitopatología; un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 467 p.
- BELALCÁZAR S., MERCHÁN V.M. 1991. Control de enfermedades, pp. 243-297. *In*: Belalcázar S, Toro JC, Jaramillo R. (eds.). El cultivo del plátano en el trópico. Instituto Colombiano Agropecuario, Colombia.
- BLACKMAN V.H. 1919. The compound interest law and plant growth. *Annals of Botany* 33: 353-360.
- CARLIER J., FOURÉ E., GAUHL F., JONES D.R., LEPOIVRE P., MOURICHON X., PASBERG-GAUHL C., ROMERO R.A. 2000. Black leaf streak, pp. 37-79. *In*: Jones D.R. (ed.). Diseases of Banana, Abacá and Enset. CAB International, Wallingford.
- CRAENEN K., ORTIZ R. 2003. Genetic improvement for a sustainable management of resistance, pp. 181-198. *In*: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- DALY J.M. 1976. Carbon balance of diseased plants: Changes in respiration, photosynthesis and translocation, pp. 450-479. *In*: Heitefuss R.; Williams P.H. (eds.). *Physiological Plant Pathology*. Springer, Berlin.
- JONES D.R. 2003. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. pp. 25-41. *In*: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- LEPOIVRE P., BUSOGORO JP., ETAME J.J., EL HADRAMI A., CARLIER J., HARELIMANA G., MOURICHON X., PANIS B., RIVEROS AS., SALLÉ G., STROSSE H., SWENNEN R. 2003. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions, pp. 151-159. *In*: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- MARIN D.H., ROMERO R.A., GUZMAN M., SUTTON T.B. 2003. Black sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. *Plant Disease* 87 (3): 208-222.
- MEREDITH D., LAURENCE J. 1970. Black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*); susceptibility of cultivars. *Tropical Agriculture* 47: 273-287.
- MOLINA G.C., KRAUSZ J.P. 1989. A Phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to black sigatoka. *Plant Disease* 73: 142-144.

- MOURICHON X., PETER D., ZAPATER M. 1987. Inoculation experimental de *Mycosphaerella fijiensis* sur de jeunes plantules de bananiers. *Fruits* 42 (4): 195-198.
- ROBINSON J.C., ANDERSON T., ECKSTEIN K. 1992. The influence of functional leaf removal at flower emergence on components yield and photosynthetic compensation in banana. *Journal of Horticultural Science* 67 (3): 403-410.
- ROMERO R.A. 2003. The spread, detection and impact of black leaf streak disease and other *Mycosphaerella* species in the 1990s, pp. 21-47. In: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.
- SIMMONDS N.W., SMARTT J. 1999. Principles of crop improvement. 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Science, Oxford. 361 p.
- STOVER R.H. 1980. Sigatoka leaf spot diseases of bananas and plantains. *Plant Disease* 64: 750-755.
- TAIZ L., ZEIGER E. 2002. Plant physiology. 3<sup>rd</sup> Ed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. 690 p.

