

BOLI COMPLEXE LA *PINUS NIGRA* ARNOLD ÎN DEFILEUL CRIȘULUI REPEDE

OVIDIU HÂRUȚA, ECATERINA FODOR, ALIN TEUȘDEA

Universitatea din Oradea, Facultatea de Protecția Mediului,
Specializarea Silvicultură, Oradea, România

Abstract

COMPLEX DISEASES IN *PINUS NIGRA* ARNOLD SITUATED ALONG CRIȘUL REPEDE RIVER GORGE

Pinus nigra Arnold stands situated along Crișul Repede River Gorge were the topic of a study conducted during 2000 and 2002. The study focuses on the causes of the decline of Austrian pine populations. The factors responsible for the decline were drought (as a favoring factor) and a complex of several fungal pathogens: *Lophodermium pinastri*, *Sphaeropsis sapinea*, *Dothistroma pini* and *Cyclaneusma minus*. Scanned images of attacked needles were digitally processed to assess the severity of the associated diseases based on the presence of lesions and fungal fructifications. The average value for the attacked foliar area was around 11% (of total foliar area), with extreme values of 22,7% and 3,44%. The associations were tested using Yule (Q) index, C-score of association and χ^2 test. The paper comments the association of the Austrian pine foliar pathogens, succession of pathogens and spatial niches' partition represented by the host.

Key words: Austrian pine decline, foliar pathogens, complex diseases, C score test

Rezumat

Arboretele de pin negru (*Pinus nigra* Arnold) din Defileul Crișului Repede au fost cercetate în intervalul 2000-2002 pentru stabilirea unor cauze ale declinului acestor arborete. Principalii factori implicați în acest fenomen au fost seceta ca factor favorizant și complexul format din mai mulți patogeni foliari: speciile *Lophodermium pinastri*, *Dothistroma pini*, *Sphaeropsis sapinea*, *Cyclaneusma minus*. Pentru evaluarea severității atacului, au fost prelucrate imaginile scanate ale acelor cu leziuni și pustule provocate de cele 4 specii. Suprafața foliară cu leziuni reprezintă în medie 11% din suprafața foliară totală, cu valori extreme de 21,4% și 3,44%. Asocierea între patogeni a fost analizată cu ajutorul testului de asociere Yule (Q), indicelui C de asociere și a testului χ^2 . Sunt comentate aspectele legate asocierea patogenilor, partiția nișei spațiale reprezentată de gazdă și aspectele succesionale în patogeneză.

Cuvinte cheie: declinul pinului negru, patogeni foliari, boli complexe, testul de asociere C

1. INTRODUCERE

Patosistemele edificate la nivelul aparatului foliar al arborilor sunt subsisteme de natură parazitară ale ecosistemului forestier (Frantzen, 2001), caracterizate de un set de atribute precum patogenitate, virulență, infecțiozitate și agresivitate ce pot fi cuantificate. În acest context există mai multe ipoteze asupra prezenței mai multor patogeni pe aceeași gazdă.

Bolile sucesionale sunt boli în care există o succesiune de patogeni astfel încât un patogen favorizează instalarea unui alt patogen în timp (Shigo, 1967). Bolile asociate sunt definite drept complexe de patogeni și patosistemele dezvoltate de prezența simultană a patogenilor pe aceeași gazdă (Turechek și Madden, 2000). Până la un punct există o suprapunere de termeni între boli asociate și declin în sensul că în ambele contexte este vorba de mai mulți patogeni eventual asociați și cu alți factori de stres pentru arbori cum sunt insectele fitofage și factorii abiotici. Dacă bolile asociate sunt considerate la nivelul fitoindividului și a populației locale, în schimb declinul este un fenomen de pierdere progresivă a homeostaziei unei populații, unei comunități de arbori, a metapopulațiilor sau a întregii specii, la nivelul întregului său areal (Contreras-Hermosilla, 2000). Bolile se manifestă ierarhic, sunt fenomene care traversează nivele de integrare de la individ la biom și modul de cercetare a acestor subsisteme parazitare care sunt patosistemele sunt diferite în funcție de scara ecologică luată în considerare. Dezvoltarea lor spațio-temporală înglobează atât aspectele sucesionale cât și asocierea simultană a patogenilor între care se stabilesc relații de competiție sau sinergice. Rezultanta acestor interacțiuni determină gradul de afectare a gazdelor. De altfel, gazda este o resursă și un habitat în același timp și reprezintă o componentă a nișei realizate a patogenului. Patogenii structurează comunități distincte sau bresle cu reguli specifice de asamblare.

Foliajul coniferelor este ținta unei mari diversități de agenți patogeni. Populațiile de leziuni dezvoltate pe ace sunt expresia unei îmbolnăviri locale sau sistemice iar numărul acestora sau extinderea pe sau în organul atacat reprezintă severitatea îmbolnăvirii (patosistemele sunt alcătuite din populații de patogeni, populații de gazde și populații de leziuni în sensul Kranz, 1974). Unitatea de bază devine astfel leziunea, iar suprafața unitară de eșantionare sau investigație devine un ac (Powell et al., 2004).

Bolile complexe care afectează foliajul pinului negru (*Pinus nigra* Arnold) constituie subiectul acestui studiu desfășurat în intervalul 2000-2002 în arborete pure din defileul Crișului Repede, pe tronsonul Bulz-Șuncuiuș. Pinul negru edifică fitocenoze specifice care au capacitatea de a proteja solul, de a îmbunătăți fertilitatea acestuia mai ales pe soluri scheletice formate pe calcare, manifestând o rezistență medie față de ger, fiind bine ancorat prin sistemul radicular, cu un rol mediogen mai bine pronunțat ca la pinul silvestru (Doniță, 1998; Augusto et al., 2002). Alături de alte specii ale genului *Pinus* spp., specia se află în declin în tot arealul (Mack et al., 2000). Studiul de față este axat pe aspecte de ecologie a patogenilor în contextul comunităților

sau breslelor pe care le formează.

Observații preliminare în arborete edificate de *Pinus nigra* în județul Bihor au relevat un fenomen de declin ale cărui cauze aparente au fost bolile complexe, atacuri secundare de insecte de scoarță în condiții de densitate mare a arborilor, seceta, invazia de buruieni concurente.

Specia de interes a fost supusă unor valuri de patogeni între 1998-2001 în condițiile generate de secetă. Analiza complexului de patogeni în arboretele studiate în defileul Crișului Repede a fost realizată pe mai multe coordonate: (i) evaluarea suprafețelor ocupate de leziunile produse de patogeni (a fost aleasă specia frecvent întâlnită pe ace *Lophodermium pinastri*) prin analiză de imagine, ca măsură a severității atacului; (ii) determinarea naturii co-prezenței speciilor de patogeni pe gazdă (la nivelul suprafeței unitare reprezentată de un ac, la nivel de arbore și la nivel de arboret). Asamblarea breslelor de patogeni se face după modele ce pot fi cuantificate și presupune fie excluderea reciprocă din habitat (segregare), fie asocierea pozitivă (agregarea) (Sanders et al., 2003). Ipoteza nulă a organizării comunității este a asamblării întâmplătoare în lipsa unei interacțiuni dintre specii precum competiția, mutualismul, favorizarea sau factorii abiotici (Gotelli, 2000). Pentru evaluarea modelului de asamblare a comunității de patogeni a fost utilizat un indice cantitativ al organizării comunității „C-score” a lui Stone și Roberts (1990). Indicele cuantifică numărul de unități ale tablei de șah imaginate ca un echivalent al prezențelor-absențelor perechilor de specii distribuite într-o suprafață de eșantionaj sau pe unitățile de eșantionaj non-dimensionale cum este o frunză. Asocierea speciilor se poate evalua cu ajutorul unei multitudini de indici de asociere calitativi și cantitativi între care indicele Yule, utilizat pentru compararea rezultatelor și în studiul de față și testul χ^2 (pentru testarea asocierii).

2. MATERIAL ȘI METODĂ

2.1. Suprafețele de studiu

Localizarea studiului a fost în defileul Crișului Repede între localitățile Bratca și Șuncuiuș, în arborete de pin negru plantate cu aproximativ 50 de ani în urmă. O suprafață de studiu este plasată pe versantul drept al văii Prometeu la Bratca, a doua suprafață este plasată pe versantul stâng al văii Prometeu, a treia suprafață este plasată pe versantul stâng al Crișului Repede la Bălnaca, iar a patra suprafață de studiu, pe versantul stâng al râului în localitatea Șuncuiuș (fig. 1). Suprafețele de la Bratca aparțin de U.P. III Remeți, O.S. Remeți, în timp ce suprafețele de la Bălnaca și Șuncuiuș aparțin de U.P. V Dumbrava, O.S. Aleșd. În U.P. II Remeți temperatura medie anuală este de 8°C, în zona de dealuri în care se află arboretele de pin negru studiate (pe Valea Iadului și Valea Satului, afluenți ai Crișului Repede), iar perioada de vegetație durează 160 de zile. Precitațiile medii anuale se situează între 800 și 1000 mm. Tipul de stațiune

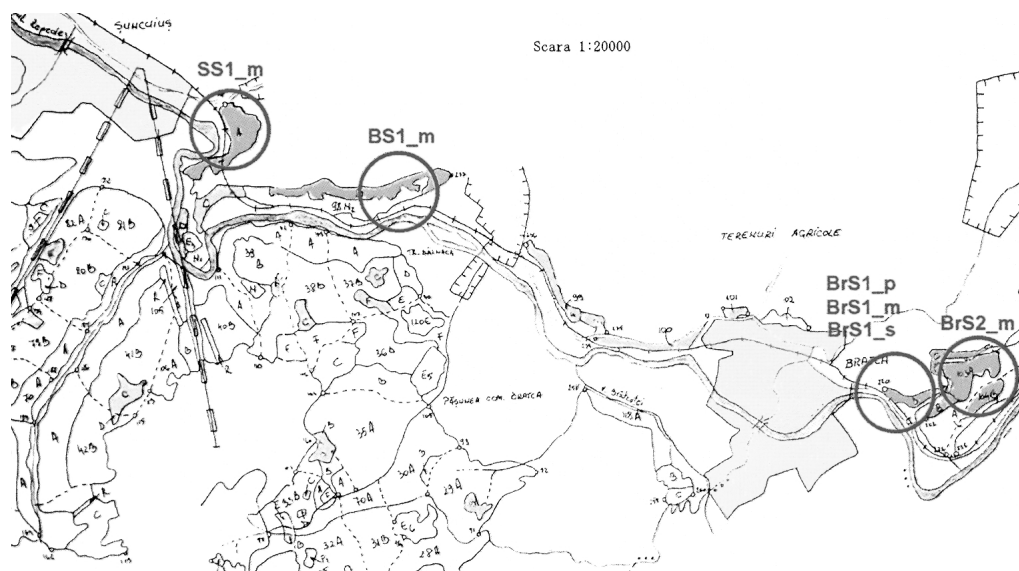


Fig. 1. Harta localizării suprafețelor de probă, cu arborete de pin negru (OS. Remeți și O.S. Aleșd).
Map of the *Pinus nigra* stands location along Crișul Repede Gorge

În care a fost introdus pinul negru este tipul montan de amestecuri Bi cu *Asperula-Dentaria*. Ca tipuri de sol domină solurile brune eumezobazice litice (eutricambosol litic) și rendzina, subtipul litic. Arboretele de pin negru ocupă 18 % din suprafața împădurită și au rol de protecție. În ceea ce privește U.P. V Dumbrava, aceasta este situată în zonă colinară din bazinul Crișului Repede. Temperatura medie anuală este de 10°C, precipitațiile medii anuale se situează în jurul valorii de 658 mm, tipul de stațiune în care a fost introdus pinul negru fiind deluros de fâgete de limită inferioară Bi, rendzinic, deluros de fâgete Bm, brun edafic mijlociu cu *Asperula-Asarum*. Ca soluri predomină solul brun eumezobazic (eutricambosol) și rendzina, subtipul litic. Pinul a fost plantat în fâșii de protecție precum și în rezervația Academiei Române de la Șuncuiș. 41% din arboretele de pin au o consistență de peste 0.8 și sunt caracterizate de un grad mare de fragmentare.

2.2. Studiul comunității de patogeni

Au fost identificați arbori cu grade diferite de afectare (intensitate) în funcție de un examen vizual pe următoarele categorii: slabă, medie și puternică, câte trei arbori pe arboret, pentru fiecare categorie de afectare. S-au prelevat la întâmplare, din treimea inferioară a coroanei (de regulă partea cea mai afectată de leziuni) câte 50 de ace/arbore (în total 900 de ace). Acele au fost incubate în condiții sterile în camere umede pentru stimularea fructificării patogenilor. Identificarea s-a făcut prin examen microscopic. Datele de prezență/absență pe fiecare ac au fost înregistrate în matrici. Pentru evaluarea afectării la nivel de arboret au fost cumulate cele trei probe pe fiecare din suprafețele de studiu (în total 150 de ace/suprafață de studiu).

2.3. Estimarea severității atacului

În funcție de suprafața ocupată de leziuni pe ace în cazul îmbolnăvirii cu *Lophodermium pinastri* a fost realizată pe un eșantion de 23 de ace scanate la 900 DPI, cu ajutorul unui scanner Mustek 1200CP+. Imaginile obținute au fost prelucrate cu ajutorul unui soft pentru analiza de imagine și s-a calculat aria ocupată de leziuni (foto 1).



Foto. 1. Histerotecii de *Lophodermium pinastri* pe un ac de *Pinus nigra*. Imagine neprelucrată și prelucrată.
Lophodermium pinastri hysterothecia on a *Pinus nigra* needle (unprocessed and processed image)

2.4. Estimarea asocierii dintre specii

Au fost utilizați mai mulți indici de asociere: indicele Yule, testul χ^2 și indicele de comunitate *C-score*. Indicele *C-score* a fost calculat cu ajutorul programului EcoSim (Gotelli și Eastminger, 2001) și face parte din categoria modelelor aleatoare sau nule prin care se compară valoarea unei metrici (în cazul de față a indicelui *C*) cu valoarea derivată din simularea unor matrici care conțin același număr de coloane și rânduri ca matricea cu datele reale de observație (Manly și Sanderson, 2002). Algoritmul programului constă în generarea iterativă a unui număr mare de comunități posibile pe baza matricii de prezență-absență rezultată din observațiile de teren. Analiza propriu-zisă se desfășoară pe submatrice pătratice de tip:

$$\begin{array}{cc} 01 & 10 \\ 10 & 01 \end{array}$$

în care 0 reprezintă absența speciei și 1 prezența.

Indicele *C* este numărul mediu de submatrice în care speciile investigate coexistă. Pentru fiecare pereche de submatrice se calculează $(R_i - S)(R_j - S)$ în care R_i este numărul de prezențe ale speciei *i* și R_j ale speciei *j*, iar *S* este numărul de unități de probă. Cum ipoteza nulă presupune că asocierea dintre specii este aleatoare, programul generează pornind de la datele reale 5000 de permutări (algoritmul face parte din categoria testelor de randomizare) care corespund astfel variantelor modelului nul. Dacă valoarea calculată a indicelui pe datele reale este mai mare decât media indicilor rezultați din permutări speciile segregă, iar dacă această valoare este mai mică, speciile se asociază. Pentru standardizarea rezultatelor, programul calculează un indice *C*

standardizat în funcție de mărimea probei, *SES* (Standardized Effect Size) pentru fiecare matrice. Este în egală măsură o modalitate de testare a semnificației, deoarece se consideră că 95% din valorile *SES* se încadrează în intervalul [-2; 2], presupunând că datele standardizate au o distribuție normală. Astfel, valorile indicelui *C* calculate pe datele de observație reflectă o distribuție întâmplătoare a speciilor dacă se încadrează în intervalul [-2; 2], o segregare a speciilor dacă valorile sunt mai mari decât 2 și o asociere a speciilor dacă valorile sunt mai mici decât -2. Indicele *C* standardizat se calculează conform formulei:

$$\text{Indice } C \text{ standardizat} = (I_{obs} - I_{sim})/S_{sim}$$

unde: I_{obs} reprezintă valoarea indicelui *C* calculat pe datele de observație,

I_{sim} reprezintă valoarea indicelui *C* rezultat din simulări și

S_{sim} este abaterea standard a celor 5000 de iterații ale simulării.

Indicele *C* a fost astfel calculat pentru perechi de specii pe probe cumulate pe arboret, probabilitățile de prezență concomitentă a mai mult de două specii fiind foarte mici la o primă estimare. S-a calculat și pe câte un arbore ales la întâmplare din arborii eșantionați indicele *C* pentru asocierea tuturor celor patru specii de patogeni, pentru a determina dacă există o asamblare a comunității de patogeni la nivel de arbore individual.

Indicele Yule face parte din categoria indicilor simetrici de similaritate și asociere folosind date binare. Coeficientul se construiește pornind de la o matrice 2x2 în care sunt incluse prezențele comune ale speciilor, absențele comune și prezențele alternative ale fiecărei specii în diferitele locații.

$$S = \frac{a \cdot d - b \cdot c}{a \cdot d + b \cdot c}$$

unde:

a reprezintă numărul de locații în care sunt prezente ambele specii

b reprezintă numărul de locații în care se întâlnește numai specia 1

c reprezintă numărul de locații în care se întâlnește specia 2, iar

d reprezintă numărul de locații în care nu se întâlnesc cele două specii.

Indicele Yule a fost utilizat pentru o primă estimare a asocierii speciilor de patogeni pe gazde și în locațiile alese. Indicele ia valori în intervalul [-1;1]. Testul χ^2 a fost de asemenea aplicat ca test general de asociere a datelor de observație.

Testele de asociere au fost aplicate la diferite nivele (arbore individual, arboret, nivel de peisaj considerând tronsonul ales un tip definit de peisaj) pentru a decela nivelul la care se poate considera fenomenul de asociere a patogenilor și care este natura acestei asocieri.

Evaluarea statistică a variației concomitente a frecvențelor relative ale speciilor de patogeni în diferite locații a fost făcută cu ajutorul testului ANOVA a cărei semnificație a fost verificată cu testul Tukey. Verificarea omogenității varianțelor s-a făcut prin testul Bartlett. Datele inițiale nefiind date continue, au fost transformate prin funcția: $\sqrt{2\arcsin x_i}$ (Giurgiu, 1972). Evaluarea variabilității frecvențelor pe specii în toate locațiile a fost estimată cu ajutorul coeficientului de variație.

3. REZULTATE

Speciile patogene identificate ca fiind asociate pe acele de *Pinus nigra* sunt prezentate în continuare.

1. *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton - specie cosmopolită care atacă 33 de specii de pini și produce o îmbolnăvire sistemică în arealul natural al pinilor. În Europa este o specie endemică care a provocat epidemii recente în centrul și sudul continentului, în plantații. Patogenul, considerat ca fiind endofit patogen și necrotrof, se instalează pe gazde expuse în prealabil stresurilor abiotice și biotice (Burgess et al., 2001). Atacă pinii ajunși la fructificație dar și puieti în pepiniere cărora le produce putregai la baza tulpinii (Stanosz et. al, 2005). Determină dezvoltarea unor epidemii severe pe fondul unor stresuri abiotice (Blodgett et al., 2005). Simptomele sunt multiple: uscarea ramurilor în treimea inferioară a coroanei, colorarea lemnului în albastru, cancere ale ramurilor, mortalitate la nivelul rădăcinilor (Harrington și Wingfield, 2000). O parte din leziuni apar pe ace și conuri în care se dezvoltă fructificațiile sub forma unor pustule negre. Specia este saprofită în litieră iar spori sunt propagați de vânt și de picăturile de apă.

2. *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter - specie cosmopolită, afectează *Pinus sylvestris*, *P. nigra* și *P. mugo* la care determină căderea prematură a acelor, fiind un patogen oportunist și o specie endofită (Sieber et al., 1999). Îmbolnăvirea este locală, la nivelul acelor, în toată coroana. Infecțiile sunt favorizate de ploii. Leziunile apar ca benzi paralele cu nervurile în care se formează histerotecii. La deschiderea acestora, sunt expuse mase ohracee de spori iar marginea fructificației este franjurată din cauza ruperii epidermei.

3. *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet (teleo: *Mycosphaerella pini* E. Rostrup apud Munk) - specie cosmopolită care afectează pinii. Speciile susceptibile de gazde sunt *Pinus nigra*, *P. radiata*, *P. ponderosa* la care determină căderea prematură a acelor, iar în timpul epidemiilor poate infecta de asemenea specia *Larix decidua*. Specia are o răspândire largă în Eurasia, Africa, Oceania, cele două Americi, îmbolnăvirile cele mai severe producându-se la *Pinus radiata*, în emisfera sudică, unde a fost introdusă ca specie de plantații (Lang, 1987). Îmbolnăvirea este locală și afectează acele din treimea inferioară a coroanei. Infecția se produce la nivelul stomatelor; pe ace apar benzi roșcate care le strangulează, astfel încât vârful se brunifică iar restul acelor se colorează în galben. Aspectul general al foliajului este marcat de înroșirea și căderea masivă a

acelor de pe ramurile din treimea inferioară. Fructificațiile se formează în leziunile locale produse în situsurile de infecție (Barnes et al., 2004). Sporii sunt diseminați de vânt și de picăturile de apă din ceață. Factorul abiotic important de inducere a bolii este seceta.

4. *Lophodermium pinastri* (Schad.) Chev.:ana. *Leptostroma pinastri* Desm.) - specie cosmopolită, atacă pinii, din care speciile susceptibile sunt *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, *P. cembra*, *P. mugo* la care determină căderea prematură a acelor. Este considerată o specie slab patogenă. Îmbolnăvirea este locală, la nivelul foliajului care este afectat în treimea inferioară a coroanei. Acesta capătă un aspect marmorat. De la producerea infecției până la apariția leziunilor foliare trec doi ani (Choi și Simpson, 1991). Histerotecile apar pe acele căzute sau uscate și rămase în coroană. Leziunile au un aspect caracteristic prin prezența histerotecilor negre flancate de benzi negre. Diseminarea sporilor are loc cu ajutorul vântului și a picăturilor de ploaie.

Analiza frecvențelor relative pe arbori, pe specii de patogeni, în fiecare suprafață de studiu arată că există o variație mare chiar la nivelul arborilor studiați în cadrul aceleiași suprafețe de probă. Coeficienții de variație, calculați cumulativ pentru toate locațiile în care s-au eșantionat arbori, sunt revelatori în ceea ce privește nivelul mare de variație: *Lophodermium pinastri* - 65%, *Dothistroma septosporum* - 64,49%, *Sphaeropsis sapinea* - 85,12%, *Cyclaneusma minus* - 65,14%.

Repartiția frecvențelor și a asocierii pe perechi de patogeni arată că situațiile cele mai des întâlnite sunt de prezență alternativă a speciilor sau de absență a ambelor specii analizate pe loturile de ace eșantionate. Prin cumularea observațiilor pe câte trei arbori aparținând celor trei grade de afectare din fiecare suprafață de probă și pe specii de patogeni, a rezultat o imagine diferită a dominanțelor numerice în funcție de suprafața de studiu (fig. 1).

1. Specia *Dothistroma septosporum*, patogen agresiv, realizează frecvențele cele mai mari în două suprafețe (conform fig. 1), Bratca suprafața 2 cu 90% de prezențe și Bălnaca suprafața 1 cu 77% de prezențe, ambele suprafețe fiind mediu afectate de îmbolnăviri ale foliajului.

2. *Sphaeropsis sapinea*, patogen agresiv și sistemic, nu domină breasla de patogeni foliari în nici o locație, înregistrând frecvențele cele mai mari la Bratca, în suprafața 1 de probă.

3. *Lophodermium pinastri*, patogen oportunist slab, domină în arboretele de la Șuncuiuș cu valori de 49% din totalul acelor investigate.

4. *Cyclaneusma minus* este o componentă constantă a breslei de patogeni, valorile cele mai mari fiind înregistrate la Bratca.

După transformare, datele de frecvență relativă a patogenilor au fost utilizate pentru evaluarea diferențelor prin testul ANOVA cu o verificare prealabilă a omogenității varianțelor (testul Bartlett) și o verificare ulterioară a semnificației rezultatelor prin testul Tukey (tabelul 1). Se constată că pentru specia *Cyclaneusma minus* nu există diferențe semnificative în ceea ce privește frecvențele între suprafețele de studiu, pentru specia *Dothistroma septosporum*, de asemenea nu se constată diferențe semnificative, pentru specia *Lophodermium pinastri*, apar diferențe

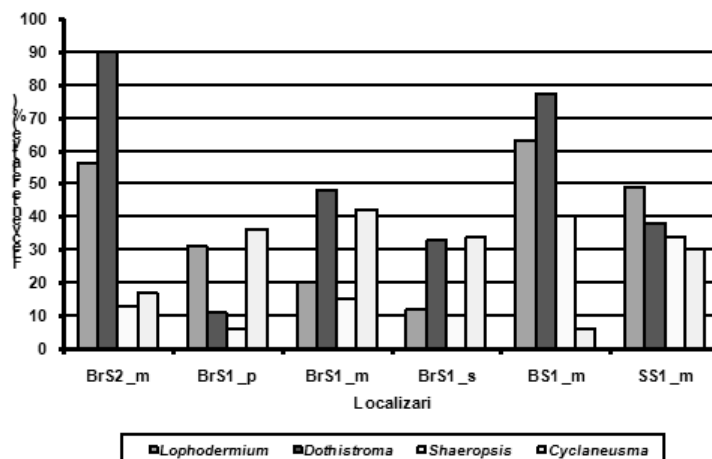


Fig. 2. Repartiția frecvențelor relative ale speciilor *Lophodermium pinastri*, *Dothistroma septospora*, *Sphaeropsis sapinea*, *Cyclaneusma minus* pe valori cumulate
Cumulated relative frequencies of *Lophodermium pinastri*, *Dothistroma septosporum*, *Sphaeropsis sapinea*, *Cyclaneusma minus* on *Pinus nigra* in stands located along Crișul Repede Gorge

Tabelul 1. Rezultatele ANOVA și a testelor Bartlett și Tukey asupra frecvențelor relative ale speciilor *Lophodermium pinastri*, *Sphaeropsis sapinea*, *Dothistroma septospora* și *Cyclaneusma minus* (arbori moderat afectați în 4 localizări din defileul Crișului Repede)
Lophodermium pinastri, *Sphaeropsis sapinea*, *Dothistroma septospora* and *Cyclaneusma minus* relative frequencies comparison among stands situated along Crișul Repede Gorge, ANOVA results (Bartlett test of variance homogeneity, Tukey significance test)

Specia	ANOVA	P	Bartlett	Tukey
<i>Cyclaneusma minus</i>	F _{obs} =0,28 F _{0,05} =4,0661	0,05	N.S.	Nu există diferențe între localizări
<i>Dothistroma septospora</i>	F _{obs} =4,13 F _{0,05} =4,0661	0,05	M.S. P=0,04	Nu există diferențe semnificative între localizări
<i>Lophodermium pinastri</i>	F _{obs} =4,23 F _{0,05} =4,0661	0,05	N.S.	Diferențe semnificative există între localizarea Bratca și Bălnaca
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	F _{obs} =2,81 F _{0,05} =4,0661	0,05	N.S.	Nu există diferențe între localizări

semnificative între suprafețele de studiu de la Bălnaca și de la Bratca ($p < 0,05$), iar în ceea ce privește specia *Sphaeropsis sapinea*, nu există diferențe semnificative între suprafețele de studiu.

Distribuția pe suprafețe de studiu a valorilor standardizate ale C-score (*SES*) pe perechi de specii relevă situații interesante (tabelul 2).

1. Co-prezența de specii *Lophodermium pinastri* și *Dothistroma septosporum* relevă agregare, deci o asociere pozitivă pe aceeași unitate (acul de pin negru) într-un singur caz, în rest asocierea fiind întâmplătoare

2. Co-prezența speciilor *Lophodermium pinastri* și *Cyclaneusma minus* are tendință de agregare în trei locații, în rest asocierea lor fiind întâmplătoare

Tabelul 2. Valorile indicelui C standardizat pe combinații a câte două specii în toate arboretele de *Pinus nigra* studiate (2001)
Standardized effect size of C score on binary pathogen species combinations, in all studied *Pinus nigra* stands.

Combinatii de specii	Localizări					
	BrS2_m	BrS1_p	BrS1_m	BrS1_s	BS1_m	SS1_m
<i>Lophodermium</i> x <i>Dothistroma</i>	-2.33	-1.2	1.72	0.45	1.98	0.43
<i>Lophodermium</i> x <i>Cyclaneusma</i>	-3.46	-3.56	-1.98	-1.41	-3.1	-1.86
<i>Lophodermium</i> x <i>Sphaeropsis</i>	-3.88	3.32	0.06	-1.08	-4.71	2.51
<i>Dothistroma</i> x <i>Sphaeropsis</i>	-3.11	-1.71	6.51	2.78	-4.57	2.96
<i>Dothistroma</i> x <i>Cyclaneusma</i>	-4.12	0.38	-0.46	-2	2.75	1.22
<i>Sphaeropsis</i> x <i>Cyclaneusma</i>	0.24	-3.07	1.86	-0.13	-4.21	3.18

3. Co-prezența speciilor *Lophodermium pinastri* și *Sphaeropsis sapinea* manifestă tendințe opuse, de agregare în 2 locații, de segregare în 2 locații și de asociere întâmplătoare în restul locațiilor

4. Co-prezența speciilor *Dothistroma septosporum* și *Sphaeropsis sapinea* este de asemenea paradoxală, deoarece manifestă segregare în trei locații, agregare în 2 locații și o asociere întâmplătoare într-o locație

5. Co-prezența speciilor *Dothistroma septosporum* și *Cyclaneusma minus* manifestă o tendință de agregare în două locații și segregare într-o locație

6. Co-prezența speciilor *Dothistroma septosporum* și *Cyclaneusma minus* manifestă agregare în două locații și segregare într-o locație

Analiza la nivel de arbore individual al asocierii celor patru specii de patogeni oferă un tablou complet diferit în raport cu asocierea dintre perechi de specii: speciile fie sunt prezente pe același arbore întâmplător, fie segregă după cum se observă din tabelul 3.

Rezultă că cele patru specii se assemblează într-o breaslă de patogeni asociați fie întâmplător, fie se resping reciproc la nivelul arborelui în sensul că are loc o colonizare exclusivă la nivelul unității de resursă care este acul.

Calcularea valorilor pentru testul de asociere Q și testul χ^2 pe câte trei arbori în arboretele studiate a relevat că domină asocierile întâmplătoare, fapt relevat și de testul C . Considerând ca valori semnificative pentru asociere pozitivă sau negativă, valorile absolute peste 0,7, au fost identificate 10% agregări ale perechilor de specii și 8% segregări ale speciilor de patogeni (tabelele 4-7). Comparând cu valorile indicelui C standardizat pentru localizările din U.P. II Remeți, au fost identificate în 11% din cazuri neconcordanțe între cele trei teste, în timp ce pe setul total de date, între testul Q și χ^2 sunt 8% neconcordanțe. Considerăm că nivelul acestor neconcordanțe nu este semnificativ și se datorează mai degrabă unor erori de procesare a datelor inițiale decât unor erori metodologice care țin de aplicarea corectă a testelor. Se remarcă fenomenul comportamentului diferit al arborilor din același arboret în ceea ce privește interpretarea prezenței concomitente a mai multor specii de patogeni: în timp ce pe un arbore calculele arată o tendință de asociere sau de segregare a patogenilor, pe alți arbori asocierea este întâmplătoare.

Tablelul 3. Valorile indicelui C standardizat de asociere a speciilor de patogeni foliari, *Lophodermium pinastri*, *Dothistroma septosporum*, *Sphaeropsis sapinea* și *Cyclaneusma minus* pe câte un arbore, în arborete de *Pinus nigra*, în defileul Crișului Repede, 2001
Standardized effect size of C score of *Lophodermium pinastri*, *Sphaeropsis sapinea*, *Dothistroma septospora* and *Cyclaneusma minus* calculated for an individual tree selected from every *Pinus nigra* stand situated along Crișul Repede Gorge, 2001

Suprafață de eșantionare	Valori ale indicelui C standardizat
Bratca, S1, slab afectat	0,62 (asociere întâmplătoare)
Bratca, S1, mediu afectat	2,96 (speciile segregă pe aceeași gazdă)
Bratca, S1, puternic afectat	-0,79 (asociere întâmplătoare)
Bratca, S2	2,18 (speciile segregă pe aceeași gazdă)
Bălnaca	5,61 (speciile segregă pe aceeași gazdă)
Șuncuiș	-0,89 (asociere întâmplătoare)

Severitatea atacului de *Lophodermium pinastri* estimată prin analiză de imagine arată că în situațiile analizate, media suprafeței foliare unitare ocupate de leziuni și fructificațiile patogenului este de 11,06+/-4,76%, suprafața minimă este de 3,44% iar suprafața maximă este de 12,6%. Numărul mic de probe nu permite o analiză a repartiției frecvențelor valorilor de acoperire cu leziuni a acelor, cu toate acestea putem estima pe baza datelor că severitatea atacului este relativ mare prin suprafața fotosintetică inactivată de leziuni.

4. DISCUȚII

Acele de conifere sunt unități de resursă pe care se dezvoltă și fructifică patogenii foliari (Gourbière și Debouzie, 2003), și reprezintă primul nivel al scării ecologice la care se definește un patosistem. Unitățile infecțioase de bază din punct de vedere epidemiologic sunt leziunile și fructificațiile patogenilor. O observație empirică a scos în evidență că fiecare leziune parentală produce 10 leziuni fiice în condiții ideale (Powell et al., 2004). Modul în care sunt colonizate cu patogeni acele, arborii, arboretele variază în timp și spațiu. Analiza co-prezenței speciilor unei bresle de patogeni așa cum sunt observați la un moment dat trebuie să țină seama de succesiunea în timp acestora. De exemplu, *Lophodermium pinastri*, un patogen slab, și *Cyclaneusma minus*, o specie endofită potențial patogenă se asociază pe diferite specii de Pinus, dar produc fructificații în momente diferite (Sieber et al., 1999; Gourbière și Debouzie, 2003).

În cazurile prezentate în lucrarea de față, asamblarea comunității de patogeni foliari comportă mai multe discuții. Modul de asamblare la scara unității, deci a acului, este diferită față de regulile de asamblare la nivelul arborilor și arboretelor și acest fapt reiese din dificultatea interpretării datelor de frecvență și ale aplicării indicilor și testelor de asociere. O comunitate structurată ar arăta tendințe clare de agregare sau de segregare a speciilor în unitățile de probă. O comunitate în curs de constituire sau tranzitorie așa cum sunt majoritatea patosistemelor manifestă o asamblare întâmplătoare pe unitățile de eșantionaj din cauza unei succesiuni de patogeni sau din

cauza unei noi invazii. Pătrunderea de noi specii într-o comunitate constituită conduce la o asamblare întâmplătoare a speciilor (Sanders et al., 2003). Această pătrundere, în majoritatea cazurilor, pe calea aerului, dă un caracter întâmplător colonizării indivizilor - gazde în arborete. Fenomenul de excludere sau de partiționare a resursei în cazul co-prezenței la nivelul acului depinde în afară de pura întâmplare și de succesiunea venirii patogenilor la situsul de infecție, de poziția pe ramură, în coroană, de particularitățile morfo-anatomice ale leziunii.

Tabelul 4. Valori calculate pe combinația *Lophodermium* - *Dothistroma* pe *Pinus nigra* în toate localizările din defileul Crișului Repede, ale indicelui de asociere Yule și ale testului χ^2 , la câte trei arbori
 Calculated values of Yule association index and Chi squared test, on associations between *Lophodermium* - *Dothistroma* on *Pinus nigra*, in stands located along Crișul Repede Gorge, on three individual trees per stand

	Localizare	Yule (Q)	Hi ² (χ^2)	P	Observații
<i>Lophodermium</i> - <i>Dothistroma</i>	BrS2_m	0.53	2.06	0.15	marginal semnificativ
		-0.50	1.39	0.24	nesemnificativ
		-0.28	0.21	0.65	nesemnificativ
	BrS1_p	0.36	0.14	0.71	nesemnificativ
		0.13	0.10	0.75	nesemnificativ
		0.33	0.10	0.75	nesemnificativ
	BrS1_m	-0.89	13.58	0.0002	foarte semnificativ
		-0.04	0.003	0.95	nesemnificativ
		0.09	0.04	0.84	nesemnificativ
	BrS1_s	-0.65	3.82	0.05	nesemnificativ
		-0.50	0.92	0.34	nesemnificativ
		0.55	1.04	0.31	nesemnificativ
	BS1_m	-0.31	0.7	0.39	nesemnificativ
		-0.78	4.77	0.02	semnificativ
		-0.21	0.35	0.55	nesemnificativ
SS1_m	-0.06	0.03	0.86	nesemnificativ	
	-0.14	0.23	0.63	nesemnificativ	
	0.43	1.88	0.17	nesemnificativ	

Tabelul 5. Valori calculate pe combinația *Lophodermium* - *Sphaeropsis* pe *Pinus nigra* în toate localizările din defileul Crișului Repede, ale indicelui de asociere Yule și ale testului χ^2 , la câte trei arbori.
 Calculated values of Yule association index and Chi squared test, on associations between *Lophodermium* - *Sphaeropsis* on *Pinus nigra*, in stands located along Crișul Repede Gorge, on three individual trees per stand.

	Localizare	Yule (Q)	Hi ² (χ^2)	P	Observații
<i>Lophodermium</i> - <i>Sphaeropsis</i>	BrS2_m	-0.45	1.05	0.31	nesemnificativ
		0.80	4.67	0.03	semnificativ
		0.42	2.06	0.15	nesemnificativ
	BrS1_p	-0.22	0.22	0.64	nesemnificativ
		-0.31	0.94	0.33	nesemnificativ
		-0.38	0.74	0.39	nesemnificativ
	BrS1_m	0.24	0.15	0.70	nesemnificativ
		-0.08	0.01	0.91	nesemnificativ
		0.11	0.14	0.71	nesemnificativ
	BrS1_s	-0.50	1.05	0.31	nesemnificativ
		-0.09	0.03	0.87	nesemnificativ
		0.81	4.76	0.03	semnificativ
	BS1_m	0,5	0.86	0.13	nesemnificativ
		-0.14	0.13	0.71	nesemnificativ
		-0.33	0.23	0.62	nesemnificativ
SS1_m	-0.52	3.25	0.07	nesemnificativ	
	-0.67	5.43	0.02	semnificativ	
	-0.06	0.03	0.86	nesemnificativ	

Tablelul 6. Valori calculate pe combinația *Lophodermium - Cyclaneusma* pe *Pinus nigra* în toate localizările din defileul Crișului Repede, ale indicelui de asociere Yule și ale testului χ^2 , la câte trei arbori.
Calculated values of Yule association index and Chi squared test, on associations between *Lophodermium - Cyclaneusma* on *Pinus nigra*, in stands located along Crișul Repede, on three individual trees per stand.

	Localizare	Yule (Q)	Hi2 (χ^2)	P	Observații
<i>Lophodermium - Cyclaneusma</i>	BrS2_m	-0.09	0.02	0.88	ne semnificativ
		0.85	6.63	0.01	semnificativ
	BrS1_p	-0.32	0.97	0.33	ne semnificativ
		0.79	2.85	0.09	ne semnificativ
	BrS1_m	0.42	1.20	0.27	ne semnificativ
		-0.17	0.05	0.82	ne semnificativ
	BrS1_s	0.65	4.63	0.03	semnificativ
		0.79	2.85	0.09	ne semnificativ
	BS1_m	0.12	0.15	0.70	ne semnificativ
		0.18	0.22	0.63	ne semnificativ
	SS1_m	0.55	1.08	0.29	ne semnificativ
		0.87	4.99	0.02	semnificativ
		0.78	11.45	0.0007	foarte semnificativ
		0.5	2.43	0.11	ne semnificativ
		0.15	0.23	0.63	ne semnificativ
	0.70	2.92	0.09	ne semnificativ	
	0.62	5.36	0.02	semnificativ	
	-0.20	0.51	0.47	ne semnificativ	

Tablelul 7. Valori calculate pe combinația *Dothistroma - Sphaeropsis* pe *Pinus nigra* în toate localizările din defileul Crișului Repede, ale indicelui de asociere Yule și ale testului χ^2 , la câte trei arbori.
Calculated values of Yule association index and Chi squared test, on associations between *Dothistroma - Sphaeropsis* on *Pinus nigra*, in stands located along Crișul Repede Gorge, on three individual trees per stand.

	Localizare	Yule (Q)	Hi2 (χ^2)	P	Observații
<i>Dothistroma - Sphaeropsis</i>	BrS2_m	-0.91	12.12	0.0004	foarte semnificativ
		-0.44	0.62	0.43	ne semnificativ
	BrS1_p	-0.65	1.76	0.18	ne semnificativ
		-0.22	0.22	0.64	ne semnificativ
	BrS1_m	-0.25	0.50	0.48	ne semnificativ
		0.62	1.38	0.24	ne semnificativ
	BrS1_s	-0.48	0.71	0.40	ne semnificativ
		-0.82	13.61	0.0002	foarte semnificativ
	BS1_m	-0.67	2.28	0.13	ne semnificativ
		-0.82	5.86	0.02	semnificativ
	SS1_m	-0.58	5.06	0.02	semnificativ
		-0.24	0.18	0.67	ne semnificativ
		0.50	0.22	0.64	ne semnificativ
		0.03	0.004	0.94	ne semnificativ
		-0.50	3.23	0.07	ne semnificativ
	-0.45	1.39	0.24	ne semnificativ	
	-0.76	10.31	0.0001	foarte semnificativ	
	-0.45	1.39	0.24	ne semnificativ	

Un exemplu este formarea de bariere în ac în dreptul benzilor la *Lophodermium pinastri* (Frankland, 1998), care blochează situsurile infecțioase. Se pot asocia pe perechi de specii dar prezența a mai mult de două specii pe un ac este excepțională sau este urmarea unui proces succesional.

Din speciile identificate, *Dothistroma septosporum* și *Sphaeropsis sapinea* reprezintă patogeni agresivi cu manifestare diferită: unul este sistemic, celălalt este

patogen local al foliajului. Se poate considera apariția lor în arborete ca urmare a unui proces epidemic. *Lophodermium pinastri* și *Cyclaneusma minus* sunt specii oportuniste și endofitice, cu o istorie prealabilă apariției speciilor de mai sus. Manifestarea lor ca patogeni asociați într-un complex patologic a fost favorizată de densitatea mare și secetele recurente ca factori de stres în arboretele de pin negru studiate.

La nivelul arboretului, comportamentul speciilor de patogeni în raport cu gazdele este influențat de stațiune, de condițiile climatice și modul în care acestea sensibilizează gazdele, de factori biotici din care competiția dintre arbori determinată de densitate pare să joace rolul cel mai important, cel puțin în arboretele în care nu se intervine (Reich et al., 1996), precum și de capacitatea de a scăpa de infecție în mod aleatoriu a arborilor (Slusarenko et al., 2004).

La nivelul peisajului sunt importante elementele de topografie, gradul de fragmentare al arboretelor, lacunaritatea și conectivitatea peisajului (Plotnik et al., 1996). Astfel, arboretele fragmentate din defileul Crișului Repede sunt dispuse în lungul unui culoar natural care direcționează circulația sporilor, favorizând astfel extinderea infecțiilor, fapt confirmat de afectarea cu cei patru patogeni a tuturor arboretelor studiate.

Datorită naturii modulare a arborilor, fiecare ramură poate fi privită ca o unitate de rang superior a patosistemului, relativ autonomă. Această populație de module este colonizată de patogen după un model diferit comparativ cu acele: există o componentă aleatorie căreia i se adaugă depunerea sporilor din leziunile deja existente pe alte ace și ramuri. Această depunere depinde de intensitatea sporulării, densitatea leziunilor și aria ocupată de acestea (Powell et al., 2004).

Analiza asocierii cu ajutorul indicelui C s-a dovedit mai precisă în ceea ce privește evaluarea semnificației co-prezențelor și a caracterului lor: întâmplător, agregat sau segregat. Alți indici de asociere sunt sensibili la absențele conjugate în unitățile de probă și ca atare gradul de precizie a evaluării scade. Indicele C este de altfel recomandat pentru studiul invaziilor biotice în care elementul aleator domină procesul de colonizare (Sanders et al., 2003). Concordanța relativ ridicată a rezultatelor celor trei categorii de teste arată că o informație completă și verificată ca semnificație se obține folosind mai multe teste pentru studierea fenomenului asamblării breslelor sau comunităților diferitelor organisme.

5. CONCLUZII

Asocierea patogenilor care formează un patosistem complex sau o breaslă de patogeni este diferită în funcție de scara ecologică la care se studiază fenomenul. La nivelul unității de resursă care este acul de pin, asocierea este parțial întâmplătoare, parțial dictată de particularități de exploatare a situsurilor infecțioase care permit asocierea prin agregare a unor specii datorită unei partiții spațiale sau temporale a resursei, sau a unor caracteristici ale procesului patogen. De exemplu, *Dothistroma septospora* este un patogen foliar local, iar *Sphaeropsis sapinea* este un patogen

sistemic cu o parte din simptome și leziuni manifestate la nivel foliar care exploatează diferențiat resursa, ca atare pot apare pe unele ace concomitent.

La nivelul individului diferite zone ale coroanei sunt diferențiat colonizate de patogeni care astfel își partiționează spațial arborele. Modul în care sunt afectați arborii variază mult la nivelul arboretului.

La nivelul arboretului apare un mozaic de arbori cu grade diferite de afectare și cu proporții diferite de colonizare de către cei patru patogeni.

La nivelul peisajului, arboretele sunt expuse colonizării cu patogeni conform configurației peisajului, coridoarele reprezentate de calea ferată și cursul de apă fiind favorabile propagării sporilor patogenilor cu ajutorul vântului.

Succesional, *Dothistroma septosporum* pare a fi pătruns înaintea speciei *Sphaeropsis sapinea* observație confirmată de un coeficient de variație inferior celui calculat pentru *Sphaeropsis sapinea*.

Fenomenul de declin conturat în anii din urmă la nivelul pinetelor din întreg județul Bihor, constatat și în alte arborete decât cele prezentate în lucrarea de față, se află în regres, aspectul general al arboretelor fiind mult mai bun în ultimele două sezoane de vegetație ceea ce confirmă ipoteza favorizării declinului de secetă.

BIBLIOGRAFIE

- AUGUSTO, L., RANGER, J., BINKLEY, D., ROTHE, A., 2002. Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Ann. For. Sci.* 59: 233-253.
- BARNES, I., CROUS, P.W., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J., 2004. Multigenes phylogenies reveal that red band needle blight of Pinus is caused by two distinct species of *Dothistroma*: *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology*, 50: 551-565.
- BLODGETT, J. T., HERMS, D. A., BONELLO, P., 2005. Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. *For. Ecol. Manage.* 208: 373-382.
- BURGESS, T., WINGFIELD, M.J., WINGFIELD, B.D., 2001. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Appl. and Env. Microbiol.*, 67(1): 354-362.
- CHOI, D., SIMPSON, J.A., 1991. Needle cast of *Pinus radiata* in New South Wales. *Australian Journal of Botany*, 39(2): 137-152.
- CONTRERAS-HERMONSILLA, A., 2000. The underlying causes of forest decline. CIFOR. Occasional paper no. 30.
- DONIȚĂ, N., 1998. *Dendrologie*. Editura Universității din Oradea.
- FRANKLAND, J.C., 1998. Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102(1): 1-15.
- FRANTZEN, J., 2001. Resistance in populations in Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., van der Loon, L.C. (eds.) *Mechanisms of resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Publishers. ch. 3: 161-187
- GILMAN, E.F., WATSON, D.G., 1994. *Pinus nigra*. Austrian Pine. Fact sheet ST-465, series of the Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- GIURGIU, V., 1972. *Metode ale Statisticii Matematice Aplicate în Silvicultură*. Editura Ceres.

București.

- GOTELLI, N.J., 2000. Null model analysis of species co-occurrence patterns. *Ecology*, 81(9): 2606-2621.
- GOTELLI, N.J., ENTSMINGER, G.L., 2001. EcoSim: Null models software for ecology. Version 7.26. Aquired Intelligence Inc&Keseey-Bear.
- GOURBIÈRE, F., DEBOUZIE, D., 2003. Local variations in microfungal populations on *Pinus sylvestris* needles. *Mycol. Res.* 197 (10): 1221-1230.
- HARRINGTON, T.C., WINGFIELD, M.J., 2000. Diseases and ecology of indigenous and exotic pines. In Richardson, D.M. (ed.). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press. Ch. 19.: 3-33.
- KRANZ, J., 1974. *Epidemics of Plant Diseases: Mathematical Analysis and Modeling: Mathematical Analysis and Modeling*. Springer Verlag, Berlin.
- LANG, K.J., 1987. *Dothistroma pini* on young spruce *Picea abies*. *Europ. Journ. of Forest Pathology*, 17: 316-317.
- MACK, R.N. SIMBERLOFF, D., LONDSDALE, W.M. EVANS, H., CLOUT, M., BAZZAZ, F., 2000. Biotic invasions. Causes, epidemiology, global consequences and control. *Issues in Ecology* 5: http://nie.ecoed.net/vol/v1/figure_sets/species/pdf/ESA_issue_5.html
- MANLY, B., SANDERSON, J.G., 2002. A note on null models: justifying the methodology. *Ecology*, 8(2): 580-582.
- PLOTNIK, R.E., GARDNER, R.H., HARGROVE, W.W., PRESTEGAARD, K., PERLMUTTER, M., 1996. Lacunarity analysis: A general technique for the analysis of spatial patterns. *Physical Review*, 53 (5): 5461-5468.
- POWELL, A.J., SLAPNIČAR, J., VAN DER WERF, W., 2004. Epidemic spread of a lesion-forming plant pathogen-analysis of a mechanistic model with infinite age structure. *AMS subjects-92D25, 92D99*.
- REICH, P.B., OLEKSYN, J., TJOEKER, M., 1996. Evidence of longer needle retention of spruce and pine populations at high elevations and high altitudes is largely a phenotypic response. *Tree Physiology*, 16: 643-647.
- SANDERS, N.J., GOTELLI, N.J., HELLER, N.E., GORDON, D.M., 2003. Community disassembly by an invasive species. *PNAS*, 100(5): 2474-2477.
- SHIGO, A.L. 1967. Succession of Organisms in Discoloration and Decay of Wood. *International Review of Forestry Research*, 2: 237-299.
- SIEBER, T. N., RYS, J., HOLDENRIEDER, O., 1999. Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *Uncinata*. *Mycol. Res.* 103: 306-310.
- SLUSARENKO, A.J., FRASER, R.S.S., VAN LOON, L.C., 2001. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Publishers.
- STANOSZ, G.R., SMITH, D.R., ALBERS, J.S., 2005. Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. *Forest Pathology*, 35(4): 233-244.
- STONE, L., ROBERTS, A., 1990. The checkerboard score and species distribution. *Oecologia*, 85:74-79.
- TURECHEK, M.W., MADDEN, L.V., 2000. Analysis of association between the incidence of two spatially aggregated foliar diseases of strawberry. *Phytopathology* 90: 157-170.