

Germinação de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn., sob diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas

Seed germination of *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn., under different conditions of light and temperature

Luciana Magda de Oliveira¹, Robério Anastácio Ferreira² e
Maria Laene Moreira de Carvalho³

RESUMO

Estudou-se a influência da luz e da temperatura para a germinação de sementes de *Senna multijuga*. As sementes foram avaliadas pelos testes de germinação, tetrazólio e emergência de plântulas. O teste de germinação foi realizado em duas temperaturas (25°C e 20-30°C) e diferentes condições de radiação luminosa, (luz branca contínua e alternada e ausência de luz). Em um dos lotes foi testado, ainda, o efeito dos tratamentos de luz e temperatura, em sementes submetidas a tratamento para superação da dormência. O teste de tetrazólio foi realizado a 0,075% e 30°C, durante 7 horas e o teste de emergência realizado em canteiro. A temperatura 20-30°C em condição de luz alternada promove maior germinação de sementes armazenadas de *S. multijuga*. Nas sementes tratadas para superar a dormência, a germinação é favorecida tanto pela luz contínua, como a alternada e, não há efeito diferenciado das temperaturas de 25°C ou 20-30°C.

Termos para indexação: viabilidade e vigor de sementes; espécie florestal.

ABSTRACT

Seeds of *Senna multijuga* of different areas and yield crops were used to verify the influence of light and temperature on the seed germination of this species. Two lots were tested using the germination and tetrazolium tests and seedlings emergence. In the germination tests were used two temperature (25°C and 20-30°C) and three light conditions (white continuously, alternate with 8 hours of light and 16 hours of darkness and dark continuously). In one lot it was still tested the effect of these treatments in seeds with treatment to break seed dormancy. The tetrazolium test was realized with 0,075% and 30°C, for 7 hours and the seedlings emergence was carried out in nursery. The temperature 20-30°C in the alternate light increases the germination of stored seeds of *S. multijuga*. In the seeds submitted to the treatment to break seed dormancy, the germination was favored in both cases of presence of light and temperature.

Index Terms: seed viability; seed vigor; tree species.

¹ Enga. Florestal, Doutoranda, Departamento de Agricultura - DAG/UFLA. C.P. 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: lumagda@lavras.br

² Prof., Dr., Departamento de Engenharia Agrônoma - DEA/UFS. Av. Marechal Rondon, S/N, CEP 49100-000 São Cristóvão, SE. E-mail: raf@ufs.br

³ Profa., Dra., Departamento de Agricultura - DAG/UFLA. C.P. 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: mlaenemc@ufla.br

Introdução

Senna multijuga (Rich.) Irwin et Barn., conhecida como cássia-verrugosa, ocorre em quase todo o país, principalmente na mata pluvial da encosta atlântica. A espécie é heliófita, pioneira, própria para arborização urbana (Lorenzi, 1992) e revegetação de matas ciliares (Davide et al., 1995). A madeira pode ser empregada para caixotaria leve, confecção de brinquedos, lenha e carvão. As sementes desta espécie apresentam dormência (Carvalho, 1994), sendo classificadas como ortodoxas (Hong et al., 1996 e Carvalho, 2000).

Em geral, as espécies Leguminosae como a cássia-verrugosa apresentam problemas na germinação, em consequência da dormência de sementes. Em condições naturais, os fatores luz e temperatura são determinantes no padrão de dormência anual de sementes e podem atuar na superação ou na indução da dormência (Bewley e Black, 1994).

As espécies florestais apresentam comportamento variável com relação à sensibilidade à luz, no processo germinativo. Estas, podem ser influenciadas positiva ou negativamente, ou ainda, apresentarem comportamento indiferente. A ativação ou inibição da germinação pela luz ocorre devido à ação do fitocromo. A luz vermelha com pico de absorção em 660nm estimula a germinação, enquanto a luz vermelho-distante com pico em 730nm a inibe (Kigel e Galili, 1995). A conversão do fitocromo, da forma vermelho para a vermelho-distante e vice-versa, é determinada pelo nível de hidratação das sementes. Em algumas espécies, a germinação pode ser estimulada por curtos períodos ou inibida por longos períodos de exposição à luz, entretanto quase todas elas podem apresentar interações complexas entre luz e temperatura (Bewley e Black, 1994).

Outro fator que influencia na resposta à luz, durante a germinação, é o período pós-colheita das sementes. Sementes recém colhidas de *Portulaca oleracea* apresentaram comportamento fotoblástico positivo na germinação, mas este fotoblastismo não manifestou-se durante o armazenamento (Lima e Felipe, 1986).

A sensibilidade da semente à temperatura é devido a alterações nas membranas celulares, responsáveis por alterações reversíveis na sensibilidade do fitocromo. Deste modo, é sugerido que todo este processo ocorre em relação aos receptores (Bewley e Black, 1994). A temperatura favorável à

germinação pode alterar a fluidez da membrana, resultando em maior exposição dos receptores (Karssen, 1995). Assim, a temperatura pode influenciar tanto a percentagem final quanto à velocidade de germinação (Cavalcante e Perez, 1995). Além disso, influi também na absorção de água pelas sementes e nas reações bioquímicas, durante o processo germinativo (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Em trabalho realizado por Probert et al. (1985), foi demonstrado que as condições de temperatura a que a planta-mãe foi submetida, durante o desenvolvimento das sementes, também podem influenciar nas respostas quantitativas de germinação. A exposição de sementes a flutuações de temperatura, em algumas espécies com dormência tegumentar, pode ser efetiva para superar a dormência, obtendo-se máximo efeito em amplitudes maiores. Por outro lado, em temperaturas constantes as sementes tendem a permanecer dormentes (Bewley e Black, 1994).

Com o intuito de fornecer informações básicas para auxiliar a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Senna multijuga*, este trabalho teve como objetivo verificar a influência de diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas para o teste de germinação desta espécie.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas e no Viveiro Florestal, do Departamento de Ciências Florestais (DCF), da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes foram colhidas na região de Lavras-MG, em agosto de 1989 (lote 1/89) e em Itutinga-MG, em outubro de 1997 (lote 2/97). Os frutos foram secos em sol pleno para a extração das sementes e, depois de extraídas, as sementes foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em câmara fria (6 a 9°C e 70% de umidade relativa).

A caracterização dos lotes foi feita através da determinação da umidade e dos testes de germinação, tetrazólio e emergência de plântulas.

A umidade das sementes foi determinada em estufa a 103°C ± 2°C por 17 horas, sendo utilizadas quatro repetições de 1g de sementes. O cálculo foi realizado como sugerido pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

Para a instalação dos testes de germinação, foi feita a assepsia das sementes com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos. As sementes

foram semeadas em caixas plásticas transparentes (11x11x3,5cm), sobre substrato areia (peneirada, lavada e autoclavada a 120°C por 20 minutos). Em cada caixa foram colocados 250mL de areia e 100mL de água destilada. Os testes foram realizados em câmara de germinação BOD, em esquema fatorial 2x2x3. Os tratamentos consistiram de dois lotes (1/89 e 2/97), duas temperaturas (25°C e 20-30°C) e diferentes condições de radiação luminosa (luz branca contínua e alternada com fotoperíodo de 8 horas e ausência de luz). No tratamento ausência de luz, as caixas foram colocadas em dois sacos de polietileno pretos, sendo as avaliações realizadas após 15 dias da instalação dos testes.

Foi realizado, também, um experimento, com sementes do lote 2/97, submetidas ao tratamento para superar dormência (imersão em água a 100°C, seguido de repouso fora do aquecimento por 24 horas), como sugerido por Davide et al. (1995). O teste foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente e, as avaliações realizadas após 7 dias da instalação. Os resultados foram então comparados com os resultados do teste sem tratamento para superar a dormência.

No teste de tetrazólio, para auxiliar a hidratação, as sementes foram escarificadas manualmente com auxílio de lixa de papel (80), na extremidade oposta ao hilo e acondicionadas em bandeja de polietileno, entre duas folhas de papel germitest umedecidas com 150mL de água destilada, removendo-se o excesso. As bandejas foram mantidas em germinador a 25°C por 14 horas. Após este período, os tegumentos foram removidos e os embriões imersos na solução de tetrazólio (0,075%), permanecendo em BOD, a 30°C por 7 horas, na ausência de luz.

O teste de emergência de plântulas foi realizado em canteiro, contendo substrato composto de terra e areia (3:1) e, as sementes foram semeadas espaçadas aproximadamente 5cm, em linhas e a 2cm de profundidade. Foram realizadas duas avaliações (estande inicial, aos 7 dias e final, aos 15 dias), sendo consideradas emergidas, as plântulas que apresentaram os cotilédones abertos e a parte aérea sem anormalidades. A irrigação do canteiro foi realizada diariamente até o final do teste.

Os testes de germinação, tetrazólio e emergência foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições de vinte e cinco sementes. Para as análises estatísticas foi empregado o programa SANEST, sendo as médias

transformadas em arco seno raiz quadrada de $x/100$ e comparadas através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

É possível verificar que houve diferença significativa entre os lotes em relação ao percentual de sementes que emitiram radícula, viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio e o percentual de sementes duras (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliações em sementes de *Senna multijuga*. Umidade (U), emergência de radícula (ER), plântulas normais (PN), sementes duras (SD), tetrazólio (TZ), estande inicial (EI) e final (EF) do teste de emergência em canteiro.

LOTES	U	ER	PN	%			
				SD	TZ	EI	EF
Lote 1/89	8,7	51,37 a	19,15 a	17,96 b	35,7 b	41,96 a	44,98 a
Lote 2/97	9,2	30,35 b	23,26 a	68,13 a	89,6 a	55,09 a	60,84 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Pode-se verificar que o lote 2/97 apresentou maior percentual de sementes duras e maior percentual de viabilidade pelo teste de tetrazólio, em relação ao lote 1/89. Deste modo, pode-se considerar que as sementes recém colhidas apresentam dormência mais acentuada e melhor qualidade fisiológica. Por outro lado, o lote 1/89 apresentou maior percentual de emergência de radícula, mas não foi suficientemente vigoroso para originar maior percentual de plântulas normais.

As sementes de *S. multijuga* apresentaram um comportamento semelhante ao mencionado por Popinigis (1985) para a família Leguminosae, em que o armazenamento pode ter contribuído diretamente para superar a dormência. Resultados obtidos por Santarém e Aquila (1995) comprovaram que o armazenamento favoreceu a germinação de *Senna macranthera* e, os maiores valores de germinação foram obtidos em lotes de sementes com dois anos de idade. De acordo com Ferreira et al. (1992), possivelmente, o armazenamento promove o aumento na permeabilidade do tegumento, reduzindo o número de sementes dormentes.

Em relação à avaliação de plântulas normais do teste de germinação e estande inicial e final da emergência de plântulas, não foram observadas diferenças significativas entre os lotes, mas o lote 2/97

apresentou melhor desempenho aparente, refletindo assim a maior viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio. Isto demonstra, provavelmente, um maior vigor aparente do lote 2/97, em condições de campo.

Estes resultados confirmam a afirmativa de Bewley e Black (1994) que, em condições de campo, as sementes são comumente submetidas às flutuações de temperatura, sendo que, em algumas espécies, este é um fator efetivo para a superação da dormência tegumentar.

No teste de germinação realizado com o lote 2/97 (Tabela 2), as sementes submetidas ao tratamento para superação da dormência apresentaram desempenho superior, tanto no percentual de sementes que emitiram radícula quanto de plântulas normais. Provavelmente, a dormência observada na espécie pode ser atribuída ao efeito da impermeabilidade dos tegumentos. Do mesmo modo, de acordo com Acuña e Garwood (1987), a água quente mostrou-se eficiente para superar a dormência tegumentar em cinco espécies arbóreas secundárias de florestas tropicais; para sementes de *Leucaena leucocephala*, quando utilizado a imersão em água a 100°C por 4 segundos (Passos et al., 1988) e de *Parkinsonia aculeata*, com imersão em água quente (80-90°C) durante 1 e 2 segundos (Torres e Santos, 1994). Entretanto, Baskin et al. (1998) constataram que, apesar da água quente também ter sido eficiente para superar a dormência de *Senna marilandica* e *S. obtusifolia*, quando as sementes foram colocadas em períodos iguais ou superiores a 20 segundos houve redução do percentual germinativo.

Isto demonstra que, face aos diferentes resultados obtidos, este tratamento ainda não pode ser recomendado como metodologia padrão para todas as espécies que apresentam esta causa de dormência. Outro fator importante a ser considerado é que, seu mecanismo de atuação quanto aos efeitos no metabolismo das sementes ainda não é bem conhecido.

Tabela 2 - Germinação de sementes do lote 2/97 de *Senna multijuga*, com e sem tratamento para superação de dormência: emergência de radícula (ER) e plântulas normais (PN).

Tratamento	ER %	PN %
Água quente	86,38 a	48,93 a
Testemunha	30,35 b	23,26 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Para as diferentes temperaturas testadas foram observadas diferenças significativas apenas para o lote 1/89 na luz alternada, em todos os parâmetros avaliados (Tabelas 3 e 4). A temperatura alternada tende a promover menor porcentagem de sementes duras (Tabela 3), maior porcentagem de emergência de radícula (Tabela 4) e plântulas normais (Tabela 5).

Tabela 3 - Sementes duras (%) obtidas no teste de germinação, nas diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas empregadas, em sementes de *Senna multijuga*.

Lotes	Condições de radiação luminosa	Sementes duras (%)	
		25°C	20-30°C
1/89	Contínua	19,20 a A	6,64 a A
	Alternada	41,80 a A	3,01 a B
	Ausência de luz	30,90 a A	18,47 a A
2/97	Contínua	72,80 a A	61,80 a A
	Alternada	69,60 a A	57,20 a A
	Ausência de luz	78,90 a A	67,20 a A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 4 - Emergência de radícula (%) obtida no teste de germinação, nas diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas, em sementes de *Senna multijuga*.

Lotes	Condições de radiação luminosa	Emergência de radícula (%)	
		25°C	20-30°C
1/89	Contínua	54,00 a A	61,23 a A
	Alternada	37,98 a B	60,05 a A
	Ausência de luz	47,95 a A	47,15 a A
2/97	Contínua	23,97 a A	37,20 a A
	Alternada	30,07 a A	39,23 a A
	Ausência de luz	20,17 a A	32,77 a A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Deste modo, observa-se que a alternância de temperatura parece ter maior importância na germinação de sementes da espécie estudada, do que a temperatura constante. Neste sentido, para Oliveira et al. (1989), é importante a utilização de temperaturas alternadas em pesquisas relacionadas à germinação de sementes florestais, uma vez que estas refletem as flutuações que ocorrem em condições naturais. Para Bouwmeester e Karssen (1993), a germinação de *Spergula arvensis* também é influenciada pela temperatura alternada. Por outro lado, de acordo com Andrade e Pereira (1994), sementes de *Cedrela odorata* apresentaram melhor desempenho

Tabela 5 - Plântulas normais (%) obtidas no teste de germinação, em diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas, em *Senna multijuga*.

Lotes	Condições de radiação luminosa	Plântulas normais (%)	
		25°C	20-30°C
1/89	Contínua	31,06 a A	37,46 a A
	Alternada	10,64 b B	37,73 a A
	Ausência de luz	7,62 b A	3,70 b A
2/97	Contínua	22,86 a A	39,93 a A
	Alternada	15,11 a A	27,67 a A
	Ausência de luz	14,33 a A	22,60 a A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

da germinação das sementes em temperaturas constantes de 25 e 30°C, quando comparadas à temperatura alternada de 20-30°C.

Quanto às condições de radiação luminosas testadas, foram observadas diferenças significativas apenas para o lote 1/89, em que a presença de luz contínua favoreceu o percentual de plântulas normais (Tabela 5). Foi verificado ainda que, para 20-30°C, as condições de radiação luminosa contínua e alternada foram superiores para promover a germinação, em relação ao tratamento na ausência de luz, em ambos os lotes.

Os resultados apresentados demonstraram que as diferentes condições de radiação luminosas empregadas exerceram pouca influência no processo germinativo de sementes de *S. multijuga* com maior grau de dormência ou maior vigor.

No lote 2/97, nas sementes com tratamento para superação da dormência (Tabela 6), foi observado que para emergência de radícula não houve efeito significativo das diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas empregadas. Entretanto, as condições de luz contínua e alternada promoveram maior percentual de plântulas normais, independentes da temperatura utilizada (Tabela 7).

Conclusões

- A temperatura 20-30°C em condição de luz alternada promove maior germinação de sementes armazenadas de *S. multijuga*;
- A germinação de sementes dormentes é favorecida tanto pela luz contínua como a alternada e não há efeito diferenciado na utilização das temperaturas de 25°C ou 20-30°C.

Tabela 6 - Emergência de radícula (%) obtida no teste de germinação, em diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas, em sementes do lote 2/97 de *Senna multijuga*, submetidas a tratamento para superação de dormência.

Condições de radiação luminosa	Emergência de radícula (%)	
	25°C	20-30°C
Contínua	81,16 a A	83,20 a A
Alternada	87,60 a A	86,06 a A
Ausência de luz	88,80 a A	90,50 a A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 7 - Plântulas normais (%) obtidas no teste de germinação, em diferentes condições de radiação luminosa e temperaturas, em sementes do lote 2/97 de *Senna multijuga*, submetidas a tratamento para quebra de dormência.

Condições de radiação luminosa	Plântulas normais (%)	
	25°C	20-30°C
Contínua	74,89 a A	67,27 a A
Alternada	58,07 ab A	54,10 a A
Ausência de luz	30,87 b A	21,15 b A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Referências Bibliográficas

- ACUÑA, P.I.; GARWOOD, N.C. Efecto de la luz y de la escarificación en la germinación de las semillas de cinco especies de árboles tropicales. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v.35, n.2, p.203-207, novembro. 1987.
- ANDRADE, A.C.S.; PEREIRA, T.S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação de sementes de cedro—*Cedrela odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.1, p.34-40, 1994.
- BASKIN, J.M.; NAN, X.; BASKIN, C.C. A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of *Senna* (Fabaceae). **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 501-512, Dec. 1998.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- BOUWMEESTER, H.J.; KARSSSEN, C.M. The effect of environmental conditions on the annual patterns

- on seeds of *Spergula arvensis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.71, n.1, p.64-73, Jan. 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária/Departamento Nacional de Defesa Vegetal/Coordenação de Laboratório Vegetal, 1992. 365p.
- CARVALHO, L.R. **Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais quanto à capacidade de armazenamento**. 2000. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA- CNPF/SPI, 1994. 640p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUPESP, 2000. 588p.
- CAVALCANTE, A.M.B.; PEREZ, S.C.J.G.A. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de *Leucena leucocephala* (Lam.) De Wit. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.1, p.1-8, 1995.
- DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R.; BOTELHO, S.A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 45p.
- FERREIRA, A.G.; LIPPJOK, H.; HEUSER, E.D. Efeitos da escarificação sobre a germinação e do pH sobre o crescimento de *Acacia bonariensis* Gill e *Mimosa bimucronata* (DC) OK. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.63-65, jul. 1992.
- HONG, T.D.; LIMINGTON, S.; ELLIS, R.H. **Seed storage behavior: a Compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. (IPGRI. Handbooks for Gene banks, 4).
- KARSSSEN, C.M. Hormonal regulation on seed development dormancy, and germination studied by genetic control. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, p.333-350, 1995.
- KIGEL, J.; GALILI, G.M. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853p.
- LIMA, R.F.; FELIPPE, G.M. Efeito da luz e temperatura na germinação de *Portulaca oleracea*. **Ciência e Cultura**, v.38, n.9, p.1577-1589, set. 1986.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- OLIVEIRA, E.C.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. Proposta para padronização de metodologias em análise de sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, v.11, n.1, p.1-42, 1989.
- PASSOS, M.A.A.; LIMA, T.V.; ALBUQUERQUE, J.L. Quebra de dormência em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, v.10, n.2, p.97-102, 1988.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.
- PROBERT, R.J.; SMITH, R.D.; BIRCH, P. Germination responses to light and alternating temperature in European populations of *Doctylis glomerata*. Variability in relation to origin. **New Phytologist**, v.99, p.305-316, 1985.
- SANTARÉM, E.R.; AQUILA, M.E.A. Influência de métodos de superação de dormência e do armazenamento na germinação de *Senna macranthera* (Colladon) Irwin & Barneby (Leguminosae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.17, n.2, p.205-209, 1995.
- TORRES, S.B.; SANTOS, D.S.B. Superação de dormência em sementes de *Acacia senegal* (L.) Willd e *Parkinsonia aculeata* (L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.1, p.54-57, 1994.