

MULTIPLICACIÓN DE *Cedrela odorata* L. MEDIANTE LA PROPAGACIÓN A PARTIR DE EXPLANTES NODALES Y LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Leixys Rodríguez¹, Yosvani Acanda Artigas², Raisa Rodríguez³, Anabel Díaz¹

1. Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), Cuba, leixys@iitabaco.co.cu
2. Universidad de Vigo, España
3. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Cuba

Introducción

El Cedro (*Cedrela odorata* L.) es una de las especies de la familia Meliaceae citada entre las más valiosas del mundo por las características de su madera. *Cedrela odorata* Linnaeus ha sufrido en las últimas décadas la disminución del tamaño de sus poblaciones (número de individuos) debido a diversos factores, resaltando entre ellos los procesos de deforestación y el aprovechamiento selectivo sobre los mejores individuos, que afectan la constitución genética de sus poblaciones. Los esfuerzos por conservar sus recursos han sido ampliamente rebasados por la velocidad con que se están deteriorando (Patiño, 1997). A este hecho se incorpora los problemas de propagación que presenta el cedro, como por ejemplo la corta área de dispersión de semillas, (FAO 1974/cit. por Galván, 1996), la poca disponibilidad y el bajo potencial germinativo de las mismas, así como el ataque del lepidóptero *Hypsipyla grandella* (Zeller) que son las principales causas incidentes en la reforestación.

La biotecnología pudiera constituir una alternativa en la generación de un sistema de multiplicación y regeneración de explantes, que posibilite la producción masiva de genotipos selectos destinados a la reforestación.

La propagación *in vitro* del cedro y otras meliáceas como la caoba (*Swietenia macrophylla* King) se ha desarrollado a partir ápices caulinares (Maruyama, 2006) y explantes nodales obtenidos de semillas germinadas *in vitro* (Maruyama *et al.*, 1989; Orellana, 1997; Valverde *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2002). La especie presenta varias características que dificultan su cultivo *in vitro*, la recalcitrancia es una de ellas y viene determinada por la pérdida de la habilidad de desarrollar brotes axilares debido a la ausencia del crecimiento o desarrollo de las yemas, defoliación en los brotes y la presencia de sólo un pecíolo elongado (Lee y Rao, 1988). Así como se ha visto que algunos explantes sufren necrosis debido a la existencia de compuestos fenólicos aparentemente sin contaminación (Flores, 2001).

La embriogénesis somática (ES) es otra de las técnicas biotecnológicas que se ha desarrollado en múltiples especies forestales. Específicamente para las tropicales, la ES se ha descrito como un fenómeno complicado donde la naturaleza y las características fisiológicas y temporales de los explantes son cruciales (González y Peña, 2007). Para el cedro, las investigaciones en este sentido son muy limitadas (González y Peña, 2007). La contaminación resulta uno de los principales problemas; la difícil obtención de cultivos libres de microbios ha sido asociado a la contaminación presente en la superficie y tejidos endógenos de las plantas adultas donadoras, de ahí lo complejo de emplear explantes provenientes de árboles de cedro (Maruyama, 2006). No obstante existen trabajos en cedro que reportan la obtención de callos a partir de inflorescencias (Daquinta *et.al.*, 2004) con el empleo del tiazurón, sin embargo, aunque es la primera vez que se reportan callos provenientes de plantas adultas, no se logró madurar embriones. Explantes provenientes de plántulas regeneradas a partir de semillas *in vitro* tales como: cotiledones, hipocotilos,

epicotilos y raíces jóvenes, constituyen otra alternativa que pudiera disminuir los riesgos de contaminación. Sin embargo, existen algunos trabajos con bajos rangos de obtención de callos embriogénicos (González y Peña, 2007; Muñoz, 2003) a partir de este tipo de explantes.

El presente trabajo propone un método para la multiplicación del cedro mediante la propagación *in vitro* a partir de explantes nodales o mediante la embriogénesis somática a partir de cotiledones e hipocotilos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Iniciación del cultivo *in vitro*. Las semillas conservadas a 4°C durante 2 meses después de la fecha de recolección y provenientes del Instituto de Investigaciones Forestales fueron seleccionadas y lavadas con abundante agua corriente y detergente. Se dejaron incubar toda la noche en una solución de Acrobat 0.2% y posteriormente se lavaron con abundante agua corriente. Las semillas se desinfectan superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio NaClO 30% v/v y una gota de Tween 20 por cada 100 ml de solución durante 20 minutos y posteriormente se lavan tres veces con abundante agua destilada estéril. Una vez desinfectadas las semillas se colocaron en el medio de germinación (2 g/l de Sales MS, 7 g/l de Agar y pH 5.7) esterilizado por autoclave (20 minutos a 120 °C). La germinación se llevó a cabo en una incubadora a 25 °C.

Efecto del BAP en la iniciación y multiplicación de los brotes axilares. Se tomaron explantes nodales de plantas germinadas *in vitro* y se diseñó un experimento para evaluar el efecto del BAP a 0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/l en la iniciación y multiplicación de brotes axilares en un medio que además de BAP contenía 2 g/l de Sales MS, 30 g/l de sacarosa y 7 g/l de Agar. El pH del medio se ajustó a 5.0. Se emplearon 30 explantes nodales para cada tratamiento y los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de fotoperíodo (16 horas luz/ 8 horas osc.) y 25 °C. A los 20 días se contaron los explantes que habían desarrollado brotes con al menos 5 mm de largo.

Efecto del AIA y el ANA en la elongación de los brotes axilares. Para evaluar el efecto del AIA y el ANA en la elongación de los brotes axilares se tomaron brotes iniciados y se sembraron en un medio que contenía 2 g/l de Sales MS, 30 g/l de sacarosa, 7 g/l de Agar y 0, 0.25, 0.5 o 1 g/l de AIA o ANA. El pH del medio se ajustó a 5.0. Se emplearon 30 brotes para cada tratamiento y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo que el experimento anterior. A los 20 días de cultivo se contaron los brotes que habían alcanzado 2 cm de largo y que habían enraizado. Para la aclimatación de las plantas a suelo se preparó una mezcla de suelo mineral, zeolita y materia orgánica en una proporción 1:1:1 y se esterilizó en autoclave 20 minutos a 120 °C y se secó en una estufa a 80°C durante dos horas. Las plantas transplantadas se mantuvieron durante 48 horas en una cámara húmeda para facilitar la supervivencia.

Inducción de callo embriogénico: Los explantes empleados fueron cotiledones e hipocotilos provenientes de plántulas germinadas *in vitro*. Para la inducción de callo embriogénico el medio Murashige and Skoog (MS) fue suplementado con varias concentraciones (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/l) de ácido naftalenacético (ANA) ó ácido 2,4

diclorofenoxyacético (2,4 D) (0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/ L). Los callos fueron inducidos en oscuridad.

Medio de proliferación: Los callos formados en los distintos tratamientos fueron colocados en el medio de proliferación consistente en los mismos constituyentes minerales respectivos al medio de inducción por 30 días en condiciones de oscuridad.

Medios de diferenciación: Aquellos callos que presentaban características embriogénicas fueron colocados en placas de petri (6 callos/placa) con 20ml de los siguientes medios de diferenciación:

D1: Propio medio de inducción

D2: Medio suplementado con 1 mg/ L de BAP

Para ambos tratamientos (D1 y D2) los cultivos fueron mantenidos durante 60 días a 25 ±1°C con fotoperíodo. Después de la inducción se efectuaron análisis macromorfológicos que incluyeron aspectos tales como textura, color y friabilidad de los callos.

Análisis estadístico. Para el análisis de los resultados se empleó un ANOVA de Clasificación Simple con una prueba de comparación múltiple de proporciones y el test de Tukey para analizar los resultados propagación a partir de explantes nodales, y el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el análisis de la formación de callos. El programa estadístico utilizado fue el STATGRAPHICS Centurion.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aproximadamente el 95 % de las semillas colocadas en fotoperíodo, germinaron al cabo de 15 días y solamente se observó un 12 % de contaminación. Los índices de contaminación registrados se pueden atribuir a la asociación de semillas de especies forestales tropicales con muchos microorganismos, que de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero representan un factor limitante para los trabajos *in vitro* (Pérez y col., 2002). Para la mayoría de las especies tropicales se ha demostrado que las semillas recalcitrantes requieren un estricto almacenamiento que generalmente implican condiciones de alta humedad y sin refrigeración: Al parecer el almacenamiento a 4 °C durante un período relativamente corto no afecta significativamente los niveles de germinación de las semillas de cedro rojo, ya que hemos comprobado la viabilidad de las semillas conservadas a esta temperatura durante un año.

Efecto del BAP en la iniciación y multiplicación de brotes axilares a partir de explantes nodales. La mejor respuesta se obtuvo con 0.25 mg/l de BAP (tabla 1), los explantes alcanzaron los mayores valores en altura y coeficiente de multiplicación (2,43) (ver figura 1) a estas concentraciones. El resto de las concentraciones de BAP posibilitaron también el desarrollo de brotes pero en menor magnitud (Tabla 1), sin embargo se evidenció la necesidad de la citoquinina para la inducción de brotes.

Tabla 1. Efecto del BAP en la iniciación del desarrollo de brotes axilares. (Los datos contenidos en la tabla representan frecuencias absolutas, las letras indican las diferencias significativas entre los distintos tratamientos).

BAP mg/l	Proporciones
0	0/30 c
0.25	30/30 a
0.5	24/30 b
1	5/30 c
2	5/30 c
Estadístico X²	119.94***

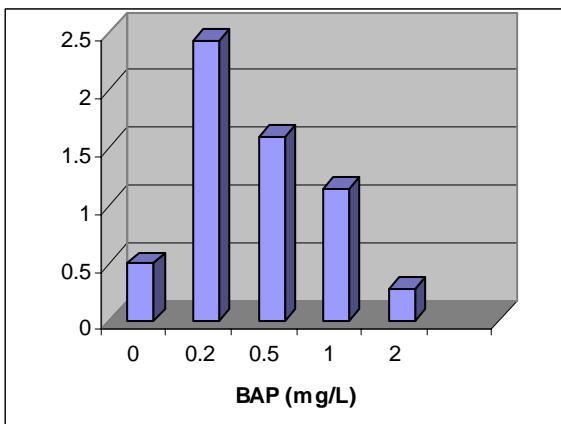


Figura 1. Efecto del BAP sobre el coeficiente de multiplicación de brotes.



Figura 2. Brotes axilares a partir de nudo cotiledonar tratado con 0.25 mg/l de BAP

C. odorata, y que los explantes requerían la presencia de auxinas en el medio, sin embargo la benzilaminopurina es una citoquinina conocida por estimular la formación de brotes y el metabolismo de los explantes (George y Sherrington, 1984), y ha sido empleada en múltiples ocasiones como única fitohormona en los medios (Thorpe y col., 1991). Por otro lado, Murayama y col. (1989) obtuvieron múltiple formación de brotes con la adición de BAP al medio WP (Woody Plant Medium) en *C. odorata*.

Según Pérez y col. (2003); para segmentos nodales obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*, el mayor número y crecimiento de segmentos fue alcanzado con 1.5 mg/L⁻¹ de BAP, nuestra experiencia indicó sin embargo que las menores concentraciones de citoquininas

Trabajos en *Cedrela fissilis* Vellozo reportaron mayores índices de multiplicación que los reportados en esta trabajo, 6-7 brotes producidos en un segundo ciclo de subcultivo por nudo con el empleo del BAP (Da Costa y col., 2007); sin embargo, para el Cedro rojo no se han reportado valores similares a los obtenidos pues Pérez y col., 2002 reportaron haber alcanzado menores valores en la multiplicación a partir de explantes nodales.

Algunos autores (Valverde y col., 1998) plantearon que el BAP por sí solo no provocaba una respuesta organogénica en

(0.25-0.5 mg/L⁻¹) fueron las favorables, mayores concentraciones propiciaron la aparición de callos en la base de los explantes, esto coincide con lo observado por Puddephat *et al.*, 1997 en *Quercus robur* y puede atribuirse a que dichas concentraciones superan el límite aceptable por el explante provocando este desorden fisiológico. Otra causa pudo ser la alta intensidad metabólica de los explantes, que por ser tejidos jóvenes, tienen mayor potencial morfogenético y con ello mayor potencialidad para emitir brotes y raíces, o de lo contrario callos (Bonga, 1982).

Flores, 2006 no encontró diferencias significativas entre la respuesta de los explantes nodales de *C. odorata* cuando se evaluó el efecto del BAP a 0, 0.5, 1, 2 y 4 mg/l en explantes nodales de plantas adultas de 10 años de edad. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente estudio probablemente debido a que se emplearon explantes de plantas con edades diferentes. Estos resultados sugieren que el potencial organogénico de los explantes nodales de *C. odorata* disminuye con la edad de la planta. En un experimento realizado con anterioridad a este estudio pudimos demostrar que los explantes de nudo cotiledonal respondían mejor al BAP en la iniciación de los brotes axilares (datos no mostrados) (Figura 2).

Elongación de los brotes axilares. El 86,3 % de los brotes axilares inducidos no alcanzaron 10 mm de largo por lo que fue necesario determinar otro medio donde estos brotes elongarán. Se evaluó el efecto del AIA y ANA independientemente en la elongación de los

Tabla 2. Efecto del AIA y el ANA en la elongación y enraizamiento de brotes axilares. Los datos contenidos en la tabla representan los valores medios de las frecuencias absolutas. Las letras indican las diferencias significativas entre los distintos tratamientos

Tratamientos	Proporciones
Medio de Establecimiento	28/30 a
0.25 mg/l AIA	8/30 b
0.5 mg/l AIA	3/30 c
1 mg/l AIA	2/30 c
2 mg/l AIA	0.30 c
0.25 mg/l ANA	5/30 bc
0.5 mg/l ANA	2/30 c
1 mg/l ANA	0/30 c
2 mg/l ANA	0/30 c
Estadístico X²	100.60***

brotes axilares. Curiosamente los mejores resultados se obtuvieron en el propio medio de establecimiento sin auxinas donde la proporción de brotes con más de 2 cm y raíces fue 28/30 (tabla 2). Altas concentraciones favorecieron el desarrollo de callos en la base de los explantes.

En el medio de establecimiento propuesto, en total ausencia de reguladores del crecimiento, los brotes axilares enraízan y crecen adecuadamente y los entrenudos se alargan lo suficiente como para permitir la separación de los nudos y proseguir con la multiplicación a partir de yemas axilares. En estudios previos hemos comprobado que a pH 5.0 se reduce la fenolización y necrosis de los explantes en cedro (datos no mostrados) lo que hace innecesaria la adición de carbón activado, ácido ascórbico y otros antioxidantes al medio de cultivo. A este

pH se redujo también la defoliación de los brotes y se favoreció el enraizamiento.

Los brotes radicales fueron finos y alargados, con proliferación de raíces secundarias y coloración verde clara (figura 3), con escasa presencia de fenoles; esto coincide con las características descritas en bibliografía para el caso de los brotes radicales en segmentos nodales derivados de plantas germinadas *in vitro* (Pérez y col., 2003).

El 100 % de las plantas sobrevivieron a la aclimatación, lo que se debió tal vez al buen desarrollo de las raíces y el mantenimiento en un ambiente de alta humedad.

Inducción de callo embriogénico: En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para el carácter formación de callos.

Tabla 3: Valores obtenidos para el carácter formación de callos. Los resultados indican la media del cociente entre los explantes que forman callos y el total de explantes por medio. Las diferentes letras al lado de los 25 pares indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

	Medio	Formación de callo	
		Cotiledones	Hipocótilos
I1	MS	0 d	0 d
I19	MS + 0.5 mg/L 2,4-D	0.83 ab	0.97 a
I20	MS + 1 mg/L 2,4-D	0.77 abc	0.93 a
I21	MS + 2 mg/L 2,4-D	0.86 ab	0.97 a
I22	MS + 3 mg/L 2,4-D	0.65 bc	0.83 a
I24	MS+ 0.5 mg/L ANA	0.2 d	0.33 cd
I25	MS+ 1 mg/L ANA	0.80 abc	0.82 ab
I26	MS+ 2 mg/L ANA	0.53 c	0.97 a
I27	MS+ 3 mg/L ANA	0.62 bc	0.48 bc
I28	MS+ 5 mg/L ANA	0.94 a	0.37 c

Como se observa en la tabla los explantes más reactivos fueron los hipocótilos que presentaron los valores más elevados de formación de callos. La concentración de las auxinas influyó de diferente manera en los explantes: para los cotiledones los mejores resultados se obtuvieron con 5 mg/L de ANA y con 0.5, y 2 mg/L de 2,4 D; para los hipocótilos los mejores resultados se obtuvieron con 2,4 D y con 2mg/L de ANA. Los callos se mostraron translúcidos, friables y de color amarillo a café, características que se han atribuido a comportamiento embriogénico en especies leñosas (Rodríguez et al., 2005) y constituidos por células con forma globular (figura 3 B). La total ausencia de auxinas no posibilitó el desarrollo de callosidades a partir de los explantes evaluados, no se observaron ni oxidaciones y necrosis del tejido (Figuras 3A y B).

En el caso particular de cotiledones, se observó que además del desarrollo de callos presentaron rutas morfogénicas dirigidas hacia la rizogénesis. Esta situación es descrita en

otras especies maderables como el eucalipto (*Eucalyptus sp.*) y que posteriormente produce una reducida tasa de producción de callo embriogénico (Termignoni *et al.*, 1996; Trindade y Pais, 1999; Nugent *et al.*, 2001).

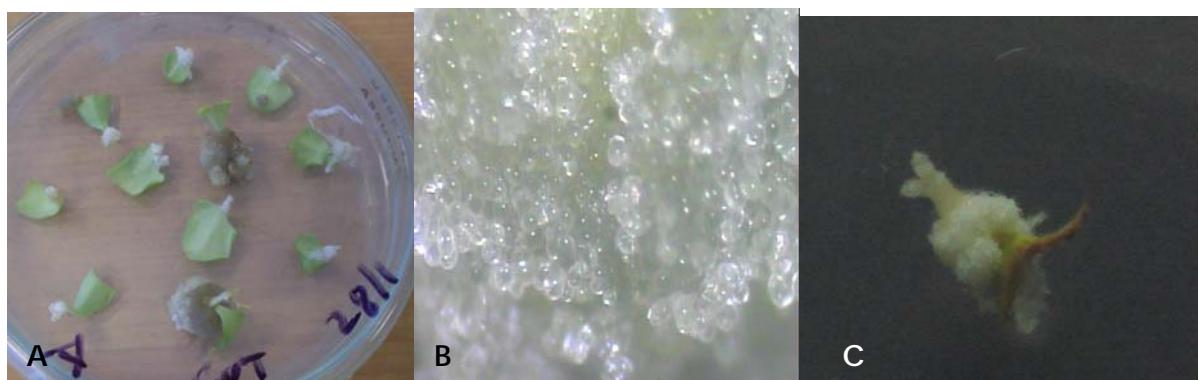


Figura 3: Desarrollo de la embriogénesis somática en cedro (*C. odorata*). (A) Callo proembriogénico, (B) Estructuras globulares y (C) embrión somático desarrollado en medio MS suplementado con 1mg/L de BAP a partir de callo de cotiledón.

Se ha planteado que el tipo y concentración de auxinas en el medio es crítico para la inducción de embriones somáticos (Sharry *et al.*, 2006). El 2,4 D se considera el regulador del crecimiento más eficiente en la inducción de embriogénesis somática (Merkle, 1995). Sin embargo, en algunos casos esta auxina no es necesaria para el desarrollo de embriones somáticos, en algunos trabajos se ha visto su efecto positivo en la formación de callos no así en la inducción de callos morfogénicos (Sharry *et al.*, 2006). El empleo de ANA para inducir embriogénesis somática ha sido reportado en varias especies forestales como *Eucalyptus sp.* (Muralidharan *et al.* 1989, Termignoni *et al.* 1996).

Medios de diferenciación: Aquellos callos de apariencia friable fueron colocados en medio de diferenciación bajo fotoperíodo para la maduración de estructuras embriogénicas. Fueron evaluados dos medios, sin embargo los resultados para la diferenciación y maduración de embriones sólo ocurrió en una callosidad inducida en 2mg/L de ANA a partir de cotiledones en medio D2 (Figura 3C), los callos después de varias semanas de subcultivo en el medio de diferenciación sufren oxidaciones y necrosis. Trabajos previos como los desarrollados por Muñoz (2003), reportan la formación de embriones en medio suplementado con kinetina sin embargo no lograron madurar estructuras embriogénicas.

En muchas especies forestales, se ha demostrado que los tejidos vegetativos se comportan recalcitrantes para la organogénesis o la embriogénesis, y es posible que la combinación de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo sea inadecuada para desarrollar una respuesta. La acumulación de compuestos fenólicos es otra de las causas que pudieron influir en las bajas frecuencias de maduración y diferenciación obtenidas en el trabajo. No obstante los resultados obtenidos reportan por primera vez la regeneración de embriones a partir de tejidos juveniles en *C. odorata*.

La efectiva producción de embriones somáticos pudiera ofrecer una oportunidad para multiplicar el material evadiendo algunas dificultades de las técnicas de clonación

tradicionales como el enraizamiento, ya que los embriones somáticos son estructuras bipolares (Pinto *et. al.*, 2002) así como la posibilidad de multiplicar a gran escala genotipos sin requerir grandes espacios. Sin embargo, su empleo en *C. odorata* no está aún desarrollado ni así las técnicas de propagación vegetativa. De hecho, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la especie tiene gran potencial para ser micropropagada mediante la organogénesis. Aunque aún es necesario realizar un seguimiento y evaluación en campo de las plantas obtenidas mediante las técnicas utilizadas en este estudio, podemos decir que el método de micropropagación, enraizamiento y aclimatación desarrollado en este trabajo puede ser usado para producir masivamente plántulas de con fines comerciales.

Conclusiones

- La total ausencia o bajas concentraciones de BAP, así como el empleo de agentes antioxidantes posibilita indistintamente el desarrollo de brotes a partir de explantes nodales en cedro (*C. odorata* L.).
- Para la elongación y enraizamiento de los brotes regenerados no es necesario adicionar ningún tipo de regulador al medio.
- Los hipocotilos son más reactivos para la formación de callos que los cotiledones en presencia de las auxinas ANA y 2,4 D, sin embargo los cotiledones fueron los únicos explantes que posibilitaron el desarrollo de estructuras embriogénicas.
- El método de propagación de cedro mediante la organogénesis directa a partir de explantes nodales, es más simple y eficiente que la propagación mediante el método de embriogénesis propuesto.

Referencias Bibliográficas

Daquinta M., M. Cid, Y. Lezcano, D. Pina y R. Rodríguez: Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en Cedro y Caoba híbrida. Comunicación corta, *Biotecnología vegetal* 4(2): 121 - 124, 2004.

Flores, C.A. Establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de microestacas tomadas de plantas de invernadero". M. Sc. Thesis, CATIE, Turrialba, Costa Rica, 71 p. 2001.

Galván, O.: Análisis comparativo del crecimiento de *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Anburana cearensis* en fajas de enriquecimiento y viales de extracción. Tesis para optar el Titulo de Ingeniero Forestal. UNALM-Perú. 1996.

González J. C and Y. J. Peña: Establishment of efficient protols for massive propagation or tropical trees from Mesoamerica through somatic embryogenesis: *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Cybistax donnell-smithii*, *Crescentia cujete* and *Cordia dodecandra*. Proc. 11rd 18 on Acclim and Estabth of Micropropagated Plants. Eds J. M. Santamaría and Y. Desjardins. Acta Hort, 748, JSHS, 2007.

Lee, S.K. y A.N. Rao. Plantlet production of *Swietenia macrophylla* King through tissue culture. *Gardening Bulletin of Singapore*, 41, 11-18. 1988.

Maruyama, E. Tissue culture of *Swietenia macrophylla* King (Big-Leaf Mahogany). *Plantation Technology in Tropical Forest Science*. (ed. by K. Suzuki, K. Ishii, S. Sakurai and S. Sasaki), Springer-Verlag, Tokio, pp. 131-136. 2006.

Maruyama, E., Ishii, K., Saito, A. y K. Migita. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Perú – Amazon forest. *Journal of Agricultural Science (Japan)*, 33, 252-260. 1989.

MERKLE, S.A. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1995, vol. 1, no. 3, p. 112-121.

Muñoz SY. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* L) a partir de cotiledones. Tesis para optar por el Titulo de Biologa. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Peru. 2003.

Orellana, N.M.A. "Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King)". M. Sc. Thesis, CATIE, Turrialba, Costa Rica, 94 p. 1997.

Patiño, F. Recursos Genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos. Propuestas para Acciones Coordinadas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma-Italia. p 58. 1997.

Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L. y M. E. Aguilar. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. Optimización de la fase de multiplicación. *Revista Forestal Centroamericana* (Costa Rica), 42, 67-71. 2002.

Valverde, C.L, Dufour, M. y V. M. Villalobos. "*In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae)". Revista de Biología Tropical 46 (2): 225-228. 1998.