



Germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a diferentes temperaturas

Germination of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) at different temperatures

 Lázaro A. Maqueira-López^{1*},  Osmany Roján-Herrera¹,
 Joselín Solano-Flores¹,  Iracely Milagros-Santana²

¹Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios", km 1½ carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. CP 22900.

²Universidad de Pinar del Río "Hermanos Saíz Montes de Oca", avenida José Martí No. 270, Pinar del Río, Cuba, CP 20100.

RESUMEN: La investigación se desarrolló en la Unidad Científico Tecnológica de Base, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. El objetivo fue evaluar la influencia de diferentes temperaturas en la germinación de cuatro cultivares de frijol. Se analizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) de los cultivares, Cubana 23, Chévere, Buena Ventura, La Cuba 154. Las temperaturas de germinación consideradas en cada ensayo fueron 20, 30 y 40 °C. El diseño experimental utilizado en todos los casos fue completamente aleatorizado, cada ensayo fue evaluado individualmente y fue repetido dos veces, se trabajó con los valores medios de dichas repeticiones. Se contaron las semillas germinadas desde su establecimiento hasta la estabilización, con los datos obtenidos se determinó: porcentaje de germinación; número de semillas germinadas por día y el Índice Maguire. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 99 %. Los resultados de este trabajo indican que existen sensibilidad de diferentes cultivares de frijol ante una variación en la temperatura, durante el proceso de germinación; por tanto, el efecto de la temperatura está estrechamente relacionado con el material genético con que se está trabajando. Temperaturas superiores a 30 °C disminuyen la velocidad de germinación en los cultivares en estudio.

Palabras clave: índice de germinación, leguminosas, vigor.

ABSTRACT: The research was developed in the Base Scientific Science Unit, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba, belonging to the National Institute of Agricultural Sciences. The objective was to evaluate the influence of temperatures on the germination of four bean cultivars. Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (beans) were analyzed from the cultivars, Cubana 23, Chévere, Buena Ventura, La Cuba 154. The germination temperatures considered in each trial were 20, 30 and 40 °C. The experimental design used was completely randomized in all cases, each trial was evaluated individually and was repeated twice, it worked with the means of these repetitions. Germinated seeds were counted from their establishment until stabilization, with the obtained data: germination percentage, germinated seeds per day and the Maguire Index were determined. The results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) with a confidence level of 99 %. The results of this work indicate that there is sensitivity of different bean cultivars to a variation in temperature in the germination process; therefore, the effect of temperature is closely related to the genetic material that is being worked on. Temperatures higher than 30 °C decrease the germination speed in cultivars under study.

Key words: germination rate, legume, vigor.

*Autor para correspondencia: lalberto@inca.edu.cu

Recibido: 30/10/2019

Aceptado: 07/03/2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

El frijol *Phaseolus vulgaris* L. es una de las leguminosas que posee un lugar preferencial, por su composición nutricional al ser una fuente rica en proteínas y minerales (1,2). Es una leguminosa anual, intensamente cultivada desde los trópicos hasta las zonas templadas (3,4). Ocupa más del 80 % de la superficie sembrada anualmente en el mundo, con 15 millones de hectáreas aproximadamente (5).

En Cuba esta leguminosa constituye un plato fundamental en la dieta de los pobladores, donde de conjunto con el arroz (*Oryza sativa* L.) forma parte de la alimentación básica. Sin embargo, el país ha estado importando más de 60 mil toneladas del grano por año, para poder satisfacer la demanda del mercado (6,7). Es por ello que se siguen estrategias para aumentar el rendimiento y reducir las importaciones, para lo cual se han destinado grandes extensiones de áreas, tanto en el sector estatal, como en fincas de agricultores. También se fortalece la implementación de acciones, tales como: promover el mejoramiento genético de cultivares; la producción de semillas y el logro de una correcta fitotecnia, con énfasis en lograr una adecuada germinación y garantizar la densidad de plantas que establece el instructivo del cultivo. Sin embargo, la respuesta de cultivares de frijol a condiciones ambientales diferentes, producto a la gran variabilidad del clima, resulta, en la actualidad, un elemento de vital importancia para lograr una elevada productividad ante los efectos del cambio climático (8). Por tanto, para alcanzar rendimientos estables en el tiempo o bien incrementarlos, es necesario analizar cuáles son los principales factores que contribuyen a determinar el rendimiento final, conocer la influencia de estos y realizar un manejo adecuado de los mismos. Esto está dado porque el frijol requiere de temperaturas relativamente bajas para su normal desarrollo y, cuando estas son elevadas, la germinación, la morfología y el crecimiento de las plantas se ven afectados, limitándose en última instancia su productividad. Por esta causa, en Cuba, su cultivo generalmente esté limitado a un corto período de tiempo. Además, a pesar de existir aproximadamente 21 cultivares registrados en el país, es insuficiente la información de la respuesta de estos ante los efectos de la variabilidad climática (9). Es evidente que la temperatura es uno de los factores ambientales más importante durante el desarrollo de las plantas de frijol y el que más lo está afectando producto a la incidencia del cambio climático. Es por ello, que deben encaminarse las investigaciones, con el

fin de lograr identificar los cultivares de frijol más adaptados a la variabilidad climática existente, sobre todo al aumento de la temperatura.

De las fases y etapas del cultivo, el proceso de germinación se considera como uno de los más afectados por la temperatura debido a su efecto en la actividad de las enzimas reguladoras de la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla tras su rehidratación (10). En la actualidad existe poca información del efecto de la temperatura sobre la germinación de cultivares de frijol obtenidos en el país y se requiere de una comprensión precisa de la dinámica de la germinación a diferentes temperaturas para asegurar un número de plántulas en la práctica productiva; además, este experimento es importante para impulsar programas en el mejoramiento de los cultivares, en función de la adaptación al clima en el sector agrícola. Por lo antes señalado, es que se realizó este trabajo, con el objetivo de evaluar la influencia de las temperaturas en la germinación de cuatro cultivares de frijol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se desarrollaron en la Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios (UCTB-LP), perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); situada en la llanura sur de la provincia de Pinar del Río, a los 22°44' de latitud Norte y a los 83°45' de latitud Oeste, a 60 m s.n.m, con pendiente aproximada de 1 %, según Atlas de Cuba (3). Se analizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) de cuatro cultivares, Cubana 23 (color negro), Chévere (color blanco), Buena Ventura (color rojo), La Cuba 154 (color crema) (Tabla 1) (9). Estas fueron suministradas por el grupo de semillas del INCA. Para la selección de los mismos se tuvieron en cuenta la disponibilidad de semillas, el área sembrada al menos en las provincias occidentales, color del grano y hábito de crecimiento.

Una vez cosechado el cultivo y con el propósito de bajar su humedad hasta 10 % para evitar su deterioro, las vainas se secaron en una estufa con aire forzado a 40 °C durante 48 horas y posteriormente fueron descascaradas. La semilla obtenida se colocó sobre tamices con orificios circulares y aquella que quedó retenida entre los tamices de 0,7 a 1,6 cm de largo que fue empleada en la experimentación. Este calibre correspondía al tercio medio de los distintos tamaños de semillas obtenidas en cada cultivar y fue el más representativo de cada uno. Antes de ser sometida a las pruebas de germinación.

Tabla 1. Tabla de descripción de los cultivares.

Cultivares	CG	Rendimiento potencial (t ha ⁻¹)	HC	Días después de la siembra			Masa 100 semillas (gramos)
				DF	DMF	DMC	
Cubana 23	Negro	1,2	II	43	75	85	19
Buena Ventura	Rojo	2,9	II	33	68	79	19
Chévere	Blanco	3,1	III	39	71	81	18
La Cuba 154	Blanco	3,0	III	35	70	85	18

CG: color del grano; HC: hábito de crecimiento; DF: días a la floración; DMF: días a la madurez fisiológica; DMC: días a la madurez de cosecha

En el experimento, las temperaturas de germinación consideradas en cada ensayo fueron 20, 30 y 40 °C. La unidad experimental correspondió a las placas de Petri de vidrio de 140 mm de diámetro y 20 mm de alto, con dos capas de papel de filtro humedecido con agua destilada sobre el fondo de las placas y 30 semillas en su interior. Se establecieron cuatro repeticiones por tratamiento. Una vez colocadas las semillas en las placas, estas se ubicaron en una cámara de germinación modelo RTOP-310D regulada a la temperatura respectiva (20, 30, 40 °C). El diseño experimental utilizado en todos los casos fue completamente aleatorizado, cada ensayo (temperaturas 20, 30, 40 °C) fue evaluado individualmente y fue repetido dos veces, se trabajó con las medias de dichas repeticiones. Se contaron las semillas germinadas desde su establecimiento hasta la estabilización, con los datos obtenidos se determinó:

- El Porcentaje de germinación (PG): se consideró como semilla germinada aquella con una radícula de longitud mayor o igual a 2 mm (11).

$$PG = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas sembradas}} \times 100 \quad (1)$$

- Semillas germinadas por día (SGD): se contaron las semillas germinadas diariamente y se utilizó como criterio la aparición de la radícula mayor o igual a 2 mm.
- Índice Maguire (IM): representa la velocidad de germinación calculada a través de un tiempo ponderado de germinación acumulada. Donde G es el porcentaje de plántulas que germinaron durante el intervalo de tiempo t (12).

$$IM = \sum_{t=1}^n \frac{G_t}{t_1} \quad (2)$$

A los datos de cada variable evaluada se le comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (Test Bartlett's y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente). Los resultados (PG, IM) fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 99 %. La comparación de las medias se efectuó mediante la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($P>0,01$) (13). Para ello se utilizó el Programa STATGRAPHICS Centurión sobre Windows, versión XV (14). Con los valores de semillas germinadas por día se elaboraron gráficos de la dinámica de germinación de cada cultivar en las diferentes temperaturas estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes finales de germinación aparecen en la [Tabla 2](#), todos los cultivares presentaron diferencias significativas en el rango de 20 a 40 °C de temperaturas. Los valores más elevados se apreciaron a 20 °C, mientras que los más bajos se observan a 40 °C. Sin embargo, los cultivares Cubana 23 y Buena Ventura fueron más afectados al someter sus semillas a temperaturas de 30 °C, puesto que solo germinaron a esta temperatura el 34 y el 47 % de las semillas, mientras que La Cuba 154 y Chévere presentaron valores de 82 y 73 %, respectivamente.

Los resultados de La Cuba 154 y Chévere a 30 °C deberían ser tenidos en cuenta para la planificación de las siembras del cultivo en Cuba en fechas tardías (después de marzo) y también como progenitores en los programas de mejoramiento genético del cultivo del frijol para resistencias a estrés abióticos sobre todo para altas temperaturas.

La influencia de la temperatura en el porcentaje de germinación de semillas de cultivos de interés agrícola ha sido informada por varios autores, los que destacan que el porcentaje de emergencia de las semillas garantiza el 50 % del éxito de la producción y puntualizan que la germinación solo ocurre apropiadamente dentro de un determinado rango de temperatura (15,16). En estudios realizados en el cultivo del maní (*Arachis hypogaea* L), se demostró en todos los genotipos estudiados que la germinación se incrementó con el ascenso de la temperatura por encima de 14 °C. Para el rango comprendido entre 16 y 32 °C se obtuvieron porcentajes germinativos que cumplen la norma de comercialización de semilla corriente para maní (>80 %); siendo en todos los genotipos iguales o superiores al 90 % (17).

Hay que destacar que en los resultados del presente estudio existe una respuesta diferencial y particular de los cultivares a la temperatura de germinación y hay variación en los porcentajes finales de germinación.

En cuanto a la dinámica de germinación, existen diferencias entre el tiempo necesario para el proceso de germinación a las diferentes temperaturas a las que fueron expuestas las semillas de los cultivares en estudio ([Figura 1](#)). El cultivar Cubana 23, muestra un adelanto en el inicio de la germinación de las semillas a 30 °C en unas 24 horas aproximadamente, con respecto a las temperaturas de 20 y 40 °C que iniciaron su germinación a las 50 horas. Sin embargo, el comportamiento del resto de los cultivares en las distintas temperaturas fue diferente al de Cubana 23, ya que iniciaron el proceso a las 50 horas aproximadamente.

Tabla 2. Porcentajes de germinación de semillas de frijol a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Cultivares			
	Cubana 23	Buena Ventura	La Cuba 154	Chévere
20	98,4 a	96,7 a	98,4 a	94,7 a
30	34,2 b	47,5 b	82,5 b	73,3 b
40	12,5 c	19,2 c	12,5 c	15,0 c
ESx	1,7***	1,8***	1,7***	1,2***

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Test de tukey, $p \leq 0,05$)

A la temperatura de 20 °C, a pesar de no afectarse el porcentaje de germinación para los cultivares (Cubana 23, Buena Ventura, La Cuba 154, Chévere) (Tabla 1); se observa en la Figura 1 que la dinámica de germinación se encuentra modificada. Es posible apreciar un retraso en el proceso de la germinación y se destaca un prolongado período de tiempo de aproximadamente 150 y 200 horas, necesario para que culminara el proceso de germinación de las semillas. Un comportamiento similar se aprecia a 40 °C aunque para esta temperatura solo se observa un período prolongado de tiempo de aproximadamente 100 a 150 horas, necesario para que culmine el proceso de germinación de las semillas.

Para este caso esto puede estar relacionado con el bajo porcentaje de germinación de la semilla a esta temperatura (Tabla 2).

El comportamiento del cultivar Cubana 23 que adelantó el inicio de la germinación de las semillas en 24 horas a temperatura de 30 °C podría tenerse en cuenta para posteriores estudios en búsqueda de cultivares a las altas temperaturas y para la selección de progenitores en el programa de mejora genética del frijol, buscando tolerancia a estrés abiótico.

En estudios con semillas de maíz (*Zea mays* L.) se informó que al aumentar la temperatura a 45 °C, se incrementó el tiempo medio de la germinación (18); sin embargo, en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a pesar de no afectarse la germinación entre 15 y 25 °C para los cultivares estudiados, se observó que la dinámica de

germinación resultó modificada por las temperaturas y se adelantó el momento de obtención de la velocidad máxima de germinación, a medida que aumentaron las mismas. Se destaca que a 35 °C; en los cultivares donde lograron germinar las semillas, el tiempo de germinación se prolongó a 144 horas aproximadamente (19).

El índice de Maguire (Figura 2), que es una variable que pondera la germinación acumulada con el tiempo, logró diferenciar el efecto de la temperatura con el proceso de germinación de los diferentes cultivares. Se aprecia en la figura que existen diferencias significativas entre las diferentes temperaturas para cada cultivar.

También se observó que los mayores valores de este índice se alcanzaron con temperaturas de 20 °C para todos los cultivares en estudio. Sin embargo, a 30 y 40 °C tuvieron un índice más bajo. A pesar de esto se puede precisar que a 30 °C se observan los cultivares Cubana 23 y Buena Ventura con un mejor comportamiento que los restantes cultivares en estudios. En las condiciones climáticas de Cuba, resulta de mucho interés la problemática que existe en cuanto la disminución de la germinación a temperaturas por encima de 30 °C, existen estudios donde se utilizan los índices de germinación de semillas para la selección temprana de genotipos tolerantes a determinado estrés (16,20).

Aspectos señalados por algunos autores, informan que la pobre germinación de las semillas a altas temperaturas, está relacionada con la síntesis de proteínas en el embrión de las semillas, lo cual influye en su velocidad de germinación.

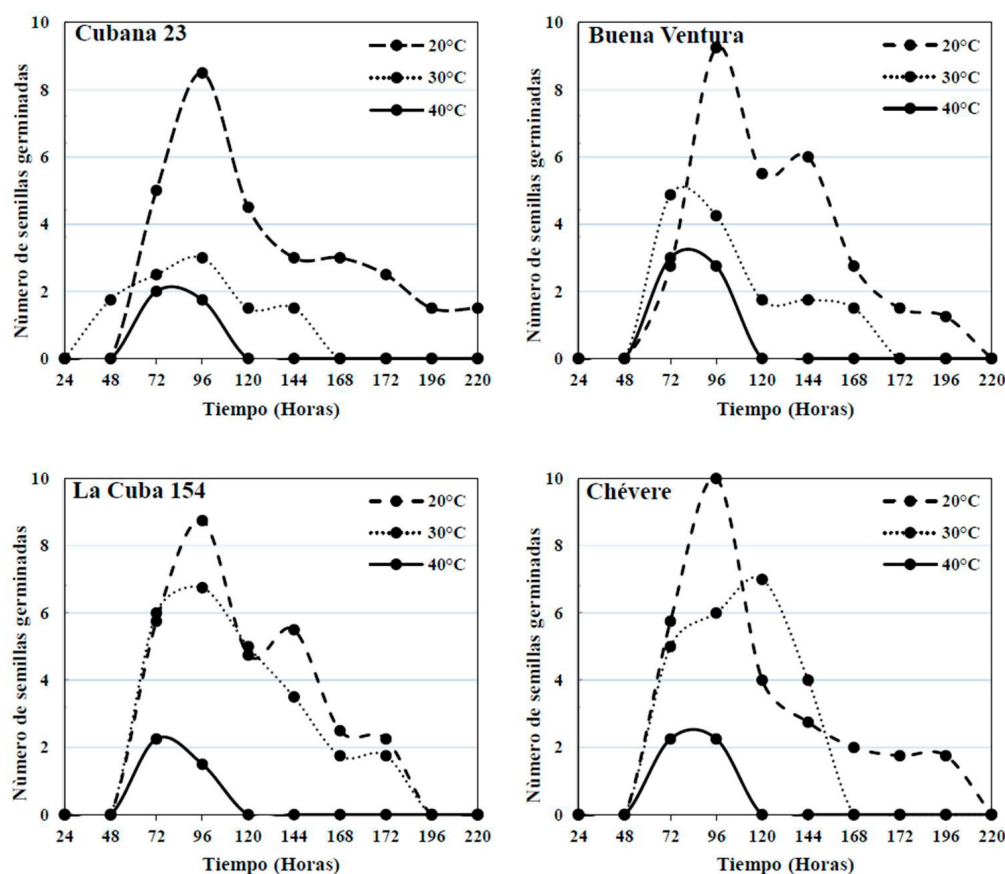


Figura 1. Dinámica de germinación de semillas de frijol de cuatro cultivares a diferentes temperaturas.

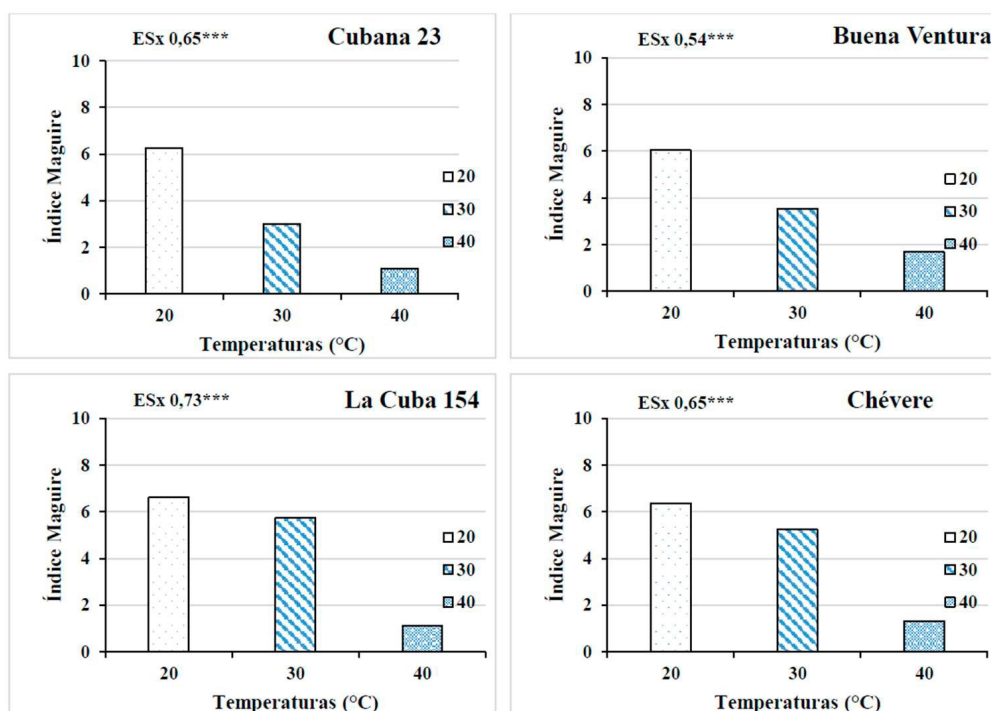


Figura 2. Índice de Maguire de semillas de frijol de cuatro cultivares a diferentes temperaturas.

Al respecto se informa, que en la semilla ocurren varios procesos que dependen únicamente de las reservas, el ácido giberélico del embrión actúa sobre la capa de aleurona, donde se activa la enzima amilasa que inicia la degradación de sustancias de reserva contenidas en el endospermo y el cotiledón. De la digestión de tejidos de reserva son liberados diversos compuestos para ser reutilizados en múltiples procesos de síntesis. Moléculas complejas como son: celulosas, hemicelulosas, almidones, amilopectinas, lípidos, ligninas, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y hormonas, son degradadas a moléculas simples por enzimas específicas (11,21).

Otros autores destacan el papel del pericarpio en la termo inhibición de las semillas, señalan además, que en parte esto está dado por la presencia de inhibidores en el tejido o también por el hecho de que en presencia de altas temperaturas los requerimientos de oxígeno resultan relativamente altos, lo que no permite que el pericarpio mantenga estas demandas (22).

Para la mayoría de los casos, la velocidad de germinación se incrementa al aumentar la temperatura; aunque también temperaturas muy altas tienden a disminuirla, en ese rango es posible encontrar la temperatura óptima de germinación. Con temperaturas sobre 32 °C puede disminuir el índice de velocidad germinativo de las semillas. Sin embargo, independientemente del genotipo, el aumento de la temperatura hasta 38 °C disminuye significativamente la velocidad de germinación (22,23). El efecto negativo de las altas temperaturas en la velocidad de germinación también fue expuesto por algunos autores (24), quienes señalaron que una vez llegado al nivel óptimo de temperaturas, donde la velocidad germinativa es mayor, ocurre un descenso a medida que las temperaturas se acercan a su límite máximo donde se produce un daño irreversible en las semillas.

CONCLUSIONES

- Los resultados de este trabajo indican que existe sensibilidad de diferentes cultivares de frijol ante una variación en la temperatura en el proceso de germinación; por tanto, el efecto de la temperatura está estrechamente relacionado con el material genético con que se está trabajando.
- Temperaturas superiores a 30 °C disminuyen la velocidad de germinación en los cultivares en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ulloa JA, Ulloa PR, Ramírez JC, Ulloa Rangel BE. El frijol *Phaseolus vulgaris*: su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. CONACYT. 2011;8(3):5-9.
2. OECD. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 6: OECD Consensus Documents 'Internet'. 2016 'cited 17/03/2021'. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/safety-assessment-of-transgenic-organisms-in-the-environment-volume-6_9789264253421-en
3. Lamz-Piedra A, Cárdenas-Travieso RM, Ortiz-Pérez R, Alfonso LE, Sandrino- Himely A. Evaluación preliminar de líneas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. promisorios para siembras tempranas en Melena del Sur. Cultivos Tropicales. 2017;38(4):111-8.
4. Boudet-Antomarchi A, Boicet-Fabre T, Radame -Castillo O. Rendimiento y sus componentes en variedades de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de sequía en Rio Cauto, Granma. Centro Agrícola. 2015;42(3):61-8.
5. Lanna AC, Taeko-Mitsuzono S, Rios-Terra TG, Pereira-Vianello R, Alves de Figueiredo-Carvalho M. Physiological

- characterization of common bean «*Phaseolus vulgaris*» L. genotypes, water-stress induced with contrasting response towards drought. *Australian Journal of Crop Science*. 2016;10(1):1-6.
6. BCC (Banco Central de Cuba). Alimentos. Información Económica. 2016.
7. Martínez-González L, Maqueira-López L, Nápoles-García MC, Núñez-Vázquez M. Efecto de bioestimulantes en el rendimiento de dos cultivares de frijol *Phaseolus vulgaris* L. Biofertilizadores. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(2):113-8.
8. FAO. El cambio climático, la agricultura y la seguridad alimentaria. 2018.
9. Faure Alvarez B, Benítez González R, Rodríguez Acosta E, Grande Morales O, Torres Martínez M, Pérez Rodríguez P. Guía técnica para la producción de frijol común y maíz. Instituto de Investigaciones en Granos, Artemisa (Cuba); 2014 p. 22.
10. Obregón P. La germinación. Agricultura y ganadería 'Internet'. 2017 'cited 17/03/2021'. Available from: <https://www.monografias.com>
11. Ruiz-Sánchez M, Muñoz-Hernández Y, Guzmán D, Velázquez-Rodríguez R, Díaz-López GS, Martínez AY, et al. Efecto del calibre semilla (masa) en la germinación del sorgo. *Cultivos Tropicales*. 2018;39(4):51-9.
12. Vieira-Ferraz M, Claudenir-Franco F, Sales-Batista G, Fernandes-Lopes K. Salinity on the germination of seed and index of germination speed of three ornamental species. *Ornamental Horticulture*. 2016;22(2):196-201.
13. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. 1955;11(1):1-42.
14. Crop SG. STATGRAPHICS® Plus 'Internet'. 2000. Available from: <http://www.statgraphics.com/statgraphics/statgraphics.nsf/pd/pdpricing>
15. Kayongo Njuki S, Andersson P, Pessarakli M. Farmer participatory evaluation of bean *Phaseolus vulgaris* L) varieties for seed production in Teso-karamoja Sub- region, Uganda. *International Journal of Research*. 2014;2(3):2311-476.
16. Aflaki F, Sedghi M, Pazuki A, Pessarakli M. Investigation of seed germination indices for early selection of salinity tolerant genotypes: A case study in wheat. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2017;29(3):222-6.
17. Caroca R, Zapata N, Vargas M. Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní *Arachis hypogaea* L. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*. 2016;32(2):94-101.
18. Basra AS, Dhillon R, Malik CP. Influence of seed pre-treatments with plant growth regulators on metabolic alterations of germinating maize embryos under stressing temperature regimes. *Annals of botany*. 1989;64(1):37-41.
19. Torres W. Germinación de semillas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill.) a diferentes temperaturas. *Cultivos Tropicales*. 1996;17(1):16-99.
20. Vitória RZ da, De Oliveira F de TG, Posse SCP, Arantes SD, Schmildt O, Viana A, et al. Qualidade fisiológica de sementes de aroeira em função da maturação dos frutos sob diferentes temperaturas de germinação. *Nucleus*. 2018;15(2):575-82. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.2870>
21. Morales-Santos ME, Peña-Valdivia CB, García-Esteva A, Aguilar-Benítez G, Kohashi-Shibata J. Características físicas y de germinación en semillas y plántulas de frijol *Phaseolus vulgaris* L. silvestre, domesticado y su progenie. *Agrociencia*. 2017;51(1):43-62.
22. Drew RLK, Brocklehurst PA. Investigations on the control of lettuce seed germination at high temperatures. *Journal of experimental botany*. 1984;35(7):986- 93.
23. Grey TL, Beasley JP, Webster TM, Chen CY. Peanut seed vigor evaluation using a thermal gradient. *International Journal of Agronomy*. 2011;2011.
24. Finch-Savage WE. The use of population-based threshold models to describe and predict the effects of seedbed environment on germination and seedling emergence of crops. *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture*. Haworth Press: New York, USA. 2004;51-96.