

AValiação DA INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SOBRE A INCIDÊNCIA DA FUSARIOSE DA PIMENTA-DO-REINO*

ELIZABETH Y. CHU, TADAMITSU ENDO, RUTH L.B. STEIN¹ & FERNANDO C. DE ALBUQUERQUE¹

CPATU, Caixa Postal 48, 66095-100 Belém, PA.

(Aceito para publicação em 17/03/97)

CHU, E.Y.; ENDO, T.; STEIN, R.L.B. & ALBUQUERQUE, F.C. de. Avaliação da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares sobre a incidência da fusariose da pimenta-do-reino. Fitopatologia brasileira 22:205-208. 1997.

RESUMO

A fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) é a doença mais devastadora à cultura na região amazônica. As medidas de controle preconizadas são dispendiosas e não apresentam controle adequado da doença, sendo necessário estudos de novos métodos de controle. Objetiva-se avaliar a possibilidade de reduzir a incidência da fusariose, através da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Foi realizado um experimento com plântulas de pimenta-do-reino, cv. Guajarina, em casa de plástico. Utilizaram-se quatro espécies de FMA: *Scutellospora* sp., *S. heterogama*, *S. gilmorei* e *Entrophospora colombiana*. A pré-inoculação foi feita pela deposição de solo-inóculo em contato direto com as raízes das plântulas, na fase cotiledônea, em copos de 500 ml, contendo solo fumigado. Após três meses e meio, as plântulas foram transferidas para vasos de plásticos de quatro quilos, contendo mistura de solo fumigado e inóculo de *F. solani* f. sp. *piperis* na proporção de 0,2% (v/v). Durante o transplântio,

foi feita uma reinoculação de FMA, colocando solo-inóculo das mesmas espécies no fundo do vaso de plástico. A incidência da doença foi avaliada quatro meses após o transplântio. A incidência da fusariose foi de 5%,10%,15%,35% e 85% para os tratamentos de *S. gilmorei*, *E. colombiana*, *S. heterogama*, *Scutellospora* sp. e a testemunha, respectivamente. A inoculação com FMA reduziu de 50 a 80% a incidência da doença, em relação à testemunha, sendo que *S. gilmorei* apresentou o maior potencial para redução da doença (80%), maior produção de matéria seca das plantas sobreviventes (11,7 g por planta) e maior percentagem do comprimento das raízes colonizadas pelo FMA (55,18%). Pelos resultados obtidos, há perspectiva de se incorporar o uso de FMA num programa de controle da fusariose de pimenta-do-reino.

Palavras-chave: *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, micorríza.

ABSTRACT

Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on the incidence of fusarium root rot of black pepper

Fusarium root rot (*Fusarium solani* f.sp. *piperis*) of black pepper (*Piper nigrum*) is the most destructive disease of black pepper in the Amazon region. The recommended methods do not show adequate control of the disease. It is necessary to study new methods of control. In order to verify the possibility of reducing disease incidence by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), an experiment was conducted with black pepper seedlings, cv. Guajarina, in a plastic house. Four species of AMF were tested: *Scutellospora* sp., *S. heterogama*, *S. gilmorei* and *Entrophospora colombiana*. Pre-inoculation was performed by depositing the soil-inoculum right underneath the root system of cotyledonous stage seedlings, in 500 ml plastic cups containing fumigated soil. Three and half months later, the seedlings were transferred to 4 kg plastic pots containing a mixture of fumigated soil and an inoculum of *F. solani* f. sp. *piperi*, in

the ratio of 0,2% (v/v). During the transplantation, reinoculation of AMF was carried out by depositing the soil-inoculum of the same species on the bottom of the plastic pot. The experiment was evaluated four months later. Fusarium root rot incidences were 5%,10%, 15%, 35% and 85% for the treatments of *S. gilmorei*, *E. colombiana*, *S. heterogama*, *Scutellospora* sp. and control without inoculation, respectively. The mycorrhizal inoculation reduced disease incidence from 50 to 80% with *S. gilmorei* being the specie which showed the greatest potential for disease control, dry matter production of surviving plants (11,7g / plant) and percentage of colonized root length (55.18%). From the results obtained, there is a perspective to incorporate the use of AMF into a control program of fusarium root rot of black pepper.

* Trabalho executado com apoio do Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA

A fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis* Albuquerque) da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a doença mais devastadora à cultura na região amazônica. O patógeno afeta o sistema radicular e a parte aérea da planta e provoca perdas significativas aos pipericultores. Quando a infecção inicia pela parte aérea, onde a disseminação é mais rápida, pode ocorrer a morte de um pimental de 20 ha, com cerca de 30.000 plantas, em dois a três anos (Albuquerque, 1976). No estado do Pará, aproximadamente 10 milhões de pimenteiras foram destruídas pela fusariose no período entre 1972 e 1980 (Albuquerque, 1980). A fusariose da pimenta-do-reino é de ocorrência restrita ao Brasil (Holliday & Mowat, 1963), nos Estados de Pará, Amazonas, Mato Grosso, Paraíba, Bahia e Espírito Santo (Gonçalves & Alves, 1967; Albuquerque, 1976; Ventura *et al.*, 1980). As medidas de controle preconizadas, tais como uso de fungicidas e erradicação de plantas doentes são dispendiosas e não tem apresentado resultados satisfatórios. Isto tem causado o abandono de extensas áreas cultivadas e a diversificação de atividades, em regiões pipericultoras tradicionais. Para viabilizar o sistema de produção da pimenta-do-reino em áreas de ocorrência da doença, é necessária a busca de novos métodos de controle.

A maioria das plantas cultivadas forma associação simbiótica com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Os efeitos benéficos desta associação em aumentar a absorção de nutrientes e de crescimento da planta hospedeira já foram bem documentados (Rhodes, 1980). Embora a infecção de FMA pouco altere a morfologia das raízes da planta hospedeira, as células radiculares podem sofrer modificações estruturais e bioquímicas, como permeabilidade de membrana, quantidade e qualidade de exsudação, em consequência da alteração nutricional da planta (Shönbeck, 1979). Exsudação alterada de raízes pode induzir mudanças na composição microbiana da rizosfera ou "micorrizosfera" (Rambelli, 1973; Linderman, 1994). Muitas dessas mudanças podem influenciar o crescimento da planta (Bagyaraj & Menge, 1978), a tolerância ao estresse ambiental (Hardie, 1985) e a incidência de doença (Bartschi *et al.*, 1981; Caron *et al.*, 1986).

Como o FMA, os patógenos habitantes do solo completam o ciclo de vida dentro e fora da raiz da planta. Ambos são biotróficos e competem fortemente entre si. Devido a sua habilidade saprófita, os patógenos superam o FMA antes de penetrar nas raízes (Garbaye, 1991). Portanto, o efeito supressivo do FMA sobre os patógenos ocorre desde que se estabeleça antes da invasão do patógeno. Stewart & Pflieger (1977) demonstraram que a inoculação simultânea de FMA e de patógenos não afetou a podridão de raiz de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch e as plantas só se tornaram resistentes quando o FMA foi inoculado 20 dias antes de *Pythium ultimum* Trow. e *Rhizoctonia solani* Kuhn. A pré-inoculação de *Glomus intraradices* Schenck & Smith reduziu o dano causado por *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen em tomateiro (Caron *et al.*, 1986). Houve redução na severidade da doença em citrus, causada por *Phytophthora parasitica* (Dastur) quando as plantas foram pré-inoculadas com *Gigaspora margarita* Becker & Hall e *Glomus macrocarpum* Tul. & Tul., 110 dias antes do patógeno (Scheck *et al.*, 1977). Como as mudas de plantas perenes são produzidas em viveiro, a pré-inoculação

com FMA pode se tornar um procedimento normal na produção de mudas. Até o momento, não há registro de estudos visando à utilização de FMA como alternativa para o controle de *F. solani* f. sp. *piperis*. Neste trabalho, verificou-se a possibilidade de reduzir a incidência da fusariose através da inoculação das plantas com FMA.

O trabalho foi conduzido em casa de plástico, no Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental-CPATU, estado do Pará.

As sementes de pimenta-do-reino, cv. Guajarina, foram colocadas para germinar em areia lavada. A germinação ocorreu 35 dias após a semeadura. As plântulas, na fase cotiledônea, foram transferidas para copos de plástico de 500 ml, contendo Latossolo Amarelo Distrófico, textura média, fumigado com brometo de metila (264 ml/m³). A análise química do solo apresentou as seguintes características: pH (em água) : 5,1; 20 mg/kg de P; 40 mg/kg de K; 1,9 meq/100g de Ca; 3,4 meq/100g de Ca+Mg e 0,4 meq/100g de Al.

Os tratamentos de inoculação incluíram quatro espécies de FMA: *Scutellospora* sp. (isolado de dendê), *S. heterogama* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders (proveniente de IAC), *S. gilmorei* (Trappe & Gerd.) Walker & Sanders (isolado de castanha-do-brasil), *Entrophospora colombiana* Spain & Scheck (proveniente de CIAT) e testemunha não inoculada. Os FMAs foram multiplicados em vasos-de-cultivo, contendo *Brachiaria decumbens* como planta hospedeira. O solo, os esporos e os segmentos de raízes colonizadas de *B. decumbens* constituíram o solo-inóculo.

A pré-inoculação com FMA foi feita pela deposição de 30g de solo-inóculo, contendo aproximadamente 800-1.000 esporos, em contato direto com as raízes das plântulas, durante o transplante para copos de plástico de 500 ml. As plântulas receberam quatro aplicações de 33% de uma solução nutritiva completa (Bolly-Jones, 1956), 10 ml/planta, durante 105 dias. Três meses e meio após a pré-inoculação, 20 plantas de cada tratamento foram transferidas para vasos de plástico com capacidade para quatro quilos, contendo o mesmo solo fumigado mais inóculo de *F. solani* f. sp. *piperis*, previamente cultivado em meio de solo e farelo de trigo (4:1) e incubado sobre temperatura de 25°C e umidade de 90%, durante 15 dias. O inóculo do patógeno foi incorporado ao solo na proporção de 0,2% (v/v) e peneirado (malha=1cm²) para homogeneizar a mistura. Foi feita a re-inoculação do FMA durante o transplante, colocando-se as mesmas espécies e mesma quantidade de solo-inóculo no fundo do vaso de plástico. Como as plantas de testemunha sem inoculação não cresceram nem com a aplicação de solução nutritiva, foram substituídas por plantas com seis meses de idade para se igualarem ao tamanho das plantas inoculadas. As plantas receberam quatro aplicações de 50% da mesma solução nutritiva, 10ml/ vaso, após a reinoculação do FMA. Durante o período do experimento, a intensidade de luz foi reduzida para 60% pelo uso de sombrite e a temperatura variou de 25°C a 35°C.

Foi feito o isolamento do patógeno das lesões necróticas na base do caule da planta de pimenta-do-reino, nos meios de BDA (200g batata; 20g dextrose e 20g agar) e de Komada, 1975 (K₂HPO₄ 1g; KCl 0,5g; MgSO₄ • 7H₂O 0,5g; Fe-Na-EDTA 0,01g; L-asparagina 2g; D-galactose 20g;

Agar 15g; água destilada 1.000ml; PCNB 75% WP 1g; Oxgall 0,5g; Na₂B₄O₇ • 10H₂O 1g; Estreptomicina 0,3g), seletivo para *Fusarium* durante o período de aparecimento da doença.

O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro repetições por tratamento e cinco plantas por repetição.

O experimento foi avaliado quatro meses após o transplante para vasos de plástico, tomando como características de avaliação, a incidência de fusariose (número das plantas mortas/número total da planta), a produção da matéria seca das plantas sobreviventes, a percentagem de colonização do comprimento de raiz das plantas sobreviventes e o número de colônias de *Fusarium* recuperadas do solo após o experimento. A percentagem de colonização do comprimento de raiz foi determinada pela observação microscópica de 25 segmentos de um centímetro de raízes por planta, coloridos com 0,05% de azul de tripano em lactoglicérol, método de Phillips & Hayman (1970) adaptado por Abbott & Robson (1981). As colônias de *F. solani* f. sp. *piperis* foram obtidas pelo método de diluição em placa (10⁻²) no meio de BDA e posteriormente transferidas para meio de Komada.

Os sintomas da doença, lesão necrótica na base do caule, amarelecimento e murcha da planta, foram observados um mês após a exposição das plantas de pimenta-do-reino ao *F. solani* f. sp. *piperis*. A morte das plantas infectadas ocorreu cerca de uma semana após o aparecimento dos sintomas.

Na Figura 1 estão apresentados os resultados dos tratamentos sobre a incidência de fusariose. A inoculação com FMAs reduziu de 50 a 80% a incidência de fusariose em relação à testemunha não inoculada. No estudo de interação entre FMA, *Rhizobium* e fungo patogênico em soja, Chou & Schmitthener (1974) e Woodhead *et al.* (1977), observaram que a presença de *Glomus mosseae* Nicol. & Gerd. reduziu o número de plantas mortas por *Phytophthora megasperma* (Drechter) var. *sojae* Waterhouse. Em condições de campo, as mudas micorrizadas de *Liriodendron tulipifera* L. sofreram 50% a menos de infecção radicular causada por *Cylindrocladum scoparium* (P. Henn.) v. ARX e menor índice de mortalidade (Bagyaraj, 1984).

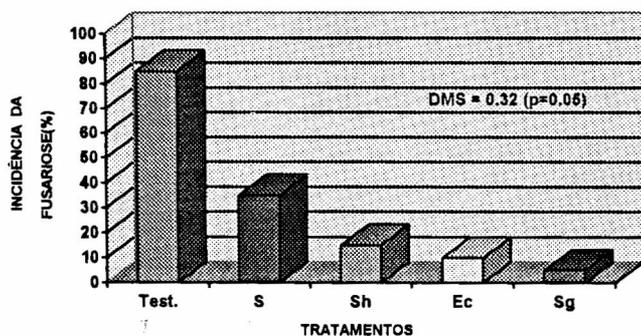


FIG.1 - Efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares: *Scutellospora* sp.(S.), *Scutellospora heterogama* (Sh), *Entrophospora colombiana* (Ec) e *Scutellospora gilmoeri* (Sg), sobre a incidência da fusariose em pimenta-do-reino, cv. Guajarina, quatro meses após a inoculação de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Embora não tenha sido o objetivo deste trabalho verificar a interferência de *F. solani* f.sp. *piperis* sobre a eficiência do FMA, a inoculação aumentou a produção de matéria seca das plantas micorrizadas em comparação com aquelas não-inoculadas, mesmo na presença do patógeno (Tabela 1). A redução da percentagem de colonização micorrízica das raízes pode ou não ocorrer na presença do patógeno, dependendo especificamente de cada combinação de planta-patógeno-FMA (Davis *et al.*, 1978). Mesmo que a colonização micorrízica das raízes seja reduzida pela presença do patógeno, as reduções da incidência de doença e da população de patógeno já foram observadas. (Caron *et al.*, 1986). O maior número de colônias de *F. solani* f.sp. *piperis* foi recuperado do solo da testemunha não-inoculada que apresentou também a maior incidência da doença. Entre as espécies de FMA testadas, *S. gilmorei* foi a que mostrou o maior potencial em reduzir a incidência da doença e a população do patógeno no solo e ao mesmo tempo promover o maior produção de matéria seca e percentagem de comprimento de raízes colonizadas das plantas sobreviventes de pimenta-do-reino (Figura 1 e Tabela 1).

TABELA 1 - Produção de matéria seca das plantas sobreviventes, número de colônias de *F. solani* f. sp. *piperis* recuperadas e comprimento de raízes colonizadas por FMA, em plantas de pimenta-do-reino micorrizadas ou não, quatro meses após a inoculação do patógeno.

Tratamento	Matéria seca (g/planta)	Nº colônias de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> /g solo seco	Comprimento de raízes colonizadas (%)
Testemunha	3,0 c	23,4 a	—
<i>Scutellospora</i> sp.	8,5 ab	3,8 b	25,8 b
<i>S. heterogama</i>	6,4 b	2,0 b	37,5 b
<i>E. colombiana</i>	6,2 b	1,8 b	22,8 b
<i>S. gilmorei</i>	11,7 a	1,0 b	55,2 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

O efeito da inoculação com FMA em aumentar a resistência da planta de pimenta-do-reino à fusariose pode estar relacionado com aumento da produção de biomassa (Davis, 1980), alteração fisiológica da planta (Baltruschat & Schönbeck, 1975), maior competição por nutrientes e sítio de penetração (Dehne, 1982) e alteração na população microbiana da micorrizosfera (Meyer & Linderman, 1986). Ainda que a interação planta-FMA-patógeno seja complexa, o efeito do FMA sobre o desenvolvimento da doença e do patógeno deve ser investigado.

Embora a ênfase de estudos seja mais direcionada para interação FMA e patógenos que causam doenças em raízes de plantas, o FMA pode influenciar também as doenças da parte aérea da planta (Schönbeck, 1979; Dehne, 1982). Em seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), nas folhas de plantas micorrizadas, o tamanho da lesão e a produção de esporos de *Microcyclus ulei* foram significativamente reduzidos em relação às plantas não-micorrizadas (Feldmann *et al.*, 1989). Sabendo-se que *F. solani* f. sp. *Piperis* ataca também a parte aérea da planta de pimenta-do-reino, é inte-

ressante avaliar o efeito da micorrização sobre a infecção via parte aérea.

De acordo com os resultados obtidos, há perspectiva de se incorporar o uso de FMA num programa de controle da fusariose da pimenta-do-reino.

O trabalho deverá ser repetido, usando estacas de pimenta-do-reino e solo natural não fumigado, conforme o procedimento adotado pelos pipericultores da região para formação de mudas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: competition with indigenous fungi in field soils. *Aust. J. Agric. Res.* 32: 621-630. 1981.
- ALBUQUERQUE, F.C. Características morfológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). Tese de mestrado. Universidade de Viçosa. Viçosa. 63 p. 1976.
- ALBUQUERQUE, F.C. Podridão das raízes e secamento dos ramos da pimenta-do-reino: fusariose da pimenta negra, in: Encontro Nacional de Fitossanitaristas, 1., Campinas, Anais. Campinas, Secretaria de Defesa Sanitaria. 1980. p. 107-117.
- BAGYARAJ, D.J. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In: Conway L.I.P. & Bagyaraj, D.J. ed. VA mycorrhiza. Boca Raton. CRC press. 1984. p.131-153.
- BAGYARAJ, D.J. & MENGE, J.A. Interactions between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. *New Phytol.* 80 : 567-573. 1978.
- BALTRUSCHAT, H. & SCHÖENBECK, F. Studies on the influence of endotrophic mycorrhiza on the infection of tobacco by *Thielaviopsis basicola*. *Phytopath. Zeitschrift.* 84: 172-188. 1975.
- BARTSCHI, H., GIANINAZZI-PEARSON, V. & VEGH, I. Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopath. Zeitschrift.* 102: 213-218. 1981.
- BOLLY-JONES, E.W. Visual symptoms of mineral deficiencies of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 14: 493. 1956.
- CARON, M., RICHARD, C. & FORTIN, J.A. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on fusarium crown and root rot of tomatoes *Phytoprotection.* 67: 15-19. 1986.
- CHOU, L.G. & SCHMITTHENNER, A.F. Effect of *Rhizobium japonica* and *Endogone mosseae* on soybean root rot caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Disease Report.* 58: 221. 1974.
- DAVIS, R.M., MENGE, J.A. & ZENTMYER, G.A. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plants. *Phytopathology.* 68: 1614-1617. 1978.
- DAVIS, R.M. Influence of *Glomus fasciculatus* on *Thielaviopsis basicola* root rot of citrus. *Plant Disease.* 64: 839-840. 1980.
- DEHNE, H.W. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology.* 72: 1115-1119. 1982.
- FELDMANN, F., JUNQUEIRA, N.T.V. & LIBERIE, R. Utilization of VA-mycorrhiza as a factor in integrated plant protection. *Agriculture, Ecosystem and Environment.* 29: 131-135. 1989.
- GARBAYE, J. Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia, Birkhauser Verlag.* 47: 370-375. 1991.
- GONÇALVES, J. R. C. & ALVES, M. F. Estudo comparativo do desenvolvimento de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em meios preparados com extratos de diferentes materiais usados como adubo em pimenta-do-reino. *Rev. Soc. Bras. Bot.*1(1): 59-65. 1967.
- HARDIE, K. The effect of removal of extraradical hyphae on water uptake by vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 101: 677-684. 1985.
- HOLLYDAY, P. & MOWAT, W.P. Foot rot of *Piper nigrum* L. (*Phytophthora palmivora*) s.l. *Common Wealth Mycol. Inst. paper* nº 5. 1963. 62p.
- KOMADA, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8: 114-124. 1975.
- LINDERMAN, R.G. Role of VAM fungi in biocontrol. In: Pflieger, F.L. & Linderman, R.G. ed. Mycorrhizae and plant health. St. Paul, APS press. 1994. p. 1-25.
- MEYER, J.R. & LINDERMAN, R.G. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 191-196. 1986.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161. 1970.
- RAMBELLI, A. The rhizosphere of mycorrhizae. In: G.L. Marks & T.T. Kozlowski, eds., *New York Academic Press.* 1985. p. 299-343.
- RHODES, L.H. The use of mycorrhizae in crop production systems. *Outlook on Agriculture.* 10: 275-281. 1980.
- SCHECK, N.C., RIDINGS, W.H. & CORNELL, J.A. Interaction of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and *Phytophthora parasitica* on two citrus root stocks., in 3rd N. am. conf. Mycorrhizae. p. 9. 1977 (Abstract).
- SCHÖNBECK, F. Endomycorrhiza in relation to plant disease. In: B. Schippers & W. Gams, ed. *Soil-borne plant pathogens.* Academic Press. New York. 1979. p. 273-274.
- STEWART, E.L. & PFLEGER, F.L. Development of poinsettia as influenced by endomycorrhizae, fertilizer and root rot pathogens *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*. *Florists Rev.* 159: 37,79-80. 1977.
- VENTURA, J.A., ALBUQUERQUE, F.C. & RIBEIRO, S.R. Etiologia da podridão das raízes da pimenta-do-reino no Espírito Santo. *Fitopatol. bras.* 5(3): 464-465. 1980.
- WOODHEAD, S.H., GERDEMANN, J.W. & PAXTON, J.D. Mycorrhizal infection of soybean roots reduces phytophthora root rot. 3rd N. Am. Conf. mycorrhizae. p.10. 1977 (Abstract).