

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Prevalencia de la roya *Olivea tectonae* (Rac.) de la teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica

Luis Matarrita Díaz¹
José Sergio Sandoval Islas²
Marcela Arguedas Gamboa³

Resumen

El presente estudio es producto del diagnóstico y determinación de prevalencia (incidencia y severidad) de la enfermedad conocida como "roya de la teca" *Olivea tectonae* (Rac.) en Costa Rica, en la especie forestal *Tectona grandis* L.f. Se realizó entre los meses de marzo y agosto del 2004 en las regiones Atlántica, Brunca, Chorotega, Huetar Norte y Pacífico Central de Costa Rica. Las royas son patógenos obligados y muy especializados en cuanto a los hospederos que afecta, pertenecen a la clase de los *Basidiomycetes* del orden *Uredinales*. El hongo *O. tectonae* se caracteriza por la aparición de manchas marrones y amarillas en plantas pequeñas, especialmente asociada en plantaciones de vivero. Se detecta en Costa Rica en enero del 2004. Con esta investigación se determinó la presencia del hongo en un 67% de las 69 fincas analizadas, lo que hace suponer que la distribución de la enfermedad está generalizada a nivel nacional. Para medir incidencia y severidad, se analizaron 32 parcelas ubicadas en las regiones Chorotega, Huetar Norte y Pacífico Central, en tres rangos de edad (2-4, 5-7 y > 8 años). En éstas, la incidencia promedio fue de un 94.58%, siendo la Pacífico Central la más afectada con un 99.38%. Al comparar severidad entre regiones y edades, el Pacífico Central y el rango de edad 5-7 años, presentaron los mayores porcentajes. Las precipitaciones pueden incidir sobre el grado de severidad de la roya, pues en los meses de julio y agosto en el Pacífico Central, los promedios anuales de lluvia que caen son mayores, respecto a las otras regiones. En este estudio, también se encontraron plantas que no son afectadas por la roya, lo que podría estar ligado a una resistencia ó tolerancia de éstas al hongo *O. tectonae*.

Palabras claves: Costa Rica, Incidencia, *Olivea tectonae*, Roya de la teca, Teca, *Tectona grandis*, Tolerancia, Severidad.

Abstract

Prevalence of the teak rust *Olivea tectonae* (Rac.) on teak (*Tectona grandis* L.f.) in Costa Rica. The present study is the result of the diagnosis and prevalence determination (incidence and severity) of the well-known disease "teak rust" *Olivea tectonae* (Rac.) in Costa Rica, on *Tectona grandis* L.f, that could have an impact in the development of this species. It was carried out between March and August 2004, in the Atlantic, Brunca, Chorotega, North Huetar and Central Pacific regions in Costa Rica. The rusts are obligated pathogens and very host specialized, they belong to the *Basidiomycetes*, order *Uredinales*. The fungus *O. tectonae*, is characterized by the appearance of brown and yellow stains in

¹ Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. lmatarrita@protechnet.go.cr

² Colegio de Postgraduados, México. sandoval@colpos.mx

³ Instituto Tecnológico de Costa Rica. marguedas@itcr.ac.cr

seedling, specially frequent in nurseries. It was detected in Costa Rica in January 2004. This investigation determined the presence of the fungus in 67% of the 69 analyzed estates, which lead to the supposition that distribution of the disease is generalized at national level. To measure incidence and severity, 32 lots located in the Chorotega, North Huetar and Central Pacific regions, were analyzed, in three age ranges (2-4, 5-7 and > 8 years). The average incidence was 94.58%, being the Central Pacific the most affected with 99.38%. When comparing severity among regions and ages, the Central Pacific region and the age range 5-7 years, presented the biggest percentages. Precipitations can influence the degree of severity of the rust, because in July and August in the Central Pacific, the annual rainfall average increases, in comparison to other regions. Plants were found that were not affected by the rust, which could be related to a resistance or tolerance to the *O. tectonae* fungus.

Key words: Costa Rica, Incidence, *Olivea tectonae*, Teak rust, Teak, *Tectona grandis*, Tolerance, Severity.

INTRODUCCIÓN

La teca, *Tectona grandis* L.f., es una de las principales maderas preciosas que existen actualmente en el mundo, apreciada entre otras cosas por su color claro, su excelente fibra y durabilidad (Pandey y Brown, 1996).

En Centroamérica se reporta la siembra de aproximadamente 76 000 hectáreas (FAO, 2002). En este momento, es considerada como una de las especies forestales de mayor importancia, pues está siendo vendida en mercados internacionales, tanto los productos de raleos, como la madera cuando alcanza su madurez (Moya, 2002). La teca es una de las maderas más valiosas del mundo, lo que hace que continúe existiendo un gran interés en plantar e invertir en esta especie. Costa Rica no es la excepción, con más de 40 000 ha plantadas (INISEFOR, 2003) y un área promedio anual de 1000 ha (Pandey y Brown, 1996; Schmincke, 2000).

Como toda especie vegetal, *T. grandis* es atacada por diferentes plagas, dentro de ellas cabe destacar la “roya de la teca”, la cual es una enfermedad causada por el hongo *Olivea tectonae* (Rac). (Arguedas, 2004). En noviembre del 2003 se publicó en diarios de Panamá la presencia de esta enfermedad, lo cual generó gran preocupación en el sector forestal. En febrero del 2004, se confirmó la presencia de este hongo y se caracterizaron los daños ocasionados en las regiones Atlántica, Huetar Norte y Pacífico Central de Costa Rica (Arguedas, 2003; Arguedas *et al*, 2003).

Por lo anterior, se hace necesario realizar el presente estudio para evaluar el daño producido por el hongo *Olivea tectonae* (Rac.), así como determinar su prevalencia, por medio de la toma de muestras y el establecimiento de parcelas en diferentes regiones, donde se valore la incidencia y severidad asociado a la precipitación, edad de la plantación y diámetro de la planta. Se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo general:

Determinar la prevalencia de la enfermedad conocida como “roya de la teca” *O. tectonae* en diferentes zonas de Costa Rica.

Objetivos específicos:

- Identificar y georeferenciar plantaciones con la presencia de roya de la teca *O. tectonae* en Costa Rica.
- Determinar la incidencia de la roya de la teca *O. tectonae* en diferentes regiones de Costa Rica.
- Cuantificar la severidad de la roya de la teca *O. tectonae* en plantaciones infectadas.

LA ROYA DE LA TECA: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes

La “roya de la teca” es una enfermedad que sólo había sido detectada en Pakistán e India, antes de localizarse en Panamá (2003) y Costa Rica (2004) (Arguedas, 2004). Las royas son parásitos obligados y muy especializados en cuanto a los hospederos que afecta y no pueden vivir fuera de ellos (González, 1989).

Clasificación taxonómica

De acuerdo a Kendrick (1992), la especie *Olivea tectonae*, pertenece a la clase Basidiomycota, al orden Uredinales y a la familia Melampsoraceae.

Manifestaciones sintomatológicas

Los síntomas se pueden detectar desde el estado de plántula hasta árboles adultos, pero con algunas variaciones según la edad de la planta. En plántulas recién germinadas se observan pequeños puntos cloróticos en los cotiledones, sobre algunos de los cuales se presentan pústulas de urediniosporas. En plantas jóvenes, de menos de 2 m de altura, el daño se presenta únicamente en las hojas más bajas con cantidades moderadas de esporas en el envés. Los síntomas son variables ya que en algunos casos se producen manchas necróticas de diferente tamaño y en otros la quema es más generalizada (Arguedas, 2004).

En árboles grandes, las hojas afectadas son las más viejas. Los síntomas iniciales son áreas cloróticas de borde difuso en el haz y en el envés de colores amarillo y pardo, posteriormente, lo que se observa es la coloración naranja de las grandes acumulaciones de esporas en el envés (Sharma *et al*, 1985) (Figura 1).



Concentración de uredosporas

Figura 1. Plantación de teca (*Tectona grandis* L.f.) de dos años severamente atacada por la roya *Olivea tectonae*. Parrita, Costa Rica. 2004.

La transmisión de este hongo puede darse a través del viento, o bien por medio de plantas vivas o pseudoestaca, ya que por semilla es muy improbable (Esquivel, 2003).

Manejo

El desarrollo de la enfermedad se ve favorecido en plantaciones estresadas, por lo que se recomienda evaluar diferentes niveles de manejo, especialmente en actividades culturales como la poda y los raleos. En plántulas de vivero ó en plantaciones recién establecidas que presentan la enfermedad, se deben realizar aplicaciones con fungicidas como: Benomil, Óxido de Cobre, Oxicarboxin, etc., rotándolos para evitar la resistencia a los mismos (Arguedas, 2004).

METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló entre los meses de marzo y agosto del 2004; se dividió en dos etapas:

Primera etapa

En el mes de marzo del 2004, se visitaron plantaciones de teca en diferentes regiones del país, para la toma de muestras de follaje; en el campo, por medio de una lupa de 20x se realizó un prediagnóstico para verificar la presencia del hongo. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio del Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) para corroborar el prediagnóstico, por medio de un microscopio marca Zeiss de 6,3/0,16 y un micro-estereoscopio marca Zeiss de w10x/25. La ubicación de los puntos de muestreo, se determinó con la ayuda de un receptor (GPS)

marca Garmin. Con esta información se elaboró un mapa que muestra las plantaciones atacadas y no atacadas por *O. tectonae*.

Segunda etapa

Se realizó en los meses de julio y agosto del 2004. Para esta evaluación, se seleccionaron las tres regiones del país donde se detectaron más plantaciones afectadas por *O.tectonae*, a saber: Pacífico Central, Huetar Norte y Chorotega.

Establecimiento de parcelas

Se establecieron 32 parcelas o unidades experimentales de forma circular de 500 m²: 12 en la localidad de los Chiles (Huetar Norte), 8 en Nandayure (Chorotega) y 12 en Parrita (Pacífico Central) (Figura 2).



Figura 2. Ubicación de las parcelas evaluadas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.) por regiones (puntos rojos) y las estaciones meteorológicas del Instituto Meteorológico de Costa Rica (puntos azules). Costa Rica, 2004.

Se utilizaron tres ámbitos para ubicar las plantaciones con respecto a la edad: de 2 a 4 años, de 5 a 7 años y más de 8 años. Los sitios fueron georeferenciados con un receptor (GPS) marca Garmin.

Evaluación dasométrica

En cada parcela se determinó el número de árboles y se midió el diámetro de cada uno de ellos, con una cinta diamétrica. El personal técnico de cada finca brindó la información de la edad de la plantación.

Incidencia y severidad de la enfermedad

En cada parcela, se determinó la incidencia de la enfermedad, con la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia} = \text{árboles enfermos} / \text{total de árboles observados} \text{ (Arguedas, 2004)}$$

Para la determinación de la severidad, se estableció una escala arbitraria, de acuerdo al porcentaje de follaje afectado por árbol (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala arbitraria para evaluar la severidad de *Olivea tectonae* en *Tectona grandis* en diferentes regiones de Costa Rica.

Valor	Porcentaje de daño (%)	Categoría de daño
0	0	Sano
1	0.1 a 25	Muy bajo
2	25.1 a 50	Bajo
3	50.1 a 75	Medio
4	75.1 a 100	Muy alto

(Arguedas, 2004).

Información meteorológica

Se trabajó con información de precipitaciones promedio de los últimos 5 años (1999 al 2003) del Instituto Meteorológico Nacional (IMN, 2004).

Análisis estadístico

A las variables evaluadas se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA), y específicamente, una prueba de contrastes para el análisis de grupos de edad (SAS versión 6.11, Rebolledo 1999). También se correlacionó: severidad vrs. zona, sitio, edad y la interacción de algunos de estos factores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa

Las plantaciones enfermas se ubican en las regiones Huetar Norte, Brunca, Atlántica, Chorotega y Pacífico Central (Figura 3).

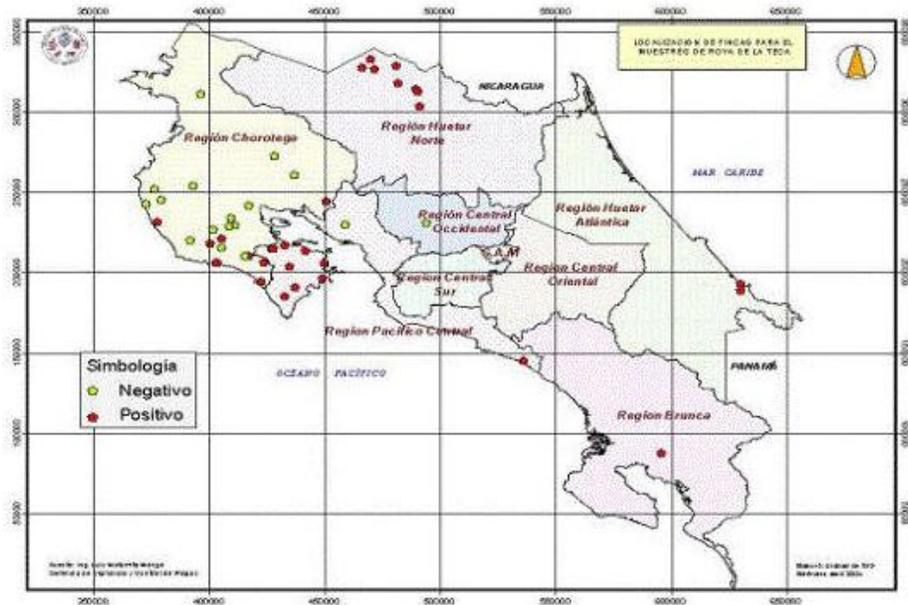


Figura 3. Ubicación de plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.) evaluadas por regiones. Los puntos rojos indican presencia de la roya *Olivea tectonae* y los verdes ausencia. Marzo del 2004. Costa Rica.

Segunda etapa

Estado silvicultural de las plantaciones en estudio por región

En el Cuadro 2 se muestran las regiones involucradas en el estudio, los sitios donde se tomaron las muestras, las parcelas, edad de plantaciones, promedios de diámetro de las plantas y densidad poblacional por hectárea. Se puede observar cómo a mayor edad de la plantación y por el efecto de los raleos, la densidad por hectárea es menor, lo que conlleva a un mayor diámetro por árbol, debido al espacio que ocupa. En la región Chorotega solamente se mencionan dos sitios (rangos de edad), pues en el momento de los muestreos no se ubicaron plantaciones jóvenes (menores de 4 años).

Cuadro 2. Estado silvicultural de las plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.) evaluadas de acuerdo a sitio y región. Costa Rica, 2004.

Región	Sitio	Edad (años)	Diámetro (cm)	Densidad (árboles/ha)
Pacífico Central	1	2	9.02	1055
	2	4	10.34	1010
	3	9	24.16	400
Huetar Norte	1	3	10.84	975
	2	6	19.82	500
	3	10	22.44	435
Chorotega	2	6	22.67	310
	3	10	27.48	235

Incidencia

El Cuadro 3 muestra que la región Chorotega es la menos afectada con un 90.21% de incidencia, seguida por la Huetar Norte con 94.15% y con mayor porcentaje aparece la región Pacífico Central con 99.38%. Se considera que la incidencia en las tres regiones es bastante alta, lo que hace pensar que su distribución está generalizada a nivel nacional.

Cuadro 3. Incidencia promedio de la roya *Olivea tectonae* en plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.), en tres regiones de Costa Rica, 2004.

Región	Sitio	Edad (años)	Incidencia promedio (%)
Pacífico Central	1	2	98.15
	2	4	100
	3	9	100
Promedio			99.38
Huetar Norte	1	3	95.1
	2	6	100
	3	10	87.35
Promedio			94.15
Chorotega	2	6	80.43
	3	10	100
Promedio			90.21

Severidad

Entre regiones se mostraron diferencias en las edades, con respecto al grado de severidad de la enfermedad. La región Pacífico Central, específicamente en la localidad de Parrita (Puntarenas), presentó los mayores niveles de severidad (Figura 4).

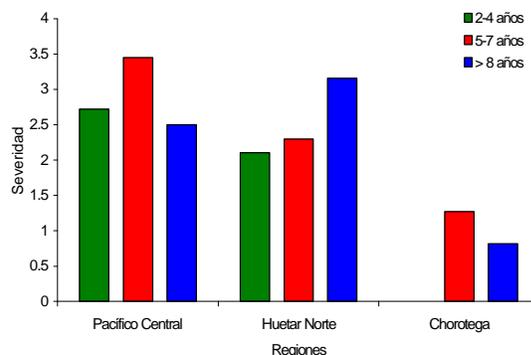


Figura 4. Severidad de roya *Olivea tectonae* en tres regiones de Costa Rica y tres edades de plantaciones de teca (*Tectona grandis* L.f.), 2004.

Como se observa en la figura anterior, en la región Pacífico Central la severidad de la enfermedad fue superior al 25% (grado 2) en todas las edades evaluadas; asimismo, se determinó que las plantaciones comprendidas entre 5 y 7 años mostraron la mayor severidad de la enfermedad. En el análisis de varianza (ANDEVA) se determinaron diferencias estadísticamente significativas del modelo $p = 0.0001$, $R^2 = 0.20$ y coeficiente de variación del 30%. Mediante la prueba de contrastes, se determinaron diferencias en todos los grupos de edad con valores de $p = 0.0001$. Los factores edad y la interacción edad por parcela mostraron valores de probabilidad igual a 0.0001 y 0.0003, respectivamente. Los valores obtenidos permitieron establecer diferencias significativas en todas las edades evaluadas.

Se muestra como en la región Huetar Norte, se determinaron diferencias estadísticas entre grupos de edad de plantación, cuyo factor mostró un $p = 0.0001$, igualmente obtenido por el modelo cuyo R^2 fue de 0.12 y un coeficiente de variación de 54%.

Entre ámbitos de edad, la mayor edad se diferenció estadísticamente de los grupos 5 a 7 años y 2 a 4 años según prueba de contrastes ($p = 0.0001$). No obstante, estos dos grupos de edad no se diferenciaron estadísticamente.

La severidad es mayor en plantaciones de edades entre 5 y 7 con un $p = 0.0001$ y cuyo modelo mostró un $p = 0.0002$, un R^2 de 0.23 y un coeficiente de variación de 45%.

Cuando se realizó el análisis sin tomar en cuenta los ámbitos de edad, se determinó que la menor severidad se presenta en la región Chorotega y la mayor en el Pacífico Central (Figura 5).

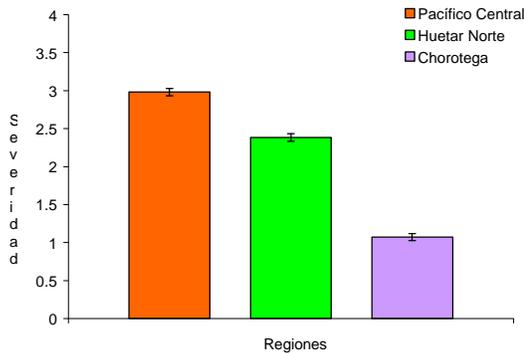


Figura 5. Severidad de roya *Olivea tectonae* en plantaciones teca (*Tectona grandis* L.f.) según región, sin tomar en cuenta los ámbitos de edad. Costa Rica, 2004.

Comportamiento de la precipitación

La precipitación de las regiones osciló entre 2000 y 3000 mm anuales, según histórico mensual de los últimos cinco años (Figura 6). Esta variable es similar entre las regiones Pacífico Central y Huetar Norte; sin embargo, en el Pacífico Central el período semi-seco es más prolongado, esta región es la que presenta la severidad más alta.

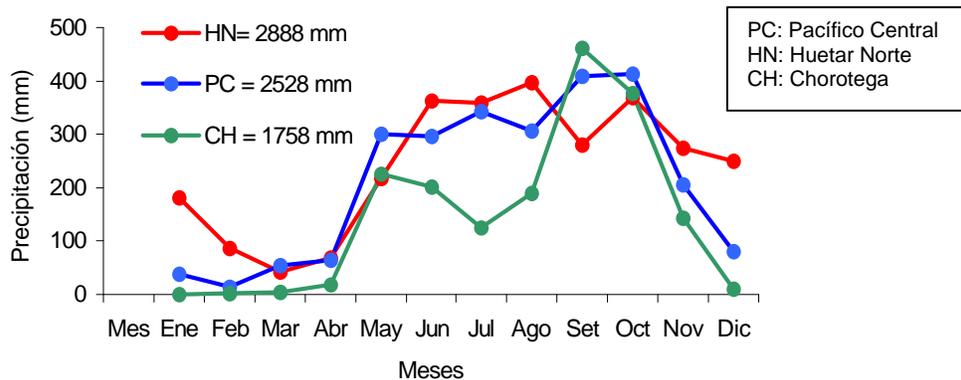


Figura 6. Precipitación promedio mensual de 1999 al 2003, en las regiones Pacífico Central, Huetar Norte y Chorotega de Costa Rica. Fuente: IMN, 2004.

Los factores climáticos como la precipitación, inciden sobre el comportamiento de las enfermedades como las royas. Por ejemplo, la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.), requiere de un mínimo de precipitación para establecerse, así como un período seco en medio de los meses lluviosos para provocar una diseminación exitosa de las uredosporas (Bock, 1992; Cadena, 1982; Waller, 1982).

Otras observaciones

Dentro de todas las parcelas establecidas, se observaron árboles con el follaje totalmente verde, que aparentan no ser afectados por la enfermedad (Figura 7). En un estudio realizado por Arguedas *et al* (2006) en un jardín clonal de teca en la región Huetar Norte de Costa Rica, se evaluó la resistencia de 83 clones ante la infección de *O. tectonae*; de ellos más de un 90% presentaban alta resistencia e inclusive, tres no presentaron ningún nivel de infección.

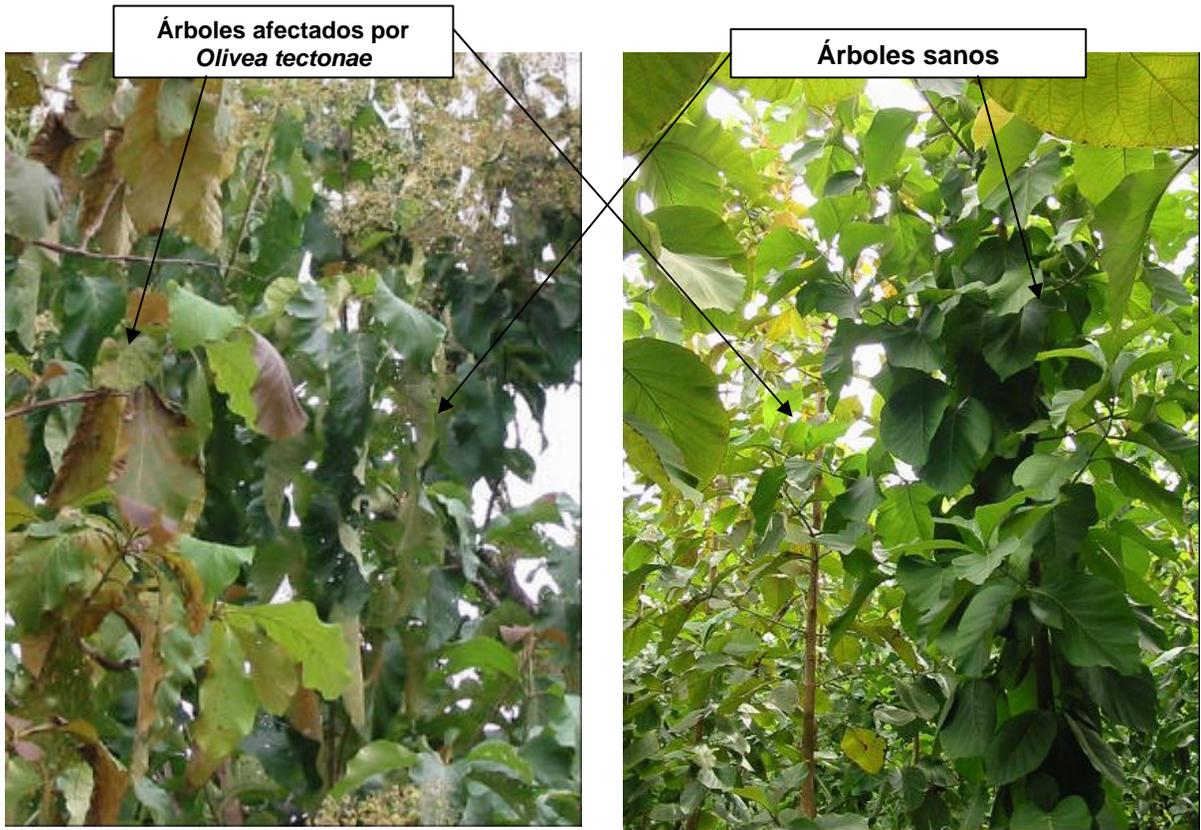


Figura 7. Árboles sanos dentro de una plantación de teca (*Tectona grandis* L.f.) severamente afectada por la roya *Olivea tectonae*.

CONCLUSIONES

En las cinco regiones muestreadas (Huetar Norte, Brunca, Atlántica, Chorotega y Pacífico Central), se observó la presencia del hongo *O. tectonae* en plantaciones de teca.

La Chorotega, es la única región en donde sólo un 27% de las fincas visitadas presentó la enfermedad.

A nivel nacional la incidencia de la enfermedad se encuentra en un 94.58%, la región Pacífico Central es la que presenta mayor incidencia con 99.38% y la Chorotega, la menor con 90.21%.

La severidad de la roya es mayor en árboles de edad intermedia (5-7 años).

La región Pacífico Central fue la que presentó el mayor porcentaje de severidad, con 50.1 - 75%.

La precipitación puede estar incidiendo sobre el grado de severidad de la roya de la teca, pues en los meses de julio y agosto en la región Pacífico Central, los promedios anuales son mayores, respecto a las otras regiones evaluadas.

En algunas regiones se encontraron árboles completamente sanos, lo que puede indicar que en las poblaciones, puede existir altos niveles de resistencia de la teca a *O. tectonae*.

La información que se tiene con respecto al manejo de la roya de la teca es bastante escasa, tanto a nivel de Costa Rica como a nivel internacional, por lo que se deben realizar más estudios, para conocer cual es el efecto del hongo sobre el rendimiento del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración recibida durante el desarrollo de este proyecto a los ingenieros Sergio Abarca Monge y Luis Alfredo Montes Pico, del Servicio Fitosanitario del Estado y la Gerencia de Vigilancia y Control de Plagas respectivamente, al Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuario (OIRSA), a la Cámara Costarricense Forestal, a las empresas reforestadoras Ecodirecta S.A., Expomaderas S.A., Panamerican Wood S.A., Barca S.A., así como al señor Jícara Galán, asistente de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arguedas, M. 2003. Problemas fitosanitarios de teca (*Tectona grandis* L.f) en América Central: nuevos reportes. In Seminario y grupo de discusión virtual. Teca (*Tectona grandis* L.f). (2003, Heredia, CR) (CD-ROM). Heredia, CR, Universidad Nacional. 11 p. 1 CD-ROM.
- Arguedas, M. 2004. La roya de la teca *Olivea tectonae* (Rac.): consideraciones sobre su presencia en Panamá y Costa Rica. (en línea). Kurú: Revista Forestal. (Costa Rica): 1(1):1-5. Consultado 26 ago. 2006. Disponible en <http://www.itcr.ac.cr/publicaciones/revistakuru>.
- Arguedas, M; Chaverri, P; Verjans, J. 2004. Problemas fitosanitarios en teca (*Tectona grandis* L.f) en Costa Rica. Recursos Naturales y Ambiente. No. 41. (Revista Forestal Centroamericana):131-136.
- Arguedas, M; Murillo, O; Ayuso, F; Madrigal, O. 2006. Variación en la resistencia de clones de teca (*Tectona grandis* L.f.) ante la infección de la roya (*Olivea tectonae* Rac.) en Costa Rica. (en línea). KURÚ: REVISTA FORESTAL (Costa Rica) 1(6). 10 p.
- Bhat, KM. Timber quality of teak from managed tropical plantations with special reference to Indian plantations. Bois et Forests des Tropiques. 263 (1):6-15.
- Bock, KR. 1992. Dispersal of uredosporas of *Hemilia vastatrix* under field conditions. Trans. Brit. Mycol. Soc 45 (1):63-74.
- Cadena, GG. 1982. Diseminación de *Hemilea vastatrix* Berk, et Br. In Taller sobre roya del cafeto. (1982, Manizales, CO). Manizales, CO; CENICAFE. 27 p.
- Cummings, G; Hiratsuka, B. 1983. Illustrated Genera of Rust Fungi. Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. 152 p.
- Esquivel, E. 2003. La roya de la teca (*Tectona grandis* L.; Verbenaceae) causada por *Olivea tectonae* (T.S. & K. Ramak) Mulder (Chaconiaceae) en Panamá – primer reporte en América. Agrociencia Panamensis 25. Hoja Informativa Técnica sobre Ciencias Agrícolas en la República de Panamá. (3) 4. 2 p.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2002. Roma, IT, FAO. 468 p. (Informe principal. Estudio FAO Montes, N°140).



- González, C. 1989. Introducción a la Fitopatología. San José, CR, ICCA. 148 p.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional, CR). 2004. Precipitaciones promedio de 1999 al 2003. San José, CR. Consultado 19 jul. 2004. Disponible en www.imn.go.cr.
- INISEFOR (Instituto de Investigación y Servicios Forestales, CR). 2003. Seminario y grupo de discusión virtual. Teca (*Tectona grandis* L.f). (2003, Heredia, CR) (CD-ROM). Heredia, CR, Universidad Nacional. 1 CD-ROM.
- Kendrick, B. 1992. The Fifth Kingdom. 2^{da} Ed. Sidney, CA, Mycologue Publications. 414 p.
- Moya, R. 2002. Influencia del cambium, tasa de crecimiento y nivel de precipitación sobre la densidad básica de la teca en Costa Rica. Madera y Bosques. 8(1):39-49.
- Pandey, D; Brown, C. 1996. Una visión general de los recursos mundiales de teca y de los elementos que influyen en sus perspectivas de futuro. (en línea). Consultado 26 ago. 2006. Disponible en http://www.fao.org/docrep/x4565s/x4565s03.htm#P0_0.
- Rebolledo, H. 1999. SAS en Microcomputadora. Análisis estadísticos de datos experimentales. 8^a ed. México, MX, Universidad Autónoma de Chapingo. 176 p.
- Schmincke, KH. 2000. Teak plantations in Costa Rica – precious wood experience. Unasyva 201(15):29-35.
- Sharma, JK; Mohanan, C; Florence, EJM. 1985. Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown en Kerala. Kerala, IN. Kerala Forest Res. Inst. 275 p.
- Waller, JM. 1982. Coffee Rust-epidemiology and control. Crop Protection. 1(4):385-404.