

VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESCAMAS CEFÁLICAS EM COBRAS-DE-VIDRO NO SUL DO BRASIL

Morphological variation of the cephalic scales in glass-lizards in Southern Brazil

Michele de Oliveira¹; Jorge Reppold Marinho²; Rodrigo Fornel¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Câmpus de Erechim. Laboratório de Ecomorfologia Animal (ECOMORF). E-mail: rodrigofornel@hotmail.com

² Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Câmpus de Erechim. ECOFAUNA.

Data do recebimento: 17/03/2015 - Data do aceite: 18/06/2015

RESUMO: Embora a função das escamas cefálicas de Squamata seja bem conhecida, o significado funcional e os fatores envolvidos na variação da forma e tamanho ainda não foram suficientemente elucidados. De acordo com o modelo do isolamento pela distância, esperaria-se que quanto mais afastados dois grupos estiverem, mais distintos morfologicamente eles serão. No sul do Brasil, o rio Uruguai pode constituir uma barreira geográfica para muitas espécies, contribuindo para o isolamento e diferenciação das populações. O presente trabalho objetivou verificar a existência de diferenças na forma e no tamanho das escamas cefálicas em *Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820) no sul do Brasil, por meio de técnicas de morfometria geométrica. Foram amostrados 30 indivíduos, provenientes de coleções científicas (MuRAU e Muzar), nos quais foram utilizados 25 marcos anatômicos. As análises não mostraram diferença significativa no tamanho ($t = 1,45$; g.l. = 9,52; $p = 0,18$) e na forma ($W = 0,51$; $F = 1,81$; $p = 0,12$) das escamas cefálicas dos grupos. Entretanto, houve uma tendência à diferenciação de forma, apontada pelas projeções dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) na análise exploratória (PCA). Apesar disso, a hipótese de que o rio Uruguai atuaria como uma barreira, levando à diferenciação dos grupos, não foi corroborada.

Palavras-chave: *Ophiodes fragilis*. Morfometria geométrica. Isolamento pela distância.

ABSTRACT: Although the function of cephalic scales of Squamata is well known, the functional significance and the factors involved in variation in shape and size have not yet been sufficiently elucidated. According to the model of isolation by distance, the farther away two groups are, one would expect that more distinct morphologically they will be. In southern Brazil, the Uruguay River may constitute a geographical barrier for many species, contributing to the isolation and differentiation of populations. This study aimed to verify the existence of differences in the shape and size of the cephalic scales in *Ophiodes fragilis* (Raddi, 1820) in southern Brazil, through geometric morphometric techniques. Thirty individuals from scientific collections (MuZAR and Murau) were sampled, which were used in 25 anatomical landmarks. The analysis did not show significant difference in size ($t = 1.45$, $df = 9.52$; $p = 0.18$) and in the shape ($W = 0.51$; $F = 1.81$; $p = 0.12$) of cephalic scales between groups. However, there was a trend towards differentiation in shape, pointed by the projections of the first two principal components (PC1 and PC2) in the exploratory analysis (PCA). Nevertheless, the hypothesis that the Uruguay river would act as a barrier, leading to the differentiation of groups, was not supported.

Keywords: *Ophiodes fragilis*. Geometric morphometric. Isolation by distance.

Introdução

Variações morfológicas em populações naturais são impulsionadas por forças evolutivas. Entre elas, a seleção natural e as mutações genéticas podem levar a novas características mais adaptadas ao ambiente (WHITE, 1978). Indivíduos pertencentes a um mesmo táxon, que vivem juntos, podem apresentar os mesmos hábitos de vida e estar sob pressões de seleção semelhantes. No entanto, é possível encontrar entre eles diferenças fenotípicas originadas por fatores intrínsecos, como espécie, idade, tamanho do corpo ou sexo (GOULD e GOULD, 1997; KOEHL, 2000). Da mesma forma, fatores extrínsecos associados ao ambiente, como a disponibilidade de alimento e abrigo, ou a qualidade ambiental, podem influenciar a expressão fenotípica com respostas flexíveis, variações de crescimento ou diferenças no desenvolvimento (ALBERCH et al, 1979; BONNER ; HORN, 2000; PIGLIUCCI, 2001).

O campo da morfometria envolve métodos para descrição e análise estatística da variação de forma dentro e entre amostras de organismos e para análises de variações de formas como um resultado de crescimento, tratamento experimental ou evolução (ROHLF e MARCUS, 1993). A morfometria geométrica captura a geometria de uma estrutura através de coordenadas de marcos anatômicos e permite a separação dos componentes de forma e tamanho (ROHLF e MARCUS, 1993; MONTEIRO e REIS, 1999). Algumas das adaptações que podem ser quantificadas no fenótipo podem ter sido influenciadas pelo isolamento geográfico. Dependendo do tempo em que populações naturais foram separadas por barreiras geográficas, a evolução pode seguir caminhos independentes e as populações podem sofrer pressões de seleção natural específicas, resultando em fenótipos diferenciados (RIDLEY, 2006). De acordo com o modelo de isolamento pela distância proposto por Wright (1943), é esperado que

conforme aumente a distância geográfica entre as populações, vá também aumentando as diferenças genéticas entre elas como uma consequência da maior redução no fluxo gênico entre elas. Pode-se considerar que o mesmo ocorre com a morfologia. Assim, quanto mais distantes os grupos estiverem, mais distintos morfologicamente eles serão entre si. No sul do Brasil, o rio Uruguai pode constituir uma barreira geográfica para diversas espécies, resultando no isolamento das populações.

Os Squamata são um dos grupos mais diversificados entre os vertebrados, incluindo cerca de 9.400 espécies descritas de serpentes, lagartos e *Amphisbaenia*, presentes em todos os continentes, exceto a Antártida e os oceanos Pacífico e Índico. São organismos chave para os estudos de numerosos campos, desde a evolução, ecologia e comportamento até a medicina e a física aplicada (PYRON, 2013). A família Diploglossidae inclui três gêneros de lagartos de corpo alongado que, geralmente, possuem membros pequenos e uma longa cauda com capacidade de autotomia. Os membros locomotores são bastante reduzidos em alguns *taxa* que podem, inclusive, apresentar ausência de membros anteriores e membros posteriores vestigiais (VITT e CALDWELL, 2014).

O gênero *Ophiodes* Wagler (1828) ocorre exclusivamente na região neotropical, a leste da cordilheira dos Andes, distribuindo-se ao centro, leste e sudeste da América do Sul (BORGES-MARTINS, 1998). Engloba sete espécies, das quais três possuem ocorrência registrada no sul do Brasil: *O. vertebralis*, *O. striatus* e *O. fragilis* (THE REPTILE DATABASE, 2014; SPECIESLINK, 2014; BORGES-MARTINS, 1998). Este gênero possui predominantemente hábitos criptozóicos, sendo que seus representantes possuem corpo cilíndrico longo, ausência de membros anteriores, membros posteriores vestigiais e capacidade de autotomia caudal, o que faz

com que sejam popularmente conhecidas como cobras-de-vidro (MONTECHIARO et al., 2011).

A espécie *O. fragilis* (Raddi, 1820) foi revalidada por Borges-Martins e Di Bernardo (1999). Os indivíduos desta espécie possuem coloração com barras claras e escuras e dorso dourado escuro ou acobreado e membros posteriores alongados, em forma de estilete. A distribuição da espécie corresponde às áreas florestadas da Mata Atlântica, Florestas com Araucária e regiões florestadas adjacentes às bacias do rio Uruguai e Paraná (BORGES-MARTINS, 1998), sendo comum também em áreas de ocupação antrópica (PIZATTO, 2005).

Estudos realizados com outros gêneros de lagartos indicam que diferenças na dieta, na ecologia e nos padrões de crescimento ósseo podem ser refletidas na morfologia, influenciando inclusive na formação das escamas cefálicas (HUGHE et al., 2009; BRUNER et al., 2005; COSTANTINI et al., 2010). Contudo, não há ainda estudos relativos à morfologia das escamas cefálicas para o gênero *Ophiodes*. Assim, a realização de trabalhos nesta área torna-se fundamental e pioneiro para a melhor compreensão destes organismos e da influência das condições ambientais sobre sua morfologia.

Nesse sentido, o presente trabalho pretende verificar se há diferenças e/ou variações significativas na forma e tamanho nas escamas cefálicas do topo da cabeça de exemplares de *O. fragilis* coletados nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, por meio de técnicas de morfometria geométrica.

Metodologia

Foram fotografados 30 indivíduos de *O. fragilis* provenientes do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, depositados no Museu Regional do Alto Uruguai e das Missões

(MuRAU), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, e no Museu Zoobotânico Augusto Ruschi (Muzar), da Universidade de Passo Fundo. Cada indivíduo teve a região cefálica fotografada em vista dorsal com uma câmera digital de 5.0 megapixels de resolução, com função macro, sem flash e a uma distância focal padrão de 10 cm.

Foram utilizados 25 marcos anatômicos bidimensionais para as escamas do topo da cabeça, os quais podem ser visualizados na figura 1. Estes marcos anatômicos foram digitalizados para cada amostra, utilizando o programa TPSDig2, versão 2.10 (ROHLF, 2006). As coordenadas dos marcos anatômicos foram sobrepostas com o método de sobreposição generalizada de Procrustes (GPA – *Generalized Procrustes Analysis*) (DRYDEN e MARDIA, 1998). O método de GPA remove diferenças não relacionadas à forma como escala, posição e orientação (ADAMS et al., 2004).

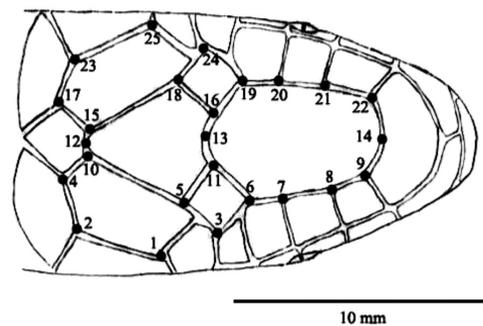
O tamanho das escamas cefálicas foi estimado usando o tamanho do centroide, ou seja, a raiz quadrada da soma dos quadrados da distância de cada ponto de referência a partir do centroide (média de todas as coordenadas) da configuração (BOOKSTEIN, 1991). Em outras palavras, o conjunto de marcos anatômicos propostos para o topo da região cefálica, através do cálculo do tamanho do centroide, resultou em um único valor para cada indivíduo, assim gerando um valor único que seria um equivalente ao «tamanho global» para cada indivíduo amostrado. A variação no tamanho da região cefálica foi calculada a partir do tamanho do centroide log-transformado. Para testar a diferença no tamanho das escamas entre as localidades foi realizado o teste *t* de Student. As variâncias entre grupos foram visualizadas através de Boxplots.

Uma Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*) foi

usada para analisar a forma da configuração do conjunto de escamas, buscando verificar a existência de alguma estruturação dos dados *a priori*. As visualizações das diferenças de forma foram feitas através de projeções das configurações de marcos anatômicos ao longo dos diferentes eixos da PCA. Para testar a diferença de forma, foi usada a MANOVA (*Multivariate Analysis of Variance*). Como análise de reclassificação cruzada, foi usada a função LDA (*Linear Discriminant Analysis*), a partir da qual foram gerados percentuais de reclassificação *a posteriori* para os dois grupos.

Para todas as análises estatísticas e para a geração dos gráficos foi usada a linguagem “R” na versão 2.14.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) e as bibliotecas MASS (VENABES e RIPLEY, 2002) e stats (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009). Os procedimentos de morfometria foram realizados com o pacote Rmorph, uma biblioteca para análise multivariada de morfometria geométrica para R, gentilmente cedida por Baylac (2008).

Figura 1 - Vista dorsal da região cefálica *O. fragilis* com localização de 25 marcos anatômicos. (Arte: Michele de Oliveira).



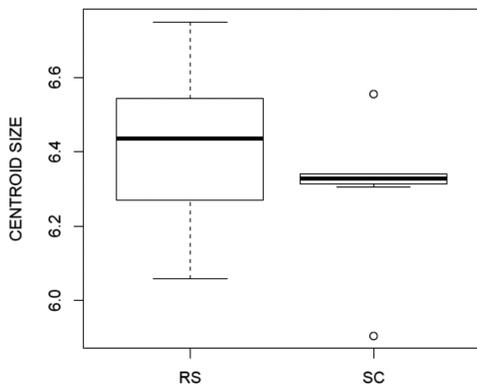
Resultados

Foram amostrados 23 indivíduos pertencentes ao estado do Rio Grande do Sul e sete pertencentes ao estado de Santa Catarina.

Os indivíduos do Rio Grande do Sul foram coletados na região norte do estado, no Alto Uruguai gaúcho e no Planalto Médio. Os de Santa Catarina foram coletados no Alto Uruguai catarinense e no litoral, na região de Itapema. O teste de normalidade de Shapiro feito para o tamanho do centroide indicou que a variância foi a mesma entre os dois grupos ($W = 0,98, p = 0,71$).

Quanto ao tamanho do conjunto de escamas cefálicas, não houve diferença significativa no tamanho do centroide entre os indivíduos encontrados nos dois estados ($t = 1,45; g.l. = 9,52; p = 0,18$). Os dois grupos são, portanto, semelhantes no que diz respeito ao tamanho deste conjunto de escamas cefálicas. As variâncias entre os grupos podem ser observadas na figura 2.

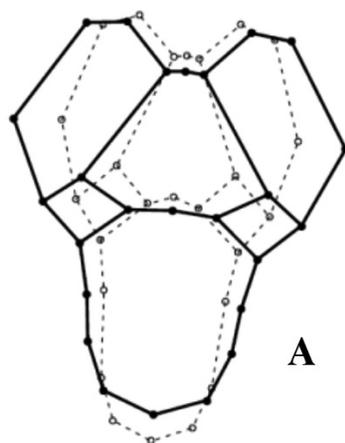
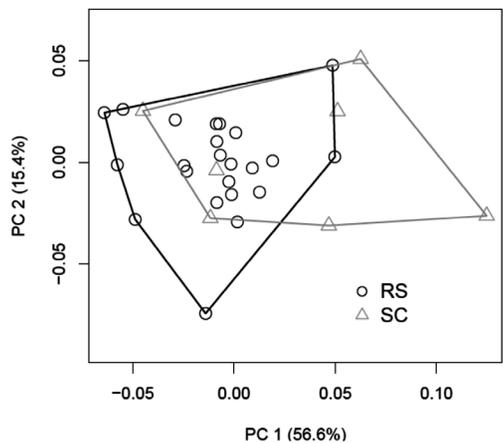
Figura 2 - Boxplot para o tamanho do centroide a partir da vista dorsal das escamas cefálicas de *O. fragilis* pertencentes aos estados do Rio Grande do Sul (RS) e de Santa Catarina (SC).



Quanto à forma, a análise exploratória (PCA) não evidenciou uma diferenciação clara entre os indivíduos das duas regiões. Os indivíduos de Santa Catarina estão, em sua maioria, sobrepostos aos do Rio Grande do Sul, como pode ser observado na figura 3. O resultado da MANOVA não foi estatisticamente significativo para a diferença de forma ($W = 0,51; F = 1,81; p = 0,12$). Contudo, as projeções das diferenças de forma na confi-

guração dos marcos anatômicos dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) evidenciaram uma tendência à diferenciação da forma (figura 3, A e B).

Figura 3 - Gráfico de análise de componentes principais (PCA) com representação dos dois primeiros eixos para a forma das escamas cefálicas na vista dorsal para os indivíduos de *O. fragilis* do Rio Grande do Sul (RS) e de Santa Catarina (SC). Ao lado, projeções das diferenças na forma na configuração de marcos anatômicos nas escamas cefálicas de *O. fragilis* em vista dorsal, em função de PC1 (A) e de PC2 (B). A linha contínua representa a forma do extremo dos escores positivos e a linha tracejada a forma do extremo dos escores negativos ao longo de cada eixo.



A

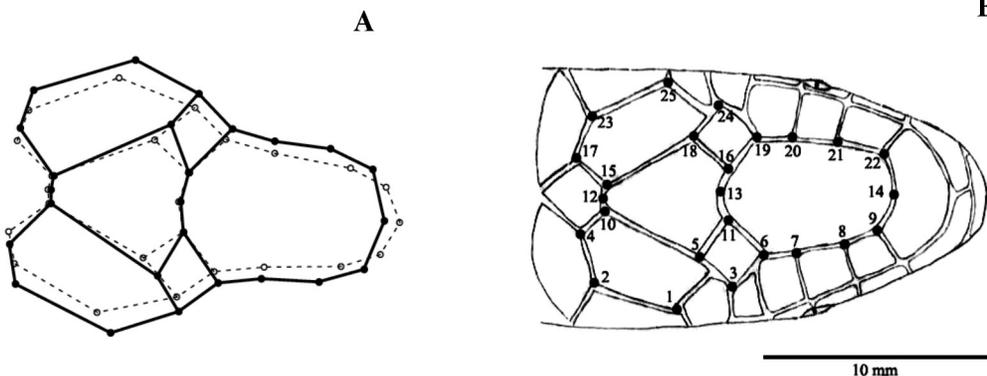
Discussão

Este estudo não encontrou diferença significativa entre o tamanho das escamas cefálicas para os grupos estudados. Também não houve diferença significativa na forma, embora tenha sido observada uma tendência à diferenciação. Oufiero et al. (2011) apontam que o clima é um dos principais fatores que afeta os traços fisiológicos e da história de vida dos lagartos. Os exemplares deste estudo foram coletados em regiões que são bastante semelhantes quando aos aspectos climáticos e fitogeográficos, o que pode ter influenciado na ausência de diferenciação.

A extensão na qual as diferenças entre as populações refletem a divergência genética ou o mesmo genótipo respondendo diferentemente a condições ambientais locais é importante para entender o processo evolutivo e seu resultado. De fato, a importância relativa de fatores genéticos e ambientais para explicar as diferenças na distribuição de características entre as populações é uma das principais questões da biologia evolutiva (ULLER, 2003). Os resultados obtidos até então não corroboram a hipótese de diferenciação morfológica por isolamento geográfico.

Os percentuais de reclassificação da LDA indicaram que 100% dos indivíduos do Rio Grande do Sul foram reclassificados de forma correta, enquanto que 57,1% dos indivíduos de Santa Catarina foram reclassificados incorretamente. Estes indivíduos estariam mais próximos daqueles do grupo do Rio Grande do Sul. Na projeção dos marcos anatômicos na análise discriminante, observou-se que a sobreposição dos indivíduos evidenciou uma diferença mais significativa na forma das placas cefálicas nos pontos 1, 3, 5, 18, 24 e 25 (figura 4).

Figura 4 - Diferenças na forma das escamas cefálicas entre *O. fragilis* do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. (A) Projeções das diferenças na forma na configuração de marcos anatômicos nas escamas cefálicas na vista dorsal de *O. fragilis* do Rio Grande do Sul (linha pontilhada) e de Santa Catarina (linha contínua) proveniente da análise discriminante. (B) Desenho da vista dorsal da cabeça de *O. fragilis* com a localização dos marcos anatômicos propostos neste estudo.



É mais provável que a tendência à variação morfológica observada seja devida diferenças de sexo ou à variação das características do habitat ao longo da distribuição, já que foram analisados apenas indivíduos adultos pertencentes a uma mesma espécie. Entretanto, trata-se de um grupo de taxonomia complexa, onde a determinação das espécies é bastante difícil. Embora *Ophiodes fragilis* tenha sido revalidada por Borges-Martins e Di-Bernardo (1999), a espécie não figura na lista de répteis brasileiros da Sociedade Brasileira de Herpetologia (BÉRNILS e COSTA, 2012).

As escamas cefálicas de Squamata apresentam uma ampla variação. Além das restrições anatômicas, dieta e acasalamento também possuem um papel na formação da morfologia da cabeça dos lagartos, incluindo ossos e escamas cefálicas (COSTANTINI, 2010). O sistema muscular pode exercer pressões e tensões estruturais nos elementos anatômicos subjacentes. As diferenças morfológicas entre espécies e dentro de uma mesma espécie refletem diferenças na dieta, ecologia e padrões de crescimento ósseo

(HERREL et al., 2008; NIEHOFF *et al.*, 2004). A maneira como as diferenças morfológicas evoluíram pode fornecer informações úteis a respeito dos padrões morfológicos e genéticos e das pressões seletivas agindo sobre esses organismos.

Conclusões

A partir da análise dos dados foi possível observar que não há diferença significativa na variação de tamanho nas escamas cefálicas de *O. fragilis* entre indivíduos do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Embora exista uma tendência à variação na forma destas escamas, é mais provável que esta se deva a outros fatores, como dimorfismo sexual e variações nas características do habitat e não a uma modificação morfológica em função do isolamento geográfico. Entretanto, estas questões ainda necessitam de mais estudos. A hipótese de que o rio Uruguai atuaria como uma barreira geográfica, isolando as populações dos dois estados, não foi corroborada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric Morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, v. 71, p. 5-16, 2004.
- ALBERCH, P.; GOULD, S. J.; OSTER, G. E.; WAKE, D. B. Size and shape in ontogeny and phylogeny. **Paleobiology**, n. 5, p. 296-317, 1979.
- BAYLAC, M. **Rmorph**: a R geometric and multivariate morphometrics library, 2008. (Available from the author: baylac@mnhn.fr).
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. (org.). **Répteis brasileiros**: Lista de espécies. Versão 2012.2. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012. Acesso em: 25 mar. 2014.
- BONNER, J. T.; HORN, H. S. Allometry and natural selection. In: BROWN, J. H.; WEST, G. B. (org.). **Scaling in Biology**. New York: Oxford University Press, 2000.
- BORGES-MARTINS, M. 1998. **Revisão taxonômica e sistemática filogenética do gênero *Ophiodes Wagler, 1828* (Sauria, Anguillidae, Diploglossinae)**. Tese Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 1998.

- BORGES-MARTINS, M.; DI-BERNARDO, M. Revisão taxonômica e sistemática filogenética do gênero *Ophiodes Wagler*, 1828 (Sauria, Anguinae, Diploglossinae). **Publicacion Extra Museo Nacional de Historia Natural**, n. 50, p. 39-39, 1999.
- BOOKSTEIN, F. L. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. London: **Cambridge University Press**, 1991.
- BRUNER, E.; COSTANTINI, D.; FANFANI, A.; DELL'OMO, G. Morphological variation and sexual dimorphism of the cephalic scales in *Lacerta bilineata*. **Acta Zoologica**, v. 86, p. 245-254, 2005.
- COSTANTINI, D.; ALONSO, M. L.; MAOZEN, M. BRUNER, E. The Relationship Between Cephalic Scales and Bones in Lizards: A Preliminary Microtomographic Survey on Three Lacertid Species. **The Anatomical Record**, v. 293, p. 183-194, 2010.
- DRYDEN, I. L.; MARDIA, K. V. **Statistical shape analysis**. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc, 1998.
- GOULD, J. L.; GOULD, C. G. **Sexual Selection: mate choice and courtship in nature**. New York: Scientific American Library, 1997.
- KOEHL, M. A. R. Consequences of size change during ontogeny and evolution. In: BROWN, J. H.; WEST, G. B. (org.). **Scaling in Biology**. New York: Oxford University Press, 2000.
- HERREL, A.; HUYGHE, K.; BACKELJAU, T.; BREUGELMANS, K.; GRBAC, I.; VAN DAMME, R.; IRSCHICK, D.J. Rapid large scale evolutionary divergence in morphology and performance associated with exploitation of a different dietary resource. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 4792-4795, 2008.
- HUDHE, K.; HERREL, A.; ADRIENS, D.; VAN DAAMME, R. It is all in the head: morphological basis for differences in bite force among color morphs of the Dalmatian wall lizard. **Biology Journal of Linnean Society**, v. 96, p. 13-22, 2009.
- MONTECHIARO, L.; KAEFER, I.; QUADROS, F. C.; CECHIN, S. Feeding habits and reproductive biology of the glass lizard *Ophiodes cf. striatus* from subtropical Brazil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 7, n. 1, p. 63-71, 2011.
- MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 1999.
- NIEHOFF, A.; KERSTING, U.G.; ZAUCKE, F.; MOLOCK, M.M.; BRÜGGEMANN, G.P. Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise. **Bone**, v. 35, p. 899-908, 2004.
- PIGLIUCCI, M. Phenotypic plasticity. In: FOX, C. W.; ROFF, D. A.; FAIRBAIN, D. J. (Org.). **Evolutionary Ecology: Concepts and Case Studies**. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- PIZATTO, L. Reproductive biology of "Glass Snake" *Ophiodes fragilis* (Squamata: Anguinae) in Shouth-East Brazil. **Herpetological Journal**, v. 15, p. 9-13, 2005.
- PYRON, R. A.; BURBRINK, F.; WIENS, J. J. A phylogeny revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **Evolutionary Biology**, v.13, n. 93, 2013.
- OUFIERO, C.E.; GARTNER, G.E.A.; ADOLPH, S.C.; JR., T.G. Latitudinal and climatic variation in body size and dorsal scale counts in *Sceloporus* lizards: a phylogenetic perspective. **Evolution**, v. 65-12, p. 3590-3607, 2011.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **Stats – R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Development Core Team, 2009. Disponível em: <<http://www.rproject.org>>. Acesso em: 27 mar. 2014.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ROHLF, F. J. **TPSDig, Version 2.10**. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York, 2006. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph>>. Acesso em: 27 mar. 2014.

ROHLF, F.J.; MARCUS, L.F. A revolution in morphometrics. **TREE**, v. 8, p. 129-132, 1993.

SPECIESLINK. Disponível em: <<http://splink.cria.org.br/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

THE REPTILE DATABASE. Disponível em: <<http://reptile-database.reptarium.cz/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

ULLER, T.; OLSSON, M. Life in the land of the midnight sun: are northern lizards adapted to longer days? **OIKOS**, v. 101, p. 317-322, 2003.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **MASS – Modern Applied Statistics with S**. New York: Springer. 4ª ed, p. 495. 2002.

VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. 4ª ed. San Diego: Elsevier, 2014.

WHITE, M.J.D. **Modes of speciation**. San Francisco: W.H. Freeman, 1978.

