

ANATOMIE ET ÉCOLOGIE FONCTIONNELLES DES PLANTES SUPÉRIEURES TRAVAUX PRATIQUES

TP3 – Structure des tissus racinaires et foliaires : ontologie racinaire et allocation des métaux lourds

Introduction

Ce TP est basé sur les activités de recherche menées par mon laboratoire au WSL et le matériel mis à disposition provient en grande partie d'une expérimentation réalisée en conditions semi-contrôlées, avec pour thème les afforestations en site contaminé (voire en page 2-3 les encarts sur le projet de recherche et la révélation histochimique du zinc [Zn]). Les échantillons foliaires et racinaires observés dans ce TP permettent d'analyser les sites préférentiels d'accumulation de contaminants métalliques et les réactions de stress, de défense et de tolérance qu'ils occasionnent dans les racines et le feuillage. En outre, nous profitons de la disponibilité de matériel racinaire pour approfondir l'étude des zones fonctionnelles dans les racines mycorrhizées (ectomycorhizes). Du matériel frais et des préparations sur la base de matériel prélevé dans les racines d'herbacées alpines, échantillonnées dans le cadre d'un autre projet, permettent de visualiser les spécificités des endomycorhizes à arbuscules.

Au cours de l'expérimentation « de la cellule à l'arbre » (page 2), les racines ont, de manière générale, absorbé et transféré certains contaminants du sol (Zn et cadmium [Cd]) vers les parties aériennes et bloqués d'autres (cuivre [Cu] et plomb [Pb]) dans la rhizosphère. Nous nous sommes concentrés sur la détection des contaminants dans les tissus végétaux ; au moyen de méthodes histochimiques et microanalytiques, nous avons analysé les altérations structurales et identifié les principales réponses physiologiques à la toxicité des métaux lourds accumulés. Pour en avoir un aperçu, nous utiliserons un type de préparation permettant à la fois de localiser le zinc en excès et de visualiser les réactions structurales dans les tissus (niveau histologique) et les cellules (niveau cytologique). En effet, le zinc a formé des structures particulières dans les sites d'accumulation - des globuloïdes foncés et violacés avec le réactif de coloration utilisé, suite à une complexation par les groupes phosphates de molécules de phytates. Les Figs. 4A-F en page 3 montrent la structure de ces globuloïdes de Zn et les Figs 4A et 4D illustre leur apparence dans les préparations fournies pour ce TP. Les Figs 4G-U synthétisent des données de microanalyse sur la composition ionique de ces complexes, lesquelles ont été obtenues par analyse en microscopie électronique à balayage de sections adjacentes à celles utilisées en histochimie (coupes sériées). Sur ce type de préparation, seules les accumulations de Zn les plus importantes sont détectables. Des extraits de publication supplémentaires, présentant d'autres résultats histochimiques de microlocalisation du Zn, sont fournis en page 7-10 pour chaque catégorie de matériel contaminé. Ils permettent de compléter la liste de tissus et de types cellulaires ayant accumulé du Zn et de mieux comprendre les relations de cause à effet entre l'accumulation de ce contaminant métallique et les changements structuraux.

Sur la base de préparations provenant des traitements « contrôle » et « métaux lourds », les changements structuraux causés par l'accumulation de contaminants métalliques peuvent être identifiés. Cependant, seuls les tissus foliaires se prêtent à cette étude. Dans le cas des racines, les autres contraintes environnementales (mycorrhization, pathogènes) et physiologiques (mélange de tissus vitaux et nécrotiques [cortex]) ne permet pas de telles comparaisons, au moins dans le cadre d'un TP. Une documentation de référence sous forme d'articles est fournie en annexe. Aucune préparation d'aiguille d'épicéa n'est fournie car cette espèce est parvenue à bloquer les contaminants dans sa rhizosphère et les aiguilles, en conséquence, n'ont pas fait l'objet d'analyses en microscopie.

Pour détecter aussi bien les complexes de phosphates et de Zn que les changements structuraux, il faudra utiliser toute la gamme d'objectifs disponibles sur les microscopes et notamment ceux à fort grossissement. Une meilleure maîtrise des observations en microscopie forme ainsi un but supplémentaire - cette fois méthodologique - pour ce TP. Seules des illustrations générales des préparations sont fournies. Il conviendra de les compléter avec des microphotographies digitales montrant le détail des globuloïdes de Zn ainsi que les altérations cytologiques dans les cellules.

De la cellule à l'arbre

Etude des effets de la toxicité du sol sur les cellules, les organes et les organismes, ainsi qu'au niveau de l'écosystème, dans le but de procéder à une phytoremédiation de sols contaminés par des plantes ligneuses

Le grand projet "de la cellule à l'arbre" comprend aujourd'hui 33 projets, étudiant des phénomènes au niveau moléculaire (cellule), des organes et des organismes, jusqu'au niveau de l'écosystème.

Problème

La sédimentation de déchets dans les décharges publiques, les émissions d'unités de production, ainsi que l'utilisation de boues d'épurations par l'agriculture (en Suisse, réglementée depuis 1981) sont la raison de la pollution par les métaux lourds de beaucoup de sols partout en Europe. Cette pollution n'est pas seulement due à des décharges désaffectées ("Altlasten") nécessitant de gros efforts d'assainissement, mais est aussi le résultat d'émissions chroniques. La pollution par les métaux lourds sur de grandes superficies est, à long terme, également un grave problème. En Suisse, on soupçonne (Keller & Desaulles, Schriftenreihe FAL 23, 1997) que la totalité des surfaces agricoles contaminées par les métaux lourds sont polluées pour 4% par l'agriculture elle-même, 12% par l'industrie, 11% par les UIOM et 9% par le trafic.

En Europe, il faut trouver des solutions pour stabiliser/décontaminer des sols peu contaminés à des fins d'utilisation durable ("Energy Farming", zone de récréation). A cette fin, il est absolument indispensable de collecter des données sur les flux, l'allocation et le métabolisme des polluants en relation avec la plantation, le type de sol et l'acidité des pluies. Le grand projet "de la cellule à l'arbre" prend en compte, sous une approche "système écologique", que les réactions des plantes aux polluants sont fortement influencées par une situation concurrentielle entre elles pour leur part de lumière, d'eau et de substances nutritives, ainsi que par les organismes associés (parasites, pathogènes, mycorhize, bactéries). Ainsi, le grand projet "de la cellule à l'arbre" comble une lacune de la recherche en biologie végétale. En effet, jusqu'ici, les connaissances en la matière se basaient uniquement sur les plantes utiles (monoculture), les plantes en pots et les recherches en laboratoire.

Buts "savoir"

- absorption des métaux lourds (Zn, Cd, Cu, Pb) par les plantes et la communauté des organismes au sein de l'écosystème modèle
- influence des pluies acides et de l'acidité du sol
- transport/immobilisation des métaux lourds au sein d'un organisme
- physiologie du stress (croissance, barrière, système de défense, dégâts)
- analyse des relations entre plantes sous stress (comportement concurrentiel) et des organismes associés (bactéries, champignons, insectes)

Buts pour la pratique

- estimation du risque et des gains lors de la création d'espaces verts / de reboisement de sols modérément contaminés
- phytoremédiation de décharges publiques

Contenu

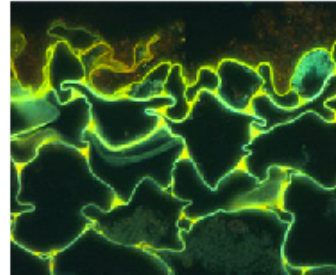
- ▢ [Projets](#)
- ▢ [Experiments](#)
- ▢ [Rendez-Vous](#)
- ▢ [Poster](#)
- ▢ [Cooperations](#)

Publications

- ▢ [Liste des publications](#)

Contact

- ▢ [Madeleine S. Goerg-Günthardt](#)



De la cellule... (exodermis d'une racine contaminée par les métaux lourds)



...à l'arbre (forêt modèle).
Photos: M. Goerg-Günthardt (WSL)

R  velation histochimique et microanalytique du Zn et des éléments minéraux associés :

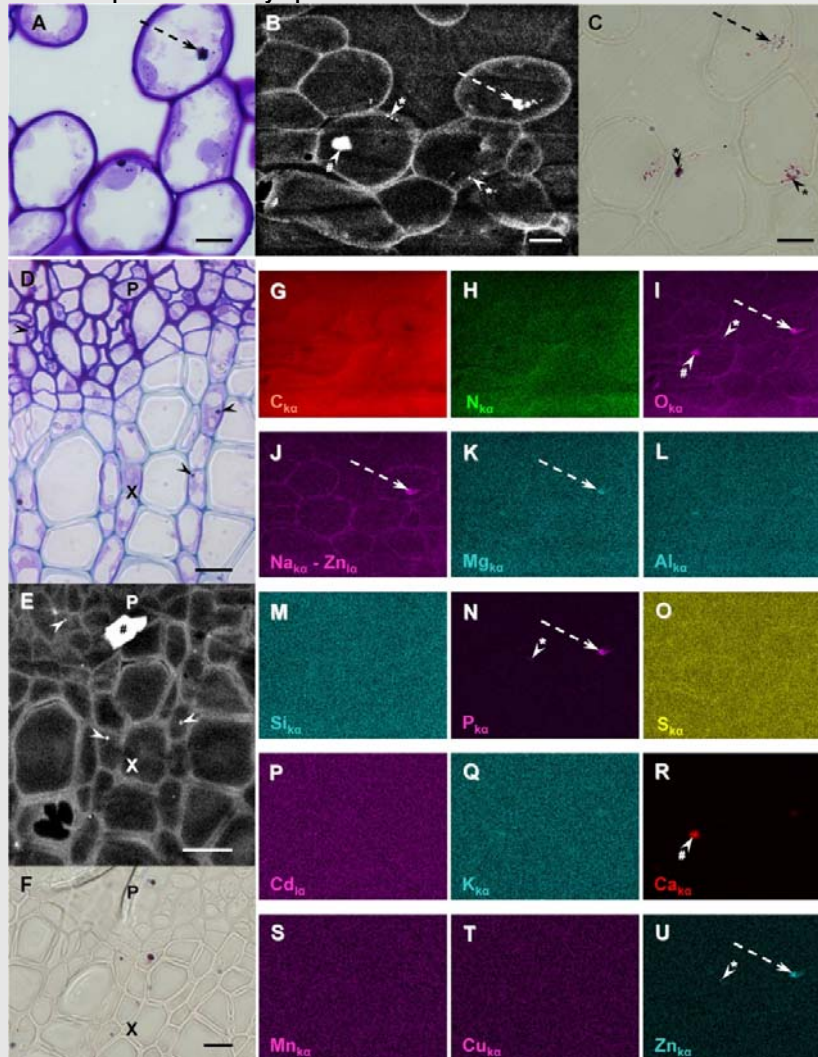


Fig. 4. Structure of phytic acid deposits and elemental mapping in semi-thin cuttings of resin-embedded leaf material about 20 weeks-old from a poplar tree growing on HM-contaminated soil. A-F structure of cytoplasmic and vacuolar deposits inside spongy parenchyma (A-C), phloem (P) and xylem (X, D-F) in three serial sections using three different revelation methods. A, D phytic acid deposits in vacuole (dashed arrow) or cytoplasm (arrowheads) had a globular shape and showed β -metachromasy. Vacuolar deposits were sometimes large enough to show up in all three cuttings (dashed arrow A-C) whereas those in cytoplasm, often clustered together (* arrowheads in B and C), were too small to appear in more than one single cutting. B, E heavy ion accumulations were indicated by a strong RBSD signal (#, arrowheads and dashed arrows). In contrast to the globular Zn-rich phytic acid deposits, angular deposits (#) were typical for calcium (oxalate) crystals (dislodged deposit in E). C, F Zn was histochemically detected (reddish dots) within cytoplasm and vacuole. G-U elemental mapping of the spongy parenchyma cells depicted in B, using the $K\alpha$ energy level (Na: interference with $ZnL\alpha$; Cd: $L\alpha$ only). H, I, O among all potential Zn anion ligands, only oxygen (I) was increased in Zn-rich deposits (* arrowheads, dashed arrow in U). Other enriched cations included Na (J), Mg (K), and phosphorous (N). Signal for Al (L), Si (M) and potassium (Q) was too low to be clearly distinguished from background. Calcium (oxalate) crystal (#) contained much oxygen (I) and Ca (R) little Mg, Al and potassium, and no Zn or phosphorous; crystal spectrum is given in Fig. 5D. No trace of Cd (P) or Cu (T) was detected. Bars: 10 μ m. Technical specifications: Histochemical revelation of phosphates with TB (pH 4.5) in first (A, D) and of Zn with DZ in third (C, F) serial cutting; elemental analysis EDX of second cutting (G-U, RBSD image in B) by FESEM at 8.5 mm work distance, 1792 x magnification and acceleration voltage of 25 kV using a 20 μ m condenser diaphragm and the EDX (35° take-off angle) detector; element data scanned during 440 μ s dwell time; measurements cumulated over 2048 frames and mapped at 256 x 200 ppi resolution (each point in map represents a total peak count).

  f  rence :

Vollenweider et al. (2011). Compartmentation of metals in foliage of *Populus tremula* grown on soils with mixed contamination. II. Zinc binding inside leaf cell organelles. Environ. Pollut. 159: 337-347.

Objectifs

- Observer et comprendre la structure racinaire et son évolution ontogénétique et fonctionnelle dans des racines d'arbres mycorrhizées à croissance secondaire.
- Observer et comprendre le contraste entre ecto- et endomycorrhizes
- Observer la distribution du Zn dans les cellules et les tissus racinaires de l'épicéa et du peuplier.
- Observer la distribution du Zn dans les cellules et les tissus foliaires de l'érable et du peuplier.
- Analyser les effets structuraux des métaux lourds dans les tissus foliaires d'érable et de peuplier et discuter la relation de cause à effet entre l'allocation du Zn et les effets structuraux.
- Améliorer sa technique de microscopie, notamment à fort grossissement

Matériel fournis

- Préparations:

Ontologie racinaire et mycorrhization :

- Racines d'épicéa mycorrhizées (ectomycorrhize): au moins 3 zones fonctionnelles ; matériel frais et préparations permanentes à partir des 3 zones fonctionnelles (assimilatrice/conductrice/lignifiée).
- Racines de saule (ecto- et endomycorrhize) et de peuplier (ectomycorrhize) : au moins 3 zones fonctionnelles ; matériel frais (saule) et préparations permanentes à partir des 3 zones fonctionnelles (assimilatrice/conductrice/lignifiée ; peuplier).
- Racines d'herbacées alpines (endomycorrhize) : préparations permanentes de zones absorbantes mycorrhizées dans les apex racinaires

Sols contaminés : microlocalisation du Zinc et toxicité :

- Racines d'épicéa : zone conductrice de racines prélevées sur des arbres ayant poussé sur sol contrôle ou contaminé.
- Racines de peuplier: zone conductrice de racines prélevées sur des arbres ayant poussé sur sol contrôle ou contaminé.
- feuilles de peuplier: partie médiane et basale de feuilles prélevées sur des arbres ayant poussé sur sol contrôle ou contaminé.
- feuilles d'érable: partie médiane et basale de feuilles prélevées sur des arbres ayant poussé sur sol contrôle ou contaminé.

!!! Matériel de recherche !!!

!!! Veuillez s.v.p. manier les lames avec soin!!!

- Micrographies digitales de racines et de feuilles.
- 1 article de synthèse sur la problématique des sols contaminés en Suisse
- 2 articles de recherche sur l'allocation du Zn et ses effets.

Méthodes - indications techniques

Matériel frais (mycorrhization): mettez un segment de racine mycorrhizée dans une demi-boîte de Petri en plastique, bien immergé dans l'eau. Transférer sous une loupe. Observer la partie mycorrhizée renflée à l'extrémité distale des racelles et les hyphes qui en rayonnent (ectomycorrhize, épicéa et saule). Observer les filaments micorrhiziens, plus fins que les poils absorbants, et rayonnants dans la partie distale de la racine (endomycorrhize, saule). Repérer la partie conductrice en retrait, montrant un certain rétrécissement du diamètre racinaire - et une dégénérescence du manteau fongique, dans le cas de l'ectomycorrhize (changement de la coloration). Observer finalement le début de desquamation des tissus primaire dans la partie lignifiée plus épaisse, à la base du segment de racine. Documenter vos observations avec votre téléphone portable fixé sur l'adaptateur amovible.

Lames pour la microscopie (ontologie racinaire, mycorrhize, allocation et toxicité du Zn):

Prenez le temps d'observer, en vous aidant de tous les objectifs à disposition. Commencez par régler les oculaires et par vous assurer d'une bonne vision binoculaire des préparations. Si nécessaire, nettoyez les oculaires et les objectifs des restes d'huile d'immersion. Pour

chaque objectif, réglez correctement la position du condenseur de façon à avoir toujours le maximum de lumière au niveau de la préparation. Travaillez si possible avec une intensité de lumière maximale et contrastez la préparation de manière adéquate. Passez progressivement du plus petit au plus fort grossissement. Pour l'immersion, déposez une goutte de liquide sur la préparation, selon les indications fournies sur l'objectif. À la fin d'une observation, enlevez délicatement l'huile ou pompez l'eau d'immersion de la lame examinée. Rincez ensuite la lame à l'alcool et séchez-la avec un kleenex propre. En fin de séance, ôtez l'huile et/ou l'eau d'immersion des objectifs et rincez les objectifs plusieurs fois avec de l'alcool technique. Sécher ensuite les objectifs avec un kimwipe.

Prenez d'abord une lame d'un traitement contrôle - ou celle de la zone absorbante dans le cas de l'observation de l'ontologie racinaire. Commencez par repérer les différents types de tissus, tracez un schéma histologique en utilisant la clé de symboles du **document de cours 3/29**. Repérez ensuite, par tissu, les différents types de cellules et identifiez les organelles cellulaires.

Une fois familiarisé avec l'échantillon étudié, passez aux autres lames et repérez les changements structuraux ou l'accumulation du Zn en vous aidant de l'aide mémoire et des questions ci-dessous pour chaque type de préparation. Annotez les photos fournies et complétez-les avec vos propres microphotographies, en utilisant les adaptateurs amovibles montés sur vos microscopes.

Résultats – travail attendu

Par groupe, au minimum:

- racines :
 - o 1 espèce : morphologie de l'ectomycorrhize et ontologie (3 zones fonctionnelles) et allocation du Zn (1 zone fonctionnelle)
 - o 1 espèce : morphologie de l'endomycorrhize (zone absorbante)
- feuilles : 1 espèce, allocation du Zn et changements structuraux

Coordination et échanges intra- et inter-groupes : en début de séance, répartition et organisation du travail de façon à ce que l'ensemble du matériel ait été observé d'ici à la fin du TP. Échanges des résultats et des observations intra- et inter-groupes.

Outre les indications méthodologiques générales déjà mentionnées, les paragraphes ci-dessous détaillent les observations spécifiques recommandées pour chaque type de préparation et les résultats à obtenir.

Résultats – guide pour les observations et leur documentation

Ontologie racinaire

Compréhension de la structure racinaire : repérer les structures caractéristiques de la phase ontologique et de l'activité fonctionnelle (cours, documents de référence : **4/58-60, 4/62**) :

zone d'absorption: identifier : le xylème et le phloème primaires / les cellules conductrices / l'endoderme non renforcé et le péricycle / le cortex

- *ectomycorrhize* : le réseau de Hartig / les hyphes mycéliens / la répartition caractéristique des composés de défense, notamment les tannins.
- *Endomycorrhize* : les arbuscules formés par les hyphes dans les cellules corticales

zone conductrice: identifier les éléments mentionnés pour la zone d'absorption / repérer les canaux à résine et les premières assises de cambium / décrire avec un tableau à 2 colonnes l'évolution des structures entre les parties absorbantes et conductrices / répondre aux questions :

- le cortex est nécrotique : quels en sont les critères structuraux ?
- quelles structures indiquent un renforcement de l'isolement par rapport à l'environnement racinaire ?
- quelles structures indiquent un renforcement des capacités de conduction ?

zone à croissance secondaire: analyser avec un tableau à 2 colonnes l'évolution des structures en comparaison de celles dans la zone conductrice / repérer les différents types

cellulaires dans les tissus conducteurs / identifier les structures d'origine primaire et celles d'origine secondaire.

Allocation du zinc dans les racines d'épicéa/de peuplier et dans les feuilles d'érable/peuplier

- Compréhension de la structure racinaire et foliaire: repérer les tissus, les types de cellules et les structures sub-cellulaires.

- En vous aidant des **Figs 4A et 4D**, page 3, repérez dans les préparations fournies les accumulations de Zn complexé par les ions phosphates et formant des globoides foncés et violacés. Indiquez dans un tableau pour chaque tissu (colonne) et chaque compartiment cellulaire (ligne) la présence et la relative abondance des accumulations de Zn. Dans la dernière ligne enfin, semi-quantifiez la fréquence du Zn par tissu symptomatique avec une variable à 4 niveaux (0=absence / 1=traces / 2=présence / 3=abondance). Comparez la révélation histochimique des complexes de Zn sur vos coupes avec celle réalisée selon une autre technique histochimique et illustrée dans la documentation fournie pour le même type de matériel végétal (**page 7-10**). Rédigez une petite synthèse de vos résultats en répondant notamment aux questions :

- Quel est (sont) le(s) tissu(s) où s'accumule(nt) principalement le Zn ?
- Dans quelle organelle est-il le plus fréquent ?
- Quelles sont les principales différences d'un type de microlocalisation à l'autre ?
- Que peut-on en déduire quant à la sensibilité des différentes méthodes ?

Effets des métaux lourds et notamment du zinc dans les feuilles d'érable/peuplier

- Compréhension de la structure foliaire : repérez les tissus, les cellules et les structures sub-cellulaires selon les instructions données ci-dessus (cours, documents de référence : **3/36**).

- Repérez les zones qui, en comparaison avec le contrôle, montrent des différences de structure remarquables, sur la base des informations fournies (**peuplier : Fig. 9-11, annexe1 ; érable : Fig. 3, annexe 2**). Observez d'abord le limbe et ensuite la veine principale. Faites une liste des tissus présentant des anomalies de structure. Rédigez un protocole d'observation : consacrez un bref paragraphe à chaque tissu, décrivez les modifications structurales du tissu à la cellule puis à la structure sub-cellulaire et estimez la vitalité des structures (en cas de nécrose, indiquer les critères diagnostiques) ; repérez les accumulations de Zn (cf. **Figs 4A et 4D**), observez leur distribution et leur taille relative et indiquez dans le protocole leur éventuelle contribution aux symptômes observés.

- Repérez sur les micrographies fournies - et illustrez avec des microphotographies digitales complémentaires - les changements structuraux suivants :

- limbe* : les zones symptomatiques discontinues / la nécrose de l'épiderme inférieur / l'épaississement des parois cellulaires, parfois sous la forme de protrusions pectiques / l'accumulation de phénols vacuolaires / les forts dégâts dans les chloroplastes (diminution de la fréquence et de la taille / condensation du contenu / accumulation de plastoglobules)
- veine* : condensation et déformation du complexe cellule compagne/tube criblé / accumulation de produits du métabolisme secondaire.

Informations histochimiques complémentaires

Révélation histochimique du Zn (racine de peuplier) :

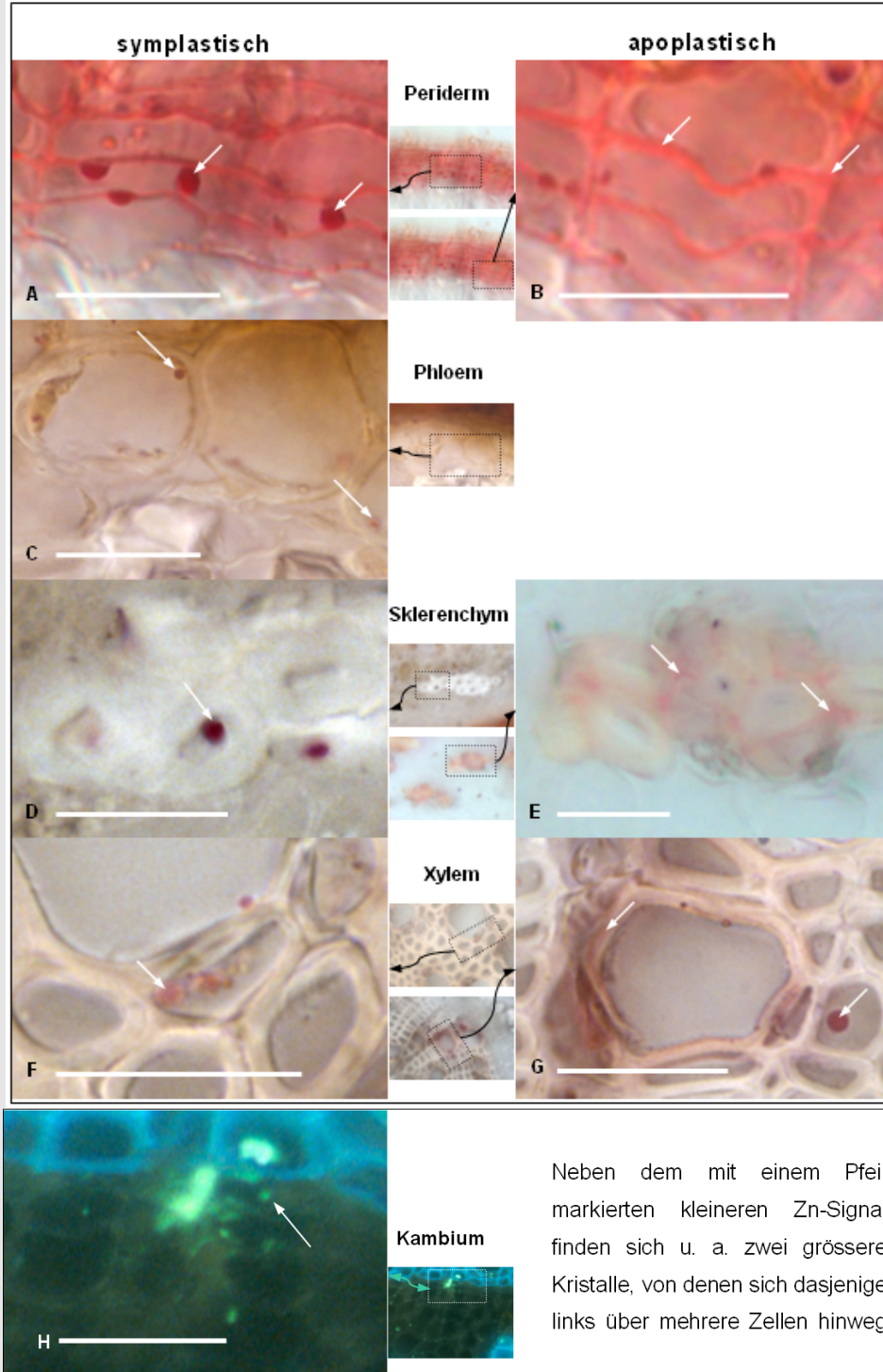
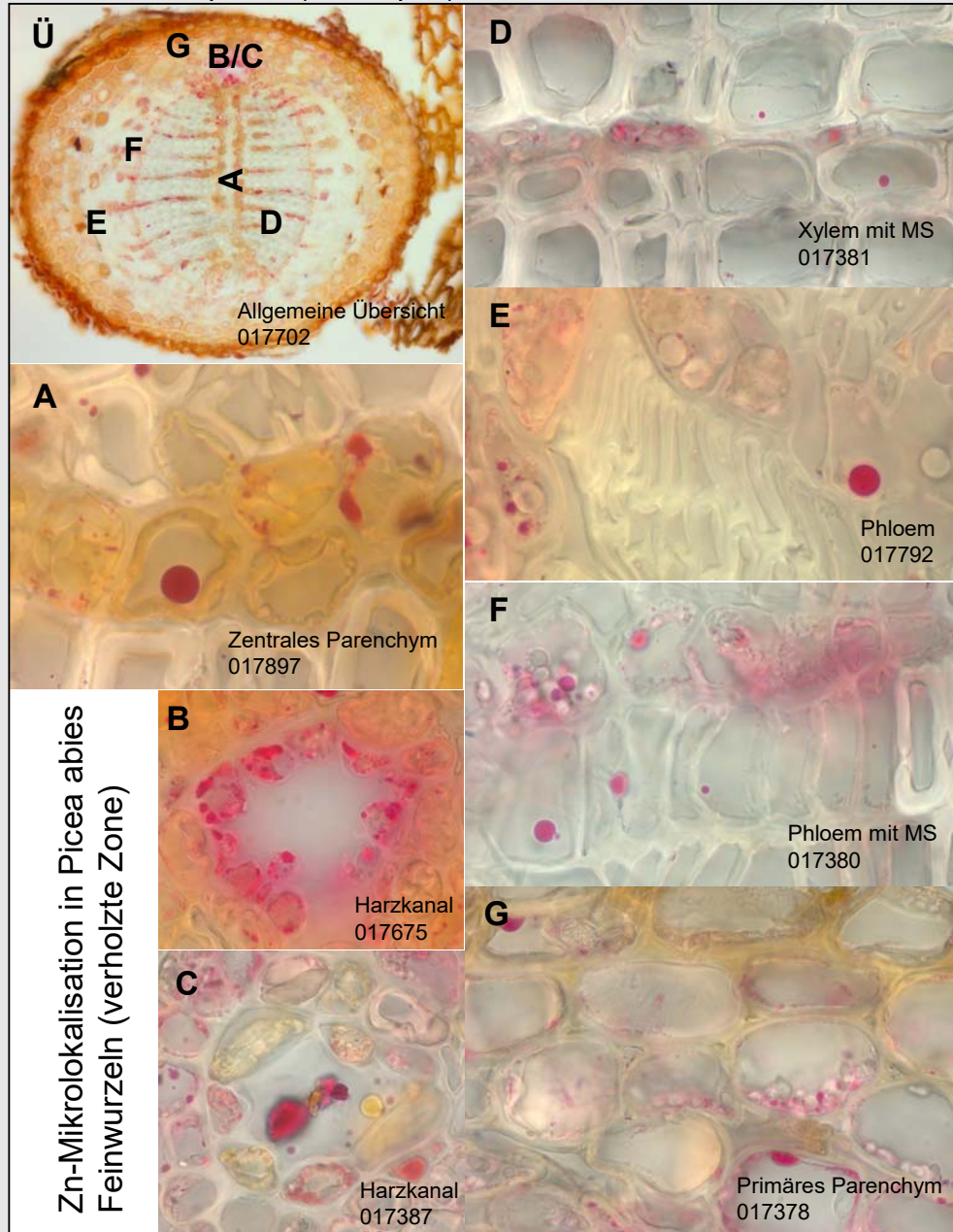


Abb. 3 4 Mikrolokalisation des Zn-Signals; Methode 2 (A-G), Methode 1 (H); verholzte Zone. Die Balkenlänge in A-H entspricht 20 µm.

Référence : Bernasconi (2006). Nachweis und Mikrolokalisation von Zink und Kupfer und ihrer zellulären Effekte in Feinwurzeln von *Populus tremula* (L.). Diplomarbeit. WSL, CH-8903 Birmensdorf.

Révélation histochimique du Zn (racine d'épicéa) :



Ü: Übersicht Fichtenfeinwurzel (verholzte Zone, CO, 3.3 SW), Dithizon mit Puffer. Lokalisation der Fotos A-G (allgemein). A: Zentrales Parenchym (verholzte und unverholzte Zellen), Zn-Signal in Zellwand, Vakuole und Cytoplasma. B: Harzkanal, Zn-Signal hauptsächlich im Cytoplasma der Harzkanal-Zellen. C: Harzkanal, Zn-Signal hauptsächlich im Harzkanal selbst. D: Xylem mit Markstrahl, Zn-Signal apoplastisch in den Gefässen und symplastisch im Cytoplasma der Markstrahlen. E: Phloem (links Zellen des primären Parenchyms, rechts anschliessend wäre das Xylem, Mitte oben Zelle des Markstrahls), Zn-Signal in Vakuole und mehrfach im Cytoplasma. F: Phloem mit Markstrahl, Zn-Signal in Vakuolen sowie im Cytoplasma der Markstrahlzellen. G: Primäres Parenchym, Zn-Signal im Cytoplasma.

Référence : Bernasconi (2006). Nachweis und Mikrolokalisierung von Zink und Kupfer sowie Analyse von Stressreaktionen in Feinwurzeln von Picea abies (L.). Technischer Bericht. WSL, CH-8903 Birmensdorf

Révélation histochimique du Zn (feuille de peuplier) :

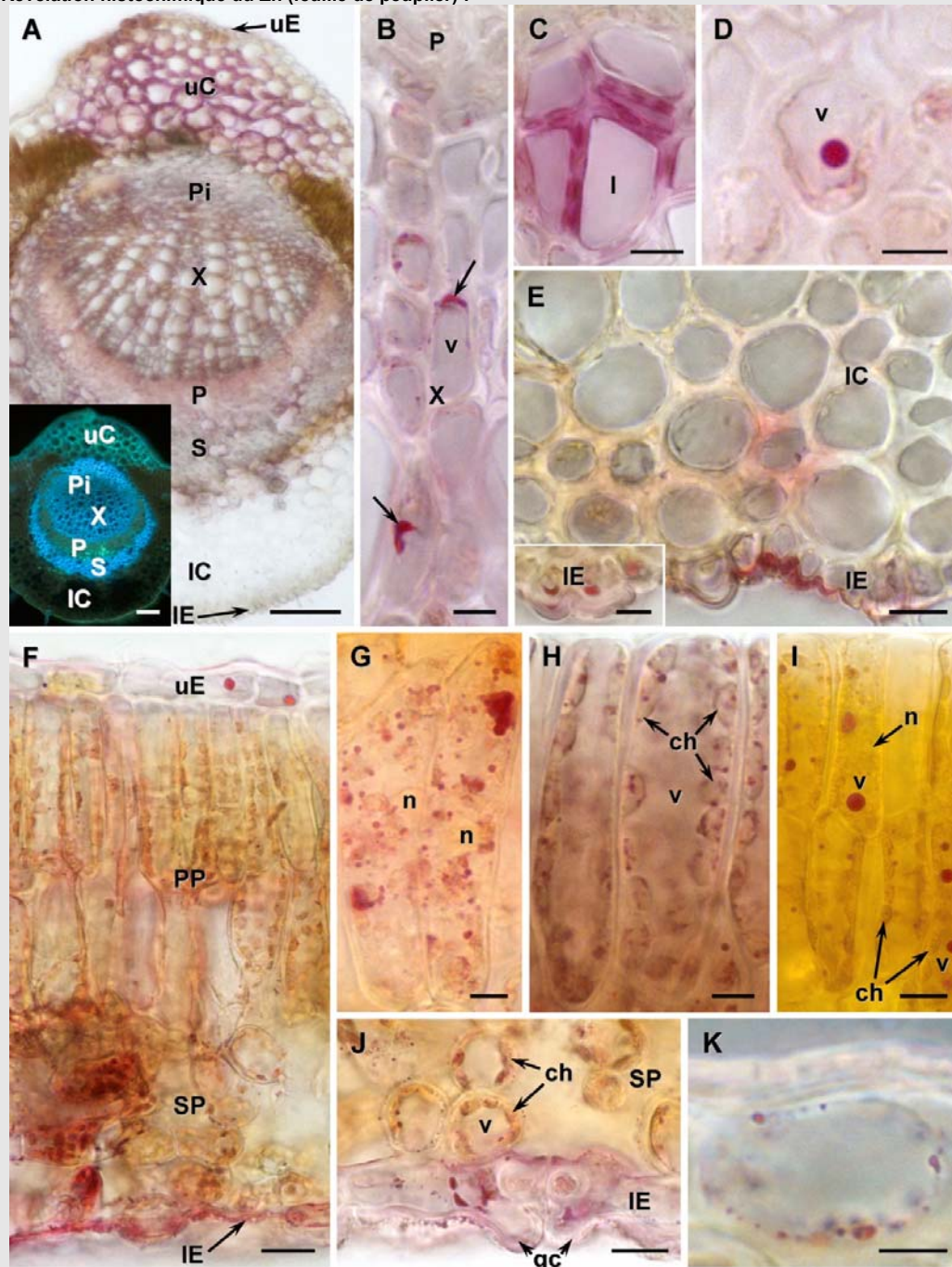


Fig. 5. Zinc microlocalisation in unfixed fresh samples as evidenced using DZ staining. Zinc was complexed in a similar way and in the same leaf vein (A, B) and blade (C-E) tissues as in fixed samples (see Fig. 4). B, D, E cell-level distribution of Zn in fresh vs. fixed samples was similar except in xylem (X) apoplast where more Zn was detected using fresh material (arrows in B). D Zn allocation to vacuole (dashed arrow), cytoplasm (arrows) and chloroplast (arrowhead) within palisade parenchyma (PP) cells. E Zn signal in the inner periclinal cell wall of lower epidermis (IE). Notice the missing signal in mesophyll (D) or phloem (P, B) cell walls. Tissues: upper epidermis (uE), upper (uC) and lower (IC) collenchyma, pith (Pi), sclerenchyma (S), spongy parenchyma (SP); gc: guard cells. Bars: 100 μ m (A), 20 μ m (C), 10 μ m (B, D, E).

référence :

Vollenweider et al. (2010). Compartmentation of metals in foliage of *Populus tremula* grown on soils with mixed contamination. I. From the tree crown to leaf cell level. *Environ. Pollut.* 159: 324-336.

Révélation histochimique du Zn (feuille d'érable) :

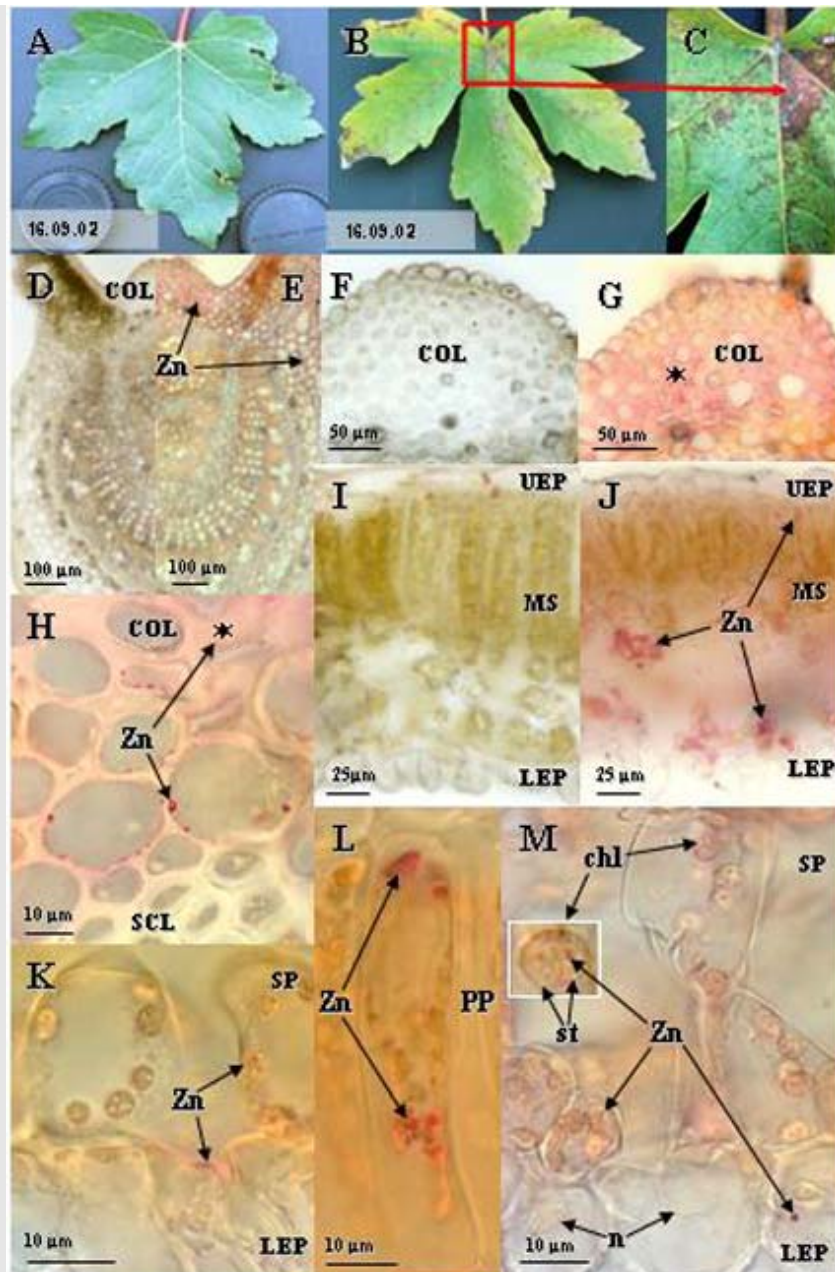


Fig. 1. Visible symptoms (B-C vs. asymptomatic control in A) and micro-localisation of Zn (D-M) in leaves of Sycamore Maple after experimental exposure to HM in the topsoil. Material was sampled during the third year of exposure (2002) at the end of the vegetation season. Typical symptoms included basipetally-increasing gradients of necroses along veins (B, detail in C) and leaf chlorosis. Increased amounts of Zn were observed as traces in the leaf blade (J, K-M vs. I) and vein (E, G, H, vs. D, F) of the leaf samples from the HM treatment, whereas the control (D, F) remained unstained. Zinc was micro-localised in the apoplast (pink stain and □ in cell wall of E, G, H; K) as well as symplast (H, J -M). Zinc was stored homogeneously in cell wall of collenchyma (COL; G, H) whereas it especially accumulated in the pectin-rich outer layer of lower epidermis cells (LEP; M). Cytosolic (H, L, M) and chloroplastic (K, M) micro-localisation of Zn was observed in the symplast; nuclei (n) did not contain Zn (M). Several Zn granules accumulated in the stroma of chloroplasts (chl; detail in M). UEP: upper epidermis; MS: mesophyll; SCL: sclerenchyma; PP: palisade parenchyma; SP: spongy parenchyma.

référence :

André, O., Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M.S. 2006: Foliage response to heavy metal contamination in Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus* L.). Forest, Snow and Landscape research, 80/3: 275-288.