

# CONSIDERACIONS SOBRE LA METODOLOGIA DE LA GENÈTICA I DE LES CIÈNCIES BIOLÒGIQUES EN GENERAL

per ANTONI PREVOSTI

Cap del Departament de Genètica. Facultat de Biologia.  
Universitat de Barcelona.

A una reunió com aquesta en què l'objecte és obrir un col·loqui el més ampli possible, ens ha semblat adient presentar un tema referent a la metodologia de la biologia en general, però que es pot plantejar clarament analitzant alguns aspectes dels desenvolupaments recents de la genètica.

Sovint, en tractar d'aspectes metodològics i de filosofia de la biologia, es nota una forta influència de la física. Aquesta ciència, històricament ha estat la capdavantera i actualment continua sent la que té un coneixement més complet i profund del seu camp. Per aquests motius és freqüent que es tendeixi a identificar la filosofia de la ciència amb la filosofia de la física i, com a conseqüència, que els requeriments metodològics de la física s'estenguin sense un examen crític a les altres ciències. En el cas de la biologia, que ens interessa ací, això pot donar lloc a dues postures que són inadequades per al seu desenvolupament.

És evident que l'adquisició de coneixements biològics té uns requeriments que són generals per a tot coneixement científic i, per tant, que coincideixen amb els dels coneixements físics. No obstant, els fenòmens biològics tenen unes característiques pròpies que han de tenir-se en compte quan volem analitzar-les des de un punt de vista científic. Això no es té en compte a la primera de les postures a què ens hem referit, és a dir, quan s'assimilen indiscriminadament i sense criteri els mètodes de la física a la biologia. La conseqüència pot ser el plantejament de problemes i la utilització de vies per solucionar-les poc adequats en vista a aconseguir el progrés dels coneixements biològics. Aquesta postura es troba freqüentment entre els biòlegs, principalment entre els que procedeixen d'altres branques de la ciència; també és la d'alguns filòsofs de la ciència.

La segona postura actualment és rara entre els biòlegs, però es troba en alguns filòsofs de la ciència, principalment de formació exclusivament filosòfica. Parteix del fet que en els fenòmens biològics s'observa, realment, quelcom diferent que en els físics, i aleshores per a entendre'ls es planteja el problema en termes no científics. Per exemple, en llibres de filosofia actual s'utilitzen freqüentment conceptes bergsonianos o aristotèlics en analitzar el fenomen de la vida.

Possiblement, les diferències principals que existeixen entre la física i la biologia, consisteixen en que la física estudia sistemes senzills, mentre que la biologia els estudia complexos. Una de les principals línies de progrés de la física ha consistit en el descobriment de sistemes progressivament més senzills que estan per sota dels que detectem directament amb els nostres sentits. Així s'han arribat a trobar les que semblen ser partícules elementals, que ja no serien sistemes. En l'estudi d'aquestes partícules han sorgit dificultats que semblen insuperables, com ara és la de precisar la velocitat i la posició d'un electró simultàniament. Això ha conduït als físics a renunciar a aquest tipus de coneixement i a accontentar-se amb la formulació de teories operants. La condició que han de tenir aquestes es poder-se utilitzar per tal de manejar els fenòmens u objectes als quals es refereixen, sense pretendre un coneixement del que aquests realment són. En el cas que no sigui possible una altra cosa, com és en realitat actualment en algunes qüestions físiques, aquesta posició em sembla excel·lent i la més honorada que pot adoptar un científic. En canvi, generalitzar-la a tot tipus de coneixement científic, com es fa amb freqüència, em sembla inadmissible, tant des d'un punt de vista objectiu com subjectiu. Objectivament, em sembla que hi ha coneixements científics que contribueixen a la formació de la nostra visió del món i per tant, que ens aporten quelcom més que la possibilitat de manejar aquest món. Pel que es refereix a la biologia, aquest punt serà tractat amb més extensió després. D'altra banda, si bé és important el desenvolupament de la tècnica, cosa a la qual condueix el fet de disposar d'un «coneixement operant», molts científics no és això el que busquen, sinó una aproximació al coneixement del món.

És més el valor del coneixement en si, que el de la seva utilització, el que els mou. Per a la societat humana en general, despullar la ciència del seu valor com a coneixement és un aspecte més de la tendència a considerar com a únic valor l'«eficàcia».

Centrant-nos en el cas concret de la biologia, aquesta s'ocupa de sistemes més, i sovint molt més complicats que els físics. En el coneixement d'aquests no s'ha arribat als límits com passa en la física. És més, potser en l'estudi dels sistemes biològics, la barrera que s'ha trobat en el dels físics no existeixi. A la història recent de la Biologia es troben exem-

ples de línies de treball que podríem considerar «poc operants a causa de que han conduït a coneixements «només operants», ja que per altres vies d'investigació s'ha arribat a un coneixement del mateix fenomen que m'atreviria a qualificar de real. L'exemple del concepte de cistró, proposat per BENZER l'any 1955, és adient per precisar el que diem més amunt. BENZER, analitzant la regió rII del bacteriòfag T<sub>4</sub>, arriba experimentalment al concepte de cistró com a substitut del concepte clàssic de gen, el qual amb el desenvolupament de la genètica, principalment dels microorganismes, resultava totalment inadequat.

Tractant de resumir la història tant com sigui possible, diguem que a la genètica dels anys 20 i 30, es considerava el gen com a la unitat de mutació, de recombinació i de funció. Però el descobriment del fenomen al qual se'n va dir pseudoal·lisme, demostrà que la recombinació es produeix també dins de les unitats que es consideraven com a gens. A més, això és degut al fet que dins d'una d'aquestes unitats poden produir-se mutacions en diferents punts, les quals són les que es poden recombinar. Quan aquesta recombinació es produeix es posa de manifest un fenomen que rep el nom d'efecte cis-trans. Vegem en quina cosa consisteix i com s'explica aquest fenomen d'acord amb els coneixements actuals. Un gen és un segment d'ADN que porta informació a través d'una cadena polipeptídica concreta (hi ha gens dels quals l'informació només s'aprofita per formar ARN, però això, ací no fa el cas). Aquest segment és una seqüència lineal de nucleòtids que constitueix un missatge amb senyals indicadors d'on comença i on acaba. Actualment, alguns gens han estat totalment seqüenciats i es coneix, per tant, la seva seqüència de nucleòtids, així com la seqüència d'aminoàcids de la proteïna a través de la qual porten la informació. Les mutacions són substitucions d'un nucleòtid per un altre o canvis en la seva seqüència que en traduir-se el missatge que porta el gen a la proteïna corresponent fan que aquesta presenti canvis en els seus aminoàcids. Aquests canvis en molts casos tenen per conseqüència que la proteïna no funcioni o ho faci malament.

Com és sabut, molts organismes porten regularment o ocasionalment 2 al·lels de tots o d'alguns dels seus gens. En aquest cas pot ser que cada al·lel tingui una mutació diferent ( $m_1$  a l'al·lel 1 i  $m_2$  a l'al·lel 2, fig. 1 a). Si l'efecte d'aquestes mutacions és que la proteïna que es sintetitza, amb la informació d'aquests gens, no funcioni bé, el resultat serà que l'organisme no tindrà aquesta proteïna funcional. La manca de la funció d'aquesta proteïna determinarà que l'organisme presenti alguna anomalia manifestada al nivell del fenotip, és a dir, que sigui mutant. Ara bé, en reproduir-se organismes d'aquesta constitució genètica, per recombinació (fig. 1 b) poden donar a la descendència cromosomes amb els 2 mutants o amb cap mutant (fig. 1 c). Aleshores els individus que tinguin un cromosoma

soma de cada un d'aquests tipus, com a la fig. 1 c, poden ser individus fenotípicament normals. En efecte, en un cromosoma tenen un gen doble mutant, que regirà la formació d'una proteïna no funcional, pel fet de presentar les dues alteracions condicionades per les mutacions; el gen de l'altre cromosoma porta la informació normal, per la qual cosa regirà una proteïna normal i, per tant, funcional. La presència d'aquesta pro-

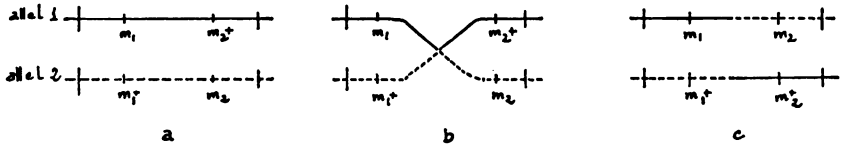


FIGURA 1. — a) L'al·lel 1 té el mutant  $m_1$ , però és normal al punt  $m_2^+$ . L'al·lel 2 és normal al punt  $m_1^+$  i mutant a  $m_2$ . Els mutants estan en posició trans. b) Es produeix recombinació quan es trenca el cromosoma dintre del gen i es torna a soldar la part de l'esquerra de l'al·lel 1 amb la de la dreta del 2 i recíprocament. c) Resultat de la recombinació. Tenim 2 al·lells formats per part del 1 i part del 2 originals, dels quals un té els 2 mutants  $m_1$  i  $m_2$ , mentre que l'altre és totalment normal  $m_1^+$  i  $m_2^+$ . Els mutants estan en posició cis.

teïna normal permet el desenvolupament del fenotip normal. Tenim, doncs, una situació on els dobles heterozigots, pels 2 mateixos mutants, quan aquests estan en cromosoma diferent, és a dir, en posició *trans*, donen lloc a un fenotip mutant (color anormal dels ulls a *Drosophila*, falta de síntesi d'arginina a *Escherichia coli*, etc.); en canvi quan els mutants estan en el mateix cromosoma, posició *cis*, el fenotip és normal. Aquest fenomen és anomenat efecte *cis-trans*.

L'anàlisi més completa i profunda d'aquest fenomen el realitzà, com hem dit abans, BENZER l'any 1955. Aleshores, ja des de feia uns anys, principalment les dades experimentals demostratives de l'efecte *cis-trans* feien insostenible la teoria clàssica del gen, com a unitat de recombinació de mutació i de funció. D'altra banda, la metodologia de la genètica clàssica (creuaments entre soques amb caràcters diferents i anàlisi de la seva descendentia), principalment amb els treballs de BENZER, havia arribat als límits de les seves possibilitats de donar respostes a la pregunta, què és un gen? Per això BENZER proposà una definició «operant» de les unitats de la herència, a les quals, a més, donà els noms de *mutó* a la unitat de mutació, *recó* a la de recombinació i *cistró* a la de funció. Aquesta última, a la qual ens limitarem, la defineix com «el segment màxim de mapa genètic dintre del qual es produeix l'efecte *cis-trans*». Això no obstant, el propi BENZER<sup>1</sup> diu que el cistró resulta ser una estructura molt sofisticada i que serà fascinant tractar de traduir la topografia d'un cistró

a la d'una estructura fisiològicament activa, com una cadena polipeptídica plegada, formant un enzim.

El concepte de cistró és un exemple bonic del que pot aconseguir-se en l'anàlisi científica quan no és possible utilitzar un mètode de coneixement directe. No obstant, el propi BENZER indica, com acabem de citar, la possibilitat d'obtenir un coneixement del que és un cistró, a un nivell més directe que el purament operacional aconseguit amb l'anàlisi genètica clàssica. El fet és que, com hem indicat abans, actualment sabem bé què és un gen i això s'ha aconseguit amb la col·laboració de les tècniques genètiques i bioquímiques. Conèixer que un gen és un segment definit d'ADN, portador d'informació en forma d'un missatge que utilitza 4 símbols, que aquests són els 4 nucleòtids del ADN, que de l'ordre en què estan aquests símbols depèn la informació portada pel missatge, que en el missatge hi ha senyals precisos de començament i de final, que la informació que conté és en molts casos per la síntesi de proteïnes específiques, de manera que la seqüència de nucleòtids de l'ADN es tradueix en una seqüència d'aminoàcids a la proteïna d'acord amb un codi d'equivalències definit, etc., és quelcom més que un coneixement simplement operant. El coneixement del que són els gens, de les seves propietats i significat, en aquest nivell, ha ampliat la nostra concepció científica i m'atreveria a dir no solament científica, sinó general del món. El fenomen de la vida queda situat ara, almenys en alguns dels seus aspectes més fonamentals, fora del camp de les especulacions, adquirint al mateix temps una magnitud i unes dimensions pròpies, dintre dels fenòmens naturals del món físic. Em sembla evident que en aquest cas, en l'anàlisi del que és un gen, hauria estat totalment fora de lloc que els biòlegs s'haguessin acontentat com un coneixement només operant. Pel nivell que els gens ocupen dintre de la jerarquia de sistemes del món físic, era possible un coneixement directe del gens, mitjançant la combinació de les tècniques genètiques amb les bioquímiques.

No obstant això, potser per l'enlluernament de la física, és freqüent l'opinió que a la biologia i a la ciència en general, tenim que contentar-nos amb un coneixement operant. Em sembla que el coneixement científic ha de ser operant. Si no ho és podem dir que no passa la prova necessària per ser científic, però moltes vegades pot ser quelcom més i aquest quelcom més omple un aspecte de les necessitats de l'home, sense el qual el progrés tècnic pot perdre valors positius que indubtablement té. En el cas de la biologia és possible que, a causa del nivell que ocupen els sistemes biològics dintre dels sistemes del món físic o natural, els seus coneixements puguin obtenir-se sense necessitat d'acontentar-nos amb el fet que siguin només operants. Almenys, de moment no hem arribat a aquest límit. En realitat, en la biologia, les dificultats vénen de la complexitat

dels sistemes biològics, i, per tant, són més grans en els nivells superiors de les poblacions i dels ecosistemes. Això no obstant, no sembla que aquestes dificultats hagin de ser insuperables, com les que troben els físics en els sistemes que estan en el límit de la simplicitat. La utilització del mètode analític, seguit d'una síntesi dels coneixements amb ells obtinguts, permet augurar que en el futur s'aconseguirà un coneixement satisfactori. En l'aspecte analític, el que ara manca és un millor coneixement dels sistemes més senzills que constitueixen els elements integrants dels sistemes més complexos. Per a la integració posterior es necessita el desenvolupament de tècniques matemàtiques adequades per a la formulació dels models explicatius d'aquests sistemes complexos. En els camps de gran complexitat potser es trobi un altre límit de la nostra capacitat de conèixer, al nivell del gran sistema que és l'Univers, però aquest, principalment, també es un problema dels físics.

Pel que fa a la utilització de les matemàtiques a la biologia tenim un altre exemple de com és d'insuficient per al biòleg viure de les rendes del que li subministra el físic. La història de l'estadística és un exemple de com el biòleg ha hagut de desenvolupar mètodes adequats per als seus problemes. Els treballs de GALTON, PEARSON i FISHER, entre altres, en són exemples. Per trobar l'instrument matemàtic adequat per tractar els seus problemes, el biòleg, a més de considerar el que li ofereix la física, ha d'explorar directament les formulacions abstractes dels matemàtics i, si cal, caminar pel seu compte.

L'anàlisi seguida de síntesi, que acabem de indicar com el camí del progrés de la biologia, requereix passar de nivells inferiors a superiors i viceversa, de forma que es produeixi una interacció entre els coneixements dels diversos nivells. Això ho veiem en el desenvolupament recent de la genètica. La problemàtica resolta per la genètica molecular havia estat plantejada de dalt a baix, des del nivell superior a l'inferior, és a dir, analíticament. El genètic clàssic partint de l'organisme, l'analitzava en caràcters, i del comportament d'aquests en els creuaments, deduïa les propietats de les unitats genètiques elementals, els gens. A part de les limitacions que ja s'han comentat abans, a aquesta via d'anàlisi li han calgut les característiques fonamentals dels processos hereditaris, individualitat de les unitats de l'herència o els gens, característiques de la seva transmissió, localització i disposició dintre de la cèl·lula, existència del fenomen de la mutació i les seves peculiaritats, etc. Tot això ha servit per comprendre la importància bàsica que té el fenomen de l'herència dintre del fenomen de la vida en general i ha menat l'atenció dels bioquímics a fer-se les preguntes, la contestació de les quals ha donat origen a la genètica molecular. Aquesta, com hem dit abans, ha aportat un coneixement directe d'alguns aspectes essencials de la genètica, als quals la

metodologia clàssica no podia arribar, com, per exemple, al que són els gens.

Els coneixements de la genètica molecular han tingut una retroacció sobre els nivells superiors d'integració d'aquesta ciència. Així, el coneixement que els gens tenen com a primer efecte genotípic la síntesi d'una proteïna específica, ha obert un nou camp d'estudi de la variabilitat genètica: la variabilitat a les proteïnes. Amb la utilització de les tècniques d'electroforesi, l'anàlisi d'aquesta variabilitat es realitza rutinàriament en poblacions nombroses. L'impacte produït a la genètica de poblacions i, per tant, a la teoria de l'evolució, per aquesta possibilitat i pels resultats ja obtinguts, ha estat considerable. Excepte en casos més aviat excepcionals, a la genètica de poblacions li era impossible estudiar el comportament dels gens individuals. Excepte en el cas dels gens amb efectes patològics, que tenen poca importància per a l'evolució, i en els pocs casos en què es troben aHels d'un mateix gen determinant vaariabilitat discontinua en caràcters normals del fenotip extern, els gens que determinen la variabilitat a les poblacions tenen efectes petits que, combinats amb els d'altres gens i amb l'efecte de l'ambient, no poden detectar-se individualment i donen lloc a la variabilitat contínua o quantitativa. Per això, l'anàlisi de l'herència d'aquests caràcters es fa en termes purament estadístics, calculant mitjanes, variàncies, distribucions de freqüències, etc. En poder-se detectar les proteïnes controlades pels gens d'efectes petits, no només s'ha obert una nova dimensió de la variabilitat dels sistemes biològics, sinó que s'ha fet possible el coneixement directe i precís d'aspectes de la genètica de poblacions, com el càlcul de la quantitat de variabilitat genètica existent en una població, el nivell d'homozigosi o heterozigosi que es produeix en una població quan s'hi aplica selecció, creuaments consanguinis, etc., quin significat té el lligament en diferents processos evolutius i moltes coses més. Totes aquestes són qüestions que planteja des de fa temps la genètica de poblacions. Les respostes que ja està començant a donar-hi l'anàlisi de la variabilitat al nivell molecular estan obrint nous punts de vista, cosa amb la qual, als nivells d'integració superiors de la genètica de poblacions i la teoria de l'evolució es formulen nous models matemàtics, els quals al seu torn plantejen noves preguntes a contestar a nivell analític de l'estudi de la variabilitat a les proteïnes. És a dir, es produeix com hem dit abans una interacció contínua de nivell superior a inferior i viceversa.

Un exemple d'aquesta interacció el tenim en el següent cas, estudiat recentment al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de Barcelona. La distribució estadística de l'estatura de l'home, de la grandària general del cos en molts organismes i de les dimensions molt correlacionades amb aquest, molt freqüentment presenta una clara asimetria

negativa. La longitud de l'ala a *Drosophila melanogaster* és un caràcter d'aquest tipus amb distribució asimètrica negativa. M. AGUADÉ, J. CUELLO, L. SERRA i J. XUFRE han realitzat experiments de selecció de la longitud de l'ala a *Drosophila melanogaster*. Començant a la mateixa població s'han establert línies de selecció per ales llargues i ales curtes, utilitzant exactament la mateixa pressió de selecció, és a dir, seleccionant a les línies d'ales llargues a cada generació, el 20% de individus amb ales més llargues i a les línies d'ales curtes el 20% d'individus amb ales més curtes. Malgrat això, la selecció resulta més eficaç a les línies d'ales curtes, aconseguint-se un canvi més gran en el promitg de la longitud de l'ala. És a dir, començant simultàniament a partir de la mateixa població inicial, línies seleccionades per ales llargues i línies seleccionades per ales curtes, la resposta a la selecció és totalment asimètrica (fig. 2). En els experiments que estem considerant s'han analitzat, a més, diversos sistemes d'alloenzims, amb la qual cosa s'ha pogut obtenir informació sobre com la selecció per la longitud de l'ala afecta l'estructura del genotip. Així, s'ha vist que la selecció per ales curtes augmenta molt més la homozigosi que la selecció per ales llargues, d'acord amb experiments anteriors<sup>2</sup> en els quals el que s'analitzà foren les ordenacions cromosòmiques. Per tant, les ales curtes depenen de genotips més homozigots i les ales llargues de genotips més heterozigots. Aquest fet explica, almenys en part, la resposta asimètrica a la selecció i, també, l'asimetria negativa que sol trobar-se en la distribució de la longitud de l'ala.

En aquest exemple es veu com la descripció purament estadística del fenomen de la variació a la longitud de l'ala a *Drosophila melanogaster* en relacionar-lo amb un nivell inferior, el molecular, passa a tenir una explicació, encara que només parcial.

L'anàlisi del fenomen exclusivament des del nivell en què es manifesta, és a dir, al d'un fenotip morfològic i reduïble, per mida a quantitatiu, no permetia anar més enllà d'una descripció estadística: dir que el fenomen s'adapta a un model de distribució que s'aparta de la normal per una tendència a la asimetria negativa. Aquest model comporta que el caràcter, la longitud de l'ala, depengui de molts factors d'efectes relativament petits, els efectes dels quals donen lloc a aquest tipus de distribució. Les estructures del genotip i de les interaccions entre aquest i l'ambient, que poden explicar la distribució observada son nombroses. Pot pensar-se en efectes de homozigosi i heterozigosi amb superioritat o sense dels heterozigots, en interaccions més o menys complicades entre els diferents gens no al·lèls, en variacions de la homeostasi del desenvolupament o canalització relacionades amb els diferents genotips presents a la població i amb les interaccions d'aquests amb l'ambient, etc. És a dir, amb l'estudi del caràcter al nivell del fenotip morfològic, utilitzant les tècniques de creua-



LONGITUD  
DE L'ALA

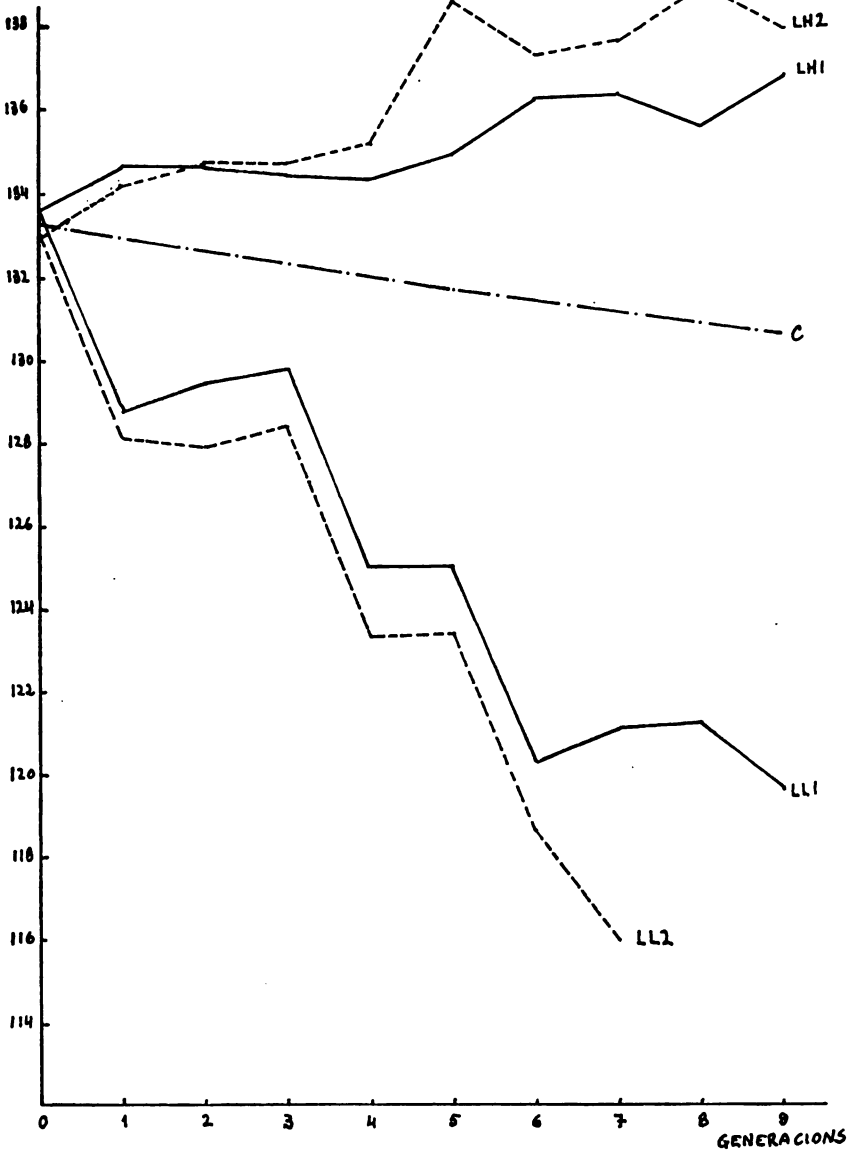


FIGURA 2. — Exemple dels resultats de la selecció per ales llargues i ales curtes. Les línies LH són seleccionades per ales llargues, les LL seleccionades per ales curtes i la C és una línia control. La longitud de l'ala es dona en unitats del micròmetre (1 unitat micròmetre 0,01754 mm). La diferència entre la línia control i les línies seleccionades correspon a l'efecte aconseguit amb la selecció.

ments de la genètica clàssica, no es pot sortir d'una indeterminació en allò que es refereix al coneixement de quina estructura de factors genètics i ambientals determina realment la situació que s'observa al nivell del genotip morfològic. No és possible discriminar entre diverses alternatives que poden explicar les dades que tenim. De fet, la línia seguida en aquest cas parteix d'un nivell superior per a induir la situació que la determina en un nivell inferior. L'anàlisi directa d'aquest nivell inferior, l'estructura del genotip, és actualment possible amb l'estudi de la variabilitat a les proteïnes. Aquesta situació és general a la biologia. Els diversos nivells dels fenòmens biològics tots són analitzables directament o és de preveure que puguin ser-ho en el futur. La biologia és una ciència que es mou en un nivell intermedi en relació al que tendeix a infinitament petit i a infinitament gran, on es troben els límits del coneixement amb què topa la física. En canvi, la biologia troba les dificultats en la gran complexitat dels fenòmens biològics, però cada nivell d'aquesta complexitat sembla que pot ser assequible a un anàlisi directa. Per tant, no sembla que els coneixements biològics hagin de trobar-se en situacions límit com les de la física, almenys no s'hi troben actualment.

La interacció entre els coneixements obtinguts a diferents nivells és la base de la superació de les situacions en les quals semblava que s'havia arribat a una indeterminació. En l'exemple que hem posat, l'anàlisi a nivell del fenotip morfològic havia posat de manifest una sèrie de possibilitats respecte a l'estructura del genotip que determina la longitud de l'ala. Això ha servit per plantejar unes preguntes adequades i planejar experiments per contestar-les i conduir a l'anàlisi directa d'aquesta estructura mitjançant l'estudi de varios sistemes d'enzims. Les respostes obtingudes amb aquesta anàlisi, permeten entendre millor certs aspectes del nivell superior. Per exemple, el fet que la grandària petita estigui relacionada amb l'homozigosi, fa pensar que vagi acompanyada de petites deficiències metabòliques. Això suggereix experiments al nivell de l'anàlisi de fenotip morfològic, com subministrar diverses substàncies en l'alimentació de soques seleccionades per ales curtes, a fi de veure si tenen un efecte sobre la grandària. En cas d'obtenir-se resultats positius amb algunes substàncies, podria estudiar-se el seu metabolisme i el genotip que controla aquest metabolisme, a fi d'obtenir proves directes de que realment presenta deficiències i veure quina base genètica tenen. Amb això hauríem tornat als nivells inferiors per contestar les qüestions sorgides a l'estudi dels superiors. D'aquesta manera, passant successivament d'un nivell a l'altre (evidentment no necessàriament d'una manera alternativa tant regular com suposem en aquest exemple) es van obtenint uns coneixements biològics que són quelcom més que operants.

BIBLIOGRAFIA

1. BENZER, S. — *The elementary units of heredity*, In, «The Chemical basis of Heredity» (Eds. Mc. Elroy, W. D. i Glass, B.). The John Hopkins Press. Baltimore (1957).
2. PREVOSTI, A. — *Inversion heterozygosity and selection for wing length in Drosophila subobscura*. «Genetical Research», 10: 81-94 (1967).