

真菌激发子诱导油菜抗菌核病研究

魏志文, 张梅梅, 赵艳霞, 郑维发

(江苏师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 为了提高油菜对菌核病的抗性, 利用病原菌激发子喷施油菜植株, 分析其防御体系中酚类物质的变化及对病原菌入侵的抗性。结果表明, 多糖激发子和细胞壁激发子均能迅速激活油菜的免疫机制, 促进酚类物质的合成, 多糖激发子诱导后 96 h 多酚含量达到最大值(0.229 mg/g), 细胞壁激发子诱导 120 h 后多酚含量达到最大值(0.267 mg/g), 且提取的植物多酚在体外培养条件下对油菜菌核病菌的菌丝生长有显著的抑制作用, 特别是细胞壁激发子诱导组的提取物抑菌率可达 60.70%。这说明病原菌激发子可以用于油菜菌核病的防治。

关键词: 油菜; 菌核病; 激发子; 诱导抗性

中图分类号: S435.654 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)08-0072-05

Induced Resistance of *Brassica napus* by Fungal Elicitors to *Sclerotinia sclerotiorum*

WEI Zhi-wen, ZHANG Mei-mei, ZHAO Yan-xia, ZHENG Wei-fa

(Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province,
Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: In order to enhance the resistance of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum*, the experiments investigated the effects of fungal elicitors, such as cell wall fragment and polysaccharose on *Brassica napus*. The results showed that the two elicitors both could activate the immune mechanism of *Brassica napus*, and enhance the production of polyphenol. The production of polyphenol reached the maximum, 0.267 mg/g and 0.229 mg/g, respectively induced by the cell wall elicitor after 120 h and by polysaccharose elicitor after 96 h. The extracts of polyphenol from *Brassica napus* showed strong inhibition on the mycelia growth *in vitro*, especially the extracts from the treatment by cell wall elicitor had inhibition rate of 60.70%. These results indicate that fungal elicitors can be used for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*.

Key words: *Brassica napus*; *Sclerotinia sclerotiorum*; elicitor; induced resistance

油菜是我国重要的油料作物, 作为食用油来源和潜在的生物质能源具有重大的经济价值。我国油菜种植面积为 733 万 hm^2 左右, 其生长过程中很容易发生菌核病。油菜菌核病是由核盘菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 侵染引起的一种真菌性病害, 发病率一般为 10%~30%, 严重时可达 80% 以上, 病株一般减产 10%~70%, 该病对油料作物生产构成了极大威胁^[1]。目前, 防治

油菜病害的主要手段为化学防治, 其具有见效快、杀菌谱广、成本低等特点, 但长期、反复和大量使用化学农药不仅引起环境污染, 对人类健康造成潜在危害, 而且还导致产生了大量的抗药性病原微生物。植物在长期自然进化过程中, 自身形成了一套独特的防御系统, 即在遇到有害生物侵袭时自身能被诱导而启动一系列复杂的防卫反应, 减轻或消除危害的发生, 即诱导抗病性。自 1901 年 Rav 和

收稿日期: 2014-01-24

基金项目: 江苏师范大学自然科学基金项目(13XLB02)

作者简介: 魏志文(1978-), 男, 河北承德人, 实验师, 硕士, 主要从事应用微生物研究。E-mail: zhiwen_wei@126.com

Teauverie 发现植物免疫现象以来,国内外许多学者对植物诱导抗病性进行了大量和深入的研究。诱导抗性在植物病害防治上已经有许多成功的例子,如,利用草酸喷施黄瓜可诱导其产生对真菌、细菌和病毒病害的抗性^[2];用尖镰孢霉诱导黄瓜抗炭疽菌^[3];利用草酸青霉发酵液诱导番茄抗镰刀菌和轮枝孢菌^[4-5];在水稻上用水杨酸喷施第1、2片叶,可诱导其苗期抗稻瘟病等^[6]。然而油菜作为我国重要的油料作物,其相关的诱导抗性研究还比较少。

根据植物自身的免疫机制,本实验室采用病原菌细胞壁碎片及其多糖产物对油菜植株进行诱导处理,以激活植物自身的免疫系统,产生免疫活性物质,从而对外界接触的病原菌产生快速有效的预防作用,为油菜种植业减少对化学农药的依赖,生产出绿色健康的菜籽油提供理论依据,这对于保护人类健康和降低环境污染都具有积极意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 油菜菌核病菌为本实验室保存。

1.1.2 植物材料 供试油菜品种为双低甘蓝型油菜中油821,购自种子市场。

1.1.3 培养基 固体培养基为PDA培养基:200 g去皮土豆切块,煮沸30 min,4层纱布过滤后用蒸馏水补足1 000 mL,加入葡萄糖20 g、琼脂15 g。液体培养基为马铃薯液体培养基(PDB)。

1.2 油菜植株的培养和激发子的制备

1.2.1 油菜植株培养 将土壤基质(土:沙=1:1, v/v)装入陶制花盆中,装量为4/5,高压蒸汽灭菌1 h,冷却后播种油菜种子,种子此前经过次氯酸钠消毒及无菌水清洗。播种后将花盆放入光照培养间培养,25℃,16 h/8 h光暗交替,相对湿度80%,定时喷施适量灭菌植物营养液^[7],保持土壤湿润。待幼苗长出4片真叶后,移栽入相同土质的花盆中,每盆移栽3株,长至株高15 cm后用于试验。

1.2.2 细胞壁激发子的制备 将菌核病菌接种于PDA培养基并在28℃下培养5 d,然后转入PDB液体培养基中,28℃下振荡培养3 d(摇床转速为150 r/min)。培养结束后取培养物,4 000 r/min离心10 min,菌丝体用去离子水洗涤3次,用50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH值7.2)洗涤3次,以JY92-II V超声波细胞粉碎机破碎细胞(300 W, 30 s×10次),4 000 r/min离心10 min,取沉淀,在显微镜下观察,菌丝体均为碎片状。用上述缓冲液洗涤3次,去离子水洗涤3次,然后用去离子水配制

成60 μg/mL的细胞碎片溶液作为激发子,高压蒸汽灭菌,置4℃冰箱保藏备用。

1.2.3 多糖激发子的制备 PDB液体培养基培养病原菌3 d后取培养物,4 000 r/min离心10 min,收集上清液。将上清液浓缩至初始体积的1/5,加入3倍体积的95%乙醇,静置沉淀24 h,4 000 r/min离心10 min,收集沉淀即为粗多糖。利用硫酸-蒽酮法测定多糖含量,定容至50 μg/mL,高压蒸汽灭菌后4℃冰箱保存。

1.3 油菜菌核病菌孢子的制备

将油菜菌核病菌接种于PDA斜面,25℃恒温培养10~15 d。挑出菌落上的菌核,于50℃烘箱中烘48 h后破碎,加入无菌生理盐水悬浮孢子,用血球计数板在光学显微镜下观察孢子,调整浓度至 1.25×10^6 cfu/mL备用。

1.4 菌核病菌孢子对油菜防御系统的诱导试验

取培养的健康油菜植株,分为试验组和对照组,每组3株。取病原菌孢子悬液喷施在植株茎叶表面,24 h后取样,采用联苯胺(DAB)染色法^[8]观察病原菌孢子是否诱导植物防御系统启动,对照组喷施无菌水。

联苯胺染色法原理:植物被病原菌侵染后,自身防御系统启动,初期会产生大量活性氧(ROS),主要成分为 H_2O_2 ,在过氧化物酶存在下,DAB可与 H_2O_2 结合而形成红褐色聚合物。操作方法:接种病原菌孢子的油菜植株在25℃下培养24 h(光照12 h)后,取叶片浸入1 mg/mL的DAB中,用真空泵抽气10 min,取出叶片,置于95%乙醇中煮沸10 min脱色,然后将叶片转入新鲜的乙醇中室温下继续脱色5 h,观察叶片中是否出现红褐色沉淀。

1.5 病原菌孢子入侵植株前后酚类物质变化测定

取健康油菜植株分为对照组和试验组,将病原菌孢子液喷施在植株茎叶表面,对照组喷施无菌水,每组3个重复。喷施后晾干水迹立即取叶片作为样品,而后每24 h取样一次,取样叶片置于丙酮-乙醇溶液(1:1, v/v)中,用高速分散器打碎,冰水浴中超声波提取,4 800 r/min离心10 min,取上清液,残渣继续超声提取2次,合并3次提取的上清液,用活性炭除叶绿素,冷冻干燥后定容至1 mL,以Folin-Ciocalteu法测定多酚的含量。

1.6 病原菌细胞壁和多糖激发子对植物多酚的诱导作用测定

取健康盆栽油菜植株分为多糖激发子试验组、细胞壁激发子试验组和对照组,每组3株,将多糖激发子和细胞壁激发子溶液分别喷施在相应的试验组

植株表面,每次间隔 24 h,连续 3 次,对照组同时喷施无菌水,喷施结束后晾干水渍立即取植株样品,此后每 24 h 取样一次,提取多酚,检测多酚含量。

1.7 病原菌细胞壁和多糖激发子诱导植物多酚所产生的防御作用测定

取健康盆栽油菜植株分为多糖激发子试验组、细胞壁激发子试验组和对照组,诱导处理同 1.6。第 3 次喷施结束 24 h 后在试验组与对照组植株表面同时喷洒接种 1.25×10^6 cfu/mL 的病原菌孢子悬液,24 h 后取样,间隔 24 h 取样一次,提取多酚,检测多酚含量。

1.8 植物多酚抑制真菌生长的活性测定

采用牛津杯法^[9]测定激发子诱导植物产生的多酚成分的抑菌活性,多酚共设 3 个质量浓度,每个质量浓度 3 个平行,分别为 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。供试真菌为油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinglata*)和茄子黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)。将平皿中培养好的供试病原菌用直径 9 mm 的打孔器取菌落边缘菌饼反接于培养皿中心,距中心 25 mm 处放置灭菌的牛津杯,取 200 μL 多酚提取液加入牛津杯中,空白对照加入 200 μL 无菌水,25 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,观察菌落生长状况。十字交叉法测量菌落直径,计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = (A - C) / (A - B) \times 100\%$$

其中, A 为对照菌落直径, B 为菌丝块直径, C 为处理菌落直径。

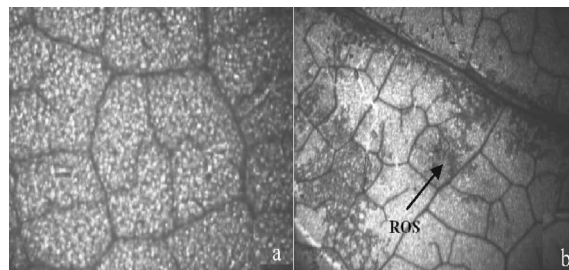
1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对试验数据进行分析,结果用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 油菜对菌核病菌孢子侵染的早期防御反应

ROS 迸发是植物对病原菌应答的早期反应之一,通常情况下,植物受病原菌侵染早期可迅速产生大量 ROS,ROS 直接攻击膜系统中的不饱和脂肪酸,启动膜脂过氧化发生和膜蛋白间的聚合,从而破坏植物细胞膜的结构与功能^[10],导致被侵染细胞坏死,从而阻断病原菌的进一步侵染。另外,ROS 可作为信号物质参与植物对病菌侵染的防御反应^[11]。由图 1 可知,油菜菌核病菌孢子在侵入油菜叶片的过程中会引发油菜植株的 ROS 迸发,对病原菌的入侵产生抑制作用,同时其可能作为启动油菜植株内多酚等抗菌物质合成的信号物质而发挥作用。

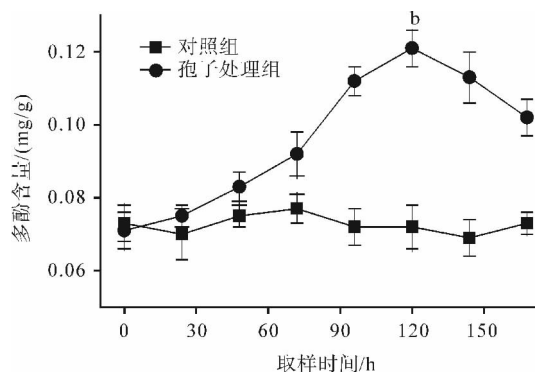


a. 对照组; b. 孢子侵染组

图 1 孢子侵染后的 ROS 迸发(5 \times)

2.2 油菜菌核病菌入侵前后酚类物质的变化

由图 2 可知,对照组(未接病原菌孢子)植株在取样阶段多酚含量没有发生显著的变化,而接种孢子组植株的多酚含量逐渐增加,在接种孢子 120 h 时,植物组织多酚含量达到最大值(0.121 mg/g),与对照样品相比,有显著差异($P < 0.05$)。反映了接种孢子后,病原菌孢子对植物造成了侵害,激活了植物的免疫机制,产生多酚对抗病原菌在植株体内的萌发及由此引发的 ROS 迸发,但依靠植株自身的抗病机制并不能完全有效抵御病原菌的侵害,随着病原菌侵害的加剧,植株感染面积增大,细胞出现大量死亡,其产生多酚的能力也相应下降。



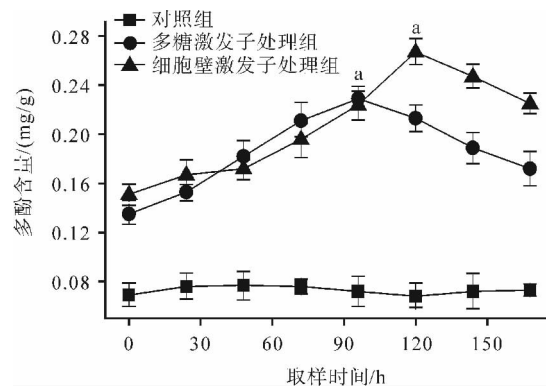
b 表示与对照组比较, $P < 0.05$, 下同

图 2 孢子入侵后酚类物质含量的变化

2.3 油菜菌核病菌细胞壁、多糖激发子对植物多酚的诱导作用

由图 3 可知,采用病原菌细胞壁和多糖激发子对油菜植株进行喷施后,第 1 次采集样品的多酚含量高于对照组,说明前 2 次(48 h)的诱导喷施已激活了植物的相关免疫机制。对照组在整个试验过程中多酚含量处于平稳状态,没有发生显著变化。激发子处理的 2 个试验组多酚在诱导处理后均表现为迅速增加,多糖激发子诱导组在处理结束后 96 h,多酚含量达到最大值(0.229 mg/g),此后开始下降;而细胞壁激发子诱导组在处理 120 h 后多酚含

量达到最大值(0.267 mg/g),之后表现明显下降趋势,说明细胞壁激发子和多糖激发子均能诱导植物体内多酚含量的迅速增加,病原菌侵害植物细胞后会激发大量的 ROS 产生,多酚作为植物清除 ROS 的有效成分可以在一定程度上抵御病原菌对植物的侵害并延缓因 ROS 迸发而引起的细胞坏死。



a 表示与对照组比较, $P<0.01$,下同

图 3 激发子对多酚的诱导作用

2.4 油菜菌核病菌激发子诱导植物多酚对病原菌的防御作用

由图 4 可知,诱导组接种病原菌孢子 24 h 后,其多酚含量即与对照组产生差异。接种孢子后,诱导组的多酚含量呈现显著增加的趋势,细胞壁激发子处理组和多糖激发子处理组均在接种孢子 144 h 后多酚含量达到最大值,分别为 0.327 mg/g 和 0.284 mg/g,与图 3 中相应的激发子处理组比较,均出现了一定程度的增加,说明病原菌孢子在侵染植物过程中进一步诱导了植物体内的防御机制,从而引起了多酚的增加。然而多酚峰值的出现有所延后,特别是峰值过后多酚含量并没有明显下降,说明病原菌孢子在植物组织内的侵染作用对植物的免疫机制起到了持续的激活作用。对照组植物在接种病原菌孢子后多酚含量表现缓慢增加趋势,接种孢子 120 h 后其多酚含量达到最大值,为 0.130 mg/g,而后多酚含量并未保持稳定而是表现明显下降,主要是由于病原菌孢子萌发后侵染植物组织,初始阶段激活了植物的防御机制,产生多酚以应对病原菌的侵染和活性氧迸发对自身造成的伤害,但由于防御机制相对于诱导组激活较晚,积累的多酚含量不足,对病原菌的侵害和活性氧迸发造成的伤害所产生的应对作用较弱,从而造成植物组织和细胞的死亡,进一步影响了多酚的合成。所以在对照组中多酚含量只出现了一个小高峰,而后迅速下降。

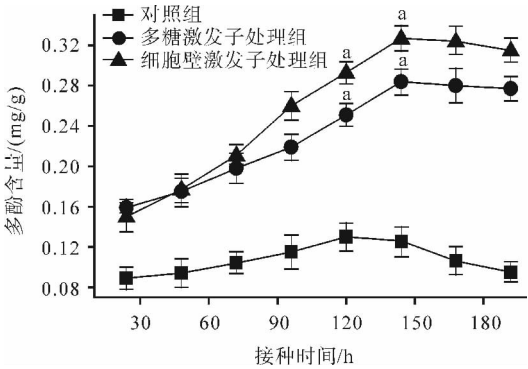


图 4 接种病原菌后激发子诱导组的多酚含量变化

2.5 油菜菌核病菌激发子诱导产生的多酚对病原菌菌丝生长的抑制效果

由表 1 可知,油菜菌核病菌激发子诱导产生的植物多酚在体外培养试验中对油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌和茄子黄萎病菌的菌丝生长均有抑制作用,质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的细胞壁激发子诱导多酚对油菜菌核病菌菌丝的抑制率(3 d)可达 60.70%,对番茄灰霉病菌菌丝的抑制率(7 d)达 50.72%,对茄子黄萎病菌菌丝的抑制率(9 d)为 44.68%,抑制效果均达极显著水平。质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的多糖激发子诱导多酚对油菜菌核病菌菌丝的抑制率(3 d)为 49.25%,对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制率(7 d)为 47.25%,对茄子黄萎病菌菌丝的抑制率(9 d)为 38.80%,抑制效果达显著或极显著水平。多酚质量浓度降低,抑菌率随之降低。在 3 株病原菌抑菌试验中,100 $\mu\text{g/mL}$ 多酚对油菜菌核病菌菌丝生长的抑制效果最为显著,而对番茄灰霉病菌和茄子黄萎病菌菌丝生长的抑制作用偏弱,说明植物经诱导产生的抗菌物质对亲和性病原菌的作用效果更明显。相应地,多酚对亲和性病原菌的抑制效果呈现明显的浓度效应,而对非亲和性的其他病原菌浓度效应则不明显。

表 1 油菜菌核病菌激发子诱导的植物多酚对病原菌的抑制效果

供试病原菌	激发子质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	抑菌率/%	
		细胞壁激发子诱导多酚	多糖激发子诱导多酚
油菜菌核病菌(3 d)	100	60.70 \pm 2.28a	49.25 \pm 2.99a
	50	25.37 \pm 5.17	20.40 \pm 0.87
	25	1.24 \pm 0.25	4.97 \pm 0.79
番茄灰霉病菌(7 d)	100	50.72 \pm 2.65a	47.25 \pm 2.66a
	50	37.39 \pm 1.74b	33.91 \pm 1.74b
	25	4.35 \pm 1.01	2.03 \pm 0.58
茄子黄萎病菌(9 d)	100	44.68 \pm 1.76a	38.80 \pm 1.43b
	50	31.16 \pm 0.95b	28.81 \pm 2.69
	25	26.46 \pm 1.77	25.87 \pm 1.02

3 结论与讨论

通过试验发现,在接种病原菌孢子 120 h 后,多酚含量达到最大值 0.121 mg/g,而多糖激发子诱导 96 h 后,多酚含量达 0.229 mg/g,细胞壁激发子诱导 120 h 后多酚含量达 0.267 mg/g,由此可知,多酚类物质是油菜防御体系中的一种重要抗病物质,而油菜菌核病菌细胞壁激发子和多糖激发子诱导植株后能够显著提高植株的多酚含量,说明这 2 种激发子和油菜菌核病菌孢子均能诱导并激活油菜植株的免疫防御体系。当采用激发子诱导油菜植株并接种菌核病菌孢子后 144 h,多酚含量峰值会进一步增加,且峰值持续时间延长,说明病原菌孢子在侵染免疫植株的过程中持续刺激植株的防御体系,从而合成了更大量的多酚。本试验还表明,激发子诱导多酚对病原菌菌丝生长的抑制效果显著,100 $\mu\text{g/mL}$ 的细胞壁激发子诱导多酚对油菜菌核病菌的抑制率达 60.70%,100 $\mu\text{g/mL}$ 的多糖激发子诱导多酚对油菜菌核病菌的抑制率达 49.25%,2 种激发子诱导多酚的抑菌率不同可能由于诱导的多酚成分存在差异所致,这一情况需进一步试验分析。抑菌率随多酚质量浓度的降低而显著下降。油菜抗菌核病多酚对其他植物病原菌也有显著的抑制作用,说明多酚类物质在植物抗病原菌机制中是一类普遍存在的成分,但其抑菌率与质量浓度之间的比例效应不如对油菜菌核病菌明显,分析原因为,番茄灰霉病菌和茄子黄萎病菌生长比较缓慢,从而导致不同质量浓度抑菌物质对这 2 种病原菌的抑制差异不如对油菜菌核病菌明显。另外,不同激发子诱导不同植物产生的多酚成分可能会有差别,因而造成抑菌效果的不同,这也可能是其原因之一,需要进一步的试验予以证实。

近年来,人们致力于研究植物的抗病机制及其调控,并取得了长足进展,许多试验证明,在植物诱导抗病中,ROS 迸发是最早启动的抗病反应^[12-13]。一方面 ROS 本身具有抑制真菌孢子萌发和细菌生长的作用;另一方面,ROS 作为信号物质启动了植物对病菌侵染的防御反应,促进植保素生成以及参与许多基因的表达^[14-16]。其中启动的苯丙氨酸解氨酶(PAL)途径可以生成酚类和其他抗菌活性物质,从而对病原菌的侵染产生抑制^[17-18]。

多酚类物质只是植物防御体系中众多抗病物质之一,但通过多酚类物质的含量变化可以确定油菜菌核病菌的细胞壁激发子和多糖激发子能够诱导启动健康植株的防御体系,说明采用油菜菌核病菌的细胞成分诱导油菜抗菌核病有潜在的应用价值,这对其他植物的防病抗病研究也具有参考价值。

参考文献:

- [1] 陈利锋,徐敬友. 农业植物病理学(南方本)[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [2] Mandel O, Baker R. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt on cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* [J]. *Phytopathology*, 1991, 81: 462-469.
- [3] Biles C L, Martyn R D, Netzer D. *In vitro* inhibitory activity of xylem exudates from cucurbits towards *Fusarium oxysporum* microconidia[J]. *Phytoparasitica*, 1990, 18 (1): 41-49.
- [4] de Cal A, Garcia-Lepe R, Melgarejo P. Induced Resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems[J]. *Phytopathology*, 2000, 90: 260-268.
- [5] Larena I, Sabuquillo P, Melgarejo P, et al. Biocontrol of fusarium and verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under green house and field conditions[J]. *Journal of Phytopathol*, 2003, 151: 507-512.
- [6] 蔡新忠, 郑重. 水杨酸诱导水稻幼苗抗瘟性的生化机制[J]. *植物病理学报*, 1997, 27(3): 231-236.
- [7] 马太和. 无土栽培[M]. 2 版. 北京: 北京出版社, 1985: 1-5.
- [8] Pellinen R I, Ko rhonen M S, Tauriainen A A, et al. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130 (2): 549-560.
- [9] Schlumbaum A, M auch F, Vogeli U, et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth[J]. *Nature*, 1986, 324: 365-367.
- [10] Van Camp W, Van Montagu M, Inze D. H_2O_2 and NO : Redox signals in disease resistance[J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3: 330-334.
- [11] Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, et al. The involvement of cysteine protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 431-443.
- [12] Wojtaszek P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 322: 681-692.
- [13] John J G, Gary J L. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 21-29.
- [14] Desikan R, Eeynolds A, Hancock J T, et al. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures[J]. *Biochemical Journal*, 1998, 330: 115-120.
- [15] Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, et al. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic tobacco [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 5818-5823.
- [16] Delledonne M, Zeier J, Marocco A, et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen in term ediates in the plant hypersensitive disease resistance response[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 3454-3459.
- [17] Vance C P, Kirk T K, Sherwood R T. Lignification as a mechanism of disease resistance[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1980, 18: 259-288.
- [18] 韩建东, 曹远银, 姚平. 小麦一秆锈菌互作中的激发子对小麦过敏性坏死反应和防御酶活性的诱导[J]. *华北农学报*, 2009, 24(1): 79-82.