

اثر اسید سالیسیلیک بر سیستم آنتی اکسیداتیو چند رقم انگور پس از اعمال سرما

قادر حبیبی*

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه کاربرد دی اکسید گوگرد در انبارداری انگور برای سلامتی انسان مضر شناخته شده است و به جای آن از اسید سالیسیلیک استفاده می شود که بطور موثری می تواند تنش های اکسیداتیو در طی انبارداری را کاهش دهد. در این تحقیق اثر هورمون اسید سالیسیلیک بر روی فعالیت سیستم آنتی اکسیدانت چند رقم انگور شامل بیدانه سفید، دسترچین، صاحبی و قزل ازوم که به مدت دو هفته تحت تیمار سرمای صفر درجه قرار گرفته بودند، مطالعه شد.

مواد و روش ها: میوه ها بلافاصله پس از برداشت در دو گروه آزمایشی تقسیم بندی و گروه اول به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک و گروه دوم (شاهد) در آب مقطر قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک باعث افزایش معنی دار محتوی نسبی آب (RWC) و همچنین فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در قزل ازوم و صاحبی نسبت به شاهد شده است. اعمال اسید سالیسیلیک باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در رقم دسترچین شد ولی فعالیت این آنزیم را در رقم بیدانه سفید متاثر نکرد.

نتیجه گیری: تیمار اسید سالیسیلیک با افزایش همزمان فعالیت آنزیم های SOD و کاتالاز (CAT) باعث کاهش معنی دار مقدار مالون دی آلدئید ناشی از آسیب غشایی فقط در قزل ازوم و صاحبی شد. نتایج نشان داد که هورمون فوق می تواند در تخفیف اثرات سرما از طریق افزایش توان سیستم آنتی اکسیدانت در رقم های قزل ازوم و صاحبی عمل نموده و در انبارداری این ارقام مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اسید سالیسیلیک، انگور، سوپر اکسید دیسموتاز

مقدمه

می باشد. از جمله راهکارهای مناسب برای حفظ کیفیت میوه ها، ذخیره آن ها در دمای پایین است ولی در کنار سرمادهی افزودن مواد شیمیایی حفاظت کننده ضروری به نظر می رسد (۲۰). امروزه استفاده از دی اکسید گوگرد (SO_۲) برای حفاظت انگور در طی انبارداری برای سلامتی انسان مضر شناخته شده است (۱۳). در نتیجه بایستی یک ماده شیمیایی، جایگزین SO_۲ شود. مطالعات اخیر نشان داده اند که اسید سالیسیلیک (SA) می تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای مواد قارچ کش به کار رود. اسید سالیسیلیک در غلظت های ۱ تا ۲ میلی مول بر لیتر می تواند شاخص های آلودگی قارچی و تخریب میوه ها را کاهش دهد (۳، ۱۹). وقتی بافت های گیاهی در معرض سرما قرار می گیرند تولید مولکول های ROS (Reactive oxygen species) در آن ها افزایش می یابد. این مولکول ها می توانند باعث تخریب پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از قدیمی ترین و مهم ترین گیاهان چند ساله می باشد که ارقام آن با نام های مختلف (حدود ۱۴۰۰۰ نام مترادف) در سرتاسر جهان شناخته می شوند (۱). ارقام مورد کشت انگور در ایران متنوع بوده و از جمله آن ها می توان به بیدانه سفید (انگور بی دانه)، عسگری، قزل ازوم، صاحبی و دسترچین اشاره کرد. البته رقم بیدانه سفید (سلطانی) بیشترین سطح زیر کشت باغات انگور کشور ایران را به خود اختصاص می دهد و به عنوان رقم پر مصرف محسوب می شود (۱۶). یکی از مشکلات نگهداری انگور آسیب پذیری آن در برابر آلودگی قارچی و کاهش محتوی نسبی آب آن در طی دوره انبارداری

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه

پیام نور، تهران، ایران

Email: gader.habibi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۰۱

سلول ها و در نهایت غشاهای زیستی شوند. سلول های گیاهی برای کاهش اثرات تخریبی این مولکول ها، فعالیت سیستم آنتی اکسیدانت خود از جمله آنزیم های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) را افزایش می دهند (۲). وقتی اسید سالیسیلیک در غلظت های مناسب اعمال می شود، این هورمون باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی اکسیدانت بافت های گیاهی از طریق فعال کردن آنزیم های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیس موتاز و کاتالاز می شود (۶، ۱۲). هورمون اسید سالیسیلیک با فعال کردن آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانت باعث کاهش مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) حاصل از تخریب غشا شده و تخریب میوه ها را به تأخیر می اندازد (۴). بررسی کارهای که در این زمینه در ایران انجام گرفته است نشان می دهد که اثر اسید سالیسیلیک تنها بر روی شاخص های مورفولوژیکی رقم بیدانه سفید مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶) و سایر ارقام بررسی نشده اند و از طرف دیگر مکانسیم های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اثر این هورمون بر روی ارقام مختلف انگور ناشناخته مانده است. از آنجایی که جزییات فیزیولوژیکی تأثیر کاربرد هورمون اسید سالیسیلیک بر روی انگور کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۳)، در این تحقیق سعی بر آن است تا اثر تیمار اسید سالیسیلیک بر تحمل سرما، مقادیر محتوی نسبی آب (RWC)، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم های SOD و CAT در طی انبارداری بررسی شود تا بتوان در کنار شناخت مکانسیم های فیزیولوژیکی تحمل سرما، ارقامی را که در پاسخ به تیمار اسید سالیسیلیک شاخص خرابی آن ها کاهش می یابد را شناسایی و در انبار داری مد نظر قرار داد.

مواد و روش ها

میوه های هر رقم از یک باغ انگور در نزدیکی شهرستان ملکان در دهه آخر شهریورماه ۱۳۹۰ بلافاصله پس از برداشت در دو گروه آزمایشی تقسیم بندی و گروه اول به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک و گروه دوم (شاهد) در آب مقطر قرار گرفتند. پس از خشک شدن آب سطحی خوشه ها در دمای آزمایشگاه، نمونه ها به دمای صفر درجه سانتی گراد و رطوبت ۹۰-۸۰ درصد انتقال یافتند. سنجش پارامترها پس از ۲۴ ساعت و ۱۵ روز از گذشت ذخیره سازی انجام شدند. محتوی نسبی آب خوشه ها با استفاده از وزن تر (Fw, Fresh)

وزن خشک (Dw, Dry weight) و وزن اشباع (Sw, Saturate weight) و بر اساس رابطه $RWC = 100 \times (Fw - Dw) / (Sw - Dw)$ که توسط لارا و همکارانش (۲۰۰۳) ارائه شده است، بدست آمد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز (SOD) روش گیانوپولیتز و رایز (۸) و بر اساس درصد ممانعت از احیاء نیتروبلوتترازولویوم (NBT) به ترکیب ارغوانی رنگ دی فورمازان بوسیله رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) حاصل از فتولیز ریوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه گیری قرار گرفت. نمونه ها بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر mM ۲۵ از هیدروکسی اتیل پیرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES) با pH=۷/۸ و حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت mM ۰/۱ استخراج شد. عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شده و روشنایور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل mM ۲۵ HEPES، mM ۰/۱ EDTA، pH=۷/۶، mM ۵۰ NBT، Na_2CO_3 (۱۰/۲، pH)، mM ۱۲ L-متیونین، $1 \mu M$ و $1 \mu M$ ریوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور تقریباً ۸۰۰۰ لوکس به منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه های شاهد مخلوط فوق بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه گردید و جذب نمونه ها در nm ۵۶۰ توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس مقدار پروتئین آنزیمی لازم برای القاء ۵۰ درصد ممانعت از احیاء NBT در مقایسه با نمونه های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه شده و به صورت $Unit\ mg^{-1}$ protein بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش سیمون و همکاران (۱۷) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در nm ۲۴۰ مورد اندازه گیری قرار گرفت. عصاره آنزیمی پس از پودر شدن نمونه ها در ازت مایع، در بافر فسفات با غلظت mM ۵۰ و pH=۷ استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم مقدار مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات mM ۵۰ (pH=۷) و mM ۱۰ از H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نهایت

آنزیم های SOD و CAT در ارقام قزل ازوم و صاحبی در نهایت باعث کاهش MDA در نمونه های تیمار شده نسبت به شاهد گردید (نمودار ۱) و در نتیجه توانست میزان پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاء این ارقام را تخفیف دهد.

جدول ۱- تأثیر یک و پانزده روز تیمار سرما و اسید سالیسیلیک (SA) بر مقدار محتوی نسبی آب (%) و مقدار مالون دی آلدئید (MDA) (nmol g⁻¹ FW) دانه های ارقام مختلف انگور. تفاوت بین اعداد مربوط به هر پارامتر در هر رقم که با حروف متفاوت نشان داده شده اند معنی دار می باشد (p ≤ ۰/۰۵).

رقم	زمان	تیمار	محتوی نسبی آب	مالون دی آلدئید
بیدانه سفید	روز اول	شاهد	۸۹ ± ۳/۵۲ ^a	۵/۳۸ ± ۰/۰۹ ^b
		۲ mM SA	۸۴ ± ۳/۲۱ ^a	۴/۱۶ ± ۰/۱۲ ^b
	روز ۱۵	شاهد	۵۷ ± ۶/۵۰ ^b	۱۱/۷ ± ۱/۰۷ ^a
		۲ mM SA	۶۲ ± ۷/۲۲ ^b	۱۲/۳ ± ۲/۲۳ ^a
دسترچین	روز اول	شاهد	۷۴ ± ۵/۵۴ ^a	۳/۱۸ ± ۰/۳۴ ^b
		۲ mM SA	۸۰ ± ۴/۲۹ ^a	۲/۸۶ ± ۰/۸۹ ^b
	روز ۱۵	شاهد	۶۷ ± ۵/۵۳ ^b	۷/۷۲ ± ۱/۲۲ ^a
		۲ mM SA	۶۲ ± ۵/۵۸ ^b	۶/۲۳ ± ۱/۷۱ ^a
قزل ازوم	روز اول	شاهد	۸۱ ± ۲/۸۲ ^a	۹/۸۹ ± ۱/۲۰ ^b
		۲ mM SA	۷۸ ± ۴/۴۴ ^a	۱۰/۲ ± ۲/۱۲ ^b
	روز ۱۵	شاهد	۵۷ ± ۷/۴۷ ^b	۱۴/۵ ± ۱/۰۷ ^a
		۲ mM SA	۷۴ ± ۴/۱۷ ^a	۱۰/۳ ± ۱/۲۳ ^b
صاحبی	روز اول	شاهد	۸۸ ± ۴/۶۳ ^a	۳/۲۵ ± ۰/۸۹ ^b
		۲ mM SA	۸۴ ± ۵/۲۱ ^a	۴/۱۶ ± ۱/۲۲ ^b
	روز ۱۵	شاهد	۶۰ ± ۱/۵۰ ^c	۸/۷۹ ± ۲/۲۳ ^a
		۲ mM SA	۷۳ ± ۲/۲۳ ^b	۵/۴۵ ± ۱/۰۳ ^b

بحث

تنش سرما باعث افزایش تنش اکسیداتیو در بافت های گیاهی می شود و گیاه برای مقابله با اثرات تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت خود را افزایش می دهد. میزان افزایش فعالیت این آنزیم ها با افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش های محیطی همبستگی دارد (۹). در این تحقیق، اسید سالیسیلیک باعث تخفیف اثرات سرما و تأخیر تخریب میوه ها در ارقام

فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی H₂O₂ (mM⁻¹ cm⁻¹) بر حسب ۰/۰۴۱ μM H₂O₂ mg⁻¹ protein min⁻¹ محاسبه گردید. سنجش مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش بومیناتان و دوران (۵) صورت گرفت. عصاره میوه در محلول ۱/۰۱٪ (w/v) تری کلرو استیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشناور با محلول ۲۰٪ از TCA حاوی ۵٪ تیوباربیتریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس لوله ها سریعاً در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند. همزمان با عصاره های انگور محلول های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳- تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه ها در ۵۳۲ nm توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نهایت مقدار MDA نمونه ها بر حسب واحد nmol g⁻¹ FW محاسبه شد.

آزمایش ها به صورت طرح کاملاً تصادفی طرح ریزی و به اجرا در آمد. هر تیمار دارای ۴ تکرار مستقل بود. میانگین و انحراف معیار (SD) داده ها و همچنین رسم نمودارها بوسیله نرم افزار Excel ۲۰۰۳ به انجام رسید. برای گروه بندی میانگین ها نیز از نرم افزار Sigma stat ۳.۰۲ با آزمون Tukey در سطح احتمال p ≤ ۰/۰۵ استفاده به عمل آمد.

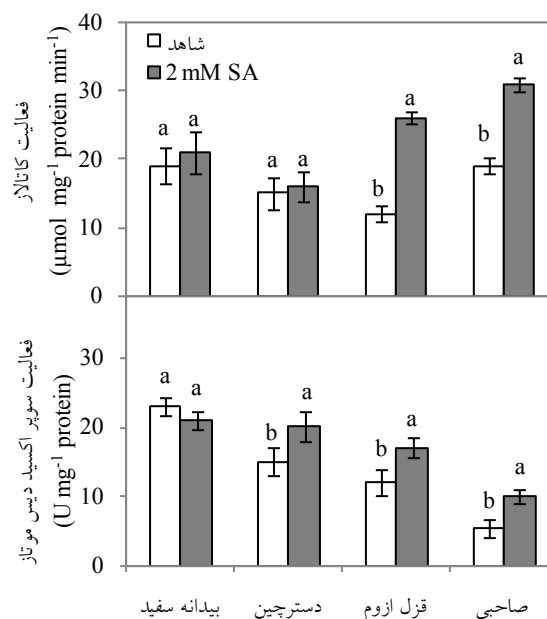
یافته ها

در انگورهای شاهد (تیمار نشده با SA) مقدار RWC و فعالیت آنزیم های SOD و CAT پس از ۱۵ روز اعمال تیمار سرما نسبت به روز اول کاهش نشان دادند. ولی مقدار به دست آمده برای MDA نسبت به روز اول افزایش معنی دار نشان داد. پس از گذشت ۱۵ روز از اعمال سرما، تیمار SA باعث افزایش RWC در رقم های قزل ازوم و صاحبی نسبت به شاهد شد ولی پارامتر RWC در رقم های دیگر نسبت به شاهد تغییر معنی دار نشان نداد (جدول ۱). هر چند تیمار SA باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در رقم دسترچین شد ولی به خاطر عدم تغییر فعالیت CAT در این رقم تغییر معنی داری در مقدار MDA حاصل نشد. نتایج نشان داد که اعمال SA با افزایش معنی دار فعالیت

این تحقیق کمترین خرابی و آلودگی را در دانه های خود نشان دادند.

نتیجه گیری

هورمون اسید سالیسیلیک به عنوان یک ترکیب فنلی طبیعی قابلیت کاهش آسیب های اکسیداتیو ناشی از تنش سرما را داراست و می تواند از از انباشت مالون دی آلدئید در ارقام مستعد انگور یعنی رقم های قزل ازوم و صاحبی جلوگیری کرده و در نتیجه به عنوان جایگزین برای مواد شیمیایی که در صنعت انبارداری استفاده می شوند، بکار رود. همچنین این هورمون اثرات متفاوتی بر روی ارقام مختلف دارد که پیشنهاد می شود ارقام مستعد و پاسخگر به این هورمون و نیز غلظت مناسب این هورمون برای هر رقم مورد شناسایی قرار گیرد.



نمودار ۱- تأثیر دو هفته اعمال سرما و هورمون اسید سالیسیلیک (SA) بر فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیس موتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در ارقام مختلف انگور. تفاوت بین اعداد مربوط به ستون ها که با حروف متفاوت نشان داده شده اند معنی دار می باشد ($p \leq 0.05$). مقایسه میانگین رقم ها بصورت جداگانه انجام شد.

قزل ازوم و صاحبی از طریق افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت SOD و CAT شد. این نتایج با یافته های محققانی که تخفیف اثرات سرما توسط اسید سالیسیلیک را در ذرت (۷)، توت فرنگی (۱۰) و خیار (۱۸) از طریق افزایش فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانت منتشر کرده اند، انطباق دارد. یکی از بارزترین نشانه های تنش سرما در طی انبار داری، انباشت مالون دی آلدئید و اثرات مخرب آن است (۱۲، ۱۵). در این تحقیق، تیمار اسید سالیسیلیک باعث کاهش مالون دی آلدئید از طریق افزایش فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیس موتاز و کاتالاز در ارقام قزل ازوم و صاحبی شد. این نتایج در سازگاری با کاهش مالون دی آلدئید تحت تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک در کارهای اخیر می باشد (۱۴). کاهش مقادیر مالون دی آلدئید میزان آسیب به غشاها و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء را کاهش می دهد (۱۸). کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء باعث حفظ تمامیت غشاء گردیده و از تخریب بافت ها ممانعت می کند. به همین خاطر ارقام قزل ازوم و صاحبی در

- (1) Alleweldt G, Spiegel-roy P, Reisch B. Grapes (Vitis). In: Moore, J. N. and Ballington, J. R. (eds.): Genetic resources of temperate fruit and nut crops. Acta Hort, 1990; 290 (4): 291-337.
- (2) Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plan Biol, 2004; 55(3): 373-399.
- (3) Asghari M, Aghdam MS. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. Trends Food Sci Tech, 2010; 21(1): 502-509.
- (4) Babalar M, Asghari M, Talaei A, Khosroshahi A. Effect pre- and post-harvest salicylic acid treatment on ethylene production fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit. Food Chem, 2007; 105 (2): 449-453.
- (5) Boominathan R, Doran PM. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, Alyssum bertoloni. New phytologist, 2002; 156 (24): 202-205.
- (6) Cao SF, Hu ZC, Zheng YH, Lu BH. Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. Postharvest Biol. Technol. 2010 (2); 58: 93-97.
- (7) Farooq M, Aziz T, Basra SMA, Cheema MA, Rehman H. Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. J. Agron and Crop Sci, 2008; 194 (2): 161-168.
- (8) Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. Plant Physiol, 1977; 59 (2): 309-314.
- (9) Habibi G, Hajiboland R. Comparison of water stress and UV radiation effects on the induction of CAM and antioxidative defense in the succulent Rosularia elymaitica (crassulaceae). Acta Biol Cracov Bot, 2011; 53 (1): 7-15.
- (10) Karlidag H, Yildirim E, Turan M. Exogenous applications of salicylic acid affect quality and yield of strawberry grown under antifrost heated greenhouse conditions. J. Plant Nut. Soil Sci, 2009; 172 (2): 270-276.
- (11) Lara MV, Disante KB, Podesta FE, Andreo C, Drincovich MF. Induction of a crassulacean acid like metabolism in the C₄ succulent plant, Portulaca oleracea L.: physiological and morphological changes are accompanied by specific modifications in phosphoenolpyruvate carboxylase. Photosyn Res, 2003; 77 (1): 241-254.
- (12) Luo Z, Wu X, Xie Y, Chen C. Alleviation of chilling injury and browning of postharvest bamboo shoot by salicylic acid treatment. Food Chem, 2012; 131 (3): 456-461.
- (13) Meng X, Li B, Liu J, Tian S. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. Food Chem, 2008; 106 (1): 501-508.
- (14) Mo YW, Gong DQ, Liang GB, Han RH, Xie JH, Li WC. Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during postharvest storage. J Sci Food Agric, 2008; 88 (15): 2693-2699.
- (15) Posmyk MM, Bailly C, Szafranska K, Janas KM, Corbineau F. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (Glycine max (L.) Merr.) seedling. J. Plant Physiol, 2005; 162 (4): 403-412.
- (16) Ranjbarani E, Sarikhani H, Wakana A, Bakhshi D. Effect of salicylic acid on storage life and postharvest quality of grape (Vitis vinifera L. cv. Bidaneh Sefid). J. Fac. Agr. Kyushu Univ, 2011; 56 (1): 263-269.
- (17) Simon LM, Fatrai Z, Jonas DE, Matkovics B. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of Phaseolus vulgaris. Biochem Physiol Pflanzen (BPP), 1974; 166 (17): 387-392.
- (18) Tao L, Hong F, Xin S, Lin DQ, Fan Z, Guo LH, Hui LH. The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. Plant Growth Reg, 2010; 60 (1): 35-42.
- (19) Yao H, Tian S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. Postharvest Biol. Technol, 2005; 35 (5): 253-262.
- (20) Zoffoli JP, Latorre BA, Naranjo P. Preharvest applications of growth regulators and their effect on postharvest quality of table grapes during cold storage. Postharvest Biol. Technol, 2009; 51 (4): 183-192.