

## Zárójelentés

### „A fagy- és télállóság élettani és biokémiai alapjainak tanulmányozása őszibarack genotípusokban” című OTKA pályázatban elvégzett feladatokról

#### 1. Bevezetés

A korszerű táplálkozás fontos része a gyümölcsfogyasztás. Az őszibarack a nyári, asztali gyümölcsök között kiemelt jelentőségű. A csonthéjas gyümölcsfajok termésének egynegyedét az őszibarack adja. Az elmúlt időszakban csökkent és nagymértékben ingadozott őszibarack-termesztésünk, ami jelzi az ágazat problémáit. Ezek közül is a termesztéshozás biztonságát kell kiemelnünk. Magyarország az őszibarack-termesztés északi zónájában helyezkedik el, ezért a termésbiztonságot leginkább a téli és kora tavaszi fagykárosodások veszélyeztetik. Kutatási eredményeinkkel az őszibarack-termesztés fejlesztése szempontjából fontos élettani kérdések tisztázásához szeretnénk hozzájárulni. A fagy- és télállóság kialakulásában és megszűnésében fontos szerepet játszó élettani és biokémiai folyamatok részletes feltárása olyan módszereket adhat a kezünkbe, amelyek hatékonyabbá tehetik a nemesítési munkát, amelyekkel az eddigieknél eredményesebben választhatók ki az egy-egy adott termőtájból legeredményesebben termesztendő fajták, és amelyekkel a termesztéstechnológia is fejleszthető. Az őszibarack termesztés volumenét tekintve, a termésbiztonság megteremtésének nagy gazdasági jelentősége van. Magyarország ökológiai adottságai révén közvetlenül érdekelt az őszibarackfajták fagy- és téltűrésének részletes megismerésében, de az e témában születő kutatási eredmények nemzetközi érdeklődésre is számot tarthatnak, azokból más országok termesztői számára is hasznos következtetések vonhatók le. Alapkutatási szempontból fontos, hogy a termesztett növényeink élettani és biokémiai folyamatait, a környezeti feltételek változására adott válaszreakcióit minél jobban megismerjük. Az őszibarack ilyen szempontból elhanyagolt növény. Kutatási eredményeinket elsősorban tudományos közlemények és előadások formájában adtuk közre, de folyamatosan beépítjük azokat a kertészmérnök képzés tananyagába, valamint a készülő szakkönyvek és egyetemi tankönyvek anyagába is.

#### 2. Anyag és módszer

A vizsgálatokat 2005 őszén kezdtük, és 4 egymás utáni téli nyugalmi időszakban végeztük. A vizsgálatok genetikai anyagát a Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcstermő Növények Tanszékének Génbanki Fajtagyűjteménye szolgáltatta, mely Soroksáron a BCE Kísérleti Üzem és Tangazdaság területén található. A fajtagyűjteményben a pályázati időszak megkezdésekor 30 őszibarackfajta állt rendelkezésre. Ezek közül választottuk ki a különböző vizsgálatok számára a genotípusokat. A fák hármas csoportokban, két ismétlésben (a fontosabb fajták 3 ismétlésben), véletlen blokk elrendezésben állnak az ültetvényben. A kísérleti ültetvény művelési rendszere karcsú orsó 4 x 2 m sor- és tőtávolsággal, a telepítés éve 2003. A kísérleti ültetvény területén automata meteorológiai állomás működik, az időjárási adatokat ez szolgáltatta.

#### Vizsgálati módszerek:

##### 2.1. Az áttelelő szervek fagyállóságának meghatározása

Három standard fajtát előzetes fagyállósági tesztek alapján választottunk ki, ezek a következők: 'Venus', 'Redhaven', 'Piroska'. A 'Venus' fajtagyűjteményünk legfagyérzékenyebb fajtája. A 'Redhaven' fajta az előzetes tesztekben közepes

fagyállóságot mutatott. A nemzetközi szakirodalomban is a 'Redhaven' fajtát szokás a közepes fagyállóságú csoport referencia fajtájaként használni. Fajtagyűjteményünkben a 'Piroska' a legfagyűrőbb őszibarackfajta. Ezt a három fajtát folyamatosan vizsgáltuk egész tél során. A fajtagyűjtemény többi fajtáját csak esetenként vontuk vizsgálat alá, és eredményeiket a standard fajták adataihoz hasonlítottuk.

Szeptember 1-től a következő tavaszi virágnylásig havonta 2-3 alkalommal, mesterséges fagyasztással vizsgáltuk az áttelelő szervek fagyállóságát. A fákról begyűjtött vesszőket Conviron, illetve Rumed 3301 típusú klímakamrában minden alkalommal több fagyasztási hőmérsékleten kezeltük. A lehűtés és a felengedés fokozatos volt. A hőmérsékletet óránként 2 °C-al csökkentettük, 4 órán át tartottuk a mintákat a kísérleti hőmérsékleten, majd ugyancsak óránként 2 °C-al emeltük a hőmérsékletet a klímakamrában. A kezelés után 1 napig szobahőmérsékleten tartottuk a mintákat, majd a virágrügyek hosszirányú elmettszése után a szövetek elszíneződése alapján határoztuk meg a fagykárosodás mértékét. Mintánként 200-250 virágrügyet metszettünk fel. Minden időpontban kiszámítottuk a fagyűrési középértékeket ( $LT_{50}$ ), amely az a hőmérséklet, amely az adott genotípusnál az adott időpontban 50 %-os fagykárosodást okozott.

## **2.2. Az áttelelő szervek víztartalmának és vízállapotának meghatározása**

Az ültetvényből begyűjtött vesszőkről minden alkalommal mintánként 20 db virágrügyet és 40 db hajtásrügyet szedtünk le, és azokat petricsészébe helyeztük. A rügyek nélküli vesszőket feldaraboltuk 4-5 cm hosszúságú darabokra. A behozott mintákat lemértük, súlyállandóságig szárítottuk majd újból lemértük. A mérési adatok alapján határoztuk meg az áttelelő szervek víztartalmát %-ban.

A vízállapot meghatározásához víztelítési kísérleteket végeztünk, melyhez minden alkalommal mintánként 6 db vesszőt használtunk fel. Az ültetvényből való begyűjtés után a vesszők tömegét megmértük, majd 24 óráig vízzel telt kádba merítettük őket. A kádból kivéve a vesszők felületén lévő vizet szűrőpapírral felitattuk, majd újból lemértük tömegüket. Ezután a vesszőket súlyállandóságig szárítottuk, és a szárítás után ismét megmértük tömegüket. A mérési adatokból kiszámítottuk a vesszők relatív vízhiányát, tehát azt a vízmennyiséget, amelyet a kezelés során felvettek.

## **2.3. Az áttelelő szervek cukortartalmának és cukor-összetevőinek meghatározása HPLC-vel**

A vizsgálatra begyűjtött növényi részekből 250 mg mennyiséget mértünk be dörzsmozsárba, majd kvarchomok és 1000 ml desztillált víz hozzáadásával dörzsöléssel feltártuk. Centrifugálás, dekantálás és szűrés után Ca-EDTA hozzáadásával 20  $\mu$ l mennyiségű mintát fecskendeztünk a HPLC készülékbe, majd 30 percig futtattuk. 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett 90 °C-ra emeltük a rendszer hőmérsékletét. A mérést refraktív index detektor segítségével hajtottuk végre, a készülékben az eredeti Waters mérőoszlopot használtuk. Az eredményeket a standard mintákkal való összehasonlítás alapján értékeltük, a csúcsok beazonosításával és a görbe alatti területek meghatározásával.

## **2.4. Növényi hormonok vizsgálata az áttelelő szervekben**

A vizsgálni kívánt növényi részeket feldaraboltuk, 250 mg mennyiséget bemértünk belőlük, majd 1 ml metanol:víz 80:20 arányú keverékével felöntöttük. Centrifugálás, dekantálás és szűrés után előkészítettük a mintákat a HPLC-s méréshez. A C-18-as jelű

4,6x150  $\mu\text{m}$  átmérőjű oszlopon 20  $\mu\text{l}$  mennyiségű mintát 6 percig futtattuk. A folyamatos folyadékoszlopot metanol:víz 60:40 arányú keverékével biztosítottuk, melybe literenként 0,5 ml ecetsavat is tettünk. Az áramlási sebesség 1  $\mu\text{l}/\text{perc}$  volt. A mérést UV detektorral hajtottuk végre szobahőmérsékleten. A hormonok bomlékonysága is indokolja, hogy a rendszert ne melegítsük fel mérés közben. A minták eredményeit a standard oldat eredményeihez hasonlítva határoztuk meg a csúcsok beazonosításával és a görbe alatti területek integrálásával.

## 2.5. Az antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata

Az áttelelő szervek peroxidáz és a polifenol oxidáz enzim aktivitását vizsgáltuk spektrofotometriás eljárással.

A minták előkészítése:

A kijelölt fákról 60 és 80 cm közötti hosszúságú vesszőket szedtünk, és az ezeken lévő virág- és hajtásrügyeket vizsgáltuk.

Adott mennyiségű, friss növényi mintát (0,25 g), ismert mennyiségű (1 ml), jéghideg pufferrel (0,1 M Trisz HCl, pH=7,8; ami tartalmazott 10% glicerolt, 10% Tritont 100-at, 5% Polietilén-glikol 4000-t, 5% NaCl-t), kvarchomok jelenlétében az előre lehűtött dörzsmozsarakban eldörzsöltük. Ezután hűtött körülmények között, 5 percig, 20000 fordulat/perces fordulatszámra centrifugáltuk (MSE Micro Centaur). A felülúszót használtuk fel a két enzim aktivitásának méréséhez. Az enzimaktivitásokat U/ml-ben adtuk meg.

A peroxidáz enzimaktivitást Srivastava et al. (1983) módszerével mértük spektrofotometriás úton ( $\lambda = 460 \text{ nm}$ ), 0,1 M Na acetát pufferben (pH = 4,5), ortodianizidin kromatogén reagens ( $\epsilon = 11,3$ ) és  $\text{H}_2\text{O}_2$  szubsztrát jelenlétében.

A polifenol-oxidáz enzim aktivitását Bassuk et al. (1981) leírása alapján mértük spektrofotometriás úton ( $\lambda = 420 \text{ nm}$ ), 0,1 M foszfát pufferben (pH = 6,0) catechol szubsztrát jelenlétében.

## 2.6. A peroxidáz izoenzimek mintázatának vizsgálata őszibarackfajták áttelelő szerveiben

A peroxidáz izoenzimek vizsgálata izoelektromos fókuszálással (IEF módszerrel) történt 2005-2006 telén, több alkalommal. A vizsgálatokba két eltérő fagyállóságú fajtát vontunk be, a fagyérzékeny 'Mayfire' és a fagytüró 'Piroska' fajtát. A virágrügyeket és a vesszőket vizsgáltuk.

A minták előkészítése kvarchomok hozzáadásával eldörzsöléssel történt.

Az elválasztás Phast System gélelektroforézis (Pharmacia) készüléken, pH=3,0-9,0 tartományban elválasztó, kés géleken történt. Az IEF elválasztás paraméterei:

- pH gradiens kialakításához 75 Vh (2000 V, 2,5 mA)
- minta felvitele 15 Vh-nál (200 V, 2,5 mA)
- izoelektromos fókuszálás 800 Vh-ig (2000 V, 2,5 mA)
- elválasztás 10 °C-on
- festés

## 2.7. A virágrügyfejlődés fenológiai folyamatának vizsgálata

A virágrügyfejlődés ütemét kétféle módszerrel vizsgáltuk. Az egyik a mikrosporogenezis stádiumainak megfigyelése, a másik a termők hosszának mérése.

22 fajtát vizsgáltunk: 'Arany csillag', 'Babygold 6', 'Champion', 'Cresthaven', 'Dixired', 'Early Redhaven', 'Fairlane', 'Fantasia', 'Flavortop', 'Harko', 'Independence', 'Mariska', 'Michelini', 'Piroska', 'Red June', 'Redhaven', 'Snow Queen', 'Spring Lady', 'Springcrest', 'Springtime', 'Suncrest', 'Venus'. Előzetes vizsgálataink alapján a fajtákat hidegigényük, valamint fagy- és téltűrésük alapján 3 csoportba soroltuk, és mindegyik csoportból választottunk egy standard fajtát a részletesebb vizsgálatokhoz. A rövid mélynyugalmú, fagyérzékeny csoportból a 'Venus' fajtát, a közepes csoportból a 'Redhaven' fajtát, a legjobb fagyűrűsű, hosszú mélynyugalmú csoportból pedig a 'Piroska' fajtát választottuk standardként.

A mikrosporogenezist kétféle vesszőtípuson, a rövid nyársakon (0-15 cm) és a hosszú vesszőkön (50-70 cm) vizsgáltuk. Ehhez megfelelő időközönként szedtünk mintákat a fákról 1,5-2,5 m közötti magasságból. A virágrügyekből kiszedtük a portokokat, azokat tárgylemezre helyeztük, kármin ecetsavval megfestettük, majd fedőlemezzel lezártuk. Ezután a fedőlemez enyhe nyomásával láthatóvá tettük a portokokon belüli szövetállományt. Mintánként 5 virágrügyből vettük ki a portokokat. A preparátumokat mikroszkóp alatt megvizsgálva 6 fejlődési stádiumot különítettünk el:

1. archesporium állapot – a portokokban differenciálatlan szövetállomány, archesporium szövet található
2. füzér állapot – megkezdődött a pollen anyasejtek kialakulása, a gömb alakú sejtek összetapadva, füzérszerűen láthatók
3. pollen anyasejt állapot – kész pollen anyasejtek vannak a portokokban
4. tetrád állapot – lezajlott a redukciós osztódás, a portokokban tetrádok vannak
5. mikrospóra állapot – a tetrád burokból kiszabadult mikrospórák láthatók
6. pollen állapot – a portokokban kész pollenszemek vannak.

Az adatok statisztikai értékeléséhez megállapítottuk a stádiumok átmenetének időpontját. A mikrosporogenezis vizsgálati módszerei részletesen megtalálhatók a témakörben készített publikációinkban Szalay et al., (2002), Szalay (2006).

A virágrügyfejlődés vizsgálatának másik módszere a termőhossz változásának mérése volt. Ugyanazokban az időpontokban és ugyanazokból a virágrügyekből történt, mint a mikrosporogenezis vizsgálata, azzal párhuzamosan. A virágrügyekből kiemelt termők hosszát mikrométer segítségével 0,1 mm pontossággal meghatároztuk. A mérés 5 ismétlésben történt. Az adatok alapján felrajzoltuk a termők hosszának változását a téli nyugalmi időszak során.

## **2.8. Szabadföldi fenológiai vizsgálatok**

A fajtaértékelés részeként a fajtagyűjteményünkben szereplő genotípusok fenológiai folyamatait szabadföldi felvételezéssel rendszeresen rögzítjük (virágzás, érés, fajtásnövekedés, lombhullás). A teljesség igénye nélkül jelentésünkben csak néhány a virágzással összefüggő adatot elemzünk.

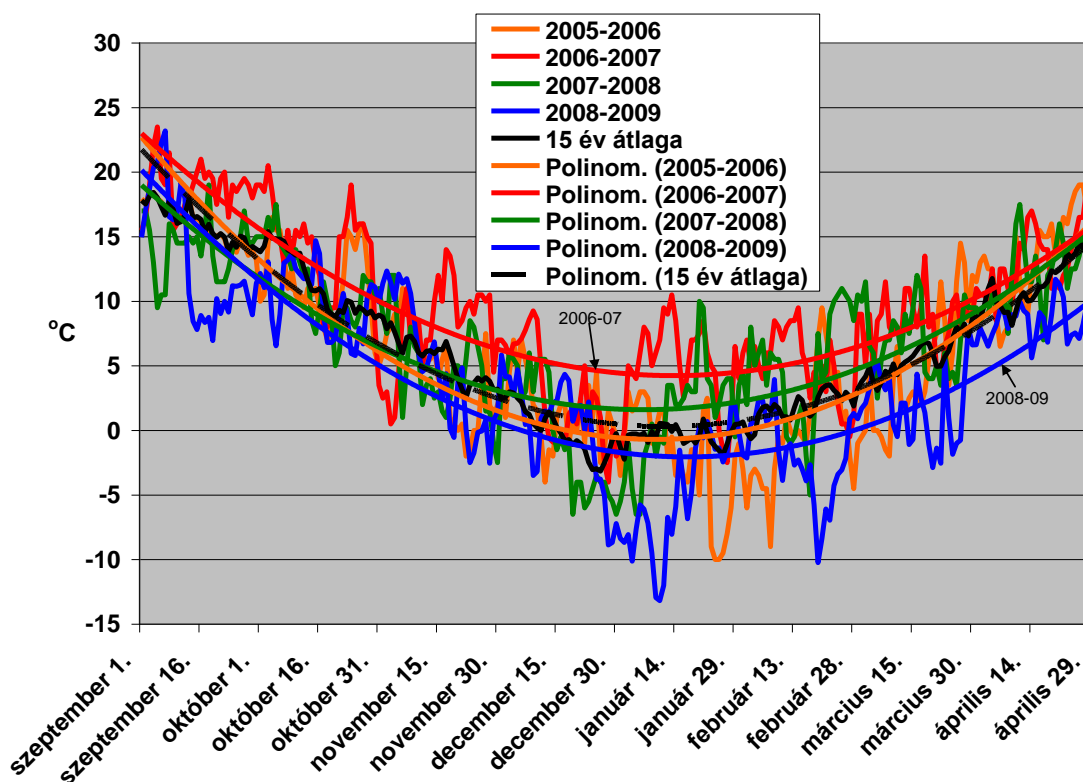
## **2.9. A téli fagykárok felvételezése**

A virágrügyek téli fagykárosodását az erőteljes lehúlések után szabadföldi felvételezéssel vizsgáltuk fajtagyűjteményünkben. Fánként 6 db vessző begyűjtésével a virágrügyek, a hajtásrügyek és a vesszők károsodásának mértékét határoztuk meg %-ban. Ez a vizsgálat azért fontos, hogy a mesterséges fagyasztásos eredményekkel össze tudjuk hasonlítani az adatokat.

### 3. Eredmények

#### *A vizsgálati időszak időjárási adatai*

Mivel az őszibarackfák fenológiai folyamatait és az áttelelő szerveik fagy- és téltűrő képességét nagymértékben befolyásolja a termőhely időjárásának alakulása, az ezzel kapcsolatos kutatási eredmények nem értelmezhetők a meteorológiai adatok nélkül. A vizsgált évjáratok napi középhőmérsékleti adatait és ezek trendvonalát az 1. ábrán tüntettük föl. A csapadékmennyiség adatait az 1. táblázat tartalmazza.



1.ábra. A vizsgált évjáratok napi középhőmérséklete és azok trendje, összehasonlítva a 15 éves átlag adatokkal

1.táblázat. Havi összes csapadékmennyiségek a vizsgált évjáratokban Soroksáron

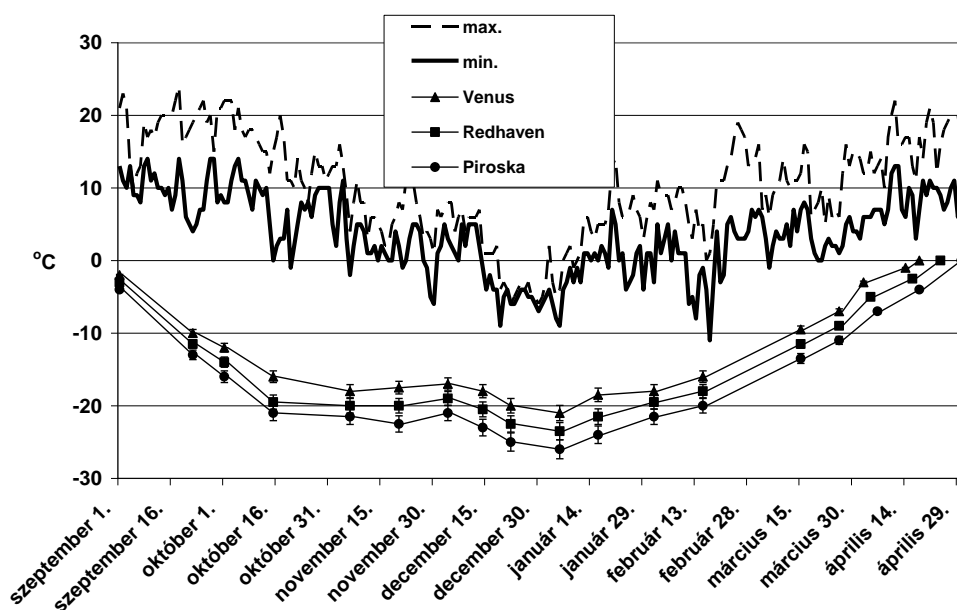
hónap	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009
Szeptember	47	20	48	67
Október	12	22	53	31
November	40	35	85	41
December	91	18	54	67
Január	49	38	52	40
Február	64	57	17	33
Március	41	53	19	41
Április	39	9	39	3
Összesen (szept.-ápr.)	<b>383</b>	<b>252</b>	<b>367</b>	<b>325</b>

### 3.1. Őszibarackfajták áttelelő szerveinek fagyállósága

A pályázati munka során minden évjáratban elvégeztük az előzetes vizsgálatok eredményei alapján kiválasztott három fajta áttelelő szerveinek fagyállósági vizsgálatát. A virágrügy vizsgálatok két évjáratban kapott eredményeit mutatjuk be részletesen. Először a 2007/2008-as évjárat adatait elemezzük, mivel ez a tél a sokéves átlaghoz hasonló időjárású volt, és ez után kerül sor az átlagostól sokkal enyhébb 2006/2007-es évjárat adatainak elemzésére. A fajtagyűjtemény többi fajtáinak fagyállóságát évjáratonként csak 1-2 alkalommal vizsgáltuk mesterséges fagyasztással, és az adatokat a standard fajták vizsgálati eredményeihez hasonlítottuk.

#### *A virágrügyek edződése*

A fagyűrés változását vizsgálva az őszibarack virágrügyeknél a fagyállóság kialakulásának két szakaszát figyeltük meg. Az első szakasz addig tartott, amíg a külső hőmérséklet tartósan fagypont alá nem csökkent. Kísérletünkben, 2007 őszén, az edződés első szakaszának végére a 'Venus' fajta virágrügyeinek fagyűrési középértéke  $-17,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot, a 'Redhaven' fajtáé  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot, a 'Piroska' fajtáé pedig  $-22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ot ért el (2. ábra). Ezeket az értékeket november közepén mértük. Ezután egy pár napos igen enyhe periódus következett, aminek hatására a virágrügyek fagyállósága kis mértékben csökkent, majd amikor a külső hőmérséklet tartósan fagypont alá süllyedt az áttelelő szövetek edződése folytatódott, és december végén, a legfagyűrőbb állapotban, amikor a második edződési szakasz is lejátszódott  $-21$  és  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$  között volt a vizsgált fajták virágrügyeinek fagyűrési középértéke.



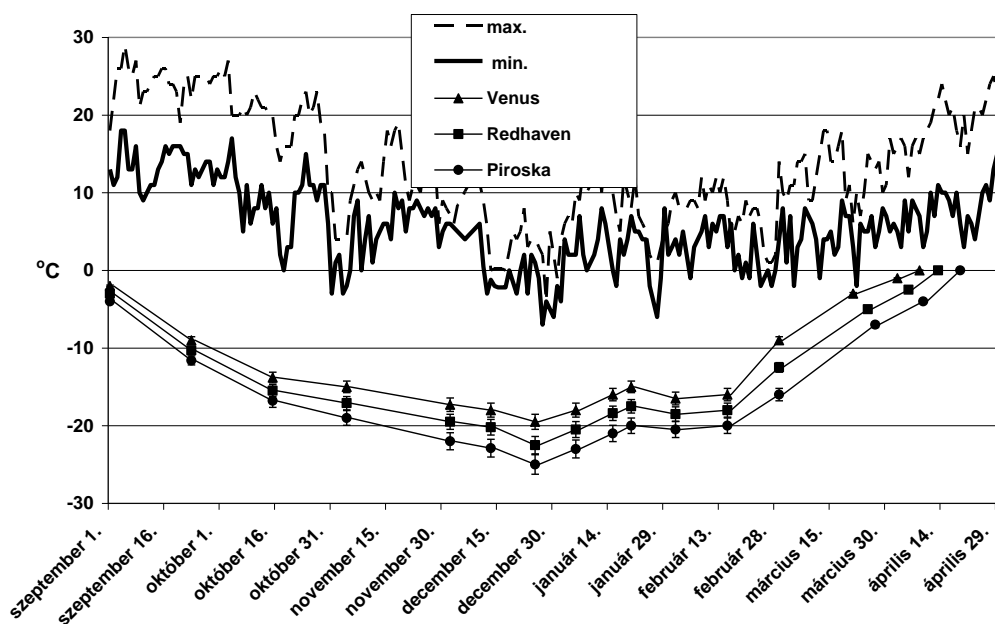
2. ábra. Őszibarackfajták virágrügyeinek fagyűrési középértékei ( $LT_{50}$ ) 2007-2008 telén Soroksáron

A vizsgált fajták eltérő fagyállóságú fajtacsoportokat reprezentálnak. Ősszel, az edződési folyamat kezdetén nem volt nagy különbség a fajták között. A fagyűrő ('Piroska') és a fagyérzékeny ('Venus') fajta virágrügyeinek fagyűrési középértéke között  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  eltérés volt. A fajták közötti különbség a téli nyugalmi időszak első felében fokozatosan növekedett, és december végén - január elején, amikor az áttelelő szervek a

legfagyállóbbak voltak, 5 °C különbséget mértünk a legérzékenyebb és a legfagyűrőbb fajta virágrügyeinek fagyűrési középértéke között.

A közepes fagyállóságú 'Redhaven' fajta virágrügyeinek fagyűrési középértékeit nemcsak szabadföldön, hanem +15 °C-os konstans hőmérsékleten tartva is vizsgáltuk. Az ültetvényből konténerbe áttelepített, és az épületbe bevitt fa virágrügyeinek edződési folyamata lelassult, majd leállt. Míg a kinti fák virágrügyeinek fagyűrési középértéke november közepén -20 °C volt, az épületbe bevitt fa virágrügyei csak -16,5 °C-os fagyállótságot értek el. Az épületben elhelyezett fa virágrügyeiben nem játszódtott le az edződés második szakasza, sőt fagyállótságuk lassan, de folyamatosan csökkent.

Az áttelelő szervek edződési folyamatát tehát a környezeti tényezők, ezek közül is a hőmérséklet alapvetően meghatározza. Ezért egy termőhelyen is különbég van az évjáratok között a virágrügyek fejlődési ütemében és fagyállótságuk alakulásában. Erre példaként a fent említett évjárat mellett a 2006-2007 telén mért vizsgálati eredményeket szeretnénk bemutatni. Míg 2007-2008 telének időjárása a Kárpát-medencében nem tért el lényegesen a sok éves átlagtól, 2006-2007-ben az elmúlt 50 év legenyhébb tele köszöntött ránk (1. ábra). 2006-ban Budapest külterületén lévő kísérleti ültetvényünkben a napi hőmérsékleti minimum értéke 2 nap kivételével egészen december elejéig nem csökkent fagypontra alá. Ez után is csak egy rövid hideg periódus következett, majd a hőmérséklet ismét 0 °C fölé emelkedett. A szokásosnál enyhébb időjárás kedvezőtlen feltételeket teremtett az áttelelő szervek edződéséhez. Az edződési folyamat első szakaszának végén, december eső napjaiban a 'Venus' fajta virágrügyeinek fagyűrési középértéke -17,3 °C, a 'Redhaven' fajtáé -19,5 °C, a 'Piroska' fajtáé pedig -22 °C volt (3. ábra). Ezek az értékek nagyon hasonlóak a másik évjáratban mértékekhez, de azokat az áttelelő szervek sokkal később érték el, fagyűrő képességük sokkal lassabban alakult ki, mint az elsőként bemutatott évjáratban. December végén, amikor a virágrügyek a legfagyállóbbak voltak -19,5 °C és -25 °C fagyűrési középértékeket mértünk. Ez azt jelenti, hogy a szokatlanul enyhe télen, 2006-2007-ban a 'Venus' fajtánál 1,5 °C-al, a másik két fajtánál pedig 1 °C-al kevésbé voltak fagyállóak a virágrügyek, mint az átlagos időjárású 2007-2008-as télen.



3. ábra. Őszibarackfajták virágrügyeinek fagyűrési középértékei (LT<sub>50</sub>) 2006-2007 telén Soroksáron

### ***A virágrügyek fagyállóságának csökkenése***

Az áttelelő szervek fagyállósága a tél második felében fokozatosan csökkent. Az őszibarack virágrügyek kialakult maximális fagyállósága csak nagyon rövid ideig tartott a vizsgálati eredményeink szerint. Az átlagos időjárású 2007-2008 évi télnek a nyugalmi időszak második felében mért eredményeit a 2. ábrán láthatjuk. A virágzási időhöz közeledve a fajták közötti különbségek fokozatosan csökkentek. Míg Január elején 5 °C különbség volt a fagyérzékeny és a fagytüró fajta virágrügyeinek fagytürési középértéke között, április második felében már csak 2 °C volt a különbség, hasonlóképpen mint ősszel az edződési folyamat kezdetén.

A tél második felében is meghatározó jelentőségű a külső hőmérséklet alakulása, hiszen az áttelelő szervek fagyállóságának csökkenési ütemét az nagymértékben befolyásolja. Januártól már érzékenyen reagálnak a virágrügyek is a felmelegedésekre, és az enyhe időjárás hatására szöveteik fagyállósága gyors ütemben csökken. Az eltérő időjárás miatt tehát nagy különbségek vannak az évjáratok között a virágrügyek fagyállóságának változását tekintve ebben az időszakban is. A másik vizsgált évjáratban, az egy évvel korábbi tél folyamán gyorsabban csökkent a virágrügyek fagyállósága az enyhébb időjárás miatt (3. ábra). A hőmérséklet csökkenésének hatására a virágrügyek képesek ismét kismértékben újból megedződni. Erre látunk példát a 2006-2007 telének január és február hónapjában.

A klímakamrás kísérletek során a hajtásrügyek és a vesszők fagyállóságát is vizsgáltuk. Ezek eredményeiről a készülő publikációkban számolunk be. A virágrügyek fagyállóságának kísérleti adatai részletesen megtalálhatók a Hort Science folyóiratnál közlésre elfogadott cikkünkben (IF: 0,914). Az adatok ezen kívül felhasználásra kerültek az elkészült szakdolgozatokban és a kertészmérnök képzés tananyagában, valamint angol nyelvű szakkönyv fejezetünkben, amely 2008-ban jelent meg.

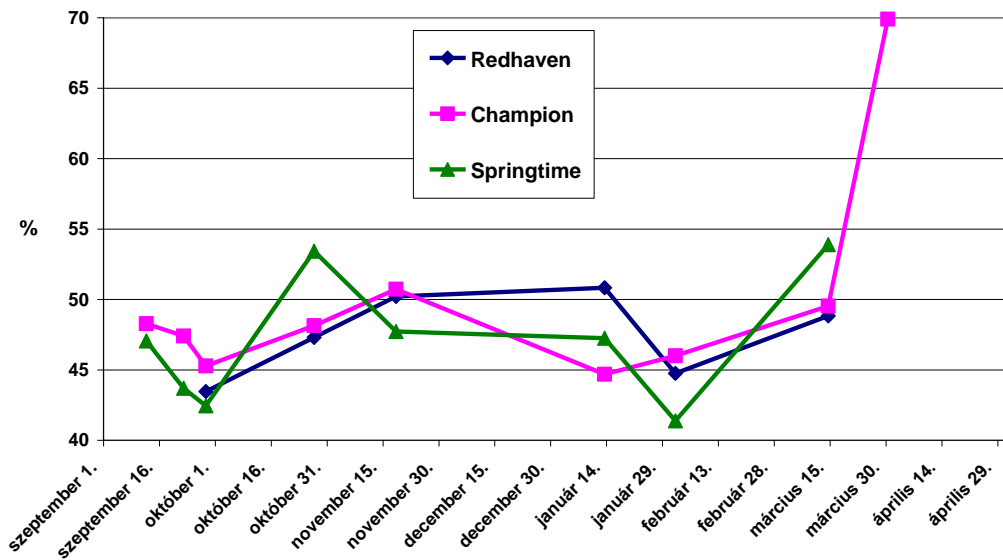
### **3.2. Őszibarackfajták áttelelő szerveinek víztartalma és vízállapota**

A víztartalom vizsgálatát minden évjáratban elvégeztük. A 2005-2006-os évjárat vizsgálati eredményeit mutatjuk be részletesen. A virágrügyek, a hajtásrügyek és a vesszők víztartalmának változását 3 kiválasztott fajtánál a 4.-6. ábrákon tüntettük föl. Az áttelelő szervek víztartalma a téli nyugalmi időszak alatt ingadozó volt, ugyanis a külső hőmérséklet, a napsugárzás, a természetes csapadék és a levegő páratartalma mind befolyásolják azt. A vizsgált áttelelő szervek víztartalma a téli nyugalmi időszak során 40 és 55 % között változott, majd tavasszal a vegetáció megindulásakor erőteljesen növekedett. A tél második felében mindegyik szervnél tapasztalható volt a víztartalom csökkenése. Sok szakirodalmi forrás utal rá, hogy az őszibarackfák téli fagykárosodásához gyakran a szövetek vízvesztése, a fa víztartalmának csökkenése is hozzájárul. A három vizsgált fajta között ebből a szempontból nem találtunk szignifikáns különbséget.

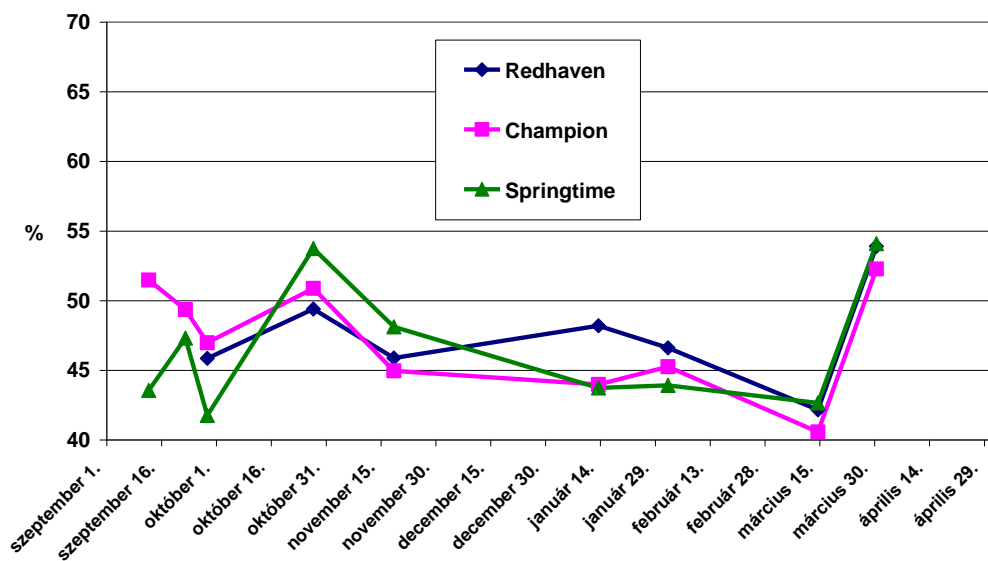
Vizsgáltuk az áttelelő szervek relatív vízhiányát is víztelítéssel kíséreltet. A különböző fajták fajtál fás szövetei 2 és 6 % közötti vízmennyiséget tudtak fölvenni a tömegükre vetítve. A különböző fagyállóságú fajták eredményei között nem volt szignifikáns különbség, kivétel ez alól a 'Champion' február 6-i eredménye, amikor ennek a fajtának a vesszői a többtől lényegesen nagyobb relatív vízhiányt mutattak (7. ábra).

A víztartalom és vízállapot vizsgálatok részletes eredményei Kertész Katalin diplomamunkájában megtalálhatók, valamint felhasználjuk azokat készülő publikációkban és a kertészmérnök képzés tananyagának bővítéséhez. A továbbiakban tovább kívánjuk vizsgálni fajtagyűjteményünk kiemelt fajtáinak víztartalom és vízállapot változásait a téli nyugalmi időszak során, továbbfejlesztve és kibővítve a módszereket.

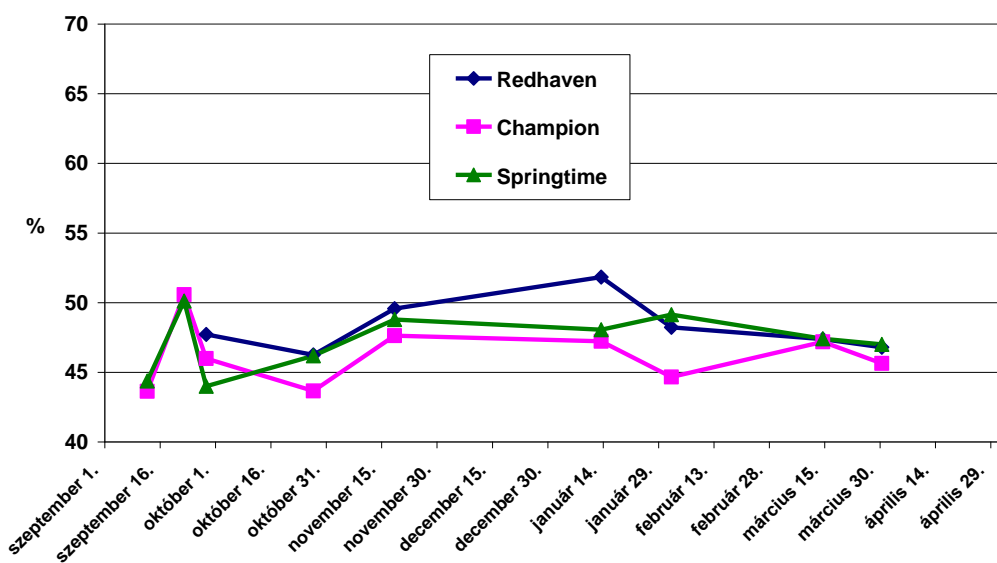




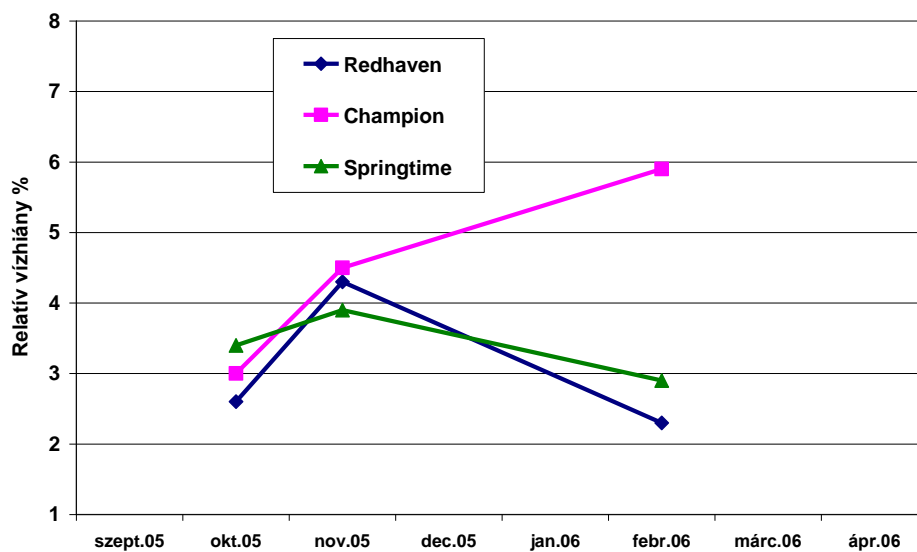
4. ábra. Őszibarackfajták virágrügyeinek víztartalma 2005-2006, Soroksár



5. ábra. Őszibarackfajták hajtásrügyeinek víztartalma 2005-2006, Soroksár



6. ábra. Őszibarackfajták vesszőinek víztartalma 2005-2006, Soroksár

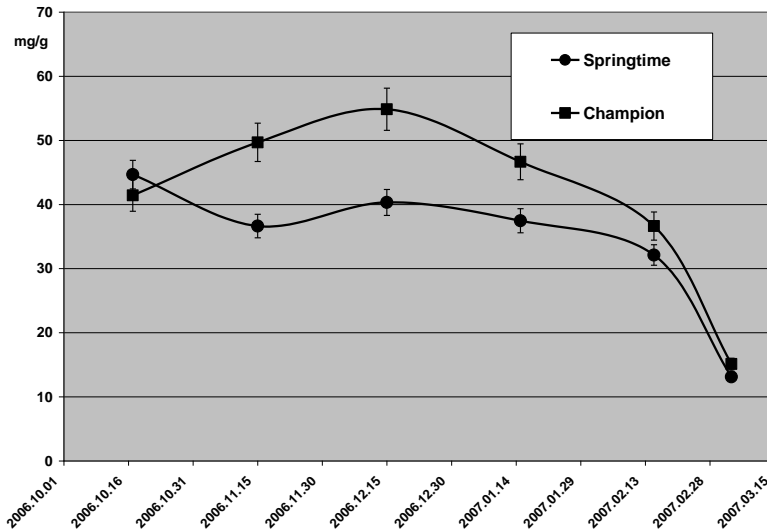


7. ábra. Őszibarackfajták vesszőinek relatív vízhiánya 2005-2006, Soroksár

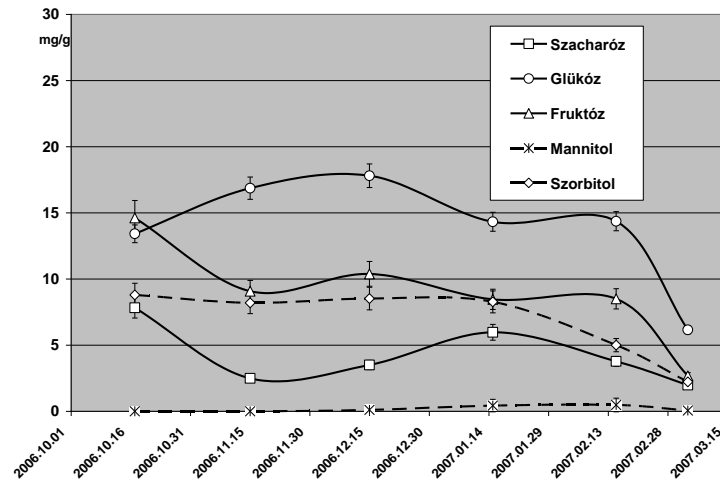
### 3.3. Őszibarackfajták áttelelő szerveinek cukortartalma és cukor-összetevői

Pályázati munkánk során két évjáratban részletesen vizsgáltuk két kiválasztott őszibarackfajta áttelelő szerveinek cukortartalmát és a cukrok összetevőit. A 2006/07 téli eredményeket mutatjuk be. A két fajta igen eltérő fagyállóságú. A 'Springtime' rövid mélynyugalmú és fagyérzékeny, a 'Champion' pedig hosszú mélynyugalmú és fagyűrő fajta. A cukortartalom változása mind a három áttelelő szervben és mind a két vizsgált fajtánál olyan tendenciát mutatott, hogy a nyugalmi időszak kezdetén növekedett a cukortartalom, a tél közepén volt a legmagasabb, és a tél második felében csökkent. A mérési időpontok döntő többségében a fagyállóbb fajta áttelelő szerveiben szignifikánsan magasabb cukortartalmat mértünk, mint a fagyérzékenyben (8., 11. és 14. ábra). Az áttelelő szervek a téli fagykárok ellen többféle módon védekeznek, ezek közül az egyik, hogy növekszik a sejtnedv cukortartalma, hiszen nagyobb koncentrációjú oldat alacsonyabb hőmérsékleten fagy meg. Ez a védekező mechanizmus tehát az őszibarackfajtákban is működik. Érdekes kérdés ezen belül, hogy melyik cukorösszetevők mennyisége növekszik meg leginkább a fagystressz hatására, melyik cukorformák a legfontosabbak ebben a védekezési mechanizmusban. Vizsgálati eredményeink szerint a három megvizsgált áttelelő szerv közül a virágrügyekben és a hajtásrügyekben a glükóz szerepe a legjelentősebb ebben a folyamatban (9., 10., 12. és 13. ábra). Emellett a fruktóz szerepe emelhető ki. Ennek a két cukor-összetevőnek, tehát az egyszerű cukroknak a mennyisége növekszik meg elsősorban a tél első felében a leghidegebb időszakra való felkészülés során. A külső hőmérséklet tél eleji fokozatos csökkenésének hatására a fagyűrőbb genotípus virág- és hajtásrügyeiben lényegesen nagyobb arányú növekedést figyeltünk meg, mint a fagyérzékenyben. Mivel a tél során őszibarackfák legfagyérzékenyebb szervei a virág- és hajtásrügyek, nagy valószínűséggel a genotípus fagyállóságának biokémiai markereként használható a szövetek glükóz és fruktóz tartalma. A rügyekben az összetett cukrok (szacharóz) és kisebb jelentőségű egyszerű cukrok is jelen voltak egész tél során, de ezek mennyiségi változása nem utalt arra, hogy jelentős szerepet játszanának a fagy elleni védekezésben. A vesszőkben összetettebb a kép, itt valamennyi cukor összetevő mennyiségi változása nagyon hullámzó volt, úgy tűnik, hogy együttesen játszanak szerepet a fagyállóság kialakításában (15. és 16. ábra). A másik évjáratban is hasonló tendenciákat tapasztaltunk.

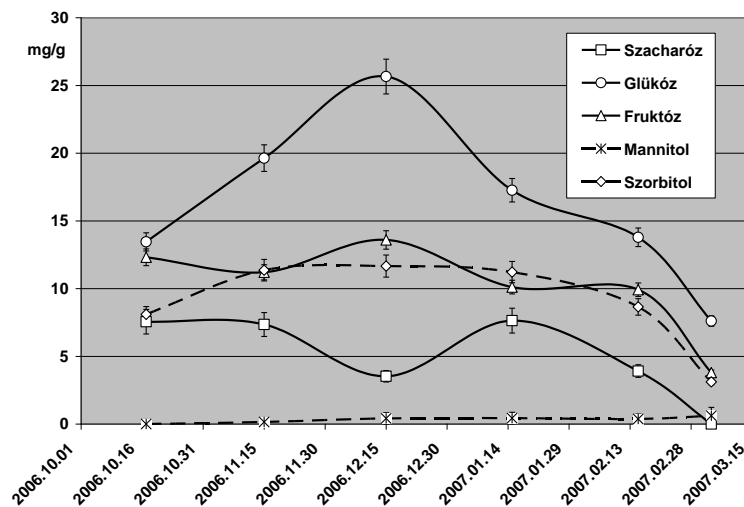
A témakörből készülő cikk 80 %-os készütségekben van. Szerzői: Szalay L., Mézes Z., Fodor M., Németh Sz., Végvári Gy. A jelenlegi tél adataival együtt kerülnek majd publikálásra az eredmények. A cukortartalom vizsgálatának eredményei felhasználásra kerültek Mézes Zoltán diplomamunkájában.



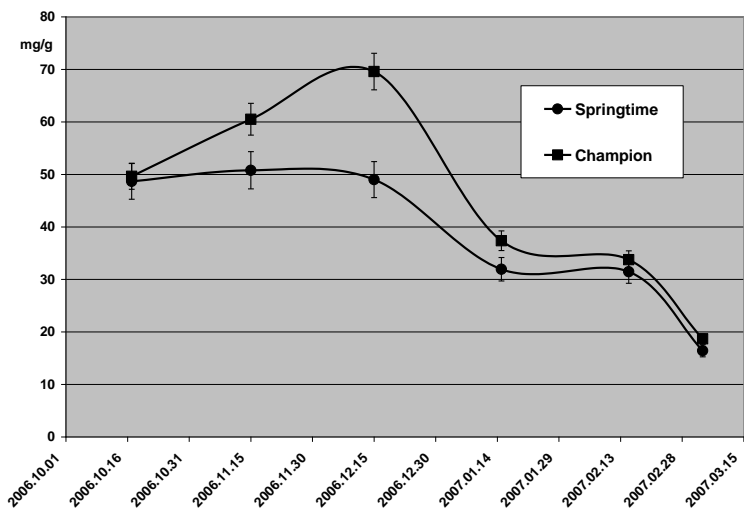
8. ábra. Az összes cukortartalom változása őszibarackfajták virágrügyeiben 2006-2007 telén Soroksáron



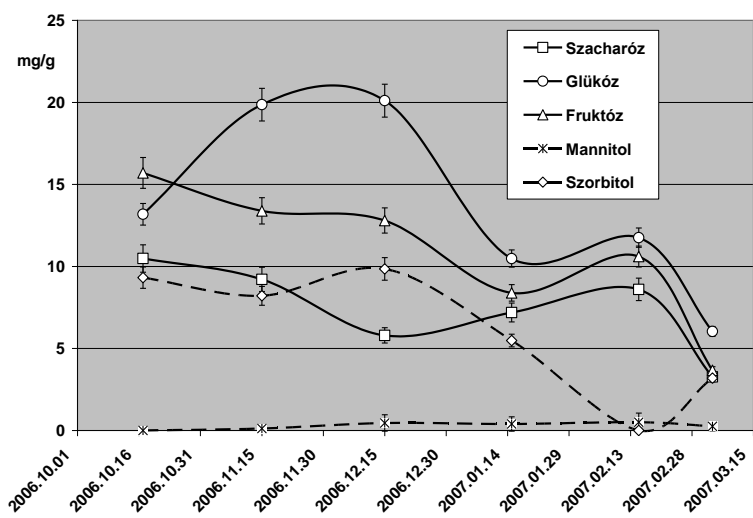
9. ábra. A különböző cukorformák mennyiségének változása a fagyérzékeny 'Springtime' őszibarackfajta virágrügyeiben 2006-2007 telén Soroksáron



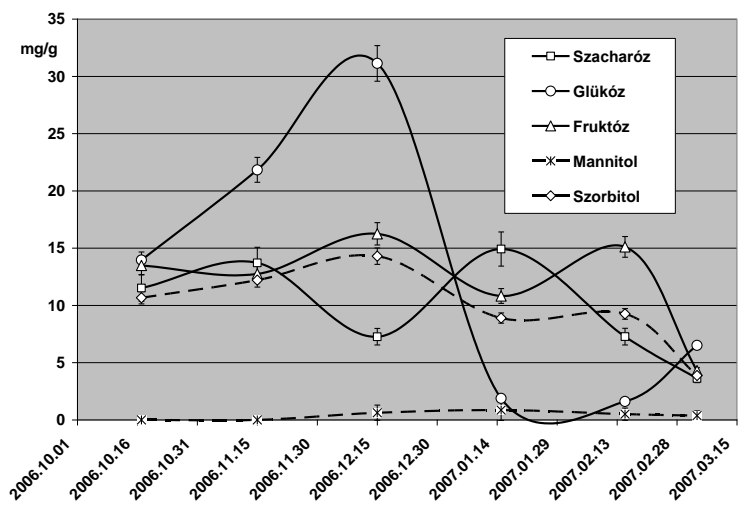
10. ábra. A különböző cukorformák mennyiségének változása a fagytűrő 'Champion' őszibarackfajta virágrügyeiben 2006-2007 telén Soroksáron



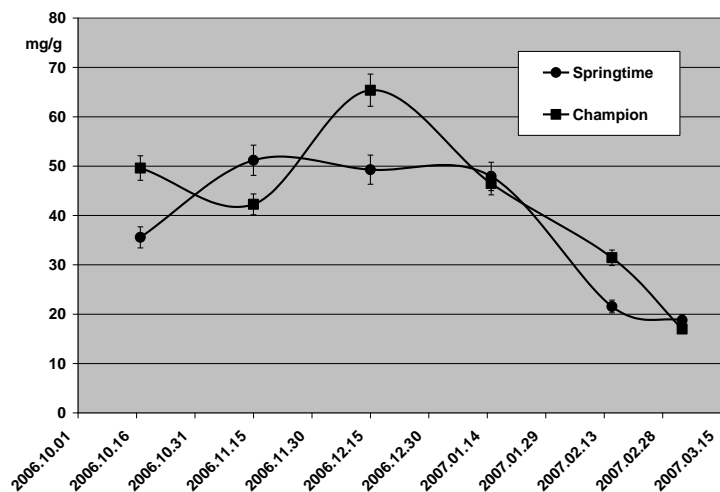
11. ábra. Az összes cukortartalom változása őszibarackfajták hajtásrügyeiben 2006-2007 telén Soroksáron



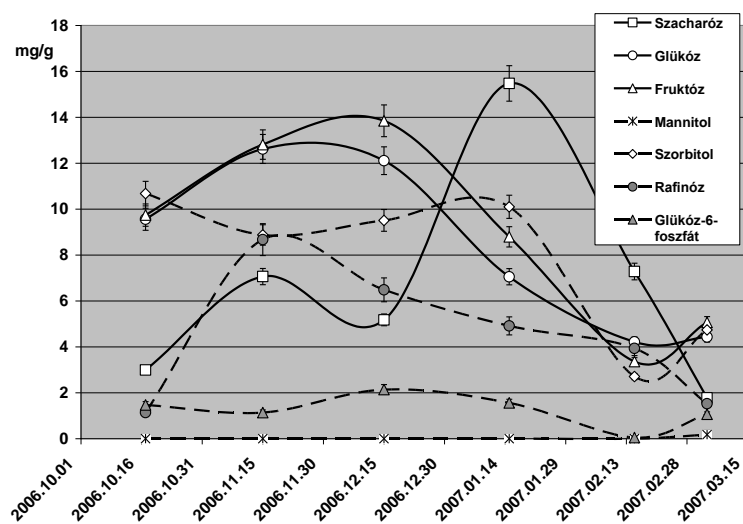
12. ábra. A különböző cukorformák mennyiségének változása a fagyérzékeny 'Springtime' őszibarackfajta hajtásrügyeiben 2006-2007 telén Soroksáron



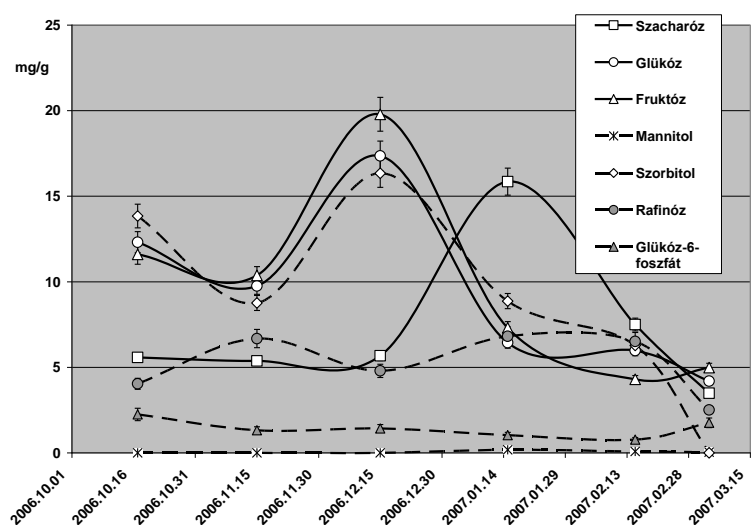
13. ábra. A különböző cukorformák mennyiségének változása a fagyűrő 'Champion' őszibarackfajta hajtásrügyeiben 2006-2007 telén Soroksáron



14. ábra. Az összes cukortartalom változása őszibarackfajták vesszőiben 2006-2007 telén Soroksáron



15. ábra. A különböző cukorformák mennyiségének változása a fagyérzékeny 'Springtime' őszibarackfajta vesszőiben 2006-2007 telén Soroksáron

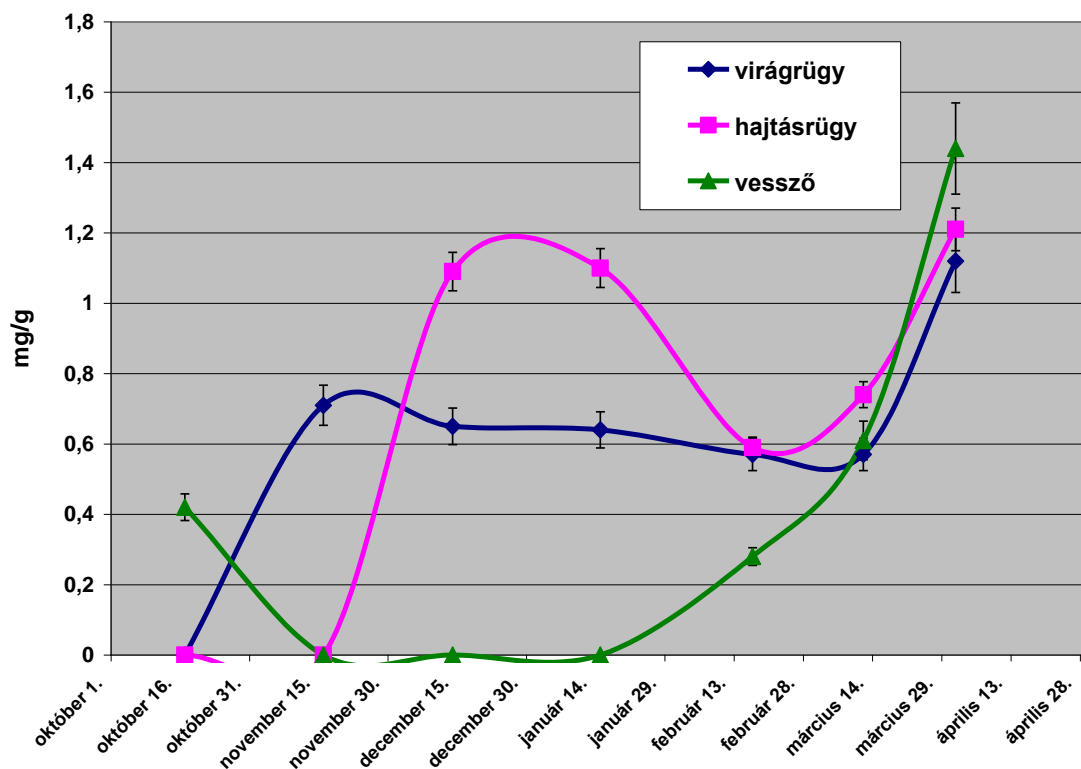


16. ábra. A különböző cukorformák mennyiségének változása a fagyűrő 'Champion' őszibarackfajta vesszőiben 2006-2007 telén Soroksáron

### 3.4. Hormonális változások az őszibarackfajták áttelelő szerveiben

A pályázati időszak során egy évjáratban vizsgáltuk a 'Champion' és a 'Springtime' őszibarackfajták áttelelő szerveiben a növényi hormonok mennyiségének változását. HPLC segítségével több hormon is kimutatható volt. A vizsgálati eredmények részletesen Mézes Zoltán diplomamunkájában található. Itt a 'Springtime' fajta áttelelő szerveiben mért auxintartalom változást mutatjuk be a 17. ábrán. A különböző áttelelő szervekben az auxintartalom változása nagyon eltérő képet mutatott. A virágrügyekben a tél elején egy gyors növekedés, majd egy lassú csökkenés volt megfigyelhető, ezután a tél végén ismét gyorsan emelkedett az auxintartalom, és a legmagasabb értéket április elején, közvetlenül a virágzás előtt mértük. A hajtásrügyekben is gyors emelkedés volt megfigyelhető a tél kezdetén, de ez később kezdődött, mint a virágrügyeknél, és magasabb értékeken tetőzött. Januárban és februárban csökkent, majd ismét emelkedett az auxintartalom a hajtásrügyekben. A vesszőkben a tél első felében elhanyagolható mennyiségű auxin volt, majd január közepétől a tavaszi vegetáció megindulásáig folyamatos emelkedést figyeltünk meg.

A hormonális változások és a téli nyugalmi állapot összefüggéseit más növényeknél már nagyon részletesen vizsgálták, a csonthéjas gyümölcsfajokról még kevés ilyen jellegű adatunk van. Éppen ezért fontosak ezek a kutatások. Eredményeink publikálása előtt a vizsgálatok megismétlésére és az adatok részletes elemzésére lesz szükség.



17. ábra. A 'Springtime' őszibarackfajta áttelelő szerveinek auxintartalma a 2007-2008 évi téli nyugalmi időszak során Soroksáron

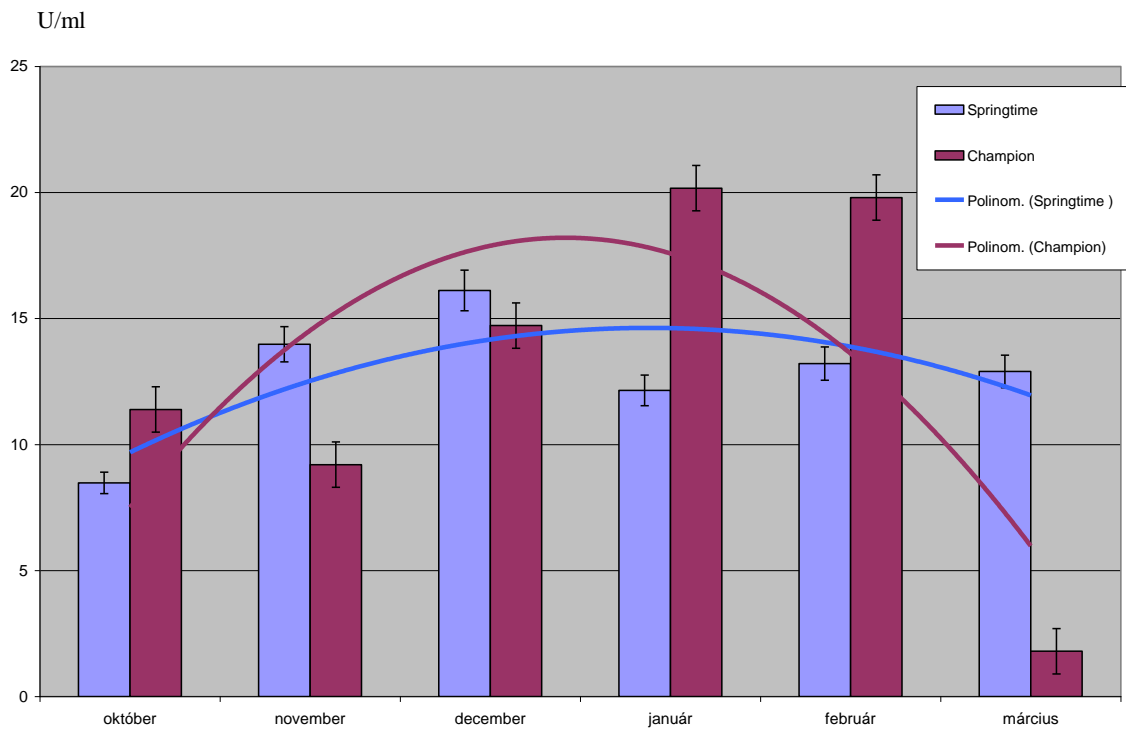
### **3.5. Az antioxidáns enzimek (stresszenzimek) aktivitásának változása az őszibarackfajták áttelelő szerveiben**

Mivel minden stresszhatás, így a fagystressz is a káros oxigénformák felhalmozódásával jár a szövetekben, az antioxidáns enzimeknek, más néven stresszenzimeknek nagy szerepük van a fagykárok elleni védekezésben. Két eltérő fagyállóságú őszibarackfajta, a fagyérzékeny 'Springtime' és a fagyűrő 'Champion' vizsgálatával a legfontosabb antioxidáns enzimek szerepét kívántuk megvizsgálni az őszibarack fagykárok elleni védekező mechanizmusában. A pályázati időszak előtt már előzetes vizsgálatokat végeztünk, majd a pályázat megnyerése után folytattuk a munkát. Így 4 egymás utáni évjárat eredményei állnak rendelkezésünkre. Mivel ezen a területen elért kutatási eredményeinket tudományos közleményekben részletesen ismertettük, most csak egy évjárat adatait emeljük ki. A többi évjáratban is hasonló tendenciákat mutattunk ki.

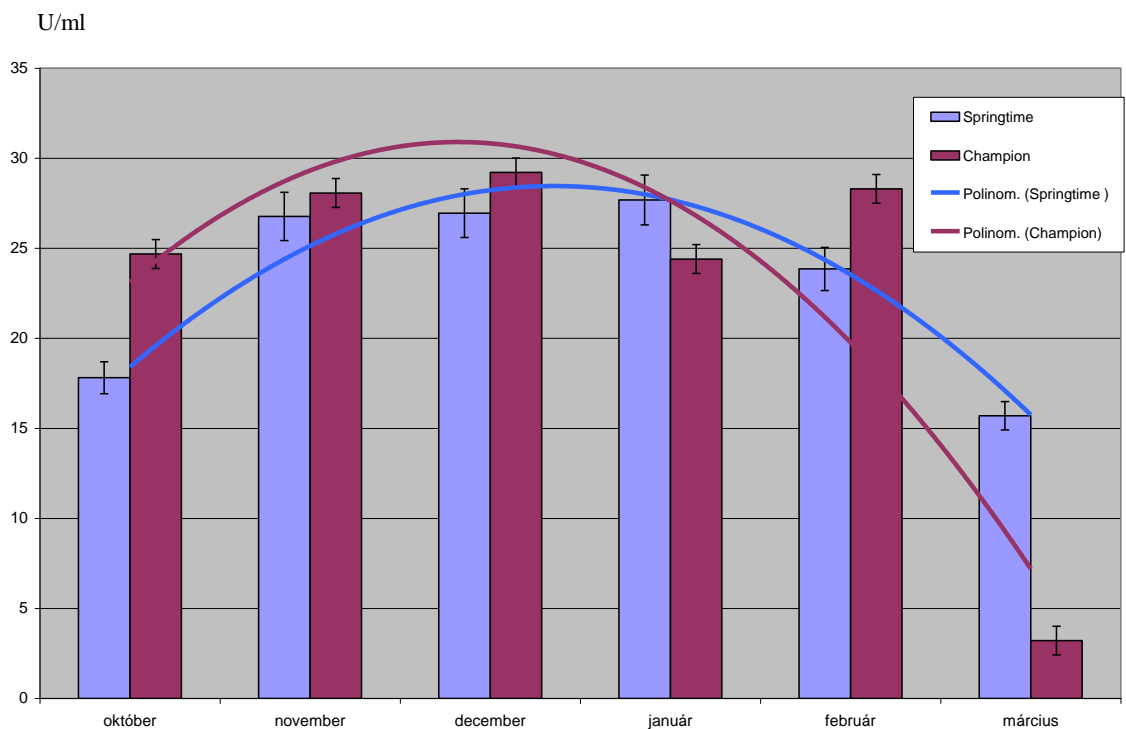
A peroxidáz és polifenol oxidáz enzim aktivitásának változása egymással ellentétes tendenciát mutatott a téli nyugalmi időszak során a vizsgált áttelelő szervekben (18.-21. ábra). Mind a virágrügyekben, mind a hajtásrügyekben a nyugalmi időszak elején fokozatosan növekedett a peroxidáz enzim aktivitása és csökkent a polifenol oxidázé. A tél közepén mértük a legmagasabb peroxidáz és a legalacsonyabb polifenol oxidáz aktivitási értékeket. A téli nyugalmi időszak második felében fokozatosan csökkent a peroxidáz és növekedett a polifenol oxidáz enzim aktivitása a virág- és hajtásrügyekben. Mind a négy évjáratban ezt a tendenciát tapasztaltuk.

A két eltérő fagyállóságú fajta virág- és hajtásrügyeiben különböző volt a peroxidáz és a polifenol oxidáz enzim aktivitása minden mérési időpontban. A fagyűrő fajtában általában a peroxidáz, a fagyérzékenyben pedig a polifenol oxidáz aktivitása volt magasabb, de előfordult ennek ellenkezője is. A két fajta közötti különbség nem minden esetben volt szignifikáns. Az őszibarack fagyállóságának meghatározásához tehát a peroxidáz és a polifenol oxidáz enzimek valószínűleg nem használhatók biokémiai markerként. Eredményeink alap kutatási jelentőségűek. Ilyen részletesen korábban nem vizsgálták az őszibarack áttelelő szerveiben az antioxidáns enzimek jelentőségét a fagykárok elkerülését szolgáló védekezési rendszerben. A kutatást ki kívánjuk terjeszteni más enzimek vizsgálatára is, ehhez tanszékünkön megteremtettük a technikai feltételeket. Előzetes vizsgálatok alapján valószínűleg a glutation reduktáznak is jelentős szerepe van az őszibarack genotípusokban a fagystressz elleni védekezésben. A kataláz és az aszkorbinsav reduktáz viszont csak elhanyagolható mennyiségben volt kimutatható az őszibarackfák áttelelő szerveiben. Eddigi kutatási eredményeinket fölhasználtuk több cikk és tudományos konferencián bemutatott prezentáció, valamint oktatási anyag elkészítéséhez.

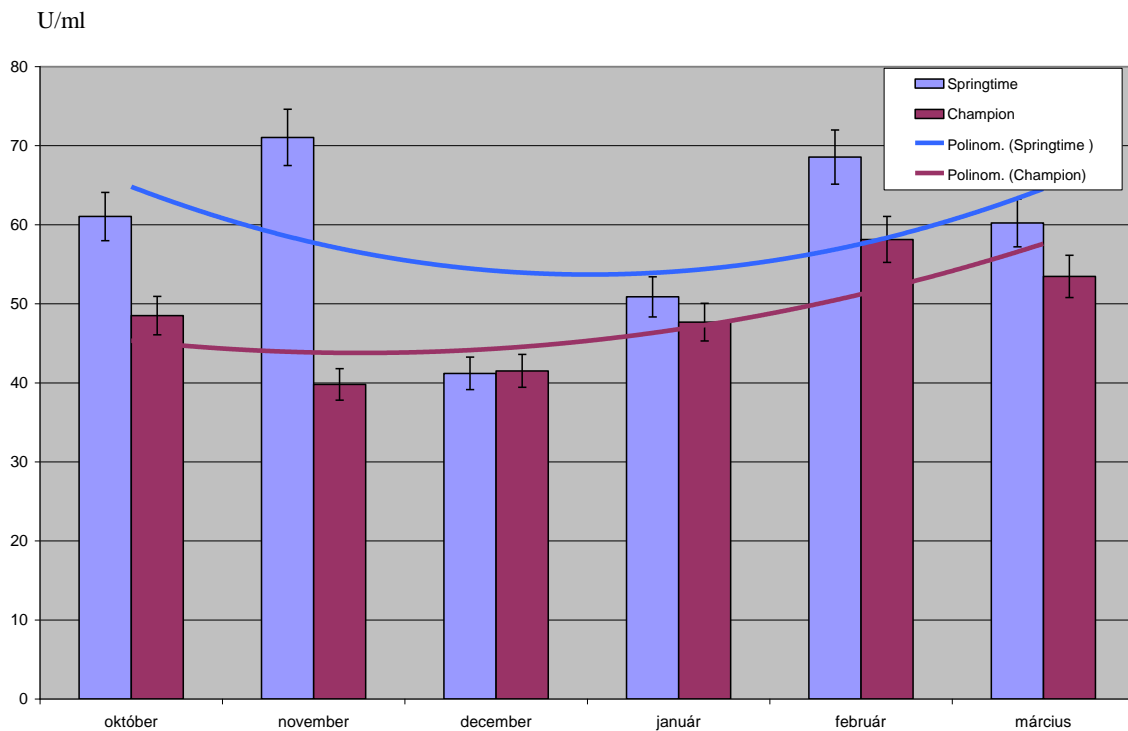




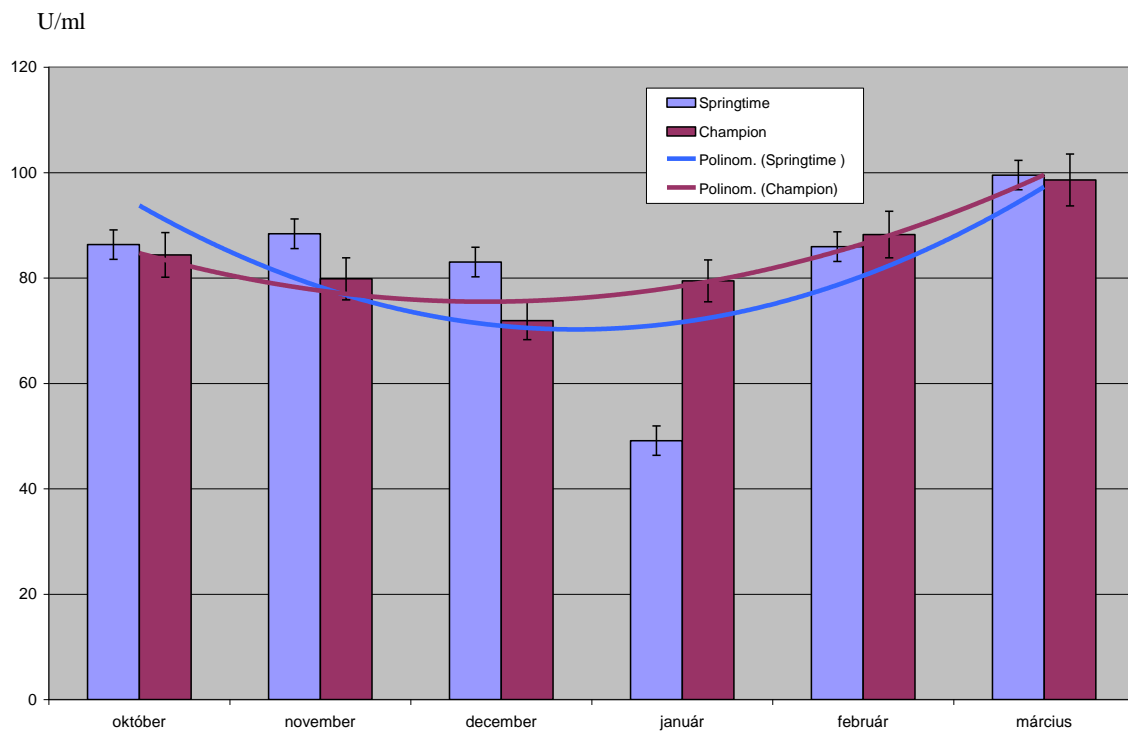
18. ábra. A peroxidáz enzim aktivitásának változása őszibarackfajták virágrügyeiben 2004-2005 telén



19. ábra. A peroxidáz enzim aktivitásának változása őszibarackfajták hajtásrügyeiben 2004-2005 telén



20. ábra. A polifenol-oxidáz enzim aktivitásának változása őszibarackfajták virágrügyeiben 2004-2005 telén

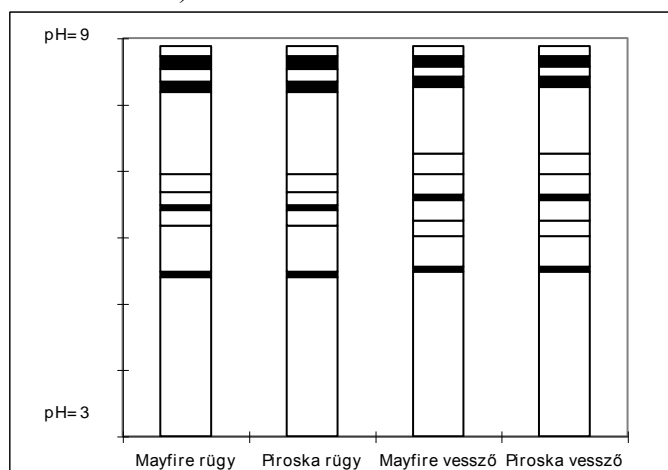


21. ábra. A polifenol-oxidáz enzim aktivitásának változása őszibarackfajták hajtásrügyeiben 2004-2005 telén

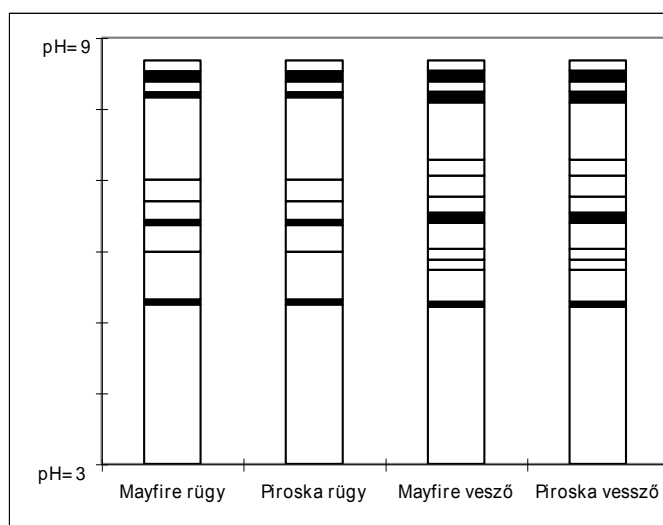
### 3.6. Őszibarackfajták áttelelő szerveinek peroxidáz izoenzim mintázata

A vizsgálatokat 2005-2006 telén két fajta virágrügyeiben és vesszőiben végeztük, novembertől márciusig havonta egy alkalommal.

Példaként csak két időpont eredményeit mutatjuk be. A januári és a februári vizsgálati eredményekből is látszik, hogy nem volt különbség a két eltérő fagyállóságú őszibarackfajta izoenzim mintázatában egyik vizsgált szervnél sem. A többi időpontban is ezt tapasztaltuk (22. és 23. ábra).



22. ábra. Őszibarackfajták virágrügyeinek és vesszőinek peroxidáz izoenzim mintázata 2006 januárjában



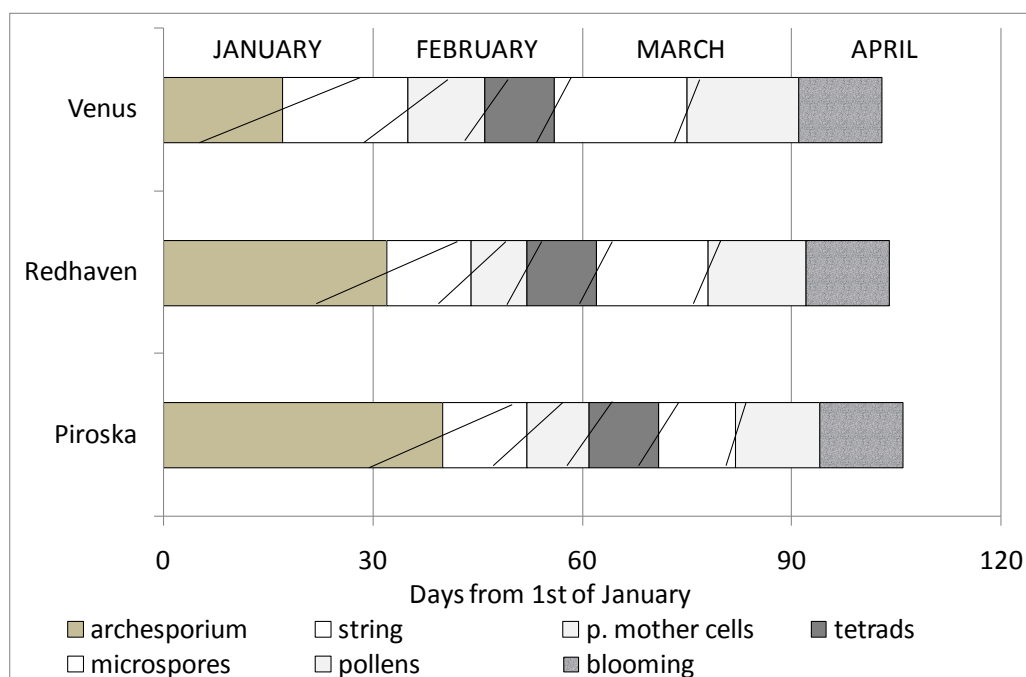
23. ábra. Őszibarackfajták virágrügyeinek és vesszőinek peroxidáz izoenzim mintázata 2006 februárjában

Az izoenzim mintázatok vizsgálata nem hozott olyan kutatási eredményt, ami akár alapkutatási, akár gyakorlati szempontból hasznosítható lenne. A két nagyon eltérő őszibarackfajta áttelelő szerveiben szinte teljesen azonos peroxidáz izoenzim mintázatot találtunk minden vizsgálati időpontban. Emiatt ezen a kutatási területen nem folytattuk a munkát.

### 3.7. Őszibarackfajták mikrosporogenezise (a virágrügyfejlődés ütemének vizsgálati eredményei)

Kutatási eredményeinket felhasználtuk az angol nyelvű szakkönyv fejezetünk készítéséhez, mely 2008-ban jelent meg. Ezen kívül a legújabb eredményekkel kiegészítve a témakörből egy angol nyelvű cikk is elkészült. Az alábbiakban magyar nyelven néhány részletet közlünk a cikkből, amelyet az Acta Biologica Hungarica c. folyóiratban szeretnénk megjelentetni.

*Különböző elhelyezkedésű virágrügyek fejlődési üteme, valamint a fajták közötti különbségek.* Munkánk során különböző hosszúságú vesszőkön lévő virágrügyeket vizsgáltunk. A mikrosporogenezis üteme eltérő volt a különböző elhelyezkedésű virágrügyekben. A fejlődés üteme a rövid (max. 15 cm hosszúságú) vesszőkön lévő virágrügyekben volt a leggyorsabb. A hosszú vesszőkön elhelyezkedő virágrügyek közül a vessző végén lévőkben gyorsabb volt a fejlődés, mint a vessző alapi részén lévőkben. Ha a genotípusokat és évjáratokat szeretnénk összehasonlítani, nagyon fontos tehát, hogy azonos helyzetű virágrügyeket vizsgáljunk. Korszerű ültetvényekben az őszibarack fákat rendszeresen erősen metszük. Metszéskor a hosszú vesszőket hagyjuk meg, a termés ezeken képződik. A fajták virágrügyfejlődésének értékelésekor, a fajták és az évjáratok összehasonlításakor ezért a hosszú termővesszők közepén lévő virágrügyeket vizsgáltuk. Három kiemelt fajta mikrosporogenezisének lefolyását mutatjuk be a hosszú vesszők közepén lévő vesszőkben a 24. ábrán, 2007-2008 telének vizsgálati eredményei alapján. A mikrosporogenezis stádiumai fokozatosan mentek át egymásba. A statisztikai értékelésekhez az átmenet napjának azt az időpontot tekintettük, amikor 50 %-ban az előző, 50 %-ban a következő stádium volt látható a mikroszkóp alatt. A 'Venus' fajta mikrosporogenezise volt a leggyorsabb, az archesporium állapot vége (a mélynyugalom vége) január közepén, a tetrad állapot pedig február végén volt ennél a fajtánál. A leglassúbb fejlődésű 'Piroska' fajta virágrügyeiben február elején figyeltük meg az archesporium állapot végét, és március elején a tetrad állapotot.



24. ábra. Őszibarackfajták mikrosporogenezisének folyamata a hosszú vesszők közepén lévő virágrügyekben, 2007/2008 telén Soroksáron

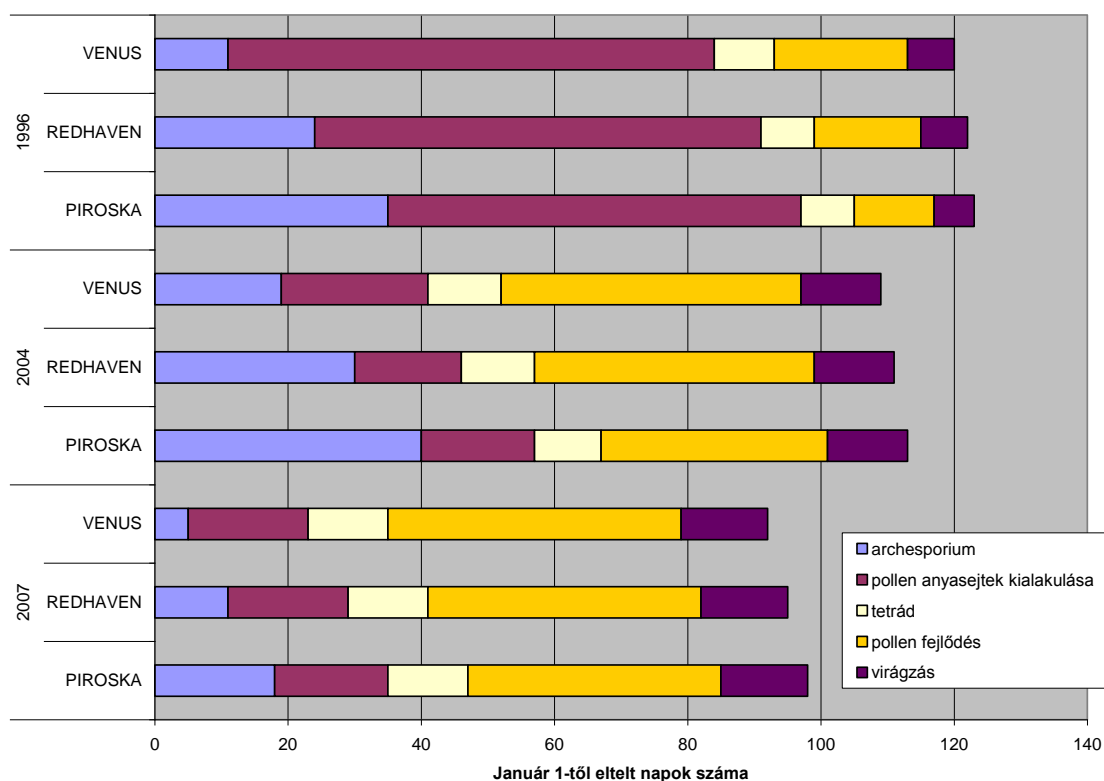
*Évjáratok közötti különbségek.* A Kárpát-medence három klímaövezet (atlanti, mediterrán és kontinentális) találkozásánál helyezkedik el. Ennek következtében időjárása nagyon változékony. Kísérleti helyszínünk a Kárpát-medence közepén, Budapest külső területén van, ahol ez a változékonyság határozottan megfigyelhető, és nagyon nagyok a különbségek az egyes évek hőmérsékletének alakulásában. Az éghajlati elemek, ezek közül is leginkább a hőmérséklet nagyban befolyásolják a növények fenológiai folyamatait, így természetesen az őszibarack fák virágrügy-fejlődését is.

Két szélsőséges és egy átlagos évjárat mikrosporogenezisének adatait emeltük ki a 25. ábrán az elmúlt 15 vizsgálati eredményei közül.

2003/2004 telén kísérleti helyszínünk időjárása a több éves átlagnak megfelelően alakult. Ezen az átlagos időjárású télen fajtagyűjteményünk őszibarackfajtáinak virágrügyeiben (a hosszú vesszők közepén) a füzér állapot január 20. és február 10. között alakult ki. Ez után a pollen anyasejtek kialakulása 18-22 nap alatt zajlott le, majd a tetrád állapotot 10-11 napig figyeltük meg. A tetrád állapot a gyors fejlődésű fajtáknál február közepén, a lassú fejlődésűeknél pedig március elején volt. A tetrádok burokból való kiszabadulása után a pollenszemek kialakulásához hosszú időre, 35-45 napra volt szükség, és a virágzás április közepére esett.

Az átlagnál jóval hidegebb 1995/1996-os télen, amikor a napi középhőmérsékletek folyamatosan az átlagos érték alatt voltak, a legszembetűnőbb az, hogy a pollen anyasejtek kialakulása nagyon lassan zajlott le. Ezen a télen a füzér állapot kezdete néhány nappal korábban következett be, mint 2003/2004 telén, ez azt jelzi, hogy az áttelelő szervek korábban megkapták a szükséges hideghatást. A kényszernyugalmi időszakban a tartósan alacsony hőmérséklet lelassította a fejlődési folyamatokat, és a pollen anyasejtek kialakulásához 62-73 napra volt szükség fajtától függően. A tetrád állapot március végén – április elején 8-9 nap alatt lezajlott, majd a pollenszemek kialakulása 12-20 napot vett igénybe. A virágzás is szokatlanul későn, április utolsó napjaiban kezdődött.

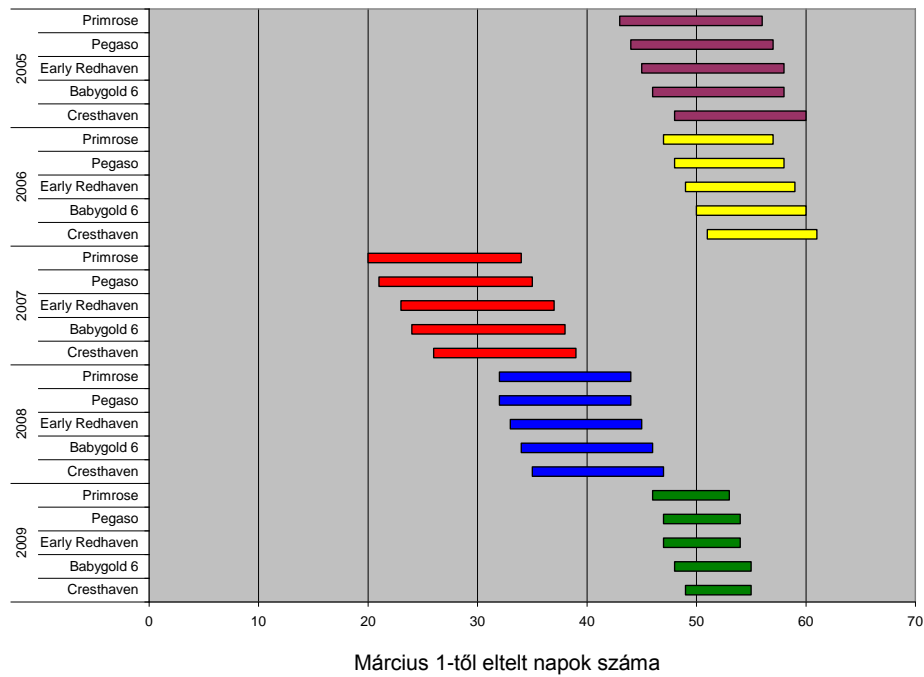
A 2006/2007-es tél a vizsgálati időszakunk és egyben az elmúlt 50 év legenyhébb időjárású tele volt Magyarországon (1. ábra). Ezen a télen a vizsgált őszibarackfajták virágrügyeinek mélynyugalma januárban véget ért. Ezután a pollen anyasejtek kialakulásához 17-18 napra volt szükség. A tetrád állapot január végén – február elején valamennyi fajtánál lezajlott. A pollenszemek kialakulása 38-44 napot vett igénybe. A virágzás szokatlanul korán, március végén elkezdődött.



25. ábra. Három őszibarackfajta ('Venus', 'Redhaven', 'Piroska') mikrosporogenezise és virágzási ideje a hosszú vesszők középső virágrügyeinek vizsgálata alapján három eltérő időjárású télen Soroksáron

### 3.8. Szabadföldi fenológiai vizsgálatok eredményei

Soroksári Génbanki Fajtagyűjteményünkben 75 őszibarackfajta található. A fajták értékelésének részeként rendszeres fenológiai megfigyeléseket végzünk, és hosszú évek óta feljegyezzük a fenológiai stádiumok bekövetkezésének időpontját. Emellett rendszeresen felmérjük a téli természetes fagykárokat is. Az alábbiakban ezek közül az adatok közül pályázati időszak éveinek virágzási idő adatai közül mutatunk be néhányat a 26. ábrán, kiemelve virágzási idő csoportonként egy-két jellemző fajtát. Sok éves átlagban Soroksáron az őszibarack virágzáskezdeté április 7-én van. A vizsgált 5 évjárat közül kettőben kezdődött ettől korábban a virágzás, háromban pedig később. Egy-egy évjáratban a fajták közötti különbség 4-6 nap között változott, a virágzási idő hossza pedig 6 és 14 nap között volt. A virágzási idő ismerete a fagykárok elkerülése miatt fontos az őszibaracknál, a fajtatársítás szempontjából nincs jelentősége, mert a természetben lévő őszibarackfajták mindegyike megfelelő öntermékenyülő képességgel rendelkezik. A virágzási idő, mint minden egyéb fenológiai folyamat genetikailag meghatározott, de fenotípusos kifejeződését nagymértékben befolyásolják a környezeti tényezők, ezek közül is elsősorban a hőmérséklet alakulása. A genetikai meghatározottságot igazolja, hogy a fajták virágzási idő sorrendje minden évjáratban azonos volt, a környezet hatását pedig a nagy évjáratok közötti különbségek. A fenológiai vizsgálatok eredményeit felhasználtuk a publikációk, szakdolgozatok készítésénél, valamint beépítettük a kertészmérnök képzés tananyagába.



26. ábra. Kiemelt őszibarackfajták virágzási ideje Soroksáron a pályázati időszak évjárataiban

### 3.9. Téli fagykárok felvételezése

A pályázati időszak során több alkalommal is volt olyan lehülés, ami fagykárosodást okozott Soroksáron a fajtagyűjteményünkben, de szerencsére a termésmennyiséget nem befolyásolta lényegesen. A szabadföldi vizsgálati eredmények minden alkalommal szoros korrelációt mutattak a mesterséges fagyasztási eredményekkel. Az adatokat felhasználtuk szakdolgozatok és cikkek készítéséhez, jelentésünkben részletes ismertetésükre nem kívánunk kitérni.

**A pályázat kutatási eredményeinek felhasználásával készült szakdolgozatok, diplomamunkák:**

sor-szám	a dolgozat címe	készítette	képzési forma	év
1	Őszibarackfajták fenológiai és morfológiai értékelése	Gyökös Gergő Imre	egyetem	2006
2	Őszibarackfajták virágrügyeinek fagyállósága	Radnai István	egyetem	2006
3	Őszibarackfajták fenológiai és pomológiai vizsgálata	Üveges Krisztián	főiskola	2006
4	Kajszi- és őszibarackfajták áttelelő szerveinek beltartalmi változása a téli nyugalmi időszak során	Mézes Zoltán	egyetem	2008
5	A víztartalom változása kajszi- és őszibarackfajták áttelelő szerveiben	Kertész Katalin	egyetem	2008
6	Júliusban érő őszibarackfajták értékelése génbanki fajtagyűjteményben	Kovács István János	főiskola	2008

**Hivatkozások:**

- Bassuk, N.L., Hunter, L.D., Howard, B.H. 1981. The apparent involvement of polyphenol oxidase and phloridzin in the production of apple rooting co-factors. *Journal of Horticultural Science*. 56(4):313-322.
- Srivastava, S.K., Vashi, D.J., Naik, B.I., 1983. Control of senescence by polyamines and guanidines in young and mature barley leaves. *Biochemistry*. 22(10):2151-2154.
- Szalay L., Timon B., Szabó Z., Papp J. 2002. Microsporogenesis of peach (*Prunus persica* L. Batsch) varieties. *International Journal of Horticultural Science*. 8(3-4):7-10.
- Szalay L. 2006. Comparison of flower bud development in almond, apricot and peach genotypes. *International Journal of Horticultural Science* 12(2):93-98.