



धनिया के तना गाँठ रोग का जनन द्रव्य के दीर्घकालीन संरक्षण एवं गुणवत्तायुक्त बीज उत्पादन पर प्रभाव

जमील अख्तर, बालेश्वर सिंह, प्रदीप कुमार, राज किरण, मीना शेखर, साधना, सुशील पांडेय, स्मिता लेंका एवं सुनील चन्द्र दूबे

पादप संगरोध संभाग और जननद्रव्य संरक्षण संभाग

भाकृअप-राष्ट्रीय पादप आनुवंशिक संसाधन ब्यूरो, नई दिल्ली 110 012

सारांश : भाकृअप-राष्ट्रीय पादप आनुवंशिक संसाधन ब्यूरो, नई दिल्ली स्थित राष्ट्रीय जीन बैंक में जननद्रव्य के दीर्घकालिक संरक्षण हेतु विभिन्न स्रोतों से प्राप्त अनेक फसलों के बीजों को उनके संरक्षण से पूर्व स्वास्थ्य की स्थिति जानना एक नियमित प्रक्रिया है क्योंकि इसमें केवल स्वस्थ बीज का संरक्षण किया जाता है। इसी प्रक्रिया के अंतर्गत जननद्रव्य संरक्षण संभाग के माध्यम से धनिया जनन द्रव्य के 1328 प्रभेद स्वास्थ्य परीक्षण हेतु पादप संगरोध संभाग को प्राप्त हुए। वर्तमान अध्ययन में बीज स्वास्थ्य परीक्षण से पता चला कि धनिये के जिन नमूनों में बीज विकृत आकार के हैं उनमें अधिकतर तना गाँठ रोग (बीज गाँठ) से ग्रसित हैं जो कि *प्रोटोमाइसिस मैक्रोस्पोरस* नामक कवक के कारण होता है। *प्रो. मैक्रोस्पोरस* का संक्रमण बीज के आकार एवं गुणवत्ता को अत्यधिक प्रभावित करता है। परिणामस्वरूप, संक्रमित बीजों के आकार सामान्य बीजों की तुलना में अत्यधिक (6.46x5.01 से 12.76x3.94 मिली मीटर तक) बढ़ जाते हैं और बीज की अंकुरण क्षमता समाप्त हो जाती है। स्वस्थ बीज की तुलना में संक्रमित बीजों के आकर एवं माप में विकृति गाँठ रोग के प्रति प्रभेदों की संवेदनशीलता को दर्शाता है। संक्रमित बीजों में उपस्थित बीजाणु दीर्घ अवधि (2 वर्ष) तक जीवित रहते हैं और यदि ऐसे ग्रसित बीजों का संरक्षण राष्ट्रीय जीन बैंक में दीर्घ अवधि के लिए किया जाता है तो संभव है कि बीज के साथ-साथ बीजाणु भी सुषुप्तावस्था में जीवित रहें। जहाँ एक तरफ ऐसे ग्रसित बीज रोगकारक को एक स्थान से दूसरे स्थान तक फैलने में वाहक सिद्ध हो सकते हैं, वहीं दूसरी तरफ ऐसे रोग ग्रसित बीजों की मांग प्रभावित होगी जिसके परिणामस्वरूप धनिया की खेती करने वाले किसानों को कम कीमत प्राप्त होगी।

Effect of stem gall disease on long-term germplasm preservation and quality seed production of coriander

Jamil Akhtar, Baleshwar Singh, Pradeep Kumar, Raj Kiran, Meena Shekhar, Sadhana, Sushil Pandey
Smita Lenka & Sunil Chandra Dubey

Plant Quarantine Division and Germplasm Division

ICAR-National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi 110 012

Abstract

To know the health status of crops germplasm received from various sources, seed health testing (SHT) is a routine process for long-term conservation of healthy seeds in the National Genebank at ICAR-National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi. In this process, 1328 accessions of coriander were received in the Plant Quarantine Division for SHT through Germplasm Conservation Division. In the present study, SHT revealed that most of the samples of coriander in which the seeds are deformed suffer from stem gall (seed gall) disease caused by *Protomycesmacrosporus*. Infection of *P. macrosporus* greatly affects the size and quality of seeds. As a result, infected seeds become excessively larger (from 6.46x5.01 to 12.76x3.94 mm) as compared to normal seeds and the germination capacity of the seeds is also lost. Deformity in size and measurement of infected seeds compared to healthy seeds indicates susceptibility to stem gall disease. Our observation revealed that the chlamydospores present in the infected seeds survive for a long period (~ 2 years) and if such infected seeds are conserved for long term in the National Genebank, it is possible that along with the seeds, dormant chlamydospores also survive. While on the one hand such diseased seed can prove to be the carrier in spreading the pathogen from one place to another, on the other hand, market demand will be affected which will result in lower prices for the farmers cultivating coriander.

प्रस्तावना

धनिया (*कोरिएंड्रम सैटाइवम* एल.- *Coriandrum sativum* L.), जो एम्बलियासी कुल से संबंधित है, को खान-पान प्रयोजनों के साथ-साथ औषधीय गुणों के लिए मसाले के रूप में बड़े पैमाने पर उपयोग किया जाता है। धनिया को कोरिएंडर, सिलेंट्रो एवं चीनी अजमोद के नाम से भी जाना जाता है। धनिया के बीज में अनेक गुणकारी तत्व पाए जाते हैं। शोध अध्ययनों से पता चलता है कि प्रति 100 ग्राम बीज में औसतन कार्बोहाइड्रेट 24 ग्राम, प्रोटीन 1.3 ग्राम, वसा 19.6 ग्राम, खनिज लवण 5.3 ग्राम, नमी 6.3 ग्राम के साथ-साथ लिनालूल, अल्फा एवं बीटा पिनीन, पैरासाइमीन, अल्फा-टर्पीनीन, गामा-टर्पीनीन, लोनोनीन तथा गैर-लिनालूल अल्कोहल, एस्टर्स, फ्लेवेनोइड्स, क्यूमाराइंस, आइसोक्यूमाराइंस, थालाइड्स एवं फेनोलिक एसिड जैसे औषधीय गुण वाले तत्व भी पाए जाते हैं। इसके अतिरिक्त धनिया के बीज से 0.4 प्रतिशत सुगंध तेल भी निकलता है¹¹। भारत की तुलना में यूरोपीय प्रजातियों में तेल अधिक पाया जाता है। धनिया के तेल में मुख्यतः कोरिएंडराल, जिरेनिओल एवं वेब्रिनिओल होता है। इसमें मुख्य तत्व लिनालूल (90%) होता है। 7% थाइमोल भी पाया जाता है। ये तत्व सुगंध तथा स्वाद को बढ़ाते हैं। धनिया के बीज से 90% वसा-युक्त तेल एवं 5% वाष्पशील तेल भी प्राप्त होता है। धनिया के बीज का उपयोग अपच एवं पेटिश के साथ-साथ सर्दी के उपचार हेतु भी किया जाता है। धनिया के बीजों से प्राप्त सुगंध तेल में संभवतः वायुनाशी, रोगाणुरोधक, जीवाणुनाशक कवकनाशी एवं मांसपेशियों को आराम देने वाली विशेषता होती है³। लोग शरीर के विभिन्न विकारों से निपटने के लिए धनिया के बीज एवं अन्य भागों का उपयोग देसी दवा के रूप करते हैं²²। वैश्विक बाज़ार में लगभग 80 प्रतिशत योगदान देने वाले सबसे बड़े उत्पादक, उपभोक्ता और निर्यातक देश होने के कारण भारत को धनिया का राजा कहा जाता है। भारत के अतिरिक्त बुल्गारिया, रोमानिया, रूस, ईरान, मोरक्को, कनाडा तथा ऑस्ट्रेलिया प्रमुख धनिया उत्पादक देश हैं। धनिया की फसल मौसम तथा वातावरण के प्रति अति संवेदनशील होती है। जहाँ फसल की वानस्पतिक एवं प्रजनक वृद्धि के दौरान ठंडी जलवायु की आवश्यकता होती है वहीं फसल परिपक्वता के दौरान गर्म शुष्क जलवायु धनिया की खेती के लिए उपयुक्त होती है। फसल की कटाई के बाद बीज को उनकी गुणवत्ता के आधार पर विभिन्न श्रेणी (ग्रेड) जैसे बादामी, ईगल, स्कूटर, सिंगल पैरट, डबल पैरट, ग्रीन एक्स्ट्रा तथा ग्रीन स्पेशल में वर्गीकृत किया जाता है। जहाँ बादामी ग्रेड निम्न गुण वाला है, वहीं ग्रीन स्पेशल ग्रेड महीन होती है तथा प्रीमियम क्वालिटी के रूप में कारोबार किया जाता है। भारत में धनिया

की खेती लगभग सभी राज्यों में की जाती है, लेकिन राजस्थान, गुजरात, मध्य प्रदेश, तमिलनाडु, उत्तर प्रदेश और उत्तराखंड प्रमुख धनिया उगाने वाले राज्य हैं। इसकी खेती को कई कवक, जीवाणु एवं कृमि जनित रोग प्रभावित करते हैं, जैसे उकठा तना सड़न, जड़ सड़न, चारकोल सड़न, पौद अंगमारी, तना गाँठ, पत्र लांछन आदि। पत्र चित्ती (*सर्कोस्पोरा कोरिएंड्री*-*Cercospora coriander*), एन्थ्रेक्नोज (*कोलेटोट्राइकम कैप्सिसी*-*Colletotrichum capsici* एवं *सी. ग्लियोस्पोरीओइड्स*-*C. gloeosporioides*), चूर्णिल आसिता (*ईरीसिफे पॉलीगोनी*-*Erysiphe polygoni*), बीज सड़न (*फ्यूज़ेरियम वर्टिसिलिओइड्स*-*Fusarium verticillioides*, *यू. सेमीटेक्टम*-*F. semitectum* तथा *यू. इक्वीसेटाई*-*F. sequisetii*)। ग्रेन मोल्ड (*फ्यूज़ेरियम कर्वुलेरिया*-*Fusarium Curvularia* तथा *अल्तेरनेरिया* (*Alternaria*), जीवाणु झुलसा (*जैन्थोमोनास कैम्पेस्ट्रिस* पीवी. कोरिएंडर-*Xanthomonas campestris* v. *coriander*), कोमल सड़ांध (*ईर्विनिया कैरोटोवोरा*-*Erwinia carotovora*), अंकुर सड़ांध (*स्यूडोमोनास स्पीशीज़*-*Pseudomonas sp.*), जड़ सड़न (*रोटाईलेंकुलस रेनीफोर्मिस*-*Rotylenchulus reniformis* तथा जड़गाँठ (*मेलोइडोगाईन इन्कोग्निटा*-*Meloidogyne incognita*), फिल्लोडी (*फाइटोप्लाज़्मा*-*Phyllosticta*) (खरे एवं सहकर्मी, 2017)। धनिया में कम से कम 13 बीज-जनित कवक प्रजातियां एवं 4 जीवाणु प्रजातियां बीमारी के रूप में फसल को नुकसान पहुंचाती हैं तथा पत्तों तथा बीजों की गुणवत्ता में गिरावट के लिए जिम्मेदार हैं¹⁶। तना गाँठ रोग धनिया के बीज की गुणवत्ता को बहुत प्रभावित करती है तथा पैदावार में भी 0.9-22.81 प्रतिशत की हानि होती है^{7&10}। अतः धनिया बीज के दीर्घकालीन संरक्षण, धनिया का मसाले के रूप में महत्व तथा *प्रो. मैक्रोस्पोरस* के बीज पर कुप्रभाव को ध्यान में रखते हुए वर्तमान अध्ययन धनिया उत्पादन करने वाले राज्यों में तना/बीज गाँठ रोग का प्रकोप एवं उसकी सघनता के साथ-साथ जननद्रव्य में बीज संक्रमण की सघनता एवं बीज अंकुरण पर इसके प्रभाव का आंकलन करने के प्रमुख उद्देश्यों से किया गया है।

सामग्री एवं विधि

वर्ष 2011 से 2019 के दौरान जननद्रव्य संरक्षण संभाग, भाकृअनुप-राष्ट्रीय पादप आनुवंशिक संसाधन, नई दिल्ली के माध्यम से विभिन्न संग्रह एवं बहुलीकरण के स्रोतों से धनिया जननद्रव्य (बीज) के कुल 1328 नमूने स्वास्थ्य परीक्षण हेतु पादप संगरोध संभाग में प्राप्त हुए। जननद्रव्य के नमूने भारत के राज्यों, क्रमशः राजस्थान (824), उत्तराखंड (308), बिहार (110), मध्य

प्रदेश (39), असम (33), त्रिपुरा (11), आंध्र प्रदेश, हिमाचल प्रदेश एवं हरियाणा (1 प्रत्येक) से प्राप्त हुए जोकि विभिन्न कृषि-जलवायु क्षेत्रों का प्रतिनिधित्व करते हैं। बीजों का स्वास्थ्य परीक्षण पादप संगरोध संभाग, भाकृअनुप-एनबीपीजीआर, नई दिल्ली की पादप रोग प्रयोगशाला में किया गया। स्वास्थ्य परीक्षण के दौरान सभी नमूनों की प्रारम्भ में दृश्य परीक्षण जांच की गई तथा सूक्ष्मदर्शी हेतु काम आने वाली कांच की स्लाइड पर पानी की बूँद में संक्रमित बीजों को तोड़कर सूक्ष्मदर्शी की सहायता से 4x, 10x तथा 40x आवर्धन (मैग्निफिकेशन) पर क्लेमाईडोस्पोर को देखकर सुनिश्चित किया गया कि बीज *प्रो. मैक्रोस्पोरस* से संक्रमित हैं।

प्रो. मैक्रोस्पोरस की उत्तरजीविता अवधि का अध्ययन करने के लिये प्रयोगशाला में सामान्य तापक्रम, 25-35°C पर अलग-अलग अवधि (वर्ष 2012, 2013, 2014, 2016, 2018 एवं 2019) के संरक्षित धनिया के रोगग्रस्त बीजों का प्रयोग किया गया। रोगी बीजों में मौजूद बीजाणुओं के अंकुरण का आंकलन हैंगिंग ड्रॉप विधि के माध्यम किया गया। इसमें जल में बने बीजाणु घोल में बीजाणुओं की संख्या 104 प्रति मिली समायोजित करने के बाद कैविटी स्लाइड में 25 माइक्रो लीटर (μ l) प्रति कैविटी की दर से डाल कर (5 स्लाइड प्रति नमूना) चैम्बर में उल्टा रख दिया जोकि 11 सेंटीमीटर व्यास वाली पेट्री प्लेट तथा आसुत जल में अच्छी तरह भिगोये हुए त्रिस्तरीय ब्लॉटर की सहायता से बनाये गये थे। अब इन्हें बीजाणु अंकुरण के लिए उपयुक्त तापक्रम (22±1°C) पर इन क्यूबेटर (बीओडी) में 10-12 दिनों तक रखा गया तथा इस दौरान बीजाणुओं में अंकुरण सुनिश्चित करने के लिए 24 घंटे के अंतराल पर सूक्ष्मदर्शी में प्रतिदिन देखा गया। साथ-साथ स्वस्थ तथा रोगी नमूनों में दस-दस बीजों की अलग-अलग माप को आधार मानकर औसत माप (मिमी) की गणना भी की गयी।

रोगाणु, *प्रो. मैक्रोस्पोरस* की पुनः पुष्टि आईटीएस सिक्वेसिंग द्वारा भी सुनिश्चित की गयी। इसके लिए संक्रमित धनिया के बीज का सीटैब (CTAB) विधि द्वारा जीनोमिक डीएनए निकाला गया। तत्पश्चात्, स्पेक्ट्रोफोटोमीटर द्वारा डीएनए की गुणवत्ता और सांद्रता का आंकलन किया गया और पीसीआर चक्र क्रिया के लिए डीएनए की सांद्रता 50 नैनोग्राम प्रति माइक्रो लीटर समायोजित किया गया। पीसीआर चक्र के लिए 25 माइक्रो लीटर पीसीआर (PCR) मिश्रण में 1 गपीसीआर बफर, डीएनए 50 नैनोग्राम, डीएनटीपी (dNTPs) 10 मिलि मोलर, टैक डीएनए पॉलीमरेज़ (TaqDNA Polymerase) 1 यूनिट और आईटीएस (ITS) 4 तथा 5 प्राइमर्स 0.2 मिलिमोलर की दर से डाले गये।

थर्मोसायलर का उपयोग करके राइबोसोमल डीएनए के आईटीएस खण्ड का विस्तारण निम्नलिखित पीसीआर स्थिति के साथ किया गया। प्रारंभिक विकृतीकरण -94°C पर 10 मिनट, इसके बाद 30 चक्र का विकृतीकरण -94°C पर 30 सेकंड, अनिलिंग (annealing) -62°C पर 40 सेकंड और विस्तारण (extension) -72°C पर 40 सेकंड और अंतिम विस्तारण चक्र -72°C 10 मिनट के लिए। विश्लेषण के लिए प्रवर्धित उत्पाद को 1x टीबीई बफर (TBE buffer) वाले एगरोज़ जेल (agarose gel-1.2%) में इथुडियम ब्रोमाइड के साथ 80 V के विद्युत धारा पर लगभग 1 घंटे तक चलाया गया तथा प्रवर्धित उत्पाद की सिक्वेसिंग करवाई गयी।

इसके अतिरिक्त संभावित रोगी बीजों की जांच 2 रेप्लिकेशन में ब्लॉटर परीक्षण के माध्यम से की गयी जिसमें 11 सेमी व्यास वाली प्लास्टिक पेट्री प्लेट में आसुत जल में अच्छी तरह भीगे (लगभग 10 मिनट) हुए त्रिस्तरीय ब्लॉटर पेपर रख कर बीज को इस प्रकार रखा गया कि पेट्री प्लेट में किनारे की तरफ समान दूरी पर कम से कम 9 तथा मध्य में एक बीज व्यवस्थित हों। नमूनों की पहचान सुनिश्चित करने के लिए पेंसिल की सहायता से ब्लॉटर पेपर पर नमूना संख्या के साथ-साथ अवलोकन तिथि भी इंगित की गयी। इस प्रकार प्रत्येक नमूने की दो-दो प्लेटें लगायी गयीं और उनको 22±1°C तापमान पर 12 घंटे के फ्लोरोसेंट प्रकाश और अंधेरे के वैकल्पिक चक्रों में 7 दिनों के लिए ऊष्मायन हेतु रखा गया। 8वें दिन सूक्ष्मदर्शी की सहायता से उन बीजों का अवलोकन किया गया। माइक्रोस्कोप के विभिन्न आवर्धन स्तरों (यानी 0.75x से 11.25x तक) पर बीज-जनित विशिष्ट कवक के संक्रमण की पहचान की गयी तथा प्रजातीय स्तर तक कवक की पहचान कॉलोनी वर्णों, बीजाणु पिंडों और बीजाणुओं के आकार माप तथा वर्णों के आधार पर की गयी है¹⁵। आवश्यकता पड़ने पर पहचान की पुष्टि सुनिश्चित करने के लिए लैक्टोफिनॉल/ कॉटनब्लू में बनायी गयी स्लाइड्स के अवलोकन हेतु सूक्ष्मदर्शी का भी उपयोग किया गया तथा बीज पर संक्रमण की आवृत्ति तथा बीज अंकुरण पर उनके प्रभाव को भी दर्ज कर उनका विश्लेषण किया गया।

परिणाम एवं विवेचना

धनिया बीज के दीर्घकालीन संरक्षण, मसाले के रूप में उसके महत्व तथा *प्रो. मैक्रोस्पोरस* के कुप्रभाव को ध्यान में रखते हुए वर्तमान अध्ययन में ये जानने का एक प्रयत्न किया गया है कि धनिया उत्पादन करने वाले राज्यों में तना/बीज गाँठ रोग का प्रकोप कहाँ-कहाँ और उसकी सघनता क्या है। साथ-साथ जननद्रव्य में बीज संक्रमण की सघनता, बीज अंकुरण पर उसके प्रभाव तथा

रोगाणु की उत्तर जीविता का विवरण भी निम्नलिखित रूप में किया गया है। प्रारम्भिक दृश्य परीक्षण के परिणामस्वरूप पता चला है कि 9 राज्यों से आए 1328 नमूनों (प्रभेदों) में से मात्र बिहार, त्रिपुरा, असम, मध्य प्रदेश और आन्ध्र प्रदेश के 64 प्रभेदों में बीज गाँठ (सीड गाल) पाया गया (सारणी 1 क)। इसके अतिरिक्त 19 प्रभेदों में अन्य बीज जनित रोगजनकों का संक्रमण भी दर्ज किया गया तथा संक्रमण का स्तर अलग-अलग स्थान एवं प्रभेदों में भिन्न पाया गया (सारणी 1ख)। स्वस्थ बीज की तुलना में गाँठ रोग से ग्रसित बीजों के आकार में विकृति (चित्र 1 अ, ब, स एवं द) तथा माप में अत्यधिक अंतर को देखा जा सकता है, जो अलग-अलग स्थानों में वहां की जलवायु एवं शोषक कारकों के कारण और/या प्रभेदों की संवेदनशीलता के कारण भी हो सकता है।

संक्रमण के बाद, कवक बीजाणु (क्लैमाइडोस्पोर्स) के रूप में विकसित हो जाते हैं और बीज के परिपक्व होने पर, इन्हीं बीजाणुओं के रूप में सुषुप्तावस्था में पड़े रहते हैं। सूक्ष्मदर्शी अवलोकनों से प्राप्त रूपात्मक विशेषताओं के अनुसार पता चला कि क्लैमाइडोस्पोर्स मोटे, दीर्घवृत्तीय आकार के तीन-स्तरित दीवार वाले हैं, जिनकी औसत माप (व्यास) सामान्यतः 50-60 माइक्रोमीटर है (चित्र 1य) तथा इन्हीं पारंपरिक विधि के द्वारा रूपात्मक विशेषताओं के आधार पर बीज गाँठ (सीड गाल) के रोगाणु की पहचान *प्रो. मैक्रोस्पोरस* के रूप में सुनिश्चित हुई। बाद में आईटीएस खण्ड के अनुक्रमण के परिणामस्वरूप प्राप्त 875 बेस पेअर (इच) के उत्पाद के अनुक्रमण, जोकि नेशनल सेंटर फॉर बायोटेक्नोलॉजी इन्फॉर्मेशन (NCBI) के डेटाबेस में जमा किया गया (आईडी: एमटी 044448), के द्वारा बीज गाँठ (सीड गाल) के रोगाणु की पहचान की पुनः पुष्टि *प्रो. मैक्रोस्पोरस* के रूप में हुई।

गाँठ रोग से संक्रमित बीज की अधिकतम (12756x3944 माइक्रोन) तथा न्यूनतम (6462x5010 माइक्रोन) माप क्रमशः आरडी-373 एवं आरडी-415 प्रभेदों में दर्ज की गयी जोकि मुज़फ्फरपुर, बिहार से प्राप्त हुए थे। कुल 64 संक्रमित प्रभेदों में से 8 प्रभेद (आईसी 631219, आईसी 620876, आईसी 620885, आईसी 620868, आईसी 620890, आईसी 620872, आईसी 620879 एवं आईसी 598484) ऐसे पाये गये जिनमें संक्रमित बीज की माप >10.00x4.00 मिमी थी। इन प्रभेदों में से एक प्रभेद, आईसी 631219 जो असम से था, को छोड़कर बाकी सभी 7 प्रभेद मुज़फ्फरपुर, बिहार से प्राप्त हुए थे। इसी प्रकार 30 प्रभेद (केपी/पीकेएम-42, केपी/पीकेएम-57, आईसी 627434, आईसी 630361, आईसी 620897, आईसी 620869, आईसी 620858,

आईसी 620862, आईसी 620863, आईसी 620864, आईसी 620867, आरडी-383, आईसी 620870, आईसी 620871, आईसी 620873, आईसी 598480, आईसी 620880, आईसी 598481, आईसी 598479, आईसी 620886, आईसी 620887, आईसी 598486, आईसी 620893, आईसी 598485, आईसी 620894, आईसी 620895, आईसी 620896 एवं आईसी 598242) ऐसे थे जिनमें संक्रमित बीज की माप >9.00x4.30 मिमी थी। इन प्रभेदों में से 24 प्रभेद अकेले मुज़फ्फरपुर, बिहार के थे तथा 2 प्रभेद (केपी/पीकेएम-42, केपी/पीकेएम-57) गुणा, मध्य प्रदेश तथा एक-एक प्रभेद गुंटूर, आन्ध्र प्रदेश (आईसी 598242) एवं ढलाई, त्रिपुरा (आईसी 630361) से प्राप्त हुए थे। इसी प्रकार मात्र 6 प्रभेद (आईसी 620875, आईसी 598488, आईसी 598487, आईसी 598482, आईसी 620884 तथा आईसी 620904) ऐसे थे जिनमें संक्रमित बीजों की माप >7.00x4.80 मिमी तथा 4 प्रभेद (आईसी 620874, आईसी 620881, आईसी 620883 तथा आईसी 620889) में संक्रमित बीजों की माप >6.00x4.90 मिमी थी तथा ये सभी प्रभेद मुज़फ्फरपुर, बिहार से प्राप्त हुए थे। सबसे अधिक प्रभेदों (56) में बीज संक्रमण बिहार से दर्ज किया गया तत्पश्चात् त्रिपुरा और असम से क्रमशः 4, 2 प्रभेदों में संक्रमण पाया गया। इसके अतिरिक्त मध्य प्रदेश एवं आंध्र प्रदेश से भी एक-एक प्रभेद संक्रमित पाये गये। परिणामों से स्पष्ट है की बिहार में गाँठ रोग का प्रकोप सबसे अधिक है क्योंकि बिहार से प्राप्त 110 प्रभेदों में से 56 में संक्रमण पाया गया। इन परिणामों से सर्वविदित है कि जिन प्रभेदों में संक्रमण के कारण बीज के आकार एवं माप में जितनी अधिक विकृति होगी वे प्रभेद गाँठ रोग के प्रति उतने ही अधिक संवेदनशील होंगे। ऐसे संक्रमित बीज, जिनमें क्लैमाइडो-स्पोर्स सुषुप्तावस्था में उपस्थित होते हैं, रोगाणुवाहक का कार्य करते हैं जिससे रोग एक स्थान से दूसरे स्थान तक फैलता है।

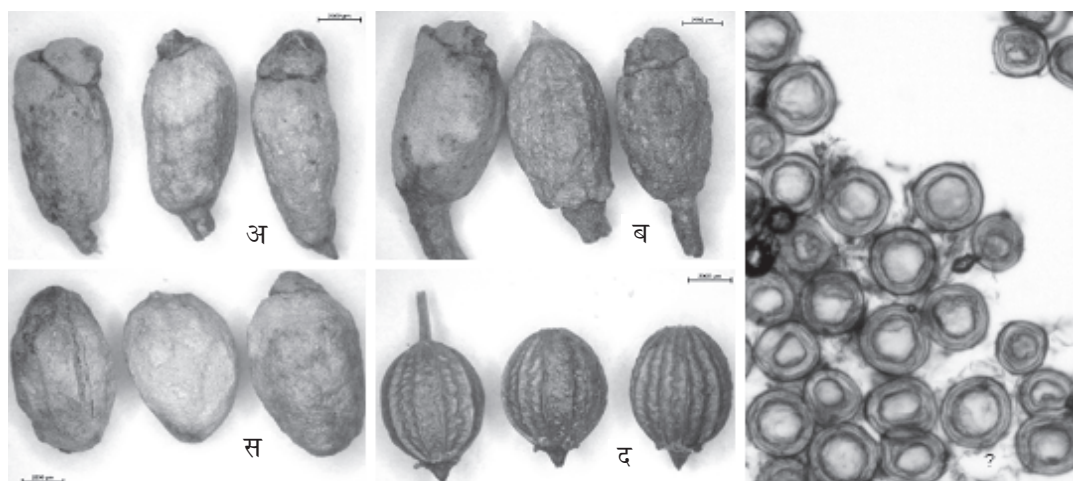
जबकि, ब्लॉटर परीक्षण के परिणामस्वरूप रूपात्मक लक्षणों (morphological characters) के आधार पर अलग-अलग प्रभेदों में कई ग्रेन मोल्ड (grain mould) की समस्या पैदा करने वाले कवकों जैसे *अल्टर्नेरिया अल्टर्नेटा* (आईसी 310994, आईसी 340824 एवं आईसी 421995), *बाईपोलैरिस टेट्रामेरा* (आईसी 572776), *कर्बुलरिया लूनाटा* (आईसी 595461) एवं *फोमा सोर्घिना* (आईसी 538810) की पहचान हुई (सारणी 1 ख)। इसी प्रकार बीज सड़न करने वाले कवक प्रजातियों जैसे *फ्यूज़ेरियम वर्टिसिलिओइड्स* (आईसी 143700, आईसी 280067, आईसी 524214, आईसी 524219, आईसी 538810, आईसी 574530, आईसी 595456, आरएसआर/आरएसएम-14, आरएसआर/

सारणी 1 क – विभिन्न स्रोतों से प्राप्त धनिया जननद्रव्य के प्रभेदों में बीज-जनित प्रो. मैक्रोस्पोरस की पहचान एवं बीज अंकुरण पर उनका प्रभाव।

प्रभेद	स्रोत (संग्रह/बहुलीकरण)	बीज अंकुरण (%)		बीज की औसत माप (मिमी)	
		स्वस्थ	रोगी	स्वस्थ	रोगी
आईसी620858	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.27x4.31	9.88x5.80
आईसी598489	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.02x4.6	8.03x5.28
आईसी620859	मुज़फ्फरपुर, बिहार	98	0	6.22x4.76	9.37x5.11
आईसी620860	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.26x4.42	8.77x5.03
आईसी620861	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.01x4.22	8.18x5.45
आईसी620862	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.31x4.24	9.31x4.32
आईसी620863	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.54x4.34	9.18x4.47
आईसी598484	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.20x3.91	12.76x3.94
आईसी620864	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.32x4.47	9.53x5.20
आईसी620865	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.05x4.20	8.88x4.97
आईसी620866	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.24x4.27	8.95x4.90
आईसी620867	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.48x4.93	9.57x5.45
आईसी620868	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.36x4.75	9.44x5.37
आरडी-383	पूर्वी चम्पारण, बिहार	100	0	5.35x4.71	9.43x5.23
आईसी620869	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	4.91x4.54	9.13x5.05
आईसी620870	मुज़फ्फरपुर, बिहार	98	0	5.43x4.51	9.24x5.54
आईसी620871	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.16x4.06	9.88x4.32
आईसी620872	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.53x4.05	11.57x4.24
आईसी620873	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	4.83x4.37	9.15x5.04
आरडी-390	बाँका, बिहार	100	0	5.19x4.39	8.89x4.94
आईसी620874	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.22x4.57	6.95x4.94
आईसी620875	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.16x4.45	7.55x4.93
आईसी598480	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.35x4.51	9.47x5.04
आईसी620876	मुज़फ्फरपुर, बिहार	92	0	5.64x4.93	10.32x5.46
आईसी598488	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.13x4.24	7.75x4.95
आईसी620877	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.25x4.25	8.12x5.08
आईसी620878	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.02x4.24	8.73x5.04
आईसी620879	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.43x4.25	12.16x4.91
आईसी620880	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	4.98x4.63	9.78x5.03
आईसी598481	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.41x4.10	9.75x4.93
आईसी620881	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.26x4.67	6.95x5.21
आईसी620882	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.09x4.25	8.18x4.67
आईसी620883	मुज़फ्फरपुर, बिहार	96	0	5.18x4.41	6.95x5.00
आईसी598487	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.58x4.61	7.60x5.06
आईसी598482	मुज़फ्फरपुर, बिहार	100	0	5.82x4.97	7.93x5.13

सारणी 1 ख — विभिन्न स्रोतों से प्राप्त धनिया जननद्रव्य के प्रभेदों में अन्य बीज-जनित कवकों की पहचान एवं बीज अंकुरण पर उनका प्रभाव।

प्रभेद (%)	स्रोत (संग्रह/बहुलीकरण)	कवक	संक्रमण (%)	बीज अंकुरण
आईसी 310994	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	अल्टर्नेरिया अल्टर्नेटा	30	80
आईसी 340824	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	अ- अल्टर्नेटा	20	80
आईसी 421995	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	अ- अल्टर्नेटा	20	80
आईसी 595461	कोटा, रास्थान	कर्बुलरिया लूनाट	30	90
आईसी 538810	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	फोमा सोर्घिना	30	70
आईसी 143700	अजमेर, राजस्थान	यूजेरियम वर्टिसिल ओइड्स	10	75
आईसी 524214	अजमेर, राजस्थान	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	20	70
आईसी 574530	अजमेर, राजस्थान	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	30	80
आईसी 280067	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	20	70
आईसी 524219	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	30	60
आईसी 538810	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	20	75
आरएसआर/आरएसएम-14	गोलाघाट, असम	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	30	82
आरएसआर/आरएसएम-16	गोलाघाट, असम	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	10	70
आईसी 595456	झालावाड़, राजस्थान	प/यू. वर्टिसिल ओइड्स	20	80
आईसी 564104	अजमेर, राजस्थान	प/यू. सेमिटेक्टम	20	70
आईसी 572776	सोलन, हिमाचल प्रदेश	बाईपोलैरिस टेट्रामेरा	10	90
आईसी 620867	मुज़फ़रपुर, बिहार	माईरोथीसियम वेरूकेरिया	30	80
आईसी 538810	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	मा. वेरूकेरिया	10	90
आईसी 279821	भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड	वर्टिसिलियम अल्बो-एट्रम	20	80



चित्र 1 — धनिया के बीजगाँठ (सीड गाल) के आकार में रूपात्मक भिन्नता; अ) अत्यधिक लम्बाकार, ब) लम्बाकार, स) अंडाकार, द) सामान्य आकार तथा य) प्रो. मैक्रोस्पोरस कवक के बीजाणु (क्लैमाइडोस्पोर्स) की संरचना।

आरएसएम-16) तथा एफ *सेमिटेक्टम* (आईसी 564104) के संक्रमण की भी पहचान हुई। इसके अतिरिक्त बिहार से 2 और बीज-जनित कवकों, *माइरोथीसियम वेरूकेरिया* (आईसी 620867) एवं *वर्टीसिलियम अल्बो-एट्रम* (आईसी 279821) के संक्रमण भी अलग-अलग प्रभेदों में दर्ज किए गए तथा बाद में भवाली, नैनीताल, उत्तराखण्ड से प्राप्त प्रभेद (आईसी 538810) में भी *मा. वेरूकेरिया* की पहचान की गयी। 2 स्रोतों, बिहार एवं उत्तराखण्ड से प्राप्त प्रभेदों में *मा. वेरूकेरिया* के संक्रमण की पुष्टि के साथ-साथ पूर्व के शोध अध्ययनों की समीक्षा से स्पष्ट है कि धनिया इसकी नई परपोषी फसल है।

अनुसंधान शोध साहित्यों/पत्रों की समीक्षा से पता चलता है कि धनिया *प्रो. मैक्रोस्पोर्स* कवक की प्राथमिक परपोषी फसल है। इसके अतिरिक्त विश्वभर से अम्बेलीफेरी कुल की 27, कम्पोज़ीटी कुल की 14 एवं एपिएसी कुल की अनेकों जातियों का वर्णन परपोषी फसल के रूप में मिलता है¹³। इसमें अम्बेलीफेरी कुल की अग्रलिखित जातियाँ, जैसे एगोपोडियम, अम्मी, एन्जेलिका, एन्थ्रीकस, अर्चगेजिका, एथामनटा, कैप्नोडियम, कैरम, काउकाज़िस, चेरोफार्डिजुम, कोरिएनड्रम, फेरुज़ा, हेराक्ज़ीयम, हाइड्रोकोटाईज़, लेज़रपिटिवन, लिगुस्टीकम, मियम, ओननथे, पन्सीसिया, पैरम, प्यूसीडैनम, पिम्पीनुआ, सेसेली, सिलौस, थप्सिया एवं ट्रिनिया, एजीपोडियम पोडाग्रारिया, टोरिलिस जपोनिका, फोएनिकुलम ब्लेयर मिल तथा ट्राईगोनेल्लाफोएन मग्रेसियम, बोएहर्विया डिफुज़ा, एन्थ्रसकस सिलवेस्ट्रिस सम्मिलित हैं। प्रकृति में इस कवक की उत्तर जीविता इन पोषी जातियों पर निर्भर करती है। अतः धनिया की उच्च कोटि के बीज उत्पादन के लिए परपोषी जातियों/प्रजातियों पर अंकुश लगाना अति आवश्यक है।

वर्तमान अध्ययन का परिणाम दर्शाता है कि कितना गाँठ रोगाणु के संक्रमण का प्रभाव सबसे अधिक बीज पर पड़ता है। परिणामस्वरूप संक्रमित बीज के आकार एवं माप में अत्यधिक बदलाव होता है तथा बीज की अंकुरण क्षमता सम्पूर्ण रूप से नष्ट हो जाती है। इसकी पुष्टि खरे एवं सहकर्मी (2017) के अध्ययन से भी होती है जिसमें उन्होंने बताया है कि संक्रमित बीज का अंकुरण नहीं होता है। अन्य शोध अध्ययनों से ऐसा प्रायः देखा गया है कि *प्रो. मैक्रोस्पोर्स* के संक्रमण के कारण धनिया के बीज में अंकुरण न होने के साथ-साथ जैवरासायनिक घटक बिगड़ जाते हैं जोकि मसाले की गुणवत्ता एवं औषधीय मूल्यों की गिरावट के लिए जिम्मेदार होते हैं।

वर्ष 2012, 2013, 2014 एवं 2016 में संरक्षित बीजों से लिये गये क्लेमाइडोस्पोर्स का अंकुरण नगण्य था जबकि 2018 और 2019 में संरक्षित बीजों से लिये गये क्लेमाइडोस्पोर्स में अंकुरण

क्रमशः 15 एवं 30 प्रतिशत दर्ज किया गया। हमारे इस अध्ययन से यह पता चलता है कि संक्रमित बीज में सामान्य तापमान (25-35°C) पर *प्रो. मैक्रोस्पोर्स* की उत्तरजीविता क्लेमाइडोस्पोर के रूप में 2 वर्ष तक रहती है। ऐसे ही एक शोध के द्वारा गुप्ता (1975v) ने कमरे के तापमान में रोगाणु की क्लेमाइडोस्पोर के रूप में उत्तरजीविता पर किये गये अध्ययन में बताया है कि क्लेमाइडोस्पोर की उत्तरजीविता बढ़ती अवधि के साथ घट जाती है और 8 वर्षों के बाद सम्पूर्ण रूप से समाप्त हो जाती है। कुछ अन्य शोध कार्यों से पता चलता है कि विभिन्न प्रजातियों के कवक अति-कम तापमान पर भी दशकों तक जीवित रह सकते हैं जैसे -20°C पर भण्डारित अफीम के बीज में *डेन्ड्रिफिऑन पेनिसिलेटम* की उत्तरजीविता 20 वर्ष तथा -180°C पर भण्डारित सरसों एवं हरी मिर्च के बीज में क्रमशः *अल्टर्नेरिया ब्रेसिसीकोला* की उत्तर जीविता >15 वर्ष तथा *कोलेटोट्राईकम कैप्सिसी* की उत्तरजीविता >10 वर्ष तक दर्ज की गयी है^{1,2&9}। यदि हम ऐसे संक्रमित जननद्रव्यों (बीज) का जीनबैंक में -20°C तापमान पर दीर्घकालीन संरक्षण करते हैं तो ऐसी स्थिति में बीज के साथ-साथ रोगाणु के भी लम्बे समय तक जीवित रहने की पूरी सम्भावना हो सकती है तथा बीज की उच्च गतिशीलता के कारण जननद्रव्य के दूरस्थ आवागमन के फलस्वरूप इन बीज-जनित रोगाणुओं का प्रसार रोग-रहित क्षेत्रों में भी संभव है। लकड़ा (1993) एवं गुप्ता (1975c) द्वारा किये गये शोध दर्शाते हैं कि गाँठ रोग से ग्रसित बीजों में अपचायी एवं अनपचायी शर्करा, प्रोटीन, तेल, नाइट्रोजन, फॉस्फोरस, पोटैशियम, कैल्शियम, मैग्नीशियम, तथा लौह तत्वों की मात्रा में कमी आती है जबकि मैंगनीज तत्व की मात्रा में वृद्धि होती है। अतः इस रोग के संक्रमण के फलस्वरूप परिवर्तित उपापचय तथा रोगजनक के लाखों क्लेमाइडोस्पोर्स की उपस्थिति के कारण पत्तियों, तनों एवं बीज के जैव रासायनिक घटकों में परिवर्तन हो सकता है। अतः संरक्षण से पूर्व स्वास्थ्य परीक्षण के माध्यम से बीज को रोग मुक्त बनाने के लिये रोगग्रसित बीज को निकाल कर नष्ट करना अति आवश्यक है।

धनिया के बीज में औषधीय गुण के कारण इसका उपयोग वायुनाशी, मूत्रवर्धक रोगाणु रोधक, जीवाणुनाशक तथा कवकनाशी के रूप में लाभकारी है। अतः दिन प्रतिदिन इसकी मांग बढ़ती जा रही है तथा आजकल धनिया-युक्त सामग्री वाले उत्पादों जैसे तेल, इत्र, स्वाद और पोषक तत्वों के उद्योगों में धनिया के पत्ते एवं बीज का महत्व कई देशों में बढ़ता जा रहा है। यद्यपि धनिया में पौध प्रजनन के सीमित प्रयासों से कुछ उच्च उपज देने वाली किस्में उपलब्ध हैं²³। परंतु भाकृअप-रापाआसंब्यू, नई दिल्ली, भारत स्थित राष्ट्रीय जीन बैंक में उपस्थित >1100 विविध प्रभेदों में से

उपरोक्त परिभाषित गुणों वाले प्रभेदों की पहचान करने तथा रोगरोधी के साथ-साथ उच्च उपज देने वाली किस्मों का विकास करने की आवश्यकता है।

निष्कर्ष

यह सर्वविदित है कि बीज खेती के साथ-साथ उच्च उपज देने वाली किस्मों को विकसित करने के लिए फसल प्रजनन कार्यक्रमों में उपयोग के लिए सबसे महत्वपूर्ण घटक है। बीज के रूप में जननद्रव्यों के राष्ट्रीय/अंतर्राष्ट्रीय आदान-प्रदान से विश्वभर में कृषि फसलों में वृहद् आनुवंशिक विविधता उपलब्ध होती है। इसलिए धनिया में बीज-जनित तना रोग के संक्रमण, अनुक्रमण और विस्तारण पर हमारा अध्ययन इस रोग के दुष्प्रभावों से होने वाली हानि को कम करने के लिए सहायक सिद्ध हो सकता है। इसके अतिरिक्त तना/बीज गांठ रोग के हॉटस्पॉट (hot-spot) स्थल को चिन्हित कर प्रतिरोधी जननद्रव्यों की पहचान (स्क्रीनिंग) करने तथा इसके विपरीत रोग-मुक्त क्षेत्रों को उच्च गुणवत्ता वाले रोग-रहित बीज का उत्पादन करने में सहायता मिल सकती है। आजकल अधिक उपज देने वाली किस्मों के साथ बिहार राज्य में धनिया के क्षेत्रफल में थोड़ी वृद्धि हो रही है। परंतु, उत्पादन के वर्तमान स्तर को पौध प्रजनन के सतत प्रयासों से और अधिक बढ़ाया जा सकता है। धनिया के बीज में मसाले के साथ-साथ औषधीय गुणों के महत्व को देखते हुए महत्वपूर्ण रोगों, विशेषकर तना गांठ रोग के प्रतिरोध के स्रोतों की पहचान करना एवं वांछित गुणों के साथ एकल या एकाधिक रोगों के प्रतिरोध के लिए नई किस्मों के विकास को प्राथमिकता देने की आवश्यकता है।

आभार

लेखक, निदेशक, भाकृअनुप-रापाआसंब्यू, नई दिल्ली को उनकी मदद के लिए आवश्यक अनुसंधान सुविधाएं प्रदान करने, भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद्, नई दिल्ली को वित्तीय सहायता देने तथा पादप संगरोध संभाग के अन्य वैज्ञानिक और तकनीकी स्टाफ के द्वारा की गयी सहायता के लिए आभारी हैं।

संदर्भ

1. Akhtar J, Singh B, Kandan A, Kumar P, Maurya K A, Chand D, Gupta Veena & Dubey SC, Survival of *Alternaria brassicicola* in cryo-preserved *Brassica* spp. seeds, *Indian Phytopathology*, **70** (2) (2017) 256-257.
2. Akhtar J, Singh B, Kandan A, Chand D, Gupta V & Agarwal P C, Detection of *Dendryphon penicill* atumin opium poppy seeds, *Indian J Pl. Prot*, **44** (1) (2016) 161-162.
3. M N Khare, Tiwari S P & Sharma Y K, Disease problems in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) and fenugreek (*Trigonella foenumgraceum* L.) cultivation and their management for production of quality pathogen free seeds, *International Journal of Seed Spices* **4** (2014) 11-17.
4. Khare M N, Tiwari S P & Sharma Y K, Disease problems in the cultivation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and their management leading to production of high-quality pathogen free seed. *Int. J. Seed Spices*, **7** (2017) 1-7.
5. Gupta R N, Longevity of chlamydospore of coriander stem gall fungus, *Indian Phytopathology*, **26** (1973) 581-582.
6. Gupta R N, Mineral matter content in coriander leaves and fruits as influenced by stem gall disease, *Indian Phytopathology*, **28** (1975) 136-137.
7. Gupta R N & Sinha S, Varietal field trials in the control of stem gall disease of coriander, *Indian Phytopathology* **26** (1973) 337-340.
8. Tripathi A K, R K Chouhan, A M Bataria & S Chouhan. *Indian Phytopathology* **28** (2003) 450-452.
9. Dev U, Akhtar J, Chaudhury R, Kandan A, Chand D, Kumar J, Singh B & Agarwal P C, Survival of *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby in decade-long cryo-preserved chilli seeds. *Seed Research*, **40** (1) (2012) 92-94.
10. Naqvi SAMH, Varietal screening of coriander against stem gall in relation to disease intensity and crop loss. *Indian J. Mycol. Pl. Pathol.* **12** (1985) 270-276.
11. Pandey S, *Coriandrum sativum*, a biological description and its uses in the treatment of various diseases, *Int. J. Pharmacy Life Sci.* **1** (2010) 119-126.
12. Preece T F & Hick A J, An introduction to the Protomycetales: Burenianundata on *Apium nodiflorum* and *Protomyces macrosporus* on *Anthriscus sylvestris*, *Mycologist* **15** (2001) 118-125.
13. Bacigalova K, Mulenko W & Wolczanska A, Novelty of Protomycetaceae in the tatra mts, *Polish Bot. J.* **53** (2008) 169-176.

14. Baumler J A, Beitrage zur Cryptogamen - Flora des Presburger Comitates II. - Vehr. Vereins Natur-Heilk, Pressburg **6** (1890) 62-126.
15. Mathur S B & Kongsdal O, Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. International Seed Testing Association, Basserdorf, Switzerland, (2003) 425.
16. Richardson M J, An annotated list of seed-borne diseases. ISTA, Zurich, Switzerland, (1990) 387.
17. Reddy M S & Kramer C L, A taxonomic revision of the Protomycetales. *Mycotaxon* **3** (1975) 1-50.
18. Lakra B S & Parkash S, A new technique of isolation of *Protomyces macrosporus*, *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* **23** (1993) 320-321.
19. Leharwan M & Meenu G, Stem gall of coriander: a review, *Agricultural Review*, **40** (2) (2019) 121-128.
20. Verma R K, Soni K K, Chourasia S & Singh S, Stem gall of *Boerhaaviadiffusa* caused by *Protomyces macrosporus*: a new host record. *Indian Journal of Tropical Biodiversity* **22** (1) (2014) 91-94.
21. Valverde R A & Templeton G E, Leaf gall of *Torilis japonica* caused by *Protomyces macrosporus* in Arkansas. *Plant Disease* **68** (1984) 716-717.
22. Singh R K, Meena S S, & Vashishta B B, Medicinal properties of seed spices. National Research Centre on Seed Spices (ICAR), Ajmer, (2007) 19-22.
23. Singh H B, Singh A, Tripathi A, Rai S K, Katiyar R S, Johri J K & Singh S P, Evaluation of Indian coriander accessions for resistance against stem gall disease. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **50** (4) (2003) 339-343.