



Effects of Zinc Sulphate Used as an Elicitor on Superoxide Dismutase, Peroxidase and Total Phenolic Compounds of Pepper Calluses

Cemil İşlek^{1,a}, Bengü Türkyılmaz Ünal^{1,b,*}, Sinan Aydın^{2,c}

¹Biotechnology Department, Faculty of Arts and Science, Nigde Omer Halisdemir University, 51240 Nigde, Turkey

²Biology Department, Faculty of Arts and Science, Nigde Omer Halisdemir University, 51240 Nigde, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 30/11/2020 Accepted : 05/12/2020</p> <p><i>Keywords:</i> <i>Capsicum annuum</i> Elicitor POX SOD ZnSO₄</p>	<p>The amount of secondary metabolites can be increased with different elicitor applications in vitro. It has been determined that zinc sulphate significantly increases the amount of capsaicin in the cell culture of red hot pepper. It is important to determine how the metal applied as elicitor will have an effect on plant metabolism. In the study, it was aimed to determine the effects of zinc sulphate (ZnSO₄) applied to the cell suspension cultures of pepper seeds at different concentrations (0.1 M, 0.2 M, 0.4 M) and for periods (24, 48, 72 hours) on the total protein and phenolic substance amounts, and superoxide dismutase-peroxidase enzyme activities of pepper calluses. It was observed that the amount of protein increased, superoxide dismutase and peroxidase enzyme activities decreased, and the total amount of phenolic substance increased especially in 72 hours of treatment where zinc was applied as elicitor. These results show that ZnSO₄ can be used as an abiotic elicitor in plant cell culture media.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(12): 2780-2784, 2020

Elisitör Olarak Kullanılan Çinko Sülfatın Biber Kalluslarının Süperoksit Dismutaz, Peroksidaz ve Toplam Fenolik Bileşikleri Üzerine Etkileri

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 30/11/2020 Kabul : 05/12/2020</p> <p><i>Anahtar Kelimeler:</i> <i>Capsicum annuum</i> Elisitör POX SOD ZnSO₄</p>	<p>In vitro koşullarda farklı elisitör uygulamalarıyla sekonder metabolit miktarı artırılabilir. Kırmızı acı biber hücre kültüründe çinko sülfat'ın kapsaisin miktarını önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Elisitör olarak uygulanan metalin bitki metabolizması üzerinde nasıl bir etki göstereceğinin belirlenmesi önemlidir. Çalışmada biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültürlerine değişik konsantrasyonlarda (0,1 M; 0,2 M ve 0,4 M) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) uygulanan çinko sülfat (ZnSO₄)'in biber kalluslarının toplam protein ve fenolik madde miktarları ve peroksidaz-süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elisitör olarak çinko uyguladığımız gruplarda konsantrasyon artışıyla orantılı şekilde protein miktarının arttığı, süperoksit dismutaz-peroksidaz enzim aktivitelerinin azaldığı, toplam fenolik madde miktarının ise özellikle 72 saat uygulamasında arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar ZnSO₄'ün bitki hücresi kültür ortamında abiyotik bir elisitör olarak kullanılabileceğini göstermektedir.</p>

^a cislek@ohu.edu.tr

^c sinanaydn74@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-6690-2846>

^b <https://orcid.org/0000-0002-2095-3701>

^b bengu35540@gmail.com

^b <http://orcid.org/0000-0003-4003-5200>



Giriş

Kompleks yapıları nedeniyle sentetik olarak üretilemeyen biyolojik kökenli çok sayıda sekonder metabolit, bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla uygun miktarlarda elde edilebilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Birçok bitki türünde sekonder metabolitlerin uyarımı sağlanmıştır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Kullanılan farklı elisitörlerin kültür hücrelerinde fitokimyasal üretimini birkaç kat arttırdığı ifade edilmektedir (Johnson ve ark., 1991; Antognoni ve ark., 2007; Çetin, 2010). Elisitör olarak tanımlanan fiziksel, kimyasal ya da biyolojik etmenlerin sekonder metabolizmada artışa neden olması bunların üretimlerinde bir strateji olarak kullanımlarını gündeme getirmiştir (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa ve ark., 2010).

Capsicum annuum L. (Kırmızı biber) Solanaceae familyasından Anavatanı Güney Amerika olan ve Türkiye’de özellikle Akdeniz bölgesinde ise seracılıkla, Güney Doğu Anadolu bölgesinde tarla tarımıyla üretimi ön planda olan bir bitkidir. Kapsaisin, aromatik bileşikler, kırmızı karotenoidler, bazı vitaminler, yağ ve minerallerce zengin olan kırmızı biber, gıda, kozmetik, zirai mücadele ve ilaç sektörlerinde önemli yere sahiptir (Sener ve Sahin, 2010). Biber bitkisinin içeriğinde %1,5-1,8 olan kapsaisinin antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antitümoral, immünmodülatör analjezik, ülser ve obezite engelleyici etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Maggi ve ark., 1989). Birçok ilacın hammaddesini oluşturan ve tıbbi malzemelerde kullanılan kapsaisinin üretim miktarının artırılması ve stabil hale getirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Kırmızı biber tohumları hücre süspansiyon kültürlerinde, farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde elisitör olarak uygulanan çinko sülfat ($ZnSO_4$)’ın tüm uygulama gruplarında kapsaisin miktarını kontrol grubuna oranla önemli derecede arttırdığı tespit edilmiştir (Islek ve ark., 2015).

Çinko elisitör olmanın yanı sıra karbonhidrat ve protein metabolizmasında önemli fonksiyonlara sahiptir. Membran stabilitesinde etkin, triptofan sentezini düzenleyerek oksin sentezi fonksiyonları gösteren, verim ve kalite üzerine doğrudan etkileri bulunan bir mikro elementtir (Marschner, 1997). Zn triptofan sentezini düzenleyerek oksin etkilerini değiştirir, aynı zamanda süperoksit dismutaz, dehidrojenazlar vb. redoks enzimlerinde kofaktör olarak yer alır (Narendhran, 2016).

Elisitör olarak uygulanan metalin bitki metabolizması üzerinde nasıl bir etki göstereceğinin araştırılması önemlidir. Çalışmada kırmızı biber hücre süspansiyon kültürlerine kapsaisin üretimini arttırmak üzere farklı konsantrasyon ve sürelerde elisitör olarak uygulanan $ZnSO_4$ ’ın biber kalluslarının toplam protein ve fenolik madde miktarları ile süperoksit dismutaz-peroksidaz enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyal

Capsicum annuum L. (Maraş-1) tohumu temini Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma İstasyonu Müdürlüğü’nden sağlanmıştır.

Kültür Ortamı

Ekim öncesi acı kırmızı biber tohumları yüzeysel sterilizasyona (3 dakika %70 etil alkol ve 20 dakika sodyum hipoklorit ile) tabi tutulmuştur. Tohum çimlendirilmesinde bitki büyüme düzenleyici içermeyen, %3 sakkaroz ve %0,7 agar ilave edilen pH 5,7 Murashige ve Skoog (MS) (1962) temel besin ortamı kullanılmıştır (Ellialtıoğlu ve ark., 1998). Fidelerden dört haftalık inkübasyon süresi sonrasında hipokotil eksplantları kesilmiştir. Hipokotil eksplantından kallus eldesinde 1,0 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 0,1 mg/L kinetin, %3 sakkaroz ve %0,7 agar ilave edilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Kallus ve süspansiyon kültüründe aynı besin ortamı kullanılmış, süspansiyon kültüründe ortama agar ilavesi yapılmamıştır. Magenta kaplarında geliştirilen kallus dokuları, aseptik koşullarda 2g/40 mL sıvı besin ortamına aktarılıp, $25 \pm 2^\circ C$ derecedeki çalkalayıcı üzerine konulmuştur (Islek, 2009).

Elisitör Uygulamaları ve Örneklerin Analize Hazırlanması

Dört haftalık süspansiyon kültürleri taze besin ortamına alınıp, 1’er mL $ZnSO_4$ (0,1; 0,2 ve 0,4 M) eklenmiştir. Uygulama sonrası çalkalayıcılar üzerine konulan süspansiyon kültürlerinden 24, 48 ve 72 saat sonra Whatman No: 2 filtre kâğıdı üzerinde buhner hunisi vakum pompası kullanılarak kallus dokuları ayrılmıştır. Kallus dokuları analizlerin yapılacağı zamana kadar $-70^\circ C$ de saklanmıştır.

Biyokimyasal Analizler

Taze kallus örneklerindeki (n=3) toplam protein miktarı Bradford (1976)’un, süperoksit dismutaz (SOD, EC:1.15.1.1) aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971)’in, peroksidaz aktivitesi (POX, EC 1.11.1.7) Herzog ve Fahimi (1973)’nin yöntemlerine göre tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı analizinde ise Folin-Ciocalteu analizi kullanılmıştır (Singleton ve Rossi, 1965; Gayosa ve ark., 2004).

İstatistik Analizi

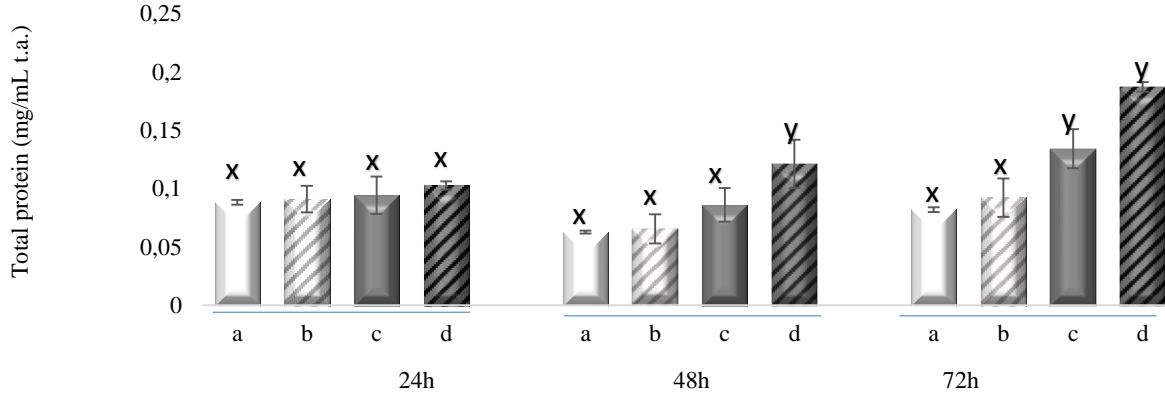
Tüm veriler Tukey test (1954) ile $p < 0,05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Çinko sülfat’ın kırmızı biber kallus toplam protein miktarları üzerindeki etkileri Şekil 1’de verilmiştir.

Toplam protein miktarı üzerine $ZnSO_4$ ’ın etkileri incelendiğinde tüm uygulama sürelerinde kontrole göre konsantrasyon artışına paralel olarak artış saptanmıştır. 0,2 M $ZnSO_4$ 72 saat (%63,78) ve 0,4 M $ZnSO_4$ 48saat (%92,99) ve 72 saat (%128,29) uygulamalarındaki artışlar önemlilik derecesindedir (Şekil 1).

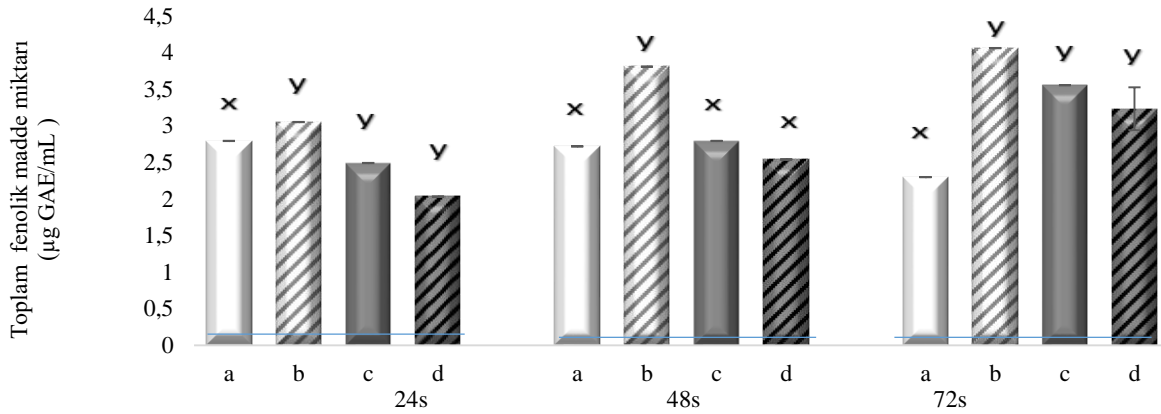
Arpa’da köklendirme ortamına konulan çinko’nun konsantrasyon artışına bağlı olarak apoplastik protein miktarında üç katlık yükselmeye neden olduğu bilinmektedir (Brune ve ark., 1994).



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlar ve sürelerde ZnSO₄ uygulamalarının acı kırmızı biber'in toplam protein miktarı üzerine etkisi (n=3)

a- Kontrol (distile su) b- 0,1 M ZnSO₄ c- 0,2 M ZnSO₄ d- 0,4 M ZnSO₄
y kontrol grubuna (x) göre önemlilik derecesinde farklılığı (P<0,05) göstermektedir (Tukey test)

Figure 1. The effect of ZnSO₄ applications at different concentrations and durations on the total protein amount of hot red pepper (n=3).



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlar ve sürelerde ZnSO₄ uygulamalarının acı kırmızı biber'in toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi (n=3)

a- Kontrol (distile su) b- 0,1 M ZnSO₄ c- 0,2 M ZnSO₄ d- 0,4 M ZnSO₄
y kontrol grubuna (x) göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)

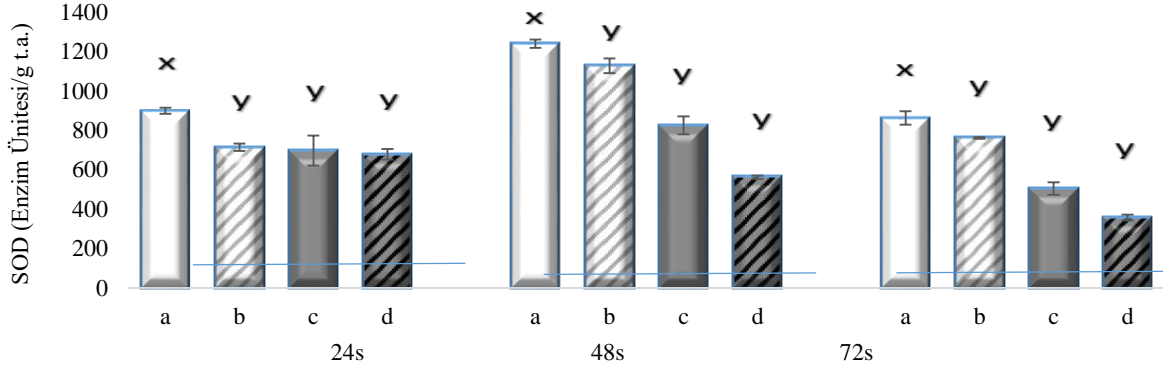
Figure 2. The effect of ZnSO₄ applications at different concentrations and durations on the total phenolic substance of hot red pepper (n = 3)

Toplam fenolik madde miktarı 24 saat uygulamasında 0,1 M ZnSO₄, 48 saat uygulamasında 0,1 M ZnSO₄ ve 0,2 M ZnSO₄ ve 72 saat uygulamasında her üç ZnSO₄ konsantrasyonunda kontrole göre artış göstermiştir. Çalışmamıza benzer şekilde fasulye bitkisinde kadmiyum (Mithöfer ve ark., 2004), ve biber bitkisinde bakır sülfat (Islek ve Turkyılmaz 2015) uygulamaları sonucunda da fenolik madde miktarının kontrol grubuna göre artış gösterdiği, artışın uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlu uygulamalarda daha fazla olduğu bilinmektedir. Kontrolleri ile karşılaştırıldığında, 0,4 M ZnSO₄ uygulamalarında 24 ve 48. saatlerde uygulama konsantrasyonunun artışı toplam fenolik madde miktarında azalmaya neden olurken protein miktarını artırmıştır. Bu uygulama konsantrasyonu için protein ve toplam fenolikler arasındaki bu negatif korelasyon, büyüme için artan protein talebi nedeni ile fenoliklerin oluşumunun azalması ve fenilalanin gibi fenolik sentezinin ana maddesinin, fenolik sentez yolundan ziyade, tercihen protein sentezine akması olabilir.

ZnSO₄ uygulamalarında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi tüm zamanlarda konsantrasyon artışına paralel olarak önemlilik derecesinde (P<0,05) azalmıştır. En fazla azalma %54,66 ile 0,4 M ZnSO₄ 48 s uygulamasında saptanmıştır.

Sonuçlarımızla uyumlu şekilde, *Triticum aestivum* cv. Alpu ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurşun, kadmiyum ve kurşun+kadmiyum süperoksit dismutaz SOD ve CAT enzim aktivitesinde azalmalara sebep olmuştur (Ak ve Yücel, 2011). Ayçiçeği bitkisine demir ve kadmiyum ağır metallerinin uygulanması sonucu da SOD, CAT ve POX enzim aktivitelerinde azalmalar meydana gelmiştir (Gallego ve ark., 1996).

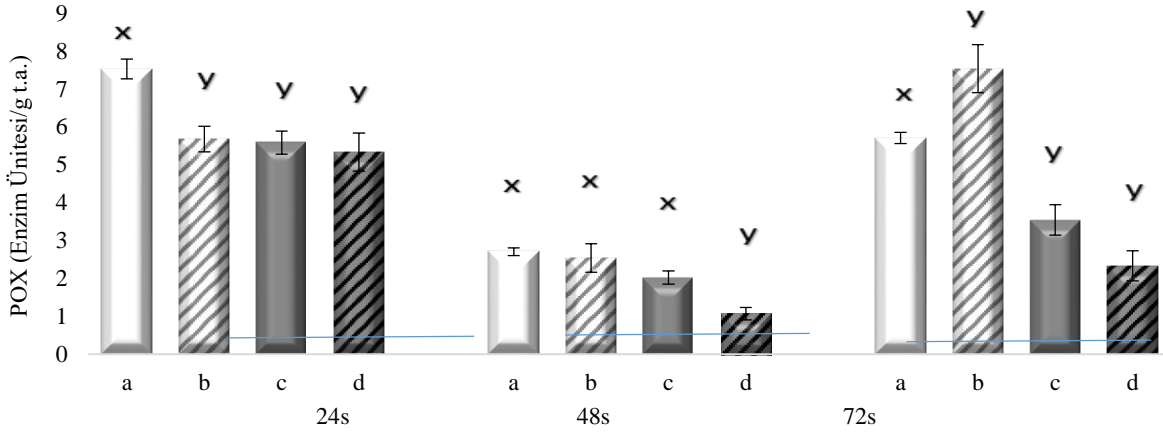
Peroksidaz aktivitesinde 0,4 M ZnSO₄ 72 s dışındaki tüm ZnSO₄ uygulamalarında kontrole oranla azalmalar meydana gelmiştir. 24 ve 72 saat uygulamalarının tüm konsantrasyonlarındaki azalmalar önemlilik derecesindeyken, 48 saat uygulamasındaki azalmalardan yalnız 0,4 M ZnSO₄ uygulamasındaki önemlilik derecesindedir (P<0,05).



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlar ve sürelerde ZnSO₄ uygulamalarının acı kırmızı biber'in SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi (n=3)

a- Kontrol (distile su) b- 0,1 M ZnSO₄ c- 0,2 M ZnSO₄ d- 0,4 M ZnSO₄
y kontrol grubuna (x) göre önemlilik derecesinde farklılığı (P<0,05) göstermektedir (Tukey test)

Figure 3. The effect of ZnSO₄ applications at different concentrations and durations on the SOD enzyme activity of hot red pepper (n = 3)



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlar ve sürelerde ZnSO₄ uygulamalarının acı kırmızı biber'in POX enzim aktivitesi üzerine etkisi (n=3)

a- Kontrol (distile su) b- 0,1 M ZnSO₄ c- 0,2 M ZnSO₄ d- 0,4 M ZnSO₄
y kontrol grubuna (x) göre önemlilik derecesinde farklılığı (P<0,05) göstermektedir (Tukey test)

Figure 4. The effect of ZnSO₄ applications at different concentrations and durations on the POX enzyme activity of hot red pepper (n = 3)

Düzcan ve Arabacı (2010), nane bitkisinde çeşitli ağır metallerin peroksidaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine bakmış ve 1-10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitelerinde azalmalar tespit etmiştir. Yine Nepovím ve ark. (2004)'da turpta ağır metal uygulamalarında peroksidaz aktivitelerinde azalma belirlemişlerdir.

İçinde yer aldığı enzimler incelendiğinde karbonhidrat, protein, fosfat ve RNA oluşumunda görev alan çinkonun bitki metabolizması için çok elzem bir element olduğu söylenebilir. Son yıllarda çinko oksit nanopartiküller (NP'ler)'in kallus üretiminde olumlu etkilere sahip olduğu (Tariq ve ark., 2020), bitki hücre ve doku kültürlerinde sekonder metabolitlerin biyosentezi için yeni bir elisitör olarak kullanıldığı bilinmektedir (Abbasi ve ark., 2019; Asl ve ark., 2019).

Elisitör olarak çinko uyguladığımız gruplarda konsantrasyon artışıyla orantılı şekilde protein miktarının arttığı, stres koşullarında artan süperoksit dismutaz-peroksidaz enzim aktivitelerinin azaldığı görülmüştür. Fenolik bileşikler ise belli bir konsantrasyona kadar artarken bazı konsantrasyonlarda ise azalma eğilimindedir. Artan bu konsantrasyonlarda diğer sekonder metabolizma

ürünlerinin üretimi yönünde metabolizmanın yönlendirilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlar ZnSO₄'ün bitki hücresi kültür ortamında abiyotik bir elisitör olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Hücre kültürlerine çinko sülfat vb. metallerin eklenmesiyle kimyasal içeriğin değiştirilmesi sekonder metabolit üretimini düzenleyen metabolik yolların aydınlatılması olanağı sağlayacaktır. Aynı zamanda endüstriyel üretimlerinde bitki hücrelerinin sekonder metabolit içeriklerinin artırılması imkanı sunacaktır.

Kaynaklar

- Abbasi BH, Zahir A, Ahmad W, Nadeem M, Giglioli-Guivarc'h, N, Hano C. 2019. Biogenic zinc oxide nanoparticles-enhanced biosynthesis of lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 47(1): 1367-1373.
- Ak A, Yücel E. 2011. Ecotoxicological effects of heavy metal stress on antioxidant enzyme levels of *Triticum aestivum* cv. Alpu. Biodicon, 4(3): 19-24.

- Antognoni, F, Zheng SP, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S. 2007. Induction of flavonoid production by UVB radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fiterapia*, 78: 345-352.
- Asl KR, Hosseini B, Sharafi, A, Palazon J. 2019. Influence of nano-zinc oxide on tropane alkaloid production, h6h gene transcription and antioxidant enzyme activity in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots. *Engineering in Life Sciences*, 19(1): 73-89.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide Dismutase: Improved assay and applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287.
- Bradford MM. 1976. A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brune A, Urbach W, Dietz KJ. 1994. Zinc stress induces changes in apoplasmic protein content and polypeptide composition of barley primary leaves. *Journal of Experimental Botany*, 45(9): 1189-1196.
- Çetin ES. 2010. Research on secondary metabolite production by vine cell suspension cultures. PhD Thesis, Süleyman Demirel University, Institute of Science, Isparta, Turkey
- Düzcan B, Arabacı G. 2010. Effects of various metals on peroxidase enzyme activity in Peppermint (*Mentha arvensis*). 24th National Chemistry Congress, Zonguldak, Turkey.
- Ellihtioğlu S, Ustun S, Mehmetoğlu U. 1998. Determining of most suitable medium composition to obtain *in vitro* callus formation of some pepper varieties. II. Kizilirmak International Science Congress, Proceedings of Biology, KKU Faculty of Literature and Sciences, 51-58.
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121(2): 151-159.
- Gayosa C, Pomar F, Merino F, Bernal MA. 2004. Oxidative Metabolism and Phenolic Compounds in *Capsicum annum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon?. *Scientia Horticultures*, 102(1): 1-13.
- Herzog V, Fahimi HD. 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase, using 3,3-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*. 55: 554-562.
- Islek C. 2009. Effect of some stimulants on capsaicin production in free and arrested *Capsicum annum* L. cell suspension cultures, PhD thesis, Ankara University Institute of Science, Ankara.
- Islek C, Turkyilmaz B. 2015. Copper toxicity in *Capsicum annum*: Superoxide dismutase and catalase activities, phenolic and protein amounts of in-vitro-grown plants. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(6): 2441-2445.
- Islek C, Turkyilmaz B, Aydin S. 2015. Effects of Silver Nitrate and Zinc Sulfate on Capsaicin Production in *Capsicum annum* L Cell Suspension Cultures. III. International KOP Regional Development Symposium, 415-419.
- Johnson TS, Ravishankar GA, Venkataraman LV. 1991. Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Food Biotechnology*, 5: 197-205.
- Maggi C, Barbanti G, Santicioli P, Beneforti P, Misuri D, Meli A, Turini D. 1989. Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans. *Journal Urology*, 142(1): 150-154.
- Marschner H. 1997. Mineral nutrition of higher plants. Institute of Plant Nutrition, University of Hohenheim. Academic Press, Inc., Sandiego, CA 9210, Germany. p. 889.
- Mithöfer A, Schulze B, Boland W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS letters*, 566(1-3): 1-5.
- Mulabagal V, Tsay HS. 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International journal of Applied Science and Engineering*, 2(1): 29-48.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Narendhran S, Rajiv P, Sivaraj R. 2016. Influence of zinc oxide nanoparticles on growth of *Sesamum indicum* L. in zinc deficient soil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 365-371.
- Nepovím A, Podlipná R, Soudek P, Schröder P, Vaněk T. 2004. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere*, 57(8): 1007-1015.
- Ramachandra R, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20 (2): 101-153.
- Shilpa K, Selvakkumar C, Senthil AK, Lakshmi, BS. 2010. In vitro root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(1): 105-109.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Sener E, Sahin S. 2010. Pharmacokinetic, toxicological and pharmacological properties of capsaicin. *Hacettepe University Faculty of Pharmacy Journal*, 29(2): 149-163.
- Tariq A, Ilyas S, Naz S. 2020. Nanotechnology and Plant Tissue Culture. In *Nanoagronomy*. Springer, Cham. pp. 23-35
- Tukey JW. 1954. Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans. of New York Acad. Sci.* pp. 88-97.