

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

**HIBRIDAÇÕES CONTROLADAS INTER E  
INTRAESPECÍFICAS PARA O MELHORAMENTO  
GENÉTICO DE PORTA-ENXERTOS DE PEREIRA<sup>1</sup>**

LUCIANE ARANTES DE PAULA<sup>2</sup>, ANDREA DE ROSSI RUFATO<sup>3</sup>  
PAULO RICARDO DIAS DE OLIVEIRA<sup>4</sup>, MAURÍCIO REGININI TALLAMINI<sup>3</sup>

**RESUMO** - O objetivo da pesquisa foi a averiguação da compatibilidade de pólen em pereira com marmeleiro (hibridações interespecíficas) e com cultivares de pereira (hibridações intraespecíficas). Foram usadas: ‘Packham’s Triumph’ (genitor feminino) e ‘William’s’ e ‘Clapp’s Favorite’, ‘Maçã’ e ‘Portugal’ (genitores masculinos). Foi determinada frutificação efetiva (%) no campo aos 40 dias após as hibridações e a germinação *in vivo* por meio de atribuição de notas, seguindo escala de posição do tubo polínico no ovário. Obteve-se maior frutificação efetiva entre as pereiras ‘Packham’s Triumph’ x ‘Clapp’s Favorite’. Nos cruzamentos interespecíficos, a maior frutificação efetiva foi obtida entre ‘Packham’s Triumph’ x ‘Portugal’. Na germinação *in vivo*, o estágio de desenvolvimento do tubo polínico apresentou variações significativas entre as combinações, porém não se obteve penetração de tubo polínico no óvulo. Como se observou frutificação em todos os cruzamentos, existe possível compatibilidade entre os genótipos estudados. Os resultados indicam que as cultivares doadoras de pólen da espécie *P. communis* são compatíveis com ‘Packham’s Triumph’. Outros estudos devem ser realizados com pólen de marmeleiro a fim de confirmar essa compatibilidade.

**Termos de indexação:** *Pyrus communis*, *Cydonia oblonga*, germinação *in vivo*, hibridação interespecífica.

**HYBRIDIZATIONS INTER AND INTRAESPECIFIC CONTROLLED  
FOR BREEDING OF PEAR ROOTSTOCKS**

**ABSTRACT** - The objective of the study was to characterize the pollen compatibility of pear with quince (interspecific crosses) and between species of pear. It was used: ‘Packham’s Triumph’ (female parental) and ‘William’s’ and ‘Clapp’s Favorite’, ‘Maçã’ and ‘Portugal’ (male parental). It was determined fruit set (%) in the field at 40 days after crosses and the *in vivo* germination. It was obtained a higher fruit set in the crossing ‘Packham’s Triumph’ x ‘Clapp’s Favorite’. In interspecific crosses, the highest fruit set was obtained with ‘Packham’s Triumph’ x ‘Portugal’. In *in vivo* germination, the developmental stage of the pollen tube showed significant variations between the combinations, but the pollen tube did not penetrate the embryo sac. As it was observed fructification in all crossing is possible the existence of compatibility among genotypes. The results indicated that the pollen donor cultivars of the species *P. communis* are compatible with ‘Packham’s Triumph’. Other studies should be conducted with the pollen of quince to confirm this compatibility.

**Index terms:** *Pyrus communis*, *Cydonia oblonga*, *in vivo* germination, hybridization.

<sup>1</sup>(Trabalho 138-14). Recebido em: 28-04-2014. Aceito para publicação em: 02-12-2014.

<sup>2</sup>Professora na Universidade de Caxias do Sul – UCS/CAMVA, Av. Dom Frei Cândido Maria Bampi, 2800, Cep: 95.200-000, Vacaria/RS. Email: lucianedepaula@yahoo.com.br (autor para correspondência)

<sup>3</sup>Embrapa Uva e Vinho – EFCT, BR 285, km 4, Caixa Postal: 1513, Cep: 95200-000. Vacaria-RS. Email: andrea.rufato@embrapa.br, mauricio\_rt@hotmail.com;

<sup>4</sup>Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130, Cep: 95700-000 Bento Gonçalves, RS. Email: paulo.oliveira@embrapa.br

A cultura da pereira é uma alternativa para aumentar a diversificação do sistema produtivo de frutas na região Sul do Brasil. Dentre as frutas de clima temperado, a pera é a terceira mais consumida no Brasil, sendo superada somente pela maçã e pelo pêssego (TOMAZ et al., 2009).

A pereira, caracterizada como cultura de produção reduzida no Brasil, com 16,4 mil toneladas em 2010 (IBGE, 2012), em na sua maior parte, tem apresentado diversos problemas, dentre os quais a falta de estudos sobre porta-enxertos. Atualmente, as poucas áreas implantadas com pereira no Brasil são com porta-enxertos de *Pyrus callieriana*, que proporcionam às plantas alto vigor e baixa produção, além de outros problemas, os quais são relatados por Trevisan et al. (2005), como a falta de cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas e a deficiência de tecnologias de manejo, além do constante abortamento de gemas, cujas causas são desconhecidas, que pode ser de ordem climática, nutricional ou fitossanitária, conforme hipóteses já apontadas.

Os porta-enxertos originados de pereira comum (*P. communis*) são considerados mais resistentes ao frio e menos suscetíveis à clorose fêrrica, enquanto os de marmeleiro têm menor vigor, maior precocidade, melhor tamanho de fruto e menor suscetibilidade ao declínio da planta. Entretanto, as generalizações têm pouco valor, já que variações podem ocorrer em ambas as espécies (WERTHEIM, 2002).

O emprego do marmeleiro (*Cydonia oblonga*) como porta-enxerto tem contribuído de modo determinante no desenvolvimento da pericultura moderna na Itália. O marmeleiro é, atualmente, o porta-enxerto mais usado para pereira na Itália (cerca de 90% dos plantios) ou na Europa (MUSACCHI, 2006), enquanto a pereira (seedling ou clonal) tem emprego reduzido e limitado à cultivar William's (QUARTIERI et al., 2007). A utilização do marmeleiro (*Cydonia oblonga*) como porta-enxerto é promissora na obtenção de plantas de pequeno porte, devido à sua característica ananizante e também à rápida frutificação, além de proporcionar uniformidade aos pomares (TOMAZ et al., 2009). Visando ao melhoramento genético de pereira, a maioria dos estudos realizada objetiva selecionar e/ou criar cultivares-copa adaptadas às condições predominantes nas regiões de clima temperado (NAKASU et al., 2007), enquanto, no caso de porta-enxertos, os estudos desenvolvidos para as condições do Brasil são bastante incipientes (TOMAZ et al., 2009). Nos programas de melhoramento genético de porta-enxertos de pereira, a redução do porte da

planta e a frutificação precoce são objetivos primários (LORETI, 2003). No Brasil, a pesquisa trabalha para desenvolver materiais adaptados para copa e porta-enxertos às condições edafoclimáticas das regiões produtoras (OLIVEIRA et al., 2011), além de alto grau de compatibilidade entre ambos.

Entre os métodos de melhoramento utilizados para obtenção de novos genótipos de porta-enxertos, está a hibridação, com a principal finalidade de obter populações segregantes, a partir das quais indivíduos superiores podem ser selecionados. Hibridações interespecíficas são realizadas com objetivo de introduzir genes ausentes na espécie de interesse ou de agrupar genótipos de espécies diferentes, visando à criação de novos tipos (BRUCKNER, 2008), sendo de interesse a transferência de genes, por exemplo, do nanismo e precocidade de produção para genótipos de *P. communis*, que estão presentes no marmeleiro. Para tal, são necessários, inicialmente, estudos de compatibilidade de polens entre genótipos de *P. communis* e de pólen de *C. oblonga* com genótipos de pereiras. A compatibilidade é importante mecanismo reprodutivo presente na maioria das angiospermas que contribui para manter e aumentar a diversidade dentro das espécies (ZHANG et al., 2009). No entanto, a compatibilidade é uma das principais barreiras para programas de melhoramento genético, que buscam a obtenção de novas cultivares para o manejo reprodutivo dos pomares (BANDEIRA et al., 2011).

Avaliações de compatibilidade requerem polinizações controladas a campo, combinadas com análises laboratoriais, para determinar a viabilidade dos grãos de pólen (LEITE; SOUZA, 2003) através de seu crescimento na superfície estigmática, estilete e saco embrionário. Além disso, técnicas de microscopia permitem analisar características associadas à germinação do tubo polínico e sua taxa de crescimento, sendo assim possível analisar hibridações efetivas em programas de melhoramento genético, bem como estudar características referentes a compatibilidades e/ou incompatibilidades existentes (BANDEIRA et al., 2011).

Estudos de compatibilidade já foram realizados em outras fruteiras da família *Rosaceae*, a exemplo da ameixeira-japonesa (*Prunus salicina*), para se detectar compatibilidade entre diferentes genótipos (BANDEIRA et al., 2011; ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2010).

Devido à importância do porta-enxerto na cultura da pereira, são necessários estudos que verifiquem o grau de compatibilidade de polens para posteriores cruzamentos intra e interespecíficos para obtenção de novos materiais adaptados às condições

peculiares de cada local.

O trabalho teve como objetivo verificar o grau de compatibilidade de pólen entre cultivares de *P. communis* e *C. oblonga* através de cruzamentos interespecíficos, e entre cultivares de *P. communis* (cruzamentos intraespecíficos), de interesse no melhoramento genético.

Para a caracterização da compatibilidade entre genótipos, foram realizadas hibridações controladas para avaliar a frutificação efetiva a campo e a germinação *in vivo* em laboratório através do crescimento do tubo polínico posterior à hibridação controlada. Foi utilizada a cultivar de pereira Packham's Triumph (*P. communis*) como genitor feminino e duas pereiras: 'William's' e 'Clapp's Favorite', e dois marmeleiros (*C. oblonga*): 'Maçã' e 'Portugal' como genitores masculinos, totalizando quatro combinações de hibridações controladas, sendo estes realizados em um pomar comercial localizado no município de Vacaria-RS.

As hibridações controladas foram realizadas utilizando flores no estádio de balão, totalizando 300 polinizações para cada combinação. Após a hibridação manual, os ramos foram mantidos ensacados com tecido não tecido (TNT agrícola) branco por 40 dias, e então, determinada a percentagem de frutificação efetiva através da relação entre o número de flores polinizadas e o número de frutos formados.

A avaliação da germinação *in vivo* foi realizada no laboratório da Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, localizada em Vacaria-RS, pertencente à Embrapa Uva e Vinho, onde se coletaram quatro ramos de 'Packham's Triumph', com dez flores cada, no estádio de balão. Após, os ramos foram levados ao laboratório e acondicionados em recipientes com água e mantidos em temperatura ambiente (18-22°C). As flores foram emasculadas e polinizadas manualmente, de acordo com cada combinação dos cruzamentos realizados no campo. Cinco dias após a polinização, foram coletados os pistilos e colocados em frascos contendo solução fixadora FAA, formol, ácido acético e álcool etílico na proporção de 1:1:8, respectivamente, e armazenados em geladeira a 4°C, e as lâminas posteriormente preparadas conforme metodologia descrita por Wilson e Brown (1957) e analisadas em microscópio óptico Nikon E200, com objetiva 10x. Foram observadas 40 lâminas, (um ovário por lâmina) para cada hibridação efetuada. Avaliou-se o grau de desenvolvimento do tubo polínico por meio da atribuição de notas de 1 a 5, adaptado da classificação feita por Franken et al. (1988), conforme mostrado na Tabela 1.

Para a germinação *in vivo*, o delineamento

experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 10 flores cada. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, através do programa WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

A hibridação controlada entre 'Packham's Triumph' x 'Clapp's Favorite' resultou em 55% de frutificação efetiva, sendo esta a maior percentagem observada entre as combinações avaliadas. Já nos cruzamentos interespecíficos, a maior frutificação efetiva obtida foi de 12,7% entre 'Packham's Triumph' x 'Portugal' (Tabela 2). As maiores percentagens de frutificação efetiva, nos cruzamentos intraespecíficos, podem ser atribuídas ao fato de as cultivares pertencerem à mesma espécie e possuírem compatibilidade alélica.

Na germinação *in vivo*, houve diferença significativa para o estágio de desenvolvimento do tubo polínico, em cada combinação de cruzamento. Não se obteve penetração de tubo polínico no óvulo (nota 5) em nenhuma das combinações avaliadas (Figuras 1 e 2).

Para todas as cultivares empregadas como genitores masculinos, independentemente do cruzamento intra ou interespecífico, a maior incidência dos tubos polínicos foi no interior do pistilo (nota 2), e a menor incidência (10,3%) foi detectada no interior do ovário (nota 4) (Figuras 1 e 2). Como houve frutificação efetiva de 21,7% no cruzamento 'Packham's Triumph' x 'William's', ficou confirmado que houve compatibilidade entre os polens destas cultivares, já que 'William's' é indicada como polinizadora de 'Packham's Triumph' (NAKASU et al., 2007).

As cultivares Clapp's Favorite de pera (Figura 1), e Maçã e Portugal de marmelo (Figura 2) tiveram menores incidências (6,25%) de tubos polínicos próximo ao ovário (nota 3), com 6,25%, 4,16% e 26,19%, respectivamente, não sendo observada a chegada destes até o interior do óvulo (nota 5). Apesar disso, a combinação Packham's Triumph x Clapp's Favorite resultou em maior frutificação efetiva (55%), quando comparada aos demais cruzamentos (Tabela 2), indicando compatibilidade entre ambas.

O fato de não ter sido observada a fecundação do óvulo na germinação *in vivo*, entre as hibridações realizadas, pode estar associado com fatores ambientais, como, por exemplo, temperaturas baixas em relação à considerada como ótima (20°C) (LEITE; SOUZA, 2003), necessitando de mais tempo para que o tubo polínico penetre o óvulo. O mesmo foi observado por Bandeira et al. (2011), em

cruzamentos entre cultivares de ameixa-japonesa (*Prunus salicina*), onde verificaram que seria necessário maior tempo para que os tubos polínicos chegassem até o saco embrionário e fecundasse a oosfera. Além dos fatores ambientais, a nutrição também pode influenciar no sucesso da frutificação efetiva e na germinação *in vivo*, onde os nutrientes cálcio e boro são essenciais. Assim, o fornecimento inadequado desses nutrientes pode contribuir para a redução de produtividade, devido à menor fixação dos frutos (LAVIOLA; DIAS, 2008).

Nos cruzamentos interespecíficos, quando o marmeleiro ‘Maçã’ foi usado como genitor masculino, somente uma pequena porcentagem (4,1%) de tubos polínicos foi observada próximo ao ovário (Figura 2). Observou-se ainda que houve pequena taxa de frutificação efetiva (1,4%) (Tabela 2), indicando também possível compatibilidade. No caso do marmeleiro ‘Portugal’, 26,1% dos tubos polínicos estavam próximos ao ovário (nota 3), porém a taxa de frutificação efetiva foi maior que no primeiro cruzamento interespecífico (Tabela 2), indicando possível compatibilidade.

A baixa frutificação efetiva ocorrida nos cruzamentos interespecíficos pode estar relacionada ao fato de pertencerem a gêneros diferentes, embora tenham o mesmo número cromossômico  $2n=34$  (WATKINS, 1979) ou até mesmo a fatores ambientais (BARBOSA, 2006). O estresse por condições meteorológicas desfavoráveis pode reduzir


a viabilidade do grão de pólen, bem como a produção de sacos embrionários viáveis, o que resulta na falta de sincronia no processo de fecundação e na redução da frutificação (BANDEIRA et al., 2011).

Na pereira, a formação dos frutos pode ocorrer por partenocarpia, ou seja, sem que ocorra polinização e/ou fecundação, sendo desenvolvidas as paredes do ovário, originando peras sem sementes ou com sementes inviáveis (LUZ et al., 2012). Portanto, apesar de os cruzamentos interespecíficos de ‘Packham’s Triumph’ com as cultivares de marmeleiro ‘Maçã’ e ‘Portugal’ indicarem provável compatibilidade, por se tratar de estudo inicial, mais pesquisas são necessárias para a busca de informações a respeito do grau de compatibilidade e da formação de sementes viáveis

Os resultados indicaram que as cultivares de pera (*P. communis*) doadoras de pólen são compatíveis com a pereira ‘Packham’s Triumph’, podendo ser utilizadas nos programas de melhoramento genético. Outros estudos devem ser realizados com os polens de marmelo (*C. oblonga*), a fim de se estabelecer o gradiente de compatibilidade com cultivares de pereira.

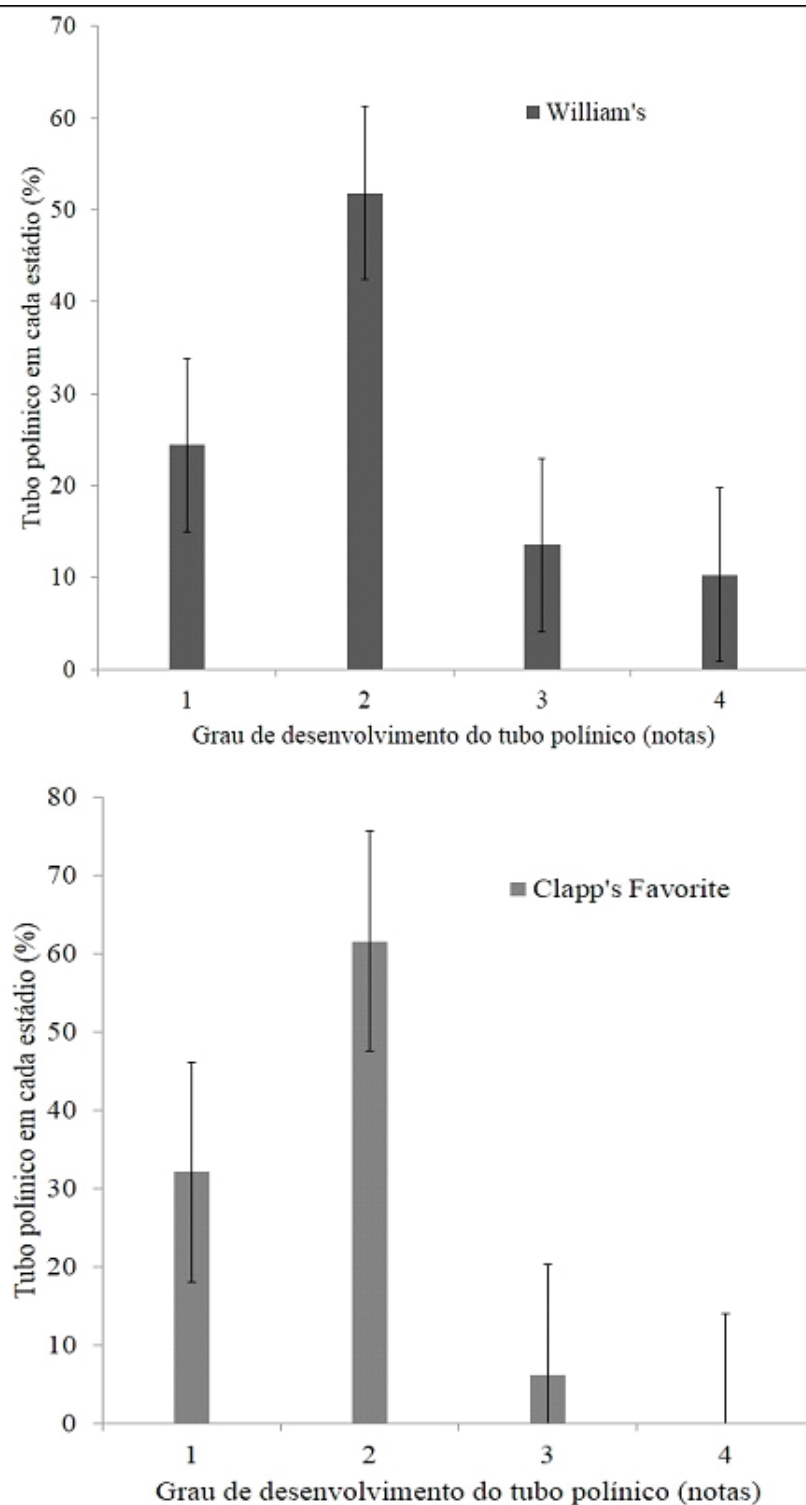
Os autores agradecem o CNPq, pela bolsa de pós-doutorado (PNPD) da primeira autora, pela bolsa de produtividade em pesquisa da segunda autora, pela bolsa de iniciação científica do quarto autor e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

**TABELA 1-** Escala de crescimento do tubo polínico no pistilo da cultivar Packham’s Triumph (*Pyrus communis*), após polinização *in vivo*.

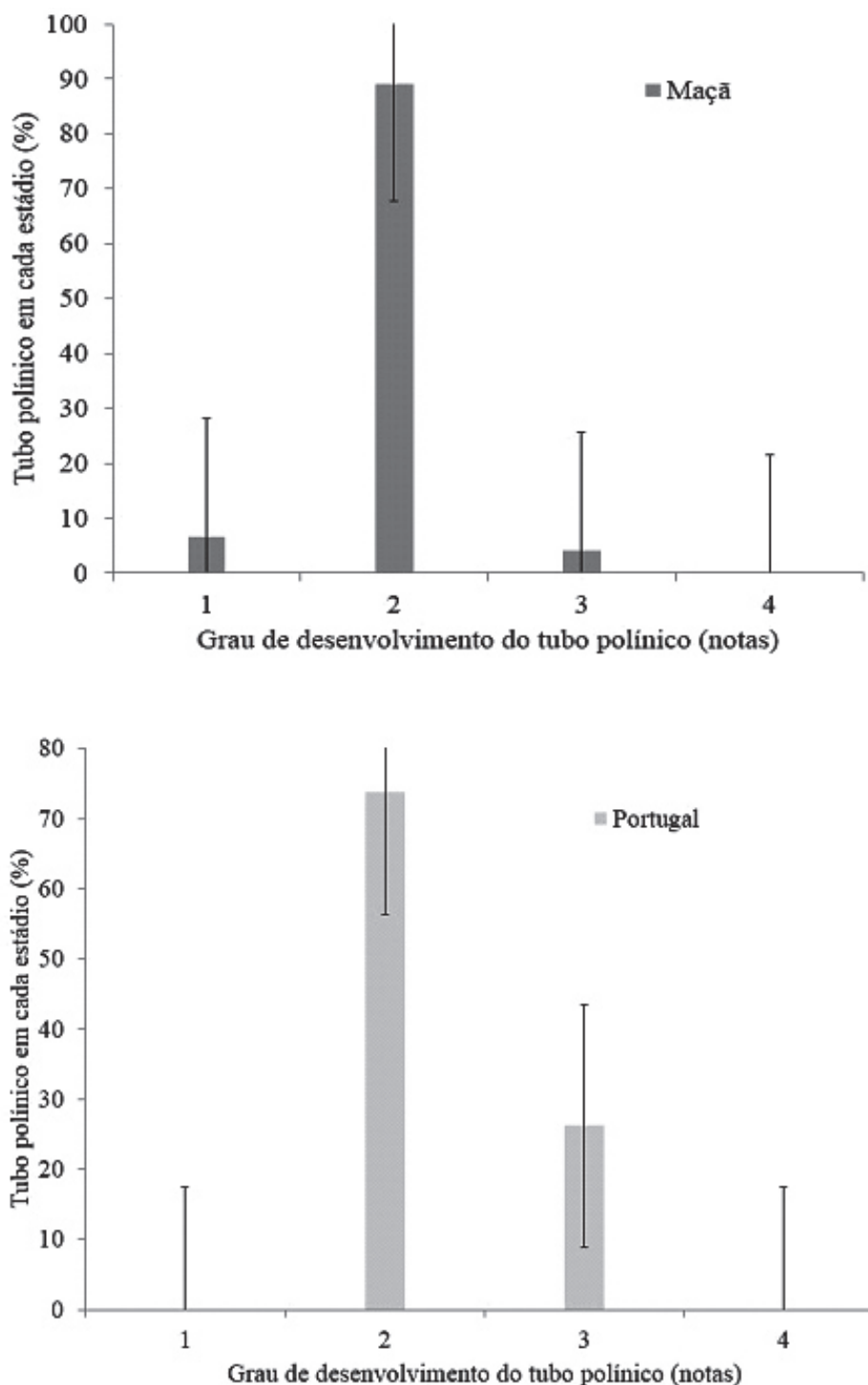
Nota		Desenvolvimento do tubo polínico
1		Grãos de pólen viáveis no estigma
2		Tubo polínico no interior do pistilo
3		Tubo polínico próximo ao ovário
4		Tubo polínico no interior do ovário
5		Tubo polínico no interior do óvulo

**TABELA 2-** Percentagem de frutificação efetiva dos cruzamentos intra e interespecíficos avaliados aos 40 dias. Vacaria-RS, 2011.

Cruzamentos	Frutificação efetiva (%)
Packham’s Triumph x William’s	21,7
Packham’s Triumph x Clapp’s Favorite	55,0
Packham’s Triumph x Maçã	1,4
Packham’s Triumph x Portugal	12,7



**FIGURA 1-** Percentagem de incidência de tubo polínico cv. William's e Clapp's Favorite, em cada nota do percurso estigma-saco embrionário de pereira cv. Packham's Triumph, de acordo com as polinizações controladas *in vivo*. As barras representam o erro-padrão da média. Vacaria – RS, 2011. Notas: 1=grãos de pólen viáveis no estigma; 2=tubo polínico no interior do pistilo; 3=tubo polínico próximo ao ovário; 4=tubo polínico no interior do ovário.



**FIGURA 2-** Percentagem de incidência de tubo polínico cv. Maçã e Portugal, em cada nota do percurso estigma-saco embrionário de pereira cv. Packham's Triumph, de acordo com as polinizações controladas *in vivo*. As barras representam o erro-padrão da média. Vacaria – RS, 2011. Notas: 1=grãos de pólen viáveis no estigma; 2=tubo polínico no interior do pistilo; 3=tubo polínico próximo ao ovário; 4=tubo polínico no interior do ovário.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE JÚNIOR, C.L.; DENARDI, F.; DANTAS, A.C.M.; NODARI, R.O. Desenvolvimento de tubos polínicos em cruzamentos entre cultivares brasileiras de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1324-1327, 2010.
- BANDEIRA, J.M.; THUROW, L.B.; PETERS, J.A.; RASEIRA, M.C.B.; BIANCHI, V.J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira-japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 860-867, 2011.
- BARBOSA, W. **Gulfbreeze**: nova opção de ameixa para o Estado de São Paulo. 2006. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/Artigos/Ameixa/Ameixa.htm>>. Acesso em: 14 jun. 2012.
- BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa: UFV, 2008. 200p.
- FRANKEN, J.; CUSTERS, J.B.M.; BINO, R.J. Effects of temperature on pollen tube growth and fruit set in reciprocal crosses between *C. sativus* and *C. metuliferus*. **Plant Breeding**, Singapore, v. 100, n. 2, p. 150-153, 1988.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/home/](http://www.ibge.gov.br/home/)>. Acesso em: 30 de jun. 2013.
- LAVIOLA, B.G.; DIAS, L.A.S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.32, n. 5, p.1.969-1.975, 2008.
- LEITE, D.L.; SOUZA, C.M. Polinização. In: CENTELLAS QUEZADA, A.; NALSU, B.H.; HERTER, F.G. (Ed.). **Pera**: produção. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 23-28. (Frutas do Brasil, 46)
- LORETI, F. Sottoprogetto miglioramento genetico dei portinnesti. In: MACFRUT, 2003, Cesena. **Atti...**
- LUZ, A.R.; RUFATO, A.D.R.; MARCON FILHO, J.L.; MUNIZ, J.N. Floração e polinização. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A (Ed.). **A cultura da pereira**. Florianópolis: Dioesc, 2012. cap. 3, p.38-53.
- MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat**. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2003.
- MUSACCHI, S.; QUARTIERI, M.; TAGHAVINI, M. Pear (*P. communis*) and quince (*C. oblonga*) roots exhibit different ability to prevent sodium and chloride uptake when irrigated with saline water. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 268-275, 2006.
- NAKASU, B.H.; HERTER, F.G.; CAMELATTO, D.; REISSER JÚNIOR, C.; FORTES, J.F.; CASTRO, L.A.S.; FREIRE, C.J.S.; BASSO, C.; FAORO, I.D.; PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; PEREIRA, J.F.M.; CANTILLANO, R.F.F.; VERÍSSIMO, V. **Coleção plantar**: a cultura da pera. Brasília: Embrapa, 2007. v.1, 58 p.
- OLIVEIRA, P.R.D.; RITSCHER, P.S.; RUFATO, A.D.R.; FIORAVANCO, J.C.; FAORO, I.D.; LEITE, G.B.; DUTRA, L.F.; MAYER, N.A.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. The Brazilian pear breeding program. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.909, p.145-151, 2011.
- QUARTIERI, M.; TAGLIAVINI, M.; MARANGONI, B.; BASSI D.; GIANNINI, M.; PREVIATI, A.; SCHIAVON, L. Portinnesti clonali di pera, eredi ideali del cotogno. **L'Informatore Agrario**, Verona, v.19, p.42-48, 2007.
- TOMAZ, Z.F.P.; RODRIGUES, A.C.; VERÍSSIMO, V.; MARAFON, A.C.; HERTER, F.G.; RUFATO, A.D.R. Compatibilidade de enxertia de cultivares de marmeleiros com pereiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.4, p.1211-1217, 2009.
- TREVISAN, R.; CHAVARRIA, G.; HERTER, F.G.; GONÇALVES, E.D.; RODRIGUES, A.C.; VERÍSSIMO, V.; PEREIRA, I.S. Raleio de gemas florais para a redução do abortamento em pereira (*Pyrus pyrifolia*) na região de Pelotas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n. 3, p. 504-506, 2005.
- WATKINS, R. Apple and pear. In: SIMMONDS, N.W. **Evolution in crop plants**. 2<sup>nd</sup> ed. Bristol: J.W. Arrowsmith, 1979. p.247-250.
- WERTHEIM, S.J. Rootstocks for european pear: A review. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.596, p. 299-309, 2002.
- WILSON, J.A.; BROWN, S.O. Differential staining of pollen tubes in grass pistils. **Agronomy Journal**, Madison, v. 49, n. 4, p. 220-222, 1957.
- ZHANG, Y.; ZHAO, Z.; XUE, Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.60, p.21-42, 2009.