维普资讯 http://www.cqvip.com

第36卷 第3期
2008年3月
西北农林科技大学学报(自然科学版)
Journal of Northwest A & F University(Nat. Sci. Ed.)
Vol. 36 No. 3
Mar. 2008

箭杆杨组织培养再生体系的建立

陶延珍[1],李 枫[2],李 毅[2]
(1 兰州市城关区皋兰山造林站,甘肃 兰州 730000;2 甘肃农业大学 林学院,甘肃 兰州 730070)

[摘 要] 【目的】探讨常温下适宜箭杆杨试管苗腋芽增殖、生根的最佳培养条件。【方法】以MS培养为基本培养基,附加不同浓度的吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)以及6-氨苄基腺嘌呤(6-BA)组成试验培养基,对箭杆杨组织进行培养,观察其生根情况和愈伤组织诱导情况。【结果】箭杆杨脱分化最佳培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA,该条件下的愈伤组织诱导率为90%;不定芽分化诱导培养基为:1/2MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA,该条件下的诱导分化率为67.1%;芽增殖培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1mg/L IBA,该条件下的增殖数为5.8;最佳生根培养基为:1/2MS+1.0 mg/L IBA,该条件下的生根率为81.3%。【结论】建立了箭杆杨组织培养再生体系,为其种质资源的试管保存奠定了基础。

[关键词] 箭杆杨;组织培养;愈伤组织;分化;生根
[中图分类号] S792.119 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2008)03-0203-05

Establishment of tissue culture regeneration system of *populus nigra* var *thevestina*

TAO Yan-zheng[1], LI Feng[2], LI Yi[2]
(1 *Gaolan Mountain Afforestation Station of Chengguan District, Lanzhou, Gansu* 730000, *China*;
2 *College of Forestry Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu* 730070, *China*)

Abstract:【Objective】The study is to Explore the best culture condition of axillary buds mutiplication and rooting in *Populus nigra* var *thevestina* tissue culture under normal temperature.【Method】With the basic MS medium added with different concentrations of IBA, NAA and 6-BA, the rooting and callus induction were observed.【Result】The best medium for dedifferentiation was MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L, the frequency of callus induction was 90%; The ideal medium for induction and differentiation of the callus was 1/2MS+IBA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, induction and differentiation rate was 67.1%; The medium for shoot proliferation was MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1mg/L, proliferation number was 5.8; The optimum medium for producing roots was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L with 81.3% rooting ratio.【Conclusion】The tissue culture regeneration system was established, which laid a basis for the storage invitro of germplasm resources.

Key words: *Populus nigra* var *thevestina*; tissue culture; callus; differentiation; rooting

箭杆杨(*Populus nigraL*. Var. *thevestina*)是我国西北地区主要农田防护林及"四旁"绿化树种[1]。近年来,由于环境恶化和人为破坏加剧,许多优良种质资源日趋减少。同时,农田防护林及"四旁"绿化林现已到达采伐期,若不及时采取保护措施,箭杆杨优良种质资源将遭受严重破坏,甚至消亡。

在传统的林业生产中,种质资源主要依靠田间定植得以保存,需占用大量的土地。这种保存方法

[收稿日期] 2007-03-19
[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(YS021-A21_001))
[作者简介] 陶延珍(1968-),女,甘肃兰州人,工程师,主要从事抗旱造林技术研究。E-mail:susp008@163.com.
[通讯作者] 李 毅(1962-),男,湖北汉川人,教授,博士生导师,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:liyi@gsau.edu.cn.

维普资讯 http://www.cqvip.com

既浪费土地资源,又需大量的人力去种植与管护。利用生物技术对树木的组织或细胞进行培养和保存,不仅保存迅速、保存量大、可在短期内获得大量无性系后代,而且保存所占空间很小,可节省土地资源、降低保存成本。利用组织培养方法进行种质资源离体保存已有许多报道。张力平等[2]对葡萄种质资源保存的研究结果表明,在培养基中加入适量多效唑可以有效延长继代周期,减少保存成本。王大元等[3]在柑桔种质资源保存的研究中发现,组织培养方法可以大大减少保存所占空间、保存手续简便、保存的培养物有可能大量再生繁殖。李毅等[4]对毛白杨的研究表明,MS+0.5 mg/L 6-BA +0.1 mg/L IAA 对愈伤组织诱导率可达90%。但至今尚未见用组织培养方法保存箭杆杨种质资源的报道。为此,本试验对箭杆杨进行了组织培养研究,旨在探索常温下适宜箭杆杨试管苗腋芽增殖、生根的最佳培养条件,为箭杆杨种质资源的保存和快速繁殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 箭杆杨枝条 2005-03从甘肃张掖、武威选取箭杆杨优良单株,采集休眠枝条作为研究材料,带回实验室进行水培催芽。

1.1.2 试 剂 吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)均为天津市精细化工研究所生产;6-氨苄基腺嘌呤(6-BA)为国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 箭杆杨外植体的获取

剪取箭杆杨1年生带芽茎段,每段保留2个侧芽,用洗衣粉液漂洗30 min,再用体积分数75%酒精浸泡10 s、1 g/L HgCl溶液浸泡10 min,无菌蒸馏水冲洗3~4次,置于无激素MS培养基上培养。8 d后叶片展开,将叶片切成0.5 cm×0.5 cm的小块,接种于不同激素配比的MS脱分化培养基中诱导愈伤组织。

1.3 箭杆杨愈伤组织诱导培养基的筛选

培养基是影响林木组织培养成败的最主要因素,只有在适宜的生长、分化培养基中,植物才能表现出细胞的全能性,获得较高的分化率,从而实现快速繁殖。在实际应用中,往往根据植物种类及其部位选择不同的培养基[4]。本研究以MS为基本培养基,IBA质量浓度设0.1,0.5和1.0 mg/L 3个水平,6-BA质量浓度设置为0.5,1.0和1.5 mg/L 3个水平,在培养室温度(25±2)℃、光照14 h和光强1 500~2 000 lx条件下,进行2因素3水平正交试验。培养基中蔗糖质量浓度为20 g/L,琼脂质量浓度为4 g/L。根据愈伤组织诱导率和生长速度,筛选适宜的箭杆杨愈伤组织诱导培养基。

1.4 箭杆杨愈伤组织再分化培养与芽增殖培养基的筛选

以MS为基本培养基,附加不同种类生长素与6-BA组成5种培养基:MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA;MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA;MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA;MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA和1/2MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA。在上述5种培养基中接种箭杆杨愈伤组织,进行再分化研究。

从带芽茎段上剪取无菌腋芽,分别接种MS+0.5 mg/L 6-BA、MS+1.0 mg/L 6-BA、MS+0.5 mg/L 6-BA +0.1 mg/L IBA和MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA 4种培养基,进行培养,30 d后检测腋芽增殖数及生长发育情况。

1.5 箭杆杨生根培养基的筛选

分别以MS和1/2 MS为基本培养基,向其中添加IBA和NAA构成生根培养基,IBA和NAA 2种生长素的添加量均设0.5,1.0和1.2 mg/L 3个水平,培养基中蔗糖、琼脂浓度同1.3节。以生长20~30 d的箭杆杨试管苗为继代材料,剪取带一个叶片、长度3~4 cm的茎段,转接到上述生根培养基中,进行生根试验,培养条件同1.3节。

上述试验各处理均重复3次,每次20瓶。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对箭杆杨愈伤组织诱导的影响

外源激素6-BA与IBA配比,对箭杆杨愈伤组织的诱导有较大影响。由表1可知,6-BA浓度对愈伤组织的产生起关键作用,0.5 mg/L 6-BA与不同质量浓度的IBA配比后,对箭杆杨愈伤组织的诱导率为31.2%~35.6%,且以小团块愈伤组织(直径≤2 mm)居多,占84%以上,其中以MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA最为明显,达到88.6%;1.0 mg/L 6-BA与不同质量浓度IBA配比后,对箭杆杨愈伤组织的诱导率较高,为72.8 %~90.0%;1.5 mg/L 6-BA与不同质量浓度IBA配比后,对箭杆杨愈伤组织的诱导率为65.1%~67.3%,愈伤组织生长迅速,直径>2 mm的团块占90%以上,其中以MS+1.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IBA最为明显,达93.5%。综合诱导率和生长速度两因素,MS+

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.0 mg/6-BA L+0.1 mg/L IBA 为箭杆杨愈伤组织诱导适宜的培养基。

表 1　6-BA/IBA 对箭杆杨愈伤组织诱导的影响

Table 1　Effect of 6-BA/IBA on callus inducting rate

6-BA/(mg·L^{-1})	IBA/(mg·L^{-1})	诱导率/% Inducting rate	不同直径愈伤组织诱导率/% Callus diameter	
			≤2 mm	>2 mm
	0.1	31.2	88.6	11.4
0.5	0.5	35.6	84.5	15.5
	1.0	34.9	86.8	13.2
	0.1	90.0	12.6	87.4
1.0	0.5	87.9	15.3	84.7
	1.0	72.8	10.4	89.6
	0.1	65.1	9.8	90.2
1.5	0.5	67.3	7.9	92.1
	1.0	66.4	6.5	93.5

2.2　不同培养基对箭杆杨愈伤组织再分化与不定芽形成的影响

将长势良好的愈伤组织转入低细胞分裂素培养基中,进行不定芽分化培养。由表 2 可知,IBA/6-BA 配比的诱导效果优于 NAA/6-BA 配比;诱导率随生长素(NAA 和 IBA)质量浓度的下降而升高;诱导时间随 NAA 和 IBA 质量浓度的下降而缩短,随大量元素的减少而提前。NAA/6-BA 配比培养的愈伤组织可直接诱导出不定根,而不定芽诱导率很低,组织较容易褐变;IBA/6-BA 配比可提高不定芽的诱导率,但不定芽有玻璃化现象;1/2 MS 培养基可有效降低玻璃化试管苗的形成。综上可知,1/2MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA 是箭杆杨愈伤组织再分化和不定芽形成的较适宜诱导培养基。

表 2　不同培养基对箭杆杨不定芽分化诱导的影响

Table 2　Effect of different media on adventitious shoot induction

培养基配比 Culture medium combination	诱导时间/d Induction time	诱导率/% Inductivity	愈伤组织状况 Callus status
MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA	25.7	21.9	愈伤组织增长快,产生大量不定根,组织易褐变 Fast-growth calli, massive adventitious roots, easy browning
MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA	23.1	36.4	生长缓慢,有不定根产生,易褐变 Slow-growth, production adventitious roots, easy browning
MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA	22.7	36.5	生长较快,不定芽有玻璃化现象 Faster-growth, dventitious shoot vitrification.
MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA	19.6	60.9	生长良好,不定芽有玻璃化现象 Well-growth, Adventitious shoot vitrification.
1/2MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA	20.2	67.1	生长良好,产生的不定芽长 2~3 cm,有褐变现象 Well-growth, adventitious shoot were 2~3 cm, browning.

2.3　不同激素配比对箭杆杨腋芽试管快速增殖的影响

由表 3 可知,6-BA 与 IBA 搭配对腋芽的增殖效果优于其单独使用,不含 IBA 的培养基,腋芽增殖少,且生长缓慢;腋芽增殖数与 6-BA 的质量浓度正相关。

表 3　不同激素配比对箭杆杨腋芽增殖的影响

Table 3　Effect of different hormone associations on axillary shoot

培养基配比 Culture medium combination	腋芽增殖数 Axillary shoot propagation number	生长与发育 Growth and development
MS+0.5 mg/L 6-BA	3.5	生长缓慢,分化率低 Slow-growth, low differentiation rate
MS+1.0 mg/L 6-BA	3.9	腋芽生长缓慢,分化率低 Slow-growth Axillary shoot, low differentiation rate
MS+0.5mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA	5.2	生长良好,无丛生芽,腋芽较多 Well-growth, no cluster shoot, many axillary shoots
MS+1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA	5.6	生长良好,无丛生芽,腋芽较多 Well-growth, no cluster shoot, many axillary shoots.

2.4　不同激素对箭杆杨生根的影响

诱导生根是植物组织培养繁殖的关键环节之一。由表 4 可知,各种质量浓度 NAA 与 IBA 对箭杆杨试管苗生根均有较好的诱导效果,且随其质量浓度的提高,诱导率也增大。从基本培养基选择来看,1/2 MS 更有利于生根。从试管苗根发生数量与根形成的质量综合考虑,1/2 MS+1.0 mg/L IBA 为箭杆杨的适宜生根培养基。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表4 不同激素对箭杆杨试管苗生根的影响

Table 4 Effect of different hormones on root formation

培养基配比 Culture medium	生根率/% Rooting rate	生根数目 Rooting number	根形态 Root configuration
MS+0.5 mg/L NAA	48.4	1.5	根粗而短,基部无愈伤组织 Thick and short root, no callus on base.
MS+1.0 mg/L NAA	54.8	2.2	毛根较多,基部无愈伤组织 Many hair roots, no callus on base
MS+1.2 mg/L NAA	69.3	3.7	毛根多,基部产生大量愈伤组织 A lot of hair roots, massive calli on base.
MS+0.5 mg/L IBA	56.1	2.1	根细而短,基部无愈伤组织 Thin and short root, no callus on base.
MS+1.0 mg/L IBA	71.6	2.6	根发育良好,基部无愈伤组织 Root growth well, no callus on base.
MS+1.2 mg/L IBA	74.7	4.2	气生根明显,基部产生大量愈伤组织 Evident aerial root, massive callus on base.
1/2 MS+0.5 mg/L NAA	61.0	1.8	根细而短,基部无愈伤组织 Thin and short root, no callus on base.
1/2 MS+1.0 mg/L NAA	67.8	2.4	毛根较多,基部无愈伤组织 Many hair roots, no callus on base
1/2 MS+1.2 mg/L NAA	82.3	4.2	毛根多,基部产生大量愈伤组织 A lot of hair roots, massive calli on base.
1/2 MS+0.5 mg/L IBA	69.1	2.3	根细而短,基部无愈伤组织 Thin and short root, no callus on base.
1/2 MS+1.0 mg/L IBA	84.6	3.3	根发育好,基部无愈伤组织 Root growth well, no callus on base.
1/2 MS+1.2 mg/L IBA	87.7	4.5	气生根明显,基部无愈伤组织 Evident aerial root, no callus on base.

3 讨论与结论

3.1 外植体消毒

灭菌是植物组织培养工作中的重要环节,对大多数植物来说,采用新生的或新抽的枝条、叶、茎尖为材料,污染率可下降20%~30%[5]。污染因素很多,灭菌时既要求将外植体表面的微生物彻底杀死,又要求尽可能少伤害外植体组织和表层细胞。现常用的灭菌剂有:乙醇、次氯酸盐、氯化汞和抗生素类杀菌剂等。灭菌剂和灭菌程序的选择应视外植体的具体情况而定,从野外采来的材料,菌类物质易粘附其上,在做组织培养时不易消毒。因此,必须根据取材时间、材料幼嫩程度、材料类型,来选择消毒剂、消毒程序和消毒时间[6-8]。本研究箭杆杨枝条取自3月底,将其带回室内冲洗干净,放入培养室内水培,待培养出嫩芽后,以其为初始培养材料进行组织培养,由于芽是在室内长出的,翠嫩易受伤害,故应适当减小酒精的消毒时间。本研究采用洗衣粉水漂洗30 min,然后酒精杀菌10 s,最后1 g/L HgCl处理10 min,无菌水冲洗3~4次的程序来消毒,结果污染率可控制在10%以下,成活率达到100%。另外,水培过程中,喷洒适当浓度的84消毒液,对减小污染也有良好的作用。

3.2 培养基及盐类对杨树苗木组织培养的影响

在离体条件下,植物组织生长所需养分一般由基本培养基提供。目前常用的基本培养基有MS(包括1/2 MS、1/3 MS)、KC、White和Nitch等,其中应用最多的是MS培养基及1/2 MS培养基,其营养丰富且全面。在木本植物的组织培养中,还有B5和H等培养基。本试验选择的基本培养基是MS及1/2 MS培养基,结果显示,在箭杆杨的初代培养及苗木生根培养中,采用1/2 MS培养基效果较好。

3.3 激素配比对杨树愈伤组织诱导的影响

对杨树组织培养的研究表明,植物生长调节剂中的细胞分裂素与生长素,是诱导外植体脱分化的主要因素,其种类和浓度配比对愈伤组织的诱导影响很大[9-10]。本试验结果表明,1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA对箭杆杨愈伤组织诱导率最高,达90%,为箭杆杨愈伤组织诱导的适宜激素配比。

3.4 愈伤组织的再分化与腋芽的增殖

对木本植物组织培养的研究表明,植物生长素种类及其与细胞分裂素的配比,是影响愈伤组织再分化和胚状体发生的关键[11]。本试验中,IBA的诱导作用要高于NAA,其中以1/2 MS+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L 6-BA培养基对不定芽的诱导分化效果最佳。一般认为,以愈伤组织分化成的苗作为商品化苗木容易引起培养物的变异,很难保持其亲本特有性状,其原因是:(1)激活的外植体经愈伤组织分化形成不定芽和根需较长时间;(2)愈伤组织在

维普资讯 http://www.cqvip.com

长时间培养过程中,幼芽分化遗传畸变及生根响应中的变异性,导致随后的生长响应或形态学上的优良性状发生变异[12-13]。本试验结果表明,MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA 为箭杆杨芽增殖的适宜培养基。

3.5 试管苗根的形成

植物激素中,生长素对根的形成具有重要作用[9]。在一定范围内,试管苗的生根率与生长素在培养基中的含量呈正相关;过量时,则会形成大量的愈伤组织团块而导致输导组织不畅,影响苗木生长和移栽成活。本试验发现,MS+1.0 mg/L IBA 为比较理想的箭杆杨生根培养基。

3.6 愈伤组织继代培养中材料的褐化与试管苗的玻璃化问题

愈伤组织继代中的褐化与试管苗玻璃化问题,始终是林木组织培养的难题[9,13]。培养材料和培养条件(如湿度、光照、无机盐成分、蔗糖浓度等)均会影响到褐化[13-14]。李毅[15]对箭胡毛杨试管苗褐化的研究结果表明,蔗糖浓度的大小与褐变开始的时间成反比。郝贵霞[16]对毛白杨玻璃化成因的研究表明,培养容器的透气性和相对湿度是导致毛白杨产生玻璃化的重要因素。本试验发现,在箭杆杨试管苗培养过程中,愈伤组织在50~60 d开始出现褐化现象,对不定芽的诱导产生抑制作用,通过降低培养基中大量元素的含量,可以有效地降低玻璃化苗的发生率。

[参考文献]

[1] 刘 榕,史元增.甘肃杨树[M].兰州:兰州大学出版社,1995:108-109.
Liu R,Shi Y Z. Poplar in Gansu [M]. Lanzhou: Lanzhou University Press,1995:108-109. (in Chinese)

[2] 张力平,曹孜义,李 唯.多效唑在葡萄试管种质常温保存中的应用 [J].园艺学报,1994,21(4):389-391.
Zhang L P,Cao Z Y,Li W. Application of aclobutrazol in conservation of grape germplasm *in vitro* at normal temperature[J]. Acta Horticulturae Sinica,1994,21(4):389-391. (in Chinese)

[3] 王大元,李建知,彭素兰,等.用组织培养方法保存柑桔种质的初步研究 [J].园艺学报,1979,6(2):95-97.
Wang D Y, Li J Z,Peng S L,et al. Study firstly on germplasm resources conservation of Citrus by tissue culture[J]. Acta Horticulturae Sinica,1979,6(2):95-97. (in Chinese)

[4] 李 毅,邸 利.常温条件下三倍体毛白杨愈伤组织诱导及其保存 [J].植物生理学通讯.2002,38(6),551-553.
Li Y,Di L. Induction and preservation of triploid calli of populus tomentosa in normal temperature [J]. Plant Physiology Comlenications,2002,38(6),551-553. (in Chinese)

[5] 李俊明.植物组织培养教程 [M].北京:北京农业大学出版社,1992.
Li J M. Tissue culture of plants[M]. Beijing: Beijing Agriculture University Press,1992. (in Chinese)

[6] 陈友兴.植物离体培养中微生物污染的鉴定与控制 [J].亚热带植物通讯,2000,29(1):67-71.
Chen Y X. A review of detection and control of microbial contamination of plant cultures in vitro [J]. Subtropical Plant Science,2000,29(1):67-71. (in Chinese)

[7] Leifert C. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grownplants: reasons for contamination problem *in vitro* [J]. Critical reviews in plant science,1994,13:139-183.

[8] Gunson H E. Latent bacterial infection: Epiphytes as contaminants of micropropagated[C]//Nichocas J R. Inphysiology, growthand development of plants in culture. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers,1994:379-396.

[9] 陈正华.木本植物组织培养及其应用 [M].北京:高等教育出版社,1986:34-49.
Cheng Z H. Application and tissue culture of Xylophyta[M]. Beijing: Higher Education Press,1986:34-49. (in Chinese)

[10] 林静芳.响叶杨和大齿杨的组织培养 [J].植物生理学通讯,1983,19(2):37.
Lin J F. Tissue culture of *Populus adenopoda* Maxim and *Populus lasiocarpa* Oliv[J]. Plant Physiology Communications,1983,19(2):37. (in Chinese)

[11] 李 毅,邸 利.箭胡毛杨组培繁殖技术的研究 [J].甘肃农业大学学报,2002,37(2):180-184.
Li Y,Di L. A study on tissue culture technique of *Populus nigra* var *thevestina* × (*P. diversifolia* + *P. tomentosa*)[J]. Journal of Gansu Agricultural University,2002,37(2):180-184. (in Chinese)

[12] 张立功.杨树体细胞胚状体的诱导发生[J].林业科学,1981,17(4):426-427.
Zhang L G. Induction of embryoid somatic cells of *Populus*[J]. Scientia Silvae Sinicae,1981,17(4):426-427. (in Chinese)

[13] Andrew J, Schmidt, James M L. Media and environmental effects on phonolics production from tobacco cell culture [J]. Biotechem and Bioengineering,1989,33:1437-1444.

[14] Bhat S R, Chandel K P S. A novel technique to overcome browning in tissue culture [J]. Plant Cell Reports,1991,10:358-361.

[15] 李 毅.箭胡毛杨愈伤组织诱导、保存与再分化[J].西北植物学报,2002,22(3):656-660.
Li Y. Induction, preservation and differentiation of calli of *Populus* × Jianhumao [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica,2002,22(3):656-660. (in Chinese)

[16] 郝贵霞.毛白杨叶片组培再生芽玻璃化问题的探讨[J].北京林业大学学报,1999,21(1):68-71.
Hao G X. Vitrification of regeneration shoots of *P. tomentosa* [J]. Journal of Beijing Forestry University,1999,21(1):68-71. (in Chinese)