

# 一株烟曲霉抗植物病原菌活性次生代谢产物的研究

孔 阳, 马养民, 王佳运, 易军军, 王丽红

(陕西科技大学食品与生物工程学院, 西安 712100)

**摘 要:**以一株烟曲霉属白花夹竹桃内生真菌为研究对象, 对其抗植物病原菌活性的次生代谢产物进行了研究, 共分离鉴定了6个化合物, 分别是 alternariol (1), 4-acetylaminobutyric acid (2), monomethylsulochrin (3), succinic acid (4), cyclo-(Ala-Val)(5), homogentisic acid (6)。化合物1对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制率分别为91.8%、89.1%和90.6%, 大于阳性对照; 对番茄灰霉病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制率为86.6%和84.3%, 与阳性对照相当; 对供试的4种细菌都有很强的抑制作用, 整体效果优于阳性对照。本研究为研制新型微生物来源的杀菌剂和植物病害的防治提供了理论依据。

**关键词:**烟曲霉; 植物病原菌; 细菌; 抑菌活性

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)02-0034-05

## Studies on Anti-Plant Pathogen Secondary Metabolites from an *Aspergillus fumigatus*

KONG Yang, Ma Yangmin, WANG Jiayun, YI Junjun, WANG Lihong

(School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** The active metabolites of *Aspergillus fumigatus* isolated from *Nerium indicum* Mill. cv. Paihua were studied. All 6 isolated and identified compounds were as follows: alternariol, 4-acetylaminobutyric acid, monomethylsulochrin, succinic acid, cyclo-(ala-val), and homogentisic acid. Alternariol had an inhibitory rate of 91.8%, 89.1% and 90.6% against *Alternaria brassicae*, *Cytospora* sp. and *Colletotrichum gloeosporioides* respectively, higher than that of the positive control. The inhibition rate against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* sp. *cucumebrium* Owen was 86.6% and 84.3%, respectively, the same as the positive control. Alternariol had a strong antibacterial effect on all 4 bacteria tested. This study provides a theoretical basis for the development of new microbiological fungicides and plant diseases controlling.

**Key words:** *Aspergillus fumigates*; Plant pathogen; Bacteria; Antibacterial activity

植物病原真菌是寄生于植物并能够引起植物病害甚至死亡的病原微生物, 尤其是农作物病原菌导致的植物病害严重时会使农作物死亡并大幅度减产, 在病害高发区产量极低甚至颗粒无收, 对农业生产和粮食安全造成了重大的威胁<sup>[1]</sup>。植物内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各组织和器官内部或细

胞间隙而没有引起宿主明显病害症状的真菌。药用植物内生真菌次生代谢产物种类繁多, 生理活性强, 具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、植物生长调节等多种活性<sup>[2]</sup>。白花夹竹桃 (*Nerium indicum* Mill. cv. Paihua) 为夹竹桃科夹竹桃属植物<sup>[3]</sup>。夹竹桃在近代临床上用于治疗心力衰竭、喘息咳嗽、癫痫、跌打损伤等症<sup>[4]</sup>。同时, 研究表明夹竹桃提取物还有较好的杀虫、杀菌作用<sup>[5]</sup>。本课题组从白花夹竹桃中分离得到一株烟曲霉属 (*Aspergillus fumigatus*) 内生真菌 NR3, 通过前期研究发现其发酵产物具有良好的抗菌活性, 因此本文对 NR3 抗植物病原菌的活性成分进行了研究, 以期新型低毒易降解天然抗菌剂的研发提供理论依据。

收稿日期: 2018-12-29

基金项目: 陕西省科技厅重点研发计划项目(2018NY-043); 陕西省教育厅专项科学研究计划项目(2018JK0109); 国家级大学生创新创业项目(201810708043); 陕西科技大学2017年教学改革研究项目(17Y044)

作者简介: 孔 阳(1980-), 女, 讲师, 在读博士, 主要从事天然产物化学的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

从秦岭地区的白花夹竹桃(*Nerium indicum* Mill. cv. Paihua)根中分离得到内生真菌NR3,在4℃下用PDA培养基保存于本实验室。

活性测试菌:植物病原真菌有白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、苹果腐烂病菌(*Cytospora* sp.)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora thora capsic*)、烟草赤星病菌(*Alteraria alternata*)、草莓镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl. sp. *fragariae*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* sp. *cucumebrium*)、葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)由陕西科技大学食品学院微生物实验室提供。另外,还对常见的致病细菌作了测试,革兰氏阳性菌用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、乳链球菌(*Streptococcus lactis*)、革兰氏阴性菌用大肠杆菌(*Enterococcus coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),以上菌种均由陕西省微生物研究所提供。

### 1.2 培养基

NR3的大量发酵采用大米固体培养基,植物病原真菌采用PDA培养基,细菌用牛肉膏蛋白胨培养基。PDA培养基<sup>[6]</sup>、牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[7]</sup>和察氏液体培养基<sup>[7]</sup>按照文献方法配制。

大米固体培养基:取纯净的大米,按照每100g大米加入120 mL无糖察氏液体培养基配制。

### 1.3 NR3的鉴定

将NR3接种于PDA斜面上,28℃下培养3 d至孢子成熟,利用CTAB法<sup>[8]</sup>提取菌丝体基因组DNA,通过引物ITS1F和ITS4R扩增目标菌株的ITS区。将测序获得的ITS序列通过与NCBI数据库进行同源性分析,利用MEGA 6.0软件构建系统发育进化树,再结合形态学方法对菌株NR3进行鉴定<sup>[9]</sup>。

### 1.4 次生代谢产物的分离纯化和结构鉴定

将NR3接种于大米固体培养基中,28℃培养20 d,将发酵产物阴干粉碎,用甲醇回流提取3次,浓缩得粗提物。将粗提物用硅胶柱色谱分离纯化,以石油醚、石油醚:乙酸乙酯=(1:1,1:2)、乙酸乙酯、乙酸乙酯:甲醇=(1:1,1:2)、纯甲醇为洗脱剂依次梯度洗脱,得到Fr.1~7七个部分。Fr.4再进行Sephadex LH-20柱层析和重结晶,得到

化合物2(18 mg),化合物3(11 mg)。Fr.6用Flash中压液相色谱和重结晶,得到化合物4(27 mg),化合物5(23 mg)。Fr.5用Sephadex LH-20柱色谱和重结晶,得到化合物1(36 mg)和化合物6(21 mg)。纯度检验确定为单体化合物后,进行<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、HSQC和HMBC测试,结合参考文献对化合物结构式进行表征。

## 1.5 抗菌活性的测定

### 1.5.1 抗植物病原真菌活性测试

采用生长速率法<sup>[5]</sup>进行6种单体化合物对11种植物病原菌的抑菌活性测试。按每升培养基加250 mg样品的比例,将培养基制成带药平板。再将植物病原真菌菌饼(直径6 mm)平放于培养基表面,每组做3次平行实验,纯丙酮作空白对照,苯并咪唑44作阳性对照,28℃恒温培养3 d,用十字交叉法测量菌落扩展直径,按下式计算菌丝生长抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率} = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径} \times 100\%$$

### 1.5.2 抗细菌活性测试

采用滤纸片法<sup>[6]</sup>进行6种单体化合物对4种细菌的抑菌活性测试。用DMSO将样品配成0.25 mg/mL药液,放入灭菌的圆形滤纸片(直径6 mm)充分浸透备用。供试细菌用无菌水配成浓度为10<sup>6</sup> CFU/mL的菌悬液(平板菌落计数法<sup>[10]</sup>),迅速接种至平板上,然后把药液滤纸片放在培养基表面上,每组做3次平行,用青霉素钠和硫酸链霉素作阳性对照,DMSO作空白对照,37℃恒温培养1~2 d,十字交叉法测量抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 NR3基因序列结果

内生真菌NR<sub>3</sub>通过ITS基因测序,将NR<sub>3</sub>基因序列与Genbank数据库进行比对,利用MEGA 6.0软件构建系统发育进化树(见图1),菌株NR<sub>3</sub>与烟曲霉属菌株*Aspergillus fumigatus* JX501388.1同源性为100%<sup>[8]</sup>。

### 2.2 化合物结构鉴定结果

通过一维<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR及二维HSQC、HMBC核磁共振光谱分析,结合理化性质鉴定单体化合物结构,最终确定6个化合物。

化合物1白色针状结晶,易溶于甲醇。<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.77(1H, S), 10.91(1H, S), 10.34(1H, S)是3个-OH氢信号, 2.7(3H, S, H-7')是-CH<sub>3</sub>氢信号。<sup>13</sup>C-NMR(100MHz,

DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 138.07(C-1), 97.36(C-2), 164.02(C-3), 100.81(C-4), 165.35(C-5), 104.25(C-6), 164.65(C-7), 108.91(C-1'), 152.56(C-2'), 101.55(C-3'), 158.36(C-4'), 117.47(C-5'), 138.27(C-6'), 25.19(C-7')核磁数据与文献<sup>[11]</sup>值基本一致, 确定化合物1为 Alternariol。

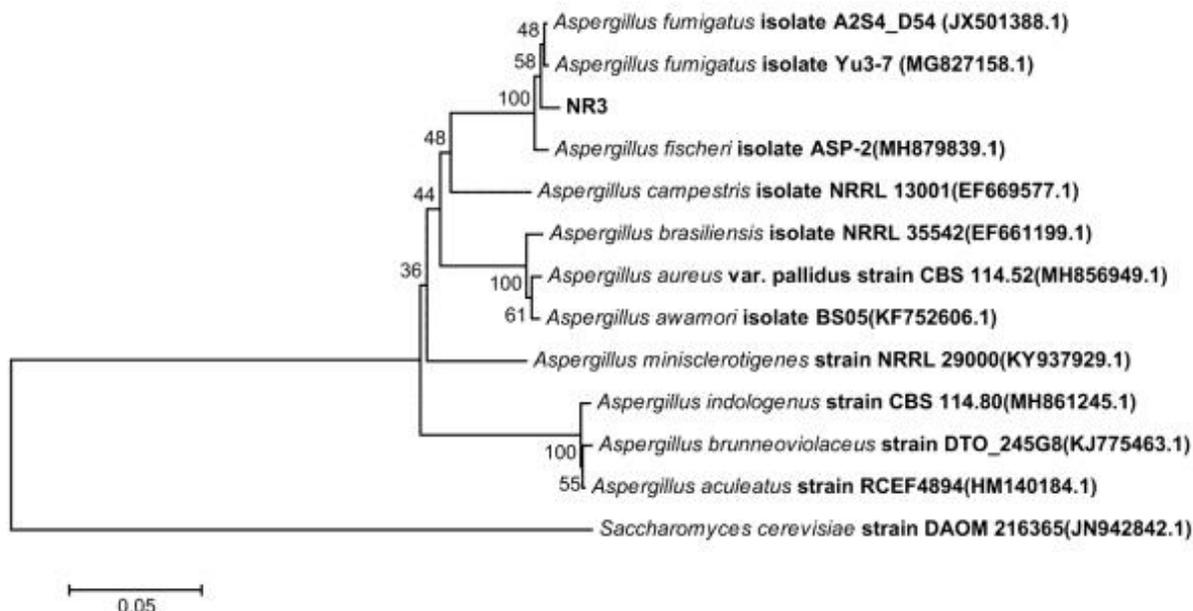


图1 基于ITS序列的NR3系统发育树

化合物2白色块状结晶, mp. 121 ~ 123 $^{\circ}$ C。 $^1$ H-NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 12.00(1H, br s, H-1) 是-COOH 氢信号, 2.19(2H, t, J=7.2 Hz, H-2), 1.59(2H, m, J=7.2 Hz, H-3), 3.01(2H, q, J=6.4 Hz, H-4) 是3个亚甲基氢, 1.77(3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 7.80(1H, br s, -NH)。 $^{13}$ C-NMR (100 MHz, DMSO),  $\delta$ : 174.3(C-1) 和 168.87(C-5) 是两个羰基碳信号, 38.17(C-4)、31.09(C-2)、24.47(C-3) 和 22.55(C-6) 是饱和碳。综上所述, 并与文献<sup>[12]</sup>数据基本一致, 确定化合物2为 4-acetylaminobutanoic acid。

化合物3黄色块状结晶, mp. 179 ~ 182 $^{\circ}$ C。 $^1$ H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 6.63(1H, d, J=4Hz, H-4), 7.02(1H, d, J=2.4 Hz, H-6), 6.47(1H, s), 6.08(1H, s) 是4个苯环氢信号; 3.72(3H, s, H-8), 3.70(3H, s, H-9), 3.39(3H, s, H-8') 是3个-OCH<sub>3</sub>, 2.31(3H, s, H-7') 是甲基氢信号。 $^{13}$ C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 有18个碳信号,  $\delta$ : 199.22(C-10), 165.81(C-7) 是两个羰基碳信号; 127.85(C-1), 127.25(C-2), 156.12(C-3), 102.40(C-4), 156.55(C-5), 107.33(C-6), 110.48(C-1'), 163.76(C-2'),  $\delta$ : 109.90(C-3'), 147.53(C-4'), 102.68(C-5'), 160.42(C-6') 是12个芳香碳信号; 51.77(C-8),  $\delta$ : 55.68(C-9),  $\delta$ : 55.91(C-8'), 22.03(C-7'), 核磁数据与文献<sup>[13]</sup>对照基本一致, 确定化合物3为 monomethyl sulochrin。

化合物4无色结晶, 易溶于甲醇, 溴酚蓝反应呈现淡黄色, 初步推测为羧酸类。 $^1$ H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 2.40 为与羧基相连的CH<sub>2</sub>氢信号,  $\delta$ : 12.12 是羧基上的氢信号。 $^{13}$ C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 只显示了2个碳信号,  $\delta$ : 173.6 是羧基碳的信号,  $\delta$ : 29.1 是亚甲基碳的信号。与文献值<sup>[14]</sup>对照一致, 确定化合物4为 succinic acid。

化合物5白色粉末, mp. 176 ~ 178 $^{\circ}$ C, 易溶于甲醇。 $^1$ H-NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 7.99(1H, s) 和 7.76(1H, s) 是2个酰胺的活泼氢信号, 4.05(1H, m), 3.83(1H, m) 是与N相连的2个CH氢,  $\delta$ : 1.06(3H, d, J=8.8 Hz, H-8) 和 0.98(3H, d, J=8.8 Hz, H-9) 为异丙基上的两个甲基氢化学位移, 1.37(3H, d, J=7.0 Hz, H-10) 是甲基氢信号, 4.05(1H, m, H-3), 3.83(1H, m, H-6) 和 2.31(1H, m, H-7) 为三个-CH氢信号。 $^{13}$ C-NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 168.5(C-1), 169.5(C-4) 是两个羰基碳信号, 次甲基信号  $\delta$ : 51.2(C-3), 60.7(C-6) 和 31.5.6(C-8), 3个甲基  $\delta$ : 16.4(C-8), 20.1(C-9) 和 20.9(C-10) 参照文献数据<sup>[15]</sup>, 确定化合物5为 cyclo-(Ala-Val)。

化合物6淡黄色油状,  $^1$ H-NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ : 10.35(1H, s) 是羧基氢信号,  $\delta$ : 8.63(1H, s) 是酚羟基信号,  $\delta$ : 6.58(1H, d, J = 8.5 Hz), 6.52(1H, d, J=2.4 Hz), 6.45(1H, dd, J = 8.5, 2.4

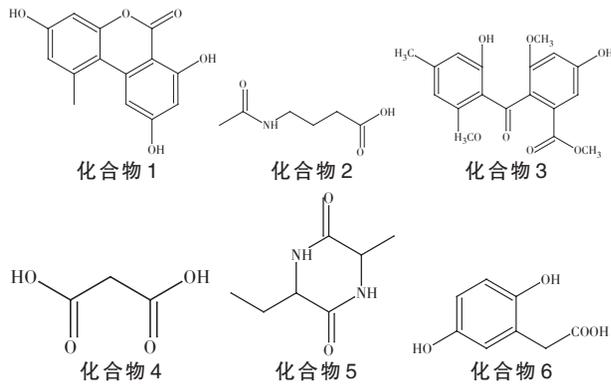


图2 化合物结构图

Hz)是三取代的苯环上的氢信号, $\delta$ : 3.35(2H, s)是与苯环相连的亚甲基氢信号。 $^{13}\text{C}$ -NMR(100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 173.4是羧基碳信号, $\delta$ : 149.9, 148.3, 122.8, 118.0, 115.8, 114.4是对位上有取代的苯环碳信号, $\delta$ : 36.1是与苯环相连的 $\text{CH}_2$ 的碳信号。综合分析 $^1\text{H}$ -NMR和 $^{13}\text{C}$ -NMR,与文献<sup>[14]</sup>对照,化合物6为homogentisic acid。

### 2.3 样品对植物病原菌的测试结果

将从烟曲霉NR3代谢产物中得到的6种单体化合物对10种植物病原菌抑菌活性进行了测试。结果如表1所示,6种化合物对供试的10株

表1 6个化合物对植物病原菌菌丝生长的抑制效果

测试菌株	相对抑制率(%)						阳性对照	空白对照
	化合物1	化合物2	化合物3	化合物4	化合物5	化合物6		
a	91.8	31.1	-	49.2	24.3	48.9	90.1	-
b	71.9	32.3	17.7	57.7	18.8	-	90.7	-
c	83.7	-	25.0	35.1	-	25.0	85.3	-
d	78.4	29.5	12.1	59.2	23.6	29.1	92.4	-
e	89.1	34.5	-	52.6	28.5	63.4	87.2	-
f	86.6	23.3	8.6	58.4	19.3	50.8	86.9	-
g	84.3	-	12.3	33.2	-	32.3	84.7	-
h	90.6	25.0	-	56.3	21.3	68.6	88.4	-
i	86.2	39.2	-	40.5	21.9	-	90.3	-
k	75.9	14.2	-	49.3	20.5	79.3	88.2	-

注:a.白菜黑斑病菌;b.草莓镰刀菌;c.棉花枯萎病菌;d.西瓜枯萎病菌;e.苹果腐烂病菌;f.番茄灰霉病菌;g.黄瓜枯萎病菌;

h.葡萄炭疽病菌;i.辣椒疫霉病菌;k.烟草赤星病菌

植物病原菌菌丝生长有不同程度的抑制作用。

化合物1对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制作用分别达到了91.8%、89.1%和90.6%,大于阳性对照90.1%、87.2%和88.4%,说明其对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制效果强于阳性对照;对番茄

灰霉病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制率为86.6%和84.3%,与阳性对照86.9%和84.7%相比基本相当;对草莓镰刀菌、西瓜枯萎病菌和烟草赤星病菌的抑制率都在70%以上。由此可见,化合物1具有很好的抑制植物病原菌活性。化合物2、3和5对供试10种病原菌有一定抑制作用,但不明显。

表2 6个化合物对4种细菌生长的抑制效果

化合物编号	抑菌圈直径(mm)			
	A	B	C	D
1	29±1	35±1	28±1	32±1
2	24±1	29±1	22±1	19±1
3	8±0	9±0	6±1	8±1
4	16±1	12±1	11±1	13±1
5	11±0	15±1	13±1	14±1
6	23±1	18±1	15±1	14±1
空白对照	-	-	-	-
硫酸链霉素	30±0	29±0		
青霉素钠			30±1	31±0

注:A.金黄色葡萄球菌;B.乳链球菌;C.大肠杆菌;D.铜绿假单胞菌

化合物4对草莓镰刀菌、西瓜枯萎病菌、苹果腐烂病菌、番茄灰霉病菌和葡萄炭疽病菌的抑制率分别为57.7%、59.2%、52.6%、58.4%、56.3%，都达到了50%以上，说明化合物4对这5种植物病原菌有一定的抑制作用。化合物6对烟草赤星病菌的抑制率达到79.3%，对苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制率也达到了60%以上，对番茄灰霉病菌的抑制率为50.8%，对其余测试菌有一定的抑制作用。综合来看，化合物1有很强的抑制供试菌丝生长的作用，化合物4和6对部分菌有较强的抑制作用。

#### 2.4 样品对细菌的测定结果

从表2可以看出：化合物1对供试的4种细菌都有很强的抑制作用，对于乳链球菌和铜绿假单胞菌的抑菌圈直径分别为(35±1)mm和(32±1)mm，超过了阳性对照，对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈分别是(29±1)mm和(28±1)mm，抑制作用与阳性对照相当。化合物2对乳链球菌的抑菌圈直径为(29±1)mm，抑制作用与阳性对照相当，对金黄色葡萄球菌的抑制作用也很好，抑菌圈达到了(24±1)mm。化合物6对金黄色葡萄球菌和乳链球菌的抑菌圈直径分别是(23±1)mm和(18±1)mm，有较好的抑制作用。化合物4和5对4种细菌有一定的抑制作用。化合物3抑菌效果相对较差。

### 3 结论与展望

通过ITS基因测序和形态学研究确定烟曲霉属真菌NR<sub>3</sub>与*Aspergillus fumigatus* JX501388.1同源率为100%，从其发酵产物中分离得到6个抑菌活性化合物，分别为一个香豆素类化合物(alternariol)、一个二苯甲酮类化合物(monomethylsulochrin)、两个生物碱类(cyclo-(Ala-Val)和4-acetylaminobutyric acid)和两个羧酸(succinic acid和homogentisic acid)。其中alternariol对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制率大于阳性对照，对于番茄灰霉和黄瓜枯萎病菌抑制作用与阳性相当，对供试的两种革兰氏阴性菌和两种革兰氏阳性菌抑制作用整体优于阳性对照。homogentisic acid对烟草赤星病菌的抑制效果较好。succinic acid和homogentisic acid也对不同的菌株显示出了一定的抑制活性。

随着病原微生物对抗菌药物耐药性不断增强，人们越来越期望得到更多新型的、效果更为显著的抗菌药物，植物内生真菌因是新型抗菌药

物的巨大筛选源而备受关注<sup>[16]</sup>。通过研究植物内生真菌次生代谢产物的化学结构和构效关系，对新型强活性抗生素的研发有很好的指导意义<sup>[16]</sup>。综上所述，烟曲霉NR<sub>3</sub>能产生具有广谱抗菌活性的化合物并且其次生代谢产物alternariol具有广谱抑菌效果，可以作为新型天然抗菌农药资源进一步开发和利用。本研究为研制新型微生物来源的杀菌剂和植物病害的防治提供了理论依据<sup>[17]</sup>。

#### 参考文献：

- [1] 黄曦,许兰兰,黄荣韶,等.枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J].生物技术通报,2010(1):24-28.
- [2] 陈丽媛,孙翠焕.药用植物内生真菌研究进展[J].微生物学杂志,2015,35(5):98-101.
- [3] 吴征镒.中国植物志[M].北京:科学出版社,1997,63:147.
- [4] 邢晓娟.夹竹桃的药理作用与临床应用[J].现代医药卫生,2007,23(16):2466.
- [5] 冯小飞,赵宁,杨品辉,等.红花夹竹桃萃取物对植物病原真菌的抑菌活性[J].福建农业学报,2018,33(8):849-854.
- [6] 孔阳,李彦军,张雯.蝙蝠葛茎叶石油醚提取物抗菌及食物防腐作用的研究[J].食品科技,2010,35(3):246-248.
- [7] Derwich E, Benziane Z, Boukir A. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil from flowers of Nerium oleander [J]. Ejeafche, Electron J Environ, Agric Food Chem, 2010, 9(6): 1074-1084.
- [8] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等.一种快速简便的植物病原真菌基因组DNA提取方法[J].植物病理学报,2005,35(4):362-365.
- [9] 曹永军,程萍,喻国辉,等.利用ITS1和ITS4通用引物扩增香蕉枯萎病菌核酸片段鉴定其生理小种[J].热带作物学报,2010,31(7):1098-1102.
- [10] 李爱华,岳思君,马海滨.真菌孢子三种计数方法相关性的探讨[J].微生物学杂志,2006,26(2):107-110.
- [11] Ma Y M, Qiao K, Kong Y, et al. A new isoquinolone alkaloid from an endophytic fungus R<sub>22</sub> of Nerium indicum[J]. Natural Product Research, 2017, 31(8): 951-958.
- [12] 刘净,谢涛,等.冬凌草化学成分的研究[J].中国天然药物,2004,5(2):276-279.
- [13] Liu J Y, Song Y C, Zhang Z, et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites [J]. J biotech, 2004, 114: 279-287.
- [14] 于德泉,杨峻山.分析化学手册(第二版)[M].北京:化学工业出版社,1999:125-129.
- [15] 丁中涛,周俊,谭宁华.金铁锁中的四个环二肽[J].中草药,2000,31(11):803-805.
- [16] 马养民,赵洁.植物内生真菌抗菌活性物质的研究进展[J].有机化学,2010,30(2):220-232.
- [17] 黄华毅,王佳琳,马荣,等.枯草芽孢杆菌STO-12抑菌活性及其抑菌物质分析[J].浙江农业学报,2017,29(1):81-88.