

毛葡萄穗轴溃疡病病原鉴定及防治药剂初步筛选

吴代东¹, 付 岗^{2*}, 叶云峰^{3*}, 胡风云³,

苏祖祥¹, 覃柳燕¹, 牟海飞¹

(1. 广西农业科学院生物技术研究所, 南宁 530007; 2. 广西农业科学院微生物研究所, 南宁 530007;

3. 广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023)

摘要 毛葡萄穗轴溃疡病主要危害果穗穗轴,引起果穗枯死和果实大量脱落,造成果实产量降低。本研究对该病的病原菌进行分离、致病性测定,并通过形态学特征、ITS rDNA 和 EF-1 α 基因序列分析将该病的主要病原鉴定为小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)。通过抑制菌丝生长法在室内初步筛选防治该病的药剂,试验结果表明,在测试的 26 种药剂中,30%氟硅唑微乳剂、64%噁霜·锰锌可湿性粉剂、70%戊唑·丙森锌可湿性粉剂、70%代森锰锌可湿性粉剂、22.2%抑霉唑乳油、70%丙森锌可湿性粉剂及 60%唑醚·代森联水分散粒剂等 7 种药剂对该病病原的抑制作用较强,抑菌率均达 100%,可作为备选药剂进行田间防治试验。

关键词 毛葡萄; 穗轴溃疡病; 小新壳梭孢菌; 病原鉴定; 药剂筛选

中图分类号: S 436.63 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.01.038

Identification of the panicle canker pathogen and screening of the fungicides

Wu Daidong¹, Fu Gang², Ye Yunfeng³, Hu Fengyun³, Su Zuxiang¹, Qin Liuyan¹, Mou Haifei¹

(1. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

2. Microbiology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

3. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

Abstract Panicle canker pathogen damaged the panicle of *Vitis heyneana*, caused a large number of fruits drop and reduced the yield seriously. The pathogen was isolated and its pathogenicity was tested. Based on morphological characteristics, ITS rDNA and EF-1 α gene sequences analysis, the pathogen was identified as *Neofusicoccum parvum*. Inhibitory activity analysis of 26 kinds of fungicides demonstrated that 7 kinds of fungicides including flusilazole 30% ME, oxadixyl·mancozeb 64% WP, tebuconazole·propineb 70% WP, mancozeb 70% WP, imazalil 22.2% EC, propineb 70% WP and pyraclostrobin·metiram 60% WG showed high inhibitory rates of 100% on *N. parvum*. Thus, these 7 kinds of fungicides can be recommended as alternative agents for field testing.

Key words *Vitis heyneana*; panicle canker; *Neofusicoccum parvum*; identification of pathogen; screening of the fungicides

毛葡萄(*Vitis heyneana* Roemer et Schult)为葡萄科葡萄属东亚种群,多年生藤本植物。主要分布在长江以南各省,耐干旱、瘠薄,以野生状态自然生长在丘陵、石山、灌木丛和森林边缘地带。由于富含营养、保健及抗衰老物质,被作为酿制特色风味果酒的原料^[1]。广西罗城仫佬族自治县是中国野生毛葡萄之乡,有超过 5 000 hm² 的自然生长区域^[2]。近年来,随着毛葡萄酿酒产业在广西的迅速发展,对毛葡萄鲜果的需求量不断增加,从而提高了人工种植

毛葡萄的积极性。目前,罗城县 11 个乡镇全部建立有野生毛葡萄基地,种植总面积达 4 467 hm²。随着毛葡萄人工种植面积的增加,发生的病虫害种类也日益增多。其中,穗轴溃疡病是近年毛葡萄种植区发生的一种严重影响果实产量的病害,主要发生在结果期至成熟期,引起果穗褐变枯死,造成果实收获前大量脱落。作者前期初步调查发现,严重地块果穗发病率达 80% 以上,常造成减产 50%~80%。目前尚无关于该病害病原分类、发生规律及防治技

收稿日期: 2014-11-16 修订日期: 2015-01-22

基金项目: 广西科技成果转化与推广计划项目(桂科转 14125003-1-15,桂科转 1346003-14);国家现代农业产业技术体系广西特色水果创新团队南宁葡萄综合试验站(nycytgxgxttd-04-19-14)

* 通信作者 E-mail: yeyunfeng111@126.com; fug110@gxaas.net

术方面的研究报道,因此,该病害成为制约毛葡萄产业发展的重要因素。作者于 2012—2014 年对广西罗城县的毛葡萄穗轴溃疡病病样进行了采集、病原菌分离鉴定及室内防治药剂筛选试验,以便为该病害的有效防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试毛葡萄样品

病原菌分离使用的毛葡萄果穗穗轴病样 5 份和致病性测定使用的健康毛葡萄果穗样品均取自广西壮族自治区罗城仫佬族自治县四把镇水源毛葡萄基地。

1.1.2 供试药剂

26 种供试药剂分别为:1.8% 辛菌胺乙酸盐水溶剂(广西安嘉科技农化有限公司);15% 咪鲜胺微乳剂、250 g/L 丙环唑乳油、30% 氟硅唑微乳剂(海南博士威农用化学有限公司);10% 苯嘧菌酯悬浮剂(浙江禾田化工有限公司);250 g/L 吡唑嘧菌酯乳油、60% 唑醚·代森联水分散粒剂(德国巴斯夫公司);10% 苯醚甲环唑水分散粒剂(安徽绩溪农华生物科技有限公司);30% 嘧菌酯可湿性粉剂(美丰农化有限公司);70% 代森锰锌可湿性粉剂(四川国光农化股份有限公司)、70% 丙森锌可湿性粉剂、75% 肟菌·戊唑醇水分散粒剂(拜耳作物科学公司);24% 腈苯唑悬浮剂、36% 硝苯菌酯乳油(美国陶氏益农公司)、70% 戊唑·丙森锌可湿性粉剂(北京燕化永乐农药有限公司);22.2% 抑霉唑乳油(美国仙农有限公司);45% 克菌·戊唑醇悬浮剂、53% 苯甲·戊唑醇乳油、50% 嘧菌酯·百菌清悬浮剂(南京金金利生物科技有限公司);30% 苯甲·丙环唑乳油(先正达(中国)投资有限公司);25% 氟吗·唑菌酯悬浮剂(沈阳科创化学品有限公司);45% 甲霜·噁霉灵可湿性粉剂(黑龙江省哈尔滨市农欢化工厂);64% 噁霜灵·锰锌可湿性粉剂(天津科润北方种衣剂有限公司);65% 多抗·阳光霉素可湿性粉剂(江苏金益农生物科技有限公司);12% 春雷霉素可湿性粉剂(河北上瑞化工有限公司);3% 多抗霉素可湿性粉剂(山东省禹城市农药厂)。

1.2 病害症状观察

2012 年 6 月—2013 年 9 月对罗城县毛葡萄基地的毛葡萄穗轴溃疡病症状及发生扩展情况进行了

观察、记录和拍摄。

1.3 病原菌分离和鉴定

1.3.1 病原菌的分离纯化

选取毛葡萄果穗穗轴上病健交界处组织,切成 0.3 cm 小段,用 75% 乙醇浸泡 30 s,0.1% 升汞消毒 40 s,再用无菌水漂洗 3 次,置于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上,在 28℃ 培养箱中黑暗培养,待长出菌丝后,挑取菌落边缘进行纯化,纯化后的菌落通过单孢分离获得单孢系统培养分离物。

1.3.2 分离物的致病性测定

从田间剪取健康幼嫩的毛葡萄果穗,用无菌水冲洗干净。将纯培养的分离物菌丝块通过针刺接种法接种到离体的毛葡萄果穗穗轴上,置于 28℃ 的恒温培养箱内保湿培养,以针刺伤口处放 PDA 培养基块的穗轴为对照,定期观察各组织的发病情况,发病后再对病斑进行病原菌分离,通过柯赫氏法则验证病原菌。

1.3.3 病原菌形态学鉴定

将病原菌(经验证具有致病性的分离物)接种到 PDA 平板上,置于 28℃ 的培养箱中黑暗培养,观察菌落特征。另外,将病原菌接种到添加无菌松针(马尾松)的水琼脂培养基上^[3],28℃ 黑暗培养 25 d,显微观察分生孢子的形态特征,对病原菌进行形态学鉴定。

1.3.4 分子生物学鉴定

病原菌基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[6]。以真菌核糖体 rDNA 区通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3')对病原菌的 rDNA-ITS 序列进行 PCR 扩增;同时,参照文献[4]合成引物 EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')和 EF1-986R(5'-TACTTGGAAGGAACCCTTACC-3')对病原菌的翻译延伸因子 EF-1 α 基因序列进行 PCR 扩增。反应均在 25 μ L 体系中进行,体系含有 10 $\times$ Ex buffer 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L,10 μ mol/L 正反向引物各 0.5 μ L,基因组 DNA 100 ng,5 U/ μ L Ex Taq 0.5 μ L;ddH₂O 补足至 25 μ L。反应程序为:95℃ 预变性 5 min,进入循环,95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 复性 80 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目标 DNA 片段,由上海鼎安生物科技有限公司进行测序,测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行同源性

比对。

1.4 室内药剂筛选

在 PDA 平板上培养 7 d 的菌落外缘,用打孔器打取直径 5 mm 的菌饼转接到含不同杀菌剂的 PDA 培养基中,药剂浓度按说明书推荐的使用浓度。以不含农药的 PDA 平板为对照,菌丝面朝下置于平板中央,每平板接种一块菌丝块,每处理重复 3 次。培养 7 d 后(对照菌丝长满皿)测量菌落直径,计算平均抑菌率。

抑菌率(%) =
$$\frac{\text{对照菌落增长直径} - \text{处理菌落增长直径}}{\text{对照菌落增长直径}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 病害症状

该病害主要危害毛葡萄果穗穗轴,在穗轴基部先出现褐色水渍状斑,病斑环绕果穗发展,并向顶部

穗轴扩展,严重时可扩展到整个穗轴,造成果穗褐变干枯死亡,随后果实大量脱落,脱落的果实大多数健康,少数从果蒂腐烂,有时果实不脱落,逐渐干缩。空气湿度大时,果穗褐变腐烂。该病害从毛葡萄结果初期到成熟期(6—9 月)均可发生,高温多雨时期发病较重,枝繁叶密、通风不良的地块发病也较重,着色中期至成熟采收期蔓延速度快。

2.2 病原菌分离和鉴定

2.2.1 病原菌分离和致病性测定

对毛葡萄果穗穗轴 5 个病害标样进行病原分离,分离纯化得到形态特征一致的菌株 12 株。通过针刺接种法将这些菌株的菌丝块(平均直径 3 mm)接种到健康的毛葡萄果穗上,接种后第 3 天,接种部位均出现明显的发病症状,接种后第 5 天,病症扩展到整个果穗,致果穗全部褐变死亡(图 1b)。接种发病症状与田间自然发病症状(图 1a)相似。对照的果穗未发病(图 1c)。



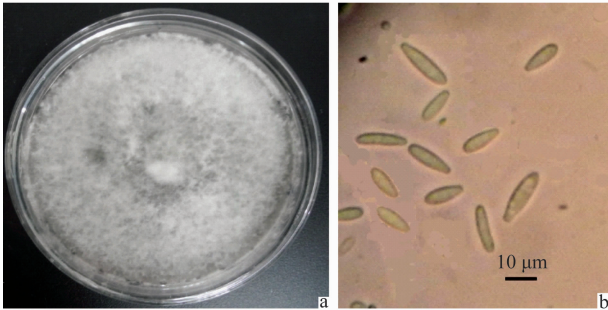
a: 自然症状; b: 接种后症状; c: 健康对照
a: Natural symptoms; b: Symptoms after inoculation; c: CK

图 1 毛葡萄穗轴溃疡病自然发病及接种发病症状

Fig. 1 Natural symptoms and inoculation symptoms of panicle canker on *Vitis heyneana*

2.2.2 病原菌形态学鉴定

病原菌在 PDA 培养基上生长迅速,气生菌丝发达,菌落高度可以达到并紧贴培养皿上盖。初期基质菌丝和气生菌丝均为白色(图 2a), 4 d 后气生菌丝变为灰黑色,基质菌丝变为黑色。在添加无菌松针(马尾松)的水琼脂培养基上培养 25 d 后,在松针上形成黑色的分生孢子器,分生孢子器近球形,直径为 350.0~500.0 μm 。分生孢子单胞,椭圆形至纺锤形,薄壁半透明,大小为(12.0~17.5) μm $\times$ (4.0~6.0) μm (图 2b)。这些病原菌的培养性状和形态特征与已报道^[3,5]的葡萄座腔菌科(Botryosphaeriaceae)中的一种无性型菌物即小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)相似。



a: 菌落; b: 分生孢子
a: Colony; b: Conidia

图 2 毛葡萄穗轴溃疡病病原菌形态

Fig. 2 Morphology of the pathogen of panicle canker

2.2.3 分子生物学鉴定

分别以 ITS1、ITS4 和 EF1-728F、EF1-986R 为

引物对病原菌的 rDNA-ITS 基因和 EF-1 α 基因序列进行 PCR 扩增,并对扩增产物进行测序。结果获得 571 bp 的 rDNA-ITS 基因序列(GenBank 登录号: KJ599627)和 293 bp 的 EF-1 α 基因序列(GenBank 登录号: KM921768),将两种序列分别与 GenBank 中核酸数据进行 BLAST 比对, rDNA-ITS 基因和 EF-1 α 基因序列均与多个小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)的序列同源性最高,相似性分别为 100%和 99%。

结合病原菌的形态特征、rDNA-ITS 及 EF-1 α 基因序列分析结果,将病原菌鉴定为小新壳梭孢菌(*N. parvum*)。

2.3 室内防治药剂筛选

室内药剂筛选试验结果见表 1,在测试的 26 种药剂中,30%氟硅唑微乳剂 7 000 倍液、64%噁

霜·锰锌可湿性粉剂 600 倍液、70%戊唑·丙森锌可湿性粉剂 4 000 倍液、70%代森锰锌可湿性粉剂 600 倍液、22.2%抑霉唑乳油 800 倍液、70%丙森锌可湿性粉剂 600 倍液及 60%唑醚·代森联水分散粒剂 1 000 倍液对病原菌的抑制作用较强,抑菌率均达 100%。另外,75%肟菌·戊唑醇水分散粒剂 4 000 倍液、30%苯甲·丙环唑乳油 2 000 倍液、15%咪鲜胺微乳剂 2 000 倍液、65%多抗·阳光霉素可湿性粉剂 1 000 倍液、30%嘧菌酯可湿性粉剂 3 000 倍液及 45%克菌·戊唑醇悬浮剂 1000 倍液对病原菌的抑制作用也较强,抑菌率在 95.3%~98.2%之间。抑菌作用较差的药剂是:36%硝苯菌酯乳油 1 500 倍液和 50%嘧菌酯·百菌清悬浮剂 2 000 倍液,抑菌率分别为 21.2%和 12.9%。

表 1 不同药剂对病原菌菌丝生长的抑菌率¹⁾
Table 1 Inhibition rate of different fungicides on mycelia growth of *Neofusicoccum parvum*

编号 No.	药剂种类 Fungicide	稀释倍数 Dilution times	平均抑菌率/% Average inhibitory rate
1	30%氟硅唑 ME Flusilazole 30% ME	7 000	100.0 a
2	64%噁霜·锰锌 WP Oxadixyl·mancozeb 64% WP	600	100.0 a
3	70%戊唑·丙森锌 WP Tebuconazole·propineb 70% WP	4 000	100.0 a
4	70%代森锰锌 WP Mancozeb 70% WP	600	100.0 a
5	22.2%抑霉唑 EC Imazalil 22.2% EC	800	100.0 a
6	70%丙森锌 WP Propineb 70% WP	600	100.0 a
7	60%唑醚·代森联 WG Pyraclostrobin·metiram 60% WG	1 000	100.0 a
8	75%肟菌·戊唑醇 WG Trifloxystrobin·tebuconazole 75% WG	4 000	98.2 a
9	30%苯甲·丙环唑 EC Difenoconazole·propiconazole 30% EC	2 000	98.2 a
10	15%咪鲜胺 ME Prochloraz 15% ME	2 000	97.3 a
11	65%多抗·阳光霉素 WP Polyoxin·sunshine mycin 65% WP	1 000	96.0 ab
12	30%嘧菌酯 WP Kresoxim-methyl 30% WP	3 000	95.9 ab
13	45%克菌·戊唑醇 SC Captan·tebuconazole 45% SC	1 000	95.3 ab
14	250 g/L 丙环唑 EC Propiconazole 250 g/L EC	1 000	90.4 b
15	45%甲霜·噁霉灵 WP Metalaxyl·hymexazol 45% WP	1 000	87.1 b
16	3%多抗霉素 WP Polyoxin 3% WP	800	82.3 c
17	250 g/L 吡唑嘧菌酯 EC Pyraclostrobin 250 g/L EC	1 000	81.9 c
18	10%苯醚甲环唑 WG Difenoconazole 10% WG	1 000	81.9 c
19	1.8%辛菌胺乙酸盐 AS N,N-Dioctyldiethylenetriamine·triacetic acid 1.8% AS	700	80.0 c
20	24%腈苯唑 SC Fenbuconazole 24% SC	1 500	77.6 c
21	25%氟吗·唑菌酯 SC Flumorph·pyraoxystrobin 25% SC	1 500	64.7 d
22	10%苯嘧菌酯 SC Benzene kresoxim-methyl 10% SC	7 500	63.1 d
23	53%苯甲·戊唑醇 EC Difenoconazole·tebuconazole EC	1 500	58.8 e
24	12%春雷霉素 WP Kasugamycin 12% WP	600	50.7 e
25	36%硝苯菌酯 EC Meptyl dinocap 36% EC	1 500	21.2 f
26	50%嘧菌酯·百菌清 SC Kresoxim-methyl·chlorothalonil 50% SC	2 000	12.9 g

1) 同列数据后不同小写字母表示差异显著(SAS, $P<0.05$)。
Different small letters in the same column represent significant difference at 0.05 level by SAS.

3 结论与讨论

本研究对引起广西罗城县毛葡萄果穗大量枯死的病原菌进行分离,并结合形态学特征及 rDNA-ITS 序列和 EF-1 α 基因序列分析结果将病原菌鉴定为新小壳梭孢菌(*N. parvum*)。*N. parvum* 是葡萄座腔菌科(Botryosphaeriaceae)中的一种无性型菌物,曾作为小葡萄座腔菌(*Botryosphaeria parva*)的无性阶段被报道^[6]。该病原菌在鲜食葡萄上引起溃疡病已有报道^[7-8],但在用于酿酒业的毛葡萄这个较特殊的品种上引起溃疡病尚无报道。燕继晔等^[9]报道国内鲜食葡萄溃疡病主要由 *N. parvum*、*Botryosphaeria dothidea*、*Diplodia seriata* 和 *Lasiodiplodia theobromae* 等 4 种病原菌引起,造成葡萄穗轴干枯、烂果、落粒。4 种病原菌在地理分布上有差异,其中,*N. parvum* 和 *L. theobromae* 分布在亚热带季风气候区域,*B. dothidea* 分布于温带季风气候区域和亚热带季风气候区域,*D. seriata* 主要分布于温带季风气候区域的山东和河北两省。而本研究报道的毛葡萄穗轴溃疡病菌(*N. parvum*)也出现在亚热带季风气候区域,病害症状与葡萄溃疡病症状相似。此外,*N. parvum* 也是林木和果树上常见的病原真菌,常引起茎秆、枝条枯萎病或溃疡病,也可引起叶枯病。国内外已报道的有柏木枯萎病^[5],圆锥蒲桃梢枯病^[10],鳄梨、亚洲梨的茎秆和枝条溃疡病^[11-12],油桐叶枯病^[3]等。本研究分离到的 *N. parvum* 菌株在 PDA 培养基上不易产生无性分生孢子,参照袁志林等的方法^[3],将菌株接种到含有无菌松针的水琼脂培养基上,暗培养 25 d 后才能产生无性分生孢子。*N. parvum* 与同属的其他种类真菌在形态上极为相似,在分子鉴定方面仅靠 ITS 序列分析不足以区分不同种类,结合 EF-1 α 序列分析进行种类鉴定可使试验结果更为可靠^[13],因此,本研究结合 ITS 和 EF-1 α 序列分析结果对病原菌进行分类鉴定。

在研究过程中,我们还发现了两种能引起毛葡萄果穗枯死的致病力较弱的真菌,分别鉴定为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*),但这两种菌的分离率较低。此外,史国英等^[2]曾报道了主要发生在花期的毛葡萄穗轴褐腐病病原可毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)。可见,毛葡萄穗部病害可由

多种真菌引起,这些真菌存在复合侵染的可能性。因此,对毛葡萄穗部病害的病原种类和侵染规律等可进行更为深入系统的研究。

通过抑制菌丝生长法在室内对该病的防治药剂进行初步筛选,获得多种对病原菌抑制作用较强的低毒药剂,包括 30% 氟硅唑微乳剂、64% 噁霜灵·锰锌可湿性粉剂、70% 戊唑·丙森锌可湿性粉剂、70% 代森锰锌可湿性粉剂、22.2% 抑霉唑乳油、70% 丙森锌可湿性粉剂及 60% 唑醚·代森联水分散剂剂等,抑菌率均达 100%。这些药剂可作为备选药剂进行田间防治试验,以便筛选出田间防治效果较好的药剂。

参考文献

- [1] 吴代东, 吴宗立, 李朝生, 等. 毛葡萄各生长期主要病虫害防治[J]. 广西农业科学, 2004, 35(1): 70-71.
- [2] 史国英, 胡春锦, 罗掉爱, 等. 毛葡萄穗轴褐腐病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物病理学报, 2010, 40(3): 242-249.
- [3] 袁志林, 陈益存, 汪阳东. 一种新发生的油桐叶枯病病原真菌[J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 658-662.
- [4] 梁超琼, 曹支敏, 陈敏, 等. 杨树水泡型溃疡病菌培养性状、无性型与分子系统学分析[J]. 林业科学, 2014, 50(4): 66-76.
- [5] 李淑斌, 张颖. 柏木枯萎病病原菌的形态特征及分子鉴定[J]. 华北农学报, 2011, 26(S1): 190-192.
- [6] Pennycook S R, Samuels G J. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand [J]. Mycotaxon, 1985, 24: 445-458.
- [7] 张玮, 燕继晔, 黄金宝, 等. 葡萄溃疡病菌巢式 PCR 高效检测体系的建立[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 479-480.
- [8] Kaliternam J, Milicevic T. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Croatia[J]. Plant Disease, 2013, 97(12): 1656.
- [9] Yan Jiye, Xie Yue, Zhang Wei, et al. Species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in China [J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 221-236.
- [10] Ploetz R C, Pérez-Martínez J M, Palmateer A J, et al. *Neofusicoccum parvum* causes a lethal dieback of *Syzygium paniculatum* in Florida [J]. Plant Pathology, 2009, 58(4): 801.
- [11] McDonald V, Lynch S, Eskalen A. First report of *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, and *N. parvum* associated with avocado branch canker in California [J]. Plant Disease, 2009, 93(9): 967.
- [12] Shen Y M, Chao C H, Liu H L. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and dieback of Asian pear trees in Taiwan [J]. Plant Disease, 2010, 94: 1062.
- [13] Marques M W, Lima N B, Morais M A, et al. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil [J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 195-208.