中图分类号：S532　文献标识码：A　文章编号：1672－3635(2015)04-0222-06

病虫防治

马铃薯六种主要病毒通用RT-PCR检测体系的建立

张　威[1]，白艳菊[1*]，文景芝[2]，范国权[1]，高艳玲[1]，申　宇[1]，张　抒[1]，孟宪欣[3]，王　军[4]

（1. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所，黑龙江　哈尔滨　150086；2.东北农业大学农学院，黑龙江　哈尔滨　150030；3. 黑龙江省农业科学院作物育种研究所，黑龙江　哈尔滨　150086；4.北大荒垦丰种业股份有限公司，黑龙江　哈尔滨　150090）

摘　要：马铃薯X病毒（PVX）、马铃薯Y病毒（PVY）、马铃薯S病毒（PVS）、马铃薯卷叶病毒（PLRV）、马铃薯M病毒（PVM）和马铃薯A病毒（PVA）是马铃薯生产田中发生率较高、危害较严重的病毒，因此，建立特异性强、灵敏度高、检测速度快的RT-PCR分子检测体系对保障马铃薯种薯质量具有非常重要的意义。试验筛选了6种病毒的特异引物、优化了PCR部分的试剂以及确定了退火温度。结果表明，当Mg^{2+}浓度为2.6 mmol/L、dNTPs浓度为0.1 mmol/L、*Taq* DNA聚合酶浓度为0.03 U/μL，以及退火温度为55.5 ℃时反应体系最稳定。最终，建立了一套通用RT-PCR检测体系，只需要变换每种病毒的引物，就可以实现对PVX、PVY、PVS、PLRV、PVM和PVA病毒的RT-PCR检测。每种病毒检测灵敏度均能达到pg以上。

关键词：马铃薯；PVX；PVY；PVS；PLRV；PVM；PVA

Establishment of Universal RT-PCR System for Detection of Six Major Potato Viruses

ZHANG Wei[1], BAI Yanju[1*], WEN Jingzhi[2], FAN Guoquan[1], GAO Yanling[1], SHEN Yu[1], ZHANG Shu[1], MENG Xianxin[3], WANG Jun[4]

(1. Institute of Virus-free Seedling Research, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China; 2. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China; 3. Institute of Crop Breeding, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China; 4. Beidahuang Kenfeng Seed Limited Company, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

Abstract: The higher incidence and more serious viruses in potato fields are potato virus X (PVX), potato virus Y (PVY), potato virus S (PVS), potato leafroll virus (PLRV), potato virus M (PVM), and potato virus A (PVA), so it is very important to guarantee the quality of seed potato by establishment of RT-PCR molecular detection system with specificity, high sensitivity and fast detection speed for these viruses. In this research, the primer for each virus was screened, PCR reagents were optimized, and annealing temperature was determined. The results indicated that when the concentration of Mg^{2+} was 2.6 mmol/L, dNTPs was 0.1 mmol/L, ***Taq*** DNA polymerase was 0.03 U/μL, and annealing temperature was 55.5 ℃, the reaction system was the most stable. Finally, a universal RT-PCR detection system was established, which only need to change primer for each virus when the RT-PCR detection for PVX, PVY, PVS, PLRV, PVM and PVA was needed. The detection sensitivity of each virus could reach the level of pg.

Key Words: potato; PVX; PVY; PVS; PLRV; PVM; PVA

收稿日期：2014-12-20

基金项目：黑龙江省自然科学基金项目（C201234）；黑龙江省农业科技创新工程重点资助项目（2012ZD015）；现代农业产业技术体系专项资金资助（CARS-10-P14）；国家科技支撑项目（2012BAD06B02-02C2）。

作者简介：张威（1981-），女，助理研究员，硕士，研究方向为分子植物病理学。

***通信作者**（Corresponding author）：白艳菊，研究员，研究方向为分子植物病理学，E-mail: yanjubai@163.com。

马铃薯是世界上最重要的粮食作物之一，具有分布范围广、适应性强、产量高、用途广等特点。中国马铃薯的种植面积和总产量均居世界首位[1]，然而整体生产水平却只有马铃薯生产发达国家荷兰平均单产的32%[2]。其中病毒病是降低马铃薯种薯产量，引起种性退化的主要原因。

目前，生产上发生普遍、危害较严重的6种主要病毒有：马铃薯X病毒（PVX）、马铃薯Y病毒（PVY）、马铃薯S病毒（PVS）、马铃薯卷叶病毒（PLRV）、马铃薯M病毒（PVM）和马铃薯A病毒（PVA）[3-7]，是马铃薯产业发展的制约瓶颈[8,9]。现阶段对病毒病尚没有有效的治疗办法，只能预防[10]。病毒检测是防治措施中最为重要的环节，也是种薯质量认证的关键指标。

反转录聚合酶链式反应（Reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）是从分子水平上对病毒的RNA进行检测，以其灵敏度高、特异性强、检测速度快等优点在病毒检测中日益显示出了强大的优势。6种病毒RT-PCR的检测体系都具有独特性，其中PCR部分各试剂用量、退火温度等都具有不同要求，为了提高6种病毒的检测效率，简化操作步骤，通过对每种病毒PCR部分Mg^{2+}、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶浓度工作范围，以及退火温度梯度等试验研究，最终，建立了一套通用RT-PCR检测体系，只需要变换每种病毒的引物，其他试剂用量和程序不变，就可以实现对这6种病毒的检测。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　样品来源

从马铃薯现蕾期到收获期，对内蒙古、黑龙江、吉林、云南等主要马铃薯产区进行样品采集，主要采集花叶、卷叶、坏死、皱缩、矮化等典型病毒病症状或疑似病毒病症状的样品，应用英国ADGEN公司的马铃薯病毒DAS-ELISA检测试剂盒对样品进行PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA检测，阳性样品于-70 ℃冰箱保存备用，6种病毒的阴、阳性对照由黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所提供。

1.1.2　主要试剂

Trizol购自Invitrogen公司；M-MLV反转录酶购自Promeger公司；dNTPs、RNA酶抑制剂、*Taq*DNA聚合酶、*Eco*R I、*Sal*I和pMD18-T均购自TaKaRa（大连）公司；大肠杆菌*Escherichia coli* GM109由实验室保存；质粒提取试剂盒和DNA片段回收试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司；其他试剂均为分析纯；引物合成及序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.2　试验方法

1.2.1　引物的筛选

每种病毒从中、英文文献中查找多对引物，筛选出CP（Coat protein，CP）保守区的引物；用Primer Premier 5.0软件进行评价，筛选分值高的引物；然后进行RT-PCR扩增，筛选出只能扩增得到特异性条带的引物，经综合考虑，最终每种病毒筛选1对特异性引物（表1）。

1.2.2　总RNA提取

参照Trizol Reagent（Invitrogen™）说明书，并在此基础上进行改进：将样品置于研钵中，加液氮研磨成粉末，转至1.5 mL离心管，加入1 mL Trizol混匀，使其充分裂解；4 ℃、14 000 r/min离心5 min；取上清，加入200 μL三氯甲烷，振荡混匀，室温放置15 min；4 ℃，12 000 r/min离心15 min；吸取上层水相至新1.5 mL离心管中，加入0.5 mL异丙醇，混匀，室温放置10 min；4 ℃、12 000 r/min离心10 min；弃上清，留沉淀，加入1 mL 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀；4 ℃、7 500 r/min离心5 min，弃上清，将离心管倒置于滤纸上，自然干燥；加入25~100 μL DEPC水溶解沉淀，即得到RNA。

1.2.3　提取RNA质量的检测

用紫外分光光度计测定其吸光度值，鉴定总RNA的纯度。

1.2.4　RT-PCR

反转录体系：取2.5 μL RNA，65 ℃加热8 min，冰上放置2 min；再加入下游引物（100 ng/μl）0.5 μL，5 × RT buffer 1 μL，dNTPs（2.5 mmol/l）1 μL，RNase Inhibitor 5 U，M-MLV反转录酶100 U，用ddH_2O补足至10 μL，短暂离心。反应程序：42 ℃反应1 h，92 ℃灭活2 min，-20 ℃保存待用。

PCR反应体系：取2 μL cDNA，10 × PCR buffer 2.5 μL，上、下游引物（100 ng/μl）各0.5 μL。分别对6种病毒反应体系中的Mg^{2+}、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶浓度进行优化：dNTPs浓度选择在0.1~0.5 mmol/L，*Taq* DNA聚合酶浓度选择在0.01~

表1　病毒特异性引物

Table 1　Specific primers of viruses

病毒 Virus	引物 Primer	引物序列（5'~3'） Primer sequence (5'~3')	PCR扩增片段长度（bp） Fragment length of PCR amplification
PVX[11]	PVX-F	ATGTCAGCACCAGCTAGCA	711
	PVX-R	TGGTGGTGGTAGAGTGACAA	
PVY[12]	PVY-F	GGCATACGGACATAGGAGAAACT	447
	PVY-R	CTCTTTGTGTTCTCCTCTTGTGT	
PVS[13]	PVS-F	GAGGCTATGCTGGAGCAGAG	729
	PVS-R	AATCTCAGCGCCAAGCATCC	
PLRV[14-16]	PLRV-F	CGCGCTAACAGAGTTCAGCC	336
	PLRV-R	GCAATGGGGGTCCAACTCAT	
PVM[17]	PVM-F	ACATCTGAGGACATGATGCGC	520
	PVM-R	TGAGCTCGGGACCATTCATAC	
PVA	PVA-F	GATGTCGATTTAGGTACTGCTG	273
	PVA-R	TCCATTCTCAATGCACCATAC	

注：PVA引物由‘加拿大食品检验机构’的徐慧民提供。

Note: Primer of PVA was provided by Huimin Xu from Canadian Food Inspection Agency.

0.05 U/μL，Mg^{2+}浓度选择在1.0~3.7 mmol/L。

PCR反应程序：92 ℃预变性5 min；92 ℃变性30 s，退火温度设定49.0~60.3 ℃、30 s，72 ℃延伸45 s，循环30次；72 ℃延伸8 min。

1.2.5　PCR产物的检测、克隆与测序

反应结束后，取5 μL扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶（含0.5 mg/L的溴化乙锭）电泳检测。用Bio-Rad凝胶成像系统观察结果。

RT-PCR产物纯化后分别连接到pMD18-T载体上，转化到GM109感受态细胞中。挑取的抗性单菌落扩繁后，试剂盒提取质粒，再应用*Eco*R I和*Sal*I对重组质粒进行酶切鉴定。目的片段进行测定，采用DNAstar软件进行序列分析。

2　结果与分析

2.1　总RNA提取质量

试验采用Trizol法提取总RNA，为保障RT-PCR检测结果准确，必须使用纯度较高、完整性较好的RNA。从表2可以看出，试验提取的总RNA OD_{260}/OD_{280}比值均为1.80~1.90，表明植物组织中的酚类化合物、多糖和蛋白质等已基本去除，总RNA纯度较理想。

2.2　PCR部分试剂浓度确定

通过分别对PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA6种病毒PCR部分的Mg^{2+}（1.0~3.7 mmol/L）、dNTPs（0.1~0.5 mmol/L）、*Taq* DNA聚合酶（0.01~

表2　RNA的紫外吸收值

Table 2　Ultraviolet absorption value of RNA

样品编号 Sample number	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/OD_{280nm}
1	1.389	0.761	1.83
2	1.456	0.814	1.80
3	3.628	1.920	1.88
4	2.786	1.544	1.80
5	2.682	1.432	1.87

注：OD_{260nm}—260 nm处紫外吸收值；OD_{280nm}—280 nm处紫外吸收值。

Note: OD_{260nm}—Ultraviolet absorption value of 260 nm; OD_{280nm}—Ultraviolet absorption value of 280 nm.

0.05 U/μl）进行单因子工作浓度确定。经反复试验，最终确定当dNTPs浓度在0.1 mmol/L、Mg^{2+}浓度在2.6 mmol/L、*Taq* DNA聚合酶浓度在0.03 U/μL时，6种病毒的RT-PCR均能达到检测稳定的状态，而且应用一套通用RT-PCR检测体系，只需要变换每种病毒的引物，就可以实现对这6种病毒进行检测，提高了检测效率，简化了操作步骤且达到节约成本的目的。

2.3　RT-PCR反应程序退火温度确定

通过分别对PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA6种病毒RT-PCR退火温度梯度的试验，确定了每种病毒的退火温度范围，从表3可以看出，退火温度在51.9~58.6 ℃时，6种病毒都能扩增得到目的片段，最终选择中间值55.5 ℃为体系的退火温度。

2.4　6种病毒通用RT-PCR检测体系的建立

通过对6种病毒PCR部分Mg^{2+}、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶浓度工作范围，以及退火温度梯度等试验，最终建立了一套通用RT-PCR检测体系（表4）。

表3　6种病毒的退火温度范围

Table 3　Annealing temperature range of six viruses

病毒 Virus	软件推荐退火温度（℃） Annealing temperature software recommended	退火温度范围（℃） Range of annealing temperature
PVX	52.0	49.0~58.6
PVY	57.5	51.9~60.3
PVS	56.0	50.5~60.3
PLRV	56.0	50.5~60.3
PVM	55.0	50.5~58.6
PVA	54.0	50.5~58.6

表4　PCR反应体系

Table 4　PCR reaction system

试剂 Reagent	用量（μl） Consumption
DEPC水	16.50
cDNA	2.00
上游引物（100 ng/μl）	0.50
下游引物（100 ng/μl）	0.50
10×PCR缓冲液	2.50
$MgCl_2$（25 mmol/l）	2.60
dNTPs（2.5 mmol/l）	0.25
*Taq*酶（5 U/μl）	0.15
总量 Total	25.00

分别以感染病毒的马铃薯叶片总RNA为模板，对6种病毒分别进行RT-PCR扩增。从图1看出，泳道2，3，4，5，6和7分别扩增得到长度为273 bp，336 bp，447 bp，520 bp，711 bp和729 bp的6条特异性条带，而阴性对照无此条带，成功扩增得到PVA、PLRV、PVY、PVM、PVX和PVS病毒。

2.5　RT-PCR产物的克隆与序列测定

将6种病毒的RT-PCR扩增产物纯化后，克隆到pMD18-T载体上，试剂盒提取质粒，对重组质粒的插入片段进行序列测定，测序结果用DNAstar软件分析，分析结果显示：PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA的扩增产物分别由711，447，729，336，520和273个核苷酸组成，与预期片段大小相同，序列与相应病毒序列同源性均在98.5%以上，证明RT-PCR检测结果准确。

2.6　通用RT-PCR检测体系的灵敏度

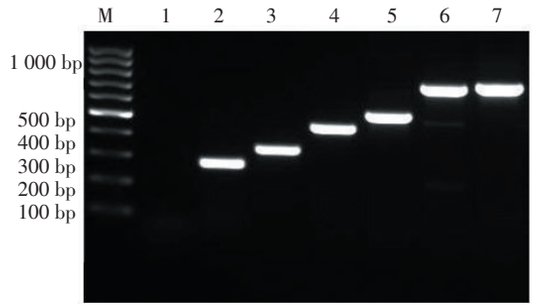
提取PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA病毒的RNA，紫外分光光度计测定RNA的浓度依次为921.30 ng/μL，1 120.50 ng/μL，605.75 ng/μL，160.35 ng/μL，66.78 ng/μL和561.00 ng/μL，每一种病毒的RNA经过浓度梯度稀释后再进行RT-PCR扩增，结果见表5，经计算6种病毒的RT-PCR检测体系最低能检测出RNA浓度分别为368 pg/μL，448 pg/μL，303 pg/μL，107 pg/μL，66 pg/μL和374 pg/μL。

2.7　应用RT-PCR检测体系对马铃薯田间样品进行检测

分别应用PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA 6种病毒RT-PCR检测体系对已知带毒情况的田间采集的马铃薯病叶和脱毒试管苗进行检测，RT-PCR检测结果非常准确。图2为代表性样品的电泳图。

3　讨　论

PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA是马铃薯生产田中发生率较高、危害较严重的病毒，也是国家标准《马铃薯种薯》（GB18133-2008）中规定的马铃薯种薯必须检测的病毒。目前马铃薯质检单位和科研机构主要采用血清学DAS-ELISA方法进行病毒检测，此方法虽适合样品量较大的田间样品的检测，但不适用于病毒浓度较低的马铃薯脱毒试管苗和休眠薯块的检测，马铃薯试管苗作为源头，其脱毒是否彻底关系到各级种薯的质量，因此，需



M-100 bp Marker；1-阴性对照；2-PVA样品；3-PLRV样品；4-PVY样品；5-PVM样品；6-PVX样品；7-PVS样品。

M-100 bp Marker; 1-Negative control; 2-Sample of PVA; 3-Sample of PLRV; 4-Sample of PVY; 5-Sample of PVM; 6- Sample of PVX; 7- Sample of PVS.

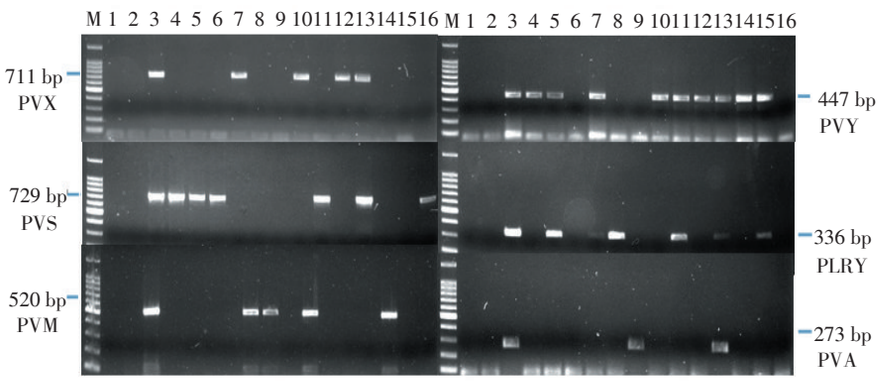
图1　马铃薯六种病毒通用RT-PCR检测体系的建立

Figure 1　Establishment of RT-PCR detection system for six potato viruses

表5　通用RT-PCR检测体系的灵敏度

Table 5　Universal RT-PCR detection system sensitivity

病毒 Virus	检测方法 Detection method	RNA浓度（ng/μl） RNA concentration	稀释倍数 Diluent fold						
			100	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000
PVX	RT-PCR	921.30	+	+	+	+	+	+	-
PVY	RT-PCR	1 120.50	+	+	+	+	+	+	-
PVS	RT-PCR	605.75	+	+	+	+	+	-	-
PLRV	RT-PCR	160.35	+	+	+	+	-	-	-
PVM	RT-PCR	66.78	+	+	+	-	-	-	-
PVA	RT-PCR	561.00	+	+	+	+	-	-	-



M-100 bp Marker；1-水对照；2-阴性对照；3-阳性对照；4~16-马铃薯田间样品。

M-100 bp Marker; 1-Water control; 2-Negative control; 3-Positive control; 4-16-Potato sample in field.

图2　应用RT-PCR对马铃薯田间样品的检测

Figure 2　Detection of potato field samples using RT-PCR

要配套更灵敏的检测技术。近年来，RT-PCR检测技术以其灵敏度高、特异性强、检测速度快等特点在病毒检测上得到应用，可以弥补DAS-ELISA检测方法的不足，对试管苗、休眠薯块等样品都可以进行准确检测。

通过分别对6种病毒引物筛选、PCR部分各试剂工作浓度以及每种病毒退火温度确定，最终建立一套通用RT-PCR分子检测体系，只需要变换每种病毒的引物，就可以实现分别对PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA病毒的RT-PCR检测。

在RT-PCR反应体系中，引物的选择对试验的成败起关键性作用[18]，既要使引物能对病毒进行特异性扩增，又要使引物能对同一病毒的不同株系进行特异性扩增，以保障不漏检病毒。本研究从中、英文文献中每种病毒查找多对引物，首先在GenBank上将每种病毒不同分离物的CP基因进行多序列比对，筛选出在保守区的引物，然后用Primer Premier 5.0软件进行综合评价，筛选效果好的引物，然后再用RT-PCR体系扩增，筛选出能扩增得到特异性条带而无杂带的引物，最终每种病毒筛选到一对特异性引物。其次，PCR部分Mg^{2+}、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶浓度对试验成败起关键作用，经反复试验，最终确定当dNTPs浓度在0.1 mmol/L、Mg^{2+}浓度在2.6 mmol/L、*Taq* DNA聚合酶浓度在0.03 U/μL时，6种病毒的RT-PCR均能达到检测稳定的状态。再次，PCR反应程序中退火温度对反应的影响很大，通过对每种病毒RT-PCR退火温度梯度进行试验，确定了退火温度在51.9~58.6 ℃ 6种病毒都能扩增得到目的片段，最终选择中间值55.5 ℃为体系的退火温度。

本研究还对6种病毒RT-PCR检测体系的灵敏度进行了测定，对每一种病毒的RNA经过浓度梯度稀释后再进行RT-PCR扩增，经计算6种病毒的RT-PCR检测体系最低能检测出RNA浓度分别为368 pg/μL，448 pg/μL，303 pg/μL，107 pg/μL，66 pg/μL和374 pg/μL，均达到pg以上。

最后，分别应用PVX，PVY，PVS，PLRV，PVM和PVA 6种病毒通用RT-PCR检测体系对已知带毒情况的田间采集的马铃薯病叶和脱毒试管苗进行检测，RT-PCR检测结果非常准确，但对病毒含量较低的脱毒试管苗来说，RT-PCR检测的灵敏度更高，因此该体系完全可以应用于马铃薯上述6种病毒的田间检测。

[参 考 文 献]

[1] 张威, 白艳菊, 高艳玲, 等. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(4): 71-74.

[2] 王迎男, 贾立国, 樊明寿. 2010~2012年世界各洲及各洲主要生产国马铃薯生产状况分析 [M]//屈冬玉, 陈伊里. 马铃薯产业与现代可持续农业. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2015.

[3] Solomon-Blackburn R M, Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches [J]. Heredity, 2001, 86: 17-35.

[4] 钟婷婷, 蒲志刚, 何俊蓉, 等. 四川省马铃薯主产区最新病毒病普查及血清学鉴定 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(1): 96-99.

[5] 刘洪义, 张洪祥, 李明福, 等. 黑龙江省马铃薯病毒病的普查及鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 307-310.

[6] 白艳菊, 文景芝, 杨明秀, 等. 西南地区与东北地区马铃薯主要病毒发生比较 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 733-736.

[7] 张仲凯, 丁铭, 方琦, 等. 云南马铃薯病毒种类及脱病毒种苗筛选技术体系 [J]. 云南农业科技, 2003(增刊): 121-130.

[8] Jansky S, Jin L, Xie K, *et al*. Potato production and breeding in China [J]. Potato Research, 2009, 52(1): 57-65.

[9] Wang Q, Zhang W. An economic analysis of potato demand in China [J]. American Journal of Potato Research, 2010, 87(3): 245-252.

[10] 吴兴泉, 陈士华, 谢联辉. 马铃薯X病毒的分子鉴定与检测技术 [J]. 河南农业科学, 2006(2): 72-75.

[11] 张威, 白艳菊, 申宇, 等. 马铃薯X病毒黑龙江分离物外壳蛋白基因克隆与序列分析 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(8): 1-5.

[12] 孙琦, 张春庆, 孟昭东, 等. 马铃薯X、Y病毒的复合RT-PCR检测体系的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(4): 737-738.

[13] Crosslin J M, Hamlin L L. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid [J]. American Journal of Potato Research, 2011, 88: 333-338.

[14] Nie X, Singh R P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tuber [J]. Journal of Virological Methods, 2001, 91: 37-49.

[15] Singh R P, Nie X Z, Singh M. Duplex RT-PCR: Reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance [J]. Journal of Virological Methods, 2000, 86: 121-129.

[16] Nie X Z, Singh R P. Detection of multiple potato viruses using an oligo (dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2000, 86: 179-185.

[17] Xu H, D´Aubin J, Nie J. Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes [J]. Virology Journal, 2010: 25(7): 1-7.

[18] 郑轩, 成巨龙, 赵震, 等. 五种烟草病毒TMV、CMV、TEV、PVY及TVBMV的多重RT-PCR同步检测 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 146-153.