

芒果植株再生及其在生物技术中的应用

肖洁凝^{1,2} 吴永杰¹ 陈云凤¹ 陈启助¹ 黄学林^{1,*}

¹中山大学生命科学学院基因工程教育部重点实验室, 广州 510275, ²广州大学生物与化学工程学院生物系, 广州 510405

The Plant Regeneration and Its Application in Biotechniques of Mango

XIAO Jie-Ning^{1,2}, WU Yong-Jie¹, CHEN Yun-Feng¹, CHEN Qi-Zhu¹, HUANG Xue-Lin^{1,*}

¹The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275; ²Department of Biology, School of Biology and Chemistry Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510405

提要 介绍了近20年来芒果植株再生研究的进展及其在生物技术中的应用。芒果植株再生研究主要通过体胚发生途径进行, 用已建立的芒果体胚再生体系进行芒果品种改良已有不少基础研究, 将芒果ACC氧化酶的反义基因导入“Hindi”芒果的PEMs中控制果实成熟以及用芒果胚性培养物与真菌滤出物共培养, 已初步筛选出抗炭疽病菌的芒果品种。

关键词 芒果; 体胚发生; 器官发生; 生物技术

芒果(*Mangifera indica*)是漆树科芒果属的常绿大乔木, 产于热带和南亚热带地区, 果树速生, 适应性强, 可作行道树。其果实外观美丽, 果肉风味可口, 享有“热带水果之王”的美誉。虽然芒果生产发展迅速, 但问题还较多。病虫害是芒果生产中的大敌, 其中炭疽病、白粉病、蒂腐病是严重危害芒果生产的三大病害; 而虫害约有300余种, 严重影响芒果的产量以及采后贮运销售, 果农常常遭受巨大损失, 影响芒果生产的经济效益^[1,2]。另外, 人们对芒果品质的要求也越来越高, 市场的供应期也不断延长。但由于芒果果实不耐低温, 不耐贮存, 3周后即出现腐烂变软^[3], 其种子是典型的顽拗性种子, 不耐低温, 对脱水敏感, 不耐贮存, 寿命极短^[4]。因此, 为适应生产和市场的需要, 培育品质优良、抗病性强、耐贮性好、矮化集于一身的芒果品种是芒果研究中面临的重要课题。

植物生物技术为改良品种提供了一条新途径, 本文介绍国内外芒果的植株再生及其在生物技术中应用的研究进展。

1 芒果的离体植株再生

要通过生物技术进行品种改良和实现超低温种质保存, 其首要的条件是建立芒果组织培养再生体系。经过多年的研究, 已取得了较大的进展(表1), 特别是芒果体细胞胚胎发生的研究。

1.1 芒果体细胞胚胎发生和原生质体培养

Litz等^[5]首次报道通过芒果珠心组织进行离体培养, 并获得体细胞胚, 但体胚不能成苗。DeWald等^[6,7]采用两个多胚芒果品种(Parris和James Saigon)的珠心组织, 通过体胚发生途径, 成功地获得再生植株。依据目前的资料, 芒果的体细胞胚胎发生主要经过3个阶段: (1)胚性培养物的诱导; (2)体胚的诱导、分化、发育和成熟; (3)体胚的萌发和成苗。芒果的体细胞胚胎发生主要是通过间接发生途径^[5~13], 即通过愈伤组织或暂短的愈伤组织阶段, 但也有直接发生的^[14,15]。芒果珠心组织的胚性反应能力主要取决于外植体供体的基因型和培养基所含的成分^[5~13], 以及被珠的发育状态^[8]。

诱导胚性培养物的外植体多采用授粉后20~60 d的幼果或长度约为1~5 cm的幼果^[5~13], Patena等^[13]认为较小的幼果比较大的幼果胚性反应能力强, DeWald等^[6,7]则采用胚占据胚囊腔一半的幼果。将分离的珠心组织或去除胚后的半边胚珠组织(使珠心组织与培养基接触)置于固体培养基上培

收稿 2004-02-17 修定 2004-05-31

资助 IPGRI基金(L0A021057)。

* 通讯作者(E-mail: ls17@zsu.edu.cn, Tel: 020-84110797)。

表1 芒果离体培养的形态发生

发生途径	外植体	主要研究内容及结果	参考文献
体胚发生	珠心组织	获得体胚但不能发育成植株; 体胚发生与品种有关	5
		可获得的体胚发生, 但只获得较少的萌发苗; 体胚发生与品种有关	8
		获得体胚和植株再生; 增殖需要细胞分裂素; 体胚发生与品种有关	29
		固体培养基适于体胚诱导; 体胚诱导依赖蔗糖, 5%~6% 蔗糖好; 谷氨酰胺可促进体胚发生	6
		经愈伤诱导和悬浮培养增殖, 获得高频率体胚发生; 试图解决体胚发生中过早萌发、下胚轴体胚二次胚发生以及体胚缺乏两极的问题	7
		芒果单胚品种的快速体胚发生	14
		对高含水性体胚成熟度的调控进行研究: 提高培养基中固化剂(Gel-Gro)浓度; ABA可以促进次生胚的正常发育	30
		ABA、渗透压和温度对芒果体胚发生的作用	31
		乙烯促进剂以及抑制剂对体胚发生的影响, 乙烯抑制体胚发生, 单胚品种产生更多的乙烯	32
		基因型、2, 4-D和胚性培养物看护培养对胚性愈伤组织的诱导	9
		单胚品种的高频率体胚发生, 不同的品种胚性反应能力不同	12
		优化培养基, 有效控制褐化	13
		芒果单胚品种的快速体胚发生	20
		原生质体培养(体胚发生)	珠心组织形成的PEMs
器官发生	茎尖	生长素和细胞分裂素对离体茎尖生长的作用, 仅获得了有限的茎尖增殖	18
		从幼叶诱导愈伤, 获得再生植株	17
	叶片	叶和茎尖离体培养具有产生大量酚类物质、培养基褐化、植株褐化和污染、生长缓慢问题	33
	体胚苗根	体胚苗再生	10
	茎尖、茎节	生长素和细胞分裂素对离体茎尖、茎节生长的影响, 仅获得了有限的茎尖增殖和腋芽	19
	去顶幼苗	获得较大量的子叶节腋芽	20
	子叶	形成不定根	20
	成熟胚轴	成熟胚轴成苗	4

养, 后者被诱导成胚性培养物的能力较前者高^[12]。培养基主要用MS或1/2MS培养基, 也有用RO^[12]和BP培养基^[13]。Thomas^[12]发现, 对于单胚品种“Arka Anmol”, RO培养基比MS培养基更容易诱导胚性培养物。培养基的附加物主要有6%蔗糖、20% CW、2, 4-D、GA、Gln、抗坏血酸及固化剂。值得注意的是, 不同研究者在培养基中都添加了60 g·L⁻¹蔗糖、20% CW、2, 4-D和Gln, 这些物质似乎对诱导胚性培养物较有效。Litz等^[9]认为2, 4-D附加胚性培养物的看护培养有利于某些基因型体胚的诱导。由于培养过程中产生大量的酚类物质会导致外植体褐化, 影响愈伤组织的诱导, 必须在培养基中加活性碳(AC)以及通过5~7 d的继代^[6,7], 以除去酚类物质, 但也有些品种胚性培养物的诱导不需更换培养基^[14]。Patena等^[13]则通过使用低浓度的2, 4-D(0.5 mg·L⁻¹)、高压灭菌的椰子水、固体培养基和BP培养基有效控制外植体褐化。我们发现在以未成熟子叶为外植体

时, 褐化问题并不严重, 对诱导几乎无影响, 也不需更换培养基^[15]。胚性培养物诱导可在光下^[5~9]或暗中培养^[13~15], 培养2~10周不等。

经诱导的培养物需分别转至体胚诱导、分化和生长及成熟培养基上进行培养。不同研究者所用的培养基种类各不相同, 有液体、固体或半固体培养基, 培养基的基本成分有改良的B₅培养基^[6,7]、MS或1/2MS^[14]、RO或改良的1/2B₅培养基(含RO有机物)^[12]以及BP^[13]。在培养的前期, 培养基普遍加入2, 4-D^[6,7,12~14], 有些还加入GA^[12,14]或KT^[6,7]; 培养的后期, 去除培养基2, 4-D(但也有例外的)后, 加入BA或KT、ABA或GA。所有植物生长调节剂使用的浓度大多数为1~5 mg·L⁻¹, 但也有加入更低浓度或更高浓度的^[12,13]。培养基中还添加40~60 g·L⁻¹蔗糖、20% CW、CH、Gln、固化剂及其它成分。

DeWald等^[6,7]根据比较体胚的诱导、生长和成熟的培养基效果的结果, 认为液体培养能加速

原胚物质(PEMs)的生长,但若要形成正常的体胚则需转到固体培养基中进行继代培养,否则液体培养基中会引发多种畸形生长;改良的B₅培养基比WPM、MS或改良的MS基本培养基好;在培养基中添加5%~6%的蔗糖有利于体胚的产生;使用Gelrite较Difco Bacto的效果好,并认为Gelrite含有某些有利于体胚生长的物质,如Ca和Mg。外植体大多数应在暗中培养数周以上,这可防止体胚过早萌发,但过长的黑暗培养会影响体胚的萌发率^[16]。

成熟的体胚被转置萌发和成苗培养基上进行光照培养,所采用的基本培养基有改良的B₅培养基^[6,7]、1/2改良B₅培养基^[10,11]、1/2MS^[14]、1/2B₅培养基(含RO有机物)^[12]或BP培养基^[13]。培养基中不加入植物生长调节剂或加入细胞分裂素类似物,如6-BA^[14]或TDZ^[12],蔗糖浓度为15~30 g·L⁻¹,大多数实验体系加20% CW,常可通过高温灭菌^[13,15]或过滤灭菌^[5~7]加入培养基中。

虽然有较多的品种已建立了的体胚再生体系,但仍有一些品种几经试验而不能成功,如“Red Itamaraca”^[16]。另外,体胚的成苗率还普遍较低,一般为10%~30%,最高为63%^[7];常出现体胚苗生长缓慢和根发育不良等现象^[7,12]。

目前,对芒果原生质体培养进行研究的只有印度的Ara等人^[11]。他们用珠心组织(品种为Amrapali)所建立的悬浮培养体系,已获得原胚物质,然后将其置于原生质体分离培养基(PIM,培养基内含B₅大量元素、MS微量元素及其它附加物,并含1.2%纤维素酶、1.0%半纤维素酶和0.6%果胶酶)中以去除细胞壁,经分离的原生质体再次诱导形成微愈伤组织(microcalli),在含有植物生长调节剂的培养基上增殖,而在不含植物生长调节剂的培养基上即形成体胚,体胚的萌发率约为40%~60%,成苗率约为30%。

1.2 芒果器官发生

虽然人们已对芒果器官发生进行了一些研究,但成功得到再生植株的例子还较少,成功的报道是Raghuvanshi和Srivastava^[17]用“Amrapali”芒果充分展开的幼叶,通过诱导愈伤组织,得到了再生植株。他们将消毒后的外植体接种到含0.05% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的MS液体培养基

中,75 r·min⁻¹振荡培养12 h,每2 h更换一次新鲜的培养液,以去除酚类物质。将处理过的外植体置于加有不同浓度的生长素和细胞分裂素组合的培养基上培养,结果是,在含有0.24 mg·L⁻¹ NAA和2 mg·L⁻¹ 6-BA的培养基上的外植体生长最快,培养4周便可看到芽的形成,萌动的芽经培养3周,平均长度可达5.8 cm,用吲哚丁酸(IBA)处理后可有20%的苗出根。

采用茎尖或茎节培养只能得到有限的茎尖增殖和腋芽,且难以生根^[18~20]。王晓峰和傅家瑞^[4]用成熟芒果的离体胚轴进行培养获得了再生植株,他们发现0.5% AC可有效抑制胚轴的褐变。WPM液体培养基外加0.5% AC、3%蔗糖、6 mg·L⁻¹ IBA、4 mg·L⁻¹ KT适宜芒果离体胚轴的萌发和生长。

我们曾研究过十多种外植体不定芽的诱导效果,所用的外植体包括成年树的顶芽、叶柄、花枝和幼果,一年生幼苗的顶芽、茎节段、叶柄和叶片,离体幼苗的茎尖、茎节段、子叶节、根尖和叶片,成熟胚的子叶以及去顶幼苗子叶节等,发现只有萌发7 d的去顶幼苗子叶节能诱导出3~7个腋芽,它们在含5 mg·L⁻¹ IBA的生根诱导培养基上预培养5 d,再在生根培养基上培养1周后能诱导出根,但炼苗移栽难以成活^[20]。

成熟的芒果子叶形成不定根较为容易,培养21 d后,平均生根率达64%(在不含营养成分和植物生长调节物质的琼脂培养基上)。芒果子叶生根的位点主要在近轴面切口上表皮的主维管束处。2,4-D抑制子叶不定根的形成,但诱导子叶形成根状物或瘤状物。5和50 mg·L⁻¹的NAA对子叶切段生根作用不明显,当浓度达到100 mg·L⁻¹时,则推迟芒果子叶不定根的形成,减少根的数目。5、50和100 mg·L⁻¹的IAA和IBA都可促进子叶生根,可使子叶生根百分率比对照增加35%以上,平均生根数增加60%以上。200 mg·L⁻¹的三碘苯甲酸(TIBA)可完全抑制子叶不定根的形成,加入IBA可部分逆转抑制效应。子叶不同切面不定根形成的能力差异可能与生长素的极性运输有关^[20]。

我们采用这一实验体系,通过抑制扣除杂交方法(SSH),获得6个可能与不定根形成相关的cDNA片段,这些片段的cDNA所推导的蛋白质分

别与膜运载蛋白、甲酸脱氢酶(FDH)、ABC 转运蛋白、乙酰辅酶 A 羧化酶和转录因子同源; 用 RACE 法对与拟南芥生长素反应因子同源的 cDNA 片段进行扩增, 获得包含完整读码框架(ORF)的 2 个基因的序列, 分别命名为 *MiARF1*(芒果生长素反应因子类蛋白基因 1) 和 *MiARF2*(芒果生长素反应因子类蛋白基因 2)^[21, 22], 现正对其功能作进一步分析。

2 芒果离体培养在生物技术中的应用

人们采用已建立的芒果体胚再生体系, 对芒果进行品种改良等生物技术研究(表 2)。自 1990 年开始, Litz 等^[23]以及 Mathews 和 Litz^[24]用建立的

体胚体系初步研究基因转化, 将 *NPTII* 基因整合到体胚中, 发现不同发育时期的体胚对卡那霉素的敏感性不同, 发育前期的体胚比发育后期的体胚更为敏感。Mathews 和 Litz^[16]将含有葡糖醛酸酶和新霉素磷酸转移酶基因的 pTiT37-SE::pMON9749 与胚性培养物(直径少于 1 000 μm) 共培养后, 获得了转基因植株, 但转基因植株中不含目的基因。直到 1997 年, Cruz-Hernandez 等^[25]用 pBI121 双元载体通过土壤农杆菌 LBA4404 介导转化, 成功地将芒果 ACC 氧化酶的反义基因导入“Hindi”芒果的 PEMs 中, 试图获得控制果实成熟的转基因植株, 但未见转基因植株的后续报道。

表 2 芒果离体培养在生物技术中的应用

材料来源	生物技术研究	参考文献
胚性培养物(珠心组织)	筛选抗炭疽病菌的胚性培养物	26
胚性培养物(珠心组织)	筛选抗炭疽病菌及毒植物素的胚性培养物, 并分析其机制	27
体胚(珠心组织)	将 <i>NPTII</i> 基因整合到体胚中; 不同发育时期的体胚对卡那霉素的敏感性不同; 发育前期的体胚比发育后期的体胚更为敏感	23, 24
体胚(珠心组织)	β -葡糖醛酸酶(GUS)基因和新霉素磷酸转移酶基因(<i>NPTII</i> 基因)转化	16
体胚(珠心组织)	ACCase 反义基因的转化	25
胚性培养物(未成熟子叶)	用 PEMs 成功地进行超低温保存	28

为了培育抗炭疽病(由真菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起)的芒果品种, Litz 等^[26]通过芒果胚性培养物与上述真菌滤出物共培养时, 初步筛选出抗炭疽病菌的体胚。Jayasankar 和 Litz^[27]对抗菌及抗毒植物素的胚性培养物作了进一步研究, 发现抗菌及抗毒植物素的胚性培养物可抑制菌丝的生长, 抗菌的胚性培养物分泌的几丁质酶和葡聚糖酶增多, 这在筛选抗炭疽病菌的芒果中迈出了可喜的一步。

在芒果种质超低温保存方面中, 我们采用玻璃化方法于液氮中低温保存了芒果胚性培养物, 存活率 90% 以上, 这些经过超低温保存过的胚性培养物可通过体细胞胚胎发生的途径再生植株。试验结果证实芒果的胚性组织培养物可作为芒果种质长期保存的良好试材, 只需用简单的玻璃化液预处理就可直接在液氮低温下长期保存^[28]。

3 结语

虽然芒果离体培养的研究已有 20 多年, 取得了不少结果, 但许多研究仍处于实验阶段, 远未

能解决生产中的问题。因此, 今后应加强研究的问题有: (1) 国内对芒果植株再生研究的品种较少, 应扩大植株再生研究中的品种数目; (2) 在现有的基础上, 加强离体培养调控因素的研究, 特别是体胚成熟的同步化及成苗率, 建立完善的芒果植株再生体系; (3) 用经超低温保存的植物, 进一步研究其抗冻的机制, 克隆出与抗冻有关的基因, 用以进行芒果品种改良; (4) 用现有的植株再生体系, 进一步加强芒果离体培养在生物技术中应用的研究, 利用基因工程等技术, 培育抗病、抗虫害的新品种, 改善芒果果实的品质, 控制果实的成熟; (5) 不同发育时期的芒果子叶具有不同的离体形态发生能力。以幼胚的子叶为外植体可进行有效的体胚发生, 而成熟胚的子叶却能在无激素的培养基中易形成不定根, 并具有很强向胚轴极性, 因此芒果子叶不但是建立体胚再生植株的有效外植体, 而且对离体形态发生的调控机制的研究来说也是一种理想的材料, 可对其调控机制开展研究。

参考文献

- 1 逯万兵, 刘岩. 芒果高产栽培. 北京: 金盾出版社, 1995. 1~116
- 2 黄国弟. 我国芒果选育种研究现状及发展趋势. 中国果树, 2000, (3): 47~49
- 3 Lakshminarayana S. Mango. In: Nagy S, Shaw PE (eds). Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses. Westport: AVI Publishing, 1980. 184~257
- 4 王晓峰, 傅家瑞. 芒果种子的脱水与贮藏研究. 植物学报, 1991, 33(2): 118~123
- 5 Litz RE, Knight RJ, Gazit S. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica* L. Plant Cell Rep, 1982, 1: 264~266
- 6 DeWald SG, Litz RE, Moore GA. Optimizing somatic embryo production in mango. J Am Soc Hortic Sci, 1989, 114: 712~716
- 7 DeWald SG, Litz RE, Moore GA. Maturation and germination of mango somatic embryos. J Am Soc Hortic Sci, 1989, 114: 837~841
- 8 Litz RE. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic *Mangifera indica* L. HortScience, 1984, 19: 715~717
- 9 Litz RE, Hendrix RC, Moon PA et al. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2, 4-D and embryogenic nurse culture. Plant Cell Tiss Org Cult, 1998, 53: 13~18
- 10 Ara H, Jaiswal U, Jaiswal VS. Rooting of microshoots of *Mangifera indica* L. cv. Amrapali. Curr Sci, 1998, 74: 240~242
- 11 Ara H, Jaiswal U, Jaiswal VS. Plant regeneration from protoplasts of mango (*Mangifera indica* L.) through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 2000, 19: 622~627
- 12 Thomas P. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucellar tissue of monoembryonic mango. J Hortic Sci Biotech, 1999, 74: 135~139
- 13 Patena LF, Carlos-Refuerzo LR, Barba RC. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mango (*Mangifera indica* L.). In Vitro Cell Dev -Pl, 2002, 38: 173~177
- 14 Jana MM, Nadgauda RS, Rajmohan K et al. Rapid somatic embryogenesis from the nucelli of monoembryonic mango varieties. In Vitro Cell Dev -Pl, 1994, 30: 55~57
- 15 Xiao J-N, Huang X-L, Wu Y-J et al. Direct somatic embryogenesis induced from cotyledons of mango immature zygotic embryos. In Vitro Cell Dev -Pl, 2004, 40: 196~199
- 16 Mathews H, Litz RE. Mango. In: Hammerschlag FA, Litz RE (eds). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Wallingford: CAB International, 1992. 433~448
- 17 Raghuvanshi SS, Srivastava A. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. Plant Cell Tiss Org Cult, 1995, 41: 83~85
- 18 Yang ZH. Effect of plant growth regulators on *in vitro* propagation, regeneration and organogenesis of mango (*Mangifera indica* L), kiwi (*Actinidia arguta* Planch. Ex Miq.), pomegranate (*Punica granatum* var. nana (L.) Pers.) and pistachio (*Pistacia vera* L.). Berlin: Köster, 1993. 26~45
- 19 梁永恒. 芒果种质资源的保存及外植体植株再生[硕士学位论文]. 广州: 中山大学, 1998
- 20 肖洁凝. 芒果 (*Mangifera indica* L.) 离体形态发生的调控及不定根形成相关基因的克隆[博士学位论文]. 广州: 中山大学, 2003
- 21 肖洁凝, 黄学林, 张以顺等. 芒果子叶切段不定根形成相关基因的 cDNA 片段的克隆. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30: 136~140
- 22 肖洁凝, 黄学林, 黄霞等. 芒果生长素反应因子类蛋白的 cDNA 克隆和表达. 生物工程学报, 2004, 20: 59~62
- 23 Litz RE, Mathews H, Bharathan N et al. Transformation of somatic embryos of mango. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, 1990, 7: 67 (abstract)
- 24 Mathews H, Litz RE. Kanamycin sensitivity of mango somatic embryos. HortScience, 1990, 25: 965~966
- 25 Cruz-Hernandez A, Gomez Lim MA, Litz RE. Transformation of mango somatic embryos. Acta Hort, 1997, 455: 292~298
- 26 Litz RE, Mathews VH, Hendrix RC et al. Mango somatic cell genetics. Acta Hort, 1991, 291: 133~140
- 27 Jayasankar S, Litz RE. Characterization of embryogenic mango cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate and phytotoxin. Theor Appl Genet, 1998, 96: 823~831
- 28 Wu Y-J, Huang X-L, Xiao J-N et al. Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. Cryoletters, 2003, 24(5): 303~314
- 29 DeWald SG. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from mango (*Mangifera indica* L.) nucellar callus [PhD Diss]. Gainesville: University of Florida, 1987
- 30 Monsalud M-J, Mathews H, Litz RE et al. Control of hyperhydricity of mango somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult, 1995, 42: 195~206
- 31 Pliego-Alfaro F, Litz RE, Moon PA et al. Effect of abscisic acid, osmolarity and temperature on *in vitro* development of recalcitrant mango (*Mangifera indica* L.) nucellar embryos. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 44: 53~61
- 32 Litz RE, Yurgalevitch C. Effects of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, aminoethoxyvinylglycine, methylglyoxal-bis-(guanylhydrazone) and dicyclohexylammonium sulfate on induction of embryogenic competence of mango nucellar explants. Plant Cell Tiss Org Cult, 1997, 51: 171~176
- 33 Thomas P, Ravindra MB. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. J Hortic Sci, 1997, 72(5): 713~722