# 东乡野生稻渗入系苗期抗旱遗传 及生理机制初步分析

付学琴12 贺浩华1 罗向东2 文 飘2 谢建坤2\*

(1. 江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室 ,江西 南昌 330045; 2. 江西师范大学 生命科学院 ,江西 南昌 330022)

摘要: 以强抗旱性的巴西旱稻、东乡野生稻和弱抗旱性的栽培稻协青早 B 为对照品种,以基于萎蔫率的抗旱等级为鉴定指标 采用苗期反复自然干旱鉴定法和 20% PEG6000 模拟干旱法 对江西东乡普通野生稻( Oryza rufi-pogon) /协青早 B //协青早 B 构建的回交重组自交系( Backcross inbred lines , BIL) 群体( BC<sub>1</sub>F<sub>9</sub>) 进行苗期抗旱机理及遗传分析。结果表明: 230 个 BC<sub>1</sub>F<sub>9</sub> BIL 群体经 2 次反复自然干旱后 在 1/2MS 营养液恢复生长的平均抗旱等级分别为 3.76 和 4.39 菱蔫率呈连续正态分布 暗示东乡野生稻苗期抗旱性表现为质量 – 数量性状遗传性状特征。将干旱处理一次后等级为 1 级的 14 个株系 在 20% PEG6000 模拟干旱条件下进行处理 结果与反复干旱二次后结果一致 株系 1112、1168、1172 和 1315 为强抗旱基因渗入系 可进一步用于抗旱基因的挖掘与利用。在 20% PEG6000 模拟干旱条件下 强抗旱性株系 1112 苗期叶片的可溶性糖、脯氨酸含量和 SOD 活性增加幅度都大于弱抗旱性株系 1323 、GSH 含量下降幅度则低于弱抗旱株系 ,说明强抗旱株系渗透物质比弱抗旱株系积累快且幅度大 而细胞膜过氧化产物积累速度较慢 ,更有利于适应干旱环境。

关键词: 东乡野生稻; 渗入系; 苗期; 抗旱机理; 初步分析

中图分类号: S332.4; S511.9 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2011) 05 - 0845 - 06

# Primary Analysis of Drought Resistance Heredity and Physiological Mechanism of Introgression Lines of Common Wild Rice( *O. rufipogon* Griff. ) from Dongxiang in Jiangxi Province at Seedling Stage

FU Xue-qin<sup>1 2</sup>, HE Hao-hua<sup>1</sup>, LUO Xiang-dong<sup>2</sup>, WEN Piao<sup>2</sup>, XIE Jian-kun<sup>2 3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

**Abstract**: With the repeated natural drought method and the 20% ( w/v) PEG -6000 simulated drought method , the drought resistance of seedlings of a BIL population (  $BC_1F_9$ ) of Dongxiang common wild rice ( Dwr) /Xieqingzao B( Xqz B) //Xqz B were examined by drought treatment assay and genetic analysis. The control materials included the strong drought – resistant varieties , Brazil upland rice , Dongxiang common wild rice and the drought – sensitive cultivar Xqz B , using grade of drought resistance based on seedling wilting as evaluation indice. The result showed that after two repeated natural droughts and recovering growth in 1/2MS nutrient solution , the mean grades of drought resistance of  $230~BC_1F_9$  BIL population were 3.76 and 4.39 ,

收稿日期: 2011 - 06 - 19 修回日期: 2011 - 07 - 11

基金项目: 公益性行业(农业) 科研专项(201103007) 和国家自然科学基金项目(30960189)

作者简介: 付学琴(1975—) ,女 ,讲师 ,博士生 ,主要从事水稻遗传与育种的研究 ,E - mail: huangwe2433@ sina. com;

\* 通讯作者 湖建坤 研究员 博士 E - mail: xiejiankun@ yahoo. com。

respectively. The continuous normal distribution of wilting rates suggested that drought resistance at the seed-ling stage in Dwr indicated the inheritance of qualitative – quantitative traits. The lines with 1  $\sim$  2 grades of drought resistance under natural drought were further treated with the stress of 20% ( w/v) PEG – 6000 simulated drought. The lines 1112 ,1168 ,1172 and 1315 were of strong drought resistance and can be further used for exploring and utilizing of drought resistance genes. Under 20% ( w/v) PEG – 6000 simulated drought stress increases in the soluble sugar , proline content and SOD activity in the strong drought resistance line 1112 were larger than those in the weak drought resistant line 1323. Decreases in GSH content were smaller than in weak drought resistance lines , indicating that penetration materials were accumulated more rapidly and increased more in strong drought resistance lines than in weak drought resistance lines. And the accumulation of membrane peroxidation was slower better for adaption to drought environment.

**Key words**: Dongxiang Wild Common Rice; introgression lines; seedling; drought resistance mechanism; primary analysis

水稻属喜温好湿的短日照作物,是全世界最重要的粮食作物之一。我国是个水资源缺乏的国家,每年因干旱所导致的农作物减产量,可超过其它非生物环境胁迫所造成的减产总和。据统计 20 世纪 90 年代以来,我国每年平均受旱面积达 2 667 万  $\mathrm{hm}^2$  ,由此造成粮食减产  $700 \sim 800$  亿  $\mathrm{kg}^{[1]}$  。培育抗旱水稻品种,对于缓解水资源危机,节约能源,改善日益恶化的生态环境,保障国家的粮食安全、生态安全和社会可持续发展具有重要意义。因此,对水稻抗旱性的研究一直科学家们普遍关注的课题。

目前,水稻的抗旱性研究主要集中在栽培稻上,而野生稻蕴藏着栽培稻所没有或已丢失的优异基因 $^{[2]}$ 。江西东乡野生稻(简称东野)是全世界分布最北的普通野生稻( $28^{\circ}14^{\circ}N$ ),具有雄性不有 $^{[3]}$ 、恢复性 $^{[4]}$ 、广亲和性 $^{[5]}$ 、高产 $^{[6-7]}$ 、耐冷性 $^{[8-9]}$ 、耐旱性 $^{[10]}$ 和多种抗病虫性状 $^{[11]}$ 等优良特性,是一个天然基因库。然而,由于遭受到人畜破坏、东野原生境及周边生态环境的恶化,东野居群由 1978 年发现时的 9个居群锐减到现在仅存的 3 个居群 因此,加速开展东野有利基因的鉴定、发掘和利用已刻不容缓。本课题组从 2001 年始,将目前仅存的 3 个居群的东野植株材料移植于网室水泥池,进行了为期 3 a 的抗旱性预备试验,发现东野在土壤特别干旱情况下仍能存活。尤其是在 2003 年 7 月 9 日—30 日(期间未降雨,也未对试验材料进行人工灌水) 日最高气温持续  $40^{\circ}$ C左右的气候条件下,土表龟裂,但东野存活率高达 89.82%。经进一步研究,东野苗期抗旱性状表现为最大根长、茎长、根干重、根鲜重、根干鲜重比及抗旱指数 6 个性状,表明东野蕴藏着抗旱基因资源 $^{[12]}$ 。为了更好地挖掘有利用东野中的抗旱基因,本文以萎蔫率为鉴定指标,对东乡普通野生稻渗入系群体( $BC_1F_9$ )进行苗期抗旱性鉴定标准体系的建立及近等基因系的构建提供依据。同时,对筛选出的强抗旱性株系,以期为"东野"抗旱性鉴定标准体系的建立及近等基因系的构建提供依据。同时,对筛选出的强抗旱性株系的生理生化特性进行分析,以期揭示"东野"的抗旱机理,为更好地发掘和利用"东野"抗旱基因奠定基础。

## 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

以"东野"为供体亲本,栽培稻协青早 B 为受体亲本,杂交获得  $F_1$  代,再以协青早 B 为母本回交获得  $BC_1F_1$  群体,经单粒传加代获得 230 个"东野"/协青早 B / 协青早 B  $BC_1F_9$ 。回交重组自交系(BIL) 群体的株系,以强抗旱性的巴西旱稻、东乡野生稻和弱抗旱性的栽培稻协青早 B 为对照品种。

### 1.2 苗期抗旱性鉴定

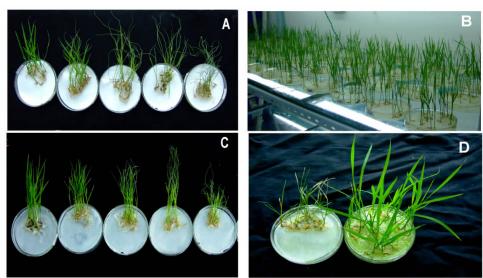
选用成熟的 230 个  $BC_1F_9$ ,群体和对照品种的种子放于 50 °C 烘箱中干燥 2 d .打破休眠。每个试验材料挑选 30 粒饱满一致的种子 ,浸种萌发 2 d .将露白种子按株系均匀播种于垫有 2 张湿润滤纸的 9 cm 培养皿中 ,然后加 MS 培养液放入 28 °C 光照培养室内生长 .待苗长至 3 叶 1 心期剔除弱苗 .将所有株系同时吸干根部水分进行反复干旱处理 .第一次干旱处理: 干旱 7 h 后调查萎蔫率 ,之后将株系加 MS 培养液后让其恢复 24 h 和 48 h 后调查萎蔫率 ,最后根据其萎蔫率评定其抗旱等级;第二次干旱处理:恢复 48 h 后再干旱处理 5 h 后调查萎蔫率 ,之后再恢复 24 h 和 48 h 后调查萎蔫率 ,再评定其抗旱等级。PEG6000 模拟干旱处理:将自然干旱处理一次后抗旱等级为 1 级即萎蔫率 5.0% 以下的株系 ,重新浸种萌发进行自然干旱一次后 ,再采用 20% 的 PEG6000 模拟干旱处理 6 d ,恢复生长 24 h 和 48 h ,调查萎蔫率 ,再评定其抗旱等级。

#### 1.3 抗旱性评价方法

苗期抗旱性评价等级 参照严长杰等<sup>[13]</sup>的方法 略有改动。采用  $1 \sim 7$  级评定法: 即将萎蔫率为 0%  $\sim 5\%$  定为 1 级 5.1%  $\sim 15\%$  为 2 级 15.1%  $\sim 30\%$  为 3 级 30.1%  $\sim 50\%$  为 4 级 50.1%  $\sim 65\%$  为 5 级 65.1%  $\sim 75\%$  为 6 级 75.1%  $\sim 100\%$  为 7 级。

#### 1.4 生理指标测定

分别于干旱处理的  $0.2 \neq 6$  d 取叶片 ,用蒽酮比色法测定可溶性糖含量; 用茚三酮比色法测定脯氨酸含量; 参照李合生 [14] 方法测定超氧化物岐化酶(SOD) 活性; 参照卢少云等 [15] 方法进行提取和测定还原性谷胱甘肽(GSH) 含量。



A: BIL 自然干旱处理 7 h 后的 1  $\sim$  5 等级幼苗; B: 正常生长 10 d 的幼苗; C: 恢复生长 24 h 1  $\sim$  5 等级幼苗; D: 等级 20% PEG6000 处理 6 d 的抗旱与敏感幼苗。

A: Drought – resistance grade of seedling from 1 to 5 after natural drought 7 h; B: The normal growth 10dseedling; C: Drought – resistance grade of seedling from 1 to 5 after recovering growth 24 h; D: Drought – resistance grade of strong drought – resistance lines and drought – sensitive lines after 20% PEG6000 6 h.

#### 图 1 幼苗抗旱性表观

Fig. 1 Seedling drought resistance apparent

# 2 结果与分析

#### 2.1 BIL 群体抗旱等级分析

亲本及 230 个 BIL 群体各株系幼苗 经干旱处理 7 h 后(图 1A) 幼苗与处理前(图 1B) 对比均表现不同程度的萎蔫。经干旱处理一次后,抗旱材料巴西旱稻的平均抗旱等级为 2.5 ,抗旱亲本东野和不抗旱亲本协青早 B(籼稻)平均抗旱等级分别为 1.78、4.25 ,BIL 群体平均抗旱等级为 3.76; 经反复干旱处理二次后,抗旱材料巴西旱稻的平均抗旱等级为 3.25 ,东野和协青早 B 平均抗旱等级分别为 2.13、5.25 ,BIL 群体平均抗旱等级为 4.39。从群体抗旱等级分布图可知(图 2) ,第二次干旱处理后抗旱等级



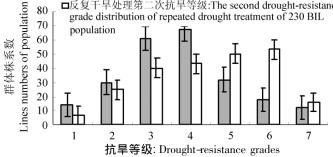


图 2 230 个 BIL 群体反复干旱抗旱处理等级分布图

Fig. 2 Drought – resistant grades distribution of repeated drought treatment of 230 BIL

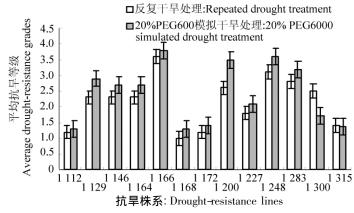
 $1 \sim 4$  级的群体株系数较第一次均减少  $5 \sim 7$  级群体株系数均有所增加 ,经方差分析表明差异极显著 ( $F_{0.05} = 7.215 > Fcrit = 6.69$  P 值为 0.574) ,说明反复干旱可以进一步筛选出抗旱性强的株系。

#### 2.2 BIL 群体抗旱性遗传分析

从 230 个 BIL 群体苗期抗旱性等级分布图分析表明 ,BIL 群体抗旱性等级变异范围在 1~7 级之间,

6

呈近似正态的连续分布 暗示"东野"苗 期抗旱性为主效基因控制的数量遗传。 把干旱处理一次后抗旱等级为1级的 14 个株系 ,再采用 20% PEG6000 处理 6 d后 其平均抗旱等级与反复干旱处 理二次的抗旱等级趋势基本一致(图 3) 经方差分析表明差异不显著( $F_{0.01}$  = 0. 215 < Fcrit = 2. 47 P 值为 0. 358) ,说 明经反复干旱筛选抗旱株系方法可行。 从图 3 分析表明,两种方法处理的抗旱 等级为1级的株系有4个(即抗旱性最 强的):1112、1168、1172 和 1315。在苗 期反复干旱和 20% PEG6000 模拟干旱



20% PEG600 模拟干旱和自然干旱处理的抗旱等级比较

Fig. 3 Drought-resistance grades compare of 20% PEG6000 simulated drought and natural drought treatment

两种处理下 株系 1112 的平均抗旱等级分别为 1.2 和 1.3 株系 1168 的平均抗旱等级分别为 1.0 和 1. 3 株系 1172 的平均抗旱等级分别为 1.2 和 1.7 株系 1315 的平均抗旱等级分别为 1.4 和 1.37 说明这 4 个株系均为强抗旱品种,可提供于构建"东野"近等基因系。

控制抗旱性数量性状基因座( Quantitative trait locus QTL) 可能有多个 不同株系获得的 QTL 不同 , 越抗旱表示有更多的"东野"抗旱 QTL 积聚。230 个 BIL 群体抗旱性等级呈近似正态的连续分布 ,表明 各株系间抗旱 QTL 存在差别; 1112、1168、1172 和 1315 可能聚集了较多的"东野"抗旱 QTL 表现出强抗 旱特性 ,而不抗旱株系由于抗旱 OTL 位点的遗传源自协青早 B ,所以对抗旱敏感 ,表现为不耐旱。

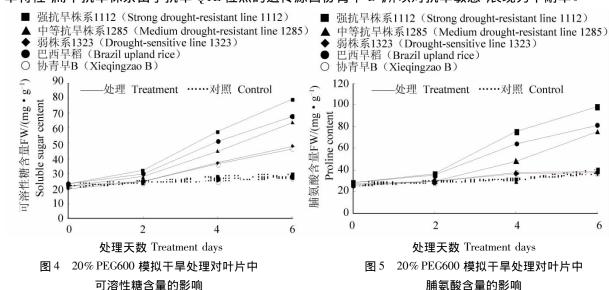


Fig. 4 Effect of 20% PEG6000 simulated drought on soluble sugar content in rice leaves

Fig. 5 Effect of 20% PEG6000 simulated water stress on proline content in rice leaves

- 2.3 20%PEG6000模拟干旱对叶片中可溶性糖、脯氨酸、超氧化物岐化酶和还原性谷胱甘肽含量的影响 可溶性糖的含量变化是植物体内渗透调节能力的重要指标。从图 4 可 2.3.1 可溶性糖的含量变化 知 随着水分胁迫的加剧 株系 1112、1285、1323 和巴西旱稻、协青早 B 处理的可溶性糖含量比对照都明 显增加 6 d 后分别增加了 2.63 2.21 1.71 2.42 1.70 倍 表明抗旱性强的品系可溶性糖含量增加速度 快 幅度大 这有利于提高水稻的抗旱性。
- 2.3.2 脯氨酸的含量变化 脯氨酸作为植物体内另处一种重要的渗透调节物质 其增加幅度大小也反 映了不同品种抗旱性的差异。如图 5 所示 水胁迫条件 6 d 后 株系 1112、1285、1323 和巴西旱稻、协青 早 B 处理的脯氨酸含量比对照分别增加了 2.45、1.92、1.06、2.25、1.08 倍 说明抗旱性强的品系游离脯 氨酸含量积累多 渗透调节能力增加 有利于水稻对干旱环境的适应。

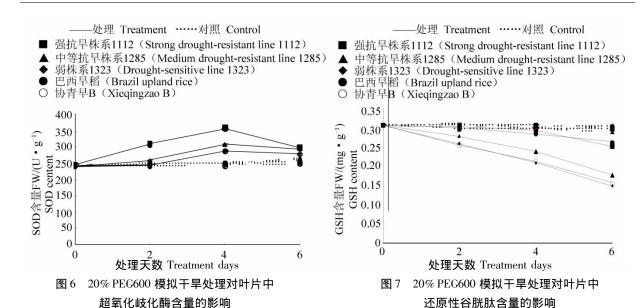


Fig. 6 Effect of 20% PEG6000 simulated drought on SOD content in rice leaves

Fig. 7 Effect of 20% PEG6000 simulated drought on GSH content in rice leaves

2.3.3 SOD 活性变化 SOD 是植物体内清除活性氧的重要酶类。试验结果(图6)表明,在模拟干旱条件下,株系1112、1285、1323和巴西旱稻、协青早B处理在0~4d内酶活性均有所提高,而4d后酶活性开始下降,呈现出单峰曲线变化,峰值酶活性分别比对照提高了1.44,1.27,1.19,1.42,1.18倍,比4d前提高了1.47,1.01,1.01,1.46,1.20倍,说明水份胁迫可以提高SOD活性,且抗旱性强的品系受水份胁迫时酶活性增加幅度大,而抗旱性弱的品系酶活性增加幅度较小。随着胁迫时间的延长,SOD活性开始迅速下降,且抗旱性强的品系下降较快,说明活性氧积累到超过保护酶系统清除能力时,会对抗氧化酶造成伤害导致其活性下降。

2.3.4 GSH 含量变化 GSH 是植物体内重要的抗氧化剂。从图 7 可知 ,在模拟干旱条件下 ,株系  $1112 \times 1285 \times 1323$  和巴西旱稻、协青早 B 处理叶片中 GSH 的含量比对照均有所下降 ,处理 6 d 后下降幅度分别为  $16.67\% \times 37.93\% \times 50\% \times 13.73\% \times 49.03\%$  ,抗旱性弱的品系明显比抗旱性强的品系下降幅度大 ,说明抗旱性强的品系抗氧化能力较强 ,有利于清除活性氧的伤害。

# 3 讨论

本文中 230 个 BIL 萎蔫率表型变异均为  $0\% \sim 100\%$  ,表现为近似正态的连续分布 ,由此提出"东野"苗期抗旱性为数量性状遗传特征 ,其中可能包含有主基因或效应较大的 QTL ,这与本课题组前期研究结果基本一致 $^{[5\ 28\ -30]}$ 。经 PEG 模拟干旱处理后 ,群体耐旱性表现为偏态的连续分布 ,而且偏向协青早 B ,这可能是由于群体中个体的偏态造成的 ,这与前人研究的在水稻种间远缘杂交群体中 ,特别是野

栽群体中呈现出明显的偏态分离结果一致 $[^{31-33}]$ 。 另处,由于是以协青早 B 为母本构建的 BIL 群体,因此不能排除存在细胞质遗传的可能性。

#### 参考文献:

- [1] 景蕊莲. 作物抗旱节水研究进展 [J]. 中国农业科技导报 2007 9(1):1-5.
- [2] Tanksley S D, McCouch S R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potentiall from the wild [J]. Science, 1997–277(5329): 1063-1066.
- [3] 肖晓春 王云基 肖诗锦 等. 东乡野生稻细胞质源雄性不育系"东 B11A"的选育[J]. 江西农业学报 2001 [J3(2):8-11.
- [4] 余守武 万勇 胡标林 筹. 东乡野生稻细胞质雄性不育育性恢复的遗传研究[J]. 分子植物育种, 2005 3(6):761-767.
- [5] 卢诚,潘熙淦. 东乡野生稻及02428、8504、以cpsl017 广亲和性遗传的研究[J]. 江西农业学报 1991 3(2):93-98.
- [6] Li D J, Sun C Q, Fu Y C, et al. Identification and mapping of genes for improving yield from Chinese common wild rice( O. rufipogon Griff.) using advanced backcross QTL analysis [J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(18):1533-1537.
- [7] Tian F, Li DJ, Fu Q, et al. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of untrogressed segments associated with yield related traits [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(12):570-580.
- [8] 陈大洲, 肖叶青, 赵社香, 等. 东乡野生稻苗期和穗期的耐寒性研究[J]. 江西农业学报, 1996, 8(1):1-6.
- [9] 刘凤霞 孙传清 谭禄宾 等. 江西东乡野生稻孕穗开花期耐冷基因定位 [J]. 科学通报 2003 48(17):1864-1867.
- [10] Zhang X, Zhou S X, Fu YC, et al. Identification of a drought tolerance introgression line derived from Dongxiang common wild rice (O. rufipogon Griff.) [J]. Plant Mol Biol, 2006, 62(1): 247-259.
- [11] 李湘民 黄瑞荣 兰波,等. 东乡野生稻种质资源的抗病性研究[J]. 江西农业大学学报 2006 28(4):493-498.
- [12] 谢建坤 胡标林 万勇 筹. 东乡普通野生稻与栽培稻苗期抗旱性的比较研究[J]. 生态学报 2010 30(6): 1665-1674.
- [13] 严长杰 李欣, 程祝宽 筹. 利用分子标记定位水稻芽期耐冷性标记 [J]. 中国水稻科学 1999 13(3):134-138.
- [14]李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社 2000: 42-58.
- [15] 卢少云 黎用朝 郭振飞 等. 钙提高水稻幼苗抗旱性的研究[J]. 中国水稻科学 ,1999 ,13(3):161-164.
- [16] Price A H, Courtois B. Mapping QTLs associated with drought resistance in rice: progress, problems and prospects [J]. Plant Growth Regulation, 1999, 29(6):123-133.
- [17] Nguyen H T, Babu R C, Blum A. Breeding for drought resistance in rice: physiological and molecular genetics considerations [J]. Crop Science, 1998, 37(5):1426-1434.
- [18] 罗利军 涨启发. 栽培稻抗旱性研究的现状与策略 [J]. 中国水稻科学 2001 ,15(3):209-214.
- [19]程建峰,潘晓云,刘宜柏 等.水稻抗旱性鉴定的形态指标[J]. 生态学报,2005 25(11):3117-3125.
- [20] 胡标林 余守武 万勇 , 等. 东乡普通野生稻全生育期抗旱性鉴定 [J]. 作物学报 2007 , 33(3): 425-432.
- [21]应存山. 中国稻种资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 56-71.
- [22]张灿军,王育红,姚宇卿,等.旱稻抗旱性鉴定方法与指标研究: II 抗旱性鉴定评价技术规范[J].干旱地区农业研究,2005,23(3):37-39.
- [23]杨建昌 ,王志琴 ,朱庆森. 水稻品种的抗旱性及其生理特性的研究[J]. 中国农业科学 ,1995 ,28(5):65-72.
- [24]凌祖铭 李自超 涂荣 等 水旱栽培条件下水、陆稻品种产量和生理性状比较[J]. 中国农业大学学报 2002 7(3): 13-18.
- [25]王育红 姚宇卿 张灿军 筹. 旱稻抗旱性鉴定方法与指标研究: Ⅳ旱稻苗期抗旱性[J]. 干旱地区农业研究 2005 23 (5):134-137.
- [26]王贺正,马均,李旭毅, 等. 水稻开花期抗旱性鉴定指标的筛选[J]. 作物学报, 2005, 31(11):1485-1489.
- [27]徐富贤,郑家奎,朱永川,等.杂交中稻发根力与抽穗开花期抗旱性关系的研究[J].中国农业大学学报 2002,7(3):13-18.
- [28] 谢建坤,陈大洲,肖叶青,等.应用微卫星标记分析东乡野生稻遗传多样性初探[J].中国农业科学,2003,36(8):873-878.
- [29] 肖晓春 王云基 肖诗锦 筹. 东乡野生稻细胞质源雄性不育系"东 B11A"的选育[J]. 江西农业学报 2001 13(2):8-11.
- [30] 余守武 万勇 胡标林 等. 东乡野生稻细胞质雄性不育育性恢复的遗传研究. 分子植物育种[J]. 2005 3(6):761-767.
- [31] Xia Z , Shao X Z , Yong C F , et al. Identification of a drought tolerant introgression line derived from Dongxiang common wild rice ( O. rufipogon Griff.) [J]. Plant Mol Biol 2006 62(8): 247-259.
- [32] Price A H, Steele K A, Moore B J, et al. A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice ( Oryza sativa L.) used to identify QTLs forroot penetration ability [J]. Theor Appl Genet 2000, 100(16):49-56.
- [33] Li D J, Sun C Q, Fu Y C, et al. Identification and mapping of genes for improving yield from Chinese common wild rice (O. rufipogon Griff.) using advanced backcross QTL analysis [J]. Chinese Sci Bul, 2002, 47(18):1533-1537.