

王树香,李 明,高宝嘉. 正交设计优化油松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):46-49.

正交设计优化油松 ISSR-PCR 反应体系

王树香¹, 李 明¹, 高宝嘉²

(1. 河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001; 2. 河北农业大学林学院,河北保定 071001)

摘要:采用正交设计的方法对油松 ISSR-PCR 反应体系 5 因素(*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTPs、引物的浓度)在 4 水平上进行优化试验,PCR 结果用 SPSS 数据软件分析。结果表明:各因素不同水平对 PCR 反应结果都有显著的影响,且除 dNTP 因素外其他 4 因素影响均较大;筛选出各反应因素的最佳水平,建立油松 ISSR-PCR 的最佳反应体系(20 μ L)为:*Taq* DNA 聚合酶 1 U、模板 5 μ g/ μ L、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、dNTP 0.20 mmol/L、引物 0.4 μ mol/L;进行梯度退火试验,筛选出针对不同引物的最适的油松 ISSR 退火温度。该优化体系的建立为油松及其近缘种的系统学和种质资源鉴定及遗传多样性的研究奠定基础。

关键词:油松;分子标记;ISSR-PCR;反应体系;正交设计

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0046-04

油松(*Pinus tabulaeformis*)为我国特有树种,是我国温带针叶林中主要的建群树种,在工业用材、城镇绿化和荒山造林中具有重要的价值。就目前研究的相关资料来看,国内关于油松的遗传多样性和遗传结构的研究较多。如李鑫等利用 RAPD、ISSR(inter simple sequence repeat,简单重复序列区间)等分子标记方法对天然油松群体作了遗传多样性分析^[1-4];郝真真等从表观上对 ISSR-PCR 进行了优化,并研究了油松种群遗传多样性和空间遗传结构特征^[5]。ISSR 分子标记技

术具有多态性水平高、可重复性好、DNA 用量少、成本低等优点,广泛用于群体遗传多样性分析和种质鉴别等研究^[6-13]。但是,采用正交设计的方法对油松 ISSR-PCR 反应体系进行优化还无报道,因此,本试验利用正交设计从 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物、模板 DNA、 Mg^{2+} 等 5 个因素 4 个水平进行分析,优化并建立油松 ISSR-PCR 反应体系,从而提高 ISSR 分析结果的可靠性和重复性,为油松品种的分子鉴定、遗传多样性分析和品种改良奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

油松选于河北省辽河源国家级森林公园(北纬 41°00'~41°10'、东经 118°30'~118°40'),采集当年生针叶置于冰盒中带回实验室,置于 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。试验用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购自上海宝生科技发展有限公司,引物(USB811)由上海宝生科技发展有限公司合成。

畜,2009(2):38-40.

[8] 韩吉龙,岳耀敬,裴 杰,等. 藏羊刺鼠信号蛋白基因(*Agouti*)的多态性及不同颜色被毛皮肤组织中 *Agouti* 与小眼畸形相关转录因子基因(*MITF*)表达的定量分析[J]. 农业生物技术学报,2013,21(3):338-347.

[9] 李洪涛,曾献存,张文祥,等. 哈萨克绵羊 *MC1R* 和 *ASIP* 基因多态性及表达量与被毛颜色表型相关性的研究[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(3):366-375.

[10] 夏热甫·居马依,刘江虎,古丽沙拉·加别力. 关于阿勒泰羊品种发展趋势的探讨[J]. 新疆畜牧业,2011(3):43-44.

[11] 巴登加甫,木拉提汗,杨菊清,等. 新疆细毛羊沧桑五十年[J]. 中国草食动物,2006,26(1):38-39.

[12] Fontanesi L, Dall'olio S, Beretti F, et al. Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein(*ASIP*) and melanocortin 1 receptor(*MC1R*) genes[J]. Animal,2011,5(1):8-17.

[13] 王 乐,高维明,郑文新,等. 新疆富蕴县阿勒泰羊毛绒品质分析[J]. 草食家畜,2011(2):31-32.

收稿日期:2013-11-01

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2008000231);河北农业大学科研基金(编号:QJ201230)。

作者简介:王树香(1977—),女,河北唐山人,硕士,实验师,主要从事微生物学、分子生态学研究。Tel:(0312)7528256;E-mail:wangshuxiang77@163.com。

通信作者:高宝嘉,博士,教授,主要从事生态学、森林有害生物管理研究。E-mail:baojiagao@163.com。

参考文献:

[1] 刘琳玲,邢秀梅,王桂武,等. *Agouti* 基因的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011(8):37-38.

[2] 庞有志. 兔的毛色遗传与家兔育种[J]. 中国养兔,2008(10):30-35.

[3] Royo L J, Alvarez I, Arranz J J, et al. Differences in the expression of the *ASIP* gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed[J]. Animal Genetics,2008,39(3):290-293.

[4] 吴宇婷. 哺乳动物毛色形成机制与影响因素[J]. 四川动物,2011,30(6):1003-1007.

[5] 姜俊兵,赵志军,贺俊平,等. *Agouti* 在不同颜色被毛羊驼皮肤组织中的表达[J]. 畜牧与兽医,2007,39(4):38-41.

[6] Norris B J, Whan V A. A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep[J]. Genome Research,2008,18(8):1282-1293.

[7] 王大星,徐 冬. 阿勒泰羊品种遗传资源调查报告[J]. 草食家

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 UNIQ - 10 柱式新型植物基因组 DNA 抽提试剂盒 [购自生工生物工程(上海)股份有限公司] 从油松叶片中提取多株植物基因组总 DNA,提取的 DNA 作为 ISSR - PCR 反应体系的模板。所提 DNA 样品的纯度和含量用紫外吸收和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 反应因素的确定与正交表的设计

为了确定 PCR 反应中 5 个因素 (*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、模板 DNA、dNTPs、引物) 的最佳反应浓度,采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 于 4 个水平上进行试验,每个处理重复 2 次,每个处

理体积均为 20 μ L(表 1),其中加入 2.0 μ L 无 Mg^{2+} 的 10 \times Buffer,其他成分按照正交设计所分析的浓度加入,不足 20 μ L 的用超纯水补足。16 个处理在美国 ABI 2720 型 PCR 仪上进行扩增,反应程序初步定为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min;4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶在 3 V/cm 电压下电泳,电泳结果采用 BIO - RAD Doc - 2000 自动凝胶成像系统成像,并用 SPSS 18.0 软件进行方差分析,进而获得油松 ISSR - PCR 最佳反应条件。

表 1 油松 PCR 反应因素的 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计

处理编号	因素					分值	
	20 μ L 体系 <i>Taq</i> 酶(U)	Mg^{2+} (mmol/L)	20 μ L 体系模板 DNA(μ g)	dNTP (mmol/L)	引物 (μ mol/L)	重复 I	重复 II
1	0.5	1.5	50	0.15	0.3	5	7
2	0.5	2.0	80	0.20	0.4	16	16
3	0.5	2.5	110	0.25	0.5	14	9
4	0.5	3.0	140	0.30	0.6	3	3
5	1.0	1.5	80	0.25	0.6	8	10
6	1.0	2.0	50	0.30	0.5	7	14
7	1.0	2.5	140	0.15	0.4	10	13
8	1.0	3.0	110	0.20	0.3	15	15
9	1.5	1.5	110	0.30	0.4	12	6
10	1.5	2.0	140	0.25	0.3	2	1
11	1.5	2.5	50	0.20	0.6	9	4
12	1.5	3.0	80	0.15	0.5	4	5
13	2.0	1.5	140	0.20	0.5	1	2
14	2.0	2.0	110	0.15	0.6	11	12
15	2.0	2.5	80	0.30	0.3	6	11
16	2.0	3.0	50	0.25	0.4	13	8

1.4 退火温度梯度检测

在正交试验结果分析的基础上,利用扩增仪进行 PCR 反应程序中退火温度梯度试验,退火温度设置为 46 ~ 55 $^{\circ}$ C,扩增仪自动生成 46.0、49.0、52.0、55.0 $^{\circ}$ C 等 4 个温度梯度。所用的 PCR 扩增体系为正交设计所得出的最佳体系。

2 结果与分析

2.1 电泳结果评分

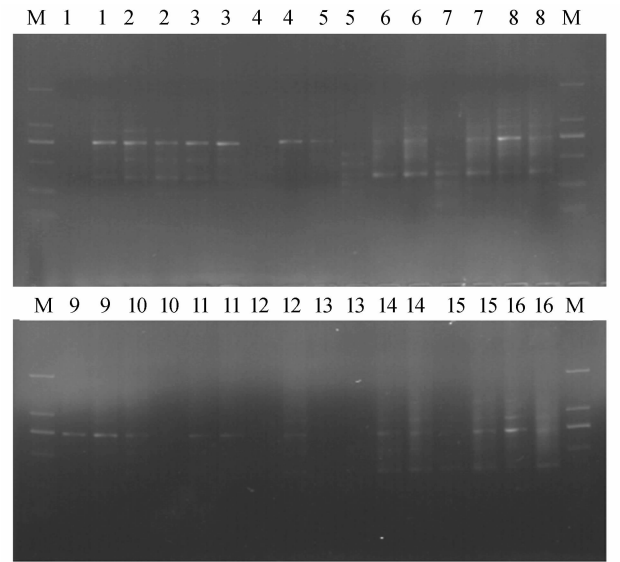
正交试验 PCR 产物电泳结果见图 1,获得的 16 个处理的谱带结果存在很大差异。参照何正文等的方法^[14],依据谱带强弱和杂带的多少对 PCR 扩增结果依次打分。其中,条带数量多、清晰的扩增结果计 16 分,最差的计 1 分。2 次重复分别独立统计,16 个处理的分数见表 1。

2.2 各因素对 ISSR - PCR 反应影响的差异分析

将上述处理和评分结果用 SPSS 数据处理软件进行方差分析,结果见表 2。由 *F* 值可知,模版 DNA 的浓度对反应结果的影响最大,dNTPs 浓度的影响最小,各因素水平变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为模板 DNA 的浓度、*Taq* DNA 聚合酶的浓度、引物的浓度、 Mg^{2+} 的浓度、dNTPs 的浓度。由于各因素水平间的差异除 dNTPs 和 Mg^{2+} 的浓度外均达到了显著水平,可以进一步进行因素内水平间的多重比较(表 3)。

2.3 因素内各水平对 ISSR - PCR 结果的影响

2.3.1 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 PCR 结果的影响



M为DNA marker; 1~16为如表1的16个处理,重复数字表示2次重复

图1 PCR产物电泳结果

聚合酶在 0.5、1.0、1.5、2.0 U 等 4 个水平间差异达到显著或极显著水平(表 2)。同时,由结果均值与酶量的关系(表 3)可知,*Taq* DNA 聚合酶浓度对 PCR 结果影响相对较大。*Taq* DNA 聚合酶浓度过高时会产生大量弥散带(处理 13 至处理 16),使电泳背景过深,不利于遗传多态性分析。*Taq* DNA 聚

表 2 PCR 反应各因素的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Taq DNA 聚合酶	155.25	3	51.750	8.039 **	0.001
dNTPs	18.25	3	6.083	0.945	0.442
引物	115.00	3	38.333	5.955 **	0.006
Mg ²⁺	59.75	3	19.917	3.094	0.056
模版 DNA	228.75	3	76.250	11.845 **	0.000

注: ** 代表 0.01 水平差异显著。

合酶在 1 U 左右时达到了最佳效果,PCR 反应的敏感性和特异性均最高,因此选择 1 U 水平为最佳反应水平。

2.3.2 dNTPs 浓度对 PCR 结果的影响 dNTPs 在 0.15 ~ 0.30 mmol/L 等 4 个水平间差异不显著(表 2、表 3);但从 dNTPs 与估计均值关系(表 4)可知,其在 0.2 mmol/L 时效果最佳,因此,从效果及经济角度考虑,dNTP 的最佳水平为 0.15 ~ 0.20 mmol/L。

表 3 PCR 反应因素各水平间方差分析

变异来源	水平	1	2	3	4
Taq DNA 聚合酶 浓度	1		-2.375	3.750	1.125
	2	0.080		6.125	3.500
	3	0.009	0.000		-2.625
	4	0.388	0.014	0.055	
Mg ²⁺ 浓度	1		-3.500	-3.125	-1.875
	2	0.014		0.375	1.625
	3	0.025	0.771		1.250
	4	0.159	0.218	0.339	
模板 DNA 浓度	1		-1.125	-3.375	4.000
	2	0.388		-2.250	5.125
	3	0.017	0.095		7.375
	4	0.006	0.001	0.000	
dNTP 浓度	1		-1.375	0.250	0.625
	2	0.294		1.625	2.000
	3	0.846	0.218		0.375
	4	0.629	0.134	0.771	
引物浓度	1		-4.000	0.750	0.250
	2	0.006		4.750	4.250
	3	0.563	0.002		-0.500
	4	0.846	0.004	0.699	

注:上三角为评分均值差值,下三角为 P 值。

表 4 各因素 4 水平评定结果均值

水平	Taq DNA 聚合酶 浓度	Mg ²⁺ 浓度	模板 浓度	dNTP 浓度	引物 浓度
1	9.125	6.375	8.375	8.375	7.750
2	11.500	9.875	9.500	9.750	11.750
3	5.375	9.500	11.750	8.125	7.000
4	8.000	8.250	4.375	7.750	7.500

2.3.3 引物浓度对 PCR 结果的影响 引物除在 0.3、0.5、0.6 μmol/L 水平间差异不显著外,在其他水平间均差异极显著(表 3),即引物在 0.4 μmol/L 水平时,PCR 结果呈最优结果,而在其他水平时 PCR 结果的效果均较差(表 4)。说明引物浓度过小或过大均易引起非特异性扩增,导致条带模糊,因此,本试验将 0.4 μmol/L 作为最佳引物浓度。

2.3.4 Mg²⁺ 浓度对 PCR 结果的影响 Mg²⁺ 在 1.5 mmol/L

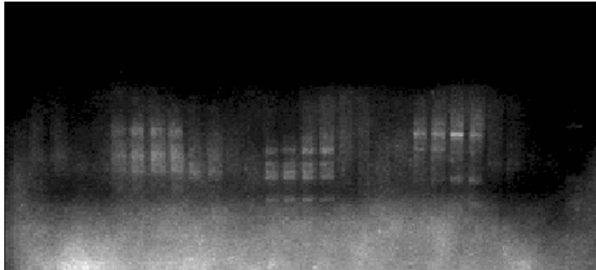
与 2.0 mmol/L 及 1.5 mmol/L 与 2.5 mmol/L 水平间差异显著(表 3)。同时,在 1.5 ~ 2.0 mmol/L 范围内,Mg²⁺ 浓度对 PCR 结果影响较大(表 4),在 2.0 mmol/L 与 3.0 mmol/L 水平间扩增结果差异不显著(表 3)。因此,从经济和效果考虑,2.0 mmol/L 为 Mg²⁺ 的最佳浓度。

2.3.5 模版 DNA 浓度对 PCR 结果的影响 模版 DNA 浓度在 7 μg/μL 与其他 3 个水平间差异显著或极显著(表 2)。表 3 也说明,在模板 DNA 浓度为 5.5 μg/μL 时达到最佳,但 4.5 μg/μL 与 5.5 μg/μL 间差异不显著。因此,模版 DNA 浓度在 4.5 ~ 5.5 μg/μL 范围内均可,但从经济、效果等多方面考虑应选择 5 μg/μL 为 DNA 的最佳浓度。

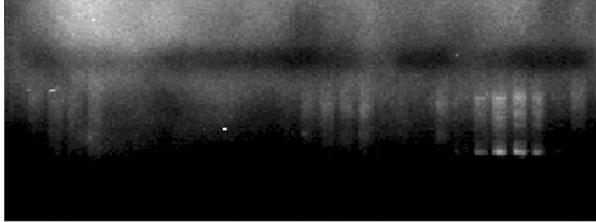
2.4 退火温度的确定

根据正交试验的扩增优化结果,对已筛选的 14 条引物的退火温度进行优化检测。采用的扩增体终浓度为: Taq DNA 聚合酶 1 U, 2 μL 10 × Buffer[100 mmol/L Tris - HCl(pH 值 8.8)、500 mmol/L KCl], 模板 5.0 μg/μL, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, dNTP 0.20 mmol/L, 引物 0.40 μmol/L。本试验对各引物分别设置 46、49、52、55 ℃ 等 4 个温度梯度,研究退火温度对 PCR 扩增结果的影响,扩增结果如图 2 所示,并对扩增结果进行了评定(表 5)。

1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 4 4 4 4 5 5 5 5 6 6 6 6 7 7 7 7



8 8 8 8 9 9 9 9 10 10 10 10 11 11 11 11 12 12 12 12 13 13 13 13 14 14 14 14



各数字为引物序号, 1~14 分别为引物 827、808、884、836、812、826、818、849、820、828、834、855、809、838; 重复数字从左至右分别表示同一引物的退火温度 46、49、52、55 ℃

图 2 退火温度对 ISSR 反应的影响

根据试验结果得出油松 ISSR - PCR 反应条件各引物退火温度优化结果: 827、884 最佳退火温度为 49 ℃; 838、826 最佳退火温度为 52 ℃; 其他引物以 55 ℃ 为最佳退火温度。

3 结论与讨论

遗传多态性分析结果往往具有不稳定性,这与 PCR 反应的不稳定有关。ISSR - PCR 体系优化一般采用简单梯度试验方法,通过进行多次的梯度试验,对每个因素的最佳水平进行摸索,过程不但繁琐而且不能兼顾各因素间的交互作用。本试验借助统计软件,将正交试验设计与分析应用到 PCR 反应系统的优化中,使分析结果具有均衡性、综合性、效果明显的

表 5 退火温度对 PCR 结果的影响

引物	不同退火温度下的 PCR 结果			
	46 ℃	49 ℃	52 ℃	55 ℃
827	+/-	+/-	-	-
808	+/-	+	+	+
884	+/-	+/-	-	-
836	+	+	++	++
812	+/-	+/-	+/-	+
826	+	++	++	+
818	+/-	+/-	+/-	+
849	+/-	+/-	+/-	+/-
820	-	-	+/-	-
828	-	-	-	+/-
834	-	-	+/-	+
855	-	+/-	+/-	++
809	-	+/-	-	++
838	++	++	++	-

注：“+”代表有扩增产物；“++”代表扩增效率高；“+/-”代表扩增产物不稳定；“-”代表无扩增产物。

特点,最终确立油松 ISSR-PCR 最佳的反应体系(20 μL)浓度:2 μL 10×Buffer、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、Mg²⁺ 2.0 mmol/L、模板 DNA 5.0 μg/μL、dNTPs 0.20 mmol/L、引物 0.4 μmol/L。

试验中模板 DNA 对反应体系影响显著,这与白锦军等的研究结果^[15]相似,但与吴根土等的研究结果^[16-17]相反,其原因可能是因为模板 DNA 中含有酚、多糖等杂质,会抑制 *Taq* DNA 聚合酶活性,从而影响结果,因此说明高质量的基因组 DNA 是获得稳定 ISSR-PCR 结果的前提。在油松的 ISSR-PCR 反应体系中,*Taq* DNA 聚合酶、Mg²⁺ 和引物的浓度对 PCR 扩增结果影响显著,这与前人的研究结果^[18-19]相同。本试验结果显示 dNTPs 的浓度变化对 PCR 结果影响不显著,这不同于其他研究结果^[20-21],分析其原因可能是单因素梯度试验结果的分析未考虑其他因素的交叉影响,造成不可避免的试验误差,而本试验采用正交试验方差分析,从而提高了分析结果的可靠性。

本试验构建的油松 ISSR-PCR 最佳反应体系中,除模板 DNA 浓度偏高外,*Taq* DNA 聚合酶量、Mg²⁺ 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度均与其他亲缘相近树种相似,如红松^[22]、云南松^[23]等。ISSR 反应对某些物种模板 DNA 浓度不太敏感,但本研究结果显示影响是极显著的,也与贺佳等的研究结果^[24]相同。退火温度在减少模板与引物间的非特异性结合,进而提高 PCR 反应的特异性方面具有重要作用,因此本试验对筛选出的 14 条引物逐个进行退火温度梯度试验,确定每个引物的最适退火温度,为以后相似研究提供参考。本试验优化的稳定 ISSR 反应体系可以为油松品种选育奠定基础,同时对油松种质资源鉴定、亲缘关系分析、遗传多样性分析、遗传图谱构建等领域提供科学依据。

参考文献:

- [1] 李 磊,柴宝峰,王孟本. 华北地区油松种群遗传多样性分析[J]. 植物研究,2006,26(1):98-102.
- [2] 李 磊,柴宝峰. 基于分子标记的油松种群遗传保护分析[J]. 应用与环境生物学报,2009,15(4):459-463.
- [3] 周飞梅,樊军锋,侯万伟. 陕西地区油松天然群体遗传结构的 RAPD 分析[J]. 东北林业大学学报,2008,36(12):1-3.

- [4] 王 磊,樊军锋,刘永红,等. 我国油松主要分布区种质资源遗传多样性[J]. 东北林业大学学报,2009,37(12):3-7,13.
- [5] 郝真真,王孟本. 油松遗传多样性研究的 ISSR-PCR 体系优化与初步应用[J]. 山西大学学报:自然科学版,2009,32(1):119-124.
- [6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [7] Culley T M, Wolfe A D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers [J]. Heredity, 2001, 86 (Pt 5):545-556.
- [8] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报,2004,39(2):19-21.
- [9] 肖海峻,孟利前,李玉冰. ISSR 分子标记及其在植物遗传育种中的应用[J]. 内蒙古农业科技,2006(4):31-33,42.
- [10] Venkateswarlu M, Raje R S, Surendra S B, et al. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy[J]. Tree Genetics & Genomes,2006,3(1):15-24.
- [11] Shang Y, Zhang W H, Pei K Q, et al. Population genetic structure of a dominant desert tree, *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae) in the Southeast Gurbantunggut desert detected by RAPD and ISSR markers[J]. Acta Botanica Sinica,2004,46(6):675-681.
- [12] Gemasv J V, Almadanim M C, Tenreiro R, et al. Genetic diversity in the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2004,51(5):501-511.
- [13] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theoretical and Applied Genetics,2000,100(8):1311-1320.
- [14] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):76-77.
- [15] 白锦军,魏安智,王 佳,等. 仁用杏 ISSR 分析体系的正交优化[J]. 分子植物育种,2009,7(6):1237-1244.
- [16] 林 萍,张含国,谢运海. 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 生物技术,2005,15(5):34-37.
- [17] 吴根土,师桂英,徐秉良,等. 裸仁美洲南瓜 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. 西北农业学报,2010,19(4):155-159.
- [18] 郭凌飞,邹明宏,曾 辉,等. 澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学,2008,44(5):160-164.
- [19] 刘威生,冯晨静,杨建民,等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建[J]. 果树学报,2005,22(6):626-629.
- [20] 罗淑萍,曾 斌,孙晋科,等. 野扁桃 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 经济林研究,2007,25(3):1-5.
- [21] 姜 静,杨传平,刘桂丰,等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志,2003,22(3):91-93.
- [22] 冯富娟,王凤友,刘 彤. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J]. 植物学通报,2004,21(3):326-331.
- [23] 刘 娜,王昌命,普晓兰. 云南松胚乳 DNA 提取与 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 西南林学院学报,2009,29(2):27-30.
- [24] 贺 佳,丁小余,褚必海,等. 泽泻 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 南京师大学报:自然科学版,2006,29(3):86-90.