

外源水杨酸浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根系生长和生理特性的影响

赵海波, 卢艳如, 龚宜龙, 刘海燕, 刘凤兰* (山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041000)

摘要 [目的]研究外源水杨酸浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根系生长和生理特征的影响。[方法]以“五月慢”小油菜幼苗为研究对象, 采用砂培法研究不同浓度的 SA 浸种对盐胁迫下的小油菜幼苗地下部干重、根长、根表面积、地下部 SOD 和 POD 活性的影响。[结果]清水浸种时, 随着盐胁迫浓度的增大, 根长、根表面积和地下部干重逐渐减少, 50 mmol/L 盐胁迫处理 SOD 和 POD 的活性增加。在无胁迫条件下, 随着水杨酸浸种浓度的增加, 各项指标均呈现低浓度促进, 高浓度抑制。当水杨酸浸种浓度为 1.0 mmol/L 时, 增加的幅度最大, 效果最佳。不同浓度的 SA 浸种对盐胁迫具有不同的缓解效果。[结论]该研究结果可为小油菜抗盐胁迫提供科学的依据。

关键词 水杨酸; 浸种; 盐胁迫; 小油菜; 生理特性

中图分类号 S565.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)19-001-03

Effect of Exogenous Salicylic Acid on Root Growth and Physiological Characteristics of *Brassica chinensis* L. Seedlings under Salt Stress
ZHAO Hai-bo, LU Yan-ru, GONG Yi-long, LIU Feng-lan* et al (College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000)

Abstract [Objective] To study the effect of exogenous salicylic acid on root growth and physiological characteristics of *Brassica chinensis* L. seedlings under salt stress. [Method] Wuyue Man seedlings were used as research object and sand culture was used to study the effect of exogenous salicylic acid on root dry weight, root length, root surface area and the activities of superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) of *Brassica chinensis* L. seedlings under salt stress. [Result] During the water soaking of seed, with the increase in salt concentration, root dry weight, root length, and root surface area decreased. At the 50 mmol/L salt, the activities of SOD and POD firstly rose then dropped. Without salt stress, with the increase in soaking concentration, all indicators take on low concentration promotion and high concentration inhibition. When the SA soaking concentration is 1.0 mmol/L, the increase amplitude was the greatest and the effect was optimal. Soaking with different SA concentration under salt stress showed different alleviation effects. [Conclusion] The results of this study can provide scientific basis for *Brassica chinensis* L. seedling resisting salt stress.

Key words Salicylic acid (SA); Seed soaking; Salt stress; *Brassica chinensis* L.; Physiological characteristics

盐胁迫是指植物由于生长在高盐浓度生活环境而受到的高渗透势的影响。在全球的干旱和半干旱地区, 约有 50% 的灌溉土地受到盐碱化的影响, 区域内的非灌溉土地同样会发生盐碱化, 因此对如何提高植物的抗盐胁迫能力的研究具有重要的现实意义。近年来, 学术界对不同植物的抗盐能力进行研究, 其中郝敬虹等^[1]、周静等^[2]和徐晨等^[3]分别对黄瓜、辣椒和水稻等植物进行了研究, 但目前对小油菜抗盐胁迫的研究报道较少。

水杨酸 (Salicylic acid, SA), 化学式 $C_7H_6O_3$, 又称邻羟基苯甲酸, 是一种脂溶性的有机酸, 近年来研究发现水杨酸作为一种植物内源信号物质, 在植物遭受逆境特别是盐胁迫时会发挥重要作用, 因此人们推测 SA 可能与植物抗盐性有关^[4-6]。小油菜 (*Brassica chinensis* L.) 是十字花科芸苔属芸苔种蔬菜, 用途广泛, 营养价值高, 是广大人民所喜爱的蔬菜之一。近年来对小油菜的研究主要集中在研究肥料对小油菜生长的影响等^[7-8], 而关于外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根系生长及生理特性的影响则鲜有报道。笔者以“五月慢”小油菜幼苗为研究对象, 研究了不同浓度 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根系生长及生理特性的影响, 探究 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗是否有缓解效应, 旨在为小油菜抗盐胁迫提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料为小油菜幼苗, 品种为“五月慢”。

基金项目 2015 年校级大学生创新创业训练项目 (SD2015CXXM-52)。

作者简介 赵海波 (1992-), 男, 安徽芜湖人, 本科生, 专业: 园艺。

* 通讯作者, 教授, 硕士, 从事植物生理生态研究。

收稿日期 2016-06-03

1.2 试验方法 试验于 2015 年 5~7 月在山西师范大学校内实验室中进行。试验设置 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mmol/L 6 个 SA 浸种浓度, 以去离子水浸种为对照。试验选取颗粒饱满、大小均一的“五月慢”种子, 用 0.1% $KMnO_4$ 溶液消毒 10 min, 再用去离子水清洗几次, 置于阴凉处阴干, 然后分成 7 等份, 用不同浓度 SA 溶液在室温下浸种 10 h 后, 将浸种完成的种子播种到装有洗净河沙的 72 孔穴盘中。先用 1/2 霍格兰营养液培养, 待幼苗长出 2 片真叶时, 将 NaCl 按比例溶于 1/2 霍格兰营养液中, 配制成 50、100 和 150 mmol/L 的盐溶液, 并以营养液为对照进行盐胁迫。待幼苗长至四叶一心时, 从茎基部将其分成地上部和地下部, 分别对小油菜幼苗根系进行生长和生理指标的测定。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 根系生长指标。 在每个处理选取 10 株均匀健壮、长势一致的幼苗植株根系, 洗净, 使用根系扫描仪测定总根长和根表面积, 并求平均值, 重复 6 次。

1.3.2 根系的干重。 随机选取 10 株, 在烘箱中 80℃ 烘干至恒重, 使用 1/100 的电子天平称量植株干重^[9], 求平均值, 重复 6 次。

1.3.3 根系 SOD 活性。 根系 SOD 活性的测定采用氮蓝四唑 (NBT) 法^[10]。

1.3.4 根系 POD 活性。 根系 POD 活性的测定采用愈创木酚法^[10]。

1.4 数据处理 试验数据使用 Excel 和 SAS 统计软件进行统计与分析, 并进行 LSD 多重比较, 结果均以平均值 ± 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根系生长的影响

2.1.1 地下部干重。从图 1 可以看出,用清水浸种时,随着盐胁迫浓度的增加,地下部干重逐渐减小,各处理间均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。与无胁迫相比,50、100 和 150 mmol/L 盐胁迫处理地下部干重分别减少 21.08%、29.01% 和 32.98%。

在无胁迫条件下,随着浸种浓度的增加,对地下部干重的影响在低浓度时表现为促进作用,高浓度时表现为抑制作用。与清水相比,当水杨酸浓度分别为 0.25、0.50、1.00 和 2.00 mmol/L 时地下部干重分别增加了 21.56%、33.30%、48.02% 和 20.02% ($P < 0.01$);当水杨酸浓度分别为 4.0 和 8.0 mmol/L 时,地下部干重分别减少了 5.30% 和 19.51% ($P < 0.01$)。

当水杨酸浓度为 1.0 mmol/L 时对小油菜幼苗地下部干重的促进作用最强。在此浸种浓度下,与清水对照相比,随着盐胁迫浓度的增加,地下部干重呈增加趋势,50、100 和 150 mmol/L 盐胁迫处理小油菜幼苗的地上部干重与无胁迫相比分别增加了 48.02%、72.43%、78.79% 和 64.79%。由此可见,低浓度的水杨酸浸种对地下部干重起促进作用,高浓度的水杨酸浸种则对地下部干重起抑制作用,1.0 mmol/L 为水杨酸浸种的最适浓度。在此最适浸种浓度下,对盐胁迫的缓解效应呈现先增加后减小的趋势,其中对 100 mmol/L 的盐胁迫的缓解效果最佳。

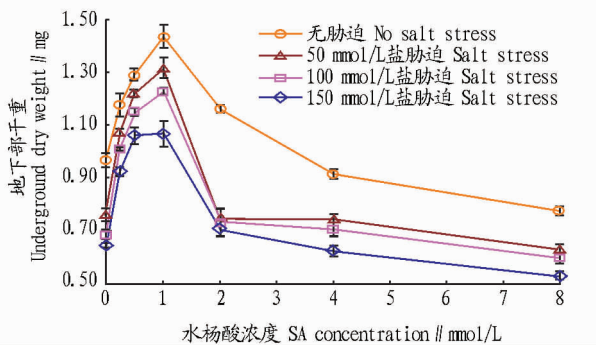


图 1 外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗地下部干重的影响

Fig.1 Effect of SA soaking seed on the root dry weight under salt stress

2.1.2 根长。从图 2 可以看出,用清水浸种时,随着盐胁迫浓度的增加,小油菜幼苗根长逐渐变短,各处理间均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。与无胁迫相比,50、100 和 150 mmol/L 盐胁迫处理小油菜幼苗根长分别减少 11.47%、20.00% 和 32.35%。

在无胁迫条件下,随着浸种浓度的增加,对根长的影响在低浓度时表现为促进作用,高浓度时表现为抑制作用。与清水相比,当水杨酸浓度分别为 0.25、0.50、1.00 和 2.00 mmol/L 时,小油菜幼苗根长分别增加了 29.91%、59.65%、80.00% 和 36.17% ($P < 0.01$),而当水杨酸浓度分别为 4.00 和 8.00 mmol/L 时小油菜幼苗根长分别减少了 10.78% 和 24.17% ($P < 0.01$)。

当水杨酸浓度为 1.0 mmol/L 时对小油菜幼苗根长的促进作用最强,在此浸种浓度下,与清水相比,随着盐胁迫浓度的增加,小油菜幼苗根长呈增加趋势,50、100 和 150 mmol/L 盐胁迫处理小油菜幼苗根长分别增加 80.00%、85.64%、81.95% 和 85.10%。由此可见,低浓度的水杨酸浸种对小油菜幼苗根长起促进作用,高浓度的水杨酸起抑制作用,其中 1.0 mmol/L 为水杨酸浸种的最适浓度。最适浓度的水杨酸浸种对不同浓度的盐胁迫均有较高的缓解效应。

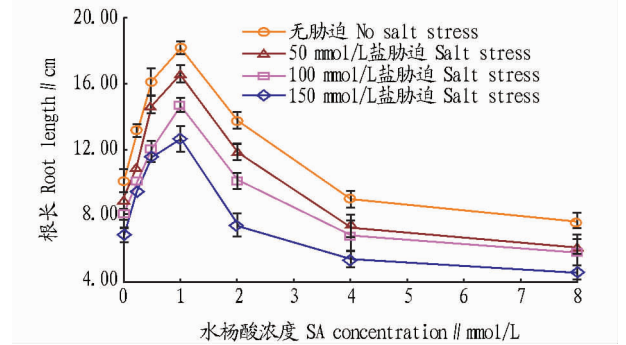


图 2 外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根长的影响

Fig.2 Effect of SA soaking seed on the root length under salt stress

2.1.3 根表面积。从图 3 可以看出,用清水浸种时,随着盐胁迫浓度的增加,小油菜幼苗的根表面积逐渐减小,且各处理间均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。与无胁迫相比,50、100 和 150 mmol/L 盐胁迫处理小油菜幼苗的根表面积分别减少 28.76%、39.38% 和 48.23%。

在无胁迫条件下,随着浸种浓度的增加,对根表面积的影响表现为低浓度促进,高浓度抑制。与清水对照相比,当水杨酸浓度为 0.25、0.50 和 1.0 mmol/L 时小油菜幼苗的根表面积分别增加了 16.79%、44.58% 和 47.87% ($P < 0.01$);而当水杨酸浓度为 2.0、4.0 和 8.0 mmol/L 时,小油菜幼苗的根表面积分别减少了 8.17%、10.52% 和 23.94% ($P < 0.01$)。

当水杨酸浓度为 1.0 mmol/L 时对小油菜幼苗根表面积的促进作用最强,在此浸种浓度下,与清水对照相比,随着盐胁迫浓度的增加,小油菜幼苗根表面积呈增加趋势,小油菜幼苗根表面积分别增加 47.87%、95.68%、124.52% 和 157.44%。由此可见,低浓度的水杨酸浸种对根表面积起促进作用,高浓度的水杨酸起抑制作用,其中 1.0 mmol/L 为水杨酸浸种的最适浓度。随着盐胁迫浓度的增大,缓解效应也呈增加趋势,因此在一定范围内对 150 mmol/L 盐胁迫的缓解效果最好。

2.2 外源 SA 浸种对小油菜幼苗根系保护酶活性的影响

2.2.1 地下部 SOD 活性。从图 4 可以看出,用清水浸种时,随着盐胁迫浓度的增加,地下部 SOD 活性先增加后减少。与无胁迫相比,其中 50 mmol/L 盐胁迫处理地下部 SOD 活性显著增加 8.47%,150 mmol/L 盐胁迫处理地下部 SOD 活性显著减少 8.61%。

在无胁迫条件下,随着浸种浓度的增加,对地下部 SOD 活性的影响表现为低浓度促进,高浓度抑制。与清水相比,

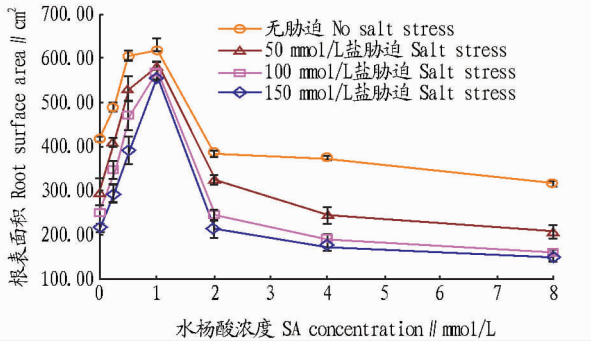


图3 外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗根表面积的影响

Fig.3 Effect of SA soaking seed on the root superfel area under salt stress

当水杨酸浓度为 0.25、0.50 和 1.00 mmol/L 时地下部 SOD 活性分别增加了 45.71%、47.57% 和 88.35% ($P < 0.01$),而当水杨酸浓度为 4.0 和 8.0 mmol/L 时地下部 SOD 活性分别减少了 33.69% 和 43.64% ($P < 0.01$)。当水杨酸浓度为 2.0 mmol/L 时,地下部 SOD 活性与清水浸种相比差异不显著。

当水杨酸浓度为 1.0 mmol/L 时,对小油菜幼苗的地下部 SOD 的促进作用最强,在此浸种浓度下,与清水相比,随着盐胁迫的浓度增加,地下部 SOD 活性呈增加的趋势,地下部 SOD 活性分别增加了 88.35%、113.51%、83.03% 和 47.72%。由此可见,低浓度的水杨酸浸种对地下部 SOD 活性起促进作用,高浓度的水杨酸起抑制作用,其中 1.0 mmol/L 为水杨酸浸种的最适浓度。在最适浸种浓度下,对地下部 SOD 活性的增加呈先增加后减少的趋势,其中对 50 mmol/L 盐胁迫的缓解作用最好。

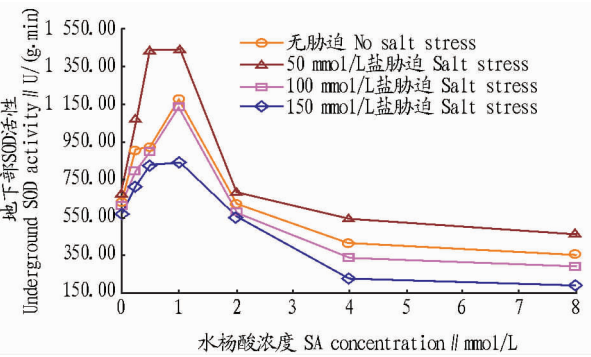


图4 外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗地下部 SOD 活性的影响

Fig.4 Effect of SA soaking seed on SOD activity under salt stress

2.2.2 地下部 POD 活性。从图 5 可以看出,用清水浸种时,随着盐胁迫浓度的增加,地下部 POD 活性先增加后减少,各处理间均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。与无胁迫相比,50 mmol/L 盐胁迫处理地下部 POD 活性增加了 24.53%,100 和 150 mmol/L 盐胁迫处理地下部 POD 活性分别减少 11.47% 和 17.56%。

在无胁迫条件下,随着浸种浓度的增加,对地下部 POD 活性的影响表现为低浓度促进,高浓度抑制。与清水相比,当水杨酸浓度为 0.25、0.50、1.00 和 2.00 mmol/L 时地下部

POD 活性分别增加 33.17%、74.59%、87.00% 和 15.02% ($P < 0.01$);当水杨酸浓度为 8.00 mmol/L 时地下部 POD 活性减少 16.01% ($P < 0.01$);当水杨酸浓度为 4.0 mmol/L 时,地下部 POD 活性与清水浸种相比差异不显著。

当水杨酸浓度为 1.0 mmol/L 时,对小油菜幼苗的地下部 POD 的促进作用最强。在此浸种浓度下,随着盐胁迫浓度的增加,地下部 POD 活性呈增加的趋势,与清水相比小油菜地下部 POD 活性分别增加 87.00%、57.67%、94.53% 和 51.03%。由此可见,低浓度的水杨酸浸种对地下部 POD 起促进作用,高浓度的水杨酸起抑制作用,其中 1.0 mmol/L 为水杨酸浸种的最适浓度。最适浓度的水杨酸浸种对 100 mmol/L 盐胁迫的缓解作用最佳。

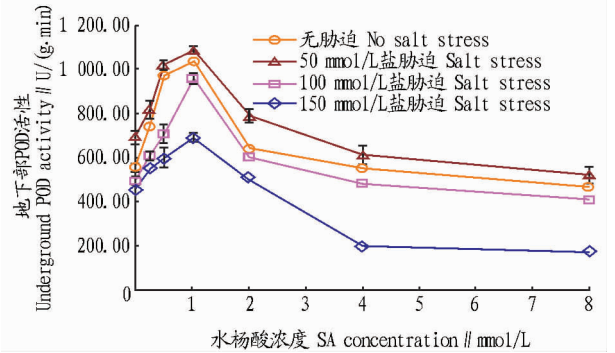


图5 外源 SA 浸种对盐胁迫下小油菜幼苗地下部 POD 活性的影响

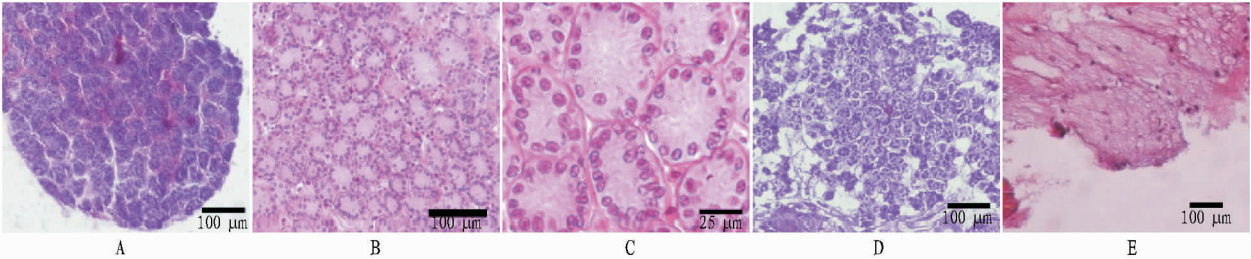
Fig.5 Effect of SA soaking seed on POD activity under salt stress

3 结论与讨论

地下部干重、根长和根表面积是小油菜的生长指标,也是生理指标的最终表现形式。植物的根长和根表面积对水分及矿物质的吸收具有重要的影响。在适宜浓度的水杨酸浸种处理下,随着根长和根表面积的增大,地下部干重也相应增加,具有一定的协同效应。超氧化物歧化酶(SOD)与过氧化物酶(POD)都是植物体内重要的保护酶。在正常的生理状态下,机体产生的自由基和清除自由基的速率处于动态平衡状态,但当机体内自由基产生增多,就会对机体的 Pr、脂质和 DNA 造成损伤,导致机体的疾病发生。SOD 的主要作用是将体内多余的氧自由基歧化生成 H_2O_2 和 O_2 ,而 H_2O_2 的积累对细胞有氧化破坏作用,POD 能将 H_2O_2 还原成 H_2O ,从而对机体起到保护作用。

该研究结果表明,随着盐胁迫的浓度增加,地上部干重、根长和根表面积都呈下降趋势,这与王国霞^[11]的研究结果相符,与韩志平等^[12]的研究结果不同。此外,地下部 SOD 和 POD 的活性随着盐胁迫浓度的增加呈现先上升后下降的趋势,这与苏丹等^[13]的研究结果相同,但与王钰^[14]的研究结果不同。这可能是由于不同植物对盐分的抗性存在差异。随着水杨酸浓度的增加,各项指标均呈现先上升后下降的趋势,说明水杨酸有低浓度促进高浓度抑制的双重效应。此外,与清水浸种相比,在 1.0 mmol/L 的水杨酸浸种处理下各

(下转第 7 页)



注:A.增殖期;B、C.合成期;D、E.分泌期。
Note: A. Proliferative stage; B, C. Synthetic stage; D, E. Secretory stage.

图2 不同时期促雄腺的形态特征观察

Fig.2 Morphological characterization of androgenic gland in different development stages

3 结论与讨论

3.1 促雄腺的位置分布与形态结构 该研究表明,口虾蛄促雄腺的位置分布与十足类相似,位于第三步足的交接支基部内侧,包埋于肌肉、肝胰腺之间,通过组织膜附着在输精管表面;但是,其形态结构与腺体细胞较十足类之间差异显著。

3.2 促雄腺腺细胞结构 该研究表明增殖期口虾蛄促雄腺腺体体积相对较小,各空心腺泡间界限明显,腺泡内的腺细胞数量相对较少,排列多不规则,腺细胞呈椭圆形;细胞核体积约占整个细胞的50%,细胞核染色深,嗜碱性强;此阶段细胞处于发育阶段,细胞核处于有丝分裂间期,为细胞的扩增做准备。合成期,腺体体积较腺泡发育期明显增大,腺泡间界限清晰,腺泡内腺细胞数量明显增多,且规则地排列在腺泡膜内侧;细胞核规则地排列在细胞外侧,嗜碱性减弱;核仁1~3个;分泌期,腺泡界限仍然清晰,但腺细胞间界限模糊,腺泡内出现空隙,血窦明显。腺体细胞内的大量细胞器有外排现象,腺细胞细胞核固缩,多因腺体分泌激素导致细胞核固缩,细胞质的分解导致了腺体细胞间界限模糊。

口虾蛄在全年各月份均可发现促雄腺体,个体差异不明显。腺体发育的时间段与个体大小的相关性不显著,而与周年温度有关。口虾蛄促雄腺内部结构不同于其他甲壳类,每

个空心腺泡是由多个腺细胞组成,每个腺泡外围有结膜,彼此隔离,界限清晰。口虾蛄促雄腺分泌方式为胞浆式分泌方式,与中国对虾(*Penaeus chinensis*)^[5]、三疣梭子蟹^[6]等数十足类甲壳动物相似。

促雄腺腺体发育不仅受外界环境的影响,同时也受到虾体自身激素调节器官的影响。眼柄的处理对促雄腺的发育有一定影响^[7],若研究口虾蛄外界条件及自身处理对腺体的影响,可进一步试验进行研究。

参考文献

[1] 吴萍,楼允东,邱高峰. 甲壳动物雄性腺研究的进展[J]. 水产学报, 1999,23(1):77-83.
[2] 张亚群,王克坚. 甲壳动物促雄腺激素功能、生化和分子结构的研究[J]. 水产科学,2014,33(5):331-336.
[3] SUZUKI S. Androgenic gland hormone is a sex-reversing factor but cannot be a sex-determining factor in the demale crustacean isopods *Armadillidium vulgare* [J]. General and comparative endocrinology, 1999, 115: 370-378.
[4] 叶海辉,李少菁,王桂忠. 十足目甲壳动物促雄性腺研究概述[J]. 动物学杂志,2001,36(1):43-47.
[5] 李富花,相建海. 中国对虾促雄腺形态结构和功能的初步研究[J]. 科学通报,1996,41(15):1418-1422.
[6] 苏青,朱冬发,杨济芬,等. 三疣梭子蟹促雄腺显微和超微结构的研究[J]. 水产科学,2010,29(4):193-197.
[7] KHALAILA I, MANOR R, KELLER R, et al. The eyestalk-androgenic gland-testis endocrine axis in the crayfish *Cherax quadricarinatus* [J]. General and comparative endocrinology, 2002,127:147-156.

(上接第3页)

项指标均有不同比例增加,说明SA浸种对盐胁迫有一定的缓解效应。这与单长卷等^[15]、李婧男等^[16]、周旋等^[17]的研究结果相一致,与张爱慧等^[18]的研究结果不同。这可能是由于SA对不同植株的影响各异,有待于进一步探讨。综上所述,不同浓度的SA对盐胁迫下小油菜有缓解效应,其中1.0 mmol/L SA的缓解效应最佳。

参考文献

[1] 郝敬虹,易旻,尚庆茂,等. 水杨酸处理对干旱胁迫下黄瓜幼苗氮素同化及其关键酶活性的影响[J]. 园艺学报,2012(1):81-90.
[2] 周静,徐强,张婷. NaCl 胁迫对不同品种辣椒幼苗生理生化特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2015(2):120-125.
[3] 徐晨,凌凤楼,徐克章,等. 盐胁迫对不同水稻品种光合特性和生理生化特性的影响[J]. 中国水稻科学,2013(3):280-286.
[4] 王玉萍,董雯,张鑫,等. 水杨酸对盐胁迫下花椰菜种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 草业学报,2012(1):213-219.
[5] 刘凤兰,杜新民,吴忠红,等. 水杨酸浸种对西葫芦幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 北方园艺,2013(13):1-5.
[6] 刘杰,杨絮茹,周蕴薇. 水杨酸浸种处理对黑麦草种子萌发及幼苗抗旱性的影响[J]. 草业科学,2011(4):582-585.

[7] 刘安辉,赵鲁,李旭军,等. 氮肥对镉污染土壤上小油菜生长及镉吸收特征的影响[J]. 中国土壤与肥料,2014(2):77-81.
[8] 张彦,孙磊,苏群,等. 复合微生物肥料对小油菜种子发芽及根系生长的影响[J]. 现代农业科技,2015(20):19,25.
[9] 于洪杰,周新刚,关丽娜,等. 不同氮水平营养液对砂培黄瓜幼苗生长及根系形态的影响[J]. 北方园艺,2016(7):17-22.
[10] 袁蒙蒙,高丽朴,王清,等. 壳聚糖涂膜处理对西葫芦冷害的影响[J]. 河南农业科学,2012(10):114-117.
[11] 王国霞. 盐胁迫对红心萝卜种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 西北农业学报,2016(5):743.
[12] 韩志平,郭世荣,焦彦生,等. NaCl 胁迫对西瓜幼苗生长和光合气体交换参数的影响[J]. 西北植物学报,2008(4):4745-4751.
[13] 苏丹,李红丽,董智,等. 盐胁迫对白榆无性系抗氧化酶活性及丙二醛的影响[J]. 中国水土保持科学,2016(2):9-16.
[14] 王钰. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发、幼苗生长及保护酶活性的影响[J]. 天津农业科学,2016(4):22-24.
[15] 单长卷,赵新亮,汤菊香. 水杨酸对干旱胁迫下小麦幼苗抗氧化特性的影响[J]. 麦类作物学报,2014(1):91-95.
[16] 李婧男,刘强,李升. 水杨酸对盐胁迫下沙冬青幼苗抗氧化酶活性及PSII光化学效率的影响[J]. 华南农业大学学报,2010(1):42-46.
[17] 周旋,申璐,肖霄,等. 外源水杨酸对盐胁迫下茶树生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 西北农业学报,2014(6):127-133.
[18] 张爱慧,朱士农. 外源水杨酸对盐胁迫下丝瓜幼苗生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 江西农业学报,2013(10):27-29.