

黄土高原不同县域山杏种质遗传多样性研究

李 明, 赵 忠, 杨吉安, 卢 斌

(西北农林科技大学 林学院, 西部环境与生态教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】研究黄土高原不同县域山杏种子可溶性蛋白质含量和电泳谱带的差异, 为山杏种内分类及良种选育提供理论依据。【方法】采用形态学观测法, 对黄土高原(陕西麟游和甘肃灵台、华池、庆城)山杏种质资源变异情况进行调查, 从中筛选出形态类型典型的山杏, 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法和 SDS-PAGE 电泳法对种子可溶性蛋白质含量和谱带进行检测分析。【结果】共筛选出了 37 种山杏变异类型, 其种子可溶性蛋白质含量差异较大。SDS-PAGE 电泳分析表明, 山杏种子可溶性蛋白质含量丰富、多态、稳定、谱带清晰, 主要由 41.1, 39.0, 34.6, 22.7, 22.0 和 21.7 ku 6 种亚基组成, 其余亚基数量丰富但含量较少。聚类分析表明, 37 种山杏类型可分为 5 个大类。【结论】种子可溶性蛋白质分类结果与形态特征和生物学特性存在一定的相似性, 利用分类结果可对山杏品种进行改良。

[关键词] 黄土高原; 山杏; 种质资源; 遗传多样性

[中图分类号] S662.201

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0143-07

Genetic diversity analysis on germplasm of *Armeniaca sibirica* in different counties in Loess Plateau

LI Ming, ZHAO Zhong, YANG Ji-an, LU Bin

(College of Forestry, Northwest A&F University, Key Laboratory of Environment and Ecology in Western China, Ministry of Education, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was conducted to study the difference of content and electrophoresis bands on the soluble seed protein among different counties of *Armeniaca sibirica* (L.) Lam in broken Loess Plateau to provide theoretical basis for classification and breeding of *A. sibirica*. 【Method】Morphological observation method was used to investigate the variations of *A. sibirica* germplasm resources in broken Loess Plateau, and to sift typical morphotypes. The methods of Bradford and SDS-PAGE were used to analyze the soluble seed protein of *A. sibirica*. 【Result】37 mutation types were sifted, the protein contents of which were quite different; The result of SDS-PAGE showed that soluble seed protein had such advantages as richness, stability, and polymorphism. The protein subunits band was clear, and the main components included six kinds of 41.1, 39.0, 34.6, 22.7, 22.0, 21.7 ku, and the other subunits band was numerous but with few contents; The 37 mutation types can be classified into 5 groups. 【Conclusion】The protein contents and electrophoresis bands are quite different, and the result has some similarity with the classification results on the morphological and biological characters. The classification results can be used for variety improvement of *A. sibirica*.

Key words: Loess Plateau; *Armeniaca sibirica* (L.) Lam; germplasm resource; genetic diversity

* [收稿日期] 2010-04-07

[基金项目] 林业公益性行业科研专项“仁用杏精深加工技术与开发”(200904020)

[作者简介] 李 明(1986—), 男, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事苦杏仁综合利用研究。E-mail: limingly@126.com

[通信作者] 赵 忠(1958—), 男, 甘肃宁县人, 教授, 博士生导师, 主要从事半干旱地区植被恢复与重建研究。

E-mail: zhaozh@nwsuaf.edu.cn

山杏(*Armeniaca sibirica* (L.) Lam)为蔷薇科(Rosaceae)李亚科(Prunoideae)杏属(*Armeniaca* Mill)植物^[1],原产我国及亚洲西部,是重要的经济林和水土保持林造林树种,在黄土高原广为分布^[2]。山杏仁的脂肪和蛋白质含量均较高,具有丰富的营养价值 and 保健作用^[3],既是食品、饮料和制药工业的重要原料,也是新的高级食用油料的来源作物^[4]。

山杏具有自交不亲和性,由于长期的杂交变异以及不同地区间的相互引种,山杏产生了很多变异类型,种质资源极为丰富,形成了一个复杂的但只概括为 1 个“种(*A. sibirica*)”的群体。由于山杏种质良莠混杂,加之花期易受晚霜危害,长期以来坐果率低、结实量小、丰产性差等问题严重制约着山杏产业的发展。随着杏仁加工产业化进程的加快,生产上对山杏良种的需求更加迫切。目前,国内关于山杏种质资源的研究较少,尚未进行深入系统的山杏种质资源调查研究,选育出的适合地区特性的优良品种也很少。因此,进行山杏种质资源的调查和分类研究,对山杏良种的选育具有重要的指导意义。

种子蛋白质电泳技术在作物品种真实性鉴定、种子纯度检验、品种间遗传差异和种质资源遗传分析等方面已得到广泛应用^[5-7]。目前,大麦和小麦品种的醇溶蛋白电泳技术、豌豆属和黑麦草属的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术等已列入国际种子检验规程^[7],但是对于山杏种子的蛋白电泳技术国内尚少有研究。有研究表明,杏仁蛋白中的水溶性清蛋白含量较高,球蛋白次之,谷蛋白和醇溶蛋白含量极少^[3]。

本研究通过对黄土高原不同县域山杏种质资源形态学的调查,分析了山杏种质资源的变异情况,初步筛选出典型变异类型,并结合种子可溶性蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析,确定黄土高原山杏典型类型的遗传特征,以期为该地区山杏种内分类和良种选育研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

于 2009-07 山杏成熟期,在黄土高原山杏主产地的陕西省麟游县及甘肃省灵台县、华池县、庆城县,按不同方位分别选取 3 个山杏纯林。在每一林分中,选择地形较平坦、杏树分布较集中、生长和结实情况较好的地段,设置 20 m×20 m 的样地 3 块。试验共设置标准样地 36 块,共有山杏 640 株。采集各样地内每株山杏的叶片、果实和果核,进行形态比

对分析;根据形态分类结果,每种山杏变异类型选择 1 株有代表性的山杏,采集种子进行蛋白质分析。

1.2 形态分类

采用形态学观测的方法,参考《果树种质资源描述符:记载项目及评价指标》中有关山杏的评价指标,结合植物志^[1-2]以及文献记录的与杏资源评价相关的数量指标^[8],对各株山杏的叶片、果实、果核等形态指标进行比对,观察形态差异,找出典型的变异表现型。

1.3 种子蛋白分析

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法,用 Eppendorf UV-2000 紫外/可见分光光度计测定每个类型山杏种子的可溶性蛋白质含量,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析种子可溶性蛋白质组分的差异。

1.3.1 山杏种子蛋白样品的制备 每个山杏变异表现型取完整籽粒 2 粒,加液氮研磨后转入 10 mL 离心管,加满-20℃预冷丙酮,振荡摇匀后-20℃放置,过夜脱脂^[9]。然后于 4℃、10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再加满-20℃预冷丙酮,振荡摇匀后-20℃脱脂 12 h,4℃、10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,取杏仁粉 4℃风干备用。称取干燥杏仁粉 0.1 g 放入 2 mL 离心管,加入预冷的提取缓冲液 1 mL,4℃下反复振荡后静置 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.5 mL 转入 2 mL 离心管,再加入 0.5 mL 上样缓冲液振荡混匀,煮沸 5 min,-20℃保存。

提取缓冲液中含 0.062 5 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)、质量分数 0.5% SDS、体积分数 10%甘油、体积分数 5%β-巯基乙醇、1 mmol/L PMSF;上样缓冲液中含 0.01 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)、体积分数 5%β-巯基乙醇、质量分数 2% SDS、体积分数 10%甘油、质量分数 0.02%溴酚蓝。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳分析 参考《分子克隆实验指南》^[10]和《生物化学实验技术》^[11],采用 BIO-RAD Protean II 垂直板电泳仪进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶和分离胶配方如表 1 所示。

电泳缓冲液中含 0.003 5 mol/L 甘氨酸和 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.3)。

采用 BIO-RAD Universal 电源,浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 110 V,上样量 10 μL,当溴酚蓝迁移至凝胶底部时停止电泳。取出凝胶用含 1 g/L 考马斯亮蓝 R250、体积分数 50%甲醇、体积分数 10%冰醋酸的染色液染色 8 h,再用含体积分数 5%甲醇、体积分数 7%冰醋酸的脱色液脱色至谱带清晰为

止,用 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照。

表 1 SDS-PAGE 电泳中浓缩胶和分离胶溶液的配制

Table 1 Formula of condensation gel and separation gel solution in SDS-PAGE

试剂 Reagent	5 mL 5% 浓缩胶 Condensation gel	30 mL 13.5% 分离胶 Separation gel
体积分数 30% ACr/Bis 储备液 30% volume fraction ACr/Bis stock solution	0.83	13.0
1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8) 浓缩胶缓冲液 1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8) condensation gel buffer solution	0.63	—
1.0 mol/L Tris-HCl(pH 6.8) 分离胶缓冲液 1.0 mol/L Tris-HCl(pH 6.8) separation gel buffer solution	—	7.5
质量分数 10% SDS 溶液 Massfraction 10% SDS solution	0.05	0.3
TEMED 溶液 TEMED solution	0.005	0.012
超纯水 Ultrapurewater	3.4	8.9
100 g/L AP 溶液 100 g/L AP solution	0.05	0.3

1.4 数据处理

用 Quantity one 软件,判读所得山杏各类型电泳图谱上蛋白质亚基谱带的有无,各山杏类型在图谱上同一位置有谱带的记为“1”,无谱带的记为“0”。根据统计结果,用 NT-SYS 程序中的 Simqual 软件,计算山杏不同类型间的遗传相似系数;用 Unweight Pair Group Method Arithmetic Clustering (UPM-GA) 进行聚类,并构建各类型山杏种子可溶性蛋白

质遗传差异树状图。其他数据处理采用 Excel 2003 和 SPSS 13.0 进行。

2 结果与分析

2.1 山杏种质资源的变异分析

在 36 块样地中共发现山杏典型变异表现型 37 种,这 37 种类型山杏的数量性状差异及其变异如表 2 所示。

表 2 37 种类型山杏的数量性状差异及变异分析

Table 2 Difference and variability of quantitative character of 37 morphotypes

数量性状 Quantitative character	最小值 Minimum	最大值 Maximum	均值 Average	标准差 Standard deviation	变异系数 Variation coefficient
果质量/g Fruit weight	4.361	19.052	9.434	2.872	0.304
果长/cm Fruit length	2.237	3.324	2.714	0.288	0.106
果宽/cm Fruit width	2.134	3.515	2.705	0.266	0.098
果厚/cm Fruit thickness	1.768	3.002	2.335	0.238	0.102
果形指数 Fruit length/Fruit width	0.890	1.190	1.005	0.069	0.068
果厚/果宽 Fruit thickness/Fruit width	0.782	0.945	0.864	0.038	0.044
出核率/% Nuclear rate	10.460	27.520	16.850	3.810	0.226
核质量/g Nuclear weight	0.671	2.377	1.543	0.401	0.260
核长/cm Nuclear length	1.570	2.474	2.008	0.231	0.115
核宽/cm Nuclear width	1.237	1.939	1.624	0.157	0.097
核厚度/cm Nuclear thickness	0.821	1.307	1.055	0.094	0.089
核形指数 Nuclear length/Nuclear width	1.041	1.518	1.239	0.110	0.088
核厚/核宽 Nuclear thickness/Nuclear width	0.559	0.728	0.651	0.041	0.063
出仁率/% Kernel rate	22.67	32.32	27.51	2.09	0.077

表 2 显示,不同类型的山杏,在果实大小、形状、颜色、出核率及果核大小、形状、出仁率等方面均存在明显差异,大部分数量性状的变异系数达到或超过 0.1,表明研究区山杏变异类型较多,种质资源丰富。不同类型山杏在果形和核形上差异较大,故果形和核形可以作为山杏形态分类的依据。

2.2 不同类型山杏种子蛋白含量的比较

用考马斯亮蓝 G-250 法对不同类型山杏种子的可溶性蛋白质含量进行测定,其结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,37 种类型山杏种子的可溶性蛋白质含量差异明显,其中类型 20 种子的可溶性蛋白

质含量最低,为 160.4 g/kg,类型 32 种子的可溶性蛋白质含量最高,为 283.9 g/kg;37 种类型山杏种子可溶性蛋白质含量的变异系数为 0.161,差异较大。

2.3 不同类型山杏种子可溶性蛋白质的电泳分析

37 种类型山杏种子可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 电泳谱带如图 2~4 所示。图 2~4 显示,37 类山杏种子可溶性蛋白质的电泳谱带丰富、稳定、多态,不同类型山杏种子间可溶性蛋白质的谱带存在一定差异,既有相同的蛋白质谱带,又有各自特异的谱带类型。运用 Quantity one 软件对谱带进行定量

判读分析,可知山杏种子可溶性蛋白质亚基较多、分布较广,但主要分布在 10~65 ku,其中以 41.1, 39.0,34.6,22.7,22.0,21.7 ku 这 6 种亚基含量较多、谱带颜色较深,为大多数类型山杏所共有,是山杏的主要特征谱带。37 种类型山杏种子可溶性蛋白质都有34.6,22.7,22.0,21.7 ku 这 4 种亚基,说

明其是山杏区别于其他树种的特征谱带。大多数类型均有 39.0 ku 的亚基,但类型 2 和 24 中缺少这种亚基;类型 2,5,6,7,14,16,17,19,22,24,27,29, 30,32 山杏种子可溶性蛋白质中还含有 41.1 ku 的亚基,而其他类型则缺少这种亚基。

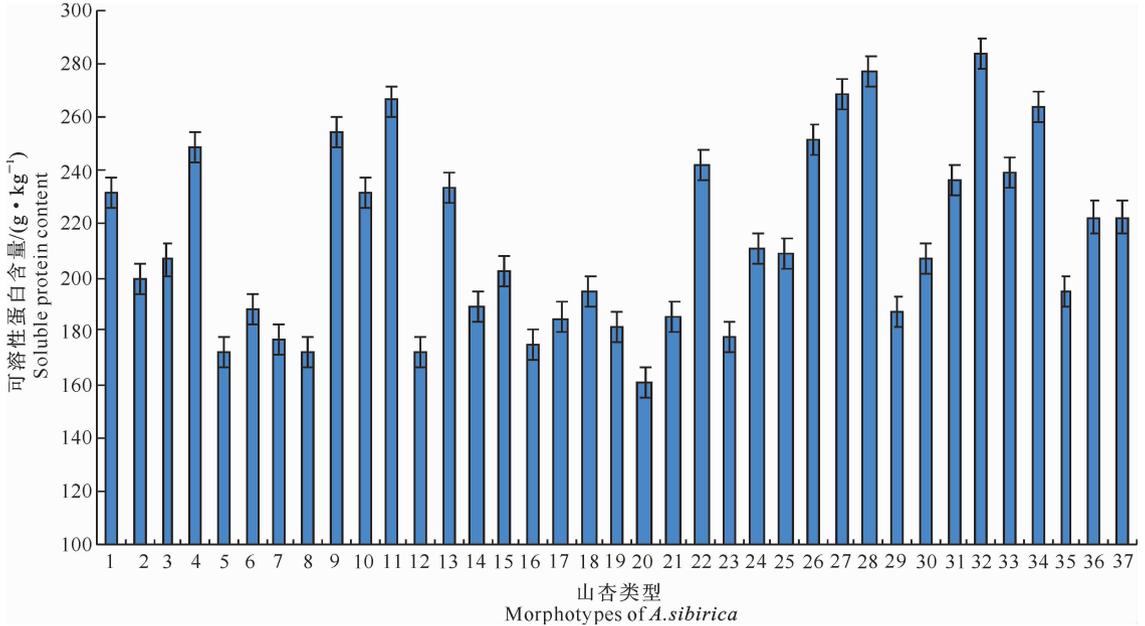


图 1 37 种类型山杏种子可溶性蛋白质含量的比较

Fig. 1 Comparison of soluble protein content of 37 morphotypes' *A. sibirica* seed

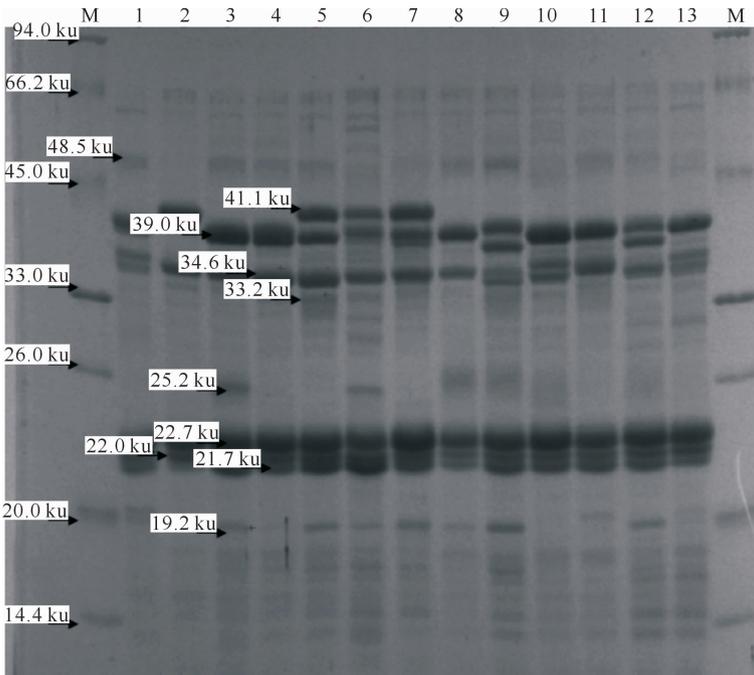


图 2 类型 1~13 山杏种子可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 图谱

M. 蛋白质 Marker;1~13. 山杏类型 1~13

Fig. 2 SDS-PAGE map of *A. sibirica* seed soluble protein

M. Protein Marker;1-13. Morphotypes of *A. sibirica* 1-13

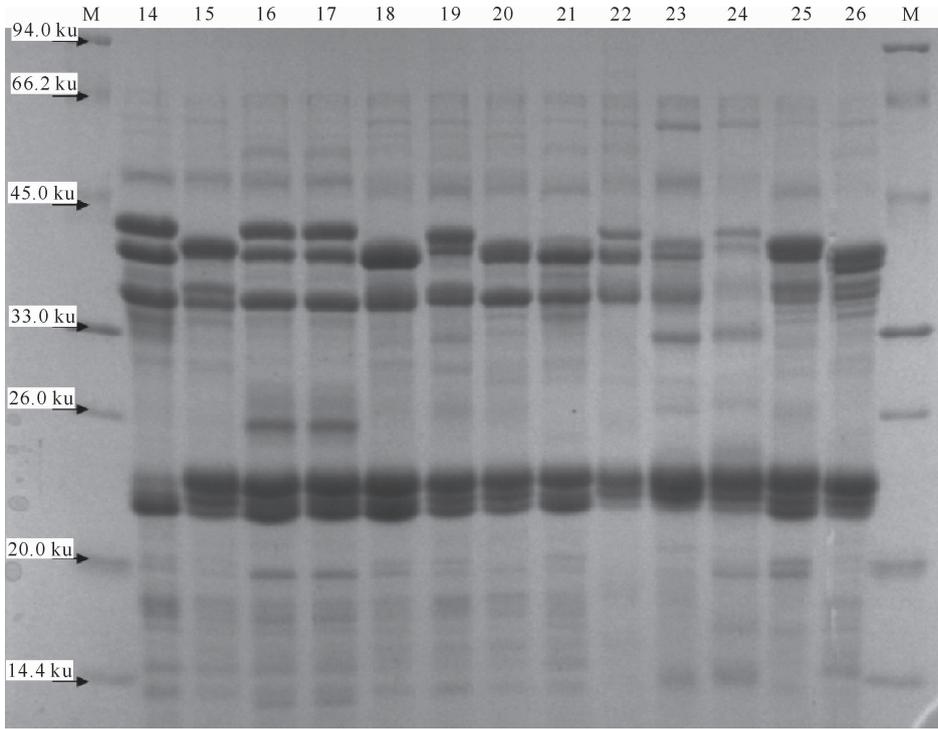


图 3 类型 14~26 山杏种子可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 图谱

M. 蛋白质 Marker; 14~26. 山杏类型 14~26

Fig. 3 SDS-PAGE map of *A. sibirica* seed soluble protein

M. Protein Marker; 14-26. Morphotypes of *A. sibirica* 14-26

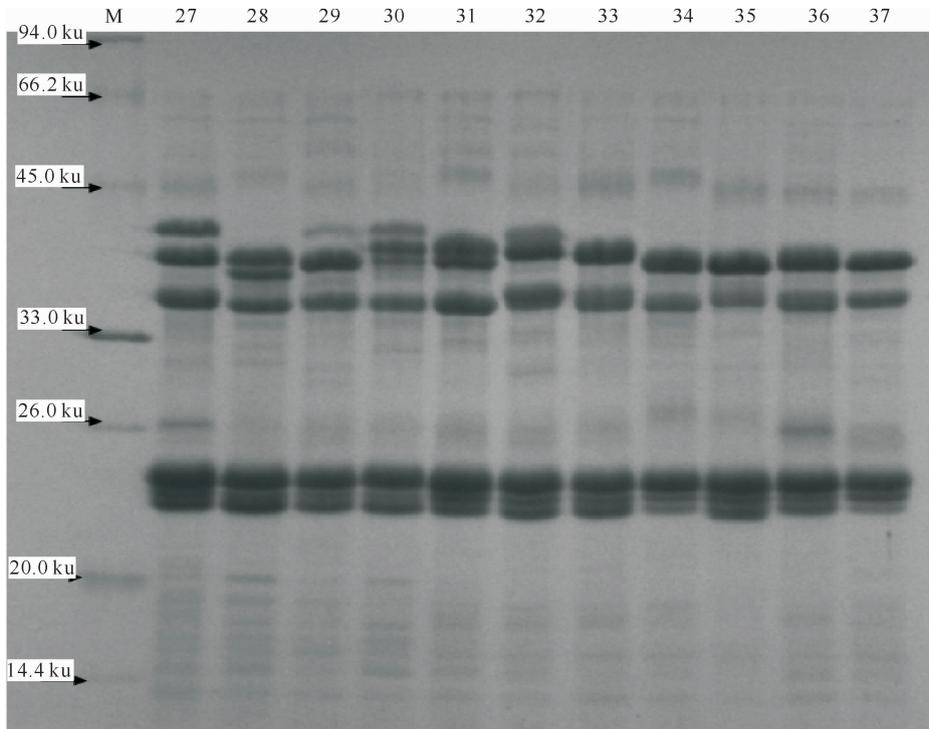


图 4 类型 27~37 山杏种子可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 图谱

M. 蛋白质 Marker; 27~37. 山杏类型 27~37

Fig. 4 SDS-PAGE map of *A. sibirica* seed soluble protein

M. Protein Marker; 27-37. Morphotypes of *A. sibirica* 27-37

37 种类型山杏种子可溶性蛋白质中还存在着一些含量较少的亚基,不同类型山杏在这些亚基上差别较大。大多数类型山杏如 1,3,4 等均含有 48.5 ku 的亚基,而类型 2,6,7,10,12,22,24,30 中则缺少该亚基;大多数类型如 2,3,4 等均含有 33.2 ku 的亚基,而类型 1,16,19,22,23,29,33,36,37 没有该亚基;类型 3,6,8,9,10,12,16,17,23,24,32,34,36,37 含有 25.2 ku 的亚基,其余类型则没有;大多数类型中含有 19.2 ku 的亚基,而类型 2,10,15,20,22,26,27,29,30,31,32,33,34,35,36,37 没有该亚基。各类型间亚基的差别显示了其独特的蛋白质组成模式和遗传特性,这既是不同类型间相互区别的主要蛋白质特征,也是山杏亲缘关系确定和遗传分

类的主要依据。

此外,山杏种子可溶性蛋白质中还存在着一些含量很少的亚基,大多分布在 10~20 ku 和 50~65 ku。它们类型丰富,谱带颜色较浅,分辨率较低,含量较少,有些为所有类型所共有,有些则在少数类型中特异存在,这也是山杏分类的重要依据。

2.4 不同类型山杏的聚类分析

根据 Quantity one 软件读带结果,结合人工判读分析,确定每个山杏类型的谱带,并用 NT-SYS 软件计算 37 种类型山杏间的遗传相似系数,用 UPMGA 法对各类型遗传相似系数进行聚类并构建树状图(图 5)。图 5 显示,蛋白质遗传相似系数为 0.82 时,可将 37 种山杏形态类型分为 5 类。

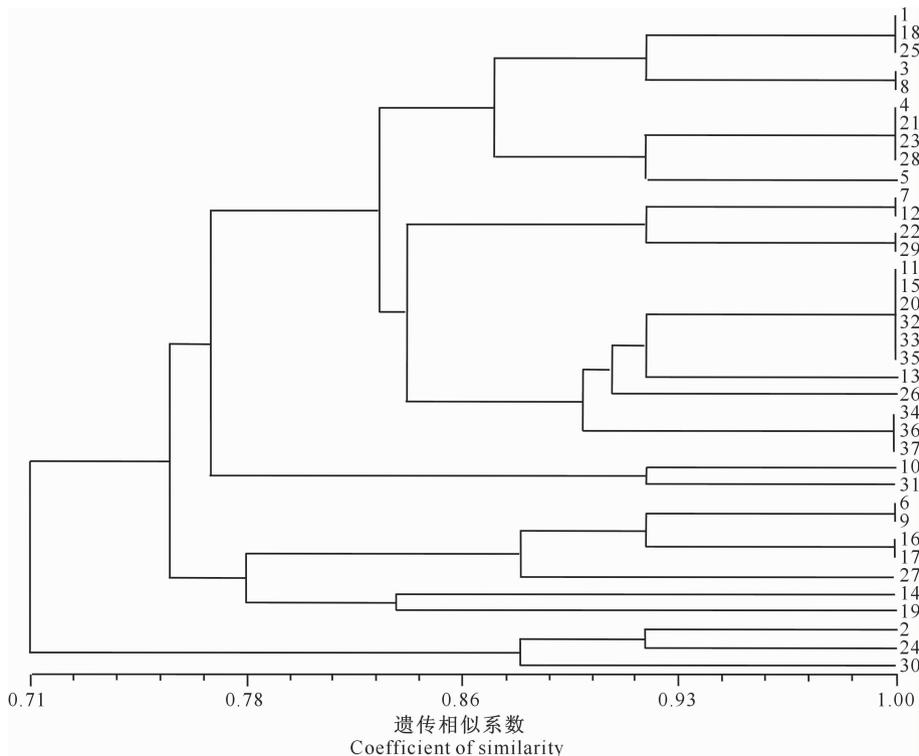


图 5 基于 UPMGA 法构建的不同类型山杏遗传相似系数的聚类树状图

Fig. 5 Tree map of similar genetic coefficient of different morphotypes *A. sibirica* by UPMGA

由图 5 可见,第 I 类山杏包括类型 1,3,4,5,7,8,11,12,13,15,18,20,21,22,23,25,26,28,29,32,33,34,35,36 和 37,共 25 种,这些类型山杏种子的可溶性蛋白质中均含有 64.2,59.1,34.6,22.7,22.0 和 21.7 ku 6 种亚基,蛋白质谱带基本相似,仅在 1 或 2 个亚基上存在差异。在形态上,这些类型山杏果实颜色基本上为黄色带粉红色,果实圆形,极少开裂,果核圆鼓型,中等大小。

第 II 类山杏包括类型 10 和 31,共 2 种,其谱带基本一致,种子可溶性蛋白质含量基本相同,果实均较鼓、较大,形态间差异较小。

第 III 类山杏包括类型 6,9,16,17 和 27,共 5 种,这些类型山杏种子可溶性蛋白质的谱带只在个别亚基上存在差异,如类型 16,17 中无 33.2 ku 的亚基,类型 27 没有 19.2 ku 的亚基。类型 6,16 和 17 种子的可溶性蛋白质含量基本相同,类型 9 和 27 的蛋白质含量较高。以上 5 种类型山杏形态基本相似,但在果实、果核大小上存在一定差异。

第 IV 类山杏包括类型 14 和 19,共 2 种,类型 14 种子可溶性蛋白质较类型 19 多 1 个 33.2 ku 的亚基,二者种子可溶性蛋白质含量相同;在形态上,类型 14 的核质量和出核率远大于类型 19,二者间其

余形态指标差异不大。

第 V 类山杏包括 2, 24 和 30, 共 3 种, 其种子可溶性蛋白质间差异较小, 蛋白质含量均在 200 g/kg 左右, 形态上基本相似。

3 结论与讨论

黄土高原不同产地的山杏, 在叶片、果实、果核等形态特征方面均存在明显差异, 变异类型较多, 其原因主要是山杏的天然杂交, 以及不同地域间相互引种造成的多表现型现象。其次, 降雨量、地形、霜冻期、积温等环境因素对山杏的表现型也有较大影响^[12]。山杏丰富的变异类型是育种的宝贵材料, 有研究者发现, 山杏产量、抗冻能力、杏仁脂肪油含量与其种质间存在相关性^[13]。因此, 调查山杏资源、选育优良种质, 对山杏的生产十分必要。

本研究对黄土高原山杏种质资源进行了广泛收集与整理, 采集了 37 种形态类型典型的山杏, 结果表明, 37 种类型山杏在形态、种子可溶性蛋白质含量、蛋白质亚基等方面存在一定差异, 遗传范围较广, 改良育种潜力较大。刘明国等^[14]应用 PAGE 技术对山杏种内 POD 同工酶及种子可溶性蛋白质进行了分析, 研究了丰产、晚化、初选抗冻优株的遗传特性及分类, 认为山杏叶片 POD 同工酶和种子可溶性蛋白质多态、稳定、活力强, 具有信息量大和准确性高的特点, 分类结果与形态特征基本吻合, 可以作为山杏种内变异的遗传标记。本研究中, 山杏种子可溶性蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析表明, 山杏种子可溶性蛋白质含量丰富(约 200 g/kg)、蛋白质谱带清晰、稳定, 是进行山杏遗传分类研究的重要依据, 这与刘明国等^[14]的研究结果基本一致。山杏种子可溶性蛋白质中, 41.1, 39.0, 34.6, 22.7, 22.0, 21.7 ku 6 种亚基含量较多, 是山杏的特征亚基。

本研究中, 山杏种子可溶性蛋白质的分类结果显示, 37 种类型山杏可分为 5 类, 从蛋白质水平得到的分类结果与形态特征既有一定的吻合, 也有一定的差异。这与刘明国等^[14]的研究有一定差别。其原因可能在于形态特征容易受生理环境等因素的影响, 其部分表现形态并不是可稳定遗传的变异。在所分 5 类中, 第 I 类山杏包括了 25 种类型, 是山杏主要和普遍的表现类型, 其蛋白谱带差异不大, 但形态特征上存在一定差异。第 II、III、IV、V 类分别包括了 2, 5, 2, 3 种类型, 每类中的各类型山杏种子可溶性蛋白质电泳谱带比较相似、形态特征比较一致、可溶性蛋白质含量也基本处于同一水平。种子

可溶性蛋白质分类结果与形态特征、生物学特性趋于一致, 这说明依据蛋白质水平的分类结果有较强的准确性。不同类型山杏间遗传相似系数的大小反映了彼此之间亲缘关系的远近, 在以后的山杏良种选育中, 根据选育品种的类型和用途, 较多地利用这 5 类间或者同类中遗传相似系数较大的类型进行杂交, 可以获得较大的杂种优势。这 5 类山杏种子间可溶性蛋白质含量和谱带的差异较大, 表明山杏品种改良潜力较大。

黄土高原山杏种质资源丰富, 变异类型多样, 是育种的宝贵材料。因此, 应当深入系统地开展山杏种质资源调查, 利用山杏丰富的基因资源进行良种选育, 解决山杏生产中产量低、种质差及易受晚霜危害等难题。山杏种子可溶性蛋白质丰富、多态、稳定, 其分类结果与形态特征和生物学特性比较一致, 可以利用其进行山杏分类研究。同时, 由于形态特征容易受环境条件影响, 蛋白质检测容易受生理、人为干扰, 在山杏种子遗传多样性研究、种下类群划分时, 应当综合运用形态学、孢粉学、蛋白质检测和分子标记等方法, 以得到更为准确可靠的结论。

[参考文献]

- [1] 俞德浚. 中国植物志: 第三十八卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1986: 24-31.
Yu D J. Flora of China; Vol 38 [M]. Beijing: Science Press, 1986: 24-31. (in Chinese)
- [2] 张加延, 张 钊. 中国果树志: 杏卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 93-559.
Zhang J Y, Zhang Z. Chinese fruit tree: Apricot [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2003: 93-559. (in Chinese)
- [3] Abd El-Aal M H, Hamza M A, Rahma E H. *In vitro* digestibility, physico-chemical and functional properties of apricot kernel proteins [J]. Food Chemistry, 1986, 19: 197-211.
- [4] 李科友, 史清华, 朱海兰, 等. 苦杏仁主要营养成分研究 [J]. 西北农业学报, 2003, 12(2): 119-121.
Li K Y, Shi Q H, Zhu H L, et al. Study on main nutrient compositions of bitter almond [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2003, 12(2): 119-121. (in Chinese)
- [5] Thiellement H, Bahrman N, Damerval C, et al. Proteomics for genetic and physiological studies in plants [J]. Electrophoresis, 1999, 20(10): 2013-2026.
- [6] 刘敏轩, 王赞文, 韩建国. 种子真实性及品种纯度蛋白质电泳鉴定技术研究进展 [J]. 种子, 2006, 25(7): 54-57.
Liu M X, Wang Y W, Han J G. Advances in studies of seed authenticity and purity identification by protein electrophoresis [J]. Seed, 2006, 25(7): 54-57. (in Chinese)