

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2022.04.003

# 小桐子生物碱粗提物杀虫抑菌活性的初步研究

江文世<sup>1a</sup>, 李瑶佳<sup>1b</sup>, 李海生<sup>2</sup>

(西昌学院 1a. 理学院; 1b 农学院, 四川 西昌 615013; 2. 乐至县农业农村局, 四川 资阳 641503)

**摘要:** [目的] 为了探索小桐子综合开发利用的价值, 对小桐子生物碱粗提物杀虫抑菌活性进行初步研究。[方法] 以攀西地区 2 种农业主要害虫(甘蓝蚜虫、菜青虫)和 3 种病原菌(石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌和草莓灰霉病菌)为试验材料, 采用点滴法和生长速率法对小桐子生物碱粗提物的杀虫抑菌活性进行了生物测定。[结果] 在杀虫活性方面, 小桐子生物碱粗提物对同翅目的甘蓝蚜虫和鳞翅目的菜青虫均具有较高触杀活性, 其  $LC_{50}$  值范围为 46.249 7~61.064 6 mg/L,  $LC_{90}$  值范围为 331.714 0~342.491 7 mg/L, 总体上与 2.5% 溴氰菊酯 EC 的杀虫效果相当; 在抑制病原真菌方面, 小桐子生物碱粗提物对石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌和草莓灰霉病菌的  $EC_{50}$  分别为 70.635 5、52.400 6 和 133.412 2 mg/L, 其抑菌效果一定程度上优于对照药剂 50% 多菌灵 WP。[结论] 小桐子提取物有较强的杀虫抑菌作用, 在植物源农药的开发方面具有良好的应用前景。

**关键词:** 小桐子; 生物碱粗提物; 触杀毒力; 抑菌作用

**中图分类号:** TQ464.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2022)04-0012-05

## Preliminary Study on Insecticidal and Antibacterial Activities of Crude Alkaloid Extract from *Jatropha curcas* L.

JIANG Wenshi<sup>1a</sup>, LI Yaojia<sup>1b</sup>, LI Haisheng<sup>2</sup>

(1a. School of Science; 1b. School of Agriculture, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China;  
2. Agriculture and Rural Affairs Bureau of Lezhi County, Ziyang, Sichuan 641503, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the application value of *Jatropha curcas* L., preliminary study on insecticidal and antibacterial activities of crude alkaloid extract from *Jatropha curcas* L. was carried out. [Method] Two major agricultural pests (cabbage aphid, cabbage green worm) and three pathogens (pomegranate dry rot, apple rot and strawberry gray mold) in Panxi area were used as experimental materials to determine the insecticidal and bacteriostatic activities of crude alkaloid extract from *Jatropha curcas* L. by dripping method and growth rate method. [Result] In terms of insecticidal activity, the crude alkaloid extract from *Jatropha curcas* L. had high contact activity against homoptera cabbage aphids and lepidoptera cabbage caterpillars. The  $LC_{50}$  values ranged from 46.249 7 to 61.064 6 mg/L, and the  $LC_{90}$  values ranged from 331.714 0 to 342.491 7 mg/L, which was generally equivalent to the insecticidal effect of 2.5% deltamethrin EC; In terms of inhibiting pathogenic fungi, the  $EC_{50}$  of the crude alkaloid extract from *Jatropha curcas* L. against pomegranate dry rot, apple rot and strawberry gray mould were 70.635 5, 52.400 6 and 133.412 2 mg/L respectively, and its antibacterial effect was better than that of the control agent 50% carbendazim WP to a certain extent. [Conclusion] In conclusion, the extract of *Jatropha curcas* L. has strong insecticidal and bacteriostatic effects, and has good application prospects in the development of botanical pesticides.

**Keywords:** *Jatropha curcas* L.; crude alkaloid extract; contact virulence; bacteriostatic activity

### 0 引言

小桐子(*Jatropha curcas* L.)系大戟科(Euphorbiaceae)麻风树属(*Jatropha*)植物, 又称麻风树、羔

桐、臭油桐、芙蓉树, 近年来其在西南干热河谷区域的种植工作逐步开展<sup>[1-3]</sup>。它是一种重要的药用植物, 其性寒, 具有解毒、止痛、散瘀的作用, 临床用于皮肤瘙痒、跌打损伤及胃肠炎的治疗<sup>[4-6]</sup>, 其活性成

收稿日期: 2022-11-09

基金项目: 西昌学院“两高”人才项目(LGZ201915)。

作者简介: 江文世(1968—), 男, 四川内江人, 教授, 硕士, 研究方向: 化学分析。

分较多,尤其是其枝叶和果壳等部位中含有丰富的萜类、黄酮类、多肽等多种物质,因具备较强的驱蚊和驱虫、抑菌等功效一直备受关注<sup>[7-9]</sup>,但在其生物碱方面的研究相对较少。众所周知,生物碱是植物次生代谢产物中含量最大的一类<sup>[10]</sup>,它具有高效、安全、低毒以及对有害生物不易产生抗药性等优点,符合人们对理想农药的要求。鉴于生物碱在药用方面的利用价值,为更好地综合开发、利用小桐子资源,对其生物碱在杀虫、抑菌作用等方面进行研究具有十分重要的价值。

为初步探索小桐子生物碱粗提物的杀虫抑菌活性,采用微量点滴法和生长速率法分别测定小桐子枝叶生物碱粗提物对攀西地区2种农业主要害虫(甘蓝蚜虫、菜青虫)和3种病原菌(石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌、草莓灰霉病菌)的作用,以期为进一步利用小桐子研发植物源农药提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试虫:甘蓝蚜和菜青虫,均为田间收集、饲养。

病原菌:石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌和草莓灰霉病菌,由西昌学院农业科学学院植物保护实验室提供。

### 1.2 药剂

小桐子生物碱粗提物:参考林巧等<sup>[11]</sup>的方法,采用超声法提取小桐子枝叶中的生物碱。其步骤为:(1)按小桐子叶样品粉末0.5 g和质量分数为80%的乙醇按料液比1:30(g/mL)加入,用1%的盐酸溶液定容,调节pH值;(2)在40℃下超声提取20.15 min后过滤,旋转蒸发浓缩,利用二氯乙烷萃取分离,继而在得到的水相中加入10%碳酸钠(pH 10)溶液碱化,经二氯乙烷萃取分离后将得到的有机相置于烘箱烘干以获得生物碱的粗提物。

2.5%溴氰菊酯乳油(EC):江苏南京红太阳集团有限公司生产。

50%多菌灵可湿性粉剂(WP):华阳农药有限公司生产。

### 1.3 杀虫触杀活性测定

将小桐子生物碱粗提物加一滴吐温80后再用超纯水溶解,先配成 $1.0 \times 10^5$  mg/L母液再用超纯水配制试验所需的各质量浓度梯度;分别以2.5%溴氰菊酯乳油以及等量超纯水加一滴吐温80的处理为对照,采用微量点滴法进行药剂触杀活性测定。

### 1.3.1 蚜虫触杀活性测定

选取大小相近的甘蓝蚜成虫30头,在前期预备试验的基础上选取致死率为10%~90%的5个质量浓度,即10、20、50、100、200 mg/L,分别用微量进样器点滴0.1 μL供试药剂于成蚜的前胸背板处,待药液自然干后随即将试虫转移到新鲜甘蓝叶片上,放入养虫盒内于25℃下培养,分别于24、48、72 h后观察记录试虫存活和死亡情况,计算死亡率和校正死亡率,利用各质量浓度梯度对数值和死亡率(或校正死亡率)的概率值为基础数据,通过最小二乘法算出各处理的毒力回归方程,并对其进行显著性检验,最终求出 $LC_{50}$ 、 $LC_{90}$ 。每处理均重复3次,空白对照组用一滴吐温80加超纯水点滴处理,常规药剂对照组以2.5%溴氰菊酯乳油加一滴吐温80溶液,并用超纯水配制的各质量浓度梯度药液点滴处理。

### 1.3.2 菜青虫触杀活性测定

选取个头长度相近的3龄菜青虫幼虫30头,在前期预备试验的基础上选取致死率为15%~90%的5个质量浓度,即10、20、50、100、200 mg/L,用微量进样器在幼虫前胸背板点滴1 μL的供试药剂,药液自然干后,将试虫转移到新鲜叶片在养虫盒内25℃培养,分别于24、48、72 h时观察记录菜青虫存活以及死亡情况,后续处置方法同1.3.1。

### 1.3.3 试虫死亡率的计算

根据供试害虫死亡情况,分别按式(1)和式(2)计算死亡率和校正死亡率。

$$\text{死亡率} = (\text{死虫数}/\text{试虫数}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{校正死亡率} = [(\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}) / (1 - \text{对照组死亡率})] \times 100\% \quad (2)$$

### 1.4 对病原真菌的抑制作用测定

采用菌丝生长速率法<sup>[12-13]</sup>评价小桐子生物碱粗提物对石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌、草莓灰霉病菌的抑制作用。

供试药液的配制:将小桐子生物碱粗提物加入一滴吐温80初融后再用超纯水溶解,配成 $1.0 \times 10^5$  mg/L母液,分别吸取1 mL母液加入不同比例热PDA培养基(55℃)倒平板配成5、10、50、100、200、500、1 000 mg/L梯度含药培养基中;分别以多菌灵和等量超纯水加入一滴吐温80的处理为常规药剂对照组和空白对照组,按上述质量浓度梯度和方法配制所需培养基,各处理与对照均重复3次。

在无菌条件下将事先活化好的不同病原菌菌丝块(直径4 mm)分别接种于含药的培养基正中央,每皿接1块菌饼,放置于25℃的恒温培养箱中培

养,待空白对照组的菌落直径长到距培养皿边缘 1 cm 左右时,采用十字交叉法测量所有处理下病原菌的菌落直径(cm)并做好记录,计算抑菌率,通过最

小二乘法算出各处理的毒力回归方程,并对其进行显著性检验,最终求出  $EC_{50}$ 、 $EC_{90}$ ,计算公式如式(3)所示。

$$\text{抑菌率} = \frac{(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径})}{(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})} \times 100\% \quad (3)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 小桐子生物碱粗提物的杀虫活性

小桐子生物碱粗提物对 2 种害虫的触杀致死作用如表 1 所示,由于空白对照在饲养中自然死亡率

为 5%~20%(48 h),数据需要校正。由表 1 可以看出,小桐子生物碱粗提物对甘蓝蚜和菜青虫有较强的致死作用,其质量浓度越高其致死作用越强,在 200 mg/L 时其对甘蓝蚜和菜青虫的校正死亡率分别达到了 84.20% 和 80.04%。

表 1 小桐子生物碱粗提物对 2 种害虫的触杀作用(48 h)

项目	药剂质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	甘蓝蚜虫		菜青虫	
		死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%
小桐子生物碱粗提物	10	23.86	16.46	18.20	8.20
	20	35.25	28.96	29.68	21.09
	50	55.63	51.32	52.16	46.31
	100	70.28	67.39	68.23	64.35
	200	85.60	84.20	82.21	80.04
2.5% 溴氰菊酯 EC	10	22.96	15.47	19.26	9.39
	20	38.29	32.29	31.65	23.30
	50	58.12	54.05	53.28	47.57
	100	71.39	68.61	70.98	67.43
	200	88.92	87.84	83.94	81.98
空白对照		8.86		10.89	

以药剂不同质量浓度梯度对数值(x)为自变量,触杀活性测定结果的校正死亡率的概率值(y)为因变量,作直线回归方程,求出  $LC_{50}$  值。比较不同药剂对 2 种供试害虫的杀虫效果,结果如表 2 所示。从表 2 中的回归方程可以看出,药剂不同质量浓度梯度对数值与 2 种受试害虫的校正死亡率概率值间均高度线性正相关。同时,比较  $LC_{50}$  值发现,小桐

子生物碱粗提物对甘蓝菜蚜和菜青虫均具备较强的触杀毒力,其  $LC_{50}$  值范围为 46.249 7~61.064 6 mg/L,  $LC_{90}$  值范围为 331.714 0~342.491 7 mg/L,总体接近 2.5% 溴氰菊酯 EC 的杀虫效果。此外,在同一处理质量浓度下,小桐子生物碱粗提物对甘蓝蚜虫的  $LC_{50}$  和  $LC_{90}$  均比菜青虫的低,表明小桐子生物碱粗提物对甘蓝菜蚜具有更好的触杀毒力活性。

表 2 小桐子生物碱粗提物对 2 种害虫的触杀毒力回归方程

药剂名称	害虫	毒力回归方程	r <sup>2</sup> 值	LC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	LC <sub>90</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
小桐子生物碱粗提物	甘蓝蚜虫	y=1.497 8x+2.506 0	0.997 5**	46.249 7	331.714 0
小桐子生物碱粗提物	菜青虫	y=1.711 4x+1.943 8	0.997 7**	61.064 6	342.491 7
2.5% 溴氰菊酯 EC	甘蓝蚜虫	y=1.602 1x+2.395 3	0.991 4**	42.247 8	266.534 7
2.5% 溴氰菊酯 EC	菜青虫	y=1.710 x+2.012 7	0.998 6**	55.802 4	313.324 9

注:“\*\*”表示同列数据间差异有高度统计学意义(P<0.01)。

### 2.2 小桐子生物碱粗提物的杀菌活性

采用菌丝生长速率法测定小桐子生物碱粗提

物对 3 种真菌病害的抑菌活性,结果如表 3 和 4 所示。

表3 小桐子生物碱粗提物对3种病原菌的抑制作用

处理	药剂质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	对石榴干腐病菌 的抑菌率/%	对苹果腐烂病菌 的抑菌率/%	对草莓灰霉病菌 的抑菌率/%	平均抑菌率/%
小桐子生物碱粗提物	5	12.10	15.89	9.56	12.52
	10	23.35	28.41	19.25	23.67
	50	32.18	40.33	30.58	34.36
	100	52.66	56.88	42.81	50.78
	200	69.25	71.95	55.66	65.62
	400	78.36	81.26	68.49	76.04
	800	89.94	91.23	76.99	86.05
50%多菌灵可湿性粉剂	5	11.53	15.47	9.12	12.04
	10	19.58	25.20	17.82	20.87
	50	30.85	36.05	28.19	31.70
	100	43.27	47.58	40.02	43.62
	200	58.32	60.24	51.28	56.61
	400	71.18	70.13	64.85	68.72
	800	83.28	81.66	70.22	78.39

表4 小桐子生物碱粗提物对3种病原菌的毒力回归方程

药剂名称	病原菌	毒力回归方程	r <sup>2</sup> 值	EC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	EC <sub>90</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
小桐子生物碱粗提物	石榴干腐病	y=1.059 1x+3.041 7	0.965 4**	70.635 5	1 145.794 6
小桐子生物碱粗提物	苹果腐烂病	y=1.012 6x+3.259 0	0.973 0**	52.400 6	966.026 7
小桐子生物碱粗提物	草莓灰霉病	y=0.895 4x+3.097 1	0.985 7**	133.412 2	3 601.729 2
50%多菌灵 WP	石榴干腐病	y=0.941 0x+3.083 7	0.974 1**	108.755 3	2 502.683 6
50%多菌灵 WP	苹果腐烂病	y=0.823 2x+3.388 6	0.977 9**	90.674 0	3 268.393 3
50%多菌灵 WP	草莓灰霉病	y=0.835 1x+3.118 6	0.985 8**	179.020 9	6 131.551 1

注:“\*\*”表示同列数据间差异有高度统计学意义(P<0.01)。

由表3和4可知,不同质量浓度小桐子生物碱粗提物对供试病原真菌均有一定程度的抑制作用,随着其质量的浓度增加,其抑菌效果呈增加趋势。同一质量浓度间比较,小桐子生物碱粗提物的抑菌活性高于对照药剂50%多菌灵WP。综合室内毒力测试结果,小桐子生物碱粗提物对石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌和草莓灰霉病菌的EC<sub>50</sub>分别为70.635 5、52.400 6和133.412 2 mg/L,对应EC<sub>90</sub>分别为1 145.794 6、966.026 7和3 601.729 2 mg/L;对照药剂50%多菌灵WP对上述3种真菌病害的EC<sub>50</sub>分别为108.755 3、90.674 0和179.020 9 mg/L,EC<sub>90</sub>分别为2 502.683 6、3 268.393 3和6 131.551 1 mg/L,说明小桐子生物碱粗提物中含有一定的抑菌活性成分,其抑菌效果优于常规药剂

多菌灵,其中尤以对苹果腐烂病菌的抑制作用最强,值得进一步研究

### 3 结论与讨论

小桐子植物资源特别丰富,目前在云南、四川、贵州等地已有大面积栽培<sup>[4-5,14]</sup>,具备开发植物源农药的天然条件,其活性成分研究方面时有报道。郑如刚等<sup>[15]</sup>利用小桐子种子提取物对小菜蛾、家蝇杀虫活性测定结果表明,种子的5种溶剂提取物对2种试虫的杀虫活性均较强,其中对小菜蛾的触杀活性以乙酸乙酯提取物最高,48 h其校正死亡率可达93.6%。魏琴等<sup>[16]</sup>检测并证实小桐子种仁中麻疯树毒蛋白(curcin)能明显地抑制水稻稻瘟病、玉米纹枯病等病原真菌丝生长和孢子的萌发。郭巧生

等<sup>[17]</sup>测定了小桐子枝叶 6 种不同溶剂提取物对小麦赤霉病菌、稻瘟病菌、烟草疫霉菌和辣椒疫霉菌菌丝生长的抑制作用,其抑制率分别为 87.1%、90.3%、86.4% 和 77.9%。

本试验结果表明,从小桐子枝叶中获得的生物碱粗提物表现出较强的生物活性。在杀虫活性方面,小桐子生物碱粗提物不仅对同翅目的甘蓝蚜虫具有较高触杀活性,同时对鳞翅目的菜青虫也具备显著活性,其  $LC_{50}$  值范围为 46.249 7~61.064 6 mg/L,  $LC_{90}$  值范围为 331.714 0~342.491 7 mg/L,总

体上与 2.5% 溴氰菊酯 EC 的杀虫效果相当;在抑制病原真菌方面,小桐子生物碱粗提物对石榴干腐病菌、苹果腐烂病菌和草莓灰霉病菌的  $EC_{50}$  分别为 70.635 5、52.400 6 和 133.412 2 mg/L,其抑菌效果一定程度上优于对照药剂 50% 多菌灵 WP。

本文仅针对小桐子生物碱粗提物的杀虫触杀毒力以及抑制真菌的生物活性方面进行了初步探索,其他方面的生物活性以及田间实际应用效果还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 郑天水. 浅谈小桐子树种在干热河谷地区生态种植的优势[J]. 林业勘查设计, 2021, 50(5): 65-69.
- [2] 孙永玉, 李昆, 雷晨雨, 等. 干热河谷小桐子不同种源的光合生理及生长性状[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27(2): 351-356.
- [3] 王辉, 杜官本. 我国小桐子产业现状及发展趋势探析[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(6): 190-195.
- [4] 夏咸松, 浦恩堂, 严胜骄, 等. 小桐子活性成分在农药方面的研究进展[J]. 现代农药, 2009(2): 42-45.
- [5] 杨栩, 温海成, 韦松基. 民族药麻疯树的化学成分及药理学研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(4): 58-60.
- [6] 夏咸松, 严胜, 骄林军, 等. 小桐子油粕的化学成分研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2011, 20(2): 96-98.
- [7] 伍保龙, 易弋, 夏杰, 等. 小桐子抑菌成分粗提工艺及其活性研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1907-1909.
- [8] 徐俊驹, 谭宁华. 麻疯树酚性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012(20): 3074-3077.
- [9] 刘杰, 李黔柱, 尹航, 等. 麻疯树植物资源的研究与开发利用进展[J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2007(1): 105-110.
- [10] 薛广厚, 范海廷, 李航, 等. 生物碱在植物源农药中的应用研究[J]. 北方园艺, 2009(6): 131-134.
- [11] 林巧, 江文世, 李瑶佳, 等. Box-Behnken 响应面法优化小桐子枝叶中生物碱提取工艺[J]. 现代食品, 2022, 28(7): 82-86+91.
- [12] 罗建梅, 张兴怡, 伍建榕, 等. 植物提取物对油茶炭疽菌的抑菌活性筛选[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(4): 852-859.
- [13] 罗忠友, 韦小丽, 余丽萍, 等. 10 种植物醇提取物对木腐菌的抑菌活性筛选[J]. 林产工业, 2022, 59(6): 46-51.
- [14] 徐天宇, 李婕, 杨启良, 等. 限量灌溉和施氮对小桐子产量和品质的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2018, 44(3): 244-250.
- [15] 郑如刚, 张宇博, 陈祎平, 等. 小桐子种子提取物对小菜蛾、家蝇杀虫活性初探[J]. 热带生物学报, 2012, 3(1): 69-72.
- [16] 魏琴, 廖毅, 周黎军, 等. 麻疯树毒蛋白(curcin)的抗真菌活性研究[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(3): 71-75.
- [17] 郭巧生, 李育川, 邵清松, 等. 小桐子枝叶提取物对植物病原真菌的生物活性[J]. 植物研究, 2010, 30(4): 503-507.

(上接第 11 页)

- [28] 吕春晖, 刘美玲, 齐菲, 等. 稀土元素铈对盐胁迫下小麦种子萌发的影响[J]. 农产品加工(学刊), 2014(10): 63-64+69..
- [29] 张雪洁, 单长卷, 赵新亮. 硝酸铈对玉米幼苗抗旱生理的影响[J]. 河南农业, 2022(11): 6-8..
- [30] 李庆, 王应军, 宗贵仪, 等. 铈缓解镉对玉米种子的毒害效应研究[J]. 稀土, 2013, 34(6): 1-6..
- [31] 段晓宇, 汪维双, 杨红, 等. 硝酸铜、硝酸铈对细茎石斛组培苗生长的影响[J]. 四川农业大学学报, 2012, 30(2): 186-189.
- [32] 陈颖, 曹福亮. 稀土对银杏组培芽苗生长及其不定根的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005(6): 54-56.
- [33] 徐迎亚. 稀土元素镧、铈对金线兰离体培养的影响及机理初探[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [34] 郭淑华. 硝酸铈对南瓜组培苗生长影响的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 13022-13023+13059.
- [35] 高学鹏, 彭杨. 稀土元素铈对油茶幼苗生长的影响[J]. 南方农业, 2018, 12(33): 131-132.
- [36] ZENG F, AN Y, ZHANG H, et al. The effects of La(III) on the peroxidation of membrane lipids in wheat seedling leaves under osmotic stress[J]. Biological Trace Element Research, 1999, 69(2): 141-150.
- [37] 许晟, 刘佳敦, 施和平. 稀土元素铈对花生幼苗生长与抗氧化保护酶系统的影响[J]. 亚热带植物科学, 2021, 50(5): 333-340.
- [38] 金春雁, 王建安, 徐增莱, 等. 铈(III)对盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)组培苗生根及生理生化效应的研究[J]. 中国稀土学报, 2006(3): 380-384.