

MsNHX1 基因转化紫花苜蓿及转基因植株的鉴定

刘小琳¹, 康俊梅¹, 孙彦², 王继峰¹, 胡晓艳^{1,3}, 杨青川^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 2. 中国农业大学草地研究所, 北京 100094;
3. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 712100)

摘要: 以紫花苜蓿“中苜 1 号”(*Medicago sativa* L. cv. Zhongmu No. 1) 7 日龄无菌苗子叶为外植体, 建立适用于农杆菌介导的转基因组织再生体系, 并进行 *MsNHX1* 基因转化试验。*MsNHX1* 基因编码“中苜 1 号”液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 将其转化到“中苜 1 号”中, 以期获得耐盐性更好的苜蓿材料。利用 PCR 技术、RT-PCR 技术及 Dot Blotting 技术对转基因植株进行鉴定, 结果显示: *MsNHX1* 基因已经整合到“中苜 1 号”基因组内, 并且可以转录为 mRNA。

关键词: 中苜 1 号; 紫花苜蓿; *MsNHX1* 基因; 转化; 转基因植株鉴定

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2008)02-0115-06

Agrobacterium-mediated Transformation of Alfalfa by *MsNHX1* Gene and Molecular Detection for Transgenic Alfalfa

LIU Xiao-lin¹, KANG Jun-mei¹, SUN Yan², WANG Ji-feng¹,
HU Xiaoyan^{1,3}, YANG Qingchuan^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;
2. China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. College of Resources
and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi Province 712100, China)

Abstract: In order to obtain the materials with better performance of salt tolerance, the plant regeneration system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was established using the cotyledons as the explants from the sterile 7-day old seedlings of *Medicago sativa* L. cv Zhongmu No. 1 and the genetic transformation of *MsNHX1* gene was conducted. The vacuolar Na^+/H^+ antiporter of Zhongmu No. 1 was coded by gene *MsNHX1* and then transformed back into Zhongmu No. 1. PCR, RT-PCR, and Dot Blotting analysis were used to verify the transgenic plants and the results indicate that *MsNHX1* gene had been inserted into the genome of the transgenic plants and the extrinsic gene had been transcribed to mRNA.

Key words: *Medicago sativa* L. cv. Zhongmu No. 1; Alfalfa; *MsNHX1* gene; Transformation; Transgenic plants identification

目前, 土壤盐渍化问题已成为限制农业可持续发展 and 生态环境恢复所面临的主要问题^[1~3], 而苜蓿有限的耐盐能力限制着其栽种范围, 急需对其耐盐性状进行改良, 培育耐盐性强的紫花苜蓿(*M. sativa*) 新品种, 扩大在盐碱地区的种植范围。随着分子生物学的快速发展, 借助植物基因工程手段改良苜蓿性状已成为现代育种的重要途径, 最常用的转基因方法是建立在植物组培基础上的农杆菌介导法。1988 年, Hinchee 等首先用根癌农杆菌介导法

获得了大豆转基因植株^[4], 本实验利用紫花苜蓿遗传转化中应用最多的根癌农杆菌 LBA4404, 通过 PCR, Southern Blot, RT-PCR 的方法检测再生植株。

MsNHX1 基因是从“中苜 1 号”中克隆的与耐盐性相关的基因, 对植物耐盐性起重要作用^[5]。在烟草中基因 HRP-C 的导入可以超量表达^[6], 在拟南芥中, *PAP1* 基因的转入可以 MYB 转录因子超量表达^[7], 本研究利用农杆菌介导法将 *MsNHX1* 基因再次转化“中苜 1 号”, 希望能使 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白

收稿日期: 2007-06-07; 修回日期: 2007-09-14

基金项目: “十五”国家高技术发展计划(863 计划)(2002AA241101); 国家自然科学基金项目(30471110)

作者简介: 刘小琳(1982), 女, 内蒙古赤峰市人, 硕士研究生, 研究方向为牧草生物技术; * 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: qchyang66@yahoo.com.cn

得到超量表达,以期进一步提高苜蓿的耐盐性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

“中苜 1 号”(*Medicago sativa* L. cv. Zhongmu No. 1) 7 日龄无菌苗子叶; 农杆菌菌株为 LBA4404; 质粒为 pBINHX, 质粒载体含有 *MsNHX1* 基因。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、TaqTM Hot Start DNA polymerase、限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*R V、*Hind*II 和 *Pst*I 均购自 TaKaRa 公司。DEPC 为 AMRESCO 公司产品, Tris 和 RNase A 为 Sigma 公司产品, 异硫氰酸胍购自 Promega 公司, dNTP 为 TaKaRa 公司产品。其余常规药品均为进口或国产分析纯级。

逆转录试剂盒为 Promega 公司产品, 核酸纯化试剂盒为 TaKaRa 公司产品, 点杂交试剂盒为 Roche 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 苜蓿的转化 a. 直接从 -80℃ 冰箱中取 1 mL 用甘油长期保存的菌液, 加入到 40 mL YEB+ Rif 25 mg/L+ Str 50 mg/L+ Km 50 mg/L 液体培养基中, 180 r/min 离心, 28℃ 培养过夜至 A₆₀₀ ≈ 0.6, 准备侵染用。b. 将切好的培养 7 d 的苜蓿无菌苗子叶浸泡到农杆菌菌液中, 侵染 8 min; 留出一部

分子叶作对照, 分别为: CK₁: 未侵染的外植体放入 UM+ 2.4D 2 mg/L+ KT 0.25 mg/L 上, 检测培养基的有效性; CK₂: 未侵染的外植体放入 UM+ 2.4D 2 mg/L+ KT 0.25 mg/L+ 75 mg/L Km+ 500 mg/L Cef 上, 检测抗生素的有效性。c. 将侵染过的外植体接种到加盖一层无菌滤纸的 UM+ 2.4D 2 mg/L+ KT 0.25 mg/L 培养基上, 共培养 7 d。d. 取出共培养后的子叶放入三角瓶中, 按以下步骤清洗外植体表面的农杆菌: 灭菌 ddH₂O; 灭菌 ddH₂O+ Cef (500 mg/L); 液体 UM+ Cef (500 mg/L); 每步清洗 20 min, 期间不断振荡。e. 将外植体转入诱导愈伤组织形成的筛选培养基上培养(UM+ 2.4D 2 mg/L+ KT 0.25 mg/L+ 75 mg/L Km+ 500 mg/L Cef), 约 20 d 继代 1 次, 并逐渐减少 Cef 用量到 100 mg/L。f. 当子叶分化出抗性愈伤组织时, 将其换到诱导体胚分化的筛选培养基培养(UM+ 2.4D 0.5 mg/L+ KT 2 mg/L+ 75 mg/L Km+ 100 mg/L Cef), 约 25 d 继代 1 次。g. 当抗性芽长到 1~1.5 cm 时, 将其转到 1/2MS+ 100 mg/L Cef 培养基中生根成苗, 约 30 d 后生根完全, 即可移栽温室。

1.3.2 再生植株的 PCR 检测 利用 CTAB^[8] 少量提取再生植株的 DNA, 以备 PCR 扩增检测用。

1.3.3 再生植株的 RT-PCR 鉴定 利用异硫氰酸胍法提取上述结果呈阳性的植株总 RNA, 用无 RNase 的 DNase I 消化可能存在的 DNA, mRNA 逆转录后, 用引物 GUSF、GUSR 进行 RT-PCR 电泳检查(表 1)。

表 1 再生植株特异片段的检测

Table 1 Detection of specific fragments of regeneration plants

名称 Name	上游引物 Upstream probe	下游引物 Downstream probe	长度 Length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
GUS 部分片段 GUS fragment	GUSF: 5'-GCAACTGGAC AAGGCACT-3'	GUSR: 5'-GAGCGTCCG AGAA CATTACA-3'	750	54
35S 启动子片段 35S promoter fragment	P35S 1: 5'-CTTACGCAG CAGGTCTCATCA-3'	P35S 2: 5'-CCACCTTCCTTT CCACTATCTT-3'	530	54
<i>MsNHX1</i> 基因中间片段 <i>MsNHX1</i> gene fragment	NHXF: 5'-CCACCTAT(AT)AT(AT) TT(CT)AATGC(AGC)GG(AG)TT-3'	NHXR: 5'-CAC(AT)ACAC(CT)TC(AG) CC(CAG)AAGAC(AG)AG(AC)CT-3'	250	52
<i>MsNHX1</i> 基因全长 Whole <i>MsNHX1</i> gene	Psy: 5'-CACAATCCCCTATCCTT CGCAAG-3'	Pgy: 5'-CAATTCCACAGTTTT CGCGATCCA-3'	1700	60

1.3.4 再生植株的 Dot Blotting 检测

1.3.4.1 探针标记 以 pBINHX 为模板, 用特异引物(上游引物 5'-CACAATCCCCTATCCTT CG-CAAG-3', 下游引物 5'-CCAAAGTTATT-GAAAGCACCAG-3') 扩增的 DNA 片段为探针, 探针标记按照 Roche 公司的“Dig High Prime DNA

Labeling and Detection Starter Kit I”的操作手册提供的方法进行。

1.3.4.2 Dot Blotting 检测 参考 Sambrook 等^[9]方法和 Roche 公司的“Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I”的操作手册提供的方法进行。

2 结果与分析

2.1 目的基因 *MsNHX1* 对苜蓿的转化

培养 7 d 的苜蓿无菌苗子叶, 经农杆菌侵染, 共培养结束后, 转至诱导愈伤组织形成的筛选培养基中进行愈伤组织的诱导, 约 2 周后即可看到愈伤组织产生(图 1A); CK₂ 中几乎所有的子叶都未能分化出愈伤组织, 并随着时间的推移逐渐褐化死亡(图

1B); 而 CK₁ 中的子叶近 100% 分化出愈伤组织, 且其愈伤组织比转化的生长更加迅速(图 1C)。抗性愈伤组织生长到足够大时, 转到诱导体胚分化培养基中诱导体胚的分化(图 2A), 当体胚长出的抗性芽约 2~3 cm 长时(图 2B), 将其移入生根培养基中诱导生根(图 2C), 诱导生根的小苗转移到事先浸透的(营养土: 蛭石= 1: 1)小花盆中繁种(图 2D)。当苜蓿小苗长出健壮的根、茎、叶时, 可将其移入大田(图 2E)。

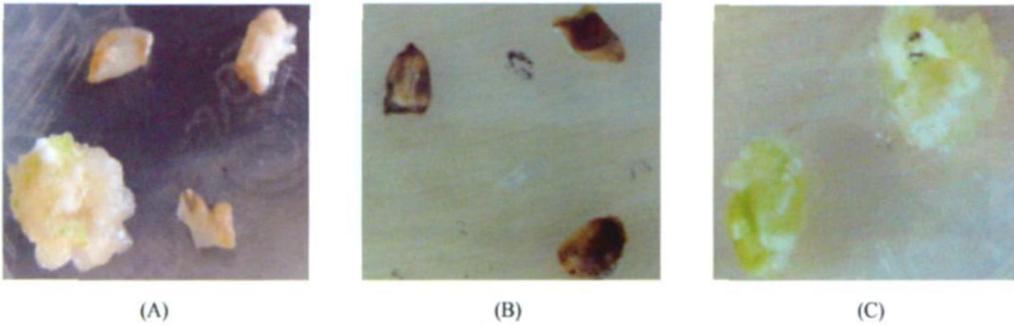


图 1 不同处理下愈伤组织的分化情况

Fig. 1 Callus induction under different treatments

图 1(A) 子叶经浸染且有 500 mg/L Cef 胁迫的愈伤组织; 图 1(B) 子叶未浸染但有 500 mg/L Cef 胁迫的生长情况; 图 1(C) 子叶未浸染且无 Cef 胁迫的愈伤组织

Fig. 1(A) Callus of cotyledon after the inoculation of *Agrobacterium* and under the stress of 500 mg/L Cef; Fig. 1(B) Cotyledon without inoculation of *Agrobacterium*, but under the stress of 500 mg/L Cef; Fig. 1(C) Callus of cotyledon neither through the inoculation of *Agrobacterium* nor under the stress of Cef

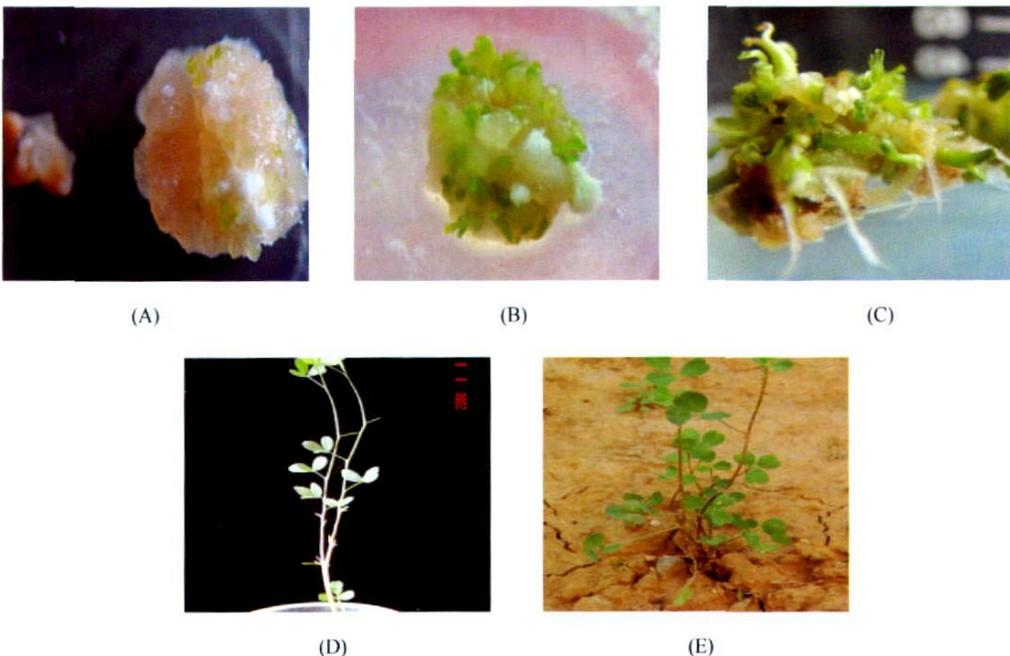


图 2 转基因苜蓿的组培

Fig. 2 The tissue culture of transgenic alfalfa

图 2(A) 转化苜蓿的胚状体; 图 2(B) 具有抗性芽的愈伤组织; 图 2(C) 生根的转基因小苗; 图 2(D) 栽入小花盆中的转基因小苗; 图 2(E) 栽入土中的转基因小苗

Fig. 2(A) The somatic embryo of transgenic alfalfa; Fig. 2(B) The callus with shoots; Fig. 2(C) The transgenic plantlet with roots; Fig. 2(D) The transgenic plantlet in pot; Figure 2(E) The transgenic plantlet in field

2.2 再生植株的 PCR 检测

以再生植株基因组 DNA 为模板, 用引物 GUSF、GUSR 扩增 GUS 基因部分片段, 其大小约 750 bp, P35S-1、P35S-2 扩增 35S 启动子部分片段, 约 530 bp。发现所选植株的 DNA 中都能扩出目的片段(如图 3A、B), 从而初步确定它们有可能为转基因阳性植株。再用引物 NHXF、NHXR 对上述结果呈阳性的植株进行 *MsNHX1* 基因中间片段的 PCR 扩增(如图 3C), 在所选的 4 株植株中, 3 号植

株 PCR 结果为阴性, 说明该植株可能是被空载体转化或未被转化, 其它 3 株初步确定为转基因阳性植株。对于上述 PCR 结果为阳性的植株, 为检测基因组中外源基因的完整性, 选用引物 P_{sy}、P_{gy} 进行 *MsNHX1* 基因全长的 PCR 扩增(如图 3D), 所扩增的片段包括 35S 启动子部分片段、*MsNHX1* 基因全长和 GUS 基因的部分片段, 约 1.7 Kb, 在所选的 11 株植株中, 有 7 株 PCR 结果为阳性, 初步判定它们为转基因阳性植株。

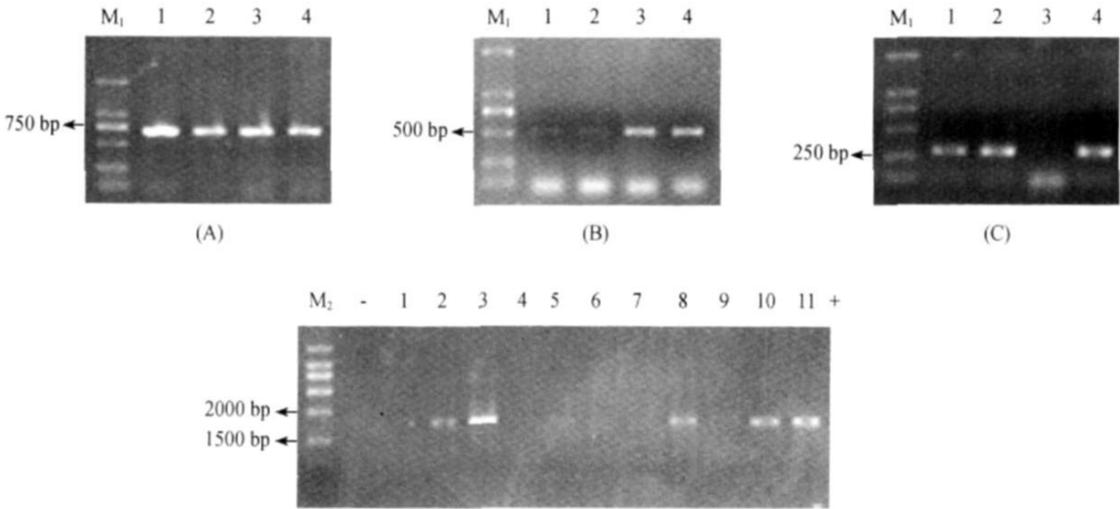


图 3 再生植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR identification of regeneration plants

图 3(A) GUS 片段 PCR 鉴定; 图 3(B) 35S 启动子片段的 PCR 鉴定; 图 3(C) *MsNHX1* 基因中间片段的 PCR 鉴定; 图 3(D) *MsNHX1* 基因全长的 PCR 鉴定

- 为未转化植株阴性对照; + 为质粒阳性对照。M₁: 分子量标准 DL2000; M₂: 分子量标准 DGL4000

Fig. 3(A) PCR identification of GUS fragment; Fig. 3(B) PCR identification of 35Promoter fragment; Fig. 3(C) PCR identification of *MsNHX1* gene fragment; Fig. 3(D) PCR identification of whole *MsNHX1* gene

- : Negative control; + : Positive control (plasmid pBINHX); M₁: DL2000 marker; M₂: DGL4000 marker

2.3 再生植株的 RT-PCR 鉴定

总 RNA 的质量是关系逆转录 cDNA 完整性的重要因素。提取的紫花苜蓿总 RNA 用无 RNase 的 DNase I 处理, 除去污染的基因组 DNA, 结果见图 4 (A)。28S RNA 和 18S RNA 条带清晰, 浓度比例符合要求, 表明提取的 RNA 完整性较好。

以未转化的阴性对照和再生植株的叶片总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA 第一链, 用引物对 I 扩增 GUS 部分片段, 检测结果如图 4(B)。阴性对照泳道 2 中没有扩增条带, 而泳道 1 转化的植株中扩增出明显的特异条带。这表明表达元件中 GUS 基因已经整合入基因组, 并且可以转录为 mRNA。

2.4 Dot Blotting 检测

用地高辛(DIG)标记的 692 bp 的探针对 PCR

检测呈阳性的植株进行 DNA Dot Blotting 检测(图 5)。结果表明, A1 质粒 pBINHX 和植株 A3、B4、C2、C5、D4 出现杂交信号, 而 B1 非转化植株和其它植株没有出现杂交信号。DNA Dot Blotting 进一步证明了部分转化植株中外源 *MsNHX1* 已稳定整合到了苜蓿的基因组中。

3 讨论

苜蓿的离体再生体系目前还不像模式植物如烟草那样稳定和高效。在外源基因转入苜蓿时, 几乎所有器官或组织都可作为外植体, 但是外植体的选择是决定组织培养成功的一个关键因素。Gallego 等在利用子叶、下胚轴、叶柄和叶片做外植体时, 得出叶柄是最好的外植体的结果, 平均产生 18 个体细

胞胚, 8% 的体细胞胚转变为正常的植株^[10]; Cuadrado 等在实验中也得到了同样的结论——叶柄是最好的外植体^[11]; Iantcheva 等利用杂花苜蓿品种 R108 的根作外植体, 根先被 1 mol/L 蔗糖溶液预处理 48 和 72 h 后, 在液体培养基中培养, 预处理 72 h 的根完成再生所用时间最短, 需要 55 d, 体细胞胚转化为完整植株的比例最大, 达到 70%^[12]。由于苜蓿生长周期长的生物学特性以及该属种类繁多, 基因组大等原因, 要想获得比较统一可行的诱导和分化培养基, 目前是比较困难的^[13], 不同的品种需要不同的再生体系。

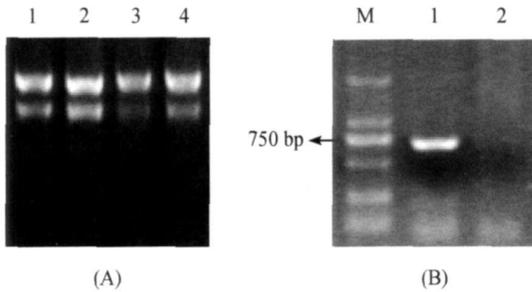


图4 再生植株的 RT-PCR 鉴定

Fig. 4 RT-PCR identification of regeneration plants

图4(A)泳道1为从未转化植株中提取的总RNA, 泳道2~4为从再生植株中提取的总RNA; 图4(B)再生植株的 RT-PCR 鉴定, 泳道1为阳性转化植株的 PCR 结果, 泳道2为未转化植株阴性对照。M为分子量标准 (DL2000)

Fig. 4(A) Lane 1: total RNA of untransformed plants; Lane 2-4: total RNA of regeneration plants; Fig. 4(B) RT-PCR identification of regeneration plants. Lane 1: PCR analysis result showed the presence of the expected 1.7 Kb fragment of transgenic alfalfa; Lane 2: negative control (untransformed alfalfa); M; DL2000 marker

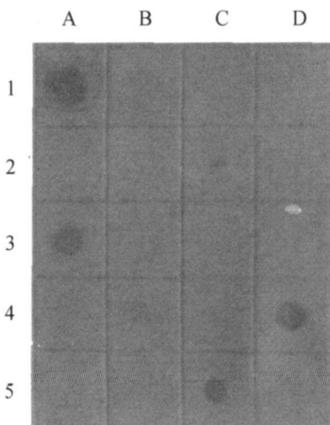


图5 苜蓿转化植株的 DNA Dot Blotting 结果

Fig. 5 DNA dot blotting of transgenic alfalfa

A1, 质粒 pBINHX; B1, 非转化植株 (CK); 其余为转化植株
A1, plasmid pBINHX; B1, non-transformed plants (CK); others are putative transformed plants

在本试验中, 以苜蓿品种“中苜1号”为材料, 以子叶为外植体, 以 UM+ 2, 4D 2 mg/L+ KT 0.25 mg/L 为诱导愈伤组织生成的最佳培养基, 这与陈晨等的研究结果一致^[14]。

在对转基因植株鉴定方面, PCR 法是建立在核酸水平上最常用的检测方法, 近年来, 一些实验室尝试通过复合 PCR 来检测转基因植株。在复合 PCR 检测中, 需在同一反应管中加入多对引物, 反应中易产生二级结构和引物竞争, 因而结果不够稳定, 可同时检测的目标产物数量也会受到限制, 且其中产物片段较大的往往扩增受到抑制^[15]。所以本试验采取常规 PCR 的方法, 分别对 GUS 基因部分片段、35S 启动子部分片段进行 PCR 检测, 但进一步的研究表明, 一些整合有 GUS 基因、35S 启动子基因的转基因株系的基因组中并不含有目的基因 *MsNHX1*, 这可能与外源基因的整合机制有关, 例如染色体上易位、倒位及重组的发生, 都可能导致目标序列的删除或缺失, 所以又对 *MsNHX1* 基因中间片段及 *MsNHX1* 基因全长进行 PCR 检测, 初步确定结果呈阳性的植株为转化植株。DNA Dot Blotting 检测, 可有效地去除经 PCR 结果为假阳性的植株, 并具有较高的准确性, 是转基因研究中快速有效的手段。但是对转 *MsNHX1* 基因的“中苜1号”来说, 探针的设计上要注意特异性, 探针只能与转化植株的 DNA 结合, 才能起到筛选作用, 这点与其他转外源基因植株的检测有所差别。

在核酸水平上对转基因植株进行检测后, 转录水平检测 RT-PCR 也是必要的。RT-PCR 结果说明, 经 PCR、DNA Dot Blotting 鉴定为阳性的转化苜蓿植株中, 表达元件已经整合入基因组, 并且在转录水平上未沉默。

4 结 论

以紫花苜蓿“中苜1号”7日龄无菌苗子叶为外植体, 建立了适用于农杆菌介导的转基因组织再生体系, 所选用的培养基、抗生素浓度、农杆菌菌液侵染浓度适合“中苜1号”的转基因研究。本研究共获得 42 株再生植株, 对它们进行的针对报告基因 GUS, 35S 启动子, *MsNHX1* 基因全长的 PCR 鉴定, 结果表明有 18 株的检测结果显示阳性; 然后再对其中 8 株进行了 RT-PCR 鉴定, 共得到 2 个阳性株系; 最后, 又对这 18 个植株进行 DNA Dot Blot 检测, 共得到 5 个转基因植株。因此, 我们得出的结论

是:在 42 株再生植株中有 5 株目的基因 *MsNHX1* 已经整合到苜蓿基因组中,转化率为 11.9%,并在转录水平上得到表达。

该实验将编码“中苜 1 号”液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的 *MsNHX1* 基因转化到“中苜 1 号”中,以期获得耐盐性更好的苜蓿材料。此外,探针的设计上注意了探针的特异性,使探针只能与转化植株的 DNA 结合起到筛选作用^[16],这点与其他转外源基因植株的检测有所差别。

本实验为其他基因转入“中苜 1 号”建立了适用于农杆菌介导的转基因组织再生体系,为其基因转化工作打下基础,为苜蓿新品系的培育提供了重要种质资源,对分子育种体系的建立具有重要的指导意义,为以后的生产实践奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Rhoades J D, Kandiah A, Mashali A M. The use of saline waters for crop production[J]. FAO, Irrigation and Drainage Paper, 1992: 80-92
- [2] Jacoby. B. Mechanisms involved in salt tolerance by plants. M. Pessarakli (ed.), Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker[M]. New York, 1993. 97-123
- [3] 牛东玲,彭宏春,王启基,等.柴达木盆地弃耕地盐渍状况的主分量分析[J].草业学报,2001,10(2):39-46
- [4] HINCHEE Maw, DVCONNER Ward, NEWELL C A. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium mediated DNA transfer [J]. Bio Technology, 1988(6), 915-922
- [5] Hamada A, ibino T, amura T, et al. Na^+/H^+ antiporter from Synechocystis species PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long G terminal tail important for the carrier activity[J]. Plant Physiology, 2001a, 125: 437-446
- [6] Laura Heggie and Marcel A. K. Jansen. Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsur NN) plants over expressing a synthetic HRP-C gene are altered in growth, development and susceptibility to abiotic stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, (43) : 1067-1073
- [7] Takayuki Tohge, Yasutaka Nishiyama. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over expressing an MYB transcription factor[J]. The Plant Journal. 2005, (42) : 218-235
- [8] 萨姆布鲁克 J., 拉塞尔 D. W. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [9] Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 475-490
- [10] Gallego P, Hita O, Villalobos N, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago arborea* L. [J]. Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2001, 37(2) : 199-203
- [11] Cuadrado Y, Guerra H, Martin A B, et al. Differences in invertase activity in embryogenic and non embryogenic calli from *Medicago arborea* [J]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2001, 67: 145-151
- [12] Iantcheva A, Slavov S, Prinsen E, et al. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre treatment [J]. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2005, 81: 37-43
- [13] 金淑梅,管清杰,罗秋香,等.苜蓿愈伤组织高频再生遗传和转化体系的建立[J].分子植物育种,2006,4(4):571-578
- [14] 陈晨,曹致中,贺顺姬,等.农杆菌介导的紫花苜蓿遗传转化体系的建立与优化[J].甘肃农业大学学报,2004,39(5):516-519
- [15] 金芫军,郝畅,程红梅,等.用复合 PCR 方法检测 6 种转基因玉米外源 DNA 中的特异性[J].农业生物技术学报,2005,11(5):562-567
- [16] 毛培胜,张涛,杨青川.紫花苜蓿品种鉴定的 RAPD 分子标记技术研究[J].草地学报,2007,15(2):124-128

(责任编辑 梁艳萍)