

辣椒雄性不育系 *SDH4* 基因的表达特性分析

邵贵芳, 王 姣, 张 水, 赵 凯, 邓明华*

(云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650201)

摘 要: 为了探究线粒体电子传递复合体 II 的关键酶基因(*SDH4*)与辣椒细胞质雄性不育的关系, 该试验通过 GenBank 报道的辣椒线粒体基因组序列, 特异引物扩增 *SDH4* 基因, 并通过分析 *SDH4* 基因的时空表达及转录本编辑位点, 以期找到辣椒细胞质雄性不育系 9704A 和保持系 9704B 的差异。结果表明: (1) 从辣椒细胞质雄性不育系 9704A 和保持系 9704B 中获得的目的基因编码区片段长度一致, 全长均为 378 bp, 编码 125 个氨基酸残基。(2) 辣椒保持系不同组织中 *SDH4* 基因表达存在差异, 种子中表达最高, 茎中表达最低。(3) 在不同材料花蕾发育的同一时期, *SDH4* 基因表达也不一致, 在花粉母细胞减数分裂时期, 不育系 *SDH4* 基因表达量明显低于保持系; 而在造孢细胞增殖期、小孢子单核期和小孢子成熟期的表达量均高于保持系。(4) 不育材料中 *SDH4* 基因在 29 位点出现 RNA 编辑, 导致氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸, 增强了蛋白结构的疏水性能。研究认为, 辣椒细胞质雄性不育系 9704A 和保持系 9704B 中 *SDH4* 基因的表达差异可能引起植物的能量代谢供应出现异常, 从而导致雄性不育的产生。

关键词: 辣椒; 雄性不育; *SDH4*; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q786; Q789 **文献标志码:** A

Cloning and Expression Analysis of *SDH4* Gene from Pepper Cytoplasmic Male Sterility Line

SHAO Guifang, WANG Jiao, ZHANG Shui, ZHAO Kai, DENG Minghua*

(College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In order to study the relationship between pepper (*Capsicum annuum*) cytoplasmic male sterility and *SDH4*, we cloned a key enzyme gene of mitochondrial electron transfer complex II. *SDH4* gene by using specific primers to amplify the mitochondrial genome sequence reported by GenBank. By analyzing the spatiotemporal expression of *SDH4* gene and transcriptional editing site to find differences of male sterile line and maintainer line. The results showed that: (1) the length of the coding region of the target gene in two lines was 378 bp, encoding 125 amino acid residues. (2) *SDH4* gene has a different expression in different tissues in pepper maintainer line, the highest in seed and the lowest in stem. (3) There is a difference of *SDH4* gene expression in the same period of budding development of different materials. *SDH4* gene in meiosis stage of pollen mother cell of male sterile line was significantly lower than that of maintainer line, in the other three periods (sporogenous cell division stage, uninucleate microspore stage and mature pollen stage), *SDH4* gene expression of male sterile line were higher than those of maintainer line.

收稿日期: 2017-11-21; **修改稿收到日期:** 2018-03-07

基金项目: 国家公益性行业科技体系(200903025); 国家大宗蔬菜产业技术体系(nyeytx-35-gwzj); 云南省蔬菜生产科研协作组; 云南农业大学研究生科技创新项目(2016yk36)

作者简介: 邵贵芳(1991—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究。E-mail: 834242734@qq.com

* 通信作者: 邓明华, 博士, 教授, 主要从事蔬菜生物学研究。E-mail: dengminghua2013@163.com

(4) In male sterile line, the RNA editing of *SDH4* gene at the 29 site resulted in the change of amino acid from serine to leucine, which enhanced the hydrophobicity of the protein structure. It is considered that the difference of *SDH4* gene expression in pepper cytoplasmic male sterility line 9704A and maintainer line 9704B may cause abnormal energy metabolism supply of plants, resulting in male sterility.

Key words: *Capsicum annuum*; male sterility; *SDH4*; qRT-PCR;

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是发生在自然界的一种普遍现象,目前已在 200 多个物种中广泛发现^[1]。作为杂交育种的重要手段,雄性不育的产生往往与线粒体有着密不可分的关系。线粒体作为植物生长过程的重要产能细胞器,为植物提供 90% 以上的能量。研究表明,在大多数植物中,线粒体的功能紊乱,造成植物在花粉发育高度需要能量的关键环节因能量供应不足,导致不能产生正常的功能性花粉,从而引起植物的雄性不育^[2]。

线粒体呼吸链包含 4 个复合体:复合体 I (NADH 脱氢酶)、复合体 II (琥珀酸脱氢酶)、复合体 III (细胞色素 C 还原酶)和复合体 IV (细胞色素 C 氧化酶)。F₀F₁-ATP 合酶被称为复合体 V,但其并没有电子传递活性。线粒体经过这些复合体进行电子传递,从而构成电化学梯度产生能量,供给植物正常生长。吕俊恒^[3]在辣椒雄性不育系 9704A 和同型保持系 9704B 的叶片和花蕾的不同时期发现,能量代谢的相关基因 *G6PDH*、*MDH*、*ACO* 和 *ND-PK*,在保持系不同组织、两系花蕾不同时期均有差异表达,认为这几个基因与辣椒植株的生长发育密切相关,它们明显差异的表达量,可能引起能量代谢紊乱,导致植株雄性不育。线粒体复合体是电子传递过程中的关键环节,*SDH4* 作为编码线粒体电子传递链复合体 II 亚基的重要基因,其功能的是否正常直接影响着复合体 I 的生物活性。

RNA 编辑是线粒体基因转录后调控表达的一种重要方式,其现象普遍存在于植物、动物、微生物等有机生物体,以及细胞核、线粒体、叶绿体等具有自身遗传编码系统的细胞器中。近年来研究表明,高等植物 CMS 的发生与 RNA 编辑有一定的关系。基因转录后通过碱基的插入、缺失或替换,使 RNA 产物的长度、结构发生变化从而影响基因的表达模式或创造嵌合基因,导致线粒体的功能紊乱,造成胞质雄性不育^[4-6]。

本研究通过对 *SDH4* 基因在保持系不同组织及两系中花蕾不同发育时期的表达分析,以及在两系中转录本编辑位点的分析,以期找到 *SDH4* 基因

在两系中差异,为进一步研究辣椒雄性不育的形成与能量代谢的关系提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

辣椒雄性不育系 9704A 及其保持系 9704B,种植于云南农业大学园林园艺学院实验基地,取保持系茎、叶、花、果实、胎座和种子 6 个不同组织作为组织表达材料;取不育系与保持系造孢细胞增殖期、花粉母细胞减数分裂期、小孢子单核期和小孢子成熟期 4 个不同时期花蕾,作为研究两系表达谱差异的材料。所有材料取样后立即冻于液氮,置于 -80 ℃ 超低温冰箱长期保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 和 RNA 提取及 cDNA 合成 本实验通过 BioTeKe 公司的试剂盒提取 DNA,用 Trizol 试剂对各个组织与花蕾不同时期的 RNA 进行提取,提取后立即用紫外分光光度仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳双重检测 RNA 浓度及纯度,检测合格后使用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒进行 cDNA 合成。

1.2.2 *SDH4* 基因的克隆 根据辣椒物种中提供的该基因的编码序列,利用 Primer Premier 5.0 设计引物 F1 (AAACGACCAGGTACAGCATA) 和 R1 (GTCATCTGACCAAGGAGCAT),引物序列由北京擎科新业生物技术有限公司合成。分别以不育系和保持系的 DNA 和 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件为:95 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,40 个循环;72 ℃ 后延伸 10 min;4 ℃ 保存。

1.2.3 生物信息学分析 利用 GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 预测基因的 cDNA 序列,利用 DNAMAN,Editseq,seqman 等软件对测序结果进行初步编辑、比对、人工校对,并推导出氨基酸序列,氨基酸分子量 (Mw) 和等电点 (pI) 利用 Compute pI/Mw Tool (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) 来预测,利用 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽序列,使用 PSort II

程序(<http://psort.hgc.jp>) 预测蛋白质的亚细胞定位情况,蛋白质的保守结构域通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 服务器上的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行预测,使用 SOPMA 程序 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>) 预测蛋白质的二级结构,蛋白质的跨膜螺旋结构由 TMHMM Server version 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测。利用 ClustalX 对氨基酸序列进行同源性比较,并用 MEGA7 构建多物种系统进化树。

1.2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实时定量 PCR 采用 TaKaRa 公司荧光定量试剂盒,染料为 SYBR Green,在 Applied Biosystem 荧光定量 PCR 仪上进行。以辣椒 Actin 片段为内标,所用 Actin 引物为 F2(TGCAGGAATCCACGAGACTAC)和 R2(TACCACCACTGAGCACAATGTT); cDNA 为模板,根据 *SDH4* 基因的测序结果设计荧光定量引物 F3(TCAGAAAAGAAACGAGAG)和 R3(GCACATAAATGAAGGGAT)。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L 体系,包含 10 μ L SYBR Premix Ex Taq II (购于 TaKaRa 公司),10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 上下游引物各 0.8 μ L,2 μ L cDNA 模板,0.4 μ L ROX Reference Dye II,6 μ L ddH₂O;反应程序为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火 34 s,循环 40 次。每个样品设 3 次重复。反应结束,利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行相对表达量分析。

1.2.5 *SDH4* 的转录本分析 选取两系叶片为材料,分别提取 DNA 和 RNA 进行 *SDH4* 基因扩增,扩增产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序,然后比对分析。

2 结果与分析

2.1 *SDH4* 基因的分离

分别以辣椒雄性不育系与保持系的 DNA 和 cDNA 为模板,采用特异性引物进行 *SDH4* 基因 PCR 扩增。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增结果送北京擎科新业生物技术有限公司测序,结果表明目的片段为 450 bp 的完全编码序列,与预期结果相符(图 1)。

2.2 辣椒 *SDH4* 基因的生物信息学分析

RT-PCR 产物测序结果表明,编码区全长 378 bp,编码 125 个氨基酸(图 2)。生物信息学分析表明 *SDH4* 蛋白质等电点为 10.163,分子量为

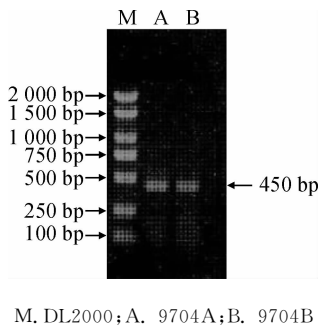
14 532.54 ku,无信号肽,亚细胞定位显示该蛋白质位于细胞质的概率是 21.7%。通过 SOPMA 程序预测 *SDH4* 蛋白的二级结构中含有 72 aa 的 α -螺旋(57.60%),12 aa 的延伸链结构(9.60%),无 β 转角,40 aa 的无规则卷曲(32%)。

2.3 *SDH4* 氨基酸序列比对及其分子进化关系

对雄性不育系与保持系 PCR 产物的测序结果进行比对,雄性不育系与保持系中 *SDH4* 的氨基酸序列无差异。通过 Blast(protein) 比对可知,辣椒 *SDH4* 氨基酸序列与多个物种 *SDH4* 氨基酸序列的相似性分别为:烟草(YP-173457.1)99%,葡萄(YP-002608381.1)93%,酸枣(YP-009241655.1)94%,西瓜(YP-003587239.1)92%,番木瓜(YP-002608211.1)95%,黄瓜(YP-004849351.1)86%,茄子(AK77854.1)96%,林烟草(XP-009778651.1)100%等。利用 MegAlin 计算辣椒与其他物种的氨基酸序列的相似度,MEGA7.0 构建系统进化树,表明辣椒的 *SDH4* 基因与林烟草和烟草的亲缘关系较近(图 3 和 4)。

2.4 *SDH4* 基因的组织表达分析

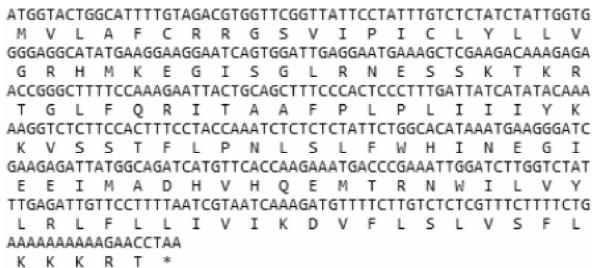
实时荧光定量结果(图 5)表明,*SDH4* 基因在



M. DL2000; A. 9704A; B. 9704B

图 1 辣椒 *SDH4* 基因扩增结果

Fig. 1 The amplification result of *SDH4* gene in pepper



* 代表终止密码子

图 2 辣椒 *SDH4* 基因的 CDS 序列及其编码的氨基酸序列

* indicates the stop codon

Fig. 2 The coding region sequence and amino acid sequence of *SDH4*

保持系的 6 个组织中均有表达,但不同组织中表达差异较为明显。其中,*SDH4* 基因在种子中的表达量最多,为茎中表达量的 50 倍;叶、果皮、胎座的表达量相差很小,花中的表达量仅高于茎,叶、果皮、胎座的表达量分别是花中表达量的 3.8、3.0 和 2.0 倍。

2.5 *SDH4* 基因在不育系和保持系不同花期的表达

实时荧光定量结果(图 6)表明,在小孢子发育的造孢细胞增殖期、花粉母细胞减数分裂期和小孢子成熟期,*SDH4* 基因在不育系和保持系的表达量差异不大,但在花粉母细胞减数分裂时期,*SDH4* 的表达量明显高于保持系。对于不育系,*SDH4* 基因的表达在花粉母细胞减数分裂时期最低;保持系中,则在造孢细胞增殖期最低,随后呈现上升趋势,在小孢子成熟期突然骤降。不管是不育系还是保持系,*SDH4* 基因的表达量均在小孢子单核期达到最高,而在小孢子成熟期表达量降低。此结果表明 *SDH4* 基因在不育系和保持系中的表达存在差异,该差异可能与雄性不育的形成有关。

2.6 *SDH4* 基因转录本的编辑位点

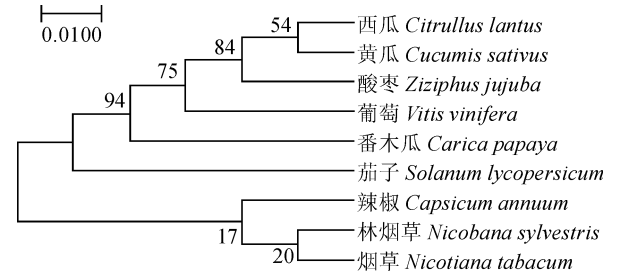
RNA 编辑指 DNA 转录 RNA 后,核苷酸在 RNA 上的插入、缺失或碱基替换来改变 DNA 来源模板遗传信息的普遍现象,对中心法则进行了新的

重要补充^[7]。在高等植物中,RNA 的编辑一般发生在编码区,且一般是 C→U。当然,也会通过对基因组编码的 C 残基进行脱氨基来创造终止密码子^[4]。研究表明,RNA 编辑与植物的细胞性雄性不育的发生有一定的关系。

在辣椒不育系和保持系中,*SDH4* 都有且只有一处编辑位点,在 29 位点上编辑方式为 C→T(图 7 中箭头),位于密码子的第 2 位,导致氨基酸由丝氨酸变为亮氨酸,由亲水性氨基酸变为疏水性氨基酸,增强了蛋白质结构的疏水性能。推测不育的形成可能与氨基酸的亲疏水性有关。

3 讨论

琥珀酸脱氢酶复合物(复合体 II)是一种存在于线粒体的高度保守的蛋白质复合物,由 *SDH1* 到

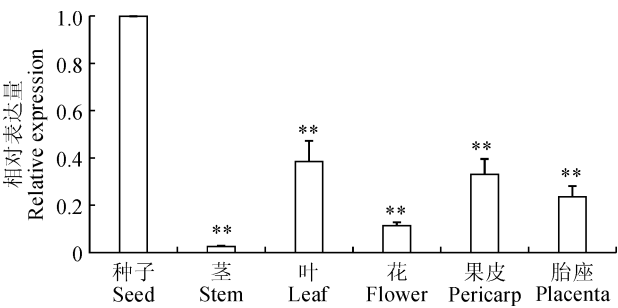


标尺代表遗传距离;数值代表从 1 000 次重复计算得到的 Bootstrap 百分比值

图 4 辣椒与其他物种 *SDH4* 基因推导氨基酸序列进化树分析

The scale bar represents genetic distance; Number represents the Bootstrap percentage value calculated from 1 000 replicates

Fig. 4 The evolutionary tree of amino acid sequences of *SDH4* from pepper and other plants



图中数据为 3 次重复的平均值±SD; * 和 ** 分别代表在 0.05 和 0.01 水平差异显著性。图 6 同

图 5 *SDH4* 基因在 9704B 不同组织中的表达

The data of each column in mean±SD (n=3); * indicates significance at 0.05 level; * * indicate significance at 0.01 level. The same as Fig. 6

Fig. 5 The expression of *SDH4* gene in different organs of the maintainer line 9704B

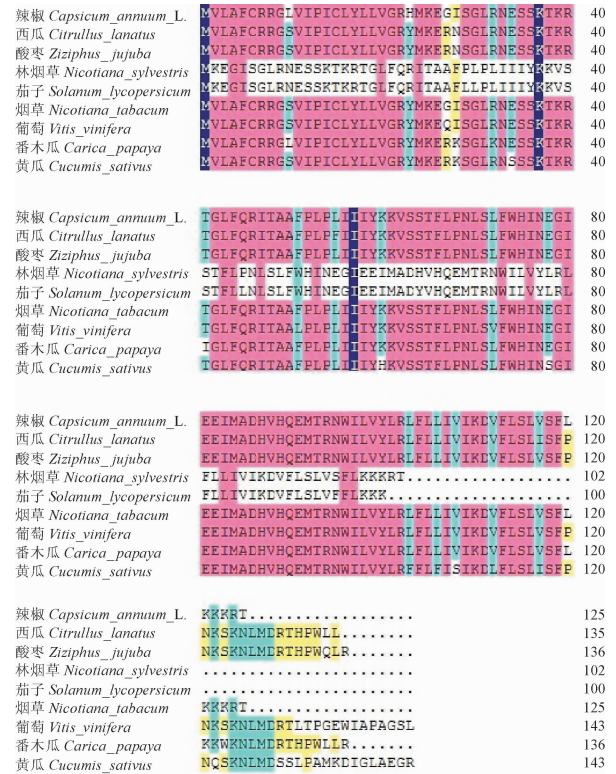
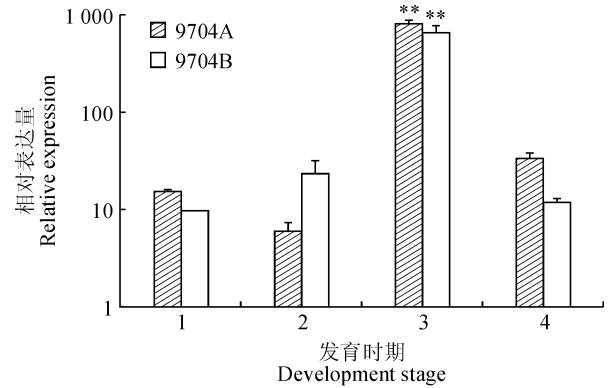


图 3 辣椒与其他物种 *SDH4* 基因推导的氨基酸比对

Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of *SDH4* from pepper and other plants

SDH4 亚基形成,属于琥珀酸泛醌氧化还原酶家族。但在目前,有研究发现植物复合体Ⅱ中出现了 4 个其他以外的亚基(成为 SDH5~SDH8)。SDH4 是位于线粒体电子传递复合体Ⅱ的关键酶,关系着 ATP 的产生和生物合成过程碳骨架的形成。SDH4 编码跨膜亚基,跨膜亚基含有血红素和



1. 造孢细胞增殖期;2. 花粉母细胞减数分裂期;3. 小孢子单核期;4. 小孢子成熟期
图 6 SDH4 基因在 9704A 和 9704B 花蕾不同发育时期的表达

1. Pporogenous celldivision stage; 2. Pollen mother cell (PMC) meiosis stage; 3. Uninucleate microspore stage; 4. Mature pollen stage

Fig. 6 The expression of SDH4 gene during the 4 flower development stages in 9704A and 9704B

醌结合位点^[8],通过跨膜螺旋结构将复合体锚定在线粒体内膜上。最新研究发现,在拟南芥中,SDH6 和 SDH7(SDH3 和 SDH4 的缺失序列)有助于将琥珀酸脱氢酶锚定在线粒体内膜上^[9]。SDH4 活性指标对雄性生殖细胞具有重要的指导意义^[10-11]。在一些作物中,研究者通过酶细胞化学分析发现,不育系和保持系的 SDH 活性存在差异,推测可能与雄性不育的形成有关^[12-16]。

同一个基因在植物的不同组织中会根据自身的特性与功能进行时空的特异性表达。这也是造成在同一植株不同组织表达差异的原因。SDH4 作为电子传递链过程的关键酶,与 ATP 的产生有着一定的联系。一般情况下,年幼的、生长旺盛的器官的呼吸速率高于年老的、衰老的器官;生殖器官(花、果、种子)高于营养器官(茎、叶)。在 9704B 的 6 个组织中,SDH4 在种子中的表达量最高,很有可能采取材料的时候正好是种子形成期,该时期的种子需要大量能量及淀粉、蛋白等有机物质来用于细胞增大,促进胚、胚乳或子叶的快速生长。实验材料选取的叶片可能是新鲜的嫩叶。在不育系和保持系的花期的第 2 时期(花粉母细胞减数分裂时期),保持系中的 SDH4 基因的表达量高于不育系,但在小孢子单核期,不育系中 SDH4 表达量骤然上升,且表达

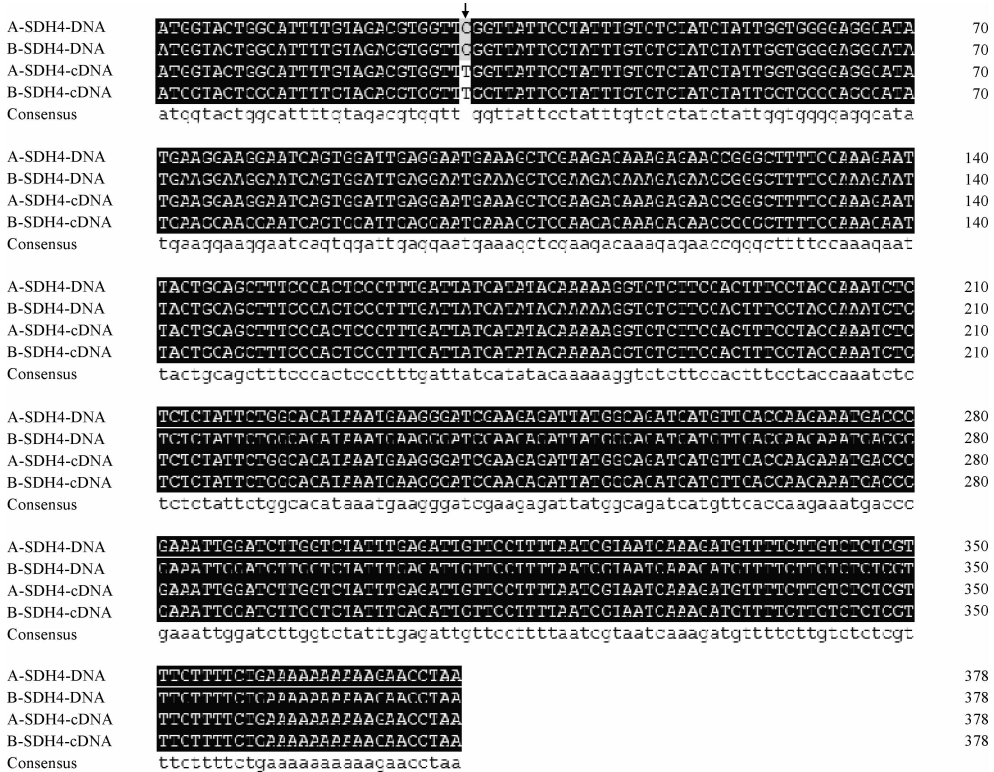


图 7 SDH4 基因在辣椒不育系和保持系中转录本的编辑位点
Fig. 7 Editing sites in transcript of SDH4 gene in pepper sterile and maintainer line

量高于保持系。有研究表明,不育系的小孢子在四分体时期会出现异常,到单核期初期,小孢子空瘪,并开始解体;到中后期,小孢子质核及小孢子壁都开始逐渐降解。从小孢子单核期到小孢子成熟期,SDH4 基因在不育系中的表达均高于保持系。我们推测,不育因子导致的线粒体功能紊乱,在小孢子正常发育的关键时期,影响了能量的正常供应,从而导致了雄性不育的发生。

参考文献:

[1] 吴 峰,刘玉梅,孙德岭,等.辣椒胞质雄性不育系与保持系生化特性研究[J].天津农业科学,2008,**14**(2):50-52.
WU F, LIU Y M, SUN D L, *et al.* Biochemical characteristics of cytoplasmic male sterile and maintainer lines in pepper [J]. *Tianjin Agricultural Science*, 2008,**14**(2): 50-52.

[2] WARMKE H E, LEE S L. Pollen abortion in T cytoplasmic male-sterile corn (*Zea mays*): a suggested mechanism[J]. *Science*, 1978, **200**(434): 561-563.

[3] 吕俊恒. 辣椒雄性不育系 5 个能量代谢基因的克隆与表达谱分析[D]. 云南:云南农业大学,2015.

[4] 刘欣芳,马 骏,马 慧,等.高等植物 RNA 编辑的研究进展[J].辽宁农业科学,2012,(4): 43-47
LIU XF, MA J, MA H, *et al.* Advances in the research of higher plants RNA editing [J]. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2012,(4): 43-47.

[5] WEI L, YAN Z X, DING Y. Mitochondrial RNA editing of FO-ATPase subunit 9 gene(atp9) transcripts of Yunnan purple rice cytoplasmic male sterile line and its maintainer line[J]. *Acta Physiol. Plant*, 2008,**30**(5): 657-662.

[6] ZHAO Y H, LIAO X F, ZHOU B J, *et al.* Mutation in the coding sequence of atp6 are associated with male sterile cytoplasm in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) [J]. *Euphytica*, 2016,**207**(1): 169-175.

[7] KELLER R W, WOLF J, GERBER A. Editing of messenger RNA precursors and of tRNAs by adenosine to inosine conversion[J]. *FEBS Lett*, 1999,**452**(1-2):71-76.

[8] YANKOVSKAYA V, HORSEFIELD R, TORNRÖTH S, *et al.* Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation[J]. *Science*, 2003, 299: 700-704.

[9] SCHIKOWSKY C, SENKLER J, BRAUN H P. SDH6 and SDH7 contribute to anchoring succinate dehydrogenase to the inner mitochondrial membrane in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol.*, 2017,**173**(2): 1 094-1 108.

[10] RUIZ-PESINI E, ALVAREZ E, ENRIQUEZ J A, *et al.* Association between seminal plasma carnitine and sperm mi-

RNA 的正常编辑对线粒体的正常功能发挥着重要的作用,当线粒体基因发生不正确或不完全的 RNA 编辑时,其产物可能导致线粒体功能的异常而造成雄性不育^[17]。SDH4 基因在不育系和保持系中的编辑位点无变化,为完全编辑,但编辑频率是否会有差异,从而影响 ATP 合酶的正常功能,还有待进一步的研究。

tochondrial enzymatic activities[J]. *International Journal of Andrology*, 2001, 24: 335-340.

[11] RAO M V, SHARMA P S N. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice [J]. *Reprod Toxicol*, 2001, 15: 705-712.

[12] WATSON C V, NATH J, NANDA D. Possible mitochondrial involvement in mechanism of cytoplasmic male sterility in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Biochemical Genetics*, 1977, 15: 1 113-1 124.

[13] 刘忠松.不育花药的生理生化研究进展与展望[J].植物生理学通讯,1987,(2): 16-21.
LIU Z S. Advances and prospects of physiology and biochemistry in sterile anthers[J]. *Plant Physiology Communication*, 1987,(2): 16-21.

[14] 栗冀玫,赵双宜,张燕君,等.萝卜(*Raphanus sativus* L.)雄性不育系小孢子发生中的酶细胞化学初探[J].山东农业大学学报(自然科学版),1996,**31**(3): 341-346.
LI J W, ZHAO S X, ZHANG Y J, *et al.* Enzymatic cytochemistry in microsporogenesis of male sterile line of *Raphanus sativus* L[J]. *Journal of Shandong Agricultural University* (Natural Science Edition), 1996,**31**(3): 341-346.

[15] 黄晋玲,杨 鹏,李炳林.棉花晋 A 细胞质雄性不育系的遗传研究[J].棉花学报,2004,**16**(4): 229-230.
HUANG J L, YANG P, LI B L. Genetic study on cytoplasm male sterile line of Jin A cotton[J]. *Cotton Journal*, 2004,**16**(4): 229-230.

[16] 袁建玉.不结球白菜 CMS 新种质细胞学及生理生化特性研究[D].南京:南京农业大学,2005: 35-36.

[17] 易 平,汪 莉,孙清萍, *et al.* HL 型水稻 atp6 基因转录本编辑位点的分析[J].生物化学与生物物理进展, 2002, **29**(5): 729-733.
YI P, WANG L, SUN Q P, *et al.* Study on the editing sites in the transcript of atp6 gene of HL-rice mitochondria[J]. *Prog Biochem Biophys.*, 2002,**29**(5): 729-733.

(编辑:宋亚珍)