



# NbUNE12 与 CMV 2a 蛋白相互作用并负调控 2b 缺陷型 CMV 突变体侵染植物

姚佳怡,顾周杭

(浙江理工大学生命科学与医药学院,杭州 310018)

**摘要:** 为了探究黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)复制酶 2a 蛋白细胞核定位的生物学意义,以本氏烟 UNE12 蛋白(NbUNE12)为研究对象,通过双分子荧光互补实验及病毒诱导的基因沉默方法分析该蛋白与 2a 蛋白的相互作用情况及其在 CMV 侵染过程中的作用。结果表明:CMV 2a 蛋白与 NbUNE12 蛋白的相互作用主要集中于细胞核中;下调表达 NbUNE12 增加 CMV 的 2b 缺陷型突变体(CMVΔ2b-GFP)在植物系统叶的病毒含量,表明 NbUNE12 蛋白能够与 CMV 2a 蛋白发生相互作用,并且负调控 CMVΔ2b-GFP 侵染本氏烟。该研究为 CMV 2a 蛋白在植物细胞核定位的生物学功能进一步研究奠定理论基础。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒;bHLH 转录因子;UNE12;本氏烟;抗性

**中图分类号:** Q939.46

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2025)03-0270-06

**引文格式:**姚佳怡,顾周杭. NbUNE12 与 CMV 2a 蛋白相互作用并负调控 2b 缺陷型 CMV 突变体侵染植物[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2025,53(2):270-275.

**Reference Format:** YAO Jiayi, GU Zhouhang. NbUNE12 interacts with CMV 2a protein and negatively regulates infected plants of a 2b-deleted mutant of CMV[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University,2025,53(2):270-275.

## NbUNE12 interacts with CMV 2a protein and negatively regulates infected plants of a 2b-deleted mutant of CMV

YAO Jiayi, GU Zhouhang

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** To investigate the biological significance of the nuclear localization of the cucumber mosaic virus (CMV) 2a protein, the article, focusing on *Nicotiana benthamiana* UNE12 protein (NbUNE12), investigated the interaction between 2a and NbUNE12, as well as the functional role of Nb-UNE12 during CMV infection by conducting bimolecular fluorescence complementation experiments and employing the virus-induced gene silencing method. The findings indicate that the interaction between CMV 2a and NbUNE12 predominantly occurred within the nucleus. Silencing NbUNE12 enhanced the accumulation of a 2b-deficient CMV mutant (CMVΔ2b-GFP) in the upper systemic leaves, suggesting that NbUNE12 interacted with CMV 2a and acted as a negative regulator of CMVΔ2b-GFP accumulation. This study lays a theoretical foundation for further study of the biological function of CMV2a protein localization in plant nucleus.

**Key words:** cucumber mosaic virus; bHLH transcription factor; UNE12; *Nicotiana benthamiana*; resistance

## 0 引言

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus,

CMV)为雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)黄瓜花叶病毒属(Cucumovirus)的重要成员,能侵染寄主植物多达 1000 种,且分布范围广泛,对农业生产造成

收稿日期:2024-07-04 网络出版日期:2024-09-13

基金项目:浙江理工大学基本科研业务费项目(2021Q032)

作者简介:姚佳怡(1999—),女,浙江海宁人,硕士研究生,主要从事植物病毒学方面的研究。

通信作者:顾周杭,E-mail:hzgu@zstu.edu.cn

严重危害<sup>[1]</sup>。CMV 的基因组由 3 条正义单链 RNA 分子组成, 分别命名为 RNA1-3, 其中 RNA1 和 RNA2 分别编码病毒基因组复制相关的 1a 蛋白和 2a 蛋白<sup>[2]</sup>。此外, 由 RNA2 亚基因组 RNA4A 编码的 2b 蛋白是 CMV 的主要致病因子, 参与病毒长距离移动、影响植物抗性途径<sup>[3]</sup>。2b 蛋白能克服宿主水杨酸(Salicylic acid, SA)介导的免疫反应, 从而抑制 SA 对病毒移动的影响。SA 预处理能够导致缺失 2b 蛋白的 CMV 突变体(CMV $\Delta$ 2b)失去系统性侵染的能力<sup>[4]</sup>。

寄主因子与 CMV 复制相关蛋白相互作用从而影响病毒的复制。普通烟(*Nicotiana tabacum*)液泡膜上的锌指蛋白 Tsi1 相互作用蛋白 1 (Tsi1-interacting protein 1, Tsi1p1)与 CMV 的 1a 蛋白和 2a 蛋白均存在相互作用, 并且正调控植物对 CMV 的抗性<sup>[5]</sup>。目前普遍认为 CMV 复制场所位于液泡膜<sup>[2,4]</sup>, 作为复制酶重要组成部分的 2a 蛋白理论上应该集中于液泡膜上, 但有研究报道瞬时表达 2a 蛋白存在明显的细胞核定位<sup>[6]</sup>, 然而该现象的生物学意义目前仍不清楚。

转录因子是一类通过影响 RNA 聚合酶复合物与启动子相互作用来影响基因转录水平的重要蛋白, 其主要定位于细胞核。bHLH 转录因子家族因其高度保守的碱性/螺旋-环-螺旋结构域(Basic helix-loop-helices, bHLH)而得名, 广泛存在于动物和植物中<sup>[7-8]</sup>; bHLH 结构域由大约 60 个保守的氨基酸残基组成, 含有 2 个保守的基序, 碱性区和螺旋-环-螺旋区(HLH 区)<sup>[9]</sup>, bHLH 通过参与调控植物激素信号途径, 在植物生长、发育、光信号转导和逆境反应中发挥着至关重要作用<sup>[10-13]</sup>。在拟南芥, bHLH 家族成员 AtMYC2 可在干旱和盐胁迫下可以诱导脱落酸(Absciscic acid, ABA)诱导基因表达<sup>[14]</sup>; 在烟草中, NtMYC2a、NtMYC2b 和 NtMYC2c 是尼古丁生物合成途径中茉莉酸(Jasmonic acid, JA)诱导表达的必需组成部分<sup>[15]</sup>; GbbHLH171 在植物体内与 GbSOBIR1 相互作用, 调控棉花对黄萎病的抗性<sup>[16]</sup>。bHLH 家族中 ILR3 与苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus, AMV)的外壳蛋白( Coat protein, CP)直接相互作用, ILR3 从细胞核迁移到核仁, 激活 SA 依赖性防御信号途径<sup>[17]</sup>。本氏烟 NbUNE12 (Solgenomics 数据库中编号为 Niben101Scf00415g00003. 1)属于 bHLH 转录因子家族成员。NbUNE12 的拟南芥中同源基因 bHLH059 参与调控温度响应的 SA 防卫途径, 当在

拟南芥中过量表达 bHLH059 能够抑制 SA 积累<sup>[18]</sup>。上述结果暗示 NbUNE12 有可能在本氏烟中通过参与调控 SA 途径, 从而影响 CMV, 特别是 CMV $\Delta$ 2b 的侵染。

为了揭示 CMV 2a 蛋白定位在细胞核中的生物学功能, 确定其与本氏烟 bHLH 转录因子家族成员 NbUNE12 是否存在相互作用, 本文通过双分子荧光互补实验(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)验证了两者的相互作用, 并利用通过烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)介导的基因沉默技术(Virus-induced gene silencing, VIGS)进一步明确 NbUNE12 在 CMV 侵染过程中的作用, 以期证实 CMV 2a 蛋白在细胞核定位的生物学意义, 并进一步阐明 UNE12 转录因子在植物抗病过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

植物为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*), 在恒温 22 °C、16 h 光照和 8 h 黑暗温室中培养; CMV Fny 株系(CMV-Fny)侵染性克隆(pCB301-F109、pCB301-F209、pCB301-F209 $\Delta$ 2b-GFP、pCB301-F309)保存于本实验室。

### 1.2 载体构建

以本氏烟 cDNA 为模板, 通过引物对 UNE12 VIGS F/UNE12 VIGS R 进行 PCR 扩增, 获得 PCR 产物 1, PCR 产物 1 经 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切克隆至 pTRV2 载体中, 获得重组克隆 pTRV2-UNE12; 通过引物对 UNE12 F/UNE12 R 获得 PCR 产物 2, PCR 产物 2 与和 p2YN 载体分别进行 *Pac* I / *Bcu* I 双酶切, 连接转化获得 p2YN-UNE12 载体; 以 pCB301-F209 为模板, 通过引物对 Fny2a F/Fny2a R 获得 PCR 产物 3, 将割胶回收后的 PCR 产物 3 和 p2YC 载体分别进行 *Pac* I / *Sgs* I 双酶切、连接与转化后得到重组克隆 p2YC-Fny2a。扩增上述 PCR 产物所用的引物序列见表 1, 所有克隆经测序验证。

### 1.3 农杆菌转化与浸润接种

将 p2YN-UNE12、p2YC-Fny2a、pTRV2-UNE12 分别转入农杆菌 GV3101, 记作 YN-UNE12, YC-Fny2a, TRV2-UNE12; 农杆菌的活化与扩大培养的方法参考文献[19]。在 BiFC 实验中, 相应农杆菌用浸润缓冲液(10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸, 200 mmol/L 乙酰丁香酮)分别调至浓度

为 OD<sub>600</sub> 等于 0.25, 室温黑暗下放置 3~4 h 后, 浸润接种至本氏烟叶片中, 浸润缓冲液配置参照文献[19]。在 TRV 介导的 VIGS 实验中, 含 pTRV2-UNE12 农杆菌与含 pTRV1 的农杆菌以 1:1 比例混匀后, 调整终浓度为 OD<sub>600</sub> 等于 0.25 后, 混合接种本氏烟叶片。在 CMV 接种中, 将分别包含 pCB301-F109、pCB301-F209、pCB301-F309 质粒的农杆菌用浸润缓冲液分别调至浓度为 OD<sub>600</sub> 等于 0.5, 室温黑暗下放置 3~4 h, 等体积比例混合均匀后, 浸润本氏烟叶片。在 CMVΔ2b-GFP 接种中, 将分别包含 pCB301-F109、pCB301-F209Δ2b-GFP、pCB301-F309 质粒的农杆菌 GV3101 菌液以同样操作方式处理后, 浸润本氏烟叶片。

1.4 激光共聚焦显微镜观察

将携带表达红色荧光蛋白 (Red fluorescent protein, RFP) 的组蛋白 2B 载体 (H2B-RFP) 的农杆菌分别与 YN-UNE12/ YC-Fny2a、YN-UNE12/YC、YC-Fny2a/YN 农杆菌组合共同浸润本氏烟, 其中 YN-UNE12/YC、YC-Fny2a/YN 组合为阴性对照, 48 h 后通过激光共聚焦显微镜

观察。

1.5 RNA 杂交检测

采集处理植物叶片, 用 RNA 提取液 (50 mmol/L 醋酸钠 pH 值 5.2, 10 mmol/L EDTA pH 值 8.0 和 1% SDS) 提取植物的总 RNA, 具体方法参考文献[19]。CMV 基因组杂交方法参考地罗氏高辛标记检测试剂盒 II 的产品使用说明书, 探针序列为 5'-GACTGACCATT TTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCCGTTC-DIG-3'。

1.6 蛋白杂交检测

采集处理植物叶片, 使用含有质量分数 1% SDS 和质量分数 2% β-巯基乙醇的 1×PBS 提取叶片总蛋白, 蛋白检测方法具体参照文献[19]。

1.7 逆转录反应与荧光定量 PCR

以植物总 RNA 为模板, 通过随机引物反转录获得 cDNA, 采用引物对 UNE12 qPCR F/UNE12 qPCR R 进行荧光定量 PCR, 以本氏烟蛋白磷酸酶 2A (Protein Phosphatase 2A, Solgenomics 数据库中编号: Niben101Scf09716g01002.1) 作为内参, 相对定量计算方法采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法, 引物序列见表 1。

表 1 本文所用引物

引物名称	序列(5'-3')	目的
UNE12 VIGS F	AAggtaccATGGCGACGAACCAAC	构建 NbUNE12 VIGS 载体
UNE12 VIGS R	AAActcgagTGACGGGGCTGC	
UNE12 F	CCttaattaaATGGCGACGAACCAAC	构建 NbUNE12 BiFC 载体
UNE12 R	AAAactagtTGACGGGGCTGC	
Fny2a F	ttaattaaATGGCTTTCCCTGCC	构建 CMV 2a BiFC 载体
Fny2a R	ggcgcgccCGACTCGGGTAACTCCG	
UNE12 qPCR F	CCAACCAACAACAAGCACAAC	NbUNE12 qPCR 检测
UNE12 qPCR R	TCACATAGTCCAGAATCTCATCAAG	
PP2A qPCR F	GACCCTGATGTTGATGTTTCGCT	NbPP2A qPCR 检测
PP2A qPCR R	GAGGGATTTGAAGAGAGATTTC	

注: 小写字母为酶切位点。

2 结果与讨论

2.1 CMV 2a 蛋白与转录因子 NbUNE12 存在相互作用

为了探究 CMV 2a 蛋白与 NbUNE12 是否存在相互作用, 利用 BiFC 技术分析两者在植物体内相互作用情况, 结果如图 1 所示。在 YN-UNE12 与 YC-Fny2a 共浸润叶片中呈现来源于相互作用之后产生的黄色荧光蛋白 (Yellow fluorescent protein, YFP) 信号, 并且该荧光信号与定位于细胞核的 H2b-RFP 信号具有重叠 (见图 1(a)); 而相应阴性对照处理中均未出现来源于 YFP 荧光信号 (见图 1(b)~(c))。上述结果表明 NbUNE12 与 CMV 2a

存在相互作用, 并且该相互作用主要集中在细胞核中。拟南芥中 NbUNE12 的同源基因 bHLH059 正调控温度响应的 SA 信号途径<sup>[18]</sup>。因此, NbUNE12 可能在烟草中扮演类似角色, 而 CMV 则有可能通过 2a 蛋白与 NbUNE12 的相互作用, 影响后者在激活 SA 过程中的功能。

2.2 NbUNE12 对 CMV 积累量的影响

2.2.1 下调 NbUNE12 不影响野生型 CMV 侵染  
为了分析 NbUNE12 对 CMV 侵染植物过程中的作用, TRV 介导的 VIGS 降低 NbUNE12 的表达量, 在本氏烟上分别接种 TRV-mCherry、TRV-UNE12。重组 TRV 接种 10 d, 2 组植株表



型未出现明显差异(见图 2(a)一(b))。实时荧光定量 PCR 检测植物系统叶 *NbUNE12* 的表达量显示, TRV-UNE12 接种植株中的 *NbUNE12* 表达量下调约 70%(见图 2(c)), 由此可见, TRV-UNE12 能够有效沉默靶标基因, 且不会引起植株明显的发育异常。为了确定下调表达 *NbUNE12* 对 CMV 积累量的影响, 分别在 *NbUNE12* 沉默和对照植株上浸润接种野生型

CMV, 在 CMV 侵染植株 6 d, TRV-mCherry 和 TRV-UNE12 处理植株的系统叶均出现 CMV 引起的典型叶片卷曲症状, 且症状反应没有明显差别(见图 3(a)一(b))。RNA 杂交结果显示: 与对照组相比, TRV-UNE12 处理植株中的 CMV 基因组 RNA 链积累量没有明显差异(见图 3(c)), 因此 *NbUNE12* 下调表达与否对 CMV 在系统叶的积累量没有明显影响。

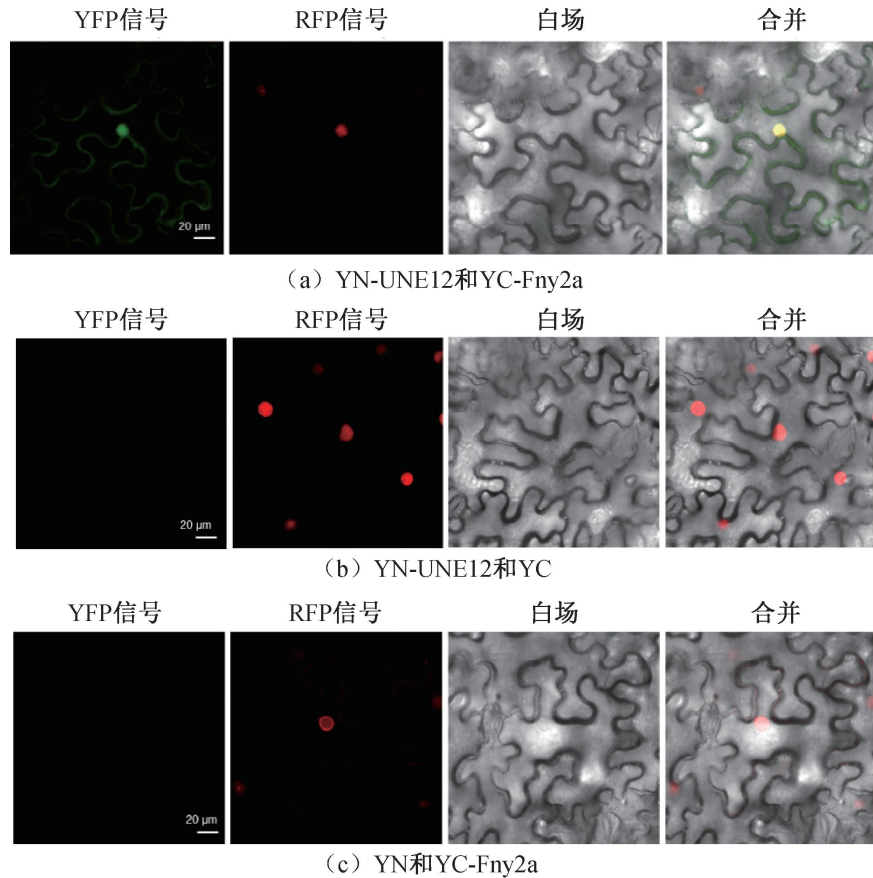


图 1 NbUNE12 与 CMV 2a 在细胞核中存在相互作用

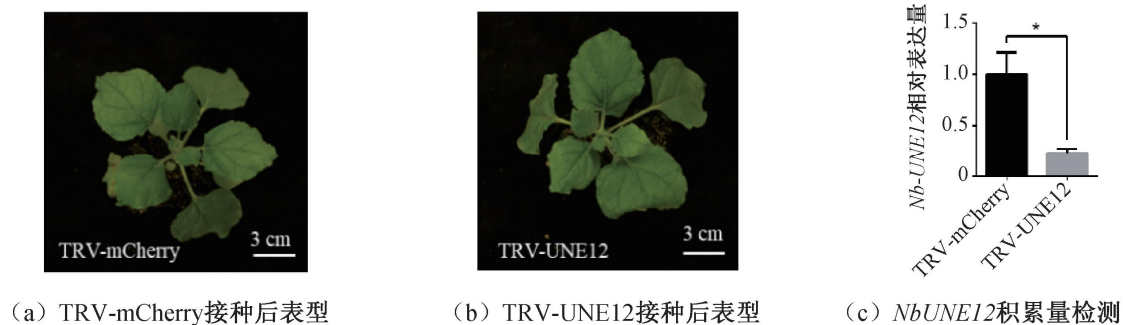


图 2 *NbUNE12* 沉默后植株表型图

注: \* 表示  $P$  值小于 0.05。

### 2.2.2 下调 *NbUNE12* 有利于 CMV $\Delta$ 2b-GFP 侵染

*NbUNE12* 在拟南芥中的同源基因参与调控 SA 抗性<sup>[18]</sup>, 而 CMV 2b 蛋白在病毒侵染过程中参与抵抗 SA 介导的免疫反应<sup>[20-21]</sup>。因此, CMV 可能由于 2b 蛋白的存在, 导致该病毒对于植物中 *NbUNE12* 下调表达不敏感。为了验证这种可能性, 在 *NbUNE12* 下调表达的植株上接种 CMV 突

变体 (CMV $\Delta$ 2b-GFP)。在 *NbUNE12* 下调表达 70% 植株与对照植株 (见图 4(a)) 分别接种 CMV $\Delta$ 2b-GFP, 病毒接种 6 d, 在 *NbUNE12* 沉默植株的来源于 CMV $\Delta$ 2b-GFP 的 GFP 荧光信号强度均明显强于对照(见图 4(b)一(c))。Northern 杂交结果显示: 相比于对照, *NbUNE12* 沉默植株系统叶中 CMV $\Delta$ 2b-GFP 基因组积累量增加, 其中 RNA1

和 RNA2 含量提高至 2.7 倍, RNA3 积累量提高至 1.7 倍(见图 4(d)), 蛋白杂交也证明了 *NbUNE12* 沉默植株系统叶中 CMV $\Delta$ 2b-GFP 的外壳蛋白积累量提高至约 3.86 倍(见图 4(e))。以上结果表明, 下调植物中 *NbUNE12* 的表达量有利于 CMV $\Delta$ 2b-GFP 侵染。

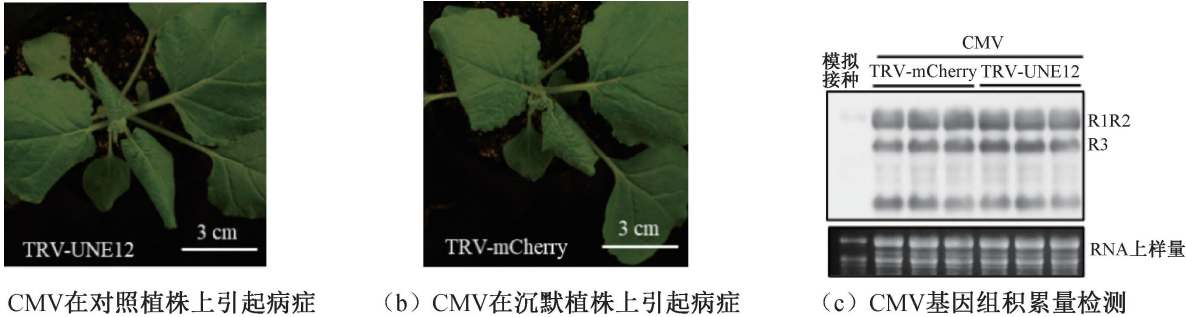


图 3 野生型 CMV 接种 *NbUNE12* 沉默植株症状图及积累量检测图

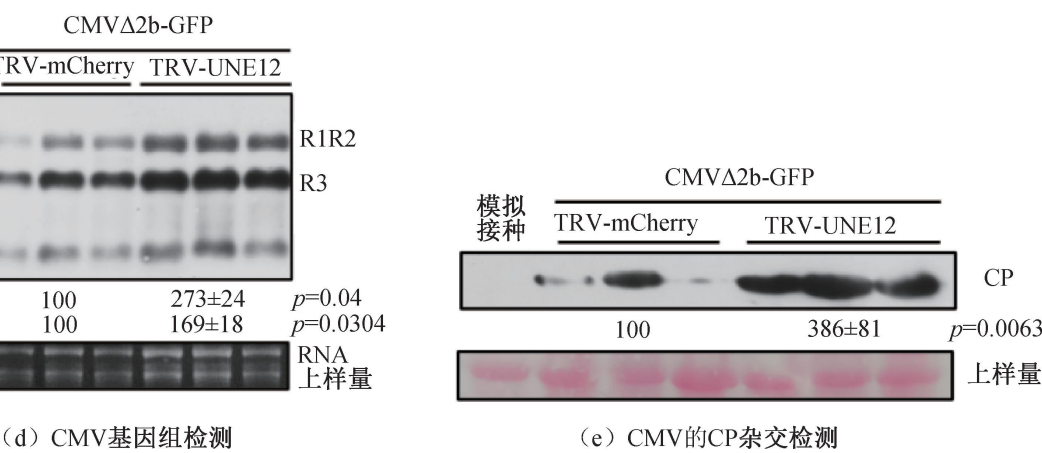
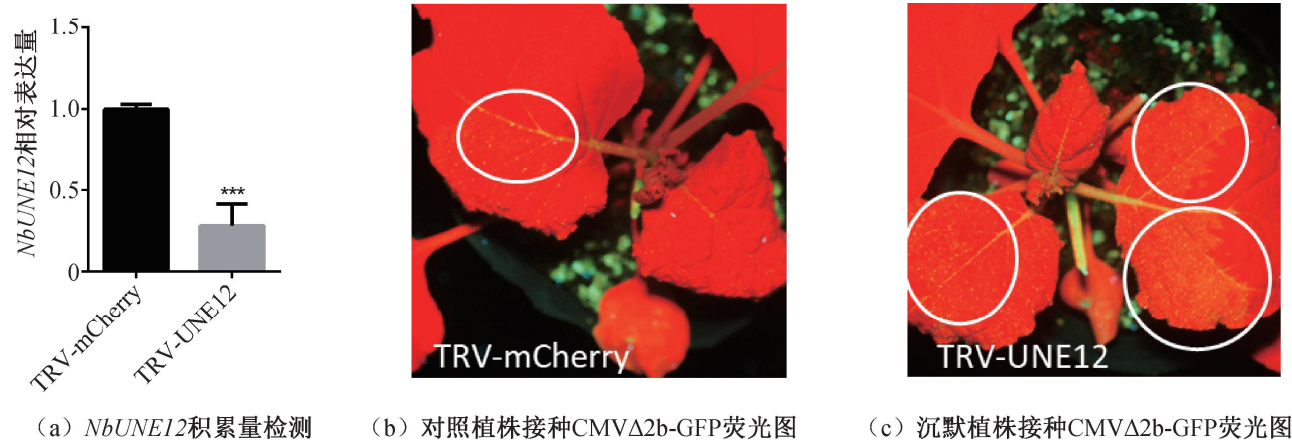


图 4 下调 *NbUNE12* 能够显著提高系统叶中 CMV $\Delta$ 2b-GFP 积累量

注:(a)中\*\*\*表示 *P* 值小于 0.001;(b)和(c)中白色圈指示 CMV $\Delta$ 2b-GFP 来源的荧光范围。

### 3 结 论

本文以本氏烟 bHLH 转录因子家族成员 *NbUNE12* 作为研究对象,采用 BiFC 验证了其 与 CMV 2a 蛋白是否存在相互作用,并下调本氏烟 *NbUNE12* 的表达量以确定其对 CMV 侵染过程的影响,主要结论如下:

a)CMV 2a 蛋白与 *NbUNE12* 在本氏烟中存在着相互作用,并且该相互作用主要发生在细胞核中;

b)沉默 *NbUNE12* 对于野生型 CMV 在本氏烟

上引发的病症和基因组积累量没有显著影响;

c)*NbUNE12* 在 CMV $\Delta$ 2b-GFP 侵染植株过程中发挥负调控作用。沉默 *NbUNE12* 能够提高该突变体在本氏烟中基因组水平和蛋白水平的积累。其中基因组 RNA1 和 RNA2 总积累量提高至 2.7 倍, RNA3 积累量提高至 1.7 倍。而在蛋白水平上, CMV 的 CP 蛋白的积累量提高至 3.86 倍。

本文为 CMV 复制相关蛋白 2a 存在核定位现象的生物学意义提供了一种可能性,即 2a 蛋白有可能在细胞核中通过与 *NbUNE12* 相互作用,从而影响后者调控植物 SA 相关防卫反应。

## 参考文献:

- [1] Jacquemond M. Cucumber mosaic virus[J]. *Advances in Virus Research*, 2012, 84: 439-504.
- [2] Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, et al. Cucumber mosaic virus[M]// Maramorosch K, Murphy A F, Shatkin J A. *Advances in Virus Research*. Amsterdam: Elsevier, 1992: 281-348.
- [3] Ding S W, Anderson B J, Haase H R, et al. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome [J]. *Virology*, 1994, 198(2): 593-601.
- [4] Ji L H, Ding S W. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(6): 715-724.
- [5] Huh S U, Kim M J, Ham B K, et al. A zinc finger protein Tsip1 controls Cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant[J]. *The New Phytologist*, 2011, 191(3): 746-762.
- [6] Wang X T, Ma J C, Jin X J, et al. Three-dimensional reconstruction and comparison of vacuolar membranes in response to viral infection [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(2): 353-364.
- [7] Duek P D, Fankhauser C. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 51-54.
- [8] Feller A, Machemer K, Braun E L, et al. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(1): 94-116.
- [9] Atchley W R, Fitch W M. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 5172-5176.
- [10] Castelain M, Le Hir R, Bellini C. The non-DNA-binding bHLH transcription factor PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7 is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2012, 145(3): 450-460.
- [11] Hao Y Q, Zong X M, Ren P, et al. Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors regulate a wide range of functions in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7152.
- [12] Radani Y, Li R X, Korboe H M, et al. Transcriptional and post-translational regulation of plant bHLH transcription factors during the response to environmental stresses[J]. *Plants*, 2023, 12(11): 2113.
- [13] Gao F, Dubos C. The *Arabidopsis* bHLH transcription factor family[J]. *Trends in Plant Science*, 2024, 29(6): 668-680.
- [14] Abe H, Urao T, Ito T, et al. *Arabidopsis* AtMYC<sub>2</sub> (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(1): 63-78.
- [15] Zhang H B, Bokowiec M T, Rushton P J, et al. Tobacco transcription factors NtMYC<sub>2a</sub> and NtMYC<sub>2b</sub> form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis [J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(1): 73-84.
- [16] Zhou Y, Sun L Q, Wassan G M, et al. GbSOBIR1 confers *Verticillium* wilt resistance by phosphorylating the transcriptional factor GbbHLH171 in *Gossypium barbadense* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(1): 152-163.
- [17] Aparicio F, Pallás V. The coat protein of Alfalfa mosaic virus interacts and interferes with the transcriptional activity of the bHLH transcription factor ILR3 promoting salicylic acid-dependent defence signalling response [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(2): 173-186.
- [18] Bruessow F, Bautor J, Hoffmann G, et al. Natural variation in temperature-modulated immunity uncovers transcription factor bHLH059 as a thermoresponsive regulator in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS Genetics*, 2021, 17(1): e1009290.
- [19] 程晓东, 施伟, 杜志游, 等. 基于黄瓜花叶病毒(CMV)基因沉默载体的构建[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(12): 1550-1558.
- [20] Zhao J H, Liu X L, Fang Y Y, et al. CMV2b-dependent regulation of host defense pathways in the context of viral infection [J]. *Viruses*, 2018, 10(11): 618.
- [21] Zhou T, Murphy A M, Lewsey M G, et al. Domains of the cucumber mosaic virus 2b silencing suppressor protein affecting inhibition of salicylic acid-induced resistance and priming of salicylic acid accumulation during infection[J]. *The Journal of General Virology*, 2014, 95(6): 1408-1413.

(责任编辑:张会巍)