

齿兰环斑病毒 CP 基因的原核表达及其产物抗血清制备

罗金水^{1,2}, 吴祖建¹, 谢联辉¹

(¹福建农林大学植物病毒研究所, 福州 350002; ²福建省热带作物科学研究所, 福建漳州 363001)

摘要:本研究在于探讨侵染兰花的重要病毒之一齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) CP 基因的原核表达及其产物抗血清制备技术。从福建省漳州市采集感染齿兰环斑病毒的建兰病样, 设计一对特异性引物扩增并克隆得到该病毒的外壳蛋白基因, 该基因开放阅读框长 477 bp, 编码 158 aa 约合 18.0 kDa 的蛋白质, 随后将目的基因插入 pET-29a(+) 中构建相应的原核表达载体进行诱导表达, 目的蛋白经纯化后免疫家兔获得了特异性抗血清。Western blot 检测结果表明, 抗血清与诱导表达的 ORSV 外壳蛋白发生特异性反应。间接酶联免疫吸附检测结果表明, 抗血清可检测阳性病汁液的最低稀释度达 1:25600(v/v), 最佳工作浓度为 1:12800(v/v), 阳性病汁液灵敏度为 0.195 mg/mL(w/v), 而与 TMV 等 11 种同源或异源病毒均无明显的血清学交叉反应。

关键词:齿兰环斑病毒; 外壳蛋白; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S436.8

文献标志码: A

论文编号: 2011-0344

Prokaryotic Expression and Antiserum Preparation of the CP gene of *Odontoglossum Ringspot Virus*

Luo Jinshui^{1,2}, Wu Zujian¹, Xie Lianhui¹

(¹Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

²Fujian Institute of Tropical Crops, Zhangzhou Fujian 363001)

Abstract: The aim was to study prokaryotic expression and antiserum preparation of the CP gene of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), which was one of the most important and worldwide viruses attacking orchids. Chinese Cymbidium plants which showed disease symptoms were collected from Zhangzhou, Fujian. One pair of specific primers was designed for amplification of the coat protein (CP) gene from the samples infected with ORSV. The open reading frame encoding CP of ORSV isolate obtained from Zhangzhou, Fujian is 477 bp, encoding a 18.0 kD protein with 158 aa. The expected CP gene was then inserted into the pET-29a (+) vector for the prokaryotic expression. And the aimed protein was purified and used to immune the rabbit for antiserum preparation. According to the result of ID-ELISA analysis, specific rabbit anti-ORSV serum was prepared with a high titre of 1:25600, a working concentration of 1:12800, and a sap sensitivity of 0.195 mg/mL. Western blot analysis confirmed that the antiserum reacted strongly and specifically to the CP of ORSV. There were no obvious cross reactions between the antiserum and 11 kinds of homologous or heterologous viruses such as Tobacco Mosaic Virus (TMV).

Key words: *Odontoglossum ringspot virus*; coat protein; prokaryotic expression; antiserum

0 引言

齿兰环斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV) 是危害兰花最为严重的病毒之一。Jensen & Gold (1951) 首次从齿兰 (*Odontoglossum grande*) 上分

离到 ORSV^[1]。由于最早是在齿兰的叶片上发现, 并且表现为环斑症状, 所以称之为齿兰环斑病毒。在 1983 年中国学者朱本明报导了这种兰花病毒^[6]。郑平等 (2001) 的调查结果表明, 该病毒与兰花上另一重要病

基金项目: 福建省重大专项前期研究项目 (2005N1004)。

第一作者简介: 罗金水, 男, 1978 年出生, 福建沙县人, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 植物病理学。通信地址: 363001 福建省漳州市芗城区天宝镇五峰热作所, Tel: 0596-6101160, E-mail: luojsh978@126.com。

收稿日期: 2011-02-12, 修回日期: 2011-03-18。

毒建兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, CyMV)在中国的广东、福建、海南和江苏等沿海地区以及四川、云南和江西内陆地区均有发生,而且沿海地区比内陆发生更为严重^[7]。ORSV曾被认为是烟草花叶病毒兰花株系(*Tobacco mosaic virus-orchid strain*)^[1-2],后经ICTV第八次报告确认隶属烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)。病毒粒体直杆状,长300 nm,宽18 nm。病毒衣壳无包膜,螺旋对称延伸,基因组为+ssRNA,全长6609~6618 bp,是烟草花叶病毒属中最长的,其中编码病毒外壳蛋白的开放阅读框长477 bp^[3-5]。受不同兰花品种的影响,该病毒侵染兰花产生花叶、坏死、褪绿条纹等各种症状,受害严重的将毫无商品价值。病毒主要通过种苗和汁液传播,如带毒种苗调运、组培扩繁脱毒不彻底、兰圃园艺操作不当。通过血清学检测可以有效控制此病毒的传播危害,而该项技术首要解决的问题是需要提供大量的抗血清。目前制备抗血清主要是利用提纯病毒和表达的外壳蛋白两类抗原免疫获得。其中,利用病毒外壳蛋白基因的原核表达产物免疫家兔制备抗血清是一项简便快捷的技术,可以克服传统依赖寄主提纯病毒作为抗原的抗血清制备技术的多项不足,在烟草、大豆、马铃薯等多种作物病毒上有报道^[8-10]。本文作者曾报道建兰花叶病毒CP基因的原核表达及抗血清制备^[11],这次报道当前危害兰花另一个最主要、最重要的病毒即齿兰环斑病毒CP基因的原核表达及其产物抗血清制备,以便为兰花病毒的检测提供简便、高效的抗血清制备技术。

1 材料与方法

1.1 毒源

2005年6月从福建省漳州市采集获得疑是感染齿兰环斑病毒的建兰病样,并对其诊断鉴定。

1.2 菌株和试剂

DH5 α 为克隆菌株,pMD 18-T为TA克隆载体;BL21(DE3)为表达菌株,pET-29a(+)为原核表达载体;*Bam*H I和*Hind* III为限制性内切酶。

1.3 引物设计

根据Genbank上登录的ORSV外壳蛋白基因设计一对特异引物,引物加入保护碱基和酶切位点(加下划线部分为酶切位点)。序列如下:

5'端引物,5'-GCGGATCCATGTCTTACTACTATTACAGACC-3';

3'端引物,5'-GGAAGCTTGAAGAGGTCCAAGTAAGTC-3'。

1.4 植物总RNA抽提、PCR扩增和克隆

参照文献^[11]的方法,以建兰病叶抽提总RNA,进

行PCR扩增和克隆。其中PCR反应条件:94℃预变性5 min,然后进入循环94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min,共5个循环;94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 1 min,共30个循环;最后,72℃延伸10 min。取PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带,插入pMD18-T克隆载体,并酶切鉴定。

1.5 原核表达载体的构建、序列分析和融合蛋白诱导表达

参照文献^[11]的方法,以pET-29a(+)作为表达载体,构建重组表达质粒。确认ORSV外壳蛋白基因成功插入表达载体后,提取重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株,然后加IPTG诱导表达融合蛋白,12% SDS-PAGE分离检测蛋白表达情况。

1.6 融合蛋白的纯化及抗血清制备

参照文献^[11]的方法,纯化目的蛋白,并以肌肉注射+皮下注射的方法免疫家兔获取抗血清。使用ID-ELISA法测定抗血清的效价、工作浓度、灵敏度及特异性,带毒的建兰病叶和健康的建兰叶片与磷酸盐缓冲液按1:20(w/v)稀释研磨,离心上清分别作阳性对照和阴性对照,用于测定抗血清特异性的12种病毒是:ORSV、CyMV、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、番茄环斑病毒(*Tomato ring-spot virus*, ToRSV)、番茄斑萎病毒(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)、马铃薯Y病毒(*Potato virus Y*, PVY)、番木瓜环斑病毒(*Papaya ring spot virus*, PaRSV)、马铃薯S病毒(*Potato virus S*, PVS)、南芥菜花叶病毒(*Arabidopsis mosaic virus*, ArMV)、香石竹斑驳病毒(*Carnation mottle virus*, CarMV)、西瓜花叶病毒(*Watermelon mosaic virus*, WMV)。

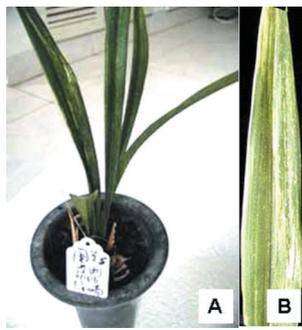
1.7 Western blot检测

参照文献^[11]的方法,对诱导表达蛋白进行Western blot检测。

2 结果与分析

2.1 毒源鉴定

如图1,所采集的6个建兰样品均表现出受ORSV侵染的典型症状,即叶片表现褪绿条纹。表1数据表明,ID-ELISA检测的阳性与阴性OD值结果理想,其P/N值大于2.1,阴性值在0.1左右,说明试验结果可靠。所有建兰病样检测结果均为阳性。磷钨酸负染法电镜观察,如图2,病毒粒体呈现直杆状,大小和明艳林等(2006)^[12]报道一致,约300 nm。试验结果表明病样感染了ORSV。



A: 感染的建兰植株; B: 褪绿条纹叶片
图1 感染 ORSV 的建兰



横线段长度为 100 nm。
图2 ORSV 电镜扫描结果

表1 毒源 ID-ELISA 检测结果

OD ₄₀₅	建兰病样						对照	
	1	2	3	4	5	6	阳性	阴性
ORSV	0.653	0.487	0.825	0.661	0.625	0.657	0.486	0.117
P/N	5.6	4.2	7.1	5.6	5.3	5.6	4.2	—

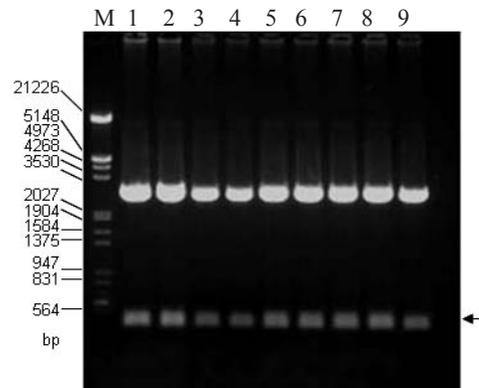
注: P/N: 指病样或阳性对照与阴性对照的 OD₄₀₅ 比值。

2.2 RT-PCR 扩增与克隆

提取获得建兰病叶总 RNA, 利用设计的特异引物反转录扩增, 扩增产物电泳结果如图 3, 泳道 2 的条带与目的基因大小一致, 目的基因大小在 470 bp 左右。回收此目的条带并插入克隆质粒 pMD-18T 中, 获得含有目的基因的重组子, 命名为 pMD-ORSVCP。图 4 是重组子双酶切产物电泳结果, 箭头所指条带与目的片段大小一致。

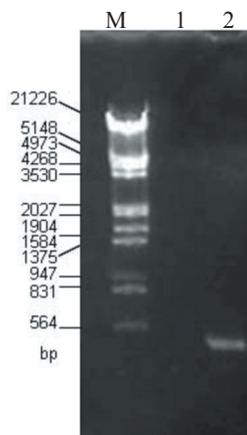
2.3 原核表达载体的构建

上述重组的克隆质粒与表达载体 pET-29a(+) 均用 *Bam*H I 和 *Hind* III 两种限制性内切酶进行双酶切操作, 回收各自的目的片段并连接, 获得含有 ORSV 外



M: DNA Marker, λDNA/*Eco*R I+*Hind* III; 1—9: 克隆的重组子 pMD-ORSVCP 双酶切产物

图4 重组子(pMD-ORSVCP)的双酶切鉴定



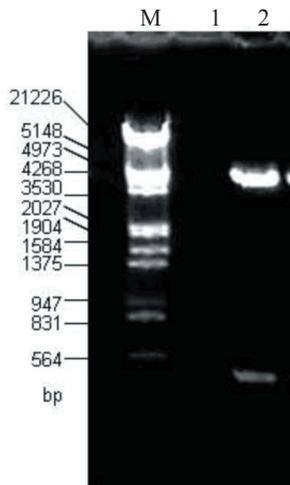
M: DNA Marker, λDNA/*Eco*R I+*Hind* III;
1: 空白对照; 2: RT-PCR 扩增产物

图3 RT-PCR 扩增产物电泳结果

壳蛋白基因片段的重组表达子, 命名为 pET-29a-ORSVCP。图 5 为重组表达子双酶切产物电泳图, 箭头所指条带与 ORSV 外壳蛋白基因大小一致, 说明目的基因片段已成功插入 pET-29a(+) 载体中。

2.4 序列测定及比对

对重组表达子 pET-29a-ORSVCP 进行双向测序。图 6 是成功插入表达载体的 ORSV 外壳蛋白基因核苷酸序列, 大小为 477 bp, 编码 158 aa。将此核苷酸序列登录 GenBank 获得登录号 (EF632298), 其序列比对结果表明 ORSV 漳州分离物与国内外其他分离物的核苷酸序列同源性在 97%~100% 之间, 其中中国浙江杭州分离物 (DQ915440) 同源性最高, 达到 99.8%, 仅在第 279 位相差一个碱基, 且属于同义突变, 氨基酸序列同



M: DNA Marker, λ DNA/*EcoRI*+*Hind* III; 1:空白对照; 2:重组表达子 pET-29a-ORSVCP 双酶切产物

图5 重组表达子(pET-29a-ORSVCP)双酶切鉴定

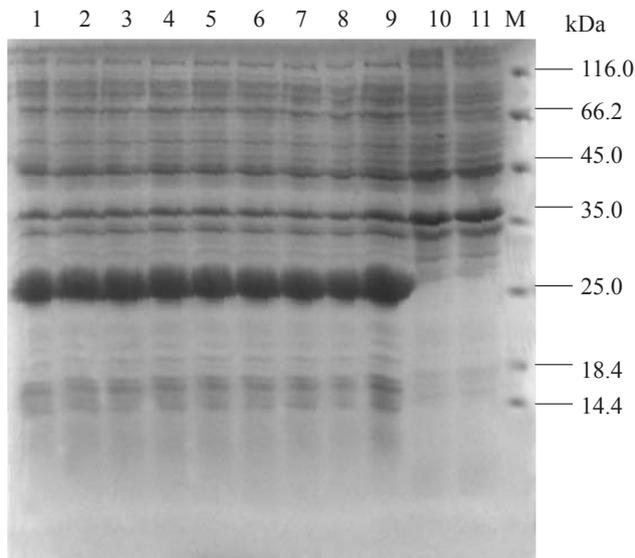
源性达100%。该碱基可能是PCR扩增误差或测序误差造成的。它们应属同一株系。

2.5 原核表达

重组表达子 pET-29a-ORSVCP 中插入的目的基因片段前后融合有载体自身的编码序列,读码框未发生移码突变,经 EditSeq 软件估算诱导表达产物的蛋白分子量约为 23.4 kDa,其下游序列末端含有编码组氨酸的标签便于诱导表达产物的纯化。将重组表达子转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导,如图 7 所示,获得一条高效表达蛋白条带,该蛋白条带分子量在 25~30 kDa 之间,而对照没有此蛋白条带。菌体经超声波破碎离心后,12%SDS-PAGE 分离检测出表达产物在沉淀中,表明诱导产物是不可溶的包涵体。

1	AGT	TCT	TAC	ACT	ATT	ACA	GAC	CCG	TCT	AAG	CTG	GCT	TAT	TTA	AGC	TCG	GCT	TGG	GCT	GAC	
	M	S	Y	T	I	T	D	P	S	K	L	A	Y	L	S	S	A	W	A	D	
61	CCC	AAT	TCA	CTA	ATC	AAC	CTT	TGT	ACC	AAT	AG	TT	CTG	GGT	AAT	CAG	TTC	CAA	ACA	CAA	CAA
	P	N	S	L	I	N	L	C	T	N	S	L	G	N	Q	F	Q	T	Q	Q	
121	GCT	CGA	ACA	ACT	GTT	CAA	CAG	CAG	TTT	GCT	GAT	GTT	TGG	CAG	CCG	GTT	CCT	ACT	TTG	ACC	
	A	R	T	T	V	Q	Q	Q	F	A	D	V	W	Q	P	V	P	T	L	T	
181	AGT	AGG	TTC	CCT	GCA	GGC	GCT	GGT	TAC	TTC	AGA	GTT	TAT	CGC	TAT	GAT	CCT	ATA	TTA	GAT	
	S	R	F	P	A	G	A	G	Y	F	R	V	Y	R	Y	D	P	I	L	D	
241	CCT	TTA	ATA	ACT	TTC	TTA	ATG	GGT	ACT	TTT	GAT	ACT	CGC	AAT	AGA	ATA	ATC	GAG	GTA	GAA	
	P	L	I	T	F	L	M	G	T	F	D	T	R	N	R	I	I	E	V	E	
301	AAT	CCG	CAG	AAT	CCG	ACA	ACT	ACG	GAA	ACA	TTA	GAT	GCA	ACT	CGT	AGA	GTT	GAT	GAT	GCA	
	N	P	Q	N	P	T	T	T	E	T	L	D	A	T	R	R	V	D	D	A	
361	ACT	GTA	GCA	ATA	AGA	TCT	GCA	ATA	AAT	AAT	CTA	TTA	AAT	GAG	TTA	GTT	AGG	GGA	ACT	GGT	
	T	V	A	I	R	S	A	I	N	N	L	L	N	E	L	V	R	G	T	G	
421	ATG	TAC	AAT	CAA	GTC	TCA	TTT	GAG	ACG	ATG	TCT	GGA	CTT	ACT	TGG	ACC	TCT	TCC	TAA	477	
	M	Y	N	Q	V	S	F	E	T	M	S	G	L	T	W	TTC	S	S	END		

图6 ORSV 福建漳州分离物外壳基因开放阅读框的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

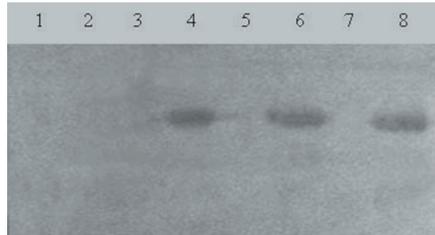


M:蛋白Marker; 1—9:重组表达子 pET-29a-ORSVCP 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后用 IPTG 诱导表达的菌液; 10:重组表达子 pET-29a-ORSVCP 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 但未加 IPTG 诱导表达的菌液; 11:阴性对照 pET-29a(+). 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后用 IPTG 诱导表达的菌液

图7 ORSV CP 融合蛋白 12% SDS-PAGE 鉴定

2.6 Western blot 检测

诱导表达的目的蛋白纯化后作为抗原免疫家兔获得抗 ORSV 抗血清。图 8 显示, 制备的抗血清与诱导表达的融合蛋白有较强的血清学反应, 条带特异, 无杂带, 与对照无免疫反应, 表明目的抗原与抗体之间的免疫反应性好。



1: 阴性对照 pET-29a(+). 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 但未加 IPTG 诱导表达的菌液; 2: 阴性对照 pET-29a(+). 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后用 IPTG 诱导表达的菌液; 3, 5, 7: 重组表达子 pET-29a-ORSVCP 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 但未加 IPTG 诱导表达的菌液; 4, 6, 8: 重组表达子 pET-29a-ORSVCP 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后用 IPTG 诱导表达的菌液

图 8 pET-29a-ORSVCP 诱导产物的 Western blot 鉴定

2.7 抗血清的特性分析

2.7.1 抗血清的效价和工作浓度 如表 2 所示, 当 ORSV 抗血清的稀释倍数在 1:100~1:25600 范围内, 检测阳性病汁液(1/20, w/v) 的吸光值均达到阴性的两倍以上, 随着抗血清稀释度的提高, 吸光值逐渐降低并接近阴性值。抗血清的效价达到 1:25600 (v/v), 此时阳性 OD₄₀₅=0.488, 阴性 OD₄₀₅=0.152。为保证实际检测应用效果, 将抗血清工作浓度定为 1:12800 (v/v), 此时阳性 OD₄₀₅=0.588, 阴性 OD₄₀₅ 接近 0.2, P/N>2。

2.7.2 抗血清的病汁液灵敏度 表 3 显示, ORSV 抗血清 12800 倍稀释液检测阳性病叶的灵敏度达 1:12800 (w/v), 即 0.195 mg/mL 的阳性病汁液, 此时阳性 OD₄₀₅=0.398, 阴性 OD₄₀₅=0.163, P/N>2。

2.7.3 抗血清的特异性 从表 4 中可见, 由 ORSV 外壳蛋白基因的原核表达产物制备的抗血清与 ORSV 起较强的血清学反应, 与其他 11 种病毒的 OD₄₀₅ 在 0.121~0.278 之间, P/N<2, 无明显血清交叉反应, 结果表明该抗血清具有较强的特异性。

表 2 抗血清的效价测定结果

OD ₄₀₅	抗血清稀释度							
	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200
空白	0.198	0.185	0.287	0.222	0.205	0.163	0.170	0.152
阳性(P)	1.414	1.319	1.016	0.871	0.769	0.578	0.488	0.265
阴性(N)	0.359	0.260	0.210	0.238	0.187	0.163	0.152	0.158
P/N	3.9	5.1	4.8	3.7	4.1	3.5	3.2	1.7

表 3 抗血清灵敏度测定结果

OD ₄₀₅	病叶稀释度									
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
阳性(P)	0.700	0.578	0.527	0.501	0.479	0.487	0.421	0.398	0.314	0.259
阴性(N)	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163
P/N	4.3	3.5	3.2	3.1	2.9	3.0	2.6	2.4	1.9	1.6

表 4 抗血清特异性测定结果

OD ₄₀₅	病毒											
	CyMV	ORSV	TMV	CMV	PVY	PVS	ToRSV	TSWV	CarMV	ArMV	PaRSV	WMV
病样	0.108	0.812	0.221	0.278	0.262	0.157	0.122	0.195	0.121	0.181	0.146	0.129
阴性	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166	0.166
P/N	0.7	4.9	1.3	1.7	1.6	0.9	0.7	1.2	0.7	1.1	0.9	0.8

3 结论与讨论

从实验结果及分析看出, 本研究成功利用基因克隆技术构建齿兰环斑病毒外壳蛋白基因的原核表达载体, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中获得高效表达, 以此表

达产物免疫家兔制备的抗血清特性良好, 和 ORSV 病毒有特异的血清学反应, 抗血清的检测效价和病汁液灵敏度等特性良好, 可大量制备并组装成试剂盒推广到兰花生产中使用, 尤其是在兰花的进出口检疫、种苗

调运检疫,以及脱毒苗生产,达到控制病毒病传播危害的目的。本研究获得的表达重组子可以置于低温下长期保存备用,随时取出重新用于制备目的蛋白的抗血清,十分方便。相对该病毒的传统病毒制剂抗血清制备以及RT-PCR检测技术而言^[13],不需昂贵的实验设备,简单实用。齿兰环斑病毒外壳蛋白基因的原核表达在国内有相似文献报道,潘俊松等^[14-15](1999)利用pET-21d构建该病毒外壳蛋白基因的大肠杆菌表达载体pEO,表达融合蛋白并获得了特异抗血清,不同之处在于pET-29a(+)表达载体,以及抗血清特性鉴定方法。原核表达获得的融合蛋白是丧失活性的包涵体,仅具有病毒颗粒衣壳蛋白的部分免疫原性,同提纯的病毒颗粒抗血清制剂有一定差异,有待研究表达具活性的蛋白,从而制备特异性、灵敏度更强、更高的抗血清。

参考文献

- [1] Jensen D D, Gold H A. A virus ring spot of *Odontoglossum orchid*: symptoms, transmission and electron microscopy[J]. *Phytopathology*, 1951, 41: 648-653.
- [2] Kado C I, van Regenmortel M H V, Knight C A S. Studies on some strains of tobacco mosaic virus in orchids I. Biological, chemical, and serological studies[J]. *Virology*, 1968, 34: 17-24.
- [3] Chng C G, Wong S M, Mahtani P H, et al. The complete sequence of a Singapore isolate of *odontoglossum ringspot virus* and comparison with other tobamoviruses[J]. *Gene*, 1996, 171(2): 155-161.
- [4] Ikegami M, Isomura Y, Matumoto Y, et al. The complete nucleotide sequence of *odontoglossum ringspot virus* (Cy-1 strain) genomic RNA[J]. *Microbiol Immunol*, 1995, 39(12): 995-1001.
- [5] Ryu K H, Park W M A. The complete nucleotide sequence and genome organization of *odontoglossum ringspot tobamovirus* RNA[J]. *Arch Virol*, 1995, 140(9): 1577-1587.
- [6] 朱本明. 上海地区三种花卉病毒病. 自然杂志, 1983, (8): 39.
- [7] 郑平, 刘荣维, 徐明全, 等. 国内两种主要兰花病毒病的综合普查研究. 广东农业科学, 2001, (6): 37-40.
- [8] 朱常香, 宋云枝, 王玫玫, 等. 烟草环斑病毒外壳蛋白基因的原核表达及抗血清的制备[J]. 中国病毒学, 2005, 20(4): 434-437.
- [9] 陈文华, 韦传宝, 贾玉成, 等. 大豆花叶病毒CP基因原核表达与抗血清制备[J]. 生物技术通报 2009, 10: 98-101.
- [10] 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 等. 马铃薯X病毒CP基因的原核表达及特异性抗血清的制备[J]. 郑州工程学院学报, 2003, 24(2): 26-28.
- [11] 罗金水. 建兰花叶病毒CP基因的原核表达及抗血清制备[J]. 热带作物学报, 2009, 30(8): 1113-1119.
- [12] 明艳林, 郑国华, 李梅. 齿兰环斑病毒的鉴定及其抗血清的制备与应用[J]. 中国病毒学, 2006, 21(1): 64-67.
- [13] 明艳林, 李梅, 郑国华, 等. RT-PCR检测齿兰环斑病毒技术的建立. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(3): 345-347.
- [14] 潘俊松, 刘志昕, 康由发, 等. 齿兰环斑病毒外壳蛋白基因的表达及其表达产物抗血清的制备[J]. 热带作物学报, 1999, 20(2): 62-66.
- [15] 潘俊松, 刘志昕, 吴豪, 等. 建兰花叶病毒外壳蛋白基因序列分析及病毒检测. 农业生物技术学报, 1999, 7(4): 325-328.