

## HAL1 基因转化番茄及耐盐转基因番茄的鉴定

张 荃 王淑芳 赵彦修 赵可夫 张 慧\*

(山东师范大学逆境植物重点实验室 济南 250014)

**摘 要** 采用 PCR 方法,从啤酒酵母中扩增得到可调节植物细胞离子均衡的 HAL1 基因,克隆后序列分析表明:其开放读码框全长 879bp,编码一个 294 个氨基酸的多肽(分子量 32kD)。构建含 HAL1 和 Npt II 嵌合基因的植物表达框架 pRH,三亲杂交后经农杆菌介导的叶圆盘法转化番茄(中蔬 5 号),在含卡那霉素的培养基上进行转化体的筛选。转基因番茄的 PCR、Southern 杂交、RT-PCR 检测以及鲜重、干重和  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  含量的测定表明:HAL1 基因确已整合到一些转基因番茄的基因组中;且转基因植株的耐盐性提高。

**关键词** HAL1 基因,转基因番茄,耐盐性

**中图分类号** Q943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0658-05

虽然小分子渗透调节物质的代谢工程以及过量表达可消除活性氧自由基的基因工程策略对于提高植物耐盐性是非常重要的,但它们均为间接的保护性机制<sup>[1~3]</sup>。盐胁迫下由于植物细胞离子均衡受到破坏以及高  $\text{Na}^+$  对植物代谢的毒害,其直接的保护机制应是降低  $\text{Na}^+$  的毒害,调节细胞的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比率,维持其高  $\text{K}^+$  低  $\text{Na}^+$  的离子均衡<sup>[4~6]</sup>。

HAL1 最早是从啤酒酵母中克隆获得的,过量表达该基因的酵母转化子可耐高达 1.5mol/L NaCl 胁迫,而剔除该基因则大大降低酵母的耐盐性;HAL1 基因提高酵母的耐盐性是通过两方面的作用,一是增加了细胞内  $\text{K}^+$  含量,另一是降低了细胞内  $\text{Na}^+$  含量,因此,该基因是通过调节酵母细胞的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比率来提高其耐盐性<sup>[7~8]</sup>。Bordas 等率先将 HAL1 基因导入菜瓜(*Cucumis melo*),提高了转基因植株在组培条件下的耐盐性<sup>[9]</sup>。本实验采用 PCR 方法克隆了酵母的 HAL1 基因,并进行了番茄的遗传转化,获得了耐盐性提高的转基因番茄。

### 1 材料和方法

#### 1.1 工具酶和试剂

各种限制酶、连接酶及其它分子生物学试剂均购自 Promega、Boehringer Mannheim 及 Biolabs 等公司。

#### 1.2 菌种和质粒

酵母菌种由山东大学微生物系提供。pBlue-

script II KS、转化宿主菌 JM109、pUC19、植物表达载体质粒 pROK2、三亲杂交辅助质粒 pRK2013、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 等菌株均为本实验室保存。

#### 1.3 番茄种子

番茄(*Lycopersicon esculentum*)种子“中蔬 5 号”,由中国农科院蔬菜花卉研究所提供。

#### 1.4 质粒 DNA 微量提取及酵母染色体 DNA 的提取

参照 F. 奥斯伯等的方法<sup>[10]</sup>。

#### 1.5 HAL1 基因的扩增

根据已发表的酵母 HAL1 基因的序列资料,设计了一对引物,并在两个引物的 5' 端分别引入 BamHI、KpnI 位点。

5 端引物:5' CG GGATCCATGGATTTCAAAGATTAGGAT  
BamHI

TGCATG 3'

3 端引物:3' GG GGTACCTTTTCAACTATTCTGTGTGAT  
KpnI

TG 3'

取大约 100ng 的酵母总 DNA 为模板,在 50 $\mu$ L 扩增体系中(含 5 $\mu$ L 10 $\times$  缓冲液,2mmol/L dNTP,引物各 10 $\mu$ mol/L,Taq DNA 聚合酶 5u)进行 HAL1 基因的扩增。扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$  1min,56 $^{\circ}\text{C}$  1min,72 $^{\circ}\text{C}$  2min,30 个循环。

#### 1.6 HAL1 基因的定向克隆及全序列分析

由于 PCR 产物末端有 A,运用 A-T cloning 策略,

收稿日期:2001-06-11,修回日期:2001-09-04。

基金项目:国家海洋 863(819-08-04)及国家重点基础研究专项经费(G1999011700)资助项目。

\* 通讯作者。 Tel:86-531-2960864;E-mail:Zhangh@sdnu.edu.cn

将 PCR 扩增出的 HAL1 基因定向克隆到 pBluescript II KS 质粒中,转化大肠杆菌 JM109,进行蓝白斑筛选并酶切验证,得到阳性重组质粒 pKSH。用 *Bam*HI 和 *Kpn*I 双酶切 pKSH,回收目的基因片段并定向克隆于 pUC19 中,转化后筛选得到阳性重组质粒 pUCH。

采用双脱氧末端终止法的荧光自动测序,在 ABI373 型自动测序仪上,对测序质粒进行正向和反向测序。核苷酸及氨基酸序列分析用 DNASIS 软件。

1.7 植物表达框架的构建及农杆菌的转化

用 *Bam*HI 和 *Kpn*I 双酶切 pUCH,回收 HAL1 基因片段并定向克隆于双元载体 pROK2 中,得到植物表达载体 pKH。三亲株杂交方法转化根癌农杆菌 LBA4404<sup>[11]</sup>。

1.8 番茄的转化及再生

采用农杆菌介导的叶圆盘法转化番茄,按 McCormick.S“根癌农杆菌介导的番茄转化”中介绍的方法进行<sup>[12]</sup>。

1.9 转基因番茄(T<sub>0</sub>)的分子鉴定

转基因番茄叶片 DNA 提取参照 F.奥斯伯等的方法<sup>[10]</sup>;以该 DNA 为模板的 PCR 检测反应条件同前。从 PCR 结果为阳性的转化株中随机选取 4 株进行 Southern 杂交分析:用 *Eco*RI 消化转基因番茄的基因组 DNA,以完整的 HAL1 基因片段为模板,随机引物标记法进行 Southern 杂交分析<sup>[10]</sup>。

1.10 转基因植株(T<sub>1</sub>)的遗传分析及 RT-PCR 鉴定

将转基因番茄(T<sub>0</sub>)移栽到土壤中,成熟后单株收获 T<sub>1</sub> 种子;每株系取 100 粒种子,将 T<sub>1</sub> 种子表面消毒后播种于含 100mg/L 卡那霉素的筛选培养基上;2 周后,检查绿苗和白苗的分离比例。选择长势良好的绿苗进行 RT-PCR 分析;叶片总 RNA 的提取使用异硫氰酸胍方法<sup>[10]</sup>,反转录用 Promega 试剂盒;将反转录产物稀释至 50μL,取 1μL 作为 PCR 模板;反应条件为:94℃ 1min,56℃ 45s,72℃ 1min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。

1.11 转基因番茄的耐盐性评价

选取 RT-PCR 结果为阳性的 T<sub>1</sub> 转基因番茄和对照番茄的茎端于含 0、100、150、175mmol/L NaCl 的 MS<sub>0</sub> 培养基中,26℃、16h 光照培养;15d 后观察生长情况,并将上述材料从培养基中取出,取地上部分测鲜重、干重。同时,取上述材料在 70℃ 烘烤至恒重后称干重,于马福炉中(550℃)灰化后,用少量 HNO<sub>3</sub>

溶解,定容至 100mL 进行 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 含量分析。

2 结果与分析

2.1 HAL1 基因的克隆及全序列分析

以酵母菌总 DNA 为模板,使用设计的两条引物进行 PCR 扩增,扩增产物与预期的 HAL1 基因大小(约 0.88kb)相吻合。为便于测序,并将其定向克隆于 pUC19 中;对 pUCH 质粒进行双向测序,结果与国外报道的序列一致。

2.2 植物表达框架的构建及其对农杆菌的转化

植物表达框架 pKH 的结构如图 1 所示。采用三亲结合方式, pKH 质粒在转移辅助质粒(pRK2013)的协助下转移到根癌农杆菌细胞中,提取对照农杆菌(LBA4404)、辅助菌(pRK2013)以及三亲杂交后的农杆菌质粒 DNA,用 HAL1 基因特异引物进行 PCR 检测,结果证实:HAL1 基因确已整合到三亲杂交后的农杆菌基因组中。

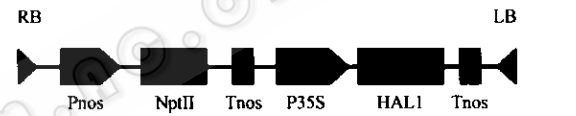


图 1 植物表达载体 pKH 的 T-DNA 结构示意图  
Fig.1 The Structure of pKH T-DNA

2.3 番茄的遗传转化及再生

经农杆菌感染的番茄叶片或上胚轴移至含 100mg/L 卡那霉素的分化培养基上 2~3 周后,约有 50% 的外植体长出绿色的愈伤组织;继代培养 3~6 周后,分化出茎芽;将绿色的茎芽切下,转入含 100mg/L 卡那霉素的生根培养基中,约 70% 的芽经过 15~20d 即可生根,而对照(未经农杆菌转化的番茄)在含 100mg/L 卡那霉素的生根培养基上则根本不生根。本实验获得了 12 株(T<sub>0</sub>-1~T<sub>0</sub>-12)经 100mg/L 卡那霉素筛选、正常生根且长势良好的转基因番茄。待根系生长完整后,将植株移至温室花盆中培养。

2.4 转基因番茄(T<sub>0</sub>)的分子鉴定

以 Npt II 引物对获得的 12 株再生番茄(T<sub>0</sub>-1~T<sub>0</sub>-12)以及对照番茄进行 PCR 检测,除对照及转化株 T<sub>0</sub>-11 以外,其它转基因番茄均扩增出约 0.46kb 的 Npt II 特异条带;以 HAL1 基因特异引物对同样的 13 株番茄进行 PCR 检测,除对照及转化株 T<sub>0</sub>-11 以外,其它转基因番茄均扩增出约 0.88kb 的 HAL1 基因特异条带,如图 2 所示;结果说明 HAL1 基因已整合进番茄(T<sub>0</sub>-1~T<sub>0</sub>-10, T<sub>2</sub>-12)的基因组中;Npt II 引

物和 HAL1 基因特异引物对 T<sub>0</sub>-11 的 PCR 检测均为阴性,这说明 T<sub>0</sub>-11 虽经 100mg/L 卡那霉素的筛选,但可能由于卡那霉素浓度较低而产生了逃逸。

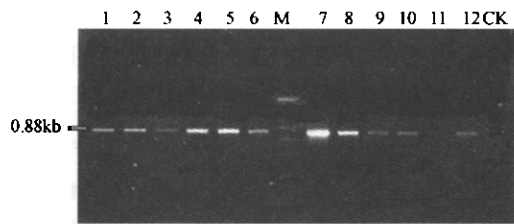


图2 转基因番茄(T<sub>0</sub>)的PCR分析(以 HAL1 基因引物)  
Fig.2 PCR analysis of transgenic tomato (T<sub>0</sub>) with HAL1 primers  
M:Marker; 1~12:Transgenic tomato; CK:Control tomato

对随机选取的 4 株 PCR 结果为阳性的植株(T<sub>0</sub>-1、T<sub>0</sub>-3、T<sub>0</sub>-6 和 T<sub>0</sub>-10)及对照植株进行 Southern 分析,结果表明:其中 2 株转基因番茄(T<sub>0</sub>-1 和 T<sub>0</sub>-3)存在 Hal1 基因的杂交信号,且均为一条杂交带,说明 HAL1 基因是以单拷贝插入番茄 T<sub>0</sub>-1 和 T<sub>0</sub>-3 基因组中的,结果见图 3。

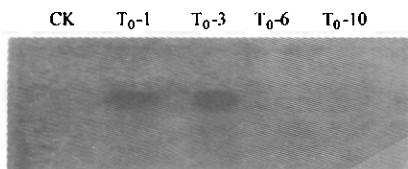


图3 转基因番茄(T<sub>0</sub>)的 Southern 分析  
Fig.3 Southern analysis of transgenic tomato (T<sub>0</sub>)

2.5 转基因番茄(T<sub>1</sub>)的遗传分析及 RT-PCR 分析

T<sub>0</sub> 代的种子 T<sub>1</sub> 在含 100mg/L 卡那霉素的筛选培养基上培养,绿苗数/白苗数之比为 2.89/1,统计分析结果表明自交一代符合 3:1 的分离规律;说明外源基因在植物染色体上为单位点插入,与 Southern 分析的结果相符。选取 T<sub>1</sub> 代苗子(T<sub>1</sub>-11、T<sub>1</sub>-13 和 T<sub>1</sub>-15 为 T<sub>0</sub>-1 的后代,T<sub>1</sub>-61 为 T<sub>0</sub>-6 的后代,T<sub>1</sub>-31 为 T<sub>0</sub>-3 的后代)进行 RT-PCR 分析,结果表明:5 株苗子中除了 T<sub>1</sub>-61,其余 4 株均扩增出 HAL1 条带,也与 Southern 分析结果相符,结果见图 4。

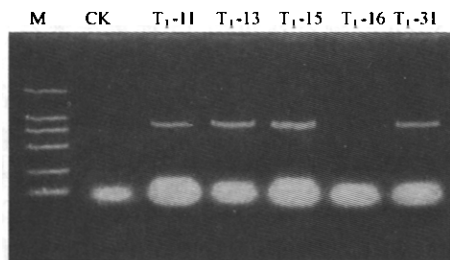


图4 转基因番茄(T<sub>1</sub>)的 RT-PCR 分析  
Fig.4 RT-PCR analysis of transgenic tomato (T<sub>1</sub>)

2.6 转基因植株(T<sub>1</sub>)的耐盐性评价

对 T<sub>1</sub>-11、T<sub>1</sub>-13、T<sub>1</sub>-15 和 T<sub>1</sub>-31 转基因番茄和对照番茄进行盐处理,15d 后,无论是对照还是转基因番茄植株,在任何盐浓度下其生长均显著慢于未经盐处理的番茄植株。其中,在 150mmol/L NaCl 处理下,番茄根的生长受到抑制,且变短变粗、分叉减少;但转基因番茄根的生长情况优于对照。用 175mmol/L NaCl 处理 10d 后,对照番茄叶片变黄,基部叶片脱落并伴有坏死;而转基因番茄叶片深绿,生长情况明显好于对照,结果见图 5。



图5 转基因番茄(T<sub>1</sub>-15)和对照番茄在 175mmol/L NaCl 胁迫下的生长情况  
Fig.5 The transgenic tomato and control tomato under 175mmol/L NaCl stress  
A. Control tomato; B. Transgenic tomato (T<sub>1</sub>-15)

盐胁迫下,转基因番茄地上部分的鲜重、干重明显高于对照番茄;如在 100mmol/L NaCl 处理下,与未经盐处理的相比,对照番茄的鲜重下降了 42%,而转基因番茄 T<sub>1</sub>-1 群体(取 T<sub>1</sub>-11、T<sub>1</sub>-13 和 T<sub>1</sub>-15 的平均值)却仅下降约 21%,结果见表 1。另外,100mmol/L NaCl 处理下,转基因番茄 T<sub>1</sub>-11、T<sub>1</sub>-13、T<sub>1</sub>-15 和 T<sub>1</sub>-31 单株地上部分的鲜重、干重测定也获得类似的结果(资料未显示)。随着盐处理浓度的增加,无论对照还是转基因番茄的生长都明显减慢,但转基因植株生长减慢低于对照。

表 1 转基因番茄 T<sub>1</sub>-1 群体(取平均值)的鲜重、干重测定

Table 1 The fresh weight, dry weight of the transgenic tomato (T <sub>1</sub> -1) and control tomato					
Line	NaCl/(mmol/L)	FW/g		DW/g	
Control	0	1.87	a	0.14	a
	100	1.08	c	0.08	c
	150	0.58	e	0.05	e
	175	0.25	g	0.02	g
T <sub>1</sub> -1 line	0	1.82	a	0.14	a
	100	1.44	b	0.11	b
	150	0.75	d	0.07	d
	175	0.42	f	0.04	f

注:每列中的不同字母示 P≤0.05

在 100mmol/L NaCl 胁迫下,对照和转基因番茄 T<sub>1</sub>-13 地上部分和地下部分的 Na<sup>+</sup> 含量都升高,但对照植株中 Na<sup>+</sup> 含量升高更为显著,结果见图 6(图中为每克干重含量);值得注意的是:对照和转基因番茄 T<sub>1</sub>-13 地上部分和地下部分 K<sup>+</sup> 含量都降低,但前者 K<sup>+</sup> 含量降低幅度要大于后者(差别并不显著),结果见图 7。另外,100mmol/L NaCl 处理下,转基因番茄 T<sub>1</sub>-11、T<sub>1</sub>-15 和 T<sub>1</sub>-31 地上部分和地下部分的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 含量测定也得到类似的结果(资料未显示)。

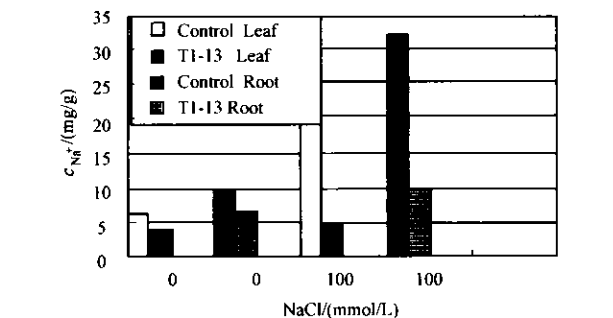


图 6 100mmol/L NaCl 胁迫下转基因番茄(T<sub>1</sub>-13)Na<sup>+</sup> 含量分析  
Fig.6 The Na<sup>+</sup> analysis for the transgenic tomato (T<sub>1</sub>-13) and control tomato under 100mmol/L NaCl

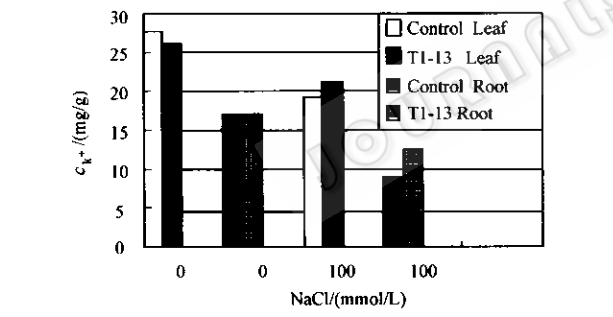


图 7 100mmol/L NaCl 胁迫下转基因番茄(T<sub>1</sub>-13)K<sup>+</sup> 含量分析  
Fig.7 The K<sup>+</sup> analysis for the transgenic tomato (T<sub>1</sub>-13) and control tomato under 100mmol/L NaCl

3 讨 论

近年来,植物耐盐基因工程进展迅速。旨在提高植物体内渗透保护物质的代谢工程策略均部分地提高了转基因植物的耐盐性;同时也出现了一些新的基因工程策略,如过量表达可清除活性氧自由基的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等基因<sup>[13]</sup>;然而,这些基因工程策略均未能着眼于消除盐胁迫下细胞内过多 Na<sup>+</sup> 的毒害<sup>[14]</sup>。Apse 等在拟南芥中过量表达负责 Na<sup>+</sup> 区隔化以消除 Na<sup>+</sup> 毒害的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向运转蛋白基因 *AtNHX1*,使转基因植株

的耐盐性有了显著提高<sup>[15]</sup>。本实验室从酵母中克隆了可调节植物细胞 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比的 HAL1 基因,其对消除细胞的 Na<sup>+</sup> 毒害以及离子均衡均有极其重要的作用<sup>[16]</sup>;将其导入高等植物拟南芥中,并实现其过量表达是又一极具重要意义的植物耐盐基因工程策略<sup>[17]</sup>。本实验则将 HAL1 基因转化高等植物番茄<sup>[18]</sup>;转基因植株的分子检测以及遗传和耐盐性分析表明,HAL1 基因确已整合到一些转基因番茄的基因组中,且转基因植株(如 T<sub>1</sub>-11、T<sub>1</sub>-13)的耐盐性提高;其 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 含量测定发现:转基因番茄 K<sup>+</sup> 含量(如 T<sub>1</sub>-13)并未获得显著增加,但由于 Na<sup>+</sup> 含量显著降低,因而其 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比率增大,这可能是转基因番茄耐盐性提高的原因和机理。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Brown A D. Microbial Water Stress Physiology, Principles and Perspectives. John Wiley & Sons, 1990

[ 2 ] Bohnert H J, Jensen R G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Tibtech*, 1996, 14: 89 ~ 97

[ 3 ] Galinski E A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water solute interaction, stress protection. *Experientia*, 1993, 49: 487 ~ 496

[ 4 ] Haro R, Banuelos M, Quintero F J *et al.* Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. *Plant Physiol*, 1993, 89: 868 ~ 874

[ 5 ] Rubio F, Gassmann W, Schroeder J I. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science*, 1995, 270: 1660 ~ 1663

[ 6 ] Flowers T J, Garcia M, Koyama M *et al.* Breeding for salt tolerance in crop plants—the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1997, 19: 427 ~ 433

[ 7 ] Gaxiola R *et al.* A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J*, 1992, 11: 3157 ~ 3164

[ 8 ] Marquez J A, Serrano R. Multiple transduction pathways regulate the sodium extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Letters*, 1996, 382: 89 ~ 92

[ 9 ] Bordas M, Montesinos C, Dabauza M *et al.* Transfer of the yeast alst tolerance gene HAL1 to Cucumis melo L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research*, 1997, 6: 41 ~ 50

[ 10 ] Ausubel F, Brent R, Kingston R E, Moore D D *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed, Beijing: Science Press, 1998

[ 11 ] GU H Y (顾红雅), QU L J (瞿礼嘉), MING X T (明小天) *et al.* Plant Genes and Molecular Manipulations(植物基因与分子操作), Beijing: Beijing University Press, 1998

[ 12 ] McCormick S. Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual B<sub>6</sub>*, 1991, pp. 1 ~ 9

[ 13 ] Holmberg N, Bulow L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 1998, 3: 61 ~ 66

[ 14 ] Yeo A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J Experi Botany*, 1998, 49: 915 ~ 929

- [15] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, Blumwald E. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, **285**: 1256 ~ 1258
- [16] Rios G, Ferrando A, Serrano R. Mechanism of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Sacharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, **13**: 515 ~ 528
- [17] YANG S X(杨素欣), ZHAO Y X(赵彦修), ZHANG Q(张荃) *et al.* Hall mediate salt adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Research*, 2001, **11**(2): 141 ~ 148
- [18] Gisbert C, Rus A M, Bolarin M C *et al.* The Yeast Hall gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology*, 2000, **123**: 393 ~ 402

## Cloning of HAL1 Gene and Characterization for Salt Tolerance Tomato

ZHANG Quan WANG Shu-Fang ZHAO Yan-Xiu ZHAO Ke-Fu ZHANG Hui\*

(Plant stress Key Lab, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

**Abstract** The HAL1 gene was cloned by PCR strategy and confirmed by sequencing. Its open read frame is 879bp, encoding a peptide of 294 amino acids (32kD Protein). A chimaeric construct of HAL1 and Npt II (neomycin phosphotransferase II) was constructed and introduced into commercial cultivars of tomato (Zhong SU No.5: *Lycopersicon esculentum*) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transformation. Transformants were selected for their ability to grow and root on media containing kanamycin. Transformation was confirmed by analysis of PCR, Southern blot and RT-PCR. The salt tolerance of transgenic tomato is evaluated by comparing the fresh weight, dry weight,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  content of transgenic tomato and control tomato. It is concluded that the over-expressing of HAL1 in tomato could enhance the salt tolerance of the transgenic tomato.

**Key words** HAL1 gene, transgenic tomato, salt tolerance

Received: June 11, 2001

This work was supported by National High Science and Technology Program (863) Foundation (918-08-04) and National Key Basic Research Special Funds (1999011700)

\* Corresponding author. Tel: 86-531-2960864; E-mail: Zhangh@sdnu.edu.cn

## The Editorial Board of Chinese Journal of Biotechnology

### EDITOR-IN-CHIEF

JIAO Rui-Shen (J.S. Chao) Professor

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

### VICE-EDITOR-IN-CHIEF

MANG Ke-Qiang Professor

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

FAN Yun-Liu Academician

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

YANG Kai-Yu Professor

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

SHEN Zhong-Yao Professor

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

### MEMBERS OF THE BOARD (alphabetically)

WANG Hui-Lian

WANG Ji-Cheng

LU Jing-Liang

YE Min

LIU Er-Xiang

ZHU Shou-Yi

ZHU Xiang-Yuan

LI Zai-Ping

LI Xiang-Hui

LUN Shi-Yi

SONG Hou-Yan

ZHENG You-Xia

ZHENG Zhao-Xin

CHEN Zhang-Liang

CHEN Shou-Yi

MENG Guang-Zhen

ZHANG Shu-Zheng

ZHANG Qi-Xian

ZHANG Ke-Xu

YANG Yun-Liu

HOU Yun-De

SHI Lu-Ji

YU Jun-Tang

HONG Guo-Fan

LU De-Ru

GUO Li-He

HUANG Cui-Fen

GE Xi-Rui

ZHEN Yong-Su

WANG Jun(Hong Kong)

### MANAGING EDITORS

WU Wen YE Jun