

丹参、黄精内生放线菌的分离及遗传多样性分析

李小林¹ 袁红梅¹ 戚珊珊¹ 冯茂林¹ 刘洪伟² 张小平^{1*}

(1. 四川农业大学资源环境学院 四川 雅安 625014)

(2. 四川省甘孜藏族自治州种子管理站 四川 康定 626000)

摘要: 从四川遂宁地区采集了丹参、黄精 2 种道地中药材, 样品通过 0.87% 次氯酸钠不同时间梯度消毒, 用组织法和匀浆法对植株进行处理, 并在 HV、G₂、S 等培养基中加入不同浓度的重铬酸钾和萘啶酮酸以抑制非放线菌的生长, 确定了分离中药材内生放线菌比较适宜的方法。经分离、纯化得到 52 株菌落大小、形态、颜色各异的内生放线菌。选取其中 12 株代表菌株进行 16S rRNA PCR-RFLP 分析, 在 88% 的相似水平上, 被分为 5 个遗传类型, 表明了药用植物内生放线菌的遗传多样性。

关键词: 药用植物, 内生放线菌, 分离, 遗传多样性

Isolation and Genetic Diversity of the Endophytic Actinomycetes from *Salvia miltiorrhiza* Bge. and *Polygonatum sibiricum* Red.

LI Xiao-Lin¹ YUAN Hong-Mei¹ QI Shan-Shan¹ FENG Mao-Lin¹ LIU Hong-Wei²
ZHANG Xiao-Ping^{1*}

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China)
(2. Seed Management Station of Ganzi, Kangding, Sichuan 626000, China)

Abstract: Two species of Chinese medicinal plants, *Salvia miltiorrhiza* Bge. and *Polygonatum sibiricum* Red., were collected from Suining region of Sichuan province. The plants were disinfected with 0.87% hypochlorite under different time and treated with the methods of organic law and homogenate law, respectively. Then endophytes were isolated in the media HV, G₂, S amended with which use different concentrations of potassium dichromate plus malidixic acid as inhibitors. The method of isolating endophytic actinomycetes from the medicinal plants was optimized. Fifty-two endophytic actinomycetes with different colony size, shape and color were isolated and purified. Twelve representative strains were chosen for genetic diversity study by 16S rRNA PCR-PFLP. Five clusters were obtained based the 16S rRNA PCR-RFLP patterns which indicated the high genetic diversity of the endophytic actinomycetes in medicinal plants.

Keywords: Medicinal plant, Endophytic actinomycetes, Solation, Genetic diversity

放线菌是一类数量大、种类多,具有重要应用价值的微生物资源,能够产生大量的抗生素。研究表明内生放线菌能够产生多种生物活性物质,其中有很多对严重威胁人类健康的疾病有一定的疗效。同时内生放线菌对植物病原菌的抑制也有不同程度的效果^[1-2]。

很多植物体内都存在大量的内生放线菌,它们定殖在植物细胞间隙和细胞内的同时还和寄主建立起比较和谐的共生关系^[3]。中药材作为一类特殊的植物,其内生环境不同于一般植物,放线菌在与它们的协同进化过程中,可能产生新的基因及代谢途径,导致新的代谢产物的合成,因此有望获得新的抗生素类物质。四川遂宁地区气候和土壤环境具有多样性,分布有丹参、黄精等具有药用价值的道地中药材植物。目前有关于药用植物内生放线菌的研究鲜见报道。

1 材料与方法

1.1 供试植物与培养基

供试植物:黄精(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)和丹参(*Polygonatum sibiricum* Red.),采自遂宁安居区。

培养基:HV培养基^[4]、S培养基^[5]、海藻糖-脯氨酸培养基^[6]及改良高氏二号培养基^[7]。

1.2 PCR 扩增引物

16S rDNA PCR 扩增用引物(PA, 8-27f: 5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; PB, 1523-1504r:

5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')由上海生工公司合成^[8]。

1.3 植株内生放线菌的分离

称取丹参和黄精样品根、茎、叶各 5 g,用清水洗去污泥后,在超净台中分别进行以下处理。(1) 表面消毒:首先,用蒸馏水冲掉植物表面的泥沙杂质,把植物样品剪切成小段,在 70%乙醇中浸泡 5 min 后用无菌水冲洗。然后,将样品浸泡在 0.87%次氯酸钠(有效氯)溶液中,并设置消毒时间梯度(0、10、15、20、25、30 min),用无菌水冲洗后,再浸泡于灭过菌的 10%碳酸氢钠溶液中 10 min^[9],之后再用无菌水冲洗,并将冲洗后的无菌水保留备用。(2) 机械处理:用无菌刀片切除其表皮,于研钵中充分研磨至匀浆后,加 50 mL 无菌水,取 0.5 mL 匀浆液用三角玻棒涂抹分离培养基平板,24℃-26℃ 下避光培养 21 d^[10-12],计数。(3) 设置对照:将表面消毒过程中最后一遍清洗的无菌水按 0.1 mL/皿涂布于分离培养基,28℃ 培养 2 周后观察菌落生长情况^[4]。

1.4 抑制剂的选择

采用重铬酸钾与萘啶酮酸^[13]抑制细菌和真菌以利于目的放线菌的生长。并对重铬酸钾设置 15、25、35、50、75、100 g/L 5 个梯度,对萘啶酮酸设置 15、20、25 g/L 3 个梯度。

1.5 16S rRNA 多样性分析

根据菌落形态特征,选取了 12 株代表菌株(表 1)进行遗传多样性分析。

表 1 16S rDNA PCR-RFLP 供试菌株 Table 1 Strains used in 16S rDNA PCR-RFLP			
菌株 Strains	宿主 Hosts	培养基 Medium	来源 Isolation or source
PH111	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	海藻糖-脯氨酸	遂宁安居区
PG416	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	改良高氏 2 号	遂宁安居区
SH312	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	海藻糖-脯氨酸	遂宁安居区
PS411	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	S 培养基	遂宁安居区
PH311	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	海藻糖-脯氨酸	遂宁安居区
PS415	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	S 培养基	遂宁安居区
SH311	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	海藻糖-脯氨酸	遂宁安居区
PG344	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	改良高氏 2 号	遂宁安居区
SV232	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	HV 培养基	遂宁安居区
SV221	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	HV 培养基	遂宁安居区
SV222	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	HV 培养基	遂宁安居区
SS131	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	S 培养基	遂宁安居区

1.5.1 放线菌 DNA 的提取: 放线菌 DNA 的提取参考姜淑梅等的改良酶法和 Lee 等的简单提取细菌 DNA 法^[14-15]。取约 50 mg 菌体加入 500 μ L 含有溶菌酶的 1 \times TE 溶液(使溶菌酶终浓度为 2 g/L), 放入 37 $^{\circ}$ C 摇床 1–2 h。加入 20% SDS 50 μ L 及蛋白酶 K 5 μ L 振荡混匀 1 min, 放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中 30–60 min (PK 浓度为 20 mg/L)。加 550 μ L 苯酚 : 氯仿 : 乙戊醇混合液(25 : 24 : 1), 振荡混匀, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液转管, 重复抽提 3 次。然后加 800 μ L 无水乙醇, 加 80 μ L 3 mol/L 乙酸钠(pH 4.8–5.2) 室温放置 10 min 以上。12000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 加 200 μ L 70%乙醇, 轻摇洗涤 2 次, 12000 r/min 低温离心 5 min, 弃乙醇。真空抽提干燥后加 1 \times TE 50 μ L 溶解 DNA, –20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5.2 PCR 反应体系及条件: 反应体系(50 μ L): 2 \times PCR Mix (北京天根生物科技) 25 μ L; 引物 A (25 pmol) 0.5 μ L, 引物 B (25 pmol) 0.5 μ L; 模板 DNA (30 μ g/L) 1.0 μ L; 双蒸水补足至 50 μ L。PCR 反应条件为: 92 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测产物^[16]。

1.5.3 酶切及电泳: 选取 4 种限制性内切酶 *Rsa* I (5'-GT/AC-3'), *Hae* III (5'-GG/CC-3'), *Hha* I (5'-GC/GC-3')和 *Msp* I (5'-C/CGG-3')^[17-18]。酶切反应体系为: 6 μ L PCR 扩增产物, 5 U 限制内切酶, 10 \times 酶切缓冲液 1 μ L, 双蒸水补足至 10 μ L。37 $^{\circ}$ C 水浴保温 3 h, 2%琼脂糖凝胶分离, 80 V 水平电泳 3.5 h, 凝胶成像系统记录成像。

1.5.4 结果处理: 对于 16S rRNA RFLP 将相同电泳谱带合并后, 将在同一位置上扩增带的编码设为“1”, 无扩增带的编码设为“0”。再通过简单匹配系数法计算各菌株间的相似性, 采用软件 NTSYS2.1 中的平均连锁聚类法将结果转化为树状图。

2 结果与分析

2.1 表面消毒结果

分离过程中, 植物组织表面消毒方法是很重要的, 消毒过重和过轻都会造成对内生菌数量结果的影响。本研究先用 70%乙醇浸泡 5 min, 无菌水冲洗后采用 0.87%次氯酸钠来消毒, 并设置了 6 个时间梯度(表 2), 最后用 10%碳酸氢钠溶液浸泡。样品表面消毒后将漂洗液涂布平板, 28 $^{\circ}$ C 培养 14 d 后无菌

落长出。表明经过表面消毒过程, 样品表面附生菌的影响已经消除, 保证了所分离的菌株均来自于样品内部。

表 2 次氯酸钠消毒效果						
Table 2	The disinfection of effect sodium hypochlorite					
时间 Time (min)	0	10	15	20	25	30
Colony	++	+	+	–	–	*

注: +: 1–5 个菌落; ++: 5–10 菌落; –: 无菌落; *: 在培养基被真菌或细菌污染之前无法检测出菌落。

Note: +: 1–5 colonies; ++: 5–10 colonies; –: No colony; *: Can't detect any microbe before the whole dish be polluted by the rapid grown fungi and bacteria.

由表 2 可看出, 对照的杂菌落数明显多于其他时间梯度, 这可能是由于乙醇和无菌水并不能完全去除植株表面微生物而造成的。随着次氯酸钠消毒时间的增加, 样品表面消毒越彻底, 当消毒时间达 20 min 后就很彻底。考虑到时间越长, 次氯酸钠渗入内部对内部内生环境的影响越大, 可能会出现大量的内生放线菌被杀死, 所以最终选择 0.87%次氯酸钠消毒时间为 20 min。

2.2 抑制剂对内生菌的影响

不同浓度重铬酸钾和萘啶酮酸对丹参和黄精内生杂菌抑制作用见表 3。

由表 3 可以看出, 重铬酸钾和萘啶酮酸能在一定程度上抑制真菌和细菌, 浓度过高也会抑制放线菌^[19-20]。当重铬酸钾的浓度超过 75 g/L 时, 对所有菌落(包括细菌、放线菌和真菌)的抑制作用较强, 不宜于开展挑菌工作。而在重铬酸钾的浓度在 15 g/L 时, 培养基中几乎长满了霉菌和细菌。只有在重铬酸钾 25 g/L 和萘啶酮酸 20 g/L 时, 真菌、细菌和放线菌的菌落数持平, 并且没有被快速生长的霉菌掩埋, 放线菌菌落在 5–10 个, 可以顺利地进行挑菌工作; 因此, 在培养基中加入 25 g/L 重铬酸钾和 20 g/L 萘啶酮酸, 可达到理想的内生放线菌分离效果。

2.3 分离纯化结果及分析

经 HV、S、改良高氏二号等培养基分离纯化, 据菌落形态和革兰氏染色的镜检特征, 共分离纯化得到 52 株放线菌。经 Williams^[21]和 Thakur^[22]等文献中相关方法进行鉴定, 初步判定所有菌株均属链霉菌属, 共 7 个类群, 分别为白孢、灰褐、烬灰、灰红紫、金色、蓝色、吸水。其中, 白孢类群为 7

表 3 不同浓度重铬酸钾和萘啶酮酸对微生物菌落的影响
Table 3 The inhibitive action of different density potassium dichromate plus malidixic acid to microbe

萘啶酮酸 Malidixi cacid (g/L)	微生物 Type of microorganism	重铬酸钾 Potassium dichromate (g/L)				
		15	25	50	75	100
15	Bacteria	*	+++	++	++	+
	Fungus	*	+++	++	+	-
	Actinomycetes	-	++	+	+	-
20	Bacteria	*	++	++	+	-
	Fungus	*	++	++	-	-
	Actinomycetes	-	++	+	-	-
25	Bacteria	*	+	+	+	-
	Fungus	*	++	++	-	-
	Actinomycetes	-	+	+	-	-

注: +: 1-5 个菌落; ++: 5-10 菌落; +++: 20 个菌落或以上; -: 无菌落; *: 在培养基被真菌或细菌污染之前无法检测出菌落。
Note: +: 1-5 colonies; ++: 5-10 colonies; +++: 20 colonies or more; -: No colony; *: Can't detect any microbe before the whole dish be polluted by the rapid grown fungi and bacteria.

个, 占 13.5%; 灰褐类群为 16 个, 占 30.8%; 灰红紫类群为 2 个, 占 3.8%; 白色类群为 12 个, 占 23.1%; 烬灰类群为 13 个, 占 25%; 蓝色和吸水各 1 个, 各占 1.9%。

2.4 RFLP 的聚类结果

16S rDNA PCR 扩增出来以后, 用 *Rsa* I、*Hae* III、*Hha* I、*Msp* I 4 种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切, 部分电泳结果见图 1, 4 种酶切结果综合分析后得到聚类分析树状图(图 2)。

从上图可以看出各菌株间酶切图谱类型有一定差异, 将其结果数值化并用 NTSYS2.1 软件进行分析得到聚类图(图 2)。

根据图 2, 我们可以看出全部供试菌株在 55% 的相似水平上聚在一起, 在 88% 的相似水平上, 所有供试菌株被分为 5 个群。PH111 与其他的菌株相差比较远, 除了 PH111 以外, 所有的菌株都能在 74% 左右的水平聚在一起, 遗传距离较近。发现分离自黄精的 PS411 与分离自丹参的 SV221 遗传距离最近, 同源性最高。群 III 里聚集起来的菌株最多, 包含了从两种植物中分离出来的 6 株菌。结果表明来自不同宿主植物的放线菌也可归在同一类群, 如 PS411、SV221、PS415、PG344 和 SS131 在一个小亚群内聚在一起。

3 讨论

在中药材内生放线菌的研究中, 方法和手段都不成熟。其内生放线菌的确定就是一个问题, 消毒过轻会人为扩大内生菌的生物多样性, 过重却又会 导致许多内生放线菌的丢失。所以我们只能相对地 确证内生放线菌而不是绝对。同时抑制剂的选择也 是个重点, 抑制作用过重会导致内生放线菌的无法 生长, 抑制过轻则会引起细菌和真菌的污染, 无法 得到纯放线菌。

基于 RFLP 技术分析所得到的聚类图, 将所有 供试菌株在 88% 的相似水平上分为 5 个群。黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red.) 中分离出的内生放线

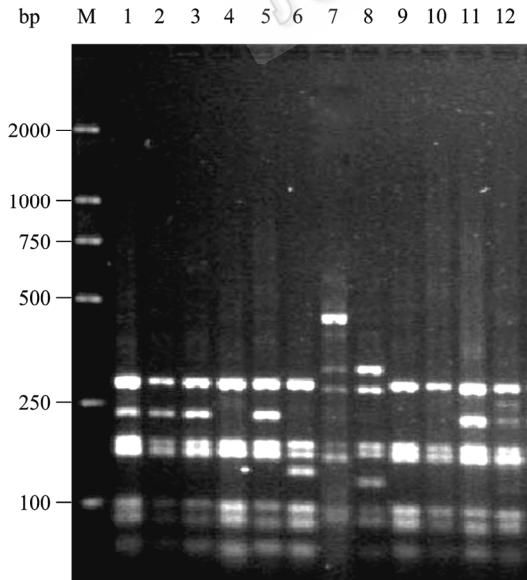


图 1 *Msp* I 限制性内切酶酶切图谱
Fig. 1 The restriction patterns of 16S rDNA
Note: M: DNA marker; 1-12: PH111, PG416, PH311, PS411, SH312, PS415, SH311, PG344, SV232, SV221, SV222, SS131.

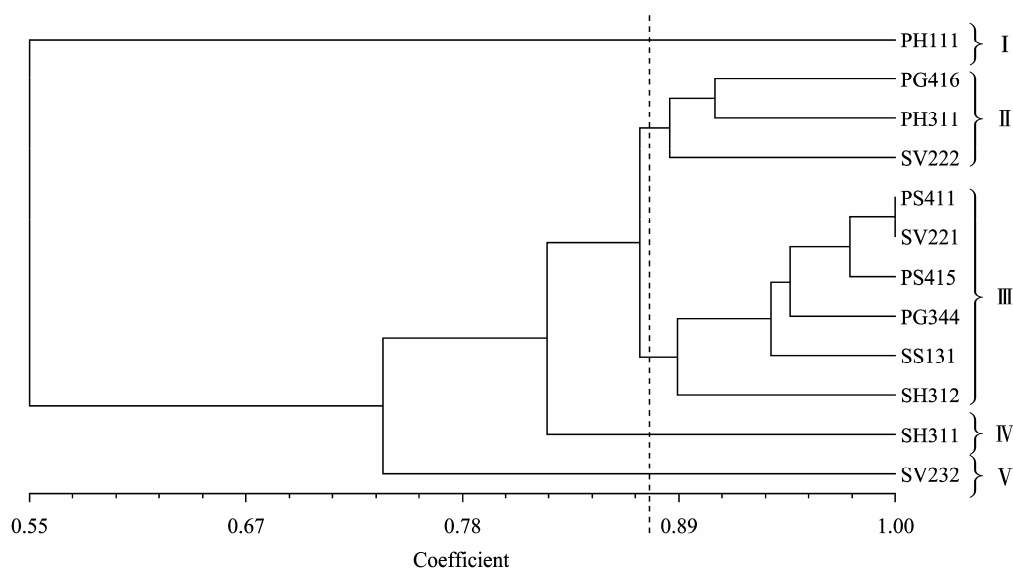


图2 供试菌株 16S rRNA PCR-RFLP 聚类图

Fig. 2 The dendrogram constructed based on the 16S rRNA PCR-RFLP

菌遗传多样性非常丰富, 在每个群内都有出现, PH111、SH311 和 SV232 单独成群, PH111 与其他群的遗传距离较远。可能与黄精内生环境的特异性有一定关系。除 PH111 外, 从黄精里分离出的放线菌都与丹参中内生放线菌聚在 II、III 群。表明不同宿主的放线菌在一定范围内有同源性, 不同宿主内生放线菌遗传多样性的差异, 可能与药用植物的药用成分有关。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 和黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red.) 作为非常有价值的药用植物广泛分布于四川省, 本试验仅对内生放线菌的分离条件和遗传多样性进行了初步探索。所以建议未来研究加大采样范围, 采用多种分析方法, 如, AFLP、rep-PCR、ARDRA、生理生化、细胞化学组分、DNA/DNA 杂交等, 以此系统揭示内生放线菌的多样性特征, 建立起道地中药材内生放线菌资源库, 为抑制生物活性物质的筛选奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 陈代杰. 微生物药理学. 第 1 版. 上海: 华东理工大学出版社, 1990: 37-38.
- [2] 梁亚萍. 6 株野生植物内生放线菌防治促生作用的研究. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(7): 131-136.
- [3] 沈寅初, 张一宾. 生物农药. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 14-15.
- [4] Ootoguro M, Hayakawa M, Yamazaki T, et al. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter. *J Appl Microbiol*, 2001(91): 118-130.
- [5] Baker D. Methods for the isolation, culture and characterization of the Frankiaceae: soil actinomycetes and symbionts of actinorhizal plants//Labeda DP. Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. New York: McGraw-Hill Publishing Co, 1990: 213-236.
- [6] 彭云霞, 姜怡, 段淑蓉, 等. 稀有放线菌的选择性分离方法. 云南大学学报, 2004, 29(1): 86-89.
- [7] Jiang Y, Duan SR, Tang SK, et al. The isolation method of rare actinomycetes. *Microbiology*, 2006(33): 181-183.
- [8] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003(4): 82-84.
- [9] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990: 2-18.
- [10] 古强, 刘宁, 邱旦恒, 等. 植物叶片内生放线菌的分离分类与拮抗活性. 微生物学报, 2006, 46(5): 778-782.
- [11] 陈华红, 杨颖, 姜怡, 等. 植物内生放线菌的分离方法. 微生物学通报, 2006, 33(4): 182-185.
- [12] 詹刚明, 荣晓莹, 孙广宇. 两株颞颌内生放线菌的分离及生防活性检测. 陕西农林科学, 2005(5): 38-39.
- [13] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 等. 稀有放线菌的分离方法. 微生物学通报, 2006, 33(1): 181-183.
- [14] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. 生物技术, 2007(1): 39-40.

- [15] Lee YK, Kim HW, Liu CL, *et al.* A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *Microbiol Methods*, 2003(52): 245–250.
- [16] 刘杰, 陈文新. 我国中东部地区紫穗槐、紫荆、紫藤根瘤菌的数值分类及 16S rRNA PCR-RFLP 研究. *中国农业科学*, 2003, **36**(1):17–25.
- [17] Angela S, Birgit R, Ulrike P, *et al.* Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002(39): 23–32.
- [18] 张海涛. 海绵放线菌的分离和多样性研究. 中国科学院研究生院(大连化学物理研究所)博士论文, 2006.
- [19] 司美茹, 薛泉宏, 来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究. *微生物学报*, 2004, **31**(2): 61–65.
- [20] 安德荣, 慕小倩, 赵文军, 等. 土壤放线菌分离中抑制剂的应用研究. *西北农业学报*, 2002, **11**(1): 106–108.
- [21] Williams ST. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol4. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1989: 2333–2339.
- [22] Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, *et al.* Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale*, 2007(17): 242–249.

~~~~~  
(上接 p.1271)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

#### 3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

### 4 特别说明

#### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

#### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

#### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

### 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>