

魔芋组织培养与细胞工程

胡建斌*

(河南农业大学林学院园艺学院, 郑州 450002)

摘要 近几年来, 魔芋组织培养研究进展较快, 其细胞工程领域也取得了一定的研究成果。现对魔芋组织培养过程中外植体取材、愈伤组织诱导与分化的激素应用进行了概述, 重点介绍了魔芋离体形态建成的几种模式及其调控机制的研究新进展。有关魔芋种质资源离体保存和突变体的筛选的研究工作已经展开, 其遗传转化体系也逐渐完善, 外源基因如抗病基因、抗除草剂基因等现已转化成功。最后还对魔芋今后的研究方向进行了讨论, 指出了目前存在的主要问题并提出了相应的对策。

关键词 魔芋; 组织培养; 细胞工程

魔芋(elephant foot, konjac)别名磨芋、蒟蒻, 为天南星科(*Araceae*)魔芋属(*Amorphophallus* Blume)多年生草本植物。我国魔芋资源丰富, 现已报道的有21种, 约占全球总数的1/6^[1], 其中13种为我国特有。在我国魔芋资源中, 花魔芋(*A. rivieri*)和白魔芋(*A. albus*)因具有产量高、质量好、营养成分丰富等优点已经成为魔芋主要栽培种^[2]。魔芋球茎富含多糖、蛋白质、纤维以及多种氨基酸、微量元素和生物碱, 在医药、食品等工业中具有广泛用途^[3,4]。魔芋也是我国民间传统利用的中草药, 历代本草医药记载, 其有化痰散积, 行瘀消肿之功效。经现代医学大量临床研究和实验证明, 魔芋还具有排毒、减肥、通便、洁胃、抑制胆固醇、降血脂和血糖、增加血液中胰岛素以及预防糖尿病和动脉硬化等心脑血管系统疾病的功效^[5,6]。近年来, 由于人们对生活质量的要求日益增高, 魔芋具有医药和保健的双重价值亦日益凸现。

魔芋为单叶植物, 通常用主球茎着生的根茎作为营养繁殖器官, 其繁殖系数极低, 以致产品器官生产不足, 严重的阻碍了魔芋生产及相关产业的发展^[7]。植物组织培养具有快速、高效、低成本的优点, 现已成为许多植物特别是无性繁殖植物良种繁育的重要手段^[8]。利用植物组织培养技术可提高魔芋繁殖速度、脱除病毒和防止种性退化, 已经成为当前魔芋研究的热点。在此基础上, 还展开了对魔芋种质离体保存、突变体筛选、遗传转化等细胞工程方面的研究, 这些研究为魔芋种质资源创新和新品种的开发奠定了一定的基础。

1 魔芋组织培养

通过组织培养的方法使外植体再生植株是进行原生质体融合、遗传转化等生物技术的前提条件, 生物工程育种成功与否在很大程度上也依赖于再生体系是否高效。目前, 国内外对魔芋组培的研究主要集中于离体快繁。由于魔芋是一种单叶植物, 无结节, 无法通过腋芽繁殖, 且茎尖培养技术尚未突破, 因此, 现有的报道几乎都是通过愈伤组织培养获得再生植株。

1.1 外植体的选取

以魔芋的叶柄、幼芽、鳞片、球茎、种子、花序等作外植体均有获得再生植株的成功报道。早在上个世纪80年代, 庄承纪等^[9]从花魔芋、白魔芋、勐海魔芋(*A. bannaensis*)和疣柄魔芋(*A. virosus*)的叶鞘、花序、叶柄和茎尖诱导出愈伤组织。王平华等^[10]将白魔芋球茎分为主芽、皮上芽苞、侧芽、皮下组织和主芽基部5个部分, 并分别作为外植体加以研究, 发现球茎不同部位的细胞的分化程度并不一致, 其中皮下组织和主芽基部易形成愈伤组织, 主芽和皮上芽苞组织容易直接分化出芽。柳俊等^[11]用花魔芋种子为外植体研究发现, 种子因接种部位不同分化程度也呈现出明显差异, 顶部外植体大多不经过愈伤组织阶段而直接形成芽, 中部则易形成愈伤组织, 而基部的愈伤组织形成能力显著降低。严华兵

收稿日期: 2006-09-20 接受日期: 2006-12-27

* 通讯作者。Tel: 0371-63554959, Fax: 0371-63558078, E-mail:

jbbu220@yahoo.com.cn

等^[12]对白魔芋叶柄、球茎芽苞、球茎薄壁组织、根状茎等进行了愈伤组织诱导,发现叶柄愈伤组织诱导率(62.5%)虽然低于球茎薄壁组织(86.5%)和根状茎(72.0%),但它形成的愈伤组织状态良好,外观呈瘤状结构,这种愈伤组织比其他类型外植体形成的愈伤组织更易继代、增殖和分化成苗。

1.2 愈伤组织的诱导与分化

培养基中的激素种类、浓度及其配比是影响外植体脱分化及再分化的重要因素。大多研究表明,魔芋愈伤组织诱导需要生长素和细胞分裂素共同完成,其中BA和NAA最为常用,效果也较好,其用量通常为0.5~1.0 mg/L。KT和ZT也可以用来代替BA,但浓度可以更低。在加有浓度相当的细胞分裂素和生长素的培养基上(如:MS + 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA),愈伤组织诱导率普遍较高,生长速度快,状态也较好^[13]。但在培养基中添加2,4-D对魔芋愈伤组织的形成具有强烈抑制作用^[14]。魔芋愈伤组织分化一般是通过提高培养基中细胞分裂素对生长素的比值来实现。大多试验表明,当分化培养基中BA/NAA比值(浓度单位均为mg/L)大于5时可得到较高的分化率^[9~14]。陈永波等^[15]通过正交试验探讨了花魔芋愈伤组织分化的条件,结果发现MS + 1.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA上的愈伤组织分化率达100%,而添加GA₃(0~2.0 mg/L)对芽分化的作用不明显。

1.3 植株再生

愈伤组织的分化及植株再生是魔芋组织培养的关键环节,再生体系效率和繁殖系数的高低都与这一过程密切相关。从现有报道来看,魔芋愈伤组织可通过不定芽和拟球茎两种途径进行植株形态建成。

1.3.1 芽器官发生模式 一般来说,器官发生是离体植株形态建成的主要途径。这一途径又可分为3种方式:(1)先芽后根,即先分化形成不定芽,之后在芽基部生长不定根进而形成完整植株;(2)先根后芽,即先分化出根,再在根上端产生不定芽而形成完整植株;(3)在愈伤组织的不同部位形成芽和根,再通过维管组织的联系形成完整植株^[16]。从现有的报道来看,魔芋离体培养植株形态建成主要是通过第三种方式,直接从魔芋外植体诱导形成再生植株的报道十分少见。黄丹枫等^[17]对魔芋离体植株再生方式进行了统计,结果发现,愈伤组织分化不定芽是魔芋离体植株再生的主要途径。他们发现,分化培养过程中,愈伤组织内某些胚性细胞出现定向生长,并逐渐形成突

起的生长锥,进而形成芽原基,而芽原基周围的叶原基则发育成芽苞片,最终形成不定芽。Hu等^[18]利用组织制片技术对魔芋植株再生过程进行了详细观察,发现不定芽主要起源于愈伤组织浅层或表层细胞。这些细胞体积较小,胞质浓厚,核仁明显,内含物丰富,具有典型胚性细胞特征,经分化培养可形成拟分生组织团。在含有高浓度细胞分裂素和低浓度生长素的培养基上,拟分生组织团发育成芽原基,进而形成植株。他们还发现,由于位于愈伤组织深处的拟分生组织团在发育过程中受到周围细胞挤压而不能正常生长,最后只形成一些畸形芽原基而不能发育成植株,因此认为魔芋不定芽属于外起源。

1.3.2 球茎器官发生模式 魔芋是一种变态器官植物,因而在离体培养过程中也能表现出这种发育特征。黄丹枫等^[17]曾发现在培养基蒸发量较大、较干燥的环境可形成拟球茎,但频率极低。柳俊等^[11]发现,魔芋愈伤组织经过多次切割继代后便失去了愈伤组织状态而形成拟块茎(拟球茎)结构,这种拟块茎即使不转入分化培养基而经过一段时间的培养也会在其中央长出芽。Hu等^[18]以花魔芋为材料,对这一特殊的器官发生模式进行了组织细胞学观察,结果发现,位于魔芋愈伤组织浅层的拟分生组织团在分化培养过程中除了直接形成芽原基外,还可以形成一种体积更大的球状结构,这种球状体具有明显的顶端分生组织,但叶原基不明显,在形态结构上与不定芽的芽原基有明显的区别。在培养过程中,其体积进一步增大并突破愈伤组织表皮层形成肉眼可见的拟球茎。谢庆华等^[19]利用白魔芋、花魔芋和黄魔芋(*A. bannaensis*)的鳞叶、叶柄、球茎等器官为外植体通过愈伤组织阶段成功诱导出微型球茎(拟球茎),这说明拟球茎现象在魔芋属植物组织培养中普遍存在,并没有组织器官的特异性。上述研究均报道,拟球茎一旦形成,便可产生芽和根,进而形成完整植株。因此,通过这种球茎器官发生途径,可直接从愈伤组织上诱导形成完整植株,省去了生根培养环节。

Hu等^[18]还对拟球茎进行了解剖学的研究,结果发现拟球茎在组织结构上可分为周皮、皮层和髓部,且皮层和髓部含有大量贮藏物质,如淀粉和多糖等,实质上就是一种微型贮藏器官。且它具有与田间魔芋一样的繁殖方式,即独立培养可在其基部不断产生新的小球茎,从而实现“器官-器官”的繁殖方式。理论上,这一方式的繁殖速度快,产生体细胞无性系变异的可能性较小,远远优越于通过切割愈伤组织的

繁殖方式。与试管苗相比,拟球茎作为一种微型变态繁殖器官,因具体积小、可贮运、易出苗、易生根等优点有望代替试管苗用于魔芋种芋繁殖。

1.3.3 魔芋离体形态建成的调控机制 不定芽和拟球茎是魔芋组织培养中植株形态建成的两种不同方式,明确这两种方式的形成机制及其调控机制对有目的调控形态发生的途径具有重要的意义。胡建斌等^[20]对魔芋的愈伤组织进行了分类,发现结构疏松、生长速度快的愈伤组织(II型)容易直接产生不定芽,而结构致密、表面呈瘤状或球状、生长速度慢的愈伤组织(III型,属半组织化结构)则以球茎器官发生为主。Hu等^[21]通过设计不同浓度的NAA和BA组合发现,BA/NAA比值大于5或不使用NAA,III型愈伤组织出芽率普遍高于50%,且主要以多芽、丛生芽为主,拟球茎几乎不形成;比值为4时,拟球茎形成率最高(75%),而不定芽形成率在20%以下;比值小于4或相等时,愈伤组织生长速度加快,而器官发生能力明显下降。进一步研究发现,魔芋拟球茎的形成受蔗糖浓度和低温诱导,而光周期影响不明显。这项研究为建立以魔芋试管球茎为中心的离体快繁体系打下了技术基础。为了明确这两种不同的形态建成模式的生理生化调控机制,胡建斌^[22]利用高效液相色谱分析了这两种途径中愈伤组织的内源吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)和茉莉酸(JA)的含量及其变化规律,结果发现GA₃、ABA和JA三种内源激素在芽和球茎形成过程中含量变化明显。不定芽发生过程中,GA₃含量快速上升,ABA含量下降,而JA保持稳定;拟球茎形成过程中,GA₃含量基本稳定,ABA含量下降,而JA含量快速上升。经分析发现,只有GA₃与JA的浓度比值在两种途径中呈现出截然相反的变化规律,因此认为魔芋愈伤组织中内源GA₃与JA的平衡关系是调控魔芋离体形态建成方式的主要因素,即GA₃/JA比值较高或迅速上升,形态建成以不定芽途径为主,反之则以拟球茎途径为主。

1.4 体细胞胚发生

体细胞胚发生是植物离体培养中存在的普遍现象,目前已报道在210多种植物中成功诱导出体细胞胚^[23]。但有关魔芋体细胞胚的报道则十分少见,甚至有的作者认为天南星科植物不能形成体细胞胚^[24]。黄丹枫等^[17]发现,经过多次继代的球茎愈伤组织可形成体细胞胚,但发生频率非常低且不能形成植株。他们发现体细胞胚起源于愈伤组织中单个胚原细胞,

胚原细胞经过一次分裂后形成二细胞原胚,之后便进入无序分裂状态,结果只能形成早期形态的胚,如球型胚、心型胚,而不能形成成熟的子叶型胚,因而不能发育成完整植株。Hu等^[18]试验发现,在含有高浓度生长素的培养基(MS + 4.0 mg/L NAA + 1.5 mg/L BA)上反复继代花魔芋叶柄愈伤组织偶尔可形成体细胞胚,但也未发现其发育成植株。超微观察结果表明,这些体细胞胚在结构上均存在不同程度的畸形,如某些体胚根本没有子叶或子叶融合,有些体胚芽分生组织不在顶端而在其侧面,有些子叶型胚根本没有顶端分生组织或分生组织已液泡化等,魔芋体细胞胚的高度畸形化可能是导致其不能进一步发育的主要原因。目前,魔芋体细胞胚发生频率极低且不能成苗,要使其成为魔芋的离体再生方式则需对其发育机制及形成条件作深入研究。

2 魔芋种质资源低温保存

离体条件下,魔芋无法通过植株继代,因而现有的种质资源离体保存的方法均是通过愈伤组织保存,通过愈伤组织保存的一个最大的问题是容易产生无性系变异。寻求适宜离体种质保存方法对于魔芋种质资源多样性的保护以及育种工作具有重要意义。张玉进等^[25]对魔芋不定芽进行了离体低温保存,发现不定芽大小是影响保存存活率的决定性因素。他们将长为1.5 cm的不定芽接种于加有20 g/L甘露醇、0.5 mg/L BA、0.1 mg/L NAA和3%蔗糖的MS培养基上于室内光照培养7天后,转入4℃黑暗可保存180天,发现不定芽的过氧化物酶活性和可溶性糖含量均达到较高水平,恢复培养后其存活率达100%。而过于幼小的不定芽(小于0.5 cm)难以忍耐低温胁迫和生长延缓剂的作用而死亡。张玉进等^[26]还建立了魔芋不定芽超低温保存体系。他们将1 mm大小的魔芋不定芽茎尖于含0.7 mol/L蔗糖的MS培养基预培养2天,并用玻璃化溶液PVS₂处理20 min后直接投入液氮中保存。保存后的茎尖经40~77℃水浴快速化冻,于1.2 mol/L蔗糖培养液浸泡20 min,黑暗培养2周后转入光照条件下,不定芽可直接生长发育成植株,其存活率达70%,经RAPD技术检测未发现无性系变异发生。张玉进等^[27]利用上述相同超低温保存方法对魔芋花粉进行保存,发现保存后的花粉具有“冷刺激”效应,即比新鲜花粉具有更高的萌发率,该项研究为克服由魔芋雌蕊先熟造成的生殖隔离现象以及促进杂交育种研究具有重要意义。

3 魔芋突变体的筛选

魔芋愈伤组织培养容易产生变异, 这为有用突变体的出现提供了可能。吴金平等^[28]以花魔芋愈伤组织为材料, 应用甲基磺酸乙酯(EMS)化学诱变获得了抗软腐病的新材料。他们发现预培养时间和 EMS 浓度对愈伤组织的存活率有较大影响, 预培养 4 天的愈伤组织选择 0.4% EMS 处理和预培养 6 天愈伤组织选用 0.6% EMS 处理均可得到较高的存活率, 且能达到诱变的效果。存活后的愈伤组织经软腐病菌接种后, 经过 6 个月的继代培养与筛选, 极少数愈伤组织可正常生长并与病菌共存活。该项研究对魔芋抗病育种研究具有积极的意义。

4 遗传转化研究

近年来, 由于转基因技术迅速发展, 人们开始将这一技术应用于魔芋的遗传改良, 以期获得优良的育种材料。张兴国等^[29]采用 RT-PCR 的方法从白魔芋组培苗的幼嫩球茎组织中克隆出了 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因, 这是有关魔芋基因克隆的首次报道。严华兵^[30]建立了白魔芋叶柄愈伤组织转化的受体系统, 发现 30 mg/L G418 可作为以愈伤组织为转化受体的筛选压, 250 mg/L Carb 可有效抑制农杆菌生长而对愈伤组织抑制作用不明显, 预培养 4 天可得到较高的转化效率且有利于转化后的愈伤组织的存活。他以具有广普抗性的目的基因(*NtPRP27-like*)构建了表达载体 *pBI121-like-27*, 以农杆菌 EHA105 菌株为介导, 对 2 300 例白魔芋试管苗叶柄愈伤组织进行了转化, 获得了大批抗性愈伤组织及其所分化出的 PCR 阳性植株。李贞霞等^[31]利用农杆菌 LBA404 和基因枪两种转化方法将以腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶小亚基基因(*AGPSI*)反义基因和抗除草剂基因(*PAT*)成功导入白魔芋愈伤组织, 并获得了经 Southern 检测的阳性植株。他们发现以农杆菌介导的转化中, 试验初期以 75 mg/L Kan 作为选择压, 后期选择压提高到 100 mg/L 可提高选择的效果且不影响愈伤组织的生长, 预培养 2 天有利于愈伤组织再生。基因枪转化体系以 1 mg/L Basta 作早期选择压, 后期浓度提高到 2 mg/L, 可确保得到真正转化子并抑制假阳性的发生, 氦气压力比轰击距离以 1 100 psi : 9 cm 较适宜, 轰击后恢复培养 6~7 天有利于减少伤害提高转化几率。周盈等^[32]以潮霉素抗性基因为选择标记, 建立了根癌农杆菌介导的花魔芋遗传转化体系, 并获得了大批转基因植株。他们通过比较 Basta 和潮

霉素作为选择压时发现, Basta 在所试验浓度中均表现抑制所需时间过长, 不能在短时间内有效抑制非转化细胞的生长, 而 22.5 mg/L 潮霉素既能够有效抑制非转化细胞的生长, 又不会过早的造成非转化细胞的死亡而影响转化细胞的生长, 是理想的筛选浓度。

5 小结与展望

从以上报道可以看出, 近年来魔芋的组织培养研究有了较快的进展, 转基因研究也取得了一定成果, 但仍面临着一些问题。第一, 魔芋再生体系并不完善, 具体表现为魔芋继代培养技术还未突破。目前魔芋的离体繁殖只能以愈伤组织培养为继代方式, 而愈伤组织培养存在两个极为明显的不利因素: (1)愈伤组织类型具多样性且分化频率不一致导致出苗整齐度差, 这限制了组织培养技术在魔芋工厂化育苗和相关生物技术领域中的应用。(2)繁殖后代不可避免产生体细胞无性系变异, 愈伤组织培养容易诱发无性系变异已为人们所公认, 这也大大的降低了它作为一种繁殖方式的价值。Hu 等^[18]发现了魔芋可通过变态器官(拟球茎)的形式进行继代繁殖, 这一发现对魔芋继代繁殖技术的突破具有极大的启发意义, 但如何提高增殖率则需深入研究; 第二, 魔芋再生植株田间移栽成活率低。魔芋在离体条件无法通过植株继代, 苗龄过老的植株由于其根系没有活力而移栽田间后难以成活, 因而只有特定苗龄的再生植株成活率才高^[22]。在魔芋转基因研究中, 由于转化效率低, 阳性植株少且苗龄不一, 这也降低了田间移栽的成活率, 从而增加了魔芋转基因研究的难度。魔芋组织培养中形成的拟球茎具可贮运, 田间种植出苗率高等优点^[21], 如果使转化后的抗性愈伤组织直接形成拟球茎而不是使其再生植株, 则可使拟球茎集中种植进而提高成活率; 第三, 原生质体培养和细胞融合等方面的研究几乎呈空白。魔芋细胞工程研究主要集中于前期的组织培养体系的研究, 而在原生质体的分离、培养等技术上停止不前^[13], 这直接导致了细胞融合等现代生物技术难以在魔芋种质资源创新和细胞工程育种发挥实质性作用。

现代生物技术的迅速发展, 为药用植物带来了新的契机, 并取得了大批成果。魔芋也应立足于利用现代生物技术的优势, 并结合魔芋生物学特性, 高起点的建立适合于魔芋自身的组培与细胞工程技术体系。为此, 应该在以下几个方面加强研究: 研究魔芋离体细胞脱分化、再分化和形态建成的内在机制及

其调控机制, 建立高效、稳定的再生体系和继代培养体系; 加强魔芋基础研究(如植物学、发育生理等), 建立稳定的种芋繁殖技术体系, 实现离体到田间的对接; 集中力量进行原生质体培养研究, 为魔芋种质资源创新和生物工程育种打下技术基础。

参考文献(References)

- [1] Long CL *et al.* *Biodivers Conserv*, 2003, **12**: 1145
- [2] 牛义等. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, **27**: 634
- [3] Zhang YQ *et al.* *Carbohydr Polym*, 2005, **60**: 27
- [4] Teramoto A *et al.* *J Food Sci*, 2005, **65**: 491
- [5] 陈秀敏等. *中国生化药物杂志*, 2001, **22**: 318
- [6] 刘桂敏. *中草药*, 2004, **35**: 15
- [7] 刘佩瑛. *魔芋学*, 北京: 中国农业出版社, 2002, 108
- [8] Chu CC. *Acta Bot Sin*, 2002, **44**: 1075
- [9] 庄承纪等. *云南植物研究*, 1987, **9**: 339
- [10] 王平华等. *西南农业大学学报*, 2001, **23**: 63
- [11] 柳俊等. *华中农业大学学报*, 2001, **20**: 283
- [12] 严华兵等. *湖北农业科学*, 2005, **4**: 71
- [13] 林蓉等. *中国农学通报*, 2004, **21**: 153
- [14] 马林等. *广西植物*, 2003, **23**: 553
- [15] 陈永波等. *氨基酸和生物资源*, 2005, **27**: 29
- [16] 谢从华等. *植物细胞工程*, 北京: 高等教育出版社, 2004, 26
- [17] 黄丹枫等. *上海农学院学报*, 1994, **12**: 25
- [18] Hu JB *et al.* *Plant Cell Rep*, 2005, **24**: 642
- [19] 谢庆华等. *云南农业大学学报*, 2004, **19**: 696
- [20] 胡建斌等. *华中农业大学学报*, 2004, **23**: 654
- [21] Hu JB *et al.* *J Horticult Sci Biotech*, 2006, **81**: 859
- [22] 胡建斌. *魔芋离体形态发生机制及其繁殖技术*. 华中农业大学博士学位论文, 武汉: 华中农业大学图书馆, 2006, 54
- [23] 催凯荣等. *植物体细胞胚发生的分子生物学*, 北京: 科学出版社, 2000, 13
- [24] 刘淑琼等. *实验生物学报*, 1990, **24**: 391
- [25] 张玉进等. *西南农业大学学报*, 1999, **21**: 304
- [26] 张玉进等. *作物学报*, 2001, **27**: 97
- [27] 张玉进等. *园艺学报*, 2002, **27**: 139
- [28] 吴金平等. *华中农业大学学报*, 2005, **24**: 448
- [29] 张兴国等. *园艺学报*, 2001, **28**: 251
- [30] 严华兵. *魔芋转基因体系的建立*. 华中农业大学硕士学位论文, 武汉: 华中农业大学图书馆, 2005, 11
- [31] 李贞霞等. *园艺学报*, 2006, **33**: 411
- [32] 周盈等. *分子植物育种*, 2006, **4**: 559

Tissue Culture and Cell Engineering in *Amorphophallus* Blume

Jian-Bin Hu*

(College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract In recent years, rapid progress has been achieved in tissue culture of konjac as well as in the field of cell engineering. The present article summarized the achievements including explant selection and hormonal application in callus induction and shoot differentiation in konjac tissue culture. Emphases were laid on the new progress on several morphogenetic modes in konjac *in vitro* and their regulative mechanisms. Also, researches have been carried out in the field of germplasm conservation and mutant selection *in vitro*. The genetic transformation system was improved gradually and foreign genes, e.g., disease-resistant gene and herbicide-resistant gene, were successfully transformed to konjac. At last, the paper discussed research direction in the future and pointed out the major problems in current researches. Meanwhile, the author put forward the solutions pertinent to the problems.

Key words *Amorphophallus* Blume (konjac); tissue culture; cell engineering

Received: September 20, 2006 Accepted: December 27, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-371-63554959, Fax: 86-371-63558078, E-mail: jbh220@yahoo.com.cn