

- [10] Barbacid M, 1994, *J. Neurobiol.*, **25**:1386-1394.
- [11] Yuen EC, and WC Mobley, 1995 *Mol Med Today*, **1**:278-287.
- [12] Yuen EC, et al., 1996, *Neural Notes*, **1**,3-7.
- [13] Holtzman DM, et al., 1995 *J. Neurosci.*, **15**:1567-1576.
- [14] Diccico-Bloom. E, et al., 1993 *Neuron*, **11**:1101-1110.
- [15] Verdi JM, and D. J. Anderson, 1994, *Neuron*, **13**:1359-1365.
- [16] Cabelli RJ, et al., 1995, *Science*, **267**:1662-1668.
- [17] Domenici L, et al., 1994 *Neuroreport*, **5**:2041-2052.
- [18] Berardi N, et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**:684-694.
- [19] McMahon SB, et al., 1995, *Nature Med*, **1**:774-783.
- [20] Li Y, et al., 1995, *J. Neurosci.*, **15**:2888-2897.
- [21] Crowley C, et al., 1994, *Cell*, **76**:1001-1010.
- [22] Smeyne RJ, et al., 1994, *Nature*, **368**:246-252.
- [23] Mobley MC, et al., 1989, *Neuron*, **3**:655-665.
- [23] Holtzman DM, et al., 1995, *J. Neurosci.*, **15**:1567-1576.

小麦遗传转化技术研究进展

安海龙 卫志明

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

植物基因工程研究兴起于本世纪八十年代中期。自其诞生至今,如何将这项技术应用于小麦、水稻、玉米等农作物的遗传改良研究始终是人们努力的重要目标之一。要实现这一目标,首先需要建立一套高效、可靠、重复性好的基因转化系统。而在植物基因转化系统研究方面,禾谷类相对于其他双、单子叶植物而言,具有起步晚、困难大的特点,而小麦相对于其他禾谷类如水稻、玉米等,又进一步表现出其滞后性和困难性。通常产生转基因植物的方法有两类,一类是借助于原生质体的直接转化法如PEG法、电激法、脂质体法等,另一类是农杆菌介导的植物细胞、组织、器官直至完整植株的基因转化法。在原生质体转化方面,由于用于游离原生质体的小麦胚性悬浮系的建立及由原生质体再生植株的艰难性,直到1988年才由小麦原生质体再生植株成功^[1],进而在1993年获得了小麦转基因植株^[2,3]。迄今这方面的研究也仅有零星的几篇,而已建立的转化系统又普遍存在实验周期长、转化频率低和重复性差的缺点,限制了其进一步的应用。农杆菌方面Woolston等早在1988年即利用农感染的方法证明了小麦细胞的可转化性^[4],然而由于小麦不是农杆菌的天然宿主,同时也由于当时人们

对转化条件的认识尚不足,虽然其后甚至也获得了一些抗性愈伤组织,但是直到1997年才利用农杆菌转化法获得了小麦转基因植株^[5]。目前这方面的报道已有两篇,虽然尚缺少相应的重复实验,转化频率也不高,但以水稻方面的工作为借鉴,继续深入研究无疑是极有价值的。虽然上述两类方法是产生转基因植物的较常用的方法,但是世界首例转基因小麦却是利用基因枪介导的方法产生的。其后一系列的研究又进一步发展和完善了基因枪转化法,使其真正成为目前产生转基因小麦的最成熟、最可靠的转化方法。本文将就这些情况作一综述。

一、基因枪法

1992年Vasil等^[6]用杜邦PDS 1000/He型基因枪轰击5-7月龄具分化能力的C型小麦胚性愈伤组织,采用梯度筛选的方法获得了抗除草剂Basta的再生植株, Southern杂交和PAT酶活性分析证实了bar基因在该小麦基因组中的整合、表达及稳定遗传。这是世界上首例转基因小麦的报道。之后借助于基因枪导入系统,先后有多家实验室也获得了转基因小麦,并进一步在转化系统的改进和完善方面作出了贡献^[7-14]。下面将从受体材料的选择,轰击条

件与参数,筛选系统等方面作一扼要介绍。

1. 受体材料的选择

虽然 Vasil 等采用 5-7 月龄的 C 型胚性愈伤组织作为受体材料获得了成功,但是该材料具有周期长、难鉴别和难保持等缺点,因而并没有获得广泛应用。此后研究者们尝试了预培养不同天数的幼胚或其来源的愈伤组织,其中获得成功的有未经预培养的幼胚^[11]、分离并经 2 天预培养的幼胚盾片组织^[8]、预培养 3-5 天尚未出愈的幼胚^[15,16]和预培养 5-22 天的幼胚盾片愈伤组织^[7,9,10,12-14]。Nehra 等^[8]的工作表明,分离的幼胚盾片组织具有极高的体细胞胚胎诱导及分化潜能,是极好的轰击受体,但从幼胚上剥下盾片组织却有些麻烦。而从对粒子轰击所造成的损伤的耐受性上来讲,预培养时间长的材料要比预培养时间短的材料好些^[10,14]。综上所述,目前小麦基因枪转化方面受体材料多采用培养 5-9 天的幼嫩盾片愈伤组织或培养 3-5 天的尚未出愈的幼胚。

2. 轰击条件与参数

轰击条件与参数主要涉及轰击所用的金属粒子种类、DNA 向金属粒子表面的吸附程序、每枪粒子用量以及轰击时所用的氦气压力等。轰击用的微弹粒子多为金粉或钨粉,质粒 DNA 向金粉或钨粉表面的吸附多采用 Dlein 等^[17]和 Daines 等^[18]所报道的程序或稍加改进。Becher 等^[11]和 Altpeter 等^[9]曾分别报道每枪用较少的微弹(30 μ g)要比较多的微弹(116 或 100 μ g)效果好,然而从 30-600 μ g 用量范围内都有成功的报道^[8,9,11],这说明微弹用量只是影响轰击效果的众多因素中的一个,此外尚有许多的环节可以影响轰击效果。以 PDS 1000/He 型基因枪为例,其氦压使用值在 900-1550 Psi (一个 Psi 相当于 6.895KPa)范围内均可^[11],而以 1100 用的较多^[7,8,19]。Vain 等^[20]曾发现对玉米悬浮细胞进行渗透处理可以提高转化频率,其机理可能是渗透条件下细胞质变浓,这样便减少了受枪击细胞的细胞质外渗,从而减轻了细胞的损伤。Altpeter 等^[9]采用 Vain 等的

方法,在小麦转化上也取得了较好的效果。目前在轰击前 4 小时到轰击后 16 小时范围内将小麦材料置于含 0.4M 渗透剂(甘露醇和/或山梨醇)的培养基上进行渗透处理已成为小麦转化操作中的一个基本环节。

3. 筛选系统

(1) 筛选标记基因及筛选剂 小麦遗传转化研究中应用最广泛的筛选标记基因是 bar 基因,其筛选剂有 Basta、bialaphos 和 L-PPT 三种。其中 Basta 由化学合成而来,bialaphos 由发酵而来,其有效成分均为 L-PPT。目前这三种筛选剂在筛选转基因小麦方面都相当成功^[6,7,10]。此外也有用 npt II、cp4/gox 和 hpt 作为筛选标记基因的,其筛选剂分别为 G418、草甘磷和潮霉素。由于禾谷类细胞具有较高的内源卡那霉素抗性,并且卡那霉素干扰转化细胞的分化过程,因此小麦转化实验大多用不干扰分化过程的 G418 来代替卡那霉素作为 npt II 基因的筛选剂^[5,8]。草甘磷用于转基因小麦的筛选不仅有效,而且筛选过程中没有任何筛选逃逸现象发生,但同等条件下其转化频率要低于 bar 筛选系统^[12]。早期实验发现潮霉素作为小麦的筛选剂易诱导生根而不易得到抗性愈伤组织和再生抗性植株^[8,10]。最近 Ortiz 等^[13]采用潮霉素筛选 4-6 周后即转入不含潮霉素的分化培养基分化的方法,成功地获得了小麦转基因植株。这一成功表明潮霉素作为小麦转化细胞的筛选剂是有效的。

(2) 筛选策略 小麦转化实验的筛选策略一般有两种:一种是通过连续筛选获得抗性愈伤组织,然后再去分化抗性植株,筛选过程中存在一个抗性愈伤组织阶段,这一策略在 Vasil 等^[6]的工作中表现的较为典型。另一种是经过一定时间筛选后,将尚处于嵌合状态的愈伤组织直接转入分化,筛选过程中并不存在一个抗性愈伤组织阶段,这一策略在 Nehra 等^[8]的工作中表现得比较典型。早期实验多采用前一策略,但是由于严格意义上的小麦抗性愈伤组织比较难以获得,而且获得这种抗性愈伤组织

所需时间也比较长,因此后来的研究者多采用后一策略来进行转基因小麦的筛选工作^[5-10,12-14]。

此外,有别于以幼胚或幼胚来源的愈伤组织为受体的基因枪转化法,Roland等^[21]用特制的微靶基因枪将带 *gus* 或花色素苷合成酶基因的质粒导入小麦生长点中并检测到了上述报告基因的表达。杜立群等^[22]则以基因枪轰击小麦生长点,诱导其发育成完整植株后对其结实的种子进行萌发实验,获得了卡那霉素抗性植株,Southern杂交证实了 *npt II* 基因在小麦基因组中的整合。这是基因枪法介导的小麦生长点转化法的一个成功实例。

从 Vasil 发表第一篇小麦转化文章至今,短短几年间基因枪法转化小麦已实现了从探索到程序化的转变,成为一种相当成熟可靠的技术。然而这一转化方法存在转化频率偏低而整合拷贝数偏高的缺点,尚有待改进。

二、农杆菌法

农杆菌法介导的植物遗传转化系统存在一系列的优点,然而由于小麦本身不是农杆菌的天然宿主,因而农杆菌介导的小麦遗传转化研究进展显得相对缓慢一些,这里将简要介绍一下这方面的一些重要进展。

1. 农感染实验

农感染实验是专门为验证根癌农杆菌转化单子叶禾谷类植物的可行性而设计的,利用 T-DNA 区插有完整病毒基因组的农杆菌侵染禾谷类植物幼苗,如果有转化事件发生,随后应该可以在相应的幼苗中检测到病毒系统感染症状的发生。利用这一方法已经证明了玉米细胞的可转化性^[23,24]。采用类似思路,Woolston等^[4]将小麦 WDV 病毒基因组插入到质粒载体的 T-DNA 区,以含该载体的农杆菌侵染小麦幼苗,3周后发现典型的病毒感染症状发生,Southern分析表明病毒基因组已插入到了小麦细胞的基因组中,在该植物材料中还分离到了完整的病毒颗粒,这一结果有力地证明小麦细

胞也能被农杆菌所转化。

2. 农杆菌向小麦细胞表面的附着——来自扫描电镜的证据

Graves等^[25]用扫描电镜观察农杆菌浸过的小麦幼苗切段,发现有农杆菌附着于细胞表面,且农杆菌与细胞壁之间,农杆菌相互之间有小纤丝相连,进一步表明这种附着属于生物性附着。Mooney等^[26]以幼胚为材料也观察到了同样的结果。这些实验证明了根癌农杆菌也可以附着于小麦细胞表面,附着过程似乎并不是造成侵染障碍的原因所在。

3. *vir* 基因诱导物的存在

vir 基因表达是农杆菌侵染植物细胞过程中的重要一环。Usami等^[27,28]发现小麦组织中确实存在 *vir* 基因的诱导物,然而该诱导物要么含量极低,要么扩散性极差,因为只有在补加乙酰丁香酮的情况下才能在共培养的农杆菌中检测到 T-DNA 环化事件的发生(通常认为这是 T-DNA 转移过程中的一种中间形式),这可能是造成侵染障碍的原因之一。

4. 一些早期的实验

邓万银等^[29]曾以致瘤农杆菌注射抽穗期小麦叶鞘基部及穗茎,三周后检查发现有瘤状组织形成,在该瘤状组织中还检测到了冠瘿碱的存在;此外还发现附加乙酰丁香酮时瘤状组织相对大些,发生频率也相对高些。Hess等^[30]则以农杆菌注射花期小麦穗的小穗,其后在收获的种子中进行萌发实验,获卡那霉素抗性植株,Southern杂交证实了 *npt II* 基因的整合与稳定遗传。Mooney等^[31]以农杆菌感染部分酶解处理的小麦幼胚,获得少量抗性愈伤组织,遗憾的是没能再生出植株来。Xu等^[32]用多种酚类化合物及双子叶植物的提取液分别对农杆菌进行预处理,然后感染小麦悬浮系细胞,也获得了同 Mooney 等相类似的结果。上述早期实验给了人们以极大的信心和鼓舞。

5. 最近的突破

最近,美国 Monsanto 公司的研究人员采用幼胚或其来源的愈伤组织为材料,感染以非超

毒力型菌株及质粒,成功地再生了抗性植株, Southern 杂交及功能分析证实了 *gus* 及 *npt II* 基因在该小麦基因组中的整合、表达及稳定遗传^[5]。这是目前利用农杆菌法获得小麦转基因植株并且能提供详尽分子检测证据的首篇报道。然而和水稻方面的工作相比,其尚缺少相应的重复实验,并且转化频率也不太理想,仅 0.14% - 4.3%,和基因枪法差不多。除此之外山东大学夏光敏等^[33]也以继代 2 个月到 2 年的 II 型小麦愈伤组织为感染材料,利用根癌农杆菌介导的方法也成功地获得了小麦转基因植株,报道的转化频率为 3.7% - 5.9%,略高于前一实验。这些成功表明,农杆菌法介导的小麦遗传转化在可行性方面已无可质疑了。

目前虽然农杆菌法转化小麦已有成功的报道,但是如何提高转化频率,简化操作程序及增加实验的可重复性将是有待解决的迫切课题。

三、其他方法

目前除了基因枪法和农杆菌法,人们在 PEG^[2] 和转化脂^[3] 介导的小麦原生质体转化法,花粉管通道法^[34-36],激光微束法^[37],电激法^[38] 转化方面也都获得了成功,均再生出了转基因小麦植株。迄今为止,人们已在小麦转化的方法创新与技术完善上作出了广泛的努力,详见表 1。然而和基因枪法、农杆菌法相比,这些方法转化频率也不太高,尚需进一步的改进与完善。

四、转基因在小麦基因组中的整合、表达和稳定遗传

转基因在小麦基因组中的整合情况在已报道的文献中以低拷贝整合为主, T-DNA 区的串联整合以及整合重组是常见的现象^[5-7,39]。

表 1 小麦转化系统研究状况一览表

转化方法	转化材料	外源基因	转化结果	育性	文献
基因枪法	5-7 月龄 C 型愈伤组织	<i>bar, gus</i>	再生植株	杂交可育	6
	诱导 4-22 天的幼胚或其愈伤组织	<i>bar, gus</i>	再生植株	部分自交可育	10
	诱导 5 天的愈伤组织	<i>bar, gus</i>	再生植株	部分自交可育	7
	诱导 2 天的幼胚盾片组织	<i>bar, gus, npt II</i>	再生植株	自交可育	8
	新鲜幼胚	<i>bar, gus</i>	再生植株	自交可育	11
	诱导 5 天的愈伤组织	<i>cp4/gox, gus</i>	再生植株	自交可育	12
	诱导 7-9 天的愈伤组织	<i>hpt, bar, gus</i>	再生植株	自交可育	13
	诱导 1-9 天的幼胚或其愈伤组织	<i>bar, gus</i>	再生植株	自交可育	14
	诱导 5-7 天的愈伤组织	<i>bar, gus</i>	再生植株	自交可育	9
	诱导 3 天的幼胚	<i>npt II, bxn</i>	再生植株	自交可育	15
	诱导 4-6 天的幼胚	<i>bar</i>	再生植株		16
	幼苗生长点	<i>npt II, gus, 慈菇胰蛋白酶抑制剂基因</i>	再生植株		22
	农杆菌法	幼胚或其愈伤组织	<i>npt II, gus</i>	再生植株	部分自交可育
II 型愈伤组织		<i>npt II</i>	再生植株		33
花粉管	正在开花的小花	<i>gus</i>	转化植株		34
通道法	正在开花的小花	BYDV CP 基因	转化植株		35
PEG 法	原生质体	<i>hpt, gus</i>	再生植株		2
转化脂法	原生质体	<i>hpt</i>	再生植株	白化苗	3
激光微束	幼胚	<i>npt II</i>	再生植株		37
穿刺法					
电激法	幼胚	<i>bar</i>	再生植株		38

转基因的表达水平和拷贝数的关系较为复杂,有时单拷贝转基因植株可以具有很高的表达水平,而高拷贝数植株反而表达水平很低^[7,8]。此外也发现具有外源片段整合但却没有相应表达的情况^[8,12],这可能是所谓的转基因沉默或表达水平极低。转基因在后代植株中的分离情况大多符合孟德尔法则^[6,8,11]。

五、转基因技术用于小麦遗传改良方面的前景

高分子量麦谷蛋白是一种重要的小麦种子储存蛋白,它参与面筋的形成并能影响面筋的强度和弹性。高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)有X和Y两种,X和Y序列高度同源,其差异仅在于重复序列长度和N末端片段不同。HMW-GS基因分别位于1A、1B和1D染色体的Glu-1基因座位,其中位于1D染色体上的是Dx5和Dy10基因对。Blech1和Anderson等^[40]利用Dy10基因的N末端及其上游序列和Dx5基因的N末端下游序列构建的嵌合基因转化小麦,在转基因植株的种子中检测到了嵌合基因的表达,发现杂种亚基的含量和天然亚基相近,并且杂种亚基象天然亚基一样能够参与HMW的形成。Barro等^[19]利用了两个近等基因系L88-6和L88-31,L88-6能够表达5个HMW-GS基因(1Ax1,1Bx17+1By18,1Dx5+1Dy10),而L88-31则仅能表达2个HMW-GS基因(1Bx17+1By18),利用1Ax1和1Dx5基因转化这两个近等基因系,发现L88-31转化植株中有些植株1Ax1和1Dx5基因表达接近天然水平,而有些植株的表达则超过了天然水平;用面粉调混性自动记录仪对L88-31转化植株麦粒进行的分析表明MT值和PR值有较大的升高,而RBD值则下降。制做面包要求面粉的MT值和PR值要高而RBD值要低,这说明转基因小麦面粉品质在这方面已经有了一定程度的改善。

HMW-GS基因的转化研究表明,遗传转化技术用于小麦的品质改良等方面是有相当潜力

的,今后应该多开展一些此类研究。

六、结 语

遗传转化技术用于小麦等粮食作物,其根本目标在于改良品质、增加产量和提高抗逆性。要实现这些目标还需要一系列技术方面的突破,这些技术主要涉及以下四个方面。首先是如何降低转基因拷贝数的问题,因为与高拷贝数相应的多位点整合易引发预料不到的突变发生。其次是如何实现外源基因在小麦植株中的组织特异性和诱导性表达的问题,外源基因的组成型表达在大多数情况下是不必要和无益的,而构建组织特异性和诱导性表达载体(如叶和茎特异性表达启动子驱动的抗虫抗病基因,只能在小麦叶和茎中表达而不能在种子中表达),则常常更能满足需要。再次是如何消除转基因植株中的筛选标记基因的问题,作物尤其是小麦这样的种植范围极广的粮食作物,其生物安全性方面的考虑便首当其冲,因而发展一套消除转基因植物中的筛选标记基因的技术将是十分必要和迫切的。最后是如何发展小麦叶绿体转化系统的问题,外源基因插入叶绿体基因组而不是核基因组的遗传转化目前已在烟草上取得了成功^[41]。再生的烟草植株外源基因拷贝数极高(5000-10000个),表达水平则达相应核基因组插入植株的10倍以上;此外由于母性遗传的原因,该植株也可以避免由花粉引起的外源基因扩散至别的植物的问题。由于这些优点,发展小麦的叶绿体转化系统便显得十分必要和富于吸引力了。

展望未来,由于遗传转化技术和目标片段克隆两方面的快速发展,相信植物基因工程技术用于小麦等粮食作物的遗传改良当为时不远。

参 考 文 献

- [1] Harris R. et al., 1988, *Plant Cell Reports*, 7: 337.
- [2] 郭光沁等, 1993, *科学通报*, 38: 1227.
- [3] 朱楨等, 1993, *生物工程学报*, 9: 320.
- [4] Woolston C. J. et al., 1988, *Plant Mol Biol*, 11:

- 35.
- [5] Cheng M. et al., 1997, *Plant Physiology*, **115**: 971.
- [6] Vasil V. et al., 1992, *Biotechnology*, **10**:667.
- [7] Weeks J. T. et al., 1993, *Plant Physiology*, **102**: 1077.
- [8] Nehra N. S. et al., 1994, *The Plant Journal*, **5**: 285.
- [9] Altpeter F. et al., 1996, *Plant Cell Reports*, **16**: 12.
- [10] Vasil V. et al., 1993, *Biotechnology*, **11**:1553.
- [11] Becher D. et al., 1994, *The Plant Journal*, **5**:299.
- [12] Zhou H. et al., 1995, *Plant Cell Reports*, **15**:159.
- [13] Ortiz J. P. A. et al., 1996, *Plant Cell Reports*, **15**: 877.
- [14] Takumi S. et al., 1996, *Journal of Plant Physiology*, **149**:418.
- [15] 王小军等, 1996, *植物学报*, **38**:942.
- [16] 黄粤等, 1997, *西北植物学报*, **17**:142.
- [17] Klein T. M. et al., 1988, *Biotechnology*, **6**:559.
- [18] Daines R. J., 1990, *BioLyctic Systems Newsletter*, **1**:1.
- [19] Barro F. et al., 1997, *Nature Biotechnology*, **15**: 1295.
- [20] Vain P. et al., 1993, *Plant Cell Reports*, **12**:84.
- [21] Roland B. 1993, *Plant Journal*, **4**:735.
- [22] 杜立群等, 1996, *植物学报*, **38**:921.
- [23] Grimsley N. H. et al., 1987, *Nature*, **325**:177.
- [24] Grimsley N. H. et al., 1988, *Biotechnology*, **6**:185.
- [25] Graves A. E. et al., 1988, *J. Bacteriol.*, **170**: 2395.
- [26] Mooney P. A. et al., 1991, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **25**:199.
- [27] Usami S. et al., 1987, *Mol Gen Genet*, **209**:221.
- [28] Usami S. et al., 1988, *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**:3748.
- [29] 邓万银等, 1989, *中国科学 B 辑*, **2**:171.
- [30] Hess D. et al., 1990, *Plant Sciences*, **72**:233.
- [31] Moony P. A. et al., 1991, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **25**:209.
- [32] Xu Y. et al., 1993, *Cell Research*, **3**:49.
- [33] 夏光敏等, 1999, *植物生理学报*, **25**:22.
- [34] 曾军祉等, 1993, *中国科学 B 辑*, **3**:256.
- [35] 成卓敏等, 1993, *自然科学进展—国家重点实验室通讯*, **3**:560.
- [36] 郭亮等, 1997, *遗传学报*, **24**:255.
- [37] 王兰岚等, 1995, *遗传学报*, **22**:394.
- [38] 柯遐义等, 1997, *武汉植物学研究*, **15**:103.
- [39] Srivastava V. et al., 1996, *Theor. Appl. Genet.*, **92**:1031.
- [40] Blechl A. E. et al., 1996, *Nature Biotechnology*, **14**:875.
- [41] Daniell H. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 345.

研究工作

逆转录病毒介导的人血小板生成素(TPO)在骨髓基质细胞中的表达

张毅 唐佩弦 李秀森 江飞子 毛宁

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

人血小板生成素(Thrombopoietin, TPO)是近年发现的对早期造血具有重要调控作用的细胞因子,其主要生物活性表现为维持巨核细胞增殖与分化及有功能血小板的形成,并可促进造血干/祖细胞(CD34⁺细胞)的增殖和分化^[1,2]。骨髓基质细胞作为造血微环境中的主要成分,对CD34⁺细胞的增殖与分化同样具有调节作用^[3]。鉴于基质细胞与TPO对CD34⁺细胞的作用特点,我们利用逆转录病毒介导TPO基因在人骨髓基质细胞系中表达,进一步研究转基因骨髓基

质细胞对CD34⁺细胞的体外扩增的影响及为基因治疗提供基础实验资料。

材料与方 法

1. 质粒与细胞系

人全长TPO cDNA和逆转录病毒载体质粒均由本室构建与保存。PA317细胞和

本文1999年4月28日收到,7月5日接受。

本课题为国家863高科技技术重点课题基金(BH-030501)和全军95重点课题基金资助。