

基于 ITS2 条形码鉴定水红花子及其混伪品

任 莉 辛天怡 郭梦月 姚 辉 庞晓慧

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京,100193)

摘要 目的:利用 ITS2 条形码对中药材水红花子及其混伪品进行鉴定研究。方法:为对该中药材进行准确鉴定,共收集 71 份样本,包含药材正品及其混伪品。通过对样品进行 DNA 提取、PCR 扩增、双向测序,利用 CodonCode Aligner 软件进行序列质量评价与拼接,获得 ITS2 序列。用 MEGA 软件进行序列比对、变异位点及遗传距离分析,采用最近距离法和构建 NJ(邻接)树法来评价 ITS2 条形码的鉴定能力。结果:水红花子药材基原物种红蓼 ITS2 序列种内遗传距离为 0~0.0124,与其混伪品水蓼、酸模叶蓼以及春蓼的种间遗传距离分别为 0.0334~0.0508、0.0688~0.0875、0.0379~0.0467。红蓼种内最大遗传距离小于其与混伪品的种间最小遗传距离,表明 ITS2 条形码可以准确鉴定水红花子与其混伪品。此外,基于 ITS2 序列构建的 NJ 树也可将水红花子及其混伪品明显区分开。结论:ITS2 条形码是鉴别水红花子药材的有效工具,可为保障该药材生产投料安全提供新的技术手段。

关键词 水红花子;DNA 条形码;ITS2;分子鉴定

Identification of *Polygoni Orientalis Fructus* and its adulterants using ITS2 barcode

Ren Li, Xin Tianyi, Guo Mengyue, Yao Hui, Pang Xiaohui

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract Objective: The ITS2 barcode was used to identify *Polygoni Orientalis Fructus* and its adulterants in this study. **Methods:** For the accuracy of the identification, a total of 71 samples from *Polygoni Orientalis Fructus* and its adulterants were collected. The DNA was extracted from the samples and the ITS2 regions were amplified and sequenced. The sequences were then assessed and assembled using the CodonCode Aligner. The genetic distances and variable sites of ITS2 region were analyzed using MEGA after sequence alignment. Nearest distance and phylogenetic tree(NJ-tree) methods were used to test the identification efficiency of the ITS2 barcode. **Results:** The intraspecific genetic distances of *Polygonum orientale* were 0~0.0124, while the interspecific genetic distances between *P. orientale* and its adulterants were 0.0334~0.0508, 0.0688~0.0875 and 0.0379~0.0467, respectively. The maximum intraspecific genetic distance of *P. orientale* was lower than the minimum interspecific genetic distance between *P. orientale* and its adulterants, which showed that ITS2 barcode could discriminate *P. orientale* and its adulterants accurately. Besides, the NJ tree based on ITS2 sequences supported that *P. orientale* and its adulterants can be easily differentiated. **Conclusion:** The ITS2 barcode is an effective tool for the identification of *P. orientale* and its adulterants. Our study may provide a new technique to ensure the production feeding security of traditional Chinese medicine.

Key Words *Polygoni Orientalis Fructus*; DNA barcoding; ITS2; Molecular identification

中图分类号:R282.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.007

水红花子为蓼科蓼属植物红蓼 *Polygonum orientale* L. 的干燥成熟果实,具有散血消症、消积止痛、利水消肿等功效^[1]。现代药理研究表明水红花子具有抗氧化、抗肿瘤、抗心肌缺血等作用^[2-7],临床上可用于治疗胃癌、肠癌、肝癌、胃痛、糖尿病等^[8-9]。红蓼的全草、花序、果实和根均可入药^[10]。除具有重要药用价值外,红蓼还可食用,并有望被制成杀虫剂与吸附剂^[11-15],具有重要开发价值。然而,由于其同

属物种形态特征高度相似、地方习用品广泛存在,使其混伪现象严重,常见的混伪品有水蓼 *P. hydropiper* L.、酸模叶蓼 *P. lapathifolium* L. 以及春蓼 *P. persicaria* L.^[4]等,为其质量控制以及深入研究带来了困难。因此,为保障水红花子的用药安全以及进一步研究开发的顺利进行,需要一种快速、准确的方法对其进行鉴定。

DNA 条形码是利用相对较短的、标准的 DNA 片

基金项目:重大新药创制国家科技重大专项“中药新药安全性检测技术与标准研究”(编号:2014ZX09304307001);国家科技支撑计划(编号:2011BAI07B08)

作者简介:任莉,在读硕士研究生,E-mail:renliwangyi@163.com

通信作者:庞晓慧,博士,副研究员,主要研究方向:中药分子鉴定研究,Tel:(010)57833051,E-mail:xhpang@implad.ac.cn

段来进行物种鉴定的一项新的分子鉴定技术,是近年来的研究热点^[16]。Chen 等^[17] 比较了 7 个候选 DNA 条形码 (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, ITS2, ITS) 对药用植物鉴定的有效性,发现 ITS2 序列的物种水平鉴定效率达到 92.7%,首次提出以 ITS2 为核心, *psbA-trnH* 为补充序列的药用植物条形码鉴定体系。随后,ITS2 条形码被广泛应用于中药材鉴定^[18-31],并建立以 ITS2 为主体的中药材鉴定体系和网络鉴定数据库(<http://www.tcmbarcode.cn>),该鉴定体系现已纳入《中华人民共和国药典》^[32]。我们利用 ITS2 条形码对水红花子药材进行鉴定研究,拟解决该药材的真伪鉴别问题,为保障水红花子用药安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究共收集实验材料 71 份。其中水红花子样本 44 份,包含药材样本 29 份,原植物样本 15 份;其混伪品样本 27 份,包含酸模叶蓼 18 份,春蓼 9 份。样品采自北京、吉林、四川、上海、福建、浙江等地,凭证标本经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员及通化师范学院于俊林教授鉴定,并保存于中国医学科学院药用植物研究所。另外,从 GenBank 下载 ITS2 序列 5 条,分别为酸模叶蓼 1 条,水蓼 4 条。样本信息详见表 1。

表 1 样品信息				
样本名	拉丁名	凭证样本号/ GenBank 登录号	样本来源	采样 部位
红蓼	<i>Polygonum orientale</i>	YC0168MT01	河北安国药材市场	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT02	安徽亳州药材市场	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT03	药用植物研究所	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT04 ~ 05	河北安国药材市场	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT06 ~ 07	安徽亳州药材市场	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT08 ~ 16	吉林省通化市	叶片
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT17	四川成都荷花池药市	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT18 ~ 19,26	北京	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT20 ~ 25	北京	叶片
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT27,40	广东省广州市	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT28	河南孟州	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT29 ~ 30	福建莆田	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT31	吉林省通化市	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT32 ~ 33	四川省宜宾市	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT34 ~ 36	浙江省湖州市	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT37 ~ 38	河南郑州	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT39,43	上海	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT41 ~ 42	浙江省湖州市	果实
红蓼	<i>P. orientale</i>	YC0168MT44	药用植物园	果实
水蓼	<i>P. hydropiper</i>	JQ288748	GenBank	/
水蓼	<i>P. hydropiper</i>	JX144666	GenBank	/
水蓼	<i>P. hydropiper</i>	KJ939173	GenBank	/
水蓼	<i>P. hydropiper</i>	EU196884	GenBank	/
酸模叶蓼	<i>P. lapathifolium</i>	YC0845MT01 ~ 18	吉林省通化市	叶片
酸模叶蓼	<i>P. lapathifolium</i>	HM357908	GenBank	/
春蓼	<i>P. persicaria</i>	YC0844MT01 ~ 09	吉林省通化市	叶片

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 分别取水红花子药材样本约 40 mg(适当粉碎,加入样本量 10% 的 PVP-40),硅胶干燥的基原植物叶片约 20 mg,均用 DNA 提取研磨仪 (Retsch MM400, Germany) 研磨 2 min (30 次/s) 后,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 采用 ITS2 序列通用引物,正向 ITS2F:5'-ATCGGATACTTGGTGTGAAT-3',反向 ITS3R:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。扩增体系及程序参照“中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则”^[32]。PCR 扩增产物委托上海美吉测序公司进行双向测序。

1.2.3 数据处理 测序峰图利用 CodonCode Aligner V3.7.1 (CodonCode Co., USA) 校对拼接,去除引物区。将所获序列及 GenBank 下载序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 28 S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[33]。将所有序列用软件 MEGA5.1 分析比对^[34],并基于 K2P 模型进行遗传距离分析,用邻接 (NJ) 法构建系统聚类树,利用 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 水红花子及其混伪品 ITS2 序列特征 水红花子基原物种红蓼 44 条 ITS2 序列的长度为 245 bp, GC 含量为 66.9% ~ 67.8%。红蓼序列间存在 3 个变异位点,分别为 73 位点 A-G 变异,133 位点 C-T 变异,228 位点 G-A 变异,分为 6 个单倍型。混伪品水蓼、酸模叶蓼以及春蓼 ITS2 序列长度分别为 245 bp、250 bp 和 245 bp, GC 含量为 66.1% ~ 68.0%。红蓼与水蓼、酸模叶蓼以及春蓼 ITS2 序列间存在较多的变异位点,详见图 1。

表 2 水红花子种内及与其混伪品种间 K2P 遗传距离	
样品	K2P 遗传距离
红蓼种内	0 ~ 0.0124
红蓼与水蓼种间	0.0334 ~ 0.0508
红蓼与酸模叶蓼种间	0.0668 ~ 0.0875
红蓼与春蓼种间	0.0379 ~ 0.0467

2.2 水红花子及其混伪品种内及种间遗传距离分析 将红蓼的 ITS2 序列进行遗传距离分析,种内最小遗传距离为 0,最大遗传距离为 0.0124。水蓼、酸模叶蓼以及春蓼 ITS2 序列种内遗传距离分别为 0 ~ 0.0292,0 ~ 0.0040 和 0。红蓼与水蓼,红蓼与酸模叶蓼以及红蓼与春蓼之间的遗传距离分别为 0.0334

~0.0508、0.0668 ~0.0875、0.0379 ~0.0467。红蓼与其混伪品种间最小遗传距离大于红蓼种内最大遗传距离,说明采用 ITS2 序列可以将水红花子与其混伪品准确区分开。

2.3 构建 NJ 树鉴别水红花子及其混伪品从基于

ITS2 序列构建的 NJ 树图(图 2)可以看出,红蓼单独聚为一支,支持率为 87%,表现出单系性。混伪品水蓼、酸模叶蓼及春蓼各自聚为一支,明显与红蓼分开。因此,ITS2 条形码可准确鉴别水红花子药材及其混伪品。

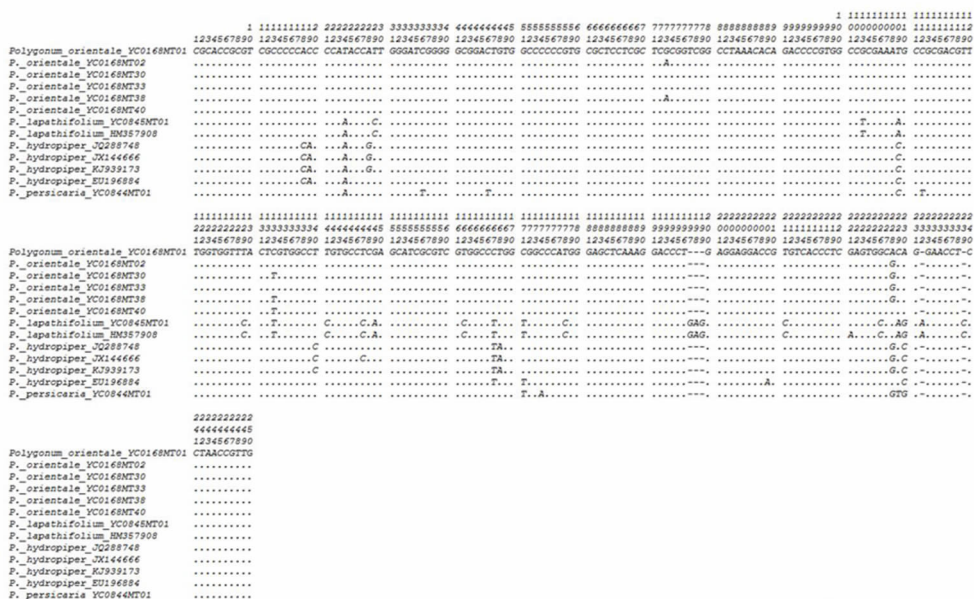


图 1 水红花子及其混伪品 ITS2 序列种间变异位点信息

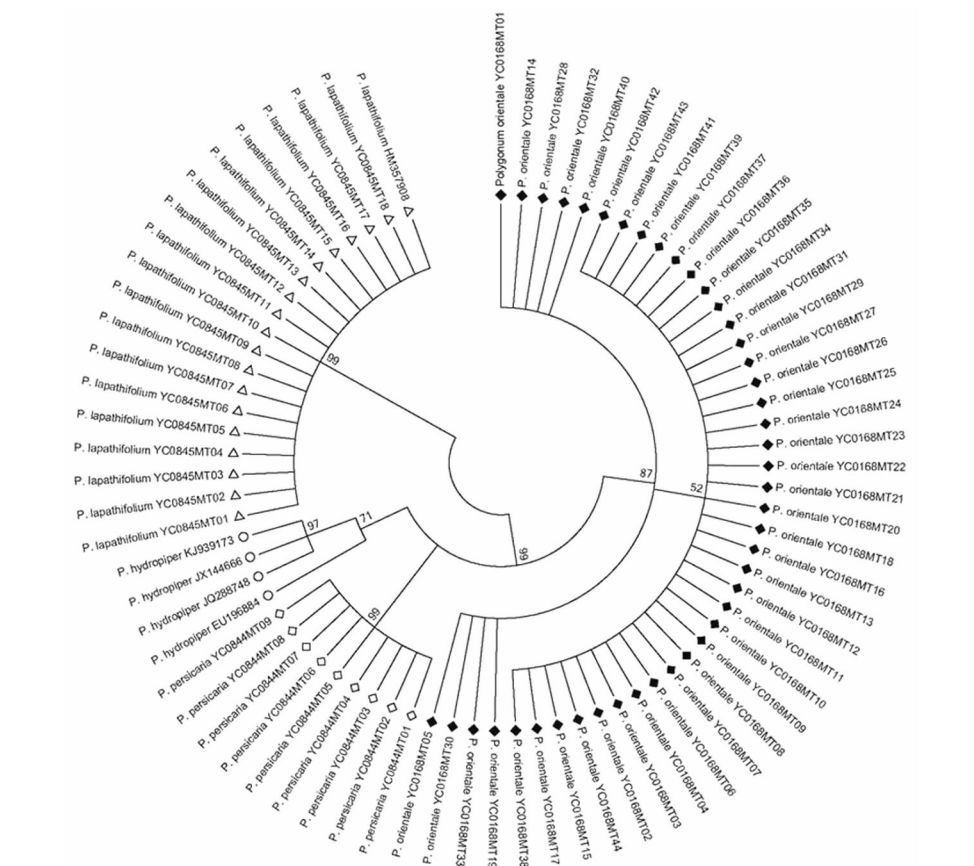


图 2 基于 ITS2 序列构建的水红花子及其混伪品 NJ 树

注:Bootstrap 1 000 次重复,支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。

3 讨论

3.1 水红花子药材样本亦可成功获得 ITS2 序列

DNA 条形码技术有望实现对物种进行快速、准确、自动的识别和鉴定,在物种鉴定方面显示了广阔的应用前景,因此一经提出便受到了广泛关注。然而,由于加工、炮制、贮藏时间长等因素,常常导致中药材 DNA 降解严重,是否能成功获得条形码序列是很多专家关注的问题。研究表明许多中药材可成功获得条形码序列,如木香类药材^[18]、党参^[19]、柴胡^[20]、羌活^[21]、大青叶^[22]、人参^[23]、合欢花^[24]、合欢皮^[24]、五加皮^[25]、红景天^[26]、枸杞子^[27]、秦艽^[28]等。本研究中在提取水红花子药材样本的 DNA 时,增加了取样量(40 mg),是叶片样本用量的两倍,并且在研磨前加入样本量 10% 的 PVP-40,结果 PCR 产物电泳后条带单一明亮,所有样本均可成功获得 ITS2 序列。据报道一些药材样品 DNA 降解特别严重,提取到的 DNA 经电泳后条带呈弥散状态,甚至有少数是不可见的,但 PCR 产物电泳后可显示出条带,并能成功测序^[20-21,24]。就其原因,主要是 ITS2 序列较短,且在基因组内为多拷贝,降低了扩增和测序的难度,有利于鉴定 DNA 降解的药材样品,对于中药材 DNA 鉴定具有重要实践意义。

3.2 ITS2 条形码是准确鉴定水红花子药材的好工具 鉴于 ITS2 序列具有较强的鉴定能力,Chen 等提出将其作为药用植物鉴定的标准条形码^[17],并将其推广应用于中药材鉴定研究中。罗焜等运用 ITS2 条形码对药材秦艽进行了鉴定研究,结果显示 ITS2 序列可有效鉴定秦艽药材及其混伪品^[28]。辛天怡等研究了 ITS/ITS2 条形码对羌活药材鉴定的稳定性与准确性,结果表明 ITS/ITS2 序列可稳定、准确地鉴别羌活药材^[21]。赵莎等应用 ITS2 序列对中药材五加皮及其混伪品进行鉴定研究,发现 ITS2 条形码可准确鉴别五加皮及其混伪品^[25]。本研究应用 ITS2 条形码对水红花子进行鉴定研究。为确保研究的准确性和可重复性,收集了大量样本(共 71 份),其中水红花子正品样本 44 份,包含药材样本 29 份。通过对水红花子基原植物红蓼 44 条 ITS2 序列进行种内变异分析,发现红蓼 ITS2 序列种内遗传距离较小。种间变异分析表明红蓼与其混伪品 ITS2 序列间的遗传距离较大。红蓼与其混伪品种间最小遗传距离大于红蓼种内最大遗传距离。另外,从基于 ITS2 序列构建的 NJ 树可看出红蓼单独聚为一支,明显与其混伪品分开。因此,本研究显示 ITS2 条形码能够稳定、准确地鉴别水红花子药材及

其混伪品,是鉴定水红花子的好工具。

3.3 运用 DNA 条形码技术鉴定中药材具有重要实践价值 近年来,随着分子生物学技术的迅猛发展,促进了 DNA 分子标记鉴定技术的诞生,目前已在中药鉴定领域中广泛应用,推动着中药鉴定技术不断进步和完善。DNA 条形码是目前国际上物种鉴定的最新技术,与其他分子鉴定方法相比具有如下优势:鉴定结果可重复性良好;方法通用性强;可构建统一数据库和鉴定平台,易于推广和标准化^[35]。目前该技术已在中药材鉴定领域广泛应用,大大加快了中药鉴定标准化的进程。水红花子为我国传统中药,据报道其同属植物酸模叶蓼、春蓼、水蓼等在不同地区被作为水红花子入药,严重影响其药材品质及疗效^[4]。由于水红花子的混伪品来自同属近缘植物,药材形态近似,采用传统的鉴定方法通常会较为困难,只有具备丰富鉴别经验的专业人员才能准确地识别出混伪品,因此建立有效的水红花子鉴定方法十分必要。本研究采用 ITS2 条形码对其进行鉴定,可以准确便捷地鉴别水红花子与其混伪品,为水红花子药材的准确客观鉴定提供了新的技术手段。DNA 条形码技术不仅可解决中药材的鉴定问题,而且非专业分类人员通过 DNA 条形码鉴定体系也可准确鉴定药材的正品及混伪品。鉴于 DNA 条形码技术的诸多优势,必将在今后的中药材鉴定、流通管理以及药材市场监管等领域发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 版(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:83.
- [2] 张振明,雷晓燕,许爱霞,等. 水红花子醇提物的抗脂质过氧化作用[J]. 中国药理学杂志,2005,40(13):991-993.
- [3] Wei Y, Chen X Q, Jiang X Y, et al. Determination of taxifolin in Polygonum orientale and study on its antioxidant activity[J]. J Food Compos Anal, 2009, 22(2):154-157.
- [4] 翟廷君. 水红花子质量标准规范化研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2005.
- [5] 程飞. 水红花子药效学及毒性实验研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2011.
- [6] 沈祥春,陶玲,王永林,等. 注射用复方荭草冻干粉针剂对麻醉犬实验性心肌梗塞的保护作用[J]. 时珍国医国药,2007,18(3):539-541.
- [7] 陶玲,沈祥春,王永林,等. 注射用复方荭草冻干粉针剂对兔离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药,2006,17(9):1650-1652.
- [8] 沈丕安. 中药药理与临床运用[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:924-925.
- [9] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京:科学出版社,1977:282.
- [10] 杨志云,秦民坚,钱士辉. 红蓼研究进展[J]. 中国野生植物资源

- 源,2008,27(1):11-15.
- [11]刘娟,刘程诚,关力.红蓼的开发利用及研究进展[J].黑龙江医药,2012,25(4):542-544.
- [12]李秀岚,李友莲.红蓼提取物对桃蚜拒食活性及触角电位的研究[J].山西农业大学学报,2005,25(3):228-230.
- [13]胡冠芳,刘敏艳,沈慧敏,等.红蓼提取物对 13 种农业害虫触杀活性的研究[J].草业学报,2011,20(4):229-235.
- [14]Wang L,Zhang J,Zhao R,et al. Adsorption of basic dyes on activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn;Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies[J]. Desalination,2010,254(1-3):68-74.
- [15]Wang L,Zhang J,Zhao R,et al. Adsorption of 2,4-dichlorophenol on Mn-modified activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn[J]. Desalination,2011,266(1-3):175-181.
- [16]Chen S L,Pang X H,Song J Y,et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv,2014,32:1237-1244.
- [17]Chen S L,Yao H,Han J P,et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One,2010,5(1):e8613.
- [18]马晓冲,姚辉,邬兰,等.木香、川木香、土木香、青木香和红木香药材的 ITS2 条形码分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2169-2175.
- [19]赵莎,辛天怡,侯典云,等.党参药材及其混伪品的 ITS/ITS2 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2013,15(3):421-428.
- [20]于俊林,赵莎,任明波,等.基于 ITS2 条形码鉴定柴胡与大叶柴胡[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2160-2163.
- [21]辛天怡,姚辉,罗焜,等.羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究[J]. 药理学学报,2012,47(8):1098-1105.
- [22]孙稚颖,庞晓慧.基于 DNA 条形码技术探讨板蓝根及大青叶基原物种问题[J]. 药理学学报,2013,48(12):1850-1855.
- [23]Chen X C,Liao B S,Song J Y,et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding[J]. Gene,2013,530:39-43.
- [24]赵莎,庞晓慧,宋经元,等.应用 ITS2 条形码鉴定中药材合欢皮、合欢花及其混伪品[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2164-2168.
- [25]Zhao S,Chen X C,Song J Y,et al. Internal transcribed spacer2 barcode;a good tool for identifying *Acanthopanax cortex* [J]. Front Plant Sci,2015,6:840.
- [26]Xin T Y,Li X J,Yao H,et al. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues [J]. Sci Rep,2015,5:8337.
- [27]Xin T Y,Yao H,Gao H H,et al. Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode [J]. Food Res Int,2013,54:1699-1704.
- [28]罗焜,马培,姚辉,等.多基原药材秦艽 ITS2 条形码鉴定研究[J]. 药理学学报,2012,47(12):1710-1717.
- [29]Xiang L,Song J Y,Xin T Y,et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. FEMS Microbiol Lett,2013,347:156-162.
- [30]Pang X H,Shi L C,Song J Y,et al. Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials[J]. J Nat Med,2013,67:571-575.
- [31]Hou D Y,Song J Y,Yao H,et al. Molecular identification of *Corni Fructus* and its adulterants by ITS/ITS2 sequences[J]. Chin J Nat Med,2013,11(2):121-127.
- [32]陈士林,姚辉,韩建萍,等.中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):141-148.
- [33]Keller A,Schleicher T,Schultz J,et al. 5. 8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430:50-57.
- [34]Tamura K,Peterson D,Peterson N,et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol,2011,28(10):2731-2739.
- [35]陈士林,郭宝林,张贵君,等.中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1043-1055.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 780 页)

- [15]张改霞,金钱,贾静,等.药用植物羌活种子 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):390-395.
- [16]辛天怡,李西文,姚辉,等.中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究[J]. 中国科学:生命科学,2015,45(7):695-702.
- [17]张宇,郭良栋.真菌 DNA 条形码研究进展[J]. 菌物学报,2012,31(6):809-820.
- [18]周均亮,赵瑞琳.真菌 DNA 条形码技术研究进展[J]. 微生物学通报,2013,40(8):1468-1477.
- [19]KEITH A. SEIFERT. Progress towards DNA barcoding of fungi[J]. Molecular Ecology Resources,2009,9(1):83-89.
- [20]Dentinger BT,Didukh MY,Moncalvo JM. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and Allies (Agaricomycotina) [J]. PLoS One,2011,6(9):e25081.
- [21]周爱东,吴小芹,王明生,等.彩色豆马勃硝酸还原酶基因克隆与序列分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2013,37(6):22-26.
- [22]刘信奎,孙伟,矫明昭.中药饮片马勃质量标准的改进[J]. 中国保健营养,2012(7):241.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)