

AFLP 及其在果树中的应用

刘 成¹, 李俊才¹, 许雪峰², 李天忠², 韩振海²

(1. 辽宁省果树科学研究所, 熊岳 115009; 2. 中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

摘 要:通过对 AFLP 技术(扩增片段长度多态性)的基本原理、技术特点的介绍,综述了利用 AFLP 标记技术开展果树遗传图谱构建、指纹图谱绘制与品种鉴定、遗传多样性分析及基因定位等方面的研究。

关键词: AFLP 技术; 果树; 应用

中图分类号: Q 75; S 66 **文献标识码:** A **文章编号:** 100—0009(2007)03—0059—04

AFLP 技术(Amplified Fragment Length Polymorphism 扩增片段长度多态性),是 1993 年由荷兰 KEY-GENE 公司的科学家 Zabeau 和 Vos 创建发展的一种新的 DNA 分子标记技术及检测 DNA 多态性的新方法,并于 1993 年获得欧洲专利局专利^[1]。AFLP 技术是限制性片段长度多态性(RFLP)和聚合酶链式反应(PCR)技术相结合的产物,可用于所有物种^[2]。它克服了 RFLP 技术复杂、RAPD 稳定性较差的缺点,又兼具两者之长。AFLP 标记多态性强,谱带丰富且清晰可辨,试验结果稳定,重复性好,被认为是一种较为理想的、高效的分子标记技术^[3]。近年来,人们将这一技术不断发展、完善,使之成为应用广泛的分子标记技术^[4]。目前,不仅在水稻、玉米、小麦、大豆、棉花等主要农作物上得以应用,而且在苹果、桃、葡萄等果树中也得到较广泛应用^[5]。

AFLP 技术的基本原理是通过基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择性扩增而揭示其多态性^[4,5],亦即将基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子大小不等的限制性酶切片段,酶切后的 DNA 片段连上接头形成带接头的特异片段,作为 PCR 扩增的模板,特异性片段经 PCR 扩增,只有那些与引物的选择性碱基严格配对的 DNA 片段才能被扩增出来;扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳将特异的限制性片段分离^[5]。

AFLP 技术的特点是 DNA 用量少、灵敏度高,不需要预先知道基因组的信息。一般一次反应可得到 50~150 个扩增片段,尽管其多态性不一定是最高的,但一次试验能比其它标记得到更多数量的带,被认为是效率最高的标记。AFLP 采用长引物和更高的退火温度进行 PCR,比 RAPD 等其他以 PCR 为基础的分子标记具有更好的重复性^[2,6,7,8]。

和其他分子标记技术一样, AFLP 技术在果树上得到了较广泛的应用。利用 AFLP 标记技术开展了果树遗传连锁图谱构建、指纹图谱绘制与品种鉴定、遗传多样性分析及基因定位等方面的研究。

1 遗传连锁图谱的构建

果树遗传高度杂合,且大多数自交不亲和,所以很难获得纯系,也就难以获得合适的群体。果树作物的遗传图谱发展迅速主要得益于“双假测交”(double pseudotestcross)理论的提出和分子标记技术的发展。就果树植物而言,由于世代周期长、单位面积种植的植株数目少,要得到表现个体间差异的、有一定数目的高世代群体很难,加之有些果树存在严重自交退化现象,因而也很难获得一定数量的自交纯系^[9]。由于果树长期进化及长期人工选择并利用无性繁殖方式,果树育种的杂交亲本均保持了高度的杂合性,其基因型在 F₁ 代出现 1:1 的分离比例,与测交效果相一致,但因亲本之一并非纯合隐性,且这种利用亲本杂交获得的 F₁ 群体与测交有着本质不同,因而定名为“假测交”,“双”的意思是双亲均为杂合体,这样的双亲相互杂交,后代的遗传表现与测交试验表现相似。“双假测交”理论由 Weeden 和 Hemmat 等首先提出,并在实践中加以应用^[10]。通过这种方法,Weeden 等在苹果上构建了分别拥有 233 个和 156 个分子位点的连锁图,前者含 24 个连锁群体共计 950cM,后者含 21 个连锁群^[11]。随后人们用相似的方法在柑橘^[12]、核果类(如樱桃、桃、李、杏)^[13,14]、葡萄^[15]等果树上进行了遗传作图研究。

目前,苹果、桃、柑橘、梨、葡萄、香蕉等主要果树作物都具有了遗传连锁图谱。AFLP 标记在基因组中随机分布,也易于获得大量的标记用于后代的分离分析,因而适合于构建高密度遗传图谱。在 RFLP 遗传图上, AFLP 标记可增加染色体末端标记和填充 RFLP 空隙,不干扰 RFLP 标记簇,对进一步饱和作图具有重要作用。Lu 等^[16]用一个 F₂ 群体构建了桃砧木 AFLP 遗传

第一作者简介:刘成,男,1966 年生,硕士,副研究员,主要从事梨育种和栽培。

收稿日期:2006—12—26

连锁图 153 个标记, 分布在 15 个连锁群, 覆盖 1 297 cm, 平均图距 9.1 cm。房经贵等^[17] (2000) 的研究结果表明, AFLP 标记在两个芒果品种 (Keitt×Tommy) 杂交 F₁ 代呈孟德尔分离的标记占 53.99%, 适合于进一步构建遗传连锁图。在不同基因型和作图群体中, AFLP 标记的同源性得到一定程度的证实^[18], 因而在整合遗传连锁图谱上潜力很大, Sosinski 等^[9] (1998) 整合了桃的来自 3 个不同群体的遗传图谱, 其中主要是 AFLP 标记。

Maliepaard 等^[20] 于 1998 年发表了最新的苹果基因组连锁图, 他们以苹果品种间的杂交组合“Prima×Fiesta”及其 152 株杂交后代为群体, 用 RFLP、RAPD、AFLP、SCAR、SSR 及同工酶等标记构建了双亲的连锁图谱。每一亲本得到 17 个连锁群, 推测与苹果染色体组的 17 条染色体相对应, 这两张图由 67 个在双亲上都表现杂合的多位点标记整合到一起; 图谱中含有大量的可重复的 RFLP 位点, 有时在一个连锁群上连锁的 RFLP 标记在另一个连锁群上也表现相对应的连锁关系。较高的标记密度和大量的 RFLP 与 SSR 共显性标记使得这张图成为一个理想的参考图谱, 可用于其他群体, 也可作为数量性状位点定位的一个有价值的工具。

Dirlwanger 等^[21] 1998 年发表了最新的桃基因组遗传连锁图, 他们以 1 株来自桃品种间的杂交组合“Ferjalou Jalousia×Fantasia”的 F₁ 代个体自花授粉所产生的 63 株 F₂ 代个体为作图群体, 用 RFLP、RAPD、IMA、AFLP、同工酶标记及农艺性状标记构建了桃的连锁图谱。249 个标记分布在 11 个连锁群上, 覆盖基因组长度为 712 cm, 标记间的平均距离为 4.5 cm, 认为该图可作为数量性状位点定位的一个有价值的工具。

在以前的遗传图谱基础上, 增加 AFLP 等标记, 使遗传图谱的标记密度更高, 间距更小, 如葡萄、柑橘、椰子等^[22-24]。Vilanova 等^[25] (2003) 利用“Stark Early Orange”和“Tyrinthos”杂交 F₁ 代的 76 个自交 F₂ 代进行了 SSR 和 AFLP 标记, 建立了与抗李茎痘病毒 (plum pox virus, PPV) 和自花结实性状的基因连锁图谱。

Peters 等^[26] 在模拟植物拟南芥建立了基于 AFLP 的基因组图谱方法, 对今后利用 AFLP 构建遗传图谱提供了有效的方法。

2 果树指纹图谱的建立和品种鉴定

品种鉴定是分子标记技术在果树上应用最多的领域。果树多用无性繁殖, 个体差异不甚明显, 新老品种数量繁多, 加之各地交流频繁, 极易造成同物异名或同名异物现象, 传统的鉴别方法分辨率不高。AFLP 检测的位点数多, 保证了其鉴定的高度准确性, 因而被公认为园艺作物建立指纹图谱效率最高的标记。使用 AFLP 分子标记技术鉴别果树品种, 在理论和实践上均有重要意义。

祝军等^[27] 从 68 对引物中筛选出 4 对多态性高、分辨率强的引物, 分析了 P32M46 引物绘制的 25 个苹果重要品种 AFLP 指纹图谱的遗传多样性, 区分了供试的 25 个苹果品种, 其中包括红富士—短枝红富士、金冠—金矮生、元帅—新红星和旭—威赛克 4 对突变系品种。祝军等^[28] 还用 P44M64 引物构建了 5 个苹果矮化砧木 (M₇、M₉、M₂₆、M₂₇ 和 M₁₀₆) 的基因型指纹图谱, 发现各基因型扩增带型互不相同, 可一一分开, 且各基因型分别拥有自己的特征带。Cervera^[29] (1998) 根据 T 葡萄品种 AR—41T、OR—05G 与 R—B 在 108 个位点上的标记基因型相同, 认为 3 者是同物异名, 此判断出现误差的概率是 10⁻²¹。张璐生等^[30] 利用 AFLP 建立了清晰的猕猴桃的指纹图谱。

2002 年, 于晓英等^[31] 采用 AFLP 标记对 35 份香蕉种质材料进行了分析, 结果表明, 在引物对 E-ACC/ 有差异带或特异带, 滑蕉、龙选、东 SM-CTA 和 E-ACC/M-CAG 构建的香蕉指纹图谱中, 供试的材料都 1、海红、泰国蕉等品种的特征带尤为明显, 并鉴定出几内亚、苹果以及阳江矮等 3 份种质材料实际上为同一个品种。此外, AFLP 标记技术还应用于芒果、枣、桃等果树树种的品种鉴定中^[32-34]。Geuna 等^[35] 用 5 对引物对 118 个杏品种进行 AFLP 标记, 确认这些杏来自 4 个不同地区。

3 果树种质资源遗传多样性和亲缘关系的研究

多样性的种质资源是果树育种的前提和重要保证, 而分子标记是检测种质资源遗传多样性的有效工具。AFLP 标记是进行种质亲缘关系分析和检测种质多样性的有效工具, 可以确定亲本之间的遗传差异和亲缘关系, 从而确定亲本间遗传距离, 并进而划分杂交优势, 提高杂种优势潜力。可以用杂合度和多态位点比例来衡量群体内的遗传多样性, 利用 DNA 多样性还可以进行种间亲缘关系分析^[36]。

目前, 人们普遍认为 DNA 水平上的多态性信息对于评判遗传多样性是最有效的。运用 AFLP 标记, 选用较少效率高的引物组合, 就可达到覆盖全基因组的目的, 而且可在短时间内对大量样品进行分析。Yamamoto 等^[37] T 对 24 个亚洲栗和 3 个其他栗品种的 AFLP 遗传多样性分析, 发现来源于朝鲜半岛的日本栗 (*Castanea crenata*) 栽培品种比来自日本的具有更广泛的遗传多样性, 推测日本的栗品种可能引自朝鲜半岛的 Shibagum, 或者是它们具有共同的祖先。Teulat 等^[38] 用 AFLP 和 SSR 标记分析了 12 个可可自然群体的多样性, 两种标记得出的群体间的关系相似, 且与 RFLP 得出的结果相符合。Goto^[39] T 采用 AFLP 对葡萄属的 4 个种进行表型分析, 从分子水平证实了从形态和历史研究得出的意大利葡萄品种 Ansonica 源自希腊的推论。

AFLP 现已广泛应用于植物的遗传多样性分析, 特

别是在作物遗传多样性的种系方面,如 AFLP 分析水稻、大豆、大麦,结果显示在种系间存在显著遗传差异,从获得的数据显示 AFLP 技术在鉴定低水平的遗传差异性和辨别高度相关性的基因型方面具有足够高的灵敏度^[36]。祝军等^[27]对我国 25 个苹果重要品种的遗传多样性研究结果表明,苹果栽培品种间在 DNA 一级结构组成上存在相当大的差异,具有较高的遗传多样性,成为 AFLP 技术鉴定苹果品种的依据。亲缘关系较近的品种间,带型差异小;反之则大。元帅与金冠是果树育种材料的核心种质,二者之间的差异带为 8 条,说明在遗传组成上二者有较大差异。王涛等^[40]2001 年在构建苹果 AFLP 指纹图谱的基础上分析了我国及世界苹果生产中 20 个重要苹果砧木间的遗传差异和亲缘关系,并根据 AFLP 扩增结果,计算出各砧木间的平均遗传距离为 $0.55 \pm 0.14\sigma$ 。聚类分析表明,苹果属中的 2 个亚属的砧木被分别聚成两大组,即真正苹果亚属大组 and 花秋苹果亚属大组,与已知的系谱一致。Baldoni 等^[41]应用 AFLP 研究了橄榄野生种及其栽培种之间的遗传关系。Sanz—Cortés 等^[42]利用 6 对 AFLP 引物对属于 10 个栽培品种的 38 个西班牙橄榄进行了遗传多样性分析,产生了 106 条多态性条带,认为西班牙不同地区栽培的橄榄遗传差异很大。易干军等^[43]用两对引物组合对 46 份龙眼材料进行 AFLP 分析,认为分子水平上龙眼品种间的遗传多样性并非那样丰富;同年,他们应用 AFLP 技术,对 39 个荔枝品种进行了遗传多样性分析及分类研究,认为在分子水平上,荔枝品种的遗传多样性并非形态学性状所体现的那样丰富^[44]。庞晓明等^[45]从 40 个 Pst I/MseI 酶切后的 AFLP 引物对中筛选出多态性高的 7 个,对 36 份枳属特异种质进行了指纹分析,认为聚类结果与地理来源没有明显的联系。

王峥峰等^[46]采用 AFLP 方法对锥栗在 3 个不同群落亚种群的遗传分化的研究表明,75.36%的遗传变异表现在种群内,24.64%的遗传变异表现在种群间;常绿阔叶林群落亚种群和针阔叶混交林群落亚种群的种群聚在一起。说明锥栗不同亚种群有不同的遗传多样性,种群间遗传分化较大。

Kanzaki 等^[47]对 19 个完全甜柿和 14 个不完全甜柿品种的亲缘关系进行了研究。结果发现,日本原产的完全甜柿品种间的亲缘关系较近,而与中国原产的完全甜柿品种“罗田甜柿”的亲缘关系较远。同时,发现原产日本的完全甜柿品种的遗传背景较为狭窄,罗田甜柿可能是独立起源的。房经贵等^[17]利用 14 对引物组合对 AFLP 标记在两芒果品种间(Keitt×Tommy)杂交 F₁ 代的多态性及分离方式进行研究,结果表明,AFLP 标记在该 F₁ 代群体中的多态性较高,分离位点出现的平均频率是 37.16%。分离方式有孟德尔分离、偏孟德尔分离

及异常分离 3 种方式。3 种分离位点出现的平均频率分别为 21.13%,15.74%和 2.27%,其中孟德尔分离位点占分离位点总数的 53.99%。并认为,该研究结果可为进一步利用该群体构建芒果 AFLP 遗传图谱打下良好的基础,提供一定的理论依据。易干军等^[48]采用 AFLP 标记技术对 35 个香牙蕉品种(系)进行了鉴定与分类,从分子水平上反应了香牙蕉地方品种之间的亲缘关系。

Lin 等^[49]对麻梨(*Pyrus serrulata*)、白梨(*P. bretschneideri*)、中国豆梨(*P. calleryana*)、砂梨(*P. pyrifolia*)、秋子梨(*P. ussuriensis*)、褐梨(*P. phaeocarpa*)、杏叶梨(*P. axmeniacae-folia*)、木梨(*P. xerophila*)、杜梨(*P. betulae-folia*)和西洋梨(*P. communis*)等 10 个种的梨进行 AFLP 分析,结果表明起源中国的麻梨、杜梨、秋子梨、白梨、砂梨、褐梨、木梨和中国豆梨等 8 个种在聚类分析时分在一个组,白梨和砂梨的相关系数最大,遗传距离最近,表明两者之间的亲缘关系最近;而起源新疆的杏叶梨与西洋梨聚类在一组,遗传距离最近,表明二者的具有较近的亲缘关系;西洋梨与起源中国的 8 个种的梨相关系数很小,与杜梨最小达 0.528,表明西洋梨与杜梨的亲缘关系最远,西洋梨与东方梨的亲缘关系较远。吕秀兰^[50]利用 AFLP 对金花梨的 18 个变异单系和 2 个金花梨进行遗传多样性分析,认为金花梨变异单系具有较高的遗传多样性;鲁凤娟^[51]利用 AFLP 对 44 个梨品种进行了分析,发现白梨系统与砂梨系统首先聚在一起,然后是秋子梨最后与西洋梨聚在一起,与 Lin 的结果是一致的,同时还对备受争议的苹果梨的分类地位进行了分析,认为将苹果梨归为白梨系统比较适宜。

4 质量性状基因的分子标记

果树上的分子标记辅助选择和质量性状基因定位,在苹果上报道最多,研究也最深入。苹果黑星病(apple scab)是由真菌 *Venturia inaequalis* 引起的、在世界上许多苹果栽培区属最为严重的病害。从苹果属的几个种中已鉴定出抗黑星病的基因,确定为主基因(VB_B)控制。2000 年 Xu 和 Korbans^[52]发表了最新的 VB_B 基因连锁标记,在 0.3 cm 距离内有 15 个 AFLP 标记,其中 7 个标记与 VB_B 基因不分离,1 个位于 VB_B 基因的左侧,另 6 个标记位于 VB_B 基因的右侧,为 VB_B 基因的克隆和测序奠定了基础。

苹果的柱型性状是一种非常适合矮化密植的性状,是受显性单基因(Co)控制的质量性状。王彩虹等^[53]2001 年用分离群体分组分析法,筛选到 Co 基因的一个 AFLP 标记,该标记与 Co 基因位点的重组率为 $(3.3 \pm 2.3)\%$,且此标记在苹果基因组中为单拷贝。并将一个与 Co 基因连锁较为紧密的 AFLP 标记成功地进行了再扩增,同时也实现了此标记片段的克隆和转化^[54]。

1998 年 Lu^[55]等在构建桃树砧木的 AFLP 遗传连锁

图谱的基础上,将2个抗李根线虫病的基因(Mi和Mij)定位在同一个连锁群,发现一个共显性的AFLP标记(EAA/MCA10)与Mij位点紧密连锁(3.4 cm),而另一个显性的AFLP标记(EAT/MCAT2)与Mi位点紧密相关(6.0 cm)。并于1999年将共显性的AFLP标记(EAA/MCA10)进行了克隆、测序及转化为STS标记,该标记可作为桃树砧木抗李根线虫病育种中早期辅助选择的一个有用工具^[19]。

此外,Kanzaki等^[56]于2001年对甜柿中控制涩味的性状进行研究,找到一个与该性状相连锁的AFLP标记—EACC/MCTA—400。该标记在所有完全甜柿品种中表现为缺失,而在不完全甜柿中表现为存在,该标记可用于柿树育种中完全甜柿类型的预先选择。

5 体细胞无性系变异的监测

在组织培养和种质离体保存过程中,保持材料的遗传稳定性是最重要的目标,因此,需要采用有效的方法监测材料是否发生体细胞无性系变异。目前,监测的手段有形态学、细胞学和分子标记等。形态学的方法直观、简单易行,但形态特征为基因表达的产物,易受环境的影响,而且还受时期的限制。细胞学方法对基因突变无能为力。而分子标记可从分子水平准确地鉴定无性变异。Vendrame等^[57]在山核桃研究中发现AFLP可很容易地区分来自不同细胞系的体细胞胚,而且发现多态性的出现与培养时间长短无显著的相关关系,少数来自同一细胞系的体细胞胚之间也发现了多态性,而RAPD标记相对而言效率低得多,而且难以检测到细胞系内的变异。郝玉金^[58]2000年用AFLP标记发现,超低温保存前后,纽荷兰脐橙愈伤组织、M26和草莓DNA甲基化状况有明显差异,3种发现差异的材料均伴随着表型的变化。

6 目标基因的定位和克隆

分子标记辅助选择和基因定位克隆,都需要找到与目的基因紧密连锁的分子标记。寻找与目标基因紧密连锁的分子标记的有效方法有:近等基因系法和群体分离分析法(bulk Segregant analysis,BSA)。近等基因系法在果树作物上应用较少;BSA分析中,一对混合池(bulk)除了目标基因区域有细微差异外,其它部分都是相同的,多态性很小。AFLP能在短时间筛选大量的标记来找出混合池之间的多态性。张潞生等^[30]用AFLP结合BSA方法找到一个与猕猴桃雄性性别连锁的标记,为猕猴桃的性别控制基因的进一步研究打下了基础。Lu等^[16]找到了与两种桃树根结线虫抗性相连锁的AFLP标记,并将其用于桃砧木的早期选择,结果与表型基本相符。AFLP的高效性使其也成为研究数量性状基因位点的有效工具。Dirlewanger^[59]于1998年把桃果肉糖酸性状细分为10个组分,用以AFLP为主的3种

标记,都找到了QTLs,向了解桃果实的品质构成的分子基础迈进了一大步。

参考文献:

- [1] Zabeau M and Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting [P]. European Patent Application 94202629.7(publication No. 0534858). Paris: European patent office, 1993
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [3] 黎裕,贾继增,王天宇. 分子标记的种类及其发展 [J]. 生物技术通报 1999(4): 19-22.
- [4] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种 [J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- [5] 张桂露,陈静,王文江,等. AFLP技术及其在果树上的应用研究进展 [J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(增刊): 60-63.
- [6] Ajmone M P, Castiglioni P, and Fusari F, et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 219-227.
- [7] Powell W, Morgante M, and Andre C. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR(microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. Mol Breed, 1996, 2: 225-238.
- [8] Hill M, Witschboer H, and Zabeau M, et al. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in Lactuca spp [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93(4): 1202-1210.
- [9] Hamrick JL, Golt WJW. Allozyme diversity in plant species [A]. Massachusetts Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources, 1990, 43-63.
- [10] Weeden NF. Approaches to mapping in horticultural crops [A]. in: Gresshoff PM, eds. Plant Genome Analysis. Boca Raton: CRC Press, 1994, 57-68.
- [11] Hemmat M, Weeden NF, Manganaris AG, et al. Molecular marker linkage map for apple [J]. Journal of Heredity, 1994, 85(1): 4-11.
- [12] Gmitter G. Genome mapping of citrus. Plant Genome [J]. 1995, 16(1): 37-46.
- [13] Foolad M. R. Anulsekars, Pecerra V, et al. A genetic linkage map of Prunus based on an interspecific cross between peach and almond [J]. Theor. Appl. Genet., 1995, 91: 262-269.
- [14] Boobprakob U, Byrne DH. Genetic relationships of diploid plum based on RAPD polymorphisms [J]. HortScience, 1995, 30: 763.
- [15] Lodhi MA, Reisch BJ. Molecular genetic mapping and genome size of Vitis [J]. Plant Genome, 1992, 11: 9-11, 37.
- [16] Lu ZX, Sossey-Alaoui K, and Righard GL, et al. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99(1-2): 115-122.
- [17] 房经贵,章镇,马正强,等. AFLP标记在两个芒果品种间杂交F₁代的多态性及分离方式 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(3): 19-24.
- [18] Waugh R, Bonar N, and Baird E, et al. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley [J]. Mol Gen Genet, 1997, 255(3): 311-321.
- [19] Sosinski B, Sossey-Alaoui K, and Rajapakse S, et al. Use of AFLP and RFLP markers to create a combined linkage map in peach [Prunus Persica (L.) Batsch] for use in marker assisted selection [J]. Acta Hort, 1998, 465: 61-68.

注:参考文献的20~59条省略,有需要者请与编辑部联系。