

# 草甘膦对转基因大豆 GTS 40-3-2 生理特性的影响

常丽娟\*, 刘文娟, 张富丽, 王东, 宋君

(四川省农业科学院分析测试中心, 成都 610066)

**摘要:** **目的** 研究草甘膦对转基因大豆 GTS 40-3-2 生理特性的影响。**方法** 实验室盆栽种植转基因大豆 GTS 40-3-2, 在 GTS 40-3-2 第三复叶期喷施不同浓度的草甘膦处理, 24 h 后取叶片分别进行生理指标检测。**结果** 叶绿素含量对照组最高, 且随草甘膦浓度的增加而降低; 不同浓度的草甘膦处理叶片的相对电导率 (electrolytic leakage, EL) 和丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量与对照组相比无显著差异 ( $P>0.05$ ); 与对照组相比较, 草甘膦喷施导致过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性下降, 随草甘膦浓度的增加, CAT 活性无显著差异 ( $P>0.05$ ), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性升高。POD 活性受草甘膦影响较大, SOD 活性受草甘膦影响较小。**结论** 喷施草甘膦对 GTS 40-3-2 生理特性存在一定的影响, 应注意日常施用量。

**关键词:** 转基因大豆; 草甘膦; 生理特性

## Effect of glyphosate on the physiological characteristics of transgenic soybeans GTS 40-3-2

CHANG Li-Juan\*, LIU Wen-Juan, ZHANG Fu-Li, WANG Dong, SONG Jun

(Analysis and Test Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the effect of glyphosate on the physiological characteristics of transgenic soybeans GTS 40-3-2. **Methods** The transgenic soybean GTS 40-3-2 was planted in the laboratory pot, and different concentrations of glyphosate were sprayed at V3 stage of GTS 40-3-2. After 24 h, the leaves were taken for physiological index detection. **Results** The chlorophyll content of the control group was the highest and decreased with the increase of glyphosate concentration. The relative electrical conductivity (EL) and malonaldehyde (MDA) content of the leaves treated with different concentrations of glyphosate were not significantly different from those of the control group ( $P>0.05$ ). Compared with the control group, glyphosate spray resulted in decreased catalase (CAT) activity. With the increase of glyphosate concentration, there was no significant difference in CAT activity ( $P>0.05$ ), and the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) increased. The POD activity was greatly affected by glyphosate, while the SOD activity was less affected by glyphosate. **Conclusion** Spraying glyphosate has a certain effect on the physiological characteristics of GTS 40-3-2, and should pay attention to the daily application rate.

基金项目: 省财政基因工程青年基金项目(2018QNJJ-023)

Fund: Supported by Youth Fund of Genetic Engineering of Provincial Finance (2018QNJJ-023)

\*通讯作者: 常丽娟, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向转基因生物安全监管。E-mail: 277989595@qq.com

\*Corresponding author: CHANG Li-Juan, Master, Assistant Professor, Analysis and Test Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China. E-mail: 277989595@qq.com

**KEY WORDS:** genetically modified soybean; glyphosate; physiological characteristics

## 1 引言

草甘膦是 20 世纪 70 年代孟山都公司开发的广谱除草剂,其作用机制是竞争性抑制莽草酸合成途径中的 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)的活性,阻止芳香族氨基酸的合成导致植物死亡<sup>[1]</sup>。抗草甘膦转基因植物商品化种植以来,草甘膦成为世界上使用量最大的除草剂品种,其使用安全性成为研究重点。草甘膦使用安全性研究主要集中在对非靶标生物如水生生物、两栖类动物、土壤生物和哺乳动物的生态毒性<sup>[2-5]</sup>、对靶标植物的生长、生理及产量构成影响<sup>[6,7]</sup>及草甘膦长期使用加快抗性杂草的出现<sup>[8]</sup>。GTS 40-3-2 是美国孟山都公司开发的抗除草剂转基因大豆,其转入的外源基因 *aroA* 编码对草甘膦高耐性的 CP4-EPSPS,替代了被草甘膦抑制的 EPSPS,改善了莽草酸代谢途径,从而使大豆获得了对草甘膦的抗性<sup>[9]</sup>。尽管 GTS 40-3-2 可以耐受一定浓度的草甘膦,但大量研究表明喷施草甘膦对 GTS 40-3-2 产量存在影响<sup>[10-12]</sup>。也有一些研究从遗传学方面入手,对抗草甘膦大豆喷施不同剂量的草甘膦,研究其后代配子分离情况<sup>[13]</sup>。刘文娟等<sup>[14]</sup>研究发现,1.23~4.92 kg·ai·hm<sup>-2</sup>的草甘膦可在转基因大豆生长的第二复叶期安全使用,不会造成大豆的减产;喷施草甘膦超过 7.38 kg·ai·hm<sup>-2</sup>,一定程度上损伤大豆的结粒水平,但籽粒质量不受影响;草甘膦喷施对转基因大豆的抗性遗传没有显著影响。从植物生理方面研究草甘膦对 GTS 40-3-2 影响的报道较少,原向阳等<sup>[15]</sup>研究发现草甘膦可以抑制抗草甘膦转基因大豆的叶绿素合成,促进莽草酸的积累,保护酶 SOD 活性变化不大。

本研究在 GTS 40-3-2 第三复叶期,喷施不同浓度的草甘膦,全面检测 GTS 40-3-2 各项生理指标变化,从植物生理方面探究 GTS 40-3-2 耐受草甘膦的浓度,为 GTS 40-3-2 的田间种植提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 植物材料与土壤

试验所用的抗草甘膦转基因大豆 GTS 40-3-2 购于美国孟山都公司;种植转基因大豆的土壤为大田土壤与市场购买营养土按 2:1 配制而成的混合土,土壤 pH 值 6.2~6.8,偏酸性,土壤有机质含量 3.56%,全氮 1.2 g/kg,速效钾 197.5 mg/kg,速效磷 12.1 mg/kg。

#### 2.1.2 仪器与试剂

UV1000 单光束紫外可见分光光度计(上海圣科仪器

设备有限公司); $\mu$ Quant 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);RXZ-600B 人工气候箱(宁波江南仪器厂);BSD-250 低温震荡培养箱(上海博讯医疗设备厂);BS124S 赛多利斯电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);HH-2 恒温水浴锅(常州国华仪器有限公司)。

41%草甘膦异丙胺盐水剂(福建省福鼎市绿丰化工有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA 总蛋白定量试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)。

### 2.2 实验设计

实验室人工气候箱盆栽种植抗草甘膦转基因大豆 GTS 40-3-2,选择直径 28 cm,高 26.5 cm 的塑料桶,底层放置厚约 5 cm 鹅卵石,上层装入混匀的试验土壤。人工气候箱温度 37 °C,光照 16 h,黑暗 8 h,光照强度 66%,湿度 80%。当幼苗生长到第二复叶期定苗至每盆 4 株,幼苗生长到第三复叶期,分别进行不喷施草甘膦(对照, CK)和喷施 0.92、1.84、3.68、7.36 kg·ai·hm<sup>-2</sup> 草甘膦(记作 G1、G2、G3、G4)处理,1.23~2.46 kg·ai·hm<sup>-2</sup> 为供试 41%草甘膦的推荐剂量。每个处理设置 3 次重复,喷施草甘膦 24 h 后,取 GTS 40-3-2 叶片分别进行生理指标检测。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 总类囊体蛋白的提取与测定

总类囊体蛋白的提取采用杜林方<sup>[16]</sup>KM 法,采用 BCA 总蛋白定量试剂盒测定总类囊体蛋白浓度。

#### 2.3.2 叶绿素含量的测定

叶绿素含量测定方法参照舒展等<sup>[17]</sup>建立的简化叶绿素测定方法,用打孔器切取新鲜的大豆叶片,注意避开粗大叶脉,将取下的叶片切成宽约 1 mm 的细丝。然后将叶片细丝投入 5 mL 80%丙酮的试管中,密封试管口过夜浸提到叶片细丝变为白色,将 80%丙酮定溶至 5 mL,混匀后将试管内液体倒入比色杯中,分别在 663 nm 和 645 nm 处读取光密度值(OD 值)。实验结果计算公式:Chla=12.7OD<sub>663</sub>-2.69OD<sub>645</sub>, Chlb=22.9OD<sub>645</sub>-4.86OD<sub>663</sub>,提取液的叶绿素浓度 CV=Chla+Chlb(CV,  $\mu$ g/mL),单位叶面积的叶绿素含量 CA=0.5CV/S(CA, mg/dm),S 为用于提取叶绿素的叶片面积(cm<sup>2</sup>)。

#### 2.3.3 相对电导率的测定

相对电导率(electrolyte leakage, EL)采用浸泡法进行测定<sup>[18]</sup>,取大小一致的植物叶片,蒸馏水冲洗后用滤纸吸干表面水分,避开主叶脉将叶片剪成条状,称取 0.1 g 置于

10 mL 去离子水的试管中, 封闭试管室温下浸泡 12 h, 测定浸提液电导值为 R1, 沸水浴 30 min 后冷却至室温, 再次测定浸提液电导值为 R2, 实验结果计算公式: 相对电导率 =  $R1/R2 \times 100\%$ 。

#### 2.3.4 保护酶及丙二醛的测定

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒对 SOD、POD、CAT、MDA 的酶活进行测定。

### 2.4 数据分析

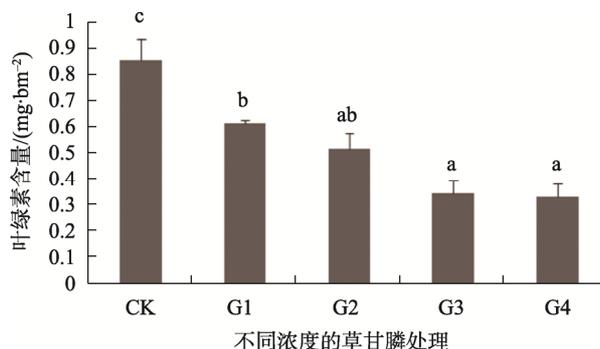
所有实验数据采用统计学分析软件 SPSS 10.0 进行分析; 图表采用 Excel 2000 进行处理。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同浓度的草甘膦对叶绿素含量的影响

对不同浓度草甘膦处理的 GTS 40-3-2 叶片的叶绿素含量进行测定(结果见图 1), 由图 1 可知, CK 叶绿素含量最高, G1 浓度的草甘膦处理后, 大豆叶片叶绿素含量下降了 28.08%, 与 CK 差异达显著水平 ( $P < 0.05$ ), G2 浓度的草甘膦处理后, 叶绿素含量小幅度下降, 与 G1 无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 草甘膦浓度超过推荐剂量后, 叶绿素含量大幅度下降, 与 CK、G1 差异显著 ( $P < 0.05$ )。

叶绿素通过吸收和传递光能参与光合作用, 通过光合作用把二氧化碳和水转化成储存着能量的有机物, 光合作用直接决定农作物的产量。由实验结果可知,  $0.92 \text{ kg} \cdot \text{ai} \cdot \text{hm}^{-2}$  的草甘膦可导致叶绿素的显著下降, 说明较低浓度的草甘膦可抑制叶绿素的合成; 超过推荐剂量后, 叶绿素含量再次显著下降, 严重影响光合作用的正常进行。因此, 叶绿素含量的研究从生理方面验证喷施草甘膦会降低大豆产量。



注: 标注字母相同代表没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 标注字母不同表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 以下同。

图 1 不同浓度的草甘膦处理对大豆叶片叶绿素含量的影响 ( $n=3$ )  
Fig.1 Effects on chlorophyll content under different concentrations of glyphosate ( $n=3$ )

### 3.2 不同浓度的草甘膦对相对电导率和 MDA 的影响

对不同浓度草甘膦处理的 GTS 40-3-2 叶片的相对电导率和 MDA 含量进行测定(结果见图 2), 由图 2 可知, G1 浓度的草甘膦处理后, GTS 40-3-2 叶片的相对电导率上升, 4 个浓度的草甘膦处理的转基因大豆叶片的相对电导率与 CK 无差异 ( $P > 0.05$ )。MDA 检测结果表明, G1 浓度的草甘膦处理后, GTS 40-3-2 叶片的 MDA 含量下降, 4 个浓度的草甘膦处理的转基因大豆叶片的 MDA 与 CK 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

电导率和 MDA 含量可反应喷施草甘膦对大豆细胞膜的破坏作用。由实验结果可知, 4 个不同浓度的草甘膦处理对细胞膜的影响较小, 没有出现明显的膜脂过氧化及细胞破裂。

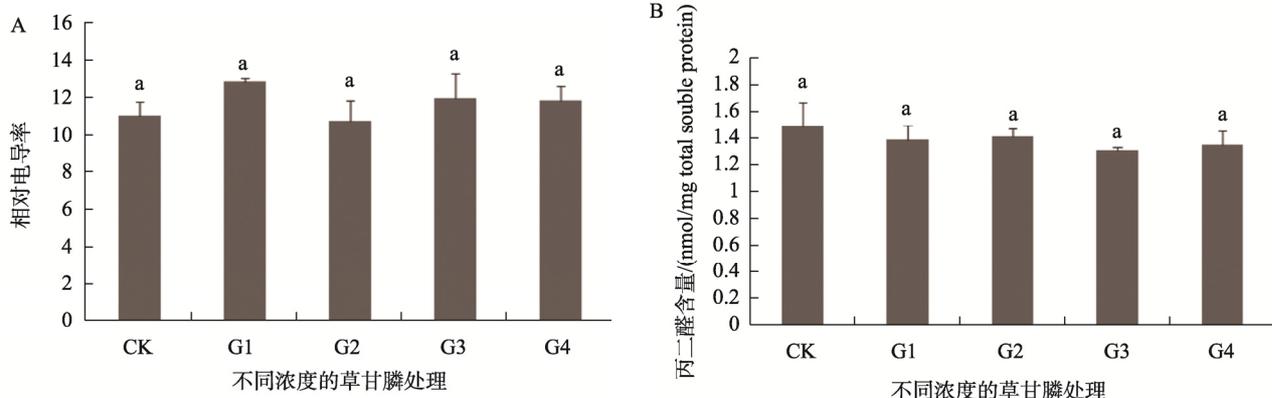


图 2 不同浓度的草甘膦处理对大豆叶片 EL 和 MDA 的影响 ( $n=3$ )

Fig.2 Effect on EL and MDA under different concentrations of glyphosate ( $n=3$ )

### 3.3 不同浓度的草甘膦对保护酶活性的影响

不同浓度的草甘膦胁迫条件下, GTS 40-3-2 叶片的保护酶活性发生变化, 如图 3 与 CK 相比较, 喷施 G1 浓度的草甘膦后 CAT 活性大幅下降, 随着草甘膦浓度升高, CAT 活性无明显变化。与 CK 相比较, SOD、POD 活性呈上升趋势, 随草甘膦浓度的升高而升高, 其中 POD 活性受草甘膦影响较大, 喷施 G1 浓度的草甘膦, POD 活性上升与 CK 差异显著 ( $P<0.05$ ), 草甘膦浓度超过推荐剂量 1.23~2.46  $\text{kg}\cdot\text{ai}\cdot\text{hm}^{-2}$  后, POD 活性又显著上升, 草甘膦浓度为 G4 时, POD 活性为 9.80  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  总蛋白。SOD 活性受草甘膦影响较小, 喷施 G1、G2 浓度的草甘膦, SOD 活性缓慢上升, 与 CK 无显著差异 ( $P>0.05$ ), 草甘膦浓度超过推荐剂量

1.23~2.46  $\text{kg}\cdot\text{ai}\cdot\text{hm}^{-2}$  后, SOD 活性小幅度上升, 与 CK 差异达显著水平 ( $P<0.05$ )。

当植物受到逆境胁迫时, 细胞内产生过量的活性氧自由基(reactive oxide species, ROS), ROS 具有很强的化学反应活性, 在细胞内累积对细胞和基因结构造成损坏。植物体内的保护酶系统可以清除过多的 ROS, 维持细胞的正常代谢。因此, 保护酶活性可以反应植物受逆境胁迫的程度。由实验结果可知, 喷施不同浓度的草甘膦后, SOD、POD 2 种保护酶活性随草甘膦浓度的上升而上升, 说明草甘膦诱导的逆境胁迫中, SOD、POD 表达量上调, 2 种酶活性越高, 细胞受逆境胁迫的程度越大。

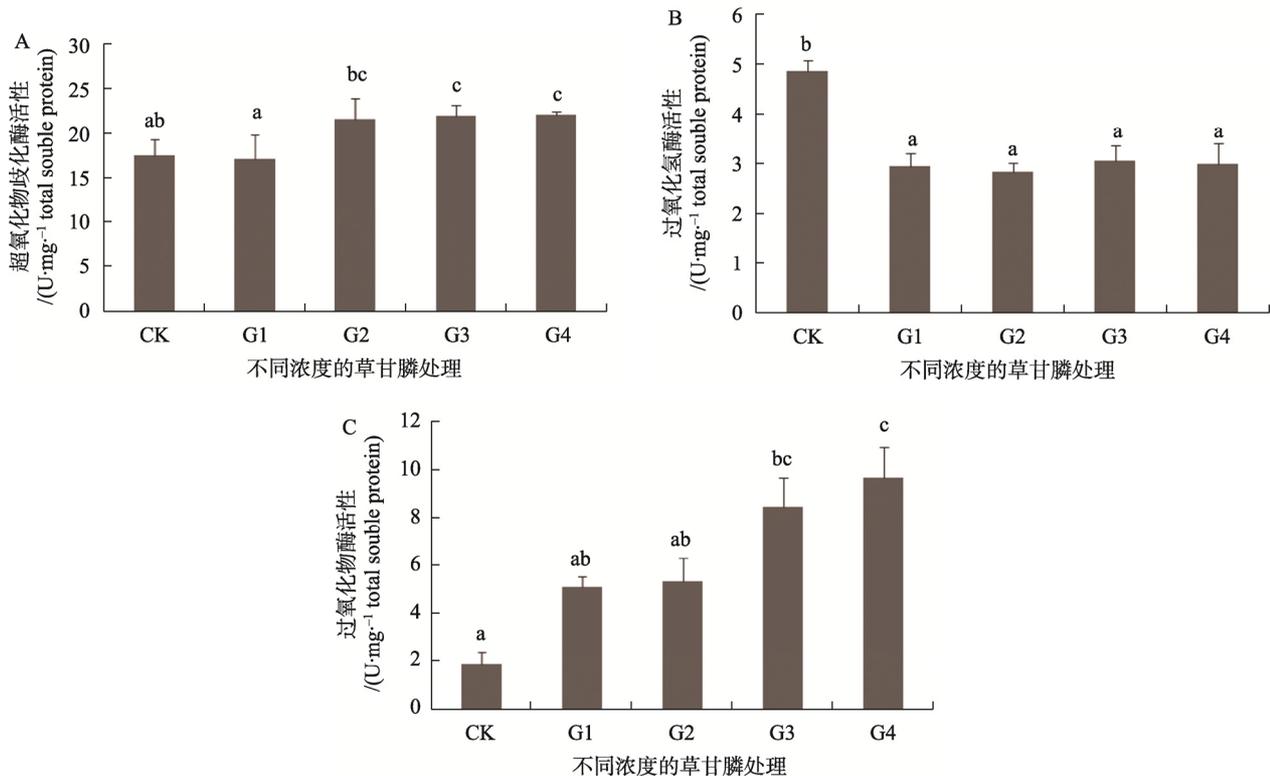


图 3 不同浓度的草甘膦处理对大豆叶片保护酶的影响( $n=3$ )

Fig.3 Effect on protective enzymes under different concentrations of glyphosate ( $n=3$ )

## 4 讨论

我国是草甘膦的生产应用大国, 研究草甘膦对植物生理指标的影响可以更加科学的使用草甘膦和有效控制杂草。已有研究表明, 草甘膦阻断光合作用的电子传递, 并降低叶片中镁的含量, 抑制叶绿素的合成, 从而影响植物光合作用<sup>[19]</sup>。对抗草甘膦转基因大豆研究发现, 喷施草甘膦可降低叶绿素含量, 而且施药期越早, 叶绿素含量指数越低<sup>[20]</sup>。本试验研究不同浓度草甘膦对 GTS 40-3-2 叶绿素

含量的影响, 发现较低浓度的草甘膦即可导致叶绿素含量的大幅下降, 草甘膦浓度超过推荐剂量后, 叶绿素含量再次大幅下降。说明草甘膦对叶绿素的合成影响较大, 而且超过推荐剂量的草甘膦严重抑制叶绿素的合成。

相对电导率和 MDA 含量都是反应植物膜系统状况的重要生理指标, MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一, 膜脂过氧化导致细胞膜破裂, 细胞质外渗使相对电导率增大。王鹏等<sup>[6]</sup>研究发现, 喷施 41%草甘膦导致普通大豆品种晋大 73 的 MDA 含量和相对电导率急剧下降, 而抗草甘

膦转基因大豆的 MDA 含量和相对电导率小幅度波动后恢复正常水平。本试验发现, GTS 40-3-2 经过 24 h 不同浓度梯度的草甘膦处理后, 叶片的 MDA 含量和相对电导率与对照相比无显著差异, 说明草甘膦对 GTS 40-3-2 的膜系统损伤较小, 与王鹏的研究结果一致。

草甘膦对植物是一种逆境胁迫, 逆境条件下植物体内产生大量的活性氧自由基 ROS, 破坏蛋白质、核酸及脂类等生物大分子活性, 从而影响植物的生长发育。田学军等<sup>[21]</sup>对鬼针草幼苗研究发现, 鬼针草幼苗 SOD、POD、CAT 活性随草甘膦浓度的升高而升高, 清除逆境胁迫产生的 ROS。原向阳等<sup>[15]</sup>采用两种不同的草甘膦制剂, 配制 4 个浓度梯度的草甘膦, 喷施第三复叶期的抗草甘膦转基因大豆, 发现 SOD 酶活性与对照相比较无显著差异。本试验研究发现, 喷施草甘膦后, CAT 活性下降, 随着草甘膦浓度的上升, CAT 活性无明显变化。草甘膦在推荐剂量内使用, SOD、POD 酶活升高, 超过推荐剂量后 SOD、POD 酶活上升较明显, 与对照差异显著。说明草甘膦的喷施导致转基因大豆细胞内产生大量的 ROS, 草甘膦超过推荐剂量后, 细胞内累积的 ROS 含量较高, SOD、POD 酶活上升幅度加大, 清除 ROS 维持细胞的正常代谢。

## 5 结 论

喷施较低浓度的草甘膦可降低第三复叶期 GTS 40-3-2 的叶绿素合成, 保护酶活性 CAT 酶活下降, SOD、POD 酶活升高。草甘膦浓度超过推荐剂量后, 各生理指标急剧变化。因此, 从植物生理指标变化可以得出结论, 推荐剂量内草甘膦对 GTS 40-3-2 形成一定程度的逆境胁迫, 超过推荐剂量的草甘膦会大大增加逆境胁迫效果。

## 参考文献

- [1] 刘延, 崔海兰, 黄红娟, 等. 抗草甘膦杂草及其抗性机制研究进展[J]. 农药学学报, 2008, 10(1): 10-14.
- [2] Fernanda ML, Juliana ZS, Marta MS. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 162: 201-207.
- [3] Edge CB, Gahl MK, Pauli BD, *et al.* Exposure of juvenile green frogs (*Lithobates clamitans*) in littoral enclosures to a glyphosate-based herbicide [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011, 74(5): 1363-1369.
- [4] Keren HG, Virginia A, Eduardo DG, *et al.* Soil microbial communities and glyphosate decay in soils with different herbicide application history [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 634: 974-982.
- [5] Xin R, Ruonan L, Junze L, *et al.* Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses [J]. *Environ Poll*, 2018, 243: 833-841.
- [6] 王鹏, 郭玮, 马艳芸, 等. 苗期喷施草甘膦对大豆叶片生理指标的影响 [J]. *山西农业科学*, 2016, 44(8): 1177-1180.
- [7] Wang P, Guo W, Ma YY, *et al.* Effect of glyphosate on physiological indexes of soybean leaves in seedling stage [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2016, 44(8): 1177-1180.
- [7] Michael GB, Palle P. Adjusting management practices using glyphosate-resistant soybean cultivars [J]. *Agron J*, 2004, 96: 462-468.
- [8] Shaner DL. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate [J]. *Weed Sci*, 2009, 57(1): 118-123.
- [9] Dill GM. Glyphosate-tolerant crops: History, status and future [J]. *Pest Manag Sci*, 2005, 61(3): 219-224.
- [10] Roger WE, Fred WR, Lenis AN, *et al.* Glyphosate-resistant soybean cultivar yields compared with sister lines [J]. *Agron J*, 2001, 93: 408-412.
- [11] King CA, Purcell LC, Vories ED. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications [J]. *Agron J*, 2001, 93: 179-186.
- [12] Paul LR, Timothy LG. Challenges in comparing transgenic and nontransgenic soybean cultivars [J]. *Crop Sci*, 2003, 43: 1584-1589.
- [13] David RW, Alan KW, Wood ED, *et al.* Gametic selection by glyphosate in soybean plants hemizygous for the CP4-EPSPS transgene [J]. *Crop Sci*, 2006, 46: 30-35.
- [14] 刘文娟, 刘勇, 宋君, 等. 喷施草甘膦对转基因大豆产量构成和抗性遗传的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(6): 697-703.
- [14] Liu WJ, Liu Y, Song J, *et al.* Impact of spraying glyphosate on yield component and resistance genetics of glyphosate-tolerant soybean at two-trifoliolate leaf stage [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2013, 35(6): 697-703.
- [15] 原向阳, 郭平毅, 张丽光. 第三复叶期喷施草甘膦对转基因大豆和普通大豆生理指标的影响 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3886-3892.
- [15] Yuan XY, Guo PY, Zhang LG. Impact of glyphosate on physiological index of transgenic and conventional soybean on three-trifoliolate leaf stage [J]. *Sci Agric Sin*, 2008, 41(11): 3886-3892.
- [16] 杜林方. 具高放氧活性的 PS II 颗粒的制备及保存 [J]. *植物生理学通讯*, 1995, 31(3): 212-215.
- [16] Du LF. Preparation and storage of PS II particles with high oxygen-evolution activity [J]. *Plant Physiol Commun*, 1995, 31(3): 212-215.
- [17] 舒展, 张晓素, 陈娟, 等. 叶绿素含量测定的简化 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46(4): 399-402.
- [17] Shu Z, Zhang XS, Chen J, *et al.* The simplification of chlorophyll content measurement [J]. *Plant Physiol Commun*, 2010, 46(4): 399-402.
- [18] Liu XZ, Huang BZ. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass [J]. *Crop Sci*, 2000, 40(2): 503-510.
- [19] Toth SZ, Schansker G, Strasser RJ. In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: ADCMU-inhibition study [J]. *Biochim Biophys Acta-Bioenerget*, 2005, 1708(2): 275-282.
- [20] 原向阳, 郭平毅, 张丽光. 不同时期喷施草甘膦对大豆生理指标的影响 [J]. *中山大学学报*, 2009, 48(2): 90-94.
- [20] Yuan XY, Guo PY, Zhang LG. Impact of spraying glyphosate on physiological index of soybean at different growth stages [J]. *Acta Sci*

Natur Univ Sunyatseni, 2009, 48(2): 90–94.

- [21] 田学军, 陶宏征, 沈云玫. 草甘膦对三叶鬼针草种子活力和幼苗保护酶活性的影响[J]. 现代农药, 2015, 14(2): 44–48.

Tian XJ, Tao HZ, Shen YM. Effects of glyphosate on seed vigor and seedling protective activity of *Bidens piloda* L. [J]. Mod Agrochem, 2015, 14(2): 44–48.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



常丽娟, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向转基因生物安全监管。

E-mail: 277989595@qq.com