

Khảo sát sự biến nạp gen ở mô sẹo mía (*Saccharum officinarum* L.) bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh chồi sau chuyển gen

- Trần Văn Hà
- Cung Hoàng Phi Phương
- Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 15 tháng 10 năm 2013)

TÓM TẮT

Mía (*Saccharum officinarum* L.) là một trong những cây trồng chủ đạo cho nhiều ngành công nghiệp trên thế giới. Việc tạo các giống mía chuyển gen góp phần khắc phục được các nhược điểm của phương pháp canh tác truyền thống. Khúc cắt thân non mía sau 10 ngày đặt trên môi trường MS (Murashige và Skoog) bổ sung 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 3 mg/L cho tỉ lệ tạo sẹo cao nhất với tỉ lệ 91,11%. Sẹo mía được cảm ứng tạo chồi trên môi trường MS bổ sung 6-Benzyladenin (BA) với các nồng độ 0, 0,5, 1,0,

1,5, 2,0, 2,5 mg/L. Cả 6 nồng độ BA đều có khả năng tạo chồi, tuy nhiên nồng độ 1,0 mg/L là tốt nhất. Sẹo 4-5 tuần tuổi được tiến hành chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* kết hợp với sự thay đổi các yếu tố nồng độ acetosyringone (AS), thời gian ủ mẫu với khuẩn và thời gian phơi khô mẫu. Trong đó, việc sử dụng nồng độ AS 100 μ M và 150 μ M đều có thể chuyển gen và tái sinh chồi thành công với tỉ lệ chuyển gen giả định là 25%.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, callus- mô sẹo, regeneration-tái sinh, sugarcane- cây mía, transformation-chuyển gen.

MỞ ĐẦU

Mía (*Saccharum officinarum* L.) là một trong những vụ mùa sớm nhất được con người biết đến và cung cấp trên 70% lượng đường trên thế giới. Do quá trình đô thị hóa, diện tích đất trồng mía ở nước ta và trên thế giới ngày càng bị thu hẹp. Công nghệ sinh học hiện đại đã tạo ra cây trồng biến đổi gen (GMO) bằng cách chèn những gen mong muốn vào thực vật. Hiện

nay có nhiều phương pháp chuyển gen vào thực vật như bắn gen, vi âm, xung điện,.. Đặc biệt, từ sau 1980, nhờ phát hiện vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây khối u ở thực vật, việc chuyển gen ở thực vật đã đạt được nhiều thành tựu nhảy vọt.

Những nghiên cứu về chuyển gen cây mía ở nước ta còn rất hạn chế trong khi trên thế giới đã có nhiều bài

báo khoa học công bố về các công trình chuyển gen trên mía. Do đó, mục tiêu nghiên cứu của đề tài này là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển gen vào mô sẹo mía bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh chồi sau chuyển gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chồi mía POJ (Proefstation Oost Java) *in vitro* thuộc loài *Saccharum officinarum* L. do Công ty Cổ phần đường Quảng Ngãi cung cấp được dùng làm nguồn vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm.

Môi trường M: Môi trường MS (Murashige và Skoog (1962) bổ sung đường sucrose (20 g/L), agar (8 g/L), nước dừa 10% và các chất khác nhau tùy theo mục đích thí nghiệm.

Thí nghiệm 1: Khảo sát môi trường thích hợp cho sự tạo sẹo: các chồi mía 2-3 tuần tuổi được cắt phần thân non dài 2-3 mm sát gốc đặt lên môi trường M bổ sung polyvinylpyrrolidone (PVP) 0,8 g/L và 2,4-D với các nồng độ khác nhau: 1 mg/L (D1), 2 mg/L (D2), 3 mg/L (D3), và 4 mg/L (D4). Mỗi nghiệm thức 15 mẫu, lặp lại 3 lần. Mẫu được đặt trong tối ở 22-25°C và theo dõi quá trình tạo sẹo.

Thí nghiệm 2: Khảo sát môi trường thích hợp cảm ứng tạo chồi từ sẹo: sẹo 4-5 tuần tuổi trên môi trường tạo sẹo tốt nhất từ **thí nghiệm 1** được cắt nhỏ đường kính 2-3 mm đặt lên môi trường M bổ sung BA với các nồng độ khác nhau: 0,0 mg/L (B0), 0,5 mg/L (B0,5), 1,0 mg/L (B1,0), 1,5 mg/L (B1,5), 2,0 mg/L (B2,0), 2,5 mg/L (B2,5). Mỗi nghiệm thức 12 mẫu, lặp lại 3 lần. Mẫu được đặt trong điều kiện chiếu sáng 16h/ngày, cường độ chiếu sáng : 3000 lux và theo dõi quá trình tạo chồi.

Thí nghiệm 3: Khảo sát nồng độ PPT tối thiểu gây chết 100% cho mô mía: sẹo 4-5 tuần tuổi trên môi trường tạo sẹo tốt nhất từ **thí nghiệm 1** được cắt nhỏ đường kính 2-3 mm đặt lên môi trường M bổ sung PVP

0,8 g/L và phosphinothricin (PPT) với các nồng độ khác nhau: 0 mg/L (P0), 1 mg/L (P1), 2 mg/L (P2), 3 mg/L (P3), 4 mg/L (P4), 5 mg/L (P5). Mỗi nghiệm thức 12 mẫu, lặp lại 3 lần. Mẫu được đặt trong tối ở 22-25°C và theo dõi tỉ lệ sống sót của các mẫu mô.

Thí nghiệm 4: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen và tái sinh chồi sau chuyển gen:

Chuẩn bị dịch khuẩn

Vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA101 mang plasmid pGII0229 TRgus cp148 luc có khả năng kháng kanamycin và rifampicin được dùng để chuyển gen vào mô sẹo mía. Đoạn DNA của plasmid pGII0229 được chèn vào bộ gen của thực vật chứa gen *bar* có khả năng kháng PPT và gen chỉ thị *gus*. Vi khuẩn được nuôi cấy trong 20 mL YEP lỏng (bacto pepton 10 g/L, bacto yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L) bổ sung rifampicin (50 mg/L) và kanamycin (50 mg/L) qua đêm ở 22°C. Ly tâm thu sinh khối vi khuẩn và pha loãng sinh khối vi khuẩn bằng dung dịch tạo sẹo tốt nhất từ **thí nghiệm 1** sao cho dịch huyền phù có chỉ số OD₆₀₀ = 0,6-0,8. Thêm vào dịch huyền phù vi khuẩn một lượng acetosyringone (AS) sao cho nồng độ cuối cùng đạt 100 và 150 µM, lắc đều và để yên trong 30 phút.

Ủ mẫu với dịch khuẩn

Mô sẹo sau 4-5 tuần tuổi cảm ứng trên môi trường tạo sẹo tốt nhất từ **thí nghiệm 1** được cắt nhỏ đường kính 2-3 mm. Ngâm các sẹo trong dịch huyền phù vi khuẩn với các khoảng thời gian 15 và 30 phút. Thâm khô sẹo mía bằng giấy thấm vô trùng trong khoảng thời gian 15 và 30 phút, sau đó đặt sẹo lên đĩa petri chứa môi trường tạo sẹo tốt nhất từ **thí nghiệm 1**. Mỗi nghiệm thức 12 mẫu, lặp lại 2 lần.

Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, các mẫu sẹo sau chuyển gen được rửa bằng nước cất bổ sung cefotaxime 500 mg/L, thấm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng, mang một nửa số lượng mẫu đi thử GUS. Các sẹo còn lại được chuyển sang môi trường tái sinh chồi (môi trường tạo chồi tốt nhất từ **thí nghiệm 2**) kết hợp với chọn lọc (bổ sung nồng độ PPT tối thiểu gây chết hoàn toàn mô mĩa ở **thí nghiệm 3**), giữ trong điều kiện chiếu sáng 16h/ ngày. Sau khoảng 5-6 tuần, cắt lá và thân các chồi tái sinh mang đi kiểm tra sự biểu hiện của gen *gus* bằng cách thử GUS.

Kiểm tra sự hiện diện của gen *bar* trong chồi mĩa tái sinh trên môi trường chọn lọc bằng phương pháp PCR: Các chồi mĩa sau chuyển gen tái sinh trên môi trường chọn lọc được tách chiết DNA bộ gen và kiểm tra gen *bar* bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu BAR3/BAR4.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thí nghiệm 1: Khảo sát môi trường thích hợp cho sự tạo sẹo

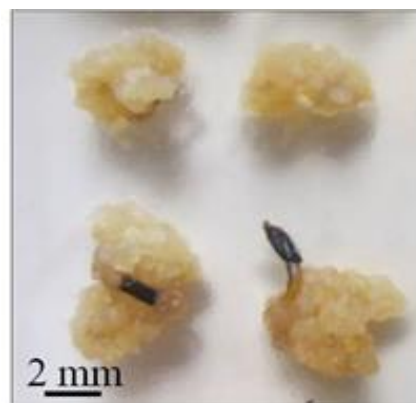
Sau 7-10 nuôi cấy, các khúc cắt thân bắt đầu hình thành sẹo tại vị trí cắt gần với gốc (Bảng 1). Sau 4-6 tuần, các mẫu mô sẹo trở nên rắn chắc và ngả sang màu vàng (Hình 1). Các mẫu thân không tạo sẹo thì đen dần và cuối cùng chết đi.

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự tạo sẹo

Nghiem thức	Tỉ lệ mẫu tạo sẹo (%)
D1	55,56 ± 3,85 ^a
D2	64,44 ± 3,85 ^b
D3	91,11 ± 3,85 ^c
D4	75,56 ± 3,85 ^d

Theo bảng 1, môi trường D3 cho tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất (91,11%). Ở nồng độ cao, auxin làm xáo trộn sự phân chia tế bào dẫn đến sự tạo thành mô sẹo [3]. Tuy nhiên theo Chen và cs (1988),

nồng độ 2,4-D quá cao làm giảm tỉ lệ cảm ứng tạo sẹo đặc (K. Chengalrayan và cs, 2005) [4].



Hình 1. Mô sẹo sau 6 tuần

Như vậy, trong phạm vi khảo sát, môi trường D3 với sự bổ sung 2,4-D 3 mg/L là thích hợp nhất cho quá trình tạo sẹo từ khúc cắt thân non mĩa. Các sẹo trên môi trường D3 được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thí nghiệm 2: Khảo sát môi trường thích hợp cảm ứng tạo chồi từ sẹo

Sau 10 ngày, sẹo đặt trên các môi trường bắt đầu cảm ứng tạo chồi. Bảng 2 cho thấy 2 nghiệm thức cho tỉ lệ mẫu tạo chồi nhiều nhất là B1,0 và B1,5 (30,56%).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA lên sự phát sinh chồi của sẹo mĩa

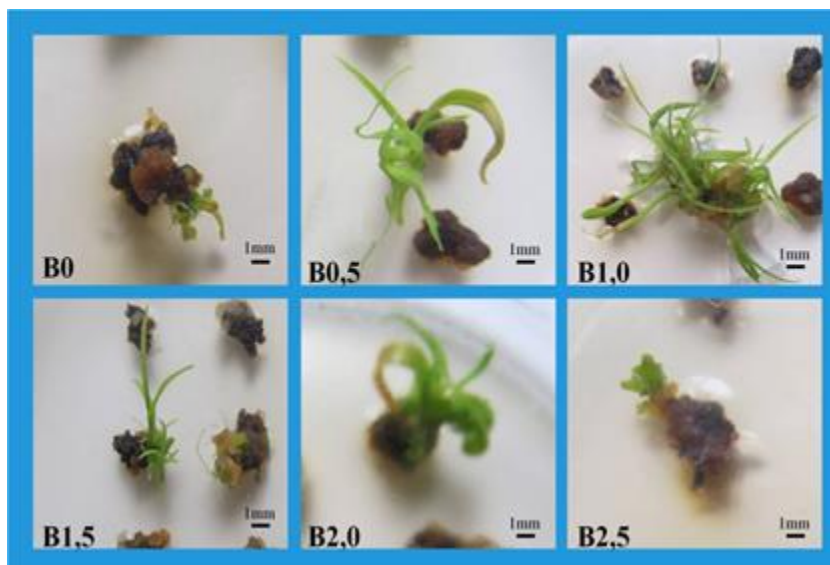
Nghiem thức	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)
B0	5,56 ± 4,81 ^c	0 – 1
B0,5	22,22 ± 4,81 ^{ab}	1
B1,0	30,56 ± 4,81 ^a	2 – 5
B1,5	30,56 ± 4,81 ^a	1 – 2
B2,0	19,44 ± 4,81 ^b	1
B2,5	19,44 ± 4,81 ^b	1

Sau 5 tuần nuôi cấy, các nghiệm thức có sự khác biệt về số chồi phát sinh từ một mẫu mô ban đầu (Hình 2). Nổi bật là nghiệm thức B1,0 với số chồi dao động 2-5 chồi/mẫu. Các nghiệm thức còn lại có số chồi/mẫu ít hơn và không có sự khác biệt rõ ràng.

Các chồi được tạo thành ban đầu không có sự khác biệt về hình thái nhưng sau 5 tuần nuôi cấy lại có sự khác biệt rõ ràng. Điều này có thể giải

thích rằng ở một số loài thực vật, mặc dù sự hình thành chồi được cảm ứng bởi cytokinin nhưng chồi không xuất hiện cho đến khi khúc cắt được chuyển sang môi trường giảm hoặc không có cytokinin [2].

Tóm lại, theo kết quả bảng 2, môi trường B1,0 là thích hợp nhất cho quá trình tạo chồi từ sẹo. Nồng độ BA 1,0 mg/L sẽ được sử dụng cho các nghiệm thức tiếp theo.



Hình 2. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo chồi từ sẹo sau 5 tuần nuôi cấy

Thí nghiệm 3: Khảo sát nồng độ PPT tối thiểu gây chết 100% cho mô mía

Các mẫu mô sẹo đối chứng trên môi trường không có PPT vẫn giữ nguyên màu sắc như ban đầu và phát triển tốt. Trong khi đó, các mẫu trên môi trường có PPT sau 1-2 tuần bắt đầu hóa vàng, nâu tùy theo nồng độ. Theo bảng 3, sau 3 tuần nuôi cấy, tỉ lệ sống của mẫu giảm khi nồng độ PPT tăng và các mẫu chết hoàn toàn ở nồng độ PPT 5 mg/L.

Bảng 3. Ảnh hưởng của PPT lên khả năng sống của sẹo mía

\	Tỉ lệ mẫu sống (%)
P0	100,00 ± 0,00 ^a
P1	50,00 ± 8,33 ^b
P2	38,89 ± 4,81 ^c
P3	36,11 ± 4,81 ^c
P4	16,67 ± 0,00 ^d
P5	0,00 ± 0,00 ^e

Thí nghiệm 4: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen và tái sinh chồi sau chuyển gen:

Trong lần đầu tiên, chúng tôi tiến hành trên 8 nghiệm thức kết hợp sự thay đổi các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen: nồng độ acetosyringone (100 μ M và 150 μ M), thời gian ủ mẫu với dịch khuẩn (15 và 30 phút) và thời gian phơi khô mẫu sau khi ủ (15 và 30 phút). Tuy nhiên, kết quả đạt được không như mong muốn,

các sẹo sau khi đồng nuôi cấy mang kiểm tra đều không biểu hiện GUS.

Những mẫu sẹo còn lại được chuyển lên môi trường chọn lọc kết hợp với tái sinh BAPT (môi trường BA1,0 bổ sung PPT 5 mg/L). Sau 2 tuần, nhận thấy một số mẫu có biểu hiện hình thành chồi, chúng tôi chuyển các mẫu sang môi trường kéo dài và nhân chồi BGPT (môi trường M bổ sung BA 1,0 mg/L, GA3 0,1 mg/L, PPT 5 mg/L) và kết quả thu được sau 3 tuần chọn lọc, tái sinh như Bảng 4:

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ AS, thời gian ủ mẫu với dịch khuẩn, thời gian phơi khô mẫu lên hiệu quả chuyển gen và tái sinh chồi

Nghiệm thức	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Tỉ lệ mẫu cảm ứng chồi (%)	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00	8,33	25,00	0,00

T1: Nồng độ AS 100 μ M, thời gian ủ mẫu 15 phút, thời gian phơi khô mẫu 15 phút

T2: Nồng độ AS 100 μ M, thời gian ủ mẫu 15 phút, thời gian phơi khô mẫu 30 phút

T3: Nồng độ AS 100 μ M, thời gian ủ mẫu 30 phút, thời gian phơi khô mẫu 15 phút

T4: Nồng độ AS 100 μ M, thời gian ủ mẫu 30 phút, thời gian phơi khô mẫu 30 phút

T5: Nồng độ AS 150 μ M, thời gian ủ mẫu 15 phút, thời gian phơi khô mẫu 15 phút

T6: Nồng độ AS 150 μ M, thời gian ủ mẫu 15 phút, thời gian phơi khô mẫu 30 phút

T7: Nồng độ AS 150 μ M, thời gian ủ mẫu 30 phút, thời gian phơi khô mẫu 15 phút

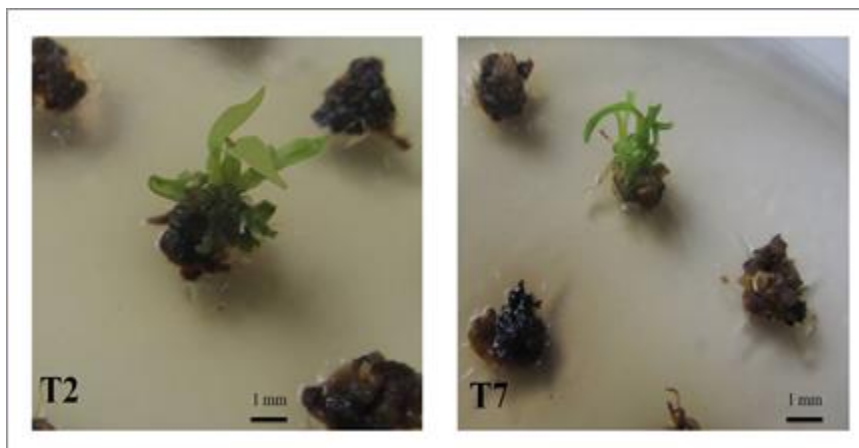
T8: Nồng độ AS 150 μ M, thời gian ủ mẫu 30 phút, thời gian phơi khô mẫu 30 phút

Theo quan sát thấy, nghiệm thức T2 và T7 đều có chung tỉ lệ cảm ứng chồi là 25%. Các mẫu cảm ứng chồi tiếp tục được chọn lọc trên môi trường bổ sung BGPT. Tuy nhiên, chỉ có mẫu chồi của nghiệm thức T2, T7 (chiếm 8,33%) phát

triển và nhân chồi, các mẫu khác sức sống yếu dần rồi chết đi. Tuy khác nhau về nồng độ AS, thời gian ủ mẫu và thời gian phơi khô mẫu nhưng 2 nghiệm thức T2 và T7 lại cho kết quả giống nhau, điều này có thể giải thích là do các nguyên nhân:

- **Môi trường cảm ứng tạo chồi ở thí nghiệm 2 chưa được tối ưu hóa làm cho các tế bào chuyển gen không có khả năng tái sinh.**
- Áp lực chọn lọc của PPT lớn, vi khuẩn xâm nhiễm làm giảm sức sống của mẫu mô. Mặc dù các tế bào được chuyển gen, nhưng những tế bào này không phát triển đủ mạnh để thắng được áp lực chọn lọc của PPT.
- Mẫu mô tiếp xúc không đồng đều với môi trường. Các tế bào chuyển gen nằm ở vị trí tiếp xúc với môi trường sẽ có khả năng sống sót và tái sinh thấp hơn so với các vị trí khác.

Trong lúc đợi mẫu chồi nhân lên, chúng tôi tiến hành lặp lại lần 3 và 4 nghiệm thức T2 và T7 để kiểm tra biểu hiện GUS nhưng kết quả cũng không như ý muốn.



Hình 3. Các chồi phát triển trên môi trường có PPT sau 6 tuần

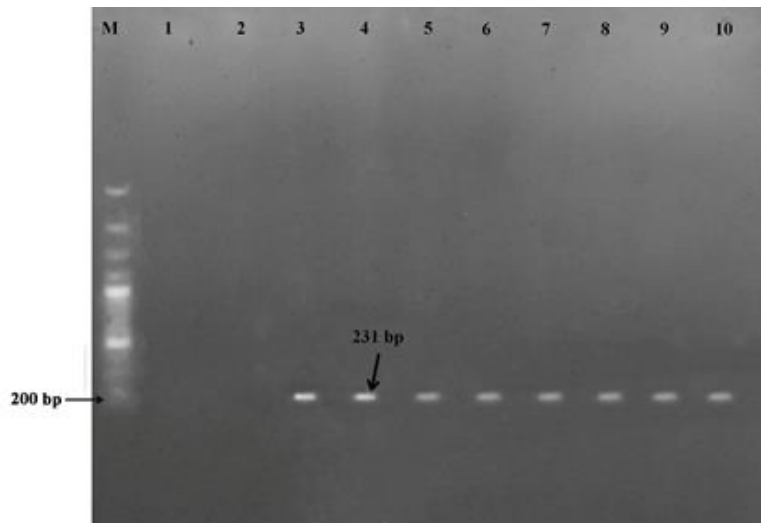
Cụm chồi ở nghiệm thức T2 và T7 sau 40 ngày qua 5 lần cấy chuyển trên môi trường bổ sung PPT 5 mg/L vẫn phát triển rất tốt (Hình 3) nhưng khi cắt lá mang thử nghiệm GUS lại cho kết quả âm tính.

Để có kết luận chắc chắn, cụm chồi T2 và T7 được chuyển sang môi trường nhân chồi BG (môi trường M bổ sung BA 1,0 mg/L, GA₃ 0,1 mg/L)

không bổ sung PPT để tạo nguồn vật liệu tách DNA và kiểm tra gen *bar*.

Kiểm tra sự hiện diện của gen *bar* trong chồi mía tái sinh trên môi trường chọn lọc bằng phương pháp PCR.

Sau khi tách chiết DNA chồi mía T2, T7 và chạy PCR gen *bar* với cặp mồi đặc hiệu BAR3/BAR4, chúng tôi thu được kết quả điện di như hình sau:



Hình 4. Kết quả điện di PCR gen *bar* chồi mía

Giếng M: Thang 100 bp; Giếng 1, 2: mẫu đối chứng âm (nước cất); Giếng 3, 4: mẫu đối chứng dương (sản phẩm PCR gen *bar* của plasmid pGII0229); Giếng 5, 6, 7: sản phẩm PCR gen *bar* chồi mía T2; Giếng 8, 9, 10: sản phẩm PCR gen *bar* chồi mía T7.

Theo kết quả điện di, DNA chồi mía T2, T7 có chứa gen *bar* có khả năng kháng PPT, tuy nhiên lại không biểu hiện GUS. Điều này có thể giải thích là do hiện tượng im lặng gen xảy ra trên vùng biểu hiện *gus*.

Như vậy, việc sử dụng nồng độ AS 100 μ M (thí nghiệm T2) và 150 μ M (thí nghiệm T7) đều có thể chuyển gen thành công với tỉ lệ giả định là 25%. Tuy nhiên việc sử dụng nồng độ AS cao và thời gian ủ mẫu với vi khuẩn lâu sẽ ảnh hưởng đến sức sống, sự tái sinh chồi cũng như sự biểu hiện gen của mẫu mô sẹo sau chuyển gen. Do đó, trong phạm vi khảo sát, thí nghiệm T2 (Nồng độ AS 100 μ M, thời gian ủ mẫu 15 phút, thời gian phơi khô mẫu 30 phút) là thích hợp nhất cho quy trình chuyển gen vào sẹo mía gián tiếp qua vi khuẩn *A. tumefaciens* và tái sinh chồi sau chuyển gen.

KẾT LUẬN

Để khảo sát sự chuyển gen trên cây mía với vật liệu từ mô sẹo, chúng tôi đã tạo được mô sẹo từ khúc cắt thân non mía trên môi trường bổ sung 2,4-D cũng như cảm ứng được chồi từ sẹo mía trên môi trường bổ sung BA.

Phương pháp chuyển gen trên mô sẹo mía thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* và tái sinh chồi bước đầu đã tạo được chồi chuyển gen với việc kết hợp các yếu tố: nồng độ AS, thời gian ủ mẫu với vi khuẩn và thời gian phơi khô mẫu. Trong đó, việc kết hợp nồng độ AS 100 μ M, ủ mẫu với vi khuẩn 15 phút, phơi khô mẫu 30 phút sau khi ủ là thích hợp nhất.

Môi trường bổ sung PPT 5 mg/L là thích hợp nhất cho việc chọn lọc mẫu mô sẹo chuyển gen, và thời gian chọn lọc là 3 tuần.

Transformation of callus sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* – Mediated method and regeneration of transgenic shoot

- Tran Van Ha
- Cung Hoang Phi Phuong
- Bui Van Le

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is a major industrial crop in the world. The creation of transgenic sugarcane varieties contributed to overcome the disadvantages of traditional farming methods. Immature

cutting cane stems after 10 days of putting on MS medium (Murashige and Skoog) supplemented 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 3 mg/L triggered the highest rate of explants inducing callus (91.11%).

Calli were cultured on MS medium supplemented 6- Benzyladenin (BA) with concentrations of 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/L for inducing shoot. All six concentrations of BA could induce shoot, but the concentration of BA 1 mg/L was the most suitable. The 4-to-5-week old calli were introduced desired gene by using

Agrobacterium tumefaciens, which was affected by acetosyringone concentration, inoculation and co-culture time. Consequently, transformation with acetosyringone 100 μ M or 150 μ M could be successful and regenerate transgenic shoots with assumed rate 25%.

Keyword: *Agrobacterium tumefaciens*, callus, regeneration, sugarcane, transformation.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Kohli, D. Gahakwa, P. Vain, D.A. Laurie, P. Christou, Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing, *Planta*, 208, 88-97 (1998).
- [2]. E.F. George, Plant propagation by tissue culture: Part 2, In practice, 2nd edition edition, Exegetics Ltd, Edington, Great Britain (1996).
- [3]. F.B. Salisbury, C. Ross, *Plant Physiology*, Wadsworth publishing Company Belmont, California a division of Wadsworth Inc (1992).
- [4]. K. Chengalrayan, A. Abouzid, M. Gallo-Meagher, In vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus, *In Vitro Cell*, 41, 477-482 (2005).
- [5]. P. Lakshmanan, R. Jason Geijkas, K.S. Aitken et al., Invited review: Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities, *In Vitro Cell*, 41, 345-363 (2005).
- [6]. S.M. Brumbley, S.J. Snyman, A. Gnanasambandam et al., Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Sugar, *Tuber and Fiber Crops*, Wiley-Blackwell Publishing, 7, 1-58 (2008).
- [7]. X. Li, Z. Zhu, D. Feng, T. Chang, X. Liu, Influence of DNA methylation on transgene expression, *Chinese Science Bulletin*, 46, 1300-1303 (2001).