

Botryosphaeria dothidea 突变体库的构建及分析

郑伟^{1,2}, 贾晓曼¹, 王玉珂³, 王怡霖¹, 孙庚午¹, 何邦令^{1*}, 刘会香^{1*}

1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018

2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100

3. 山东省泰安市第二中学, 山东 泰安 271000

摘要: *Botryosphaeria dothidea* 是重要的林果溃疡病害病原, 分布广, 危害重。本研究应用 ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) 介导的 *B. dothidea* 遗传转化体系成功构建了 1053 个转化子的突变体库, 并且通过继代培养、PCR 验证和 Southern blot 证明潮霉素 B 抗性基因整合到 *B. dothidea* 基因组中且可稳定遗传。以 *B. dothidea* sdau11-126 为对照, 对 526 株转化子的菌落形态、生长速率和致病性进行分析, 筛选获得了 8 个变异明显且稳定的突变体, 以期对 *B. dothidea* 致病基因的分离、克隆和功能鉴定奠定基础。

关键词: *Botryosphaeria dothidea*; 农杆菌介导转化 (ATMT); 突变体; 筛选

中图分类号: S763.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2017)01-0001-06

Construction and Evaluation of the Mutant Library of *Botryosphaeria dothidea*

ZHENG Wei^{1,2}, JIA Xiao-man¹, WANG Yu-ke³, WANG Yi-ling¹, SUN Gen-wu¹, HE Bang-ling^{1*}, LIU Hui-xiang^{1*}

1. College of Plant Protection/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2. College of Forestry/Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

3. Tai'an City Second Middle School in Shandong Province, Tai'an 271000, China

Abstract: *Botryosphaeria dothidea* is an important pathogen of forest and fruit trees and it is widely distributed and causes serious damage. In this study, mutant library of *B. dothidea* was constructed via ATMT mediated transformation and 1053 transformants were obtained. Hygromycin B resistance genes were integrated into the genome of the *B. dothidea*, and mitotically stable after several subcultures were tested by PCR amplification and Southern blot. The strain *B. dothidea* sdau11-126 was used as control to analyze colonial morphology, growth rate and pathogenicity of 526 transformants. Eight stable and obvious mutants were obtained by screening. This study will lay a foundation for isolating, cloning and functional identification of the pathogenic genes.

Keywords: *Botryosphaeria dothidea*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation(ATMT); mutants; screening

Botryosphaeria dothidea 属于囊菌门, 葡萄座腔菌属, 是引致林果溃疡病的重要病原, 其分布广泛、寄主范围广, 可侵染杨树、苹果树、梨树、桃树、桉树以及橄榄树等多个树种^[1], 引致果实腐烂、叶片斑点、枝干溃疡、顶梢枯死、树体流胶乃至整株树木的死亡^[2], 危害严重。因此, 揭示 *B. dothidea* 致病的分子机制是国内外学者关注的热点之一。

酶和毒素是 *B. dothidea* 致病机制研究最多的内容。酶和毒素可同时或分别在致病过程中起作用^[3]。Ki Woo Kim 等人对 *B. dothidea* 侵染果实的电镜观察发现, 在无伤口和自然孔口存在的情况下, *B. dothidea* 能分泌类似角质层降解酶的物质帮助其顺利侵染^[4]。韩国学者对被 *B. dothidea* 侵染过的苹果果实的提取物进行了分析, 发现其产生多聚半乳糖醛酸酶 (Polygalacturonase, PG)、聚甲基半乳糖醛酸酶 (pectin methyl galacturonic acid enzymes, PMG) 和多聚半乳糖醛酸反式消除酶 (poly-galacturonic acidtrans-elimination enzyme, PGTE) 等一系列果胶酶^[5]。但目前对 *B. dothidea* 致病机理的研究还处于初级阶段, 并不能直接证明哪种物质在致病过程中起主要作用, 更不能在深层次上揭示其致病机理。真菌 ATMT 突变体库的构建为真菌突变基因的筛选及生长发育相关机理的研

收稿日期: 2016-08-01

修回日期: 2016-10-27

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0201100); 国家科技部基础平台项目中国树木溃疡病重要病原微生物多样性及在中国的生态地理分布和危害调查(2009FY210100)

作者简介: 郑伟(1990-), 男, 河南安阳人, 硕士研究生. E-mail:610965956@qq.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:hebangling@126.com; hxliu722@126.com

究提供了良好的平台^[4]。虽然目前多种真菌 ATMT 突变体库的构建方法及相关基因的分离和克隆已取得重要研究进展^[6-8], 但 *B. dothidea* 在突变体库方面的研究较少, 本研究旨在建立 *B. dothidea* ATMT 介导的突变体, 并从中随机选取部分菌株, 对其表型和致病性等进行分析, 寻找致病突变体, 进而对致病相关基因进行分离和初步注释, 为寻找调控 *B. dothidea* 生长发育和致病性相关基因奠定基础。为明确其致病机理、掌握其与寄主的互作关系以及明确其发病规律等提供了科学依据, 最终为 *B. dothidea* 引致病害的有效控制提供新的思路和策略。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Botryosphaeria dothidea sdau11-126 菌株(对照菌株)分离自苹果果实(辽宁, 瓦房店 E121°13'; N39°45'), 经检测为强致病菌株; 质粒载体 pBht2(含 1.4 kb 的潮霉素抗性基因 *hph*), 农杆菌 AGL-1 放于 30%甘油中-80 °C 冻存。上述菌株均保存在山东农业大学林木与病原分子互作研究室。

1.2 实验方法

1.2.1 *B. dothidea* 突变体库的构建

1.2.1.1 对照菌株对潮霉素 B 敏感性测定 将对照菌株接种在 PDA 平板上, 28 °C 的培养箱中黑暗培养 4 d, 用直径 5 mm 的灭菌的打孔器在菌落周边打取菌丝块, 接种于含不同潮霉素浓度(0 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、75 μg/mL)的 PDA 平板的中央, 置于 28 °C 培养, 每个处理设 3 个重复。后用十字交叉法测量菌落直径, 筛选出能够抑制菌株生长的最佳浓度。

1.2.1.2 对照菌株原生质体的制备 对照菌株在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d 后, 加入 3 mL 无菌水, 用火焰灭菌的涂布器将平板上菌丝刮断, 将菌丝液转移到 200 mL PD 培养基中, 100 r/min 28 °C 培养 48 h。在超净工作台中, 用四层纱布过滤收集菌丝, 用 0.7 M NaCl 溶液冲洗菌丝几次, 用灭菌的滤纸和吸水纸滤干水分, 用 50 mL 灭菌离心管盛装菌丝, 称量干菌丝的重量备用。用 0.7 M NaCl 溶液溶解酶, 0.7 M/mL NaCl 溶解 0.015 g 崩溃酶和 0.015 g 裂解酶, 酶解液体积与菌丝质量的关系为: 3 mL/g。酶完全溶解后用注射器吸取酶液, 经过滤器将滤液加到盛菌丝的离心管中, 在 31 °C、100 r/min 的摇床中酶解 3.5 h。菌丝酶解后用细胞筛过滤除去残渣, 用 1~2 mL 0.7 M NaCl 冲洗残留在细胞筛上的原生质体两次, 收集所有的滤液盛于一灭菌的 50 mL 离心管中, 在 4 °C、3000 r/min 条件下离心 15 min, 小心弃上清, 用 1~2 mL 的 STC 轻轻用枪头吹打悬浮沉淀, 再离心 1 次, 再弃上清, 最后用 1 mL 的 STC 悬浮原生质体, 使其浓度为 6×10^6 /mL, 于-80 °C 条件下保存。

1.2.1.3 根癌农杆菌介导转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 首先将冻融法转化好的携带标记基因的农杆菌 AGL-1, 在 LB 固体平板培养基上划线培养, 长出菌落后挑选单菌落克隆, 牙签接种到 LB 液体培养基, 200 r/min 28 °C 过夜培养。

取上述培养液 1 mL, 12000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 用 200 μL AIM 液体充分悬浮菌体, 12000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 再用 200 μL AIM 充分悬浮菌体后转移菌体到试管中, 调节试管中农杆菌的浓度大约为 $OD_{600}=0.15$, 28 °C 水平摇床培养 5~6 h, 此时农杆菌的浓度 OD_{600} 值约为 0.5~0.6。

在超净工作台中往用 STC 保存的原生质体的 1.5 mL 离心管中加入 500 μL YPS, 放到 DNA 混合仪上恢复或者摇床 28 °C 条件下 100 r/min, 6 h。

加热已经准备好的固体 AIM 使之溶化, 等液态 AIM 凉到不烫手时加入 (spore element 500 μL/100 mL; 乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS) 200 μmol/L; 卡那霉素 50 μg/mL) 倒平板, AIM 凝固后再其上面覆盖硝酸纤维素膜 (NC 膜)。100 μL 培养好的经 AS 诱导培养的农杆菌和 250 μL 恢复细胞壁的原生质体混合后涂布在贴有硝酸纤维素膜的 AIM 平板, 22 °C 黑暗条件诱导培养 48 h。

农杆菌和原生质体共培养后, 将 AIM 上的 NC 膜用火焰灭菌的手术刀切成约 3 mm 宽的细条, 转移到筛选培养基中(不含 5% 山梨醇的 PDA 加热融化后加入潮霉素 50 μg/mL; 头孢霉素 40 μg/mL; 链霉素 50 μg/mL), 28 °C 培养 7 d 左右出现转化子, 将转化子再转移到筛选培养基上重复筛选 2 次。

随机挑选出 *B. dothidea* 菌株的转化子转接到含潮霉素的 PDA 平板上, 待长出后, 再转接至不含潮霉素的 PDA 连续继代培养 5 代后, 转接到含潮霉素的 PDA 平板上, 观察转化子是否仍对潮霉素表现出抗性。

分别对上述继代培养后的转化子采用 CTAB 法提取 DNA, 然后以 DNA 为模板, 用扩增潮霉素 B 抗性基因的上下游引物 *hph1* (5'-CAGCCTTGCTATCACATT-3') 序列, *hph2* (5'-AGCCCTGCTTCTTCCA-3') 序列进行 PCR 和 Southern blot 检测。

1.2.2 *B. dothidea* 突变体的筛选

1.2.2.1 菌落形态观察和生长速率测定 将供试的突变菌株在 PDA 平板上 28 °C 恒温培养 4 d 后, 观察记录各菌株菌落形状、颜色、气生菌丝的生长情况。分别于 2 d、3 d、4 d 用十字交叉法测量菌落生长直径, 计算菌落生长速率并用 SPSS 软件分析其差异显著性。每个菌株设 3 个重复, 并重复 3 次。

1.2.2.2 致病性测定 对照菌株和突变体菌株 PDA 培养基于 28 °C 培养 4 d, 菌落边缘取直径为 5 mm 的菌饼作为接种体备用。将红富士苹果果实表面洗净后用 75% 的酒精表面消毒, 最后用无菌水冲洗 3 次, 风干待用。试验采用人工接种法^[9,10], 28 °C 下培养。将野生型菌株和突变体菌株分别接种到苹果表面, 测量其在相同时间内病斑扩展直径。选用“海棠”叶片, 叶片表面处理方法同上, 然后用灭菌的湿棉花包住叶柄保湿。接种后的叶片放入托盘内 (盘底铺上灭菌的纱布), 盘口覆上保鲜膜, 于 28 °C 保湿培养。试验采用针刺伤 (均匀分布在直径 2 mm 的圆形区域) 的伤口处理方式, 刺伤部位避开叶片主脉。将 PDA 空白饼块、野生型菌株和突变体菌株分别接种到叶片表面, 测量其在相同时间内病斑扩展直径。SPSS 软件分析其差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *B. dothidea* 突变体库的构建

2.1.1 对照菌株在 PDA 上的菌落形态 对照菌株在 PDA 培养基上, 28 °C 培养 4 d 后菌落直径约 5 cm, 菌落边缘初生长的菌丝为白色, 中心菌丝为灰黑色, 产生黑色色素 (见图 1a)。

2.1.2 对照菌株对潮霉素 B 的敏感性测定 试验设置不同浓度梯度的潮霉素 B 对对照菌株进行敏感性测试, 结果所示 (见图 2), 当潮霉素浓度为 50 μg/mL 时, 对照菌株不能生长, 故本试验中采用 50 μg/mL 的潮霉素 B 用于筛选。

2.1.3 原生质体制备 获得的原生质体在显微镜下呈圆球形, 大小不一, 直径在 6.72 μm~32.35 μm 之间, 平均 21.71 μm (见图 1b)。

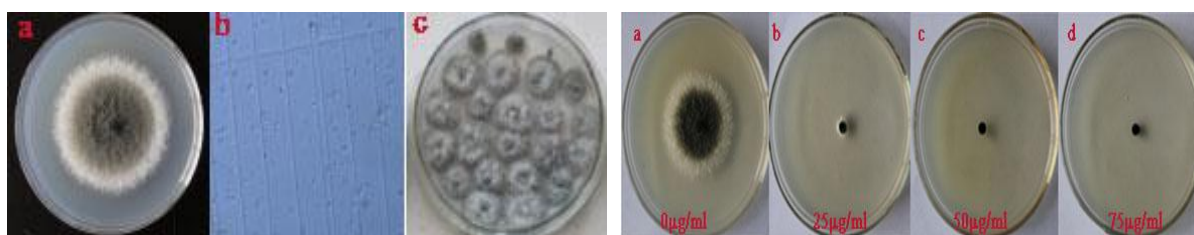


图 1 a: 对照菌株在 PDA 上菌落形态 (4d); b: 10×40 光学显微镜下原生质体; c: 通过 ATMT 获得的转化子
Fig.1 a: The colonial morphology of control strain on PDA (4d); b: Protoplasts were observed under 10×40 optical microscope; c: Transformants were obtained by ATMT

图 2 对照菌株对潮霉素 B 的敏感性测定
Fig. 2 Assessment of sensitivity of control strain to hygromycin B

2.1.4 根癌农杆菌介导转化 农杆菌介导原生质体的转化效率为每 10^6 个原生质体产生 25~40 个转化子。本试验转化 pBHt2 获得具有潮霉素抗性转化子 1053 个 (见图 1c)。

2.1.5 转化子的遗传稳定性分析 随机挑选转化子菌株转接在不含潮霉素 B 的 PDA 平板上连续继代培养 5 代后, 再接种到含有潮霉素 B 的培养基上, 转化子仍然能够在含有潮霉素 B 的平板上生长 (见图 3), 表现出对潮霉素 B 的抗性, 而对照菌株在含潮霉素 B 的 PDA 上不能生长。说明转化子 T-DNA

的插入具有遗传稳定性。



图 3 转接 5 代后在含潮霉素 B 的 PDA 上生长

1: 对照菌株, 2-6: 转化子

Fig.3 The fifth generation on PDA containing hygromycin B

1: cotrol strain, 2-6: transformants

2.1.6 转化子潮霉素 B 抗性基因 PCR 检测 随机挑选的转化子均可以扩增获得一条约 1.4 kb 的片段，与从质粒扩增出来的潮霉素 B 抗性基因片段相同，而对对照菌株 DNA 为模板没有扩增出任何条带（见图 4），说明 *hph* 基因已经整合进对照菌株的基因组中。以潮霉素 B 基因片段为探针对转化子进行 Southern blot 检测，结果显示 T-DNA 以单拷贝插入基因组中（见图 5）。

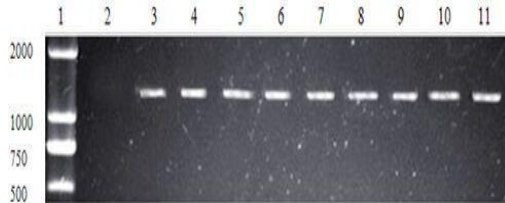


图 4 随机插入转化子潮霉素抗性基因 PCR 检测

1: Marker; 2: 对照菌株; 3-11: 转化子

Fig.4 PCR amplification of *hph* gene of random inserted-transformants

1: Marker; 2: control strain; 3-11: PCR amblicons of transformants

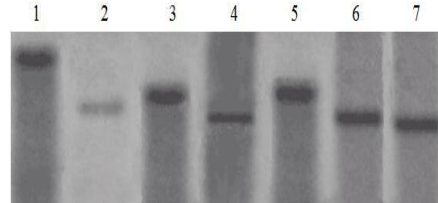


图 5 转化子 T-DNA 插入拷贝数检测

1: 质粒 pBHt2; 2-7: 转化子

Fig.5 Copy number of T-DNA insert of transformants

1: plasmid pBHt2; 2-7: Transformants

2.2 B. dothidea 突变体的筛选

2.2.1 突变体菌落形态观察 对照菌株在 PDA 培养基上 28°C 培养 4d 后菌落形态同图 1a。在供试 526 个转化子中有 8 株菌落形态发生了明显变化，其中突变体 LW-31 和 LW-26 气生菌丝疏松且旺盛，菌落正面和反面一直保持为乳白色；突变体 LW-27、LW-22 气生菌丝稀薄且不旺盛，菌落正面和背面均为淡黄色；LW-100 气生菌丝稀薄不旺盛，菌落呈轮纹状，菌落正面和反面都是红褐色；LW-93 气生菌丝稀薄不旺盛，菌落边缘有水溶现象，菌落正面和反面都是红褐色；LW-7 气生菌丝疏松且旺盛，菌落初期为灰白色，后期变为灰褐色；LW-111 菌丝稀松旺盛，菌落为乳白色并有两个同心环状凹陷（见图 6）。

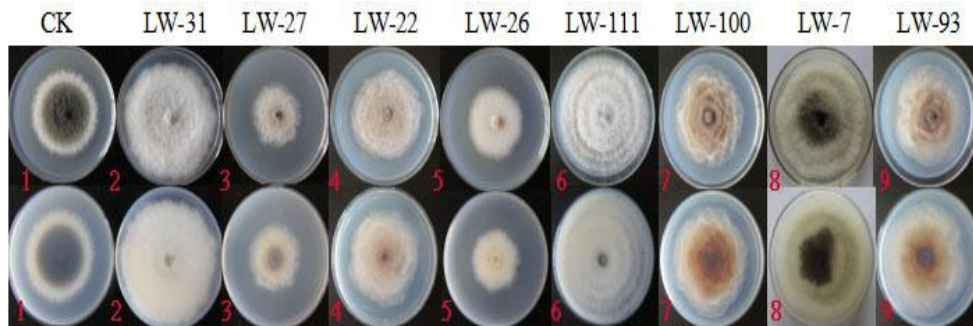


图 6 对照菌株和突变菌株在 PDA 上菌落形态 (4d)

Fig.6 Colony morphology of control strain and mutants strains on PDA(4d)

2.2.2 突变体生长特性测定分析 对照菌株和 8 个突变体菌株菌落直径（见图 6）、生长速率（见图 7）测定结果发现突变体 LW-7、LW-31、LW-111 菌株生长速率明显比对照菌株快，生长速率分别增快了 27.60%、29.35%、27.83%，并且与对照菌株相比存在显著差异（见表 1）。突变体 LW-27 和 LW-26 菌株生长速率明显比对照菌株慢，生长速率分别减慢 26.84%和 24.43%，并且与对照菌株相比存在显

著差异。

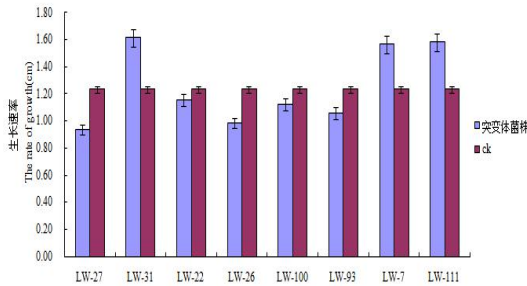


图 7 对照菌株与突变菌株菌落生长速率的比较
Fig.7 Comparison of the growth rate between control strain and mutants strains

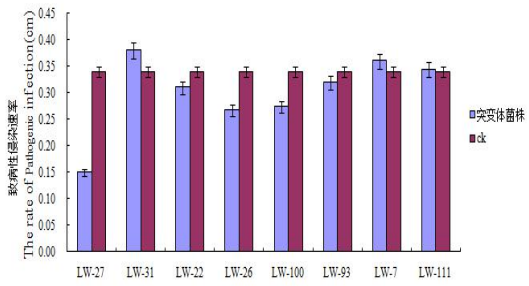


图 8 对照菌株与突变菌株侵染苹果速率比较
Fig.8 Comparison of infection rate between control strain and mutants strains

表 1 对照菌株和突变菌株在菌落生长速率和致病性两方面方差分析
Table 1 Variance analysis of two aspects of colony growth rates and pathogenicity of control strain and mutants strains

菌株 Strain	菌落直径/cm Colony diameter	侵染苹果病斑直径/cm The spot diameter of infection apple	侵染叶片病斑直径/cm The spot diameter of infection leaves
CK	6.18±0.11 ^b	3.06±0.31 ^b	1.05±0.15 ^b
LW-27	4.24±0.16 ^c	1.38±0.14 ^c	0.53±0.10 ^c
LW-31	8.08±0.19 ^a	3.42±0.21 ^a	1.62±0.18 ^a
LW-22	5.78±0.13 ^b	2.82±0.18 ^b	0.74±0.12 ^b
LW-26	4.67±0.17 ^c	2.40±0.13 ^c	0.66±0.08 ^c
LW-100	4.72±0.20 ^b	2.46±0.20 ^c	1.18±0.20 ^b
LW-93	4.64±0.15 ^b	2.90±0.15 ^b	1.00±0.15 ^b
LW-7	7.82±0.24 ^a	3.26±0.12 ^a	1.47±0.20 ^a
LW-111	7.90±0.14 ^a	3.10±0.19 ^b	0.83±0.16 ^b

注:每列中字母相同者表示差异未达显著水平($P>0.05$), 字母不同者表示差异达显著水平($P<0.05$)。

Note: The same alphabets in right side of the same list show no significance ($P>0.05$), on the contrary, having significance ($P<0.05$).

2.2.3 突变体致病性测定 测量对照菌株和突变菌株在苹果果实上病斑扩展直径(见图 9), 计算病斑平均扩展速率(见图 8)。突变菌株 LW-7 和 LW-31 致病性比对照菌株致病性增强, 分别增强了 13.76%和 10.65%, 并且与对照菌株存在显著差异; 突变菌株 LW-27、LW-26、LW-100 比对照菌株致病性减弱, 分别减弱了 54.90%、25.68%、26.86%, 并且与对照菌株存在显著差异; 突变菌株 LW-93、LW-22、LW-111 与对照菌株没有差异显著性(见表 1)。

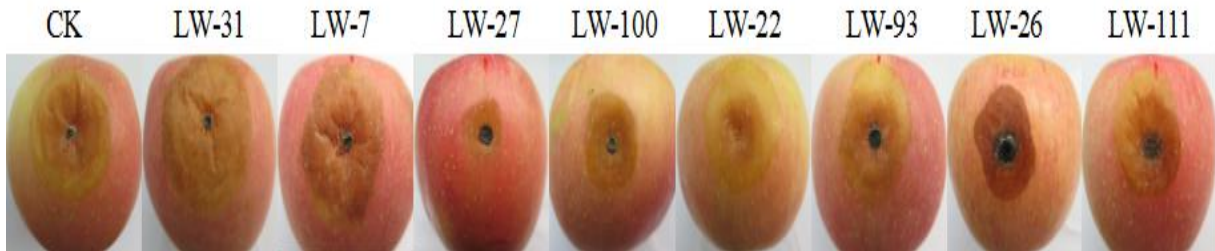


图 9 对照菌株和突变菌株致病力测定(4 d)

Fig.9 Pathogenic force measurement of control strain and mutants strains(4 d)

测量对照菌株和突变体接种于离体海棠叶片上病斑扩展直径(见图 10)。经多次重复实验统计后发现: 突变菌株在海棠叶片的致病性和在苹果果实的致病性基本一致。突变菌株 LW-7 和 LW-31 致病性比对照菌株致病性增强, 分别增强了 40.38%和 54.28%, 并且与对照菌株存在显著差异; 突变菌株 LW-27、LW-26 比对照菌株致病性减弱, 分别减弱了 49.52%、37.14%, 并且与对照菌株存在显著差异; 突变菌株 LW-93、LW-22、LW-111、LW-100 与对照菌株没有差异显著性(见表 1)。



图 10 对照菌株和突变菌株致病力测定 (4 d)

Fig.10 Pathogenic force measurement of control strain and mutants strains(4 d)

注: a, b, c 表示接种位点: a 为 PDA 空白对照, b 为对照菌株, c 为接种突变体菌株。

Note : a, b and c were vaccination site : a. PDA(CK); b control strain; c mutants strains

3 讨论

目前, 已有很多研究人员运用 ATMT 方法成功实现了多种病原菌功能基因的定点突变和功能分析。根癌农杆菌介导的真菌遗传转化还具有高效产生标记突变体和分离、克隆相关突变基因的优势。与 PEG 法相比它可以用原生质体、菌丝、孢子和蘑菇的菌褶组织等材料转化, 受体广泛^[1]; 农杆菌介导转化方法得到的突变体单插入较多; 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化的效率是常规转化效率的 100~1000 倍; 而 PEG 介导的真菌遗传转化主要特点是操作简单, 对原生质体有一定的毒性, 变异率高, 且转化率也比较低^[1]。

本研究对 *B. dothidea* 突变体库内 526 个转化子筛选发现大部分菌株在菌落形态、菌落生长速率、致病性等性状上与对照菌株没有明显差异, 仅少数突变体表现出明显的差异。这与宋哲^[5]、王梅娟等^[7]的报道是一致的。出现这种现象的可能原因有: 外源基因是随机插入病原菌基因组的; 表型的改变不仅受外源基因的影响, 还同时受病原菌本身的株系、遗传转化体系以及插入拷贝数等众多因素影响。

4 结论

本研究在已建立并优化 ATMT 介导的 *B. dothidea* 遗传转化体系的基础上, 重点进行了突变体库的构建和表型筛选, 使 *B. dothidea* 突变体库容达 1053 个转化子, 其转化效率为每 10^6 个原生质体产生 25~40 个转化子, 并且通过继代培养、PCR 和 Southern blot 证明 *hph* 基因已经整合进对照野生菌株的基因组中, 而且可稳定遗传。通过对突变体菌落形态、生长速率、气生菌丝茂密程度及致病性等因子进行系统分析和重复筛选, 发现该菌株突变效率较低, 比较保守, 菌落颜色与该菌株的生长速率和致病性没有相关性, 菌株的生长速率与致病性存在正相关性。

参考文献

- [1] Phillips AJL, Alves A, Correia ACM, et al. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorph[J]. Mycologia, 2005,97(2):513-529
- [2] Liu HX, Li XD, Zhu XP, et al. First report of pomegranate stem scab caused by *Botryosphaeria dothidea* in China[J]. Plant Pathology, 2009,58(2):400
- [3] 陈 亮. *Botryosphaeria dothidea* 和 *Valsa mali* var. *mali* 遗传转化体系的建立[D].泰安:山东农业大学,2014:1-2
- [4] Kim KW, Park EW, Kim KS. Glyoxysomal nature of microbodies complexed with lipid globules in *Botryosphaeria dothidea*[J]. Phytopathology, 2004,94(9):970-977
- [5] 宋 哲. 苹果轮纹病菌突变体库建立和突变体表型分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2014:3-5
- [6] 范 雷. 灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体库的构建及其致病相关基因研究[D].武汉:华中农业大学,2012:7-13
- [7] 王梅娟, 李 坡, 吴 敏, 等. 玉米大斑病菌 ATMT 突变体库的构建及其分析[J]. 中国农业科学, 2012,45(12):2384-2392
- [8] 朱荷琴. 我国棉花黄萎病菌的致病力分化及致病相关基因的克隆与分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2013:13-15
- [9] 韦洁玲, 黄丽丽, 郜佐鹏, 等. 苹果树腐烂病室内快速评价方法的研究[J]. 植物病理学报, 2010,40(1):14-20
- [10] 臧 睿. 陕西省苹果树腐烂病菌不同分离株的生物学特性及致病性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006:31-33
- [11] 王 阳. 小麦条锈菌遗传转化体系的建立[D].杨凌:西北农林科技大学,2006:10-15