

## • 药材与资源 •

## 党参微卫星引物筛选及群体遗传多样性研究

李忠虎<sup>1</sup>, 刘晓东<sup>2</sup>, 王小琦<sup>2</sup>, 范彬<sup>2</sup>, 王兴东<sup>2</sup>, 赵桂仿<sup>1\*</sup>

1. 西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

2. 甘肃省肿瘤医院 放射科, 甘肃 兰州 730050

**摘要:** **目的** 利用筛选的党参多态性微卫星引物进行党参群体遗传多样性研究。**方法** 利用磁珠富集法分离党参核基因组微卫星引物, 并选取党参4个野生居群48个样品进行遗传多样性分析。**结果** 筛选出了10个能成功扩增党参样品的微卫星引物; 这些引物扩增产物的等位基因数目为5~14个, 观察杂合度范围为0.446~0.833, 期望杂合度范围为0.697~0.895; 使用4个党参近缘物种(轮叶党参、球花党参、鸡蛋参和长叶党参)进行引物通用性检测, 发现有5对引物(Cpi01、Cpi04、Cpi06、Cpi07和Cpi08)能同时在4个物种中成功扩增。**结论** 筛选出的多态性微卫星引物能用于党参的遗传多样性和群体遗传结构研究, 同时也能够用于党参属其他近缘物种的群体遗传学研究。

**关键词:** 党参; 微卫星; 遗传多样性; 居群; 引物筛选

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0210-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.019

**Microsatellite primer screening and population genetic diversity of *Codonopsis pilosula***LI Zhong-hu<sup>1</sup>, LIU Xiao-dong<sup>2</sup>, WANG Xiao-qi<sup>2</sup>, FAN Bin<sup>2</sup>, WANG Xing-dong<sup>2</sup>, ZHAO Gui-fang<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

2. Department of Radiology, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China

**Abstract: Objective** To study the genetic diversity of *Codonopsis pilosula* using the screened polymorphic microsatellite primers. **Methods** The microsatellite primers of *C. pilosula* were isolated based on nuclear genome by magnetic bead enrichment, and genetic diversity was examined in 48 individuals from four wild populations of *C. pilosula*. **Results** Ten microsatellite primers which could be used to amplify the sample of *C. pilosula* were screened and the number of alleles for the primer amplification products ranged 5—14. The ranges of observed and expected heterozygosities were 0.446—0.833 and 0.697—0.895, respectively. The transferability of these microsatellite loci was tested upon four closely related species (*C. lanceolata*, *C. subglobosa*, *C. convolvulacea*, and *C. longifolia*) of *C. pilosula*, among which five pairs of primers (Cpi01, Cpi04, Cpi06, Cpi07, and Cpi08) were successfully amplified. **Conclusion** These polymorphic microsatellite primers could be used to study the genetic diversity and population genetic structure of *C. pilosula* and those of other related species of *Codonopsis* Wall.

**Key words:** *Codonopsis pilosula* Nannf.; microsatellite; genetic diversity; population; primer screening

党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. 是桔梗科 (Campanulaceae) 党参属 *Codonopsis* Wall 的一种传统常用中药, 广泛用于治疗脾肺虚弱、内热消渴等症<sup>[1]</sup>。由于长期的过度采挖和利用, 现存党参野生资源逐渐变得稀少, 居群大量呈现片段化分布态势。

为了设计有效的保护和恢复策略, 急需对党参的群体遗传学资料进行研究。

微卫星DNA, 又称简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 具有多态性高、重复性好等优点<sup>[2]</sup>, 已广泛用于植物群体遗传多样性研究<sup>[3-4]</sup>。目前对

收稿日期: 2012-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41101058); 西北大学科研启动基金资助项目 (PR11054); 西北大学优秀青年学术骨干支持计划项目 (PR12146)

作者简介: 李忠虎 (1981—), 男, 甘肃平凉人, 讲师, 博士, 主要从事植物分子群体遗传学、系统发育与进化研究。

Tel: 18706841871 E-mail: lizhonghu@nwu.edu.cn

\*通信作者 赵桂仿 Tel: (029)88305264 E-mail: gfzhao@nwu.edu.cn

党参遗传多样性的研究仅限于 RAPD 标记<sup>[5-7]</sup>, 本研究筛选党参多态性微卫星引物, 并进行群体遗传多样性研究, 旨在为党参植物资源的利用和保护提供科学依据。

## 1 材料

材料采自 4 个党参野生居群 (表 1), 每个居群

采集 12 个个体, 共 48 个个体样品。野外采集新鲜健康的幼嫩叶片后, 用硅胶迅速干燥, 标号并记录样品的海拔、经纬度、生境等信息, 带回实验室, 保存于 -20 °C 冰箱内备用。所有样品的凭证标本保存于西北大学生命科学学院西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室。

表 1 党参 4 个野生居群的取样数量和地理分布

Table 1 Sampling number and geographic distribution of four wild populations of *C. pilosula*

代号	采集地点	经度 (E)	纬度 (N)	样品数
ZZ	甘肃省文县中寨乡	104.683 6°	32.944 5°	12
ZS	陕西省柞水县营盘林场	109.115 2°	33.687 5°	12
MX	陕西省眉县太白山蒿坪寺	107.854 6°	34.156 2°	12
HX	陕西省户县光头山	108.572 3°	34.015 6°	12

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取

采用 CTAB 法<sup>[8]</sup>, 从硅胶干燥的叶片中提取党参基因组 DNA, 并对提取步骤略加改进。提取的 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测其浓度和纯度。

### 2.2 基因组 DNA 的酶切与接头连接

选取适当的限制性内切酶 (Rsa I) 消化基因组 DNA, 37 °C 温浴 2 h。将 DNA 切成约 500~1 000 bp 大小的片段, 以期得到含有足够微卫星 DNA 的序列。酶切产物用寡核苷酸双链接头 5'-GTTTAAGG-CCTAGCTAGCAGAATC-3' 和 5'-pGATTCTGCTA-GCTAGGCCTTAAACAAAA-3' 进行连接。连接反应总体系 30 μL, 包括酶切产物 22 μL, 双链接头的等量混合物 7 μL, 1 μL 10× 连接酶缓冲液和 2 μL T4 DNA 连接酶。连接反应于 16 °C 水浴过夜, 取出后 65 °C 保温 15 min 灭活连接酶的活性。

### 2.3 连接产物 PCR 扩增

利用单链寡核苷酸引物 5'-GTTTAAGGCCTA-GCTAGCAGAATC-3' 对连接产物进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中含连接产物 1.0 μL, 寡核苷酸引物 0.3 μL, 牛血清白蛋白 (BSA) 0.5 μL, 12.5× Premix Taq 酶 (TaKaRa) 和 10.7 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 20 s, 52 °C 退火 20 s, 60 °C 延伸 20 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 7 min, 在 4 °C 保存。扩增结束后产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 然后利用纯化试剂盒将 300~500 bp 明亮的条带进行割胶纯化。

### 2.4 磁珠富集微卫星 DNA

将连接双链接头的 DNA 片段与用生物素标记

的微卫星探针 (AC)<sub>15</sub>、(GT)<sub>15</sub>、(AG)<sub>15</sub>、(CT)<sub>12</sub> 和 (CG)<sub>15</sub> 进行杂交。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 70 °C、5 s 进行 99 个循环, 每个循环降温 0.2 °C, 再 50 °C 保温 10 min; 然后 50 °C、5 s 进行 20 个循环, 每个循环降温 0.5 °C; 最后 15 °C 保温 10 min。按照 M-280 Streptavidin-coated Dynabeads 操作指南, 将与生物素探针杂交好的 DNA 与经过预先处理的磁珠悬浮液混合; 37 °C 温浴 1 h 并混匀; 然后在磁场中吸附磁珠, 并多次洗涤, 提取上清液 (其中含有微卫星 DNA 片段)。将富集获得含有微卫星的 DNA 片段进行 PCR 扩增恢复, PCR 结束后产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 并纯化片段大小在 300~500 bp 明亮的电泳条带。

### 2.5 微卫星片段的克隆与测序

将富集回收的 DNA 片段连接到载体 PMD19-T 上, 然后转化到感受态细胞 (JM109), 涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12~18 h (一般培养过夜), 进行挑斑 PCR 检测。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 选择片段大小在 400~800 bp 的条带进行纯化。纯化后的产物在 ABI 9700 PCR 仪上进行测序反应。反应总体系 10 μL, 包括 1 μL 模板 DNA (根据电泳条带的亮暗程度选择), 0.3 μL 测序试剂 BigDye, 1.85 μL 测序缓冲液, 1 μL M13 引物和 5.85 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增程序为 96 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 5 s, 60 °C 延伸 4 min, 共 25 个循环; 最后在 4 °C 保存。测序反应完成后, 将产物利用 NaAc 和乙醇试剂进行纯化, 最后利用 10 μL 甲酰胺溶解。溶解后的产物在 PCR 仪上变性 5 min, 迅速放到冰上冷却, 然后在 ABI-3130xl 遗传分析仪上读取数据, 进行序列分析。

## 2.6 测序结果分析

将所得的 DNA 峰图转化为基因序列,并用手工进行序列校对,然后利用 Clustal X 软件对所有序列进行多重比对分析,以去除重复的序列。用软件 SSR Hunter<sup>[9]</sup>进行潜在微卫星位点的搜索,同时对搜索得到的序列进行去接头处理。并利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

## 2.7 PCR 检测设计的引物

对合成的引物进行 PCR 扩增检测,选取在 45~60 °C 进行退火温度的梯度 PCR。20 μL 的反应体系包括 2.0 μL 10×PCR 缓冲液,50 ng 模板 DNA,1.0 μL dNTP 混合物,1×rTaq 酶,正、反向引物各 1.0 μL 和 16.8 μL ddH<sub>2</sub>O。反应程序如下:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s,48~56 °C (每个引物退火温度不同,根据具体情况设定)复性 30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环;72 °C 终延伸 7 min。反应结束后,PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

## 2.8 多态性分析

用摸索好最适扩增条件的引物对党参 4 个野生群体 48 份样品进行 PCR 扩增,从中筛选出扩增条带清晰、扩增稳定性良好、多态性高的引物,扩增步骤采用“2.7”项中的扩增体系和反应条件。PCR 扩增产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,

银染检测分析电泳条带。电泳完成后,通过 UVI Photo MV 软件分析条带的相对分子质量大小和 DNA 片段长度多态性。利用软件 GENEPOP<sup>[10]</sup>计算观察杂合度 (observed heterozygosity,  $H_O$ ) 和期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_E$ ) 等群体多态性信息,并检测引物位点是否偏离哈迪温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 和位点间的连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 情况。

## 3 结果与分析

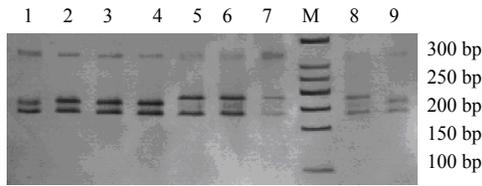
### 3.1 引物设计

对测序所得到的 280 条 DNA 序列用 SSR Hunter 软件进行检测,一般认为当 DNA 序列中含有两个或两个以上碱基单元连续重复 5 次以上时,认为这样的重复为微卫星。最后去除重复序列和测序太短的序列,共检测得到 42 条含有微卫星的 DNA 序列,对这些序列进行特异性引物设计。进行引物设计时主要考虑引物的退火温度、长度和预期片段大小等信息。同时,对设计的引物在党参野生群体样品中进行多态性检测,以期找到能够扩增出与预期片段大小相同或相近 DNA 条带的特异性引物。经过反复扩增实验,最后筛选了 10 对能成功扩增党参野生居群样品的引物 (表 2)。以引物 Cpi01 为例,对部分党参样品的扩增结果见图 1。

表 2 党参 10 对微卫星引物的遗传信息

Table 2 Basic genetic information of 10 pairs of microsatellite primers of *C. pilosula*

位点	引物序列	重复单元	片段大小 / bp	退火温度 / °C	等位基因数	$H_O$	$H_E$
Cpi01	F: GCTTATCACGGTCTCGCATAT R: GTGCCTTGAGTAAGTGAATTTGT	(TC) <sub>10</sub> (CA) <sub>5</sub>	121~179	53	11	0.778	0.835
Cpi02	F: GAAATCGCGTCGTGCTTGTG R: GTAAGTCTCTTTCTTGGA	(GT) <sub>5</sub> (GA) <sub>6</sub> (TG) <sub>7</sub> (GA) <sub>7</sub> (TTG) <sub>4</sub>	218~268	52	13	0.611	0.697
Cpi03	F: GAGGTTTATCAATCAGCCGAAAT R: CGACGAAAGGATAGGGAGGG	(GA) <sub>7</sub> (CT) <sub>9</sub>	238~270	56	7	0.446	0.768
Cpi04	F: CTCCCTCCATAGGTCCTCATT R: ACTCCAGCCATCAAGAACAC	(CT) <sub>8</sub> (CA) <sub>8</sub> (TTC) <sub>4</sub>	252~310	55	9	0.676	0.783
Cpi05	F: ATGTTACCCATTCTCTGTT R: GTGGTCCGTGGACTACTTTC	(GA) <sub>10</sub>	266~295	52	10	0.653	0.869
Cpi06	F: GCATGGATGCTCGTTGACTC R: TGCGGGCACTTATTGTTAG	(AC) <sub>9</sub>	136~176	53	14	0.833	0.895
Cpi07	F: CCATCATTGAAACCATGCTCTC R: AATCCAAAGTGCCGAGCCTCT	(TG) <sub>9</sub>	202~250	56	5	0.722	0.814
Cpi08	F: TCCCAGCAATGCAGCAAAT R: TTCAATCCCGTCGCTTCC	(GT) <sub>5</sub> (TG) <sub>14</sub>	206~239	53	12	0.792	0.865
Cpi09	F: GAAATGCCTCAAATACCCT R: GAAGAGTAATAAAGAGGGAG	(TC) <sub>5</sub> (TC) <sub>5</sub> (CT) <sub>4</sub>	226~258	52	8	0.562	0.737
Cpi10	F: ACAAATATGCTCTCCAAT R: CTCTTTCTATCTCCCTTCT	(AG) <sub>7</sub> (AG) <sub>4</sub> (AG) <sub>4</sub>	126~139	48	6	0.623	0.766



M-Marker 1, 2-ZZ 群体样品 3, 4-ZS 群体样品  
5~7-MX 群体样品 8, 9-HX 群体样品  
M-Marker 1 and 2-population ZZ 3 and 4-population ZS  
5—7-population MX 8 and 9-population HX

图 1 引物 Cpi01 对部分党参样品的扩增结果

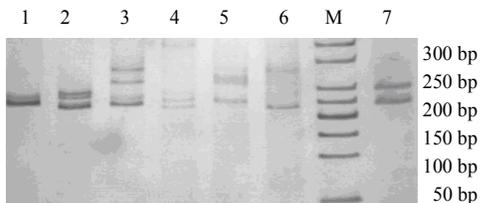
Fig. 1 Amplification of *C. pilosula* samples with Primer Cpi01

### 3.2 微卫星引物多态性分析

利用 GENEPOP 软件对筛选出的党参微卫星位点进行群体遗传多样性分析, 得到了等位基因数目和片段大小以及观察杂合度和期望杂合度等群体多态性信息(表 2)。10 对扩增成功的微卫星引物中检测到 5~14 个不等的等位基因数, 平均等位基因数目为 9.5 个。这些微卫星位点的  $H_O$  为 0.446~0.833, 平均值为 0.670;  $H_E$  为 0.697~0.895, 平均值为 0.803。就单个引物位点而言, 通常其  $H_E$  总是大于  $H_O$ 。经过 Hardy-Weinberg 平衡检测, 发现这些微卫星引物没有一个位点显著偏离 HWE, 位点间也不存在 LD 情况。通过分析  $H_O$  和  $H_E$  值, 说明各个群体之间存在较丰富的遗传多样性。

### 3.3 引物通用性检测

使用筛选出能够稳定扩增、多态性丰富的微卫星引物对野外采集的 4 个党参近缘物种(轮叶党参、球花党参、鸡蛋参和长叶党参)样品进行种间转移扩增, 并对扩增产物利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。结果表明, 5 对引物(Cpi01、Cpi04、Cpi06、Cpi07 和 Cpi08)能够成功在这 4 个党参近缘物种中扩增得到条带清晰的 PCR 产物, 以引物 Cpi07 为例, 见图 2。



M-Marker 1-轮叶党参 2, 3-球花党参 4, 5-鸡蛋参 6, 7-长叶党参  
M-Marker 1-*C. lanceolata* 2 and 3-*C. subglobosa*  
4 and 5-*C. convolvulacea* 6 and 7-*C. longifolia*

图 2 引物 Cpi07 对党参 4 个近缘物种的扩增结果

Fig. 2 Amplification of *C. pilosula* closely related species with Primer Cpi07

## 4 讨论

获得高质量的基因组 DNA 是进行分子生物学实验研究的基础。党参植物体内含有较多的多糖和酚类等次生代谢产物<sup>[11]</sup>, 在 DNA 提取时如何去除这些成分是实验成功与否的关键。本研究采用改进的 CTAB 法有效提取出了高质量的党参基因组 DNA, 为后续 DNA 的酶切-连接扩增以及微卫星引物富集等步骤打下了良好的基础。

一般认为, 微卫星富集法能够明显提高阳性微卫星位点克隆的得率, 但在实验中发现获得有序列的概率并不高。经常是测了很多序列, 但由于插入片段太短或者是 SSR 重复单元离插入末端太近而不能用来设计引物; 或侧翼序列中的二级结构太多, 不足以设计高质量的引物; 再加上设计出来的引物不能很好地在居群样品中成功扩增; 最终导致筛选出来具有明显清晰扩增条带的微卫星位点数太少。本实验共测定 280 个阳性克隆序列, 最终在 4 个党参野生群体 48 个样品中只成功筛选得到了 10 对易于扩增而且具有丰富多态性的引物。利用筛选出的引物对党参样品进行群体遗传多样性分析发现, 这些微卫星位点的等位基因 PCR 产物之间的大小差异均大于 20 bp。另外, 每个位点  $H_O$  都小于  $H_E$ , 说明党参野生群体样品中, 等位基因存在一定程度的杂合, 群体中存在一定程度的基因分化现象<sup>[5,7]</sup>, 这为后续党参的群体遗传学分析奠定了良好基础。

一般来说, 植物核基因组中微卫星两端的侧翼序列具有一定程度的保守性, 而且这种保守性在亲缘关系较近的物种之间比较明显, 这就使得物种间的交叉转移扩增成为可能, 并在一些近缘植物物种间的使用中得到了较好的效果<sup>[12-14]</sup>。但是转移扩增也存在一些局限, 主要表现在: (1) 种间交叉转移扩增要求目标物种的近缘种中已有一些微卫星位点被分离的情况下才能被采用; (2) 转移扩增往往存在多态性较低和片段长度较短等问题, 特别是在一些亲缘关系较远的物种之间; (3) 与直接分离目标物种的微卫星标记相比, 通过转移扩增得到的多态性位点数一般较少。尽管存在着这些不足, 但由于物种间的转移扩增能够节省研究时间和研究费用, 而且对仪器设备的要求也不高, 简单易行, 因此对于一些基因组学和遗传学信息比较少的物种, 应用物种间转移扩增法是获得这些物种微卫星的有效途径。在本研究中, 本课题组使用筛选出的 10 对党参微卫星引物对其 4 个近缘物种进行种间交叉转移扩

增,发现有 5 对引物在 4 个近缘物种能够成功扩增,这些引物将为后续党参近缘物种的群体遗传学分析和物种分化研究打下基础。

党参是我国的一种传统常用中药,也是一种多年生缠绕草本植物。党参野生资源一般分布于山地灌丛、林缘及河谷等地,有时在草坡多石砾地方也有分布,说明党参具有较强的环境适应能力。而一个物种对环境变化的适应能力主要取决于该物种是否具有丰富的遗传多样性或遗传变异能力,种内遗传多样性或遗传变异越丰富,物种对环境变化的适应能力越强。近年来,SSR 分子标记技术已被广泛应用于药用植物的遗传多样性分析<sup>[15-17]</sup>。本实验运用 SSR 分子标记技术,对党参的野外居群进行遗传多样性分析,结果显示,党参居群具有较丰富的遗传多样性水平,从 DNA 水平上验证了党参居群丰富的遗传变异能力,说明党参具有较强的环境适应能力,为后续党参属植物资源的保护、利用和评价奠定了良好基础。

#### 参考文献

- [1] 朱恩圆. 中药党参的质量评价研究 [D]. 南京: 中国药科大学, 2001.
- [2] 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] Bai W N, Liao W J, Zhang D Y. Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveal two refuge areas asymmetrical gene flow in a temperate walnut tree in East Asia [J]. *New Phytol*, 2010, 188: 892-901.
- [4] 李隆云, 陈大霞, 钟国跃, 等. 不同产地仙茅遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 967-971.
- [5] Guo H B, Lu B R, Wu Q H, *et al.* Abundant genetic diversity in cultivated *Codonopsis pilosula* populations revealed by RAPD polymorphisms [J]. *Genet Resour Crop Evo*, 2007, 54: 917-924.
- [6] Zhang Y B, Ngan F N, Wang Z T, *et al.* Random primer polymerase chain reaction differentiates *Codonopsis pilosula* from different localities [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 157-160.
- [7] 张建清, 苏 雪, 吴 琼, 等. 药用植物党参的 RAPD 分析 [J]. *中药材*, 2006, 29(5): 417-420.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [9] Li Q, Wan J M. SSRHunter: Development of a local searching software for SSR sites [J]. *Hereditas*, 2005, 27: 808.
- [10] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. *J Hered*, 1995, 86: 248-249.
- [11] 郭洪波. 野生与栽培党参遗传多样性及其保存和保护策略研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [12] Barbara T, Palma-Silva C, Paggi G M, *et al.* Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations [J]. *Mol Ecol*, 2007, 16: 3759-3767.
- [13] Escribano P, Viruel M A, Hormaza J I. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae) [J]. *Mol Ecol Note*, 2004, 4: 746-748.
- [14] Salywon A, Dierig D A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae) and cross-species amplification [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 382-384.
- [15] 李凤岚, 马小军. 药用植物分子遗传图谱研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(1): 129-133.
- [16] 葛淑俊, 孟义江, 李广敏, 等. 我国药用植物遗传多样性研究进展 [J]. *中草药*, 2006, 37(10): 1584-1589.
- [17] 吴天姝, 梁 翠, 李宏博, 等. 人参单一基因微卫星标记的分析 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(13): 2650-2660.