

龚瑞玥,方春林,万正义,等. 基于 SRAP 分子标记的黄颡鱼属遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):92-95.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.021

基于 SRAP 分子标记的黄颡鱼属遗传多样性分析

龚瑞玥¹, 方春林², 万正义³, 舒汉鼎¹, 胡成钰¹, 毛慧玲¹

(1. 南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330039; 2. 江西省水产科学研究所, 江西南昌 330039;

3. 江西省瑞昌长江四大家鱼原种场, 江西瑞昌 332200)

摘要:选用 64 对 SRAP 引物对黄颡鱼属进行遗传多样性研究。结果显示,有 46 对引物能成功扩增,其中 19 对条带清晰、显示较高多态性。检测其 PCR 产物共获得 179 条,每对引物扩增条带 5~15 条不等,扩增片段介于 90~510 bp 之间,物种间遗传相似系数范围为 0.500~1.000,黄颡鱼属各物种间具有较大的遗传差异性。SRAP 聚类结果显示,瓦氏黄颡鱼与其他物种差异最大,普通黄颡鱼、长须黄颡鱼和中间黄颡鱼亲缘关系较近。遗传多样性分析结果显示,5 种黄颡鱼遗传多样性处于较高水平,有助于后续深入对黄颡鱼属各物种亲缘关系和系统演化进行分析。

关键词:黄颡鱼属;SRAP;遗传多样性;遗传相似系数

中图分类号: S961.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0092-03

黄颡鱼俗称黄丫头,是备受我国老百姓喜爱的主要经济鱼类之一。据中国动物志中报道,黄颡鱼属共有普通黄颡鱼(*P. eupogon*)、长须黄颡鱼(*P. fulvidraco*)、瓦氏黄颡鱼(*P. vachelli*)、光泽黄颡鱼(*P. nitidus*)和中间黄颡鱼(*P. intermedius*)等 5 种,中间黄颡鱼仅分布于珠江水系及海南岛,其他 4 种均广泛分布于长江水系^[1-2]。随着市场对黄颡鱼需求的增大,其养殖规模不断扩大,随之出现鱼种混杂,品种退化现象,主要表现在生长速度变慢、抗病力及抗逆力降低等方面。从良种选育、养殖和种质资源保护角度考虑,亟须提供一种有效的方法来鉴别这些物种,并研究其遗传多样性。

序列相关扩增多态性(SRAP, sequence-related amplified polymorphism)分子标记是由美国加州大学蔬菜系 Li 等于 2001 年提出^[3],该标记具有简单、高效、高共显、高重复、易测序等优点^[4-5],广泛运用于物种遗传多样性、品种鉴定和亲缘关系的研究当中。本研究从分子水平角度,应用 SRAP 分子标记技术来鉴别黄颡鱼属 5 个种,并探讨它们的遗传多样性及其亲缘关系,为黄颡鱼属种质资源保护和开发利用提供理论资料^[6-7],对黄颡鱼渔业资源的可持续发展具有十分重要的科学指导意义。

1 材料与与方法

1.1 样品采集

2011 年 6 月至 2012 年 9 月,从江西鄱阳湖和广东西江野外采得鱼类(表 1),并应用传统形态学方法将它们逐一进行分类。

表 1 黄颡鱼属鱼类采样信息

物种	样本数(尾)	体长(mm)	地点
普通黄颡鱼(PT)	50	102.91~159.34	江西鄱阳湖
瓦氏黄颡鱼(WS)	35	100.15~182.77	江西鄱阳湖
长须黄颡鱼(CX)	42	96.91~163.65	江西鄱阳湖
光泽黄颡鱼(GZ)	70	91.76~120.22	江西鄱阳湖
中间黄颡鱼(ZJ)	8	8.12~10.25	广东西江

1.2 基因组 DNA

每个物种随机选取 4 尾,共 20 尾样品。取背部肌肉,采用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA^[8]。

1.3 SRAP 引物来源

由表 2 可知,SRAP 引物序列,将上游引物与下游引物交叉组合得到 64 对 SRAP 引物,按照简写上下游序号原则进行命名,如上游 2 号引物 me 与下游 3 号引物 em 组合而成的 SRAP 引物命名为 m2e3。

表 2 SRAP 引物序列

序号	上游引物	序号	下游引物
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCCTACGAATTAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCCTACGAATTAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCCTACGAATTAATTTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCCTACGAATTAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCCTACGAATTAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCCTACGAATTAATTTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	em7	GACTGCCTACGAATTAATTTCAA
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	em8	GACTGCCTACGAATTAATCTGT

1.4 PCR 扩增和电泳检测

20 μL SRAP 的 PCR 扩增体系含:100 ng/μL 模板 DNA 1.0 μL,50 μmol/L 上下游引物各 0.06 μL,10 × PCR buffer (Mg²⁺) 2.0 μL,200 μmol/L dNTPs 1.6 μL,5.0 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL,ddH₂O 15.08 μL;PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,5 个循环;94 °C 变性 1 min,53 °C 退火 1 min,72 °C

收稿日期:2015-08-15

基金项目:江西省科技支撑资助项目(编号:20112BBF60011);江西省教育厅科技资助项目(编号:GJJ14152)。

作者简介:龚瑞玥(1990—),女,江西南昌人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:enidpace713@gmail.com。

通信作者:毛慧玲,硕士,教授,主要从事鱼类遗传与育种研究。E-mail:huilinn6@163.com。

延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物多态性。

1.5 数据统计分析

对着 SRAP 的 PCR 扩增图谱, 自下而上按迁移率不同排列计数, 无带则赋值为“0”, 有带则赋值为“1”, 建立不同 SRAP 引物“0-1”矩阵表。应用软件包括 POPGENE32、POWERMARKER V3.25 等不同软件处理、分析“0-1”矩阵表数据, 获得等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、等位基因有效率(A)、多态信息含量(PIC)等遗传多样性指标。分别应用 NTSYS - pc2.0 软件、UPGMA 程序计算遗传相似系数^[9]、聚类分析^[10]。

2 结果与分析

2.1 SRAP 扩增结果

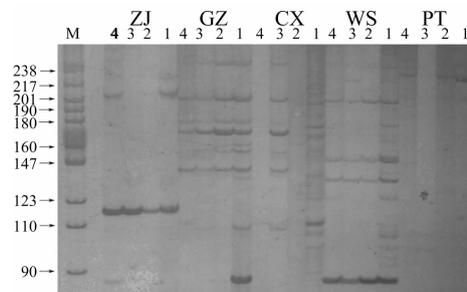
由 64 对 SRAP 引物扩增结果获悉, 46 对引物能成功扩增, 占引物总数的 71.9%。检测引物扩增的 PCR 产物, 共获得 179 条, 每对引物扩增条带 5~15 条不等, 扩增片段介于 90~510 bp 之间。由此可确定 46 对引物是黄颡鱼属 SRAP 标记的有效引物。

选取其中条带清晰、多态性较高的 19 对引物(表 3)用于分析。DNA 图谱(图 1)清楚地显示了引物 m2e1、m6e5 在 20 尾黄颡鱼样品特异性扩增产物所具有的多态性, 相同引物下

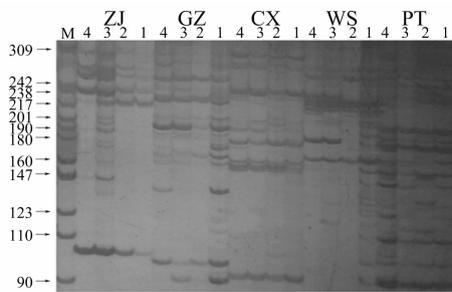
扩增出的同种不同个体均能显示明显的相同特征性条带, 体现出种内差异较小; 而同属不同种间条带差异明显, 多态性高, 清晰地体现出黄颡鱼属 5 个种之间的差异。

表 3 显示多态性高的 19 对 SRAP 引物

序号	引物	上游引物	下游引物
1	m1e1	TGAGTCCAAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAATTAAT
2	m1e7	TGAGTCCAAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAATTCAA
3	m2e1	TGAGTCCAAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAATTAAT
4	m2e4	TGAGTCCAAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAATTTGA
5	m2e5	TGAGTCCAAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAATTAAC
6	m2e7	TGAGTCCAAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAATTCAA
7	m3e5	TGAGTCCAAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTAATTAAC
8	m3e6	TGAGTCCAAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTAATTTGA
9	m3e7	TGAGTCCAAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTAATTCAA
10	m4e4	TGAGTCCAAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTAATTTGA
11	m5e1	TGAGTCCAAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAATTAAT
12	m5e6	TGAGTCCAAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAATTTGA
13	m5e7	TGAGTCCAAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAATTCAA
14	m6e2	TGAGTCCAAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTAATTTGC
15	m6e5	TGAGTCCAAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTAATTAAC
16	m6e6	TGAGTCCAAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTAATTTGA
17	m6e7	TGAGTCCAAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTAATTCAA
18	m8e1	TGAGTCCAAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTAATTAAT
19	m8e4	TGAGTCCAAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTAATTTGA



引物 m2e1 扩增后显示的胶图



引物 m6e5 扩增后显示的胶图

图 1 引物 m2e1 和 m6e5 在 20 尾黄颡鱼样品中显示的多态性

2.2 遗传多样性指标分析

19 对 SRAP 引物对黄颡鱼属 5 个物种 20 尾样品进行扩增, 检测到 118 个等位基因, 每个位点可扩增出的等位基因数为 4~8 个不等, 平均数为 6.2 个, 大小在 90~510 bp 之间, 计算出有效等位基因数。由表 4 可知, 有效等位基因数等位基因有效率、多态信息含量等平均数值分别为 5.348 6、0.834 2、0.766 7。由表 5 可见, 除中间黄颡鱼外的 4 个物种 Shannon 信息指数均较高, 特别是长须黄颡鱼高达 0.683 9。上述数据都是反映遗传多样性的指标, 其数值越大, 说明基因丰富度越高。

2.3 黄颡鱼属各种聚类分析

由图 2 可知, 根据 PCR 产物的多态性和聚类分析结果, 5 种黄颡鱼间遗传相似系数范围为 0.500~1.000, 这说明黄颡鱼属各物种间具有较大的遗传差异性。其中, 不同物种间遗传相似系数低, 同一物种间遗传相似系数高, 说明亲缘关系近。根据材料间的遗传相似系数对黄颡鱼属进行聚类分析, 在遗传相似系数为 0.50 水平时, 可将瓦氏黄颡鱼与其他物种区分开; 在遗传相似系数为 0.56 水平时, 可明确地将光泽黄颡

鱼与其他 3 个物种区分开来; 在遗传相似系数为 0.64 的水平下, 可将普通黄颡鱼与长须黄颡鱼、中间黄颡鱼分开; 随后在 0.72 水平时, 长须黄颡鱼和光泽黄颡鱼分为 2 类。综合来说, 供试的黄颡鱼属 5 个物种相似系数不高, 遗传距离相对较远, 分属于不同种。19 对 SRAP 引物所构成的各物种的特异性谱系, 能够为黄颡鱼属各物种提供更准确的分子水平上的鉴定。

3 讨论

SRAP 作为一种新型的分子标记技术, 不需要像 RAPD、SSR 标记那样花费大量人力和时间进行引物设计开发, 重复试验结果稳定, PCR 扩增所需求的 DNA 质量要求低, 最为重要的一点是 SRAP 标记稳定且多态性可与 AFLP 标记相媲美^[11-12]。本试验利用了 19 对 SRAP 引物对黄颡鱼属进行遗传多样性研究, 结果显示 5 种黄颡鱼遗传多样性处于较高水平。相对于其他几个物种而言, 中间黄颡鱼的多样性指数偏低, 原因可能是广州西江采样点为经济高度发达区域, 环境污染、过度捕捞等人为干扰比较严重, 而其余 4 个物种都采于生态环境较好的鄱阳湖, 物种受到破坏程度相对较小^[13]。

表4 19个SRAP引物扩增数据统计结果

引物	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	等位基因有效率 A	多态信息含量 PIC
m1e1	8.000 0	6.811 3	0.950 0	0.836 2
m1e7	4.000 0	4.000 0	0.400 0	0.703 1
m2e1	7.000 0	6.480 0	0.900 0	0.826 5
m2e4	5.000 0	4.500 0	0.600 0	0.743 8
m2e5	5.000 0	3.629 6	0.700 0	0.685 3
m2e7	7.000 0	6.164 4	0.750 0	0.816 4
m3e5	4.000 0	1.923 1	1.000 0	0.450 0
m3e6	6.000 0	6.000 0	0.600 0	0.810 2
m3e7	5.000 0	4.173 9	0.600 0	0.725 4
m4e4	6.000 0	4.571 4	0.800 0	0.754 4
m5e1	8.000 0	8.000 0	0.800 0	0.861 3
m5e6	8.000 0	7.142 9	1.000 0	0.844 2
m5e7	8.000 0	7.619 0	1.000 0	0.854 1
m6e2	6.000 0	5.000 0	1.000 0	0.771 6
m6e5	6.000 0	5.000 0	1.000 0	0.771 6
m6e6	6.000 0	5.333 3	0.800 0	0.786 1
m6e7	6.000 0	5.000 0	1.000 0	0.771 6
m8e1	7.000 0	5.555 6	1.000 0	0.797 8
m8e4	6.000 0	4.719 0	0.950 0	0.757 3
平均数	6.210 5	5.348 6	0.834 2	0.766 7

表5 黄颡鱼属的Shannon信息指数

物种	信息指数
普通黄颡鱼	0.620 2
瓦氏黄颡鱼	0.654 6
长须黄颡鱼	0.683 9
光泽黄颡鱼	0.651 5
中间黄颡鱼	0.576 4

对196个扩增条带构建的各物种特异性谱系,虽然能够用于对黄颡鱼属幼苗和幼鱼的鉴别,但是由于SRAP引物扩增出的条带较多,需通过多对引物扩增检测才能对黄颡鱼属进行区分,这将浪费大量人力、物力,如果将SRAP转化为SCAR标记能够克服这一缺点^[14-17]。丁炜东等通过SRAP方法对3种草鱼基因组进行分析,设计了3对SCAR引物,其中SCAR1能够区分人工养殖和野生草鱼种群^[18]。由此可见,将SRAP标记转化为SCAR标记后,其特异性和稳定性均大幅度提高,可以更方便快捷地应用于相似物种的鉴定。

鲮科鱼类的分类系统一直比较混乱,在属的划分上还存在许多争议,黄颡鱼属亦如此。肖调义等对洞庭湖4种黄颡鱼的生态学特征和遗传多样性的RAPD分析结果表明,长须黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼具有较近的亲缘关系,而光泽黄颡鱼与普通黄颡鱼关系较近^[19],与本研究结果相反。SRAP聚类结

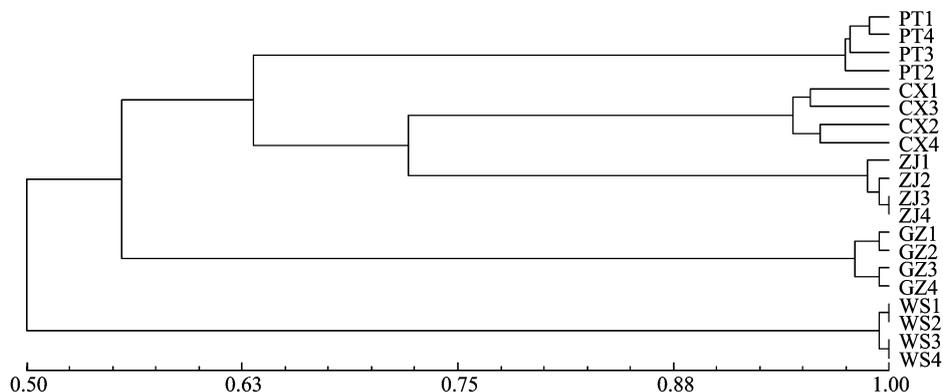


图2 19个SRAP标记对黄颡鱼属5个种的聚类图

果表明普通黄颡鱼和长须黄颡鱼关系相近,光泽黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼关系相近,这与丁言伟对黄颡鱼属分子系统发育研究结果^[20]相近;与赵哲霞等的SSR分析结果^[9]略有不同,主要原因可能在于普通黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼之间的位置调换了,各物种内遗传差异与SSR分析相比较小。其可能的原因在于SSR引物设计是根据普通黄颡鱼相关序列设计的,扩增出来的多态性条带相对于其他物种较多;而SRAP分子标记是通过独特的引物设计对ORFs进行扩增。

基因组DNA不同区域进化速率相差很大,而分子标记是根据特定序列设计引物进行扩增检测来解决所研究物种的亲缘关系和系统发生,结果肯定存在差别。至于选取那种方法得出的结论最准确、具有更高的可信性都还没有定论,需要之后进一步研究比较。

参考文献:

[1] 褚新洛,郑葆珊,戴定远,等. 中国动物志:硬骨鱼纲鲈形目[M]. 北京:科学出版社,1999:1-43.

- [2] 刘世平. 鄱阳湖黄颡鱼生物学研究[J]. 动物学杂志,1997,32(4):10-15.
- [3] Li G, Quiros C F. Genetic analysis, expression and molecular characterization of *BoGSL-ELONG*, a major gene involved in the aliphatic glucosinolate pathway of brassica species [J]. *Genetics*, 2002, 162(4):1937-1943.
- [4] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(2):280-288.
- [5] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(2):328-334.
- [6] Sekino M, Hara M. Inheritance characteristics of microsatellite DNA loci in experimental families of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(4):310-315.
- [7] Nakabo T. The third international symposium on the marine sciences

张仕林,许玉超,帅强,等. 洋葱不同组织 RNA 提取方法比较分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):95-97.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.022

洋葱不同组织 RNA 提取方法比较分析

张仕林^{1,2}, 许玉超¹, 帅强³, 邓鹏¹, 王建军¹

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,江苏南京 210095;
2. 上海蔬菜研究所,上海 201899; 3. 南京新农科创投资有限责任公司,江苏南京 211134)

摘要:探讨洋葱不同组织总 RNA 提取的最优方法,以期为今后开展洋葱的分子生物学研究奠定基础。以洋葱品种 W470 发育旺盛时期的叶片、根、鳞茎为材料,比较 TaKaRa 试剂盒法、TIANGEN 试剂盒法、TRIzol 法、pBIOZOL 法等 4 种 RNA 提取方法提取洋葱 RNA 的效果。凝胶电泳结果显示,除了 TIANGEN 试剂盒法不能提取洋葱根的总 RNA,其他方法在洋葱不同组织中均可提取到不同质量的 RNA。对不同方法提取洋葱 RNA 浓度、纯度进行检测发现,TaKaRa 试剂盒法提取洋葱叶片的总 RNA 浓度为 342.31 μg/g, pBiozol 法提取洋葱鳞茎、根的总 RNA 浓度分别为 1 119.39、171.85 μg/mL。经 RT-PCR 验证,TaKaRa 试剂盒法提取的洋葱叶片总 RNA、pBiozol 法提取洋葱鳞茎、根的总 RNA 均成功扩出洋葱 β-actin 基因片段。由结果可知,TaKaRa 试剂盒适合提取洋葱叶片的总 RNA,pBIOZOL 法适合提取洋葱鳞茎、根的总 RNA 且质量能够满足后续试验要求。

关键词:洋葱;总 RNA;RNA 提取;RT-PCR

中图分类号:S633.201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0095-03

洋葱 (*Allium cepa* L.) 为百合科葱属 2 年生蔬菜,在我国已广泛栽培,并作为主要的出口蔬菜品种之一^[1]。洋葱不仅可以作为蔬菜和调味品,而且因其糖类、硫化物含量丰富,从而具有降“三高”、降低和预防血栓形成风险以及预防心肌梗塞等功效。此外,洋葱还含有特殊的营养物质槲皮素,能抑制

癌细胞活性、阻止癌细胞生长、预防癌症^[2]。

RNA 是一种重要的遗传信息分子,提取高质量 RNA 是进行定量 PCR、RT-PCR、Northern 杂交和 cDNA 文库构建等相关研究的前提条件^[3-5]。目前有许多提取植物 RNA 的方法,例如 CTAB 法、SDS 法、Trizol 法等,但针对洋葱不同组织的 RNA 提取研究却鲜有报道。黄钰等对分蘖洋葱叶片 RNA 提取方法进行比较和分析^[3,6]。由于洋葱各种组织,尤其是叶片、鳞茎中含有丰富的多糖等次生代谢物,而且多糖会抑制酶的活性^[7],导致洋葱高质量 RNA 的提取受到制约。此外,由于洋葱不同组织内含物成分不尽相同,在具体操作过程中对 RNA 提取方法的要求也不一样。本试验通过对 TaKaRa

收稿日期:2015-09-11

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:200903018)。

作者简介:张仕林(1989—),男,四川广元人,硕士研究生,研究方向为洋葱遗传育种与分子生物学。E-mail:709744424@qq.com。

通信作者:王建军,硕士,副教授,主要从事洋葱遗传育种研究。
E-mail:wangjianjun@njau.edu.cn。

of the yellow sea[C]. Qingdao:Ocean Press,1994:81.

[8] 赵哲霞,蒋珊,王滨花,等. 黄颡鱼属 SSR 分子鉴定及其遗传多样性[J]. 南昌大学学报:理科版,2014,38(5):498-501.

[9] Yu H T, Lee Y J, Huang S W, et al. Genetic analysis of the populations of Japanese anchovy (*Engraulidae: Engraulis japonicus*) using microsatellite DNA[J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(5): 471-479.

[10] 何琳,王群. 基于 PCR 的 SSR 标记分离方法综述基因组学与应用生物学[J]. 遗传组学与应用生物学,2010,29(4):775-782.

[11] Ferriol M, Belén Picó M, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50(3): 227-238.

[12] Lin X Y, Kaul S, Rounsley S, et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature, 1999, 402: 761-768.

[13] 冉玮,张桂蓉,王卫民,等. 利用 SRAP 标记分析 3 个团头鲂群体的遗传多样性[J]. 华中农业大学学报,2010,29(5):601-

606.

[14] 谢传晓,朱苏文,李培金,等. 玉米对生性状两个显性基因 SCAR 分子标记[J]. 高技术通讯,2002,12(8):38-41.

[15] 张增艳,辛志勇,陈孝,等. 源于 LI 的小麦抗黄矮病基因的特异 PCR 标记及辅助育种的研究[J]. 作物学报,2002,28(4):486-491.

[16] 石金锋,贾建航,金德敏,等. 紫菜无性系特异 SCAR 标记的获得[J]. 海洋学报,2003,25(1):128-131.

[17] La Rosa R, Angiolillo A, Guerrero C, et al. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(7): 1273-1282.

[18] 丁炜东,曹丽萍,曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J]. 动物学报,2008,54(3):475-481.

[19] 肖调义,张学文,章怀云,等. 洞庭湖四种黄颡鱼基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(3):84-89.

[20] 丁言伟. 黄颡鱼属(硬骨鱼纲,鲶科)鱼类分子系统发育及种群遗传结构的研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005:1-58.