

## 天麻抗真菌蛋白对木霉菌丝的作用位点

徐荣华, 刘小烛\*

(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

**摘要:** 天麻抗真菌蛋白 (*Gastrodia* Antifungal Protein, GAFP) 能强烈抑制腐生真菌菌丝的生长, 在天麻限制和防止蜜环菌 [*Armillariella mellea* (Vahl. ex Fr.) Karst.] 侵染球茎的防卫机制中起重要作用。本文报告 GAFP 抗菌机理研究的部分内容——GAFP 对木霉菌丝的作用位点。用荧光试剂异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记 GAFP, 试验表明, 标记后的 GAFP 与未标记的 GAFP 对木霉菌丝生长均有抑制作用。在荧光显微镜下观察 GAFP 在木霉菌丝上的作用位点, 发现被“标记 GAFP”作用后的菌丝边缘有荧光, 并主要集中在木霉菌丝的顶端和菌丝横隔处, 表明 GAFP 对木霉的作用位点在菌丝的细胞壁上。

**关键词:** 天麻抗真菌蛋白; 木霉; 异硫氰酸荧光素; 作用位点

**中图分类号:** Q 945    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253 - 2700(2003)05 - 0573 - 06

**Action Site of *Gastrodia* Antifungal Protein on *Trichoderma* Hyphae**

XU Rong-Hua, LIU Xiao-Zhu

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

**Abstract:** The *Gastrodia* antifungal protein (GAFP) can strongly inhibit the mycelia growth of saprophytic fungi and plays an important role in the defence mechanism of plants to restrict and prevent the infection of the fungus *Armillariella mellea*. This paper reported a part of researches of antifungal mechanism of GAFP—the action site of GAFP on *Trichoderma* hyphae. GAFP had been labeled by Fluorescein isothiocyanate (FITC). The experiments showed GAFP labeled and GAFP alone both could inhibit the growth of *Trichoderma*. The action site of GAFP on *Trichoderma* hyphae had been observed by the fluorescence microscope. Fluorescence had been found on the edges of *Trichoderma* hyphae affected by the GAFP labeled. Fluorescence from the apex of *Trichoderma* hyphae and septum were stronger than that from the other place. It indicated that the action site of *Gastrodia* Antifungal Protein on *Trichoderma* hyphae was in the cell wall.

**Key words:** *Gastrodia* Antifungal Protein; *Trichoderma*; Fluorescein isothiocyanate; Action site

天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 是我国特有的一种兰科 (*Orchidaceae*) 非自养型的药用植物, 具有平肝息风、止痉等功效 (杨世林等, 2000), 近年来的研究发现天麻还有增智、

\* 通讯联系人 To whom correspondence should be addressed

收稿日期: 2003 - 02 - 27, 2003 - 03 - 28 接受发表

作者简介: 徐荣华 (1979 - ) 男, 硕士研究生, 主要从事植物生物化学和分子生物学研究。

健脑、延缓衰老的作用(杜贵友等, 1998)。天麻没有叶绿素, 不能光合作用, 依靠消化侵入其球茎的蜜环菌 [*Armillariella mellea* (Vahl. ex Fr.) Karst.] 提供营养而生长发育, 和蜜环菌是一种很特殊的共生关系。形态学上的证据表明: 在蜜环菌和天麻共生过程中, 蜜环菌的菌丝不能侵染当年生的顶生球茎, 而在蜜环菌侵染的头年生球茎中, 菌丝被限制在皮层的一定区域, 并在该处消化(周铨等, 1987)。在天麻生长过程中, 蜜环菌的侵染是天麻形成初生、次生球茎乃至开花结实的必要条件, 但侵入的蜜环菌菌丝只能局限在特定区域, 这说明天麻具有一种有力的阻止和限制真菌侵染的防御机制。

1988 年首次从天麻顶生球茎中分离得到一种 14 kD 的抗真菌蛋白(胡忠等, 1988), 命名为天麻抗真菌蛋白 (*Gastrodia* Antifungal Protein, 简称 GAFP-1), 后又分离到 GAFP-2, 在体外对绿色木霉和羊肚菌均有明显的抑制作用。研究表明: 天麻中虽然也存在几丁质酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶, 但它们的抗真菌作用和 GAFP 相比是次要的(杨增明和胡忠, 1990); GAFP 同天麻中的几丁质酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶均没有协同作用(胡忠和黄清藻, 1994), 同时 GAFP 也没有这两种酶活性。目前, GAFP 的基因已被克隆(胡忠等, 1999; 王晓晨等, 1999a), GAFP 的基因也被转入烟草(陈英等, 2002)和棉花(危晓薇等, 2001)。GAFP 的 cDNA 序列和火烧兰 (*Epipactis helleborine*)、二叶兰 (*Listera ovata*) 的甘露糖结合蛋白 (mannose-binding protein of *Epipactis helleborine*, EHMBP; mannose-binding protein of *Listera ovata*, LOMBP) (Van Damme 等, 1994) 以及雪花莲 (*Galanthus nivalis* L.) 的甘露糖结合凝集素 (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) (Van Damme 等, 1987) 具有很高的同源性, 在蛋白质理化性质方面亦很相近, 而且 GAFP 亦有同甘露糖和几丁质结合的特性(徐庆等, 1998)。

迄今为止, 对 GAFP 的研究已有很大的进展, 但是就 GAFP 结构与功能研究方面来说, 结构研究的报道较多, 而有关功能研究的报道却还很少。本文以 GAFP 对真菌细胞的作用位点作为抗菌机理研究的切入点来研究 GAFP 的功能, 采用荧光标记来研究 GAFP 对木霉的孢子和菌丝可能的作用位点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

绿色木霉 (*Trichoderma viride* Pers. Ex Fr.) 菌种由本实验室保存。供试天麻为昭通的乌天麻 (*Gastrodia elata* Bl. f. *glauca* S. Chow)。异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) isomer1 为 Sigma 产品; Sephadex G-25、Sephadex G-50、DEAE-Sephadex A25 为 Pharmacia 产品, CM-Cellulose 52 为 Whatman 产品, 小牛血清蛋白 (Albumin Bovine, BSA) 为 SIGMA 产品; 其余试剂除标明外均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 GAFP-1 的分离纯化

天麻抗真菌蛋白的分离纯化参考胡忠的方法(胡忠等, 1988)稍作修改: 将鲜球茎切碎(主要是皮和皮下 2~3 mm 处的组织), 于 0.2 mol/L 的氯化钠中匀浆,  $10^4 \times g$  冷冻离心去沉淀。上清用硫酸铵沉淀, 饱和度 80%, 用适量的 0.05 mol/L pH 6.0 的磷酸钠盐缓冲液溶解沉淀, 除去不溶物, 对 0.05 mol/L pH 6.0 的磷酸钠盐缓冲液充分透析。过 DEAE-Sephadex A25 (0.05 mol/L pH 6.0 的磷酸钠盐缓冲液平衡), 除去色素和酸性蛋白, 流出液经浓缩上 Sephadex-G50, 将第二个流出峰组分上 CM-Cellulose 52 柱, 用 pH 6.5 的 0.05 mol/L 磷酸钠盐缓冲液平衡, 0~0.4 mol/L 氯化钠 (pH 6.5) 梯度洗脱, 得到两个有抗真菌活性的峰, 收集峰 1, 脱盐浓缩, 冻成干粉备用, 即为 GAFP-1。

蛋白质电泳采用 Lammeli 系统的 SDS-PAGE, 胶浓度为 15%, 考马斯亮蓝染色。

### 1.2.2 GAFP-1 的荧光标记和纯化鉴定

天麻抗真菌蛋白和小牛血清蛋白的荧光标记: 取天麻抗真菌蛋白 (GAFP-1) 5 mg, 溶于 5 ml 稀醋酸缓冲液 (pH 6.0), 置于截留分子量 3 500 的透析袋中, 对 0.025 mol/L 的碳酸钠缓冲液透析 72 h, 每隔 6 h 换一次缓冲液。取 FITC 荧光素 1.5 mg, 溶于 1 ml 相同浓度的碳酸钠缓冲液中。将荧光素溶液缓缓加入天麻抗真菌蛋白溶液中, 边滴加边搅拌, 4℃ 慢速搅拌 2 h。小牛血清蛋白直接用 0.025 mol/L 的碳酸钠缓冲液溶解后, 浓度亦为 1 mg/ml, 荧光标记操作同上。

准备 Sephadex G-25 洗脱柱, 柱体积 10 ml, 用 0.005 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.4) 平衡。将上述标记过的天麻抗真菌蛋白 (GAFP-1) 溶液和小牛血清蛋白溶液分别上柱, 0.005 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.4) 洗脱, 紫外 (280 nm) 检测, 收集洗脱峰, 冷藏备用。

在直径 9 cm 的培养皿中加入马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) 约 8 ml, 取绿色木霉孢子接种培养皿的中心, 置于 25℃ 培养, 待菌丝向外蔓延的圆面直径约为 3 cm 时, 在前方滴加一定量的待测液, 继续培养, 以检测滴加待测液处是否有抑菌圈出现。

### 1.2.3 荧光标记的天麻抗真菌蛋白对木霉作用

接种绿色木霉菌种孢子于 20 mm 的玻璃平皿 (内含 PDA 平板培养基) 上 28℃ 活化培养, 24 h 后转接其新产生的孢子于 50 ml 三角瓶中 (内含 15 ml 的菌丝生长培养基, 0.5% 的酵母膏, 1% 的葡萄糖), 37℃ 水浴, 80 r/min 摇晃培养 18 h。取出 1.5 ml 的菌丝培养液于 1.5 ml 的离心管中, 800 r/min 离心 5 min, 收集菌丝, 使用 0.01 mol/L 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤菌丝 2 次, 除去残留的培养基成分, 每次洗完均离心, 向其中加入标记了 FITC 的 GAFP 或对照 (FITC 标记的 BSA), 室温 (25℃) 放置 10 min, 离心收集菌丝 (4℃ 800 r/min), 倾出上清, 使用 0.001 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤菌丝 2 次, 置于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 荧光显微镜观察。

接种木霉菌种孢子于 20 mm 的玻璃平皿 (内含 PDA 平板培养基) 上 28℃ 活化培养, 24 h 后用 0.01 mol/L 磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.4) 洗下培养基上新产生的孢子, 重新悬浮于相同浓度的磷酸盐缓冲液中, 孢子浓度约  $10^7$  个/L, 与荧光标记的天麻抗真菌蛋白作用的步骤同上, 荧光显微镜观察。

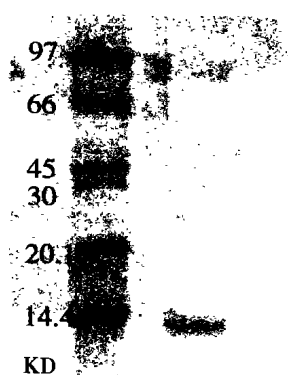


图 1 GAFP-1 的 SDS 电泳图谱  
左边为标准蛋白质的分子量 marker,  
右边为 GAFP-1

Fig.1 Patterns of GAFP-1' SDS-PAGE  
On the left lane are bands of standard  
molecular weight proteins; on the right  
lane is a band of GAFP-1.

## 2 结果

### 2.1 GAFP-1 的分离纯化

图 1 表明: 在 15% 的 SDS-PAGE 上, GAFP-1 显示出一条带, 分子量 14 kD。

### 2.2 FITC 标记的 GAFP-1 的纯化鉴定

FITC 标记 GAFP-1、BSA 反应后, 分别经 Sephadex G-25 凝胶过滤纯化, 紫外 (280 nm) 检测收集, 有明显的单一蛋白洗脱峰。图 2 显示: 未标记 FITC 的 GAFP-1 有抗真菌活性, FITC 标记后的 GAFP-1 仍有抗真菌活性, 未标记 FITC 的 BSA 无抗真菌活性, FITC 标记后的 BSA 仍未有抗真菌活性, FITC、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液均无抗真菌活性。

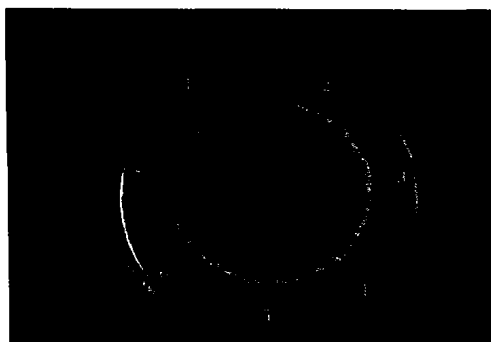


图2 抗真菌活性测试

测试真菌为绿色木霉。1 为 5  $\mu$ l GAFF-1 (1 mg/ml); 2 为 5  $\mu$ l FITC 标记的 GAFF-1 (1 mg/ml); 3 为 5  $\mu$ l BSA (1 mg/ml); 4 为 5  $\mu$ l FITC 标记的 BSA (1 mg/ml); 5 为 5  $\mu$ l 的 FITC (0.01 mg/ml); 6 为 5  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液 (0.001 mg/ml); 7 为 5  $\mu$ l 碳酸盐缓冲液 (0.01 mg/ml)。

Fig. 2 Antifungal test

The fungus tested was *Trichoderma viride*.

Sample (concentration)	volume	result
1. GAFF-1 (1 mg/ml)	5 $\mu$ l	+
2. GAFF-1 labeled by FITC (1 mg/ml)	5 $\mu$ l	+
3. BSA	5 $\mu$ l	-
4. BSA labeled by FITC (1 mg/ml)	5 $\mu$ l	-
5. FITC (0.01 mg/ml)	5 $\mu$ l	-
6. Phosphate buffer (0.001 mol/l)	5 $\mu$ l	-
7. Carbonate buffer (0.01 mol/l)	5 $\mu$ l	-

### 2.3 FITC 标记的 GAFF-1、BSA 对木霉菌丝及孢子作用的荧光显微镜观察

标记了 FITC 的 GAFF-1 作用后的木霉菌丝, 在荧光显微镜下可看到菌丝壁上有一定量的荧光, 但主要集中在菌丝的菌隔及顶端, 菌丝的其余部位虽然也有荧光, 较菌隔和菌丝顶端为弱。标记了 FITC 的 GAFF-1 作用后的木霉孢子在荧光显微镜下未见荧光。标记了 FITC 的 BSA 作用后的木霉菌丝及孢子都未见荧光。

### 3 讨论

已经报道过的分子量为 10kD (王晓晨等, 1999b) 的 GAFF 是从黄天麻中分离纯化的; 14 kD (胡忠等, 1988) 的 GAFF 则分离于红天麻。本文第一次报道来自乌天麻的天麻抗真菌蛋白 GAFF-1, 用 SDS-PAGE 测得其分子量为 14 kD, 在体外对绿色木霉的菌丝延伸有显著的抑制作用。本研究中, FITC 标记的 GAFF 作用后的木霉菌丝在荧光显微镜下可观察到荧光, 而 FITC 标记的 BSA (作为阴性对照) 作用后的木霉菌丝和 GAFF (作为阴性对照) 单独作用后的木霉菌丝上没有观察到可见的荧光, 这表明观察到荧光是 FITC 标记的 GAFF 结合真菌菌丝的结果。

FITC 标记的 BSA 作用后的木霉菌丝没有观察到荧光是因为 BSA 不能与真菌的菌丝结合; GAFF 单独作用后的木霉菌丝上未观察到荧光, 则是因为单独的 GAFF 虽然可以结合菌丝, 但它不能产生荧光。本实验中没有使用单独的 FITC 作用后的菌丝作为对照是因为 FITC 的分子较小 (分子量为 389.39), 很容易通过渗透作用进入菌丝细胞。徐庆等 (1998) 报道 GAFF 有结合甘露糖、几丁质、N-乙酰葡萄糖胺的特性, 而甘露糖、几丁质和 N-乙酰葡萄糖胺则是大多数真菌细胞的主要成分。目前已有证据表明一些抗真菌蛋白或抗菌肽的抗菌作用是与其专一性结合真菌细胞壁表面的甘露糖和几丁质有关。Bormann 等 (1999) 发现一种抗真菌的几丁质结合蛋白可与真菌新生细胞壁的  $\beta$ -几丁质相结合, 导致细胞极性的改变, 从而菌丝生长受抑制。在植物防御反应中起重要作用的植物凝集素 (Peumans & Van Damme, 1995; Rakhel 等, 1993), 如从荨麻中分离到的 UDA (*Urtica dioica* agglutinin) (Broekaert 等, 1989)、从橡胶中分离到的 HEVEIN (Van Parijs 等, 1991) 在体外对多种真菌都有明显的抗性, 而这两种凝集素的抗菌活性也被认为和几丁质结合有关。目前有抗真菌活性的几丁质结合蛋白 (chitin-binding protein) 也已从马铃薯、烟草、燕麦、西红柿等

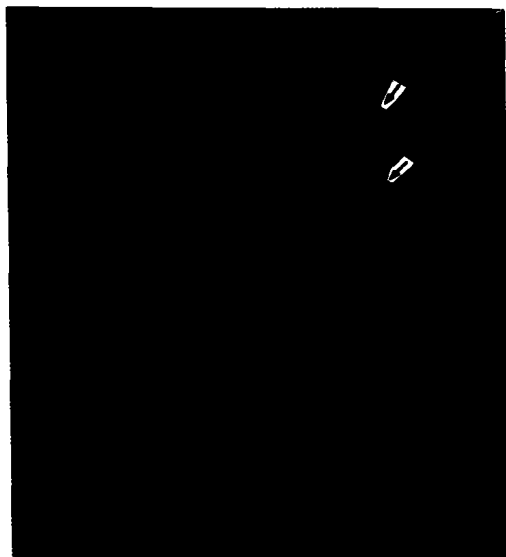


图3 GAFF (标记了 FITC) 对菌丝作用的荧光显微镜观察菌丝的中间虽然也有荧光, 但较菌隔和菌丝顶端为弱。

Fig. 3 Fluorescence microscopic images of *Trichoderma* hyphae reacted with FITC-labeled GAFF. Fluorescence from the apex of *Trichoderma* hyphae and septum were stronger than that from the other place.

多种植物中分离得到 (Friedrich 等, 1991; Hejgaard 等, 1992; Koo 等, 1998; Ponstein, 1994; Van Damme 等, 1999), 这些蛋白在氨基酸序列上同 HEVIEN 比较相似, 且一般具有几丁质的结合域, 分子量大多都在 13 ~ 14.5 kD 附近。GAFF 的分子量也很小, 对木霉等多种病原真菌的孢子萌发和菌丝延伸均有抑制作用 (胡忠等, 1988; 王晓晨等, 1999a, 1999b)。本实验使用 FITC 标记的 GAFF 与木霉的菌丝作用, 在荧光显微镜下观察到菌丝周围有荧光出现, 且以菌丝横隔和菌丝顶端较强, 表明 GAFF-1 抑制真菌生长的作用位点应该在真菌的细胞壁上。推断天麻抗真菌蛋白抑制真菌菌丝作用的位点可能是位于真菌细胞壁上的几丁质。真菌生长过程中, 真菌细胞壁上的几丁质水解和再合成存在一个平衡, GAFF 可能是通过结合几丁质, 打破这个平衡, 从而抑制真菌生长。菌丝的顶端和菌丝横隔处是几丁质的水解和再合成的活跃部位, 所以暴露出的几丁质残基也较真菌细胞壁的其他部分较多, 以至可结合的 GAFF 分子也较多, 这与观察到的菌

丝的顶端和菌丝横隔处的荧光较强也相一致。而 FITC 标记的 GAFF 作用后的孢子上未观察到明显的荧光, 可能是因为未萌发时的孢子还处于休眠封闭状态, 其胞壁结构和成分很少变化, 以致不结合或结合的 GAFF 很少。至于 GAFF 结合几丁质以后是如何起作用的, 真菌的生理生化会产生什么变化, 还需要实验的进一步证实。

致谢 本研究得到本所胡忠教授的指导以及曾英和王华等老师的热情帮助。

### 〔参 考 文 献〕

- 危晓薇, 黄全生, 王冬梅等, 2001. 天麻抗真菌蛋白基因转化彩色棉的初步筛选 [J]. 新疆农业科学, 38 (6): 352
- Bormann C, Baier D, Horr I, *et al*, 1999. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity [J]. *J Bacteriol*, 181: 7421—7429
- Broekaert WF, Van Parijs J, Leyns F, 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties [J]. *Science*, 245: 1100—1102
- Chen Y (陈英), Wang YQ (王义琴), Zhu GQ (诸葛强), *et al*, 2002. Acquisition of tobacco with transformation genes of GAFF (*Gastrodia* antifungal protein) and evaluation of antifungal activity *in vitro* [J]. *Journal of Plant Resources and Environments* (植物资源与环境), 11 (2): 1—5

- Du GY (杜贵友), Chen K (陈楷), Zhou WQ (周文全), *et al*, 1998. Clinical effect of tianma-cuzhi granules on senile vascular dementia [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, **11**: 695
- Friedrich L, Moyer M, Ward E, *et al*, 1991. Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2 [J]. *Mol Gen Genet*, **230**: 113—119
- Hu Z (胡忠), Yang ZM (杨增明), Wang J (王均), 1988. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Gastrodia elata* corm [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **10** (4): 373—380
- Hu Z (胡忠), Huang QZ (黄清藻), 1994. Induction and accumulation of the antifungal protein in *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **16** (2): 169—177
- Hu Z (胡忠), Huang QZ (黄清藻), Liu XZ (刘小烛), *et al*, 1999. Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFF-1 from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **21** (2): 131—138
- Hejgaard J, Jacobsen S, Bjorn SE, *et al*, 1992. Antifungal activity of chitin-binding PR-4 type proteins from barley grain and stressed leaf [J]. *FEBS Lett*, **307**: 389—392
- Koo JC, Lee SY, Chun HJ, *et al*, 1998. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1382**: 80—90
- Peumans WJ, Van Damme EJ, 1995. Lectins as plant defense proteins [J]. *Plant Physiol*, **109** (2): 347—352
- Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, *et al*, 1994. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity [J]. *Plant Physiol*, **104**: 109—118
- Rakheh NV, Lee H, Broekaert WF, 1993. Structure and function of chitin-binding proteins [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **44**: 591—615
- Van Damme EJ, Allen AK, Peumans WJ, 1987. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity toward mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs [J]. *FEBS Lett*, **215**: 140—144
- Van Damme EJ, Balzarini J, Smeets K, *et al*, 1994. The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities [J]. *Glycoconjugate J*, **11** (4): 321—332
- Van Damme EJ, Charels D, Roy S, *et al*, 1999. A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes [J]. *Plant Physiol*, **119** (4): 1547—1556
- Van Parijs J, Broekaert WF, Goldstein IJ, *et al*, 1991. Hevein: an anti-fungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex [J]. *Planta*, **183**: 258—262
- Wang XC (王晓晨), Xu Q (徐庆), Liu Y (刘颖), *et al*, 1999a. Inhibition of plant pathogenic fungi by lectin-like protein from *Gastrodia elata* Bl [J]. *Microbiol Bull* (微生物学通报), **26**: 256—260
- Wang XC (王晓晨), Willson Adiles DIAZ, Guy BAUW, *et al*, 1999b. Molecular cloning of GAFF-1, an antifungal protein from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **41** (10): 1041—1045
- Xu Q (徐庆), Liu Y (刘颖), Wang X (王晓晨), *et al*, 1998. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Gastrodia elata* [J]. *Plant Physiol Biochem*, **36** (12): 899—905
- Yang SL (杨世林), Lan J (兰进), Xu JT (徐锦堂), 2000. Progress of TianMa (*Gastrodia*) research [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **31** (1): 66—69
- Yang ZM (杨增明), Hu Z (胡忠), 1990. A preliminary study on the chitinase and  $\beta$ -1, 3-Glucanase in corms of *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **12** (4): 421—426
- Zhou X (周铉), Yang X (杨兴华), Liang HX (梁汉兴), *et al*, 1987. TianMa (*Gastrodia*) Morphology (天麻形态学) [M]. Beijing: Science Press, 76—94