

河南省西部山区小麦白粉菌 群体遗传多样性分析

霍云凤^{1,2} 曹丽华¹ 段霞瑜^{2*} 周益林² 宋玉立³ 何文兰³

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002)

摘要: 为揭示河南省小麦白粉菌群体遗传结构、起源及进化关系, 采用简单重复序列区间 (inter-simple sequence repeats, ISSR) 和扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分子标记技术对河南省西部山区 4 个小麦产区的 35 个小麦白粉菌单孢分离菌株进行了群体遗传多样性分析。结果显示: ISSR 和 AFLP 分析均将 35 个菌株分为 3 个组, 组 I 包括来自卢氏和灵宝的大部分菌株; 组 II 包括来自栾川、卢氏和巩义的菌株; 组 III 由 4 个地区的个别菌株组成, 同时包含 1 个闭囊壳释放子囊孢子获得的菌株。ISSR 分析出菌株遗传距离分布在 0.0139 ~ 0.6592 之间, 扩增多态性比率为 64.83%, 各菌株间的 Shannon 指数为 0.2749; 而 AFLP 分析所得的各菌株遗传距离变化幅度在 0.1257 ~ 0.9322 之间, 扩增多态性比率为 82.68%, 各菌株间的 Shannon 指数为 0.5100。可见, 河南省小麦白粉菌具有丰富的遗传多样性, 研究所用的 2 种方法均可用于遗传多样性分析, 其中 AFLP 分析小麦白粉菌群体表现出更为丰富的遗传多样性。

关键词: 小麦白粉菌; ISSR; AFLP; 遗传多样性

Genetic diversity of the wheat powdery mildew populations in the west of Henan Province

Huo Yunfeng^{1,2} Cao Lihua¹ Duan Xiayu^{2*} Zhou Yilin² Song Yuli³ He Wenlan³

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 2. State Key Lab for Biology of Plant Disease and Insect Pest, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to analyze the population genetic diversity of wheat powdery mildew, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, in four wheat production areas in the west of Henan Province. Thirty-five isolates from single colonies collected in Gongyi, Lingbao, Lushi and Luanchuan cities (counties) were divided into three groups based on UPGMA trees according to the data of AFLP and ISSR analysis. The first group mostly originated from Lushi and Lingbao. The second group included isolates from Luanchuan, Lushi and Gongyi. The isolates in the third group were collected from the above four areas including one isolate from chasmothesia. The results also showed that the range of genetic distance was 0.0139 – 0.6592, the polymorphic frequency was 64.83% and Shannon index was 0.2749 based on ISSR analysis, while the

基金项目: 国家“973”课题(2006CB100203), 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD08A05), 公益性行业(农业)科研专项(3-15)
作者简介: 霍云凤, 女, 1975年生, 讲师, 研究方向为小麦白粉菌遗传多样性, email: huoyunfeng218@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: xyduan@ippcaas.cn

收稿日期: 2010-04-19

range of genetic distance was 0.1257–0.9322, the polymorphic frequency was 82.68% and the Shannon index was 0.5100 based on AFLP analysis. The mildew pathogen displayed abundant genetic diversity in Henan Province. AFLP analysis revealed richer genetic diversity for wheat powdery mildew populations.

Key words: wheat powdery mildew; ISSR; AFLP; genetic diversity

小麦白粉菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 引起的小麦白粉病是我国小麦主产区发生普遍且危害极大的重要病害,重病田可减产 30% 以上^[1]。自 20 世纪 70 年代以来,河南省小麦白粉病危害明显加重,在 1981—1991 年 10 年中,有 7 年发病面积高达百万 hm^2 以上,1990 年发生最重,全省小麦产量损失在 5 亿 kg 左右^[2]。凌中南等^[3]将河南省小麦白粉病发生流行分为 6 个区:西部山地越夏区、沿河平原受害区、东部平原常发区、岗坡丘陵或沙碱地轻发生区、南部稻茬麦轻发生区,其中西部山地越夏区是小麦白粉菌的越夏基地,该地区秋苗发病最早、最重,春季受害时间最长。小麦白粉菌在西部山地越夏区自生麦苗上越夏,9 月中旬后随着气流传播到东部和南部秋播麦苗上,在越夏基地附近,处于地势低洼或沿河的麦苗发病最早,至 11 月中旬扩散到沿黄河稻茬区,第 2 年入春后,随气温升高,平原麦区开始发病,4 月下旬至 5 月上旬病茎率、病叶率、严重度的增长速率先后达到最大值^[3]。

对于小麦白粉菌群体的研究,传统方法是通过一套鉴别寄主研究小麦白粉菌生理小种或毒性的多样性,监测病菌的变异,其变异范围和数量是新毒性预测及抗病品种利用的重要依据。但是毒性鉴定耗时较长,工作量大,难以对较大的病原菌群体进行鉴定,也无法有效区别发病地区的菌源是否来自异地,此外,对重要小种的发生发展也缺乏预见性^[4]。随着分子生物学的发展,各种分子标记技术被应用于小麦白粉菌遗传多样性的分析。肖仲久等^[5]利用 RAPD 标记对贵州省 24 个小麦白粉菌单孢培养物进行了分析,结果表明 RAPD 标记在贵州省小麦白粉菌中存在较高的多态性;甘丽萍和王生荣^[6]利用 RAPD 标记对甘肃省中西部 20 个小麦白粉菌菌株进行了分析,得出小麦白粉菌在甘肃省存在较高的遗传多样性,且多样性与地理来源之间存在一定的相关性;贾少锋等^[7]将 ISSR 分子标记应用到小麦白粉菌的遗传多样性研究,对田间小区内白粉菌的群体多样性进行了初步分析,研究表明 ISSR 分子标记在小麦白粉菌遗传多样性研究上稳定性较好。而 AFLP 技术在小麦白粉菌遗传多样性方面的应用尚

未见报道。

根据已有的研究,河南省西部山区的越夏菌源是引起下一年度全省小麦白粉病的最初菌源^[3],但由于该地区不是河南省小麦主产区和高产区,受重视程度不够,加上传统毒性鉴定的手段存在一定的局限性,尚未对河南西部山地不同地区小麦白粉菌群体间的关系进行深入研究。本研究采用 ISSR 和 AFLP 技术分析了河南省西部山区不同小麦产区的白粉菌群体,探讨越夏菌源区小麦白粉菌群体遗传结构及区内不同群体之间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:试验所用小麦品种为感病品种铭贤 169,由中国农业科学院植物保护研究所白粉病组提供。小麦白粉菌菌株于 2008 年采自河南省西部山区的巩义市、灵宝市、卢氏县和栾川县(表 1),经 2 次挑取单菌落纯化、活体保存和繁殖。

引物序列来源见 <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html> 和徐志等^[8],由上海生工生物工程技术有限公司合成。从引物中筛选出多态性好、条带清晰的 ISSR 引物 10 个(表 2),AFLP 引物 6 对用于遗传多样性分析(表 3)。

主要试剂: *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 混合液、Marker 均购于天根生化科技有限公司;限制性内切酶 *Mse* I(发酵)、*Pst* I(发酵)和 T_4 -DNA 连接酶(发酵)购于上海生物工程技术有限公司。

主要仪器:电泳仪、水平电泳槽,北京六一仪器厂;Bio-Rad 凝胶成像系统、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪及电泳槽,美国伯乐公司;T Gradient 96 PCR 仪,德国 Biometra 公司。

1.2 方法

1.2.1 小麦白粉菌分生孢子的收集和菌株保存

小麦白粉菌菌种的分离纯化:采集的样品接种于大试管中的小麦无菌苗上,大试管顶部用 4 层纱布封口,于 18 °C 光照条件下培养 5 天,待植株叶片上可见侵染点但尚未产孢时剪取具有单个分生孢子堆的叶段,插入含 60 mg/L 苯胺咪唑水琼脂培养基

表 1 河南省小麦白粉菌菌株编号及来源

Table 1 The code and the source of the wheat powdery mildew isolates

编号 Code	菌株 Isolate	来源 Source	采集时间 (月-日) Date of collection (month-day)	编号 Code	菌株 Isolate	来源 Source	采集时间 (月-日) Date of collection (month-day)
57	08-11-1-2	灵宝市 Lingbao City	09-18	87	08-11-17-4	巩义市 Gongyi City	09-21
58	08-11-1-3	灵宝市 Lingbao City	09-18	89	08-11-18-3	栾川县 Luanchuan County	09-20
60	08-11-1-6	灵宝市 Lingbao City	09-18	90	08-11-18-4	栾川县 Luanchuan County	09-20
62	08-11-2-2	灵宝市 Lingbao City	09-18	92	08-11-19-1	卢氏县 Lushi County	09-19
63	08-11-2-5	灵宝市 Lingbao City	09-18	94	08-11-19-3	卢氏县 Lushi County	09-19
64	08-11-2-6	灵宝市 Lingbao City	09-18	95	08-11-23-1	栾川县 Luanchuan County	09-20
67	08-11-7-2	卢氏县 Lushi County	09-19	97	08-11-23-3	栾川县 Luanchuan County	09-20
68	08-11-8-5	灵宝市 Lingbao City	09-18	98	08-11-24-2	卢氏县 Lushi County	09-19
69	08-11-10-1	灵宝市 Lingbao City	09-18	100	08-11-24-4	卢氏县 Lushi County	09-19
73	08-11-13-6	卢氏县 Lushi County	09-19	101	08-11-24-5	卢氏县 Lushi County	09-19
74	08-11-13-7	卢氏县 Lushi County	09-19	102	08-11-25-1	栾川县 Luanchuan County	09-20
76	08-11-14-1	卢氏县 Lushi County	09-19	103	08-11-25-2	栾川县 Luanchuan County	09-20
78	08-11-15-5	栾川县 Luanchuan County	09-20	105	08-11-26-1	栾川县 Luanchuan County	09-20
79	08-11-16-1	卢氏县 Lushi County	09-19	106	08-11-26-3	栾川县 Luanchuan County	09-20
82	08-11-16-4	卢氏县 Lushi County	09-19	110	08-11-35-2	巩义市 Gongyi City	12-27
83	08-11-16-6	卢氏县 Lushi County	09-19	111	08-11-35-3	巩义市 Gongyi City	12-27
84	08-11-16-7	卢氏县 Lushi County	09-19	119	子 08-11-1-2	郑州惠济区	05-09
86	08-11-17-2	巩义市 Gongyi City	09-21	Zi-08-11-1-2	Huiji District, Zhengzhou		

注:119 号为释放子囊孢子所得。Note: The No. 119 was obtained from the released ascospore.

的指形管中,18℃光照培养3~5天,接种于大试管中的小麦无菌苗上,18℃光照培养。该过程重复2次,获得分离纯化的白粉菌菌株。

分生孢子的收集:将纯化好的白粉菌菌株接种于大试管中的小麦无菌苗上,于18℃光照条件下培养,待叶片长满分生孢子时转接到种于顶端扎有5层纱布的玻璃罩内的盆栽无菌苗上,以隔离杂菌。培养5~6天,将叶片剪成叶段,置于含60 mg/L 苯胺咪唑唑脂粉培养基平板上,18℃光照培养,待充分产生分生孢子时收集孢子于2.0 mL离心管中,干燥4~6天后,-20℃冰箱保存待用。

菌株保存:将纯化的菌株接种到大试管中的小麦无菌苗上,于18℃光照培养24 h后转到4℃光照培养箱中培养保存,每40天转接1次。

1.2.2 小麦白粉菌基因组 DNA 的提取

称取5~10 mg孢子粉,采用改良的CTAB法^[9]提取小麦白粉菌基因组DNA,用NanoDrop610检测DNA浓度,4℃保存待用。

1.2.3 AFLP 分析

按徐志等^[8]的方法进行,并略有改动。具体操作程序如下:取100 ng/ μ L DNA样品5 μ L,加入限制

性内切酶 *Mse* I 和 *Pst* I 各5 U、TANGO™缓冲液8 μ L,添加 ddH₂O 至40 μ L。37℃温育3 h后取出,样品加入10 μ L下述的反应液:5 pmol/ μ L *Pst* I 接头和50 pmol/ μ L *Mse* I 接头各1.0 μ L、10 mmol/L ATP 1.0 μ L、10 U/ μ L T₄-DNA 连接酶0.1 μ L、TANGO™缓冲液2.0 μ L、ddH₂O 4.9 μ L。37℃连接3 h。

对连接产物进行预扩增,预扩增引物未加选择性碱基。预扩增方法如下:连接产物稀释5倍,取5 μ L连接产物稀释液加到*Mse* I引物(50 ng/ μ L)和*Pst* I引物(50 ng/ μ L)各0.6 μ L、10×PCR Buffer 2.0 μ L、5 U/ μ L *Taq* 酶0.15 μ L、10 mmol/L dNTP 0.4 μ L、ddH₂O 11.25 μ L的混合液中。混合后,进行PCR扩增,退火温度58℃30 s,共30个循环。预扩增完成后,在1.5%琼脂糖凝胶中检测。

选择性扩增体系同预扩增。选扩引物是在预扩增引物基础上加2个选择性碱基,PCR反应条件如下:94℃5 min;94℃30 s,62℃30 s(-0.7℃/循环),72℃1 min,11个循环;94℃30 s,54℃30 s,72℃1 min,28个循环。4℃保存。

使用Bio-RAD公司的DNA序列分析电泳槽做变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后银染。

1.2.4 ISSR 分析

参照贾少锋等^[7]方法,并优化。ISSR 体系 25 μL ,其中:5 ng/ μL DNA 2 μL 、10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 4.3 μL 、2.5 U/ μL Taq 酶 0.2 μL 、2.5 mmol/L dNTP 4 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ primer 2.5 μL 、ddH₂O 12 μL 。混合后进行 PCR 扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,45 ~ 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,循环 40 次;然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

1.2.5 数据统计与分析

对每对引物出现的扩增条带,有带的记为“1”,无带的记为“0”。对得到的 1、0 数据矩阵采用 PopGene32 软件计算 Nei 氏遗传距离^[9],利用 TreeView

软件构建群体进化无根的 UPGMA 树。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

2.1.1 ISSR 引物筛选

从 50 个 ISSR 引物中筛选出 10 个引物,每个引物可扩增出 8 ~ 23 条带,除 7 号引物有弥散背景外,其余引物条带均清晰、完整,引物序列见表 2。

2.1.2 AFLP 引物筛选

从 40 对 AFLP 引物组合中共筛选出 6 对多态性高、条带清晰的引物,引物序号及序列见表 3。

表 2 ISSR 所用引物及序列

Table 2 The code and the sequences of ISSR primers used

编号 Code	序列 Sequence(5'-3')	退火温度($^{\circ}\text{C}$) Annealing temperature	编号 Code	序列 Sequence(5'-3')	退火温度($^{\circ}\text{C}$) Annealing temperature
1	AGAGAGAGAGAGAGACT	48	6	HBHAGAGAGAGAGAGAG	45
2	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52	7	BDBCACACACACACACA	52
3	TCTCTCTCTCTCTCTCC	45	8	DBDACACACACACACAC	48
4	ACACACACACACACACT	52	9	VHVGTGTGTGTGTGTGT	48
5	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	48	10	HVHTGTGTGTGTGTGTG	48

表 3 AFLP 所用引物及序列

Table 3 The code and the sequences of the AFLP primers used

编号 Code	引物编号 Primer code	序列 Sequence(5'-3')	编号 Code	引物编号 Primer code	序列 Sequence(5'-3')
1	P11	GACTGCGTACATGCAGAA	4	P15	GACTGCGTACATGCAGCA
	M17	GATGAGTCCTGAGTAACG		M22	GATGAGTCCTGAGTAACT
2	P25	GACTGCGTACATGCAGTG	5	P22	GACTGCGTACATGCAGGT
	M26	GATGAGTCCTGAGTAATT		M12	GATGAGTCCTGAGTAAAC
3	P17	GACTGCGTACATGCAGCG	6	P25	GACTGCGTACATGCAGTG
	M16	GATGAGTCCTGAGTAACC		M16	GATGAGTCCTGAGTAACC

2.2 ISSR 分析结果

利用表 2 中筛选出的多态性较好的引物对采自河南巩义、灵宝、卢氏和栾川的 35 个菌株进行多态性分析。ISSR-PCR 扩增后,共得到扩增条带 145 条,其中多态性条带 94 条,多态性比率为 64.83%,各菌株间的遗传多样性指数为 0.2749,各菌株遗传距离分布在 0.0139 ~ 0.6592 之间。聚类分析显示:ISSR 将 35 个菌株分为 3 个组,组 I 包括采自卢氏和灵宝的大部分菌株及 1 个栾川的菌株;组 II 以栾川菌株为主,还包括卢氏的部分菌株和巩义的菌株;组 III 由灵宝、卢氏、栾川的少数菌株及郑州的 1 个由闭囊壳释放子孢子获得的菌株组成(图 1)。

2.3 AFLP 分析结果

随机抽取 8 个菌株,筛选出条带清晰、多态性较高的引物组合 6 对(表 3)。利用这 6 对引物组合对河南 4 个地区的 35 个菌株进行 PCR 扩增,扩增多态性比率为 82.68%,各菌株间的遗传多样性指数为 0.5100,35 个菌株遗传距离分布在 0.1257 ~ 0.9322 之间。AFLP 聚类分析将 35 个菌株分为 3 个大组,组 I 包括采自卢氏和灵宝的大部分菌株;组 II 主要由栾川菌株组成,并包含 2 个卢氏菌株和 1 个巩义菌株;组 III 同样是由 4 个地区的个别菌株组成,同时包含 1 个由闭囊壳释放子孢子获得的菌株(图 2)。试验结果与 ISSR 基本吻合。

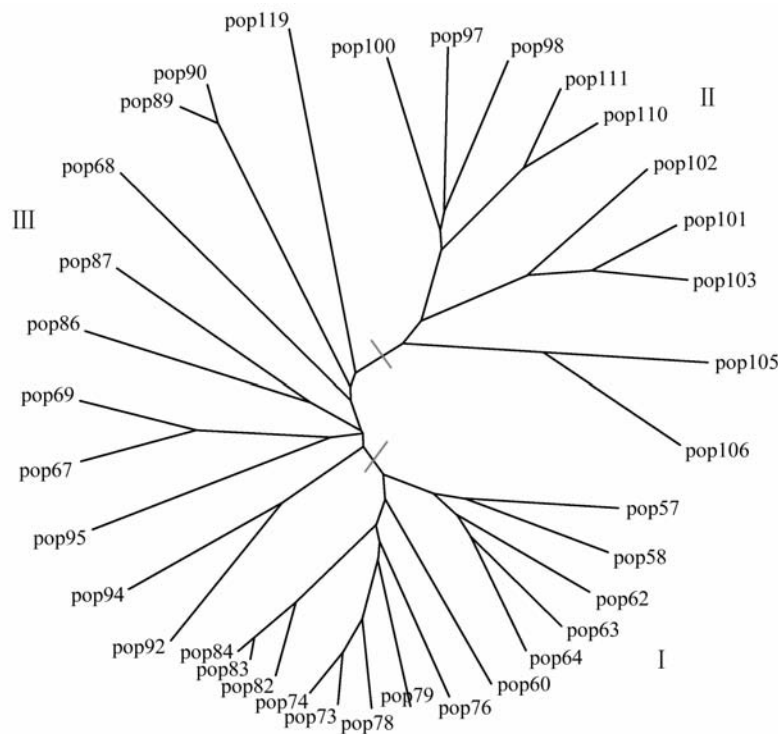


图1 基于ISSR分析构建的UPGMA无根树

Fig. 1 Unrooted UPGMA tree based on ISSR analysis

3 讨论

分子标记技术是研究遗传多样性的重要手段。ISSR分子标记具有不用预先知道DNA序列、试验成本低和操作简单等优点,在遗传多样性研究中被认为是能替代RAPD和SSR分子标记的较有效的方法^[10]。AFLP分子标记技术具有多态性高、结果稳定、重复性强、能更高效地揭示基因组中的核苷酸变异等优点,在条锈菌群体亲缘关系研究方面已经表现出其优势^[11],但存在成本高、操作难度大等缺点。

本研究采用ISSR和AFLP方法,分析了河南省西部山区4个小麦产区的35个小麦白粉菌单孢子堆分离菌株的遗传多样性,两种试验方法均显示该地区小麦白粉菌存在较大的遗传分化,遗传距离分布分别为0.0139~0.6592(ISSR)和0.1257~0.9322(AFLP),与王锡锋^[12]得出的河南省小麦白粉菌群体组成比较复杂的研究结论相一致。对群体间遗传多样性聚类分析结果表明:ISSR分子标记在组I中包括7个卢氏菌株和6个灵宝菌株,AFLP分子标记包括10个卢氏菌株和5个灵宝菌株,卢氏菌株和灵宝菌株在组I中基本上是各自占据无根树的一支,并未交叉。灵宝和卢氏中间有崤山山脉相隔,崤山的存在决定了两地菌株亲缘关系虽然较近,但

菌株之间实现交流的机会相对较少,需要有较强的上升气流和适当的风向才能实现。而卢氏菌株和栾川菌株采自崤山和伏牛山中间的山谷丘陵地带,地理环境相似,且无山脉阻挡,因此有利于栾川菌株向卢氏传播。2种方法的无根树中栾川菌株与卢氏菌株均聚在一支,说明这两个地点之间有菌株交流。因此AFLP揭示的群体遗传结构特征与地理条件是相呼应的。巩义菌株样本数量较少,需作进一步分析。对河南省4个地区的35个小麦白粉菌菌株的群体遗传多样性分析得出:ISSR扩增多态性比率为64.83%,各菌株间的遗传多样性指数为0.2749,AFLP扩增多态性比率为82.68%,各菌株间的遗传多样性指数为0.5100。通过对遗传距离的变化及无根树分析得出:ISSR和AFLP两种分子标记均说明河南省小麦白粉菌具有丰富的遗传多样性,揭示的群体遗传结构也相似;但AFLP揭示的遗传距离变化幅度较大,说明该技术能揭示更多的小麦白粉菌遗传多样性变异,因此能更细致地揭示出不同地区菌株间的相互关系。ISSR较为简便,也适用于像小麦白粉菌这样具有有性生殖、遗传变异丰富,但又必须在活体上培养、分生孢子难以收集的植物病原菌。

由于样本数量有限,本试验对河南省小麦白粉

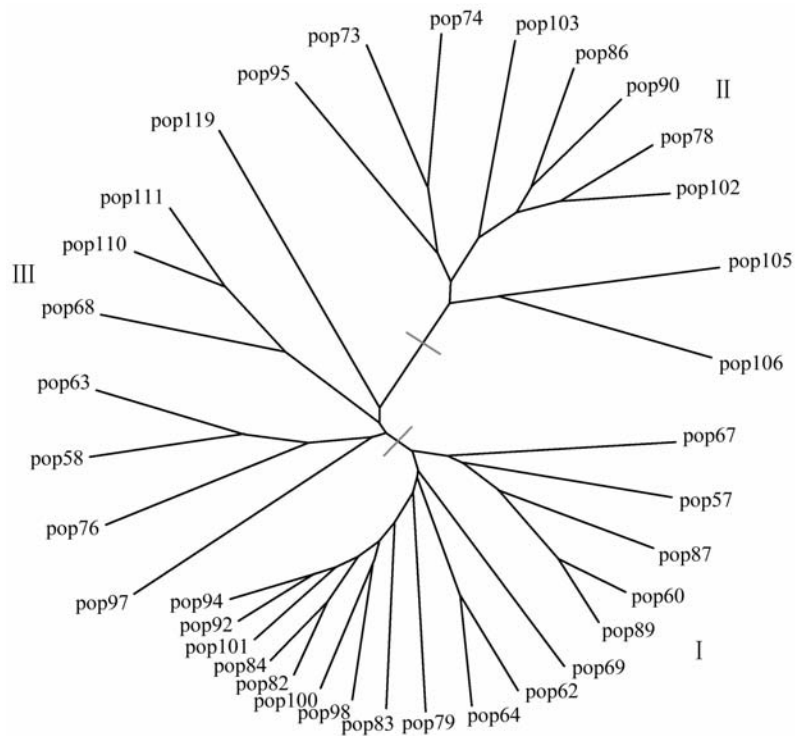


图 2 基于 AFLP 分析构建的 UPGMA 无根树

Fig. 2 Unrooted UPGMA tree based on AFLP analysis

菌遗传多样性的分析还不够全面和系统,尚需扩大样品采集范围,以获得更全面、准确、客观的分析结果。还应分析河南省小麦白粉病的遗传多样性,探讨西部山区小麦白粉菌遗传分化对河南省乃至周边省份小麦白粉病发展的影响,加强不同发病区的联合调查,为联动及一体化预测和防控小麦白粉病提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 王俊美,王飞,宋玉立,等. 小麦已知抗白粉病基因在河南的抗性评价及 *Pm2* 基因的标记追踪. 麦类作物学报, 2009, 29(3): 535 - 539
- [2] 王海燕,张忠山. 河南省小麦白粉病流行原因和减灾对策. 自然灾害学报, 1993, 2(3): 62 - 66
- [3] 凌中南,张国彦,杨景涛,等. 河南省小麦白粉病发生防治现状及治理对策. 植保技术与推广, 1999, 19(6): 15 - 16
- [4] 王锡锋,张忠山. 河南省小麦白粉病研究的新进展. 中国农学通报, 1995, 11(2): 33 - 36
- [5] 肖仲久,蒋选利,李小霞,等. 基于 RAPD 对贵州省小麦白粉菌的遗传多样性评价. 湖北农业科学, 2009, 48(4): 769 - 772
- [6] 甘丽萍,王生荣. 甘肃省中西部小麦白粉菌生理小种 RAPD 分析. 河南农业科学, 2009(2): 64 - 67
- [7] 贾少锋,段霞瑜,周益林,等. 小麦白粉菌 ISSR 分子标记体系构建及其分离菌株的多样性分析. 植物保护学报, 2007, 34(5): 493 - 499
- [8] 徐志,梅丽宏,李志英,等. 利用 AFLP 分子标记和无毒基因构建小麦白粉菌遗传连锁图谱. 植物病理学报, 2009, 39(1): 16 - 22
- [9] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76: 5269 - 5273
- [10] Aga E, Bekele E, Bryngelsson T. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. Genetica, 2005, 124: 213 - 221
- [11] Hovmoller M S, Justesen A F, Brown J K M. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in north-west Europe. Plant Pathology, 2002, 51: 24 - 32
- [12] 王锡锋. 河南省小麦白粉病发生特点及防治对策. 河南农业科学, 1991(12): 14 - 15