

大别山山核桃种群遗传多样性研究

王正加^{1 2} 黄有军² 郭传友³ 黄坚钦^{2*} 王华芳¹

(1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083) (2 浙江林学院现代森林培育省级重点实验室, 浙江临安 311300)

(3 淮北煤碳师范学院生物系, 安徽淮北 235000)

摘要 为了更有效地保护和合理开发大别山山核桃 (*Carya dabieshanensis*) 资源, 该文利用 RAPD 分子标记技术, 对 3 个天然大别山山核桃种群的 90 个单株的遗传多样性、种群内和种群间的遗传变异进行了研究。结果表明: 20 对 10 bp 随机引物共检测到 238 条谱带, 其中多态带为 162 条, 占 68.1%。遗传多样性分析结果显示: Shannon 多样性指数为 0.476 1, 58.18% 的变异分布于群体内, 而种群间变异占了 41.82%; *Nei* 指数群体总基因多样性为 0.314 5, 群体内平均基因多样性 (H_S) 为 0.186 5, 群体间的基因多样性 (H_{ST}) 为 0.128 0, 群体 *Nei* 基因分化系数 (G_{ST}) 为 0.406 7, 说明 40.67% 的变异存在于种群间, 群体内的变异占了总变异的 59.33%, 与 Shannon 多样性指数相比基本一致, 均表明种群内有较丰富的遗传变异, 这为优良品种选育提供广阔前景。种群间的基因流 (N_m) 为 0.730 6, 证明种群间遗传交换较小, 这与环境适应性和高山阻隔有一定的关系。

关键词 山核桃 种群 RAPD 分析 遗传多样性

RAPD ANALYSIS ON GENETIC DIVERSITY OF *CARYA DABIESHANENSIS* POPULATIONS

WANG Zheng-Jia^{1 2} HUANG You-Jun² GUO Chuan-You³ HUANG Jian-Qin^{2*} and WANG Hua-Fang¹

(1 School of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(2 Key Laboratory of Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

(3 Department of Biology, Huaibei Coal Industry Normal College, Huaibei, Anhui 235000, China)

Abstract The genetic diversity and genetic variation within and among three natural *Carya dabieshanensis* populations were studied using RAPD analysis. The result showed that 238 loci were detected by using 20 random primers (10 bp) of which 162 loci were polymorphic (68.1%). Species genetic diversity indicated by Shannon's index was 0.476 1, 58.18% of which was due to within population genetic diversity and 41.82% among population variation. Species gene diversity indicated by *Nei*'s index was 0.314 5, gene diversity within populations (H_S) was 0.186 5, gene diversity among populations (H_{ST}) was 0.128 0 and the coefficient of gene differentiation (G_{ST}) among the populations was 0.406 7, 59.33% of which was within populations and 40.67% was among populations. The gene diversity estimated by *Nei*'s index was consistent with that estimated by Shannon's index. These results suggest that there is rich genetic within population variation, which offers excellent prospects for seeding selection. The estimate of gene flow from G_{ST} (N_m) was 0.730 6, indicating that genetic recombination between populations is quite small, which probably is related to environmental adaptations of *C. dabieshanensis* and population isolation in their high mountain habitat.

Key words *Carya dabieshanensis*, Population, RAPD analysis, Genetic diversity

大别山山核桃 (*Carya dabieshanensis*) 属胡桃科山核桃属植物, 是刘茂春和黎章矩于 1984 定名的新种。主产于皖西金寨和霍山, 面积共 1 333 hm²。分布区的母岩以石灰岩最多, 以石灰岩发育的黑色和红色淋溶石灰土, 板岩发育的石质红壤, 页岩发育的黄、红壤生长良好 (祝学范和祝学林, 2001), 是较好

的生态树种之一。大别山山核桃有果大、壳薄、出仁率和出油率均较高等优点, 在某些性状方面还优于昌化山核桃, 目前, 大别山山核桃绝大部分都处于野生状态, 产量低, 人工栽培很少, 且尚未结果。因此, 大别山山核桃急待进一步开发, 扩大人工栽培面积和生产规模, 增加产量, 这对提高当地山区农民的收

收稿日期: 2005-03-16 接受日期: 2005-09-13

基金项目: 国家自然科学基金 (30371124) 浙江省科技厅重大招标项目 (0211025) 浙江省自然科学基金重大项目 (ZA0208) 和杭州市科技局重大攻关项目 (2002112A12)

* 通讯作者 Author for correspondence E-mail: huangjq@zjfc.edu.cn

E-mail of the first author: wzj21@163.com

入意义重大。郭传友等(2004)对大别山山核桃的生态群落作了详尽的调查,结果认为,其在分布的群落中占据明显的优势,是群落的建群种,林下有保存较好的次生植被,具有丰富的物种多样性,共有维管植物 128 种(含变种),隶属于 95 属,52 科。群落林冠郁闭度较高(约 0.8),林下灌木和草本种类相对贫乏。近年来,大别山山核桃果实的营养和经济价值逐步为人们所认识,由于受经济利益的驱使,其野生群落在山区农民不合理地采摘果实的过程中受到不同程度地破坏,自然分布面积有所减小。为了保护 and 开发大别山山核桃资源,改良品质,保护生态环境,本文利用简便、快速、易行的 RAPD 标记技术对目前分布较窄的大别山山核桃天然种群进行遗传多样性分析,为大别山山核桃的资源保存、引种驯化及遗传改良提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料采集与处理

根据大别山山核桃在大别山北坡分布区的地形、地势、气候及局部生境等具体特征,在大别山山核桃群体中选择了 3 个种群,分别是金寨县渔潭乡的西园种群、关庙乡的仙桃种群和霍山县漫水河镇的平田种群(表 1),在每个种群内单株间隔 50 m 以上采集 30 个单株的叶片,迅速装入放有变色硅胶的密封袋内干燥,带回实验室后,放入低温冰箱中保存备用。

表 1 材料来源
Table 1 Origin of material

种群 Population	地理位置 Geographical location	海拔 Elevation (m)
西园 Xiyuan	31°10' N, 115°37' E	530
仙桃 Xiantao	31°41' N, 115°40' E	750
平田 Pingtian	30°37' N, 114°54' E	640

1.2 DNA 提取及纯度检测

用 Genequantpro(Pharmacia)测定 DNA 的含量和纯度, OD_{260}/OD_{280} 于 1.8 左右较纯,可用于 RAPD 分析(Pich & Schubert, 1993)。

1.3 RAPD 反应体系优化

参照王正加等(2003)。

1.4 RAPD 引物筛选

从 600 条随机引物中筛选出谱带清晰、重复性好的引物 20 个用于全部 DNA 的扩增(王正加等, 2005)。

1.5 数据处理

统计 20 个引物在所有 DNA 样品中扩增的电泳带总数与多态带的数目,有电泳带记为 1,无电泳带记为 0,作 0/1 矩阵输入计算机。用 POPGEN32 计算 Shannon 多样性指数、群体遗传分化指数和遗传距离等,并用 UPGMA 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 多态位点百分比及其分布

对 20 个 RAPD 引物在 3 个种群中的扩增情况进行统计,结果表明,20 个引物共扩增出 238 条 DNA 片断,平均每个引物扩增出 11.9 条,其 DNA 片断的大小分布在 200~2 500 bp 之间。其中,呈多态性的条带有 162 条,占总条带数的 68.1%,平均每个引物扩增出的多态条带 8.1 条,显示大别山山核桃天然群体具有丰富的遗传变异。

从表 2 各种群的统计结果看,多态位点比率最高的种群是平田种群,最低的种群是仙桃种群。根据多态位点比率的大小,3 种群的排列顺序为平田种群 > 西园种群 > 仙桃种群。可见,大别山山核桃各自然种群间的变异性同样存在着一定的差异。

2.2 不同种群的遗传多样性

根据等位基因频率计算了大别山山核桃 3 个自然种群的 Shannon 遗传多样性指数(I),结果显示(表 3),平田种群的遗传多样性 I 值最高,为 0.280 1,仙桃种群的遗传多样性 I 值最低,为 0.265 1。依据各种群 Shannon 遗传多样性指数的大小,3 个种群的排列次序为:平田种群 > 西园种群 > 仙桃种群,其顺序与根据多态位点比率的排序结果一致。为了准确地评价大别山山核桃各种群间的遗传分化,本文进一步应用 Shannon 多样性指数计算和分析了变异在群体间和群体内分布(表 3)。由表 3 可见,总群体 Shannon 多样性指数为 0.476 1,群体内平均 Shannon 多样性指数为 0.275 0,平均有 58.18% 的变异分布于群体内,种群间变异占了 41.82%。可见大别山山核桃群体内蕴涵着更丰富的变异,具有很大的选择潜力。

Nei 群体遗传分化指数是衡量种群遗传分化最常用的指标,表示在总的遗传变异中种群间变异所占的比例(葛颂和洪德元,1994),本研究结果显示,大别山山核桃 3 种群的基因多样性也存在着一定的差异。平田种群的基因多样性最高(0.191 6),仙桃种群的基因多样性最低(0.1789)。依据基因多样

表 2 大别山山核桃种群内多态位点比率
Table 2 Percentage of polymorphic loci within populations of *Carya dabieshanensis*

种群 Population	样本数 Number of samples	位点数 Number of loci	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci
西园 Xiyuan	30	238	129	54.0
平田 Pingtian	30	238	131	55.2
仙桃 Xiantao	30	238	127	53.2
总计 Total	240	238	162	68.1

表 3 大别山山核桃的基因多样性
Table 3 Genetic diversity of *Carya dabieshanensis*

	西园 Xiyuan	平田 Pingtian	仙桃 Xiantao	种的基因 多样性 Species genetic diversity	种群内基因 多样性 Within-population genetic diversity (H_s)	种群间基因 多样性 Inter-population genetic diversity (H_{ST})	种群间基因 分化系数 Coefficient of gene differentiation (G_{ST})
Shannon 多样性指数 Shannon Index (I)	0.279 8	0.280 1	0.265 1	0.476 1	0.275 0	0.201 1	0.418 2
<i>Nei</i> 指数 <i>Nei</i> index	0.189 0	0.191 6	0.178 9	0.314 5	0.186 5	0.128 0	0.406 3

性数值的大小, 3 种群的排列次序是: 平田种群 > 西园种群 > 仙桃种群, 这与根据 3 种群多态位点百分率 (PPB) 的高低大小排序一致。

应用 *Nei* 指数估测的基因多样性在群体内和群体间的分布进行了统计与分析 (表 3), 由表 3 可见, 群体总基因多样性为 0.314 5, 群体内平均基因多样性 (H_s) 为 0.186 5, 种群间基因分化系数 (G_{ST}) 为 0.406 3, 也就是说群体总变异的 40.63% 存在于种群间, 群体内的变异占了总变异的大部分, 达 59.37%。Shannon 遗传多样性和 *Nei* 群体遗传分化指数两种分析方法都得出了变异的大部分存在于群体内的结论。由 G_{ST} 估算的大别山山核桃基因流为 0.730 6, 显示种群间的基因交流较小。

2.3 群体间遗传一致度和遗传距离

基因分化系数只能对一个群体的分化程度作出评价, 却不能判定群体间相互关系的远近, 而遗传一致度 (或称为遗传相似系数) 和无偏遗传距离的度量则可以说明每两个群体间彼此关系的亲疏。为了确定大别山山核桃 3 个种群彼此间的遗传关系, 计算出了各种群间的遗传一致度和遗传距离 (表 4)。为了更直观地显示大别山山核桃 3 个自然种群之间的相互关系, 利用 UPGMA 聚类分析方法所得出的结果, 绘制了 3 种群间的聚类图 (图 1)。

由表 4 可见, 大别山山核桃各种群间遗传相似系数最高值为 0.835 1, 最低值为 0.802 1, 平均为 0.816 7。各种群间的遗传距离在 0.180 3 和 0.220 5

表 4 大别山山核桃居群间的遗传一致度和遗传距离
Table 4 *Nei*'s genetic identity and genetic distance among populations of *Carya dabieshanensis*

居群 Population	西园 Xiyuan	平田 Pingtian	仙桃 Xiantao
西园 Xiyuan	*	0.835 1	0.802 1
平田 Pingtian	0.180 3	*	0.812 8
仙桃 Xiantao	0.220 5	0.207 2	*

* : 对角线上是 *Nei*'s 遗传一致度, 对角线以下是遗传距离 *Nei*'s genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)。

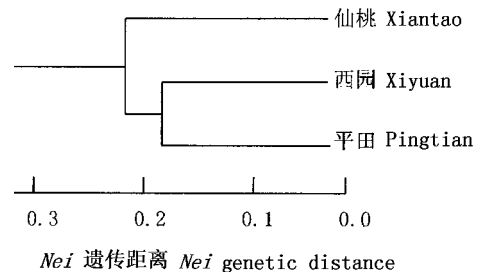


图 1 大别山山核桃 3 个自然种群 UPGMA 聚类图

Fig. 1 Dendrogram among 3 populations of *Carya dabieshanensis* using UPGMA cluster analysis

之间变动, 平均为 0.202 7。根据图 1 各种群的聚类结果, 西园种群与平田种群间的关系最近, 西园种群与仙桃种群间的关系最远。一般情况下, 植物群体遗传变异性的分布格局与该物种的地理分布情形和生态特征等有关 (Loveless & Hamrick, 1984), 但同时也存在着不同的观点。一种学派研究结果认为遗传距离与空间距离之间的相关性很大 (Kiang & Chi-

ang, 1990; Alpert *et al.*, 1993) 而另一学派的学者研究结果则认为遗传距离与空间距离之间并无明显的内在关系(黄启强等, 1995; 李军等, 1995)。对于大别山山核桃群体的研究表明, 群体间遗传距离与空间距离之间的相关性显著, 群体间产生了较大的遗传变异。

3 讨论

对于任何一个物种来说, 其遗传多样性越丰富, 对环境变化的适应能力就越强, 就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境(葛颂和洪德元, 1994)。一般认为特有种和狭窄分布的植物与广布种相比, 其遗传多样性较低, 这可能是造成物种濒危的原因之一(汪小全等, 1996)。

本文筛选了 20 个随机引物对大别山山核桃 3 个天然种群进行了 RAPD 扩增, 结果显示大别山山核桃天然群体具有较丰富的遗传变异。

对大别山山核桃天然群体 3 个种群遗传多样性的研究表明, 大别山山核桃 RAPD 多态性条带百分比为 68.1%, 低于珙桐(*Davidia involucrata*) (97.03%)、辽东栎(*Quercus liaotungensis*) (79%)、观光木(*Tsoongiodendron odorum*) (84.62%、78.13%) 及蒙古栎(*Quercus mongolica*) (71.22%), 而高于华木莲(*Sinomanglietia glauca*) (53.2%) 和银杉(*Cathaya argyrophylla*) (32%) (宋丛文和包满珠, 2004; 恽锐等, 1998; 黄久香和庄雪影, 2002a, 2002b; 夏铭等, 2001; 林新春等, 2003; 汪小全等, 1996)。群体总 Shannon 多样性指数为 0.476 1, 群体内变异占 58.18%, 有 41.82% 的变异分布于群体内各种群之间, 低于美洲山楸(*Populus tremuloides*) (0.650 0)、北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*) (0.618 9)、鹅掌楸(*Liriodendron chinense*) (0.580 6), 而高于观光木(0.356 5)、大青楸(*Populus ussuriensis*) (0.310 0)、华木莲(0.278 2) 和版纳青梅(*Vatica guangxiensis*) (0.168 6) (Yet *et al.*, 1995; 罗光佐等, 2001; 黄久香和庄雪影, 2002b; 苏晓华等, 1997; 林新春等, 2003; 李巧明等, 2002)。群体 H_T 总基因多样性为 0.314 5, 低于板栗(0.316 8)、北美鹅掌楸(0.433 1) 和鹅掌楸 0.395 5 (高捍东, 2001; 罗光佐等, 2001); G_{ST} 为 0.406 3, 即群体中的变异有 40.63% 存在于种群间, 59.37% 的变异分布于群体内, 表明大别山山核桃群体具有较丰富的遗传多样性。由 G_{ST} 估算的大别山山核桃基因流 (N_m) 为 0.730 6, 表明群体间的基因交流很少, 这可能是大别山核桃分

布地域较广, 并存在高山阻隔等有一定的关系, 同时也证明了大别山山核桃经过长期的自然选择之后, 能适应环境等变化。有些学者认为, 稀有植物所具有的遗传变异比常见种低, 稀有种因种群缩小而导致近亲繁殖和等位基因的随机重组, 从而降低其种群生存的能力(葛颂等, 1997; Wright, 1931)。所以必须采取积极有效的措施来保护种群遗传衰退。

近些年来, 对遗传多样性在物种中所起的保护作用, 不同的学者有不同的看法, 有的认为, 遗传多样性对物种的生存和发展起着决定作用, 而另一些则认为, 生态因素(如生境的破坏和环境的变迁等)是物种濒危和灭绝的直接原因, 因此是物种保护中应首先考虑的问题(葛颂和洪德元, 1999)。事实上物种的多样性水平、生活史特性以及生态因素等都会影响物种的生存与发展。为了大别山山核桃选育种、种质资源保护等科研工作和可持续发展的需要, 建议当地政府和林业管理部门尽快采取有效措施予以保护, 在其基础上进行科学地开发利用, 创造有效基因交流的条件, 以达到保护环境、保护遗传多样性、增加农民收入的目的。

参 考 文 献

- Alpert P, Lumaret R, Giusto FD (1993). Population structure inferred from allozyme analysis in the clonal herb *Fragariao bilobensis* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 80, 1002 - 1006.
- Gao HD (高捍东) (2001). Genetic analysis of cultivars of chestnut (*Castanea mollissima*) by technique of RAPD. *Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology* (江苏林业科技), 28, 1 - 3. (in Chinese with English abstract)
- Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (1994). Genetic diversity and its detection. In: Qian YQ (钱迎倩), Ma KP (马克平) eds. *Principles and Methodologies of Biodiversity Studies* (生物多样性研究的原理与方法). China Science and Technology Press, Beijing, 123 - 140. (in Chinese)
- Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (1999). Studies of morphological and allozyme variation of the endangered *Adenophom lobophylla* and its widespread congener *A. potaninii*. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 26, 410 - 417. (in Chinese with English abstract)
- Ge S (葛颂), Wang HQ (王海群), Zhang CM (张灿明), Hong DY (洪德元) (1997). Genetic diversity and population differentiation of *Cathaya argyrophylla* in Bamian Mountain. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 39, 266 - 271. (in Chinese with English abstract)
- Guo CY (郭传友), Huang JQ (黄坚钦), Wang ZJ (王正加), Fang YM (方炎明) (2004). Preliminary study on the *Carya dabieshanensis* community of Tiantangzhai Mountains in Anhui Province. *Guihaia* (广西植物), 24, 97 - 101. (in Chinese with English abstract)

- Huang JX(黄久香), Zhuang XY(庄雪影) (2002a). Comparison of genetic diversity of *Tsoongiodendron odorum* in southern China by RAPD marker. *Journal of South China Agricultural University* (华南农业大学学报), 23, 54 – 57. (in Chinese with English abstract)
- Huang JX(黄久香), Zhuang XY(庄雪影) (2002b). Genetic diversity of the population of *Tsoongiodendron odorum*. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), 26, 413 – 419. (in Chinese with English abstract)
- Huang QQ(黄启强), Wang LH(王莲辉), Nobuhiro T, Kiihachiro O(1995). The genetic variation of isozyme in natural population of mass pine. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 22, 142 – 151. (in Chinese with English abstract)
- Kiang YT, Chiang YC(1990). Comparing differentiation of wild bean (*Glycinesoja siebandzucc*) populations on isozymes and quantitative traits. *Botanical Bulletin Academic Sinica*, 131, 129 – 142.
- Li J(李军), Tao Y(陶芸), Zheng SZ(郑师章), Zhou JL(周纪纶) (1995). Isozymatic diffrenetiation in local population of *Glycine soja* Sieb. & Zucc. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 37, 669 – 676. (in Chinese with English abstract)
- Li QM(李巧明), Xu ZF(许再富), He TH(何田华) (2002). A preliminary study on conservation genetic of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae). *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 44, 246 – 249. (in Chinese with English abstract)
- Lin XC(林新春), Yu ZX(俞志雄), Qiu LH(裘利洪), Xiao GM(肖国民), Liu L(刘力) (2003). Studies on genetic diversity of endangered *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae). *Acta Agriculturae Universitatis Jingxiensis* (江西农业大学学报), 25, 805 – 810. (in Chinese with English abstract)
- Liu MC(刘茂春), Li ZJ(黎章矩) (1984). A new species of *Carya* from China. *Journal of Zhejiang College of Forestry* (浙江林学院学报), 1, 41 – 43. (in Chinese with English abstract)
- Loveless MD, Hamrick JLH(1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review Ecology System*, 15, 65 – 95.
- Luo GZ(罗光佐), Shi JS(施季森), Yin TM(尹佟明), Huang MR(黄敏仁), Wang MX(王明麻) (2001). Comparison of genetic diversity between *Liriodendron tulipifera* Linn. and *L. chinense* (Hemsl.) Sarg. by means of RAPD markers. *Journal of Plant Resources and Environment* (植物资源与环境), 9, 9 – 13. (in Chinese with English abstract)
- Pich C, Schubert I(1993). Miniperp method for isolation of DNA form plants with a high content of polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 21, 3328 – 3332.
- Song CW(宋丛文), Bao MZ(包满珠) (2004). Study on genetic diversity of RAPD mark for natural *Davidia involucrate* population. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 40, 75 – 79. (in Chinese with English abstract)
- Su XH(苏晓华), Zhang QW(张绮纹), Zheng XW(郑先武), Zhang XH(张香华), Gui F(归复) (1997). Genetic structure in *Populus ussuriensis* Kon. confirmed by RAPD marker. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 33, 504 – 512. (in Chinese with English abstract)
- Wang ZJ(王正加), Huang JQ(黄坚钦), Guo CY(郭传友), Liang JF(梁景峰) (2005). Genomic DNA extraction and RAPD primer screening of *Carya cathayensis*. *Journal of Anhui Agricultural University* (安徽农业大学学报), 32, 72 – 76. (in Chinese with English abstract)
- Wang ZJ(王正加), Huang JQ(黄坚钦), Guo CY(郭传友), Yang P(杨萍) (2003). The optimal reaction system of RAPD in *Carya cathayensis*. *Journal of Zhejiang College of Forestry* (浙江林学院学报), 20, 429 – 433. (in Chinese with English abstract)
- Wang XQ(汪小全), Zou YP(邹喻萍), Zhang DM(张大明) (1996). Analysis of genetic diversity in *Cathaya argyrophylla* using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Science in China* (Series C) (中国科学 C 辑), 26, 436 – 441. (in Chinese with English abstract)
- Wright S(1931). Evolution populations. *Genetics*, 16, 97 – 159.
- Xia M(夏铭), Zhou XF(周晓峰), Zhao SD(赵士洞) (2001). RAPD analysis on genetic diversity of natural population of *Quercus mongolica*. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 37, 126 – 133. (in Chinese with English abstract)
- Yet FC, Chang DKX, Yang RC(1995). RAPD variation within and among natural population of trembling aspen from Alberta. *The Journal of Heredity*, 8, 454 – 459.
- Yun R(恽锐), Zhong M(钟敏), Wang HX(王洪新), Wei W(魏伟), Hu ZA(胡志昂), Qian YQ(钱迎倩) (1998). Study on DNA diversity of *Liaodong oak* population at Donglin mountain region, Beijing. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 40, 169 – 175. (in Chinese with English abstract)
- Zhu XF(祝学范), Zhu XL(祝学林) (2001). Investigation on resource and development prospect of *Carya cathayensis* in Jingzhai. *Journal of Anhui Forestry Science and Technology* (安徽林业科技), 29, 684 – 685. (in Chinese with English abstract)