

双砧木嫁接对西瓜根际土壤生物学性状及细菌群落结构的影响

郭松, 于蓉, 董瑞, 李程, 田梅

(宁夏农林科学院园艺研究所 银川 750002)

摘要: 为提高嫁接西瓜品质及连作土传病害的抗性, 揭示双砧木嫁接增强植株抗性的机制, 以西瓜单砧嫁接为对照, 基于高通量测序技术分析双砧嫁接、中间砧嫁接根际土壤的生物学性状及细菌群落结构特征。结果表明, 与对照相比, 双砧嫁接处理有助于富集根际土壤中碳、氮、磷 3 种微生物生物量; 根际土壤中的放线菌数量显著提高 36.64%; 根际土壤 β -葡糖苷酶、氨基酶、磷酸酶活性分别显著提高 9.01%、16.07% 和 13.14%; 其拥有丰富的特有分类操作单元 OTU (Operational Taxonomic Unit) 数量及不同占比的共有优势细菌门属, 显著提高变形菌门 (Proteobacteria)、螺旋体菌门 (Saccharibacteria) 等的占比。双砧嫁接处理有助于提高土壤微环境中相关酶活性、微生物数量等, 通过砧穗间相互调节作用缓解胁迫因子的伤害, 同时增强了嫁接西瓜的抗性, 为进一步利用双砧嫁接技术提供了理论依据。

关键词: 西瓜; 中间砧; 双砧嫁接; 土壤生物学性状; 细菌群落结构

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2023)12-059-05

Effects of double rootstock grafting on watermelon rhizosphere soil biological properties and bacterial community structure

GUO Song, YU Rong, DONG Rui, LI Cheng, TIAN Mei

(Institute of Horticulture, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, Ningxia, China)

Abstract: In order to improve the quality of grafted watermelon and the resistance to soil borne diseases in continuous cropping, reveal the mechanism of double rootstock grafting to enhance plant resistance, and discuss the effects of double rootstock grafting on biological properties and bacterial community structure of watermelon rhizosphere soil, the biological characteristics and bacterial community structure of rhizosphere soil grafted with double rootstocks and interstocks were analyzed based on high-throughput sequencing technology with watermelon single rootstock as control. The results showed that microbial biomass C, microbial biomass N and microbial biomass P in rhizosphere soil of double rootstock grafting treatment were significantly higher than those of other treatments. The actinomycetes in rhizosphere soil increased by 36.64%; The activities of rhizosphere soil of β -glucosidase, aminopeptidase, and phosphatase increased by 9.01%, 16.07% and 13.14%, respectively. Double rootstock grafting has a rich number of unique OTUs and different proportions of common dominant bacteria. Double rootstock grafting improved the availability of nutrients in the rhizosphere soil of watermelon, the activity of phosphatase and other enzymes in the rhizosphere soil, improved the fertility of the plant rhizosphere soil microenvironment, and enhanced the resistance of grafted watermelon. It provides a theoretical basis for further using double rootstock grafting technology.

Key words: Watermelon; Interstock; Double rootstock grafting; Soil biological properties; Bacterial community structure

土壤中微生物种群和数量是土壤微生态环境的重要组成部分。西瓜根际土壤中的微生态环境与枯萎病等土传病害的抗性机制密切相关。西瓜枯萎病等土传病害的发生概率及危害程度受到土

壤中微生物种群比例的影响^[1-2]。土壤微生物群落中细菌群落结构占比 70% 以上, 其在养分循环、防控土传病害等方面发挥重要作用^[3]。西瓜嫁接处理后, 砧木和西瓜接穗的互作会影响根系分泌物, 使

收稿日期: 2022-03-21; 修回日期: 2023-10-18

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划(2022BBF02025); 宁夏回族自治区自然科学基金(2021AAC03265); “十四五”农业高质量发展和生态保护科技创新示范项目(NGSB-2021-7); 国家现代农业产业技术体系(CARS-25)

作者简介: 郭松, 男, 助理研究员, 研究方向为西甜瓜育种及栽培。E-mail: 2001929@163.com

土壤中的微生物组成发生变化^[4-5]。

西瓜嫁接技术比较广泛地应用到生产中,其对根际土壤微生物数量和群落结构等方面的研究已有报道^[6-7],但对双砧木嫁接和中间砧嫁接的西瓜植株根系微生物结构等方面的研究鲜有报道^[8]。根际土壤微生物与连作存在着密切关系,也会影响到微生物生物量的积累、土壤酶活性及根系分泌物的释放^[9]。通过优良砧木嫁接调节根际土壤的微生物种群结构,也是克服西瓜连作障碍的有效途径。有研究表明,嫁接根系分泌物可降低土壤酶活性;抗性砧木与接穗之间存在着互作效应,土壤微生物群落影响着根际病原菌的数量^[10-12]。因此,笔者通过检测分析两种西瓜嫁接处理的根际土壤生物学性状及细菌群落结构,以期揭示双砧木嫁接、中间砧嫁接增强植株抗性的机制,为进一步有效利用双砧木嫁接技术防控土传病害提供理论依据。

1 材料与方法

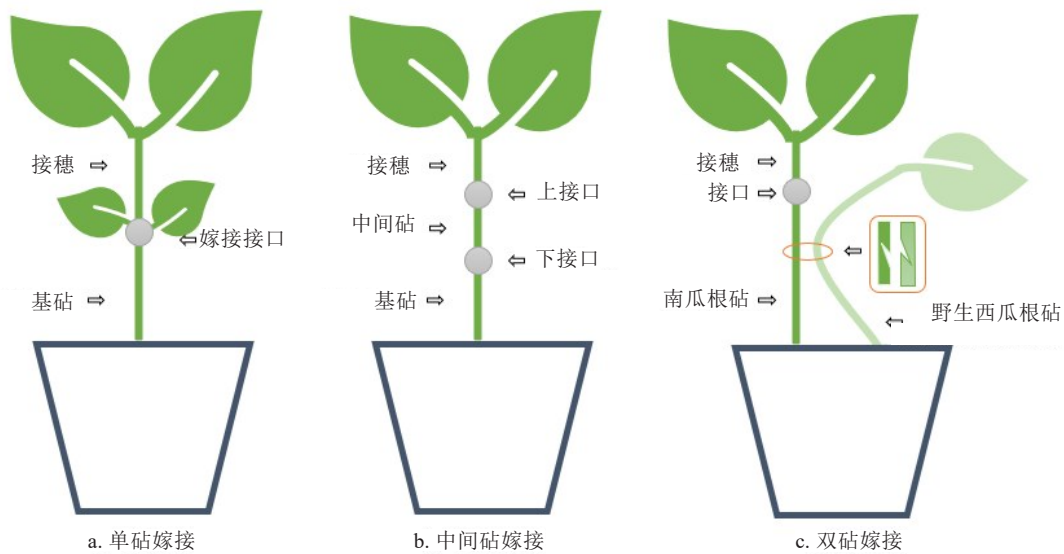
1.1 材料

供试的西瓜品种为宁农科1号(由宁夏农林科学院园艺研究所提供),砧木为白籽南瓜品种早生西砧(购于宁夏银川市西北农资城)和野生西瓜(所用材料 PI 189225 由国家园艺种质资源库提供)。

1.2 试验设计

试验于2021年2—8月在宁夏吴忠市利通区高闸瓜菜试验基地开展。试验田前茬作物为水稻,土壤有机质含量(w ,后同) $19.10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、碱解氮含量 $83.20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、有效磷含量 $22.50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效钾含量 $137.30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮含量 $1.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全磷含量 $0.93\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全钾含量 $49.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、pH为8.12,地力水平中等。

试验采用单因素随机区组设计,采用南瓜和野



注:a. 单砧嫁接采用顶插接法嫁接;b. 中间砧嫁接采用顶插接法嫁接;c. 野生西瓜与已嫁接西瓜采用靠接法完成双根嫁接。

图1 不同砧木嫁接处理示意图

Fig. 1 Different stock grafting treatment diagram

生西瓜双根砧嫁接(以下简称“双砧嫁接”)、白籽南瓜为根用砧木且野生西瓜作为中间砧嫁接(以下简称“中间砧嫁接”)2种多砧木嫁接方式(如图1),设置南瓜单砧木的常规嫁接为对照组CK,试验小区采用完全随机排列,设3次重复,每个重复30株,共9个小区,每个小区 35 m^2 ,株行距 $30\text{ cm}\times 2.0\text{ m}$ 。生物菌剂按 $3\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-1}$ 与羊粪 $6000\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-1}$ 混合均匀,预湿后于2月25日施入定植行内。3月10日定植,田间管理同常规生产。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 土壤样品采集方法 西瓜成熟采收后,采集各处理表层 $0\sim 20\text{ cm}$ 的土样,采样时每个处理随机采集12株西瓜的根际土壤混样,重复采样3次获得3个分析样品。样品过筛(40目)后迅速装入无菌自封袋密封,运至实验室检测土壤生物学性状及细菌群落结构。

1.3.2 土壤微生物群落的测定方法 各处理根际土壤在培养基上进行培养后,采用稀释平板法测定

微生物数量;细菌群落结构基于高通量测序分析完成。采用容量分析法测定微生物生物量碳;采用茚三酮比色法测定微生物生物量氮;采用磷钼蓝比色法测定微生物生物量磷。采用 Hayano 的方法^[13]测定 β - 葡糖苷酶活性,采用 Ladd 的方法^[14]测定氨基酸酶活性,采用 Bremner 的方法^[15]测定磷酸酶活性。

1.4 数据统计分析

采用邓肯氏新复极差检验法对数据进行多重比较分析。利用 R 语言 v 4.1.3 进行植株根际土壤细菌多样性分析。

2 结果与分析

2.1 双砧嫁接对根际土壤微生物生物学性状的影响

2.1.1 不同嫁接处理微生物数量的变化 由表 1 可知,中间砧嫁接和双砧嫁接处理的根际土壤中细菌数量均显著高于单砧嫁接对照,双砧嫁接西瓜处理的细菌数量与中间砧嫁接处理的差异不显著。双砧嫁接西瓜的根际土壤中的放线菌数量显著高于其他两个处理,比 CK 提高 36.64%。

表 1 双砧木嫁接对西瓜根际土壤微生物数量的影响

Table 1 Effect of double rootstock grafting on the microbial quantity of watermelon rhizosphere soil

处理	细菌数量	放线菌数量
单砧嫁接(CK)	10.15 ± 0.56 b	13.81 ± 0.53 c
中间砧嫁接	13.56 ± 0.56 a	15.97 ± 0.76 b
双砧嫁接	13.21 ± 0.26 a	18.87 ± 0.53 a

注:表中数据为平均值±标准差。同列数字后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

2.1.2 不同嫁接处理土壤生物量的变化 由表 2 可知,3 种嫁接处理的根际土壤中微生物生物量碳和氮含量均表现为双砧嫁接>中间砧嫁接>单砧嫁接对照,且 3 种嫁接处理之间均存在显著差异。3 种嫁接处理的根际土壤中微生物生物量磷含量表现为双砧嫁接>单砧嫁接>中间砧嫁接,双砧嫁接处理显著高于其他 2 个处理,中间砧嫁接与单砧嫁接对照处理无显著差异。由此可以看出,双砧嫁接处理有助于富集根际土壤中 3 种微生物生物量。

表 2 双砧嫁接对西瓜根际土壤生物量碳、氮、磷含量的影响

Table 2 Effects of double stock grafting on biomass C, N, P in watermelon rhizosphere soil (mg·kg⁻¹)

处理	w(微生物生物量碳)	w(微生物生物量氮)	w(微生物生物量磷)
单砧嫁接(CK)	105.5±1.8 c	18.5±1.2 c	26.8±2.5 b
中间砧嫁接	122.0±1.3 b	20.8±0.4 b	25.8±1.5 b
双砧嫁接	145.3±3.1 a	24.7±0.9 a	41.7±3.2 a

2.1.3 不同嫁接处理土壤酶活性的变化 由表 3 可知,双砧嫁接处理的根际土壤中 β -葡糖苷酶、氨基酸酶、磷酸酶活性均显著高于单砧嫁接处理。中间砧嫁接和双砧嫁接处理间 β -葡糖苷酶、氨基酸酶活性差异显著,但二者间磷酸酶活性无显著差异。中间砧嫁接处理的 β -葡糖苷酶、氨基酸酶活性与单砧嫁接对照差异不显著,但其磷酸酶活性显著高于单砧嫁接对照处理,中间砧嫁接和双砧嫁接处理间磷酸酶活性差异不显著。由此可以看出,双砧嫁接有助于提高根际土壤相关酶活性,根际土壤 β -葡糖苷酶、氨基酸酶、磷酸酶活性分别比 CK 提高 9.01%、16.07%和 13.14%。

表 3 双砧木嫁接对西瓜根际土壤酶活性的影响

Table 3 Effects of grafting on enzyme activities in watermelon rhizosphere soil (nmol·g⁻¹·min⁻¹)

处理	β - 葡糖苷酶活性	氨基酸酶活性	磷酸酶活性
单砧嫁接(CK)	1.22±0.28 b	10.95±0.14 b	1.75±0.26 b
中间砧嫁接	1.20±0.10 b	9.35±0.12 b	1.95±0.09 a
双砧嫁接	1.33±0.08 a	12.71±0.10 a	1.98±0.11 a

2.2 双砧木嫁接对根际土壤细菌群落结构的影响

2.2.1 不同处理对根际土壤细菌多样性的影响 由表 4 可知,3 个处理的样本文库覆盖率均在 98.1%以上,结果可代表真实情况。双砧嫁接处理除辛普森指数显著低于单砧嫁接和中间砧嫁接处理外,其他 3 个指数均显著高于单砧嫁接和中间砧嫁接处理,但中间砧嫁接和单砧嫁接处理的 4 个指数之间均无显著差异。表明双砧嫁接处理可显著提高细菌的丰富度。

2.2.2 不同处理的细菌门分类水平的优势菌群分析 分析不同处理的细菌门分类水平结构可知,在

表 4 不同嫁接处理根际土壤细菌的多样性指数

Table 4 Diversity index of rhizosphere soil bacteria under different grafting treatments

处理	Ace 指数	Chao1 指数	香农指数	辛普森指数	覆盖范围
单砧嫁接(CK)	2 008.6±15.85 b	2182.6±29.4 b	6.03±0.64 b	0.003±0.004 a	0.982±0.001 a
中间砧嫁接	2 098.0±29.17 b	2145.9±20.6 b	6.03±0.55 b	0.003±0.002 a	0.986±0.005 a
双砧嫁接	2 445.1±18.30 a	2393.4±27.7 a	6.70±0.14 a	0.001±0.005 b	0.985±0.003 a

表5 不同处理的细菌门分类水平结构占比

Table 5 Proportion of bacterial phylum classification level structure under different treatments %

门分类水平	单砧嫁接(CK)	中间砧嫁接	双砧嫁接
变形菌门 Proteobacteria	30.24±0.74 b	33.04±1.02 a	32.32±0.57 a
酸杆菌门 Acidobacteria	16.42±0.39 a	16.9±0.49 a	16.79±0.52 a
绿弯菌门 Chloreflexi	13.54±0.47 a	13.22±0.59 a	13.57±0.58 a
放线细菌门 Actinobacteria	11.54±0.31 b	14.06±0.44 a	11.84±0.42 b
厚壁菌门 Firmicutes	3.64±0.09 a	3.37±0.11 b	3.53±0.03 ab
拟杆菌门 Bacteroidetes	5.51±0.09 a	4.12±0.13 b	5.25±0.23 a
硝化螺旋菌门 Nitrospirae	1.84±0.06 b	3.1±0.10 a	1.96±0.05 b
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	4.51±0.18 a	3.78±0.05 b	4.39±0.12 a
螺旋体菌门 Saccharibacteria	1.84±0.06 c	2.52±0.07 b	3.31±0.07 a
匿杆菌门 Latescibacteria	0.84±0.01 b	1.31±0.05 a	0.65±0.03 c
未分类菌门 Unclassified	2.16±0.04 a	1.72±0.02 b	2.21±0.02 a
未知菌门 Others	4.09±0.07 a	2.87±0.07 b	4.18±0.08 a

注:同行数字后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

单砧嫁接、中间砧嫁接和双砧嫁接 3 个处理根际土壤中,共有的优势细菌门有 12 个。由表 5 可知,3 个处理中的变形菌门占比最高,分别占比达 30.24%、33.04%、32.32%,其次是酸杆菌门、绿弯菌门、放线细菌门,这 4 个优势细菌门占比均超过 10%以上。

各处理间酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloreflexi)占比差异不显著。中间砧嫁接处理中的变形菌门(Proteobacteria)、放线细菌门(Actinobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、匿杆菌门(Latescibacteria)占比显著高于单砧嫁接对照处理;但单砧嫁接对照处理中的厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)占比却显著高于中间砧嫁接处理。双砧嫁接处理中的厚壁菌门(Firmicutes)占比与对照处理差异不显著;但双砧嫁接处理中的变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体菌门(Saccharibacteria)占比显著高于单砧嫁接,说明嫁接改变了这几个优势细菌门的占比。

2.2.3 基于属分类水平的优势菌群分析 由表 6 可知,有 10 个优势细菌属占比大于 1%。对细菌属

表6 细菌属分类水平共有优势细菌结构占比

Table 6 Proportion of dominant bacterial structures at the classification level of bacterial genera %

共有优势细菌属	单砧嫁接(CK)	中间砧嫁接	双砧嫁接
norank_c_Acidobacteria	5.21±0.07 b	7.04±0.17 a	5.43±0.17 b
硝化螺菌属 <i>Nitrospira</i>	3.29±0.12 c	4.44±0.01 a	3.40±0.03 b
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	4.36±0.17 a	2.96±0.09 b	2.93±0.08 b
norank_f_Gemmatimonadaceae	3.54±0.09 a	2.39±0.07 c	2.51±0.04 b
norank_o_Gaiellales	2.65±0.08 b	2.99±0.05 a	2.27±0.02 c
norank_f_Xanthobacteraceae	2.84±0.12 b	1.84±0.03 c	3.09±0.10 a
norank_o_SC-I-84	2.46±0.05 b	2.31±0.05 c	2.53±0.02 a
norank_f_Anaerolineaceae	2.16±0.09 a	2.31±0.09 a	2.20±0.09 a
norank_f_Nitrosomonadaceae	1.64±0.06 c	2.09±0.06 b	2.22±0.02 a
鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	2.08±0.10 a	1.86±0.02 b	2.14±0.05 a
未知菌属 Others	10.54±0.46 c	13.83±0.55 a	12.43±0.38 b

分类水平共有优势细菌结构占比分析发现, norank_c_Acidobacteria 在根际土壤中占比最高,中间砧嫁接处理占比为 7.04%,双砧嫁接处理占比为 5.43%。其中,单砧嫁接植株根际土壤中芽孢杆菌属(*Bacillus*)的占比为 4.36%,显著高于中间砧嫁接(2.96%)和双砧嫁接(2.93%)。

双砧嫁接处理的 norank_f_Xanthobacteraceae、norank_o_SC-I-84、norank_f_Nitrosomonadaceae 占比显著高于中间砧嫁接和单砧嫁接处理;中间砧嫁接处理中的 norank_c_Acidobacteria、硝化螺菌属(*Nitrospira*)、norank_o_Gaiellales 占比显著高于其他两个处理。但各处理间的 norank_f_Anaerolineaceae 占比差异不显著。

2.2.4 基于 OTU 水平的 Venn 分析 通过统计不同处理样本中所共有及独有的可操作性分类单元数量并绘制 Venn 图。由图 4 可知,西瓜单砧嫁接、中间砧嫁接和双砧木嫁接 3 个处理的根际土壤中细菌总 OTU 数量分别为 1895、2076 和 2246。其中,共有的 OTU 数量为 1794,西瓜单砧嫁接、中间砧嫁接和双砧木嫁接处理的根际土壤中特有的细菌 OTU 数量分别为 12、53 和 204。结果表明,双砧嫁接和中间砧嫁接均能够明显增加西瓜根际土壤中特有的优势细菌数量,这可能是嫁接提高抗性的主要机制。

3 讨论与结论

笔者在试验中发现,双砧嫁接处理的根系分泌物较自根西瓜显著抑制病菌群落的生长,尤其是双

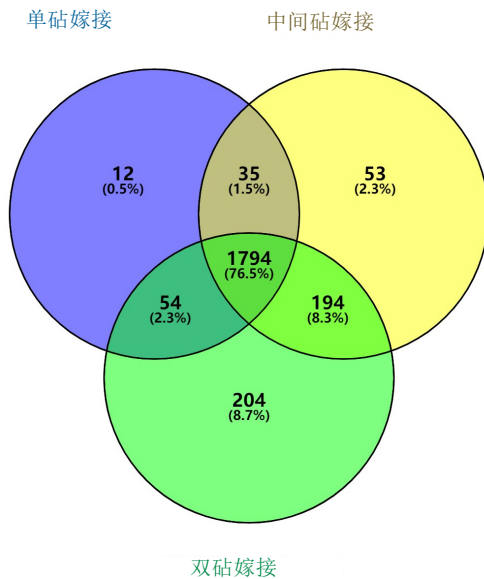


图4 细菌 OTU 分类水平 Venn 图

Fig. 4 Venn plot of bacterial OTU classification level

砧嫁接提高了西瓜土壤磷酸酶活性和微生物数量,具有抑制菌丝生长的化感物质,这与尹玉玲等^[9]在茄子上的研究一致。且双砧嫁接处理有助于富集根际土壤中微生物生物量碳、微生物生物量氮、微生物生物量磷,表明砧穗间存在着互作效应,但在向接穗传递过程中有一定程度的降低,这与符厚隆等^[10]在冬瓜嫁接试验中的结果相近。双砧木嫁接处理和中间砧嫁接处理根际土壤中碳、氮、磷含量均显著高于单砧嫁接处理,且能够改善西瓜根际土壤微环境,提高根际土壤相关酶活性。但双砧嫁接对西瓜枯萎病菌(尖孢镰刀菌数量)的影响差异还需进一步研究。

除微生物生物量磷无显著差异外,双砧嫁接处理碳、氮表现显著高于中间砧嫁接西瓜处理。与西瓜单砧嫁接处理相比,中间砧嫁接和双砧嫁接改变了这几个优势细菌门的占比,比如变形菌门、放线细菌门、硝化螺旋菌门等。同时,双砧嫁接拥有丰富的特有 OTU 数量及不同占比的共有优势细菌门属。砧木与接穗通过相互调节,缓解胁迫因子的伤害,可能是双砧嫁接提高抗性的主要机制^[11-12]。

本研究结果表明,双砧嫁接处理根际土壤中微生物生物量碳、微生物生物量氮、微生物生物量磷含量均显著高于其他处理;双砧嫁接处理根际土壤中特有分类操作单元 OTU 数量为 204,微生物菌门有 2 个,分别为变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体菌门(Saccharibacteria),不同占比的共有优势细菌门属为 norank_f_Xanthobacteraceae、norank_o_SC-I-84、

norank_f_Nitrosomonadaceae。中间砧嫁接处理根际土壤微生物群落的覆盖度较大,但其丰富度与群落多样性低于双砧嫁接处理。中间砧嫁接处理根际微生物生物量也发生了改变,砧木根系分泌物富集并改变了土壤细菌门属。与之相比,双砧嫁接处理根际土壤物质代谢旺盛,提高了西瓜根际土壤养分有效性,根际土壤磷酸酶等酶活性也得到提高,改善了根际土壤微环境。本研究为进一步研究抗性机制和双砧木嫁接技术的利用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 任奎瑜,赵久成,郭霜,等.红椎林中正红菇生境的土壤肥力及真菌多样性特征[J].西南农业学报,2020,33(1):109-116.
- [2] 姚华开,张传进,刘岳飞,等.混栽对主栽作物茄子根际土壤微生物生态学特性的影响[J].热带作物学报,2018,39(6):1067-1074.
- [3] 杨尚东,郭霜,任奎瑜,等.甘蔗宿根矮化病感病与非感病株根际土壤生物学性状及细菌群落结构特征[J].植物营养与肥料学报,2019,25(6):910-916.
- [4] 庞师婵,郭霜,任奎瑜,等.番茄/茄子嫁接对其根际土壤生物学性状及细菌群落结构的影响[J].园艺学报,2020,47(2):253-263.
- [5] 李靖宇,张肖冲,田兴国,等.压砂地砾砂瓜自根苗/嫁接苗不同连作方式土壤微生物群落结构比较[J].生态学杂志,2021,40(11):3608-3619.
- [6] 宋阳.嫁接西瓜根系分泌物特征及其对根际微生物区系的影响研究[D].南京:南京农业大学,2018.
- [7] 白晶芝,赵源,吴凤芝.盐碱胁迫对黄瓜嫁接苗根际土壤细菌和真菌群落结构及丰度的影响[J].中国生态农业学报,2017,25(11):1626-1635.
- [8] 孟凡鲁.甜瓜中间砧对嫁接西瓜生长和果实品质的影响[D].山东泰安:山东农业大学,2012.
- [9] 尹玉玲,周宝利,李云鹏,等.嫁接对茄子连作土壤生物活性及种子萌发和幼苗生长的影响[J].生态学杂志,2009,28(4):638-642.
- [10] 符厚隆,廖道龙,刘子凡,等.南瓜砧木嫁接冬瓜根系分泌物对土壤微生态的影响[J].中国瓜菜,2022,35(6):56-61.
- [11] SONG Y, ZHU C, RAZA W, et al. Coupling of the chemical niche and microbiome in the rhizosphere: Implications from watermelon grafting[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2016, 3(3):249-262.
- [12] 张捷,艾迪,孟景祥,等.植物嫁接砧木与接穗互作机制研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2022,50(5):139-145.
- [13] KENLER M, TABATABAI M A. Effects of liming and tillage-systems on microbial biomass and glycosidases in soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2003, 39: 51-61.
- [14] GREN M, HIREL B. Glutamine synthetase in higher plant[J]. Plant Cell Physiology, 2012, 40: 1187-1193.
- [15] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,2000.