

利用 RAPD-PCR 探讨天蓝喇叭虫生物群系分化

刘志新^{1,2}, 龚迎春^{1,2}, 王爱芹^{1,2}, 余育和^{1,*}, 冯伟松¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 选择天蓝喇叭虫 (*Stentor coeruleus*) 作为研究对象, 对武汉市南湖、月湖、关桥 3 个水体共 5 个样点天蓝喇叭虫 (*S. coeruleus*) 样本的总 DNA 进行随机扩增多态 DNA 聚类分析, 以检测各个样本的遗传相似性和趋异程度, 借以评估样本间的遗传变异度。结果如下: (1) 从 98 条随机引物中筛选 12 条引物共扩增出 89 条大小为 100 ~ 1500bp 的清晰条带, 平均每条引物扩增出 7.4 条片段。(2) 用 Rapdistance 1.04 分析显示, 不同样点样本之间存在着一定的变异, 其遗传距离在 0.076 ~ 0.416 之间。(3) 构建的聚类图中, 南湖 3 个样点的遗传距离较近, 在聚类图上聚成一枝, 应该为同一个种群。本试验将为探讨水体原生动物的迁徙能力对生物群系分化的影响积累实例资料, 更希望可以促进水体原生动物的研究和种间过渡区本质及物种扩散行为的研究。

关键词 天蓝喇叭虫 (*Stentor coeruleus*); 生物群系; RAPD; 南湖

文章编号: 1000-0933 (2007) 07-2942-06 中图分类号: 文献标识码: A

Applicability of RAPD-PCR pattern to genetic diversity of *Stentor coeruleus*

LIU Zhi-Xin^{1,2}, GONG Ying-Chun^{1,2}, WANG Ai-Qin^{1,2}, YU Yu-He^{1,*}, FENG Wei-Song¹

1 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (7) 2942 ~ 2947.

Abstract : *Stentor coeruleus* is widely distributed in many regions of the world. In this paper, we selected five samples of *Stentor coeruleus* from three Lakes (Lake Nanhu, Lake Yuehu, Pond Guanqiao). Genotype data from these five samples were analyzed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker to assess the genetic diversity of the *S. coeruleus* populations. The results were as followed: (1) The 11 primers produced 89 clear bands with an average of 7.4 fragments, ranging from 100 — 1500bp. (2) Considerable genetic diversity in these populations was suggested using the calculating genetic distance (0.076 — 0.416) between them. (3) Assessment of differences in populations by the phylogenetic tree erected using Rapdistance 1.04 showed that the three samples from N. Lake clustered into one branch indicating that these samples belong to one biotype. Our results show that RAPD technology is a rapid, precise and sensitive technique for identification of *S. coeruleus* genotypes and provides experimental evidence for the applicability of RAPD on the genetic diversity of *S. coeruleus*. Moreover, it can help in investigations of differences in populations and the mechanism of speciation. However, the phylogenetic relationships within *S. coeruleus*, must be interpreted with caution.

Key Words : *Stentor coeruleus*; biotype; RAPD; Lake Nanhu

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30570240)

收稿日期 2006-08-08; 修订日期 2007-05-24

作者简介 刘志新 (1984 ~) 男, 湖北襄樊人, 硕士生, 主要从事原生动物分子生态研究. E-mail: lzx20022456@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

Foundation item : The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30570240)

Received date 200-00-00; **Accepted date** 200-00-00

Biography LIU Zhi-Xin, Master candidate, mainly engaged in protozoa molecular ecology. E-mail: lzx20022456@126.com

种群生态学研究领域包括种群数量、分布、动态、种群调节、群体遗传等方面。种群生态学研究开始很早^[1~6]种群分化是种群生态学研究探讨较多的一个重要方面。生物的生存与发展本质上是生物对其生活环境长期适应和进化的生态过程。物种生存、繁殖以及进化的基本单元是种群,种群是联系生态学和遗传学的纽带^[7]。在 20 世纪 70~80 年代,不少学者开始把以往分开的种群遗传学和种群生态学结合起来研究自然种群的分化。在不断的探索中,人们试图从环境影响^[8,9]、地理隔离^[10,11]等诸多方面揭示种群分化的原因。但是在自然界中,一个种群产生分化显然不会是单独的一个因素所能够决定的,在一些种群的分化过程中,迁徙能力可能会产生较大的影响^[12]。

目前关于种群分化的研究多局限于高等动植物^[13~19],而在微型生物种群分化方面的研究起步较晚且文献较少^[20~23],其中关于原生动物的研究则几乎处于空白。但是,天蓝喇叭虫(*S. coeruleus*)^[24]等原生动物作为种群分化的研究对象却具有其他生物类群所不具有的优势:首先,原生动物分布广泛,一般都是全球性分布,采样方便,特别是对于大范围的调查研究具有重要的应用价值。其次,原生动物个体微小,体表相对表面积大,生命周期短,细胞直接承受外界的环境压力,进化速度相对较快^[25],可以在相对较短的时间内表现和重演种群分化的历程。

20 世纪末期种群生态学研究与其它学科相互交叉,并迅速向微观和宏观两个方向发展。在微观方面以分子生物学和遗传学的理论和方法为基础,探索种群遗传多样性和进化能力。其中随机扩增多态 DNA (random amplified poly-morphic DNA, RAPD) 分析技术因其有操作简单、灵敏度高和具有丰富的引物供筛选等特点而常被视作近缘种间及种内区分和系统关系分析的重要分子手段。本文试图利用此种分子标记技术对武汉 3 个水体的天蓝喇叭虫进行种群遗传多样性的分析,为种群分化机制积累实例,并期望能够促进天蓝喇叭虫等原生动物在种群生态学方面的研究应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料的采集与处理

研究所用天蓝喇叭虫采自武汉南湖、月湖、关桥 3 个水体。其中南湖设 N. lake I、N. lakeII 和 N. lakeIII 3 个样点,作为参考样点的月湖(Y. lake)和关桥(G. pond)各设一个样点(图 1)。采集的样本在解剖镜下用微吸管挑出后用蒸馏水清洗以去除杂质和其他的微生物。室温蒸馏水中饥饿 24h 消化虫体内的食物,再次收集虫体,无菌水洗涤 3 次。

1.2 DNA 的提取

每个样点洗净收集 200~300 个天蓝喇叭虫,加适量的消化液(0.1mol/L EDTA, pH 8.0;10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;0.5% SDS;60μg/ml Proteinase K)以 55℃ 过夜(8~12h),然后按传统的酚/氯仿法提取总 DNA,TE (10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0;1mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解后于 4℃ 保存备用。

1.3 引物筛选

本实验共对 98 条 10bp 的引物进行筛选,引物均从 Operon 公司购买。用 G. pond 样本所提的总 DNA 进行初筛,从 98 条引物中筛出 45 条多态性好且具有清晰稳定条带的引物。然后换用 N. lake 样本所提的总 DNA 从筛选出的 45 条引物中进一步筛选出 12 条多态性好且效果稳定的引物用于本实验 5 个样本的 DNA 扩增。引物号及序列见表 1。

1.4 RAPD 扩增

反应体系为 25μl,其中模板 DNA 20~25μg/ml,10×buffer 2.5μl, Mg²⁺ 2mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U,

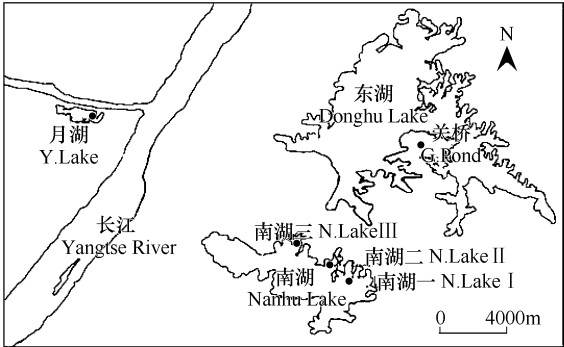


图 1 5 个采样点的分布图
Fig. 1 Five sampling locations

dNTP 0.2mmol/L ,引物 0.4μmol/L。反应条件 :94℃ 预变性 5min ,94℃ 变性 45s ,36℃ 复性 1min ,72℃ 延伸 2min ,45 个循环 ,72℃ 延伸 10min。

1.5 电泳检测

扩增产物用含有 EB (0.5μl/ml)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 ,电泳液为 0.5 × TBE ,取扩增产物 DNA10μl 加 2μl 溴酚蓝染色 ,混匀后点入胶孔。75V 恒压电泳 1.5h ,Image UVP 凝胶处理系统观察并一次性成像。

1.6 数据分析

根据 200bpDNA Ladder (MBI)指示的标准分子量 ,对照反应产物在琼脂糖凝胶上的迁移率 ,依据统一标准确定片段大小 ,分别用 1 和 0 代表扩增位点的有无 ,采用专业分析软件 Rapdistance 1.04 进行 Neighbour-joining 聚类分析。本试验以 Nei 和 Jaccard 遗传指数作为计算遗传相似系数和进行聚类分析的方法。计算方法分别是 : $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $JS = N_{xy} / (N_x + N_y)$,其中 F 为 Nei 相似系数 , JS 为 Jaccard 相似系数 , N_{xy} 为两个 DNA 样品共同拥有的扩增带数 , N_x 和 N_y 分别为两个 DNA 样品的扩增带数。

2 结果

采用的 12 条随机引物 ,对南湖等 3 个水体采集的 5 个样本进行 PCR 扩增 ,共获得 89 条大小为 100bp ~ 1500bp 的清晰条带 ,平均每条引物扩增出 7.4 条片段。扩增出来的片段显示出较大的多态性 (图 2)。

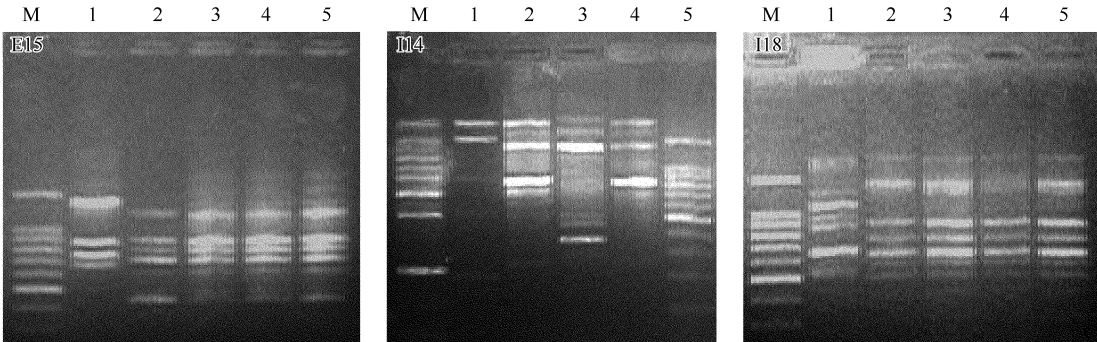


图2 部分引物 (E15、I14、I18)扩增产生的 RAPD 带型
Fig. 2 RAPD bands generated by part of the primes (E15、I14、I18)

采用软件 RAPDistance 1.04 分析结果见表 2。Nei 遗传指数分析结果显示 N. lakeII 和 N. lakeIII 的遗传距离最近 ,为 0.075862。N. lakeI 与 N. lakeII 次之 ,为 0.081481。此外 ,G. pond 与南湖的 3 个样点 (N. lakeI、N. lakeII、N. lakeIII)遗传距离较远 ,分别为 0.415929、0.389831、0.332343。Y. lake 作为南湖之外的另一

表 2 Nei 遗传指数分析 5 个天蓝喇叭虫样本之间的遗传距离 (D)矩阵
Table 2 Genetic distance with Nei 's coefficient of five *S. coeruleus* assemblages

湖名 Lake name	南湖一 N. lake I	南湖二 N. lake II	南湖三 N. lake III	关桥 G. pond	月湖 Y. lake
N. lake I	0.0				
N. lake II	0.081481	0.0			
N. lake III	0.142857	0.075862	0.0		
G. pond	0.415929	0.389831	0.332343	0.0	
Y. lake	0.151515	0.094891	0.098592	0.304348	0.0

个湖泊与南湖的 3 个样点 (N. lakeI、N. lakeII、N. lakeIII)的遗传距离距离相对于 G. pond 来说较近 ,分别为 0. 151515、0. 094891、0. 098592。

采用邻接法 ,Nei 遗传距离分析得到的聚类图与遗传距离 (*D*) 矩阵的结果相吻合 (图 3):

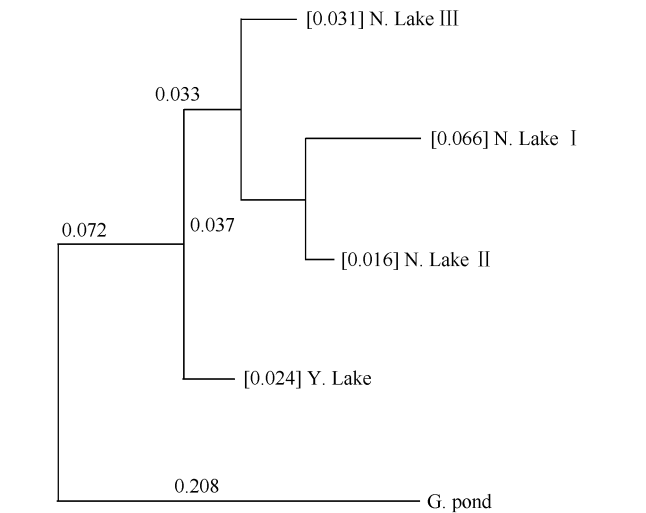


图 3 采用邻接法 ,Nei 遗传距离分析得到的 5 个天蓝喇叭虫样本的聚类图

Fig. 3 Neighbor-joining dendrogram of five *S. coeruleus* assemblages based on Nei 's genetic distance

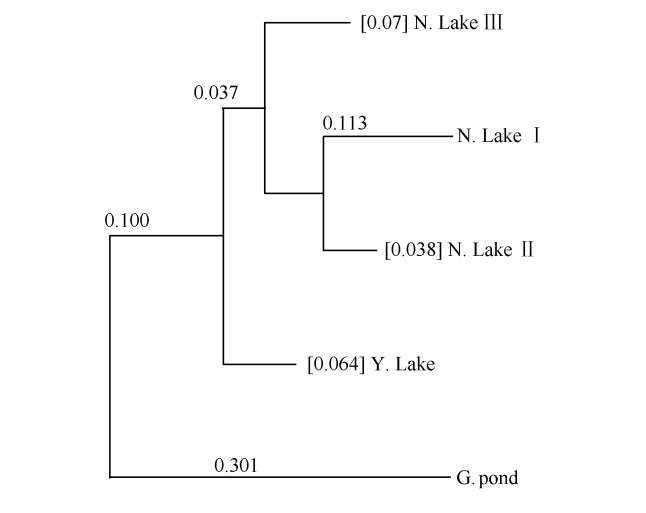


图 4 采用邻接法 ,Jaccard 遗传距离分析得到的 5 个天蓝喇叭虫样本的聚类图

Fig. 4 Neighbor-joining dendrogram of five *S. coeruleus* assemblages based on Jaccard 's genetic distance

采用 Jaccard 指数分析的结果与采用 Nei 指数分析得到的结果几乎相同 ,只是 Jaccard 指数分析得到的遗传距离比 Nei 指数分析得到的稍大 (表 3) ,但是差别不明显 ,且二者反映的 5 个样点间的遗传关系相同 ,分析得到的聚类图 (图 4)完全一致 :南湖 N. lake I 和 N. lake II 首先聚在一起 ,然后与 N. lake III 聚在一起。Y. lake 与南湖的遗传距离相对于 G. pond 较近。

表 3 Jaccard 遗传指数分析 5 个天蓝喇叭虫样本之间的遗传距离 (*D*) 矩阵

Table 3 Genetic distance with Jaccard 's coefficient of five <i>S. coeruleus</i> assemblages					
湖名 Lake name	N. lake I	N. lake II	N. lake III	G. pond	Y. lake
N. lake I	0. 0				
N. lake II	0. 150685	0. 0			
N. lake III	0. 150000	0. 141026	0. 0		
G. pond	0. 587500	0. 560976	0. 500000	0. 0	
Y. lake	0. 263158	0. 173333	0. 179487	0. 466667	0. 0

3 讨论

地理隔离会造成种群分化已为大家所公认。但是 ,在一个连续的水体中种群分化情况就较为复杂 ,以往的很多研究都证实在同一水体中因为水体流动而导致基因的自由交流等原因 ,处于其中的生物应该属于同一个种群^[26~28]。但是 ,近年来有些学者对此提出了质疑 ,因为即使是在同一水体中也存在不同的小生境 ,生活在其中的生物承受着不同的环境压力 ,加之对于同一水体生活的微型生物而言 ,其迁徙能力对其基因交流也有一定程度的影响。在一些极端的情况下同一水体中的生物甚至可以分化为不同的种^[29]。如王爱芹等针对同一水体中生活的微型生物的种群分化研究表明生活于武汉市东湖的螳状独缩虫 (*Carchesium polypinum* Linne)不属于同一个种群^[30]。缪炜等也在研究中国 8 省市自治区的 19 个螳状独缩虫种群的地理分布格局的形成与演化时 ,东湖中有一个样点没有与东湖内其它 4 个样点一起聚在北方种群一支内 ,而是聚在南方种

群一支内^[31],也暗示东湖内的螳状独缩虫并非一个种群。

本试验将螳状独缩虫和天蓝喇叭虫的生物种群分化做了一个比较,探讨一下微型动物种群分化过程中的迁徙能力的作用。试验选用与武昌东湖毗邻的南湖作为采样地,对其中生活的天蓝喇叭虫种群进行了种群遗传分析。试验分析对象的选取是出于两方面考虑:其一是考虑到它们的相似性。天蓝喇叭虫和螳状独缩虫同属于纤毛类原生动物,有相似性和可比性。其二是考虑到它们迁徙能力的差异。螳状独缩虫幼体(游泳体)浮游生活,成体成群固着生活,在一定程度上限制了其在水体中的迁徙能力。而天蓝喇叭虫整个生活史都是浮游生活,相对迁徙能力较强。本试验即是要验证这种迁徙能力的差异到底会不会在同一水体微生物物种的种群分化中产生作用,为以后的种群生态学研究积累实例资料。最终实验结果表明,武昌南湖中的天蓝喇叭虫是为同一个种群,彼此之间有较大的遗传相似度。这一结果也证实了同一水体中生活的微型生物的迁徙能力差异会对种群分化造成影响。

原生动物(protozoa)是最原始、最简单、最低等的单细胞(unicellular)动物^[9]。本试验所采用的天蓝喇叭虫伸展时体长可达1~2mm,不论收缩或伸展,肉眼均可见。而且天蓝喇叭虫体色为天蓝色,外部特征明显,易于辨认。这样就可以直接用野外采回的水样在解剖镜挑选出纯的喇叭虫种群,不用采用人工纯培养的方法,进而也避免了人工纯培养中可能造成的突变对天然种群研究所带来的影响。

本试验只是从迁徙能力方面对武昌南湖中的天蓝喇叭虫的种群分化进行了一些探索,但是一个物种的种群分化显然不会是一种因素能够决定的,如湖水的理化因子和湖水水流等其他因素对种群分化的影响是值得我们进一步探索的方向。

References :

[1] Zhong Z C , Zeng B. Trends and Advances in Researches on Plant Population Ecology. Journal of Southwest China Normal University , 2001 , 26 (2) : 230 — 236.

[2] Malthus T R. An Essay on the Principle of Population. London : Freedom Publication , 1826.

[3] Darwin C. The origin of species , by means of natural selection. London , UK : John Murray Press , 1859.

[4] Harper J L. The population Biology of Plants. London , UK : Academic Press , 1977.

[5] Silvertown J W. Introduction to Plant Population Ecology. England : Longman , London , 1982.

[6] Dirzo R , Sarukhan J. Perspectives on Plant Population Ecology. Sinauer Associates INC. England : Publishers , Sunderland , 1984.

[7] Liao Z Y , Dang C L. Study on the Population and Differentiation of *Album wallichii* in Jizu Mountain , Binchuan County , Yunnan Province. Acta Botanica Yunnanica , 1998 , 20 (2) : 211 — 219.

[8] Bale J S , Master G J , Hodkinson I D , *et al.* Herbivory in global climate change research : direct effects of rising temperature on insect herbivores. Global Change Biology , 2002 , 8 : 1 — 16.

[9] Hoffmann A A , Hercus M J. Environmental stress as an evolutionary force. Bioscience , 2000 , 50 : 217 — 226.

[10] Carlos J , Emerson B C , Oromi P , *et al.* Colonization and diversification towards a phylogeographics synthesis for the Canary Islands. Tree , 2000 , 15 (3) : 104 — 109.

[11] Emerson B C. Evolution on oceanic islands : molecular phylogenetic : approaches to understanding pattern and process. Molecular Ecology , 2002 , 11 : 951 — 966.

[12] Chang Q , Cao F H , Zhu L F , Zhang B W , Zhou K Y. Microsatellite variation and genetic diversity in the black-crowned night heron *Nycticorax nycticorax* in the lower reaches of Yangtze River. Acta Zoologica Sinica , 2005 , 51 (4) : 657 — 663.

[13] Ran J B , Zhang Q Z , Wei M. Population ecology of *Micracanthorhynchina motamurai* in *Coreius guichenoti* in the upper reach of Yangtze. Chinese Journal of Ecology , 2005 , 24 (6) : 703 — 706.

[14] Zhao T B , Yang C , Zhou L Z , Zhang Z B , Jin F H , Ning S L. Advance of Ecological Study on Great Gerbil (*Rhombomys opimus*) in China. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol , 2005 , 36 (5) : 591 — 596.

[15] Yang C , Zhi Y P. Zheng R. An analysis of ecological adaptability on *Tetraena mongolica* Maxim populations. Acta Ecologica Sinica , 2006 , 26 (1) : 91 — 96.

[16] Xu Z L. Ecological characters of *Euchaeta concinna* (copepod) in the east china sea. Oceanologia et Limnologia Sinica , 2006 , 37 (2) : 97 — 104.

[17] Koskivaara M E. Microhabitat distribution and coexistence of *Dactylogyrus* species (Monogenea) on the gills of roach. Parasitology , 1992 , 104 :

273—281.

[18] Li J Y, Wu J Y, Yang D W, Chen Z S, Zeng H. The Population Ecology of *Elonginurus mugilus* Parasite in *Mugil cephalus* in Guangdong Province, China. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39 (2): 67—72.

[19] Wu J Y, Li J Y, Chen Z S, Yang D W. The Population Dynamics of *Octotestis apogoni* in *Apogon quadrifasciatus* in Guangdong Province, China. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000, 39 (2): 73—77.

[20] Liu Y, Zhao H M, Cai L L. The present situation and assessment of the microorganism in South Lake in Jiaxing after renovation. *Environmental Pollution & Control*, 2005, 27 (1): 41—44.

[21] Zhao X, Wang J L. Bioremediation of chlorophenol-contain inated soil using bioaugmentation technology and the soil microbial population dynamics. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26 (5): 821—827.

[22] Huang L Y, Xia L J. Effect of Microorganism on Circulation of Nitrogen and Phosphorus and Evolvment of Pelagic Micro-alga Population in the ponds on Saline-alkaline Land in the West Part of China. *Modern Fisheries Information*, 2005, 20 (4): 29—31.

[23] Song Z G, Xu Q Z, Lu X A, Jiao B H, Ai F. A Primary Study on Population Biodiversity of Marine Microorganisms from East China Sea. *Microbiology*, 2006, 33 (1): 63—67.

[24] Tartar V. The Biology of Stentor. Oxford: Pergamon Press Ltd., 1961.

[25] Shen Y F, Protozoology. Beijing: Science Press, 1999.

[26] Baranyi C, Gollmann G, Bobin M. Genetic and morphological variability in roach *Rutilus rutilus*, from Austria. *Hydrobiologia*, 1997, 350: 13—23.

[27] Gollmann G. Biochemical markers in the population genetics of *Chondrostoma nasus*. *Folia Zoologica*, 1995, 44: 83—89.

[28] Takahashi D, Ohara K. Genetic variations estimated from PCR-RFLP analysis of two morphs of the freshwater goby *Rhinogobius* in the Lake Biwa water system. *Ichthyological Research*, 2004, 51 (2): 99—105.

[29] Baratti M, Goti E, Messina G. High level of genetic differentiation in the marine isopod *Sphaeroma terebrans* (Crustacea Isopoda Sphaeromatidae) as inferred by mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 315 (2): 225—234.

[30] Wang A Q, Yu Y H, Zhang W J. Heterogeneity of *Carchesium polypinum* (Ciliophora: Peritrichida) in Donghu Lake. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (3): 895—900.

[31] Miao W, YU Y H, Shen Y F, Zhang X Y. Intraspecific phylogeography of *Carchesium polypinum* (Peritrichia, ciliophora) from China, inferred from 18S-ITS-5.8S ribosomal DNA. *Science in China Series, C-Life Science*, 2003, 33 (2): 151—159.

参考文献：

[1] 钟章成, 曾波. 植物种群生态研究进展. *西南师范大学学报*, 2001, 26 (2): 230~236.

[7] 廖周瑜, 党承林. 云南宾川县鸡足山地区多星韭种群分化的研究. *云南植物研究*, 1998, 20 (2): 211~219.

[12] 常青, 曹发华, 朱立峰, 张保卫, 周开亚. 长江下游地区夜鹭种群微卫星变异及遗传多样性. *动物学报*, 2005, 51 (4): 657~663.

[13] 冉江波, 张其中, 魏明. 长江上游圆口铜鱼幼鱼肠道内寄生小吻虫种群生态的研究. *生态学杂志*, 2005, 24 (6): 703~706.

[15] 杨持, 智颖飙, 征荣. 四合木种群的生态适应性. *生态学报*, 2006, 26 (1): 91~96.

[16] 徐兆礼. 东海精致真刺水蚤 (*Euchaeta concinna*) 种群生态特征. *海洋与湖沼*, 2006, 37 (2): 97~104.

[18] 吕军仪, 吴金英, 杨大伟, 陈志胜, 曾华. 鳃长尾吸虫种群生态研究. *中山大学学报*, 2000, 39 (2): 67~72.

[19] 吴金英, 吕军仪, 陈志胜, 曾华, 杨大伟. 四线天竺鲷肠道内天竺鲷八睾吸虫种群动态研究. *中山大学学报*, 2000, 39 (2): 73~77.

[20] 刘颖, 赵惠明, 蔡丽玲. 嘉兴南湖整治后水质对微生物种群生态分布的影响. *环境污染与防治*, 2005, 27 (1): 41~44.

[21] 赵璇, 王建龙. 氯酚污染土壤的生物强化修复及其微生物种群动态变化的分子生物学监测. *环境科学学报*, 2006, 26 (5): 821~827.

[22] 黄宁宇, 夏连军. 微生物对西部盐碱地池塘氮、磷循环和浮游微藻种群演变的影响. *现代渔业信息*, 2005, 20 (4): 29~31.

[23] 宋志刚, 许强芝, 鲁心安, 焦炳华, 艾峰. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究. *微生物学通报*, 2006, 33 (1): 63~67.

[25] 沈韞芬. 原生动物学. 北京: 科学出版社, 1999.

[30] 王爱芹, 余育和, 张文静. 东湖螈状独缩虫 (纤毛门: 寡膜纲) 的异质性. *生态学报*, 2006, 26 (3): 895~900.

[31] 缪纬, 余育和, 沈韞芬, 张锡元. 螈状独缩虫种内分子系统地理学的研究. *中国科学 (C 辑)*, 2003, 33 (2): 151~159.