

# 蓝藻 *Synechococcus* sp PCC7942 与其抗氨苄突变株的诱变培养及超微结构观察

蒋婧<sup>1</sup>, 苏力寻<sup>1</sup>, 陈亮<sup>1</sup>, 沈明山<sup>1</sup>, 王湘平<sup>2</sup>

(1 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2 福建农林大学测试中心, 福建 福州 350002)

**摘要:** 利用化学诱变剂, 对野生型蓝藻 *Synechococcus* sp PCC7942 进行诱变筛选, 获得 2 株抗氨苄的聚球藻突变株。对抗氨苄株 1、抗氨苄株 2 及野生藻 PCC7942 的生长情况、优化培养条件和超微结构等方面进行了比较分析, 结果表明, 野生型 PCC7942 的基础抗性为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而抗氨苄株 1、抗氨苄株 2 分别为  $240$  和  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经培养, 3 种藻的生长都表现出全天光照优于半天光照。在加入氨苄青霉素的 BG-11 培养基中, 抗氨苄株 1、2 的长势明显好于野生型 PCC7942 但都不如它们各自在正常 BG-11 培养基中的长势。用透射电镜对 3 种藻不同生理时期的超微结构进行观察, 发现在一般情况下 3 种藻之间以及它们在不同生长时期的外观基本相同, 但出现了螺旋结构和出芽生殖的特殊情况。

**关键词:** 抗氨苄突变 PCC7942 氨苄青霉素; 培养; 超微结构

中图分类号: Q934.3; Q319+.33; Q248 文献标识码: A 文章编号: 1671-5470(2006)04-0388-06

## Mutagenesis cultivation and ultrastructural observation of *Synechococcus* sp PCC7942 and two Amp-tolerant mutants

JIANG Jing<sup>1</sup>, SU Li-xun<sup>1</sup>, CHEN Liang<sup>1</sup>, SHEN Ming-shan<sup>1</sup>, WANG Xiang-ping<sup>2</sup>

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. Test Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract** Two Amp-tolerant mutants of PCC7942 were acquired after ethylmethyl sulphonate (EMS) mutagenesis and ampicillin enrichment. Through comparing among PCC7942 and two mutants on their growing responses, cultivating conditions and ultrastructures, it was discovered that the basic tolerance of PCC7942 to Amp was  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  while the values of mutant 1 and 2 were  $240 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . It was also observed that PCC7942 and the two mutants all grew better when receiving all-day illumination than half-day one. In BG-11 containing antibiotic Amp, the growing responses of mutant 1 and 2 were obviously better than wild type PCC7942. In the ultrastructural level, the structure of the wild-type and two mutants was similar in the different growing phases, but some special phenomenons such as the spiral structure and budding were also discovered.

**Key words** Amp-tolerant mutants PCC7942; Amp; cultivation; ultrastructural observation

蓝藻是一类能进行植物型光合作用的原核生物, 约 150 属 2000 余种, 适应性强, 广泛分布于地球上的各个角落。由于蓝藻在细胞结构、代谢、遗传和进化等方面表现出独特的性质, 多年来被广泛应用于光合作用、固氮作用、叶绿体起源以及植物进化等重大生物学研究<sup>[1]</sup>。

1964 年, Kumar<sup>[2]</sup> 通过不断提高培养基中抗生素的浓度, 在组囊藻中直接筛选到抗链霉素突变体和抗青霉素突变体。1967 年 Pkalek<sup>[3]</sup> 运用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 分离到抗异酰肼突变体。之后, 陆续有各种蓝藻突变体的相关报道。突变体的分离为蓝藻的遗传研究提供了必要的工具。迄今, 在蓝藻上所得到的绝大多数突变体都采用常规方法, 如直接分离自发突变、物理诱变和化学诱变。作者利用化学诱变剂分离到 2 株抗氨苄突变株, 较野生型蓝藻具有较高的氨苄耐受性。本文报道野生型蓝藻及抗氨苄突变株生长状况及超微结构上出现的一些特殊现象, 为今后的蓝藻研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 藻种 聚球藻 7942 (*Synechococcus* sp. PCC7942), 购自中科院武汉水生生物研究所。

收稿日期: 2005-11-07 修回日期: 2006-06-18

基金项目: 国家科学技术部国家转基因研究与产业化专项基金资助项目 (J00-B-014)。

作者简介: 蒋婧 (1984-), 女, 研究方向: 生物化学。

1.1.2 培养基 BG-11 培养基, 配方参见 Rippka et al<sup>[4]</sup> 的方法。

1.1.3 抗生素 氨苄青霉素 (上海生工生物工程技术有限公司)。

1.1.4 仪器 VS-7220 可见分光光度计 (山东瑞利分析仪器公司); LRH-250-G 光照培养箱 (广东省医疗器械厂); JEM-1010 型透射电子显微镜。

## 1.2 培养方法

200 mL 的三角瓶装 120 mL BG-11 培养基, 筛选时加  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氨苄青霉素, 按 0.5% 接种量使初始  $D_{440}$  为 0.1。2000 k 全天光照, 培养温度  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

## 1.3 PCC7942 的基础氨苄抗性测定

在 BG-11 液体培养基中添加氨苄青霉素至终浓度依次为  $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $60 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $70 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $80 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $90 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $120 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $160 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $250 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 测定 PCC7942 基础抗性。

## 1.4 抗氨苄株的筛选

将文献 [5] 的方法加以改进。指数期生长细胞经诱变剂甲基磺酸乙酯 ( $\text{EMS}$ ,  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理后, 涂布于 BG-11 琼脂平板面上的醋酸纤维膜上。先在不含氨苄的 BG-11 固体培养基上培养 24 h, 然后将膜转移至含  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氨苄的 BG-11 固体培养基上 [简称 BG-11(Amp)] 进行筛选培养。1 周后, 待膜上出现绿色单藻落, 挑选全部藻体分别置于 BG-11 液体培养基中培养至对数生长期后期, 接种于含系列氨苄浓度的液体培养基上进行最高耐氨苄测试。

## 1.5 最适测量波长测定

改变分光光度计的波长, 测量在不同稀释浓度和有无氨苄存在时野生藻和抗氨苄株  $D$  值。

## 1.6 最佳生长条件测定

用分光光度法在  $440 \text{ nm}$  波长下测定藻类  $D$  值, 记录 3 种藻株在不同光照时间培养条件下的生长状况, 并进行比较分析。

## 1.7 生长曲线测定

将野生型及抗氨苄藻株在 BG-11 液体培养基中培养至对数生长期后期, 按 0.5% 接种量分别接种于 BG-11 及 BG-11(Amp) 培养基, 每组均以 PCC7942 作为对照,  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  正常光照培养, 每隔 1 d 测定其  $D_{440}$  值, 连续测 24 d 记录各组数据并绘制成生长曲线。

## 1.8 电镜观察

选取野生型及抗氨苄株的不同生理时期藻体, 用质量分数为 2% 磷钨酸点样负染, 在 JEM-1010 型透射电子显微镜下观察并拍照。

# 2 结果与讨论

## 2.1 PCC7942 基础氨苄抗性测定

将 PCC7942 培养至对数生长期后期, 接种于含系列氨苄青霉素浓度的 BG-11 液体培养基中, 测定其基础抗性 (表 1)。通过 3 组平行实验, 可知最佳筛选浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 聚球藻 PCC7942 氨苄青霉素基础抗性的测定<sup>1)</sup>

Table 1 The measurement of resistance of PCC7942 to Amp

| 处理    | $\rho(\text{Amp}) / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |    |
|-------|--|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|       | 40   | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 120 | 160 | 200 | 250 | 300 | 对照 |
| 第 1 组 | +  | +  | +  | +  | +  | +  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  |
| 第 2 组 | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  |
| 第 3 组 | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +  |

<sup>1)</sup> +. 正常生长, 藻液翠绿色; -. 藻液褪色或变为白色。

## 2.2 抗氨苄株氨苄抗性测试

筛选培养 1 周后, 膜上出现 2 株绿色单藻落, 分别挑选至 BG-11(Amp) 液体培养基中培养, 命名为抗氨苄株 1 和抗氨苄株 2 将经筛选、培养所得的抗氨苄株 1 和抗氨苄株 2 菌株培养至对数生长期后期, 接种于

含系列氨苄溶度的液体培养基上进行最高耐氨苄测试. 通过 3 组平行测定, 得知抗氨苄株 1、2 最高耐氨苄量分别为 240 和 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (表 2、3). 由上可见, 抗氨苄株 2 较抗氨苄株 1 有较高的氨苄耐受性.

表 2 抗氨苄株 1 氨苄青霉素基础抗性的测定<sup>1)</sup>

Table 2 The measurement of the resistance of mutant 1 to Amp

| 处理    | $\rho(\text{Amp}) / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 对照 |
|-------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|       | 120  | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 300 |    |
| 第 1 组 | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +  |
| 第 2 组 | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +  |
| 第 3 组 | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +  |

<sup>1)</sup> +. 正常生长, 藻液翠绿色; -. 藻液褪色或变为白色.

表 3 抗氨苄株 2 氨苄青霉素基础抗性的测定<sup>1)</sup>

Table 3 The measurement of the resistance of mutant 2 to Amp

| 处理    | $\rho(\text{Amp}) / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 对照 |
|-------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
|       | 120  | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 300 |    |
| 第 1 组 | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +  |
| 第 2 组 | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +  |
| 第 3 组 | +  | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | -   | +  |

<sup>1)</sup> +. 正常生长, 藻液翠绿色; -. 藻液褪色或变为白色.

### 2.3 最适波长的确定

将 3 种藻株分别接种入 BG-11 和 BG-11(Amp) 的培养基中, 并把藻体分别稀释 2 和 6 倍. 测定在不同的波长下不同稀释度的光密度值 (图 1).

由图 1 可知, 波长为 440 nm 测定藻类时, 光密度为最大值. 在稀释 2 和 6 倍的 BG-11 和 BG-11(Amp) 培养基中有着同样的规律, 而且光密度值与稀释倍数成正比. 该波长下测定的光密度值能很好地反映藻类的密度. 因此, 选择 440 nm 作为最适测量波长.

### 2.4 光照时间对 3 种藻株生长的影响

由图 2-4 可知, 野生藻半天光照下 120 h 左右藻体进入对数生长期, 全天光照下仅需要 94 h. 抗氨苄株 1 和 2 半天光照下, 都在 143 h 左右藻体进入对数生长期, 全天光照仅需 94 h 可见, 全天光照使藻体缩短其延滞期,  $D_{440}$  各个时期的数值和净增率明显大于半天光照. 因此, 光照时间对藻体细胞的生长有很大的影响<sup>[6]</sup>.

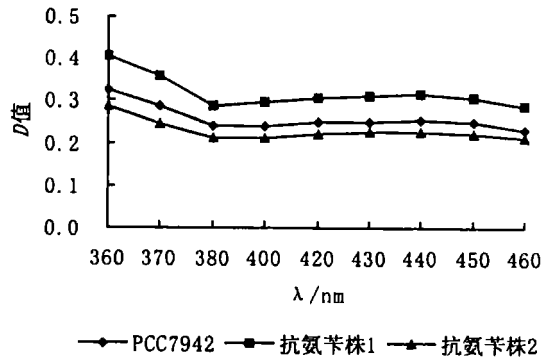


图 1 3 种藻株在 BG-11 培养基中不同波长下  $D$  值的变化规律

Fig 1  $D$  values of wild-type and two mutants under different wavelengths in BG-11

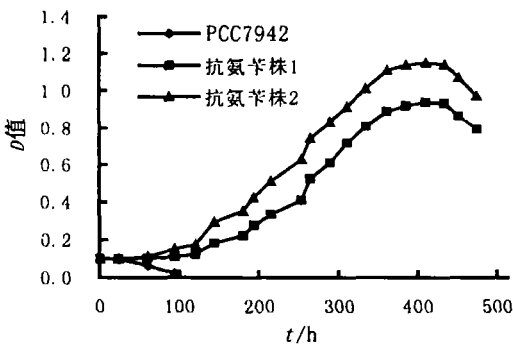


图 2 光照时间对野生藻株生长状况的影响

Fig 2 Effects of the illuminating duration on the growth of the wild-type

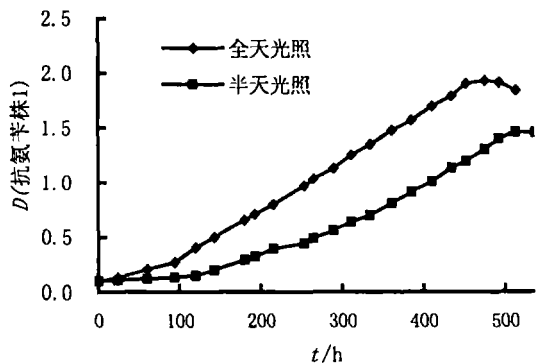


图 3 光照时间对抗氨苄株 1 生长状况的影响

Fig 3 Effects of the illuminating duration on the growth of mutant 1

## 2.5 3种藻株在 BG-11 中的生长曲线

将野生藻与抗氨苄株 1 和 2 分别接种于 BG-11 培养基中, 28 °C 全天光照培养, 初始浓度  $D_{440}$  值 0.1, 结果如图 5 所示。

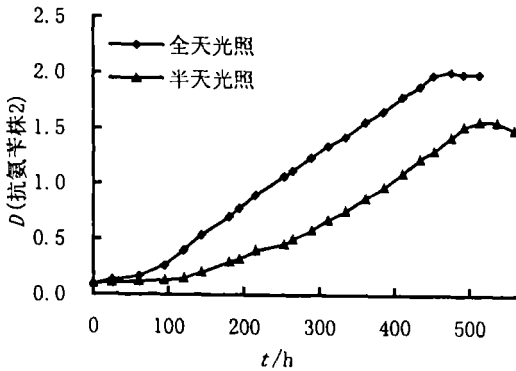


图 4 光照时间对抗氨苄株 2 生长状况的影响

Fig 4 Effects of the illuminating duration on the growth of mutant 2

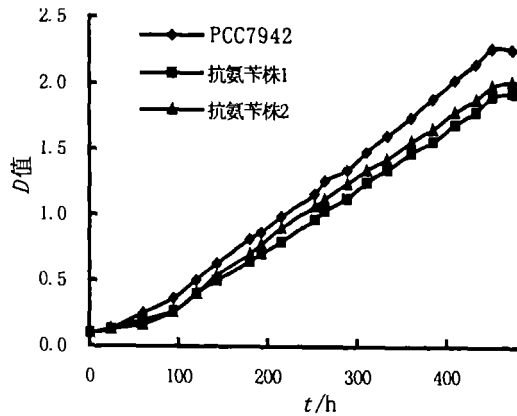


图 5 3种藻类在 BG-11 培养基中的生长曲线

Fig 5 The growing response of the wild-type and two mutants in BG-11

由图 5 可以看出, 在正常的 BG-11 培养基中, 3 种藻株总体生长情况基本相似, 都于 94 h 左右进入对数生长期; 而 PCC7942 于 452.5 h  $D$  值达到最大, 抗氨苄株 1 和 2 都于 475 h 左右时  $D$  达到最大值, 从而进入生长停滞期和衰亡期。同时 PCC7942 在各个时间的  $D$  值在 3 种藻株中都是最高的。2 种抗氨苄株相比较, 抗氨苄株 2 的  $D$  值在起始阶段低于抗氨苄株 1, 但之后增长率较大, 于 143 h 超过了抗氨苄株 1 表明抗氨苄株 2 的生长速率和适应力略高于抗氨苄株 1。

## 2.6 3种藻株在 BG-11(Amp) 中的生长曲线

将野生型 PCC7942 抗氨苄株 1 和 2 分别接种于 BG-11(Amp) 培养基中, 初始浓度  $D_{440}$  值为 0.1, 28 °C 全天光照培养, 结果如图 6 所示。

由图 6 可知, 野生型 PCC7942 在 BG-11(Amp) 培养基中不能生长, 而抗氨苄株 1 和 2 在此培养基中的生长规律基本相同。经过约 120 h 的延滞期后, 抗氨苄株 1 和 2 同时进入对数生长期, 在接种 410 h 后两藻株的  $D$  值都达到最大, 进入生长的停滞期和衰亡期。与抗氨苄株 1 相比, 抗氨苄株 2 在各个时间段的  $D$  值都更大一些, 在此氨苄浓度下表现出更好的适应性。

同时, 与在 BG-11 培养基中生长相比, 抗氨苄株 1 和 2 在氨苄存在下 (具筛选压) 各个生长阶段的  $D$  值都偏小, 延滞期变长, 并更快进入生长停滞期和衰亡期。

## 2.7 3种藻株的继代培养

将这 3 种藻株进行继代培养, 其中野生型 PCC7942 只在 BG-11 培养基中培养, 而抗氨苄株 1 和 2 分别在 BG-11 和 BG-11(Amp) 培养基中培养。5 代后这 3 种藻株在培养基中的生长曲线都未发生明显变化, 表明这 2 种突变藻株抗氨苄特性的遗传稳定性。

## 2.8 透射电子显微镜对 3 种藻株的观察

分别取延滞期、对数生长期和衰亡期的 3 种藻类 [PCC7942 取 BG-11 培养基, 而抗氨苄藻株 1 和 2 则分别取自 BG-11 和 BG-11(Amp) 培养基]。并对 3 种不同时期的藻进行点样负染, 用透射电镜观察研究超微结构并拍照 (图 7)。

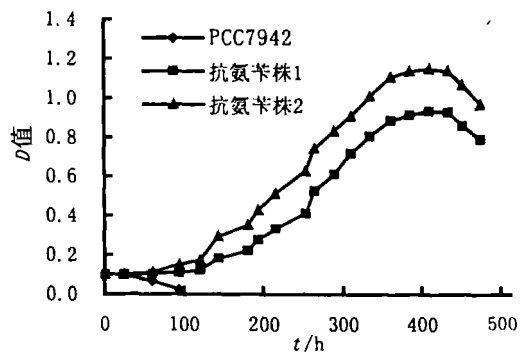
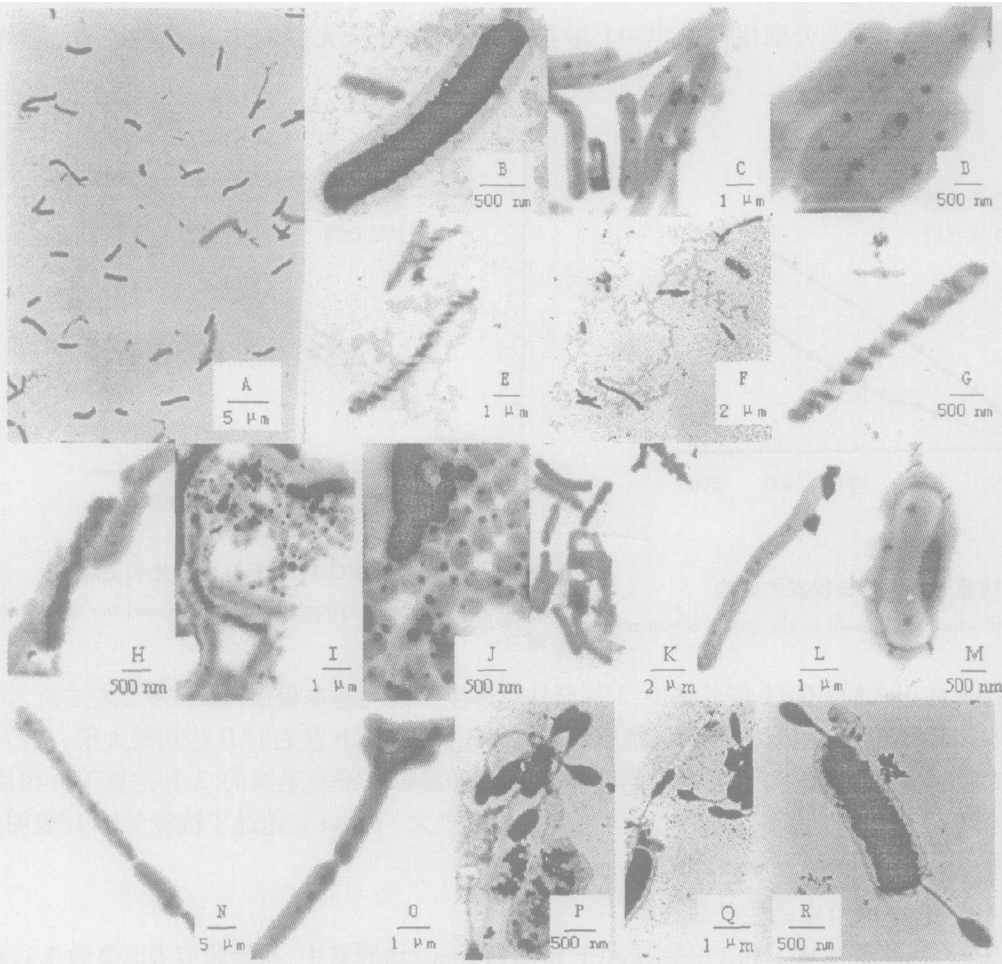


图 6 3种藻类在含  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素的 BG-11 培养基中的生长曲线

Fig 6 The growing response of the wild-type and two mutants in BG-11 with  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Amp



A. 在大多数情况下 3 种藻株的形态基本相似, 呈长杆状; B 藻类外部包被着一层浅色的荚膜; C、D. 蓝藻细胞内排列的羧体; E-H. 螺旋状的藻体; H. 螺旋状的藻体中也有羧体; I、J 小球状的藻体; K-M. 藻体裂殖, 在藻体某处缢缩成两段; N. 藻体同时分裂为多段; O. 二叉分裂的藻体; R、Q. 出芽生殖; R. 藻体两头同时出芽。

图 7 3 种藻株的超微结构观察

Fig 7 The ultrastructural observation of the wild-type and two mutants

由图 7 可知, 在大多数情况下 3 种藻株形态基本相同, 都为长杆状 (图 7A), 大多数长度约为 2-5  $\mu\text{m}$ , 宽度约为 0.2-0.5  $\mu\text{m}$ , 长宽比约为 10-25. 但在 3 种藻株中, 也有一些体型较异常的, 特别是分裂中的藻体通常会拉得很长 (图 7N). 在较高放大倍数下, 可以观察到藻体内有深色颗粒状物质. 根据吴天福等<sup>[7]</sup>报道, 此颗粒为羧体, 为蓝藻浓缩、利用  $\text{CO}_2$  的细胞结构. 羧体在蓝藻细胞内排列不太规则 (图 7C、D), 且不同藻体内的羧体有大有小. 藻类外部包被着一层浅色的荚膜 (图 7B).

在 BG-11(Amp) 培养基中, 抗氨苄株 1 和 2 中都发现了一些螺旋状的藻株 (图 7E-H). 菌体细长, 螺旋很明显, 有异于正常长杆状的藻株, 但在菌体中也和正常藻体一样有羧体 (图 7H). 衰亡期的藻体中比例较高, 抗氨苄株 1 中的数目也比抗氨苄株 2 较高, 而野生型 PCC7942 以及在正常 BG-11 培养基中培养的抗氨苄藻则未观察到这种形状的藻类. 这种现象在查阅的资料中未见记载, 推测为抗氨苄藻在存在氨苄的极端环境下衰亡时所产生的形态变化的特殊现象.

在 3 种藻株中都有一种小球状藻体经常聚集在一起, 相对在野生型 PCC7942 中出现的较多 (图 7I、J). 小球中也有羧体, 这种小球状藻是一种特殊的形态还是藻类生长的初级阶段有待具体研究.

在电子显微镜下可以看到正在繁殖的藻体, 绝大部分藻体以分裂方式进行生殖, 尤其是取自对数生长期的藻体中, 繁殖的比例较高, 而延滞期和衰亡期则相对较少. 裂殖方式有几种, 大部分是在藻体某处缢缩成两段 (图 7K-M) 或多段 (图 7N), 每段都保留 1 或几个羧体. 也有少数是以二叉分裂的形式进行分裂 (图 7O). 在 BG-11(Amp) 培养基中, 抗氨苄株 1 和 2 中都发现一种额外的出芽生殖方式, 后代以芽体的形式从母体中长出. 在抗氨苄株 2 中出现的频率较高一些. 有的甚至同时产生数个芽 (图 7R、Q), 或从菌

体两头同时出芽(图 7R), 总的来说, 出芽生殖的比例并不高. 推测此生殖方式可能是抗氨苄藻为克服不利的生长环境而发展出的应对方法.

### 3 讨论

(1) 实验测得野生型 PCC7942 的基础抗性为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 与文献 [8] 报道 ( $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 有差异. 因为不同的藻对氨苄青霉素具有不同的本底耐受性, 如果不经过基础抗性测定, 而盲目依赖文献报道的筛选浓度, 会导致抗性平板上出现假阳性的单克隆.

(2) 一般测定藻类密度选用 730 或 750 nm 波长. 由于本试验过程未采用摇床, 藻类生长较慢,  $D$  值较小, 并且吸收光谱在 730 或 750 nm 的波长光密度较小, 误差较大, 所以不宜采用. 本试验主要是以  $D$  值的大小来反映生长情况, 所以用 440 nm 波长来测定不会有较大误差.

(3) 在 BG-11(Amp) 培养基中, 抗氨苄株 1 和 2 中都发现了一些螺旋状的藻株, 也和正常藻体一样有羧体. 在衰亡期的藻体中比例较高, 在抗氨苄株 1 中的数目也比抗氨苄株 2 较高, 而野生型 PCC7942 以及在 BG-11 培养基中培养的抗氨苄藻则没有. 推测为抗氨苄藻在存在氨苄极端环境中衰亡时所产生的形态变化的特殊现象.

3 种藻株中都存在小球状藻体, 其中也有羧体. 这种小球状藻是一种特殊的形态还是藻类生长的初级阶段有待具体研究. 螺旋状和小球状的藻类在其他文献中都未见相关报道.

在 BG-11(Amp) 培养基中, 抗氨苄株 1 和 2 中都发现了出芽生殖的现象, 抗氨苄株 2 中出现的频率较高一些. 此生殖方式推测为抗氨苄藻为克服较为不利的生长环境而发展出的应对方法.

#### 参考文献:

- [1] 楼士林, 章军, 吴巧娟. 蓝藻基因表达载体系统的构建和应用 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(2): 586-591.
- [2] KUMAR H D. Streptomycin and penicillin-induced inhibition of growth and pigment production in blue-green algae and production of strains *Anacystis nidulans* resistant to these antibiotics [J]. J Exp Bot 1964, 15: 232-250
- [3] PKALEK P. A ttempt to find genetic recombination in *Anacystis nidulans* [J]. Nature, 1967, 215: 666
- [4] RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY J et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria [J]. Gen Microbiol 1979, 11: 1-61
- [5] PRICE G D, BADGER M R. Isolation and characterization of high- $\text{CO}_2$  requiring mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 [J]. Plant Physiol 1989, 91: 514-525.
- [6] 汪琨, 马荣水, 徐惠娟, 等. 转入源胸腺肽 a1 基因聚球藻 7942 及其野生藻的培养 [J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 15-19
- [7] 吴天福, 刘永定, 宋立荣. 聚球藻 *Synechococcus* sp PCC7942 高  $\text{CO}_2$  需求突变株的筛选及其超微结构观察 [J]. 植物学报, 2000, 42(2): 116-121.
- [8] 王风平. 整合鲈鱼生长激素基因的蓝藻 7942 [J]. 台湾海峡, 2002, 22(3): 303-307.

(责任编辑: 陈幼玉)