

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.03.006

Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫的安全性研究

李亚荣, 张 帅, 雒珺瑜, 朱香镇, 王 丽, 崔金杰*

中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000

摘要:【目的】转基因作物对非靶标昆虫的影响是转基因作物环境安全评价的重要内容,研究 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫的影响,对转基因作物的环境安全评价具有重要意义。【方法】采用实验动物学、分子生物学等方法,研究 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫发育历期、成虫体重、雌雄比例及体内氨基酸种类和含量的影响。【结果】与蔗糖对照组相比,Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫不同龄期的发育历期、成虫体重和雌雄比例均无明显差异,对体内氨基酸种类和含量也没有显著差异。【结论】Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫的生长发育及代谢无显著影响。

关键词: 龟纹瓢虫; Cry2Ab 蛋白; 生长发育; 氨基酸; 生物安全

Study on the safety of Cry2Ab protein to the *Propylaea japonica*

LI Yarong, ZHANG Shuai, LUO Junyu, ZHU Xiangzhen, WANG Li, CUI Jinjie*

Institute of Cotton Research of CAAS/State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan 455000, China

Abstract:【Aim】The impact of genetically modified crops on non-target insects is an important part of environmental safety assessment of genetically modified crops. To study the effect of Cry2Ab protein on the *Propylaea japonica*, it is of great significance for the environmental safety evaluation of genetically modified crops.【Method】Adding the Cry2Ab protein to the sucrose solution, study the effects of Cry2Ab protein on the developmental duration, adult body mass, sex ratio and amino acid type and content of the *Propylaea japonica*.【Result】Compared with the control group fed with sucrose water, there was no significant difference in developmental duration, adult body mass, sex ratio, amino acid species and contents in *Propylaea japonica* by Cry2Ab protein feeding.【Conclusion】The Cry2Ab protein had no significant effect on the individual development and metabolism of the *Propylaea japonica*.

Key words: *Propylaea japonica*; Cry2Ab protein; growth and development; amino acid; biosafety

据报道,截至 2017 年,24 个国家转基因作物种植面积已达到 1.898 亿 hm^2 (国际农业生物技术应用服务组织,2018)。我国转基因棉花的成功培育和商业种植促进了转基因抗虫水稻、玉米等作物的发展。转基因作物的发展,在节约土地面积、解决我国部分地区的粮食短缺问题、减少农药污染方面创造了巨大的社会以及经济效益(高欣欣等,2018;郭三堆等,2015)。然而,与其他技术一样,转基因作物对环境的安全性也引起了人们的关注(范俊韬和李俊生,2007;郭建英等,2008;马祥建和郝德荣,2011;吴启佳等,2016)。转基因作物的大规模种植可能会对人类健康和生态环境造成影响。因此,任何转基因作物进行商业化种植之前都

必须经过严格的环境风险评价(路献勇等,2017)。转基因抗虫作物对农田重要非靶标生物的影响是生态环境风险评价的重要内容(杨艳等,2014),其中,对非靶标生物尤其是在生态系统中扮演着重要角色的天敌昆虫的影响更应该倍加重视(高欣欣等,2018)。

龟纹瓢虫 *Propylaea japonica* (Thunberg) 属鞘翅目瓢虫科龟纹瓢虫属,具有耐高温和捕食能力强等特点,是农田捕食性天敌的优势类群,可捕食棉蚜、飞虱、棉铃虫等多种害虫,被认为是转基因棉田的重要非靶标指示性天敌昆虫(郭传斌,2017;刘艳敏,2016;杨燕芳,2013)。

已有研究表明,Bt 蛋白对龟纹瓢虫解毒相关基

收稿日期(Received): 2018-11-09 接受日期(Accepted): 2019-04-29

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08011-002)

作者简介: 李亚荣,女,硕士研究生。研究方向:转基因安全评价。E-mail: 15638749495@163.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: cuijinjie@126.com

因表达量、解毒酶活性、消化酶活性和肠道微生物没有不利影响(雒珺瑜等, 2015; 王英丽, 2014; 赵耀, 2016), 而关于 Bt 蛋白对非靶标生物体内游离氨基酸的影响目前还未见报道。鉴于此, 本研究以龟纹瓢虫为实验材料, 研究 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫不同龄期的发育历期、新羽化成虫的体重、雌雄比例及体内氨基酸种类和数量的影响, 重点研究龟纹瓢虫取食不同浓度的 Bt 蛋白后体内游离氨基酸的种类和含量的变化, 以期对转基因棉花的环境安全评价积累科学数据, 为转基因生物的安全管理提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及饲养方法

龟纹瓢虫采自中国农业科学院棉花研究所东场实验基地, 饲养于养虫笼(50 cm×50 cm×50 cm), 室内连续饲养 5 代后备用。饲养条件: 光照 L/D=14 h/10 h, 温度(25±1) °C, 湿度 70%±10%; 豌豆蚜为实验室扩繁多年的种群, 以蚕豆为寄主, 在培养箱内扩繁, 扩繁条件: 光照 L/D=14 h/10 h, 温度(20±1) °C, 湿度 70%±10%。

1.2 供试化合物

0.005、0.05、0.5 mg·mL⁻¹ Cry2Ab 蛋白(中国农业科学院植物保护研究所植保生物技术研究室); 0.5 mg·mL⁻¹ E-64 蛋白酶抑制剂(美国 Sigma 公司); 2 mol·L⁻¹ 蔗糖(索莱宝科技有限公司)。E-64 蛋白酶抑制剂和 Cry2Ab 蛋白均以 2 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液为溶质进行配制。

1.3 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫生物学的影响

收集龟纹瓢虫卵块置于培养皿中, 在培养箱光照 L/D=14 h/10 h、温度(25±1) °C、湿度 70%±10% 条件下孵化, 然后将幼虫挑至 1.5 mL 离心管单管饲养。用足量豌豆蚜饲喂龟纹瓢虫, 龟纹瓢虫幼虫共有 4 个龄期, 在每个龄期蜕皮后, 用 2.5 μL 移液枪吸取 0.5 mg·mL⁻¹ 的 Cry2Ab 蛋白 1.0 μL 至 1.5 mL 离心管壁上, 饲喂处理 24 h, 以 2 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液作为阴性对照; 以 0.5 mg·mL⁻¹ E-64 溶液作为阳性对照。分别记录不同处理条件下龟纹瓢虫不同龄期的发育历期、羽化后 12 h 内成虫的体重及性别比例。每个处理设置 30 头幼虫, 3 个平行重复。

1.4 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫体内氨基酸种类和含量的影响

收集龟纹瓢虫卵块置于培养皿中, 在培养箱光

照 L/D=14 h/10 h、温度(25±1) °C、湿度 70%±10% 条件下孵化, 然后将幼虫挑至 1.5 mL 离心管单管饲养, 用足量豌豆蚜饲喂龟纹瓢虫初孵幼虫至 3 龄。用 2.5 μL 移液枪分别吸取 0.005 和 0.05 mg·mL⁻¹ 的 Cry2Ab 蛋白 1.5 μL 至 1.5 mL 离心管壁上, 饲喂处理 72 h(每个处理设置 30 头幼虫, 5 个重复), 以 2 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液作为空白对照。收取上述样品, 测定龟纹瓢虫 3 龄幼虫体内氨基酸的种类和含量。

游离氨基酸测定: 分别称取 0.005、0.05 mg·mL⁻¹ Cry2Ab 蛋白处理和 2 mol·mL⁻¹ 蔗糖溶液处理的样品 0.1 g, 在液氮低温环境中充分研磨; 研磨充分后加入 2 mL 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸, 静置 30 min 后摇匀浸提样品, 然后在 12000 r·min⁻¹、4 °C 条件下离心 10 min; 准确吸取 1.5 mL 上清液于离心管中, 加入 1.5 mL 8% 的磺基水杨酸, 充分混匀, 静置 15 min; 取上清液, 通过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后上机检测氨基酸种类和含量。氨基酸分析采用 S-433D 型全自动氨基酸分析仪(德国赛卡姆公司)。

1.5 数据分析方法

用 SPSS 18.0 软件对数据进行方差处理和分析, 采用单因素方差分析和 Duncan's 差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫生物学的影响

2.1.1 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫发育历期的影响

由表 1 可知, E-64 蛋白酶抑制剂处理后, 龟纹瓢虫 2、3、4 龄, 预蛹以及蛹的羽化历期与 Cry2Ab 蛋白处理和蔗糖对照处理相比均明显延长, 说明本实验处理方法有效。与蔗糖对照组相比, 取食 Cry2Ab 蛋白后龟纹瓢虫幼虫的 2、3、4 龄的发育历期及预蛹和蛹期均没有显著性差异。可见, Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫幼虫的发育历期和化蛹及蛹的历期均没有显著影响。

2.1.2 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫成虫体重的影响

Cry2Ab 蛋白处理组的雌虫平均体重为 7.37 mg, 雄虫平均体重为 5.99 mg, 蔗糖组雌虫平均体重为 7.56 mg, 雄虫平均体重为 6.19 mg, 不同处理对雌雄成虫体重影响不大, 且雄虫体重均低于雌虫。说明 Cry2Ab 蛋白处理对龟纹瓢虫雌雄体重没有影响。

2.1.3 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫雌雄比例的影响

Cry2Ab 蛋白处理组和蔗糖对照组的雌、雄虫比例

相近。Cry2Ab 蛋白处理组中龟纹瓢虫的雌虫比例为 20%,雄虫比例为 80%;蔗糖对照组中雌虫比例为 23%,雄虫比例为 77%,雌、雄虫比例之间差异未达显著水平。说明 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫成虫的雌雄性比无明显影响。

表 1 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫发育历期的影响
Table 1 Effect of Cry2Ab protein on the developmental duration of *P. japonica*

处理 Treatment	发育时间 Development time of the developmental stage/h				
	2 龄 2nd instar	3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	预蛹 Prepupa	蛹 Pupa
0.5 mg · mL ⁻¹ Cry2Ab	55.50±0.88a	59.45±2.35a	56.08±2.85a	96.30±3.10a	65.57±0.44a
2.0 mol · mL ⁻¹ 蔗糖	56.82±1.79a	58.18±2.55a	54.22±2.33a	96.73±2.57a	66.32±0.47a
2.0 mol · mL ⁻¹ Sucrose					
0.5 mg · mL ⁻¹ E-64	79.40±1.32b	84.69±1.98b	98.62±2.56b	129.90±2.35b	70.90±0.58b

同列数据后的不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level.

2.2 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫体内氨基酸种类和含量的影响

取食不同浓度 Cry2Ab 蛋白的龟纹瓢虫幼虫体内主要氨基酸种类与蔗糖对照组相同,均为缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸;不同处理条件下,龟纹瓢虫幼虫体

内 8 种主要游离氨基酸含量最高的是赖氨酸,组氨酸次之,蛋氨酸含量最低,且 Cry2Ab 蛋白处理组与蔗糖对照组相比无显著差异。可见,Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫幼虫体内主要氨基酸种类及含量无显著影响,即对幼虫体内代谢没有显著影响(表 2)。

表 2 Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫体内氨基酸种类和含量的影响
Table 2 Effect of Cry2Ab protein on amino acid composition and content in *P. japonica*

处理 Treatment	氨基酸含量 Amino acid content/(μg · mg ⁻¹)							
	缬氨酸 Valine	蛋氨酸 Methionine	异亮氨酸 Isoleucine	亮氨酸 Leucine	酪氨酸 Tyrosine	组氨酸 Histidine	赖氨酸 Lysine	精氨酸 Arginine
0.005 mg · mL ⁻¹ Cry2Ab	2.52±0.48	0.39±0.14	1.71±0.57	2.55±0.74	2.48±0.72	3.86±0.42	6.53±0.64	1.44±0.27
0.05 mg · mL ⁻¹ Cry2Ab	2.25±0.26	0.19±0.19	1.84±0.60	2.84±0.57	1.82±0.44	3.11±0.57	5.89±1.22	1.60±0.31
2.0 mol · mL ⁻¹ 蔗糖	2.15±0.35	0.46±0.13	1.90±0.18	2.88±0.56	2.28±0.93	3.66±0.10	5.32±1.37	1.44±0.63
2.0 mol · mL ⁻¹ Sucrose								

3 结论与讨论

转基因作物的推广和转基因技术的成熟加速了转基因作物在全球的商业化种植,随之而来的潜在的环境安全问题也引起了人们的关注。转基因作物对非靶标昆虫的影响是潜在环境安全问题关注的焦点之一(周霞等,2018)。转基因作物表达的目的蛋白可以通过食物链从植物传递给天敌,从而使天敌暴露于转基因作物所表达的蛋白环境中(高欣欣等,2018)。对非靶标昆虫的影响是转基因作物环境安全评价的重要内容(Ramirez-Romero *et al.*, 2008)。

已经有研究从不同方面评估了 Bt 蛋白对非靶标性昆虫没有显著影响。有研究表明转基因棉田里的节肢动物群落昆虫结构和组成,生物多样性等与非转基因棉田无显著性差异(雒珺瑜等,2016);Chen *et al.* (2015)研究表明,Bt 水稻上褐飞虱卵对绿盲蝽

Apolygus luorum (Meyer-Dür.) 的生存能力(成虫羽化率和卵孵化率)、发育期(卵期,若虫发育期)、成虫鲜重、成虫寿命和繁殖力没有显著影响。Yang *et al.* (2017)研究显示 Bt 蛋白对非靶标昆虫蜘蛛的种群密度、捕食能力、相对丰度没有负面影响。

转基因作物对捕食性天敌影响的研究具有非常重要的经济学和生物学意义,在害虫综合防治中也具有重要地位(李丽莉,2004)。大量试验研究了 Bt 蛋白对非靶标捕食性天敌的影响。研究表明,中华通草蛉 *Chrysoperla sinica* (Tjeder) 取食含 Cry1Ab 蛋白的饲料后幼虫的发育历期、结茧率、茧期、羽化率、成虫体重等生物学参数与取食不含 Cry1Ab 蛋白的饲料处理相比均没有显著差异(高欣欣, 2017)。Ali *et al.* (2017a) 通过分析 Cry1Ac、Cry2Ab、Cry1Ca、Cry1F 蛋白对异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas) 化蛹率、羽化率、7 d 幼虫重量、性

比和体重的影响来评估转基因作物对环境的风险。研究发现,含 Cry1Fa 的转基因作物对草蛉没有不利影响 (Ali *et al.*, 2017b)。以食物链为切入点的研究发现蚜虫不受 Cry 蛋白的影响,从而消除了猎物质量对天敌寄生蜂等的影响 (Tian *et al.*, 2015)。有研究发现带有 Bt 蛋白的烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 被龟纹瓢虫取食后,其生长发育和捕食量没有明显变化 (顾爱祥, 2012)。龟纹瓢虫取食含 Bt 的水稻花粉后,其幼虫、蛹的生长发育和成虫生殖参数与取食非转基因水稻花粉的相比无显著差异 (白耀宇, 2004)。张小洁 (2014) 研究表明,转 Cry2A 和 Cry1C 基因的水稻对龟纹瓢虫的生长发育不会产生负面影响。目前,大多数的研究表明,转基因抗虫作物对非靶标昆虫,特别是对有益昆虫如捕食性天敌没有明显的不利影响 (李丽莉等, 2004)。这些结论和本研究结果一致,龟纹瓢虫取食 Cry2Ab 蛋白后其发育历期、成虫体重、雌、雄虫比例与对照组相比均没有显著变化。

蛋白质是细胞的主要组成成分和构成机体组织、器官的重要组成部分。构成蛋白质的基本单位是氨基酸,组织中的游离氨基酸可以直接参与机体蛋白质合成和氨基酸代谢。本研究以体内游离氨基酸为切入点,发现取食不同浓度的 Cry2Ab 蛋白后龟纹瓢虫幼虫体内主要氨基酸种类与蔗糖对照组相同,均为缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸;与对照组相比,龟纹瓢虫幼虫体内 8 种主要游离氨基酸的含量也没有明显差异。可见, Cry2Ab 蛋白对龟纹瓢虫体内主要氨基酸种类及含量无显著影响。

随着转基因技术的深入和不断发展,转基因作物的研发力度和商业化种植的规模将逐渐扩大。一种新型转基因作物在商业化种植之前必须进行安全评价工作,特别是对非靶标天敌的影响。本研究以非靶标天敌昆虫龟纹瓢虫为研究对象,从发育历期、成虫体重、雌、雄虫比例、游离氨基酸种类和含量的变化说明了 Cry2Ab 蛋白对其生物学特性和氨基酸代谢没有显著影响。本研究结果可为转基因作物的商业种植和推广提供参考依据。

参考文献

白耀宇, 2004. 转 Bt 基因水稻 Cry1Ab 杀虫蛋白的环境动态及其对非靶标昆虫的影响. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学.

- 范俊韬, 李俊生, 2007. 转基因作物的生态效应. 环境保护, 35(13): 58-61.
- 高欣欣, 全玉东, 王振营, 白树雄, 张天涛, 何康来, 2018. 转基因玉米表达的 Cry1Ab、PAT 和 EPSPS 蛋白对日本通草蛉幼虫的安全风险评估. 植物保护学报, 45(4): 663-669.
- 高欣欣, 2017. 转基因玉米表达的 4 种蛋白对中华通草蛉幼虫的安全风险评估. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 顾爱祥, 2012. 转基因棉花对烟粉虱及龟纹瓢虫生理生态的影响研究. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.
- 郭传斌, 2017. 棉田天敌蚜虫及室内龟纹瓢虫各虫态历期调查. 安徽农业科学, 45(14): 139-140.
- 国际农业生物技术应用服务组织, 2018. 2017 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. 中国生物工程杂志, 38(6): 1-8.
- 郭建英, 万方浩, 韩召军, 2008. 转基因植物的生态安全性风险. 中国生态农业学报, 16(2): 515-522.
- 郭三堆, 王远, 孙国清, 金石桥, 周焘, 孟志刚, 张锐, 2015. 中国转基因棉花研发应用二十年. 中国农业科学, 48(17): 3372-3387.
- 李丽莉, 王振营, 何康来, 彭于发, 花蕾, 2004. 转基因抗虫作物对非靶标昆虫的影响. 生态学报, 24(8): 1797-1806.
- 刘艳敏, 2016. 转 cry1Ab/2Ab 和 cry1Ac 基因玉米对龟纹瓢虫和日本通草蛉的生态安全性. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 雒珺瑜, 张帅, 吕丽敏, 王春义, 朱香镇, 崔金杰, 2015. 转 Cry1Ac+Cry2Ab 棉对棉铃虫的控制作用及对天敌捕食烟粉虱功能反应的影响. 遗传, 37(6): 575-581.
- 雒珺瑜, 张帅, 吕丽敏, 王春义, 朱香镇, 李春花, 崔金杰, 2016. 2009—2013 年 Bt 棉田节肢动物群落多样性动态变化. 生态学报, 36(13): 4195-4203.
- 路献勇, 李淑英, 朱加保, 雒珺瑜, 马艳, 崔金杰, 程福如, 2017. 转 RRM2 基因棉和其亲本苗蚜种群数量及其优势天敌的动态规律. 生物安全学报, 26(2): 152-158.
- 马祥建, 郝德荣, 2011. 转基因植物的安全性问题及其解决途径. 江苏农业科学, 39(6): 501-504.
- 王英丽, 2014. Cry1Ac 和 Cry2Ab 对大草蛉、七星瓢虫和绿盲蝽的影响. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.
- 吴林珂, 张帅, 雒珺瑜, 张利娟, 吕丽敏, 朱香镇, 王丽, 崔金杰, 2018. 龟纹瓢虫幼虫体内主要共生菌种类分析. 中国生物防治学报, 34(2): 317-323.
- 吴启佳, 崔旭红, 张国安, 梁宏合, 焦晓国, 2016. Bt 水稻对青翅蚁形隐翅虫和非靶标害虫种群动态的影响. 湖北大学学报(自然科学版), 38(5): 445-448, 460.
- 杨艳, 李云河, 曹凤勤, 程立生, 彭于发, 2014. 转 Bt 基因抗虫作物对鳞翅目非靶标昆虫生态影响的研究进展. 生物安全学报, 23(4): 224-237, 214.

- 杨燕芳, 2013. 抗性和敏感龟纹瓢虫种群生命表及抗性相关酶系研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 周霞, 谢翔, 左娇, 谭燕华, 曹扬, 霍姗姗, 易小平, 赵辉, 张丽丽, 郭安平, 2018. 转基因作物对天敌的影响研究进展. 环境昆虫学报, 40(5): 1021-1026.
- 张小洁, 2014. 转 *Bt* 基因水稻对龟纹瓢虫的潜在影响. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学.
- 赵耀, 2016. 转基因棉对棉蚜及其天敌龟纹瓢虫的影响. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学.
- ALI I, ZHANG S, CUI J J, 2017a. Bio-safety evaluation of Cry1Ac, Cry2Ab, Cry1Ca, Cry1F and Vip3Aa on *Harmonia axyridis* larvae. *Journal of Applied Entomology*, 141(1/2): 53-60.
- ALI I, ZHANG S, IQBAL M, EJAZ S, CUI J J, 2017b. Trypsinized Cry1Fa and Vip3Aa have no detrimental effects on the adult green lacewing *Chrysopa pallens*, (Neuroptera: Chrysopidae). *Applied Entomology & Zoology*, 52(2): 1-7.
- CHEN Y, LAI F X, SUN Y Q, HONG L Y, TIAN J C, ZHANG Z T, FU Q, 2015. Cry1Ab rice does not impact biological characters and functional response of *Cyrtorhinus lividipennis* preying on *Nilaparvata lugens* eggs. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(10): 2011-2018.
- RAMIREZ-ROMERO R, DESNEUX N, CHAUFAX J, KAI-SER L, 2008. Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91: 110-115.
- TIAN J C, YAO J, LONG L P, ROMEIS J, SHELTON A M, 2015. Bt crops benefit natural enemies to control non-target pests. *Scientific Reports*, 5: 16636.
- YANG H L, PENG Y D, TIAN J X, WANG J, HU J L, SONG Q S, WANG Z, 2017. Review: biosafety assessment of Bt, rice and other Bt, crops using spiders as example for non-target arthropods in China. *Plant Cell Reports*, 36(4): 1-13.

(责任编辑: 郑姗姗 郭莹)

<http://www.jbscn.org>