

海湾扇贝与紫扇贝生殖隔离研究

张守都^{1,2}, 张国范¹, 李莉¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)和秘鲁紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)进行了跨种间的杂交尝试, 结果显示两个物种之间正向和反向均可受精和正常发育, 没有发现合子前隔离, 并且通过 internal transcribed spacer 1(ITS1)标记验证了杂交的成功。至杂交子一代性成熟时通过对杂合子成熟性腺进行 H.E. 染色石蜡切片观察发现, 雄性性腺明显退化且不能产生有活力的精子, 雌性性腺发达且能形成外观正常卵子, 但是却不能与亲本进行回交, 即表现为典型的合子后隔离: 杂种不育。

关键词: 海湾扇贝(*Argopecten irradians*); 秘鲁紫扇贝(*Argopecten purpuratus*); 种间杂交; ITS1; 合子后隔离

中图分类号: S917.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)08-0009-06

物种的形成一般认为是一个新的物种从一个单一的种系逐渐分化出来的结果, 而相对的另外一种方式则是由杂交引起的新物种的形成, 即由两个截然不同的物种系通过杂交的方式同时对新的物种产生遗传物质上的贡献^[1]。这种杂交即是指远缘杂交, 根据杂交物种之间的进化距离又分为种间杂交、属间杂交、科间杂交以及更高分类阶元之间的杂交。现代物种的定义中很重要的一个属性就是生殖隔离, 生殖隔离是各个物种在自然界中能够独立而且稳定存在的关键因素。所以远缘杂交首先要克服这种不同物种间的生殖隔离机制, 而事实证明无论在自然界中的天然杂交种还是人工干预的远缘杂交均具有这种潜力。在自然界中大约有 10% 的动物和 25% 的植物至少和一个其他的物种发生过杂交, 远缘杂交是基因组进化和物种形成的主要动力之一^[2]。很多生物学家近年也在通过人工控制研究在地理分布上有重叠区的近缘物种之间的远缘杂交来模拟在新的物种形成的过程^[1], 进一步揭示了远缘杂交在物种形成中的普遍性和现实中的可操作性。

远缘杂交目前已经成为作物品种改良和新品种开发的重要手段, 在水稻、小麦、玉米、花椒、番茄、大豆、棉花等很多作物品种的育种中通过远缘杂交获取雄性不育系进而对杂种优势的利用获得了巨大的成效。目前在动物育种中的相关研究还比较少, 主要原因之一是受生物物种生殖隔离机制的影响远缘杂交难以获得成功, 包括难以获得杂交种和杂种后代难以延续, 一个典型案例就是马和驴杂交

获得骡子, 但是骡子却不能生育; 二是获得杂种的后代分离难以控制, 世代长, 稳定慢。海湾扇贝(*Argopecten irradians*)自 1982 年被引入中国以后在中国北方大规模推广养殖, 形成了一个成功的新品种产业。但由于多年的小规模群体内繁育导致国内海湾扇贝养殖群体近交衰退严重^[3], 现有品种资源已无法满足日新月异的育种目标要求, 海湾扇贝育种工作要取得突破, 必须借助于更加广泛的遗传资源的利用, 远缘杂交可以打破品种间的界限, 扩大基因重组的范围, 获得更加丰富的变异类型。秘鲁紫扇贝(*Argopecten purpuratus*)与海湾扇贝同属, 染色体均为 32 条^[4], 具备进行远缘杂交成功和产生新物种的可能性。真核生物的 rDNA 中的 ITS1 区域相比其他区域进化要快的多, 与其相邻的 18S rRNA 则表现出高度的保守性, 能方便的设计通用引物, 从而能实现以相同的引物在不同物种间进行扩增达到物种鉴定的目的^[5]。本研究通过 ITS1 扩增片段分析验证了这两种扇贝之间的杂交并对在远缘杂交中产生的生殖隔离问题进行初步的探讨。

收稿日期: 2011-11-21; 修回日期: 2012-03-06

基金项目: 国家“863”项目(2006AA10A408, 2010AA10A401); 国家公益性行业(农业)科研专项(3-35)

作者简介: 张守都(1984-), 男, 山东日照人, 博士研究生, 主要从事水产研究, 电话: 053282898712, E-mail: shouduzhang@163.com; 李莉, 通信作者, E-mail: lili@qdio.ac.cn

1 材料与方 法

1.1 亲贝的获取和培养

实验所用的海湾扇贝(以下简称 C)和智利紫扇贝(以下简称 P)由大连壹桥苗业集团有限公司提供,海湾扇贝于 2009 年 4 月选自大连壹桥苗业集团有限公司育苗车间的生产所用亲贝,智利紫扇贝为 2009 年从秘鲁引进。所有实验用亲贝均同时在大连壹桥苗业集团有限公司育苗车间培育,进行性腺促熟,整个促熟过程遵循无公害食品海湾扇贝养殖技术规范 NY/T 5063-2001。

1.2 产卵和受精

从每个群体中随机挑选 10 只性腺发育至第四期^[6]的个体在空气中阴干 30 min, 然后对每只扇贝注射五羟色胺^[7], 将每一个准备好的扇贝逐一放入一个单独容器中待产, 所处理扇贝会首先排放精子, 收集质量好的精子备用, 接下来中间会出现一个暂停期, 将扇贝用新鲜海水冲洗几遍后放回烧杯中, 待其进一步排放卵子。为了进一步防止自体受精, 每次收集卵子均进行洗卵, 然后收集在显微镜下检查过的未被污染的卵子备用。

精子和卵收集完成后, 开始授精。首先将一个群体(紫扇贝或海湾扇贝)各扇贝的部分精子混合, 然后同另一个群体 10 个扇贝的部分卵进行授精, 形成两个群体的正反交组合(紫扇贝(♀)×海湾扇贝(♂), 海湾扇贝(♂)×紫扇贝(♀))。然后, 进行群体内交配(紫扇贝×紫扇贝, 海湾扇贝×海湾扇贝), 将每个群体的 10 个扇贝分为两组, 每组 5 个, 将其中 5 个扇贝的精子与另外 5 个扇贝的卵授精, 反之亦然。因此, 得到 4 个交配组合(紫扇贝×紫扇贝, 紫扇贝(♀)×海湾扇贝(♂), 海湾扇贝(♂)×紫扇贝(♀)和海湾扇贝×海湾扇贝)。实验设 3 个重复组。

1.3 杂交子一代的分子确定

1.3.1 DNA 的提取

用天根生化科技有限公司的 Fast200 DNA 提取试剂盒参照厂家说明书提取实验用亲本和杂交子一代的 DNA。

1.3.2 ITS1 序列的克隆和测序

ITS1 序列的引物参照喻子牛^[8]: 5'GGTTTCTGTAGGTGACCTGC3'(18S 正向) 和 5'CTGCGTTCATCGACCC3'(5.8S 反向)。PCR 反应体系为: 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2

μmol/L 每对引物, 20 ng DNA 模版, 1 U Taq polymerase, 2.5 μL 10× PCR buffer, 以及 0.4 mg/mL BSA。PCR 反应程序为: 95°C 5 min, 30 个循环中 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 最后 72°C 大延伸 5 min。所有 PCR 反应均在 TAKARA 的 TP600 PCR 仪上进行。亲本扩增片段直接送交北京华大公司进行测序并进行序列比对查找物种特异位点。杂交子一代扩增序列经在浓度为 1.5%的琼脂糖凝胶上分型, 并用 Axygen 公司 AxyPrep™ DNA 回收试剂盒进行目标片段的回收, 用天根生化科技有限公司的 pEASY-T1 克隆试剂盒和 Trans1-T1 感受态细胞将回收的目标片段进行克隆, 通过菌落 PCR 检测克隆的成功性, 将阳性克隆送交北京华大公司测序, 每个个体随机测 6 个单倍型克隆。

1.4 杂交子一代回交研究

由于正反杂交子一代均只能产生卵子, 所以回交是以亲本的精子和子代的卵子进行的, 为避免杂交子一代中可能会有隐性精子的污染, 亦对卵子进行严格的洗卵, 方法同上。

1.5 杂交子一代性腺的组织学切片观察

对海湾扇贝和紫扇贝×海湾扇贝杂交子一代的成熟性腺取样进行 H.E.染色石蜡包埋切片, 方法参考任成林等^[9], 并对杂交子一代性腺发育的异常同正常海湾扇贝成熟性腺进行对比分析。

1.6 数据分析

各实验组的数据比较用 One—Way ANOVA 方差分析, 采用统计分析软件 SPSS 17.0, 差异显著性设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 两种扇贝杂交时的受精观察

本实验结果显示, 海湾扇贝同秘鲁紫扇贝的双列杂交正反交过程中均可受精并能正常孵化, 正反杂交组合的受精率和孵化率同纯种对照组并无显著差异($P > 0.05$, 表 1)。

2.2 杂交子一代的分子鉴定

经过对两种扇贝亲本的 ITS1 序列的比对分析, 发现了 8 个物种特异的标记位点。以此为标记确定了在随机测的紫扇贝(♀)×海湾扇贝(♂)杂交组和海湾扇贝(♂)×紫扇贝(♀)杂交组的杂合子个体中的单倍型

克隆中均含有来自两个物种的序列, 进而确定了杂交的可信性(图 1: 来源于紫扇贝(♀)×海湾扇贝(♂)杂

交组的杂合子同父母本的 ITS1 序列比对分析, 海湾扇贝(♂)×紫扇贝(♀)组结果相同(此处未列出)。

表 1 4 个实验组的受精率和孵化率的比较

Tab. 1 Comparison of fertilization rate and hatching rate between four experimental groups (mean ± SD)

组别	受精率(1 h)	孵化率(24 h)
紫扇贝×紫扇贝	83.92 ± 6.78 ^a	77.24 ± 9.34 ^a
紫扇贝(♀)×海湾扇贝(♂)	80.06 ± 3.95 ^a	78.77 ± 5.53 ^a
海湾扇贝(♂)×紫扇贝(♀)	83.38 ± 1.59 ^a	80.63 ± 3.22 ^a
海湾扇贝×海湾扇贝	82.56 ± 8.06 ^a	79.15 ± 6.47 ^a

注: 同一列内相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)

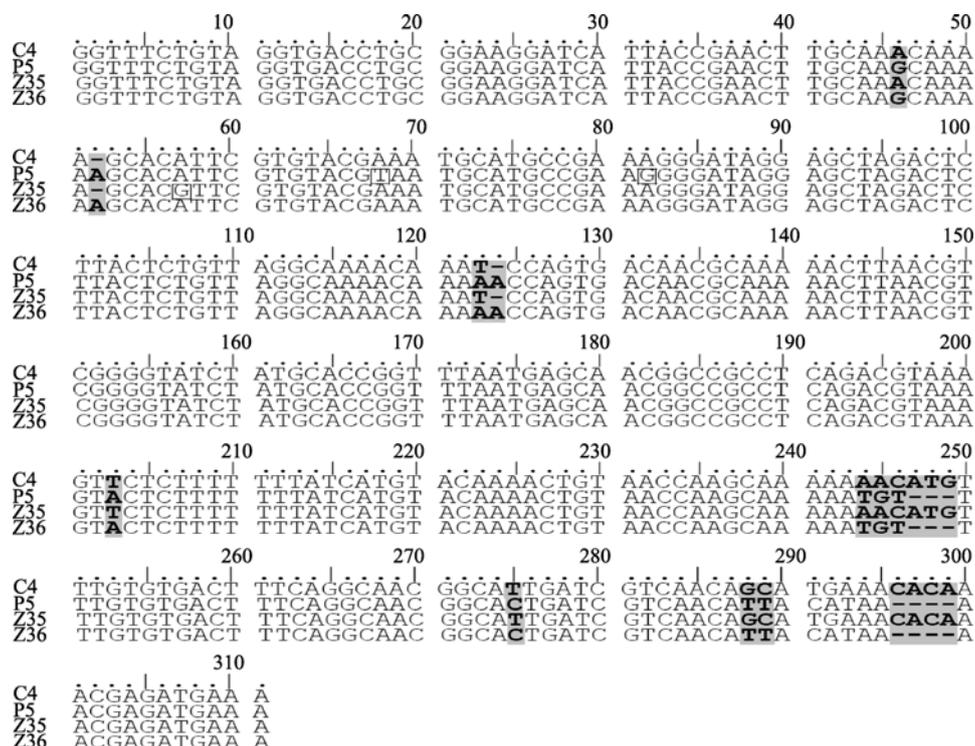


图 1 亲本(c4:海湾扇贝, p5:秘鲁紫扇贝)和一个随机抽取 PC 组杂合子的 ITS1 序列(z35,z36)的比对结果

Fig. 1 Comparison of four ITS1 sequences: c4 from *Argopecten irradians* parent; p5 from *Argopecten purpuratus* parent; and z35 and z36 from one random PC hybrid individual

粗体字母表示的是四条序列间的不同碱基位点, 用阴影字母标注的是基于对海湾扇贝和秘鲁紫扇贝 15 个亲本的 ITS1 测序和在 NCBI 中检索到的 3 条海湾扇贝的 ITS1 序列的比对分析发现的种间特异位点区域

Different sites within the four sequences are shown in bold letters. Inter-specific differences are indicated by shaded letters and are based on the analysis of the 15 ITS1 sequences of *A. i. irradians* and *A. purpuratus* we sequenced and 3 ITS1 sequences of *A. i. irradians* from NCBI

2.3 杂合子与亲本的回交

海湾扇贝同秘鲁扇贝的杂合子与亲本的回交已经有报道^[10], 本研究中正反杂交杂合子可成功生长至性成熟(图 2-1), 人工促熟方法同前。杂合子性腺成熟过程中前期同海湾扇贝并无太大差异, 既表现为性腺外表生长一层黑膜, 随着性腺的成熟黑膜逐渐褪去, 此时性腺表现同性腺成熟海湾扇贝相似, 为精区和卵区区分明显的雌雄同体, 但不能进行人

工采卵, 可能性腺未能达到真正成熟。当继续进行促熟时, 性腺开始逐渐发生单雌性化转变, 转变比例最大可达 90.9%, 并且能成功采出成熟的卵子, 未见有成熟精子排出。作者通过解剖的方式观察部分残留的雄性性腺部分, 发现雄性性腺发育异常, 未见有成型精子或者精原细胞生成, 即杂合子表现为雄性败育, 只有成熟的卵子可以排出, 所以作者实施的回交是以正反交两个组别杂合子的卵子和海湾扇

贝的精子进行的,受精观察发现,每组回交受精率低于 20%,受精的卵子发育缓慢,在 24 h 之后发育到囊胚期,且停滞在这个阶段直至死亡,即正反交组合的杂合子均表现为同亲本的完全生殖隔离。

2.4 杂合子性成熟性腺的组织切片观察

通过 H.E.染色石蜡包埋切片对紫扇贝×海湾扇贝组别杂合子的表现为全雌化的性腺进行切片观察(图 2-5、图 2-6)并同正常海湾扇贝的性腺切片(图 2-3、图 2-4)进行对比,结果发现紫扇贝×海湾扇贝组别杂合子扇贝性腺同海湾扇贝性腺相比雌性性腺发达而雄性性腺几乎退化消失,同其外表型结果相一致(图 2-1),即雄性败育,但由于回交的障碍尚不能确定杂合子产生的卵子是否正常。

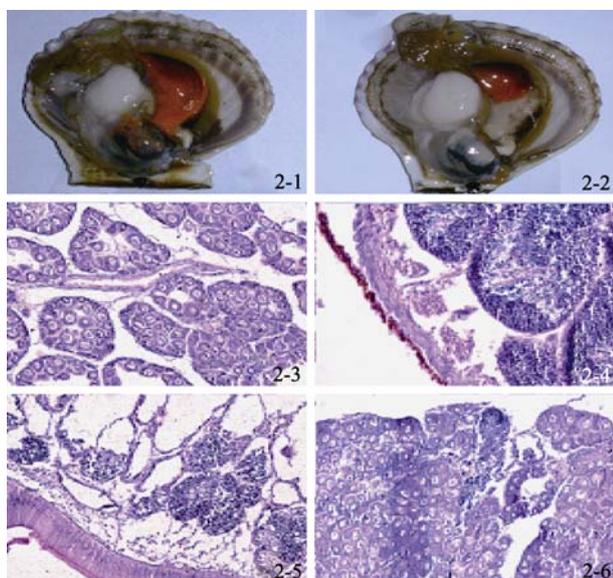


图 2 杂合子成熟性腺及其组织切片

Fig. 2 Mature gonad and tissue slice of the Hybrid
2-1. 杂交扇贝 F1 的全雌性性腺外观; 2-2. 海湾扇贝雌雄同体性腺外观; 2-3. 海湾扇贝雌性腺的 H.E. 石蜡切片; 2-4. 海湾扇贝雄性腺的 H.E. 石蜡切片; 2-5. 杂交扇贝 F1 的尚未退化雄性性腺的 H.E. 石蜡切片; 2-6. 杂交扇贝 F1 全雌化性腺的 H.E. 石蜡切片
2-1. The appearance of female gonad of the Hybrid; 2-2. The appearance of hermaphroditic gonad of bay scallop; 2-3. The H. E. staining paraffin slice of the female gonads of the bay scallop; 2-4. The H. E. staining paraffin slice of the male gonads of the bay scallop; 2-5. The H. E. staining paraffin slice of the male gonad of the hybrid F1; 2-6. The H. E. staining paraffin slice of the degraded male gonad and the female gonad of the hybrid F1

3 讨论

生殖隔离是近代关于物种定义的核心^[11],但它在物种形成和保持物种稳定方面的作用其实要比它对

物种的定义影响大得多^[2]。生殖隔离分为合子前隔离和合子后隔离,合子前隔离又分为行为性隔离,形态及机械隔离,配子不亲和等;合子后隔离包括杂种不活或弱勢,杂种不育,杂种衰败等。自然界中存在的天然杂种,特别是研究两个同域分布物种之间存在的杂交带,逐渐成为近年来植物系统与进化领域的热点领域,因为这为探讨生殖隔离在物种起源方式及物种进化模式提供了很好的素材。在天然杂种中的生殖隔离也是多种多样的,Zachariah 等^[11]发现 *Lycaeides melissa* 和 *Lycaeides idas* 这两种蝴蝶在自然界中的杂交种同亲本的隔离方式主要是与宿主植物相关行为和生态适应性相关的,所以决定个体行为的尤其是交配行为的个体形态上的差别以及杂交种对一些极端的或者全新的生态环境的习惯会导致杂交种同其亲本甚至是杂交种之间的生殖隔离。Jesu's 等^[1]研究也发现基于外表形态的强烈的选择性交配以及地理环境的分化是造成 *H. melpomene* 和 *H. cydno* 同其杂交种 *H. heurippa* 生殖隔离的主要原因。而跨种杂种合子后隔离在人们的生活中则是更加普遍,像驴和马的杂交产生骡子,老虎和狮子杂交产生虎狮兽等,无论是合子前隔离还是合子后隔离都倾向于杂种后代适合度的下降,这与自然选择倾向于淘汰杂种来确保物种的独立性是相一致的。但是当杂合子偶然碰上适合它的生态位的时候,生殖隔离机制可能会消失或者部分消失而导致一个新物种的可能形成,所以从某种意义上说生殖隔离是物种在进化中的一个重要动力。

生殖隔离的克服是远缘杂交在人工育种中应用的关键,而合子后隔离是作者在人工育种中遇到的主要的隔离方式,远缘杂交后代一般表现为高度不育,因为在杂种的体细胞中没有同源染色体,减数分裂过程中染色体联会和分离就会发生紊乱,从而得不到功能正常的生殖细胞。但如果杂种染色体数目自然加倍成异源多倍体,其细胞内染色体就能正常配对,最终发育成可育的配子。这种异源多倍体一旦出现会立即导致基因流的阻断并形成繁殖隔离^[12],成为一个新的物种。基于以上的理论基础,远缘杂交已经在农作物的育种中取得了巨大的成果,无论是对作物品种遗传资源的改良还是通过远缘杂交培育雄性不育系来对杂种优势的利用都给农作物的育种打开了一个全新的视野^[13]。到目前动物育种中对远缘杂交的利用跟植物相比还处于初级阶段,目前国内见报道较多的是鱼类的育种,但是鱼类育种有一

个很大的优势是很多的杂种一代是可育的,对育种的遗传资源可以很快得到拓展,对育种的效果立竿见影^[14]。在贝类育种中相关报道还比较少见,Zhang等^[15]进行了海湾扇贝北方亚种和南方亚种墨西哥湾贝的亚种间杂交,未见有种间隔离的现象,但这并不算是真正的种间杂交。本研究首先通过 ITS 分子标记确认了杂交后代为真实的杂合子,即这两种扇贝在杂交时并不存在生殖隔离,双向受精均可实现,并能正常孵化和生长至成体,并没有出现合子前生殖隔离。但杂合子一代却表现为典型的合子后生殖隔离:杂合子不育。导致这种远缘杂交不相容的原因大致可分为三点:第一,亲本双方染色体的数目或核型差别过大。染色体数目不同导致基因组数目和性质的差异,从而引起杂合个体中来源于父母双方的等位基因不协调,引起代谢紊乱,导致杂合个体不发育甚至死亡。第二,酶的基因座位或表达的时空顺序的差异。杂交亲本的亲缘关系越远,双亲的等位基因表达的时空顺序可能不同步或出现相互抑制。酶的不相容性就会导致杂种胚胎组织的诱导和器官形成时空失调,于是产生畸形或中途死亡。第三,核质不相容。研究表明,母体卵细胞质控制杂种胚胎基因表达的迟滞或加速。如果卵子的细胞质不能与精子的核 DNA 正常协调(不相容),就会阻滞或加速基因的表达,从而致使胚胎不能正常发育,直至死亡^[14]。根据本研究的实验结果,杂合子可正常发育(至少是外观发育正常)至性成熟,而实验中所用父母本染色体数目均为 32 条^[4],这说明父母双方的并未因染色体数目的差异而引起代谢紊乱而影响到个体的存活和发育。但杂合子个体在性成熟后并不能产生可育的配子,这可能与这两种扇贝的染色体核型的明显差异^[4]有关,在配子形成过程中进行减数分裂前期,来源于父母本双方的染色体虽然数目一样,但由于核型上的差异,染色体的性质并不相同,导致同源染色体联会时不能正确配对,从而不能产生正常的配子,这是导致本研究中杂合子不育的主要原因。另外根据杂合子性腺成熟后期外观上出现的由雌雄同体向全雌化转变现象,作者推测导致双亲间等位基因表达发生紊乱,由酶的不相容性导致了这种器官发育的时空失调。而鉴于正反杂交的差异性并不显著,在本研究中没有表现出明显的核质不相容现象。杂合子不育给这两种扇贝间的杂交在扇贝育种的后续运用带来了困难,由于父母本都是雌雄同体,在排放精卵时很容易自体受精,影响

到杂交效果。而生产中又因成本和可操作性不能按本研究中精卵分离方法进行精确杂交,这就很大程度上限制了该杂交在生产中的大规模推广,而杂合子后代由于不育并不能作为品种选育的基础。针对这种问题,目前做的只能是充分利用扇贝的高繁殖力,即一次能产生大量的配子,通过回交的手段来获取减数分裂时能正常联会分离的个体,进行可育性的渐进选择从而改变其育性,但这可能是一个漫长而艰难的过程。随着贝类研究进入基因组时代和各种新的分子生物技术的出现,相信通过分子生物学的方法来阐明和克服这种种间隔离机制在不远的将来一定会实现,到那时贝类的遗传育种工作一定会开拓出一片新天地。

致谢:感谢大连壹桥苗业有限公司为本研究提供了紫扇贝和海湾扇贝亲本材料、实验所用的场地以及所有设施并负责子代的培养,青岛农业大学王春德博士具体负责紫扇贝的引种工作,一并致谢!感谢中国科学院海洋所何滔博士在组织切片中提供的帮助!

参考文献:

- [1] Jesu's M, Camilo A S, Eldredge B, et al. Mauriciol-inares speciation by hybridization in Heliconius butterflies[J]. Nature, 2006, 441: 868-871.
- [2] James M. Hybrid speciation[J]. Nature, 2007, 446: 279-283.
- [3] 张国范, 郑怀平. 海湾扇贝养殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [4] Elisabeth V B, Gilda B, Karin L. Chromosome number of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*[J]. Tohoyo Journal of Agricultural Research, 1990, 40: 91-95.
- [5] 王师, 包振民, 张玲玲, 等. 应用 PCR-RFLP 技术鉴别区分中国沿海四种主要养殖扇贝[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 210-214.
- [6] Sastry A N. Reproduction of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. Influence of temperature on maturation and spawning[J]. Biol Bull, 1963, 441: 146-153.
- [7] Cruz P, Ibarra A M. Larval growth and survival of two catarina scallop (*Argopecten circularis* Sowerby, 1835) populations and their reciprocal crosses[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1997, 212: 95-110.
- [8] Yu Z N, Kong X Y, Zhuang Z M, et al. Sequence study and potential uses of ribosomal DNA internal transcribed spacers in scallop *Chlamys farreri*[J]. J Fish

- Sci China, 2001, 8(1): 6-9.
- [9] 任成林, 田勇, 梁淑珍. 动物组织 H.E.染色石蜡切片技术的改进[J]. 河北北方学院学报, 2007, 23(1): 41-45.
- [10] 王春德, 刘宝忠, 李继强, 等. 紫扇贝与海湾扇贝种间杂交的研究[J]. 海洋科学, 2009, 33(10): 84-91.
- [11] Zachariah G, James A F, Matthew L F, et al. Homoploid hybrid speciation in an extreme habitat[J]. Science, 2006, 314: 1923-1925.
- [12] Seehausen O. Hybridization and adaptive radiation[J]. Trends Ecol Evol, 2004, 19(4): 198-207.
- [13] 戴华军, 朱正斌, 沈雪林, 等. 作物远缘杂交育种的途径及其实质[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 144-149.
- [14] 楼允东, 李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 151-158.
- [15] Zhang Hai-bin, Liu Xiao, Zhang Guo-fan, et al. Growth and survival of reciprocal crosses between two bay scallops, *Argopecten irradians concentricus* Say and *A. irradians irradians* Lamarck[J]. Aquaculture, 2007, 272: 88-93.

Reproductive isolation of inter-specific crosses between *Argopecten irradians* and *Argopecten purpuratus*

ZHANG Shou-du^{1,2}, ZHANG Guo-fan¹, LI Li¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Nov., 21, 2011

Key words: *Argopecten irradians*; *Argopecten purpuratus*; inter-specific crosses; ITS1; reproductive isolation

Abstract: Inter-specific crosses were conducted between *Argopecten irradians* and *Argopecten purpuratus*. Bidirectional fertilizations and successful hatching were examined for all crosses and no prezygotic isolation was observed. The success of hybridization was confirmed by ITS1 maker. Through the observation of H. E. staining paraffin slice of the gonad of mature hybrids, male gonad was found obsolescence without any active sperm while female gonad was developed with abundant normal appearance eggs. But the hybrids eggs could not back-cross with the parental species, exhibiting typical postzygotic isolation—hybrid sterile.

(本文编辑: 梁德海)