

一株黑松-美味牛肝菌菌根辅助细菌的筛选及鉴定*

盛江梅 吴小芹** 侯亮亮 应晨希

(南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037)

摘要 为探讨菌根际有益微生物之间的作用关系及其互作对黑松 (*Pinus thunbergii*) 生长的影响, 对分离自黑松-美味牛肝菌 (*Boletus edulis*, Be) 和黑松-黄色须腹菌 (*Rhizopogon luteous*) 菌根际土壤的81株细菌进行菌根辅助细菌 (Mycorrhiza helper bacteria, MHB) 的筛选. 通过干皿对抗法筛选获得1株具MHB潜力的菌株HB12, HB12菌株对Be菌丝生长的平均增长率达34.4%. 盆栽试验结果表明, 单接Be处理的黑松根系菌根侵染率为36.8%, 而双接种Be和HB12菌株处理的菌根侵染率为54.5%; 双接种Be和HB12处理、单接Be处理和单接HB12处理较未接种处理的黑松苗高提高44%、36%和24.5%, 地径提高27.7%、22.9%和26.5%. 由此可确定菌株HB12为黑松-美味牛肝菌的菌根辅助细菌. 经形态观察、Biolog系统鉴定及16S rRNA分子鉴定, 初步确定菌株HB12为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*). 图2 表2 参19

关键词 黑松; 美味牛肝菌; 根际; 菌根辅助细菌; 蜡状芽孢杆菌

CLC Q948.122.3

Isolation and Identification of a MHB Strain from the Rhizosphere Soil of *Pinus thunbergii* Inoculated with *Boletus edulis**

SHENG Jiangmei, WU Xiaoqin**, HOU Liangliang & YING Chengxi

(Faculty of Forest Resource and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract To investigate the effect of ectomycorrhiza co-inoculated with mycorrhiza helper bacteria (MHB) on the growth of pine seedlings, we screened MHB from 81 bacterial strains isolated from rhizosphere soil of *Pinus thunbergii* inoculated with *Boletus edulis* (Be) or *Rhizopogon luteous*, and we used the methods of dry-plate, liquid co-culture test *in vitro* and co-inoculation to evaluate the potential MHB strains. The dry-plate confrontation assay revealed that HB12 significantly promoted the *in vitro* hyphal growth of Be with an increasing rate of 34.4%. *B. edulis* significantly increased mycorrhizal formation in the presence of HB12 (54.5%) compared with the no-bacteria control (36.8%). Compared with the blank control (-Be, -HB12), the pine seedlings co-inoculated with Be and HB12 strain, Be alone (+Be, -HB12), and HB12 alone (+HB12, -Be,) could significantly improve their mean height with increasing rates of 44%, 36% and 24.5%, and their diameter with increasing rates of 27.7%, 22.9% and 26.5%, respectively. The MHB stain was identified based on the analysis of morphological characters, Biolog system and 16S rRNA gene sequences homology. HB12 was identified as *Bacillus cereus*, of which 16S rRNA sequences have been registered at GenBank database under the accession number FJ040806. Fig 2, Tab 2, Ref 19

Keywords *Pinus thunbergii*; *Boletus edulis*; rhizosphere; mycorrhiza helper bacterium; *Bacillus cereus*

CLC Q948.122.3

菌根真菌和根际微生物作为植物根际微环境中的重要组成部分, 在维持植物根际生态系统的稳定、促进植物生长和提高宿主抗逆性等方面发挥重要作用. 植物促生根圈细菌 (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) 是一类植物根际有益微生物, 它与外生菌根真菌 (Ectomycorrhizal fungi, EMF) 的互作在改良土壤结构和促进植物营养吸收等方面均具有重要作用^[1-3], 近年来外生菌根真菌与PGPR的相互关系成为菌根学研究领域的热点.

菌根辅助细菌 (Mycorrhizal helper bacteria, 简称MHB)

收稿日期: 2009-10-01 接受日期: 2009-10-27

*国家自然科学基金项目 (No. 30571471)、"十一五" 国家林业科技支撑计划专题 (No. 2006BAD08A1002) 和林业公益性行业科研专项 (No. 201004061) Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571471), the Special Project of National "11th Five-year Plan" for Forestry Science and Technology of China (No. 2006BAD08A1002) and the Special Research Program for Public-welfare Forestry of China (No. 201004061)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xqwu@njfu.edu.cn)

是指可与菌根联结并对菌根的形成具有选择性促进作用的细菌. 作为一类特殊的PGPR, MHB可显著促进菌根真菌孢子萌发、菌丝生长及提高菌根侵染率等, 从而有效地促进植物生长, 提高植物抗性^[4-5]. 黑松是典型的外生菌根树种, 不仅具有极强的观赏价值, 还被广泛应用于荒山造林、沿海防护林带的建设. 然而, 近年来随着生态环境的不断恶化以及松材线虫病的严重危害, 黑松分布范围和种植面积不断减少. 研究表明, 接种外生菌根真菌可提高黑松的生长势, 增强黑松对松材线虫病的抵抗力, 从而延缓或减轻松苗死亡^[6]. MHB与菌根真菌联合作用, 可有效促进菌根真菌的功能发挥, 因此, 通过深入研究黑松菌根围EMF与MHB的互作, 改善根际微生态环境就成为有效促进黑松生长及提高其抗性的重要途径之一. 美味牛肝菌 (*Boletus edulis*) 是黑松的优良外生菌根真菌, 对黑松苗具有显著的促生作用^[7]. 本研究以黑松-美味牛肝菌菌根苗为材料, 进行菌根苗根际MHB筛选, 并探讨MHB及其与EMF互作对黑松生长的影响, 以期有效提高黑松抗性寻找途径, 以及为进一步开发利用

EMF-MHB复合生物肥料等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与培养

供试细菌: 南京林业大学森林病理学实验室保存的从18月生黑松-美味牛肝菌 (*Pinus thunbergii*-*Boletus edulis*) 和黑松-黄色须腹菌 (*P. thunbergii*-*Rhizopogon luteous*) 菌根苗根际土壤分离获得的81株细菌菌株^[8]。采用胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 培养基培养。

供试外生菌根真菌: 美味牛肝菌 (*Boletus edulis*, 简称Be) 和黄色须腹菌 (*Rhizopogon luteous*, 简称R1)。采用综合马铃薯培养基 (ZPD) 培养。

1.2 细菌菌体与外生菌根菌平板互作测定

细菌菌体悬浊液制备: 将81株供试细菌活化后, 用接种环取少量接种于装有50 mL TSA液体培养基中, 28 ℃、160 r/min振荡培养72 h。4 ℃、5 000 r/min离心5 min, 用生理盐水润洗菌体两次, 最后根据离心管内菌体的数量定性加入生理盐水, 混匀后即菌体悬浊液。

采用改良的干皿对抗法^[9]初筛具MHB潜力的菌株。取灭菌培养皿, 每皿接种3块直径为7 mm、厚度约5 mm的Be或R1菌块 (倒置放置), 各菌块上滴加25 μL供试细菌菌体悬浊液, 置于25 ℃培养箱中培养。每隔6 d添加25 μL 0.01 mol/L的葡萄糖溶液, 防止菌块干燥。待菌块生长12~16 d后, 借助体式显微镜 (LEICA MZI6型) 观测菌根菌丝生长状况。以滴加生理盐水的作为对照, 每处理设6个重复。

1.3 细菌胞外代谢产物对外生菌根菌生长的影响

将具MHB潜力的细菌菌株活化后, 接种于50 mL TSA液体培养基中, 28 ℃、160 r/min振荡培养72 h, 0.22 μm细菌过滤器过滤后即含胞外代谢产物的无菌滤液。将1 mL滤液与ZPD琼脂培养基混合倒平板后, 接种Be菌块于培养皿中央, 置于25 ℃恒温培养, 12~15 d后观测其菌落半径, 以TSA空白培养液处理作为对照。

每50 mL ZPD液体培养基中加入3块Be菌饼 (直径7 mm, 厚度5 mm), 同时加入1 mL无菌滤液, 25 ℃、160 r/min培养12~15 d, 定性滤纸过滤, 60 ℃烘箱中烘至恒重后称重, 以TSA空白培养液为对照, 每处理3个重复。

1.4 外生菌根菌与细菌双接种的盆栽试验

菌根苗固体菌剂的制备和黑松芽苗培育按照参考文献[7]的方法进行。采用芽苗截根法移栽黑松幼苗, 灭菌基质土与菌根苗固体菌剂比例为10:1, 细菌接种液浓度约为 10^7 cfu/g, 用量为5 mL/株。取适量无菌的盆栽基质装入培养杯中, 大约覆盖20 g菌剂; 将子叶期的黑松幼苗截去少量主根后移栽至培养杯中; 用无菌移液管吸取5 mL的细菌菌体悬浊液注入培养杯中; 浇水定根。以只接种细菌、只接种外生菌根菌和不接种菌3种处理作为对照, 每处理10个重复。置于25 ℃温室培养, 光照为12 h/d, 适时浇水, 统一管理。待黑松苗生长一段时间后测量苗高、地径生长指标。

1.5 菌根侵染率测定

将黑松苗根系小心取出洗净, 并用吸水纸将水吸干; 在根系上下及周围部位随机取若干 (200个左右) 根段, 观察 (必要时借助光学显微镜) 记录形成菌根根段数量, 计算菌

根侵染率: 菌根侵染率=形成菌根根段数×100%/总根段数。每处理取5株松苗。

1.6 MHB菌株鉴定

1.6.1 生物学特征观察 将筛选出的MHB菌株接种于TSA培养基平板, 28 ℃培养24~36 h, 待出现单菌落, 进行菌体形态、菌株培养特征、革兰氏染色、3%氢氧化钾溶解性试验、芽胞染色和伴孢晶体染色观察^[10]。

1.6.2 Biolog细菌自动系统鉴定分析 根据革兰氏染色和芽胞染色结果选用Biolog鉴定板, 采用Biolog微生物鉴定系统 (ELX808型) 对筛选获得的MHB菌株进行鉴定。具体步骤参照说明书进行。

1.6.3 16S rDNA序列测定及系统发育树构建 采用SDS法提取MHB菌株的基因组DNA^[11], 溶解于适量TE缓冲液中。采用扩增细菌16S rDNA的一对通用引物 (正向引物16Sf: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 反向引物16Sr: ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT), 按照参考文献[12]的方法进行PCR扩增。PCR产物用QIAGEN公司的纯化试剂盒纯化回收, 连接载体pMD19-T, 转化JM109后送Invitrogen公司测序。

测序结果采用NCBI数据库中BLASTn进行比对分析, 选取数据库中高同源性的菌株16S rRNA系列, 并采用MEGA4.0软件构建系统发育树。

1.7 统计分析

HB12菌株胞外代谢产物处理Be后菌丝的生长量与对照之间的差异水平采用独立样本t检验进行统计分析, $P \leq 0.05$ 。采用单因素方差分析对进行Be、HB12各处理对黑松苗高、地茎等生长指标进行统计分析, $P \leq 0.05$ 。以上统计分析均采用SPSS 13.0软件进行。

2 结果与分析

2.1 MHB潜力细菌菌体对美味牛肝菌生长的促进作用

将供试的81株细菌与美味牛肝菌 (Be)、黄色须腹菌 (R1) 采用干皿对抗法进行培养测定, 其中分离自黑松-美味牛肝菌菌根际土壤的细菌菌株HB12对Be表现出明显的促进作用, 而对R1无促进作用。与对照相比, HB12处理的Be菌丝增长了40% (图1)。因此, 可初步将HB12视为具MHB潜力的菌株。

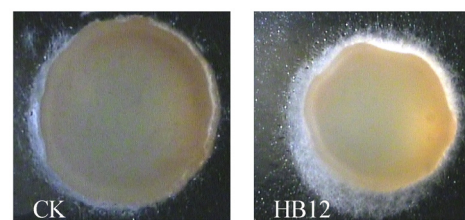


图1 HB12菌株菌体对Be菌丝生长的影响 (×17)

Fig. 1 Effect of different bacteria suspension on the growth of *B. edulis* (×17)

2.2 MHB潜力菌株胞外代谢产物对美味牛肝菌生长的影响

菌株HB12的胞外代谢产物与Be平板互作实验结果 (表1) 表明, HB12对Be菌丝生长表现出显著的促进作用 ($P=0.008<0.05$), HB12处理的Be菌丝生长直径较对照增长了17.41%。液体共培养的结果表明, HB12菌株的胞外代谢产物能显著提高对Be菌丝的生物量 ($P=0.045<0.05$), 与对照相

比, HB12处理的Be菌丝生物量提高了28.8%.

2.3 MHB潜力菌株与美味牛肝菌互作对黑松生长的影响

单独接种HB12菌株或Be、双接种HB12菌株和Be于黑松幼苗, 10 mo后松苗的生长情况见表2. 单接种HB12、双接种Be和HB12处理的黑松苗高与对照的差异达显著水平 ($P=0.002<0.05$), 而单接种Be的处理与对照差异不显著. 单接种HB12、单接种Be及双接种Be和HB12处理的黑松地茎与对照差异显著 ($P=0.006<0.05$). 接种处理的松苗苗高和地径与对照相比, 单接Be的处理分别增长24.5%和26.5%, 单接HB12的处理增长36%和22.9%; 而双接种Be和HB12的处理则达到了44%和27.7%, 其中, 双接种处理的促生效果好于单接种处理. 由表2还可看出, 双接种HB12和Be处理的菌根侵染率达54.5%, 显著高于单接种Be菌剂处理36.8%的菌根侵染率.

2.4 HB12菌株的形态与培养特征

HB12菌株在TSA培养基上菌落呈乳白色、圆形、粘稠、表面光滑、边缘锯齿型; 芽孢中生, 比菌体小, 革兰氏阳性, 无伴孢晶体; 形态为链杆状.

2.5 MHB菌株Biolog细菌自动鉴定系统分析

HB12菌株在Biolog鉴定板上培养16~24 h时的读数相似值 (SIM值) 均大于0.50, 且菌株鉴定结果与数据库中所比对出的细菌种类的相似性 (PROB) 为98%. 鉴定结果表

明HB12为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) /苏云金杆菌 (*B. thuringiensis*). 结合上述HB12菌株无伴孢晶体的染色结果, 推测HB12为蜡状芽孢杆菌.

2.6 MHB菌株16S rDNA序列分析及系统发育树构建

测序结果去除载体序列后, 获得HB12菌株1 409 bp的16S rRNA序列, 序列提交GenBank数据库, 获得的登录号为FJ040806. 将HB12的16S rRNA序列与GenBank中的序列进行BLASTn, 获得同源性数值, 比对结果中与HB12菌株相似性最高的是蜡状芽孢杆菌/苏云金杆菌, 同源性达到100%. 从图2的进化树可以看出, HB12的遗传进化距离与蜡状芽孢杆菌亲缘关系较近. 结合HB12菌株的形态特征及Biolog细菌鉴定结果, HB12菌株鉴定为蜡状芽孢杆菌.

3 讨论

国外对MHB的研究已有几十年的历史, 筛选出了不少外生菌根真菌的MHB, 其中以芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、假单胞杆菌属 (*Pseudomonas* sp.) 和类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.) 的细菌居多^[13-15]. Bending等从欧洲赤松 (*P. sylvestris*) - 褐环乳牛肝菌 (*Suillus luteus*) 菌根共生体中分离获得芽孢杆菌属的MHB^[16]. 目前, 在国内还少见有关MHB筛选研究的报道. 本文从黑松-美味牛肝菌菌根苗根际土壤分离、筛选获得1株菌根辅助细菌HB12菌株, 经形态、生理生化以及16S rRNA序列分析鉴定为蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*).

表1 HB12菌株胞外代谢产物对Be生长的影响

Table 1 Effect of bacterial extracellular metabolites on the growth of *B. edulis*

菌株 Strain	平板互作 Dry-plate confrontation		液体共培养 Liquid co-culture test	
	菌落直径 Colony diameter (d/cm)	增长率 Growth rate (r/%)	生物量 Mycelia biomass (m/g)	增长率 Growth rate (r/%)
HB12	6.61±0.32a	17.41	0.44±0.00a	28.8
CK	5.63±0.13b	—	0.34±0.06b	—

表2 MHB潜力菌株与Be互作对松苗生长的影响

Table 2 Effect of MHB strains inoculated with *B. edulis* on the growth of pine seedlings

处理 Treatment	生长指标 Growth index				菌根侵染率 Colonization rate (r/%)
	苗高 Seedling height (h/cm)	增长率 Growth rate (r/%)	地径 Ground diameter (d/mm)	增长率 Growth rate (r/%)	
Be+HB12	10.97±2.06a	44	2.12±0.31a	27.7	54.5a
HB12	10.36±1.05a	36	2.04±0.31a	22.9	0
Be	9.49±2.10ab	24.5	2.10±0.43a	26.5	36.8b
CK	7.62±1.14b	—	1.66±0.22b	—	—

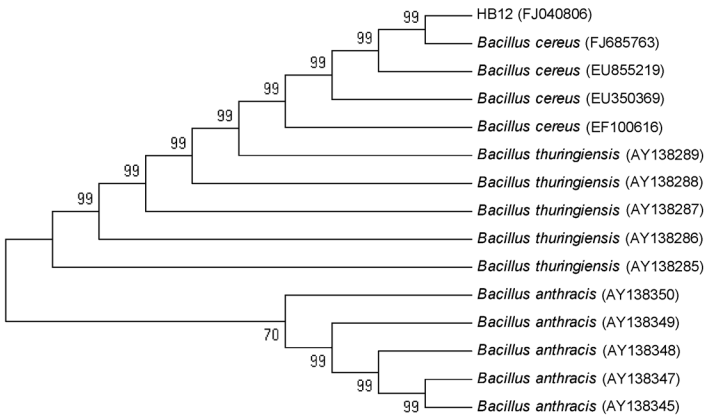


图2 MHB菌株HB12的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of MHB strain HB12

已有大量研究证实,双接种MHB和菌根真菌对植物表现出的促生作用,其中一个重要的原因就是MHB可提高菌根侵染率。Garbaye等从漆蜡蘑(*Laccaria laccata*)的子实体中分离到某种MHB,将该MHB与漆蜡蘑双接种花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)可以显著提高菌根形成的数量^[5]。Duponnois等将根内球囊霉(*Glomus intraradices*)与假单胞杆菌属MHB双接种阿拉伯树胶(*Acacia senegal*)的研究也表明,双接种处理后植株的各项生物量指标都明显高于单接种处理,且接种MHB显著提高了菌根侵染率^[4]。本试验的结果也表明,美味牛肝菌(Be)和蜡状芽孢杆菌HB12菌株双接种处理显著提高了黑松根系的菌根侵染率,有效促进松苗生长,说明MHB菌株HB12的作用机制之一就是可促进外生菌根真菌Be对黑松苗根系的侵染。

有研究表明,MHB具有明显的真菌选择性^[17-18]。本试验筛选获得的MHB菌株HB12分离自黑松-美味牛肝菌菌根际土壤,并对其宿主具有促生作用,而从黑松-黄色须腹菌菌根际土壤分离的细菌中未发现对美味牛肝菌表现出促生作用的菌株,HB12菌株对黄色须腹菌的生长也未表现出促进作用(数据未发表),这一现象表明HB12菌株也具有真菌选择性,这与前人的研究结果一致。

本试验筛选获得的HB12菌株为蜡状芽孢杆菌,有研究表明,该菌与菌根真菌具有协同作用^[1, 19]。Artursson等对AM菌根围的细菌研究发现蜡状芽孢杆菌VA1菌株是群落中的优势种群,且VA1菌株总是特异性作用于菌丝降解区的AM菌丝体上;推测AM菌丝体可能是细菌的重要营养源,这一特异性结合有利于两者形成共生关系,有利于蜡状芽孢杆菌VA1从菌丝体获取营养及释放碳源^[19]。Jacek等研究发现,在供试土壤受镉(Cd)污染的条件下,两种外生菌根真菌*Amanita rubescens*、*Hebeloma sinapizans*分别与蜡状芽孢杆菌混合接种欧洲赤松,对松苗生长都具有明显的促进作用,同时还提高了松苗抗重金属Cd的能力^[1]。MHB促进植物生长的作用机制包括改善植物养分吸收、与病原菌竞争生态位、提高植物抗性、促进菌根真菌孢子萌发和菌丝生长等多个方面,本试验中的蜡状芽孢杆菌HB12菌株与Be互作对黑松生长具有明显的促进作用,其协同促生机制还有待进一步的深入研究。

References

- Kozdrój J, Piotrowska-Seget Z, Krupa P. Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from an industrial desert soil protect pine seedlings against Cd (II) impact. *Ecotoxicology*, 2007, **16**: 449~456
- Domenech J, Ramos-Solano B, Probanza A, Lucas-García JA, Colón JJ Gutiérrez-Mañero FJ. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: A study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *For Ecol & Manage*, 2004, **194**: 293~303
- Wang XR (王新荣), Kang LH (康丽华). The effects of dual- inoculation of ectomycorrhiza and rhizobia on the growth of acacia angium. *For Res* (林业科学研究), 1998, **11** (5): 542~546
- Duponnois R, Plenchette C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endo-mycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza*, 2003, **13**: 85~91
- Garbaye J, Duponnois R. Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii*-*Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis*, 1992, **14**: 335~344
- Wu XQ (吴小芹), Sun MQ (孙民琴), Gao Y (高悦), Sheng JM (盛江梅), Ye JR (叶建仁). Effects of some ectomycorrhizas on pine seedlings to disease resistance. *J. Sci Silv Sin* (林业科学), 2007, **43** (6): 88~93
- Wu XQ (吴小芹), Sun MQ (孙民琴). Mycorrhizal formation between seven ectomycorrhizal fungi and seedlings of three pines species. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2006, **26** (1): 4186~4191
- Sheng JM (盛江梅). Isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from rhizosphere soil of *Pinus thunbergii* inoculated with ectomycorrhizal funig: [Master's Degree Dissertation]. Nanjing, China: Nanjing Forestry University (南京: 南京林业大学), 2008. 1~52
- Dunstan WA, Malajczuk N, Dell B. Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell seedlings. *Plant Soil*, 1998, **201**: 241~249
- 程丽娟. 微生物学实验技术. 西安: 天则出版社, 1993. 1~334
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in molecular biology, 4th ed. Translated by Yan ZY (颜子颖), Wang HL (王海林). Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 1999. 1~1319
- Jiang P (蒋萍), Ye JR (叶建仁). Identification on molecular of an antagonistic bacteria NA isolated from leaf surface of *Pinus massoniana*. *J Xinjiang Agric Univ* (新疆农业大学学报), 2008, **31** (3): 39~42
- Founoune H, Duponnois R, Ba AM, Sall S, Branget I, Lorquin J, Neyra M, Chotte JL. Mycorrhiza helper bacteria stimulated ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *New Phytol*, 2002, **153**: 81~89
- Founoune H, Duponnois R, Meyer JM, Thioulouse J, Masse D, Chotte J L, Neyra M. Interactions between ectomycorrhizal symbiosis and *Fluorescent pseudomonads* on *Acacia holosericea*: Isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **41**: 37~46
- Poole EJ, Bending GD, Whipps JM, Read DJ. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytol*, 2001, **151**: 743~751
- Bending GD, Poole EJ, Whipps JM, Read DJ. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiol & Ecol*, 2002, **39**: 219~227
- Garbaye J. Helper bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol*, 1994, **128**: 197~210
- Kataoka R, Taniguchi T, Futai K. Fungal selectivity of two mycorrhiza helper bacteria on five mycorrhizal fungi associated with *Pinus thunbergii*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, **25**: 1815~1819
- Artursson V, Jansson JK. Use of bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **7**: 1953~1966