DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2008.70018

三峡库区浮游生物群落 DNA 指纹结构空间异质性

颜庆云^{1,3} 余育和¹ 冯伟松¹ 于志刚² 陈洪涛²

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国海洋大学化学化工学院, 青岛 2660033;

3. 中国科学院研究生院,北京 100039)

摘要:通过随机扩增多态性DNA(RAPD)技术研究了三峡库区秭归至万州段浮游生物群落DNA指纹结构的空间异 质性。结果如下:(1)筛选出的13条引物共检测到131条长度在200—2200bp的谱带,谱带多态率为97.7%;各采样 点的共有条带占总谱带数的2.3%,而特有条带占38.2%;(2)秭归(ZG)、巴东(BD)、巫山(WS)、奉节(FJ)和万州(WZ) 分别获得59、52、58、47和38条谱带,其中秭归的特有条带最多(12条),万州最少(7条);(3)基于浮游生物群落RAPD 指纹的聚类分析显示5个采样点分作三枝:巴东和巫山相似性最高,并进而与秭归聚合成一枝;而万州和奉节各自 成为单独的一枝。这表明研究区域内的浮游生物群落DNA指纹结构具有较明显的空间异质性,并与采样点的地理 分布和环境特征存在着较好的相关性。因此,浮游生物群落DNA指纹结构能为群落的时空变化及大型水利工程对 它们的生态影响监测提供有力的分子依据,并能为生态机理的分子阐释提供参考。

关键词: 空间异质性; DNA指纹结构; 浮游生物群落; 三峡库区 中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)增-0018-06

由不同的功能类群组成的浮游生物是水生食物链的基础,其中浮游植物占据着第一营养级,浮游动物是次级生产者,而浮游细菌属于还原者,它们在水体生态系统的物质循环和能量流动中发挥着极其重要的作用。此外,浮游生物在个体、种群、群落结构层面都能较快地响应环境的变化,是环境状况的重要指示生物。三峡水库是迄今为止世界上最大的水库,从2003年6月蓄水至今,其生态环境发生了较大的变化。由于浮游生物在水生生态系统中扮演着重要角色,并且对环境变化较为敏感,因此对环境状况具有很好的预警作用,对浮游生物的监测也是大型水利工程生态影响评价的重要组成部分之一。

传统的浮游生物监测主要通过显微镜进行形态学分类,但由于其个体小、种类组成复杂,很 多种类又缺乏明显的分类特征,并且需要娴熟的 分类技能和专业知识,使得浮游生物的形态学鉴 定显得比较困难和繁琐^[1-3]。近20年来,伴随着分 子生物学技术的快速发展,DNA指纹分析技术被 逐渐用于群落水平的研究[3-5]。与传统的分类方法 相比,它具有技术路线程序化、比较分析规范化 的特点,并且操作简便,因此在监测群落的多样 性及其时空变化方面具有很大的潜能,只不过对 浮游生物的研究大多还集中在微型或小型个体 ^[2,6]。Savin, et al.^[1]对浮游生物群落(包括大型个体) 进行的分子和形态学方法比较研究表明两者各具 优缺点;余育和等^[7]提出DNA指纹分析在浮游生 物群落的应用是可行的;颜庆云等^[8,9]研究了浮游 生物群落DNA指纹拓扑结构与物种组成及理化因 子的关系。本文在此基础上通过群落DNA指纹结 构来揭示三峡水库蓄水两年后库区浮游生物群落 的空间异质性,以期揭示库区浮游生物群落与空 间位置及水质状况的关系,并结合流域环境背景 资料,分析大型水利工程对浮游生物群落遗传多 样性的影响。

- 1 材料与方法
- 1.1 库区概况 三峡工程是一项举世瞩目的生态

作者简介:颜庆云(1979—),男,湖南衡阳人;博士研究生;主要研究方向为浮游生物群落 DNA 指纹分析。E-mail: yanqyun@ihb.ac.cn 通讯作者:余育和,E-mail: yhyu@ihb.ac.cn

收稿日期: 2008-01-27; 修订日期: 2008-04-25

基金项目:国家自然科学基金项目(30490232; 30770298; 30570240); 973项目(2002CB412308)资助

工程,对生态环境有着广泛而复杂、深刻而长远的 影响。经过四十多年的科学论证,最终由全国人大 审议通过并于1994年正式开土动工,大坝建成后于 2003年6月开始蓄水。三峡水库全长600多公里,是目 前世界上最大的水库。本研究选择库区下游段近300 公里为研究对象,该区段水流相对较缓、泥沙含量较 低,有益于浮游生物群落的空间异质性研究。

1.2 样品的采集 2005年5月,在三峡库区秭归至 万州江段主要城区附近设置5个采样点(图 1),用25 号浮游生物网(孔径64µm)于表层水平拖曳捞取浮 游生物,样品收集于50mL采样瓶,现场滴加2—3 滴福尔马林液加以固定。



图 1 三峡库区采样点位置图

Fig. 1 Location of sampling sites in the Three-Gorges Reservoir region of Yangtze River, China

1.3 群落DNA抽提及RAPD分析 群落DNA的抽 提方法参见文献[8];在对DNA模板量、引物浓度、 Mg²⁺浓度及PCR循环参数等进行优化后从OPM、 OPE及OPG三组(共60条)随机引物中筛选出扩增结 果稳定、谱带清晰的13条(表1)进行RAPD扩增。 RAPD扩增在Perkin ElmerTM9600型PCR仪上进行, 反应体系参照文献[10]: 25.0µL体系中含有1×PCR Buffer, 0.4µmol/L 随机引物, 1.5mmol/L Mg²⁺, 80µmol/L dNTP, 1.5U Taq酶(Fermentas) 和约50ng 的模板DNA。混匀后稍离心将反应液集中于管底进 行以下扩增:94℃预变性5min,后接45个循环(每个 循环依次包括94℃ 40s, 37℃ 40s, 72℃ 120s), 最 后72℃延伸5min,反应终止于4℃。用1.5%的琼脂 糖凝胶(含0.5µg/mL EB)在1×TAE中以80V的电压进 行电泳分离,UVP凝胶成像分析系统观察并一次性 成像。

1.4 数据分析 各RAPD扩增至少重复两次,稳定、 清晰的谱带用于最终的数据分析。根据DNA Ladder 指示的标准分子量,对照扩增产物的迁移率及UVP Lab Works软件的光密度扫描曲线确定扩增片断的 大小。分别以1、0代表扩增位点的有、无输入 RAPDistance 1.04程序计算Dice相似系数S,并通过 1—S换算得距离;同时针对RAPD谱带用SPSS 13.0 软件进行聚类分析(Ward's method),并通过 XLSTAT-Pro 2006软件进行主成分分析(PCA)。

表 1 随机引物及其RAPD扩增结果

Tab. 1 Random primers and their amplified results

引物 Random primers	碱基序列 (5'3') Sequences (5'3')	片断大小 Sizes of bands (bp)	谱带数 No. of bands	特有条带 No. of specific bands	谱带多 态率 Polymorphic rates
OPM-05	GGGAACGTGT	200-1600	10	5	100%
OPM-06	CTGGGCAACT	300-2200	13	6	100%
OPM-15	GACCTACCAC	400-2200	8	2	100%
OPM-16	GTAACCAGCC	300-2200	10	3	100%
OPM-17	TCAGTCCGGG	360-2000	14	8	100%
OPM-20	AGGTCTTGGG	500-2000	9	1	100%
OPE-02	GGTGCGGGAA	300-1600	9	5	100%
OPG-08	TCACGTCCAC	400-1800	10	5	100%
OPG-10	AGGGCCGTCT	450-1800	11	2	81.8%
OPG-13	CTCTCCGCCA	500-1600	8	4	100%
OPG-16	AGCGTCCTCC	400-1800	11	1	90.9%
OPG-17	ACGACCGACA	450-1400	9	3	100%
OPG-18	GGCTCATGTG	250-1400	9	5	100%
合计 Total		200-2200	131	50	97.7%

2 结 果

2.1 RAPD指纹分析

筛选出的 13 条随机引物共获得 131 条长度在 200—2200bp 的清晰谱带,其中只有 3 条为各采样 点的共有带(占 2.3%),50 条仅出现在一个采样点 被检测到(占 38.2%),谱带多态率为 97.7%(表 1)。 秭归、巴东、巫山、奉节、万州分别获得 59、52、 58、47 和 38 条谱带(表 2),平均为 50.8 条;各采 样点获得的特有条带也是秭归最多(12 条),万州 最少(7 条)。平均每条引物扩增得到的谱数为 10.1 条;其中各引物在不同采样点检测到的谱带数如 表 2 所示。

2.2 浮游生物群落空间异质性

基于RAPD指纹分析的Ward's method聚类(图 2)显示5个采样点的浮游生物群落可以分成明显的 三枝:万州与其他各采样点的相似性最低,成为单

独的一枝;其次是位于万州下游的奉节也成为单独 的一枝; 而巴东和巫山的相似程度最高, 它们最先 聚合后进而与秭归汇聚成一大枝。从浮游生物群落 DNA指纹图谱的Dice相似系数矩阵 (表 3) 来看, 各样点间的相似系数在0.259—0.455, 其中巴东与 巫山的相似性最高(0.455),万州与奉节间最低 (0.259)。位于相对较下游的秭归、巴东、巫山间的 相似性比其他任意两采样点间的相似性都要高,这 支持了上述的聚类分枝关系。针对RAPD谱带的主 成分分析(PCA)显示前3个主分量解释了总信息量 的77.96%, 第一、二、三主分量分别解释了28.42%、 26.30%和23.24%的信息。利用第一、二主分量作的 二维分布图(图 3)显示巴东和巫山最接近,而万州 和奉节与其他样点相距较远,这进一步印证了聚类 结果所显示的浮游生物群落DNA指纹结构的空间 异质性。

表 2 RAPD指纹1/0矩阵

Tab. 2 Binary matrix showing the presence (1) and absence (0) of RAPD fingerprints

采样点			各引物 RAPD	谱带 RAPD ban	ds of each primer		
sites	OPM-05(10) ^a	OPM-06(13)	OPM-15(8)	OPM-16(10)	OPM-17(14)	OPM-20(9)	OPE-02 (9)
秭归 ZG	0000100100	0001101010001	11100101	0011001100	00100110010000	101110010	011011011
巴东 BD	0100001001	0011110011000	00100100	0111101000	00001011010010	000101110	000000101
巫山 WS	0101001001	0101000100010	00010101	1011010101	11100100100100	011101101	000000001
奉节 FJ	1010101010	0000001110101	01011010	0000110110	00010001001001	010001001	000100101
万州 WZ	0110110000	1100100000000	00001000	0000001001	00000000100000	001011100	100010110
合计 Total ^b	1321313112	1213312231112	12222312	1133223312	11211222221111	1 2 3 3 2 4 3 2 2	111121324

采样点		各引	物 RAPD 谱带	RAPD bands of each prime	r	
Sampling sites	OPG-08(10)	OPG-10(11)	OPG-13(8)	OPG-16(11)	OPG-17(9)	OPG-18(9)
秭归 ZG	1010001010	00101111011	00011011	10110001110	011000100	101001100
巴东 BD	0000000101	10000111101	00001101	01101101101	110101001	$0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1$
巫山 WS	0100110101	10011111101	00001010	01010110110	000101010	010100110
奉节 FJ	0001001011	00001011011	00100100	00001010100	010001010	000101000
万州 WZ	0000010001	01011011000	11000000	$1\ 0\ 1\ 1\ 0\ 1\ 0\ 0\ 1\ 0\ 0$	$1\ 0\ 0\ 0\ 1\ 0\ 1\ 0\ 0$	001001000
合计 Total ^b	1111122224	21124355224	11113222	2 2 3 3 2 3 2 2 5 2 1	231213221	112213211

a.括号中的数字表示该引物的谱带数; b.谱带在 5 个采样点出现的次数

a. Number in the parenthesis represents the number of bands amplified by the primer; b. The times of each band detected at all the sampling sites





3 讨 论

空间异质性是指所研究系统或系统属性在空间上的复杂性和变异性^[11],其程度越高意味着更多的小生境存在,从而可以维持群落有更多的种类生存,即群落的多样性越高^[12,13]。从遗传多样性看,物种间碱基序列的不同使得各模板DNA在同一随机引物的PCR扩增中有不同的扩增位点。因此,理论上可以认为具有相似浮游生物群落组成的水体

具有相似的RAPD指纹图谱。DNA指纹分析技术现 已成为生态学研究中常用的方法,并广泛应用于生 物多样性、生物地理学等方面的研究^[14],它们在群 落水平的应用增进了我们对生物多样性和系统进 化的认识^[3,15]。而RAPD是DNA指纹分析技术的重 要代表,它所选用的引物(通常为10个碱基)能对各 模板DNA进行随机扩增而没有物种选择性,也不需 预知任何的核酸序列信息,比较适合于对群落结构 进行整体扫描分析。颜庆云等^[8,9]用RAPD技术研究 了洞庭湖浮游生物群落DNA多态性与物种组成及 理化因子的关系。当然与其他的指纹分析方法一样 RAPD也有其自身的不足,如不能很好地反映群落 中所有物种的多样性,重复性问题也是一个重要的 制约因素。



图 3 RAPD 指纹主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of RAPD fingerprints 秭归 ZG; 巴东 BD; 巫山 WS; 奉节 FJ; 万州 WZ

表 3 F	₹APD 相似系数矩阵(上三角)及距离矩阵(下三角)
-------	-----------------------------------

Tab. 3 Similarity matrix (above diagonal) and distance matrix

(below	diagonal)	of RAPD	fingerprints
(001011	unugonur)	or run D	ingerprintes

	秭归 ZG	巴东 BD	巫山 WS	奉节 FJ	万州 WZ
秭归 ZG		0.414	0.376	0.321	0.351
巴东 BD	0.586		0.455	0.323	0.289
巫山 WS	0.624	0.545		0.362	0.333
奉节 FJ	0.679	0.677	0.638		0.259
万州 WZ	0.649	0.711	0.667	0.741	

本研究中 RAPD 扩增获得的 131 条谱带中只有 3 条在各采样点均都被检测到,而 38.2%的谱带只 在一个采样点出现,谱带多态率达 97.7%,这表明 研究区内浮游生物群落的空间异质程度较高。聚类 分析则通过采样点的分枝关系更直观地说明了这 一点:位于库区核心段的秭归、巴东和巫山(距大坝 130km 以内)聚为一枝;距离大坝约 160、280km 的 奉节、万州各自成为单独的一枝(图 2), 该聚类分 枝关系与采样点的地理位置和环境条件相对应。秭 归、巴东和巫山位于三峡水库的核心区,该区段水 流和缓、水面较宽,类似于静水湖泊;大面积被淹 的土地、植被等给水体补充了一定的营养元素;水 质清澄,泥沙含量较低,透明度相对上游河段要高, 充分的光照条件有益于浮游植物的生长,浮游动物 的饵料条件也因此得到了改善。这些共同的生态特 征使得该江段浮游生物具有相似的群落组成而被 聚为一枝。万州处于库区中部,水流稍急,更趋近 于流水生态系统;受重庆经济辐射的影响,受纳的 工业废水和生活污水较多、水污染负荷相对较高: 该江段泥沙含量高,透明度低;这些环境特征明显 有别于库区核心区的3个采样点(秭归、巴东和巫山) 使得浮游生物群落 DNA 指纹结构不同而被划分为 单独的一枝。奉节在地理分布上位于前两枝之间(图 1), 且浮游生物的生活环境条件(如流速、泥沙含量 等)也介于两者间,其指纹结构显示奉节成为介于它 们之间的一枝(图 2)。此前的研究也表明秭归、巴 东和巫山的浮游生物群落 DNA 指纹结构与万州存 在明显的差异,奉节则和秭归较为相似而与秭归为 同一枝^[16]。这表明浮游生物群落 DNA 指纹结构不 仅能揭示群落的空间异质性,对时间异质性也具有 较好的指示性。与此同时,我们在东湖的研究发现 PCR-DGGE 指纹分析技术也能较好地揭示浮游生 物群落 DNA 多态性的时空异质性^[17,18]。因此,如 若能有效地综合不同的 DNA 指纹方法(如 DGGE、 RAPD、T-RFLP),这将为浮游生物群落的时空变化 及大型水利工程对它们的生态影响提供有力的分 子依据,并能为生态机理的分子阐释提供有效的参 考。

参考文献:

- Savin M C, Martin J L, LeGresley M, et al. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods [J]. *Microb. Ecol.*, 2004, 48: 51–65
- [2] Rappé M S, Suzuki M T, Vergin K L, et al. Phylogenetic diversity of ultraplankton plastid small-subunit rRNA genes recovered in environmental nucleic acid samples from the Pacific and Atlantic coasts of the United States [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 294–303

- [3] Moon-van der Staay S Y, De Wachter R, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity [J]. *Nature*, 2001, 409: 607–610
- [4] van Hannen E J, van Agterveld M P, Gons H J. *et al.* Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *J. Phycol.*, 1998, **34**: 206–213
- [5] Burton R S. Molecular tools in marine ecology [J]. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1996, 200: 85-101
- [6] Lindström E S. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content [J]. *Microb. Ecol.*, 2000, 40: 104–113
- [7] Yu Y H, Zhang W J, Yan Q Y. The feasibility for application of DNA fingerprinting to community-level life system [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28: 457—463 [余育和,张文静, 颜庆云. DNA 指纹分析技术在群落级生命系统应用的可能性. 水生生物学报, 2004, 28: 457—463]
- [8] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S. Corresponding relations between DNA fingerprinting topological structure and species composition of plankton community in Dongting Lake [J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25: 2221-2226 [颜庆云,余育和,冯伟松. 洞庭 湖浮游生物群落DNA指纹拓扑结构与物种组成对应关系. 生态学报, 2005, 25: 2221-2226]
- [9] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, et al. Relationship between DNA fingerprinting of plankton community and physico-chemical factors [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29: 601—606 [颜 庆云,余育和,冯伟松,等. 洞庭湖浮游生物群落 DNA 指纹与 理化因子的关系. 水生生物学报, 2005, 29: 601—606]
- [10] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**: 6531-6535

- [11] Li H, Reynolds J F. On definition and quantification of heterogeneity [J]. Oikos, 1995, 73: 280-284
- [12] Piontkovski S A, Williams R. Multiscale variability of tropical ocean zooplankton biomass [J]. *ICES J. Mar. Sci.*, 1995, **52**: 643–656
- [13] Davies K F, Chesson P, Harrison S, *et al.* Spatial heterogeneity explains the scale dependence of the native-exotic diversity relationship [J]. *Ecology*, 2005, 86: 1602–1610
- [14] Zehr J P, Voytek M A. Molecular ecology of aquatic communities: reflections and future directions [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 401: 1-8
- [15] López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, et al. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton [J]. Nature, 2001, 409: 603–607
- [16] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, *et al.* DNA polymorphism of the plankton community and its relationships to species composition in the Three Gorges Reservoir Region of the Yangtze River [J]. *J. Freshw. Ecol.*, 2006, 21: 385–390
- [17] Yan Q Y, Yu Y H, Feng W S, *et al.* Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factors in Lake Donghu [J]. *Micro. Ecol.*, 2007, 54: 290–297
- [18] Yu Y H, Yan Q Y, Feng W S. Spatiotemporal heterogeneity of plankton communities in Lake Donghu, China, as revealed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and its relation to biotic and abiotic factors [J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008, **63**: 328–337

SPATIAL HETEROGENEITY OF DNA FINGERPRINTS OF PLANKTON COMMUNITIES IN THE THREE-GORGES RESERVOIR REGION

YAN Qing-Yun^{1,3}, YU Yu-He¹, FENG Wei-Song¹, YU Zhi-Gang² and CHEN Hong-Tao²

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: In order to study the ecological impact of large-scale water conservancy engineering, spatial heterogeneity of plankton communities in the Three-Gorges Reservoir region was studied by random amplified polymorphic DNA (RAPD). The results were: (1) 13 of 60 screened random primers used in the study amplified a total of 131 observable bands, 97.7% of which were the polymorphic bands; only three bands were detected at all the sampling sites, and 38.2% of the total bands restricted to single sampling sites; (2) the numbers of amplified bands at Zigui (ZG), Badong (BD), Wushan (WS), Fengjie (FJ) and Wanzhou (WZ) were 59, 52, 58, 47 and 38, respectively; the individual bands detected at ZG was the most and WZ got the least; (3) cluster analysis based on RAPD fingerprints showed that the target communities could be grouped into three clusters: WZ and FJ comprised a single cluster respectively, and the third cluster contained the other three sampling sites (ZG, BD and WS). These results indicated that the spatial heterogeneity was correlated to the geographical locations and environmental conditions. Therefore, DNA fingerprinting of plankton community could play an important role in monitoring the spatiotemporal dynamics and in evaluating the ecological impacts of large-scale water conservancy engineering. It also could offer useful document for elucidating the molecular mechanism of some ecological problems.

Key words: Spatial heterogeneity; DNA fingerprinting; Plankton community; Three-Gorges Reservoir region

《水生生物学报》编辑委员会

ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA EDITORIAL BOARD

主	编	Chief Editor	桂建芳	GUI Jian–Fang			
副主	主编	Associate Editors	解绶启	XIE Shou–Qi			
委	员	Members (以姓氏	拼音为序)			
		蔡庆华 CAI Qing-	-Hua	曹文宣	CAO Wen-Xuan	常剑波	CHANG Jian–Bo
		陈家宽 CHEN Jia-	-Kuan	陈宜瑜	CHEN Yi-Yu	陈毅峰	CHEN Yi-Feng
		高坤山 GAO Kun-	-Shan	何舜平	HE Shun-Ping	洪云汉	HONG Yun–Han
		胡征宇 HU Zheng	-Yu	李文鑫	LI Wen-Xin	李钟杰	LI Zhong–Jie
		林浩然 LIN Hao-	Ran	刘建康	LIU Jian–Kang	曲久辉	QU Jiu–Hui
		麦康森 MAI Kang-Sen		聂 品	NIE Pin	唐启升	TANG Qi-Sheng
		沈 韫 芬 S	HEN	宋立荣	SONG Li-Rong	吴振斌	WU Zhen–Bin
		Yun-Fen		吴灶和	WU Zao-He	谢平	XIE Ping
		土 J WANG Di	ng	肖伟	XIAO Wei	熊思岳	XIONG Si-Yue
		相建母 XIANG Jia	in-Hai	熊邦喜	XIONG Bang–Xi	于 丹	YU Dan
		谢小车 XIE Xiao-	Jun	杨先乐	YANG Xian-Le	张奇亚	ZHANG Qi-Ya
		保旭朱 XU Xu-D	ong	游 力	YOU Li		
	余具兴 YU Q₁−Xing		Harald R	osenthal (德国)			
心た	日立口	木作言 ZHU Zuo-	-Yan		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	# VIIV	
細ギ	日回り	Eunorial onnce	仙利住	DU AIN-Lneng ±	: 」 whing Qin 宗	西 YU Ai	