

緑藻スジアオノリの高温域における生長と光合成および呼吸特性

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村瀬, 昇, 水上, 譲, 鬼頭, 鈞, 福本, 依子, 南, 元洋, 原口, 展子, 廣澤, 晃 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011801

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



緑藻スジアオノリの高温域における生長と光合成および呼吸特性

村瀬 昇^{*1}・水上 譲^{*1}・鬼頭 鈞^{*1}
福本依子^{*1}・南 元洋^{*1}・原口展子^{*1}・廣澤 晃^{*2}

Growth, Photosynthesis and Respiration Characteristics in a High Temperature Region of *Enteromorpha prolifera*.

Noboru Murase^{*1}, Yuzuru Mizukami^{*1}, Hitoshi Kito^{*1}
Yoriko Fukumoto^{*1}, Motohiro Minami^{*1}, Hiroko Haraguchi^{*1}, and Akira Hirosawa^{*2}

The growth, photosynthesis and respiration of three strains of *Enteromorpha prolifera* were investigated under a high temperature region (20°C–35°C) in an indoor culture. Culture experiments were carried out at 5 °C interval from 20°C to 35°C and at 2 °C interval from 26°C to 36°C in order to clarify the upper critical temperature for growth of a culture strain (NH strain) and two wild strains (KG and AW strains). Growth of NH strain was very fast from 20°C to 28°C. The growth of KG strain was fast next to NH strain. The upper critical temperatures for growth were 30°C for AW strain, 32°C for KG strain, and 34°C for NH strain. The relative photosynthetic and respiratory rates at 30°C and 35°C to that at 20°C were higher in NH and KG strains than in AW strain. These results indicate that the high upper critical temperature of NH and KG strains in a high temperature region (20°C–35°C) is mainly caused by a high photosynthetic activity. The physiological characteristics in high temperature region of *E. prolifera* are important for stable cultivation.

1 緒 言

スジアオノリ *Enteromorpha prolifera* は、緑藻綱アオノリ属に分類される。アオノリ属は日本には7種あり¹⁾、そのうち水産的に重要なものとしては、スジアオノリ *E. prolifera*、ボウアオノリ *E. intestinalis*、ヒラアオノリ *E. compressa*、ウスバアオノリ *E. linza* などが挙げられる。特に、スジアオノリは濃緑色で軟らかく風味が良いため、主に徳島県吉野川をはじめ高知県、千葉県、岡山県、山口県などの河口域で盛んに養殖されている。

スジアオノリ養殖においては、採苗から収穫までの大部分の過程が養殖場の自然環境条件に影響を受けやすいため、養殖生産量を安定させるには人工採苗技術や温度耐性のある優良株の開発が必要である。近年、母藻細断法による人工採苗技術²⁾や種網の冷凍保存技術³⁾により、採苗の安定確保が促進されつつある。しかし、スジアオノリの養殖は、徳島県では春季と秋季の水温が12°C–23°Cの時期に限られ、養殖期間が短いという問題点がある⁴⁾。その

ため、養殖期間の延長を目的として、秋季あるいは春季の高温時でも生長できる株の選抜育種が進められている。

本研究は、スジアオノリの高温域における生長特性と光合成・温度特性を把握し、生育地が異なる3つの株の生育上限温度を比較、検討することにより、養殖において高温耐性が備わった優良株の選定に資することを目的とする。

2 材料と方法

2.1 材料

本研究では、徳島県吉野川のスジアオノリ養殖場から採集したNH株（1999年5月採集）、香川県内の河川から採集したKG株（1999年9月に漁業者による持ち込み）および山口県粟野川で採集したAW株（2000年6月採集）を材料とした。

採集したNH株およびKG株については徳島県水産研究センター鳴戸分場で、AW株については水産大学校生物生産学科水産植物学研究室で母藻細断法により継代培養を行っ

2004年10月14日受付. Received October 14, 2004.

* 1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

* 2 徳島県立農林水産総合技術センター水産研究所 (Fisheries Research Institute, Tokushima Agriculture, Forestry and Fisheries Technology center)

た。成熟を促進させるために採集した株のうち20cm以上に伸長した良好な個体を1-3mm角に細断し、滅菌海水が入った腰高シャーレ(容量約250ml)内に散布し、温度20℃、光量 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12時間明期, 12時間暗期)で静置して培養した。3-7日後に腰高シャーレの内側と水面との境界付近に集まった生殖細胞を採取した。それをクレモナ糸と滅菌海水が入った腰高シャーレ内に散布して静置培養した。さらに、糸上で20cm前後まで伸長した個体を用いて、前述と同様の操作および条件で継代を繰り返した。

2000年8月には水産大学の研究室にNH株およびKG株が持ち込まれ、AW株をあわせた3つの株について、生長と光合成および呼吸測定の実験を開始するまで予備培養を行った。20cm前後に伸長した個体を用いて、継代培養と同様の操作で成熟を促進させ、生殖細胞を採取した。それをクレモナ糸に採苗し、温度20℃、光量 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12時間明期, 12時間暗期)で、通気して培養した。培養液には滅菌海水1lあたり10mlのES-enrichmentを加えたPES培地と蒸留水とを2:1に調整したものを使用した。この予備培養を3回繰り返してからそれぞれの実験を行った。

2.2 温度別生長実験

生長実験を開始する前日には、予備培養中の3つの株からそれぞれ45個体ずつ選び、個体を識別するため、長さを長(5.0~11.0cm)、中(4.0~5.0cm)および短(1.5~4.0cm)の3段階に分けた。生長実験は培養庫を用いて温度20, 25, 30および35℃の4温度区を設けた。また、高温下での生長限界を明らかにするために流水式温度勾配培養システムを用いて温度26, 28, 30, 32, 34および36℃の6温度区を設けた。流水式温度勾配培養システムは、図1aに示すように冷却恒温装置(タイテックCL-150, 図1, WP)、6つの小室に分かれた大型水槽(171×48×16cm, 同, LWB)および照明装置(Hitachi 27W蛍光管, 同, L)で構成される。大型アクリル水槽の各小室に置かれた小型水槽(22×36×16cm, 同, SWB)には、温度調節器(井内TR-2, 同, TC)が取り付けられている(図1b)。冷却恒温装置により24℃で維持された水が大型水槽内の各小室を循環し、各小室内の小型水槽内の水は温度調節器により設定した温度が維持できる。このシステムにより2℃間隔という細かい温度設定が可能となり、各小型水槽内の温度精度は $\pm 0.1^\circ\text{C}$

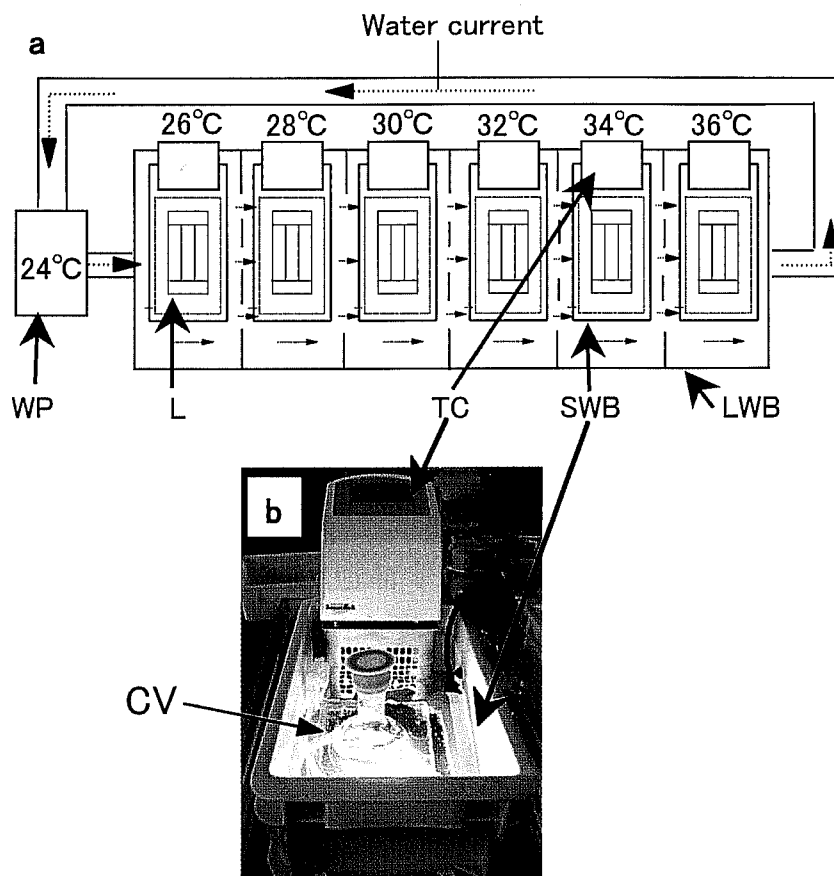


Fig. 1. Schematic diagram of temperature-gradient culture apparatus (a) and small water bath (b). WP, water pump with temperature controller; L, lamps; TC, temperature controller, SWB, small water bath; LWB, large water bath; CV, culture vessel.

の範囲内であった。各小型水槽内には、予備培養で用いた同じ培養液と予備培養後の株を5個体選んで入れた培養ビンを各株ごとに設置した(図1b, CV)。光条件は、光量 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、12時間明期、12時間暗期とした。培養液は2日ごとの生長測定時に交換した。

生長については、2日ごとに基部から先端までの長さを測定し、各個体ごとに生長倍率(測定日の長さ/開始日の長さ)を求めた。良好に生長している未成熟の個体(図2a)が成熟した場合(図2b)には、成熟部分を差し引いた長さを測定した。個体全体が枯死して色が抜けた場合(図2c)には、残存する部分の長さを測定し実験を終了

した。

2.3 光合成および呼吸測定

光合成および呼吸速度の測定には、大型試料用に改良されたプロダクトメーター(作動式検容計)を使用した⁵⁾。反応容器(容量200ml)および対照容器には温度別生長実験と同じ培養液を50ml入れ、さらに反応容器には湿重量が0.1~1gになるように未成熟の個体を入れた。光源には蛍光灯(Hitachi 27W蛍光管)を用い、光量は $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。温度を20, 30および35℃の順に上昇させ、単位時間当たりの酸素放出量を測定した。また、呼吸測定の場合には反応容器および対照容器にアルミ箔をまいて光を遮断し、光合成測定と同様に温度を20, 30および35℃の順に上昇させ、単位時間当たりの酸素吸収量を測定した。光合成および呼吸測定は試料を変えてそれぞれ6回実施した。測定終了後、80℃で10時間送風乾燥し、乾重量を測定した。光合成および呼吸活性は乾重量1mg、1時間当たりの酸素放出量および吸収量で表した。また、20℃に対する、30℃および35℃での光合成および呼吸活性の相対値をそれぞれ求めた。

3 結 果

3.1 生 長

温度20, 25および30℃におけるNH株, KG株およびAW株の培養6日目の生長倍率を図3に示した。NH株につい

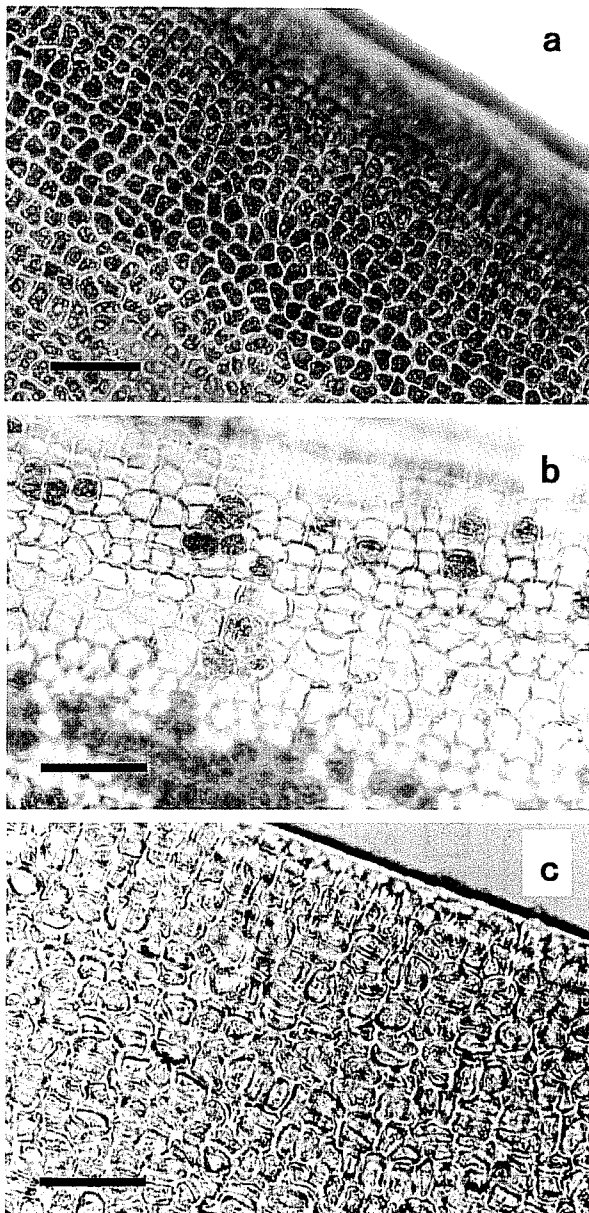


Fig. 2. Surface views of *Enteromorpha prolifera* fronds showing immature cells (a), mature cells (b) and discolored cells (c). Scale bars indicate $50 \mu\text{m}$.

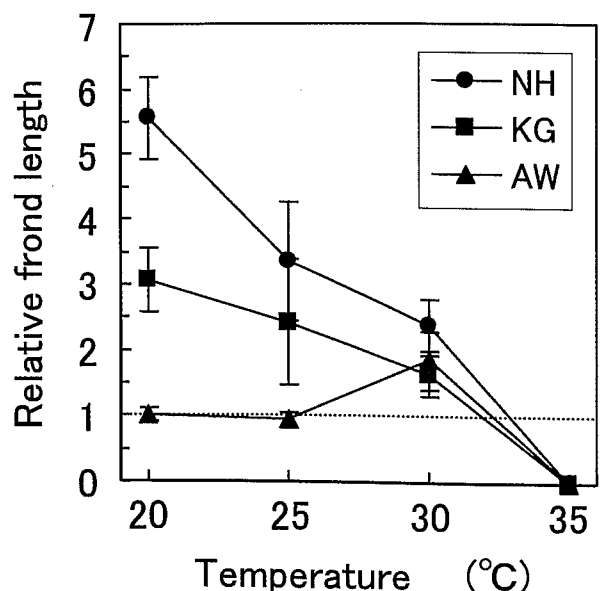


Fig. 3. Relative frond lengths of NH, KG and AW strains of *E. prolifera* at 20°C, 25°C, 30°C and 35°C under $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 6 days in the culture. Vertical bars indicate S.D.

ては、培養4日目まで25℃、20℃、30℃の順で良好に伸長した。培養6日目には、20℃では3個体、25℃では全5個体で成熟部分が認められたため、生長倍率は20℃で 5.56 ± 0.64 倍（平均値±標準偏差、以下同様）と高い値を示し、25℃では成熟による生殖細胞の放出により 3.34 ± 0.91 倍であった。一方、30℃では成熟個体が認められなかったが、生長倍率は 2.38 ± 0.38 倍であった。KG株については、培養6日目まで20℃、25℃、30℃の順で良好な生長が認められ、それぞれ全5個体、4個体および1個体で成熟部分が観察された。培養6日目の生長倍率は、20℃で 3.05 ± 0.49

倍、25℃で 2.42 ± 0.95 倍、30℃で 1.62 ± 0.31 倍であった。AW株については、成熟が他の2株よりも早期に観察され、培養2日目までに20℃および30℃では全5個体、25℃では4個体で成熟部分が認められた。培養6日目の生長倍率は、20℃で 1.01 ± 0.10 倍、25℃で 0.93 ± 0.11 倍、30℃で 1.84 ± 0.45 倍であった。35℃では、いずれの株とも培養2日目までに全ての個体で枯死が認められた。20℃および25℃ではNH株は、成熟が認められているにも関わらず、他の株に比べて良好な生長が認められた。次いで、KG株の生長が良好であった。

温度26、28、30、32、34および36℃におけるNH株、KG株およびAW株の培養6日目の生長倍率を図4に示した。26～32℃では、NH株は成熟や枯死した部分が観察されず、他の2株に比べて良好な生長が認められた。枯死部分はNH株が34℃以上、KG株およびAW株が32℃以上で認められた。生長倍率が高い値を示した温度区は、NH株が26℃で 5.39 ± 0.83 倍、KG株が28℃で 1.83 ± 0.63 倍、AW株が30℃で 1.52 ± 0.28 倍を示した。生育可能な上限温度は、生長倍率が1以上を示す温度のうちの最高温度で、NH株が34℃で 1.22 ± 0.13 倍、KG株が32℃で 1.36 ± 0.10 倍、AW株が30℃で 1.52 ± 0.28 倍あった。36℃でいずれの株も培養2日目までに全ての個体で枯死が認められた。

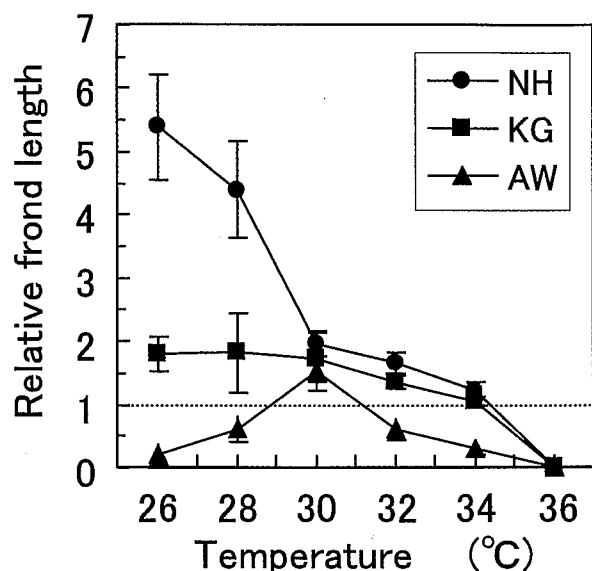


Fig. 4. Relative frond lengths of NH, KG and AW strains of *E. prolifera* at 26℃, 28℃, 30℃, 32℃, 34℃ and 36℃ under $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 6 days in the culture. Vertical bars indicate S.D.

3.2 光合成・呼吸活性

光合成・呼吸測定の結果を図5に示した。NH株では、光合成速度は20℃で $3.14 \pm 0.78 \mu\text{l O}_2 \text{mg}^{-1} (\text{dry. wt.}) \text{h}^{-1}$ 、30℃で $4.72 \pm 0.88 \mu\text{l O}_2 \text{mg}^{-1} (\text{dry. wt.}) \text{h}^{-1}$ 、35℃で $4.21 \pm 0.68 \mu\text{l O}_2 \text{mg}^{-1} (\text{dry. wt.}) \text{h}^{-1}$ を示し、呼吸速度は20℃で

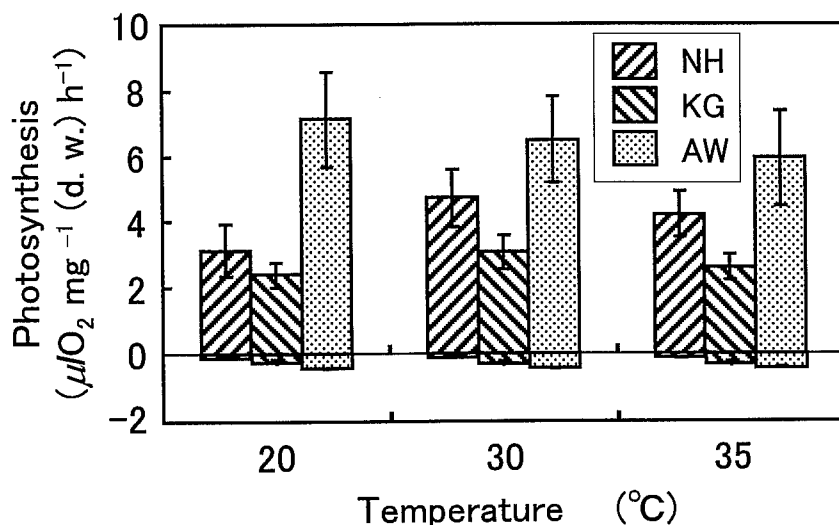


Fig. 5. Photosynthetic and respiratory rates of NH, KG and AW strains of *E. prolifera* at 20℃, 30℃ and 35℃. Measurement of photosynthesis was carried out under $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Respiration was measured under dark condition. Vertical bars indicate S.D.

4 考 察

$0.129 \pm 0.024 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 30°C で $0.128 \pm 0.021 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 35°C で $0.141 \pm 0.026 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$ を示した (図 5)。 20°C に対する 30°C および 35°C での光合成および呼吸速度の相対値を表 1 に示す。 20°C に対する光合成速度の相対値は 30°C で $152.3 \pm 11.40\%$, 35°C で $136.6 \pm 13.6\%$, 呼吸速度の相対値は 30°C で $100.4 \pm 2.0\%$, 35°C で $109.8 \pm 2.3\%$ であった。このように NH 株の 30°C および 35°C では, 光合成活性が 20°C に比べ高かったが, 呼吸活性は 20°C とほぼ同じか, やや高かった。

KG 株では, 光合成速度は 20°C で $2.41 \pm 0.38 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 30°C で $3.06 \pm 0.51 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 35°C で $2.61 \pm 0.40 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$ を示し, 呼吸速度は 20°C で $0.271 \pm 0.085 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 30°C で $0.300 \pm 0.094 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 35°C で $0.323 \pm 0.080 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$ を示した (図 5)。光合成速度の相対値は 30°C で $127.4 \pm 2.6\%$, 35°C で $109.0 \pm 5.8\%$, 呼吸速度の相対値は 30°C で $110.9 \pm 17.7\%$, 35°C で $122.0 \pm 18.3\%$ であった (表 1)。このように KG 株の 30°C および 35°C では, 光合成活性は NH 株に次いで高く, 呼吸活性は両温度区とも 20°C より高かった。

AW 株では, 光合成速度は 20°C で $7.13 \pm 1.46 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 30°C で $6.49 \pm 1.33 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 35°C で $5.92 \pm 1.44 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$ を示し, 呼吸速度は 20°C で $0.454 \pm 0.006 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 30°C で $0.461 \pm 0.002 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$, 35°C で $0.432 \pm 0.014 \mu\text{l O}_2\text{mg}^{-1}(\text{dry. wt.})\text{h}^{-1}$ を示した (図 5)。光合成速度の相対値は 30°C で $91.9 \pm 12.7\%$, 35°C で $85.9 \pm 27.0\%$, 呼吸速度の相対値は 30°C で $101.4 \pm 1.23\%$, 35°C で $95.1 \pm 1.81\%$ であった (表 1)。このように AW 株の 30°C および 35°C では, 光合成活性は 20°C と比べると低く, 呼吸活性は 20°C とほぼ同じか, やや低かった。

本研究では, スジアオノリの養殖株 (NH 株) と野生株 (KG 株と AW 株) を対象として $20^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ の高温域における生長特性と光合成および呼吸特性について, 5°C および 2°C 間隔での培養実験と光合成および呼吸測定により精査した。

生長については, 20°C および 25°C では, NH 株と KG 株は AW 株に比べて良好であった。スジアオノリは, 成熟が始まると藻体の成熟部分が流失し, 生長が低下することが知られている⁶⁾。したがって, 早期に成熟が始まる AW 株に比べて NH 株と KG 株では, 成熟による藻体の脱落よりも伸長する速度が上回ったため, 良好な生長が認められたと考えられる。生育適温については, 成熟により藻体の一部が脱落し, その後の伸長が認められなかったことから, 各株間で明瞭な差異を見いだすことができなかった。

$26 \sim 36^\circ\text{C}$ までの 2°C 間隔の培養実験結果からは, 成熟および生育が可能な上限温度を明らかにすることができた。成熟はいずれの株も 30°C 以下で認められ, 32°C 以上では藻体の色が抜けて, その後伸長せず枯死することが明らかになった。生育上限温度は, 養殖株の NH 株が 34°C と最も高く, 次いで野生株の KG 株が 32°C , AW 株が 30°C の順であった。本研究により, 長年に亘り養殖に適した株として選抜されてきた NH 株の生育温度特性として $20^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ での生長が良好で, 生育限界温度も高いことが明らかとなった。KG 株については, 養殖業者が比較的水温が高い 9 月に香川県内の河川で採集した株である。KG 株は, 30°C 以下での生長と生育限界温度が NH 株に次いで高いことから, 高温域でも生長する株として養殖現場での活用が期待できる。

各株の高温域における光合成活性および呼吸測定については, 光量 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のもと温度 20°C , 30°C および

Table. 1. Percentages of photosynthetic and respirator rate at 30°C and 35°C to that at 20°C in each strain, respectively

Strain	Photosynthesis or Respiration	Temperature ($^\circ\text{C}$)	
		30	35
NH	Photosynthesis	152.3 ± 11.4	136.6 ± 13.6
	Respiration	100.4 ± 2.0	109.8 ± 2.3
KG	Photosynthesis	127.4 ± 2.6	109.0 ± 5.8
	Respiration	110.9 ± 17.7	122.0 ± 18.3
AW	Photosynthesis	91.9 ± 12.7	85.9 ± 27.0
	Respiration	101.4 ± 1.2	95.1 ± 1.8

Data are mean $\pm$ S.D.

35℃で行った。Mizusawaらは、夏季に潮間帯上部に生育するホソエダアオノリ *E. crinita* の光合成測定を行い、光量 $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のもとでは光合成最適温度が35℃、光合成速度が約 $4 \mu\text{l O}_2 \text{mg}^{-1} (\text{dry. wt.}) \text{h}^{-1}$ と報告した⁷⁾。種や測定条件が異なるものの、本研究で用いた3つの株の35℃における光合成速度は2.6~5.9 $\mu\text{l O}_2 \text{mg}^{-1} (\text{dry. wt.}) \text{h}^{-1}$ であり、前述の報告とほぼ同じ値を示した。

アオノリ属の光合成最適温度については、前川・杉山が夏季におけるホソエダアオノリとヒラアオノリで報告している⁸⁾。これによると、光合成最適温度は潮間帯上部に生育するホソエダアオノリで30.0℃、潮間帯中部に生育するヒラアオノリで25.0℃であり、光合成最適温度が高い海藻ほど潮間帯上部など高温環境下で生育していた。本研究では、NH株およびKG株では30℃、AW株ではそれより低い温度に光合成最適温度があると考えられ、NH株とKG株は高温環境下に適した光合成特性を有することが示唆された。

高温域 (30℃および35℃) での光合成および呼吸活性と生育上限温度との関係を詳しくみると、20℃に比べて光合成活性がかなり高くなり、呼吸活性がほぼ同じか、やや高くなったNH株では、生育上限温度が最も高い値を示した。また、光合成および呼吸活性がともに高くなったKG株では、NH株の次に生育上限温度が高い値を示した。一方、20℃に比べて高温域での光合成活性が低下し、呼吸活性がほぼ同じか、やや低下したAW株では、生育上限温度が最も低い値を示した。このように、生長の基礎である光合成および呼吸活性は生育上限温度に大きく関与していることが明らかとなった。

藻体の脱色により枯死に至った温度は、AW株が32℃、KG株が34℃以上の高温域で認められたにもかかわらず、両株の光合成活性は30℃および35℃でも比較的高い値を示した。片山らは、光合成測定時に短時間内に起こる藻体の温度馴化が高温域において強光下で促進されると指摘している⁹⁾。本研究の光合成測定では、測定温度に移した直後にわずかな時間で光合成速度を光量 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で求めているため、高温域での光合成活性が高まったと考えられる。このように光合成測定と生長実験での結果は完全に一致しなかったが、今後は時間要因を考慮して、長期間にわたる生長実験と光合成測定を組み合わせるなどの実験方法を検討する必要がある。

NH株あるいはKG株が高温域に適した生長、光合成および呼吸特性を有することは、光合成あるいは呼吸に関する酵素¹⁰⁾ や熱ショックタンパク質¹¹⁾ などが関与している可

能性が考えられる。しかし、このような温度に対する生化学的研究については海藻類では不明な点が多く、スジアオノリ以外の海藻も含めてさらに詳しく検討する必要がある。

以上のことから、NH株およびKG株において高温域での良好な生長と高い生育限界温度は、高温に適応した光合成および呼吸特性によるものと考えられた。特に、KG株については、現在養殖されているNH株とともに、秋季の養殖開始時期を早めたり、春季の養殖終期を遅らせるなどの養殖期間を拡大させることができる。また、KG株は生長量も比較的大きいことから安定した収量を得られるため、養殖に適した株であると考えられる。今後はKG株の実用化に向けて、自生が確認された河川において屋外での養殖試験などを実施する必要がある。さらに、本研究のような詳細な温度設定による培養実験や光合成および呼吸測定を実施することは、スジアオノリ養殖において選抜株の生理生態的特性が解明できるだけでなく、温暖化による水温上昇が養殖生産量に与える影響を評価するためにも有効な研究方法であると考えられる。

文 献

- 1) 吉田忠生：新日本海藻誌，第1版，内田老鶴圃，東京，1998，pp. 33-36.
- 2) 團昭紀・大野正夫・松岡正義：水産増殖，45(1)，5-8 (1997).
- 3) 團昭紀・広沢晃・牧野賢治・大野正夫・能登谷正浩：水産増殖，51(1)，7-14 (2003).
- 4) 徳島水試：徳島県，アオノリ養殖生産管理技術に関する総括報告書，平成8~10年度地域重要新技術開発促進事業，1999，pp. 1-49.
- 5) 横浜康継・前川行幸：藻類，36，29-36 (1988).
- 6) 平岡雅規・團昭紀・萩平将・大野正夫：日水誌，65(2)，302-303 (1999).
- 7) M. Mizusawa, A. Kageyama, and Y. Yokohama: *Jap. J. Phycol.*, 26, 109-114 (1978).
- 8) 前川行幸・杉山篤：水産増殖，43(4)，429-435 (1995).
- 9) 片山舒康・佐藤弘典・横浜康継：藻類，38，94 (1990).
- 10) Y. Yokohama: *Int. Revue Ges. Hydrobiol.*, 58, 463-472 (1973).
- 11) 吉田静夫：温度，“現代植物生理学4-環境応答”(新免輝男編)，朝倉書店，東京，1991，pp.142-158.