

一株基因 II 型新城疫强毒株的分子特性

秦卓明^{1,2}, 马保臣¹, 贾 强², 欧阳文军², 崔治中^{1*}

(¹ 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

(² 山东农业科学院家禽研究所 济南 250100)

摘 要 :从患病肉鸡群分离到一株新城疫病毒(Newcastle Disease virus, NDV)SQZ04。经蚀斑纯化后接种 40 日龄 SPF 鸡可诱发典型病变。经蚀斑纯化前和后的 MDT 为 50.5h 和 51.2h, ICPI 为 2.0 和 1.92, IVPI 为 2.8 和 2.68, 表明属强毒株。但 F 基因分型表明 SQZ04 属基因 II 型, 而且其与已知基因 II 型的疫苗株 LaSota、B1 和 Texas48 的同源性分别为 99.3%、98.7% 和 96.9%, 显著高于与基因 VII 或 IX 型强毒株的同源性 88.3%~88.6% 或 91.3%~92.1%。这是国内第一株属于基因 II 型的 NDV 强毒株。SQZ04 F 多肽氨基酸裂解位点的序列为¹¹¹GGRQGRL¹¹⁷, 与弱毒株序列完全相同, 这也是国内外首次报道具有这一氨基酸序列的强毒野毒株。然而, SQZ04 株与其他已知强毒株的 HN 氨基酸同源性高达 95.3%~97.3%, 显著高于与弱毒株 LaSota 等的同源性 87.8%~89.5%。

关键词 :新城疫病毒;毒力;基因型;氨基酸;F 基因;HN 基因

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2006)06-0912-05

新城疫(Newcastle disease, ND)是由属禽副黏病毒-1 型的 NDV 引起禽的一种急性、烈性传染病, 主要侵害鸡和火鸡, 发病率和死亡率均很高, 是危害我国养禽业的最严重疫病之一^[1]。特别是 2001 年 4 月以来, 山东、江苏等我国养禽密集地区新城疫流行严重, 呈现新特点:一是高抗体水平(HI 抗体滴度平均在 10^8 以上)的产蛋鸡发病^[2];二是经过传统疫苗免疫的雏鸡发病(发病率、死亡率较高, 后期出现较多的神经症状);三是鹅等水禽发病, 而传统则不感染^[3]。

大量的研究表明, NDV F 蛋白 F1/F2 多肽裂解位点氨基酸的基序和 NDV 的毒力密切相关^[4,5], 其致病机理已通过反向遗传操作技术得以证实^[6]。F 蛋白通常以无活性的 F₀ 前体形式存在, 但 F₀ 必须裂解成以二硫键连接的 F1 和 F2 亚单位后, 才使病毒具有感染性。F 蛋白能否被裂解取决于病毒毒力的强弱和宿主细胞的特性。F₀ 的裂解是病毒与细胞融合所必需的, 也是病毒感染所必需的。强毒株的氨基酸基序为:¹¹²R/K-R-Q-K/R-R-F¹¹⁷, 弱毒株的基序为:¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R-L¹¹⁷, 两种情况都是在 117 位前裂解开^[7,8]。强毒株 F₀ 分子能被宿主体内多种细胞蛋白酶裂解, 对多种细胞具有感染力, 并可

导致全身感染, 这是 F 基因致病性的基础。而弱毒株的 F 蛋白仅在少数特殊类型的细胞中裂解, 因此, 仅对少数细胞具有感染力, 临床上表现为局部感染。OIE 已将此作为 NDV 强弱毒的重要分子诊断手段^[9]。基因 II 型 NDV 中除 Texas48 为强毒外, 其余大部分为弱毒或中等毒力^[10]。但迄今为止, 国内尚未见基因 II 型强毒的报道。本文在研究中发现了一株 NDV, 其生物学毒力检测为强毒, 但却属基因 II 型, 更特别的是, 其 F 蛋白多肽裂解位点氨基酸的基序与弱毒完全一致。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血清、菌株和鸡胚:NDV 阳性血清、*Escherichia coli* DH5a、SPF 种蛋和鸡由山东农业科学院家禽所 SPF 鸡场保存和提供。F₄₈E₉ 购自中国兽药监察所。AIV-H₉ 和 AIV-H₅ 抗原购自农业部哈尔滨兽医研究所。AIV-H₉ 和 AIV-H₅ 单因子阳性血清由中国农业大学提供。

1.1.2 主要试剂:TRIzol 为 Gibco BRL 产品;AMV、RNasin、pGEM-T Easy Vector 为 Promega 产品;DNA 回收试剂盒、Ex Taq 聚合酶、dNTPs 和核酸分子量标准

基金项目:山东省科技攻关重点支持项目(030317);山东省自然科学基金支持项目(031020101)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241560;E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

作者简介:秦卓明(1968-),男,河南淮阳人,研究员,在职博士生,主要从事禽病和分子病毒学研究。E-mail: qinzm1997@163.com

其他作者:徐怀英²,袁小远²

收稿日期:2006-02-28;接受日期:2006-04-11;修回日期:2006-06-12

为 TaKaRa 产品。

1.2 病毒纯化和毒力测定

按常规方法进行病原分离和鉴定^[3],按文献[11]法利用 9~10 日龄 SPF 鸡胚对分离株进行鸡胚成纤维细胞(CEF)细胞培养,以琼脂糖覆盖,挑选蚀斑,连续 3 代后,将纯化好的蚀斑克隆冻融 3 次接种 11 日龄 SPF 鸡胚,利用差速离心法浓缩病毒。取 40 日龄 SPF 鸡进行动物回归试验。按照 OIE 方法^[9],利用纯化前后的病毒分别进行鸡胚最小致死量(MDT)、1 日龄雏鸡脑内致死指数(ICPI)和 6 周龄静脉接种指数(IVPI)测定。

1.3 F 和 HN 的序列测定

1.3.1 引物设计:参照 GenBank 中 LaSota 的 F 和 HN 序列,设计两对引物, T₁ 和 T₂ 用于扩增 F 基因全长, HN₁ 和 HN₂ 用于扩增 HN 基因全长。引物序列为: T₁: 5'-ATGGGCTCCAAACCTTCTTAC-3'; T₂: 5'-TTGTAGTGGCTCTCATC-3'; HN₁: 5'-TCCGTTCTACCACATCACCA-3'; HN₂: 5'-CGTCTTCCCAACCATCCTAT-3'。设计通用 RT 引物^[12] 5'-ACGGGTAGAA-3'。引物由上海 Sangon 公司合成。

1.3.2 RT-PCR:按照 TRIzol 试剂盒说明提取病毒 RNA。取 7 μ L RNA 加入 10 μ mol/L RT 引物 4.5 μ L,经 70 $^{\circ}$ C 变性 5min 后,冰浴 5min,依次加入下列体系:

5 \times RT buffer 4 μ L, 10mmol/L dNTP 2 μ L, 40U/ μ L RNasin 0.5 μ L, 10U/ μ L 的 AMV 2 μ L, 反应总体积 20 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 1h。然后 95 $^{\circ}$ C 5min, 冰浴 5min, -20 $^{\circ}$ C 保存。合成的 cDNA 可作为 PCR 扩增 F 和 HN 的模板。PCR 反应体系: cDNA 5 μ L, 上、下游引物各 1.0 μ L, 2 \times PCR Master Mix 25 μ L, 补足灭菌水至 50 μ L。F (HN) 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2.5min (HN 为 2min), 进行 33 (HN 为 32) 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取反应产物, 以标准核酸分子量作对照, 1% 琼脂糖凝胶电泳检验。

1.3.3 转化鉴定和测序:回收 PCR 产物, 将回收物连接 16 $^{\circ}$ C 1.5h 至 pGEM-T Easy Vector, 转化至感受态 DH5 α 均匀涂布于含 Ampicillin、IPTG、X-gal 的 LB 固体培养基平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 14~16h。挑取白色菌落小量培养, 作 *Eco*R I 酶切鉴定和 PCR 扩增双重鉴定。将阳性质粒送上海博采公司测序。

1.4 NDV F 和 HN 基因序列分析

从 GenBank 获取 LaSota、Texas48 等具有不同基因型代表株的 F 和 HN 核苷酸序列, 结合本实验室新近分离的不同基因型的代表性毒株 SDD01、SGM01 等^[12] (表 1)。利用 DNASTar 软件, 参照传统方法进行基因分型^[12-14], 比较 F1/F2 多肽裂解位点氨基酸序列, 同时比较其氨基酸同源性, 绘制系统发育树。

表 1 试验用新城疫毒株

Table 1 Properties of Newcastle disease virus strains in the study

Strain	Location	Host	Year	Virulence	F Gene accession No.	HN Gene accession No.	Genotype
LaSota	USA	Chicken	1946	Lentogenic, vaccine	AF077761	AF077761	II
F ₄₈ E ₉	China	Chicken	1948	velogenic	AF079172	AY997298	IX
Taiwan95	Taiwan	Chicken	1995	velogenic	NDU62620	NDU62620	VII
B1	USA	Fowl	1947	Lentogenic, vaccine	AF309418	AF309418	II
Texas48	USA	Fowl	1948	velogenic	M24711	M24711	II
SDD01	China	Layer	2001	velogenic	DQ227247	DQ234591	VII
SGM01	China	Broiler	2001	velogenic	DQ227248	DQ234592	VII
SQZ04	China	Broiler	2004	velogenic	DQ228921	DQ228934	II
SKY03	China	Broiler	2003	velogenic	DQ227251	DQ234583	VII
SBD02	China	Broiler	2002	velogenic	DQ227252	DQ234586	IX

2 结果

2.1 病毒鉴定和致病性测定

利用分离物接种 SPF 鸡胚, 鸡胚在 48h 内死亡, 死亡胚全身出血、水肿。HA 效价为 2⁸。与 ND、AIV-H₉、AIV-H₅ 和 EDS₇₆ 等阳性血清进行 HI 交叉反应, 分离毒仅与 ND 血清呈阳性反应, 与其他无反应, 证实为 NDV, 命名为 SQZ04。将该毒在 CEF 细胞上进行蚀斑纯化, 连续 3 代后, 72h 在琼脂平板上出现直

径在 1.1~1.2mm 的蚀斑。挑选蚀斑, 冻融 3 次, 接种 SPF 鸡胚, 作为毒种备用。将分离毒接种 10 只 40 日龄 SPF 鸡。SPF 鸡在接种 48h 开始出现呼吸道症状, 96h 全部死亡, 剖检出现气管、十二指肠、泄殖腔粘膜、盲肠扁桃体等出血, 具有新城疫的典型病变, 与现场观察到的完全一致。从死亡鸡中分离到 NDV 病毒。经蚀斑纯化前和后的 MDT 为 50.5h 和 51.2h, ICPI 为 2.0 和 1.92, IVPI 为 2.8 和 2.68, 病毒纯化前后两次检测的结果基本一致, 均显著高于

NDV 强毒的标准。

2.2 RT-PCR 和基因分型

对 SQZ04 的 F 和 HN 基因进行扩增,均获得目的片段,经双向测序、拼接和校正,F 基因开放阅读框架(Open Read Fragment, ORF)全长 1662bp,编码

553 个氨基酸;HN 基因 ORF 全长 1716bp,编码 571 个氨基酸。参考文献方法进行 F 基因分型,SQZ04、Texas48、La Sota 和 B1 为基因 II 型;Taiwan95、SDD01、SGM01 和 SKY03 为基因 VII 型;F₄₈E₉ 和 SBD02 为基因 IX 型(图 1)。

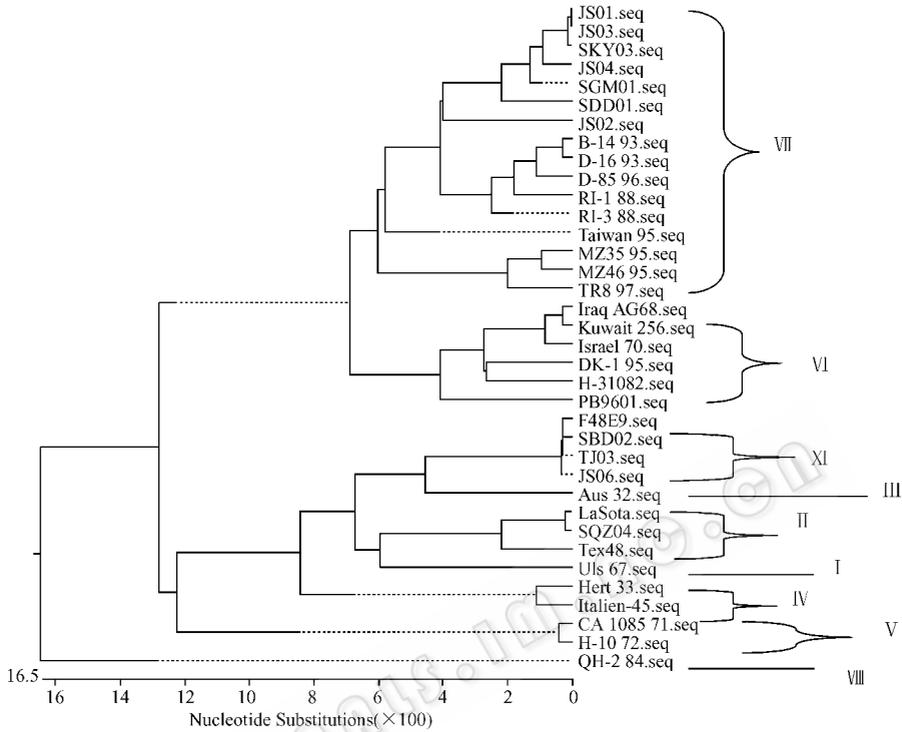


图 1 新城疫病毒 F 基因的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of NDV strains F gene.

2.3 F 蛋白裂解位点氨基酸序列比较

图 2 显示的是 SQZ04 株与 LaSota、F₄₈E₉ 和 Taiwan95 等不同基因型 NDV 的氨基酸序列 F 多肽裂解位点附近 30 个氨基酸序列(91~120)比较。由图 2 可知,不同毒株在 F1/F2 多肽裂解激活位点附近的氨基酸序列(111~117)不同。SQZ04 在此位点

的氨基酸序列为:¹¹¹GGRQGR¹¹⁷,与 NDV 弱毒株 LaSota 和 B1 序列相同。其他已知强毒株 Texas48、F₄₈E₉、Taiwan95、SDD01、SGM01、SBD02 和 SKY03 在此位点的氨基酸序列为:¹¹¹GRRQK(R)RF¹¹⁷,符合 NDV 强毒株氨基酸序列。除 SQZ04 外,其他毒株生物学毒力测定的结果与其强弱毒氨基酸基序相符。

	100	110	120	
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G G R Q G R L I G A			SQZ04.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G G R Q G R L I G A			LaSota.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G G R Q G R L I G A			B1.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G R R Q K R F I G A			Texas48.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G R R Q K R F I G A			Taiwan95.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G R R Q K R F I G A			SDD01.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G R R Q K R F I G A			SGM01.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S V T T S G G R R Q K R F I G A			SKY03.pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S A T T S G G R R Q R R F I G A			F ₄₈ E ₉ .pro
91	L L T P L G D S I R R I Q E S A T T S G G R R Q R R F I G A			SBD02.pro

图 2 NDV 氨基酸同源性比较

Fig.2 Homology comparison of NDV F gene amino acids.

2.4 F 和 HN 基因氨基酸序列同源性的比较

表 2 显示 SQZ04 与其他不同基因型毒株的 F 和 HN 基因氨基酸全长同源性比较。SQZ04 F 基因与已知基因 II 型 LaSota、B1 和 Texas48 的同源性分别为

99.1%、98.7% 和 96.9%;与基因 VII 型的 Taiwan95、SDD01、SGM01 等的同源性为 88.3%~88.6%;与基因 IX 型 F₄₈E₉ 和 SBD02 的同源性分别为 91.3% 和 92.1%,进一步表明 SQZ04 属基因 II 型。

与 F 基因同源性的比较结果相反, SQZ04HN 基因与 LaSota、B1 和 Texas48 和 F₄₈E₉ 等的同源性较低, 仅为 87.8% ~ 89.5%, 而与 Taiwan95 的同源性为 95.3%, 与 SDD01 等新近分离的基因 VII 或 IX 型毒株同源性较高, 达 96.9% ~ 97.3%。

图 3 更直观显示了 SQZ04 与 NDV 不同株之间 HN 基因的遗传距离。SQZ04 与 Taiwan95 以及 SDD01 等新分离的毒株的 HN 遗传距离较近, 而与 LaSota、F₄₈E₉ 等传统毒株遗传距离较远。

表 2 NDV F 和 HN 基因氨基酸全长同源性比较

Table 2 Homologies comparison of NDV F gene and HN gene amino acids

	SQZ04	LaSota	B1	Texas48	Taiwan95	SDD01	SGM01	SXY03	F48E9	SBD02
SQZ04	*	99.3	98.7	96.9	88.6	88.1	88.3	88.3	91.3	92.1
LaSota	88.1	*	99.3	97.5	89.0	88.4	88.6	88.6	91.7	92.4
B1	89.0	98.6	*	96.9	88.4	88.3	88.4	88.4	91.2	91.9
Texas48	87.8	96.7	97.2	*	89.5	88.8	88.8	88.8	92.1	92.4
Taiwan95	95.3	87.8	88.3	87.2	*	95.5	95.7	95.7	92.1	92.2
SDD01	97.4	87.6	88.1	87.4	95.6	*	97.7	97.5	90.8	91.5
SGM01	97.0	87.4	87.9	87.2	95.3	99.5	*	98.2	90.8	91.5
SXY03	96.9	87.6	88.1	87.6	95.1	96.9	96.5	*	91.0	91.7
F48E9	89.5	91.1	91.4	90.6	89.2	89.2	89.0	89.2	*	98.7
SBD02	96.9	87.8	88.3	87.4	96.3	96.9	96.5	96.7	89.9	*

Homologies of F amino acids (top); Homologies of HN amino acids (bottom).

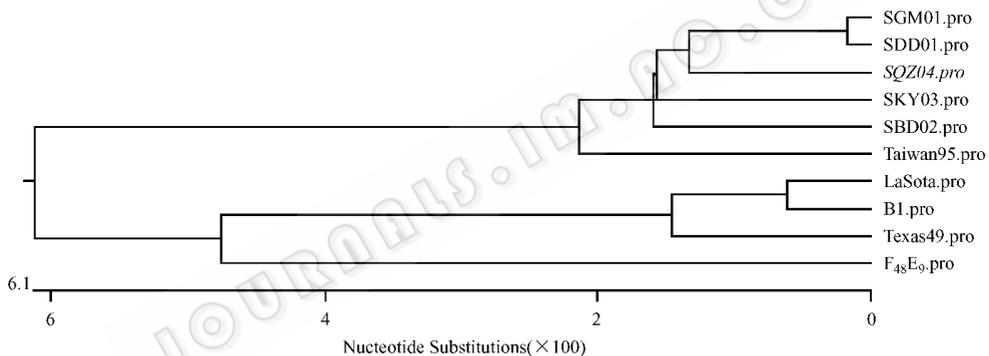


图 3 新城疫病毒 HN 基因氨基酸全长的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of NDV strains HN genes amino acids.

3 讨论

通过经典的 MDT, ICPI 和 IVPI 3 项生物学试验指标, 确定了本研究分离鉴定的 NDV 野毒株 SQZ04 是强毒。然而, 该毒株 F 蛋白裂解位点的氨基酸序列^[11] GGRQGR^[17] 与典型的弱毒株完全相同(图 2)。这是国内外首次显示, NDV 的 F 蛋白裂解位点处的氨基酸基序可能不一定是 NDV 毒力的必要因子。迄今为止, NDV 基因 II 型中除美国 Texas48(其氨基酸序列为强毒)外, 其余大都为弱毒或中等毒力^[10], 由此可见, 基因型与毒力的关系不是必然的。

本实验的结论似乎与 OIE 关于 NDV 强毒的分子诊断相矛盾。但事实上, OIE 仅对 NDV 强毒的氨基酸序列做了规定, 并未对弱毒的氨基酸序列规定。更重要的是, OIE 仍强调把生物学毒力测定作为判定 NDV 毒力强弱的最重要指标^[9]。有关 NDV 强弱

毒的分子诊断方法较多, 很多实验方案就是根据 F 基因裂解位点氨基酸的序列确定的^[5, 15]。本研究曾发现 5 个属基因 II 型的野毒株, 生物学毒力测定既有强毒, 又有弱毒, 而且以强毒居多(未发表材料)。为确保试验结果的可靠性, 本研究对该野毒进行了蚀斑克隆, 且对毒株的生物学毒力分别进行了两次测定, 重复的结果基本一致, 并以生物学实验作为一个毒株毒力评定的最终依据。因此, 在注重分子诊断快捷、方便的同时, 应特别注重与传统方法的结合, 以期得出正确的结果。

此外, 除 F 蛋白外, NDV 的 HN、M 等蛋白对 NDV 的毒力均有不同程度的影响。其中, HN 蛋白参与病毒粒子与细胞受体(神经氨酸)的吸附, 使 F 蛋白能充分接近受体而发生病毒与细胞膜的融合, 因此, 对 NDV 的毒力影响较大^[16]。M 蛋白也可以通过抑制宿主细胞蛋白的合成而协同 F、HN 蛋白的

致病作用^[17]。

尽管 SQZ04 株在 F 基因氨基酸序列上类似于弱毒,但其与目前流行的强毒株 Taiwan95、SDD01、SGM01 等的 HN 基因同源性较高。SQZ04 分离株毒力较强是否与 HN 基因或 M 基因相关有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 崔治中. 我国家禽新城疫流行现状. *中国家禽*, 2002, **24**(4): 4-6.
- [2] 秦卓明, 何叶峰, 徐怀英, 等. 种鸡感染新城疫强毒的诊断及其预防. *山东家禽*, 2002, **5**: 35-37.
- [3] 王永坤, 严维巍, 周继宏, 等. 鸡副粘病毒病防制的探讨. *中国禽业导刊*, 2000, **17**(11): 4-5.
- [4] Saif YM. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋主译. 第十一版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [5] Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol*, 2001, **30**(2): 117-128.
- [6] Panda R, Huang Zhuhui, Elankumaran S, *et al.* Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis*, 2004, **36**: 1-10.
- [7] Nagai Y, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 1976, **69**: 523-538.
- [8] Peeters BP, De Leeuw OS, Koch G, *et al.* Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Vir*, 1999, **73**(6): 5001-5009.

- [9] 世界动物卫生组织(OIE)著. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疫病诊断试验和疫苗标准手册. 农业部畜牧兽医局译. 第一版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.
- [10] Ballagi-Pordany A, Wehman E, Herczeg J, *et al.* Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from F gene. *Arch Virol*, 1996, **141**: 243-261.
- [11] 梁荣, 曹殿军, 阎丽辉, 等. 新城疫病毒分离株的蚀斑纯化及影响蚀斑形成的主要因素. *中国兽医学报*, 2003, **23**(6): 533-535.
- [12] 秦卓明, 马保臣, 何叶峰, 等. 新城疫病毒 HN 和 F 基因遗传变异相关性的研究. *微生物学报*, 2006, **46**(2): 227-232.
- [13] Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, *et al.* Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol*, 1998, **143**(1): 49-64.
- [14] Liu XF, Wan HQ, Ni XX, *et al.* Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle Disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol*, 2003, **148**(7): 1387-1403.
- [15] Kant A, Koch G, Van Roozelaar DJ, *et al.* Differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, 1997, **6**: 837-849.
- [16] Huang Zhuhui, Panda A, Elankumaran S, *et al.* The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *Virus Res*, 2004, **78**(8): 4176-4184.
- [17] Morrison TG, Simpson D. Structure, function and intracellular proceeding of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res*, 1988, **10**: 113-136.

Molecular characterization of a genotype II virulent Newcastle disease virus isolate from chicken

QIN Zhuo-ming^{1,2}, MA Bao-chen¹, JIA Qiang², OUYANG Wen-jun², CUI Zhi-zhong^{1*}

⁽¹⁾ College of Animal Science and Technology, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China

⁽²⁾ Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Ji'nan 250100, China

Abstract: Newcastle disease virus (NDV) field strain SQZ04 was isolated from a broiler flock with typical symptoms and lesions, and cloned by plaque-purification three times. NDV SQZ04 was determined as a virulent strain with MDT of 50.5h and 51.2h, ICPI of 2.0 and 1.92, IVPI of 2.8 and 2.68 respectively before and after plaque-purification. Analysis of F gene indicated that SQZ04 was determined as a virulent gene type II, and its protein amino acid sequence has homologies of 99.3%, 98.7% and 96.9% with published gene type II vaccine strains LaSota, B1, virulent strain Texas48, much higher than homologies of 88.3%~88.6% or 91.3%~92.1% with published gene types VII and IX. This is the first virulent field strain of gene type II reported in China. Further more, the amino acid sequence¹¹¹ GGRQGRL¹¹⁷ in the F protein cleavage site in SQZ04 strain is identical to lentogenic strains of NDV, such as vaccine strains LaSota, B1. This is the first report that virulent NDV could have lentogenic amino acid sequence in the cleavage site of F protein, where HN genes was compared SQZ04 has a higher homologies of 95.3%~97.3% with known velogenic strains, but lower homologies of 87.8%~89.5% with published lentogenic strains.

Keywords: Newcastle disease virus; Virulence; Genotype; Amino acid; F gene; HN gene

Foundation item: Key Project for Science and Technology Development of Shandong Province (030317); Natural Science Foundation of Shandong Province (031020101)

* Corresponding author. Tel: 86-538-8241560; E-mail: zzcui@sdaa.edu.cn

Other authors: XU Huai-ying², YUAN Xiao-yuan²

Received: 28 February 2006/Accepted: 11 April 2006/Revised: 12 June 2006