

大豆细菌性斑点病菌 harpin 编码基因的克隆与表达

姜兆远, 邹晓威, 高洁*, 白庆荣, 张佳环*

(吉林农业大学农学院, 长春 130118)

摘要 【方法、目的】利用 PCR 方法从丁香假单胞菌大豆致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)Psg12 菌株中克隆到 1026 bp 的 *hrp* 基因。将其定向插入到表达载体 pGEX-4T-1 上, 并转化宿主菌 BL21, IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 显示其表达产物为分子量为 61 kDa 的融合蛋白质。【结果】该蛋白质在性质与功能上类似于已发现的 harpins, 即富含甘氨酸、不含半胱氨酸, 热稳定以及对蛋白酶 K 敏感, 能够在烟草上引起典型的过敏反应, 过敏反应还可被真核生物代谢抑制剂抑制。序列比较发现该基因与日本的 Psg r0 菌的 *hrpZ* 相似性为 79%, 与 GenBank 已公布的其它 *hrpZ* 的相似性为 79%~99%, 与其他革兰氏阴性植物病原细菌不存在相似性。【结论】本实验从丁香假单胞菌大豆致病变种(*P. syringae* pv. *glycinea*)Psg12 菌株中克隆到新的 *hrpZ* 基因, 并成功表达, 这是国内首次从 *P. syringae* pv. *glycinea* 菌株中克隆到 *hrpZ* 基因。

关键词: 大豆细菌性斑点病菌; harpin 编码基因; 烟草; 过敏性坏死反应

中图分类号: Q786 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)10-1403-05

大豆细菌性斑点病(*P. syringae* pv. *glycinea*, Psg)是大豆上发生普遍, 危害较严重的细菌病害之一。其病原菌和其他革兰氏阴性植物病原细菌一样, 拥有 *hrp*(hypersensitive response and pathogenicity, *hrp*)基因。*hrp* 基因决定革兰氏阴性植物病原细菌在非寄主植物上的过敏性反应(hypersensitive response, HR)和在寄主植物上的致病性(pathogenicity), *hrp* 基因编码的 harpin 蛋白是引起非寄主植物过敏性反应的主要因子^[1]。自从 1986 年首次报道 *hrp* 基因和 1992 年首次从梨火疫病菌中分离到 *hrpN_{Ea}* 基因产物 harpin 蛋白以来, 人们对植物病原细菌 *hrp* 基因的分布、结构、功能等及 harpin 蛋白进行了大量研究^[2-12]。

有关假单胞菌属(*Pseudomonas*)*hrp* 基因的研究主要集中在丁香假单胞菌(*P. syringae*)中, 已从其种下相关致病变种中克隆了 80 余个 *hrp* 基因, 但到

目前为止国外只有日本的 Inoue Y 从大豆细菌性斑点病菌中克隆和表达了编码 harpin 的基因 *hrpZ*^[13], 国内还未见其他相关报道^[14-19]。本文依据大豆细菌性斑点病菌的 *hrpZ* 基因序列设计引物, 从 Psg 中克隆并表达了具有 harpin 理化特性和生物功能的蛋白, 以期比较丁香假单胞菌 harpin 类蛋白的结构和功能的关系, 开展利用 *hrpZ* 基因创制抗病虫新种质材料以及生物农药的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、培养条件与质粒: 丁香假单胞菌大豆致病变种(*P. syringae* pv. *glycinea* strain 12, Psg12, 本实验室鉴定保存), pGEX-4T-1、pTA2 载体(北京鼎国生物技术有限公司)。

1.1.2 主要试剂和仪器: 各种酶及引物合成(大连

基金项目: 吉林省科技发展计划(20060204-02); 农业部“十一五”转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08003-004); 吉林农业大学科研启动基金资助项目

* 通信作者。Tel: +86-431-84532849; E-mail: jiecao115@126.com(高洁), zhangjiahuan_63@yahoo.com.cn(张佳环)

作者简介: 姜兆远(1980-)男, 吉林人, 博士研究生, 研究方向植物病原细菌。E-mail: jzy_80@163.com

收稿日期: 2009-03-20; 修回日期: 2009-05-06

TaKaRa 公司), 异丙基 β -硫代半乳糖苷 (IPTG)、偏钒酸铵 (ammonium metavanadate, NH_4VO_3)、氯化镧 (lanthanum chloride, LaCl_3) 和蛋白酶 K (Protease K) (上海生工生物工程技术有限公司); 高速冷冻离心机 (T-42K, 德国 KONTRON 公司), 分光光度计 (UV2300, 天美科技有限公司), PCR 仪 (MG48+, 杭州朗基科学仪器有限公司), 超声波细胞粉碎机 (JY9Z-II N, 宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 PCR 扩增和基因克隆

基因组 DNA 和质粒的提取、转化、限制性酶切、凝胶电泳以及 DNA 连接方法参见分子克隆试验指南^[20]。

依据 Inoue 登录 GenBank (登录号: AB112554.1) *hrpZ*_{Psg} 基因的开放阅读框 (ORF), 设计用于扩增 *hrpZ*_{Psg12} 基因的寡核苷酸引物为: 5'-ATGCAGAGTCTCAGTCTTAAAC-3' 和 5'-TCAGGCAGCAGCCTGGTTG-3'。PCR 扩增条件如下: 94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环, 72℃ 10 min。PCR 产物电泳后, 经回收纯化与 pTA2 载体连接验证后测序。

1.3 *hrpZ*_{Psg12} 基因的表达

*hrpZ*_{Psg12} 基因的编码区由下面的一对引物通过 PCR 扩增得到 5'-GGGGATCCATGCAGAGTCTCAGTCTTAAAC-3' (*Bam*HI) 和 5'-GGGAATTCTCAGGCAGCAGCCTGGTTG-3' (*Eco*RI)。PCR 扩增条件同 1.2。扩增产物回收后经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 连同同样双酶切的表达载体 pGEX-4T-1 上, pGEX-4T-1 与重组质粒 pGEX-*hrpZ*_{Psg12} 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后经菌液 PCR 及双酶切鉴定出阳性表达菌株 BL/pGEX-*hrpZ*_{Psg12}。

以重组菌株 BL/pGEX-4T-1 为对照, BL/pGEX-*hrpZ*_{Psg12} 分别在 28℃ 与 37℃ 下经 1 mmol/L IPTG 诱导后, 参照文献^[21] 进行菌体收集、破碎、粗蛋白提取及蛋白表达分析。

1.4 表达产物的鉴定

把表达产物 harpinZ_{Psg12} (浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 分成 4 份, 每份 100 μL , 参照陈功友的方法^[14] 处理。36 h 内观察叶片 HR 发展情况。

1.5 烟草过敏反应测定

参见 Klement 的方法^[22] 将 harpinZ_{Psg12} 注射到烟草叶片中, 36 h 内观察叶片 HR 发展情况。

1.6 基因序列测定和分析

由上海生工生物工程技术有限公司进行序

列测定。在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上进行核苷酸和氨基酸序列相似性比较, DNASTar 软件进行序列分析。

2 结果和分析

2.1 *hrpZ*_{Psg12} 基因的克隆和表达

以 Psg12 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 方法特异性扩增到约 1.0 kb 大小的 DNA 片段。对克隆至 pTA2 上片段的序列测定表明, 其包含一个完整的编码区, 核苷酸序列大小为 1026 bp。将目的基因定向插入表达载体 pGEX-4T-1 连接后转化大肠杆菌 BL21, 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 切鉴定 (图 1) 后获得重组表达菌株 BL/pGEX-*hrpZ*_{Psg12}。在 28℃ 和 37℃ 下经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 分析发现, 2 个温度下 BL/pGEX-*hrpZ*_{Psg12} 都比 BL/pGEX-4T-1 多一条 61 kDa 大小的蛋白质条带, 而 BL/pGEX-4T-1 多一条 27 kDa 的还原型谷胱甘肽 (图 2)。这表明, Psg12 中的编码 34 kDa 大小蛋白的基因 *hrpZ*_{Psg12} 已成功地构建于表达载体 pGEX-4T-1 上, 并在大肠杆菌中表达。

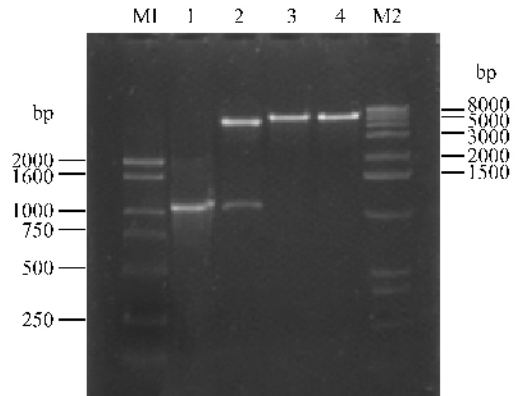


图 1 重组表达质粒 pGEX-*hrpZ*_{Psg12} 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid pGEX-*hrpZ*_{Psg12}. M1. DGL2000 marker; 1. PCR product; 2. pGEX-*hrpZ*_{Psg12}/*Bam*HI + *Eco*RI; 3. pGEX-*hrpZ*_{Psg12}/*Eco*RI; 4. pGEX-*hrpZ*_{Psg12}/*Bam*HI; M2. 1 kb DNA marker.

2.2 *hrpZ*_{Psg12} 基因序列分析

重组质粒 pGEX-*hrpZ*_{Psg12} 序列测定结果显示, *hrpZ*_{Psg12} 基因大小为 1026 bp, 编码 341 个氨基酸, 其编码的蛋白质富含甘氨酸 (13.19%), 不含半胱氨酸。GenBank 数据库中相似性搜索比较显示, 该基因与日本的 Psg r0 菌的 *hrpZ* 相似性为 79%, 氨基酸比对发现 harpinZ_{Psg12} 蛋白与 *hrpZ* 超级家族相似性 31% ~ 99% (表 1)。此结果符合 harpin 在属与属之间相似性低而在同一个属内相似性较高的特点。

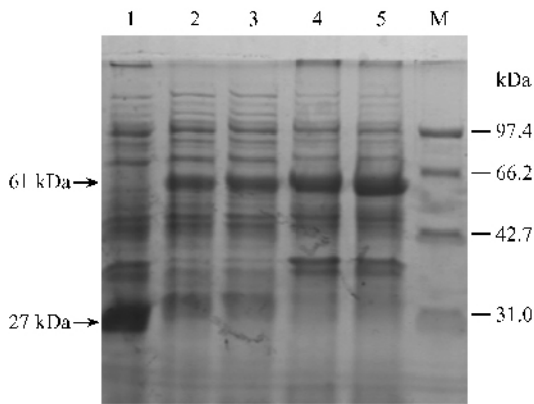


图2 28℃和37℃下诱导表达的融合蛋白 SDS-PAGE 检测

Fig.2 SDS-PAGE detection of an harpin protein expressed in BL21 harboring a reconstructed plasmid BL21/pGEX-hrpZ_{Psg12} at 28℃ and 37℃. 1. BL21/pGEX-4T-1 as control; 2 and 3. Sonicated cell supernatant; 4 and 5. Sonicated cell deposit; 2 and 4. BL21/pGEX-hrpZ_{Psg12} expressed at 28℃; 3 and 5. BL21/pGEX-hrpZ_{Psg12} expressed at 37℃; M. D530S marker.

表1 hrpZ_{Psg12} 及其蛋白质的相似性比较

Table 1 Identity comparison of hrpZ_{Psg12} and harpinZ_{Psg12}

hrp genes	Gene size/ bp	Nucleotide identity /%	Amino acid number	Protein identity /%	Content of gly /%
hrpZ _{Psg12}	1026(FJ853143.1)**	—	341	—	13.19
hrpZ _{Psp} *	1026(AB112577.1)	99	341	99	13.19
hrpZ _{Psa}	1026(AB112576.1)	99	341	99	13.19
hrpZ _{Pss}	1029(AB102727.1)	96	342	96	13.45
hrpZ _{Psa}	1029(AB112575.1)	95	342	95	13.74
hrpZ _{Ps}	753(FJ811970.1)	99	250	99	15.20
hrpZ _{Psg}	1038(AB112554.1)	79	345	76	12.75
hrpZ _{Pc}	1023(AB433910.1)	—	340	31	14.41
hrpW _{Pv}	1689(AY859343.1)	—	560	34	26.25
hrpW _{Pv}	1698(AY859272.1)	—	565	31	26.73
hrpN _{Ec}	1023(Q47278)	—	340	31	16.18
hrpZ _{Psta218}	423(FJ605454.1)	80	140	80	8.57

* Psg, *P. syringae* pv. *glycinea*; Psp, *P. syringae* pv. *pisi*; Psa, *P. syringae* pv. *aptata*; Pss, *P. syringae* pv. *syringae*; Psa, *P. syringae* pv. *aceris*; Ps, *P. syringae*; Pv, *P. viridiflawa*; Psta, *P. syringae* pv. *tabaci*; Ec, *Erwinia chrysanthemi*; ** Accession number or Gene ID in GenBank.

2.3 harpinZ_{Psg12}的理化特性和生物功能

基因工程菌 BL/pGEX-hrpZ_{Psg12} 诱导表达后提取 harpinZ_{Psg12} 蛋白,经 100℃ 处理 15 min,仍可在烟草上激发 HR; harpinZ_{Psg12} 经蛋白酶 K 处理,则丧失在烟草上激发 HR 的能力,表明 harpinZ_{Psg12} 蛋白对热稳定,对蛋白酶 K 敏感。harpinZ_{Psg12} 蛋白与生物代谢抑制剂偏钒酸铵和氯化镧混合后注射烟草叶片不能引起过敏性反应(图 3)。用生物代谢抑制剂与 harpinZ_{Psg12} 混合注射烟草的试验,从一方面证明,烟

草枯斑的形成的确是由 harpinZ_{Psg12} 蛋白而非其他因素引起;另一方面也表明,过敏性反应的产生与植物的代谢有关,是植物的一种主动防卫反应而不是化学毒害作用。以上提示,harpinZ_{Psg12} 蛋白与革兰氏阴性植物病原菌中产生的 harpin 具有相同的理化特性和生物功能。

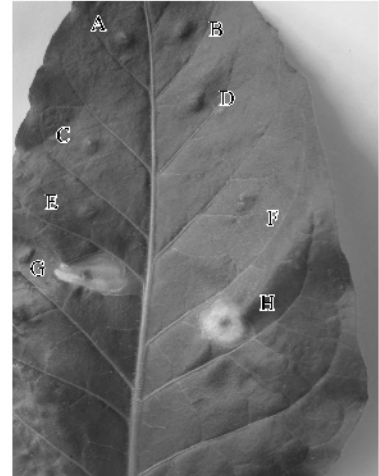


图3 harpinZ_{Psg12} 诱导烟草过敏性反应

Fig.3 Induction of HR on tobacco by harpinZ_{Psg12}. A. PBS buffer; B. BL21; C. BL21/pGEX-4T-1; D. harpinZ_{Psg12} plus NH₄VO₃; E. harpinZ_{Psg12} plus LaCl₃; F. Protease K-treated harpinZ_{Psg12}; G. Heat-treated harpinZ_{Psg12}; H. harpinZ_{Psg12}.

3 讨论

本文依据已报道的丁香假单胞菌大豆致病变种的 hrpZ(ORF)设计引物,从大豆细菌性斑点病菌中克隆到编码 harpin 的基因 hrpZ(命名为 hrpZ_{Psg12}, GenBank 登录号为:FJ853143)。经 Blast 比对 hrpZ_{Psg12} 基因与已克隆的丁香假单胞大豆致病变种(Psg r0 菌株,序列号:AB112554.1)hrpZ 有 79% 的相似性,这符合 hrpZ 不仅在不同种间存在差异而且在不同菌株间也存在差异的特点。氨基酸分析发现 harpinZ_{Psg12} 富含甘氨酸(13.19%),不含半胱氨酸,harpinZ_{Psg12} 理化性质的测定结果符合 harpin 所具有的热稳定,蛋白酶 K 敏感,能被钙离子通道阻断剂及生物代谢阻断剂所阻断的特性。经 Blast 比对 harpinZ_{Psg12} 与 Psp Pisum-1 菌株的 harpinZ 只在 N 端第 58 位的氨基酸存在差异,而 harpinZ 的过敏性反应活性是由 C 端区域所决定的。这些都证明 hrpZ_{Psg12} 基因编码的 harpinZ_{Psg12} 就是引起 HR 的激发子蛋白,hrpZ_{Psg12} 基因是一个不同于日本人已克隆的丁香假单胞菌大豆致病变种的 hrpZ 的新基因。从大豆细

菌性斑点病菌中克隆和表达 harpin 编码基因,在国内还未见报道。

harpin 类蛋白不仅激发植物的防卫反应使植物获得抗病性,如烟草对 TMV,棉花对蚜虫的抗性^[23-24],而且可以通过激活植物本身产生的一系列反应使植物获得许多其它有益的生物学效应,如提高作物产量、抗逆性及果实的耐存储性等。本文从大豆细菌性斑点病菌克隆和表达的 harpin 编码基因,为开展丁香假单胞菌大豆致病变种 harpin 蛋白结构和功能分析以及基因药物学设计方面奠定基础。

本文由于从丁香假单胞大豆致病变种克隆的 *hrpZ* 基因和日本人已克隆同菌的 *hrpZ* 基因相似性只有 79%,为此我们对本试验中使用的菌株 Psg12 又进行了重新鉴定,鉴定项目包括,LOPAT 鉴定谱,KB 上产荧光的特性,冰核活性,果聚糖产生 β -葡糖苷酶,利用甘露醇、甜菜碱、肌醇、山梨醇、葫芦巴碱、奎尼酸盐、赤尼酸盐、L-酒石酸盐、D-酒石酸盐、L-乳酸盐、高丝氨酸等生长,对大豆、菜豆、豌豆的致病性,同时也做了该菌的 16SrRNA 序列测定,所有试验结果均表明菌株 Psg12 就是丁香假单胞菌大豆致病变种(*P. syringae* pv. *glycinea*)^[25-26]。

参考文献

- [1] He SY, Huang HC, Collmer A P. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{Pss}: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Plant Journal*, 1994, 6: 271 - 282.
- [2] Lindgren PB, Peet RC, Panopoulos NJ. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 1986, 168: 512 - 522.
- [3] Wei ZM, Ron JL, Cathy HZ. Harpin, elicitor of the HR produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257: 85 - 88.
- [4] Li CM, Haapalainen M, Lee J, et al. Harpin of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* harbors a protein binding site. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18: 60 - 66.
- [5] Lin HJ, Cheng HY, Chen CH. Plant amphipathic proteins delay the hypersensitive response caused by harpin_{Pss} and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 51: 367 - 375.
- [6] Taka R, Taguchi F, Ichinos Y, et al. Effect of harpin from four pathovars of *Pseudomonas syringae* on pea defense responses. *Journal of General Plant Pathology*, 2001, 67: 148 - 151.
- [7] Taguchi F, Tanaka R, Kinoshita S, et al. Harpin, from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is defective and deficient in its expression and HR-inducing activity. *Journal of General Plant Pathology*, 2001, 67: 116 - 123.
- [8] Strobel N, Ji C, Goplan S, et al. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrpZ*_{Pss} protein. *Plant Journal*, 1996, 9: 431 - 439.
- [9] Jin QL, Liu NZ, Qiu JL. A truncated fragment of *hrpPss* induces systemic resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997, 51: 243 - 257.
- [10] Takakura Y, Ishida YJ, Inoue Y. Induction of a hypersensitive response like reaction by powdery mildew in transgenic tobacco expressing harpin_{Pss}. *Physiological and Molecular Plant pathology*, 2004, 64: 83 - 89.
- [11] Becker C, Orlandi E, Mock N, et al. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiology*, 1994, 102: 1341 - 1348.
- [12] Xie Z, Chen Z. Harpin induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(2): 183 - 190.
- [13] Inoue Y, Takikawa Y. The *hrpZ* and *hrpA* genes are variable, and useful for grouping *Pseudomonas syringae* bacteria. *Journal of General Plant Pathology*, 2006, 72: 26 - 33.
- [14] 闻伟刚,王金生. 水稻白叶枯病菌基因的克隆与表达. *植物病理学报(Acta Phytopathologica Sinica)*, 2001, 31(4): 295 - 300.
- [15] 陈功友,张兵,武晓敏,等. 大豆斑疹病菌 harpin 编码基因的克隆与特性研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(4): 793 - 894.
- [16] 向云,王蒂,张金文. Wnu1 启动子 Mel 3' 非转录区的克隆及 *hrp* 基因植物表达载体的构建. *甘肃农业大学学报(Journal of Gansu Agricultural University)*, 2004, 39(2): 124 - 130.
- [17] 赵立平,梁元存,刘爱新,等. 表达 *hrp* 基因的大肠杆菌 DH5 (pCPP430) 诱导植物抗病性的研究. *高技术通讯(High Technology Letters)*, 1997, 29(9): 35 - 391.
- [18] 李汝刚,范云六. 表达 harpin 蛋白的转基因马铃薯降低晚疫病斑生长率. *中国科学 C 辑(Science in China, Series C)*, 1999, 29(1): 56 - 61.

- [19] 陈功友,张学民,张信娣,等. 水稻细条斑病菌的化学诱变及 *hrp* 基因突变体的功能互补研究. 农业生物技术学报(*Journal of Agricultural Biotechnology*),2000 ,8 (2):117 - 122 .
- [20] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning*. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2003 .
- [21] Ding L , Meng X , Xu J , et al. High-efficiency expression and bioactivity testing of *hrpZ* in *Escherichia coli*. *Acta Botanica Boreali - Occidentalia Sinica* ,2005 ,25(18):2391 - 2394 .
- [22] Klement , Z. Hypersensitivity. *Phytopathogenic Prokaryotes* , Vol. 2. New York : Academic Press , 1982 : 149 - 177 .
- [23] 董宏平,李明立,彭建令等. Harpin_{Es}促进烟草生长和诱导抗虫的信号通路. 高技术通讯(*Chinese High Technology Letters*) 2004 ,12 29 - 32 .
- [24] Dong HP , Peng JL ,Bao ZL , et al. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiol* , 2004 ,136(3):3628 - 3638 .
- [25] 王金生. 植物病原细菌学. 北京:中国农业出版社, 2000 258 - 264 .
- [26] 陶天申 杨瑞馥,东秀珠. 原核生物系统学. 北京:化学工业出版社, 2007 :99 - 107 .

Cloning and expressing of a harpin-encoding gene from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Zhaoyuan Jiang , Xiaowei Zou , Jie Gao* , Qingrong Bai , Jiahuan Zhang*

(College of Agronomy , Jilin Agricultural University , Changchun 130118 , China)

Abstract : [**Methods** , **Objective**] We amplified the 1026 bp *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* isolate Psg12 genomic DNA by PCR technique , and then constructed expression vector pGEX-*hrpZ*_{Psg12} with regular molecular cloning operation. The recombinant plasmid was transformed into BL21 (DE3). Recombinant protein was induced by Isopropylthio-β-D-Galactoside (IPTG). [**Results**] The molecular mass of the fusion protein is 61kDa analyzed by SDS-PAGE. The protein , similar to the other known harpins , was heat-stable , which contained abundant glycine (G) , but had no cysteine. Furthermore , this protein was sensitive to protease K and able to trigger hypersensitive response (HR) in common tobacco. The HR elicitation by the protein in tobacco was inhibited by eukaryotic metabolic inhibitors , NH₄VO₃ and LaCl₃. The *hrpZ* gene showed 79% identity to *hrpZ*_{Psg} which cloned from *P. syringae* pv. *glycinea* (Psg r0) in Japan and 79 - 99% identity to other *hrpZ* in GenBank. However , it did not show any sequence identity with those of other genus of gram-negative plant pathogenic bacteria. [**Conclusion**] In summary , *hrpZ*_{Psg12} was a novel gene that was cloned by us from *P. syringae* pv. *glycinea* , and this is the first report to express *hrpZ*_{Psg12} gene in BL21 .

Keywords : *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ; harpin-encoding gene ; tobacco ; hypersensitive response

(本文责编 :王晋芳)

Supported by the Foundation of Jilin Science and Technology Development Plan (20060204-02) , the Ministry of Agriculture , " Eleventh Five-Year " genetically modified organisms to cultivate new varieties of major projects (2008ZX08003-004) and the Project Sponsored by the Scientific Research Foundation of Jilin Agricultural university

* Corresponding author. Tel : + 86-431-84532849 ; E-mail : jiecao115@126.com (Jie Gao) , zhangjiahuan_63@yahoo.com.cn (Jiahuan Zhang)

Received : 20 March 2009 / Revised : 6 May 2009