

硝尔库勒湖沉积物中非培养放线菌多样性

关统伟^{1,2}, 吴晋元², 职晓阳², 唐蜀昆², 徐丽华², 李文均², 张利莉^{1*}

(¹塔里木大学, 新疆兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300)

(²云南大学, 云南省微生物研究所, 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091)

摘要:【目的】认识和了解盐湖沉积环境中放线菌的多样性, 为今后的开发和利用奠定基础。【方法】应用免培养技术和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对新疆硝尔库勒盐湖沉积物中放线菌的多样性进行了研究。实验采用 SDS-CTAB 法提取土样中总 DNA, 利用放线菌特异性引物对土样总 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增, 并构建 16S rRNA 基因克隆文库; 对随机挑选的 160 个克隆通过酶切筛选出 51 个不同图谱的重组克隆, 并对其测序。【结果】所获得的 51 个克隆序列属于 39 个 OTUs, 其中 52.9% 的克隆序列分布于放线菌门(phylum *Actinobacteria*)放线菌亚(*Actinobacteridae*)的 5 个亚目和酸微菌亚纲(*Acidimicrobidae*)中, 并且在这两个亚纲中有大量克隆序列属于放线菌的新类群, 另外 47.1% 的克隆序列以极高的自展值在放线菌门内支持形成一个独立的大分支, 极有可能代表一个新亚目或更高级分类单元的类群。【结论】这些研究结果说明硝尔库勒盐湖中存在有较为丰富的放线菌系统发育多样性, 并且潜藏着新类型的放线菌资源。

关键词: 硝尔库勒湖; 系统发育; 放线菌多样性; 免培养方法

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0851-06

我国是世界盐湖最多的国家之一, 含有丰富的嗜盐微生物资源。据统计我国面积大于 1Km² 的盐湖有 813 个^[1], 但现在对这些盐湖进行过生物学调查的却不足 50 个^[2], 而绝大多数研究又集中在微生物的纯培养方面^[3-5], 虽然有学者^[6]曾对我国西藏的部分盐湖做过免培养方面的研究, 但国内外有关针对盐湖未培养放线菌方面的研究还鲜为报道, 这也说明仍有大部分的盐湖生态环境和生物类群有待探索。新疆地处干旱-半干旱暖温带区, 许多盐湖的湖水不断蒸发浓缩, 正逐步演化为湖表无卤水的干盐湖, 从而导致大量盐湖微生物物种资源渐趋消失。硝尔库勒湖位于新疆阿图什市境内, 湖盐以氯化钠为主, 盐浓度近于饱和, 采样时湖面卤水很少, 正向干盐湖趋近。笔者正在利用纯培养和免培养技术以及系统发育分析来揭示天

山山间盆地的硝尔库勒盐湖沉积物中放线菌物种多样性和系统发育多样性, 从而了解盐湖的放线菌多样性及其生态结构, 有利于系统保护和有效利用微生物物种和基因资源, 探索微生物物种和基因多样性演化机制, 为今后的开发和利用奠定基础。本文仅报道免培养方面的研究结果, 以供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 硝尔库勒湖盆为中、新生代哈拉峻山间构造断陷盆地中的次一级凹地, 受边缘深大断裂构造控制, 古生代变质盐系组成中低山系; 盆内新生代第三纪红色沙砾岩、含膏泥沙盐组成湖堤或湖成阶地; 第四纪冲积、风积和湖积粉细砂、粉沙粘土和盐

基金项目: 国家自然科学基金(30600001, 30660005); 人事部留学人员科技活动项目(610605); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(BR0803); 新疆高校科研计划创新研究群体基金项目(XJEDU2005G07)

*通讯作者。Tel: +86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn

作者简介: 关统伟(1978-), 男, 河南人, 硕士, 讲师, 主要从事放线菌资源及应用研究。E-mail: guantongweily@163.com

收稿日期: 2008-02-04; 修回日期: 2008-04-08

类化学沉积覆盖湖面。湖盆呈东北-西南向分布,湖长 18~20 km,宽 2~4 km,面积 45 km²,湖面海拔 1585 m。2007 年 10 月 30 日,从新疆阿图什市哈拉峻乡的硝尔库勒湖(76°53' E, 40°10' N)采集湖底沉积物(1~15 cm 表层土样),其 pH 为 6.5~7.0,样品采集后放于 4 °C 阴暗保存,运抵实验室后立即做免培养分析。以上操作过程均进行严格的无菌操作,尽量排除操作污染。

1.1.2 主要试剂和仪器: QIAquik PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)、pMD-18T vector (TaKaRa)、蛋白酶 K (Proteinase K, Merck)、Taq 酶(TaKaRa)、dNTPs (TaKaRa)、DNA Marker(Sangon)、其他生化试剂均为国产分析纯。凝胶成像仪(Bio-rad)、电泳仪(Bio-rad)、PCR 扩增仪(Bio-rad)。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 土样总 DNA 的提取: 结合国内外几位学者的相关报道,主要采用 SDS-CTAB^[7-10]抽提法提取盐湖沉积物中的微生物总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增: 应用放线菌的特异性引物^[11](S-20 : 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTG-3', A-19 : 5'-CCG-TACTCCCCAGGCGGGG-3')对土壤总 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应条件参照 Stach^[11]的方法进行,扩增体系为 50 μL,扩增片段大小约 640 bp。然后将目的条带按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒的说明对 PCR 产物进行纯化处理。

1.3 克隆文库构建及系统发育分析

1.3.1 克隆文库构建: 纯化产物通过 T4 DNA 连接酶与载体进行连接,并转化 *E.coli* DH5α感受态细胞。转化产物涂布在含有氨苄青霉素(100)的 LB 平板,随机挑取白色克隆子划线培养,并构建克隆文库。PCR 扩增出插入的放线菌 16S rRNA 基因片段后用 *Hae* 酶切 3 h,选出酶切带谱不同的重组子送到上海生物工程有限公司进行测序。

1.3.2 系统发育分析: 根据测序结果,用 Blast 搜索程序从 GenBank 等公共数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列,用 CLUSTALX 进

行多序列比对^[12],系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算^[13],用 MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining) 聚类分析,并构建出系统进化树^[14]。同时,重复取样 1000 次进行自展值 (bootstrap value) 分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性^[15]。定义克隆子 16S rDNA 序列相似性低于 99% 作为不同的分类单元,克隆序列的相似性大于 99% 的归于同一个 OUT 为标准^[16],采用 Shannon Index、Simpson Index、Species Richness、Estimated sample coverage 等相关指数进行样点克隆文库的微生物多样性评价分析。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因文库构建及多样性指数分析

实验随机挑选 160 个克隆子,经过 *Hae* 酶切筛选后,对 51 个克隆子进行测序,同时构建硝尔库勒湖沉积物样品的克隆文库。对克隆的测序结果应用 RDP 中的 Chimera Check 程序检查所获得的序列,结果无 chimera 发现。通过统计学方法,分析硝尔库勒盐湖未培养放线菌 16S rRNA 基因文库,用稀有度统计方法分析所构建 16S rRNA 基因文库中 160 个克隆的稀有度曲线(图 1)。

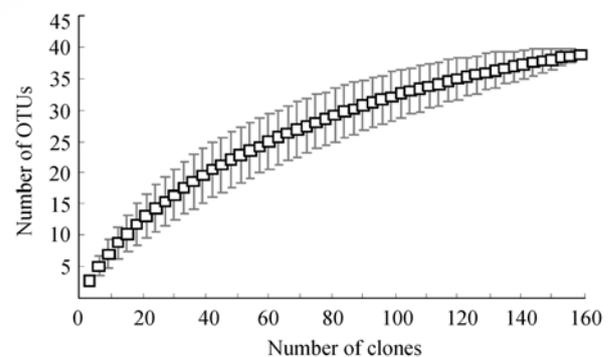


图 1 硝尔库勒湖样点放线菌稀有度曲线

Fig. 1 Rarefaction curve for Xiaerkule Lake sample (□) OTUs of 16S rRNA gene clones. Error bars are standard deviations.

使用 SPADE (species prediction and diversity estima

表 1 克隆文库多样性指数
Table 1 diversity index of the clone library

Sample	No. of OTUs	C	Diversity estimate					
			Species Richness		Shannon Index		Simpson Index	
			FSR	95% CIs	Chao & Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Xiaerkuler lake	39	0.919	45.5	(40.8, 63.1)	3.283	(2.916, 3.650)	0.07953	(0.04404, 0.11503)

CI: Confidence interval; MLE: maximum likelihood estimator; Chao & Shen: based on Horvitz-Thompson estimator and sample coverage method; FSR: Estimation of species richness; C: Estimated sample coverage

tion [http://chao.stat.nthu.edu.tw])分析软件对硝尔库勒湖的样品生物多样性指数进行分析。结果如表 1, 在可信区间为 95%的情况下, 其样品覆盖率估计(C)为 91.9%, 样点的物种丰度(Species Richness)分别为 45.5, 而实验结果表明在该样点共获得 39 个 OTUs, Shannon Index 为 3.283; Simpson Index 为 0.07953。根据 Kemp^[17] 的研究发现, 随着库容的增大, OTUs 的数目总是在增加, 这一结果说明几乎没有哪一个文库能够穷尽样品中微生物的多样性。因此, 用 rarefaction curve 分析 16S rDNA 克隆文库都不可能达到平台期, Coverage C 也不可能达到 100%, 当 rarefaction curve 趋于平缓或者趋近平台期时也就可以认为库容(library size)已经足够。

以上实验结果和统计分析数据显示, 覆盖率估计(C)为 91.9%, 基本上包括环境中大多数放线菌的种类, 但从 rarefaction curve 图来看稀释曲线仍没有趋向平台期, 因此, 还需要在 6S rDNA 克隆文库增加克隆子的数量, 使得 OTUs 的数量增加, 以趋近平台期, 从而更好的代表硝尔库勒盐湖沉积物中放线菌多样性。

2.2 16S rRNA 基因序列分析

测序获得 51 个克隆的 16S rRNA 基因插入片段序列同 GenBank 数据库中已知序列进行比对, 每个序列以 99.0%相似性划分为一个 OUT 作为标准来分析序列信息, 得到硝尔库勒湖样点 39 个 OTUs。把 39 个 OUTs 的序列与已知放线菌类群的有效序列共同构建系统发育树, 同时以 *Bacillus Subtilis* 的 16S rRNA 基因序列作为外群(如图 2)。可以看出这些序列分属于整个放线菌门(*Actinobacteria*)类群, 其中在酸微菌亚纲(*Acidimicrobidae*)和放线菌亚纲(*Actinobacteridae*)有广泛分布。在红色杆菌亚纲(*Rubrobacteridae*)和红蜡菌亚纲(*Coriobacteridae*)中没有发现亲缘关系较近的类群。据实验统计, 在测得的 39 个 OTUs 中, 有 35.3%属于放线菌亚纲(*Actinobacteridae*)内, 17.6%属于酸微菌亚纲(*Acidimicrobidae*), 有趣的是 47.1%的 OTUs 与有效发表的所有类群无较近的亲缘关系, 如克隆序列 XJ14-83、XJ14-20、XJ14-127 等, 它们以极高的自展值支持形成一个独立的大分支, 极有可能代表一个新亚目或更高级分类单元的类群(图 2)。

对 51 个测序克隆进行同源性分析, 结果展示该样点的克隆序列 XJ14-170 与 *Streptomonospora salina* 同源性为 99.8%; 克隆序列 XJ14-148 与 *Saccharopolyspora*

salina 的同源性为 98.7%; 克隆序列 XJ14-65 与 *Frankia alni* 的同源性为 97.4%; 克隆序列 XJ14-84 与 *Blastococcus jejuensis* 的同源性为 99.3%; 克隆序列 XJ14-36 与 *Streptomyces somaliensis* 的同源性为 98%; 克隆序列 XJ14-103 与 *Cellulomonas bogoriensis* 的同源性为 97.4%; 克隆序列 XJ14-140 与 *Georgenia muralis* 的同源性为 97.6%; 克隆序列 XJ14-207 与 *Acidimicrobium ferrooxidans* 的同源性为 95.4%, 其他大部分克隆序列与已知放线菌有效序列的相似性均低于 95%, 也就是说大约 80%的克隆序列代表着新的放线菌类群。有 16 个 OTUs 存在于在放线菌亚纲(*Actinobacteridae*)中, 分属于弗兰克氏菌亚目(*Frankineae*)、假诺卡氏菌亚目(*Pseudonoardineae*)、链孢囊菌亚目(*Streptosporangineae*)、链霉菌亚目(*Streptomycineae*)和微球菌亚目(*Micrococcineae*)的 7 个科中, 包括弗兰克氏菌科(*Frankiaceae*)、地嗜皮菌科(*Geodermatophilus*)、假诺卡氏菌科(*Pseudonoardiaceae*)、拟诺卡氏菌科(*Nocardiopsaceae*)、链霉菌科(*Streptomycetaceae*)、微球菌科(*Micrococcaceae*)、纤维单孢菌科(*Cellulomonadaceae*), 其中微球菌亚目(*Micrococcineae*)中的类群最多。这些结果预示着硝尔库勒盐湖沉积物中存在着丰富的放线菌种群多样性, 并期待着研究者去发掘与应用。

3 讨论

极端微生物(extremophiles)由于其独特的生理机制、基因类型和代谢产物的特殊性使其成为一类极具开发潜力的生物资源, 从而驱使各国学者不断向极端环境微生物探索。到目前为止, 人们对盐湖环境放线菌研究还主要集中在纯培养方面, 通过分子生态手段的研究还未见报道。本研究对硝尔库勒湖的免培养分析表明硝尔库勒盐湖沉积物中存在有丰富的放线菌多样性, 还发现了大量至今无法得到纯培养的克隆序列, 这说明盐湖环境中存在着许多尚未为人所知的放线菌类群。如位于放线菌亚纲(*Actinobacteridae*)中的纤维单孢菌科(*Cellulomonadaceae*)、弗兰克氏菌科(*Frankiaceae*)和地嗜皮菌科(*Geodermatophilus*)中的一些克隆序列, 至今在高盐环境中没有分离得到它们的纯培养, 在这些科中人们也没有分离得到嗜盐放线菌类群, 对于这些克隆序列所代表的尚未培养微生物是否具有特殊的功能基因更是不得而知。过去

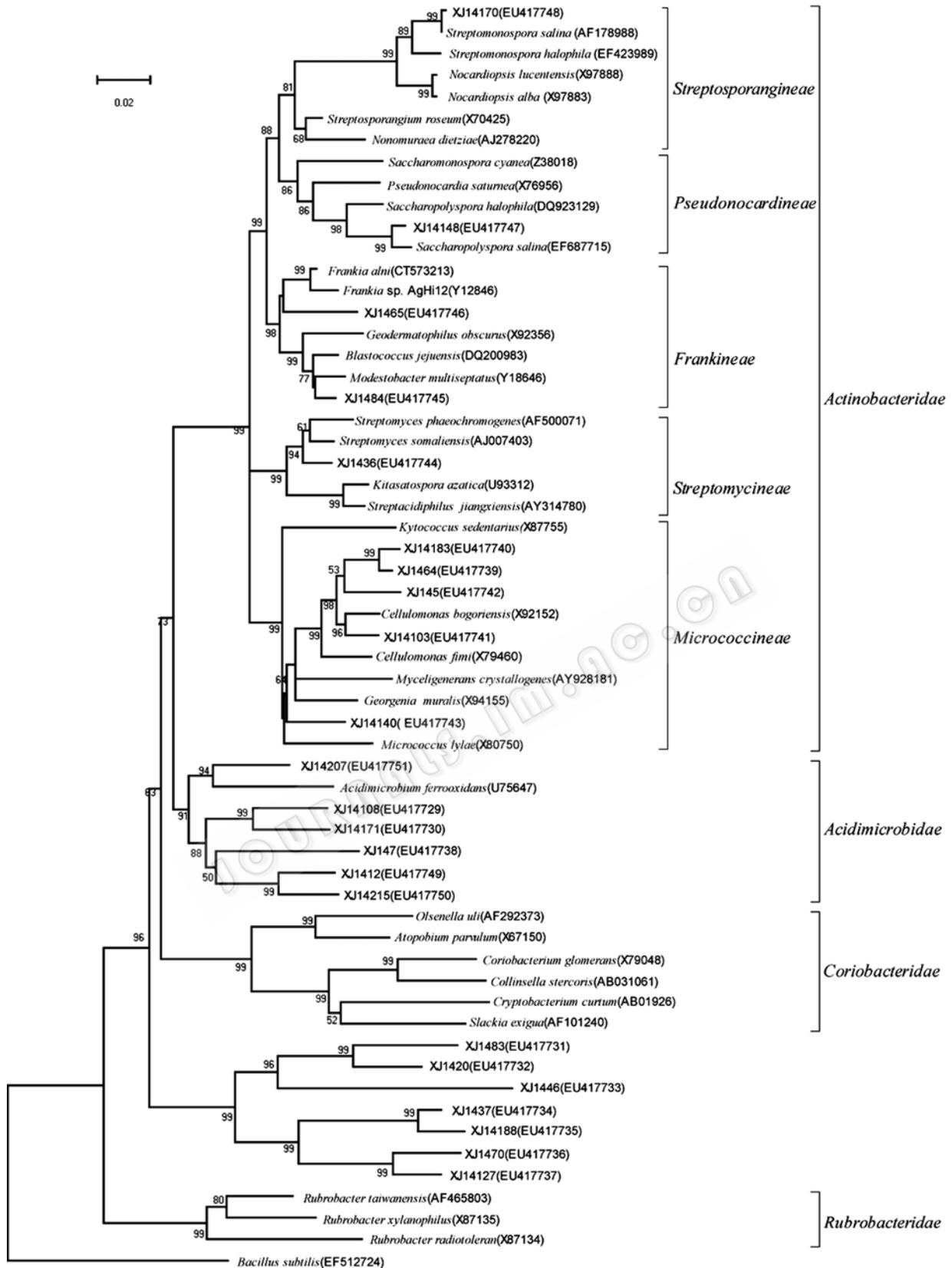


图 2 硝尔库勒盐湖沉积物样品中部分克隆序列与放线菌相关种构建的以 16S rRNA 基因序列为基础的系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among actinobacterial 16S rRNA gene sequences (partial clone sequences, 640 bp) obtained from the sediment sample of Xiaokerkule salt lake and their closely related sequences downloaded from GenBank. All of bootstrap values over 50 are shown based on neighbour-joining analyses of 1000 resamples data sets. Bar, 0.02 sequence divergence.

人们从盐湖分离得到的嗜盐放线菌全部分布于放线菌亚纲 (*Actinobacteridae*) 中, 在酸微菌亚纲 (*Acidimicrobidae*) 中还未发现, 而本研究不仅在新疆的硝尔库勒盐湖, 而且在云南江城的高盐盐矿土样 (另刊发表) 中通过免培养序列分析发现大量存在于酸微菌亚纲 (*Acidimicrobidae*) 中的未知放线菌类群克隆序列。这说明在高盐环境中可能存在有酸微菌亚纲 (*Acidimicrobidae*) 的大量放线菌新类群 (包括嗜盐放线菌)。但由于酸微菌亚纲 (*Acidimicrobidae*) 至今仅有一个有效种 (*Acidimicrobium ferrooxidans*) 可参考, 人们对这个纲中的其他潜在类群的生理机制, 代谢途径等了解可以说知之甚少, 如何把这些潜在的新类群从高盐环境中分离得到纯培养无疑是摆在微生物学者面前的一个重要难题。笔者关于该盐湖纯培养方面的研究表明纯培养的结果 (另刊发表) 与免培养的结果具有很好的一致性。那么, 使用微生物分子生态技术来检测盐湖放线菌的物种多样性, 指导人们按照与之系统发育关系相近的可培养放线菌的新陈代谢特性及营养需求设计培养条件, 来指导纯培养分离未知微生物无疑是一条可探索的新途径。

不同的生态环境是否可以决定有不同的微生物群落组成? 带着这样的疑问笔者对位于盐湖和海洋两种独特的生态环境沉积物中的放线菌类群做了比较。Heike Stevens 等^[18]以相同的放线菌特异性引物, 使用免培养手段, 在位于德国的海洋沉积物中探索到了 7 个科的放线菌类群, 包括 *Microbacteriaceae*、*Micrococcaceae*、*Mycobacteriaceae*、*Nocardiaceae*、*Nocardioidaceae*、*Promicromonosporaceae*、*Pseudonocardaceae* 和 *Sanguibacteraceae*, 而笔者在中国新疆的硝尔库勒湖沉积物中也探索到 7 个科的放线菌克隆序列, 包括 *Frankiaceae*、*Geodermatophilus*、*Pseudonocardaceae*、*Nocardiopsaceae*、*Streptomycetaceae*、*Micrococcaceae*、*Cellulomonadaceae*, 但两者之间存在着明显的异同之处。两种环境沉积物中都具有 *Micrococcaceae*、*Pseudonocardaceae*、*Nocardiopsaceae*, 但在硝尔库勒湖中存在有 *Frankiaceae*、*Geodermatophilus*、*Streptomycetaceae*、*Micrococcaceae* 和 *Cellulomonadaceae*, 且有大量的 *Acidimicrobidae* 的放线菌新类群。这说明由于生态环境的巨大差异, 其相应的微生物群落组成也存在有明显的差异性, 那么在一些独特的生态环境中就有可能发掘到较普通环境中难以分离到的新的放线菌物种。

应用分子生态技术研究环境中微生物多样性的结果表明, 目前获得的可培养微生物仅为微生物总数的 1%, 土壤环境仍存在大量未获得纯培养的微生物。免培养方法不需要得到环境中微生物的纯培养, 突破了用传统的微生物分离纯化的方法调查环境中微生物多样性时很多微生物无法得到纯培养的限制, 因此这一方法目前已经广泛运用于土壤、海洋、湖泊、肠道等多种生态系统中微生物多样性的调查, 并且揭示了环境中前所未有的微生物多样性。因此, 仅靠纯培养来反映环境中微生物的多样性是远远不够的, 而基于土壤微生物群落总 DNA 的分子生态学方法避免了传统分离培养方法的缺点, 通过免培养技术调查盐湖环境下的放线菌资源能使我们更充分的了解高盐环境中放线菌多样性, 从而为人们分离未知微生物提供必要的参考数据。

参 考 文 献

- [1] 郑喜玉, 张明刚, 徐昶, 等. 中国盐湖志. 北京: 科学出版社. 2002.
- [2] 潘海莲, 周成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(1): 1-6.
- [3] 崔恒林, 杨勇, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 新疆两盐湖可培养嗜盐古菌多样性研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(2): 171-176.
- [4] 许学伟, 吴敏, 吴月红, 等. 新疆阿牙克库木湖可培养嗜盐古菌的种群结构. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27(8): 3119-3123.
- [5] 戴欣, 王宝君, 黄燕, 等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(2): 161-165.
- [6] Jiang HC, Dong HL, Zhan GX, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in north-western China, *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 3832-3845.
- [7] Zhou JZ, Davery E, Figure JB. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, 1997, 143: 3 913-3 919.
- [8] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态研究中总 DNA 的提取. 农业环境科学学报 (*Journal of Agro-Environment Science*), 2005, 24(5): 854-860.
- [9] Zhou JZ, Mary AB, James MT. DNA recovery from Soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 316-322.
- [10] Colin RJ, Jenneifer PH, Dache W, et al. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4993-4995.

- [11] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, *et al.* New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol*, 2003, 5: 828–841.
- [12] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4): 876–888.
- [13] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111–120.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425.
- [15] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstap. *Evolution*, 1985, 39: 783–791.
- [16] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, *et al.* Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 6189–6200.
- [17] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47: 161–177.
- [18] Heike S, Thorsten B, Beate R, *et al.* Diversity and abundance of Gram positive bacteria in atidal flat ecosystem. *Environ Microbiol*, 2007, 9(7): 1810–1822.

Actinobacterial diversity of a sediment sample from Xiaoerkule Lake

Tongwei Guan^{1, 2}, Jinyuan Wu², Xiaoyang Zhi², Shukun Tang², Lihua Xu²,
Wenjun Li², Lili Zhang^{1*}

(¹Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar 843300, China)

(²Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: [Objective] The aim of study was to investigate Actinobacterial diversity in Xiaoerkule salt lake, to lay a foundation for furthering to tap. [Methods] Actinobacterial diversity in this sediment from Xiaoerkule Lake was investigated by culture-independent method and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Total DNA of sediment sample was extracted using SDS-CTAB method. The primers for the class *Actinobacteria* were used for actinobacterial 16S rRNA gene amplification and then a clone library was constructed for the sediment sample. [Results] Fifty-one clones screened from 160 clones on the basis of *Hae* III digestion patterns were sequenced, and their sequences were deposited in the GenBank. Clone sequences (52.9%) belonged to *Acidimicrobidae* and 5 suborders of *Actinobacteridae*. The other clone sequences (47.1%), which formed one large distinct clade in phylogenetic tree among phylum *Actinobacteria*, may represent one new suborder or new class. [Conclusion] There was abundant actinobacterial diversity in the sediment of Xiaoerkule Lake, and the result implied that there were large numbers of unknown actionobacterial groups here.

Keywords: Xiaoerkule lake; phylogenetic analysis; actinobacterial diversity; culture-independent method

Supported by the Chinese National Natural Science Foundation(30600001, 30660005), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Ministry of Personnel(610605), the Program for New Century Excellent Talent in University, the Opening Project by Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Constuction Corps (BR0803) and the Scientific Research Program of the Higher Education Institution of XinJaing (XJEDU2005G07)

*Corresponding author. Tel: +86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn

Received: 4 February 2008/ Revised: 8 April 2008