

武陵山放线菌多样性

曹艳茹¹, 姜怡¹, 陈义光^{1, 2}, 唐蜀昆¹, 秦盛¹, 赵国振¹, 徐丽华^{1*}

(¹ 云南大学, 云南省微生物研究所, 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091)

(² 吉首大学生物资源与环境生态重点实验室, 生态研究所, 吉首 416000)

摘要:【目的】为了探究武陵山放线菌多样性, 以便从新放线菌菌株中发现新的潜在药物先导化合物。

【方法】从武陵山采集 280 份土样, 采用纯培养的方法, 用 4 种培养基分离到 1134 株放线菌。选择其中 30 株代表菌进行了初步分类鉴定; 以 3 株细菌和 7 株农作物致病真菌作为指示菌, 检测其抑菌活性; 利用特异性引物扩增的方法, 检测是否具有聚酮合酶(PKS)、PKS 基因、非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因和多烯类化合物合成酶(CYP)基因。【结果】分离到的武陵山放线菌中, 链霉菌占 70% 以上, 还有小单孢菌等 8 个科 13 个属, 其中有 5 个菌株是潜在的新种。选取的 30 株实验菌对细菌、真菌有不同程度的抗菌活性; 其中含有 4 类化合物合成基因的菌株占 23%~60%。【结论】武陵山原始森林土壤中, 放线菌多样性很丰富, 且存在很多未开发的稀有类群。有抑菌活性的菌株, 可用于进一步的药物开发利用。

关键词: 放线菌; 多样性; 化合物合成基因

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0952-07

迄今为止, 已经发现并描述的放线菌达 40 多个科、180 多属、约 4000 多个种^[1]。从放线菌发现的化合物达 11000 种以上。目前在医药和农业上应用的抗生素约 160 种, 其中 2/3 是用放线菌生产的^[2]。可以说放线菌源药物的开发取得了极为辉煌的成就。尽管如此, 未培养的放线菌仍然有 90% 以上^[2-5], 这是开发新药的希望之一。但是从另一个角度看, 当今要从放线菌再开发出新药的确是越来越困难了。其中去除已知菌、已知化合物就是难题之一。现代基因组研究的成果及国内外的经验告诉我们, 新物种应该具有合成新化合物的新基因, 因此获得未知菌是发现新的药物先导物的途径之一^[6]。我们从武陵山原始森林采集土样, 分离放线菌, 研究已培养放线菌的组成, 并结合抗菌活性检测和基因筛选的方法, 试图发现新的物

种, 为新药开发提供新菌源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:武陵山地处渝、鄂、湘、黔 4 省市交界处, 面积约 100000 km², 长度 420 km, 一般海拔高度 1000 m 以上, 最高峰为凤凰山, 海拔 2570 m。山脉为东西走向, 呈岩溶地貌发育。本研究采样地区之一的梵净山位于贵州省东北部, 是武陵山的主体, 主峰海拔 2570 m, 长宽各约 20 km, 是一片保护完好的亚热带原始常绿阔叶林。另一个采样地区位于湖南省西北部的张家界国家森林公园、索溪峪自然保护区、天子山自然保护区, 面积达 264 km², 地貌以峰、林、洞、湖、瀑于一身, 属亚热带高原型季风湿润气

基金项目: 国家重大基础研究发展规划项目(2004CB719601); 国家自然科学基金(30560001, 30600001); 云南省国际合作计划(2005GH21), 云南省自然科学基金(2004 C0002Q); 国家科技部国际合作项目(2006DFA33550)及新世纪优秀人才支持计划项目

*通讯作者。Tel: +86-871-5035263/5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

作者简介: 曹艳茹(1983-), 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 从事放线菌资源研究。E-mail: yanrucao3@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2007-12-14; 修回日期: 2008-02-21

候,年平均气温 16 。2007 年 4 月,从武陵山山脉的张家界国家森林公园(纬度:29°3',经度:110°5')及贵州梵净山生物圈保护区(经度:108°77'~108°82',纬度:27°83'~28°03')采集土样 280 份。采集深度 5~20 cm,3 个穴的土样混合为 1 份样品。样品装入无菌塑料袋中,4℃ 保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:溶菌酶、蛋白酶 pK、dNTPs、Taq 酶等购自上海生工生物工程技术有限公司,Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂为国产分析纯试剂。电泳仪购自 Bio-RAD 公司,PCR 仪购自德国 Biometra 公司。

1.1.3 引物:聚酮类(PKS I)^[11]、型^[12],非核糖体含硫多肽类(NRPS)^[11]和多烯类^[13](CYP)4 类化合物合成基因的引物购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 放线菌分离方法

1.2.1 土样预处理:每个样品混匀,取 2 g,于室温自然风干 1 周,于 120℃ 干热处理 1 h。将土样装入 18 mL 含 0.1%Na₄P₂O₄ 的无菌水溶液中,120 r/min 振荡 1 h,再用 160 w 超声波机振荡 15 s,后稀释成 10⁻³ 土悬液涂布平板。

1.2.2 分离培养基及平板稀释法:1、HV 培养基^[7]。加制霉菌素 100 mg/L,萘啶酸 25 mg/L。2、海藻糖-脯氨酸^[8]。加制霉菌素 100 mg/L,萘啶酸 25 mg/L。3、组氨酸-棉子糖^[9]。加利福平 25 mg/L。4、甘油-门冬酰胺琼脂^[10]。加 K₂Cr₂O₇ 50 mg/L。涂布平板,28℃ 培养 35 d 后,挑取单菌落于 ISP 2^[10] 斜面培养基,28℃,培养 10 d。

1.3 抗菌活性实验

从分离的 1134 株纯培养放线菌选取 30 个特殊菌株作为研究材料。用葡萄糖-大豆粉液体培养基,28℃,摇瓶发酵一周,发酵液直接用于抗菌试验。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) 3 株细菌,疫霉(*Phytophthora nicotianae*)、赤星霉(*Alternaria alternata*)、镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、炭疽(*Colletotrichum* sp.)、节梨孢菌(*Gonmatopyricularia amomi*)、皮斑病霉(*Protomyces macrosporus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) 7 株植物致病真菌,共 10 株指示菌,采用打孔法做抑菌试验。实验菌株由中国科学院昆明植物研究所提供。

1.4 几类活性物质合成基因阳性菌筛选

1.4.1 样品 DNA 的提取:采用 Li 等^[14]的方法进行。

1.4.2 PCR 扩增:采用 25 μL 反应体系。PCR 扩增条件:PKS₁、PKS₂、NRPS 的扩增照文献 10 的条件进行。CYP 扩增条件:96℃ 预变性 5 min;80℃ 暂停后加酶;96℃ 1 min,60℃ 30 s,72℃ 45 s,45 个循环;72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,电压为 100 V。

1.5 放线菌的鉴定

用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行的扩增,测定其序列。用 PA(8-27f:5'-AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG-3')做正向引物,测定了 16S rRNA 基因 5' 端部分序列(953~1134 bp)。通过 Blast 程序,从 GenBank、EMBL、NCBI 等公共数据库中进行相似性搜索,调出相似性最高且是有效发表的典型菌株的序列,用 clustalx 进行序列比对,用 MEGA3.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,确定放线菌的分类地位^[11]。

2 结果和讨论

2.1 放线菌的组成

用上述 4 个培养基从 280 份土壤样品中共分离到 2017 株放线菌,根据菌落形态、气生菌丝的有无及在甘油-门冬酰胺琼脂和酵母膏-麦芽膏琼脂的颜色去重复后,获得 1134 株纯培养放线菌。它们中,链霉菌(*Streptomyces*)占 70%以上,小单孢菌(*Micromonospora*)约 25%。进一步从这 1134 个纯培养选择 30 个特殊菌株,测定 16S rRNA 基因序列并进行系统发育分析。结果表明它们属于 8 个科、13 个属。其中链霉菌属(*Streptomyces*)5 株,小单孢菌属(*Micromonospora*)2 株,指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)1 株,小链孢菌属(*Catellatospora*)1 株,球孢囊菌属(*Sphaerisporangium*)2 株,链孢囊菌属(*Streptosporangium*)5 株,马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)1 株,野野村菌属(*Nonomuraea*)1 株,诺卡氏菌属(*Nocardia*)4 株,红球菌属(*Rhodococcus*)1 株,节杆菌属(*Arthrobacter*)2 株,微杆菌属(*Microbacterium*)1 株,假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)1 株(图 1~3),还有 3 株其他细菌。可见这些地区广泛分布着链霉菌科、小单孢菌科、链孢囊菌科及诺卡氏菌科等至少 13 个属的放线菌。其中球孢囊菌属是日本人最近才发表的新属^[15],在武陵山就有分布。将相似性在 97%以下

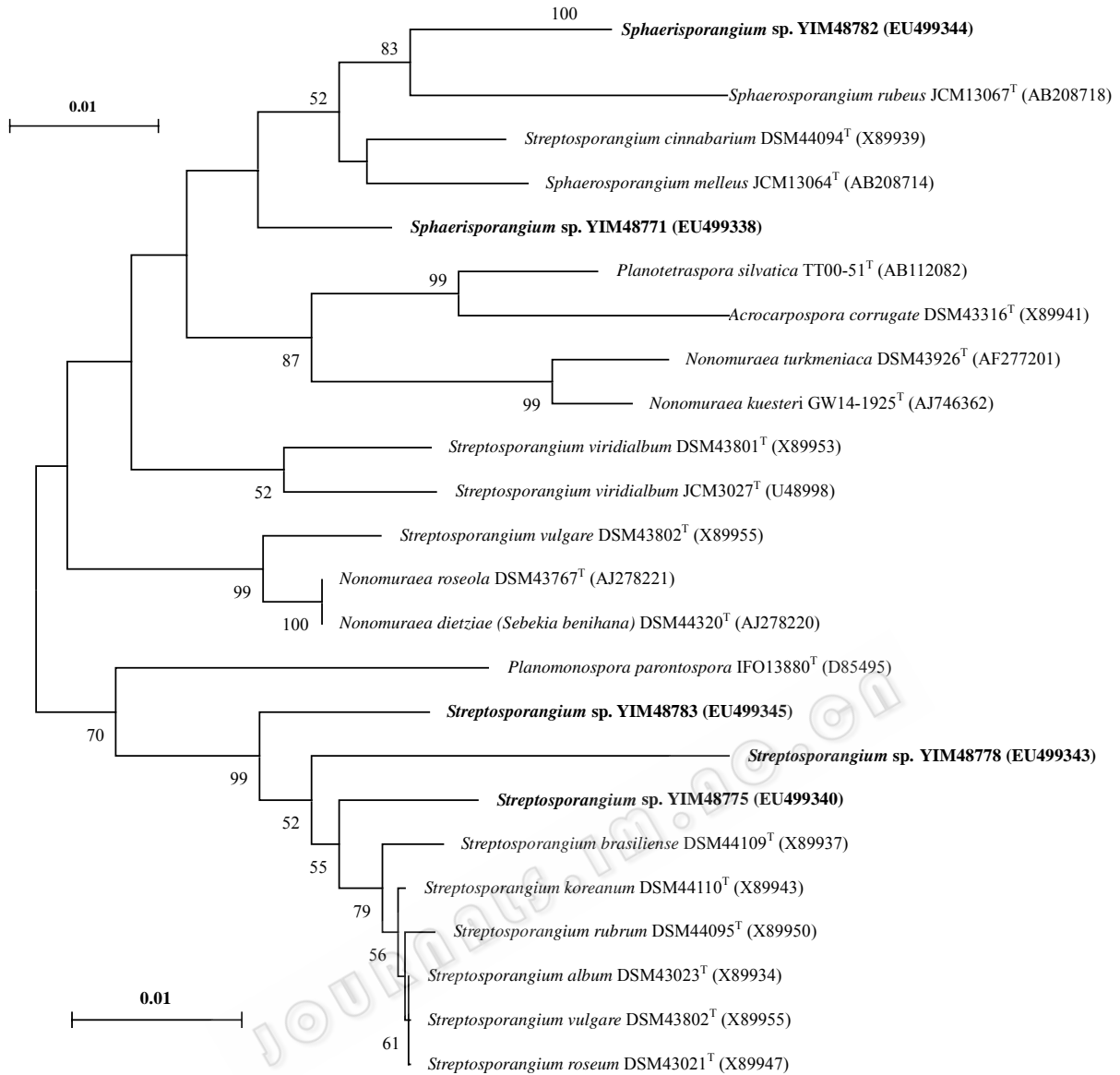


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree showing the relationships among reference strains and experimental trains based on 16S rRNA gene sequences. Bar: 1% sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled data sets. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

的菌株，测定了 16S rRNA 基因全序列，构建了系统进化树。结果表明 YIM 48771、YIM 48782 为球孢囊菌属的潜在新种，YIM 48783 为链孢囊菌属的潜在新种，YIM 48789 为诺卡氏菌属的潜在新种，YIM 48790 为指孢囊菌属的潜在新种。这些潜在新种待完成多相分类后，另行发表。值得一提的是，这 30 株放线菌，仅个别菌株与已知菌的相似性为 100%；其余都在 99% 以下，与已知菌的区别比较明显。

2.2 抗菌活性

抗菌活性的检测结果示于表 1。10 株指示菌中，

除 3 种细菌外，其余都是农作物常见的病原真菌。27 株放线菌和 3 株细菌中，有 11 株菌（占总数的 37%）的发酵液既对细菌，又对真菌有抑制作用；17 株（占 57.3%）仅对细菌有抑制作用；22 株（占总数量的 73%）对某种真菌有作用；对镰刀菌有抑制作用的有 16 株（占 53%）；抑制疫霉的有 13 株（占 43%）；抑制巨大芽孢杆菌的有 12 株（占 40%）。链孢囊菌科的 8 株菌（包括球孢囊菌属 2 株，链孢囊菌属 5 株，野野村氏菌属 1 株）中，有 4 株抑制金黄色葡萄球菌、6 株抑制巨大芽孢杆菌、3 株抑制镰刀菌。YIM 48776

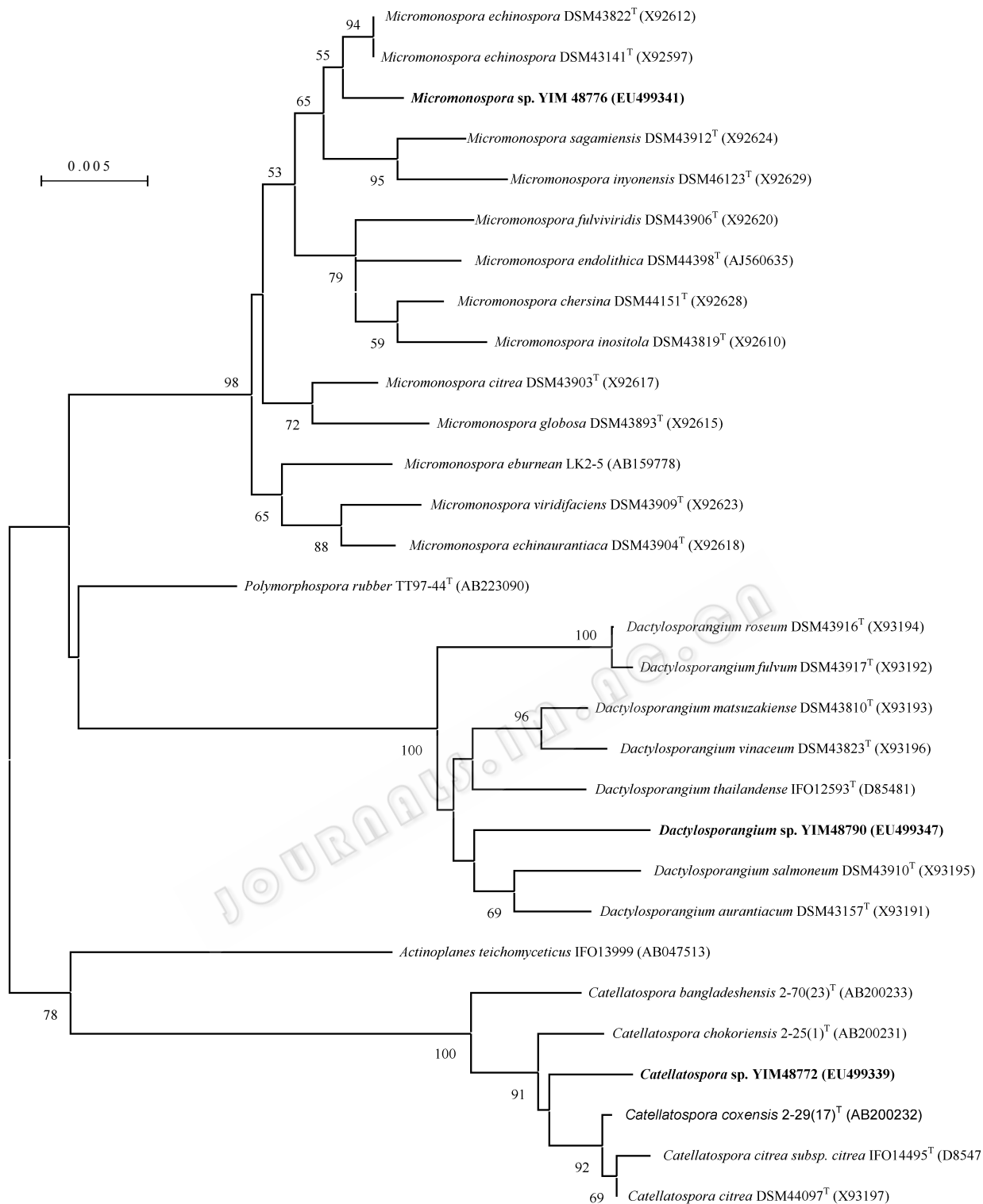


图2 根据 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationships among reference strains and experimental strains based on 16S rRNA gene sequences. Bar: 0.5% sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled data sets. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

(小单孢菌属) YIM 48778 (链孢囊菌属) 对三株细菌有很明显的抑制作用, YIM 48794 (假单孢菌属)

对指示菌中的大多数真菌有较强的抑制作用, 所有 30 株菌都不能抑制烟草炭疽病菌。

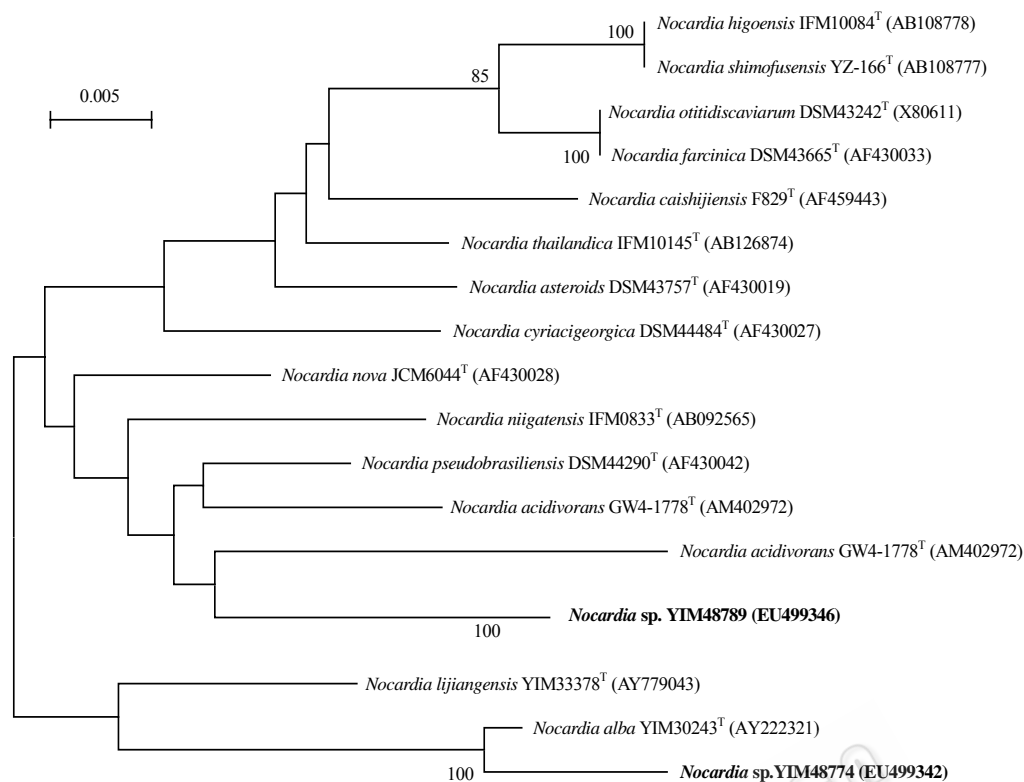


图 3 根据 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationships among reference strains and experimental strains based on 16S rRNA gene sequences. Bar: 0.5% sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled data sets. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

表 1 抗菌活性及 4 类化合物合成基因筛选阳性的菌株数

Table 1 Antimicrobial activities and distribution of biosynthetic sequences in 30 isolates

Family (strain No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A(5)	1	0	0	1	0	4	0	0	1	0	1	4	3	2
B(4)	1	1	1	1	0	3	0	1	0	0	2	2	3	3
C(1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D(8)	4	1	6	5	0	3	0	0	1	0	2	5	2	5
E(5)	1	0	2	2	0	3	0	0	0	0	1	3	3	4
F(2)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
G(1)	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H(1)	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
I(3)	0	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	2	0	1
Total(30)	9	3	12	13	1	16	0	2	2	1	7	18	12	17

A. Streptomycetaceae; B. Micromonosporaceae; C. Thermomonosporaceae; D. Streptosporangiaceae; E. Nocardiaceae; F. Micrococcaceae; G. Jonesiaceae; H. Pseudonocardaceae; I. Other bacteria. 1. *Staphylococcus aureus*; 2. *Bacillus subtilis*; 3. *Bacillus megaterium*; 4. *Phytophthora nicotianae*; 5. *Alternaria alternate*; 6. *Fusarium graminearum*; 7. *Colletotrichum* sp.; 8. *Gonmatopyricularia amomi*; 9. *Protomyces macrosporus*; 10. *Aspergillus niger*. 11. CYP; 12. PKS II; 13. PKS I; 14. NRPS.

2.3 化合物合成基因筛选

聚酮类化合物是由小分子羧酸经过缩合而成的复杂次生代谢产物。目前已知的聚酮化合物超过 1000 种,具有广泛的生物活性,如抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗病原生物、抗结核和免疫抑制等作用,且已广泛应用于医药、农业、畜牧业和工业,仍具有重要的开发

价值^[16]。该类化合物是由 PKS、和 基因控制合成的。非核糖体含硫多肽类(non-ribosomal thiopeptide)抗生素是多肽类抗生素中的一个重要家族,由 NRPS 基因指导合成。这类化合物主要是对细菌产生作用。多烯类化合物是重要的药物先导化合物,是由 CYP 基因合成的一类化合物,主要对真菌有抑制

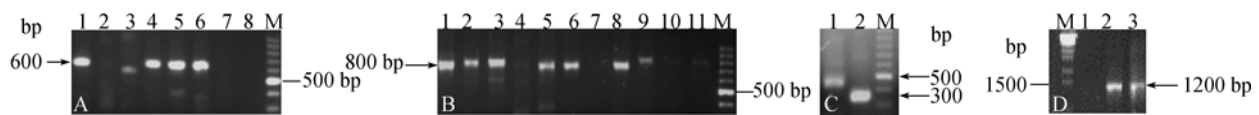


图 4 四种基因筛选扩增产物的电泳图谱

Fig. 4 PCR products of four genes. A. PKS : 2,3,7,8 Negative control; 1,4,5,6 Expression product; M. 100 bp DNA Ladder Marker. B. NRPS: 4,7,9,10,11 Negative control; 1,2,3,5,6,8 Expression product; M. 100 bp DNA Ladder Marker. C. CYP: 1. Negative control; 2. Expression product; 3. M. 100 bp DNA Ladder Marker. D. PKS : M. γ -EcoT 14 digest; 1. Negative control; 2,3 Expression product.

作用。

4类化合物合成基因的筛选结果示于表1和图4。30个菌株中,PKS基因筛选呈阳性的菌株占60%(18株),NRPS基因筛选呈阳性的占到57%(17株),PKS基因的阳性扩增率为40%(12株),CYP基因筛选呈阳性的菌株只有7株,占总数的23%。这些结果显示,前3种基因的阳性菌在所选择的30株菌中广泛分布。

从理论上讲,具有某种化合物合成基因的菌株,就应该产生相应的抗菌活性。对抗菌活性而言,有10株放线菌的抑菌活性和基因筛选结果是对应一致的,但有16株放线菌含有某类化合物合成基因,但不产生相应的抗菌活性;对于抗真菌活性而言,有9株放线菌的发酵液抑菌实验结果和其基因筛选结果是对应一致的,但有17株基因筛选为阳性却不产生相应的抗菌活性。这种不一致说明,基因与活性(产物)之间有一个重要的环节,即发酵条件。只有适合的发酵条件才能使基因的充分表达成为可能。

30个菌株中,筛选到4类化合物合成基因的频率也很高,且绝大部分都有抗菌活性。上述5个新种对3种细菌和7种植物致病真菌中的1至3种产生抗菌活性,都具有1至4类化合物的合成基因。一株指孢囊菌的潜在新种(YIM 48790)同时含有4类化合物的合成基因。这些菌株是从1134株菌中挑选出来的,有抗菌活性的菌株占的比例很高。挑选菌株的经验无疑是十分重要的。

生物活性物质合成基因筛选作为一种新药先导物发现的工具已在一些单位开始应用^[17-21]。这是一种快捷、简便、低成本的筛选程序。所得的阳性菌株不但可以预知其产物的类型和理化特性,有利于化合物的制备及结构解析;而且可以利用不同基因的Shuffling和代谢途径工程,“制造”新的人工天然产物,人为增加化合物的多样性。如果把基因筛选、Shuffling、代谢途径工程与特异性靶点的活性测定、化合物的快速鉴别和结构解析相结合,将大大提高新药先导物发现的效率。

致谢 感谢云南大学微生物研究所蔡祥凤、陈云在实验中的协助。同时感谢同实验室的蔡曼、吴晋元等同学在整个实验中的帮助。

参 考 文 献

- [1] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] Bérday J. Bioactive microbial metabolites, a personal review. *J Antibiot*, 2005, 58(1): 1-26.
- [3] Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts H, *et al.* Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4399-4406.
- [4] Zengler K, Toledo G, Rappé M, *et al.* Cultivating the uncultured. *PNAS*, 2002, 99(24): 15681-15686.
- [5] Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, *et al.* Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 (12): 7210-7215.
- [6] 杨颖, 姜怡, 尹敏, 等. 放线菌次生代谢产物合成基因组研究. 微生物学杂志(*J Microbiol*), 2007, 27(6): 68-71.
- [7] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol*, 1987, 65: 501-509.
- [8] 姜怡, 唐蜀昆, 陈华红, 等. 稀有放线菌分离方法. 微生物学通报(*Microbiology*), 2006, 33(1): 181-183.
- [9] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源学. 北京: 科学出版社, 1997.
- [10] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16: 313-340.
- [11] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. *Microbial Ecology*, 2005, 49: 10-24.
- [12] Mikko MK, Virpi S, Laura H, *et al.* An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180: 1-6.
- [13] Hwang YB, Lee MY, Park HJ, *et al.* Isolation of putative polyene-producing actinomycetes strains via PCR-based genome screening for polyene-specific hydroxylase genes. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 102-107.
- [14] Li WJ, Xu P, Schumann P, *et al.* *Georgenia ruanii* sp. nov., a

- novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*-*Internationa*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57: 1424–1428.
- [15] Ara I, Kudo T. *Sphaerosporangium* gen. nov., a new member of the family *Sphaerosporangiaceae*, with descriptions of three new species as *Sphaerosporangium melleum* sp. nov., *Sphaerosporangium rubeum* sp. nov. and *Sphaerosporangium cinnabarinum* sp. nov., and transfer of *Streptosporangium viridialbum* Nonomura and Ohara 1960 to *Sphaerosporangium viridialbum* comb. nov. *Actinomycetologica*, 2007, 21(1): 11–21.
- [16] 陈代杰. 微生物药学. 上海: 华东理工大学出版社, 1999.
- [17] Mikko MK, Laura H, Eveliina M, *et al.* Molecular Evolution of Aromatic Polyketides and Comparative Sequence Analysis of Polyketide Ketosynthase and 16S Ribosomal DNA Genes from Various *Streptomyces* Species. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4472–4479.
- [18] Liu W, Ahlert J, Gao Q, *et al.* Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100(21): 11959–11963.
- [19] Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, *et al.* A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat Biotechnol*. 2003, 21(2): 187–190.
- [20] Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, *et al.* Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005, 331: 253–260.
- [21] McAlpine JB, Bachmann BO, Pirae M, *et al.* Microbial genomes as a guide to drug discovery and structure elucidation: ECO-02301, a new antifungal agent, as an example. *J Nat Prod*, 2005, 68: 493–496.

Diversity of actinomycetes in Wuling Mountain

Yanru Cao¹, Yi Jiang¹, Yiguang Chen^{1,2}, Shunkun Tang¹, Sheng Qin¹, Guozhen Zhao¹, Lihua Xu^{1*}

¹Yunnan Institute of Microbiology and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

²Key Laboratory of Bio-resources and Environmental Ecology, Institute of Ecology, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: [Objective] To isolate new actinomycetes for discovering compounds of pharmaceutical importance. [Methods] We collected 280 soil samples from virgin forest in Wuling Mountain. In total 1134 actinomycetes were isolated by culture-dependent method. Of them 30 strains were selected and then characterized by phylogenetic analysis based on sequences of 16S rRNA gene. Antimicrobial activities were determined by agar well diffusion method, and genes of type III and polyketide synthases (PKS_{III}, PKS_{PKS}), nonribosomal peptide synthase (NRPS) and polyene cytochrome P450 hydroxylase (CYP) were screened by PCR. [Results] Thirty strains belonged to 8 families, 13 genera: *Streptomyces* (>70%), *Micromonospora*, *Dactylosporangium*, *Catellatospora*, *Sphaerisporangium*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, and *Pseudonocardia*. There are 5 novel species candidates. Thirty strains showed different antimicrobial activities against one to three bacteria and pathogenic fungi. [Conclusion] Abundant diversity of actinomycetes existed in the virgin forest of Wuling Mountain which has many new taxa, and *Streptomyces* is the predominant population. The strains showed high antimicrobial activities and can be further researched for exploiting new compounds of pharmaceutical.

Keywords: actinomycete; diversity; synthesis genes of secondary metabolites

Supported by the National Basic Research Program of China (2004CB719601), the National Natural Science Foundation of China (30560001, 30600001), the Yunnan Provincial International cooperative Program (2005GH21), the Yunnan Provincial Natural Science Foundation (2004C0002Q), the Ministry of Science of Technology of China (2006DFA33550) and the Program for New Century Excellent Talents in University

*Corresponding author. Tel: +86-871-5035263/5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

Received: 14 November 2007/ Revised: 21 February 2008