

# 侵染稀硷的中国番茄黄化曲叶病毒及其卫星 DNA 全基因组结构特征

彭 燕<sup>1</sup> 谢 艳<sup>1</sup> 张仲凯<sup>2</sup> 周雪平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学生物技术所 杭州 310029)

(<sup>2</sup>云南省农业生物技术重点实验室 昆明 650223)

**摘 要:**从云南红河稀硷上分离到病毒分离物 Y64,全序列测定表明,Y64 DNA-A 全长 2730 个核苷酸。基因组比较发现,Y64 DNA-A 与中国番茄黄化曲叶病毒 Y38 分离物(TYLCCNV[Y38])同源性最高(99%),与中国番茄黄化曲叶病毒广西分离物(TYLCCNV)的同源性次之(96%),而与亚洲地区的其它双生病毒的同源性均在 83% 以下,表明稀硷上的分离物 Y64 是 TYLCCNV 的 1 个分离物。利用 DNA $\beta$  的特异性引物 beta01 和 beta02,在病毒分离物 Y64 中扩增到卫星 DNA 分子(Y64 $\beta$ )。序列分析表明,Y64 $\beta$  全长 1340 个核苷酸,至少在其互补链上编码 1 个有功能的 ORF (C1)。Y64 $\beta$  的全序列与 TYLCCNV 的各个分离物的卫星分子(Y38 $\beta$ 、Y36 $\beta$  和 Y8 $\beta$ )的同源性最高,分别为 99.5%、99.5% 和 99.3%;与其它已报道的卫星 DNA $\beta$  的同源性均低于 66.4%。系统关系树研究表明,卫星 DNA $\beta$  分子与其辅助病毒是共同进化的。

**关键词:**中国番茄黄化曲叶病毒,稀硷,菜豆金色花叶病毒层,卫星 DNA $\beta$

**中图分类号:** Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2004)01-0029-05

双生病毒是一类具有孪生颗粒形态的单链环状植物 DNA 病毒。根据介体传播、寄主范围和基因组结构可以分成 4 个属。粉虱传双生病毒(Whitefly-transmitted geminivirus,WTG)属于其中的菜豆金色花叶病毒属(Begomovirus),自然条件下由烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播<sup>[1]</sup>。大多数 Begomoviruses 为双组分病毒,基因组含有两条大小均为 2.5~3.0kb 的 DNA 分子,即 DNA-A 和 DNA-B。少数 Begomoviruses 为单组分病毒,基因组只含 1 条 DNA 分子,即 DNA-A,大小约 2.8kb<sup>[2]</sup>。对新加坡胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein virus,AYVV)、巴基斯坦棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl virus,CLCuV)及印度秋葵黄脉花叶病毒(Bhendi yellow vein mosaic virus,BYVMV)的研究发现,这类单组分 Begomoviruses 伴随着 1 种新型卫星分子(DNA $\beta$ )。DNA $\beta$  是症状相关因子,但其复制、包裹、移动和介体传播等都依赖辅助病毒的 DNA-A<sup>[3~5]</sup>。

双生病毒寄主范围广,病毒基因组变异快,已在 39 个国家的番茄、木薯和棉花等作物上造成毁灭性

危害<sup>[6]</sup>。我国已在云南、广西地区的烟草、番茄、南瓜上发现了多种双生病毒<sup>[7~10]</sup>,但杂草上的 Begomoviruses 还未见报道。

杂草是双生病毒的重要中间寄主,因其分布广泛、繁殖能力强,对病毒的传播扩散起了重要作用。为了解双生病毒在杂草上的分布、危害情况,我们对亚洲常见杂草稀硷(*Siegesbeckia orientalis*)上的双生病毒进行了研究。本文报道了稀硷中分离到的 Begomovirus 及其伴随卫星 DNA 的全基因组结构特征。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒源

病毒分离物 Y64 采自云南红河地区的稀硷,病株表现叶脉增厚、叶片黄化、植株矮化等症状。

### 1.2 DNA 提取

按谢艳等<sup>[8]</sup>报道的方法提取总 DNA。

### 1.3 PCR 扩增、克隆和序列测定

根据双生病毒基因间隔区及外壳蛋白保守序列设计引物 PA 和 PB,扩增 DNA-A 部分区域,并进行

基金项目:国家杰出青年基金资助项目(30125032)

\* 通讯作者。Tel:86-571-86971680;Fax:86-571-86971680;E-mail:zzhou@zju.edu.cn

作者简介:彭燕(1974-),女,江西人,博士,从事植物病理研究,现工作单位为广州医学院实验医学研究中心。E-mail:ahappylife2000@yahoo.com

收稿日期:2003-03-26,修回日期:2003-07-31

克隆及序列测定,然后根据测出的序列设计特异引物 Y6F<sub>1</sub>和 Y6R 扩增近全长的 DNA-A。PCR 反应条件参照 Zhou 等<sup>[1]</sup>的方法。根据谢 艳等<sup>[5]</sup>报道的

方法扩增 DNA $\beta$  全长序列。PCR 产物分离纯化后,克隆到 pGEM-T 载体。利用通用引物及各特异测序引物进行序列测定(表 1)。

表 1 PCR 扩增和测序所用引物

Table 1 Primers used for PCR and sequencing

Primers	Sequence(5'→3')*	Position
Primers used for DNA-A cloning :		
PA	TAATATTACCKGWKGVCCSC	2724 ~ 13
PB	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA	512 ~ 490
Y6F1	ACCGGATGTACAGAAGCCCTGA	455 ~ 476
Y6R	CTTCCGATACATGGGCCTGTTTG	444 ~ 422
Primers used for DNA-A sequencing :		
Y64F	GAGGGTGACGAAGATCGC	1586 ~ 1603
Y64R	CCTGCCAAATCTGGACTCAT	1258 ~ 1239
Y64F1	TTATCGACCGCCCAITCA	1986 ~ 2004
Y64R1	TTGGGAATTACGATAATGCC	2690 ~ 2671
Y6R2	GGAAGCCAGTTCAAATTAAGG	1731 ~ 1710
Primers used for DNA $\beta$ cloning :		
beta01	GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC	1277 ~ 1301
beta02	GGTACCTACCCCTCCAGGGGTACAC	1281 ~ 1257
Primers used for DNA $\beta$ sequencing :		
beta03	CTTGCTAATGCTGCTGACT	443 ~ 462

\* B = C, T or G; K = G or T; R = A or G; S = C or G; V = A, C or G; W = A or T; Y = C or T.

## 1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件(Madison, Wis, USA)和 DNAMAN Version 4.0(Lynnon Biosoft, Quebec Canada)进行序列分析。多序列比较采用 DNASTar clustalw 方法,进化树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法(Neighbor-joining)。用于 DNA-A 序列比较和进化分析的病毒有:中国番茄黄化曲叶病毒烟草分离物 Y38(Tomato yellow leaf curl China virus-Tb[ Y38 ], TYLCCNV-Tb[ Y38 ], AJ420317)、中国番茄黄化曲叶广西分离物(Tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV, AF311734)、泰国番茄黄化曲叶病毒缅甸分离物(Tomato yellow leaf curl Thailand virus-[ Myanmar ], TYLCTHV-[ MM ], AF206674)、泰国番茄黄化曲叶病毒 1 号分离物(Tomato yellow leaf curl Thailand virus-[ 1 ], TYLCTHV-[ 1 ], X63015)、越南番茄曲叶病毒(Tomato leaf curl Vietnam virus, ToLCVV, AF264063)、胡椒曲叶病毒(Pepper leaf curl virus, PepLCV, AF134484)、烟草曲茎病毒 Y1 分离物(Tobacco curly shoot virus-[ Y1 ], TbCSV-[ Y1 ], AF240675)、Karnataka 番茄曲叶病毒(Tomato leaf curl Karnataka virus, ToLCKV, U38239)、斯里兰卡胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein Sri Lanka virus, AYVSLV, AF314144)、云南烟草曲叶病毒 Y3 分离物(Tobacco leaf curl Yunnan virus-[ Y3 ], TbLCYNV-[ Y3 ], AJ420319)、云南南瓜曲叶病毒(Squash leaf curl Yunnan virus, SLCYV, AJ420319)、中国南瓜曲叶病毒(Squash leaf curl China

virus, SLCCNV, AB027465)。用于 DNA $\beta$  序列比较的 DNA $\beta$  分子有新加坡胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein virus, AYVV $\beta$ , AJ252072)、秋葵黄脉花叶病毒(Bhendi yellow vein mosaic virus, BYVMV $\beta$ , AJ308425)、Multan 棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl Multan virus, CLCuMV $\beta$ 01, AJ292769; CLCuMV $\beta$ 02, AJ298903)、Rajasthan 棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl Rajasthan virus, CLCuRV $\beta$ , AY083590)、中国番茄黄化曲叶病毒 Y8、Y36 和 Y38 分离物(TYLCCNV-[ Y8、Y36、Y38 ], Y8 $\beta$ 、Y36 $\beta$  和 Y38 $\beta$ , AJ421622、AJ506791、AJ420315)。

## 2 结果

### 2.1 病毒基因组 DNA-A 结构

利用 PA 和 PB,PCR 扩增得到 1 条约 500bp 的特异性条带。在对 500bp 产物进行序列测定的基础上,用引物 Y6F1 和 Y6R 扩增出 1 条约 2.7kb 的特异条带,而健康对照无此产物。全序列测定拼接后发现, Y64 DNA-A 全长 2730 个核苷酸(nt) (EMBL 登录号 AJ457823)。Y64 DNA-A 基因组结构具有典型的粉虱传双生病毒特性,共编码 6 个可读框(ORFs) (图 1-A)。在 AV2 和 AC1 之间含 1 个长 265nt 非编码区,又称基因间隔区(Intergenic region, IR),对应于核苷酸 2594 ~ 128 位。IR 区含有双生病毒复制和转录所需的各种顺式元件:茎环结构(含有保守的 9 个核苷酸 TAATATTAC);TATA box(位于茎环结构上游

60~63nt 处)重复序列 GGTGTCT(位于核苷酸 2601~2163 位,重复于 2635~2641nt)及 CAAATGCG 位于 2630~2636nt,重复于 2666~2672nt)。

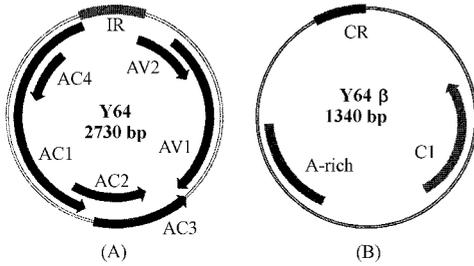


图 1 Y64 DNA-A 和 DNA $\beta$  基因组结构

Fig.1 Genomic organization of Y64 DNA-A (A) or DNA $\beta$  (B)

## 2.2 Y64 DNA-A 与其它双生病毒的同源性比较

将 Y64 DNA-A 全序列进行 Blast 检索发现, Y64 与亚洲报道的双生病毒的同源性较高,而与美洲、非洲及地中海地区的相对较低。进一步与亚洲地区的双生病毒比较表明, Y64 与 TYLCCNV 的同源性为 96%,与烟草上的 TYLCCNV 分离物 Y38(TYLCCNV-[Y38])的同源性达 99%,而与其它双生病毒的同源性均在 83% 以下。仔细比较 Y64 与 TYLCCNV-[Y38],发现即使是变异最大的 IR 区,两者之间的同源性也达 98%,各 ORFs 的同源性均达 99~100%(表 2)。Y64 与我国报道的 TbCSV-[Y1], TblCYNV-[Y3], SLCYV 及 SLCCNV 的同源性分别为 80%、76%、75% 和 72%。从系统关系树得知, Y64 与 TYLCCNV 及其分离物 Y38 形成一独立分支,且与 Y38 的关系更近,而与其它 10 种病毒的同源关系均较远(图 2)。

表 2 Y64 与亚洲其它双生病毒 DNA-A、IR 及各 ORFs 的同源性比较(%)

Table 2 Comparison of nucleotide and amino acid sequence identities of complete DNA-A, IR and encoded ORFs between Y64 DNA-A and other 12 begomoviruses in Asia(%)

Virus	DNA-A <sup>a</sup>	IR <sup>a</sup>	AV2 <sup>b</sup>	AV1 <sup>b</sup> (CP)	AC1 <sup>b</sup> (Rep)	AC2 <sup>b</sup>	AC3 <sup>b</sup>	AC4 <sup>b</sup>
TYLCCNV-Tb[Y38]	99	98	100	99.6	99	99	99	99
TYLCCNV	96	96	97	97	99	97	95	98
TYLCTHV-[MM]	83	81	69	78	93	88	87	90
TYLCTHV-[I]	82	76	70	78	92	90	87	88
ToLCVV	81	83	82	84	88	67	63	86
PepLCV	80	77	76	77	85	81	72	77
TbCSV-[Y1]	80	76	72	78	81	69	64	86
ToLCKV	78	49	63	79	78	50	64	59
AYVSLV	78	77	72	76	87	69	69	78
TblCYNV-[Y3]	76	72	72	78	76	71	70	42
SLCYV	75	70	65	78	75	82	75	35
SLCCNV	72	38	60	77	69	52	64	8

<sup>a</sup> Nucleotide; <sup>b</sup> Amino acid.

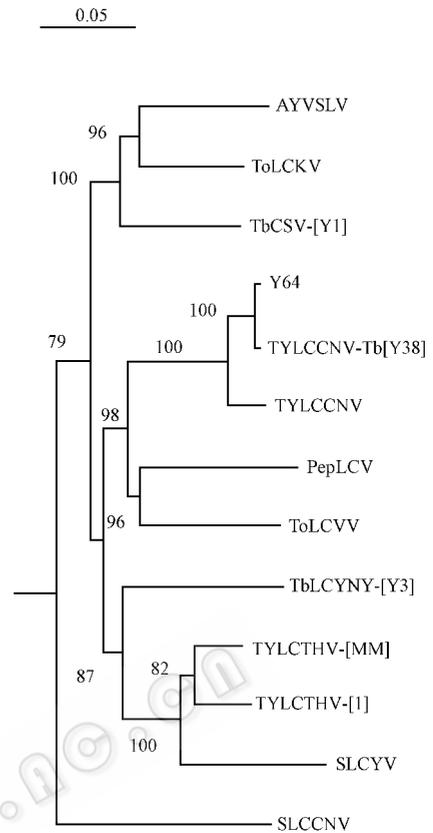


图 2 基于 DNA-A 构建的系统进化树

Fig.2 Relationship dendrogram based on DNA-A of Y64 and other 12 begomoviruses

## 2.3 病毒伴随 DNA $\beta$ 分子结构及与其它已报道 DNA $\beta$ 的同源性比较

根据 DNA $\beta$  的保守序列,设计引物 beta01 和 beta02,PCR 扩增后得到 1 条 1.3kb 特异条带,而健康对照则无任何条带。全序列测定表明, Y64 $\beta$  长 1340 个核苷酸(EMBL 登录号为 AJ421483),互补链上编码 1 个 13.6kD 的 C1 蛋白,在 761~994 位核苷酸之间富含 A(65.8%A),在 1240~15 位核苷酸之间含 1 个长为 115nt 保守区域(Conserved region, CR),CR 区含有双生病毒科病毒共有的茎环结构和 TAATAT-TAC(图 1-B)。

Y64 $\beta$  与已报道的其它 DNA $\beta$  的全序列同源性比较表明, Y64 $\beta$  与 TYLCCNV 各分离物伴随的卫星分子同源性最高,与 Y8 $\beta$ 、Y36 $\beta$  和 Y38 $\beta$  的同源性分别为 99.3%、99.5% 和 99.5%,与胜红蓟、秋葵、棉花上的卫星 DNA $\beta$  的同源性较低,为 51.2~66.4%。从 C1 编码的氨基酸序列比较看, Y64 $\beta$ C1 与 Y8 $\beta$ 、Y36 $\beta$  和 Y38 $\beta$  的同源性很高,分别为 100%、99.2% 和 100%,而与其它 5 个卫星分子的 C1 的同源性只有 29.4~61%。CR 是 DNA $\beta$  分子中最保守的区域,

Y64 $\beta$  与同种 TYLCCNV 的各个 DNA $\beta$  的 CR 区完全一致,与其它 5 个 DNA $\beta$  的 CR 区同源性也很高,达 93.9~98.3%(表 3)。

表 3 Y64 $\beta$  与其它双生病毒卫星 DNA $\beta$  的同源性比较(%)

Table 3 Percentages of nucleotide and amino acid sequence identities between DNA $\beta$  of Y64 and other begomoviruses(%)

Virus	Y8 $\beta$	Y36 $\beta$	Y38 $\beta$	AYVV $\beta$	BYVMV $\beta$	CLCuMV $\beta$ 01	CLCuMV $\beta$ 02	CLCuRV $\beta$
DNA $\beta$ <sup>a</sup>	99.3	99.5	99.5	66.4	51.8	51.4	51.2	52.8
Cl <sup>b</sup>	100	99.2	100	61	29.4	33.1	33.1	33.1
CR <sup>a</sup>	100	100	100	98.3	94.8	94.8	95.7	93.9

<sup>a</sup> Nucleotide; <sup>b</sup> Amino acid.

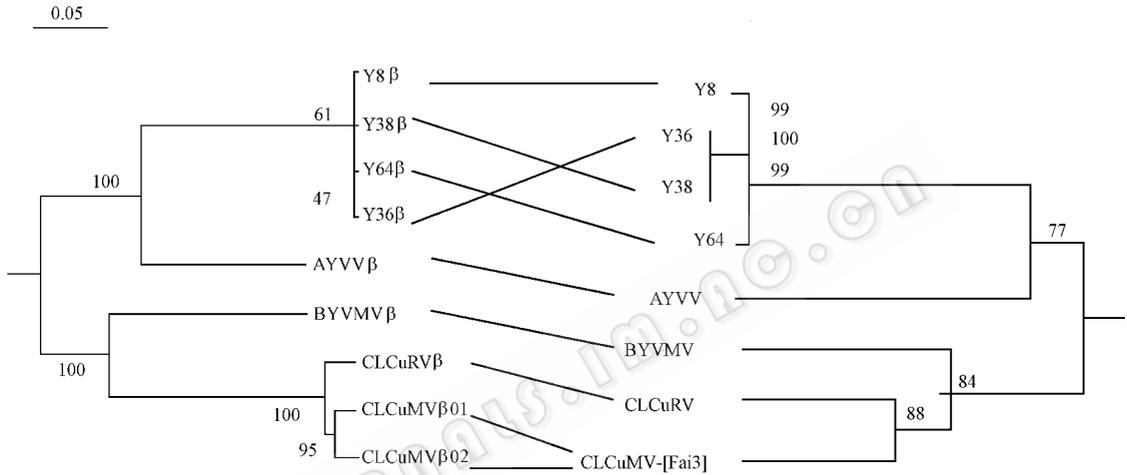


图 3 卫星 DNA 分子与其辅助病毒的进化分析

Fig. 3 Phylogenetic trees of complete nucleotide sequences of DNA $\beta$  and their cognate helper viruses

### 3 讨论

我们对从云南杂草稀硷上分离到的 Y64 进行全基因组结构研究。序列分析发现, Y64 与 TYLCCNV 广西分离物及其烟草分离物 Y38 的同源性最高, 分别达 96% 和 99%。双生病毒科病毒全基因组核苷酸序列同源性小于 89%, 往往定名为不同病毒, 大于 89%, 则认为是同一病毒的不同株系<sup>[12]</sup>。由此, 我们认为 Y64 是 TYLCCNV 的 1 个分离物。

广西报道的 TYLCCNV 证实为单组分病毒<sup>[13]</sup>, 而我们对稀硷上的 Y64 用 DNA-B 特异引物 PCR 扩增和 Southern 杂交均未能检测到 DNA-B, 推测 Y64 可能也是单组分 Begomovirus。目前, 已发现含卫星 DNA $\beta$  分子的双生病毒 AYVV、CLCuMV 和 BYVMV 均为单组分病毒, 因此 Briddon<sup>[3,4]</sup> 认为 DNA $\beta$  只与单组分 Begomoviruses 相伴随。运用卫星 DNA $\beta$  的特异引物 beta01 和 beta02, 从 Y64 中分离到与病毒相伴随的卫星 Y64 $\beta$ 。研究发现, DNA $\beta$  被辅助病毒的

### 2.4 基因组 DNA-A 与其伴随卫星 DNA $\beta$ 分子共进化

DNA $\beta$  分子与其辅助的单组分双生病毒 DNA-A 分别用全序列(DNA $\beta$  或 DNA-A)构建系统关系树, 分析表明, 以 DNA-A 构建的进化树形成四大分支, TYLCCNV 的 4 个分离物(Y8、Y36、Y38 和 Y64)形成 1 个分支, AYVV 及 BYVMV 因同源关系较远分别形成 1 个分支, 从 CLCuMV-[Fai3] 和 CLCuRV 形成 1 个分支; 以 DNA $\beta$  构建的系统关系树形成与其伴随的辅助病毒 DNA-A 一一对应的四大分支(图 3)。这说明 DNA $\beta$  分子与其辅助病毒 DNA-A 是共同进化的。

外壳蛋白包裹, 由烟粉虱传播, 大小为 DNA-A 的一半, 除茎环结构和 TAATATTAC 外, 与病毒基因组 DNA-A 无序列同源性。Y64 $\beta$  含有的 CR 区, 推测是辅助病毒 DNA-A 编码的复制蛋白识别及互作位点, 其 A-rich 区可能是与卫星分子包装的尺寸要求相关的<sup>[14]</sup>。Y64 分离物中发现有 DNA $\beta$ , 进一步辅证 Y64 可能是单组分 Begomovirus。

杂草分布广泛, 生命力极强, 是多种病虫害赖以生存的重要中间寄主。从稀硷上分离到中国番茄黄化曲叶病毒, 说明稀硷是该病毒的重要中间寄主, 由于稀硷分布广, 因此有可能会造成该病毒发生面扩大, 目前该病毒已在云南和广西引起作物严重危害, 应引起重视。为了更好地了解我国双生病毒的类型及分布情况, 有必要对杂草上的 Begomoviruses 进行深入系统的研究。

### 参 考 文 献

[1] Harrison B D, Robinson D I. Natural genomic and antigenic variation  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- in whitefly-transmitted geminiviruses ( Begomoviruses ). *Annu Rev Phytopath* , 1999 , **37** : 369 – 398.
- [ 2 ] Lazarowitz D G. Geminiviruses : Genome structure and gene function. *Crit Rev Plant Sci* , 1992 , **11** ( 4 ) : 327 – 349.
- [ 3 ] Saunders K , Bedford I D , Briddon R W , *et al.* A unique virus complex causes ageratum yellow vein disease. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** : 6890 – 6895.
- [ 4 ] Briddon R W , Mansoor S , Bedford I D , *et al.* Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* , 2001 , **285** : 234 – 243.
- [ 5 ] 谢 艳 ,周雪平 ,李正和 ,等 . 与烟草曲叶病毒伴随的新型 DNA 分子鉴定 . 科学通报 , 2002 **47** ( 10 ) : 768 – 771.
- [ 6 ] Moflat A S. Plant pathology : Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* , 1999 , **286** : 1835.
- [ 7 ] Zhou X P , Xie Y , Zhang Z K. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting tobacco in Yunnan , China. *Arch Virol* , 2001 , **146** : 1599 – 1606.
- [ 8 ] 谢 艳 ,周雪平 ,张仲凯 ,等 . 从云南分离的烟草曲叶病毒为菜豆金色花叶病毒属的一个新种 . 科学通报 , 2001 , **46** ( 17 ) : 1459 – 1462.
- [ 9 ] 洪益国 ,蔡健和 ,王小凤 ,等 . 中国南瓜曲叶病毒 : 一个双生病毒新种 . 中国科学 ( B 辑 ) , 1994 **24** ( 7 ) : 608 – 613.
- [ 10 ] 刘玉乐 ,蔡健和 ,李冬玲 ,等 . 中国番茄黄花曲叶病毒——双生病毒的一个新种 . 中国科学 ( C 辑 ) , 1998 **28** ( 2 ) : 148 – 153.
- [ 11 ] Zhou X P , Liu Y , Calvert L , *et al.* Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J Gen Virol* , 1997 , **78** : 2101 – 2111.
- [ 12 ] Fauquet C M , Bisaro D M , Briddon R W , *et al.* Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae* , and an updated list of begomovirus species. *Arch Virol* , 2003 , **148** : 405 – 421.
- [ 13 ] Yin Q Y , Yang H Y , Gong Q H , *et al.* Tomato yellow leaf curl China virus : monopartite genome organization and agroinfection of plants. *Virus Res* , 2001 , **81** : 69 – 76.
- [ 14 ] Zhou X P , Xie Y , Tao X R , *et al.* Characterization of DNA $\beta$  associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *J Gen Virol* , 2003 , **84** ( 1 ) : 237 – 247.

## Molecular Characterization of Tomato Yellow Leaf Curl China Virus and its Associated Satellite DNA Infecting *Siegesbeckia orientalis*

PENG Yan<sup>1</sup> XIE Yan<sup>1</sup> ZHANG Zhong-Kai<sup>2</sup> ZHOU Xue-Ping<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

(<sup>2</sup> Yunnan Biotechnology Research Institute , Yunnan Academy of Agricultural Sciences , Kunming 650223 , China )

**Abstract** : Virus isolate Y64 was obtained from *Siegesbeckia orientalis* in Honghe , Yunnan province. The complete nucleotide sequence of DNA-A was determined , it contains 2730 nucleotides. Comparisons show that the total DNA-A of Y64 has the highest sequence identity ( 99% ) with that of Tomato yellow leaf curl China virus ( TYLCCNV ) isolate Y38 , and 96% sequence identity with that of TYLCCNV Guangxi isolate , while less than 83% identities are found when compared with other begomoviruses isolated in Asian. It is concluded that Y64 infecting *Siegesbeckia orientalis* is an isolate of TYLCCNV. Satellite DNA molecule ( Y64 $\beta$  ) was found to be associated with Y64 using the primers beta01 and beta02. Y64 $\beta$  consists of 1340 nucleotides , with a functional ORF ( C1 ) in complementary-sense DNA. Y64 $\beta$  has 99.5% , 99.5% and 99.3% sequence identities with Y38 $\beta$  , Y36 $\beta$  and Y8 $\beta$  associated with TYLCCNV , respectively , and lower than 66.4% sequence identities are found with other reported satellite DNA molecules. Relationship dendrograms show that satellite DNA $\beta$  molecules are co-evolved with their help begomoviruses.

**Key words** : Tomato yellow leaf curl China virus , *Siegesbeckia orientalis* , Begomovirus , Satellite DNA $\beta$

Foundation item : National Natural Science Foundation for Outstanding Youth Scholars ( 30125032 )

\* Corresponding author. Tel : 86-571-86971680 ; Fax : 86-571-86971680 ; E-mail : zzhou@zju.edu.cn

Received date 03-26-2003