

产 PDG 杜仲内生菌的分离筛选和分类鉴定及生长条件研究

刘 超¹, 师俊玲¹, 周小娟¹, 杨保伟¹, 窦兴霞²

(1 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2 山东省临沂市 产品质量监督检验所, 山东 临沂 276004)

【摘 要】 【目的】分离筛选杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.) 树皮中产松脂醇二葡萄糖苷(Pinoresinol diglucoside, PDG)的内生真菌, 为 PDG 的生产提供参考。【方法】采用表面灭菌法分离杜仲内生真菌, 摇瓶培养分析各菌株产 PDG 的能力, 结合形态学特征和 rDNA 内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)序列分析对高产菌株进行鉴定, 研究培养温度、pH 对其生长的影响及其对不同碳源和氮源的利用情况。【结果】共分离得到 18 株内生真菌, 有 3 株具有产 PDG 能力, 其中以菌株 XP-8 的 PDG 产量最高(11.65 mg/L), 分类鉴定确定该菌株为拟茎点霉属(*Phomopsis* sp.)。菌株 XP-8 在 20~35 ℃、pH 4~8 的条件下均能较好生长, 在 28 ℃、pH=5 时生长最快; 菌株 XP-8 对麦芽糖和葡萄糖的利用能力较强, 不能利用苹果酸; 对硝酸钠的利用能力较强, 但不能利用天门冬氨酸。【结论】获得了高产 PDG 的菌株 XP-8, 确定了其分类学地位, 并研究了其生长特点。

【关键词】 杜仲; 松脂醇二葡萄糖苷; 拟茎点霉属; 分类鉴定; 生长条件

【中图分类号】 Q939.97

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)01-0203-07

Isolation, identification and growth conditions of endophytic fungi of *Eucommia ulmoides* Oliv. for production of PDG

LIU Chao¹, SHI Jun-ling¹, ZHOU Xiao-juan¹, YANG Bao-wei¹, DOU Xing-xia²

(1 College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Linyi Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Shandong Province, Linyi, Shandong 276001, China)

Abstract: 【Objective】 The study aimed at isolating pinoresinol diglucoside (PDG)-producing endophytic fungi from *Eucommia ulmoides* Oliv. to identify the strain with the highest yield of PDG and to investigate the basic conditions for its growth. 【Method】 Endophytic fungi were isolated from the surface sterilized bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. and then, cultivated in liquid broth at flask level to test the PDG production. The strain with the highest PDG production was selected and identified based on the morphological characteristics and the sequence of rDNA in the ITS district. Basic growth conditions of the strain were also studied in aspects of temperature, pH, carbon source and nitrogen source by the single-factor experimental design. 【Result】 Eighteen strains of endophytic fungi were isolated from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. Only three of them had the ability to produce of PDG. The strain XP-8, with the highest PDG production of 11.65 mg/L, was identified as *Phomopsis* sp. It could grow in a wide range of conditions from 20 ℃ to 35 ℃ and pH 4 to 8 with the best growth at 28 ℃ and pH 5. The strain XP-8 could use glucose and maltose, but not malic acid, among the tested carbon sources. Sodium nitrate showed to be the

* [收稿日期] 2010-06-18

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2008K02-09); 全国大学生科技创新项目(G07036)

[作者简介] 刘 超(1985—), 男, 河北沧州人, 在读硕士, 主要从事食品生物技术研究。

[通信作者] 师俊玲(1972—), 女, 陕西渭南人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事食品生物技术研究。

E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn

most favorable one among the tested nitrogen sources, whereas aspartic acid could not be used at all. 【Conclusion】 The PDG-producing endophytic fungi were isolated from *Eucommia ulmoides* Oliv.. The best strain having the highest PDG production was identified, and the basic conditions for its growth were also studied.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; pinoresinol diglucoside; *phomopsis* sp.; identification; condition for colony growth

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是传统的具降血压功能的名贵中药,其有化学降压药无法比拟的持续、稳定和无副作用等优点^[1]。自 Charles 等^[2]证明杜仲中最主要的降压成分是松脂醇二葡萄糖苷(Pinoresinol diglucoside, PDG)以来,人们对杜仲皮中 PDG 的提取与分离进行了大量研究^[3-4]。但是由于杜仲皮来源较为有限,以及生产周期长和其中的 PDG 含量低等原因^[5-6],从杜仲皮中提取 PDG 并不适用于药物的工业化生产。微生物发酵法生产植物中的功效成分,具有简便、环保、成本低等优点^[7]。李爱华等^[8]从杜仲中分离到了 1 株能够产 PDG 的杜仲内生真菌,王维等^[9]和刘超等^[10]对其发酵条件进行优化以后,该菌的 PDG 产量可以达到 30 mg/L,从而为发酵法生产 PDG 提供了可能。

在前述研究中,作者只是根据形态学特征对分离到的菌种进行了初步的分类鉴定。由于大多数植物内生真菌在培养条件下不产生孢子和分生孢子器,不利于对菌种进行准确的分类鉴定。分子生物学技术的发展,为真菌的准确分类提供了有效的辅助手段^[11]。研究表明,真菌的 rDNA-ITS 区 DNS 进化速度较快,不同种属间基因序列的差异性大,能够表现出广泛的序列多态性;且其 ITS 序列长度适中,携带着足量的遗传信息,能够对那些生长条件特殊、形态特征相似的菌种进行准确分类^[12]。

为了完善以前的研究工作并获得更为丰富的 PDG 产生菌资源,本研究对杜仲的内生真菌进行了重新分离,分析了其 PDG 产生能力,综合形态特征和分子生物学技术对 PDG 高产菌株进行了准确分类,并研究了其生长条件,以期为该菌的人工培养和进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 分离材料

杜仲皮,于 2008-11 采自西北农林科技大学校园,选择 10 龄以上无病害杜仲树取皮待用。

1.2 培养基

试验采用的培养基有:(1)固体培养基。马铃薯

葡萄糖琼脂培养基(PDA),自然 pH(约 8.0);察氏琼脂培养基(CA),自然 pH(约 7.9)。(2)液体培养基。马铃薯葡萄糖培养基(PD),自然 pH(约 8.0)。(3)不同碳源培养基。用与蔗糖等摩尔量的葡萄糖、淀粉、麦芽糖、苹果酸、乳糖、木糖替换察氏琼脂培养基中的蔗糖,制成不同碳源的培养基,自然 pH(约 7.9)。(4)不同氮源培养基。用与硝酸钠等摩尔量的尿素、甘氨酸、硫酸铵、天门冬氨酸、半胱氨酸、精氨酸替换察氏琼脂培养基中的硝酸钠,配制不同氮源的培养基,自然 pH(约 7.9)。(5)不同 pH 培养基。用 HCl 和 NaOH 将察氏琼脂培养基的 pH 值分别调为 3,4,5,6,7,8,9,10,11 和 12,备用。

1.3 菌种的分离、纯化和保藏

参考 Larran 等^[13]的方法进行杜仲内生菌的分离。取新鲜杜仲树皮约 10 g,切成大小约 5 mm×5 mm 的小块,先在体积分数 70%的酒精中浸泡 1 min,然后用质量分数 3%的次氯酸钠(有效氯)溶液处理 2 min,无菌水清洗 2 次后,接种于 PDA 平板上,于 25 ℃下培养 3~5 d,待树皮切口处有菌丝萌发时,挑取形态不同的菌落,经过分离、筛选、纯化得到纯菌。将纯化后的菌种移至 PDA 斜面,于 4 ℃保存备用。

1.4 产 PDG 菌株的筛选

取 1.3 中保存的内生菌,于 PDA 斜面在 28 ℃条件下进行活化,然后转入种子培养液(250 mL 三角瓶装 PD 培养基 100 mL),于 28 ℃、180 r/min 摇床培养 4 d;以体积分数 10%的接种量转入发酵培养基(250 mL 三角瓶装 PD 培养基 100 mL)中,于 28 ℃、180 r/min 发酵培养 10 d。

发酵结束后,破碎菌粒,破碎液于 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入 2 倍体积的体积分数 95%乙醇过夜。取醇沉液在 5 000 r/min 下离心 10 min,上清液减压蒸馏,除去乙醇^[9]。经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,进行高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)分析。HPLC 检测条件为:检测波长 228 nm,柱温 25 ℃,

流速 1 mL/min,进样量 10 μL,流动相为体积分数 26%甲醇^[14]。

1.5 菌种的分类鉴定

1.5.1 形态学观察 将活化后的菌株 XP-8 点接于 PDA 平板,28 ℃ 恒温培养 15 d,培养期间每隔 24 h 观察 1 次菌落和形态特征。待长出黑色载孢体后制片,在 Motic BA 400 数码成像光学显微镜下获取菌种孢子的显微形态,用软件 Motic 3.1 Preview Software 对所得图像进行分析。

1.5.2 ITS 区序列分析 首先用液氮研磨法破碎真菌细胞,然后用 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒(杭州博日科技有限公司)提取待测菌的总 DNA;用真菌鉴定专用试剂盒 Fungal Identification PCR Kit(大连宝生物公司)进行 ITS 区全序列(包括 ITS1、5.8S rDNA、ITS2)的 PCR 扩增。扩增条件为:94 ℃ 10 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。

扩增产物的由上海桑尼生物科技有限公司进行序测定。测序的正向引物为 5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3';反向引物为 5'-CGC-CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'。

1.5.3 序列分析与系统树的构建 将测序获得的 ITS 序列,在 GenBank 中用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线比对功能进行比对,获得同源序列,选择数据库中那些 ITS 区序列和 XP-8 相似度高的菌株构建系统树。用 ClustalX 1.8 进行序列比对,保存为 Phylip 格式,以 DNADIS 软件计算距离矩阵,用 Neighbor-Joining 分析方法进行分子系统学分析,用自展法(Bootstrap)进行统

计学检测(自展数据集为 1 000 次),用 TreeView 软件显示系统树^[15-16]。

1.6 菌落生长条件分析

1.6.1 温度条件 用无菌打孔器切取直径 5 mm 的菌丝圆片移植于察氏培养基平板中央,分别置于 5,10,15,20,25,28,30,35,37 和 40 ℃ 的恒温恒湿培养箱中,培养 4 d 后测量菌落直径,计算菌落直径延伸速度,每个处理重复 3 次。菌落直径延伸速度的计算公式为:

菌落直径延伸速度(cm/d)=(4 d 后的菌落直径(cm)-0.5(cm))/4。

1.6.2 培养基的 pH 值及碳、氮源的利用 用打孔器打取直径 5 mm 的菌丝圆片,分别移植于不同 pH 值的察氏培养基平板、不同碳源培养基平板和不同氮源培养基平板的中央,于 28 ℃ 下恒温培养 4 d 后测量菌落直径,计算菌落直径延伸速度(同 1.6.1),每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 产 PDG 菌种的分离、筛选

本研究共分离得到 18 株菌落特征各不相同的杜仲内生菌菌株。用 HPLC 对分离到的 18 株杜仲内生菌进行产 PDG 能力鉴定,发现有 3 株菌即 XP-3、XP-8 和 XP-11 能产生 PDG,其中菌株 XP-8 产 PDG 的能力最强,产量可达 11.65 mg/L,分别是 XP-3(0.874 mg/L)的 13 倍和 XP-11 的(3.254 mg/L)4 倍。标样和 XP-8 发酵液的 HPLC 图谱见图 1。根据上述结果,选择 XP-8 作为后续研究用菌种,并对其进行分类鉴定。

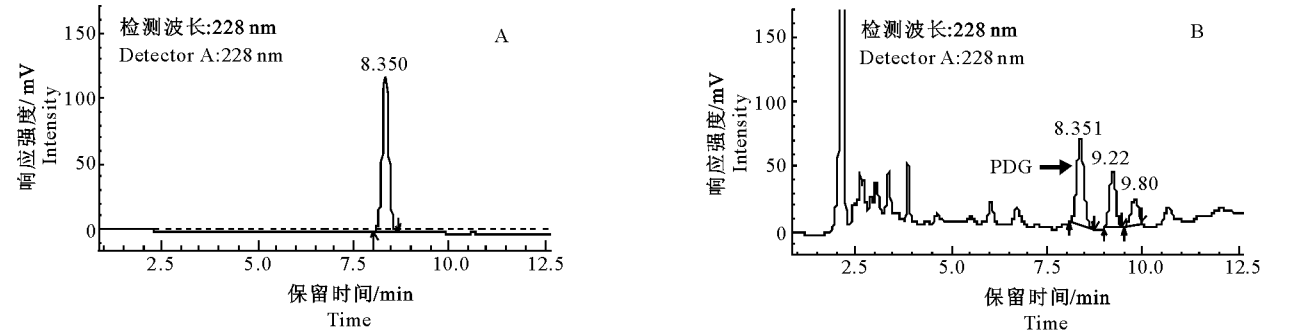


图 1 PDG 标样(A)和菌株 XP-8 发酵液(B)的液相分析

Fig.1 Chromatogram of PDG standard (A) and sample of XP-8(B)in the HPLC analysis

2.2 内生菌 XP-8 的形态学鉴定

2.2.1 菌落特征 将菌种 XP-8 接种于 PDA 平板,每天进行菌落形态观察。结果发现,28 ℃ 培养 5 d 后菌丝铺满平板;气生菌丝不发达,白色,呈匍匐

状生长;菌落紧贴培养基,呈同心圆状(图 2-A)。继续培养至 15 d,菌落上长出肉眼可见的黑色载孢体;菌丝呈丛卷毛状,中央浓厚,呈乳白色;外围菌丝较稀疏,略带黄色,基质呈灰黄色(图 2-B)。

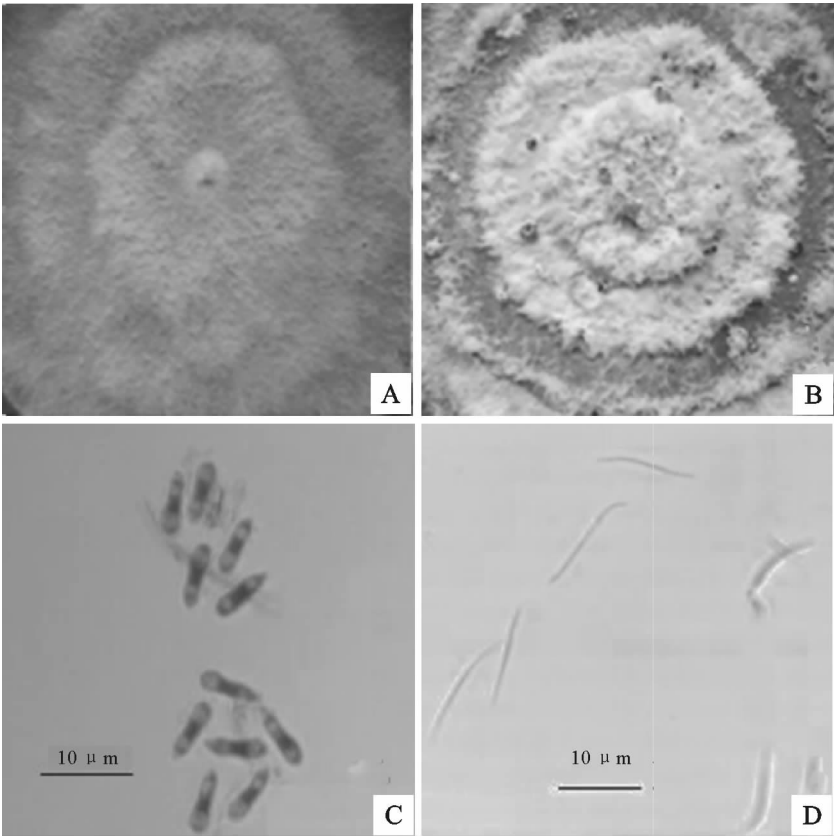


图 2 菌株 XP-8 的形态特征观察

A、B. XP-8 在 PDA 平板上分别生长 5 和 15 d 的菌落特征;C、D. XP-8 在 PDA 培养基上生长 15 d 时产生的甲型和乙型分生孢子

Fig. 2 Morphological characteristics of the strain XP-8

A、B. The colonies formed of XP-8 in PDA medium after 5 days and 15 days, respectively;

C、D. The α -conidia and β -conidia, respectively, XP-8 in PDA medium after 15 days

2.2.2 显微形态特征 取菌种在 PDA 培养基上培养 15 d 后长出的黑色载孢体,于显微镜下进行观察,可见切开后的载孢体中有 2 种形态的孢子,其中甲型孢子为单孢,无色,长椭圆形,具 2 个小油球,大小为 $(2.1\sim2.5)\mu\text{m}\times(5.8\sim7.5)\mu\text{m}$ (图 2-C);乙型孢子为单孢,无色,线形,直或钩状,大小为 $(1\sim2)\mu\text{m}\times(16\sim22)\mu\text{m}$ (图 2-D)。

综合以上菌落和形态特征,对比《真菌分类鉴定手册》,初步鉴定该菌株为拟茎点菌属。

2.3 ITS 序列鉴定

PCR 扩增及序列分析获得菌株 XP-8 rDNA-ITS 区的基因片段(图 3)和相应的碱基序列(Gen-Bank 接受号为 GQ906158)。图 3 结果表明,内生菌 XP-8 的 rDNA-ITS 区基因序列长度为 456 bp。系统发育树分析结果(图 4)表明,内生菌 XP-8 与拟茎点霉属菌种 *Phomopsis* sp. *Vega*E3-78(EF687934)处于同一个分支中,说明其与此菌株的进化距离最近。序列同源性分析表明,二者的序列同

源性达 96.2%。上述结果显示,杜仲内生菌 XP-8 与 *Phomopsis* sp. *Vega*E3-78(EF687934)同属拟茎点霉属。

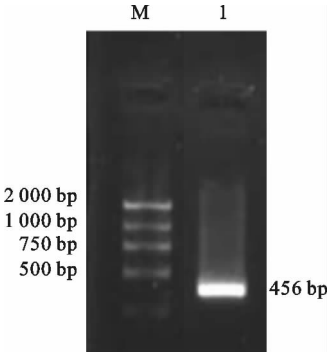


图 3 菌株 XP-8 rDNA-ITS 区的 PCR 扩增

M, DNA Marker DL2000;1. 菌株 XP-8

Fig. 3 PCR result of the rDNA-ITS of the strain XP-8

M, DNA Marker DL2000;1. XP-8

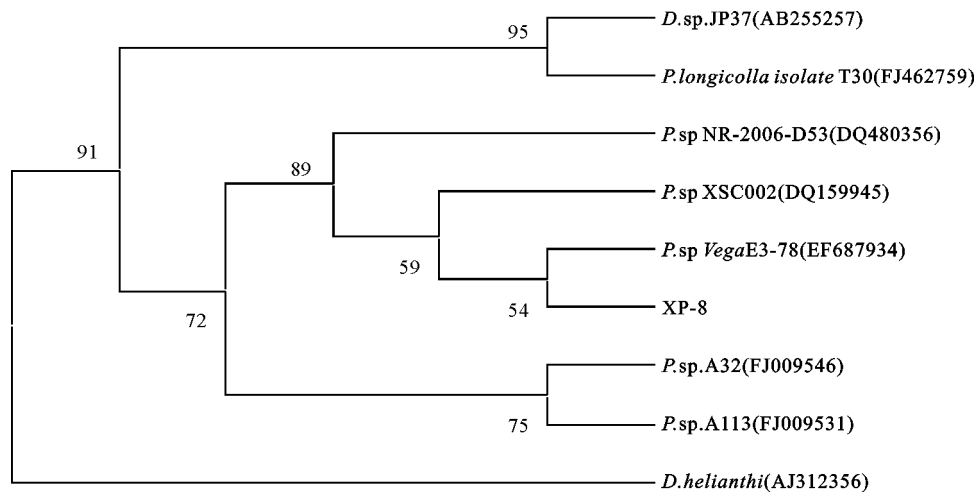


图 4 基于菌株 XP-8 ITS 区基因序列构建的系统发育树
节间数字代表 bootstrap 支持值;P 代表 *Phomopsis*;D 代表 *Diaporthe*
Fig. 4 Phylogenetic tree of the strain XP-8 obtained on the basis of the Neighbor-Joining analysis of the domain gene sequences in the ITS direct
The numbers in each node represents bootstrap support value;P is *Phomopsis*;D is *Diaporthe*

2.4 XP-8 的生长条件分析

2.4.1 温度 由图 5 可知,在察氏培养基及自然 pH(约 7.9)条件下,菌株 XP-8 在 20~35 ℃ 的温度条件下均能较好生长,在 28 ℃ 时菌落扩展速度最快;低于 5 ℃ 或高于 40 ℃ 时,菌体几乎不能生长。

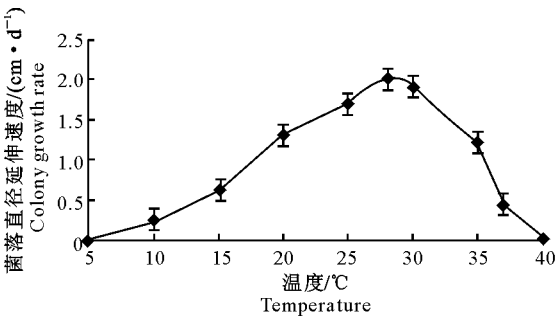


图 5 培养温度对杜仲内生菌 XP-8 生长的影响
Fig. 5 Effect of temperature on the XP-8 growth

2.4.2 培养基 pH 由图 6 可见,在察氏培养基上,培养温度为 28 ℃ 时,菌株 XP-8 于 pH 3~12 的条件下均能较好地生长,但以 pH 值为 5 时生长最快。由此可见,XP-8 在弱酸环境下的生长速度明显大于中性和碱性条件。

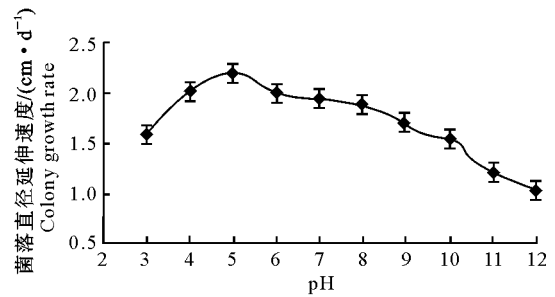


图 6 培养基 pH 对杜仲内生菌 XP-8 生长的影响
Fig. 6 Effect of medium pH on the XP-8 growth

2.4.3 碳源和氮源 在其他营养物质和培养条件均相同的条件下,以含量相同但种类不同的糖类为惟一碳源时,菌株 XP-8 在培养基上的生长速度并不相同,生长速度快说明其对该碳源的利用率高,反之则说明其对该碳源的利用率低。

由图 7 可以看出,菌株 XP-8 不能利用单糖中的苹果酸;对葡萄糖的利用能力大于木糖;对麦芽糖的利用能力最强;对可溶性淀粉的利用能力最弱。因此,麦芽糖是培养该菌种的最适碳源。

在其他营养物质和培养条件均相同的条件下,以含量相同但种类不同的含氮物质为惟一氮源时,菌株 XP-8 在培养基上的生长速度不同,表明其对不同氮源的利用率不同。由图 8 可知,菌株 XP-8 对无机氮源硝酸钠的利用能力大于其他有机氮源。在以硝酸钠为惟一氮源时,菌落的生长速度最快;以天门冬氨酸为惟一氮源时,菌落不能生长;以甘氨酸、半胱氨酸、精氨酸为氮源时,菌落均能较好地生长。因此,硝酸钠是培养该菌的最适氮源。

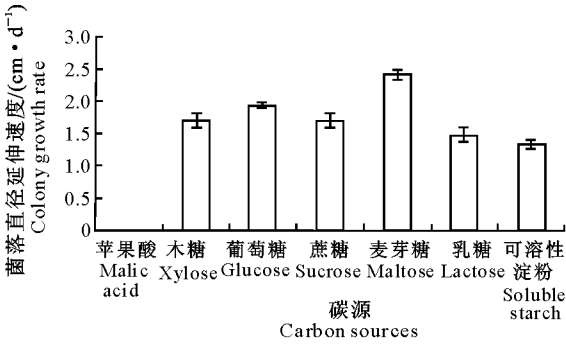


图 7 不同碳源对杜仲内生菌 XP-8 生长的影响
Fig.7 Effects of carbon sources on the colony growth

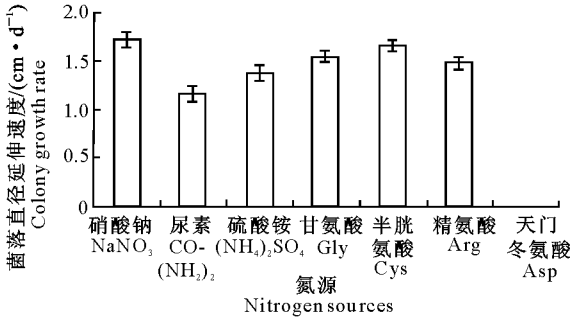


图 8 不同氮源对杜仲内生菌 XP-8 生长的影响
Fig.8 Effect of nitrogen sources on the colony growth

3 讨论与结论

ITS 区基因序列分析显示,本研究分离所得的 PDG 高产菌株 XP-8 为拟茎点霉属,其形态学特征和生理生化特征与已报道的拟茎点霉属基本吻合^[17],说明鉴定结果可靠;菌株 XP-8 能够利用多种碳源和氮源,生长的适宜温度和 pH 范围较宽,且生长速度快,说明其易于培养,适于大规模生产,在 PDG 生产中有一定的开发前景。

[参考文献]

[1] 王亚琴,张康健. 杜仲次生代谢物的研究进展 [J]. 中草药, 2004,35(7):836-839.
Wang Y Q,Zhang K J. Advances in research on secondary metabolites of *Eucommia ulmoides* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2004,35(7):836-839. (in Chinese)

[2] Charles J S,Ravikumt P R,Huang F C. Isolation and synthesis of pinoresinol diglucoside,a major antihypertensive principle of Tu-Chung(*Eucommia ulmoides* Oliv.) [J]. Journal of the American Chemical Society,1976,98(17):5412-5413.

[3] 陈晓青,李宇萍,彭密军,等. 杜仲中松脂醇二葡萄糖苷的提纯 [J]. 中南工业大学学报:自然科学版,2003,34(3):262-265.
Chen X Q,Li Z P,Peng M J,et al. The extraction and purification of pinoresinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. Journal of Central South University of Technology:Natural Science,2003,34(3):262-265. (in Chinese)

[4] 姜新义,杨中林,李 萍. 杜仲中松脂醇二葡萄糖苷含量测定的样品处理方法优化 [J]. 药学进展,2009,33(1):30-33.
Jiang X Y,Yang Z L,Li P. Optimization of processing method for determination of pinoresinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences,2009,33(1):30-33. (in Chinese)

[5] 吴吉龙,张国清. 杜仲皮的采剥与加工 [J]. 安徽林业,1999(4):19.
Wu J L,Zhang G Q. The picking and process technology of *Eucommia ulmoides* park [J]. Journal of Anhui Forestry,1999(4):19. (in Chinese)

[6] 王丽楠,杨美华. HPLC 法测定不同生长年限杜仲皮中松脂醇

二葡萄糖苷 [J]. 中草药,2009,40(4):651-653.
Wang L N,Yang M H. HPLC method for determination of PDG in different growing years of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2009,40(4):651-653. (in Chinese)

[7] 林福呈,刘小红,王洪凯,等. 紫杉醇及其产生菌的研究现状与展望 [J]. 微生物学报,2003,43(4):534-538.
Lin F C,Liu X H,Wang H K,et al. Recent research and prospect on taxol and its producing fungi [J]. Acta Microbiologica Sinica,2003,43(4):534-538. (in Chinese)

[8] 李爱华,樊明涛,师俊玲. 杜仲内生菌的分离及产 PDG 菌株的筛选 [J]. 西北农业学报,2007,27(3):616-619.
Li A H,Fan M T,Shi J L. Isolation of endophytes from *Eucommia ulmoides* Oliv. and screening for strains with PDG production [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2007,27(3):616-619. (in Chinese)

[9] 王 维,师俊玲,杨保伟. 茎点菌属产松脂醇二葡萄糖苷的培养条件优化 [J]. 农业工程学报,2008,24(6):287-290.
Wang W,Shi J L,Yang B W. Optimization of conditions for production of pinoresinol diglucoside by a strain of *Phoma* sp [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2008,24(6):287-290. (in Chinese)

[10] 刘 超,师俊玲,王 维,等. 杜仲茎点霉 SP-16F 产松脂醇二葡萄糖苷营养条件的优化 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(7):157-164.
Liu C,Shi J L,Wang W,et al. Optimization of nutrient elements for the production of pinoresinol diglucoside by a strain of *Phoma* sp. of *Eucommia ulmoides* Oliv. using response surface analysis [J]. Journal of Northwest A&F University:Natural Science Edition,2009,37(7):157-164. (in Chinese)

[11] Fungaro M H,Magnani M,Vilas-Boas L A,et al. Genetic relationships among Brazilian strains of *Aspergillus ochraceus* based on RAPD and ITS sequences [J]. Canadian Journal of Microbiology,2004,50(11):985-988.

[12] Iwen P C,Hinrichs S H,Rupp M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens [J]. Medical Mycology,2002,40(1):87-109.

[13] Larran S,Perello A,Simon M R,et al. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum*

L.) leaves [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18(7): 683-686.

[14] 陈晓青,李宇萍,彭密军,等. 杜仲中松脂醇二葡萄糖甙的提纯 [J]. 中南工业大学学报:自然科学版, 2003, 34(3): 262-265.
Chen X Q, Li Z P, Peng M J, et al. The extraction and purification of pinoresinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* Olive [J]. Journal of Central South University of Technology: Natural Science Edition, 2003, 34(3): 262-265. (in Chinese)

[15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

[16] 冯光惠,余华顺,姚 娟,等. 基于 rDNA ITS-1 序列酿酒酵母的系统分类学研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(11): 191-195.
Feng G H, Yu H S, Yao J, et al. Phylogenetic reclassification analysis of *S. cerevisiae* based on the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence of rDNA [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(11): 191-195. (in Chinese)

[17] 蒋贤权,王 伟,唐建辉,等. 甜瓜采后拟茎点霉菌腐烂病及其生物防治 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(2): 129-135.
Jiang X Q, Wang W, Tang J H, et al. Characteristics and bio-control of *Phomopsis* rot on postharvest rockmelon [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2007, 34(2): 129-135. (in Chinese)

.....

(上接第 202 页)

[5] 王丽媛,叶建荣,李兴民,等. PCR 技术检测食品与饲料中动物源成分 [J]. 保鲜与加工, 2006, 6(4): 33-36.
Wang L Y, Ye J R, Li X M, et al. Detection of meat component and meat species in food and feedstuff using PCR technique [J]. Storage and Process, 2006, 6(4): 33-36. (in Chinese)

[6] Chantangsi C, Lynn D H, Brandl M T, et al. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus tetrahymena [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(10): 2412-2423.

[7] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270: 96-99.

[8] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. Phil Trans R Soc B, 2005, 360: 1847-1857.

[9] 辛翠娜,彭建军,王 莹,等. Cytb 分子标记技术在物种鉴定中的应用 [J]. 野生动物杂志, 2009, 30(4): 217-221.
Xin C N, Peng J J, Wang Y, et al. Application of Cyt b gene as a molecular marker in species identification [J]. Chinese Wildlife, 2009, 30(4): 217-221. (in Chinese)

[10] 付 景,张迎春. 27 种瓢虫 mtDNA-CO I 基因序列分析及系统发育研究 [J]. 昆虫分类学报, 2006, 28(3): 179-185.
Fu J, Zhang Y C. Sequence analysis of mtDNA-CO I gene and molecular phylogeny on twenty-seven species of coccinellids (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. Entomotaxonomia, 2006, 28(3): 179-185. (in Chinese)

[11] 张淑霞,杨 岚,杨君兴. 近代鸟类分类与系统发育研究进展 [J]. 动物分类学报, 2004, 29(4): 675-682.
Zhang S X, Yang L, Yang J X. On the modern avian taxonomy and phylogenetics [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2004, 29(4): 675-682. (in Chinese)

[12] 汪小龙,潘 洁,王 师. 细胞色素 B 基因 PCR-RFLP 鉴定阿胶原料 [J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2006, 36(4): 645-648.
Wang X L, Pan J, Wang S. Identification of the raw material of Ejiao using the *CytB* gene PCR-RFLP method [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition, 2006, 36(4): 645-648. (in Chinese)

[13] 高 琳,徐幸莲,周光宏. 应用 PCR-RFLP 法鉴别肉制品中的猪和牛源性成分 [J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(2): 135-138.
Gao L, Xu X L, Zhou G H. Identification of porcine and bovine-derived materials in meat products by PCR-RFLP assay [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2008, 31(2): 135-138. (in Chinese)

[14] Wolf C, Rentsch J, Hübner P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 1350-1355.