

野生虫草无性型分离株分子鉴定及遗传多样性的研究

冯德龙^{1,2}, 胡惠萍², 黄龙花², 谢意珍², 吴清平², 霍光华¹

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物新技术公共实验室, 广东广州 510070)

摘要: 虫草具有较高的食用与药用价值, 本文以 19 株野生虫草分离株为研究材料, 利用 ITS 引物进行 PCR 扩增、测序, 并从 Genbank 上下载虫草属相关序列, 构建系统发育树, 并对 19 株虫草无性型分离物进行 ERIC-PCR 扩增, 同时还检测了上述无性分离物发酵液中虫草素的含量。系统发育分析表明在分子水平上 19 株虫草的无性型分离菌株, 都为蛹虫草 (*Cordyceps militaris*)。与高雄山虫草 (*C. takaomontana*)、蝉花 (*C. cicadae*)、古尼虫草 (*C. gunnii*) 以及冬虫夏草 (*C. sinensis*) 平均遗传距离分别为 0.1269、0.1228、0.2251 和 0.2354, 在遗传距离上, 与高雄山虫草和蝉花较近, 与冬虫夏草较远。ERIC-PCR 相似系数在 0.8 水平上, 可以将 19 个蛹虫草菌株分为 3 组, 相似系数在 0.9 水平上 19 株蛹虫草菌株可以分为 8 组。对蛹虫草发酵液中虫草素含量检测发现, 所有蛹虫草无性型分离物发酵液都含有虫草素, 最高的可达到 126.33 mg/L, 为现有的蛹虫草生产菌株 JD 的 119 倍。

关键词: 虫草; 鉴定; 遗传多样性; 虫草素

文章编号: 1673-9078(2017)4-108-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.017

Molecular Identification of Wild *Cordyceps* Asexual Isolates and Investigation of Their Genetic Diversity

FENG De-long^{1,2}, HU Hui-ping², HUANG Long-hua², XIE Yi-zhen², WU Qing-ping², HUO Guang-hua¹

(1. College of Life Sciences and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, 330045, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: *Cordyceps* has high edible and medicinal values. Using nineteen wild *Cordyceps* isolates as the experimental material, internal transcribed spacer (ITS) universal primers were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification and the products were sequenced. *Cordyceps*-related sequences were downloaded from GenBank to construct a phylogenetic tree, the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR amplification of 19 *Cordyceps* asexual isolates was conducted, and the cordycepin content of fermentation broths of the isolates was determined. Phylogenetic analysis showed that all 19 *Cordyceps* asexual isolates were *C. militaris*. The average genetic distances of *C. militaris* from *C. takaomontana*, *C. cicadae*, *C. gunnii*, and *C. sinensis* were 0.1269, 0.1228, 0.2251, and 0.2354, respectively. In terms of genetic distance, *C. militaris* was relatively close to *C. takaomontana*, and far from *C. sinensis*. ERIC-PCR results showed that the 19 *C. militaris* strains could be divided into three distinct groups with a similarity coefficient of 0.8, and could also be divided into eight groups with a similarity coefficient of 0.9. Measurement of the cordycepin contents of the fermentation broths of the isolates showed that cordycepin could be detected in all broths, and the highest content reached 126.33 mg/L, which was 119 times as much as that of the existing production strain JD.

Key words: *Cordyceps*; identification; genetic diversity; cordycepin

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 广东省科技计划农业攻关项目 (2012A020100010); 国家科技支撑计划项目 (2013BAD16B05); 国家自然科学基金项目 (31560574)

作者简介: 冯德龙 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 大型真菌资源开发与利用; 胡惠萍为并列第一作者

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全监测与控制 and 食药用菌生物工程研究; 霍光华 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药用成分鉴定、制备与产品开发

虫草隶属于子囊菌门(*Ascomycota*)肉座菌目(*Hypocreales*)虫草菌科(*Ordyicipitaceae*)虫草属(*Cordyceps*)^[1]。因虫草中含有丰富的多糖、虫草素、虫草酸及腺苷等成分而具有较强的抗菌、抗肿瘤、降血糖等作用^[2-5],而备受人们关注并成为国内外研究热点^[5]。尤其是冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)近些年来过度采挖,使得天然冬虫夏草资源更加紧缺,因此如何选育出更好的虫草菌种,用于人工大规模产业化生产,以取代日益枯竭的虫草资源就显得尤为重要。详细了解虫草菌株之间的亲缘关系能为将来高产优质的无性分离物的育种提供丰富的遗传材料,所以研究虫草无性型菌株的遗传多样性有着重要的意义。

随着分子进化论的发展,研究者可以在分子水平上研究物种的亲缘关系。ITS 是 rDNA 的内转录间隔区,不加入成熟核糖体,受到的选择压力较小,进化速度较快,在绝大多数真核生物中有着极为广泛的序列多态性。另外 ITS 序列种内同源性高,而在种间又有不同程度的变异,这些优点使得 ITS 序列成为理想

的种间鉴定分子标记方法,并已广泛地应用于真菌分子分类学、遗传多样性及菌株鉴定等方面的研究^[6,7]。ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus)是一种肠杆菌基因间重复共有序列,在染色上的分布和拷贝数有着种间的特异性,从而被广泛应用于细菌分型、流行病学调查和分子微生态学研究^[8,9]。近年来 ERIC-PCR 技术在一些真菌以及大型食用菌上成功应用^[10,11]。本研究拟以 rDNA ITS 序列和 ERIC-PCR 标记来探讨虫草菌的无性分离物间的亲缘关系,同时,检测了这些菌株发酵液中的虫草素,并将检测结果与其亲缘关系进行比较,以期对虫草资源的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本研究从自然保护区分离出 18 株虫草菌株进行实验,见表 1。

表 1 供试虫草菌株

Table 1 *Cordyceps* isolates used in this study

菌株编号	地理来源	拉丁名	登录号
W141437	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351799
W141434	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351800
W141451	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351801
W141449	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351802
W141433	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351803
W141456	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351804
W141904	四川海螺沟	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351805
W141457	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351806
W141432	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351807
W141458	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351808
W141436	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351809
E141314	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351810
E142054	湖北神农架国家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351811
E141327	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351812
E141313	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351813
E141315	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351814
I140012	吉林左家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351815
M150613	安徽天堂寨国家自然保护区	<i>Cordyceps</i> .sp	KU351817
JD	广东省微生物研究所	<i>Cordyceps militaris</i>	KU351816
--	日本长野	<i>Cordyceps militaris</i>	AB027379*
NIFTS HF774	日本	<i>Cordyceps takaomontana</i>	AB189444*
AMV1504		<i>Cordyceps takaomontana</i>	KF937322*
4644	--	<i>Cordyceps cicadae</i>	JX488484*

转下页

接上页			
4646	--	<i>Cordyceps cicadae</i>	JX488475*
K(M)	澳大利亚	<i>Cordyceps gunnii</i>	AJ309344*
YC0171MT08	--	<i>Cordyceps gunnii</i>	KF003087*
G97022	--	<i>Cordyceps gunnii</i>	AJ309340*
L95D05(5137)	中国云南	<i>Cordyceps sinensis</i>	AJ309357*
L95D04(RZ)	中国云南	<i>Cordyceps sinensis</i>	AJ309354*
ASI-7004	韩国	<i>Ganoderma lucidum</i>	JQ520167*

注: *为来自 GenBank 的序列。

1.2 仪器设备和试剂

PCR 仪, Thermo 公司; 核酸电泳仪, Bio-Rad 公司; 超净工作台, 苏净安泰公司; 控温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司; 凝胶成像系统, 英国 UVITEC 公司; 恒温水浴锅, 广东环凯微生物科技有限公司; 安捷伦高效液相色谱仪 1200, 美国安捷伦科技有限公司; 琼脂糖凝胶、TE buffer、2000bp marker、PCR Taq mix、异戊醇和 CTAB, 上海生工公司; 氯仿, 广州化学试剂厂。

1.3 培养基

1.3.1 菌丝培养培养基

CPDA(g/L): 去皮土豆 200, 葡萄糖 20, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 20, pH 自然; 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。CYM(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 2, 酵母膏 2, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 20, pH 自然; 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3.2 摇瓶培养基

液体 CYM 培养基(g/L): 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 2 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, pH 自然; 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.4 方法

1.4.1 菌丝培养

菌种在 CPDA 斜面培养基上 25 °C 活化, 待斜面长满, 将菌种接至铺好噻洛芬膜的菌丝培养平板上, 25 °C 培养 7~10 d, 从噻洛芬膜上刮下菌丝, 冷冻干燥, -20 °C 保存备用。

1.4.2 DNA 提取和纯化

菌丝使用液氮研磨, 使用 CTAB 法提取 DNA, 氯仿: 异戊醇 (24:1) 除杂、异丙醇沉淀 DNA, 75% 乙醇洗涤, 干燥, 最后用 TE 缓冲液溶解 DNA。提取的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.4.3 ITS-PCR 扩增及产物分析

ITS-PCR 扩增采用真菌核糖体基因间隔区通用引

物 ITS1F 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS 4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 对虫草 ITS 序列进行扩增^[6]。ITS-PCR 扩增体系: 2×PCR Taq mix 25 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 20 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 总体积 50 μL。ITS-PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s; 55 °C 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 共循环 30 次, 最后 72 °C、10 min, PCR 产物 4 °C 保存。

ITS-PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在凝胶成像系统下成像保存。PCR 扩增产物回收纯化后, 送至上海生工生物技术有限公司测序。双向序列用 BioEdit 软件拼接后提交至 GenBank。

1.4.4 ERIC-PCR 扩增及产物分析

ERIC-PCR 扩增, 采用 ERIC1R 5'-ATGTAAGCTC CTGGGGATTAC-3'; ERIC2 5'-AAGTAAGTGAC TGGGGT GAGCG-3' 引物^[8]对虫草进行 ERIC-PCR 进行扩增。ERIC-PCR 扩增体系: Taq 酶 1.5 U, DNA 模板 1 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, dNTPs 0.3 mmol/L, Mg^{2+} 3 mmol/L, ddH₂O 补足, 10×PCR buffer, 共 25 μL。ERIC-PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min; 51 °C、1 min; 72 °C 延伸 3 min; 共 35 次循环, 最后 72 °C、10 min, PCR 产物 4 °C 保存。

ERIC-PCR 产物通过 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 4 V/cm, 电泳 60 min。以电泳图谱中 DNA 片段在某样品中出现赋值“1”, 不出现赋值“0”为依据, 计算样品间相似系数, 采用 UPGMA 聚类分析法, 利用 NTSYS pc (version 2.10e) 版软件自动生成聚类图。

1.4.5 系统发育树构建

测得序列在 GenBank 上 Blast, 根据已有的虫草属真菌的 ITS 序列信息, 确定测得的 19 个菌株 ITS 序列。同时结合 GenBank 中 10 个虫草属菌种的 ITS 序列, 利用 ClustalX 软件进行多重序列比对, 由 MEGA Version 6.05 软件进行分析。系统发育树构建: 按照 NJ (neighbor-joining) 法, 基于 Kimura 双参数模型, 以灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 为外类组群 (outgroup), 经 bootstrap (1000 次循环) 检测系统可靠性。

1.4.6 摇瓶培养及虫草素测定

将菌种在 CYM 平板 25 °C 活化后, 分割成黄豆大小, 接种到 250 mL 摇瓶含有 100 mL CYM 液体培养基中, 25 °C、135 r/min 培养 20 d, 收集菌丝体烘干称质量测生物量, 发酵液过滤后 4 °C 保存备用, 将处理好的样品进行 HPLC 检测^[12]。

2 结果与讨论

2.1 ITS 序列的结构和变异分析

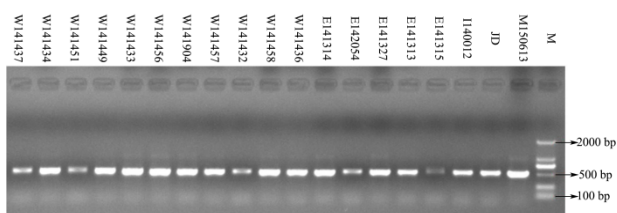


图 1 19 株虫草 ITS-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis images of ITS-PCR amplified products of 19 *Cordyceps* strains

如图 1 所示 19 个虫草 ITS-PCR 产物大小相近为 500 bp 左右, 将测定的 19 个虫草 ITS 序列与 11 个来自 Genbank 相关种的 ITS 序列对位排列, 共有 589 个碱基位点。ITS 的 GC 含量变化很大, 48.3%~64.2%。ITS 序列发生插入和缺失的频率比较高, 保守位点 253 个, 可变位点 322 个, 变异率为 54.66%, 简约信息位点 187 个, 虫草 ITS 序列包含较多遗传信息。

2.2 ITS 序列系统发育的构建与分析

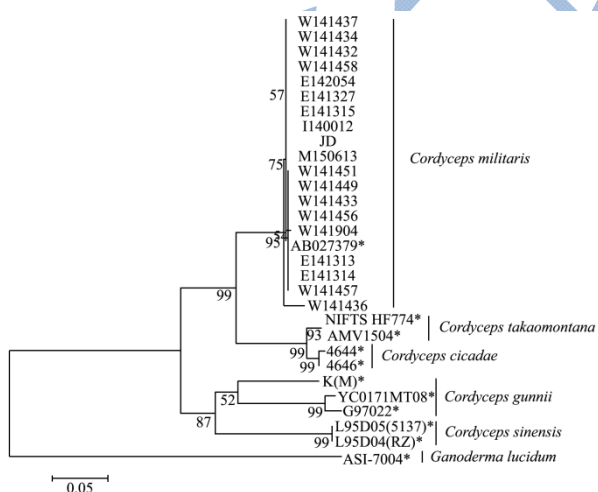


图 2 虫草分离菌株 ITS 序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree indicating relationships among *Cordyceps* isolates based on ITS region sequences

注: *表示来自 GenBank 的序列。

由图 2 可知, 虫草子实体和虫草分离物的 ITS 序列与 GenBank 中的蛹虫草 ITS 序列几乎没有差异, 所

有的虫草全部聚成一类, 而且 19 株虫草无性型 ITS 序列测序后经 NCBI 上 blast 结果比对都是蛹虫草, 本研究中虫草的无性分离物即为蛹虫草的无性型。蛹虫草之间的 ITS 序列差异不大, 菌株 E141327 与 W141904、E141315、JD、M150613 之间的遗传距离为 0.004, 另外菌株 JD 作为商业栽培种与野外采集种 W141434、W141451、W141432、W141458、E142054 以及 E141327 之间的距离都为 0, 与吉林采集的野生菌种 W141451、W141449、W141433、W141456、W141457、W141432、W141436、E141314 的遗传距离为 0.02, 与四川采集的野生菌种 W1411904 的遗传距离为 0.04, 说明蛹虫草遗传距离与地域差异之间存在一定的关系, 进一步研究蛹虫草遗传多样性与地域差异之间关系, 需要更为广泛的实验材料。蛹虫草与虫草属的高雄山虫草、蝉花、古尼虫草以及冬虫草夏草以置信度值 99% 被分开, 与其遗传距离分别为 0.127、0.123、0.222 和 0.235, 蛹虫草在遗传距离上与高雄山虫草、蝉花和冬虫草夏草相比较遗传距离最远的是冬虫草夏草。

2.3 ERIC-PCR 指纹图谱分析

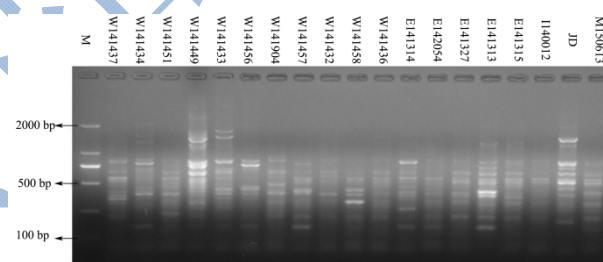


图 3 蛹虫草分离菌株 ERIC-PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis pattern of ERIC-PCR products of *Cordyceps militaris* isolates

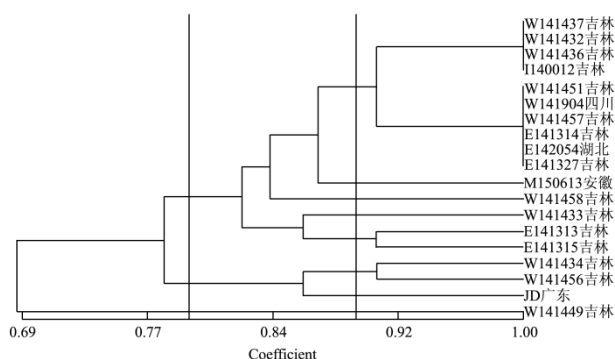


图 4 ERIC-PCR 聚类图

Fig.4 Dendrogram of *Cordyceps militaris* test isolates based on ERIC-PCR data

从图 3 可知, ERIC-PCR 产物大小 0.15~1.5 kb, 各菌株扩增条带数为 5~12 条, 平均每个菌株扩增 8 条带。从图谱分析, 蛹虫草条带特征丰富, 表明蛹虫

草具有丰富的遗传多样性, 菌种采自吉林地区的 W141437、W141432 和 W141436 具有相似的带型, 采自吉林的 W141449 与吉林地区的 W141437、W141432、W141436 在 1.3 kb 和 1.8 kb 的位置上具有两条特征带, 分别采集自湖北的 W142054 和采集自四川的 W141904 地域上虽不是同一地区, 但二者分别在 8.6 kb、6.6 kb、3.1 bp 和 2.1 kb 处都具有相似的带型出现, 与采集自安徽的 M150613 相比, 只在 5.0 kb 处少一条带。

从图 4 可以看出相似系数在 0.8 水平上, ERIC-PCR 可以将蛹虫草 19 个菌株分为 3 组, W141449 为一组, 第二组: W141434、W141456 和 JD; 第三组: W141437、W141432、W141436、I140012、W141451、W141904、W141457、E141314、E142054、E141327、M150613、W141458、W141433、E141313 和 E141315。相似系数在 0.9 水平上 19 株蛹虫草菌种可以分为 8 组。可见蛹虫草的无性型菌株的遗传基础较宽, 并显示出较丰富的遗传多样性。

2.4 虫草素测定及分析

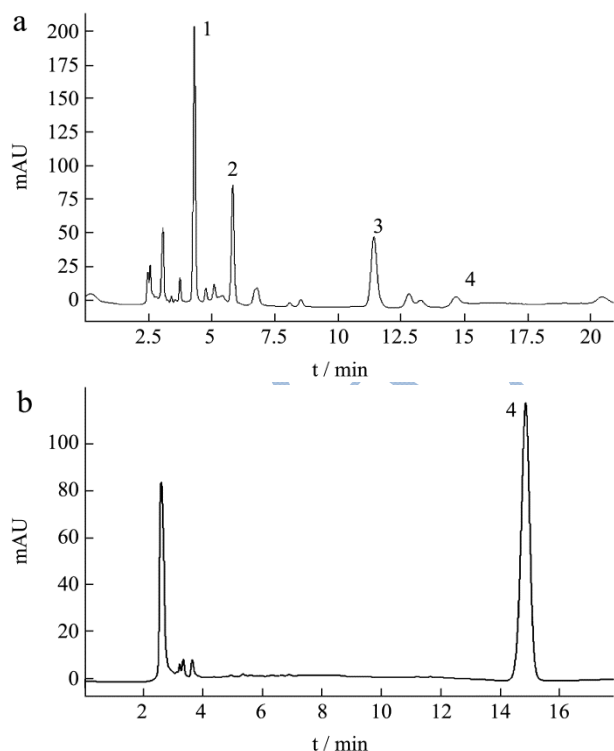


图5 菌丝体 (a) 和发酵液 (b) HPLC 分析图谱

Fig.5 HPLC chromatograms of mycelium (a) and fermentation broth (b)

注: 1 表示尿苷 Uridine; 2 表示鸟苷 Guanosine; 3 表示腺苷 Adenosine; 4 表示虫草素 Cordycepin。

从图 5 可知, 菌丝体的核苷成分比发酵液的成分复杂, 发酵液核苷成分单一, 但其中虫草素的含量远

高于菌丝体。

从表 2 可知, 所有的蛹虫草菌株的发酵液中均含有虫草素, 菌株发酵液虫草素含量最高的是含量最低的 119 倍, 在吉林左家采集到的菌种较多, 但同时发酵液中含虫草素的含量差异很大; 吉林左家采集的蛹虫草菌种与四川海螺沟、湖北神农架、安徽天堂寨采集到的蛹虫草菌种在发酵液虫草素含量的比较上看, 不能说明那个省份采集到的菌种一定比另外某个省份采集到的菌种性状优良。也进一步说明采集到的蛹虫草菌种具有丰富的种内多样性, 其中分离自吉林左家自然保护区的菌株 E141313 发酵液的虫草素含量达到 126.33 mg/L 为现有的蛹虫草生产菌株 119 倍, 具有很好开发应用前景。

表 2 菌株发酵液中虫草素含量比较

Table 2 Comparison of the yields of cordycepin in the fermentation broth of each strain

编号	发酵液虫草素产量/(mg/L)
W141449	7.75
W141434	3.08
I140012	1.67
W141458	34.41
E141313	126.33
W141433	4.27
W141451	56.08
E141314	52.05
W141456	109.33
JD	1.06
E141327	14.97
W141904	90.97
W141457	51.33
W141436	23.40
E141315	15.27
W141432	60.29
W141437	34.44
E142054	47.08
M150613	48.34

3 结论

3.1 本文运用 ITS 序列对供试菌株进行系统发育分析, 将供试菌株聚成 5 组, 聚成同一组的虫草菌株 ITS 序列与蛹虫草同源性非常高, 为 99%, 从分子水平鉴定了采集的虫草菌株为蛹虫草。ITS 区的碱基变异为区分虫草属的不同种提供了充分的信息, 但是种内菌株的同源性很高, 往往只是在少数几个位点上发生了变异, 这与之前唐传红等利用 rDNA ITS 序列发现蛹虫

草具有很小遗传分化的结果一致^[13]。所以要对蛹虫草种内多样性分析还需要借助更精确的分子标记技术进行研究。

3.2 ERIC-PCR 被广泛应用于细菌分型、流行病学调查和分子微生物学研究^[8,9]。陈迎春等以大肠杆菌 MG1655 为研究对象对 ERIC-PCR 产物形成规律进行研究,认为如果细菌基因组中含有 ERIC 序列,那么 ERIC-PCR 的扩增产物通常一端含有 ERIC 序列,而另一端则是随机匹配;如果细菌基因组中不存在 ERIC 序列,ERIC-PCR 就成为一种较特殊的随机扩增^[14]。因此可产生具有较高重复性和一定特异性的指纹图谱。从而认为 ERIC-PCR 是一种半随机性质的 PCR。本文对蛹虫草 ERIC-PCR 研究表明,相似系数在 0.9 水平上 19 株蛹虫草菌种可以分为 8 组。这与唐传红等利用 ERIC-PCR 对虫草分型的结果类似:相似系数在 0.8 水平可以将 19 个蛹虫草菌株分为 8 组。ERIC-PCR 的方法在虫草的无性分离物遗传多样性研究中可以有效的将供试的虫草菌株分开,而且由于实施这一试验只需一对引物,且稳定性好,因此可以用于相关真菌的遗传多样性研究。

3.3 从虫草素检测结果看,虫草无性分离物的发酵液中均含有虫草素,结合 ERIC-PCR 分型,相似系数在 1 的两组中,W141437、W141432、W141436 和 I140012 这四个采自吉林地区的菌株中除 I140012 发酵液中虫草素含量(1.67 mg/L)较低外,其余三株虫草发酵液虫草素含量相近平均为 39.37 mg/L;另外一组 W141451、E141314、E141327、E142054、W141904 和 W141457 中,W141904 采自四川地区含量较高(90.97 mg/L),而采自吉林地区的 E141327 较低(14.97 mg/L),其他四株发酵液虫草素含量均相近,平均为 51.63 mg/L。发酵液虫草素含量最高的 E141313 达到 126.33 mg/L,与发酵液虫草素含量次高的 W141456 15.27 mg/L 两株均采集自吉林左家自然保护区,但二者在 ERIC-PCR 分型上差异较大。分离株从 ERIC-PCR 分型和在相同条件下产虫草素含量差异可以看出蛹虫草种内的多样性。另外,筛选出采集自吉林地区的 E141313 虫草素含量 126.33 mg/L 是现有生产菌株 JD 的 119 倍,为后续开发高产虫草素发酵生产或是栽培提供了优良的菌种资源。

参考文献

- [1] Sung G H, Hywel-Jones N L, Sung J M, et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *Clavicipitaceae* fungi [J]. *Studies in Mycology*, 2007, 57: 5
- [2] Ahn Y J, Park S J, Lee S G, et al. Cordycepin: selective

growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium spp* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(7): 2744-2748

- [3] Lin Y W, Chiang B H. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of radix astragali [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(3): 244-250
- [4] Soobong C, Mikyung C H, Dongwha J, et al. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus Linteus*, and *Paecilomyces Tenuipes* in 90% pancreatectomized rats [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2014, 68(11): 2257-64
- [5] Paterson R R M. *Cordyceps*-A traditional chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(7): 1469-1495
- [6] 黄龙花,吴清平,杨小兵,等.基于 ITS 序列分析探讨我国栽培凤尾菇的分类地位[J].*食用菌学报*,2009,16(2):30-35
HUANG Long-hua, WU Qing-ping, YANG Xiao-bing, et al. Taxonomic status of *Pleurotus sajor-caju* cultivated in China based on ITS sequence analysis [J]. *Acta Edulis Fungi*, 2009, 16(2): 30-35
- [7] 苏春丽,唐传红,张劲松,等.基于 rDNA ITS 序列探讨中国栽培灵芝菌株的亲缘关系[J].*微生物学报*,2007,47(1):11-16
SU Chun-li, TANG Chuan-hong, ZHANG Jin-song, et al. The phylogenetic relationship of cultivated isolates of *Ganoderma* in China inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(1): 11-16
- [8] Wu S, Wu Q, Zhang J, et al. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria Monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China [J]. *Food Control*, 2015, 47: 340-347
- [9] 郑扬云,吴清平,吴葵,等.华南四省食品中空肠弯曲菌分离株的毒力相关基因分析和 ERIC-PCR 分型[J].*微生物学报*,2014,54(1):14-23
ZHENG Yang-yun, WU Qing-ping, WU Kui, et al. Virulence-associated gene detection and ERIC-PCR typing of *Campylobacter Jejuni* strains isolated from foods in four southern Chinese provinces [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(1): 14-23
- [10] Redondo C, Cubero J, Melgarejo P. Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis [J]. *Mycopathologia*, 2009, 168(1): 11-22
- [11] 温亚丽,曹晖,潘迎捷.ERIC 技术在紫木耳亲缘关系鉴定上的应用研究[J].*菌物学报*,2005,24(1):53-60

- WEN Ya-li, CAO Hui, PAN Ying-jie. Application of ERIC method to the affinity among *Auricularia* strains [J]. *Mycosystema*, 2005, 24(1): 53-60
- [12] 刘艳芳,唐庆九,杨焱,等.虫草素高产菌株的筛选及菌丝体中核苷类成分的分析[J].天然产物研究与开发,2010,22(6): 1061-1064
- LIU Yan-fang, TANG Qing-jiu, YANG Yan, et al. Screening of *Cordyceps* strains with high cordycepin contents and analysis of nucleotides in mycelia [J]. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22(6): 1061-1064
- [13] 唐传红,唐庆九,张劲松,等.基于 rDNAITS 序列和 ERIC-PCR 研究虫草真菌无性分离物的遗传多样性[J].南京农业大学学报,2014,37(2):146-152
- TANG Chuan-hong, TANG Qing-jiu, ZHANG Jin-song, et al. Study on relationships between isolates from chongcao fruiting bodies based on rDNA ITS and ERIC-PCR [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(2): 146-152
- [14] 陈迎春,曹又方,赵立平.大肠杆菌 MG1655 菌株 ERIC-PCR 图谱主带序列组成分析[J].微生物学通报,2002,29(6):28-32
- CHEN Ying-chun, CAO You-fang, ZHAO Li-ping. Non-Random nature of genomic DNA amplification of *E. coli* K-12 MG1655 via ERIC-PCR [J]. *Microbiology*, 2002, 29(6): 28-32