

深港两地工程土壤真菌多样性分析

龙海^{1,2}, 章桂明¹, 汪莹^{1,2}, 程颖慧¹, 李芳荣¹, 王颖¹, 高瑞芳¹, 李一农^{1*}

(1. 深圳出入境检验检疫局, 广东深圳 518001; 2. 深圳市检验检疫科学研究院, 深圳市外来有害生物检测技术研发重点实验室, 广东深圳 518045)

摘要 [目的]对深圳和香港工程土壤的真菌种类进行检测。[方法]以深圳和香港两地不同深度(0.5、10.0、20.0和30.0 m)的工程土壤为研究对象,结合形态学和 ITS 序列扩增并测序的方法,分析土壤真菌多样性。[结果]共分离得到 934 个菌株,分别属于 79 个属 132 种。深圳土壤有 14 个属 19 种;香港土壤有 73 个属 122 种。66 个属 113 种只在香港有分布;7 个属 10 种只在深圳有分布。深港两地均有分布的有 7 个属 9 种。[结论]深港两地工程土壤真菌种类有一定差异性;香港工程土壤真菌种类较多,其中还包括多种植物病原真菌,土壤入境前必须进行检疫处理。

关键词 工程土壤;真菌多样性;形态学;分子生物学

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)27-0097-03

Analysis of Fungal Diversity in Engineering Soils from Shenzhen and Hongkong

LONG Hai^{1,2}, ZHANG Gui-ming¹, WANG Ying^{1,2}, LI Yi-nong^{1*} et al (1. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, Guangdong 518001; 2. Shenzhen Key Laboratory of Inspection Research & Development of Alien Pests, Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen, Guangdong 518045)

Abstract [Objective] The aim was to detect the fungal diversity in engineering soils from Shenzhen and Hongkong. [Method] The engineering soils of different depths (0.5, 10.0, 20.0 and 30.0) in Hongkong and Shenzhen were studied. The fungal diversity in soil was analyzed by the methods of morphological and ITS region amplification and sequencing. [Result] A total of 934 strains were isolated, belonging to 79 genera and 132 species, respectively. There are 14 genera and 19 species in the soil sample of Shenzhen. There are 73 genera and 122 species in that of Hongkong. 66 genera, 113 species are distributed only in Hongkong; 7 genera, 10 species are distributed only in Shenzhen. 7 genera, 9 species are distributed in Shenzhen and Hongkong. [Conclusion] The differences of fungal species in engineering soils between Shenzhen and Hongkong are significant. There are many kinds of fungi in the soil of Hongkong project, including many plant pathogenic fungi. Before entering, the soil must be treated with quarantine.

Key words Engineering soils; Fungal diversity; Morphology; Molecular biology

近年来,随着我国“一带一路”战略的深入推进,与周边国家或地区的跨境工程也正在筹划或开工建设中,一部分工程土壤有可能会进入我国境内。这就会涉及到土壤检疫问题,而我国目前缺乏相应的检疫标准或方法。为了应对可能出现的问题,笔者以深港两地不同深度的工程土壤为研究对象,结合形态学和分子生物学分析土壤真菌的多样性,以期后续风险分析和土壤检疫处理提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 供试土样 在香港设 3 个取样点,在深圳设 2 个取样点,每个取样点分别在 0.5、10.0、20.0 和 30.0 m 土层处各取 1 份样品,每份样品 3~5 kg,装入封口袋,置于土壤采集专用保藏箱(4℃),并应尽可能在原有状态下迅速送回实验室,-20℃保存。采样地点见表 1。

1.2 样品制备 将现场取回的 20 个原始样品分别置于灭菌的搪瓷盘中混匀,制成平均样品,棋盘式取 5 个平行样,每个样品 100 g,研磨,用孔径为 2 mm 的筛网过筛,去除杂质。共有 100 个试验样品。

1.3 分离接种 将试验样品每个称取 10 g 加入盛有 100 mL 无菌水的 500 mL 三角瓶中,置于振荡器上振荡 20 min,使土壤均匀分散在稀释液中成为土壤悬液。土壤分散后,吸取 5 mL 土壤悬液到 45 mL 稀释液中,依次按 10 倍法稀释到

10^{-3} 。取 1 mL 悬浮液均匀涂抹在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基平板上,于 25℃培养。

表 1 采样地点及其地理坐标

Table 1 Sampling sites and geographic coordinates

取样点 Sampling site	采样地点 Sampling position	经纬度 Latitude, longitude	海拔 Altitude m
A	香港米埔鱼塘	114°04'16.78" E, 22°31'32.35" N	51
B	香港米埔鱼塘	114°03'43.90" E, 22°29'23.40" N	51
C	香港米埔鱼塘	114°03'40.74" E, 22°29'28.17" N	51
D	深圳保税区	114°03'26.74" E, 22°30'11.64" N	21
E	深圳皇岗公园	114°03'23.82" E, 22°31'11.30" N	21

1.4 分离纯化及菌株保存 培养第 2 天开始观察并记录菌落数,对长出的菌丝及时纯化到 PDA 培养基上,观察记录菌落的生长速度、颜色变化、孢子的形成情况等,并拍照和保存菌种。

1.5 分子生物学检测

1.5.1 病菌的 DNA 提取。采用 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)试剂盒提取真菌菌丝 DNA。

1.5.2 内转录间隔区(ITS)PCR 扩增、测序和分析。应用引物 ITS4(5'-TCCTCGCTTATGATATGC-3')和 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')^[1]对 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50.0 μL,反应体系:10×Buffer(含

基金项目 国家质检总局科技计划项目(2015IK266)。

作者简介 龙海(1979-),男,安徽蒙城人,高级农艺师,博士,从事进出口植物检疫工作。*通讯作者,研究员,从事植物病理学研究。

收稿日期 2016-07-20

Mg²⁺) 5 μL, 2.5 μmol/L dNTP 5.0 μL, 10 μmol/L ITS4/ITS5 各 1.0 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL, 模板 DNA 1.5 μL, 加 ddH₂O 至 50.0 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 经 35 个循环(92 °C 变性 60 s, 57 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s), 最后 72 °C 延伸 10 min^[1]。取 5.0 μL 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物用 E. Z. N. A.™ Cycle - Pure Kit 纯化回收试剂盒纯化, 方法按照说明书进行。纯化后的 PCR 产物送至上海基康生物技术有限公司进行测序分析。用 BioEdit 7.0^[2] 对序列进行编辑, 在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行 BLAST 分析。

2 结果与分析

2.1 分离纯化 对广深港隧道工程 5 个取样点共 20 份原始土壤样品进行分离培养, 共计 934 个菌株。各取样点分离纯化的菌株数和鉴定的种属数见表 2。由表 2 可知, 取样点 A 分离得到的菌株数最多, 达 373 个, 取样点 E 分离得到的菌株数最少, 仅 118 个; 属数以取样点 C 最多, 达 37 个, 取样点 D 最少, 仅 9 个; 种数以取样点 A 最多, 达 55 个, 取样点 D 最少, 仅 12 个。对这些菌株全部进行了菌种保存和 DNA

提取。

表 2 各取样点土壤中分离出的菌株数和鉴定的种属数

Table 2 The number of fungal strains isolated and species/genus identified in the soil of each sampling point

取样点 Sampling sites	菌株数 The number of strain	属数 The number of genus	种数 The number of species
A	373	36	55
B	162	33	54
C	130	37	49
D	151	9	12
E	118	10	15

2.2 真菌多样性 由表 3 可知, 深港两地工程土壤中共鉴定出 79 个属 132 个种真菌。香港土壤样品中有真菌 73 个属 122 种; 深圳土壤样品中有真菌 14 个属 19 种。其中, 66 个属 113 种真菌只存在于香港段土壤样品中; 7 个属 10 种真菌只存在于深圳段土壤样品中。深港两地工程土壤样品中都存在的真菌为 7 个属 9 种。

表 3 深港两地工程土壤中的真菌多样性^[3-4]

Table 3 The fungal diversity in engineering soils from Shenzhen and Hongkong

属 Genus	种 Species	是否侵 染植物 Infect plant	分布 Distribution		属 Genus	种 Species	是否侵 染植物 Infect plant	分布 Distribution	
			深圳 Shenzhen	香港 Hongkong				深圳 Shenzhen	香港 Hongkong
<i>Acremonium</i>	<i>A. cellulolyticus</i>	否	否	是	<i>Monochaetia</i>	<i>M. camelliae</i>	是	否	是
	<i>A. sp.</i>	不详	否	是	<i>Montagnulaceae</i>	<i>M. sp.</i>	不详	否	是
	<i>A. strictum</i>	是	否	是	<i>Mortierella</i>	<i>M. alpina</i>	是	否	是
<i>Alternaria</i>	<i>A. porri</i>	是	是	否		<i>M. beljakovae</i>	不详	否	是
	<i>Ambomucor</i>	<i>A. seriatoinflatus</i>	不详	否	是	<i>Mucoromycotina</i>	<i>M. sp.</i>	不详	否
<i>Annulohyphoxylon</i>	<i>A. nitens</i>	不详	否	是	<i>Mycosphaerella</i>	<i>M. holualoana</i>	是	否	是
	<i>Apophysomyces</i>	<i>A. trapeziformis</i>	否	否	是	<i>Myrothecium</i>	<i>M. gramineum</i>	是	否
<i>Aporospora</i>	<i>A. terricola</i>	不详	否	是	<i>Nectria</i>	<i>N. sp.</i>	不详	否	是
	<i>Arthopyreniaceae</i>	<i>A. sp.</i>	不详	否	是	<i>Neosartorya</i>	<i>N. hiratsukae</i>	否	是
<i>Arthrimum</i>	<i>A. phaeospermum</i>	是	是	否	<i>Neurospora</i>	<i>N. intermedia</i>	否	否	是
	<i>A. sacchari</i>	是	否	是	<i>Nigrospora</i>	<i>N. oryzae</i>	是	否	是
<i>Arthrographis</i>	<i>A. kalrae</i>	否	否	是		<i>N. sp.</i>	不详	否	是
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. aculeatinus</i>	不详	否	是		<i>N. sphaerica</i>	是	否
<i>Aspergillus</i>	<i>A. nidulans</i>	否	否	是	<i>Paecilomyces</i>	<i>P. lilacinus</i>	是	否	是
	<i>A. niger</i>	是	是	否		<i>P. sp.</i>	不详	否	是
	<i>A. sp.</i>	不详	否	是	<i>Paraphaeosphaeria</i>	<i>P. sp.</i>	不详	否	是
	<i>A. sydowii</i>	是	是	是	<i>Penicillium</i>	<i>P. aculeatum</i>	是	否	是
<i>Aureobasidium</i>	<i>A. versicolor</i>	是	是	是		<i>P. citrinum</i>	是	否	是
	<i>A. pullulans</i>	是	否	是		<i>P. daleae</i>	是	否	是
	<i>A. sp.</i>	不详	否	是		<i>P. janthinellum</i>	是	否	是
<i>Bionectria</i>	<i>B. ochroleuca</i>	是	是	否		<i>P. oxalicum</i>	是	否	是
	<i>Bipolaris</i>	<i>B. sp.</i>	不详	否	是		<i>P. paxilli</i>	是	否
<i>Blakeslea</i>	<i>B. trispora</i>	是	否	是		<i>P. pimiteouiense</i>	否	否	是
	<i>Chaetomium</i>	<i>C. globosum</i>	是	否	是		<i>P. pinophilum</i>	是	是
<i>Cladosporium</i>	<i>C. sp.</i>	不详	是	是		<i>P. pulvillorum</i>	是	是	否
	<i>C. asperulatum</i>	是	否	是		<i>P. sp.</i>	不详	否	是
	<i>C. cladosporioides</i>	是	否	是	<i>Peniophora</i>	<i>P. verruculosum</i>	是	否	是
	<i>C. perangustum</i>	是	是	是		<i>P. incarnata</i>	否	否	是
<i>Cochliobolus</i>	<i>C. sp.</i>	不详	否	是		<i>P. sp.</i>	不详	否	是
	<i>C. kusanoi</i>	是	是	否	<i>Periconia</i>	<i>P. macrospinosia</i>	是	否	是

接下表

续表 3

属 Genus	种 Species	是否侵染植物 Infect plant	分布 Distribution		属 Genus	种 Species	是否侵染植物 Infect plant	分布 Distribution	
			深圳 Shenzhen	香港 Hongkong				深圳 Shenzhen	香港 Hongkong
<i>Colletotrichum</i>	<i>C. lunatus</i>	是	否	是	<i>Phaeoacremonium</i>	<i>P. parasiticum</i>	是	否	是
	<i>C. gloeosporioides</i>	是	否	是		<i>P. rubrigenum</i>	是	否	是
<i>Coprinellus</i>	<i>C. radians</i>	否	否	是	<i>Phaeoseptoria</i>	<i>P. musae</i>	是	否	是
	<i>C. sp.</i>	不详	否	是		<i>Phaeosphaeriopsis</i>	<i>P. musae</i>	是	否
<i>Curvularia</i>	<i>C. sp.</i>	不详	否	是	<i>Phanerochaete</i>	<i>P. sordida</i>	是	否	是
<i>Diaporthe</i>	<i>D. sp.</i>	不详	否	是	<i>Phialemonium</i>	<i>P. cf. curvatum</i>	不详	否	是
<i>Discosia</i>	<i>D. sp.</i>	不详	否	是		<i>P. dimorphosporum</i>	否	否	是
<i>Dokmaia</i>	<i>D. sp.</i>	不详	否	是	<i>Phialophora</i>	<i>P. calyciformis</i>	是	否	是
<i>Emericellopsis</i>	<i>E. donezkii</i>	否	否	是	<i>Phlebiopsis</i>	<i>P. gigantea</i>	是	否	是
	<i>E. humicola</i>	否	否	是	<i>Phoma</i>	<i>P. sp.</i>	不详	否	是
<i>Entomocorticium</i>	<i>E. sp.</i>	不详	否	是		<i>P. herbarum</i>	是	否	是
<i>Epicoccum</i>	<i>E. sorghi</i>	是	否	是		<i>P. macrostoma</i>	是	否	是
<i>Eupenicillium</i>	<i>E. parvum</i>	否	否	是		<i>P. multirostrata</i>	是	否	是
	<i>E. rubidurum</i>	否	否	是		<i>P. tropica</i>	是	否	是
	<i>E. sp.</i>	不详	否	是	<i>Phomopsis</i>	<i>P. sp.</i>	不详	否	是
<i>Eutypella</i>	<i>E. scoparia</i>	是	否	是	<i>Poitrasia</i>	<i>P. circinans</i>	是	否	是
	<i>E. sp.</i>	不详	否	是	<i>Pseudorobillarda</i>	<i>P. texana</i>	是	否	是
<i>Exserohilum</i>	<i>E. rostratum</i>	是	否	是	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>P. inflorescentiae</i>	是	否	是
<i>Fusarium</i>	<i>F. equiseti</i>	是	是	是		<i>P. lycopersici</i>	是	否	是
	<i>F. nematophilum</i>	是	否	是		<i>P. unguis - hominis</i>	否	否	是
	<i>F. oxysporum</i>	是	是	是	<i>Ramichloridium</i>	<i>R. apiculatum</i>	是	否	是
<i>Gliocladium</i>	<i>G. flavofuscum</i>	否	否	是	<i>Rhizopycnis</i>	<i>R. sp.</i>	不详	否	是
<i>Gongronella</i>	<i>G. bulteri</i>	是	是	是	<i>Rhytidhysterion</i>	<i>R. rufulum</i>	是	否	是
	<i>G. sp.</i>	不详	否	是	<i>Schizophyllum</i>	<i>S. commune</i>	否	否	是
<i>Graphium</i>	<i>G. dubautiae</i>	是	否	是	<i>Sporisorium</i>	<i>S. scitamineum</i>	是	否	是
<i>Hamigera</i>	<i>H. avellanea</i>	是	是	否	<i>Stagonospora</i>	<i>S. sp.</i>	不详	否	是
<i>Hypocrea</i>	<i>H. crassa</i>	否	否	是	<i>Staphylotrichum</i>	<i>S. coccosporum</i>	是	是	否
	<i>H. lixii</i>	是	是	是	<i>Teratosphaeria</i>	<i>T. zuluensis</i>	是	否	是
	<i>H. muroiana</i>	是	是	否	<i>Trichoderma</i>	<i>T. asperellum</i>	是	否	是
	<i>H. schweinitzii</i>	否	否	是		<i>T. aureoviride</i>	否	否	是
	<i>H. virens</i>	否	否	是		<i>T. koningiopsis</i>	是	否	是
<i>Lasiodiplodia</i>	<i>L. theobromae</i>	是	否	是		<i>T. longibrachiatum</i>	是	否	是
<i>Leptosphaeria</i>	<i>L. sp.</i>	不详	否	是	<i>Trichosporon</i>	<i>T. sp.</i>	不详	否	是
<i>Letendraea</i>	<i>L. helminthicola</i>	是	否	是		<i>T. asahii</i>	否	否	是
<i>Microsphaeropsis</i>	<i>M. arundinis</i>	是	否	是	<i>Verticillium</i>	<i>V. antillanum</i>	不详	否	是
<i>Minimidochium</i>	<i>M. sp.</i>	不详	否	是	<i>Zasmidium</i>	<i>Z. nocoxi</i>	不详	否	是

3 结论与讨论

(1) 该研究结果表明, 深港两地工程土壤中的真菌种类有差异。从各取样点的菌株和属、种数量来看, 香港米埔鱼塘 A 点分离到的菌株数远远多于其他各取样点分离到的菌株数, 而其他 4 个取样点分离到的菌株数量相差不多; 对于属和种的数量, 香港取样点的数量明显多于深圳取样点, 原因有待进一步研究。深港两地土壤样品中的真菌优势种群为青霉菌、镰刀菌和曲霉菌, 这些真菌种类繁多, 分布广泛, 适应性强。香港土壤样品中的特有种类大多是植物病原真菌, 需要做进一步的风险分析和致病性研究。

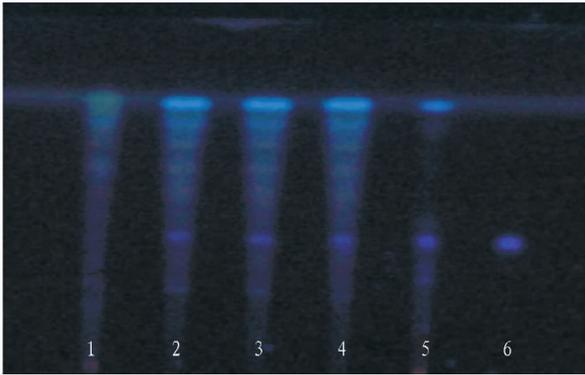
(2) 用分离培养和形态学方法鉴定土壤中的真菌, 缺点是周期较长, 鉴定结果不准确, 分离到的一些菌株鉴定不到种属等。为了弥补形态学方法的不足, 笔者利用分子生物学方法对形态学的鉴定结果进行验证, 尽量确保鉴定结果的准确性。对于土壤中不可培养的真菌, 只能利用分子生物学方

法进行检测和鉴定。末端限制性片段长度多态性(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)技术和变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)指纹图谱技术都可用于土壤真菌多样性的分析^[5-6]。这 2 种方法的优点是能够较快和较全面地分析土壤中真菌群落的构成, 缺点是难以得到菌株和进行后续研究。采用分离培养方法和分子生物学方法鉴定土壤真菌各有优缺点, 可根据不同研究目的进行选择, 以期得到较为理想的结果。

参考文献

- [1] WHITE T, BRUN J, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic [C]//INNIS M A, GLEFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: Acquire to methods and application. New York: Academia Press, 1990:315-322.
- [2] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT[J]. Nucleic acids symposium Series, 1999, 41:95-98.

2.4 川牛膝的薄层鉴别 从图4可以看出,3批供试品宫衣净酊色谱中,在与杯苋甾酮标准品和川牛膝对照药材的相应位置上显示相同颜色的荧光斑点,缺川牛膝的阴性对照在相同位置上无相应的斑点,说明阴性对照无干扰,薄层色谱法对川牛膝的鉴定具有专一性。



注:1. 宫衣净酊阴性样品;2~4. 宫衣净酊样品;5. 川牛膝对照药材;6. 杯苋甾酮标准品。

Note: 1. Negative sample of Gongyijing tincture; 2~4. Gongyijing tincture sample; 5. Control of Radix Cyathulae; 6. Standard substance of Radix Cyathulae.

图4 宫衣净酊中川牛膝的 TLC 图谱

Fig. 4 TLC of Radix Cyathulae in Gongyijing tincture

3 讨论与结论

酊剂是药物用规定浓度乙醇提取或溶解制成的澄明液体制剂,也可用流浸膏稀释制成。一般药材制成浓度20 g/mL,含剧毒药物10 g/mL。酊剂具有杂质含量少、药量高、服用剂量少、制备简单、易保存、不易变质的特点^[10]。宫衣净酊以补气益血、行滞祛瘀、利尿消肿的红花、葛根、急性子、川牛膝为主药。该组方中红花具有活血通经、祛瘀止痛、抗菌消炎、解热镇痛等功效,且对子宫具有兴奋作用,小剂量使用可使子宫发生节律性收缩,大剂量使用则使其收缩加强^[11];红花对妊娠动物的作用尤为明显^[12]。葛根具有解肌退热、生津止渴、透疹、升阳止泻等功效,且具有抗氧化损伤、抗细胞凋亡的作用^[13]。急性子具有消积、破血、软尖、抗菌、抗氧化等功效^[10],且具有兴奋子宫平滑肌、加强子宫收缩的作用^[14]。川牛膝具有活血祛瘀、利尿通淋、引血下行等功效^[15]。通过结合以上4种中药材的药理特性、配伍关系及酊剂的特点,该中药酊剂可用于治疗奶牛胎衣不下,且临床效果显著。

笔者参照《中国兽药典》中对红花、葛根、急性子、川牛膝4味药材的鉴别方法,通过对照品、供试品、阴性样品色谱的比较试验,确定了宫衣净酊中4味药材的薄层鉴别方法。这4种方法专属性强,制备简单,检测快速,样品与对照品相应的位置上显示相同的斑点,阴性对照无干扰,可作为宫衣净

酊中急性子、红花、葛根和川牛膝的定性鉴别方法。在葛根的鉴别中,《中国兽药典》2010年版(2部)葛根的薄层鉴定方法,结果发现斑点分离不明显;结合《中国药典》2010年版(1部)中当归拈痛丸中的处理方法,结果显示斑点清晰,说明薄层色谱方法对葛根的鉴定具有专一性。在红花的鉴别中,参照《中国兽药典》2010年版(1部)红花的薄层鉴定方法,结果发现相应的点分离较差,且其他成分干扰较严重;结合《中国药典》2010年版(1部)中化积口服液中药红花的处理方法,结果显示斑点清晰,说明薄层色谱方法对红花的鉴别具有专一性。在急性子的鉴别中,参照《中国兽药典》中急性子的鉴别方法试验,效果不明显;参照红花的鉴别方法,发现能分离对应斑点,但分离不彻底,后对急性子的不同展开液进行优化,发现采用三氯甲烷-甲醇(10.0:0.5)为展开剂比三氯甲烷-甲醇-水-甲酸(10.0:0.5)^[10]为展开剂的分离效果更好。在川牛膝的鉴别中,参照《中国兽药典》2010年版(2部)川牛膝的薄层鉴定方法,结果显示斑点清晰,说明薄层色谱方法对川牛膝的鉴别具有专一性。

宫衣酊剂为活血化瘀、促进产后勤宫的复旧、提高产后繁殖性能的新兽药产品,为了保证其临床疗效,应建立质量标准,以保证该酊剂的质量。该研究中采用的TLC法可以对宫衣净酊进行薄层鉴别,且方法简单,专一性较强,可以达到控制宫衣净酊质量的目的。

参考文献

- [1] 陈一资,胡滨. 动物性食品中兽药残留的危害及其原因分析[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(2):162-166.
- [2] 王兰. 抗生素污染现状及对环境微生物的影响[J]. 药物生物技术,2006,13(2):144-148.
- [3] 杨志强,李建喜,王学智. 中药研究新进展和新技术[J]. 兽医导刊,2007(9):33-35.
- [4] 李双亮,崔保安,张红英. 中药在兽医临床中应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2009(1):94-96.
- [5] 崔东安,王学智,王旭荣,等. 正交试验法优选宫衣净酊渗漉提取工艺研究[J]. 中国兽药杂志,2013,47(11):50-53.
- [6] 谢家声,杨锐乐,李世宏,等. 宫衣净酊剂及宫衣净 II 号合剂防治奶牛胎衣不下效果观察[J]. 中兽医学杂志,2008(增刊):47-49.
- [7] 吕长淮. 薄层色谱法在药物分析中的应用进展[J]. 中国药房,2006,17(22):1748-1749.
- [8] 任丽花,辛蕊华,程龙,等. 金根苓连散的质量标准研究[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(8):169-172.
- [9] 许春燕,刘希望,杨亚军,等. 银翘蓝芩口服液薄层色谱鉴别方法研究[J]. 动物医学进展,2015(11):40-43.
- [10] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 北京:中国农业出版社,2010:453.
- [11] 董玉睿. 浅谈西红花的药理研究概况[J]. 天津中医学院学报,2000,19(2):53-55.
- [12] 高其铭. 中药红花的药理研究概况[J]. 中西医结合杂志,1984,4(12):758.
- [13] 楚纪明,马树运,李海峰,等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品,2015,17(2):142-146.
- [14] 李琼阁,胡敦梅,丁玉峰. 中药急性子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国药师,2012,15(2):262-264.
- [15] 赵兴梅,徐光忠,李建利,等. 川牛膝和怀牛膝的现代药理研究概况[J]. 华西药学报,2004,19(3):205-207.

(上接第99页)

- [3] 中华人民共和国 WTO/TBT-SPS 国家通报咨询中心. 中国国家有害生物检疫信息平台[DB/OL]. www.pestchina.com.
- [4] CAB International. Crop protection compendium[M]. Wallingford, UK: CAB International, 2016.

- [5] 尹承苗,王功帅,李园园,等. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析[J]. 生态学报,2014,34(4):834-846.
- [6] 夏国围,贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报,2014,54(12):1489-1499.