

AFLP 法分析染料对黄孢原毛平革菌的损伤效应

戴兴春^{1,2}, 武琳慧¹, 吴林林¹, 黄民生^{1*}

(1. 华东师范大学环境科学系, 上海 200062; 2. 扬州大学环境科学与工程学院, 扬州 225000)

摘要:利用 AFLP 对 DNA 碱基序列分辨率高的特性, 研究纯培养条件下染料对黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)菌株 DNA 的损伤效应. 在对黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)AFLP 最佳引物筛选的基础上, 通过分析最佳引物扩增结果中 DNA 相似性、染料浓度与 DNA 相似性关系以及构建 UPGMA 相似性树状图, 评价染料对 *P. chrysosporium* DNA 损伤效应. 结果表明, AFLP 法可较好反映染料对 DNA 损伤效应, 在优选的 3 种引物组合中, E-AAC/M-CAA 引物组合 AFLP 扩增效果最好, 共获得 35 条 DNA 扩增条带, 其中有 12 条具有特异性, 多态性比率 34.3%; 在进行 DNA 相似性分析和 UPGMA 法聚类分析后发现, AFLP 技术较好地表达了 DNA 相似性与染料浓度的正相关关系, 并且显示 *P. chrysosporium* 对染料损伤效应敏感, 染料浓度不宜高于 50 mg/L, 当染料浓度达到 300 mg/L 即可对 *P. chrysosporium* 产生较大损伤作用, 使之基本丧失原有的处理功能.

关键词: AFLP; 黄孢原毛平革菌; 染料浓度; 损伤效应

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)05-1353-06

Evaluation of the Damaging Effect of Dyestuff on *Phanerochaete chrysosporium* with Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis

DAI Xing-chun^{1,2}, WU Lin-hui¹, WU Lin-lin¹, HUANG Min-sheng¹

(1. Department of Environmental Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

Abstract: The AFLP analysis was carried out in order to evaluate the DNA damaging effects of dyestuff of different concentrations on *Phanerochaete chrysosporium*. The DNA similarity and UPGMA cluster analysis were conducted to determine the relationships between the concentrations of dyestuff and DNA damaging effects. The results showed that the AFLP analysis could reflect the polymorphisms of DNA well, and the primer pairs E-AAC/M-CAA could give more amplified DNA fragments than others primers. From the DNA maps of best primer pairs, 35 clear and stable DNA bands were observed, including 12 polymorphous bands which were accounted for 34.3% diversity. It was indicated from the DNA similarity and UPGMA cluster analysis that DNA polymorphisms correlated with dyestuff's concentrations well. If the concentration of dyestuff was not higher than 50 mg/L, the damaging effect on DNA was finite. If the concentrations of dyestuff were up to 300 mg/L, the DNA of *Phanerochaete chrysosporium* would have been injured greatly, and would have been bankrupted in its intrinsic function.

Key words: AFLP; *Phanerochaete chrysosporium*; concentration of dyestuff; damaging effect

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是白腐真菌产酶和降解持久性有机污染物的模式菌种, 属担子菌纲^[1], 利用 *P. chrysosporium* 降解染料废水的研究一直是环境领域的热点. 早在 20 世纪 80 年代, Bumpus 等^[2]发现 *P. chrysosporium* 对结构复杂的多环芳烃化合物和氯化芳族化合物具有较好的降解作用; Swamy 等^[3]进一步研究后认为 *P. chrysosporium* 产生的胞外酶-木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)等可有效地催化氧化复杂的染料分子; 90 年代初, Spadaro 等^[4]证实 *P. chrysosporium* 具有广谱的染料降解能力, 可将其彻底矿化为 CO₂ 和 H₂O, 并且具有环保、节能的优势. 由此可见, 应用 *P. chrysosporium* 处理染料废水的研究意义巨大.

目前国内外对 *P. chrysosporium* 降解合成染料的研究报道较多, 一般侧重于 2 个方面, 一方面研究

P. chrysosporium 降解染料的外源条件^[5,6]、降解酶^[7]、处理效果^[8,9]和作用机理^[10]等; 另一方面是研究染料毒性对细菌和哺乳动物致癌性和致突变性^[11,12]. 而利用分子生物学技术, 从 DNA 分子水平分析 *P. chrysosporium* 对染料的耐受性以及高浓度染料对 *P. chrysosporium* DNA 损伤效应尚无报道.

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)技术是目前构建 DNA 指纹图谱的先进方法之一^[13], 具有分辨率高、重复性好、方便和灵敏的特点^[14,15], 广泛应用于微生物遗传育种、分类研究、菌种鉴定等方面. 其原理是: 不同基因型 DNA 有不同的酶切位点,

收稿日期: 2007-05-20; 修订日期: 2007-07-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(50278034); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z331)

作者简介: 戴兴春(1972~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: 52050802003@student.ecnu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: mshuang@des.ecnu.edu.cn

AFLP 的内切酶可识别基因位点差异,使酶切片段的数目与长度发生变化,通过不同的引物组合扩增,在凝胶电泳图上反映 DNA 多态性.因此从理论上讲,当染料氧化过程中产生的自由基造成 *P. chrysosporium* DNA 损伤后^[16],可使 DNA 碱基发生突变而具有不同酶切位点,经 AFLP 扩增可反映出 DNA 多态性变化,从而敏锐地表达 *P. chrysosporium* DNA 碱基序列的突变率,多态性大则 DNA 突变率高,因此通过 AFLP 对 DNA 多态性的分析,可判断染料对 *P. chrysosporium* DNA 的损伤效应,从而评判染料对其结构与功能的影响.

基于上述分析,利用 AFLP 法评价不同浓度染料对 *P. chrysosporium* DNA 的损伤效应成为可能.本研究将利用 AFLP 灵敏、分辨率高的特点,在优选最佳引物的基础上,通过计算 *P. chrysosporium* 菌受不同浓度染料损伤后的 DNA 多态性比率和相似性比率,以及构建 DNA 聚类分析树状图等方法,分析染料浓度与 DNA 碱基致突变的效应关系,进而判断 *P. chrysosporium* 菌对不同浓度染料的耐受性,以期利用 *P. chrysosporium* 菌处理染料废水的工艺参数确定提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

P. chrysosporium 接种至 PDA 培养基平板,37℃ 培养5 d.以推棒刮下孢子粉并溶于水,经过 4 层擦镜纸过滤,滤去菌丝体得孢子粉,孢子液接种至 kirk 限氮培养基,接种量 1×10^6 个/mL,37℃ 摇瓶中培养 6 d 备用.

孟宇等^[17]在白腐真菌 AFLP 指纹分析研究中认为, E-AGC/M-CAT 和 E-AGC/M-ACC 2 组引物对的扩增效果最佳; Kure 等^[18, 19]认为引物对 E-AAC/M-CAA 更适于真菌的 AFLP 扩增.本研究对上述 3 种引物组合进行平行比较,筛选染料对 *P. chrysosporium* DNA 损伤效应的最佳引物,以考察不同浓度染料对 *P. chrysosporium* DNA 相似性的影响.

染料采用活性艳红 X-3B,设 6 个浓度梯度,分别为 0 (空白对照)、100、200、300、400 和 500 mg/L,在培养第 6d 加入到摇瓶中,编号依次为 1~6.

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

样品加入染料培养 10 d 后,分离 *P. chrysosporium* 菌球,经生理盐水浸泡洗涤后待用.

1.2.2 DNA 制备

采用蜗牛酶法^[20, 21]提取 *P. chrysosporium* 总 DNA,提取后 4℃ 隔夜, -20℃ 保存备用.

1.2.3 DNA 浓度确定

取 1 μ L DNA 稀释至 50 μ L,在波长 260 nm 紫外线下用光程为 1 cm 的石英比色杯测定吸光值,根据公式 DNA 浓度(μ g/mL) = $D_{260}/(0.020 \times L) \times$ 稀释倍数,确定 DNA 模板浓度.

1.2.4 接头与引物

接头浓度配制为 50 pmol/ μ L,引物浓度配制为 50 ng/ μ L,实验所采用接头与引物见表 1.

表 1 实验所用接头与引物及其碱基序列

Table 1 Adapters and primers	
名称	碱基序列
<i>EcoR</i> I 接头	5'-CTC GTA GAC TGC GTACC-3'
	3'-CAT CTG ACG CATGGT TAA-5'
<i>Mse</i> I 接头	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	3'-TACTCAGGACTCAT-5'
预扩增 <i>EcoR</i> I 引物	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
预扩增 <i>Mse</i> I 引物	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
选择扩增 <i>EcoR</i> I 引物(E-AGC)	5'-GACTGCGTACCAATTC AGC-3'
选择扩增 <i>EcoR</i> I 引物(E-AAC)	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3'
选择扩增 <i>Mse</i> I 引物(M-CAT)	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAT-3'
选择扩增 <i>Mse</i> I 引物(M-ACC)	5'-GATGAGTCCTGAGTAA ACC-3'
选择扩增 <i>Mse</i> I 引物(M-CAA)	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA-3'

1.2.5 标准 AFLP 反应体系的建立

(1)酶切反应体系 限制性酶切体系包括 DNA 模板 500 ng (根据各样品 DNA 浓度取适量), *EcoR* I 0.5 μ L 和 *Mse* I 2.5 μ L,通用 Buffer($10 \times$)2.5 μ L, 1 mg/mL BSA2.5 μ L,加水补足 25 μ L,混匀,离心收集,37℃ 保温3 h,65℃ 保温3 h,80℃ 灭活15 min.

(2)连接反应体系 酶切完成后的 DNA 样品中加 T_4 DNA 连接酶 0.5 μ L, T_4 DNABuffer($10 \times$) 5 μ L, *EcoR* I Adapter 0.5 μ L, *Mse* I Adapter 0.5 μ L,加水补足至 50 μ L, 16℃ 连接 3 h, 4℃ 过夜,保证充分连接.

(3)预扩增反应 连接产物 10 μ L,用 TE Buffer 按1:10比例稀释后取 5 μ L,加入 *EcoR* I 引物(E)1 μ L, *Mse* I 引物(M)1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, dNTPs 1 μ L,通用 Buffer($10 \times$) 5 μ L,加水补足总体积 50 μ L.预扩增反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 60 s,56℃ 退火 1 min,72℃ 延长 60 s,22 个循环,最后 60℃ 延长 10 min,4℃ 保存.

(4)选择性扩增反应 预扩增产物 3 μ L,按 1:50 比例用 TE Buffer 稀释后取 5 μ L 作为 DNA 模板, *EcoR* I primer 0.5 μ L, *Mse* I primer 0.5 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, dNTPs 0.5 μ L,通用 Buffer($10 \times$) 2 μ L,加水

补足至总体积 20 μ L. 选择性扩增反应条件为: 95℃ 预变性 1 min, 94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延长 1 min, 10 个循环, 接着 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延长 1 min, 27 个循环, 4℃ 保存.

1.3 扩增产物的凝胶电泳分析

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5% 溴乙锭溶液染色, 然后在 GDS28000 凝胶图像分析系统上照相, 采用 SmartView 软件读取电泳条带并统计数据.

1.4 DNA 相似度分析及相似性树状图构建

采用 MVSP(Version 3.1) 分析软件对所获数据进行 UPGMA 聚类分析、DNA 相似度分析和相似度树状图构建.

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

取预扩增 DNA 产物 5 μ L, 在 100 V 电压下进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 基因组 DNA 样品呈现 1 条迁移率很小的整齐条带(见图 1), 表明所提取的 DNA 样品比较纯; 各样品在波长为 260 nm 和 280 nm 的紫外光下测得吸光值之比 D_{260}/D_{280} 介于 1.7~1.9 之间, 说明提取的 DNA 纯度高, 蛋白质含量较少, 能够满足 AFLP 分析的需要.

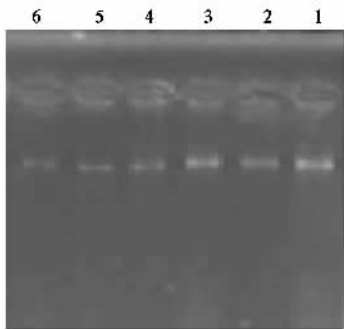


图 1 提取的 DNA 样品电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA

2.2 引物组合 E-AGC/M-CAT 的 AFLP 扩增结果

由图 2 可见, 利用引物 E-AGC/M-CAT 组合可以得到较多的 *P. chrysosporium* DNA 扩增条带, 总扩增条带数达到 50 条, 但可供分析的特异条带数较少, 共有 8 条, 多态性比率为 16%(见表 2).

2.3 引物组合 E-AGC/M-ACC 的 AFLP 扩增结果

由图 3 可见, 利用引物 E-AGC/M-ACC 组合得到的 *P. chrysosporium* DNA 扩增条带数和特异性条带数均较少, 其中扩增条带数共有 18 条, 特异性条带数为 6 条, 多态性比率为 33.3%(见表 3), 扩增电泳

图显示除了第 2 泳道和 3 泳道的 DNA 出现新的条带外, 其它样品 DNA 扩增结果均没有明显变化.

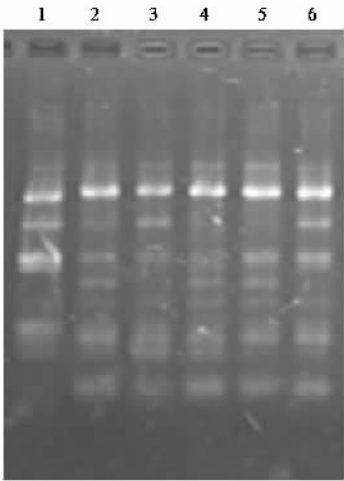


图 2 引物组合 E-AGC/M-CAT 的 AFLP 扩增结果
Fig.2 Fingerprinting of AFLP with primer pair of E-AGC/M-CAT

表 2 引物组合 E-AGC/M-CAT 扩增条带数统计

Table 2 Statistic of the amplification generated by primer pair of E-AGC/M-CAT			
编号	扩增带数	特异性条带数	多态性比率
1	8	0	16%
2	9	1	
3	8	1	
4	9	2	
5	9	2	
6	7	2	

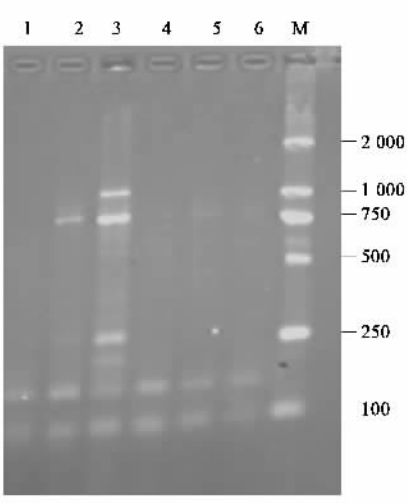


图 3 引物组合 E-AGC/M-ACC 的 AFLP 扩增结果
Fig.3 Fingerprinting of AFLP with primer pair of E-AGC/M-ACC

2.4 引物组合 E-AAC/M-CAA 的 AFLP 扩增结果

由图 4 可见, 利用引物组合 E-AAC/M-CAA 对不同浓度染料影响下的 *P. chrysosporium* 进行 AFLP 扩

表 3 引物组合 E-AGC/M-ACC 的扩增条带数统计
Table 3 Statistic of the amplification generated by primer pair of E-AGC/M-ACC

编号	扩增带数	特异性条带数	多态性比率
1	2	0	33.3%
2	3	1	
3	6	4	
4	2	0	
5	3	1	
6	2	0	

增时,所得到的 DNA 扩增效果较好,共获得 DNA 扩增条带 35 条,并且该引物组合对表现 *P. chrysosporium* 受损后的 DNA 多态性效果较佳,产生多态性的条带数量较多,共获得可供分析的特异性条带数 12 条,多态性比率 34.3%(见表 4)。

图 4 中还显示了 250 ~ 500 bp 范围内扩增条带最为稳定,DNA 特异性最少(如图 4 中 a、b、c 所示),说明此位点 DNA 为 *P. chrysosporium* 稳定的特征性条带。

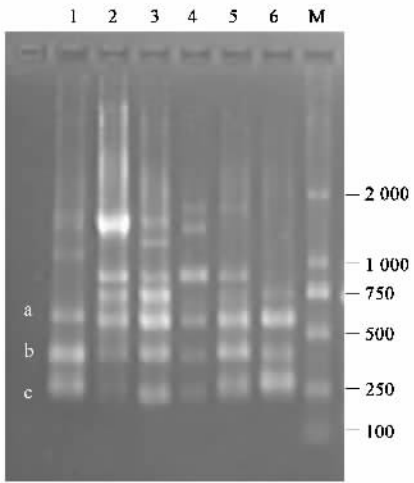


图 4 引物组合 E-AAC/M-CAA 的 AFLP 扩增结果
Fig.4 Fingerprinting of AFLP with primer pair of E-AAC/M-CAA

表 4 引物组合 E-AAC/M-CAA 的扩增条带数统计
Table 4 Statistic of the amplification generated by primer pair of E-AAC/M-CAA

编号	扩增带数	特异性条带数	多态性比率
1	6	0	34.3%
2	6	2	
3	7	3	
4	6	3	
5	6	3	
6	4	1	

2.5 最佳引物分析

AFLP 法构建 DNA 图谱可通过特异性 PCR 引物

的设计来调整图谱中限制性片段的适宜数目^[22], Janssen 等^[23]认为 30 ~ 50 个可见扩增片段较为适宜,若产生过多条带则对凝胶电泳的分析要求较高,而扩增条带数量过低则不能敏锐地表达 DNA 片段之间的差异性。

实验所选 3 种 *EcoR* I / *Mse* I 引物组合均可获得较清晰扩增结果,其中 E-AGC/M-CAT 引物组合获得扩增条带数达到 50 条,但特异性条带较少,共 8 条,多态性比率 16%,在进行 DNA 相似性分析和 UPGMA 聚类分析时差异不明显,不利于区分不同浓度染料对 DNA 的影响;E-AGC/M-ACC 引物组合扩增效果稍差,获得扩增条带数 18 条,特异性条带 6 条,多态性比率 33.3%,由于空白样扩增条带只有 2 条,在进行 DNA 相似性分析和 UPGMA 分析时,相似性相差过大,与实际情况较难吻合,且不利于反应染料浓度对 DNA 的影响;E-AAC/M-CAA 组合扩增共得到 35 条 DNA 扩增条带,其中 12 种 DNA 条带具有差异性,多态性比率 34.3%,扩增结果最有利于进行 DNA 多态性分析。

在重复实验中,E-AAC/M-CAA 组合扩增结果除了少量弱扩增带难以稳定重现外,所有清晰条带均可以稳定地重复扩增,但条带亮度有强弱差异,表明利用该引物组合进行的 AFLP 法可敏锐地捕捉到各样品之间较高的多态性,有利于分析研究染料对 DNA 的生物损伤效应,因此本研究选择该引物扩增结果进行分析讨论。

2.6 DNA 相似性分析及树状图构建

根据引物分析结果,采用 SmartView 读取图 4 凝胶电泳图带数并进行统计,图谱中条带存在记为 1,条带缺失记为 0;统计结果采用 MVSP(Version 3.1)分析,利用 UPGMA 法(Percent Similarity)进行聚类分析,构建受不同浓度染料影响后 *P. chrysosporium* DNA 之间的相似性关系,所得相似性矩阵(similarity matrix)见表 5,染料浓度与 DNA 相似性相关曲线见图 5,构建的 DNA 相似性树状图见图 6。

表 5 各样品 *P. chrysosporium* DNA 的相似性统计
Table 5 Genetic similarity matrix of *P. chrysosporium* after impacting by dyestuff

编号	1	2	3	4	5	6
1	100					
2	76.923	100				
3	71.429	92.308	100			
4	61.538	83.333	76.923	100		
5	61.538	83.333	76.923	83.333	100	
6	60	66.667	60	66.667	66.667	100

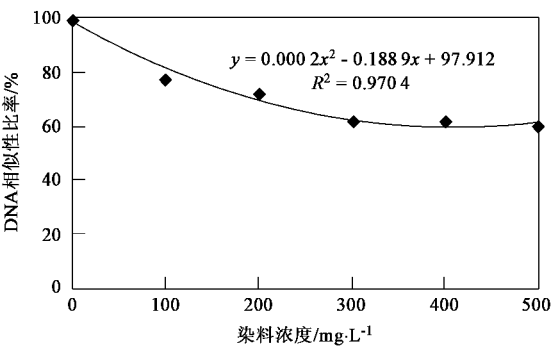


图 5 染料浓度与 DNA 相似性的关系

Fig.5 Relationship between concentration of dyestuff and similarity of DNA

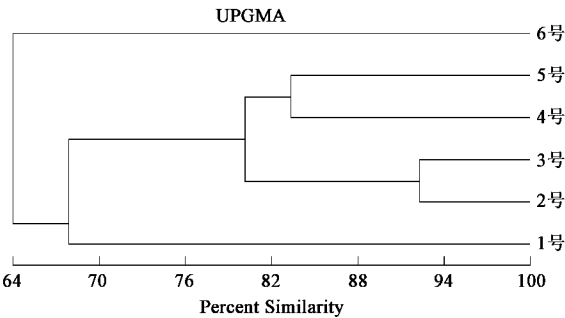


图 6 各样品 *P. chrysosporium* DNA 相似性树状图

Fig.6 UPGMA dendrogram of *P. chrysosporium* using MVSP(Version 3.1) program

由表 5 可见, *P. chrysosporium* 对染料的耐受性不高, 2 号(100 mg/L)与 1 号(空白)的相似系数为 76.9%, 说明 100 mg/L 浓度染料即可对 *P. chrysosporium* DNA 产生较大损伤效应, 使其 DNA 碱基大量突变, 并导致丰富的 DNA 多态性; 表 5 同时清晰显示了随着染料浓度的增加 *P. chrysosporium* DNA 与空白的相似性成反相关关系, 即随着染料浓度增加, 相似性降低, 相似性变化的下限值约为 60% 左右。

根据表 5 中不同 *P. chrysosporium* 样品与空白 DNA 相似性统计结果, 得出染料浓度与 DNA 相似性相关趋势线(见图 5), 由图 5 可见, *P. chrysosporium* 对染料的损伤效应较为敏感, 若保持较高的 DNA 相似性(相似度 $\geq 90\%$), 则染料浓度必须 < 50 mg/L; 300 mg/L 染料是对 *P. chrysosporium* 损伤的极限浓度, 在这一浓度下, *P. chrysosporium* DNA 与空白的相似度为 61.5%, 染料浓度超过 300 mg/L 后, *P. chrysosporium* DNA 变化率较小。

由图 6 扩增条带相似性树状图可看出, 随着染

料浓度的增加, *P. chrysosporium* DNA 与空白的相似性不断降低, 在染料浓度 500 mg/L 条件下相似性可低至 60% 左右, 说明 *P. chrysosporium* DNA 碱基突变率与染料浓度成正相关, 这与前面的分析结论一致; 从图 6 还可看出, 染料浓度造成 *P. chrysosporium* DNA 突变率成阶段式变化, 如 2 号(100 mg/L)与 3 号(200 mg/L)相似性约为 90%, 4 号(300 mg/L)与 5 号(400 mg/L)相似性约为 82%, 初步分析认为, 染料造成碱基大量突变必须达到 1 个临界值, 浓度低于临界值则碱基突变量较小, 超过临界值则突变几率较大。这一推测与临界值的确定有待下一步进行深入研究。

3 结论

(1) 实验表明 AFLP 技术对基因组的微小变化具有较好的分辨能力。在恰当的引物设计和反应条件下, AFLP 法是研究染料对 *P. chrysosporium* DNA 损伤的有效方法。

(2) 本实验设计的反应条件下, 引物组合 E-AAC/M-CAA 是采用 AFLP 法研究不同浓度染料对 *P. chrysosporium* DNA 损伤效应的较适宜引物, 在其 AFLP 扩增图谱中共有 35 条 DNA 扩增条带, 其中 12 条具有特异性, 多态性比率 34.3%。

(3) 通过分析最佳引物扩增的 AFLP 图谱, 染料浓度与 *P. chrysosporium* DNA 突变率成正相关, 即染料浓度越高, *P. chrysosporium* DNA 与空白的相似性越低; 并且 *P. chrysosporium* 对染料的损伤效应较为敏感, 染料浓度不宜高于 50 mg/L, 当染料浓度达到 300 mg/L 时即可对 *P. chrysosporium* 产生较大损伤作用, 使之基本丧失原有处理功能。

参考文献:

[1] 林刚, 文湘华, 钱易. 液体培养基中添加天然成分对白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 生长的促进作用[J]. 环境科学, 2003, 24(4): 41-47.

[2] Bumpus J A, Tien M, Wright D, et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. Science, 1985, 228(4706): 1434-1436.

[3] Swamy J, Ramsay J A. Evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(3): 130-137.

[4] Spadaro J T, Gold M H, Renganathan V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied Environmental Microbiology, 1992, 58(8): 2397-2401.

[5] 高大文, 文湘华, 周晓燕, 等. 微量元素对白腐真菌的生长影响和抑制酵母菌效果的研究[J]. 环境科学, 2006, 27(8): 1623-1626.

- [6] 高大文,文湘华,周晓燕,等. pH 值对白腐真菌液体培养基抑制杂菌效果的影响研究[J]. 环境科学,2005,26(6):173-179.
- [7] 喻国策,文湘华,李东锋,等. 黄孢原毛平革菌在多种氨氮浓度下木质素降解酶的产生[J]. 环境科学学报,2003,23(6):802-806.
- [8] 李慧蓉,李华兵,李文琼,等. 黄孢原毛平革菌对 6 种染料的脱色降解[J]. 环境科学研究,1999,12(3):14-21.
- [9] 黄民生,安世杰,张晶,等. 白腐真菌对活性污染废水脱色实验研究[J]. 华东师范大学学报,2005,1:139-143.
- [10] Goszczynski S, Paszczynski A, Pasti-Grigsby M B, *et al.* New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(5):1339-1347.
- [11] Sobti R C, Gill G B, Juneja T R. Evaluation of genotoxicity of certain azo and azoxy compounds through chromosomal aberrations; sister chromatid exchanges and sperm head abnormality assays[J]. Med Sci Res, 1992, 20(10):373-380.
- [12] 孙红文,黄国兰,王春节,等. 偶氮染料对斜生栅藻的毒性作用及结构活性相关性研究[J]. 环境科学,1998,19(4):22-25.
- [13] 陈洪,朱立煌,李冬梅,等. 致病性念珠菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱[J]. 科学通报,1996,41(10):935-938.
- [14] 褚栋,毕玉平,张友军,等. 烟粉虱生物型研究进展[J]. 生态学报,2005,25(12):3398-3405.
- [15] William J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):6531-6535.
- [16] 钟金汤. 偶氮染料及其代谢产物的化学结构与毒性关系的回顾与前瞻[J]. 环境与职业医学,2004,21(1):58-62.
- [17] 孟宇,蒋昌顺,廖问陶,等. 糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)的 AFLP 指纹图谱分析[J]. 遗传学报,2003,30(12):1140-1146.
- [18] Kure C F, Skaar I, Holst J A, *et al.* The use of AFLP to relate cheese-contaminating Penicillin strains to specific points in the production plants[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 83:195-204.
- [19] Marilena A M, Samina M, David M. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 229(2):249-257.
- [20] Saad D S, Kinsey G C, Kim S, *et al.* Extraction of genomic DNA from filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, 54:99-103.
- [21] 李绍兰,周斌,杨丽源,等. 真菌 DNA 提取方法的改良[J]. 云南大学学报,2002,24(6):471-472.
- [22] Linstedt B A, Heir E, Vardund T, *et al.* A variation of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique using three restriction endonucleases, and assessment of the enzyme combination *Bgl* II-*Mfe* I for AFLP analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 189(1):19-24.
- [23] Janssen P, Coopman R, Huys G, *et al.* Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as new tool in bacterial taxonomy[J]. Microbiology, 1996, 142(7):1881-1893.