

中国—越南柑桔黄龙病病原 16S rDNA 片段的序列分析

邓崇岭¹, 陈传武¹, 赵小龙², 陈国平^{1*}, 邓光宙¹, 王明召¹

(1. 广西壮族自治区柑桔研究所, 广西 桂林 541004; 2. 广西壮族自治区农业厅, 南宁 530022)

摘要: 采集广西、广东和越南的 8 个柑桔黄龙病样品, 利用黄龙病的特异引物 OI1/OI2c 对其 16S rDNA 片段进行 PCR 扩增, 将其扩增产物纯化、回收, 进行序列测定。利用 DNASTAR 软件、clustalw2 软件和 MEGA4.0 软件进行同源性分析与系统发育分析。结果表明, 越南黄龙病株系 (Vietnam-0901 和 Vietnam-0905) 与除广西样品 GX-1001 和广东样品 GD-1002 外所有亚洲种柑桔黄龙病病原的同源性都很高 (97.6%~100.0%), 而与非洲种、美洲种和土豆斑马条纹病的同源性相对较低 (分别为 96.0%/97.7%, 94.7%/96.4% 和 96.2%/97.6%)。表明我国广东、广西和越南发生的 HLB 病原均属亚洲种, 但在亚洲种之间不同地区的黄龙病病原也发生了一定变异, 广西样品 GX-1001 和广东样品 GD-1002 与其它亚洲种柑桔黄龙病病原的同源性较其它亚洲种株系偏低, 但聚类还是归在一个类群, 表明相同地域内的黄龙病病原菌还存在一定差异。

关键词: 中国; 越南; 柑桔黄龙病; 16S rDNA; 同源性; 序列分析

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)05-0608-05

Sequence analysis of 16S rDNA of Huanglongbing agents collected from China and Vietnam

DENG Chong-Ling¹, CHEN Chuan-Wu¹, ZHAO Xiao-Long²,
CHEN Guo-Ping^{1*}, DENG Guang-Zhou¹, WANG Ming-Zhao¹

(1. Guangxi Citrus Research Institute, Guilin 541004, China; 2. Department of Agriculture of Guangxi, Nanning 530022, China)

Abstract: In this study, eight samples of Huanglongbing (HLB) trees were collected from Guangdong, Guangxi and Vietnam. The HLB agent specific primer sets, OI1/OI2c was used to amplify DNA from the loci of 16S rDNA. PCR products were collected, purified, and sequenced. The sequences were compared to all published DNA sequences in GenBank through BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for phylogenetic analyses. The cluster analyses were performed by MEGA software. It was concluded that eight of 16S rDNA sequences from different areas were phylogenetically most closely related to those of the published HLB agents. The similarities between the Vietnam samples sequences Vietnam-0901 和 Vietnam-0905 to that of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (except GX-1001 and GD-1002) were more higher (97.6%–100.0%), to that of *Ca. L. africanus* were 96.0%/97.7%, to that of *Ca. L. americanus* were 94.7%/96.4%, and to that of Potato Zebra Chip were 96.2%/97.6%. The results indicated that the HLB agents collected from Vietnam were *Ca. L. asiaticus*. But there are still some differences between these Las samples.

Key words: China; Vietnam; Huanglongbing; 16S rDNA; Sequence analysis

收稿日期: 2010-05-28 修回日期: 2010-09-29

基金项目: 科技部国际科技合作项目 (2008DFA30900); 广西国际科技合作与交流项目 (桂科合 0895001-3-3); 广西自然科学基金 (桂科自 0832187); 广西农业重点科技计划项目 (NK200827) [Supported by the International Cooperation Program of China (2008DFA30900); International Scientific Cooperation and Exchange Program of Guangxi (0895001-3-3); the Natural Science Foundation of Guangxi (0832187); Agricultural Science Planning Project of Guangxi (NK200827)]

作者简介: 邓崇岭 (1962-), 男, 广西全州人, 副研究员, 从事柑桔品种选育、无病毒苗木繁育和黄龙病防治等研究, (E-mail) cldeng88168@126.com.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: cgp88888@126.com)

柑桔黄龙病 (Huanglongbing, HLB) 是一种在柑桔生产上危害极其严重的病害。该病病原菌为韧皮部杆菌 (*Candidatus Liberibacter*), 属于难培养细菌。迄今, 该病原菌已发现 3 个种: 即亚洲种 (*Ca. L. asiaticus*, Las)、美洲种 (*Ca. L. americanus*, Lam) 和非洲种 (*Ca. L. africanus*, Laf) (Garnier 等, 2000; Coletta-filho 等, 2005), 目前在亚洲报道的黄龙病病原菌均为亚洲种。近来也有报道称巴西发现有些黄龙病症状与植原体 (*Phytoplasma*) 相关 (Teixeira 等, 2008; Chen 等, 2009)。亚洲种全基因组 DNA 序列已成功获得 (Duan 等, 2009), 为进一步的研究提供了有利的条件。Hansen 等 (2008) 发现土豆斑马纹病 (Potato Zebra Chip) 的病原菌为 (*Ca. L. psyllaurosus*, Lps), 且该病原菌较美洲种与非洲种和亚洲种相比有更高的同源性。

长期以来, HLB 在亚洲地区发生严重, 造成了巨大的经济损失, 严重威胁着亚洲地区的柑桔产业。越南与广西接壤, 两地各柑桔产区都有柑桔黄龙病发生。近年来广西加大了对黄龙病的防控力度, 使黄龙病发生率由 2006 年的 3.9% 下降到 2009 年的不足 1%。越南从南到北都有柑桔黄龙病发生, 而且较

为严重, 据 2006 年调查, 越南各地区柑桔黄龙病发生率为 0.6%~56.3%, 其中, 与广西交界的东北区柑桔黄龙病发生率为 11.8%。目前, 越南在柑桔生产上也存在一些薄弱环节, 首先对柑桔黄龙病的认识不足, 包括一些大型农场的干部和相关研究单位技术人员都不能辨认柑桔黄龙病及其危害症状; 其次在茎尖微芽嫁接脱毒及无病毒苗木繁育方面基础较为薄弱, 柑桔无病毒苗木在生产上应用推广所占比例很低。由于柑桔黄龙病具有苗木 (接穗) 远距离传播及木虱传播的特征, 因此联防联控, 控制两地间苗木运输, 加强检疫和木虱监控就显得格外重要。

近年来, 16S rDNA 序列分析已广泛用于黄龙病的系统发育、分类和鉴定 (冯震等, 2006; 廖晓兰等, 2004; 单振菊等, 2008; Jagoueix 等, 1996)。越南与中国气候条件及地形均有一定差异, 两国间柑桔黄龙病病原是否完全相同, 迄今尚未见报道, 本研究采用 PCR 技术对采自中国广东、广西以及越南的柑桔黄龙病 16S rDNA 进行测序分析, 利用 DNASTAR 软件、clustalw2 软件和 MEGA4.0 软件对相关序列进行同源性分析和系统发育分析。以期为中越两国柑桔黄龙病病原的分子进化研究提供证据, 并对两

表 1 用于黄龙病病原菌 16S rDNA 分析的来自不同地区、表现不同症状的黄龙病材料

Table 1 Plant materials with different symptoms collected from different areas for 16S rDNA analysis of HLB Pathogen

编号 Serial Number	病原菌寄主 Host of Pathogen	来源 Source	症状 Symptom
GX-1001	沙田柚	广西桂林市阳朔县	斑驳型
GX-1002	沙田柚	广西桂林市阳朔县	斑驳型
GD-1002	沙糖桔	广东清新县	斑驳型
GD-1003	春甜桔	广东广州市	斑驳型
GD-1004	春甜桔	广东广州市	斑驳型
Vietnam-0901	伏令夏橙	越南河内	黄化型
Vietnam-0902	夏代橙	越南兴安省文江县	斑驳型
Vietnam-0903	青皮厚皮橙	越南永隆省三平县	斑驳型

国黄龙病的综合防控提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

黄龙病病原样品采自广西、广东以及越南河内、兴安、永隆省等地疑似黄龙病的 8 个柑桔样品 (表 1)。

1.2 总核酸的提取及 PCR 扩增

取待检测样品的叶脉组织, 用液氮磨碎后用改进的 CTAB 法提取 DNA (Lin 等, 2008)。

用于 PCR 扩增的引物由上海生工生物工程有限公司合成 (表 2)。以总 DNA 为模板, 采用

20 μ L 反应体系, 进行 PCR 扩增。其中含 10 \times PCR Buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 5 μ L Taq 酶 0.1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L, 10 mM 的引物各 1 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C/61 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min (Jagoueix 等, 1994; Lin 等, 2010)。每个反应重复 2 次, 最后进行电泳检测, 在凝胶成像系统下观察记录结果。

1.3 柑桔黄龙病病原 16S rDNA 基因的测序及分析

采用 Promega 公司的胶回收试剂盒, 对柑桔黄龙病病原 16S rDNA 的 PCR 产物进行纯化、回收, 由上海生工生物工程有限公司进行测序, 所用测序

表2 用于HLB检测及其病原菌16S rDNA扩增的引物序列

Table 2 Primer sequences used for detection of HLB and amplification of 16S rDNA of the pathogen of HLB

引物 Primers	核酸序列 (5'-3') Nucleotide sequence (5'-3')	退火温度 (°C) Annealing temperature	扩增片段大小(bp) Amplicon size
Las-O-F	CGGTGAATGTATTAAGCTGAGGCGTTCC	65	470
Las-O-R	ACCCACAACAAAATGAGATACACCAACAACCTTC		
O11	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	61	1 160
O12c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT		



图1 不同来源 HLB 样品 PCR 扩增结果
Fig.1 Amplification result of PCR on HLB samples from different areas

M. 100bp Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照;
3-4. 广西样品; 5-7. 广东样品; 8-10. 越南样品。



图2 不同来源 HLB 病原菌 16S rDNA 扩增后纯化结果
Fig.2 Purified results of 16S rDNA of HLB pathogen from different areas

M. DL2000 Marker; 1-2. 广西样品;
3-5. 广东样品; 6-8. 越南样品。

仪器为 ABI-PRISM3730, 测序试剂为 BigDyeterminator v3.1。将测序结果在 GenBank 上分析比对, 并通过 DNASTAR 软件进行同源性分析, 利用 clustalw2 软件及 MEGA4.0 软件进行系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 越南柑桔黄龙病的检测情况

用 Las-O-F/ Las-O-R 引物对对来自广西、广东和越南采集的 8 个样品进行 PCR 检测, 8 个样品均扩增得到了大小为 470 bp 的特异目的 DNA 片段(图 1)。所检测材料均为典型的斑驳及黄化症状样品。

2.2 PCR 产物的测序和分析

用 O11/O12c 引物对来自广西、广东和越南的柑桔黄龙病样品 PCR 扩增得到特异目的片段 1 160 bp, 将得到的 PCR 产物进行纯化、回收、序列测定(图 2)。

利用 DNASTAR 软件将本研究所得到的越南及中国广西、广东两省的柑桔黄龙病病原 16S rDNA 的序列与基因库中的亚洲种印度株系 L22532、亚洲种广西株系 EU921616、重庆株系 DQ432004、福建株系 DQ431998、广东株系 DQ432005、台湾株系 DQ302750、湖南株系 DQ432002、贵州株系 DQ157275、非洲种 L22533、美洲种 AY742824、土豆斑马条纹病 GQ468843 以及根瘤农杆菌 AB289608 和根瘤菌 HM768206 进行同源性分析(表 3)。

由表 3 可见, 越南黄龙病株系(Vietnam-0901 和 Vietnam-0905)与除了广西样品 GX-1001 和广东样品 GD-1002 外所有亚洲种柑桔黄龙病病原的同源性都很高(97.6%~100.0%), 而非洲种、美洲种和土豆斑马条纹病的同源性相对较低(分别为 96.0%/97.7%, 94.7%/96.4%和 96.2%/97.6%)。

2.3 越南柑桔黄龙病病原与其它相关病原的系统发育关系

利用 MEGA4.0 软件进一步构建系统发育树分析显示(图 3, 图 4), 用距离法(NJ)与最小进化法(ME)构建的不同 HLB 株系 16S rDNA 序列系统发育树基本一致: 越南 HLB 病原菌株系与 HLB 亚洲种中国各株系病原菌遗传距离较近, 印度株系稍远, 非洲种与土豆斑马条纹病病原菌次之, 与美洲种最远。由此可明确, 在越南发生的 HLB 病原属亚洲种。

广西样品 GX-1001 和广东样品 GD-1002 与其它亚洲种柑桔黄龙病病原的同源性较其它亚洲种株系偏低, 但聚类还是归在一个类群, 表明相同地域内的黄龙病病原菌还是存在着一定差异。

3 讨论

原核生物细胞中的 16S rDNA 的碱基序列是十

表 3 不同来源的 16S rDNA 的同源性比对 (%)

Table 3 The identical ratio of 16S rDNA gene sequences among 8 samples

		Percent identity																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Divergence	1	95.0	99.2	95.0	95.1	95.1	91.8	88.4	91.7	91.5	91.6	91.5	88.5	88.4	96.5	86.8	86.2	79.1	78.5	1	GX-1001.seq
	2	5.2	95.2	100.0	98.2	100.0	99.8	99.7	99.9	99.7	99.7	100.0	99.2	97.6	97.7	96.4	86.7	88.8	2	GX-1002	
	3	0.8	4.9	95.2	95.1	95.3	92.1	89.7	92.1	91.8	91.9	91.8	89.8	89.6	96.7	88.1	87.3	80.3	79.6	3	GD-1002.seq
	4	5.2	0.0	4.9	98.2	100.0	99.8	99.7	99.9	99.7	99.8	99.7	100.0	99.2	97.6	97.7	96.4	86.7	88.7	4	GD-1003.seq
	5	5.1	1.9	5.1	1.9	98.2	98.0	97.9	98.1	97.9	98.0	97.9	98.2	97.6	96.2	96.0	94.7	87.1	87.0	5	Vietnam-0901.seq
	6	5.1	0.0	4.8	0.0	1.9	99.8	99.7	99.9	99.7	99.8	99.7	100.0	99.2	97.6	97.7	96.4	88.8	88.9	6	Vietnam-0905.seq
	7	8.7	0.2	8.3	0.2	2.1	0.2	99.1	99.6	99.5	99.5	99.5	99.3	98.8	97.5	97.3	95.7	87.6	87.6	7	Las_Chongqing_DQ432004.seq
	8	12.6	0.3	11.1	0.3	2.2	0.3	0.9	99.3	99.0	99.0	99.0	99.6	99.0	97.4	97.5	96.1	88.4	88.0	8	Las_GX_EU921616.seq
	9	8.9	0.1	8.3	0.1	2.0	0.1	0.4	0.7	99.4	99.4	99.5	99.0	97.6	97.5	95.8	87.6	87.7	9	Las_Guizhou_DQ157275.seq	
	10	9.1	0.3	8.7	0.3	2.2	0.3	0.5	1.0	0.6	99.3	100.0	99.1	98.6	97.4	97.1	95.4	87.3	87.3	10	Las_Hunan_DQ432002.seq
	11	9.0	0.3	8.6	0.2	2.1	0.2	0.5	1.0	0.6	0.7	99.3	99.1	98.6	97.5	97.1	95.4	87.6	87.3	11	Las_Fujian_DQ431998.seq
	12	9.1	0.3	8.7	0.3	2.2	0.3	0.5	1.0	0.6	0.0	0.7	99.1	98.6	97.4	97.1	95.4	87.3	87.3	12	Las_GD_DQ432005.seq
	13	12.5	0.0	11.0	0.0	1.9	0.0	0.7	0.4	0.5	0.9	0.9	0.9	99.1	97.7	97.5	96.2	88.2	88.1	13	Las_Taiwan_DQ302750.seq
	14	12.7	0.8	11.3	0.8	2.5	0.8	1.2	1.0	1.0	1.4	1.4	1.4	0.9	96.8	97.4	95.7	88.0	87.6	14	Las_India_L22532.seq
	15	3.6	2.4	3.4	2.4	3.9	2.4	2.6	2.7	2.5	2.7	2.6	2.7	2.4	3.2	97.0	96.5	90.2	89.5	15	ZC_GQ468843.seq
	16	14.6	2.3	13.0	2.3	4.1	2.4	2.7	2.6	2.6	2.9	2.9	2.9	2.6	3.0	95.5	87.6	87.5	16	Laf_L22533.seq	
	17	15.4	3.7	14.0	3.7	5.6	3.7	4.4	4.0	4.4	4.7	4.7	4.7	3.9	4.4	3.6	4.7	87.8	87.9	17	Lam_AY742824.seq
	18	24.9	12.4	23.2	12.4	14.3	12.2	13.8	12.8	13.8	14.1	13.7	14.1	13.0	13.3	10.6	13.7	13.5	95.2	18	Agrobacterium_Tumefaciens_Gene_AB289608
	19	25.7	12.2	24.1	12.3	14.4	12.2	13.7	13.2	13.6	14.0	14.0	14.0	13.1	13.7	11.4	13.8	13.4	5.0	19	Rhizobium_HM768206.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		

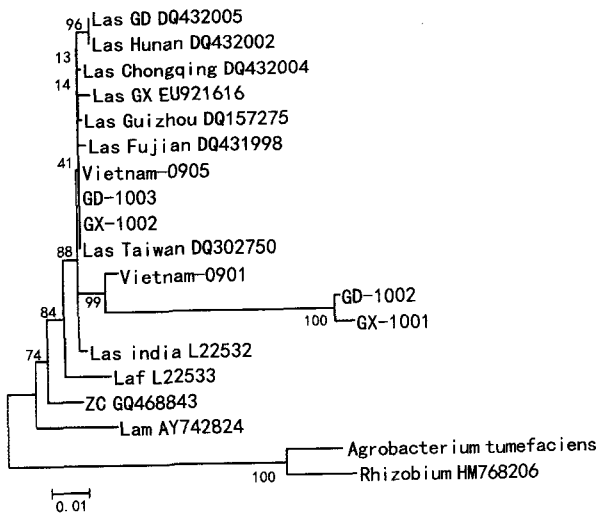


图 3 用距离法(NJ)构建不同 HLB 株系 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining(NJ) based on 16S rDNA of different isolates of HLB pathogen

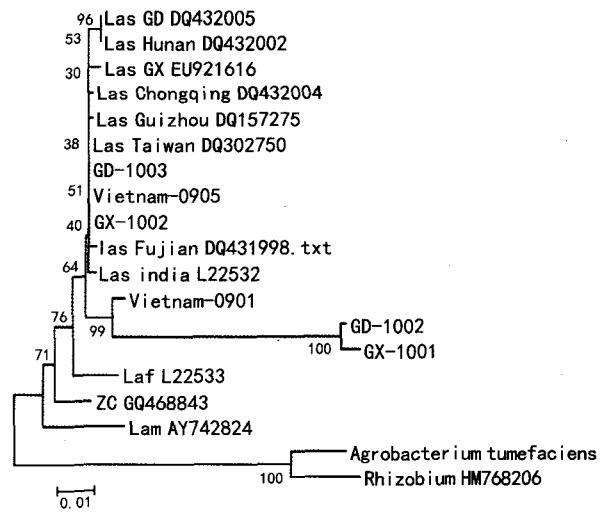


图 4 用最小进化法(ME)构建不同 HLB 株系 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by Minimum Evolution(ME) based on 16S rDNA of different isolates of HLB pathogen

分保守的,分析原核生物细胞中的 16S rDNA 的碱基序列,比较与其它种属之间 16S rDNA 序列的同源性,可以真实地揭示它们亲缘关系的距离和系统发育地位(Ereik 等,1995)。通过 MEGA4.0 软件对越南 HLB 病原菌 16S rDNA 比对、构建系统发育树分析显示:越南、广东和广西的样品与 HLB 亚洲种中国各株系病原菌遗传距离较近,与印度株系稍远,与非洲种与土豆斑马条纹病病原菌次之,与美

洲种最远。从分子水平上证明越南柑桔黄龙病病原属于柑桔黄龙病病原亚洲种。

在系统发育树中虽然所有亚洲种样品聚类都归为一个组群,但 Vietnam-0905、GD-1003 和 GX-1002 三个样品与其它亚洲种差异很小,而同是来自越南、广东和广西的样品 Vietnam-0901、GD-1002 和 GX-1001 与其它亚洲种株系相比却有较大差异,表明相同地域内的黄龙病病原菌还是存在着一定差

异,由此推断在我国不同地域内可能存在着新的亚种或株系,这可能与这些地方间苗木调运、木虱迁飞造成的黄龙病传播相关,其存在株系的相关情况以及是否还存在其它株系还有待进一步研究。

参考文献:

- Chen J, Pu X, Deng X, et al. 2008. A phytoplasma related to 'Candidatus Phytoplasma asteri' detected in *Citrus* showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) symptoms in Guangdong P R China[J]. *Phytopathology*, **99**(3):236-242
- Coletta-filho HD, Takita ML, Targon PN, et al. 2005. Analysis of 16S rDNA sequences from *Citrus* Huanglongbing bacteria reveal a different 'Candidatus Liberibacter' strain associated with citrus disease in Sao Paulo[J]. *Plant Disease*, **89**(8):848-852
- Duan Y, Zhou L, Hall D G, et al. 2009. 542 Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter 543 asiaticus' obtained through metagenomics[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, **22**:1 011-10 20
- Ereik L, Carle P, Bove JM, et al. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism association with witches broom disease of line and proposition of a candidatus taxon for the organism 'Candidatus phytoplasma aurantifolia'[J]. *International J Systematic Bacteriol*, **45**(2):449-453
- Feng Z(冯震), Shan ZJ(单振菊), Zhou G(周根). 2006. Cloning and sequencing of Shatian pomelo Huanglongbing pathogen 16S rDNA(沙田柚黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆与序列分析)[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*(广西农业生物科学), **25**(1):61-65
- Garnier M, Jagoueix-Eveillard S, Cronje PR, et al. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of 'Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis'[J]. *Int J Sys Evol Microbiol*, **50**:2 119-2 125
- Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R, et al. 2008. A New Huanglongbing Species, 'Candidatus Liberibacter psyllauros,' Found To Infect Tomato and Potato, Is Vectors by the Psyllid *Bactericera cockerelli*(Sulc)[J]. *Enviro Microbiol*, **74**(18):5 862-5 865
- Jagoueix SM, Bove JM, Garnier M. 1994. The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria[J]. *Int J Sys Bact*, **44**:397-386
- Jagoueix SM, Bove JM, Garnier M. 1996. PCR detection of two 'Candidatus Liberibacter' species associated with greening disease of citrus[J]. *Molecular and Cellular Probes*, **10**:43-50
- Liao X(廖晓兰), Zhu YF(朱永芳), Zhao WJ(赵文军), et al. 2004. Cloning and sequencing of *Citrus* HLB Pathogen 16S rDNA and its detection by real-time PCR(柑桔黄龙病病原 16S rDNA 克隆、测序及实时荧光 PCR 检测方法的建立)[J]. *J Agric Biology*(农业生物学报), **12**(1):80-85
- Lin H, Doddapaneni H, Bai X, et al. 2008. Acquisition of uncharacterized sequences from 'Candidatus Liberibacter', an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method[J]. *Mol Cell Probes*, **22**:30-37
- Lin H, Chen CW, Doddapaneni H, et al. 2010. A new diagnostic system for ultra sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing[J]. *J Microbiol Methods*, **81**(1):17-25
- Shan ZJ(单振菊), Feng Z(冯震), Zhou G(周根), et al. 2008. Cloning and sequence analysis of 16S rDNA of *Citrus* Huanglongbing agents collected from five Provinces in South China (南方 5 省区柑桔黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆与序列分析)[J]. *J South China Agric Univ*(华南农业大学学报), **29**(2):25-29
- Teixeira DC, Danet JL, Eveillard S, et al. 2005. Citrus Huanglongbing in Sao Paulo state, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease[J]. *Molecular Cellular Probes*, **19**:173-179
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, et al. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea Witches-Broom phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State of São Paulo, Brazil[J]. *Phytopathology*, **98**(9):977-984
-
- (上接第 681 页 Continue from page 681)
- 量元素科学), **11**(11):51-53
- Fan WG(樊卫国), Liu JP(刘进平), Xiang L(向灵). 1998. Studies on the nutritional components of the pollens and the leaves of *Rosa roxburghii* Trattt(刺梨花粉和叶的营养成分分析)[J]. *Acta Nut Sin*(营养学报), **20**(1):107-110
- Fang CW(方成武), Liu XL(刘晓龙), Zhou A(周安). 2005. Determination contents of heavy metal and pesticide residue of *Paeonia ossii* and plantation soil from different habitat in Anhui Province(安徽不同产地牡丹皮及其生长土壤农残与重金属含量检测)[J]. *Res Practice Chin Med*(现代中药研究与实践), **19**(6):17-20
- Ma QY(马庆一), Wei J(卫军). 2002. Studies on the selection and application of natural pigmentsto be used as preservative (天然色素作为防腐剂的筛选及应用研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **23**(6):78-80
- Tian YJ(田义杰). 2003. Analysis the heavy metal ements in *Potentilla anserina* of a Tibetan medicine(藏药蕨麻中重金属元素的含量分析)[J]. *Stud Trace Elements Health*(微量元素与健康研究), **20**(2):42
- Wang MX(王明轩), Zhao SL(赵淑琳). 1995. The application of capsanthin in the fields of food and medicals(辣椒红色素在医药和食品业中的应用)[J]. *Northwest Univ Sin*(西北大学学报), **25**(6):645-647
- Wang Y(王艳), Fang JY(方建勇). 2008. The colored-leaf plants and landscape of Hangzhou(彩叶植物在杭州园林中的配置应用)[J]. *Chinese Land Arch*(中国园林), **7**:73-80
- Wei JQ(韦记青), Qi XX(漆小雪), Jiang YS(蒋运生). 2008. Analysis on nutritional components of sympatric *Camellia nitidissima* and *Camellia euphlebica* leaves(同群落金花茶与显脉金花茶叶片营养成分分析)[J]. *Acta Nut Sin*(营养学报), **30**(4):420-424