

产普鲁兰酶克雷伯氏菌的分离鉴定及酶学性质研究*

Isolation of *Klebsiella pneumoniae* Producing Pullulanase and Its Enzymatic Characterization

谢能中, 王青艳, 米慧芝, 朱绮霞, 秦 艳, 曹 薇, 朱 婧, 陆 雁, 黄日波**

XIE Neng-zhong, WANG Qing-yan, MI Hui-zhi, ZHU Qi-xia, QIN Yan, CAO Wei, ZHU Jing, LU Yan, Huang Ri-bo

(广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 利用曲里苯蓝法从淀粉加工厂废水氧化池酸性污泥样品中筛选普鲁兰酶产生菌, 对筛选到的 GXAS-38 菌株进行形态观察、生理生化特征分析、16S rDNA 序列系统发育分析和普鲁兰酶酶学性质研究, 并用 PCR 方法克隆 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶基因。结果表明, GXAS-38 菌株属于肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 其产普鲁兰酶的最适反应温度为 60℃, 在温度 35~50℃ 时酶活较稳定; 最适反应 pH 值 5.5, 在 pH 值 5.0~7.5 时酶活较稳定。Ca²⁺、Na⁺ 和 Li⁺ 对 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶活性有激活作用; Cu²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 和 Ba²⁺ 对 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶活性有抑制作用; 螯合剂 EDTA 能够强烈地抑制 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶活性, GXAS-38 菌株的普鲁兰酶反应需要金属离子参与。GXAS-38 菌株完整的普鲁兰酶编码基因全长 3291 bp, 编码 1096 个氨基酸。

关键词: 普鲁兰酶 肺炎克雷伯氏菌 分离 鉴定 酶学性质 基因克隆

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)01-0035-05

Abstract: A pullulanase producing bacterium, designated strain GXAS-38, was isolated from samples collected from the waste lagoon of a starch factor in Nanning, Guangxi. Strain GXAS-38 was identified as *Klebsiella pneumoniae* based on morphological, physiological characterization and 16S rDNA sequences analysis. The optimum temperature and pH for the enzyme were determined as 60℃ and 5.5, respectively. The stable temperature and pH range were 35~50℃ and 5.0~7.5, respectively. The enzyme could be stimulated by Ca²⁺, Na⁺ and Li⁺, but inhibited by Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Ba²⁺ and EDTA. The pullulanase gene was amplified by PCR and sequenced. The full length of this gene was 3291 bp and presumably encoded 1096 amino acids.

Key words: pullulanase, *Klebsiella pneumoniae*, isolation, identification, enzymatic characterization, gene cloning

收稿日期: 2012-08-07

修回日期: 2013-01-25

作者简介: 谢能中(1981-), 男, 博士, 主要从事生物基平台化合物和绿色能源的研究。

* 广西千亿元重大科技攻关工程项目(桂科攻 11107008-4), 广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053063), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 12118004-3, 桂科重 12118004-4), 广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW01, 12YJ25SW02)资助。

** 通讯作者。黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程研究。E-mail: rbhuang@gxas.cn。

淀粉原料一般含有 60%~90% 的支链淀粉, 而支链淀粉所含的 4%~6% 葡萄糖残基以 α -1,6-糖苷键连接^[1]。支链淀粉难分解会影响到淀粉的水解效率和利用率。普鲁兰酶(Pullulanase, EC 3.2.1.41)属于淀粉水解酶, 能够专一性地切开支链淀粉分支点中的 α -1,6-糖苷键, 剪下整个侧枝而形成直链淀粉, 最大限度地利用具有分支的淀粉原料, 加速糖化过程, 从而有效的提高淀粉利用率和水解效率, 降低能耗和粮耗^[2~4]。随着现代化和工业化的迅速发展, 全

球对能源需求剧增,传统能源日益枯竭并难以支撑经济可持续发展^[5]。以淀粉等生物质资源开发乙醇、丁醇等生物燃料是当前能源开发的热点研究领域,需要消耗普鲁兰酶等不同种类淀粉酶。此外,普鲁兰酶在食品、医药、纺织等行业中也有着非常重要的用途,例如生产高纯度葡萄糖和果糖,高麦芽糖浆,以及改性淀粉^[6~8]。为了改善淀粉酶对淀粉的作用效果,大规模地提高淀粉的利用率和生产效率,降低生产成本,许多国家纷纷投入大量的人力和财力研究开发普鲁兰酶。

我国从 70 年代开始便对普鲁兰酶进行研究开发,但是到目前仍然仅限于实验室研究并且产酶酶活较低^[9~11]。普鲁兰酶是淀粉制糖酶系中,我国尚不能自主生产的产品^[12]。目前我国应用最广、产量最大的普鲁兰酶源自丹麦 Novo 公司,该公司所生产的普鲁兰酶是由嗜酸性普鲁兰芽孢杆菌 (*Bacillus acidopullulyticus*) 经深层发酵产生^[1, 13]。我国在普鲁兰酶的研究上距离发达国家还有很大差距,工业普鲁兰酶完全依赖进口,定价权掌握在少数外国公司手中,垄断的市场供应导致了国内普鲁兰酶高昂的销售价格,极大地限制了国内相关产业的发展^[14]。

木薯淀粉生产过程中产生的木薯渣主要堆积在废水氧化池里,这类废水成分比较复杂,含有少量淀粉、蛋白质、有机酸等物质,pH 值 4~5,属高浓度酸化有机废水,适合各种降解淀粉的耐酸性微生物生长。曲里苯蓝能与多糖形成蓝色复合物,一般对微生物无毒害作用,不影响酶的活性,适合建立快捷、灵敏的方法来筛选产多糖水解酶类的微生物^[15]。本文利用普鲁兰糖复合物经普鲁兰酶水解后蓝色褪去而出现水解圈的原理来筛选普鲁兰酶产生菌,研究普鲁兰酶产生菌的酶学性质。

1 材料与方法

1.1 酶与试剂

基因组提取试剂盒、DNA Marker、DNA 聚合酶、pMD18-T 载体购自 TaKaRa。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒为上海生物工程有限公司产品。酵母粉和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品。曲里苯蓝为 Sigma 公司产品。其它试剂为国产分析纯。基因测序委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 培养基

共有 3 种培养基:富集培养基、分离培养基和发酵培养基。富集培养基的主要成分为:普鲁兰多糖 10 g/L,蛋白胨 1 g/L,酵母粉 1 g/L,(NH₄)₂SO₄ 1 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L,KH₂PO₄ 1 g/L,Na₂

HPO₄ 0.5 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.02 g/L,pH 值 4.8;使用时,1L 富集培养基中加入 1 ml 过滤除菌的金属离子混合液;金属离子混合液的成分为:FeCl₃·6H₂O 0.1 g/L,Na₂MoO₄·2H₂O 0.03 g/L,MnCl₂·4H₂O 0.03 g/L,ZnSO₄·7H₂O 0.1 g/L,H₃BO₃ 0.3 g/L,CoCl₂·6H₂O 0.2 g/L,CuCl₂·2H₂O 0.01 g/L,NiCl₂·6H₂O 0.02 g/L。分离培养基的主要成分为:曲里苯蓝 0.1 g/L,普鲁兰多糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L,酵母粉 5 g/L,KH₂PO₄ 2 g/L,Na₂HPO₄·12H₂O 2 g/L,(NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.02 g/L,琼脂粉 22 g/L,pH 值 4.8;使用时,1 L 分离培养基中加入 1ml 上述金属离子混合液。产普鲁兰酶发酵培养基的主要成分为:普鲁兰多糖 3 g/L,支链淀粉 1 g/L,蛋白胨 8 g/L,酵母粉 5 g/L,(NH₄)₂SO₄ 1 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L,KH₂PO₄ 1 g/L,Na₂HPO₄ 0.5 g/L,CaCl₂·2H₂O 0.1 g/L,pH 5.0 g/L;使用时,1 L 发酵培养基加入 1 ml 上述金属离子混合液。

1.3 菌株富集与筛选

称取 5g 淀粉加工厂废水氧化池酸性污泥样品,加入 30 ml 生理盐水,在 40℃、200 r/min 条件下震荡培养 2h,静止 20min 后取上清 5 ml 接种到装有 50 ml 富集培养基中,在 40℃恒温摇床中富集培养 3 d,然后取 2 ml 接种到 50 ml 新鲜的富集培养基上继续富集 3 d。将富集液分级稀释,涂布到含曲里苯蓝的分离培养基平板上,于 40℃倒置培养 2 d。将菌落周围有透明圈,而且与菌落直径比值大的菌株进行分离纯化和保藏。

1.4 菌株鉴定

参考文献^[16]的方法,将已纯化的 GXAS-38 菌株在发酵培养基平板上划线,40℃倒置培养 24 h,分析 GXAS-38 菌株的形态学和生理生化特征。利用试剂盒提取总 DNA,以其为模板,采用 16S rDNA 通用引物,参考 Steven 等人的 PCR 方法^[17]扩增 GXAS-38 菌株的 16S rDNA 基因并测序,将获得的 16S rDNA 特征序列在 NCBI GenBank 数据库采用 Blast 程序进行同源比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 序列注册号是 JX457349。使用 MEGA 5.1 软件对 16S rDNA 进行序列同源性分析并采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树^[18, 19]。

1.5 普鲁兰酶的酶活测定

利用 DNS 法^[20]测定酶催化产生的还原糖浓度。取发酵液 8000 r/min 离心 5 min 得到上清酶液,预热 100 μl 普鲁兰糖浓度为 1% (m/V) 的缓冲液(pH

值 5.5), 加入等体积的酶液, 45℃ 水浴中保温 15 min。取出加入 300 μ l 的 DNS 试剂, 沸水浴显色 10 min, 迅速冷却后在 540 nm 波长下测定溶液的吸光值。对照是在加 DNS 后, 沸水浴前加入酶液。酶活单位定义为: 在相应条件下, 每分钟分解普鲁兰糖所释放的还原糖, 其还原力相当于 1 μ mol 麦芽三糖所需的酶量。

各种酶学性质的具体测定中, 最适温度是以普鲁兰糖为底物, 将粗酶液加入到用 pH 值 7.0 乙酸缓冲液配制的底物溶液中, 在不同温度(35℃、40℃、45℃、55℃、60℃、65℃和 70℃)下测定普鲁兰酶活力; 每组重复 3 次, 结果取平均值, 并绘制温度-相对活力曲线。温度稳定性是将粗酶液在不同温度(同前)水浴中保温 20 min 后, 再在最适温度下测其残余酶活, 以未处理的原酶液活力为 100%; 每组重复 3 次, 结果取平均值。最适 pH 值是取粗酶液加入到用不同 pH 值的乙酸缓冲液(pH 值 4.0~5.5)、磷酸盐缓冲液(pH 值 6.0~8.0)配制的底物溶液中, 在最适温度下测定酶活性; 每组重复 3 次, 结果取平均值, 并绘制 pH 值-相对活力曲线。pH 值稳定性是将粗酶液用不同 pH 值的缓冲液(同前)稀释, 40℃ 水浴保温 20 min 后, 再在最适条件下测其残余酶活, 每组重复 3 次, 结果取平均值。在酶液中分别添加各种金属化合物和 EDTA, 使反应体系中各种金属离子和 EDTA 终浓度为 2 mM 和 5 mM。在 pH 值 5.5、60℃ 保温 10 min 后, 测定残余酶相对活力, 以不含金属离子的酶液为对照, 每组重复 3 次, 结果取平均值。

1.6 普鲁兰酶基因的获得

基因组总 DNA 的提取采用 TaKaRa 公司的 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒进行。从 NCBI GenBank 数据库中获得克雷伯氏菌普鲁兰酶基因序列, 使用 Vector NTI 等软件对其进行序列比对(Multiple sequence alignment)来获得该基因保守区域。使用 Primer Premier 5.0 软件来设计正向引物 P1: ATGGTCAGATATACCTGTCATGCCCT, 反向引物 P2: TTATTTACTGCTCACCGGCAGGCCG。采用 1% 琼脂糖凝胶回收目的片段, 连接 pMD18-T 载体并转化 *E. coli* DH5 α , 阳性克隆委托上海生工生物工程技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 产普鲁兰酶菌株的筛选和鉴定结果

筛选到 7 株在平板上能够降解普鲁兰糖产生水解圈的菌株, 其中 GXAS-38 菌株形成的透明圈与菌

落直径比值最大。GXAS-38 菌株单菌落表现为白色、圆形、凸起、湿润光滑。细菌呈革兰阴性杆菌, 不运动, 有荚膜, 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 甲基红反应阴性, 硝酸盐还原阳性, V-P 实验反应阳性。从 GXAS-38 菌株基因组中扩增出约 1500 bp 的片段。与 GXAS-38 菌株相似性最高而且鉴定到种的前 20 株菌均属于肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 相似性 > 99%。GXAS-38 菌株与肺炎克雷伯氏菌 L17 的亲缘关系最为密切(图 1)。综合形态学特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果, 确定 GXAS-38 菌株是克雷伯氏菌属中的肺炎克雷伯氏菌, 并将其命名为肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae* GXAS-38)。

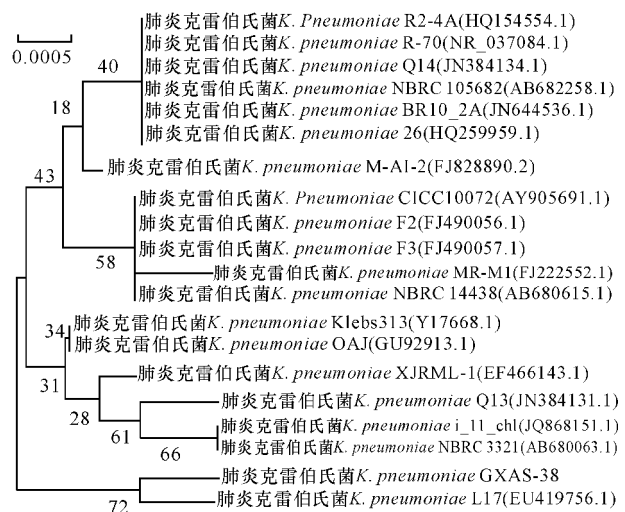


图 1 GXAS-38 菌株的 16S rDNA 系统进化树(标尺线表示进化距离)

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain GXAS-38 and related strains(Scale line shows the evolutionary distance)

2.2 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶酶学性质

2.2.1 最适温度及热稳定性

图 2(a)结果显示, pH 值为 7.0 时, GXAS-38 菌株的普鲁兰酶反应的最适温度范围为 60℃, 在温度为 50~60℃ 时, 酶活性变化不大, 相对酶活超过 80%; 温度低于 50℃ 或超过 60℃ 以后, 温度对酶活的影响十分显著, 酶的相对活力迅速下降。图 2(b)结果显示, GXAS-38 菌株的普鲁兰酶在温度 35~45℃ 范围内都很稳定, 温度对酶活影响不大; 当温度提高到 50℃ 时, 酶的相对活力降低至 76%。

2.2.2 最适 pH 值及 pH 值稳定性

由图 3(a)结果可知, GXAS-38 菌株的普鲁兰酶最适 pH 值为 5.5。在 pH 值为 5.5~6.5 时, 该酶具有较高的活性, 相对活力高于 75%; pH 值低于 5.5 或高于 7.0 时, 相对活力都急剧下降。该酶在 pH 值

4.0~8.0 都稳定(图 4b), 具有较广的 pH 值稳定范围。

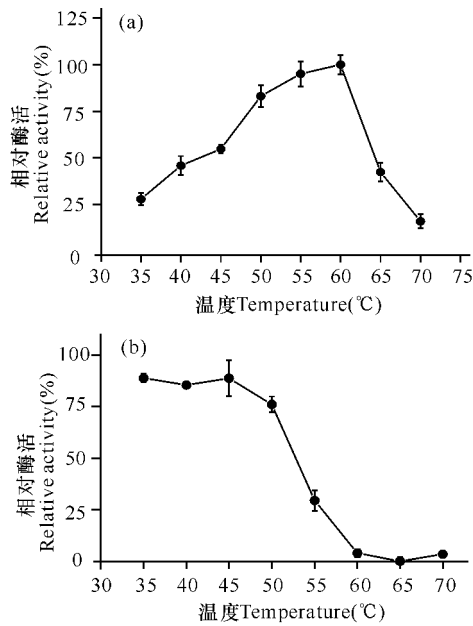


图 2 温度对普鲁兰酶活性(a)和稳定性(b)的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the activity(a) and stability(b) of crude pullulanase

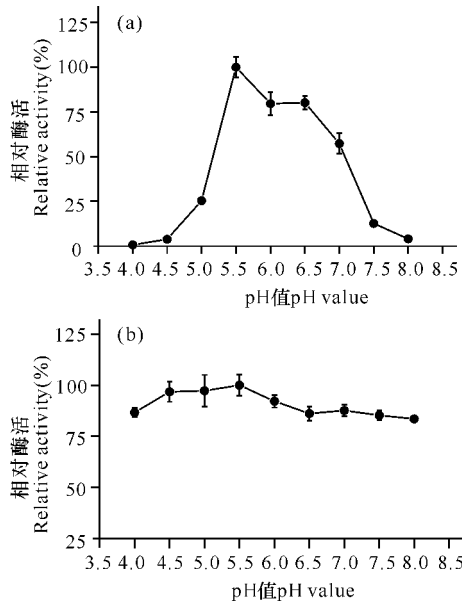


图 3 pH 值对普鲁兰酶活性(a)和稳定性(b)的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the activity(a) and stability (b) of crude pullulanase

2.2.3 金属离子和乙二胺四乙酸(EDTA)对酶活力的影响

由图 4 可知,低浓度(2 mM)的 Ca^{2+} 和 Na^{+} 对 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶活性有不同程度的激活作用,其中 Ca^{2+} 的作用最为明显。过量的 Ca^{2+} 和 Na^{+} (浓度为 5 mM)对酶的激活作用不明显,甚至会抑制酶的反应速度(如 Na^{+})。低浓度(2 mM)的 Li^{+} 对酶活影响不明显,当浓度提高至 5 mM 时,可以有效提

高酶的活力。低浓度(2 mM)的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Ba^{2+} 对该酶有抑制作用,继续提高其浓度会进一步降低 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶的活性,其中 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 抑制作用最为显著,当 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 浓度为 5 mM 时,残余酶相对活力几乎为零。低浓度(2 mM)的 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 和 K^{+} 对该酶无明显的激活或抑制作用,当其浓度提高至 5 mM 时,过量的离子会微弱的抑制酶反应速度。低浓度(2 mM)的螯合剂 EDTA 能够强烈的抑制 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶活性,进一步提高其浓度,抑制效果更为明显,说明该酶促反应需要金属离子参与。

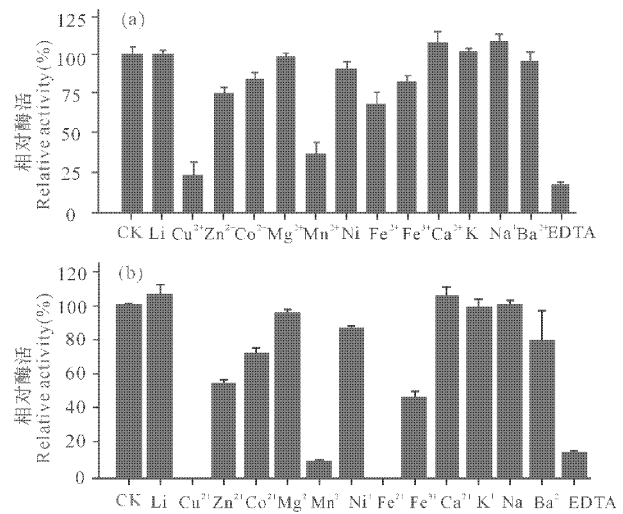


图 4 不同浓度金属离子和 EDTA 对普鲁兰酶活性的影响

Fig. 4 Effect of metal ions and EDTA on the activity of crude pullulanase

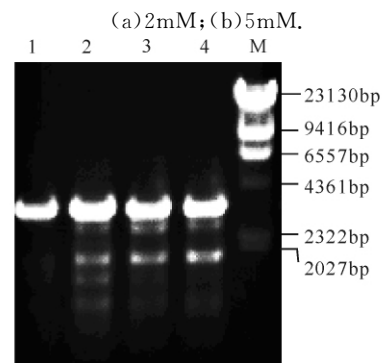


图 5 PCR 扩增普鲁兰酶基因

Fig. 5 Electrophoresis of the full-length PCR products of pullulanase gene

2.3 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶基因克隆

从图 5 中可以看出 PCR 扩增出了约 3.3 kb 的 GXAS-38 菌株的普鲁兰酶基因 *pulA* 片段,与预期的结构基因大小一致。GXAS-38 菌株的普鲁兰酶基因序列全长 3291 bp,编码 1096 个氨基酸。GXAS-38 菌株的普鲁兰酶基因 *pulA* 与肺炎克雷伯氏菌 HS11286 (CP003200. 1)、肺炎克雷伯氏菌 KCTC

2242(CP002910.1)、肺炎克雷伯氏菌 MGH 78578 (CP000647.1)、肺炎克雷伯氏菌 NTUH -K2044 (AP006725.1)的普鲁兰酶基因 *pulA* 的相似性均达到 96%以上。

3 讨论

普鲁兰酶在改善淀粉酶对淀粉的作用效果、提高利用率、降低粮耗、提高产品质量及开发新产品方面具有相当大的价值,在淀粉加工工业中有着重要的用途及良好的市场前景。不同来源的普鲁兰酶,酶学性质差异较大,大多菌株产生的普鲁兰酶作用温度和 pH 值不适合工业化应用^[9~11]。Novo 公司生产的普鲁兰酶具有良好的酶学性质,其最适温度为 60℃,最适 pH 值为 5.0,目前占领了全世界大部分的市场份额^[1,13]。本研究利用曲里苯蓝染色法筛选到的产气克雷伯氏菌 GXAS-38 具有产普鲁兰酶的能力,其发酵液粗酶的最适反应温度和 pH 值为 60℃和 5.5,与 Novo 公司生产的普鲁兰酶性质相近。低浓度的 Ca²⁺ 和 Na⁺,以及较高浓度的 Li⁺ 对该普鲁兰酶活性有不同程度的激活作用;Cu²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 和 Ba²⁺ 对该酶有抑制作用,当 Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 浓度提高至 5 mM,残余酶相对活力几乎为零。螯合剂 EDTA 能够强烈的抑制该酶的活性,说明该酶反应需要金属离子的参与。

传统发酵利用原始菌株生产酶制剂存在产酶量少、下游处理成本高,以及原始菌株不是食品安全生产菌等问题。随着基因工程技术的发展,人们可以通过增加基因拷贝数、上游连入强启动子等手段构建基因工程菌来解决这些问题。本研究利用 PCR 方法获得了完整的普鲁兰酶编码基因 *pulA*,为构建基因工程菌,进一步提高酶的产量和活性,降低生产成本,真正实现该酶产业化奠定了基础。

参考文献:

[1] Jensen B F, Norman B E. *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase: application and regulatory aspects for use in the food industry[J]. Process Biochem, 1984, 19(4): 129-134.

[2] Kelly R M, Dijkhuizen L, Leemhuis H. Starch and α -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(3): 184-193.

[3] Copeland L, Blazek J, Salman H, et al. Form and func-

tionality of starch[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(6): 1527-1534.

[4] Palackal N, Lyon C S, Zaidi S, et al. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 113-124.

[5] Kerr R A. Climate change. Global warming is changing the world [J]. Science, 2007, 316: 188-190.

[6] Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future [J]. Science, 2007, 315(5813): 808-810.

[7] Hyun H H, Zeikus J G. General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 49(5): 1168-1173.

[8] Domań-Pytka M, Bardowski J. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin[J]. Crit Rev Microbiol, 2004, 30(2): 107-121.

[9] 张明焱,沈微,饶志明,等.地衣芽孢杆菌普鲁兰酶编码基因的鉴定[J].生物学杂志,2009,26(2):8-10.

[10] 韩鹏,周鹏,闫巧娟,等.嗜热枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因的表达与重组酶的性质[J].微生物学通报,2011,38(12):1755-1761.

[11] 郭宏文,江成英,江洁,等.普鲁兰酶产生菌的筛选[J].食品研究与开发,2008,29(9):52-55.

[12] 谢银珠,沈微,王正祥.酸性普鲁兰酶基因在地衣芽孢杆菌中的表达[J].食品与发酵工业,2011,37(2):7-10.

[13] 程池.普鲁兰酶 Promozyme 200L 及其生产菌株[J].食品与发酵工业,1992,6:72-76.

[14] 姜楠,宋谈,王萍.普鲁兰酶及其分泌相关蛋白的研究进展[J].微生物学报,2011,51(6):725-731.

[15] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-428.

[16] 马向东,柯涛,熊兰,等.一种鉴定多糖水解酶类及其产生菌的新方法[J].微生物学报,2007,47(6):1102-1104.

[17] 布坎南,吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].第8版.北京:科学出版社,1984:729-758.

[18] Steven B, Briggs G, McKay C P, et al. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture dependent and culture-independent methods [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 59(2): 513-523.

[19] Tamura K, Peterson D, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.

[20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.

(责任编辑:邓大玉)