

冬枣胞浆病病原微生物的分离与鉴定

孙蕾¹, 王太明¹, 王开芳¹, 曲永赞¹, 杜华兵¹, 孙道英¹, 鲍晓明², 徐有强²

(1. 山东省林业科学研究院, 山东, 济南, 250014; 2. 山东大学, 生命科学学院, 济南, 250100)

冬枣 (*Zizyphus Jujuba* Mill cv. Dongzao) 别名冻枣、苹果枣, 为鼠李科枣属中的一个品种, 落叶果树。枣果营养丰富, 富含各种氨基酸, 尤其是维生素 C 含量高, 同时含有较高的环磷酸腺苷(cAMP)和三菇类等生物活性物质。冬枣堪称枣中精品, 其果肉细嫩多汁、甜味浓郁, 略带酸味, 生食无渣, 随着人们对鲜枣营养价值的深入了解, 以及人们消费观念由温饱型向保健型的转变, 国内外对鲜枣的需求量日益增加, 尤其在中国加入 WTO 后, 具有鲜明地域特色的冬枣必将受到国际市场的欢迎。冬枣栽培面积和发展规模不断扩大, 产量逐年递增。为延长冬枣面市时间, 提高经济效益, 满足群众需求, 冬枣贮藏保鲜量越来越大, 冬枣贮藏保鲜已成为一新兴产业。但冬枣贮期病害较重, 尤其是贮后 60 天左右, 病害大面积发生, 这已成为困扰冬枣贮藏业发展的主要限制因素之一。

浆胞病是冬枣贮藏的主要病害之一。其主要病症是发病早期在枣果肩部或腰部出现淡、深红色和茶褐色变色斑点, 后期颜色加深, 病部表皮形状不变, 用手触压出现凹陷不能弹起。形状近圆形、卵形或不规则形。发病严重时, 病斑连片而导致全果病烂。病部果肉与果皮易分离, 病部果肉呈浆状、可挑取, 颜色为淡黄褐色。对冬枣病原微生物的研究对于延长冬枣储期, 制定有效的预防病害措施, 发展防害技术有重大的意义。

本部分主要针对冬枣浆胞病, 开展病原微生物的分离与鉴定。以期有针对性地预防冬枣贮藏病害, 以延长冬枣储期, 提高经济效益。

1 材料及方法

新鲜采收的冬枣 0℃ 左右低温下储存, 期间每隔一定时间观察, 储存约三个月冬枣开始出现浆胞病早期症状 (图一), 取一定数量的病枣编号, 于 -20℃ 下保存, 备用病原微生物的分离。



图一：冬枣浆胞病早期症状

1.2 冬枣病原微生物的分离与培养

选取典型症状的病枣，用 70% 的乙醇溶液擦洗冬枣表面，特别是病斑处，用无菌刀剥去冬枣果皮，清晰可见冬枣的病害范围，取冬枣果病健交界处的样品，用于微生物分离。分离方法分为两种，①将取出的样品置于无菌水中，振荡分散处理 5 分钟，经适当稀释，铺于平板中进行微生物培养。②直接将取出的样品置于平板上。

分别才用不同的培养基及培养条件分离不同的微生物，①马铃薯葡萄糖培养基（PDA——马铃薯 200g，蔗糖（或葡萄糖）20g，琼脂粉 15-20g，加水至 1000ml，15 磅 20min 灭菌）平板上，28℃用于培养真菌；②牛肉膏蛋白胨培养基（蛋白胨 10g，牛肉膏 5g，NaCl 10g，加水至 1000ml，调 pH 至 7.2，琼脂粉 15-20g，15 磅 20min 灭菌）平板上，37℃用于培养细菌。2 到 5 天观察菌落生长状况。

1.3 冬枣病原细菌的回接实验

对分离频率较高的冬枣病原微生物进行回接实验。选取当年健康的冬枣果，用生理盐水清洗几遍，置于净化工作台上用无菌风吹干，并用紫外线 5 秒钟短暂照射，以对冬枣果进行表面消毒。将病原微生物分别培养至对数生长期，离心收集菌体，适当稀释，使各菌液浓度在 OD600 为 0.5 左右。分别用 3ml 菌液对冬枣进行接种处理，二种以上菌株混合接种时，各菌株间等体积混合。接种方式为枣果与菌液混匀方法，接种冬枣果为两种处理方式，①选用正常冬枣果，②用无菌针，点刺健枣果表皮。各实验组及对照组均选用 9 粒健康冬枣果。

接种后封于无菌纸质信封中，0℃左右冷库保存。

1.4 冬枣病原微生物的鉴定

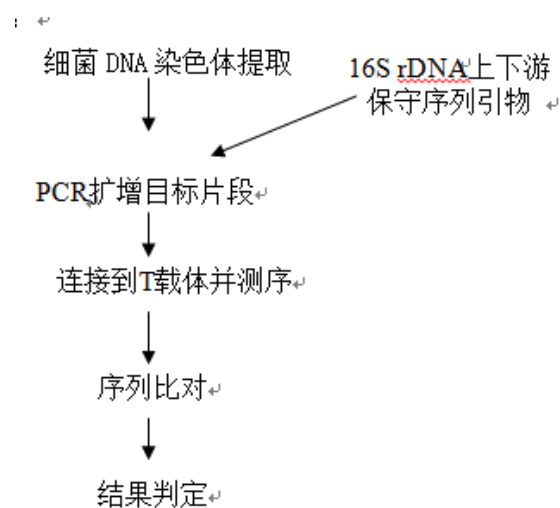
对分离得到的真菌采用经典形态学鉴定方法，

对分离得到的细菌采用经典生理生化（美国 BIOLOG 公司微生物自动鉴定系统）及现在分子生物学相结合的方法进行鉴定。

1.5 细菌分子生物学鉴定——16S rDNA 方法

根据核糖体 DNA 在进化上的保守性，利用 16S rDNA 两端的保守序列，设计引物 PCR 扩增待测菌株的 16S rDNA 基因，并将测得的碱基序列，与 GenBank 中已知相关序列进行同源性比较分析，一般地，当两种菌株的 16S rDNA 同源性达到 97%以上，认为这两种菌是同一种菌。

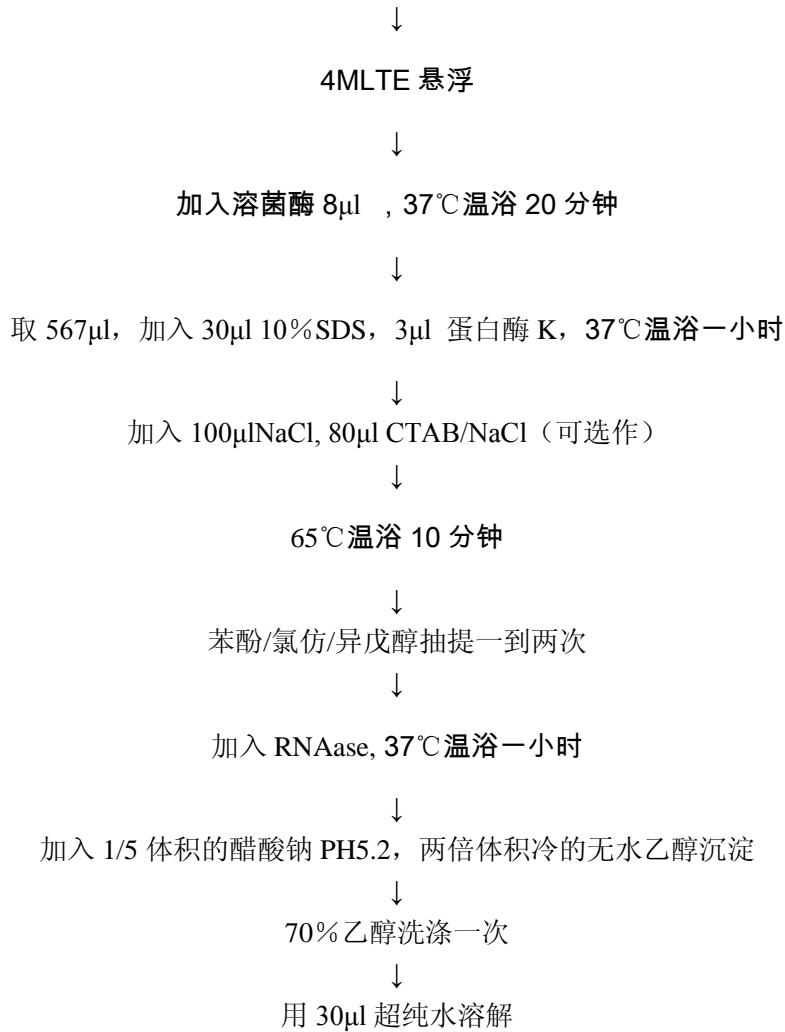
基本流程：



1) 引物：引物由上海博亚生物技术有限公司合成。根据文献报道，选用 16S rDNA 高通用性引物：fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 及 rP2 (5'-ACGGCTAC2CTTGTTACGACTT-3')，用于冬枣病原细菌 16S rDNA 基因片段的扩增。

2) 冬枣病原细菌基因组 DNA 的提取，采用改进的方法提取病原细菌基因组 DNA：

离心沉淀 8000rpm 过夜培养的菌液，TE 洗涤



3) PCR 扩增冬枣病原细菌基因组 16S rDNA 片段:

200μl PCR 反应体系: 144μl ddH₂O, 20μl 10×buffer, 16μl BD, 4μl dNTP, 4μl fD1, 4μl rP2, 8μl 基因组 DNA, EF Taq 3.2μl.

94°C 5min	}	35 cycles
94°C 1min		
58°C 1min		
72°C 2min		
72°C 10min		
-		
4°C hold		

1) 冬枣病原细菌基因组 16S rDNA 片段的连接转化与测序:

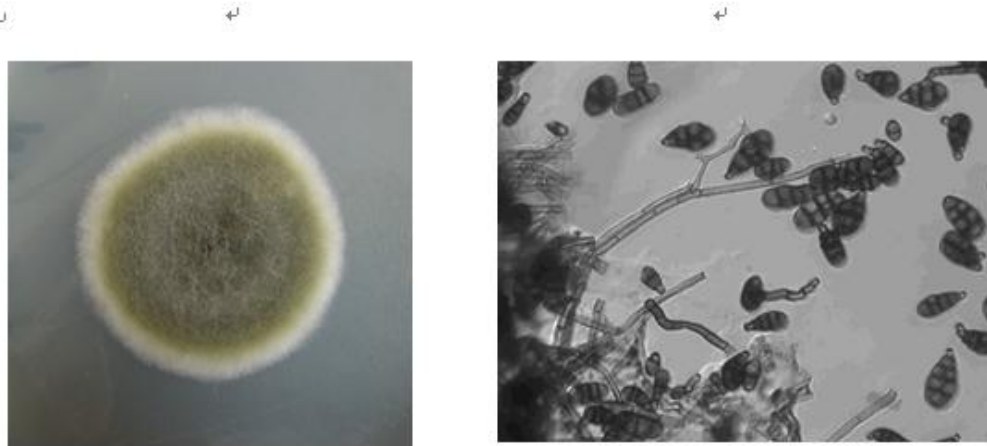
PCR 产物经电泳、凝胶回收得到的 DAN 片段与 pMD18-T vector (TaKaRa) 连接, 并转化 E.coli。16S rDNA 序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

2 结果与讨论

2.1 冬枣浆胞病病原真菌的分离与鉴定

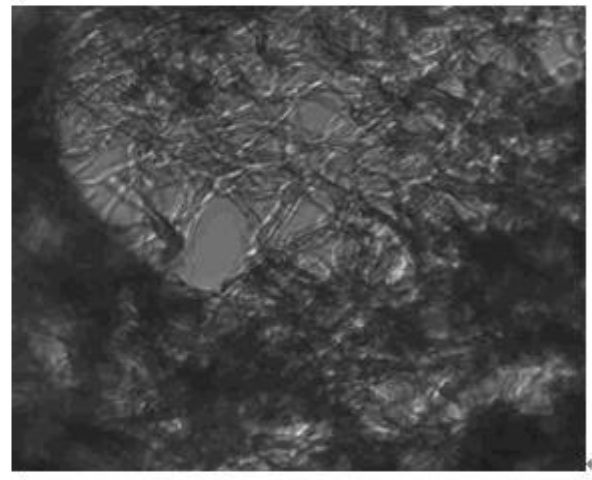
从 2004 年至 2006 年连续 3 年对贮藏冬枣浆胞病进行病原真菌的分离。一般地,在 PDA 培养基上 30℃ 恒温培养两天后,无论是病枣组织直接接种,还是样品经无菌水稀释后接种,均明显观察到真菌菌落。对连续三年贮藏冬枣浆胞病的分离真菌菌落形态观察结果显示,三年来均出现两种基本相同的真菌菌落形态。

①在 PDA 培养基上,初期菌丝无色后变为墨绿色或黑绿色,菌丝表面有黑色小粒点,培养基底面为黑色或黑紫色。28℃ 培养一周后菌落直径为 68.2~72.6mm,气生菌丝薄层絮状,有明显浅灰与黑褐色交替的同心轮纹(图二 A)。显微镜观察可见,分生孢子梗淡褐色或榄褐色单枝或分支,有隔膜。分生孢子定生或侧生,有啄或无啄,孢子形状为卵形、梭形、长圆形、倒棍棒形,表面平滑或有瘤,有横隔膜 1-9 个,纵隔膜 0-6 个,横分隔处稍缢缩,大小 7-68.5X6-22.5 微米(图二 B)。按照魏景超《真菌鉴定手册》鉴定该病原真菌为半知菌亚门交链孢霉属 (*Alternaria* Nees Wallr.)



图二, 交链孢霉属 (*Alternaria* sp.) 的菌落形态 (A) 和孢子形态 (B)

②在 PDA 培养基上生长迅速,初期菌丝呈白色(图三 A),培养 4 天后,菌丝颜色变深略有点黑色,后变黑灰色或黑褐色,菌丝呈树根状生长,初期菌丝较细后变粗,边缘菌丝不整齐,28℃ 培养 5 天后,菌落直径为 5.2cm。培养基底面为灰蓝色或灰黑色。显微镜观察可见,初期菌丝为淡橄榄色,成熟菌丝为淡褐色,菌丝具隔膜,菌丝直径为 6 微米,经常规真菌培养未观察到分生孢子。按照魏景超《真菌鉴定手册》初步鉴定该病原真菌为真菌半知菌亚门无孢菌群根菌索菌 (*Rhizomorpha* Roth.ex Fr.)。



图三，根菌索菌 (*Rhizomorpha* sp.) 的菌落形态 (A) 和菌丝形态 (B)

2.2 冬枣浆胞病病原细菌的分离与鉴定

对 2005、2006 年 2 年的贮藏冬枣浆胞病进行病原细菌的分离。实验中发现使用常规细菌 LB 培养基（酵母膏蛋白胨培养）没有分离到细菌，培养 48 小时后，病枣果组织周围没有细菌长出。经多次改变培养基配方，最终接种在牛肉膏蛋白胨培养基（牛肉浸膏 5g，蛋白胨 10g，NaCl 10g，琼脂 15-20 g，加水至 1000ml，调 pH 至 7.2，15 磅 20min 灭菌），37℃ 过夜培养，可见病枣果组织周围分布多种细菌。进而进行分离纯化，根据菌落形态观察，粗略分辨，共分离到五种细菌，其中连续两年均分离到的细菌共有 4 种，其菌落形态描述见表一，菌体及菌落形态特征见图四，从菌体形态上看，有杆菌和球菌两种，从连续两年的分离结果推测，这四种菌株与冬枣浆胞病的发生有一定关系。

表一：2005、2006 年贮藏冬枣浆胞病细菌菌落的形态

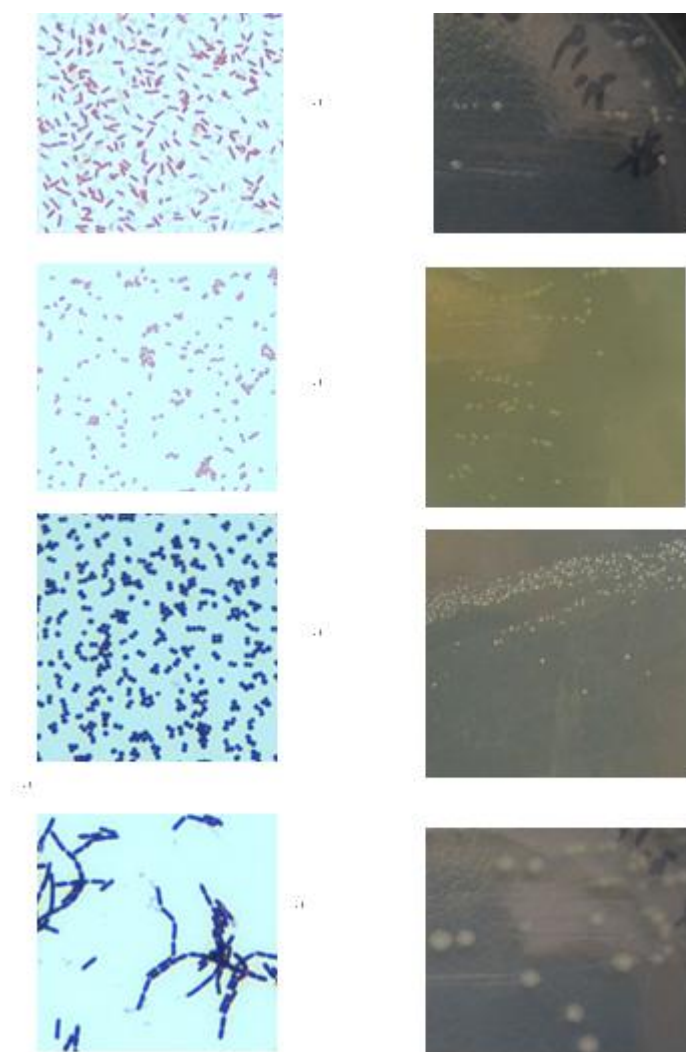
编号	气味	颜色	形状	特征
062241	无特殊气味	乳白色	规则圆形	较为干燥，表面有光泽，突起
062271	有恶臭	黄色	规则圆形	粘稠，表面有光泽，突起，很湿润
062272	无特殊气味	白色	规则圆形	较为湿润，表面有光泽，突起
062281	无特殊气味	白色 近于透明	不规则，周边很模糊	较为干燥，表面无光泽，不突起，较平

2.3 冬枣浆胞病病原细菌的分子生物学鉴定

2.3.1 四种病原细菌基因组 DNA 的提取及 rDNA 片段的扩增

按照材料与方法中描述的操作程序，提取到细菌的基因组 DNA。但某些菌株 SDS 破壁后液体将变得非常粘稠，直接加氯仿异戊醇抽提，上清液无法吸出，可用 CTAB/NaCl 溶液处理，再用氯仿异戊醇抽提，上清液较清澈，可以顺利提取到基因组 DNA。图五 A 显示四种冬枣浆胞病可能的病原细菌基因组 DNA 提取物的电泳图谱。

以提取到的病原基因组 DNA 作模板，使用通用引物，扩增出目约 1500bp 的 rDNA 目的片段见图五 B。



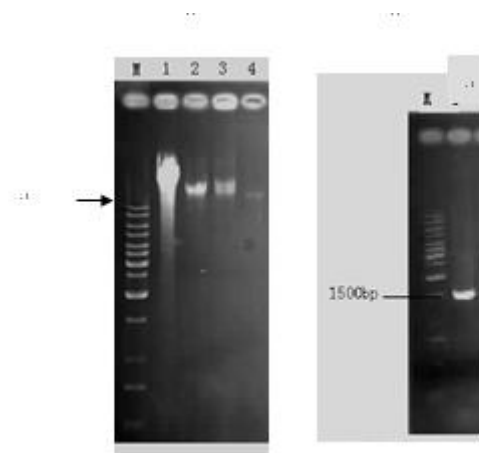
2.3 冬枣浆胞病病原细菌的分子生物学鉴定

2.3.1 四种病原细菌基因组 DNA 的提取及 rDNA 片段的扩增

按照材料与方法中描述的操作程序，提取到细菌的基因组 DNA。但某些菌株 SDS 破壁后液体将变得非常粘稠，直接加氯仿异戊醇抽提，上清液无法吸出，可用 CTAB/NaCl 溶液

处理，再用氯仿异戊醇抽提，上清液较清澈，可以顺利提取到基因组 DNA。图五 A 显示四种冬枣浆胞病可能的病原细菌基因组 DNA 提取物的电泳图谱。

以提取到的病原基因组 DNA 作模板，使用通用引物，扩增出目约 1500bp 的 rDNA 目的片段见图五 B。



2.3.2 rDNA 片段的测定序列

把扩增得到的 rDNA 目的片段连接到 pMD18-T vector (TaKaRa 公司产品) 上，把验证后的重组子质粒送到博亚生物公司测序。已完成 062281 菌株 rDNA 片段的序列测定，为 1162bp (图六)，其它菌株的 rDNA 片段的分析工作还在进行。

```
GACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAC
GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA
TACCGGATGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGG
ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCCGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAA
AGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGGAAGTGTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGTGTTAGG
GGTTTCTCCCTTAGTGCTGCAGCTACGCGTAGCACTCGCTGTGAGTACGTGCGAGACTGAACTCAAAG
ATGACGGGGCCGCACAGCGTGAGCATGTGTTATTCTAGCAACGCGAGAAGTATCAGTCTGAATACTCT
GCATCTACAGATAGAACGTCCCTCGTGGCGAAAGAAAGAGTGCATGATGTCTCAGCTCTGTCTCTGGA
AGTTGTTATACACACAAGAACTGACTATGCTACTCATGTGCTAGGATGCGTGCAACCGAATAGGGTGA
GACGAACTAATGGCCATAAGT
```

d 图六、冬枣可能病原细菌 062281 的 16S rDNA 序列

将所得到 062281 菌株的 16S rDNA 序列提交 gene bank 数据库, 使用 blast 软件

```
> gi|60098072|emb|AJ880761.1 Bacillus subtilis partial 16S rRNA gene, isolate SMF7  
Length=1522
```

```
Score = 1614 bits (814), Expect = 0.0  
Identities = 857/865 (99%), Gaps = 6/865 (0%)  
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 43 GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG 102  
|  
Sbjct 3 GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCG 62  
  
Query 103 GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAAC 162  
|  
Sbjct 63 GACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGTAAC 122  
  
Query 163 CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGA 222  
|  
Sbjct 123 CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGA 182  
  
Query 223 CCGCATGGTTCAAACATAAAAAGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGGCGGC 282  
|  
Sbjct 183 CCGCATGGTTCAAACATAAAAAGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGGCGGC 242  
  
Query 283 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCCGAGAGG 342  
|  
Sbjct 243 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG 302  
  
Query 343 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG 402  
|  
Sbjct 303 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG 362  
  
Query 403 AATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTT 462  
|  
Sbjct 363 AATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGGTTTT 422  
  
Query 463 GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTG 522  
|  
Sbjct 423 GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTG 482  
  
Query 523 ACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG 582  
|  
Sbjct 483 ACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG 542  
  
Query 583 TGGCAAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTG 642  
|  
Sbjct 543 TGGCAAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTG 602  
  
Query 643 ATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAAGTGGGAACTTGAGTGCAG 702  
|  
Sbjct 603 ATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAAGTGGGAACTTGAGTGCAG 662  
  
Query 703 AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAACACCA 762  
|  
Sbjct 663 AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAACACCA 722  
  
Query 763 GTGGCGAAAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGT-GGGAGCG 821  
|  
Sbjct 723 GTGGCGAAAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCG 782  
  
Query 822 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-AACGATGAGTGCT-AGTGTTA-GGG 878  
|  
Sbjct 783 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG 842  
  
Query 879 TTTC--TCCCTTAGTGCTGCAGCTA 901  
|  
Sbjct 843 TTTCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA 867
```

进行同源性分析, 分析结果表明冬枣可能病原细菌 062281 的 16SrDNA 所测定序列与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的同源性达到 99% (图 7), 因此 062281 号菌株鉴定为枯草杆菌。其余可能冬枣浆胞病可能病原细菌的分子生物学鉴定工作还在进行中。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 细胞杆状, 直或接近直杆状。0.3~2.2×1.2~7.0 微米, 不形成菌丝体, 形成抗热内生芽孢, 椭圆到柱状, 中生到次端生, 菌株内或菌株间变化。芽孢囊不明显膨大, 内生芽孢较营养细胞有较大的折光性, 并且不宜染色。运动, 鞭毛典型侧生, 革兰氏染色阳性。菌落粗糙、不透明, 不闪光, 扩张, 污白色或微带黄色。葡萄糖存在条件产酸不产气, 液化明胶、胨化牛奶, 还原硝酸盐、水解淀粉, 是好氧性细菌。

2.4 冬枣浆胞病病原细菌的回接实验结果

2007 年对所分离到的浆胞病可能病原细菌进行了回接试验, 试验组合为: 1、2、3、4、12、23、13、123、1234、空白对照。(菌株编号 1: 2281; 2: 2241; 3: 2271; 4: 2272)。目前接种冬枣已经发病, 症状为典型的浆胞病病症。发病情况显示, 病斑并没有从针刺伤口处形成, 表明伤口不是病原细菌的侵入途径。各试验病果的发病情况基本相似, 进一步的细菌分离工作正在进行。

参考文献:

1. 孙蕾, 吴兴梅, 房用.等, 冬枣采后浆胞病定性研究. 保鲜与加工, 2004(5):23-24
2. 季延平, 吴玉柱, 刘殷, 曹鹏云;冬枣轮纹病病原菌的研究;山东林业科技2005 (2) :22-23
3. 王太明, 孙蕾, 吴兴梅, 杜华兵, 刘元铅, 王开芳, 曲永普, 乔勇进; 冬枣贮期主要病害及防治技术的研究; 食品科学2004, 9: 130-135
4. 万颖杰, 张俊磊, 安静; 细胞培养中细菌类微生物污染的快速检测; 局解手术学杂志2005, 4 (2) : 88-90
5. 刘文斌, 马立新, 蒋思婧, 江正兵; 链霉菌基因组提取方法的比较与改进; 湖北大学学报2000, 22 (3) : 286-288
6. 王亚萍, 梁丽松, 王贵禧, 李艳菊; 冬枣果实三种主要病原细菌对温度和PH值的耐受力研究; 林业科学研究 2005, 18 (2) : 199-203
7. 周绪宝; 冬枣采后黑腐病病害及防治技术的研究; 中国农业大学硕士学位论文2003, 06, 01
8. 乔勇进, 孙蕾, 吴兴梅.等, 不同成熟度沾化冬枣冰点测定及是以贮藏温度的研究. 经济林研究, 2005, 23(1): 62-64
9. 杨波; 烟草赤星病拮抗细菌筛选及其16S rDNA PCR—RFLP分析; 浙江大学硕士学位论文2005, 05, 01
10. 陈贵堂; 冬枣采后生理及其贮藏技术研究; 河北农业大学硕士学位论文 2003, 06, 01

11. Andrew Macrae, THE USE OF 16S RDNA METHODS IN SOIL MICROBIAL ECOLOGY Brazilian Journal of Microbiology (2000) 31:77-82
12. William GW, Susan MB ,Dale A P , *et al* . 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J] . Journal of Bacteriology , 1991, 1: 697 - 703
13. Kathryn A. Harris and John C. Hartley,Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. Journal of Medical Microbiology 2003, 52, 685–691
14. Michail O D, Pamela B. Principles and applications of methods for DNA -Based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology,1999 ,6 :1661 - 1669.
15. S Saglani, K A Harris, C Wallis, J C Hartley, Empyema: the use of broad range 16S rDNA PCR for pathogen detection, Downloaded from adc.bmjournals.com on 21 May 2006
16. F.奥斯伯, R.布伦特, R.E.金斯顿, D.D.穆尔, J.G.赛德曼, J.A.史密斯, K.斯特拉尔;精编分子生物学实验指南; 科学出版社1998版
17. 辛玉成, 王贵禧, 崔卫东, 等8 冬枣果实病害的发生与生态相关性研究初报 [J] 8 莱阳农学院学报, 2003,20(4):255-257
18. 沈萍, 范秀容, 李广武; 微生物学实验第三版; 高等教育出版社
19. 孙蕾,杜华兵, 吴兴梅.等, 冬枣自发气调 (MAP) 贮藏技术研究. 经济林研究, 2005, 23(1): 62-64