

## rDNA ITS 序列在 ACCC 真菌鉴定中的应用

姜雨萌 牛永春 邓晖\*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室 北京 100081)

**摘要:**【目的】真菌无处不在, 并与人类生活紧密相关。真菌的鉴定是科学研究和资源开发利用的基础。本研究从中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)随机选取已经定名的 112 株库藏真菌菌株作为实验材料, 通过 DNA 测序, 评估核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA ITS)序列在真菌属级鉴定上的应用。【方法】采用真菌 DNA 条形码 rDNA ITS 的序列测定和在 GenBank 中查寻比对的方法, 对这些菌株进行属水平的鉴定复核。【结果】通过研究, 供试菌株中有 80 株的属名与原鉴定相符, 同时表明序列中套峰的情况降低与 GenBank 中序列比对的相似性。【结论】rDNA ITS 序列测定法可以用于真菌菌株进行属水平的鉴定复核, 国家菌种保藏机构应对已入库保藏和即将入库的所有真菌菌株都进行属水平的鉴定复核, 并对菌株鉴定结果作审慎处理, 原定名的名称及其变更历史应以“曾用名”在数据库中保留。

**关键词:** 真菌, DNA 条形码, 鉴定, ITS, 属

## Applying rDNA internal transcribed spacer sequences to identify fungal strains preserved at Agricultural Culture Collection of China

JIANG Yu-Meng NIU Yong-Chun DENG Hui\*

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

**Abstract:** [Objective] Fungi are found everywhere and associated closely with human life. Identification of fungi is the basis of further scientific research and commercial application of fungal resources. In this study, 112 fungal strains preserved at the Agricultural Culture Collection of China (ACCC) were randomly chosen to test the application of rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences in their identification at the genus level. [Methods] rDNA ITS was sequenced from all the strains used in this study and compared with available sequences in GenBank using a BLASTn search for their generic identification. [Results] Among the strains used, 80 were consistent with their original generic determinations. Polymorphisms of DNA bases or impurity of sequence chromatograms reduced the similarity in comparison with the target sequence in GenBank.

**Foundation item:** National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2013AA102801, 2013AA102802); Fund of National Infrastructure of Microbial Resources

\*Corresponding author: Tel: 86-10-82108651-622; Fax: 86-10-82108647; E-mail: denghuimail@aliyun.com

Received: November 20, 2015; Accepted: March 09, 2016; Published online (www.cnki.net): March 23, 2016

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102801, 2013AA102802); 国家微生物资源平台项目

\*通讯作者: Tel: 86-10-82108651-622; Fax: 86-10-82108647; E-mail: denghuimail@aliyun.com

收稿日期: 2015-11-20; 接受日期: 2016-03-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-23

**[Conclusion]** rDNA ITS sequences can be used for confirmation of fungal strain identity at the level of genus. It is recommended that all the fungal strains prior to and in preservation in national microorganism collections should be checked through rDNA ITS sequence analysis and the name of strains should be treated with caution. The original determination and the history of used names of each strain should be kept in the database for further reference.

**Keywords:** Fungi, DNA barcoding, Identification, ITS, Genus

真菌分为广义的真菌和狭义的真菌。广义的真菌是一个广泛生物类群,除了纯真菌(Pure fungi)外还有粘菌、卵菌、地衣以及一些单细胞的真核生物<sup>[1]</sup>。狭义的真菌是指生物三域系统中真核生物域中的纯真菌,包含6个门,子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、球囊菌门(Glomeromycota)、微孢子虫门(Microsporidia)和接合菌门(Zygomycota)<sup>[2]</sup>。真菌一般具有真正的细胞核;营养体通常为分枝繁茂的丝状体,单个的丝状体称为菌丝,菌丝呈顶端生长;有硬的细胞壁,大多数真菌的壁为几丁质;通过细胞壁吸收营养物质,分泌胞外酶降解不被吸收的多聚物为简单化合物吸收,是异养型;通过有性和无性繁殖的方式产生孢子延续种族<sup>[1]</sup>。真菌在工业、农业和医药卫生等领域有广泛的利用,几乎遍及与人类生活相关的各个方面,例如在食品业、纺织业、制革、造纸、洗涤、医药等所用的原料和酶类,植物病害和生物防治,土壤微生物,环境污染和废弃物的降解等。

真菌的鉴定是真菌研究和利用的基础。DNA条形码(DNA barcoding)技术作为一新兴的物种鉴定方法以其灵敏、精确、方便和客观的优势,在动植物中已经得到广泛应用<sup>[3]</sup>。Schoch等提出rDNA ITS作为真核生物域的第二大界——真菌界的DNA条形码,以利于真菌多型分类生态学和生物多样性的研究<sup>[4]</sup>。rDNA ITS是指核糖体RNA基因(rDNA)的内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS),通常情况下ITS1、5.8S和ITS2这3个区段合称为ITS序列,真菌ITS的长度一般在650–750 bp之间<sup>[3]</sup>。在GenBank中有约172 000条真菌的rDNA ITS全序列,其中56%有拉丁学名,代表约15 500种和

2 500属,来源于500余种刊物的约11 500项科学研究<sup>[4]</sup>。我国研究者应用rDNA ITS序列于医学、土壤、工业、植物内生、植物病原和污染真菌的鉴定中,对于口腔黏膜、临床浅部真菌<sup>[5]</sup>,银杉根际土壤真菌<sup>[6]</sup>,纤维素降解菌<sup>[7]</sup>,甘草、麻疯树根部内生真菌<sup>[8-9]</sup>,桃、猕猴桃果实贮藏期间病原真菌<sup>[10-11]</sup>、黄瓜叶斑病菌<sup>[12]</sup>、烟草根黑腐病致病菌<sup>[13]</sup>,化妆品中污染真菌<sup>[14]</sup>等真菌的鉴定中都以rDNA ITS序列作为主要的鉴定手段。

本实验研究的目的是选取中国农业微生物菌种保藏管理中心(Agricultural Culture Collection of China, ACCC)保藏的菌株,采用rDNA ITS序列测序和比对的方法进行菌种名称的复核,验证rDNA ITS序列在真菌属的水平上复核鉴定的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

随机选取来自ACCC的真菌共计37属112株菌株(表1)。

### 1.2 菌株的培养

将菌株接种于PDA培养基<sup>[15]</sup>或V8培养基上,25℃恒温培养箱中培养。接种后3 d开始观察并测量菌落直径,记录初生菌丝表面特征、有无色素产生等并拍摄数码照片。待菌落覆盖培养皿2/3表面积时刮于2 mL离心管中,用于DNA提取。

V8培养基配方:200 mL V8蔬菜汁,碳酸钙0.3 g,琼脂20 g,自来水补足至1 L。 $1.0 \times 10^5$  kPa灭菌30 min。

### 1.3 DNA的提取

采用CTAB法提取DNA<sup>[16]</sup>。将准备好的装有菌丝的离心管中放入钢珠,然后将离心管放于液氮中10 min,再置于MM400混合式研磨仪中3–5 min

表 1 菌株属名以及菌株数  
Table 1 The strain numbers of each genus

属名 Genera	菌株数 Strain numbers	属名 Genera	菌株数 Strain numbers
<i>Ascochyta</i>	1	<i>Paecilomyces</i>	1
<i>Botrytis</i>	1	<i>Sclerotium</i>	2
<i>Cephalothecium</i>	1	<i>Shiraia</i>	6
<i>Cladosporium</i>	1	<i>Sphaeropsis</i>	2
<i>Colletotrichum</i>	4	<i>Stachybotrys</i>	2
<i>Coniothyrium</i>	1	<i>Stemphylium</i>	1
<i>Corynespora</i>	5	<i>Taeniolella</i>	3
<i>Gonytrichum</i>	3	<i>Taifanglania</i>	1
<i>Magnaporthe</i>	9	<i>Thielaviopsis</i>	1
<i>Memmoniella</i>	1	<i>Torula</i>	2
<i>Myrothecium</i>	3	<i>Trichoderma</i>	1
<i>Neurospora</i>	1	<i>Trichothecium</i>	6
<i>Sclerotinia</i>	14	<i>Trichurus</i>	2
<i>Phytophthora</i>	1	<i>Ulocladium</i>	3
<i>Pilidium</i>	1	<i>Pestalotiopsis</i>	4
<i>Polymyxa</i>	1	<i>Phialophora</i>	1
<i>Pseudocercospora</i>	5	<i>Phoma</i>	2
<i>Rhizoctonia</i>	9	<i>Phyllosticta</i>	4
<i>Rhizopus</i>	6		

至研磨成粘稠状。随后用 CTAB 法进行 DNA 提取。

#### 1.4 rDNA-ITS 扩增和序列分析

引物采用真菌通用引物：ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。50  $\mu$ L PCR 扩增体系：DNA 模板 2  $\mu$ L，*Taq* 酶(2.5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L，10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L，dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L，10  $\mu$ mol/L 的正向引物和反向引物各 1  $\mu$ L，加灭菌双蒸水至 50  $\mu$ L。PCR 反应在 Bio-Rad T100 上进行，程序为：95  $^{\circ}$ C 3 min；95  $^{\circ}$ C 2 min，53  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；72  $^{\circ}$ C 10 min，12  $^{\circ}$ C 保持。配制 1%琼脂糖凝胶，取 4  $\mu$ L 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭溶液染色 15 min 后，在凝胶成像系统中观察。将检测电泳条带达到一定亮

度的 PCR 产物送交北京三博远志生物技术有限责任公司进行 rDNA ITS 序列测定。将所测得的 rDNA ITS 序列在 GenBank 中进行比对。

## 2 结果与讨论

实验中的 112 株菌株经 rDNA ITS 序列比对，共有 80 株菌株的比对结果与原名称在属的水平上相同，占供试菌株的 71.4%。这些比对一致的菌株，取每个属的代表性菌株的比对结果见表 2。

经 rDNA ITS 序列比对，比对结果与原名称在属的水平上相同的 80 株菌株与 GenBank 中的序列相似性均为 98%–100%。测序结果中有特殊结构的情况基本不影响比对的相似率，但测序结果中有套峰的情况下比对的相似性会降低，有的可以达到 90%，例如 *Rhizoctonia* 属的 4 株菌，*Shiraia*、*Phytophthora*、*Corynespora*、*Torula* 属各 1 株菌在 GenBank 中比对的相似率 $\leq$ 95%，都是因为测序结果中存在套峰的情况。对于这几株菌株，还需重复试验，获得无套峰的正常序列结合形态学和其他方法进一步研究。Landeweert 等认为采用 ITS1F/ITS4B 这对引物扩增土壤中的担子菌，通过 ITS 区域比对 OTU (Operational taxonomic units)与 GenBank 中参照序列相似性 99%–100%之间的鉴别为相同种<sup>[17]</sup>。杨友联等对炭疽菌的研究指出，登录在 GenBank 中的 *Colletotrichum gloeosporioides* 的 ITS 序列中有部分极可能被错位定义，因此，在引用 GenBank 中的序列参与构建系统发育时需谨慎选择，尽可能的选择模式菌株的序列参与比较分析<sup>[18]</sup>。

综上所述，通过试验和文献分析，采用 rDNA ITS 序列在属的水平上对菌株进行复核是相对准确的。

针对本实验涉及的真菌，在链格孢属 *Alternaria*、葡萄孢属 *Botrytis*、枝孢属 *Cladosporium*、炭疽菌属 *Colletotrichum*、棒孢属 *Corynespora*、疫霉属 *Phytophthora*、拟青霉属 *Paecilomyces*、丝核菌属 *Rhizoctonia*、核盘菌属 *Sclerotinia* 的真菌种类有通过 rDNA ITS 序列鉴定的研究报道。刘先宝等

表 2 每个属代表性菌株在 GenBank 中的比对结果  
Table 2 The BLAST result in GenBank of representative fungal strains of each genus

属 Genera	ACCC 编号 ACCC No.	在 GenBank 中比对结果 BLAST result in GenBank
<i>Botrytis</i>	ACCC 37345	<i>Botrytis cinerea</i> 99%
<i>Cephalothecium</i>	ACCC 36170	<i>Cephalothecium roseum</i> 100%
<i>Cladosporium</i>	ACCC 37043	<i>Cladosporium oxysporum</i> 99%
<i>Colletotrichum</i>	ACCC 37106	<i>Colletotrichum fructicola</i> 100%
<i>Corynespora</i>	ACCC 36068	<i>Corynespora cassicola</i> 99%
<i>Magnaporthe</i>	ACCC 37656	<i>Magnaporthe grisea</i> 99%
<i>Memmoniella</i>	ACCC 37883	<i>Memmoniella echinata</i> 99%
<i>Myrothecium</i>	ACCC 37572	<i>Myrothecium verrucaria</i> 99%
<i>Neurospora</i>	ACCC 36128	<i>Neurospora pannonica</i> 100%
<i>Pestalotiopsis</i>	ACCC 37999	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i> 99%
<i>Phialophora</i>	ACCC 37624	<i>Cadophora malorum</i> 98%
<i>Phytophthora</i>	ACCC 38065	<i>Phytophthora nicotianae</i> 90%
<i>Pilidium</i>	ACCC 37269	<i>Pilidium concavum</i> 98%
<i>Pseudocercospora</i>	ACCC 38044	<i>Pseudocercospora pallida</i> 99%
<i>Rhizoctonia</i>	ACCC 37094	<i>Rhizoctonia solani</i> 99%
<i>Rhizopus</i>	ACCC 36867	<i>Rhizopus stolonifer</i> 90%
<i>Sclerotinia</i>	ACCC 36142	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 99%
<i>Shiraia</i>	ACCC 37743	<i>Shiraia bambusicola</i> 99%
<i>Stachybotrys</i>	ACCC 37897	<i>Stachybotrys chartarum</i> 99%
<i>Stemphylium</i>	ACCC 38036	<i>Stemphylium sarciniforme</i> 98%
<i>Taifanglania</i>	ACCC 37727	<i>Taifanglania hechuanensis</i> 99%
<i>Trichoderma</i>	ACCC 37210	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> 100%
<i>Trichothecium</i>	ACCC 36087	<i>Trichothecium roseum</i> 99%
<i>Trichurus</i>	ACCC37922	<i>Trichurus dendrocephalus</i> 100%
<i>Torula</i>	ACCC 37252	<i>Torula caligans</i> 99%
<i>Paecilomyces</i>	ACCC 37116	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (异名 : <i>Paecilomyces lilacinus</i> ) 98%
<i>Sclerotium</i>	ACCC 36154	<i>Athelia rolfsii</i> (异名 : <i>Sclerotium rolfsii</i> ) 100%
<i>Ulocladium</i>	ACCC 37166	<i>Alternaria consortialis</i> (异名 : <i>Ulocladium consortialis</i> ) 99%

通过测定橡胶树多主棒孢菌(*Corynespora cassicola*)的 rDNA ITS 区全序列,结果表明,种内各菌株间 ITS 序列一致性高达 99%以上,部分菌株间出现个别碱基的差异,并根据 rDNA ITS 区设计了一对高度特异引物(CorP1/CorP2)<sup>[19]</sup>。王艳等将从三七根茎上分离出的两株菌株进行 rDNA ITS 序列分析并建立系统发育树,结果全 rDNA ITS 序列仅在第 134 位点上发生间或缺失突变,鉴定 2 株真菌均为长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum*<sup>[20]</sup>。张正光等对可引起非洲菊典型的根腐病的菌株进行了 rDNA ITS 序列分析,结果与 GenBank 中隐地疫霉的 rDNA ITS 序列的相似性均为 99.87%,仅有 1 个碱基的差

异,确定为隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)<sup>[21]</sup>。王瑞虎等对番茄灰霉病菌进行序列测定,其 18S rDNA 以及 rDNA ITS 序列分别与葡萄孢菌一致性高达 100%和 99.94%,最终确定为葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)<sup>[22]</sup>。淮稳霞等通过 rDNA ITS 序列分析并建立聚类分析树状图将供试的 15 株立枯丝核菌归入 AG2-2 和 AG1-IA 2 个融合群<sup>[23]</sup>。

然而,并不是所有真菌都能通过 rDNA ITS 序列准确的得到种名。曲文文等对链格孢属的 34 株菌株进行了 ITS、OPA2-1、POA1-3 序列分析,发现这些序列对链格孢菌都有一定的区分性,但在种的水平上,基于形态分类的不同种常被归为系统发

育树的同一分支,或者同一个种被区分在不同的分支等,认为链格孢菌存在明显遗传分化,其遗传分化机制尚需进一步研究<sup>[24]</sup>。汪涯等通过 ITS 序列测定一株真菌 R2,与枝孢属 *Cladosporium* sp.中的尖孢枝孢菌 *Cladosporium oxysporum* 一致性高达 99%,通过建立系统发育树最终确定为尖孢枝孢菌<sup>[25]</sup>。陈璐等指出多主棒孢是一个高度变异的群体,不同寄主间差异较大,目前已有的通过 ITS 序列鉴定的方法都还有待验证,并设计出了特异性引物用以检测肌动蛋白(Actin)基因<sup>[12]</sup>。McNeill 等在国际藻类、真菌和植物命名法规(墨尔本法规)给真菌的有性型和无性型赋予了同样的优先权<sup>[26]</sup>,这可能会引起真菌有性型和无性型名称的一些混乱,也会引起真菌种的概念的新的研究<sup>[27]</sup>。因此,真菌属的名称和种的概念会随着真菌分类学家的研究进展而时有变化。将条形码技术作为一种新的性状来构建分类系统,实现生物自身的序列变异信息与现有形态分类学的结合,以此来加快对全球生物物种进行分类和鉴定的步伐<sup>[3]</sup>。但无论真菌的属或种的名称随着研究进展怎样变化,在保证菌株信息和实物可靠以及菌株纯度的条件下,对于我国的大量真菌资源进行真菌 DNA 条形码 rDNA ITS 序列测定,在属的水平上初步确定真菌资源的分类地位,有利于真菌资源今后的准确鉴定和其他研究,是对我国大量真菌资源快速鉴定的相对简便的途径。

本研究通过对 ACCC 保藏的 112 株真菌进行 rDNA ITS 序列测定,得到 80 株菌在属的水平上是准确鉴定的,在此基础上会分批对这些菌株采用形态学和多基因序列分析进一步鉴定到种。国家级微生物菌种保藏管理中心保藏的大量微生物菌种,是我国重要的资源,每年花费国家大量的人力、物力、财力对这些国家资源进行保藏。以前菌株的名称多是通过形态学特征结合菌株功能进行鉴定,给出菌株的属名或种名;随着分子生物学技术的发展和普及,通过真菌 DNA 条形码 rDNA ITS 序列测定的方法,能在较短时间内辅助进行属的水平的鉴定。对于真菌资源来说,建议对于待入国家级菌库和已库

藏的大量真菌资源,都进行 rDNA ITS 序列的测定,尽快整理出准确鉴定的利用价值高的菌株,利于这些资源的全社会研究和共享。

对于通过 rDNA ITS 序列测定的方法赋予的菌株的属或种名称与原名称不一致的应审慎处理,除了要做包括形态、多基因片段的序列分析等进一步验证外,原名称是因为其入库保藏时的功能等特征而鉴定的,原名称应至少作为菌株的一项特征予以保留,入库后依据不同时期不同文献或实验结果而做的名称变更,都应以“曾用名”予以记录保留其变更历史和原因,便于今后研究者进一步研究利用时参考。

## 参 考 文 献

- [1] Xing LJ, Li MC. General Mycology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999 (in Chinese)  
邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [2] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al. Dictionary of the Fungi[M]. 10th Edition. Wallingford: CABI, 2008
- [3] Zhou JL, Zhao RL. Advances on DNA barcoding in fungi[J]. Microbiology China, 2013, 40(8): 1468-1477 (in Chinese)  
周均亮, 赵瑞琳. 真菌 DNA 条形码技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(8): 1468-1477
- [4] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246
- [5] Zhang WZ, Chen L, Zhao J, et al. Analysis of 297 cases of superficial mycosis and its pathogenic fungi strains[J]. Chinese Journal of Mycology, 2014, 9(1): 28-30,35 (in Chinese)  
张伟铮, 陈力, 赵瑾, 等. 297 例浅部真菌病临床及病原菌菌种分析[J]. 中国真菌学杂志, 2014, 9(1): 28-30,35
- [6] Zhao YR, Gou XJ, Yan J. Isolation and molecular characterization of two fungi of *Cathaya argyrophylla* rhizosphere[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2009, 28(2): 94-97,103 (in Chinese)  
赵颖茹, 苟小军, 颜军. 两株银杉根际土壤真菌的分离与分子鉴定[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2009, 28(2): 94-97,103
- [7] Hu YL, Xian L, Liu G, et al. Isolation and identification of two fungal strains hydrolyzing cellulose and initial characteristics of its produced cellulases[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2008, 39(4): 425-428 (in Chinese)  
胡亚林, 洗亮, 刘果, 等. 两株纤维素降解真菌的分离鉴定及其产纤维素酶学性质的初步研究[J]. 广西农业科学, 2008, 39(4): 425-428
- [8] Tie WF, Hu YL, Zhu JB, et al. Isolation and identification of endophytical fungus in licorice collected from Xinjiang Area[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(9): 149-153 (in Chinese)  
帖卫芳, 胡鸾雷, 祝建波, 等. 甘草内生真菌的分离及鉴定[J]. 生物技术通报, 2010(9): 149-153
- [9] Yuan LC, Zhao Q, Zhang KH, et al. Isolation and identification of endophytes from *Jatropha curcas* by ITS analysis[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2009, 22(1): 95-98 (in

- Chinese)
- 袁理春, 赵琪, 张克华, 等. 麻疯树根部内生真菌分离及鉴定[J]. 西南农业学报, 2009, 22(1): 95-98
- [10] Yao ZP, Wang YS, Guo XM, et al. ITS rDNA sequence analysis and identification of pathogens for postharvest diseases of peach fruit[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(4): 172-178 (in Chinese)
- 姚子鹏, 王友升, 郭晓敏, 等. 桃果实贮藏期间病原真菌的 ITS rDNA 序列分析与鉴定[J]. 中国食品学报, 2011, 11(4): 172-178
- [11] Duan AL, Lei YS, Sun XY, et al. Molecular identification and rDNA-ITS sequence analysis of fungal pathogens in kiwifruit during storage[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(4): 810-818 (in Chinese)
- 段爱莉, 雷玉山, 孙翔宇, 等. 猕猴桃果实贮藏期主要真菌病害的 rDNA-ITS 鉴定及序列分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(4): 810-818
- [12] Chen L, Shi YX, Xie XW, et al. PCR assay for detection of *Corynespora cassiicola*, the causal agent of *Corynespora* leaf spot of Cucumber[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(3): 585-592 (in Chinese)
- 陈璐, 石延霞, 谢学文, 等. 黄瓜棒孢叶斑病菌 PCR 检测方法的建立[J]. 园艺学报, 2014, 41(3): 585-592
- [13] Dou YX, Peng X, Yu JM, et al. Grouping and rDNA-ITS sequence analysis of *Thielaviopsis basicola* on tobacco in China[J]. Mycosystema, 2012, 31(4): 531-539 (in Chinese)
- 窦彦霞, 彭雄, 余佳敏, 等. 中国烟草根黑腐病菌根串珠霉菌群及 rDNA-ITS 序列分析[J]. 菌物学报, 2012, 31(4): 531-539
- [14] Li M, Gao L, He CF, et al. Application of ITS sequences in detection and identification of fungi in cosmetics[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(15): 3057-3059, 3064 (in Chinese)
- 李萌, 高路, 何聪芬, 等. 基于 ITS 序列的化妆品中污染真菌检测与鉴定[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15): 3057-3059, 3064
- [15] Fang ZD. Plant Pathology Research Methods[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese)
- 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [16] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Huang PT, trans. 3rd Edition. Beijing: Scientific Press, 2002 (in Chinese)
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002
- [17] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper TW, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327-333
- [18] Yang YL, Liu YX, Liu ZY. Research progress on fungus taxonomy of *Colletotrichum*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(1): 152-157 (in Chinese)
- 杨友联, 刘永翔, 刘作易. 炭疽菌属真菌分类学研究进展[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(1): 152-157
- [19] Liu XB, Cai JM, Pan XX, et al. Rapid molecular identification and detection of *Corynespora cassiicola* of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008, 29(4): 489-493 (in Chinese)
- 刘先宝, 蔡吉苗, 潘羨心, 等. 橡胶树多主棒孢菌 rDNA-ITS 区的分子鉴定及检测[J]. 热带作物学报, 2008, 29(4): 489-493
- [20] Wang Y, Dai YD, Ge F, et al. Identification of fungi of high yield ginsenoside Rd isolated from *Panax notoginseng*[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(9): 7-12 (in Chinese)
- 王艳, 代永东, 葛锋, 等. 三七中高产人参皂苷 Rd 真菌的鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(9): 7-12
- [21] Zhang ZG, Guo CB, Wang YC, et al. Identification and ITS sequence analysis of the pathogens causing root rot of *Gerbera jamesonii* in Nanjing area[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(5): 392-396 (in Chinese)
- 张正光, 郭成宝, 王源超, 等. 非洲菊根腐病病原的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 392-396
- [22] Wang RH, Guan X, Chen XL, et al. Identification and phylogenetic tree analysis of tomato gray Mould pathogen[J]. Northern Horticulture, 2013(6): 127-131 (in Chinese)
- 王瑞虎, 关鑫, 陈秀玲, 等. 番茄灰霉病菌的鉴定及系统发育树分析[J]. 北方园艺, 2013(6): 127-131
- [23] Huai WX, Cheng CC, Li DL, et al. Sequences analysis of rDNA internal transcribed spacer (ITS) of *Rhizoctonia solani* Kühn from some local areas in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(4): 200-205 (in Chinese)
- 淮稳霞, 程衬衬, 李东林, 等. 中国局部地区草坪立枯丝核菌的 rDNA ITS 序列分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(4): 200-205
- [24] Qu WW, Liu X, Yang KQ, et al. Identification and phylogenetic analysis of walnut-associated *Alternaria* spp. in Shandong Province, China[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2012, 39(2): 121-128 (in Chinese)
- 曲文文, 刘霞, 杨克强, 等. 山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 121-128
- [25] Wang Y, Li XX, Zhang ZB, et al. Identification of endophytic fungi strain R2 from *Ginkgo biloba* and its antimicrobial activity[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(4): 718-723 (in Chinese)
- 汪涯, 李希茜, 张志斌, 等. 银杏内生真菌菌株 R2 的鉴定及其抑菌活性[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(4): 718-723
- [26] McNeill J, Barrie FR, Buck WR, et al. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)[A]//Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011[M]. Königstein: Koeltz Scientific Books, 2012
- [27] Deng H, Tan YP, Shivas RG, et al. *Curvularia tsudae* comb. nov. et nom. nov., formerly *Pseudocochliobolus australiensis*, and a revised synonymy for *Curvularia australiensis*[J]. Mycoscience, 2015, 56(1): 24-28