

## 乌头霜霉病病原物分子检测方法的建立

胡亮, 王婷, 李娜, 欧洪, 王光志\*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与  
开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:建立乌头霜霉病病原菌快速分子检测方法,为乌头种苗检疫及栽培环境土壤安全性评价提供依据。  
**方法:**使用真菌 DNA 提取试剂盒提取病原菌 DNA,采用真菌核糖体内转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1/ITS4,对病原菌的 rDNA-ITS 区间序列进行扩增,将聚合酶链式反应(PCR)产物回收纯化并进行序列测定,并将测得的 ITS 序列同 GeneBank 中搜索到的相关 ITS 序列进行比较,运用 DNAMAN 比对出特异序列片段,利用特异序列片段通过 Primer Premier 5.0 设计并筛选特异性引物,建立乌头霜霉病病原菌快速 PCR 检测方法。**结果:**从 Primer Premier 5.0 设计的 8 对引物中筛选出了灵敏度高、特异性强的引物对 L1A/L1B,该引物能够从乌头霜霉病病原菌 DNA 扩增出 670 bp 的具有检测价值的明亮条带,利用该引物也能够检测出乌头种苗、成株以及栽培土壤是否存在乌头霜霉病原菌。**结论:**筛选出的引物对 L1A/L1B 能够快速、简便、有效地检测出乌头霜霉病原菌,建立的方法能用于对乌头种苗霜霉病的提前检测或检疫。

**[关键词]** 乌头; 霜霉病; 分子检测; 真菌核糖体内转录间隔区; 聚合酶链式反应

**[中图分类号]** R284.1;R931.2;R22;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0065-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180806

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1654.034.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-24 17:04

## Establishment of Molecular Detection Method for Pathogen of Aconiti Downy Mildew

HU Liang, WANG Ting, LI Na, OU Hong, WANG Guang-zhi\*

(Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the rapid molecular detection method for pathogen of aconiti downy mildew and provide the basis for the quarantine of the *A. carmichaeli* seedling and safety evaluation of the cultivated environmental land. **Method:** Pathogen DNA was extracted by fungal DNA kit and rDNA-ITS sequence of pathogen was amplified by ITS1/ITS4 universal primers of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in fungi; the polymerase chain reaction (PCR) product was recycled, purified and sequenced. The measured ITS sequences were then compared with the related ITS sequences searched in GeneBank; specific sequences were obtained by using DNAMAN and specific primers were designed and screened by using Primer Premier 5.0. With methods mentioned above, the rapid PCR method for identification of pathogen of Aconiti downy mildew was established. **Result:** The L1A/L1B primers with high sensitivity and specificity were selected from 8 pairs of designed primers in Primer Premier 5.0. L1A/L1B primers could be used to amplify 670 bp bright bands with detection value from the pathogen DNA, and they can be also used to detect whether the pathogen of Aconiti downy mildew was present in

**[收稿日期]** 20170606(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30901962);四川省教育厅重点项目(15ZA0098)

**[第一作者]** 胡亮,在读硕士,从事中药资源研究工作,E-mail:15882195737@163.com

**[通信作者]** \*王光志,博士,教授,从事中药资源研究与开发工作,E-mail:kzwon@163.com

the *Aconitum carmichaeli* seedling, adult plant and cultivated soil. **Conclusion:** The primers selected above can be used to detect the pathogen more quickly, easily and effectively, and the established method can be used for the early detection and quarantine of *A. carmichaeli* seedling with downy mildew.

[**Key words**] *Aconitum carmichaeli*; downy mildew; molecule detection; ITS; PCR

乌头 (*Aconitum carmichaeli*) 系毛茛科乌头属药用植物, 为知名川产道地药材川乌、附子的原植物, 在四川江油地区一直有大面积栽培。长期以来, 乌头在栽培的过程中, 发病较多, 如叶斑病、霜霉病、根腐病、白绢病等, 其中霜霉病、根腐病和白绢病对药材产量影响较大, 这几种病害也常常相互交叉影响, 严重时可引起 50% 以上的减产<sup>[1]</sup>。

霜霉病是乌头易患的一类叶部病害, 具有发病时间早、传播速度快、防治困难等特点。早在 1979 年, 余永年等<sup>[2-3]</sup> 将其病原物鉴定为鞭毛菌亚纲卵菌目霜霉科霜霉属的乌头霜霉 (*Peronospora aconiti*), 随后研究中对乌头患霜霉病的发病情况做了调查, 研究了乌头霜霉病的发病症状和发病规律<sup>[1]</sup>, 之后与乌头霜霉病相关的研究鲜见报道。与其他霜霉属菌类一样, 乌头霜霉因其具有专性寄生的特点, 在实验条件下很难离体培养, 给该病原物的后续研究造成了困难。基于以上问题, 本课题组进一步对乌头霜霉的传播方式进行了研究, 对病原菌的有性阶段和无性阶段进行了超微形态观察, 测定了病原菌 16S rDNA-ITS, 28S rDNA D1/D2 区序列<sup>[4-5]</sup>, 为乌头霜霉的快速分子鉴定提供了有力支持; 同时针对叶面病害的特征, 研究了乌头叶面微生物菌群变化特征及其与乌头霜霉病的相关性<sup>[6]</sup>。

笔者在前期调查乌头霜霉病发病过程时, 发现霜霉病的发病与种源地种苗携带乌头霜霉以及栽培地土壤环境条件有密切关系。因此, 为了后期栽培植株的健康生长, 对乌头种苗和栽培地土壤进行早期乌头霜霉的检疫, 显得尤为必要。通过早期检疫, 筛选健康种苗和合适的栽培环境, 可有效防治乌头霜霉病的大面积发生, 提高药材产量。基于此, 本文利用乌头健康植株、健康根际土以及川牛膝白锈病原菌和川芎根腐病原菌做对照, 进行了乌头霜霉病原物快速检测方法研究。

## 1 材料

分别从乌头种源地北川、青川、安县等地收集乌头种苗放于超低温冰箱保存备用; 从江油采集患霜霉病乌头的病叶、病根和病株根际土, 置于无菌袋中, 低温保存带回实验室备用; 在距患病植株 5 m 外无患病植株的区域采集健康乌头植株的根、根际土

壤和叶片, 分别放置于无菌袋中低温条件下带回实验室备用。参考文献[7]方法收集乌头霜霉病原菌丝, 将乌头病叶背面的霜霉菌丝霉层用灭菌水冲洗掉, 冲洗过后的病叶在 24 °C 条件下保湿, 当叶背面重新长出新的霜霉菌丝霉层, 使用灭菌毛刷将霉层菌丝刷下保存至离心管中, -86 °C 超低温冰箱保存。检验特异性的对照病原菌菌种 (尖孢镰刀菌、小不整球壳菌、茄类镰刀菌、链格孢菌) 保存于实验室斜面培养基。

T100TM Thermal Cycler 型 PCR 仪, Power Pac Basic 型凝胶水平电泳仪, Gel DocTM XR + SOP 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 900 Series 型超低温冰箱, ND2000 型核酸蛋白检测仪 (美国 Thermo 公司); Allegra X-22R 冷冻离心机 (德国 Beckman Coulter 公司)。Fungal DNA Min Kit (Omega 生物公司); 通用型 DNA 纯化回收试剂盒, 土壤基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司); *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, PCR 产物回收试剂盒 (成都海牧生物技术有限公司); ITS 通用引物 ITS1/ITS4 由上海生工生物工程股份有限公司合成; 其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

## 2 方法

### 2.1 各样品 DNA 的提取及处理

**2.1.1 乌头霜霉 DNA 提取** 将乌头霜霉菌丝转移到离心管中, 用全自动样品快速研磨仪低温充分研磨, 按照 Omega 真菌 DNA 提取试剂盒的方法, 提取基因组 DNA。所提的 DNA 供乌头霜霉 ITS 序列测定。

**2.1.2 对照病原菌 DNA 提取** 对照病原菌菌种尖孢镰刀菌、小不整球壳菌、茄类镰刀菌、链格孢菌, 从实验室已保存的斜面培养基中选取并接种至平板, 将平板用封口胶包裹好后放置于已灭菌恒温培养箱中培养, 待平板中菌丝生长到一定浓度后, 刮下菌丝至离心管中。菌丝 DNA 提取方法同 2.1.1 项。

**2.1.3 供检测材料 DNA 的提取** 健康乌头叶、根 DNA 提取: 选取于电子显微镜下镜检无霜霉病菌的健康叶片, 选取整株都没有病叶的健康乌头植株的根均按照 2.1.1 项下方法提取 DNA。

患病乌头的病叶、病根 DNA 提取: 选择整株患

霜霉病的乌头的叶和根,提取方法同上。

种源地种苗 DNA 提取:种苗 DNA 提取方法同上。

乌头根际土壤 DNA 的提取:用天根土壤基因组 DNA 提取试剂盒对乌头霜霉病株和健康株根际土壤 DNA 进行提取。

**2.2 乌头霜霉 DNA 的 PCR 扩增** 利用 2.1.1 项下提取的乌头霜霉 DNA,采用真菌核糖体内转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1/ITS4(由上海生工公司合成)对乌头霜霉的核糖体内转录间隔区区间序列进行 PCR 扩增。

**2.2.1 引物序列** ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。

**2.2.2 反应体系** 参考本课题组之前建立的方法<sup>[5]</sup>,总体积 25  $\mu\text{L}$ ,1 单位的 *Taq* 酶,10  $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,dNTP(各 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )4  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,加灭菌双蒸水至 25  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.3 反应条件** 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

**2.3 PCR 产物回收纯化** 取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$  用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,缓冲液 1  $\times$  TBE,恒定电压为 110 V,电泳 45 min 后凝胶成像系统检测。在紫外灯光下找到目标片段,迅速切取,将切取的目标片段使用天根通用型 DNA 纯化试剂盒回收法回收,详见说明书。

**2.4 序列测定** 将纯化回收产物委托上海市 Invitrogen 生物技术公司进行测序。测序的结果使用 Contig Express 软件进行正反碱基比对、拼接。

**2.5 特异性引物设计** 将 2.4 项下得到的结果利用生物学软件 DNAMAN 8.0 与 GeneBank 中相关 ITS 序列进行比对,通过比对,将差异较大的区域的序列导入 Primer Premier 5.0 软件设计能对病原菌特异性扩增的引物。

**2.6 特异性引物筛选** 用提取的病原菌 DNA 做模板,利用 2.5 项下设计的 8 对引物,进行特异性引物的检测筛选。

**2.6.1 反应体系** 总体积为 25  $\mu\text{L}$ ,病原菌 DNA 1  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  上游引物 1  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  下游引物 1  $\mu\text{L}$ ,10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs 1  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,*Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu\text{L}$ 。

**2.6.2 PCR 扩增条件** 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 6 min。待反应结束后,用 1.5% 琼脂

糖凝胶电泳检测,对比引物的扩增效果。

**2.6.3 引物特异性检验** 取 2 份乌头霜霉病原物 DNA,再选取小不整球壳菌、茄类镰刀菌、链格孢菌、尖孢镰刀菌 DNA 各 1  $\mu\text{L}$ ;以灭菌双蒸水为阴性对照,用 2.5 项下设计的引物进行 PCR 扩增。反应体系及扩增条件同 2.6.1,2.6.2 项。

**2.6.4 引物灵敏度检测** 选取 1 份乌头霜霉病原物 DNA,使用核酸蛋白检测仪测定其浓度后,用灭菌水以 10 倍梯度稀释为 9 个浓度梯度。取稀释后 9 个浓度梯度 DNA 各 1  $\mu\text{L}$  做为模板,用 2.5 项下设计的引物进行 PCR 扩增,扩增条件及反应体系同 2.6.1,2.6.2 项。

**2.7 特异性引物检测效果验证**

**2.7.1 乌头种苗霜霉病病害检测** 取不同种源地的种苗各 3 份,用试剂盒法提取 DNA 后,各取 DNA 1  $\mu\text{L}$  用于 PCR 扩增,反应体系及扩增条件同 2.6.1,2.6.2 项。

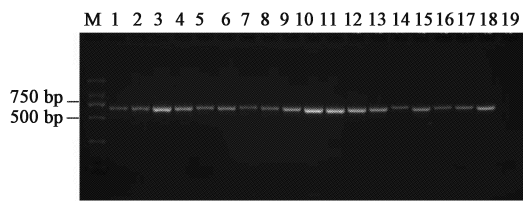
**2.7.2 乌头成株及栽培土壤霜霉病病害检测** 分别选取病原菌丝、乌头霜霉病叶、健康乌头根、乌头霜霉病根、健康乌头叶、患霜霉病乌头根际土壤以及健康乌头根际土壤样品各 2 份。提取样品 DNA,分别取 DNA 1  $\mu\text{L}$  进行 PCR 反应,反应体系及反应条件同上。

### 3 结果与讨论

**3.1 特异性引物的设计** 利用真菌(ITS)通用引物 ITS1/ITS4 扩增乌头霜霉病原菌核糖体内转录间隔区区间序列,扩增出序列长度为 892 bp,以 Voglmayr H<sup>[8]</sup> 公布的 *Peronospora* 属真菌 *P. aparines* 的 rDNA 序列为参考,对乌头霜霉病原菌 rDNA-ITS 序列信息进行了界定。将 2.4 项下所测病原菌序列与 NCBI 收录的与霜霉属相似的 ITS 序列通过 DNAMAN 8.0 软件进行比对,比对出的差异较大区域的序列使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,一共设计了 8 对引物,最后筛选出了引物对 L1A/L1B,引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

**3.2 乌头霜霉病原物 PCR 扩增** 用 3.1 项下筛选出的特异性引物对随机抽取的 18 个病原菌 DNA 样品进行扩增。对扩增产物进行电泳检测。结果显示,18 个病原菌 DNA 扩增产物均在 500 ~ 750 bp 有一条明亮的条带,且灭菌双蒸水的扩增产物没有条带,见图 1。表明所设计的 L1A/L1B 引物对能扩增出乌头霜霉病原菌的 DNA,目的片段的产量比较高,并且没有非特异性扩增的干扰。

**3.3 引物 L1A/L1B 特异性检验** 选取 2 份乌头霜

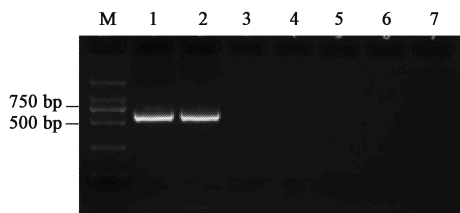


M. 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 18. 乌头霜霉病病原菌菌株; 19. 灭菌双蒸水

图 1 乌头霜霉病病原菌 PCR 扩增产物电泳

Fig. 1 Electrophoresis of amplification products by downy mildew pathogenic bacteria

霉病病原菌 DNA, 以及对照病原菌 DNA 各 1 份, 用灭菌双蒸水 1 份。用引物对 L1A/L1B 进行 PCR 扩增, 扩增产物通过凝胶电泳检测后, 结果显示只有乌头霜霉病病原菌 DNA 样品在 670 bp 位置处有明亮的条带, 其他几组对照组以及阴性均没有扩增出条带, 见图 2。结果表明所设计的 L1A/L1B 引物对特异性较强, 能够扩增出病原菌 DNA, 而且不会扩增出其他杂菌。



M. 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 2. 乌头霜霉病病原菌菌株; 3. 小不整球壳菌; 4. 茄类镰刀菌; 5. 链格孢菌; 6. 尖孢镰刀菌; 7. 灭菌双蒸水

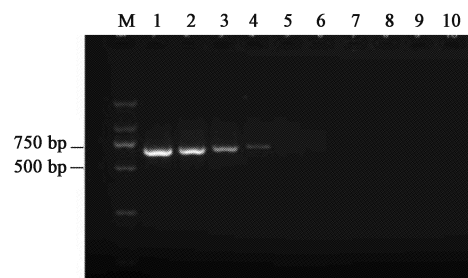
图 2 引物 L1A/L1B 特异性 PCR 扩增检验

Fig. 2 Primer L1A/L1B specific test of PCR amplification

**3.4 引物 L1A/L1B 灵敏度检测** 选取 1 份病原菌 DNA 为母液, 经核酸浓度测定仪测得其质量浓度为  $45.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取母液  $1 \mu\text{L}$ , 将其逐级稀释, 以各稀释梯度 DNA 为模板, 用引物对 L1A/L1B 进行 PCR 扩增, 最后凝胶电泳检测结果见图 3。实验结果表明, 引物对 L1A/L1B 最低检出限 DNA 质量浓度为  $4.56 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 表明该引物灵敏度较高。

**3.5 种苗检测结果** 对各种源地的乌头种苗的根基因组 DNA 进行扩增, 电泳结果见图 4。徐塘镇 1 号和 3 号种根样品、豆叩镇 4, 5, 6 号种根样品在 500 ~ 750 bp 都扩增出了条带, 桂溪镇和陈家坝乡的种根样品没有扩增出条带, 灭菌双蒸水无条带。表明徐塘镇和豆叩镇所选取的乌头种苗样品中携带有霜霉病病原菌。

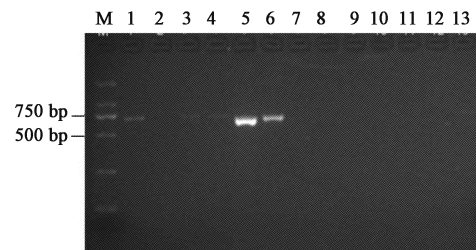
**3.6 乌头成株及栽培土壤霜霉病病害检测** 用引物 L1A/L1B 对乌头成株及栽培土壤进行 PCR 扩



M. 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 9. 质量浓度分别为  $4.56 \times 10^0$ ,  $4.56 \times 10^{-1}$ ,  $4.56 \times 10^{-2}$ ,  $4.56 \times 10^{-3}$ ,  $4.56 \times 10^{-4}$ ,  $4.56 \times 10^{-5}$ ,  $4.56 \times 10^{-6}$ ,  $4.56 \times 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 10. 灭菌双蒸水

图 3 引物 L1A/L1B 灵敏度 PCR 扩增检测

Fig. 3 Sensitivity detection of primers L1A/L1B by PCR amplification

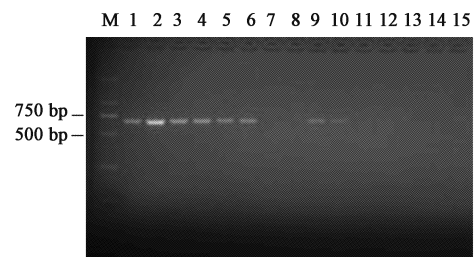


M. 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 3. 徐塘镇样品; 4 ~ 6. 豆叩镇样品; 7 ~ 9. 桂溪镇样品; 10 ~ 12. 陈家坝乡样品; 13. 灭菌双蒸水

图 4 乌头种苗 PCR 扩增检测

Fig. 4 Seedlings detection by PCR amplification

增, 见图 5, 结果显示所设计的引物 L1A/L1B 能够通过 PCR 均能够对乌头霜霉菌丝 DNA, 乌头霜霉病根 DNA, 乌头霜霉病叶 DNA 以及病株根际土 DNA 扩增出比较明显的条带。表明所设计的该对引物能够应用于乌头霜霉病病害的检测。



M. 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 2. 乌头病叶; 3 ~ 4. 乌头霜霉病病原菌菌株; 5 ~ 6. 乌头病株根际土; 7 ~ 8. 乌头健康叶; 9 ~ 10. 乌头病根; 11 ~ 12. 乌头健康植株根际土; 13 ~ 14. 乌头健康根; 15. 灭菌双蒸水

图 5 乌头霜霉病害样品 PCR 扩增检测

Fig. 5 Detection of aconitine downy mildew of PCR amplification

## 4 讨论

近年来, 应用分子技术对植物病害进行研究的报导逐渐增多, 通过核酸技术对植物病原菌进行检测的方法也逐渐成熟。核酸技术具有快速、准确、灵

敏度高等特点,国内外的文献报道中也较多见利用核酸技术对各种病原菌的检测<sup>[9-12]</sup>。本文通过使用 rDNA-ITS 通用引物对乌头霜霉病病原菌 rDNA-ITS 序列进行扩增,将扩增产物回收纯化后进行序列测定。根据所测得病原菌 ITS 区序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计了引物对 L1A/L1B。

设计的引物 L1A/L1B 对 18 个乌头霜霉病病原菌丝 DNA 样品进行扩增,结果表明,18 个样品的扩增产物均在 500 ~ 750 bp 有一条明亮的条带,以灭菌双蒸水为阴性对照的产物无条带,所以引物 L1A/L1B 能够扩增出病原菌菌丝 DNA。引物 L1A/L1B 对病原菌丝 DNA,尖孢镰刀菌,茄类镰刀菌,小不整壳菌以及链格孢菌 DNA 进行 PCR 扩增,电泳的结果显示所设计出的引物只能扩增出霜霉病原菌丝 DNA,不会扩增出对照菌种 DNA,特异性较强。将霜霉病原菌丝 DNA 样品浓度梯度稀释后进行扩增,结果表明引物 L1A/L1B 的灵敏度较高,最低检测浓度为 4.56  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过采集不同种源地的种苗然后进行检测,证实所设计的引物能够通过 PCR 扩增检测出种苗中是否携带有病原菌。

所设计的引物对 L1A/L1B 具有特异性强、灵敏度高等特点,能够运用于乌头霜霉病病原菌的检测。另外该设计的引物对还能够应用于乌头霜霉病的快速分子检测。除此以外该引物还可以开发成分子探针,应用于乌头种苗的检测,便于从源头筛选出健康种苗,避免引种过程中种苗携带病菌从而降低霜霉病的发病。

#### [参考文献]

[1] 唐莉,梁丽娟,叶华智,等. 附子常见病害的调查研究[J]. 现代中药研究与实践,2004,18(6):29-32.

[2] 余永年. 霜霉一新种[J]. 植物病理学报,1979,9(2):127-130.

[3] 余永年,王燕林. 乌头霜霉卵孢子的发现[J]. 真菌学报,1984,3(4):189-191.

[4] 欧洪,李娜,胡亮,等. 乌头霜霉病病原菌 rDNA-ITS 和 28S rDNA D1/D2 区序列分析[J]. 中草药,2016,47(15):2741-2746.

[5] 欧洪,李娜,王光志. 乌头霜霉病病原菌形态学研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2016,33(2):59-63.

[6] 李娜,胡亮,王婷,等. 乌头叶面微生物菌群变化特征及其与乌头霜霉病相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):42-46.

[7] 秦文韬. 葡萄霜霉病菌快速分子检测方法研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.

[8] Voglmayr H. Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences[J]. Mycol Res,2003,107(10):1132-1142.

[9] 庞莉,李梅,孙青,等. 棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌的快速分子检测[J]. 植物保护学报,2016,43(06):892-899.

[10] 陈庆森,冯永强,黄宝华,等. 食品中致病菌的快速检测技术的研究现状与进展[J]. 食品科学,2003,24(11):148-152.

[11] Karen O, Hogberg N, Dahlberg A, et al. Inter and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis[J]. New Phytol, 1997, 136(2):313-325.

[12] Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus tuber by species-specific ITS primers [J]. Mol Ecol, 1998, 7(3):273-277.

[责任编辑 顾雪竹]