

乌头霜霉病病原菌 rDNA-ITS 和 28 S rDNA D1/D2 区序列分析

欧 洪, 李 娜, 胡 亮, 王 婷, 何 静, 王光志*

成都中医药大学/中药材标准化教育部重点实验室/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, 四川成都 611137

摘要: 目的 明确四川江油地区栽培乌头霜霉病病原菌乌头霜霉 *Peronospora aconiti* rDNA-ITS 和 28 S rDNA D1/D2 区序列, 为病害诊断和防治提供理论基础。方法 从病株收集病原菌分生孢子及菌丝, 提取 DNA, 扩增 rDNA-ITS 和 28 S rDNA D1/D2 片段序列, 进行测序分析, 并构建邻接(neighbor-joining, NJ)发育树分析病原菌种类。结果 检测出的病原菌 rDNA-ITS 序列与 NCBI 数据库中霜霉属 *P. pulveracea*、*P. aparines* 相似度为 94%, 28 S rDNA D1/D2 区序列与霜霉属 *P. pulveracea*、*P. ficariae*、*P. bulbocapni* 相似度达 97%。结论 分子 rDNA-ITS 和 28 S rDNA D1/D2 区序列鉴定的结论和形态学鉴定的结论一致, 乌头霜霉病病原菌为霜霉科霜霉属乌头霜霉 *Peronospora aconiti* Yu, 其 rDNA-ITS 和 28 S rDNA D1/D2 区序列可用于该病原物的鉴定。

关键词: 乌头; 霜霉病; 乌头霜霉; rDNA-ITS; 28 S D1/D2

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2016)15 - 2741 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.024

rDNA-ITS and 28 S rDNA D1/D2 sequence analysis of downy mildew pathogen from *Aconitum carmichaeli*

OU Hong, LI Na, HU Liang, WANG Ting, HE Jing, WANG Guang-zhi

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine/Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To define sequences about rDNA-ITS and 28 S rDNA D1/D2 of *Peronospora aconiti* separated from cultivated *Aconitum carmichaeli* in Jiangyou area of Sichuan province and provide a theoretical basis for the diagnosis and prevention of downy mildew disease. **Methods** Spores and hyphae of *P. aconiti* from diseased plants were collected and total genomic DNA of pathogen were extracted and then rDNA-ITS and 28 S rDNA D1/D2 fragment were amplified and sequenced. According to the above results, the abutment (Neighbor-joining, NJ) phylogenetic tree of pathogen was constructed and analyzed. **Results** The rDNA-ITS and 28 S rDNA D1/D2 sequences of *P. aconiti* were sequenced and compared according to the database from NCBI. Compared that with *P. pulveracea* and *P. aparines*, the similarity of rDNA-ITS sequences of *P. aconiti* was 94%. The similarity of 28 S rDNA D1/D2 sequences of *P. aconiti* was 97% compared that with *P. pulveracea*, *P. ficariae* and *P. bulbocapni*. **Conclusion** The results of morphological identification of downy mildew pathogen separated from *A. carmichaeli* are consistent with those from molecular identification (rDNA-ITS and 28 S rDNA D1/D2 sequences) and the pathogen of *Aconitum* downy mildew should be *P. aconiti*. Therefore, rDNA-ITS and 28 S rDNA D1/D2 sequences constructed in this paper can be used to identify downy mildew pathogen from *Aconitum carmichaeli* Debx.

Key words: *Aconitum carmichaeli* Debx; downy mildew; *Peronospora aconiti*; rDNA-ITS; 28 S D1/D2

毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 为常用药用植物, 除野生外, 在四川、陕西等地均有栽培。其干燥母根为川乌, 具有祛风除湿、温经

止痛等功效; 其子根为附子, 为知名的川产道地药材, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效^[1]。随着附子需求量的日益增大, 乌头的种植面积也不

收稿日期: 2015-11-30

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); 全国中药资源普查实施四川省试点项目

作者简介: 欧 洪 (1989—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药资源研究。Tel: 15928114716 E-mail: ouhome@163.com

*通信作者 王光志 (1976—), 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药资源研究与开发。E-mail: kzwon@163.com

断加大,并引种到多地。四川省江油市作为乌头的道地产区,近几年加大了种植规模,提高了附子及川乌的产量。笔者在对江油地区的栽培乌头调查中,发现乌头极易感染各种严重的病害,严重影响了附子、川乌药材的质量及产量。在诸多病害中,霜霉病是乌头栽培过程中极易发生的一种流行范围很广、危害面积大的严重病害,文献中对该病也有报道^[2-6]。乌头染病后,叶背会慢慢覆盖一层灰褐色霉层,随后整株的叶片逐渐枯萎、干枯、死亡,所以在当地霜霉病也被称作“灰苗子病”。霜霉病染病周期长,侵染范围广,对该地区乌头的产量及品质造成严重的影响。余永年^[2]将患霜霉病乌头叶子上发现的病原菌鉴定为霜霉属乌头霜霉 *Peronospora aconiti* Yu,首次从形态上明确了乌头霜霉病病原菌的分类学地位,但未见进一步形态学研究的相关报道。通过查阅文献,在国内外也未见对该病原菌的准确鉴定和分析,这不利于病害的传播机制、病株的诊断和病害防治研究。

近年来的研究表明,以 DNA 为基础的核酸分析技术可以用来鉴定物种以及评价种属间的系统关系,尤其是核糖体 DNA 内转录间隔区(ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS)。该区的编码区序列具有很强的保守性,在非转录区科、属、种水平上又有很高的变异性。真菌种类繁多,仅从形态学角度鉴定,需要丰富的工作经验和较长的检验时间。真菌的 rDNA-ITS 区段在属间及同属不同种间存在着广泛的多态性,对此序列的检测有助于分析其遗传关系,已广泛地应用于真菌分类鉴定和分子检测系统中^[7-11]。28 S rDNA D1/D2 区近年来也成为真菌分类鉴定的热门区域,乾义柯等^[12]利用形态学鉴定和 28 S rDNA D1/D2 区序列对新疆甜菜的霜霉病病原菌进行了分析;刘建利^[13]利用 28 S rDNA D1/D2 区和 ITS rDNA 序列来鉴定甜瓜白粉病病原菌。基于真菌 rDNA 区的序列分析,能够快速准确地反映其生物亲缘关系和分类情况,具有方便、高效的优点。目前,国内外尚未见有关乌头霜霉 *Peronospora aconite* rDNA-ITS 序列和 28 S rDNA D1/D2 序列分析的相关报道。为此,本研究对乌头霜霉菌病原菌 rDNA-ITS 和 28 S rDNA D1/D2 序列进行测定和分析,以期从分子生物学的角度明确该病原菌 rDNA-ITS 序列和 28 S rDNA D1/D2 序列,明确其系统发育地位,为病害的传播机制研究、早期诊断和防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病原菌来源 乌头霜霉病病原菌采自于四川省江油市普照村雅安三九优质无公害附子 GAP 生产基地的乌头患病植株的叶面。先将患病的叶片带回实验室,对病原物进行形态学研究,结合文献报道^[3]的形态学特征,明确病株的症状属于霜霉病,病原菌的形态学符合文献报道特征后,再采用无菌毛刷刷下分生孢子的方法^[14],从新鲜的病叶上轻扫下病菌分生孢子及菌丝,-86 °C 冰箱冷冻保存备用。

1.1.2 主要仪器和试剂 全自动样品快速研磨仪(上海净信科技部),Leica DM2000 型光学显微镜,CT15RE 高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司),T100 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),MK2000-2 干式恒温器(杭州奥盛仪器公司),GelDox XR+凝胶成像系统(美国 BIO-Rad 公司),ND2000 核酸蛋白检测仪(美国 Thermo 公司)。OMEGA 真菌 DNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、标准相对分子质量 2 000、PCR 产物回收试剂盒均购于成都海牧生物技术有限公司;其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 病原菌形态观察

将采集到的病叶用无菌水冲洗已有的病菌霉层,放入 18~22 °C 的保湿箱。等待叶背重新长出浓密菌丝后,用无菌毛刷刷下霉层到载玻片上制成水装片观察病原菌孢子囊形态;采用透明胶带粘贴法^[15],将小块透明胶带贴在菌丝生长的叶面上,而后取下放在载玻片上,滴一滴甘油乳酸加上盖玻片观察病原菌孢囊梗形态。

1.3 真菌基因组 DNA 的提取

用无菌毛刷从枯黄的患病乌头叶背上刷下菌丝霉层到离心管中称质量,用全自动样品快速研磨仪低温充分研磨,采用 OMEGA 真菌 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取。具体 DNA 提取步骤参照 OMEGA 真菌 DNA 提取试剂盒提取手册上的说明。核酸蛋白检测仪测定 DNA 浓度及其 A_{260}/A_{280} 值,涡旋混匀后,取 5 μ L DNA 上清在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 病原菌 PCR 扩增

采用真菌核糖体内转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1/ITS4 以及 NL1/NL4^[12](均由上海生工生物工程股份有限公司合成)对病原菌 DNA 进行 PCR 扩增。

1.4.1 引物序列 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTG-

CGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、NL1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、NL4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。

1.4.2 反应体系 总体积为 25 μL , 1 单位的 Taq 酶、 $10\times$ buffer 2.5 μL 、dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正反向引物各 1 μL 、DNA 模板 1 μL , 最后补加灭菌双蒸水到 25 μL 。

1.4.3 反应条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 序列测定

将所得 PCR 产物进行条带分析比对、切胶回收, 采用天根通用型 DNA 纯化试剂盒回收法。所得产物委托上海市 Invitrogen 生物技术公司测序。测序结果采用 Contig Express 软件进行正反碱基比对, 并进行拼接。

1.6 序列分析

将测得的乌头霜霉病病原菌的 ITS-DNA 序列和 28 S rDNA 序列提交到 NCBI 数据库获得登录号, 并进行 Blast 比对。运用 MEGA 5.1 中邻位相连法 (neighbor joining, NJ) 法构建系统进化树, 应用自展法 (bootstrap) 检验系统进化树, 自展数据集为 1 000 次。其他参考序列均从 GenBank 中获得。

2 结果与分析

2.1 乌头霜霉病病原菌显微形态

用无菌毛刷刷下霉层到载玻片上制成水装片在显微镜下观察到病原菌椭圆形的孢子囊, 淡褐色, 直径为 20~30 μm (图 1)。在显微镜下观察到霜霉病原菌的无色孢囊梗, 长为 200~450 μm , 主干占总长的 1/2, 分支呈二叉式锐角状分叉数次, 分枝较为对称, 小枝较为细长而且顶端尖锐 (图 2)。本实验研究对象与余永年^[2]报道的一致, 病原菌为寄生于乌头植株的霜霉科霜霉属乌头霜霉 *Peronospora aconiti* Yu。

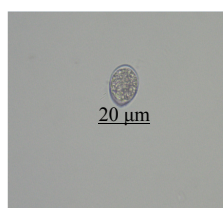


图 1 病原菌孢子囊显微图

Fig. 1 Micrograph of pathogen sporangia

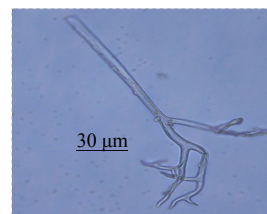


图 2 病原菌孢囊梗显微图

Fig. 2 Micrograph of pathogen sporangiophore

2.2 基因组 DNA 的提取

试剂盒法对病菌孢子进行基因组 DNA 提取, 琼脂糖凝胶电泳检测, 其 DNA 条带呈带状, 有拖尾现象, 相对分子质量约为 15 000 (图 3)。用 ND2000 核酸蛋白检测仪测得 DNA 质量浓度为 94 ng/ μL , 紫外吸收 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值为 1.78, 纯度较高, 满足后续 PCR 操作的质量要求。

2.3 病原菌 DNA PCR 扩增

取基因组 DNA 1 μL 为模板, 分别以引物 ITS 1/4 和 NL1/4 进行扩增得到条带, 得到 PCR 产物, 产物条带大小分别约为 870 bp 和 740 bp (图 4)。切胶回收测序得到 rDNA-ITS 区 PCR 产物序列长度为 892 bp, 28 S D1/D2 区 PCR 产物长度为 741 bp。序列长度与电泳条带一致。

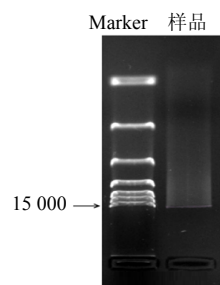
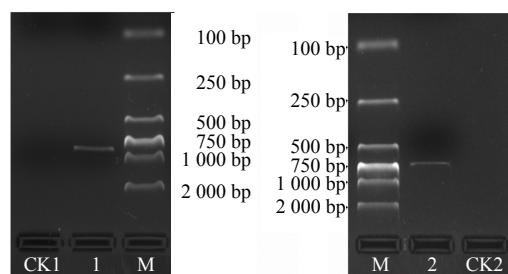


图 3 病原菌基因组 DNA 电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis of pathogen genomic DNA



CK1、CK2-空白对照 M-Marker 1-rDNA-ITS PCR 产物
2-28 S D1/D2 区 PCR 产物

CK1, CK2-blank control M-Marker 1-rDNA-ITS PCR products
2-28 S D1/D2 area PCR products

图 4 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR products

2.4 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

以 Voglmayr^[16]公布的 *Peronospora* 属真菌 *P. aparines* 的 rDNA 序列序列为参考, 对病原菌 rDNA-ITS 序列信息 (图 5) 进行了界定。该序列 ITS1-5.8S-ITS2 总长度为 796 bp, 其中 ITS1 序列长度为 219 bp, 5.8 S 序列长度为 156 bp, ITS2 序列长度为 421 bp。提交序列到 NCBI 数据库得到登录号 KU161589。用 BLAST 在数据库中搜索同源性序列, 发现乌头病原菌乌头霜霉 rDNA-ITS 序列与同属 *P. aparines* (登录号 KM058095)、*P.*

pulveracea (登录号 FJ384778.1) 的相似度最高, 均为 94%。将病原菌 rDNA-ITS 序列命名为 JY01-ITS, 以腐霉科腐霉属 *Pythium canariense* (登录号 AY065618.1) ITS 区序列为外群菌株序列, 同时选下载霜霉科下不同属 rDNA-ITS 序列登录号, 采用 NJ 法构建系统进化树 (图 6)。由图 6 可见, 所有序列主要聚成 3 个分支, 乌头霜霉病原菌 rDNA-ITS 序列在自举值 95% 水平与霜霉属内病菌聚成一支, 结合病原菌形态学特征, 鉴定此病原菌为霜霉属病菌。

```

1   ttttcccc ttttgatat gcttaagttc agcgggtagt cttgcctgat atcaggtcca
61  attgagatgc cgcgcggccg aagccgcacc gcacaaattc ccaaattgggt cgactctcga
121 cagccgaaac tgtcactcta cttcgcagca gcaaagccag ctcaaagcc aagtcacgca
181 caactacggt tcatcagtca taccgccaca gcaggaagat cgtccaataa ggcctgttc
241 agccgaagcc aatctaccgc gaatcgaaca ttctccatt aacgccacag cacgaaacc
301 gatcgcggac tggtcacacg gacagcctcc acaaccagca acgccacgct tttcgagcaa
361 agagaataca gttctgtact tttaaaagga ctgcagccg attcgaaaac cagccgcaag
421 acaactcaca tctggcatat cctccaccga ctacacggaa agaagaaaac caagttgat
481 gtacggacac tgatacaggc atactccag ggctaaccgg gaagtgcaat atgcttcaa
541 aatttcgatg atcactgaa tcttgcatt cgcattacgt atcgcagttc gcagcgttct
601 tcatcgatgt gcgagcctag acatccactg ctgaaagttg ttatctagtt aaaagcagag
661 actttcgtcc ccacagtatg ttcagtattt aagaatggtt taaaattaac gctactagct
721 ccgaccgagg tccgagcgtc cgccatgatg ggattcgtc agcagcagcc agccagcaa
781 aagatgccag cagccgccgc caattaaacc cccgaattaa tggggtgata cggttcacgt
841 ggaaagtgtt taggtgtggt aatgatcctt ccgcaggttc accctacgga ag

```

图 5 乌头霜霉病原菌 rDNA-ITS 序列

Fig. 5 rDNA-ITS Sequence of *Aconitum downy* mildew pathogen

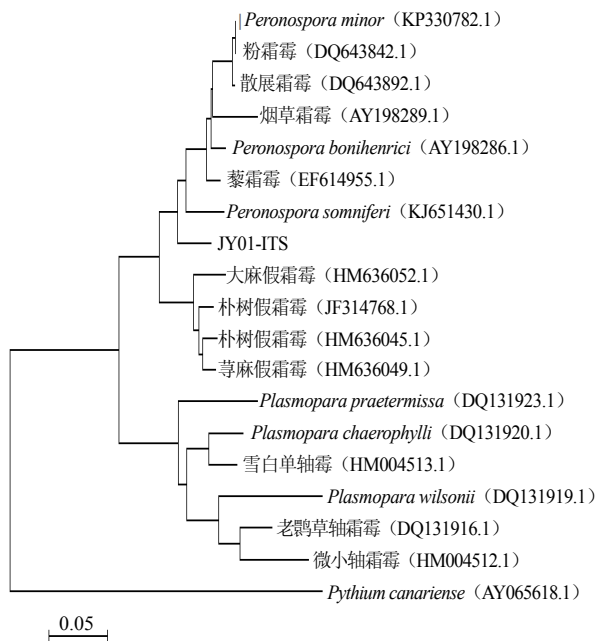


图 6 基于 rDNA-ITS 序列分析的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequence analysis

2.5 病原菌 28 S D1/D2 区序列分析

病原菌 28 S D1/D2 区序列 (图 7) 共长 741 bp, 将序列提交到 NCBI 数据库, 得到登录号 KU161590。用 BLAST 在数据库中搜索同源性序列, 发现乌头霜霉 28 S D1/D2 区序列与同属 *P. pulveracea* (登录号 KM058100)、*P. ficariae* (登录号 KM058095)、*P. bulbocapni* (登录号 KM058092) 的相似度最高, 高度达到 97%。将病原菌 28 S D1/D2 区序列命名为 JY01-28 S D1/D2, 以腐霉科腐霉属 *Pythium canariense* (登录号 HQ665069.1) 28 S 序列为外群菌株序列, 同时下载霜霉科下不同属 28 S 序列构建系统进化树 (图 8)。如图 8 可见, 乌头霜霉病原菌 28 S D1/D2 区序列在自举值 93% 水平与其他霜霉属病菌聚成一支, 与 rDNA-ITS 序列分析结果一致。

3 讨论

乌头霜霉病是危害乌头植株的常见的严重病害, 对药材附子、川乌的产量和品质有极大影响。通常在 3 月份上旬, 乌头幼苗就开始发病, 幼苗叶

```

1 tttcaagacg ggtcggatcg ctccatttcg tcaacgtccc gaacggcaac aagttaaagt
61 ccacatcaat ccacacataa ccacacgcac atagcaagct atccgcacac ggcacacacg
121 gagacacaaa cccactcaaa agcacgttgt aggcacctca gtcccaaccg cgacgactcg
181 tccgccaaga tataacagac aaacgcaagc gtaagcccta cctcctcggc agtcatttcc
241 cgcagtatac gaactgacct tgacgtccca ccgcagcaca gggcaccagc aagcacatgc
301 agcagacgca cgcacgcact cgccaatgga atatgccaca gattatagac tggatacgat
361 tcggttccct ttcagcagtt tcaggtactc ttttaactctc ttttcaaagt tcttttcac
421 tttccctcac ggtacttggt tactatcggc ctgcaccaa tatttagctt tagatggaat
481 ttaccaccta ctttgcgctg cattctcaa caacgcgact caaagaaaac gggtcgtacg
541 cacgagccac tcaggaatga acgggagtat caccctccat gctgtcctct tccaaggaac
601 ttgccttaag cgcccgcgct gaccacgcct ctatagacta caattcgccg taaaaattt
661 gtacggagat ttttaagctg agctcatccc gcttcaactcg ccgttactag gggaatcctt
721 gttagtttct tttcctccgc t
    
```

图 7 乌头霜霉病病原菌 28 S D1/D2 区序列

Fig. 7 28 S D1/D2 sequence of Aconitum downy mildew pathogen

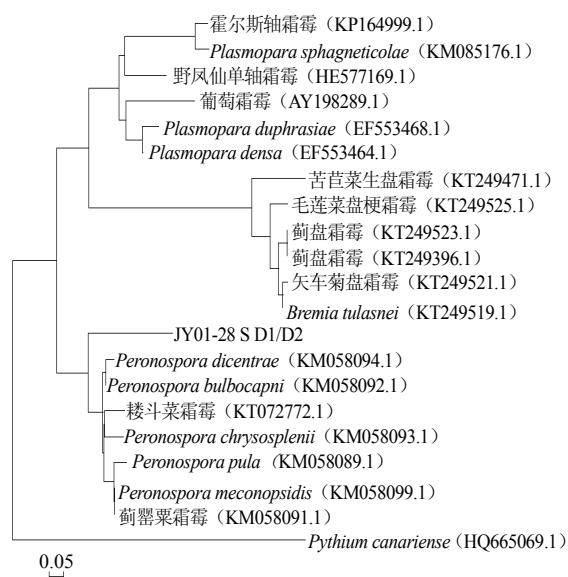


图 8 基于 28 S rDNA D1/D2 区域序列分析的系统发育树
Fig. 8 Phylogenetic tree based on 28 S rDNA D1/D2 sequence analysis

片呈现出反卷变厚，叶背开始出现灰色霉层；4~5 月份，随着气温和相对湿度升高，病害危害乌头达到最盛。病叶开始变得脆硬，叶背密被一层厚厚的灰褐色霉层，严重的会导致整个植株的枯死；6 月份，栽培地乌头植株成熟，准备采收，加上气温升高，不利于病菌的萌发传播。余永年^[2]在研究中根据病原菌有性阶段、无性阶段的形态特征以及寄主范围，将乌头霜霉病病原菌命名为乌头霜霉 *Peronospora aconiti* Yu，并对其卵孢子进行了报道^[17]。根据病原菌菌丝的特点，对 DNA 提取方法进行了优化提取，用真菌通用引物 ITS1/4 和卵菌纲通用引物 NL1/4 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增，测序得到

该病原菌的核酸保守序列。研究首次得到了乌头霜霉的 rDNA-ITS 区域和 28 S D1/D2 区域的序列，并对序列进行了 BLAST 比对。结果显示，乌头霜霉病病原菌 rDNA-ITS 与 NCBI 数据库中序列相似度最高的为霜霉属，相似度为 94%；与 28 S D1/D2 区域序列相似度最高的同 rDNA-ITS 序列分析一致也为霜霉属，相似度达 97%。与二者相似度最高的均为同属的 *P. pulveracea*（登录号 KM058100）。

本实验利用分子生物学手段首次对乌头霜霉病病原菌进行了研究，测定了该病原菌的 rDNA-ITS 区域和 28 S D1/D2 区域的序列，测序结果表明，利用分子生物学手段所得出的该病原菌的分类学地位与形态学研究结论一致。为了进一步了解各地区的乌头霜霉病病原菌的遗传差异，研究还将继续选取不同发病地区的霜霉病病原菌进行遗传差异分析，并及时监测其生理小种分化，为乌头霜霉病的检测和防治提供理论基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 余永年. 霜霉一新种 [J]. 植物病理学报, 1979, 9(2): 127-130.
- [3] 陶家凤, 秦 芸. 四川的霜霉菌 [J]. 四川农业学报, 1987, 2(1): 13-22.
- [4] 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, 6(18): 29-32.
- [5] 陈小红, 叶华智, 严吉明, 等. 四川药用植物病害调查与病原鉴定 I 主要栽培药用植物病害 [J]. 西南农业学报, 2006, 19(1): 58-62.
- [6] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中国药用植物栽培学 [M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [7] Carling D E. Hyphal anastomosis reaction,

- rDNA-internal transcribed spacer, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-B1 [J]. *Phytopathology*, 2002, 92: 43-50.
- [8] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1): 101-106.
- [9] 郝剑瑾, 程舟, 梁洪卉, 等. 基于 rDNA ITS 序列探讨我国冬虫夏草的遗传分化及分布格局 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 112-116.
- [10] Suga H T, Hasegawa H, Mitsui K, *et al.* Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region [J]. *Mycol Res*, 2000, 104(10): 1175-1183.
- [11] 王娜, 马雅军, 代光辉, 等. 黄瓜霜霉病和白粉病病原菌的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(10): 155-158.
- [12] 乾义柯, 张祥林, 克衣木, 等. 甜菜霜霉病菌形态鉴定及 28 S rDNA 序列分析 [J]. 新疆农业科学, 2012, 49(2): 249-254.
- [13] 刘建利. 利用 28 S rDNA D1/D2 区和 ITS rDNA 序列鉴定甜瓜白粉病病原菌 [J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 47-51.
- [14] 甘丽萍, 王生荣. 12 种白粉菌种间 RAPD 亲缘关系研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(8): 133-138.
- [15] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [16] Voglmayr H. Phylogenetic relationships of Peronospora and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *Mycol Res*, 2003, 107(10): 1132-1142.
- [17] 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.