

## 巢式 PCR 检测油茶根腐病菌的研究

李 河, 宋光桃, 何末军, 郝 艳, 周国英

(中南林业科技大学 林学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 为建立油茶 *Camellia oleifera* 根腐病菌层生镰刀菌 *Fusarium proliferatum* 的巢式聚合酶链式反应(PCR)快速检测体系, 扩增层生镰刀菌核糖体 DNA 基因间隔序列(ITS)区并测定其序列, 比较该序列与 GenBank 中近似种的 ITS 序列差异, 设计了特异性引物 GF1 和 GR2, 利用该对引物与 ITS1 和 ITS4 进行巢式 PCR 扩增检测层生镰刀菌。结果显示, 巢式 PCR 对层生镰刀菌的检测灵敏度可达 100 ag 基因组 DNA, 比常规扩增方法提高了 1 万倍。利用设计的 GF1/GR2 特异性引物与 ITS 区通用引物进行巢式 PCR 扩增, 可灵敏地扩增出油茶根腐病菌层生镰刀菌 DNA。图 4 参 22

**关键词:** 森林保护学; 油茶根腐病; 镰刀菌; 巢式 PCR; 分子检测

**中图分类号:** S763.15; S794.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1000-5692(2009)06-0849-05

## Detection of *Camellia oleifera* root rot pathogen with nested-PCR

LI He, SONG Guang-tao, HE Mo-jun, HAO Yan, ZHOU Guo-ying

(College of Forestry, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

**Abstract:** A species-specific polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid and accurate detection of the pathogenic root rot of diseased *Camellia oleifera* plant tissues was developed. Based on differences in internal transcribed spacer (ITS) sequences of *Fusarium proliferatum*, a pair of species-specific primers, GF1/GR2, was designed. Other species of *F. proliferatum* were used to test the specificity of the primers. The GF1/GR2 primer only amplified a unique 400 bp band from the CSUFT070109 strain, and its detection sensitivity was 1 pg of genomic DNA in 25  $\mu$ L reaction solution. A nested PCR procedure using ITS1/ITS4 as the first-round primers followed by GF1/GR2 increased detection sensitivity 10 000-fold to 100 ag. This assay detected the pathogen rapidly and accurately meaning methods developed here could simplify both plant disease diagnosis and pathogen monitoring as well as guide plant disease management. [Ch, 4 fig. 22 ref.]

**Key words:** forest protection; root rot of *Camellia oleifera*; *Fusarium proliferatum*; nested-PCR; molecular detection

油茶 *Camellia oleifera* 是中国特有的木本油料树种。茶油作为一种不饱和脂肪酸油脂, 其结构和组成非常符合人体营养之必需<sup>[1]</sup>。油茶根腐病是普遍危害油茶树的一种根部病害<sup>[2]</sup>, 受害油茶苗根部腐烂, 导致植株不能正常吸收养分和水分而干枯死亡, 给油茶生产带来了严重的威胁。因此, 准确地在油茶根腐病发病初期的植株上检测鉴定病原菌, 预测根腐病的发生, 及时采取有效的防治方法控制病害的传播和流行, 对减少经济损失均具有十分重要的意义。镰刀菌 *Fusarium* spp. 通常被认为是某

收稿日期: 2008-12-15; 修回日期: 2009-03-16

基金项目: “十一五”国家林业科技支撑计划资助项目(2006BAD08A1104); 国家林业局重点项目(2006-47; 2007-07); 湖南省教育厅资助项目(08C930); 中南林业科技大学青年科学研究基金资助项目(07003B); 中南林业科技大学研究生科技创新基金资助项目(2007bx02)

作者简介: 李河, 讲师, 从事森林保护及微生物学研究。通信作者: 周国英, 教授, 从事森林保护学等研究。E-mail: csuftlihe@163.com

些植物的致病菌和污染菌,广泛分布于土壤、植物的地上及地下部分。由于形态复杂,又易受外界环境的影响发生变异,镰刀菌种类繁多,人们对各种性状的分类意见看法不一。镰刀菌的分类鉴定主要依靠形态学,但是具有一定的局限性,如层生镰刀菌 *Fusarium proliferatum* 与串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme* 均有串生链状的小分生孢子,很难根据形态来进行区分。随着生物技术的发展,镰刀菌属许多种的 rDNA 基因间隔序列(ITS,internal transcribed spacer)序列在 GenBank 核酸序列数据库中已经列出,这为根据镰刀菌 rDNA ITS 序列差异来检测和鉴定镰刀菌奠定了基础。本文通过对层生镰刀菌 rDNA ITS 区克隆后测序,所得序列与 GenBank 等数据库中已有的序列进行比对,根据序列差异设计了一对特异性引物 GF1/GR2,结合巢式 PCR 扩增的方法检测此病原菌。此方法具有准确、快速、易操作等优点,可以在病害侵染初期鉴定出病原物,这对预防油茶根腐病具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病原菌

实验室分离的油茶根腐病菌层生镰刀菌(编号:CSUFT070109)。

### 1.2 DNA 抽提和 ITS 区扩增

采用十六烷基三甲基氯化铵(CTAB)方法提取分离病原菌基因组 DNA<sup>[3]</sup>。转录间隔区扩增采用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4(由上海生工合成)。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)体系(25  $\mu\text{L}$ ): 10 倍缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP(各 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )1  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶(0.833 5  $\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 稀释 50 倍后取 2  $\mu\text{L}$  (对照组加双蒸水,其他条件相同), ddH<sub>2</sub>O 18.25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.3 PCR 产物克隆测序

将 PCR 扩增产物纯化后克隆至 PMD18-T 质粒上,转化至感受态细胞中,用含 X-Gal, IPTG, Amp LB 蓝白斑平板法筛选阳性克隆,液体 LB(Luria-Bertani)培养基培养。挑取阳性的白色菌落培养做 PCR 检测,对克隆成功的菌株进行测序(上海生工生物工程有限公司)。

### 1.4 引物设计

对层生镰刀菌 rDNA ITS 区克隆后,测序所得序列与 GenBank 等数据库中已有的序列进行比对,根据序列差异采用 Primer Premier 5.0 软件设计了油茶根腐病原菌层生镰刀菌的特异性引物 GF1 和 GR2,送上海生工生物工程公司合成。

### 1.5 发病组织 DNA 的提取

参考 Wang 等<sup>[4]</sup>的方法并改进:取新发病的腐根,每克组织加入 0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠 50  $\mu\text{L}$ ,研磨后,1.2 万  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,取 5  $\mu\text{L}$  上清液加入 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris(pH 8.0)495  $\mu\text{L}$ ,混匀后备用。

### 1.6 常规 PCR 扩增

PCR 扩增引物 GF1 和 GR2,总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 然后进入循环,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 38 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 最后 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。反应结束后取 3  $\mu\text{L}$  扩增产物于 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶中电泳 30 min 后在凝胶成像系统上检测和拍照<sup>[5]</sup>。

### 1.7 巢式 PCR 扩增

以 ITS 区通用引物 ITS1/ITS4 作为第 1 轮反应引物,反应体系及程序参考 1.2。取 1  $\mu\text{L}$  PCR 产物为模板与引物 GF1 和 GR2 组合进行巢式 PCR 扩增,体系和程序参考 1.6<sup>[6-7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物 GF1 和 GR2 特异性验证

本实验设计的特异性引物 GF1/GR2 只能从分离的油茶根腐病菌层生镰刀菌 CSUFT070109 菌株 DNA 中特异地扩增出约 400 bp 的条带(图 1)。而镰刀菌其他种及空白对照均无扩增条带,表明引物具有特异性,可以将油茶根腐病原菌与其他近似种及其他相关种区分开。



图 1 特异引物 GF1/G2 PCR 扩增电泳图

M. 2 000 bp DNA 分子标记; 1. 水; 2. CSUFT07010 菌株; 3~18. 镰刀菌属其他种

Figure 1 Electrophoresis of PCR-amplified products with specific primers GF1/GR2 Lane M. DNA marker; Lane 1. H<sub>2</sub>O; Lane 2. CSUFT070109 strain; Lane 3~18. other species of *Fusarium*



图 2 特异引物 GF1/G2 常规 PCR 灵敏度检测

M. DNA 分子标记; 1. 水; 2~12. 25  $\mu$ L PCR 反应体系中分别含模板 DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag

Figure 2 Sensitivity of regular PCR for detection of CSUFT070109 strain with primers GF1/GR2 using different quantity of DNA

Lane M. DNA marker; Lane 1. H<sub>2</sub>O; Lane 2~12. Products amplified DNA at quantity of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag in 25  $\mu$ L PCR reaction system respectively

图 3 巢式 PCR 扩增病原菌 DNA 灵敏度检测

M. DNA 分子标记; 1. 水; 2~12. 25  $\mu$ L PCR 反应体系中分别含模板 DNA 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag

Figure 3 Sensitivity of nested-PCR for detection of CSUFT070109 strain with primers ITS1/ITS4 for the first round and primers GF1/GR2 for the second round amplification.

Lane M. DNA marker; Lane 1. H<sub>2</sub>O; Lane 2~12. Products amplified DNA at quantity of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag in 25  $\mu$ L PCR reaction system respectively

## 2.2 常规 PCR 扩增病原菌基因组 DNA

将 CSUFT070109 号菌株基因组 DNA, 从  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, 逐步按 10 倍的数量级稀释至  $1 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 从每个质量浓度的样品中取  $1 \mu\text{L}$  为模板进行 PCR 扩增。结果显示, 在  $25 \mu\text{L}$  的反应体系中含有  $1 \text{ pg}$  (质量浓度为  $40 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的基因组 DNA 时, 引物 GF1 和 GR2 可以扩增到约 400 bp 的特异性条带(图 2)。

## 2.3 巢式 PCR 扩增病原菌基因组 DNA

以 ITS 区通用引物 ITS1/ITS4 分别对 CSUFT070109 号菌株不同质量浓度的基因组 DNA 进行 PCR 扩增的产物为模板, 分别以特异性引物 ITS1/ITS4 和 GF1/GR2 进行巢式 PCR 扩增。结果表明, 巢式 PCR 产物量与单独进行特异性引物扩增的 PCR 产物量相比有明显提高, 能够使原来看不到扩增条带的样品( $25 \mu\text{L}$  反应体系中分别含 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag 基因组 DNA)产生明显的条带(图 3), 巢式 PCR 反应可以使检测灵敏度达到 100 ag (质量浓度为  $4 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 比常规方法提高了 1 万倍。

## 2.4 油茶组织的病原物检测

从人工接种病菌的油茶根部取发病组织提取 DNA, 利用巢式 PCR 方法扩增检测。2 个发病样品均扩增出了约 400 bp 的特异性条带, 而 3 个健康植株中有 1 株也扩增出了条带(图 4), 说明该健康植株携带了根腐病原菌。对泳道 1, 2, 3 切胶回收 DNA, 纯化后送上海生工测序, 测序结果表明它们的碱基序列完全相同, 且与层生镰刀菌序列一致, 可排除假阳性结果, 说明该套检测体系能用于油茶根腐病菌层生镰刀菌的灵敏快速检测。



图 4 巢式 PCR 扩增检测植物组织中病原菌 DNA

M. 标记; 1~2. 发病油茶组织; 3~5. 健康油茶组织

Figure 4 Nested PCR amplification of DNA extracted from plant samples with primers ITS1/ITS4 for the first round and primers GF1/GR2 for the second round amplification.

Lane M. marker; Lane 1~2. diseased *Camellia oleifera* tissues; Lane 3~5. healthy *Camellia oleifera* tissues

### 3 讨论

随着分子生物技术和生物信息学的快速发展,许多真菌的 rDNA ITS 区域的序列测定结果向 Genbank 等三大数据库提交,使得通过数据库的核糖体 ITS 区序列检索鉴定真菌成为现实, rDNA ITS 区的 DNA 已广泛地用于种间和属间的分子系统学研究和鉴定<sup>[8-9]</sup>。真核生物编码核糖体核酸的基因是一个串联的重复转录单位,在 2 代之间进化很快,常发生变异,在同一属种间甚或种内可有不同程度的差异,因此 rDNA ITS 序列具有菌种分类鉴定的意义<sup>[10]</sup>。目前,分子检测技术广泛应用于植物病原菌的研究中,主要有随机扩增多态性 DNA (RAPD),限制性片断长度多态性 (RFLP),扩增片断长度多态性 (AFLP), rDNA 序列分析和特异性引物的 PCR 检测等<sup>[11-12]</sup>。由于真菌核糖体基因 ITS 序列在真菌种间的高度变异和种内的稳定性,为真菌的分子检测提供了理想的靶序列<sup>[13]</sup>。近年来,利用 PCR 扩增病原菌核糖体 ITS 基因区段进行病原菌鉴定、检测及病害诊断的技术得到了很大的发展<sup>[14-16]</sup>。

PCR 技术在常规诊断中所存在的问题是纯化核酸。大多数核酸抽提程序不能除去植物的多糖或多酚化合物,这些物质对 PCR 扩增反应有抑制作用。但巢式引物进行第 2 次 PCR (即巢式 PCR 法),则可大大提高检测灵敏度。王茂华等<sup>[17]</sup>建立的检测和鉴定玉米 *Zea mays* 细菌性枯萎病菌 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* 的巢式 PCR 技术,其检测灵敏度可达到 4 个细菌细胞,同样可以准确、灵敏地检测和鉴定玉米细菌性枯萎病菌。吴琼等<sup>[18]</sup>针对该病菌设计了特异性引物,采用巢式 PCR 技术,能够准确地区别该病菌及其近似种,检测的灵敏度在 1 fg 级,检测活菌则达到 2 菌落形成单位。检测人工污染的玉米种子时,不受种子提取液中其他物质的干扰,灵敏度依然达到 2 菌落形成单位。该技术在甘蔗 *Saccharum officinarum* 宿根矮化病菌 *Leifsonia xyli* ssp. *xyli*<sup>[19]</sup>和松树 *Pinus* 脂溃疡病菌 *Fusarium circinatum*<sup>[20]</sup>等细菌性病害的检测鉴定中,均体现出很高的灵敏度。巢式 PCR 在真菌病害的快速检测中也有不少报道。周业琴等<sup>[21]</sup>设计了 2 个聚类群的特异引物 Hor2/Hor9 和 Hm1/Hm5,结合 ITS 通用引物 Til1/Til4 建立了分别检测水稻 *Oryza sativa* 腥黑粉菌 *Tilletia horrida* 2 个聚类群单个冬孢子的套式 (巢式) PCR 检测方法,整个检测过程可以缩短至 8 h。而梁玮莎等<sup>[22]</sup>针对高羊茅 *Festuca arundinacea* 和多年生黑麦草 *Lolium perenne* 种子中内生真菌建立的巢式 PCR 方法,检测灵敏度可以达到 25 ng·L<sup>-1</sup>,且单粒种子的检测达到了口岸检验检疫的要求。本研究利用巢式 PCR 方法对层生镰刀菌进行检测,灵敏度可达 100 ag 基因组 DNA,比只扩增 1 次的常规扩增方法灵敏度提高了 1 万倍。这对该病害在田间的动态检测和预测预报具有十分重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 李常伦,张仕吉. 株洲市油茶生产现状开发前景与对策[J]. 经济林研究, 2004, 22 (2): 78 - 80.  
LI Changlun, ZHANG Shiji. Current production situation, develop prospect and counter-measure of *Camellia oleifera* in Zhuzhou City [J]. *Econ For Res*, 2004, 22 (2): 78 - 80.
- [2] 曹福祥,吴光金,田再荣,等. 油茶根腐病发生规律和综合防治研究[J]. 中南林学院学报, 1994, 14 (1): 44 - 49.  
CAO Fuxiang, WU Guangjin, TIAN Zairong, et al. Study on the Infection cycle and the integrated control of root rot of *Camellia oleifera* [J]. *J Cent South For Univ*, 1994, 14 (1): 44 - 49.
- [3] HILLIS D M, MORITZ C M, MABLE B K. *Molecular Systematics* [M]. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996: 407 - 514.
- [4] WANG Hong, QI Meiqing, CULTER A J. A simple method of preparing plant samples for PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 1993, 21 (17): 4153 - 4154.
- [5] 彭慧,郑岳臣. rDNA ITS 序列在鉴定尖端赛多孢子菌中的应用[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29 (1): 26 - 28.  
PENG Hui, ZHENG Yuechen. Application of ribosomal DNA internal transcribed spacer in identification of *Scedosporium apiospermum* [J]. *Acta Univ Med Tongji*, 2000, 29 (1): 26 - 28.
- [6] 邢红梅,丁平,周晓云,等. 红掌胶胞炭疽菌的分子检测[J]. 植物病理学报, 2008, 38 (2): 113 - 119.  
XING Hongmei, DING Ping, ZHOU Xiaoyun, et al. Molecular detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Anthurium andraeanum* [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2008, 38 (2): 113 - 119.



- [7] 张海峰, 任众, 刘翔, 等. 冬生疫霉 (*Phytophthora hibernalis*) 的快速分子检测 [J]. 植物病理学报, 2008, **38** (3): 231 - 237.  
ZHANG Haifeng, REN Zhong, LIU Xiang, *et al.* Rapid molecular detection of *Phytophthora hibernalis* by PCR[J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2008, **38** (3): 231 - 237.
- [8] GU Jing, HUI Dongwei, ZHANG Bingchang, *et al.* Studies on rDNA ITS1 regions of soybean and its wild relatives [J]. *Acta Bot Sin*, 1994, **36**: 759.
- [9] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, **37** (4): 407 - 416.  
WANG Jianbo, ZHANG Wenju, CHEN Jiakuan. Application of ITS sequence of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxon Sin*, 1999, **37** (4): 407 - 416.
- [10] LI Ruoyu, LI Dongming, YU Jin, *et al.* Recent advances in medical mycology [J]. *J Peking Univ Health Sci*, 2002, **34** (5): 559 - 563.
- [11] BROWN A E, SREENIVAPRASED S, TIMMER L W. Molecular characterization of slow-growing orange and kelime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum* [J]. *Phytopathology*, 1996, **86** (5): 523 - 527.
- [12] FREEMAN S, MINZ D, JUKEVITCH E, *et al.* Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruit [J]. *Phytopathology*, 2000, **90** (6): 608 - 614.
- [13] 杨佩文, 李家瑞, 杨勤忠, 等. 根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用[J]. 云南农业大学学报, 2003, **18** (3): 228 - 233.  
YANG Peiwen, LI Jiarui, YANG Qinzhong, *et al.* Cloning and sequencing the internal transcribed spacer of the ribosomal gene of *Plasmodiophora brassicae* and applying it in detecting the pathogen [J]. *J Yunnan Agric Univ*, 2003, **18** (3): 228 - 233.
- [14] SCHUBERT R, BAHNWEIG G, NECHWATAL J, *et al.* Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root rot diseases in European deciduous forests by species specific polymerase chain reaction [J]. *Eur J For Pathol*, 1999, **29**: 169 - 188.
- [15] BONANTS P, WEERDT M H, Van GENT-PELZER M, *et al.* Detection and identification of *Phytophthora fragariae* by the polymerase chain reaction [J]. *Eur J Plant Pathol*, 1997, **103**: 345 - 355.
- [16] VOLOSSIOUK T, ROBB E J, NAZARR N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (11): 3972 - 3976.
- [17] 王茂华, 胡白石, 卢玲, 等. 利用巢式 PCR 检测玉米细菌性枯萎病菌[J]. 南京农业大学学报, 2005, **28** (2): 37 - 40.  
WANG Maohua, HU Baishi, LU Ling, *et al.* Detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by nested-PCR[J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2005, **28** (2): 37 - 40.
- [18] WU Qiong, CHEN Zhinan, FAN Huaizhong, *et al.* Identification of corn bacterial wilt pathogen by nested-PCR based on 16S rDNA [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2005, **35** (5): 420 - 427.
- [19] 周凌云, 周国辉. 甘蔗宿根矮化病菌 PCR 检测技术研究[J]. 广西农业生物科学, 2006, **25** (2): 172 - 174.  
ZHOU Lingyun; ZHOU Guohui. PCR techniques for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infecting sugarcane [J]. *J Guangxi Agric Bio Sci*, 2006, **25** (2): 172 - 174.
- [20] 廖太林, 李百胜, 叶建仁, 等. 松树脂溃疡病菌的分子检测[J]. 林业科学, 2007, **43** (1): 111 - 115.  
LIAO Tailin, LI Baisheng, YE Jianren, *et al.* Molecular detection of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker [J]. *Sci Silv Sin*, 2007, **43** (1): 111 - 115.
- [21] 周业琴, 刘素萍, 周国梁, 等. 水稻腥黑粉病菌的单孢检测[J]. 植物检疫, 2006, **20** (增刊): 38 - 41.  
ZHOU Yeqin, LIU Suping, ZHOU Guoliang, *et al.* The detection for single teliospore of *Tilletia horrida* [J]. *Plant Quarantine*, 2006, **20** (supp): 38 - 41.
- [22] 梁玮莎, 易建平, 周而勋. 高羊茅和多年生黑麦草内生真菌的分子检测[J]. 菌物研究, 2006, **4** (3): 96 - 97.  
LIANG Weisha, YI Jianping, ZHOU Erxun. Molecular detection of endophytic fungi in tall fescue and perennial ryegrass [J]. *J Fungal Res*, 2006, **4** (3): 96 - 97.