

## 四川凉山地区烟草黑胫病菌的 ITS 序列分析

张海珊<sup>1\*</sup>, 许大风<sup>2\*</sup>, 刘东阳<sup>3</sup>, 周本国<sup>2</sup>,

高正良<sup>2</sup>, 卢军<sup>3</sup>, 章东方<sup>1</sup>, 严丹侃<sup>1</sup>, 王芳<sup>2</sup>, 王勇<sup>3\*</sup>

(1. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031; 2. 安徽农业科学院烟草研究所, 合肥 230031;  
3. 四川省烟草公司凉山州公司, 四川 西昌 615000)

**摘要:** 本研究利用真菌核糖体基因转录间隔区 (ITS) 通用引物, PCR 扩增四川省凉山州不同地区的 20 株烟草黑胫病菌的 ITS 序列, 并对 PCR 产物进行了克隆测序。结果表明, 20 个供试菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 总长均为 803 bp; 各菌株之间的 ITS 序列同源性达到 99.3% 以上; 与 GenBank 报道的寄生疫霉台湾烟草分离株 *Phytophthora parasitica* (GU111675.1) 的同源性在 99.6%~100% 之间; 但各菌株 ITS 序列的个别位点存在突变, 这些突变主要集中在 ITS2 区上, 其中第 468 处的突变具有一定地域性, 主要为德昌和西昌的菌株。利用 MEGA6 软件对 20 个供试菌株及 GenBank 中登陆的 15 个疫霉属菌株序列进行聚类分析, 供试菌株与 GenBank 上登录的 GU111675.1、KF010303.1、AJ854295.1、KC768775.1、L41383 聚在同一聚类组上, 均为 *Phytophthora parasitica* (或 *Phytophthora nicotianae*), 其它疫霉菌种聚在不同的聚类组上, 遗传关系较远, 这表明来自四川凉山不同地区的 20 株烟草黑胫病分离菌株均为寄生疫霉 (*Phytophthora parasitica*)。

**关键词:** 烟草黑胫病; ITS; 寄生疫霉; 烟草

中图分类号: S572.09

文章编号: 1007-5119 (2015) 01-0096-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2015.01.018

## Sequence Analysis of the Ribosomal DNA ITS of *Phytophthora Parasitica* in Tobacco in Liangshan Region of Sichuan Province

ZHANG Haishan<sup>1\*</sup>, XU Dafeng<sup>2\*</sup>, LIU Dongyang<sup>3</sup>, ZHOU Benguo<sup>2</sup>,

GAO Zhengliang<sup>2</sup>, LU Jun<sup>3</sup>, ZHANG Dongfang<sup>1</sup>, YAN Dankan<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Plant Protection and Agricultural Product Quality and Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2. Tobacco Research Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;  
3. Liangshan Tobacco Company of Sichuan Province, Xichang, Sichuan 615000, China)

**Abstract:** The internal transcribed spacer regions (ITS) of the ribosomal RNA gene from 20 isolates of tobacco black shank were amplified with the polymerase chain reaction through the universal primers and sequence. The result showed that the total length of ITS of those 20 isolates tested were all 803bp, and the nucleotide sequence identity among those sequences was above 99.3%, and 20 strains had 99.6%-100% homologies with *Phytophthora parasitica* (GU111675.1) published in GenBank. But the ITS of those 20 isolates tested had some mutation sites which mainly concentrated in the ITS2 area and 468 mutation of isolates, which mainly came from Dechang and Xichang had certain regional. With the bio-software of MEGA6, Sequences from the above isolates were compared with 15 sequences published in GenBank database and phylogenetic trees were constructed based on ITS sequence data. The results showed that the isolates tested, GU111675.1, KF010303.1, AJ854295.1, KC768775.1 and L41383 were clustered into the same clade and all were *Phytophthora parasitica* (or *Phytophthora nicotianae*). They were clustered in a distant clade for different *Phytophthora* species and phylogenetically distinct each other. The results indicated that twenty isolates which isolated from different regions of Liangshan prefecture were *Phytophthora parasitica*.

**Keywords:** tobacco black shank; internal transcribed spacer regions; *Phytophthora parasitica*; tobacco

基金项目: 四川省烟草公司凉山州公司科技项目“凉山州烟草黑胫病发生规律及防治研究”(201203002)

作者简介: 张海珊, 女, 硕士, 主要从事植物病害研究。E-mail: zhhs81@126.com。\*通信作者, E-mail: wy269405@sohu.com。\*相同贡献作者

收稿日期: 2014-05-06

修回日期: 2014-12-03

烟草黑胫病是威胁世界烟草生产的主要病害,同时也是我国烟草生产中危害严重的病害之一<sup>[1]</sup>, *Phytophthora parasitica* (*Phytophthora nicotianae*) 是其唯一病原<sup>[2-3]</sup>, 可危害烤烟、晒烟、晾烟、香料烟、白肋烟等所有栽培烟草, 主要侵染烟草根部和茎基部, 其初侵染来源为带菌土壤及病残体<sup>[4]</sup>。烟株发病后其根系和茎基部变黑腐烂, 并很快萎蔫死亡, 有极强的破坏性, 对烟叶的产量和品质影响极大<sup>[5]</sup>。烟草黑胫病菌在自然条件下还可以侵染草莓、茄子等其他重要经济作物<sup>[6]</sup>。烟草黑胫病在生产中常常与烟草根黑腐病及烟草青枯病等根茎类病害混合发生, 给病害的诊断造成困难<sup>[7]</sup>。病原菌本身的形态学和生物学性状具有较大的变异性, 因而菌种鉴定也较为困难。

核糖体 DNA 转录间隔区 (Ribosomal DNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS) 是介于 18S、5.8S 和 28S rDNA 之间的区域, 该区域进化速度较编码区快, 在真菌种间存在着极大的变异, 在种内不同菌株间又高度保守。核糖体序列的测定和比对为大量生物的系统发育和亲缘关系的鉴定提供了有价值的信息, 其内转录间隔区已被广泛应用于亲缘关系较近的系统发育研究<sup>[8-9]</sup>。王翠霞等<sup>[10]</sup>根据镰刀菌 ITS 通用引物, PCR 扩增了冬瓜枯萎病菌核糖体基因 ITS 区, 并对以葫芦科为寄主的镰刀菌不同专化型的 ITS 进行聚类分析。朱桂宁等<sup>[11]</sup>利用真菌通用引物 ITS1/ITS4 扩增山药炭疽病菌的 ITS 区, 经序列比对分析将山药炭疽病菌鉴定为胶孢炭疽菌。杨秀梅等<sup>[12]</sup>采用相同的方法, 将引起云南百合疫病的病原鉴定为烟草疫霉。

目前对于烟草黑胫病的研究, 大多集中在培养学特性、生理小种鉴定以及生物防治上, 有关分子方面的研究不多, 有关烟草黑胫病菌的 ITS 序列克隆与分析方面的系统研究更鲜有报道。高乔芬等<sup>[7]</sup>和谢勇等<sup>[13]</sup>利用烟草黑胫菌 ITS 序列分别设计了特异性引物, 对烟草黑胫病菌的分子检测进行了研究, 但并未对该病菌的 ITS 序列进行系统发育方面的研究。四川省凉山州是我国重要的优质烟叶产区, 也是烟草黑胫病发生严重的地区之一, 且该地

区多种根茎类病害混发现象较多。本研究采用真菌核糖体转录间隔区 ITS 的通用引物 (ITS1/ITS4), 扩增四川省凉山州几个不同地区烟草黑胫病菌的 ITS 区段, 将其克隆和测序, 并将其序列与 GenBank 中登录的 15 个疫霉属真菌的 ITS 序列进行比较, 建立 ITS 聚类分析图, 探讨烟草黑胫病菌四川省凉山分离株的系统发育情况及其分类地位, 以期对烟草黑胫病菌的检测及病害诊断提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验于 2012—2013 年在安徽省农业科学院完成。

1.1.1 供试菌株及来源 烟草黑胫病菌菌株 20 个, 2012 年按柯赫氏法则分别从四川凉山德昌、西昌、会理等烟草主产区的烟草黑胫病发病病株上分离得到。菌株编号和分离地点见表 1。

表 1 20 个烟草黑胫病菌菌株来源  
Table 1 20 isolates tested and its source

编号	菌株	来源	编号	菌株	来源
1	LS1	冕宁	11	XCGC11	西昌高草
2	514B	德昌	12	XCGC12	西昌高草
3	DCFH	德昌凤凰	13	XCGC2	西昌高草
4	DCFH2	德昌凤凰	14	XCGC21	西昌高草
5	DCWS1	德昌王所	15	XCHN	西昌海南
6	DCWS12	德昌王所	16	XCHN3	西昌海南
7	DCWS2	德昌王所	17	XCHN32	西昌海南
8	HL1	会理	18	XC3	西昌
9	HL2	会理	19	XC32	西昌
10	HL3	会理	20	XC33	西昌

1.1.2 供试试剂 pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; rDNA 通用引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') 由上海生工生物工程股份有限公司合成; DH5 感受态细胞由笔者实验室制备。

1.1.3 培养基配制 胡萝卜培养基 (CA) 配方<sup>[14]</sup>: 胡萝卜 200 g 加水 1000 mL 煮沸 1 h, 过滤后加琼脂 17 g, 溶化后分装灭菌。

## 1.2 供试菌株基因组 DNA 提取

1.2.1 菌丝的培养 供试菌株在 CA (胡萝卜) 培养基上培养 5~7 d 至长满培养皿, 用灭菌小枪头刮取菌丝, 用滤纸吸干水分, -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 菌丝体总 DNA 提取 供试菌株菌丝体总 DNA 均采用 CTAB 法提取<sup>[15]</sup>。取 0.1 g 冻干菌丝加液氮研磨成粉末状, 转移至 1.5 mL 离心管中, 加 1 mL CTAB 提取液, 65 °C 水浴 60 min; 冷却至室温后, 加入 1 mL 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 混合液, 轻轻摇匀, 10 000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液, 加入两倍体积预冷的无水乙醇, 轻轻颠倒混匀, -20 °C 放置 20 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 用 70% 乙醇沉淀 2 次, 风干; 加适量无菌双蒸水或 TE 溶解, -20 °C 保存备用。

1.2.3 烟草黑胥病菌核糖体 DNA-ITS 区的 PCR 扩增 采用 White 等为真菌核糖体 DNA 的 ITS 序列设计的通用引物 ITS1/ITS4, 扩增出 ITS1 区 (18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的转录间隔区)、5.8S 区、ITS2 区 (5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的转录间隔区)。PCR 反应体系为 (50  $\mu$ L 体系): 10  $\times$  PCR 反应缓冲液 5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (2.5 mmol/L) 3  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物 (20  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu$ L。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 35 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 产物的克隆与测序 感受态细胞的制备及基因克隆均参照文献<sup>[14]</sup>的方法。将 PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒回收, 取 2  $\mu$ L 与 pMD18-T 载体进行连接, 将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 (DH5<sup>+</sup>), 经菌液 PCR 验证为阳性克隆后送上海生工测序。

1.2.5 序列分析 采用 DNASTAR 对 20 个供试菌株 ITS 序列与 GenBank 中有代表性的 15 个疫霉属菌株的 ITS 区序列进行序列比对, 分析其同源性。用 Mega6.05 软件进行系统发育分析和进化树的构建。采用邻位相连法 (NJ, neighbor-joining) 进行距离

分析, 运用 Bootstrap 对系统树进行检验, 重复 1000 次。构建聚类分析图的材料及来源见表 2。

表 2 供试疫霉菌株来源与登陆号

Table 2 Sources and GenBank accession No. of Phytophthora isolates used in this study

菌株种名	寄主	地理来源	登陆号
Phytophthora parasitica	烟草	中国台湾 嘉义县	GU111675.1
Phytophthora nicotianae	柑橘	印度	KF010303.1
Phytophthora nicotianae	烟草	意大利	AJ854295.1
Phytophthora parasitica	常春花	美国	KC768775.1
Phytophthora nicotianae	未知	巴西	L41383
Phytophthora sojae	大豆	美国	AY590276
Phytophthora capsici	辣椒	墨西哥	AY726623
Phytophthora megasperma	茴香	意大利	DQ116960
Phytophthora cinnamomi	松树	瑞士	EF055303
Phytophthora citricola	未知	德国	EF490382
Phytophthora cactorum	未知	瑞士	EU877748
Phytophthora hibernalis	玫瑰花	德国	EU686391
Phytophthora drechsleri	卷心菜	阿根廷	JQ653303
Phytophthora colocasiae	芋头	印度	JX134654
Phytophthora palmivora	甜樱桃	土耳其	KF831194

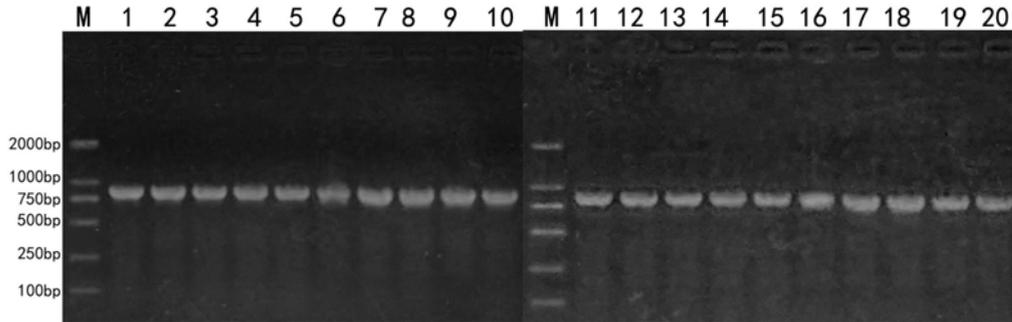
## 2 结果

### 2.1 核糖体基因 ITS 的 PCR 扩增

以提取的 20 个供试菌株 DNA 为模板, 用通用引物 ITS1/ITS4 进行 PCR 扩增, 均可扩增出一条 900 bp 左右的特异性条带, 且没有其他片段的干扰和拖带现象, 所扩增的条带特异性较好, 电泳结果如图 1 所示。

### 2.2 核糖体基因 ITS 区段测序与变异分析

测序结果显示, 20 个供试烟草黑胥病菌菌株的 ITS 序列全长为 892 bp (XCHN32 和 XCHN3 为 891 bp)。其中包括 18S 部分序列, ITS1 区、5.8S 区和 ITS2 区全部序列及 28S 部分序列。由于 18S 和 28S 部分序列在真核生物中高度保守, 去掉这一保守区域对测序列结果分析没有影响, 通过与 GenBank 中登陆的序列做比对, 将所测序列去掉头尾, 取 803 bp (包括 ITS1 区、5.8S 区和 ITS2 区完整序列) 用 DNASTAR 软件进行比对分析。结果表明, 供试 20 个菌株的 ITS1 区、5.8S 区和 ITS2 区大小均等长, 分别为 228 bp、160 bp 和 415 bp。从表 3 可以看出 ITS1 区的 G+C 含量为 43.86%~44.74%; ITS2 区的 G+C 含量为 47.95%~48.43%。所有供试菌株 5.8S 的 G+C 含量均为 47.50%, 说明 5.8S rDNA



注：M 为 Marker；泳道 1~20 分别为菌株 LS1、514B、DCFH、DCFH2、DCWS1、DCWS12、DCWS2、HL1、HL2、HL3、XCGC11、XCGC12、XCGC2、XCGC21、XCHN、XCHN3、XCHN32、XC3、XC32、XC33。

图 1 烟草黑胫病菌 ITS 区域 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic pattern of ITS region of 20 strains.

表 3 供试菌株 ITS 序列长度及 G+C 含量

Table 3 Length and GC content of ITS sequences from 20 tested strains

菌株名称	ITS1		5.8S		ITS2	
	长度/bp	(G+C)%	长度/bp	(G+C)%	长度/bp	(G+C)%
LS1	228	44.30	160	47.50	415	48.43
524B	228	44.30	160	47.50	415	48.19
DCFH	228	44.74	160	47.50	415	48.43
DCFH2	228	44.30	160	47.50	415	48.19
DCWS1	228	44.74	160	47.50	415	47.95
DCWS12	228	43.86	160	47.50	415	47.95
DCWS2	228	44.30	160	47.50	415	48.43
HL1	228	44.30	160	47.50	415	48.43
HL2	228	44.30	160	47.50	415	48.67
HL3	228	44.30	160	47.50	415	48.43
XCGC11	228	44.30	160	47.50	415	48.43
XCGC12	228	44.30	160	47.50	415	48.43
XCGC2	228	44.30	160	47.50	415	48.43
XCGC21	228	44.30	160	47.50	415	48.19
XCHN	228	44.74	160	47.50	415	48.19
XCHN3	228	44.30	160	47.50	415	48.19
XCHN32	228	44.30	160	47.50	415	48.19
XC3	228	44.30	160	47.50	415	48.43
XC32	228	44.30	160	47.50	415	48.43
XC33	228	44.30	160	47.50	415	48.19

进化过程中高度保守，并且同源性最高。

序列分析表明，供试菌株 ITS1 区序列在第 13、124、146 和 214 位等 4 个核苷酸碱基位点具有差异，ITS2 区序列在第 431、468、517、531、542、564、583、625、693、730、755、780 位等 12 个位点处碱基具有差异（表 4）。由表 4 可以看出，四川烟草黑胫病菌的 ITS 区突变主要集中在 ITS2 区上，其中第 468 位和 531 位发生的突变较为普遍，且 468 处的突变具有一定的地域性，主要为德昌和西昌的分离株。将获得的供试菌株 ITS 区序列在 GenBank 中进行同源性比较，发现与其同源性最高的 100 个序列菌株全部为 *Phytophthora parasitica* 或 *Phytophthora nicotianae*，20 个供试菌株与 GenBank

报道的寄生疫霉台湾烟草分离株 *Phytophthora parasitica* (GU111675.1) 的同源性在 99.6%~100% 之间，仅有 1~3 个碱基的差异。供试菌株之间的同源性也达到了 99.3% 以上，说明 *Phytophthora parasitica* 种内不同个体之间的 ITS 区序列相对保守。

### 2.3 核糖体基因 ITS 序列聚类分析

采用 Mega6.0 软件对 20 株供试菌株与 GenBank 数据库中下载的其他疫霉属菌株的 ITS 区序列进行序列分析，用 NJ (Neighbor-Joining) 法构建系统进化树（图 2）。结果表明：35 个菌株被分为 3 个聚类组。其中冬生疫霉 *Phytophthora hibernalis*、掘氏疫霉 *Phytophthora drechsleri*、大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 和樟疫霉 *Phytophthora cinnamomi* 4 个菌株被分在一个大聚类组中。辣椒疫霉 *Phytophthora capsici*、芋疫霉 *Phytophthora colocasiae*、棕榈疫霉 *Phytophthora palmivora*、柑桔生疫霉 *Phytophthora citricola*、大雄疫霉 *Phytophthora megasperma* 和致病疫霉 *Phytophthora infestans* 6 个菌株被分在同一个聚类组中。

20 个四川凉山分离株和 GenBank 上登录的 *Phytophthora parasitica* (或 *Phytophthora nicotianae*，登录号为 GU111675.1、KF010303.1、AJ854295.1、KC768775.1、L41383) 聚为一组，与其他疫霉相似种相距较远，相似同源性较低，由此表明所分离的 20 个供试菌株均为寄生疫霉。*P. Cactorum* (EU877748) 虽也与 *Phytophthora parasitica* 聚在

表4 供试菌株 ITS1 和 ITS2 区变异位点  
Table 4 The variation sites in ITS1 and ITS2

ITS1			ITS2		
变异位点	变异类型	菌株	变异位点	变异类型	菌株
13	A - G	DCFH	431	A - G	XCGC11、XCGC2
124	A - G	DCWS1	468	C - T	524B、DCFH、DCFH2、DCWS1、DCWS12、XC33、XCGC2、XCGC11、XCGC12、XCGC21、XCHN、XCHN3、XCHN32、
146	T - C	XCHN	517	A - T	XCHN
214	C - T	DCWS12	531	T - A	DCWS2、HL2、HL3、LS1、XC3、XC32、
		-	542	A - G	DCFH
		-	564	G - A	DCWS12
			583	G - T	XCGC2、XCGC11
			625	T - C	XCGC2、XCGC11
			693	C - T	DCWS1
			730	A - G	XCGC12
			755	A - T	XC33
			780	T - C	HL2

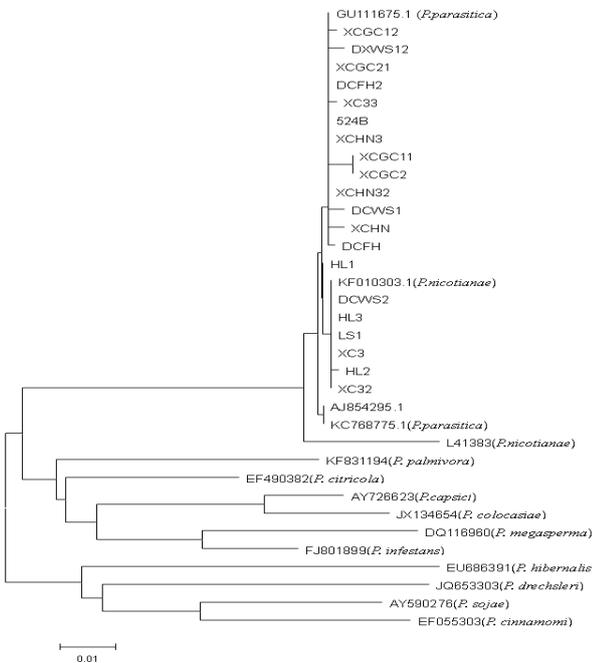


图2 基于 ITS 构建供试菌与 15 个疫霉属种的聚类分析  
Fig. 2 Phylogenetic tree based on sequences of ITS between two *Phytophthora* isolates and 15 morphospecies *Phytophthora* spp.

同一个大的聚类组上,但 *Phytophthora parasitica* 遗传距离较远。并且 DCFH2、XC33、XCGC12、DXWS12、XCGC21、524B、XCGC11、XCGC2、XCHN32、XCHN3、DCWS1、XCHN、DCFH 与 *Phytophthora parasitica* (GU111675.1) 在一个分支上,HL1、DCWS2、LS1、HL3、XC3、HL2 与

*Phytophthora nicotianae* (KF010303.1) 在一个分支上。

### 3 讨论

烟草黑胫病菌的分离和形态学鉴定较难。真菌 rDNA 区段含有多个串连重复序列,每个重复序列包含 18S、5.8S、28S rDNA 及其间隔区域,ITS1 和 ITS2 将 18S、5.8S、28S 分割开。因而 ITS 对真菌种、属水平的分类是一个稳定性状,可以以该区域 DNA 核苷酸序列为依据,进行相似种的区分。以 ITS 区序列来研究疫霉的形态学种,可充分反应种间的系统发育关系。本研究中,来自四川凉山不同地区的烟草黑胫病菌菌株之间 ITS 同源性在 99.3%以上,各菌株的碱基突变主要集中在 ITS2 区上,其中第 468 位和 531 位发生的突变较为普遍。468 处的突变主要为德昌和西昌的分离株,具有一定的地域性。ITS1 区有 4 个碱基发生突变的位点,5.8S 区则高度保守没有出现变异位点。

菌株聚类分析结果表明,来自于德昌和西昌的大部分菌株与台湾烟草上的 *Phytophthora parasitica* (GU111675.1) 聚在同一个分支上,来自于会理和冕宁的所有菌株都与印度柑橘上的 *Phytophthora nicotianae* (KF010303.1) 聚在同一个分支上;说明烟草黑胫病菌具有一定的地域性,其 ITS 区在不同地区不同的环境条件下会出现一定程度的突变,但这种突变与病原菌的致病性、生物学特性等方面

是否有相关性有待于进一步的研究。同时结果还表明不同寄主来源的寄生疫霉聚在同一分支,说明寄生疫霉在不同寄主中,ITS 序列相对比较保守,而且发育关系较近,同时也说明 *Phytophthora parasitica* 的寄主范围广泛,危害性大。

国内外有关烟草黑胫病病菌的生物防治、检测及生理小种鉴定等方面的研究较多,有关分子检测方面也有相关研究;但对于其在疫霉属的分类地位以及疫霉属的系统发育情况报道较少,尤其是对于该病菌的 ITS 基因更鲜有系统全面的相关研究。本研究对疫霉属的系统发育情况和烟草黑胫病病菌在疫霉属中的分类地位进行了系统研究,可望对烟草黑胫病病菌的分类及病害诊断提供分子依据和研究基础。

#### 4 结 论

试验结果显示四川凉山不同地区的烟草黑胫病病原菌为 *Phytophthora parasitica*,其核糖体 DNA 的 ITS 区相对保守,但个别位点存在突变。各菌株的碱基突变位点主要集中在 ITS2 区上,且第 468 位和 531 位发生的突变较为普遍,468 处的突变具有一定的地域性,主要为德昌和西昌的分离株。系统发育结果表明,寄生疫霉在不同寄主中,ITS 序列相对比较保守,而且发育关系较近,同时也说明 *Phytophthora parasitica* 的寄主范围广泛,危害性大。

#### 参考文献

[1] 张修国,罗文富,吴德喜,等.烟草黑胫病菌全基因组 DAN 遗传多态性 RAPD 标记[J].中国烟草学报,1999,5(2):26-29.  
[2] 郑小波,陆家云.烟草疫霉两个变种的划分及疫霉属几

个生物学性状的研究[J].南京农业大学学报,1989,12(2):46-52.  
[3] 马国胜,高智谋,陈娟.烟草黑胫病菌研究进展[J].烟草科技,2003(4):35-42.  
[4] 耿坤,罗文富,杨艳丽.烟草黑胫病菌的田间群体分布规律[J].云南农业大学学报,2002,17(4):389-392.  
[5] 马国胜,高智谋.安徽省烟草黑胫病菌的交配型及其地理分布研究[J].植物病理学报,2006,36(6):566-568.  
[6] Washington W S, McGee P. Dimethormorph soil and seed treatment of potted tomatoes for control of damping off and root rot caused by *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*[J]. Australasian Plant Pathology, 2000, 29(1): 46-51.  
[7] 高乔芬,秦西云,方敦煌,等.烟草疫霉的快速分子检测[J].云南农业大学学报,2012,27(2):156-159.  
[8] Aanen D K, Kuyper T W, Hoekstra R F. A widely distributed ITS polymorphism with a biological species of the ectomy corrhizal fungus *H. ebelom* a *velutipes*[J]. Mycol Res, 2001, 105(3): 284-290.  
[9] 李依韦,银玲. rDNA-ITS 序列分析在植物病原真菌分类鉴定中的应用[J].内蒙古民族大学学报,2012,27(1):66-67.  
[10] 王翠霞,徐金茹,刁雨琳,等.冬瓜枯萎病菌核糖体 rDNA ITS 区的克隆与序列分析[J].华北农学报,2010,25(1):80-83.  
[11] 朱桂宁,蔡健和,胡春锦,等.广西山药炭疽病病原菌的鉴定与 ITS 序列分析[J].植物病理学报,2007,37(6):572-577.  
[12] 杨秀梅,瞿素萍,王丽花,等.百合疫病病原鉴定及其 PCR 检测[J].园艺学报,2011,38(6):1180-1184.  
[13] 谢勇,王云月,陈建斌,等.烟草黑胫病菌分子检测[J].云南农业大学学报,2000,15(2):176.  
[14] 郑小波.疫霉菌及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1999:82.  
[15] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔.分子克隆实验指南[M].金冬燕,译.2版.北京:科学出版社,1993.