

陈辉辉, 金磊磊, 喻镇东, 等. 1 株侵染互花米草海洋真菌 *Buergenerula spartinae* YDC07 的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 342–346. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.113

# 1 株侵染互花米草海洋真菌 *Buergenerula spartinae* YDC07 的分离鉴定

陈辉辉<sup>1,2</sup>, 金磊磊<sup>1</sup>, 喻镇东<sup>1,2</sup>, 姜晓龙<sup>1,2</sup>, 绍荣<sup>2</sup>, 许伟<sup>2</sup>, 陈集双<sup>1</sup>

(1. 南京工业大学生物资源工程研究所, 江苏南京 210009; 2. 盐城工学院, 江苏盐城 224005)

**摘要:**对侵染中国江苏沿海滩涂盐碱地的互花米草茎和叶上真菌进行分离纯化, 得到 1 株与侵染互花米草海洋真菌形态极其相似的菌株 YDC07。对菌株 YDC07 进行培养性状观察和形态学鉴定, 发现该菌与中国新记录菌属互花米草比尔格纳菌十分相似; 通过 rRNA 基因 ITS 序列分子生物学鉴定, 发现该菌与比尔格纳菌属中互花米草比尔格纳菌相似度为 96%~99%, 在进化树中显示亲缘关系最近; 该真菌可以侵染互花米草秸秆, 使其生物量逐渐减少。菌株 YDC07 rRNA-ITS 序列相关信息提交 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号为 KJ459363。菌株 YDC07 是在江苏沿海滩涂盐碱地互花米草上新发现的一种比尔格纳菌属海洋真菌。

**关键词:**互花米草; 海洋真菌; *Buergenerula spartinae*; rRNA-ITS; 进化分析

**中图分类号:** Q949.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0342-05

互花米草 1979 年引入我国, 在减缓风暴潮压力、保护滩堤、促进围垦、消除近海污染等方面<sup>[1]</sup>发挥着积极作用, 具有重要的生态价值, 但因其耐受力 and 繁殖能力强等特性, 导致其在本土物种竞争、挤占贝类栖息地、改变滩涂景观、降低生物多样性等方面<sup>[2]</sup>产生消极作用, 互花米草已成为我国沿海主要的入侵物种<sup>[3]</sup>。Kohlmeyer 等研究资料显示, 目前已经报道来自互花米草的专性和兼性海洋真菌有 39 种<sup>[4-5]</sup>, 这些海洋真菌具有很强的分解木质纤维素和动植物尸体的能力<sup>[6-8]</sup>, 具有潜在的应用价值。不过, 对互花米草中海洋真菌的长期研究发现, 仍然有很多未知海洋真菌没有被发现。研究表明, rRNA-ITS 区在种内非常保守, 种间却有较大变异。通常情况下, 每种真菌的单倍体基因组 rRNA 拷贝数都会超

过 100 个, 可以很容易地从少量真菌组织中检测到 rRNA; ITS 区在真菌的种或变种之间虽然相似性很高, 但仍有足够的种间序列差异, 可以选择一些序列作为专化性引物<sup>[9]</sup>。目前, rRNA-ITS 区分子检测是研究真菌菌种间同源性和遗传关系, 进行菌种鉴定的一种有效方法<sup>[10-12]</sup>。

试验以江苏沿海滩涂盐碱地互花米草 (*Spartina alterniflora*) 植株的茎和叶为材料, 对其进行海洋性真菌的分离纯化, 并通过形态学观察及 rRNA-ITS 序列分析对菌株进行鉴定, 为海洋性真菌的合理开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试样采集

互花米草茎和叶, 于 2012 年 10 月 9 日采自江苏省大丰市大丰港沿海滩涂盐碱地。采集后的样品分成 2 份, 1 份直接用于真菌分离, 另 1 份于 4℃ 冰箱短期保存, 备用。

### 1.2 试剂与仪器

主要试剂有: 异丙醇、甲醇、氯仿、无水乙醇, 均为分析纯, 市购; 琼脂粉、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、十二烷基硫酸钠 (SDS) 等, 市购; 10 U/μL *Taq* DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷酸 (dNTPs), 购自 TaKaRa 公司; DNA marker, Fermentas 公

2001; 734–743.

[6] 蒋恩臣, 苏旭林, 王明峰, 等. 生物质连续热解反应装置的变螺距螺旋输送机设计[J]. 农业机械学报, 2013(2): 121–124.

[7] 何芳, 徐梁, 柏雪源, 等. 生物质热解过程吸热量[J]. 太阳能学报, 2006, 27(3): 237–241.

[8] 张东海. 螺旋输送机的优化研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.

[9] 王金梅, 陈革新, 赵培庆, 等. 生物质连续炭化工艺研究[J]. 现代化工, 2009, 29(21): 300–302.

[10] 朱锡锋. 生物质热解原理与技术[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2006.

收稿日期: 2014-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30971898)。

作者简介: 陈辉辉(1988—), 男, 江苏南京人, 硕士, 主要从事植物真菌及病毒研究。E-mail: huihui\_chen2012@163.com。

通信作者: 陈集双, 博士, 教授, 主要从事植物真菌、病毒、植物反应器、秸秆资源化和产业化利用等研究。E-mail: biochenjs@njut.edu.cn。

## 参考文献:

[1] Basu P. Biomass gasification and pyrolysis: practical design and theory[M]. Oxford: Elsevier Inc, 2010.

[2] 石海波, 孙姣, 陈文义, 等. 生物质热解炭化反应设备研究进展[J]. 化工进展, 2012, 31(10): 2130–2136, 2166.

[3] 周德凤, 郝婕, 巴晓微, 等. 稻壳的开发利用[J]. 长春工业大学学报: 自然科学版, 2004, 25(1): 59–62.

[4] 杜建红, 孙丽娅, 张永康, 等. 三段式炭化装置及炭化工艺参数研究[J]. 机械设计与制造, 2010(12): 186–188.

[5] 王鹰. 连续输送机械设计手册[M]. 北京: 中国铁道出版社,

司生产;DNA 凝胶回收试剂盒,Axygen 公司生产。主要仪器有:真空抽滤装置,光学显微镜。

### 1.3 真菌的分离与纯化

真菌分离参照方中达的方法<sup>[13]</sup>进行,具体步骤为:把采集的互花米草叶和茎,浸泡在 70% 乙醇中 10 s,无菌水反复漂洗 3~5 次;用有效氯含量 34.0~46.0 g/L 的 NaClO 溶液(巴氏消毒液),对互花米草叶和茎表面消毒 3 min,用无菌水反复漂洗 3~5 次;将漂洗过的互花米草叶和茎用无菌滤纸吸去表面水分,移入 PDA 培养基平板中,于 28℃ 恒温培养箱中倒置培养;当菌丝体产生时,切去边缘菌丝接种到新的 PDA 培养基平板上纯化;反复纯化 3 代以上,得到纯种真菌菌丝。PDA 培养基配方为去皮马铃薯 200 g、葡萄糖或蔗糖 18 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL;121℃ 灭菌 20 min。

### 1.4 形态学鉴定

1.4.1 培养性状观察<sup>[14-17]</sup> 将分离到的菌株 YDC07 接种于 PDA 平板中央,28℃ 静置培养;在培养 1、3、5、7、15、30 d 后观察、拍照、记录菌落形状、大小、色泽变化、表面菌丝和边缘特征、菌落质地及是否产生色素、是否产生孢子和产生孢子种类等。

1.4.2 光学显微特征观察 将载玻片洗净擦干,中间添加 1 滴灭菌水;用解剖针挑取少量菌丝体置于水滴中,让其充分散开;盖上干净的盖玻片,置于显微镜下镜检观察菌丝体粗细、分枝、是否有隔及是否产生分生孢子等特征。

### 1.5 分子鉴定

1.5.1 真菌基因组 DNA 提取 将经分离纯化的真菌菌株 YDC07 的菌丝接种于 PDA 培养基中,28℃、200 r/min 摇床培养 3 d;通过真空抽滤装置过滤收集菌丝体,冷冻干燥;经液氮研磨,转移至 1 mL EP 管中,采用改良 SDS-CTAB 法<sup>[18]</sup>提取基因组 DNA,溶解于加有适量 10 μg/mL RNaseA 的 ddH<sub>2</sub>O 中;用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。真菌基因组 DNA 提取液置于 -20℃ 保存,备用。

1.5.2 真菌 ITS 序列克隆 以真菌菌株 YDC07 基因组 DNA 为模板,用 White 等设计的植物真菌通用引物 ITS4:5′-TCCTCCGCTTATGATATGC-3′ 和 ITS5:5′-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3′ 作为上下游引物<sup>[19]</sup>,进行 ITS 序列 PCR 扩增。扩增体系为 50 μL:5 μL 10× PCR buffer,4 μL 2.5 mmol/L dNTP,1 μL 20 μmol/L ITS4,1 μL 20 μmol/L ITS5,1 μL 模板 DNA 50 ng,0.5 μL 10 U/L Taq 聚合酶,37.5 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环;72℃ 延伸

10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,参照使用说明书,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化回收;经纯化回收的产物与 pMD18-T 载体连接,转化感受态细胞 DH5α;在含 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板上,经蓝白斑筛选得到阳性白斑;通过碱法提取重组质粒 DNA,经 EcoR I 和 Hind III 单双酶切鉴定及 PCR 扩增检验阳性克隆产物,经鉴定为阳性的质粒送到南京金斯瑞公司进行 DNA 测序(ABI 3730xl DNA analyzer,Perkin-Elmer,USA)。

1.5.3 真菌 rRNA-ITS 序列系统进化分析 测得的序列在 GenBank 数据库中进行 Blastn 相似性比对,下载同源性较高的序列,用 ClustalX 1.83<sup>[20]</sup> 软件进行多级比对;利用 Bioedit 软件手工将比对结果进行加工,去掉长序列的多余部分;用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树<sup>[21]</sup>,进化树由 Bootstrap Test of Phylogeny 中 Neighbor-Joining(NJ)法制作完成。

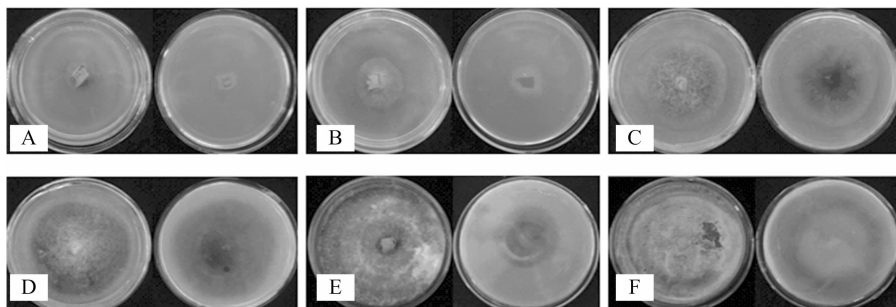
### 1.6 互花米草秸秆被真菌 YDC07 侵染后症状及其生物量变化

把晒干的互花米草秸秆高温灭菌,称量记录秸秆的干质量;接种针挑取一块真菌菌丝放到 PDA 平板中央,没有接种菌丝的 PDA 平板做为对照;将灭菌的互花米草秸秆在无菌条件下分别接种到有菌丝和没有菌丝的 PDA 培养基四周,每天观察记录真菌对互花米草秸秆的侵染情况;接种 7、14、30 d 后取出平行的 3 组互花米草秸秆,去除菌丝并晒干,称量记录秸秆的干质量。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养性状

由图 1 可见,菌株 YDC07 菌丝在 PDA 培养基上前期生长速度较慢,后期较快,且为等径生长,7~8 d 即把直径为 9 cm 的平板铺满;菌丝前期为白色透明状,后逐渐转变为浅褐色,最后转变为黑褐色,生长到后期,菌丝开始老化变成深黑褐色;菌落形态为转轮状,中长细杆绒丝状,层状排列,大量时呈发丝状堆积,边缘整齐,边缘一圆环状菌丝与内部圆形菌丝颜色稍有差别;培养 3 d 的气生菌丝为白色,呈绒状,基内菌丝产少量灰褐色脂溶性色素,5 d 左右气生菌丝表面逐渐呈灰褐色,脂溶性色素颜色加深,7 d 后培养基色素呈黑褐色,表面灰褐色菌丝逐渐转变为黑褐色,15 d 时气生菌丝全部变为黑褐色,脂溶性色素彻底转变为深黑褐色,30 d 左右菌丝开始成块老化脱落。菌株 YDC07 菌落的生长特征与互花米草比尔格纳菌(*B. spartinae*)及小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)特征<sup>[22]</sup>相吻合。

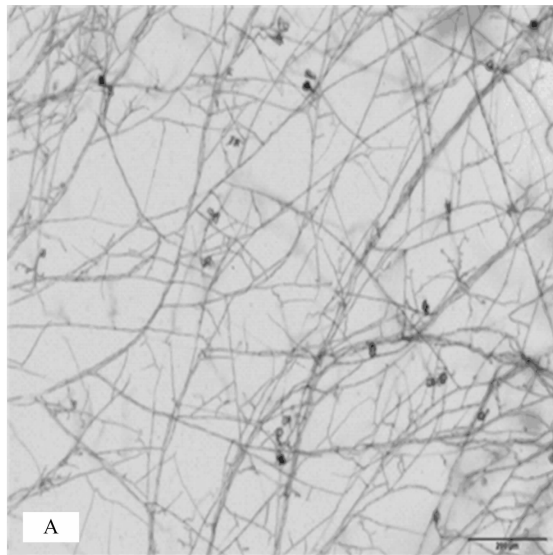


A 至 F 分别代表菌株 YDC07 在培养 1、3、5、7、15、30 d 时菌落的生长情况

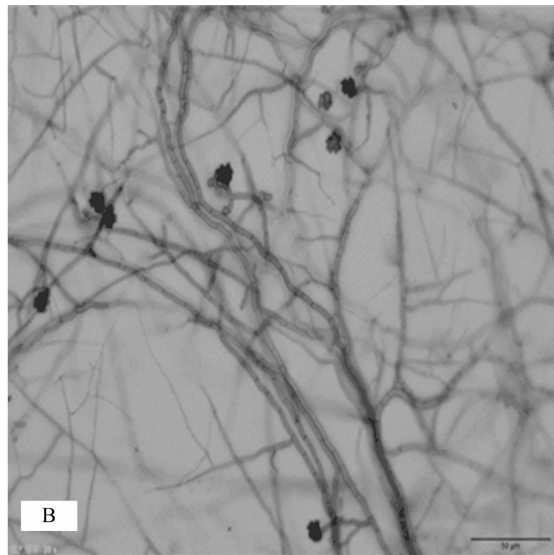
图1 菌株 YDC07 的菌落培养性状

## 2.2 光学显微特征

由图 2 可见,菌株 YDC07 菌丝体细长,交织成网状,部分分枝与主枝成直角或锐角,菌丝有隔;随着菌丝生长,菌丝逐



渐变粗、变成熟,菌丝顶端会逐渐出现螺旋成团状分布的分生孢子,孢子不断变多、变大、成熟。菌株 YDC07 的菌丝特征与互花米草比尔格纳菌及小麦全蚀病菌基本一致<sup>[22]</sup>。

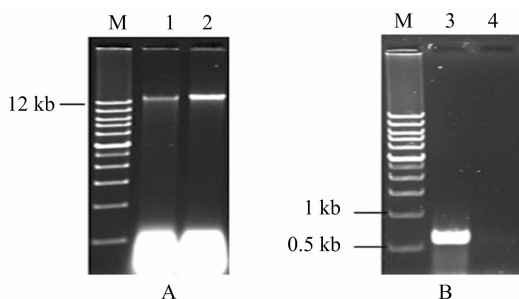


A、B 为菌株 YDC07 培养 7 d 和 15 d 分别在 100 倍和 200 倍显微镜下的观察结果

图2 菌株 YDC07 的菌丝特征

## 2.3 真菌 rRNA - ITS 序列进化分析

菌株 YDC07 基因组 DNA 的提取结果如图 3 - A 所示。rRNA 基因 ITS 序列扩增引物 ITS4 和 ITS5 的扩增区段包括 18 S 和 28 S 的部分序列及 ITS1、ITS2 和 5.8 S 的全部序列<sup>[23]</sup>,菌株 YDC07 基因组的扩增结果为 598 bp(图 3 - B)。



A: YDC07 基因组 DNA, 1、2 为平行的 2 个样品;  
B: 3—ITS PCR 产物, 4—阴性水对照, M—500 bp DNA marker, fermentas 的 #SM0311 产品

图3 菌株 YDC07 基因组 DNA 提取及其 ITS PCR 产物电泳结果

菌株 YDC07 基因序列在 GenBank 数据库中 Blast 检索,经初步比对,提交序列与 100 条序列相似性很高,比对  $e$  值都为 0。表 1 为列出的部分比对结果,由此可见,提交序列与来自于互花米草比尔格纳菌种的 ITS1 - 5.8 S - ITS2 区段相似度为 96% ~ 99%、覆盖率为 89% ~ 94%,其中,与 *Buergenerula spartinae* strain SAP12、*Buergenerula spartinae* strain SAP124 和 *Buergenerula spartinae* strain SAP126 的同源性最高,相似性为 99%,其次是 *Buergenerula spartinae* strain ATCC 22848,相似性为 96%;提交序列与很多小麦全蚀病菌属品种和几株 *Magnaporthe salvinii* 品种、柱孢属品种 (*Cylindrocarpon*) 的 ITS1 - 5.8 S - ITS2 区段序列相似度较高,同源性在 89% ~ 95%、覆盖率在 73% ~ 97%。

由图 4 可见,菌株 YDC07 与 *B. spartinae* 归为 1 族。根据

rRNA - ITS 区序列同源性分析,菌株 YDC07 rRNA - ITS 序列与互花米草比尔格纳菌品种同源性最高,结合该菌的培养性状、光学显微观察结果,确定菌株 YDC07 为比尔格纳属真菌,是与该属中互花米草比尔格纳菌种极其相似的一种新记录海洋真菌。

## 2.4 互花米草秸秆被真菌 YDC07 侵染后症状及其生物量变化

由图 5 可见,接种真菌 YDC07 的互花米草秸秆上有菌丝长出,而没有接种真菌 YDC07 的互花米草秸秆则没有。对接种前后互花米草生物量统计发现,侵染真菌 YDC07 的互花米草秸秆干质量,7、14、28 d 后分别减少 0.013 3、0.070 6、0.166 0 g,互花米草生物量逐渐减少。

## 3 结论与讨论

互花米草比尔格纳菌是丝状子囊菌中唯一一个可以直接通过显微观察确定菌株的归属,而不需要进一步通过对真菌 rRNA - ITS 区扩增进行 ITS 序列进化分析的菌株<sup>[5,24]</sup>。随着分子鉴定方法的发展,先前许多根据传统形态学特征进行物种分类的方法受到质疑,结合分子遗传进化特征及形态学鉴定进行物种分类,是更科学、更准确的分类方法<sup>[25]</sup>。Schroeder 等研究表明,真菌 rRNA - ITS 序列分析对解开绝大多数盐沼地海洋真菌分类和进化关系之谜有着极其重要的作用<sup>[26-29]</sup>。Gessner 等研究认为,互花米草比尔格纳菌主要入侵互花米草的茎和叶<sup>[5]</sup>,这个入侵部位与本试验结论较为一致。

通过对分离自江苏沿海滩涂盐碱地互花米草海洋真菌菌落的培养性状观察、菌丝光学显微特征观察及 rRNA 基因组 ITS 序列系统进化分析,确定分离得到的菌株 YDC07 和中国新记录属中比尔格纳属互花米草比尔格纳菌 (*B. spartinae*) 成员特征相吻合,因此,将其命名为 *B. spartinae* YDC07。菌

表 1 菌株 YDC07 基因序列与 GenBank 数据库比对相似率较高的菌株

序列登录号	菌株名称	相似性 (%)	覆盖率 (%)
AF422960.1	<i>Buergenerula spartinae</i> strain SAP12	99	94
AF422961.1	<i>Buergenerula spartinae</i> strain SAP124	99	94
AF422962.1	<i>Buergenerula spartinae</i> strain SAP126	99	91
JX134666.1	<i>Buergenerula spartinae</i> strain ATCC 22848	96	89
FJ746639.1	<i>Magnaporthe salvinii</i> strain ATCC 32149	93	94
AY120939.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>maydis</i> Ggm02	92	87
U17212.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> G1	93	93
U17213.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> G2 and G3	93	94
AY428782.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> strain GGG317	93	92
AY428781.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> strain GGG282	93	92
AY428780.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> strain GGG175	92	92
AY428773.1	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i> strain GC334	89	92
AY428771.1	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i> strain CG304	92	90
FJ430735.1	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	90	88
EU853848.1	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i> strain ATCC MYA - 3385	93	73
JF414848.1	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> isolate M54	92	92

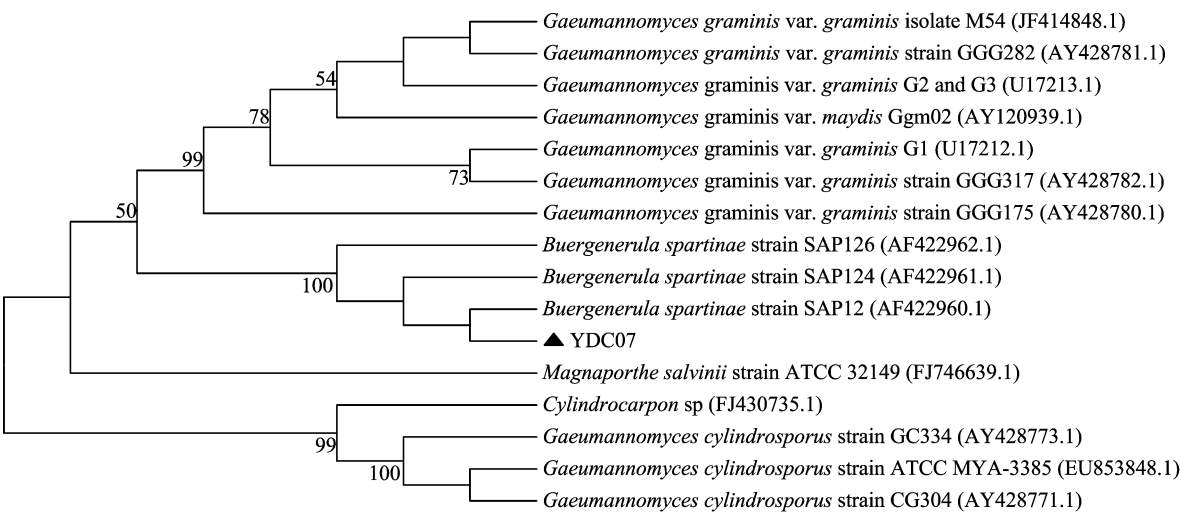
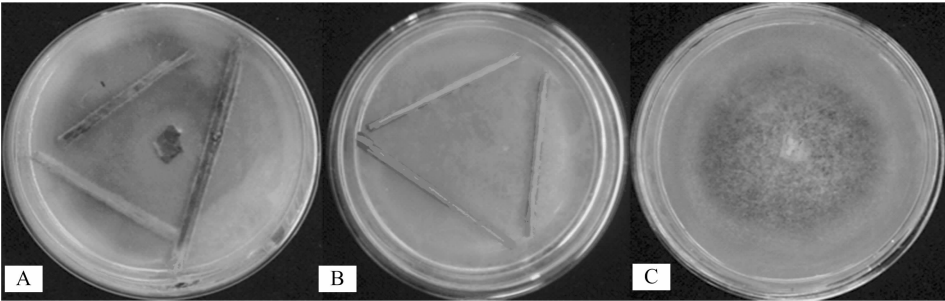


图4 菌株 YDC07 与 GenBank 中相关物种 rRNA-ITS 序列进化树



A—侵染后互花米草秸秆变黑并长菌丝的症状；B—没接菌丝（对照）；C—没接互花米草秸秆

图5 真菌 YDC07 侵染互花米草秸秆的症状

株 YDC07 是在江苏省大丰市大丰港沿海滩涂盐碱地的互花米草中分离得到的,与已报道的互花米草海洋真菌互花米草比尔格纳菌生存环境一致,这也进一步证实 YDC07 真菌的分类归属是正确的。目前,菌株 *B. spartinae* YDC07 的菌丝中存在线粒体病毒,这是首次在江苏大丰港沿海滩涂盐碱地的入侵植物互花米草中发现携带线粒体病毒的海洋真菌,向 NCBI

提交真菌 *B. spartinae* YDC07 的 rRNA - ITS 序列及该真菌携带线粒体病毒的序列,获得菌株 *B. spartinae* YDC07 的 GenBank 登录号为 KJ485703。另外,试验表明,如 *B. spartinae* YDC07 侵染互花米草秸秆,则互花米草秸秆的生物量会逐渐减少。

本试验研究一方面丰富了入侵江苏沿海滩涂盐碱地互花

米草的海洋真菌种类,另一方面对 NCBI 数据库中关于沿海滩涂互花米草的入侵海洋真菌及其携带病毒数据进行了补充。

#### 参考文献:

- [1] Wang G, Qin P, Wan S W, et al. Ecological control and integral utilization of *Spartina alterniflora* [J]. Ecological Engineering, 2008, 32 (3): 249 – 255.
- [2] Simenstad C, Thom R. *Spartina alterniflora* (smooth cordgrass) as an invasive halophyte in Pacific northwest estuaries [J]. Hortus Northwest, 1995, 6(12): 38 – 40.
- [3] 李富荣, 陈俊勤, 陈沐荣, 等. 互花米草防治研究进展 [J]. 生态环境, 2007, 16(6): 1795 – 1800.
- [4] Kohlmeyer J, Volkman – Kohlmeyer B. Fungi on *Juncus* and *Spartina*: new marine species of *Anthostomella*, with a list of marine fungi known on *Spartina* [J]. Mycological Research, 2002, 106(3): 365 – 374.
- [5] Gessner R V. Seasonal occurrence and distribution of fungi associated with *Spartina alterniflora* from a Rhode Island estuary [J]. Mycologia, 1977, 69(3): 477 – 491.
- [6] Bergbauer M, Newell S Y. Contribution to lignocellulose degradation and DOC formation from a salt marsh macrophyte by the ascomycete *Phaeosphaeria spartinicola* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1992, 9(4): 341 – 347.
- [7] Newell S Y, Porter D. Microbial secondary production from salt marsh – grass shoots, and its known and potential fates [J]. Kluwer Academic, 2000, 72: 159 – 185.
- [8] Newell S Y, Porter D, Lingle W L. Lignocellulolysis by ascomycetes (fungi) of a saltmarsh grass (smooth cordgrass) [J]. Microscopy Res Techn, 1996, 33: 32 – 46.
- [9] 匡治州, 许 杨. 核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用 [J]. 生命的化学, 2004, 24(2): 120 – 122.
- [10] Aanen D K, Kuyper T W, Hoekstra R F. A widely distributed ITS polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes* [J]. Mycological Research, 2001, 105(3): 284 – 290.
- [11] Hietala A M, Vahala J, Hantula J. Molecular evidence suggests that *Ceratobasidium bicorne* has an anamorph known as a conifer pathogen [J]. Mycological Research, 2001, 105(5): 555 – 562.
- [12] Okabe I, Arakawa M, Matsumoto N. ITS polymorphism within a single strain of *Sclerotium rolfsii* [J]. Mycoscience, 2001, 42(1): 107 – 113.
- [13] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [14] 刘崇玉. 植物内生真菌 HCCB05974 和 HCCB06030 次级代谢产物的分离纯化 [D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [15] 杨宴霞. 放线菌 SPRI – 710055 次级代谢产物中除草活性成分研究及菌种鉴定 [D]. 上海: 上海师范大学, 2009.
- [16] 刘 谦. 海洋放线菌 TXC6 – 6 次级代谢产物中活性组分的分离纯化、结构和菌种的鉴定 [D]. 上海: 上海师范大学, 2012.
- [17] 刘岩岩, 张 鹭. 一株乳酸菌培养条件优化及菌种鉴定 [J]. 齐齐哈尔大学学报, 2008, 24(2): 21 – 24.
- [18] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [19] 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.
- [20] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673 – 4680.
- [21] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596 – 1599.
- [22] Walker J. Taxonomy of take – all fungi and related genera and species [J]. Biology and Control of Take – all, 1981, 29: 15 – 74.
- [23] 赵 杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用 [J]. 陕西农业科学, 2004(4): 35 – 37.
- [24] Newell S Y. Spore – expulsion rates and extents of blade occupation by ascomycetes of the smooth – cordgrass standing – decay system [J]. Botanica Marina, 2001, 44(3): 277 – 285.
- [25] 王春兰, 朱 品, 黄 睿, 等. 杭州地区一株侵染水稻的嗜水小核菌菌株的鉴定 [J]. 科技通报, 2013, 29(9): 55 – 60.
- [26] Schroeder S, Kim S H, Cheung W T, et al. Phylogenetic relationship of ophiostoma piliferum to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 195(2): 163 – 167.
- [27] O'donnell K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) [J]. Current Genetics, 1992, 22(3): 213 – 220.
- [28] de Los Angeles Vineusa M, Sanches – Puellas J M, Tibell L. Intraspecific variation in *Mycocalicium subtile* (Mycocaliciaceae) elucidated by morphology and the sequences of the ITS1 – 5.8S – ITS2 region of rDNA [J]. Mycological Research, 2001, 105(3): 323 – 330.
- [29] Yan Z H, Rogers S O, Wang C J K. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology [J]. Mycologia, 1995, 87(1): 72 – 83.