

南海长棘海星共附生真菌的分离鉴定及多样性分析*

刘威¹, 梁婉玲², 谢中梁², 蓝文健^{2,3}, 李厚金⁴, 杨得坡^{2,3}, 王来友^{1,5}

(1. 广东药学院中医药研究院, 广东 广州 510006;

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

3. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006;

4. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

5. 广东省中医药防治代谢性疾病重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 长棘海星 (*Acanthaster planci*) 是热带和亚热带海域珊瑚礁的主要破坏者, 体内外有丰富的共附生微生物。该文对采自南海三亚珊瑚礁保护区的一个长棘海星样品的共附生真菌, 利用3种培养基进行分离纯化得到近200株真菌菌株。采用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增其中16株真菌的 ITS-rDNA 片段序列, 并进行测序, 测试结果提交 GenBank, 登录号为 KF999808-KF999822 以及 KJ723458。利用邻接法构建系统发育树及简单分析该长棘海星共附生真菌的种群多样性。序列分析显示, 16株真菌分别属于 Ascomycota 门4目 (Hypocreales、Eurotiales、Pleosporales、Microascales), 5属 (*Trichoderma*、*Penicillium*、*Neosartorya*、*Leptosphaerulina*、*Pseudallescheria*), 以及 Deuteromycota 门1目 (Meliolales), 1属 (*Fusarium*, 有性型 *Gibberella*), 并聚为8类。多样性分析的结果显示, 菌体的个体数在镰刀属上(10株)表现为高度富集, 群落的均匀度比较低。

关键词: 长棘海星; 共附生真菌; ITS-rDNA; 种群多样性

中图分类号: Q939.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2015)01-0084-05

Isolation, Identification and Diversity of Fungi Associated with *Acanthaster planci* Collected from the South China Sea

LIU Wei¹, LIANG Wanling², XIE Zhongliang², LAN Wenjian^{2,3},
LI Houjin⁴, YANG Depo^{2,3}, WANG Laiyou^{1,5}

(1. Institute of Chinese Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

3. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

4. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

5. Guangdong TCM Key Laboratory against Metabolic Diseases, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Acanthaster planci*, commonly known as the crown of thorns starfish, usually preys upon scleractinian corals. Recently, *Acanthaster planci* has been found biocenotic association with diverse and abundant microbial communities. Using three different media, nearly 200 strains of the endophytic fungi were isolated from the *Acanthaster planci* collected from the Sanya, Hainan province, China. The ITS-rDNA gene of 16 strains were sequenced, and submitted to GenBank. The register numbers of the se-

* 收稿日期: 2014-05-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102502, 30973633); 广东省科技计划资助项目(2012A031100005, 2010B030600011); 广东省自然科学基金资助项目(2011Y1-00036); 中山大学高校基本科研业务费专项基金资助项目(111gpy09)

作者简介: 刘威(1987年生),男;研究项目:中药化学生物学;通讯作者:王来友;E-mail: laiyouwang@hotmail.com

quences for these strains are KF999808-KF999822 and KJ723458. The phylogenetic tree was then constructed by using a neighbor-joining method, as well as the population diversity analysis. 16 strains belonging to 2 phyla (Deuteromycota, Ascomycota), 5 orders (Hypocreales, Eurotiales, Meliolales, Microascales), 6 genera (*Trichoderma*, *Pseudallescheria*, *Penicillium*, *Neosartorya*, *Leptosphaerulina*, *Pleosporale*, *Fusarium*,) were classified into 8 groups. And ten strains belonging to *Fusarium* indicates that *Fusarium* is the dominant fungi, and the endophytic fungi community with form of commensalism of *Acanthaster planci* has the low degree of homogeneity.

Key words: *Acanthaster planci*; endophytic fungus; ITS-rDNA; diversity

长棘海星 (*Acanthaster planci*) 属于棘皮动物, 状似葵花, 浑生长满毒刺, 是热带和亚热带海域珊瑚礁的主要破坏者, 严重威胁海洋生态安全与生物多样性。目前, 国内外对长棘海星的研究大多集中于长棘海星的生态及活性成分的研究。1990 年, Shiomi K 等^[1]的研究表明长棘海星体内的多种毒素能阻断哺乳动物神经肌肉的传递引起肝的严重退化; 1994 年, Shiroma N 等^[2]发现长棘海星分泌的毒素能引起海葵等海洋生物的逃避反应; 1998 年, Toshiaki T 等^[3]研究发现花生四烯酸和 α -亚麻酸对长棘海星有诱捕作用; 2009 年, 李厚金等^[4]的研究证实花生四烯酸是长棘海星体内主要的必需不饱和脂肪酸, 而且体内无法合成, 需要不断捕食富含花生四烯酸的珊瑚。近年来, 人们发现共附生真菌与宿主在遗传、生理、代谢等方面相互渗透进化, 形成互利共生关系。长棘海星体内有丰富的微生物为其提供有效的化学防御, 不仅是一个潜在的微生物多样性宝库, 更是天然药物的一个非常重要的来源途径。本实验室多年来先后从中国三亚的长棘海星样品中分离获得一批能够产生新颖结构的活性真菌菌株, 并从中分离得到多个新骨架类型和有显著活性的化合物。如 2012 年, LAN W J 等^[5]从 *Trichoderma* sp. 培养液提取物中分离得到 2 个新的 sorbicillinoid 类似物对多种肿瘤细胞系有较强的毒性。2013 年, Zhao Y 等^[6]从 *Ceriporia lacerate* 的 GPY 培养发酵液中分离得到 3 个新的羊毛甾烷型三萜化合物。因此, 开展长棘海星共附生真菌的相关研究具有非常重要的生态意义与海洋药物资源开发利用的价值。

本文采用平板涂布法从采自三亚珊瑚礁保护区的长棘海星样品中分离得到近 200 株真菌, 采用 ITS-rDNA 分子系统鉴定方法确定了 16 株具有代表性的真菌种属, 通过统计学方法研究了长棘海星共附生真菌的种群多样性, 为下一步深入研究长棘海星共生真菌的次生代谢情况奠定基础。

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 样品 采自中国三亚珊瑚礁保护区的长棘海星活性样本。水下采样, 将采得的样本装入盛有海水的塑料桶, 于冰盒保存。48 h 内送至实验室于 4 °C 保存。

1.1.2 试剂与仪器 Bioflux 真菌基因组提取试剂盒 (Fungal DNA Kit 50 T), 日本 Bioflux 公司; 溶菌酶、蛋白酶 K、dNTPs、DNA 相对分子量标准, 加拿大 MBI 公司; Taq 酶, 日本 TaKaRa 公司;

引物

ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCCG - 3'

ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

1.1.3 培养基 PDA 培养基: 马铃薯 200 g (煮沸 0.5 h, 取滤液), 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 人工海水 1 L, pH 7.0 ~ 7.4。

马丁氏培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 孟加拉红 33 mg, 琼脂 20 g, 人工海水 1 L, pH 7.0 ~ 7.4。

察氏培养基: 蔗糖 30 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, $NaNO_3$ 3 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4$ 0.01 g, 琼脂 20 g, 人工海水 1 L, pH 7.0 ~ 7.4。

以上培养基均在 121 °C 下灭菌 30 min, 用前加入氯霉素 200 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 长棘海星活体依次用无菌海水快速清洗数次, $\varphi = 75\%$ 乙醇浸泡 30 s, 无菌海水漂洗 3 次, 无菌滤纸吸干。然后将长棘海星不同部位磨碎, 取 10 g 碎片于装有 90 mL 无菌海水的匀浆器中, 反复震荡, 静置取上清液备用。

1.2.2 共附生真菌的分离纯化及保存 取 200 μ L 备用上清液用无菌海水进行梯度稀释 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 。用灭菌涂布棒均匀涂布到相应的分离培养基平板上, 与 25 °C 倒置培养至肉眼能观察到

真菌菌落, 如此反复纯化 3 次。

纯化的菌株转接到新鲜 PDA 琼脂平板上培养, 待菌落长满约斜面一半时, 置于 4 °C 保存。

1.2.3 纯化真菌 DNA 的提取与 ITS-rDNA 扩增及序列分析 取少量新鲜菌体, 按照日本 Bioflux 公司的真菌 DNA 提取试剂盒的方法进行真菌基因组 DNA 的提取。以获得的 DNA 为模板, 采用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对真菌的核糖体转录间隔区 ITS 进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系 (50 μL): 模板 DNA 2 μL; 10 × PCR 缓冲液 5 μL, dNTPs 5 μL, 上下游引物 (10 pmol/μL) 各 1.8 μL, Taq 聚合酶 2 μL, 无菌超纯水 32.4 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环后, 72 °C 延伸补齐 10 min, 最后冷却至 16 °C。获得的产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送至广州华大基因公司测序。

构建系统发育树: 测序结果提交到 GenBank 数据库并获得登录号, 应用 Blast 对所测系列进行系列相似性比对, 获得相关种属的 ITS 序列, 使用 ClustalX 软件进行多序列比对, 使用 MEGA6 软件的 N-J 法构建系统发育树的, 进化距离的计算按照 Kimura2-parameter 方法进行, 可靠性通过 1 000 次 Bootstrap 计算得出。

1.2.4 种群多样性分析 以同源性大于 97% 的菌种定义为同一分类单元, 以 Shannon-wiener 指数 (H) 和 Pielou 均匀度指数 (E) 作为计算多样性的标准。

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

$$E = H/H_{\max}$$

其中, $P_i = N_i/N$, H 为实际求得的物种多样性指数, P_i 是第 i 种的多度比例, N_i 是每一个属中的菌株数, N 是每个样品中菌株总数; H_{\max} 为最大的物种多样性指数, $H_{\max} = \ln S$, S 为群落中的总物种数。

2 结果与讨论

2.1 长棘海星共附生真菌的分子鉴定

2.1.1 ITS 序列分析 利用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 分别对 16 株长棘海星共附生真菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得长度 500 ~ 600 bp 的单一片段, 扩增结果的电泳图 (见图 1)。对 PCR 产物进行测序, 获得的 ITS 序列提交 GenBank 数据库, 登录号为 KF999808-KF999822 以及 KJ723458。测序结果显示, 所有菌种都有完整的核糖体内转录间隔

区序列 (ITS1 和 ITS2) 和 5.8S, 及部分 18S rRNA 和 28S rRNA 基因序列。用 ClustalX 软件对 16 株真菌的 ITS 序列进行比对分析, 发现 5.8S 基因序列高度保守, 而核糖体内转录间隔区序列 (ITS1 和 ITS2) 则具有显著的多态性。ITS 序列长度范围在 440 ~ 530 bp, (G + C)% 含量在 51% ~ 61% 之间, 差异较大 (见表 1)。其中 F46-1 的 (G + C)% 含量约 52%, 与 F1-2、F2-3、F16-1 等 8 个菌株的 (G + C)% 含量较为相似, 但序列长度 525 bp, 明显大于后者, 表明了 F46-1 与其他菌株是不同。F1-1 与 F4-1A 的 (G + C)% 含量约 56%, 可能是一类; 而 F7-1C、F7-1B 和 F27-1 的 (G + C)% 含量高达 58% 以上, 明显与其他菌株不同。

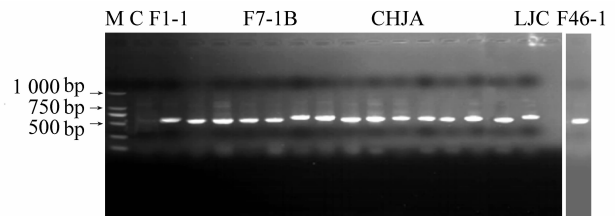


图 1 长棘海星 16 株共附生真菌的 ITS 扩增产物电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of ITS amplified products of isolates from *Acanthaster planci* 泳道编号为菌株编号, M 代表 Marker, C 为空白对照

表 1 长棘海星共附生真菌 ITS 片段序列 (G + C)% 含量
Table 1 The (G + C)% content of ITS fragments from the fungi associated with *Acanthaster planci*

菌株编号	ITS 长度/bp	(G + C) /%
F1-1	505	56
F1-2	463	52
F2-3	454	53
F4-1A	511	56
F7-1B	445	58
F7-1C	461	61
F10-3	480	55
F16-1	453	52
F27-1	506	60
CHJA	462	53
CHJB	460	52
CHJ1F	464	52
CHJ2	459	53
CHJ3	444	51
LJC	462	52
F46-1	525	52

2.1.2 16 株长棘海星共附生真菌的系统学分析 将获得的 16 株真菌的 ITS 序列通过 Blast 与数据库

已有序列进行比对, 均能获得相似度大于 99% 的匹配序列 (见表 2)。

表 2 长棘海星 16 株共附生真菌 ITS 序列及其最相似菌序列信息

Table 2 Phylogenetic information of ITS of 16 isolates from *Acanthaster planci*

菌株编号	登录号	序列同源性最相似种属及	Score	Cover/%	Similarity/%
F1 - 1	KF999808	<i>Trichoderma erinaceum</i>	1 007	98	100
F1 - 2	KF999809	<i>Fusarium fujikuroi</i>	933	98	99
F2 - 3	KF999810	<i>Fusarium proliferatum</i>	933	98	100
F4 - 1A	KF999811	<i>Trichoderma atroviride</i>	1 020	99	99
F7 - 1B	KF999812	<i>Leptosphaerulina</i> sp.	909	98	99
F7 - 1C	KF999813	<i>Penicillium citrinum</i>	928	98	99
F10 - 3	KF999814	<i>Fusarium solani</i>	972	98	99
F16 - 1	KF999815	<i>Fusarium</i> sp.	929	99	100
F27 - 1	KF999816	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	998	96	99
CHJA	KF999817	<i>Fusarium</i> sp.	928	96	99
CHJB	KF999818	<i>Fusarium</i> sp.	937	98	100
CHJ1F	KF999819	<i>Fusarium</i> sp.	929	97	100
CHJ2	KF999820	<i>Fusarium</i> sp.	950	99	99
CHJ3	KF999821	<i>Fusarium clamydosporum</i>	922	98	99
LJC	KF999822	<i>Fusarium</i> sp.	941	100	99
F46 - 1	KJ723458	<i>Pseudallescheria boydii</i>	1 081	99	99

选取同源性较高的模式菌序列用 ClustalX 软件进行多序列比对, 运用 MEGA6 以邻接法聚类构建

系统发育树, 外群取 *Mucor racemosus* f. *sphaerosporus* (AJ878775) (见图 2)。

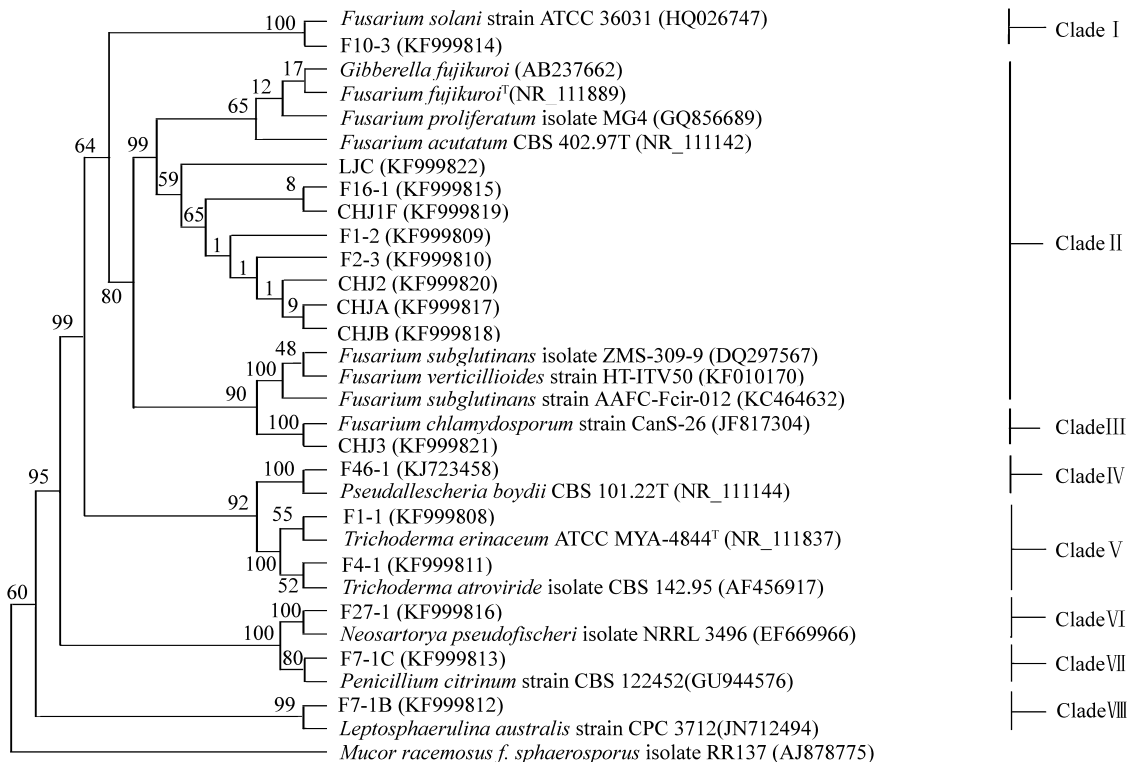


图 2 基于 N-J 邻接法构建的 16 株长棘海星共附生真菌 ITS 系统发育树, 重复 1 000 次

Fig. 2 Phylogeny illustrating species relationships inferred from neighbor-joining analysis of the ITS gene. Each number indicates the percentage of bootstrap samplings, derived from 1 000 samples, supporting the internal branches of 50% or higher.

图 2 所示是 16 株长棘海星共附生真菌的系统发育树, 分支上为 Bootstrap 重复 1 000 次大于 50% 的支持率。结果可以看出, 16 株真菌可以归为 8 类。F7-1B、F7-1C、F27-1、F46-1、CHJ3、F10-3 分别与 *Leptosphaerulina* sp.、*Neosartorya pseudofischeri*、*Penicillium citrinum*、*Pseudallescheria boydii*、*Fusarium clamydosporum*、*Fusarium solani* 的支持率都达到 80% 以上 (其中 F27-1、F46-1、CHJ3、F10-3 的支持率更是达到了 100%), 且分别自成一类, 进而确定其种属。而 F4-1A 和 F1-1 聚为一类, 与 AF456917 和 NR_111837 的支持率分别为 52% 和 55% (均 > 50%), 初步认为这两株菌分别是 *Trichoderma atroviride* 和 *Trichoderma erinaceum*。剩下的 8 株真菌从进化树上看, 亲缘关系非常接近, 与 *Fusarium fujikuroi* species complex 聚成一个大类, 但无法与已知菌株得到有力的支持, 只能鉴定为 *Fusarium* 属而无法鉴定到种, 需要借助其他方法进一步确定。这表明 ITS 序列对 *Fusarium fujikuroi* species complex 不能进行很好的区分。

相似列来源于 GenBank, CBS: 荷兰真菌菌种保藏中心; NRRL: 美国农业部北方利用研究开发部; T: 典型菌株。

Clade I : *Fusarium solani* species complex;

Clade II : *Fusarium fujikuroi* species complex;

Clade III : *Fusarium chlamydosporum* species complex;

Clade IV : *Pseudallescheria*;

Clade V : *Trichoderma*;

Clade VI : *Neosartorya*;

Clade VII : *Penicillium*;

Clade VIII : *Leptosphaerulina*;

2.2 长棘海星共附生真菌的种群多样性分析

根据 ITS 序列及系统学分析结果, 可知长棘海星共附生真菌主要集中在 Ascomycota 门的 4 目 (Hypocreales、Eurotiales、Pleosporales、Microascales), 5 属 (*Trichoderma*、*Penicillium*、*Neosartorya*、*Leptosphaerulina*、*Pseudallescheria*), 以及 Deuteromycota 门的 1 目 (Meliolales), 1 属 (*Fusarium*, 有性型为 *Gibberella*)。其中, *Fusarium* 是长棘海星共附生真菌的优势种群 (10 株), 属于 *Fusarium fujikuroi* species complex。

长棘海星共附生真菌多样性指数为 1.247, 均匀度指数为 0.450, 由此可见, 长棘海星样品上菌株种类较少, 而且菌体的个体数在镰刀属上表现为高度富集, 均匀度比较低。

3 结 论

基于 ITS-rDNA 的多态性的序列分析可获得相对足够的信息进行生物亲缘关系的研究, 广泛应用于真菌的属种间及部分种内水平的系统学研究^[7-9]。但对于 ITS 区差异小的菌株如某属种的复合体, ITS 就不适合属内种的鉴定, 此时必须结合形态学和生理生化特征, 或进行多态位点基因序列的分析。

本文从南海三亚珊瑚礁保护区的长棘海星样品中分离纯化得到近 200 株共附生真菌, 并对 16 株进行鉴定, 但所选的 ITS-rDNA 片段不能很好区分其中的 8 株镰刀属, 它们均属于复合种 *Fusarium fujikuroi* species complex (GFC)。GFC 是由至少 10 个不同的交配群组成, 种内形态特征非常相似, 采用传统的形态学分类方法难以区分^[10]。Ma 等^[11]发现利用 TEF-1 基因片段可将 *F. fujikuroi*、*F. veticillioides* 和 *F. proliferatum* 很好地区分开来, 而且重复性好。因此, TEF-1 基因可用于 GFC 复合种内的分子生物学鉴定^[12]。

基于 ITS 序列分析的海洋生物共附生真菌的分子鉴定方法表明长棘海星是微生物群落多样性丰富的宿主。对长棘海星进行深入的共附生真菌研究, 尤其是天然产物分子多样性的研究具有潜在而重要的药物开发价值和生态意义。

参考文献:

- [1] SHIOMI K, YAMAMOTO S, YAMANAKA H, et al. Liver damage by the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) lethal factor [J]. *Toxicon*, 1990, 28(5):469-475.
- [2] SHIROMA N, NOGUCHI K, MATSUZAKI T, et al. Haemodynamic and haematologic effects of *Acanthaster planci* venom in dogs [J]. *Toxicon*, 1994, 32(10):1217-1225.
- [3] SUENAGA K. Bioorganic studies on marine natural products with bioactivity, such as antitumor activity and feeding attractance [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 2004, 77:443-451.
- [4] 李厚金, 李淑青, 王丰, 等. 长棘海星的体内脂肪酸成分及其生物学意义分析 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(5):55-60.
- [5] LAN W J, ZHAO Y, XIE Z L, et al. Novel Sorbicillin Analogues from the Marine Fungus *Trichoderma* sp. Associated with the Seastar *Acanthaster planci* [J]. *Natural Product Communications*, 2012, 7(10):1337-1340.

- [8] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1994.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2000.
- [10] 陆欣. 土壤肥料学 [M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [11] NAEEM S, HAKANSSON K, LAWTON J H, et al. Biodiversity and plant productivity in a model assemblage of plant species [J]. *Oikos*, 1996, 76: 259 - 264.
- [12] OVIINGTON J D. The volatile matter, organic carbon and nitrogen contents of tree species grown in close stands [J]. *New Phytologist*, 1957, 56: 1 - 11.
- [13] PETERSEN R C. The Chemical composition of wood. The chemistry of solid wood [M]// ROWELL R M, ed. *Advances in chemistry; Series 207*. Washington D C: American Chemical Society,1984.
- [14] SCHLESINGER W H. Biogeochemistry: An analysis of global change [M]. San Diego, CA: Academic Press, 1997.
- [15] LINDSAY E A, FRENCH K. *Chrysanthemoides monilifera* ssp. *rotundata* invasion alters decomposition rates in coastal areas of south-eastern [J]. *Australia Forest Ecology and Management*, 2004, 198: 387 - 399.
- [16] ROWE D B. Green roofs as a means of pollution abatement [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 159: 2100 - 2110.
- [17] VITOUSEK P M, HOWARTH R W. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur [J]. *Biogeochemistry*, 1991, 13: 87 - 115.
- [18] 高伟平,熊雪,周禾. 草坪生态系统中碳汇与碳源的研究进展 [J]. *草业科学*,2012, 29: 717 - 723.
- [19] FLL. Guidelines for the planning, construction and maintenance of green roofing,2008 [C]// *Landscape, research, development and construction society. Forschungsgesellschaft Landschaftsentwicklung Landschaftsbau e. V. Bonn*;2008.
- [20] DUNNETT N P, KINGSBURY N. Planting green roofs and living walls [M]. Portland, USA: Timber Press, 2004.
- [21] DURHMAN A K, ROWE D B, RUGH C L. Effect of substrate depth on initial coverage, and survival of 25 succulent green roof plant taxa [J]. *Hort Science*, 2007, 42: 588 - 595.
- [22] GETTER K L, ROWE D B. Media depth influences sedum green roof establishment [J]. *Urban Ecosystem*, 2008, 11: 361 - 372.
- [23] HUNT W F, HATHAWAY A M, SMITH J T, et al. Choosing the right green roof media for water quality [C]// *Greening Rooftops for Sustainable Communities; Proceedings of the 4th North American Green Roof Conference*. Boston, USA: 2006.
- [24] ROWE D B, MONTERUSSO M A, RUGH C L. Assessment of heatexpanded slate and fertility requirements in green roof substrates [J]. *Hort Technology*, 2006, 16: 471 - 477.

(上接第 88 页)

- [6] ZHAO Y, LI S Q, LI H J, et al. Lanotane triterpenoids from the fungus *Ceriporia lacerate* associated with *Acanthaster planci* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2013, 49 (4): 653 - 656.
- [7] IWEN P C, HINRICHS S H, RUPP M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens [J]. *Medical Mycology*, 2002, 40 (1): 87 - 109.
- [8] 赵国柱,张天宇,张猛. 核糖体基因簇在真菌系统学研究中的意义 [J]. *生命的化学*, 2002, 22 (1): 13 - 15.
- [9] CARMELA B, TERESA F E, AMPARO Q, et al. An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon [J]. *Yeast*, 2002, 19 (3): 257 - 268.
- [10] HENG M H, SALLEH B, ZAKARIA L. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from rice, sugarcane and maize from *Peninsular Malaysia* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12 (10): 6722 - 6732.
- [11] 马晓伟,邢春杰,于金凤,等. 水稻恶苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) β -微管蛋白基因克隆及与多菌灵抗药性关系 [J]. *微生物学报*, 2012, 52 (5): 581 - 587.
- [12] GEISER D M, JIMENEZ-GASCO M D, KANG S C, et al. FUSARIUM-ID v. 1. 0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110 (5): 473 - 479.