

链格孢菌菌株致病性及其遗传差异性*

常纓 王义权¹ 强胜**

(南京农业大学杂草研究室 南京 210095)

(¹厦门大学生物系 福建厦门 361005)

摘要 对分离自紫茎泽兰的 19 个链格孢菌菌株的致病性进行了比较研究,并对这 19 个菌株和其它来源的 3 个菌株的 5.8S rDNA 及其两侧的 ITS1 区和 ITS2 区进行了序列分析.结果显示,链格孢菌菌株的致病性差异明显;21 株链格孢菌菌株在 5.8S rDNA 及其两侧的转录间区(ITS 区)的序列无差异,而与百日草链格孢菌(*Alternaria zinniae*)的序列差异显著,表明 21 株链格孢菌菌株属种内变异.采用 AFLP 分子标记技术对 21 株链格孢菌的 DNA 扩增片段长度多态性进行了分析,结果表明,链格孢菌自然变异群体内存在很高的遗传多样性.链格孢菌菌株的相似性与菌株的地理来源有一定的相关性,但基于 AFLP 标记划分的 AFLP 类群与基于寄主病情指数划分的致病力类群间关系不相一致;起始菌株与变异菌株相似性显著,但二者和致病性的关系不显著.图 2 表 1 参 18

关键词 链格孢菌; ITS 区; 5.8S rDNA; AFLP

CLC Q939.103:Q75

PATHOGENICITY AND GENETIC DIVERSITY OF ALTERNARIA ALTERNATA STRAINS*

CHANG Ying, WANG Yiquan¹ & QIANG Sheng**

(Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(¹Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract The pathogenicity of 19 strains of *Alternaria alternata* isolated from *Eupatorium adenophorum* was studied. 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 sequences of 22 strains from crofton weed and other plants were analyzed. The results showed that there were differences in their pathogenicity to crofton weed. The sequence analysis showed that there was no difference among 21 strains in 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 sequences, respectively, but the significant difference occurred between all the 21 *A. alternata* strains and *A. zinniae*. This indicated that the variance of all the 21 different strains of *A. alternata* was interspecific. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) were first used to analyze the DNA diversity of the 21 *A. alternata* strains. The result showed that there was a very high genetic diversity among natural and variable populations. There were some correlations between genetic similarity and geographical sources of *A. alternata*. The groups classified based on AFLP patterns were not associated with pathogenicity. Ancestry strains had high similarity with their original ones on genetics, but not on pathogenicity. Fig 2, Tab 1, Ref 18

Keywords *Alternaria alternata*; ITS sequence; 5.8S rDNA; AFLP

CLC Q939.103:Q75

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Spreng.)是我国目前最具入侵性的外来恶性杂草^[1].强胜等在研究紫茎泽兰病害并企图寻求控制该草的真菌除草剂候选菌株的过程中,分离获得了自然致病的链格孢菌(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler);其研究表明,该菌具有开发为生物源除草剂的潜力^[2-3],致病机理是产生一种新的高毒性毒素^[4],且不同变异菌株的致病性和产毒能力存在较大差异^[5-6].为进一步揭示各

菌株在致病性和产毒能力之间的关系,还需要对该链格孢菌的遗传差异进行深入探讨.

AFLP 技术以其稳定性好、获得的信息量大的特点,被广泛用于研究动、植物和微生物的遗传特性^[7].但至今未见利用 AFLP 研究链格孢菌的报道.本文对 21 株链格孢菌菌株进行了 ITS 序列分析,首次报告了对分离自中国及澳大利亚的 21 株链格孢菌菌株 DNA 用 AFLP 分析的结果.

1 材料和方法

1.1 供试菌株

供试菌株为 21 株链格孢菌(*A. alternata*)菌株及百日草链格孢菌(*A. zinniae*),其来源及致病力比较详见表 1.

1.2 菌丝培养

从 PDA 平板上培养 3 d 的菌落边缘取 10 mm × 10 mm 的

收稿日期:2004-04-12 接受日期:2004-05-17

*国家“863”项目(2001AA246012),国家自然科学基金(N030170619),国家基础研究专项(“973”项目,2002CB111402)和江苏省自然科学基金(BK2001066),江苏省博士后基金 8590 课题资助. Supported by the State Basic Research and Development Plan (“863”, “973”), the National Natural Science Foundation of China and Jiangsu Natural Science Foundation

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wrl@njau.edu.cn)

菌丝块,转入 80 mL 的 PSK 液体培养基中,25 °C 条件下摇床 110 r/min 震荡培养 6 d,4 层纱布过滤菌丝体后,用无菌水洗 2 次,再用灭菌的生理盐水洗 2 次,用灭菌的吸水纸吸去水分,-20 °C 冰箱保存备用。

1.3 DNA 的提取

采用 CTAB 法,用 9023 型荧光检测仪测 DNA 浓度^[8]。

1.4 ITS 分析

表 1 链格孢菌 21 个菌株及百日草链格孢菌 (AZ) 材料来源及在理查培养基上的无菌滤液对紫茎泽兰致病力的比较

Table 1 Sources and pathogenicity comparison of 21 *A. alternata* strains and *A. zinniae* (AZ) by sterile culture filtrate in Richard medium

代号 Code	菌株 Strains	来源 Sources	寄主 Host	病斑直径 Spot diameter (d/mm)	标准误 Std	显著水平 Significance level (P < 0.05)	显著水平 Significance level (P < 0.01)
T	AZ	Sydney, Australia	<i>A. zinniae</i>	4.08	0.138261	a	A
P	NEW	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	3.4825	0.247388	a	A
A	X501	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	3.458	0.110236	a	A
B	A501	Originated from 501	<i>E. adenophorum</i>	3.3705	0.397688	a	A
M	X402	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	3.318	0.143229	a	A
C	501	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	1.9705	0.096573	b	B
J	Y503	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	1.785	0.164264	bc	B
V	AUE	Nanjing, Jiangsu, China	<i>Veronica persica</i>	1.75	0.080017	c	B
L	402	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	1.155	0.110532	d	C
I	501-J	From 501	<i>E. adenophorum</i>	1.106	0.041215	d	C
G	501-4	From 501	<i>E. adenophorum</i>	1.0815	0.06702	d	C
K	Qs-503	From 501	<i>E. adenophorum</i>	1.0535	0.112799	d	C
D	501-1	From 501	<i>E. adenophorum</i>	1.008	0.151217	d	CD
U	AD1	Nanjing, Jiangsu, China	<i>Digitaria sanguinalis</i>	0.98	0.108444	d	CD
R	B	From 501	<i>E. adenophorum</i>	0.98	0.152079	d	CD
Q	LS	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	0.9485	0.086585	d	CD
E	501-2	From 501	<i>E. adenophorum</i>	0.756	0.088544	e	DE
O	AW	Sydney, Australia	<i>E. adenophorum</i>	0.637	0.072746	ef	E
F	501-3	From 501	<i>E. adenophorum</i>	0.616	0.122583	ef	E
S	QZ-101	Nanjing, Jiangsu, China	<i>E. adenophorum</i>	0.5495	0.054071	ef	EF
N	YN	Kunming, Yunnan, China	<i>E. adenophorum</i>	0.4865	0.076147	fg	EF
H	501-5	From 501	<i>E. adenophorum</i>	0.3255	0.017616	gh	FG

1.4.1 PCR 扩增 选用 30 μL 体系,包括:10 ×PCR 缓冲液 3 μL, Mg²⁺ 2 mmol/L, 引物各 1 μmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, DNA 20~50 ng, Taq Plus DNA 聚合酶 2U。5' - 端引物 ITS1 序列为: 5' - CgTAACAAggTTTCcGTAggTgAAC - 3'; 3' - 端引物 ITS2 序列为: 5' - TTA TTgA TATgCTTAAACTCAgCggg - 3'。PCR 扩增程序为:首先 95 °C 变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶, TBE 为电泳缓冲液, 5 V/cm 电压, 上样 3 μL 电泳检测。

1.4.2 DNA 序列测定 各菌株的 PCR 纯化产物直接送到上海联合基因生物有限公司,用 PE 公司生产的 377 型 DNA 测序仪进行序列测定。

1.5 AFLP 分析

1.5.1 人工接头与引物由上海生工合成 用于 AFLP 的引物和接头 (AFLP primers and adapter) 如下:

- PstI adapter: 5' - GACGTGACGGCCGTCA TGCA - 3'
- Ada - P - 2: 5' - TGACGGCCGTACAG - 3'
- TaqI adapter: 5' - GACGA TGA GTCCTGAG - 3'
- Ada - T - 2: 5' - CGCTCAGGACTCAT - 3'
- PP: 5' - GACGGCCGTCA TGCA GA - 3'
- PT: 5' - GATGAGTCCTGAGCAA - 3'
- P1: 5' - GACGGCCGTCA TGCA GAAT - 3'
- P2: 5' - GACGGCCGTCA TGCA GAAG - 3'
- P3: 5' - GACGGCCGTCA TGCA GAAC - 3'
- T1: 5' - GATGAGTCCTGAGCAAAT - 3'
- T2: 5' - GATGAGTCCTGAGCAAAC - 3'

T3: 5' - GATGAGTCCTGAGCAAACA - 3'

1.5.2 酶切连接 将菌丝基因组 DNA 用限制性内切酶 Taq 于 65 °C 消化 2 h 在 20 μL 反应体系中含有: 100 ng 菌丝 DNA; 5U Taq ; 25 mmol/L Tris - Acetate (pH 7.8); 100 mmol/L KAc; 10 mmol/L MgAc₂; 1 mmol/L DTT 然后在反应体系中加入 5U Pst ,并于 37 °C 消化 2 h 取 5 μL 上述溶液并向其加入 4 μL 混合液,混合液含 0.5U T₃ DNA 连接酶; 2 pmol Pst adapter; 5 pmol Taq adapter; 250 mmol/L Tris - HCl (pH 7.6); 50 mmol/L MgCl₂; 50 mmol/L NaCl; 50 mmol/L ATP; 50 mmol/L DTT; 25% PEG; 再用 ddH₂O 补足体积至 20 μL, 于 25 °C 连接 2 h

1.5.3 酶切片段的扩增 首先对 AFLP 模板进行预扩增以选择出部分酶切片段, 10 μL 反应体系 [2.5 ng 模板 DNA; 55 ng Primer - Pst - 1; 55 ng Primer - Taq - 1; 0.2 U Taq 酶; 各 0.2 mmol/L dNTP; 1.5 mmol/L MgCl₂; 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris - HCl (pH 9.0); 0.1% Triton ×100], 扩增反应条件: 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 20 个循环后 72 °C 延伸 7 min PCR 反应结束后, 取稀释后的预扩增反应产物作为第二次选择性扩增的模板, 10 μL 反应体系 (1 μL 稀释后的预扩增反应产物; 30 ng Primer - Pst - 2; 15 ng Primer - Taq - 2; 0.2 U Taq 酶; 各 0.2 mmol/L dNTP; 1.5 mmol/L MgCl₂; 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris - HCl (pH 9.0); 0.1% Triton ×100) 扩增反应条件: 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 第一个循环采用 65 °C 退火, 接下来的 13 个循环每个循环退火温度降低 0.7 °C, 第 14 到第 36 个循环为 56

退火,36个循环后延伸 7 min 第二次扩增反应结束后,在扩增产物中加入等体积的甲酰胺 [98% 甲酰胺; 10 mmol/L EDTA (pH 8.0); 0.05% 溴酚兰; 0.05% 二甲苯青], 4 保存. 扩增反应在 Gene公司 PT200上完成.

1.5.4 扩增产物的凝胶电泳分析 将 PCR 产物 90 变性 3 min后于变性聚丙烯酰胺凝胶上. 凝胶基质的成分为: 8% 丙烯酰胺凝胶; 0.3% N, N - 亚甲丙烯酰胺; 7.2 mol/L 尿素; 50 mmol/L Tris/50 mmol/L 硼酸 /1 mmol/L EDTA. 在每 100 mL 凝胶基质中加入 0.8 mL 10% 过硫酸胺、63 μL TEMED并灌注于 38 cm ×50 cm电泳槽内 (BioRad Sequi - Gen GT Sequencing Cell),以 1 ×TBE为电泳缓冲液、50 、恒功 80 W 电泳 3 h 20 min 电泳结束后凝胶在固定 终止液 (10% 冰醋酸)中固定 1 h,用双蒸水清洗 3次,每次 2 min;将凝胶放入染色液 (1 g/L AgNO₃; 0.056% HCOH)中轻轻摇动 30 min;清水清洗凝胶 5 s;将凝胶浸入显色液 (30 g/L Na₂CO₃; 0.056% HCOH; 2 mg/L Na₂O₃)中,轻轻摇动,约 3 min后出现谱带;待凝胶完全显色后,倒入固定 终止液终止反应,双蒸水浸洗凝胶两次后,使其自然干燥,便可得到清晰可见的电泳带谱. 各菌株的 AFLP谱用惠普扫描仪扫描.

2 结果分析

2.1 供试材料的 ITS分析

对 21株链格孢菌菌株及百日草链格孢菌进行 PCR 扩增,均扩增出目的片段,测序得到两个不同的序列,即 21株链格孢菌菌株均为相同序列,GenBank登录号为: AY445812;百日草链格孢菌 GenBank登录号为: AY445813.

虽然供试的 21株链格孢菌菌株致病性存在差异 (表 1),但通过 ITS分析,各菌株在 5.8S rDNA 及其两侧的转录间区 (ITS区)的序列无差异. 链格孢菌与百日草链格孢菌的序列差异显著.

2.2 供试材料的 AFLP分析

对供试材料进行 AFLP分析,共扩增出 468条带,差异带为 37条,不同引物的指纹图谱显示出不同程度的差异,所有谱带集中在 1 000 ~ 100 bp之间,表现出链格孢菌各菌株遗传差异的稳定性.

通过 UPGMA 作图,得到供试菌株亲源关系聚类图 (图 1). 可以看到,亲源关系最远的一组聚类,即百日草链格孢菌 (T菌株)与链格孢菌各菌株的相似系数仅为 0.126,这与上述 ITS数据分析结果相一致.

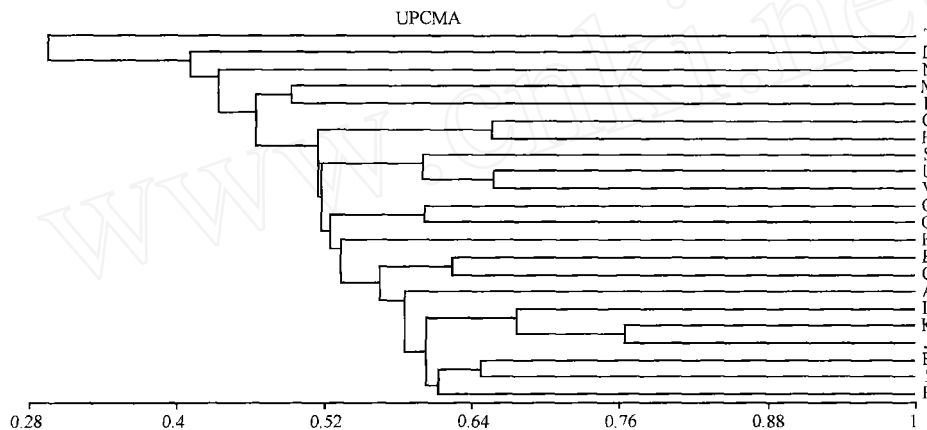


图 1 链格孢菌株与百日草链格孢菌株 AFLP指纹图谱数值分析树状图

Fig 1 UPGMA dendrogram of 21 *A. alternata* strains and *A. zinniae* using AFLP fingerprints

A: X501; B: A501; C: 501; D: 501 - 1; E: 501 - 2; F: 501 - 3; G: 501 - 4; H: 501 - 5; I: 501 - J; J: Y503; K: QS503; L: 402; M: X402; N: YN; O: Aw; P: NEW; Q: LS; R: B; S: QZ101; T: 百日草 (AZ); U: AD; V: AUE

2.3 AFLP多态性与菌系地理来源和致病性的关系

对基于 AFLP多态性而确定的链格孢菌株类群 (图 1)与菌株地理来源 (表 1)关系的考查和分析表明,聚类关系较近的菌株,地理来源也较为接近. F、I、E、J、K、L、A、C、B、R、O、Q各菌株均来自澳大利亚悉尼, V、U与 S菌株的宿主与其它菌株不同,但均来源于南京,相同地理来源的菌株均表现出较近的亲缘关系; N菌株取自云南,因而在聚类中与其它菌株表现出较远的亲缘关系; D、M、P、G、H各菌株虽然起始于澳大利亚悉尼,但各菌株变异较大,在聚类图中表现出较远的亲缘关系. 可见菌株地理来源与其类别归属间也存在一定的相关性.

供试材料的致病力强、中、弱不同类型的 21个菌株 (表 1)中,分属不同的聚类群内,因此链格孢菌菌株 AFLP多态性与致病性在总体上具有不相关性.

2.4 起始菌株与变异菌株和致病性的关系

从表 1可以看出,分离自澳大利亚的链格孢菌 501在继代

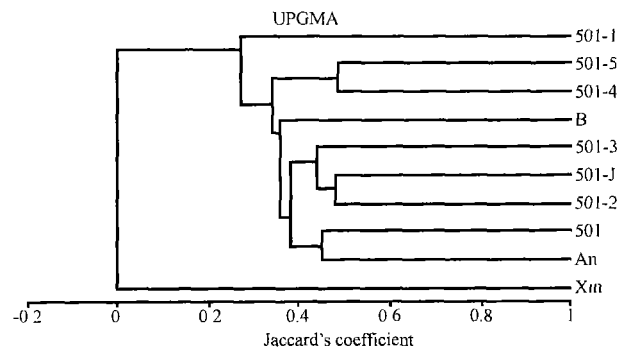


图 2 链格孢菌 501菌系 AFLP指纹图谱数值分析树状图

Fig 2 UPGMA dendrogram of *A. alternata* strains from strain 501 using AFLP fingerprints

培养中存在自然变异,在致病性上形成了差异菌株. 通过 AFLP分析与 UPGMA作图,得到了 501各变异菌株亲源关系聚类图 (图 2). 图 2显示出各菌株均为新 501 (直接来自澳大利亚 501)菌株

的变异,各菌株间差异显著,其中 501 - 1、B 变异较大。在相似系数为 0.4 处,可以分成 3 个聚类群,即:501 - 4、501 - 5 为一聚类群,该组菌株的致病性为中和弱;501 - 2、501 - 3、501 - J 为一聚类群,但该组菌株的致病性却分别为弱、弱、中;501 与 A501 为一聚类群,该组菌株的致病性均为强。可见,通过 AFLP 分析可以把变异菌株与其起始菌株区别开来,但起始菌株与变异菌株和致病性的关系不显著。

3 讨论

由于 rRNA 的结构与功能十分保守,被称为生物体内的“活化石”^[9],因此 rRNA 的基因 - rDNA 的结构已被广泛研究。在 rDNA 中,ITS 区的进化速率较快,可以提供较丰富的变异位点和信息位点^[10],被广泛用于研究科内、属内种间及居群间的分子系统演化关系及物种鉴别^[11-14]。王洪凯^[15]对 *Alternaria* sp. ITS 和 5.8S rDNA 的测序分析表明,rDNA 的 ITS 区基因序列可以作为链格孢菌属内种间鉴别依据。我们通过对 21 株链格孢菌菌株的 ITS 区基因序列分析表明:链格孢菌各菌株具有稳定的遗传特性,其致病性的差异可确定为种内变异。

限于条件,人们在传统的分类当中只能选取少数有差异的性状作为分类的依据,但还有一些差异是表型不可见的,或者无法为常规的分析方法所检测,因而很难做到全面分析差异性。同时表型可见的差异中有些又是依赖环境的,用其作为分类依据不够客观。而在 AFLP 分析当中,不同的扩增片段对应着基因组上的不同位点,不同样品 AFLP 带型的差异反映了 DNA 水平上酶切位点分布的差异^[16]。因此可以将每一扩增片段看作其基因组的一个特征,并且这种特征数目众多,不受环境条件的影响,非常稳定可靠。AFLP 技术因此也成为研究遗传多样性的有利工具。

本试验首次将 AFLP 技术引入链格孢菌株遗传多样性的研究。由链格孢菌的 AFLP 图谱(图 1)可以看出,链格孢菌的 AFLP 有很高的多态性,这充分反映了链格孢菌自然变异的群体内存在着较高的遗传多样性。在链格孢菌的遗传多样性研究中,以前曾采用过 RFLP 和 RAPD 的方法^[17],但 RFLP 技术复杂,RAPD 结果重现性差。

本研究还表明:链格孢菌菌株的相似性与菌株的地理来源有一定的相关性,但基于 AFLP 标记划分的 AFLP 类群与基于寄主病情指数划分的致病力类群间关系不大一致。强胜等用 5 个引物对澳大利亚 5 个链格孢菌起始菌株的 RAPD 分析中亦得出类似的结果^[6]。在其它作物病原菌上也有不少 DNA 多态性与毒性多态性之间不存在显著相关性的报道^[18]。出现这种结果的原因,其一可能是所用引物数目相对较少,揭示的可用于区分菌株的多态性不丰富;其二,从进化的角度来看,致病性应该是病原菌生存而进化保留的重要性状,因而决定致病性的基因可能较多;其三,所用菌株材料均仅根据致病力的不同而选定,忽视其它遗传差异的存在,加之选用菌株数目较多,干扰了分析结果。因此,为了寻找与致病性基因紧密连锁的分子标记,在研究策略上,应首先建立类似于植物近等基因系的材料,然后选用数目不宜过多的仅在致病力方面存在差异,而在其它方面遗传差异相对较小的成对菌株,用不同引物进行 RAPD 扩增或用其它分子标记方法鉴定,或者直接采用突变体策略。

References

- 1 Qiang S (强胜). The history and status of the study on crofton weed (*Eupatorium adenophorum* Spreng) — a worst worldwide weed *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1998, 16 (4): 366 ~ 372
- 2 Qiang S, Summerell BA. Pathogenicity of *Alternaria alternata* on crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). The Proc of 17th Asian - Pacific Weed Sci Soc Conf Bangkok: Thailand Plant Protection Society, 1999. 556 ~ 561
- 3 Qiang S, Summerell BA, Li YH. Evaluation of mycelium virulence of *Alternaria alternata* to *Eupatorium adenophorum*. The Proc of Asian - Pacific Weed Sci Soc Conf Beijing: The Standard Press, 2001. 105 ~ 112
- 4 An CF (安传福). On mass - production, isolation, purification and preliminary structure identification of *Alternaria alternata* phytoalexin and its application as a potential microbial - product herbicide: [A Thesis for Master Degree (硕士学位论文)]. Nanjing (南京): Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2003
- 5 Wan ZX (万佐玺), Zhu JJ (朱晶晶), Qiang S (强胜). The pathogenic mechanism of toxin of *Alternaria alternata* (Fr) Keissler to *Eupatorium adenophorum* Spreng *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2001, 10 (3): 47 ~ 50
- 6 Qiang S (强胜), Chang Y (常纓), Wan ZX, Li YH (李扬汉). Comparison on pathogenicity and other characteristics of five isolates of *Alternaria alternata* from *Eupatorium adenophorum*. *J Nanjing Agri Univ* (南京农业大学学报), 2002, 25 (4): 23 ~ 27
- 7 Chen Q (陈强), Zhang XP (张小平), Li DY (李登煜), Terfelew Z, Lindström K. Genetic aspects of peanut cultivars in China revealed by AFLP analysis *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, 9 (2): 177 ~ 121
- 8 Cheng D (程度), Huang XY (黄翔宇), Li BJ (李宝健). A method for preparation of high quality genomic DNA from medicinal fungi and construction of a genomic library *Mycosystema* (菌物系统), 2002, 21 (1): 137 ~ 139
- 9 Douzery EJP, Pridgeon AM, et al. Molecular phylogenetics of Disease (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequence *Am J Bot*, 1999, 86 (6): 887 ~ 899
- 10 Andreasen K, Baldwin BG. Unequal evolutionary rates between annual and perennial lineages of checker mallows (*Sidaea*, Malvaceae): evidence from 18S - 26S rDNA internal and external transcribed spacers *Mol Biol Evol Zool*, 18: 936 ~ 944
- 11 Gu J, Hui DW, et al. Studies on rDNA ITS1 regions of soybean and its wild relatives *Acta Bot Sin*, 1994, 36: 759
- 12 Hui DW, Chen SY. Interspecific relationship of 12 species of glycine constructed by the gene of rRNA. *Sci Sin B*, 1997, 27 (4): 327 ~ 333
- 13 Wang JB, et al. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms *Acta Phytotaxon Sin*, 1999, 37 (4): 407 ~ 416
- 14 Zhao ZL, et al. Characters of rDNA ITS region sequences of fruits of *Alpinia galanga* and their adulterants *Planta Med*, 2001: 67 ~ 68
- 15 Wang HK (王洪凯), Zhang TY (张天宇), Zhang M (张猛). Application of sequencing of 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 on identification and classification of *Alternaria* at species level *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 24 (2): 168 ~ 173
- 16 He YQ (何月秋), Leung H, Zeigler RS, Tang WH (唐文华). AFLP analysis for variants of *magnaporthe grisea* *Mycosystema* (菌物系统), 2002, 21 (3): 363 ~ 369
- 17 Wang HK (王洪凯), Zhang TY (张天宇), Zhang M (张猛). Advances on taxonomic studies of the genus *Alternaria*. *J Shandong Agri Univ (Nat Sci)* (山东农业大学学报(自然科学版)), 2001, 32 (3): 406 ~ 410
- 18 Piao CG (朴春根), Tang WH (唐文华), Zeng SM (曾士迈), Meng AM (孟安明), Feng JD (冯继东). A study on lineage of Chinese races of yellow rust (*Puccinia striiformis* F. SP. *Tritici*) with RAPD analysis *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1996, 26 (3): 205 ~ 210