



## 研究报告

### A Letter

## ITS 鉴定真菌病原：一例司法鉴定研究实例

周倩<sup>1,3</sup>, 刘燕娟<sup>1,3</sup>, 陈俊如<sup>1</sup>, 夏花<sup>1</sup>, 高必达<sup>1,2,3</sup>

1 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙, 410128

2 植物疾病控制与利用湖南省高校重点实验室, 长沙, 410128

3 湖南农业大学司法鉴定中心, 长沙, 410128

✉ 通讯作者: bdgao@yahoo.com.cn ✉ 作者

基因组学与生物技术, 2012 年, 第 1 卷, 第 2 篇 doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0002

收稿日期: 2011 年 07 月 19 日

接受日期: 2012 年 05 月 16 日

发表日期: 2012 年 05 月 17 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》2012 年第 31 卷第 1 期上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

周倩等, 2012, ITS 鉴定真菌病原: 一例司法鉴定研究实例, 基因组学与生物技术(online) Vol.1 No.2 pp.9-13 (doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0002)

引用格式(英文):

Zhou et al., 2012, Identification of Fungus Pathogen by ITS Sequencing: A Judicial Case Study, Jiyinzuxue Yu Shengwujishu (online) Vol.1 No.2 pp.9-13 (doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0002)

**摘要** 本研究选择一例疑似空气污染物伤害松树的司法鉴定案作为研究实例, 在现场勘察、初步形态鉴定的基础上, 应用 ITS 序列分析鉴定了对疑似空气污染物伤害松树的病原做了分子鉴定。我们对委托鉴定的疑似空气污染物伤害松树的地及周边地区进行了勘察, 现场勘察结果并不支持空气污染物伤害松树的想法。为明确松树枯死的原因, 对取样病枝上的疑似病原物进行了显微镜观察和培养性状观察, 根据显微镜下孢子的形态和病原菌的培养性状, 初步判断导致马尾松枯死的病原可能为拟盘多毛孢属(*Pestalotipsis*)真菌。为进一步确定病原种类, 我们应用分子生物学技术对危害马尾松的病原物进行了 ITS 分子鉴定。测定了疑似真菌的 ITS 序列, 并进行了比对和系统发育分析。研究结果表明, 导致松树枯死的病原菌系韦司梅拟盘多毛孢(*Pestalotipsis vismiae*)。在本研究案例中, 利用真菌 ITS 序列的系统发育分析, 快速、准确的鉴定了真正导致松树枯死的病原, 为今后类似司法鉴定案件审理提供了证据鉴定的新手段。

**关键词** 松树; 真菌病原; *Pestalotipsis vismiae*; Internal transcribed spacer (ITS); 实例研究; 司法鉴定

## Identification of Fungus Pathogen by ITS Sequencing: A Judicial Case Study

Zhou Qian<sup>1</sup>, Liu Yanjuan<sup>1</sup>, Chen Junru<sup>1</sup>, Xia Hua<sup>1</sup>, Gao Bida<sup>1,2,3</sup>

1. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, P.R. China

2. Key Lab of Hunan Province University, Hunan, Agricultural University, Changsha, 410128, P.R. China

3. Judicial Expertise Center of Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, P.R. China

✉ Corresponding author, bdgao@yahoo.com.cn ✉ Authors

**Abstract** In this study we chose one judicial case of suspected injury to the pine by air pollutants as a case study, we made an on-site investigation and preliminary morphological identification prior to molecular identifying the pathogen that tentatively caused harm to the pine by air pollutants. The results seemed to be unsupported the charge of the injured pines by air pollutants based on the on-site survey in the pine field and the surrounding areas. In order to figure out reasons for the dead pine trees, we sampled the tentative disease pathogens from the branches of the pines to be observed under the microscope as well as to be incubated for observation of cultured characters. Based on the microscopic morphology of spores and cultured characters of the pathogens, we did preliminary determine the curse leading to dead pines that might be the *Pestalotipsis* fungus. To further confirm the pathogenic species, we employed the techniques of molecular biology, the ITS molecular identification, to determine the pathogen by sequencing, aligning and phylogenetic analyzing. The results showed that the pathogen resulting in dead pines should be the fungus *Pestalotipsis vismiae*. In this case study, we conducted the phylogenetic analysis of fungal ITS sequences to have rapidly and accurately identified the actual pathogen leading to dead pine trees, which would be the case to provide a new means for identification of forensic evidence in future.

**Keywords** Pine tree (*Pinus* spp); Fungus pathogen; *Pestalotipsis vismiae*; Internal transcribed spacer (ITS); Case study; Judicial identification



## 研究背景

真核生物编码核糖体 RNA 基因的 rDNA 是具有多个拷贝的简单重复序列, 每个重复序列包含 1 个跨越 18S、5.8S 和 28S rDNA 拷贝区的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS), 其中包括 5.8S RNA 基因。真核生物 ITS 区间的 DNA 序列具有很高的保守性, 已广泛用于种间、属间的分子系统学研究(蔡金娜等, 2000; Jeewon et al., 2003; Yuan et al., 2009), 也被广泛应用于生物的种间鉴别(Douzery et al., 1999)。本研究选择一例疑似空气污染物伤害松树的司法鉴定案作为研究实例。该实例是由湖南农业大学司法鉴定中心 2010 年 7 月受理的一个司法鉴定案。案例背景是: 湖南省永州市道县仙子脚镇下石塘村一片松树枯死, 怀疑因受附近冶炼厂尾气污染造成损失而诉讼冶炼厂。委托方(法院)要求鉴定送检样品是否为附近冶炼厂尾气污染导致。在现场勘察、初步形态鉴定的基础上, 应用 ITS 序列分析鉴定了对疑似空气污染物伤害松树的病原做了分子水平上的鉴定。

## 1 结果与分析

### 1.1 疑似污染区现场勘查

空气污染物对植物造成伤害的特点是具有成片性, 且对植物没有选择性。松树成片针叶枯死脱落的地方在离冶炼厂较远处的一块地, 而在离冶炼厂更近的地块仅发现 1 株松树有此症状, 且旁边的松树都正常, 这不符合污染物损害的规律。在怀疑受到污染物伤害的区域内还有农民诉水稻受到污染物损害而发黄, 但紧邻的另几块水稻田未见叶片发黄, 邻近的玉米也未见污染损害迹象; 有农民诉黄花菜受到污染物损害, 然而现场勘查结果是锈病引起, 与污染物无关。综合上述现场勘查的结果, 判断松树针叶枯死并非化工厂释放的空气污染物所致。

### 1.2 菌株的分离及显微观察

松树叶片枯死处, 仔细观察可以看到叶片上有小黑点(图 1), 用病组织制成玻片, 未发现病原孢子。病斑采用真菌常规分离法分离到一白色菌落真菌, PDA 上培养 8 d 后产生黑色孢子堆, 显微镜下观察(图 2), 分生孢子梭形或椭圆形, 5 个细胞, 分隔处缢缩, 中间 3 个细胞褐色, 两端细胞圆锥形, 无色, 顶端有 2~3 根无色刺毛。根据病原菌培养基上生长情况和镜检孢子情况, 初步鉴定该菌为拟盘多毛孢

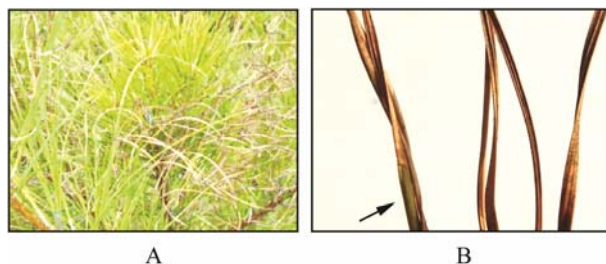


图 1 样品病害症状

注: A: 整株受害状况; B: 针叶受害状况; 箭头: 健康叶片

Figure 1 Disease symptoms of the samples

Note: A: Injured tree; B: Injured needle; Arrow indicates a part of healthy leaves

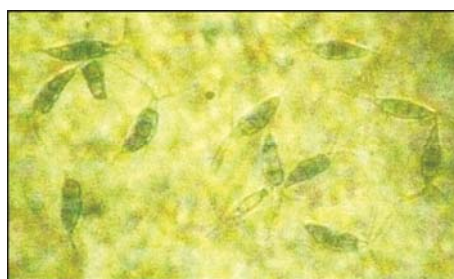


图 2 样品病菌显微图(10×40)

Figure 2 Micrographs of sample's pathogen (10×40)

属(*Pestalotopsis*)真菌。

### 1.3 样品 ITS 序列扩增、测序、比对与系统进化分析

采用真菌核糖体通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增并测序获得长度 561 bp 的 ITS 序列, 序列结果如下。

```
GGGGGATTTAGCGGCCAAAGACGCTGCAACTCCAGTC  
AAAAGCGAGATAAAAATTTACTACGCTCAGAGGATAT  
CGCAGATCCGCCGTTGTATTTTCAGGAGCTACAGCTAGC  
AAAAGCAGTAGGCTCCCAACACTAAGCTAGGCTTAAGG  
GTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCACTAGAAAT  
ACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATT  
CACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCG  
CTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTT  
GTTGAAAGTTTTGACTTATTAATAAATAAGACGCTCAGAT  
TACAATAAAATAACAAGAGTTTGGTAGTCCACCGGCA  
GCCGTTACAGGGTAAGCCGTTCCAGGGTAAGGCGCTA  
CAGGGTAGGCCGTTCCAAGGTAGGGTGCACCGAGCAG  
CTTCTGCCGAGGCAACAATGGTAAGTTACATGGGTTG  
GGAGTTTAGAAACTCTATAATGATCCCTCCGCTGGTT  
CACCAACGGAGACCTTGTTACGATTTTAACTTCCA
```

将测序所得序列在 NCBI 数据库中进行 Blast



比对搜索, 结果表明, 最接近的序列都分布在拟盘多毛孢属中(表 1), 序列覆盖范围(query coverage)均达到 97%。最大相似性(max identity)均在 99%以上。

从比对结果中下载相似性较高的 2 条同源序列 AB251916、AF377290, 将此 2 条序列与拟盘多毛孢属基本物种 ITS 序列、作为外群的 JF303032 (*Lysinibacillus fusiformis* cT185) ITS 序列, 一起构建系统进化树(图 4)。从系统进化树大体可以看出最接近的序列都分布在拟盘多毛孢属(*Pestalotopsis*)中, 且与 *P. vismiae* SN-3 的 ITS 序列(AB251916)在进化树上处于同一小的分支, 由此判断, 该菌(daoxian isolate 20100919)系韦司梅拟盘多毛孢(*Pestalotopsis vismiae*)。

## 2 讨论

拟盘多毛孢属真菌中的一些种是重要的植物病原菌, 所引起的病害世界各地均有分布。拟盘多毛孢属危害松科植物主要引起叶部病害, 病原菌以分生孢子和菌丝体在病叶中越冬, 孢子靠雨水传播, 危害重时松林火烧一般, 提早落叶, 严重影响生长。蔡竹固和李明仁(1997, 林木病虫害研讨会论文集, pp.89-96)对台湾地区针叶树拟盘多毛孢叶枯病进行了调查时, 发现主要由枯斑拟盘多毛孢(*P.*

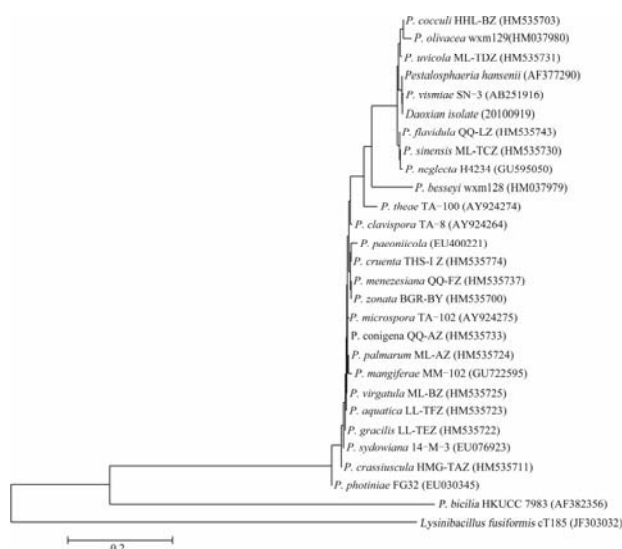


图 4 样品 ITS 序列及基本物种 ITS 序列的 NJ 系统进化树  
 Figure 4 The NJ phylogenetic tree based on the ITS sequences of sample and the basic species

*funereal*)、白井纳拟盘多毛孢(*P. shiraiana*)、污斑拟盘多毛孢(*P. foedans*)、掌状拟盘多毛孢(*P. palmarum*) 4 种真菌引起。此外, Suto and Kobayashi (1993)报告日本针叶树种上 *Pestalotiopsis* 有 10 种, 即忽视拟盘多毛孢(*P. neglecta*)、三尖杉拟盘多毛孢(*P. cephalotaxi*)、污斑拟盘多毛孢(*P. foedans*)、栎拟盘

表 1 样品 ITS 序列的 Blast 比对  
 Table 1 Blast result of the sample ITS sequence

登录 Accession	性质 Description	最大值 Max score	总值 Total score	序列覆(%) 盖率 Query coverage (%)	E 值 E value	最大相 似性(%) Max ident (%)
AB251916.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, partial	1 026	1 026	100	0.0	99
HM537054.1	Fungal endophyte sp.g77 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1 024	1 024	99	0.0	99
FJ481027.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> strain xsd08116 18S ribosomal RNA gene	1 024	1 024	99	0.0	99
EU686167.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 196 18S ribosomal RNA gene	1 024	1 024	99	0.0	99
HM068372.1	<i>Pestalotopsis</i> sp.B2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1 022	1 022	98	0.0	100
AY682934.1	<i>Pestalotopsis neglecta</i> strain PSHI2003Endo502 18S ribosomal RNA	1 022	1 022	98	0.0	100
EU686116.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 224 18S ribosomal RNA gene	1 020	1 020	99	0.0	99
EU686128.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 236 18S ribosomal RNA gene	1 018	1 018	99	0.0	99
EU686113.1	Fungal endophyte sp. ECD-2008 isolate 218 18S ribosomal RNA gene	1 018	1 018	99	0.0	99
EF451801.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> isolate 48JAES 18S ribosomal RNA gene, partial	1 016	1 016	99	0.0	99
GQ241288.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> strain KUC5020 18S ribosomal RNA gene	1 014	1 014	97	0.0	100
EU326213.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> isolateXSD-67 18S ribosomal RNA gene, partial	1 014	1 014	100	0.0	99
AF409977.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1 014	1 014	97	0.0	100
AF409973.1	<i>Pestalotopsis bicilia</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1 014	1 014	97	0.0	100
AF377290.1	<i>Pestalotopsis hansenii</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1 014	1 014	97	0.0	100
EU076934.1	<i>Pestalotopsis vismiae</i> isolate 18-M-3 18S ribosomal RNA gene, partial	1 011	1 011	97	0.0	100
AF409961.1	<i>Pestalotopsis</i> sp.HKUCC 832418S ribosomal RNA gene, partial	1 007	1 007	97	0.0	99
EU686122.1	Fungal endophyte sp. ECD-230 isolate 196 18S ribosomal RNA gene	1 000	1 000	99	0.0	98
GQ119343.1	<i>Pestalotopsis</i> sp. SLD002 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	97	0.0	99





多毛孢 (*P. glandicola*)、广布拟盘多毛孢 (*P. disseminata*)、枯斑拟盘多毛孢 (*P. funerea*)、茶褐斑拟盘多毛孢 (*P. guepini*)、长刺拟盘多毛孢 (*P. longi-aristata*)、罗汉松拟盘多毛孢 (*P. podocarpi*) 及日本香柏拟盘多毛孢 (*P. thujicola*)。上述研究中均未提及 *P. vismiae* 引起松叶病害。而张家祥(2002)从中国南方各省采集到 800 多份植物病害标本, 通过分离鉴定获得了 150 余个拟盘多毛孢属菌株, 寄主植物覆盖了 49 个科, 其中就有 *P. vismiae* 危害松科植物的记录。拟盘多毛孢属是个无性属, 不是分类学上的属, 目前的分类仍然处于比较混乱的状态没有一个比较完善的体系。拟盘多毛孢属下各种的分类主要依赖形态特征的尺度变化范围, 且各学者的看法不一, 在已发表的各种中, 种间形态的尺度差异微小, 许多种的形态尺度相互重叠, 不同的人可能将同一个菌株鉴定成不同的种。目前, 分子系统学研究表明, 拟盘多毛孢属的形态特征和分子特征具有一定的对应关系(Jeewon et al., 2002; 2003; 韦继光等, 2005), 因此, 形态特征与分子特征相结合进行种的确认和命名是可行的方案。

### 3 材料与方法

#### 3.1 现场勘查及样品采集

2010 年 7 月 21 日至 22 日, 湖南农业大学司法鉴定中心三名执业资格鉴定人在委托鉴定的松树种植地(湖南省永州市道县仙子脚镇下石塘村)及周边进行了勘查。现场鉴定时 3 家从废矿渣中提炼锰的冶炼厂都已停产, 未见烟雾排出。在工厂查看了冶炼厂所用燃料为焦炭。

勘查了松(*Pinus spp*)树附近的植物, 包括烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)和黄花菜(*Hemerocallis fulva* L.)等作物的受害情况。

采集了冶炼厂附近针叶枯死脱落的松树枝条。

#### 3.2 病原菌的分离与形态学观察

用保湿培养法对样品进行表面带菌检验。用底部铺有 3 层滤纸, 直径为 9 cm 的灭菌培养皿作培养床。先用无菌水润湿滤纸, 取样品材料放在滤纸上, 置于 25℃温箱中培养。病斑采用真菌常规分离法进行分离, 分离到的真菌转移至 PDA 培养基上纯化培养, 然后进行转管保存。

根据分离真菌的培养性状和显微形态特征(Guba, 1961; Sutton, 1980), 参考有关工具书和资料

进行属或种的鉴定(陈育新等, 2002, 菌物系统, 21(3): 316-323; 陈育新等, 2003; Wei and Xu, 2004)。

#### 3.3 DNA 提取

将分离菌株接种到 PDA 平板上进行活化, 于 28℃培养箱中黑暗培养 6 d 后, 用灭菌的药匙将菌丝刮下, 称取 0.5 g 于 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 1 mL CTAB 裂解液(张妙彬等, 2009), 3/10 体积的石英砂, 研磨; 65℃水浴 10 min, 然后加入 600 μL 7.5 mol/L 的 NaCl 溶液, 冰浴 8 min 后 13 000 r/min 离心 5 min; 取 600 μL 上清到一个新的 EP 管中, 加 400 μL 的氯仿:异戊醇(24: 1), 混匀; 静置分层后取 500 μL 上清至另一新的 EP 管, 加入 0.1 倍体积 NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇, 离心 8 min 后收集 DNA, 用 70%乙醇洗 DNA 两次; 待乙醇挥发后, 用 0.1×TE 溶解 DNA, -20℃保存。

#### 3.4 PCR 扩增 ITS 序列

采用真菌核糖体通用引物 ITS4 (5'-TAATCCGC TTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGT CGTAACAAGG-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 50μL, 反应体系为: 10×PCR buffer 5 μL, dNTP (10mmol/L) 1 μL, Taq 酶(2.5 U/μL) 1 μL, 引物 ITS4 和 ITS5 各 2 μL (25 μmol/L), 模板 DNA (500 ng/ul) 1 μL, 在 PCR 扩增仪上进行扩增。PCR 扩增条件: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳, 用凝胶成像仪进行观察并拍照。PCR 产物委托生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

#### 3.5 ITS 序列比对与系统进化分析

我们将测得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比较搜索, 下载同源性序列, 用 MEGA4.0 软件包进行系统进化分析, 构建系统进化树。

#### 作者贡献

周倩负责病原物的分离纯化、显微观察和论文写作, 刘燕娟负责真菌 DNA 的提取与 ITS 序列的扩增, 陈俊如负责 ITS 序列分析和系统发育树的构建, 夏花和高必达负责现场调查和取样。高必达负责试验指导。

#### 致谢

感谢湖南道县仙子脚镇下石塘村村民在现场调查中提供的信息与配合。感谢两位匿名的同行评



审人的评审意见和修改建议。

## 参考文献

- Cai J.N., Zhou K.Y., Xu L.S., Wang Z.T., Shen X., Wang Y.Q., and Li X.B., 2000, Ribosomal DNA ITS sequences analyses of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China, *Yaouxue Xuebao (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 35(1): 56-59 (蔡金娜, 周开亚, 徐珞珊, 王峥涛, 沈曦, 王义权, 李晓波, 2000, 中国不同地区蛇床的 rDNA ITS 序列分析, *药学报*, 35(1): 56-59)
- Chen Y.X., Wei G., Chen W.P., Wang Z.W., and Lu Z.H., 2003, Three new species of *Pestalotiopsis* in China, *Guangxi Nongye Shengwu Kexue (Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science)*, 22(3): 1-4 (陈育新, 韦刚, 陈卫平, 王忠文, 陆志华, 2003, 中国拟盘多毛孢属的三个新种, *广西农业生物科学*, 22(3): 1-4)
- Douzery E.J.P., Pridgeon A.M., Kores P., Linder H.P., Kurzweil H., and Chase M.W., 1999, Molecular phylogenetics of disease (orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences, *Am. J. Bot.*, 86(6): 887-899 <http://dx.doi.org/10.2307/2656709>
- Guba E.F., ed., 1961, *Monograph of monochaetia and pestalotia*, Harvard University Press, U.S.A., pp.54-262
- Jeewon R., Liew E.C.Y., and Hyde K.D., 2002, Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(3): 378-392 [http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00422-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00422-0)
- Jeewon R., Liew E.C.Y., Simpson J.A., Hodgkiss I.J., Kevin D.H., 2003, Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(3): 372-383 [http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00010-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00010-1)
- Suto Y., and Kobayashi T., 1993, Taxonomic studies on the species of *Pestalotiopsis*, parasitic on conifers in Japan, *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 34(3): 323-344
- Sutton B.C., ed., 1980, *The coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*, CABI, England, pp.523-537
- Wei J.G., and Xu T., 2004, *Pestalotiopsis kunraingensis* sp. nov, an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*, *Fungal Diversity*, 15: 247-254
- Wei J.G., Xu T., Guo L.D., Lai C.Y., Pan X.H., and Xiong Y., 2005, Delimitation between *Pestalotiopsis* and allied genera based on result of molecular phylogenetics, *Guangxi Nongye Shengwu Kexue (Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science)*, 24(3): 200-204 (韦继光, 徐同, 郭良栋, 赖传雅, 潘秀湖, 熊英, 2005, 从分子系统学角度分析拟盘多毛孢属及其近缘属的界限, *广西农业生物科学*, 24(3): 200-204)
- Yuan Z.Q., Zhang J.Y., and Liu T., 2009, Phylogenetic relationship of China *Dendrobium* species based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA, *Biologia Plantarum*, 53(1): 155-158 <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-009-0024-0>
- Zhang J.X., 2002, Identification of *Pestalotiopsis* Spp. from Southern China and study on the species-recognizing characters, Thesis for M.S., Zhejiang University, Supervisor: Xu T., pp.29-30 (张家祥, 2002, 中国南方拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)真菌及其分种性状的研究, 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 徐同, pp.29-30)
- Zhang M.B., Pan L.J., Fan G.Q., Chen J.M., and Cheng P., 2009, Study on DNA isolation from polysaccharides-rich transgenic *Dendrobium*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(1): 209-214 (张妙彬, 潘丽晶, 范干群, 陈继敏, 程萍, 2009, 富含多糖的转基因石斛基因组 DNA 提取方法, *分子植物育种*, 7(1): 209-214)