

苜蓿镰孢菌根腐病病原致病性和毒素化学型测定

孔前前 秦丰 张雨竹 马占鸿 刘志龙 王海光*

(中国农业大学 植物保护学院,北京 100193)

摘要 为了解苜蓿镰孢菌根腐病病原的致病性差异和致病机制,本研究对分离自河北省黄骅市和张家口市宣化区部分苜蓿种植地苜蓿根腐病样品的 150 株镰孢菌(*Fusarium* spp.) (2015 年分离获得 72 株,2016 年分离获得 78 株),采用平皿法进行了致病性测定,利用分子生物学技术对所分离获得的镰孢菌菌株是否具有产脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和雪腐镰刀菌烯醇(NIV)毒素的潜力进行了检测,并对获得的粗毒素进行了生物活性测定。结果表明:分离获得的镰孢菌对萌发的苜蓿种子均具有致病性,但致病性强弱存在差别,除三线镰孢(*F. tricinctum*)和大部分木贼镰孢(*F. equiseti*)菌株致病性较弱外,大多数镰孢菌菌株表现出较强致病性;在所获得镰孢菌菌株中,菌株 KD3(*F. oxysporum*)、菌株 QD3-2(*F. oxysporum*)、菌株 N6-1(*F. equiseti*)、菌株 N9-2(*F. acuminatum*)、菌株 NT1-1(*F. acuminatum*)和菌株 QD10-1(*F. acuminatum*)共 6 株镰孢菌具有产 NIV 毒素潜力,未发现具有产 DON 毒素潜力的菌株;将 NIV 毒素化学型菌株 QD3-2 发酵培养后经有机溶剂萃取获得粗毒素,对其进行的生物活性测定结果表明,粗毒素对苜蓿种子的萌发具有较强抑制作用。本研究结果为探讨苜蓿镰孢菌根腐病致病机理、有效防治苜蓿根腐病和保障苜蓿安全生产提供了一定基础。

关键词 苜蓿根腐病; 镰孢菌; 致病性; 毒素化学型; 粗毒素

中图分类号 S432.4⁺4; S435.4

文章编号 1007-4333(2018)05-0074-12

文献标志码 A

Detection of pathogenicity and mycotoxin chemotypes of *Fusarium* causing alfalfa root rot

KONG Qianqian, QIN Feng, ZHANG Yuzhu, MA Zhanhong, LIU Zhilong, WANG Haiguang*

(College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Alfalfa (*Medicago sativa*) is widely cultivated in the world. Alfalfa root rot has become one of the most important factors resulting in quality decline and yield losses of alfalfa. To explore the difference in pathogenicity and the pathogenic mechanism of *Fusarium* causing alfalfa root rot, 150 *Fusarium* strains isolated from the samples of alfalfa root rot collected from Huanghua and Xuanhua District in Hebei Province, China, among which 72 strains were isolated in 2015 and 78 strains were isolated in 2016, were used in this study. Pathogenicity determination of all *Fusarium* strains was conducted using plate method. The DON (deoxynivalenol) and NIV (nivalenol) mycotoxins producing potentialities of the strains were investigated. And bioactivity tests of crude mycotoxins derived from strain QD3-2 (*F. oxysporum*), which was identified as NIV chemotype, were performed. The results showed that all the isolated *Fusarium* strains induced pathogenicity on germinated alfalfa seeds, but there were differences among the pathogenic intensities. Most *Fusarium* strains exhibited strong pathogenicity except *F. tricinctum* strains and most *F. equiseti* strains. Strain KD3 (*F. oxysporum*), strain QD3-2 (*F. oxysporum*), strain N6-1 (*F. equiseti*), strain N9-2 (*F. acuminatum*), strain NT1-1 (*F. acuminatum*) and strain QD10-1 (*F. acuminatum*) displayed potential to produce NIV, and there were no strains showed DON producing potentiality. After fermentation, crude mycotoxins were extracted from strain QD3-2 using organic solvents. The bioactivity tests demonstrated that the crude mycotoxins had strong inhibitory effects on the

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303057)

第一作者: 孔前前, 硕士研究生, E-mail: 1439918864@qq.com

通讯作者: 王海光, 副教授, 主要从事植物病害流行病学和宏观植物病理学研究, E-mail: wanghaiguang@cau.edu.cn

germination of alfalfa seeds. This study would provide theoretical references for further studies on the pathogenic mechanism of pathogens causing alfalfa root rot, efficient management of alfalfa root rot and alfalfa production safety.

Keywords alfalfa root rot; *Fusarium*; pathogenicity; mycotoxin chemotype; crude mycotoxin

苜蓿 (*Medicago sativa*) 是一种世界广泛栽培的多年生豆科牧草, 因其含有丰富的蛋白质与维生素而作为优良牧草喂养牲畜, 并且种植苜蓿可以改良土壤特性, 防止水土流失, 具有良好的生态效益、经济效益和社会效益^[1]。据我国农业部印发的《全国苜蓿产业发展规划(2016—2020)》, 2015年我国苜蓿年末保留面积约为 471.13 万 hm^2 。但随着苜蓿种植面积增加和种植年限延长, 苜蓿病害发生日趋严重, 苜蓿根腐病已成为造成苜蓿植株衰败、品质和产量下降的一个重要原因。

苜蓿根腐病在世界范围苜蓿栽培地区普遍发生^[2], 该病在苜蓿各个生育期均可受害, 侵染初期苜蓿根表面产生褐色坏死斑点, 侵染后期苜蓿根茎分枝减少, 主侧根变空腐烂, 固氮能力下降, 最终植株死亡, 造成苜蓿种植地在几年之内株丛稀疏。苜蓿根腐病一旦大面积发生会严重降低苜蓿产量, 甚至需要重新建植。另外, 引起苜蓿根腐病的镰孢菌可产生毒素, 从而影响以苜蓿为食料的牲畜健康^[3-5]。

苜蓿根腐病病原种类多, 各地病原种类存在差异。镰孢菌 (*Fusarium* spp.) 是引起该病害的主要病原菌^[6-10]。国外研究人员报道引起苜蓿根腐病的镰孢菌主要有尖孢镰孢 (*F. oxysporum*)^[6-7, 11-13]、锐顶镰孢 (*F. acuminatum*)^[12-13, 14-16]、燕麦镰孢 (*F. avenaceum*)^[6, 13-16]、茄镰孢 (*F. solani*)^[6-7, 13, 16]、木贼镰孢 (*F. equiseti*)^[12]、半裸镰孢 (*F. semitectum*)^[12]、镰状镰孢 (*F. fusarioides*)^[12]、接骨木镰孢 (*F. sambucinum*)^[13]、黄色镰孢 (*F. culmorum*)^[15]、三线镰孢 (*F. tricinctum*)^[16] 等。我国科研人员报道引起苜蓿根腐病的镰孢菌主要有尖孢镰孢^[17-23]、锐顶镰孢^[18, 24]、半裸镰孢^[18, 24]、茄镰孢^[17, 19-24]、串珠镰孢 (*F. moniliforme*)^[19]、木贼镰孢^[20, 23]、砖红镰孢 (*F. lateritium*)^[20-21]、雪腐镰孢 (*F. nivale*)^[20]、拟丝孢镰孢 (*F. trichothecioides*)^[20]、黄色镰孢^[22]、燕麦镰孢^[24]、多隔镰孢 (*F. decemcellulare*)^[24]、层出镰孢 (*F. proliferatum*)^[23]、变红镰孢 (*F. incarnatum*)^[23] 和拟枝孢镰孢 (*F. sporotrichioides*)^[25-26] 等。但是针对相关不同镰孢菌致病性差异的研究相对较少。

镰孢菌可产生对植物组织和细胞有明显毒害作用的毒素^[27-29], 利用毒素接种可产生与病原菌侵染

相同或类似的症状。毒素是镰孢菌致病的主要途径, 不但可在病原菌致病过程中起到重要作用, 而且可引起人畜中毒, 严重威胁人畜健康^[5, 27-29]。已报道的镰孢菌毒素有多种, 主要包括单端孢霉烯族化合物 (trichothecenes)、玉米赤霉烯酮 (zearalenone)、丁烯酸内酯 (butenolide)、串珠镰刀菌素 (moniliformin)、伏马菌素 (fumonisin) 等^[28, 30]。根据功能基团的类型, 可将单端孢霉烯族毒素分为 A 和 B 两种类型, 单端孢霉烯族毒素 A 包括 T-2 毒素、HT-2 毒素、新茄病镰刀菌烯醇和蛇形霉素 (diacetoxyscirpenol); 单端孢霉烯族毒素 B 包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON) 和雪腐镰刀菌烯醇 (nivalenol, NIV)^[28]。一般地, 利用气相色谱法/质谱分析法进行镰孢菌毒素化学型的测定^[31-32]。随着镰孢菌产毒素机制研究的进展, 基于分子生物学的产毒素镰孢菌的快速检测和鉴定得到了迅速发展^[4, 30-35]。利用分子生物学技术分析苜蓿根腐病病原镰孢菌产毒素潜力的研究鲜有报道, 并且对于相应病原菌所产毒素生物活性测定的研究也很少^[36]。

随着畜牧业对苜蓿需求量的增加, 苜蓿种植面积逐渐扩大, 苜蓿产业得到迅速发展。但是, 由于苜蓿是多年生植物, 一旦建植后几年内一般不会重建, 从而导致苜蓿根腐病的发生面积急剧增加, 病情急剧恶化, 不仅可造成严重的产量损失, 而且引起根腐病的镰孢菌还会产生为害牲畜和人类健康的毒素, 直接影响苜蓿的品质和产量, 造成严重经济损失, 已成为制约苜蓿产业和畜牧业发展的限制性因素之一。目前, 由于苜蓿根腐病病原菌种类较多, 使得田间防治缺乏针对性, 难以进行准确及时防治。本研究拟对分离自河北省黄骅市和张家口市宣化区部分苜蓿种植地苜蓿根腐病样品的镰孢菌菌株, 采用平皿法进行致病性测定, 利用分子生物学方法对分离获得的各镰孢菌菌株是否具有产生毒素 DON 和 NIV 的潜力进行检测, 并对利用过滤萃取法获得的粗毒素进行生物活性测定, 旨在了解不同镰孢菌的致病性差异和产毒素潜力, 为苜蓿镰孢菌根腐病致病机制研究以及有效防治苜蓿根腐病和保障苜蓿安全生产提供一定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

所用菌株分离自2015年7—9月在河北黄骅市和张家口市宣化区部分苜蓿种植地采集的苜蓿根腐病样品以及2016年9月在河北张家口市宣化区部分苜蓿种植地采集的苜蓿根腐病样品。

采用《植病研究方法》^[37]中的组织分离法进行病原物分离。2015年从采集自河北黄骅市和张家口市宣化区部分苜蓿种植地苜蓿根腐病样品中分离获得105个菌株;2016年从采集自河北张家口市宣化区部分苜蓿种植地苜蓿根腐病样品中分离获得84个菌株。对分离获得的菌株,除根据参考文献[23]利用形态学鉴定方法和基于真菌核糖体DNA内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)、延伸因子EF-1 α (Elongation factor 1 α)的分子生物学鉴定方法进行种类鉴定外,还利用基于基因内间隔区(Intergenic spacer, IGS)的分子生物学鉴定方法进行种类鉴定。采用改良的CTAB法^[38]提取所分离菌株的基因组DNA。分别采用通用引物ITS4/ITS5^[39]、EF-1H/EF-2T^[40]和CNL12/CNS1^[41]对所有菌株的ITS、延伸因子EF-1 α 和IGS区段进行PCR扩增,以基因组DNA作为模板。扩增产物经过1%琼脂糖凝胶电泳检测后,将PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果经在NCBI网站中进行同源序列BLAST比对分析,利用MEGA 5.0软件进行多序列比较并采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树,分析分离菌株与GenBank中已知近缘种的亲缘关系,确定分离菌株的种类。

经利用形态学鉴定方法和分子生物学鉴定方法鉴定,2015年分离获得的105个菌株中,除6株拟茎点霉(*Phomopsis* spp.)、6株木霉菌(*Trichoderma* spp.)、6株粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)、5株间座壳菌(*Diaporthe* spp.)、5株淡色丛赤壳(*Bionectria ochroleuca*)、1株角担菌(*Ceratobasidium* sp.)、1株平头炭疽菌(*Colletotrichum truncatum*)、1株黑孢霉(*Nigrospora sphaerica*)、1株链格孢(*Alternaria alternata*)、1株未鉴定出之外,还有72株为镰孢菌,包括22株木贼镰孢、21株茄镰孢、16株尖孢镰孢、8株锐顶镰孢、2株*F. commune*、1株层出镰孢、1株芳香镰孢(*F. redolens*)和1株藤仓镰孢(*F.*

fujikuroi);2016年分离获得的84个菌株中,除5株茄丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和1株露湿漆斑菌(*Myrothecium roridum*)外,还有78株为镰孢菌,包括44株木贼镰孢、19株尖孢镰孢、11株茄镰孢、2株三线镰孢、1株锐顶镰孢、1株层出镰孢。将2015年和2016年分离获得的共计150株镰孢菌作为本研究的供试菌株。

1.2 分离获得的镰孢菌致病性测定

采用平皿法^[20]测定所分离纯化的镰孢菌的致病性。将镰孢菌菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(培养皿直径9 cm)上培养5 d后,使用直径为6 mm的无菌打孔器在菌落边缘打取菌饼转接至1%水琼脂培养基(WA)(培养皿直径9 cm)中央,于25℃ MJX-100B-Z霉菌培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)中培养3 d。中苜1号苜蓿种子(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供)经70%酒精消毒1 min、无菌水冲洗3遍,8% NaClO溶液消毒8 min、无菌水冲洗3遍后,每20粒均匀排列在上述含菌WA培养基所长菌落的菌丝边缘,以在不接菌的WA培养基上同样处理的20粒种子作为对照组,每处理3次重复,于25℃霉菌培养箱中培养7 d后,依据病害严重度分级标准^[20]调查病害发生情况和严重度,并计算发病率和病情指数。病害严重度共分5级^[20],0级:幼苗健康无病;1级:幼苗根尖出现黄褐色斑点;2级:幼苗初生根尖变软、腐烂;3级:幼苗胚根变褐腐烂;4级:种子无法萌发被菌丝包裹。

按照下式计算发病率:

$$\text{发病率} = \frac{\text{发病幼苗数}}{\text{种子总数}} \times 100\% \quad (1)$$

按照下式进行病情指数的计算:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级发病株数} \times \text{病害分级代表值})}{4 \times \text{种子总数}} \times 100 \quad (2)$$

1.3 利用分子生物学技术测定菌株产毒素潜力

采用改良的CTAB法^[38]提取各供试镰孢菌菌株的基因组DNA作为模板,利用Tri7F/Tri7DON和Tri13F/Tri13DONR 2对引物^[42]对供试菌株Tri7和Tri13基因进行PCR扩增,检测DON毒素化学型菌株;利用Tri7F/Tri7NIV和Tri13R/Tri13NIVF 2对引物^[42]对供试菌株Tri7和Tri13基因进行PCR扩增,检测NIV毒素化学型菌株。

所用引物序列如表1所示。

PCR扩增体系设定为:扩增体系均为25.0 μL ,其中 ddH₂O 15.2 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , Mg²⁺ (25 mmol/L) 2.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL , 上下引物各 1.0 μL , Taq 酶 (5 U/ μL) 0.3 μL , 模板 DNA 1.0 μL 。

引物对 Tri7F/Tri7DON、Tri7F/Tri7NIV 的扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

引物对 Tri13F/Tri13DONR 和 Tri13R/Tri13NIVF 的扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

将扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,经溴化乙锭(EB)染色后在紫外凝胶成像系统 LANE 1D Ver 4.0(北京赛智创业科技有限公司)下观测拍照。

表1 Tri7 和 Tri13 基因 PCR 扩增所用的引物

Table 1 PCR primers used for Tri7 and Tri13 amplification

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
Tri7F	TGCGTGGCAATATCTTCTCTCA
Tri7DON	GTGCTAATATTGTGCTAATATTGTGC
Tri7NIV	GGTTC AAGTAACGTTTCGACAATAG
Tri13F	CATCATGAGACTTGTKCRAGTTTGGG
Tri13DONR	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG
Tri13R	TTGAAAGCTCCAATGTCGTG
Tri13NIVF	CCAAATCCGAAAACCGCAG

注:引物序列来源于参考文献[42]。

Note:Primer sequences are derived from reference [42].

1.4 镰孢菌毒素提取

利用清水清洗小麦种子,去除杂质后,将水过滤干净后(麦粒不需晾干),称取 250 g 放入 1 L 的锥形瓶中,加入 250 mL 蒸馏水,封口并浸泡过夜后,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min,制作成麦粒培养基冷却后备用。将经过上述分子检测确定具有产毒素潜力的菌株 QD3-2 在 PDA 平板上培养 5 d 后,利用无菌牙签刮取菌丝后,利用无菌水配制成浓度为 1×10^8 个/mL 的孢子悬浮液,将上述孢子悬浮液每 10 mL 加入各

个含有麦粒培养基的锥形瓶中,25 $^{\circ}\text{C}$ 霉菌培养箱中发酵 15 d 后提取毒素。

将发酵后的麦粒培养基利用玻璃棒搅拌均匀,加入乙酸乙酯(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)定容至 1 000 mL,放入 KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)中 30 min,使得乙酸乙酯充分渗入其中,静置片刻后用 4 层纱布过滤,滤液放在 RE52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)上将乙酸乙酯蒸出,获得褐色物质,作为粗毒素 A。经乙酸乙酯萃取后的培养物继续用乙酸乙酯浸泡过夜后,按上述方法萃取 3 次。萃取后的麦粒培养物放盆中晾干,待乙酸乙酯挥发尽,用正丁醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)按上述方法继续萃取 3 次,获得粗毒素 B。

1.5 粗毒素生物活性测定

选取大小一致、饱满的中苜 1 号种子,利用 70%酒精消毒处理 1 min,无菌水冲洗 3 次,然后利用 8%NaClO 溶液消毒处理 8 min,无菌水冲洗 3 次,晾干备用。将处理的苜蓿种子浸入加无菌水溶解获得的粗毒素 A 溶液和粗毒素 B 溶液中 30 min,对照组将种子在无菌水中浸泡 30 min,然后将苜蓿种子均匀摆列在含双层滤纸的培养皿中,每皿 30 粒,每处理 3 次重复,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 霉菌培养箱中培养 48 h,将胚根长度达到其种粒长度的一半作为种子萌发标准,观察记录苜蓿种子的萌发情况,并计算种子萌发率。根据下式计算粗毒素对苜蓿种子萌发的抑制率:

$$\text{抑制率} = ((\text{对照组平均萌发率} - \text{处理组平均萌发率}) / \text{对照组平均萌发率}) \times 100\% \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 所分离镰孢菌致病性测定结果

采用平皿法对 2015 年和 2016 年分离获得的共计 150 株镰孢菌进行致病性测定的结果如表 2 和表 3 所示。在 2015 年所获得的镰孢菌菌株中,尖孢镰孢、茄镰孢、层出镰孢、锐顶镰孢、藤仓镰孢、芳香镰孢和 *F. commune* 对萌发的苜蓿种子具有较强致病性,所获得的木贼镰孢不同菌株致病性存在较大幅度的差异(表 2)。其中,木贼镰孢菌株 QZ3、锐顶镰孢菌株 N12-1、尖孢镰孢菌株 QD13-2 的致病性在相应病原种类菌株中最强,相应的平均病情指数分别为 90.83、82.92、77.13(图 1)。在 2016 年所获

表2 2015年所分离镰孢菌菌株致病性测定结果

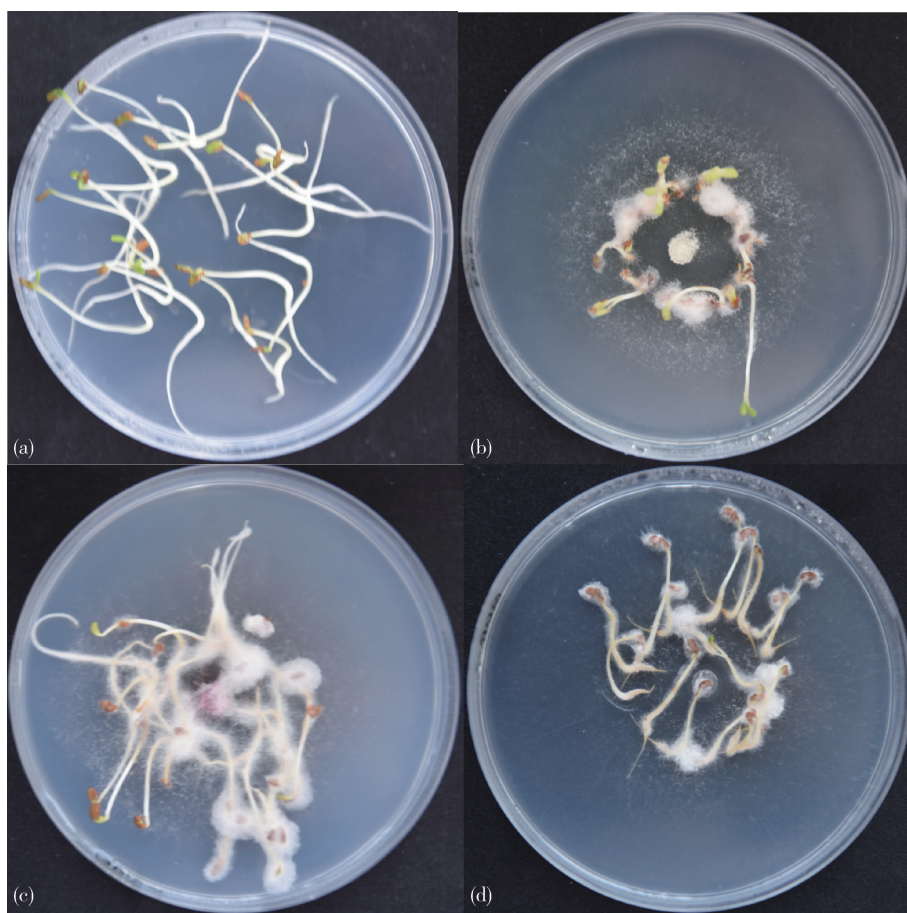
Table 2 Pathogenic determination of *Fusarium* isolates obtained in 2015

菌株编号 Strain number	菌株种类 Strain species	平均发病率/% Average disease incidence	平均病情指数 Average disease index	菌株编号 Strain number	菌株种类 Strain species	平均发病率/% Average disease incidence	平均病情指数 Average disease index
KD3	<i>F. oxysporum</i>	100.00	69.26	QD18-1	<i>F. solani</i>	100.00	60.09
KD4-4	<i>F. oxysporum</i>	91.40	50.96	KD7	<i>F. equiseti</i>	100.00	47.50
NT1-3	<i>F. oxysporum</i>	100.00	66.95	KD7-1	<i>F. equiseti</i>	74.26	33.75
N6-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	68.29	KD7-2	<i>F. equiseti</i>	100.00	43.75
N7-1	<i>F. oxysporum</i>	100.00	74.58	KL2	<i>F. equiseti</i>	83.33	25.00
N11-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.46	KL2-1	<i>F. equiseti</i>	65.00	24.58
QD3-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	73.75	KL2-2	<i>F. equiseti</i>	83.33	36.25
QD6-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	74.58	KL3-1	<i>F. equiseti</i>	96.67	54.58
QD8-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.83	N1-3	<i>F. equiseti</i>	46.67	11.67
QD10-2	<i>F. oxysporum</i>	76.85	39.68	N3-2	<i>F. equiseti</i>	13.33	3.33
QD11-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	74.04	N4-1	<i>F. equiseti</i>	84.56	34.06
QD12-1	<i>F. oxysporum</i>	100.00	74.58	N6-1	<i>F. equiseti</i>	20.00	7.50
QD13-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	77.13	N9-1	<i>F. equiseti</i>	68.33	23.46
QD21	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.00	N11-1	<i>F. equiseti</i>	75.00	22.50
QL3	<i>F. oxysporum</i>	100.00	72.08	N15-2	<i>F. equiseti</i>	95.00	32.92
QL4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.42	N18-1	<i>F. equiseti</i>	23.77	6.82
KD1	<i>F. solani</i>	100.00	75.90	QD2-1	<i>F. equiseti</i>	83.33	20.83
KD2-4	<i>F. solani</i>	100.00	70.42	QD11-1	<i>F. equiseti</i>	5.00	1.25
KD6	<i>F. solani</i>	100.00	67.92	QD13-1	<i>F. equiseti</i>	100.00	79.17
KD10	<i>F. solani</i>	98.33	69.17	QD19	<i>F. equiseti</i>	96.67	48.33
KD10-2	<i>F. solani</i>	74.12	39.25	QL22	<i>F. equiseti</i>	100.00	42.50
KL1	<i>F. solani</i>	100.00	75.00	QL5	<i>F. equiseti</i>	96.67	56.25
KL4	<i>F. solani</i>	100.00	69.17	QZ3	<i>F. equiseti</i>	100.00	90.83
KL5-1	<i>F. solani</i>	100.00	69.55	N1-1	<i>F. acuminatum</i>	100.00	80.83
KL5-2	<i>F. solani</i>	87.32	48.10	N8-1	<i>F. acuminatum</i>	100.00	80.90
KL5-3	<i>F. solani</i>	100.00	66.25	N9-2	<i>F. acuminatum</i>	100.00	75.42
KZ1-1	<i>F. solani</i>	98.33	70.42	N12-1	<i>F. acuminatum</i>	100.00	82.92
KZ2	<i>F. solani</i>	100.00	68.06	NT1-1	<i>F. acuminatum</i>	100.00	72.08
N3-1	<i>F. solani</i>	100.00	66.67	QD18-2	<i>F. acuminatum</i>	96.67	75.83
N5-1	<i>F. solani</i>	100.00	71.67	QD3-1	<i>F. acuminatum</i>	100.00	75.83
N5-2	<i>F. solani</i>	100.00	72.43	QD10-1	<i>F. acuminatum</i>	96.67	68.40
N6-3	<i>F. solani</i>	100.00	31.25	KLX2	<i>F. proliferatum</i>	100.00	70.42
N7-2	<i>F. solani</i>	100.00	75.00	N1-2	<i>F. redolens</i>	98.33	65.00
N15-1	<i>F. solani</i>	100.00	69.58	QD17	<i>F. fujikuroi</i>	100.00	74.58
N19	<i>F. solani</i>	100.00	71.67	KLX1	<i>F. commune</i>	100.00	75.42
QD4	<i>F. solani</i>	100.00	67.08	QL2	<i>F. commune</i>	90.00	76.67

表3 2016年所分离镰孢菌菌株致病性测定结果

Table 3 Pathogenic determination of *Fusarium* isolates obtained in 2016

菌株编号 Strain number	菌株种类 Strain species	平均发病率/% Average disease incidence	平均病情指数 Average disease index	菌株编号 Strain number	菌株种类 Strain species	平均发病率/% Average disease incidence	平均病情指数 Average disease index
BI-5-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	76.67	BI-8-2	<i>F. equseti</i>	82.81	21.14
BI-5-4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	76.69	BI-5-1	<i>F. equseti</i>	81.67	21.67
BI-6-3	<i>F. oxysporum</i>	100.00	78.00	BI-3-1	<i>F. equseti</i>	73.33	20.00
BI-7-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	72.92	BI-2-2	<i>F. equseti</i>	84.91	22.48
BI-9-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	72.08	BI-2-3	<i>F. equseti</i>	75.88	19.39
BI-12-3	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.00	BI-6-4	<i>F. equseti</i>	100.00	39.45
BI-13-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.00	B3-3-2	<i>F. equseti</i>	91.49	27.54
BI-14-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	70.42	BI-14-1	<i>F. equseti</i>	72.81	20.77
BI-14-4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	73.66	BI-10-2	<i>F. equseti</i>	90.00	35.83
BI-1-2	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.42	BI-10-3	<i>F. equseti</i>	70.00	20.00
BI-1-4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	73.75	BI-7-4	<i>F. equseti</i>	86.49	33.09
BI-1-5	<i>F. oxysporum</i>	100.00	70.37	BI-14-3	<i>F. equseti</i>	72.81	25.77
BI-2-1	<i>F. oxysporum</i>	100.00	60.59	B3-4-1	<i>F. equseti</i>	85.00	36.67
BI-2-5	<i>F. oxysporum</i>	100.00	70.83	BI-8-4	<i>F. equseti</i>	91.67	34.58
BI-10-4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.00	BI-15-3	<i>F. equseti</i>	87.98	29.19
BI-14-5	<i>F. oxysporum</i>	98.33	51.67	BI-10-1	<i>F. equseti</i>	86.40	31.75
BI-13-4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	66.25	BI-11-3	<i>F. equseti</i>	88.33	31.25
BI-7-3	<i>F. oxysporum</i>	100.00	75.83	BI-1-1	<i>F. equseti</i>	58.33	14.58
BI-4-4	<i>F. oxysporum</i>	100.00	72.08	BI-1-3	<i>F. equiseti</i>	100.00	30.22
BI-9-1	<i>F. solani</i>	100.00	72.50	BI-6-1	<i>F. equseti</i>	55.00	14.17
BI-15-4	<i>F. solani</i>	98.33	61.67	BI-7-1	<i>F. equseti</i>	98.33	27.08
BI-11-1	<i>F. solani</i>	96.67	67.50	BI-12-4	<i>F. equseti</i>	84.74	36.01
BI-16-2	<i>F. solani</i>	100.00	65.42	BI-13-3	<i>F. equseti</i>	88.33	43.33
BI-13-1	<i>F. solani</i>	100.00	57.96	BI-15-2	<i>F. equseti</i>	51.67	19.17
BI-12-5	<i>F. solani</i>	96.67	55.00	BI-16-1	<i>F. equseti</i>	59.91	19.58
BI-11-2	<i>F. solani</i>	100.00	67.50	BI-16-4	<i>F. equseti</i>	44.04	11.01
BI-9-3	<i>F. solani</i>	98.33	49.17	B3-4-3	<i>F. equseti</i>	95.00	25.00
BI-4-2	<i>F. solani</i>	100.00	63.75	B3-1-1	<i>F. equseti</i>	100.00	61.67
BI-4-1	<i>F. solani</i>	98.33	59.58	B3-2-1	<i>F. equseti</i>	91.67	43.75
BI-3-2	<i>F. solani</i>	100.00	44.17	B3-2-2	<i>F. equseti</i>	86.67	25.42
BI-8-3	<i>F. equseti</i>	76.67	35.83	B3-2-3	<i>F. equseti</i>	98.33	36.25
B2-1-1	<i>F. equseti</i>	66.67	16.67	B3-3-1	<i>F. equseti</i>	78.33	25.83
BI-16-3	<i>F. equseti</i>	66.67	22.92	B3-4-2	<i>F. equseti</i>	100.00	49.58
BI-15-1	<i>F. equseti</i>	81.67	25.07	B3-5-3	<i>F. equseti</i>	95.00	42.08
BI-12-2	<i>F. equseti</i>	80.00	20.83	B3-5-2	<i>F. equseti</i>	8.33	3.33
BI-12-1	<i>F. equseti</i>	66.67	16.67	B3-3-3	<i>F. acuminatum</i>	100.00	73.75
BI-4-3	<i>F. equiseti</i>	80.00	22.08	B2-1-2	<i>F. tricinctum</i>	83.07	24.12
BI-2-4	<i>F. equseti</i>	70.00	21.67	B3-5-1	<i>F. tricinctum</i>	100.00	58.33
BI-8-1	<i>F. equseti</i>	72.98	18.66	BI-7-5	<i>F. proliferatum</i>	100.00	69.50



(a) 对照组 CK; (b) 菌株 QZ3 (*F. equiseti*) Strain QZ3 (*F. equiseti*); (c) 菌株 N12-1 (*F. acuminatum*) Strain N12-1 (*F. acuminatum*); (d) 菌株 QD13-2 (*F. oxysporum*) Strain QD13-2 (*F. oxysporum*)

图 1 部分镰孢菌菌株致病性测定结果

Fig. 1 Pathogenic determination of several *Fusarium* isolates

得的镰孢菌菌株中,尖孢镰孢、茄镰孢、层出镰孢和锐顶镰孢对萌发的苜蓿种子具有较强致病性,所获得的木贼镰孢和三线镰孢对萌发的苜蓿种子致病性较弱(表 3)。

按照病原种类,对 150 株镰孢菌的致病性测定结果(病情指数)进行了方差分析(表 4),结果表明不同种类镰孢菌的致病性不同:锐顶镰孢、*F. commune*、藤仓镰孢、尖孢镰孢、层出镰孢的致病性之间差异不显著 ($P > 0.05$);锐顶镰孢、*F. commune*、藤仓镰孢的致病性与芳香镰孢、茄镰孢、三线镰孢、木贼镰孢的致病性之间存在极显著差异 ($P < 0.01$);三线镰孢与木贼镰孢的致病性较弱,平均病情指数分别为 41.23 和 29.48,这 2 种镰孢菌的致病性与其他种类镰孢菌的致病性之间的差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

为了分析同种镰孢菌不同菌株致病性之间的差

异,对 2 年中分离获得的同种镰孢菌不同菌株相应的病情指数进行了方差分析。结果表明:66 株木贼镰孢的平均病情指数变化幅度大,致病性之间差异较大,菌株 QZ3 的致病性最强,平均病情指数为 90.83;菌株 QD11-1 的致病性最弱,平均病情指数为 1.25。35 株尖孢镰孢之间的致病性差异也较大,其中致病性最强的为菌株 B1-6-3,其平均病情指数为 78.00;致病性最弱的为菌株 QD10-2,其平均病情指数为 39.68。32 株茄镰孢的致病性之间差异也较大,平均病情指数变化幅度较大,其中致病性最强的为菌株 KD1,其平均病情指数为 75.90;致病性最弱的为菌株 N6-3,其平均病情指数为 31.25。9 株锐顶镰孢的相应平均病情指数均较高,菌株 QD10-1 相应的平均病情指数最低,为 68.40,其致病性与菌株 N12-1、N8-1 和 N1-1 之间存在显著差异 ($P < 0.05$),除菌株 QD10-1 之外的其他 8 个菌株致病性

表 4 所分离 150 株镰孢菌的致病性方差分析结果

Table 4 Variance analysis results of pathogenicity of 150 *Fusarium* strains isolated in this study

病原 Pathogen	平均病情指数 Average disease index
<i>F. acuminatum</i>	76.22 aA
<i>F. commune</i>	76.04 aA
<i>F. fujikuroi</i>	74.58 aA
<i>F. oxysporum</i>	70.85 abAB
<i>F. proliferatum</i>	69.96 abcAB
<i>F. redolens</i>	65.00 bcB
<i>F. solani</i>	63.71 cB
<i>F. tricinctum</i>	41.23 dC
<i>F. equiseti</i>	29.48 eD

注：方差分析采用 Duncan 新复极差法，第二列中不同小写字母表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)，不同大写字母表示差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

Note: The variance analysis is performed using Duncan's multiple range test. In the second column, the different lowercase letters indicate the significant difference at the level of 0.05 ($P < 0.05$) and the different capital letters indicate the significant difference at the level of 0.01 ($P < 0.01$).

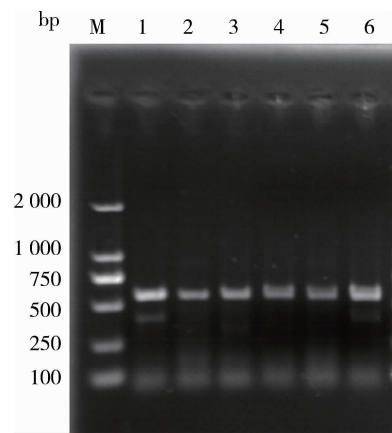
之间差异不显著 ($P > 0.05$)。2 株层出镰孢 KLX2 和 B1-7-5 的致病性之间差异不显著 ($P > 0.05$)。2 株三线镰孢 B3-5-1 和 B2-1-2 的致病性之间的差异达到显著水平 ($P < 0.05$)，未达到极显著水平 ($P > 0.01$)。2 株 *F. commune* QL2 和 KLX1 的致病性之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

致病性测定结果表明，所分离镰孢菌对萌发的苜蓿种子均具有致病性，但致病性强弱有差异。除三线镰孢和大部分木贼镰孢菌株的致病性较弱外，大多数镰孢菌菌株表现出较强致病性。

2.2 基于分子生物学技术的菌株毒素化学型测定结果

通过 Tri7F/Tri7DON、Tri7F/Tri7NIV、Tri13F/

Tri13DONR 和 Tri13R/Tri13NIVF 4 对引物对分离获得的 150 株镰孢菌的 *Tri7* 和 *Tri13* 基因进行 PCR 扩增检测，共有 6 株镰孢菌可通过 Tri13R/Tri13NIVF 引物对扩增出条带 (图 2)，分别为菌株 KD3 (*F. oxysporum*)、菌株 QD3-2 (*F. oxysporum*)、菌株 N6-1 (*F. equiseti*)、菌株 N9-2 (*F. acuminatum*)、菌株 NT1-1 (*F. acuminatum*) 和菌株 QD10-1 (*F. acuminatum*)，具有产 NIV 毒素潜力，未发现具有产 DON 毒素潜力的菌株。从中选择菌株 QD3-2 进行固体培养提取粗毒素，用于进行生物活性测定。



样品顺序从左到右依次为 Marker、KD3 (*F. oxysporum*)、QD3-2 (*F. oxysporum*)、N6-1 (*F. equiseti*)、N9-2 (*F. acuminatum*)、NT1-1 (*F. acuminatum*) 和 QD10-1 (*F. acuminatum*)。

The samples from left to right are Marker, KD3 (*F. oxysporum*), QD3-2 (*F. oxysporum*), N6-1 (*F. equiseti*), N9-2 (*F. acuminatum*), NT1-1 (*F. acuminatum*) and QD10-1 (*F. acuminatum*), respectively.

图 2 Tri13R/Tri13NIVF 引物 PCR 产物电泳图

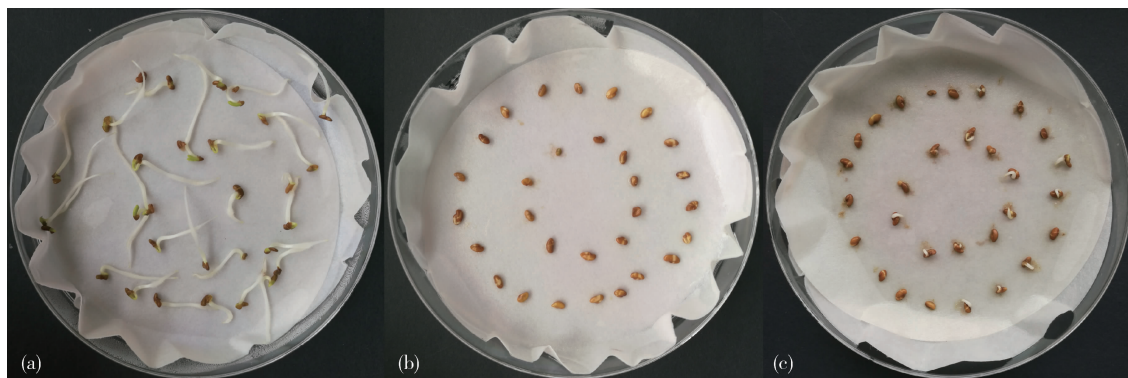
Fig. 2 Electrophoresis results of parts of *Fusarium* strains by using primer Tri13R/Tri13NIVF

2.3 粗毒素生物活性测定结果

利用乙酸乙酯萃取菌株 QD3-2 固体培养物获得的粗毒素 A 处理中苜 1 号种子，种子均未萌发；利用正丁醇萃取菌株 QD3-2 固体培养物获得的粗毒素 B 处理中苜 1 号种子，平均萌发率仅为 34.44%，萌发抑制率为 64.78%，可见菌株 QD3-2 产生的毒素对种子萌发具有较强的抑制作用 (表 5 和图 3)。由图 3 可见，菌株 QD3-2 产生的毒素不仅对苜蓿种子萌发具有抑制作用，对其胚根生长也具有较强抑制作用。

表5 菌株 QD3-2 的粗毒素对苜蓿种子萌发的影响
Table 5 Effects of crude mycotoxins extracted from strain QD3-2
on the germination of alfalfa seeds

处理 Treatment	重复 Repeat	萌发率 Germination rate	平均萌发率 Average germination rate	抑制率 Inhibition rate
粗毒素 A Crude mycotoxin A	1	0.00	0.00	100.00
	2	0.00		
	3	0.00		
粗毒素 B Crude mycotoxin B	1	40.00	34.44	64.78
	2	30.00		
	3	33.33		
CK	1	96.67	97.78	-
	2	100.00		
	3	96.67		



(a)对照组 CK;(b)粗毒素 A Crude mycotoxin A;(c)粗毒素 B Crude mycotoxin B

图3 苜蓿种子经菌株 QD3-2 的粗毒素处理后的萌发情况

Fig. 3 Germination of alfalfa seeds treated using crude mycotoxins extracted from strain QD3-2

3 结论与讨论

本研究对分离自河北省黄骅市和张家口市宣化区部分苜蓿种植地苜蓿根腐病样品的 150 株镰孢菌进行了致病性测定,利用分子生物学方法进行了菌株毒素化学型研究,并对产毒素菌株所产生的粗毒素进行了生物活性测定。分离获得的镰孢菌对萌发的苜蓿种子均具有致病性,并且大多数镰孢菌菌株表现出较强致病性。6 个菌株为 NIV 毒素化学型,具有产 NIV 毒素潜力;在供试菌株中未发现 DON 毒素化学型菌株;提取的粗毒素对苜蓿种子的萌发具有较强抑制作用。研究结果有助于了解苜蓿镰孢菌根腐病的致病机制,对于提高苜蓿品质和产量、促进畜牧业发展具有积极意义。

虽然分离获得的镰孢菌对萌发的苜蓿种子均具有致病性,但致病性强弱有较大差异,这一结果与阮柳^[43]对 2013 年和 2014 年分离自河北黄骅苜蓿种植地苜蓿根腐病样品的镰孢菌菌株进行的致病性测定结果相似。苜蓿根腐病的病原种类十分复杂,经常是由多种病原菌复合侵染引起病害^[18,20],本研究仅采用了单一种类镰孢菌菌株接种苜蓿种子进行致病性的测定,为更深入了解苜蓿镰孢菌根腐病发病机制,需利用多种镰孢菌同时接种开展进一步研究。另外,在本研究中所分离纯化的镰孢菌菌株的致病性是利用平皿法^[20]测定的,为更好地测定分离菌株对苜蓿植株的致病性,在进一步研究中可采用接种盆栽苜蓿幼苗的方法^[18-19,21]测定所分离镰孢菌菌株的致病性。

国内外对于镰孢菌毒素有关研究很多,尤其是对于引起谷物病害的镰孢菌或赤霉菌毒素类型开展了深入研究,分子生物学技术也在相关病原菌毒素化学型的测定方面有较成熟的应用^[30,32-34]。在本研究立项之前进行文献检索时,并未发现利用分子生物学技术测定苜蓿根腐病原镰孢菌毒素化学型的研究报道。本研究利用分子生物学技术对分离自苜蓿根腐病样品的镰孢菌是否具有产 DON 和 NIV 毒素的潜力进行了检测,发现 6 株镰孢菌具有产 NIV 毒素潜力,未发现具有产 DON 毒素潜力的菌株。本研究中获得的具有产毒素潜力的菌株,可通过分离提纯相应菌株的毒素,利用气相色谱法/质谱分析法等其他方法进行毒素种类鉴定和验证。本研究仅使用了用于测定 DON 化学型和 NIV 化学型的引物进行了镰孢菌产 DON 和 NIV 毒素潜力的研究,深入研究可以使用检测产其他毒素的引物,进行其他种类毒素的分子生物学检测。

对获得的毒素进行生物活性测定可用来评价毒素的性质、作用机理和分离效果等。真菌毒素生物活性测定可分为植株和组织器官水平的生物测定^[44]、细胞及细胞器水平的生物测定^[45]、酶及代谢水平的生物测定^[46],其中植物和组织器官水平的生物测定可利用幼苗浸渍法、离体叶片浸渍法、成熟叶组织生物测定法、种子萌发抑制法等进行^[44]。本研究利用种子萌发抑制法对提取的尖孢镰孢菌株 QD3-2 粗毒素进行了生物活性测定,粗毒素不仅对苜蓿种子萌发具有明显的抑制作用,而且对胚根生长具有较强抑制作用。刘海波^[36]对苜蓿根腐病病原尖孢镰孢的毒素滤液进行了生物活性测定,毒素滤液对苜蓿种子萌发和胚根生长具有明显抑制作用,与本研究结果一致,并且毒素滤液对苜蓿幼苗具有很强的致萎性,同时对大豆和绿豆胚根的生长亦有明显的抑制作用。在本研究中,仅进行了尖孢镰孢菌株 QD3-2 粗毒素的生物活性测定,对其他几个菌株的粗毒素的生物活性需要进一步测定,并且可以研究这些粗毒素对苜蓿植株或其他组织、器官的生物活性,更深入的相关研究尚需进一步系统开展。本研究获得的尖孢镰孢菌株 QD3-2 粗毒素为黄褐色粗提物,需进一步分离纯化研究。

致谢

感谢中国农业科学院北京畜牧兽医研究所袁庆华研究员、王瑜老师和苗丽宏老师,以及河北北方学

院农林科技学院刘东霞副教授和袁军海教授在苜蓿根腐病样品采集中给予的大力支持和帮助。感谢中国科学院微生物研究所孙炳达老师在镰孢菌鉴定过程中给予的帮助。

参考文献 References

- [1] 何峰,韩冬梅,万里强,李向林. 我国主产区紫花苜蓿营养状况分析[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(2):503-509
He F, Han D M, Wan L Q, Li X L. The nutrient situations in the major alfalfa producing areas of China [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20 (2): 503-509 (in Chinese)
- [2] 李敏权. 苜蓿根和根颈腐烂病的病原及种质抗病性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2002
Li M Q. Studies on pathogens and resistance to crown and root rot in alfalfa [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2002 (in Chinese)
- [3] Scudamore K A, Livesey C T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77(1):1-17
- [4] Russell R, Paterson M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7):1467-1474
- [5] 李彦忠,南志标. 牧草病害诊断调查与损失评定方法[M]. 南京:江苏凤凰科学技术出版社,2015
Li Y Z, Nan Z B. *The Methods of Diagnose, Investigation and Loss Evaluation for Forage Diseases* [M]. Nanjing: Phoenix Science Press, 2015 (in Chinese)
- [6] Chi C C, Hanson E W, Childers W R. Penetration and subsequent development of three *Fusarium* species in alfalfa and red clover[J]. *Phytopathology*, 1964, 54(4):434-437
- [7] Leath K T, Kendall W A. *Fusarium* root rot of forage species: pathogenicity and host range [J]. *Phytopathology*, 1978, 68(6):826-831
- [8] 陈雅君,刘学敏,崔国文,溪启新. 紫花苜蓿根腐病的研究进展[J]. 中国草地,2000,22(1):51-56
Chen Y J, Liu X M, Cui G W, Xi Q X. Research progress in root rot of alfalfa[J]. *Grassland of China*, 2000, 22(1):51-56 (in Chinese)
- [9] 郭玉霞,南志标,王成章,李春杰,沈禹颖,严学兵. 苜蓿根部入侵真菌研究进展[J]. 草业学报,2009,18(5):243-249
Guo Y X, Nan Z B, Wang C Z, Li C J, Shen Y Y, Yan X B. Progress in research on root invading fungi of *Medicago sativa* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18 (5): 243-249 (in Chinese)
- [10] Samac D A, Rhodes L H, Lamp W O. *Compendium of Alfalfa Diseases and Pests* [M]. 3rd ed. Saint Paul: APS Press, 2014
- [11] Snyder W C, Hansen H N. The species concept in *Fusarium* [J]. *American Journal of Botany*, 1940, 27(2):64-67

- [12] Seif El-Nasr H I, Leath K T. Crown and root fungal disease of alfalfa in Egypt[J]. *Plant Disease*, 1983, 67(5): 509-511
- [13] Uddin W, Knous T R. *Fusarium* species associated with crown rot of alfalfa in Nevada[J]. *Plant Disease*, 1991, 75(1): 51-56
- [14] Cormack M V. *Cylindrocarpon ehrenbergi* Wr, and other species as root parasites of alfalfa and sweet clover in Alberta[J]. *Canadian Journal of Research*, 1937, 15(9): 403-424
- [15] Hawn E J. Studies on the epidemiology of crown bud rot of alfalfa in Southern Alberta[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1958, 36(2): 239-250
- [16] Turner V, Van Alfen N K. Crown rot of alfalfa in Utah[J]. *Phytopathology*, 1983, 73(9): 1333-1337
- [17] 陈雅君, 崔国文. 黑龙江省紫花苜蓿根腐病调查及病原分离[J]. 中国草地, 2001, 23(3): 78-79
Chen Y J, Cui G W. Pathogen isolation and investigation of alfalfa crown and root rot in Heilongjiang[J]. *Grassland of China*, 2001, 23(3): 78-79 (in Chinese)
- [18] 李敏权, 柴兆祥, 李金花, 董云霞, 张丽萍, 张自和. 定西地区苜蓿根和根颈腐烂病原研究[J]. 草地学报, 2003, 11(1): 83-86
Li M Q, Chai Z X, Li J H, Dong Y X, Zhang L P, Zhang Z H. Identification pathogens of crown and root rot of alfalfa in Dingxi Region[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2003, 11(1): 83-86 (in Chinese)
- [19] 王多成, 孟有儒, 李文明, 李万苍. 苜蓿根腐病病原菌的分离及鉴定[J]. 草业科学, 2005, 22(10): 78-81
Wang D C, Meng Y R, Li W M, Li W C. Isolation and identification of the pathogens causing root rot disease of *Medicago sativa*[J]. *Pratacultural Science*, 2005, 22(10): 78-81 (in Chinese)
- [20] 孟嫣. 甘肃省干旱灌区苜蓿地土壤镰刀菌种群结构及致病性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006
Meng N. Population and pathogenicity of *Fusarium* associated with alfalfa in arid-irrigated area of Gansu Province [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- [21] 樊少华. 甘肃省干旱灌区苜蓿地土壤镰刀菌致病性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007
Fan S H. The pathogenicity of *Fusarium* associated with alfalfa in arid-irrigated area of Gansu Province in China [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [22] Cao L X, Zhao C H, Bai Q J, Shao Z Z. Identification of the pathogens causing root rot of alfalfa in Inner Mongolia[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2008, 23(5): 105-107
- [23] 阮柳, 马占鸿, 刘振宇, 秦丰, 王海光. 苜蓿根腐病的病原分离、鉴定与杀菌剂毒力测定[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(6): 56-67
Ruan L, Ma Z H, Liu Z Y, Qin F, Wang H G. Isolation, identification and toxicity determination of pathogens causing alfalfa root rot[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016, 21(6): 56-67 (in Chinese)
- [24] 郭玉霞, 王成章, 严学兵, 李德峰, 吕超, 马登坦. 不同紫花苜蓿品种根部入侵真菌研究[J]. 草地学报, 2009, 17(6): 723-730
Guo Y X, Wang C Z, Yan X B, Li D F, Lv C, Ma D T. Root-invading fungi of different alfalfa varieties[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2009, 17(6): 723-730 (in Chinese)
- [25] 赵宗峰. 新疆呼图壁县种用苜蓿主要真菌病害及其病原菌初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2011
Zhao Z F. Preliminary study on major fungal diseases and pathogens of alfalfa in Hutubi County of Xinjiang [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [26] 潘龙其, 张丽, 杨成德, 袁庆华, 王瑜, 苗丽宏. 紫花苜蓿根腐病原菌——拟枝孢镰刀菌的鉴定及其生物学特性研究[J]. 草业学报, 2015, 24(10): 88-98
Pan L Q, Zhang L, Yang C D, Yuan Q H, Wang Y, Miao L H. Identification and biological characteristics of *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Medicago sativa* root[J]. *Acta Prataculturalae Sinica*, 2015, 24(10): 88-98 (in Chinese)
- [27] 史建荣, 王裕中, 何晨阳, 王金生. 镰刀菌单端孢霉烯毒素及其在植物病程中的作用[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 298-302
Shi J R, Wang Y Z, He C Y, Wang J S. *Fusarium* trichothecene toxins and their function in plant diseases [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1997, 27(4): 298-302 (in Chinese)
- [28] 彭杰, 吴晓鹏, 黄惠琴, 鲍时翔. 镰刀菌毒素研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2): 25-27
Peng J, Wu X P, Huang H Q, Bao S X. Research development of *Fusarium* toxins[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(2): 25-27 (in Chinese)
- [29] 张岳平. 镰刀菌真菌毒素产生与调控机制研究进展[J]. 生命科学, 2011, 23(3): 311-316
Zhang Y P. The research advance of biosynthesis and regulation mechanism on *Fusarium* mycotoxins. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(3): 311-316 (in Chinese)
- [30] 史文琦, 杨立军, 冯洁, 张旭, 曾凡松, 向礼波, 汪华, 喻大昭. 小麦赤霉病流行区镰刀菌致病种及毒素化学型分析[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 486-494
Shi W Q, Yang L J, Feng J, Zhang X, Zeng F S, Xiang L B, Wang H, Yu D Z. Analysis on the population structure of *Fusarium* pathogenic spp. and its mycotoxin chemotypes in *Fusarium* head blight epidemic region [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(5): 486-494 (in Chinese)
- [31] 武爱波, 赵纯森, 瞿波, 廖玉才. 镰刀菌毒素及其分子生物学研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(5): 516-521
Wu A B, Zhao C S, Qu B, Liao Y C. Studies on mycotoxins produced by *Fusarium* isolates and their molecular biological researches[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2003, 22(5): 516-521 (in Chinese)
- [32] Jennings P, Coates M E, Tuener J A, Chandler E A, Nicholson P. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assays[J]. *Plant Pathology*, 2004, 53(2): 182-190
- [33] Lee T, Oh D W, Kim H S, Lee J, Kim Y H, Yun S H, Lee Y W. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing

- chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 2966-2972
- [34] 李伟, 胡迎春, 陈莹, 张爱香, 陈怀谷. 长江流域禾谷镰孢菌群部分菌株系统发育学、产毒素化学型及致病力研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(1): 51-58
- Li W, Hu Y C, Chen Y, Zhang A X, Chen H G. Phylogenetic analysis, chemotype diversity, and pathogenicity of the *Fusarium graminearum* clade in the Yangtze basin [J]. *Mycosystema*, 2010, 29(1): 51-58 (in Chinese)
- [35] Gong L, Jiang Y M, Chen F. Molecular strategies for detection and quantification of mycotoxin-producing *Fusarium* species: A review[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(9): 1767-1776
- [36] 刘海波. 利用病原菌毒素筛选抗根腐病苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006
- Liu H B. Selection of anti-root rot plants of *Medicago sativa* L using toxin generated by *Fusarium oxysporum* [D]. Chongqing: Southwest University, 2006 (in Chinese)
- [37] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- Fang Z D. *Research Methods in Plant Pathology* [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese)
- [38] Guo L D, Hyde K D, Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences[J]. *New Phytologist*, 2000, 147(3): 617-630
- [39] White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]. In Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. London: Academic Press, 1990: 315-322
- [40] Leslie J F, Summerell B A, Bullock S. *The Fusarium Laboratory Manual* [M]. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006
- [41] Appel D J, Gordon T R. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA[J]. *Experimental Mycology*, 1995, 19(2): 120-128
- [42] Chandler E A, Simpson D R, Thomsett M A, Nicholson P. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 62(6): 355-367
- [43] 阮柳. 紫花苜蓿根腐病病原菌分离鉴定及防治药剂筛选[D]. 北京: 中国农业大学, 2015
- Ruan L. Isolation and identification of pathogens causing alfalfa crown and root rot and fungicide screening for its control [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [44] 董金皋, 朱晞. 真菌毒素生物测定方法研究概况 I. 植株和组织器官水平的生物测定[J]. 河北农业大学学报, 1992, 15(4): 99-103
- Dong J G, Zhu X. Research status of mycotoxin bioassay I. Bioassays on plant and tissue organ levels [J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 1992, 15(4): 99-103 (in Chinese)
- [45] 董金皋, 史有艳, 姜虎山. 真菌毒素生物测定方法研究概况 II. 细胞及细胞器水平的生物测定[J]. 河北农业大学学报, 1993, 16(3): 94-98
- Dong J G, Shi Y Y, Jiang H S. Research status of mycotoxin bioassay II. Bioassays on cell and organelle level [J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 1993, 16(3): 94-98 (in Chinese)
- [46] 董金皋, 王江柱, 朱晞. 真菌毒素的生物测定方法研究概况 III. 酶及代谢水平的生物测定[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(2): 95-98
- Dong J G, Wang J Z, Zhu X. Research status of mycotoxin bioassay III. Bioassays on enzyme and metabolic level [J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 1994, 17(2): 95-98 (in Chinese)

责任编辑: 杨爱东