

尖孢镰刀菌的分离鉴定及不同苜蓿品种芽期抗病性

刘香萍*, 敬雪敏, 闫红秀, 罗英花, 许美花

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要 为了解黑龙江省大庆市苜蓿根腐病的病原,评价不同苜蓿品种芽期对根腐病的抗病性,于2018年采集疑似感染根腐病的苜蓿病株,对其进行了病原分离与鉴定。将鉴定得到的致病菌接种于18个品种的紫花苜蓿幼芽,测定相对根长、相对苗长、发病率和病情指数,利用隶属函数进行抗病性综合评价。形态学和rDNA-ITS序列分析结果表明,分离获得的致病菌为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*,其对不同苜蓿品种芽期相对根长、相对苗长、发病率和病情指数均有显著影响($P < 0.05$)。说明尖孢镰刀菌对苜蓿有较强致病性。抗病性综合评价表明:不同苜蓿品种芽期对尖孢镰刀菌根腐病抗性由强到弱依次为:‘龙牧801’ > ‘斯贝德’ > ‘SK3010’ > ‘巨能-CR’ > ‘肇东’ > ‘DS310FY’ > ‘WL168HQ’ > ‘WL354HQ’ > ‘TG4’ > ‘WL319HQ’ > ‘擎天柱’ > ‘WL298HQ’ > ‘龙牧806’ > ‘北极星’ > ‘皇后’ > ‘北极熊’ > ‘CW2000’ > ‘教汉’。

关键词 苜蓿; 根腐病; 尖孢镰刀菌; 分子鉴定; 抗病性

中图分类号: S 435.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018428

Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* on alfalfa and disease resistance of alfalfa varieties during the bud stage

LIU Xiangping, JING Xuemin, YAN Hongxiu, LUO Yinghua, XU Meihua

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract In order to understand the pathogens of alfalfa root rot in Daqing of Heilongjiang province, and to evaluate the resistance of different alfalfa varieties to root rot during the bud stage, the alfalfa roots showing symptoms of root rot were collected, and pathogens were isolated and identified in 2018. Based on morphological characteristics and rDNA-ITS sequence analysis, the pathogen was identified as *Fusarium oxysporum*. The pathogen was inoculated into alfalfa sprouts of 18 varieties. The relative root length, relative seedling length, morbidity and disease index were measured to evaluate disease resistance by comprehensively analyzing subordinative function. The results showed that *F. oxysporum* had significant effects on relative root length, relative seedling length, morbidity and disease index of different alfalfa varieties ($P < 0.05$) during the bud stage, indicating that *F. oxysporum* had strong pathogenicity to alfalfa. The comprehensive evaluation of disease resistance showed that the resistance order of alfalfa varieties during the bud stage to *F. oxysporum* from strong to weak was ‘Longmu 801’ > ‘Sibeide’ > ‘SK3010’ > ‘Juneng-CR’ > ‘Zhaodong’ > ‘DS310FY’ > ‘WL168HQ’ > ‘WL354HQ’ > ‘TG4’ > ‘WL319HQ’ > ‘Qingtianzhu’ > ‘WL298HQ’ > ‘Longmu 806’ > ‘North Star’ > ‘Queen’ > ‘Polar Bear’ > ‘CW2000’ > ‘Aohan’.

Key words alfalfa; root rot; *Fusarium oxysporum*; molecular identification; disease resistance

紫花苜蓿 *Medicago sativa* L. 属豆科多年生草本植物,是世界上种植最为广泛的牧草之一,它具有产量高、适应性强、营养丰富、草质优良、家畜易于消化等特点,其营养价值居牧草之首,有“牧草之王”的

美誉^[1]。紫花苜蓿根系发达,一次种植可利用多年,可用于生态恢复改良干旱和轻度盐碱土壤。但因利用年限较长,根腐病不仅影响当年苜蓿产量,对第2年返青及其多年生特性都有较大影响,已成为苜蓿

收稿日期: 2018-10-02 修订日期: 2018-11-09

基金项目: 黑龙江八一农垦大学创新人才项目(CXRC2017006);国家自然科学基金(31702169);黑龙江八一农垦大学学成、引进人才科研启动计划(XDB2014-05);大庆市指导性科技计划项目(ZD-2017-69);黑龙江八一农垦大学研究生科研创新项目(YJSCX2018-Y39)

* 通信作者 E-mail: lxp3885@126.com.

产量下降和植株衰败的一个极其重要的原因^[2-3]。根腐病是世界性病害,几乎所有苜蓿产区都有发生。据估计,每年全世界由根腐病造成的产量损失在20%左右,有些严重发生的地块甚至达到40%^[4-5]。根腐病是由镰刀菌引起的土传真菌病害^[6],2003年,李敏权等^[7]在对甘肃定西苜蓿根腐病病原的研究中发现了3种镰刀菌,即尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、锐顶镰刀菌 *F. acuminatum* 和半裸镰刀菌 *F. semitectum*,这是我国首次有关根腐病病原的系统的研究报道。尖孢镰刀菌是苜蓿根腐病主要致病菌,它不仅可以在宿主植物中存活,还可在土壤和空气中存活达10年以上,表现出很强的致病性^[8]。目前,苜蓿种苗对尖孢镰刀菌的抗病性方面缺乏系统性研究。本试验在形态学观察的基础上,结合分子生物学手段,测定了18个紫花苜蓿品种芽期对尖孢镰刀菌的抗病性,以期苜蓿抗根腐病品种的筛选提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与苜蓿品种来源

2018年6月在黑龙江八一农垦大学动物科技学院草业科学系苜蓿试验田进行了根腐病调查采样,苜蓿品种为‘龙牧801’。将田间疑似病株挖出,并将主根维管束变褐坏死的根腐病根样品(图1)带回实验室进行致病菌分离与鉴定。

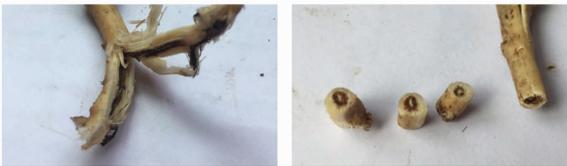


图1 苜蓿根腐病症状

Fig. 1 Symptoms of alfalfa root rot

供抗病性评价苜蓿品种共18个,分别为‘CW2000’、‘DS310FY’、‘SK3010’、‘WL168HQ’、‘WL298HQ’、‘WL319HQ’、‘WL354HQ’、‘敖汉’、‘北极星’、‘北极熊’、‘皇后’、‘巨能-CR’、‘龙牧801’、‘龙牧806’、‘TG4’、‘擎天柱’、‘斯贝德’和‘肇东’,均由黑龙江省畜牧研究所提供。

1.2 病原菌分离纯化

病原菌分离采用常规组织分离法进行,通过在PDA培养基上培养、纯化获得分离菌株。再经过平板涂布法进行单孢分离,用斜面PDA培养基4℃冰

箱中保种,待用。

1.3 病原菌形态学观察

待菌丝长成菌落之后,依据Booth's镰刀菌分类标准^[9]在显微镜下观察菌丝和分生孢子形态、厚垣孢子的有无及着生方式,并用测微尺测量孢子大小,同时进行显微照相。

1.4 病原菌致病性测定及再分离纯化

根据柯赫氏法则,将单孢分离的菌株回接至健康的成株‘龙牧801’,植株发病症状与田间自然发病症状一致,从症状完全一致的植株上分离、纯化病原菌至PDA培养基,观察再次分离、纯化的菌株与接种菌株形态是否一致,形态一致的菌株为目标病原菌。

1.5 病原菌分子生物学鉴定

在形态学特征鉴定的基础上,采用DNA提取试剂盒(OMEGA-D3390-01,OMEGA公司)提取菌株DNA。采用rDNA-ITS区通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μL,2×Taq Master Mix 12.5 μL, DNA模板为1 μL,上下游引物各0.3 μL, ddH₂O 10.9 μL。反应程序为94℃预变性3 min;94℃变性30 s,54℃退火30 s;72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸5 min。PCR产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,扩增产物送交该公司测序。

获得的rDNA-ITS序列与GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中的镰刀菌rDNA-ITS序列进行比较,利用MEGA 5软件进行聚类分析,构建进化树。

1.6 不同苜蓿品种芽期抗病性比较

1.6.1 病原菌接种

在PDA培养基上培养病原菌,1周后加5 mL无菌水至培养基上,用手术刀刮取菌丝,双层无菌纱布过滤菌丝,再加5 mL无菌水冲洗培养基表面残留的菌丝,滤液即为孢子悬浮液,浓度为 1×10^6 个/mL。挑选各苜蓿品种中优质的种子约200粒,在无菌条件下用75%乙醇浸泡2 min,再用1%次氯酸钠浸泡5 min,无菌水冲洗5次,无菌滤纸吸干种子表面水分,将种子均匀放置在放有双层滤纸的9 cm无菌培养皿中,添加适量无菌水使种子吸饱水分进行催芽。1~2 d后种子萌发,幼芽约1 cm时,挑选长势一致的幼芽放置在新的放有双层滤纸的9 cm无菌培养

皿中,每皿 25 粒。每个苜蓿品种分为 A、B 两组,每组 3 个重复,A 组为处理组,每皿注射 3 mL 的孢子悬浮液;B 组为对照组,每皿注射 3 mL 无菌水。每天适量添加无菌水,保证幼芽吸水饱满。待接种 14 d 后,测定根长、苗长和发病株数,根据病斑占根系面积的百分比进行病害分级。分级标准为:0 级,无症状;1 级,根部变细;2 级,根部病斑面积小于等于 1/2;3 级,根部病斑面积大于 1/2;4 级,全株腐烂(图 2)。



图 2 苜蓿芽期接种病原菌病害分级标准图

Fig. 2 Classification criteria picture of disease on alfalfa plants inoculated with pathogens during the bud stage

1.6.2 测定指标

相对根长=(菌液处理组根长/对照组根长)×100%;

相对苗长=(菌液处理组苗长/对照组苗长)×100%;

发病率=(病株数/总株数)×100%;

病情指数= \sum (各级病株数×该级代表值)/(总株数×最重级别代表值)×100。

1.6.3 数据处理

运用隶属函数对各指标进行标准化处理^[10]。当指标与抗病性呈正相关用公式(1),当指标与抗病性呈负相关用公式(2)。

$$\mu(X_j) = \frac{X_j - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} \quad (1)$$

$$\mu(X_j) = \frac{X_{\min} - X_j}{X_{\max} - X_{\min}}, j = 1, 2, \dots, n \quad (2)$$

$$V_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}{X_j}} \quad (3)$$

$$W_j = \frac{V_j}{\sum_{j=1}^m V_j} \quad (4)$$

$$D = \sum_{j=1}^n [\mu(X_j) \cdot W_j], j = 1, 2, \dots, n \quad (5)$$

式中, $\mu(X_j)$ 表示隶属函数值; X_j 表示 j 品种的综合

指标值; X_{\min} 表示 j 品种综合指标的最小值, X_{\max} 表示 j 品种综合指标的最大值。

用公式(3)计算标准差系数 V_j ,之后用公式(4)得到各指标的权重系数 W_j 。用公式(5)计算综合评价值。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学鉴定

菌株在 PDA 培养基上 25℃ 培养 7 d 后菌落直径为 62.3~68.0 mm,气生菌丝茂盛呈白色絮状(图 3a),培养基底部为黄白色,气生菌丝有隔,且具有侧生分枝(图 3b)。不易产生小型分生孢子,无隔膜,大小(3.0~9.5) μm × (0.9~2.0) μm ;产生的大型分生孢子(图 3c)多呈纺锤形,细长,顶端微微弯曲,一般具有 3~5 个隔膜,大小(10.0~15.5) μm × (3.5~2.1) μm 。培养后期,容易生成厚垣孢子(图 3d),菌丝膨大。依据形态学特征,将该菌株鉴定为尖孢镰刀菌。

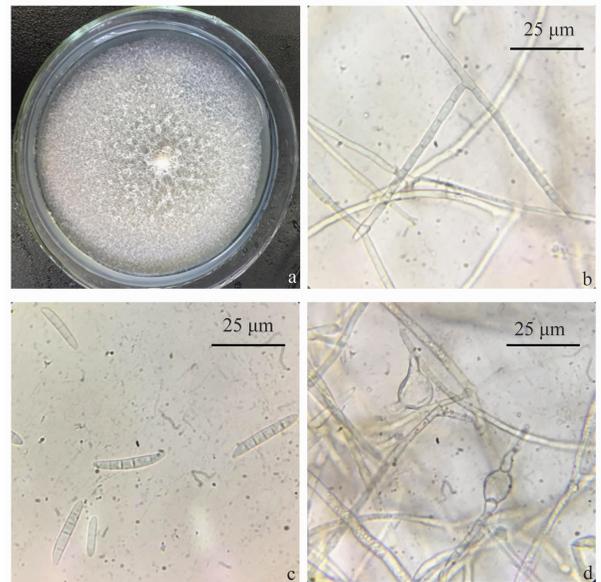


图 3 苜蓿根腐病原菌的形态特征
a: 在 PDA 培养基上的菌落形态; b: 菌丝; c: 大孢子和小孢子; d: 厚垣孢子
a: Colony of pathogen on PDA plate; b: Mycelia; c: Macroconidia and microconidia; d: Chlamydo-spore

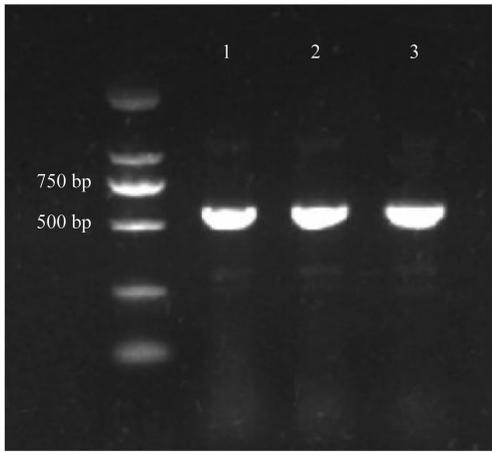
图 3 苜蓿根腐病原菌的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of root rot pathogen

2.2 病原菌分子生物学鉴定

菌株经提取 DNA,利用 ITS 引物进行 PCR 扩增后,经琼脂糖凝胶电泳检测得到大小约 560 bp 的片段(图 4)。所获得的序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,发现该病原菌与登录号为 MG136705

等尖孢镰刀菌的 ITS 序列同源性为 99%~100%。

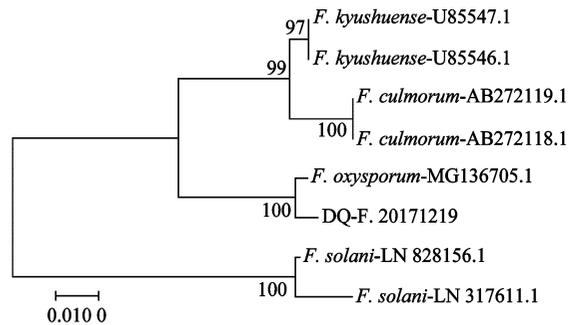


1~3: 3个重复
1-3: 3 replicates

图 4 苜蓿根腐病原菌的 rDNA-ITS 片段 PCR 扩增图谱
Fig. 4 PCR amplification electrophoresis map of rDNA-ITS fragment of root rot pathogen

在基于 rDNA-ITS 区序列构建的系统发育树中 (图 5), 病原菌与 NCBI 数据库中的尖孢镰刀菌聚为一类, 而与其他菌种距离较远, 表明该病原菌属于尖孢镰刀菌。

相对苗长呈现下降趋势, 在一定程度上反映了苜蓿接种病原菌后的抗病性强弱, 并且不同品种间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。从图 6 可知, 各品种相对根长在 0.39~0.96 之间。其中相对根长小于 0.5 的有‘敖汉’、‘皇后’和‘北极熊’, 相对根长分别为 0.39、0.40 和 0.41; 大于 0.95 的有‘斯贝德’, 相对根长为 0.96; 其他品种的相对根长在 0.5~0.95 之间。各品种的相对苗长在 0.48~0.98 之间。其中相对苗长小于 0.5 的有‘敖汉’, 相对苗长为 0.48; 大于 0.95 的有‘巨能-CR’和‘WL354HQ’, 相对苗长分别为 0.95 和 0.98; 其他品种的相对苗长在 0.5~0.95 之间。



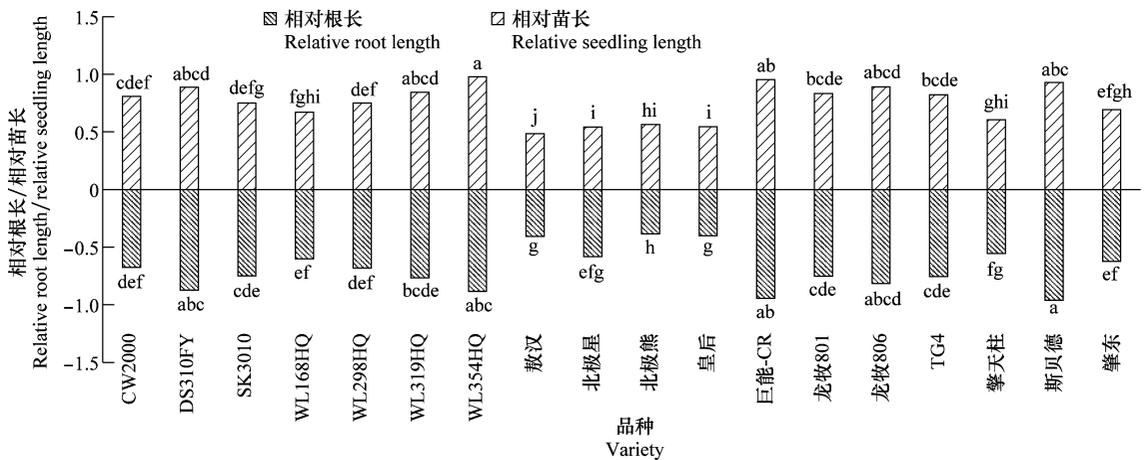
分支处数字代表分类单元聚集在一起的几率, 即进化树的自展值 (>50%)
The number in the branch is bootstrap value (>50%)

图 5 基于 rDNA-ITS 区序列构建的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree constructed with the program neighbor-joining (NJ) based on rDNA-ITS sequence

2.3 不同苜蓿品种芽期抗病性评价

2.3.1 尖孢镰刀菌对 18 个苜蓿品种芽期相对根长和相对苗长的影响

受尖孢镰刀菌侵染后, 苜蓿芽期的相对根长和



柱上不同小写字母表示不同品种的相对根长或相对苗长差异显著
Different small letters on the bar indicate significant difference in relative root length or relative seedling length among different varieties

图 6 尖孢镰刀菌对 18 个苜蓿品种芽期相对根长和相对苗长的影响

Fig. 6 Effects of *Fusarium oxysporum* on relative root length and relative seedling length of 18 alfalfa varieties during the bud stage

2.3.2 18 个苜蓿品种芽期根腐病发病率

不同品种苜蓿芽期的发病率存在显著差异 ($P < 0.05$)。从图 7 可知, 发病率在 66.67%~100% 之间,

其中发病率最低的为‘龙牧 801’, 发病率为 66.67%; 而发病率达到 95% 的有 6 个苜蓿品种, 分别为‘敖汉’、‘CW2000’、‘龙牧 806’、‘北极星’、‘北极熊’和‘皇后’。

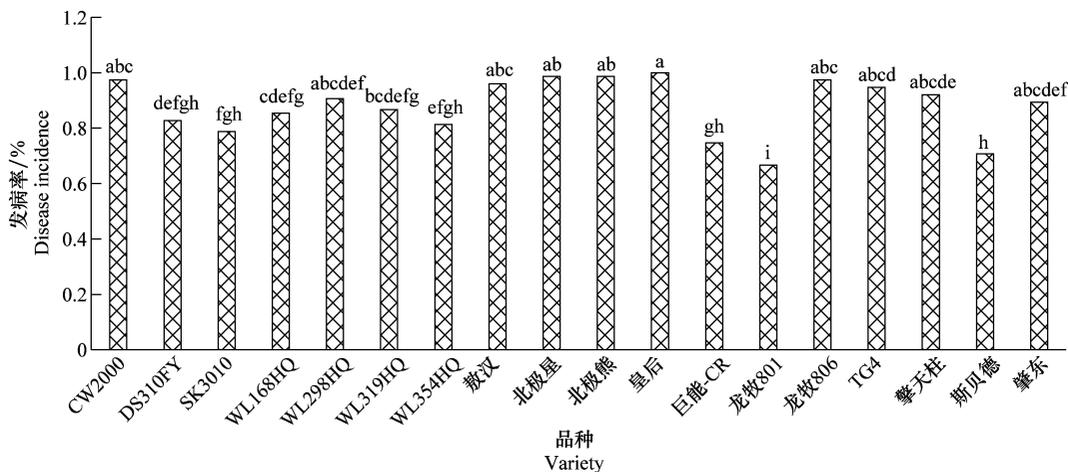


图 7 18 个苜蓿品种芽期接种尖孢镰刀菌的发病率

Fig. 7 Disease incidence of 18 alfalfa varieties inoculated with *Fusarium oxysporum* in the bud stage

2.3.3 18 个苜蓿品种芽期病情指数

不同苜蓿品种芽期对病原菌的抗性存在显著差异。从图 8 可知,各品种的病情指数变化范围在 25~68 之间。病情指数在 30 以下的是‘龙牧 801’,其病

情指数为 25;病情指数在 60 以上的品种有:‘北极星’、‘皇后’、‘北极熊’、‘CW2000’和‘敖汉’,‘敖汉’的病情指数最高,为 68。

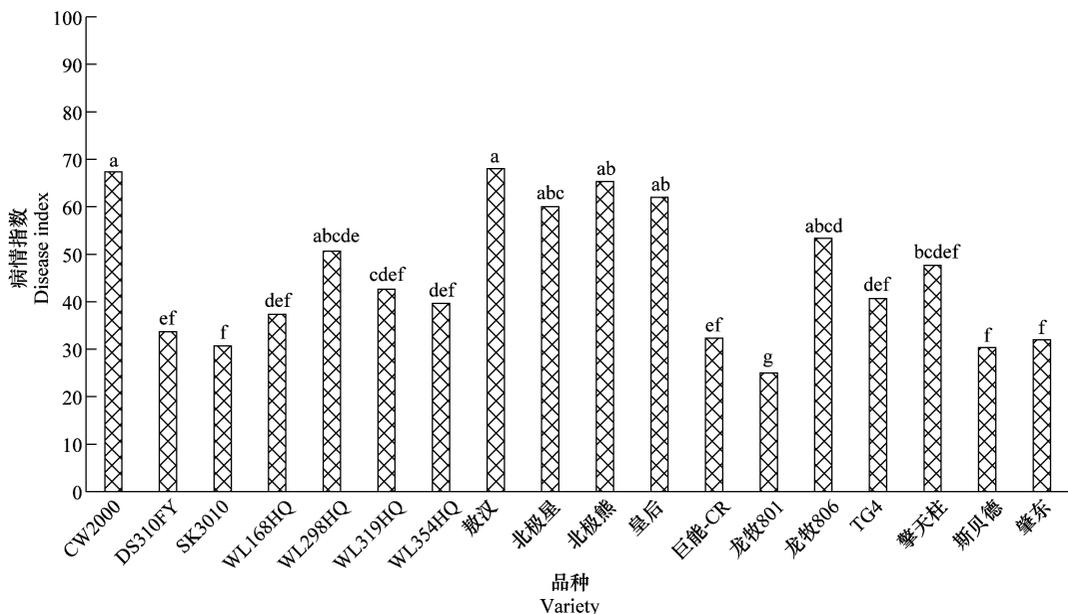


图 8 18 个苜蓿品种芽期接种尖孢镰刀菌的病情指数

Fig. 8 Disease index of 18 alfalfa varieties inoculated with *Fusarium oxysporum* in the bud stage

2.3.4 18 个苜蓿品种芽期对尖孢镰刀菌抗病性综合评价

以 18 个苜蓿品种芽期的相对根长、相对苗长、发病率和病情指数 4 个指标作为依据,采用隶属函数法结合各指标的权重系数,综合评价这 18 个苜蓿品种芽期对尖孢镰刀菌的抗病性(表 1)。D 值代表抗病性

的强弱,D 值越大抗病性越强。排序结果表明,18 个苜蓿品种芽期抗病性的强弱顺序依次为‘龙牧 801’>‘斯贝德’>‘SK3010’>‘巨能-CR’>‘肇东’>‘DS310FY’>‘WL168HQ’>‘WL354HQ’>‘TG4’>‘WL319HQ’>‘擎天柱’>‘WL298HQ’>‘龙牧 806’>‘北极星’>‘皇后’>‘北极熊’>‘CW2000’>‘敖汉’。

表 1 18 个苜蓿品种芽期各指标隶属函数值与 D 值

Table 1 Subordinate function and D value of index of 18 alfalfa varieties in the bud stage

材料编号 Accession code	品种 Variety	隶属函数 Subordinate function				D 值 D value	排序 Order
		相对根长 Relative root length	相对苗长 Relative seedling length	发病率 Disease incidence	病情指数 Disease index		
1	CW2000	0.505	0.652	0.080	0.016	0.029	17
2	DS310FY	0.849	0.813	0.520	0.798	0.797	6
3	SK3010	0.635	0.534	0.640	0.868	0.860	3
4	WL168HQ	0.374	0.374	0.440	0.713	0.704	7
5	WL298HQ	0.515	0.540	0.280	0.403	0.405	12
6	WL319HQ	0.660	0.723	0.400	0.589	0.590	10
7	WL354HQ	0.868	1.000	0.560	0.659	0.664	8
8	敖汉	0.035	0.000	0.120	0.000	0.001	18
9	北极星	0.344	0.117	0.040	0.186	0.186	14
10	北极熊	0.000	0.158	0.040	0.062	0.062	16
11	皇后	0.027	0.123	0.000	0.140	0.137	15
12	巨能-CR	0.975	0.947	0.760	0.830	0.832	4
13	龙牧 801	0.637	0.704	1.000	1.000	0.992	1
14	龙牧 806	0.749	0.819	0.080	0.341	0.349	13
15	TG4	0.644	0.682	0.160	0.636	0.633	9
16	擎天柱	0.297	0.245	0.240	0.473	0.467	11
17	斯贝德	1.000	0.897	0.880	0.876	0.878	2
18	肇东	0.413	0.418	0.320	0.837	0.824	5

3 讨论

镰刀菌形态复杂,易受外界环境影响发生变异,通过形态学观察很难准确鉴定到种。本研究用形态学和分子生物学结合的方式,对样本菌株进行鉴定。其中的分子生物学用到的 rDNA-ITS 是介于 18S rDNA、5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的区域,该区域被普遍用来进行真菌种间或种内遗传相似性的分子系统研究^[11-13]。

关于苜蓿苗期根腐病抗病性评价,黄宁等^[14]用尖孢镰刀菌接种了 62 个苜蓿品种的无菌苗,聚类分析得到了抗病品种 4 个、中抗品种 31 个、感病品种 27 个;辛宝宝等^[15]用尖孢镰刀菌对 60 份紫花苜蓿种质材料进行苗期对根腐病抗病性评价,通过计算发病率和病情指数,并测定株高、地上生物量及地下生物量,得出 12 份耐病材料、34 份感病材料、14 份高感材料,无免疫和抗病材料,它们的发病率范围是 3.33%~100%,病情指数范围为 25.92~82.78;潘其龙等^[16]用拟枝孢镰刀菌接种测定 30 个紫花苜蓿品种苗期抗性,结果表明不同品种间抗性差异显著,病情指数在 30.67~64.67。关于苜蓿种苗期抗病性评价,郭玉霞等^[17]将锐顶镰刀菌接种于 14 个紫花苜蓿品种的种子进行种苗期对根腐病抗病性评价,通过测定相对根长、苗高、发病率,并计算病情指

数,得出 1 个品种抗病性最强、4 个品种抗病性较强、5 个品种抗病性较弱、1 个品种抗病性最弱,它们的病情指数范围为 8.58~63.12;孔前前等^[18]用 150 株镰刀菌侵染‘中苜 1 号’苜蓿种子,测定其发病率及病情指数来评价镰刀菌的致病性。其中尖孢镰刀菌的病情指数范围为 51.67~78.00。而苜蓿种子自身存在发芽率的问题,本试验对苜蓿种子进行催芽后接种尖孢镰刀菌,避开了苜蓿种子由于种子休眠、未受精、不完整、包衣过厚而影响试验准确性的问题,降低了误差。本试验对 18 个苜蓿品种芽期进行尖孢镰刀菌根腐病抗性评价,得出发病率范围为 66.67%~100%,病情指数变化范围为 25~68。这与辛宝宝等^[15]、孔前前等^[18]的试验虽然接种的菌种相同,但因接种时期和苜蓿品种的不同而导致病情指数存在较大差异。

4 结论

本研究从苜蓿根腐病病组织中分离得到病原菌,形态学鉴定结果与基于 ITS 序列的分子生物学鉴定结果一致,确定所分离病原菌为尖孢镰刀菌。18 个苜蓿品种在芽期对其抗病性存在差异,由强到弱依次是‘龙牧 801’>‘斯贝德’>‘SK3010’>‘巨能-CR’>‘肇东’>‘DS310FY’>‘WL168HQ’>‘WL354HQ’>‘TG4’>‘WL319HQ’>‘擎天柱’>

‘WL298HQ’>‘龙牧 806’>‘北极星’>‘皇后’>‘北极熊’>‘CW2000’>‘敖汉’。

参考文献

- [1] 赵燕梅, 钟华, 崔志文, 等. 不同品种、刈割时期苜蓿的营养特性[J]. 草业与畜牧, 2015(1): 17-22.
- [2] 孟悦, 徐博, 陈晶晶, 等. 紫花苜蓿根腐病及其防治方法的研究进展[J]. 江西农业, 2017(23): 30.
- [3] 丛丽丽, 康俊梅, 张铁军, 等. 苜蓿镰刀菌根腐病原菌的分离鉴定与致病性分析[J]. 草地学报, 2017, 25(4): 857-865.
- [4] 李万苍, 李文明, 孟有儒. 苜蓿根腐病菌(*Fusarium solani*)生物学特性研究[J]. 草业学报, 2005(4): 106-110.
- [5] 郭玉霞, 管永卓, 张金锋, 等. 根腐病原镰刀菌-苜蓿品种-土壤水分互作对种苗生长的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(3): 623-631.
- [6] 铁男. 苜蓿根腐病如何防治[J]. 农药市场信息, 2018(17): 48.
- [7] 李敏权. 苜蓿根和根颈腐烂病病原致病性及品种抗病性研究[J]. 中国草地, 2003(1): 40-44.
- [8] WU Hongsheng, ZHOU Xiaodong, SHI Xue, et al. *In vitro* responses of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to phenolic acids in decaying watermelon tissues [J]. *Phytochemistry Letters*, 2013, 8: 171-178.
- [9] BOOTH C. 镰刀菌属[M]. 陈其焜译. 北京: 农业出版社, 1988.
- [10] 辛宝宝, 袁庆华, 王瑜, 等. 不同苜蓿材料对木贼镰刀菌根腐

病的抗病性评价[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 158-164.

- [11] SAMPIETRO D A, MARIN P, IGLESIAS J, et al. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium*-species associated to cereal grains from Argentina [J]. *Fungal Biology*, 2010, 114: 74-81.
- [12] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHDORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (rDNA-ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [13] 刘晓倩, 祁建民, 陈玉森, 等. 中国红麻炭疽病原菌的分离鉴定及 rDNA-ITS 序列分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(17): 3515-3521.
- [14] 黄宁, 孙鑫博, 王铁梅, 等. 62 个苜蓿品种抗根腐病评价及抗病评价标准品种的筛选[J]. 中国草地学报, 2013, 35(1): 12-17.
- [15] 辛宝宝, 袁庆华, 王瑜, 等. 紫花苜蓿对尖孢镰刀菌的抗性评价[J]. 中国草地学报, 2016, 38(1): 74-80.
- [16] 潘龙其, 张丽, 田进山, 等. 紫花苜蓿不同品种对拟枝孢镰刀菌的抗性评价[J]. 草业学报, 2016, 25(5): 95-101.
- [17] 郭玉霞, 郭志鹏, 张靖雪, 等. 锐顶镰孢致病性及苜蓿品种间的抗病性研究[J]. 植物病理学报, 2018, 48(2): 213-222.
- [18] 孔前前, 秦丰, 张雨竹, 等. 苜蓿镰孢菌根腐病原致病性和毒素化学型测定[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(5): 74-85.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 200 页)

- [8] HONG S G, MACCARONI M, FIGULI P J, et al. Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe [J]. *Mycological Research*, 2006, 110(11): 1290-1300.
- [9] 徐阳, 刘雪峰, 蒋萍, 等. 和田地区核桃叶枯病原菌的鉴定[J]. 西部林业科学, 2012, 41(3): 102-105.
- [10] 曲文文, 刘霞, 杨克强, 等. 山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 121-128.
- [11] 韩敏, 蒋萍. 核桃叶斑病原菌的分子鉴定[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(1): 91-96.
- [12] 陈红梅, 李金花, 柴兆祥, 等. 35 个马铃薯品种对镰刀菌干腐病优势病原的抗病性评价[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 308-314.
- [13] 余仲东, 李涛, 王兴旺, 等. 5 个核桃主栽品种对 *Botryosphaeria* 溃疡病的抗性评估[J]. 中国南方果树, 2016, 45(4): 123-125.
- [14] 牛亚胜, 谢鸣, 汪恒兴, 等. 核桃品种对黑斑病抗性的研究[J]. 北方果树, 2010(4): 5-7.
- [15] 石进昌, 马玉林. 不同核桃品种对核桃细菌性黑斑病的抗性调查[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(2): 66.
- [16] 张静妮. 不同秋眠等级苜蓿匍匐霉叶斑病抗性评价及抗病机理研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [17] 王瑜, 刘怡, 周彬彬, 等. 苜蓿对匍柄霉叶斑病与茎点霉叶斑病

的抗性评价研究[J]. 草业学报, 2015, 24(7): 155-162.

- [18] 黄德芬. 甘蓝黑腐病的离体抗性鉴定及相关生理生化指标分析[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [19] 玄立春, 王红霞, 孙晓丽, 等. 核桃青皮单宁测定方法的研究[J]. 河北果树, 2013(4): 4-6.
- [20] 寿园园, 李春敏, 赵永波, 等. 苹果抗褐斑病离体鉴定的方法[J]. 果树学报, 2009, 26(6): 912-914.
- [21] 高润雷. 哈密瓜细菌性叶斑病原鉴定及不同品种抗病性测定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [22] 姜琬. 重庆枇杷灰斑病菌鉴定、抗性评价及防控研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [23] 刘天明, 李华, 张振文. 鲜食葡萄品种对霜霉病的抗性及其抗病机理研究[J]. 植物保护学报, 2001, 28(2): 118-122.
- [24] 殷辉, 周建波, 吕红, 等. 36 个苹果树品种对腐烂病菌的抗病性评价[J]. 山西农业科学, 2017, 45(6): 998-1001.
- [25] 施丽丽. 河北省太行山区核桃主要栽培品种综合性状评价研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [26] 陈永芳, 弓成林, 程昌凤. 18 个桔类品种果实品质的灰色关联分析[J]. 四川农业大学学报, 2000, 18(2): 157-159.

(责任编辑: 杨明丽)