

Fusarium graminearum sensu stricto 和 F. asiaticum 3 种分子鉴定方法的比较

茹艳艳,谢淑娜,李保叶,孙 静,刘佳中,郝俊杰*
(河南省农业科学院 植物保护研究所/农业部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室/
河南省农作物病虫害防治重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要: *Fusarium graminearum sensu stricto* 和 *F. asiaticum* 是中国主要的禾谷镰刀菌复合种(FGSC)成员,为了提高这 2 个种的鉴定效率,选取 48 个引起小麦赤霉病和玉米茎腐病的 FGSC 菌株,比较了系统发育谱系分析、PCR-RFLP(聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性)和多重 PCR 3 种分子鉴定方法。系统发育谱系分析首先扩增菌株的 *EF-1 α* 和 *Tri101* 两个基因的部分序列,测序之后利用 MEGA 6.06 软件构建系统发育树,结果表明,有 11 个菌株与 *F. asiaticum* 聚在一起,37 个菌株与 *F. graminearum sensu stricto* 聚为一枝,此法繁琐、复杂、成本高,但鉴定结果准确。PCR-RFLP 基于组蛋白 H3 基因特殊的酶切位点,设计引物 H3dStyI/H3R1,通过 PCR 和酶切反应进行鉴定,电泳检测发现,有 11 个菌株为 *F. asiaticum*,37 个菌株为 *F. graminearum sensu stricto*,该法工作量大且对操作过程要求高。多重 PCR 基于 *CYP51A* 基因设计特异引物 FaF/FaR 和 FgF/FgR 进行鉴定,电泳检测结果表明,有 11 个菌株为 *F. asiaticum*,37 个菌株为 *F. graminearum sensu stricto*,此法操作简单、效率高。以上 3 种分子鉴定方法结果一致,但多重 PCR 方法具有快速、准确、高效的特点。
关键词: 禾谷镰刀菌复合种; *Fusarium graminearum sensu stricto*; *Fusarium asiaticum*; 分子鉴定
中图分类号: S432.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)11-0080-07

Comparison of Three Molecular Identification Methods for *Fusarium graminearum sensu stricto* and *F. asiaticum*

RU Yanyan, XIE Shuna, LI Baoye, SUN Jing, LIU Jiazhong, HAO Junjie*
(Plant Protection Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops
in Southern Region of North China/Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: *Fusarium graminearum sensu stricto* and *F. asiaticum* are major members of *Fusarium graminearum* species complex(FGSC) in China. In this study, to improve the identification efficiency of these two species, 48 members of FGSC collected from plants showing *Fusarium* head blight (FHB) or maize stalk rot(MSR) were identified using three molecular identification methods. One method was amplification of partial sequences of two genes *EF-1 α* and *Tri101*, and then sequencing and phylogenetic analyses by MEGA 6.06 software. The results showed that 11 isolates were clustered together with *F. asiaticum* and 37 isolates were clustered together with *F. graminearum sensu stricto*. This method was cumbersome, complex and costly, but the identification results were accurate. A second method was polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). Based on the specific restriction sites of histone H3 gene, primers H3dSty I and H3R1 were designed. 11 isolates were identified as *F. asiaticum* and

收稿日期:2017-04-13
基金项目:河南省农业科学院科研发展专项资金项目(201412008,豫财预[2017]76-11);河南省农业科学院自主创新专项基金
金项目(2017ZC38)
作者简介:茹艳艳(1986-),女,河南洛阳人,助理研究员,博士,主要从事玉米病害研究。E-mail:ruyanbingyu@163.com
* 通讯作者:郝俊杰(1978-),男,河南登封人,副研究员,博士,主要从事玉米病害研究。E-mail:haojjds@163.com

37 isolates were *F. graminearum* sensu stricto. This method required lots of work and high operation process. The third method was a multiplex PCR. Based on the *CYP51A* gene, primers FaF/FaR and FgF/FgR were designed. 11 isolates were identified as *F. asiaticum* and 37 isolates were *F. graminearum* sensu stricto. This method was simple and efficient. These results were similar, while the multiplex PCR method was more rapid, accurate and efficient.

Key words: *Fusarium graminearum* species complex (FGSC); *Fusarium graminearum* sensu stricto; *Fusarium asiaticum*; molecular identification

禾谷镰刀菌复合种 (*Fusarium graminearum* species complex, FGSC) 是农业生产中常见的病原菌,可引起多种作物根腐病、茎腐病和穗腐病的发生,不仅使农作物出现减产,造成严重的经济损失,而且产生的多种真菌毒素还影响粮食的安全^[1-3]。目前,已经明确禾谷镰刀菌复合种包含至少 16 个种,不同种表现一定的地理分布特征,其中中国主要为 *F. asiaticum* (进化分枝 6) 和 *F. graminearum* sensu stricto (进化分枝 7)^[4-7]。

关于 FGSC 的概念,最初 O’Donnell 等^[8]在全球收集了数十个代表性菌株,选用 *Tri101* (the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene)、*RED* (a putative reductase gene)、*EF-1 α* (translation elongation factor 1 α)、*TUB* (β -tubulin)、*PHO* (phosphate permase genes) 和 *URA* (UTP-ammonia ligase) 6 个单拷贝核基因,进行系统发育谱系分析,发现禾谷镰刀菌是一个复合种。之后, Ward 等^[9]报道了利用多位点基因型分析法 (multilocus genotyping assay) 进行 FGSC 的鉴定,该方法基于 3 个持家基因 (*RED*、*MAT* 和 *TEF-1*) 和毒素合成的 3 个基因 (*TRI101*、*TRI12* 和 *TRI3*) 设计 48 对引物,通过多重 PCR,同时进行种和毒素型的鉴定。Davari 等^[10]发明了一种灵敏、有效识别 FGSC 的方法——RCA (rolling circle amplification),该方法通过比较超过 40 个 *Fusarium* spp. 菌株 (FGSC、FIESC、FTSC 和 FOSC) 的 *EF-1 α* 基因序列,设计 FGSC 特异的探针引物,PCR 产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (有条带) 或者加入荧光染料 (SYBR Green I) 在紫外 (UV) 灯下照射 (荧光发亮) 进行鉴定,此法的特点是灵敏,但不能区分 FGSC 的不同种。Fernández-Ortuño 等^[11]研究报道了通过 Real-time PCR 同时检测 FGSC 中 3 个不同种 (*F. asiatic-*

um、*F. ussurianum* 和 *F. vorosii*), 该方法基于镰刀菌的特异基因 *CYP51C* (a sterol 14- α demethylase paralogue) 设计定量引物进行鉴定,此法具有明显的局限性,只能对已知的这 3 个种进行鉴定。

由于中国和日本的 FGSC 主要为 *F. graminearum* sensu stricto 和 *F. asiaticum* 2 个种,因此,研究者基于这 2 个种,分别建立了系统发育谱系分析、PCR-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 和多重 PCR 等方法。系统发育谱系分析是基于 FGSC 菌株的 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因,利用 MEGA 6.06 软件构建系统发育树,完成种的鉴定^[12-13]; PCR-RFLP 是基于组蛋白 H3 基因特殊的酶切位点,设计引物 H3dStyI/H3R1,通过 PCR 和酶切反应,完成种的鉴定^[14]; 多重 PCR 是基于 *CYP51A* 基因,设计特异引物 FaF/FaR (对 *F. asiaticum* 特异) 和 FgF/FgR (对 *F. graminearum* sensu stricto 特异),完成对 FGSC 种的鉴定^[15]。本研究选取引起河南省小麦赤霉病和玉米茎腐病的 FGSC 菌株,通过比较 3 种分子鉴定方法,选择出一种快速、准确、高效的 *F. graminearum* sensu stricto 和 *F. asiaticum* 鉴定方法。

1 材料和方法

1.1 样品收集与菌株分离

2012 年,在小麦赤霉病和玉米茎腐病发病的高峰期,采集河南省许昌、漯河、驻马店地区的病样 (小麦赤霉病为穗部,玉米茎腐病为病株茎基部第 1~2 节)。FGSC 菌株的分离、单孢纯化和初步鉴定 (主要通过观察 PDA 培养基上的菌落形态和颜色以及液体摇菌培养后分生孢子的形态来鉴定) 等参照孙静等^[16]和吴全安等^[17]的方法,共获得 48 个 FGSC 菌株 (表 1)。

表 1 试验所用的 48 个 FGSC 菌株

编号	菌株	种	采集地点	寄主	编号	菌株	种	采集地点	寄主
1	WC2L	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦	25	WL3M	<i>F. asiaticum</i>	漯河	小麦
2	WL2L	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦	26	WM1Q	<i>F. asiaticum</i>	驻马店	小麦
3	WC3K	<i>F. asiaticum</i>	许昌	小麦	27	WC2N	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦
4	WL2F	<i>F. asiaticum</i>	漯河	小麦	28	WC3H	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦
5	WC3C	<i>F. asiaticum</i>	许昌	小麦	29	WL3A	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦

续表 1 试验所用的 48 个 FGSC 菌株

编号	菌株	种	采集地点	寄主	编号	菌株	种	采集地点	寄主
6	WC1F-1	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦	30	MLbF-1	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	玉米
7	MCdG-2	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	玉米	31	WL2K	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦
8	WL4H	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦	32	WC1P	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦
9	MMbC-3	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	玉米	33	WC3M	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦
10	WL3Q	<i>F. asiaticum</i>	漯河	小麦	34	WL3S	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦
11	MMbN-2	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	玉米	35	WL4P	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦
12	WM3S	<i>F. asiaticum</i>	驻马店	小麦	36	WL2P	<i>F. asiaticum</i>	漯河	小麦
13	WC4C	<i>F. asiaticum</i>	许昌	小麦	37	MLaQ-2	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	玉米
14	WL4C	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦	38	WM2S	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	小麦
15	WL4Q	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦	39	MMbA-2	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	玉米
16	WM1D	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	小麦	40	WC3Q	<i>F. asiaticum</i>	许昌	小麦
17	WL4L	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦	41	MMbM-3	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	玉米
18	WM1H	<i>F. asiaticum</i>	驻马店	小麦	42	WL2C	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦
19	WC1D	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦	43	WC2P	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦
20	WC4K	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦	44	WL2A	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦
21	MCcH-1	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	玉米	45	MLcN-1	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	玉米
22	WC1K-1	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦	46	WC4P	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	许昌	小麦
23	WL4E	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦	47	WL3K	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦
24	WM3L	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	驻马店	小麦	48	WL2N	<i>F. graminearum</i> sensu stricto	漯河	小麦

注:菌株命名的第 1 个字母“W”和“M”分别代表菌株来自小麦和玉米。

1.2 菌丝收集与 DNA 提取

对活化的菌株挑取少量新鲜菌丝到 PDA 平板上,26 ℃ 黑暗条件下培养 4 d 后,以灭菌牙签刮取菌丝 1 g 左右,用组织细胞破碎仪(Bullet Blender,美国)研磨后,采用真菌 DNA 小量提取试剂盒(上海莱枫生物技术有限公司,产品目录号:DK621-01)提取各菌株的基因组 DNA,置于-20 ℃ 保存备用。

1.3 *Tri101* 和 *EF-1α* 基因的 PCR 扩增、测序及系统发育谱系分析

用引物 TRI1015B/TRI1013E^[18] 和 EF1/EF2^[19]

分别扩增 48 个菌株的 *Tri101* 和 *EF-1α* 基因部分序列(表 2)。PCR 反应体系均为: *Taq* PCR Master Mix(BIOTEKE 公司)12.5 μL、上游引物(5 μmol/L)和下游引物(5 μmol/L)各 1 μL、模板 DNA(10 ng/μL)1 μL、ddH₂O 9.5 μL,总体积为 25 μL。反应程序均为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,54 ℃ 50 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。扩增产物使用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。引物合成及扩增产物序列测定(采用双向测序)均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 2 试验所用的引物

引物	引物序列(5′—3′)	扩增目标大小/bp	目标基因	引用文献
EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	600	<i>EF-1a</i>	17
EF2	GGARGTACCAGTSATCAGTT			
TRI1015B	CCATGGGTCGCRGGCCARGTSAA	1 336	<i>Tri101</i>	16
TRI1013E	AACTCSCCRTCIGGYTTYTTNGGCAT			
H3dStyI	AGCATCACCYGAACATCGCATCATCCCATG	223	<i>H3</i>	12
H3R1	TTGGACTGGATRGTAACACGC			
FaF	CAGCTTCCTCGAAGACCT	292	<i>CYP51A</i>	13
FaR	GGACCGTAAATTCTTTCAGTG			
FgF	TATCCCTTATGGGTCTTGGT	352	<i>CYP51A</i>	13
FgR	GGACCGTAAACTTCTTCTGCA			

注:R = A 或 G,Y = C 或 T,S = C 或 G,I = Inosine(肌苷),N = Nucleoside(核苷)。

通过 DNASTar 软件的 SeqMan 模块将 *Tri101* 和 *EF-1α* 基因序列拼接在一起,人工校对后获得测序菌株的完整序列,然后与 GenBank 数据库中 FGSC 16 个种代表性菌株[来自美国农业研究菌种保藏中心(NRRL)]的 *Tri101* 和 *EF-1α* 基因序列通过 Clust-

alX 1.81(www.clustal.org/clustal2/)进行多重比对,删除多余不匹配的序列,利用 MEGA 6.06 软件通过最大似然法(maximum-likelihood,ML),根据贝叶斯推断(Bayesian information criterion scores)选择最合适的模型(Kimura-2 参数模型,Bootstrap replications 的

值为 1 000) 进行系统发育谱系分析^[12-13]。

1.4 PCR-RFLP

用引物 H3dStyI 和 H3R1(表 2) 扩增 48 个菌株的基因组 DNA, 获得的 PCR 产物分别用内切酶 Sty I (对 *F. asiaticum* 特异, 酶切片段大小为 195 bp 和 28 bp) 或者 EcoRV 酶切(对 *F. graminearum* sensu stricto 特异, 酶切片段大小为 191 bp 和 32 bp), 其他 *Fusarium* spp. 菌株不会出现酶切片段, 酶切产物使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 Sty I 酶切后电泳条带较小的即为 *F. asiaticum* 菌株, 用 EcoRV 酶切后电泳条带较小的即为 *F. graminearum* sensu stricto 菌株。PCR 反应操作方法参照 Suga 等^[14] 的反应体系和程序。

1.5 多重 PCR

同时用引物 FaF/FaR 和 FgF/FgR(表 2) 扩增 48 个菌株的基因组 DNA。多重 PCR 反应操作方法参照 Yun 等^[15] 的反应体系和程序, 扩增产物使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, *F. asiaticum* 菌株电泳条带大小为 292 bp, *F. graminearum* sensu stricto 菌株电泳条带大小为 352 bp。

2 结果与分析

2.1 FGSC 菌株的系统发育谱系分析

对所研究的 48 个菌株的 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因部分序列进行了测定。同时从 GenBank 数据库中下载了已报道的 FGSC 16 个种(*F. asiaticum*、*F. graminearum* sensu stricto、*F. vorosii*、*F. boothii*、*F. acaciae-mearnsii*、*F. mesoamericanum*、*F. austroamericanum*、*F. brasiliense*、*F. cortaderiae*、*F. meridionale*、*F. aethiopicum*、*F. louisianense*、*F. nepalense*、*Fusarium* sp.、*F. ussuriense*、*F. gerlachii*) 的 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因序列, 另外选取 *F. culmorum* 和 *F. pseudograminearum* 作为参考种, 共获得 18 个种 40 个菌株(来自 NRRL) 的 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因序列。将所有序列多重比对后对齐, 去掉两端引物和多余部分碱基, 用于建树的 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因序列片段为 998 bp 和 598 bp。用 MEGA 6.06 软件进行 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因部分序列的系统发育谱系分析, 结果表明, 所研究的 48 个 FGSC 菌株中有 11 个菌株为 *F. asiaticum* (基于 *Tri101* 和 *EF-1 α* 的 Bootstrap 为 96%), 37 个菌株为 *F. graminearum* sensu stricto (基于 *Tri101* 和 *EF-1 α* 的 Bootstrap 为 97%) (图 1)。

2.2 FGSC 菌株的 PCR-RFLP 鉴定

PCR 产物酶切之后, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳

进行检测, 结果表明, 用 Sty I 酶切, 有 11 个 FGSC 菌株的电泳条带与其他菌株相比较小, 为 *F. asiaticum* 菌株(图 2A); 用 EcoRV 酶切, 有 37 个 FGSC 菌株的电泳条带与其他相比较小, 为 *F. graminearum* sensu stricto 菌株(图 2B)。该鉴定结果与系统发育谱系分析的结果一致。

2.3 FGSC 菌株的多重 PCR 鉴定

多重 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果表明, 有 11 个 FGSC 菌株出现 292 bp 的电泳条带, 为 *F. asiaticum*; 有 37 个 FGSC 菌株出现 352 bp 的电泳条带, 为 *F. graminearum* sensu stricto (图 3)。该方法对 48 个 FGSC 菌株的鉴定结果与上述 2 种方法的结果一致。

3 结论与讨论

将 FGSC 准确鉴定到种是研究其相关病害的基础。目前, 常用的是形态鉴定结合分子鉴定的方法。近年来, 利用特异性 PCR、特征 DNA 序列等分子技术辅助鉴别 FGSC 的方法已经被普遍应用^[20-22]。Geiser 等^[23] 建立了基于 *TEF-1 α* 基因部分序列的镰刀菌数据库, 根据 *TEF-1 α* 基因部分序列进行系统发育谱系分析, 将 FGSC 鉴定到种。本研究中, 通过比对测序菌株和 GenBank 数据库中已报道的 FGSC 16 个种代表性菌株的 *Tri101* 和 *EF-1 α* 基因部分序列, 进行系统发育谱系分析, 结果表明, 有 11 个 FGSC 菌株与 *F. asiaticum* 聚在一起成为一个分枝, 37 个 FGSC 菌株与 *F. graminearum* sensu stricto 聚在一起, 但这种分子鉴定 FGSC 的方法繁琐、复杂。有些 FGSC 具有地理分布特征, 单独基于 *Tri101* 或者 *EF-1 α* 基因部分序列进行的系统发育谱系分析, 并不能准确鉴定到种, 故需要将二者的基因序列拼接之后进行系统发育谱系分析, 其结果更准确可靠。系统发育谱系分析方法的特点是准确、利于新发现种的鉴定, 特别是对自然界中 FGSC 内不同种之间通过基因渗入的杂交新种或者基因内重组出现新种的鉴定, 对发现新种有重要的意义, 但成本较高。

Suga 等^[14] 报道了 PCR-RFLP, 该法是基于组蛋白 H3 基因的特殊酶切位点设计特异引物, 第一步 PCR 反应产物片段大小为 223 bp, 用内切酶 Sty I 酶切后只有 *F. asiaticum* 菌株出现 195 bp 的条带, 用 EcoRV 酶切后只有 *F. graminearum* sensu stricto 菌株出现 191 bp 的条带, 将相差 28 bp 或者 32 bp 的条带通过电泳显示出来, 需要 2% 或者浓度更高的琼脂糖凝胶。该法对电泳过程有很高的要求, 此外 PCR 反应产物中含有的 Buffer、dNTP、镁离子等也

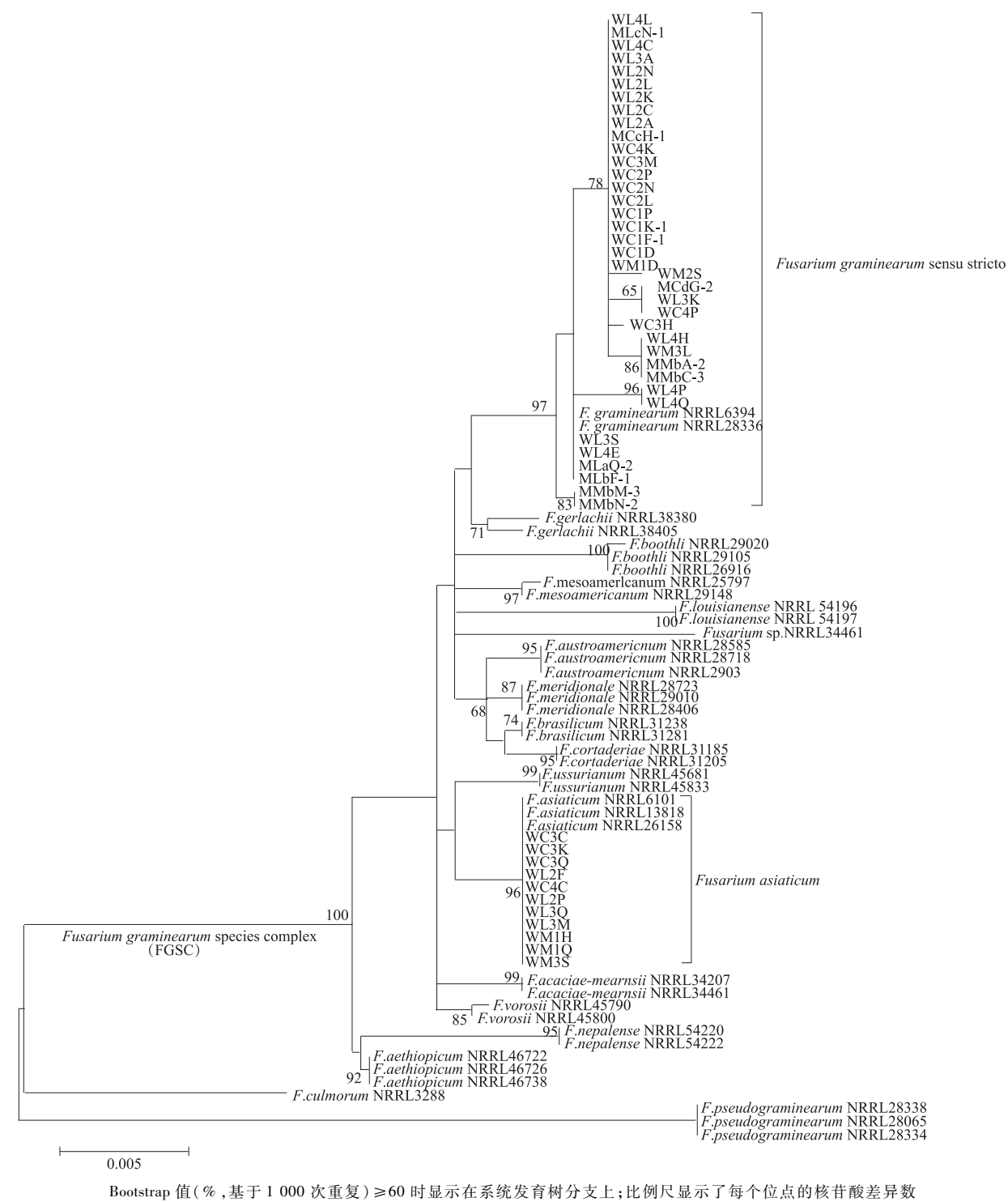
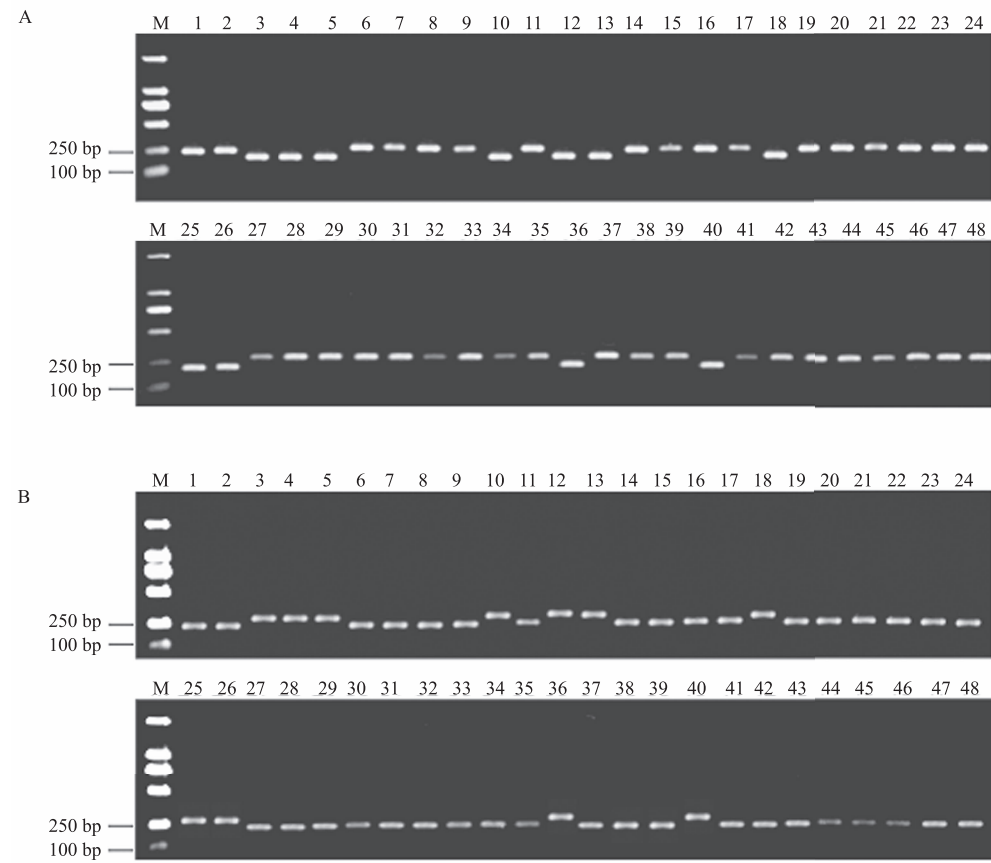


图 1 基于 FGSC 菌株 *Tri101* 和 *EF-1α* 基因部分序列的系统发育谱系分析

可能会影响酶切效率。

Ward 等^[9]为了对 FGSC 同时进行种和毒素型的鉴定,设计了利用 48 对引物的多重 PCR,该方法的优点是对已明确的 FGSC 种进行鉴定,但操作过程繁琐复杂,第一步 PCR 反应过程需要高保真 *Taq* 酶降低碱基错配率,PCR 产物经过特殊的仪器设备纯化后作为模板,再利用种和毒素型引物进行等位基因特异性延伸反应,从而完成种的鉴定。Yun

等^[15]研究报道,基于 *CYP51A* 和 β -*tubulin* 基因设计了 *F. asiaticum* 和 *F. graminearum* sensu stricto 的特异引物 FaF/FaR、FgF/FgR 和 FgaF/FgaR(内参引物),用来同时定性和定量检测小麦中的 FGSC。本研究利用特异引物 FaF/FaR 和 FgF/FgR 进行多重 PCR,可将 FGSC 准确鉴定到种,此方法简单、灵敏、错误率低,电泳检测结果一目了然,但只能用来鉴定 *F. graminearum* sensu stricto 和 *F. asiaticum* 这 2 个种,



A. *Sty* I 酶切; B. *EcoRV* 酶切。M 为 DL2000 Marker; 3、4、5、10、12、13、18、25、26、36 和 40 为 *F. asiaticum* 菌株, 其他为 *F. graminearum* sensu stricto 菌株, 下同

图 2 PCR-RFLP 鉴定 FGSC 的电泳检测结果

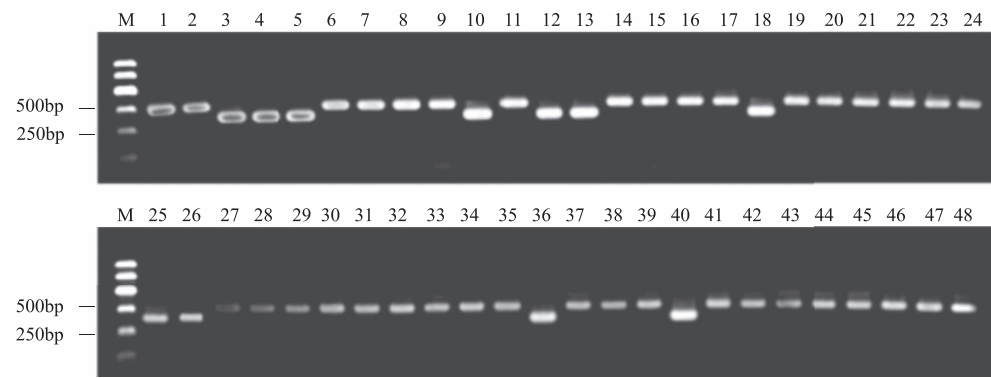


图 3 多重 PCR 鉴定 FGSC 的电泳检测结果

不能对其他 14 个种或新发现种进行鉴定。

通过对 48 个 FGSC 菌株的鉴定发现,以上 3 种分子鉴定 *F. graminearum* sensu stricto 和 *F. asiaticum* 方法的结果一致,其中系统发育谱系分析步骤繁琐、费用高,PCR-RFLP 对操作过程要求高且工作量大,而多重 PCR 快速、准确、高效,但其可能只适合对 FGSC 引起的中国小麦或玉米相关病害的鉴定,因为 *F. graminearum* sensu stricto 和 *F. asiaticum* 是中国作物上 FGSC 的主要成员。

本研究比较了鉴定 FGSC 的分子方法,发现多

重 PCR 的方法适用于室内大量鉴定 *F. graminearum* sensu stricto 和 *F. asiaticum* 的工作,其对象包括 FGSC 菌株、籽粒和植株等,可为中国 FGSC 相关病害的进一步研究奠定基础。

参考文献:

[1] Miller J D, Greenhalgh R, Wang Y, et al. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species [J]. Mycologia, 1991, 83(2):121-130.

[2] 孙静,刘佳中,谢淑娜,等. 小麦—玉米轮作田镰孢菌

- 的种群结构及其致病性研究[J]. 河南农业科学, 2015, 44(5): 91-96.
- [3] 杨继芝, 王继师, 龚国淑, 等. 不同禾谷镰刀菌对小麦产量及其主要性状的影响[J]. 河南农业科学, 2010(9): 91-95.
- [4] O'Donnell K, Ward T J, Aberra D, *et al.* Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(11): 1514-1522.
- [5] O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M, *et al.* Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(6): 600-623.
- [6] Sarver B A, Ward T J, Gale L R, *et al.* Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(12): 1096-1107.
- [7] Starkey D E, Ward T J, Aoki T, *et al.* Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(11): 1191-1204.
- [8] O'Donnell K, Kistler H C, Tacke B K, *et al.* Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab[J]. Proc Nat Acad Sci, 2000, 97(14): 7905-7910.
- [9] Ward T J, Clear R M, Rooney A P, *et al.* An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(4): 473-484.
- [10] Davari M, van Diepeningen A D, Babai-Ahari A, *et al.* Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using rolling circle amplification (RCA) [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 89(1): 63-70.
- [11] Fernández-Ortuño D, Waalwijk C, Van der Lee T, *et al.* Simultaneous real-time PCR detection of *Fusarium asiaticum*, *F. ussurianum* and *F. vorosii*, representing the Asian clade of the *F. graminearum* species complex[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(1): 148-154.
- [12] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [13] Boutigny A L, Ward T J, Van Coller G J, *et al.* Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley, and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference [J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(9): 914-920.
- [14] Suga H, Karugia G W, Ward T, *et al.* Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan [J]. Phytopathology, 2008, 98(2): 159-166.
- [15] Yin Y, Liu X, Ma Z. Simultaneous detection of *Fusarium asiaticum* and *Fusarium graminearum* in wheat seeds using a real-time PCR method [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(6): 680-686.
- [16] 孙静, 谢淑娜, 刘佳中, 等. 河南省玉米茎基部镰刀菌的形态和分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 8-16.
- [17] 吴全安, 梁克恭, 朱小阳, 等. 北京和浙江地区青枯病病原菌的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 1989, 22(5): 71-75.
- [18] Proctor R H, McCormick S P, Alexander N J, *et al.* Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium* [J]. Mol Microbiol, 2009, 74(5): 1128-1142.
- [19] O'Donnell K, Kistler H C, Ciglek E, *et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2044-2049.
- [20] Reischer G H, Lemmens M, Farnleitner A, *et al.* Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe [J]. J Microbiol Methods, 2004, 59(1): 141-146.
- [21] Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkah M, *et al.* Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran [J]. Journal of Plant Pathology, 2008, 90(3): 463-468.
- [22] Hsuan H M, 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.
- [23] Geiser D M, Jimenez-Gasco M M, Kang S, *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.