

玉米茎腐病病原菌检测方法研究

马红霞, 张海剑, 孙华, 石洁*, 陈丹, 郭宁

(河北省农林科学院植物保护研究所, 农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室,
河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 保定 071000)

摘要 为提高玉米茎腐病病原菌检测结果的准确性和可信度,以组织分离法做对比,采用分子检测法,对采自田间的189个玉米茎腐病病株进行真菌种类的鉴定和数量的统计。结果表明,分子检测法对腐霉 *Pythium* spp. 的检出频率为29.24%,对镰孢菌 *Fusarium* spp. 的检出频率为73.68%,组织分离法对腐霉的检出频率仅为0.58%,对镰孢菌的检出频率为60.82%,两方法的符合率最高仅为35.92%,最低为0。因此,采用组织分离和分子检测相结合的方法可提高玉米茎腐病病原菌鉴定结果的准确性。

关键词 玉米茎腐病; 镰孢菌; 腐霉

中图分类号: S 435.131 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.03.025

Comparison of pathogen detection methods for corn stalk rot

Ma Hongxia, Zhang Haijian, Sun Hua, Shi Jie, Chen Dan, Guo Ning

(Plant Protection Institute of Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, IPM Centre of Hebei Province, Key Laboratory of IPM on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding 071000, China)

Abstract In order to improve the accuracy and credibility of detection results of pathogen causing corn stalk rot, the species of 189 fungal strains collected from the diseased corn plants in the field were identified and the number of fungi was counted by molecular detection and tissue isolation. The results showed that the detection frequency was 29.24% for *Pythium* spp. and 73.68% for *Fusarium* spp. by molecular detection, while the detection frequency was 0.58% for *Pythium* spp. and 60.82% for *Fusarium* spp. by tissue isolation. The highest coincidence rate was only 35.92% and the lowest was 0 between the two methods. Therefore, combination of tissue isolation and molecular detection methods can improve the accuracy of identification of the pathogen causing corn stem rot.

Key words corn stalk rot; *Fusarium* spp.; *Pythium* spp.

玉米茎腐病引起的早衰和倒伏已成为制约我国玉米持续增产和机械化进程的重要因素^[1]。茎腐病由多种病原菌单独或复合侵染^[2],导致该病的抗性遗传规律非常复杂,这给抗病育种和病害防治工作带来很大的困难^[3]。近年来,在生产上品种抗性“丧失”的情况时有发生,因此,明确不同玉米种植区茎腐病的病原菌种类及其种群结构尤为重要。

玉米茎腐病是世界上玉米产区普遍发生的一种重要土传病害^[4],其病原菌准确鉴定一直是个难题。目前玉米茎腐病病原菌的鉴定通常采用组织分离法,即样品从田间采回后,立即进行组织分离,并纯化分离物,再进行形态学鉴定或分子鉴定^[5]。这种方法的优点是操作简便,对设备要求不高。然而该

方法是建立在病原菌分离培养基础上的,鉴定结果易受采集和分离过程中许多因素的影响,其结果的准确性和可信度常被质疑,如分离采用的培养基种类、采集分离的时间、分离部位、病株的病级等差异都可使茎腐病的两种主要病原菌腐霉 *Pythium* spp. 和镰孢菌 *Fusarium* spp. 的分离频率发生很大的变化,从而导致鉴定结果的差异^[6]。

本研究从玉米植株发病组织中直接提取基因组 DNA,检测病样组织中真菌的种类和数量(分子生物学鉴定方法),同时应用常规病原菌分离检测方法进行鉴定,对比分析两种检测方法获得的结果,以期建立一种更准确鉴定玉米茎腐病病原菌的新方法。

收稿日期: 2016-05-24 修订日期: 2016-07-11

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-02)

* 通信作者 E-mail: shij99@163.com

1 材料与方法

1.1 样品采集及预处理

2015 年从河北、河南、山东、安徽和江苏 5 省 32 市的 91 个不同地点采集了 189 株玉米茎腐病初期发病植株,取茎基部带出田间。在地边及时将取样茎秆表面以 70%乙醇棉擦拭并在酒精灯火焰上掠过,用消毒的手术刀将茎纵剖两半,从其中一半中取髓部组织分别放置在 PDA 和 CMA 两种培养基上,每皿 4 块;同时取另一半同一部位的组织放置在 1.5 mL 离心管中并即刻投入液氮中保存。返回实验室后及时将初分离物进行纯化,并于 4℃ 保存待用。

1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 L。CMA 培养基:玉米粉 30 g、琼脂粉 17 g、蒸馏水 1 L。LB 固体培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L、琼脂粉 15 g/L,pH 7.4。LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L。

1.3 主要生化试剂与设备

艾德莱真菌基因组提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; β -巯基乙醇、胶回收试剂盒、氨苄青霉素钠、50×TAE、DL2000 等购自 TaKaRa 公司;PCR 试剂购自康为世纪;pGM-T Vector、DH5 α 感受态细胞等试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;低熔点琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉等购自 Sigma 公司;PCR 引物合成及序列测定均由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成;其余试剂为国产分析纯。ETC811 型 PCR 仪购自苏州东胜兴业科学仪器有限公司、DYY-11 型电泳仪购自北京

六一仪器厂、GelDoc XR+凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司、Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机购自上海力申科学仪器有限公司。

1.4 DNA 提取

刮取纯化后的菌株菌丝,液氮研磨,使用艾德莱真菌基因组提取试剂盒基因组 DNA。用同样的方法将保存于液氮中的玉米茎髓部组织提取其基因组 DNA。于 -20℃ 保存待用。

1.5 PCR 扩增与序列分析

使用真菌通用引物 ITS1/ITS4 扩增 1.4 中获得的基因组 DNA。PCR 反应体系为 25 μ L:DNA 1 μ L、上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、2×Es Taq Master Mix 12.5 μ L,加 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 7 min;95℃ 变性 30 min;57℃ 退火 45 s;72℃ 延伸 30 s,35 个循环,72℃ 延伸 8 min,4℃ 保存。将 PCR 产物交由北京诺赛基因组研究中心进行测序,测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对。

对出现重叠峰的基因组 DNA,针对植物组织分离中可能获得的致病相关真菌和卵菌,分别采用表 1 中的引物进行扩增,将扩增得到的 PCR 产物测序,测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对。以芒孢腐霉、层出镰孢、禾谷镰孢和拟轮枝镰孢标准菌株为阳性对照,水为阴性对照。PCR 反应体系和扩增程序同上。退火温度依引物而定。

对未鉴定出的真菌 DNA 模板采用通用引物 EF-1F/EF-1R 扩增,扩增产物经回收试剂盒纯化后,与 pGM-T Vector 于 24℃ 连接 2 h,转化大肠杆菌 DH5 α ,再将成功的阳性克隆样品送至北京诺赛基因组研究中心进行 DNA 序列测定,测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对。

表 1 本研究中涉及的引物
Table 1 Primer pairs used in this study

引物 Primer	序列(5'-3')	扩增片段/ bp Product size	退火温度/℃ T _m	文献 Reference
禾谷镰孢复合种 <i>F. graminearum</i>	Fg16NF ACAGATGACAAGATTTCAGGCACA Fg16NR TTCTTTGACATCTGTTC AACCCA	280	57	[7]
层出镰孢 <i>F. proliferatum</i>	Pro1 CTTTCCGCCAAGTTTCTTC Pro2 TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	588	56	[8]
拟轮枝镰孢 <i>F. verticillioides</i>	Ver1 CTTCTGCGATGTTTCTCC Ver2 AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA	578	57	[8]
卵菌通用引物 Universal primer for Oomycetes	DC6 GAGGGACTTTTGGGTAATCA ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	1 100	58	[9]
真菌 rDNA-ITS Universal primer for rDNA-ITS	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	550	57	[10]
真菌延伸因子 Universal primer for elongation factor	EF-1F CATCGAGAAGTTCGAGAAGG EF-1R TACTTGAAGGAACCCCTTACC	300	58	[11]

1.6 样品检测结果分析

用检出频率和符合率评估检测方法的优劣。样品中检出病原菌即判定该样品携带该病原菌。检出频率(%)=某种病原菌检出样品数/检出病原菌样品总数×100;符合率(%)=两种方法检测出同种病原菌的样品数/该种病原菌检出样品总数×100^[12]。

2 结果与分析

2.1 真菌种类及数量检测

采用分子检测法检测了 189 个样品。用真菌通用引物 ITS1/ITS4 扩增后测序,有 144 个样品(76.19%)检测到真菌,其中 78 个样品检测到单一真菌,有 66 个样品出现重叠峰,表明这部分样品中可能存在 2 种(含)以上真菌,分别使用特异性引物对这 66 个样品进行扩增,有 61 个样品检测出含有 2 种及以上真菌,在 1 个样品中最多检测出 4 种真菌;使用特异性引物未检测成功的 5 个样品采用通用引物 EF-1F/EF-1R 及克隆转化的方法得到结果。采用组织分离法,有 143 个样品分离出真菌,共获得 195 个菌株;有 41 个样品分离出了 2 种(含)以上真菌。两种方法共有 171 个样本检测出真菌(表 2)。

表 2 检出多种真菌的样品数量比较

Table 2 Comparison of the number of fungal detected by two identification methods

方法 Method	样品数量/个 Number of sample					
	0 种 Zero	1 种 One	2 种 Two	3 种 Three	4 种 Four	5 种 Five
分子检测法 Molecular detection	45	78	44	18	4	0
组织分离法 Tissue isolation	46	102	33	7	0	1

分子检测法检测出 9 种真菌,组织分离法检测出 13 种真菌。其中分子检测法检测出的腐霉菌种类为 3 种,明显多于组织分离法检测出的 1 种;对于

镰孢菌两种方法检测出的种类相同,均为 4 种;分子检测法检测出的其他真菌的种类为 2 种,远少于组织分离法检测出的 8 种(表 3)。

2.2 主要病原菌检出频率及符合率

在我国,引起玉米茎腐病的主要病原菌普遍被认为是镰孢属和腐霉属的真菌。本研究采用组织分离法和分子检测法共检出 171 个真菌 DNA,其中,分子检测法对腐霉属的检出频率为 29.24%,明显高于组织分离法的 0.58%;对镰孢属的检出频率为 73.68%,也高于组织分离法的 60.82%;对其他真菌的检出频率较低,仅为 2.34%,低于组织分离法的 42.11%(表 4)。

表 3 检出真菌种类比较

Table 3 Comparison of the fungal species detected by two identification methods

真菌 Fungus	种类 Species	组织分离法	分子检测法
		Tissue isolation	Molecular detection
腐霉 <i>Pythium</i> spp.	芒孢腐霉 <i>P. aristosporum</i>	+	+
	禾生腐霉 <i>P. graminicola</i>	-	+
	棘腐霉 <i>P. acanthicum</i>	-	+
镰孢菌 <i>Fusarium</i> spp.	禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i>	+	+
	层出镰孢 <i>F. proliferatum</i>	+	+
	拟轮枝镰孢 <i>F. verticillioides</i>	+	+
	厚垣镰孢 <i>F. chlamydosporum</i>	+	+
其他真菌 Other fungi	类腐霉菌 <i>Pythiogeton zeae</i>	-	+
	喙突脐蠕孢	+	-
	<i>Exserohilum rostratum</i>	+	-
	稻黑孢 <i>Nigrospora oryzae</i>	+	-
	球黑孢 <i>N. sphaerica</i>	+	-
	枝状枝孢 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	-
	枝顶孢菌 <i>Acremonium zeae</i>	+	-
	包围漆斑菌 <i>Myrothecium cinctum</i>	+	-
毛霉 <i>Mucor</i> sp.	+	-	
木霉 <i>Trichoderma</i> sp.	+	+	

表 4 对腐霉属和镰孢属真菌检出频率比较

Table 4 Comparison of detected frequency for *Pythium* spp. and *Fusarium* spp.

真菌 Fungus	检出样品总数/个 Total sample numbers	组织分离法 Tissue isolation		分子检测法 Molecular detection	
		检出样品数/个 Number of samples	检出频率/% Detected frequency	检出样品数/个 Number of samples	检出频率/% Detected frequency
腐霉 <i>Pythium</i> spp.	50	1	0.58	50	29.24
镰孢菌 <i>Fusarium</i> spp.	154	104	60.82	126	73.68
其他真菌 Other fungi	75	72	42.11	4	2.34

从检出频率看,分子检测法对芒孢腐霉、禾生腐霉、棘腐霉、禾谷镰孢、层出镰孢和拟轮枝镰孢的检出频率较高,分别为 27.49%、1.17%、0.58%、43.27%、

19.30%、41.52%,远高于组织分离法的检出频率(表 5)。

分子检测法与组织分离法检出的腐霉和镰孢菌

的符合率存在差异。在 189 个样品中,采用组织分离法检测出的腐霉菌只有芒孢腐霉,且只有 1 株,病原菌检出频率为 0.58%;而采用分子检测法检出了 3 种腐霉:芒孢腐霉、禾生腐霉和棘腐霉,检出频率提高到 29.24%(表 4)。两种检测方法的符合率仅为 2.13%(表 5),表明分子检测法对腐霉的检测结果优于组织分离法。

分子检测法检出的镰孢菌种类和组织分离法一致,但不同种的病原菌检出频率和符合率存在差异。如禾谷镰孢的检出频率相近,分别为 38.60% 和

43.27%,但符合率为 35.92%,表明在 103 个检出禾谷镰孢的样品中仅有 37 个样品用两种方法同时检测出,说明对禾谷镰孢而言,两种方法中的任何一种均不能检出所有带菌样品。层出镰孢和拟轮枝镰孢的检出频率虽远高于组织分离法,但符合率分别为 7.89% 和 14.29%,也不能检出所有带菌样品。分子检测法仅有 2.92% 的样品检出厚垣镰孢,低于组织分离法的 13.45%,符合率为 7.69%。

对于其他真菌,分子检测法仅有 2.34% 的样品检出,而组织分离法有 42.11% 的样品检出。

表 5 对病原菌检出频率及符合率比较

Table 5 Comparison of detected frequency and agreement of results for two identification methods

种类 Species	组织分离法	Tissue isolation	分子检测法	Molecular detection	符合样品数/个 Number of agreement	符合率/% Agreement rate
	数量/个 Number	检出频率/% Frequency	数量/个 Number	检出频率/% Frequency		
芒孢腐霉 <i>P. aristosporum</i>	1	0.58	47	27.49	1	2.13
禾生腐霉 <i>P. graminicola</i>	0	0.00	2	1.17	0	0.00
棘腐霉 <i>P. acanthicum</i>	0	0.00	1	0.58	0	0.00
禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i>	66	38.60	74	43.27	37	35.92
层出镰孢 <i>F. proliferatum</i>	8	4.68	33	19.30	3	7.89
拟轮枝镰孢 <i>F. verticillioides</i>	25	14.62	71	41.52	12	14.29
厚垣镰孢 <i>F. chlamydosporum</i>	23	13.45	5	2.92	2	7.69
其他真菌 Other fungi	72	42.11	4	2.34	1	1.33

2.3 镰孢菌和腐霉同时被检出情况比较

用组织分离法仅分离到 1 株腐霉且该样本未分离到其他真菌。用分子检测法检测到 50 株腐霉,其中有 33 株与镰孢菌共同检测到,22 株与禾谷镰孢共同被检测到。

3 讨论

玉米茎腐病又称玉米茎基腐病、玉米青枯病等,是我国玉米上主要病害。感病植株在玉米生长乳熟期开始叶片呈现青灰色或黄色枯萎,根系和茎基部节位变软变空,果穗下垂,植株死亡,容易倒伏。玉米茎腐病一般引起减产 20%,严重时可致减产 50%~60% [13]。我国研究者普遍认为,引起该病的病原菌以禾谷镰孢和腐霉为主,二者单独或者复合侵染,其种群结构及优势病原菌因地区而异 [14-15]。玉米茎腐病原菌的种类和数量受气候因子和土壤中的生物因子等多种因素影响,地区间、年度间变化较大 [16]。

对于玉米茎腐病病原菌检测方法,最早采用组织分离法分离纯化,然后根据分离菌株的菌落形态、颜色、孢子大小、形状等对病原菌进行形态学鉴定 [17],参照《Monograph of the Genus *Pythium*》 [18]、《中国真菌志》 [19]、Key to *Pythium* [20]、《The *Fusarium* Laboratory Manual》 [21] 和《真菌鉴定手册》 [22]。

近年来,随着分子生物学的发展,人们开始采用形态学鉴定与分子鉴定相结合的方式 [23],这大大提高了病原菌鉴定的准确性。但是,因为仍然采用组织分离法分离纯化,受到培养基、植株发病程度(与采集时间密切相关)等的影响,因此,在各地致病菌的检测结论方面仍有不同认识。

本研究采用分子生物学手段检测感病组织中的病原菌,以期提高鉴定的准确性。结果表明,189 个样品中有 144 个样品(76.19%)检测到真菌 DNA,其中采用真菌通用引物 ITS1/ITS4 从 78 个样品中扩增出单一真菌;余下的 66 个样品分别使用特异性引物进行 PCR 扩增,又从 61 个样品中检测出真菌;使用特异性引物未检测出结果的样品采用真菌通用引物 EF-1F/EF-1R 及克隆转化的方法检测到结果。在这部分样品中由于受特异性引物数量的限制,不能排除还存在未检出真菌。

在本研究中,对于腐霉属病原菌的检测,组织分离法仅检出了 1 株腐霉,检出频率为 0.58%,而分子检测法检出了 3 种腐霉,检出频率达到 29.24%,不仅检出种类多,而且敏感性高。因此,对于腐霉的检测,采用分子检测法更为高效。这是因为在田间用培养基不适合腐霉的分离,腐霉在培养基上的定殖生长能力弱于禾谷镰孢,在腐霉菌落上,禾谷镰孢

仍可以生长,但是在禾谷镰孢菌落上,腐霉则不能生长^[24]。如果采用无营养成分的水琼脂培养基 WA 可能会有利于腐霉的分离。也可以将在 PDA 培养基上初步分离长出的菌落提取混合 DNA,然后用 ITS4/DC6 进行 PCR 检测,有可能会分离或检测到腐霉的存在。

对于镰孢属病原菌的检测,分子检测法检出的种类和组织分离法一致,其中对禾谷镰孢、层出镰孢和拟轮枝镰孢的检出频率和敏感性均高于组织分离法,但是符合率结果表明两种方法中的任何一种均不能检出所有带菌样品,因此在检测镰孢菌时应采用以上两种方法相结合的方式。理论上,镰孢菌的种特异性引物可以检测出所有存在于发病植株中的镰孢菌,但实际结果是部分镰孢菌在组织分离法中检出而采用该方法未检测出,这是因为真菌生长速度快,极少的病原菌在充足的培养时间内均能够形成菌落,而在分子检测法中,如果组织中病菌含量低则会造成提取 DNA 含量少,加之引物灵敏度低等原因而得不到扩增结果。在分子检测法中能够检测到病原菌,而在组织分离法中未分离得到。这可能是由于毛霉等生长速度快,掩盖了镰孢菌的存在,致使不能分离得到镰孢菌。

分子检测法中厚垣镰孢的检出敏感性远低于组织分离法,是因本研究中没有找到厚垣镰孢的特异性引物,故仅在用特异性引物未鉴定出的样品中检出部分,导致检出的数量不全。

分子检测法对其他真菌的检出数量远远少于组织分离法,表明这些真菌大多数情况下并非单独在样品中存在,而是和其他病原菌并存,其是否是玉米茎腐病病原菌或者在玉米茎腐病病原菌侵染中的作用和地位有待进一步研究。

分子检测法的优点是克服了培养基选择性问题的^[25-26],排除了取样分离时期、病株的病级和操作人分类学水平等的影响,针对性强,对我国玉米茎腐病主要病原菌腐霉和镰孢菌的检出敏感性高。缺点是,目前研发的特异性引物只是很少的一部分,不能覆盖全部的真菌。因此,可采用组织分离和分子检测相结合的方法,进一步提高茎腐病病原菌鉴定结果的准确性。

参考文献

[1] 宋风景. 玉米对腐霉茎腐病抗病性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2015.
 [2] 吕国忠,陈捷,刘伟成,等. 玉米茎腐病的病原菌与品种抗性[J]. 玉米科学,1995(S1): 47-51.
 [3] 陈永欣. 玉米抗茎腐病育种的研究[J]. 山西农业大学学报,

1995,15(4): 399-404.
 [4] 赵廷昌,冯凌云. 玉米茎腐病研究进展概述[J]. 辽宁农业科学,1992(3): 12-14.
 [5] 袁虹霞,闵营辉,张丹丹,等. 河南省玉米茎腐病病原菌分离及致病性测定[J]. 玉米科学,2011,19(6):122-124.
 [6] 吴海燕,孙淑荣,范作伟,等. 玉米茎腐病研究现状与防治对策[J]. 玉米科学,2007,15(4): 129-132.
 [7] Nicholson P, Simpson D R, Weston G, et al. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*,1998, 53(1): 17-37.
 [8] Mulè G,Susca A,Stea G,et al. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* [J]. *European Journal of Plant Pathology*,2004, 110 (5):495-502.
 [9] Bonants P, Weerd M H D, Marga V G P, et al. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1997,103(4): 345-355.
 [10] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
 [11] Ignazio C, Linda M, Kohn A. Method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. *Mycologia*,1999, 91(3): 553-556.
 [12] 杨秀芹,宋旭婷,徐雪,等. 绵羊群体中不同布鲁氏菌病血清学诊断方法比较研究[J]. 东北农业大学学报,2016, 47(3): 11-16.
 [13] 崔小伟. 河南省玉米茎腐病研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
 [14] 王晓鸣,吴全安,刘晓娟,等. 寄生玉米的 6 种腐霉及其致病性研究[J]. 植物病理学报,1994,24(4): 343-346.
 [15] 陈捷. 我国玉米穗、茎腐病病害研究现状与展望[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(5): 393-401.
 [16] 陈楠,潘晓静,姚远,等. 东北地区玉米茎腐病镰孢菌 EF-1 α 基因序列分析鉴定[J]. 玉米科学,2015,23(4):143-148.
 [17] 宋佐衡,梁景颐,白金铠. 辽宁省玉米茎腐病病原菌的研究[J]. 沈阳农业大学学报,1990,21(3):214-218.
 [18] van der Plaats-Niterink A. J. Van der. Monograph of the genus *Pythium* [J]. *Studies in Mycology*,1987,21:1-213.
 [19] 余永年. 中国真菌志[M]. 北京:科学技术出版社,1998.
 [20] Dick M W. Key to *Pythium* [J]. *Mycologia*, 1990,83(3):386-387.
 [21] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. Blackwell Pub Professional,2006.
 [22] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
 [23] 张丹丹. 河南省玉米茎腐病病原菌种类鉴定及致病性测定[D]. 郑州:河南农业大学,2010.
 [24] 陈绍江,宋同明,吴全安. 玉米青枯病病原腐霉对其伴生镰孢菌的影响[J]. 植物病理学报,1997,27(3): 251-256.
 [25] 孙静,谢淑娜,刘佳中,等. 河南省玉米茎基部镰孢菌的形态和分子鉴定[J]. 植物病理学报,2014,44(1): 8-16.
 [26] 孙广宇,王琴,张荣,等. 条斑型玉米圆斑病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 植物病理学报,2006,36(6): 494-500.