

土壤镰孢菌 Real-Time QPCR 定量方法的建立及应用

魏巍^{1,2,3}, 许艳丽¹, 刘金波^{1,3}, 李春杰¹, 韩晓增¹, 李文滨², 李淑娴⁴

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4. Crop Genetics Research Unit (CGRU), United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), Stoneville 38776, USA)

摘要:基于镰孢菌 ITS 序列,设计一对应用于实时荧光定量 PCR (Real-Time QPCR) 反应的镰孢菌属特异性引物 TS 和 TR,并建立了相应的 Real-Time QPCR 体系。应用该反应体系,绝对定量了无肥 (NF)、化肥 (NP) 以及化肥配施有机肥 (NPM) 等 3 种施肥措施下大豆田土壤镰孢菌 DNA 含量。结果表明:引物 TS 和 TR 对镰孢菌属真菌有较好的特异性;Real-Time QPCR 反应的扩增曲线中各梯度浓度标准品的循环阈值 (Ct 值) 间隔均匀,熔点曲线无杂峰,标准曲线的相关系数 $R^2 = 0.993$,斜率为 -0.2927;在大豆生育时期的苗期,NF、NP 及 NPM 措施下土壤镰孢菌总 DNA 每克干土中含量分别为 18.33、44.61 和 140.83 pg,且 NPM 措施含量极显著高于 NF 及 NP 措施 ($P < 0.01$)。

关键词:镰孢菌;实时荧光定量 PCR;绝对定量

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0655-04

Development and Application of a Real-Time Quantitative PCR Assay for Detection of *Fusarium* spp. in Soil

WEI Wei^{1,2,3}, XU Yan-li¹, LIU Jin-bo^{1,3}, LI Chun-jie¹, HAN Xiao-zeng¹, LI Wen-bin², LI Shu-xian⁴

(1. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Harbin 150081, Heilongjiang; 2. Key Laboratory of Soybean Biology of Ministry of Education, Harbin 150030, Heilongjiang; 3. Graduate School, CAS, Beijing 100049, China; 4. Crop Genetics Research Unit (CGRU), United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), Stoneville 38776, USA)

Abstract: Base on the internal transcribed spacers (ITS) of *Fusarium*, a pair of specificity primers, TS and TR, were designed and synthesized for Real-time quantitative PCR (Real-Time QPCR) system of *Fusarium* spp. and then its optimal reaction system was established. Using this reaction system, the masses of genomic DNA of *Fusarium* spp. in soybean field, which were extracted from three fertilization management, including no fertilizer (NF), chemical N and P (NP) and chemical N, P and manure (NPM), were quantified absolutely. TS and TR have possessed a good specificity to *Fusarium* spp. In the amplification curve of this Real-Time QPCR reaction, the spacings of Cycle Threshold (Ct) of standard substance under every concentration gradient were uniform. The melting curve showed a simple peak. The correlation coefficient (R^2) and slope of the equation from the standard curve were respective 0.993 and -0.2927. At soybean seedling stage, the mass of genomic DNA of *Fusarium* spp. per gram of soil under NF, NP and NPM fertilization management were 18.33, 44.61 and 140.83 pg, respectively. The mass in NPM measure was higher than NF and NP measure significantly ($P < 0.01$).

Key words: *Fusarium* spp.; Real-Time QPCR; Absolute quantitation

镰孢菌属真菌 (*Fusarium* spp.) 是土壤真菌的主要类群。镰孢菌可以侵染寄主植物的维管束系统和器官,从而引起植物萎蔫和根、茎、叶和果实腐烂等症^[1],因此该属真菌是农业生产中作物萎蔫病和根腐病的主要病原菌^[2]。土壤镰孢菌种群密度的研究多采用稀释平板法等传统研究手段^[3],然而传统方法的局限性导致其无法全面反映自然条件下土壤镰孢菌种群密度分布,从而使结果产生偏

差。近年来,实时荧光定量 PCR (Real-Time quantitative polymerase chain reaction, Real-Time QPCR) 技术的提出,为植物病害菌检测提供了全新的方法,它可以通过检测病原菌目的序列 PCR 扩增产物的荧光信号强度达到实时解析的目的^[4]。目前,已有研究者选择 SYBR Green I 和 Eva Green 等荧光染料对环境样品中的镰孢菌属进行绝对定量分析^[5-7],然而黑土区大豆田土壤镰孢菌属种群密度的 Real-

收稿日期:2010-03-02

基金项目:中国科学院知识创新工程重大资助项目 (KSCX1-YW-09-09);大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目 (SB08B01);国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAD21B01-15)。

第一作者简介:魏巍(1984-),男,在读博士,研究方向为植物病原微生物。E-mail: weiwei0274@126.com。

通讯作者:许艳丽,研究员,博士生导师。E-mail: xyll@neigaeherb.ac.cn。

Time QPCR 检测体系建立及应用的研究尚未见报道。

该文参考镰孢菌属真菌 ITS 序列,设计应用于 Real-Time QPCR 反应的镰孢菌属特异性引物 TR 和 TS,并应用该特异性引物对黑土大豆田 3 种施肥措施下土壤镰孢菌属 DNA 含量进行 Real-Time QPCR 绝对定量检测,旨在建立黑土大豆田土壤镰孢菌属种群密度的 Real-Time QPCR 定量方法。

1 材料与方法

1.1 样品采集

Real-Time QPCR 检测样品于 2008 年采集自中国科学院海伦农业生态试验站(47°26'N, 126°38'E)长期定位试验区。该试验区土壤类型为中厚层黑土,开垦前为草甸草原植被,开垦历史为 100 a 左右。1993 年将农田设 3 个施肥处理:无肥处理(No Fertilizer, NF)、化肥处理(NP chemical fertilizer applied, NP)和化肥配施有机肥处理(NP chemical fertilizer and organic manure, NPM)。施肥量为 N 32.26 kg·hm⁻²、P₂O₅ 82.44 kg·hm⁻²、有机肥 15 000 kg·hm⁻²,有机肥为腐熟猪粪^[8]。作物种植方式为小麦-玉米-大豆轮作,样品采集时农田作物为大豆。

在大豆生育期的苗期(6月13日)采集 3 种施肥措施土壤,均采用土钻按 5 点取样法采集土壤非根际土样,为避免表层土壤受空气影响,各系统去除 0~5 cm 表土,采集 5~20 cm 土壤样品。混合均匀后用无菌封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室,新鲜土样过 2 mm 土壤筛,于 4℃ 保存以备实时荧光定量 PCR 研究使用。

1.2 土壤真菌形态学鉴定

土粒法分离土壤镰孢菌^[3,9]。分离得到的镰孢菌菌株经单孢纯化后,进行标准培养,即将菌丝接种到 PDA 和 SNA 培养基上,于 25℃ 恒温光照培养箱内 12 h 光照与黑暗交替培养^[9]。根据 Booth 和 Leslie 等的分类系统,结合《常见镰刀菌鉴定指南》进行形态学鉴定^[10]。分离得到的其它土壤真菌参照《真菌鉴定手册》进行形态学鉴定^[11]。

1.3 Real-Time QPCR 研究

1.3.1 土壤真菌基因组总 DNA 提取 土壤真菌基因组总 DNA 的提取参考 Zhou 等的方法^[12]。DNA 的纯化采用上海生物工程有限公司生产的 TAE 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒。提取的土壤总 DNA 通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳进行检验。

1.3.2 Real-Time QPCR 标准品尖孢镰孢菌菌株 DNA 提取 应用经形态学鉴定及单孢分离得到的尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* V₃S-3-1-4 基因组 DNA 作为标

准品。镰孢菌纯菌基因组总 DNA 的提取参考李志岗等方法^[13]。DNA 的纯化及电泳检验同 1.3.1。

1.3.3 引物设计 参照 GenBank 上公布的镰孢菌属 ITS 序列,用 Primer Premier 5.0 生物软件设计了镰孢菌属真菌特异性引物 TR 和 TS,并由上海生物工程有限公司合成。引物的序列如下:

TR:5'-TTC GTG ATA CCA AAG GGA C -3'

TS:5'-CCA CAA GGG CAG CAA CGG-3'

1.3.4 Real-Time QPCR 扩增反应条件 Real-Time QPCR 应用 Bio-Rad 公司 MJ Opticon Monitor 荧光定量 PCR 仪。反应体系体积为 25 μL,其中 10×PCR Buffer 2 μL, MgCl₂ (200 mmol·L⁻¹) 2 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹) 2 μL, 上、下游引物 (20 pmol·L⁻¹) 各 1 μL, Taq 酶 0.3 μL, EVA Green I 2 μL, DNA (20 ng·μL⁻¹) 提取物 2 μL, 再加去离子水补足。反应条件为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 10 s, 56.6℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 并收集荧光信号, 40 个循环;72℃ 5 min。熔点曲线分析温度设于 65~95℃ 之间,每隔 0.2℃ 收集荧光信号 1 s。

1.3.5 数据分析 采用 MJ Opticon Monitor TM 3.1 实时荧光定量分析软件和 DPS 7.55 统计软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 土壤真菌分离鉴定

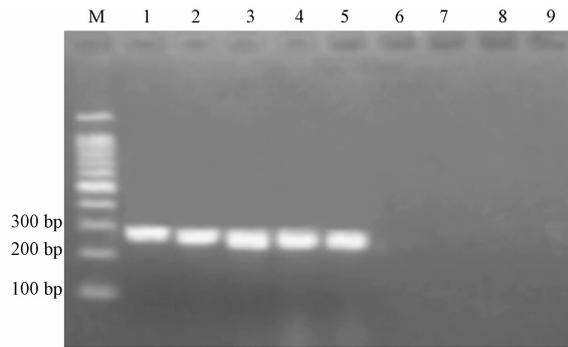
在大豆根腐病害主要发生的苗期,从 3 种施肥措施大豆田土壤中共分离获得镰孢菌 101 株,经形态学鉴定得到 5 种镰孢菌,即燕麦镰孢菌 *Fusarium avenaceum*、禾谷镰孢 *Fusarium graminearum*、串珠镰孢菌 *Fusarium moniliformis*、尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 和三线镰孢菌 *Fusarium tricinctum*。分离到的其它真菌包括青霉菌 *Penicillium* spp., 木霉菌 *Trichoderma* spp. 以及葡萄孢菌 *Botrytis* spp.。

2.2 引物检测

以分离鉴定得到的 5 种镰孢菌代表菌株作为 PCR 反应的阳性菌株,选取木霉菌属、青霉菌属和葡萄孢菌属中的优势种作为阴性对照菌株。PCR 扩增结果显示,5 株镰孢菌菌株分别有 1 条 260 bp 的特异性扩增带,而其它阴性对照菌株和空白均无扩增(图 1),说明所设计的引物具有镰孢菌属真菌的特异性。

2.3 土壤镰孢菌 Real-Time QPCR 检测体系的建立

2.3.1 标准品浓度测定 研究中以尖孢镰孢菌基因组 DNA 作为标准品,测定该标准品 DNA 溶液浓度为 58.8 ng·μL⁻¹。将初始浓度 DNA 溶液进行 1:10¹、1:10²、1:10³ 和 1:10⁴ 的梯度稀释,并以该 5



M:100bp Marker; 1:*F. oxysporum*; 2:*F. moniliformis*; 3:*F. tricinatum*; 4:*F. avenaceum*; 5:*F. graminearum*; 6:*Trichoderma harzianum*; 7:*Penicillium* spp.; 8:*Botrytis cinerea*; 9:空白对照(Blank)。

图1 镰孢菌属的特异性引物常规 PCR 检测

Fig.1 Conventional PCR assay to specificity primers of *Fusarium* spp.

个浓度梯度的 DNA 溶液作为模板进行 Real-Time QPCR 扩增。

2.3.2 扩增曲线分析 Real-Time QPCR 反应结束后,利用 MJ Opticon Monitor™ 3.1 软件绘制出反应的扩增曲线(图2)。

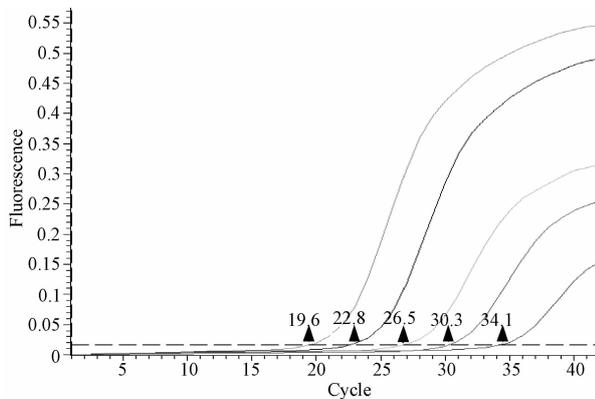


图2 Real-Time QPCR 扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of Real-Time QPCR

从左至右 5 条曲线依次代表标准品的初始浓度溶液以及 $1:10^1$ 、 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 和 $1:10^4$ 的梯度稀释液的扩增曲线。可见该 5 条曲线较光滑、倾斜度较大且各循环阈值(Ct 值)间隔均匀。

2.3.3 标准曲线分析 根据扩增曲线提供的标准品各梯度稀释浓度反应的循环阈值(Ct 值),MJ Opticon Monitor™ 3.1 软件自行绘制出反应的标准曲线(图3)。该标准曲线的相关系数 $R^2 = 0.993$,斜率为-0.2927,计算其扩增效率 $E = 103\%$ 。

2.3.4 熔点曲线分析 测定各浓度稀释梯度的标准品及样品在 PCR 过程中的熔点温度并绘制熔点曲线(图4)。标准品及样品的熔点曲线峰型单一,且标准品及样品熔点温度相同($82.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$),表明扩增反应产物溶解温度均一,特异性好且无引物二聚体影响。

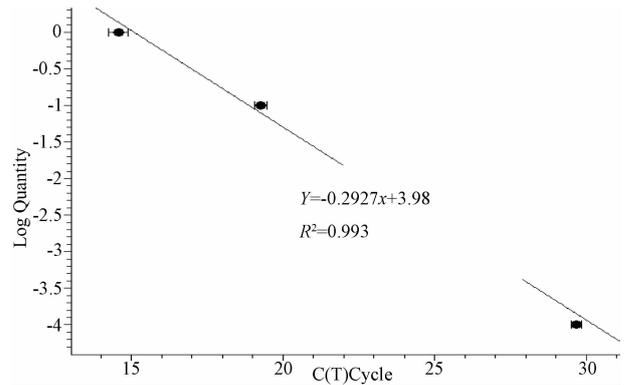


图3 Real-Time QPCR 标准曲线

Fig.3 Standard curve of Real-Time QPCR

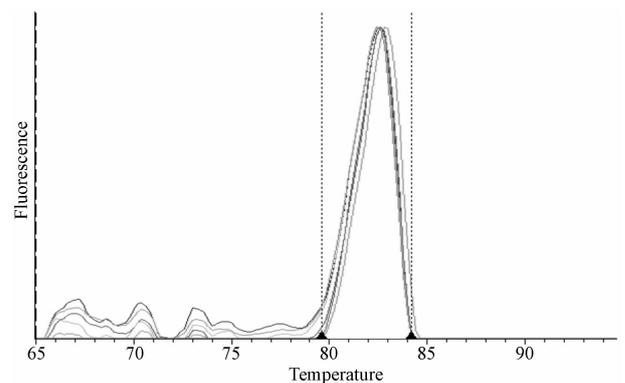


图4 Real-Time QPCR 熔点曲线

Fig.4 Melting curve of Real-Time QPCR

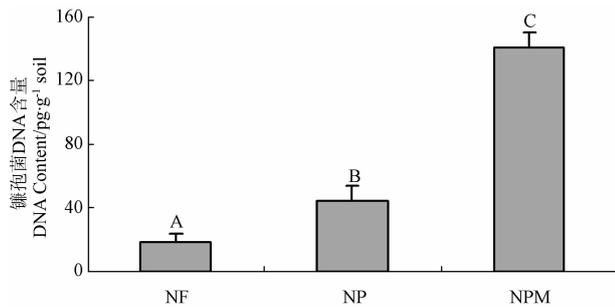
综合上述引物检测、扩增曲线、标准曲线和熔点曲线结果,可以确定该土壤镰孢菌属 Real-Time QPCR 定量检测体系和反应条件合理可靠。

2.6 不同施肥措施下土壤镰孢菌 DNA 动态变化

利用该 Real-Time QPCR 检测体系对 3 种施肥措施土壤镰孢菌 DNA 含量进行定量检测,根据标准曲线斜率及 $C(t)$ 值,由 MJ Opticon Monitor™ 3.1 软件计算出各样品组 DNA 含量(图5)。在大豆根腐病发生的苗期,NPM 措施下土壤镰孢菌 DNA 含量最高,每克干土中含量达到 140.83 μg 。其次为 NP 措施,含量为 44.61 μg 。而无肥措施土壤镰孢菌 DNA 含量为 18.33 μg ,仅为 NPM 措施的 13%。3 种施肥措施相互间的差异均达到极显著水平($P < 0.01$)。该结果表明大豆田土壤采取 NP 或 NPM 措施后,土壤镰孢菌 DNA 含量均极显著地增加。NPM 措施甚至可以将土壤镰孢菌 DNA 含量提升 1 个数量级。

3 结论与讨论

Real-Time QPCR 反应所用的引物、反应得到的扩增曲线、熔点曲线以及标准曲线均达到 Real-Time QPCR 反应的理想条件。引物 TR 和 TS 扩增结果无引物二聚体及非特异性扩增出现,显示出良好的特



NF: 无肥, NP: 化肥, NPM: 化肥配施有机肥

字母标记 A, B, C 表示极显著水平差异 ($P < 0.01$)

NF: no fertilizer, NP: chemical nitrogen and phosphorus, NPM: chemical nitrogen, phosphorus and manure

A, B and C represent the significant difference at $P < 0.01$

图5 3种施肥措施土壤镰孢菌基因组DNA含量

Fig.5 Mass of genomic DNA of *Fusarium* spp. in soil from three kinds of fertilization management.

异性。然而建立实时荧光定量检测体系除了引物应具有良好的特异性外,标准曲线的建立同样至关重要。由于 Real-Time QPCR 绝对定量是建立在模板的初始浓度与 Ct 值关系的基础上^[14],因此为保证样本定量分析具有稳定可重复的结果,标准曲线参数的要求非常严格。理论上合格的标准曲线具有一致的重复反应、高的线性 ($R^2 > 0.99$) 和高扩增效率 (E: 90 ~ 105%, 即斜率 ≈ -0.3)^[14]。其中,扩增效率大于 100% 的原因可能是由于反应抑制剂的存在所造成的。反应抑制剂能够延迟反应 Ct 值,但随着标准品模板的稀释,其浓度逐渐减小,因此在高稀释度标准品样品中反应抑制剂对 Ct 值的延迟程度也在减弱,导致高稀释度标准品样品 Ct 值略微增高,进而造成扩增效率计算结果略微大于 100%。由于研究中作为标准品的镰孢菌基因组 DNA 在提取过程中应用了可以成为反应抑制剂的化学药品,如氯仿、饱和酚等^[5],所以导致结果中扩增效率为 103%。

应用建立的 Real-Time QPCR 反应体系,成功地定量了土壤中镰孢菌 DNA 含量。长期以来,土壤镰孢菌种群密度的研究一直借助于稀释平板法等传统研究手段^[3]。虽然稀释平板法凭借其操作简便、快捷和易成功等优点^[15],成为土壤微生物分离培养及衡量微生物小群体多样性的常规手段,但是该方法也存在很多缺陷,例如培养基的成份可以影响微生物的生长状况,进而影响所得菌落的多样性水平;菌落形成单位 (CFU) 的数量通常随培养基营养浓度的降低而增加^[16]。因此它无法全面反映自然条件下微生物的生长状况,从而使结果产生偏差。另一方面,土壤中镰孢菌可以通过大型分生孢子、小型分生孢子、厚垣孢子以及菌丝段等方式进行繁殖。因此通过稀释平板法分离培养出的镰孢

菌,其来源可能是土壤中尚未生长的大、小分生孢子、厚垣孢子甚至是稀释及接种过程中产生的菌丝段^[10],所以无法真实地反映出自然条件下镰孢菌的数量,致使该方法在进行大量样品中镰孢菌种群密度分析和后续研究时成为一个可能的限制因子。

通过对特异性引物扩增产物进行电泳检测和 Real-Time QPCR 熔点曲线分析可知,该引物扩增后无引物二聚体及非特异性扩增出现,因此定量结果可以准确反映出土壤镰孢菌总 DNA 的含量。由于土壤镰孢菌总 DNA 质量与镰孢菌个体数呈正向相关,因此,可以通过土壤中镰孢菌 DNA 含量间的差异来反映不同环境土壤镰孢菌种群密度分布情况。该方法不经过分离培养过程,可以克服传统稀释平板法的局限性,同时还具有快捷和省力等优势。

在大豆生育期的苗期,3种施肥措施下土壤镰孢菌总 DNA 在每克干土中质量 (Q) 由高到低的顺序为 QNPM > QNP > QNF。李海波等研究表明农田不施肥,有机质含量显著下降;单施化肥或高量化肥可使有机 C、N 库保持稳定或小幅波动;化肥和有机肥配合施用则能提高有机质含量,改善土壤质量,提高土壤肥力^[17]。因此,大豆田土壤施入化肥配施有机肥 (NPM) 后,能明显提高土壤有机质养分含量,增强土壤酶活性,增加土壤微生物的数量,创造有利于土壤微生物生长繁育的土壤生态化学环境。土壤镰孢菌的正常生长繁殖同样需要土壤有机质作为养分,因此土壤有机质含量与土壤镰孢菌种群密度可能存在正向相关关系,进而造成 NPM 措施下大豆田土壤镰孢菌具有较大的种群密度。

参考文献

- [1] Kistler H C, Alabouvette C, Baayen R P, et al. Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* [J]. *Phytopathology*, 1999, 88: 30-32.
- [2] Isabel M, Roncero G, Hera C. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 62: 87-98.
- [3] 刘金波, 许艳丽, 魏巍. 大豆根际土壤镰孢菌不同分离方法比较 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(1): 106-112. (Liu J B, Xu Y L, Wei W. Comparing different methods for isolating *Fusarium* from soybean Rhizosphere soil [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(1): 106-112.)
- [4] Nitsche A, Steuer N, Schmidt C A, et al. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA [J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45: 1932-1937.

(下转第 662 页)

- 22(2):121-126.)
- [4] 许艳丽,李春杰,刘金波,等.东北黑土区重迎茬对大豆病虫害发生的影响[J].大豆科学,2008,27(3):472-476.(Xu Y L, Li C J, Liu J B, et al. Effect of an alternate-year and continuous-cropping on diseases and pests of soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(3):472-476.)
- [5] 韩晓增,苗淑杰.连作对大豆根瘤形成和固氮功能影响的研究展望[J].大豆通报,2007(1):43-45.(Han X Z, Miao S J. Prospects of the research on how continuous cropping affected nodulation and nitrogen fixation in soybean[J]. Soybean Bulletin, 2007(1):43-45.)
- [6] 刘忠堂,于龙生.重迎茬对大豆产量及品质的影响研究[J].大豆科学,2000,19(3):229-237.(Liu Z T, Yu L S. Study on the influence of successive and alternative cropping on soybean yield and quality[J]. Soybean Science, 2000, 19(3):229-237.)
- [7] 杜长玉,胡亚祥,胡兴国,等.不同肥料对大豆连作效果的研究[J].内蒙古农业科技,2006(3):20-21.(Du C Y, Hu Y X, Hu X G, et al. Study on the influence of different fertilizer on continuous soybean[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2006(3):20-21.)
- [8] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,2000.(Lu R K, Soil Agro-chemistry Analyse Method [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.)
- [9] 薛庆喜,杨思平,杨玉春,等.不同作物茬口对连作大豆产量及农艺性状的影响[J].大豆科学,2009,28(1):73-76.(Xue Q X, Yang S P, Yang Y C, et al. Effects of different crop stubbles on yield and agronomic characters of continuous cropping soybean [J]. Soybean Science, 2009, 28(1):73-76.)
- [10] 王宗玮,张鑫生,闫飞.大豆连作障碍机理的研究简述[J].吉林农业科学,2009,34(3):12-13,27.(Wang Z W, Zhang X S, Yan F. Review on mechanisms of continuous cropping stress of soybean[J]. Jilin Agricultural Sciences, 2009, 34(3):12-13, 27.)
- [11] 李春杰,许艳丽,陈海山,等.耕作方式对连作大豆生长发育及产量的影响[J].中国油料作物学报,2008,30(4):455-459.(Li C J, Xu Y L, Chen H S, et al. Effects of tillage patterns on development and yield of continuous cropping soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(4):455-459.)
- [12] 张兴梅,王伟,何淑平,等.两种类型土壤大豆施钾效应[J].中国油料作物学报,2007,29(4):452-455.(Zhang X M, Wang W L, He S P, et al. Effects of potassium application rate on soybean indifferent soil types [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(4):452-455.)
- [13] 李春杰,许艳丽,王喜斌,等.追肥方式对连作大豆生长发育和产量的影响[J].大豆科学,2008,27(6):1003-1006.(Li C J, Xu Y L, Wang X B, et al. Effect of top dressing fertilizer patterns on growth and yield of continuous cropping soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(6):1003-1006.)
- [14] 赵伟,王宏燕,王大庆,等.农肥和化肥对东北黑土土壤氮素转化作用的研究[J].水土保持学报,2009,23(2):99-103.(Zhao W, Wang H Y, Wang D Q, et al. Effect of manure and chemical fertilizers application on nitrogen transfer in black soil[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2009, 23(2):99-103.)
- [15] 孙广林,夏永胜,张中原.关于大豆配方施肥的研究与应用[J].土壤通报,2007,38(3):527-530.(Sun G L, Xia Y S, Zhang Z Y. Recommended fertilization for soybean and its application [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2007, 38(3):527-530.)
- (上接第 658 页)
- [5] Zhang Z, Zhang J, Wang Y, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249: 39-47.
- [6] Gao X, Jackson T A, Lambert K N, et al. Detection and quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with Real-time quantitative polymerase chain reaction[J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1372-1380.
- [7] Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen L K, et al. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76:234-240.
- [8] 王树起,韩晓增,乔云发,等.长期施肥对东北黑土酶活性的影响[J].应用生态学报,2008,19(3):551-556.(Wang S Q, Han X Z, Qiao Y F. Effects of long-term fertilization on enzyme activities in black soil of Northeast China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(3):551-556.)
- [9] Leslie J F, Somervell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA. 2006: 18-21.
- [10] 王拱辰,郑重,叶琪明,等.常见镰孢菌分类指南[M].北京:中国农业出版社,1996:1-97.(Wang Z C, Zheng Z, Ye Q M, et al. Guide to identification of common *Fusarium* species [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996:1-97.)
- [11] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:492-515.(Wei J C. Manual of Fungus identification [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1979:492-515.)
- [12] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 316-322.
- [13] 李志岗,宋东辉,王建明,等.耕层土壤镰刀菌单胞系的建立和基因组DNA的快速抽提[J].山西农业大学学报,2002,32(4):31-34.(Li Z G, Song D H, Wang J M, et al. Establishment of single conidial strains of *Fusarium* and rapid isolation their genomic DNA [J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 2002, 32(4):31-34.)
- [14] Dorak M T. Real-time PCR [R]. Taylor & Francis Group, 2006: 41-45.
- [15] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:40-44.(Shen P, Fan X R, Li G W. Microbiology experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999:40-44.)
- [16] Helle H, Susanne E. A resource-saving method for isolation of *Fusarium* and other fungi from individual soil particles[J]. Mycological Research, 1999, 103: 1545-1548.
- [17] 李海波,韩晓增,王凤.长期施肥条件下土壤碳氮循环过程研究进展[J].土壤通报,2007,38(2):384-388.(Li H B, Han X Z, Wang F. Review of soil carbon and nitrogen cycling under long-term fertilization [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2007, 38(2):384-388.)