

四川省山药黑斑病病原菌的鉴定

韩 帅, 张河庆, 吴 婕, 李洪浩, 席亚东*

(四川省农业科学院植物保护研究所, 蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室, 成都 610066)

摘要 为鉴定引起山药茎蔓黑斑病的病原菌, 本研究利用柯赫氏法则验证其致病性, 根据菌株的形态特征和基于 *rpb2* 基因序列分析进行分类鉴定, 并初步测定其寄主范围。结果显示: 分离的 2 株病原菌分生孢子椭圆形, 单胞, $(3.9\sim 5.1)\mu\text{m}\times(1.8\sim 2.7)\mu\text{m}$, 产孢细胞瓶梗形, 分生孢子器近圆形或梨形, 无刚毛, 具孔口, 有时孔口延长形成乳突, NaOH 颜色反应呈阳性, 参考 *Phoma* 鉴定手册, 可将其划分到 section *Peyronellaea*。将供试菌的 *rpb2* 序列进行 BLAST 比对分析, 其与 GenBank 中的 *Epicoccum laticollum* 具有最高的同源性, 支持率为 97%, 结合形态学特征可将其鉴定为 *E. laticollum*, 该菌经人工接种后也能侵染番茄、辣椒和花菜幼苗。

关键词 山药黑斑病; 病原鉴定; 附球菌属; *rpb2* 序列分析

中图分类号: S 435.39 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018156

Identification of the pathogen causing black rot of yam in Sichuan Province

HAN Shuai, ZHANG Heqing, WU Jie, LI Honghao, XI Yadong

(Sichuan Provincial Key Laboratory for Vegetable Germplasm Innovation and Variety Improvement, Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract To identify the pathogen causing black rot of yam, experiments were performed, including pathogenicity test, host range determination, identification based on morphology and *rpb2* sequences. The results showed that conidia of the pathogens were ellipsoidal, aseptate, $(3.9\sim 5.1)\mu\text{m}\times(1.8\sim 2.7)\mu\text{m}$, with phialidic conidiogenous cells, globose, pyriform and glabrous pycnidia, and sometimes elongated ostioles like a short, slightly papillate neck. The pathogens showed positive reactions in the NaOH test. Based on the morphology, the fungus was classified in section *Peyronellaea* according to the *Phoma* identification manual. The analysis of *rpb2* sequences showed that the fungus shared the highest homology with *Epicoccum laticollum* (up to 97%) in GenBank. Therefore, the fungus was identified as *E. laticollum*, which could infect tomato, pepper and cauliflower in the seedling stage after inoculation.

Key words black spot of yam; pathogenic identification; *Epicoccum*; *rpb2* sequence analysis

山药又名薯蓣, 是一种药食两用的多年生草质藤本植物, 在我国的西北、华北及长江流域均有广泛种植。由于山药具有较高的营养价值和药用价值, 近年来种植面积不断扩大, 加上单一连作的栽培模式使病害逐年加重。在山药栽培管理过程中常见的病害有枯萎病^[1]、褐斑病^[2]、炭疽病^[3-4]、根腐病^[5-6], 此外茎腐病^[7]、斑枯病^[8]、漆腐叶斑病^[9]也时有发生, 这些病害已严重影响到山药的产量和品质。

茎点霉属 *Phoma* 真菌拥有丰富的生态多样性, 通常被认为是种类最多的真菌类群之一, 已命名和

描述的超过3 000种^[10]。早期学者主要依据寄主类群和培养性状来进行分类, 对于形态差异较小的物种, 形态分类就显示出一定的局限性。2004年 Boerema 等^[11]编写出版了《*Phoma* Identification Manual》, 将厚垣孢子、产孢细胞、分生孢子和分生孢子器的形态学特征、菌落的培养性状、NaOH 颜色反应以及寄主范围作为分类依据, 重新整理和修订了茎点霉属真菌, 并将其分为九大部分, 根据编制的检索表可将供试菌划分至其中一个部分, 再划分到种。这为供试菌在种属水平上的准确鉴定提供了有效的帮助,

收稿日期: 2018-04-08 修订日期: 2018-05-15

基金项目: 四川省科技计划项目(2016NYZ0053)

* 通信作者 E-mail: xiyadong2002@126.com

但部分分类单元之间的划分界限仍然比较模糊,鉴定过程中供试菌可能同时拥有几种分类单元的特征^[12]。分子生物学的快速发展为微生物的分类鉴定提供了新思路和新方法,Aveskamp 等^[13]利用 4 个基因(LSU、SSU、ITS、*tub2*)对亚隔孢壳科 Didymellaceae 进行多位点系统发育研究,对该科几个单系进化支进行了分类学修订,将原本属于广义茎点霉 section *Peyronellaea* 部分的 *Ph. sorghina*、*Ph. pimprina* 和 *E. nigrum* 转至新建立的附球菌属 *Epicoccum*,该属的典型特征为能够产生深色的葡萄串状的厚垣孢子。Chen 等^[14]将 *rpb2* 与 LSU、ITS 和 *tub2* 三个位点结合进行多位点系统发育分析,对附球菌属进行了修订和补充,加入了 5 种不产生厚垣孢子的原茎点霉属真菌。随后,Chen 等^[15]使用相同方法对附球菌属进行了再次补充和完善,将 9 个新种纳入其中,其中包括 *E. latusicollum*、*E. viticis* 和 *E. duchesneae* 等 5 个不产生厚垣孢子的新种。关于附球菌属真菌的研究主要集中于生物防治方面,Campbell^[16]研究发现,黑附球菌 *E. purpurascens* 对小麦禾旋孢腔菌 *Cochliobolus sativus* 有拮抗作用;室内试验表明,黑附球菌可以减少核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 对莴苣的侵染^[17];Malgarejo 等^[18]的研究表明,*E. nigrum* 能够有效抑制桃褐腐菌 *Monilinia laxa*;李宝年等^[19]认为附球菌属真菌对樟子松枯梢病原菌 *Diplodia pinea* 具有拮抗作用。近几年来,也有报道称附球菌属真菌能引起作物病害,*E. sorghinum* 会造成高粱根部变黑腐烂^[20]和种子腐烂^[21],*E. nigrum* 能引起枇杷叶片的褐斑病^[22]。

本研究于 2016 年从四川省攀枝花市米易县采集山药病样,发现茎蔓上一种新的病害,采用柯赫氏法则回接验证,依据病原菌的菌落形态、分生孢子和分生孢子器的形态特征,结合 *rpb2* 基因序列建树比对分析,确定病原菌的种类,从而为山药病害的准确识别和药剂防治提供重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料和供试菌株

植物材料:山药品种为‘雅山一号’,病样采自攀枝花米易县垭口镇和丙谷镇。辣椒品种为‘香辣二荆条’,花菜品种为‘碧玉’,番茄品种为‘大红番茄’。供试菌株(编号为 SY11 和 SY12)均从山药发病茎

蔓分离获得,经过单孢纯化保存于 4℃ 冰箱备用。

1.2 培养基

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,PDA)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 12 g,蒸馏水 1 000 mL;水琼脂培养基:琼脂 6 g,蒸馏水 1 000 mL;燕麦琼脂(oatmeal agar,OA)培养基:燕麦片 20 g,琼脂 12 g,蒸馏水 1 000 mL;麦芽浸膏(malt extract agar,EMA)培养基:麦芽膏 40 g,琼脂 12 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.3 主要试剂

试剂及仪器:十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,CTAB),乙二醇四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA),Taq PCR Master Mix,北京擎科新业生物技术有限公司;Loading Buffer,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.4 病原菌的分离和纯化

采用常规组织分离法进行病原菌的分离^[23]。病样用清水冲洗干净,自然风干,使用消毒剪刀截取病健交界处 5 mm×5 mm 的组织块,75%乙醇浸泡 1 min,然后用 5%次氯酸钠处理 30 s,无菌水漂洗 3 次后用无菌滤纸吸干水分,将组织块接种至 PDA 平板上,25℃ 黑暗培养。

菌株纯化采用单孢分离法。收集菌株的分生孢子器,机械压破后加入适量无菌水,取上清制成一定浓度的孢子悬浮液,均匀地涂布于 PDA 平板上,25℃ 黑暗培养 3~4 d 挑取单菌落,转接于 PDA 斜面上,获得纯菌株,待长满后 4℃ 保存。

1.5 病原菌的形态学鉴定

将活化的纯菌株转接于 OA、EMA 和 PDA 培养基上,25℃ 黑暗培养 7 d,测定菌落直径,并记录菌落的形态特征,同时在菌落边缘滴加适量的 10% NaOH 溶液,在 10 min 和 1 h 后观察并记录培养基的颜色变化。黑暗培养 7 d 后,将平板转移至 12 h 黑光灯照射、12 h 黑暗处理的人工气候培养箱中,25℃ 培养 7 d,诱导分生孢子器的产生,在光学显微镜下观察分生孢子、厚垣孢子和分生孢子器的形态特征,并测定 20 个分生孢子的大小,根据《Phoma Identification Manual》^[11]中关于生长速度、颜色反应以及分生孢子、分生孢子器和产孢细胞的形态特征等描述细则来进行形态学鉴定。

1.6 病原菌的致病性测定

离体叶片和茎蔓的无伤接种。将健康的山药叶片和茎蔓洗净,用 75% 乙醇进行表面消毒,超净工作台中风干后放置于水琼脂平板上,将直径为 6 mm 的菌饼接种于叶片背面和茎蔓表面,适量喷洒无菌水保湿,转置 L//D=16 h//8 h,光照时和黑暗时温度分别设置为 25℃ 和 16℃ 的人工气候培养箱中培养,以接种空白马铃薯葡萄糖琼脂块作为对照。每个处理为 9 片叶和 9 段茎蔓,重复 3 次。

1.7 病原菌的分子生物学鉴定

病原菌的总 DNA 提取采用 CTAB 法:菌株在 PDA 平板上培养 7 d 后,轻轻刮取表面的气生菌丝,冷冻干燥处理后使用液氮研磨至粉状,加入预热的 CTAB 液,于 65℃ 恒温水浴 30 min。冷却后加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提取上清,然后加入等体积的酚:氯仿(24:1)抽提两次。向上清液中加入 0.6 倍体积的异丙醇,使 DNA 沉淀,使用 70% 乙醇洗涤两次,干燥处理后加入 TE 缓冲液溶解 DNA,4℃ 保存备用。

分别用引物 ITS1/ITS4^[24]、RPB2-5F2^[25]/fRPB2-7cR^[26]对基因片段 ITS 和 *rpb2* 进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系为: *Taq* PCR Master Mix 12.5 μL、正向引物和反向引物(10 mmol/L)各 0.5 μL、模板 DNA(约 30~50 ng/μL)1 μL、ddH₂O 10.5 μL。PCR 的扩增条件:(1)ITS 序列:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保

存。(2)*rpb2* 序列:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 5 个循环;94℃ 变性 45 s,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 5 个循环;94℃ 变性 45 s,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,使用凝胶成像系统进行观察和拍照。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化和测序,将测序结果和 GenBank 中已知种属的 DNA 进行 Blast 比对分析,同时下载相似的序列,使用 MEGA 7.0 软件,基于 p-distance 模型以邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,经 Bootstrap 1 000 次循环检验。

1.8 病原菌寄主范围的测定

菌株培养 5 d 后,在菌落边缘制备直径为 6 mm 菌饼,在辣椒、番茄、花菜和豇豆的幼苗茎基部进行接种,每种作物 20 株,置于 L//D=16 h//8 h,光照时和黑暗时温度分别设置为 25℃ 和 16℃ 的条件下培养,并定期进行症状观察和记录,统计发病率。

2 结果与分析

2.1 山药茎蔓黑斑病症状观察

在攀枝花米易县埡口镇和丙谷镇的山药种植基地进行病害调查,共采集样品 12 份,其中样品 11 和 12 为山药茎蔓病害,主要症状为病斑初期呈近圆形小黑点,逐渐扩展为近圆形或梭形黑斑,病斑中心稍凹陷,之后扩大至不规则长形黑斑,病斑表面开裂,有的绕茎一周,病部稍缢缩(图 1a)。



a: 山药田间发病症状; b: 叶片接种 SY11; c: 叶片接种 SY12; d: 茎蔓接种 SY11; e: 茎蔓接种 SY12; f: CK1; g: CK2

a: Symptoms in yams; b: Leaf inoculated with SY11; c: Leaf inoculated with SY12; d: Vine inoculated with SY11; e: Vine inoculated with SY12; f: CK1; g: CK2

图 1 山药黑斑病的发病症状

Fig. 1 Black spot symptoms in yams

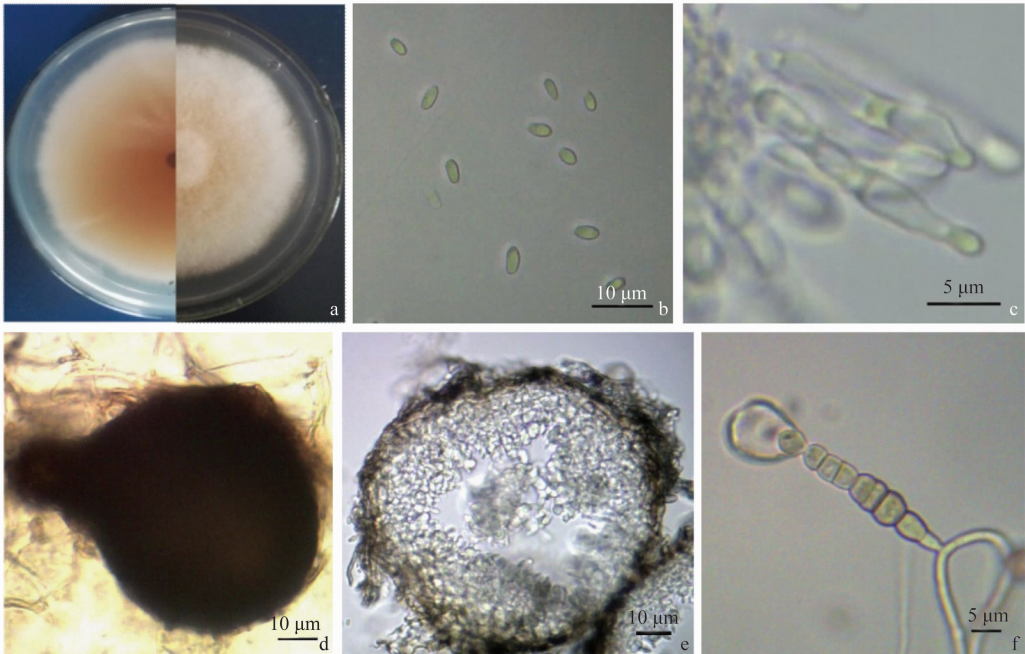
2.2 分离菌株的形态学特征

本研究从山药发病茎蔓上分离获得了 2 株菌,编号分别为 SY11 和 SY12。SY11 在 PDA 培养基上

中心呈橘黄色,边缘白色,菌丝形成垫状菌落(图 2a),在 OA 培养基上菌丝呈白色,中心致密,边缘稀疏,菌落背面淡黄色,在 EMA 培养基上的培养性状与

PDA 相似,SY11 接种于 PDA、OA 和 EMA 培养基 7 d 后菌落直径分别为 8.4、7.8 和 7.5 cm,使用 10 mol/L NaOH 溶液处理 EMA 培养基 10 min 后,培养基颜色变为墨绿色,1 h 后逐渐变为棕色;分生孢子无色、无隔、椭圆形(图 2b),大小为 $(3.9\sim5.1)\mu\text{m}\times$

$(1.8\sim2.7)\mu\text{m}$,分生孢子器椭圆形,具孔口(图 2d),器壁为拟薄壁组织,内侧由 6~7 层等轴细胞组成,外侧为 2~3 层暗褐色细胞(图 2e),产孢细胞瓶梗形(图 2c),菌丝末端或中间着生呈链格孢状的膨大细胞(图 2f)。



a: PDA 平板上的培养性状; b: 分生孢子; c: 产孢细胞; d: 聚集的分生孢子器; e: 分生孢子器切片; f: 膨大细胞
a: Colony on PDA; b: Conidia; c: Conidiogenous cells; d: Pycnidia; e: Section of pycnidium; f: Swollen cell

图 2 山药茎蔓黑斑病原菌 SY11 的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the strain SY11 isolated from black rot of yam

SY12 在 PDA 上的菌落形态和 SY11 类似,但菌落中心为絮状、背面有紫色的同心轮纹(图 3a),在 OA 培养基上菌落中心菌丝呈浅粉色、絮状,其余白色、垫状,菌落背面中心为紫红色,在 EMA 培养基上性状与 OA 类似,在 PDA、OA 和 EMA 培养基上培养 7 d 后的菌落直径分别为 8.5、7.9 和 7.6 cm,使用 10 mol/L NaOH 溶液处理 EMA 培养基 10 min 后,培养基颜色变为墨绿色,1 h 后逐渐变为棕色;分生孢子无色、无隔、椭圆形(图 3b),大小为 $(3.9\sim5.0)\mu\text{m}\times(1.8\sim2.8)\mu\text{m}$,分生孢子器椭圆形,具突出的孔口(图 3c),埋生或表生于培养基表面,器壁为拟薄壁组织,内侧由 4~5 层等轴细胞组成,外侧为 2~3 层暗褐色细胞(图 3d),菌丝末端或中间着生浅粉色、呈串珠状的近圆形膨大细胞(图 3e)。结合《Phoma Identification Manual》中的描述细则可将两个菌株归入 section *Peyronellaea* 中。

2.3 分离菌株的致病性鉴定

接种 SY11 和 SY12 菌株 2 d 后,山药叶片上产

生菌饼大小的黑褐色圆斑,接种 6 d 后形成近圆形病斑,病斑边缘褪绿黄化,叶脉变黑,病斑中心生有白色菌丝(图 1b~c),对照叶片未发病(图 1f),发病率为 100%。山药茎蔓接菌 4 d 后,茎蔓均发病,病部边缘变褐,中心逐渐变黑,稍缢缩,表面密生白色菌丝(图 1d~e),对照茎蔓没有症状(图 1g)。将发病叶片和茎蔓进行组织分离,对重新分离获得的病原菌的培养性状和微观特征进行观察,确定该菌和病样分离获得的病原菌为同一菌株,表明这两个菌株均能侵染山药叶片和茎蔓,是引起山药茎蔓黑斑病的病原菌。

2.4 病原菌的分子鉴定

以供试菌 SY11 和 SY12 的基因组 DNA 为模板,使用引物 ITS1/ITS4 对 ITS 区进行 PCR 扩增,分别获得长度为 509 bp 和 523 bp 的扩增片段,测序结果与 GenBank 数据库中的相似序列进行 Blast 比对分析,结果显示 SY11 和 SY12 与旋孢腔菌属、小球腔菌属、茎点霉属、附球菌属真菌的相似度达

99%以上,未能鉴定到种。使用引物 RPB2-5F2/1R-PB2-7cR 进行 PCR 扩增,分别获得长度为 905 bp 和 898 bp 的扩增片段,将序列提交至 GenBank,获得登录号分别为 MG787262 和 MG787263;同时将测序结果与 GenBank 数据库中的相似序列进行 Blast 比对分析,使用 MEGA7.0 软件构建基于 *rpb2* 序列

的系统发育树,结果表明供试菌与 3 株 *E. latusicollum*(KY742174、KY742175 和 KY742176) 聚为一支,支持率为 97%,附球菌属的其他种则在各自的分支上,外群 *Leptosphaeria conoidea* 则自成一支和附球菌属并列(图 4),结合 SY11 和 SY12 的形态学特征,可以将其鉴定为 *E. latusicollum*。

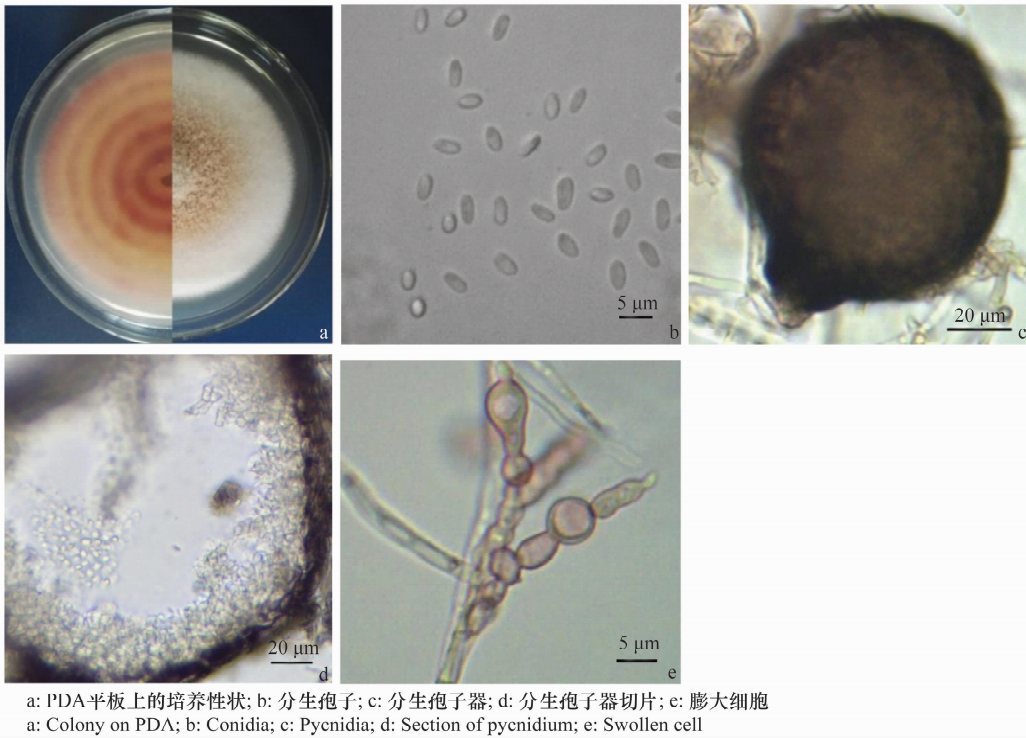


图 3 山药茎蔓黑斑病原菌 SY12 的形态学特征

Fig. 3 Morphological characteristics of the strain SY12 isolated from black rot of yam

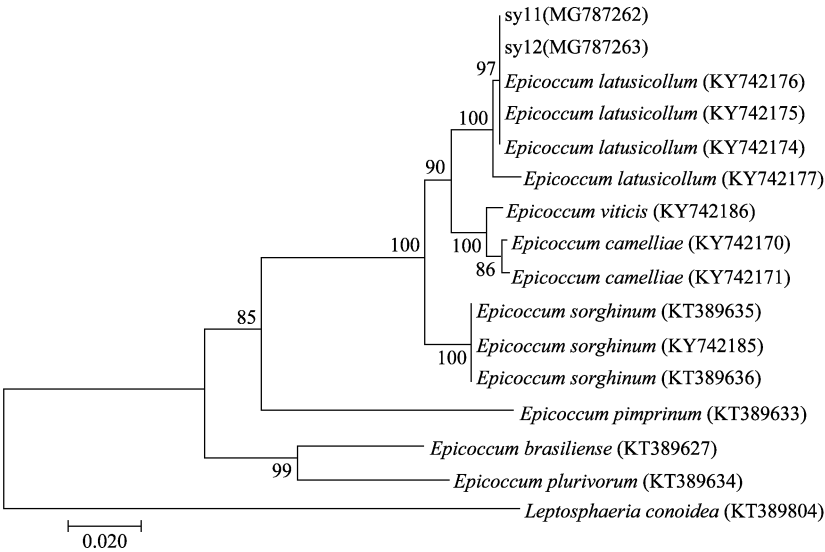


图 4 基于 *rpb2* 序列对附球菌属的系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Epicoccum latusicollum* based on *rpb2* sequences

2.5 病原菌寄主范围的研究

菌株 SY11 和 SY12 接种番茄苗茎基部 3 d 后,菌饼周围出现一圈水渍状病斑,6 d 后病斑变为褐色,扩展至整个茎基部,稍有缢缩,发病率为 100%;接种辣椒苗 4 d 后,接种部位开始变褐,6 d 后病斑扩大并且凹陷,其发病率分别为 85% 和 90%;接种花菜幼苗 4 d 后,接种部位出现不规则褐色病斑,6 d 后病斑中心变为黑色,表面密布白色菌丝,其发病率分别为 70% 和 80%;SY11 接种豇豆苗未发病,SY12 发病率为 10%,症状表现为粉色的稍凹陷病斑。结果表明,两个菌株能侵染辣椒、番茄和花菜,它的寄主范围可能包括茄科和十字花科作物,但对豇豆的侵染力非常有限。

3 讨论

山药是四川攀枝花米易县重要的经济作物之一,近年来由于山药的规模化种植,重茬严重,品种也较为单一,病害日益加重,经过病害调查和鉴定,当地由胶孢炭疽菌引起的炭疽病、尖孢镰刀菌和链格孢属真菌引起的叶斑病较为常见。我们在山药茎蔓上发现了一种新病害,症状为茎蔓生有椭圆形至梭形的黑斑,病斑中心开裂稍凹陷,之后连成一片至茎蔓枯死。本研究对引起攀枝花山药茎蔓黑斑病的两株真菌进行了分离和鉴定,并通过柯赫氏法则验证分离菌株为致病菌,经过形态学特征和基于 *rbp2* 序列的分子鉴定,确定分离菌株为 *E. latusicollum*,属于子囊菌门、亚隔孢壳科、附球菌属真菌。

附球菌属于 2010 年由 Aveskamp 等建立,经过后续的补充和完善,现有 16 个属。Chen 等^[15]通过多基因序列分析,将 *E. latusicollum* 纳入到附球菌属中,并对菌株编号为 LC 5158(从高粱中分离获得)的 *E. latusicollum* 的形态学特征和菌落培养性状作了描述。本研究分离到的菌株 SY11 和 SY12 与 LC 5158 形态学特征基本一致,也和 *Phoma* 鉴定手册对 section *Peyronellaea* 的描述基本相符,只是未见厚垣孢子,但能观察到菌丝中间或末端分化出的串珠状的近圆形膨大细胞,有的呈粉色,与 *Ph. anserina* 和 *Ph. eucalyptica* 在培养基上形成的膨大细胞类似^[26],这可能是形成厚垣孢子的前体细胞^[15]。同时,SY11 和 SY12 在 PDA 培养基上的生长速度快于 OA 和 MEA 培养基,NaOH 反应是由墨绿色逐渐转变为棕色,呈阳性,这与 LC 5158 培养性状一致,但是菌丝颜色和产生的色素有所不同,

SY11 和 SY12 的菌丝呈橙色或粉色,培养基呈浅粉色至紫色,且 SY12 能产生紫红色的同心轮纹,而 LC 5158 的菌丝为烟灰色至暗绿色,这可能是因为 *E. latusicollum* 的地理特异性较明显。

通常情况下,子囊菌门真菌 *rpb2* 单基因的系统发育关系与 18S rDNA 高度契合^[27],Chen 等认为 *rpb2* 单基因的系统发育树与多基因结合的系统发育树非常吻合,且 *rpb2* 基因在种间和属间关系上显示出比 ITS 更好的区分度^[15]。本研究利用 rDNA-ITS 和 *rpb2* 基因分别进行建树分析,结果显示基于 ITS 序列构建的系统发育树(本文未列出)不能鉴定到种,而 *rpb2* 基因能将分离菌株与附球菌属的 *E. latusicollum* 聚为一支,并且在种间表现出很好的区分度。

国内外关于 *E. latusicollum* 的报道极少,目前仅限于分类水平上的研究,只是在个别文献中有所提及,该菌主要分离自黄荆、野山茶、高粱、掌叶槭和罗汉松等植物,常被认为属于内生菌、腐生菌或半寄生菌^[15],对该菌病理学方面的研究较少。本研究首次报道了山药茎蔓上的一种新病害,通过组织分离、柯赫氏法则验证、形态学鉴定和分子生物学鉴定,试验结果表明引起山药茎蔓黑斑病的病原菌为 *E. latusicollum*,并初步确定该菌能侵染茄科和十字花科的个别作物,这为该病害的正确识别及防治方法的筛选提供了基础。

参考文献

- [1] 姚圣梅. 山药新病害——枯萎病[J]. 长江蔬菜, 1988(3): 41.
- [2] 王诗军, 田福进, 田凤环, 等. 山药褐斑病的发生特点与防治方法[J]. 中国植保导刊, 2004, 4(3): 42-43.
- [3] 黄云, 王洪波, 李庆, 等. 山药炭疽病病原研究(I): 炭疽病的症状及其病原鉴定[J]. 西北农业大学学报, 2004, 26(1): 44-46.
- [4] 朱桂宁, 蔡健和, 胡春锦, 等. 广西山药炭疽病病原菌的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 572-577.
- [5] 沈丽淘. 山药根腐病的病原学及防治药剂筛选研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
- [6] 贾海民, 鹿秀云, 陈丹, 等. 麻山药根腐病发生规律及其防治技术[J]. 北方园艺, 2011(1): 159-160.
- [7] 易龙, 肖崇刚, 杨水英, 等. 重庆盾叶薯蓣茎腐病发生严重[J]. 植物保护, 2005, 31(6): 96-97.
- [8] 陈红岩, 刘晓芸. 保定市山药病害种类及为害特点调查初报[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(6): 24-26.
- [9] 王飞, 刘红彦, 文艺, 等. 山药漆腐叶斑病原菌的鉴定及其生物学特性研究[J]. 园艺学报, 2017, 44(5): 972-978.
- [10] CROUS P W, GAMS W, STAPLERS J A, et al. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century [J]. Studies in Mycology, 2004, 50: 19-22.

- [11] BOEREMA G H, DE GRUYER J, NOORDELOOS M E, et al. *Phoma* identification manual [M]. CABI publishing, 2004.
- [12] AVESKAMP M M, VERKLEY G J M, DE GRUYTER J, et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section Peyronellaea and multiple taxonomic novelties [J]. *Mycologia*, 2009, 101: 363–382.
- [13] AVESKAMP M M, DE GRUYTER J, WOUDEBERG J H C, et al. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera [J]. *Studies in Mycology*, 2010, 65: 1–60.
- [14] CHEN Qian, JIANG J R, ZHANG G Z, et al. Resolving the *Phoma* *enigma* [J]. *Studies in Mycology*, 2015, 82: 137–217.
- [15] CHEN Q, HOU L W, HOU W J, et al. Didymellaceae revisited [J]. *Studies in Mycology*, 2017, 87: 105–159.
- [16] CAMPBELL W P. The influence of associated microorganisms on the pathogenicity of *Helminthosporium sativum* [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1956, 34: 865–874.
- [17] MERCIER J, REELEDER R D. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and other fungi on the phylloplane of lettuce [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1987, 65(8): 1633–1637.
- [18] MELGAREJO P, CARRILLO R, SAGASTA E. Potential for biological control of *Monilinia laxa* in peach twigs [J]. *Crop Protection*, 1986, 5(6): 422–426.
- [19] 李宝年, 徐树辉, 杨传波, 等. 樟子松枯梢病拮抗真菌的筛选 [J]. *东北林业大学学报*, 2004, 32(5): 97–99.
- [20] STOKHOLMA M S, WULFFB E G, ZIDAC E P, et al. DNA barcoding and isolation of vertically transmitted ascomycetes in sorghum from Burkina Faso; *Epicoccum sorghinum* is dominant in seedlings and appears as a common root pathogen [J]. *Microbiological Research*, 2016, 191: 38–50.
- [21] RISTIĆ D, STANKOVIĆ I, VUČUROVIĆ A, et al. *Epicoccum nigrum* the new pathogen of sorghum seed in Serbia [J]. *Ratarstvo I Povrtarstvo*, 2012, 49(2): 160–166.
- [22] WU Di, ZHANG Danhua, TIMKO M P, et al. First report of *Epicoccum nigrum* causing brown leaf spot of loquat in South-western China [J]. *Plant Disease*, 2017, 101(8): 1553.
- [23] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [24] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//INNIS M A, GELFAND D, SNINSKY J J, et al. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, California, USA: Academic Press, 1990: 315–322.
- [25] SUNG G H, SUNG J M, HYWEL-JONES N L, et al. A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combination bootstrap approach [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44: 1204–1223.
- [26] DE GRUYTER J, NOORDELOOS M E. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)-I. 1. Section *Phoma*: Taxa with conidia very small conidia *in vitro* [M]. *Rijksherbarium / Hortus Botanicus, Leiden*, Volume 15, Part 1, 1992: 71–92.
- [27] LIU Y J, WHELEN S, HALL B D. Phylogenetic relationships among ascomycetes evidence from an RNA polymerase II subunit [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16: 1799–1808.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 67 页)

- [17] ARTHURS S, THOMAS M B. Effect of dose, pre-mortem host incubation temperature and thermal behaviour on host mortality, mycosis and sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in *Schistocerca gregaria* [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2001, 11(3): 411–420.
- [18] 李政海, 鲍雅静, 王海梅, 等. 锡林郭勒草原荒漠化状况及原因分析 [J]. *生态环境学报*, 2008, 17(6): 2312–2318.
- [19] 郭元朝. 内蒙古锡林郭勒盟草原蝗虫发生危害及其防治对策 [J]. *草原与草业*, 2007, 19(3): 30–33.
- [20] 全川, 郗凤江, 杨景荣, 等. 锡林河流域中游草原植被退化遥感监测及合理放牧强度的确定 [J]. *草业学报*, 2003, 12(4): 78–83.
- [21] 刘玲, 郭安红. 2004 年内蒙古草原蝗虫大发生的气象生态条件分析 [J]. *气象*, 2004, 30(11): 55–57.
- [22] 徐骁骁, 孙清琳, 刘鹏, 等. 环境温度对黑龙江草蜥体温及生理体温调节能力的影响 [J]. *生态学杂志*, 2017, 36(2): 447–451.
- [23] BLANFORD S, THOMAS M B, LANGEWALD J. Thermal ecology of *Zonocerus variegatus* and its effects on biocontrol using pathogens [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2000, 2(1): 3–10.
- [24] BLANFORD S, THOMAS M B, LANGEWALD J. Behavioural fever in the Senegalese grasshopper, *Oedaleus senegalensis*, and its implications for biological control using pathogens [J]. *Ecological Entomology*, 1998, 23(1): 9–14.
- [25] 姚君明. 东亚飞蝗体温调节特性及其对绿僵菌致病性影响的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- [26] KLASS J I, BLANFORD S, THOMAS M B. Development of a model for evaluating the effects of environmental temperature and thermal behaviour on biological control of locusts and grasshoppers using pathogens [J]. *Agricultural and Forest Entomology*, 2007, 9(3): 189–199.
- [27] 岳梅, 雷仲仁, 朱彬洲, 等. 东亚飞蝗耐高温能力及其体温调节行为 [J]. *昆虫学报*, 2009, 52(10): 1103–1109.
- [28] ANDERSON R V, TRACY C R, ABRAMSKY Z. Habitat selection in two species of short-horned grasshoppers. The role of thermal and hydric stresses [J]. *Oecologia*, 1979, 38(3): 359–374.
- [29] 涂雄兵. 绿僵菌侵染对东亚飞蝗发育的影响研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [30] 任金龙, 赵莉, 赵炎, 等. 意大利蝗对温度耐受力的初探 [J]. *草业科学*, 2015, 32(2): 274–280.

(责任编辑: 田 喆)