

基于形态学及多基因位点的枸杞褐斑病病原鉴定

王艳^{1,2}, 晋玲^{1*}, 申培增³, 崔治家¹, 朱田田¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中药质量标准重点实验室, 兰州 730000;

3. 甘肃省白银市农技服务中心, 白银 730900)

摘要 枸杞 *Lycium barbarum* Mill. 是一种药食两用的名贵中药材, 褐斑病是 2010 年在甘肃省枸杞种植区发生的由无性态类真菌新种枸杞小黑梨孢 *Stigmella lycii* 引起的新病害, 据 2015 年—2018 年调查, 该病害已扩展至甘肃省各枸杞种植区, 常年发病率 45%~65%, 严重度 2~3 级。本研究首次对枸杞小黑梨孢有性态形态进行描述, 并结合分子生物学方法, 确定该病原菌的系统发育地位, 为该病的防治提供一定的理论依据。枸杞褐斑病菌在离体培养条件下和越冬病叶上均可形成有性态。子囊壳球形至亚球形, 大小 $185.6\ \mu\text{m} \times 176.6\ \mu\text{m}$, 有喙, 喙的大小为 $(35.7 \sim 53.6)\ \mu\text{m} \times (32.0 \sim 53.55)\ \mu\text{m}$; 子囊袋状, 大小 $(103.2 \sim 165.7)\ \mu\text{m} \times (15.7 \sim 22.4)\ \mu\text{m}$, 含 8 个子囊孢子; 子囊孢子砖格状, 大小 $(25.9 \sim 36.5)\ \mu\text{m} \times (9.4 \sim 14.1)\ \mu\text{m}$, 平均 $31.2\ \mu\text{m} \times 12.3\ \mu\text{m}$, 具 (4~) 6~7 个纵隔和 1~3 个横隔。通过 ITS、LSU、RPB2 和 EF1- α 多基因位点联合构建系统发育树, 确定该菌为子囊菌门格孢腔菌目格孢腔菌科真菌。秋末冬初清洁田园, 减少来年初侵染源, 是有效防治枸杞褐斑病的关键措施。

关键词 枸杞褐斑病; 枸杞小黑梨孢; 格孢腔菌科; 系统发育

中图分类号: S 436.63 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019312

Morphology and multi-locus phylogeny of *Lycium barbarum* leaf spot pathogen

WANG Yan^{1,2}, JIN Ling^{1*}, SHEN Peizeng³, CUI Zhijia¹, ZHU Tiantian¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Standard and Quality of

Chinese Medicine Research in Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

3. Baiyin Agricultural Technology Service Center, Baiyin 730900, China)

Abstract *Lycium barbarum* Mill. is a precious traditional Chinese medicine. It has been used as medicine and food for more than 2 000 years in China. *Lycium* leaf spot is a new disease detected in 2010 in Gansu province. According to the survey results from 2015 to 2018, the disease had expanded to all cultivation areas in Gansu with the disease incidence of 45%–65% and the disease severity of 2–3 degrees. This study combined the morphology and molecular technology to clarify the phylogenetic status of the *Lycium* leaf spot pathogen *Stigmella lycii*. The pathogen was pathogenic to the leaves of *L. barbarum*, causing necrotic and premature leaf and fruit fall. The asci and ascospores of its sexual morphs appeared on fallen leaves of *L. barbarum* in late growth seasons in nature or cultures *in vitro*. Its ascomata was $185.6\ \mu\text{m} \times 176.6\ \mu\text{m}$ in diameter, with a conical to cylindrical beak of $(35.7 \sim 53.6)\ \mu\text{m} \times (32.0 \sim 53.55)\ \mu\text{m}$. Asci bitunicate, with eight ascospores, $(103.2 \sim 165.7)\ \mu\text{m} \times (15.7 \sim 22.4)\ \mu\text{m}$ in size; its ascospores were $(25.9 \sim 36.5)\ \mu\text{m} \times (9.4 \sim 14.1)\ \mu\text{m}$ (mean = $31.2\ \mu\text{m} \times 12.3\ \mu\text{m}$), with (4-) 6–7 longitudinal septa and 1–3 transverse septa. Through multi-loci phylogenetic analysis of ITS, LSU, RPB2 and EF1- α sequences, we confirmed that *S. lycii* belonged to Pleosporaceae. The morphological and phylogenetic status of *S. lycii* was described and illustrated in this study for the first time.

Key words *Lycium barbarum* leaf spot; *Stigmella lycii*; Pleosporaceae; phylogenetic analysis

枸杞 *Lycium barbarum* Mill. 为茄科多年生灌木, 是一种药食两用的名贵中药材, 常以其干燥果实

收稿日期: 2019-06-21 修订日期: 2019-07-22

基金项目: 国家自然科学基金(31960004, 31460013); 甘肃省自然科学基金(17JR5RA164); 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室培育基地开放基金(ZYZL18-001); 中央本级重大增减支项目(2060302); 第四次全国中药资源普查甘肃省工作和甘肃省中药材病虫害现状调查研究(GSZYPC2018Z28); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-21)

* 通信作者 E-mail: zyxyjl@163.com

入药,其味甘、性平,归肝、肾经,具有滋补肝肾、益精明目、润肺止咳、延缓衰老等功效^[1]。枸杞还具有耐干旱、抗盐碱等特点,是绿化造林、防风固沙、调节气候的重要树种^[2]。枸杞在我国已有 600 多年的栽培历史,主要分布在我国西北和华北地区,宁夏、甘肃、内蒙古、青海和新疆是主要产区^[3]。甘肃省近年来发展为我国枸杞的第二大产区,白银、酒泉、武威、金昌和张掖 5 市年种植面积在 3 万~4 万 hm^2 ,所产枸杞品质优良,可与宁夏枸杞媲美,是我国枸杞出口首选产地之一^[4]。

随着栽培面积的逐年扩大,枸杞病虫害发生日益严重^[5]。2010 年,在甘肃省白银市进行枸杞病害调查时发现了一种新病害—枸杞褐斑病,症状主要表现为在叶部形成中至大型病斑,后期引起大量的落叶落果^[6],据 2015 年—2018 年调查,该病害已扩展至甘肃省各枸杞种植区,常年发病率 45%~65%,严重度 2~3 级。通过初步研究发现,该病害由枸杞小黑梨孢 *Stigmella lycii* 引起,该菌是小黑梨孢属全世界报道的第 3 个种,目前,国内外仅对该菌的无性态形态进行了描述^[6],但是对该菌的系统发育地位、生物学特性及其引起病害的防治措施等无相关研究报道。

本研究拟通过 *LSU*, *ITS*, *RPB2* 和 *EF1- α* 等 4 个基因位点构建系统发育树来确定枸杞褐斑病菌 *S. lycii* 的系统发育地位,为枸杞褐斑病的病原学研究提供一定的理论依据,同时为枸杞褐斑病的综合防治以及枸杞的绿色无公害生产提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试标样于 2011 年采自甘肃省景泰县大庙村枸杞园中具有典型症状的病叶。病原菌的分离采用常规组织分离方法和单孢分离法。单孢分离方法:将病叶在 0.1% 升汞中消毒 1 min,用灭菌针挑取叶片上分生孢子器,置于 1 mL 无菌水中,捣碎,将 5 μL 菌悬液分别置于 WA(琼脂 14 g,水 1 000 mL)平板上,20℃ 培养 6 h 后,观察并挑取已萌发的分生孢子琼脂块,将其置于 PDA(马铃薯 200 g,葡萄糖 10 g,水 1 000 mL)平板上,14 d 后,挑取菌落边缘菌丝进行纯化、培养,并于 4℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 病原菌形态观察

从采集的新鲜枸杞褐斑病病叶组织及 PDA 培

养基上菌龄为 14 d 的菌落中挑取病原菌的分生孢子器和子囊壳,置于载玻片上,以水为浮载剂,在光学显微镜下观察并测定分生孢子器、分生孢子、子囊壳、子囊、子囊孢子各 50 个,分别取最大值和最小值作为该指标的上限和下限。切取具有分生孢子器的 5 mm^2 新鲜病叶,置于 1% 戊二醛的二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.2)中进行固定,在 1% 四氧化锇的二甲胍酸钠缓冲液中进行后固定,扫描电镜(TEM)下观察病原菌菌丝的结构以及分生孢子表面的特征。

1.2.2 病原菌致病性测定

将纯化后的病原菌株在 PDA 培养基平板上,25℃ 下扩繁培养 14 d 后,挑取子囊壳,置于含 0.1% Tween-80 的灭菌水中,用血球计数板配制浓度为 1×10^4 个/mL 的孢子悬浮液,取种植 2 年的健康枸杞幼苗,采用针刺接种法和无伤接种法各接种 5 株幼苗。用手动喷雾器将孢子悬浮液均匀喷雾在刺伤和无伤叶片上(约 300 叶/100 mL),对照 5 株枸杞幼苗叶片喷雾同样体积的含 0.1% Tween-80 的灭菌水。接种后,置于封闭的小温室(23℃ $\pm$ 2℃,相对湿度>95%),24 h 后将小温室打开,置于室内,每隔 2 d 观察一次发病情况,发病后,从病斑上再次分离病原菌。

1.2.3 病原菌 DNA 提取及系统发育树的构建

采用真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(SK1375,上海生工)提取病原菌基因组 DNA。分别采用引物对 ITS1/ITS4、LROR/LR5^[7]、fRPB2-5f/fRPB2-7cR^[8]和 EF1-728F/EF-2^[9]扩增 ITS、LSU、RBP2 和 EF1- α 4 个基因片段。50 μL PCR 反应体系:10 $\times$ PCR Buffer(含 20 mmol/L MgCl_2)5 μL 、10 mmol/L dNTPs 0.25 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 2.5 μL 、2 U/mL *Taq* 4 μL 、10~100 ng 模板 DNA 2.5 μL ,超纯水补足至 50 μL 。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,分别以 52℃ (ITS、LSU),60℃ (EF1- α),55℃ (RBP2)退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;72℃ 延伸 8 min,4℃ 保存。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,用凝胶成像仪进行观察并照相。PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化和测序。得到序列用 MAFFT v. 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>)^[10] 进行比对,并用 BioEdit^[11] 软件校对,去除两端不确定的序列后,在 GenBank 中进行 BLASTn 比较搜索,下载相似序列并进行多基因片段的拼接,MEGA 6.0 软件采

用邻接法构建系统发育树。系统发育树包括 12 个分类群,即格孢腔菌科真菌的代表属和在形态上与枸杞小黑梨孢 *S. lycii* 很相近的两个属:壳隔孢属 *Camarosporium* 和 *Neocamarosporium*。

2 结果与分析

2.1 症状

主要危害叶片,偶尔也危害果柄。叶面初生褐色小点,后扩大成圆形、近圆形褐色至灰褐色病斑,大小 2~8 mm,边缘明显隆起,中部略现轮纹,后期中部产生少量黑色小颗粒。发病严重时,病斑相互连接,发黄易脱落。花蕾受害多自顶端向下变褐干枯死亡,或产生长条形淡褐色病斑,最后全部变为淡褐色而枯死,甚至整束花蕾枯死。病株上的果实很小乃至脱落,或不形成果实,中下部叶片落光(图 1a)。



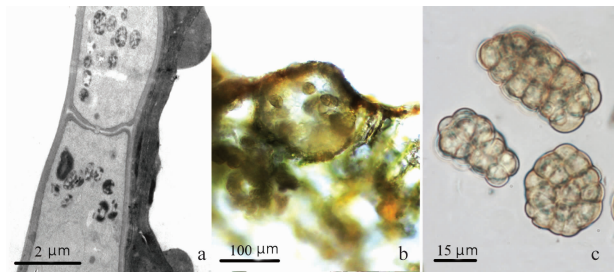
图 1 枸杞褐斑病症状

Fig. 1 Symptoms of *Lycium barbarum* leaf spot

2.2 病原

从组织上挑取病原菌进行观察,发现菌丝埋生于寄主组织中,有隔,隔膜中间有孔(图 2a),具分支,无色至淡褐色。无性态(见图 2):分生孢子器埋生,成熟时破裂,球形,黑色,直径 160.7~177.5 μm ,器壁薄,孔口不明显(图 2b)。分生孢子无色至淡褐色,砖格状,卵圆形、椭圆形,梨形、桑葚形、螺壳形,(22.0~56.5) $\mu\text{m} \times (13.6 \sim 34.5) \mu\text{m}$,由 10~35 个小孢子组成,小孢子为不规则形、亚球形,无色至淡黄色,大小(2.46~10.6) $\mu\text{m} \times (2.46 \sim 9.9) \mu\text{m}$ (图 2c)。有性态(见图 3):形成于越冬前的病叶上,子囊壳 185.6 $\mu\text{m} \times 176.6 \mu\text{m}$,散生,半埋生于叶片组织中,球形、亚球形至椭圆形,具一短喙,宽 35.7~53.6 μm ,高 32.0~53.55 μm 。子囊壳壁由 2~3 层平行排列的长方形、多角形的拟薄壁细胞组成,10.0~12.5 μm 。子囊袋状,双囊壁,大小为(103.2~

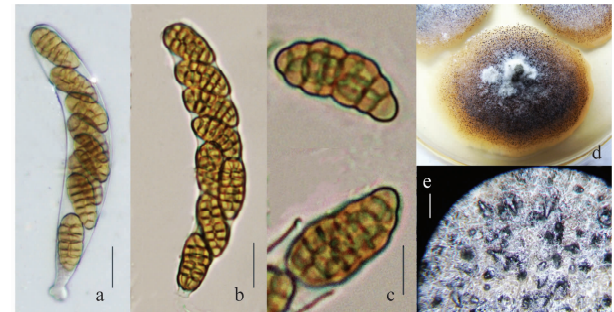
165.7) $\mu\text{m} \times (15.7 \sim 22.4) \mu\text{m}$,含 8 个子囊孢子,具一短的圆柱状至棍棒状小柄,稍弯曲,顶部圆,子囊孢子排列紧密(图 3a,3b)。子囊孢子初期卵圆形,淡黄色,后期金黄色至黄褐色,大小为(25.9~36.5) $\mu\text{m} \times (9.4 \sim 14.1) \mu\text{m}$ (平均 31.2 $\mu\text{m} \times 12.3 \mu\text{m}$),长宽比约 2.5,直或稍弯曲,长椭圆形,两端圆或一端稍尖,砖格状,通常具(4~)6~7 个纵隔和 1~3 个横隔(图 3c)。



a: 菌丝; b: 分生孢子器纵切面; c: 分生孢子 (a: 扫描电镜; b, c: 光学显微镜)
a: Mycelium; b: Section of a pycnidia; c: Conidia (a: Transmission electron microscopy; b, c: Light microscopy)

图 2 枸杞褐斑病菌无性态微观形态

Fig. 2 Asexual morphology of *Stigmella lycii*



a, b: 子囊; c: 子囊孢子; d: PDA 上菌落形态 (14 d); e: PDA 培养基上形成的子囊壳。标尺: a, b = 20 μm , c = 10 μm , e = 500 μm
a, b: Asci. c: Ascospores. d: 14-day-old colony on PDA. e: Perithecia on PDA. Scale bars: a, b = 20 μm , c = 10 μm , e = 500 μm

图 3 枸杞褐斑病菌有性态微观形态

Fig. 3 Sexual morphology of *Stigmella lycii*

在 PDA 培养基上,菌落 14 d 后直径 35.5 mm,黄色,边缘不整齐,稍隆起,气生菌丝白色,稀疏,絮状,菌落背面稍暗(图 3d),产生大量的子囊壳(图 3e),黑色,球形至亚球形,大小为(190.0~331.5) $\mu\text{m} \times (127.5 \sim 218.8) \mu\text{m}$ (平均 255.9 $\mu\text{m} \times 170.0 \mu\text{m}$),具明显的喙,大小为(12.8~102.3) $\mu\text{m} \times (44.9 \sim 110.2) \mu\text{m}$ (平均 62.7 $\mu\text{m} \times 82.6 \mu\text{m}$)。子囊袋状,大小为(68.9~283.9) $\mu\text{m} \times (12.8 \sim 28.6) \mu\text{m}$ (平均 173.2 $\mu\text{m} \times 19.6 \mu\text{m}$),子囊孢子(17.9~43.4) $\mu\text{m} \times (7.7 \sim 15.6) \mu\text{m}$ (平均 29.1 $\mu\text{m} \times 12.9 \mu\text{m}$),子囊孢子每个细胞均可萌发。在 PDA 培养基上培养 25 d 后,子囊

破裂,子囊孢子变为深褐色至黑褐色砖格状,大小为 $(15.3\sim33.2)\mu\text{m}\times(7.7\sim21.7)\mu\text{m}$ (平均 $26.3\mu\text{m}\times12.0\mu\text{m}$),较子囊孢子小,具(4~)5~7个纵隔,4~6个横隔,水滴中不萌发。

2.3 致病性试验

针刺法接种的叶片 2 d 后开始发病,叶面病斑初期为圆形淡褐色小点,后期逐渐扩大为灰褐色圆斑。无伤接种叶片主要在叶缘发病,3~5 d 后可见淡褐色圆斑。与针刺法接种可见相同的症状(图 1b)。对照叶片未发病。在接种植株上取发病叶片进行病原菌分离,获得与原接种菌株相同菌株。根据柯赫氏法则,证明接种菌株 SGQ-11 为枸杞褐斑病的病原菌。

2.4 枸杞褐斑病病原系统发育分析

通过对菌株 SGQ-11 的 ITS、LSU、RBP2 和 EF1- α 的扩增,成功获得 586、945、1 114 bp 和 1 018 bp 的序列(登录号分别为:JX226072, KX457973, KX457974 和 KX457972)。用 BLASTn 在 GenBank 中搜索并下载同源序列,通过多基因片段拼接并构建了系统发育树(图 4)。系统发育树共包括 12 个分类群,分为两个明显的分支:一个分支包括了格孢腔菌科格孢腔菌

属 *Pleospora*、*Neocamarosporium* 属和小黑梨孢属 *Stigmella* 3 个属的 10 个菌株:枯叶格孢腔菌 *P. herbarium* (CBS 109843; CBS 109844 和模式菌株 CBS 191. 86)、*Clathrospora elynae* (CBS 196. 54 和模式菌株 CBS 161. 51)、*N. calvescens* (CBS 246. 79、CBS 344. 78 和 CBS 432. 77), 模式菌株 *N. goegapense* CPC 23676 和枸杞小黑梨孢 *S. lycii* SGQ-11; 另一个分支是格孢腔菌属壳格孢属 *Camarosporium* 的分支:包括了 *Camarosporium betae* (CPC 21572 和模式菌株 CBS 483. 95)。从系统发育树发现,枸杞小黑梨孢 *S. lycii* 与 *Neocamarosporium* 属真菌的模式种 *N. goegapense* (CPC 23676) 聚类在一个小的分支中,说明亲缘关系较近。但是,从形态上来看,枸杞小黑梨孢 *S. lycii* 的分生孢子大小为 $(22.0\sim56.5)\mu\text{m}\times(13.6\sim34.5)\mu\text{m}$ 是 *N. goegapense* 无性态分生孢子 $(15\sim24)\mu\text{m}\times(15\sim19)\mu\text{m}$ 的 2 倍;从寄主植物来看,枸杞小黑梨孢寄生于茄科植物枸杞引起枸杞褐斑病,而 *N. goegapense* 分离自番杏科松叶菊属植物的枯死叶片^[12]。因此,小黑梨孢属和 *Neocamarosporium* 属均为格孢腔菌目格孢腔菌科真菌,但是二者是不同的两个属。

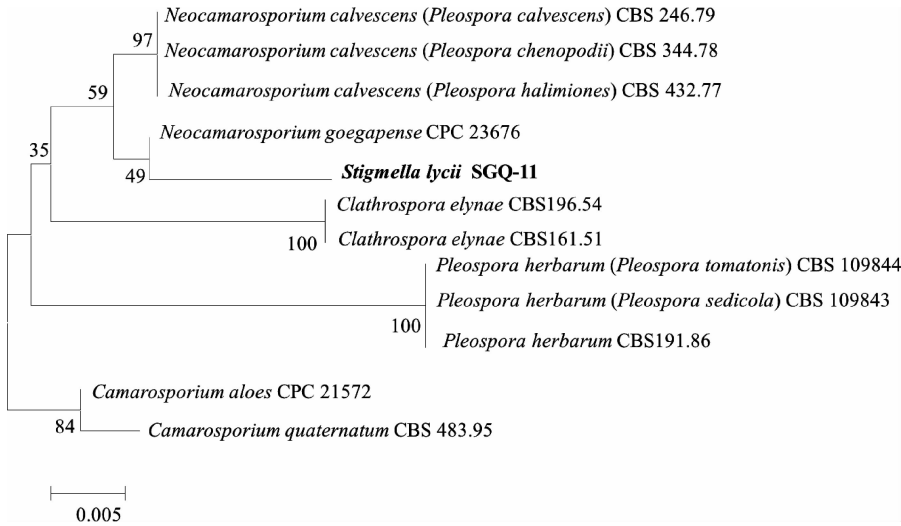


图 4 基于 ITS、SSU、LSU、RBP2 和 EF1- α 多基因序列的枸杞褐斑病菌系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on a combined dataset of ITS, SSU, LSU, RBP2 and EF1- α sequences of *Stigmella lycii*

3 讨论

3.1 病原

小黑梨孢属 *Stigmella* 为无性态,腔菌纲真菌,目前,该属广泛接受的有 3 个种: *S. effigurata* (Schwein.) S. Hughes (= *S. dryina*; = *S. dryo-*

phylla (Corda) Lindau)^[13], *S. tirumalensis* Bagyan. et al.^[14] 和枸杞小黑梨孢 *S. lycii*^[5]。本研究通过形态学和分子生物学方法,首次报道枸杞小黑梨孢 *S. lycii* 在离体和活体情况下可产生有性态,明确小黑梨孢属 *Stigmella* 为格孢腔菌目格孢腔菌科真菌。格孢腔菌科是 Nitschke 于 1869 年基于埋生的

子囊壳建立的一个科,是格孢腔菌目的代表科,也是该目中最大的一个科^[15-17],从1961年—2013年,国内外学者对该科真菌的分类进行了很多研究^[17-21]。Ariyawansa等对该科的模式种及可获得菌种基于18S nrDNA, 28S nrDNA, ITS和RPB2多基因位点构建了系统发育树,认为格孢腔菌科包含18个属^[21],本研究发现,小黑梨孢属*Stigmella*也应归入格孢腔菌科,根据命名优先原则^[16,22-23],枸杞小黑梨孢*S. lycii*仍然是合法的命名。

*Neocamarosporium*是Crous等于2014年以模式种*N. goegapense*建立的属^[12]。在系统发育关系上,小黑梨孢属*Stigmella*与*Neocamarosporium*在一个大的分支中,由于无法获得小黑梨孢属*Stigmella*的模式种*S. effigurata*的标本和菌种,因此并没有参与到本研究的系统发育树的构建中。后期还需要收集两个属更多的菌种进行形态学及系统发育学的分析,来确定两个属之间的亲缘关系。

在枸杞属植物上共报道了3株壳格孢(*C. lycii*、*C. lyciicolae*和四孢壳格孢*C. quaternatum*)^[25],这3株壳格孢均寄生于枸杞枝条,而枸杞小黑梨孢寄生于叶片;在形态学上,枸杞小黑梨孢*S. lycii*分生孢子器为(160.7~177.5) μm ,小于四孢壳格孢*C. quaternatum*(450 μm)和*C. lyciicolae*(190~380) $\mu\text{m} \times (100 \sim 350) \mu\text{m}$,但是分生孢子大小为(22.0~56.5) $\mu\text{m} \times (13.6 \sim 34.5) \mu\text{m}$,却明显大于*C. lycii*(15~17) $\mu\text{m} \times (9 \sim 10) \mu\text{m}$ 和*C. lyciicolae*(8.5~17) $\mu\text{m} \times (8 \sim 13) \mu\text{m}$,并且小于四孢壳格孢*C. quaternatum*(50~60 μm)的分生孢子。当枸杞小黑梨孢*S. lycii*在PDA培养基上培养60d时,子囊溶解,释放出深褐色至黑褐色孢子,与壳格孢属真菌的孢子在形态上非常相似,但是,壳格孢属真菌的孢子产生于分生孢子器产孢梗,在这一点上,二者完全可以区分开。Hughes认为小黑梨孢属*Stigmella*是基于其分生孢子器产孢而建立的属,应该划分在壳格孢属*Camarosporium*中^[24],但是在Ariyawansa的系统发育分析中表明,壳格孢不属于格孢腔菌科^[21]。本研究进一步表明,小黑梨孢属*Stigmella*与壳格孢属*Camarosporium*亲缘关系较远。

3.2 枸杞褐斑病的防治初步建议

通过室内模拟越冬和田间调查发现,枸杞褐斑病的病原菌主要以菌丝体、子囊壳以及分生孢子器在病残体中于地表或土壤中越冬,成为次年初侵染

来源。通过致病性测定,确定其主要越冬菌态为病残体上的菌丝体以及后期落叶上大量形成的子囊壳。因此,在秋末冬初,清理田园,将病叶、果等病残组织集中烧毁或深埋,减少来年初侵染源,是防治该病的关键措施。后续还需要针对枸杞褐斑病菌的生物学特性、病原菌的寄主范围、枸杞褐斑病的发病规律和防治措施进行深入细致的研究,为枸杞的无公害绿色生产提供一定的技术支撑。

参考文献

- [1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社, 2005: 174.
- [2] 许兴, 郑国琦, 周涛, 等. 宁夏枸杞耐盐性与生理生化特征研究[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(3): 70-73.
- [3] 卢有媛, 郭盛, 张芳, 等. 枸杞属药用植物资源系统利用与产业化开发[J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 29-36.
- [4] 曹占凤. 甘肃省枸杞产业现状与发展[J]. 农业科技与信息, 2014(6): 41-43.
- [5] 陈秀蓉. 甘肃省药用植物病害种类及其防治[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 82-90.
- [6] WANG Yan, CHEN Xiurong, YANG Chende. A new *Stigmella* species associated with *Lycium* leaf spots in northwestern China [J]. Mycotaxon, 2012, 122: 69-72.
- [7] 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 H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press, 1990: 315-322.
- [8] LIU Yajuan, WHELEN S, HALL B D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit [J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16(12): 1799-1808.
- [9] VERKLEY G J M, QUAEDVLIEG W, SHIN H D, et al. A new approach to species delimitation in *Septoria* [J]. Studies in Mycology, 2013, 75(1): 213-305.
- [10] KATO H K, MISAWA K, KUMA K, et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(14): 3059-3066.
- [11] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [12] CROUS P W, SHIVAS R G, QUAEDVLIEG W, et al. Fungal planet description sheets: 214-280 [J]. Persoonia, 2014, 32: 184-306.
- [13] HUGHES S J. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis [J]. Canadian Journal of Botany, 1958, 36(6): 727-836.

- [14] BAGYANARAYANA G, BRAUN U, JAGADEESWAR P. Three new phytoparasitic fungi from India [J]. Mycotaxon, 1992, 45:105-108.
- [15] ZHANG Ying, CROUS P W, SCHOCH C L, et al. Pleosporales [J]. Fungal Diversity, 2012, 52:1-225.
- [16] WIJAYAWARDENE N N, CROUS P W, KIRK P M. Naming and outline of-2014 including proposals for the protection or suppression of generic names [J]. Fungal Diversity, 2014, 69:1-55.
- [17] HYDE K D, JONES E B G, LIU Jiankui, et al. Families of Dothideomycetes [J]. Fungal Diversity, 2013, 63:1-313.
- [18] KODSUEB R, DHANASEKARAN V, APTROOT A, et al. The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA [J]. Mycologia, 2006, 98:571-583.
- [19] ZHANG Ying, SCHOCH C L, FOURNIER J, et al. Multi-locus phylogeny of the Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation [J]. Studies in Mycology, 2009, 64:85-102.
- [20] LUMBSCH H T, HUHDORF S M. Outline of Ascomycota-2009 [J]. Fieldiana Life Earth Science, 2010, 1:1-60.
- [21] ARIYAWANSA H A, THAMBUGALA K M, MANAMGODA D S, et al. Towards a natural classification and backbone tree for Pleosporaceae [J]. Fungal Diversity, 2015, 71: 85-139.
- [22] HAWKSWORTH D L. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition [J]. IMA Fungus, 2012, 3(1): 15-24.
- [23] WINGFIELD M J, DE BEER Z W, SLIPPERS B, et al. One fungus one name promotes progressive plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6):604-613.
- [24] HUGHES S J. Studies on micro-fungi. XIV. *Stigmella*, *Stigmella*, *Camptomeris*, *Polythrincium* and *Fusicladiella* [J]. Mycological Papers, 1952, 49: 1-25.
- [25] FARR D F, ROSSMAN A Y. Fungal databases, U. S. National Fungus Collections, ARS, USDA [EB/OL]. [2019-06-21]. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

(责任编辑:田 喆)

征订启事

全国优秀农业期刊、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊

欢迎订阅 2021 年《中国种业》

《中国种业》是由农业农村部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。

刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。主要栏目有:种业论坛、专题综述、种业管理、研究论文、品种选育、良种良法等;报道内容范围:最新种业政策、各地种业管理经验、种业企业经营之道、新品种新技术等,信息量大,技术实用。

欢迎投稿、刊登广告

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大 16 开,每期 20 元,全年 240 元。国内统一连续出版物号:CN 11-4413/S,国际标准连续出版物号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3 元。

邮发代号:82-132

地 址:(100081)北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电 话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)

网 址:www.chinaseedqks.cnE-mail: chinaseedqks@163.com

微信公众号:中国种业

中国种业编辑部 QQ 群:115872093

中国种业读者 QQ 群:289113905