

贵州省白及叶褐斑病病原菌鉴定及其生物学特性

宋莉莎 曾桂萍 任 静 司世飞 赵 致 李 忠*

(贵州大学农学院, 贵阳 550025)

摘要: 为明确贵州省白及叶褐斑病病原菌及其生物学特性, 采用组织分离法和离体接种法分别对其病原菌进行分离和致病性测定, 利用形态学及ITS、*EF-1 α* 、 *β -tubulin*基因序列分析对病原菌的分类进行鉴定, 并对病原菌的生物学特性进行研究。结果表明: 分离得到的白及叶褐斑病病原菌菌株编号为HGUP₁₇₃₅₅; 该菌菌丝白色、羊绒状, 菌落中心隆起呈淡黄色、背面枫叶红色, 大型分生孢子窄镰刀形, 3~8个分隔, 未见厚垣孢子, 小型分生孢子卵圆形, 1~2个分隔; 在以ITS、*EF-1 α* 、 *β -tubulin*三个基因序列构建的系统发育树中, 菌株HGUP₁₇₃₅₅与燕麦镰刀菌*Fusarium avenaceum*聚于一支, 且支持率达100%, 结合形态特征与分子生物学将其鉴定为燕麦镰刀菌。该菌菌丝最适生长温度为20℃, 最适生长pH为6, 在燕麦片琼脂培养基上生长最快, 以麦芽糖为碳源、以L-苯丙氨酸为氮源时利用率最高, 致死温度为45℃, 对光照不敏感。

关键词: 白及; 叶褐斑病; 病原菌鉴定; 燕麦镰刀菌; 生物学特性

Identification and biological characteristics of the pathogen causing leaf brown spot of Chinese ground orchid *Bletilla striata* in Guizhou Province

Song Lisha Zeng Guiping Ren Jing Si Shifei Zhao Zhi Li Zhong*

(College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China)

Abstract: To clarify the pathogen causing leaf brown spots of Chinese ground orchid *Bletilla striata* in Guizhou Province and its biological characteristics, the pathogen was obtained by using the method of tissue isolation. Its pathogenicity was tested *in vitro* inoculated leaves, and the pathogen was classified and identified with morphology and phylogeny based on combined ITS, *EF-1 α* and *β -tubulin* sequence analysis; the biological characteristics of pathogen were also studied. The results showed that the strain isolated from leaf brown spots of *B. striata* was named as HGUP₁₇₃₅₅. Its main diagnostic features were as followed: white mycelia, cashmere-like form, uplifted center of colonies, faint yellow, maple-leaf red dorsal surface, oval microconidia with one – two septa, narrow sickle-like macroconidia with three – eight septa, and no chlamydospores. The phylogenetic tree based on combined ITS, *EF-1 α* , *β -tubulin* sequences showed that HGUP₁₇₃₅₅ strain was clustered together with *Fusarium avenaceum*, supported by 100%. According to the combined morphological characteristics and phylogenetic tree, the pathogen was identified as *F. avenaceum*. The mycelia of HGUP₁₇₃₅₅ strain grew fastest on oatmeal agar medium with maltose and L-phenylalanine as the carbon and nitrogen sources, respectively, at 20℃, pH 6.0, and its fatal temperature was 45℃ and it was insensitive to light.

Key words: *Bletilla striata*; leaf brown spot; pathogen identification; *Fusarium avenaceum*; biological characteristics

基金项目: 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2017]2828), 科技部科技基础性工作专项(2014FY120100), 贵州省中药材现代农业产业体系建设项目(GZCYTX2015-0202)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhongzhongligzu@163.com

收稿日期: 2017-10-18

白及 *Bletilla striata* 系兰科多年生草本植物,又名连及草、甘根,主要分布于我国贵州、四川等省,以干燥假鳞茎入药,具有补肺、止血等功效(宋立人,1999)。除药用价值外,白及还可作观赏植物(张满常等,2015)。随着市场对白及需求量的剧增和可观的经济效益,人们对野生白及滥挖滥采,白及野生资源极度匮乏,近年来一些省开始了大面积人工栽培。随着种植面积的不断扩大和种植年限的不断延长,白及病害越来越严重,主要有根腐病、锈病、叶斑灰霉病(曾令祥等,2012;孙乐乐等,2013;赵仁全等,2016)。2016年贵州省施秉县牛大场镇中药材基地白芨上出现一种新的叶部病害,该病害主要侵染叶片,叶上病斑为圆形至长梭形,而后多个病斑聚集扩大呈不规则病斑,病斑黄褐色,发病植株矮小,严重时植株枯死,田间发病率可达50%,严重影响白及的药用价值和商业价值,对种植户造成较大经济损失。

目前已报道的药用植物叶斑病病原菌种类较多,不同药用植物叶部病害的病原菌不尽相同,如苍术叶斑病的病原菌为菊苣茎点霉 *Paraphoma chrysanthemicola* (葛昕欣,2016);引起铁皮石斛黑斑病的病原菌为链格孢 *Alternaria alternata* 和细极链格孢 *A. tenuissima* (孔琼等,2018);白头翁叶斑病的病原菌为银莲花壳二孢 *Ascochyta anemones* (苏丹,2013)。传统真菌主要基于营养体和子实体的形态学特征进行分类及鉴定,但真菌形态学特征容易受培养条件及其它因素的影响,且许多子实体类型经常难以获得,因此分类学家都倾向用DNA序列来界定真菌的分类地位。同时越来越多的学者意识到单个基因并不能十分准确地揭示真菌的分类地位,利用多基因联合鉴定已成为趋势(周游,2015)。其中内转录间隔(internal transcribed spacer, ITS)、 β -微管蛋白(β -tubulin)、延伸因子(elongation factor, *EF-1 α*)等多基因联合已被广泛用于镰刀菌属及种间的鉴定(曹雪梅等,2014),如任静等(2018)依据形态学特征以及多基因位点的系统发育分析对头花蓼茎枯病的病原菌木贼镰刀菌 *Fusarium equiseti* 进行了分类鉴定。

近年来,贵州省白及叶褐斑病的危害程度加重,然而对该病原菌种类及其生物学特性还未见报道。本研究从贵州省施秉县白及主要产区采样并分离得到白及叶褐斑病病原菌,通过形态学观察并结合18S rDNA-ITS、*EF-1 α* 、 β -tubulin 基因序列对其病原菌进行分类鉴定,明确该病原菌的生物学特性,以期为该病害发生、流行规律研究及防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及植物:2016年6月在贵州省施秉县牛大场镇中药材种植基地采集有典型症状的病叶。白及品种为紫花白及 *Bletilla striata*,来源于贵州三泓药业股份有限公司药材示范基地。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖15 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 000 mL;马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PSA)培养基:去皮马铃薯200 g、蔗糖15 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 000 mL;察氏(Czappek)培养基:硝酸钠2 g、磷酸氢二钾1 g、氯化钾0.5 g、硫酸镁0.5 g、硫酸亚铁0.01 g、蔗糖30 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL;麦芽浸膏琼脂(malt extract agar, MEA)培养基:麦芽膏粉130 g、琼脂15 g、氯霉素0.1 g、蒸馏水1 000 mL;水琼脂(water agar, WA)培养基:琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL;胡萝卜(carrot agar, CA)培养基:胡萝卜200 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L;燕麦片琼脂(oatmeal agar, OMA)培养基:燕麦片30 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL。

试剂及仪器:Omega D3390-02 真菌DNA小量提取试剂盒、2 $\times$ PCR Master 即用PCR扩增试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;果糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、硫酸铵、蛋白胨、尿素、酵母膏、L-苯丙氨酸,天津科密欧化学试剂有限公司;其它试剂均为国产分析纯。SZX10体视显微镜、BX51型光学显微镜,日本Olympus公司;DYY-4C型高稳双压电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 白及叶褐斑病病原菌的分离

2016年6月在贵州省施秉县牛大场镇中药材种植基地采集有典型症状的病叶,对其发病症状进行调查。

采用组织分离法(方中达,1998)。从白及叶片病健交界处切取5 mm $\times$ 5 mm小块组织,在75%酒精中浸泡10 s后,于0.1%酸性升汞中浸泡3 min,用无菌水将组织冲洗4次,用无菌吸水纸吸干,将其接种至含100 μ g/mL链霉素、青霉素的PDA平板上,于25 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养,5 d后对其进行纯化培养,纯化后菌株转入到PDA培养基上作为菌种保存,备用,标记菌株号为HGUP₁₇₃₅₅。

1.2.2 白及叶褐斑病病原菌致病性测定

按照柯赫氏法则进行致病性测定。选取1年生

健康白及叶片, 无菌水冲洗, 并用75%酒精对其叶表面进行消毒, 采取针刺与无伤2种方式进行接种。将分离菌株在PDA平板上于25℃培养7 d, 用直径5 mm的打孔器在菌落边缘打取菌饼, 用灭菌针在叶片上刺伤4个定点, 每片叶接种1块菌饼, 接种时将菌饼均匀覆盖4个定点, 以同样方法将菌饼接种到未刺伤的叶片上, 以不接菌的健康白及叶片作为空白对照(徐海娇等, 2017)。每个处理重复3次, 25℃保湿培养, 观察并记录发病情况。

1.2.3 病原菌形态学和分子生物学鉴定

病原菌形态学鉴定: 将分离得到的致病菌株接种到PDA平板上, 25℃恒温黑暗培养7 d后, 观察记录菌落特征及生长情况。待产孢后用光学显微镜拍摄其结构及分生孢子形态。

病原菌分子生物学鉴定: 按照DNA提取试剂盒说明书提取病原菌基因组DNA。使用2×PCR Master即用PCR扩增试剂盒、ITS引物(ITS1: 3'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-5'; ITS4: 3'-TCCTCCGC-TTATTGATATGC-5')(Mackay et al., 1999)、 β -tubulin引物(Btl2a: 5'-TTCCCCGTCTCCACTTCTT-CATG-3'; Btl2b: 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)-ATCATGTT-3')(Peever et al., 2004)、*EF-1 α* 引物(EF1: 5'-ATGGGTATAAGGA(A/G)GAAAGAC-3'; EF2: 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/A)ATCATGTT-3')(O'Donnell et al., 1998)对菌株进行PCR特异性扩增, 引物均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。ITS序列PCR反应条件: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 52℃退火45 s, 72℃延伸90 s, 35个循环; 72℃延伸10 min。 β -tubulin基因PCR反应条件: 95℃预变性3 min; 95℃变性1 min, 55℃退火50 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。*EF-1 α* 基因PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性45 s, 56℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 35个循环; 72℃延伸10 min。反应结束后进行1.2%琼脂糖凝胶电泳检验, PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将所得核苷酸序列在GenBank中进行同源性比较。参考Stefańczyk et al.(2016)方法选取23株镰刀菌菌株, 并下载其相应的ITS、*EF-1 α* 、 β -tubulin基因序列, 基于最大简约法(任静等, 2016)利用PAUP 4.0软件(Swofford, 2002)构建系统发育树。

1.2.4 白及叶褐斑病原菌生物学特性测定

参照张笑宇等(2017)方法测定病原菌对碳、氮源的利用: 以Czapek培养基为基础培养基, 用含有

相同碳元素质量的D-果糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉置换基础培养基中的葡萄糖, 并以基础培养基作对照。用含有相同氮元素质量的硫酸铵、蛋白胨、尿素、酵母膏、L-苯丙氨酸置换基础培养基中的硝酸钠, 并以基础培养基作对照。用直径为5 mm的打孔器在活化7 d的菌落边缘打取菌块, 接种至含有不同碳源或氮源的培养基上于25℃恒温黑暗培养, 每个处理重复3次, 7 d后用十字交叉法测量菌落直径, 观察菌落形态。

温度对病原菌菌丝生长的影响: 用直径为5 mm的打孔器在活化7 d的菌落边缘打取菌饼, 接种于PDA平板中央, 分别于5、10、15、20、25、30、35、40℃恒温条件下培养, 每个处理3次重复, 7 d后用十字交叉法测量菌落直径, 观察菌落形态。

pH对病原菌菌丝生长的影响: 用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH将PDA培养基pH分别调为4、5、6、7、8、9、10, 用直径5 mm的打孔器在活化7 d的菌落边缘打取菌饼, 并接种于不同pH的PDA平板中央, 于25℃下恒温黑暗培养, 每个处理重复3次, 7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

光照对病原菌菌丝生长的影响: 用直径5 mm的打孔器在活化7 d的菌落边缘打取菌饼, 并接种至PDA平板中央, 分别于24 h黑暗、12 h明暗交替和24 h光照条件下25℃恒温培养, 每个处理3次重复, 7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

培养基对病原菌菌丝生长的影响: 用直径5 mm的打孔器在活化7 d的菌落边缘打取菌饼, 分别转接到PDA、PSA、Czapek、OMA、CA、WA、MEA平板中央, 以WA平板为对照, 每个处理重复3次, 25℃恒温培养, 7 d后用十字交叉法测量菌落直径。

病原菌菌丝致死温度测定: 参照康迅等(2017)方法测定菌丝致死温度。取8支体积为20 mL的无菌试管, 向每个试管中加入10 mL无菌水, 将试管分别置于40、45、50、55、60、65、70和75℃的恒温水浴锅中, 同时缓慢摇动试管使之均匀受热, 待其与水浴锅温度一致时用直径5 mm打孔器在活化7 d的菌落边缘打取菌饼, 每支试管里放入3块菌饼, 将试管继续在温水浴锅中处理10 min, 取出试管冷却至室温, 将菌块接种到PDA平板中央, 25℃恒温黑暗培养, 5 d后观察菌块生长情况, 确定菌丝致死温度。

1.3 数据分析

利用SPSS 18.0软件进行试验数据的统计分析, 采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 白及叶褐斑病的发病症状

白及叶褐斑病发病症状主要位于白及叶片尖部和基部,在体视镜下未观察到病原物的形态特征,该病害症状表现为叶片上产生圆形至不规则病斑,病斑中央淡褐色,边缘深褐色。干燥条件下病斑中央易破裂、穿孔。发病严重时常形成较大病斑,导致植株地上部分枯死。根据发病特征,确定该病害为白及叶褐斑病(图1)。



图1 贵州省白及叶褐斑病发病症状

Fig. 1 Symptoms of leaf brown spot disease on *Blitilla striata* in Guizhou Province

A: 发病叶片正面; B: 发病叶片背面; C: 田间病株。A: Front of infected leaf; B: back of infected leaf; C: infected plant in the field.

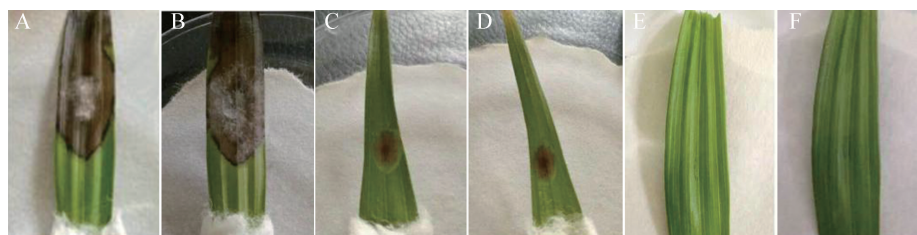


图2 接种白及叶褐斑病病原菌7 d后白及叶片的发病症状

Fig. 2 Symptoms of leaves seven days after inoculated with the pathogen causing leaf brown spot of *Blitilla striata*

A, B: 针刺接种后发病叶片正面和反面; C, D: 无伤接种后发病叶片正面和反面; E, F: 对照叶片正面和反面。A, B: Front and back of the leaf after acupuncture inoculation; C, D: front and back of the leaf inoculated without injury; E, F: front and back of the control leaf.

2.3 病原菌的形态学和分子生物学鉴定

2.3.1 病原菌形态学鉴定

在PDA培养基上,25℃黑暗培养7 d,病原菌菌落直径达6~7 cm,气生菌丝丰富,呈羊绒状,菌丝白色,菌落中心隆起呈淡黄色(图3-A),菌落背面枫叶红色(图3-B);培养15 d后,镜检发现病原菌开始产孢,其分生孢子梗多分枝,无色透明(图3-C~D),大型分生孢子窄镰刀形,细长,弯曲,两端细尖,3~8个分隔,大小为26.6~54.7 μm ×3.1~4.1 μm (图3-E);小型分生孢子1~2个分隔,卵圆形,大小为3.2~17.8 μm ×2.0~3.6 μm (图3-F)。根据形态学特征可初步将其鉴定为镰刀菌属真菌。

2.3.2 病原菌分子生物学鉴定

在基于ITS、*EF-1 α* 、 *β -tubulin*基因序列构建的联

2.2 白及叶褐斑病病原菌的致病性

接种白及叶褐斑病病原菌3 d后,叶片开始发病,产生中心淡褐色、边缘深褐色的病斑。接种7 d后,菌丝穿透叶肉组织,致使病斑扩大(图2-A~B);在相同条件下,无伤接种的叶片也产生淡褐色病斑(图2-C~D);对照叶片未见发病(图2-E~F)。回接叶片发病症状与原病害样本症状相同,从发病叶片再分离的病原菌与原接种菌种相同,证实该菌株为白及叶褐斑病的致病菌,且致病性强,易通过伤口侵染。

合系统发育树中,大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 菌株VICVd69为外群,菌株HGUP₁₇355与燕麦镰刀菌 *F. avenaceum* 菌株Z161、M127聚集于一个类群,且支持率达100%。结合菌株形态特征将病原菌HGUP₁₇355鉴定为燕麦镰刀菌(图4)。

2.4 白及叶褐斑病病原菌的生物学特性

白及叶褐斑病病原菌均能利用6种供试碳源,其中对麦芽糖的利用效果最好,培养7 d后菌落直径达81.33 mm,极显著高于其它氮源处理($P<0.01$);其次为乳糖和淀粉,菌落直径分别为71.51 mm和64.22 mm;对蔗糖的利用效果最差,菌落直径为56.65 mm(图5-A)。白及叶褐斑病病原菌均能利用6种供试氮源,其中对L-苯丙氨酸的利用效果最好,菌落直径达67.52 mm,显著高于其它氮源处理($P<$

0.05);其次为尿素和蛋白胨,菌落直径分别为64.01 mm和48.52 mm;对硫酸铵的利用效果最差,菌落直径为24.32 mm,极显著低于其它氮源处理($P<0.01$,图5-B)。白及叶褐斑病病原菌在10~30℃均可生长,当温度为20℃时,菌丝直径为67.63 mm,极显著高于

其它温度处理($P<0.01$,图5-C);低于10℃或高于35℃,菌丝生长迟缓甚至停止;40℃下处理10 min后,病原菌仍能继续生长,但45℃或者高于45℃处理10 min后,病原菌无法生长,表明该菌菌丝的致死温度是45℃。

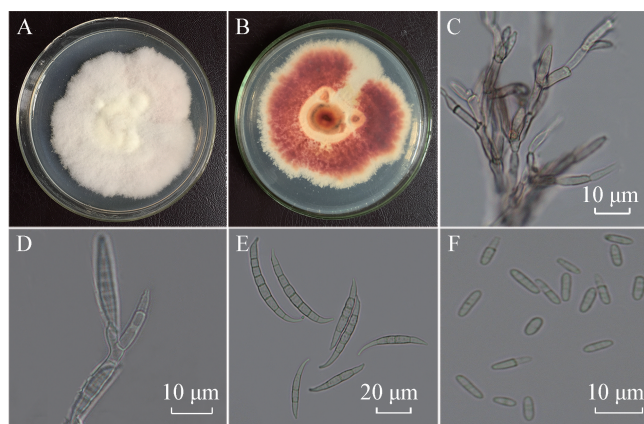


图3 白及叶褐斑病病原菌菌落、分生孢子梗和分生孢子特征形态

Fig. 3 The colony, conidiophores and conidium characteristic form of the pathogen causing leaf brown spot of *Bletilla striata*

A~B: 菌落形态正面和反面; C~D: 分生孢子梗; E: 大型分生孢子; F: 小型分生孢子。A~B: Front and back of colony; C~D: conidiophores; E: macroconidia; F: microconidia.

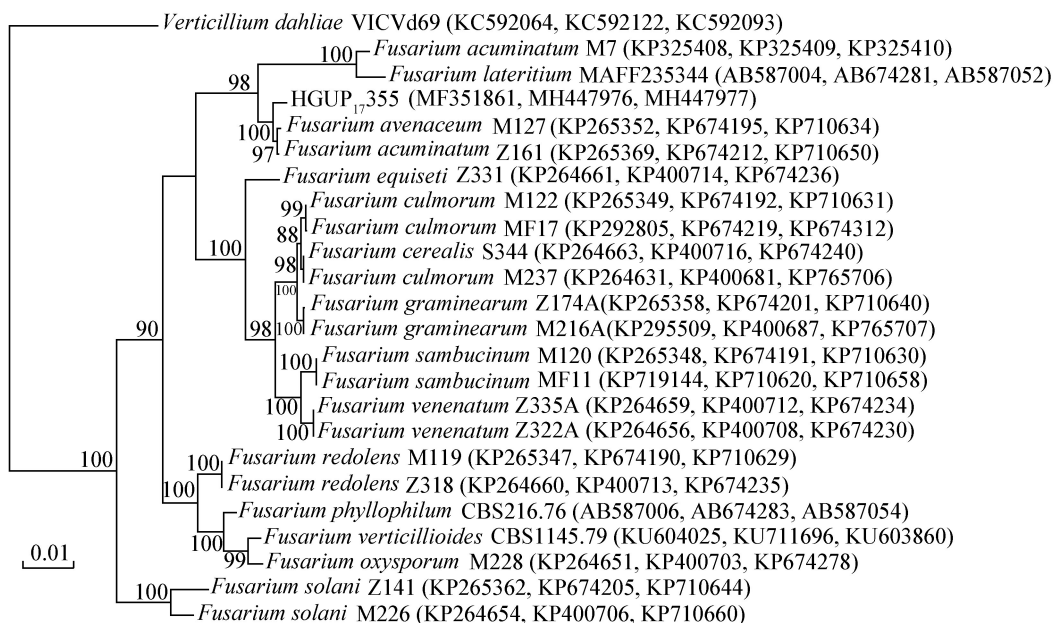


图4 基于ITS、*EF1-α*、*β-tubulin*基因序列构建的白及叶褐斑病病原菌菌株与其它23株燕麦镰刀菌菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the strain isolated from the leaf brown spot of *Bletilla striata* and other 23 strains

based on combined ITS, *EF1-α* and *β-tubulin* sequences

HGUP₁₇₃₅₅: 白及叶褐斑病病原菌菌株。括号中的基因登录号从左至右分别为ITS、*EF1-α*、*β-tubulin*基因序列。
HGUP₁₇₃₅₅: Strain isolated from leaf brown spot of *Bletilla striata*. The GenBank accession numbers in parentheses are the gene sequences of ITS, *EF1-α*, *β-tubulin* from left to right.

病原菌在不同pH培养基上的生长速度不同;当pH为6时,菌落直径最大,为62.50 mm,pH为7和8时次之,菌落直径为57.83 mm和51.50 mm,而pH为4、5、9和10时,菌落直径较小(图5-D)。在24 h持

续光照、24 h持续黑暗、12 h光暗交替处理下,白及叶褐斑病病原菌菌落直径分别为58.16、58.37和58.50 mm,三者之间差异不显著,表明不同光照处理对病原菌菌丝生长无影响(图5-E)。病原菌在

OMA培养基上生长时菌落直径最大,为56.00 mm,在PDA和Czapek培养基上次之,菌落直径分别为53.67 mm和52.83 mm,但在OMA、PDA和Czapek

这3种培养基上生长时差异不显著,而在MEA和CA培养基上菌落直径较小,病原菌在WA培养基上不能生长(图5-F)。

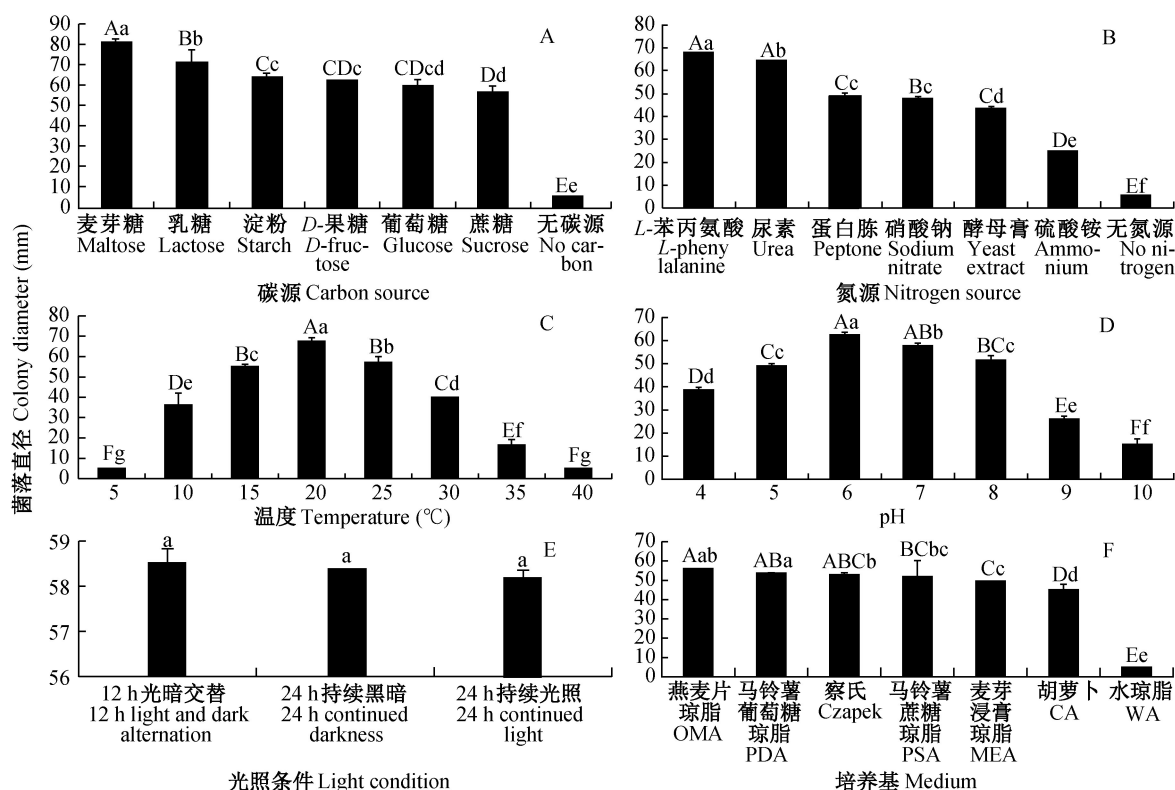


图5 不同培养条件对白及叶褐斑病原菌菌丝生长的影响

Fig. 5 Effects of different conditions on the mycelium growth of the pathogen causing leaf brown spot of *Bletilla striata*

A~F: 碳源、氮源、温度、pH、光照和培养基对菌丝生长的影响。图中数据为平均数±标准差。不同大、小写字母分别表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平差异显著。A~F: Effects of different carbon sources, nitrogen sources, temperatures, pH values, light conditions and media on the mycelium growth. Data are mean±SD. Different uppercase or lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test, respectively.

3 讨论

参照Booth(1971)镰刀菌属分类系统所描述的燕麦镰刀菌,结合本研究对该病原菌的系统发育树分析,最终将贵州省施秉县白及种植基地发现的叶褐斑病原菌鉴定为燕麦镰刀菌,该病原菌还可引起小麦茎腐病(何苏琴等,2006)、马铃薯干腐病(史丽娟,2014)、金边龙舌兰叶腐病(黄玖利等,2008)等。镰刀菌属真菌的种类较多,并且多数危害植物根茎部,引起黄芪根腐病(何晨,2015)、薯蓣茎腐病(赵志祥等,2013)。同时,该属真菌还可引起植物的花腐、果腐等病害,如茄子花腐病(韩冰,2017)、甜椒果腐病(Ramdiyal & Rampersad, 2010)。镰刀菌也可引起植物叶斑病,如Parkunan & Ji(2013)研究结果表明锐顶镰刀菌 *F. acuminatum* 是洋葱叶斑病的致

病菌;Su et al.(2014)研究发现腐皮镰刀菌 *F. solani* 可引起老鼠筋黑斑病;张森等(2017)研究报道层出镰刀菌 *F. proliferatum* 能危害剑麻,引起剑麻叶斑病。本研究结果表明镰刀菌属真菌能引起植物腐烂、枯萎等病害,亦能引起植物叶部病害。

本研究结果表明,供试菌株能很好地利用L-苯丙氨酸和尿素进行生长,对硫酸铵的利用效果较差,因此在生产上可适量施用硫酸铵作氮肥,限制使用尿素以降低病害发生。在实验室条件下,该病菌适宜生长温度范围为15~20℃,低于10℃或高于35℃菌丝生长明显减缓甚至停止生长,这与该病一般在春夏之交发生相符,与贵州省施秉县中药材基地白及栽培区年平均气温为16.4℃的环境条件较一致(魏升华等,2014),与王娜(2013)关于该菌最适宜生长温度的结果也一致。龚弘强等(2007)报道西藏青

稗籽粒病害病原菌燕麦镰刀菌的最适生长温度为25℃,与本研究结果有差异,究其原因可能是菌株来源、成熟度、测量误差等因素不同(杨迎青等,2017)。本研究中的供试菌株对pH适应范围较广,但当pH为6时,生长最快,与魏蜜等(2017)研究结果一致,表明在偏酸性条件下供试菌株生长力较强,因此在生产上可以通过增施石灰调节土壤pH,再结合增施磷钾肥有望降低该病害的发生。本研究中的供试菌株在燕麦培养基上生长最快,与王玉琴等(2014)研究结果一致。本研究虽对贵州省施秉县白及叶褐斑病病原菌的鉴定及生物学特性进行了研究,但对该病害的流行规律、致病性机制及综合防治方法等方面还未涉及,有待于进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew, Surrey UK: Commonwealth Mycological Institute
- Cao XM, Li SB, Zhang HL, Hu XP. 2014. Identification of the pathogens causing root rot of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Acta Phytopathologica Sinica*, 44(2): 213–216 (in Chinese) [曹雪梅, 李生兵, 张惠玲, 胡小平. 2014. 甘草根腐病病原菌鉴定. 植物病理学报, 44(2): 213–216]
- Fang ZD. 1998. Methodology for plant pathology (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 122–127 (in Chinese) [方中达. 1998. 植病研究方法 (第3版). 北京: 中国农业出版社, pp. 122–127]
- Ge XX. 2016. Etiology of leaf spot of *Atractylodes japonica* and the disease control. Master Thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [葛昕欣. 2016. 苍术叶斑病病原学及其防治基础研究. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Gong HQ, Huang LL, Qiao HP, Gao XN, Kang ZS. 2007. Biological characteristics of *Fusarium avenaceum* isolated from Tibet highland barley kernels. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 25(2): 21–25 (in Chinese) [龚弘强, 黄丽丽, 乔宏萍, 高小宁, 康振生. 2007. 西藏青稞籽粒燕麦镰刀菌生物学特性研究. 干旱地区农业研究, 25(2): 21–25]
- Han B. 2017. Etiology and pathogenic mechanisms of *Fusarium proliferatum* causing blossom blight of eggplant. Ph. D Thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [韩冰. 2017. 茄子层出镰孢菌花腐病病原学及其防治基础研究. 博士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- He C. 2015. Study on the main pathogen identification and chemical control for *Astragalus* root rot disease in Ningxia. Master Thesis. Yinchuan: Ningxia University (in Chinese) [何晨. 2015. 宁夏黄芪根腐病病原鉴定及药剂防治研究. 硕士学位论文. 银川: 宁夏大学]
- He SQ, Jin XL, Lu ZC. 2006. Isolation and identification of the pathogens causing wheat foot rot in Linxia Region of Gansu Province. *Plant Protection*, 32(3): 35–38 (in Chinese) [何苏琴, 金秀琳, 鲁振超. 2006. 甘肃省临夏州小麦脚腐病病原鉴定. 植物保护, 32(3): 35–38]
- Huang JL, Zhang RY, Tan ZQ. 2008. Pathogen identification of a new disease on *Agave americana* L. var. *marginata* Hort. *Guangdong Agricultural Science*, (12): 89–92 (in Chinese) [黄玖利, 张荣意, 谭志琼. 2008. 金边龙舌兰一种新病害的病原菌鉴定. 广东农业科学, (12): 89–92]
- Kang X, Jin PF, Feng X, Liu WB, Zheng FC, Miao WG. 2017. Identification and biological characteristics of the pathogen causing shoot blight of *Moringa oleifera*. *Journal of Plant Protection*, 44(3): 481–487 (in Chinese) [康迅, 靳鹏飞, 冯霞, 刘文波, 郑服丛, 缪卫国. 2017. 辣木枝枯病病原菌鉴定及其生物学特性. 植物保护学报, 44(3): 481–487]
- Kong Q, Yang SY, Wang CM, Xue CL, Guo JW, Li X, Zhou YL, Wu GM. 2018. Pathogen identification and biological characteristics of black spot from *Dendrobium officinale*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 31(3): 500–506 (in Chinese) [孔琼, 袁盛勇, 王传铭, 薛春丽, 郭建伟, 李珣, 周银丽, 吴光梅. 2018. 铁皮石斛黑斑病病原鉴定及生物学特性研究. 西南农业学报, 31(3): 500–506]
- Mackay GJ, Brown AE, Bjourson AJ, Mercer PC. 1999. Molecular characterisation of *Alternaria linicola* and its detection in linseed. *European Journal of Plant Pathology*, 105(2): 157–166
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5): 2044–2049
- Parkunan V, Ji P. 2013. First report of leaf spot on onion caused by *Fusarium acuminatum* in Georgia. *Plant Disease*, 97(10): 1384
- Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW. 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1): 119–134
- Ramdial HA, Rampersad SN. 2010. First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of sweet pepper in Trinidad. *Plant Disease*, 94(11): 1375
- Ren J, Zeng GP, Song LS, Zhao Z, Li Z. 2018. Pathogen identification and biological characteristics of *Polygonum capitatum* stem wilt. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(2): 271–274 (in Chinese) [任静, 曾桂萍, 宋莉莎, 赵致, 李忠. 2018. 头花蓼茎枯病病原的鉴定及生物学特性. 植物病理学报, 48(2): 271–274]
- Ren J, Zeng GP, Zhao Z, Li Z. 2016. A new species of *Pilidiella* on the *Polygonaceae*. *Mycosystema*, 35(9): 1056–1060 (in Chinese) [任静, 曾桂萍, 赵致, 李忠. 2016. 生于蓼科植物上的小帽壳孢属一新种. 菌物学报, 35(9): 1056–1060]
- Shi LJ. 2014. The research of interaction mechanism of the main pathogenic fungi of dry rot in Heilongjiang Province. Master Thesis. Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese) [史丽娟. 2014. 黑龙江省马铃薯干腐病主要致病菌互作机制的研究. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- Song LR. 1999. Chinese materia medica. Shanghai: Shanghai Science and Technique Publishing House, pp. 674–675 (in Chinese) [宋

- 立人. 1999. 中华本草. 上海: 上海科学技术出版社, pp. 674–675]
- Stefańczyk E, Sobkowiak S, Brylińska M, Śliwka J. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4): 871–884
- Su D. 2013. The etiology and pathogenic mechanisms of medicinal plants windflower leaf spot. Master Thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [苏丹. 2013. 新归圃药用植物白头翁叶斑病原学及其致病机理研究. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Su HR, He H, Huang QZ, Lu NH. 2014. First report of black spot of *Acanthus ilicifolius* caused by *Fusarium solani* in China. *Plant Disease*, 98(10): 1438
- Sun LL, Yang YH, Liu JK, Zhou M. 2013. *Bletilla striata* pseudobulb rot pathogen identification and its biological characteristic. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 36(3): 341–345 (in Chinese) [孙乐乐, 杨永红, 刘军凯, 周敏. 2013. 白及根腐病病原鉴定和生物学特性研究. 中药材, 36(3): 341–345]
- Swofford DL. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, pp. 54–56
- Wang N. 2013. Etiology of raspberry diseases in Jilin Province and fungicide screening to their related pathogens. Master Thesis. Changchun: Jilin Agricultural University (in Chinese) [王娜. 2013. 吉林省树莓病害的病原学研究及室内药剂筛选. 硕士学位论文. 长春: 吉林农业大学]
- Wang YQ, Yang CD, Chen XR, Xue L, Su JH. 2014. Identification of potato wilt caused by *Fusarium avenaceum* and the biological characteristics of its pathogen. *Plant Protection*, 40(1): 48–53 (in Chinese) [王玉琴, 杨成德, 陈秀蓉, 薛莉, 苏建红. 2014. 甘肃省马铃薯枯萎病(*Fusarium avenaceum*)鉴定及其病原生物学特性. 植物保护, 40(1): 48–53]
- Wei M, Zhu JQ, Zhang W, Jin WW, Fu BZ, Li GY. 2017. Biological characteristics of pathogen causing maca root rot disease and its fungicides laboratory screening. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Sciences)*, 32(5): 787–792 (in Chinese) [魏蜜, 朱洁倩, 张伟, 金文闻, 傅本重, 李国元. 2017. 玛咖根腐病菌的生物学特性及防治药剂室内筛选. 云南农业大学学报(自然科学), 32(5): 787–792]
- Wei SH, Feng ZB, Chen H, Ran MX, Zuo AP, Xu L, Zhang LL. 2014. Planting suitable area analysis, GAP base selection and construction of Miao medicine, *Polygonum capitatum* Buch. *Modern Chinese Medicine*, 16(11): 921–924 (in Chinese) [魏升华, 冯中宝, 陈华, 冉懋雄, 左爱萍, 徐亮, 张丽丽. 2014. 苗药头花蓼种植适宜区分析及GAP基地选建. 中国现代中药, 16(11): 921–924]
- Xu HJ, Tang SS, Zhou RJ, Fu JF, Li HB. 2017. Occurrence of *Sclerotinia* rot of *Pulsatilla koreana* and biological characteristics of *Sclerotinia nivalis*. *Journal of Plant Protection*, 44(2): 232–239 (in Chinese) [徐海娇, 唐珊珊, 周如军, 傅俊范, 李宏博. 2017. 白头翁菌核病发生危害调查及其病原菌生物学特性. 植物保护学报, 44(2): 232–239]
- Yang YQ, Lan B, Sun Q, Chen HF, Yu J, Zhang SL, Li XM. 2017. Identification of the pathogens causing wilt of *Asparagus officinalis* and analysis of its rDNA ITS sequence. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 36(2): 22–27 (in Chinese) [杨迎青, 兰波, 孙强, 陈洪凡, 余建, 张顺梁, 李湘民. 2017. 芦笋枯萎病菌的鉴定及rDNA ITS序列分析. 华中农业大学学报, 36(2): 22–27]
- Zeng LX, Yang L, Chen YY, Wu MK. 2012. Investigation and integrated management on diseases and pests for *Bletilla striata* in Guizhou. *Guizhou Agricultural Sciences*, 40(7): 106–108 (in Chinese) [曾令祥, 杨琳, 陈娅娅, 吴明开. 2012. 贵州中药材白及病虫害种类的调查与综合防治. 贵州农业科学, 40(7): 106–108]
- Zhang M, Rui K, Wu FZ, Zeng XP, Fu MY, Wang HF. 2017. Identification and genetic relationship on pathogen of sisal leaf spot. *Molecular Plant Breeding*, 15(11): 4356–4361 (in Chinese) [张森, 芮凯, 吴凤芝, 曾向萍, 符美英, 王会芳. 2017. 剑麻叶斑病病原菌鉴定及同源性分析. 分子植物育种, 15(11): 4356–4361]
- Zhang MC, Duan XA, Wang SY, Liu TJ. 2015. Research progress about cultivation technique of *Bletilla striata*. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, (5): 61–63 (in Chinese) [张满常, 段修安, 王仕玉, 刘体靖. 2015. 白及中药材栽培技术研究进展. 云南农业科技, (5): 61–63]
- Zhang XY, Sun XM, Zhou HY, Zhao GQ, Wang FW, Gao Q. 2017. Identification and biological characteristics of leaf spot pathogen *Drechslera avenacea* in oat. *Journal of Plant Protection*, 44(3): 473–480 (in Chinese) [张笑宇, 孙雪梅, 周洪友, 赵桂琴, 王凤梧, 高卿. 2017. 燕麦叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性. 植物保护学报, 44(3): 473–480]
- Zhao RQ, Wan DQ, Liu H. 2016. Identification of the pathogen of *Bletilla striata* rust and its control methods. *Agricultural Technology Service*, 33(16): 71–72 (in Chinese) [赵仁全, 王大群, 刘海. 2016. 白及锈病病原鉴定及其防治方法. 农技服务, 33(16): 71–72]
- Zhao ZX, Chen Y, Chen MC, Fu MY, Wang SY, Xiao TB. 2013. Identification of *Dioscorea* stem rot disease in Hainan. *Genomics and Applied Biology*, 32(6): 761–766 (in Chinese) [赵志祥, 陈圆, 陈绵才, 符美英, 王三勇, 肖彤斌. 2013. 海南薯蓣茎腐病病原菌的鉴定. 基因组学与应用生物学, 32(6): 761–766]
- Zhou Y. 2015. Study on etiology of kiwifruit soft rot disease. Ph. D Thesis. Chengdu: Sichuan Agricultural University (in Chinese) [周游. 2015. 猕猴桃软腐病病原学研究. 博士学位论文. 成都: 四川农业大学]

(责任编辑:张俊芳)