

湖北省黄连叶斑病病原鉴定及其生物学特性

席中刚 游景茂 郑 露 刘 浩 黄俊斌*

(华中农业大学植物科技学院, 湖北省作物病害检测和安全控制重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 为明确湖北省黄连叶斑病病原菌种类及其生物学特性, 采用常规组织分离法获得病原菌菌株 HL-1, 通过形态学特征并结合基于 ITS 序列分析对菌株进行鉴定, 并研究该病原菌的生物学特性, 用生长速率法测定了 6 种杀菌剂对该病原菌菌丝生长的抑制作用。结果表明, 黄连叶斑病病原菌分生孢子器黑褐色, 大小为 $100.5\sim 120.0\ \mu\text{m}\times 175.3\sim 210.0\ \mu\text{m}$; 分生孢子无色, 单孢, 大小为 $2.0\sim 2.5\ \mu\text{m}\times 4.1\sim 5.4\ \mu\text{m}$; 该菌株 ITS 序列系统发育进化分析结果表明, 其与耧斗菜茎点霉 *Phoma aquilegiicola* (HM222537.1) 的同源性为 100%, 通过形态学特征及分子鉴定结果确定该菌株为耧斗菜茎点霉。该病原菌在 $4\sim 25^\circ\text{C}$ 内均能生长, 最适温度为 20°C ; 不同光照条件对病原菌生长的影响无显著差异; 在供试碳(氮)源中病原菌对麦芽糖和蛋白胨的利用效果最好; 菌丝的致死温度为 50°C 、10 min。供试 6 种药剂中 10% 苯醚甲环唑对病原菌菌丝生长的抑制效果最好, 其 EC_{50} 最小, 为 $0.03\ \mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 黄连; 叶斑病; 病原菌; 生物学特性

Identification and biological characteristics of the pathogen causing leaf spot on *Coptis chinensis* in Hubei Province

Xi Zhonggang You Jingmao Zheng Lu Liu Hao Huang Junbin*

(The Key Laboratory of Plant Pathology in Hubei Province, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China)

Abstract: In order to confirm the pathogen of leaf spot on *Coptis chinensis* and its biological characteristics, the strain HL-1 was isolated by tissue isolation method; the pathogen was identified with morphological characteristics and ITS sequence analysis, and the biological characteristics were also determined. The toxicities of six fungicides against the pathogen were tested. The results showed that the fungal pycnidia were black brown, $100.5\sim 120.0\ \mu\text{m}\times 175.3\sim 210.0\ \mu\text{m}$ in diameter; its conidia were colorless and monospora, $2.0\sim 2.5\ \mu\text{m}\times 4.1\sim 5.4\ \mu\text{m}$ in diameter. The analysis of ITS rDNA sequence showed that the fungus shared 100% identity with *Phoma aquilegiicola* (HM222537.1). The fungus was finally identified as *Phoma aquilegiicola*. The mycelia could grow at $4\sim 25^\circ\text{C}$, and 20°C was the optimum temperature; no significant differences were found in the mycelial growth between different illuminations. The optimal carbon source for mycelial growth was maltose, and the optimum nitrogen source was peptone. Hyphal viability completely lost when hyphal agar plugs were incubated at 50°C for 10 min. The most effective fungicide was 10% difenoconazole among the six tested fungicides, with the lowest EC_{50} of $0.03\ \mu\text{g/mL}$.

Key words: *Coptis chinensis*; leaf spot; pathogen; biological characteristics

黄连 *Coptis chinensis* Franch 又名味连、鸡爪连等,为毛茛科多年生草本植物,本品性寒,味苦,具清热燥湿、泻火解毒之功效,以根茎入药,是我国重点发展的中药材品种(田智勇和李振国,2004)。黄连主产区在重庆市石柱及湖北省利川、恩施等地,产量约占全国商品黄连总量的80%以上(徐雷等,2015)。黄连是多年生植物,在生长过程中病害十分严重,主要病害有黄连紫纹羽病、黄连根腐病、黄连白粉病等(黄俊斌等,1998;朱道静等,2008;银福军等,2009)。2014年以来,湖北省恩施州太山庙黄连规范种植基地出现了一种新的叶部病害,该病害主要侵染叶片,叶上病斑呈圆形,后扩大呈不规则状大病斑,病斑由黑色变为黄褐色,发病植株较矮小,严重时会产生干枯症状,田间发病率在30%以上,严重影响黄连的药用质量及商业价值,对种植农户造成巨大经济损失。

目前已经报道了许多植物叶斑病的病原,引致梔子叶斑病的病原菌为拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis steyaertii* (黄学顺等,2006);美人蕉叶斑病的病原菌为链格孢菌 *Alternaria alternata* (傅本重等,2011);滇楸叶斑病的病原菌为围小丛壳菌 *Glomerella cin-gulata*,无性阶段为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloe-sporioides*;棕榈叶斑病的病原菌为小孢拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis microspora* (郑丽等,2014),说明不同寄主叶斑病的病原菌都不尽相同。近年来湖北省黄连叶斑病的发病面积和危害程度呈加重趋势,然而关于湖北省黄连叶斑病的病原菌种类及其生物学特性尚未见报道。

本研究从湖北省恩施州黄连主要产区采样并分离到黄连叶斑病病原菌,通过形态学特征观察和ITS序列分析对该病原菌进行分类鉴定,并通过对病原菌生理指标的研究以及6种生产上常用的杀菌剂对该菌株的毒力测定,明确该菌株的生物学特性及其对不同药剂的敏感性,以期防治黄连叶斑病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植株:黄连来源于湖北省恩施州太山庙黄连 GAP 种植基地。

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20 g;燕麦琼脂(oatmeal agar medium, OA)培养基:燕麦20 g、琼脂20 g;麦芽提取物琼脂(malt extract agar)

培养基:麦芽提取物40 g、琼脂20 g;查氏(Czapek)培养基:氯化钾0.5 g、磷酸氢二钾1 g、硝酸钠2 g、硫酸铁0.01 g、七水合硫酸镁0.5 g、蔗糖30 g、琼脂20 g。均用蒸馏水补足至1 000 mL。

供试药剂:10%苯醚甲环唑(difenoconazole)水分散粒剂,瑞士先正达作物保护有限公司;206.7 g/L 噁酮氟硅唑(fluorosiliconazole)乳油,美国杜邦公司;80%嘧霉胺(pyrimethanil)水分散粒剂,河北冠龙农化有限公司;50%腐霉利(procymidone)可湿性粉剂,兴农药业有限公司;68%精甲霜锰锌(metalaxyl-mancozeb)水分散粒剂,先正达(苏州)作物保护有限公司;70%甲基托布津(thiophanate methyl)可湿性粉剂,江苏龙灯化学有限公司。

试剂及仪器:10 mmol/L dNTP、*Taq* 酶、25 mmol/L $MgCl_2$ 、PCR Buffer 等,日本 TaKaRa 公司;其它试剂均为国产分析纯。SiGMA1-14k 离心机,德国 SIG-MA 公司;BS203 型光学显微镜,重庆光电仪器有限公司;PTC-100 PCR 扩增仪,美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离及致病性测定

采用常规组织分离法分离病原菌,用清水洗净叶并剪取4 mm×4 mm的病健交界处组织,用75%乙醇处理30 s,0.1%升汞消毒1~2 min,无菌水冲洗3遍,接种在PDA培养基上,25℃下培养5 d,将获得的菌株通过单孢纯化后保存在PDA斜面上,置于4℃冰箱保存备用。

采用菌丝块接种和分生孢子悬浮液接种2种方法对菌株进行致病性测定。菌丝块接种:从健康黄连植株上选取大小一致的无病害叶片50片,用70%酒精对其表面进行消毒1 min,打取直径为6 mm的菌丝块,接种至黄连健康叶片上;以接种PDA培养基作为对照,每处理接种10片,置于35 cm×50 cm的瓷盘内于25℃保湿培养,接种2 d后移去菌丝块,观察发病情况。

分生孢子悬浮液接种:采用机械损伤菌丝法诱导病原菌产孢,待产孢后每皿加10 mL 无菌水,配成浓度为 1×10^6 个/mL的分生孢子悬浮液备用。选取大小一致的健康黄连叶,将配制好的分生孢子悬浮液均匀喷洒到叶片上,每个叶片喷洒2 mL,以无菌水作对照,每处理接种10片,置于35 cm×50 cm的瓷盘内于25℃保湿培养,观察发病情况。根据柯赫氏法则,对发病叶片进行再分离、培养,在显微镜下观察分离得到的菌株是否与原接种菌株相同。

1.2.2 病原菌鉴定

病原菌形态学鉴定:将病原菌接种到PDA、OA、MA平板上,25℃光照培养,观察菌落形态、颜色、分生孢子器、分生孢子及产孢细胞的特征等,根据《中国真菌志第十五卷球壳孢目茎点霉属、叶点霉属》(白金铠,2003)以及《Phoma Identification Manual》(Boerema et al., 2004)对病原菌进行初步鉴定。

病原菌的分子鉴定:采用CTAB法提取病原菌株的基因组DNA。采用ITS通用引物对ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增该病原菌的目的基因序列,引物均由武汉擎科生物技术有限公司合成。25 μL PCR反应体系:10×Buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、Taq酶0.2 μL、模板DNA 1 μL、25 μmol/L引物ITS1和ITS4各0.5 μL,加ddH₂O至25 μL。PCR扩增条件:95℃预变性4 min;94℃变性1 min,54℃退火1 min,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min,12℃保存。

扩增产物的纯化和序列测定委托武汉擎科生物技术有限公司进行,所得到的核苷酸序列与GenBank(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中序列进行BLAST比对分析,并用MEGA 7.0软件将供试菌株的ITS序列与BLAST上同源性高的菌株序列进行比对,采用邻近法(neighbor-joining, NJ)进行聚类分析,构建系统发育树,重复1 000次。

1.2.3 病原菌生物学特性测定

温度对病原菌生长的影响:打取直径为6 mm的菌丝块,接至PDA平板中央,分别在4、10、15、20、25、30、35℃的恒温条件下培养,观察菌丝生长情况,5 d后采用十字交叉法测量菌落直径,每处理5次重复。

光照对病原菌生长的影响:将直径为6 mm的病原菌菌丝块接至PDA平板中央,将平板分别置于连续光照、12 h光暗交替、连续黑暗的人工气候培养箱,25℃恒温培养,5 d后用十字交叉法测量菌落直径,每处理5次重复。

病原菌菌丝致死温度的测定:将直径为6 mm的病原菌菌丝块接至无菌试管中,加入2 mL灭菌水,置于35、40、45、50、55、60℃的水浴中加热10 min,每个处理5次重复,然后接种于PDA平板中央,25℃光照培养,5 d后用十字交叉法测量菌落直径,每处理5次重复。

碳(氮)源对病原菌生长的影响:以查氏(Czappek)培养基为基础培养基,用等质量碳元素的乳糖、

葡萄糖、半乳糖、甘露醇、麦芽糖、可溶性淀粉替代蔗糖,以不加碳源的查比克培养液作为对照;用等质量氮元素的蛋白胨、硝酸铵、硝酸钾、乙酸铵、甘氨酸代替KNO₃,以不加氮源的查比克培养液作为对照。打取直径为6 mm的菌丝块接至含不同碳(氮)源的PDA平板上,25℃条件下培养5 d后用十字交叉法测量菌落直径,每处理5次重复。

1.2.4 杀菌剂对病原菌生长的毒力测定

采用菌丝生长速率法测定6种供试药剂对黄连叶斑病原菌菌丝生长的抑制活性。每种药剂根据预试验结果分别设5个浓度梯度,包括浓度为0.01、0.05、0.1、1、10 μg/mL的10%苯醚甲环唑,浓度为0.01、0.05、0.1、1、10 μg/mL的206.7 g/L噁酮氟硅唑,浓度为0.01、0.1、1、10、100 μg/mL的80%嘧霉胺,浓度为0.5、5、50、500、1 000 μg/mL的50%腐霉利,浓度为0.5、5、50、500、1 000 μg/mL的68%精甲霜锰锌,浓度为0.5、5、50、500、1 000 μg/mL的70%甲基托布津。将各浓度梯度的药液以1:9(V/V)的体积比与溶化的PDA培养基混匀,制成不同浓度药剂的PDA平板,以加等量无菌水的PDA平板为对照,各处理重复5次。将直径为6 mm的菌丝块接种到含药平板中央,置于25℃光照培养箱培养5 d,用十字交叉法测量各处理的菌落直径,计算相对抑制率,相对抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。取药剂浓度的对数值为x,菌丝生长相对抑制率的概率值为y,作毒力回归方程。

1.3 数据分析

试验数据采用DPS 7.05软件和Excel 2016进行统计分析,用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 黄连叶斑病病原菌的分离及致病性

对采集的病叶进行常规组织分离,结果表明茎点霉属真菌分离比例达到了90%,柄孢壳属*Podospora* sp.占4%,还分离出了少量烟管菌属*Bjerkandera* sp.。从分离的不同真菌中选择代表性菌株进行致病性测定,结果表明,只有茎点霉属真菌代表菌株HL-1接种时,黄连叶片产生病斑。

接种叶片在25℃下保湿培养24 h后,菌丝块接种的叶片病斑初为黑色斑点状,随发病时间延长逐渐扩展为圆形黑褐色大斑,病斑平均增长率为3.44 mm/d,接种6 d后病原菌侵染整个叶片。接种分生孢子悬浮液2 d后产生针点状黑色小病斑,后逐渐扩大并愈

合形成大病斑。2种接种方法产生的症状均与田间自然发病症状一致,从发病叶片上再分离到的病原菌与原接种菌株培养性状和形态特征相一致,而进一步确认菌株HL-1为黄连叶斑病病原菌。

2.2 菌株HL-1的鉴定

黄连叶斑病病原菌在PDA培养基上菌落圆形,边缘规则,呈绒状,生长较快,菌落生长速率为14 mm/d,菌落初期白色,后期为黄褐色(图1-a);在OA培养基上生长较慢,菌丝体初为乳白色,后变为褐色,菌体表面产生大量的气生菌丝,菌丝埋生,分枝,具隔膜,菌落生长速率为7 mm/d(图1-b),在

OA培养基上培养7 d后菌落具有不同形式的菌丝肿胀,NaOH颜色反应呈绿色;在MA培养基上菌落边缘整齐,并产生少量气生菌丝,菌体乳白色,生长速率为11 mm/d。采用机械损伤菌丝法诱导产孢,5 d后镜检观察结果显示,在培养基菌落表面或培养基质中产生黑褐色分生孢子器,球形或近球形,大小为 $100.5\sim 120.0\ \mu\text{m}\times 175.3\sim 210.0\ \mu\text{m}$ (图1-c);分生孢子无色,单孢,长椭圆状、棍棒状,大小为 $2.0\sim 2.5\ \mu\text{m}\times 5.0\sim 5.4\ \mu\text{m}$,分生孢子内不含油球(图1-d),初步鉴定菌株HL-1为无性孢子类球壳孢目稷斗菜茎点霉 *Phoma aquilegiicola*。

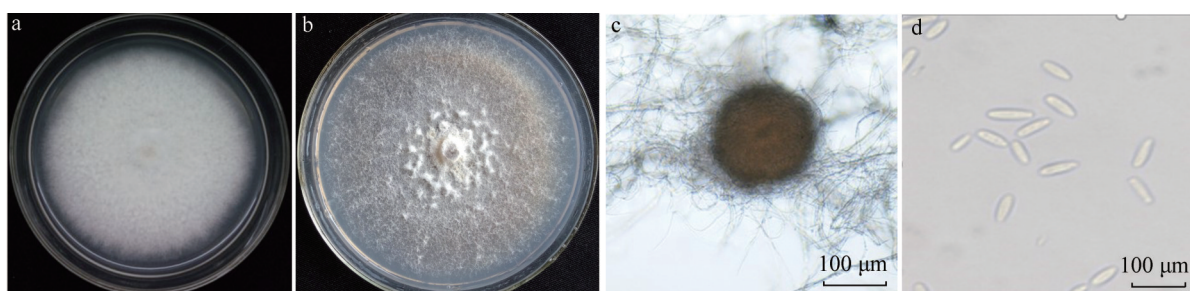


图1 湖北省黄连叶斑病病原菌的形态特征

Fig. 1 Symptoms of the pathogen of leaf spot disease on *Coptis chinensis* in Hubei Province

a: PDA平板上菌落; b: OA平板上菌落; c: 分生孢子器; d: 分生孢子。 a: Colony on PDA medium; b: colony on OA medium; c: pycnidium; d: conidium.

采用通用引物ITS1/ITS4进行PCR扩增后得到493 bp大小的片段,在GenBank中进行BLAST比对,发现该菌株与稷斗菜茎点霉 *P. aquilegiicola* (HM222537.1)的同源性最高,为100%。通过构

建系统发育树发现,菌株HL-1序列与稷斗菜茎点霉 *P. aquilegiicola* 的遗传距离最近,聚在一起(图2),结合形态学特征及分子鉴定结果确定黄连叶斑病的病原菌为稷斗菜茎点霉。

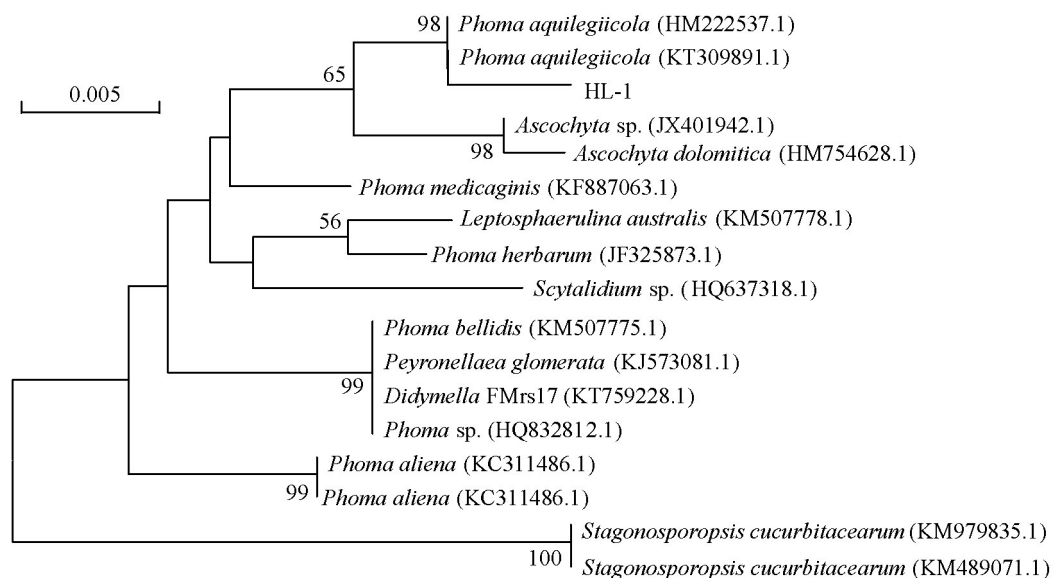


图2 基于ITS序列采用NJ法构建菌株HL-1及其相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain HL-1 and related strains based on ITS sequences by the NJ method

2.3 菌株 HL-1 的生物学特性

2.3.1 温度和光照对菌株 HL-1 的影响

不同温度对供试菌株菌丝生长的影响差异显著。菌株 HL-1 在 15~25℃ 生长较好, 其中 20℃ 最适合菌丝生长, 生长 5 d 后的菌落直径达到 71.5 mm; 4℃ 时, 菌株 HL-1 在第 3 天才开始生长, 且生长缓慢, 生长速率小于 5 mm/d; 而在温度 30℃ 以上时, 菌丝不生长(图 3)。

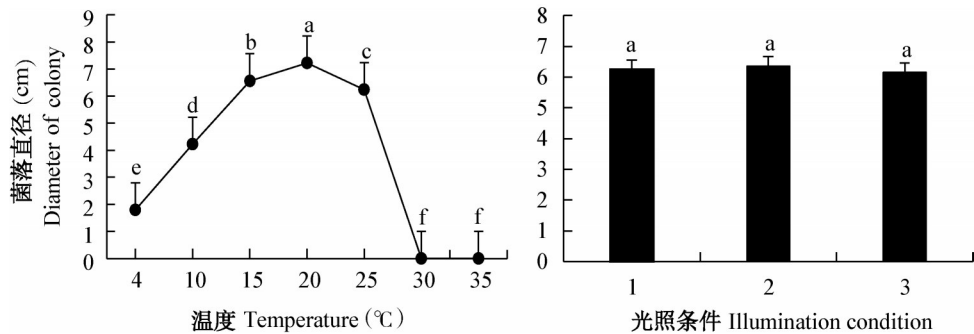


图 3 不同温度和光照条件对黄连叶斑病原菌菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of temperature and illumination on mycelial growth of the pathogen causing leaf spot of *Coptis chinensis*
1: 连续光照; 2: 连续黑暗; 3: 光照黑暗交替。图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。 1: Illumination; 2: darkness; 3: light and dark alternation. Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.3.2 碳源和氮源对菌株 HL-1 生长的影响

菌株 HL-1 在 7 种不同碳源和 5 种不同氮源的培养基条件下都能够生长, 但对不同碳、氮源的利用程度不同。在不同碳源中, 病原菌对麦芽糖的利用效果最好, 培养 5 d 后菌落直径为 6.43 cm, 显著大于

不同光照条件对病原菌菌丝的生长影响不显著。在连续光照、连续黑暗、12 h 光暗交替条件下培养 5 d, 菌落平均直径分别为 62.4、63.5、61.5 mm(图 3)。
用不同温度的水浴处理供试菌株的菌丝块, 结果表明, 菌丝块在 35~45℃ 水浴处理 10 min 后, 置于 PDA 平板上培养, 5 d 后均可长出菌丝, 而经 50、55、60℃ 处理下, 培养 10 d 后仍未观察到菌丝生长, 由此可知病原菌菌丝的致死温度为 50℃、10 min。

其它处理, 其次是淀粉和乳糖, 而对甘露醇和蔗糖利用效果最差。菌株 HL-1 对蛋白胨的利用效率最高, 培养 5 d 后的菌落直径为 6.95 cm, 显著大于其它处理, 其次为甘氨酸和硝酸钾, 对乙酸铵利用效果较差, 而对硝酸铵利用效果最差, 生长缓慢(表 1)。

表 1 不同碳、氮源对黄连叶斑病原菌菌丝生长的影响

Table 1 Effects of carbon and nitrogen sources on mycelial growth of the pathogen causing leaf spot of <i>Coptis chinensis</i>					
碳源	菌落直径 (cm)	菌落形态	氮源	菌落直径 (cm)	菌落形态
Carbon source	Diameter of colony	Colony morphology	Nitrogen source	Diameter of colony	Colony morphology
麦芽糖 Maltose	6.43±0.07 a	致密 Dense	蛋白胨 Peptone	6.95±0.05 a	致密 Dense
淀粉 Starch	5.95±0.05 b	致密 Dense	甘氨酸 Glycine	6.09±0.04 b	致密 Dense
乳糖 Lactose	5.78±0.09 bc	致密 Dense	硝酸钾 Potassium nitrate	5.85±0.04 b	致密 Dense
半乳糖 Galactose	5.59±0.15 bcd	致密 Dense	乙酸铵 Ammonium acetate	4.66±0.08 c	致密 Dense
葡萄糖 Glucose	5.49±0.11 cd	致密 Dense	硝酸铵 Ammonium nitrate	3.11±0.09 d	致密 Dense
甘露醇 Mannitol	5.29±0.06 d	致密 Dense	对照 CK	6.05±0.03 b	稀疏 Sparse
蔗糖 Sucrose	5.26±0.04 d	致密 Dense			
对照 CK	4.46±0.03 e	稀疏 sparse			

表中数据为平均数±标准差。同列数字后不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。 Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.4 杀菌剂对菌株 HL-1 的抑制活性

毒力测定结果表明, 6 种药剂对黄连叶斑病原菌的生长都有一定的抑制作用, 毒力回归方程均达到

极显著水平。其中 10% 苯醚甲环唑和 206.7 g/L 噁嗪氟硅唑的抑菌效果较好, EC_{50} 分别为 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.80 $\mu\text{g/mL}$, 其次是 80% 啞霉胺和 50% 腐霉利, EC_{50}

分别为 18.79 $\mu\text{g/mL}$ 和 20.82 $\mu\text{g/mL}$ (表 2)。

表 2 不同药剂对黄连叶斑病病原菌的毒力测定

Table 2 Toxicities of fungicides on the pathogen causing leaf spot of *Coptis chinensis*

药剂 Fungicide	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	抑制中浓度 EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
10% 苯醚甲环唑 10% difenoconazole	$y=0.7117x+6.1375$	0.9507	0.03
206.7 g/L 噁酮氟硅唑 206.7 g/L fluorosiliconazole	$y=0.9248x+5.0888$	0.9496	0.80
80% 嘧霉胺 80% pyrimethanil	$y=0.6447x+4.1787$	0.9838	18.79
50% 腐霉利 50% procymidone	$y=0.2612x+4.6556$	0.9409	20.82
68% 精甲霜锰锌 68% metalaxyl-mancozeb	$y=0.1916x+4.5804$	0.8462	154.85
70% 甲基托布津 70% thiophanate methy	$y=0.2169x+4.5227$	0.8620	158.69

3 讨论

本研究通过形态学特征与分子生物学鉴定最终确定湖北省恩施州黄连种植基地发现的叶斑病病原菌为娄斗菜茎点霉,该病原菌还可引起娄斗菜叶斑病 (Garibaldi et al., 2011)。茎点霉属真菌的种类比较多,并且多数为植物病原菌,茎点霉属自 Fries 创建以来,其分类和命名经过了多次更改,Boerema 分类系统得到了普遍认可 (Boerema et al., 2004)。但有些近缘种之间很难利用形态特征进行区分,因此分子鉴定越来越重要 (孙广宇等, 2003)。Chen et al. (2015) 依据多基因位点的系统发育分析以及形态学特征,对壳二孢属、亚隔孢壳属以及茎点霉属进行了重新分类,并将娄斗菜茎点霉以及 *Ascochyta aquilegiicola* 重命名为 *Calophoma aquilegiicola*。

杨玲玉等 (2016) 研究发现,不同种的茎点霉在生长速度、产孢等方面有显著性差异,豌豆茎点霉 *P. pinodes*、维管束茎点霉 *P. tracheiphila* 等大部分茎点霉菌株在 OA 培养基上明显促进孢子产生;杨文等 (2016) 认为茶树褐芽病菌 *P. adianticola* 在 OA 培养基上培养 7 d 后菌落平均直径为 6.0~6.4 cm,分生孢子器圆球形,分生孢子橄榄球形。而本研究所获得的茎点霉菌株在 OA 培养基上生长较慢,培养 7 d 后菌落具有不同形式的菌丝肿胀,在 MA 培养基上菌落边缘整齐,生长 10 d 后产生分生孢子和分生孢子器,未发现厚垣孢子,分生孢子较小无隔膜,初步确定为娄斗菜茎点霉,这与 Yu et al. (2014) 报道一致。通过 rDNA-ITS 分子鉴定发现供试菌株与娄斗菜茎点霉的同源性最高,为 100%;与草茎点霉 *P. herbarum*、苜蓿茎点霉 *P. medicaginis* 以及派伦霉属 *Peyronella* 真菌等同源性虽较高,但与草茎点霉 NaOH 颜色反应、苜蓿茎点霉菌落在 PDA 上的颜色以及派伦霉属真菌产孢情况存在明显差异 (李洪建等, 2015)。

张丽等 (2015a) 研究表明,苜蓿茎点霉菌丝生长的最适温度为 20℃,不同光照对分生孢子萌发影响不明显,菌丝生长最适碳源为蔗糖,最适氮源为牛肉膏;李海洋等 (2016) 发现白藜茎点霉 *P. dictamnica* 在 10~30℃ 均能生长,25℃ 为菌丝最适生长温度,在以葡萄糖为主要碳源和蛋白胨为主要氮源的培养基上生长效果最好。而本研究结果与以上试验结论存在差异,即娄斗菜茎点霉在 4~25℃ 均可以生长,最适生长温度为 20℃。此外,该菌菌丝致死温度为 50℃、10 min,这与张丽等 (2015a) 结果一致。在生产上,黄连主产区的温度一般为 10~20℃,空气湿度大且土壤宜积水,这些均有利于叶斑病的发生,给叶斑病的防治带来很大的困难,因此黄连种植应尽量选择排水力强、通透性能较好的缓坡地。碳、氮源对病原菌的生长过程具有非常重要的作用,本试验结果表明该菌株最适碳源为麦芽糖,而对甘露醇和蔗糖利用效果较差;最适氮源为蛋白胨,而对乙酸铵利用效果较差,对硝酸铵利用效果最差,说明在黄连种植后可通过增施铵态肥或营养元素肥料添加剂减少病害的发生。

张丽等 (2015b) 研究发现不同杀菌剂对苜蓿茎点霉叶斑病的防效差异显著,其中 96% 丙环唑的室内抑菌效果最强, EC_{50} 为 0.5690 $\mu\text{g/mL}$;李海洋等 (2016) 发现白藜茎点霉对 50% 咪鲜胺乳油、10% 苯醚甲环唑等敏感性较高,其 EC_{50} 均小于 0.1 $\mu\text{g/mL}$;本试验结果表明,10% 苯醚甲环唑和 206.7 g/L 噁酮氟硅唑对黄连叶斑病病原菌的抑制效果较好,而百菌清、甲基托布津等一些传统杀菌剂抑菌效果相对较差。这可能是因为噁酮氟硅唑类杀菌剂喷施叶片上后,有易粘附、不被雨水冲刷的特性,适于雨季期间黄连病害的防治 (孙景文和马洪艳, 2008)。在生产上可通过大田试验来验证 10% 苯醚甲环唑和 206.7 g/L 噁酮氟硅唑的田间防效,为黄连产区叶斑

病的防治提供参考依据。

参考文献 (References)

- Bai JK. 2003. Sphaeropsidales *Phoma*, *Phyllosticta*.//Flora Fungorum Sinicorum. Beijing: Science Press, pp. 255 (in Chinese) [白金铠. 2003. 球壳孢目茎点霉属、叶点霉属.//中国真菌志. 北京: 科学出版社, pp. 255]
- Boerema GH, de Gruyter J, Noordeloos ME, Hamers, MEC. 2004. *Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. Wallingford: CABI Publishing
- Chen Q, Jiang JR, Zhang GZ, Cai L, Crous PW. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, 82: 137–217
- Fu BZ, Wang ZY, Wu JR, Han CZ, Hong YD. 2011. Biological characterization and screening of fungicides on *Canna indica* leaf spot disease pathogen. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(31): 105–108 (in Chinese) [傅本重, 王政又, 伍建榕, 韩长志, 洪英娣. 2011. 美人蕉叶斑病原菌的生物学特性及其抑菌药剂筛选. 中国农学通报, 27(31): 105–108]
- Garibaldi A, Bertetti D, Amati MT, Gullino ML. 2011. First report of leaf spot of fan columbine (*Aquilegia flabellata*) caused by *Phoma aquilegiicola* in Italy. *Plant Disease*, 95(7): 880
- Huang JB, Zhao CS, Wei YD, Zhou MS. 1998. Preliminary study on three important *Coptis chinensis* diseases. *Plant Protection of Hubei*, (4): 10–11 (in Chinese) [黄俊斌, 赵纯森, 卫扬斗, 周茂森. 1998. 三种重要黄连病害的初步研究. 湖北植保, (4): 10–11]
- Huang XS, Fu YP, Qin LY, Li XY, Xiang QF, Zeng GZ, Jiang DH. 2006. The leaf spot on *Gardenia jasminoides* and identification of its pathogen. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 25(1): 21–25 (in Chinese) [黄学顺, 付艳平, 秦乐业, 李勋远, 向青锋, 曾国柱, 姜道宏. 2006. 栀子叶斑病及其病原的鉴定. 华中农业大学学报, 25(1): 21–25]
- Li HJ, Li FH, Shi J, Hu TM, Cheng JM, Qian YH, Jiao F. 2015. Identification of pathogen causing *Phoma* leaf spot on *Medicago sativa* in Shaanxi Province. *Acta Agrestia Sinica*, 23(6): 1310–1316 (in Chinese) [李洪建, 李芳红, 史健, 呼天明, 程积民, 钱永华, 焦锋. 2015. 陕西省苜蓿茎点霉叶斑病原菌的鉴定. 草地学报, 23(6): 1310–1316]
- Li HY, Wei CY, Liu LL, Li HB, Bai QR. 2017. Biological characteristics and fungicides susceptibility on the pathogen of *Dictamnus dasycarpus* leaf spot. *Journal of Jilin Agricultural University*, 39(3): 281–286 (in Chinese) [李海洋, 魏春艳, 刘丽玲, 李海滨, 白庆荣. 2017. 白藜茎点霉叶斑病原菌生物学特性及药剂敏感性研究. 吉林农业大学学报, 39(3): 281–286]
- Sun GY, Peng YL, Li ZQ, Zhang TY. 2003. Application of sequencing technique on fungal systematics. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 31(6): 187–192 (in Chinese) [孙广宇, 彭友良, 李振岐, 张天宇. 2003. 核苷酸序列分析在真菌系统学研究中的应用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 31(6): 187–192]
- Sun JW, Ma HY. 2008. Field trial of carbendazim + tebuconazole 30% SC to control apple canker. *Modern Agrochemicals*, 7(2): 55–56 (in Chinese) [孙景文, 马洪艳. 2008. 30%多菌灵·戊唑醇悬浮剂防治苹果轮纹病田间药效试验. 现代农药, 7(2): 55–56]
- Tian ZY, Li ZG. 2004. New research and development of *Coptis chinensis*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 15(10): 704–706 (in Chinese) [田智勇, 李振国. 2004. 黄连的研究新进展. 时珍国医国药, 15(10): 704–706]
- Xu L, Liu CL, Liu HG. 2015. The research system of Chinese herbal medicines standardized planting situation and technical in Hubei Province. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 26(9): 2238–2239 (in Chinese) [徐雷, 刘常丽, 刘合刚. 2015. 湖北省中药材规范种植现状及技术研究体系. 时珍国医国药, 26(9): 2238–2239]
- Yang LY, Wang Y, Cheng YH, Gao RF, Xu Q, He BL, Liu HX. 2016. Study on biological characteristics of *Phoma* spp. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 47(4): 501–505 (in Chinese) [杨玲玉, 王颖, 程颖慧, 高瑞芳, 许青, 何邦令, 刘会香. 2016. 茎点霉生物学特性研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 47(4): 501–505]
- Yang W, Chen Y, Chen XJ, Yao YJ, Zhou YF. 2016. A new disease of tea plant caused by *Phoma adianticola*. *Journal of Tea Science*, 36(1): 59–67 (in Chinese) [杨文, 陈瑶, 陈小均, 姚雍静, 周玉锋. 2016. 茎点霉真菌 *Phoma adianticola* 引起的一种茶树新病害. 茶叶科学, 36(1): 59–67]
- Yin FJ, Zeng W, Qu XY. 2009. Main disease investigation and control strategy on *Coptis chinensis*. *Plant Doctor*, 22(1): 21–23 (in Chinese) [银福军, 曾伟, 瞿显友. 2009. 黄连主要病害调查及防治策略. 植物医生, 22(1): 21–23]
- Yu Y, Su ZC, Tan WC, Bi CW. 2014. First report of a leaf spot on gold-thread (*Coptis chinensis*) caused by *Phoma aquilegiicola* in China. *Plant Disease*, 98(10): 1428
- Zhang L, Pan LQ, Wang SR, Yuan QH, Wang Y, Miao LH. 2015a. Study on the biological characteristics of the alfalfa *Phoma* leaf spot pathogen. *Journal of China Agricultural University*, 20(4): 158–166 (in Chinese) [张丽, 潘龙其, 王生荣, 袁庆华, 王瑜, 苗丽宏. 2015a. 苜蓿茎点霉叶斑病原菌鉴定及生物学特性研究. 中国农业大学学报, 20(4): 158–166]
- Zhang L, Pan LQ, Yuan QH, Wang Y, Miao LH, Ma JQ. 2015b. Control efficacy of different fungicides against alfalfa *Phoma* leaf spot. *Chinese Journal of Grassland*, 37(5): 62–68 (in Chinese) [张丽, 潘龙其, 袁庆华, 王瑜, 苗丽宏, 马甲强. 2015b. 不同杀菌剂对苜蓿茎点霉叶斑病的防效. 中国草地学报, 37(5): 62–68]
- Zheng L, Yang XY, Xie CP, Li J, Feng CY, Zeng XH, Tian WY, Shen HF, Qin XD. 2014. Pathogen identification of leaf spot disease of oil palm seedling and determination of its biological characteristics. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 36(6): 794–891 (in Chinese) [郑丽, 杨兴玉, 谢昌平, 李静, 冯朝阳, 曾宪海, 田婉莹, 沈会芳, 覃新导. 2014. 油棕苗期叶斑病的病原鉴定及其生物学特性研究. 中国油料作物学报, 36(6): 794–801]
- Zhu DJ, Zhang DL, Chen SJ, Tang Y, Zhong GY, Li LY. 2008. Research of disease control methods and occurrence on berberine powdery mildew. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 31(12): 1780–1781 (in Chinese) [朱道静, 张德利, 陈仕江, 唐毅, 钟国跃, 李隆云. 2008. 黄连白粉病发生规律及防治方法研究. 中药材, 31(12): 1780–1781]

(责任编辑:王璇)