

蓝莓叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性

杨秀梅¹, 王丽花¹, 张艺萍¹, 吴学尉², 周旭红³

1. 云南省农业科学院 花卉研究所/国家观赏园艺工程技术研究中心/云南省花卉育种重点实验室, 昆明 650205;

2. 云南大学 农学院, 昆明 650504; 3. 云南中医药大学 科技处科技实验中心, 昆明 650500

摘要: 为明确蓝莓叶斑病病原菌种类及其生物学特性, 采用组织分离法和单孢分离法对病原菌进行分离纯化, 通过形态学特征和多基因联合序列分析进行病原鉴定, 采用叶片涂抹接种法测定其致病性, 并于室内对其生物学特性进行研究。结果表明, 从发病蓝莓叶片分离得到 3 株形态特征一致的菌株, 代表菌株 LC-1 菌落呈深棕色, 菌丝白色至浅红棕色; 大型分生孢子梗无色透明, 长 303~410 μm , 分枝末端产生 2~4 个瓶梗; 囊泡棒状, 大小为 (12~30) $\mu\text{m} \times (2\sim 5) \mu\text{m}$; 大分生孢子无色透明, 圆柱形, 两端半圆形, 大小为 (48~82) $\mu\text{m} \times (4\sim 7) \mu\text{m}$ 。采用 *Act*, *H3*, *EF-1 α* 和 *β -tub* 4 段基因联合构建系统发育树, 供试菌株 LC-1 与柯氏丽赤壳菌(*Calonectria col-hounii*)聚在同一分支。蓝莓叶片接种菌株 LC-1 后出现典型的叶斑症状, 根据形态学特征和系统发育分析, 将该病原菌鉴定为柯氏丽赤壳菌。生物学特性研究结果表明, 菌丝最适生长温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 值为 7, 该菌对可溶性淀粉的利用最好, 菌丝生长的最适氮源为甘氨酸。

关键词: 蓝莓; 叶斑病; 柯氏丽赤壳菌; 生物学特性

中图分类号: S432 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2022)10-0048-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Biological Characteristics of Pathogen Causing Leaf Spot Disease of Blueberry

YANG Xiumei¹, WANG Lihua¹, ZHANG Yiping¹,
WU Xuwei², ZHOU Xuhong³

1. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agriculture Sciences/National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture/Yunnan Key Laboratory for Flower Breeding, Kunming 650205, China;

2. School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650504, China;

3. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: In order to clarify the species and biological characteristics of the pathogen of blueberry leaf

收稿日期: 2021-10-29

基金项目: 云南省科技厅生物种业和农产品精深加工重大专项(2019ZG006); 云南省乡村振兴科技专项(202104BI090014); 云南种子种业联合实验室项目(202205AR070001)。

作者简介: 杨秀梅, 研究员, 主要从事花卉病害防治研究。

通信作者: 周旭红, 博士, 研究员。

spot, the pathogen was isolated and purified by tissue isolation method and single spore isolation method. The pathogen was identified by morphological characteristics and polygenic joint sequence analysis. The pathogenicity was determined by leaf smear inoculation method, and its biological characteristics were studied in the laboratory. The results showed that three strains of pathogen with the same morphological characteristics were isolated from the diseased blueberry leaves. The LC-1 strain had dark brown colonies and white to light reddish brown hyphae. The macroconidiophore was colorless and transparent in a length of $303\sim 410\ \mu\text{m}$, with $2\sim 4$ bottle stems produced at the end of the branch. Vesicles were rod-shaped with a size of $(12\sim 30)\ \mu\text{m} \times (2\sim 5)\ \mu\text{m}$. The macroconidium were colorless, transparent, cylindrical, and semicircular at both ends, with a size of $(48\sim 82)\ \mu\text{m} \times (4\sim 7)\ \mu\text{m}$. The genes of *Act*, *H3*, *EF-1 α* and *β -tub* were used to construct the phylogenetic tree. The results showed that the tested strain LC-1 and *Calonectria colhounii* were clustered in the same branch. Blueberry leaves inoculated with strain LC-1 showed typical leaf spot symptoms. According to the morphological characteristics and phylogenetic analysis, the pathogen was identified as *Ca. colhounii*. The results of biological characteristics showed that the optimum growth temperature of *Ca. colhounii* mycelium was $25\ ^\circ\text{C}$, and the optimum pH was 7. The *Ca. colhounii* strain had the best utilization for soluble starch, and the optimum nitrogen source for *Ca. colhounii* mycelial growth was glycine.

Key words: blueberry; leaf spot disease; *Calonectria colhounii*; biological characteristics

蓝莓(*Vaccinium*)为杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*)蓝果类型植物,又名蓝浆果,是新兴的小浆果类树种.蓝莓果实营养价值高,除一般的果糖、维生素外还富含抗氧化剂、花青素和类黄酮,其独特的保健价值越来越被人们关注^[1-2].我国从2000年开始规模化种植蓝莓,截至2020年底,国内有超过20个省(区、市)开展产业化种植,栽培面积达6.64万 hm^2 ,总产量34.72万t,我国已成为全球蓝莓主产国之一^[3-4].云南省具有海拔高、紫外线强、光照充足的特点,蓝莓果实成熟期较早,甜度高,耐贮运,产区优势明显,目前已在玉溪、丽江、曲靖、大理等地建立了规模化的蓝莓种植区.近年来,随着蓝莓栽培面积的不断扩大,病害也随之传播蔓延并逐年加重,成为制约蓝莓产业健康发展的主要因素.

叶斑病是为害蓝莓较严重的病害之一,主要发生在蓝莓的营养生长期,大部分病原菌会造成果实病害,影响蓝莓的产量和质量.国外报道蓝莓叶斑病主要有两种类型,由 *Septoria albopunctata* 引起的壳针孢型,以及由 *Gloeosporium minus* 引起的炭疽型,它们都会使花芽减少,进而降低果实产量^[5].国内蓝莓叶部病害的病原鉴定结果各地不一致.徐成楠等^[6]对辽宁省部分地区疑似炭疽病的蓝莓枝条及叶片进行病原分离和鉴定,明确是由尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)和胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)复合侵染所致.余磊等^[7]报道云南蓝莓叶斑病普遍发病率为 $15\%\sim 20\%$,严重果园可达 75% 以上,其病原菌为细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*).贵州省黔东南州台江县蓝莓种植地发生的叶斑病,经鉴定病原菌为巨腔茎点霉(*Phoma macrostoma*)^[8].石凌波^[9]研究发现拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis trachicarpicola*)是引起广西桂林蓝莓叶斑病的病原菌.薛德胜等^[10]报道,山东半岛蓝莓种植基地发现的蓝莓叶斑病的病原菌为棒状拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis clavispora*).蓝莓叶部病害的症状相似度很高,病原菌种类复杂多样,其为害在国内蓝莓种植基地有加重趋势,应引起足够重视.

2019年8月,云南玉溪蓝莓种苗繁育基地首次发现蓝莓叶斑病,发病初期叶面或叶缘出现红褐色的小圆斑,随着病害的发展叶斑面积不断扩大,形成大面积的红褐色病斑,继而叶片枯萎凋落,植株枯萎死亡.据调查,“绿宝石”发病最为严重,发病率 30% 以上,有些地块甚至成片死亡,严重影响蓝莓种苗的质量.为明确该病的病原菌种类及生物学特性,本研究采用形态学特征和多基因系统发育分析对病原菌进行鉴定,通过活体叶片接种测定病原菌的致病性,同时研究病原菌的生物学特性,为蓝莓叶斑病的发生流行规

律研究和综合防治提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

2019 年 8 月在云南玉溪蓝莓种苗繁育基地采集发病植株,带回实验室并于 4 ℃ 冰箱保存,病株样品及致病性测定试验所用蓝莓品种均为“绿宝石”.

1.2 方法

1.2.1 蓝莓叶斑病病原菌的分离与形态学鉴定

选取具有典型症状的蓝莓病叶,采用组织分离法^[11]从病健交界处切取 5 mm×5 mm 的叶片,在 75% 乙醇中浸泡 3~5 s,然后置于 0.1% 升汞中浸泡 1~2 min,用无菌水冲洗 3 次,将其接种至马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)平板培养基上,置于 25 ℃ 恒温培养箱中培养 5 d,挑取菌落边缘的少量菌丝体进行转接培养. 7 d 后挑取菌丝镜检,观察到分生孢子产生后,用无菌水配制成 1×10⁵ 个/mL 的孢子悬浮液母液,将母液稀释 1×10⁴ 倍并充分混匀. 取 0.1 mL 孢子悬浮液均匀涂布在 4% 的水琼脂平板培养基上,将培养基切成 0.4 cm×0.4 cm 的小块,逐个镜检后挑取带有单个分生孢子的琼脂块置于新的 PDA 平板上,25 ℃ 条件下培养,再接种至 PDA 斜面培养基上,4 ℃ 保存备用.

病原菌的形态学鉴定参照 Lombard 等^[12]的方法,挑取菌丝置于麦芽汁琼脂(malt extract agar, MEA)培养基上,于 25 ℃ 培养 7 d,观察菌落特征. 挑取菌丝置于香石竹叶片培养基上,于 25 ℃ 条件下培养,待产孢后于光学显微镜下观察分生孢子梗及囊泡的形状. 随机选取 20 个分生孢子,观察其形态、隔膜数,测量孢子大小.

1.2.2 蓝莓叶斑病病原菌的分子生物学鉴定

按照生工生物工程(上海)股份有限公司的真菌基因组 DNA 提取试剂盒提供的方法提取菌株 DNA. 参照 Carbone 等^[13]的方法,选取肌动蛋白(actin)、组蛋白 H3(histone H3)、翻译延伸因子-1 α (translation elongation factor 1-alpha)和 β -微管蛋白(β -tubulin)4 个基因进行 PCR 扩增,扩增所用引物序列见表 1. PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Green Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上游引物和下游引物各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, 总体积 25 μ L. PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s、50 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min. 将 PCR 扩增产物送至宝生物工程(大连)有限公司测序,获得的序列在 NCBI 网站上进行同源性比对,并提交序列至 GenBank. 从 GenBank 下载相似度高的 *Act*, *H3*, *EF-1 α* 和 *β -tub* 基因序列作为参考序列(表 1),通过 MEGA7.0 自举法(Bootstrap)1 000 次重复检验,邻位相接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树并进行聚类分析.

表 1 多位点基因所用引物序列

基因片段	引物名称	引物序列(5'-3')	参考文献
<i>Act</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone & Kohn ^[13]
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
<i>H3</i>	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	Crous 等 ^[14]
	CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG	
<i>EF-1α</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG	Carbone & Kohn ^[13]
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	O'Donnell 等 ^[15]
<i>β-tub</i>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell & Cigelnik ^[16]
	CYLTUB1R	AGTTGTCTGGGACGGAAGAG	Crous 等 ^[14]

1.2.3 蓝莓叶斑病病原菌的致病性测定

采用涂抹接种法^[11]进行病原菌的致病性测定. 将供试菌株转接至 MEA 培养基, 25 ℃ 培养 10 d 后挑取菌丝镜检, 观察到分生孢子产生后, 用无菌水配制成 1×10^6 个/mL 的孢子悬浮液. 用毛笔将悬浮液涂抹至一年生盆栽蓝莓植株叶片上, 套袋保湿 48 h, 去袋后植株在 25 ℃、12 h 光照、12 h 黑暗的条件下培养, 观察叶片发病情况. 以无菌水涂抹叶片为对照, 每处理 5 株. 待叶片发病后, 根据柯赫氏法则, 对病叶进行病原分离, 观察分离菌与原接种菌的形态学特征是否一致.

1.2.4 蓝莓叶斑病病原菌的生物学特性测定

碳、氮源对病原菌菌丝生长的影响: 以 Czapek 培养基为基础培养基, 采用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、可溶性淀粉为碳源, 硝酸钠、甘氨酸、尿素、蛋白胨、硫酸铵为氮源; 用直径为 5 mm 的打孔器在活化 7 d 后的菌落边缘打取菌饼, 分别接种至含有不同碳源和氮源的培养基上, 25 ℃ 培养, 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 每处理重复 4 次.

温度对病原菌菌丝生长的影响: 取直径 5 mm 的菌饼转接至 PDA 平板培养基上, 分别置于 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ℃ 温度下培养, 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 每处理重复 4 次.

pH 值对病原菌菌丝生长的影响: 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将 PDA 培养基的 pH 值分别调至 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 用直径 5 mm 的打孔器在活化 7 d 后的菌落边缘打取菌饼, 接种于不同 pH 值的 PDA 平板中央, 置于 25 ℃ 下恒温培养, 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 每处理重复 4 次.

1.3 数据分析

采用 SPSS 2.0 进行数据统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行显著性检验.

2 结果与分析

2.1 蓝莓叶斑病的症状

发病初期叶面或叶缘出现红褐色的斑点(图 1a), 随着病害的发展, 病斑面积不断扩大, 形成连片的红褐色病斑(图 1b), 最终叶片枯萎凋落, 植株枯萎死亡.



a. 初期症状



b. 典型症状

图 1 蓝莓叶斑病症状

2.2 蓝莓叶斑病病原菌的分离和形态学鉴定

从发病蓝莓叶片上分离获得 3 个菌株, 各菌株的菌落形态及培养特性一致. 以菌株 LC-1 为供试菌株进行研究. 菌株在 MEA 培养基上 25 ℃ 培养 2 d 即可长出白色至浅红棕色的丝绒状菌落(图 2a). 菌落平伏, 边缘不整齐, 后期产生褐色至深褐色的色素渗入至培养基内部. 大分子孢子无色, 圆柱形, 两端半圆形, 有 1~3 个隔膜, 大小为 $(48 \sim 82) \mu\text{m} \times (4 \sim 7) \mu\text{m}$ (图 2b). 大型分生孢子梗无色, 有分枝, 长 $303 \sim 410 \mu\text{m}$, 顶端囊泡棍棒状, 大小为 $(12 \sim 30) \mu\text{m} \times (2 \sim 5) \mu\text{m}$ (图 2c). 分生孢子梗分枝末端产生 2~4 个瓶

梗,顶端为产孢细胞,瓶状,分生孢子从产孢细胞内生出(图 2d). 根据形态学特征,将该病原菌初步鉴定为丽赤壳菌(*Calonectria* spp.).

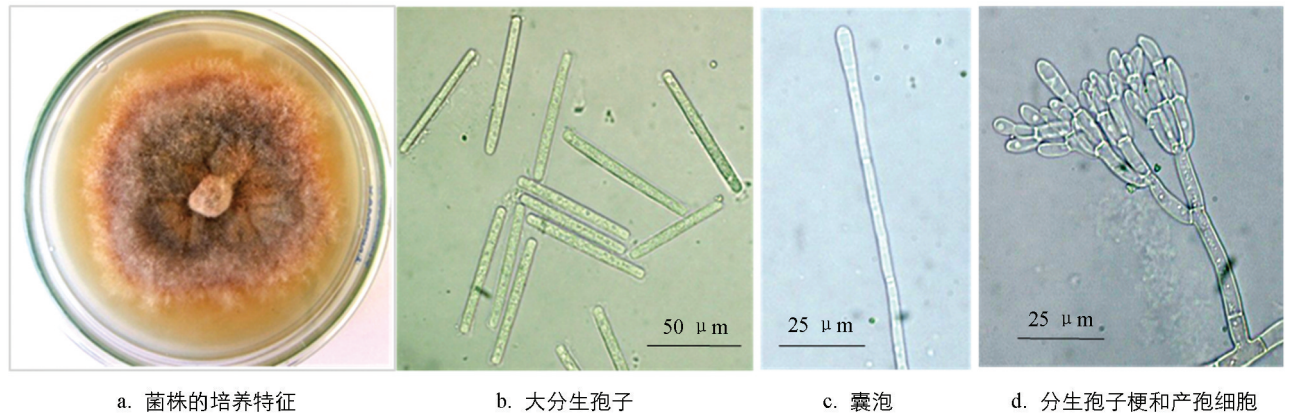


图 2 病原培养物及病原菌形态特征

2.3 蓝莓叶斑病病原菌的分子生物学鉴定

将菌株 LC-1 的 *Act*, *H3*, *EF-1α* 和 *β-tub* 基因序列提交至 NCBI/GenBank (表 2), 获得登录号 MZ872640(*Act*), MZ872641(*H3*), MZ872642(*EF-1α*), MZ872643(*β-tub*). Blast 比对结果表明, 供试菌株与柯氏丽赤壳菌(*Ca. colhounii*)的覆盖率、相似度最高. 该菌株的 *Act*, *H3*, *EF-1α* 和 *β-tub* 序列与 *Ca. colhounii* CBS 293.79 相关基因序列的同源性达 99%以上. 基于 4 个基因序列构建的系统发育树表明, 菌株 LC-1 与 *Ca. colhounii* 聚在同一分支(图 3), 结合菌株形态特征和基因序列分析, 将蓝莓叶斑病的病原菌鉴定为柯氏丽赤壳菌(*Ca. colhounii*).

表 2 系统发育分析引用的 GenBank 序列

种名	参考菌株	GenBank 登录号			
		ACT	HIS3	TEF-1α	TUB2
<i>Calonectria asiatica</i>	CBS 112711	GQ280429	AY725655	AY725702	AY725613
<i>Ca. brasiliensis</i>	CBS 230.51	GQ280502	GQ267259	GQ267328	GQ267241
<i>Ca. clavata</i>	CBS 114557	GQ280449	DQ190623	GQ267305	AF333396
<i>Ca. colhounii</i>	CBS 293.79	GQ280443	DQ190639	GQ267301	DQ190564
<i>Ca. colhounii</i>	CBS114704	GQ280442	DQ190638	GQ267300	DQ190563
<i>Ca. colombiensis</i>	CBS 112220	GQ280444	AY725662	AY725711	GQ267207
<i>Ca. hawksworthii</i>	CBS 111870	GQ280458	DQ190649	FJ918558	AF333407
<i>Ca. ilicicola</i>	CBS 190.50	GQ280483	AY725676	AY725726	AY725631
<i>Ca. ovata</i>	CBS 111299	GQ280479	GQ267253	GQ267318	GQ267212
<i>Ca. pacifica</i>	CBS109063	GQ280481	GQ267255	AY725724	GQ267213
<i>Ca. reteaudii</i>	CBS 112143	GQ280499	DQ190660	FJ918536	DQ190574
<i>Ca. rumohrae</i>	CBS114529	GQ280501	DQ190676	FJ918550	AF232873
<i>Ca. sumatrensis</i>	CBS 112829	GQ280532	AY725696	AY725733	AY725649
<i>Ca. terrae-reginae</i>	CBS112151	GQ280534	FJ918522	FJ918545	FJ918506
<i>Ca. variabilis</i>	CBS 112691	GQ280541	GQ267264	GQ267335	GQ267240

2.4 蓝莓叶斑病病原菌的致病性测定

将供试菌株 LC-1 按柯赫氏法则接种, 2 d 后叶片开始发病, 叶面产生红褐色的小圆斑(图 4a). 5 d 后病斑面积不断扩大, 形成连片的红褐色病斑, 叶片枯萎凋落(图 4b), 对照植株叶片(图 4c)未发病. 从发病叶片分离获得的病原菌与原接种菌性状一致, 表明 *Ca. colhounii* 为蓝莓叶斑病的病原菌.

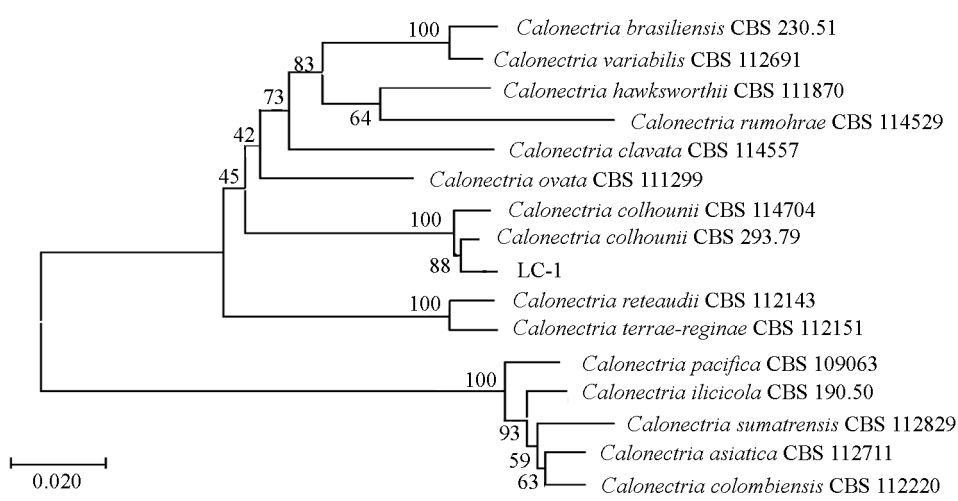


图 3 基于 *Act*, *H3*, *EF-1α* 和 β -*tub* 4 段基因建立的系统发育树



图 4 病原菌致病性测定

2.5 蓝莓叶斑病原菌的生物学特性测定

2.5.1 病原菌对碳源和氮源的利用

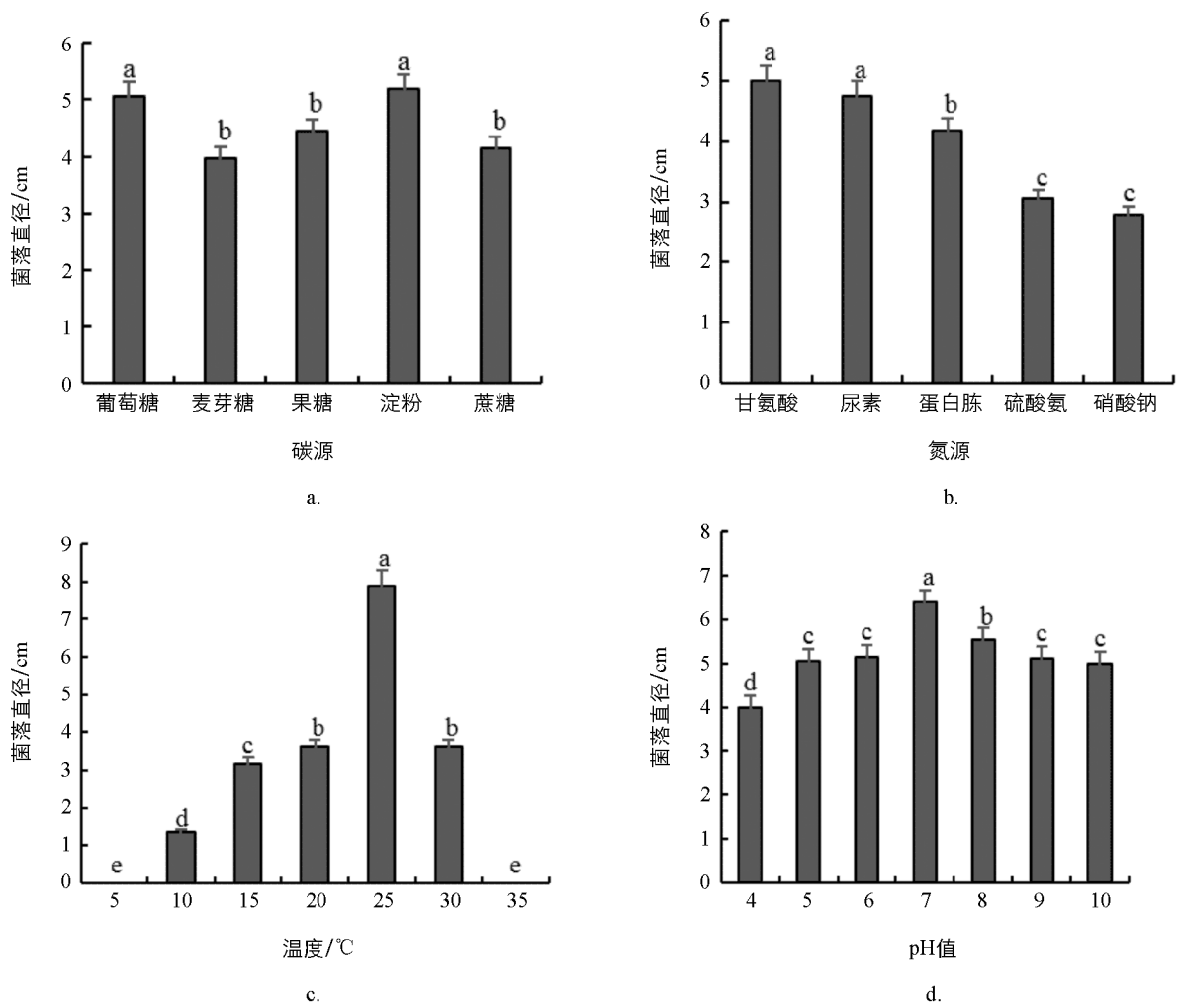
供试菌株在 5 种碳源培养基上均能生长, 对可溶性淀粉的利用效果最好, 培养 7 d 时菌落直径为 5.18 cm, 其次为葡萄糖, 两者对菌丝生长的影响差异无统计学意义(图 5a). 在氮源利用试验中, 病原菌对甘氨酸和尿素的利用较好, 菌落直径分别为 5.00 cm 和 4.76 cm, 两者对菌丝生长的影响差异无统计学意义(图 5b).

2.5.2 不同温度、pH 值对菌丝生长的影响

供试菌株在 10~30 ℃ 范围内均能生长, 最适宜温度为 25 ℃, 菌落直径为 7.90 cm; 温度为 10~20 ℃ 时菌丝生长较缓慢, 温度为 5 ℃ 和 35 ℃ 时菌丝停止生长(图 5c). 病原菌对酸碱度适应范围较广, 在 pH 值 4~10 范围内均能生长, 最适 pH 值为 7(图 5d).

3 结论与讨论

丽赤壳属(*Calonectria*)真菌是一类重要的植物病原菌, 其寄主范围广泛, 可侵染桉树、花生、大豆等农作物以及绿巨人、天南星、睡莲等园艺植物, 引起叶斑及叶片焦枯、茎干腐烂、根系或地下果实腐烂等症状, 造成巨大的经济损失^[17-20]. 丽赤壳属真菌形态学分类的重要依据是囊泡的形状, 但是囊泡形状不易区分, 因此在确定菌株种群分类时还需进一步的分子生物学鉴定, 目前结合形态学和多基因系统学鉴定该属真菌已成为发展趋势^[21-22]. Lombard 等^[12]根据形态学研究和多基因系统发育分析, 鉴定了世界范围内的 68 种丽赤壳属真菌, 建议对于未知的丽赤壳属真菌的鉴定, 可应用 *H3*, *EF-1α*, β -*tub* 3 段基因联合建树,



数据为平均数±标准差,小写字母不同表示处理间差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 5 碳氮源、温度和 pH 值对菌丝生长的影响

进行系统发育分析,从而确定其分类地位. 本研究对云南省玉溪市蓝莓种苗繁育基地发生的叶部病害进行形态学特征及 *Act*, *H3*, *EF-1 α* 和 *β -tub* 多基因系统发育分析,确定其病原菌为柯氏丽赤壳菌(*Ca. colhou-nii*),是国内首次报道. 细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)、巨腔茎点霉(*Phoma macrostoma*)、棒状拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis clavispora*)等真菌均能侵染蓝莓引起叶斑病,且引起的症状相似度很高,但与丽赤壳属真菌的亲缘关系较远. 目前已发现丽赤壳属的另外 2 个种群也可侵染蓝莓引起病害,费诺亚等^[23-24]报道湖北随州蓝莓枝枯病的病原菌为加拿大丽赤壳菌(*Ca. canadensis*)、云南曲靖蓝莓根腐病的病原菌为冬青丽赤壳菌(*Ca. ilicicola*). 该属真菌在国内蓝莓种植基地的种群分布及病害流行规律有待进一步研究.

病原菌的生物学特性与病害发生和流行规律有着密切的关系^[25]. 盖云鹏等^[26]研究结果表明,引起花生黑腐病的冬青丽赤壳在 10~30 °C 范围内均能生长,温度低于 5 °C 或高于 35 °C 时菌丝停止生长,菌丝最适生长温度为 25~28 °C;费诺亚等^[23]对加拿大丽赤壳的生物学特性研究结果表明,菌丝生长的最适温度为 25 °C,但在 5 °C 与 35 °C 条件下菌丝不能生长,这与本研究结果一致. 生物学特性研究结果表明,柯氏丽赤壳菌在 pH 值 4~10 范围内均能生长,且对供试大部分碳、氮源均可有效利用,表明该菌有较强的环境适应性. 本研究对于蓝莓叶斑病的鉴定和防治具有指导意义,为开展该病的田间流行规律研究及病害防治工作提供了理论依据.

参考文献:

[1] 杨燕林,和志娇,王朝文,等. 云南蓝莓病虫害调查及防治方法 [J]. 植物保护, 2014, 40(4): 153-156, 197.

[2] 王佳宁,赵洪海,尉莹莹,等. 蓝莓毛色二胞枝枯病的病原菌 [J]. 菌物学报, 2016, 35(6): 657-665.

[3] 李亚东,裴嘉博,陈丽,等. 2020 中国蓝莓产业年度报告 [J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(1): 1-8.

[4] 朱旭,马湫,姬江涛,等. 基于 Faster R-CNN 的蓝莓冠层果实检测识别分析 [J]. 南方农业学报, 2020, 51(6): 1493-1501.

[5] 冯璐. 越橘 *Cylindrocladium* 型叶斑病的诊断鉴定及防治 [D]. 大连: 大连理工大学, 2007.

[6] 徐成楠,王亚南,胡同乐,等. 蓝莓炭疽病病原菌鉴定及致病性测定 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(20): 3992-3998.

[7] 余磊,赵建荣,徐胜光,等. 云南蓝莓叶斑病的病原菌鉴定 [J]. 植物病理学报, 2015, 45(2): 216-219.

[8] 张国辉,刘德波,宋盛英,等. 黔东南州蓝莓叶部病害的种类调查和病原鉴定 [J]. 中国森林病虫, 2017, 36(2): 42-46.

[9] 石凌波. 蓝莓类拟盘多毛孢病菌鉴定及生物学特性研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.

[10] 薛德胜,李保华,练森,等. 蓝莓叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性 [J]. 植物保护学报, 2019, 46(2): 323-329.

[11] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[12] LOMBARD L, CROUS P W, WINGFIELD B D, et al. Phylogeny and Systematics of the Genus *Calonectria* [J]. Studies in Mycology, 2010, 66: 31-69.

[13] CARBONE I, KOHN L M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.

[14] CROUS P W, GROENEWALD J Z, RISÈDE J M, et al. *Calonectria* Species and Their *Cylindrocladium* Anamorphs: Species with Clavate Vesicles [J]. Studies in Mycology, 2006, 55: 213-226.

[15] O'DONNELL K, KISTLER H C, CIGELNIK E, et al. Multiple Evolutionary Origins of the Fungus Causing Panama Disease of Banana: Concordant Evidence from Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(5): 2044-2049.

[16] O'DONNELL K, CIGELNIK E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* are Nonorthologous [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1997, 7(1): 103-116.

[17] 庞联东,庞万伟,曾伟琼,等. 桉树焦枯病药剂防治试验 [J]. 植物检疫, 2001, 15(5): 273-275.

[18] PAN R, GUAN M, XU D, et al. *Cylindrocladium* Black Rot Caused by *Cylindrocladium* Parasiticum Newly Reported on Peanut in China [J]. Plant Pathology, 2009, 58(6): 1176.

[19] 姜子德,戚佩坤. 匙叶天南星褐腐病的检出 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 71-74.

[20] 陈帅飞,刘倩丽,李洁琼,等. 中国丽赤壳属 *Calonectria* 真菌物种及遗传多样性 [J]. 桉树科技, 2015, 32(2): 34-56.

[21] HIROOKA Y, ISHIKAWA S, TAKEUCHI J, et al. New *Cylindrocladium* Diseases of Strawberry and Coral Bells Caused by *Cylindrocladium* *Canadense* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2009, 75(1): 83-86.

[22] 殷瑜. 广州地区丽赤壳属真菌的种类鉴定 [D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2016.

[23] 费诺亚,李媛,石凌波,等. 蓝莓帚梗柱孢枝枯病病原菌鉴定及生物学特性 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(10): 2251-2255.

[24] 费诺亚. 蓝莓根腐病病原菌鉴定及生物学特性研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.

[25] 吴恩果,周瑜,朱明旗,等. 糜子丝黑穗病病原菌鉴定及其生物学特性 [J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 101-109.

[26] 盖云鹏,黄子凌,陈好好,等. 浙江省大豆红冠腐病的病原菌鉴定 [J]. 大豆科学, 2016, 35(6): 986-991.