

黑老虎叶枯病原鉴定及室内防治药剂筛选

尹 洋, 李雨荷, 席雨晴, 杨小娟, 胡盼盼, 许美容*

华南农业大学植物保护学院, 广东广州 510642

摘要: 黑老虎 [*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith] 是华南地区广泛种植的传统药用植物, 但近年来病害频发, 导致其产量和品质显著下降。本研究旨在明确黑老虎叶枯病的致病菌分类地位, 筛选有效杀菌剂, 为该病的分子诊断与田间防控提供理论支撑。采用组织分离法对广东省韶关市表现为叶尖和茎尖变褐坏死的黑老虎植株样本的病原菌进行分离, 并进一步纯化, 结合形态特征和多基因 (*ITS*、*rpb2*、*LSU* 和 *tub2*) 系统发育分析对菌株的种类进行鉴定, 利用柯赫氏法则对候选病原菌进行致病性测定, 进一步采用菌丝生长速率法测定 7 种杀菌剂对病原菌的毒力效应。结果表明: 从黑老虎病叶中分离并纯化出 1 株真菌 SGXFD, 通过致病性测定确定该菌株为黑老虎叶枯病的致病菌, 结合形态学特征和多基因联合构建的系统发育进化树分析, 将菌株 SGXFD 鉴定为 *Didymella segeticola*。室内毒力测定结果表明, 菌核净对病原菌菌丝生长的抑制作用最强, 有效中浓度 (EC_{50}) 为 1.8210 mg/L; 其次是咪鲜胺和丙环唑, EC_{50} 分别为 3.4460、3.7391 mg/L; 抑制作用相对较差的是恶醚唑、戊唑醇和代森锰锌, EC_{50} 分别为 11.3202、45.0019、51.9597 mg/L; 而多菌灵在 5 个测试浓度 (25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 mg/L) 下对该菌的抑菌率均小于 50%。本研究发现, 黑老虎叶枯病病原菌为 *D. segeticola*, 菌核净、咪鲜胺和丙环唑对该病原菌具有较强的抑制作用, 可作为黑老虎叶枯病田间防治的候选药剂。

关键词: 黑老虎; 叶枯病; 病原菌鉴定; 亚隔孢壳属; 室内药剂筛选

中图分类号: S432.1 文献标志码: A

Identification of the Pathogen Causing Leaf Blight in *Kadsura coccinea* and Screening of Effective Fungicides in Laboratory

YIN Yang, LI Yuhe, XI Yuqing, YANG Xiaojuan, HU Panpan, XU Meirong*

College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract: *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith, a traditional medicinal plant widely cultivated in South China, has experienced significant yield and quality reductions due to increasing disease incidence in recent years. This study aimed to identify the causal agent of leaf blight disease in *K. coccinea* and evaluate fungicide efficacy to establish a scientific foundation for pathogen identification and field management. Pathogens were isolated from symptomatic *K. coccinea* samples collected in Shaoguan, Guangdong and showing browning and necrosis of leaf and stem tips, using tissue isolation and purification methods. Pathogen was clarified by comprehensive identification combined morphological characterization with multi-locus phylogenetic analysis (*ITS*, *rpb2*, *LSU* and *tub2*). Pathogenicity was confirmed through Koch's postulates, while the indoor toxicity of seven fungicides to the pathogen was determined via mycelial growth inhibition assays. Isolate SGXFD, obtained from the edges of necrotic leaf tissues, was confirmed as the etiological agent through pathogenicity tests. Polyphasic identification classified the pathogen as *Didymella segeticola*. Fungicide screening revealed dimetachlone as the most effective inhibitor (EC_{50} =1.8210 mg/L), followed by prochloraz (EC_{50} =3.4460 mg/L) and propiconazole (EC_{50} =3.7391 mg/L). Moderate inhibition was observed with difenoconazole (EC_{50} =11.3202 mg/L), tebuconazole (EC_{50} =45.0019 mg/L), and mancozeb (EC_{50} =51.9597 mg/L). Carbendazim demonstrated limited efficacy (<50% inhibition) across tested concentrations (25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0 mg/L). This

收稿日期 2025-04-27; 接受日期 2025-05-14

基金项目 广东省“百千万工程”科技特派员项目 (No. KTP20240112)。

作者简介 尹 洋 (2003—), 男, 学士, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 许美容 (XU Meirong), E-mail: meirongxu@scau.edu.cn。

study establishes *D. segeticola* as the causative agent of *K. coccinea* leaf blight. Dimetachlone, prochloraz, and propiconazole exhibit significant antifungal activity against this pathogen, recommending the consideration for field application in disease management programs.

Keywords: *Kadsura coccinea*; leaf blight; pathogeny identification; *Didymella segeticola*; indoor fungicide screening

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.10.021

黑老虎 [*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith] 是我国南方特有的多年生常绿木质藤本植物, 属木兰科南五味子属, 是一种传统药用植物, 分布于广东、广西、贵州、云南等地。黑老虎主要以根或藤入药, 其味辛、微苦、性温, 可用于消肿止痛, 治胃病、风湿骨痛、跌打瘀痛、妇科病^[1-2]。现代药理学研究揭示了其丰富的生物活性, 包括但不限于抗氧化、抗肿瘤及抗炎作用^[3-6]等功效, 近年来, 黑老虎在食品、医药等领域展现出重要的应用前景^[7-9], 极具开发潜力, 其经济价值日益得到重视。我国多地开始推广黑老虎人工栽培, 随着黑老虎的种植面积逐渐扩大, 其病害问题也日益严重, 因此开展黑老虎病害病原菌的分离鉴定工作, 同时筛选有效的杀菌剂, 可为黑老虎病害的鉴定和田间防控提供理论依据, 对黑老虎产业的可持续发展具有重要意义。

目前, 黑老虎的研究主要聚焦于化学成分分析、药用价值、种质资源开发等领域^[10-12], 针对黑老虎的病害研究较少, 文献已报道的黑老虎病害有炭疽病^[13-14]、叶斑病^[15-17]、叶枯病^[18-19]、枝枯病^[19-20]等。其中, 梁忠厚等^[21]通过调查共发现虫害 18 种, 包括食叶害虫 9 种, 吸汁类害虫 7 种, 蛀干性害虫 1 种, 地下害虫 1 种, 其中食叶害虫以斜纹夜蛾为主, 吸汁类害虫以朱砂叶螨为主; 病害 4 种, 包括龙纹病、叶枯病、根腐病和叶斑病, 其中叶枯病的危害最为严重, 其次为龙纹病, 但未对引起病害的病原菌进行分离鉴定。江紫薇等^[22]通过对引起黑老虎炭疽病的病原菌的鉴定及其室内药剂毒力测定, 发现多菌灵、福美双和溴菌腈 3 种杀菌剂能够有效抑制黑老虎炭疽病的病原菌。ZHONG 等^[15]对引起黑老虎叶斑病的病原菌进行了鉴定, 最终将引起该病害的病原菌鉴定为多主棒孢霉 (*Corynespora cassiicola*)。谢津^[23]通过对广西种植园中的黑老虎病叶进行病原菌的鉴定及化学药剂的筛选, 确定了引起黑老虎轮斑病的病原菌为棒状新拟盘多毛孢 (*Neopestalotiopsis clavisporea*), 并发现所测杀菌剂中啞菌酯的室内抑菌效果虽然一般但大田防治效果最好, 可作为

该病害流行期的应急防控药剂。石春发等^[20]对黔东南地区黑老虎种植基地的黑老虎枝枯病的病原菌进行分离鉴定及其生物学特性的研究, 将引起黑老虎枝枯病的病原菌鉴定为小新壳梭孢 (*Neofusicoccum parvum*)。HU 等^[19]对广东韶关黑老虎果园中的病样进行病原菌的鉴定, 明确了镰刀菌 (*Fusarium concentricum*) 可引起黑老虎的叶枯、茎枯、花腐和果腐。当前生产实践中, 黑老虎病害诊断主要依赖表型观察, 对于病原菌种类尚未明确的病害缺乏科学用药的指导和依据。

目前对黑老虎病害的研究大多是围绕其分类、鉴定展开, 针对黑老虎病害相关防治药剂的研究较少。前期调查发现, 黑老虎叶枯病在种植区危害显著, 广东省新丰县黑老虎叶枯病的症状与现有报道存在差异, 故需明确其病原种类并筛选高效防控药剂。因此, 采用组织分离法对黑老虎叶枯病病原菌进行分离培养并进一步纯化, 通过柯赫氏法则进行致病性测定, 结合形态学观察及多基因 (*ITS*、*rpb2*、*LSU* 和 *tub2*) 联合的系统发育分析对病原菌进行鉴定, 为黑老虎的病原真菌分类提供分子证据; 基于黑老虎叶枯病的防治需求, 本研究重点评价 7 种杀菌剂对病原菌的室内毒力, 为黑老虎叶枯病的田间防治提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样采集 2023 年 5 月自广东省韶关市新丰县果园 (23°59'55"N, 113°55'13"E) 随机采集 100 片具有叶枯症状的黑老虎叶片及 50 个枯萎的茎尖样品, 每个样品采集于不同枝条。将采集的样品分别放入独立的封口袋后置于冰盒内保存, 带回实验室于 4 °C 冰箱保存供试。

1.1.2 植物材料 用于致病性测定的黑老虎健康植株由广东省农业科学院果树研究所培育, 且与 1.1.1 中果园内采集的黑老虎为同一品种。

1.1.3 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基成分为去皮马铃薯

200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 L。

1.1.4 主要试剂 E.Z.N.A[®] Fungal DNA Kit (Omega Bio-tek 公司); Premix Taq[™][宝日医生生物技术(北京)有限公司]; PCR D2000 DNA Marker (全式金生物技术有限公司); 琼脂糖 (Invitrogen 生物技术有限公司); DNase/RNase-Free Deionized Water (天根生化科技有限公司); 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 无水乙醇、异丙醇、DEPC 水(凯阁生物科技有限公司); 菌核净(上海麦克林生化科技股份有限公司); 戊唑醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 咪鲜胺(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 恶醚唑(上海麦克林生化科技股份有限公司); 丙环唑(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 代森锰锌(上海麦克林生化科技股份有限公司); 多菌灵(上海麦克林生化科技股份有限公司)。本试验所用供试药剂均属于杀菌剂原药, 剂型均为粉剂, 供试杀菌剂共 7 种。

1.1.5 主要仪器设备 SW-CJ-2FD 超净工作台(江苏精创电器股份有限公司); 通风柜(广州纬欣实验仪器设备有限公司); Sartorius1474 电子天平(上海天平仪器厂); -80 °C 医用低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司); -20 °C 冰箱(广州誉维生物科技仪器公司); 全自动高压灭菌锅 HVE-50 (Hirayama); Carl Zeiss GmbH 37081 体视显微镜(Gottingen); 双目体视镜(麦克奥迪实业集团有限公司); DK-8D 型电热恒温水槽(上海医用恒温设备厂); PAC300 型恒压恒流电泳仪(伯乐生命医学产品有限公司); Labworks[™] 凝胶成像系统(UVP); 高速冷冻离心机 Multifuge[×] 1R(赛默飞世尔科技有限公司); NanoDrop 核酸浓度测定仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 病害症状观察和描述 2023 年 5 月自广东省韶关市新丰县果园随机采集具有典型病害症状的黑老虎叶和茎, 肉眼观察其病害症状并记录。

1.2.2 病原菌的分离与纯化 采用组织分离法对采集的新鲜黑老虎病叶进行病原菌的分离^[24]: 在病健交界处用无菌刀片切取大小为 5 mm×5 mm 的组织块, 先用 75% 酒精消毒处理 10 s, 再用 3%~5% 次氯酸钠消毒处理 90 s, 然后用无菌水冲洗 3 次(60 s/次)去除表面残留的次氯酸钠, 最后置于灭菌滤纸上干燥处理后接种至 PDA 培养基上, 每个 PDA 平板上接种 4~5 个组织块, 置于

28 °C 培箱中培养^[25]。经 2~3 次纯化后, 最终获得纯培养的菌株。将纯化后的菌株接种于 PDA 斜面培养基上, 于 4 °C 条件下保存备用。

1.2.3 致病性测定 病原菌致病性测定遵循柯赫氏法则。参照石春发等^[20]的方法, 选取健康幼嫩的黑老虎叶片和茎, 用 75% 乙醇擦拭叶片和茎的表面进行消毒, 再用无菌水冲洗干净。使用针刺法将病原菌接种至黑老虎幼嫩的叶片和枝条上, 以针刺但不接种病原菌的作为对照, 分别为 CK₁ 和 CK₂, 在 28 °C 条件下进行保湿培养, 定期观察并记录发病情况。待接种叶片和茎发病后, 随机挑取发病黑老虎叶片和茎病健交界处的组织块再次进行分离、纯化和鉴定, 完成柯赫氏法则验证。

1.2.4 病原菌形态学鉴定 将 1.2.2 中分离纯化的菌株接种于 PDA 培养基上, 置于 28 °C 培养箱中培养 7 d, 观察 PDA 培养基上菌落的形态特征并在双目体视镜下观察菌落上是否有产孢结构。在显微镜下观察产孢结构和分生孢子的形态特征^[26-29], 对病原菌进行形态学观察。随机选取 20 个产孢结构和 30 个分生孢子, 测量其大小并记录其形态特征。

1.2.5 病原菌分子生物学鉴定 从 PDA 平板上刮取适量菌丝, 根据 Fungal DNA Kit 试剂盒的说明书提取真菌 DNA, 使用引物 ITS1/ITS4、LROR/LR7、Btub2Fd/Btub4Rd、RPB2-5F2/fRPB2-7cR 对所提取真菌 DNA 的 *ITS*、*rpb2*、*LSU*、*tub2* 基因片段进行 PCR 扩增^[30-33](表 1), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系: 体系共 20 μL, DNA 模板 1 μL、Premix Taq[™] 10 μL、上下游引物各 0.5 μL、ddH₂O 8 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增阳性产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后(5 μL/孔), 选取目标条带清晰的样本回收后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。用 DNAMAN 软件将测得的序列进行拼接获得完整的序列, 将拼接的完整序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析, 从 GenBank 数据库中下载与该序列相似度较高的近缘种及其外群的 *ITS*、*rpb2*、*LSU* 和 *tub2* 基因序列, 将其与下载的参考序列依次按照 *ITS*、*rpb2*、*LSU* 和 *tub2* 的顺序进行拼接, 利用 MEGA-X 软件

表 1 试验所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in this experiment

| 基因 Gene | 引物名称 Primer | 引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3') |
|------------|----------------|---|
| ITS | ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG |
| | ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC |
| rpb2 | RPB2-5F2 | GATGATCGTGATCATTTCGG |
| | rRPB2-7cR | CCCATAGCTTGCTTACCCAT |
| LSU | LROR | ACCCGCTGAACTTAAGC |
| | LR7 | TACTACCACCAAGATCT |
| tub2 | Btub2Fd | GTAACACCTTCAGACCGGTCAATG |
| | Btub4Rd | CCAGATTGGCCGAATACGAAGTTGTC |

基于最大似然法对上述 4 个基因的联合序列进行系统发育树的构建, Bootstrap 重复次数为 1000 次。
1.2.6 不同杀菌剂对黑老虎叶斑病原菌的室内毒力测定 采用菌丝生长速率法测定 7 种杀菌剂对黑老虎叶斑病原菌的室内毒力^[34-35], 供试杀

菌剂的浓度设置参照黄宇^[36]的方法。在预试验的基础上, 选择各杀菌剂对该病原菌菌丝的生长有明显抑制作用的浓度范围^[37], 将 7 种杀菌剂按比例稀释到不同质量浓度 (表 2), 分别加入至已灭菌的 PDA 培养基 (冷却至 60 °C) 中, 充分混匀后倒入培养皿中, 用灭菌打孔器于培养 7 d 且生长状况良好的菌落边缘打取直径为 7.0 mm 的菌饼, 然后将菌饼菌丝面朝下接种至 PDA 平板的中央, 以接种菌饼但不含药剂的 PDA 平板作为空白对照, 每个处理 3 次重复。置于 28 °C 条件下培养 5 d 左右, 待对照菌落直径长至培养皿 2/3 直径时, 采用十字交叉法测量各处理组及对照菌落直径, 并计算不同浓度下各杀菌剂对病原菌菌丝生长抑制率。计算公式为: 菌丝生长抑制率= [1-(处理组菌落直径-菌饼直径)/(对照组菌落直径-菌饼直径)]×100%。

表 2 供试杀菌剂及浓度设置
Tab. 2 Tested fungicides and concentration settings

| 药剂 Fungicide | 含量 Content | 浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹) | | | | | |
|---------------------|---------------|--|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 菌核净 (dimetachlone) | 90% | 0 | 0.31 | 0.63 | 1.25 | 2.50 | 5.00 |
| 戊唑醇 (tebuconazole) | 97% | 0 | 4.00 | 8.00 | 16.00 | 32.00 | 64.00 |
| 咪鲜胺 (prochloraz) | 98% | 0 | 0.25 | 0.50 | 1.00 | 2.00 | 4.00 |
| 恶醚唑 (difenoconazo) | ≥95% | 0 | 0.16 | 0.31 | 0.63 | 1.25 | 2.50 |
| 丙环唑 (propiconazole) | 97% | 0 | 0.31 | 0.63 | 1.25 | 2.50 | 5.00 |
| 代森锰锌 (mancozeb) | 90% | 0 | 12.50 | 25.00 | 50.00 | 75.00 | 100.00 |
| 多菌灵 (carbendazim) | 98% | 0 | 25.00 | 50.00 | 100.00 | 200.00 | 400.00 |

1.3 数据处理

利用 Microsoft Excel 21 和 IBM SPSS Statistics 25 软件对数据进行统计分析, 以药剂浓度的对数值为自变量, 菌丝生长抑制率为因变量进行回归分析, 得到杀菌剂独立回归方程、EC₅₀ 值、决定系数 (R²) 和卡方值 (χ²)。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与致病性测定

本研究于 2023 年 5 月从广东省韶关市新丰县果园的黑老虎植株上观察到叶片和茎均可见病斑。除 HU 等^[19]所述的镰孢菌造成的症状外, 多表现为叶尖大面积枯萎坏死, 从叶边缘至叶中脉形成“V”型坏死斑, 坏死组织上可见深浅不一的纹路 (图 1A, 该症状占有发病叶片的 36%)。

发病初期叶尖出现水渍状病斑, 而后逐渐沿叶柄端快速扩展, 中脉处的叶枯症状扩展速度较快, 病变部位失水, 迅速由绿色转为黄褐色, 直至大块枯萎和坏死。从上述症状的 20 片叶片和 20 个茎的病健交界处组织中分离、纯化病原, 100 个叶片组织块和 40 个茎组织块中分别获得 61 个和 18 个形态一致的菌株。收集保存其中 7 株菌株, 分别命名为 SGXF1、SGXF2、SGXF3、SGXF4、SGXF5、SGXF6 和 SGXFD。采用针刺法对 7 株菌株进行致病性测定发现, 从叶片上分离的菌株均能够引起黑老虎植株叶片和茎发生病变, 其中菌株 SGXFD 的致病力最强, 因此选取菌株 SGXFD 进行后续研究。接种 SGXFD 菌株的叶片从伤口处迅速产生湿润的黑褐色病斑, 接种 3 d 后, 病变部位扩大至半个叶片, 由内而外病斑颜

色从黑色至黄褐色, 叶片萎蔫坏死并皱缩、畸形 (图 1B), 同时黑褐色病变部位有黑色小粒点和白色的菌丝, 而 CK₁ 处理的叶片未发病 (图 1C)。果园的黑老虎植株上观察到枝条末端的黑褐色坏死部略微凹陷、病健交界处可见缢缩, 黑色病变区域随后逐渐扩大形成坏死的黑色枯枝 (图 1D)。接种菌株 SGXFD 的茎从伤口处开始变黑, 随后

黑色病斑逐渐向茎的顶端扩展, 接种 5 d 后, 接种点上部的茎全部坏死, 在病变部位有少量的白色菌丝状物产生 (图 1E), CK₂ 处理的茎亦未见病变 (图 1F)。对接种这 7 株菌株后发病的叶片和茎进行再分离, 均可获得与接种菌株形态学特征一致的菌落, 根据柯赫式法则, 确定这些菌株是危害黑老虎的病原菌。



A: 田间发病叶片; B: 接种菌株 SGXFD 3 d 后的叶片; C: 空白接种的叶片 (CK₁); D: 田间发病嫩茎;
E: 接种菌株 SGXFD 5 d 后的茎; F: 空白接种的茎 (CK₂)。

A: Naturally infected leaves in the field; B: Leaf after 3 days post-inoculation with strain SGXFD; C: Blank inoculation on leaf (CK₁); D: Naturally infected young stems in the field; E: Stem after 5 days post-inoculation with strain SGXFD; F: Blank inoculation on stem (CK₂).

图 1 黑老虎的田间发病症状及分离菌株 SGXFD 的致病性测定

Fig. 1 Field symptoms of *K. coccinea* leaf and shoots and pathogenicity assay of isolated strain SGXFD

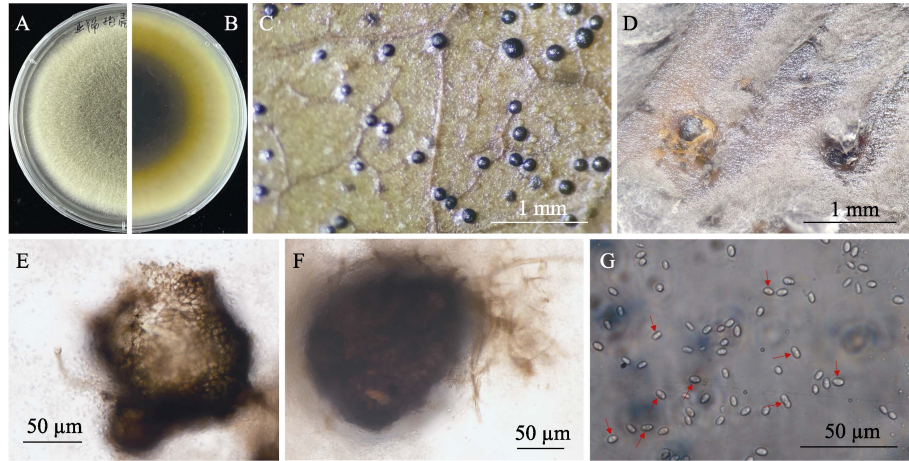
2.2 病原菌形态学观察

菌株 SGXFD 的菌落在 PDA 培养基上最初呈蓬松的白色绒毛状, 边缘整齐, 菌落呈圆形, 气生菌丝发达, 菌落颜色逐渐由白色变成灰绿色, 中央颜色逐渐变深, 生长 7 d 后, 菌落正面呈灰绿色绒毛状, 背面中央呈黑色, 高度为 5~8 mm (图 2A 和图 2B)。分生孢子器生于接种处理的黑老虎叶片表皮或半埋于表皮下 (图 2C); 病原菌经较长时间培养后 (超过 14 d), 亦可产生分生孢子器 (图 2D)。分生孢子器呈黑褐色, 球形或近球形, 有乳突, 具

孔口, 单生或聚生, 分生孢子器由 2~3 层拟薄壁细胞构成, 初期呈浅褐色, 后期变为深褐色, 大小为 (109.33~166.75) μm ×(122.42~172.37) μm (平均 141.06 μm ×154.35 μm , $n=20$), 分生孢子器被压破后可见分生孢子从中溢出 (图 2E, 图 2F)。分生孢子呈椭圆形或卵形, 无色透明, 光滑、无隔膜, 具有 0~3 个油球, 大小为 (3.98~6.99) μm ×(2.06~2.95) μm (平均 4.89 μm ×2.48 μm , $n=30$) (图 2G)。

2.3 病原菌分子生物学鉴定

对 SGXFD 的 *ITS*、*rpb2*、*LSU* 和 *tub2* 基因进



A 和 B: PDA 培养基的菌落正面 (A) 和反面 (B) 的形态; C: 接种病原菌至黑老虎叶片上产生的分生孢子器; D: PDA 培养基上的分生孢子器; E 和 F: 显微镜下观察到的分生孢子器 (E 为纵切面, F 为表面视图); G: 显微镜下观察到的分生孢子。
A and B: The obverse view (A) and reverse view (B) of colony morphology on PDA medium; C: Pycnidia produced on inoculated *K. coccinea* leaves; D: Pycnidia formation on PDA medium; E and F: Microscopic observation of pycnidia (E is longitudinal section, F is surface view); G: Conidia observed under light microscopy.

图 2 目标病原菌的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of fungal pathogen isolated from *K. coccinea*

行扩增与测序,获得的序列长度分别为 535、1097、1322、386 bp, 将其分别提交至 GenBank 中, 获得的基因序列登录号分别为 PP783558、PQ058291、PQ084643、PQ106577。在 NCBI 数据库中进行同源性比对, 下载与其相似性较高的序列及其近缘

属的序列, 使用 MEGAX 软件中最大似然法构建的系统发育树, 结果显示, SGXFD 与 *Didymella segeticola* 聚为 1 个进化支 (图 3), 且支持率为 97%。结合形态学特征和分子鉴定结果, 最终将危害黑老虎的病原菌鉴定为 *D. segeticola*。

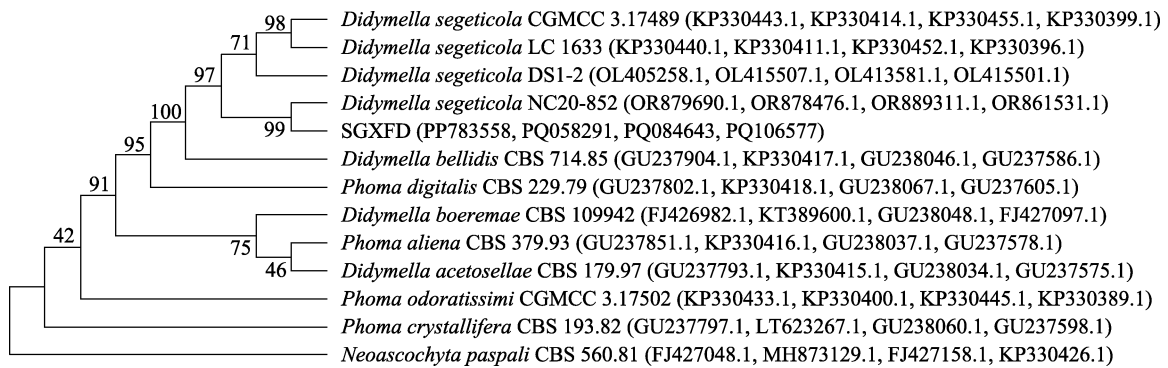


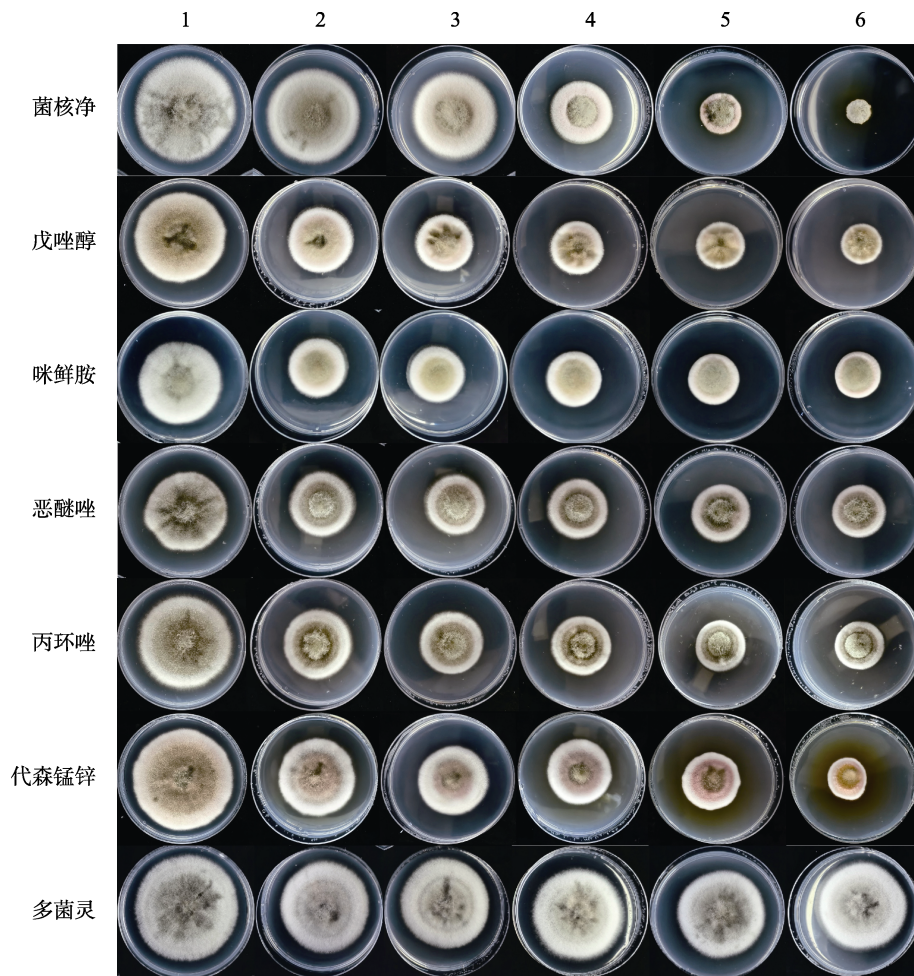
图 3 基于 ITS、rpb2、LSU 和 tub2 基因构建的菌株 SGXFD 系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain SGXFD based on ITS, rpb2, LSU and tub2 genes

2.4 不同杀菌剂对黑老虎叶斑病病原菌的室内毒力测定结果

将 7 种杀菌剂按比例稀释至不同质量浓度后进行毒力测定 (图 4)。7 种杀菌剂对黑老虎病原菌 SGXFD 的室内毒力测试数据显示, 除多菌灵外, 其余 6 种杀菌剂均表现出不同程度的抑菌作用 (图 4 和表 3)。多菌灵在最高浓度时表现出微弱的抑制效果 (抑制率未达 50%), 低浓度时也无明显抑制作用, 因此未计算其毒力回归方程及

EC₅₀。供试杀菌剂中菌核净、咪鲜胺和丙环唑的抑制效果均较为明显, EC₅₀ 值分别为 1.8210、3.4460、3.7391 mg/L, 均小于 5.0000 mg/L, 说明黑老虎病原菌 SGXFD 对这几种杀菌剂较敏感; 而戊唑醇、恶醚唑和代森锰锌对黑老虎病原菌 SGXFD 的 EC₅₀ 均大于 10.0000 mg/L, 说明该病原菌对这几种杀菌剂的敏感性均较差。7 种杀菌剂中抑制作用最强的为菌核净, EC₅₀ 值为 1.8210 mg/L。7 种杀菌剂对黑老虎病原菌 SGXFD



菌核净, 1~6 表示浓度依次为 0、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 mg/L; 戊唑醇, 1~6 表示浓度依次为 0、4.00、8.00、16.00、32.00、64.00 mg/L; 咪鲜胺, 1~6 表示浓度依次为 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/L; 恶醚唑, 1~6 表示浓度依次为 0、0.16、0.31、0.63、1.25、2.50 mg/L; 丙环唑, 1~6 表示浓度依次为 0、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 mg/L; 代森锰锌, 1~6 表示浓度依次为 0、12.50、25.00、50.00、75.00、100.00 mg/L; 多菌灵, 1~6 表示浓度依次为 0、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00 mg/L。
 Dimetachlone, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 mg/L; Tebuconazole, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 4.00, 8.00, 16.00, 32.00, 64.00 mg/L; Prochloraz, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/L; Difenconazo, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50 mg/L; Propico, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 mg/L; Mancozeb, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 12.50, 25.00, 50.00, 75.00, 100.00 mg/L; Carbendazim, 1-6 indicates the concentration in the order of 0, 25.00, 50.00, 100.00, 200.00, 400.00 mg/L.

图 4 不同杀菌剂对黑老虎病原菌 SGXFD 的室内毒力测定结果
 Fig. 4 Inhibition effect of different fungicides on strain SGXFD

表 3 7 种杀菌剂对菌株 SGXFD 的室内毒力测定
 Tab. 3 Indoor toxicity measurement on 7 fungicides to strain SGXFD

| 药剂 Fungicide | 毒力回归方程 Toxicity regression equation | 决定系数 R^2 | 有效中浓度 (95%置信区间) EC_{50} (95%FL)/(mg·L ⁻¹) | 斜率±标准误 Slope±standard error | 卡方值 (自由度) χ^2 (df) |
|-----------------|--|---------------|--|--------------------------------|----------------------------|
| 菌核净 | $Y=2.2813X-0.5939$ | 0.972 | 1.8210 (1.6843~1.9715) | 2.2813±0.1183 | 10.463 (13) |
| 戊唑醇 | $Y=0.7430X-1.2283$ | 0.939 | 45.0019 (34.9435~63.3931) | 0.7430±0.0800 | 5.412 (13) |
| 咪鲜胺 | $Y=0.4542X-0.2440$ | 0.968 | 3.4460 (2.2649~7.1145) | 0.4542±0.0777 | 1.139 (13) |
| 恶醚唑 | $Y=0.3676X-0.3874$ | 0.845 | 11.3202 (4.5142~100.7793) | 0.3676±0.0801 | 3.901 (13) |
| 丙环唑 | $Y=0.7807X-0.4472$ | 0.921 | 3.7391 (2.9146~5.2299) | 0.7807±0.0806 | 8.357 (13) |
| 代森锰锌 | $Y=1.1966X-2.0530$ | 0.910 | 51.9597 (45.8002~59.6307) | 1.1966±0.1051 | 14.319 (13) |

的抑制效果排序依次为菌核净>咪鲜胺>丙环唑>恶醚唑>戊唑醇>代森锰锌>多菌灵。以上结果表明, 菌核净、咪鲜胺和丙环唑在理论上可作为防治黑老虎叶枯病原菌 SGXFD 的候选杀菌剂。

3 讨论

亚隔孢壳属 (*Didymella*) 真菌寄主范围广, 可引起多种植物病害的发生, 症状通常表现为叶部和茎部的病斑并产生分生孢子器^[38]。已有研究表明, 病原菌 *D. segeticola* 可引起多种植物的病害, CHEN 等^[39]于 2015 年首次从刺儿菜 (*Cirsium segetum*) 叶片分离得到真菌 *Phoma segeticola*, 2017 年被重新修订为 *D. segeticola*^[40], 2016 年赵晓珍等^[41]从茶树 (*Camellia sinensis*) 上分离到病原菌 *D. segeticola*, 2019 年 GUO 等^[42]从烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 叶上分离到病原菌 *D. segeticola*, 2021 年 AN 等^[43]从缙丝花 (*Rosa roxburghii*) 叶片上也分离到了病原菌 *D. segeticola*。本研究首次确定黑老虎 (*K. coccinea*) 是病原菌 *D. segeticola* 的寄主, 扩展了该菌的寄主范围。黑老虎具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗肝纤维化等作用, 其活性成分 (如木脂素类、三萜类化合物) 具有重要的潜在药用价值^[44], 但在黑老虎规模化种植过程中, 时常受到多种病原菌的侵染, 致使黑老虎的产量及药用价值显著下降, 因此及时有效地防治引起黑老虎病害的病原菌对于黑老虎的产量和品质至关重要。

化学杀菌剂是目前防治 *Didymella* 属病原真菌的主要手段。本研究筛选出菌核净、咪鲜胺和丙环唑 3 种杀菌剂对黑老虎病原菌 SGXFD 具有较好的抑制效果, 可作为防治此病害的候选药剂, 但不推荐使用多菌灵防治该病害。其中, 菌核净是一种二甲酰亚胺类的保护性杀菌剂, 具有广谱、高效、内吸性、低残留、持效期长等特点, 对水稻纹枯病^[45]、油菜菌核病^[46]、烟草赤星病^[47]等均有较好的防治效果, 二甲酰亚胺类杀菌剂主要作用位点被认为可能是渗透感应信号通路中的双组分组氨酸激酶 (histidine kinase, HK), 也可能是与 HK 相关的其他分子^[48-49], 本研究中菌核净的抑菌效果最为明显, 可能与该类杀菌剂对病原菌 *D. segeticola* 的 HK 相关作用位点的结合能力较强有关; 咪鲜胺属于咪唑类杀菌剂, 可通过抑制麦角甾醇生物合成关键酶 CYP51 的活性, 阻碍麦角

甾醇的合成, 破坏细胞膜的结构, 同时使麦角甾醇毒性前体物质在细胞中不断累积, 从而达到抑菌目的^[50], 该杀菌剂能有效防治由子囊菌和半知菌引起的多种作物病害^[51], 可用于防治油菜菌核病^[52]、水稻恶苗病^[53]、花生褐斑病^[54]等病害; 丙环唑是一种三唑类的保护性杀菌剂, 其通过抑制 C₁₄ 位上的 α -脱甲基反应, 阻断麦角甾醇合成并积累毒性中间体, 破坏细胞膜功能, 从而发挥抑菌作用^[55-56], 具有广谱、活性强、内吸性强、持续时间长等特点, 可防治由担子菌、子囊菌及半知菌三大亚门真菌所引起的病害^[57-58], 例如水稻纹枯病^[59]、小麦赤霉病^[60]、香蕉叶斑病^[61]等。多菌灵属于苯并咪唑类杀菌剂 (MBCs), 该类杀菌剂通过与 β -微管蛋白特异性结合, 阻碍微管的组装, 破坏纺锤体的形成, 进而抑制病原菌的有丝分裂^[62]。本研究中多菌灵对黑老虎病原菌 SGXFD 的抑制效果不明显, 可能与多菌灵的单一作用于 β -微管蛋白及病原菌 β -微管蛋白基因发生突变导致抗性产生有关。黄宇^[36]测定 8 种杀菌剂对烟草病原菌 *D. segeticola* 的室内毒力, 结果表明菌核净、咪鲜胺和丙环唑对该病原菌均有较强的抑制效果; 刘佳奇^[63]测定了 5 种不同类型的杀菌剂对披碱草 6 株亚隔孢壳科病原菌的室内毒力, 结果显示, 对这 6 株亚隔孢壳科病原菌毒力最强的杀菌剂均为 30% 苯甲·丙环唑, 以上研究结果与本研究得出的结果相似。本研究采用菌丝生长速率法测定不同杀菌剂对黑老虎病原菌 *D. segeticola* 的室内毒力, 为提高黑老虎的产量和品质奠定一定的基础, 但室内的环境与外界田间环境存在较大差异, 后续研究中应进一步在田间测定菌核净、咪鲜胺和丙环唑的药效, 同时预测其抗药性风险, 为黑老虎病害的防治提供理论依据。

4 结论

通过形态学和多基因联合系统发育分析, 确定引起广东省黑老虎叶枯病原菌为 *D. segeticola*, 首次报道其侵染黑老虎。室内毒力测定表明, 菌核净、咪鲜胺和丙环唑对病原菌抑制效果显著, 可作为防治黑老虎叶枯病的候选药剂; 而多菌灵抑制率低于 50%, 不推荐使用该药剂进行防治。研究结果为黑老虎叶枯病的科学诊断及田间防控提供了理论依据, 但需进一步验证田间药效及监测抗药性风险。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1996. (in Chinese)
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
Editorial Committee of Chinese Materia Medica, National administration of traditional Chinese medicine. Chinese materia medica[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999. (in Chinese)
- [3] BAN N K, THANH B V, KIEM P V, MINH C V, CUONG N X, NHIEM N X, HUONG H T, ANH H T, PARK E J, SOHN D H, KIM Y H. Dibenzocyclooctadiene lignans and lanostane derivatives from the roots of *Kadsura coccinea* and their protective effects on primary rat hepatocyte injury induced by t-butyl hydroperoxide[J]. *Planta Medica*, 2009, 75(11): 1253-1257.
- [4] LIU Y B, YANG Y P, TASNEEM S, HUSSAIN N, DANİYAL M, YUAN H W, XIE Q L, LIU B, SUN J, JIAN Y Q, LI B, CHEN S H, WANG W. Lignans from *Tujia* ethnomedicine HeilaoHu: chemical characterization and evaluation of their cytotoxicity and antioxidant activities[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2147.
- [5] YANG Y P, LIU Y B, DANİYAL M, YU H H, XIE Q L, LI B, JIAN Y Q, MAN R Y, WANG S H, ZHOU X L, LIU B, WANG W. New lignans from roots of *Kadsura coccinea*[J]. *Fitoterapia*, 2019, 139: 104368.
- [6] 陆俊, 刘如如, 赵雪萌, 张欣悦, 邱建成, 龚莎娜. 黑老虎活性成分及生理活性研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(2): 219-224.
LU J, LIU R R, ZHAO X M, ZHANG X Y, QIU J C, GONG S N. Research progress of active constituents and physiological activity of *Kadsura coccinea*[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(2): 219-224. (in Chinese)
- [7] SRITALAHAREUTHAI V, TEMVIRIYANUKUL P, ON-NOM N, CHAROENKIATKUL S, SUTTISANSANEE U. Phenolic profiles, antioxidant, and inhibitory activities of *Kadsura heteroclita* (Roxb.) Craib and *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Sm[J]. *Foods*, 2020, 9(9): 17.
- [8] 王丽军, 廖苏奇, 梁洁, 龙海荣, 夏祥华, 陈乾平, 韦树根. 黑老虎种子的营养成分分析及评价[J]. *中国油脂*, 2021, 46(12): 112-117.
WANG L J, LIAO S Q, LIANG J, LONG H R, XIA X H, CHEN Q P, WEI S G. Analysis and evaluation of nutritional components of *Kadsura coccinea* seeds[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(12): 112-117. (in Chinese)
- [9] 苏维, 王欣悦, 付港, 陈武贤, 申湘茹, 李斌, 王炜. 南五味子属植物的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(1): 26-38.
SU W, WANG X Y, FU G, CHEN W X, SHEN X R, LI B, WANG W. Research progress on chemical constituents from *Kadsura* genus and its pharmacological activities and clinical application[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2024, 49(1): 26-38. (in Chinese)
- [10] 邓白罗, 谢碧霞, 张程. 中国南五味子属植物的种质资源及开发利用[J]. *中南林业科技大学学报*, 2008, 28(6): 90-94.
DENG B L, XIE B X, ZHANG C. Germplasm resources of *Kadsura* and their utilization in China[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2008, 28(6): 90-94. (in Chinese)
- [11] 李力, 汤立洁, 徐永莉, 闫志刚. 近十年黑老虎的化学成分及功能作用研究进展[J]. *中药材*, 2020, 43(1): 236-242.
LI L, TANG L J, XU Y L, YAN Z G. Progress of research on chemical composition and functional effects of *Kadsura coccinea* over the past decade[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2020, 43(1): 236-242. (in Chinese)
- [12] 徐亮. 黑老虎的质量标准研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
XU L. Study on the quality standards of *Kadsura coccinea*[D]. Suzhou: Soochow University, 2016. (in Chinese)
- [13] JIANG G H, JIANG A M, FAN C L, WEI J G, REN L Y, LUO J T. First report of anthracnose on *Kadsura coccinea* caused by *Colletotrichum siamense* in China[J]. *Plant Disease*, 2021, 106(1): 328.
- [14] JIANG G H, JIANG A M, FAN C L, WEI J G, REN L Y, LUO J T. First report of anthracnose on *Kadsura coccinea* caused by *Colletotrichum fructicola* in China[J]. *Plant Disease*, 2022, 106(6): 1757.
- [15] ZHONG J, WANG Y, LI C X, CHEN J, HE A G, GAO B D. First report of *Corynespora cassicola* causing leaf spot on *Kadsura coccinea* in China[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(2): 366.
- [16] SU D, ZHANG W H, SUN R, ZHANG Z T, LYU G Z. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing leaf spot on *Kadsura coccinea* in China[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(9): 2714.
- [17] JIANG G H, JIANG A M, HOU J G, FAN C L, WEI J G, REN L Y, LUO J T. First report of leaf spot caused by *Lasiodiplodia theobromae* on *Kadsura coccinea* in China[J]. *Plant Disease*, 2023, 107(7): 2218.
- [18] FAN H Y, CHEN W M, HUANG Y C, ZENG Q Q, HUANG Y. First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf blight on *Kadsura coccinea* in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(12): 3258.

- [19] HU P P, XI Y Q, LI Y H, YIN Y, XU C B, DENG X L, XU M R. First report of *Fusarium concentricum* causing leaf blight, shoot blight, and flower and fruit rot on *Kadsura coccinea* in China[J]. Plant Disease, 2025, 109(3): 713.
- [20] 石春发, 陶光林, 胡岑龙, 杨东红, 郝磊, 张喜. 黑老虎枝枯病原鉴定及其生物学特性[J]. 植物病理学报, 2019, 49(6): 866-870.
SHI C F, TAO G L, HU C L, YANG D H, HAO L, ZHANG X. Identification and characterization of causal organism of *Kadsura coccinea* twig blight[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, 49(6): 866-870. (in Chinese)
- [21] 梁忠厚, 李静纳. 药用植物黑老虎主要病虫害调查[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(34): 138-140.
LIANG Z H, LI J N. Investigation on the main diseases and pests of the medicinal plant *Kadsura coccinea*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(34): 138-140. (in Chinese)
- [22] 江紫薇, 陈选鹏, 马恩耀, 周劲松, 冯冲, 陈玉娥, 周淑瑶, 黄海波. 广东黑老虎炭疽病病原鉴定、生物学特性及其室内药剂毒力检测[J]. 西南农业学报, 2024, 37(7): 1504-1512.
JIANG Z W, CHEN X P, MA E Y, ZHOU J S, FENG C, CHEN Y E, ZHOU S Y, HUANG H B. Pathogen identification of *Kadsura coccinea* anthracnose and indoor toxicity measurement of fungicides[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2024, 37(7): 1504-1512. (in Chinese)
- [23] 谢津. 黑老虎轮斑病的病原鉴定和毒素成分分析及病害防治研究[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
XIE J. Pathogen identification, toxin analysis of the pathogen and control test of ring spot of *Kadsura coccinea*[D]. Nanjing: Guangxi University, 2020. (in Chinese)
- [24] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
FANG Z D. Research methods of plant diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998. (in Chinese)
- [25] 安宣鲜, 桑维钧, 卢燕回, 孔菲, 王五权, 李昊熙, 杨江敏, 彭丽娟, 杨茂发. 烟草叶斑病病原菌 *Epicoccum laticollum* 的鉴定、生物学特性及室内药剂筛选[J]. 热带作物学报, 2022, 43(12): 2534-2544.
AN X X, SANG W J, LU Y H, KONG F, WANG W Q, LI H X, YANG J M, PENG L J, YANG M F. Identification, biological characteristics and fungicide screening of tobacco leaf spot disease pathogen *Epicoccum laticollum*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(12): 2534-2544. (in Chinese)
- [26] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
WEI J C. Handbook of fungal identification[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979. (in Chinese)
- [27] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
LU J Y. Phytopathogenic mycology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001. (in Chinese)
- [28] BOEREMA G H, GRUYTER J D, NOORDELOOS M E, HAMERS M E C. *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2004.
- [29] 陈倩. 亚隔孢壳科的系统演化及分类学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
CHEN Q. Phylogenetic and taxonomic studies on Didymellaceae[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [30] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press, 1990: 315-322.
- [31] 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(12): 1799-1808.
- [32] REHNER S A, SAMUELS G J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences[J]. Mycological Research, 1994, 98(6): 625-634.
- [33] WOUDEBERG J H C, AVESKAMP M M, DE GRUYTER J, SPIERS A G, CROUS P W. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype[J]. Persoonia, 2009, 22(1): 56-62.
- [34] 黄琳钰, 彭辉, 姜万龙, 叶子弘, 汤近天, 杨梦飞, 李怡鹏, 张雅芬, 林水娟. 茭白叶斑病病原高粱拟球菌的鉴定及防治药剂筛选[J]. 植物病理学报, 2024, 54(5): 1029-1035.
HUANG L Y, PENG H, JIANG W L, YE Z H, TANG J T, YANG M F, LI Y P, ZHANG Y F, LIN S J. Identification of pathogenic fungus *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot of *Zizania latifolia* and laboratory screening of its sensitive chemical agents[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2024, 54(5): 1029-1035. (in Chinese)
- [35] 江艳. 烟草茎点病菌的生物学特性及室内药剂筛选[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
JIANG Y. Biological characteristics of the pathogen and fungicides screening in laboratory for tobacco black spot stalk[D]. Guiyang: Guizhou University, 2018. (in Chinese)
- [36] 黄宇. 烟草 *Didymella segeticola* 病害病原学及叶际微生物多样性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.

- HUANG Y. Studies on the etiology of tobacco disease caused by *Didymella segeticola* and its phyllosphere microbial diversity[D]. Guiyang: Guizhou University, 2021. (in Chinese)
- [37] 林接英, 吴浩芳, 麦章龙, 张云霞. 澳洲石斛疫病原菌的鉴定及其杀菌剂毒力测定[J]. 热带作物学报, 2024, 45(3): 614-621.
- LIN J Y, WU H F, MAI Z L, ZHANG Y X. Pathogen identification and fungicide toxicity test of *Phytophthora* blight in *Dendrobium kingianum*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(3): 614-621. (in Chinese)
- [38] 占浩鑫, 杨一帆, 宋婉婷, HSIANG T, 刘丽萍, 高洁. 亚隔孢壳属 *Didymella* 真菌研究进展[J]. 菌物研究, 2024, 22(3): 207-225.
- ZHAN H X, YANG Y F, SONG W T, HSIANG T, LIU L P, GAO J. Advances in current research of fungi in genus *Didymella*[J]. Journal of Fungal Research, 2024, 22(3): 207-225. (in Chinese)
- [39] CHEN Q, ZHANG K, ZHANG G Z, CAI L. A polyphasic approach to characterise two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China[J]. Phytotaxa, 2015, 197(4): 267-281.
- [40] CHEN Q, HOU L W, DUAN W J, CROUS P W, CAI L. Didymellaceae revisited[J]. Studies in Mycology, 2017, 87: 105-159.
- [41] 赵晓珍, 王勇, 李冬雪, 任亚峰, 陈卓. 茶树新病害病原菌 *Phoma segeticola* var. *camelliae* 的形态学特征及系统学分析[J]. 植物病理学报, 2018, 48(4): 556-559.
- ZHAO X Z, WANG Y, LI D X, REN Y F, CHEN Z. Morphological characterization and phylogenetic analysis of the pathogen *Phoma segeticola* var. *camelliae* causing a new tea disease[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(4): 556-559. (in Chinese)
- [42] GUO Z N, XIE H L, WANG H C, HUANG Y, CHEN Q L, XIANG L G, YU Z H, YANG X H. Leaf spot caused by *Didymella segeticola* on tobacco in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(5): 1559.
- [43] AN T T, JIA W, ZHOU C F, LIN J J, AI R L, WANG Y X, LI Z, DING H X. First report of leaf spot caused by *Didymella segeticola* on *Rosa roxburghii* Tratt in China[J]. Plant Disease, 2024, 108(11): 3416.
- [44] 舒永志, 成亮, 杨培明. 黑老虎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(4): 805-813.
- SHU Y Z, CHENG L, YANG P M. Advances in studies on chemical constituents in *Kadsura coccinea* and their pharmacological activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(4): 805-813. (in Chinese)
- [45] 万国安, 邹汉玄, 杨丽丽. 菌核净防治水稻纹枯病试验[J]. 农药, 1993, 32(6): 39-56.
- WAN G A, ZOU H X, YANG L L. Control efficacy of dimethachlone against rice sheath blight[J]. Agrochemicals, 1993, 32(6): 39-56. (in Chinese)
- [46] 石志琦, 周明国, 叶钟音. 核盘菌对菌核净的抗药性机制初探[J]. 农药学学报, 2000, 2(2): 47-51.
- SHI Z Q, ZHOU M G, YE Z Y. Preliminary study on the resistance mechanisms of *Sclerotinia sclerotiorum* to dimethachlone[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2000, 2(2): 47-51. (in Chinese)
- [47] 陈长卿, 王润林, 姜云, 牛俊轲, 闫东, 苗成琪, 高洁, 赵雪, 田馨月, 张小蕊. 烟草赤星病菌对菌核净和苯醚甲环唑的抗药性检测[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(2): 48-53.
- CHEN C Q, WANG R L, JIANG Y, NIU J K, YAN D, MIAO C Q, GAO J, ZHAO X, TIAN X Y, ZHANG X R. Resistance assessment of *Alternaria alternata* causing tobacco brown spot to dimethachlone and difenoconazole[J]. Chinese Tobacco Science, 2020, 41(2): 48-53. (in Chinese)
- [48] CUI W, BEEVER R E, PARKES S L, WEEDS P L, TEMPLETON M D. An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*)[J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 187-198.
- [49] 陈婉君. 菌核净后处理对核盘菌的低剂量刺激作用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- CHEN W J. Stimulatory effect of dimethachlone postconditioning on *Sclerotinia sclerotiorum*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [50] 叶滔, 马志强, 毕秋艳, 牛芳胜, 韩秀英, 张小凤, 王文桥, 张利辉. 植物病原真菌对甾醇生物合成抑制剂类(SBIs)杀菌剂的抗药性研究进展[J]. 农药学学报, 2012, 14(1): 1-16.
- YE T, MA Z Q, BI Q Y, NIU F S, HAN X Y, ZHANG X F, WANG W Q, ZHANG L H. Research advances on the resistance of plant pathogenic fungi to SBIs fungicides[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2012, 14(1): 1-16. (in Chinese)
- [51] OBIANOM C, SIVAKUMAR D. Differential response to combined prochloraz and thyme oil drench treatment in avocados against the control of anthracnose and stem-end rot[J]. Phytoparasitica, 2018, 46(3): 273-281.
- [52] 张冉. 咪鲜胺对核盘菌生长和致病影响的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- ZHANG R. Effects of prochloraz on the growth and virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [53] 陆志杰, 姚士桐, 金周浩, 陈国祥. 咪鲜胺对水稻种子发芽及恶苗病防效的影响[J]. 浙江农业科学, 2012(1): 85-86.
- LU Z J, YAO S T, JIN Z H, CHEN G X. Effect of prochloraz on rice seed germination and the efficacy of protec-

- tion against rice bakanae disease[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2012(1): 85-86. (in Chinese)
- [54] 姚凤兰. 咪鲜胺防治花生褐斑病田间试验[J]. 农药, 1999, 38(6): 30-31.
- YAO F L. Field test of prochloraz against early leaf spot of peanut[J]. Agrochemicals, 1999, 38(6): 30-31. (in Chinese)
- [55] LEES N D, SKAGGS B, KIRSCH D R, BARD M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: a review[J]. Lipids, 1995, 30(3): 221-226.
- [56] 张俊. 丙环唑对核盘菌和指状青霉菌抑制作用的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- ZHANG J. Inhibitory effects of propiconazole on *Sclerotinia sclerotiorum* and *Penicillium digitatum*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [57] 雷雨豪, 张翠芳, 王壮, 刘胜, 李雪生. 环境激素农药三唑类杀菌剂在土壤中的残留与风险评估[J]. 农药, 2019, 58(9): 660-663.
- LEI Y H, ZHANG C F, WANG Z, LIU S, LI X S. Residues and risk assessment of environmental hormone pesticide triazole fungicides in soil[J]. Agrochemicals, 2019, 58(9): 660-663. (in Chinese)
- [58] 刘燕菁, 范玉, 张旭光, 李兴蓉, 郑永权. 丙环唑在香蕉和土壤中的消解动态及残留安全性评价[J]. 植物保护, 2010, 36(2): 109-111.
- LIU Y J, FAN Y, ZHANG X G, LI X R, ZHENG Y Q. Residue dynamics of propiconazole in banana and soils[J]. Plant Protection, 2010, 36(2): 109-111. (in Chinese)
- [59] 刘世江, 赵琪君, 丁怡, 李荣玉, 文小东, 宋星陈. 水稻纹枯病菌对丙环唑的敏感性及其抗性检测[J]. 南方农业学报, 2020, 51(3): 565-570.
- LIU S J, ZHAO Q J, DING Y, LI R Y, WEN X D, SONG X C. Sensitivity and resistance detection of *Rhizoctonia solani* to propiconazole[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(3): 565-570. (in Chinese)
- [60] 朱昌稳, 汪明艾, 黄正银. 氟唑菌酰胺防治小麦赤霉病的效果及使用技术[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(12): 47-50.
- ZHU C W, WANG M A, HUANG Z Y. Control efficacy and application technology of pydiflumetofen against wheat head blight[J]. China Plant Protection, 2021, 41(12): 47-50. (in Chinese)
- [61] 马叶, 张春冬. 几种杀菌剂防治香蕉叶斑病田间药效试验[J]. 中国南方果树, 2011, 40(5): 55-56.
- MA Y, ZHANG C D. Field efficacy test of several fungicides for control of banana leaf spot disease[J]. South China Fruits, 2011, 40(5): 55-56. (in Chinese)
- [62] DAVIDSE L C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 43-65.
- [63] 刘佳奇. 高寒草地披碱草亚隔孢壳科叶斑病的病原鉴定及杀菌剂筛选[D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- LIU J Q. Identification and fungicide screening of Didymelaceae leaf spot pathogens on *Elymus* spp. in alpine grasslands[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2023. (in Chinese)