

崔晓霞,束红梅,倪万潮,等.甜叶菊叶斑病病原真菌的分离及分子生物学鉴定[J].江苏农业科学,2020,48(14):117-124.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.14.020

甜叶菊叶斑病病原真菌的分离及分子生物学鉴定

崔晓霞,束红梅,倪万潮,何晓兰,巩元勇,郭书巧

(江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏南京 210014)

摘要:为明确引起甜叶菊叶斑病的病原菌种类,2018 年 7 月从江苏省东台市富安镇甜叶菊生产基地采集病样。采用组织分离法,获得 4 种病原真菌分离物,观察分离物的菌落形态及分生孢子形态特征并进行致病性测定,利用 MEGA 7 软件的邻接法(neighbor-joining,简称 NJ)基于病原菌的 rDNA-ITS、GAPDH、CHS-1 区序列和 GenBank 中相关病原菌的相应序列构建系统进化树,确定病原菌的种类。因此,江苏省东台市富安镇甜叶菊生产基地甜叶菊叶斑病的致病菌鉴定结果为炭疽菌和链格孢菌。目前为止,我国关于甜叶菊病害病原物鉴定方面的报道还很少,本研究首次报道并分离鉴定由炭疽菌引起的甜叶菊叶斑病。

关键词:甜叶菊[*Stevia rebaudiana* (Bertoni)];叶斑病;病原菌鉴定;炭疽菌;链格孢菌

中图分类号:S432.4⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)14-0117-08

甜叶菊[*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]属菊科斯台维亚属多年生草本植物。甜叶菊叶片富含甜菊糖苷类、黄酮类、酚类及衍生物、挥发油类等化学成分^[1]。黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗自由基和抗氧化等多种药理活性;甜菊糖苷(steviol glycosides,简称 SGs)则是一类新型的天然甜味剂,具有高甜度、低热量、安全无毒等特点^[2],逐渐成为食品和医药领域研究开发的热点^[3-4]。2018 年笔者在江苏省东台市富安镇的甜叶菊生产基地发现了发病的甜叶菊植株,叶片上呈现出大小不等的近圆形病斑,一些发病比较严重的植株叶片枯萎、整株死亡,到后期严重影响到甜叶菊的经济产量。因此,分离并鉴定引起甜叶菊叶斑病的病原菌种类,对于该病害的防治具有重要意义。

炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)真菌分布广泛,寄主繁多,尤其在热带和亚热带农作物以及果树^[5],可以引起大量经济作物的炭疽病,比如玉米、豆类、草莓、咖啡、辣椒、葫芦、土豆等^[6-11];常危害植物叶、花、果、茎及嫩枝,引发各种农作物的炭疽

病,影响植物的生长发育,降低作物品质,严重时可造成落花、落果,甚至植株死亡,导致农作物减产,如柿子炭疽菌(*C. horii*)主要侵染果实和树枝,引起顶梢枯死,严重的甚至整树枯死^[12];也可危害采后果实,常造成果实腐烂,影响产品质量,导致严重的经济损失。准确鉴定炭疽菌有助于对炭疽病的有效防控。由于炭疽菌的种间形态特征差异小、比较接近,若仅以形态学特征对其进行鉴定是不够准确的,分子系统学作为近年来快速发展起来的一种方法,为炭疽菌的准确分类提供了有力依据^[13-15]。在病原真菌的鉴定中应用最为广泛的是核糖体内转录间隔区的 rDNA-ITS 序列,该 DNA 序列也是最先被应用于炭疽菌分类的^[16]。由于许多炭疽菌是复合种群,并且种间菌株间变异大,有多个专化型或生理小种,因此,ITS 序列不能有效地区分炭疽菌复合种群的近缘种^[17-18]。近年来,越来越多的研究报道倾向于利用多个基因序列来开展炭疽菌的鉴定和遗传多样性分析^[19]。本研究利用内转录间隔区(internal transcribed spacer,简称 ITS)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,简称 GAPDH)和几丁质合酶(chitin synthase,简称 CHS-1)基因的部分序列对分离自甜叶菊的炭疽菌进行鉴定,明确引起甜叶菊叶斑病的病原菌种类。

链格孢菌(*Alternaria* spp.)是自然界中广泛存在、危害严重的一种死体营养型植物病原真菌^[20]。链格孢菌可引起多种植物特别是农作物,如小麦、

收稿日期:2019-09-02

基金项目:江苏省博士后科研资助计划(编号:2018K224C);江苏省科技计划(编号:SZ-SQ2017019)。

作者简介:崔晓霞(1989—),女,甘肃定西人,博士,助理研究员,从事大豆抗病育种以及甜叶菊田间病害鉴定等方面的研究。E-mail: cuixiaoxia7@163.com。

通信作者:郭书巧,博士,副研究员,从事特色经济作物的代谢调控研究。Tel:(025)84390290, E-mail: gsq925@163.com。

玉米、苹果、梨等几十种农作物的真菌性病害,造成严重的经济损失^[21]。在美国伊利诺斯州,曾因细极链格孢(*A. tenuissima*)引起大豆猝倒病,造成 15% 的产量损失^[22]。我国各地广泛发生的番茄、马铃薯等茄科蔬菜的早疫病,则是由 *A. solani* 为主的病原真菌引起的^[23-24]。1982 年,日本首次发现 1 种链格孢属真菌 *A. steviae* 能引起甜叶菊黑斑病^[25],病斑呈黑色不规则形状扩展,周围区域呈褪绿状态。印度和伊朗也分别于 2007、2015 年首次分离鉴定到链格孢属真菌为引起甜叶菊叶斑病的致病病原菌^[26-27]。2018 年崔晓霞等从发病甜叶菊叶片中分离鉴定到引起褐斑病的链格孢菌^[28]。本研究利用形态学与分子生物学手段鉴定到引起甜叶菊叶斑病的致病病原菌链格孢菌,为深入开展该病害的发生发展规律、综合防治以及抗病育种研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 叶斑病标样采集及病原菌分离

2018 年 7 月从江苏省东台市富安镇甜叶菊生产基地采集叶片带有病斑的甜叶菊谱星 1 号病株,于江苏省农业科学院经济作物研究所完成试验部分。剪取病健交接处大小为 0.5 cm × 0.5 cm 的叶片,首先用无菌水冲洗 3~5 次,用 70% 乙醇表面消毒 30 s,再用 0.1% HgCl₂ 处理 2 min,最后用无菌水漂洗 3~5 次,用无菌滤纸除去叶片表面水分,将材料平铺于添加有链霉素(40 μg/mL)的 PDA 平板培养基上,于黑暗条件下 25 ℃ 培养 3~5 d,从新长出的菌落边缘挑取少量菌丝接种到新的 PDA 平板上进一步分离纯化,记录菌落的形态学特征。

1.2 病原菌的致病性测定

选择健康无病、无伤痕的甜叶菊叶片,在实验室进行离体叶片接种试验,进行分离菌株的致病性检测。每个菌株均为 3 次重复试验。将叶片用 70% 乙醇进行表面消毒后再用无菌水清洗,置于铺有保湿滤纸的培养皿内。将上述分离纯化的菌株在新的 PDA 平板上培养 7 d,采用菌丝块接种法,用灭菌刀沿菌落边缘切取 3 mm × 3 mm 大小的菌饼,菌丝面朝下、避开主叶脉贴于已消毒处理的甜叶菊叶片背面两侧,同时接种空白的 PDA 培养基块作为对照。接种后做好保湿,置于 25 ℃ 条件下诱导发病,每天观察并记录发病情况;待接种后的甜叶菊叶片发病后,将病原菌重新进行分离纯化,观察新

分离物与接种菌是否相同。

1.3 病原菌分生孢子形态学观察

将分离得到的致病菌株接种到新的 PDA 培养基上,置于 28 ℃ 培养箱中黑暗培养 8 d。取 PX-2 菌落上橘色的分生孢子团溶于适量的无菌水中;PX-3 和 PX-4 则从菌落边缘表面切取小块薄的、带菌丝的培养基,将其放置到载玻片上,在光学显微镜(Olympus CX41, Japan)下观察分生孢子及分生孢子梗的形态并拍照,用目镜测微尺测量分生孢子的大小。结合病原菌菌落在 PDA 培养基上的形态特征及色泽特征,参考《真菌鉴定手册》^[29] 确定病原菌的种类。

1.4 病原菌的分子生物学鉴定

1.4.1 总 DNA 的提取 将分离得到的菌株接种到 PDA 培养基上,置于 28 ℃ 培养箱中培养 10 d,从培养基表面刮取菌丝,加入液氮迅速研磨成粉末,参照真菌基因组 DNA 提取试剂盒(Solarbio, China)操作说明提取菌株 DNA,并将 DNA 样品放于 -20 ℃ 保存备用。

1.4.2 ITS、GAPDH、CHS-1 区扩增 采用真菌核糖体基因转录间隔区的通用引物 ITS1(5' - TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5' - TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3')、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 GAPDH 区通用引物:GDF;5' - GCCGTCAACGACCC CTTCAATTGA-3'和 GDR;5' - GGGTGGAGTCGTAC TTGAGCATGT-3'、几丁质合成酶基因 CHS-1 区通用引物:CHS-79F;5' - TGGGGCAAGGATGCTTGGA AGAAG-3'和 CHS-345R;5' - TGGAAGAACCATC TGTGAGAGTTG-3'对病原菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μL;2 μL DNA 模板、各 1 μL 上下游引物、5 μL 10 × PCR buffer (Mg²⁺ plus)、4 μL dNTP Mix(2.5 mmol)、1 μL rTaq DNA 聚合酶,无菌 ddH₂O 补齐至 50 μL。PCR 扩增程序如下:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 33 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

1.4.3 PCR 产物切胶回收与克隆 取“1.4.2”节中的 PCR 扩增产物加入 6 × DNA loading buffer 混匀,于 1% 琼脂糖凝胶上检测样品条带大小是否正确并特异。检测正确的 PCR 产物使用 DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen, USA)回收纯化,将其与 pEASY-T1 克隆载体(TransGen, China)连接,连接产物转入大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞

(TransGen, China) 中,经菌落 PCR 鉴定后,选取阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.4.4 病原菌的 ITS、GAPDH、CHS-1 序列分析

将测得的 ITS、GAPDH、CHS-1 区序列在 GenBank 中进行同源性搜索,分别与已报道真菌菌株的 ITS、GAPDH、CHS-1 区序列进行同源性比较。利用 MEGA 7 软件的邻接法(neighbor-joining,简称 NJ)构建系统发育树。将比较结果与病原菌的形态特征、培养性状和致病性结合起来,对病原菌进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离纯化

在江苏省东台市富安镇甜叶菊生产基地采集甜叶菊谱星 1 号病样,对分离菌株的菌落形态和分生孢子形态进行观察,结果分离到 4 种病原菌,将分离菌株编号为 PX-1、PX-2、PX-3、PX-4。

2.2 病原菌的培养特性和形态学特征

4 个分离菌株在 PDA 培养基上呈近圆形等径

辐射生长,气生菌丝初期为白色(图 1)。PX-1 菌株在生长后期菌落中心出现淡粉色,由菌落中心向菌落四周辐射生长(可能由于培养条件或其他因素,未能成功培养到分生孢子,将在后续研究中进一步优化培养条件或利用一些外界条件刺激诱导分生孢子的产生)。PX-2 菌丝排列整齐,毛绒状,培养 7 d 后,菌落表面产生橘红色分生孢子团,分生孢子长椭圆形,表面光滑,无色,单胞,圆柱形或椭圆形,多数两端钝圆,大小为 $(15.0 \sim 22.6) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 6.5) \mu\text{m}$ (图 2-A)。PX-3 和 PX-4 气生菌丝较为发达,生长后期逐渐变为不同程度的灰黑色,基质呈现不同类型的同心轮纹,在 PDA 平板上培养 8 d 的菌落产生大量的分生孢子,显微镜下观察,分生孢子单生或成链,形态多样,多为近球形、倒棒状或倒梨形,大小为 $(19.7 \sim 47.6) \mu\text{m} \times (6.7 \sim 15.8) \mu\text{m}$ (图 2-B、图 2-C)。根据这些形态学特征,参照魏景超的《真菌鉴定手册》^[29]及张天宇的《中国真菌志》^[19]初步判断 PX-1 和 PX-2 为炭疽菌、PX-3 和 PX-4 为链格孢属霉菌。

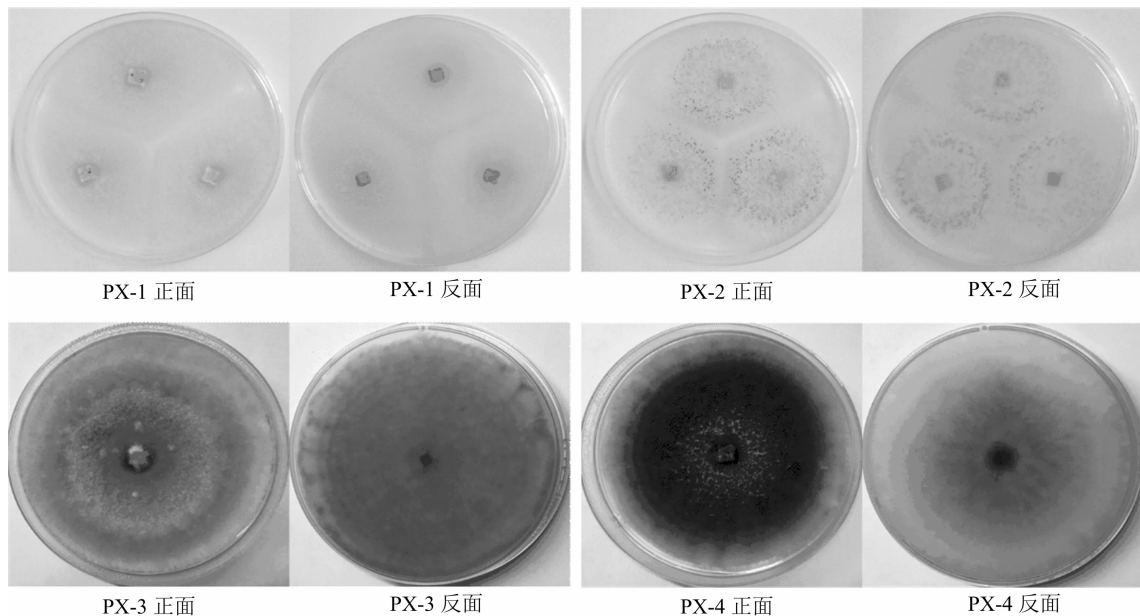


图1 分离菌株菌落形态特征

2.3 病原菌致病性测定

采用离体叶片接种方法,对叶片发病情况进行观察统计。由图 3 可知,4 个分离的菌株对甜叶菊叶片致病程度存在一定的差异,PX-1 和 PX-2 菌株侵染叶片后病斑扩展速度快,在接种后 72 h 发病部位出现水渍状浅褐色病斑;PX-3 侵染后发病程度相对较轻,发病位置呈黑褐色;而 PX-4 在接种后的第 7 天病斑仍局限于叶片的创伤位点。因此,

引起甜叶菊叶片叶斑病的 PX-1 和 PX-2 菌株的致病力较强,PX-3 对甜叶菊的致病力则相对较弱,而 PX-4 菌株的致病力则相对最弱。从接种发病的叶片病斑上刮取少量的病组织镜检,可观察到与接种菌株一致的菌丝和分生孢子。对发病组织进行病原菌的再分离,同样获得与接种病原真菌菌落形态一致的培养物,完成柯赫氏法则(Koch postulates)致病性检测。因此,接种所用的菌株是引

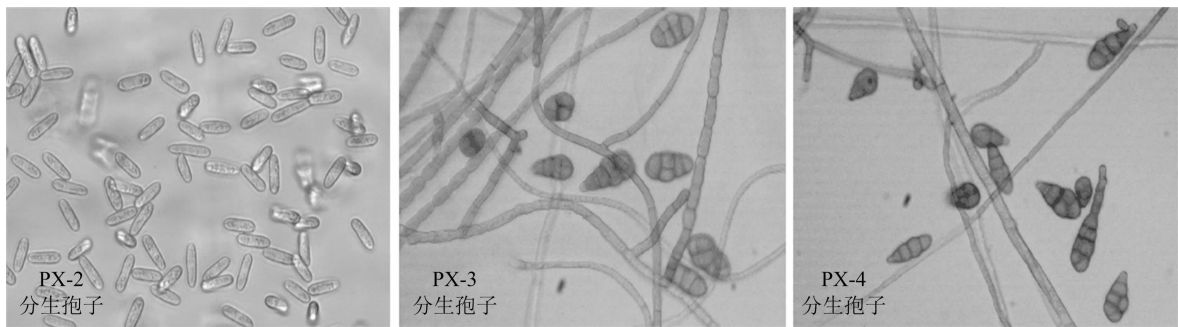


图2 分离病原真菌分生孢子形态的显微观察

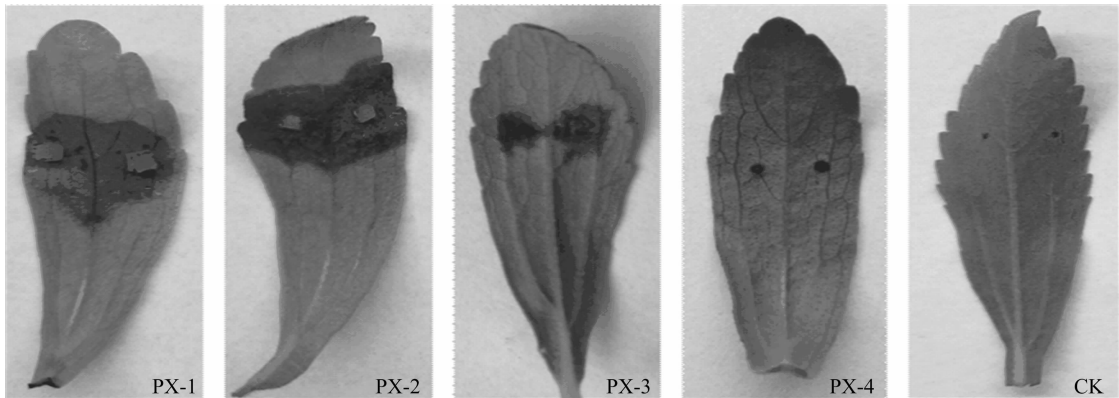


图3 甜叶菊叶片分别接种 4 株分离病原真菌后的表型

起甜叶菊叶斑病的病原菌。

2.4 病原菌的分子鉴定

2.4.1 菌株 PX-1 和 PX-2 的分子鉴定 以菌株 PX-1 和 PX-2 的基因组 DNA 为模板,利用真菌 rDNA-ITS 区通用引物 ITS1 和 ITS4 分别扩增得到 616、613 bp 大小的 ITS 序列;利用 GAPDH 区通用引物 GDF 和 GDR 分别扩增得到 252、280 bp 大小的 GAPDH 序列;利用 CHS-1 区通用引物 CHS-79F

和 CHS-345R 分别扩增得到 299、299 bp 大小的 CHS-1 序列(图 4)。PCR 产物测序结果表明, PX-1 和 PX-2 菌株间的 rDNA-ITS、GAPDH、CHS-1 序列之间存在差异。将序列在 NCBI GenBank 中进行同源性搜索, PX-1 和 PX-2 与炭疽菌属(*Colletotrichum*)真菌具有高度同源性,因此将分离到的真菌归属于炭疽菌。

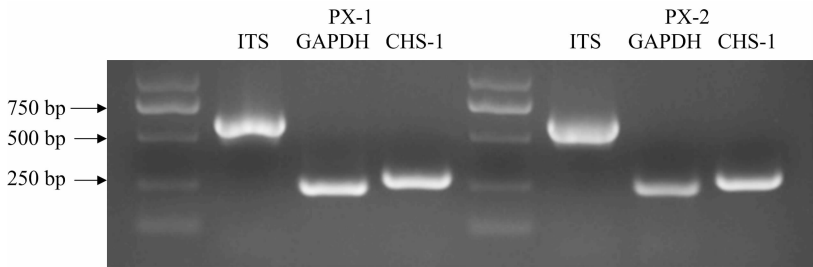


图4 病原菌 PX-1、PX-2 的 rDNA-ITS、GAPDH 和 CHS-1 的 PCR 产物电泳

利用 rDNA-ITS 区序列构建系统发育树, PX-1 菌株与 MG600754、KP743027 等(*Colletotrichum sojae* 和 *Colletotrichum gloeosporioides*) 聚为一类;PX-2 菌株则与 MH863841 和 MF540883 等(*Colletotrichum gloeosporioides* 和 *Colletotrichum fructicola*) 相似度较高,聚为一类(图 5)。在此基础上利用 GAPDH 和 CHS-1 区序列构建系统进化树,

发现 PX-1 菌株与 MG600865 等(*Colletotrichum sojae*)的序列相似度达到 100%, PX-2 菌株与 MF540891 及 MG657351 等(*Colletotrichum fructicola*) 的序列相似度达到 100%(图 6、图 7)。结合形态学观察,进一步确认引起甜叶菊叶斑病的病原菌 PX-1 和 PX-2 为大豆炭疽菌(*Colletotrichum sojae*) 和果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)。

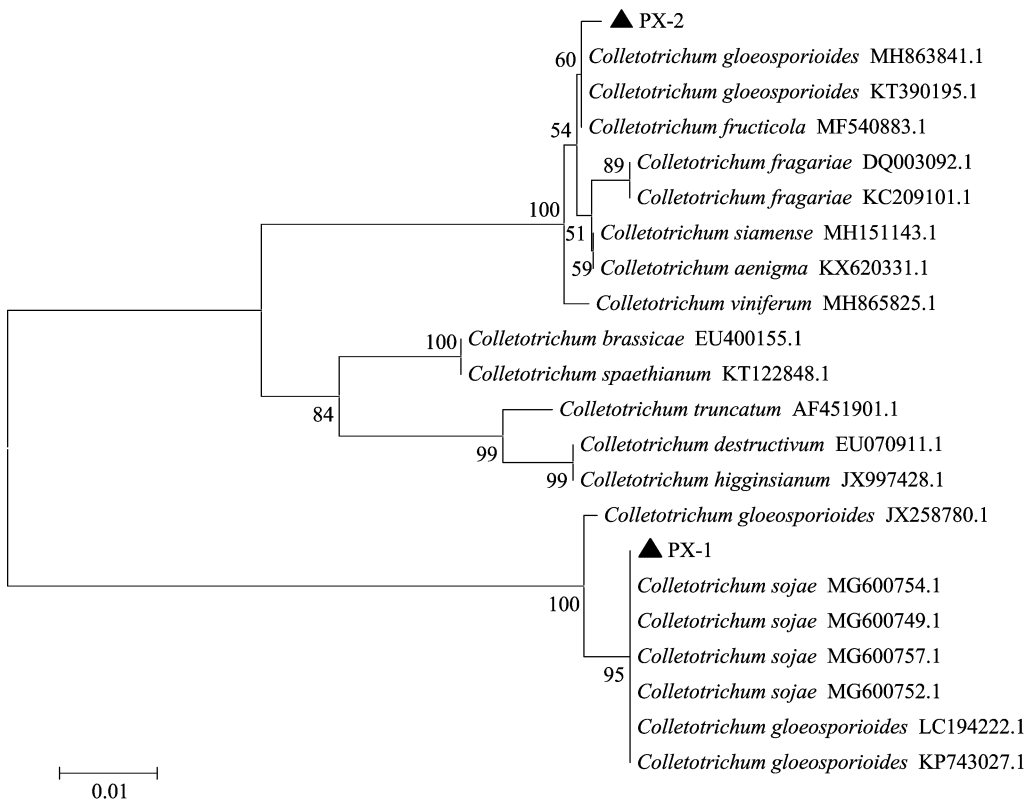


图5 病原菌 PX-1、PX-2 与炭疽菌属相关种 rDNA-ITS 序列系统发育树

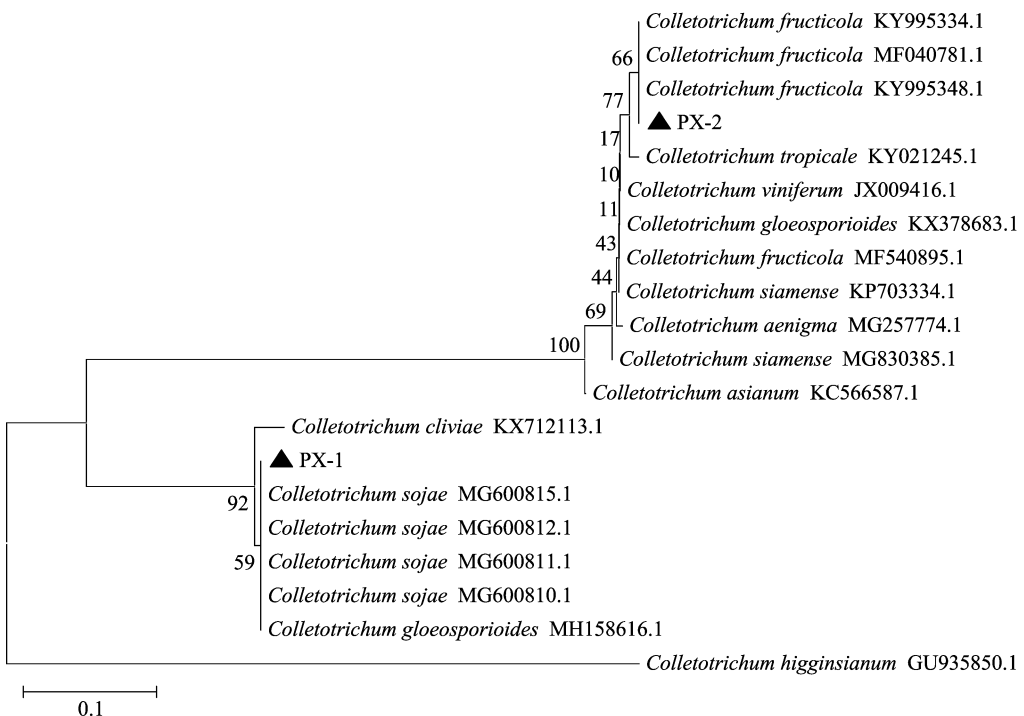


图6 病原菌 PX-1、PX-2 与炭疽菌属相关种 GAPDH 序列系统发育树

2.4.2 菌株 PX-3 和 PX-4 的分子鉴定 以菌株 PX-3 和 PX-4 的基因组 DNA 为模板,利用真菌 rDNA-ITS 区通用引物 ITS1 和 ITS4 分别扩增得到

571、572 bp 大小的 ITS 序列(图 8),PCR 产物测序结果表明,PX-3 和 PX-4 菌株间的 rDNA-ITS 序列之间存在微小的差异。将序列在 NCBI GenBank

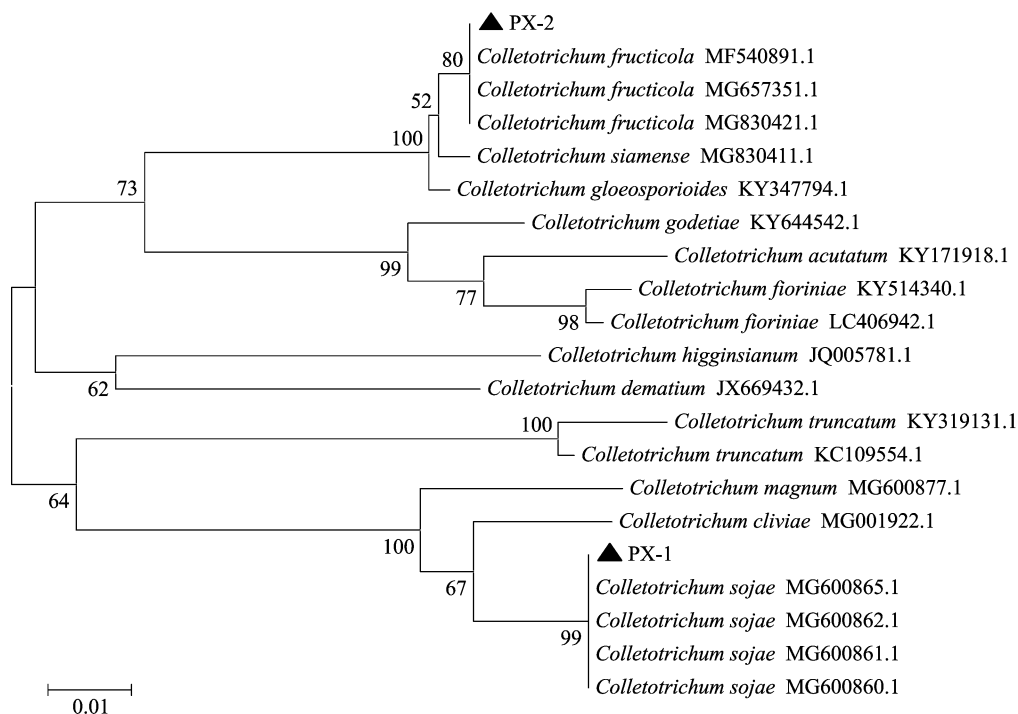


图7 病原菌 PX-1、PX-2 与炭疽菌属相关种 CHS-1 序列系统发育树

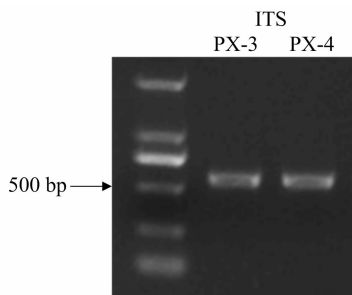


图8 病原菌 PX-3、PX-4 的 rDNA-ITS 区的 PCR 产物电泳

中进行同源性搜索, PX-3、PX-4 与链格孢菌属 (*Alternaria*) 真菌具有高度同源性, 因此将分离到的真菌归属于链格孢菌。利用 rDNA-ITS 区序列构建系统进化树, PX-3 和 PX-4 菌株与 KY814632.1 和 KY075667.1 等 (*Alternaria alternata*) 聚为一类 (图 9)。结合形态学观察, 进一步确认引起甜叶菊叶斑病的病原菌 PX-3 和 PX-4 为链格孢菌 (*Alternaria alternata*)。

3 讨论与结论

甜叶菊提取物甜菊糖苷作为甜味食品添加剂在南美已使用了数个世纪^[30], 欧盟和美国也已开始批准使用^[31]。甜菊糖苷同时具有一定的药用价值^[32], 例如对降血压、增强胰岛 β 细胞功能治疗 2 型糖尿病以及清除人体自由基等功能^[31,33-34]。我

国的甜叶菊自 20 世纪 70 年代南京中山植物园从日本引入试种成功后, 80 年代初向全国各地推广种植^[35]。目前, 我国关于甜叶菊病害已有相关报道。2008 年, 卢清会阐述了甜叶菊的病害有白绢病、立枯病、叶斑病和花叶病毒病, 并提出了相应的防治方法^[36]。近年来, 甘肃河西走廊地区甜叶菊育苗期的病害呈逐年加重趋势, 猝倒病、立枯病和叶斑病成为育苗期最容易发生的 3 大病害, 造成严重的经济损失^[37]。2017 年, 笔者在江苏省东台市富安镇甜叶菊生产基地调查发现甜叶菊叶片上呈现不同程度的病斑, 发病严重的植株叶片全部枯萎。经病原菌的分离、培养、纯化, 共分离得到 4 株病原真菌, 为炭疽菌属和链格孢属真菌。致病性测定结果发现, 炭疽菌 PX-1 和 PX-2 的对甜叶菊叶片的致病力最强, 链格孢菌 PX-3 相对次之, 链格孢菌 PX-4 的致病力则相对最弱。在下一步的研究中, 将在试验圃对这几种病原菌进行混合组合接种, 筛选高效的抑菌药剂。

近年来, 随着分子生物学的发展, 分子生物学技术在真菌的研究中也得到了广泛应用。rDNA 序列由于不同区域进化速度不同, 因此可用于不同分类水平的研究^[38]。特别是 rDNA 的 ITS 区段既具保守性, 又在科、属、种水平上均有特异性序列, 通过对 ITS 区进行测序来诊断和检测植物病原菌, 尤其

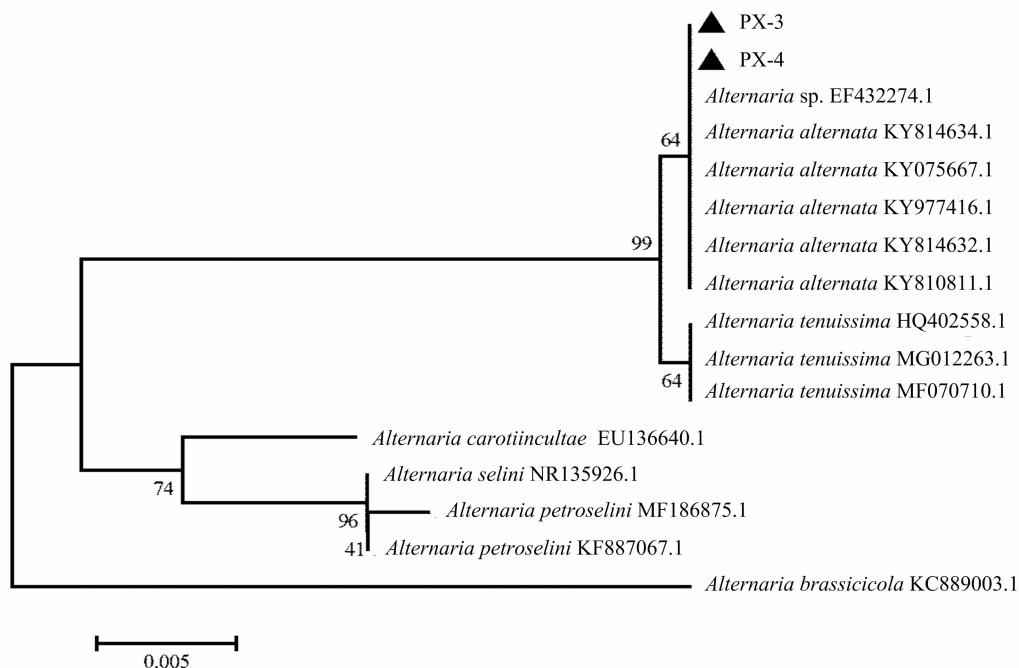


图9 病原菌 PX-3、PX-4 与链格孢菌属相关种 rDNA-ITS 序列系统发育树

是对植物病原真菌的分子检测已越来越被广泛应用^[39]。许凤仙等在对中华常春藤黑腐病病原菌分离鉴定研究中采用了形态学特征观察的方法,并结合柯赫氏法则和 rDNA - ITS 序列分析进行了验证,明确引起中华常春藤黑腐病的病原菌为葡萄座腔菌^[40]。2018 年崔晓霞等利用病原菌形态学观察结合 rDNA - ITS 序列分子生物学分析的方法,从甜叶菊守田 3 号品种中分离鉴定了引起甜叶菊褐斑病的病原菌为链格孢和细极链格孢菌^[29]。ITS 序列为多数物种的鉴定提供了有力工具,但对炭疽菌属真菌系统发育树构建的支持率较低,具有一定的局限性^[41-42]。多基因涵盖的信息比单基因多,系统发育分析能更准确地鉴定炭疽菌的种类^[18]。李沛利等通过构建多基因 (ITS、ACT、GAPDH、CHS - 1、TUB2、CAL) 系统发育树鉴定出四川省鹅掌柴炭疽病的致病病原菌为暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*)^[43]。为鉴定贵州省油茶炭疽病的病原菌种类,帅小春等采用 ITS - CAL - GAPDH - ACT - TUB 等 5 个基因序列构建系统发育树,结合形态学特征鉴定,明确贵州省油茶炭疽病的病原菌种类^[44]。

在本研究中,对引起甜叶菊谱星 1 号叶斑病的病原菌进行了分离鉴定,采用柯赫氏法则进行验证,利用 ITS、GAPDH 和 CHS - 1 基因序列构建系统发育进化树,结合菌落形态和分生孢子形态特征,鉴定到引起甜叶菊叶斑病的 2 株炭疽菌:大豆炭疽

菌 (*Colletotrichum sojae*) 和 果 生 炭 疽 菌 (*Colletotrichum fructicola*); 利用 rDNA - ITS 序列分子生物学分析结合形态学观察的方法同时也鉴定到 2 株链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 也可以引起甜叶菊叶斑病。本研究利用分子生物学手段结合形态学观察的方法对引起甜叶菊叶斑病的病原菌进行鉴定,为该病的诊断和防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] 刘 琼,潘芸芸,吴 卫. 甜叶菊化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发,2018,30(6):1085 - 1091.
- [2] Yadav A K, Singh S, Dhyani D, et al. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)] [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2011, 91(1): 1 - 27.
- [3] 徐 鸿. 甜菊糖的特点及功能 [J]. 现代农业科技, 2013, 37(2): 286 - 287.
- [4] 吴则东, 张文彬, 吴玉梅, 等. 世界甜叶菊发展概况 [J]. 中国糖料, 2016, 38(4): 62 - 65.
- [5] Sutton B C, Bailey J A, Jeger M J. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* [J]. Colletotrichum Biology Pathology and Control, 1992: 1 - 26.
- [6] Sukno S A, Sanzmarín J M, Gonzálezfuentes M, et al. First report of anthracnose stalk rot of maize caused by *Colletotrichum graminicola* in Switzerland [J]. Plant Disease, 2014, 98(5): 694.
- [7] Del Rio L E, Lamppa R S, Gross P L. First report of dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) race 73 in North Dakota [J]. Plant Disease, 2002, 86(5): 562.
- [8] Xie L, Zhang J Z, Wan Y, et al. Identification of *Colletotrichum* spp.

- isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China[J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2010, 11(1):61–70.
- [9] Akhter M S, Alam S, Islam M S, et al. Identification of the fungal pathogen that causes strawberry anthracnose in Bangladesh and Evaluation of *in vitro* fungicide activity[J]. Mycobiology, 2009, 37(2):77–81.
- [10] Lewis Ivey M L, Nava – Diaz C, Miller S A. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers [J]. Plant Disease, 2004, 88(11):1198–1204.
- [11] Nikitin M, Deych K, Grevtseva I, et al. Preserved microarrays for simultaneous detection and identification of six fungal potato pathogens with the use of real – time PCR in matrix format [J]. Biosensors, 2018, 8(4):129.
- [12] Zhang J Z. Anthracnose of persimmon caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China[J]. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 2008, 2(2):50–54.
- [13] Guerber J C, Liu B, Correll J C, et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility [J]. Mycologia, 2003, 95(5):872–895.
- [14] Cai L, Hyde K D, Taylor P W J, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum* [J]. Fungal Diversity, 2009, 39:183–204.
- [15] Mackenzie S J, Peres N A, Barquero M P, et al. Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida[J]. Phytopathology, 2009, 99(5):620–631.
- [16] Cannon P F, Damm U, Johnston P R, et al. *Colletotrichum* – current status and future directions [J]. Studies in Mycology, 2012, 73:181–213.
- [17] Weir B S, Johnston P R, Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. Studies in Mycology, 2012, 73:115–180.
- [18] Damm U, Cannon P F, Woudenberg J H C, et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012(73):37–113.
- [19] Wang Y C, Hao X Y, Wang L, et al. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] in China[J]. Scientific Reports, 2016, 6:35287.
- [20] 张天宇. 中国真菌志:第 16 卷 链格孢属[M]. 北京:科学出版社, 2003.
- [21] Farr D F, Bills G F, Chamuris G P, et al. Fungi on plants and plant products in the United States [J]. Mycologia, 1990, 42(3):243–246.
- [22] 陈伟群. 链格孢及相似属代表种的分子系统学研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 1997.
- [23] 李金花, 柴兆祥, 王 蒂, 等. 甘肃马铃薯贮藏期真菌性病害病原菌的分离鉴定[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2007, 43(2):39–42.
- [24] 邵玉琴, 吕佩珂. 番茄早疫病发生、流行与生态因子关系的研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1993(2):208–212.
- [25] Ishib A C, Yokoyama T, Tani T. Black spot disease of stevia caused by *Alternaria steviae* [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1982, 48(1):44–51.
- [26] Maiti C K, Sen S, Acharya R, et al. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana* [J]. Plant Pathology, 2007, 56(4):723–723.
- [27] Atghia O, Javan – Nikkiah M, Poursafar A, et al. First report of *Alternaria* species as the causal agent of leaf spot on *Stevia* and *Catalpa* plants in Iran [C]. 2nd Iranian Mycological Congress, 2015.
- [28] 崔晓霞, 束红梅, 蒋 璐, 等. 甜叶菊褐斑病的病原菌鉴定及 MeJA 的抗病作用[J]. 中国农业科学, 2018, 51(18):91–101.
- [29] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979.
- [30] Geuns J M C. Stevioside[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5):913–921.
- [31] Philippaert K, Pironet A, Mesuere M, et al. Steviol glycosides enhance pancreatic beta – cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity [J]. Nature Communications, 2017, 8(1):88–94.
- [32] 杨永恒, 徐晓洋, 孙玉明, 等. 甜菊葡萄糖苷转移酶基因 *SrUGT76G1* 启动子的克隆及其功能的瞬时表达分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6):27–33.
- [33] Geuns J M C. Stevia and steviol glycosides[M]. Belgium:Euprint, 2010.
- [34] Hajhashemi S, Geuns J M C. Free radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana* [J]. Free Radicals and Antioxidants, 2013, 3(44):S34–S41.
- [35] 唐志发. 甜菊糖的崛起与发展战略[J]. 中国食品工业, 1999(2):52–52.
- [36] 卢清会. 甜叶菊的主要病虫害及其防治[J]. 现代农业科技, 2008(8):83–83.
- [37] 柴再生, 蒋 宏, 王 亮. 河西走廊甜叶菊拱棚育苗三大病害发生原因及防治策略[J]. 中国糖料, 2017, 39(4):79–80.
- [38] 匡治州, 许 杨. 核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(2):120–122.
- [39] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA – ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1):101–106.
- [40] 许凤仙, 胡小倩, 马 杰, 等. 中华常春藤黑腐病及其病原菌鉴定[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(4):620–623.
- [41] Moriaki J, Tsukiboshi T, Sato T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences[J]. Journal of General Plant Pathology, 2002, 68(4):307–320.
- [42] Crouch J A, Clarke B B, Hillman B I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate – spored graminicolous *Colletotrichum* group[J]. Mycologia, 2009, 101(5):648–656.
- [43] 李沛利, 李 娟, 龚国淑, 等. 四川省鹅掌柴炭疽病病原菌的初步鉴定[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3):296–304.
- [44] 帅小春, 阮成江, 熊朝伟, 等. 油茶炭疽病新致病菌 *Colletotrichum kahawae* 的多基因序列鉴定[J]. 分子植物育种, 2018(18):5939–5945.