DOI: 10. 11686/cyxb2025405
http://cyxb. magtech. com. cn
刘佳伟, 王浩, 万超越, 等. 昭苏县绿草莓叶斑病病原鉴定及其生物学特性. 草业学报, 2026, 35(9): 154－168.
LIU Jia-wei, WANG Hao, WAN Chao-yue, *et al*. Identification of the pathogen and biological characteristics of *Fragaria viridis* leaf spot in Zhaosu County, China. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(9): 154－168.

昭苏县绿草莓叶斑病病原鉴定及其生物学特性

刘佳伟, 王浩, 万超越, 陈阳, 南晓, 李克梅*
(新疆农业大学农学院, 农业农村部西北荒漠绿洲农林外来入侵生物防控重点实验室, 农林有害生物监测与安全防控重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 绿草莓是昭苏县部分天然草原上的优势物种, 叶斑病发生普遍。为明确引起绿草莓叶斑病的病原种类及生物学特性, 本研究对新疆维吾尔自治区昭苏县采集的绿草莓叶斑病病样进行分离鉴定, 分离的真菌根据形态学和多基因联合系统发育树进行鉴定。结果表明, 共分离得到 3 种病原真菌, 分别为交链格孢、*Colletotrichum tibetense*、*Ascochyta nigripycnidia*。生物学特性研究结果显示, 三者均在 25 ℃时生长最快, 且可耐受 pH 范围较宽, 为 4～11, 当 pH 为 7～8 时, 菌丝发育最佳, 此时测得的菌落直径显著大于其他 pH 条件($P<0.05$)。交链格孢的最适培养基为玉米粉琼脂培养基(CMA), 最适碳源、氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨; *A. nigripycnidia* 在不同供试培养基中生长均较为缓慢, 最适生长培养基为马铃薯胡萝卜琼脂培养基(PCA), 在菌丝生长过程中, 硫酸铵和可溶性淀粉分别作为氮源和碳源, 展现出最好的利用效率($P<0.05$); 可溶性淀粉与蛋白胨分别为 *C. tibetense* 菌丝生长最理想的碳源与氮源($P<0.05$), 且该菌在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上菌丝生长最为迅速。3 种病原菌在不同光照条件下菌丝生长较好。通过致病性测定, 发现交链格孢、*C. tibetense*、*A. nigripycnidia* 均为绿草莓叶斑病的致病菌。其中 *A. nigripycnidia* 分离频率最高, 为 40. 15%, 为绿草莓叶斑病的主要致病菌。

关键词: 绿草莓; 叶斑病; 病原鉴定; 生物学特性

Identification of the pathogen and biological characteristics of *Fragaria viridis* leaf spot in Zhaosu County, China

LIU Jia-wei, WANG Hao, WAN Chao-yue, CHEN Yang, NAN Xiao, LI Ke-mei*
Agricultural College, Xinjiang Agricultural University, Key Laboratory of Prevention and Control of Invasive Alien Species in Agriculture & Forestry of the North-western Desert Oasis, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests, Urumqi 830052, *China*

Abstract: Green strawberry (*Fragaria viridis*) is a dominant species in some natural grasslands of Zhaosu County, where leaf spot disease occurs widely. To clarify the causal agents responsible for leaf spot disease on green strawberry and their biological characteristics, diseased leaf samples were collected from Zhaosu County, Xinjiang Uygur Autonomous Region, and subjected to fungal isolation and identification. The isolated fungi were identified based on morphological characteristics and multi-locus phylogenetic analyses. Results showed that three pathogenic fungi were obtained: *Alternaria alternata*, *Colletotrichum tibetense*, and *Ascochyta nigripycnidia*. Biological characterization revealed that all three fungi exhibited optimal mycelial growth at 25 ℃ and tolerated a broad pH range

收稿日期: 2025-09-30; 改回日期: 2025-11-12
基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1401101)资助。
作者简介: 刘佳伟(2000－), 女, 辽宁朝阳人, 在读硕士。E-mail: 2921333298@qq. com
* 通信作者 Corresponding author. E-mail: likemei@xjau. edu. cn

(4－11), with the best growth occurring at pH 7－8, where colony diameters were significantly larger than under other pH conditions ($P<0.05$). *A. alternata* grew best on corn meal agar, with soluble starch and peptone as the optimal carbon and nitrogen sources, respectively. *A. nigripycnidia* grew relatively slowly on all tested media, with potato-carrot agar supporting the most favorable growth; ammonium sulfate and soluble starch served as the most efficiently utilized nitrogen and carbon sources, respectively ($P<0.05$). For *C. tibetense*, soluble starch and peptone were also the preferred carbon and nitrogen sources ($P<0.05$), and its mycelium grew most rapidly on potato dextrose agar. All three pathogens exhibited robust mycelial growth under various light conditions. Pathogenicity assays confirmed that *A. alternata*, *C. tibetense*, and *A. nigripycnidia* are all causal agents of leaf spot disease on green strawberry. Among them, *A. nigripycnidia* was isolated most frequently (40.15%) and is thus considered the primary pathogen responsible for this disease.

Key words: *Fragaria viridis*; leaf spot disease; pathogen identification; biological characteristics

草莓(*Fragaria ananassa*)属于蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)的多年生草本植物,其果实色彩鲜艳,味道独特,具有生长周期短、收获期长和高营养价值的特点,经济价值显著[1]。我国拥有丰富的野生草莓种质资源,南北各地自然分布着13个品种,其中包括8个二倍体和5个四倍体种类[2-5]。野生草莓在牧草中具有中等饲用价值,在草甸草原生态系统中占有重要地位,且具有一定产量。新疆地区存在两种野生草莓,分别是野草莓(*Fragaria vesca*)和绿草莓(*Fragaria viridis*)[3]。相较于栽培品种,野生草莓在营养成分、品质、香气和抗病性方面表现更优,是进行草莓遗传改良的重要资源,具备广泛的育种应用前景[6]。

草莓在生长发育过程中易受多种病害侵染,据国内外研究报道,其主要病害及对应的优势病原菌如下:褐色轮斑病,由暗拟茎点霉(*Phomopsis obscurans*)引起;白粉病,由 *Sphaerotheca macularis* 引起;叶枯病,由 *Diplocarpon earlianum* 引起;灰霉病,由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起;蛇眼病,由草莓球腔菌(*Mycosphaerella fragariae*)引起;黑斑病,由交链格孢(*Alternaria alternata*)引起;炭疽病,由草莓炭疽菌(*Colletotrichum fragariae*)引起[7]。在上述病害中,叶斑病是草莓生长周期内发生普遍且危害较重的病害之一。根据现有研究,引起草莓叶斑病的主要病原菌有斑污拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis maculans*)[8]、新拟盘多毛孢(*Neopestaloti-opsis rosae*)[9]、交链格孢菌[10]和燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)[11]等。

本研究于2023－2024年对新疆昭苏县草原病害进行调查与病原鉴定,发现当地野生草莓以绿草莓为主,是昭苏县开斯克草场、巴勒克苏星空草原、吐格勒勤布拉克村等草原的优势种,在群落中占据明显优势,平均相对盖度达33.3%。调查期间发现,绿草莓叶斑病每年5－8月均有发生,各草地田间发病率普遍超过50%。截至目前,国内尚未见对此病害的报道。本研究以昭苏县绿草莓叶斑病的病原为对象,通过对其进行种类鉴定与生物学特性分析,进而为该病害的科学防控提供理论指导。

1　材料与方法

1.1　样品材料的调查与采集

2024年5－8月于新疆维吾尔自治区昭苏县开斯克草场、巴勒克苏星空草原、吐格勒勤布拉克村草原发现绿草莓叶斑类病害,采用随机踏查和5点取样法[12],在田间收集典型病叶,同一地形面积小于10 hm^2时均匀设置5个1 m×1 m样方;大于10 hm^2时每10 hm^2为1个调查单元,每1个单元按如上方法取5点进行调查。采用发病叶片数统计样方内的发病率和病情指数,植株发病的严重程度以感病植株叶片受到侵染的面积占总面积的比例来计算(表1),分级标准参照《牧草病害诊断调查与损失评定方法》[13];样本带回实验室后,一部分在4 ℃条件下保存备用,另一部分则制成标本。相关公式如下:

$$发病率(\%)=\frac{每个样方内发病的叶片数}{每个样方内该植株的总叶片数}\times 100$$

$$病情指数=\frac{\sum 病害级数\times 该级叶片数}{叶片数总和\times 发病最重级的代表数值}\times 100$$

1.2 病原菌的鉴定

1.2.1 病原菌的分离及纯化 采用常规组织分离法[14]对患病绿草莓叶片组织进行分离，在超净工作台(HCB-1300V，青岛海尔生物医疗股份有限公司)中将绿草莓叶部组织病健交界处切取5 mm×5 mm的小块，对病块进行消毒，相继用75%酒精浸泡5 s，1%次氯酸钠浸泡30 s，最后无菌水漂洗3次，待水分自然蒸发后，将小块病组织置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar，PDA；20 g·L^{-1}葡萄糖，20 g·L^{-1}琼脂，200 g·L^{-1}马铃薯，1000 mL蒸馏水)上，每皿10片，重复3次，并在25 ℃恒温条件下培养。

表1 叶斑病分级标准

Table 1 Leaf spot disease grading criteria

级别 Grade	分级标准 Grading criteria
0级 Grade 0	无症状表现 Asymptomatic manifestation
1级 Grade 1	病斑面积<叶面积的5% Lesion area accounting for less than 5% of leaf area
2级 Grade 2	病斑面积占叶面积的5%～25% Lesion area accounting for 5% to 25% of leaf area
3级 Grade 3	病斑面积占叶面积的25%～50% Lesion area accounting for 25% to 50% of leaf area
4级 Grade 4	病斑面积>叶面积的50% Lesion area accounting for more than 50% of leaf area

将病组织块在恒温培养箱(RXZ-280C，宁波杨辉仪器有限公司)中培养3～5 d，待菌落形成后，使用接种针从病组织块边缘挑取菌丝，并将其转移到新的PDA培养基中，继续培养5～7 d后，再次挑取菌丝进行单孢分离，培养2 d后单一菌落开始显现，从中挑选出最为纯净的单菌落，移至新的PDA培养基上，从而完成病原体的分离与纯化步骤[15]。

1.2.2 致病性的测定 对绿草莓叶片进行离体接种试验：选取健康且大小相似的绿草莓叶片进行表面消毒，用无菌接种针轻轻刺伤叶片表面，将菌丝块放置在针刺部位，对照组则接种大小相等的无菌PDA。将处理的叶片置于一次性培养皿中，并放入无菌水打湿的灭菌纱布。重复3次，所有样本放入25 ℃的培养箱中黑暗培养，每日观察叶片发病状况。待发病后，采用柯赫氏法则验证病原菌[16]。

1.2.3 病原菌形态学鉴定 将病原菌置于PDA平板的中心位置，25 ℃环境下培养5～7 d，仔细观察菌落的外观特征，包括形态和颜色。当病原菌开始产孢时，利用显微镜(ECLIPSE Ni-U生物显微镜，上海尼康仪器有限公司)观察并拍摄分生孢子及分生孢子梗的结构，参考《真菌鉴定手册》[17]和《中国真菌志》[18]进行特征比对鉴定病原。

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定 将待测菌株接种于PDA培养基平板上，在25 ℃条件下培养5～7 d，采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide，CTAB)法提取菌丝体中的基因组DNA[19]。以纯化的病原菌DNA作为模板，针对炭疽菌属病原菌分别用*ITS*、*GAPDH*、*ACT*、*CHS-1*、*TUB2*共5个基因序列进行PCR扩增[20-23]。壳二孢属分别用*ITS*、*LSU*、*TUB2*共3个基因序列进行扩增[24]。链格孢属分别用*ITS*、*GAPDH*、*TEF*、*ALT*共4个基因序列进行扩增[25]。扩增反应体系为(25 μL)：DNA模板2 μL、10 μmol·L^{-1}上下游引物各1 μL、2× PCR Mastermix(每1 mL含40 U Taq酶)12.5 μL、ddH_2O 8.5 μL。反应条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，退火温度条件下(表2)退火30 s，72 ℃延伸1 min，35次循环；72 ℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后，以条带清晰、单一为标准，选取合格样品送交测序。双向测序结果使用DNAMAN(version 8.0.8.789)进行拼接，并在NCBI上进行BLAST同源性分析，对下载的高相似性序列，使用Phylosuite v.1.1.14软件进行多重序列比对与修剪，再通过MrBayes v.3.2.6进行贝叶斯推断法(Bayesian inference，BI)构建系统发育树。

1.3 病原菌的生物学特性

1.3.1 不同培养基对供试菌株菌丝生长的影响 配制马铃薯葡萄糖琼脂培养基、马铃薯蔗糖琼脂培养基(potato sucrose agar，PSA，马铃薯200 g，琼脂17 g，蔗糖20 g，蒸馏水1000 mL)、查氏培养基(Czapek agar，Czapek；硝酸钠2 g，磷酸氢二钾1 g，氯化钾1 g，硫酸镁0.5 g，硫酸亚铁0.01 g，蔗糖30g ，琼脂20 g，蒸馏水1000

表 2　PCR 引物信息

Table 2　PCR primer information

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequences	退火温度 Annealing temperature (℃)	参考文献 References
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	56	[26]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
LSU	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	55	[27]
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
TUB2	BT2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	58	[28]
	BT2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC		
GAPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	60	[29]
	GDR1	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT		
TEF	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGG	55	[30]
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC		
ALT	ALT-F	ATGCAGTTCACCACCATCGC	55	[31]
	ALT-R	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC		
CHS	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	55	[32]
	CHS-345R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG		
ACT	512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	58	[33]
	783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT		

mL)、马铃薯胡萝卜琼脂培养基(potato carrot agar,PCA;马铃薯 20 g,胡萝卜 20 g,琼脂 17 g,蒸馏水 1000 mL)、水琼脂培养基(water agar,WA;琼脂 17 g,蒸馏水 1000 mL)、玉米粉琼脂培养基(corn meal agar,CMA;玉米粉 30 g,琼脂 17 g,蒸馏水 1000 mL)、胡萝卜水琼脂培养基(carrot agar,CA;胡萝卜 200 g,琼脂 17 g,蒸馏水 1000 mL)和燕麦片琼脂培养基(oatmeal agar,OA;燕麦片 30 g,琼脂 17 g,蒸馏水 1000 mL),并测试不同培养基对供试菌株的影响[34]。置于 25 ℃恒温培养箱(RXZ-280C,宁波杨辉仪器有限公司)中培养,7 d 后采用十字交叉法[22]测量菌落直径,并重复 3 次。

1.3.2　不同碳源和氮源对供试菌株菌丝生长的影响　　碳源:Czapek 培养基作为基础培养基,分别用葡萄糖、D-果糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉、菊糖、甘露醇和山梨醇为碳源等量置换 Czapek 培养基中碳元素,配制成不同含碳培养基,同时设置不含任何碳源的对照组[35]。

氮源:用硫酸铵、牛肉膏、酵母浸粉、氯化铵、蛋白胨、硝酸钾、甘氨酸和尿素为氮源等质量置换 Czapek 培养基中氮元素,配制成不同含氮培养基,以不加氮源的培养基为对照[36]。以上处理均置于 25 ℃培养,7 d 后采用十字交叉法[22]测量菌落直径,重复 3 次。

1.3.3　不同温度和光照对供试菌株菌丝生长的影响　　温度处理:配制 PDA 培养基,分别在 5、10、15、20、25、30 和 35 ℃的恒温培养箱中进行黑暗培养。7 d 后采用十字交叉法[22]测量菌落直径,以上处理重复 3 次。

光照处理:在 PDA 培养基上设置 3 种光照模式(全光照、12 h 光照与 12 h 黑暗交替以及全黑暗)。所有光照处理均在 25 ℃条件下进行。7 d 后采用十字交叉法[22]测量菌落直径,重复 3 次。

1.3.4　不同 pH 对供试菌株菌丝生长的影响　　配制 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、10 和 11 的 PDA 培养基,并在 25 ℃环境下进行黑暗培养[37]。7 d 后采用十字交叉法[22]测量菌落直径,重复 3 次。

1.3.5　菌丝致死温度　　采用水浴加热法[38]测定致死温度,将菌饼放置于含有无菌水的离心管中,分别在 45～65 ℃条件下依次处理 10 min,冷却后接种培养 5 d,每个温度点重复 3 次以初步确定致死温度范围,进而在此范围内进行精度为 1 ℃的梯度试验,以确定准确的致死温度。

1.4 数据处理

使用Excel 2019进行数据整理，SPSS 23.0软件分析数据，Duncan法进行多重比较；采用PS和figtree作图。

2 结果与分析

2.1 绿草莓叶斑病田间发病率及病情指数

本研究对吐格勒勤布拉克草原、巴勒克苏星空草原及开斯克草场3个草原样地的绿草莓叶斑病进行调查，结果显示(表3)，3地的发病率和病情指数从5—8月均呈持续上升态势。其中，吐格勒勤布拉克草原的发病率在46.88%～59.69%波动，病情指数为17.87～26.63；巴勒克苏星空草原发病率为44.06%～54.89%，病情指数为14.93～23.09；开斯克草场发病率为43.07%～50.70%，病情指数为13.85～21.90。从时间进程看，6—7月3地发病率快速上升，分别达到56.86%、52.92%和49.61%；进入7—8月，虽为病害高发期，但发病率的上升速度明显放缓。

表3 3个调查地点5-8月发病率及病情指数

Table 3 Disease incidence and disease index of three survey sites from May to August

月份 Month	吐格勒勤布拉克草原 Tugelqin bulak grassland		巴勒克苏星空草原 Balkasu starry sky grassland		开斯克草场 Kaisik pasture	
	发病率 Disease incidence (%)	病情指数 Disease index	发病率 Disease incidence (%)	病情指数 Disease index	发病率 Disease incidence (%)	病情指数 Disease index
5	46.88±0.85d	17.87±0.42d	44.06±0.78d	14.93±0.18d	43.07±0.65d	13.85±0.16c
6	50.72±0.62c	19.79±0.77c	48.97±0.71c	17.84±0.40c	45.14±0.64c	15.76±0.15b
7	56.86±0.42b	23.68±0.81b	52.92±0.30b	21.31±0.35b	49.61±0.34b	20.68±1.37a
8	59.69±0.31a	26.63±0.86a	54.89±0.60a	23.09±0.29a	50.70±0.61a	21.90±0.77a

同列不同字母表示各月份间差异显著($P<0.05$)。Different letters in the same column mean significant difference among the months at $P<0.05$ level.

2.2 绿草莓叶斑病的症状

2024年在新疆昭苏县草原中发现绿草莓的叶部病害，该病的典型病症演变过程表现为：病害初始阶段，叶表组织呈现暗紫色至紫红色微小斑块；随着病情进展，病斑呈现扩展趋势，最终形成近圆形病变区域，病斑由外缘紫红色过渡至中央灰白色。重度感染植株可观察到叶片黄化卷曲直至枯死等组织坏死现象。当环境湿度较大时，病斑表面会出现散生的小黑点，为病菌的分生孢子器(图1)。

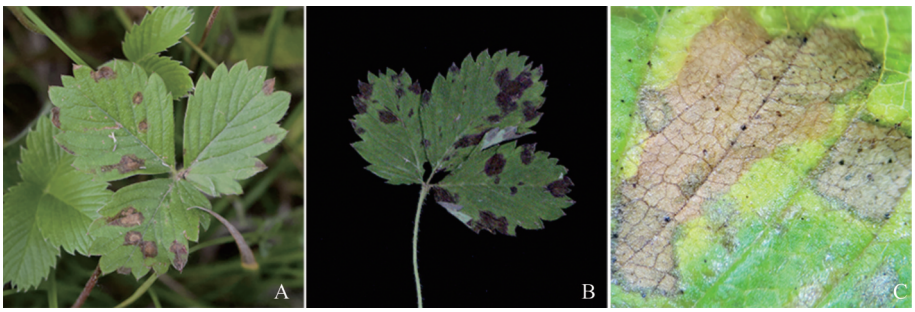


图1 昭苏县绿草莓叶斑病

Fig. 1 Leaf spot disease of *F. viridis* in Zhaosu County

A：田间症状Field symptom；B：标本Specimen；C：分生孢子器Pycnidia.

2.3 形态学鉴定

于昭苏县3个调查地点共采集绿草莓叶斑病样品52份，田间观察显示所有样品病害症状一致。分离培养时，每份样品设3皿培养基重复处理，经分离纯化获得127株菌株。根据菌落形态，菌株初步分为3种类型，其中Ⅰ类

菌株 44 株、Ⅱ类菌株 51 株、Ⅲ类菌株 32 株；多数叶片组织可同时分离出上述 3 种病原菌，存在复合侵染现象，所有菌株均保留并纳入统计。Ⅱ类菌株分离频率最高（40.15%），为优势菌株。从各类型中分别选取 1 株代表菌株，其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类菌株编号依次为 XJZSYCM-1、XJZSYCM-2、XJZSYCM-3，其形态特征描述如下。

菌株 XJZSYCM-1：该病原菌的菌落形态规则，呈圆形。培养初期菌落呈白色，随培养时间延长逐渐转为棕色，最终变为黑褐色。菌丝呈辐射状向外延伸，气生菌丝稀少。分生孢子盘上着生刚毛，形态为圆形至倒卵形，结构致密，由透明角质物质构成。分生孢子为圆柱形，无色透明，两端呈钝圆形，内含油球，大小为（12.26～23.70）μm×（2.98～4.05）μm；附着孢厚壁，棕褐色，多数球状，部分棍棒状，光滑，单细胞，大小为（6.09～8.20）μm×（4.68～7.37）μm。根据形态学鉴定初步确定为炭疽菌属（*Colletotrichum* sp.，图 2）。

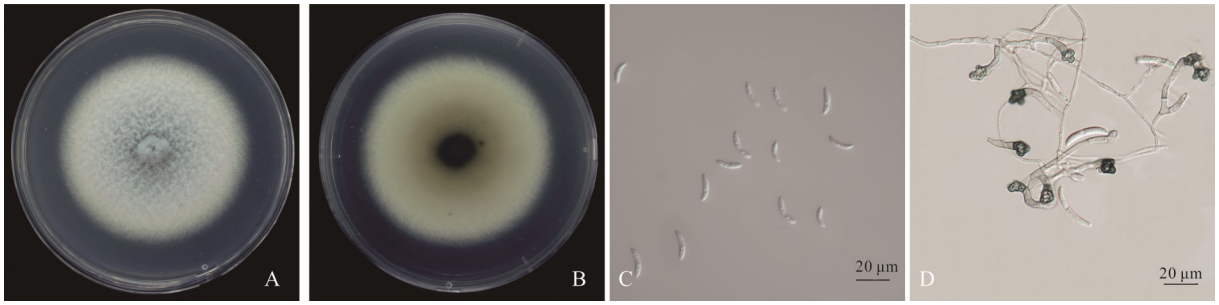


图 2　菌株 XJZSYCM-1 的形态特征

Fig. 2　Morphological characteristics of strain XJZSYCM-1

A：菌落正面 Obverse of colony morphology；B：菌落反面 Reverse of colony morphology；C：分生孢子 Conidia；D：产孢结构 Sporulation structure. 下同 The same below.

XJZSYCM-2：该菌落形态规则，呈圆形，扁平铺展。培养初期为乳白色，随成熟度增加最终转为铁灰色。菌落边缘光滑整齐，气生菌丝发达。其分生孢子梗呈瓶状，颈部明显突出，表面光滑无色。产出的分生孢子为圆柱形，透明无隔，胞壁薄而光滑，两端钝圆，大小为（4.5～7.9）μm×（1.5～2.6）μm。根据形态学鉴定初步确定为壳二孢属（*Ascochyta* sp.，图 3）。

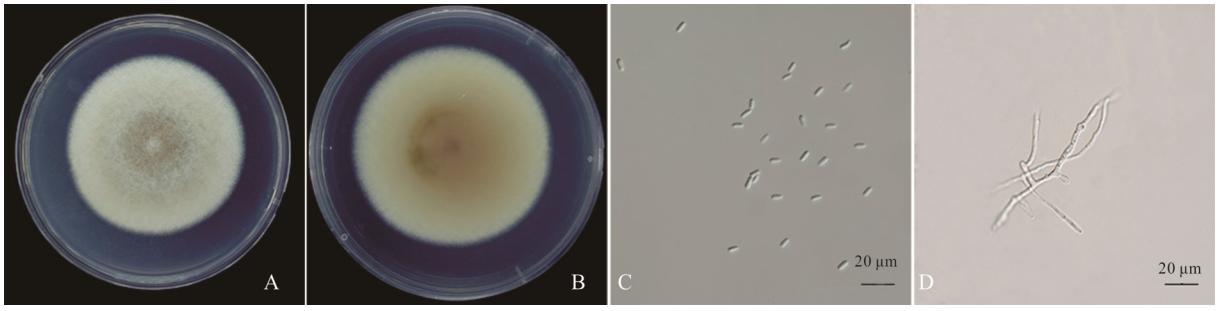


图 3　菌株 XJZSYCM-2 的形态特征

Fig. 3　Morphological characteristics of strain XJZSYCM-2

XJZSYCM-3：在 PDA 培养基上 28 ℃培养 7 d，菌落呈现较规则的圆形，初期菌丝密集呈灰绿色，随着培养时间增加，菌落呈圆形，有轮纹，菌丝边缘灰白色。分生孢子为深褐色或橄榄褐色呈砖格状，具横纵隔膜，顶端具喙，大小为（14.80～28.82）μm×（7.18～13.10）μm[39]，根据形态学鉴定初步确定为链格孢属（*Alternaria* sp.，图 4）。

2.4　分子生物学鉴定

采用 *ITS*、*TUB2*、*GAPDH*、*CHS-1* 和 *ACT* 基因特异性引物对菌株 XJZSYCM-1 进行 PCR 扩增（表 4），序列

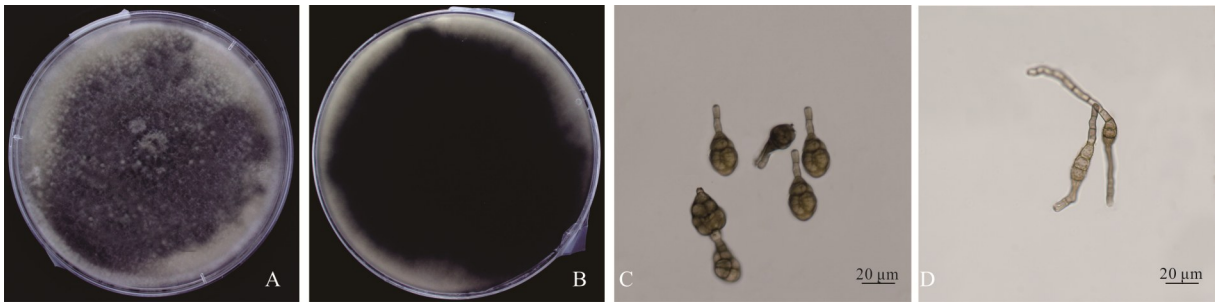


图4 菌株XJZSYCM-3形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of strain XJZSYCM-3

表4 炭疽菌属构建系统发育树的菌株信息

Table 4 Information on the strains of *Colletotrichum* sp. constructing the phylogenetic tree

种名 Species name	菌株 Strains	GenBank登录号 GenBank accession number				
		ITS	*CHS-1*	*GAPDH*	*ACT*	*TUB2*
尖孢炭疽菌 *Colletotrichum acutatum*	CBS 112996	JQ005776	JQ005797	JQ948677	JQ005839	JQ005860
博宁炭疽菌 *Colletotrichum boninense*	CBS 123755	JQ005153	JQ005327	JQ005240	JQ005501	JQ005588
菱孢炭疽菌 *Colletotrichum rhombiforme*	CBS 129953	JQ948457	JQ949118	JQ948788	JQ949778	JQ950108
大豆炭疽菌 *Colletotrichum sojae*	CBS 13487	MG600752	MG600863	MG600813	MG600957	MG601019
大豆炭疽菌 *C. sojae*	CBS 18181	MG600753	MG600864	MG600814	MG600958	MG601020
毁灭炭疽菌 *Colletotrichum destructivum*	CBS 128509	KM105214	KM105284	KM105569	KM105424	KM105494
毁灭炭疽菌 *C. destructivum*	CBS 520.97	KM105217	KM105287	KM105572	KM105427	KM105497
毁灭炭疽菌 *C. destructivum*	CBS 114801	KM105219	KM105289	KM105574	KM105429	KM105499
香蕉炭疽菌 *Colletotrichum musae*	CBS 207.80	KC566790	KC566357	KC566644	KC566936	KC566212
多主炭疽菌 *Colletotrichum plurivorum*	CBS 125473	MG600717	MG600840	MG600780	MG600924	MG600984
多主炭疽菌 *C. plurivorum*	CBS 125474	MG600718	MG600841	MG600781	MG600925	MG600985
Colletotrichum acerbum	CBS 128530	JQ948459	JQ949120	JQ948790	JQ949780	JQ950110
兰花炭疽菌 *Colletotrichum cliviicola*	CBS 125375	MG600733	MG600850	MG600795	MG600939	MG601000
兰花炭疽菌 *C. cliviicola*	CBS 133705	MG600732	MG600849	MG600794	MG600938	MG600999
Colletotrichum orchidearum	CBS 135131	MG600738	MG600855	MG600800	MG600944	MG601005
C. orchidearum	CBS 136877	MG600739	MG600856	MG600801	MG600945	MG601006
平头刺盘孢菌 *Colletotrichum truncatum*	CBS 125327	GU227887	GU228377	GU228279	GU227985	GU228181
平头刺盘孢菌 *C. truncatum*	CBS 151.35	GU227862	GU228352	GU228254	GU227960	GU228156
Colletotrichum tibetense	LC 7364	MZ595840	MZ799339	MZ772866	MZ664138	MZ673961
长直孢炭疽菌 *Colletotrichum gigasporum*	CBS 15975	KF687726	KF687776	KF687839	KF687783	KF687884
长直孢炭疽菌 *C. gigasporum*	CBS 125731	KF687727	KF687771	KF687837	KF687794	KF687879
长直孢炭疽菌 *C. gigasporum*	CBS 18152	KF687734	KF687775	KF687838	KF687799	KF687885
甘薯黑痣病菌 *M. infuscans*	CBS 869.96	JQ005780	JQ005801	JX546612	JQ005843	JQ005864

提交NCBI，GenBank登录号依次为PV920205、PX021413、PX056313、PV972777、PX115489。系统发育结果分析[以甘薯(*Dioscorea esculenta*)和黑痣病菌(*Monilochaetes infuscans*)CBS 869.96为外群]表明，XJZSYCM-1与*C. tibetense* LC 7364形成100%支持率(图5)。综合形态学特征与分子系统学分析，该病原菌鉴定为*C. tibetense*。

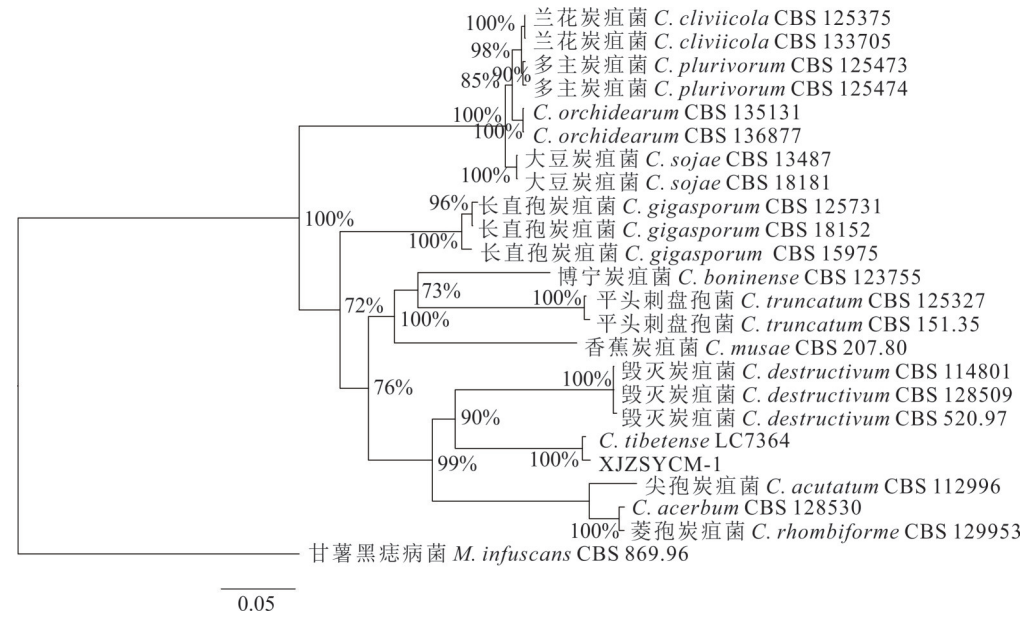


图 5　菌株 XJZSYCM-1 基于 *ITS*、*TUB2*、*GAPDH*、*CHS-1*、*ACT* 多基因序列的贝叶斯系统发育树

Fig. 5　Bayesian inference (BI) phylogenetic tree of strain XJZSYCM-1 based on *ITS*, *TUB2*, *GAPDH*, *CHS-1* and *ACT* multi-gene sequences

采用 *ITS*、*LSU*、*TUB2* 基因特异性引物对菌株 XJZSYCM-2 进行 PCR 扩增(表 5),序列提交 NCBI,GenBank 登录号依次为 PV915427、PV937034、PV927295。系统发育分析(外群为 *P. minima* CBS 524.50)表明,菌株 XJZSYCM-2 与 *A. nigripycnidia* XJAU HC77 构成 100% 支持率的单系群(图 6)。基于形态学特征与分子系统学鉴定结果,该病原菌确定为 *A. nigripycnidia*。

表 5　壳二孢属构建系统发育树的菌株信息

Table 5　Information on the strains of *Ascochyta* sp. constructing the phylogenetic tree

种名 Species name	菌株 Strains	GenBank 登录号 GenBank accession number		
		ITS	*LSU*	*TUB2*
蚕豆壳二孢 *Ascochyta fabae*	CBS 524.77	GU237880	GU237963	GU237526
蚕豆壳二孢 *A. fabae*	CBS 649.71	GU237902	GU237964	GU237527
苜蓿壳二孢 大孢变种 *Ascochyta medicaginicola* var. *macrospora*	CBS 112.53	GU237749	GU238101	GU237628
苜蓿壳二孢 大孢变种 *A. medicaginicola* var. *macrospora*	CBS 404.65	GU237859	GU238102	GU237629
Ascochyta nigripycnidia	XJAU HC77	OM701805	OM701910	OM891441
豌豆褐斑病菌 *Ascochyta pisi*	CBS 122750	KT389477	KT389694	KT389769
豌豆褐斑病菌 *A. pisi*	CBS 122751	KP330432	KP330444	KT389771
丁香壳二孢 *Ascochyta syringae*	CBS 545.72	KT389483	KT389700	KT389772
Preussia minima	CBS 524.50	MH856741	MH868263	KT389777

采用 *ITS*、*GADPH*、*ALT*、*TEF* 基因特异性引物对菌株 XJZSYCM-3 进行 PCR 扩增(表 6),序列提交 NCBI,GenBank 登录号依次为 PV919569、PX021415、PX021414、PX021416。系统发育分析[以囊状匍柄霉(*S. vesicarium*)CBS 191.86 为外群]显示,菌株 XJZSYCM-3 与交链格孢(*A. alternata*)CBS 612.72 形成 99% 支持率的单系群(图 7)。结合形态学特征与分子系统学鉴定结果,该病原菌确定为交链格孢(*A. alternata*)。

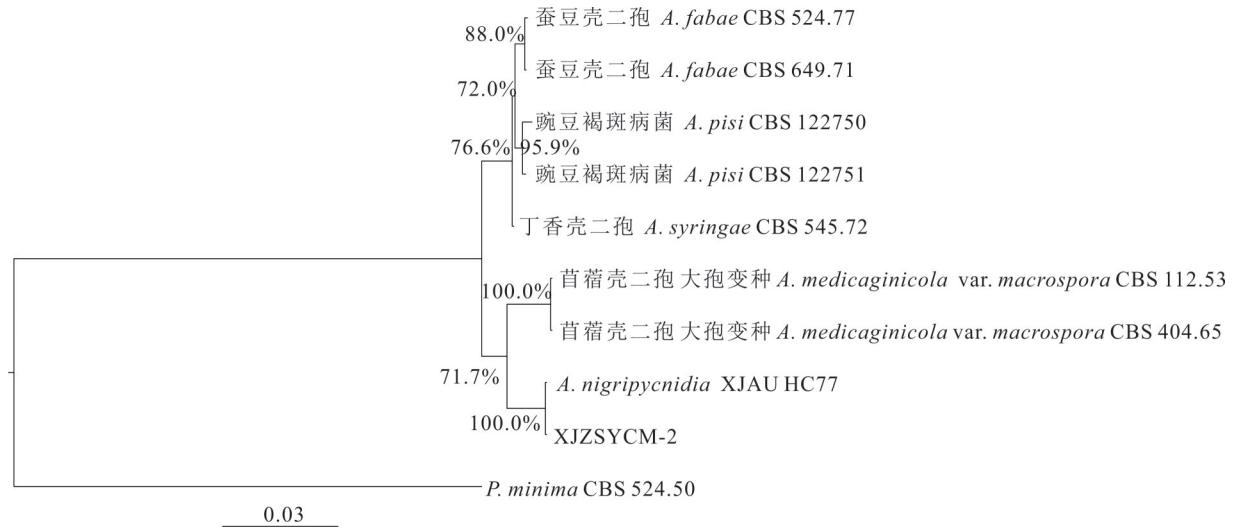


图6 菌株XJZSYCM-2基于*ITS*、*TUB2*、*LSU*多基因序列的贝叶斯系统发育树

Fig. 6 Bayesian inference (BI) phylogenetic tree of strain XJZSYCM-2 based on *ITS*, *TUB2* and *LSU* multi-gene sequences

表6 链格孢属构建系统发育树的菌株信息

Table 6 Information on the strains of *Alternaria* sp. constructing the phylogenetic tree

种名 Species name	菌株 Strains	GenBank登录号 GenBank accession number			
		ITS	*GAPDH*	*ALT*	*TEF*
六出花链格孢 *Alternaria alstroemeriae*	CBS 118808	KP124296	KP124153	KP123845	KP125071
梨黑斑链格孢 *Alternaria gaisen*	CBS 118488	KP124427	KP124278	KP123975	KP125206
交链格孢 *A. alternata*	CBS 612.72	KP124308	KP124165	KP123861	KP125084
棉链格孢 *Alternaria gossypina*	CBS 104.32	KP124430	JQ646312	JQ646395	KP125209
交链孢霉 *Alternaria jacinthicola*	CBS 133751	KP124438	KP124287	KP123984	KP125217
番茄链格孢 *Alternaria tomato*	CBS 114.35	KP124446	KP124295	KP123992	KP125225
巴斯基链格孢 *Alternaria burnsii*	CBS 118816	KP124423	KP124273	KP123970	KP125201
囊状匍柄霉 *Stemphylium vesicarium*	CBS 191.86	MH861935	—	—	KC584731

—：该区段登录号尚未上传 The accession number for this segment has not been uploaded.

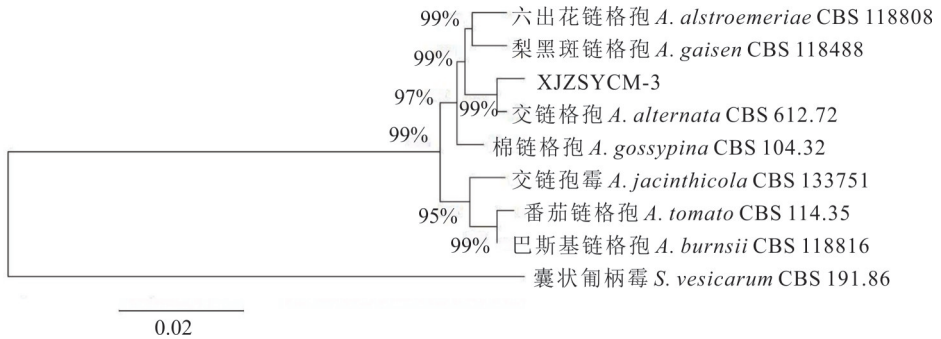


图7 菌株XJZSYCM-3基于*ITS*、*ALT*、*GAPDH*、*TEF*多基因序列的最大似然系统发育树

Fig. 7 Maximum likelihood phylogenetic tree of strain XJZSYCM-3 based on *ITS*, *ALT*, *GAPDH* and *TEF* multi-gene sequences

2.5 致病性测定

通过致病性测试分析(图8)发现,在为期7 d的观察中,试验菌株XJZSYCM-1(*C. tibetense*)、XJZSYCM-2(*A. nigripycnidia*)和XJZSYCM-3(*A. alternata*)在离体绿草莓叶片接种后第2天,接种部位周边均观察到菌丝

扩展并伴随叶片褪绿现象，对照组未出现任何变化；接种后第 4 天，XJZSYCM-3（*A. alternata*）与 XJZSYCM-1（*C. tibetense*）处理组形成黑色坏死斑，而 XJZSYCM-2（*A. nigripycnidia*）处理组则呈现大面积褪绿；持续观察至第 7 天，XJZSYCM-2（*A. nigripycnidia*）接种叶片出现菌丝大面积生长并伴随坏死斑，最终导致全叶坏死腐烂，对照组在整个 7 d 内均无症状。通过对病健交界区域组织进行分离培养，成功获得与初始接种一致的菌株，符合柯赫氏法则验证标准，证实上述 3 株菌株均为绿草莓叶斑病的致病菌。

经不同病原菌接种处理后，叶片病害症状呈现差异。其中，接种 *C. tibetense* 的叶片，病斑呈深褐色至灰褐色，多为圆形或近圆形，边缘相对清晰；接种交链格孢（*A. alternata*）的叶片，病斑颜色偏深紫黑色，形状不规则；接种 *A. nigripycnidia* 的叶片，病斑呈黄褐色至棕褐色，病斑与健康组织的界限相对模糊，且叶片整体表现出黄化迹象，病斑多为不规则斑块状。

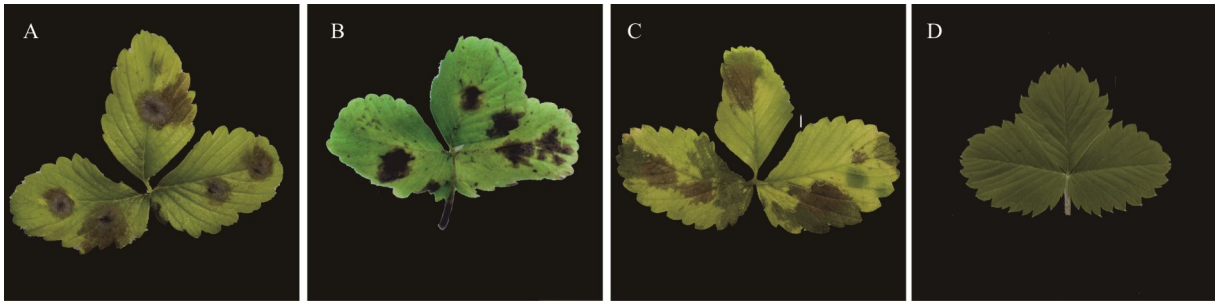


图 8　绿草莓叶斑病接种 7 d 叶片发病症状

Fig. 8　Symptoms of leaf spot disease on *F. viridis* seven days after inoculation

A～C：*C. tibetense*、交链格孢和 *A. nigripycnidia* 的致病性测定，D：对照。A－C：Pathogenicity tests of *C. tibetense*, *A. alternata*, and *A. nigripycnidia*; D: Control.

2.6　病原菌生物学特性

生物学特性结果表明，交链格孢（*A. alternata*）在 CMA、PSA、CA、PDA 培养基上均生长良好，菌落直径较大，最适生长培养基为 CMA，在 5～35 ℃菌丝生长速度差异显著（$P<0.05$），最适菌丝生长温度为 25 ℃；在 5 ℃时菌丝生长最慢。最适碳、氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨；pH 在 4～11 均能生长，最适 pH 为 7（表 7）。

A. nigripycnidia 在供试培养基中生长均较为缓慢，最适生长培养基为 PCA，25 ℃下菌落直径显著大于其他温度（$P<0.05$）；菌丝生长碳源和氮源利用效果最好的是可溶性淀粉和硫酸铵；pH 为 7～8 时菌落直径显著大于其他 pH（$P<0.05$）。

C. tibetense 在 PDA 培养基上菌丝生长最快，其次为 CA 培养基，在 OA 和 WA 培养基上生长缓慢。最适生长温度为 25 ℃；菌丝生长碳、氮源利用效果最好的是可溶性淀粉和蛋白胨，其利用效率均显著高于其他供试碳、氮源（$P<0.05$）；pH 为 6～8 时菌落直径显著大于其他 pH（$P<0.05$）。最适 pH 为 7。

不同菌株的菌丝热致死温度存在差异（表 8）。交链格孢（*A. alternata*）和 *A. nigripycnidia* 对热敏感，55 ℃水浴 10 min 即可致死；而 *C. tibetense* 表现出更高的热耐受性，在 64 ℃下处理 10 min 其菌丝失活。

3　讨论

叶斑病是危害牧草生产的一种常见重要病害，目前已报道的引起牧草叶斑病的主要病原物为链格孢属、核腔菌属（*Pyrenophora* sp.）、平脐蠕孢属（*Bipolaris* sp.）、弯孢属（*Curvularia* sp.）和近壳多孢属（*Parastagonospora* sp.）等[40]。本研究对新疆昭苏县绿草莓叶斑病开展病原研究，综合形态学与分子生物学鉴定结果，明确其病原菌为 *C. tibetense*、*A. nigripycnidia*、交链格孢（*A. alternata*）。

炭疽菌属作为一类重要的植物病原真菌，其代表种 *C. tibetense* 在病害发生中具有显著的影响。根据文献报道[41]，当前已鉴定的炭疽病病原菌共有 23 种，包含 5 个复合种［分别为胶孢炭疽菌（*Colletotrichum*

表7 不同培养条件下3种病原菌菌落生长直径

Table 7 Colony diameters of three pathogenic fungi under different culture conditions

处理 Treatment	培养条件 Culture condition	交链格孢 *A. alternata*	*A. nigripycnidia*	*C. tibetense*
培养基 Medium	马铃薯葡萄糖琼脂 Potato dextrose agar	52.89±2.05a	28.69±0.41ab	47.11±1.40a
	马铃薯胡萝卜琼脂 Potato carrot agar	52.05±1.71a	31.30±1.48a	41.67±2.02b
	马铃薯蔗糖琼脂 Potato sucrose agar	54.19±0.60a	19.99±1.23c	45.79±0.96a
	燕麦片琼脂 Oatmeal agar	48.08±3.05b	26.82±1.69b	23.91±1.08d
	玉米粉琼脂 Corn meal agar	54.70±1.87a	29.33±2.69ab	26.42±2.22d
	水琼脂 Water agar	21.02±1.93c	12.79±0.92d	26.29±1.37d
	胡萝卜水琼脂 Carrot agar	53.09±0.84a	30.43±1.27a	46.02±0.32a
	查氏培养基 Czapek agar	48.33±1.53b	21.35±0.70c	32.49±2.16c
温度 Temperature (℃)	5	8.34±2.12f	7.57±0.75d	5.97±0.26d
	10	19.39±0.63e	14.66±2.21c	21.67±1.31c
	15	23.69±1.97d	23.12±1.91b	23.61±0.95c
	20	41.34±1.21c	24.28±1.24b	44.37±1.09b
	25	47.61±1.69a	34.48±0.78a	55.95±2.95a
	30	44.90±1.50b	25.19±0.47b	53.67±2.72a
	35	39.89±0.59c	13.95±1.47c	44.57±1.53b
碳源 Carbon source	D-果糖 D-fructose	40.58±1.00e	12.70±0.47d	19.67±1.37bc
	山梨醇 Sorbitol	43.24±0.93d	6.92±0.02f	12.66±0.09d
	乳糖 Lactose	49.35±1.29c	10.41±0.44de	15.35±0.14cd
	麦芽糖 Maltose	59.73±0.74b	9.66±0.77ef	11.27±1.81d
	葡萄糖 Glucose	58.80±1.13b	16.53±0.83c	18.78±0.68bc
	甘露醇 Mannitol	43.79±1.38d	15.79±0.85c	24.51±2.51b
	菊糖 Inulin	65.24±0.57a	27.78±3.07b	19.86±0.73bc
	可溶性淀粉 Amylogen	66.26±0.51a	33.54±2.42a	30.78±7.86a
氮源 Nitrogen source	硝酸钾 Potassium nitrate	42.02±1.36b	10.74±0.81de	26.45±0.72e
	蛋白胨 Peptone	58.52±3.07a	13.85±1.43c	56.14±1.06a
	牛肉膏 Beef extract	56.16±3.24a	12.93±1.31cd	36.42±1.28cd
	酵母浸粉 Yeast extract	56.55±0.74a	19.18±2.49b	42.99±2.29b
	尿素 Urea	17.13±2.64d	8.00±0.59f	34.08±1.37d
	氯化铵 Ammonium chloride	32.15±4.24c	10.08±0.49ef	26.96±1.34e
	硫酸铵 Ammonia sulfate	35.15±0.97c	22.99±1.00a	38.05±1.04c
	甘氨酸 Glycine	33.73±4.34c	11.89±1.49cde	18.82±1.36f
pH	4	51.16±1.23c	14.46±2.39e	38.81±2.50e
	5	52.91±2.02c	33.14±2.38cd	49.93±2.53c
	6	57.83±4.57b	35.92±1.80bc	53.32±0.91b
	7	63.28±1.95a	53.04±2.09a	58.41±1.96a
	8	62.64±2.38a	52.63±3.12a	56.53±1.06a
	9	59.21±1.46ab	39.45±7.05b	48.40±0.71c
	10	49.26±1.63c	28.69±2.26d	43.73±2.18d
	11	48.92±1.09c	10.77±0.81e	38.60±1.01e
光照 Light	全黑暗 Full darkness	47.97±2.49b	32.33±0.81a	56.21±1.77a
	12 h光照/12 h黑暗 12 hours dark/12 hours light	55.43±0.79a	31.51±0.56a	53.72±1.28a
	全光照 Full light	46.60±1.21b	28.61±1.23b	46.60±1.21b

同列不同字母表示各培养条件之间差异显著($P<0.05$)。Different letters in the same column mean significant difference among the cultural conditions at $P<0.05$.

表 8　3种病原菌菌丝致死温度

Table 8　The lethal temperature of mycelium for three pathogens

菌株 Strains	温度 Temperature (℃)												
	45	50	51	52	53	54	55	60	61	62	63	64	65
交链格孢 *A. alternata*	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－
A. nigripycnidia	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－
C. tibetense	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－

＋：生长 Growing；－：不生长 No growing.

gloeosporioides）、尖孢炭疽菌、博宁炭疽菌、黑线炭疽菌（*Colletotrichum dematium*）和平头炭疽菌（*Colletotrichum truncatum*）]和两个单体类[包括黑炭疽菌（*Colletotrichum nigrum*）和球炭疽菌（*Colletotrichum coccodes*）]，本研究从绿草莓上分离获得的炭疽菌属菌株，是该病原在绿草莓这一特定寄主上的首次明确报道。*A. nigripycnidia* 隶属于子囊菌门（Ascomycota）座囊菌纲（Dothideomycetes）格孢腔菌目（Pleosporales）亚隔孢壳科（Didymellaceae）真菌，该菌的学名由 Boerema 等[42]于 1997 年首次描述并将其归入壳二孢属（*Ascochyta*）。既往研究显示，该菌具有较为广泛的寄主谱。侯刘娟[43]在伊犁河谷野果林林木病害的调查中发现，该真菌为引起蔷薇科绣线菊属金丝桃叶绣线菊（*Spiraea hypericifolia*）叶斑病的病原，此外，Ghiat 等[44]研究证实，*A. nigripycnidia* 可侵染亚麻（*Linum usitatissimum*）、鹰嘴豆（*Cicer arietinum*）、苜蓿（*Medicago sativa*）等多种豆科植物。本研究首次在绿草莓上发现 *A. nigripycnidia* 的侵染，这一研究再次证实了该病原菌可以对同科不同属植物进行侵染。交链格孢（*A. alternata*）是许多植物病害的致病菌，包括核桃枝枯病[45]、芍药黑斑病[46]等。此外，它还对甜菜（*Beta vulgaris*）、烟草（*Nicotiana tabacum*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）等经济作物造成严重损害[47]，虽然链格孢属作为多种作物的致病菌，但其侵染绿草莓的相关研究尚未见报道。

致病性结果显示，交链格孢（*A. alternata*）和 *C. tibetense* 在接种绿草莓叶片后第 4 天即可诱发典型叶斑病症状，表现为黑色坏死病斑并伴随病斑面积持续扩展。然而，分离率最高的 *A. nigripycnidia* 则表现出滞后致病性，其引发的病症直至接种后第 7 天才明显显现。基于上述结果推测，绿草莓叶斑病存在典型的复合侵染特征，病害的早期发生可能主要由交链格孢（*A. alternata*）和 *C. tibetense* 单独或共同侵染，两类病原菌的早期侵染为后续病害发展奠定基础；而在病害中后期，*A. nigripycnidia* 作为主要病原菌，与前述病原菌形成复合侵染体系，通过时序上的协同作用加剧病害严重度。该复合侵染的动态机制有待进一步研究验证。

生物学特性分析显示，交链格孢（*A. alternata*）的最适菌丝生长培养基为 CMA，最适菌丝生长温度为 25 ℃，pH 适应范围为 4～11，pH 为 7 时菌丝生长最快，该特性与邓小芸等[45]报道的核桃枝枯病病原菌交链格孢的生物学特性略有不同；最适病原菌菌丝生长的碳源和氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨，与谷清义等[46]对芍药黑斑病病原菌交链格孢的研究结果有差异，上述现象可能为病原菌的寄主特异性及地理气候条件共同作用，仍需后续研究深入揭示。而 *C. tibetense*、*A. nigripycnidia* 的生物学特性报道较为缺乏，有待深入研究。

4　结论

本研究明确了引起昭苏县绿草莓叶斑病的病原菌有交链格孢（*A. alternata*）、*C. tibetense* 和 *A. nigripycnidia*，均为在绿草莓上的首次发现。基于对 3 种病原菌生物学特性的测定，本研究揭示了不同培养环境对其菌丝体生长状况的具体影响，明确病害与病原菌的生物学特性可以初步了解病害的发病阈值条件（温湿度、光照）、侵染循环关键环节（孢子萌发期、侵入期）等特性，能精准锁定防控最佳时机。相关结果可为深入解析该病害的发生与流行规律、建立预测预报方法及制定综合防控策略提供理论支撑。

参考文献 References：

[1]　Yu H Y, Feng J Y, Wen Y Q. Investigation and classification of wild strawberry germplasm resources in Qinba Mountain area.

Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2024, 70(9): 1-9.
于海燕, 冯嘉玥, 文颖强. 秦巴山区野生草莓种质资源调查及分类研究. 陕西农业科学, 2024, 70(9): 1-9.

[2] Lei J J, Yang G, Dai H P, *et al*. Wild germplasm resources of strawberry in China. Journal of Fruit Science, 1997, 14(3): 198-200.
雷家军, 杨高, 代汉平, 等. 我国的草莓野生种质资源. 果树科学, 1997, 14(3): 198-200.

[3] Lei J J, Deng M Q, Wu L P, *et al*. *Fragaria viridis* Duch. distributed in China was certified by classificatory observation and RAPD analysis. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28(2): 119-122.
雷家军, 邓明琴, 吴禄平, 等. 新疆天山野生草莓与绿色草莓(*Fragaria viridis* Duch.)同一性的鉴定. 园艺学报, 2001, 28(2): 119-122.

[4] Lei J J, Tatsuya M, Deng M Q. Studies on the diploid strawberry species *Fragaria mandschurica* Staudt. Journal of Fruit Science, 2001, 18(6): 337-340.
雷家军, 望月龙也, 邓明琴. 草莓属二倍体种东北草莓(*Fragaria mandschurica* Staudt)研究. 果树学报, 2001, 18(6): 337-340.

[5] Lei J J, Xue L, Dai H P, *et al*. Species and distribution of the *Fragaria* in the world//Advance of strawberry research (Ⅳ). Beijing: China Agriculture Press, 2015: 364-375.
雷家军, 薛莉, 代汉萍, 等. 世界草莓属(*Fragaria*)植物的种类与分布//草莓研究进展(Ⅳ). 北京: 中国农业出版社, 2015: 364-375.

[6] Li W X, Ma S M, Yuan Z F. The germplasm resources and breeding of good strains on strawberry of China. Journal of Xinyang Agricultural College, 2011, 21(4): 112-114.
李先文, 马世民, 袁正仿. 中国草莓的种质资源和良种培育. 信阳农业高等专科学校学报, 2011, 21(4): 112-114.

[7] Zhao J N, Ma Z, Liu Z P, *et al*. *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on strawberry. Mycosystema, 2016, 35(1): 114-120.
赵景楠, 马喆, 刘正坪, 等. 草莓拟盘多毛孢叶斑病的病原菌. 菌物学报, 2016, 35(1): 114-120.

[8] Zhu X Q, Zhang Q, Zheng A Z, *et al*. Isolation and identification of strawberry leaf spot disease in Shangqiu. Northern Horticulture, 2021(17): 38-43.
朱晓琴, 张奇, 郑爱珍, 等. 商丘地区草莓叶斑病的分离与鉴定. 北方园艺, 2021(17): 38-43.

[9] Baggio J S, Forcelini B B, Wang N Y, *et al*. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. Plant Disease, 2021, 105(2): 305-315.

[10] Mehmood N, Riaz A, Naz F, *et al*. First report of strawberry leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Pakistan. Plant Disease, 2018, 102(4): 820.

[11] Xu Y H, Zhao Y, Gao C L, *et al*. Identification of pathogens causing strawberry leaf spot and determination of fungicide sensitivity. Journal of Jilin Agricultural University, 2025, 47(1): 34-39.
许永华, 赵玥, 高成林, 等. 草莓叶斑病的病原菌鉴定及杀菌剂敏感性测定. 吉林农业大学学报, 2025, 47(1): 34-39.

[12] Wan C Y. Investigation of foliar fungal diseases in alpine grassland plants of Bayanbulak and the effects of major disease on forage quality. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2025.
万超越. 巴音布鲁克高寒草地植物叶部真菌病害调查及主要病害对牧草品质的影响. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2025.

[13] Li Y Z, Nan Z B. Diagnosis and assessment methods for forage crop diseases. Nanjing: Jiangsu Phoenix Science and Technology Publishing House, 2015.
李彦忠, 南志标. 牧草病害诊断调查与损失评定方法. 南京: 江苏凤凰科学技术出版社, 2015.

[14] Fang Z D. Method of study on plant pathogen (the third edition). Beijing: Chinese Agricultural Press, 1998.
方中达. 植病研究方法(第三版). 北京: 中国农业出版社, 1998.

[15] Gong G S, Xu Q, Zhang M, *et al*. A simple method for single fungal spore isolation. Journal of Maize Sciences, 2010, 18(1): 126-127, 134.
龚国淑, 徐琴, 张敏, 等. 一种简便的病原真菌单孢分离方法研究. 玉米科学, 2010, 18(1): 126-127, 134.

[16] Liu F, Zulpya A, Li K M, *et al*. Identification of new pathogens of alfalfa anthracnose (*Colletotrichum liriopes*) and preliminary studyon biological characteristics. Xinjiang Agricultural Sciences, 2024, 61(3): 690-698.
柳丰, 祖丽皮耶·安外尔, 李克梅, 等. 紫花苜蓿炭疽病病原新记录种(*Colletotrichum liriopes*)的鉴定及生物学特性分析. 新疆农业科学, 2024, 61(3): 690-698.

[17] Wei J C. Handbook of fungal identification. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979.

魏景超. 真菌鉴定手册. 上海：上海科学技术出版社，1979.

[18] Zang M. Annals of fungi in China. Beijing：Science Press，2013.
臧穆. 中国真菌志. 北京：科学出版社，2013.

[19] Yi R H，Zhu X R，Zhou E X. Simplified CTAB method for rapid micro-extraction of filamentous fungal DNA. Journal of Zhanjiang Ocean University，2003，23(6)：72－73.
易润华，朱西儒，周而勋. 简化CTAB法快速微量提取丝状真菌DNA. 湛江海洋大学学报，2003，23(6)：72－73.

[20] Zhang G F，Yang X F，Yu Y W，*et al*. Identification，pathogenicity analysis，and fungicide screening of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Zhejiang province. Plant Protection，2025，51(3)：206－217.
张国芳，杨肖芳，郁瑜雯，等. 浙江省草莓炭疽病病原菌鉴定、致病力分析及室内药剂筛选. 植物保护，2025，51(3)：206－217.

[21] Jing Z Q，Guo Z J，Sun Q，*et al*. Identification of pathogen causing anthracnose of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Gansu Province. Northern Horticulture，2024(15)：1－7.
荆卓琼，郭致杰，孙倩，等. 甘肃省辣椒炭疽病病原菌鉴定. 北方园艺，2024(15)：1－7.

[22] Zhang X K. The identification，biological characteristics and fungicide screening of the root rot pathogen on *Trifolium repens*. Urumqi：Xinjiang Agricultural University，2024.
张许可. 白三叶草根腐病病原鉴定、生物学特性研究及室内药剂筛选. 乌鲁木齐：新疆农业大学，2024.

[23] Deng Q Q，Xu S Q，Mei Y，*et al*. Research progress on anthracnose and its pathogens in *Amomi fructus*. Chinese Agricultural Science Bulletin，2024，40(17)：120－126.
邓权清，徐世强，梅瑜，等. 砂仁炭疽病及其致病病原菌研究进展. 中国农学通报，2024，40(17)：120－126.

[24] Chen Q. Phylogenetic and taxonomic studies on Didymellaceae. Beijing：China Agricultural University，2015.
陈倩. 亚隔孢壳科的系统演化及分类学研究. 北京：中国农业大学，2015.

[25] Du L，Yuan X E，Cheng S Y，*et al*. Identification of the pathogen of *Alternaria* leaf spot on iris. Plant Protection，2024，50(6)：209－214，220.
杜磊，袁信恩，程淑媛，等. 鸢尾链格孢叶斑病病原菌鉴定. 植物保护，2024，50(6)：209－214，220.

[26] White T J，Bruns T D，Lee S，*et al*. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols：A Guide to Methods and Applications，1990，18(1)：315－322.

[27] Myllys L，Stenroos S，Thell A. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi：glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes. The Lichenologist，2002，34(3)：237－246.

[28] Jaklitsch W M，Komon M，Kubicek C P，*et al*. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea*/*Trichoderma*. Mycologia，2005，97(6)：1365－1378.

[29] Carbone I，Kohn L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. Mycologia，1999，91(3)：553－556.

[30] Aime M C. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). Mycoscience，2006，47(3)：112－122.

[31] Hong S G，Cramer R A，Lawrence C B，*et al*. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa：analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genetics and Biology，2005，42(2)：119－129.

[32] 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. Mycologia，2003，95(5)：872－895.

[33] O'Donnell K，Sarver B A J，Brandt M，*et al*. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*，including isolates from the multistate contact lens-associated U. S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. Journal of Clinical Microbiology，2007，45(7)：2235－2248.

[34] Pan L Q，Zhang L，Yang C D，*et al*. Identification and biological characteristics of *Fusarium sporotrichioide* isolated from *Medicago sativa* root. Acta Prataculturae Sinica，2015，24(10)：88－98.
潘龙其，张丽，杨成德，等. 紫花苜蓿根腐病原菌——拟枝孢镰刀菌的鉴定及其生物学特性研究. 草业学报，2015，24(10)：88－98.

[35] Zhang L L，Luo T，Li Y Z. Identification and biological characteristics of *Colletotrichum americae-borealis* causing alfalfa anthracnose in Heilongiiang. Pratacultural Science，2020，37(10)：2057－2068.
张梨梨，罗庭，李彦忠. 黑龙江苜蓿炭疽病病原鉴定及其生物学特性. 草业科学，2020，37(10)：2057－2068.

[36] Xi Z G，You J M，Zheng L，*et al*. Identification and biological characteristics of the pathogen causing leaf spot on *Coptis chinensis* in Hubei Province. Journal of Plant Protection，2018，45(2)：315－321.

席中刚, 游景茂, 郑露, 等. 湖北省黄连叶斑病病原鉴定及其生物学特性. 植物保护学报, 2018, 45(2): 315－321.

[37] Yang C D, Bian J, Chen T X, *et al*. Biological characteristics of the *Angelica sinensis* anthracnose causal agent, *Colletotrichum dematium*. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(6): 139－144.
杨成德, 卞静, 陈泰祥, 等. 当归炭疽病病菌的生物学特性研究. 草业学报, 2017, 26(6): 139－144.

[38] Zhang X K, Xia H F, Chen G L, *et al*. Identification and biological characterisation of *Fusarium* root rot pathogens of white clover. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(12): 175－187.
张许可, 夏红飞, 陈国立, 等. 白三叶草镰刀菌根腐病病原鉴定及其生物学特性. 草业学报, 2024, 33(12): 175－187.

[39] Zhang T Y. Annals of fungi in China (volume 16) *Alternaria* sp. Beijing: Science Press, 2003.
张天宇. 中国真菌志(第十六卷)链格孢属. 北京: 科学出版社, 2003.

[40] Chen M H, Song S, Cui X F, *et al*. Isolation, identification of pathogens causing leaf spot disease on gramineous forages in natural grasslands of China and screening of sensitive fungicides//Proceedings of the 2024 academic annual meeting of Chinese Society for Plant Pathology. Changchun: China Agricultural Science and Technology Press, 2024.
陈梦淮, 宋爽, 崔秀芬, 等. 我国天然草原禾本科牧草叶斑病病原菌的分离鉴定及其敏感药剂筛选//中国植物病理学会2024年学术年会论文集. 长春: 中国农业科学技术出版社, 2024.

[41] Ji Y, Li X, Gao Q H, *et al*. *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry: Discovery history, global diversity, prevalence in China, and the host range of top two species. Phytopathology Research, 2022, 4(1): 42.

[42] Boerema G H, de Gruyter J, Noordeloos M E. Contributions towards a monograph of Phoma (Coelomycetes)－Ⅳ. Section Heterospora: taxa with large sized conidial dimorphs, *in vivo* sometimes as *Stagonosporopsis* synanamorphs. Persoonia, 1997, 16(3): 335－371.

[43] Hou L J. Investigation on main fungal diseases of forest trees in the wild fruit forest in Yili. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.
侯刘娟. 伊犁野果林中林木主要菌物病害的调查. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.

[44] Ghiat N, Meamiche-Neddaf H, Infantino A, *et al*. Pathogenicity of *Ascochyta nigripycnidia*, *Didymella pinodella* and *Boeremia exigua* isolated from *Trifolium alexandrinum* in Algeria and assessment of their host range on some Fabaceae. Journal of Plant Pathology, 2025, 107(2): 1133－1146.

[45] Deng X Y, Gao M C, Yang C D. Biological characteristics of *Alternaria alternate* causing walnut branch blight in Longnan City, Gansu Province. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2024, 52(17): 133－137.
邓小芸, 高孟春, 杨成德. 甘肃省陇南市核桃枝枯病菌*Alternaria alternate*的生物学特性. 安徽农业科学, 2024, 52(17): 133－137.

[46] Gu Q Y, Huang C C, Wu Z P, *et al*. Identification, biological characteristics and botanical pesticide screening of the pathogen of black spot on *Paeonia lactiflora*. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2024, 47(10): 2428－2433.
谷清义, 黄晨晨, 武志鹏, 等. 芍药黑斑病病原菌的分离鉴定、生物学特性及植物源药剂筛选. 中药材, 2024, 47(10): 2428－2433.

[47] Haque M E. *Alternaria alternata* causing disease on sugar beet (*Beta vulgaris*) steckling in Arizona, USA. Journal of Advanced Agriculture & Horticulture Research, 2022, 2(1): 43－44.