

# 花生疮痂病原菌分离技术研究

薛彩云,傅俊范\*,周如军,崔建潮,徐 喆,赵杰锋,李元杰  
(沈阳农业大学植物保护学院,辽宁 沈阳,110866)

**摘要:**花生疮痂病菌在人工培养条件下生长缓慢、产孢困难,难以进行分离纯化。为了建立一套高效、实用的花生疮痂病菌组织分离和单孢分离纯化技术,研究了取样时期、取样部位、表面消毒时间、采后存放时间对组织分离法分离频率的影响,及不同培养基和取样时期对单孢分离技术的影响。结果表明,采用组织分离法,叶片分离频率显著高于茎秆,叶片表面适宜消毒时间 1 ~ 3min,采后冷藏 48h 内分离频率差异不显著,不同采集时期对叶片病菌分离频率无显著影响;采用改进的稀释平板法成功分离纯化到大量单孢子菌落,PLDA(花生煎汁培养基)上的单孢子菌落多于 PDA,对杂菌的抑制作用显著大于 PDA,发病早期和中期的病秆可获得大量单菌落,但发病后期只能获得极少单菌落。

**关键词:**花生疮痂病;*Sphaceloma arachidis*;分离技术;单孢分离;组织分离  
**中图分类号:**S432.4 + 4,S565.2   **文献标识码:**A   **文章编号:**1007 – 9084(2017)03 – 0386 – 07

## A technique for isolation of *Sphaceloma arachidis* from infected peanut

XUE Cai – yun,FU Jun – fan\*,ZHOU Ru – jun,CUI Jian – chao,XU Zhe,ZHAO Jie – feng,LI Yuan – jie  
(College of Plant Protection,Shenyang Agricultural University,Shenyang 110866,China)

**Abstract:**The causal agent of peanut scab disease is difficult to isolate due to its extremely slow growth and difficult to sporulate on agar media. In this study,an efficient technique for tissue isolation and single – spore isolation of the pathogene was established. Results showed that pathogen isolation frequency from leaves was significantly higher than that of stems. The optimum surface – sterilizing time was 1 – 3 min, sampling time and storage time within 48h after sampling had no significant influences on isolation frequency. Abundant single – spore colonies could be obtained by improved dilution – plate method, the number of single – spore colonies on peanut leaf decoc-tion agar (PLDA) was more than that on PDA medium, PLDA could inhibit undesired microbes significantly. The number of single – spore colonies obtained by dilution – plate method at early and middle stage of infection was significantly greater than that of late stage, and few single – spore colonies were obtained at the late stage.

**Key words:**peanut scab disease;*Sphaceloma arachidis*;isolation technique;single – spore isolation;tissue isolation

花生疮痂病是中国花生产区近年来新流行的重要病害,由花生痂圆孢(*Sphaceloma arachidis* Bit. & Jenk.)引起<sup>[1]</sup>。该病害 1940 年首次在南美巴西发现,阿根廷、日本、中国相继报道<sup>[1~5]</sup>。花生疮痂病在我国发生普遍,危害严重,福建、广东、广西、河北、河南、江苏、山东、辽宁等省份花生产区均曾暴发流行<sup>[5~13]</sup>。辽宁作为我国花生主要种植区,种植面积日益增大。近年来,花生疮痂病在辽宁多地暴发流

行,严重危害花生生产<sup>[13]</sup>。

痂圆孢属真菌已经引起多种植物病害。该属病原菌培养形态特征多表现为:菌落形态颜色多样,生长速度极慢,菌落致密,气生菌丝不茂盛,肉革质状,隆起,有褶皱,易变异等<sup>[2~3,14~26]</sup>。菌落在培养基上生长初期像细菌或酵母菌<sup>[14,15]</sup>。该属病原菌在培养基上很难产孢或不产孢<sup>[1,15,19,27]</sup>。由于痂圆孢属病原菌人工培养生长极慢,菌落形态特殊等,导致病

收稿日期:2017-01-30  
基金项目:辽宁省农业攻关计划(2011214002);辽宁省农业领域青年科技创新人才培养资助计划(2014056)  
作者简介:薛彩云(1982-),女,山西临汾,讲师,在职博士研究生,主要从事植物真菌病害研究,E-mail:syaxue@sina.com  
\* 通讯作者:傅俊范(1958-),男,蒙古族,辽宁朝阳,教授,博士,主要从事植物病害流行学和药用植物病理学研究,E-mail:fujunfan@163.com

原菌分离困难。豇豆疮痂病菌(*Sphaceloma* sp.)在PDA上分离培养4~6d才能在组织块上长出,并且病原菌在组织块上生长明显受抑制,很容易被组织块的其它真菌覆盖,在人工培养基上很难分离<sup>[20]</sup>。葡萄黑痘病菌在PDA上分离培养10d左右方能观察到病菌菌丝<sup>[16]</sup>。芒果疮痂病菌(*S. mangiferae*)分离中,由于病菌生长缓慢,极易被杂菌污染,且病菌极易被误认为是细菌菌落,导致分离失败<sup>[15]</sup>。花生疮痂病菌除了生长速度慢、肉质状隆起、表面有褶皱、气生菌丝不发达等菌落特性外,颜色多样化,从淡黄色至黑色,偶尔有棉絮状或黑点状出现<sup>[1~3]</sup>。未见有性世代报道。花生疮痂病菌在人工培养基上起初能够形成分生孢子,而继续培养几代后产孢能力丧失<sup>[1]</sup>。关于花生疮痂病菌分生孢子类型国内外有不同报道。根岸宽山报道了两种分生孢子:小型分生孢子椭圆形,单胞,无色,有两个油球,3 $\mu\text{m}$ ×(5~7) $\mu\text{m}$ ;大型分生孢子纺锤形或棍棒形,单胞或双胞,无色,(3~4) $\mu\text{m}$ ×(10~20) $\mu\text{m}$ ,与Bitancourt记载的分生孢子相似<sup>[1]</sup>。我国学者张宝棣和蔡学清分别报道三种分生孢子<sup>[5,7]</sup>。作者在研究中也发现花生疮痂病原菌分离难,并且在人工培养基上不易产孢,难以进行单孢子分离纯化。

目前,国内外对花生疮痂病的研究主要集中在品种抗性<sup>[6,28]</sup>、药剂防治<sup>[29]</sup>、发生流行<sup>[4,6,30]</sup>等方面,未见有关花生疮痂病菌分离技术的研究报道。本研究从组织分离法和单孢分离法两方面研究病原菌分离技术,探索不同分离部位、表面消毒时间、病样保存时间、发病时期对组织分离法的影响;首次采用改良的稀释平板法进行花生疮痂病菌单孢子分离纯化,研究不同培养基和发病时期对茎秆病部孢子稀释平板法分离的影响,旨在建立一套高效、实用的组织分离和单孢子分离纯化技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分离所用病样采自辽宁花生主产区阜新市阜新蒙古族自治县阜新镇他本沙扎兰村。该采集地块未喷施过任何杀菌剂。

### 1.2 组织分离法

1.2.1 不同分离部位对分离频率的影响 病样采集后放4℃冰箱保存12h,分别对叶片和茎秆病斑部位病原菌进行分离。选取有典型病斑的叶片和茎秆,将叶片病斑部剪成2~3mm见方的组织块,茎秆病斑病健交接处剪成2~3mm长度的组织块。组织块在70%酒精中浸泡3s,0.1%升汞溶液中表面消

毒2~3min,无菌水漂洗4次,在灭菌吸水纸上吸干组织块多余水分。组织块放置于PDA平板上,25℃、12h光照条件下培养。每处理10个培养皿,每培养皿放置4个组织块,设3次重复。培养3d后每天观察记录病原菌生长情况。如有组织块长出杂菌,立即将其他未长出菌落的组织块用无菌镊子转移到新的PDA平板中。

1.2.2 表面消毒时间对分离频率的影响 采用组织分离法分离叶片病部病原菌,设置4种不同升汞溶液消毒时间:1~2min,2~3min,3~4min,4~5min。其它操作同1.2.1。

1.2.3 采后存放时间对叶片组织分离的影响 不同存放时间设定为采集后8h。采集后放在4℃冰箱保存24h和48h。对不同存放时间的病叶进行组织分离,其它操作同1.2.1。

1.2.4 病害发生时期对叶片组织分离的影响 病叶采集选在不同发病时期:2014年7月7日,7月22日,8月4日,8月19日,即每隔14~15d采集。病样采集后放4℃冰箱保存12h后进行分离。其它操作同1.2.1。

### 1.3 稀释平板法

1.3.1 两种培养基对茎秆病部分生孢子稀释平板分离的影响 将病秆剪成适当长度,自来水冲洗3次,无菌水冲洗3次。25℃、12h光照条件下保湿培养18h。选取10个2~3mm长度的独立病斑,用刀片将病斑切下,放在试管中,加入5mL无菌水,涡旋振荡3min。取0.5mL振荡的孢悬液放入培养皿中,加入9.5mL无菌水,同时加入硫酸链霉素混匀。取100 $\mu\text{L}$ 菌悬液分别置于PDA和PLDA(花生煎汁培养基:鲜花生叶200g,葡萄糖5g,琼脂粉20g,蒸馏水1000mL)平板上,涂布器涂匀,25℃、12h光照条件下培养。以上所用器具和滤纸全部经灭菌处理。每处理10个培养皿,设3次重复。每天观察菌落生长情况,在第8~10d时统计平板上病原菌和其它菌落数目。

1.3.2 病害发生时期对茎秆平板稀释分离的影响 采集时间为2014年7月7日,7月22日,8月4日,8月19日,9月2日,即每隔14~15d进行采集。分离操作和培养条件同1.3.1。每处理10个培养皿,设3次重复。

### 1.4 病原菌鉴定及致病性测定

观察植株病斑上分生孢子和分生孢子盘形态。对分离培养的病原菌进行ITS序列扩增及分析。致病性测定选用盆栽花生,接种期为4~5片复叶。将培养一个月的菌落刮下,菌丝研磨过滤,用无菌水配

置一定浓度的菌丝悬浮液,均匀喷施整株花生上,25~27℃条件下保湿。对照喷施无菌水。

1.5 数据处理与分析

单因素方差分析(ANOVA)用于分析不同消毒时间、不同采集期、采后存放时间对分离频率的影响。独立样本t检验用于分析不同分离部位对组织分离法和不同培养基对稀释平板法的影响。分离频率经反正弦转换后进行比较分析。用Microsoft Excel 计算标准误差。

2 结果与分析

2.1 组织分离法

2.1.1 不同分离部位对组织分离的影响 叶片部位目标病原菌分离频率显著高于茎秆( $P<0.05$ )。由图1可知,采用组织分离方法,叶片部位病原菌分离频率为66.7%,茎秆为13.3%,二者差异显著( $P<0.05$ )。叶片的杂菌分离百分率和未长菌组织块百分率为14.2%和19.2%,茎秆分别为59.2%和

27.5%,叶片分离的杂菌频率和未长菌的组织块频率均低于茎秆。分离培养5d开始,叶片病斑上部陆续长出肉眼可见的病菌菌落,茎秆病斑8d左右开始长出病原菌。在分离培养10d,病菌菌落仍很小(图2)。病原菌最初仅在组织病斑上部隆起,随着生长逐渐蔓延到培养基上,形态似细菌,菌落颜色呈现橘色,褶皱隆起。在PDA培养基上,25℃、12h光照条件下,培养35d(5周)的菌落直径为 $28.76\pm0.53\text{mm}$ 。

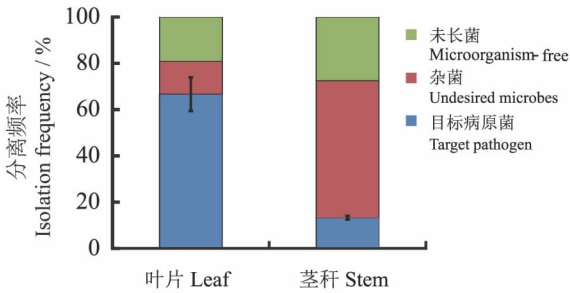
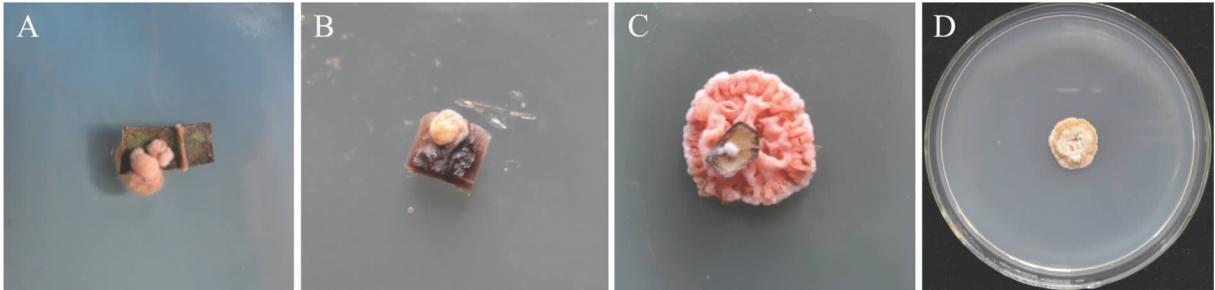


图1 叶片和茎秆病菌组织分离的分离频率  
Fig.1 Isolation frequency of leaves and stems by tissue isolation method



注:A:叶片分离培养10d的菌落;B:茎秆分离培养10d的菌落;C:叶片分离培养30d的菌落;D:PDA上35d的菌落形态  
Note:A:10-day-old colony from leaf;B:10-day-old colony from stem;C:30-day-old colony from leaf;D:35-day-old colony on PDA

图2 病菌组织分离中的菌落形态  
Fig.2 Colonies isolated by tissue isolation

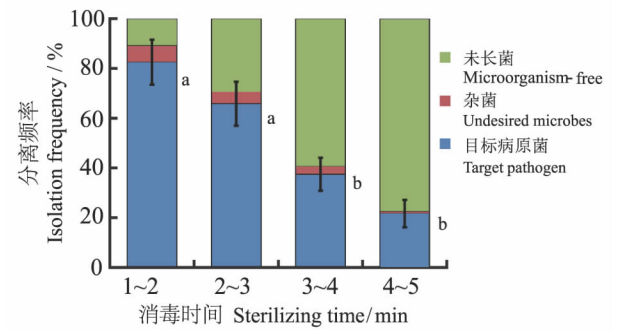


图3 不同表面消毒时间叶片病菌分离频率  
Fig.3 Isolation frequency of leaves surface-sterilized for different time

2.1.2 表面消毒时间对叶片组织分离的影响 由图3可知,随着表面消毒时间的延长,目标病菌的分

离频率呈下降趋势,分别为82.5%、65.8%、37.5%和21.7%;杂菌分离百分率呈下降趋势,分别为6.7%、5.0%、3.3%和0.8%;未长菌组织块百分率呈上升趋势,分别为10.8%、29.2%、59.2%和77.5%。叶片消毒1~2min与2~3min病原菌分离频率差异不显著,二者显著高于3~4min和4~5min( $P<0.05$ )。

2.1.3 采后存放时间对叶片组织分离的影响 如表1所示,病叶在采集后8h,病原菌分离频率为80.0%,采集后在冰箱中保存24h和48h后,分离百分率分别下降至64.2%和69.2%,三种处理的分离频率之间无显著性差异( $P>0.05$ )。杂菌菌落百分率随着保存时间的延长,呈现上升趋势。

表 1 不同保存时间叶片病菌分离频率  
Table 1 Isolation frequency of leaves with different depositing time

| 保存时间<br>Storage time          | 分离频率 Isolation frequency/% |                       |                          |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                               | 目标病原菌 Target pathogen      | 杂菌 Undesired microbes | 未长菌 Microorganism - free |
| 室温下 8h 8h at room temperature | 80.0 ± 0.04a               | 4.2                   | 15.8                     |
| 4℃/24h                        | 64.2 ± 0.06a               | 7.5                   | 28.3                     |
| 4℃/48h                        | 69.2 ± 0.08a               | 9.2                   | 21.7                     |

2.1.4 病害发生时期对叶片组织分离的影响 病害发生前期、中期、后期采集的病叶均能通过组织分离得到病原菌。4 个不同采集时间的病叶,病原菌的分离百分率均比较高,分别为 65.0%、66.7%,67.5% 和 51.7%,差异不显著 ( $P>0.05$ ) (图 4)。

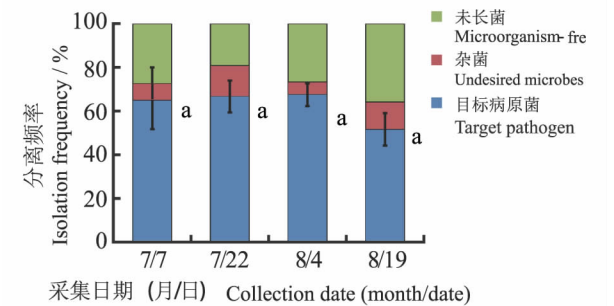
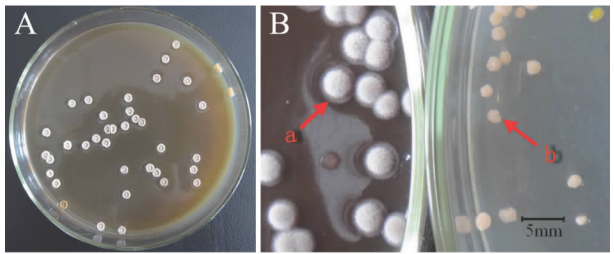


图 4 不同发病时期叶片病菌组织分离的分离频率  
Fig.4 Isolation frequency of leaves collected in different time

表 2 稀释平板法菌落数  
Table 2 Number of colonies on plates by dilution - plate method

| 培养基<br>Culture medium | 菌落数 Number of colonies |              |                           |                       |
|-----------------------|------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------|
|                       | 目标病原菌 Target pathogen  | 细菌 Bacteria  | 非致病真菌 Nonpathogenic fungi | 杂菌 Undesired microbes |
| PLDA                  | 293.40 ± 30.57         | 4.91 ± 0.27  | 0.10 ± 0.06               | 5.01 ± 0.33           |
| PDA                   | 232.30 ± 40.42         | 58.96 ± 3.16 | 0 ± 0.00                  | 58.96 ± 3.16          |



注: A:PLDA 上培养 10d 的单孢菌落; B:图中,左图为 PLDA, 右图为 PDA。“a”和“b”为 *S. arachidis* 单孢菌落  
Note: A:colonies after cultured for 10 days on PLDA; B:left is PLDA medium,right is PDA.“a”and “b” represent *S. arachidis* single - spore colony

图 5 稀释平板的菌落形态  
Fig.5 Colonies obtained by dilution - plate method

2.2.2 病害发生时期对稀释平板分离的影响 如图 6 所示,采用稀释平板法在 PLDA 培养基上对茎秆病斑孢子进行单孢分离。用发病的前中期的病秆上的孢子,平板上获得的病菌菌落数量较多,分别为 125.7 个/皿(7 月 7 日)和 133.1 个/皿(7 月 22 日),8 月 4 日的孢子量上升至最高 252.6 个/皿。而

2.2 茎秆病部稀释平板法  
2.2.1 两种培养基对稀释平板分离的影响 稀释平板单孢分离培养第 6d,PLDA 和 PDA 培养基上均出现针眼大小的病菌单菌落。培养后第 10d,获得大量纯净的单孢子菌落,PDA 上菌落直径为 1~1.5 mm,PLDA 上约 2.5~3mm。单孢子菌落生长初期形态似细菌。PLDA 上的单菌落灰白色,有少许气生菌丝;在 PDA 上浅橘色,革质气泡状,无气生菌丝(图 5)。

由表 2 可知,采用稀释平板法在 PLDA 培养基上分离病菌,病菌的菌落数为 293.40 个/皿,高于 PDA(232.30 个/皿),二者差异不显著 ( $P>0.05$ )。PLDA 培养基上杂菌菌落总数为 5.01 个/皿,杂菌数量显著低于 PDA 的杂菌 58.96 个/皿( $P<0.01$ )。

在发病后期 8 月 19 日和 9 月 2 日采集的病组织中,保湿培养很难产生孢子,平板上的病菌菌落数急剧下降,病斑菌落平均分别只有 0.6 个/皿和 1.1 个/皿。5 个采集时期的病菌菌落数,8 月 4 日显著高于 7 月 7 日和 7 月 22 日( $P<0.05$ ),三者又显著高于 8 月 19 日和 9 月 2 日( $P<0.05$ )。

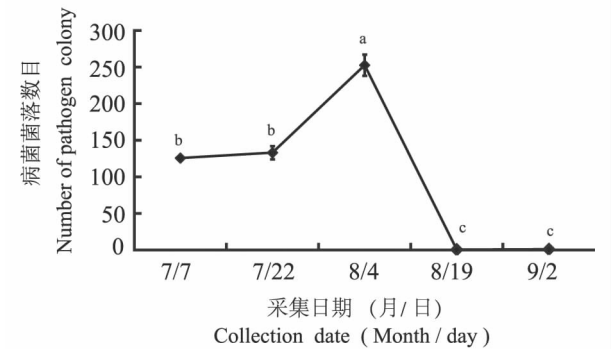
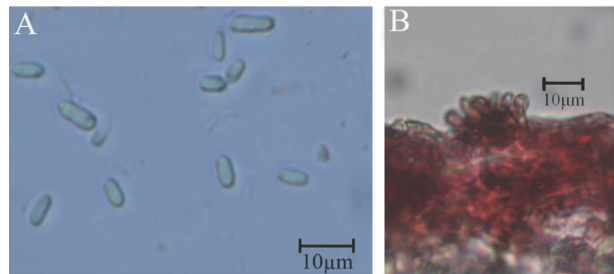


图 6 不同发病时期的病秆稀释平板法获得的病菌菌落数  
Fig.6 Numbers of pathogen fungal colonies by dilution - plate method from peanut stems obtained at different dates

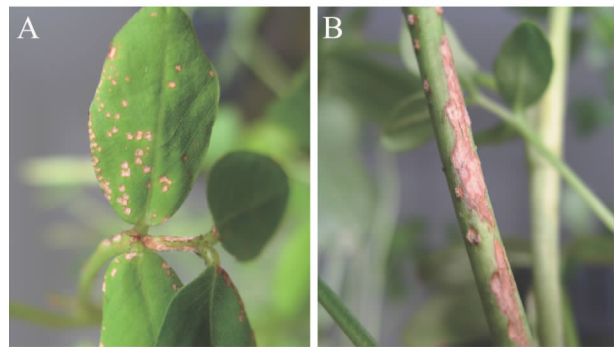
2.3 病原菌鉴定及致病性测定

花生疮痂病组织保湿培养,可获得大量的分生孢子,单胞,无色,椭圆形,透明,两端钝圆,具两个油球,孢子大小为(2.76~4.04) μm × (5.86~8.21) μm。病斑上可见大量分生孢子盘,单生或连生(图7)。ITS-rDNA 序列与 GenBank 中的核酸序列进行 BLAST 检索比对,结果显示该病菌与 *S. arachidis* (JN943485) 和 *S. manihoticola* (AY739018) 等痂圆孢属真菌相似度高达 98%。接种后,花生植株出现典型疮痂病斑(图8),病斑上产生分生孢子与分生孢子盘。因此,确定分离的病菌为花生疮痂病菌 *S. arachidis*。



注:A:分生孢子; B:分生孢子盘  
Note: A: conidia; B: acervulus

图7 叶片病斑上的分生孢子及分生孢子盘形态  
Fig.7 Morphology of conidia and acervulus on the surface of a peanut leaf



Note: A: 叶片疮痂病斑; B: 茎秆疮痂病斑  
注: A: The scab on peanut leaves; B: The scab on peanut stem

图8 病原菌接种的发病症状  
(25~27℃,接种8d,4到5叶期)  
Fig.8 Symptoms of peanut with isolated pathogen  
(25~27℃,inoculated for 8d, growth stage with 4 to 5 leaves)

3 结论与讨论

3.1 组织分离法分离病原菌

采用叶片组织分离花生疮痂病菌,分离频率显著高于茎秆。升汞表面消毒叶片1~3min 效果好。不同采集时期的病叶均有较高分离率,病叶采后冷藏48 h 内分离频率不受明显影响。

本研究用于组织分离的茎秆采自花生疮痂病发病前中期。该时期采集的茎秆通过保湿培养,病斑有大量孢子,说明病斑上病菌有活性。茎秆病菌分离频率显著低于叶片,杂菌频率和未长菌的组织块频率均高于叶片。分析原因,可能是由于茎秆部位的病斑特征所致:1)茎秆上的病斑比叶片病斑面积大,多呈木栓化结构,火山口状龟裂,有利于腐生菌等其它杂菌的侵入和污染;2)在进行表面消毒时,有龟裂纹的病斑更容易吸收表面消毒剂,不容易清洗彻底。此外,作者曾分离过葡萄黑痘病菌,在病果上难分离到病原菌,而叶片上分离频率较高。Emechebe 在 PDA 上用组织分离法分离豇豆疮痂病(*Sphaceloma sp.*)时发现,分离叶片病斑的病原菌比茎秆、叶柄和豆荚容易得多<sup>[20]</sup>,本研究结论与其一致。发病时期对叶片病原菌的分离结果并无显著影响。但病害发生后期,病叶的数量明显减少,田间难采到典型疮痂病叶。

3.2 稀释平板法分离病原菌

采用改进的稀释平板法能够达到花生疮痂病菌单孢分离和纯化的目的。在 PDA 和 PLDA 培养基平板上均能获得大量形状规则、纯净的单孢菌落。PLDA 培养基单孢分离效果优于 PDA。分离材料应选用病害发生前、中期采集的病茎秆。

菌种纯化和单孢子分离方法有琼脂平板稀释纯化法等多种<sup>[31]</sup>。在此基础上,许多学者根据不同病原菌孢子特点,对单孢分离方法或工具不断改进,总结出多种有效的单孢分离方法。如挑针法<sup>[32~33]</sup>,毛细管法<sup>[34~35]</sup>,敲打叶片孢子法<sup>[36]</sup>,以上分离方法,均需要显微操作检视单个孢子,对于孢子小且透明的真菌单孢分离比较困难。张海旺等针对栗疫病病菌分生孢子小、无色的特点,采用水琼脂平板涂布孢子菌悬液的方法,获得大量单孢子菌落,不需显微检视<sup>[37]</sup>。花生疮痂病菌人工培养很难产生分生孢子,而在病组织上,特别是茎秆病斑保湿能够产生大量的分生孢子。作者曾通过显微检视病部单个孢子,分离纯化到单孢子菌落。但由于分生孢子小,无色,在显微设备下检视单个孢子,难度大,费时,又极易污染,成功率极低。本文采用的改进的稀释平板法是一种简单、有效的针对花生疮痂病菌的单孢分离纯化方法。操作简单,容易掌握,省去表面消毒的环节,有效减少对环境的污染。单孢分离技术的实现,也为该病菌遗传等方面的研究提供可靠的技术保障。

茎秆上分生孢子的获得量在不同的病害发生时期有明显变化。在病害发生的前、中期茎秆病斑保

湿产生的分生孢子数量较多,后期茎秆的病斑孢子急剧减少,可能是导致后期病害流行趋于平缓的原因。

### 3.3 病原菌分离过程中的菌落形态特点

花生疮痂病菌生长速度慢,菌落形态特异,熟悉和了解花生疮痂病原菌的形态特征和分离特性是分离纯化花生疮痂病菌的关键。病组织块在培养基上至少5d以上才有病菌长出。病菌起初只病斑上部隆起,不扩展,生长速度极慢,形态上容易被误认为是细菌。随着不断生长,病原菌菌落逐渐蔓延到培养基上,菌落多为橘色,革质,褶皱,容易被误认为是细菌、放线菌或酵母菌。病原菌在组织块上长出的速度慢,有的组织块15d时才会长出病菌。如有杂菌长出,需及时将未长杂菌的组织块转出,避免被杂菌覆盖。稀释平板法单孢分离纯化病菌,病原菌在PLDA和PDA上均在6d左右出现针眼大小的菌落。病原菌单孢子菌落生长初期形态均似细菌,两种培养基上单菌落形态略有差别。PDA上,单孢子菌落橘色,无气生菌丝,皮革质状。PLDA上单孢子菌落灰白色,少量气生菌丝。PLDA上菌落略大于PDA。

本研究对花生疮痂病菌进行初步鉴定和致病性测定,确定分离得到的病菌为花生疮痂病菌 *S. arachidis*。关于该病菌的分生孢子类型,国内外学者有不同报道。作者仅在病斑上见到大量的椭圆形分生孢子,与根岸宽光描述的小型分生孢子形态大小一致<sup>[1]</sup>。对于花生疮痂病菌的产孢诱导与机理,遗传分化,流行规律以及致病机制等方面还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 根岸宽光,山下修一,土居養二, et al. ラッカセイそうか病に関する研究(第3報)病原菌の同定と培地上の性質[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1979, 45(1): 122.
- [2] 根岸宽光,山下修一,長井雄治, et al. ラッカセイに発生した *Sphaceloma* sp. によるそうか病(新称)について[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1976, 43(1): 121.
- [3] 根岸宽光,山下修一,土居養二, et al. ラッカセイそうか病に関する研究 第2報 病原 *Sphaceloma* 菌の形態, 培地上の性質ならびに寄生範囲[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1978, 44(1): 104 – 105.
- [4] Kearney M I T, Marinelli A, Oddino C, et al. Transmission and dispersal of *Sphaceloma arachidis* by crop debris and seed from infected peanut[J]. Peanut Science, 2002, 29: 13 – 17.
- [5] 张宝棣,彭庆平,何容根. 广东花生新病害—疮痂病的调查研究[J]. 云南农业大学学报, 1995, 10(4): 275 – 278.
- [6] 周如军,徐 喆,傅俊范,等. 辽宁花生品种对疮痂病抗性及其流行时间动态分析[J]. 植物保护学报, 2014, 41(5): 597 – 601.
- [7] 蔡学清,胡方平. 福建省花生新病害 疮痂病调查研究初报[J]. 福建农业科技, 2000(2): 23.
- [8] 陈国泽,叶万余,陈勤平,等. 花生疮痂病的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2011(12): 173 – 174.
- [9] 李 峰,朱 旭,杨廷勤,等. 南阳盆地花生疮痂病的发生规律及防治措施[J]. 农业科技通讯, 2012(6): 195, 238.
- [10] 田云云,许曼琳,王宝亮,等. 花生疮痂病在青岛市的发生及防治技术研究[J]. 花生学报, 2014, 43(1): 44 – 47.
- [11] 胡 森,钱才方,李 筠,等. 花生疮痂病的发生与防治[J]. 植物保护, 2000, 26(1): 21 – 22.
- [12] 张秀丽. 唐山地区花生疮痂病发生及防治要点[J]. 河北农业, 2013(2): 46 – 47.
- [13] 傅俊范,杨凤艳,周如军,等. 辽宁花生病虫害发生危害及种类鉴定[J]. 植物保护, 2013, 39(1): 144 – 147.
- [14] Shear, C L. The life – history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary[J]. Phytopathology, 1929, 19(7): 673 – 679.
- [15] 何胜强,戚佩坤. 芒果疮痂病菌生物学特性研究[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 149 – 155.
- [16] Sompong M, Wongkaew S, Tantasawat P, et al. Morphological, pathogenicity and virulence characterization of *Sphaceloma ampelinum* the causal agent of grape anthracnose in Thailand[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(10): 2 313 – 2 320.
- [17] Alleyne A T, Gilkes J M, Briggs G. Early detection of Super – elongation disease in *Manihot esculenta* Crantz (cassava) using molecular markers for gibberellic acid biosynthesis[J]. Eur J Plant Pathol, 2014.
- [18] 湛多仁,殷恭毅. 石榴与苹果两种痂圆孢菌新记录种[J]. 南京农业大学学报, 1985(1): 34 – 39.
- [19] Atsushi K, Ryoji N, Masahiko Y, et al. Effect of culture conditions on conidia formation by *Elsinoe ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose[J]. Plant Disease, 2009, 93(5): 481 – 484.
- [20] Emechebe A M. Scab disease of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by a species of the fungus *Sphaceloma* [J]. Ann Appl Biol, 1980, 96(1): 11 – 16.
- [21] 郑晓慧,易言郁,徐 彪,等. 石榴“麻皮”病病原研究[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(4): 498 – 499.
- [22] Butin H, Kehr R. *Sphaceloma murrayae* Jenk. & Grods., a pathogen new to Europe on *Salix* spp. [J]. Forest Pathol, 2004, 34: 27 – 31.
- [23] Kudela V, Krejzar V. First report of anthracnose of common snowberry caused by *Sphaceloma symphoricarpi* in

- the Czech Rrepublic[J]. Plant Protect Sci,2006,4(42): 139 – 146.
- [24] Poolsawat O, Tharapreuksapong A, Wongkaew S, et al. Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media [J]. Suranaree J Sci Technol,2009,16(2):149 – 157.
- [25] Poolsawat O, Tharapreuksapong A, Wongkaew S, et al. Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose in Thailand [J]. Journal of Phytopathology,2010,158:837 – 840.
- [26] 肖欢,朱明旗,侯鸿敏,等. 陕西杨陵葡萄黑痘病病原菌的分离与鉴定[J]. 西北林学院学报,2010,25(2):132 – 135.
- [27] Wani D D, Thirumalachar M J. Studies on Elsinoe and Sphaceloma diseases of plants in Maharashtra State (India) – VII [J]. Mycol,1971,XXV(2):47 – 51.
- [28] 方树民,王正荣,柯玉琴,等. 花生品种对疮痂病抗性及其机制的研究[J]. 中国农业科学,2007,40(2):291 – 297.
- [29] Moraes S A, Godoy I J, Pezzopane J R M, et al. Efficiency of fungicides in the control of peanut late leaf spot and scab by monitoring method [J]. Fitopatol Bras,2001,26(2):134 – 140.
- [30] Nagai Y, Takeuchi T. Epidemiology and important factor affecting the occurrence of peanut scab caused by *Sphaceloma arachidis* [J]. Proceedings of the Kanto – Tosan Plant Protection Sociedty,1983,30:46 – 47.
- [31] 方中达. 植病研究法 [M]. 北京:中国农业出版社,1998. 63.
- [32] 孙广宇,张天宇. 一种简单孢子分离技术[J]. 植物检疫,1996(1):40 – 41.
- [33] 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[J]. 玉米科学,2010,18(1):126 – 127,134.
- [34] 刘永祥,朱国胜,刘作易. 一种简的竹黄菌 (*Shiraia bambusicola*) 单孢分离方法 [J]. 菌物研究,2008,6(1):49 – 56.
- [35] 董娟华,罗丽,王彩霞,等. 一种强寄生病原真菌的分离方法[J]. 中国农学通报,2009,25(3):210 – 212.
- [36] 高金欣,高增贵,张小飞,等. 一种简捷的玉米大斑病菌单孢分离方法[J]. 微生物学通报,2010,37(10):1 548 – 1 550.
- [37] 张海旺,张国珍. 一种简便易行的栗疫病菌单孢分离方法[J]. 植物保护,2009,35(3):94 – 95.

(责任编辑:王丽芳)