

怀黄菊黑斑病原的分离及鉴定

赵喜亭^{1,2,3,*}, 王 苗¹, 王添乐¹, 李明军^{1,2,3}

(¹河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; ²河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南新乡 453007; ³绿色药材生物技术河南省工程实验室, 河南新乡 453007)

摘 要: 对怀黄菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. ‘Huaihuang’) 上发生的一种叶片变黑枯死的主要病害进行了病原分离和鉴定, 通过形态观察、产孢表型分析、致病力检测和 rDNA-ITS 序列分析, 初步确定该病是由链格孢属 (*Alternaria*) 的交链孢菌 (*Alternaria* sp.) 引起的怀黄菊黑斑病。从发病植株中分离纯化得到 2 个致病菌株 A1 和 A2; PDA 培养基上的 2 个致病菌株菌落质地、颜色、边缘整齐度等特征存在一定差异, 显微镜下产孢表型也存在差异, 但致病力没有差异, 其 rDNA-ITS 序列一致性达 100%, 序列已在 GenBank 上登录, 登录号为 KF688111。

关键词: 怀黄菊; 怀黄菊黑斑病; 病原鉴定

中图分类号: S 576

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 01-0174-09

Isolation and Identification of Pathogen Causing Black Spot Disease of *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaihuang’

ZHAO Xi-ting^{1,2,3,*}, WANG Miao¹, WANG Tian-le¹, and LI Ming-jun^{1,2,3}

(¹College of Life Science Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China; ²Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs of Henan Province University, Xinxiang, Henan 453007, China; ³Henan Province Engineering Laboratory of Green Medicinal Plant Biotechnology, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: A pathogen causing leaf black spot of medicinal *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaihuang’ was isolated and characterized based on the morphological features, phenotypic analysis of spore production, pathogenicity test, and sequence analysis of internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA (rDNA-ITS). The results showed that the black spot disease was caused by *Alternaria* sp. A1 and A2, two pathogenic strains, were obtained from the diseased plants. Although isolates A1 and A2 showed some variations on colony texture, color, edge uniformity, and sporulation phenotype, there was no significant difference in their pathogenicity to *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaihuang’ leaves. The rDNA-ITS sequence of the two fungi strain showed 100% identity. The sequence of the identified fungus has been submitted to GenBank (GenBank accession number: KF688111).

Key words: *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaihuang’; black spot disease; pathogen identification

收稿日期: 2014 - 10 - 17; **修回日期:** 2014 - 12 - 08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372105); 中国博士后科学基金项目 (2011M500457); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2011JS076)

* E-mail: zhaot0411@126.com

中国药用菊花的研究多数集中在生物学特性、栽培技术、药用成分动态积累及提取方法(姜传颜, 1959; 谢作成, 2008; 刘灵娣, 2009)、遗传多样性分析(吕琳 等, 2008)、道地性形成(邵清松和郭巧生, 2009)等方面, 关于其病害的研究仅仅局限于病害的形态鉴定和防治措施上(高启超 等, 1988), 关于其病害的病原研究报道较少(王艳, 2013)。

药菊发源于河南(邵清松和郭巧生, 2009), 以产于古怀庆府(今河南焦作辖区温县、沁阳、武陟、孟州)一带的“怀菊花”最为有名, 是著名的“四大怀药”(怀山药、怀菊花、怀地黄、怀牛膝)之一。怀黄菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat. ‘Huaihuang’)属于菊科(Asteraceae)菊属(*Chrysanthemum* L.), 是怀菊花中的优良种质, 是目前怀区主栽品种, 久负盛名。但近年来, 由于长期的分株繁殖和扦插繁殖, 使怀黄菊病害严重。其中有一种叶部病害更为严重, 呈逐年上升趋势。该病在怀黄菊整个生长期均可发生, 高温、高湿加速病程, 种植地块周围是白菜、萝卜等的发病更为严重。症状为叶片出现褐色小斑点, 严重时融合成片, 整个叶片变黑枯死, 影响光合作用。与之前甘贤友等(1990)发现的由 *Septoria chrysantheme* 所致的怀菊花斑枯病不同之处是该褐斑周围有黄色晕圈, 与南京发现的菊花黑斑病症状(许高娟, 2009)相似, 故称之为怀黄菊黑斑病。该病对于怀菊花的产量及药用品质的影响十分严重。为了明确这种病害的病因, 将采自河南师范大学“四大怀药种质资源保存”实验基地温县农业科学研究所种质资源圃的发病样本进行致病病原物分离, 结合形态学观察、致病力检测和分子生物学鉴定等方法进行了研究, 为探明其发病机理和制定有效防控措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2012年6月到10月分别在“河南省百疗绿色怀药保健品有限公司”、“河南省武陟县永盛药材加工厂”、“焦作科霖达生物科技有限公司”的怀菊花规模化种植基地及“温县农业科学研究所种质资源圃”进行了怀黄菊病害调查, 调查地块8个, 每块地约1334 m², 5点取样法, 每点调查10株, 共调查400株。对来自“温县农业科学研究所种质资源圃”具有典型感病症状的26份怀黄菊材料进行了病原物分离, 其中在H-6、H-13和H-20发病株中成功分离获得病原菌。

1.2 病原菌的分离和纯化

采用组织分离法(方中达, 1998), 用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基平板22℃下进行病原菌的分离培养, 挑取单胞纯化。得到的纯化菌株4℃保存在马铃薯胡萝卜琼脂(potato carrot agar medium, PCA)培养基斜面上备用。据柯赫氏法则将菌株回接菊花叶片, 接种孢子悬浮液的浓度为 1×10^6 个·mL⁻¹。接种10株, 3次重复, 无菌水为对照。接种的幼苗在22℃、RH 90%的条件下暗培养48 h, 然后在12 h/12 h光暗交替条件下继续保湿培养10 d后观察发病情况。对发病叶片进行病原菌的再分离, 与原接种菌株比较, 进行柯赫氏法则验证。

1.3 纯化菌株致病力检测

致病力检测采用离体叶片接种法(孙霞, 2006)。供试菌株在PDA上生长10 d后, 用无菌的直径5 mm的打孔器在菌落边缘打孔, 制成菌饼并接种在怀黄菊叶片上, 25℃黑暗培养48 h后, 去除菌饼, 叶片在12 h/12 h光暗交替条件下继续保湿培养, 7 d后统计出现病斑的直径。试验以直径5 mm

的 PDA 块接种叶片作为对照, 每处理接种 6 片叶片, 3 次重复。致病力差异分析采用邓肯氏新复极差法检验, $P < 0.05$ 。

1.4 病原菌的形态学鉴定

菌落形态的观察: 将保存于 PCA 斜面上的供试菌株的菌丝块接种到 PDA 上进行活化, 25 °C 黑暗条件下培养 7 d 后, 于显微镜下观察菌株的分生孢子和分生孢子梗形态。

病原菌产孢表型观察: 采用 PDA + 载玻片观察法 (张天宇, 2003)。显微镜下观察产孢表型。

1.5 病原菌的 5.8S rDNA-ITS 序列分析

分离的菌株在 25 °C 黑暗条件下于 PDA 培养基上活化生长 3 d 后, 挑取部分菌丝块接种于马铃薯葡萄糖 (potato dextrose, PD) 培养基中, 100 r · min⁻¹ 振荡培养 3 ~ 4 d 左右, 待菌丝均匀分布于培养基中时, 利用纱布过滤培养基, 收集菌丝体, 菌丝在超净工作台上吹风晾干后, - 80 °C 冷冻保存备用。

采用 CTAB 法 (何月秋, 2000) 进行菌体基因组 DNA 的提取。用真菌 rDNA 通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增, 由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。其序列为: ITS4: 5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3'; ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。

目的片段的 PCR 扩增参照 (刘春来 等, 2007) 的方法。PCR 反应体系 (25 μL) 如下: 10 × PCR buffers 2.5 μL, 2.0 mmol · L⁻¹ dNTP mix 4 μL, 2.5 U · μL⁻¹ Taq 酶 0.3 μL (上述试剂均购自 TaKaRa 公司), 模板 DNA 1 μL, 引物 ITS4 和 ITS5 各 1 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。用 1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物。

采用 DNA 快速纯化/回收试剂盒 (购自鼎国生物工程公司) 进行凝胶回收。回收产物采用 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector System 连接, 感受态细胞 DH5α 转化, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后, 送至北京中科希林生物科技有限责任公司测序。

系统发育树结合 5 个链格孢小孢子种 (链格孢 *A. alternata*, 梨黑斑链格孢 *A. gaisen* strain, 交链孢 *A. sp.*, 长柄链格孢 *A. longipes*, 细极链格孢 *A. tenuissima*) 的一些菌株及其 4 个相似属 (假格孢属 *Nimbya*, 细基格孢属 *Ulocladium*, 埃里格孢属 *Embellisia*, 匍柄霉属 *Stemphylium*), 共 16 个 5.8S rDNA-ITS 完整序列构建, 系统发育分析和进化树的构建使用 MEGA version 4.0, 进化距离分析采用邻位相连法 (neighbor-joining, NJ), 系统树的检验用 Bootstrap 1 000 次重复。

将菌株的 rDNA-ITS 序列在 GenBank 核酸数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行 BLASTN 比对和同源性分析。

2 结果与分析

2.1 病害的田间症状

对怀菊花产区的规模化种植基地及温县农业科学研究所种质资源圃进行了怀黄菊病害调查, 共调查 400 株, 有 135 株材料具有明显病症, 病株率 33.75% 左右。

该病从植株的下部叶片发生 (图 1, A), 叶片染病初期出现褐色小点, 后扩大为圆形、椭圆形或不规则形病斑, 周围出现黄色晕圈 (图 1, B), 严重时病斑融合成片、叶片变黑枯死 (图 1, C)。

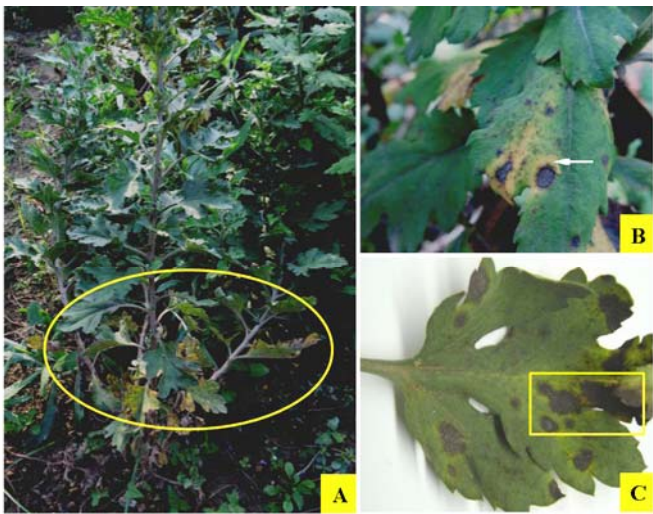


图 1 怀黄菊黑斑病的田间症状

A: 感病植株（黄色圆圈示感染叶片）；B: 感病中期叶片（箭头示黄色晕圈）；C: 感病后期叶片（方框示病斑融合成片）。

Fig. 1 Field symptoms of medicinal *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaihuang’ black spot disease

A: Diseased plant (the yellow circle indicates diseased leaves); B: Middle stages of the diseased leaves (the arrow indicates yellow halo); C: Later stages of the diseased leaves (the box indicates confluent lesions).

2.2 病原菌的分离与纯化

从发病怀黄菊叶片共获得 3 个真菌分离物，经柯赫氏法则鉴定其中 2 个菌株（A1、A2）为致病菌。将 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 A1、A2 孢子悬浮液喷洒怀黄菊植株，均产生田间发病症状（图 2）：植株下部叶片先发病，病斑接近叶边缘，周围出现黄色晕圈（箭头处）。从发病叶片上分离得到的黑斑病原菌与原接种菌株相同。将菌株接种到 PDA 平板 7 d 后观察菌落形态，发现分离得到的 2 个致病菌株生长在 PDA 培养基上的菌落质地、颜色、边缘整齐度等特征存在一定差异。

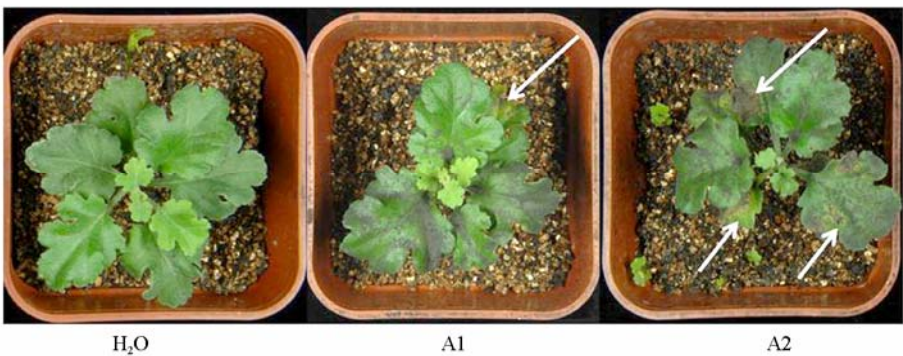


图 2 怀黄菊接种致病菌 A1、A2 处理 7 d 后叶片的发病情况

Fig. 2 Infected symptoms of medicinal *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaihuang’ leaves on the 7th day after inoculating with the A1 and A2 pathogenic strains

从图 3 中可以看到两个菌落均为圆形或近圆形菌落，A1 菌落边缘为较窄的一圈淡黄色菌丝圈，A2 颜色较 A1 亮、白，且晕圈显著。A1 菌落整体颜色较 A2 深，成深褐色。A2 颜色呈浅褐色或淡黄色。A1 菌落较 A2 菌落低矮。

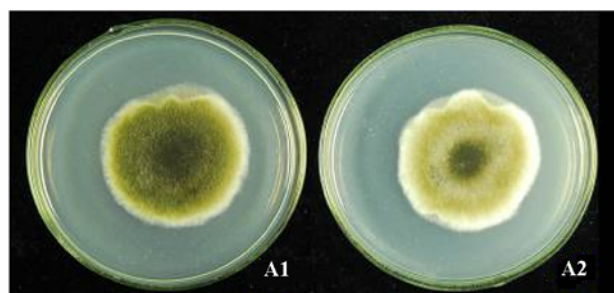


图3 A1和A2菌落形态比较

Fig. 3 Contrast of colonial morphology between A1 and A2

2.3 分离菌株致病力差异分析

从图4可以看出,离体怀黄菊叶片接种菌丝块7 d后,对照未发病,处理后的叶片产生一定大小的病斑,A1的病斑平均直径为4.3 mm,A2的为4.8 mm左右,二者差异不显著。

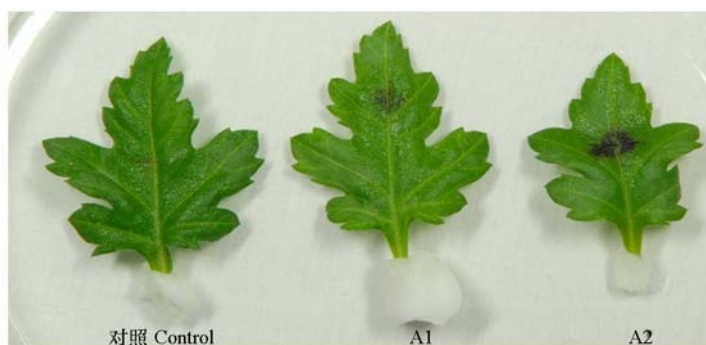


图4 离体接种7 d后怀黄菊叶片的发病症状

Fig. 4 Infected symptoms of medicinal *Chrysanthemum morifolium* 'Huaihuang' leaves on the 7th day after inoculating *in vitro* with the A1 and A2 pathogenic strains

2.4 黑斑病病原菌的形态学特征

PDA培养基上的结果(图5)显示:2个菌株分生孢子大小、分生孢子梗的形态和大小并没有显著差异:分生孢子梗都从主菌丝上直接产生,呈树杈状分支,多为单生,少数簇生,直立或弯曲,有分隔,淡褐色至褐色,大小在 $30.0 \sim 78.5 \mu\text{m} \times 3.0 \sim 7.5 \mu\text{m}$ 范围内;成熟的分生孢子呈倒棍棒形、卵形或近椭圆形,少数具有喙,喙的颜色比孢身要浅。孢身大小为 $22.5 \sim 38.0 \mu\text{m} \times 8.0 \sim 14.5 \mu\text{m}$;喙或假喙柱状,褐色,有隔呈黑褐色,大小 $6.5 \sim 28.5 \mu\text{m} \times 2.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$ 。但菌株A2的分生孢子与A1的相比,孢身中部的隔膜明显较粗,呈黑褐色,主横隔膜处缢缩也更显著。

载玻片+PDA上的培养结果(图5)显示:菌株A1形成的分生孢子长链超过10个孢子,长链分枝少且短,支链一般大于10个孢子;菌株A2分生孢子链较短,主链多次分枝,形成侧链,侧链再继续分枝形成树杈状,分枝丰富,支链一般1~5个孢子。

按照 Simmons (1967) 的鉴定标准,由以上分析可以确定分离到的病原菌菌株为链格孢属真菌。

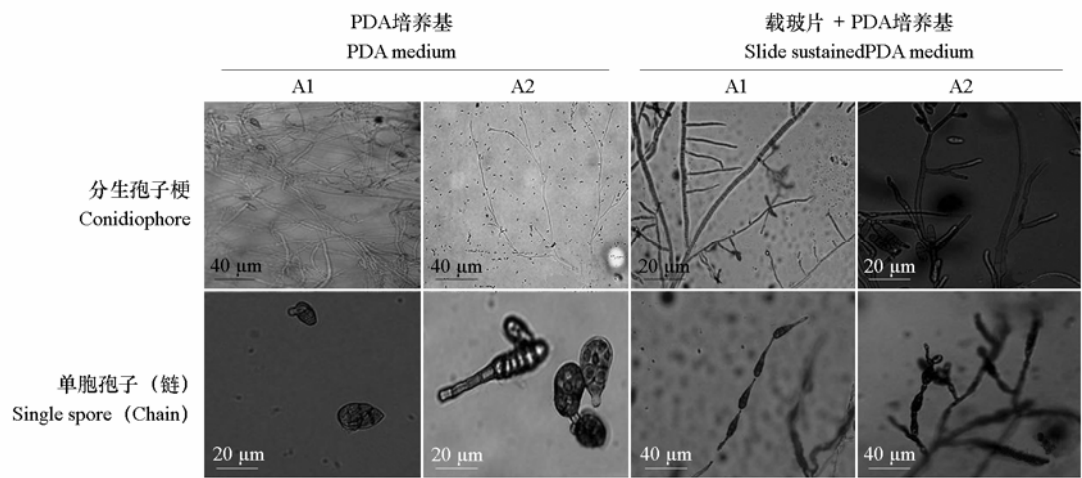


图 5 A1 和 A2 菌株的产孢表型
Fig. 5 Conidia morphology of the two isolated strains

2.5 5.8S rDNA-ITS序列分析

根据 KF688111 序列与 GENBANK 中链格孢属 (*Alternaria*) 5 个小孢子种 (*Alternaria longipes*、*A. gaisen strain*、*A. sp.*、*A. alternate* 和 *A. tenuissima*) 一些菌株及其 4 个相似属 [假格胞属 (*Nimbya*)、细基格胞属 (*Ulocladium*)、埃里格胞属 (*Embellisia*), 匍柄霉属 (*Stemphylium*)] 的 ITS1-5.8S-ITS2 序列作系统发育树分析 (图 6)。从图中可以看出, KF688111 和 JQ004404、HQ832813、HQ238277、JQ697546.1、JQ074094.1 聚在一起, 支持率为 99%, 说明 KF688111 为链格孢属 (*Alternaria*) 的分支, 进一步支持了怀黄菊黑斑病的致病菌为链格孢属 (*Alternaria*) 病原菌。

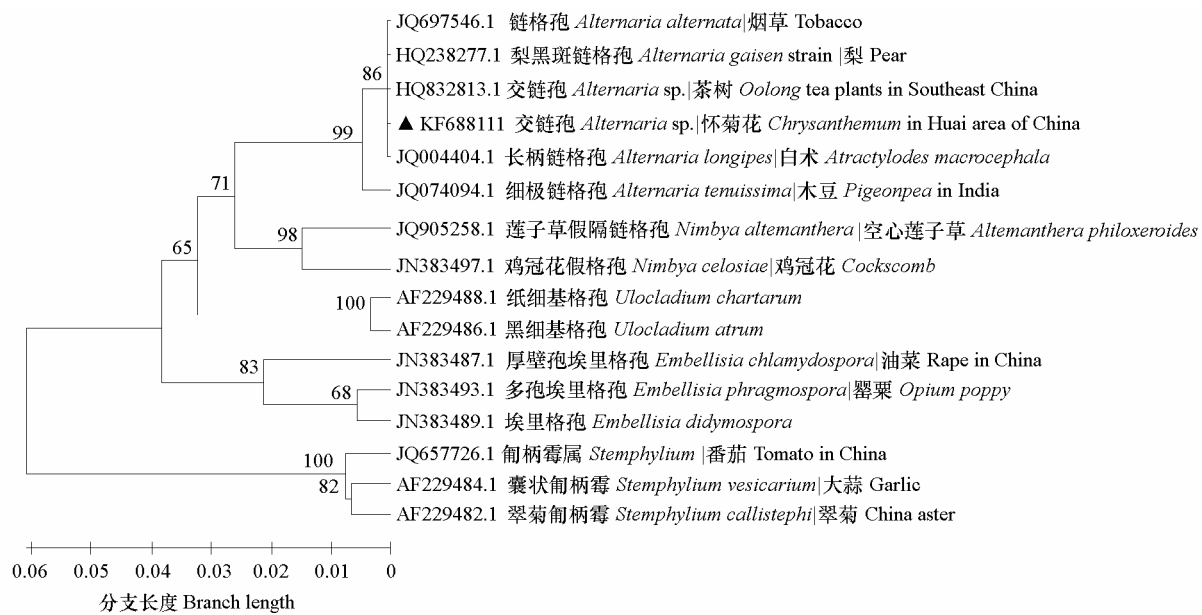


图 6 基于链格孢属及其相似属的 ITS1-5.8S-ITS2 序列构建的 NJ 树
Fig. 6 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on ITS1-5.8S-ITS2 sequence of *Alternaria* and its similar genus

5.8S rDNA-ITS 序列的分析结果表明: 两个菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 区长度均为 595 bp 且序列完全相同。将序列登录 NCBI 数据库, 登录号为 KF688111。该序列与南京菊花黑斑病的病原物序列(479 bp 和 480 bp) 不同。

通过 KF688111 序列与 GenBank 核酸数据库比对, 发现: KF68811 与菌株 *Alternaria* sp. LH129 (HQ832813) 的序列完全相同, 同源性达到 100% (图 7), 说明从怀黄菊病株中分离的两个病原菌均为链格孢属交链孢菌 (*Alternaria* sp.)。

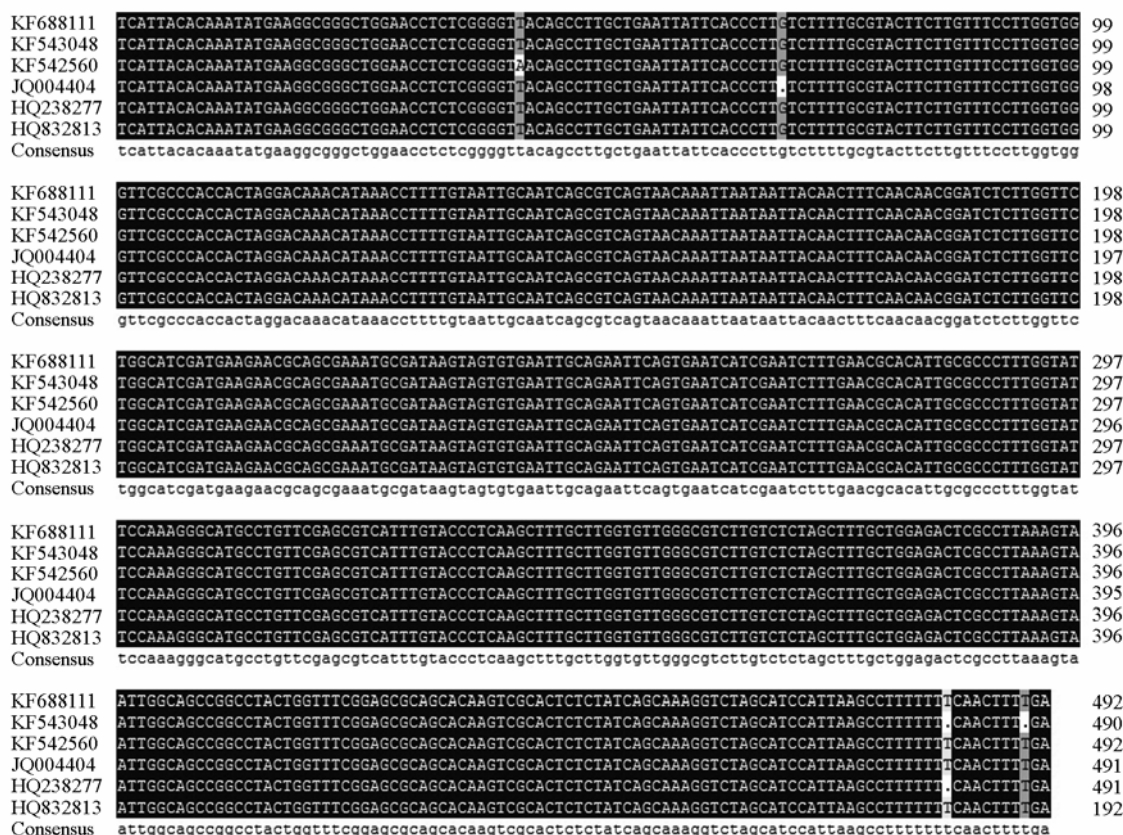


图 7 ITS 区序列同源性比对

KF543048: 芸薹链格孢菌; KF542560: 甘蓝链格孢菌; JQ004404: 烟草赤星病菌;

HQ832813: *Alternaria* sp.; HQ238277: *Alternaria gaisen* strain。

Fig. 7 Homology alignment by rDNA-ITS region sequences

KF543048: *Alternaria brassicicola*; KF542560: *Alternaria brassicae*; JQ004404: *Alternaria longipes*;

HQ832813: *Alternaria* sp.; HQ238277: *Alternaria gaisen* strain.

3 讨论

目前, 关于药用菊花病害的病原研究尚很欠缺。本研究首次对中国药用怀黄菊的黑斑病病原的分离及鉴定进行了研究。黑斑病是园艺和药用植物上发生普遍、危害严重的主要病害。由半知菌亚门丝孢纲丝孢目链格孢属真菌所引起, 通过种子、杂草和植株残体等途径传播 (肖长坤 等, 2003)。该病害的发生和流行常常给农业生产造成重大损失。1988 年, *A. brassicae* 引起的大白菜黑斑病在中

国华北、东北和西北地区爆发流行, 北京市当年白菜损失达 20%以上 (郑健秋 等, 1994)。由人参链格孢 (*A. panax* Whetzel) 危害人参、西洋参等人参属植物引起的黑斑病也是造成其损失的主要病害 (Hirosawa & Takuda, 1982)。因此研究优良种质怀黄菊的黑斑病病原对揭示其病因和制定有效防控措施具有重要的理论和实践意义。

病原菌分离常用的方法一般为划线法、稀释法和组织分离纯化法。以菊花叶片为材料, 利用组织分离法分离得到 6 个链格孢属黑斑病病原菌 (许高娟, 2009)。本研究利用此方法也分离到 3 个链格孢属黑斑病病原菌, 其中 2 个为致病菌。研究发现获得的 2 个致病菌的形态学特征存在一定差异, 但 ITS 序列却完全相同, 这说明: 仅仅依据形态特征对链格孢属病原进行鉴定是不全面的, 需要结合多个分类指标如生理生化指标、脂肪酸组分、分子生物学指标、基因性状等进行综合考虑, 从多个层面进行鉴定。这与孙霞 (2006) 的观点一致。何香等 (2010) 采用表型分析、生理生化测定、26S rDNA 比对和脂肪酸组分测定相结合, 达到了精确鉴定冬储藏甜瓜黑斑病病原菌的目的。

本研究通过形态鉴定初步确定 A1 和 A2 为链格孢属真菌, 结合 ITS 序列分析进一步证实了所分离菌为链格孢属病原菌。研究中通过 GenBank 核酸数据库比对, 发现分离菌株的 ITS 序列与产于中国东南的茶树上的菌株 *A. sp.* LH129 的序列完全相同, 因此初步推断所分离的病原菌为链格孢属的 *Alternaria sp.*。这与已报道的南京菊花黑斑病的病原 (许高娟, 2009) 不同, 但与水葫芦 (*Eichhornia crassipes*) 黑斑病 (殷利利 等, 2008)、沙棘叶斑病 (闫占文, 2006) 的病原相同。它的种级的最终确定还需要结合生理生化指标、脂肪酸组分测定、同工酶酶谱等进行分析。

此外开展怀黄菊不同栽培环境黑斑病分离物是否存在分化, 以及抗黑斑病基因的挖掘、抗性育种材料的筛选鉴定等研究工作, 将是怀区药菊黑斑病研究的重点。

References

- Fang Zhong-da. 1998. Research method for plant pathology. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press: 64, 125, 137. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社: 64, 125, 137.
- Gan Xian-you, Zhou Guo-shun, Yuan Gui-rong. 1990. Diagnosis and identification of Huai-Herb diseases. Journal of Henan Vocation-Technical Teachers College, 18 (2): 27 - 31. (in Chinese)
- 甘贤友, 周国顺, 袁桂荣. 1990. 四大怀药病害的诊断鉴定. 河南职业技术学院学报, 18 (2): 27 - 31.
- Gao Qi-chao, Wang Chun-gou, Wu Jing-yang, Chen Xin-xia. 1988. Preliminary research of medicinal *Chrysanthemum morifolium* downy mildew. Plant Protection, (4): 21. (in Chinese)
- 高启超, 汪春苟, 吴精阳, 程新霞. 1988. 药用菊花霜霉病研究初报. 植物保护, (4): 21.
- He Xiang, Sun Lei, Aierken · Rehman, Abuduwaili · Abudureyimu, Muheta · Abudukelimu. 2010. Isolation and identification of black spot pathogens from winter storage melon. Xinjiang Agricultural Sciences, 47 (7): 1365 - 1369. (in Chinese)
- 何 香, 孙 磊, 艾尔肯 · 热合曼, 阿不都外力 · 阿布都热依木, 木合塔 · 阿布都克里木. 2010. 冬季储藏甜瓜黑斑病病原菌的分离与鉴定. 新疆农业科学, 47 (7): 1365 - 1369.
- He Yue-qiu. 2000. An improved protocol for fungal DNA preparation. Mycosystema, 19 (3): 434. (in Chinese)
- 何月秋. 2000. 真菌菌丝体培养和提取 DNA 方法的改进. 菌物系统, 19 (3): 434.
- Hirosawa T, Takuda T. 1982. *Alternaria* blight of ginseng caused by *Alternaria panax* Wetz. Plant Protection, 36.
- Jiang Fu-yan. 1959. Cultivation collect and process of Shandong chrysanthemum. Bulletin of Chinese Materia Medica, 2: 64 - 65. (in Chinese)
- 姜傅颜. 1959. 山东菊花的栽培与採制. 中药通报, 2: 64 - 65.
- Liu Chun-lai, Wen Jing-zhi, Yang Ming-xiu. 2007. Application of rDNA-ITS in molecular test of phytopathogenic fungi. Journal of Northeast Agricultural University, 38 (1): 101 - 106. (in Chinese)
- 刘春来, 文景芝, 杨明秀. 2007. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用. 东北农业大学学报, 38 (1): 101 - 106.

- Liu Ling-di. 2009. Studies on biological characteristics, cultivation techniques and extraction method of effective components in Hebei Xiangju [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 刘灵娣. 2009. 河北香菊的生物学特性、栽培技术及有效成分提取方法研究 [博士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Lu Lin, Qin Min-jian, He Dan-xia, Gu Yao-hua. 2008. Analyses of ISSR molecular marker and genetic relationship of different provenances of *Dendranthema morifolium*, *D. indicum* and *D. nankingense*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 17 (1): 7 - 12. (in Chinese)
- 吕琳, 秦民坚, 贺丹霞, 顾瑶华. 2008. 不同种源药用菊花、野菊和菊花脑的 ISSR 分子标记及遗传关系分析. *植物资源与环境学报*, 17 (1): 7 - 12.
- Shao Qing-song, Guo Qiao-sheng. 2009. Investigate the origin of crude drugs of medicinal *Chrysanthemum morifolium*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 20 (7): 1751 - 1752. (in Chinese)
- 邵青松, 郭巧生. 2009. 药用菊花道地药材形成源流考. *时珍国医国药*, 20 (7): 1751 - 1752.
- Simmons E G. 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59: 67 - 92
- Sun Xia. 2006. The methodological study on Taxonomy of the Genus *Alternaria* Nees [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 孙霞. 2006. 链格孢属真菌现代分类方法研究 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Wang Yan. 2013. Study on the diseases and pathogens of *Sphaeropsidales* on medicinal plants in Gansu Province [Ph. D. Dissertation]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. (in Chinese)
- 王艳. 2013. 甘肃省药用植物球壳孢目真菌病害及其病原研究 [博士论文]. 兰州: 甘肃农业大学.
- Xiao Chang-kun, Li Yong, Li Jiang-qiang. 2003. Research in seed-borne black spot disease in cruciferous vegetables. *Journal of China Agricultural University*, 8 (5): 61 - 68. (in Chinese)
- 肖长坤, 李勇, 李健强. 2003. 十字花科蔬菜种传黑斑病研究进展. *中国农业大学学报*, 8 (5): 61 - 68.
- Xie Zuo-cheng. 2008. Study on botanical characters and dynamic accumulation of active component in medicinal *Chrysanthemum morifolium* [M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 谢作成. 2008. 药用菊花植物学性状及活性成分动态积累的初步研究 [硕士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Xu Gao-juan. 2009. Studies on seedling's resistance of related species of chrysanthemum to *Alternaria* leaf spot and genetic transformation of chrysanthemum with *hrfA* gene [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 许高娟. 2009. 部分菊花近缘种属植物黑斑病苗期抗性及 *hrfA* 基因转化菊花的研究 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Yan Zhan-wen. 2006. Main types of diseases and insects of *Hippophae rhamnoides* L. and their controlling methods in Wuqi county. *International Research and Development of Seabuckthorn*, 4 (3): 25 - 28. (in Chinese)
- 闫占文. 2006. 吴起县沙棘主要病虫害及其防治技术. *国际沙棘研究与开发*, 4 (3): 25 - 28.
- Yin Li-li, Tan Wan-zhong, Li Pei, Dang Lian-xu, Li Xin. 2008. Account of pathogen identification causing black spot disease of water hyacinth. *Weed Science*, (2): 22 - 25. (in Chinese)
- 殷利利, 谭万忠, 李培, 党连旭, 李鑫. 2008. 水葫芦的一种黑斑病鉴定记述. *杂草科学*, (2): 22 - 25.
- Zhang Tian-yu. 2003. China flora. Vol. 16. *Alternaria*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 张天宇. 2003. 中国真菌志. 第 16 卷. 链格孢属. 北京: 科学出版社.
- Zheng Jian-qiu, Hu Rong-juan, Wang Yan-mei, Hong Chuan-xue, Lin De-xin, Li Bao-dong. 1994. Analysis of critical period of Chinese cabbage yield loss caused by *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *Beijing Agricultural Sciences*, 12 (2): 39 - 42. (in Chinese)
- 郑健秋, 胡荣娟, 王艳梅, 洪传学, 林德忻, 李宝栋. 1994. 秋白菜黑斑病产量损失关键期分析. *北京农业科学*, 12 (2): 39 - 42.