

符丹丹, 孙建瑞, 张红梅, 等. 果园周边寄主炭疽病病原菌的系统发育分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 80–84, 96.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.019

果园周边寄主炭疽病病原菌的系统发育分析

符丹丹, 孙建瑞, 张红梅, 赵君峰

(河南科技大学食品与生物工程学院微生物育种与代谢调控实验室, 河南洛阳 471023)

摘要:从陕西不同地区采集蔷薇科、豆科、茄科等植物上具有炭疽病病症的标样 85 份, 共分离得到炭疽菌菌株 41 株, 选取 21 株菌株构建 ITS 的系统发育树, 结果显示, 21 个果园周边寄主的炭疽病病原菌可初步分为 8 个类群, 选取其中 5 株代表性菌株进行多基因系统发育树的构建, 结果表明胶孢炭疽菌和果生炭疽菌的菌株除可侵染苹果外, 还可侵染猕猴桃、辣椒、梨等寄主。对其中 6 个分类单元的 10 株菌株在苹果上进行致病性测定, 结果显示所有菌株有伤接种均可发病; 而归属为尖孢炭疽菌、猪毛菜炭疽菌和西蒙德炭疽菌的菌株无伤接种不能发病, 证明它们对苹果没有致病性; 而分别归属于果生炭疽菌、胶孢炭疽菌和松针炭疽菌的菌株无伤接种都可以发病, 并表现出典型的苹果炭疽病症状, 说明它们对苹果均为初侵染源, 具有致病性, 进一步证明果园周边梨、辣椒、猕猴桃等寄主可以作为苹果炭疽病潜在的初侵染来源, 为炭疽病的有效防治提供了理论基础。

关键词:苹果炭疽病; 炭疽菌属; 内转录间隔区; 多基因; 致病性测定

中图分类号:S436.611.1⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)01-0080-05

苹果炭疽病是在我国所有苹果产区普遍发生的一种重要的苹果病害, 它除可危害果实, 造成苹果采摘期大量落果、运输期及贮藏期果实腐烂, 还可侵染枝干、果台甚至叶片, 常年病果率为 10%~30%, 病害流行年份甚至可造成苹果减产 50%~70%。分析病害流行原因, 除天气因素外, 控制菌源就成了防止病害大规模暴发的一个重要因素。苹果炭疽病病原菌的源头从何而来? 清园不彻底, 各种病果、僵果不移出果园, 病枝枯枝病虫多, 杂草茂密, 甚至用炭疽病菌的其他寄主植物作为果园屏障, 在果园附近种植其他炭疽病菌寄主植物等都可能是病原菌的侵染源, 在气候适宜时造成苹果病害大流行。

对于植物病理学家来说, 准确鉴定病原是研究植物病害的基础。苹果炭疽病病原菌——炭疽菌属(*Colletotrichum*) 早期的分类主要根据寄主来源划分, 造成了上千个所谓的“麻雀种”, 也证明了炭疽菌属是一种不存在寄主专一性的多寄主植物病原真菌。在胶孢炭疽菌广义种的概念下, 许多植物, 如梨、枣子、草莓、葡萄、辣椒、豆角等寄主都可以作为胶孢炭疽菌的寄主, 一些其他寄主植物病原菌在人为接种条件下也能在苹果上致病。Phoulivong 等对辣椒、枣子、龙眼、番木瓜、杨浦桃、香蕉等寄主上的胶孢炭疽菌研究发现, 它们分别属于不同的种或类群, 因此认为胶孢炭疽菌不再是一个寄主范围广泛的病原菌^[1]。柿子炭疽病的病原菌也由胶孢炭疽菌变为哈锐炭疽菌^[2-3]。对尖孢炭疽菌的研究也得到类似的结果^[4-5]。

随着种级分类标准逐渐明确^[6-7]、复合种种级界限限定, 更多植物病原炭疽菌种类须要重新厘定^[8-9]。但是在重新划

定苹果炭疽菌种界限后, 其他寄主植物的病原菌在自然条件下与苹果炭疽病有无关系, 能否作为苹果炭疽病的侵染来源? 本研究将通过种群多样性分析、致病性测定等探索这些炭疽菌在自然条件下作为苹果炭疽病初侵染来源的可能性, 以期为针对性地防治苹果炭疽病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

2012 年从陕西省礼泉县、眉县、扶风县、陇县、杨凌等地区采集蔷薇科、豆科、柿科、猕猴桃科、茄科等植物上具有炭疽病病症的样品 85 份, 共分离得到 46 株炭疽菌, 其中 25 株分离自辣椒(采自陕西省眉县)、13 株分离自柿子(采自陕西省扶风县、杨凌等地区)、5 株分离自梨(采自陕西省陇县和礼泉县)、2 株分离自猕猴桃(采自陕西省扶风县)、1 株分离自菜豆(采自陕西省礼泉县)(表 1)。所有试验菌株均保藏于西北农林科技大学真菌研究室。

试剂: DNA 标准分子量 DSTM 2000, 购自广州东盛生物科技有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 简称 CTAB)、琼脂糖、buffer、dNTP、Mg²⁺、Taq DNA 聚合酶等, 均购自西安沃尔森生物技术有限公司。

仪器: BX51 显微镜、DP72 数码成像系统等, 均购自日本奥林巴斯株式会社; PowerPacTM 电泳仪、S1000TM PCR 扩增仪、Universal Hood II 凝胶成像系统等, 均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司; Nanodrop 2000 核酸蛋白检测仪, 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 5804R 冷冻高速离心机, 购自艾本德(中国)有限公司。

1.2 炭疽病病原菌的分离

对于具有炭疽病特征但不产孢的样品主要采用组织分离法进行分离。先用 70% 乙醇表面消毒, 切取病斑交界处的组织块放置在 PDA 平板上, 培养 4 d 后, 挑取单个菌落菌丝, 转移到新的 PDA 平板上, 培养 7 d 将得到的纯菌株保存。对于

收稿日期: 2017-10-13

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31171797)。

作者简介: 符丹丹(1979—), 女, 河南洛阳人, 博士, 讲师, 研究方向为真菌分类学。E-mail: fudandanly@126.com。

已产生分生孢子团的样品则采用直接挑取法。在体视镜下直接用灼烧过的接种针挑取分生孢子盘上分泌的分生孢子,将其接种在新鲜的 PDA 斜面上,挑取单个菌落菌丝,转移到新的 PDA 平板上,培养 7 d 后将得到的纯菌株保存。

表 1 其他寄主炭疽病原菌菌株分离结果

寄主		菌株编号	菌株数 (株)	采集地点
茄科	辣椒	F11LJMX01 ~ F11LJMX25	25	陕西省眉县
蔷薇科	梨	F11LZLX1 ~ F11LZLX4	4	陕西省陇县
		F12LZLQ1	1	陕西省礼泉县
猕猴桃科	猕猴桃	F11MHT02、 F11MHT04	2	陕西省眉县
柿科	柿子	F11SYL01 ~ F11SYL08	8	陕西省杨凌
		F11SFF01 ~ F11SFF05	5	陕西省扶风县
豆科	菜豆	F12DJLQ1	1	陕西省礼泉县

1.3 炭疽病原菌的形态学观察

根据 Sutton 的分类系统^[10]观察炭疽病原菌在 PDA 和燕麦培养基等 2 种培养基上的菌落形态。

1.4 DNA 提取和系统发育树的构建

供试菌株在 PDA 培养基上 25 ℃ 恒温培养 7 d,用接种针挑取菌丝置于离心管中,用改良的 CTAB 法^[11]提取基因组 DNA。提取的 DNA 用核酸蛋白检测仪测定浓度与纯度。扩增反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,51 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min,40 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测(1 × TAE 电泳缓冲液,130 V 电压),上样 2.5 μL,用荧光染料 EZ – VISION One 染色,扩增产物在凝胶成像系统下观察并拍照。

1.5 果园周边寄主炭疽病原菌的苹果致病性测定

为考察果园周边其他寄主炭疽病原菌是否会引起苹果炭疽病的发生,成为果园内苹果炭疽病暴发的传染源,选择部分代表性其他寄主炭疽病原菌菌株进行苹果果实的致病性测定,确定为室内苹果接种,接种挑选健康、表面没有疤痕伤口的富士、秦冠苹果,由于有些供试菌株不产孢,为统一试验条件,接种方法分别选用无伤/有伤菌饼接种。即在该菌株的 PDA 菌落边缘用打孔器打下直径为 5 mm 的菌饼,同样在健康果面上用昆虫针扎直径约 5 mm 的伤口,将菌饼贴紧果面伤口处,无伤接种则直接将菌饼黏在果面上,外面缠上保鲜膜固定。所有果实外同样套上塑封袋,袋内用喷雾器喷雾保湿,在 25 ℃ 恒温箱内暗培养。每个处理设 3 次重复。每 5 d 观察 1 次,记录接种结果。对接种发病的果实通过组织分离法转接 PDA 平板,观察菌落形态。

2 结果与分析

2.1 系统发育分析

2.1.1 ITS 序列的系统发育分析 选择本试验所分离非苹果寄主炭疽病原菌中具有代表性的 21 株菌株,另从 GenBank 上下载 36 株最新模式种的炭疽菌序列,以冬青炭疽菌(*Colletotrichum falcatum*)为外群构建 ITS 序列的最大简约

(maximum parsimony,简称 MP)法系统发育树,共 557 个特征碱基(包括空位)。最大简约法分析中有 460 个保守碱基,25 个变异极高不具简约信息,72 个具简约信息;共保存了 100 个最大简约树。图 1 所示的 ITS 序列系统发育树是保存的 120 个最大简约树中的第 1 个(树长为 140,一致性指数为 0.814 3,保留指数为 0.977 1,重缩放后的一致性指数为 0.795 6),各分支标示的支持率为最大简约法得到的自展支持率。

由图 1 可知,整个 ITS 序列的 MP 法系统发育树拓扑结构可分为 2 个大的分类群,在下半部分的尖孢炭疽菌复合群中,Clade 1 中采自菜豆上的菌株 F12DJLQ1 的分类无法确定,因为它只与西蒙德炭疽菌(*C. simmondsii*) CBS 126524 最接近但并没有聚在一枝,暂定其分类接近于西蒙德炭疽菌;Clade 2 中 3 株采自辣椒上的菌株(F12LJMX22、F12LJMX24、F12LJMX25)与 1 株尖孢炭疽菌(*C. acutatum*) BBA71292 聚在一起,但没有支持率的支持,推测其序列与尖孢炭疽菌比较相似,差异不大;Clade 3 中 4 株采自梨上的病原菌菌株和 1 株采自辣椒上的菌株 F12LJMX18 都以较高的支持率(81%)与 2 株松针炭疽菌(*C. fiorinae*)(模式种 CBS 128517* 和确定种 CBS 235.49)、菟丝子炭疽菌(*C. cuscutae* CBS 128555 和苹果炭疽菌菌株 F10PGBYSO8)聚在一枝,由于松针炭疽菌和东方炭疽菌的亲缘非常相近,仅凭 ITS 序列无法将其分开,还须借助其他基因的系统发育分析才能进一步确定其分类,但因这几个菌株的形态特征与东方炭疽菌中的苹果炭疽菌菌株差异较大,因此初步推测这几株菌的分类为松针炭疽菌。而在聚类分析图上半部分的胶孢复合群中,Clade 4 中采自柿子上的菌株 F11SYL07 以 69% 的支持率与哈锐炭疽菌(*C. horii*)的模式种 ICPM 10492* 聚在一个分枝,推测其分类比较接近于哈锐炭疽菌;Clade 5 中 2 株采自辣椒上的菌株 F12LJMX17 和 F12LJMX21 则与 1 株新西兰炭疽菌(*C. aotearoa*) C1301.3 聚在一起,但没有支持率,初步分类暂定其为新西兰炭疽菌;Clade 6 中分别采自猕猴桃和辣椒上的 4 株菌株(F11MHT02、F12LJMX15、F12LJMX16、F12LJMX20)与 3 株胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)(模式种 CBS112999* 和确定种 CBS 119204、C1254.3)聚在一起;Clade 7 中分别采自猕猴桃、梨和辣椒寄主上的病原菌菌株 F11MHT04、F12LZLQ1、F11LJMX10、F12LJMX19 与 2 株果生炭疽菌(*C. fructicola*)(模式种 CBS 130416* 和确定种 ICMP 17789)聚在一起,但支持率较低;只有 Clade 8 中菌株 F11LJMX09 的分类无法单独依靠 ITS 序列准确区分,它与猪毛菜炭疽菌(*C. salsolae*)最为接近但并没有聚在一枝,而且也没有支持率的支持,须要参考其他基因的系统发育分析才能准确定位。

最后根据单基因 ITS 序列系统发育树的初步分析,暂时初步确定所选取的 21 株其他寄主炭疽病原菌的分类大概为尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)、新西兰炭疽菌(*C. aotearoa*)、松针炭疽菌(*C. fiorinae*)、果生炭疽菌(*C. fructicola*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、哈锐炭疽菌(*C. horii*)、猪毛菜炭疽菌(*C. salsolae*)以及西蒙德炭疽菌(*C. simmondsii*)等 8 个类群,其中只有果生炭疽菌和胶孢炭疽菌是在苹果炭疽病原菌中分离得到过的。虽然 ITS 序列作为应用最为广泛的条码基因,在大规模初步分析炭疽病原菌分类时具有非常大的优势,但进一步深入研究时,还须结合其他基因综合分析才能

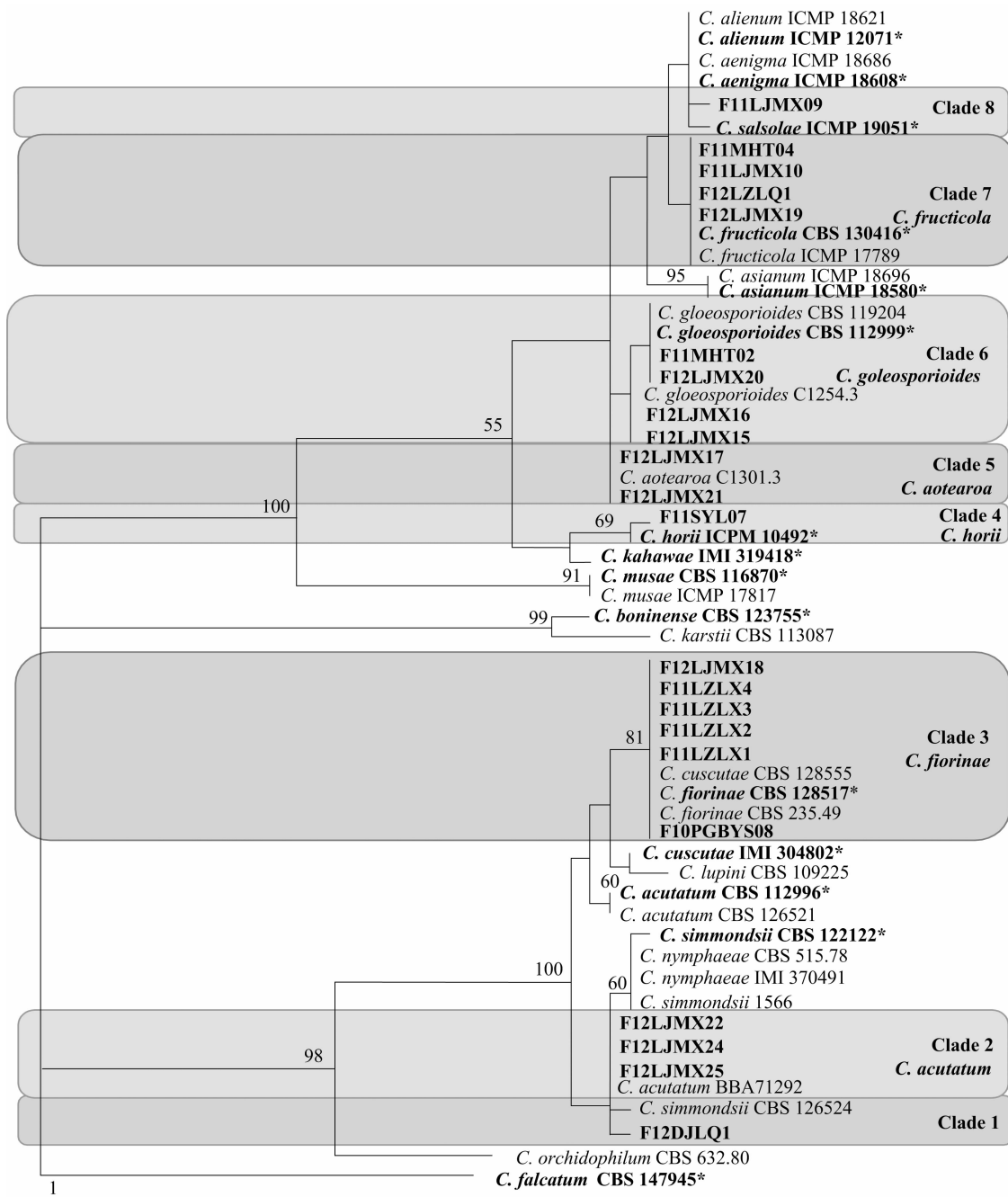


图1 果园周边寄主炭疽病原菌 ITS 序列的最大简约法系统发育树

得到可靠的结果。因此,为确定与苹果炭疽病原菌近缘的 Clade 3、Clade 6 和 Clade 7 中炭疽菌的准确分类,还须进行多基因系统发育分析。

2.1.2 多基因序列的系统发育分析 选择本试验所分离的其他寄主炭疽病原菌中与苹果炭疽病原菌分类相近的 5 株代表性菌株,另从 GenBank 上下载 42 株最新模式种的炭疽菌序列,以冬青炭疽菌 (*C. falcatum*) 为外群构建 ITS、ACT、GAPDH、CHS-1、TUB2 合并基因数据集的 MP 系统发育树,合并基因数据集的碱基序列数据集共有 2 005 个碱基,其中保守位点有 1 298 个,变异较高非简约信息位点有 162 个,简约信息位点共 545 个。共保存了 100 个最大简约树,第 1 个最大简约树的参数为树长 1 417,一致性指数为 0.712 1,保留

指数为 0.929 8,重缩放后的一致性指数为 0.662 1,各分支标示的支持率为最大简约法的自举支持率。

由图 2 可知,本试验中选取的 5 株代表性菌株共分成 3 个分枝,第 1 个分枝 (Clade 1) 由 1 株本试验中分离自陕西省陇县梨上的菌株 F11LZLX1 以 95% 的支持率与 2 株松针炭疽菌 (*C. fiorinae*) (模式种 CBS 128517* 及美国苹果上的 CBS 235.49) 聚在一起,证明菌株 F11LZLX1 应与松针炭疽菌同属一个分类群单元。第 2 个分枝 (Clade 2) 包含 1 株分离自陕西省眉县猕猴桃上的炭疽菌菌株 F11MHT02、6 株苹果炭疽菌 (来自陕西省的 5 株和河南省的 1 株) 和 2 株胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) (模式种 CBS 112999* 和美国的 CBS 119204),自举支持率为 100%,证明它们的分类单元应同属于胶孢炭

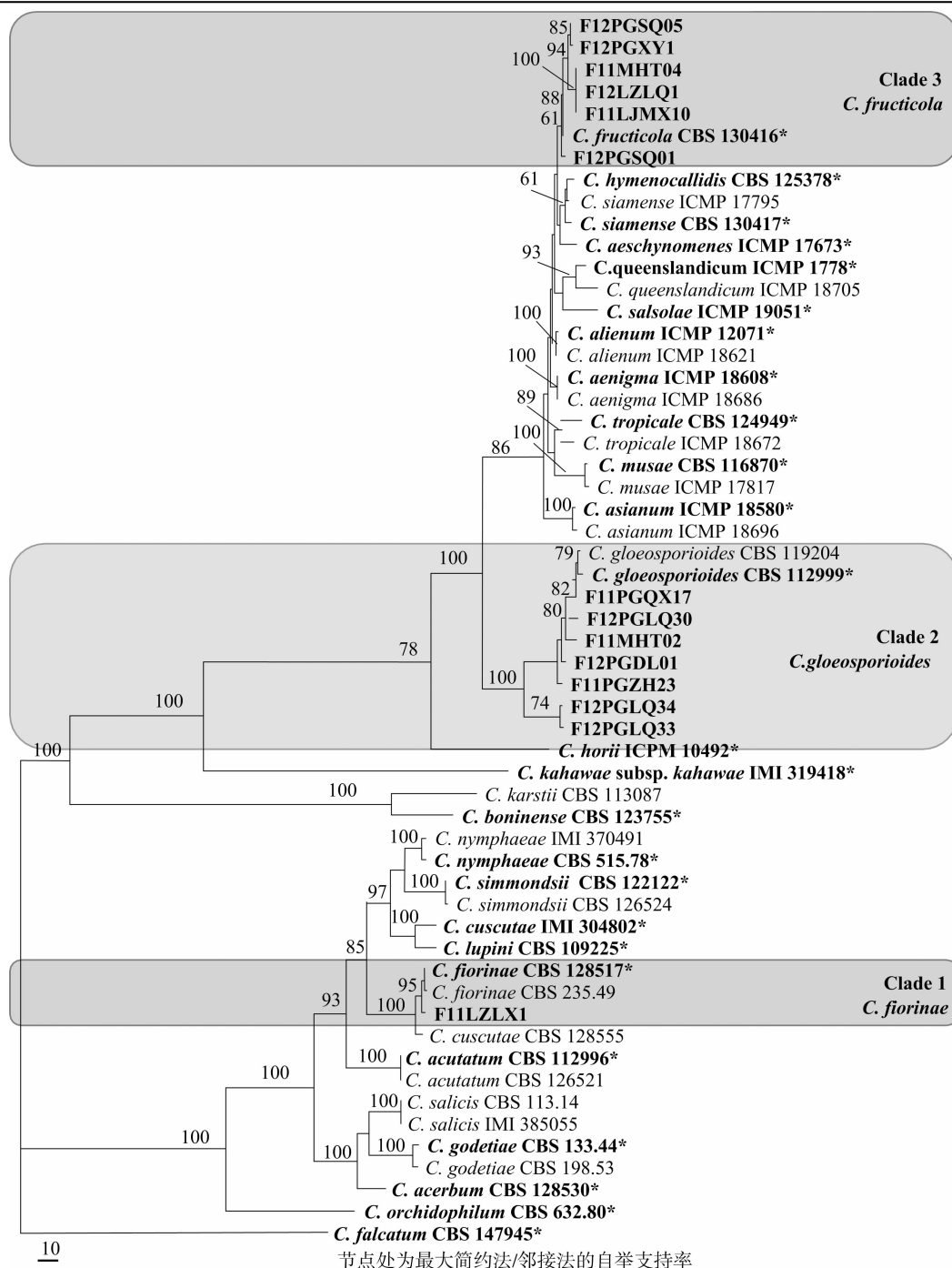


图2 果园周边寄主炭疽病原菌多基因的最大简约法系统发育树

疽菌。第3个分支(Clade 3)里3株分别采自梨、辣椒和猕猴桃上的病原菌株以100%的支持率自成一个小的分类枝,说明这3株不同寄主的炭疽病原菌5个不同基因的序列都非常相近,并以88%的支持率与3株苹果菌株(来自河南省商丘市)和1株果生炭疽菌(*C. fructicola*)模式种 CBS 130416*聚在一起,证明这3株菌很可能属于果生炭疽菌,但又与苹果炭疽病原菌有着明显的遗传上的分化。

综上所述,5株代表性菌株可分为3个类群,分别为松针炭疽菌(*C. fiorinae*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、果生炭疽菌(*C. fructicola*),其中只有归属于胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)的菌株 F11MHT02 与苹果炭疽病原菌完全

聚在一起;而归属果生炭疽菌(*C. fructicola*)的3株病原菌株(F11MHT04、F11LJMX10、F12LZLQ1)则与苹果炭疽病原菌有着细微的区别,不能聚在一个分化枝但同属一个种;归属松针炭疽菌的菌株 F11LZLX1 则与归属菟丝子炭疽菌(*C. cuscuteae*) CBS 128555 区别很大,不能归为一个种。

2.2 非苹果来源炭疽病原菌的致病性测定

对果园周边寄主炭疽病原菌株进行致病性测定,由表2可知,与苹果炭疽病原菌分类不同的菌株如尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)、猪毛菜炭疽菌(*C. salsolae*)、西蒙德炭疽菌(*C. simmondsii*)等种的菌株无伤接种苹果不能发病,证明这些种对苹果没有致病性,不能作为苹果炭疽病的侵染源。但

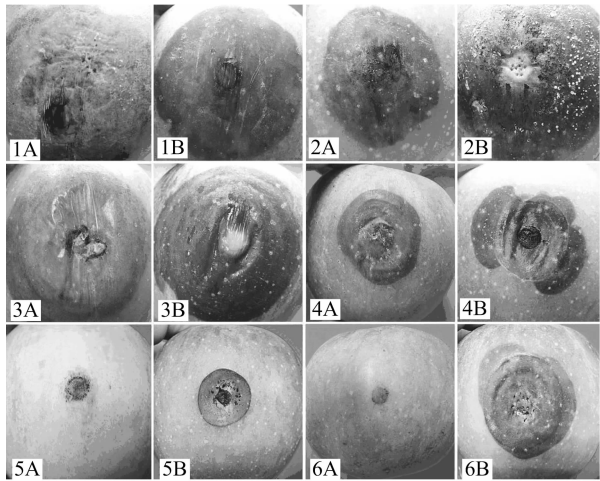
与苹果炭疽菌分类相同的种[果生炭疽菌(*C. fructicola*)、松针炭疽菌(*C. fiorinae*)和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)]无伤接种富士苹果都可以侵染,并呈现典型苹果炭疽病症状,即先产生浅褐色圆形病斑,后逐渐加深,果面稍凹陷,接种处可

见白色菌丝(图 3)。说明果生炭疽菌和胶孢炭疽菌的菌株除对苹果具有致病性,可以作为苹果炭疽病潜在的侵染源,要特别注意在果园内及周边地区清除这些寄主,以避免苹果炭疽病的发生。

表 2 不同寄主炭疽病原菌菌株的致病性测试

炭疽病原菌种名	菌株编号	寄主	不同接种方式的致病性	
			无伤接种	有伤接种
尖孢炭疽菌(<i>C. acutatum</i>)	F12LJMX22	辣椒	—	+
松针炭疽菌(<i>C. fiorinae</i>)	F11LZLX1	梨	+	+
果生炭疽菌(<i>C. fructicola</i>)	F11LJMX18	辣椒	—	+
	F11MHT04	猕猴桃	+	+
	F11LZLQ01	梨	+	+
	F11LJMX10	辣椒	+	+
	F11MHT02	猕猴桃	+	+
胶孢炭疽菌(<i>C. gloeosporioides</i>)	F12LJMX20	辣椒	+	+
猪毛菜炭疽菌(<i>C. salsolae</i>)	F11LJMX09	辣椒	—	+
西蒙德炭疽菌(<i>C. simmondsii</i>)	F12DJLQ01	菜豆	—	+

注:“+”表示致病;“—”表示不致病。



A 表示无伤接种; B 表示有伤接种; 1—尖孢炭疽菌 F12LJMX22; 2—松针炭疽菌 F11LZLX1; 3—果生炭疽菌 F11MHT04; 4—胶孢炭疽菌 F12LJMX20; 5—猪毛菜炭疽菌 F11LJMX09; 6—西蒙德炭疽菌 F12DJLQ01

图 3 不同寄主炭疽病原菌接种症状

3 讨论与结论

我国是一个幅员辽阔物种丰富的国家,尤其在高温高湿的多雨季节,植物炭疽病的发生就具有非常广泛的普遍性,甚至有时在局部地区大规模的流行,如 2008 年安徽砀山暴发的梨炭疽病、贵州凤岗的辣椒炭疽病和 2011—2013 年在整个黄河古道苹果产区暴发的苹果炭疽叶枯病等,都给当地农民带来了巨大的经济损失^[12-17]。作为苹果生产大国,我国苹果的产量和销量已经连续多年居世界第一。为更好地防治苹果生产中的重要病害,清除果园及周边地区侵染菌源就成为防治病害大规模暴发的一个有力手段,而据报道炭疽菌除可侵染苹果外,还可侵染同为蔷薇科的梨和海棠等植物,除此以外,刘建标曾报道常作为苹果园防护林的刺槐也能被炭疽菌侵染,病菌可在刺槐种荚上长期存活,靠风雨传播可造成与苹果之间的交叉感染^[18]。

为考察果园周边寄主植物炭疽病原菌是否能成为苹果炭

疽病的潜在初侵染源,本研究从陕西各地采集蔷薇科、豆科、茄科等植物上具有炭疽病病症的样品 85 份,共分离得到 41 株炭疽菌菌株,选取具有代表性的 21 株菌株,以冬青炭疽菌为外群构建 ITS 序列的 MP 系统发育树,结果显示 21 个周边寄主炭疽病原菌菌株可分为 8 个类群,分别为尖孢炭疽菌、新西兰炭疽菌、松针炭疽菌、果生炭疽菌、胶孢炭疽菌、哈锐炭疽菌、猪毛菜炭疽菌、西蒙德炭疽菌等。选取其中可能与苹果炭疽菌分类相同的 5 株代表性菌株进行多基因(ITS、ACT、GAPDH、CHS-1 和 TUB2)系统发育树的构建,结果显示 5 个菌株可分为 3 个分类单元,分别为松针炭疽菌、胶孢炭疽菌、果生炭疽菌,这表明从梨、辣椒和猕猴桃上分离得到的归属于胶孢炭疽菌和果生炭疽菌的炭疽菌菌株与苹果炭疽菌菌株分类相同,暗示了果园周边梨、辣椒和猕猴桃等寄主的炭疽病原菌可以作为苹果炭疽病潜在的初侵染源。

按分类和寄主的不同选取 10 株代表性供试菌株进行苹果上的致病性测试,结果显示与苹果炭疽病原菌分类不同的种,如尖孢炭疽菌、猪毛菜炭疽菌、西蒙德炭疽菌等种的菌株无伤接种苹果时不发病,说明这些种对苹果没有致病性。与苹果炭疽病原菌分类相近的种,如果生炭疽菌、胶孢炭疽菌和松针炭疽菌无伤接种苹果时都可以发病,并呈现典型的苹果炭疽病症状,证明这些种的菌株对苹果具有致病性,因而它们的寄主猕猴桃、辣椒和梨可作为苹果炭疽病的侵染源。

通过 ITS 及多基因系统发育分析和致病性检测几种方法相互验证,证实茄科的辣椒、猕猴桃科的猕猴桃以及蔷薇科的梨等植物炭疽病原菌菌株和苹果炭疽病原菌菌株分类相同,因此它们也可作为苹果果园炭疽病原菌的初侵染源,在建新园时要尽量避让,不要在种植有这些植物的周边建园,对多年的老果园在平时的日常防护中也要特别加以注意,比如有些果农为了增加自己的经济收入,在果园内经常种植类似辣椒之类的蔬菜,而不知道这些蔬菜也有增加苹果炭疽病发病的可能。如果果园内或周边有其他寄主,在防治苹果炭疽病的同时也应应对这些寄主进行预防,不能等到发病时才去治疗,那时就可能已经造成严重的经济损失。

- 1982;2-87.
- [8]祝水金. 遗传学实验指导[M]. 2版. 北京:中国农业出版社, 2005;6-7.
- [9]詹少华. 大豆根尖染色体制片实验的教学改革[J]. 皖西学院学报,2009,25(2):65-67.
- [10]陈高,孙航,孙卫邦. 改进的植物染色体制片方法[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):759-760.
- [11]李懋学,陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题[J]. 武汉植物学研究,1985,3(4):297-302.
- [12]Levean A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosome[J]. Hereditas,1964,52:201-220.
- [13]Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London:Edward Arnold,1971;87-89.
- [14]Arano H. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenetic considerations on Pertya and Ainsliaea[J]. The Botanic Magazine Tokyo,1963,76(895):32-39.
- [15]Kuo S R, Wang T T, Huang T C. Karyotype analysis of some formosan gymnosperms[J]. Taiwan,1972,17(1):66-80.
- [16]李懋学,张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1966;1-40.
- [17]李懋学,张教方. 植物染色体技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,1991;1-53.
- [18]冯午,刘春清. 培育多倍体西瓜的初步报告[J]. 北京大学学报(自然科学版),1962(3):303-308.
- [19]虢国成,向洋. 大麦和玉米染色体去壁低渗法制片及其核型分析[J]. 大麦与谷类科学,2008(2):8-11.
- [20]杜培,张新友,李丽娜,等. 高质量花生根尖细胞染色体制片方法研究[J]. 河南农业科学,2013,42(3):31-35.
- [21]顾蔚,卜海东,张成艳,等. 华中五味子染色体制片优化及核型分析[J]. 西北植物学报,2008,28(2):2262-2266.
- [22]李晓玲,杨进,王洪涛,等. 树型金银花染色体制片优化及核型分析[J]. 河南农业科学,2009(7):102-106.
- [23]洪培培,杨建玉,陈洪伟,等. 一串红染色体制片技术优化与计数[J]. 西北植物学报,2011,31(10):2124-2128.
- [24]王超,王婧菲,庄南生,等. 木薯根尖染色体制片方法的优化[J]. 热带作物学报,2012,33(4):627-630.
- [25]林秀琴,蔡青,路鑫,等. 甘蔗根尖染色体制片技术研究[J]. 中国农学通报,2011,27(27):104-108.
- [26]李潜学. 对二氯苯在植物染色体预处理中的应用[J]. 遗传,1980,2(6):30-32.
- [27]陈瑞阳,宋文芹,李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法[J]. 植物学报,1979,21(3):297-298.
- [28]蒲富慎,林盛华,李秀兰,等. 中国苹果属植物核型研究[J]. 植物科学学报,1985,3(4):451-456.
- [29]陈瑞阳,宋文芹,李秀兰,等. 中国苹果属植物染色体数目报告[J]. 武汉植物学研究,1986,4(4):337-342.
- [30]梁国鲁,李晓林. 中国苹果属植物染色体数目新观察[J]. 西南农业学报,1991,4(4):25-29.
- [31]肖艳,黄建昌,成明昊. 几种苹果属(*Malus*)植物核型研究[J]. 仲恺农业技术学院学报,1997,10(2):53-60.

(上接第84页)

参考文献:

- [1]Phoulivong S,Cai L,Parinn N,et al. A new species of *Colletotrichum* from *Cordyline fruticosa* and *Eugenia javanica* causing anthracnose disease[J]. Mycotaxon,2010,114(10):247-257.
- [2]Weir B S,Johnston P R,Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. Studies in Mycology,2012,73(1):115-180.
- [3]Xie L,Zhang J Z,Wang 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(1):61-70.
- [4]Than P P,Jeewon R,Hyde K D,et al. Characterisation and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli(*Capsicum* spp.) in Thailand[J]. Plant Pathology,2008,57:562-572.
- [5]Shivas R G,Tan Y P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fiorinae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. [J]. Fungal Diversity,2009,39:111-122.
- [6]Cai L,Hyde K D,Taylor P,et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*[J]. Fungal Diversity,2009,39:183-204.
- [7]Cannon P F,Damm U,Johnston P R,et al. *Colletotrichum* - current status and future directions[J]. Studies in Mycology,2012,73:181-213.
- [8]Damm U,Cannon P F,Woudenberg J H,et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex[J]. Studies in Mycology,2012,73:37-113.
- [9]Dean R, Van Kan J A, Pretorius Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology,2012,13(4):414-430.
- [10]Sutton B C. The Coelomycetes [M]. England: Commonwealth Mycological Institute,1971.
- [11]Barnes I, Gaur A, Burgess T, et al. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata* [J]. Molecular Plant Pathology, 2001,2(6):319-325.
- [12]Gonzalez E,Sutton T B,Correll J C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic,molecular,and pathogenicity tests[J]. Phytopathology,2006,96(9):982-992.
- [13]Lee D H, Kim D H, Jeon Y A, et al. Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea[J]. The Plant Pathology Journal,2007,23(2):37-44.
- [14]Spolti P, Valdebenito - Sanhueza R M, Laranjeira F F, et al. Comparative spatial analysis of the sooty blotch/flyspeck disease complex, bull's eye and bitter rots of apples [J]. Plant Pathology, 2012,61(2):271-280.
- [15]Giaretta D R, Bogo A, Medeiros Coelho C M, et al. ITS - rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of Apple glomerella leaf spot [J]. Ciencia Rural,2010,40(4):806-812.
- [16]李保华,王彩霞,董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题[J]. 植物保护,2013,39(5):46-54.
- [17]宋清,王素侠,杨春亮,等. 苹果炭疽菌叶枯病的研究初报[J]. 落叶果树,2012,44(2):29-30.
- [18]刘建标. 苹果烂果严重的原因及对策[J]. 河南林业科技, 2000,20(2):26-27.