



我国不同产区桃褐腐病病原鉴定与分析

纪兆林* 谈彬 朱薇 董京萍 朱峰 徐敬友 童蕴慧

扬州大学园艺与植物保护学院 江苏 扬州 225009

摘要:【背景】桃褐腐病是桃树的一种重要病害，给桃果生产带来了严重的经济损失。桃褐腐病病原种类较多。【目的】明确我国不同桃产区褐腐病菌的种类。【方法】采集不同产区桃褐腐病果，采用单孢分离法分离病菌，通过形态特征、分子生物学方法和接种试验对分离株进行种类鉴定和分析。

【结果】从来自浙江丽水、四川成都、云南昆明、辽宁大连、河北石家庄、北京海淀、山东泰安和山东青岛等 8 个不同桃产区的褐腐病果上经单孢分离获得 15 株分离株。各分离株菌落形态略有差异，但来自云南的分离株 hfyn 与其他分离株明显不同。通过 rDNA ITS 序列和系统进化树分析，将云南分离株 hfyn 鉴定为云南丛梗孢(*Monilia yunnanensis*)，来源于其他产区的 14 株分离株均鉴定为果生链核盘菌(*Monilinia fructicola*)。采用多对特异性引物 PCR 扩增分析，确证了上述鉴定结果。接种试验表明，不同产区来源的桃褐腐病菌分离株在桃果上的致病力存在差异，其中来自浙江丽水、河北石家庄、山东青岛的分离株致病力较强，而来自山东泰安和云南昆明的分离株致病力相对较弱。【结论】我国桃产区褐腐病菌主要以 *M. fructicola* 为主，但不同产区来源的菌株间存在形态和致病性差异，此结果可为我国桃褐腐病的治理提供科学依据。

关键词: 桃褐腐病，果生链核盘菌，云南丛梗孢，rDNA ITS，致病性

Identification and analysis of the peach brown rot pathogens from different peach-growing areas in China

Ji Zhao-Lin* TAN Bin ZHU Wei DONG Jing-Ping ZHU Feng XU Jing-You
TONG Yun-Hui

College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: [Background] Brown rot on peach and nectarine trees caused by *Monilinia* spp. is an important fungal disease, and produces serious economic losses frequently in China. There may exist more than one species of peach brown rot pathogens. [Objective] To clarify the species and pathogenicity of brown rot pathogens from different peach-growing areas in China. [Methods] The pathogens were isolated from peach brown rot fruits of different peach production areas, using the method of single spore isolation. Identification and analysis of isolates were carried out by morphological characteristics, molecular biology methods, and

Foundation items: Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-30-3-02); Agriculture Science and Technology Innovation Fund of Jiangsu Province (CX(14)2015, CX(15)1020)

*Corresponding author: E-mail: zhjlj@yzu.edu.cn

Received: 21-03-2018; Accepted: 11-06-2018; Published online: 31-07-2018

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-30-3-02); 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(14)2015, CX(15)1020]

*通信作者: E-mail: zhjlj@yzu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-21; 接受日期: 2018-06-11; 网络首发日期: 2018-07-31

inoculation assay. **[Results]** In this study 15 brown rot pathogen isolates were obtained from 8 different peach-growing areas. The morphological characteristics of the isolates were slightly different from each other, but the isolate hfyn from Yunnan Province was significantly different from the other isolates. Based on its morphology, rDNA ITS sequence and phylogenetic analysis, the isolate hfyn was identified as *Monilia yunnanensis*, which was a newly found brown rot pathogen, and the other 14 isolates were identified as *Monilinia fructicola*. PCR amplification using several pairs of specific primers confirmed the morphological and rDNA ITS identification results. Inoculation tests showed that the pathogenicities on peach fruits of 15 isolates from different peach producing areas were different. The isolates from Lishui, Zhejiang Province, Shijiazhuang, Hebei Province, and Qingdao, Shandong Province had more virulent, and the virulences of isolates from Kunming, Yunnan Province and Tai'an, Shandong Province were relatively weak. **[Conclusion]** The results indicated that the major pathogen of brown rot in peach-growing areas in China was *Monilinia fructicola*, and there were differences in morphology and pathogenicity among these isolates from different peach-growing areas. The result from the present study may provide a scientific basis for managing peach brown rot epidemics.

Keywords: Peach brown rot, *Monilinia fructicola*, *Monilia yunnanensis*, rDNA ITS, Pathogenicity

褐腐病是桃、苹果、梨等核果、仁果果树上的重要病害, 最早在 1796 年欧洲就有记载, 全世界均有发生^[1]。我国对褐腐病的记载最早可以追溯到 20 世纪 50 年代^[2], 已有 16 省(市)记载了该病的发生^[3], 主要分布在北京、河北、山东、浙江、福建等地^[4-5]。桃褐腐病主要危害果实, 也可危害花、叶和枝梢。果实自幼果期至成熟期均可受害, 越接近成熟期受害越重, 造成腐烂, 而且还可在运输、贮藏期间发生, 使果实丧失商品价值, 造成严重的经济损失^[1,6]。褐腐病病原菌主要有 3 个种^[7-8]: 果生链核盘菌(*Monilinia fructicola*)、松散链核盘菌(*M. laxa*)和果产链核盘菌(*M. fructigena*), 无性态为丛梗孢属真菌(*Monilia* spp.)。此外, 尚未发现有性态的病原菌有梅生丛梗孢(*M. mumecola*)^[9]、云南丛梗孢(*M. yunnanensis*)^[10]和 *M. polystroma*^[11], 我国大部分地区以 *M. fructicola* 为主要病原物^[8,12]。目前针对我国不同桃产区的褐腐病菌种类少见报道, 本文对不同产区桃褐腐病菌进行了分离, 根据 rDNA ITS 序列进行了初步鉴定, 并结合基于基因组 DNA 特异性片段扩增和在果实上的致病性进行了比较和分析, 为明确我国各桃主产区桃褐腐病菌种类、深入研究和制定适合不同产区的褐腐病防治技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

分别从我国辽宁、河北、北京、山东、四川、云南、浙江等桃主产区采集带有孢子霉层的桃褐腐病果, 用于褐腐病菌分离。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

葡萄糖、真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 扩增反应试剂, 北京康维世纪生物科技有限公司; 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

生化培养箱, 宁波江南仪器厂; 蒸汽灭菌器, Tomy Kogyo 有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像系统, 上海培清公司。

桃褐腐病菌分离和培养选用 PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, pH 自然。培养基灭菌条件为 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 病菌的分离纯化

挑取褐腐病果上的霉层孢子, 采用单孢分离法^[13]进行病原菌分离。分离株纯化后接种于 PDA 斜面试管, 4 °C 保存备用。

1.4 形态特征观察

参考魏景超的《真菌鉴定手册》^[14]、Lane 的褐

腐病菌形态鉴定方法^[15], 观察分离株在 PDA 平板上的形态特征。

1.5 病菌 rDNA ITS 序列扩增与分析

刮取 25 °C 培养 3 d 的 PDA 平板上分离株菌丝, 采用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取分离株基因组 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量。采用真菌 rDNA ITS 通用引物^[16]ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGG-3'), 扩增 18S rDNA-ITS1-5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA 区域序列。PCR 反应体系(25 μL): 1×PCR buffer (MgCl₂) 1.5 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.25 U, dNTPs 200 μmol/L, ITS4 和 ITS5 引物各 0.2 μmol/L, 基因组 DNA 模板 5 μL, ddH₂O 补足到 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将 PCR 产物目的条带纯化回收后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行同源序列比对, 判断分离株种类, 并且根据测序所得 ITS 序列用 MEGA 7.0 构建系统发育进化树。

1.6 特异性 PCR 鉴定与分析

为了进一步鉴定 ITS 通用引物扩增结果和比较不同产区来源桃褐腐病菌分离株的分子特征, 采用 Ioos 等^[17]、Ma 等^[18]、Côté 等^[19]分别针对 ITS 区域、微卫星区和 RAPD 片段差异区域设计的区分 *M. fructicola*、*M. laxa* 或 *M. fructigena* 褐腐病菌的特异性引物进行 PCR 扩增鉴定, 参照 1.5 提取各分离株基因组 DNA。特异性引物序列、PCR 扩增体系和条件如下:

(1) 参照 Ioos 等^[17], 引物 *M. fructicola*-ITS1 (5'-TATGCTCGCCAGAGGATAATT-3')和 *M. fructicola*-ITS4 (5'-TGGGTTGCAGAAGCACACT-3'), 引物 *M. laxa*-ITS1 (5'-TATGCTCGCCAGAGAATAATC-3')和 *M. laxa*-ITS4 (5'-TGGGTTTTGGCAGAAGCACACC-3'), 引物 *M. fructigena*-ITS1 (5'-CACGCTCGC

CAGAGAATAACC-3')和 *M. fructigena*-ITS4 (5'-GGTGTTTTGCCAGAAGCACACT-3')。PCR 反应体系(25 μL): 基因组 DNA 约 10 ng, 各引物 0.2 μmol/L, dNTPs 200 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, 1×PCR buffer。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 67.5 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

(2) 参照 Ma 等^[18], 引物 *M. fructicola*-IMfF (5'-ATGCAGAAGTGTGAATAGGGCCT-3')和 *M. fructicola*-IMfR (5'-CGAAGGATGAGAGGAAGATTAGGG-3'), 引物 *M. laxa*-MLF2 (5'-CGAGGCTCTTACGACATTTG-3')和 *M. laxa*-MLR2 (5'-TTATAC TATGGCCG GGCAGA-3')。PCR 反应体系(25 μL): 基因组 DNA 约 10 ng, 各引物 0.5 μmol/L, dNTPs 200 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U, 1×PCR buffer。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 40 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

(3) 参照 Côté 等^[19], 上游引物为 MO368-5 (5'-GC AAGGTGTCAA AACTTCCA-3'), 下游引物分别为 *M. fructicola*-MO368-10R (5'-AAGATTGTCACCATGGTTGA-3')、*M. laxa*-Laxa-R2 (5'-TGCACATATCCCTCGAC-3')和 *M. fructigena*-MO368-8R (5'-AGATCAAACATCGTCCATCT-3')。PCR 反应体系(10 μL): 基因组 DNA 约 10 ng, 各引物 0.2 μmol/L, dNTPs 200 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.25 U, 1×PCR buffer。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 3 min。

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用凝胶成像系统观察、拍照。

1.7 致病性测定

采用室内离体接种的方法进行致病性测定。75%乙醇桃果表面消毒后无菌水冲洗晾干, 用灭菌牙签在果面刺 2 个细小伤口(距离 2 mm), 取直径 6 mm 的桃褐腐病菌菌饼, 菌丝面贴放在果面伤口上, 设无菌水接种为对照。25 °C 保湿培养, 24 h 后移去菌饼, 每 24 h 观察桃果发病情况并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 分离菌株及形态特征

从我国多个桃主产区的褐腐病果中分离到 15 株分离株(表 1)。15 株分离株在 PDA 培养基上均生长良好, 培养 7 d 后菌丝基本能够铺满平板。通过观察, 大部分分离株菌落灰褐色或灰黄色, 菌落边缘整齐, 无玫瑰花瓣结构, 在培养 5 d 后都能形成数量不等的灰白(黄)至灰色球状霉粒点(分生孢子丛), 有的呈轮纹状排列或不明显(图 1A-D),

分生孢子无色、单胞, 椭圆形或柠檬形, 呈链状排列, 有分枝(图 2), 分生孢子大小为(12.1–25.8) $\mu\text{m} \times$ (9.3–16.4) μm , 平均大小为 17.5 $\mu\text{m} \times$ 13.2 μm 。不同产区来源分离株间形态特征略有差异。结合魏景超《真菌鉴定手册》^[14]和 Lane 的褐腐病菌形态鉴定方法^[15], 将这类分离株初步鉴定为 *M. fructicola*。然而云南分离株 hfyn 菌落形态与其他分离株明显不同, 不呈轮纹状, 无玫瑰花瓣结构, 不产生分生孢子, 菌丝厚度较其他分离株薄, 紧贴培养基表

表 1 褐腐病菌特异性引物 PCR 扩增结果及在桃果上的致病性

Table 1 Sources, PCR amplification results and pathogenicity of brown rot isolates

分离株编号 Isolates	采集地点 Source	rDNA ITS 鉴定 Identification	Ioos et al.			Ma et al.		Côté et al.			果实致病性 Pathogenicity on fruit
			cola	laxa	gena	cola	laxa	cola	laxa	gena	
hfdl	辽宁大连 Dalian, Liaoning	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	**
hfsc	四川成都 Chengdu, Sichuan	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	***
hfsq	山东青岛 Qingdao, Shandong	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	***
hfyn	云南昆明 Kunming, Yunnan	<i>Monilia yunnanensis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	*
hfhs-1	河北石家庄 Shijiazhuang, Hebei	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	***
hfhs-2	河北石家庄 Shijiazhuang, Hebei	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	***
hfhs-3	河北石家庄 Shijiazhuang, Hebei	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	**
hfzl-2	浙江丽水 Lishui, Zhejiang	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	***
hfzl-3	浙江丽水 Lishui, Zhejiang	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	***
hfbn-4-26	北京海淀 Haidian, Beijing	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	***
hfbn-5-27	北京海淀 Haidian, Beijing	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	**
hfbn-rp21	北京海淀 Haidian, Beijing	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	**
hfst-8	山东泰安 Tai'an, Shandong	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	*
hfst-10	山东泰安 Tai'an, Shandong	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	*
hfst-25	山东泰安 Tai'an, Shandong	<i>Monilinia fructicola</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	*

注: cola 为 *M. fructicola* 特异性扩增产物; laxa 为 *M. laxa* 特异性扩增产物; gena 为 *M. fructigena* 特异扩增产物; +: 有特异性扩增产物条带; -: 无特异性产物条带。***: 在桃果上引起的病斑面积较大, 产生的霉层孢子较多; **: 病斑面积中等, 产生一定量的孢子; *: 有一定面积的病斑, 产生的孢子较少。

Note: cola: *M. fructicola* specific product; laxa: *M. laxa* specific product; gena: *M. fructigena* specific product; +: Having products; -: No products. ***: Large lesion with more mold spores on fruit; **: Medium lesion with a certain amount spores on fruit; *: A certain size lesion with less spores on fruit.

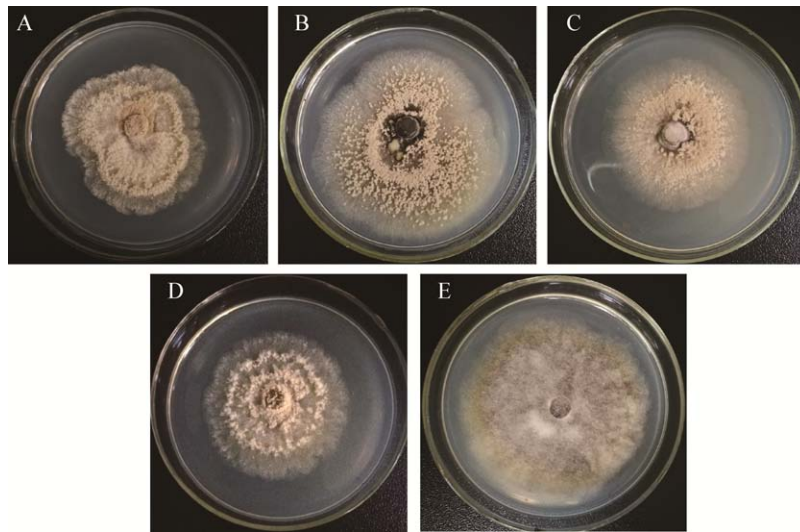


图 1 桃褐腐病菌分离株的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of brown rot isolates on PDA

注: A: 浙江丽水分离株 hfzl-2; B: 北京海淀分离株 hfbn-5-27; C: 山东泰安分离株 hfst-8; D: 山东青岛分离株 hfsq; E: 云南昆明分离株 hfyn.

Note: A: Isolate hfzl-2 from Lishui, Zhejiang; B: Isolate hfbn-5-27 from Haidian, Beijing; C: Isolate hfst-8 from Tai'an, Shandong; D: Isolate hfsq from Qingdao, Shandong; E: Isolate hfyn from Kunming, Yunnan.

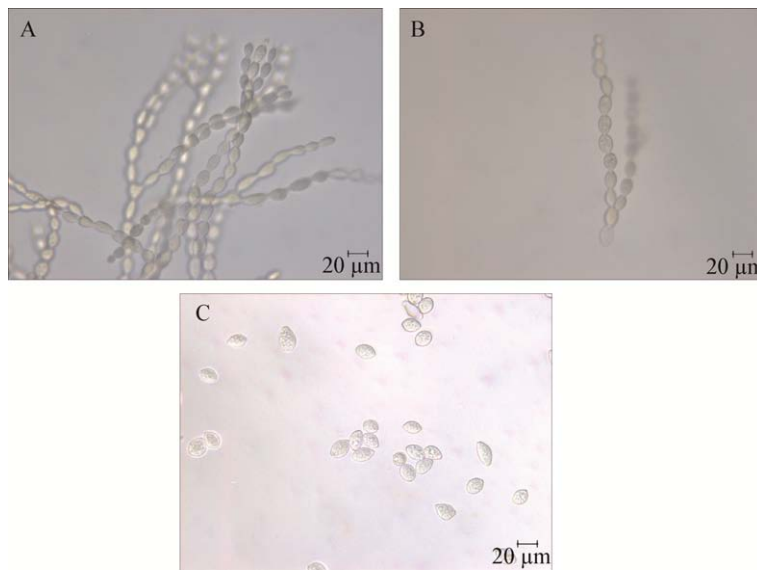


图 2 *M. fructicola* 代表分离株(hfzl-2)的分生孢子链和分生孢子形态

Figure 2 Conidial chain and conidia morphology of typical isolate (hfzl-2) of *M. fructicola*

注: A、B: 分生孢子链; C: 分生孢子.

Note: A, B: Conidial chains; C: Conidia.

面难以分离, 颜色偏暗, 呈现灰褐色纤维絮状或绒毡状, 质地均匀、平铺(图 1E)。它与 *M. fructigena* 和 *M. laxa* 的形态特征都不相符, 但与 *M. yunnanensis* 的菌落形态相似。

2.2 病菌 rDNA ITS 序列扩增与系统发育分析

利用引物 ITS4/ITS5 对上述 15 个分离株进行 PCR 扩增。经测序分别得到大小约 500 bp 的 ITS 片段序列。在 GenBank 数据库中, BLAST 结果表

明, 15 个分离株均能找到与之相似性为 99% 的已发表序列。来自云南省的分离株 hfyn 与 GenBank 中的 *Monilia yunnanensis* 相似度为 99%, 而其余 14 个均与已发表的 *Monilinia fructicola* 序列具有 99% 的相似度。15 株桃褐腐病菌分离株的 ITS 序列提交 GenBank 获得了登录号。

从 NCBI GenBank 下载相似性最高的同种和近似种褐腐病菌菌株的若干序列, 用 MEGA 7.0 软件

进行系统发育分析。采用最大似然法和邻接法构建系统发育进化树, 自展值设为 1 000。结果表明, 除云南分离株外, 其他 14 个分离株均与 *M. fructicola* 归类到同一个分支。云南分离株与 *M. yunnanensis* 在同一分支, 与已报道的 *M. fructigena* 归在同一个大分支, 说明云南分离株与 *M. fructigena* 亲缘关系较为接近, 而 *M. laxa* 和 *M. mumecola* 的亲缘关系则较为接近(图 3)。

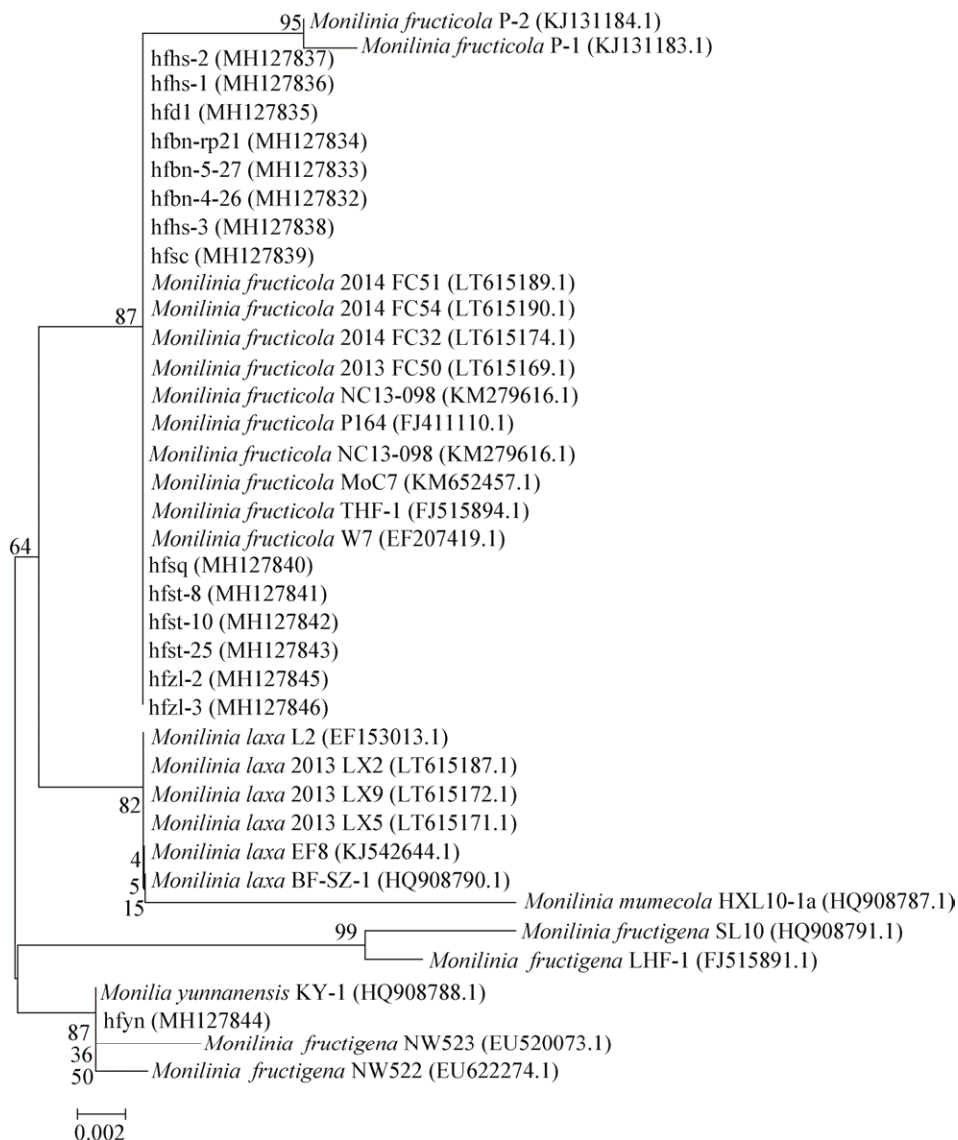


图 3 基于 rDNA ITS 序列采用邻接法构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed using the adjacency method based on rDNA ITS sequences

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.002 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.002 means the nucleotide substitution rate of 0.002.

2.3 特异性引物扩增分析

由图 4 可知, 采用 Ioos 等^[17]的方法对 15 株分离株进行 PCR 扩增, 若使用 ITS 区特异性引物 ITS1/ITS4 (*M. fructicola*)时 15 个分离株均扩增出了大小约为 330 bp 的片段, 其中 hfyn 和 hfsq 经电泳检测产量较少(图 4A); 而使用其设计的 ITS1/ITS4 (*M. fructigena*)引物时仅在 hfyn 分离株扩增出了大约 330 bp 的片段, 使用 ITS1/ITS4 (*M. laxa*)引物则对 15 株桃褐腐病菌分离株均没有扩增出特异性片段(表 1)。利用 Ma 等^[18]针对微卫星区域设计的特异引物进行 PCR 扩增, ImfF/ImfR (*M. fructicola*)引物对 15 个分离株的扩增结果与 Ioos 等^[17]针对 *M. fructicola* 设计的引物的扩增结果一样, 都能扩增出特异性条带(图 4B, 表 1), 各分离株特异性条带大小约为 440 bp; 而 MLF2/MLR2 (*M. laxa*)引物对 15 个分离株均没有扩增出特异性片段。选用 Côté 等^[19]针对 RAPD 差异片段区域设计的特异引物对 15 株分离株进行 PCR 扩增, 采用 MO368-5 和 *M. fructicola*-MO368-10R 引物时除 hfyn 和 hfsq 没有扩增出条带外, 其余 13 个分离株都扩增出了 500 bp 左右的特异性条带(图 4C), 此外分别采用其针对 *M. laxa*、*M. fructigena* 的两对特异性引物均未能扩增到条带(表 1)。

2.4 致病性测定

接种实验表明, 15 株桃褐腐病菌分离株均能使

桃果致病, 但各分离株的致病力略有差异, 呈现出不同大小和孢子量的病斑(表 1)。接种后 24 h, 各分离株接种的桃果陆续开始发病形成水渍状浸解病斑。其中来自浙江的 hfzl-2 和 hfzl-3、四川的 hfsc、北京的 hfbn-4-26 及河北的 hfhs-1 等分离株对桃果的致病性较强, 使桃果产生的病斑、霉层孢子量比其他分离株的要大且多; 接种后 96 h, 这些分离株引起的病斑已经覆盖满至桃的一侧面, 病斑中央呈现黑褐色。然而来自云南和山东泰安的分离株在相同时间内所致病斑较小且孢子量少, 表明其致病力相对较弱。图 5 为桃褐腐病菌代表分离株接种桃果的发病症状。

3 讨论与结论

本研究从来自我国不同桃产区的褐腐病果上单孢分离出 15 株真菌分离株, 采用 ITS 序列分子特征及其构建的系统进化树和基本形态学方法进行鉴定, 其中 14 株为果生链核盘菌(*Monilinia fructicola*, 无性态为果生丛梗孢 *Monilia fructicola*), 1 株为云南丛梗孢(*M. yunnanensis*)。这说明我国桃产区桃褐腐病菌的主要常见种为 *M. fructicola*, 这与 Hu 等^[10]和尹良芬^[20]报道的结果相一致。但在苹果和梨上, *M. yunnanensis* 却是最普遍的褐腐病菌, 其次是 *M. polystroma*, 而 *M. fructicola* 比例则很低^[21]; 另外周芳^[22]在研究山西省褐腐病菌种群时发现, 病

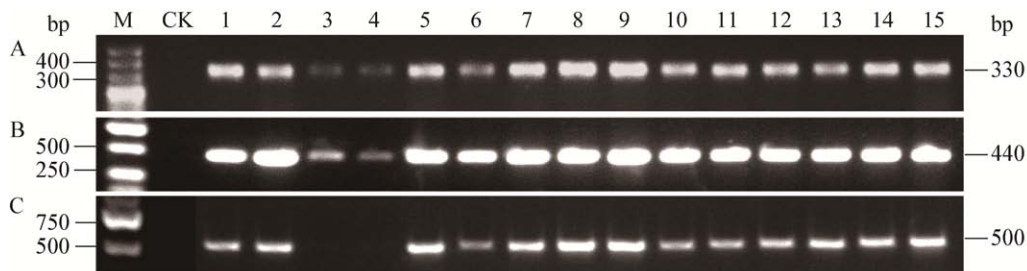


图 4 桃褐腐病菌分离株采用 Ioos 等^[17]、Ma 等^[18]和 Côté 等^[19]的 *M. fructicola* 引物进行 PCR 扩增电泳图

Figure 4 PCR amplification electrophoresis pattern of 15 brown rot isolates using *M. fructicola* primers of Ioos et al^[17], Ma et al^[18] and Côté et al^[19], respectively

注: A: Ioos 等 ITS1/ITS4 (*M. fructicola*)引物扩增; B: Ma 等 ImfF/ImfR (*M. fructicola*)引物扩增; C: Côté 等 MO368-5/MO368-10R (*M. fructicola*)引物扩增。M: 500 bp marker (A); 2 000 bp marker (B 和 C)。1: hfdl; 2: hfsc; 3: hfsq; 4: hfyn; 5: hfhs-1; 6: hfhs-2; 7: hfhs-3; 8: hfzl-2; 9: hfzl-3; 10: hfbn-4-26; 11: hfbn-5-27; 12: hfbn-rp21; 13: hfst-8; 14: hfst-10; 15: hfst-25。

Note: A: Ioos et al. ITS1/ITS4 (*M. fructicola*) primer pair; B: Ma et al. IMfF/ImfR (*M. fructicola*) primer pair; C: Côté et al. MO368-5/MO368-10R (*M. fructicola*) primer pair. M: 500 bp marker (A), 2 000 bp marker (B and C). 1: hfdl; 2: hfsc; 3: hfsq; 4: hfyn; 5: hfhs-1; 6: hfhs-2; 7: hfhs-3; 8: hfzl-2; 9: hfzl-3; 10: hfbn-4-26; 11: hfbn-5-27; 12: hfbn-rp21; 13: hfst-8; 14: hfst-10; 15: hfst-25.

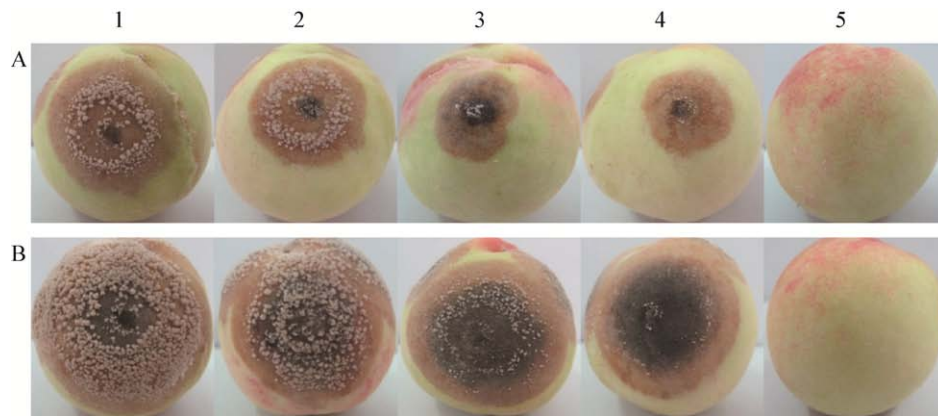


图5 桃褐腐病菌分离株接种离体桃果的发病情况

Figure 5 Symptoms of peach fruits inoculated by brown rot isolates *in vitro*

注: A: 接种后 48 h; B: 接种后 96 h. 1: hfzl-2; 2: hfzl-3; 3: hfst-25; 4: hfyn; 5: CK (ddH₂O).

Note: A: 48 h after inoculation; B: 96 h after inoculation. 1: hfzl-2; 2: hfzl-3; 3: hfst-25; 4: hfyn; 5: CK (ddH₂O).

菌主要为 *Monilinia fructigena*, 而 *M. fructicola* 很少, 其分离的寄主主要为苹果和梨, 只有 1 株分离株来源于桃。因此桃和苹果、梨上的褐腐病菌种群不同, 这可能与寄主选择性、偏好性有关, 还需要进一步研究。闫大琦^[23]在研究 *M. yunnanensis* 遗传多样性时就发现, 来自桃等核果类果树和来自苹果、梨等仁果类果树的菌株亲缘关系有着一定的差异。此外, 本研究系统进化树显示 *M. yunnanensis* 与 *M. polystroma* 和 *M. fructigena* 的亲缘关系较近, Zhu 等^[21]研究认为这 3 个种在物种形成过程中更像是系统发育物种。同属于 *M. fructicola* 的 14 株分离株菌落形态都略有不同, 产生的分生孢子丛并不都是 *M. fructicola* 常见的同心轮纹状排列^[15], 说明种内菌株间也存在着多样性, 或许与来源产区地理特征有关。然而本研究中云南丛梗孢分离株的菌落形态和几乎不能产生分生孢子的特征与 Hu 等^[10]最早鉴定该种时的报道一致, 但可以通过刮除菌丝并用无菌水冲洗后覆盖纱布的方法增加产孢量^[24]。

采用 Ioos 等^[17]和 Ma 等^[18]设计的针对 *M. fructicola* 的特异性引物对 15 个分离株进行了 PCR 扩增, 所有鉴定为 *M. fructicola* 的 14 个分离株均扩增出了特异性条带, 其中来自山东青岛的分离株 hfsc 条带较弱, 这进一步确证了本研究桃褐腐病菌的鉴定结果。鉴定为 *M. yunnanensis* 的云南分离株

hfyn 也扩增出了与上述 14 个分离株大小一致的特异性条带, 条带较弱, 同 hfsc 分离株。而应用 Côté 等^[19]针对 *M. fructicola* 设计的 RAPD 差异片段特异性引物扩增时, 也只有山东分离株 hfsc 和云南分离株 hfyn 没有扩增到特征条带; 樊锦艳等^[25]使用这对引物也没有扩增出特征条带。由于本研究没有分离到 *M. laxa* 菌株, 与针对该种特异性引物未能扩增出特征条带是相符的。此外, 使用 Ioos 等^[17]设计的 *M. fructigena* 特异性引物仅在云南分离株 hfyn 中扩增出了特征条带, 而且在构建的 rDNA ITS 系统进化树上 hfyn 分离株与已报道的 *M. yunnanensis* KY-1 和 *M. fructigena* 处于同一个分支, 说明 *M. yunnanensis* 和 *M. fructigena* 亲缘关系较近, 我们推测 *M. yunnanensis* 是由 *M. fructigena* 在特定的环境条件下变异进化产生的, 但目前还缺乏针对该菌株的特异性 PCR 引物。同时, 本研究在特异性引物扩增中均没有出现两条带的情况, 与樊锦艳等^[25]的研究结果不同, 这可能与菌株本身的差异及引物本身的特异性有关。接种试验表明不同产区来源的桃褐腐病菌分离株存在致病性差异, 甚至是同一地区来源的分离株间也存在较大的差异, 如山东分离株青岛 hfsc 和泰安 hfst 等。在桃褐腐病菌分离株分子鉴定中, 本文采用了 ITS 序列及上述特异性引物 PCR 扩增法, 最近又发展了基于漆酶基因(用于鉴定 *M.*

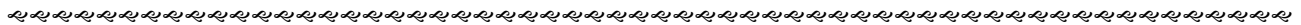
fructicola, *M. fructigena*, *M. laxa* 和 *M. polystroma*) 和延伸因子基因(用于鉴定 *M. mumecola* 和 *M. yunnanensis*)的 Real-time PCR 检测鉴定方法^[26]或可参考。

本研究未能从桃褐腐病病果中分离到 *M. fructigena* 和 *M. laxa* 分离株, 主要原因是本文的研究目的是了解我国不同桃产区桃褐腐病菌的种类, 仅从桃主产区选择代表性的桃园病样进行分离, 并没有进行广泛、大面积采样分离, 因此分离获得的分离株较少, 缺乏该产区的普遍代表性。其次, 本研究采用的是单孢分离法, 从病果上的褐腐分生孢子丛中挑取孢子进行稀释划线分离, 而 *M. laxa* 和 *M. fructigena* 侵染的病果上分生孢子较少^[12], 可能会影响这两种菌的分离比例, 另外也有可能褐腐病桃果存在两种以上复合侵染现象, 这还需要进一步研究。虽然如此, 但本研究结果说明了目前我国桃主产区褐腐病菌的主要种为 *M. fructicola*。为了准确了解我国桃主产区褐腐病菌种类和分布, 今后有必要扩大和增加不同桃产区桃褐腐病菌分离株数量, 进一步探索我国桃褐腐病菌种群的遗传多样性, 为不同产区桃褐腐病的有效防控提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Ogawa JM, Zehr EI, Bird GW, et al. Compendium of Stone Fruit Diseases[M]. USA St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1995
- [2] Xiang WN. Chinese Mycology and Plant Pathology Literature[M]. Beijing: Science Press, 1957 (in Chinese)
相望年. 中国真菌学与植物病理学文献[M]. 北京: 科学出版社, 1957
- [3] Institute of Pomology/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Chinese Fruit Pest [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1994 (in Chinese)
中国农业科学院果树研究所/柑橘研究所. 中国果树病虫志[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [4] Zhu XQ, Chen XY, Luo Y, et al. First report of *Monilinia fructicola* on peach and nectarine in China[J]. Plant Pathology, 2005, 54: 575
- [5] Hu MJ, Chen Y, Chen SN, et al. First report of brown rot of peach caused by *Monilinia fructicola* in southeastern China[J]. Plant Disease, 2011, 95(2): 225
- [6] Li SF, Chen C. Incidence and management of the peach fruit brown rot[J]. Plant Protection, 2009, 35(2): 134-139 (in Chinese)
李世访, 陈策. 桃褐腐病的发生和防治[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 134-139
- [7] Batra LR. World species of *Monilinia* (fungi): Their ecology, biosystematics and control[J]. Mycologia Memoirs, 1991, 16: 1-246
- [8] Chen LF, Xu JY. Agricultural Plant Pathology [M]. 4th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese)
陈利锋, 徐敬友. 农业植物病理学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2015
- [9] Harada Y, Nakao S, Sasaki M, et al. *Monilia mumecola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan[J]. Journal of General Plant Pathology, 2004, 70(6): 297-307
- [10] Hu MJ, Cox KD, Schnabel G, et al. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24990
- [11] van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ, et al. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*[J]. Mycological Research, 2002, 106(4): 444-451
- [12] Luo CX. Advances and prospects on researches of brown rot disease on fruits[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(2): 145-153 (in Chinese)
罗朝喜. 果树褐腐病的研究现状及其展望[J]. 植物病理学报, 2017, 47(2): 145-153
- [13] Ji ZL, Zhang JJ, Xu JY, et al. Characteristics and competition of procymidone-resistant *Botrytis cinerea* isolates[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2007, 28(2): 65-68 (in Chinese)
纪兆林, 张建军, 徐敬友, 等. 抗腐霉利的灰葡萄孢菌株特性及其竞争能力[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 28(2): 65-68
- [14] Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [15] Lane CR. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters[J]. EPPO Bulletin, 2002, 32(3): 489-493
- [16] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[A]//Innis MA. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322
- [17] loos R, Frey P. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106(4): 373-378
- [18] Ma Z, Luo Y, Michailides TJ. Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California[J]. Journal of Phytopathology, 2003, 151(6): 312-322
- [19] Côté MJ, Tardif MC, Meldrum AJ. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR[J]. Plant Disease, 2004, 88(11): 1219-1225
- [20] Yin LF. Characterization of populations of *Monilinia* spp. on stone and pome fruits in China and genetic evolution of the *Cyt b* genes[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese)

- 尹良芬. 中国核果/仁果类果树褐腐病菌种群结构及 *Cyt b* 基因的遗传进化研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2015
- [21] Zhu XQ, Niu CW, Chen XY, et al. *Monilinia* species associated with brown rot of cultivated apple and pear fruit in China[J]. Plant Disease, 2016, 100(11): 2240-2250
- [22] Zhou F. Population structure and pathogenicity of *Monilinia* in Shanxi Province[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2015
周芳. 山西省褐腐病菌种群结构及致病性研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2015
- [23] Yan DQ. Genetic diversity of *Monilia yunnanensis* by using RAPD analysis[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese)
闫大琦. 果树褐腐病菌 *Monilia yunnanensis* 遗传多样性的 RAPD 分析[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016
- [24] Zhu XQ, Zheng HH, Fang YL, et al. A method to induce significant production of conidia from *Monilinia fructigena*, *Monilia polystroma*, and *Monilia yunnanensis*[J]. Australasian Plant Pathology, 2014, 43(5): 531-533
- [25] Fan JY, Zhu XQ, Guo LY, et al. Comparison of three molecular identification methods for *Monilinia* species on stone and pome fruits[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2007, 34(3): 289-295 (in Chinese)
樊锦艳, 朱小琼, 国立耘, 等. 褐腐病菌三种分子鉴定方法的比较[J]. 植物保护学报, 2007, 34(3): 289-295
- [26] Wang JR, Guo LY, Xiao CL, et al. Detection and identification of six *Monilinia* spp. causing brown rot using TaqMan real-time PCR from pure cultures and infected apple fruit[J]. Plant Disease, 2018. DOI: 10.1094/PDIS-10-17-1662-RE



(上接 p.818)

征稿简则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。(4) 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>