

秦岭北麓猕猴桃主产区溃疡病病原菌的分离与鉴定

井赵斌¹, 杨宏勃², 杨玉旺², 沈 静², 周素敏², 颜瑞莉², 徐 明³

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西绿盾生物制品有限责任公司, 陕西 蒲城 715500;
3. 陕西省农村科技开发中心, 陕西 西安 710054)

摘 要:为明确秦岭北麓猕猴桃主产区主栽品种猕猴桃溃疡病病原菌致病性强弱与地理来源及品种之间的关系,本研究在周至、杨凌和眉县选择了海沃德、华优和红阳的感病枝条为材料,采用常规组织法对猕猴桃溃疡病病原菌进行分离、纯化,结合 16S-23S rDNA ITS 序列分析进行分子鉴定,并进行了致病性测定。结果表明:经分离、纯化和分子鉴定,共获得丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)菌株 20 个,且不同地理来源和不同品种的菌落形态差异较大;对不同菌株致病性的测定表明,各菌株致病性强弱与其地理来源及品种之间并没有直接的关系;建立基于软件 ImageJ 1.50b 的定量精确叶片致病性强弱分析方法,筛选出强致病性菌株 4 个,可为抗性材料鉴定和抗溃疡病专用生物药剂筛选研究奠定基础。

关键词:猕猴桃溃疡病;病原菌;分子鉴定;致病性;秦岭北麓

中图分类号:S763.1 文献标志码:A 文章编号:1001-7461(2016)05-0188-06

Isolation and Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Northern Area of Qinling Mountains

JING Zhao-bin¹, YANG Hong-bo², YANG Yu-wang², SHEN Jing², ZHOU Su-min², YAN Rui-li², XU Ming³

(1. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Shaanxi Lyudun Biological Products Co., Ltd, Pucheng, Shaanxi 715500, China; 3. Shaanxi Rural Science and Technology Development Center, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the relationships among the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) and the geographic origin and cultivars for the main cultivars in northern area of Qinling Mountains. The infected kiwifruit branches were collected from the cultivars of Hayward, Huayou and Hongyang in Zhouzhi County, Yangling District and Mei County. The pathogens of Psa were isolated and purified by the conventional tissue method. 16S-23S rDNA ITS methods were used to analyze the molecular evolution of the pathogens and the pathogenicity also were measured. The results showed that: A total of twenty Psa strains were obtained by isolation, purifying and molecular identification. The colonial morphology showed a large difference for different geographic origin and cultivars. There were no relationships among pathogenicity of the strains and geographic origin and cultivars. The quantitative and accurate methods of leaf pathogenicity were established based on the software ImageJ 1.50b, and four strong strains were selected. These Psa strains provide a basis for further study on identifying resistance materials and selection of specific biological pesticide for kiwifruit bacterial canker.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*; pathogen; molecular identification; pathogenicity; northern area of Qinling

收稿日期:2015-12-02 修回日期:2016-03-25

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(第 58 批面上);陕西省青年科技新星专项(S2016YFXX0021);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2015KTZDNY02-03-01);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2014JM3077);国家国际科技合作专项项目(2015DFA30400)。

作者简介:井赵斌,男,博士,助理研究员,研究方向:果树育种与生物技术。E-mail:jingzhaobin@nwsuaf.edu.cn

猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 是原产我国的重要果树资源,以其独特的风味,富含维生素 C、膳食纤维、多种矿物质营养等成分而成为重要的水果之一^[1]。截止 2013 年底全球猕猴桃面积约为 17 万 hm²,产量约 243 万 t。从 1978—2013 年,我国猕猴桃面积从不足 1 hm² 增加到了 11 万 hm²,截止到 2013 年我国猕猴桃产量达到约 124 万 t,对促进我国农民增收和区域经济发展具有重要的作用^[2]。然而,猕猴桃生产中溃疡病却普遍发生,已成为影响猕猴桃生产栽培和产业的最严重的病害,近年来更是日趋严重^[3-4]。猕猴桃溃疡病是由丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa) 引起的,猕猴桃溃疡病是生产中最具毁灭性的细菌病害之一,是中国林业上的检疫性病害^[5]。自 1980 年猕猴桃溃疡病首次在美国加利福尼亚发现以来^[6],随后在日本^[7-8]、意大利^[9-11]、韩国^[12]、中国^[5] (黄其玲等, 2013)、西班牙^[13-14]、葡萄牙^[15]、法国^[16]、新西兰^[4]、瑞士、德国、澳大利亚^[17] 均已大面积爆发。该病害已对各国猕猴桃生产和经济造成了巨大的威胁和损失,如 2011 年意大利因溃疡病而毁掉了 900 hm² 中华猕猴桃园^[18];至 2011 年新西兰确认溃疡病发病面积达到了 12.3%;至 2011 年陕西省溃疡病部分果园病株率达 80% 以上^[5]。

目前,生产上主要通过化学药剂和栽培措施来防治溃疡病,但效果不好,加之溃疡病菌致病菌类型丰富多变,没有从根本上解决问题^[19-20]。病原菌的分离与鉴定是致病性测定、品种抗性评价和药剂筛选的首要工作。目前,虽然有关于猕猴桃溃疡病病原菌分离与鉴定的报道^[21-22];而关于秦岭北麓猕猴桃主产区溃疡病病原菌的分离、鉴定及致病性测定未有系统的研究报道;同时猕猴桃病原菌在不同品种之间的分离菌株致病性是否存在差异尚不明确。

本研究以秦岭北麓猕猴桃主产区不同品种为研究对象,采用常规组织法对猕猴桃溃疡病病原菌进行分离、纯化、分子鉴定和致病性测定,以期了解该地区猕猴桃溃疡病病原菌类型,并获得高致病性的病原菌菌株,为后续品种抗性鉴定和专用生物药剂开发提供备用菌株和理论基础。

1 材料与 方法

1.1 材料

于 2015 年 3 月中旬猕猴桃溃疡病发病盛期,在秦岭北麓猕猴桃主产区周至、眉县和杨凌 3 地选择中华猕猴桃华优和红阳、美味猕猴桃海沃德果园采集猕猴桃溃疡病病原菌,采集感病病灶处,主要是树

枝和主干皮下韧皮部和分泌物,样品采集装于自封袋置于便携式低温保存箱带回实验室备用。部分品种猕猴桃溃疡病病变组织症状特征见表 1。

表 1 部分品种猕猴桃溃疡病病变组织症状特征

Table 1 Symptoms of bacterial canker on pathological tissues for different cultivars

地理来源	寄主品种	植株编号	病变组织形态
眉县	红阳 (<i>A. chinensis</i>)	1	浅褐至褐色,外皮有黄色分泌物
眉县	红阳 (<i>A. chinensis</i>)	2	浅褐至红色,韧皮部湿润
杨凌	华优 (<i>A. chinensis</i>)	1	绿色至褐色,外皮有少许无色分泌物
杨凌	华优 (<i>A. chinensis</i>)	2	褐色,外皮有少许黄色分泌物
杨凌	华优 (<i>A. chinensis</i>)	3	绿色至褐色,外皮有少许无色分泌物
杨凌	华优 (<i>A. chinensis</i>)	4	黄绿至褐色
周至	华优 (<i>A. chinensis</i>)	1	深褐色,外皮有黄色至红色分泌物
周至	华优 (<i>A. chinensis</i>)	2	黄褐色分泌物,略有风干
周至	华优 (<i>A. chinensis</i>)	3	褐色,外皮有黄色分泌物
周至	华优 (<i>A. chinensis</i>)	4	黄褐色,外皮有白色分泌物
周至	华优 (<i>A. chinensis</i>)	5	深褐色,外皮有黄色至红色分泌物
周至	海沃德 (<i>A. deliciosa</i>)	1	深褐色,外皮有黄色至红色分泌物
周至	海沃德 (<i>A. deliciosa</i>)	2	深褐色

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离、纯化及菌落形态特征观察 选取溃疡病发病病症明显的韧皮部组织,在超净工作台上用无菌水冲洗 3 次后用 0.5% 的次氯酸钠消毒 1 min,然后用无菌剪刀将发病组织剪成约 0.3 cm × 0.3 cm 的小块,放在灭菌的载玻片上,加入 50 μL 无菌水,用接种针反复按压若干次,至无菌水变为黄色后直接划线接种在 BPA 培养基(牛肉浸膏 3.0 g/L,蛋白胨 7.5 g/L,蔗糖 10.0 g/L,酵母膏 1.0 g/L,琼脂 17.0 g/L, pH 7.0, 121℃ 灭菌 20 min)上,将培养皿倒置培养于 25℃ 恒温培养 72 h,待病原菌单菌落形成后,用接种针挑取单菌落移入 BPA 斜面培养基上,在 25℃ 恒温箱中培养获得病原菌的纯化菌株。肉眼观察纯化菌落在 BPA 斜面和平板培养皿中 25℃ 恒温连续培养 72 h 的菌落颜色、形状及菌落边缘特征,并记录描述观察结果。

1.2.2 病原菌分子生物学鉴定 将获得的每个纯化菌株,用接种环挑取一环转接到 30 mL 容量的 LB 液体培养基中,每个纯化菌株 3 个重复,在 25℃ 250 rpm 培养 12 h,然后收集菌液用于分子鉴定 DNA 提取。DNA 提取用 TIANGEN 的细菌基因组 DNA 提取试剂盒完成,然后在 1% 的琼脂糖检测

DNA 质量,DNA 浓度及质量用 ND-1000 分光光度仪检测完成。

参考 Rees-George^[23] 等基于 16S-23S rDNA ITS 区域开发的猕猴桃溃疡病鉴定引物 PsaF1/R2, 引物序列为 PsaF1 (5'-TTTTGCTTTGCACAC-CCGATTTT-3'), PsaR2 (5'-CACGCACCCT-TCAATCAGGATG-3')。PCR 反应总体体系为 25 μL ,即 DNA(40 ng \cdot μL^{-1})2 μL 、Taq DNA 酶(5 U \cdot μL^{-1}) 0.15 μL 、dNTPs(2.5 mmol \cdot L^{-1}) 1.4 μL 、引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1.5 μL 、2 \times Reaction Mix 12.5 μL 、ddH₂O 7.85 μL (TIANGEN;Golden Easy PCR System)。PCR 反应程序:95℃预变性 2 min;94℃变性 15 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 30 s,扩增 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min。PCR 扩增在 Eppendorf PCR 仪上进行,取 8 μL 扩增产物在 2%的琼脂糖凝胶上检测。利用 TIANGEN 的通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收目的 DNA 片段,由苏州金唯智生物科技有限公司北京分公司测序。

将目标菌株测序获得的核苷酸序列通过 NCBI 网站 Blastn 程序进行序列同源性分析,并提交至 GenBank 数据库^[24]。

1.2.3 病原菌致病性测定 致病性鉴定选用高感溃疡病的中华猕猴桃品种红阳完成。选择健康无病斑,成熟度和大小均匀一致的红阳叶片,在实验室进行离体接种试验,每个待测菌株选择 2 个叶片,重复 3 次。叶片消毒方法参考黄其玲等(2012)方法进行。

将分离、纯化、鉴定的猕猴桃溃疡病病原菌株 Psa01~15,经纯化、扩繁,取生长旺盛的菌株用平板计数法配成 2×10^7 CFU/mL 的孢子悬浮液。采用离体叶片喷雾接种法,每个菌株接种 3 片叶子,重复 3 次,每个菌株设置相应对照,用蒸馏水接种。每个叶片叶正面和叶背面喷雾接种孢子悬浮液 100 μL ,接种后叶片叶柄用脱脂棉保湿,将叶片放于广口塑料瓶,然后置于恒温恒湿培养箱中 20℃诱导发病(图 1),湿度 85%,每天观察记录发病情况。根据发病情况,确定最后统计时间。为了确定染病组织为猕猴桃溃疡病,统计结果后采集病斑叶片提取 DNA 进行分子检测。

1.3 数据处理

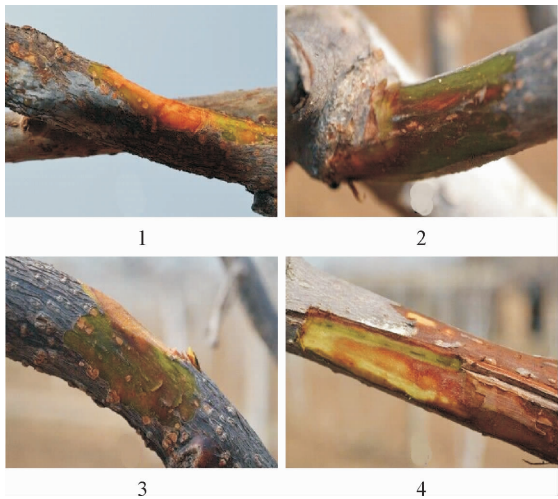
试验数据采用 SPSS18.0 进行统计分析。致病性测定分析利用软件 ImageJ 1.50b (<http://imagej.nih.gov/ij>)完成,致病性强度以最后统计时间点发病叶面积占单个叶片总叶面积的百分率进行排序,即感病率/%=发病病斑叶面积(cm^2)/单个叶片总叶面积(cm^2)。按照感病率进行致病性强度分

级:0 级(弱), $0.1\% < \text{感病率} \leq 10\%$;1 级(较弱), $10\% < \text{感病率} \leq 35\%$;2 级(较强), $35\% < \text{病斑率} \leq 70\%$;3 级(强),病斑率 $>70\%$ 。

2 结果与分析

2.1 田间病害症状

2015 年 3 月中旬,在秦岭北麓猕猴桃主产区周至、杨凌和眉县对发病严重的海沃德、华优和红阳猕猴桃品种进行田间观察。从图 1 可以看出,不同地区 and 不同品种发病症状总体上表现为,发病枝条部位呈黄褐色至深褐色,不同品种病菌感染程度存在差异。



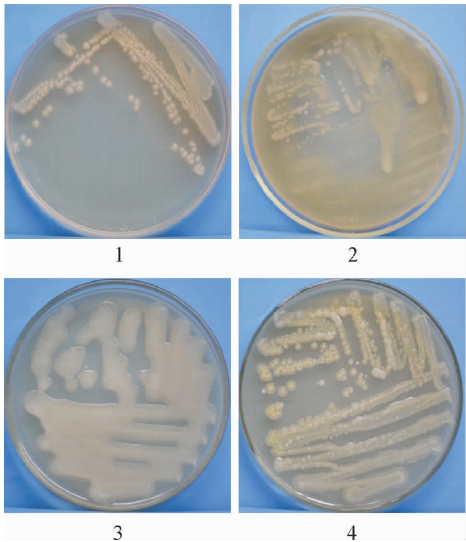
注:1. 周至华优,2. 周至海沃德,3. 杨凌华优,4. 眉县红阳。

图 1 不同品种田间病害症状

Fig. 1 The field symptoms for different kiwifruit cultivars

2.2 病原菌分离纯化及菌落形态特征

经分离纯化,从不同地理来源和品种采集的样品中共分离获得病原菌菌株 45 个。各个菌株在 BPA 培养基上菌落呈浅白色至黄色。经过分离纯化,发现来自不同地理来源和品种的菌落形态差异较大。在培养的第 3 天,分离自眉县红阳的菌落呈浅污黄色,较透明,湿润,直径约 0.8~1.3 mm,边缘略平滑,有的连片,向上圆滑突起(图 2-1);分离自周至海沃德的菌落呈浅污黄色,略透明,湿润,直径约 3~5 mm,基本连片,边缘稍不规则,凸出,丰富浅污白色流动分泌物已流到皿壁和皿盖(图 2-2);分离自周至华优的菌落呈浅污白色,略透明,湿润,直径约 3~4 mm,连片,边缘稍不规则,向上圆滑突起,有丰富浅污白色略流动分泌物(图 2-3);分离自杨凌华优的菌落呈污黄色,湿润,直径约 1~4 mm,基本连片,边缘稍不规则,向上圆滑突起,有的菌苔上面有略透明的浅污白色不流动分泌物(图 2-4)。



注:1.眉县红阳,2.周至海沃德,3.周至华优,4.杨凌华优。

图 2 猕猴桃溃疡病 4 种不同形态的菌落形态

Fig. 2 Morphological characteristics of *P. syringae* pv. *actinidiae* for different cultivars

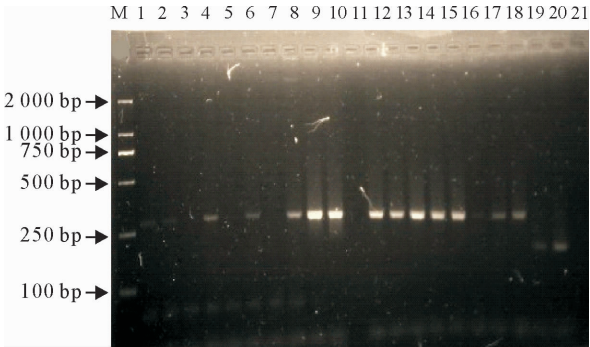
2.3 病原菌 rDNA-ITS 区域序列测序与系统发育树构建

利用引物 PsaF1/R2 对分离纯化的 45 个菌株进行 PCR 分子鉴定,根据扩增后的目的条带,约 280 bp(图 3),共确定了 20 个菌株可扩增到 280 bp 的条带,然后回收 20 个菌株目的片段进行测序。将测序得到的序列(已提交至 GenBank,序列号为:KT731213~KT731232)与 GenBank 中已知的猕猴桃溃疡病序列进行同源性比对。经 NCBI 的 Blastn 同源序列比对分析,结果表明序列编号为 Psazz-1、Psazz-2、Psazz-3、Psazz-4、Psazz-5、Psazz-6、Psazz-7、Psazz-8、Psazz-9、Psamx-1、Psamx-2、Psamx-3、Psamx-4、Psamx-5、Psamx-6、Psamx-7、Psamx-8、Psamx-9、Psayy-1 和 Psayy-2 的菌株与登录号为 CP011972.1 的猕猴桃溃疡病基因组高度相似,同源性分别达到 92%、91%、95%、93%、99%、98%、95%、97%、92%、82%、98%、84%、98%、99%、98%、99%、99%、88%、100%、99%,由此推断本研

2.4 致病性测定

根据地理来源和采样品种,从获得的 20 个菌株中选择了 15 个,采用人工离体叶片喷雾接种法进行致病性测定,结果表明接种红阳叶片均不同程度的表现出发病症状,图 4 为每个菌株感染叶片发病特征。为精确评价分析 15 个菌株的致病性大小,利用软件 ImageJ 以最后统计时间点发病病斑叶面积占整个叶面积的百分率进行排序。经过计算 15 个菌株接种的 9 个叶片的平均感病率,致病力由强到弱

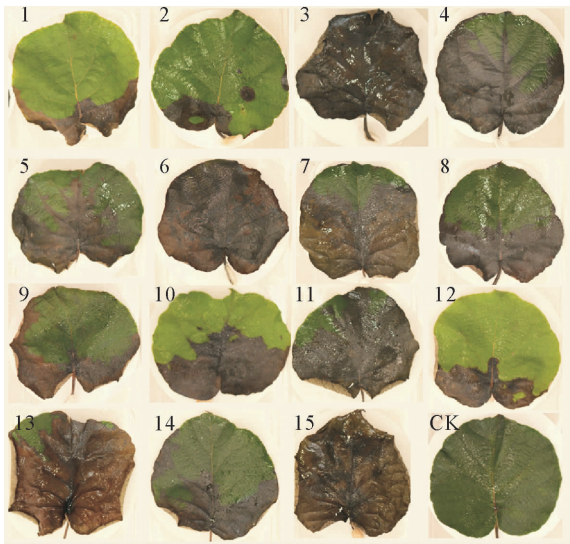
依次为 15>13>3>6>11>7>14>10>4>9>5>8>12>1>2(表 2)。从排序结果来看,菌株致病性大小与其采样的地理来源及品种并没有直接的关系。



注:M;DL2 000 DNA marker,1~21:不同菌株。

图 3 部分分离菌株的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of PCR reactions of 16S-23S rDNA ITS for part strains



注:菌株来源:1.周至-海沃德,2.杨凌-华优,3.周至-华优,4.周至海沃德,5.眉县-红阳,6.杨凌-华优,7.周至-华优,8.周至-华优,9.周至-海沃德,10.杨凌-华优,11.周至-海沃德,12.周至-华优,13.周至-华优,14.周至-海沃德,15.眉县-红阳。

图 4 不同来源猕猴桃溃疡病病原菌对红阳品种致病性测定发病特征

图 4 不同来源猕猴桃溃疡病病原菌对红阳品种致病性测定发病特征

Fig. 4 Pathology character for pathogenicity identification of *P. syringae* pv. *actinidiae* from different geographic origins and cultivars by Hongyang

3 结论与讨论

自猕猴桃溃疡病报道以来,各国学者主要围绕病原菌特点、分类地位、进化关系、发病传播规律、病原菌分离和鉴定、病原菌基因序列和蛋白组学、气候因子对病菌的影响、化学和生物防治等方面开展了相关的研究工作,并取得一定进展^[11,19,20,25-32]。虽

表 2 15 个不同来源猕猴桃溃疡病菌株对红阳品种致病力测定结果

Table 2 Pathogenicity identification of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* from different geographic origins and cultivars by Hongyang

菌株编号	来源及寄主品种	感病率 / %	致病性分级
1	周至-海沃德	21.04±1.04	1
2	杨凌-华优	14.87±0.52	1
3	周至-华优	89.46±10.54	3
4	周至-海沃德	54.00±4.59	2
5	眉县-红阳	48.03±2.74	2
6	杨凌-华优	76.59±5.41	3
7	周至-华优	61.89±2.70	2
8	周至-华优	45.21±2.55	2
9	周至海-沃德	50.25±2.49	2
10	杨凌-华优	54.39±3.73	2
11	周至-海沃德	64.57±2.25	2
12	周至-华优	32.56±1.50	1
13	周至-华优	90.83±3.89	3
14	周至-海沃德	61.34±1.77	2
15	眉县-红阳	100.00±0.00	3

注:致病力用平均值±SE 表示($n=9$):1:较弱,2:较强,3:强。

然国内已有关于猕猴桃溃疡病病原菌分离、鉴定和致病性测定的研究^[21,22,23],但这些研究获得的病原菌株数量较少,且没有探讨地理来源与品种对病原菌致病性的影响。其次,从后续品种抗病性鉴定和猕猴桃溃疡病生物药剂开发而言,更需要来源较为广泛,致病性强的专有菌株。本研究中共获得了不同地理来源和寄主品种的猕猴桃溃疡病菌株 20 个,并对其中的 15 个进行了致病性分析,结果表明不同地理来源和寄主品种的分离菌株致病性存在显著差异($P<0.05$),同时发现致病性与地理来源和寄主品种之间没有直接的关系。

猕猴桃溃疡病病菌叶片接种方法是影响致病性测定结果精确性的一个重要因素,赵利娜^[33]在研究猕猴桃溃疡病致病性中采用了表皮皮下注射法,注射量仅为 2 μL。本研究中对整个叶片采用喷雾接种法,接种量较大,或许更加接近田间自然状态;另外,在离体条件下给整个叶片施加强的病原菌压力,可以筛选出真正表现抗病的种质资源。黄其玲^[34]利用叶片喷雾接种法成功的研究了溃疡病病原菌在猕猴桃叶片上的侵染过程,结果表明叶背面喷雾接种更利于病原菌侵入。喷雾接种后什么时间点进行结果统计分析也是需要明确的一个关键科学问题,黄其玲(2013)^[34]研究发现喷雾法接种叶片背面后第 10 天时,叶片表明形成明显的褐色小病斑,随后病斑数目增多。本研究在接种 10 d 后即发现编号 6 和 15 的菌株接种的部分叶片全部出现病斑,因此选

择接种后第 11 天作为最后结果分析的时间点。这与黄其玲(2013)^[34]的研究结果不一致,前者发现在接种 30 d 后才出现病斑,面积占据叶面积的 1/2 多,这一差异可能与本研究中分离菌株的致病性强、接种菌液浓度和数量、选择的品种、以及测定的温度和湿度均有关系。试验中发现如果时间太长,离体叶片会出现萎焉和霉变的可能。因此,本研究确定的时间点和精确分析方法,可为猕猴桃溃疡病致病性的快速鉴定提供思路借鉴。

参考文献:

[1] 黄宏文. 猕猴桃属分类资源驯化栽培[M]. 北京:科学出版社, 2013.

[2] 井赵斌,雷玉山,李永武. 生物技术与我国猕猴桃育种[J]. 生物技术通报,2015,31(7):1-10.

JING Z B, LEI Y S, LI Y W. Biotechnology and kiwifruit breeding in China [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(7):1-10. (in Chinese)

[3] 李有忠,宋晓斌,张学武. 猕猴桃细菌性溃疡病发生规律研究[J]. 西北林学院学报,2000,15(2):53-56.

LI Y Z, SONG X B, ZHANG X. Studies on laws of occurrence of bacterial canker in kiwifruit[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2000, 15(2):53-56. (in Chinese)

[4] EVERETT K R, TAYLOR R K, ROMBERG M K, et al. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2011, 6:67-71.

[5] 黄其玲,高小宁,赵志博,等. GFPuv 标记猕猴桃溃疡病菌的生物学特性及其在土壤、根系中的定殖[J]. 中国农业科学,2013, 46(2):282-291.

HUANG Q L, GAO X N, ZHAO Z B, et al. Transformed GFPuv into *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and its biological characteristics and colonization in soil and roots of kiwifruit [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(2):282-291. (in Chinese)

[6] OPGENORTH D, LAI M, SORRELL M, et al. *Pseudomonas* canker of kiwifruit [J]. Plant Disease, 1983, 67:1283-1284.

[7] SERIZAWA S, ICHIKAWA T, TAKIKAWA Y, et al. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1989, 55(4):427-436.

[8] TAKIKAWA Y, SERIZAWA S I, TAKESHI Y S, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.; the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan [J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1989, 55:437-444.

[9] SCORTICINI M. Occurrence of *Pseudomonas syringe* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy [J]. Plant Pathology, 1994, 43: 1035-1038.

[10] BALESTRA G M, MAZZAGLIA A, QUATTRUCCI A, et al. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2009(4):34-36.

[11] FERRANTE P, SCORTICHINI M. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy [J]. Journal of Phytopathology, 2009, 157: 768-770.

[12] KOH Y J, NOU I S. DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* [J]. Molecular Cells, 2002, 13: 309-314.

[13] ABELLERA A, LOPEZ M M, PENALVER J, et al. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain [J]. Plant Disease, 2011, 95 (12): 1583.

[14] BALESTRA G M, RENZI M and MAZZAGLIA A. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain [J]. New Disease Reports, 2011, 24: 10.

[15] BALESTRA G M, RENZI M and MAZZAGLIA A. First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal [J]. New Disease Reports, 2010, 22: 10.

[16] VANNESTE J, POLIAKOFF F, AADUSSEAU C, et al. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France [J]. Plant Disease, 2011, 95 (10): 1311.

[17] BARTOLI C, LAMICHHANE J R, BERGE O, et al. A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16 (2): 137-149.

[18] SCORTICHINI M, FERRANTE P, MARCELLETTI S, et al. Omics, epidemiology and integrated approach for the co-existence with bacterial canker of kiwifruit, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* [J]. Italian Journal of Agronomy, 2014 (9): 606.

[19] CAMERON A, SAROJINI V. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives [J]. Plant pathology, 2014, 63: 1-11.

[20] MONCHIERO M, GULLINO M L, PUGLIESE M, et al. Efficacy of different chemical and biological products in the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit [J]. Australasian Plant Pathology, 2015, 44: 13-23.

[21] 梁英梅, 张星耀, 田呈明, 等. 陕西省猕猴桃枝干溃疡病原菌鉴定[J]. 西北林学院学报, 2000, 15 (1): 37-39.

LIANG Y M, ZHANG X Y, TIAN C M, et al. Pathogenic identification of kiwifruit bacterial canker in Shaanxi [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2000, 15 (1): 37-39. (in Chinese)

[22] 张慧琴, 毛雪琴, 肖金平, 等. 猕猴桃溃疡病原菌分子鉴定与抗性材料初选 [J]. 核农学报, 2014, 28 (7): 1181-1187.

ZHANG H Q, MAO X Q, XIAO J P, et al. Rapid molecular identification of actinidia bacterial canker and preliminary screening of resistant materials in kiwifruit [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28 (7): 1181-1187. (in Chinese)

[23] REES-GEORGE J, VANNESTE J L, COMISH D A, et al. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions [J]. Plant pathology, 2010, 59 (3): 453-464.

[24] 周平兰, 唐新科, 岳岳林, 等. 春兰炭疽病致病菌 *Colletotrichum boninense* 的鉴定及生物学特性分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42 (10): 1993-2001.

ZHOU P L, TANG X K, LONG Q L, et al. Identification of pathogen *Colletotrichum boninense* from *Cymbidium goeringii* and its biological characteristics [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42 (10): 1993-2001. (in Chinese)

[25] 邵宝林, 刘瑶, 朱天辉, 等. 猕猴桃溃疡病菌的分子检测技术研究 [J]. 植物病理学报, 2013, 43 (5): 458-466.

SHAO B L, LIU Y, ZHU T H, et al. Molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on bacterial canker of kiwifruit [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43 (5): 458-466. (in Chinese)

[26] FERRANTE P, FIORILLO E, MARCELLETTI S, et al. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit [J]. Journal of Plant Pathology, 2012, 94: 455-61.

[27] FERRANTE P, SCORTICHINI M. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy [J]. Plant Pathology, 2010, 59: 954-62.

[28] FERRANTE P and SCORTICHINI M. Refining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics [J]. Plant Pathology, 2015, 64: 51-62.

[29] GALLELLI A, L'AURORA A, et al. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols [J]. Journal of Plant Pathology, 2011, 93: 425-35.

[30] MARCELLETTI S, FERRANTE P, PETRICCIONE M, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to Actinidia species [J]. PLoS One, 2011 (6): e27297.

[31] MAZZAGLIA A, STUDHOLME D J, TARATUFOLO M C, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage [J]. PLoS One, 2012 (7): e36518.

[32] PETRICCIONE M, CECCO I D, ARENA S, et al. Proteomic changes in *Actinidia chinensis* shoot during systemic infection with a pandemic *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain [J]. Journal of Proteomics, 2013, 78: 461-476.

[33] 赵丽娜, 胡家勇, 叶振风, 等. 猕猴桃溃疡病原菌的分子鉴定和致病力测定 [J]. 华中农业大学学报, 2012, 31 (5): 604-608.

ZHAO L N, HU J Y, YE Z F, et al. Molecular identification and pathogenicity detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31 (5): 604-608. (in Chinese)

[34] 黄其玲. 应用 GFPuv 标记技术研究猕猴桃溃疡病菌在组织中的侵染扩展动态 [D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2013.