西北林学院学报 2019,34(3):132-138
Journal of Northwest Forestry University

doi:10.3969/j.issn.1001-7461.2019.03.20

# 观赏海棠干腐病病原菌鉴定

邹红竹[1],王 璇[3],刘淳洋[2],郭 翎[2*],王 雁[1*]

(1.中国林业科学研究院 林业研究所,北京 100091;2.北京植物园,北京 100093;
3.中国林业科学研究院 林业新技术研究所,北京 100091)

**摘 要**:从观赏海棠干腐病病斑处分离纯化病原菌,采用柯赫氏法则对从病原菌进行验证,通过形态学结合 ITS 序列的系统发育分析鉴定确定病原菌种名,得到观赏海棠干腐病相关病原菌 ZWY0501、ZWY0502(登录号:MG554650、MG554651),分离频率分别为 55.36%、42.86%。2 株孢子均无色,香蕉形或椭圆形,(3.13~5.51)μm×(1.19~1.89)μm。ITS 系统发育树中,2 株约 590 bp 菌株与已登录的苹果腐烂病病株(*Valsa mali*,登录号为:KP337612)同源性最高,最大相似率达到 99%。形态学及 ITS 序列的系统发育分析鉴定 ZWY0501、ZWY0502 均为苹果黑皮腐壳菌(*Valsa mali*),其为观赏海棠树皮腐烂病病原。研究结果为该病害的控制奠定了科学基础。

**关键词**:观赏海棠;干腐病;形态特征;ITS 序列系统树;苹果黑腐皮壳菌

**中图分类号**:S436.8 **文献标志码**:A **文章编号**:1001-7461(2019)03-0132-07

## Identification of the Pathogen Causing *Valsa* Canker of *Malus* Crabapple

**ZOU Hong-zhu[1], WANG Xuan[3], LIU Bo-yang[2], GUO Ling[2*], WANG Yan[1*]**

(1. *Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijin* 100091, *China*; 2. *Beijing Botanical Garden, Beijing* 100093, *China*; 3. *Research Institute of Forestry New Technology, Chinese Academy of Forestry, Beijing* 100091, *China*)

**Abstract**: The objective of the present study was to isolate, purify and identify the pathogen from *Malus* crabapple valsa canker. The pathogen isolates were obtained from tissue lasions of valsa canker on crabapple tree trunks and confirmed via Koch's postulates, then they were identified on the basis of anamorphic morphology and rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. The two isolates, obtained from the *Malus* crabapple, were numbered as ZWY0501 and ZWY0502 (ncbi GenBank ID: MG554650、MG554651), the isolation frequency of which were 55.36% and 42.86%, respectively. Conidia of both isolates were hyaline, banana-shaped or elliptic, with sizes of 3.13－5.51×1.19－1.89 μm. A same ITS sequence of about 590 bp was obtained from the two isolates ZWY0501 and ZWY0502 and it shared a maximum semilarity of 99% with that of *Valsa mali*. Phylogenic analysis showed that the two isolates were clustered in the same clade with *Valsa mali* (GenBank ID: KP337612) but were separated in different degrees from other species in the dendrogram. Based on anamorphic morphology and rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences, the pathogen was identified as *Valsa mali*. The results of the study would provide scientific basis for selecting target fungicides and resistant crabapple varieties for controlling the disease.

**Key words**: *Malus* crabapple; *Valsa* canker; Morpholoy; ITS dendragram; *Valsa mali*

海棠干腐病(crabapple *Valsa* canker)是海棠(crabapple)的主要枝干病害,引起海棠枝干皮层腐烂坏死,坏死皮层上部枝干全部枯死[1],导致树形不完整,发病严重时会导致整株枯死,且传染性强,严

**收稿日期**:2018-07-13 **修回日期**:2018-08-11
**基金项目**:北京市科技计划(Z141100002714001):海棠优良品种快速繁殖和栽培技术体系的研究。
**作者简介**:邹红竹,女,博士,研究方向:园林植物与观赏园艺。E-mail:zouhonghzu1123@126.com
* **通信作者**:王 雁,女,研究员,博士生导师,研究方向:花卉栽培、花卉遗传改良。E-mail:chwy8915@sina.com
郭 翎,女,教授级高工,硕士生导师,研究方向:园林植物。E-mail:lingguo27@hotmail.com

重影响了海棠的观赏价值。海棠干腐病早在 1979 年被魏景超[1]记录,其后在多种病理学专著中亦有提及[2-5],但至今尚未有详细症状描述及病原菌鉴定。目前,认为苹果黑腐皮壳菌(*Valsa mali*),无性世代为苹果壳囊孢(*Cytospora mali*),为引起苹果属植物腐烂病的主要病原菌[1,6-9]。*V. mali* 在真菌的分类系统中,属于子囊菌门(Ascomycota)、子囊菌纲(Ascomycetes)、黑腐皮壳目(Diaporthales)、黑腐皮壳科(Valsaceae)、黑腐皮壳属(*Valsa*)[10],在 23℃～29℃温度范围内生长良好,最高生长温度为 32℃～35℃,最低生长温度为 5℃～10℃[10],在 pH4～9 条件下可正常生长,最适 pH 为 5～6[11]。干腐病是一种跨年病害[11],*Valsa* 属真菌在病枝上以分生孢子器、子囊壳和菌丝等多种形式越冬,次年春天再次侵染植株体,病菌在 3－11 月均可侵染植株[11],春秋是发病的 2 个高峰期[2,12-13]。据统计,*Valsa* 属真菌能够侵染 70 多种果树、樟树及遮阴树、灌木和针叶树[14],其中,*V. mali* 不仅能侵染苹果属植物,而且在国外有侵染桃(*Amygdalus persica*)、梨(*Pyrus* spp.)、梅(*Armeniaca mume*)、樱(*Cerasus* spp.)等多种蔷薇科其他属植物的报道[14-15]。该病原具有潜伏侵染的特性[4,16]。我国学者对该菌其致病性分化进行了研究[17-18],认为该病原菌具有多样性和致病性分化现象,臧睿[17]等将中国苹果树腐烂病菌分为 3 个不同的生物类群,即黄褐色强致病类群、乳白色不产孢弱致病类群和灰褐色易产孢弱致病类群,并且发现致病性分化与菌株的地域来源没有明显的相关性[18]。我国不同地区的苹果树腐烂病菌在种类上存在多样性,*V. cerato-sperma*、*V. malicola*、*V. persoonii*[19]、*V. pyri*[9]均在发病的苹果树上分离得到,对苹果树接种梨壳囊孢(*C. carphosperma*)、山楂壳囊孢(*C. oxyacanthae*)、核果壳囊孢(*C. leucostoma*)亦能引起苹果腐烂病的发病[6]。

海棠是蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus*)中果实直径<5 cm 的一类植物的总称,是苹果属观赏价值专用种群,是优良的园林绿化树种。海棠在我国栽培历史悠久,18 世纪传入北美及欧洲后,受到当地园艺工作者的重视,选育出大量观赏性极强的观赏海棠品种[18]。观赏海棠品种发展迅速,春花色彩丰富且艳丽,秋果或红或黄或紫,广泛应用于公园、城市、庭院、绿地的绿化中。我国在育种方面处在落后地位,20 世纪 90 年代初开始从美国、荷兰、比利时等国家引种,但引种的观赏海棠在我国易发腐烂病,且传染性强,严重影响了观赏价值[20]。国内尚无对观赏海棠干腐病病原菌的鉴定,难以确定病原菌的具体菌种,与引起苹果腐烂病的病原菌是否一致,是否为 *Valsa* 属的真菌等问题均不清楚,无法对引进的观赏海棠对干腐病的抗性进行评价及针对性防治。

本研究对采自北京植物园海棠枸子园的海棠发病组织进行分离培养与纯化,根据真菌形态和病原致病性,结合病原菌 rDNA-ITS 序列的测试和同源性分析,对分离出的病原菌进行鉴定,解决其干腐病病原菌不确定的问题。该研究有利于后续筛选观赏性佳、抗病性好的海棠品种,并对发病的病株施以针对性药剂刮治,对抗干腐病品种的定向育种等实际问题提供理论支持和科学依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料采集

于 2016 年 5－6 月从北京植物园海棠枸子园中选取发病的观赏海棠植株(*Malus* 'Flame'、*Malus* 'Sparkler'、*Malus* 'Hope'、*Malus* 'Snowdrift'、*Malus* 'Strawberry Parfait'、*Malus* 'Radiant'、*Malus* 'Red Jade'、*Malus* 'Red Splendor'、*Malus* 'Sargentii',均为 1990 年引种于美国),用采集刀采集树干病健交界处的组织,放入牛皮纸袋中,带回中国林科院森环森保所林木病害实验室进行分离。致病性测定所用的海棠为顺义板桥基地海棠育种园(北京植物园品种繁殖基地)内,立地条件一致,无病虫害,少病疤树龄 4 a 的嫁接'绚丽'海棠(*Malus* 'Radiant')枝条,采取枝条均为 2 年生枝条,直径为 1～2 cm。

### 1.2　供试菌株的分离、培养

将所采组织从纸袋中取出后用酒精进行表面消毒,剪成大小约 0.5 cm×0.5 cm,在 75%的酒精中浸泡 30 s,用无菌水漂洗 3 次,再用 1%的次氯酸钠浸泡 1 min,无菌水漂洗 3 次。用灭菌的滤纸吸干水分,置于 PDA 平板内,在 28℃恒温培养箱中培养,2 d 后挑取菌落边缘的菌丝进行转皿培养,重复此步骤 3 次对病原菌进行纯化,纯化后的病菌进行编号保存[21]。

### 1.3　分离株致病性

将分离得到的菌株在 PDA 平板上活化培养,3～4 d 后选用直径为 7 mm 的打孔器打取菌饼。取健康的 4 年生枝条,采用 T 字型接种方法,将菌饼正面朝向伤口,用在无菌水中浸湿的脱脂棉覆盖保湿,用封口膜缠绕伤口,枝条生理学上端用保鲜膜封口,下端插入到无菌水中。每个菌株设置 15 个重复,并设置空白 PDA 作为对照,置于 24℃恒温培养箱中 12 h 光照、12 h 黑暗培养,湿度为 60%。接种

后 4 d 观察发病情况，计算发病率。海棠枝条发病后从病斑上再次分离培养纯化菌株，并与原接种菌株进行比较。

发病率＝(发病伤口数/接种总伤口数)×100% (1)

### 1.4 形态学观察

将分离获得的病原菌菌株在 PDA 平板上培养 5 d后，观察菌落培养特性。采用划碎菌落的方法诱导产孢体的形成，并在光学显微镜下观察产孢体的外部形态。采用徒手切片法切取产孢器官，在光学显微镜下观察切面的形态特征，并测量产孢体产生的分生孢子大小。根据形态特征初步确定病原菌种类。

### 1.5 分子系统学分析

1.5.1 菌体 DNA 提取 将致病菌接种至到 PDA 平板上，28℃恒温培养 7 d 后，菌丝长满 90 mm 的 PDA 平板，刮取 PDA 平板表面的气生菌丝约 200 mg于提前灭菌过的 1.5 mL 的离心管中，用研磨棒研磨。用 CTAB 植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司 DP305)提取基因组 DNA。提取后的 DNA 存放在 4℃冰箱中。

1.5.2 rDNA-ITS 片段的 PCR 扩增 用真菌 rDNA-ITS 区域的通用引物 ITS1(5′TCCGTAGGTGAACCTGC GG3′)和 ITS4 (5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC3′)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积 25 μL，包括 12.5 μL PCR mix，9.5 μL $ddH_2O$，引物 ITS1/ITS4 各 1 μL，Term 1 μL。反应程序为：94℃预变性 2 min；94℃变性 30 s；57.3℃退火 30 s；延伸 40 s，30 个循环；72℃延伸 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，选取条带清晰的 PCR 扩增产物，送往北京宝锐通生物科技有限公司测序。

1.5.3 序列比对和系统发育树构建 将测序结果序列登入 NCBI GenBank 网站(http://www.ncbi.nl m.nih.gov)数据库中并进行同源性 blast 比对，同源性最高的菌株，下载其参比序列，运用 Muscle 比对方法进行比对，并将比对后的序列矩阵进行手工校正。对 rDNA-ITS 矩阵利用 Mega 5.2、Mrbayes 3.26 和 Paup 4.10 分别进行 NJ 法(Neighbor Joining，邻接法)[22]、BI 法(Bayesian inference，贝叶斯推理法)[23]和 MP 法(Maximum parsimony，最大简约法)[24]进行系统发育学分析，由此最终确定病原菌种名。

## 2 结果与分析

### 2.1 野外发病症状观测

多发在主干和主枝上，发病初期为淡红褐色的湿润斑，略微隆起，形状不规则，大小差异较大，腐烂处韧皮部和木质部都变松软，用手按压病斑处会下陷，有脓液流出，为黄褐色。腐烂处树皮极易与树体剥离，病斑腐烂处组织鲜红褐色，呈现溃疡状，散发出浓重的酒糟味(图 1A)。发病组织与健康组织分界明显，发病早期病斑扩展较慢，到发病中期病斑面积就会迅速扩大，湿腐状会更加明显，发病后期病斑及周围病皮变为黑褐色，且干缩下陷，随后干枯的病皮上出现数量极多的黑色小点，是病原菌的子囊座(图 1B)，子囊座盘圆形或椭圆形，单腔(图 1D)或多腔，多腔孔口沿边缘向内形成不规则锯齿形，中央区域仍为寄主组织(图 1E)。当湿腐的病斑绕树干一周，树干枯死。

### 2.2 组织分离及病原菌确定

利用组织分离法对病健交界处组织进行分离，分离得到 56 株菌株。根据其培养学特征和生长速率分为 2 组。

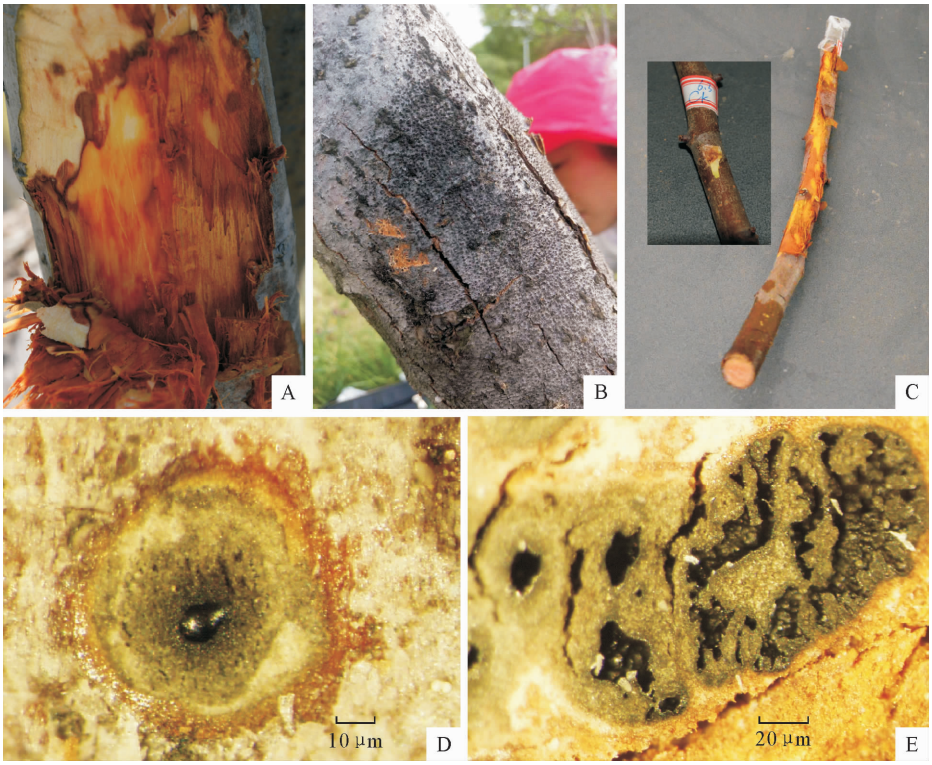
2 组菌株初期均呈白色羽毛状扩展，无气生菌丝，菌落紧贴培养基生长，第 1 组菌株 3 d 后、第 2 组菌株 5 d 后菌落中央产生黄色色素，随色素沉积，最终整个菌落变为黄褐色，第 1 组菌株 5 d 即可布满 90 mm 的平板，第 2 组 7 d 即可布满 90 mm 的平板，均产生少量气生菌丝。第 1 组菌株共分离 31 株，分离率为 55.36%，第 2 组菌株共分离 24 株，分离率为 42.86%。

对上述 2 组菌株进行致病性测定：分离株分别选取 5 株代表菌株，在实验室内接种 4 年生健康'绚丽'海棠枝条，每株菌株接种 15 个伤口，共接种 150 个伤口，保湿培养 4 d 后，接种 2 组枝条 150 个伤口均发病，发病率为 100%，所有实验菌株均具有致病性，枝条上出现红褐色湿润病斑并散发酒糟味，与野外发病症状一致，空白对照组未发病(图 1C)。对病斑进行组织分离和纯化得到了与接种的菌株形态相同的纯培养菌。

### 2.3 形态学分析

分离的 2 株病原菌形态学鉴定后均为 *Valsa* 属真菌。在 PDA 上 28℃菌落生长速率较快，4～5 d 几乎布满平板直径(图 2A)。初期菌落白色或无色，呈白色羽毛状扩展，菌丝贴培养基生长，无气生菌丝。培养 3～4 d 后，菌落中间产生黄色色素。后期菌落产生气生菌丝，量少，絮状，倒伏紧贴培养基。菌落背面棕黄色色素呈点状不均匀分布，培养 10 d 后，随着色素沉积，整个培养皿背面逐渐变为棕褐色或近黑色。分生孢子器球形，生于外子座内，单腔，分生孢子梗着生在分生孢子器腔室的内壁上，无色，呈棒状(图 2C)。分生孢子单胞，无色，香蕉形或椭

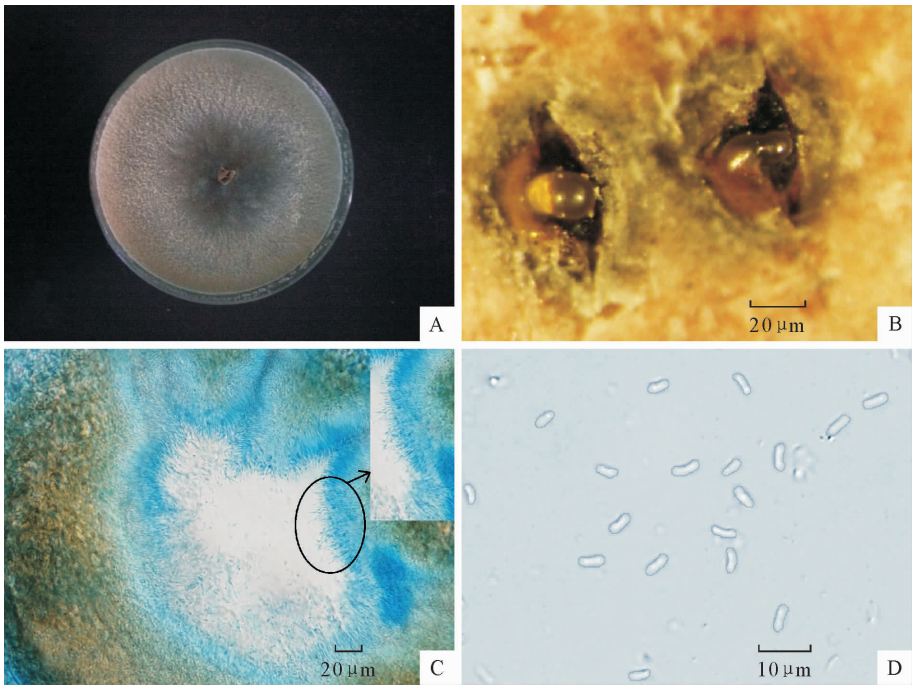
圆形(图 2D)[1-2]。潮湿时从分生孢子器孔口溢出形成分生孢子角(图 2B)。测量 50 个分生孢子，获得数据：孢子大小(3.13～5.51)×(1.19～1.89)μm，平均 4.47×1.56 μm，长宽比为 2.6～2.9。




注：A. 海棠干腐病野外发病症状；B. 干枯树皮上的子囊座；C. 海棠实验室内接种病原菌的症状；D. 子囊座单腔室横切；E. 子囊座多腔室横切。

**图 1　海棠干腐病发病症状**

Fig. 1　Disease symptom of *Valsa* canker of *Malus* crabapple




注：A. PDA 上 5 d 的菌落(培养皿 d=9 cm)；B. 分生孢子角；C. 分生孢子器横切；D. 分生孢子。

**图 2　菌株形态学培养特征**

Fig. 2　Morphologic characteristics of isolate

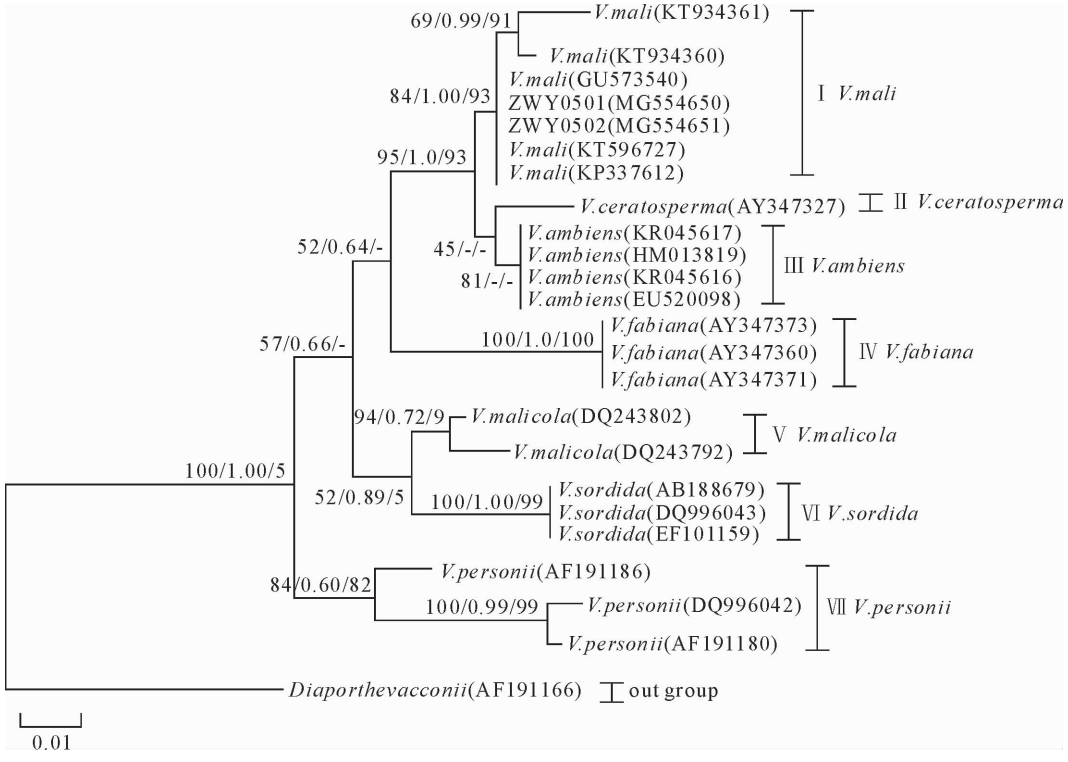
## 2.4　ITS 系统发育分析

选取 2 组菌株中的代表菌株(编号为 ZWY0501、ZWY0502)进行 rDNA-ITS 基因的 PCR 扩增，均获得 1 条迁移率相同，分子质量 500～750 bp 的扩增条带，

所测 2 株分离株最后序列长度分别为 590、593 bp，将 593 bp 序列的一端剪去 G，另一端剪去 GG 后，与另外一条的差异仅在一个位点上发生了 C 的位移，由此可知，ZWY0501 和 ZWY0502 为同一致病菌，以测序结果登录 NCBI GenBank 网站，登录号分别为：MG554650、MG554651，并与其中的序列进行同源性比对，结果显示，与已登录的苹果腐烂病病株（*V. mali*，登录号为：KP337612）同源性最高，达到 99%。

从 GenBank 中获取 21 个与供试菌种关系相近的 ITS 序列和作为外类群的 1 个 *Diaporthe Vaccinii* 的 nrITS 序列，将所有序列整理比对后构建系统发育树，进行分析。

基于 rDNA-ITS 矩阵重建的系统发育树见图 3。除本研究获得的 2 条 nrDNA-ITS 外，系统发育重建所利用的序列来源于 7 个 *Valsa* 物种。系统发育树结果表明，海棠干腐病菌分离株及其近缘属种，共形成了 5 个比较大的分支（Clade Ⅰ～Ⅲ，Ⅳ，Ⅴ，Ⅵ，Ⅶ），在 5 个较大的分枝下又形成了 7 个亚分枝（Subclade Ⅰ～Ⅶ），3 种系统发育重建的方法都能够较好地支持内群形成 7 个单系分支（Ⅰ～Ⅶ），拓扑结构基本一致，与这 7 个 *Valsa* 物种相对应。第 1 亚分支是由分离至中国苹果树（*M. domestica*）的 *V. mali* 分离株组成，第 2 亚分枝是由分离自印度枇杷（*Eriobotrya japonica*）的 *V. ceratosperma* 分离株单独组成，第 3 亚分枝是由分离至中国苹果树和梨树的 *V. ambiens* 分离株组成，第 4 亚分枝是由分离至乌干达和南非的巨桉（*Eucalyptus grandis*）的 *V. faniana* 分离株组成，第 5 亚分枝是由分离至美国和南非的苹果的 *V. malicola* 分离株组成，第 6 亚分枝是由分离至中国的未知树种的 *V. sordida* 分离株组成，第 7 亚分枝是由分离至南非和美国的桃（*Prunus persica*）及日本苹果树的 *V. personii* 分离株组成。本试验分离获得的 ZWY0501 和 ZWY0502 内嵌于 *V. mali* 所在第Ⅰ分支，其中 NJ 和 MP 的支持率分别为 84 和 98，BI 的后验概率为 1.00。上述系统发育树分析结果表明，观赏海棠干腐病病原菌为 *V. mali*。




注：结点附近的数值表示该结点的支持率（NJ 自展值/BI 后验概率/MP 自展值）。

**图 3 基于 rDNA-ITS 序列构建的海棠腐烂病菌株及相关真菌的系统发育树**

Fig. 3 Phyloghenic dendrogram of pathogen isolates of crabapple *Valsa* canker and related fungal species

## 3 结论与讨论

对真菌分类主要依据真菌无性型纯培养物的形态特征，但对于 *Valsa* 属中很多种类来说，仅仅依据这些特征并不足以确定菌株的种名[25]。因此，本研究通过科赫氏法则，采用菌物形态学和分子生物学方法对分离出的病原菌进行了准确鉴定，引起海棠干腐病的病原为 *V. mali*。本研究对 *V. mali* 引起的腐烂病症状进行了较为详细描述，通过病原菌致病力测试可得知，在 28℃ 条件下，接种发病率为

100%，该病原菌对海棠致病性非常强。该种最早为日本学者从苹果树上分离得到[26]，也是我国苹果腐烂病主要病原菌[13]。苹果腐烂病菌在国内文献中有 2 个名称在同时使用，即 *V. ceratosperma* 和 *V. mali*。许多学者对苹果腐烂病病原菌的命名进行了研究，T. Kobayashi[27] 认为 *V. mali* 在形态、培养性状、寄主范围上均与 *V. cerastospema* 一致，应归于一种。T. Kanehira[28] 等和 K. Suzaki[29] 均认为 *V. ceratosperma* 和 *V. mali* 有一定的遗传差异。我国学者臧睿[30]认为从果园和田间苹果树分离出的 *V. cerastospema* 与 *V. mali* 是同物异名，可认定为一种。通过本试验中的聚类分析图，可以很清楚地看出，海棠干腐病与 *V. mali* 聚在同一分支，故在测序结果登录 NCBI GenBank 网站时，采用了 *V. mali* 命名。

苹果腐烂病主要分溃疡型和枯枝型 2 种[13]，引起苹果减产且果实发生腐烂[14]。溃疡型多发在主干和主枝上，发病引起韧皮部和木质部腐烂松软，病斑处下陷并有脓液流出，腐烂处树皮极易与树体剥离，发病组织与健康组织分界明显，湿腐的病斑扩散至围绕树干一周时，其上部树干枯死。枯枝型症状多发生于枝梢上，发病初期在枝梢上出现红褐色病斑，不呈湿腐状，边缘交界不明显，病斑包围枝梢后枯死[13]。经过对北京地区（北京植物园、中科院植物研究所、元大都遗址公园、玉渊潭公园及板桥基地海棠育种园等）发病海棠的调查，发现 *V. mali* 引起的海棠腐烂病发生于主枝干处呈溃疡状，病健交界处明显，病斑湿腐且有酒糟味，调查样本中未出现枯枝型及果实腐烂。由 *Valsa* 属真菌引起的腐烂病在国际上统称为 *Valsa* canker，苹果腐烂病亦有腐烂病和干腐病 2 个名称在使用，结合其他物种（花椒[31]、刺槐[32]、枣树[33]、山核桃[34] 等）干腐病病症的描述，在 crabapple *Valsa* canker 中文命名时定名为海棠干腐病，能更准确地对该病进行描述。

目前来看，海棠干腐病的防治没有完全的解决办法，除施以药剂进行防治外，进行抗病品种的筛选及推广，是有效防治干腐病发生的途径。也可以筛选出一部分抗性较好的种质资源来做父母本，定向培育一部分抗病性好的观赏品种，亦能有效抑制腐烂病的发生和蔓延。病原菌的鉴定对干腐病杀菌试剂的研制及干腐病的生物防治均有重要指导意义。

## 参考文献：


[1] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海：上海科学技术出版社，1979.

[2] 赵忠仁，王元珪. 落叶果树病虫害及其防治[M]. 南京：江苏科学技术出版社，1991：28-33.

[3] 中国农业科学院果树研究所，中国农业科学院柑橘研究所. 中国果树病虫志[M]. 2 版. 北京：中国农业出版社，1996：1-6.

[4] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 2 版. 北京：中国农业出版社，1997：46-57.

[5] 侯明生. 农业植物病理学[M]. 北京：科学出版社，2006.

[6] 刘开启，牟惠芳，刘晖，等. 苹果树腐烂病侵染来源的研究[J]. 山东农业大学学报，1996，27(3)：281-284.

[7] 贺冰，贺运春，钱江. 陕山西太谷、祁县苹果树枝干病害的种类及为害性研究[J]. 山西农业科学，2011，39(4)：356-358.

[8] 樊民周，张王斌，安德荣. 陕西苹果树腐烂病病原菌的鉴定[J]. 西北农业学报，2004，13(3)：60-61.

[9] 殷辉，周建波，张志斌，等. 山西省苹果树腐烂病菌的种群结构分析[J]. 菌物学报，2016，35(12)：1493-1502.
YIN H，ZHOU J B，ZHANG Z B，*et al*. Population structure of *Valsa* species from *Malus* pumila in Shanxi Province[J]. Mycosystema，2016，35(12)：1493-1502. (in Chinese)

[10] KIRK P M，CANNON P F，DACID J C，*et al*. Dictionary of the Fungi[J]. Mycological Research，2002，106(4)：507-508.

[11] TOGASHI K. Some studies on a Japanese apple canker and its causal fungus，*Valsa mali*[J]. Jour. Coll. Agr. Hokkaido Imp. Univ.，1924，12 (3)：265-321.

[12] 阎应理，荆志刚. 苹果腐烂病菌分生孢子田间消失规律研究[J]. 植物病理学报，1988，18(4)：2-8.

[13] 高克祥，刘晓光. 苹果树腐烂病研究概况[J]. 河北林学院学报，1995，10(1)：87-91.

[14] GEORGE N A. Plant Pathology[M]. San Diego，CA：Academic Press，1978.

[15] 陈策. 国外对于苹果树腐烂病、桃树腐烂病以及其他同类病害的研究近况[J]. 中国果树，1982(Supp. 1)：68-77.

[16] 刘福昌，陈策，史秀琴，等. 苹果树腐烂病菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamada)潜伏侵染研究[J]. 植物保护学报，1979，6(3)：1-8.

[17] 臧睿，黄丽丽，康振生，等. 陕西苹果树腐烂病菌(*Cytospora* spp.)不同分离株的生物学特性与致病性研究[J]. 植物病理学报，2007，37(4)：343-351.
ZANG R，HUANG L L，KANG Z S，*et al*. Biological characteristics and pathogenicity of different isolates of *Cytospora* spp. isolated from apple trees in Shaanxi Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica，2007，37(4)：343-351. (in Chinese)

[18] 韦洁玲，黄丽丽，郜佐鹏，等. 苹果树腐烂病室内快速评价方法的研究[J]. 植物病理学报，2010，40(1)：14-20.
WEI J L，HUANG L L，GAO Z P，*et al*. Laboratory evaluation methods of apple valsa canker disease caused by *Valsa* ceratosperma sensu kobayashi[J]. Acta Phytopathologica Sinica，2010，40(1)：14-20. (in Chinese)

[19] 王旭丽. 中国苹果树腐烂病菌的种类：rDNA-ITS 序列和表型比较研究[D]. 杨陵：西北农林科技大学，2007.

[20] 郭翎. 观赏苹果引种与苹果属(*Malus* Mill.)植物 DNA 指纹分析[D]. 泰安：山东农业大学，2009.

[21] 井赵斌，杨宏勃，杨玉旺，等. 秦岭北麓猕猴桃主产区溃疡病病原菌的分离与鉴定[J]. 西北林学院学报，2016，31(5)：188-193.
JING Z B，YANG H B，YANG Y W，*et al*. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in northern area of Qinling Moutains[J]. Journal of Northwest Forestry

University,2016,31(5):188-193. (in Chinese)

[22] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution,1987,4(4):406-425.

[23] NEI M. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data[M]//MIYAMOTO M M, CRACRAFT J L. Phylogenetic analysis of DNA sequences. Oxford: Oxford University Press,1991.

[24] HOLDER M, LEWIS P O. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches[J]. Nature Reviews Genetics,2003,4(4):275-284.

[25] 潘彦平,范鑫磊,田呈明.山西省壳囊孢属真菌分类学[J].北京林业大学学报,2016,38(11):79-88.
PAN Y P, FAN X L, TIAN C M. Taxonomy of *Cytospora* in Shanxi Province, northern China[J]. Journal of Beijing Forestry University,2016,38(11):79-88. (in Chinese)

[26] 李美娜,王金友.苹果树腐烂病病原菌来源的探讨[J].北方果树,1990(2):28-30.
LI M N, WANG J Y. Astudy on the source of pathogens of apple tree Valsacanker[J]. Northern Fruits,1990(2):28-30. (in Chinese)

[27] KOBAYASHI T. Taxonomic study on Japanese fung[J]. Journal of the Japanese Plant Pathology,1972,38:170-173.

[28] KANEHIRA T, KAMEOKA Y, SHINOHARA M. Electrophoretic Patterns of the enzymes from *Valsa* Ceratosperma [J]. Transction of the Mycological Society of Japan,1991,32:199-205.

[29] SUZAKI K, YOSHIDA K, ITO T. Pathogenicity to apple branch and phloridzin degrading activity of *Valsa* ceratosperma isolated from some broad leaf trees including apple tree [J]. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan,1997,48:145-147.

[30] 臧睿.中国苹果树腐烂病菌的种群组成、分子检测及其 ISSR 遗传分析[D].杨陵:西北农林科技大学,2012.

[31] 曹支敏,梁英梅,马晓.花椒干腐病研究[J].植物保护学报,1992,19(4):58-63.
CAO Z M, LIANG Y M, MA X. Study on dry rot of wild pepper[J]. Journal of Plant Protection,1992,19(4):58-63. (in Chinese)

[32] 黄世钰,王建国.刺槐干腐病的研究[J].林业科学,1983,19(4):366-370.
HUANG S Y, WANG J G. Study on stem rot of black locust[J]. Scientia Silvae Sinicae,1983,19(4):366-370. (in Chinese)

[33] 赵晓军,周建波,赵子俊,等.枣树干腐病病原菌的鉴定[J].菌物学报,2009,28(3):332-335.
ZHAO X J, ZHOU J B, ZHAO Z J, *et al*. the pathogen causing stem dry rot of *Ziziphus jujuba*[J]. Mycosystema,2009,28(3):332-335. (in Chinese)

[34] 张璐璐,贾桂民,叶建丰,等.浙江临安山核桃干腐病发生发展规律[J].浙江农林大学学报,2013,30(1):148-152.
ZHANG L L, JIA G M, YE J F, *et al*. Frequency of carya cathayensis canker disease in Lin'an City, Zhejing Province [J]. Journal of Zhejiang A & F University,2013,30(1):148-152. (in Chinese)

(上接第 124 页)

[18] RICHARDS D, ROWE R N. Effects of root restriction, root pruning, and 6-benzyl-aminopurine on the growth of peach seedlings[J]. Ann. Bot. ,1977,41:729-740.

[19] GUREVITCH J P, WILSON J L, STONE P, *et al*. Competition among old field perennials at different levels of soil fertility and available space[J]. J. Ecol. ,1990,78:727-744.

[20] IRINO K O, IBA Y, ISHIZUKA S, *et al*. Effects of controlled-release fertilizer on growth and ectomycorrhizal colonization of pot-grown seedlings of the dipterocarp *Dryobalanops lanceolata* in a tropical nursery[J]. Soil Science & Plant Nutrition,2004,50(5):747-753.

[21] KLOOSTER W S, CREGG B M, FERNANDEZ R T, *et al*. Growth and physiology of deciduous shade trees in response to controlled-release fertilizer [J]. Scientia Horticulturae,2012,135:71-79.

[22] SANTELICES R, ESPINOZA S, ARIZA A C, *et al*. Effect of shading and fertilization on the development of container-grown *Nothofagus glauca* seedlings, a threatened species from central Chile[J]. Southern Forests: A Journal of Forest Science,2013,75(3):145-148.

[23] WEI H X, REN J, ZHOU J H. Effect of exponential fertilization on growth and nutritional status in *Buddhist pine* (*Podocarpus macrophyllus* [Thunb.]D. Don) seedlings cultured in natural and prolonged photoperiods[J]. Soil Sci. Plant Nutr. ,2013,59:933-941.

[24] OLIET J, PLANELLES R, SEGURA M L, *et al*. Mineral nutrition and growth of containerized *Pinus halepensis* seedlings under controlled-release fertilizer[J]. Scientia Horticulturae,2004,103:113-129.

[25] HERMANS C, HAMMOND J P, WHITE P J, *et al*. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? [J]. Trends in Plant Science,2006,11(12):610-617.

[26] 马雪红,胡根长,冯建国,等.基质配比、缓释肥量和容器规格对木荷容器苗质量的影响[J].林业科学研究,2010,23(4):505-509.

[27] FRANCESCO F, FRANCESCO P N. Effect of container type nursery techniques on growth and chlorophyll content of *Acer platanoides* L. and *Liquidambar styraciflua* L. plants[J]. Journal of Food, Agriculture & Environment,2006,4(3/4):209-213.

[28] 陈秋夏,郑坚,林霞,等.不同容器对木荷等 3 个容器苗生长的影响[J].西北林学院学报,2009,24(2):75-79.
CHEN Q X, ZHENG J, LIN X, *et al*. Effects of different containers on the growth of seedlings of 3 tree species[J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(2):75-79. (in Chinese)