

林惠娇, 牟桂萍, 滕少娜, 等. 苹果壳色单隔孢溃疡病菌 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(2): 65-70.
LIN Huijiao, MOU Guiping, TENG Shaona, et al. A real-time fluorescent PCR method for detection of *Botryosphaeria stevensii* from apple using TaqMan probe[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(2): 65-70.

苹果壳色单隔孢溃疡病菌 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法

林惠娇^{1,2}, 牟桂萍², 滕少娜³, 张海鹏², 周而勋¹

(1 华南农业大学 植物保护学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室/农业部华南作物有害生物
综合治理重点实验室, 广东 广州 510642; 2 黄埔海关, 广东 广州 510730; 3 重庆海关, 重庆 401147)

摘要:【目的】针对我国检疫性植物病原真菌苹果壳色单隔孢溃疡病菌 *Botryosphaeria stevensii*, 建立实时荧光 PCR 检测方法。【方法】根据苹果壳色单隔孢溃疡病菌及其近似种的 β 微管蛋白基因 (β -tubulin 基因) 保守序列设计 1 对特异性引物和 1 条 TaqMan MGB 探针, 分别以病菌 DNA 和 β -tubulin 基因靶标序列重组质粒 DNA 为阳性标准品检验探针的特异性和灵敏度。【结果】探针 BsP267 对苹果壳色单隔孢溃疡病菌菌株表现出特异性阳性扩增, 且与近缘种及其他常见的果腐病菌无交叉反应, 扩增效率为 105.858%, 探针检测 DNA 的灵敏度达到 1 fg/ μ L。【结论】本研究建立的苹果壳色单隔孢溃疡病菌实时荧光 PCR 检测法具有高特异性和灵敏度, 可用于该病害的防控检测和检疫工作。

关键词: 苹果壳色单隔孢溃疡病菌; 实时荧光 PCR; TaqMan 探针; 快速检测; β 微管蛋白基因
中图分类号: S432.44 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)02-0065-06

A real-time fluorescent PCR method for detection of *Botryosphaeria stevensii* from apple using TaqMan probe

LIN Huijiao^{1,2}, MOU Guiping², TENG Shaona³, ZHANG Haipeng², ZHOU Erxun¹

(1 College of Plant Protection, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control/The Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in South China, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China; 2 Huangpu Customs, Guangzhou 510730, China;
3 Chongqing Customs, Chongqing 401147, China)

Abstract: 【Objective】 To establish a real-time fluorescent PCR assay for detecting *Botryosphaeria stevensii*, which is the causal agent of *Diplodia* canker on apple and is presently subjected to phytosanitary legislation in China. 【Method】 A pair of specific primers and a TaqMan MGB probe were designed based on the conserved sequences of β -tubulin genes of *B. stevensii* and related species. The specificity and sensitivity of the probe were evaluated using DNAs of *B. stevensii* strains and recombinant plasmid of β -tubulin gene sequence as positive standard, respectively. 【Result】 The probe of BsP267 displayed specificity to *B. stevensii* strains with positive amplification, while there was no crossing reaction with related species and other common fruit rot pathogens. The PCR amplification efficiency was 105.858% and the detection sensitivity of DNA reached 1 fg/ μ L.

【Conclusion】 The real-time PCR method developed in this study can detect *B. stevensii* from apple with strong specificity and high sensitivity, thus can be used for the prevention, control, detection and quarantine of this disease.

Key words: *Botryosphaeria stevensii*; real-time fluorescent PCR; TaqMan probe; rapid detection; β -tubulin gene

苹果壳色单隔孢溃疡病 (*Diplodia canker*) 的病原菌为史蒂芬葡萄座腔菌 *Botryosphaeria stevensii*, 异名 *Phylospora mutila*, 无性态 *Diplodia mutila*^[1-2], 是我国禁止入境的重要检疫性有害生物^[3]。其寄主范围非常广泛, 可为害苹果 *Malus* spp.、梨 *Pyrus* spp.、李 *Prunus* spp.、葡萄 *Vitis* spp.、栎 *Quercus* spp.、棕榈 *Trachycarpus* spp.等多达 11 科 18 属的重要经济植物^[4]。根据国际应用生物科学中心 (<https://www.cabi.org/cpc>) 公布的相关信息, 目前苹果壳色单隔孢溃疡病分布的国家有美国、加拿大、秘鲁、澳大利亚、新西兰、智利、意大利、西班牙、德国、法国、英国、波兰、摩洛哥、匈牙利、葡萄牙、保加利亚、南非、印度等, 在我国无分布^[5]。该病菌可引起苹果和梨重要的枝干和果实病害, 主要导致叶片黄化枯萎, 引起枝干溃疡干枯, 还可引起果实腐烂, 在其他阔叶树上也可引起类似的症状^[1, 6]。病菌分生孢子在生长季节可通过风雨或昆虫传播^[7], 也可随原木、苗木及果实的调运进行远距离传播^[8]。该病菌通过贸易进行跨国异地传播的风险极高, 一旦传入将对我国水果产业造成很大的威胁。

准确、快速地进行物种鉴定是防止外来有害生物入侵的首要环节。由于葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* 真菌的有性态在自然环境和培养条件下都很难产生, 而其无性态的形态特征多有重叠且不稳定, 因此该属的形态分类鉴定十分困难^[9-11]。通过核糖体 DNA 序列的分析比较进行种类鉴定已被广泛应用于这一真菌类群^[2, 12-14]。此外, RAPD^[15-16]、ISSR^[17-18]、ARDRA^[19]、RFLP^[20-21]、SSCP^[22]、RAMS^[23]、MSP-PCR 和 rep-PCR^[24] 等 DNA 指纹图谱技术也被应用于该类真菌的分类研究。针对葡萄座腔菌属真菌特定类群的特异性检测技术也有相关研究^[25-29]。但目前国内外鲜见针对苹果壳色单隔孢溃疡病菌进行实时荧光 PCR 特异性检测的报道。

本研究根据苹果壳色单隔孢溃疡病菌的 β 微管蛋白 (β -tubulin) 基因保守序列, 设计筛选特异引物及探针, 旨在建立针对该病菌的实时荧光 PCR 检测技术, 为口岸的植物检验检疫提供一种灵敏而高效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株包括苹果壳色单隔孢溃疡病菌及其近缘种属、水果上常见的病原菌 27 株。来源于荷兰微生物菌种保藏中心 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS)、中国林业微生物保藏管理中心 (China Forestry Culture Collection Center, CFCC) 和中国农业微生物菌种保藏管理中心 (Agricultural Culture Collection of China, ACCC) 等标准菌种库, 以及海关从入境货物中分离保存的菌种。供试菌株来源、寄主等相关信息见表 1。

1.2 菌丝体培养及 DNA 提取

供试菌株接种于 PDA 平板于 24 ℃ 条件下光暗交替培养 7~10 d, 待菌落长到直径 5~6 cm 时, 收集菌丝, 加液氮研磨后, 采用 TIANGEN DP320 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 提取基因组 DNA, 用 Nanodrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪 (Thermo Fisher Scientific, USA) 测定 DNA 的浓度和纯度, 并于 -20 ℃ 条件下保存。

1.3 引物和探针设计

基于前期获得的苹果壳色单隔孢溃疡病菌及其近缘种的 β 微管蛋白基因 (β -tubulin 基因) 序列, 以 Primer Express 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) 和 Beacon Designer 7.5 (Premier Biosoft Company, Canada) 软件辅助设计实时荧光 PCR 引物和特异性探针, 其中, 引物 BsF1: 5'-CGGACGA GACCTTCTGTATTGAC-3' 和 BsR1: 5'-GCTC GAACCAGCCGACTAAG-3', 探针 BsP267: FAM-CGAGGTACGTGAAATT-MGB。引物及探针委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。并将其输入 GenBank 数据库中运用 Primer-BLAST 进行序列比对及特异性检验。

1.4 阳性质粒构建

将苹果壳色单隔孢溃疡病菌 β -tubulin 基因靶标序列片段转入含有氨苄卡那霉素 (Ampicillin, Amp) 抗性的 pUC57 载体上, 得到苹果壳色单隔孢溃疡病菌 β -tubulin 基因重组阳性质粒, 将目标质粒转入大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 后用甘油在 -80 ℃ 条件下保存。

表 1 本研究供试菌株的相关信息
Table 1 Information of strains used in the study

菌株编号 Strain No.	来源 Origin	学名 Scientific name	异名 Synonym	寄主 Host	地理来源 Geographic origin
CBS112553	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Vitis</i>	葡萄牙 Portugal
CBS120834	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Prunus</i>	南非 South Africa
CQ01	重庆海关 Chongqing Customs	<i>Botryosphaeria stevensii</i>	<i>Diplodia mutila</i>	<i>Glycine</i>	阿根廷 Argentina
CBS112555	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Botryosphaeria obtusa</i>	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Vitis</i>	葡萄牙 Portugal
CBS112876	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Botryosphaeria obtusa</i>	<i>Diplodia seriata</i>	<i>Vitis</i>	南非 South Africa
PP5.3-2	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Eriobotrya</i>	中国 China
CFCC51611	中国林业微生物保藏管理中心 CFCC	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Rubia</i>	中国 China
CFCC50629	中国林业微生物保藏管理中心 CFCC	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Vitis</i>	中国 China
CFCC86567	中国林业微生物保藏管理中心 CFCC	<i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Prunus</i>	中国 China
CFCC84207	中国林业微生物保藏管理中心 CFCC	<i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Vitis</i>	中国 China
PP5.3-6	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Botryosphaeria parva</i>	<i>Neofusicoccum parvum</i>	<i>Eriobotrya</i>	中国 China
CFCC86251	中国林业微生物保藏管理中心 CFCC	<i>Botryosphaeria dothidea</i>		<i>Malus</i>	中国 China
CFCC86538	中国林业微生物保藏管理中心 CFCC	<i>Botryosphaeria dothidea</i>		<i>Malus</i>	中国 China
PP5.12-2	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Botryosphaeria dothidea</i>		<i>Eriobotrya</i>	中国 China
ACCC37263	中国农业微生物菌种保藏管理中心 Agricultural Culture Collection of China	<i>Botryosphaeria dothidea</i>		<i>Lilium</i>	中国 China
CBS121886	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia olivarum</i>		<i>Olea</i>	意大利 Italy
CBS121887	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia olivarum</i>		<i>Olea</i>	意大利 Italy
CBS120835	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia africana</i>		<i>Prunus</i>	南非 South Africa
CBS121104	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia africana</i>		<i>Prunus</i>	南非 South Africa
CBS124253	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia malorum</i>		<i>Malus</i>	葡萄牙 Portugal
CBS124130	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia malorum</i>		<i>Malus</i>	葡萄牙 Portugal
CBS124462	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Diplodia intermedia</i>		<i>Malus</i>	葡萄牙 Portugal
CBS115176	荷兰微生物菌种保藏中心 CBS	<i>Sphaeropsis pyriputrescens</i>		<i>Pyrus</i>	美国 USA
11-40460	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Malus</i>	智利 Chile
PG5.31	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Malus</i>	中国 China
16-4966-2	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Vitis</i>	智利 Chile
15-128331	黄埔海关 Huangpu Customs	<i>Botryotinia fuckeliana</i>		<i>Malus</i>	南非 South Africa

1.5 特异性测试

以苹果壳色单隔孢溃疡病菌及其近缘种标准菌株的 DNA 为模板, 进行实时荧光 PCR 的特异性检测。PCR 试剂均购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司 (TOYOBO)。PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 10 μ L 2 $\times$ Thunderbird Probe qPCR Mix(含 1 $\times$ ROX reference dye), 上、下游引物 (10 μ mol/L) 和探针 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 1 μ L 模板 DNA, 加无菌水补至 20 μ L。在 ABI Step One Plus 实时荧光 PCR 仪上设

置反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 60 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 64 $^{\circ}$ C 36 s, 循环 40 次。以无菌水为空白对照, 以循环阈值 CT $\leq$ 35 作为阳性标准阈值。

1.6 灵敏度测试及标准曲线的建立

以带有苹果壳色单隔孢溃疡病菌 *β -tubulin* 基因靶标序列的重组阳性质粒 pUC-BsBTU 为模板, 对 TaqMan 探针 BsP267 进行荧光 PCR 灵敏度测试。对质粒 DNA 进行系列稀释, 得到 DNA 质量浓度为 100 000、10 000、1 000、100、10、1、0.1 fg/ μ L 的

系列稀释液,各取 1 μL 作为模板进行实时荧光 PCR 扩增,反应体系和程序同“1.5”。以无菌水为空白对照,以 CT≤35 作为阳性标准阈值。以模板量的对数值与所得 CT 值建立标准曲线。

2 结果与分析

2.1 阳性质粒的构建

将苹果壳色单隔孢溃疡病菌 *β-tubulin* 基因包含 BsF1、BsP267 和 BsR1 序列的 400 bp 片段(图 1)插入到 pUC57 载体上,构建苹果壳色单隔孢溃疡病菌 *β-tubulin* 基因重组质粒,该阳性质粒命名为

pUC-BsBTU。

2.2 特异性测试

采用引物 BsF1/BsR1 和探针 BsP267 对苹果壳色单隔孢溃疡病菌及其近缘种标准菌株以及从水果分离的常见病原真菌进行实时荧光 PCR 检测,结果(图 2)显示,探针 BsP267 分别对供试 3 株苹果壳色单隔孢溃疡病菌目标菌株表现出特异性阳性扩增,荧光信号明显增加,而非目标菌株以及空白对照都没有检测到荧光信号,表现为阴性。结果表明本研究建立的苹果壳色单隔孢溃疡病菌实时荧光 PCR 检测方法特异性良好。

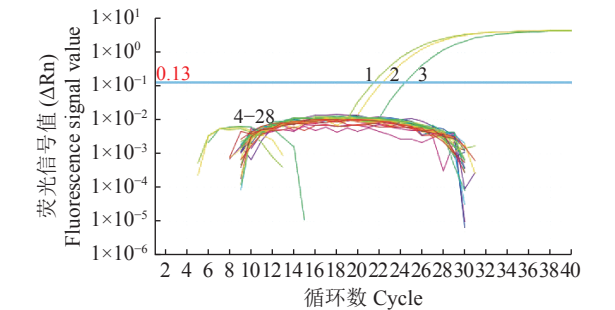
1 GTGGTGGTAC CGGTGCCGT ATGGGTACGC TCCTGATCTC TAAGATCCGC GAGGAGTTCC CCGACCGCAT GATGGCGACC
81 TTCTCCGTCG TTCCCTCCCC CAAGGTCTCG GATACCGTTG TCGAGCCTTA CAACGCCACC CTGTCCGTTC ACCAGTTTGT
161 TGAGAACT CG GACGAGACCT TCTGTATTGA CAACGAGGTA CGTGAAATTTG CCTTAGTCGG CTGGTTCGAG CGCTGAACGT
241 ACTTCTCATA GGCTCTGTAC GATATCTGCA TGAGGACCCT CAAGCTCACC CACCCTCGT ACGGTGACCT GAACCACCTG
321 GTCTCCGCCG TCAATGTCCGG CGTACCACCT TGCCTGCGTT TCCCTGGTCA GCTGAACTCT GACCTGCACA AGCTGGCCGT

阴影部分从左到右依次为 BsF1(绿色)、BsP267(黄色) 和 BsR1(蓝色)

The shaded parts with different colours from left to right are BsF1(green), BsP267(yellow) and BsR1(blue), respectively

图 1 靶标基因阳性质粒克隆序列

Fig. 1 Cloning sequence of positive plasmid of target gene



1~3 为 *Botryosphaeria stevensii* 基因组 DNA(CBS 112553、CBS 120834、CQ01); 4~27 为其他无扩增曲线的样品(CBS112555、CBS112876、PP5.3-2、CFCC51611、CFCC50629、CFCC86567、CFCC84207、PP5.3-6、CFCC86251、CFCC86538、PP5.12-2、ACCC37263、CBS121886、CBS121887、CBS120835、CBS121104、CBS124253、CBS124130、CBS124462、CBS115176、11-40460、PG5.31、16-4966-2、15-128331); 28 为空白对照(无菌水)

1~3: Cultured mycelial DNA of *Botryosphaeria stevensii*(CBS 112553, CBS 120834, CQ01); 4~27: Negative control (CBS112555, CBS112876, PP5.3-2, CFCC51611, CFCC50629, CFCC86567, CFCC84207, PP5.3-6, CFCC86251, CFCC86538, PP5.12-2, ACCC37263, CBS121886, CBS121887, CBS120835, CBS121104, CBS124253, CBS124130, CBS124462, CBS115176, 11-40460, PG5.31, 16-4966-2, 15-128331); 28: Blank control (ddH₂O)

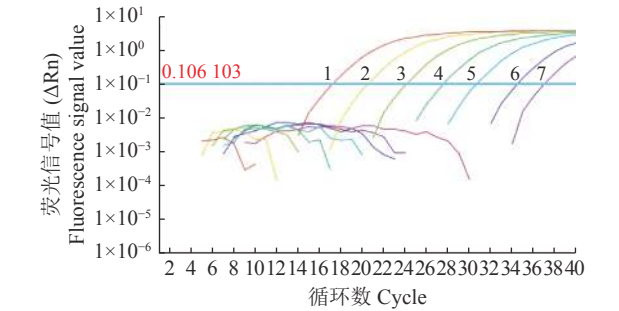
图 2 探针 BsP267 对苹果壳色单隔孢溃疡病菌的特异性检测

Fig. 2 Specificity identification of *Botryosphaeria stevensii* using probe BsP267

2.3 灵敏度测试

采用探针 BsP267 对苹果壳色单隔孢溃疡病菌菌株的重组阳性质粒 DNA 不同稀释度模板进行实时荧光 PCR 检测。结果(图 3)显示:质量浓度为 100 000、10 000、1 000、100、10、1 fg/μL 的阳性质粒 DNA 都能检测到明显的荧光信号,表现为阳性扩增;0.1 fg/μL

的阳性质粒 DNA 的 CT 值为 37.01,超过了 35 这一阳性标准阈值,这表明 BsP267 探针对于苹果壳色单隔孢溃疡病菌阳性质粒 DNA 的检测灵敏度可达到 1 fg/μL。



1~7 分别为 100 000、10 000、1 000、100、10、1、0.1 fg 质粒 DNA
1~7 are 100 000、10 000、1 000、100、10、1、0.1 fg plasmid DNA, respectively

图 3 探针 BsP267 对阳性质粒 DNA 的灵敏度检测
Fig. 3 Sensitivity identification of positive plasmid DNA using probe BsP267

2.4 标准曲线分析

将苹果壳色单隔孢溃疡病菌菌株的重组阳性质粒 DNA,分别稀释至 100 000、10 000、1 000、100、10、1、0.1 fg/μL 7 个质量浓度梯度后,荧光定量 PCR 并构建标准曲线。如图 4 所示,CT 值为 17.37~37.01,线性回归方程为: $y = -3.189 \lg x + 36.692$, 决定系数 (R^2) 为 0.993(参考值>0.95), 扩增效率为 105.858%(参考值范围为 90%~110%), 结果表明其线性相关性良好、扩增效率高、满足可信度要求,

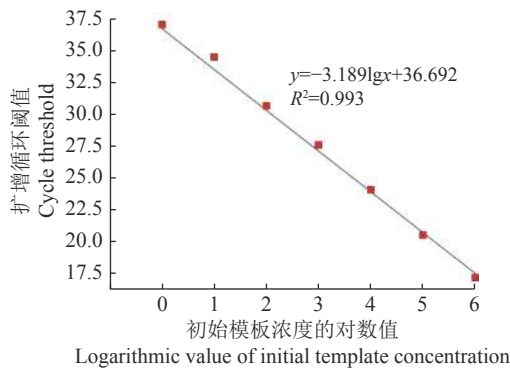


图 4 实时荧光 PCR 标准曲线

Fig. 4 Real-time fluorescent PCR standard curve

该方法可应用于苹果壳色单隔孢溃疡病菌的特异性检测。

3 结论与讨论

开发适用于口岸植物检疫的快速诊断技术,对苹果壳色单隔孢溃疡病菌进行严格检疫,对防止该类病原菌的传入至关重要。前期研究中,对苹果壳色单隔孢溃疡病菌的翻译延长因子基因 (*EF-1α*)、核糖体内转录间隔区基因 (*ITS*)、RNA 聚合酶 II 第 2 亚基基因 (*RPB2*)、谷氨酰胺合成酶基因 (*GS*) 和核糖体大亚基 (*LSU*) 等基因序列进行了特异性引物和探针筛选,最后基于特异性和扩增效率,确定了 *β-tubulin* 基因作为苹果壳色单隔孢溃疡病菌特异性检测的靶标基因。*β-tubulin* 基因在细胞生长过程中有着重要作用,其序列具有高度的保守性,具有管家基因的特性^[30]。此外,该基因既有保守的外显子又有许多可变的内含子,在不同属、种间蕴含着丰富的变异,常作为标识片段用于真菌的物种鉴定^[31-35]。

本研究使用 TaqMan MGB 探针实时荧光 PCR 检测壳色单隔孢溃疡病菌。通过大量文献分析及对前期基础研究的总结,选择苹果壳色单隔孢溃疡病菌特异性高、保守性强的 *β-tubulin* 基因作为检测靶标。引物 BsF1/BsR1 和探针 BsP267 组合对苹果壳色单隔孢溃疡病菌及其近缘种标准菌株以及从水果分离的常见病原真菌的实时荧光 PCR 检测结果显示,探针 BsP267 对供试阳性菌株均表现出特异性扩增,扩增效率为 105.858%,最低检测 DNA 质量浓度下限为 1 fg/μL;而非目标菌株以及空白对照都没有检测到特异性扩增。结果表明本研究建立的苹果壳色单隔孢溃疡病菌实时荧光 PCR 检测方法特异性良好,所设计的引物 BsF1/BsR1 和特异性探针 BsP267 可对未知样品进行壳色单隔孢溃疡病菌的特异检测。引物和探针的设计在遵循荧光 PCR

探针设计原则的基础上,将包含更多的种特异性位点作为最重要的考量,同时探针引入了小沟结合物 (Minor groove binder, MGB) 基团以确保其高特异性。基于 TaqMan MGB 探针技术的实时荧光 PCR 方法因为探针序列短,具有分辨率高、稳定性好、背景低、重复性好等优点。实时荧光 PCR 比常规 PCR (包括巢式 PCR 和多重 PCR) 具有更高的检测灵敏度,其他针对葡萄座腔菌属真菌特定类群的特异性检测研究也印证了这一点^[25-29]。

本研究建立了苹果壳色单隔孢溃疡病菌的 TaqMan MGB 探针实时荧光 PCR 检测方法。该方法特异性强、检测灵敏度高,可以提高苹果壳色单隔孢溃疡病菌的检出率和检测速度。既可用于苹果壳色单隔孢溃疡病菌的快速确诊,也可用于进境截获的可疑样品及未知苹果果品样品的快速筛查,在口岸植物检疫中具有很强的可操作性和适用性。该检测方法的建立可以防止苹果检疫性病原真菌的传入和传播,同时也可可为进口水果的快速通关提供有效的技术支持。

参考文献:

[1] VAJNA L. Branch canker and dieback of sessile oak (*Quercus petraea*) in Hungary caused by *Diplodia mutila*: I. Identification of the pathogen[J]. European Journal of Forest Pathology, 1986, 16(4): 223-229.

[2] ALVES A, CORREIA A, LUQUE J, et al. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*[J]. Mycologia, 2004, 96(3): 598-613.

[3] 中华人民共和国农业部, 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录[M]. 北京: 中华人民共和国农业部. 2007.

[4] 王卫芳, 张秋娥, 黄英, 等. 苹果壳色单隔孢溃疡病菌检疫鉴定方法: SN 3750—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013: 1-9.

[5] 张秋娥, 王卫芳, 严进, 等. 苹果壳色单隔孢溃疡病菌[J]. 植物检疫, 2012, 26(1): 43-46.

[6] PRZYBYŁ K. Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots[J]. Forest Pathology, 2010, 32(6): 387-394.

[7] TIBERI R, RAGAZZI A. Association between fungi and xylophagous insects of declining oaks in Italy[J]. Rediagionale Di Zoologia, 1998, 81: 83-91.

[8] 张露茜, 宋绍祎, 焦彬彬, 等. 进境水曲柳原木中苹果壳色单隔孢溃疡病菌的检疫鉴定[J]. 植物检疫, 2015, 29(1): 25-29.

[9] LAUNDON G F. *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii*, and *Othia spiraeae* in New Zealand[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1973, 61(2): 369-374.

[10] VAN NIEKERK J M, CROUS P W, GROENEWALD J Z, et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity

- of *Botryosphaeria* species on grapevines[J]. *Mycologia*, 2004, 96(4): 781-798.
- [11] SLIPPERS B, JOHNSON G I, CROUS P W, et al. Phylogenetic and morphological reevaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*[J]. *Mycologia*, 2005, 97(1): 99-110.
 - [12] ZHOU S, STANOSZ G R. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8s rDNA sequences[J]. *Mycologia*, 2001, 93(3): 516-527.
 - [13] TAYLOR A, HARDY G E ST J, WOOD P, et al. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2005, 34(2): 187-195.
 - [14] CROUS P W, SLIPPERS B, WINGFIELD M J, et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae[J]. *Studies in Mycology*, 2006, 55: 235-253.
 - [15] STANOSZ G R, SWART W J, SMITH D R. Similarity between fungi identified as *Diplodia pinea* f. sp. *cupressi* in Israel and *Botryosphaeria stevensii* or *Diplodia mutila* on *Juniperus* in the United States[J]. *European Journal of Forest Pathology*, 1998, 28(1): 33-42.
 - [16] 黄春燕, 刘开启. 苹果轮纹病及相关病害病原菌的 RAPD 分析[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(2): 164-169.
 - [17] ZHOU S, SMITH D R, STANOSZ G R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) finger printing[J]. *Mycological Research*, 2001, 105(8): 919-926.
 - [18] 赵嘉平. 树木溃疡病菌: 葡萄座腔菌属及相关真菌系统分类研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
 - [19] ALVES A, PHILLIPS A J L, HENRIQUES I, et al. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 245(2): 221-229.
 - [20] 余仲东, 曹支敏, 张星耀. 杨树溃疡病、苹果轮纹病等病原菌的 ITS-rDNA-RFLP 解析[J]. *中国森林病虫*, 2004, 23(2): 15-18.
 - [21] SLIPPERS B, SMIT W A, CROUS P W, et al. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(1): 128-139.
 - [22] RIDGWAY H J, AMPONSAH N T, BROWN D S, et al. Detection of botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multi-species primer pair[J]. *Plant Pathology*, 2011, 60(6): 1118-1127.
 - [23] 王璠. 桃流胶病菌 *Botryosphaeria* spp. 鉴定、分布、遗传多样性及 PCR 快速检测技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
 - [24] ALVES A, PHILLIPS A J L, HENRIQUES I, et al. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting[J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(2): 112-121.
 - [25] MA Z, MICHAELIDES T J. A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. from pistachio and various other hosts in California[J]. *Plant Disease*, 2002, 86(5): 515-520.
 - [26] LUCHI N, PRATESI N, SIMI L, et al. High-resolution melting analysis: A new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in Austrian pine[J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(8): 715-723.
 - [27] SPAGNOLO A, MARCHI G, PEDUTO F, et al. Detection of Botryosphaeriaceae species within grapevine woody tissues by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum*/N. *ribis* complex[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2011, 129(3): 485-500.
 - [28] NI H F, YANG H R, CHEN R S, et al. A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of Botryosphaeriaceae species on mango[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 133(4): 819-828.
 - [29] XU C, ZHANG H, CHI F, et al. Species-specific PCR-based assays for identification and detection of Botryosphaeriaceae species causing stem blight on blueberry in China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(3): 573-579.
 - [30] SHEIR-NEISS G, LAI M H, MORRIS N R. Identification of a gene for β -tubulin in *Aspergillus nidulans*[J]. *Cell*, 1978, 15(2): 639-647.
 - [31] MOSTERT L, GROENEWALD J Z, SUMMERBELL R C, et al. Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs[J]. *Studies in Mycology*, 2006, 54: 1-113.
 - [32] BILODEAU G J, LEVESQUE C A, DE COCK A W A M, et al. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons[J]. *Phytopathology*, 2007, 97(5): 632-642.
 - [33] AROCA A, RAPOSO R, LUNELLO P. A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -tubulin gene as the target sequence[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(6): 1131-1140.
 - [34] ZAMPIERI E, MELLO A, BONFANTE P, et al. PCR primers specific for the genus *Tuber* reveal the presence of several truffle species in a truffle-ground[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 297(1): 67-72.
 - [35] GUO Y, LI W, SUN H, et al. Detection and quantification of *Rhizoctonia cerealis* in soil using real-time PCR[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2012, 78(4): 247-254.