

核桃炭疽病原菌鉴定及生物学特性

王清海^{1,2},刘幸红²,范昆³,段春华²,牛瞻光²,吴小芹^{1*}

1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037
2. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014
3. 山东省果树研究所, 山东 泰安 271018

摘要: 本文从表现炭疽病症状的核桃果实上分离到一株具有强致病性菌株(TS-09), 并进行了鉴定和生物学特性研究。经形态特征观察、培养性状以及 rDNA-ITS、ACT、 β -tub2、GPDH 四种保守基因序列分析, TS-09 菌株为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)。生物学特性测定结果表明: TS-09 菌株在 PDA 培养基上生长最好; 25~30 °C 之间适宜菌株生长及产孢, 28 °C 是菌株最适宜的生长及产孢温度; 弱酸性环境(pH4.0)有利于产孢, 中性环境(pH7.0)适宜菌丝生长; 长时间光照抑制菌丝生长, 黑暗条件有利于菌丝生长; 菌丝的抗逆性较强, 60 °C 处理 15 min、62 °C 处理 10 min, 菌丝死亡。研究结果将为核桃炭疽病的预测及有效控制提供理论依据。

关键词: 核桃炭疽病; 鉴定; 生物学

中图分类号: S436.621.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)01-0009-06

Identification and Biological Characteristics of Pathogen from *Colletotrichum gloeosporioides*

WANG Qing-hai^{1,2}, LIU Xing-hong², FAN Kun³, DUAN Chun-hua², NIU Shan-guang², WU Xiao-qin^{1*}

1. Co-innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry/Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China
2. Shandong Provincial Academy of Forestry, Ji'nan 250014, China
3. Institute of Pomology, Tai'an 271018, China

Abstract: Walnut anthracnose disease is a kind of serious disease of walnut all over the world. In this paper, the identification and the biological characteristics of strain TS-09 isolated from the walnut fruits were studied. The results showed that the strain TS-09 was identified as *Colletotrichum gloeosporioides* based on its morphologic characters, cultural characteristics and four conserved genes(ribosomal DNA-ITS, ACT, β -tub2 and GPDH)sequences analysis and the pathogenicity was powerful. For the growth of strain TS-09, the best medium was PDA. The optimum temperature was 28 °C and the optimum pH for mycelium growth was 7.0. The condition of weak acid was favorable for spore production (pH 4.0). During continuous illumination, the mycelium growth was inhibited while the condition of continuous darkness was better for mycelium growth. The mycelium had stronger resistance against temperature and the lethal temperature for mycelium was 60 °C(15 min) or 62 °C(10 min). Our research expected to offer theory support for prediction and effective control of walnut anthracnose.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*; identification; biology

核桃(*Juglans regia*)是一种世界性分布的重要“木本粮油”生态树种。核桃仁含有多种适宜于人体健康的营养成分,被誉为“21世纪的超级食品”。核桃木是可以用于制作高级家具和军事用材。核桃种植具有良好的经济价值和社会效益。近年来,我国核桃种植业发展迅速。据FAO统计,2013年中国核桃树收果面积 $4.25 \times 10^5 \text{ hm}^2$,产量 $4.0 \times 10^4 \text{ Hg/hm}^2$,总产量 $1.70 \times 10^6 \text{ t}$,山东省核桃种植面积已达 $9.13 \times 10^4 \text{ hm}^2$,产量 $9.3 \times 10^4 \text{ t}$ 。核桃种植面积的迅猛增加,集约化程度的不断提高,但栽植品种以早食核桃为主,抗病性较差,加之密植的栽培模式致使核桃病害发生日趋严重。炭疽病可危害果实、叶片,潜伏期长、发病时间短、爆发性强,严重时病果率高达80%以上,落果率达50%以上,严重影响核桃产量和品质,造成严重的经济损失,是核桃生产中的一类灾难性病害^[1,2]。引起炭疽病的炭疽菌属(*Colletotrichum Corda*)真菌是全球公认的第八类重要的植物病原菌^[3],对全球农林业生产构成了严重威胁。其中多个种如*Colletotrichum acutatum*可造成草莓、蓝莓、芒果、枇杷、橄榄、猕猴桃、鳄梨等高档水果品质降低,货架期缩短^[4-6],*Colletotrichum kahawae*侵染咖啡,引起非洲咖啡毁灭性的灾害^[7,8],*Colletotrichum*

收稿日期: 2015-05-10

修回日期: 2015-08-23

基金项目: 山东省科技发展计划项目:核桃炭疽病新型健康管理模式构建; 山东省农业重大应用技术创新课题:生物药剂在冬枣、核桃生产中的选配与应用; 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

作者简介: 王清海(1978-),男,山东嘉祥人,博士,工程师,主要从事林木病害及生物防治研究。E-mail:wqhhai@126.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:xqwu@njfu.edu.cn

gloeosporioides 引起柿、枣、苹果、葡萄、梨、石榴等鲜食水果炭疽病^[9,10], *Colletotrichum graminicola* 严重影响玉米、甘蔗以及高粱等谷物产量^[11]。随着炭疽菌研究的深入,越来越多的研究结果表明同种寄主植物上会存在多种炭疽菌。*C. acutatum* 和 *C. gloeosporioides* 可以引起橄榄炭疽病^[6]。刘威等人研究发现 *C. gloeosporioides* 和 *Colletotrichum fructicola* 均可以引起茶树炭疽病^[12]。2012 年山东省核桃炭疽病大爆发,是否存在多种炭疽菌引起核桃炭疽病,尚未明确。笔者从山东省核桃产区表现炭疽病症状的果实上分离获得的一株强致病菌。由于该属真菌形态特征、生物学特性以及遗传变异较大,本文采用形态学、分子生物学方法对该菌株进行了种类鉴定,并对生物学特性进行了研究,旨在为该病害的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

核桃感病果实,从山东济南、泰安、临沂、枣庄等核桃主产区核桃园中采集。

1.2 核桃病果菌株分离培养

将采集的病果,带回实验室,先用 70%酒精对病果表面消毒,然后置于无菌的烧杯中,底部铺 3 层灭菌滤纸,加入少量无菌水,保持湿度,用保鲜膜密闭烧杯,置于 28 °C 培养箱中,培养 1~2 d,诱导病果上病菌产孢。挑取果实表面粉红色分生孢子堆,在 PDA 平板划线,培养。挑取单个菌落,进行纯化。

1.3 致病性测定

在实验室进行离体果实接种试验,品种为香玲。选择无病无虫伤的核桃果实,自来水冲洗,晾干后,用 75%酒精表面消毒,采用注射接种法,将分离的菌株用无菌水配制成 10^5 个·mL⁻¹ 的孢子悬浮液,每个果实在 3 个不同位置接种,每个接种点接种 20 μL 孢子悬浮液,以无菌水为对照,每个处理 5 个果实,每个处理平行测定 4 次,试验重复 3 次。处理后将核桃置于灭菌的烧杯中,用保鲜膜密闭烧杯,保持一定湿度,置于 28 °C 的恒温培养箱中,待发病后,取发病核桃,按 1.2 进行分离。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 形态特征观察 将 TS-09 菌株接种于 PDA 平板,28 °C 培养 5 d,观察菌落特征,显微观察分生孢子形态、大小以及附着胞形态。

1.4.2 TS-09 菌株部分保守基因序列分析及系统发育树构建 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法,试验所用引物见表 1^[13-16],反应条件:25 μL 反应体系,包括 Taq 酶 mix 12.5 μL,上游引物下游引物各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL, DNA 模板 2 μL。具体反应程序如下:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 0.5 min, 59 °C 退火 0.5 min (ITS 退火温度 58 °C, GPDH 退火温度 56 °C), 72 °C 延伸 1.5 min, 共 36 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。

PCR 产物由上海生物工程技术服务有限公司进行双向测序。利用 NCBI 的 BLAST 程序,将测序结果与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中相关序列进行同源性比较分析。利用 DNAMAN 软件对各基因序列进行比对,通过手工校正使序列排序获得优化,将校正后各基因按首尾相连的方法合并,利用 MEGA5.05 软件邻近 (Neighbor-Joining, NJ) 法构建多基因系统发育树,以自展法 (Bootstrap) 进行检测,共循环 1000 次。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of the primers

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequences
ACT	ACT-512F	5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3'
	ACT-783R	5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3'
ITS	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
GPDH	GDF-1	5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3'
	GDR1	5'-GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT-3'
β-tub2	βt2a	5'-GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC-3'
	βt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'

1.5 核桃炭疽菌生物学特性测定

1.5.1 不同培养基对菌丝生长和产孢影响测定 取生长一致的核桃炭疽菌菌饼 ($\Phi 9$ mm), 分别接种于 PDA 培养基、PSA 培养基、PMA 培养基、燕麦片培养基 (OA)、玉米粉琼脂培养基 (CMA)、马丁氏培养基 (Martin)、沙氏培养基 (SDA) 等培养基平板上, 28°C 恒温培养 5 d, 采用十字交叉法测量菌落直径, 观察菌落生长状况, 并于第 10 d 测产孢量^[17,18]。每个处理平行测定 4 次, 3 次重复。

1.5.2 温度对菌丝生长和产孢影响测定 将菌饼 ($\Phi 9$ mm) 置于 PDA 平板上, 分别置于 5°C 、 15°C 、 20°C 、 25°C 、 28°C 、 30°C 、 35°C 的恒温培养箱中培养, 每日 17 时测量菌落直径, 第 10 d 测产孢量, 处理、重复、测定方法同 1.5.1。

1.5.3 pH 值对菌丝生长和产孢影响测定 分别配置 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10 的 PDA 平板。配置低 pH 值的培养基时先配好 PDA 液体培养基, 并调整到相应的 pH 值, 然后用其他的三角瓶盛放相应量琼脂粉。同时灭菌, 温度降低到 59°C 时把液体琼脂快速倒入 PDA 液体培养基中, 制作平板。将菌饼 ($\Phi 9$ mm) 置于不同 pH 值的培养基上, 28°C 下培养 5 d。处理、重复、测定方法同 1.5.1。

1.5.4 光照条件对菌丝生长影响测定 将菌饼 ($\Phi 9$ mm) 置于 PDA 平板上, 设 12 h 日光灯交替照射、日光灯 24 h 持续照射、连续黑暗 3 个处理, 于 28°C 下培养, 处理、重复、测定方法同 1.5.1。

1.5.5 菌株致死温度测定 将菌饼置于灭菌试管中, 每试管放 10 枚菌片, 分别在 45°C 、 50°C 、 55°C 、 60°C 、 65°C 的恒温水浴锅中分别处理 10 min、15 min。随机从每个试管中取出 5 枚菌饼置于 PDA 平板, 28°C 恒温培养 2 d 后, 以菌丝能够生长的最高温度为基础, 增加 1°C 设为 1 个处理, 处理中又设 10、15 min 2 个时间, 最后确定致死温度及相应时间, 每个处理平行测定 4 次, 重复 3 次。

1.6 数据处理与分析

数据处理采用 Spss20.0 软件, 采用 Duncan 多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 核桃病果菌株分离及致病性

诱导病果发病后, 均分离到真菌菌株, 单孢纯化后获得一株优势菌株 (编号为 TS-09)。将 TS-09 菌株孢子悬浮液接种于健康的核桃果实, 发病率为 100%, 对照未发病。病斑初期褐色, 逐渐变黑色, 近圆形至不规则形, 中央稍凹陷, 病部有黑色小点产生, 潮湿条件下, 黑点上溢出粉红色粘质孢子堆。症状与田间发病一致, 且从这些病斑上都能够再分离到与原接种菌株相同的菌株。这表明分离到的 TS-09 菌株为该病的致病菌。

2.2 核桃炭疽病菌 TS-09 菌株鉴定

TS-09 菌株在 PDA 培养基平板上菌落棉絮状, 边缘完整, 初期灰白色, 随后在平板中央变为深灰色, 后期有粉红色分生孢子堆出现。分生孢子盘褐色至黑褐色; 分生孢子单胞、无色、长椭圆形, 大小为 $10.15 \pm 0.21 \times 3.37 \pm 0.09 \mu\text{m}$, 附着胞圆形, 淡褐色 (图 1)。利用 ACT、rDNA-ITS、GPDH、 β -tub2 等 4 种保守基因构建的多系统发育树表明, TS-09 菌株与不同来源地胶孢炭疽菌模式菌株聚在一起, 与其它炭疽菌形成明显分支。结合 TS-09 菌株的形态特征、培养性状, 鉴定 TS-09 菌株为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。

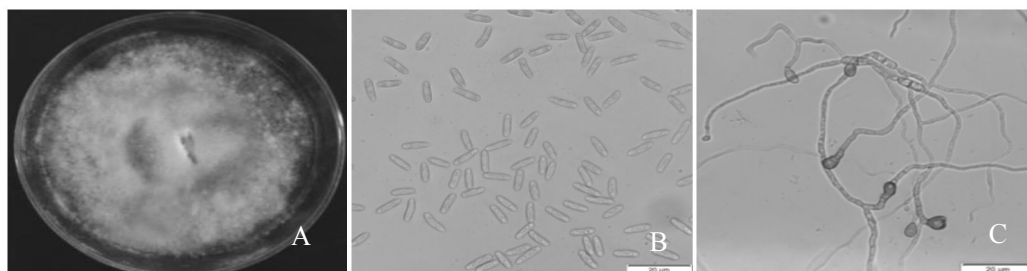


图 1 TS-09 菌株形态特征

A. 菌落培养性状; B. 分生孢子; C. 附着胞

Fig.1 The culture characters of strain TS-09

A. Colony characteristics on PDA for 15d; B. Conidia; C. Appressoria

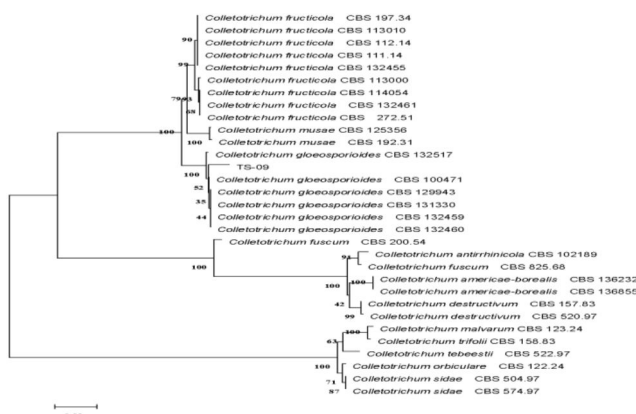


图 2 基于 ACT, rDNA-ITS, GPDH 和 β -tub2 序列的 TS-09 菌株系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain TS-09 based on ACT, ITS, GPDH and β -tub2 genes sequences data

2.3 不同培养基对核桃炭疽菌培养性状及菌丝生长的影响

TS-09 菌株在不同培养基上培养性状稍有差异 (图 3)。在营养丰富的培养基上如 PDA、PMA、PSA 和 SDA 培养基上, 菌丝稠密, 灰白色至浅灰色, 颜色均一, 培养基背面淡黄色, 颜色由里至外逐渐变浅。在营养相对缺乏的培养基如 CMA 培养基和 OA 培养基上菌丝稀疏, 白色, 棉絮状, 培养基背面与培养基颜色基本一致。在 SDA、CMA、OA 和 Martin 培养基上易产生分生孢子堆。

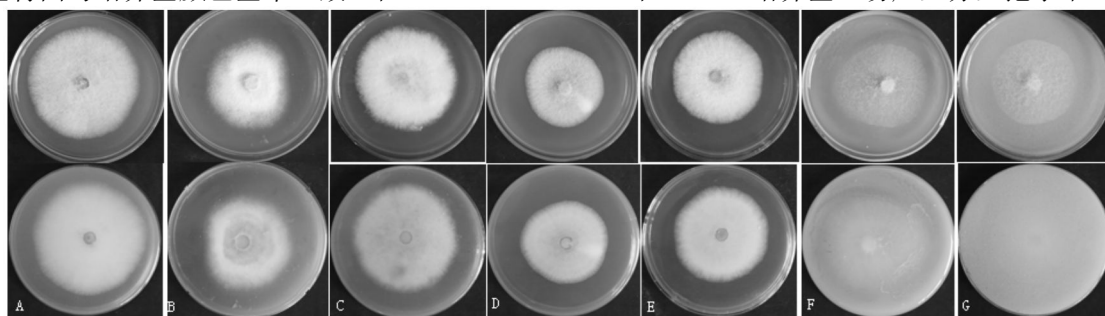


图 3 TS-09 菌株在不同培养基上的形态特征

Fig.3 The morphological characteristics of strain TS-09 on various culture media for 5 d growth

A.PDA, B.PMA, C. PSA, D. Martin, E.SDA, F. OA, G.CMA

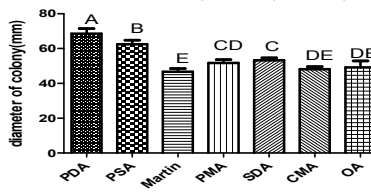


Fig.4 Effects of different medium on colony diameter of strain TS-09.

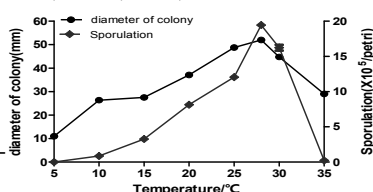


Fig.5 Effect of different temperature on mycelial growth and sporulation of strain TS-09.

由图 4 可以看出, TS-09 菌株在 PDA 培养基上生长最好, 菌落直径达 68.58 ± 1.18 mm, 与其他处理相比, 在 $P=0.01$ 水平上达到极显著水平。其次为 PSA 培养基。在 Martin 培养基上生长最差, 菌落直径仅为 46.67 ± 0.74 mm。

2.4 温度对核桃炭疽菌 TS-09 菌株菌丝生长和产孢的影响

图 5 结果表明, 温度对 TS-09 菌株菌丝生长和产孢的影响趋势一致, 低于 5°C , TS-09 菌株停止生长及产孢, 高于 35°C , 菌丝生长缓慢, 不能产孢。在 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 之间适宜菌株生长及产孢, 28°C , 菌丝生长及产孢达到最大, 是菌株的最适宜的生长及产孢温度。每年的 7 月下旬, 雨量大, 雨水勤, 温度高, 适于核桃炭疽病的大面积发生, 高于 35°C , 低于 20°C , 病害发生程度有所减轻。

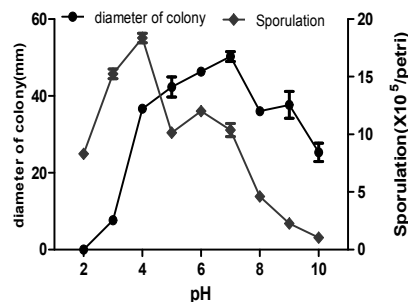


Fig.6 Effect of different pH on mycelial growth and sporulation of strain TS-09.

2.5 pH 对核桃炭疽菌 TS-09 菌株菌丝生长和产孢的影响

适宜 TS-09 菌株菌丝生长及产孢的 pH 值范围较广, 在 pH3.0~10 的范围内菌丝均能正常生长。pH7.0, 菌丝生长最好。弱酸性环境易于产孢, pH4.0 时产孢量最大 (图 6)。

2.6 光照条件对 TS-09 菌株菌丝生长的影响

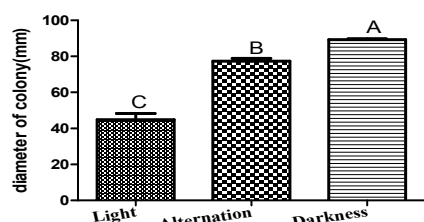


Fig.7 Effects of different light on colony diameter of strain TS-09.

图 7 结果表明, 光照对 TS-09 菌株菌丝生长具有较强的影响。TS-09 菌株适宜在黑暗条件下生长, 与其它两个处理在 $P=0.01$ 水平上具有显著性差异。与 12 h 日光灯交替照射相比, 持续光照则抑制菌丝生长。

2.7 核桃炭疽菌 TS-09 菌株菌丝致死温度

TS-09 菌株菌丝在 65 °C 处理 10 min、15 min 均死亡, 60 °C 处理 10 min, 菌丝能够存活, 处理 15 min 死亡, 以 60 °C 为起点, 再次增加 61 °C、62 °C、63 °C、64 °C 等 4 个处理, 继续测定菌株的致死温度。结果表明 TS-09 菌株菌丝的致死温度为 60 °C 处理 15 min, 62 °C 处理 10 min (表 2)。

表 2 菌丝的致死温度

Table 2 The lethal temperature of mycelium

时间 Time/min	温度 Temperature/°C								
	45	50	55	60	61	62	63	64	65
10	+	+	+	+	+	-	-	-	-
15	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注: + 活的; - 死的。Note: + live; - dead

3 结论与讨论

炭疽菌属真菌 1790 年首次发现, 直到 1831 年 Corda 才首次建立炭疽菌属。截止目前, 炭疽菌属真菌的分类、鉴定工作虽然取得了长足的进步, 但其分类还是依然比较混乱, 仍有一些争议的问题有待进一步考证。炭疽菌属真菌具有丰富的种群多样性, 形态特征、培养性状、致病力以及遗传变异较大, 有些近似种之间差异微小, 而且有时会有多种炭疽菌同时存在同一寄主的现象。所以只有依据形态学、致病性、系统发育学以及多基因的系统遗传学才能够提供较准确的结果。近年山东省核桃产区炭疽病发生危害程度日益严重。为了有效控制核桃炭疽病的暴发流行, 明确病原种类是十分必要的。本实验从山东省核桃产区核桃病果上的分离获得了一株强致病力菌株 TS-09, 通过对菌株的 ACT、rDNA-ITS、GPDH、 β -tub24 种保守基因的扩增序列分析, 结合形态特征、培养性状, 将 TS-09 菌株鉴定为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*。实验结果表明胶孢炭疽菌是引起近几年山东省核桃产区炭疽病暴发流行的主要致病菌。TS-09 菌株在 PDA 培养基平板上菌落棉絮状, 初期灰白色, 随后在平板中央变为深灰色, 后期有粉红色分生孢子堆。附着胞圆形。分生孢子单胞、无色、长椭圆形, 大小为 $10.15 \pm 0.21 \times 3.37 \pm 0.09 \mu\text{m}$, 这与秦巴山区核桃炭疽菌的分生孢子形态、大小基本一致^[19]。

一种炭疽菌可以侵染多种寄主植物, 也可以多种炭疽菌侵染同一寄主植物。Embaby 等人研究发现 *C. acutaum* 和 *C. gloeosporioides* 均可以引起草莓炭疽病^[20]; 危害辣椒, 引起辣椒炭疽病的有 *C. acutatum*、*C. truncatum*、*C. fructicola* 和 *C. siamense* 等 4 种炭疽菌^[21-23]。本研究仅对从病果上分离到的一株强致病性菌株进行了鉴定, 至于核桃上是否存在其它种的炭疽菌还会进行后续研究。

明确核桃炭疽菌的生物学特性是重要的研究基础。本实验对核桃炭疽菌 TS-09 菌株的生物学特性进行了研究。结果表明, 核桃炭疽菌 TS-09 菌株在不同培养基上培养性状略有不同。在营养相对丰富的培养基上, 菌丝生长迅速; 营养相对缺乏的培养基不利于菌丝生长, 适于产生大量分生孢子。这表明菌株在逆性环境中, 易通过产生分生孢子来度过不良环境。菌株生长及产孢的适宜温度为 28 °C。TS-09 菌株适宜在中性环境中生长, 偏酸性环境中易于产孢, 这与侵染草莓的胶孢炭疽菌生物学特性不同。侵染草莓的胶孢炭疽菌更适合在酸性条件生长, 中性条件产孢^[24]。光照对菌丝生长具有较强的影响, 24 h 光照, 不适宜菌丝生长, 黑暗条件利于菌丝生长, 这可能也是核桃园内栽植密度过大时病害发生较重的原因之一。病原菌的生物学特性与病害田间的发生、消长规律密切相关, 山东省每年的 7 月份雨季来临, 温度高, 湿度大, 非常适宜核桃炭疽菌的生长、产孢和侵染, 田间

核桃炭疽病发生严重, 实验结果与田间发生规律相吻合。本研究结果明确了引起山东省核桃主产区炭疽病的强致病性病原种类及其生物学特性, 将为预测病害发生和有效控制提供一定的理论依据。

田间观察发现, 核桃炭疽病菌每年 4 月份开始侵染, 7 月中下旬暴发, 潜伏期长。该病菌的潜伏侵染与核桃叶片果实自身代谢产物的关系以及影响该病短时间暴发的作用因子还有待深入研究。

参考文献

- [1] An HS, Yang KQ. Resistance gene analogs in walnut (*Juglans regia*) conferring resistance to *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Euphytica*, 2014,197(2):175-90
- [2] 曲文文,杨克强,刘会香,等.山东省核桃主要病害及其综合防治[J].*植物保护*,2011,37(2):136-140
- [3] Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, *et al.* The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012,13(4):414-4130
- [4] Urdaneta L, Sanabria ME, Rodríguez D, *et al.* Anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds in strawberry fruit in Lara and Trujillo states, Venezuela[J]. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 2013,30(4):504-28
- [5] Miles TD, Gillett JM, Jarosz AM, *et al.* The effect of environmental factors on infection of blueberry fruit by *Colletotrichum acutatum*[J]. *Plant Pathology*, 2013,62(6):1238-1247
- [6] Talhinhos P, Gonçalves E, Sreenivasaprasad S, *et al.* Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015,142(1):73-83
- [7] Abera A, Lemessa F, Muleta D. The antifungal activity of some medicinal plants against coffee berry disease caused by *Colletotrichum kahawae*[J]. *International Journal of Agricultural Research*, 2011,6(3):268-79
- [8] Loureiro A, Guerra-Guimarães L, Lidon FC, *et al.* Isoenzymatic characterization of *Colletotrichum kahawae* isolates with different levels of aggressiveness[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2011,36(5):287-93
- [9] Rahimlou S, Babaeizad V, Sayari M. First report of fruit spot of pomegranate caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Iran[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2014,96(3):605
- [10] Palou L, Montesinos-Herrero C, Tarazona I, *et al.* Postharvest anthracnose of persimmon fruit caused by *Colletotrichum gloeosporioides* first reported in Spain[J]. *Plant Disease*, 2013,97(5):691
- [11] Sukno SA, Sanz-Martín JM, González-Fuente M, *et al.* First report of anthracnose stalk rot of maize caused by *Colletotrichum graminicola* in Switzerland[J]. *Plant Disease*, 2014,98(5):694
- [12] 刘威,叶乃兴,陈玉森,等.茶树炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 的鉴定及系统发育分析[J].*茶叶科学*,2014,34(1):95-104
- [13] O'Donnell KA. Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex:Detection of additional phylogenetically distinct species[J]. *Mycoscience*, 2000,41(1):61-78
- [14] Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995,61(4):1323-30
- [15] Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999,91(3):553-556
- [16] O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997,7(1):103-16
- [17] Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, *et al.* Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*[J]. *PLoS Pathogens*, 2012,8(4): e1002643
- [18] 范昆,张雪丹,余贤美,等.无花果炭疽菌的生物学特性及 8 种杀菌剂对其抑制作用[J].*植物病理学报*,2013,43(1):75-81
- [19] 肖玉贵,周建华,肖银波.秦巴山核桃炭疽病病原菌生物学特性及防治技术的研究[J].*四川林业科技*,2010,31(1):54-57
- [20] Embaby EM, Ragab ME, Dougdoug KA, *et al.* Identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on strawberry in Egypt[A]. *Acta Horticulturae*, 2012:657-60
- [21] Diao Y, Zhang C, Xu J, *et al.* Genetic differentiation and recombination among geographic populations of the fungal pathogen *Colletotrichum truncatum* from chili peppers in China[J]. *Evolutionary Applications*, 2015, 8(1):108-118
- [22] Sharma G, Shenoy BD. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2014,47(10):1179-1194
- [23] Vitale S, Infantino A. Presence of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on hot pepper in central Italy[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2014,96(3):607
- [24] 张海英,张明会,刘志恒,等.草莓炭疽病病原鉴定及其生物学特性研究[J].*沈阳农业大学学报*,2007,38(3):317-321