

葡萄座腔菌属 ITS-nrDNA 的分子系统学分析

余仲东^{1*} 赵官成^{1,2} 淡静雅^{1,2} 任争争³

¹西北农林科技大学林学院 杨凌 712100

²陕西师范大学生命科学学院 西安 710062

³西北农林科技大学理学院 杨凌 712100

摘 要: 对收集的 22 株和 GenBank 下载的 40 株葡萄座腔菌 *Botryosphaeria* ITS 序列构建了 MP (Maximum parsimony) 进化树。在以 *Leucostoma* 为外群的情况下, 来自我国 (主要是陕西) 的葡萄座腔菌树木溃疡病菌总体上可分为 2 个大群, BDGroup1 与 GenBank 上报道的 *B. dothidea* 被聚在一起, BD Group2 菌株全部来自我国关中咸阳, 独立成群, 与 *Botryosphaeria* 属其他种亲缘关系远。培养特征、分生孢子大小和致病性测定显示: 来自我国的苹果轮纹病菌、苹果干腐病菌、梨轮纹病菌、桃树流胶病菌同 *B. dothidea* 亲缘关系近, 在 MP 树中聚在一起 (BD Group1)。ITS 序列分析结果支持 *B. dothidea* 与 *B. berengeriana* 为同物异名的观点。 *B. ribis* 与 *B. parva* 亲缘关系近, 而与 *B. dothidea* 亲缘关系远, 支持 *B. ribis* 与 *B. dothidea* 为不同种的观点。

关键词: 树木溃疡病, *Botryosphaeria dothidea*, *B. berengeriana*, *B. ribis*, MP 系统进化树

Phylogeny of *Botryosphaeria* species based on ITS-nrDNA sequences

YU Zhong-Dong^{1*} ZHAO Guan-Cheng^{1,2} DAN Jing-Ya^{1,2} REN Zheng-Zheng³

¹College of Forestry, Northwest Agricultural & Forestry University, Yangling 712100, China

²Life College, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

³Science College, Northwest Agricultural & Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: Based on maximum parsimony phylogeny tree of ITS-nrDNA sequences of 22 isolates collected from Shaanxi Province and 40 isolates downloaded from GenBank, *Botryosphaeria* species from China were clustered into two groups: BDGroup1 was composed of *B. dothidea* isolates, and BDGroup2 from Guanzhong region of Shaanxi Province was a distant related group. Cultivation characteristics, conidial size and pathogenicity of the Chinese isolates indicated that pathogens of apple ring rot disease, apple stem dry rot disease, pear ring rot disease and peach gummosis had high homogenous with *B. dothidea*, and they were all

基金项目: 国家科技资源共享平台 (No. 2005DKA21207-7); 国家自然科学基金 (No. 30771734); 陕西省自然科学基金 (No. 陕自 2008C109); 校青年科研基本业务基金

*Corresponding author. E-mail: yu-10083@163.com

收稿日期: 2009-08-07, 接受日期: 2009-12-03

clustered in BDGroup1, supporting the idea that *B. dothidea* and *B. berengeriana* are synonymous. The MP (Maximum parsimony) tree also showed that *B. ribis* was not the synonym species of *B. dothidea*, and *B. ribis* was more homogenous with *B. parva* Pennycook & Samuels. The other *Botryosphaeria* species were also discussed in this paper.

Key words: tree canker disease, *Botryosphaeria dothidea*, *B. berengeriana*, *B. ribis*, MP phylogeny tree

Botryosphaeria Ces. & De Not. 所导致的树木溃疡病是世界范围内发生的重大病害。Smith (1934) 首次报道该菌可侵染包括杨树在内的 20 科 34 属上百种植物, 危害最重的有蔷薇科、胡桃科、棕榈科、忍冬科的植物。吴小芹 (2001) 对 *Botryosphaeria* sp. 在国内外的危害情况研究整理发现, 该菌可侵染 11 个属的针叶树和 40 个属的阔叶树, 可造成树木溃疡、干腐、流脂流胶、枝枯、花果枯萎、果实腐烂等症状。其中, *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. & De Not. 危害的寄主最多, 达 45 个属 (针叶树 5 个属、阔叶树 40 个属)。在我国, 该属真菌对杨树、蔷薇科的苹果、梨、桃等林果木危害严重。

长期以来, *Botryosphaeria* 种间因为形态相似、繁殖体结构不易产生、无性态区别模糊、寄主谱广并存在交叉感染等特征 (Smith 1934; 景耀和刘会香 1987), 而使该属有性型和无性型种的建立相当混乱。迄今该属收录真菌 261 个种名, 被承认的约 20 个种。无性型报道有 8 个属名, 而比较明确的仅 4 个属 (*Fusicoccum* Corda, *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc. 和 *Sphaeropsis* Sacc.) (Alves et al. 2007; Phillips 1998)。我国已报道的有性态种名有 *B. dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. & De Not., *B. berengeriana* de Not., *B. ribis* Grossenb. & Dugg., *B. obtuse* Schwein, *B. lutea* A.J.L. Phillips, *B. parva* Pennycook & Samuels 等, 相关无性型种除 *Neofusicoccum australe* (Slipper, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slipper & A.J.L. Phillips, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. 外, 多以 *Dothiorella gregaria* Sacc. 著称 (景耀和刘会香 1987; 向玉英 1987; 向玉英等 1979)。近年来, 由于分子系统学研究取得的成果, 一些在形态和生物学上模糊的种在分子系统学上得到澄清, 无性型和有性型之间的关系也逐渐被阐明, 如 *B. dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. & De Not. 与 *B. ribis* Grossenb. & Dugg. 被认为是完全不同的两个种, 前者

无性型包括 *Sphaeria dothidea* Moug.:Fr., *Fusicoccum aesculi* Corda, *Phoma flaccida* Viala & Ravaz, *Phoma feniformis* Viala & Ravaz, *Macrophomopsis coronillae* (Desm.) Petrak, *Dothiorella reniformis* (Viala & Ravaz) Petrak & Sydow, *Camarosporium flaccidum* (Viala & Ravaz) Zachos; 后者无性型为 *Neofusicoccum ribis* (Grossenb. & Dugg.) Crous, Slipper & A.J.L. Phillips (Phillips & Lucas 1997; Phillips et al. 1998, 2005, 2007)。自 1985 年后, 更多学者对 *B. dothidea* 的无性型倾向于 *Fusicoccum aesculi* Corda (Pennycook & Samuels 1985; Phillips 2000; Crous & Palm 1999; Crous et al. 2006; 王金利等 2003, 2007), 国内多以 *Dothiorella gregaria* Sacc. 著称 (景耀 1987; 向玉英 1987; 张星耀等 1999)。 *Dothiorella* Sacc. 与 *Fusicoccum* Corda 因分生孢子器在子座中数目、埋生状态和分生孢子大小不同, Crous & Palm (1999) 认为最好将 *Dothiorella* Sacc. 种放在 *Diplodia* Fr. 属中, 其有性型放在 *Dothidotthia* (Shoemaker) M.E. Barr 中。而 Phillip et al. (2005) 对 *Dothiorella* 模式种 *D. pyrenophora* 模式标本的研究发现, *D. pyrenophora* 分生孢子发育的特点明显不同于 *Diplodia* Fr., 而认为应保留 *Dothiorella* Sacc. 这个属名。同年, 对 ITS 序列的系统学分析发现, 所有 *Dothiorella* Sacc. 种均被置在 *Botryosphaeria* 属中, 而并非 *Dothidotthia*, 因此认为 *Dothiorella* 也为 *Botryosphaeria* 无性型之一 (Luque et al. 2005)。

本文对采自我国杨树、苹果、梨、桃、国槐、柳树等植物上的 22 个溃疡病菌株在形态学鉴定的基础上, 进行了 *B. dothidea* 和 *B. berengeriana* 致病性、分生孢子大小测定和核糖体转录间隔区 ITS 序列分析, 并结合 GenBank 公布的 40 个不同种菌株研究了 *Botryosphaeria* 属内不同种在 ITS 区段的分子系统学关系, 以期明晰我国 *Botryosphaeria* 溃疡病菌种类提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种的采集和分离

在陕西省境内采集各种症状类型的溃疡病菌,按常规方法进行分离、培养、转接和贮存(表1),所有无性型种根据形态特征鉴别均以 *Dothiorella gregaria* Sacc.命名,有性型均为 *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.。

1.2 DNA 提取

收集培养物干菌丝, DNA 提取参照张星耀等(1999)。

1.3 引物和反应条件优化

扩增引物采用真菌核糖体基因转录间隔区(ITS)通用引物 ITS₁ 和 ITS₄, 引物序列为: ITS₁: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS₄: 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3'。PCR 反应体系为 50 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 57.3 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10.5min。

1.4 DNA 序列测定和 ITS 序列分析

PCR 产物经纯化后, 送交上海生工生物工程公司进行 DNA 双向测序, 测序引物为 PCR 扩增引物。序列用 Chromas.exe 软件进行修订后提交 GenBank, 并用 BLASTn 进行同源性比较。

1.5 系统发育树的构建

从 GenBank 上搜集相关序列, 并用 Clustalx 1.81 首先将所有序列对齐, 删除缺失位点、残缺位点、非编码序列位点后利用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析, 以自展法(bootstrap)进行检测, 共循环 1,000 次, 构建最大简约树(MP 树, Maximum parsimony tree)和邻接树(NJ 树, Neighbor-joining tree)。系统发育树描述中的简约树长度、一致性指数(Consistency index, CI)、保留指数(Retention index, RI)等由 MEGA 4.0 提供报告, 应用最大似然法(Maximum Composite Likelihood Method)计算遗传距离、菌株间平均遗传距离、序列多样性。用 Tajima-Nei 法检测序列中性突变的稳定性。

1.6 致病性测定

用杨树上分离的溃疡病菌接种红富士苹果, 快速测定 *B. dothidea* 对苹果的致病性。用苹果干腐病

菌 *B. berengeriana* 接种加杨 *Populus canadensis* Moench., 测定致病性, 并进一步比较 *B. dothidea* 与 *B. berengeriana* 在致病性上的差异。

1.7 *B. berengeriana* 与 *B. dothidea* 培养特征和分生孢子大小测定

将菌株接种到 PDA 培养基上 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养, 并观察和比较菌落颜色、气丝、子实体产生大小、分布等, 分生孢子大小为随机观察到的 50 个分生孢子的平均大小。

2 结果与分析

2.1 rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增及测序结果

供试的树木溃疡病菌菌株的 rDNA-ITS 区段直接测序长度为 484—849bp, 平均长度 547bp, 平均 GC 含量 53.4%。测序结果经校对后提交到 GenBank 数据库, 接收序列号见表 1。

2.2 rDNA-ITS 序列聚类分析

缺失位点、非编码序列位点等删除后, 共有 280 个序列位点用于分析。序列经 MEGA4.0 软件构建的 MP 简约树长度(Length)=220, 一致性指数(Consistency index, CI)=0.704762, 总留存指数(Retention index, RI)=0.924205, 总尺度化一致性指数 RCI=0.645308 (for all sites)。全部供试菌株可分为 8 个群, 总遗传距离 0.109, 序列总多样性 0.095323, 群内序列无明显多样性, 群间序列多样性为 0.14748E8, Tajima-Nei 统计值 0.369369 (表 2), 序列中度保守, 进化稳定, 无明显正突变, 自然选择在序列进化中起主要作用。构建的 MP 树与 NJ 树拓扑结构基本一致(图 1)。

从 MP 进化树上可以看出, 所有供试的 *Botryosphaeria* 在 *Leucostoma* 为外群的有根系统树中可以分为 8 个群(图 1), *B. dothidea* 与来自我国(主要是陕西)的树木溃疡病菌分别聚在一起, 总体上可分为 2 个大群: BDGroup1 与 GenBank 上报道的 *B. dothidea* 被聚在一起; BD Group2 菌株全部来自我国关中咸阳, 独立成群, 与 *Botryosphaeria* 属其他种亲缘关系远。来自我国的苹果轮纹病菌、苹果干腐病菌、梨轮纹病菌同 *B. dothidea* 亲缘关系近, 分别被聚在同一个群中, ITS 序列分析支持 *B. dothidea* 与 *B. berengeriana* 为同物异名的观点。

表 1 供试菌株 (含 GenBank 下载菌株)

Table 1 The tested isolates including isolates from GenBank

菌株号	种名	采集地	寄主	接收号
Isolate	Species	Locus	Host	Accession number
NW287	<i>Botryosphaeria berengeriana</i> de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Malus</i> sp.	EU520177
NW299	<i>Botryosphaeria berengeriana</i> de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Malus</i> sp.	EU520101
NW300	<i>Botryosphaeria berengeriana</i> de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Malus</i> sp.	EU520129
NW255	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Salix</i> sp.	EU520053
NW257	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520054
NW259	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus cathayana</i>	EU520150
NW262	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus deltoids</i>	EU520132
NW267	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520055
NW268	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520151
NW269	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus alba</i>	EU520133
NW270	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520175
NW275	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520230
NW281	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.) Ces. & de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Salix</i> sp.	EU520057
NW283	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520233
NW290	<i>Botryosphaeria.dothidea</i> (Moug.) Ces. & de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Pyrus pyrifolia</i>	EU520102
NW339	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.) Ces. & de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Populus cathayana</i>	EU520231
NW353	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.) Ces. & de Not.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520170
NW376	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus tomentosa</i>	EU622248
NW572	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Malus</i> sp.	EU520232
NW630	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Sophora japonica</i>	EU520204
NW666	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Pyrus pyrifolia</i>	EU520126
NW669	<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.	陕西 Shaanxi	<i>Populus</i> sp.	EU520095

表 2 中性理论的 Tajima's 检验

Table 2 Results from Tajima's neutrality test for 64 sequences

m	S	p _s	Θ	π	D
64	112	0.407273	0.086136	0.095323	0.369369

注: m 为序列数 S 为分离位点, p_s 为泊松系数, Θ 为每个座位分离位点数 π 核苷酸多样性, D 为 Tajima 检验值.

Note: m = number of sequences, S = number of segregating sites, p_s = S/m, Θ = p_s/a₁, and π = nucleotide diversity. D is the Tajima test statistic.

M-O-Q 群为复合种群, 包含了 *B. mamane* D.E. Gardner 与 *B. rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx、*B. quercuum* sensu Dingley、*B. obtuse* (Schwein.) Shoemaker、*B. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.

等种, 且各自单独聚为 1 个亚群, 显示种间密切的亲缘关系和独立的进化特征。R-P 群包含了 *B. ribis* 与 *B. parva*, 该结果显示: *B. ribis* 与 *B. parva* 亲缘关系近, 而与 *B. dothidea* 亲缘关系远。S-I-P 群包含了 *B. samentorum* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque、*B. iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves、*B. protearum* (Wakef.) Denman & Crous。L-A 群包含 *B. laricina* (Wehm.) Arx & E. Müll.、*B. australis* (Cooke) Petr. BL 群包含 *B. lutea* A.J.L. Phillips, 为单独的一个发育种, *Neofusicoccum australe* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips 为其无性型之一。*B. vaccinei* (Shear) M.E. Barr 单独聚为一群。

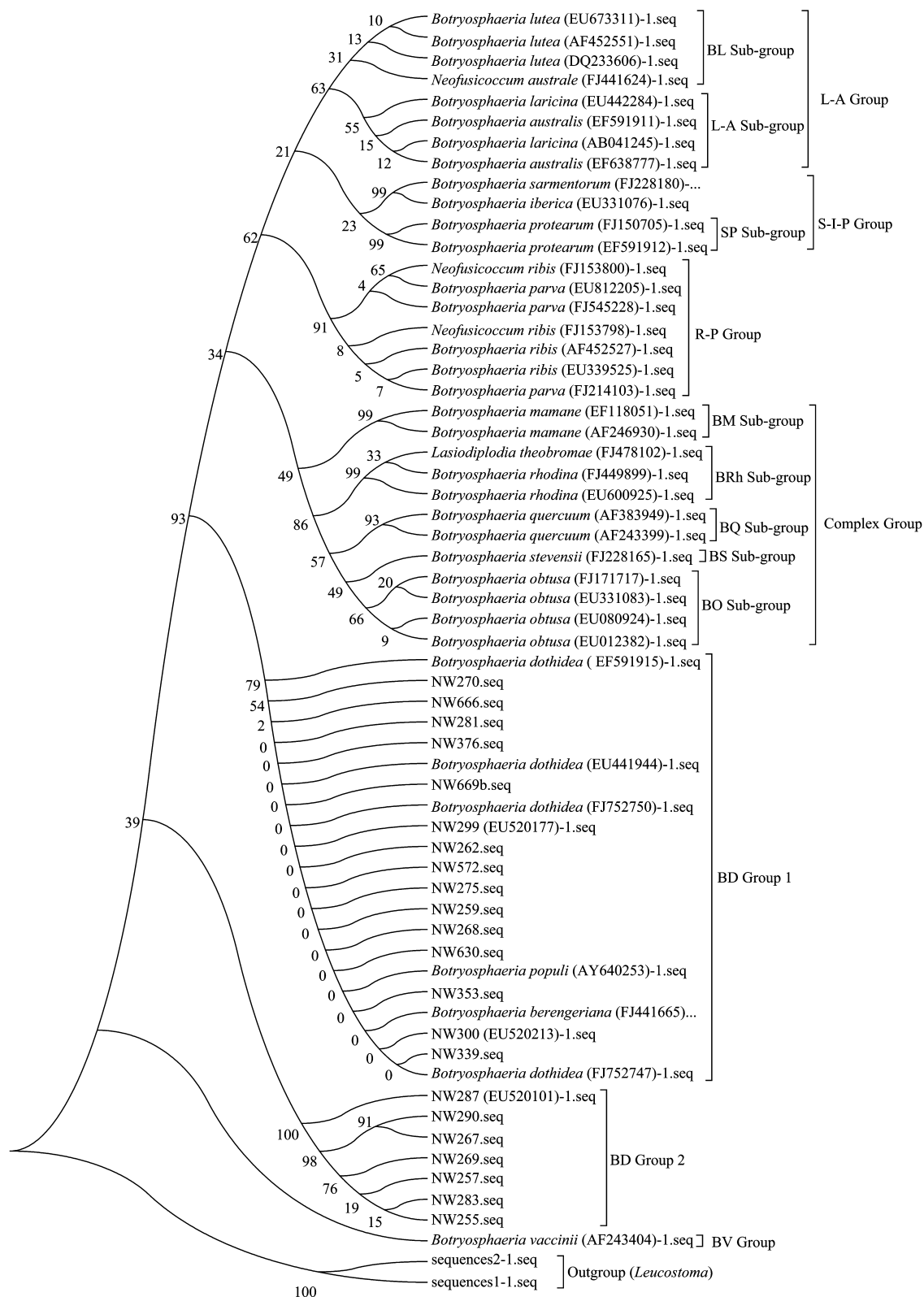


图 1 *Botryosphaeria* MP 系统进化树

Fig. 1 Maximum parsimony phylogeny tree of *Botryosphaeria*.

2.3 致病性测定

人工接种实验表明，分离自杨树上的 *B. dothidea* (NW257) 对苹果果实同样有很强的致病性，接种 18h 后，供试的苹果均发病（图 3）。用苹果轮纹病菌 (NW299) 接种加杨，15d 后均发病（图 4）。该结果表明，*B. dothidea* 与 *B. berengeriana* 在杨树及苹果上具有相同的致病性，在关中地区，苹果与杨树大量混植的地方，会加速该病的发生与流行状态。

2.4 培养特征及分生孢子大小

杨树溃疡病菌和苹果轮纹病菌在 PDA 上生长特征无明显差异，二者均不易产生子实体结构，初

期菌落均为白色，边缘菌丝粗状辐射式生长，中后期菌落中央变橄榄色，后期变褐色。气生菌丝均发达，但前者气丝灰白色，多呈蜂窝状或珊瑚状，多分布于培养皿中央，高度接近培养皿上盖。后者气丝白灰色，棉絮状，分布整个培养皿，高度绝不达到培养皿上盖。

对部分代表菌株成熟的分生孢子测定结果表明：*B. dothidea* 分生孢子多梭形，基部平截，平均大小：27.4×6.5μm，L/B 为 4.3；苹果轮纹病菌分生孢子棒状，基部突圆或稍平截，平均大小：25.7×7.0μm，L/B 为 3.7（表 3，图 3）。二者测量数值重叠，大小无显著区别，后者稍胖些。

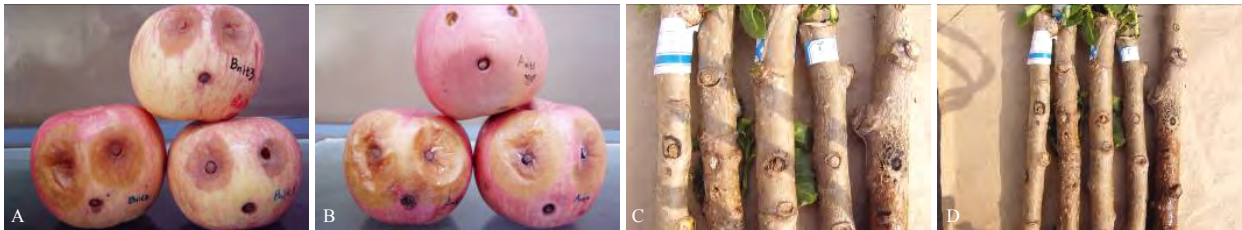


图 2 杨树溃疡病菌和苹果干腐病菌的交叉接种 A, B: 杨树溃疡病菌接种的红富士苹果，示 2 个发病接种孔和 1 个对照；C, D: 苹果轮纹病菌接种加杨，示发病枝条。

Fig. 2 Cross inoculation using pathogens isolated from apple rot canker and poplar canker. A and B: Symptoms of apple rot canker (‘Fuji’) showing 2 inoculated sites and 1 contrast; C and D: Symptoms of *Populus canadensis* canker showing inoculated holes on the branches.

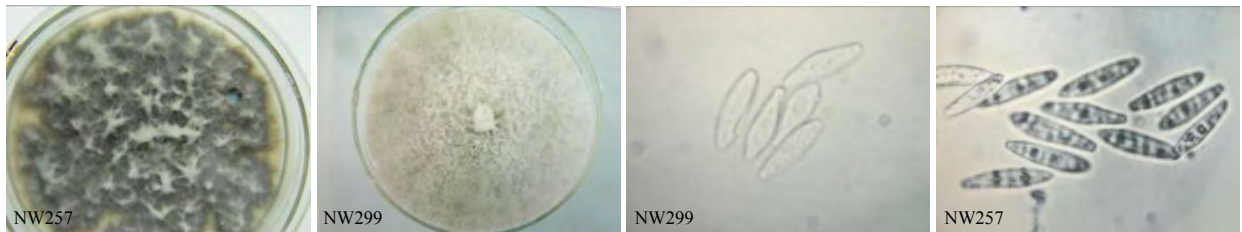


图 3 *Botryosphaeria dothidea* (NW257) 与 *B. berengeriana* (NW299) 的培养特征及分生孢子形态（600×）

Fig. 3 Characteristic of conidia and clone of *Botryosphaeria dothidea* and *B. berengeriana*, showing aerial hyphae distributed in the Petri-dish and morphological characteristic of matured conidia (600×).

表 3 分生孢子长宽比

Table 3 Length and breadth rate of conidia

菌株 Isolate	<i>Botryosphaeria dothidea</i>		菌株 Isolate	<i>Botryosphaeria berengeriana</i>	
	分生孢子大小（长×宽）	分生孢子长宽比		分生孢子大小（长×宽）	分生孢子长宽比
	Conidial size (length×breadth)	Length/ breadth of conidia		Conidial size (length×breadth)	Length/breadth of conidia
NW257	21.5×6.4μm	3.36	NW299	26.6×7.6μm	3.62
NW255	28.0×6.4μm	4.38	NW219	25.1×7.1μm	3.53
NW630	30.6×7.6μm	4.03	NW287	24.3×6.9μm	3.52
NW281	27.9×6.3μm	4.43	NW300	23.6×7.2μm	3.28
NW262	29.1×5.6μm	5.19	NW290	29.1×6.2μm	4.69
平均 Average	27.42±2.37×6.46±0.45μm	4.27±0.47		25.74±1.69×7.0±0.36μm	3.72±0.38

3 讨论

1911年,由 Crossenbacher 和 Duggar 从醋栗枝蔓分离并定名 *B. ribis*, 并发现该菌能引起醋栗、忍冬等植物的溃疡病。随后 Putterill (1919) 和 Fenner (1925) 分别发现该菌能侵染苹果树的枝干和果实 (Ainsworth 1961)。Arx & Muller (1954) 认为 *B. ribis* 与 *B. dothidea* 为同物异名, 并被广泛接受。但在 1975, 他们对双囊壁子囊菌进行再研究时发现, *B. ribis* 与 *B. dothidea* 不同, *B. ribis* 应是 *B. berengeriana* De Not. 的同物异名 (Pennycook & Samuels 1985)。自此以后, 苹果干腐病菌、苹果轮纹病菌、梨轮纹病菌均以 *B. berengeriana* 命名。由于在致病性上存在差异, 轮纹病菌后以 *B. berengeriana* f. sp. *piricola* 命名并被沿用至今 (陈策 1999; 牟惠芳等 1989)。从 ITS 序列系统进化树来看, *B. ribis* 与 *B. dothidea* 为不同的两个种, 被分别聚在不同的群中, 该结果支持 Arx & Muller (1975) 的观点。来自我国的杨树溃疡病菌、苹果树轮纹病菌、干腐病菌、梨树轮纹病菌在整体上可分为 2 个群, 均与 *B. dothidea* 群亲缘关系近。群 1 还包含了 GenBank 上公布的 3 个 *B. dothidea* 菌株和来自杨树上的 *B. populi*。来自桃树上的 *Botryosphaeria berengeriana* 也被聚在同一群中, 表明 *B. dothidea* 与 *B. berengeriana* 亲缘关系近, 支持 Sutton (1980) 认为 *B. dothidea* 与 *B. berengeriana* 为同物异名的观点。该结果还显示 *B. populi* 与 *B. dothidea* 可能为同物异名。我国对杨树溃疡病菌的定名 *B. ribis* 与 *B. dothidea* 均有, 向玉英 (1979) 认为二者为同物异名并沿用至今。从相关资料看来, 杨树溃疡病菌以 *B. dothidea* 更合适。

本研究中 *B. ribis* 与 *B. parva* 亲缘关系近, 被聚在同一群中, 与 Smith (2001) 采用 RAPD 技术分析结果类似, 但 Zhou *et al.* (2001) 用 ISSR 技术分析显示, 尽管 *B. ribis* 与 *B. parva* 有很高的亲缘关系, 但二者仍可区别, 为不同的两个种。ITS 系统进化树还显示: *B. dothidea* 与 *B. quercuum* 亲缘关系远, 并非同一个种, 不支持 Theissen & Sydow (1915) 的观点。 *B. obtusa* 为一个单独的种, 与 *B. stevensii* 亲缘关系近。本研究中, *B. stevensii* 并未显示复合种的特征 (Zhou & Stanosz 2001)。

Britton & Hendrix (1986) 连续 2 年对桃树流胶溃疡病的研究发现, *B. dothidea*, *B. obtusa*, *B. rhodina* 在溃疡病斑处有规律出现, 但未发现 *B. berengeriana*。Britton & Hendrix (1986, 1989), Stevens (1926), Weaver (1974, 1979), Pusey (1989, 1993), Biggs & Britton (1988), Okie & Reilly (1983) 等都认为桃树流胶溃疡病主要由 *B. dothidea* 引起, *B. obtusa* 与 *B. rhodina* 致病性弱或不致病。我国有学者认为桃树流胶溃疡病为 *B. berengeriana*, 用 RAPD 技术对苹果轮纹、干腐等病菌分析后发现, *B. berengeriana* 与苹果干腐病菌、山楂轮纹病菌关系近而聚在一群, 而另一群则包含了苹果轮纹病菌和梨轮纹病菌 (黄春燕和刘开启 2001)。

在致病性上, 大多数 *Botryosphaeria* 种真菌似乎都显示出广泛的寄主谱, 相互间存在交叉感染。杨树溃疡病菌接种苹果、桃、梨等蔷薇科植物也可引起典型的溃疡病症, 而苹果干腐病菌接种部分杨树种也形成典型的溃疡症状 (余仲东和高爱琴 2004; 余仲东等 2006)。尽管在培养生物学特征和分生孢子长/宽 (L/B) 存在一些差别, 但通常还不足以从形态上明显地区分它们, *B. berengeriana* 与 *B. dothidea* 存在高度的亲缘关系。

ITS 序列虽然广泛用于真菌系统学分析中, 但在遗传变异性上, ITS 还是中等保守的, 不能充分显示种间细微差别, *Botryosphaeria* 种间关系尚需多基因的联合分析。本研究中, ITS 序列总多样性 0.095323, 群内序列无明显多样性, 群间序列多样性为 0.14748E8, 接近于 0, Tajima-Nei 统计值 0.0369369, 序列中度保守, 进化稳定, 无明显正突变, 自然选择在序列进化中起主要作用。

[REFERENCES]

- Ainsworth GC, 1961. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 5th Edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 1-547
- Alves A, Phillips AJL, Henriques I, Correia A, 2007. Rapid identification of *Botryosphaeria* species by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology*, 158: 112-121
- Arx JA von, Muller E Die, 1954. Gattungen der amerosporen Oyrenomyceten. *Beitrage zur Kryptogamenflora der Schweiz*,

- 11(1): 1-434
- Arx JA von, Müller EA, 1975. Re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. *Studies in Mycology*, 9: 1-159
- Biggs AR, Britton KO, 1988. Presymptom histopathology of peach tree inoculated with *Botryosphaeria obtusa* and *B. dothidea*. *Phytopathology*, 73: 1109-1118
- Britton KO, Hendrix FF, 1989. Infection of peach buds by *Botryosphaeria obtusa*. *Plant Disease*, 73: 65-68
- Britton KO, Hendrix FF, 1986. Population dynamic of *Botryosphaeria* spp. in peach gummosis cankers. *Plant Disease*, 70(2): 134-136
- Cheng C, 1999. Research progresses of apple fruit canker. *Acta Phytopathologica Sinica*, 19(3): 193-198 (in Chinese)
- Crous PW, Palm ME, 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia*, 51(2): 167-175
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ, 2006. Resolving phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55: 235-253
- Fenner EA, 1925. A rot of apples caused by *Botryosphaeria ribis*. *Phytopathology*, 15: 230-234
- Huang CY, Liu KQ, 2001. RAPD analysis of the pathogenic fungi of apple ring rot and other major related diseases. *Acta Phytopathologica Sinica*, 31(2): 164-169 (in Chinese)
- Jing Y, Liu H, 1987. Intercross inoculation of poplar canker pathogen and walnut tree canker pathogen. *Letter of Forest Pest and Disease*, 2: 4-9 (in Chinese)
- Luque J, Martos S, Phillips AJL, 2005. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with a *Dothiorella* anamorph. *Mycologia*, 97: 1111-1121
- Mu HF, Liu H, Liu JK, 1989. The pathogen sources of ring rot of apple. *Acta Phytopathologica Sinica*, 19(3): 160-165 (in Chinese)
- Okie WR, Reilly CC, 1983. Reaction of peach and nectarine cultivars and selections to infection by *Botryosphaeria dothidea*. *Journal of American Society Horticulture Science*, 108(2): 176-179
- Pennycook SR, Samuels GJ, 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon*, 24: 445-458
- Phillips AJL, 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriosis and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology*, 146: 327-332
- Phillips AJL, 2000. *Botryosphaeria populi* sp. nov. and its anamorph *Fusicoccum populi* sp. nov. on poplar trees in Portugal. *Mycotaxon*, 76: 135-140
- Phillips AJL, Alves A, Correia A, Luque J, 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, one-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97: 513-529
- Phillips AJL, Crous P, Alves A, 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria obtuse*". *Fungal Diversity*, 25: 141-155
- Phillips AJL, Lucas MT, 1997. The taxonomic status of *Macrophoma flaccida* and *Macrophoma reniformis* and their relationship to *Botryosphaeria dothidea*. *Sydowia*, 49: 150-159
- Pusey PL, 1989. Influence of water stress on susceptibility of nonwounded peach bark to *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 73: 1000-1003
- Pusey PL, 1993. Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. *Plant Disease*, 77: 170-174
- Putterill VA, 1919. A new apple tree canker. *South African Journal of Science*, 16: 258-271
- Smith CO, 1934. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*. *Journal of Agriculture Research*, 49: 467-476
- Stevens NE, 1926. Occurrence of the current cane blight fungus on numerous hosts in the southern states. *Mycologia*, 18: 278-282
- Sutton BC, 1980. The *Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 1-696
- Sutton TB, Boyne JV, 1983. Inoculums availability and pathogenic variation in *Botryosphaeria dothidea* in apple production areas of North Carolina. *Plant Disease*, 67: 503-506
- Theissen F, Sydow H, 1915. Die *Dothideales* Kritisch-systematische originaluntersuchungen. *Annales Mycologici*, 13: 149-746
- Wang JL, He W, Qin GF, Tao WQ, Zhao J, Tian SM, 2007. Study on the anamorph and species of *Botryosphaeria*, the important pathogen of tree's canker. *Forestry Research*, 1: 21-28 (in Chinese)
- Wang JL, Qin GF, He W, Zhao J, Song YS, 2003. Research progress on taxonomy and phylogeny of *Botryosphaeria* and related fungi. *Forest Pest and Disease*, 22(3): 32-36 (in Chinese)
- Weaver DJ, 1974. Gummosis disease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*, 64: 1429-1432

- Weaver DJ, 1979. Role of conidia of *Botryosphaeria dothidea* in the natural spread of peach tree gummosis. *Phytopathology*, 69: 330-334
- Wu XQ, He YQ, Liu ZH, 2001. Occurrence and progress on tree cankers caused by *Botryosphaeria* spp. *Journal of Nanjing Forestry University*, 25(1): 61-66 (in Chinese)
- Xiang YY, 1987. Poplar disease and management. Chinese Forestry Publishing House, Beijing. 1-109 (in Chinese)
- Xiang YY, Hua XM, Zhao JZ, 1979. Identification of poplar canker pathogen. *Acta Microbiologica Sinica*, 19(1): 57-63 (in Chinese)
- Yu ZD, Gao AQ, 2004. Pathogenicity of *Dothiorella gregaria* to Rosaceae and other host trees. *Forest Pest and Disease*, 4: 21-23 (in Chinese)
- Yu ZD, Liu LL, Cao ZM, Zhang XY, 2006. Study on heterokaryotic phenomenon of poplar canker pathogen. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(5): 142-144 (in Chinese)
- Zhang XY, Zhao SG, Piao CG, LV Q, Jia XZ, 1999. Molecular genetic diversity of pathogenic fungal group causing tree canker I—Evidence of taxa *Dothiorella*, *Dothichiza*, *Cytospora* and *Coniothyrium* in molecular level. *Scientia Silvae Sinica*, 35(3): 34-40 (in Chinese)
- Zhou SG, Smith DR, Stanosz GR, 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research*, 105(8): 919-926
- Zhou SG, Stanosz GR, 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analysis of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia*, 93: 516-527
- [附中文参考文献]
- 陈策, 1999. 苹果果实轮纹病研究进展. 植物病理学报, 19(3): 193-198
- 黄春燕, 刘开启, 2001. 苹果轮纹病及相关病害病菌的RAPD分析. 植物病理学报, 31(2): 164-169
- 景耀, 刘会香, 1987. 杨树和核桃溃疡病菌的交叉接种试验. 森林病虫害通讯, 2: 4-9
- 牟惠芳, 刘晖, 刘家魁, 1989. 苹果轮纹病感染来源的调查. 植物病理学报, 19(3): 160-165
- 王金利, 贺伟, 秦国夫, 陶万强, 赵俊, 田淑敏, 2007. 树木溃疡病重要病原葡萄座腔菌属、种及其无性型研究. 林业科学研究, 1: 21-28
- 王金利, 秦国夫, 贺伟, 赵俊, 宋双玉, 2003. 葡萄座腔菌属及其相关真菌的系统学研究进展. 中国森林病虫, 22(3): 32-36
- 吴小芹, 何月秋, 刘忠华, 2001. 葡萄座腔菌属所致树木溃疡病发生与研究. 南京林业大学学报, 25(1): 61-66
- 向玉英, 花晓梅, 赵经周, 1979. 杨树水泡性溃疡病的病原鉴定. 微生物学报, 19(1): 57-63
- 向玉英, 1987. 杨树病害及其防治. 北京: 中国林业出版社. 1-109
- 余仲东, 高爱琴, 2004. *Dothiorella gregaria* 对蔷薇科等寄主致病性测定. 中国森林病虫, 4: 21-23
- 余仲东, 刘莉丽, 曹支敏, 张星耀, 2006. 杨树溃疡病菌异核体现象的研究. 林业科学, 42(5): 142-144
- 张星耀, 赵仕光, 朴春根, 吕全, 贾秀贞, 1999. 树木溃疡病病原真菌类群分子遗传多样性研究I——小穴壳属、疣壳孢属、壳囊孢属、盾壳霉属分类地位的分子证明. 林业科学, 35(3): 34-40