

台湾省苹果上牛眼果腐病菌的截获鉴定

张慧丽 李雪莲 段丽君 徐 瑛 陈先锋 段维军*

(宁波检验检疫科学技术研究院, 浙江 宁波 315012)

摘要: 为明确从宁波空港口岸入境旅客携带苹果上截获的1株明孢盘菌属菌株60017的分类地位, 通过形态学特征观察、内转录间隔区(ITS)和 β -微管蛋白基因(β -tubulin)序列比对分析以及致病性测定, 对该菌株进行了种类鉴定。结果表明: 菌株60017在PDA培养基上的菌落为圆形, 边缘整齐, 呈乳白色, 气生菌丝较少, 可产生大量分生孢子; 基于ITS和 β -tubulin序列构建的系统发育树中, 菌株60017和苹果牛眼果腐病菌 *Neofabraea kienholzii* 处于同一分支; 菌株60017接种苹果后, 在接种部位能引起褐腐症状, 与原发病症状一致。结合形态学特征、致病性测定结果以及分子鉴定结果, 最终将该菌株鉴定为苹果牛眼果腐病菌 *N. kienholzii*。

关键词: 苹果牛眼果腐病菌; 形态观察; 序列分析; 致病性测定; 检测鉴定

Isolation and identification of *Neofabraea kienholzii* on *Malus pumila* imported from Taiwan Province

Zhang Huili Li Xuelian Duan Lijun Xu Ying Chen Xianfeng Duan Weijun*

(Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, Zhejiang Province, China)

Abstract: To identify the fungal strain 60017 isolated from the apple imported from Taiwan Province of China, the morphological observation, sequence analysis and pathogenicity test were carried out. The morphological results showed that the colony of the strain 60017 on PDA medium was round, with neat edges, milky white, less aerial hyphae, and could produce a large number of conidia. Its rDNA ITS and β -tubulin sequences were sequenced. Analysis of these sequences with the related sequences in NCBI showed that the strain 60017 clustered into *Neofabraea kienholzii* clade. The pathogenicity test showed that the strain 60017 could infect apple fruit with the symptoms of brown rot. These results indicated that the fungal strain 60017 was *N. kienholzii*.

Key words: *Neofabraea kienholzii*; morphological characteristics; sequence analysis; pathogenicity; detection

近年来,随着经济全球化的发展,我国对外交流日趋密切,2016年中国出境旅游市场达到1.22亿人次(中国旅游研究院,2017),随着入境游客人次的增长,携带禁止进境物的数量同步增长,外来有害生物入侵压力也急剧上升(林盛才等,2009),而水果是入境旅客携带的最主要禁止进境物(金亦民等,2012)。同时,中国是世界上最大的苹果生产国和消费国,苹

果种植面积和产量均占世界总量的40%以上,在世界苹果产业中占有重要地位(农业部,2010)。2016年我国苹果种植面积为246.7万 hm^2 ,总产量为3 405万t(国家苹果产业技术体系首席科学家办公室,2017)。苹果产业飞速发展,已经成为主产区农村经济的支柱产业,在出口创汇、农业产业结构调整及增加农民收入等方面发挥了非常重要的作用(刘峰,2010)。

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFF0203201),国家质检总局科研项目(2017IK059),宁波市科技创新团队(2015C110018)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: weijunduan@tom.com

收稿日期: 2018-11-19

苹果牛眼果腐病菌 *Neofabraea kienholzii* 于2001年在葡萄牙被首次报道(de Jong et al., 2001), 目前在美国(Henriquez et al., 2004; Spotts et al., 2009)、澳大利亚(Cunnington, 2004)、波兰(Michal-ecka et al., 2016)、荷兰(Wenneker et al., 2017)、捷克共和国(Pešicová et al., 2017)及英国(Kingsnorth et al., 2017)均有发生。*N. kienholzii*引起的病害是苹果上一种重要的采收后病害,Aguilar et al.(2018)报道在富士苹果果实采收前2周接种该病菌,采收后果实发病率高达88%。*N. kienholzii*可以侵染富士、金冠、金星、IDARE、梅罗斯、Ru'In、红玉和黄玉等许多重要苹果品种(Pešicová et al., 2017; Aguilar et al., 2018)。而富士是我国苹果栽植面积最大的优势品种,其产量占全国苹果总产量的70%(农业部, 2010)。尽管目前*N. kienholzii*在我国尚未发生,但是一旦入侵将会给苹果等相关水果产业造成重大的经济损失。

2017年4月,宁波空港口岸检疫监管人员从台湾省旅客携带的苹果中发现腐烂病果,为明确其病原菌,本研究通过对病原菌进行分离纯化、形态特征观察、核酸序列比对分析和致病性测定,结合以上试验结果对该病原菌进行鉴定,以期口岸外来有害生物防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样:苹果病样为宁波空港口岸检疫机构送检台湾省旅客携带的苹果,品种不详。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,马铃薯切块加水煮沸20 min后纱布过滤,加蒸馏水定容至1 000 mL,用于病菌分离、纯化和保存;燕麦琼脂(oatmeal agar, OA)培养基:燕麦片30 g、琼脂粉20 g,加蒸馏水定容至1 000 mL;麦芽汁(malt extract agar, MEA)培养基:麦芽浸膏30 g、大豆蛋白胨3 g、琼脂15 g,加蒸馏水定容至1 000 mL。上述培养基灭菌后制备平板,用于病菌形态学特征观察(方中达, 1998)。

试剂及仪器:LabServ Plant DNA Kit 核酸提取试剂盒,美国 Thermo Fisher 公司;Taq DNA 聚合酶、MgCl₂、10×PCR Buffer、DL2000 Marker、DNA 片段纯化试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。Imager Z1 显微镜数码成像系统、Discovery V12 解剖镜及其成像系统,德国 Zeiss 公

司;Friocell 222 生化培养箱,德国 3M 公司;Kingfisher 核酸自动化提取仪、Thermo Scientific Multiskan GO 生物分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司;TPProfessional Basic PCR 仪,德国 Biometra 公司;PowerPac Basic 电泳设备、GelDocEQ 型凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化及形态学鉴定

用70%酒精对送检苹果上的病斑进行表面消毒,用解剖刀切去表皮后,取病健交界处的组织,大小为5 mm×5 mm,置于PDA平板上25℃下培养观察,待长出菌落后挑取边缘菌丝纯化,纯化后菌株编号为60017。观察病原菌在PDA、OA和MEA平板上的菌落形态,并在Zeiss Imager Z1显微镜数码成像系统上观察OA培养基上病原菌的分生孢子梗和分生孢子形态,共观察5个视野,测量30个分生孢子的大小。

1.2.2 病原菌的分子生物学鉴定

用灭菌枪头刮取PDA平板上培养7 d的菌株60017菌丝体,按照LabServ Plant DNA Kit 核酸提取试剂盒使用说明书,在核酸自动化提取仪上进行基因组DNA提取。提取DNA后经分光光度计检测浓度,于-20℃保存备用。利用所提取的菌株60017基因组DNA,采用ITS通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(White et al., 1990)和β-tubulin引物Bt-T2m-Up(5'-CAACTGGGCTAAGGGTCATT-3')/Bt-LVL-Lo(5'-GTGAACTCCATCTCGTCCATA-3')对其进行PCR扩增(de Jong et al., 2001),引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,确认扩增成功后,按照DNA片段纯化试剂盒说明书进行纯化。纯化产物由上海华大基因科技有限公司进行双向测序。所得序列与GenBank中核酸数据进行BLAST比对,用ClustalX1.8.3软件聚类分析后,利用MEGA 6.0软件选用Kimura2-parameter距离模型以邻接法构建系统发育树,以樟无柄盘菌 *Pezicula cinnamomea* 和苹果树溃疡病菌 *Pezicula corticola* 作为外群,发育树用自展分析法进行检验,共循环1 000次。

1.2.3 病原菌的致病性测定

自宁波市本地市场购得10个健康无病苹果,品种为红富士,用70%酒精表面消毒后,在其表面用无菌刀片划出宽1 cm左右的浅伤痕,将PDA平板上培养好的菌株60017菌丝块接种到伤口上,用脱脂

棉蘸无菌水保湿,苹果装入保鲜袋内置于25℃生化培养箱中培养,以PDA平板处理为对照。观察接种苹果的发病情况。发病后对发病部位再次进行病原菌的分离和鉴定。

2 结果与分析

2.1 送检苹果上的发病症状

从送检苹果样品中观察发现腐烂病果,果实蒂部腐烂,病斑圆形,褐色,病斑上着生乳白色霉层,切开后呈深褐色(图1),与苹果牛眼果腐病症状相似。

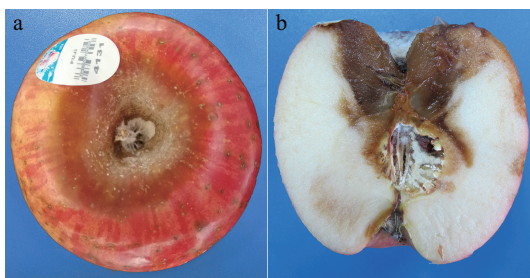


图1 台湾省苹果上牛眼果腐病症状

Fig. 1 Symptoms on the apple fruit imported from Taiwan

Province caused by *Neofabraea kienholzii*

a: 外部症状; b: 内部症状。a: External symptom; b: internal symptom.

2.2 病原菌的形态特征

病原菌在PDA培养基上分离培养4 d后,菌落为乳白色,呈圆形,边缘较整齐(图2-a)。12 d后,菌落颜色逐渐加深(图2-b),培养基背面菌落颜色呈橄榄色(图2-c)。

病原菌在不同培养基上生长形成的菌落形态变化较大。其中,在PDA培养基上气生菌丝较少,疏松,呈放射状,菌落边缘为浅褐色,不整齐(图2-d);在MEA培养基上缺乏气生菌丝,在接种的菌丝块上有白色菌丝,菌落表面光滑或蜡质,边缘皱缩(图2-e);在OA培养基上气生菌丝较多,菌落边缘整齐,有明显的轮纹(图2-f)。

菌株60017在3种培养基上均可产生小型分生孢子和大型分生孢子。在OA培养基上,大型分生孢子呈长椭圆形,大多直,个别稍弯曲,大小为 $12\sim 14\ \mu\text{m}\times 2.5\sim 3.5\ \mu\text{m}$;小型分生孢子呈长椭圆形,大小为 $4\sim 6\ \mu\text{m}\times 1.5\sim 2.5\ \mu\text{m}$ (图3-a)。分生孢子梗无明显的特征,在圆柱形菌丝末端产生瓶梗或在梗基侧对生或轮生瓶梗;产孢细胞顶生或间生;顶生瓶梗圆筒状,顶端圆锥形,直或弯(图3-b~c)。

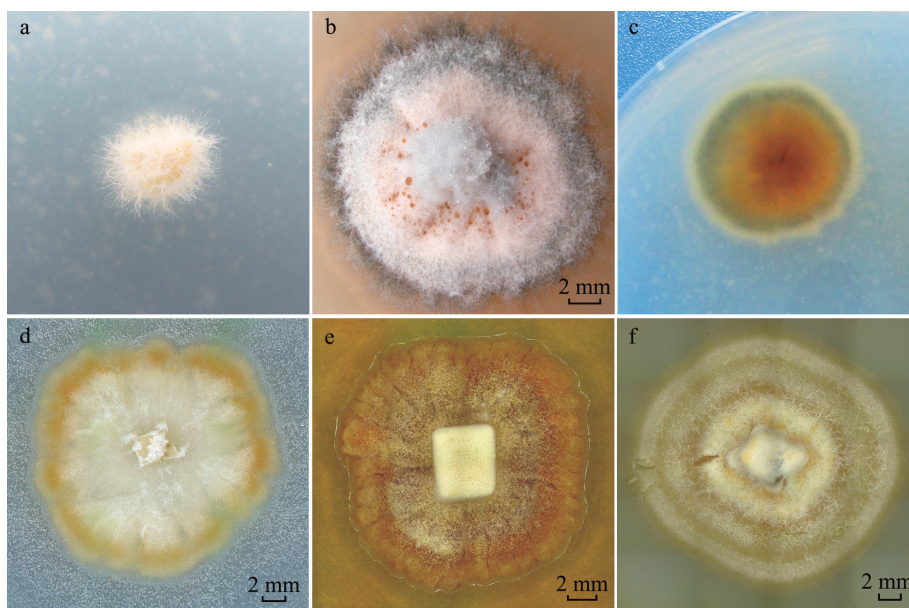


图2 菌株60017在不同培养基上的菌落形态

Fig. 2 The morphological characterization of strain 60017 on different media

a~d: 分别为菌株60017在PDA培养基上培养4 d(正面)、12 d(正面)、12 d(反面)、21 d(正面)的菌落形态; e: 菌株60017在MEA培养基上培养21 d的菌落正面形态; f: 菌株60017在OA培养基上培养21 d的菌落正面形态。a~d: Morphological characterization of strain 60017 on PDA medium for 4 d (front), 12 d (reverse), 12 d (reverse), 21 d (front), respectively; e: morphological characterization of strain 60017 on MEA medium for 21 d (front); f: morphological characterization of strain 60017 on OA medium for 21 d (front).

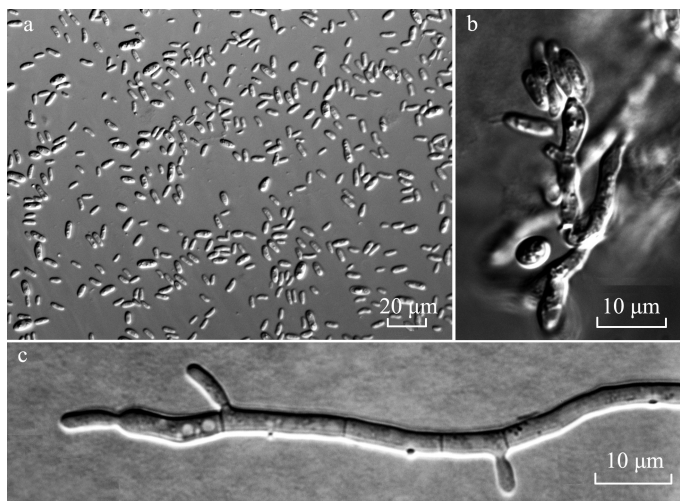


图3 菌株60017在OA培养基上的形态特征

Fig. 3 The morphological characterization of the strain 60017 on OA medium

a: 分生孢子; b~c: 产孢细胞。a: The conidia; b~c: the conidiogenous cell.

2.3 病原菌的分子生物学鉴定结果

通用引物 ITS1/ITS4 的扩增产物经过纯化、测序后得到长度为 530 bp 的 ITS 序列,与 GenBank 中相关 ITS 序列进行 BLAST 比对,结果表明测得 ITS 序列与已报道的 3 株 *N. kienholzii* 菌株的 ITS 序列 (KR859083、KR859082、KX424942) 的同源性最高,达 99%。引物 Bt-T2m-Up/Bt-LVL-Lo 扩增得到的 β -tubulin 序列长度为 955 bp,与 GenBank 中相关

β -tubulin 序列进行 BLAST 比对,结果表明测得 β -tubulin 序列与已报道的 3 株 *N. kienholzii* 菌株的 β -tubulin 序列 (KR866107、KR859289、KR859288) 的同源性达 100%,其中登录号为 KR859288 的是苹果牛眼果腐病菌 *N. kienholzii* 模式标本分离物 CBS126461 的 β -tubulin 序列。系统发育树显示,菌株 60017 与其它苹果牛眼果腐病菌 *N. kienholzii* 分离物聚在同一个分支(图4)。

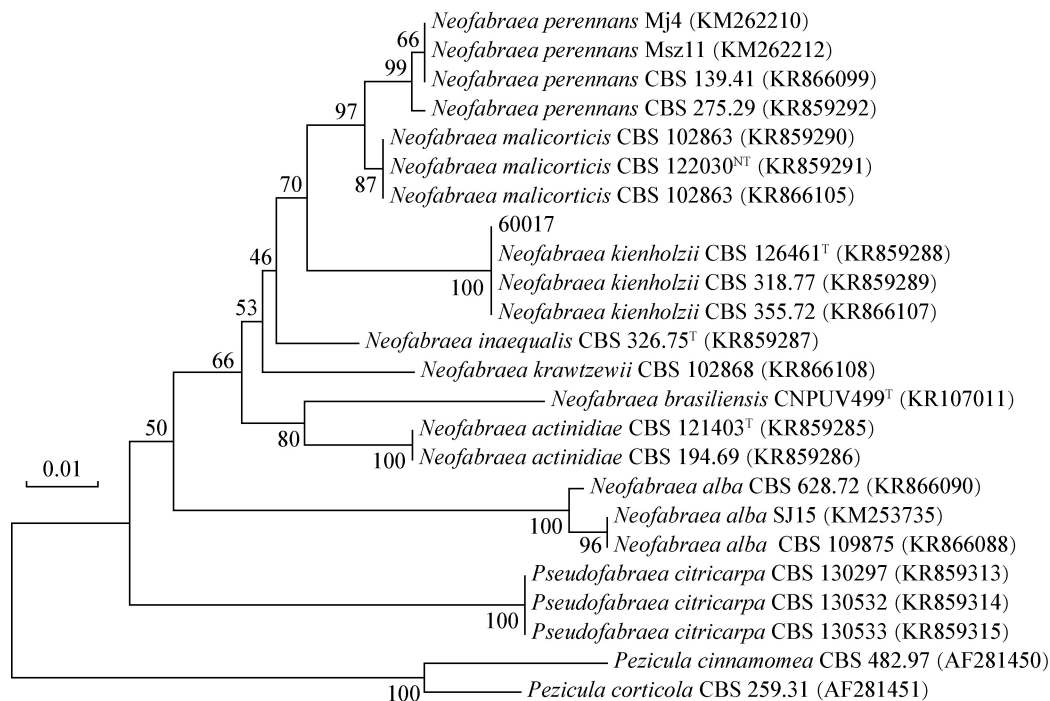


图4 基于 β -tubulin 基因序列构建菌株60017及其相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain 60017 and other related strains based on β -tubulin sequences by using neighbor-joining method

^T和^{NT}表示模式标本分离物和新模式标本分离物。^T and ^{NT} indicate ex-type and ex-neotype strains.

2.4 病原菌的致病性

供试苹果接种菌株 60017 后 8 d, 接种部位开始出现褐腐症状, 中心浅褐色, 边缘深褐色 (图 5-a), 随着时间的延长, 病斑逐渐扩大、深入, 对照无症状 (图 5-b)。对苹果发病部位进行病菌再分离, 通过形态学观察和 ITS 序列分析发现得到的分离物与接种病菌特征完全一致。致病性测定结果表明, 该菌株可以侵染苹果果实。

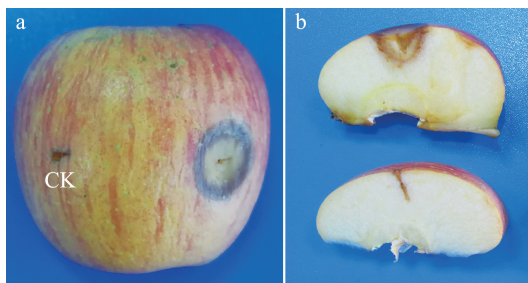


图5 菌株 60017 在苹果果实上的致病性测定

Fig. 5 Pathogenicity test of strain 60017 on apple fruit

a: 外部症状; b: 内部症状 (上为接种, 下为对照)。a: External symptoms; b: internal symptoms (above is the inoculation, and below is the control).

3 讨论

苹果牛眼果腐病是苹果上的危险病害, 主要由明孢盘菌属 *Neofabraea* spp. 的 4 个种引起, 分别是 *N. alba*、*N. malicorticis*、*N. perennans* 和 *N. kienholzii*, Johnston et al. (2014) 建议应该将 *N. vagabunda* (Desm.) P. R. Johnst 作为 *N. alba* 的正确名称, 这 4 种病原菌是我国进境植物检疫性有害生物或进境水果上关注的有害生物 (林惠娇等, 2016)。这 4 种病菌在梨和苹果果实上都能引起呈牛眼状的果实腐烂症状, 但在梨树和苹果树上的症状却有所不同, 很少产生溃疡 (Spotts et al., 2009)。这 4 种苹果牛眼果腐病菌近年来在美国等国家频繁发生, 造成严重的经济损失, 随入境水果传入我国的风险极高。为防范其入侵, 我国口岸加强了对苹果牛眼果腐病菌的检测。截至到目前, 我国广东、上海、辽宁、天津、江苏、深圳、宁波等口岸均已截获苹果牛眼果腐病菌。如广东口岸从进境美国苹果上截获了 *N. malicorticis* 和 *N. perennans* (王卫芳等, 2010), 天津口岸从进境智利嘎拉苹果上截获 *N. alba* (张裕君等, 2012), 上海口岸从进境美国苹果上截获 *N. kienholzii* (张露茜等, 2016)。

明孢盘菌属内真菌种间形态差异较小, 在人工

培养条件下并不明显, 且种内形态特征变化较大, 这给该属真菌种类鉴定带来了巨大的困难 (Cunnington, 2004; Gariepy et al., 2005; Spotts et al., 2009)。但形态学测量结果能够为该病菌的准确鉴定提供重要参考依据, 分生孢子的形态和大小仍是该属形态学分类的重要参考依据。通常认为 *N. kienholzii* (*Cryptosporiopsis kienholzii*) 的大型分生孢子大小为 $12.0\sim17.5\ \mu\text{m}\times2.5\sim3.5\ \mu\text{m}$, 小型分生孢子大小为 $2.5\sim6.5\ \mu\text{m}\times1.5\sim2.5\ \mu\text{m}$ (Spotts et al., 2009); *N. alba* 的大型分生孢子大小为 $17.0\sim30.0\ \mu\text{m}\times2.5\sim3.5\ \mu\text{m}$, 小型分生孢子大小为 $15.0\sim18.0\ \mu\text{m}\times0.5\sim1.0\ \mu\text{m}$; *N. malacorticis* 的大型分生孢子大小为 $15.0\sim35.0\ \mu\text{m}\times3.0\sim6.0\ \mu\text{m}$, 小型分生孢子大小为 $5.0\sim8.0(\sim13.0)\ \mu\text{m}\times1.0\sim1.5(\sim2.0)\ \mu\text{m}$; *N. perennans* 的大型分生孢子大小为 $12.0\sim25.0\ \mu\text{m}\times3.0\sim6.0\ \mu\text{m}$, 小型分生孢子大小为 $6.0\sim10.0\ \mu\text{m}\times1.5\sim3.0\ \mu\text{m}$ (Verkley, 1999)。本研究苹果牛眼果腐病菌 *N. kienholzii* 菌株 60017 的分生孢子大小与 Spotts et al. (2009) 研究结果基本一致。

随着分子生物学的发展, 越来越多的分子生物学方法被应用于明孢盘菌属真菌的种类划分, 如限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和 ITS、SSU、 β -tubulin、LSU、tub2、rpb2 等序列分析方法 (Verkley, 1999; de Jong et al., 2001; Chen et al., 2016)。ITS 序列在真菌鉴定中应用广泛, 但是 de Jong et al. (2001) 通过比较发现 β -tubulin 序列在明孢盘菌属类群中的突变速率比 ITS 快, 不同种之间的序列差异能达到区分物种的水平, 利用 ITS 和 β -tubulin 等序列对苹果牛眼果腐病菌进行系统发育研究, 发现来自葡萄牙苹果果实和加拿大苹果枝干溃疡组织上的 2 株菌株是 *N. malicorticis*、*N. perennans*、*N. alba* 之外的第 4 种病原菌, 应为苹果牛眼果腐病菌新种类 *Neofabraea* sp. nov.。Cunnington (2004) 进一步利用 β -tubulin 序列对澳大利亚收藏的苹果牛眼果腐病菌标本进行了研究, 发现来自新南威尔士的 2 个标本和西澳大利亚的 1 个标本与加拿大和葡萄牙的 *Neofabraea* sp. nov. 是同一个种。Henriquez et al. (2004) 从俄勒冈州梅德福的梨上发现了苹果牛眼果腐病菌新种类; Spotts et al. (2009) 研究发现这种苹果牛眼果腐病菌新种在美国俄勒冈州和华盛顿州的果园也有发生, 因此将这一新种命名为 *Cryptosporiopsis kienholzii* Seifert, Spotts & Lévesque。尽管该病菌的有性型一直未被发现, Seifert (2013) 重新修订其种名为 *N.*

kienholzii. Michalecka et al. (2016) 基于 β -tubulin 序列分析首次报道了波兰苹果上的 *N. kienholzii*; Wenneker et al. (2017) 基于 ITS、LSU、tub2 序列比对分析首次报道了 *N. kienholzii* 在荷兰的梨上引起了牛眼果腐病; Cameldi et al. (2017) 基于 β -tubulin 序列分析发现 *N. vagabunda* 是意大利艾米利亚-罗马涅地区牛眼果腐病的主要致病菌; Kingsnorth et al. (2017) 采用 ITS 和 β -tubulin 序列比对分析的方法首次报道了 *N. kienholzii* 在英国的苹果上引起牛眼果腐病。Chen et al. (2016) 对明孢盘菌属 *Neofabraea* 和无柄盘菌属 *Pezicula* 及其相关的属种进行了多基因系统发育分析, 将 *N. alba*、*N. eucalypti* 和 *N. citricarpa* 划入明孢盘菌属, 将 *N. alba* 归入 *Phlyctema* 属, 而将 *N. eucalypti* 和 *N. citricarpa* 分别划入新建立的 *Parafabraea* 属和 *Pseudofabraea* 属中。本研究基于 β -tubulin 序列构建的系统发育树显示, *N. alba* 和 *P. citricarpa* 与明孢盘菌属中其它种类关系较远, 这与 Chen et al. (2016) 的研究结果一致。经比对分析, 本研究发现 *N. kienholzii* 与其多个近似种的 ITS 序列同源性可达到 99% 以上, 单独利用 ITS 序列无法有效区分 *N. kienholzii*, 而 β -tubulin 序列与 GenBank 已报道的 *N. kienholzii* 相关序列同源性可达到 100%, 且不同种类处在不同分支位置, 能够有效区分 *N. kienholzii*。结合病原菌的形态特征、ITS 和 β -tubulin 序列比对分析结果和致病性测定结果, 将菌株 60017 鉴定为苹果牛眼果腐病菌 *N. kienholzii*。台湾省之前未见苹果牛眼果腐病菌 *N. kienholzii* 的相关报道, 这是在台湾省苹果上首次发现该病菌引起苹果牛眼果腐病的报道。

口岸是国家对外开放的门户, 是对外交往和经贸合作的桥梁, 是国家安全的重要屏障, 也是进出口的第一道关口。近年来, 随着我国经济特别是外向型经济的快速发展, 口岸出入境人员数量急剧增加, 有害生物随出入境人员携带物传入风险不断提高, 这给我国农林业生产和生态安全构成了较大威胁, 因此加强旅客携带物检疫监管刻不容缓。建议进一步加大口岸旅客携带物特别是水果类物品的检疫查验力度, 提高有害生物快速检测技术, 加强检疫工作宣传力度, 提高公众对外来有害生物入侵危害性的认识, 以更好地维护我国国门生物安全。

参 考 文 献 (References)

- Aguilar CG, Mazzola M, Xiao CL. 2018. Control of bull's-eye rot of apple caused by *Neofabraea perennans* and *Neofabraea kienholzii* using pre- and postharvest fungicides. *Plant Disease*, 102(5): 905-910
- Cameldi I, Neri F, Menghini M, Pirondi A, Nannil M, Collina M, Mari M. 2017. Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull's eye rot in Italy (Emilia-Romagna region). *Plant Pathology*, 66(9): 1432-1444
- Chen C, Verkley GJM, Sun GY, Groenewald JZ, Crous PW. 2016. Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula*, and related genera. *Fungal Biology*, 120(11): 1291-1322
- Cunnington JH. 2004. Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(3): 453-454
- China Tourism Academy. 2017. Annual report of China outbound tourism development 2017. Beijing: Tourism Education Press (in Chinese) [中国旅游研究院. 2017. 中国出境旅游发展年度报告 2017. 北京: 旅游教育出版社]
- de Jong SN, Levesque CA, Verkley GJM, Abeln ECA, Rahe JE, Braun PG. 2001. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycological Research*, 105(6): 658-669
- Fang ZD. 1998. Research methods of plant disease (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社]
- Garipey TD, Rahe JE, Levesque CA, Spotts RA, Sugar DL, Henriquez JL. 2005. *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(1): 118-124
- Henriquez JL, Sugar D, Spotts RA. 2004. Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. *Plant Disease*, 88(10): 1134-1138
- Jin YM, Wan MW, Wang WL, Kong LB, Pan MY, Zhang SJ, Gao C, Zhou Q, Liu J. 2012. Analysis of quarantining and supervising goods carried by passengers entering at Shanghai International Airports. *Acta Agriculturae Shanghai*, 28(3): 26-31 (in Chinese) [金亦民, 万明伟, 王雯丽, 孔令斌, 潘梅堂, 张书俊, 高超, 周琦, 刘俊. 2012. 上海空港口岸入境旅客携带物检疫监管情况分析. 上海农业学报, 28(3): 26-31]
- Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. 2014. Recommendations on generic names competing for use in Leotiomycetes (Ascomycota). *IMA Fungus*, 5(1): 91-120
- Kingsnorth J, Perrine J, Berrie A, Saville R. 2017. First report of *Neofabraea kienholzii* causing bull's eye rot of apple in the UK. *New Disease Reports*, 36: 15
- Lin HJ, Wang WF, Yi JP, Hu XN, He RR, Jiang X. 2016. Development of TaqMan probes real-time fluorescence PCR method for the rapid detection of the causal fungal agents of bull's-eye rot on apple. *Plant Quarantine*, 30(2): 55-62 (in Chinese) [林惠娇, 王卫芳, 易建平, 胡学难, 何日荣, 蒋湘. 2016. TaqMan 探针实时荧光 PCR 快速检测苹果牛眼果腐病菌方法的建立. 植物检

- 疫, 30(2): 55–62]
- Lin SC, Wu YN, Xu L, Chen YR. 2009. Quarantine supervision of plants and plant products carried by passengers from Thailand. *Plant Quarantine*, 23(4): 59–60 (in Chinese) [林盛才, 吴毓南, 许玲, 陈粤榕. 2009. 对泰国入境旅客携带植物及其产品的检疫监管. *植物检疫*, 23(4): 59–60]
- Liu F. 2010. Research on apple industry development of Hebei Province. Master Thesis. Baoding: Agricultural University of Hebei (in Chinese) [刘峰. 2010. 河北省苹果产业发展研究. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]
- Michalecka M, Bryk H, Poniatowska A, Puławska J. 2016. Identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. *Plant Pathology*, 65(4): 643–654
- Ministry of Agriculture. 2010. Apple's superior regional layout planning (2008–2015). *Agriculture Engineering Technology (Agricultural Product Processing Industry)*, (3): 16–17 (in Chinese) [农业部. 2010. 苹果优势区域布局规划(2008–2015年). *农业工程技术(农产品加工业)*, (3): 16–17]
- Office of Chief Scientist of National Apple Industry Technical System. 2017. Trends and suggestions of apple industry in 2017. *Fruit Growers' Friend*, (5): 1–3 (in Chinese) [国家苹果产业技术体系首席科学家办公室. 2017. 2017年苹果产业发展趋势与建议. *果农之友*, (5): 1–3]
- Pešicová K, Kolařík M, Hortová B, Novotný D. 2017. Diversity and identification of *Neofabraea* species causing bull's eye rot in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3): 683–693
- Seifert KA. 2013. Nomenclatural novelties: *Neofabraea kienholzii*. *Index Fungorum*, (28): 1
- Spotts RA, Seifert KA, Wallis KM, Sugar D, Xiao CL, Serdani M, Henriquez JL. 2009. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *Mycological Research*, 113(11): 1301–1311
- Verkley GJM. 1999. A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs: studies in mycology no. 44. Centraalbureau voor Schimmelmcultures, Baarn: The Netherlands, pp. 1–180
- Wang WF, Hu J, Zhang YY, Li XF, Chen MK, Fang JF. 2010. The first and repetitious interception in Guangdong Port of bull's eye rot on apple from US. *Plant Quarantine*, 24(1): 35–37 (in Chinese) [王卫芳, 胡佳, 张永瑜, 李新芳, 陈茂坤, 方剑锋. 2010. 广东口岸首次截获美国苹果牛眼果腐病. *植物检疫*, 24(1): 35–37]
- Wenneker M, Pham KTK, Boekhoudt LC, de Boer FA, van Leeuwen PJ, Hollinger TC, Thomma BPHJ. 2017. First report of *Neofabraea kienholzii* causing bull's eye rot on pear (*Pyrus communis*) in the Netherlands. *Plant Disease*, 101(4): 634
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. // In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press, pp. 315–322
- Zhang LX, Hu PL, Li W, Yu ZX, Jiao BB, Yi JP, Yu C, Yang CY. 2016. Identification of *Neofabraea kienholzii* on imported *Malus pumila*. *Plant Quarantine*, 30(1): 36–39 (in Chinese) [张露茜, 胡培龙, 李薇, 于子翔, 焦彬彬, 易建平, 于翠, 杨翠云. 2016. 进境苹果果实中苹果牛眼果腐病菌的检疫鉴定. *植物检疫*, 30(1): 36–39]
- Zhang YJ, Luo JF, Liu P, Liu YT, Liao F. 2012. Identification of *Neofabraea alba* from Chile apple. *Plant Quarantine*, 26(2): 47–49 (in Chinese) [张裕君, 罗加凤, 刘鹏, 刘跃庭, 廖芳. 2012. 智利苹果中牛眼果腐病菌的分离鉴定研究. *植物检疫*, 26(2): 47–49]

(责任编辑:李美娟)