

研究报告

Research Report

板栗栗疫病原菌的分离与鉴定

丰雪春¹ 陈建华¹ 蒋丽娟¹ 李培旺² 周宵¹ 陈景震^{1,2*}

1 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙, 410002; 2 湖南省林业科学院生物能源研究所, 长沙, 410002

* 通信作者, chenjingzhen621@sina.com

摘要 为了筛选湖南省板栗疫病的主要致病菌,明确引起板栗疫病的致病真菌种类,并进一步为栗疫病病害的诊断和防治提供有力的理论基础。在 2017~2019 年间,从湖南省的板栗种植基地,采集疑似板栗疫病的样品,采用常规组织分离法和 PDA、PDB 培养基,进行病样的分离、纯化培养。通过形态学观察和真菌 rDNA-ITS 序列分析相结合的方式对病原菌进行鉴定。结果表明,从具有栗疫病的板栗基部分离得到 2 株真菌,经形态学初步鉴定为板栗疫病菌 *Cryphonectria parasitica*,对其进行室内致病性试验表现出与田间自然发病一致的症状;PCR 技术扩增病原菌的 rDNA-ITS 基因,得到长度为 725 bp 的 DNA 片段。菌株序列与板栗疫病菌模式菌株的序列同源性达到 99%。结合形态特征、序列分析与系统进化分析,明确引起板栗疫病的病原菌是板栗疫病菌。本研究为湖南省板栗疫病的病害防治工作提供参考。

关键词 板栗(*Castanea mollissima* Blume), 栗疫病, 分离鉴定, 板栗疫病菌

Isolation and Identification of Pathogen of Chestnut Blight

Feng Xuechun¹ Chen Jianhua¹ Jiang Lijuan¹ Li Peiwang² Zhou Xiao¹ Chen Jingzhen^{1,2*}

1 Central South University of Forestry and Technology, College of Life Sciences and Technology, Changsha, 410002; 2 Hunan Academy of Forestry Sciences, Bioenergy research institute, Changsha, 410002

* Corresponding author, chenjingzhen621@sina.com

DOI: 10.5376/gb.cn.2020.09.0005

Abstract In order to screen the main pathogenic bacteria of chestnut blight in Hunan province, identify the types of pathogenic fungi causing chestnut blight, and further provide a strong theoretical basis for the diagnosis and prevention of chestnut blight. From 2017 to 2019, samples of suspected chestnut blight were collected from chestnut planting bases in Hunan Province, and the disease samples were isolated, purified and cultured using conventional tissue isolation method and PDA and PDB media. The pathogen was identified by morphological observation and fungal rDNA-ITS sequence analysis. The results showed that 2 strains of fungi were isolated from the base of chestnut with chestnut blight, which were preliminarily identified as *Cryphonectria parasitica* A by morphology. The indoor pathogenicity test showed the same symptoms as the natural disease in the field. PCR was used to amplify the rDNA-ITS gene of pathogenic bacteria, and a 725 bp DNA fragment was obtained. The sequence homology between the strain sequence and the model strain of *Castanea mollissima* Blight reached 99%. Combining morphological characteristics, sequence analysis and systematic evolution analysis, it is clear that the pathogen causing chestnut blight is chestnut blight. This study provides reference for disease control of chestnut blight in Hunan province.

Keywords *Castanea mollissima* Blume, Chestnut blight, Isolation and identification, Chestnut blight bacteria

收稿日期: 2020 年 3 月 31 日; 接受日期: 2020 年 4 月 21 日; 发表日期: 2020 年 5 月 7 日

引用格式: 丰雪春, 陈建华, 蒋丽娟, 李培旺, 周宵, 陈景震, 2020, 板栗栗疫病原菌的分离与鉴定, 基因组学与生物技术, 9(5): 1-7 (doi: 10.5376/gb.cn.2020.09.0005) (Chang T., Li G., Guan M., and Zhang Z.Q., 2020, Isolation and identification of pathogen of chestnut blight, *Jiyinzuxue Yu Shengwu Jishu* (Genomics and Biotechnology), 9(5): 1-7 (doi: 10.5376/gb.cn.2020.09.0005))

板栗(*Castanea mollissima* Blume), 俗称栗, 为壳斗科(Fagaceae)栗属(*Castanea*)的落叶乔木, 除青海、新疆、海南等少数省区外广泛分布于南北各地, 在中国有 2 500 多年的栽培历史。板栗是中国特色干果之一(曾小燕和李志, 2019), 享有“干果之王”的佳誉。栗果富含蛋白质、钙、铁、锌等多种维生素, 具有优良的药用和养生价值(杨威, 2012; 沈泉, 2014; 邹静等, 2017)。近年来, 随着板栗市场需求日益增大, 板栗在世界各地的种植面积也不断扩大, 病害也越来越多, 病害发生程度也越来越严重, 其中最为典型的当属栗疫病。根据联合国粮食及农业组织(FAO)统计, 中国板栗产量为 1.94×10^6 t (2017a), 居世界第一位, 约占世界栗果总产量(2.33×10^6 t)的 83%。中国是板栗传统的出口国, 而湖南省的立地条件很是适宜板栗的种植, 因此成为板栗出口的重要省份之一(陈景震等, 2015)。据湖南农业年鉴统计, 湖南省 2002 年板栗的栽培面积高达 8.10×10^4 hm² (约 110 万亩)(李党训等, 2007; 李月玲, 2008; 陈景震等, 2015), 总产量已超过 6 万吨, 全省的第 2 大果品(陈景震等, 2015)。

20 世纪 80~90 年代板栗的急速发展, 促使了湖南板栗产业的壮大, 但是由于受到传统思想的影响, 板栗树多种植在瘠薄的丘陵山地, 种植密度过大, 良种苗木不能及时推广, 导致劣质苗木多(陈景震等, 2015), 从而形成了大面积的低产林, 也在一定程度上影响了其品质, 严重制约了板栗产业健康持续发展。2017~2019 年, 对湖南省岳阳、郴州、长沙、浏阳、怀化等板栗种植区栗疫病进行了田间调查, 普遍发病率为 15~30%, 严重可达 40% 以上, 是板栗生产中最突出的问题之一。目前, 板栗研究主要集中在板栗的果实特性、栗疫病的化学防治等方面, 而未有板栗疫病致病性的相关搬到。本试验就湖南省板栗疫病进行了调查, 并采集感病植株, 对病原菌进行分离与鉴定, 以为进一步研究栗疫病的发生规律、防治措施等提供理论依据(李琳等, 2011)。

1 结果与分析

1.1 板栗栗疫病病害症状

板栗栗疫病主要危害树体的主干和枝干, 在主干基角或枝条间隙也可出现溃疡斑, 部分一年生小枝上也有发生(张林巧, 2011; 吴兆荣, 2013)。病斑主要位于老龄枝干的向阳面, 而阴面或背下发病较轻(王海燕, 2008; 朱远根, 2010)。发病初期, 主干颜色逐渐消退, 病斑处出现溃疡, 之后逐渐扩展蔓延包围树

干, 并开始向上和向下蔓延(方颖等, 2008; 张士文, 2013)。病斑形成初期, 树皮开裂, 用小刀刮下树皮, 可见红褐色的小斑点, 随着病斑的逐渐扩大, 斑点连成块, 树皮表面呈泡状凸起, 内部腐烂, 有时会有红褐色的液体流出, 并伴随有酒糟味(王海燕, 2008)。

1.2 致病性测定分析

用常规组织分离法从病部分离纯化病原菌, 多次分离结果均只出现真菌菌物, 未出现细菌, 表明板栗疫病的病原是真菌。根据真菌形态特征, 对分离得到的真菌菌物初步判断为两种不同的菌株, 编号 F1、F2 为代表菌株。将这两种菌株分别回接到板栗幼苗上, 观察幼苗的生长情况。结果显示, 接种 F2 菌可使健康的板栗幼苗发病, 感染后 5~7 d 出现明显症状, 且病斑症状与田间病斑症状基本相似, 从发病的幼苗植株上再次分离, 均可得到相同形态特征的 F2。相反, 接种 F1 菌的幼苗发病症状较轻, 再次分离也可得到相同形态特征的 F1。根据柯赫氏法则, 表明引起板栗疫病的病原菌为板栗疫病菌。

1.3 寄主范围测定

盆栽接种测定结果表明, 供试病原菌可侵染锥栗(*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils.)、漆树(*Rhus verniciflua stokes*)、山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)等植物, 并引起溃疡斑, 而不侵染马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.)、富贵竹(*Dracaena sanderiana*)等。测定中还发现, 病原菌物可侵染狗尾草(*Setaria viridis* (Linn.) Beauv.)、万年青(*Rohdea japonica* (Thunb.) Roth)、柑橘(*Citrus reticulata* Blanco), 但不表现病害症状(表 1)。说明该病原菌可侵染多种植物, 寄主范围较广。

1.4 病原菌的形态特征

病原菌在 PDA 培养基上培养 28 h 后, 便可见细嫩的白色菌丝, 5 d 后, 菌丝颜色加深, 且菌丝较密集(吴群, 2009)。菌落面积 38.465~63.585 cm²; 分生孢子器大小和形状不同, 颜色呈现为橘黄色到黄褐色; 分生孢子单孢, 无色, 扁圆形(王会芳, 2018)(图 1)。

综上, 分离得到的病原菌株形态特征与描述的 *Cryphonectria parasitica* (陈敏玫, 2007) 基本相同, 可初步判断板栗疫病的病原菌为子囊菌。

1.5 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

利用 Fungal DNA Mini Kit 提取基因组 DNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8 左右, 说明所提 DNA 的浓度和含

表 1 供试菌株的寄主范围测定结果

Table 1 The host range determination results of test strains

接种植物	分类地位	发病情况
Inoculated plant	Taxonomic statue	Pathogenicity
锥栗	壳斗科	+
<i>Castanea henryi</i> (Skan) Rehd. et Wils.	Fagaceae	
狗尾草	禾本科	-+
<i>Setaria viridis</i> (Linn.) Beauv.	Gramineae	
漆树	漆树科	+
<i>Rhus verniciflua stokes</i>	Anacardiaceae	
马蹄莲	天南星科	-
<i>Zantedeschia aethiopica</i> (L.) Spreng.	Araceae	
万年青	百合科	-+
<i>Rohdea japonica</i> (Thunb.) Roth	Liliaceae	
山核桃	胡桃科	+
<i>Carya cathayensis</i> Sarg.	Juglandaceae	
木瓜	蔷薇科	-
<i>Chaenomeles sinensis</i> (Thouin) Koehne	Rosaceae	
柑橘	芸香科	-+
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	
富贵竹	龙舌兰科	-
<i>Dracaena sanderiana</i>	Agavaceae	

注：“+”：发病；“-”：不发病；“-+”：侵染但不表现症状

Note: "+": Having pathogenicity; "-": No pathogenicity; "-+": Infection but no disease signs

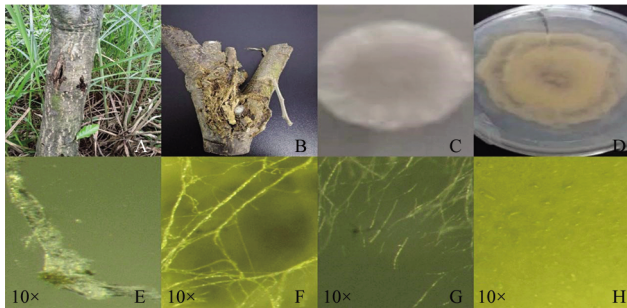


图 1 板栗感染疫病的症状及供试菌株的形态特征

注: A: 根; B: 枝; C: 弱毒力菌落形态; D: 强毒力菌落形态; E: 菌根; F、G: 菌丝; H: 分生孢子

Figure 1 Symptoms of chestnut infected with epidemic disease and morphological characteristics of test strains

Note: A: Root; B: Branches; C: Morphology of weakly virulent colonies; D: Morphology of virulent colonies; E: Mycorrhiza; F, G: Hyphae; H: Conidia

量较高,可用于后续做 PCR。

将菌株的 rDNA-ITS 序列与 GenBank 中核酸数据库进行同源性比较,结果表明,该菌株的序列与 GenBank 中的 *Cryphonectria parasitica* 菌株序列(登录号: EF545115.1)的同源性最高,为 100% (表 2)。

1.6 GenBank 中同源性高的相关序列聚类分析

简单聚类分析结果表明菌株 LY-9 与 *Cryphonectria parasitica* 同源性较高,而与菌株 YL-1 同源性较低,推测可能是与该菌株是弱毒性菌株有关,但是并不影响对该菌株的鉴定,该分子鉴定结果与形态学鉴定结果一致(王庆玲, 2017) (图 2)。

2 讨论

板栗(*Castanea mollissima* Blume)是一种集药用和食用于一体的优良资源植物,不仅营养成分丰富, Vc 含量高,而且矿物质较全面,有养胃健脾、补肾壮腰、强筋活血,止血消肿的多种功效,被誉为“干果之王”。板栗种植面积广,栽培历史悠久,耐修剪,但病虫害较多,在中国各地均有发生,关于其病原特征,

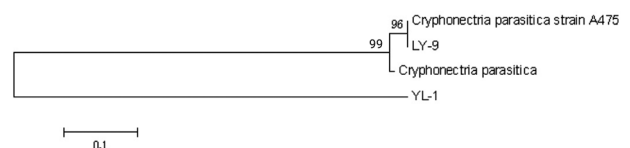


图 2 LY-9 聚类分析

Figure 2 Ly-9 cluster analysis

表2 测序结果与 GenBank 中同源性高的相关序列比较

Table 2 Comparison of sequencing results with related sequences with high homology in genbank

登记号	描述	最大值	总分	覆盖率(%)	E 值	同源性(%)
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage (%)	E value	Max ident (%)
EF545114.1	<i>Cryphonectria parasitica</i>	1 011	1 011	100	0.0	100
AY141861.1	<i>Cryphonectria parasitica</i>	917	917	99	0.0	99
MH857312.1	<i>Cryphonectria parasitica</i>	887	887	100	0.0	97
KC844303.1	<i>Cryphonectria parasitica</i>	894	894	99	0.0	96

表示某些弱毒菌株的菌丝始终保持白色,产孢量少甚至不产孢子。板栗疫病菌的分类地位变化较大,从18世纪初到现在,其命名从 *Diaporthe parasitica* Murr (麻文建, 2015); *Endothia parasitica* (Murr) Barr et And (Anderson et al., 1912); *Endothia* 属和 *Cryphonectria* 属(Barr, 1978), 后来 Micales 等(1997)也证实了栗疫病菌的子座是黑腐皮壳型的, 目前, *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr 是普遍认同的, *Cryphonectria parasitica* 译为寄生隐从赤壳菌 (周而勋等, 1999), 又称板栗疫病菌。

栗疫病菌属对内对外检疫对象, 是世界上最为著名的森林病害之一, 曾在欧洲大肆发病, 导致大面积的栗树死亡。华宝松(2004)等研究表明, 板栗疫病菌是弱寄生菌, 立地条件和管理水平与发病率有关。关于其分子检测的研究, Popov 等(2010)分析了土耳其北部欧洲板栗疫病菌的信息素前提编码基因序列并设计了两对特异性 PCR 引物, 通过 PCR 扩增, 能从 300 株经纯化培养的供试真菌中检测出板栗疫病菌, 且该检测技术可以检测出不同时期感染板栗疫病菌的植株。Davis 等(2005) 基于 RAPD 的显性分析结果设计了 11 对共显性 SCAR 标记, 用于板栗疫病菌种群生物学研究。

本试验在 2017~2018 年对湖南板栗种植区对栗疫病的发病现状调查发现, 板栗疫病的发病率高达 35% 以上, 主要危害树体的枝干, 造成溃疡斑。试验中采用常规组织分离法和形态学观察发现, 引起板栗疫病的病原菌是板栗疫病菌, 进一步分子水平的序列分析, 证明板栗疫病的病原菌为子囊菌, 与目前的分类地位一致。据报道, 板栗疫病菌还可侵染栎树、栓皮栎、常绿锥栗、欧洲山毛榉等植物(郭世宝, 2005), 但目前栗疫病的发生与立地条件的关系, 以及相应的防控措施等还有待进一步研究。

3 材料与方 法

3.1 病原菌的分离与培养

2017~2018 年从湖南省不同的板栗栽培区采集

具有典型栗疫病病症的枝干, 用塑封袋分装带回实验室, -4℃ 保存备用。利用常规的组织分离法对其进行病原菌的分离, 分离培养所用的培养基为马铃薯琼脂糖培养基(简称 PDA, 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH) (贾凤娇, 2007; 邵伟, 2009)。28℃ 的恒温培养箱中培养, 待菌落生长一致, 选择试管斜面保存法将病原菌保留在 -4℃ 的冰箱中(孙亚莉, 2012; 柳涛, 2014; 刘奕君等, 2017)。

3.2 病原菌寄主范围测定

供试植物为锥栗(*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils.)、狗尾草(*Setaria viridis* (Linn.) Beauv.)、漆树(*Rhus verniciflua* Stokes)、马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.)、万年青(*Rohdea japonica* (Thunb.) Roth)、山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)、木瓜(*Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne)、柑橘(*Citrus reticulata* Blanco)、富贵竹(*Dracaena sanderiana*)等 9 科 9 种植物。

选取健康无病的供试植物, 在无菌条件下, 将其移植于装有灭菌营养土的圆盆钵(160 mm× 220 mm)中常规管理。接种时, 用大头针分别刺伤叶子和苗茎基部, 用 5 mm 的打孔器选取 PDA 培养基上的菌丝块, 接种于伤口处(李琳等, 2011; 张美鑫, 2014)。用无菌水湿棉球保湿, 接种无菌水为对照, 室温下保湿培养, 每日观察并记录发病情况, 待发病后从病部再次分离病原菌(朱桂宁等, 2007; 李琳等, 2011; 严玉宇等, 2011)。

3.3 病原菌的形态观察

将上述分离得到的病原菌菌株在 PDA 平板上 28℃ 下培养 5 d 后, 用 5 mm 的打孔器在菌落边沿取菌丝块接种在 PDA 平板的中间处 (王兰等, 2004; 唐贵群等, 2005)。每个处理 3 个重复, 28℃ 恒温培养箱中培养 5 d, 期间每天观察并记录菌落的颜色, 大小, 产孢量等形态特征(孙红梅, 2013; 周娟, 2017; 乔镜澄等, 2017)。在体式显微镜下观察菌丝、分生孢子器、分生孢子的形态特征(刘长远 等, 1999)。

3.4 rDNA-ITS 序列分析及系统发育树的构建

将供试菌株接种于 PDB (马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 自然 pH 值)液体培养基中(芦光新等, 2014; 苏雪梅, 2015)。于 28℃ 下恒温培养振荡器中培养 5 d, 用纱布过滤, 无菌水冲洗 3 次后收集菌丝。采用广州飞扬生物工程有限公司生产 Fungal DNA Mini Kit 说明书提取菌丝基因组 DNA。所提基因组 DNA 在紫外分光光度计下检测浓度后, -20℃ 冰箱中保存备用。

采取真菌通用引物 ITS1/ITS4 (黄姝等, 2015)扩增病菌 rDNA 的 ITS 片段, 引物序列为: ITS1 (5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系: 总体积为 25 μ L, 其中 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L 的引物 ITS1/ITS4 各 0.8 μ L, DNA 提取液 1 μ L, 加灭菌双蒸水补足至 25 μ L。以 ddH₂O 代替模板 DNA 设置阴性对照。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。取 5 μ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 200 V 电泳 30 min, 在凝胶成像系统上拍照并观察(崔胜男, 2010)。PCR 产物纯化和测序由上海生工生物工程有限公司完成。

将菌株测定的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 网站上用 BLAST 软件进行同源性比对, 下载同属异种 GenBank 的 ITS 序列(张艳峰, 2011), 用 DNAMAN 软件保存所有待分析的序列, 用 MEGA5.05 软件将病原菌 rDNA-ITS 序列与下载的同源序列进行比对(于占晶, 2009), 并用邻接法 (neighbor-joining, NJ) (Tamura et al., 2007) 构建系统发育树, 使用自举法 (bootstrap) (Singh and Xie, 2010) 进行检验。

作者贡献

丰雪春是本研究的试验设计者和执行人, 撰写论文; 陈建华参与试验结果的分析; 李培旺和蒋丽娟完成试验的调查及部分数据分析; 周宵参与试验研究; 陈景震是项目的构思者, 知道实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由本研究由中央财政林业推广项目“南方优质板栗良种推广与示范”(2016XT007)和湖南省科技重大专项“大宗木本油料全资源高值化分级利

用技术及产品”(2016NK1001)、长沙市科技计划重点项目“南方优质板栗新品种选育及示范”(k1307143-21)共同资助。

参考文献

- Anderson P.J., Anderson H.W., and Aughinbaugh C.E., 1912, The chestnut blight fungus and a related saprophyte, *Phytopathology*, (2): 204-212
- Barr M.E., 1978, The diapotthales in North America with emphasis on gnomonina and its segregates, *Mycol Mem*, 7(1): 1-232
- Chen J.Z., Pi B., Li P.W., Zhang L.B., and Li C.Z., 2015, Study on transformation technology for chestnut forest of seeding propagation type, *Hainan Linye Keji (Hunan Forestry Science and Technology)*, 42(3): 32-38 (陈景震, 皮兵, 李培旺, 李力, 张良波, 李昌珠, 2015, 实生繁殖型板栗林改造技术研究, *湖南林业科技*, 42(3): 32-38)
- Chen M.M., 2007, Cloning and functional characterization of the *pcyp1* gene in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, Thesis for M.S., Guangxi University, Supervisor: Chen B.S., pp.1-60 (陈敏玫, 2007, 板栗疫病菌 *pcyp1* 基因的克隆及其功能研究, 硕士学位论文, 南宁, 广西大学, 导师: 陈保善, pp.1-60)
- Cui S.N., 2010, Effects of gene of Lipocalin 2lcn2 on the process of rat liver regeneration, Thesis for M.S., Henan Normal University, Supervisor: Xu C.S., pp.1-85 (崔胜男, 2010, 脂质运载蛋白 2 基因 lcn2 在大鼠肝再生中作用研究, 硕士学位论文, 河南师范大学, 导师: 徐存拴, pp.1-85)
- Davis J.E., Kubisiak T.L., and Milgroom M.G., 2005, Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, *Molecular Ecology Notes*, 5(2): 195-197
- Fang Y., Liu Y.P., and Li Y.Q., 2008, Control of chestnut blight, *Guoshu Zaipei (Fruit Tree Cultivation)*, 11: 36 (方颖, 刘玉平, 李逸群, 2008, 板栗疫病的防治, *果树栽培*, 11: 36)
- Hua B.S., Wang B.H., and Feng Q.J., 2004, Analysis of epidemic causes and prevention of chestnut blight, *Linye Shiyong Jishu (Practical Forestry Technology)*, (3): 31-32 (华宝松, 王炳华, 冯气金, 2004, 板栗疫病发生流行原因分析及防治, *林业实用技术*, (3): 31-32)
- Huang S., Jiang Y.B., and Li X.H., 2008, Molecular detection of fruit and vegetable anthracnose, *Hubei Nongye Kexue (Hubei Agriculture Sciences)*, 47 (6): 715-717 (黄姝, 姜云斌, 李喜宏, 2008, 果蔬采后炭疽病原菌的分子识别, *湖北农业科学*, 47(6): 715-717)
- Li D.X., Li C.Z., Li P.W., and Yu J.J., 2007, Study on grafting affinity of chestnut varieties, *Hunan Linye Keji (Hunan Forestry Science and Technology)*, 34(4): 9-11 (李觉训, 李昌珠, 李培旺, 余健军, 2007, 板栗品种嫁接亲和力的研究,

- 湖南林业科技, 34(4): 9-11)
- Li L., Chen H.Y., Liu F., He H., and Yu S., 2011, Isolation and identification of pathogen of castanea mollissima blight, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 38(12): 2395-2400 (李琳, 陈鸿宇, 柳凤, 何红, 余莎, 2011, 马拉巴栗疫病病原的分离与鉴定, 园艺学报, 38(12): 2395-2400)
- Li Y.L., 2008, Study on spray drying processing technique of Fast-dissolving Chestnut Powder, Thesis for M.S., Hebei Agricultural University, Supervisor: Zhang Z.D., and Ma J.L., pp.1-55 (李月玲, 2008, 速溶板栗粉喷雾干燥加工工艺研究, 硕士学位论文, 河北农业大学, 导师: 张子德, 马俊莲, pp.1-55)
- Liu C.Y., Zhao K.H., and Wang K., 1999, Redesignation of the causal agent of grape white for in China, Zhiwu Bingli Xuebao (Journal of Plant Pathology), 5(2): 174-176 (刘长远, 赵奎华, 王克, 1999, 中国葡萄白腐病菌分类地位的重新确定研究, 植物病理学报, 5(2): 174-176)
- Liu T., 2014, Study on the growth characteristic of Hami melon postharvest pathogen and its Preliminary study pathogenesis, Thesis for M.S., Shihezi University Supervisor: Tong J.M., and Shan D.H., pp.1-60 (柳涛, 2014, 哈密瓜采后病原菌的生长特性及致病机理初步研究, 硕士学位论文, 石河子大学, 导师: 童军茂, 单春会, pp.1-60)
- Liu Y.J., Wu M.Q., and Liao Y.M., 2017, Pathogen identification of three fungal diseases of sweet potato in Guangxi, Guangxi Zhibao (Guangxi Plant Protection), 3: 5-9 (刘奕君, 吴明琼, 廖咏梅, 2017, 广西 3 种甘薯薯块真菌性病害的病原鉴定, 广西植保, 3: 5-9)
- Lu G.X., Wang J.B., Chen X.R., Yang C.D., and Xue L., 2014, Screening identification and preliminary study on laccase-producing fungi in alpine grassland soil of eastern Qilian mountains, Caoye Xuebao (Acta Pratacae Sinica), 23(2): 243-252 (芦光新, 王军邦, 陈秀蓉, 杨成德, 薛莉, 2014, 东祁连山高寒草地土壤产漆酶真菌的筛选、鉴定及产酶条件的初步研究, 草业学报, 23(2): 243-252)
- Ma W.J., 2015, Study on molecular detection of cryphonectria parasitica, Thesis for M.S., Sichuan Agricultural University, Supervisor: Zhu T.H., pp.1-65 (麻文建, 2015, 板栗疫病菌的分子检测研究, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 朱天辉, pp.1-65)
- Popov A.P., Tsvetkov I.L., Belov A.A., Konichev A.S., Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., and Ozerskaya S.M., 2010, Molecular genetic identification of the phytopathogenic fungus Cryphonectria parasitica, Microbiology, 79(2): 223-228
- Qiao J.C., Liu Y., Ma J.H., and Wang Q., 2017, Identification and biological characteristics of tomato black spot pathogen, Jiangsu Nongye Keji (Jiangsu Agricultural Science and Technology), 45(10): 94-97 (乔镜澄, 刘宇, 马敬昊, 王谦, 2017, 番茄黑斑病病原菌的鉴定及生物学特性研究, 江苏农业科技, 45(10): 94-97)
- Shao W., 2009, Etiology, occurrence and control of Papaya (Chaenomeles lagenaria) Brown Rot, Thesis for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Huang J.B., pp.1-58 (邵伟, 2009, 木瓜褐腐病的病原学、发生规律及防治技术研究, 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师: 黄俊斌, pp.1-58)
- Shen Q., 2014, Study on Chinese chestnut glutinous rice cake microwave puffing technology, Thesis for M.S., Anhui Agricultural University, Supervisor: Dong M., pp.1-52 (沈泉, 2014, 板栗糯米饼微波膨化工艺研究, 硕士学位论文, 安徽农业大学, 导师: 董明, pp.1-52)
- Singh K., and Xie M., 2010, Bootstrap method, International Encyclopedia of Education, 5: 46-51
- Su X.M., 2015, Screening and identification of antimicrobial active strains of endophytic fungi from F. unibracteata and activities of their secondary metabolites, Thesis for M.S., Sichuan Agricultural University, Supervisor: Wu W., pp.1-60 (苏雪梅, 2015, 瓦布贝母抑菌活性菌株的筛选鉴定及其次生代谢产物的初步研究, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 吴卫, pp.1-60)
- Sun H.M., 2013, Technalagy research of feed prabiatics by corn precessing by-products, Thesis for M.S., Qilu University of Technology, Supervisor: Wang R.M., pp.1-81 (孙红梅, 2013, 利用玉米加工副产物生产饲料益生菌技术研究, 硕士学位论文, 齐鲁工业大学, 导师: 王瑞明, pp.1-81)
- Sun Y.L., 2012, Disease identification and the sensitivity of pathogens to Fungicide of Heliconia in Luo yang, Thesis for M.S., Henan University of Science and Technology, Supervisor: Lin X.M., and Hou J., pp.1-48 (孙亚莉, 2012, 洛阳蝎尾蕉病害鉴定及病原菌对杀菌剂的敏感性测定, 硕士学位论文, 河南科技大学, 导师: 林晓民, 候军, pp.1-48)
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S., 2007, MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599
- Tang G.Q., Wen C.J., Zou Y., Li N., and Hou L., 2005, Biological characteristics of four antagonistic strains of Gliocladium virens, Nongye Shengwu Zaihai Yufang Yu Kongzhi Yanjiu (Study on prevention and control of agricultural biological disasters. Research on prevention and control of agricultural biological disasters), 676-679 (唐贵群, 文成敬, 邹勇, 李宁, 候浪, 2005, 四株绿色粘帚霉拮抗菌生物学特性研究, 农业生物灾害预防与控制研究, 676-679)
- Wang H.Y., 2008, Occurrence and Integrated control techniques of chestnut blight, Hebei Nongye Keji (Hebei Agricultural Science and Technology), (23): 25 (王海燕, 2008, 栗疫病的发生和综合防治技术, 河北农业科技, (23): 25)
- Wang H.F., Rui K., Zeng X.P., Fu M.Y., and Chen M.C., 2018,

- Investigating report of diseases and identification of major pathogens on *Agave sisalana*, *Nanfang Nongye Xuebao* (Journal of southern agriculture), 49(10): 1988-1994 (王会芳, 芮凯, 曾向萍, 肖敏, 符美英, 陈绵才, 2018, 剑麻病害调查及其主要病原种类鉴定, 南方农业学报, 49(10): 1988-1994)
- Wang L., Zhao G.F., Shao Q., and He Y.Q., 2004, Studies on the some biological properties of the pathogen of indian jujube anthracnose, *Henan Nongye Keji* (Henan agricultural science and technology), 12(20): 64-66 (王兰, 赵更峰, 邵强, 何月秋, 2004, 毛叶枣炭疽菌部分生物学特性研究, 河南农业科技, 12(20): 64-66)
- Wang Q.L., 2017, Application of MALDI-TOF MS in identification of fungi, Thesis for M.S., Qingdao University, Supervisor: Liang B., pp.1-73 (王庆玲, 2017, MALDI-TOF MS 在真菌鉴定中的应用研究, 硕士学位论文, 青岛大学, 导师: 梁冰, pp.1-73)
- Wu Q., 2009, Biological characteristics of *Cryphonectria parasitica* causing chestnut blight and screening of resistant Chinese chestnut cultivars, Thesis for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Hu C.G., pp.1-61 (吴群, 2009, 栗疫病菌的生物学特性和抗病品种的初步筛选, 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师: 胡春根, pp.1-61)
- Wu Z.R., 2013, Study of investigation and irulence differentiation for chestnut blight, *Anhui Nongye Kexue* (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 41(5): 1939-1940 (吴兆荣, 2013, 板栗疫病的调查和致病力分化研究概况, 安徽农业科学, 41(5): 1939-1940)
- Yang W., 2012, Research of extraction and separation and purification of flavonoids from made inflorescence, Thesis for M.S., Inner Mongolia Agricultural University, Supervisor: Zhao L.Q., and Chang H., pp.1-63 (杨威, 2012, 板栗雄花序黄酮提取及纯化, 硕士学位论文, 内蒙古农业大学, 导师: 赵丽芹, 常虹, pp.1-63)
- Yu Z.J., 2009, Identification of the pathogen causing brown spot on *Ziziphus jujuba* Mill. cv. Hupingzao and its control, Thesis for M.S., Hebei Agricultural University, Supervisor: Ran L.X., pp.1-49 (于占晶, 2009, 壶瓶枣褐斑病的病原鉴定和防治研究, 硕士学位论文, 河北农业大学, 导师: 冉隆贤, pp.1-49)
- Zhang L.Q., 2011, Preliminary study on the biological control potential of the hypo virus CHV1-CN280 and functional analysis of P29, Thesis for M.S., Nanjing Agricultural University, Supervisor: Wang K.R., pp.1-81 (张林巧, 2011, 低毒力病毒 CHV1-CN280 对寄主毒性的影响及其 p29 基因在栗疫菌及稻瘟菌中的功能分析, 硕士学位论文, 南京农业大学, 导师: 王克荣, pp.1-81)
- Zhang M.X., 2014, The pathogenicity differentiation in the pathogen causing pear valsa canker in China and laboratory evaluation for the resistance of pyrus germplasm accession to the disease, Thesis for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Wang G.P., pp.1-82 (张美鑫, 2014, 中国梨腐烂病菌致病力分化分析及不同梨种质资源的抗病性鉴定, 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师: 王国平, pp.1-82)
- Zhang S.W., 2013, Causes and countermeasures of chestnut tree death, *Hebei Linye Keji* (Hebei Forestry Science and Technology), 6(14): 70-71 (张士文, 2013, 板栗树死亡的原因及对策, 河北林业科技, 6(14): 70-71)
- Zhang Y.F., 2015, The effects of endophytic bacteria isolated from metal tolerant-plants on the tolerances and accumulation of heavy metals by *Brassica napus*, Thesis for M.S., Nanjing Agricultural University, Supervisor: Sheng X.F., pp. 1-133 (张艳峰, 2015, 金属耐性植物内生细菌对油菜耐受与富集重金属的影响及其机制研究, 硕士学位论文, 南京农业大学, 导师: 盛下放, pp.1-133)
- Zhou E.X., Wang K.R., and Lu J.Y., 1999, Research progress of chestnut blight, *Guoshu Kexue* (Fruit Science), 16 (1): 66-71 (周而勋, 王克荣, 陆家云, 1999, 栗疫病研究进展, 果树科学, 16(1): 66-71)
- Zhou J., 2017, The study of isolation and identification and diversity of Guizhou karst soil Actinomyce, Thesis for M.S., East China University of Technology, Supervisor: Liu S.R., pp.1-70 (周娟, 2017, 贵州喀斯特土壤放线菌的分离鉴定及多样性研究, 硕士学位论文, 华东理工大学, 导师: 刘峙嵘, pp.1-70)
- Zhu G.N., Cai J.H., Hu C.J., Wei B.H., and Huang F.X., 2006, Identification and ITS sequence analysis of the pathogen of yam anthracnose in Guangxi, *Zhiwu Bingli Xuebao* (Acta Phytopathologica Sinica), 37(6): 572-577 (朱桂宁, 蔡健和, 胡春锦, 韦本辉, 黄福新, 2006, 广西山药炭疽病病原菌的鉴定与 ITS 序列分析, 植物病理学报, 37(6): 572-577)
- Zhu Y.G., 2010, Occurrence and control of *castanea henryi* blight in huang tian zhen, *Xiandai Nongye Keji* (Modern Agricultural Science and Technology), (12): 147-148 (朱远根, 2010, 黄田镇锥栗栗疫病的发生与防治, 现代农业科技, (12): 147-148)
- Zou J., Meng J., Zhang J.C., and Guo S., 2017, Production of monascus-chestnut-glutinous rice wine, *Niangjiu Keji* (Liquor-Making Science and Technology), (2): 65-67 (邹静, 孟军, 张建才, 郭朔, 2017, 红曲板栗糯米酒酿造工艺研究, 酿酒科技, (2): 65-67)