

河北省苹果树腐烂病菌不同分离株 生物学性状及致病性研究

王娟, 王树桐, 任佳慧, 曹克强*

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001)

摘要: 为了明确河北省苹果树腐烂病原菌的类型及致病性分化情况, 从河北省 8 个苹果产区采集罹病样本, 分离得到 153 株苹果树腐烂病菌, 并根据菌落颜色、菌丝生长速率和疏密程度选取其中具有明显特征差异的 12 个代表性菌株进行了致病性测定。结果表明, 河北省各地区苹果树腐烂病菌的菌落颜色分为 7 个类群, 主要为浅黄色和黄色; 不同分离株在菌丝生长速率和菌丝疏密程度上也存在较大差异, 其中 70.59% 的菌株生长速率为中等, 57.52% 的菌株气生菌丝发达。不同颜色菌株的致病力有显著差异, 在菌丝生长速率接近的情况下, 浅黄色和黄白色菌株致病力较强; 菌落颜色相同而菌丝生长速率不同的菌株间致病力也有显著差异, 且致病力强弱与生长速率呈正相关; 菌丝疏密程度对菌株致病力的影响不明显。以上试验结果均表明, 河北省苹果树腐烂病原菌具有多样性和致病性分化现象。

关键词: 河北省; 苹果树腐烂病; 生物学性状; 致病性

中图分类号: S436.611.1⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)07-0072-04

Biological Characteristics and Pathogenicity of Different Isolates of *Cytospora* spp. Isolated from Apple Trees in Hebei Province

WANG Juan, WANG Shu-tong, REN Jia-hui, CAO Ke-qiang*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: To make clear the pathogen species and pathogenic differentiation of *Cytospora* spp. in apple trees, 153 isolates of *Cytospora* spp. collected and isolated from eight different apple production areas of Hebei province were studied in this experiment. Twelve isolates were selected as representatives according to colony color, mycelia growth rate and mycelia density, to test the pathogenicity. The results indicated that there was significant difference in colony color, mycelia growth rate and mycelia density between different isolates. All isolates could be divided into 7 kinds according to the colony color, with pale yellow and yellow kinds most. 70.59% of all isolates had medium growth rate, and the aerial hyphae of 57.52% was developed. The virulence of different colony color isolates was significantly different. Pale yellow and yellow-white colony isolates had stronger virulence when the colony growth rate was similar. The colony growth rate had positive effect on the virulence when the colony color was the same. There was no significant effect of the mycelia density on the virulence of different isolates. These results indicated that *Cytospora* spp. isolated from apple trees in Hebei had diversity and different virulence.

Key words: Hebei province; apple tree valsa canker; biological characteristics; pathogenicity

收稿日期: 2013-01-05

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903004, 201203034); 国家苹果产业技术体系项目(nycytx-08-04-01)

作者简介: 王娟(1986-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病害流行。E-mail: 402959571@qq.com

* 通讯作者: 曹克强(1963-), 男, 河北容城人, 教授, 博士, 主要从事植物病害流行与综合防治研究。E-mail: ckq@hebau.edu.cn

苹果树腐烂病危害苹果树的主枝、主干、果实等多个部位,导致树势衰弱、产量下降,是苹果重大病害之一。该病害在我国苹果主产区广泛发生,危害严重^[1-3]。建国以来,我国曾在1949年、1960年、1975年、1987年前后,共发生了4次苹果树腐烂病的大流行^[4]。2008年,国家苹果产业技术体系病虫害防控研究室对我国10个苹果主产省147个苹果园的调查发现,我国苹果树腐烂病的平均发病率达到52.7%,这一结果表明,我国苹果生产正面临着腐烂病第5次发病高峰的威胁^[5-6]。梁魁景等对河北省10个地市200余个苹果园也开展了较为详尽的调查,发现15 a以上树龄的果园面积约占调查总面积的70%,这些果园的腐烂病病株率在31%~72.7%^[7]。表明河北省苹果树树龄老化,腐烂病发生日趋严重,对河北省苹果产业的健康持续发展构成了极大的威胁。

日本在20世纪初期首先报道了苹果树腐烂病的发生,并将病原菌定名为 *Valsa mali* Miyabe & Yamada (1909) (Tanaka 1919)^[8-9]。Kobayashi 根据子囊和子囊孢子的形态特征又将该病菌命名为 *Valsa ceratosperma*^[10]。近年来,这2个学名均被学者使用。Wang 等最近研究认为, *V. mali* 是我国苹果树腐烂病的主要致病菌^[1]。关于河北省苹果树腐烂病菌的研究还较少。陆燕君研究认为,河北省境内的梨树腐烂病菌为苹果树腐烂病菌的变种^[11]。孙祥瑞等研究认为,引起苹果树和梨树腐烂病的病原菌为 *V. mali* 的2个亚种^[12]。但臧睿等在研究中发现,陕西省苹果树腐烂病菌具有多样性和致病性分化现象^[13]。目前对河北省苹果树腐烂病菌的种类及致病性分化尚无定论,国家苹果产业技术体系病虫害防控研究室在前期对从河北省不同地区苹果园分离到的腐烂病菌进行观察也发现,不同菌株在培养性状上有较大差异。因此,本研究采集并分离河北省8个苹果产区的苹果树腐烂病菌,研究河北省不同地区苹果树腐烂病菌的培养性状以及部分代表性菌株的致病性分化情况。研究结果对于进一步研究苹果腐烂病发生和流行规律、病害预测预报、寄主抗病性以及病害的综合防治都有理论意义。

1 材料和方法

1.1 供试菌株的分离培养

分别从河北省8个苹果产区(张家口、石家庄、邢台、廊坊、衡水、秦皇岛、唐山和沧州),采集感染苹果树腐烂病的树皮。将病健交界处的树皮剪成大小

适中的几块,用75%乙醇浸泡1 min,再用3%~5%的次氯酸钠浸泡3 min,然后用75%乙醇浸泡30 s,最后用无菌水清洗3次,将皮块放到PDA平板上,每个平板放置3~4个皮块,25℃条件下黑暗培养。将分离到的单菌落保存在试管中PDA斜面上。

1.2 各分离株的生物学性状观察

将分离到的各菌株接种到PDA平板上,每个分离株重复4次,置于25℃条件下黑暗培养。从第2天开始测量菌落直径,直到长满皿,并于第3天拍照、记录其生长速率,于第10天观察记录菌落颜色,于第15天观察记录菌落颜色、形状、菌丝疏密程度。每次观察记录的同时进行拍照。

1.3 不同分离菌株的致病性研究

根据生物学性状的不同挑选出12个菌株进行研究。选用2年生的离体苹果树枝条,截成约30 cm长的小段,用自来水冲洗干净后晾干,之后用75%乙醇表面消毒,枝条两端用凡士林保湿。用直径为5 mm的打孔器在枝条上隔一定距离造成伤口(每个枝条设3个接种点),以菌饼(直径5 mm)作为接种体贴在伤口部位,然后用保鲜膜包裹接种部位,进行保湿。以无菌PDA圆饼接种作为空白对照。每个菌株重复5次。最后将枝条摆放在铺有滤纸的盒子里,滤纸用无菌水湿润,25℃黑暗条件下培养,3 d后观察记录其发病情况,并测量病斑的长度。选取其中3次重复的数据用SPSS软件进行差异性分析。

1.4 数据统计与分析

试验结果使用Excel 2003 进行整理,使用SPSS 10.0 软件进行统计分析,采用LSD多重比较,在 $P=0.05$ 水平上进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离结果

经分离、纯化并通过菌落和菌丝形态特征鉴定,共获得153株苹果腐烂病菌,其中张家口15株,石家庄8株,秦皇岛23株,邢台15株,衡水12株,唐山25株,沧州27株,廊坊28株。

2.2 各分离株的生物学性状

2.2.1 菌落颜色 对在PDA平板上接种培养10 d的菌落颜色进行观察发现,河北省境内的苹果树腐烂病菌可以分为7个类群(图1),总体以黄色为主,但是不同地区的优势菌株各不相同。大多数菌株呈黄色和浅黄色,部分呈黄白色和褐色,少数为灰色、中间黑四周黄和黄绿色(表1)。表1还反映出,每个地区的菌落颜色类型各具特点:张家口没有黄白

色和黄绿色菌株,石家庄没有褐色和中间黑四周黄菌株,秦皇岛没有灰色和中间黑四周黄菌株等。因

此,来自河北省的 153 株苹果树腐烂病菌的菌落颜色存在一定的多样性。

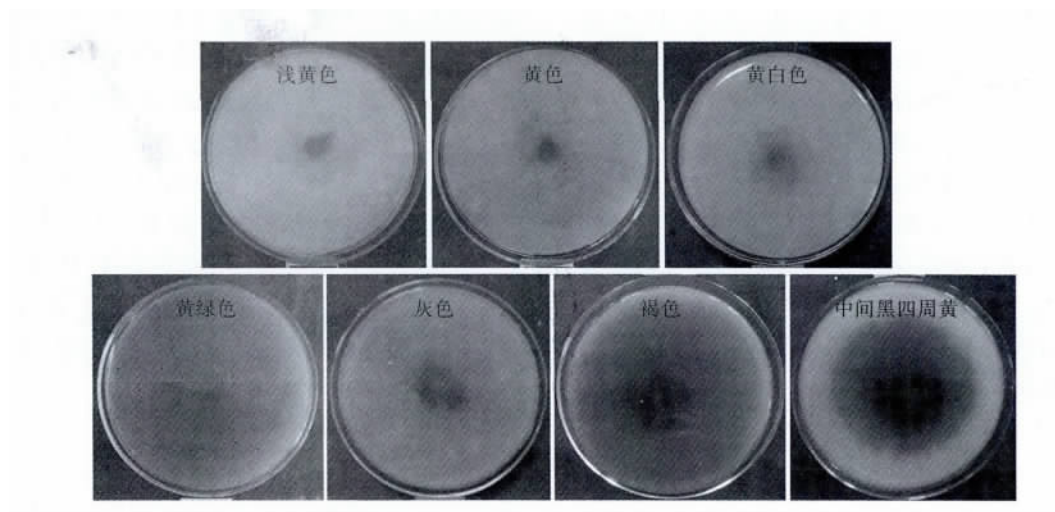


图 1 苹果树腐烂病菌菌落颜色类型

表 1 不同菌落颜色的苹果树腐烂病菌菌株在河北省各地区的分布

采样点	浅黄色	黄色	黄白色	黄绿色	灰色	褐色	中间黑四周黄	合计
张家口	1(6.67)	5(33.33)	0(0.00)	0(0.00)	2(13.33)	2(13.33)	5(33.33)	15
石家庄	1(12.50)	1(12.50)	4(50.00)	1(12.50)	1(12.50)	0(0.00)	0(0.00)	8
秦皇岛	5(21.74)	5(21.74)	6(26.09)	1(4.35)	0(0.00)	6(26.09)	0(0.00)	23
邢台	3(20.00)	3(20.00)	4(26.67)	4(26.67)	1(6.67)	0(0.00)	0(0.00)	15
衡水	0(0.00)	6(50.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(8.33)	3(25.00)	2(16.67)	12
唐山	7(28.00)	7(28.00)	3(12.00)	0(0.00)	5(20.00)	3(12.00)	0(0.00)	25
沧州	12(44.44)	4(14.81)	6(22.22)	0(0.00)	2(7.40)	3(11.11)	0(0.00)	27
廊坊	6(21.43)	5(17.86)	7(25.00)	1(3.57)	3(10.71)	4(14.29)	2(7.14)	28
合计	35(22.88)	36(23.53)	30(19.61)	7(4.58)	15(9.80)	21(13.73)	9(5.88)	153

注:括号外为菌株数,括号内为该类型菌株占当地总菌株数的百分比,表 2 同。

2.2.2 菌丝生长速率 以在 PDA 平板上接种后第 3 天的菌落直径为标准,将供试菌株划分为 3 种不同的类型。A 型:0 mm<菌落直径<40.0 mm,即菌丝生长速率较慢。此类型菌株有 7 株,占 4.58%。B 型:40.1 mm<菌落直径<70.0 mm,即菌丝生长速率中等。此类型菌株有 108 株,占 70.59%。C 型:70.1 mm<菌落直径<90.0 mm,

即菌丝生长速率较快。此类型菌株有 38 株,占 24.84%。

从表 2 可以发现,70.59%的河北省苹果树腐烂病菌生长速率为中等,但各个地区 3 种类型菌株的分布并不相同,如张家口、石家庄、衡水和唐山均没有 A 型菌株的存在。大多数地区的菌株生长速率中等,而在石家庄和邢台生长速率快的菌株占优势。

表 2 不同生长速率和菌丝疏密程度的苹果树腐烂病菌菌株在河北省各地区的分布

采样点	菌丝生长速率类型			菌丝疏密程度类型		合计
	A 型	B 型	C 型	I 型	II 型	
张家口	0(0.00)	9(60.00)	6(40.00)	12(80.00)	3(20.00)	15
石家庄	0(0.00)	2(25.00)	6(75.00)	5(62.50)	3(37.50)	8
秦皇岛	2(8.70)	17(73.91)	4(17.39)	13(56.52)	10(43.48)	23
邢台	1(6.67)	6(40.00)	8(53.33)	13(86.67)	2(13.33)	15
衡水	0(0.00)	8(66.67)	4(33.33)	7(58.33)	5(41.77)	12
唐山	0(0.00)	24(96.00)	1(4.00)	7(28.00)	18(72.00)	25
沧州	3(11.11)	19(70.37)	5(18.52)	13(48.15)	14(51.85)	27
廊坊	1(3.57)	23(82.14)	4(14.29)	18(64.29)	10(35.71)	28
合计	7(4.58)	108(70.59)	38(24.84)	88(57.52)	65(42.48)	153

2.2.3 菌丝疏密程度 以在 PDA 平板上接种后 15 d 气生菌丝的生长状况为标准,将供试菌株大致分为两大类型。I 型:气生菌丝发达,此类型菌株有 88 株,占 57.52%。II 型:气生菌丝不发达或平铺,此类型菌株有 65 株,占 42.48%。来自河北省的 153 个菌株在 PDA 平板上虽然表现出 I 型和 II 型 2 种不同的生长状况,但是菌丝疏密程度总体以 I 型为主,仅唐山地区 II 型菌株的数量明显高于 I 型菌株(表 2)。

2.3 不同分离菌株的致病性

挑选了生物学性状不同的 12 个菌株,将其分成 3 类,分批次进行致病性研究,以接种后 3 d 的病斑长度作为分析对象。在菌丝生长速率接近的情况下(如菌株 TS12、LF19、LF16、LF28、TS15、ZJK4、ZJK2),浅黄色和黄白色菌株致病力较强。菌落颜色相同而菌丝生长速率不同的菌株间(如菌株 SJZ5、QHD17、CZ21)致病力也有显著差异,且致病力强弱与生长速率呈正相关。在菌落颜色和生长速率相同的情况下(如菌株 QHD1 和 CZ22),菌丝疏密程度对菌株致病力的影响不明显(表 3)。

表 3 不同培养性状的苹果树腐烂病菌
分离株致病性测定结果

菌株编号	菌落颜色	第 3 天菌落 直径/mm	菌丝疏密 程度类型	病斑长度/ mm
TS12	浅黄色	60.49	II 型	26.95a
LF19	黄色	62.74	II 型	15.13b
LF16	黄白色	59.99	II 型	24.96a
LF28	黄绿色	56.32	II 型	11.41bc
TS15	灰色	63.99	II 型	12.78bc
ZJK4	褐色	59.72	II 型	10.61c
ZJK2	中间黑四周黄色	60.99	II 型	14.90b
SJZ5	黄白色	84.00	I 型	31.21a
QHD17	黄白色	50.37	I 型	5.48b
CZ21	黄白色	32.51	I 型	5.29b
QHD1	褐色	59.96	I 型	5.69a
CZ22	褐色	59.60	II 型	3.47a

注:同类菌株测定数据后不同小写英文字母表示差异显著
($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

本试验从河北省 8 个不同苹果产区采集分离了 153 株苹果树腐烂病菌,对它们的生物学性状及致病性进行了研究。结果发现,河北省苹果产区的苹果树腐烂病菌以黄色和浅黄色为主,其次为黄白色;菌丝生长速率大多为中等;多数菌株的气生菌丝发达。菌落颜色、菌丝生长速率和菌丝疏密程度之间并没有直接联系。本研究结果还表明,腐烂病菌的致病力与菌落颜色和菌丝生长速率有关。生长速率相同但颜色不同的菌株间致病力有显著差异,其中

浅黄色和黄白色菌株的致病力较强。相同菌落颜色的菌株间致病力也有显著差异,致病力强弱与菌丝生长速率呈正相关。但菌丝疏密程度对致病力的影响不明显。以上研究结果表明,河北省苹果树腐烂病菌具有多样性、复杂性和致病性分化现象,且不同地区之间存在较大差异。

前人对河北省苹果树腐烂病的研究主要着眼于腐烂病的发生规律和防治,还缺乏致病力分化方面的报道。本试验结果表明,河北省境内苹果树腐烂病菌中的浅黄色和黄白色菌株致病性较强,而臧睿等发现陕西省苹果树腐烂病菌中的黄褐色菌株为强致病性类群^[13],这表明不同苹果产区间病原菌菌株也存在致病力分化现象。本研究揭示了河北省苹果主产区腐烂病菌的多样性和复杂性,丰富了腐烂病的研究内容,但尚未对河北省苹果树腐烂病菌进行种类鉴定,因此,这些菌株所属种类还需进一步明确。

参考文献:

- [1] Wang X L, Wei J L, Huang L L, *et al.* Re-evaluation of pathogens causing *Valsa* canker on apple in China[J]. *Mycologia*, 2011, 103(2): 317-324.
- [2] 赵国防. 天津地区苹果腐烂病发病规律及防治情况调查[J]. *天津农业科学*, 1992(4): 18-21.
- [3] 刘光东. 延安地区苹果腐烂病流行原因及防治对策[J]. *山西农业科学*, 2010, 38(11): 103-104.
- [4] 曾士迈. 宏观植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [5] 赵增锋, 曹克强. 苹果树腐烂病流行分析及防治建议[J]. *中国果树*, 2011(1): 61-63.
- [6] 曹克强, 国立耘, 李保华, 等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. *植物保护*, 2009, 35(2): 114-116.
- [7] 梁魁景, 王树桐, 胡同乐, 等. 河北省苹果主要病虫害发生现状调查[J]. *植物保护*, 2010, 36(5): 123-127.
- [8] 陈策. 国外对于苹果树腐烂病、桃树腐烂病以及其他同类病害的研究近况[J]. *中国果树*, 1980(S1): 68-77.
- [9] 徐涛. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生防作用[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [10] Kobayashi T. Taxonomic studies of Japanese Diaporthaceae with special reference to their life histories (Volume 226)[M]. Tokyo: Government Forest Experiment Station, 1970: 170-173.
- [11] 陆燕君. 梨树腐烂病病原菌的研究[J]. *植物病理学报*, 1992, 22(3): 197-204.
- [12] 孙祥瑞, 朱杰华, 刘蕊, 等. 几种树皮腐烂病菌的分子鉴定[J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6): 36-42.
- [13] 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 等. 陕西苹果树腐烂病菌(*Cytospora* spp.)不同分离株的生物学特性与致病性研究[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(4): 343-351.