

# 苹果树腐烂病菌分生孢子器发育进度的识别

刘 伟, 胡同乐, 王树桐, 王亚南, 曹克强

(河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071000)

**摘 要:**以田间不同发育进度的苹果树腐烂病菌分生孢子器为试材,通过肉眼对其表观特征进行观察,进而采用石蜡切片法对其内部解剖结构进行显微观察,以期建立二者的对应关系。结果表明:田间苹果树腐烂病菌分生孢子器依据发育进度可以划分为3种类型:分生孢子器原基、未成熟的分生孢子器和成熟的分生孢子器,3种类型的分生孢子器通过其表观特征可相互区分;该研究揭示了该病原菌分生孢子器组织学发育特点与表观特征之间的对应关系,为以后田间调查不同发育进度类型的分生孢子器提供了标准和快速识别的方法。

**关键词:**苹果树腐烂病菌;分生孢子器;发育类型;识别

**中图分类号:**Q 939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0114-04

苹果树腐烂病是苹果三大病害之首,是广泛分布于苹果产区的世界性病害。19世纪末,日本最先发现此病,我国于1916年在辽宁省南部地区首次发现<sup>[1-2]</sup>。随着苹果栽培区域的扩大,现该病害广泛发生于东北、华北、西北、皖北、豫西及川南等十余省区<sup>[3]</sup>。据国家苹果产业体系的最新报道,自建国以来苹果树腐烂病先后出现了5次发病流行高峰<sup>[4]</sup>,每次都造成大量果园的毁灭,严重地困扰着苹果产业的健康、持续发展。

我国对苹果树腐烂病的研究始于20世纪50年代初<sup>[5]</sup>,早期的研究主要从宏观上探究病害的传播、侵染和发病等问题。随着研究方法和技术手段的更新,研究的层次从宏观调查逐步转向了微观分析。2012年Ke等<sup>[6]</sup>通过电镜和石蜡切片技术,从组织细胞学角度揭示了苹果树腐烂病菌(*Valsa mali* var. *mali*)在树体组织内侵染和定殖的过程。苹果树腐烂病菌主要传播介体是分生孢子,它由病斑组织上分生孢子器产生和释放,所以该病菌分生孢子器的形成及发育规律成为研究病菌侵染来源的重要环节<sup>[7]</sup>。在田间快速识别病斑上分生孢子器的发育进度对于调查孢子器何时大量成熟,判断何种病斑还具有传播病原菌分生孢子的能力等都起到了重要作用。基于上述问题,该试验以田间不同发育进度的苹果树腐烂病分生孢子器为试材,通过显微观察技

术归纳总结出分生孢子器在发育过程中几个明显类型,并且将表面观察和其所处发育进度建立对应关系,使研究者在田间调查分生孢子器发育进度时通过表面观察即可确定,为观察记录提供快速判断的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

苹果树腐烂病分生孢子器的获得:从河北省主要苹果产区采集苹果树腐烂病症状明显且具有分生孢子器(小黑点)的枝条和树皮,带回实验室备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 肉眼观察 用肉眼对具有苹果树腐烂病分生孢子器(小黑点)的枝条或树皮进行直接观察。以分生孢子器所处位置、在树皮表面突起程度、是否突破树皮表面形成明显孔口及分生孢子器周围的树体组织是否隆起等作为指标。将分生孢子器划分为不同的发育进度类型,记录每种类型的特征并且拍照记录。

1.2.2 石蜡切片的制作及观察 固定:将不同发育进度类型的苹果树腐烂病菌分生孢子器(小黑点)从病组织中完整取出,分别放置在FAA固定液(50%酒精89 mL,福尔马林5 mL,冰醋酸6 mL)中固定48 h。脱水:按表1配成4种含醇量(包括叔丁醇和酒精)不等的混合脱水液。将完成固定的材料先在10%、25%及50%的乙醇进行梯度脱水,再依次按表1规定的时间处理,经过第4液处理后,更换100%叔丁醇2次,其中1次处理12 h,另1次处理2 h。透明:所用透明剂为二甲苯,材料处理的顺序依次为:1/2叔丁醇+1/2二甲苯、二甲苯(Ⅰ)、二甲苯(Ⅱ),透明剂的用量均为20 mL,处理时间均为30 min。浸蜡:将上述二甲苯(Ⅱ)倒出12 mL,倒入等体积的熔融石蜡,将标本管置于35℃的恒温箱中放置

**第一作者简介:**刘伟(1988-),男,硕士研究生,研究方向为苹果树腐烂病病害流行。E-mail:lwnorman@163.com.

**责任作者:**曹克强(1963-),男,博士,教授,研究方向为植物病害流行与综合防治。E-mail:ckq@hebau.edu.cn.

**基金项目:**国家苹果产业技术体系资助项目(CARS-28);国家公益性(农业)科研专项资助项目(201203034)。

**收稿日期:**2014-03-19

72 h,使石蜡慢慢溶解渗入组织。放置 72 h 后将标本管转移至 54℃ 的融蜡箱中,待上层石蜡完全融化后,将标本管中石蜡和二甲苯全部倒出,换入新的熔融石蜡,于 55℃ 过夜处理后,再换一次石蜡,于 60℃ 处理 6 h 后即完成石蜡渗透。包埋:将熔融石蜡倒入适当大小的硬纸盒中,将浸蜡后的材料放入,将纸盒放置在加热的金属板上用平头移植针拨动分生孢子器(小黑点),位置摆放妥当后,将纸盒轻轻提起,渐渐浸入冰水中。当石蜡表面凝结成一层薄膜后,将纸盒完全沉入水中,使石蜡迅速凝固。切片:将包埋有分生孢子器(小黑点)的石蜡修成大小适宜蜡块后,用半自动轮转石蜡切片机进行切片,蜡片的厚度设置为 14  $\mu\text{m}$ 。将切好的蜡带放入 40~43℃ 摊片机中进行摊片,之后在洁净的载玻片上涂上薄薄一层 Mayer 蛋白甘油粘合剂(新鲜蛋白与等量纯甘油混合,加入水杨酸钠 1 g,用玻璃棒搅拌均匀后 4 层纱布过滤),用载玻片将蜡带从水中轻轻捞起后置于烘片机上烘干。去蜡:将完全烘干粘有蜡带的载玻片置于二甲苯中 5 min,更换新的二甲苯浸泡 5 min,然后移至无水乙醇中浸泡 5 min,95% 乙醇浸泡 5 min,70% 乙醇浸泡 5 min,随后用蒸馏水漂洗 3 次,每次 3 min。封固及观察:在切片上加 1 滴加拿大树胶,将盖玻片慢慢盖上封固。用 OLYMPUS 数码显微镜观察分生孢子器的石蜡切片并拍照记录<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 田间苹果树腐烂病病斑上分生孢子器的发育进度

对田间苹果树腐烂病病斑上分生孢子器表现特征观察和采用石蜡切片法对其内部显微结构特征观察结果表明,田间病斑上的分生孢子器从发育进度来看

可以分成 3 种类型:分生孢子器原基、未成熟的分生孢子器和成熟的分生孢子器,它们各自的表观特征和显微结构特征分别叙述如下。

**2.1.1 分生孢子器原基** 处于此发育阶段的分生孢子器表观及显微结构特征如图 1 所示。从病斑表面来看,这个类型的分生孢子器呈深褐色的点状物,突起不明显且没有顶破树皮,点状物周围的树体组织也没有隆起(图 1A)。在新发生的病斑或老病斑扩展的边缘区域会产生这种类型的分生孢子器。将分生孢子器外面的树皮剖开,可以观察到这一类型的分生孢子器没有结构上的分化,仅为一团紧实的原生物质埋生在树皮下面(图 1B)。同样,其石蜡切片的观察结果也说明分生孢子器的腔室及孔口等结构没有形成(图 1C),是分生孢子器最初形成的结构,是其发育进度的第一个类型,将其命名为分生孢子器原基。

**2.1.2 未成熟的分生孢子器** 处于此发育阶段的分生孢子器从病斑表面来看,“小黑点”即分生孢子器呈黑褐色疣状物,突起较明显,但没有顶破树皮表面,仍然全部埋生在树皮表面以下(图 2A)。由于这种类型孢子器的腔室已开始分化,根据分化程度的不同致使疣状物周围的树体组织出现不同程度的隆起。剖开树皮可以观察

表 1 4 种脱水溶液的配制比例及材料处理时间

	第 1 液(70%)	第 2 液(85%)	第 3 液(95%)	第 4 液(100%)
蒸馏水	30	15	0	0
乙醇(95%)	50	50	45	0
叔丁醇	20	35	55	75
乙醇(100%)	0	0	0	25
处理时间/h	12	2	2	2

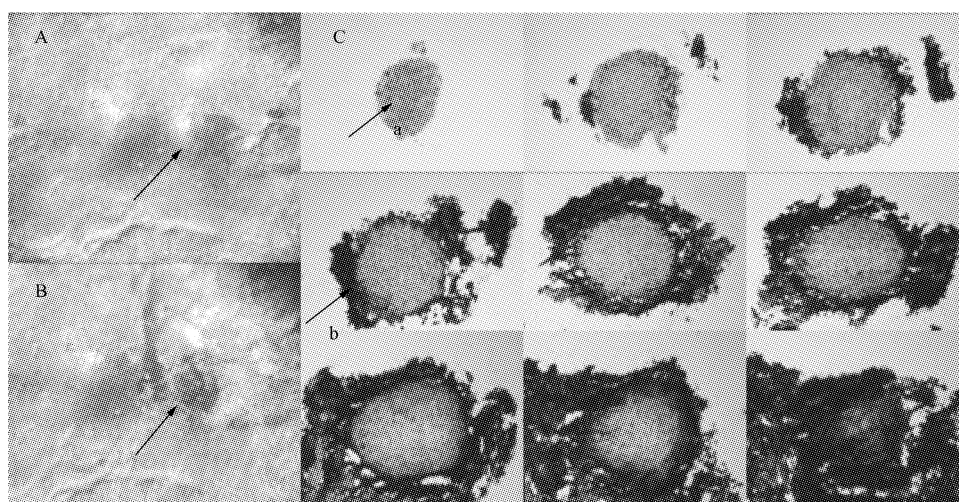


图 1 分生孢子器原基的表形和石蜡切片

Fig. 1 The observation of bark surface and paraffin sections of pycnidial primordium

A:从树皮表面观察的结果(箭头);B:剖开树皮呈现为一团紧实的原生物质(箭头);C:分生孢子器的原基石蜡切片系列横截面(a 为分生孢子器的内部菌丝组织,b 为由菌丝和寄主组织共同构成的分生孢子器壁)。



到该类型的分生孢子器的孔口和腔室已初步分化形成(图 2B)。通过这一类型分生孢子器的石蜡切片观察结果(图 2C)可以看出,虽然分生孢子器的孔口已经形成,但由于还没有分生孢子从孔口中释放到外界,所以孔口

还处于密闭状态。同时此类型的分生孢子器已经分化出腔室,大小不定,其中一些较大的腔室内还可以发现分生孢子,将这一发育类型的分生孢子器称为未成熟的分生孢子器。

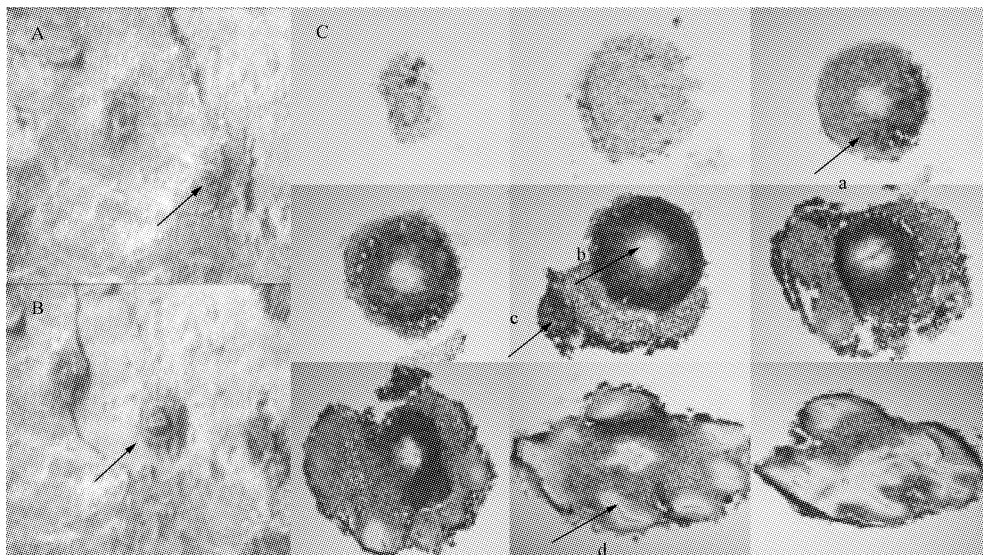


图 2 未成熟分生孢子器的表形和石蜡切片

Fig. 2 The observation of bark surface and paraffin sections of immature pycnidium

A:从树皮表面观察的结果(箭头);B:剖开树皮可见孔口和腔室初分化的分生孢子器(箭头);C:未成熟的分生孢子器石蜡切片系列横截面(a. 孔口的外壁,b. 分化未完整的孔口,c. 树皮组织,d. 发育不完全的腔室)。

2.1.3 成熟的分生孢子器 由图 3 可知,从病斑表面来看,成熟的分生孢子器呈现为突起明显的黑色疣状物,顶破树皮组织并且在树皮表面形成裂口(图 3A),由于腔室已分化完毕(图 3B),使黑色疣状物周围的树皮组织有明显的隆起(图 3A)。该发育类型的分生孢子器一般分

布在病斑区域内靠近中央的位置,基本不会在病斑的边缘形成。通过石蜡切片观察,可知此发育阶段的分生孢子器腔室大小不一,形状也不规则,并且所有腔室的底部相互连通,腔室中通常有分生孢子。

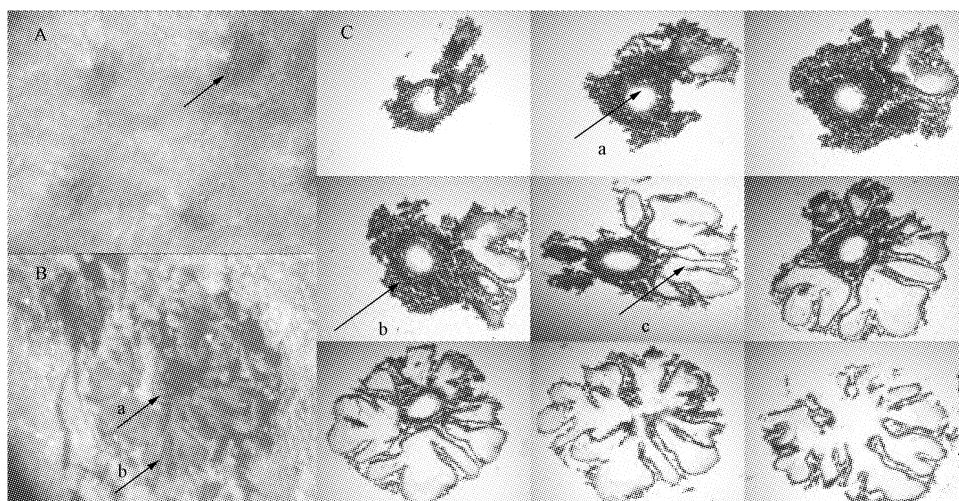


图 3 成熟分生孢子器的表形和石蜡切片

Fig. 3 The observation of the bark surface and paraffin sections of mature pycnidium

A:从树皮表面观察结果(箭头);B:剖开树皮可见孔口和腔室分化完全的分生孢子器(a. 孔口,b. 腔室);C:成熟的分生孢子器石蜡切片系列横截面(a. 孔口,b. 寄主组织,c. 腔室)。

## 2.2 苹果树腐烂病菌分生孢子器田间肉眼识别方法

根据上述观察结果,将3种发育进度阶段的分生孢子器在病斑表面的肉眼观察结果和经石蜡切片显微观察的结构特征总结成表2,可以看出,通过田间树皮上的病斑表面进行观察,可以依据分生孢子器(小黑点)的突起程度和其周围树皮组织隆起程度来区别分生孢子器原基和未成熟的分生孢子器,小黑点突起程度明显且使

周围树皮组织有小幅度隆起的可以判断为未成熟的分生孢子器,反之则为分生孢子器的原基;通过小黑点周围树皮隆起程度和树皮是否被突破形成裂口来区别未成熟的分生孢子器和成熟的分生孢子器,使周围树皮组织小幅隆起且没有裂口的为未成熟的分生孢子器,而使周围树皮组织明显隆起且有裂口的为成熟的分生孢子器。

表2 不同发育进度类型分生孢子器的观察指标

Table 2 Visual observation indexes of the developmental progress of the pycnidium of *Valsa mali* var. *mali* in the field

发育进度类型	肉眼观察指标				解剖结构	
	小黑点突起程度	小黑点周围组织的隆起程度	树皮开裂与否	孔口	腔室	孢子
分生孢子器的原基	不明显	没有隆起	不开裂	无	无	无
未成熟的分生孢子器	明显	小幅度隆起	不开裂	不完整	不完整	通常无
成熟的分生孢子器	明显	隆起明显	开裂	完整	完整	通常有

## 3 结论与讨论

该试验通过田间苹果树腐烂病病斑上分生孢子器表现特征和其内部显微结构特征的对应关系,将苹果树腐烂病菌分生孢子器根据发育进度先后顺序划分为3种类型,根据相互联系不同类型的分生孢子器的结构特点,将分生孢子器在树体里的发育过程概述为患病的树皮组织中,苹果树腐烂病菌的菌丝集结在一起,形成球状的分生孢子器原基;球状的原生物质团从周围的树皮组织中不断吸收养分,分化出腔室和孔口从而发育成为未成熟的分生孢子器;随后腔室逐步完整,内部逐渐产生分生孢子和胶质,孔口进一步向外突出顶破树皮组织与外界连通,进而发育为成熟的分生孢子器。成熟的分生孢子器在适宜的条件下释放孢子角,形成病害侵染的来源。

由于划分分生孢子器发育进度类型时受到肉眼观察的限制,只能利用明显的识别特征来区分不同类型的分生孢子器,所以该研究仅将其整个发育进度进行了粗略地划分。在试验过程中发现有些未成熟的分生孢子器由于刚分化出腔室,内部还没有产生分生孢子;而有

些分生孢子器发育程度接近于成熟,腔室内生有分生孢子,但是这些孢子器在表面看来都是突起明显且未顶破树皮组织形成孔口,所以从表面观察这类分生孢子器不能准确判断其内部是否含有分生孢子,有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 高克祥,刘晓光. 苹果树腐烂病综合防治研究进展[J]. 河北林学院学报, 1995(1): 88-89.
- [2] 张满良. 农业植物病理学(北方本)[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1997.
- [3] 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.
- [4] 曹克强, 国力耘, 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.
- [5] 陈策. 苹果树腐烂病发生规律和防治研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2009: 9-17.
- [6] Ke X W, Huang L L. Histological and cytological investigations of the infection and colonization of apple bark by *Valsa mali* var. *mali* [J]. Australasian Plant Pathol, 2013, 42: 85-93.
- [7] Bertrand P F, Harley E. Release and dispersal of conidia and ascospores of *Valsa leucostoma* [J]. Phytopathology, 1976, 66: 987-991.
- [8] 戴芳澜. 真菌的形态与分类[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 102-159.

Identification of Developmental Progress of the Pycnidium of *Valsa mali* var. *mali*

LIU Wei, HU Tong-le, WANG Shu-tong, WANG Ya-nan, CAO Ke-qiang  
(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Taking the pycnidium of *Valsa mali* var. *mali* at different developmental progresses as material, the apparent characteristics were observed by the naked eye, then the internal anatomic structure were observed by paraffin section, in order to establish the corresponding relationship between the two parts. The results showed that the pycnidium of *Valsa mali* var. *mali* in the field could be divided into three types according to the developmental progress: pycnidial primordia, immature pycnidium and mature pycnidium, and three types of pycnidium could be distinguished from each other through its apparent characteristics. This study revealed the correspondence between histological development characteristics and apparent characteristics of pycnidium, provided a standard for investigation and a method for fast recognition of different developmental types of pycnidium in the field.

**Key words:** *Valsa mali* var. *mali*; pycnidium; developmental types; identification