

# 梨树腐烂病病菌诱导产孢方法研究

吴湘琴, 吴婷婷, 叶振风, 刘 普, 朱立武

(安徽农业大学 果树学重点实验室, 安徽 合肥 230036)

**摘 要:**采用 5 种培养基质, 在不同的光照培养条件下, 对梨树腐烂病病菌的产孢情况进行研究。结果表明: 接种腐烂病菌丝的基质在 25℃ 的恒温培养下, 经持续黑光灯处理, 分生孢子器的产生时间缩短 3~5 d, 且成熟率提高 10%~20%; 其中, 在 30% PBA 培养基培养 15 d 后产生大量黑色分生孢子器, 25 d 后从分生孢子器体中溢出黄色的分生孢子角; 接种病原菌丝的蒲城雪梨树枝条产生的分生孢子器时间较抗病性强的杜梨和秋白梨提前 2~4 d, 且孢子器和分生孢子数量最多。

**关键词:**梨树腐烂病; 分生孢子; 诱导产孢

**中图分类号:**S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0133-03

梨树腐烂病(*Valsa canker of pear*)又称臭皮病、烂皮病, 主要危害梨树主枝和侧枝, 有时也危害主根基部, 病部树皮腐烂且多发生在枝干向阳面及枝杈部。该病常常造成树势衰弱, 影响梨树的产量和寿命, 当扩展到环绕枝干一周时, 全枝及整株逐渐死亡, 从而造成一定的经济损失<sup>[1-2]</sup>。掌握梨树腐烂病发病流行规律是制定病害防治措施的基础, 而用梨树腐烂病菌的孢子人工接种梨树枝干, 然后观察枝干发病情况, 以及病害的发展过程是研究腐烂病发生和流行规律的基本方法。获取病菌孢子最简单的方法是在早春降雨或空气潮湿时, 到田

间梨树腐烂病病皮上找病菌金黄色的分生孢子角, 或找到带小黑点(子座)的病皮和成熟尚未裂口的分生孢子器带回实验室用温水淋湿, 分生孢子器内可涌出病菌的分生孢子角, 但此种方法易受到环境和季节的限制<sup>[2-7]</sup>。因此, 研究出一种人工诱导梨树腐烂病产孢的方法十分重要, 而梨树腐烂病菌在一般培养基上极难产孢, 所以该试验研究了几种诱导梨树腐烂病菌产孢的方法, 以期筛选出快速产孢的方法, 满足梨树腐烂病流行病学研究的需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**供试菌株:**供试菌株为安徽农业大学果树学重点实验室保存的梨树腐烂病病菌菌株, 分离自河北省保定市省力密植栽培标准化示范园发病的梨树枝条, 试验前将菌株在 PDA 培养基上活化 3~4 d。

**供试产孢基质:**PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖

**第一作者简介:**吴湘琴(1990-), 女, 硕士研究生, 现主要从事植物病害流行和药剂防治筛选等研究工作。E-mail: 1040382345@qq.com.

**责任作者:**朱立武(1961-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为果树资源与生物技术育种。E-mail: zhuliwu@ahau.edu.cn.

**基金项目:**国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201203034)。

**收稿日期:**2013-09-06

## Identification of the Pathogen Causing Shoot Blight of Kiwifruit

LI Cheng<sup>1</sup>, JIANG Jun-xi<sup>1</sup>, LENG Jian-hua<sup>2</sup>, LI Bang-ming<sup>2</sup>, YU Qiang<sup>2</sup>, TU Gui-qing<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045; 2. Agricultural Bureau of Fengxin County, Fengxin, Jiangxi 330700)

**Abstract:** The pathogen caused shoot blight of kiwifruit were isolated and characterized with the pathogenicity test, morphology and rDNA-ITS sequence assay. The results showed that three kinds of fungi were responsible for shoot blight of kiwifruit in Fengxin County. They were *Phomopsis* sp., *Glomerella septospora* and *Botryosphaeria dothidea*, which accounted 39%, 38% and 23% respectively. Three kinds of fungi penetrated shoot of kiwifruit through wounds including PDA plug inoculation and conidial suspension inoculation.

**Key words:** kiwifruit shoot blight; *Phomopsis* sp.; *Glomerella septospora*; *Botryosphaeria dothidea*

20 g,琼脂粉 12 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌备用。PBA 培养基:梨树皮 300 g,琼脂粉 10 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌备用。ABA 培养基:苹果树皮 300 g,琼脂粉 10 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌备用。PBA&ABA 培养基:梨树皮 150 g,苹果树皮 150 g,琼脂粉 10 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃灭菌备用。灭菌的梨树枝条培养基:梨树枝条切成 8 cm 长的小段,加入 3~4 mL 去离子水,121℃湿热灭菌备用。

## 1.2 试验方法

1.2.1 梨树枝条的灭菌 供试产孢梨树枝条选取抗病性弱的荏梨、豆梨和蒲城雪梨,抗病性强的杜梨和秋白梨的 2 a 生健康的枝条,切成长 8 cm 左右的小段,取 3~4 枝装入 250 mL 的三角瓶中,并加入 3~4 mL 蒸馏水,121℃湿热灭菌备用<sup>[6]</sup>。

1.2.2 产孢方法 方法 1:将暗培养 5 d 的腐烂病菌用 5 mm 的打孔器打成菌饼,分别接种于 PDA、PBA、ABA、PBA&ABA 培养基平板中央,每平板 20 mL 培养基,3 次重复,接完用封口膜封好。方法 2:将暗培养 5 d 的腐烂病菌打成直径为 5 mm 的菌饼,接种于灭菌的梨树枝条上(菌丝面向下),每瓶接 3~4 根枝条<sup>[6]</sup>。以上

表 1 光照培养条件对梨树腐烂病菌在灭菌的梨树枝条上产孢的影响

Table 1 Effect of lighting culture conditions on conidia formation of valsa canker of pear on sterile pear tree branches

光照培养条件 Lighting culture conditions	分生孢子器的平均底面直径大小 Average basal diameter of pycnidium/mm	产生孢子器时间 Appearance time of pycnidium/d	溢出孢子角时间 Time of overflow spore angle/d	分生孢子器成熟率 Pycnidium mature rate/%
黑光灯持续照射培养 UV light cultivating	0.46	15	25	87
持续黑暗培养 Dark cultivating	0.34	20	40	68
先黑暗培养再转移黑光培养 First dark cultivating then UV light cultivating	0.41	18	30	76

## 2.2 梨腐烂病在 4 种培养基上的产孢情况

除了 ABA 培养基上培养的菌株,其它培养基均产生子实体分生孢子器,但在不同培养基上产生的分生孢子器数量、时间和孢子含量有显著差异(表 2)。腐烂病菌在 PBA 培养基上产生分生孢子器数量显著高于其它培养基。接种到 PBA 培养基上的腐烂病菌,25℃下培养

表 2 梨树腐烂病菌在 4 种培养基上的产孢情况

Table 2 The formation of conidia by valsa canker of pear on four culture mediums

培养基质 Culture mediums	PDA	ABA	PBA	PBA&ABA
菌丝生长速率 Mycelial growth rates/cm · d <sup>-1</sup>	2.23 a	1.23 b	2.15 a	1.68 b
平均每皿分生孢子器产生数量 Total pycnidium number per plate/个	100 b	—	450 a	89 b
出现分生孢子器的时间 Appearance time of pycnidium/d	20 a	—	15 a	18 b
单个孢子器孢子含量 Spore content in single pycnidium/×10 <sup>6</sup>	42 b	—	54 a	24 c

注:不同小写字母表示在 5%水平上的差异显著性。

2 种产孢试验方法均在 25℃的恒温培养箱里培养,并设置黑暗持续培养、黑光灯照射持续培养、以及‘黑暗+黑光’培养(黑暗先培养 3 d 再转到黑光灯下持续培养)3 种培养方式。计算分生孢子器成熟率,分生孢子器成熟率(%)=出现孢子角的孢子器个数/孢子器总数×100%。

## 1.3 数据分析

梨树腐烂病菌在 5 种培养基上的产孢情况通过 SPSS 软件进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 光照条件对梨腐烂病菌产孢的影响

通过观察发现,不同的光照培养条件下除 ABA 培养基外,其它 4 种培养基上分生孢子器数量在黑光灯照射培养时均有所增加,但分生孢子器大小存在差异,由表 1 可知,持续黑光培养>‘黑暗+黑光’培养>黑暗持续培养。经持续黑光处理,在 4 种培养基上培养的病菌产生分生孢子器的时间缩短 3~5 d,分生孢子器的成熟率提高 10%~20%。综合试验结果,25℃黑光灯照射下梨树腐烂病菌形成的分生孢子器体积大,数量多,产孢速率快,成熟率高。

15 d 可形成分生孢子器,25 d 分生孢子器体中可溢出分生孢子角,1 个培养皿中平均产生 450 个分生孢子器。在 PDA 和 ABA&PBA 培养基上也能产生分生孢子器,大约每皿 100 个,但是未见分生孢子器溢出分生孢子角,研碎后有孢子溢出。在 ABA 培养基上不能产生分生孢子器。

### 2.3 不同灭菌枝条产孢情况

灭菌的梨树枝条接种菌饼 14~18 d 后,三角瓶中的枝条上开始产生大量的黑色小点即分生孢子器。由表 3 可知,抗病性弱的枝条产生分生孢子器的时间较抗病性强的枝条产生分生孢子器的时间缩短了 2~4 d。25 d 后蒲城雪、豆梨和荏梨的分生孢子器已涌出黄色分生孢子角和分生孢子丝。不同品种的梨树枝条产生分生孢子器的时间和数量以及孢子含量存在差异。其中,蒲城雪产生的分生孢子器最多,最早溢出分生孢子角,杜梨产生分生孢子器的时间最长,且溢出的分生孢子角最少。蒲城雪孢子含量最多,其次是荏梨和豆梨,杜梨和秋白孢子含量最少。

表 3

不同灭菌的梨树枝条产孢情况

Table 3

The formation of conidia on different kinds of sterile pear tree branches

梨树枝条 Pear tree twigs	豆梨 Dou pear	蒲城雪梨 Puchengxue pear	砗梨 Chi pear	杜梨 Du pear	秋白梨 Qiubai pear
菌丝生长速率 Mycelial growth rates/cm · d <sup>-1</sup>	2.23	2.25	2.22	2.19	2.21
平均每根枝条分生孢子器产生数量 Total pycnidium number per twig/个	86	90	88	65	72
出现分生孢子器的时间 Appearance time of pycnidium/d	16	14	15	18	17
单个孢子器孢子含量 Spore content in single pycnidium/×10 <sup>6</sup>	50	56	54	49	50

### 3 结论与讨论

梨树腐烂病和苹果腐烂病生物学特性相似,但是二者在菌落颜色、产孢特点以及在高温下的生长情况有一定差别。前者菌落初为白色后期变褐色,而后者菌落始终为乳白色<sup>[8-10]</sup>;前者在 30% ABA 上不能形成分生孢子器而后方能产生较多的分生孢子器。腐烂病菌在 ABA、PDA、PBA 和 ABA&PBA 培养基上产孢量的显著差异,表明梨树腐烂病病菌的产孢需要梨树皮中的某些营养成分,这些营养成分越高越有利于其产孢。

目前,梨树腐烂病还没有一种能够快速大量产生分生孢子的方法,因此,在 PBA 培养基和活体枝条上接种梨树腐烂病病菌是诱导产生分生孢子的最快捷简便的方法,研究分生孢子的产孢条件,有助于更深入的理解腐烂病的发病规律。

试验结果表明,抗病性强的杜梨和秋白梨的枝条产生的分生孢子器比抗病性弱的蒲城雪梨、豆梨和砗梨的枝条产生的分生孢子器数量少的多,而且蒲城雪梨等抗病性弱的枝条能在很短时间内形成分生孢子器,并能很快溢出分生孢子角。所以,试验认为选择抗病性弱的枝条进行诱导产孢试验是比较理想的方法。

### 参考文献

- [1] 王旭丽,康振生,黄丽丽,等. ITS 序列结合培养特征鉴定梨树腐烂病菌[J]. 菌物学报,2007,26(4):517-527.
- [2] Suzuki K. Population structure of *Valsa ceratosperma*, causal fungus of Valsa canker, in apple and pear orchards[J]. J Gen Plant Pathol, 2008, 74: 128-132.
- [3] 赵红,王彩霞,陈晓忍,等. 苹果腐烂病菌诱导产孢方法[J]. 中国农学通报,2012,28(10):151-154.
- [4] Xin Y F, Shang J J. Bio-control trials of *Chaetomium spirale* ND35 against apple canker[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 121-124.
- [5] Bessho H, Tsuchiya S, Soejima J. Screening methods of apple trees for resistance to *Valsa* canker[J]. Euphytica, 1994, 77: 15-18.
- [6] 周宗山,徐成楠,吴玉星,等. 苹果树腐烂病病菌分生孢子获取方法研究[J]. 中国果树,2011(2):41-43.
- [7] 王英,师欣欣,杜国强. 苹果轮纹病病菌分生孢子离体人工诱导技术研究[J]. 中国农学通报,2009,25(1):194-197.
- [8] 陈曲,翟慧者,胡同乐,等. 苹果树腐烂病病菌分生孢子产生条件研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(25):15337-15338,15351.
- [9] 冷伟峰,李保华. 苹果轮纹病诱导产孢方法[J]. 植物病理学报,2009, 39(5):536-539.
- [10] 刘振宇,元玲美,王志勇,等. 梨树腐烂病原菌生长特性的研究[J]. 中国果树,2002(2):7-9.

## Study on the Methods Promoting Conidia Formation of *Valsa ambiens* on Pear Tree

WU Xiang-qin, WU Ting-ting, YE Zhen-feng, LIU Pu, ZHU Li-wu

(Key Laboratory of Pomology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

**Abstract:** The formation condition of the conidia was evaluated using five kinds of substrates under the condition of different illumination cultivating. The results showed that the pycnidium producing time was shortened 3~5 days by sustained in UV light and the rate of maturity of pycnidium increased by 10%~20% under 25℃ temperature raised. Among them, the fungi produced a large number of black pycnidium cultured in 30% of the PBA medium under UV light after 15 days. Then the pycnidium extruded conidia threads after 10 days. The pycnidium producing time of the inoculated Puchengxue pear (*Pyrus pyrifolia*) twigs with *V. ambiens* was less 2~4 days than the Qiubai pear (*P. bretschneideri*) which was resistance to weak and the most number of pycnidiums and conidia were produced.

**Key words:** pear canker; conidia; promote conidia formation