

doi:10.7668/hbxb.2014.06.024

苹果黑点病不同症状类型致病菌及侵染条件研究

王翠翠,金 静,李保华,王彩霞,董向丽,张振芳

(青岛农业大学 农学与植物保护学院,山东省植物病虫害综合防控重点实验室,山东 青岛 266109)

摘要:为了明确黑点病的诱因与发病条件,将套袋苹果的黑点病斑划分为黑斑型、褐变型、黑点型和内变型4种类型。黑斑型病斑中,*Alternaria*属的病菌分离频率最高,占89%;褐变型病斑中,*Acremonium*和*Alternaria*分离频率较高,占80%以上;黑点型病斑中,*Trichothecium*和*Alternaria*的分离频率高,占75%以上。其中,3株分离频率较高的真菌分别为*A. tenuissima*、*A. sclerotigenum*和*T. roseum*。3株病菌中离,*T. roseum*致病力最强,从离体果实的伤口侵染后形成大型褐色病斑,病菌侵染与扩展的最适温度分别为26.8,22.5℃;*A. tenuissima*致病力稍弱,从伤口侵染后形成的病斑稍小,颜色为深褐至黑色,病菌侵染与扩展的最适温度分别为29.4,28.5℃;*A. sclerotigenum*的侵染率很高,对温度不敏感,从伤口侵染后也能导致果肉组织褐色坏死,形成红褐色病斑。3种病菌的分生孢子均不能侵染成熟无伤果实。用3种真菌分生孢子接种的套袋果实,*T. roseum*接种果实发病最重,*A. tenuissima*接种的果实发病率稍低,用*A. sclerotigenum*接种的果实几乎没有发病。黑点病菌属于机会致病菌,遇适宜条件才能侵染致病。

关键词:机会真菌;侵染;致病条件;病斑类型;有伤侵染

中图分类号:S436.6 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)06-0136-09

Pathogens Isolated from Different Symptoms of Black Spot Disease and Infection Conditions

WANG Cui-cui, JIN Jing, LI Bao-hua, WANG Cai-xia, DONG Xiang-li, ZHANG Zhen-fang
(College of Crop Protection and Agronomy, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, Qingdao 266109, China)

Abstract: Four types lesions of black tissues type, brown type, black spot type and hardening type were divided in order to determine reasons and infection conditions of black spot disease. The isolation percentage of *Alternaria* spp. was 89% from black tissues type. The isolation percentage of *Trichothecium* and *Alternaria* were 75%, and isolation percentage of *A. tenuissima*, *A. sclerotigenum* and *T. roseum* were the highest. Among them, *T. roseum* was the most pathogenic pathogen which led to large brown lesion on ripe fruit when infected from wounds. The optimum temperatures for infection by conidia of *T. roseum* and lesion expansion were 26.8, 22.5℃ respectively. *A. tenuissima* caused large dark or brown lesions on ripe apple fruit when infected from wounds. The optimum temperatures for infection by conidia of *A. tenuissima* and lesion expansion were 29.4, 28.5℃ respectively. *A. sclerotigenum* owned the highest infection ratio from wounds of mature apple fruit and let to small red-brown lesions on the fruit. The pathogen can fit a wide range of temperature when infection from wounded apple fruit. Conidia of three pathogens could not infected healthy apple. The inoculation with conidia of *T. roseum* caused significant more lesions on the bagged fruits than the other two pathogens, then the *A. tenuissima*, and *A. sclerotigenum* almost did not cause diseased lesions. Pathogens of black spot disease were chance pathogens, and caused disease when met suitable conditions.

Key words: Chance pathogens; Infect; Pathogenic conditions; Types of disease spots; Wound infection

果实套袋已成为苹果生产的主要栽培技术措施。自6月上旬幼果期套袋,至10月上旬果实成熟

前摘袋,果实生长都处于纸袋的保护中。套袋减轻了病虫害危害,降低了农药残留,提高了果品外观质

收稿日期:2014-09-07

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2012CB126302);现代农业产业技术体系项目(CARS-28);山东省泰山学者建设工程专项

作者简介:王翠翠(1988-),女,山东潍坊人,在读硕士,主要从事植物病害流行病学研究。

通讯作者:李保华(1964-),男,山东潍坊人,教授,博士,主要从事植物病害流行病学研究。

量,增加了经济收益,是生产优质、无公害果品的主要技术措施。然而,果实套袋后,表面常产生形状不同、大小不等、褐色至黑色坏死斑,果农称之为黑点病^[1-4]。在套袋苹果上,黑点病每年可导致 3% ~ 30% 的产量损失^[5-9]。

黑点病的症状变化很大,依据黑点病斑的大小、颜色、采收后能否继续扩展等,可将黑点病的症状分为黑斑型、褐变型、黑点型和内变型 4 类。不同的年份间,黑点病的发病严重度和症状变化很大。2003 年是套袋苹果的黑点病发病较为严重的一年,一般果园的发病率都在 10% 以上,病斑以黑点型为主,直径 1 ~ 2 mm、黑色圆形,主要出现在果实的萼洼处,稍大的病斑凹陷,中央有细胞外渗汁液蒸发后留下的白粉蜡状粉末物质^[1-5]。2011 年,烟台苹果产区套袋苹果黑点病发病更为严重,一般果园的病果率为 10% ~ 30%,病重果园的病果率高达 90%。病斑以褐变型和黑斑型为主,圆形,直径多在 2 mm 以上,病斑褐色或黑色,果实采收后病斑继续扩展,而黑点型病斑相对较少。表明黑点病的发生与症状发展和气象因子密切相关。

多数研究认为,病菌侵染是导致套袋果实黑点病发生的主要原因^[3,10-11]。粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)的侵染与黑点病发病关系密切^[3,11-13]。除粉红单端孢外,点枝顶孢霉(*Acremonium strictum*)、顶孢头孢霉(*Cephalosporium acremonium*; *Cephalosporium* 更名为 *Acremonium*)和链格孢(*Alternaria* spp.)也是重要的致病菌^[3,5,11,14]。

为了研究套袋苹果黑点病不同症状类型的形成机制,了解导致不同症状类型的致病菌及其侵染致病条件,2011 和 2012 年从山东栖霞、蓬莱、沂源等地采集黑点病果,将黑点病的症状分成 4 种类型,从不同症状类型的病斑上分离真菌,对其中 3 株可能的致病菌进行种属鉴定,测试其致病性,并研究其侵染致病条件,以期了解苹果黑点病不同症状类型的形成机制,为黑点病的防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 病菌分离与鉴定

2011 和 2012 年 10 月份,自山东蓬莱、栖霞、沂源等地采集套袋富士苹果的黑点病果,根据病斑颜色、大小、所处位置、采收后病斑能否继续扩展等,将黑点病斑分成 4 种类型:黑斑型,病斑黑色或深褐色,或病斑内有黑色组织,病斑大,直径超过 1 mm,采收后病斑继续扩展;褐变型,病斑红褐色或浅褐色,病斑内无黑色病变组织,病斑大,直径超过 1 mm,采收后病斑继续扩展;黑点型,病斑为黑色或褐色,病组织干枯,或直径小于 1 mm,生长后期病斑不再继续扩展;内变型,病斑凹陷,果肉硬化或变褐坏死,病斑表皮完好或部分坏死,由生理病变所致(图 1)。

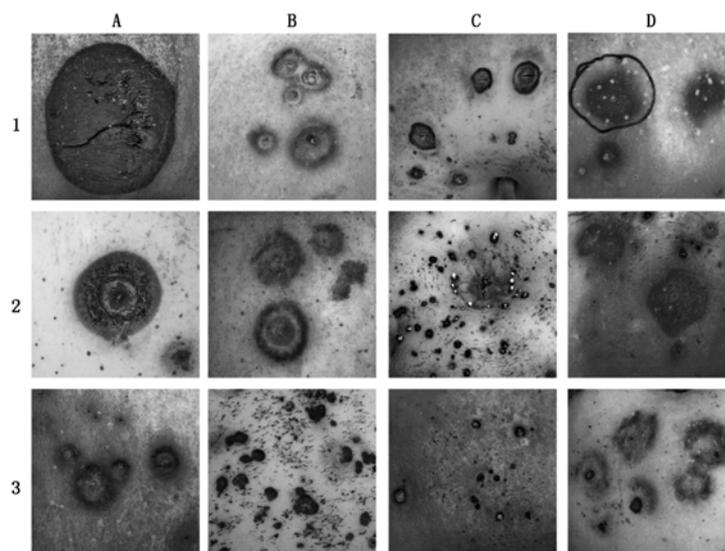


图 1 2,3 代表将 A、B、C、D 四大类病斑根据有无晕圈或病斑大小等病斑特征细分的三小类病斑。
1,2,3 represent more specific symptoms below A,B,C,D according to the absence of halo or lesion size.

图 1 四种类型的黑点病斑

Fig. 1 Four types of black spot

先取病果,用 75% 的酒精擦拭果面,消毒 2 ~ 3 min。待酒精挥发后,从病果上选取典型的黑点型、褐变型和黑斑型病斑,分别取整个病斑或自病斑边

缘切取 0.3 cm × 0.3 cm × 0.3 cm 的组织,置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,每皿 5 ~ 10 块,25 °C 下培养 3 ~ 5 d 后,挑取新生菌落边缘的菌丝,

转接至 PDA 平板上获得纯化菌株。

将分离菌株置于 PDA 平板上, 25 °C 培养 5 ~ 10 d 后, 观察菌落的颜色、大小、孢子形态等。依据菌落、孢子的形态特征, 参考有关文献将分离菌株鉴定到属或种, 并计算各类病斑上不同种属真菌的分离频率。

从黑斑型、褐变型和黑点型病斑分离菌株中, 选择在 3 类病斑中分离频率都较高的 *Alternaria* 菌株, 褐变型病斑分离频率较高 *Acremonium* 菌株和黑点病斑中分离频率较高的 *Trichothecium* 菌株, 对其种属作进一步鉴定, 并测试其致病性, 研究其侵染致病的条件, 以判断 3 种病菌是否是导致 3 种症状的主要病原菌。

以上 3 属的真菌是文献中报道的黑点病的重要致病菌。从 3 属的真菌各选 1 株出现频率高、形态特征明显的菌株。

除依据形态学进行鉴定外, 借助 ITS 序列最终将 3 株病菌鉴定到种。将待鉴定的菌株在 PDA 上培养 5 ~ 7 d, 产生孢子后, 挑取单孢, 获得单孢分离菌株。单孢菌株在 PDA 上培养 10 d 后, 刮取菌丝与孢子的混合物, 经研磨后, 用上海生工生物工程技术服务有限公司的试剂盒提取 DNA, 加 30 μ L TE 溶液溶解。用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增目标菌株的 ITS 序列。PCR 采用 25 μ L 的反应体系: 模板 DNA 1 μ L、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L、dNTP mix 2 μ L、引物各 1 μ L、双蒸去离子水 17.25 μ L。扩增 ITS 序列的反应程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。利用 Blast 将测得序列与 GenBank 中相似序列进行同源性比对, 并用 MEGA 6.0 构建系统进化树, 根据比对和系统进化的分析结果, 将菌株鉴定到种。

1.2 接种病菌准备

将上述 3 个菌株转接到 PDA 中, 在 25 °C 下培养 7 d, 用灭菌的蒸馏水冲洗菌落配制孢子悬浮液, 用血球计数板将 *T. roseum*、*A. tenuissima* 和 *A. sclerotigenum* 3 种菌株孢子悬浮液的浓度调为 10^4 , 10^4 , 10^6 个/mL。将 3 种孢子悬浮液等体积混合, 制作混合菌种。孢子悬浮液配制后在 1 h 内用完。

1.3 致病力测定

致病测试所用果实为采自山东莱阳的套袋富士苹果, 于 10 月中旬果实成熟期采摘, 室外常温下保存, 采收后 30 d 内测完。接种前, 选择大小一致, 健康无病的果实, 并用 75% 酒精擦拭果实表面 2 ~

3 min, 进行表面消毒。

将待测的 3 种病菌在 PDA 平板上 25 °C 下培养 7 d。选取消毒果实 15 个, 用直径 5 mm 的打孔器在果实腰部沿同一水平线均匀地打 4 个深度为 4 mm 的圆形伤口。用同样打孔器在已培养菌落的边缘打取菌饼, 将菌饼接种到果实的伤口内, 使菌丝紧贴果肉。每个果实同时接种 3 种病菌和对照, 以 PDA 培养基作为空白对照。将接种果实置于保湿缸中, 在 25 °C、>95% 相对湿度下培养 10 d。待接种果实发病后, 用十字交叉法测量病斑直径, 沿果实腰部将果实切开, 测量病变组织的深度, 按圆锥体计算病变组织的大小。试验在不同时间重复 3 次。

另选 12 个无伤果实, 将孢子均匀喷洒到果实的表面, 直到有水滴流下为止。每种病菌接种 3 个果实, 用无菌水作对照。将接种果实置于保湿缸中, 在 25 °C、>95% 相对湿度下培养 10 d。然后, 观察每个果实的发病情况, 记录发病的病斑数。试验在不同时间重复 3 次。

1.4 温度和相对湿度对病菌分生孢子侵染和致病的影响

温度和湿度对 3 种病菌分生孢子侵染与扩展的影响试验设置 6 个温度: 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C, 每个温度设置 100%, 90%, 70% 3 个相对湿度处理, 共 18 个组合。温度由恒箱 (上海一恒, MGC-250BP-2) 控制。100%, 90%, 70% 的相对湿度是在直径 21 cm 的保湿缸内分别加入 300 mL 蒸馏水、300 mL 2.6 mol/L 的食盐水和 300 mL 饱和食盐水控制。接种前, 选取 72 个消毒苹果, 放于 18 个保湿缸中, 在相应的温度湿度下预处理 12 h。接种时, 在每个果实上用消毒针均匀刺出 20 个 2 mm 深的伤口, 将孢子悬浮液均匀地喷洒在刺伤的表面, 直到有水滴流下为止。接种后立即将接种苹果放回置于原来的保湿缸中, 在相应的温度下培养 15 d 后。检查每个伤口的发病情况, 记录病斑数, 计算伤口的侵染率。用十字交叉法测量病斑直径。

1.5 套袋果实接种

2013 在山东莱阳谭格庄乡一个中等管理水平的苹果园内选取 2 株树势中庸的富士苹果树, 作为试验用树。试验树于 5 月 13 日盛花, 6 月上旬套袋, 10 月中旬果实成熟并采收。套袋果实分 5 次接种, 每月 1 次。接种时, 选择同等大小的健康果实, 摘下果袋 (5 月 30 日为接种后再套袋), 分别将 3 种病菌及 3 种病菌的混合孢子悬浮液均匀喷洒在果面上, 直到有水滴流下为止。接种果实套自封式塑料袋, 保湿 24 h 后摘下自封袋, 并换上普通的纸质新

果袋。每次每种孢子悬浮液在每株树上接种 10 个果实, 4 种孢子悬浮液在 2 株树上共接种 80 个果实。接种果实于 10 月中旬成熟期采摘, 检查记录每个接种果实上的病斑类型和数量。

1.6 数据处理与分析

分别以伤口接种形成病组织的体积、每个果实针刺伤口的发病率和病斑直径、田间接种的每个果实上的病斑数为基本数据单元, 采用通用线性模型 (GLM) 进行方差分析, 比较 3 种病菌致病力差异, 以及温度湿度对 3 种病菌侵染和扩展的影响效果。方差分析时, 假设病组织体积和病斑直径呈正态分布、伤口发病率呈二项分布、每个果实上病斑数呈泊松分布, 在 GLM 模型中调用 Gaussian、Binomial 和 Poisson 函数。方差分析、数据拟合和绘图全部用 R 语言实现, 在 R v3.0.2 中完成。

2 结果与分析

2.1 病菌的分离与鉴定

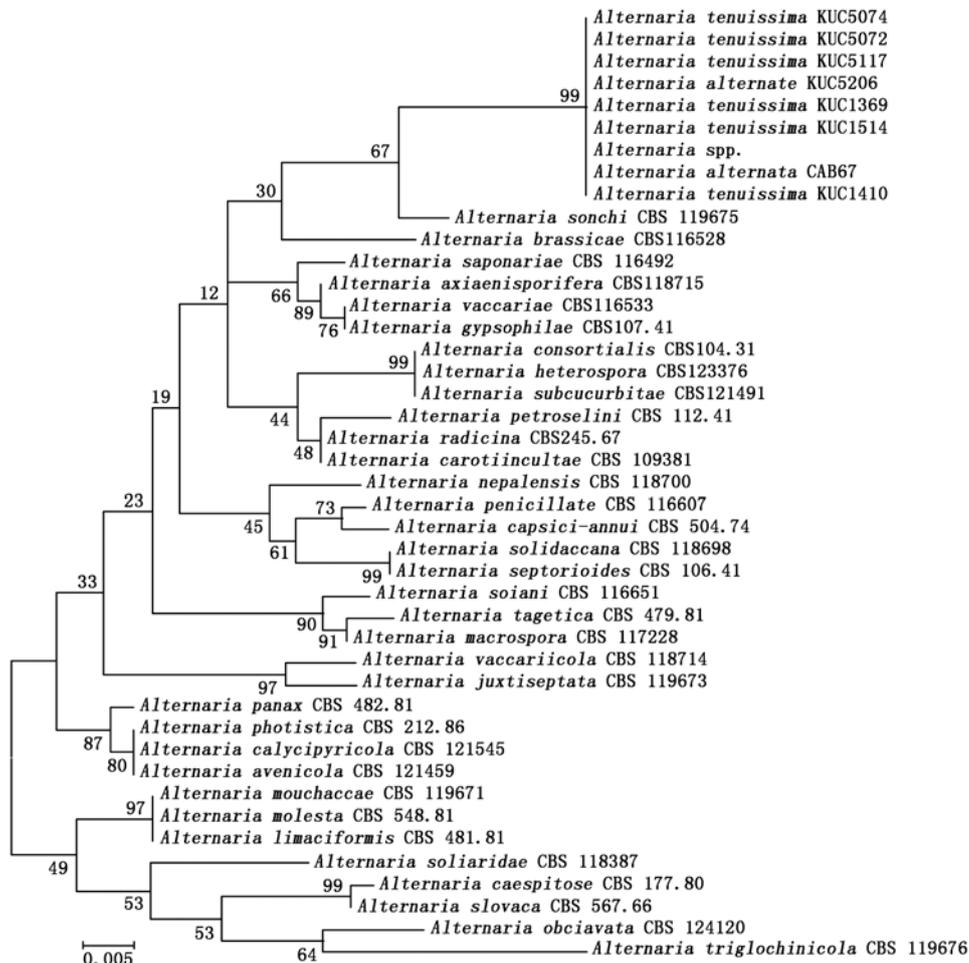
2011 和 2012 年从套袋苹果黑点病斑上分离获得

的真菌有链格孢 (*Alternaria*)、粉红单端孢 (*Trichothecium*)、枝顶孢 (*Acremonium*)、青霉 (*Penicillium*)、曲霉 (*Aspergillus*)、芽枝孢属 (*Cladosporium*)、镰刀菌 (*Fusarium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、根霉属 (*Rhizopus*) 9 个属的真菌^[1,5-18]。其中, 黑斑型病斑上 *Alternaria*

表 1 不同类型的黑点病斑上各属真菌的分离频率

Tab.1 Frequency of fungi of different species isolated from different types of black spots %

分离真菌 Fungi	病组织带菌率 Probability of diseased tissues carried fungi		
	黑点型 Black spots type	褐变型 Browning- type	黑斑型 Black tissues type
	链格孢 <i>Alternaria</i>	53.03	38.46
粉红单端孢 <i>Trichothecium</i>	25.76	1.10	1.10
枝顶孢 <i>Acremonium</i>	0.00	43.96	1.10
青霉 <i>Penicillium</i>	4.55	3.30	5.49
曲霉 <i>Aspergillus</i>	16.67	7.69	5.49
芽枝孢属 <i>Cladosporium</i>	10.61	0.00	0.00
镰刀菌 <i>Fusarium</i>	0.00	1.10	0.00
木霉属 <i>Trichoderma</i>	0.00	0.00	2.20
根霉属 <i>Rhizopus</i>	0.00	0.00	3.30



用 Maximum Likelihood (ML) 构建系统进化树, 节点值表示 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值。图 3 ~ 4 同。

The phylogenetic were constructed with method of Maximum Likelihood (ML), and the values on node represent bootstrap values for repeating 1 000 times. The same as Fig. 3 - 4.

图 2 基于 43 个 *Alternaria* 属菌株 ITS 序列构建的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS sequences of 43 isolates from genus of *Alternaria*

属的病菌分离频率最高,占89%;褐变型病斑上 *Acremonium* 和 *Alternaria* 分离频率占80%以上;黑点型病斑上 *Trichothecium* 和 *Alternaria* 的分离频率占75%以上(表1)。

自3种类型病斑上分离频率都较高的链格孢菌株,在PDA培养基上菌落圆形,初为墨绿色后转为黑色。分生孢子为暗褐色,倒棍棒型或纺锤型,大小为(14.18~36.97) μm \times (5.92~14.48) μm ,有4~6个横隔,0~3个纵隔。其形态特征符合 *A. tenuissima* 的鉴定特征。该菌株的ITS序列共526 bp,与 *A. tenuissima* 同源性高,与 *A. tenuissima* 的3个菌株属同一分枝(图2),该菌株被鉴定为 *A. tenuissima*。

自黑点病病斑上分离的粉红单端孢属菌株,在PDA培养基上菌落初为白色后转为粉红色,粉质状,分生孢子梗直立、不分枝、无隔、偶见分隔。孢子

在孢子梗顶端单个生成,为双胞,大小(12.02~18.03) μm \times (3.83~9.29) μm ,孢子在孢子梗顶端聚集成圆形或矩形孢子头,符合 *T. roseum* 的鉴定特征,其ITS序列含561 bp,与 *T. roseum* 的同源性高,在系统进化树中与 *T. roseum* 属于同一分枝(图3),该菌株鉴定为 *T. roseum*。

从褐变型病斑上分离的枝顶孢属菌株,在PDA培养基上菌落绒毛状、菌丝厚,正面白色到粉红色,背面黄色,培养2周后菌落大小为(5.0~5.2) cm \times (5.1~5.4) cm 。分生孢子梗由气生菌丝产生,分生孢子长椭圆形,全部为头状排列,孢子大小(2.1~7.5) μm \times (1.1~3.0) μm 。以该菌株的DNA为模板扩增的ITS序列共576 bp。该序列与 *A. sclerotigenum* 的同源性高,在系统进化树中与 *A. sclerotigenum* 属同一个分枝(图4),该菌株鉴定为 *A. sclerotigenum*。

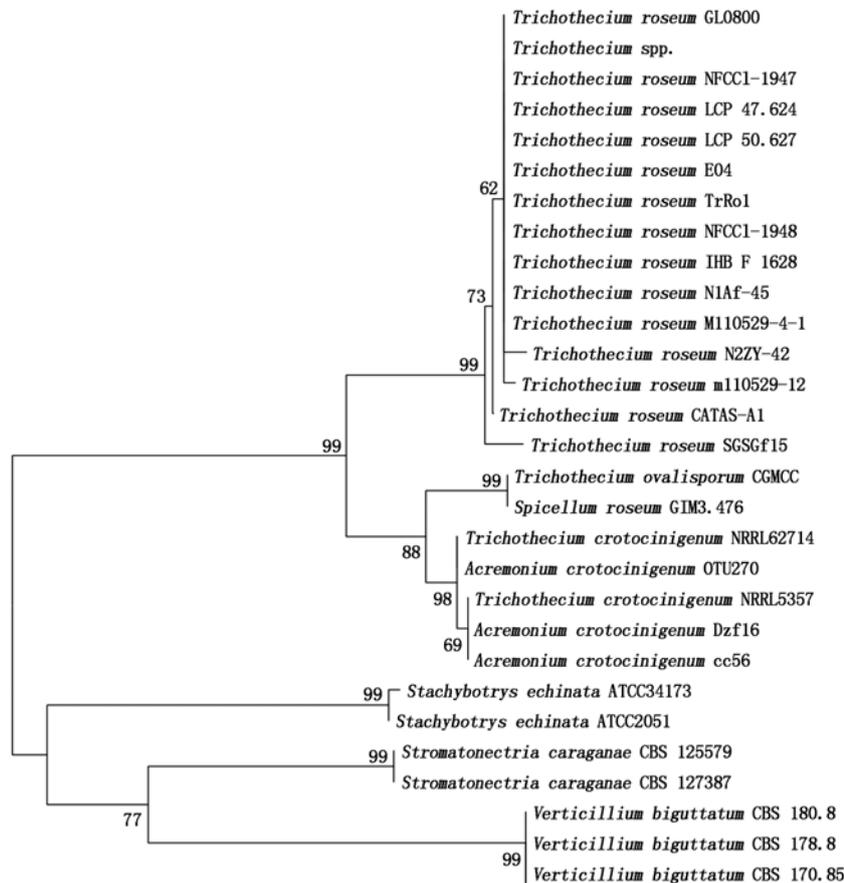


图3 基于29个 *Trichothecium* 及相近属菌株 ITS 序列构建的系统发育进化树
Fig.3 Phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS sequences of 29 isolates from *Trichothecium* and closely related genus

2.2 三株病菌的致病力

用菌饼接种离体富士苹果成熟果实的伤口,接种果实在25℃下保湿培养10d后,出现大小、深浅不一的病斑。接种 *A. tenuissima* 所致病斑为不规则圆形,外围深褐色,中部黑色,病部果肉腐烂,且中央有黑色霉层(图5-A); *T. roseum* 所致病斑表面为深

褐色不规则圆形,病部果肉腐烂,中央有粉红色霉层(图5-B); *A. sclerotigenum* 所致病斑圆形,红褐色,病斑小,外缘凹陷,硬化,病变组织失水呈海绵状,病斑上偶尔出现淡粉色霉层(图5-C)。从病斑上分离到病原菌与接种病菌相同。

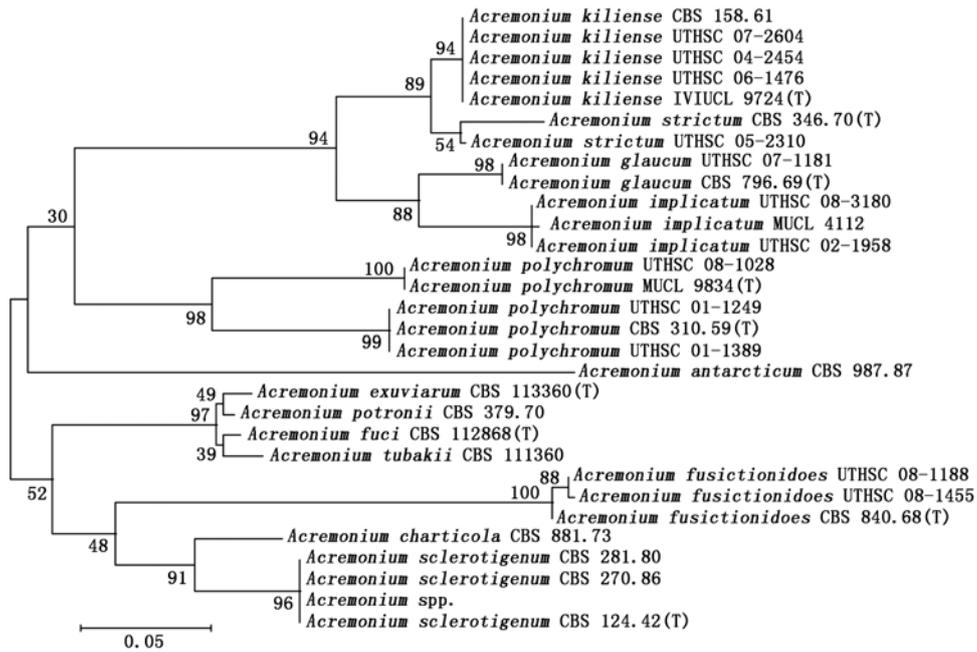
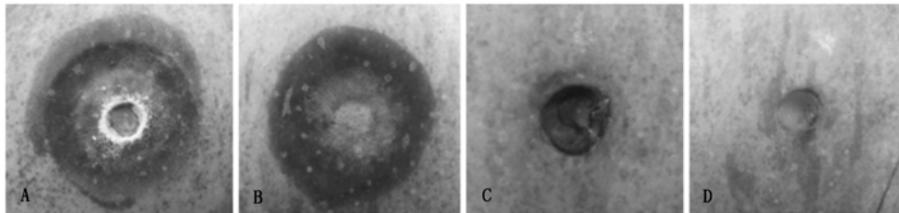
图 4 基于 30 个 *Acremonium* 属菌株 ITS 序列构建的系统发育进化树Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS sequences of 30 isolates from *Acremonium*A ~ D. 菌株 *T. roseum*, *A. tenuissima* 和 *A. sclerotigenum* 菌饼和 PDA 培养基接种 10 d 后的症状。
A-D were symptoms on apple fruit inoculated with fungus cake of *T. roseum*, *A. tenuissima* and *A. sclerotigenum* from wounds and incubate for 10 days.

图 5 三种病菌的菌饼在离体富士苹果伤口接种所形成病斑的症状

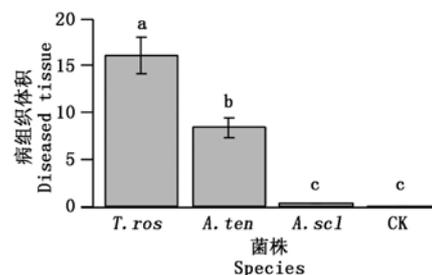
Fig. 5 Symptoms of wounds inoculated with the fungus cake of three fungi

病变组织体积的方差分析结果表明, *T. roseum* 在果肉组织的扩展速度较快, 形成病变组织的体积为 $(4.64 \pm 3.66) \text{ cm}^3$, 显著高于 *A. tenuissima* 所致病组织的体积 $(2.27 \pm 1.78) \text{ cm}^3$ ($P < 0.05$)。 *A. sclerotigenum* 扩展速度最慢, 在果实上形成病组织的体积最小, 仅为 $(0.11 \pm 0.05) \text{ cm}^3$, 显著的小于 *A. tenuissima* 所致病组织的体积 ($P < 0.05$)。对照果实的果肉组织内无任何病变, 图 6 数据为伤口组织的大小。

用 3 种真菌的孢子悬浮液接种离体无伤果实, 在 25°C 下保湿培养 10 d 后, 接种果实上均未发现明显的病变。

2.3 温度、湿度对 3 种病菌侵染与致病的影响

3 种病菌的分生孢子在测试温度范围内 ($10 \sim 35^\circ\text{C}$) 都能从离体富士苹果果实的针刺伤口侵染, 且能在果肉组织扩展形成可见病斑。相对湿度 ($70\% \sim 100\%$) 对 3 种病菌孢子侵染率与病菌在果肉组织内的扩展速度无显著影响。

不同字母表示病斑体积在 0.05 水平上差异显著 ($P < 0.05$); 病斑体积按照圆锥体体积计算。图 8 同。

Different letters indicate the diseased tissue volumes are significant difference at level of 0.05 ($P < 0.05$); Lesions volume calculated according to the volume of a cone. The same as Fig. 8.

图 6 三种病菌的菌饼接种离体富士苹果伤口形成病变组织的体积

Fig. 6 Volume of diseased tissue caused by inoculating three fungi

T. roseum 分生孢子从伤口侵染的发病率 (P_t) 及病菌扩展形成的病斑直径 (D_t cm) 与温度 (T) 间的关系, 可用 2 个多项式模型描述:

$$P_t = - (0.1011 \pm 0.05688) + (0.176 \pm$$

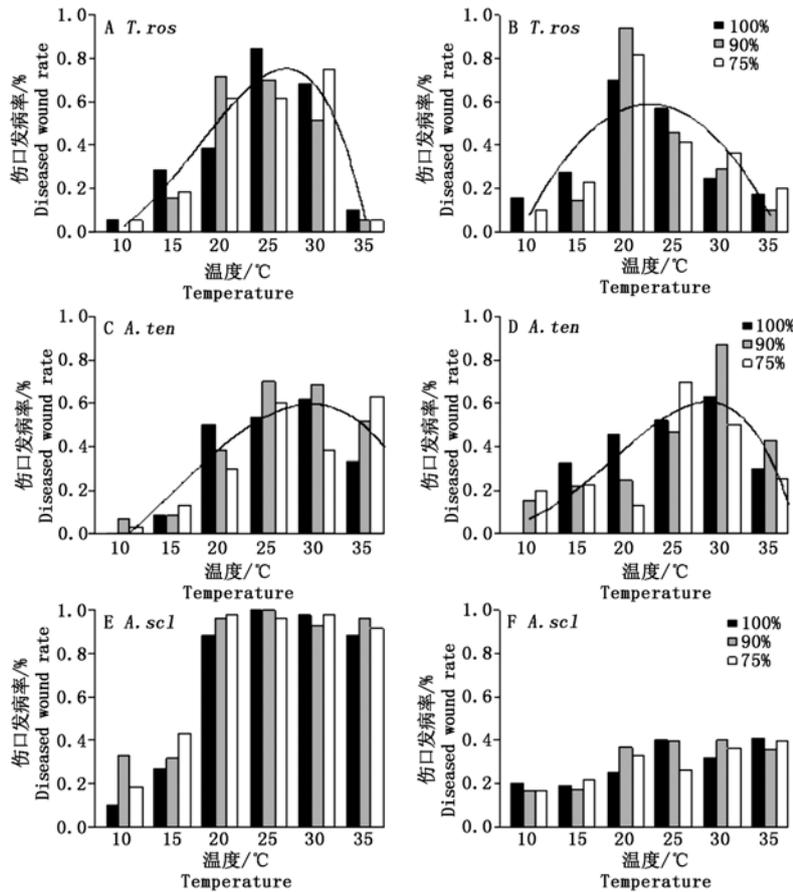
$$0.016\ 00)T^3 - (0.049\ 43 \pm 0.004\ 453)T^4 \quad (R - \text{squared} = 0.707\ 3) \quad \textcircled{1}$$

$$Dt = - (1.075\ 09 \pm 0.429\ 3) + (1.475\ 9 \pm 0.388\ 50)T - (0.327\ 6 \pm 0.082\ 34)T^2 \quad (R - \text{squared} = 0.292\ 4) \quad \textcircled{2}$$

为了避免模型参数得过小估计,温度模型中 T 为实际温度的 $1/10$ 。模型曲线如图 7 所示。依据

上述模型,最适合 *T. roseum* 侵染和病斑扩展的温度分别为 $26.8, 22.5^\circ\text{C}$ 。

在相对湿度为 100%, 90% 和 70% 3 个湿度下, *T. roseum* 孢子的平均侵染率分别为 39.2%, 35.6%, 37.8%, 培养 10 d 后,病斑的平均直径分别为 0.37, 0.45, 0.40 cm。3 个相对湿度下的平均侵染率和病斑扩展直径无显著差异 ($P > 0.05$)。



A、B、C 和 D 中的曲线分别为模型 1、2、3 和 4 的曲线。

The curves on A, B, C and D are the curves of equation 1, 2, 3 and 4.

图 7 温度、相对湿度对 3 种病菌的分生孢子从富士苹果离体果实针刺伤口侵染和病斑扩展的影响

Fig. 7 Effects of temperature and relative humidity on infection from wounds by conidia of *T. roseum*, *A. tenuissima* and *A. sclerotigenum*, and disease development

温度对 *A. tenuissima* 孢子侵染和病斑扩展的影响也可用 2 个多项式描述,

$$Pa = - (0.245\ 1 \pm 0.088\ 16) + (0.292\ 2 \pm 0.052\ 21)T^2 - (0.066\ 30 \pm 0.013\ 85)T^3 \quad (R - \text{squared} = 0.557\ 4) \quad \textcircled{3}$$

$$Da = - (0.012\ 011 \pm 0.126\ 43) + (0.106\ 7 \pm 0.030\ 04)T^3 - (0.028\ 10 \pm 0.008\ 163)T^4 \quad (R - \text{squared} = 0.251\ 3) \quad \textcircled{4}$$

其中, Pa 为分生孢子的从果实伤口侵染的发病率, Da (cm) 为病斑直径, T ($^\circ\text{C}/10$) 温度的 $1/10$ 。图 7 中绘制了 2 个模型的曲线。依据模型, *A. tenuissima* 孢子侵染和病斑扩展的最适温度为 $29.4, 28.5^\circ\text{C}$ 。

在 100%, 90% 和 70% 3 个相对湿度下, *A. tenuissima* 孢子平均侵染率分别为 34.4%, 40.6%, 34.7%, 形成病斑的平均直径分别为 0.46, 0.44, 0.36 cm。3 个相对湿度下的孢子侵染率和病斑扩展直径无显著差异 ($P > 0.05$)。

在 20, 25, 30, 35 $^\circ\text{C}$ 4 个测试温度下, *A. sclerotigenum* 分生孢子的接种发病率均在 90% 以上, 4 个温度下的侵染率没有显著差异 ($P > 0.05$)。在 10, 15 $^\circ\text{C}$ 下侵染率分别为 20.56% 和 33.89%, 显著的低于上述 3 个温度下的侵染率 ($P < 0.05$)。表明在 20 ~ 35 $^\circ\text{C}$ 之间, 温度对 *A. sclerotigenum* 分生孢子的侵染没有显著影响。在 6 个测试温度下, 扩展病斑

直径也没有显著差异($P > 0.05$),都小于 4 mm。

在 100%、90% 和 70% 的相对湿度条件下,*A. sclerotigenum* 分生孢子侵染果实的发病率分别为 68.61%、75.28%、74.44%,扩展病斑直径分别为 0.30、0.32、0.30 cm。湿度对病菌孢子的侵染率和病斑的扩展没有显著影响。

2.4 套袋果实上的接种发病率

3 种病菌接种套袋果实所形成的病斑都为圆形,直径 1~2 mm,暗褐色至黑色的黑点型病斑,病斑出现在整个果面上。未接种的对照果实也有少量病斑,平均每果病斑数为 0.02,症状与接种果实的病斑相同。

3 种病菌中,*T. roseum* 接种果实发病最重,在 5 次接种的果实中每果平均病斑数为 0.61,显著地高于混合菌种、*A. sclerotigenum* 和 *A. tenuissima* 的接种果实($P < 0.05$)。*A. tenuissima* 接种果实发病稍轻,5 次接种的果实中,平均每果病斑数为 0.13,显著低于 *T. roseum* 接种果实($P > 0.05$)。*A. sclerotigenum* 接种果实每果平均病斑数为 0.02,与对照果实无显著差异($P > 0.05$) (图 8-A)。自 5 月 30 日至 9 月 15 日的 5 次接种中,6 月 17 日接种的果实发病最重,4 种孢子悬浮液接种果实的平均每果病斑数为 0.74,显著高于其他时间接种果实 (图 8-B) ($P < 0.05$)

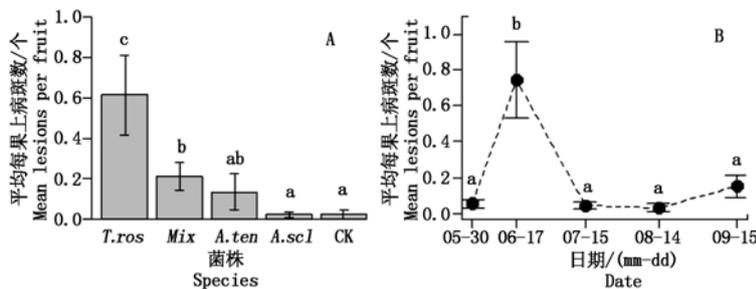


图 8 三种不同的病菌在不同时期接种的套袋果实平均每果病斑数

Fig. 8 Average number of lesions per fruit, which were inoculated with conidia of *T. roseum*, *A. tenuissima* and *A. sclerotigenum* at different date

3 讨论

套袋苹果的黑点病斑可分为黑斑型、褐变型、黑点型和内变型 4 种不同类型的病斑。黑斑型病斑中, *Alternaria* 属的病菌分离频率最高,占 89%;褐变型病斑中, *Acremonium* 和 *Alternaria* 分离频率占 80% 以上;黑点型病斑中, *Trichothecium* 和 *Alternaria* 的分离频率占 75% 以上,3 株分离频率最高的真菌分别被鉴定为 *A. tenuissima*、*A. sclerotigenum* 和 *T. roseum*。其中 *T. roseum* 致病力最强,从离体果实的伤口侵染后形成大型褐色病斑,病菌侵染与扩展的最适温度分别为 26.8、22.5 °C; *A. tenuissima* 致病力稍弱,从伤口侵染后形成的病斑稍小,颜色为深褐至黑色,病菌侵染与扩展的最适温度分别为 29.4、28.5 °C; *A. sclerotigenum* 的侵染率很高,对温度不敏感,从伤口侵染后也能导致果肉组织褐色坏死,形成红褐色病斑。2013 年用 3 种真菌分生孢子接种的套袋果实,主要形成圆形、黑色的黑点型病斑, *T. roseum* 接种果实发病最重, *A. tenuissima* 接种的果实发病率稍低,用 *A. sclerotigenum* 接种的果实几乎没有发病。

套袋苹果黑点病 4 种不同类型病斑的形成与侵染病菌的种类及果实的生长发育期有关。黑点型病

斑主要出现在苹果果实的生长前期,与 *T. roseum* 和链格孢属关系较为密切。苹果幼果期细胞代谢旺盛,酚类物质含量多,病菌侵染后,酚类物质氧化,阻止病菌扩展,病斑变为黑色。褐变型和黑斑型症状主要出现在近成熟期的果实上。近成熟期的果实,酚类物质含量降低,糖分含量升高,果实抗病明显降低,病菌侵染后在果肉细胞内能不断扩展,形成大型病斑。黑斑型病斑与链格孢属真菌关系密切,而褐变型病斑与 *A. sclerotigenum* 相关度较高。

3 种病菌在有伤条件下接种都能致病,其中 *T. roseum* 的致病力最强,接种发病率最高,应是导致果实黑点病的主要病菌,与前人的研究结果是一致的^[1,3-4,11,19]。*A. sclerotigenum* 致病力最弱,接种套袋果实几乎不发病。*A. tenuissima* 的致病力介于二者之间。3 种病菌都是弱寄生菌,接种成熟无伤果实都不能致病。在自然条件下,3 种病菌大量存在,是典型的机会致病菌,能否侵染致病关键是取决于有无适合的机会,如寄主抗性、伤口、环境条件等,遇适宜机会,病菌就能大量侵染,导致果实严重发病。自然条件下,能导致套袋果实黑点病的真菌远不止 3 种,如 *Alternaria* 属真菌。弱寄生菌能否致病,关键取决于环境能否为病菌提供繁殖和生长的机会,寄主能否为病菌提供侵染致病的机会。因此,研究

套袋苹果的黑点病除了解其致病菌外,更重要的是研究其侵染致病条件。

参考文献:

- [1] 徐秉良. 苹果黑点病症状及病原菌鉴定[J]. 柑桔与亚热带果树信息, 2000(11):43.
- [2] 陈策, 汪景彦, 鲍玉院, 等. 套袋苹果果面黑点发生和防治调查[J]. 中国果树, 2002(3):40-42.
- [3] 郝兴安, 吴云锋, 周新民, 等. 陕西套袋苹果黑点病原鉴定及发生规律研究初报[J]. 西北农业学报, 2004, 13(4):54-57.
- [4] 徐秉良, 郁继华, 魏志贞. 苹果黑点病菌寄主范围与生物学特性[J]. 植物保护学报, 2002, 29(2):129-132.
- [5] 张福兴, 隋秀奇, 孙庆田, 等. 2003年套袋富士苹果黑点病发生严重的原因与分析[J]. 烟台果树, 2004(1):13-14.
- [6] 刘和生, 李丙智. 今年套袋苹果萼洼黑点病发生情况调查[J]. 西北园艺, 2003(10):42-43.
- [7] 周宗山, 吴玉星, 徐成楠, 等. 辽西地区苹果黑点病发生调查[J]. 中国果树, 2012(1):69-70, 7478.
- [8] 郭建明. 甘肃天水套袋苹果黑点病的发生与综合防治[J]. 中国果树, 2013(2):56-58.
- [9] 刘美英, 张福兴, 孙庆田, 等. 谈套袋苹果红点病、黑点病及其防治[J]. 烟台果树, 2001(2):27.
- [10] 刘英胜. 套袋苹果黑点病发生的原因及防治措施[J]. 北方果树, 2010(4):19-20.
- [11] 郭云忠, 孙广宇, 高保卫, 等. 套袋苹果黑点病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 西北农业学报, 2005, 14(3):18-21.
- [12] 王佩圣, 胡维军, 高峻岭, 等. 套袋苹果黑点病的鉴定[J]. 落叶果树, 2000, 32(3):54.
- [13] 张愈学, 沈永波, 王宏, 等. 套袋富士苹果黑点病的鉴定[J]. 北方果树, 1998(1):10.
- [14] 郭云忠, 高保卫, 孙广宇, 等. 套袋苹果黑点病发生规律及其对几种化学药剂的敏感性[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2005, 33(z1):101-104.
- [15] 齐祖同, 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会. 中国真菌志-第五卷-曲霉属及其相关有性型[M]. 北京:科学出版社, 1997:18-19.
- [16] 张中义. 中国真菌志(第十四卷)枝孢属 黑星孢属 梨孢属[M]. 北京:科学出版社出版, 2003:14-15.
- [17] 张天宇. 中国真菌志(第十六卷)链格孢属[M]. 北京:科学出版社出版, 2003:3-10.
- [18] 孔华忠. 中国真菌志(第三十五卷)青霉属及其相关有性型属[M]. 北京:科学出版社出版, 2007:30-37.
- [19] 刘志坚. 关于套袋苹果黑点病问题的探讨[J]. 山西果树, 2000(4):26-27.

《天津农业科学》征订启事

《天津农业科学》是天津市农业科学院信息研究所主办的综合性学术期刊,创刊于1974年。国际刊号:ISSN 1006-6500,国内刊号:CN:12-1256/S。本刊为月刊,大16开,130页,每期定价5元,全年60元。

本刊为中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国学术期刊综合评价数据统计源期刊,全国优秀农业期刊。

开设栏目有:植物生理与生物技术、作物栽培与设施园艺、植物保护、土壤肥料与节水灌溉、畜牧兽医与水产养殖、园林绿化、贮藏加工、农产品安全、行业标准、新品种选育、植物生理、农业经济与信息技术、农业科研管理、新品种保护、三农问题研究、农业区划等。

适合各级农业科技人员、农技推广人员、农业行政管理干部、农业大中专院校师生参阅。

欢迎订阅,欢迎投稿!

地 址:天津市南开区白堤路268号农科大厦1905室

邮 编:300192

电话/传真:022-23678601

E-mail: tjnykx@163.com

开 户 行:建设银行南开新技术产业园区支行

账 号:1200 1650 4720 5000 1435

户 名:天津市农业科学院信息研究所