

苹果轮纹病室内快速评价体系的建立

林月莉 黄丽丽* 索朗拉姆 高小宁 陈银潮 康振生

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

摘要: 为探索高效、稳定且操作简便的苹果轮纹病室内评价方法, 选用分离菌株 S_h0803-1-1-1 菌饼分别对离体富士苹果两年生枝条以及当年生嫩梢、叶片和成熟果实 4 种材料进行接种, 并对试验结果和接种方法进行比较分析。结果显示, 在有伤和无伤条件下各接种材料接种无菌 PDA 块均不发病, 接种病菌仅在有伤情况下致病; 枝条烫伤接种发病最慢且病斑最小, 嫩梢针刺 1 针接种较叶痕接种发病明显; 1 针及 10 针刺伤接种叶片正、反面, 正面 1 针刺伤接种发病较快且一致; 果实去除果皮接种较 1 针、10 针刺伤后接种发病显著。用 4 个致病力不同的菌株验证, 发现 4 种离体材料均能验证不同菌株间的致病力差异, 且结果与田间无伤接种当年生新梢一致。说明 4 种离体材料均可准确、快速评价苹果轮纹病, 其中正面针刺 1 针接种叶片的方法最优。

关键词: 苹果轮纹病菌; 病斑直径; 伤口; 接种方法; 苹果叶片

A rapid laboratory evaluation system for apple ring rot

Lin Yueli Huang Lili* Suolang Lanu Gao Xiaoning Chen Yinchao Kang Zhensheng

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract To develop an efficient, stable and easy method for disease evaluation, excised 2-years old twigs, current-year shoots, expanded leaves and mature fruits of 'Fuji' apple tree were inoculated with the plugs of isolate S_h0803-1-1-1. The results showed that lesions only occurred on the samples inoculated by the fungus with wound; samples with/without wound and inoculated with plain PDA plug were lesion free. The effects of materials and types of wound on lesion size presented that lesions formed on the twigs which treated by burning before inoculation were smaller and formed later than others; lesions on the young shoots with one pricking wound were bigger than those on the leaf scars; leaves were easier to be infected by pricking one time on the upper sides than lower ones even with ten times pricking wounds; lesions on fruits inoculated after peeling were bigger than treated with pricking. Furthermore, to verify the stability of the laboratory-test evaluation system, four isolates with different virulences were tested through inoculating on both excised materials and shoots in the field. The results showed that all the four excised materials could present the differences in virulence among strains and the conclusions were consistent with field inoculation on shoots without wound. Therefore, all these four excised materials could be used to evaluate the pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* accurately and rapidly for laboratory-test among which the excised leaf treated by one-time pricking on the upper side before inoculation was the best option.

Key words *Botryosphaeria dothidea*; lesion diameter; wound; inoculation method; apple leaf

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项 (nyhyzx07-055), 高等学校学科创新引智计划 (B07049)

作者简介: 林月莉, 女, 1985 年生, 硕士研究生, 研究方向为苹果病害综合防治, email 362363253@qq.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email huanglili@nwsuaf.edu.cn Tel 029-87091312

收稿日期: 2010-05-14

苹果轮纹病 (apple ring rot) 是由葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* (无性态 *Macrophoma kawat-sukai* Hara) 引起的, 并可同时危害苹果树枝干和果实的重要病害, 在我国各苹果产区普遍发生。随着苹果品种的更迭, 单一感病品种的大量种植^[1], 导致近年来该病的发生危害日趋严重, 给苹果生产造成了严重的损失。苹果树枝干上的病斑是苹果轮纹病的重要菌源, 其散发的孢子可进一步侵染果实。同时该病菌还具有潜伏侵染的特性, 可引起采后果实的腐烂, 成为苹果贮运期和贮藏期的重要病害^[2]。国立耘等^[3]报道, 目前河南、山东、陕西等 7 个省市苹果枝干轮纹病的总体发病率达 77.6%, 病情指数为 37.0~95.1, 这对果实轮纹病的发生构成了潜在风险, 严重威胁苹果安全生产。

此外, 该病害在生产上存在防治难、防效差等问题, 其原因主要是对其发生规律和防治缺乏系统深入的研究^[4], 而缺乏科学统一的病害评价体系是阻碍这些研究深入进行的关键问题。如果在田间进行病害评价, 不但接种工作量大且易造成病害传播扩散, 进而影响苹果生产。室内评价体系则主要通过室内接种离体枝条的方法来评价病害^[5-7], 但该接种方法发病周期长且结果易受枝条龄期和皮层含水量等的影响^[8-9]。为此, 本研究利用苹果树离体枝条、嫩梢、叶片、果实作为接种材料, 并与田间无伤接种当年生新梢的结果进行比较, 拟建立一个快速、稳定、操作简便的苹果轮纹病室内评价体系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株: 选取 4 株苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria dothidea* Sm0709-1-1-1, 分离自陕西眉县富士苹果果实; Ld0801-1-1-1, 分离自辽宁大连富士苹果枝干; Slk0711-1-1-1, 分离自陕西洛川富士苹果枝干; Slk0803-1-1-1, 分离自陕西礼泉富士苹果枝干。将病菌接种于 PDA 培养基上, 25℃ 下黑暗培养 3 天, 于菌落边缘挑取直径 5mm 的菌饼作为接种体。病菌在 PDA 培养基上 4℃ 保存。

供试接种材料: 田间接种材料: 于 2010 年 6 月中旬苹果树旺盛生长期, 选取当年生新梢, 75% 酒精表面消毒后无菌水冲洗 3 次。离体材料: 枝条选取 2 年生背上枝, 处理方法参考臧睿等^[7]; 嫩梢选取当年生枝梢顶端未木质化部分, 长约 10 cm, 75% 酒精表面消毒后无菌水冲洗 3 次, 晾干备用; 叶片选取枝

条前端完全展开叶, 无菌水冲洗晾干, 用沾有无菌水的灭菌脱脂棉包裹叶柄基部备用; 果实选取成熟的富士苹果果实, 75% 酒精表面消毒, 无菌水冲洗 3 次后晾干备用。以上材料均采自陕西杨凌东卜村 7~10 年生富士果园。

1.2 室内接种

接种枝条: 参考臧睿等^[7]方法。采用无伤和直径 5mm 的灼热铁钉帽烫伤 2 种伤口处理方式, 将菌株 Slk0803-1-1-1 菌饼和无菌 PDA 块 (CK) 接种于伤口处, 上覆沾有无菌水的脱脂棉, 再用塑料条缠裹保湿。将接种后的枝条放入托盘内, 盘底铺上沾有无菌水的滤纸, 盘口覆上保鲜膜, 25℃ 保湿培养。每菌株设 5 个重复, 试验重复 3 次, 观测期 30 天。

接种嫩梢: 采用无伤、叶痕伤和节间接种针 1 针刺伤等 3 种伤口处理方式, 将菌株 Slk0803-1-1-1 菌饼和无菌 PDA 块 (CK) 分别接种嫩梢, 每菌株设 5 个重复, 将接种后的嫩梢放入托盘中, 25℃ 保湿培养。试验重复 3 次, 观测期 15 天。

接种叶片: 采用无伤、接种针 1 针刺伤、10 针刺伤 (均匀分布在菌饼下直径 5mm 的圆形区域内, 下同) 等 3 种伤口处理方式, 将菌株 Slk0803-1-1-1 菌饼和无菌 PDA 块 (CK) 分别接种叶片的正面或反面, 刺伤时避开叶片主脉。每菌株设 5 个重复, 分布于叶片的不同位置。将接种后的叶片放入托盘内, 25℃ 保湿培养。试验重复 3 次, 观测期 15 天。

接种果实: 采用无伤、用 5mm 打孔器去除果皮、接种针 1 针刺伤和 10 针刺伤等 4 种伤口处理方式, 将菌株 Slk0803-1-1-1 菌饼和无菌 PDA 块 (CK) 分别接种果实, 每菌株设 5 个重复。将接种后的苹果放入托盘中, 25℃ 保湿培养。试验重复 3 次, 观测期 10 天。

室内叶片、果实接种后每隔 1 天调查记载病斑扩展情况, 采用十字交叉法测量病斑直径, 叶片病斑尚未超过菌饼时需从背面测量; 嫩梢、枝条接种后每隔 1 天测量 1 次病斑长度, 枝条病斑长度应减去烫伤部位长度; 处理间的差异显著性分析用 Duncan 氏新复极差法。

1.3 接种方法的验证

根据不同接种材料及伤口类型, 将菌株 Sm0709-1-1-1、Ld0801-1-1-1、Slk0711-1-1-1、Slk0803-1-1-1 分别接种于 4 种离体材料, 以接种无菌 PDA 块作为对照, 每菌株设 5 个重复, 试验重复 3 次。

1.4 田间接种当年生新梢

将菌株 Sm0709-1-1-1、Ld0801-1-1-1、Slk0711-1-

1-1, Slq0803-1-1-1 菌饼和无菌 PDA 块 (CK) 正面贴于当年生新梢节间, 上覆沾有无菌水的脱脂棉, 再用塑料条缠裹保湿。每菌株设 5 个重复, 试验重复 3 次。

田间新梢接种结果于接种后 3 个月即同年 9 月中旬调查。病害调查分级标准: 0 级: 无病; 1 级: 枝条接种部位不增粗, 仅变色或有少量零散的小病瘤, 直径小于 1 mm, 数量少于 5 个; 3 级: 枝条接种部位不增粗, 病瘤突起, 数量在 5 个以上, 多分散, 直径 1 mm 左右; 5 级: 枝条接种部位增粗 25% 以下, 病瘤明显突起, 数量较多; 7 级: 枝条接种部位增粗 25% ~ 50%, 病瘤明显突起且愈合; 9 级: 枝条接种部位增粗 50% 以上, 病瘤明显愈合或开裂。

2 结果与分析

2.1 室内接种

接种枝条: 无伤接种无菌 PDA 块、菌株 Slq08-03-1-1-1 均不能引起枝条发病。烫伤后接种, PDA 块不能引起发病, 而接种病菌后 4~5 天, 以烫伤部位为中心, 出现长度 2~3 mm 的褐色病斑, 并逐渐扩大, 一般 40~50 天左右可环绕扩展至整个枝条。15~20 天左右从病斑中心表面逐渐散生出黑色小粒点, 即子实体 (图 1)。

接种嫩梢: 无伤或刺伤接种无菌 PDA 块均不能引起嫩梢发病。无伤接种病菌未发病, 而伤口 (刺伤) 和自然孔口叶痕接种病菌, 容易引起嫩梢发病。接种后 2~3 天, 以伤口为中心, 出现长度 2~3 mm 的红褐色病斑, 并逐渐向上下两个方向扩展, 约 13~15 天侵染整个嫩梢, 并有茶褐色粘液溢出, 未见明显子实体形成。接种后 6 天, 叶痕接种产生病斑的平均长度为 1.7 cm, 显著大于针刺接种 ($P < 0.05$) (图 1)。

接种叶片: 无伤接种无菌 PDA 块、菌株 Slq08-03-1-1-1 均不能引起叶片发病。针刺后接种, PDA 块不能引起发病, 而接种病菌后 1 天刺伤部位开始变褐, 2~3 天后以针刺部位为中心, 出现直径 1~2 mm 的红褐色小斑点, 扩大后成圆斑或不规则斑。单个病斑约 15~17 天可扩展至整个叶片, 后期 (约 13~15 天) 从中心表面逐渐散生出黑色小粒点, 即子实体 (图 1)。刺伤接种叶片正、反面对发病程度影响很大。接种后 6 天, 叶片正面接种产生病斑的平均直径大于叶片背面, 且差异显著 ($P < 0.05$)。叶片正面针刺 1 针和针刺 10 针后接种, 虽然造成的病斑大小有差异, 但并未达到显著水平, 说明叶片正面接种时, 针刺数量多少对病斑大小影响不大 (图 2)。

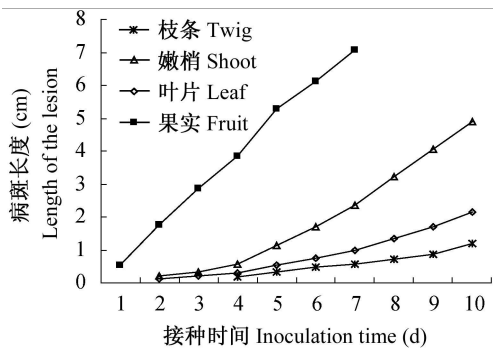


图 1 菌株 Slq0803-1-1-1 接种不同苹果材料后病斑扩展情况

Fig 1 The comparison of lesion expansion on different apple materials inoculated with isolate Slq0803-1-1-1

注: 图中数据为 3 次试验的平均值。枝条、嫩梢、叶片、果实的伤口类型分别为: 烫伤、针刺 1 针、正面 1 针刺伤、去除果皮。Note: The data in the figure are mean of three experiments. The wounds on the twigs, shoots, leaves, and fruits are burning, pricking one time, pricking one time on the upper sides, and removing the peels respectively.

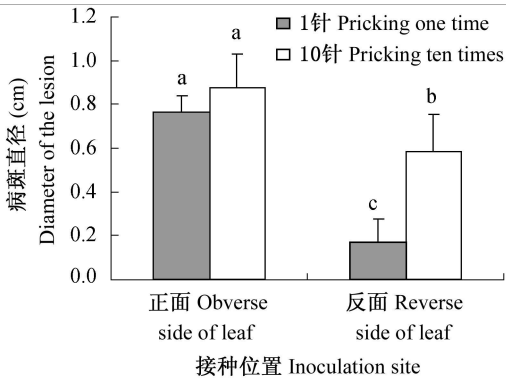


图 2 菌株 Slq0803-1-1-1 不同伤口类型接种的平均病斑直径

Fig 2 Diameter of the lesions on leaves inoculated with isolate Slq0803-1-1-1 through different kinds of wound

注: 图中数据为 3 次试验 (接种叶片 6 天后) 的平均值。不同小写字母表示差异显著 (Duncan 氏新复极差法, $P < 0.05$)。Note: Data in the figure are means of the lesions 6 d after inoculation in three experiments. Different letters represent significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

接种果实: 无伤接种或刺伤接种无菌 PDA 块均不能引起果实发病。有伤接种病菌 Slq0803-1-1-1 后 1 天, 以伤口为中心, 出现直径约 5 mm 的水渍状褐色近圆形小斑点, 扩大后成同心轮纹圆斑, 一般单个病斑 10~12 天即可使全果腐烂, 伴随有茶褐色粘液溢出。后期 (约 10 天左右) 从病斑中心表皮逐渐散生

出黑色小粒点,即子实体。接种后 6 天,针刺 1 针接种病斑的平均直径为 3.8 cm,针刺 10 针接种病斑的平均直径为 5.5 cm,去除果皮接种病斑的平均直径为 6.8 cm,三者之间差异均达显著水平 ($P < 0.05$),其中去除果皮接种所致病斑扩展最迅速(图 1)。

2.2 接种方法验证

将菌株 Sm0709-1-1-1、Ld0801-1-1-1、Slc0711-1-1-

1-1、Slq0803-1-1-1 烫伤接种枝条、针刺 1 针接种嫩梢、正面针刺 1 针接种叶片和去除果皮接种果实,4 种材料对菌株间致病力差异的评价结果保持一致,即菌株 Sm0709-1-1-1 致病力最强;Slc0711-1-1-1 和 Slq0803-1-1-1 致病力次之,但两者之间无显著性差异;Ld0801-1-1-1 致病力最弱;对照在观测期内未发病(表 1,图 3)。

表 1 不同苹果材料接种不同菌株后的发病情况

Table 1 The comparison of lesion size on different materials of apple tree inoculated with different isolates

接种材料 Plant material	病斑直径 Lesion diameter (cm)			
	Sm0709-1-1-1	Slq0803-1-1-1	Slc0711-1-1-1	Ld0801-1-1-1
枝条 Twig	0.92±0.05 a	0.56±0.03 b	0.54±0.03 b	0.29±0.04 c
嫩梢 Shoot	0.88±0.06 a	0.58±0.05 b	0.53±0.04 b	0.36±0.02 c
叶片 Leaf	0.63±0.02 a	0.31±0.03 b	0.27±0.03 b	0.19±0.02 c
果实 Fruit	2.96±0.03 a	2.86±0.02 b	2.82±0.03 b	2.13±0.02 c

注:表中数据为平均值±标准误。数据后不同字母表示差异显著(Duncan氏新复极差法, $P < 0.05$)。Note: Data in the table are mean±SE. Different letters in the same line indicate significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

从方差分析结果可以看出,接种果实 3 天后,各菌株之间的致病力差异得以充分显示,并在之后 3 天内保持稳定。接种嫩梢及叶片后 4 天、接种枝条后 7 天,各菌株间的差异才能充分显示并保持稳定。

综合上述结果,从发病时间分析,接种果实 1 天即开始出现病斑,嫩梢和叶片需 2~3 天,枝条上则需 5 天左右。从病斑大小及其扩展速率方面分析,果实上病斑明显大于另外 3 种材料,且扩展最快,嫩梢、叶片、枝条依次减小。从接种材料的成本及生理指标的一致性方面分析,以叶片为首选,果实、嫩梢次之,枝条的获取最繁杂。

2.3 田间接种当年生新梢

菌株 Sm0709-1-1-1、Ld0801-1-1-1、Slc0711-1-1-1、Slq0803-1-1-1 无伤接种田间新梢均可引起发病,而对照未发病(图 3-E)。Ld0801-1-1-1 接种后仅产生几个零星小瘤,病级为 1 级;Slc0711-1-1-1、Slq0803-1-1-1 接种后枝条增粗,但增粗在 25% 以下,病级为 5 级;Sm0709-1-1-1 接种后枝条增粗最明显,约 43%,病级为 7 级。表明菌株田间无伤接种当年生新梢对菌株间致病力差异的评价结果与室内接种一致。

3 讨论

本研究在 4 种离体材料的不同接种方法比较中发现,果实上病斑出现最早且扩展速率最大、病斑最显著,嫩梢、叶片、枝条依次减小。枝条接种是一种

传统的枝干病害鉴定方法,近年来已广泛应用。Brown-Rytlewski & McManus^[9]运用枝条接种方法对 *B. dothidea* 和 *B. obtusa* 的致病力差异进行了探索。Pavlic 等^[10]应用该方法对 *Syzygium cordatum* 上的 15 株葡萄座腔菌科真菌的致病力进行了鉴定。Chang 等^[11]和 Rozsnyay & Apostol^[12]曾分别用桃和櫻桃的枝条接种方法对病菌的抗性进行鉴定,且结果与田间活体接种一致。然而,枝条接种方法操作复杂,试验周期长,材料来源受限制,同时枝条粗细及其在果树上的分布位置均会对结果的准确性造成影响^[6-13]。嫩梢的采集对季节的要求很高并容易影响果树生长。果实接种发病迅速,试验周期短,但其成本大,且不同批次果实成熟度的差异易对试验结果造成影响。叶片接种试验周期虽较果实及嫩梢略长,但其具有材料易得、成本低廉、操作简便等优点。综合考虑,推荐叶片正面针刺 1 针作为室内接种方法的首选。

苹果轮纹病在生产上防治难、效果差,同时由于其潜育期长,病害发生时间难以确定,为防治带来很大困难。此外,在病菌致病性鉴定、抗性材料评价及药剂筛选等方面,始终缺乏一套稳定可靠、操作简便的评价体系,苹果轮纹病的田间防治依然沿用 20 世纪 80 年代的技术^[14],导致病害防治中的用药问题和防病技术缺陷问题进一步凸显。本研究结果表明,不同离体接种方法对菌株致病力的评价结果均可代表田间接种试验结果,且试验周期明显缩短、方

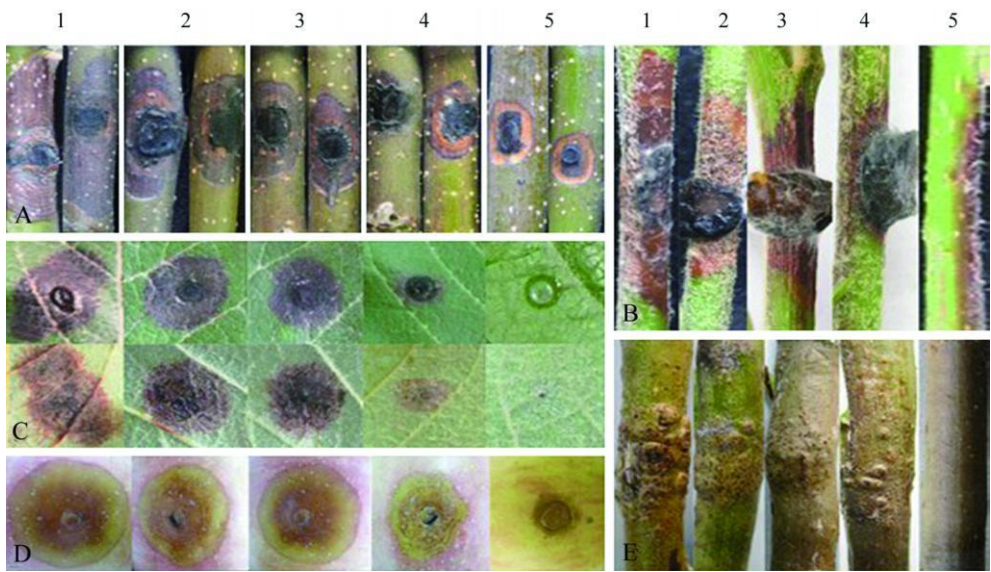


图 3 不同菌株接种不同苹果材料的病斑形态

Fig 3 The symptoms caused by inoculation with different isolates on different apple materials

注: A: 烫伤接种离体枝条后 15 天; B: 针刺 1 针接种离体嫩梢后 6 天; C: 正面针刺 1 针接种离体叶片后 8 天; D: 去除果皮接种成熟果实后 5 天; E: 田间无伤接种嫩梢后 3 个月。1 Sm0709-1-1-1; 2 Sk0803-1-1-1; 3 Sk0711-1-1-1; 4 Ld0801-1-1-1; 5 无菌 PDA 块 (CK)。
Note: A: 15 d after inoculation by burning on excised twigs; B: 6 d after inoculation by pricking one time on excised shoots; C: 8 d after inoculation by pricking one time on the obverse sides of detached leaves; D: 5 d after inoculation by removing the peels on mature fruits; E: 3 month after field inoculation without wound on shoots. 1 Sm0709-1-1-1; 2 Sk0803-1-1-1; 3 Sk0711-1-1-1; 4 Ld0801-1-1-1; 5 PDA plug (CK).

法简便、材料易得, 可以在大批量测定菌株致病性、筛选药剂和鉴定品种抗性时应用。室内叶片针刺接种发病周期短, 而且材料可以大批量获得并且不受接种材料龄期的制约, 稳定性较强, 对苹果轮纹病致病机制和防治研究具有一定的参考价值。

参 考 文 献 (References)

[1] 陈策. 苹果果实轮纹病研究进展. 植物病理学报, 1999, 29 (3): 193- 198
[2] 薛莲, 檀根甲. 采后苹果果实轮纹病的研究进展. 安徽农业科学, 2004, 32(6): 1227- 1230, 1266
[3] 国立耘, 李金云, 李保华, 等. 中国苹果枝干轮纹病发生和防治情况. 植物保护, 2009, 35(4): 120- 123
[4] 李保华. 优质果品生产中病虫防控的难点、共性与防控策略. 中国果树, 2010(3): 65- 67
[5] 周增强, 侯琿, 王丽, 等. 枝干苹果轮纹病人工接种方法与品种抗性评价. 果树学报, 2010, 27(6): 952- 955
[6] Bessho H, Komori S, Soejima J. Simple excised twig assay of *Malus* species for determining resistance to *Valsa* canker. Acta Horticulturae, 2004, 658(2): 391- 397
[7] 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. 植物病理

学报, 2007, 37(4): 343- 351
[8] Blomberg W J. *Cytospora* canker of poplars: factors influencing the development of the disease. Canadian Journal of Botany, 1962, 40(10): 1271- 1280
[9] Brown R, Ytlewski D E, McManus P S. Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. Plant Disease, 2000, 84 (9): 1031- 1037
[10] Pavlic D, Slippers B, Coutinho T A, et al. *Botryosphaeriaceae* occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. Plant Pathology, 2007, 56: 624- 636
[11] Chang L S, Iezzoni A E, Adams G. Excised shoot assay for tolerance of peach to *Leucostoma personii*. HortScience, 1989, 24(6): 1011- 1012
[12] Rozsnyai Z, Apostol J. Breeding for sweet and sour cherry disease resistance in Hungary. Acta Horticulturae, 2005, 667 (1): 117- 122
[13] Jr Kohn F C, Hendrix F E. Influence of sugar content and pH on development of white rot on apples. Plant Disease, 1983, 67: 410- 412
[14] 牟惠芳, 黄照兰. 苹果轮纹病发病规律及防治的研究. 山东农学院学报, 1981 (1): 31- 40