林业科学研究 2019,32(2):117～122
Forest Research

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2019.02.017

新疆巩留县杏果实斑点病病原菌鉴定

程 元[1], 淮稳霞[1], 姚艳霞[1], 林若竹[1], 刘忠军[2], 赵文霞*

(1. 国家林业和草原局森林保护学重点实验室 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091;
2. 新疆维吾尔自治区林业有害生物防治检疫局,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:[目的]鉴定引起新疆巩留县杏树果实斑点病病原菌,研究造成杏树果实病害的原因,为当地杏树防治工作提供依据。[方法]采用常规组织分离法分离得到罹病杏真菌菌株,利用传统形态学观察和分子系统学分析相结合的方式对所分离出菌株进行分类鉴定及其致病性检测。[结果]杏果病斑处的病原菌在显微镜下观察到分生孢子形态与经 PDA 培养基培养后观察到分生孢子形态均与 *Thyrostroma carpophilum* (Lév.) B. Sutton 所产生分生孢子一致;将分离获得的 3 株真菌的 rDNA-ITS 片段测序后与 NCBI 参考序列进行多重序列比对的结果显示,其序列与 *T. carpophilum* 一致性为 100%;在基于 ITS 基因序列构建的系统发育树中,3 株菌与 *T. carpophilum* 聚在同一分支。在接种了 *T. carpophilum* 后,杏果实和叶片均产生明显病斑并且从其所产生的病斑上再次分离到所接菌,满足柯赫氏法则。[结论]从新疆巩留县杏果实病斑处分离获得的 3 株真菌,经鉴定为引起杏穿孔病的病原菌 *T. carpophilum*。这是该菌首次在该地区发现并报道。

关键词:杏果实斑点病;rDNA-ITS;系统发育学分析;*Thyrostroma carpophilum*

中图分类号:S763.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1498(2019)02-0117-06

新疆是杏树的起源地之一,已有 1 600 多年的栽培历史,品种繁多,主要包括 3 个类型:*Armeniaca vulgaris* Lam.,*A. sibirica* (L.) Lam. 和 *A. dasgcarpa* (Ebrh) Pers,其下约有 100 余种[1-6]。他们是我国重要的果树资源之一。然而,从 2016 年以来,巩留县超过 50% 杏树遭受病害,部分枝干产生坏死斑,叶片形成圆形穿孔,而果实受害情况尤为严重,其表面出现褐色、圆形、凹陷、分散或连续的病斑,树木落果,造成果实品质和产量下降。为确定造成巩留县杏树果实病害的原因,本研究对受害杏树果实病斑进行分离、培养,得到病原菌,利用传统形态学观察和分子系统学分析相结合的方式对所分离出菌株进行分类鉴定及其致病性检测。旨在研究造成新疆巩留县杏树果实病害的原因,为当地杏树防治工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 采集地点

2017 年 5 月在新疆伊犁州巩留县(82°49′20.05″ E,43°15′16.97″ N)杏树上采集罹病杏 10 枚。

1.2 病原菌的分离与纯化

采用常规组织分离法分离病原菌[7]:取杏果实病健交界处,经 75% 酒精消毒处理 2 min,使用无菌水冲洗 2 次,无菌滤纸吸附水分后置于 PDA 培养基(马铃薯 200 g、琼脂 18 g、葡萄糖 18 g、蒸馏水 1 L)平板上,每个平板接 6 个组织块,3 个重复,25℃ 培养 3～4 d。分别挑取少量菌丝进行纯化培养产物进行后续试验操作。

1.3 形态观察

1.3.1 *病斑组织薄片的显微观察* 选取病斑明显的新鲜病果,利用徒手切片法,制成临时水载玻片,置于显微镜(Zeiss Primo Star, Carl Zeiss)下观察,并用 CCD 相机(TCC-5.0,图森图像技术有限公司)拍照。

1.3.2 *菌株的形态观察* 将分离获得的纯菌株置于 PDA 培养基平皿上,于 25℃ 下培养 15 d 后,观察其菌落颜色和形态,在显微镜下观察其菌丝、孢子等

收稿日期:2018-07-20 修回日期:2018-10-18
基金项目:国家重点研发计划课题"野果林病虫害控制技术与监测、预警体系构建"(2016YFC0501503)
* 通讯作者:赵文霞,E-mail:zhaowenxia@caf.ac.cn

显微结构特征并拍照。

1.4 系统发育学分析

1.4.1 DNA 提取和 PCR 扩增 所获得的真菌菌株于 PDA 培养基上培养 10 d 后,刮取少量菌丝,采用改良 CTAB 法进行总 DNA 的提取[8]。随后,利用真菌通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)其 rDNA-ITS 序列进行扩增[9]。PCR 反应体系为 25 μL,其中包括 12.5 μL 2×Taq PCR MasterMix(天根生化科技有限公司),9.5 μL ddH_2O,1 μL ITS1,1 μL ITS4 和 1 μL DNA 模板。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环,最后 72℃延伸 10 s,4℃保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,送北京美吉桑格生物医药科技有限公司进行双向测序。

1.4.2 系统发育树构建 测序结果利用 Staden Package 1.6.0(MRC,Cambridge,England)进行序列拼接。将来自 NCBI 网站[10]的参考序列与已测菌株序列用在线网站 Mafft 进行序列比对[11],MEGA6 进行序列删减输出 fas 格式,Mesquite 转换成 Phy 格式,置于在线网站 ATGC[12],基于最大似然法构建系统发育树(ML 树)。并用 Bayesian 方法建立 Bayesian 系统发育学树(Bayesian 树)。外群选为 *Fusarium solani*。

1.5 致病性测定

将所分离的纯菌株于 25℃条件下在 PDA 培养基上培养 10 d,然后用打孔器打出 5 mm 直径菌饼,正面朝下放置在已用无菌水和酒精消毒过的、健康完好的杏树青果和叶片上,滴上 1% 水琼脂密封保湿,放入无菌的且铺有湿润吸水纸的培养皿和塑料盒中,杏果实 6 个重复,杏叶片 3 个重复,25℃培养 3～10 d,以接种无菌琼脂块作为对照[13]。待产生病斑后,测量病斑大小并拍照。随后用 PDA 培养基分离病健交界处,鉴定是否为所接种病原菌[14]。

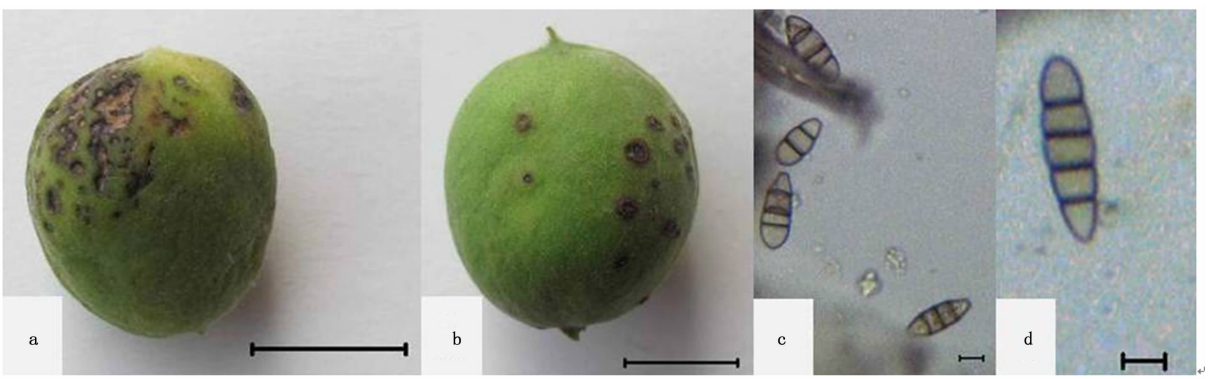
2 结果与分析

2.1 分离结果

于杏果实病斑处分离纯化获得 15 个菌落形态一致菌株,随机挑选 3 株(CYT1701、CYT1702、CYT1703)进行后续显微形态观察和系统发育学分析。

2.2 病斑组织薄片的显微观察结果

杏果实表面形成褐色、凹陷、圆形聚集或分散的病斑,其薄片制成的临时玻片在显微镜下观察时,可看到病原菌的分生孢子形态(如图 1)。分生孢子为褐色至黑色,分散或聚集存在,梭形或蠕虫形,顶细胞钝圆或锥形,多具有 3～5 个分隔,在分隔的地方出现缢缩。分生孢子大小为(24.24～49.90) μm×(9.58～18.74) μm,平均为(37.62±7.55) μm×(13.81±2.27) μm。结果与 *Thyrostroma carpophilum* (Lév.) B. Sutton[15]所产生分生孢子基本一致。



注:a:自然寄主上褐色凹陷聚集病斑;b:自然寄主上褐色凹陷分散圆形病斑;c:自然寄主上观察到的 3 隔分生孢子;d:自然寄主上观察到的 5 隔分生孢子。a～b 比例尺为 1 cm,c 比例尺为 20μm,d 比例尺为 10μm。a:Brown,hollow and aggregated lesions on natural host. b:Brown,hollow,scattered,aggregated and round lesions on natural host. c:Three septal conidia observed on natural host. d:Five septal conidia observed on natural host. -Scale bar:a～b = 1 cm;c = 20 μm;d = 10 μm.

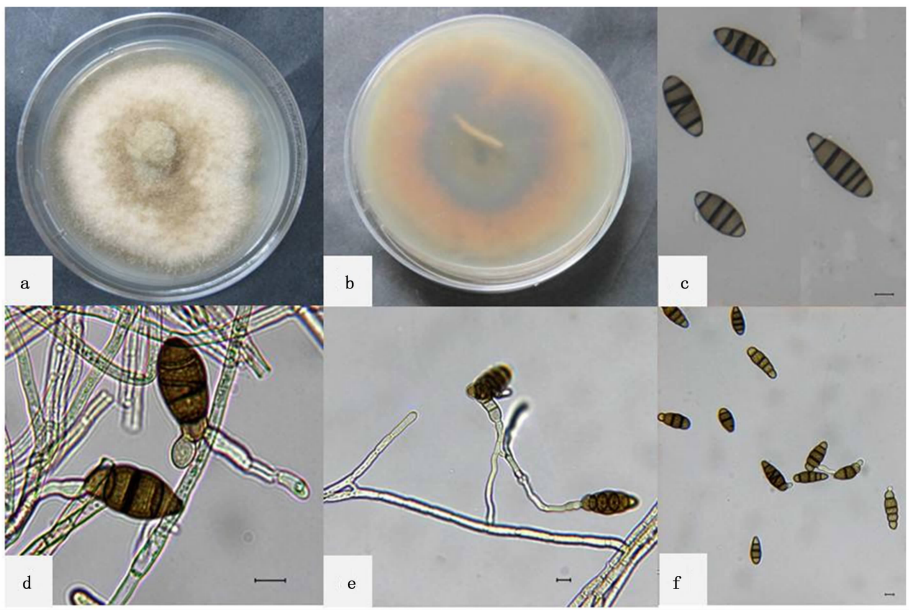
图 1 杏果实病斑和获得分生孢子形态

Fig. 1 The lesions on the apricot fruitand the morphological characteristics of conidia

2.3 培养基观察结果

将 PDA 培养基分离到菌株于 25℃培养 15 d 后,观察到结果如图 2。菌株菌落呈薄毡状,气生菌丝为白至灰褐色,菌落边缘分生孢子散生或聚集。

背面菌落中央呈深褐色,边缘为土黄色。分生孢子梗单生或合轴分枝。分生孢子为梭形或蠕虫形,顶细胞钝圆或锥形,多具有 3 ～5 个分隔,在分隔的地方出现缢缩,与自然寄主上形态相似。分生孢子大小为(33.85 ～56.31) μm × (10.46 ～22.58) μm,平均为(41.77 ± 5.88) μm × (15.77 ± 3.08) μm。产孢结构为菌落和分生孢子的形态特征与 *T. carpophilum*[15] 基本一致。



注:a ～b:菌株在 PDA 平板上 25℃生长 15 d 的菌落形态特征; c:3 ～5 隔分生孢子的形态特征; d:分生孢子梗单生; e:分生孢子梗合轴分枝; f:分生孢子再育产孢。c ～d 比例尺为 40 μm,e ～f 比例尺为 20 μm。a ～b:Morphological characteristics of colonies on PDA plates at 25℃ for 15 d. c:Morphological characteristics of 3 ～5 septa conidia. d:Simple conidiophore. e:Conidiophore of sympodial branches. f:Conidia reproduce spores. -Scale bar:c ～d = 40 μm;e ～f = 20 μm.

图 2　所获菌株的菌落及分生孢子形态特征

Fig. 2　Colony morphology of the isolates and the morphological characteristics of conidia

2.4　系统发育学结果

菌株 CYT1701、CYT1702、CYT1703(对应 GenBank 登录号:MG384321、MG384322、MG384323)序列与菌株 *T. carpophilum* (CBS231.89)进行多重序列比对,序列一致性为 100%。

将分离到的 3 株菌的 ITS 序列和 NCBI 下载的相关参考序列一起构建 ML 和 Bayesian 系统发育学树,结果显示,ML 树和 Bayesians 树拓扑结构与分支情况基本一致,3 株菌均聚在 *T. carpophilum* 这一支(ML 树支持率≥75%,Bayesian 树支持率≥85% 分别依次标注在分支上)(Fig. 3)。

2.5　致病性测定结果

在 25℃保湿培养条件下,杏叶片在接种 24 h 后出现病症,72 h 后病斑最大直径达 18 mm,呈褐色,凹陷状(图 4);杏果实于接种后 48 h 出现病症,5 d 后病斑直径达 17 mm,呈近圆形,深褐色,凹陷状(图 5)。杏果实和叶片的发病率均为 100%,然后从其病健交界处进行再分离,所得菌株形态结构和 DNA 提取、PCR 扩增获得 ITS 片段比对与系统发育学树构建后结果一致,原病原菌 *T. carpophilum* 被重新分离获取,满足柯赫氏法则。

3　讨论

Thyrostroma carpophilum [异名: *Stigmina carpophila* (Lév.) M. B. Ellis, *Helminthosporium carpophilum* Lév., *Clasterosporium carpophilum* (Lév.) Aderh., *Coryneum carpophilum* (Lév.) Jauch, *Sciniatosporium carpophilum* (Lév.) Morgan-Jones, *Sporocadus carpophilus* (Lév.) Arx, *Wilsonomyces carpophilus* (Lév.) Adask., *Macrosporium rhabdiferum* Berk., *Passalora brunaudii* Sacc., *Coryneum beyerinckii* Oudem.],该菌于 1846 年在法国首次被观察到,后来和大洋洲也有发现[14]。随着研究的深入, *T.*

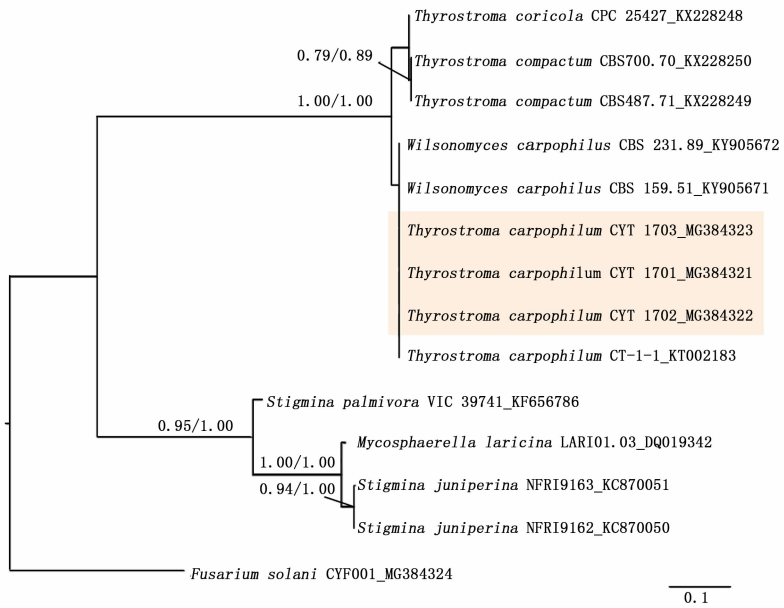
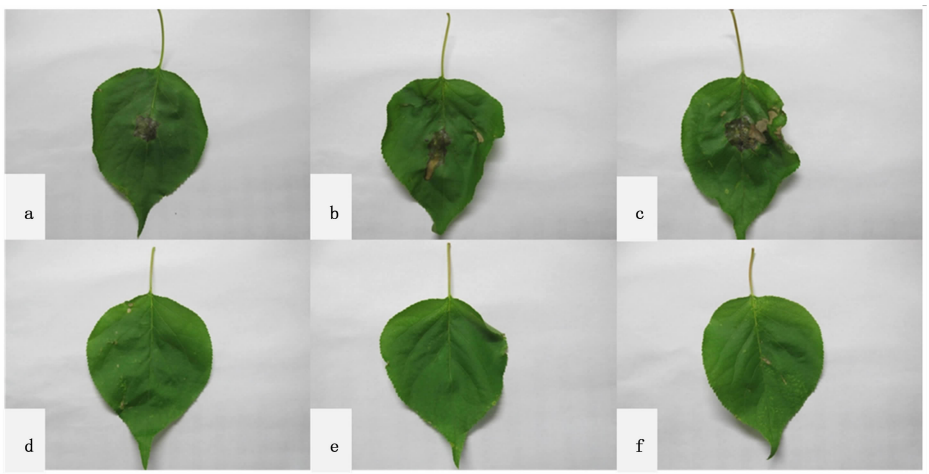


图3 基于rDNA-ITS序列构建的系统发育学树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS sequence



注:a～c:杏叶片接种所获得菌株3 d后发病症状;d～f:杏叶片对照。a～c:Symptoms of 3 days after inoculation of apricot leaves. d～f:Apricot leaves blank control.

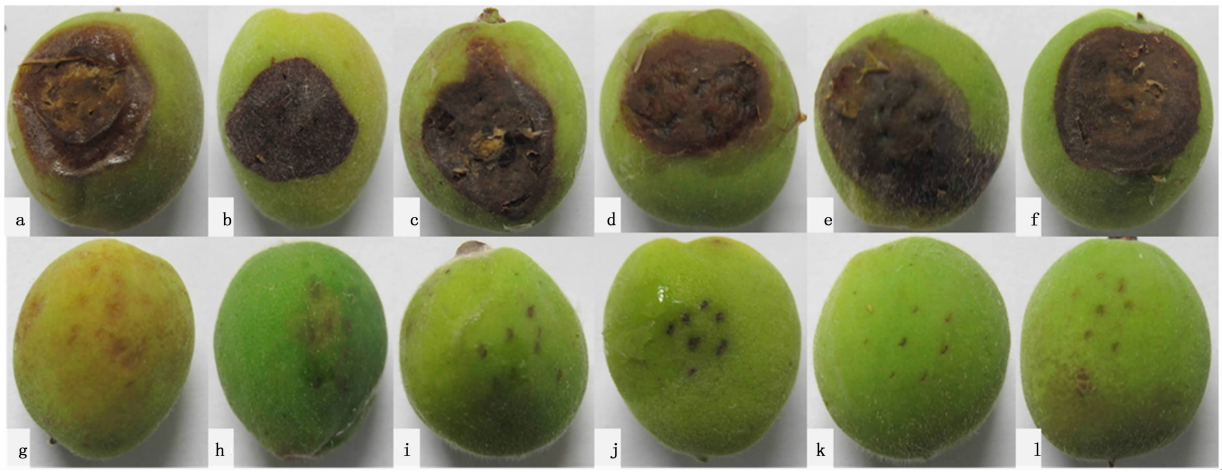
图4 杏叶片接种发病病症

Fig. 4 Symptoms on apricot leaves after inoculation

carpophilum 不断被重新分类。当前该菌最新学名,维基百科显示为 *W. carpophilus*;真菌索引显示为 *S. carpophila*;Mycobank 显示为 *T. carpophilum*。

T. carpophilum 常侵染核果类果树,可引起植物发生病变[16-18]。侵染叶片,可产生圆形病斑,随时间逐渐扩大,坏死后脱落;侵染树枝,坏死斑形成并逐渐变大,凹陷;侵染果实,形成圆形凹陷坏死组织,具有褐色色圈,树木受到严重危害时落叶、落果[18-21]。墨西哥杏树的叶片,枝条和果实受到病害,经鉴定为该菌侵染造成[18];印度杏树和桃树果实、叶片和枝条也遭遇该菌危害,损失惨重[19];伊朗的核果类树木中分离出大量 *T. carpophilum*[22-23];在国内,甘肃省兰州、临洮等地区的桃树受到 *T. carpophilum* 危害后,引起桃果实褐斑病[20]。本研究中杏果实出现的病症被命名为杏果实斑点病[24]。朱建兰等人在对杏果实斑点病菌进行生物学性状研究时提到此病害在中国和印度等国家多有发生[24-25]。由于 *T. carpophilum* 危害后核果类树木叶片发生穿孔现象,因此以 *T. carpophilum* 作为病原菌引起的植物病害也有记录为穿孔病而被深入研究[17,19,21,26-27]。

目前与杏树相关的病害有30多种,其中侵染循



注:a～f:杏果实接种所获得菌株 5 d 后发病症状;g～l:杏果实对照。a～f:Symptoms of 5 days after inoculation of apricot fruits. g～l: Apricot fruits blank control.

图 5　杏果实接种发病病症

Fig. 5　Symptoms on apricot fruits after inoculation

环和适宜发病条件的被明确的病害主要有褐斑穿孔病、霉斑穿孔病、褐腐病、杏疔病、腐烂病、白纹羽病等[25,27-29]。新疆杏树病害主要为穿孔病(病原为 *Xanthomonas pruni* (Smith) Dowson.)、流胶病(生理原因或病菌感染)和果实软腐病(生理性病害)[1,30-31],其中穿孔病以细菌性穿孔病研究为主,危害果实,初期表面形成水渍状褐色圆形小斑点,后期扩大为褐色病斑,病斑边缘翘起;危害叶片,病斑初期呈水渍状小点,后期变为褐色斑点,脱落穿孔;危害枝条,常发生水渍状暗紫色斑点,后变为褐色,枝条呈水渍状干枯[28]。虽然此病菌最后使果实出现斑点病,叶片出现穿孔病,但是其病原病斑形成方式与 *T. carpophilum* 不同。

4　结论

通过对新疆巩留县杏果实病斑处分离,获得 3 株病原菌,再经形态观察、系统发育学分析以及致病性检测,鉴定出引起杏果实斑点病害病原菌为 *Thyrostroma carpophilum*。这是第一次在新疆巩留县发现该菌并且报道。

参考文献:

[1] 林培钧, 崔乃然. 天山野果林资源——伊犁野果林综合研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.

[2] 张　钊, 刘明彰, 陈文椒,等. 新疆杏的种质资源[J]. 果树学报, 1985(3): 18.

[3] 蒋　萍, 赵　莉, 李文慧,等. 新疆南疆杏树病害调查[J]. 新疆农业大学学报, 2012, 35(2):132-136.

[4] 刘　娟. 新疆杏种质资源遗传多样性及核心种质构建[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2015.

[5] 刘　娟, 廖　康, 刘　欢,等. 新疆野杏种质资源表型性状多样性研究[J]. 西北植物学报, 2015, 35(5):1021-1030.

[6] 兰彦平, 吐拉克孜, 郭文英,等. 巴旦杏的研究现状及开发利用前景[J]. 林业科学研究, 2004, 17(5):674-679.

[7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 2007.

[8] Huai W X, Guo L D, He W. Genetic diversity of an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma terreum*, in a *Larix principis-rupprechtii*, stand assessed using random amplified polymorphic DNA[J]. Mycorrhiza, 2003, 13(5):265-270.

[9] White T J, Bruns T D, Lee S B, *et al*. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In:PCR Protocols [M] Academic Press,1990:315-322.

[10] W W M, Myers E W, Lipman D J. Blast (basic local alignment search tool)[J]. Encyclopedia of Genetics Genomics Proteomics & Informatics, 2008, 215(3):221-221.

[11] Nakamura T, Yamada K D, Tomii K, *et al*. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. [J]. Bioinformatics, 2018, 34(14):2490-2492.

[12] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, *et al*. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. [J]. Systematic Biology, 2010, 59(3):307-321.

[13] 刘开启, 杨炜华, 郭　泺. 杏果实黑斑病病原鉴定及病原菌生物学特性[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2003, 16(4):1-6.

[14] Koch R. Studies on bacteria V. The etiology of anthrax disease, based on the developmental history of *Bacillus anthracis*[J]. Bio D Plants,1876,2:277-310.

[15] Sutton B C, On *Stigmina*, *Wilsonomyces* and *Thyrostroma* (Hyphomycetes) [J]. Arnoldia, 1997,14:33-35.

[16] Ivanová, Kaločaiová, Bolvansky. Shot-hole disease on *Prunus per-*

sica-the morphology and biology of *Stigmina carpophila*[J]. Folia Oecologica, 2012, 39(1):21-27.

[17] 翟洪民. 杏树穿孔病的发生与综合防治[J]. 农家科技, 2013(7):16-17.

[18] Tovar-Pedraza J M, Ayala-Escobar V, Segura-León O L. *Thyrostroma carpophilum*, causing apricot shot-hole in Mexico[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2013, 8(1):31-33.

[19] Dar R A, Rai A N, Shiekh I A. *Stigmina carpophila*, detected on *Prunus armeniaca*, and *Prunus persica*, in India[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2017, 12(1):19-22.

[20] 何苏琴, 白 滨, 文朝慧,等. 甘肃省桃果实褐斑病病原鉴定[J]. 植物保护, 2016, 42(5):53-57.

[21] Teviotdale B L, Goodell N, Harper D. Abscission and kernel quality of almond fruit inoculated with the shot hole pathogen *Wilsonomyces carpophilus*.[J]. Plant Disease, 1998, 81(12):1454-1458.

[22] Yousefi A, Panjehkeh N H S M. Evaluation of shot hole disease incidence and severity on stone fruit trees in Razavi Korasan province[C]// The National Iranian Conference of Plant Protection, Volume Ii, Plant Disease, Tehran-Iran, 31 July-3 August. 2010.

[23] Ahmadpour A, Ghosta Y, Javan-Nikkhah M, *et al*. Isolation and pathogenicity tests of Iranian cultures of the shot hole pathogen of *Prunus*, species, *Wilsonomyces carpophilus*[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2009, 4(1):133-134.

[24] 朱建兰, 常永义, 陈德荣,等. 杏果实斑点病菌生物学性状的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1990, 25(2):165-169.

[25] 赵军营, 程 弘. 杏树病害研究进展[J]. 中国果树, 2001(1): 45-48.

[26] Teviotdale B L, Goodell N, Harper D. Effect of infection by the shot-hole fungus, *Wilsonomyces carpophilus*, on drop and quality of almond fruit 1[J]. Eppo Bulletin, 2010, 27(4):493-500.

[27] 曹若彬,浙江农业大学. 果树病理学[M]. 北京:农业出版社, 1992.

[28] 赵丽瑞. 杏树常见病虫害及其防治[J]. 湖南农机:学术版, 2008, 35(6):32-33.

[29] Thakur V S, Gupta V K, Garg R C. Management of fungal diseases of stone fruits with fungicides in Himachal Pradesh.[J]. Indian Journal of Agricultural Sciences, 1991, 61(9):677-681.

[30] 蒋 萍, 赵 莉, 李文慧,等. 新疆南疆杏树病害调查[J]. 新疆农业大学学报, 2012, 35(2):132-136.

[31] 阿里木·买买提, 张静文, 阿依夏木·亚库甫. 新疆轮台县杏树侵染性流胶病病原菌的鉴定[J]. 北方园艺, 2018(1):40-45.

The Pathogen Identification of Apricot Fruit Spots Disease in Gongliu County, Xinjiang

CHENG Yuan[1], *HUAI Wen-xia*[1], *YAO Yan-xia*[1], *LIN Ruo-zhu*[1], *LIU Zhong-jun*[2], *ZHAO Wen-xia*[1]

(1. Key Laboratory on Forest Protection, National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Forest Pest Control and Quarantine Bureau of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to identify the pathogen of apricot fruit spots disease in Gongliu County, Xinjiang, and to find the causes of apricot fruit diseases, so as to provide a reference for the disease prevention and control of local apricot trees. [**Method**] The fungal strains on the infected apricot were isolated by using conventional tissue separation method, and the isolates were identified by morphological observation, phylogenetic analysis and pathogenicity. [**Result**] The morphological feature of conidia developed on apricot fruit lesions and PDA medium were consistent with the conidia produced by *Thyrostroma carpophilum* (Lév.) B. Sutton. Furthermore, sequence identity comparison showed that all the three strains obtained were 100% identical in rDNA-ITS sequences with the NCBI reference sequence of *T. carpophilum*, and the three strains grouped into one consensual cluster with the reference isolates of *T. carpophilum* in the phylogenic tree based on rDNA ITS sequence. After inoculation of the obtained isolate, both apricot fruits and leaves produced obvious lesions, and the pathogen were again isolated from the lesions, thereby satisfying Koch's postulate. [**Conclusion**] The three strains isolated from the apricot fruit spots in Gongliu County were identified as *T. carpophilum*. This is the first report of this disease presence in Xinjiang Uygur Autonomous Region.

Keywords: apricot fruit spots; rDNA-ITS; phylogenetic analysis; *Thyrostroma carpophilum*

(责任编辑:彭南轩)