

# 广东‘鹰嘴蜜桃’上流胶病原鉴定

凌金锋<sup>1,2</sup>, 彭埃天<sup>1\*</sup>, 殷瑜<sup>1</sup>, 宋晓兵<sup>1</sup>,  
程保平<sup>1</sup>, 崔一平<sup>1</sup>, 陈霞<sup>1</sup>, 李子力<sup>1</sup>

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;  
2. 华南农业大学农学院, 广州 510642)

**摘要** ‘鹰嘴蜜桃’是广东的一个特色桃品种,以广东的连平县种植面积最大,但自2008年以来,桃树流胶病严重影响当地‘鹰嘴蜜桃’产业的发展,成为桃生产中的一大病害。为明确广东‘鹰嘴蜜桃’流胶病的病原菌种类,通过病原菌的分离和致病性回接试验,并采用形态学鉴定方法结合基于 *rDNA-ITS*、*β-tubulin* 和 *TEF1-α* 基因序列分析的分子鉴定方法对病原菌进行了鉴定。结果表明,引起广东‘鹰嘴蜜桃’流胶病的病原菌为 *Botryosphaeria dothidea* (无性态 *Fusicoccum aesculi*)。

**关键词** 鹰嘴蜜桃; 桃树流胶病; 病原鉴定

**中图分类号:** S 436.621.19 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.013

## Identification of the pathogen causing ‘Yingzuimitao’ peach tree gummosis in Guangdong Province

Ling Jinfeng<sup>1,2</sup>, Peng Aitian<sup>1</sup>, Yin Yu<sup>1</sup>, Song Xiaobing<sup>1</sup>,  
Cheng Baoping<sup>1</sup>, Cui Yiping<sup>1</sup>, Chen Xia<sup>1</sup>, Li Zili<sup>1</sup>

(1. *Research Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of High-Technology for Plant Protection of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China;*  
2. *College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

**Abstract** ‘Yingzuimitao’ is a characteristic peach cultivar in Guangdong Province, and Lianping is the largest county in planting area. However, since 2008, the development of ‘Yingzuimitao’ industry in Lianping has been seriously affected by peach tree gummosis, a destructive disease. Through pathogen isolation and pathogenicity test, combining morphological identification with molecular identification based on *rDNA-ITS*, *β-tubulin* and *TEF1-α* gene sequence analysis, the pathogen was identified as *Fusicoccum aesculi*, the anamorph of *Botryosphaeria dothidea*.

**Key words** ‘Yingzuimitao’ peach; peach tree gummosis; pathogen identification

桃 *Prunus perica* (L.) Batsch 是广东的一个珍稀水果品种,种植面积不大且零散。目前,在广东省内种植的所有桃类品种中,‘鹰嘴蜜桃’是最好的品种,种植区域主要集中在河源的连平县和韶关的翁源县<sup>[1-2]</sup>。由于政府的大力扶持,‘鹰嘴蜜桃’产业得到了迅速发展。就连平县而言,该县于2005年被评为“中国鹰嘴蜜桃之乡”;2011年,连平‘鹰嘴蜜桃’被评为“岭南十大佳果”;2015年,连平‘鹰嘴蜜桃’获得“国家地理标志保护产品”证书,这些荣誉和证

书的获得又对‘鹰嘴蜜桃’产业的发展起到了极大的促进作用。目前该县‘鹰嘴蜜桃’种植面积已发展到2797 hm<sup>2</sup>,是广东省‘鹰嘴蜜桃’连片种植面积最大的一个山区县,‘鹰嘴蜜桃’产业也已成为连平县山区农民脱贫致富的主导产业之一。然而,桃流胶病一直是该县‘鹰嘴蜜桃’产业发展面临的一大难题。该病常造成植株树势衰弱甚至整株死亡,给果农造成极大损失。为了了解该病的危害情况,本课题组于2008年到连平县进行了实地调查和病样采集,对

收稿日期: 2017-01-12 修订日期: 2017-03-23

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系岭南水果创新团队建设专项(2016LM1077);广东省农作物重大病虫害与植物检疫防控项目(粤农保[2015]10号)

\* 通信作者 E-mail: pengait@163.com

该病大面积发生流行的原因进行了分析,并提出了针对该病的防控建议<sup>[3]</sup>;2010年,本课题组再次到该地调查采样,并对‘鹰嘴蜜桃’流胶病的病原进行了分离和鉴定,为该病害的防控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病样采集及田间症状观察

分别于2008年9月和2010年8月到广东省连平县上坪镇‘鹰嘴蜜桃’果园调查‘鹰嘴蜜桃’流胶病发病情况,采集病害样本并对症状进行拍照。

### 1.2 病原菌的分离培养

参照方中达<sup>[4]</sup>的组织分离法对‘鹰嘴蜜桃’流胶病病枝病健交界处组织进行分离,待长出菌落后根据菌落形态特征将不同分离菌株分别挑出培养并单孢纯化,再移植到斜面培养基培养后4℃保存备用。

### 1.3 病原菌的致病性测定

采用离体接种方法,包括有伤和无伤接种<sup>[5-7]</sup>,并稍作修改。选取当年生健康无症春梢,先用自来水冲洗干净,再用70%乙醇进行表面消毒,然后剪成约20 cm长的小段,在中部位置刻去0.1 cm×0.5 cm的表皮,再用已长满病原菌菌丝的1 cm×5 cm灭菌纱布条包扎伤口,同时设空白对照,然后将枝条基部插入搪瓷盆中已灭菌的湿沙中(另一端用灭菌脱脂棉包扎保湿),最后将整个搪瓷盆装入封口袋中密封保湿,于26℃培养6 d后观察发病情况;无伤接种方法同有伤接种方法。

### 1.4 病原菌的培养性状及形态特征观察

将病原菌接种到马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)上,于26℃恒温培养,观察记录菌落、分生孢子等的形态特征,并测量菌落生长速率及分生孢子大小。自然基质上病原菌的形态特征观察则选取带有子实体的病部组织进行徒手切片,以水作浮载剂制成临时玻片,然后在Nikon Eclipse 90i正置荧光电动显微镜下进行显微观察、测量和拍照,记录其载孢体、产孢细胞和分生孢子的形态特征。

### 1.5 病原菌的分子生物学鉴定

#### 1.5.1 病原菌基因组DNA的提取

用解剖刀刮取新鲜菌丝体于2 mL离心管中,加入6个钢珠(直径3 mm),再加入800 μL FGI[E. Z. N. A.™ Fungal DNA Mini Kit (Omega Biotek)],在室温下采用MTM-60 Cell Mill(方统生物科技有限公

司, Fastwin Bio-tech Co. Limited)(intensity: 99)研磨30 min,其余步骤按试剂盒说明书提取病原菌基因组DNA,然后将DNA模板置于-20℃保存备用。

#### 1.5.2 病原菌的PCR扩增及测序

以病原菌基因组DNA为模板进行PCR扩增,引物ITS5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAGG-3')和ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TATGC-3')<sup>[8]</sup>用于扩增核糖体基因转录间隔区(*rDNA-ITS*)片段,引物Bt2a(5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3')和Bt2b(5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3')<sup>[9]</sup>用于扩增β-微管蛋白基因(*βtubulin*)片段,引物EF1-728F(5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3')和EF1-986R(5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3')<sup>[10]</sup>用于扩增转录延伸因子1-α(*TEF1-α*)片段。

PCR反应体系(50 μL):10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus) 5 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L) 4 μL, TaKaRa *Taq* 酶(5 U/μL) 0.4 μL,以上试剂均为TaKaRa公司产品,模板DNA 2 μL,引物(英潍捷基(上海)贸易有限公司合成)各2 μL(5 μmol/L),超纯水 34.6 μL。

反应条件:95℃预变性2 min;94℃变性30 s,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,将含有目的条带的PCR产物交由英潍捷基(上海)贸易有限公司分别用各基因相对应的PCR扩增引物进行双向测序。

#### 1.5.3 序列比对及系统发育分析

将获得的病原菌*rDNA-ITS*、*βtubulin*、*TEF1-α*序列提交到GenBank,并与GenBank中的DNA序列进行同源性比较分析,下载相关序列及其模式菌株序列,以*Macrophomina phaseolina*为外群,用MEGA 6.0软件<sup>[11]</sup>进行比对,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育进化树,以自展法(bootstrap)进行检测,重复1 000次并计算NJ系统发育进化树内每个分支的bootstrap值。

## 2 结果与分析

### 2.1 病害症状

该病既可危害实生苗、嫁接苗,也可危害成年

结果桃树主干和侧枝。发病初期枝干表面形成近圆形褐色病斑,略凹陷,后逐渐扩展为圆形、椭圆形、梭形大斑,或发展成隆起的小疱斑,在水分充足特别是持续阴雨时,病斑皮层易开裂,流出淡黄色透明黏稠胶液,凝结氧化后逐渐变成茶褐色或黑褐色凝胶。发病严重时,病斑扩大连成片,当病斑环绕枝干一周时,病部以上枝干生长逐渐衰弱,最后枯死(图 1a~c)。解剖病部,病部皮层变褐坏死,可深达木质部。

## 2.2 病原菌的分离及致病性测定

两次采样组织分离结果表明,依据菌落形态特征可将分离到的菌株划分为 7 个类群,分属于葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* sp.、拟茎点霉属 *Phomopsis* sp.、

镰刀菌属 *Fusarium* spp.、链格孢属真菌 *Alternaria* spp. 和炭疽菌属 *Colletotrichum* sp.。其中,葡萄座腔菌属的分离频率最高。

分别从上述 7 个菌落类群中各选出一个菌株进行单孢纯化,用于致病性接种试验,接种结果表明,有伤接种 6 d 后,经 *Botryosphaeria* sp. 接种的枝条,接种部位及其周围的表皮明显变褐坏死(图 1d),病部木质部也明显变褐,取病健交界处组织进行再分离,可重新分离获得与原分离菌株一致的菌株,而对照及其他 6 个菌株均未表现出任何发病症状,也未分离到测试菌株;无伤接种及对照均未发病。根据柯赫氏法则,证明该 *Botryosphaeria* sp. 菌株为‘鹰嘴蜜桃’流胶病的病原,菌株编号为 LPPG0801。



a: 枝条褐色凹陷病斑; b: 枝条流胶症状; c: 枝条枯死症状; d: 菌株 LPPG0801 有伤接种 6 d 后症状  
a: Sunken brown lesions on limb; b: Symptom of limb with gum; c: Symptom of dead limb affected by peach tree gummosis; d: Symptom on twigs inoculated by isolate LPPG0801 6 days after wound inoculation

图 1 ‘鹰嘴蜜桃’流胶病症状及菌株 LPPG0801 的致病性测定

Fig. 1 Symptoms of ‘Yingzuitao’ peach tree gummosis and pathogenicity test of isolate LPPG0801

## 2.3 病原菌的培养性状和形态特征

在 PSA 培养基上 26℃ 培养 4 d 后菌落直径达 7.01~7.44 cm,圆形或近圆形,边缘不规则,中央灰褐色或橄榄绿色,边缘白色,菌落背面中央暗褐色,边缘白色,气生菌丝棉絮状(图 2a~b)。菌落上生黑色颗粒状物,即子座,成熟分生孢子单胞,

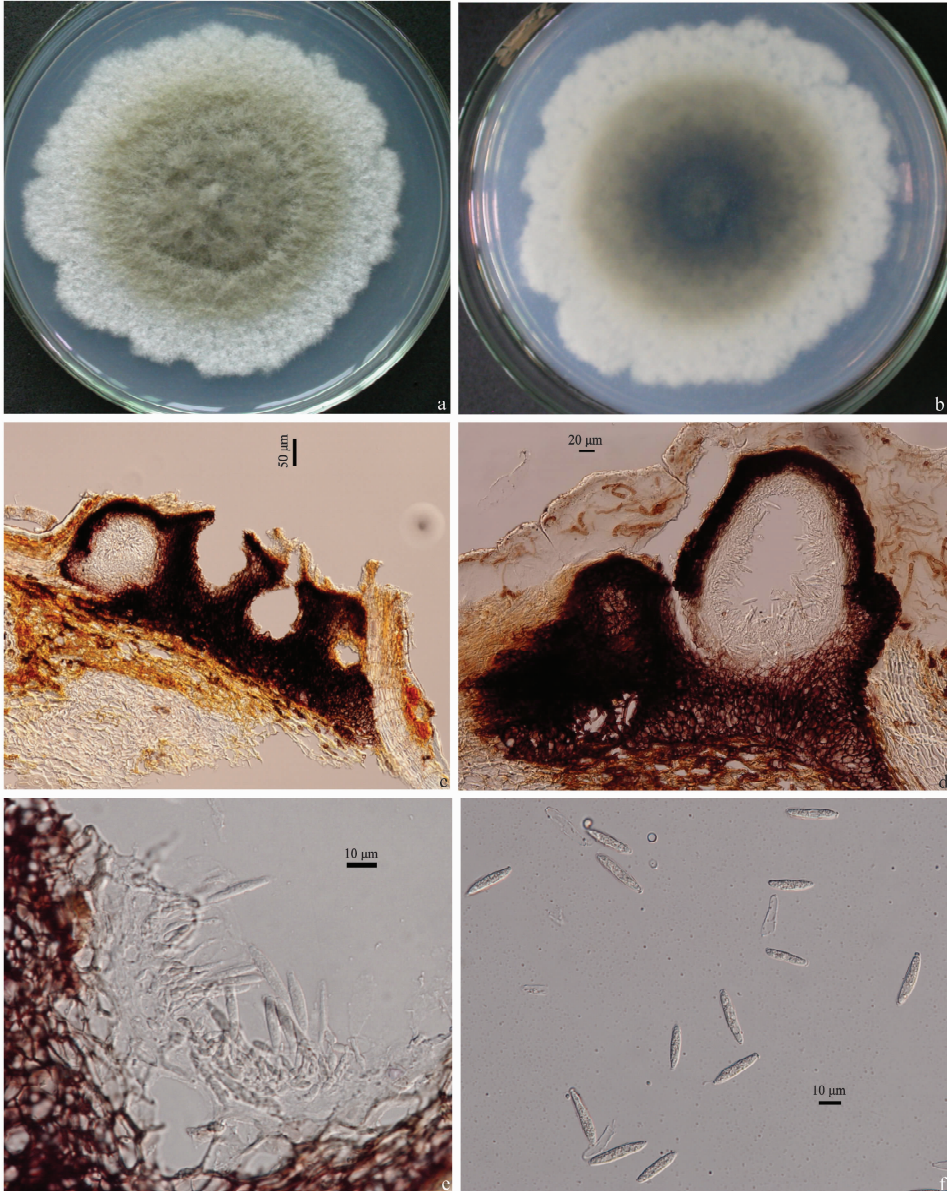
无色,薄壁,无隔,正直,纺锤形至梭形,具不规则油球,大小为  $(16 \sim 23.5) \mu\text{m} \times (5 \sim 7) \mu\text{m}$ ,平均  $(20 \pm 1.6) \mu\text{m} \times (6.2 \pm 0.4) \mu\text{m}$ ,54 个分生孢子的 95% 置信区间为  $(19.6 \sim 20.4) \mu\text{m} \times (6.1 \sim 6.4) \mu\text{m}$ ,长宽比为  $3.2 \pm 0.26$ (平均值±标准差),95% 置信区间为 3.1~3.3。



在自然基质上,载孢体埋生于表皮下,后突破表皮外露,为真子座,暗褐色至黑色,单腔室至多腔室,腔壁黑褐色、革质,向内侧渐呈无色(图 2c~d);分生孢子梗缺或不明显,无色,基部不分枝,圆柱形;产孢细胞全壁芽生式产孢,无色,圆柱形或瓶梗形(图 2e);分生孢子单胞,无色,薄壁,无隔,正直,纺锤形至梭形,具不规则油球,大小为(20.5~30) $\mu\text{m}$ ×(5.5~7.5) $\mu\text{m}$ ,平均(26.5±2.1) $\mu\text{m}$ ×(6.4±0.5) $\mu\text{m}$ ,50

个分生孢子的 95%置信区间为(25.9~27.1) $\mu\text{m}$ ×(6.3~6.5) $\mu\text{m}$ ,长宽比为 4.2±0.37(平均值±标准差),95%置信区间为 4.1~4.3(图 2f),较 PSA 培养基上形成的分生孢子略大。

在自然条件和人工培养基上均未发现有性型。根据病原菌的培养性状和形态特征,参考以往文献对该菌描述<sup>[12-14]</sup>,初步鉴定此病原菌为 *Fusicoccum aesculi*。



a-b: 菌株L.PPG0801在PSA培养基上培养4 d的菌落(a为正面; b为背面); c-d: 病枝上分生孢子座纵切面; e: 产孢细胞及正在产生的分生孢子; f: 分生孢子  
a-b: 4-day-old colony of isolate LPPG0801 on PSA (a, front; b, reverse); c-d: Vertical section through conidiomata on the host substrate; e: Conidiogenous cells and developing conidia; f: Conidia

图 2 ‘鹰嘴蜜桃’流胶病病原的菌落及形态特征

Fig. 2 Colonies and morphological characteristics of the pathogen causing ‘Yingzuititao’ peach tree gummosis

## 2.4 分子生物学鉴定

为进一步明确该病原种类,对病原菌株的 *rDNA-ITS*、*β-tubulin* 和 *TEF1-α* 基因进行扩增并测序,分别得到 581、439 和 300 bp 的基因片段,将所得序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中,获得序列登录号分别为 KU928258、KU928260 和 KU928259,并与数据库中的已知序列进行同源性比对,初步确定归属,

并下载同源性较高的相关序列,与本研究供试菌株共同构建系统发育树(图 3)。图 3 表明,供试菌株 LPPG0801 与 *B. dothidea* 和 *Dichomera saubinetii* 处于同一分支,但本研究未见菌株 LPPG0801 产生 *Dichomera* 型分生孢子,因此将该菌株鉴定为 *B. dothidea*(无性态 *F. aesculi*)。

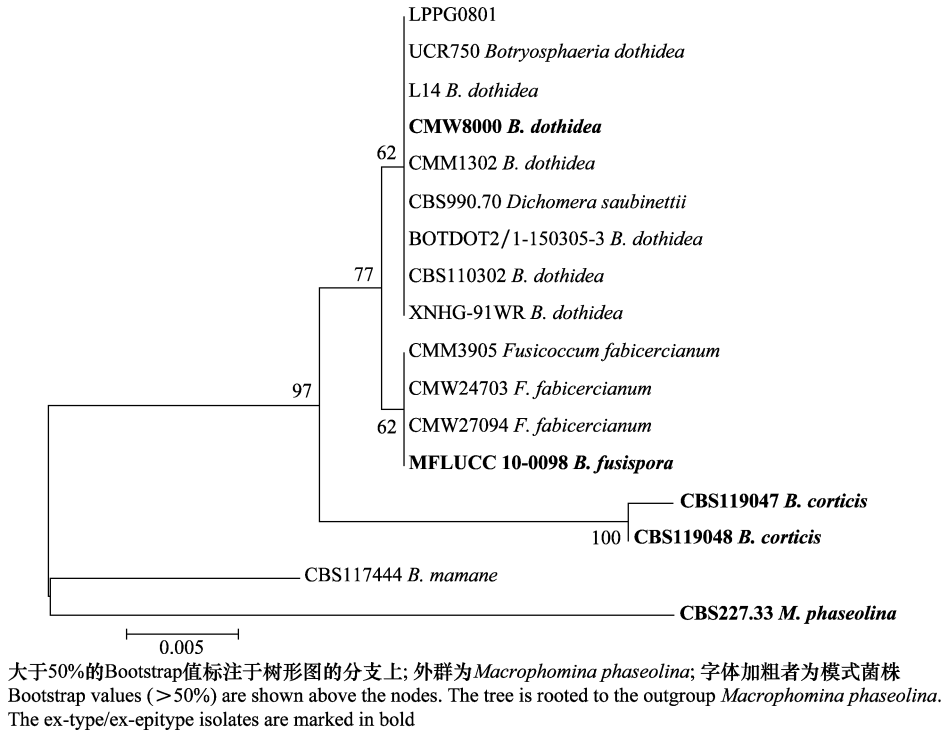


图 3 用 NJ 法基于 *rDNA-ITS*、*TEF1-α* 和 *β-tubulin* 基因核苷酸序列构建的系统发育树

Fig. 3 The NJ phylogenetic tree obtained from the combined *rDNA-ITS*, *TEF1-α* and *β-tubulin* gene sequence data

## 3 讨论与结论

桃流胶病可分为侵染性流胶病和非侵染性流胶病,但两种情况常常混合发生。2008 年本课题组调查发现,发生于广东连平的‘鹰嘴蜜桃’流胶病除非侵染性流胶外,还有一个重要原因是侵染性流胶<sup>[3]</sup>。关于侵染性流胶病的病原,国内外已有许多研究报告<sup>[15-23]</sup>。发生于广东的桃流胶病病原,已报道的有 *Leptosphaeria pruni*<sup>[16]</sup>、*Cucurbitaria* sp.<sup>[16]</sup>、*Dothiorella gregaria*<sup>[17]</sup> 和 *B. dothidea*(无性态 *F. aesculi*)<sup>[20]</sup> 4 种。经形态学鉴定和分子生物学鉴定,确定本研究中引起广东‘鹰嘴蜜桃’流胶病的病原为 *B. dothidea*(无性态 *F. aesculi*),与李夏等<sup>[20]</sup> 报道的病原一致,但未发现其有性世代。

关于 *Botryosphaeria* 真菌的鉴定,传统的鉴定

方法主要是依据无性型的形态学特征,但对于很多 *Botryosphaeria* 真菌来说,仅依据这一特征并不能作出准确鉴定,而同时引入多基因系统发育分析,可以有效解决这个问题<sup>[24]</sup>,本研究结果进一步验证了这一观点。本研究发现,病原菌在自然基质上形成的分生孢子明显比在 PSA 培养基上形成的分生孢子长,与赵晓军等<sup>[25]</sup> 的报道一致,但与 Slippers 等<sup>[26]</sup> 的报道不同,这可能与培养基的不同有关。此外,在依据 Phillips 等<sup>[14]</sup> 提出的葡萄座腔菌科 *Botryosphaeriaceae* 检索表进行检索时,在属级水平可查到 *Botryosphaeria*、*Neofusicoccum* 两属,在种级水平可查到 *B. fusispora*、*B. dothidea* 和 *B. fabriciana* 三个种,仅依靠分生孢子长度和长宽比很难确定到种。在进行多基因系统发育分析时,菌株 LPPG0801 与 *B. dothidea* 和 *D. saubinetii* 聚为一

类,与 *B. fusispora* 和 *B. fabicerciana* 等明显处于不同分枝,因此依据分子生物学的鉴定可将菌株 LPPG0801 鉴定为 *B. dothidea* 或 *D. saubinetii*。然而, *Dichomera* 真菌一个明显的特征是会产生 *Dichomera* 型分生孢子<sup>[27]</sup>,而在本研究中未见菌株 LPPG0801 产生 *Dichomera* 型分生孢子,因此排除 *D. saubinetii* 而将其鉴定为 *B. dothidea*。由此可见,采用形态学鉴定和分子生物学鉴定相结合的方法能够有效解决 *Botryosphaeria* 真菌中形态相似种难以区分的问题。

## 参考文献

- [1] 任文彬,汪薇,白卫东. 广东上坪鹰嘴蜜桃的生产与深加工前景探讨[J]. 农产品加工(创新版), 2012(6): 56-58.
- [2] 艾建安,李文珊,董丽萍. 广东鹰嘴蜜桃产业发展现状与对策[J]. 南方农村, 2015(1): 16-19.
- [3] 彭埃天,姜子德,邹寿发,等. 连平县鹰嘴蜜桃流胶病病情调查初报[J]. 广东农业科学, 2008(12): 87-88.
- [4] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-137.
- [5] 戚佩坤,张腾飞. 广东省番荔枝真菌病害的调查与鉴定[J]. 广东农业科学, 1996(5): 30-32.
- [6] 王金利,贺伟,秦国夫,等. 树木溃疡病重要病原葡萄座腔菌属、种及其无性型研究[J]. 林业科学研究, 2007, 20(1): 21-28.
- [7] Swart W J, Botes W M. First report of stem canker caused by *Botryosphaeria obtusa* on pistachio[J]. Plant Disease, 1995, 79(10): 1036-1038.
- [8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, Inc., 1990: 315-322.
- [9] Glass N L, Donaldson G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [10] Carbone I, Kohn L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.
- [11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [12] Sutton B C. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata [M]. England Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980: 164-166.
- [13] Crous P W, Palm M E. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum* [J]. Sydowia, 1999, 51(2): 167-175.
- [14] Phillips A J L, Alves A, Abdollahzadeh J, et al. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture [J]. Studies in Mycology, 2013, 76: 51-167.
- [15] 陈祥照. 桃树流胶病的研究 I. 病原特性及其发病规律[J]. 植物病理学报, 1985, 15(1): 53-57.
- [16] 张宝棣,周伯扬,董群娟. 广州地区桃树流胶病病原菌的研究[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(4): 37-42.
- [17] 戚佩坤. 广东果树真菌病害志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 122-124.
- [18] 罗江会,漆巨容,张镜,等. 重庆地区桃流胶病原菌研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(1): 50-54.
- [19] Wang Fan, Zhao Lina, Li Guohuai, et al. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, central China [J]. Plant Disease, 2011, 95(11): 1378-1384.
- [20] 李夏,李文英,孙丽丽,等. 粤北鹰嘴蜜桃流胶病的病原全型特征分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36(11): 2077-2082.
- [21] Abiko K, Kitajima H. Blister canker, a new disease of peach tree [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1970, 36(4): 260-265.
- [22] Weaver D J. A gummosis disease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea* [J]. Phytopathology, 1974, 64: 1429-1432.
- [23] Britton K O, Hendrix F F. Three species of *Botryosphaeria* cause peach tree gummosis in Georgia [J]. Plant Disease, 1982, 66: 1120-1121.
- [24] 赵嘉平,梁军,吕全,等. 葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)系统分类评述[J]. 林业科学研究, 2007, 20(3): 415-422.
- [25] 赵晓军,周建波,赵子俊,等. 枣树干腐病原菌的鉴定[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 332-335.
- [26] Slippers B, Crous P W, Denman S, et al. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea* [J]. Mycologia, 2004, 96(1): 83-101.
- [27] Barber P A, Burgess T J, Hardy G E St J, et al. *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture [J]. Mycological Research, 2005, 109(12): 1347-1363.

(责任编辑: 田 喆)