

樱桃褐斑病病原菌生物学特性及品种抗性评价

孙 杨, 付全娟, 孙玉刚, 魏国琴, 杨兴华

(山东省果树研究所, 泰安 271000)

摘要 研究了樱桃褐斑病病原菌的生物学特性, 评价了 39 个樱桃品种对褐斑病田间抗病能力。结果表明, 燕麦培养基和 PCDA 培养基最适于病菌生长; 该病菌在 10~35℃ 均能生长, 25℃ 为最适生长温度; 葡萄糖和蛋白胨是适宜病菌生长的碳、氮源; 病菌有较广的酸碱度适应范围, 在 pH4~12 均能生长, 在 pH7 条件下生长速度最快; 不同光照条件下, 黑暗时菌丝生长速度最快; 分生孢子在 10~35℃ 均能萌发, 最适温度为 25℃; 在 pH7 时分生孢子萌发率最高。不同樱桃品种对褐斑病的抗病性存在差异, 39 个品种中高抗品种 6 个, 抗病品种 12 个, 中抗品种 9 个, 感病品种 8 个, 高感品种 4 个, 无免疫品种。

关键词 樱桃褐斑病; 核果钉孢菌; 生物学特性; 抗病性

中图分类号: S 436.62 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.020

Identification of cherry cultivar resistance to leaf spot and biological characteristics of *Passalora circumscissa*

Sun Yang, Fu Quanjuan, Sun Yugang, Wei Guoqin, Yang Xinghua

(Institute of Shandong Pomology, Tai'an 271000, China)

Abstract The biological characteristics of *Passalora circumscissa* isolated from Tai'an and the resistance of 39 cherry varieties in the field were studied. The results showed that OA and PCDA were the optimum culture media for pathogen growth. The optimum temperature was 25℃ (10 to 35℃). Glucose and peptone were the optimum carbon and nitrogen sources. The pathogen adapted to a wide range of pH values, growing well from pH 4 to pH12, and the optimum pH value was 7. The mycelium grew faster in darkness. For germination of conidia, the optimum temperature and pH were 25℃ and 7, respectively. Different varieties exhibited different disease resistances, including six highly resistant varieties, 12 resistant varieties, 9 moderately resistant varieties, 8 susceptible varieties, 4 highly susceptible varieties, and immune varieties were not found.

Key words cherry leaf spot; *Passalora circumscissa*; biological character; resistance

樱桃 *Prunus avium* 营养丰富, 酸甜适口, 素有“春果第一枝”的美誉^[1]。近年来, 樱桃种植规模逐年扩大, 樱桃褐斑病的发生呈明显加重趋势, 在山东^[2]、陕西^[3]、四川^[4]等樱桃主产区均有发生, 严重制约樱桃产业的发展, 成为樱桃生产上亟待解决的问题^[5]。

樱桃褐斑病发生严重时, 多个病斑愈合, 病斑干化造成叶片穿孔、提早脱落, 光合效率下降, 树势衰弱, 抗寒性降低, 导致翌年产量下降^[6]。樱桃褐斑病的病原菌为核果钉孢菌 *Passalora circumscissa*^[7]。目前, 国内外对樱桃品种抗病性评价的文献报道较

少, 而病原菌的生物学特性尚无研究报道, 本研究对分离的核果钉孢菌, 开展生物学特性研究, 并对 39 个樱桃品种进行了田间抗病性评价, 旨在为病害的发生规律和综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

于山东省果树研究所天平湖实验基地樱桃园内采集病叶, 用单孢分离法分离、纯化菌株后, 保存于山东省果树研究所中心实验室, 备用。

1.1.2 供试培养基

樱桃叶煎汁葡萄糖培养基(FcheDA)、燕麦培养基(OA)、玉米粉培养基(CMA)、樱桃叶煎汁培养基(FcheA)、马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、马铃薯蔗糖培养基(PSA)、马铃薯胡萝卜葡萄糖培养基(PCDA)、V8 培养基(V8 汁 200 g、CaCO₃ 3.0 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1 000 mL)、胡萝卜葡萄糖培养基(CDA)、查氏培养基(Czapek)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌生物学特性研究

1.2.1.1 不同培养基对菌丝生长的影响

以 FcheDA、OA、CMA、FcheA、PDA、PSA、PCDA、V8、CDA、查氏 10 种培养基作为培养基质。将供试菌株在 PDA 平板培养 15 d 后,在菌落边缘用无菌打孔器切取直径 5 mm 的菌饼,接种到直径 9 cm 的培养基平板中央,每皿放置 1 个菌饼(下同)。每处理 3 次重复。于 25℃ 恒温培养 30 d,用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.1.2 不同碳源、氮源对菌丝生长的影响

以 Czapek 培养基为基础培养基,将蔗糖分别用等量的葡萄糖、果糖、麦芽糖、甘露醇、半乳糖、木糖置换,以无碳源的 Czapek 培养基为对照;将 KNO₃ 分别替换为蛋白胨、NaNO₃、NH₄NO₃、(NH₄)₂SO₄、牛肉浸膏、酵母浸膏,以无氮源的 Czapek 为对照,将菌饼接种到不同碳、氮源培养基,每处理 3 次重复。于 25℃ 恒温培养 30 d,用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.1.3 pH 对菌丝生长的影响

用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将 PDA 培养基的 pH 调节至 4、5、6、7、8、9、10、11、12 共 10 个梯度。分别接种 5 mm 病原菌菌饼后 25℃ 条件下恒温培养 30 d。用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.1.4 温度对菌丝生长的影响

设定 5、10、15、20、25、30、35℃ 共 7 个温度梯度。在供试的 PDA 培养基上接种直径 5 mm 的病原菌菌饼,在培养箱中连续培养 30 d。每处理 3 次重复。用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.1.5 光照对菌丝生长的影响

设连续光照、L//D=12 h//12 h、连续黑暗 3 个处理。供试培养基为 PDA 培养基,将直径 5 mm 的菌饼,接种于 PDA 培养基平板中央,25℃ 恒温培养箱中培养 30 d,十字交叉法测量菌落直径。

1.2.1.6 分生孢子悬液的制备

从樱桃园采集具有典型症状的新鲜病叶,放入装有冰袋的保鲜盒中带回实验室,用自来水将表面冲洗干净后用灭菌的去离子水冲洗 3 遍,保湿。在 10×4.5 倍解剖镜(Nikon)下用灭菌的解剖刀将分

生孢子堆挑下,用无菌水配成孢子悬浮液,然后在 10×10 的低倍镜(Leica)下检查孢子数,用无菌水调节至 20 个孢子/视野。

1.2.1.7 温度对分生孢子萌发的影响

采用凹载玻片萌发法,将调节好浓度的孢子悬液滴于载玻片上,将其放入垫有湿滤纸的培养皿内,分别置于 5、10、15、20、25、30、35℃ 的培养箱内保湿培养,每处理 3 次重复,12 h 后计数孢子总数和萌发孢子数,计算孢子萌发率。

1.2.1.8 pH 对分生孢子萌发的影响

用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 溶液调节无菌水 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,配制孢子悬浮液,采用凹玻片萌发法,置于 25℃ 条件下保湿培养,每处理 3 次重复,12 h 后测定孢子萌发率。

1.2.2 品种抗病性评价

1.2.2.1 调查品种

樱桃树为位于山东省果树研究所天平湖实验基地内 6 年生嫁接品种,株行距为 2 m×4.5 m,树势中庸。共调查 39 个品种。

1.2.2.2 调查方法

每个品种选择 3 株长势一致的植株,每株东南西北 4 个方向取 200 片叶,调查叶斑病发病情况并进行分级(表 1),计算病情指数。

表 1 樱桃褐斑病叶部病斑分级标准

Table 1 The classification standards for cherry leaf spot

病级 Grade	分级标准 Standard
0	无病斑
1	叶片病斑较少,病斑面积占整个叶面积的 1%~10%
3	病斑较多,病斑面积占整个叶面积的 11%~20%
5	病斑较多,病斑面积占整个叶面积的 21%~30%
7	病斑多,病斑面积占整个叶面积的 31%~50%
9	病斑多或融合成大斑,病斑面积占整个叶面积的 50%以上

相对抗病指数=鉴定品种病情指数/对照品种病情指数(以病情指数最高的品种为对照品种)。

褐斑病发病程度按以下标准:“+”表示偶尔发生;“++”表示经常或局部发生;“+++”表示普遍发生;“++++”表示严重发生;“+++++”表示特别严重发生。

抗病性按以下标准:“xxxxx”表示抗病性高;“xxxx”表示抗病性较高;“xxx”表示抗病性一般;“xx”表示较感病;“x”表示易感病。

以病情指数为基础,采用相对抗病性评价其抗病程度,根据相对抗病指数进行抗性划分。抗性水

平分为:免疫(I)为 1.00、高抗(HR)为 0.80~0.99、抗病(R)为 0.70~0.79、中抗(MR)为 0.50~0.69、感病(S)为 0.30~0.49、高感(HS)为 0~0.29。

1.2.3 数据分析方法

采用 SPSS18.0 软件进行单因素方差分析。处理间差异显著性分析($P < 0.05$)采用 Duncan's 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 病菌生物学特性

2.1.1 不同培养基对菌丝生长的影响

病原菌在不同培养基上均能生长,在燕麦培养基、PCDA 培养基上生长速度最快,其次为 PDA、查氏培养基,在玉米粉培养基、V8 汁培养基上生长速度最慢(图 1)。

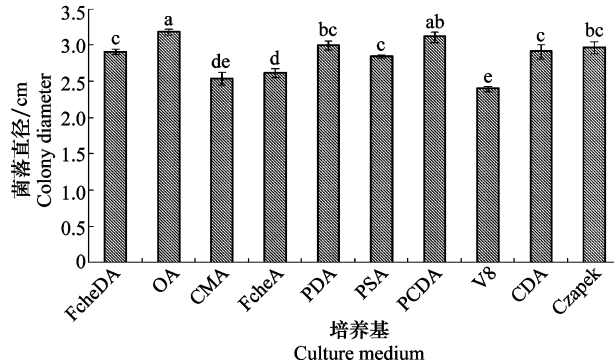


图 1 不同培养基上菌丝生长情况

Fig. 1 Effects of culture media on mycelial growth

2.1.2 不同 pH 对菌丝生长的影响

病原菌在 pH 4~12 的情况下均能生长,在 pH 为 4 时生长最慢,在 pH 为 7 时生长最快,在 pH 为 6~9 时均适合菌丝生长(图 2)。

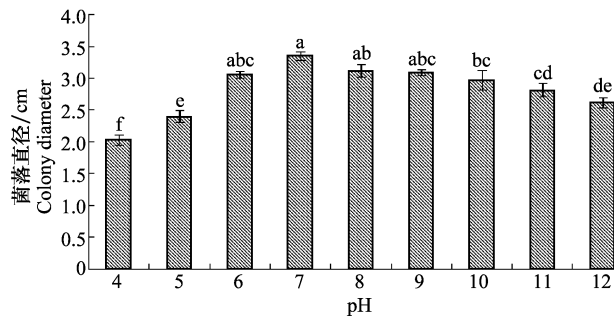


图 2 不同 pH 条件下菌丝生长情况

Fig. 2 Effects of pH on mycelial growth

2.1.3 不同碳源对菌丝生长的影响

病原菌适宜碳源为葡萄糖、麦芽糖、蔗糖,最适碳源

为葡萄糖、麦芽糖,不适宜碳源为甘露醇、木糖(图 3)。

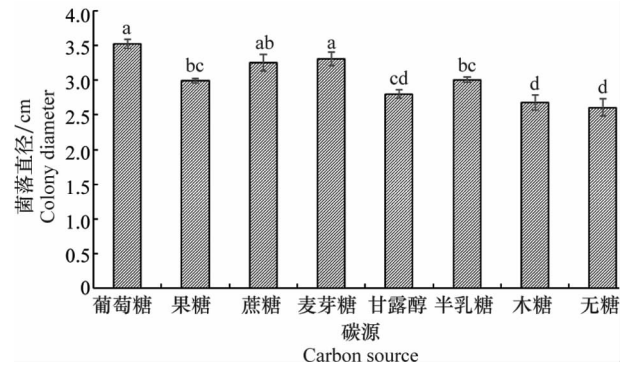


图 3 不同碳源条件下菌丝生长情况

Fig. 3 Effects of carbon sources on mycelial growth

2.1.4 不同氮源对菌丝生长的影响

病原菌适宜氮源为牛肉浸膏、蛋白胨、酵母浸膏,最适氮源为牛肉浸膏、蛋白胨,在硫酸铵培养基中生长最为缓慢(图 4)。在无氮源生长条件下,菌丝生长稀疏,只有单根菌丝向外生长速度快,因此不作为最佳培养条件。

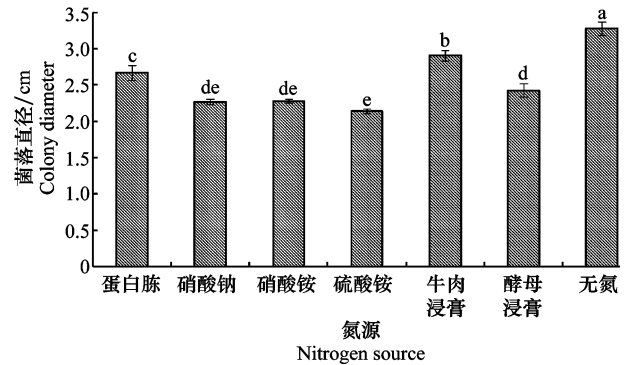


图 4 不同氮源条件下菌丝生长情况

Fig. 4 Effects of nitrogen sources on mycelial growth

2.1.5 不同温度对菌丝生长的影响

随着温度的上升,菌丝生长速度呈先加快后减慢的趋势,病原菌适宜生长温度为 25~30℃,35℃ 生长速度明显减缓(图 5)。

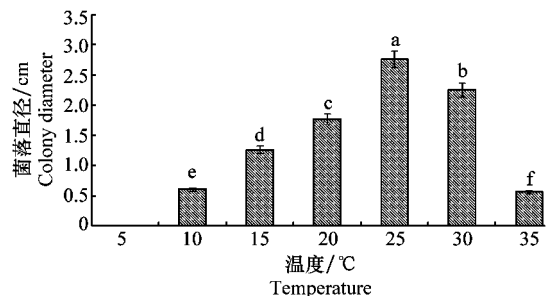


图 5 不同温度条件下菌丝生长情况

Fig. 5 Effects of temperature on mycelial growth

2.1.6 不同光照条件对菌丝生长的影响

在黑暗条件下, 菌丝生长速度最快, 在全光照条件下, 菌丝生长速度最慢, 与黑暗和光暗交替条件下相比, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$) (图 6)。

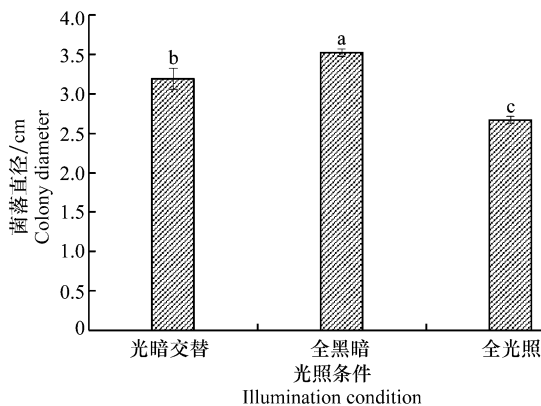


图 6 不同光照条件下菌丝生长情况

Fig. 6 Effects of illumination on mycelial growth

2.1.7 不同温度对孢子萌发率的影响

在 10~35℃ 孢子均可萌发, 随着温度的上升萌发率呈先上升后下降的趋势, 在 25℃ 时萌发率最高 (图 7)。

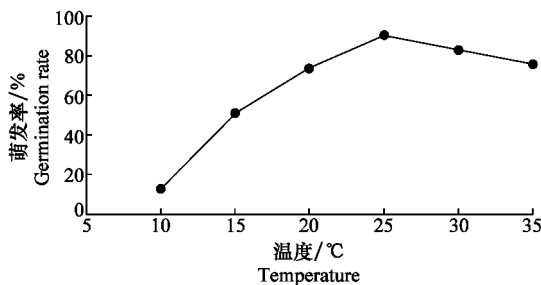


图 7 不同温度条件下孢子的萌发率

Fig. 7 Effects of temperature on conidial germination rate

2.1.8 不同 pH 对孢子萌发率的影响

随着 pH 的升高, 孢子萌发率呈先升高后降低的趋势, 在 pH 为 7 时, 萌发率达到最高值, 随后下降, 在 pH 为 12 时, 萌发率最低 (图 8)。

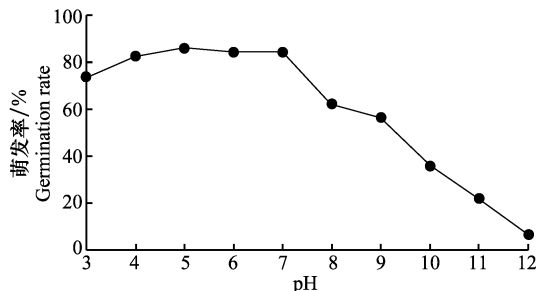


图 8 不同 pH 条件下孢子的萌发率

Fig. 8 Effects of pH on conidial germination rate

2.2 品种抗性评价

以病情指数为基础, 采用相对抗病性方法评价其抗病程度, 根据相对抗性指数进行抗性划分。39 个樱桃品种的病情指数为 7.6~62.9, 平均为 25.2; 相对抗病指数为 0~0.88, 平均为 0.60。病情指数是反映樱桃品种抗病性差异的重要指标, 按照病情指数、相对抗性指数的大小, 可将 39 个品种的抗病性分为 6 级, 即免疫 (I)、高抗 (HR)、抗病 (R)、中抗 (MR)、感病 (S)、高感 (HS)。39 个樱桃品种中无免疫品种, 高抗品种为‘秦樱’、‘重庆乌皮’、‘格拉斯’、‘樱姬’、‘红清’、‘Sir Douglas’; 抗病品种为‘早大果’、‘黑珍珠’、‘丽珠’、‘13-33’、‘鲁玉’、‘秦林’、‘佳红’、‘斯坦拉’、‘大地红’、‘饴珠’、‘早露’、‘早红珠’; 中抗品种为‘拉宾斯’、‘C2’、‘红蜜’、‘泰珠’、‘明珠’、‘先锋’、‘萨米脱’、‘布鲁克斯’、‘红灯’; 感病品种为‘美早’、‘彩玉’、‘C1’、‘雷尼’、‘晚红珠’、‘红艳’、‘岱玉’、‘桑提娜’; 高感品种为‘意早’、‘吉美’、‘红手球’、‘Red’ (表 2)。

表 2 樱桃品种特性及其对樱桃褐斑病的抗性

Table 2 Investigation of cherry cultivar characteristics and resistance to cherry leaf spot

品种 (Variety)	地区 (Area)	果实形状 (Shape)	果实颜色 (Color)	成熟时间 (Ripening period)	病情指数 (Disease index)	相对抗病指数 (Relative disease resistance index)	抗病性 (Disease resistance)	发病程度 (Morbidity degree)	抗性评价 (Resistance evaluation)
重庆乌皮	中国	圆形	浅红色	5 月上中旬	7.6	0.88	xxxxx	+	HR
秦樱	中国	心脏形	紫红色	5 月中旬	7.7	0.88	xxxxx	+	HR
樱姬	日本	心脏形	红色	6 月上旬	7.7	0.88	xxxxx	+	HR
Sir Douglas	新西兰	宽心脏形	红色	6 月上旬	8.7	0.86	xxxxx	+	HR
格拉斯	俄罗斯	宽心脏形	红色	5 月底	8.7	0.86	xxxxx	+	HR
红清	日本	心脏形	红色	5 月下旬	9.1	0.86	xxxxx	+	HR
佳红	中国	心脏形	浅黄色	5 月底至 6 月初	12.7	0.80	xxxx	++	R
早露	中国	宽心脏形	紫红色	5 月中旬	12.7	0.80	xxxx	++	R
13-33	中国	宽心脏形	黄色	5 月底至 6 月初	13.8	0.78	xxxx	++	R
斯坦拉	加拿大	心脏形	紫红色	6 月上旬	13.9	0.78	xxxx	++	R
黑珍珠	中国	宽心脏形	紫红色	5 月下旬	14.2	0.77	xxxx	++	R
早红珠	中国	宽心脏形	紫红色	5 月下旬	14.2	0.77	xxx	+++	R
早大果	乌克兰	宽心脏形	深红色	5 月中下旬	15.8	0.75	xxxx	++	R

续表 2 Table 2(Continued)

品种 Variety	地区 Area	果实形状 Shape	果实颜色 Color	成熟时间 Ripening period	病情指数 Disease index	相对抗病指数 Relative disease resistance index	抗病性 Disease resistance	发病程度 Morbidity degree	抗性评价 Resistance evaluation
秦林	美国	宽心脏形	紫红色	5月下旬	16.0	0.75	xxxx	++	R
丽珠	中国	肾脏形	紫红色	6月上旬	16.1	0.74	xxxx	++	R
鲁玉	中国	肾脏形	紫红色	5月底至6月初	17.7	0.72	xxxx	++	R
大地红	日本	短心脏形	红色	5月中下旬	17.7	0.72	xxxx	++	R
饴珠	中国	宽心脏形	黄底红晕	6月上旬	18.9	0.70	xxxx	++	R
红灯	中国	肾脏形	紫红色	5月下旬	20.3	0.68	xxx	+++	MR
明珠	中国	宽心脏形	红底黄晕	5月下旬	23.2	0.63	xxx	+++	MR
泰珠	中国	肾脏形	紫红色	6月上旬	23.4	0.63	xxx	+++	MR
C2	中国	心脏形	紫红色	6月初	23.6	0.62	xxx	+++	MR
先锋	美国	肾脏形	深红色	6月上中旬	25.2	0.60	xxx	+++	MR
拉宾斯	加拿大	卵圆形	紫红色	6月上中旬	26.3	0.58	xxx	+++	MR
萨米脱	美国	心脏形	紫红色	6月上旬	26.4	0.58	xxx	+++	MR
红蜜	中国	心脏形	黄底红晕	5月下旬	27.4	0.56	xxx	+++	MR
布鲁克斯	美国	心脏形	红色	5月下旬	28.3	0.55	xxx	+++	MR
岱玉	中国	心脏形	紫红色	6月初	31.4	0.50	xx	++++	S
红艳	中国	宽心脏形	红色	5月下旬	31.4	0.49	xx	++++	S
彩玉	中国	近圆形	黄底红晕	5月底	32.3	0.49	xx	++++	S
桑提娜	加拿大	心脏形	红色至紫红色	5月下旬	34.3	0.45	xx	++++	S
晚红珠	中国	宽心脏形	红色	6月中旬	34.3	0.45	xx	++++	S
美早	美国	肾脏形	紫红色	5月下旬	35.3	0.44	xx	++++	S
C1	中国	扁圆形	紫红色	6月上旬	35.7	0.43	xx	++++	S
雷尼	美国	宽心脏形	黄底红晕	6月上旬	38.1	0.39	xx	++++	S
吉美	中国	心脏形	紫红色	6月上旬	54.3	0.14	x	+++++	HS
Red	新西兰	宽心脏形	紫红色	6月上旬	55.2	0.12	x	+++++	HS
红手球	日本	短心脏形	红色	6月上旬	61.8	0.02	x	+++++	HS
意早	法国	短心脏形	紫红色	5月底	62.9	0	xx	++++	HS

3 讨论

尾孢菌属真菌有许多是重要的植物病原真菌,且绝大多数具有很强的寄生性^[8],人工培养和产孢条件难以确定,即使是分离后能在人工培养基上生长,其生长速度也非常缓慢,而且很难产生孢子,这制约了对尾孢菌属真菌的系统研究。本研究中,核果钉孢菌最适宜的生长条件为 25℃,黑暗,PCDA 培养基,以葡萄糖为碳源。本文通过对樱桃褐斑病菌生物学特性的研究,阐明了病菌生长和环境条件的关系,进一步明确了病害的发生规律,为病害的深入研究和防治提供了一定的理论基础。

褐斑病是樱桃生产中常见的病害,喷施化学药剂是防治该病害的主要措施,但化学药剂容易造成环境污染,且易导致病原菌产生抗药性。选育抗病品种是病害防治的有效措施。品种抗性评价是抗病育种的基础工作,为抗病育种提供理论支持。本研究中,不同樱桃品种对褐斑病的抗性存在差异,按照病情指数、相对抗病指数可分为免疫、高抗、抗病、中抗、较感病、感病 6 个等级,在调查的 39 个品种中,‘秦樱’、‘重庆乌皮’、‘格拉斯’、‘樱姬’、‘红清’、‘Sir Douglas’为高抗品种,而‘意早’、‘吉美’、‘红手球’、‘Red’为高感品种。病害抗性调查是评价品种抗病

性的重要指标,但即使是在同等发病条件下,不同年份、不同地区以及不同树势,会使品种间存在相对抗性差异。在实际育种中,除筛选出优良的抗病品种、进行种间杂交外,还应进一步找出抗病品种的抗病基因,提升选育品种的抗性。

参考文献

- [1] 王丽娟,刘林德,张莉,等. 烟台甜樱桃柱头的可授性、形态特征与坐果率[J]. 植物学报, 2011, 46(1): 44-49.
- [2] 于承广,王植义,吕杰玲,等. 铜大师防治大樱桃褐斑病、细菌性穿孔病试验[J]. 烟台果树, 2006(2): 26-27.
- [3] 张涛,李婷,郭鹏飞,等. 樱桃褐斑穿孔病发生原因及防治对策[J]. 陕西农业科学, 2010(1): 157-158.
- [4] 张燕春. 九寨沟县甜樱桃穿孔病的发生和防治[J]. 四川农业科技, 2012(6): 29.
- [5] 孙杨,孙玉刚,魏国芹. 甜樱桃褐斑病研究进展[J]. 湖北农业科学, 2014(4): 750-752.
- [6] 孙杨,孙玉刚,魏国芹. 不同樱桃品种对褐斑田间抗病性的调查[J]. 江苏农业科学, 2014(10): 129-130.
- [7] Braun U, Mouchacca J, McKenzie E H C. Cercosporoid hyphomycetes from New Caledonia and some other South Pacific islands [J]. New Zealand Journal of Botany, 1999, 37(2): 297-327.
- [8] Groenewald J Z, Nakashima C, Nishikawa J, et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses [J]. Studies in Mycology, 2012, 75: 115-170.

(责任编辑:田 喆)