

赵延存, 刘 坤, 孙连波, 等. 新疆地区梨树与白杨树腐烂病病菌的交叉侵染[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 85–88.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.021

新疆地区梨树与白杨树腐烂病病菌的交叉侵染

赵延存¹, 刘 坤^{1,2}, 孙连波², 钱国良², 刘凤权^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095)

摘要: 在新疆库尔勒地区, 梨树腐烂病严重发生的梨园周围往往伴随有严重的白杨树腐烂病发生, 推测这 2 种树木上的腐烂病病菌可能存在交叉侵染现象。为验证这一假设, 从梨树样品上分离得到 8 株梨树腐烂病病菌 (*Valsa mali* var. *pyri*), 从白杨树样品上分离到 11 株白杨树腐烂病病菌 (*Valsa sordida*) 及 9 株柳树腐烂病病菌 (*Cytospora translucens*)。将 3 种病原菌进行交叉接种, 发现梨树腐烂病病菌对白杨树枝条的侵染成功率仅为 8.9%, 而白杨树及柳树腐烂病病菌对梨树枝条的侵染成功率分别为 45.8%、63.0%。将 3 种病原菌分别接种到梨树的叶片和果实上, 发现菌株的致病力表现为梨树腐烂病病菌 > 柳树腐烂病病菌 > 白杨树腐烂病病菌。将白杨树和柳树腐烂病病菌在梨树果实上继代接种 3 代后, 2 种病原菌的致病力均有所上升。因此, 白杨树腐烂病病原菌对梨树具有较强的交叉侵染能力。

关键词: 库尔勒香梨; 梨树腐烂病病菌; 白杨树腐烂病病菌; 柳树腐烂病病菌; 交叉侵染; 致病性

中图分类号: S436.612.1⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0085-03

梨是我国第三大水果, 种植范围广, 我国梨树栽培面积约 108.5 万 hm², 产量达 1 579.5 万 t, 约占世界总产量的 2/3^[1-2]。梨树腐烂病又称烂皮病, 是梨树上危害最严重的枝干病害, 在我国各地梨园均有发生, 特别是新疆、西北、华北和东北产区发生危害较严重, 对我国梨产业的健康发展构成严重的威胁^[3]。库尔勒香梨是新疆库尔勒地区的优质特色地方梨品种, 因其品质佳而远销国内外。然而, 近年来梨树腐烂病危害严重, 许多香梨园中梨树腐烂病病株率高达 100%, 90% 的梨树死亡植株是由腐烂病危害所致, 严重制约了香梨产业的健康发展^[4-5]。

在新疆地区, 白杨树常作为防护林栽种于梨园四周, 白杨树腐烂病也发生危害较严重。在病害调研过程中, 发现白杨树腐烂病症状与梨树腐烂病症状极为相似, 因此推测这 2 种树木上的腐烂病病菌可能存在交叉侵染现象。已有研究表明, 白杨树腐烂病病菌可以危害苹果树、梨树等^[6-7], 苹果树和梨树腐烂病病菌也可以危害杨树^[8-10]。为验证香梨腐烂病病菌和白杨树腐烂病病菌的交叉侵染, 分别采集了香梨树及白杨树腐烂病的样品, 对病原菌进行分离鉴定, 并进行交叉接种侵染试验, 以确定香梨腐烂病的侵染源, 为新疆香梨腐烂病的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 库尔勒香梨树的腐烂病样品以及种植于梨园周围白杨树的腐烂病样品, 均采自新疆库尔勒地区。

1.1.2 接种材料 库尔勒香梨枝条、叶片、果实, 白杨树枝条。

1.1.3 培养基 马铃薯蔗糖培养基 (PDA): 200 g 去皮马铃薯, 切成小块, 加 20 g 琼脂, 1 000 mL 水煮沸 30 min, 4 层纱布过滤, 滤液中加入 20 g 蔗糖, 用水补足 1 000 mL。

1.1.4 引物 采用 ITS 通用引物 ITS1: 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′和 ITS4: 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′对菌株的总 DNA 进行 rDNA-ITS 序列扩增。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离与鉴定 采用组织分离法, 从病斑的病健交界处取样, 置于 PDA 平板上, 28 ℃ 黑暗培养, 待组织周围长出真菌菌丝, 从边缘处打孔, 将菌丝块移植于新的 PDA 平板上, 并对其进行编号。利用真菌 DNA 提取试剂盒 (OMEGA) 提取每个菌株的总 DNA, 然后利用 ITS 通用引物 ITS1/ITS4 进行 rDNA-ITS 序列扩增, 将 PCR 产物进行电泳检测及测序, 并将序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对分析。

1.2.2 病原菌的验证试验 依据柯赫氏法则, 采用打孔法, 首先选取粗细相同的枝条, 消毒后截成 15 cm 长的小段, 上端用石蜡封口, 然后用直径为 0.8 cm 的打孔器在树枝上打孔, 将菌丝块长满菌丝的一面紧贴伤口部位, 以只接种 PDA 培养基作为空白对照, 然后用封口膜将伤口部位包扎好, 将枝条插入灭菌的湿沙盘中, 置于 28 ℃ 培养箱中进行 12 h 光照/12 h 黑暗培养, 接种 5 d 后测量病斑长度, 每个病菌重复 3 次。将从梨树上的分离物回接梨树枝条, 同时将从白杨树上的分离物回接白杨树枝条, 观察其发病情况, 并从发病部位再次分离

收稿日期: 2016-10-25

基金项目: 国家农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-28-16);

江苏省科技支撑计划 (编号: BE2015354、BE2014386); 江苏省农业

科学院科研业务专项 [编号: ZX(15)1006]。

作者简介: 赵延存 (1976—), 男, 山东菏泽人, 博士, 副研究员, 主要从事作物病害生物防治及作物细菌病害研究。Tel: (025) 84390783;

E-mail: zhaoyc27@126.com。

通信作者: 刘凤权, 博士, 研究员, 主要从事作物细菌病害、果树病害及植物病害生物防治研究。Tel: (025) 84390873; E-mail: fqliu20011@sina.com。

病原菌,并对其进行分子鉴定。

1.2.3 病原菌的交叉侵染试验 采用打孔法将梨树上的分离物接种于白杨树枝条,同时将白杨树上的分离物接种于梨树枝条,观察其能否产生交叉侵染现象,并对发病部位再次进行病原菌的分离和鉴定。

1.2.4 病原菌在梨树上的致病性研究 将白杨树上分离得到的病原物通过打孔法接种于梨树枝条和梨果实上,并通过针刺法接种于梨树叶片,观察发病情况。统计病原菌在梨果实上发病 6 d 后的病斑大小。将白杨树上的分离物在梨果实上继代接种 3 代,即不断从发病部位分离病原菌并再次接种,观察各代病原菌的致病性变化情况。

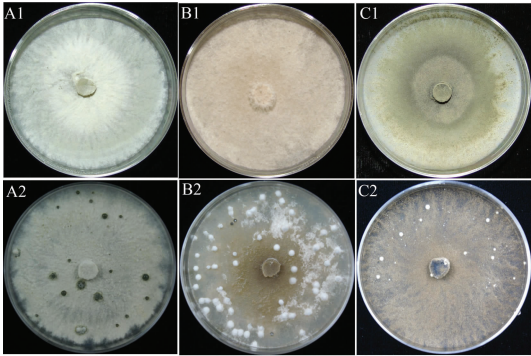
2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与鉴定

从梨树样品中共分离得到 23 株疑似病原菌的菌株,从白杨树样品中共分离得到 35 株疑似病原菌的菌株,将这些菌株进行 rDNA - ITS 测序,并将序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,发现梨树样品分离物中有 8 株菌株与梨腐烂病病菌具有较高的同源性,而白杨树样品分离物中有 11 株菌株与白杨树腐烂病病菌具有较高的同源性,另有 9 株菌株与柳树腐烂病病菌具有较高的同源性,同源性均高于 99%。再结合培养性状观察,最终将这些菌株分别鉴定为梨树腐烂病病菌 (*Valsa mali* var. *pyri*)、白杨树腐烂病病菌 (*Valsa sordida*)、柳树腐烂病病菌 (*Cytospora translucens*)。

2.2 病原菌的形态学观察

3 种腐烂病病菌的培养性状如图 1 所示,A1、B1、C1 分别为梨树、白杨树、柳树腐烂病病菌培养 5 d 后的菌落形态,其中梨树腐烂病病菌菌落呈白色,菌丝气生性较弱,紧贴着培养基生长;白杨树腐烂病病菌菌落呈橘红色,菌丝气生性较强,呈丝状,不紧贴培养基生长;柳树腐烂病病菌菌落呈褐绿色,菌丝的气生性也较弱,紧贴着培养基生长。A2、B2、C2 分别为梨树、白杨树、柳树腐烂病病菌培养 15 d 后的菌落形态,可以看出 3 种菌株均已产生分生孢子器,突起于培养基上方,其中梨树腐烂病病菌的分生孢子器呈墨绿色,较大;白杨树及柳树腐烂病病菌的分生孢子器呈白色,白杨树腐烂病病菌的分生孢子器较大也比较密集,柳树腐烂病病菌的分生孢子器较



A1、B1、C1 分别为梨树、白杨树、柳树腐烂病病菌培养 5 d 后的菌落形态; A2、B2、C2 分别为梨树、白杨树、柳树腐烂病病菌培养 15 d 后的菌落形态

图1 病原菌菌株在 PDA 平板上的菌落形态

小,且比较稀疏。

2.3 病原菌的回接验证及交叉侵染试验

将梨树、白杨树和柳树腐烂病病菌分别回接到各自寄主的枝条上,发病率分别为 100.0%、73.7%、56.3% (表 1),其病害症状如图 2 所示,与所采集样品的病害症状相似。从发病部位再次分离病菌,进行形态学及分子鉴定,结果证实分离物与接种的病原菌相同,依据柯赫氏法则证明从所采集样品上获得的分离物即为这 2 种枝条的致病菌。

将已验证的病原菌进行交叉侵染试验,即选取梨树腐烂病病菌接种白杨树枝条,再选取白杨树、柳树腐烂病病菌接种梨树枝条,观察交叉接种后的发病情况。由表 1 可知,白杨树、柳树腐烂病病菌接种到梨树枝条后发病率分别为 45.8%、63.0%,而梨树腐烂病病菌接种白杨树枝条后发病率仅为 8.9%。从以上枝条的发病部位再次分离病菌,并进行形态及分子鉴定,结果证实分离物与接种的病原菌相同,说明这些病原菌之间可以交叉侵染。

表 1 病原菌回接梨树、白杨树枝条的发病率

寄主	发病率 (%)		
	梨树腐烂病病菌	白杨树腐烂病病菌	柳树腐烂病病菌
梨树枝条	100.0	45.8	63.0
白杨树枝条	8.9	73.7	56.3



A1、A2 梨树枝条上分别接种 PDA 培养基(空白对照)、梨树腐烂病病菌; B1、B2、B3 白杨树枝条上分别接种 PDA 培养基(空白对照)、白杨树腐烂病病菌、柳树腐烂病病菌

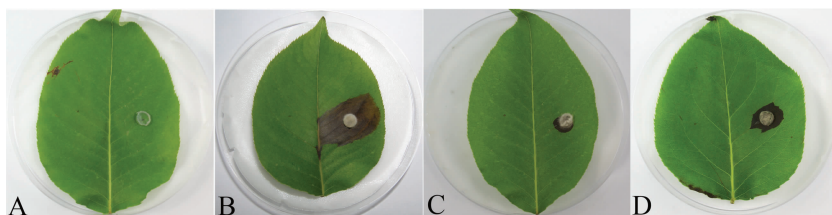
图2 病原菌回接原寄主枝条 5 d 后的病斑形态

2.4 病原菌在梨树上的致病性研究

为研究白杨树上的腐烂病病菌对梨树的危害,将其与梨树腐烂病病菌一起接种于梨树,观察致病情况。将 3 种病原

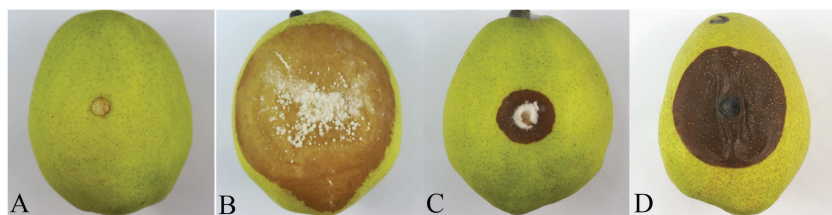
菌接种于梨树枝条,由梨树、白杨树、柳树腐烂病病菌引起的发病率分别为 100.0%、45.8%、63.0%;将 3 种病原菌接种梨树叶片,发病率分别为 100.0%、6.7%、44.4%,且柳树、白

杨树腐烂病病菌在梨树叶片上引起的病斑较小(图3);将3种病原菌接种于库尔勒香梨果实上,致病率均为100%,病害症状如图4所示,白杨树、柳树腐烂病病菌引起的病害症状颜色均较深,其病斑与梨树腐烂病病菌引起的病害症状完全不同,



A—接种PDA的空白对照; B—接种梨树腐烂病病菌; C—接种白杨树腐烂病病菌; D—接种柳树腐烂病病菌

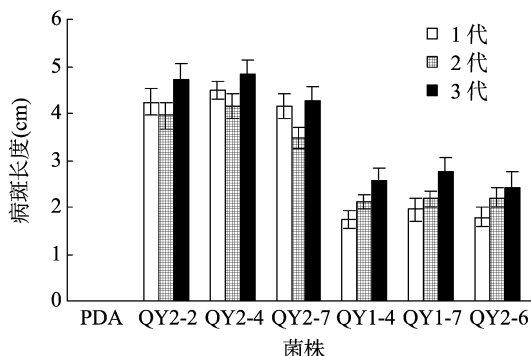
图3 病原菌接种梨树叶片3 d后的病斑形态



A—接种PDA的空白对照; B—接种梨树腐烂病病菌; C—接种白杨树腐烂病病菌; D—接种柳树腐烂病病菌

图4 病原菌接种梨树果实6 d后的病斑形态

为进一步研究白杨树上的腐烂病病菌侵染梨树后其致病力的变化情况,将梨树果实发病后分离获得的菌株作为2代进行接种,将再次分离得到的菌株作为3代进行接种,观察继代接种后病原菌的致病力变化情况。由图5可知,柳树腐烂病病菌的2代致病力有所下降,但3代致病力又有所上升,且高于1代的致病力。白杨树腐烂病病菌的致病力则逐代增强。因此,推测这2种病菌反复侵染梨树后,其致病力会逐渐增强。



PDA为对照; QY2-2、QY2-4、QY2-7均为柳树腐烂病病菌; QY1-4、QY1-7、QY2-6均为白杨树腐烂病病菌

图5 3代病原菌分别接种梨树果实6 d后的病斑长度

3 讨论

腐烂病是危害果树和林木枝干的主要病害,一些来源于不同寄主的腐烂病病原菌能够侵染其他寄主植物,引起危害^[11-14]。本试验通过柯赫氏法则、ITS序列和菌落形态特征确定了引起库尔勒地区香梨树腐烂病的病原菌为 *Valsa mali* var. *pyri*,引起白杨树腐烂病的病原菌为 *Valsa sordida* 和 *Cytospora translucens*。本研究发现,白杨树上分离得到的2种

三者的病斑大小表现为梨树腐烂病病菌 > 柳树腐烂病病菌 > 白杨树腐烂病病菌。综合分析3种病原菌在梨树枝条、叶片和果实上的致病情况,梨腐烂病病菌在梨树上的致病性最强,其次为柳树腐烂病病菌,而白杨树腐烂病病菌的致病力最弱。

腐烂病病菌均能够成功侵染香梨树枝条,这与郭众仲等的研究结果^[13]一致。但是,本研究发现分离鉴定的梨树腐烂病病菌对白杨树枝条的侵染成功率仅为8.9%,且病斑扩展较小。周玉霞等研究发现,梨树腐烂病病菌不能侵染白杨树枝条^[15],本研究的结果与之相符,这表明白杨树对梨树腐烂病病菌的侵染具有较强的抵抗能力。

虽然在室内试验中白杨树上的腐烂病病菌可以侵染梨树枝条,但是其接种发病率和致病力均明显低于梨树腐烂病病菌。另外,梨树腐烂病病菌在梨树各类伤口上均表现出强大的生存竞争能力,限制了其他腐烂病病菌的定殖侵染。但继代接种试验结果表明,白杨树腐烂病病菌的致病力可以在梨树寄主上逐代变强。长期疏于对果园周边白杨树腐烂病的管理和防治,可能导致其成为梨树腐烂病的潜在侵染源。

参考文献:

- [1] 滕元文,柴明良,李秀根. 梨属植物分类的历史回顾及新进展[J]. 果树学报,2004,21(3):252-257.
- [2] 马永刚,李太平. 我国梨产业政策发展趋势探讨[J]. 现代化农业,2014(8):21-23,24.
- [3] 周玉霞,程祯菁,张美鑫,等. 我国梨腐烂病病原菌的初步鉴定及序列分析[J]. 果树学报,2013,30(1):140-146.
- [4] 范英阁. 库尔勒香梨腐烂病的发生规律及防治技术[J]. 农业科技与信息,2010(9):21.
- [5] 吴芳,刘红霞,侯世星,等. 梨树腐烂病在香梨树体上的空间分布特点[J]. 中国农学通报,2012,28(10):277-281.
- [6] 李传道. 树木的溃疡病[J]. 南京林产工业学院学报,1979(1/2):22-35.
- [7] 张星耀,骆有庆. 中国森林重大生物灾害[M]. 北京:中国林业出版社,2003:372-385.
- [8] 李美娜,王金友. 苹果树腐烂病病原菌来源的探讨[J]. 北方果

马建华,陈 华,王 颖,等.宁夏地区苜蓿蓟马的种类调查及鉴定方法[J].江苏农业科学,2017,45(24):88-91.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.022

宁夏地区苜蓿蓟马的种类调查及鉴定方法

马建华¹,陈 华²,王 颖¹,王金福³,杜玉宁¹

(1.宁夏农林科学院植物保护研究所/宁夏植物病虫害防治重点实验室,宁夏银川 750002;
2.宁夏农业勘察设计院,宁夏银川 750002;3.宁夏武警总队后勤基地,宁夏银川 750002)

摘要:蓟马是苜蓿上最主要的害虫之一。根据调查,在宁夏地区危害苜蓿的蓟马种类主要有牛角花齿蓟马、普通蓟马、大蓟马等 3 种,其中优势种群为牛角花齿蓟马,数量占 80% 以上,成为目前苜蓿上最具危险性的害虫。苜蓿生长的物候期、刈割时间与苜蓿蓟马的发生关系极其密切。苜蓿返青期蓟马成虫开始出现,5 月中下旬初花期时蓟马达到为害高峰期,为害期可持续到每 1 茬苜蓿上。刈割可明显降低发生虫口,对苜蓿蓟马种群有明显的控制作用。

关键词:苜蓿;蓟马;种类鉴定;物候期;刈割;种群动态

中图分类号:S433.89 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)24-0088-04

苜蓿蓟马是苜蓿上最主要的常发性害虫之一^[1],主要取食叶芽、嫩叶和花,轻者造成上部叶片扭曲,重者造成成片苜蓿早枯或叶片和花干枯、早落,成为目前苜蓿尤其繁种苜蓿最具危险性的害虫^[2-9]。本研究以苜蓿蓟马为研究对象,通过对宁夏全区苜蓿种植区的调查采样,从生产全过程及作物生态系统整体出发,开展蓟马优势种群发生动态及其影响因子的相关性研究,明确蓟马的种类组成及分布、蓟马发生与苜蓿物候期的关系,为宁夏苜蓿产业蓟马的防治提供科学依据,提高苜蓿草产品质量安全水平。

1 材料与方法

1.1 苜蓿蓟马种类调查方法

于 2003、2014 年在宁夏贺兰山东麓灌区和宁夏南部山区共选择 17 个采样点,在苜蓿生长的苗期、花期、刈割不同阶段调查蓟马种类和数量。每次调查 5 个点,每个点 20 株,每个点调查 6 次,记录蓟马数量和苜蓿物候期,在标本上记录调查时间、地点、寄主等信息^[10]。

1.2 蓟马玻片标本的制作方法

蓟马玻片标本的制作方法:将蓟马放入装有 10% 氢氧化

钾的试管中在 50 ℃ 水中加热 20 min→加热后移置蒸馏水中 20 min→55% 乙醇中 15 min→70% 乙醇中 10 min→85% 乙醇中 5 min→100% 乙醇中 1 min→二甲苯中 2~3 h→滴胶→移虫→整姿→盖片→写标签^[11-12]。

1.3 蓟马标本的鉴定方法

将采集的苜蓿蓟马标本进行玻片制作,每样号制作至少 3 张玻片,每张玻片压制 3~5 个蓟马成虫标本,对获得的玻片标本在显微镜下进行鉴定,通过查阅大量的文献资料以及与国内有关专家交流学习,对照每个种的形态特征,并逐一进行拍照,统计各样点鉴定出的种类组成和数量,结合田间调查分析苜蓿蓟马优势种群及其分布特征。

1.4 苜蓿寄主物候期及环境变化对蓟马种群的影响

以苜蓿种植基地主要栽培种为调查对象。调查当年和历年的苜蓿返青期、开花期、刈割期时间。分别从 4 月上旬开始,在所选点内选 2~3 株萌芽较早的植株,立牌,标明品种、萌芽时间等,每 10 d 调查 1 次,记录苜蓿生长发育情况。

2 结果与分析

2.1 苜蓿蓟马种类调查

2013、2014 年,对苜蓿蓟马的调查情况如表 1 所示。2013 年共获得 6 份标本样,共计 170 头蓟马标本,其中用 54 头蓟马制作了 18 张玻片标本;2014 年共获得 17 份标本样,共计 475 头蓟马标本,其中用 153 头蓟马制作了 51 张玻片标本。

2.2 蓟马种类鉴定

2 年来笔者所在课题组对宁夏贺兰山东麓灌区和宁夏南部山区苜蓿种植基地的蓟马发生情况及其种类进行全面调

收稿日期:2016-09-08

基金项目:国家牧草产业技术体系盐池综合试验站(编号:CARS-34);宁夏农林科学院科技创新先导资金(编号:NXYG-14-20);宁夏回族自治区科技支撑计划(编号:2015BY11104)。

作者简介:马建华(1975—),男,宁夏中宁人,硕士,副研究员,主要从事害虫综合防治及草地生态研究。E-mail:majianhua75@163.com。

树,1990(2):28-30.

[9]刘开启,牟惠芳,刘 晖,等.苹果树腐烂病侵染来源的研究[J].山东农业大学学报,1996,27(3):281-283.

[10]向玉英,陈国贤.白杨树烂皮病发病病因的研究[J].植物保护学报,1981,8(2):137-142.

[11]孙祥瑞,朱杰华,刘 蕊,等.几种树皮腐烂病菌的分子鉴定[J].河北农业大学学报,2010,33(6):36-42.

[12]李志军,刘国成,张 泉.苹果树腐烂病研究概况[J].北方果

树,2013(4):1-3,13.

[13]郭众仲,张王斌,李亚鹏,等.不同寄主来源腐烂病菌对库尔勒香梨树致病性研究[J].新疆农业科学,2014,51(12):2245-2250.

[14]苟 巧,张王斌,但红侠,等.不同寄主来源腐烂病菌对苹果树致病性研究[J].新疆农业科学,2015,52(11):2085-2092.

[15]周玉霞,张美鑫,翟立峰,等.梨和苹果腐烂病菌不同培养表型菌株的致病性分析[J].植物病理学报,2014,44(2):217-220.