

甘肃省一例苹果霉心病病原鉴定

白滨¹ 文朝慧² 何苏琴^{3*}

(1. 甘肃省农业科学院畜草与绿色农业研究所 甘肃 兰州 730070)

(2. 甘肃省出入境检验检疫局 甘肃 兰州 730020)

(3. 甘肃省农业科学院植物保护研究所 甘肃 兰州 730070)

摘 要:【目的】对甘肃省天水市苹果霉心病病果中分离到的真菌进行病原鉴定。【方法】通过 Koch's 法则证病, 采用形态学和分子生物学方法对病菌进行种类鉴定。【结果】从甘肃省天水市苹果霉心病病果中分离得到一株淡灰褐色真菌, 用该菌的分生孢子悬浮液接种苹果果实, 可引起与自然发病相同的苹果霉心病症状。该菌的分生孢子具有不同的形态: 产生于分生孢子盘上的分生孢子具 3 个隔膜, 极少数 4–5 个隔膜, 纺锤形或长椭圆形, 淡褐色至褐色, 基细胞色稍淡, 附属丝缺, 孢子大小为 $(12.95-20.42) \mu\text{m} \times (4.98-7.97) \mu\text{m}$ [av. $(16.75 \pm 1.89) \mu\text{m} \times (6.47 \pm 0.86) \mu\text{m}$]; 产生于丝状分生孢子梗及分生孢子堆上的分生孢子具 2–9 个隔膜, 纺锤形、棒状或蠕虫状, 初始色淡, 渐呈褐色, $(12.45-59.76) \mu\text{m} \times (4.98-11.21) \mu\text{m}$ [av. $(30.10 \pm 11.16) \mu\text{m} \times (7.26 \pm 1.28) \mu\text{m}$]. 【结论】经形态学和分子生物学鉴定(GenBank 登录号 JF320818), 将该病菌鉴定为 *Discostroma fuscillum* (Berk. & Broome) Huhndorf. 这是 *Discostroma fuscillum* 引起苹果霉心病在我国的首次报道。

关键词: 苹果, 霉心病, *Discostroma fuscillum*, *Seimatosporium lichenicola*, *Sporocadus lichenicola*

*通讯作者: Tel: 86-931-7617133; 信箱: gshesuqin@sina.com

收稿日期: 2012-04-22; 接受日期: 2012-08-07

A case of apple moldy-core disease caused by *Discostroma fuscillum* in Gansu Province

BAI Bin¹ WEN Zhao-Hui² HE Su-Qin^{3*}

(1. Animal Husbandry, Pasture and Green Agriculture Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou, Gansu 730020, China)

(3. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: [Objective] Identification of the pathogen of moldy-core disease of apple in Gansu Province. [Methods] The pathogenicity of fungal isolate was confirmed by Koch's rule, and identification of the pathogen was performed according to anamorphic morphological characteristics and ITS rDNA sequence analysis result. [Results] A fungus isolated from moldy-core disease of apple in Tianshui County, Gansu Province, in January 2009. The fungus caused the same symptom compared to the natural mouldy-core disease while injected inoculation through the calyx tube of apple fruits. The fungus produced conidia with different morphological types: Conidia formed on acervuli (black conidiomata developed on mycelial mat in potato sucrose liquid medium after cultured 7 months at 3 °C–7 °C), (12.95–20.42) μm×(4.98–7.97) μm [av. (16.75±1.89) μm×(6.47±0.86) μm], 3 septa, rarely 4–5 septa, fusiform or ellipsoid, pale brown to brown, median two or upper three cells darker than the basal one, appendages laking; Conidia formed on mycelium (cultured 18 d on PSA plate at 10 °C), (12.45–59.76) μm×(4.98–11.21) μm [av. (30.10±11.16) μm×(7.26±1.28) μm], 2–9 septa, fusiform, clavate or worm-formed, initial slight colour, gradually altered to brown. [Conclusion] The fungus was identified as *Discostroma fuscillum* (Berk. & Broome) Huhndorf, based on anamorphic morphological characteristics and molecular identification (GenBank accession: JF320818). This is the first record of *Discostroma fuscillum* as the pathogen of apple moldy-core disease in China.

Keywords: Apple, Core rot decay, *Discostroma fuscillum*, *Seimatosporium lichenicola*, *Sporocadus lichenicola*

苹果霉心病是世界性病害, 国内外苹果主产区均有发生。引起苹果霉心病的病原菌种类较多, 已报道的约有近 30 个属的真菌^[1-6]。

在甘肃, 已报道的苹果霉心病病原菌有 10 余种。雷玉明报道河西走廊苹果霉心病的病原为粉红单端孢 *Trichothecium roseum*^[7]; 呼丽萍等在甘肃苹果产区采集红星及元帅品种的病果和无症

状果实, 从中分离获得了 30 余个真菌分离物, 致病种类包括粉红单端孢 *Trichothecium roseum*、狭截盘多毛孢 *Truncatella angustata*、节孢状镰刀菌 *Fusarium arthrosporioides*、串珠镰刀菌 *F. moniliforme*、链格孢 *Alternaria alternata*、蒂地盾壳霉 *Coniothyrium tirolensis*、仁果盾壳霉 *C. pirinum*、棒盘孢 *Coryneum* sp.、拟青霉

Paecilomyces sp.和头孢霉 *Cephalosporium* sp.等^[8]。

2009年1月,作者从甘肃省天水市苹果霉心病病果中分离得到一株丝状真菌,用该菌的分生孢子悬浮液接种苹果果实,可引起与自然发病相同的苹果霉心病症状,通过形态学和分子生物学鉴定,将其鉴定为 *Discostroma fuscillum* (Berk. & Broome) Huhndorf。

1 材料与方法

1.1 标样采集及病原菌分离

标样于2009年1月采自低温贮藏的甘肃省天水市出产的红富士苹果。剖开苹果霉心病病果,用无菌的解剖刀和接种针挑取少许菌丝和病组织放于马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)平板上,20℃培养。挑取尖端菌丝进行纯化。

1.2 病原菌回接

菌株 GSAA-0182 在 PSA 平板上 25℃ 培养 10 d, 用灭菌水将孢子洗下, 孢子浓度为 5×10^4 个孢子/mL; 挑选健康红元帅苹果, 用 75% 乙醇擦拭果面及萼口, 自果实萼筒向苹果心室注射接种, 每果接种 0.5 mL 孢子悬浮液, 对照果实注射 0.5 mL 灭菌水。接种和对照各 5 个果实, 置于 15℃–20℃、RH 15%–30% 条件下。30 d 后切果检查发病情况, 发病果实进行病原菌再分离。

1.3 病原菌形态特征研究

鉴定菌株 GSAA-0182 形态特征描述基于在 PSA 平板上 10℃ 黑暗培养 18 d 产生的分生孢子及在马铃薯蔗糖液体培养基(PS)中, 弱的自然散射光下 3℃–7℃ 静置培养 7 个月, 在菌丝垫上产生的黑色分生孢子座上的分生孢子的形态特征。

1.4 病原菌分子生物学鉴定

GSAA-0182 在 PSA 上 20℃–25℃ 培养 10 d, 刮取菌丝和孢子, 采用 Universal Genomic DNA Extraction Kit (大连宝生物工程有限公司)提取 DNA。选用真菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCT

TATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAA GTCGTAACAAGG-3') 扩增 ITS 基因。反应体系包括 10×Buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL, 20 μmol/L 引物各 0.5 μL, Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 补至 25 μL。反应条件: 95℃ 5 min; 56℃ 30 s; 72℃ 1 min; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯照射下从凝胶中切取目的条带, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒(大连宝生物工程有限公司)纯化。用 pMD18-T 载体进行克隆, 取 5 μL 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α, 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 平板上, 于 37℃ 培养过夜, 随机挑选白色菌落进行菌落直接 PCR 鉴定, 确认载体中插入片段的长度大小(约 600 bp)。提取阳性克隆的质粒送大连宝生物工程有限公司测序。测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 数据库进行 BLASTn 分析。从 GenBank 核酸序列数据库中下载相关菌株的 rDNA-ITS 序列, 用 ClustalX (1.83) 软件对目的序列进行比对(Alignment), 比对后的序列用系统发育分析软件 MEGA5 的 NJ 法(Neighbor-Joining)进行计算和系统发育树构建, 进行 1 000 次 Bootstrap 检验。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离

在一个批次的 60 枚苹果中, 共检测到霉心病病果 4 个, 其中一个苹果霉心病病果的发病心室中可见灰色菌丝, 病菌穿透心皮, 被侵染果肉呈茶褐色, 病组织及邻近果肉具苦味。从中分离得到菌落形态一致的淡灰褐色真菌, 将代表性菌株编号为 GSAA-0182。

2.2 病原菌回接

接种 30 d 的苹果全部发病, 心室中生灰色菌丝, 病菌可穿透心皮扩展至果肉, 被侵染的果

肉呈茶褐色,病斑横径达 22 mm–33 mm, av. 27.0 mm±4.7 mm。接种发病症状与自然发病症状相同(图 1A、B)。染病组织及心室内仅见菌丝,未见孢子产生。分离培养接菌发病的苹果,100%分离出原接种菌。对照未发病。

2.3 病原菌形态特征

在 PSA 平板上 10 °C 培养 18 d, 气生菌丝稀疏, 分生孢子大量产生, 分生孢子细胞常厚垣化。孢子初生于单个散生的孢梗, 之后聚生成孢子堆。分生孢子梗线状或丝状, 无色; 分生孢子初始色淡, 渐呈褐色。分生孢子纺锤形、棒状或蠕虫状, (12.45–59.76) μm ×(4.98–11.21) μm , av. (30.10±11.16) μm ×(7.26±1.28) μm ; 具 2–9 个隔膜, 无附属丝。分生孢子可萌发产生次生分生孢子

(图 1C, 图 2G–K)。

在 PS 液中 3 °C–7 °C 培养 7 个月, 在菌丝垫上产生大量直径约 1 mm 的黑色分生孢子盘。分生孢子梗丝状, 分枝, 无色至淡褐色, 产孢细胞具不明显环痕; 分生孢子大多具 3 个隔膜, 极少数 4–5 个隔膜, 孢子纺锤形或长椭圆形, 两端细胞钝圆或一端略尖, 淡褐色至褐色, 基细胞色稍淡, 附属丝缺, (12.95–20.42) μm ×(4.98–7.97) μm , av. (16.75±1.89) μm ×(6.47±0.86) μm (图 1D, 图 2A–F)。

菌株 GSAA-0182 产生于分生孢子盘上的分生孢子的形态特征与 Sutton 在其专著中对 *Seimatosporium lichenicola* (Corda) Shoemaker & E. Müll. 的描述基本一致^[9]。

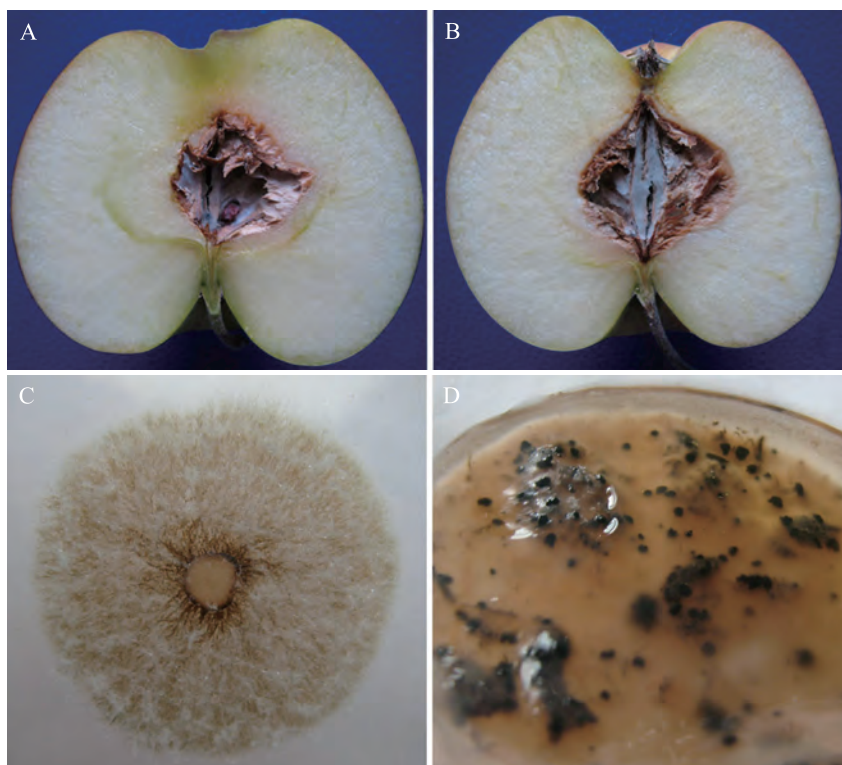


图 1 GSAA-0182 培养特征及接种苹果发病症状

Fig. 1 Symptoms of diseased apple and culture morph of GSAA-0182

注: A、B: 接种后 30 d 发病症状(15 °C–20 °C); C: 在马铃薯蔗糖琼脂(PSA)平板上 10 °C 培养 18 d; D: 在马铃薯蔗糖液体(PS)培养基中 3 °C–7 °C 培养 7 个月, 菌丝垫上产生的黑色分生孢子座(分生孢子盘)。

Note: A, B: Symptoms of diseased apple by injected inoculation after 30 d at 15 °C–20 °C; C: Colony morphae cultured on PSA plate 18 d at 10 °C; D: Black conidiomata (acervuli) developed on mycelial mat after 7 months in PS liquid medium at 3 °C–7 °C.

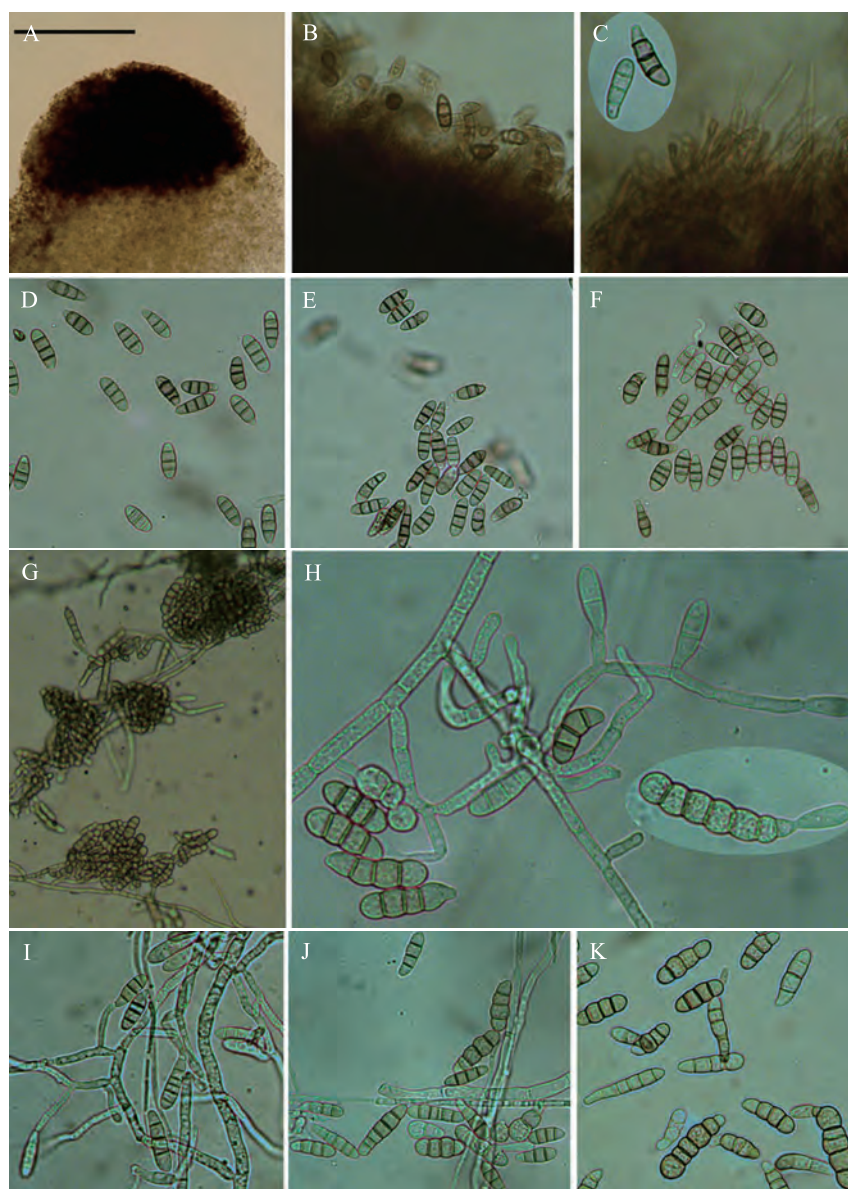


图 2 GSAA-0182 形态特征

Fig. 2 Morphological characters of GSAA-0182

注: A-F: 在 PS 液中 3 °C-7 °C 培养 7 个月, 示分生孢子盘及产生于分生孢子盘上的分生孢子; G-K: 在 PSA 平板上 10 °C 培养 18 d, 示分生孢子、产孢细胞及分生孢子堆. 标尺: A=300 μm; G=120 μm; B、D、E、F、I、J、K=50 μm; C、H=30 μm.

Note: A-F: Acervulus and conidia formed on acervuli in PS liquid medium after cultured 7 months at 3 °C-7 °C; G-K: Conidia, conidiogenous and conidial piles produced on PSA plate at 10 °C, 18 d. Scale: A=300 μm; G=120 μm; B, D, E, F, I, J, K=50 μm; C, H=30 μm.

2.4 病原菌分子鉴定结果

BLASTn 分析结果显示, GSAA-0182 (GenBank 登录号 JF320818)与 *Discostroma fuscillum* 分离物 NBRC 32680 (GenBank 登录号

AB594806.1) 和 418-BB (GenBank 登录号 GU244511.1)的 18S rRNA 部分序列, ITS1、5.8S rRNA、ITS 2 全序列, 和 28S rRNA 部分序列的同源性达 99%。

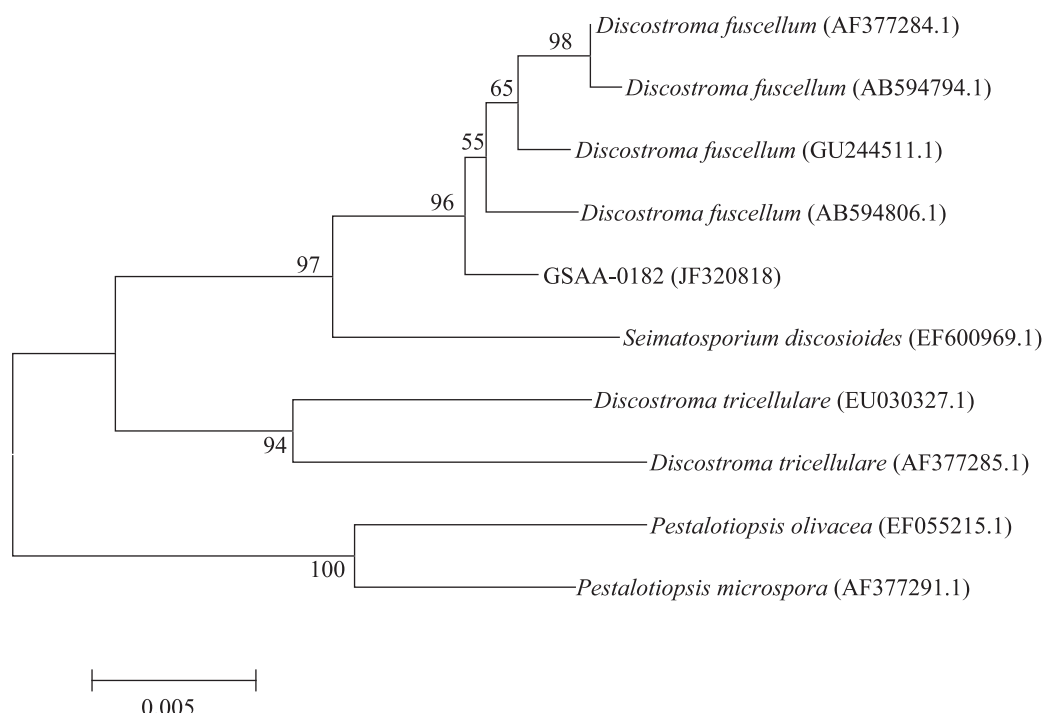


图3 基于 rDNA-ITS 序列采用 NJ 法构建的待鉴定菌株 GSAA-0182 系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequence using NJ (Neighbor-Joining) methods

注: 节间数字表示 Bootstrap 检验的支持百分率($\geq 50\%$); 粗体序列为本文作者所测; 其余序列来自 GenBank; 括号内为菌株的 GenBank 序列号. 标尺: 每个核酸位点碱基替换数 0.005.

Note: The confidence values of 50 or above from 1 000 replicate bootstrap samplings are shown at each node, the sample in bold was examined by the authors, and others obtained from GenBank. GenBank accession numbers are shown in the parentheses. Bar: 0.005 substitutions per nucleotide position.

3 结论与讨论

Discostruma fuscillum (Berk. & Broome) Huhndorf 隶属于子囊菌纲, 鹿角菌目, 其寄主包括多个科的木本和灌木植物, 生于枝干、叶片及果实; 在欧洲、北美、亚洲(中国, 印度)、非洲(埃塞俄比亚, 南非)、澳洲、新西兰都有分布。由于不同分类系统的变迁, 使该菌拥有了众多的异名, 仅列在无性型名称下的异名就有 20 多个。Cline 在其报告中对该菌有性型和无性型名称的由来及变迁历史等做了详尽的介绍, 并接受 *Sporocadus lichenicola* Corda 为 *Discostruma fuscillum* 的无性型, 将 *Seimatosporium lichenicola* 作为 *Sporocadus lichenicola* 的异名^[10]。

Tanaka 等则支持 Sutton 的广义 *Seimatosporium* 属的分类观点, 并肯定了 *Seimatosporium* 和 *Discostruma* 的系统发育关系^[11]。

Hatakeyama & Harada 研究发现, 在 *Seimatosporium* 属中, 由于培养温度和培养基的不同, 同一个菌株可以产生两种不同类型的孢子, 一种仅在孢子基部产生附属丝, 另一种在孢子的两端都生有附属丝^[12]。

在本研究中, 菌株 GSAA-0182 培养中仅产生分生孢子盘和分生孢子堆, 分生孢子盘和分生孢子堆上产生的分生孢子的大小和形状都存在较大差异, 孢子盘上产生的分生孢子形状更规则, 大小更趋一致。在自然寄主和人工培养条件下, 均未发现该菌的有性型。除引起苹果霉心病

外, 用该菌的孢子悬浮液喷雾接种苹果果实, 还可形成圆形、由表及里的褐色果腐斑。

鉴于菌株的形态特征及分子生物学鉴定结果的支持, 也为顺应真菌命名变革的趋势^[13], 将分离自甘肃省天水市苹果霉心病病果的菌株 GSAA-0182 鉴定为 *Discostroma fuscillum*。

Discostroma fuscillum (anamorph: *Seimatosporium lichenicola*) 作为苹果霉心病的病原在新西兰已有报道, 并被认为是次要病原菌^[14]。

吴文平报道, 在河北承德, *Seimatosporium lichenicola* 可侵染黄刺玫叶片, 引起褐斑或黑斑^[15]。

该菌在甘肃省苹果霉心病病原中所占比重及发生规律有待进一步调查研究。

这是 *Discostroma fuscillum* 引起苹果霉心病在我国的首次报道。

参 考 文 献

- [1] Rosenberger DA, Burr TJ. Fruit decays of peach and apple caused by *Phomopsis mali*[J]. Plant Disease, 1982, 66(11): 1073–1075.
- [2] 刘开启, 申卫星, 张培正, 等. 苹果霉心病的研究 I 致病菌种类的调查鉴定[J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(3): 291–298.
- [3] 陶铁凡. 我国苹果霉心病研究进展概述[J]. 四川果树, 1995, 23(4): 35–37.
- [4] Lee DH, Lee SW, Choi KH, et al. Survey on the occurrence of apple diseases in Korea from 1992 to 2000[J]. The Plant Pathology Journal, 2006, 22(4): 375–380.
- [5] Niem J, Miyara I, Etedgui Y, et al. Core rot development in red delicious apples is affected by susceptibility of the seed locule to *Alternaria alternata* colonization[J]. Phytopathology, 2007, 97(11): 1415–1421.
- [6] 孙晓东, 吕国忠, 王雅玲. 由镰孢菌引起的苹果心腐病病原鉴定[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2421–2423.
- [7] 雷玉明. 河西走廊苹果霉心病侵染规律研究[J]. 甘肃农业科技, 1993(9): 29–30.
- [8] 呼丽萍, 马春红, 杨光明, 等. 苹果霉心病病原研究[J]. 果树科学, 1996, 13(3): 157–161.
- [9] Sutton BC. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with picnidia, acervuli and stroma[M]. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- [10] Cline E. *Discostroma fuscillum*[EB/OL]. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. (2006-02-14)[2012-04-20]. http://nt.ars-grin.gov/sbmlweb/onlineresources/nomenfactsheet/rptBuildFactSheet_onLine.cfm.
- [11] Tanaka K, Endo M, Hirayama K, et al. Phylogeny of *Discosia* and *Seimatosporium*, and introduction of *Adisciso* and *Immersidiscosia* genera nova[J]. Persoonia, 2011, 26: 85–98.
- [12] Hatakeyama S, Harada Y. A new species of *Discostroma* and its anamorph *Seimatosporium* with two morphological types of conidia, isolated from the stems of *Paeonia suffruticosa*[J]. Mycoscience, 2004, 45(2): 106–111.
- [13] Taylor JW. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR[J]. IMA Fungus, 2011, 2(2): 113–120.
- [14] Biosecurity Australia. Revised Draft IRA Report Part B: Importation of Apples from New Zealand[M]. Canberra. Australia: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Commonwealth of Australia, 2004.
- [15] 吴文平. 盘双端毛孢属的两个种[J]. 河北省科学院学报, 1992(2): 61–65.