

苹果黑星病菌致病力分化的研究^{*}

贾莉,杨家荣,俞征,李随院

(西北农林科技大学 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了明确田间苹果黑星病菌致病力的分化情况,选取中国、英国、印度 3 个国家不同苹果产区的 57 株有代表性的苹果黑星病菌株,分别接种嘎啦、富士、秦冠 3 个寄主品种进行致病力测定。结果表明,不同菌株在相同寄主上能产生不同类型的病斑,其病斑大小、形状、颜色存在较大差异。同一菌株对不同寄主品种的致病力也存在较大差异。根据寄主对病菌的反应类型并结合病害严重度的聚类分析结果,可将 57 株苹果黑星病菌菌株划分为 3 个类群:强致病力型、中等致病力型、弱致病力型。

[关键词] 苹果黑星病菌;反应型;致病力

[中图分类号] S436.611.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0092-05

Studies on differentiation of *Venturia inaequalis* of apple in pathogenicity

JIA Li, YANG Jia-rong, YU Zheng, LI Sui-yuan

(The Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pests Management of Chinese Ministry of Education, College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to explicit the pathogenicity differentiation of *Venturia inaequalis* in fields, three apple cultivars were individually inoculated with 57 representative single spore isolates of *Venturia inaequalis* collected respectively from different apple producing areas in China, England and India. Results showed that there was obvious difference in pathogenicity among those tested isolates that could produce different types of disease spots in their size, shape and color on the same inoculation host. There was also obvious difference in pathogenicity even if different hosts were inoculated by the same spore isolates of *Venturia inaequalis*. Based on the host reaction and cluster analysis of disease severity, the 57 isolates of *Venturia inaequalis* could be divided into three categories: strong (pathotype), intermediate (pathotype) and weak pathogenicity (pathotype) respectively.

Key words: *Venturia inaequalis*; reaction type; pathogenicity

苹果黑星病菌 (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) 可通过侵染苹果叶片、叶柄、花、萼片、花梗、果实、幼嫩枝条和芽鳞等多个部位而造成落叶、落果或者果实开裂畸形,给苹果的产量和品质造成极大损失,严重威胁着苹果产业的发展^[1]。苹果黑星病在欧美各国普遍发生,国外对该病的研究较为广泛

深入^[2-3],研究内容包括苹果黑星病菌的生理特性、遗传变异、流行规律、预测预报等方面。如对苹果黑星病流行规律、预测预报的研究主要集中在田间采集数据,或模拟田间试验数据建立苹果黑星病发生过程中各个阶段的子模型,再组装成苹果黑星病发生的模拟模型。国内对苹果黑星病的研究起步相对

* [收稿日期] 2006-11-06
[基金项目] 欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10001);西北农林科技大学优秀人才项目(04ZR018)
[作者简介] 贾莉(1980-),女,内蒙古鄂尔多斯人,在读硕士,主要从事植物病理学研究。E-mail:JL110520@163.com
[通讯作者] 杨家荣(1956-),男,四川蓬溪人,教授,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:ylijryang@tom.com

较晚, 研究报道也较少, 且多为田间发生为害调查、症状识别及田间防治或药效试验方面的研究。1965 年袁甫金等^[4]曾对我国东北小苹果黑星病的初侵染源进行了较为详细的研究。此后, Huang 等^[5]采用电子显微镜及细胞化学技术, 先后研究了粉锈宁对苹果黑星病菌发育的影响, 以及黑星病菌在苹果叶片上的发育过程。胡小平等^[6-7]对苹果黑星病菌 DNA 的提取方法进行了改进, 并从 15 种培养基中筛选出 5 种最适合苹果黑星病菌生长的培养基。这些研究把人们对苹果黑星病的认识提高到一个新的水平, 但有关苹果黑星病菌致病力变异方面的研究

尚缺乏系统报道。本文对中国、英国、印度 3 个国家、不同苹果产区的部分苹果黑星病菌生理小种的致病力变异进行了初步研究, 现将部分研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 供试苹果黑星病菌为分生孢子单孢分离而得到的纯培养物^[8], 由西北农林科技大学植保资源与病虫害治理教育部重点实验室提供, 具体情况见表 1。

表 1 供试苹果黑星病菌菌株

Table 1 Isolates of *Venturia inaequalis* for pathogenicity testing

菌株编号 Isolates	采集地点 Origin	寄主 Hosts	菌株编号 Isolates	采集地点 Origin	寄主 Hosts
01~05	旬邑 Xunyi	嘎啦 Gala	23	乾县 Qianxian	秦冠 Qingguan
06~09	兴平 Xingping	嘎啦 Gala	24~31	英国 (X ₀₁) E	-
10~14	旬邑 Xunyi	富士 Fuji	32~42	英国 (X ₀₂) E	-
15~17	兴平 Xingping	富士 Fuji	43~44	印度 (Y ₂) I	-
18~19	旬邑 Xunyi	秦冠 Qingguan	45~53	印度 (Y ₄) I	-
20~22	兴平 Xingping	秦冠 Qingguan	54~57	印度 (Y ₆) I	-

注: 表中 24~57 号菌株均来自国外, 故寄主不详。

Note: Isolates from 24 to 57 came from abroad, so the hosts were unclear.

1.1.2 供试苹果品种 陕西省杨凌区杨村乡南庄村苹果园生长的嘎啦、富士、秦冠。

1.2 试验方法

1.2.1 接种方法 采用保湿喷雾接种法。选取每枝条自顶端以下完全展开的幼嫩叶片接种, 接种孢子浓度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 每株苹果树接种不同方位的 3 个枝条。对已经接种的枝条进行套袋

保湿 48 h, 在保湿期间应防止高温造成的袋内温度过高对苹果叶片造成烫伤。

1.2.2 气象数据的采集 田间安装自动气象站(澳作生态公司, 澳大利亚)。自接种时开始收集温度、降雨量、田间相对湿度、叶面湿度等气象数据(表 2), 记录至整个观察结束。

表 2 试验期间田间气象资料

Table 2 Weather data of orchard during experiment

气象因素 Weather factor	温度/ Temperature	降雨量/mm Rainfall	相对湿度/% Relative humidity	叶面湿度/% Leaf humidity
最大值 Maximum	35.29	17.4	96.79	58.150
最小值 Minimum	8.35	0.0	41.90	2.250
平均值 Average	19.99	1.99	65.03	15.894

1.2.3 观察与记录方法 接种 14 d 后观察记录症状类型、反应型、严重程度, 每隔 7 d 调查 1 次, 共调查 3 次, 记录一个发病周期内各菌株对不同寄主品种的致病力表现。根据 Croxall 等^[9]建立的严重程度分级标准记录严重程度等级, 0 级: 没有产孢病斑; 1 级: 产孢病斑面积占叶片总面积的 0~1%; 2 级: 产孢病斑面积占叶片总面积的 2%~5%; 3 级: 产孢病斑面积占叶片总面积的 6%~10%; 4 级: 产孢病斑面积占叶片总面积的 11%~25%; 5 级: 产孢病斑面积占叶片总面积的 26%~50%; 6 级: 产孢病斑面积占叶片

总面积的 51%~75%; 7 级: 产孢病斑面积占叶片总面积的 76%~100%。并计算病情指数^[10]:

$$\text{病情指数} / \% = \frac{(\text{各级病叶数} \times \text{各级严重程度})}{\text{调查叶片数} \times \text{最高严重程度}} \times 100\%$$

1.3 数据分析 采用 SAS version 8.1 数据分析软件包^[11]的 ANOVA 和 TREE 过程分析试验数据。

2 结果与分析

2.1 接种不同菌株后的症状表现

通过对自然条件下生长的苹果幼嫩枝条进行接

种发现,来自 3 个国家不同地区的苹果黑星病菌各个生理小种的致病力存在显著差异。有的菌株只在接种的 3 片叶子内进行个别侵染,最少的只有 1 个叶片发病;而有的菌株能侵染接种后的新生叶片,在一个发病周期内最多可以侵染 6 个叶片;还有少数菌株在接种后没有任何类型的症状出现(特别是在秦冠品种上接种后)。英国菌株接种后,可以在秦冠叶片上发现与国外所报道症状相同的针点状病斑;而个别的中国菌株和印度菌株接种秦冠品种后,出现较典型的过敏性坏死反应,甚至可以使接种的 3 个叶片全部出现过敏性坏死反应,且过敏性坏死斑点的面积较针点状病斑的面积稍大,发病部位略微突起,颜色呈黄色或淡红色,即使在发病末期也不会

引起叶片脱落;而大多数的菌株在接种后,表现出的症状类型大致可以分为以下几类: 规则或不规则褪绿、干枯型病斑。此类病斑大多呈淡黄绿色,当病斑连片时容易造成叶片卷曲、畸形,变褐干枯,甚至脱落,一般无分生孢子产生; 限制型病斑。此类病斑的扩展受到限制,一般只在侵入点周围稍有扩展,而且边缘清晰,一般呈圆形,有分生孢子产生; 非限制型病斑(扩展型病斑)。此类型病斑的扩展一般不受限制,所产生的病斑形状、大小极不规则,能产生大量分生孢子,很容易造成早期落叶。接种不同菌株后病害严重度也表现出了极大差异,从没有病斑到针点状病斑,对于产生明显病斑的叶片,病斑面积占叶片面积百分数也从 1%~100%不等。

表 3 57 个苹果黑星病菌菌株致病力的测定结果

Table 3 Results of pathogenicity testing with 57 isolates of *Venturia inaequalis*

菌株编号 Isolates	病情指数/ % Disease index				病类型 Pathogenic type	菌株编号 Isolates	病情指数/ % Disease index				病类型 Pathogenic type
	嘎啦 Gala	富士 Fuji	秦冠 Qinguan	平均 Average			嘎啦 Gala	富士 Fuji	秦冠 Qinguan	平均 Average	
01	25.00	12.50	9.72	15.74		30	34.03	11.11	5.56	16.90	
02	12.50	14.58	1.39	9.49		31	4.86	0	1.39	2.08	
03	33.33	13.89	11.11	19.44		32	24.38	43.28	4.17	23.94	
04	62.50	33.33	18.06	37.96		33	64.58	36.11	9.03	36.57	
05	11.11	19.44	7.64	12.73		34	9.03	43.75	5.56	19.45	
06	54.17	25.69	4.17	28.01		35	16.67	9.72	0	8.80	
07	40.28	13.89	5.56	19.91		36	3.47	4.86	2.08	3.47	
08	36.11	8.94	2.08	15.71		37	30.56	47.22	6.25	28.01	
09	12.50	43.06	7.64	21.07		38	18.75	5.56	0	8.10	
10	47.22	56.48	15.97	39.89		39	0	13.19	7.64	6.94	
11	19.44	0	4.17	7.87		40	36.11	28.47	6.25	23.61	
12	0	12.50	0	4.17		41	24.31	16.67	2.78	14.59	
13	11.11	7.64	1.39	6.71		42	16.67	50.69	3.14	23.50	
14	62.50	4.17	2.08	22.92		43	45.83	26.39	4.86	25.69	
15	15.28	25.69	0	13.66		44	21.53	9.72	6.25	12.50	
16	26.39	6.25	2.08	11.57		45	12.48	5.56	4.17	7.40	
17	13.89	65.28	5.78	28.32		46	31.94	21.53	4.86	19.44	
18	9.72	15.97	0	8.56		47	41.67	18.56	6.25	22.16	
19	34.18	4.86	6.94	15.33		48	11.11	19.44	2.08	10.88	
20	18.06	2.78	4.17	8.34		49	6.25	11.81	4.17	7.41	
21	7.83	18.06	5.56	10.48		50	21.53	9.72	0	10.42	
22	18.75	12.89	3.47	11.70		51	12.50	10.25	1.39	8.05	
23	28.76	11.11	2.08	13.98		52	46.53	16.67	3.47	22.22	
24	23.61	5.64	1.39	10.21		53	2.78	5.64	0	2.81	
25	6.25	2.08	0	2.78		54	16.67	1.39	0	6.02	
26	1.93	2.08	0	1.34		55	21.53	0	5.56	9.03	
27	47.22	13.19	6.25	22.22		56	35.42	4.17	3.47	14.35	
28	12.50	3.47	7.64	7.87		57	11.11	0	2.08	4.40	
29	27.78	8.94	4.86	13.86							

2.2 不同菌株致病力的测定结果

对不同菌株致病力测定结果(表 3)进行 ANOVA 和聚类分析,结果(表 4)表明,供试的 57 株菌株间存在显著差异。依据聚类分析结果(图 1)和所观

察到的各菌株侵染后所引起的症状类型,可将 57 株菌株划分为 3 个类群:其中 04,09,10,17,32,33,34,37 和 42 为型强致病力菌株,接种后在嘎啦和富士品种上都能产生产孢病斑,在秦冠品种上菌株

04,10 和 33 能产生产孢病斑,其余则产生针点状病斑或过敏性坏死斑点;这种 型强致病力菌株侵染寄主后,寄主的严重度级别较高,平均病情指数在 19.45%~39.89%,病斑的扩展速度较快,发病叶片有早期脱落的趋势。02,12,13,15,18,25,26,31,35,36,38,48,50,51,53,54 和 57 为 型弱致病力菌株,接种嘎啦和富士品种后产生的病斑面积较小,且扩展缓慢,接种秦冠品种后大多无明显症状,只有极个别的菌株能使秦冠产生针点状病斑,且病斑数极少;这种 型弱致病力菌株侵染寄主后,寄主的严

重度级别较低,平均病情指数在 1.34%~13.66%。其余菌株为 型中等致病力菌株,其又可以分为 3 个亚组:06,07,14,27,40,43,46,47 和 52 为一组,平均病情指数在 19.44%~28.01%,此类菌株较其他两个亚组的致病力强;08,16,19,23,24,29,30 和 56 为一组,平均病情指数在 10.21%~16.9%,这些菌株的致病力次之;01,03,05,11,20,21,22,28,39,41,44,45,49 和 55 为一组,平均病情指数在 6.94%~19.44%,此亚组菌株的致病力相对较弱。

表 4 苹果黑星病菌致病力的方差分析结果

Table 4 Anova of pathogenicity of *Venturia inaequalis*

变异来源 Source	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值 F Value	显著水平 Sig.
菌株间 Treatment	56	13 980.558	249.653	1.104 *	0.325
误差 Error	114	25 787.729	226.208		
总变异 Total	170	39 768.287			

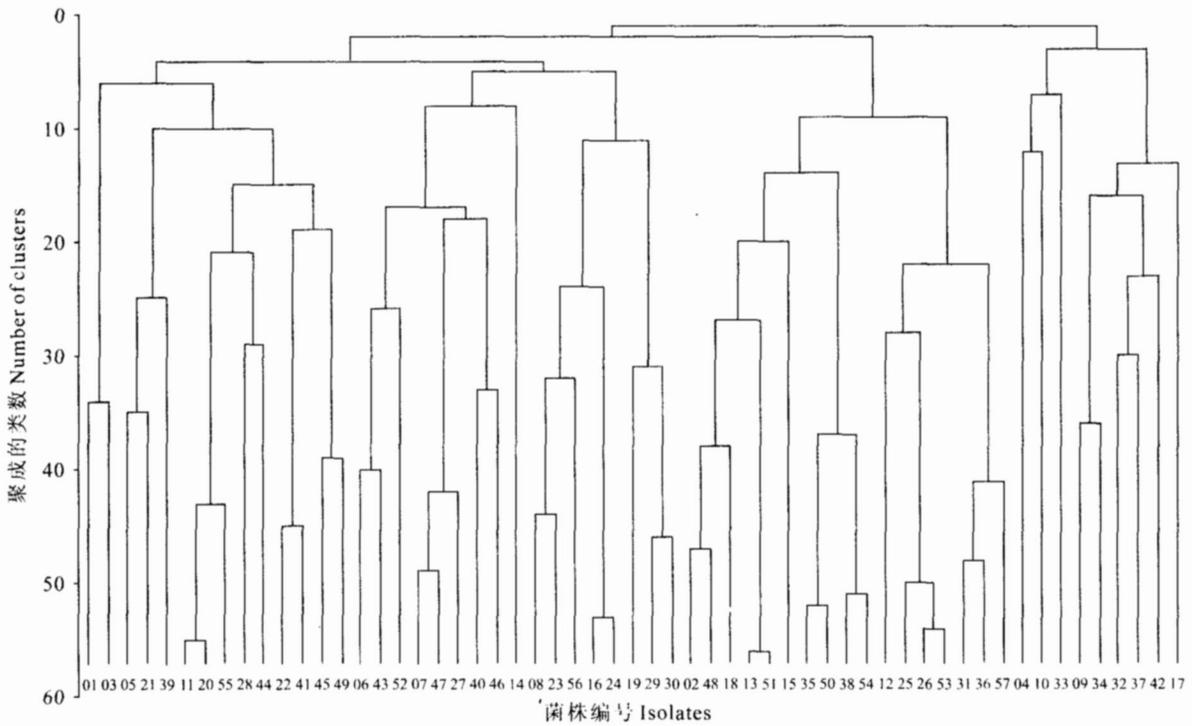


图 1 57 株苹果黑星病菌菌株的病害严重度聚类分析结果

Fig. 1 Cluster analysis of disease severity of 57 isolates of *Venturia inaequalis*

3 讨 论

苹果黑星病在我国为地区性病害,也是我国的检疫性病害。虽然此病在我国属于新发病害,但仍呈逐年加重的趋势。早在 1956 年,Shary 等发现苹果黑星病菌存在生理分化现象,并鉴定出 1 号、2 号

和 3 号生理小种。Williams 等又在 1968 年发现了 4 号和 5 号生理小种,而 20 世纪 80 年代发现的 6 号和 7 号生理小种能克服大多数苹果品种抗病性^[12-13]。目前,在国外(主要是欧洲国家)针对苹果黑星病菌新出现的毒性小种进行风险评估,并对具有持久抗病性的寄主品种进行抗病性和遗传学分

析,以最大限度延长选育出的苹果品种对苹果黑星病的持久抗病性。由于苹果黑星病菌含有大量毒性基因,且一般为单基因遗传,基因间很少紧密连锁,极易产生大量新的致病类型。因此,急需筛选一套较优的鉴别寄主,以详细监测我国苹果黑星病菌的生理小种变化,为科学控制苹果黑星病的发生危害,以及进行苹果黑星病的抗病育种提供理论指导和技术支持。

本研究选用 3 个苹果品种,对分别来自中国、英国、印度 3 个国家不同地区的 57 株苹果黑星病菌菌株进行致病力测定。结果表明,各菌株间致病力差异显著。在寄主品种中,秦冠的抗病性最强。同时在试验中还发现,秦冠对菌株 05,09,19,28,37,39,40,44 和 47 有稳定的过敏性坏死反应,这是明显的单基因遗传抗病性的表现,因而推测这 9 个菌株可能是 7 号生理小种。然而,秦冠对其他菌系的不同程度抗病性还有可能是组织自身的抗病性,或是由其他微效抗病基因控制的多基因抗病性,这些问题还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 方中达. 中国农业百科全书(植物病理学卷)[M]. 北京:中国农业出版社,1996:366-367.
- [2] Gadoury D M, Machardy W E. Effect of temperature on the development of pseudothecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. [J]. *Plant Dis*, 1981, 66:464-468.
- [3] Parker D M, Hiber U W, Bodmer M, et al. Production and transformation of cinidia of *Venturia inaequalis* [J]. *Phytopathology*, 1995, 85(1):87-91.
- [4] 袁甫金, 吕文清, 王淑娟. 黑龙江省小苹果黑星病的初侵染来源[J]. *植物病理学报*, 1965, 8(1):23-29.
- [5] Huang L L, Kang Z S, Guo J Q, et al. Development of on apple leaves observed by electron microscope[J]. *Mycosystem*, 2003, 22(3):494-497.
- [6] 胡小平, 杨家荣, 梅娜, 等. 苹果黑星病菌中国菌株生物学特性研究[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(3):93-96.
- [7] 胡小平, 杨家荣, 商文静, 等. 苹果黑星病菌 DNA 提取方法研究[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2004, 32(4):45-47.
- [8] 苟建军, 杨家荣, 胡小平, 等. 苹果黑星病菌分离培养技术[J]. *西北农业学报*, 2004, 13(3):78-80.
- [9] Croxall H E, Gwynne D C, Jenkins J E E. The rapid assessment of apple scab on leaves[J]. *Plant Pathology*, 1952, 1:39-41.
- [10] 曾士迈. 植保系统工程导论[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1994.
- [11] 胡小平, 王长发. SAS 基础及统计实例教程[M]. 西安:西安地图出版社, 2001.
- [12] Roberts A L, Crute I R. Apple scab resistance from *Malkus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malkus floribunda* [J]. *Norw J Agr Sic*, 1994, 17:403-406.
- [13] Parisi L, Lespinasse Y. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus sp.*) [J]. *Plant Dis*, 1996, 81:1179-1183.