



杨丽娜,郝靖璞,曹军,等. 桃拟茎点霉的侵染过程及其致病影响因子研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(4):674-679.

YANG Lina,HAO Jingpu,CAO Jun, et al. Study on the infection process and pathogenic influencing factors of *Phomopsis amygdali*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(4):674-679.

## 桃拟茎点霉的侵染过程及其致病影响因子研究

杨丽娜,郝靖璞,曹军,纪兆林\*

(扬州大学植物保护学院,江苏 扬州 225009)

**摘要:**[目的]桃枝枯病严重威胁着我国南方桃产业的发展,南方桃园中桃拟茎点霉(*Phomopsis amygdali*)属于桃枝枯病菌流行优势种,但其侵染过程及致病影响因子目前尚不清楚。因此,本文旨在探究*P. amygdali*侵染过程及其致病影响因子。[方法]探究桃拟茎点霉分生孢子的萌发过程,运用扫描电镜观察不同时间点分生孢子侵染桃嫩枝的部位,并在不同温度、湿度、光照时间的处理下探究该菌致病力的强弱,进一步运用商品化壳梭孢素对其进行毒力测定。[结果]桃拟茎点霉的甲型分生孢子在PDA固体培养基上培养3 h萌发率为66.4%,9 h后分生孢子萌发率为97.6%,24 h后分生孢子产生单根较长的芽管,30 h后菌丝产生隔膜,36 h后产生有分支的营养菌丝。扫描电镜结果显示,侵染菌丝主要入侵桃嫩枝木质部导管及中央髓部,并且破坏木质部导管的管胞结构,然而,在韧皮部并没有观察到侵染菌丝的存在。温度和相对湿度是影响桃拟茎点霉致病力的主要因子,且病害流行的最适温度为30℃,最适相对湿度为98%。桃拟茎点霉产生的壳梭孢素是其致病因子。[结论]本文首次探究了桃拟茎点霉的侵染过程,并发现温度和相对湿度是影响该菌致病力的主要环境因子。

**关键词:**桃枝枯病;桃拟茎点霉;侵染过程;致病影响因子;致病力

中图分类号:S432

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0674-06

## Study on the infection process and pathogenic influencing factors of *Phomopsis amygdali*

YANG Lina,HAO Jingpu,CAO Jun,JI Zhaolin\*

(College of Plant protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:**[Objectives] Peach shoot blight (PSB) greatly influenced the development of peach industry, *Phomopsis amygdali* which caused PSB was the most prevalent pathogens in peach orchard at south China. However, the infection process and pathogenic influencing factors remain unclear. Therefore, this study aimed to explore the infection process of *P. amygdali* and its pathogenic influencing factors. [Methods] In this work, conidial germination of *P. amygdali* and infection sites were observed through scanning electron microscopy (SEM). Different environmental conditions were used to explore pathogenic influencing factors of *P. amygdali*. Commercial fusicoccin was used to measure its virulence effect. [Results] The germination rate of  $\alpha$ -conidia of *P. amygdali* was 66.4% at 3 hours post inoculation, 97.6% at 9 h, then, single long germ tube produced at 24 h, septum formed at 30 h, and branching mycelium formed at 36 h. SEM observation showed that infective hyphae might mainly infect xylem and pith part of peach twigs, that destroyed the structure of xylem, and there were no infective hyphae at the phloem. Further, the study found that temperature and relative humidity (RH) were the main factors affecting the pathogenicity of *P. amygdali*. Among them, 30℃ and 98% RH were the best optimum temperature and relative humidity for the disease. Fusicoccin, one toxin produced by *P. amygdali*, was also one of pathogenic factors of *P. amygdali*. [Conclusions] In this work, the infection process of *P. amygdali* was investigated for the first time and the main environmental factors affecting its pathogenicity were temperature and RH.

**Keywords:** peach shoot blight; *Phomopsis amygdali*; infection process; pathogenic influencing factors; pathogenicity

桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 为蔷薇科桃属植物,是研究蔷薇科果树遗传学和基因组学的模式物种,起源于中国,在我国有几千年的栽培和进化历史<sup>[1-2]</sup>。从1993年起,我国的桃栽培面积和产量超过意大利和美国,被称为“世界第一产桃大国”。我国的桃产业在实现农业增效、农民增收以及乡村振兴中发挥了重要作用。然而,2007年以来我国江苏、浙江、上海、安徽等南方地区相继发生桃枝枯病,该病主要危害新梢,在枝条基部形成褐色环状缢缩溃疡斑,并向上扩展,导致叶片枯萎、黄化、脱落,直至枝条完全枯死;

收稿日期:2023-05-31

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(32202237);国家现代农业产业技术体系专项(CARS-30-3-02)

\*通信作者:纪兆林,教授,博导,主要从事桃树病害防控及分子植病研究,E-mail:zhilji@yzu.edu.cn。

也可危害叶芽,在叶痕处直接枯死;还可危害果实,造成桃果腐烂,称为实腐病。目前,桃枝枯病已经成为我国南方各大桃产区最主要的真菌病害之一,发病桃树产量平均损失 20%~50%,严重时甚至绝收,给桃农带来巨大的经济损失<sup>[3-4]</sup>。不同桃品种间发病程度差异较大,尤以‘柳条白凤’最为严重。6月下旬至7月是该病害发生的高峰期,自然环境中,桃枝枯病菌主要通过菌丝体或分生孢子器在室内、田间病枝及土壤表层、耕作层病残体上越冬,温度适宜时分泌分生孢子进行初侵染,适宜条件下可再侵染,且病菌只能通过伤口侵染桃树嫩枝及果实,不能侵染叶片<sup>[5]</sup>。

已有研究表明,引起桃枝枯病的病原菌有很多。在美国南卡罗莱纳州,引起桃枝枯病的病原物有葡萄座腔菌(*Botryosphaeria obtusa*)、桃拟茎点霉(*Phomopsis amygdali*)、白壳菌属(*Leucostoma personia*)以及壳囊孢属(*Cytospora* sp.),其中白壳菌属是最流行的病原菌,之后依次是桃拟茎点霉、葡萄座腔菌<sup>[6]</sup>。中国报道的病原物有桃拟茎点霉(*P. amygdali*)<sup>[3-4,7]</sup>、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)<sup>[4]</sup>、枫香拟茎点霉(*Phomopsis liquidambaris*)以及间作壳复合种(*Diaporthe eres*)<sup>[8]</sup>,其中,桃拟茎点霉属于优势种群<sup>[9]</sup>。桃拟茎点霉除可侵染桃外,还可侵染多种蔷薇科植物,如红叶李、杏、梨、苹果等<sup>[10]</sup>。此外,目前生产上已发现多种由该属(拟茎点霉属)真菌导致植物病害的发生,如大豆拟茎点种腐病菌(*P. longicolla*)引起大豆种子腐烂病,龙眼拟茎点霉(*P. longanae*)引起龙眼果实腐烂病,天门冬拟茎点霉(*P. asparagi*)引起芦笋茎枯病,给农业生产造成了巨大的损失,然而这些病原菌对寄主的侵染过程及致病影响因子尚不清晰。本文首先对桃拟茎点霉分生孢子的萌发过程进行探究,并在扫描电镜下观察不同侵染时间分生孢子的侵染部位,为拟茎点霉属病原真菌侵染寄主植物提供细胞学证据,再进一步检测不同环境(温度、湿度、光照)下桃拟茎点霉的最适发病条件及壳梭孢素对其毒力的影响,初步阐明桃拟茎点霉致病影响因子,为桃枝枯病及其他拟茎点霉属真菌病害的防控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

桃拟茎点霉(*P. amygdali*)野生型菌株为 ZN32,本课题组于浙江南湖桃枝枯病病枝上分离得到。供试感病桃品种为 1~2 年生‘柳条白凤’,桃嫩枝及盆栽用苗均由江苏省无锡太湖山水蜜桃科技有限公司提供。供试壳梭孢素购自 abcam 公司,货号为 ab145208,毒素纯度大于 90%。

### 1.2 分生孢子萌发过程测定

将桃拟茎点霉野生型菌株 ZN32 活化接种于 PDA 培养基上,于 25 °C 恒温培养箱中黑暗培养 15 d 后,黑色隆起状分生孢子器上会分泌淡黄色黏状物,即分生孢子。用无菌水清洗分生孢子,将清洗悬浮液稀释至  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ,将 10  $\mu\text{L}$  分生孢子悬浮液置于 1 mL 融化的 PDA 培养基中充分混匀,在培养基未凝固前涂布于无菌载玻片上,之后将载玻片置于培养皿中,于 28 °C 恒温黑暗保湿培养。分别于接种后 3、6、9、12、24、30 和 36 h 后观察其萌发情况。每时间点观察至少 100 个分生孢子,试验重复 3 次。

### 1.3 扫描电镜观察

取 1~2 年生‘柳条白凤’嫩枝,剪成 7 cm 小段,清洗表面,用 75%(体积分数)乙醇消毒,再用无菌水冲洗 3 次后晾干备用。用注射器针头在嫩枝表面扎 3 个小孔,此为带伤接种枝条。将  $10 \mu\text{L} 10^8 \text{ mL}^{-1}$  分生孢子悬浮液接种于带伤枝条上,将其置于底部湿润的灭菌纱布上,于育苗盒中培养。育苗盒用保鲜膜密封处理,于 30 °C 恒温培养箱中光暗交替培养。分别在接种 0、4、12、24 h 和 3、5、9 d 后从病灶边缘处取样,样品大小为 2 mm×2 mm×3 mm。用切片机进行横切后,将样品浸泡于 2.5%(体积分数)的戊二醛溶液中,4 °C 过夜固定,用  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液每隔 20 min 漂洗 1 次;漂洗 3 次后将样品完全浸泡于 1% 钼酸溶液中固定 1 h,最后用磷酸缓冲液漂洗 3 次,即完成样品固定工作。依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% 乙醇进行梯度脱水,每次脱水时间约 10 min。将样品在 CPD-300 型临界点干燥仪内进行干燥。用 SCD500 型离子溅射仪对样品表面喷镀黄金,用 XL-30ESEM 环境扫描电子显微镜观察桃嫩枝韧皮部、木质部、髓部。每时间点拍摄 20 张相应部位图片,试验重复 3 次。

### 1.4 不同环境条件下桃拟茎点霉致病力的影响因子测定

接种枝条处理及分生孢子悬浮液使用浓度见 1.3 节。探究温度对该菌致病力的影响,将用保鲜膜密封的育苗盒分别置于 20、25、30 和 38 °C 的恒温培养箱中 12 h 光照/12 h 黑暗交替培养,保持相对湿度(relative humidity, RH)大于 90%;探究不同湿度对该菌致病力的影响,将育苗盒分别置于高湿(RH98%)、

中湿(RH60%)和低湿(RH40%)的环境条件下(温湿度计测量),于30℃恒温培养箱中12h光照/12h黑暗交替培养;探究不同光照时间对该菌致病力的影响,将育苗盒分别置于24h全光照、12h/12h光暗交替及24h全黑暗条件下,于30℃、RH>90%恒温培养,连续8d于同一时间测量病斑长度,在第8天拍照记录病斑症状。试验重复3次。

### 1.5 壳梭孢素的毒力测定

将商品化壳梭孢素稀释至1、0.1和0.01 mg·mL<sup>-1</sup>,分别取10 μL悬滴于消过毒的带伤桃嫩枝上,于30℃恒温培养箱中光暗交替保湿培养,培养8d后拍照观察,并测量病斑长度。试验重复3次。

### 1.6 数据处理

采用SPSS 23软件通过最小显著极差法(LSD)和Student-Newman-Keuls测验比较不同处理间的显著性差异( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 桃拟茎点霉分生孢子萌发过程测定

将桃拟茎点霉的分生孢子悬浮液与PDA培养基混合后置于无菌玻片上进行培养,分别于培养3、6、9、12、24、30和36h后观察分生孢子的萌发情况。结果显示:培养3h后分生孢子萌发率达到66.4%,6h后萌发率为88%,9h后萌发率为97.6%。继续培养12~24h,分生孢子进一步萌发产生较长的芽管,30h后观察到菌丝隔膜的形成,36h后观察到分支菌丝的产生(图1)。

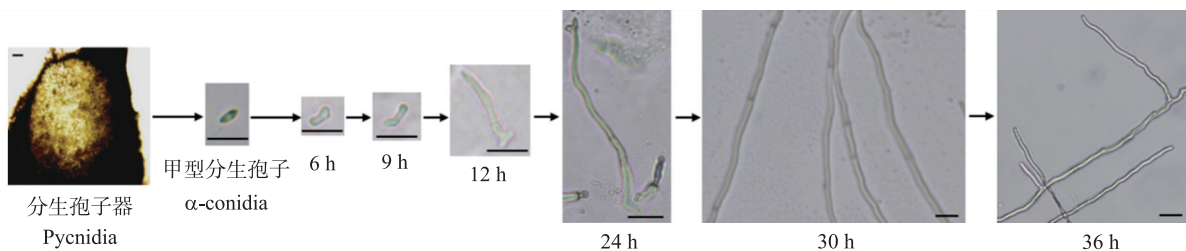


图1 不同时间点桃拟茎点霉分生孢子的萌发过程

Fig. 1 Conidial germination process of *Phomopsis amygdali* at different time

Bar = 20 μm.

### 2.2 扫描电镜观察桃拟茎点霉分生孢子的侵染过程

随着侵染时间的延长,桃嫩枝韧皮部并没有观察到侵染菌丝的存在(图2-A)。桃拟茎点霉侵染24h后,可以观察到木质部导管处有少量侵染菌丝的存在,随着侵染时间的延长,侵染菌丝集聚在导管处;侵染9d时,侵染菌丝聚集成网状堵塞导管;健康枝条中的导管呈圆形至椭圆形,随着病原菌侵染菌丝的生长,导管形状逐渐呈不规则状(图2-B)。此外,侵染5d在桃嫩枝中央髓部观察到侵染菌丝的存在,侵染时间的延长并没有引起中央髓部结构的变化(图2-C)。上述结果表明,桃拟茎点霉在侵染过程中可能主要造成桃嫩枝木质部导管的损伤,破坏导管的结构和功能,导致水分的输送发生异常,侵染后期侵染菌丝进入髓部,从而引起相应症状的产生。

### 2.3 温度对桃拟茎点霉致病力的影响

从图3可知,在4种温度下,接种后1~4d内桃拟茎点霉致病力差异不显著;接种5~8d,于30℃恒温条件下培养枝条的发病程度均显著高于其他几种温度,之后依次是25、38和20℃。结果表明,桃拟茎点霉分生孢子的最适致病温度为30℃。

### 2.4 相对湿度对桃拟茎点霉致病力的影响

从图4可知,接种3d后,RH98%条件下桃拟茎点霉致病力明显高于RH60%和RH40%,且差异显著;RH60%和RH40%处理后,桃拟茎点霉致病力较弱。上述结果表明桃拟茎点霉致病力受环境湿度影响较大,高湿有利于该菌的侵染。

### 2.5 光照时间对桃拟茎点霉致病力的影响

从图5可知,不同光照时间处理下,桃拟茎点霉致病力差异不显著。因此,光照时间可能不参与调控桃拟茎点霉的致病能力。

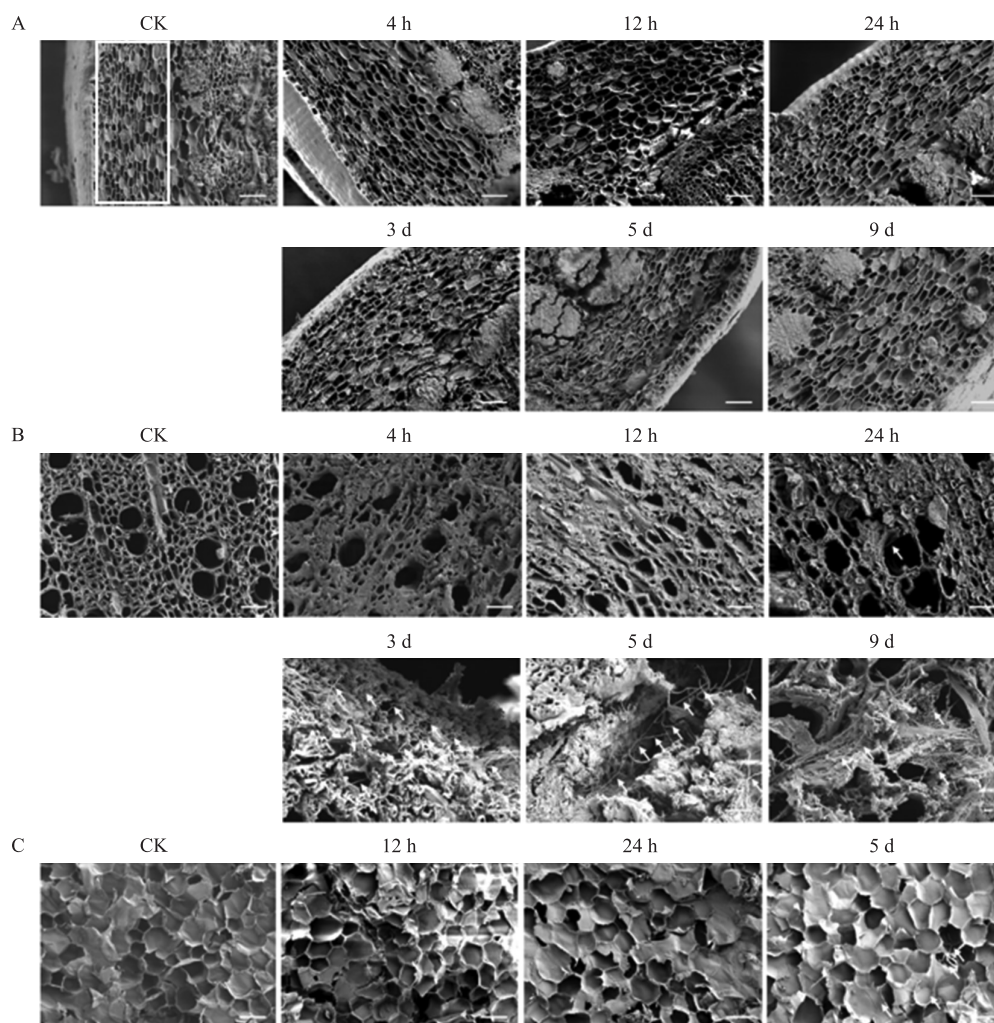


图 2 扫描电镜观察不同时间点桃拟茎点霉在桃嫩枝上的侵染情况

Fig. 2 SEM observation of infection process of *P. amygdali* on peach twigs at different time

A. 韧皮部(在 500 倍镜下拍摄);B.木质部(除接种 9 d 的样本在 2 000 倍镜下拍摄外,其他时间点样本均在 500 倍镜下拍摄);C.中央髓部(照片均在 250 倍镜下拍摄)。

A. Phloem(The above images were taken at 500×);B. Xylem(The images of CK,4 h,12 h,24 h,3 d and 5 d were taken at 500×);C. Pith part(The above images were taken at 250×). Bar=20 μm.

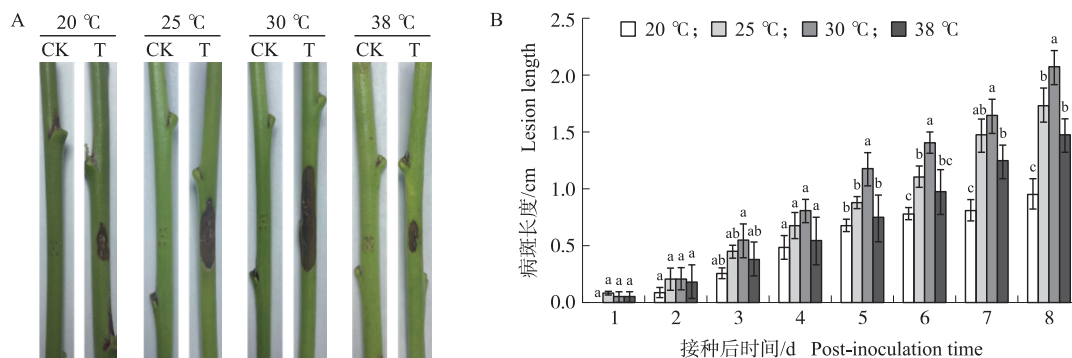


图 3 不同温度下桃拟茎点霉致病力测定

Fig. 3 Virulence measurements of *P. amygdali* at different temperature

A. 不同温度下,分生孢子接种 8 d 的病斑症状(CK.对照;T.处理);B. 不同温度下,分生孢子接种 1~8 d 的病斑长度。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

A. Disease symptoms of different temperature at 8 d(CK: Control; T: Treatment);B. Lesion length of different temperature at 1~8 days post inoculation. Lowercase indicates statistically significant differences at 0.05 level. The same as follows.

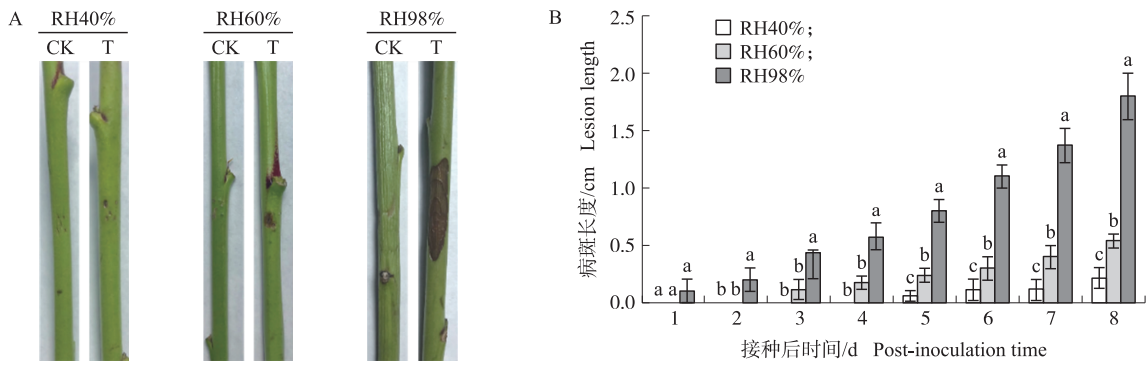


图4 不同相对湿度下桃拟茎点霉致病力测定

Fig. 4 Virulence measurements of *P. amygdali* at different relative humidity (RH)

A. 不同湿度下,分生孢子接种8 d的病斑症状;B. 不同湿度下,分生孢子接种1~8 d的病斑长度。

A. Disease symptoms of different RH at 8 d; B. Lesion length measurements of different RH at 1-8 d.

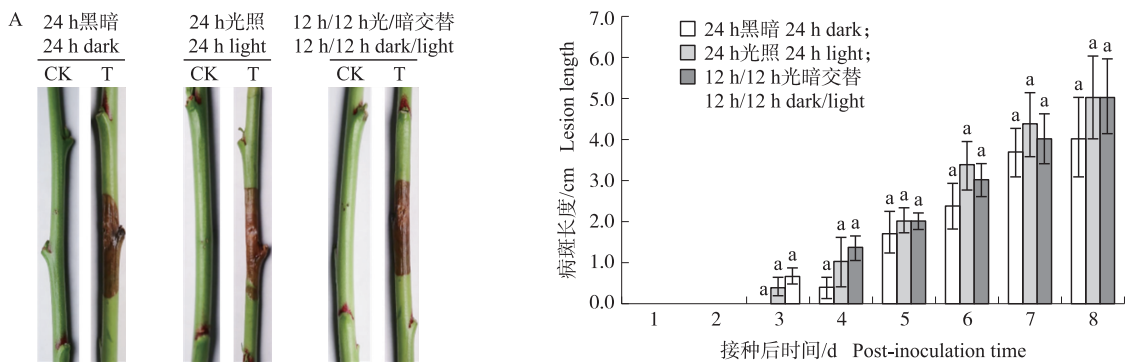


图5 不同光照时间桃拟茎点霉致病力测定

Fig. 5 Virulence measurements of *P. amygdali* at different light time

A. 不同光照长度下,分生孢子接种8 d的病斑症状;B. 不同光照时间,分生孢子接种1~8 d的病斑长度。

A. Disease symptoms of different light time at 8 d; B. Lesion length measurements of different light time at 1-8 d.

### 2.6 商品化壳梭孢素的毒力测定

前期研究表明,桃拟茎点霉会产生壳梭孢素(fusicoccin)<sup>[11-12]</sup>。本研究使用10 μL浓度为1.0、0.1和0.01 g·mL<sup>-1</sup>的商品化壳梭孢素对桃嫩枝进行接种,于30℃恒温培养箱中12 h光/12 h暗交替高湿培养,8 d后观察其致病能力,以10 μL分生孢子悬浮液(10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup>)及无菌水处理分别为阳性和阴性对照。结果(图6)显示:3种浓度的壳梭孢素处理均产生与桃拟茎点霉分生孢子悬浮液处理相似的症状,然而,毒素处理的枝条病斑扩展程度较小,与无菌水处理相比,差异显著。上述结果表明桃拟茎点霉产生的壳梭孢素是该菌的致病因子。

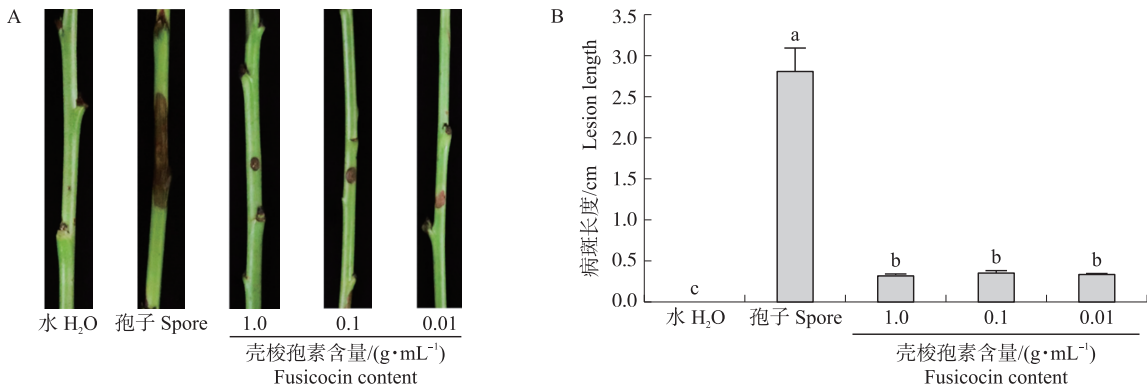


图6 不同浓度壳梭孢素对桃拟茎点霉致病力的影响

Fig. 6 Effect of fusicoccin at different concentrations on the pathogenicity of *P. amygdali*

A. 接种8 d的病斑症状;B. 接种8 d的病斑长度。

A. Disease symptom at 8 d; B. Lesion length at 8 d.

### 3 结论与讨论

本研究探究了桃拟茎点霉分生孢子的萌发过程,并从细胞学水平揭示其对寄主桃嫩枝的侵染过程。桃拟茎点霉甲型分生孢子在有营养的条件下9 h 萌发率为97.6%,随着培养时间的延长,芽管继续生长,培养30 h左右产生带有隔膜的菌丝,萌发过程中不会产生附着胞或者侵染垫等特殊的侵入结构。扫描电镜观察发现,在桃嫩枝韧皮部并没有观察到桃拟茎点霉侵染菌丝的存在,桃拟茎点霉主要危害木质部导管,导致其结构疏松、朽化,随着侵染菌丝的聚集,形成网状物质堵塞导管,导致水分的输送发生异常,侵染后期,侵染菌丝进入髓部发生危害。这与桃枝枯病的晚期发病症状相一致,叶片发黄、枯萎,直至整个枝条枯死<sup>[8]</sup>。此外,前人研究及本课题组研究均证明桃拟茎点霉必须通过伤口才能侵染桃嫩枝、果实,且不侵染桃叶片<sup>[5,13]</sup>。本研究发现随着桃拟茎点霉侵染时间的延长,韧皮部没有检测到侵染菌丝的存在,可能是由于在试验过程中制造的伤口深度相对较深,达到了木质部的位置;田间侵染条件下,桃拟茎点霉的侵染菌丝可能也会存在于寄主的韧皮部。此外,据报道苹果树腐烂病菌的侵染菌丝也是经剪锯口的木质部导管通过微孔扩展至邻近的管胞进行侵染<sup>[12]</sup>。这与本文的研究结果相一致。

桃枝枯病主要发生在我国南方桃产区,我国南方地区夏季温度较高,雨水丰富,本研究发现高温(30℃)、高湿(98%相对湿度)更有助于桃枝枯病的发生,南方桃产区满足了病原菌侵染的条件,从而导致病害的大发生。然而,不同植物病原真菌侵染寄主的最适发病条件相差较大,如苹果腐烂病菌的分生孢子可在5~35℃的温度范围内侵染剪锯口苹果枝条,最适侵染温度为20℃,湿度并不会影响该菌的侵染,只需有雨水将其分生孢子传播到剪锯口,即可侵染木质部<sup>[12]</sup>。进一步研究发现不同浓度壳梭孢素均能产生桃枝枯病症状,但病斑扩展较慢,可能是由于微生物体内可持续合成该种毒素,导致在侵染后期病斑扩展,而商品化毒素并不是源源不断提供给桃嫩枝的,因此病斑扩展程度低。

#### 参考文献 References:

- [1] Yu Y, Fu J, Xu Y G, et al. Genome re-sequencing reveals the evolutionary history of peach fruit edibility[J]. Nature Communications, 2018, 9:5404.
- [2] Yu Y, Guan J T, Xu Y G, et al. Population-scale peach genome analyses unravel selection patterns and biochemical basis underlying fruit flavor[J]. Nature Communications, 2021, 12:3604.
- [3] Dai F M, Zeng R, Lu J P. First report of twig canker on peach caused by *Phomopsis amygdali* in China[J]. Plant Disease, 2012, 96(2):288.
- [4] Tian Y L, Zhao Y Q, Sun T, et al. Identification and characterization of *Phomopsis amygdali* and *Botryosphaeria dothidea* associated with peach shoot blight in Yangshan, China[J]. Plant Disease, 2018, 102(12):2511-2518.
- [5] 纪兆林, 戴慧俊, 金唯新, 等. 桃枝枯病发生规律研究[J]. 中国果树, 2016(2):13-17, 21.  
Ji Z L, Dai H J, Jin W X, et al. Study on the occurrence law of peach branch blight[J]. China Fruits, 2016(2):13-17, 21 (in Chinese).
- [6] Froelich M H, Schnabel G. Investigation of fungi causing twig blight diseases on peach trees in south Carolina[J]. Plant Disease, 2019, 103(4):705-710.
- [7] 纪兆林, 戴慧俊, 金唯新, 等. 桃枝枯病病原鉴定[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, 34(4):94-98.  
Ji Z L, Dai H J, Jin W X, et al. Identification of the pathogen causing shoot blight of peach trees[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2013, 34(4):94-98 (in Chinese with English abstract).
- [8] Yang L N, Wang L Y, Cao J, et al. Molecular and biological characterization of two new species causing peach shoot blight in China[J]. Plant Disease, 2022, 106(1):182-189.
- [9] Yang L N, Zhang L, Cao J, et al. Rapid detection of peach shoot blight caused by *Phomopsis amygdali* utilizing a new target gene identified from genome sequences within loop-mediated isothermal amplification[J]. Plant Disease, 2022, 106(2):669-675.
- [10] Bai Q, Zhai L F, Chen X R, et al. Biological and molecular characterization of five *Phomopsis* species associated with pear shoot canker in China[J]. Plant Disease, 2015, 99(12):1704-1712.
- [11] Toyomasu T, Tsukahara M, Kaneko A, et al. Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(9):3084-3088.
- [12] Chen C, Li B H, Dong X L, et al. Effects of temperature, humidity, and wound age on *Valsa mali* infection of apple shoot pruning wounds[J]. Plant Disease, 2016, 100(12):2394-2401.
- [13] Uddin W, Stevenson K L, Pardo-Schultheiss R A. Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts[J]. Plant Disease, 1997, 81(9):983-989.