

柿种质资源炭疽病抗性评价及病原菌分离鉴定

闻家乐, 王淑瑾, 范芝蕊, 吕中一, 杨勇, 关长飞

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 依托国家柿种质资源圃, 观察记载了柿炭疽病主要发病部位及症状表型, 并对 479 份常见柿资源材料的炭疽病抗性进行评价。结果表明, 柿炭疽病原菌主要浸染嫩枝、果实、叶片及萼片。通过对柿枝条及果实炭疽病表型的田间调查, 将 479 份常见柿资源材料分为高抗, 抗病, 中抗, 感病, 高感五种抗性等级, 其中高抗和抗病种质分别有 66 和 35 份 (占比分别为 13.8% 和 7.3%), 代表种质分别有 ‘鄠阳火柿’ 和 ‘黄边小鸡心’ 等; 中抗种质有 119 种 (24.8%), 如 ‘富有’、‘次郎’ 等; 感病及高感种质分别有 209 和 50 份 (占比分别为 43.6% 和 10.4%), 代表种质分别为 ‘富平尖柿’ 和 ‘骏河’ 等。从叶片、枝条、萼片、果实中分离出病原菌, 综合菌落、菌丝、孢子形态特征及多基因序列比对, 发现其为哈锐炭疽病原菌 (*Colletotrichum horii*)。

关键词: 柿; 种质资源; 炭疽病; 抗性调查; 鉴定

Investigation of Resistance Resources and Identification of Anthracnose in Persimmon

WEN Jia-le, WANG Shu-jin, FAN Zhi-rui, Lyu Zhong-yi, YANG Yong, GUAN Chang-fei

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100)

ABSTRACT: The main incidence site and symptom phenotype of anthracnose disease for 479 common persimmon germplasms were observed and recorded in National Field Genebank for Persimmon. The results showed that the anthracnose pathogen mainly infected twigs, fruits, leaves and sepals of persimmon. Based on the disease symptoms of persimmon branches and fruit in the field, 479 accessions were divided into five resistance levels, including highly resistant, resistant, moderate resistant, susceptible, and highly susceptible. Sixty-six germplasms (13.8% of this collection) were highly resistant (representative varieties, such as 'Yunyang Huoshi'); 35 germplasms (e.g. 'Huangbian Xiaojixin') were resistant to anthracnose (7.3%); 119 germplasms (e.g. 'Fuyu', and 'Jiro') showed moderate resistance (24.8%); 209 germplasms (e.g. 'Fuping Jianshi') were susceptible (43.6%); 50 accessions (e.g. 'Suruga') were highly susceptible (10.4%). Pathogenic bacteria were isolated from leaves, branches, sepals and fruits. According to the morphological characteristics of colonies, mycelia and spores and the sequence alignment

收稿日期: 2023-01-10

修回日期: 2023-02-03

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为柿种质资源评价及抗性因子挖掘, E-mail: 30463164@nwfau.edu.cn

通信作者: 关长飞, 研究方向为 柿种质资源收集保存、鉴定评价, E-mail: guanchangfei@nwfau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272672); 农业农村部农作物种质资源保护与利用专项 (19221880)

Foundation project: The National Natural Science Foundation of China (32272672); Special Project of Conservation and Utilization of Crop Germplasm Resources supported by the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (19221880)

of multiple genes, all of them were identified as *Colletotrichum horii*.

KEY WORDS: persimmon; germplasm resources; anthracnose; resistance; identification

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.; $2n = 6x = 90$) 系柿科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros* L.) 的重要代表种, 属于双子叶植物纲, 为我国特色传统果树。中国柿属植物资源十分丰富, 国家柿种质资源圃目前保存柿资源约1200份^[1], 为其遗传改良和新品种培育提供了充足的材料。

柿炭疽病是危害柿栽培生产的一种严重的真菌性病害, 随着柿栽培面积的不断扩大, 其危害日益严重, 成为制约柿产业发展的重要影响因素。其主要为害柿树果实、叶片、新梢、柿蒂等^[2], 轻者树势衰弱, 重者整株枯死, 严重影响柿果实的质量和产量^[3]。不同品种对炭疽病的抗性存在差异, 同一品种的不同部位对炭疽病的敏感性也有差异。炭疽病爆发的主要影响因素有高温、高湿、降雨、光照、pH、品种抗性等, 最新研究发现炭疽病的发作与树龄存在关系^[4]。陕西地区一般在5月中下旬观察到新梢开始发病, 雨季发病较为严重, 在6月下旬至7月中下旬可观察到果实发病^[5]。

柿炭疽病是由柿树炭疽病原菌 (*Colletotrichum horii*) 引起, 是危害柿产业的主要病害之一。柿树炭疽病原菌最先被命名为柿盘长孢菌 *G. kaki Hori*^[6-8], 并在一段时间内得到普遍使用。Weir 和 Johnston^[9]对前人报道的炭疽病原菌进行了整理, 根据形态学及核酸序列将柿树炭疽病菌命名为柿树炭疽菌 *C. horii* nom. nov., 成为胶孢炭疽病原菌 (*C. gloeosporioides*) 复合种的成员之一, 并得到了广泛认可^[10], 柿属植物中绝大多数炭疽病均由此类病原菌引起^[11]。柿炭疽病在中国^[11,12]、韩国^[10,13]、日本^[14]、巴西^[15]、西班牙^[16]等国家均有发生, 受限于抗性资源, 柿炭疽病抗性育种研究进展缓慢。导致中国柿子炭疽病的炭疽种类包括 *C. gloeosporioides*、*C. horii*、*C. karstii*、*C. fructicola*、*C. cliviicola*、*C. siamense*。其中 *C. horii* 在采集地区均有分布, 为主要病原菌, *C. karstii*、*C. cliviicola*、*C. siamense* 是我国新发现的柿树炭疽病原菌^[17-19]。*C. nymphaeae* 和 *C. melonis* 在巴西引起的柿炭疽病为首次报道^[20]。

关于柿炭疽病抗性种质田间调查的系统研究目前报道较少, 根据田间表型观察, 王孟珂等将抗病性分为5级, 具体为20%以下, 20%~49%, 50%~74%, 75%~89%, 90%以上^[21]; 车庆辉等将抗病性分为4级, 具体为无病斑, 小于30%, 31%~59%, 大于60%^[22], Guan 等^[23]在对43份种质资源的调查中将抗病性分为4级, 具体为2%以下, 2%~5%, 5%~20%, 20%以上。但在实际研究中发现, 部分种质在不同年份观察的抗性表现差异较大, 可能受温度、水分、枝条部位等因素影响较大。因此, 本文将综合前人研究, 根据具体实验结果对柿炭疽病田间抗性调查制定分类标准。

为更好地解决炭疽病对于柿产业的严重危害, 本研究对国家柿种质资源圃479种柿资源材料开展炭疽病田间自然发病率调查, 并制定柿炭疽病抗性种质分类标准, 对柿种质资源的抗性进行分级, 筛选出抗炭疽病种质资源, 同时对病原菌进行分离鉴定, 从而为柿炭疽病的防治及抗性育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 田间调查材料

试验依托于西北农林科技大学国家柿种质资源圃，选用常见柿资源材料 479 份，通过对炭疽病发病枝条及果实的观察，统计柿炭疽病发病情况，总结发病规律。

1.2 试验试剂

PDA 培养基：去皮马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂粉 20 g，蒸馏水 1000 mL。

CMC 培养基：先将 400 mL 水微波沸腾（15 min 左右），加入 7.5 g CMC，磁力搅拌至完全溶解，再加入 0.5 g NH₄NO₃、0.5 g KH₂PO₄、0.25 g MgSO₄·7H₂O 和 0.5 g Yeast·Extract，补水至 500 mL。

1.3 种质资源调查

1.3.1 种质资源抗性鉴定标准制定

依据病枝病果数占调查总数的百分比推测全树的感病情况。由于气候、鸟类蜜蜂取食等其他不确定因素影响，会出现果实掉落损毁等情况，所以将病枝比例作为判断炭疽病抗感性的主要依据，将病果比例作为判断炭疽病抗感性的次要依据。然后根据柿树炭疽病发病率计算公式：柿树炭疽病发病率=病果率×40%+病枝率×60%，计算出柿树炭疽病发病率（注：如若树上无果，则发病率等于病枝率），将调查到的所有柿种质资源分为 5 个等级，分别为高感、感病、中抗、抗病种及高抗。由于田间调查具有一定不准确性，故发病率为 0%的情况可能由病叶病果脱落等因素导致，在此均统计为高抗种质。

1.3.2 田间调查

对国家柿种质资源圃内柿种质进行病枝及病果调查，对照种质资源抗性鉴定标准（表 1），筛选出不同抗性的种质。病枝率统计调查：选用树龄 15~20 年、长势良好的柿树，在树体东西南北四个方向各选 5 个 3~5 年生健壮的枝条，调查不同柿种质枝条的发病率情况；病果率统计调查：分别从东西南北四个方向各取 10 个果实，调查统计病果率。发病率（%）=感病枝条或果实/调查总枝条或果实×100%。

表 1 种质资源抗性鉴定标准

Table 1 Identification criteria for resistance of germplasm resources	
抗性等级	分级标准
高感	发病率在 20%以上
感病	发病率在 5~20%之间
中抗	发病率在 2~5%之间
抗病	发病率在 0~2%之间
高抗	发病率为 0%

1.4 炭疽病原菌分离鉴定

1.4.1 病样采集

采集炭疽发病症状典型的柿叶、嫩枝，放入采样袋内带入实验室进行分离

1.4.2 病原菌的分离与纯化

参考方中达^[24]，杨佳文^[25]等常规组织分离法进行病原菌的分离纯化，具体方法如下：用流动自来水将带病样本冲洗 2~3 min 洗落表面灰尘；选取病健交界处切取 5 mm ×5 mm 的矩形小块组织；用 75%酒精浸泡 30 s，进行消毒处理；用浓度为 1%的次氯酸钠浸泡 3 min；用无菌水冲洗 4~5 次，用灭菌滤纸吸干水分，接种在 PDA 培养基上，25 °C倒置培养。待菌落边缘长出菌丝后挑取少许病原菌边缘菌丝接入新的 PDA 培养基。分离纯化 5 代后，得到病原菌菌株。

1.4.3 病原菌的形态学鉴定

将纯化后的菌株在 25 °C恒温培养箱培养 7 d 后，观察菌落形态，挑取菌丝制成临时玻片，在显微镜下观察菌丝形态。然后压取 5 个 5 mm 大小菌饼置于 50 mL CMC 液体培养基中，放在摇床上 28 °C，200 r/min 摇菌 48 h，孢子诱导结束后，在显微镜下进行孢子形态的观察，依据菌落形态、菌丝、分生孢子梗和分生孢子的形态进行初步鉴定。

1.4.4 病原菌的多序列基因比对

将分离纯化的菌株培养 7 d 后，将菌丝用牙签刮入 2 mL 离心管中烘干 12 h，放入小钢珠进行研磨，按照真菌 DNA 提取试剂盒（OMEGA 试剂盒）提取基因组 DNA，PCR 所用的引物为 rDNA-ITS 通用引物 ITS1/ITS4、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*)、肌动蛋白 (*Actin*, *ACT*)、β-微管蛋白基因 (*beta-tubuLin*, *TUB2*)、几丁质合成酶 (*Chitin synthetase*, *CHS*) 进行扩增。扩增引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成（表 2）。

表 2 病原菌鉴定引物

Table 2 Primers for pathogen identification			
基因	引物	上下游引物序列（5'→3'）	参考文献
ITS	ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[26]
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	[26]
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	[27]
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	[27]
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	[28]
	CHS-345R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	[28]
GAPDH	gpd1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	[29]
	gpd2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	[29]
TUB2	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	[30]
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	[31]

PCR 反应条件为：94 °C预变性 3 min；94 °C变性 30 s，55 °C退火 30 s，72 °C延伸 1 min，共 38 个循环，72 °C延伸 5 min。最后经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物条带亮度后，送往奥科（北京）科技有限公

司测序。并将所测序列在 NCBI 官网进行 BLAST 相似性比对，并用 MEGA 7 软件以最大似然法构建系统发育树，循环 1000 次。

PCR 中 50 μL 反应体系如表 3 所示。

表 3 PCR 反应体系

Table 3 PCR reaction system	
试剂	使用量
2×Reaction Mix	25.4 μL
DNA 模板	2 μL
引物 1(F)	2 μL
引物 2(R)	2 μL
无菌水	18.6 μL

1.5 致病性分析

基于柯赫氏法则(Koch postulates)，对分离的 HGH-1 孢子悬浮液进行浸染验证及表型观察。于 7 月份温度高，雨水天气较多，湿度大的条件下，利用 HGH-1 孢子悬浮液对树势强壮、无病虫害的‘富平尖柿’当年生嫩枝进行无伤接种，接种采用区域孢子悬浮液点滴法，孢子悬浮液浓度为 1×10^6 个/mL。选择三个方位新生幼嫩枝条且生长状况一致，每个枝条以 1.5 cm 为间隔划分 5 个区域，每个区域中心部位用移液器加 5 μL 孢子悬浮液接种，套袋处理，于次日摘除。接种后 3 d 开始观察并记录发病情况，记录发病时间以及 15 日内病斑生长情况，以无菌水涂刷枝条为对照组。并对发病嫩枝再次进行病菌分离，待菌落长出后进行形态学和分子生物学鉴定。

2 结果与分析

2.1 柿炭疽病表型观察

2.1.1 柿枝条发病症状

柿炭疽病主要危害嫩梢，发病严重可致幼苗及枝条枯死（图 1）。当年生嫩枝发病可以分为四个阶段^[32]：第一阶段为新梢上出现小黑点；第二阶段小黑点会逐渐呈同心圆式扩大，最终可能成为长 10~20 mm 中间下凹的圆形斑或椭圆形斑或形状不确定的病斑；第三阶段分生孢子盘中会溢出粉红色孢子团，孢子团呈黏状，含水量较大；第四则可能导致病斑以上全部落叶，枝梢枯死。当环境条件阶段为受病菌侵染处的木质部严重受损变黑腐朽，极易折断，如若病斑不断扩大，不利于病原菌生长时，病原菌的保护机制会让其寄主枝梢进入休眠状态。



注：A：当年生嫩梢；B：木质化后枝梢；C：多年生枝干

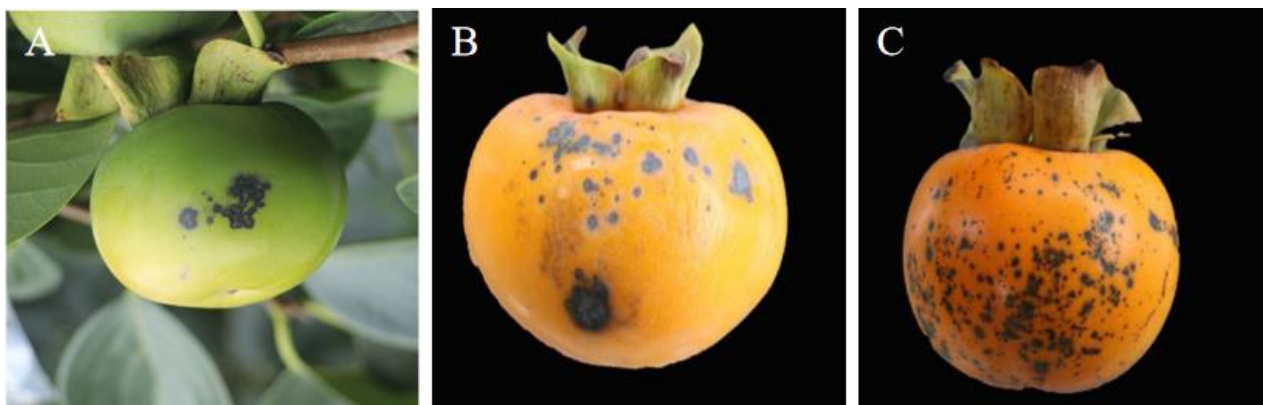
Note: A: Tender shoots in the same year; B: branch after lignification; C: perennial branches

图 1 炭疽病侵染枝梢症状

Fig. 1 Symptoms of anthracnose infestation

2.1.2 柿果实发病症状

果实发病可以分为四个阶段^[33]：第一阶段为在青绿色果面上出现深色小点；第二阶段小斑点逐渐扩大成为大的圆形病斑，进一步扩大至 5 mm 以上时，其中部会下凹并出现密集环状排列的小黑粒；第三阶段为病斑中部溢出粉红色分生孢子团；第四阶段为发病后期，随着病原菌侵入皮层以下，表面看为黑色凹陷斑点，切开后内部形成了黑色结块（图 2）。每个柿果上的病斑数目会因柿果的敏感性和发病程度的不同而产生差异，范围一般在一至二十个左右。随着病斑的不断扩大，有的病斑之间会彼此相连形成不规则形状，造成柿果迅速变软，并提前脱落。



注：A：发病初期；B：发病中期；C：发病后期

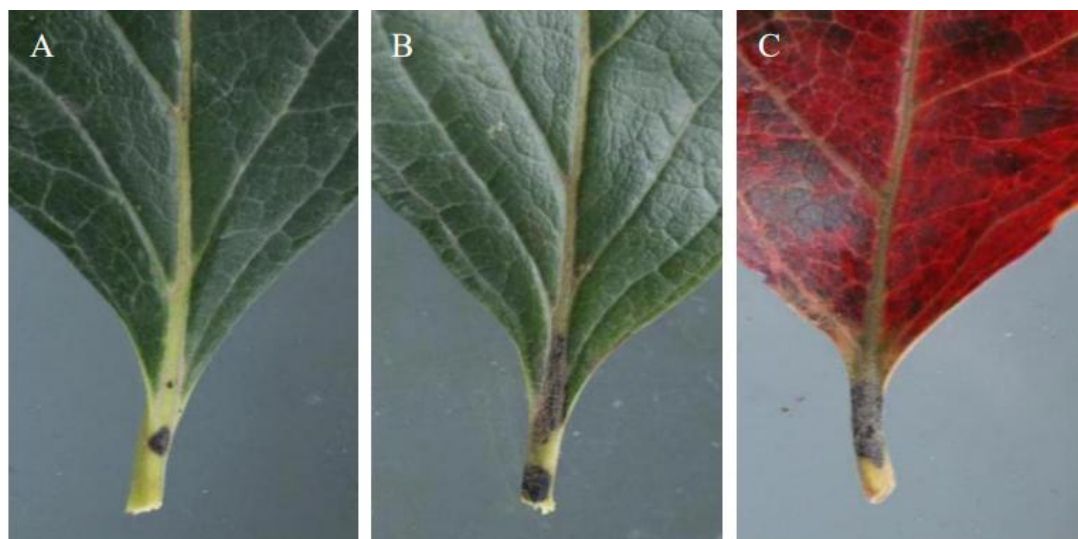
Note: A: Early stage; B: Middle stage; C: Late stage

图2 炭疽病感染果实症状

Fig. 2 Symptoms of fruit infection by anthracnose

2.1.3 柿叶片发病症状

叶片发病部位主要是叶脉和叶柄，叶脉以主脉发病较为明显，侧脉发病较轻。发病部位起初为黄褐色，然后逐渐变为黑色，形成不规则形或长条形的坏死病斑，发病严重时会影响到叶片的光合作用，导致叶片脱落，从而影响树体正常生长。夏季高温多雨，高温高湿的天气更有利于炭疽病的传播，因此夏梢嫩叶相对更易感病，最初显现深褐色小斑点，病斑多且发病严重时，会出现嫩叶扭曲、畸形，最终脱落（图3）。



注：A：发病初期；B：发病中期；C：发病后期

Note: A: Early stage; B: Middle stage; C: Late stage

图3 炭疽病感染叶片症状

Fig. 3 Symptoms of Petiole infection by anthracnose

2.2 柿种质资源炭疽抗性评价

2.2.1 柿炭疽病抗性种质田间调查

于国家柿种质资源圃种选取 479 种柿资源材料进行调查。观察炭疽病在枝条、果实、叶片、柿蒂等不同部位的发病情况，总结发病规律，记录病果病枝情况，并将相同种质综合统计，求出同一种质的病枝率和病果率。并参考表 1 种质资源抗性鉴定分级标准对炭疽病抗性等级进行划分(附表 1)。结果显示在资源圃现存资源中高抗的种质有 66 种（13.8%），代表品种有‘鄖阳火柿’、‘三原烧柿’等；抗病的种质有 35 种（7.3%），代表品种有‘黄边小鸡心’、‘大红柿’等；中抗的种质有 119 种（24.8%），代表品种有‘富有’、‘次郎’等；感病的种质有 209 种（43.6%），代表品种有‘富平尖柿’等；高感的品种有 50 种（10.4%），如‘骏河’等。调查结果与种质资源圃已知部分品种抗性相符，种质资源圃中炭疽病发病较为普遍，不同品种之间炭疽病抗性差异较大，易感品种一旦发病由于抗性较弱必须尽快采取合理防治措施，否则树体树势会快速衰弱，并且加重来年发病可能性。根据调查结果显示，炭疽病主要危害当年生嫩枝及成熟期的果实。具体抗性等级分类如下表 4 所示（详细数据见附表 1）。

表 4 柿种质资源抗性调查分级表

Table 4 Investigation on the resistance of anthracnose

编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病级 别
1	曲靖水柿 1	高抗	22	随洲早熟柿	高抗	43	东皋红柿	高抗	64	杂 5	高抗
2	襄阳牛心柿	高抗	23	淄博大方柿	高抗	44	永嘉红柿	高抗	65	金灯柿	抗病
3	洛阳镜面柿	高抗	24	皇冠柿	高抗	45	三原烧柿	高抗	66	长安烧柿	抗病
4	新昌牛心柿	高抗	25	红灯笼	高抗	46	兰田烧柿	高抗	67	户县火罐	抗病
5	华阴重台柿	高抗	26	鄖阳火柿	高抗	47	留坝莲花柿	高抗	68	花县小柿	抗病
6	绕天红	高抗	27	大方柿	高抗	48	广州鸡心柿	高抗	69	上虞方柿	抗病
7	六合柿	高抗	28	嵯县方柿	高抗	49	成县尖尖柿	高抗	70	华中雄株 9 号	抗病
8	曹县牛心	高抗	29	花县方柿	高抗	50	小尖柿芽变	高抗	71	胆柿	抗病
9	五里江牛心柿	高抗	30	九华大方柿	高抗	51	富平辣椒尖柿	高抗	72	黄边小鸡心	抗病
10	富平小尖顶	高抗	31	砧木小果	高抗	52	内丘台柿	高抗	73	花御所	抗病
11	木兰草原	高抗	32	鲁山盖柿	高抗	53	博爱八月黄	高抗	74	紫云团水柿	抗病
12	泗洪牛心柿	高抗	33	盐边和爱小柿 花	高抗	54	揭阳柿	高抗	75	七月鲜	抗病
13	云架山 2 号	高抗	34	西昌兴胜小柿 花	高抗	55	十月黄	高抗	76	盐边渔门小柿花	抗病
14	花县牛心柿	高抗	35	宿县牛心	高抗	56	鲁山四瓣柿	高抗	77	眉县钢板柿	抗病
15	石榴柿	高抗	36	合阳小牛心	高抗	57	句容柿	高抗	78	蓝田小干柿	抗病
16	满城牛心柿	高抗	37	双肩重台柿	高抗	58	寻甸水柿	高抗	79	铜山牛心柿	抗病
17	曹县牛心柿	高抗	38	长安重台柿	高抗	59	兰田社黄柿	高抗	80	大红柿	抗病
18	泗洪大牛心柿	高抗	39	华中雄株 2 号	高抗	60	历城绵柿	高抗	81	杂 2	抗病
19	河北农大牛心柿	高抗	40	华中雄株 3 号	高抗	61	浙江农大水柿	高抗	82	圃杂 1 号	抗病
20	长兴无名柿	高抗	41	华中雄株 8 号	高抗	62	彬县水柿	高抗	83	宁波高方柿	抗病
21	藁城无名柿	高抗	42	朱罐罐	高抗	63	杂 3-2	高抗	84	伏牛心	抗病

表 4 柿种质资源抗性调查分级表（续）

Table 4 Investigation on the resistance of anthracnose(continue)

编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病级 别
85	诏安水柿	抗病	125	古田水柿	中抗	165	晋城小柿	中抗	205	次郎	中抗
86	徽县尖尖柿	抗病	126	老门礅	中抗	166	山柿	中抗	206	偃师牛心柿	中抗
87	潼关莲花	抗病	127	圃杂 8 号	中抗	167	昌邑无名柿	中抗	207	郑 29（升柿）	中抗
88	果糖柿	抗病	128	台湾红柿	中抗	168	西条	中抗	208	荥阳陈沟灰柿	中抗
89	澄江无核柿	抗病	129	长沙盖柿	中抗	169	康定	中抗	209	杵头柿	中抗
90	曲靖牛奶柿	抗病	130	正阳牛心柿	中抗	170	火晶	中抗	210	火晶	中抗
91	商城冬柿	抗病	131	小广扁柿	中抗	171	新昌牛心	中抗	211	怀胎柿	感病
92	杭州牛心柿	抗病	132	尖顶小面糊	中抗	172	小蒂柿	中抗	212	胎里红	感病
93	保山大方柿	抗病	133	长安火罐柿	中抗	173	苍山牛心柿	中抗	213	平陆平顶柿	感病
94	广州牛心柿	抗病	134	定远无名柿	中抗	174	溱浦腰带柿	中抗	214	平核无	感病
95	峨眉板柿	抗病	135	皇宝柿	中抗	175	方柿	中抗	215	澄江牛心	感病
96	贡柿	中抗	136	稷山蜜蜜罐	中抗	176	松本早生	中抗	216	舟曲火柿	感病
97	临潼青柿（92）	中抗	137	辉县水柿	中抗	177	缙云黄柿	中抗	217	甲洲百目	感病
98	德阳方柿	中抗	138	会理青皮柿	中抗	178	都江堰干柿	中抗	218	圃杂 3 号	感病
99	洛阳鸡心柿	中抗	139	松阳水柿	中抗	179	株洲水柿	中抗	219	蜜罐柿	感病
100	华中雄株 11 号	中抗	140	杂 08	中抗	180	松阳扁柿	中抗	220	临潼鸡心黄	感病
101	凤翔水柿	中抗	141	兰田火罐	中抗	181	东洋一	中抗	221	牛心柿	感病
102	大长柱柿	中抗	142	雁过红	中抗	182	泗洪方柿	中抗	222	岐山水柿	感病
103	华中雄株 1 号	中抗	143	晋城盖柿	中抗	183	圆顶小面糊	中抗	223	大鳌盖柿	感病
104	荥阳火罐	中抗	144	富平板柿	中抗	184	爱知早生	中抗	224	树头红	感病
105	甜柿-1	中抗	145	宿迁扁柿	中抗	185	正月	中抗	225	杂样景	感病
106	博爱鬼脸青	中抗	146	临潼板柿	中抗	186	杭州高方柿	中抗	226	半夜甜	感病
107	四瓣柿	中抗	147	火罐	中抗	187	五花柿	中抗	227	荥阳八核柿	感病
108	洛阳鬼脸青	中抗	148	南漳尖柿	中抗	188	兰田水柿	中抗	228	三原鸡心黄	感病
109	黑柿	中抗	149	南靖扁柿	中抗	189	长沙火柿	中抗	229	桔蜜柿	感病
110	河北莲花柿	中抗	150	宁波铜盆柿	中抗	190	大扁柿	中抗	230	摘家烘	感病
111	嵇山蜜罐	中抗	151	邢台台柿	中抗	191	重台柿	中抗	231	会津身不知	感病
112	华中雄株 10 号	中抗	152	方山柿	中抗	192	兴津	中抗	232	实生柿-1	感病
113	富平升底尖柿	中抗	153	兰田大方柿	中抗	193	青杵头	中抗	233	荥阳灰柿	感病
114	阳朔牛心柿	中抗	154	铜盆柿	中抗	194	猪皮水柿	中抗	234	藤八	感病
115	大平顶柿	中抗	155	大狮头柿	中抗	195	西畴水柿	中抗	235	伊豆	感病
116	小柿（郑 49）	中抗	156	德阳水柿	中抗	196	满城莲花柿	中抗	236	旬阳牛心柿	感病
117	蜜蜜罐	中抗	157	黎城绵柿	中抗	197	面柿	中抗	237	伏尖顶	感病
118	玉环长柿	中抗	158	荥阳八月黄	中抗	198	老皮革	中抗	238	临潼社黄柿	感病
119	祁阳盘柿	中抗	159	洛阳小红柿	中抗	199	杂 4	中抗	239	临潼方柿	感病
120	五河牛心柿	中抗	160	凤山无核柿	中抗	200	面糊柿	中抗	240	澄江牛心柿	感病
121	容县方柿	中抗	161	早秋	中抗	201	海库曼	中抗	241	兴隆柿	感病
122	抗病尖柿	中抗	162	临潼尖顶柿	中抗	202	甜宝盖	中抗	242	市田柿	感病
123	圃杂 4 号	中抗	163	秋艳	中抗	203	夕红	中抗	243	南京水柿	感病
124	大丰牛心	中抗	164	富有	中抗	204	牛头柿	中抗	244	德阳盘柿	感病

表 4 柿种质资源抗性调查分级表（续）

Table 4 Investigation on the resistance of anthracnose(continue)

编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病级 别
245	舟山长柿	感病	285	满堂红	感病	325	秋尖顶	感病	365	册亨水柿	感病
246	大四瓣柿	感病	286	永济木柿	感病	326	黎城小面糊	感病	366	八月黄	感病
247	金瓶柿	感病	287	长沙莲花柿	感病	327	古桑柿	感病	367	沙谷 2 号	感病
248	荷泽八月黄	感病	288	小四瓣柿	感病	328	砀山牛心柿	感病	368	襄汾八月红	感病
249	晚御所	感病	289	峨眉牛奶柿	感病	329	上西早生	感病	369	刀根早生	感病
250	大荔七月黄	感病	290	小蓼子	感病	330	四盘柿	感病	370	大面糊	感病
251	舟曲牛心柿	感病	291	偃师驴奶头	感病	331	五里江方柿 03	感病	371	改良牛心柿	感病
252	四沟柿	感病	292	禅寺丸	感病	332	御所	感病	372	孝义牛心	感病
253	富平大尖柿	感病	293	富阳方柿（03）	感病	333	成县水柿	感病	373	长沙腰带柿	感病
254	平山七月红	感病	294	石家庄莲花柿	感病	334	吊柿	感病	374	杭州火柿	感病
255	青果	感病	295	斤柿	感病	335	襄汾扁柿	感病	375	车头柿	感病
256	圃杂 5 号	感病	296	黎城方柿	感病	336	四方柿	感病	376	洋县尖顶柿	感病
257	甲洲圆	感病	297	小红柿	感病	337	沙谷 1 号	感病	377	锅盖柿	感病
258	西村早生	感病	298	王后柿	感病	338	曹县早四瓣	感病	378	稷山板柿	感病
259	壁山牛心柿	感病	299	番茄柿	感病	339	大秋	感病	379	火柿	感病
260	兴义水柿	感病	300	九月青	感病	340	正阳八核柿	感病	380	凤台柿 2 号	感病
261	稷山水柿	感病	301	凤阳无名柿	感病	341	都江堰水柿	感病	381	日本红柿	感病
262	杨嘴柿	感病	302	富贵柿	感病	342	礼泉红柿	感病	382	孝义牛心柿	感病
263	壶平柿	感病	303	延津小水柿	感病	343	垣曲八月红	感病	383	麻田方柿	感病
264	临潼挂干柿	感病	304	圃杂 11 号	感病	344	双沟柿	感病	384	金钱柿	感病
265	临猗火柿	感病	305	鸡心黄	感病	345	小方柿	感病	385	闻喜平顶柿	感病
266	天水方柿（苗）	感病	306	正阳牛心	感病	346	句容扁柿	感病	386	红杵头	感病
267	柿砧-1	感病	307	大二糙	感病	347	大丰牛心柿	感病	387	洛阳老杵头	感病
268	宿县牛心柿	感病	308	新安牛心	感病	348	洛阳水牛心	感病	388	闻喜尖顶柿	感病
269	荥阳水柿	感病	309	血柿	感病	349	会理红柿	感病	389	永济青柿	感病
270	十月红	感病	310	泰安镜面	感病	350	井陘盖柿	感病	390	圃杂 10 号	感病
271	阳丰	感病	311	荥阳平顶水柿	感病	351	富平尖柿	感病	391	石杂 1 号	感病
272	阳谷无名柿	感病	312	保山水柿	感病	352	缙云大柿	感病	392	红柿	感病
273	孝义尖顶柿	感病	313	灯笼柿	感病	353	黄冠柿	感病	393	曲靖水柿 2	感病
274	户县马奶头	感病	314	四棱盖柿	感病	354	小宝盖柿	感病	394	河西火罐	感病
275	堂上蜂屋	感病	315	岐山火罐	感病	355	邳县牛奶柿	感病	395	大叶水柿	感病
276	花垣火柿	感病	316	红光辉	感病	356	黑熊	感病	396	老柿沟	感病
277	冬丹柿	感病	317	七月早	感病	357	长沙牛心柿	感病	397	辉县小柿	感病
278	新津柿	感病	318	怀抱月	感病	358	井陘小柿	感病	398	保康柿	感病
279	水柿	感病	319	西畴火柿	感病	359	圃杂 7 号	感病	399	襄汾七月红	感病
280	盖柿（郑 27）	感病	320	隆回软早	感病	360	合阳牛心柿	感病	400	晋城四瓣柿	感病
281	新安牛心柿	感病	321	鲁山牛心柿	感病	361	大火罐	感病	401	望漠水柿	感病
282	沙河大方柿	感病	322	华县帽盔柿	感病	362	海阳旗杆顶	感病	402	彬县尖顶柿	感病
283	眉县青化马奶头	感病	323	新秋	感病	363	保山烘柿	感病	403	长安秋蒸饼	感病
284	三原木柿	感病	324	裂御所	感病	364	眉县齐镇小牛心柿	感病	404	扁塌塌	感病

表 4 柿种质资源抗性调查分级表（续）

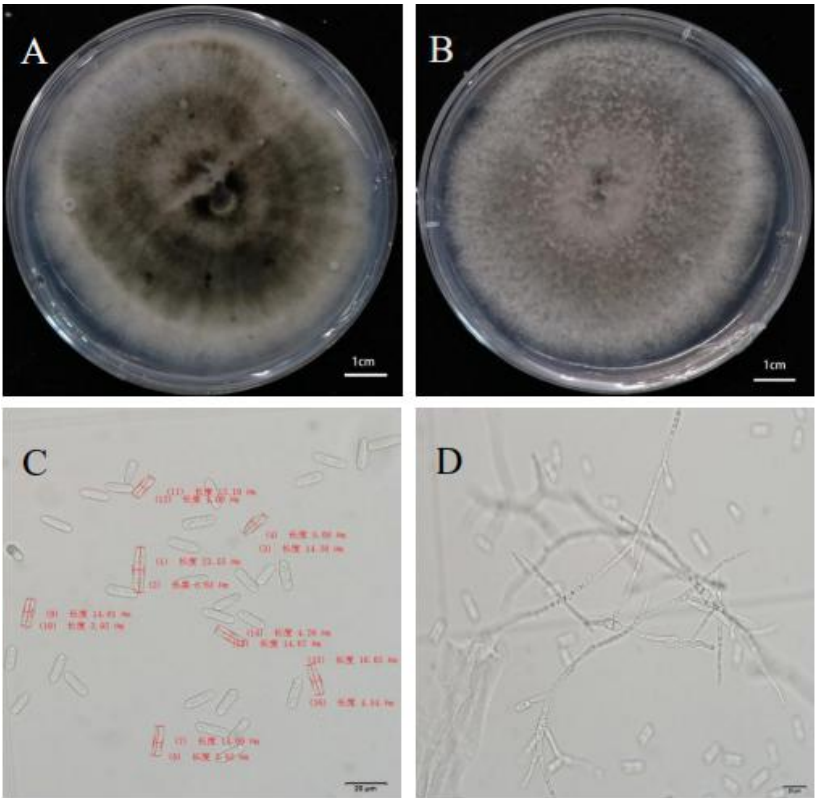
Table 4 Investigation on the resistance of anthracnose(continue)

编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病 级别	编号	品种	感病级 别
405	大萼子	感病	424	户县尖顶柿	高感	443	巴东牛心柿	高感	462	韩城牛心柿	高感
406	磨盘柿	感病	425	月柿	高感	444	长沙水柿	高感		野生近缘种	
407	圃杂 2 号	感病	426	韩国盘柿	高感	445	长安伏尖顶	高感	463	野柿子	抗病
408	泾川尖顶柿	感病	427	老杵头	高感	446	眉县牛心柿	高感	464	江阴野柿	中抗
409	辉县大柿	感病	428	乾县火柿	高感	447	华县白旋柿	高感	465	野柿	中抗
410	长安水柿	感病	429	临猗平顶牛心 柿	高感	448	干帽盔	高感	466	伏山野柿-01	感病
411	茅村牛心柿	感病	430	红富	高感	449	贵秋	高感	467	石林软枣	高抗
412	新红柿	感病	431	骏河	高感	450	藤原御所	高感	468	富有软枣砧	中抗
413	富平盘柿（唐陵）	感病	432	长沙八月黄	高感	451	眉县怀胎柿	高感	469	君迁子	感病
414	德阳绵柿	高感	433	户县大柿	高感	452	清州无核	高感	470	油柿	高抗
415	丘北水柿	高感	434	板柿	高感	453	富平三角尖柿	高感	471	油柿	抗病
416	曹县水柿	高感	435	郑 1	高感	454	安溪牛心柿	高感	472	安溪油柿	中抗
417	郧阳罐罐	高感	436	沙河火柿	高感	455	文县尖尖柿	高感	473	盘县油柿	感病
418	圃杂 6 号	高感	437	圃杂 9 号	高感	456	正阳尖顶柿	高感	474	杭州小油柿	感病
419	临潼牛心柿	高感	438	柿某种	高感	457	旬阳牛柿	高感	475	油柿子	感病
420	水镜面	高感	439	金堂干柿	高感	458	兰田水尖顶	高感	476	长果油柿	高感
421	长安罐罐柿	高感	440	郧阳大火罐	高感	459	盘县水柿	高感	477	金枣柿	抗病
422	凤翔尖顶柿	高感	441	圃杂 12 号	高感	460	南漳杵头柿	高感	478	缙云金枣柿	抗病
423	德阳冬柿	高感	442	升柿	高感	461	眉县马奶头	高感	479	松阳金枣柿	感病

2.3 柿炭疽病原菌分离及鉴定结果

2.3.1 病原菌分离及形态特征观察

从病叶、病枝、萼片和柿果中分离获得的菌株菌落形态相似，菌落均呈同心圆状生长，背面为灰色或灰褐色，还会伴有黑色斑点出现，正面大多为白色或灰色絮状绒毛型菌丝。显微镜下观察菌丝具隔膜，分支。分生孢子大小为 $7.64\sim 25.58\ \mu\text{m} \times 3.43\sim 6.19\ \mu\text{m}$ ($n=100$)，呈圆柱形，两端钝圆，光滑透明。根据形态学特征观察分析，推测菌株为胶孢属炭疽病原菌（图 4）。



注：A、B:炭疽菌株在 PDA 平板上的形态特征;C:分生孢子形态 D:菌丝形态

Note: A, B: Morphological characteristics of anthrax strains on PDA plates; C: Conidial morphology; D: Mycelium morphology

图 4 炭疽病菌落及孢子形态观察

Fig. 4 Colonies and spore morphology of anthracnose disease

2.3.2 炭疽病病原菌鉴定

将纯化的菌株进行提取和检测，使用 ITS、ACT、CHS、GAPDH、TUB2 五对基因进行 PCR 扩增，将测序结果提交至 NCBI 网站进行同源性比较分析，结果表明分离菌株的五对引物扩增所获得的基因序列与 *C. horii* 炭疽菌相似度达 99% 以上，利用 phylosuite 软件进行序列串联，MEGA 7 软件进行聚类分析，结果表明所分离菌株与 *C. horii* C11801 菌株关系最近（图 5），表明分离的 HGH-1 菌株为 *C. horii* 炭疽菌。代表性菌株 HGH-1 扩增序列上传至 NCBI 序列号分别为 ITS: OP946450、CHS: OP956549、TUB2: OP970834、ACT: OP956551、GAPDH: OP956550。

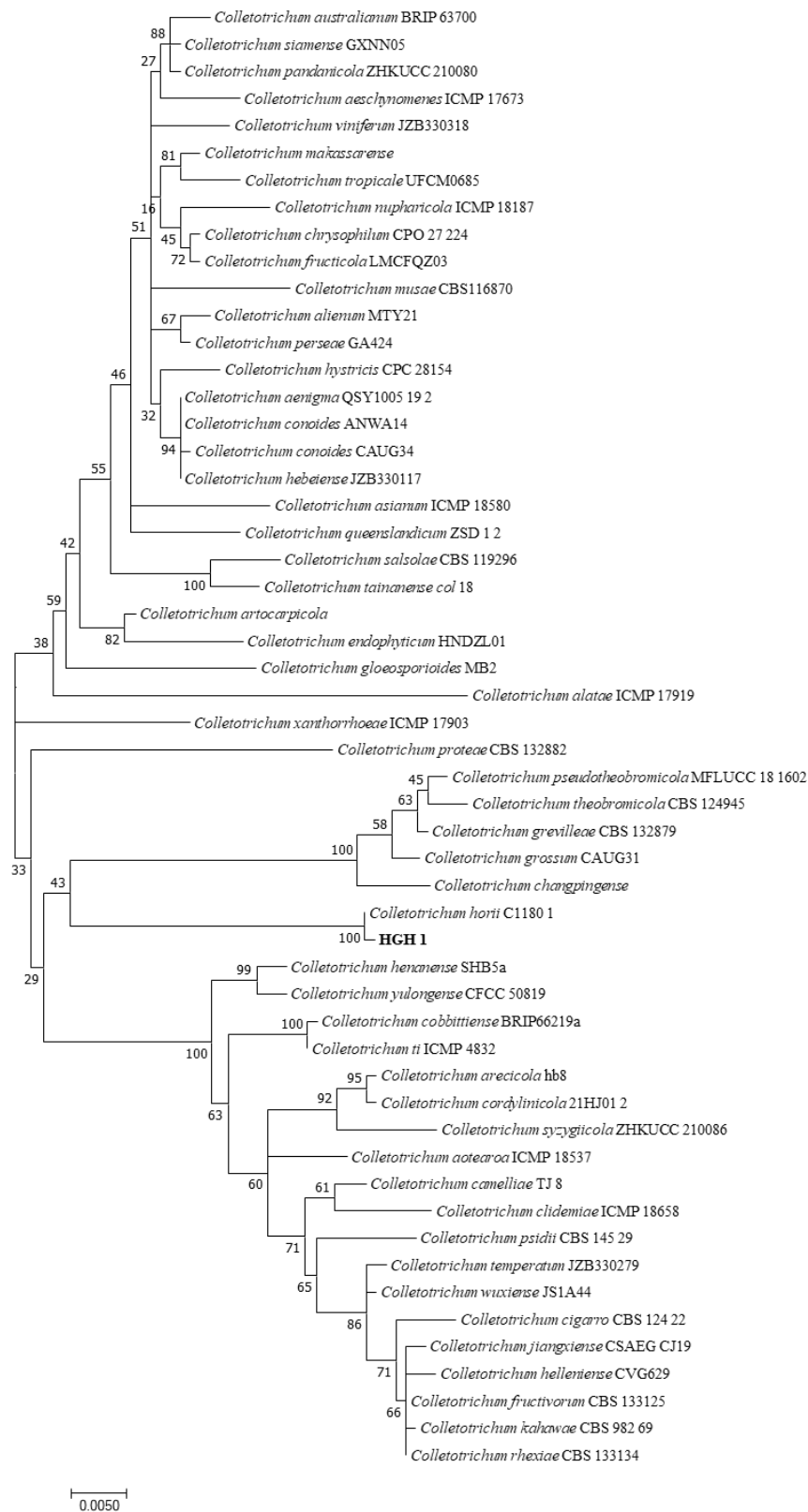


图 5 系统发育树构建

Fig. 5 Phylogenetic tree construction

2.4 致病性分析

分别选取三个菌株进行田间致病性测定，结果表明，3 株菌株接种的枝条均在接种后第 5 天开始发病，发病率为 100%。接种的枝条发病初期出现小黑点，后呈同心圆式扩大，最终长成中间略微下凹的病斑，与田间自然发病症状相同，而对照组枝条未发病（图 6）。从菌株接种发病枝条上再次进行病菌分离，经镜检后其形态与分离的哈锐菌株形态一致，根据科赫氏法则^[34]，证明所分离菌株为 *C. horii*。



注：A-C:接种菌株枝条；D:对照

Note: A-C: Branches of the inoculation strain; D: control

图 6 致病性测试

Fig. 6 Pathogenicity test

3 讨论与结论

柿炭疽病是由柿树炭疽病原菌 (*C. horii*) 引起, 危害柿产业的主要病害之一, 炭疽病的发生极大地影响柿产量, 是柿产业发展中亟须解决的一个重要问题。田间抗性调查可以大致反应出该品种的抗病情况, 区分不同品种间抗性的强弱。目前对柿炭疽病的田间调查还缺乏系统的研究, 本试验通过对国家柿种质资源圃内 479 份柿资源材料进行抗性调查, 制定了柿炭疽病抗性种质分类标准, 总结了炭疽病的发病规律及特点, 可为柿炭疽病抗性育种提供理论支持和实践依据。常见柿资源中, 多数不抗炭疽病。经统计, 479 份柿资源中高抗及抗病品种分别有 66 和 35 种, 如‘鄢阳火柿’‘黄边小鸡心’均较为抗病等; 中抗的品种有 119 种; 感病及高感的品种合计达 259 份, 占比较高。优异资源如‘华中雄株’、‘成县尖尖柿’等对于炭疽病有较强抗性, 可以作为抗性育种的亲本, 加速柿炭疽病抗性育种。对‘骏河’等高感品种进行观察, 发现在相同的管理条件下, 甜柿多为高感品种或感病品种。甜柿具有较高的营养价值和较好的风味, 具有广阔的发展前景, 但存在易感染炭疽病导致大面积减产等问题, 若能较好的解决甜柿抗性问题, 将会大大推动柿产业发展。通过对柿病原菌进行分离, 综合菌落、菌丝、孢子形态特征及多基因序列比对, 发现其为哈锐炭疽病原菌 (*C. horii*), 为柿炭疽病的抗病机理的研究与防治奠定基础。

柿炭疽病的综合防控对柿产业可持续发展具有重要的意义, 本试验在对柿炭疽病的抗性调查中, 初步总结了炭疽病的发病规律: 柿炭疽病主要侵染嫩枝, 其次为果实, 发病严重时叶片、萼片也会感染, 并造成落叶及果实软化。柿炭疽病的防治应多方面共同进行, 但总原则在于“防重于治”, 从日常的果园栽培管理方面开始注意, 及时清园, 清除病原菌, 增强修剪管理措施, 控制果园通风透光条件, 加强肥水管理, 合理用药。本试验观察得出的病原菌特性、发病规律及不同部位的病原菌发病特征, 可以为炭疽病防治提供参考借鉴, 可依据炭疽病特性对发病柿树果园进行阶段性集中防治。

目前许多抗病品种尚未得到大面积推广栽培, 在之后柿产业发展壮大过程中, 可以优先筛选高抗实生苗进行推广; 或将抗性品种作为育种亲本, 进行杂交育种改良; 对于易感品种, 如‘富平尖柿’等, 也可以采用坐地苗嫁接即先栽砧木, 第二年再嫁接, 因为通风透光较好, 可以较好地防控苗期炭疽病的蔓延, 并减少缓苗期提高树势。试验制定了柿炭疽病抗性种质分类标准, 对常见柿品种进行了抗性评价, 筛选出一批高抗柿品种, 本研究为柿炭疽病抗性育种奠定资源基础。

参考文献

- [1] Guan C F, Zhang Y F, Zhang P X, Chachar S, Wang R Z, Du X Y, Yang Y. Germplasm conservation, molecular identity and morphological characterization of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) in the NFGP of China. *Scientia Horticulturae*, 2020, 272: 109490
- [2] Weir, B.S., Johnston, P.R., & Damm, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 2012, 73: 115 - 180
- [3] 徐志英, 关崇梅, 康克功. 陕西柿树主要病虫害及其综合防治技术体系研究. *西北农业学报*, 2004(03): 72-74+77
- Xu Z Y, Guan C M, Kang K G. A study of integrated control on the disease and pests of persimmon in Shaanxi province. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2004, 13 (03): 72-74+77
- [4] 张柯, 魏森林, 丁向阳, 邓全恩, 杨金帅. 柿炭疽病发生症状的主要影响因子及综合防治技术. *河南林业科技*, 2016, 36(02): 52-54
- Zhang K, Wei S I, Ding X Y, Deng Q E, Yang J S. The symptoms main influence factors and integrated control technology of persimmon anthracnose. *Journal of Henan Forestry Science and Technology*, 2016, 36(02): 52-54
- [5] 冯锁牢, 穆娟. 富平尖柿炭疽病综合防治技术. *陕西农业科学*, 2009, 55(06): 244-245
- Feng S L, Mu J. Comprehensive control technology of Fuping persimmon anthracnose. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 55(06): 244-245
- [6] Hori S. Kaki no Shinbyogai Tansobyō. *Engei no Tomo*, 1910, 6(1): 58-61
- [7] Hori S. Kaki no Shinbyogai Tansobyō. *Engei no Tomo*, 1910, 6(2): 21-24
- [8] Ito S. *Gloeosporiose* of the Japanese persimmon. *Botanic Magazine (Tokyo)*, 1911, 25: 197-202
- [9] Weir B S, Johnston P R. Characterisation and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii* nom. nov. *Mycotaxon*, 2010, 111: 209-219
- [10] Kwon J H, Kim J, Choi O, Gang G, Han S, et al. Anthracnose caused by *Colletotrichum horii* on sweet persimmon in Korea: Dissemination of conidia and disease development. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161: 497-502
- [11] Xie L, Zhang J Z, Cai L, Hyde K D. Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose. *Mycology*, 2010, 1: 242-253
- [12] Zhang J. Anthracnose of persimmon caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China. *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2008, 2: 50-54
- [13] Hassan O, Jeon J Y, Chang T, Shin J S, Oh N K, et al. Molecular and morphological characterization of *Colletotrichum* species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with persimmon anthracnose in South Korea. *Plant Disease*, 2018, 102: 1015-1024
- [14] Hori S. Japanese persimmons. *Friends of Horticulture*, 1910, 6: 58-61 (In Japanese)
- [15] Fantinel V S., Muniz M F, Blume E, Araújo M M, Poletto T, et al. First report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose on *Acca sellowiana* fruits in Brazil. *Plant Disease*, 2017, 101: 1035-1035
- [16] Palou L, Montesinosherrero C, Tarazona I, Taberner V. Postharvest anthracnose of persimmon fruit caused by *Colletotrichum gloeosporioides* first reported in Spain. *Plant Disease*, 2013, 97: 691-691
- [17] Zhang M, Forte-Perri V, Sun W, Tang L, Huang S, Guo T, Chen X, Li Q. Identification and Observation of Infection Processes of *Colletotrichum* Species Associated with Persimmon Anthracnose in Guangxi, *Plant Dis.* 2022, <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0765-RE> (Online)

[18] 王洁, 高瑞, 余贤美, 艾呈祥. 柿种质资源对柿炭疽菌的抗性评价. 山东农业科学, 2017, 49(06): 112-114+118

Wang J, Gao R, Yu X M, Ai C X. Evaluation on persimmon germplasm resistance to *Colletotrichum horii*. Shandong Agricultural Sciences, 2017, 49(06): 112-114+118

[19] 任立超, 谢昀烨, 施鹏程, 武军, 方丽, 王汉荣. 甜柿炭疽病病原种类及生物学特性比较. 果树学报, 2022. DOI:10.13925/j.cnki.gsx.20220354 (在线)

Ren L C, Xie Y Y, Shi P C, Wu J, Fang L, Wang H R. Pathogen identification and biological characteristics of sweet persimmon anthracnose causing by *colletotrichum* species[J/OL]. Journal of Fruit Science, 2022. DOI:10.13925/j.cnki.gsx.20220354 (Online)

[20] Aguiar C T, Lichtemberg P, Michailides T J, Miranda Borges M I, Pereira W V, May D. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on persimmon in Brazil. Fungal Biology, 2022, 126(3): 235-249

[21] 王孟珂, 张杨凡, 车庆辉, 王仁梓, 关长飞, 杨勇. 柿炭疽病抗性种质调查及发病规律研究. 西北农业学报, 2020, 29(11): 1741-1750

Wang M K, Zhang Y F, Che Q H, Wang R Z, Guan C F, Yang Y. Survey of germplasm resistant to persimmon anthracnose and its pathogenesis. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2020, 29(11): 1741-1750

[22] 车庆辉. 柿不同发育期描述规范及炭疽病抗性分类探究[D]. 西北农林科技大学图书馆, 杨凌, 2021

Che Q H. The description of different developmental stages of persimmon and the classification of anthracnose resistance[D]. Northwest A & F University, Yangling, 2021

[23] Guan, C.; Hu, J.; Li, Y.; Che, Q.; Yang, Y. Identification of New Sources of Resistance to Anthracnose Caused by *Colletotrichum horii* among Persimmon Germplasms. Horticulturae, 2022, 8: 180. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8020180>

[24] 方中达. 植病研究方法 (第三版)[M]. 中国农业出版社, 1998.

Fang Z D. Phyto-disease research methods (The third edition) [M]. China Agriculture Press, 1998

[25] 杨佳文, 赵尊练, 张管曲, 谢芳琴, 姜长岳, 张永香, 韩晓萍, 徐乃林. 陕西线辣椒炭疽病原菌的鉴定及生物学特性研究. 西北农业学报, 2017, 26(11): 1695-1705

Yang J W, Zhao Z L, Zhang G Q, Xie F Q, Jiang C Y, Zhang Y X, Han X P, Xu N L. Identification and biological characterization of anthracnose bacteria in Xianlajiao Chili pepper in Shaanxi province. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2017, 26(11): 1695-1705

[26] Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics & Evolution, 1997, 7(1): 103-116.

[27] Cannon P F, Damm U, Johnston P R, Weir B S. *Colletotrichum*-current status and future directions. Studies in mycology, 2007, 59(1): 129-145

[28] Carbone I, Kohn L. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. Mycologia, 91(3): 553-556

[29] White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a guide to methods and applications, 1990, 18(1): 315-322

[30] Damm U, Cannon P F, Woudenberg J H, Johnston P R, Weir B S, Tan Y P, Shivas R G, et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology, 2007, 59(1): 75-88

[31] Liu F, Cai L, Crous P W, Damm U. Liu F, Cai L, Crous P W, et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2014, 33(1): 83-97

[32] Liu X, Zhang J Z, Lei C, Hyde K D. Biology of *Colletotrichum horii*, the causal agent of persimmon anthracnose. *Mycology*, 2010, 1(4): 242-253

[33] 屈伟良. 柿炭疽病发生规律及综合防治技术研究. *陕西林业科技*, 2009, 04: 63-64+67

Qu W L. Persimmon anthracnose occurrence regularity and corresponding techniques to control. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 2009, 04: 63-64+67

[34] Singh V P, Proctor S D, Willing B P. Koch's postulates, microbial dysbiosis and inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 2016, 22(7): 594-599