网络出版时间:2025-08-07 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.02.012

甘肃康县核桃炭疽病病原分离鉴定及其生物学特性

田一冰,杨成德,王一丹,马婷
(甘肃农业大学 植物保护学院 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室,甘肃 兰州 730070)

[摘 要] 【目的】明确甘肃康县核桃炭疽病的病原种类及其生物学特性,为该地区核桃炭疽病的综合防治提供参考。【方法】2023 年 5—8 月从甘肃康县核桃种植区采集具有典型症状的核桃枝干样本,采用组织分离法进行分离,并对其进行致病性测定和鉴定;利用菌丝生长速率法测定不同碳源、氮源、温度、pH 值和光照对其菌丝生长和产孢量的影响。【结果】致病性测定结果表明,分离物 HT14 为康县核桃炭疽病的致病菌。HT14 菌落形态为圆形,初期呈白色长绒毛状,4~5 d 后菌落中心变为灰色且菌丝生长旺盛,形成凸起并向周围扩散,菌落边缘呈白色稀疏绒毛状,菌落背面有同心轮纹,颜色由灰色变浅后又变深;后期菌落正面呈灰色,背面灰绿色;单细胞分生孢子形态为圆柱形或卵形,孢子光滑、无色,大小为(14.43~8.29) μm×(4.71~2.61) μm。经 *ITS*、*HIS*3、*ACT*、*TUB*2、*CHS*1 和 *GAPDH* 基因序列分析,分离物 HT14 与松针刺盘孢(*Colletotrichum fioriniae*)同源性为 99%,在系统发育树上聚为一支。结合形态特征将 HT14 菌株鉴定为松针刺盘孢,其菌丝生长和产孢的最佳碳源和氮源分别为乳糖和硝酸钠,菌丝生长最适条件为温度 25 ℃、光照 24 h、pH 8.0,产孢最适条件为温度 25 ℃、光照 24 h、pH 5.0;致死温度为 52 ℃。【结论】康县核桃炭疽病致病菌为松针刺盘孢,其菌丝生长和产孢的最佳碳源为乳糖,最佳氮源为硝酸钠,菌丝生长最适条件为温度 25 ℃、光照 24 h、pH 8.0,产孢最适条件为温度 25 ℃、光照 24 h、pH 5.0。

[关键词] 核桃;炭疽病;病原鉴定;松针刺盘孢;生物学特性
[中图分类号] S436.64 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)02-0116-09

Isolation, identification and biological characteristics of walnut anthracnose pathogen in Kang County, Gansu Province

TIAN Yibing, YANG Chengde, WANG Yidan, MA Ting
(*Laboratory of Gansu Province Crop Disease and Pest Biological Control Engineering, College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu* 730070, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aims to elucidate the pathogenic species and biological characteristics of walnut anthracnose in Kang County, Gansu Province, to provide a theoretical basis for the integrated management of this disease in the region. 【Method】 From May to August in 2023, samples exhibiting typical symptoms were collected from walnut stems in the walnut planting region of Kang County, Gansu Province. Tissue separation method was used to isolate the samples, and their pathogenicity was subsequently determined and identified. The influence of various carbon sources, nitrogen sources, temperature, pH levels, and light conditions on mycelial growth and spore production was evaluated by the mycelial growth rate method. 【Result】 The pathogenicity test results confirmed that the isolate HT14 is the causative agent of walnut anthracnose in Kangxian County. The colony morphology of HT14 was round, initially white and fluffy, and after 4—5 days, the center of the colony turned gray with vigorous mycelial growth,

[收稿日期] 2024-11-01 [修回日期] 2024-12-15
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660148)
[作者简介] 田一冰(1999—),女,甘肃定西人,在读硕士,主要从事植物病理学研究。E-mail:1825150236@qq.com
[通信作者] 杨成德(1975—),男,甘肃武都人,教授,博士生导师,主要从事植物病理学研究。E-mail:yangcd@gsau.edu.cn

forming raised areas that spread outward. The colony edges were white and sparse, with concentric rings on the back, whose grey color became lightened firstly and then darkened. Later, the colony front was gray and the back was gray-green. The single-celled conidia were cylindrical or oval shape, smooth, colorless, with its size being (14.43－8.29) μm×(4.71－2.61) μm. *ITS*, *HIS*3, *ACT*, *TUB*2, *CHS*1, and *GAPDH* gene sequence analysis showed that the HT14 isolate shared 99% homology with *Colletotrichum fioriniae*, which clustered into a single branch in the phylogenetic tree. Based on morphological characteristics, it was identified as *C. fioriniae*. The optimal carbon source and nitrogen source for the mycelial growth and sporulation of HT14 were determined to be lactose and sodium nitrate, respectively. The ideal conditions for mycelial growth were found to be a temperature of 25 ℃, continuous illumination of 24 h, and pH of 8.0. For sporulation, the optimal conditions were a temperature of 25 ℃, continuous illumination of 24 h, and pH of 5.0. The lethal temperature for HT14 was 52 ℃.【Conclusion】 The optimal carbon source for mycelial growth and sporulation was determined to be lactose, while the optimal nitrogen source was sodium nitrate. For mycelial growth, the optimum conditions were found to be a temperature of 25 ℃, continuous illumination of 24 h, and pH of 8.0. For sporulation, the optimal conditions were a temperature of 25 ℃, continuous illumination of 24 h, and pH of 5.0.

Key words: *Juglans regia*; anthracnose; pathogen identification; *Colletotrichum fioriniae*; biological characteristics

核桃(*Juglans regia*)原名胡桃，被誉为坚果之王，与榛子、扁桃和腰果一起被列为世界四大干果，因其丰富的营养价值被称为“液体黄金”[1]。核桃富含不饱和脂肪，加工得到的核桃油可以有效降低胆固醇[2]，是理想的优质食用油[3]，具有可观的经济效益。2 000 多年前我国就开始栽种核桃，目前国内核桃种植广泛，产量稳居全球第一，也是全球核桃消费量最高的国家[4]。甘肃康县气候适宜，是我国核桃最佳栽培区之一，也是甘肃最大的核桃产区[5]，2020 年陇南地区的核桃产量占甘肃省核桃总产量的 50%以上[6]，是当地最具特色与规模的经济林产业。近年来，随着核桃种植面积的扩增，相继发现相关病虫害的发生程度逐渐加重，严重降低了核桃的产量和品质[7]，影响种植效益。研究发现，甘肃陇南地区核桃的主要病害有黑腐病、炭疽病、褐色膏药病[8]、细菌黑斑病、褐斑病、枝枯病和腐烂病等[5]。其中由刺盘孢属(*Colletotrichum* spp.)真菌引起的核桃炭疽病作为核桃三大病害之一，在陇南地区重度发生，造成叶片、果实发育不正常或过早脱落，同时也为害枝条使其枯死。

核桃炭疽病是世界许多核桃种植区发展的重要制约因素之一，其潜伏时间长、发生普遍、病程短，导致核桃果园产量损失巨大，甚至绝收[9]。国内已有研究对河南、湖北、山东、陕西、广西西北部、河北和北京地区核桃炭疽病的病原菌进行鉴定，发现其致病菌有胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)[10]、果生刺盘孢(*C. fructicola*)[11]、咖啡刺盘孢(*C. coffeanum*)[12]、暹罗炭疽菌(*C. siamense*)[13]、尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)[14]和葡萄刺盘孢(*C. vinifrrum*)[15]等，且以胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)为主。截至目前，甘肃地区核桃炭疽病病原菌种类尚未见报道，明确甘肃核桃炭疽病的致病菌有利于进行针对性预防，防止病害大爆发[16]。2023 年笔者在甘肃康县调查时发现疑似由刺盘孢属真菌引起的核桃炭疽病。因此，本研究对康县核桃炭疽病病原菌进行分离和致病性测定，根据形态特征与多基因联合分析进行病原鉴定，并对致病菌进行生物学特性测定，以期为康县核桃炭疽病害的诊断和综合防治提供依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试样品及核桃品种：2023 年 5－8 月从甘肃康县核桃种植区(33°33′ N，105°60′ E)采集具有典型症状的发病枝干标本 6 份。将其编码标记后带回实验室备用；致病性测定选用元丰核桃。

供试培养基：马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、查氏(Czapek)培养基和合成低营养琼脂(SNA)培养基，其中 PDA 和 Czapek 培养基的制作方法同文献[17]，合成低营养琼脂(SNA)培养基的制作方法同文献[18]。

1.2　病原菌的分离纯化

采用组织分离法[19]分离病原菌。具体为用无

菌水清洗采集的发病枝条,晾干后从病健交界处切取 0.5 cm×1 cm 的长方形组织块,先用体积分数 1%的 NaClO 消毒 30 s,再用体积分数 75%的乙醇浸泡 60 s,然后无菌水漂洗 3 次,置于无菌滤纸上晾干后放在 PDA 培养基上;25 ℃培养 2～3 d 后,从边缘位置挑取少许菌丝至 PDA 平板,多次纯化直至获得纯培养,用直径 7 mm 打孔器打取菌饼置于 PDA 斜面培养,4 ℃保存备用。

1.3 分离物的致病性测定

致病性测定采用孢子悬浮液划伤接种和孢子悬浮液无伤接种[20],叶片与果实采用离体接种法,枝干进行活体接种。具体为:从培养 7 d 的分离物菌落边缘取 10 个菌饼置于 PDB 培养液中,25 ℃、180 r/min 振荡培养 7 d 获得病原菌孢子悬浮液。用体积分数 75%的乙醇对核桃叶片及枝干进行消毒后用无菌水冲洗,待自然风干后用无菌针轻刺以制造微伤口,无伤接种不制造伤口;用无菌棉花蘸取孢子悬浮液接种于伤口处,无菌水处理为对照,重复 3 次;于温度 25 ℃、相对湿度 80%的人工气候室中培养,观察核桃的发病情况。待样本出现核桃炭疽病的典型症状后,采用组织分离法对发病部位进行病原菌的再分离,观察菌落形态、颜色等培养性状和孢子形态特征。

1.4 病原菌 HT14 的鉴定

1.4.1 形态学鉴定 将分离物 HT14 在 PDA 平板上 25 ℃暗培养 7 d,观察并记录菌落颜色和形态;用 SNA 培养基诱导产孢,培养 7 d 后用光学显微镜(Axio Lab. A1,Carl Zeiss,Germany)观察孢子形态特征,并测量孢子大小,重复测定 50 个孢子,取平均值。

1.4.2 多基因系统发育分析 病原菌 DNA 提取:选用基因组 DNA 提取试剂盒(D3390-01,Omega Bio-Tek 公司)提取病原菌 DNA。

PCR 扩增:利用特异性引物 ACT-512F/ACT-783R、CYLH3F/CYLH3R、GDF/GDR、T1/βt2b、ITS1/ITS4 和 CHSI-79F/CHSI-354R[20] 对真菌的肌动蛋白基因(actin gene,ACT)、组蛋白 H3 基因(histone H3 gene,HIS3)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene,GAPDH)、β-微管蛋白基因(β-tubulin gene,TUB2)、核糖体 DNA 内部转录间隔区(internal transcribed spaces,ITS)和几丁质合成酶 1 基因(chitin synthase 1 gene,CHS1)进行 PCR 扩增与测序,引物序列详见表 1,引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系:Mix(2×)12.5 μL,上下游引物各 1 μL,DNA 模板 1 μL,ddH_2O 9.5 μL。PCR 反应程序:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,退火温度下退火 30 s(具体退火温度详见表 1),72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,送上海生工生物技术有限公司进行测序分析。将测序所得多基因序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,按照 *ITS-ACT-HIS-GAPDH-TUB2-CHS1* 顺序使用 SeqMan 进行多基因序列首尾拼接,用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(neighbour-joining,N-J)构建系统发育树,使用自引导法进行置信度检测,重复次数 1 000 次。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primer information used in this study

基因名称 Gene name	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)	退火温度/℃ Annealing temperature
ITS	ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC	56
HIS3	CYLH3F:AGGTCCACTGGTGGCAAG CYLH3R:AGCTGGATGTCCTTGGACTG	58
CHS1	CHS1-79F:TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG CHS1-354R:TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	60
ACT	ACT-512F:ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC ACT-783R:TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	58
TUB2	T1:AACATGCGTGAGATTGTAAGT βt2b:ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	59
GAPDH	GDF:GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA GDR:GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT	58

1.5 病原菌 HT14 的生物学特性测定

1.5.1 碳源对菌丝生长及产孢量的影响 基于 Czapek 培养基[21],将原基础配方中 2%蔗糖(基础碳源)分别替换为等量的葡萄糖、可溶性淀粉、甘露醇、麦芽糖和乳糖,设置不添加任何碳源处理为空白对照(CK)。25 ℃暗培养 7 d 后,采用十字交叉法测

量菌落直径，5 mL 无菌水冲洗菌丝后通过血球计数板对产孢量进行统计，试验重复 3 次，取平均值。

1.5.2　氮源对菌丝生长及产孢量的影响　基于 Czapek 培养基，将原基础配方中的硝酸钠（基础氮源）分别替换为等量的蛋白胨、酵母浸粉、尿素、甘氨酸、氯化铵、硫酸铵，设置不添加任何氮源处理为空白对照组（CK）。25 ℃暗培养 7 d 后，测定菌落直径和产孢量，方法同 1.5.1 节。

1.5.3　pH 对菌丝生长及产孢量的影响　将病原菌接种于不同 pH 值（4.0，5.0，6.0，7.0，8.0，9.0，10.0）的 Czapek 培养基中央，25 ℃暗培养 7 d 后，测量菌落直径和产孢量，方法同 1.5.1 节。

1.5.4　光照对菌丝生长及产孢量的影响　将病原菌接种于 Czapek 培养基中央，分别在全光照、12 h 光照/12 h 黑暗、全黑暗、自然光等 4 种光照条件下培养 7 d，测量菌落直径和产孢量，方法同 1.5.1 节。

1.5.5　温度对菌丝生长及产孢量的影响　将病原菌接种于 Czapek 培养基中央，分别置于 5，15，20，25，28，30，37 ℃恒温培养箱培养 7 d，测量菌落直径和产孢量，方法同 1.5.1 节。

1.5.6　致死温度测定　取 1 个直径 7 mm 的菌饼放入 2 mL 离心管中，分别在 40，45，50，55，60 ℃金属浴中处理 10 min，待菌饼冷却后将其接种到 PDA 培养基上培养，观察不同温度处理下菌丝的生长状况，初步确定菌丝的致死温度区间，随后再以 1 ℃为梯度进一步测定菌丝的致死温度[22]。

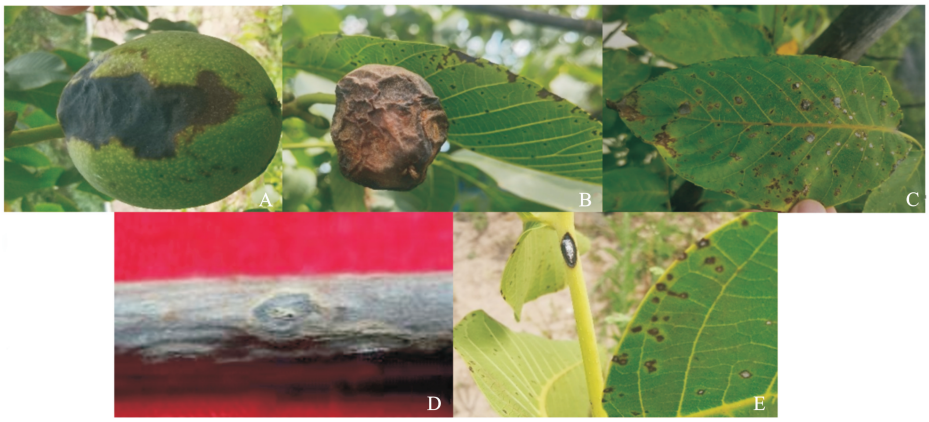
1.6　数据处理与分析

采用 SPSS 17.0 软件统计和分析试验数据，采用新复极差法（MRT）进行差异显著性检验，采用 Origion 2024 软件绘图。

2　结果与分析

2.1　核桃炭疽病的田间症状

调查发现，核桃炭疽病主要危害核桃的枝干、叶片和果实，其中果实发病部位呈黑色不规则的凹陷病斑（图 1-A），严重时全果皱缩呈黑褐色（图 1-B）；发病叶片上有不规则黑斑（图 1-C）；发病枝干部位形成近椭圆形病斑，略微凹陷，边缘明显呈黑褐色，中央颜色较浅（图 1-D）；发病嫩梢也呈椭圆形病斑，病斑边缘呈黑色，向内逐渐变浅（图 1-E）。



A. 发病果实；B. 全果发病；C. 发病叶片；D. 发病枝干；E. 发病嫩梢。

A. Diseased fruit；B. Diseased whole fruit；C. Diseased leaves；D. Diseased branches；E. Diseased young shoots.

图 1　核桃炭疽病的田间症状

Fig. 1　Field symptoms of walnut anthracnose

2.2　核桃炭疽病病原菌的分离纯化及其致病性测定

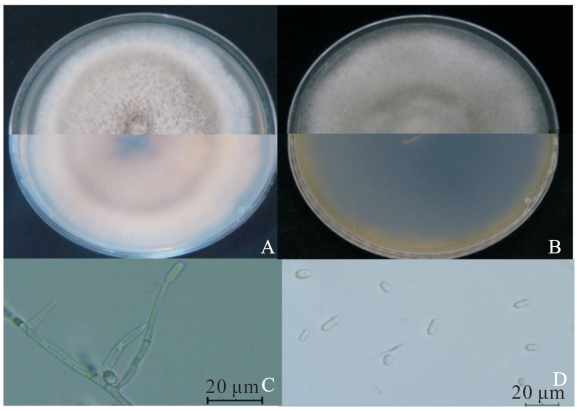
采用组织分离法，从采集的核桃炭疽病病样中分离得到 14 株分离物，分别为 HT1～HT14，其中 HT2、HT10 和 HT14 等 3 株为疑似炭疽菌分离物。致病性测定结果发现，菌株 HT2 只在有伤离体叶片及果实上发病，病斑呈棕褐色，病斑中央变薄；在有伤离体枝干上未发病，无伤情况下均未发病。菌株 HT10 在果实上接种未发病；在核桃叶片及其枝干有伤接种后均发病，有伤接种后离体叶片病斑呈黑色，活体枝干病斑呈均匀的黑色椭圆形，病斑较大，未见凹陷，与田间发病症状不同。菌株 HT14 有伤接种与无伤接种叶片均发病，接种部位产生黑色病斑，与田间症状相似；在核桃活体枝干上有伤接种 4 d 发病，接种部位出现褐色斑点，之后逐渐扩展为椭圆形病斑，病斑边缘呈黑褐色，内部颜色变浅呈褐色，与田间症状相似；无伤接种也产生与田间相似的症状，接种第 45 天整枝枯死。说明分离物 HT14 在核桃叶片、果实与枝干上形成的病斑与田间症状相似。对发病部位进行病原菌再分离，并将所得分离物与接种的原始菌株进行比较，发现二者的菌落形

态与孢子形态一致,表明菌株 HT14 为甘肃省陇南市康县核桃炭疽病的致病菌。

2.3 病原菌 HT14 的鉴定

2.3.1 形态学鉴定 菌株 HT14 在 PDA 培养基上形成的菌落呈圆形,初期菌落白色长绒毛状,7 d 后菌落中央呈浅灰色,中间菌丝发达凸起向边缘扩散,颜色为深灰色,边缘呈白色稀疏绒毛状,菌落背面由深至浅形成同心轮纹状(图 2-A);15 d 后菌落正面呈灰色,背面呈灰绿色(图 2-B);单细胞分生孢子为圆柱形或卵形,光滑,无色,大小为(14.43～8.29) μm×(4.71～2.61) μm(图 2-D)。根据形态特征将 HT14 菌株初步鉴定为刺盘孢属(*Colletotrichum*)真菌。

2.3.2 基因序列分析 以菌株 HT14 的总 DNA 为模板,采用通用引物 ITS 扩增得到长度为 564 bp 的基因片段(GenBank 登录号:PP709006),用特异性引物对 *HIS*3、*CHS*1、*ACT*、*TUB*2 和 *GAPDH* 进行 PCR 扩增并测序,分别得到长度为 406,288,266,753 和 279 bp 的基因片段(GenBank 登录号分别为 PP760162、PP760161、PP760159、PP760160、PP760163)。将相应序列进行比对,下载同源序列,以薯毛链孢(*Monilochaetes infuscans*)作为外群,通过 MEGA 7.0 中的 N-J 法构建多基因联合系统发育树。结果(图 3)发现,菌株 HT14 与松针刺盘孢(*Colletotrichum fioriniae*)聚为一支,支持率 99%。结合形态学特征,将菌株 HT14 鉴定为松针刺盘孢(*Colletotrichum fioriniae*)。



A. 菌落特征(7 d);B. 菌落特征(15 d);C. 菌丝和附着胞;D. 分生孢子形态。

A. Colony characteristics (7 d); B. Colony characteristics (15 d); C. Mycelium and appressorium; D. Conidial morphology.

图 2 菌株 HT14 的培养特征

Fig. 2 Cultivation characteristics of strain HT14

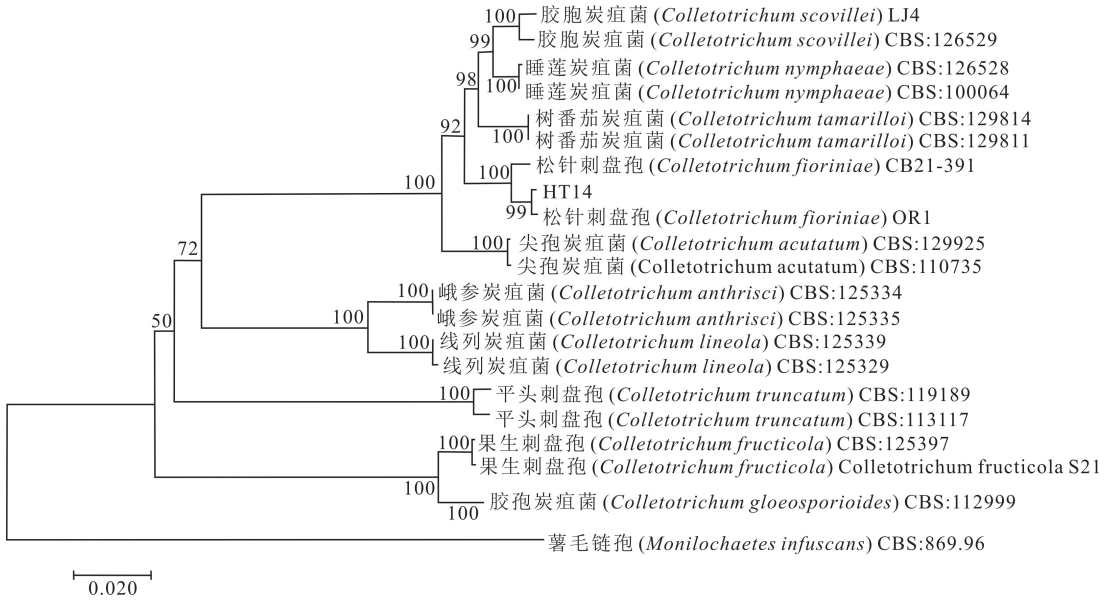
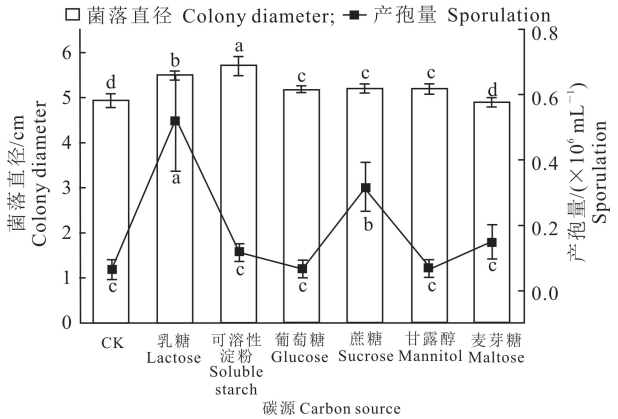


图 3 基于多基因序列构建的 HT14 菌株系统发育

Fig. 3 Phylogenesis of HT14 strain based on multi gene sequence construction

2.4 菌株 HT14 的生物学特性

2.4.1 碳源对菌丝生长和产孢量的影响 由图 4 可知,菌株 HT14 在所有供试碳源培养基上均能正常生长,但其在不同碳源培养基上的产孢量差异显著。其中以淀粉作为碳源时最利于菌丝生长,菌落直径高达 5.68 cm,显著大于其他碳源培养基($P<0.05$),但不利于孢子产生,产孢量仅为 0.12×10^6 mL^{-1};以乳糖为碳源时最利于产孢,产孢量高达 0.52×10^6 mL^{-1},显著高于其他碳源($P<0.05$)。综合菌丝生长和产孢情况,选择以乳糖为最佳碳源进行培养。



不同小写字母表示同一指标不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

Different lowercase letters indicate significant differences between different treatments of the same indicator($P<0.05$). The same below.

图 4　不同碳源对 HT14 菌丝生长和产孢量的影响

Fig. 4　Effects of different carbon sources on the growth and spore production of HT14

2.4.2　**氮源对菌丝生长和产孢量的影响**　由图 5 可知，HT14 在不同氮源培养基上均能生长，但不同氮源处理下菌丝生长和产孢量存在差异。其中以硝酸钠（基础氮源）作为氮源时，菌株 HT14 的菌丝生长最为迅速，其菌落直径与产孢量分别为 5.72 cm 和 10.07×10^6 mL^{-1}，均显著高于其他氮源处理（$P<0.05$）；以酵母浸粉为氮源时，其菌丝生长及产孢情况也较好。

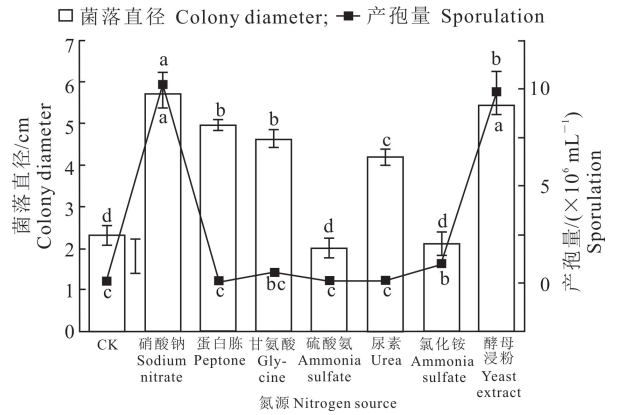


图 5　不同氮源对 HT14 菌丝生长和产孢量的影响

Fig. 5　Effects of different nitrogen sources on the growth and spore production of HT14

2.4.3　**pH 对菌丝生长和产孢量的影响**　图 6 显示，在 pH 为 4.0～10.0 条件下，HT14 菌丝均能正常生长，但在酸性（pH 4.0～6.0）条件下，HT14 菌丝生长被抑制。其中当 pH 为 8.0 时，菌落直径最大（7.77 cm），产孢量最小（0.28×10^6 mL^{-1}）；但当 pH 为 4.0 时，菌落直径最小（5.91 cm），产孢量为 0.69×10^6 mL^{-1}；当 pH 为 5.0 时，产孢量达到最大（0.96×10^6 mL^{-1}），说明 HT14 在酸性条件下的产孢量显著大于碱性条件下的产孢量（$P<0.05$）。

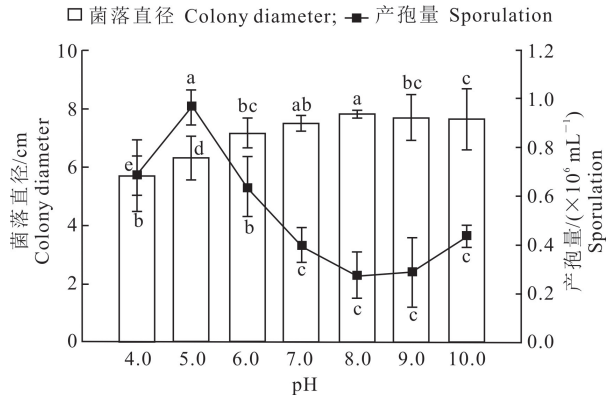


图 6　pH 对 HT14 菌丝生长和产孢量的影响

Fig. 6　Effects of different pH on the growth and spore production of HT14

2.4.4　**光照对菌丝生长和产孢量的影响**　图 7 显示，在 4 种不同的光照条件下，病原菌 HT14 菌丝均能正常生长，但不同光照处理对产孢量的影响存在显著差异。在全光照处理时产孢量最高（0.80×10^6 mL^{-1}），显著大于其他光照处理（$P<0.05$）；自然光下的产孢情况最差。

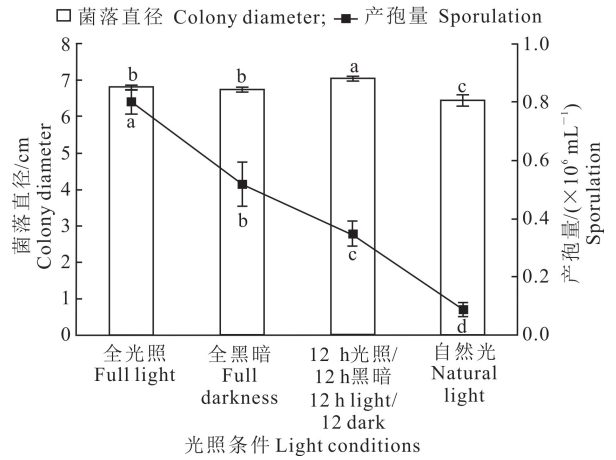


图 7　光照对 HT14 菌丝生长和产孢量的影响

Fig. 7　Effects of different light on the growth and spore production of HT14

2.4.5　**温度对菌丝生长和产孢量的影响**　图 8 表明，HT14 在 5 和 37 ℃生长情况较差，在 15～30 ℃生长情况良好，在 25 ℃时菌落直径和产孢量分别达 6.52 cm 和 2.25×10^6 mL^{-1}，均显著大于其他温度处理（$P<0.05$），表明 25 ℃是 HT14 菌丝生长与产孢的最适温度。

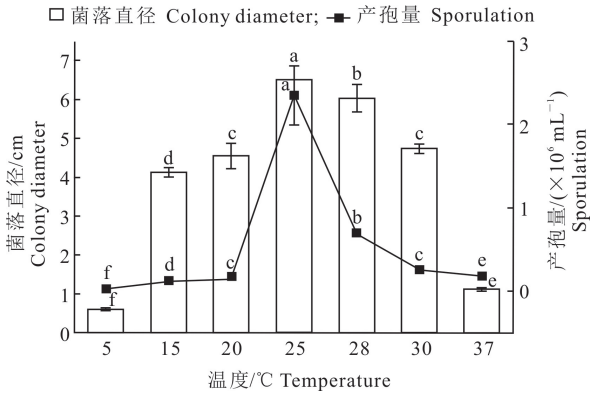


图 8 温度对 HT14 菌丝生长和产孢量的影响

Fig. 8 Effects of different temperature on the growth and spore production of HT14

2.4.6 菌株 HT14 的致死温度 将 HT14 菌饼加入 2 mL 离心管,分别在 40,45,50,55,60 ℃金属浴中处理 10 min 后,待菌饼冷却后接种到 PDA 培养基上 25 ℃暗培养。结果表明 50 ℃处理的菌饼可以在 PDA 培养基上正常生长,55 ℃处理的菌饼在 PDA 培养基上不再生长,初步确定 HT14 的致死温度范围为 50～55 ℃。随后将 HT14 菌饼分别在 50,51,52,53,54 和 55 ℃金属浴中处理 10 min,待菌饼冷却后接种到 PDA 培养基上 25 ℃暗培养。结果发现,50 和 51 ℃处理的 HT14 菌饼在 PDA 培养基均能生长,52 ℃及以上温度处理的 HT14 菌饼在 PDA 培养基上停止生长,表明 HT14 的致死温度为 52 ℃。

综上所述,HT14 菌株的最适生长条件为:以淀粉为碳源,硝酸钠为氮源,pH 8.0,全光照,培养温度 25 ℃;其产孢最适条件为:以乳糖为碳源,硝酸钠为氮源,pH 5.0,全光照,培养温度 25 ℃。该菌株对高温敏感,52 ℃高温处理 10 min 即可完全抑制其活性。

3 讨 论

笔者 2023 年对康县核桃种植区开展病害调查时发现,疑似由松针刺盘孢侵染引起的核桃炭疽病发病严重,不仅为害核桃叶片,也为害枝条和果实,严重影响当地核桃产业发展。作为全球排名第八的致病真菌[23],炭疽菌属真菌引起的炭疽病是制约核桃产业发展的主要病害之一。WANG 等[14]研究发现,河南、湖北、山东和陕西核桃炭疽病的主要致病菌为 *C. gloeosporioides*,为害核桃果实和叶片;林珊宇等[24]研究发现,由胶孢炭疽菌侵染引起广西石漠化地区核桃炭疽病,主要为害叶片、芽、嫩梢和果实,保湿处理后病斑部位产生橘红色分生孢子团;汪筱雪[25]、何兴文等[26]和曹春霞等[27]研究发现,广西、重庆与湖南地区核桃炭疽病的主要致病菌均为胶孢炭疽菌。目前国内关于松针刺盘孢侵染引起的核桃病害报道较少,ZHU 等[28]2015 年首次报道由松针刺盘孢引起的广西核桃叶斑病,发病叶斑中心呈灰白色,边缘呈深褐色,且边缘有棕褐色晕圈,这与本试验中田间核桃叶片的发病症状相似,但该研究未报道松针刺盘孢菌是否侵染核桃果实和枝条。常君等[29]研究发现,松针刺盘孢侵染可引起薄壳山核桃黑斑病。已有研究表明,松针刺盘孢也可引起其他植物病害,如秦绍钊等[30]研究发现,在贵州油茶病叶上获得的病原菌菌落形态与本研究相似,呈灰色,但未见分生孢子堆;松针刺盘孢在福建省为害砂梨时菌落呈浅红色,且产生肉眼可见的橘色分生孢子团[31],但本研究未观察到病原菌的分生孢子堆,这可能与当地气候有关。广西、福建气候潮湿,导致这两个地区分离出的病原菌易产生分生孢子堆,针对这一情况,在陇南地区雨季来临前可以采取相应措施进行预防。

明确致病菌种类是实现有针对性预防的前提,但炭疽病菌仅依靠形态学特征很难准确鉴定到种,且某些复杂物种的支持率较低,仅利用 ITS 区域也无法有效识别[32]。随着分子生物学技术的发展,形态学特征与多基因联合分析相结合已经成为目前炭疽菌分类鉴定的主要途径[33-35]。目前炭疽菌鉴定有足够分辨率的基因,包括 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)、钙调素基因(CAL)、肌动蛋白基因(ACT)、β-微管蛋白基因(TUB2)和几丁质合成酶 1 基因(CHS1)、组蛋白 H3 基因(HIS3)等,本试验以 *ITS*、*ACT*、*HIS*、*GAPDH*、*TUB2* 和 *CHS1* 等多个基因联合分析并构建系统发育树,并结合形态特征,将菌株 HT14 鉴定为松针刺盘孢(*Colletotrichum fioriniae*)。

明确 HT14 的生物学特性可以进一步了解陇南地区核桃炭疽病的发生和流行规律,以更好地制定相应防治措施。本试验结果表明,乳糖最适于 HT14 菌丝生长及产孢,这与雷娇娇等[36]对贵阳花溪茶树炭疽病菌(*C. gloeosporioide*)的研究结果一致;硝酸钠为最佳氮源,这与孙明艳等[37]对广西横州市茉莉叶部炭疽病菌 HL6-1(*C. Siamense*)的研究结果一致;本研究还发现,25 ℃和 pH 8.0 是 HT14 菌丝最适生长条件,且 25 ℃时其产孢量也达到最大,在此条件下核桃炭疽病发病情况会加重,应

采取措施进行相应处理。pH 5.0 时最适宜产孢，雨水略带酸性有利于孢子产生并进一步带动其传播，因此在当雨季来临时应注意加强病害监测和防控措施，避免病原菌在潮湿环境中大量繁殖和扩散。虽然 24 h 全光照较适宜 HT14 菌丝生长，但不同光照情况对菌丝生长的影响较小，这与但雨柔等[38]对黄精炭疽病菌（*C. fioriniae*）生物学特性的研究结果一致。本研究结果还表明，HT14 的致死温度为 52 ℃，这与蒋朝阳等[39]报道的毁灭炭疽菌 NX1-1（*C. destruc-tivum*）、NX1-3 果生刺盘孢（*C. fructicola*）和 NX2-7 暹罗刺盘孢（*C. siamense*）的致死温度相同，表明 HT14 也具有耐高温的特点。

4　结　论

本研究明确了甘肃康县核桃炭疽病的病原菌为松针刺盘孢（*Colletotrichum fioriniae*），其菌丝生长和产孢的最佳碳源为乳糖，最佳氮源为硝酸钠，最佳温度 25 ℃，最佳光照为 24 h 全光照；pH 8.0 为菌丝最适生长条件，但在 pH 5.0 时最适宜产孢；52 ℃金属浴处理 10 min 后菌株死亡，表明该菌株具有一定的耐高温能力。本研究结果为甘肃康县核桃炭疽病的诊断及其综合防治提供了参考。

[参考文献]

[1] 张琴，康明丽，赵茹，等. 青皮核桃采后腐烂病病原菌分离与鉴定[J]. 北方园艺，2024(4)：74-80.
ZHANG Q，KANG M L，ZHAO R，et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing postharvest rot disease in green walnuts[J]. Northern Horticulture，2024(4)：74-80.

[2] CORTÉS B，NÚÑEZ I，COFÁN M，et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function[J]. Journal of the American College of Cardiology，2006，48(8)：1666-1671.

[3] 罗凡，费学谦，郭少海，等. 不同干燥方式对核桃仁及核桃油理化品质的影响[J]. 中国油脂，2019，44(2)：8-13.
LUO F，FEI X Q，GUO S H，et al. Effects of drying methods on physical and chemical quality of walnut kernel and walnut oil[J]. China Oils and Fats，2019，44(2)：8-13.

[4] 李娅，韩长志. 云南省核桃产业发展现状及对策分析[J]. 经济林研究，2012，30(4)：162-167.
LI Y，HAN C Z. Analysis on present situation and strategies of walnut industry in Yunnan Province[J]. Non-wood Forest Research，2012，30(4)：162-167.

[5] 曹淇杯，刘爱林，张亚莉. 甘肃陇南核桃主要害虫的发生及防治[J]. 果树实用技术与信息，2023(6)：25-28.
CAO Q B，LIU A L，ZHANG Y L. Occurrence and control of main pests of palnut walnut in Longnan，Gansu Province[J]. Practical Technologies and Information for Fruit Trees，2023(6)：25-28.

[6] 任志勇，王明霞，吕瑞娥，等. 甘肃陇南核桃病虫害及其天敌昆虫的调查初报[J]. 中国植保导刊，2020，40(9)：56-62.
REN Z Y，WANG M X，LÜ R E，et al. A preliminary report on the pest and natural enemy of walnut in Longnan，Gansu Province[J]. China Plant Protection，2020，40(9)：56-62.

[7] 陆斌，宁德鲁. 美国核桃产业发展综述及其借鉴[J]. 林业调查规划，2011，36(3)：98-102，105.
LU B，NING D L. American walnut industry overview and its reference function[J]. Forest Inventory and Planning，2011，36(3)：98-102，105.

[8] 王明霞，闫军，赵潇. 成县核桃主要病虫害类型与防治对策[J]. 甘肃林业，2014(6)：34-35.
WANG M X，YAN J，ZHAO X. Main diseases and pests of walnut in Chengxian County and its control countermeasures[J]. Forestry of Gansu，2014(6)：34-35.

[9] 范昆，付丽，金岩，等. 山东省核桃炭疽病发生规律及危害情况调查[J]. 中国果树，2021(6)：86-88，110.
FAN K，FU L，JIN Y，et al. Investigation on occurrence and damage of walnut anthracnose in Shandong Province[J]. China Fruits，2021(6)：86-88，110.

[10] 韩长志，尹青晓，祝友朋. 核桃炭疽病研究进展[J]. 经济林研究，2023，41(4)：1-11.
HAN C Z，YIN Q X，ZHU Y P. Research status and future prospect of walnut anthracnose[J]. Non-wood Forest Research，2023，41(4)：1-11.

[11] WANG Q H，FAN K，LI D W，et al. Identification，virulence and fungicide sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* s. s. responsible for walnut anthracnose disease in China[J]. Plant Disease，2020，104(5)：1358-1368.

[12] WANG Q H，LI D W，DUAN C H，et al. First report of walnut anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola* in China[J]. Plant Disease，2018，102(1)：247.

[13] 张振，余仲东，唐明，等. 陕西省 31 株木本植物炭疽菌的 rDNA-ITS 区序列分析[J]. 林业科学，2009，45(5)：164-168.
ZHANG Z，YU Z D，TANG M，et al. ITS-rDNA sequence analysis of *Colletotrichum* in woody plants in Shaanxi Province[J]. Scientia Silvae Sinicae，2009，45(5)：164-168.

[14] WANG Q H，FAN K，LI D W，et al. Walnut anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China[J]. Australasian Plant Pathology，2017，46(6)：585-595.

[15] DA LIO D，COBO-DÍAZ J F，MASSON C，et al. Combined metabarcoding and multi-locus approach for genetic characterization of *Colletotrichum* species associated with common walnut（*Juglans regia*）anthracnose in France[J]. Scientific Reports，2018，8(1)：10765.

[16] HE L F，LI X X，GAO Y Y，et al. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. from different hosts in Shandong，China[J]. Plant Disease，2019，103(1)：34-43.

[17] 马生彪，王立，蒋晶晶，等. 蚕豆赤斑病病原菌分离鉴定及生物学特性研究[J]. 西北农业学报，2021，30(11)：1724-1732.
MA S B，WANG L，JIANG J J，et al. Isolation，identification and biological characteristics of broad bean chocolate spot[J].

Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2021,30(11):1724-1732.

[18] 方香玲,许世洋,南志标.尖孢镰刀菌苜蓿专化型厚垣孢子的诱导形成方法及萌发特性[J].草业学报,2024,33(7):130-141.
FANG X L,XU S Y,NAN Z B. Induced formation method and germination characteristics of chlamydospores by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*[J]. Acta Prataculturae Sinica,2024,33(7):130-141.

[19] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.
FANG Z D. Research methods of plant diseases[M]. 3rd ed. Beijing:China Agriculture Press,1998.

[20] 徐小文,李科,张子一,等.五倍子树炭疽病菌的分离与鉴定[J].植物病理学报,2024,54(3):664-668.
XU X W,LI K,ZHANG Z Y,et al. Identification of pathogen causing *Rhus chinensis* anthracnose[J]. Acta Psychopathological Sinica,2024,54(3):664-668.

[21] 薛婧,侯学萍,姜晓东,等.藜麦炭疽病病原菌鉴定、生物学特性及室内药剂毒力测定[J].植物病理学报,2024,54(6):1179-1187.
XUE J,HOU X P,JIANG X D,et al. Identification and biological characteristics of the pathogen causing quinoa anthracnose and indoor toxicity determination of several fungicides to the pathogen[J]. Acta psychopathological Sinica,2024,54(6):1179-1187.

[22] 曾慧兰,卢其能,曾鹏远,等.百合叶尖干枯病病原菌的鉴定、生物学特性及其对杀菌剂的敏感性研究[J].园艺学报,2018,45(12):2407-2416.
ZENG H L,LU Q N,ZENG P Y,et al. Identification,biological characteristics and sensitivity of the causal pathogen inducing leaf dieback on lily[J]. Acta Horticulturae Sinica,2018,45(12):2407-2416.

[23] DEAN R,VAN KAN J A L,PRETORIUS Z A,et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology,2012,13(4):414-430.

[24] 林珊宇,朱桂宁,贤小勇,等.广西石漠化地区核桃主要病害调查及病原菌鉴定[J].西南农业学报,2021,34(10):2158-2166.
LIN S Y,ZHU G N,XIAN X Y,et al. Investigation and pathogen identification of main diseases of walnut in Karst areas in Guangxi[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences,2021,34(10):2158-2166.

[25] 汪筱雪.广西西北部核桃真菌性病害调查及核桃炭疽菌防治研究[D].南宁:广西大学,2019.
WANG X X. Investigation on fungal diseases of walnut in northwest Guangxi and control of *Colletotrichum gloeosporioides* in walnut[D]. Nanning:Guangxi University,2019.

[26] 何兴文,林孝伦,蒲永兰,等.危害重庆市核桃主产区的两种主要病害-核桃褐斑病、炭疽病[J].植物医生,2003(2):28-29.
HE X W,LIN X L,PU Y L,et al. Two main diseases of walnut in the main producing areas of Chongqing-walnut brown spot and anthracnose[J]. Plant Doctor,2003(2):28-29.

[27] 曹春霞,姚经武,黄大野,等.湖北省郧西核桃炭疽病病原菌的分离鉴定[J].中南农业科技,2023,44(10):6-8,12.
CAO C X,YAO J W,HUANG D Y,et al. Isolation and identification of walnut anthracnose pathogen in Yunxi,Hubei Province[J]. South-Central Agricultural Science and Technology,2023,44(10):6-8,12.

[28] ZHU Y Z,LIAO W J,ZOU D X,et al. First report of leaf spot disease on walnut caused by *Colletotrichum fioriniae* in China[J]. Plant Disease,2015,99(2):289.

[29] 常君,姚小华,张亚波,等.松针刺盘孢菌侵染对薄壳山核桃不同抗性品种酶活性和酚类物质的影响[J].西南大学学报(自然科学版),2022,44(3):52-58.
CHANG J,YAO X H,ZHANG Y B,et al. Effects of *Colletotrichum fioriniae* infection on enzyme activity and phenolics content of different resistant varieties of pecan[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition),2022,44(3):52-58.

[30] 秦绍钊,洪之国,王建伟.贵州油茶炭疽病 *Colletotrichum fioriniae* 病原鉴定研究[J].福建茶叶,2019,41(8):3.
QIN S Z,HONG Z G,WANG J W. Pathogen identification of *Colletotrichum fioriniae* on *Camellia oleifera* in Guizhou[J]. Tea in Fujian,2019,41(8):3.

[31] 张慧,黄新忠,傅敏,等.福建砂梨急性花枯病病原菌的分离与鉴定[J].果树学报,2020,37(10):1537-1544.
ZHANG H,HUANG X Z,FU M,et al. Isolation and identification of the pathogen causing acute blossom blight of sand pear (*Pyrus pyrifolia*) in Fujian[J]. Journal of Fruit Science,2020,37(10):1537-1544.

[32] HONG S G,MACCARONI M,FIGULI P J,et al. Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe[J]. Mycological Research,2006,110(11):1290-1300.

[33] IWEN P C,HINRICHS S H,RUPP M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens[J]. Medical Mycology,2002,40(1):87-109.

[34] WEIR B S,JOHNSTON P R,DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. Studies in Mycology,2012,73(1):115-180.

[35] CAI L,HYDE K D,TAYLOR P,et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*[J]. Fungal Diversity,2009,39:183-204.

[36] 雷娇娇,田力,袁伟,等.贵阳花溪久安茶树炭疽病病原菌(*Colletotrichun gloeosporioides*)的分离鉴定及生物学特性[J].江苏农业科学,2020,48(11):100-105.
LEI J J,TIAN L,YUAN W,et al. Isolation,identification and biological characteristics of pathogenic bacteria of Jiuan tea tree anthracnose in Huaxi District,Guiyang City,Guizhou Province[J]. Jiangsu Agricultural Sciences,2020,48(11):100-105.

(下转第134页)

tion and their gene sequences analysis infecting *Aucuba japonica* var. *variegata*[J]. China Agricultural Science,2023,56(10):1893-1904.

[22] VALLI A,LÓPEZ-MOYA J J,GARCÍA J A. Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family *Potyviridae*[J]. Journal of General Virology,2007,88(3):1016-1028.

[23] JONES D R. Plant viruses transmitted by thrips[J]. European Journal of Plant Pathology,2005,113(2):119-157.

[24] VALOUZI H,SHAHMOHAMMADI N,GOLNARAGHI A,et al. Genetic diversity and evolutionary analyses of potyviruses infecting narcissus in Iran[J]. Journal of Plant Pathology,2021,104(1):1-14.

[25] D'ATTOMA G,MINAFRA A,SALDARELLI P,et al. Molecular evidence for the presence of wisteria vein mosaic virus in Italy:shedding light on genetic diversity and evolutionary dynamics of virus geographic populations[J]. Agriculture,2023,13(5):1090.

[26] SLATKIN M,BARTON N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow[J]. Evolution,1989,43(7):1349-1368.

[27] ROZAS J,FERRER-MATA A,SANCHEZ-DELBARRTO J C,et al. DnaSP 6:DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. Molecular Biology and Evolution,2017,34(12):3299-3302.

(责任编辑:陈丽)

(上接第124页)

[37] 孙明艳,刘可丹,李春牛,等.一种茉莉炭疽病病原菌的鉴定、生物学特性及药剂筛选[J].热带农业科学,2024,44(3):41-47.
SUN M Y,LIU K D,LI C N,et al. Identification,biological characterization,and fungicide screening of pathogens causing anthracnose in *Jasminum sambac*[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture,2024,44(3):41-47.

[38] 但雨柔,马万里,汤子萱,等.多花黄精松针炭疽菌生物学特性及防治药剂筛选[J].中药材,2023,46(8):1876-1881.
DAN Y R,MA W L,TANG Z X,et al. Biological characteristics of pine needle anthracnose of *Polygonatum cyrtonema* and screening of control agents[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2023,46(8):1876-1881.

[39] 蒋朝阳,于泽洋,杨花,等.宁夏地区葡萄炭疽病病原菌鉴定及生物学特性研究[J].西北农业学报,2024,33(6):1112-1121.
JIANG Z Y,YU Z Y,YANG H,et al. Identification and biological characteristics of *Colletotrichum* species causing anthracnose on grapevine in Ningxia[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2024,33(6):1112-1121.

(责任编辑:陈丽)