

引起葡萄叶斑病的链格孢种类的初步鉴定

王彩霞^{1,2} 李兴红² 魏艳敏¹ 燕继晔² 王 勇³ 张 玮^{2*}

(1. 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室; 农业部华北都市农业重点实验室, 北京 100097; 3. 贵州大学农学院, 贵阳 550025)

摘要: 为明确北京市大兴区、顺义区和山西省襄汾县葡萄树上叶斑病的病原菌, 利用组织分离法对病样进行分离纯化, 采用多基因系统发育学分析(ITS, *Alt a 1* 和 *gpd*)和形态学对纯化后菌株进行鉴定, 并结合柯赫氏法则对其进行验证。结果表明, 共获得37株链格孢属真菌菌株, 分属链格孢 *Alternaria alternata*、葡萄链格孢 *A. viniferae* 和乔木链格孢 *A. arborescens*, 柯赫氏法则检测结果显示接种菌株对所接叶片与果穗均具致病性, 说明这3种链格孢种均为葡萄叶斑病的病原菌; 葡萄链格孢为主要的病原菌, 有28株, 故将该类病害命名为葡萄链格孢叶斑病; 此外, 该类菌株在2~40℃之间均能生长, 25℃为最适生长温度。

关键词: 葡萄; 叶斑病; 链格孢属; 病原菌鉴定

Identification of *Alternaria* species causing leaf spots in grapes

Wang Caixia^{1,2} Li Xinghong² Wei Yanmin¹ Yan Jiye² Wang Yong³ Zhang Wei^{2*}

(1. College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. Key Laboratory of Urban Agriculture (North China), Ministry of Agriculture; Beijing Municipal

Key Laboratory for Environmental Friendly Management on Pests of North China Fruits,

Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural

and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. College of Agriculture,

Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China)

Abstract: To determine the causes of the leaf spot symptoms observed in grape vineyards in Daxing and Shunyi Districts of Beijing City and Xiangfen County of Shanxi Province, tissue isolation method, multi-gene phylogenetic analysis (ITS, *Alt a 1* and *gpd*) and morphological study were used to identify the species of pathogens. Koch's postulates were used to verify the results. In total, 37 isolates of *Alternaria* species, *A. altanata*, *A. viniferae* and *A. arborescens* were isolated. All three *Alternaria* species were pathogens of grape leaf spot disease. *Alternaria viniferae* was the dominant species with 28 isolates. Therefore, the disease was named as grape *Alternaria* leaf spot disease. In addition, the current study showed that the pathogen could grow under a wide range of temperature from 2 to 40℃, and the optimum temperature for the three species was 25℃.

Key words: grape; leaf spot; *Alternaria*; pathogen identification

链格孢属真菌对生态环境和基质的适应性强, 在世界范围内广泛分布, 在已描述的500个链格孢种中, 95%以上寄生在植物上(曲文文等, 2012;

Woudenberg, 2015; 赵艳琴等, 2017), 其引起的植物病害在我国农业生产上比较突出, 如甘肃省河西走廊的白兰瓜叶斑病, 遍布全国的番茄、马铃薯等茄科

基金项目: 国家葡萄产业技术体系专项(CARS-29-bc-2)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhwei1125@163.com

收稿日期: 2017-08-29

蔬菜的早疫病与烟草赤星病等(张天宇, 2003; 郭倩倩等, 2013)。

葡萄为葡萄科葡萄属的一种落叶藤本植物, 原产于欧洲和亚洲西部(贺普超, 2005), 是重要的经济水果之一, 我国葡萄产量和种植面积长期位居世界前列(刘涛等, 2002; Hong et al., 2008)。目前我国已经报道的葡萄真菌性叶斑病主要有褐纹病(范咏梅等, 2007; 宋卫翠等, 2014)、大褐斑病(柴兆祥, 2001; 王国珍等, 2002; 梁春浩等, 2010)、小褐斑病(王国珍等, 2002; 梁春浩等, 2010)、轮斑病(姚敏, 2015)、壳针孢叶斑病(王忠跃, 2009)、环纹叶枯病(王忠跃, 2009)、假尾孢叶斑病(Liang et al., 2016)和尾孢叶斑病(郭英兰和刘锡璁, 2003), Jayawardena et al. (2016)在我国首次分离得到1个引起葡萄叶斑病的新种 *Neopestalotiopsis vitis*。国外还报道了角斑叶焦病、叶枯病、黑痣病、枝孢叶斑病以及杂生叶斑病等6种葡萄真菌性叶斑病(Deighton, 1976; Wilcox et al., 2015)。目前国外关于链格孢属侵染葡萄的报道很多(Casieri et al., 2009; González & Tello, 2011), 国内也有关于链格孢属侵染葡萄的报道(Tao et al., 2014; 杨超等, 2017), 但是自然条件下链格孢属侵染引起葡萄叶斑病的研究未见报道。

近几年葡萄真菌性叶斑病的影响越来越严重并出现一些新症状, 如斑疹状叶斑、穿孔性叶斑、使葡萄早期落叶。本课题组于2016年8—11月, 在北京市和山西省葡萄园的不同葡萄品种上发现了1种新病害, 其病斑为褐色, 边缘颜色较深, 形状不规则, 病斑周围有黄色晕圈。为明确引起该病害的病原菌, 对其进行了病样的采集和分离, 并采用多基因系统发育分析及形态学对分离得到的病原菌进行鉴定, 同时对其生物学特性进行分析, 旨在为该叶斑病的发生和防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及寄主: 2016年8—11月从北京市大兴区、顺义区和山西省襄汾县共采集了具有褐色、不规则形、边缘加深且有黄色晕圈的20片葡萄病叶, 其中大兴区6片, 均为巨玫瑰病叶; 顺义区6片, 夏黑、巨峰和醉金香各2片病叶; 襄汾县8片, 均为晚黑宝病叶, 将其带回实验室进行病原菌分离。致病性测定所需叶片与花穗均为夏黑葡萄品种, 采自北京葡萄与葡萄酒工程技术研发中心。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose

agar, PDA)培养基: 马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15~18 g, 加水定容至1 000 mL; 马铃薯胡萝卜琼脂(potato carrot agar, PCA)培养基: 马铃薯200 g、胡萝卜200 g、琼脂15~18 g, 加水定容至1 000 mL。

试剂及仪器: 十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethylammonium bromide, CTAB), 美国Amresco公司; 2×Taq Master Mix和DNA Marker, 北京博迈德基因技术有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。Axio Imager Z2显微镜, 德国Carl Zeiss公司; Bio-Rad Gel Doc™ XR+凝胶成像仪、C1000 Touch™ Thermal Cycler PCR仪, 美国Bio-Rad公司; Eppendorf AG 5424离心机, 德国Eppendorf公司。

1.2 方法

1.2.1 葡萄叶斑病病原菌的分离与纯化

采用常规组织分离法(方中达, 1998)对具有典型症状的叶片进行分离。首先在病健交界处剪取边长为5 mm的方块, 用75%酒精消毒30 s, 无菌水清洗3次, 吹干后置于PDA平板上, 将培养皿置于温度25℃、12 h黑暗/12 h光照条件的培养箱中进行培养, 采用单孢分离法进行菌种纯化, 4℃保存备用。每种病原菌随机选取2株纯化后的菌株进行相关试验, 共选取了6株菌株, 分别命名为JZB311001、JZB311017、JZB311042、JZB311054、JZB311080和JZB311110。

1.2.2 葡萄叶斑病病原菌的分子生物学鉴定

将所得菌株在PDA平板上培养7 d, 用灭菌牙签将菌丝刮下, 放在1.5 mL的离心管中, 采用CTAB法提取DNA。以基因组DNA为模板, 分别利用rDNA转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)通用引物ITS-4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')/ITS-5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')(White et al., 1990)、链格孢属的主要过敏原*Alt a 1*基因的引物Alt-F(5'-ATGCAGTTCACCACCATCGC-3')/Alt-R(5'-ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC-3')(Hong et al., 2005)和3-磷酸甘油醛脱氢酶*gpd*基因的引物*gpd*-1(5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3')/*gpd*-2(5'-GCCAAGGAGTTGGTTGTGC-3')(Berbee et al., 1999)来进行PCR扩增, 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μL PCR反应体系: 25 μL Taq DNA聚合酶、19 μL ddH₂O、10 μmol/L上下游引物各2 μL、模板DNA 2 μL。利用引物ITS-4/ITS-5进行PCR扩增, 扩增反应程序: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 变性到延伸共35个循环; 72℃

总延伸 10 min。利用引物 Alt-F/Alt-R 进行 PCR 扩增,扩增反应程序:94℃预变性 2 min;94℃变性 1 min,57℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,变性到延伸总共 35 个循环;72℃总延伸 10 min。利用引物 *gpd-1/gpd-2* 进行 PCR 扩增,扩增反应程序:94℃预变性 2 min;96℃变性 1 min,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,变性到延伸共 35 个循环;72℃总延伸 10 min。

用 1.5% 琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳检测,使用凝胶成像系统进行拍照。最后将条带清晰的 PCR 产物送至北京博迈德基因技术有限公司进行测序。在 NCBI 上对测序结果进行 BLAST 比对分析,在 GenBank 中下载相关参考序列,利用 MAFFT 7 软件 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato & Toh, 2008) 对所有序列进行比对,利用 BioEdit 7.0.9.0 软件按照 *Alt a 1* 和 *gpd* 的顺序进行多基因序列整合,必要的时候可以手动截齐 (Hall, 1999)。利用 ALTER 软件将文件格式转换成 nexus 格式。最后将序列载入 PAUP 4.0b10 软件 (Swofford, 2002) 中,用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建系统发育树并进行系统发育分析。

1.2.3 葡萄叶斑病原菌的形态学鉴定

将纯化后的菌株在 PCA 平板上于 23℃、8 h 光照/16 h 黑暗的条件下培养 7 d (Simmons & Roberts, 1993)。每种病原菌随机选取 1 株菌株,在显微镜下观察分生孢子、分生孢子梗的形态特征及产孢表型,并测量分生孢子大小,每株菌测量 30 个。

1.2.4 葡萄叶斑病原菌的致病性测定及再分离

采用离体叶片和离体花穗接种葡萄叶斑病原菌进行致病性测定。

选取健康成熟夏黑葡萄叶片,用 75% 酒精对叶片表面消毒 30 s,用灭菌无菌水清洗 3 次,吹干备用。将纯化后的菌株在 PDA 平板上培养 7 d,用灭菌牙签将菌丝刮掉,用无菌水将孢子冲洗下来,用血球计数法配置浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液进行接种。采用滴接法进行接种,分别进行刺伤和无伤接种。每片叶子 4 个接种点,每侧 2 个,分别于主叶脉两侧且对称,一侧刺伤接种,另一侧无伤接种,每点接种孢子悬浮液 20 μ L,每个处理 9 片叶片,重复 3 次,以无菌水为空白对照。接种后将叶片置于接种盒内进行保湿。将装有叶片的接种盒置于 25℃ 培养箱中,在 90% 相对湿度下进行 24 h 黑暗培养;之后在 65% 相对湿度进行 12 h 光照/12 h 黑暗培养。观察并记录叶片的发病情况,接种部位出现褐色斑点即为开始发病,之后出现与田间相似症状即

为完全发病,同时计算叶片发病率,叶片发病率=发病叶片数/接种叶片总数 \times 100%。对病斑再次进行组织分离,观察分离物与接种菌株菌落特征,以完成柯赫氏法则验证。

选取健康盛花期夏黑葡萄花穗,消毒处理同上,并配制浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液进行接种。采用喷雾法接种,每株菌为 1 个处理,每个处理接种 3 个花穗,每个花穗接种 20 μ L 孢子悬浮液,以无菌水为空白对照,重复 3 次。将接种后花穗的穗柄置于放有无菌水的锥形瓶内保湿,将装有花穗的锥形瓶置于 25℃ 培养箱中培养,培养条件同上。观察并记录花穗的发病情况,花穗变褐即为发病,同时计算花穗发病率,花穗发病率=花穗数/接种花穗总数 \times 100%。对病穗再次进行组织分离,观察分离物与接种菌株菌落特征,以完成柯赫氏法则验证。

1.2.5 温度对葡萄叶斑病原菌菌落生长的影响

选取纯化后的菌株进行温度对菌丝生长影响的试验,共设置 2、5、10、15、20、25、30、35、40 和 45℃ 10 个温度梯度 (王斌, 2015; 王媛媛等, 2015)。用直径为 5 mm 的打孔器在 PDA 平板上已培养 5 d 的菌落上沿外边缘相同位置打取菌饼,并置于新的 PDA 平板上中进行恒温黑暗培养,每株菌为 1 个处理,每个处理 3 皿,重复 3 次。6 d 后利用十字交叉方法测量菌落直径大小。

1.3 数据分析

试验数据利用 Excel 2003 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 葡萄叶斑病原菌的分子生物学鉴定

在田间采集的 20 片葡萄叶斑病叶上共分离纯化得到 37 株链格孢属菌株。在构建的系统发育树中,以枯叶隔孢腔菌 *Pleospora herbarum* (ATCC 11681) 作为外群。将基于 *Alt a 1* 和 *gpd* 基因序列所得测序结果提交至 GenBank,获得登录号,其中利用 *Alt a 1* 所得序列长度为 307~388 bp,利用 *gpd* 所得序列长度为 418~448 bp。

系统发育树显示,37 株菌株并未完全聚在一起,其中 28 株菌株与葡萄链格孢 *A. viniferae* 聚在一起,自举支持率为 71%,2 株菌株与乔木链格孢 *A. arborescens* 聚在一起,自举支持率为 60%,7 株菌株与链格孢 *A. alternata* 聚在一起,自举支持率为 100% (图 1)。

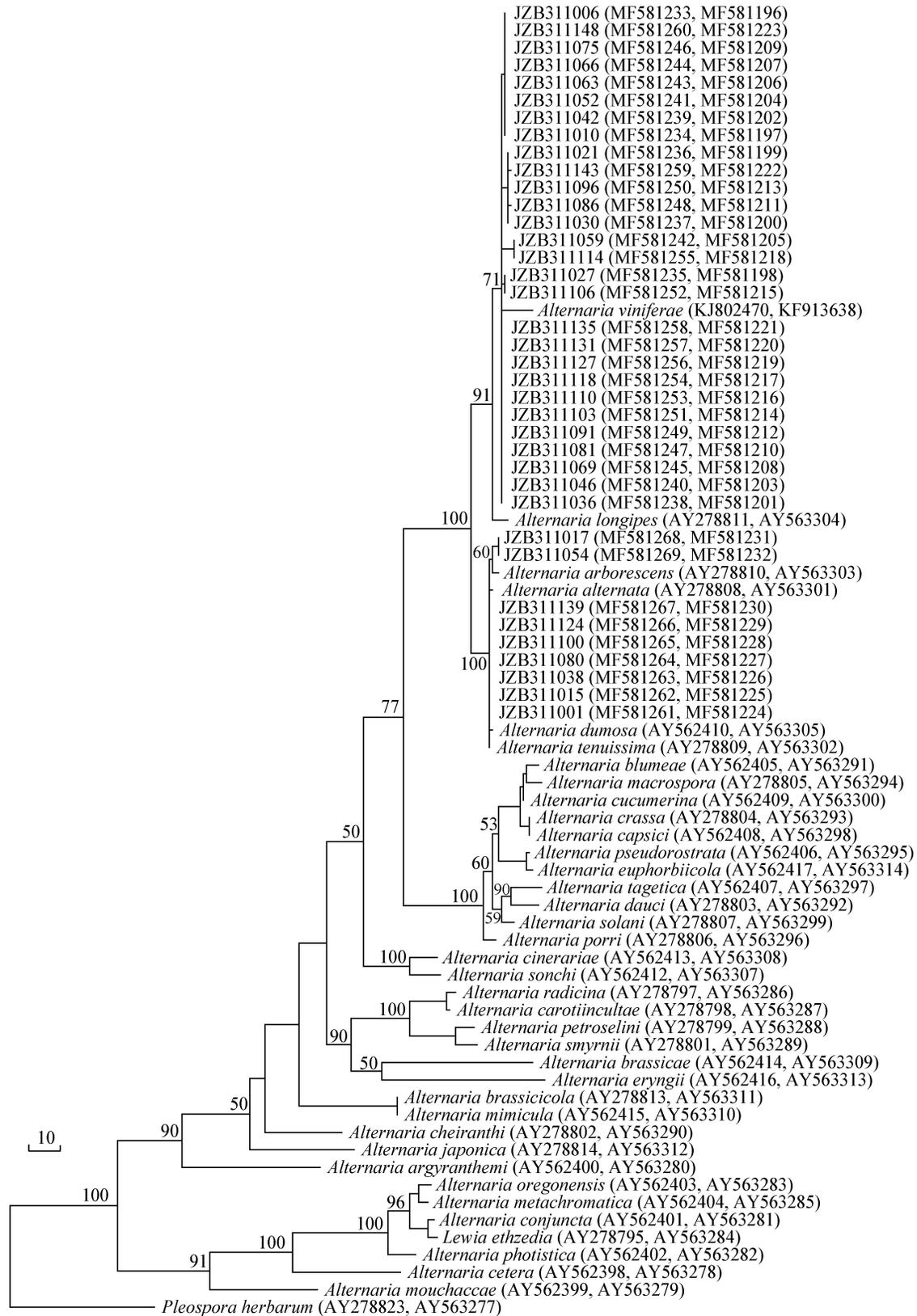


图1 利用 *Alt a 1* 和 *gpd* 基因序列基于最大简约法构建的37株菌株与其它链格孢菌的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 37 strains and related *Alternaria* sp. strains based on maximum parsimony with *Alt a 1* and *gpd* gene sequences

括号内依次为菌株的 *gpd* 和 *Alt a 1* 序列的 GenBank 登录号。The GenBank accession numbers of *gpd* and *Alt a 1* sequences of each strain are shown in brackets.

2.2 葡萄叶斑病原菌的菌落形态特征

链格孢(JZB311001):菌落颜色由无色或浅色逐渐变为浅褐色至深褐色,圆形,背面颜色较浅,具同心轮纹(图2-A~B)。分生孢子梗单生或数根簇生,直或弯曲,有隔,分枝或不分枝,淡褐色至褐色,随着连续产孢做合轴式延伸;分生孢子单生或链生,链长1~7个孢子,在细长分生孢子梗的上部形成具

短分支的分生孢子链,成树状分支状(图2-C)。淡褐色至深褐色,卵形、倒梨形、倒棍棒形或近椭圆形,分隔处略缢缩或不缢缩,有1~7个横隔膜,0~4个纵/斜隔膜,孢身大小为 $14.2\sim 44.8\ \mu\text{m}\times 8.1\sim 14.7\ \mu\text{m}$ 。短喙柱状或锥状,淡褐色,大小为 $3.4\sim 17.1\ \mu\text{m}\times 2.5\sim 5.4\ \mu\text{m}$,部分转变为产孢细胞(假喙)(图2-D~E)。

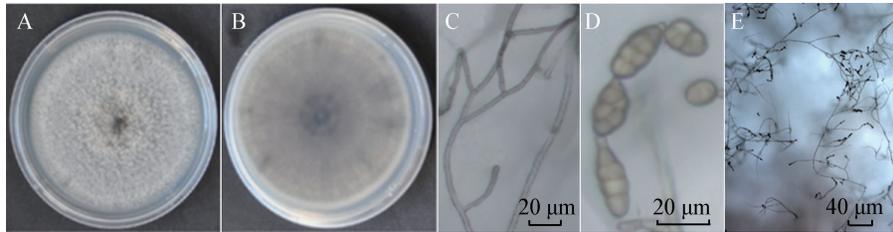


图2 链格孢在PCA培养基上的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of *Alternaria alternata* on PCA

A: 7 d时菌落正面; B: 7 d时菌落背面; C: 产孢表型; D: 分生孢子梗; E: 分生孢子。A: Front of colony at 7 d; B: reverse of colony at 7 d; C: sporulation pattern; D: conidiophores; E: conidia.

葡萄链格孢(JZB311110):菌落颜色由无色或浅色逐渐变为浅褐色至深褐色,圆形,菌丝成密绒状(图3-A~B)。分生孢子梗单生,直或弯曲,分枝或不分枝,有隔,随着连续产孢做合轴式延伸;分生孢子单生或链生,链长1~9个孢子(图3-C),不分枝,近椭圆形、倒梨形、近球形、倒棍棒形或卵形,无色、淡褐

色或黄褐色至深褐色,有1~7个横隔膜和0~5个纵/斜隔膜,分隔处略缢缩或不缢缩,孢身大小为 $16.8\sim 55.3\ \mu\text{m}\times 7.5\sim 20.0\ \mu\text{m}$ 。喙呈柱状或锥状,部分孢子侧生次生分生孢子梗,大小为 $4.3\sim 20.2\ \mu\text{m}\times 3.7\sim 5.8\ \mu\text{m}$ (图3-C~D)。

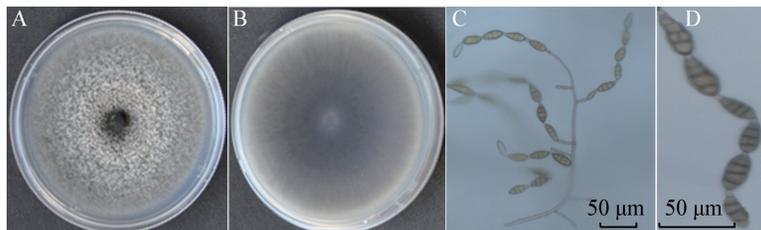


图3 葡萄链格孢在PCA培养基上的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of *Alternaria viniferae* on PCA

A: 7 d时菌落正面; B: 7 d时菌落背面; C: 分生孢子梗; D: 分生孢子。A: Front of colony at 7 d; B: reverse of colony at 7 d; C: conidia and conidiophores; D: conidia.

乔木链格孢(JZB311054):菌落颜色由无色或浅色逐渐变为浅褐色至深褐色,圆形,气生菌丝茂盛,有隔(图4-A~B)。分生孢子梗单生,分枝或不分枝,直立,直或略弯,分隔,近无色或淡褐色至褐色(图4-C)。分生孢子单生或链生,链长1~6个孢子(图4-D),产孢表型成短树枝状,分枝,做合轴式延伸,也有部分短链是由部分孢子顶端或侧面产生次生分生孢子梗而形成。分生孢子倒梨形、近椭圆形、卵形或倒棍棒形,近无色或浅褐色至褐色,有1~7个横隔膜和0~4个纵/斜隔膜,分隔处略缢缩或不缢缩,孢身大小为 $12.2\sim 40.5\ \mu\text{m}\times 7.0\sim 18.0\ \mu\text{m}$ (图4-E)。

大部分孢子有短柱状喙或假喙,较长者长度略超过孢身且分隔,有些幼孢子已有明显的喙,个别长度明显超过孢身,大小为 $2.5\sim 43.5\ \mu\text{m}\times 3.0\sim 5.2\ \mu\text{m}$,部分假喙有2个孢痕,形成短枝链。

2.3 37株供试菌株的鉴定结果及分布

根据形态学特征和分子生物学分析结果,37株分离物均被鉴定为链格孢属的3个种,即链格孢、葡萄链格孢和乔木链格孢,分别为7、28和2株。所有采集点的5个不同葡萄品种上均分离到葡萄链格孢;除北京顺义区巨峰外,所有品种上也均分离到链格孢;只有北京大兴区巨玫瑰与北京顺义区巨峰上

分离得到乔木链格孢。北京市大兴区巨玫瑰3号叶片中同时分离到了以上3种病原菌;北京市顺义区的夏黑1号、醉金香2号以及山西省襄汾县晚黑宝3号、

晚黑宝6号、晚黑宝8号叶片上均同时分离到了链格孢和葡萄链格孢,北京市顺义区巨峰1号上同时分离到了葡萄链格孢与乔木链格孢。

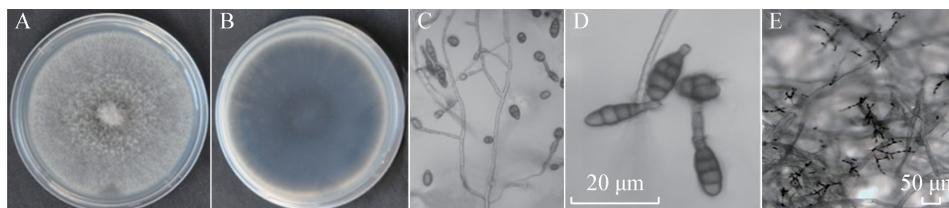


图4 乔木链格孢在PCA培养基上的形态特征

Fig.4 Morphological characteristics of *Alternaria arborescens* on PCA

A: 7 d时菌落正面; B: 7 d时菌落背面; C: 分生孢子梗; D: 产孢表型; E: 分生孢子。A: Front of colony at 7 d; B: reverse of colony at 7 d; C: conidiophores; D: sporulation pattern; E: conidia.

2.4 葡萄叶斑病病原菌的致病性测定结果

2.4.1 离体叶片接种

无伤和刺伤接种葡萄叶斑病病原菌的葡萄叶片均在接种3 d时开始发病,7 d时病斑逐渐向周边扩大,病斑颜色变深,成暗褐色,外围形成黄色晕圈,有

伤无伤的发病率均为100%(图5)。其中JZB311080发病最严重(图5-A),JZB311017发病最轻(图5-F),黄色晕圈不明显。对照叶片未发病(图5-G)。说明所接种菌株对葡萄叶片均有致病。

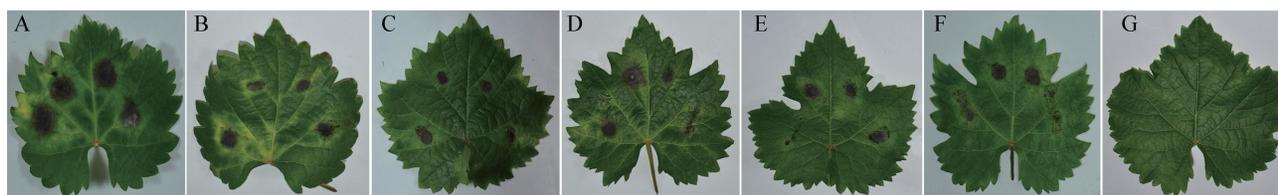


图5 室内离体葡萄叶片接种葡萄叶斑病病原菌7 d时发病症状

Fig. 5 Symptoms of grape leaves inoculated with pathogens of grape leaf spot disease *in vitro* at 7 d

A~F: 分别接种JZB311080、JZB311001、JZB311042、JZB311110、JZB311054、JZB311017菌株; G: 对照。A~F: Strains of JZB311080, JZB311001, JZB311042, JZB311110, ZB311054, JZB311017 were inoculated, respectively; G: CK.

2.4.2 离体花穗接种

葡萄花穗在接种葡萄叶斑病病原菌3 d时,果梗开始变褐,发病部位逐渐扩大,随后穗轴也开始发病变褐。5 d时已有整个花穗发病,其中JZB311054的发病率为100%(图6-A),JZB311001的发病率为50%(图6-B),JZB311110的发病率为43.3%(图6-C),JZB311042的发病率为34.4%(图6-D),JZB311080、

JZB311017未发病(图6-E~F)。对照花穗未见发病(图6-G)。对发病花穗进行再次组织分离,得到与接种菌株形态特征一样的真菌。其中JZB311001属于链格孢,JZB311042和JZB311110属于葡萄链格孢,JZB311054属于乔木链格孢,表明这3种菌均对花穗具有致病性,但致病力不同。



图6 室内离体葡萄花穗接种葡萄叶斑病病原菌5 d时发病症状

Fig. 6 Symptoms flowering ear of grape inoculated with pathogens of grape leaf spot disease *in vitro* at 5 d

A~F: 分别接种JZB3110054、JZB311001、JZB311110、JZB311042、JZB311080、JZB311017菌株; G: 对照。A~F: Strains of JZB3110054, JZB311001, JZB311110, JZB311042, JZB311080, JZB311017 were inoculated, respectively; G: CK.

2.5 温度对病原菌菌落生长的影响

所分离得到链格孢属 JZB311080、JZB311001、JZB311042、JZB311110、JZB311054 和 JZB311017 菌株在 2~40℃ 之间均可以生长,最适生长温度为 25℃,45℃ 时菌落不生长(图 7-A~C)。其中链格孢的 2 株菌株 JZB311080、JZB311001 和葡萄链格孢的

2 株菌株 JZB311042、JZB311110 的菌落生长在各温度之间均差异极显著($P<0.01$);在 2℃ 与 40℃ 之间,乔木链格孢的 JZB311054 菌株的菌落生长差异不显著,在其它温度之间均差异显著, JZB311017 菌株的菌落生长在各温度之间差异极显著($P<0.01$)。

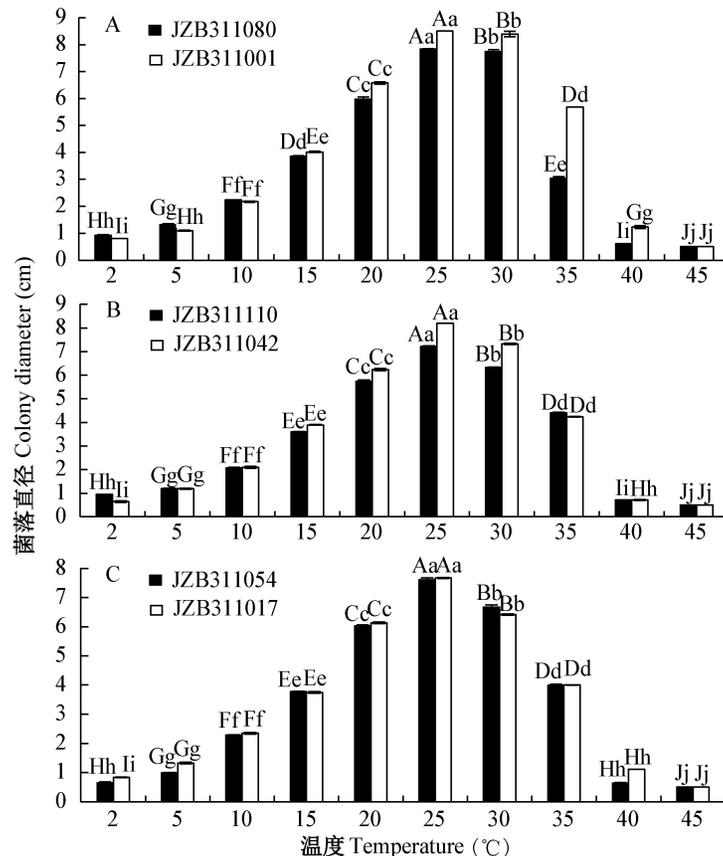


图7 不同温度对链格孢(A)、葡萄链格孢(B)和乔木链格孢(C)菌落生长的影响

Fig. 7 Effects of different temperatures on mycelial growth of *Alternaria alternata* (A), *A. viniferae* (B) and *A. arborescens* (C)

图中数据为平均数±标准误。同色柱不同大、小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 或 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different uppercase and lowercase letters on the same bars indicate significant difference at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

链格孢属真菌是世界范围内重要的植物病原真菌,种类繁多,寄主广泛,近年来其在葡萄上引起的病害引起了国内外学者关注,但关于其侵染葡萄叶片的报道还十分有限。虽然在文莱(Peregrine & Ahmad, 1982; Farr & Rossman, 2015)、美国(French, 1989; Farr & Rossman, 2015)、斯洛伐克(Kakaliková et al., 2009; Farr & Rossman, 2015)、西班牙(González & Tello, 2011; Farr & Rossman, 2015)和中国(杨超等, 2017)均有链格孢属模式种链格孢侵染葡萄的报道,但只有西班牙报道过其能引起葡萄

叶斑病(González & Tello, 2011)。我国学者 Tao et al. (2014) 于 2014 年首次在葡萄果穗上发现葡萄链格孢,并证实了该种病原菌人工接种可侵染叶片。González & Tello (2011) 首次报道了乔木链格孢可以引起葡萄叶斑病,然而该病原菌分别在瑞士葡萄枝干与果实上分离得到(Casieri et al., 2009; Farr & Rossman, 2015)。本研究结果表明,我国山西省和北京市葡萄链格孢叶斑病的病原菌种类为葡萄链格孢、链格孢与乔木链格孢,分离比例分别为 75.7%、18.9% 和 5.4%,葡萄链格孢为主要病原菌种类,这 3 种链格孢种引起我国葡萄叶斑病均为首次报道,其中

乔木链格孢为侵染我国葡萄的新链格孢种。此外,通过对葡萄叶斑病发生地点与发病品种的统计可知,这3种链格孢既能单独侵染也可复合侵染。

Weir et al. (1998) 研究结果表明,自马铃薯和番茄上分离得到的茄链格孢 *A. solani* 菌株有明显的遗传分化,进而导致致病性差异; Peever et al. (2004) 与张荣等 (2009) 研究结果也表明,链格孢种内存在明显的遗传分化,本研究结果表明葡萄链格孢、乔木链格孢和链格孢人工接种时对叶片与花穗均有致病性,但同种链格孢种对葡萄不同部位的致病力不同,种内不同菌株对葡萄同一部位的致病力也不同。接种花穗时,乔木链格孢中的 JZB311054 菌株致病力最强,发病率为 100%,而链格孢中的 JZB311001 菌株次之,为 50%;葡萄链格孢中的 2 株菌株的致病力均较弱。由此推测,同种链格孢的不同菌株对葡萄同一部位的致病性差异可能是由于链格孢种内存在遗传分化造成的,但此推测还有待于进一步深入研究。

本研究所分离得到的链格孢属菌株于 2~40℃ 之间菌落均能生长,最适温度为 25℃,这与陈凤美等 (2005) 和王斌 (2015) 报道的最适温度一致,也说明链格孢对温度有很强的适应性,任何季节都有可能引起病害,这也与葡萄链格孢叶斑病田间发生时间基本吻合,病害主要发生季节为夏季与早秋,此时的环境温度最适于病原菌的生长,有利于病害的发生。因此应在病害易发生的季节加强田间病害的调查,及时采取清除病叶、加强果园管理等措施,防止病害的大发生。在后续研究中,为明确链格孢叶斑病对我国葡萄的危害及实施相应的防控措施,需对我国主要葡萄产区的链格孢叶斑病进行普查,明确病原菌种类和优势种群,深入研究该病的发生与流行规律,为防治技术的研发奠定基础。

参 考 文 献 (References)

- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91(6): 964-977
- Casieri L, Hofstetter V, Viret O, Gindro K. 2009. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1): 73-83
- Chai ZX. 2001. Identification of grape brown spot in Lanzhou Area. *Journal of Gansu Agricultural University*, 36(1): 61-64, 99 (in Chinese) [柴兆祥. 2001. 兰州地区葡萄褐斑病发生危害及菌种鉴定. *甘肃农业大学学报*, 36(1): 61-64, 99]
- Chen FM, Liu Q, Jiang JH, Huang XH, He DN. 2005. Biological properties of endophytic fungus *Alternaria alternata* var G1009 from *Ginkgo biloba*. *Journal of Northwest Forestry University*, 20(4): 112-114 (in Chinese) [陈凤美, 刘群, 蒋继宏, 黄小花, 何冬宁. 2005. 银杏内生链格孢菌 G1009 生物学特性研究. *西北林学院学报*, 20(4): 112-114]
- Deighton FC. 1976. Three fungi on leaves of *Vitis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 67(2): 223-232
- Fan YM, Hao JZ, Zhang MZ, Zhao ZY, Wang HQ, Wu YH, Zhang J. 2007. Grape *Scolecotrichum* leaf spot disease pathogen identification and symptoms recognition in Xinjiang. *Plant Protection*, 33(3): 140-142 (in Chinese) [范咏梅, 郝敬哲, 张明智, 赵震宇, 王惠卿, 吴玉华, 张娟. 2007. 新疆葡萄褐纹病原鉴定及症状识别. *植物保护*, 33(3): 140-142]
- Fang ZD. 1998. *Research methods of plant pathology* (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [方中达. 1998. *植物病理学* (第3版). 北京: 中国农业出版社]
- Farr DF, Rossman AY. 2015. Fungal databases. Retrieved From <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. 2017-12-10
- French AM. 1989. California plant disease host index. California: California Department of Food and Agriculture Sacramento
- González V, Tello ML. 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47(1): 29-42
- Guo QQ, Yang ZH, Cui YJ, Xu J, Zhu JH. 2013. A method for molecular detection of *Alternaria solani* and its applicability to early diagnosis of potato early blight in the field. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 381-382 (in Chinese) [郭倩倩, 杨志辉, 崔亚婧, 徐进, 朱杰华. 2013. 马铃薯早疫病病原的分子鉴定与田间早期诊断. *植物保护学报*, 40(4): 381-382]
- Guo YL, Liu XJ. 2003. *Flora fungorum sinicorum*. Vol. 20, *Mycovellosiella, Passalora, Phaeoramularia*. Beijing: Science Press (in Chinese) [郭英兰, 刘锡璠. 2003. 中国真菌志. 第二十卷, 菌绒孢属 钉孢属 色链孢属. 北京: 科学出版社]
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98
- He PC. 2005. *Grape science*. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [贺普超. 2005. *葡萄学*. 北京: 中国农业出版社]
- Hong GS, Cramer RA, Lawrence CB, Lawrence CB, Pryor BM. 2005. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42(2): 119-129
- Hong SK, Wan GK, Yun HK, Choi KJ. 2008. Morphological variations, genetic diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in Korea. *Plant Pathology Journal*, 24(3): 269-278
- Jayawardena RS, Liu M, Maharachchikumbura SSN, Zhang W, Xing QK, Hyde KD, Nilthong S, Li XH, Yan JY. 2016. *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China. *Phyotaxa*, 258(1): 63-74
- Kakalíková L, Jankura E, Šrobárová A. 2009. First report of *Alternaria* bunch rot of grapevines in Slovakia. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1): 68-69

- Katoh K, Toh H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 286–298
- Liang CH, Jayawardena RS, Zhang W, Wang XG, Liu M, Liu L, Zang CQ, Xu XR, Hyde KD, Yan JY, et al. 2016. Identification and characterization of *Pseudocercospora* species causing grapevine leaf spot in China. *Journal of Phytopathology*, 164(2): 75–85
- Liang CH, Zhao KH, Liu CY, Wang L. 2010. Advances in study on grape leaf rot. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2010(S): 117–119 (in Chinese) [梁春浩, 赵奎华, 刘长远, 王璐. 2010. 葡萄褐斑病研究进展. *辽宁农业科学*, 2010(S): 117–119]
- Liu T, Ma L, Du NS. 2002. The survey of the grape's biological action. *Chinese Journal of Nature*, 24(2): 81–87 (in Chinese) [刘涛, 马龙, 堵年生. 2002. 葡萄的生物学作用研究进展. *自然杂志*, 24(2): 81–87]
- Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW. 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1): 119–134
- Peregrine WTH, Ahmad KB. 1982. Brunei: a first annotated list of plant diseases and associated organisms. *Phytopathological Papers*, 27: 1–87
- Qu WW, Liu X, Yang KQ, Liu HX, Hou LQ. 2012. Identification and phylogenetic analysis of walnut-associated *Alternaria* spp. in Shandong Province, China. *Journal of Plant Protection*, 39(2): 121–128 (in Chinese) [曲文文, 刘霞, 杨克强, 刘会香, 侯立群. 2012. 山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育. *植物保护学报*, 39(2): 121–128]
- Simmons EG, Roberts RG. 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon*, 46(1): 109–140
- Song WC, Guo QY, Wang HK, Wang DY, Lei D, Liu Y, Alaiyi. 2014. Grape common diseases and their occurrence status quo in Turpan and some other areas in northern Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 51(5): 893–901 (in Chinese) [宋卫翠, 郭庆元, 王洪凯, 王登元, 雷丹, 刘瑶, 阿来依. 2014. 吐鲁番地区及北疆部分地区葡萄常见病害种类及发生现状. *新疆农业科学*, 51(5): 893–901]
- Swofford DL. 2002. PAUP* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony. Sunderland: Sinauer Associates
- Tao WC, Zhang W, Yan JY, Hyde KD, McKenzie EHC, Li XH, Wang Y. 2014. A new *Alternaria* species from grapevine in China. *Mycological Progress*, 13: 999
- Wang B. 2015. Influence of temperature and the pH on the colony growth of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler of *Trifolium repens* Linn. *Gansu Agriculture Science and Technology*, (8): 59–61 (in Chinese) [王斌. 2015. 温度和pH对白三叶草链格孢菌菌落生长的影响. *甘肃农业科技*, (8): 59–61]
- Wang GZ, Fan ZQ, Ru QH, An HW. 2002. Survey of grapevine diseases in the eastern foot of Helan Mountain, Ningxia. *Northern Horticulture*, (6): 64–65 (in Chinese) [王国珍, 樊仲庆, 茹庆华, 安宏伟. 2002. 宁夏贺兰山东麓葡萄病害调查. *北方园艺*, (6): 64–65]
- Wang YY, Liu B, Zhou YY, Zhu XF, Gao ZG, Chen LJ. 2015. Biological characteristics and screening of fungicides of maize *Alternaria tenuis* Nees. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 46(5): 538–542 (in Chinese) [王媛媛, 刘彬, 周园园, 朱晓峰, 高增贵, 陈立杰. 2015. 玉米链格孢病菌生物学特性及防治药剂离体活性筛选. *沈阳农业大学学报*, 46(5): 538–542]
- Wang ZY. 2009. Chinese grape diseases and insect pests and integrated control techniques. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [王忠跃. 2009. 中国葡萄病虫害与综合防控技术. 北京: 中国农业出版社]
- Weir TL, Huff DR, Christ BJ, Romaine CP. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, 90(5): 813–821
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, pp. 315–322
- Wilcox WF, Gubler WD, Uyemoto JK. 2015. Compendium of grape diseases, disorders, and pests. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, pp. 1–220
- Woudenberg JHC. 2015. Restyling *Alternaria*. Ph. D Thesis. Wageningen: Wageningen University
- Yang C, Zhang GL, Ren YZ, Zhong YQ, Gao XL, Li Z, Zhang YP, Li GY. 2017. Identification of the pathogens of grape spike-stalk brown along the Tianshan Mountains. *Plant Protection*, 43(3): 129–135 (in Chinese) [杨超, 张国丽, 任毓忠, 钟杨琼, 高祥雷, 李卓, 张亚平, 李国英. 2017. 北疆沿天山北坡一带葡萄穗轴褐枯病原菌的鉴定. *植物保护*, 43(3): 129–135]
- Yao M. 2015. Identification and control of two leaf diseases in grape. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 5(9): 5–6, 10 (in Chinese) [姚敏. 2015. 葡萄2种常见叶部病害的识别和防治. *农业灾害研究*, 5(9): 5–6, 10]
- Zhang R, Yue HM, Sun GY. 2009. Sequence and phylogenetic analysis of OPA2-1 region from *Alternaria* small-spored species. *Mycosystema*, 28(4): 553–557 (in Chinese) [张荣, 岳海梅, 孙广宇. 2009. 小孢子链格孢 OPA2-1 核苷酸序列分析及系统发育研究. *菌物学报*, 28(4): 553–557]
- Zhang TY. 2003. Flora fungorum sinicorum. Vol. 16, *Alternaria*. Beijing: Science Press, pp. 19–20 (in Chinese) [张天宇. 2003. 中国真菌志. 第十六卷, 链格孢属. 北京: 科学出版社, pp. 19–20]
- Zhao YQ, Yu HR, Shi K, Zhang LJ, Zhang DM, Zhu PT, Chai C, Jia AM. 2017. Identification of the pathogen causing leaf spot on sorghum. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(2): 282–285 (in Chinese) [赵艳琴, 于华荣, 石凯, 张丽娟, 张冬梅, 朱鹏涛, 柴畅, 贾爱民. 2017. 高粱链格孢叶斑病病原鉴定. *植物病理学报*, 47(2): 282–285]

(责任编辑:张俊芳)