植物保护学报 Journal of Plant Protection，2019，46(6)：1243-1251 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2019.2018205

福建省柑橘褐斑病菌的分离、鉴定和系统进化分析

李 亚 吕佳芮 朱 玲 鲁国东 王宗华 刘国坤*

（福建农林大学，生物农药与化学生物学教育部重点实验室，福州 350002）

摘要：为明确在福建省南平市的橘柚和三明市的温州蜜橘上发现的疑似柑橘褐斑病的病原菌种类，采用组织分离法获得纯化菌株，通过回接法验证菌株的致病性，利用形态学特征对病原菌进行初步鉴定，并采用最大似然法以多聚半乳糖醛酸酶基因 *endoPG* 为靶标对本研究以及国内外已报道的链格孢菌株构建系统发育树，分析其遗传多样性。结果表明，从病组织中共分离获得26株纯培养菌株，经形态学鉴定均为链格孢菌 *Alternaria* spp.。利用分生孢子液接种橘柚离体嫩叶发现，有22株菌株能侵染橘柚叶片并产生与田间相似的褐斑病症状，确认该病害为链格孢引起的柑橘褐斑病。系统发育树分析结果显示，分离所得的26株菌株均聚在已报道的4个柑橘链格孢进化分支Clade1~Clade4中，其中21株菌株聚在国内特有的分支Clade4中，有3株菌株和1株菌株分别聚在国内外兼有的分支Clade3和Clade1中，1株菌株聚在国外特有的分支Clade2中，表明在福建省采集的这些柑橘褐斑病菌均为链格孢菌，且遗传多样性较丰富。

关键词：柑橘褐斑病；链格孢菌；病原菌分离；鉴定；系统进化分析

Isolation, identification and phylogenetic analysis of citrus brown spot pathogens in Fujian Province

Li Ya Lü Jiarui Zhu Ling Lu Guodong Wang Zonghua Liu Guokun*

（Key Laboratory of Biopesticides and Chemical Biology, Ministry of Education; Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China）

Abstract: To define the pathogens causing suspected citrus brown spot disease on tangelo at Nanping and Mikan at Sanming in Fujian Province, the pathogen fungi were isolated out from infected tissues, the pathogenicity of isolates to citrus leaves were verified, the morphology features of isolates were analyzed to identify the fungi, and the phylogenetic tree of *Alternaria* isolates from this study and those reported was constructed based on endopolygalacturonase gene by using maximum likelihood method to analyze the fungus genetic diversity. The results showed that 26 pure fungal cultures were morphologically identified as *Alternaria* spp. By inoculating tangelo tender leaves with conidial suspension, 22 isolates could infect citrus and caused brown spot symptom similar to that discovered in the orchard, which further confirmed this disease as citrus brown spot induced by *Alternaria*. The phylogenetic tree displayed, 26 Fujian isolates clustered in all four reported citrus *Alternaria* clades (Clade1−Clade4). Among them, 21 isolates clustered in Clade4 that only reported in China; three isolates and one isolate belonged to Clade3 and Clade1, respectively, which were reported both at home and abroad; one isolate located in Clade2 that only reported at abroad. These results suggested that the citrus brown spot pathogens collected from Fujian Province were *Alternaria* strains and had higher level of genetic diversity.

基金项目：国家自然科学基金(31500120)，福建省自然科学基金(2018J01615)

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：liuguok@126.com

收稿日期：2018-12-07

Key words: citrus brown spot; *Alternaria* spp.; pathogen isolation; identification; phylogenetic analysis

柑橘褐斑病是一种危害橘、柚、以及橘与柚、橘与橙等杂交种的病害(李红叶等,2014)。该病于1903年首次在澳大利亚被发现(Cobb,1903),随后在美国、以色列、南非、土耳其、西班牙、巴西、阿根廷、希腊和伊朗等国相继被报道(Peever et al.,1999;黄峰等,2012)。自2010年起,该病在我国云南、重庆、浙江、广西、广东、湖南等省(自治区、直辖市)陆续发生,危害逐年加重(赵圆等,2013)。该病在柑橘整个生育期均可发生,尤其是新稍和幼果最容易受害,发病时可致整个新稍枯死、落果落叶,成熟果实若带病斑难以鲜销,严重影响柑橘的产量和经济效益(陈昌胜等,2011)。

柑橘褐斑病的病原菌属于链格孢属真菌*Alternaria* spp.,但其种名一直没有得到统一,因其在形态上与柑橘黑腐病病原菌相似,Whiteside(1976)和Pegg(1966)将之定名为*Alternaria citri* Ellis & Pierc,但从生物学和病理学角度看,柑橘褐斑病菌与柑橘黑腐病菌相距甚远。由于其孢子形态和大小与交链格孢*Alternaria alternata*相似,Solel(1991)将其重新定名为*A. alternata*,但该命名不能将致病型和腐生型类群分开。根据培养性状和分生孢子链分枝情况的不同,Simmons(1999)把采自全球各地的44株粗柠檬叶斑病菌和91株柑橘褐斑病菌分成10个形态学种,但这10个种无一包含*A. citri*或*A. alternata*;后来发现这10个形态学种差异并不明显,种之间的性状存在重叠,以致于没有被广泛认可(李红叶等,2014)。因此,柑橘褐斑病菌的种名到目前为止仍不确定,一些学者沿用交链格孢*A. alternata*为种名,由于其具有柑橘和粗柠檬2种寄主专化型(Kohmoto et al.,1993),李红叶等(2014)将其分别称为交链格孢菌橘致病型*A. alternata* pathotype tangerine和交链格孢菌粗柠檬致病型*A. alternate* pathotype rough lemon。

近年来,国内外学者开始利用分子生物学技术对柑橘褐斑病菌进行种群分析。如Peever et al.(2002)基于多聚半乳糖醛酸酶基因*endoPG*对不同国家和地区的链格孢菌进行了分析,发现柑橘褐斑病菌进化出3个大的分支Clade1~Clade3,且分支与菌株的地理起源有一定相关性;Huang et al.(2015)利用该方法对国内不同省份的柑橘链格孢菌也进行了系统分析,发现除Clade1和Clade3外,国内还有一个新分支Clade4,但未在国内发现隶属分支Clade2的菌株。虽仍未解决柑橘褐斑病菌种名归属问题,但该系统是目前比较公认的柑橘褐斑病菌种群分类方法。目前,柑橘褐斑病在国内多个地区都曾暴发(赵圆等,2013),而在福建省还未见报道。柑橘是福建省分布广、产量多的一种果树(施清,2014),近几年南平市和三明市的橘柚及温州蜜橘不断发生疑似褐斑病,由于当地缺乏对该病害的认识和针对性的防治方案,病害频繁暴发成灾,成为当地这2个品种上最主要的病害。本研究拟明确福建省柑橘褐斑病病原菌,分析福建省柑橘褐斑病菌种群的遗传多样性,探讨其与国内外已报道种群间的亲缘关系,以期为福建省柑橘褐斑病的防控提供理论与实践指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样、对照菌株及回接寄主:从福建省南平市和三明市田间的橘柚和温州蜜橘上共采集100份表现疑似柑橘褐斑病的病样,带回实验室备用。柑橘褐斑病菌对照菌株AaZ7为浙江大学李红叶教授馈赠,采集自浙江省温州市瓯柑叶片上。用于病原菌回接的健康橘柚嫩叶采自福建省南平市水吉镇柑橘园。

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20 g、蒸馏水1 L(孔向雯等,2018)。

试剂及仪器:*Taq* Plus酶,天根生化科技(北京)有限公司;氯霉素,遂成股份药业有限公司;其它试剂均为国产分析纯。PGX-180B智能培养箱,宁波普朗特仪器有限公司;Nikon E200生物显微镜,日本尼康公司;T100 PCR仪,美国Bio-Rad公司;YA0810血球计数板,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病害的调查及病害样本的采集

2018年5月对福建省南平市的橘柚园进行褐斑病调查,共调查3次,每次间隔约1周,观察病害的发生过程,同时设置6个采样地点,水吉镇和麻沙镇各3个橘柚园,采集时间为5月上旬,随机采样,每个果园采集10枝发病幼稍(含幼果和幼叶),共60个样本。利用相同的调查方法于2018年8月对三明市的温州蜜橘园进行调查,同时设置4个采样地点,莘口镇和小陶镇各2个温州蜜橘园,采集时间为8月中

旬，随机采样，每个果园采集10片具可疑病斑的老叶，共40个样本。采集病样装入自封袋，带回实验室记录病害症状后立即进行病原菌分离。

1.2.2　病原菌的分离纯化

利用组织分离法对田间采集的100份病样进行病原菌分离。首先将病样组织用清水冲洗表面，然后在病健交界处用无菌剪刀剪取若干大小为3 mm×5 mm的组织，用75%酒精处理10 s，之后在0.1%升汞溶液中消毒60~90 s，再用无菌水冲洗3次并转移到含有50 μg/mL氯霉素的PDA平板上，放置在25℃、光照12 h/黑暗12 h交替的培养箱中，期间及时观察，一旦发现菌落长出，及时挑取在新的PDA平板上培养，最终获得纯培养菌株。

1.2.3　病原菌的培养性状和形态学鉴定

对1.2.2中分离到的纯培养菌株，按照菌落形态特征大致分为4类，每1类随机选择一半数目的菌株，共得到26株菌株用于后续试验。利用打孔器在1.2.2中培养5 d的26株菌株的菌落边缘分别打取直径为5 mm的菌饼，置于直径为9 cm的PDA平板上，在25℃、光照12 h/黑暗12 h交替条件下培养7 d，对菌落外观进行拍照，记录菌落的生长直径，每株菌株设置5次重复。统计分生孢子产量时，用5 mL无菌水和涂布器刮取生长7 d的菌落，用2层擦镜纸过滤收集分生孢子并定容至10 mL，每株菌株设置5次重复，每个平板的分生孢子用血球计数板计数5次求平均值，平均值乘以10得出每株菌株的产孢量。分生孢子和分生孢子梗形态观察时，将盖玻片斜插在正在生长的菌落边缘，待菌落蔓延至盖玻片上时，将其揭下并滴加乳酚油制片，在显微镜下观察并拍照，每株菌株观察不少于15个视野，每个视野观察不少于20个分生孢子。

1.2.4　病原菌的致病性验证

参照1.2.3方法制备26株分离菌株的分生孢子液，调制孢子浓度为1×10^5个/mL，孢子液含0.05%吐温用于增强孢子与叶片的黏附。采集大小一致且未革质化的健康橘柚嫩叶，用75%酒精擦拭叶片表面，在每张叶片左右各滴加20 μL分离菌株的分生孢子液，于28℃保湿黑暗培养3~5 d，直至发病症状出现。以含0.05%吐温的清水处理作为空白对照，以柑橘褐斑病菌AaZ7菌株作为阳性对照。当各处理叶片上出现发病症状后，观察与阳性对照发病症状是否一致，并采用1.2.2方法切取叶片病健交界处组织，对病原菌进行再分离和培养，观察再培养物与第一次分离培养物性状是否一致。

1.2.5　病原菌的分子生物学鉴定

利用CTAB法提取柑橘褐斑病菌的基因组DNA（宋月等，2014）。靶标基因为多聚半乳糖醛酸酶基因*endoPG*，其通用引物为EPG-specific（5′-TGTAA-ACCTTAGCATCA-3′）和EPG-3b（5′-TGTGCTACC-ATGGTTCTTTCC-3′）（Peever et al.，2002），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR反应体系：*Taq* Plus酶1 μL、10×*Taq* Plus Buffer 5 μL、上下游引物各1 μL、模板1 μL，ddH_2O定容至50 μL。PCR扩增程序：94℃预变性3 min；94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸30 s，35个循环。对扩增产物进行胶回收，送擎科生物技术有限公司进行测序。26株菌株的扩增序列去掉前后峰值低的不可信序列后，上传至GenBank获得序列号。利用Mega 7.0软件采用最大似然法（Gao et al.，2017），以*endoPG*序列为靶标，对本研究采集的26株柑橘褐斑病菌以及国内外41株链格孢菌构建系统发育树，以水葫芦链格孢*A. eichhorniae*（Shabana et al.，1995）为外群。Bootstrap值设为1 000来检验系统发育树的可靠性。

2　结果与分析

2.1　柑橘褐斑病的田间病害症状

在福建省南平市和三明市发生疑似褐斑病的柑橘园，发现幼叶、嫩梢和幼果都容易感病，且发展极快。幼叶发病时先产生褐色斑点，并不断扩展，病斑周围有明显的黄色晕圈（图1-A）。整个新梢都可染病，先出现针头状黑褐色凹陷小点，后扩展成椭圆形或梭形斑，病斑环绕一周后，整个新稍变褐色枯死（图1-B）。果实发病的典型病斑为近圆形，褐色，中间凹陷呈灰白色，还可产生灰白色木栓化微隆起的痘疮状病斑（图1-C），这些病果大多提前脱落。老叶上的病斑褐色近圆形，无明显黄色晕圈，病斑中央灰白色（图1-D）。上述症状与柑橘褐斑病症状基本吻合。对发病叶片进行切片，镜检发现链格孢及其孢子梗（图1-E），初步判断该病害为链格孢菌引起的柑橘褐斑病。

2.2　病原菌的分离纯化

本研究共分离获得52株纯培养菌株，按照菌落特征分为4类，每类菌株中随机选取一半共26株菌株用于后续试验。包括分离自南平市水吉镇的10株菌株，编号为NS1~NS10；分离自南平市麻沙镇的10株菌株，编号为NM1~NM10；分离自三明市莘口镇的4株菌株，编号为SX1~SX4；分离自三明市小陶镇的2株菌株，编号为ST1~ST2（表1）。

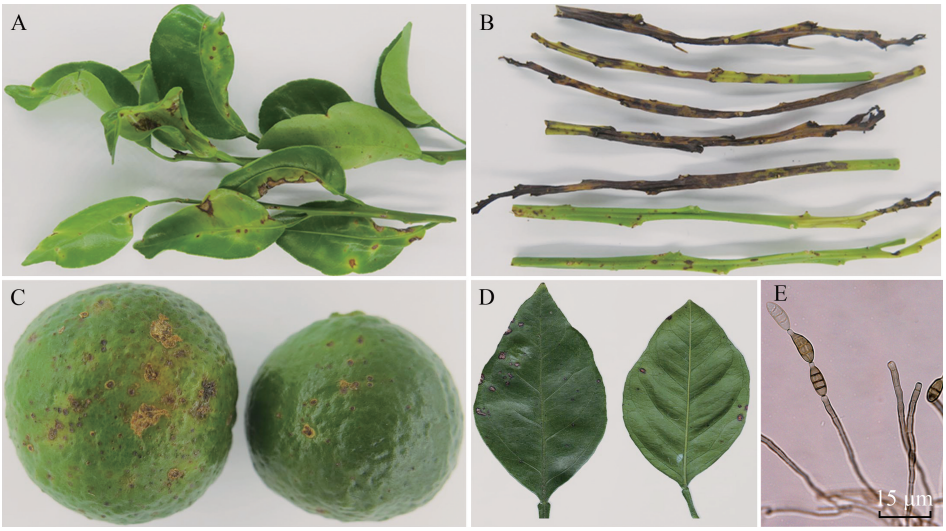

图1 福建省橘柚和温州蜜橘褐斑病的田间症状及病原菌形态图

Fig. 1 Citrus brown spot symptom on tangelo and mikan in the field and morphology of pathogen in Fujian Province

A：橘柚嫩叶发病症状；B：橘柚嫩梢枯死状；C：橘柚果实发病症状；D：温州蜜橘老叶症状(左为正面,右为反面)；E：病原菌形态。A：Symptom on tangelo tender leaves；B：symptom on tangelo tender branches；C：symptom on tangelo fruit；D：disease spots on mikan old leaves（the left is front，the right is reverse）；E：pathogen morphology.

表1 福建省柑橘褐斑病菌在PDA培养基上培养7 d的生物学特征

Table 1 The biological features of citrus brown spot pathogens collected from Fujian Province on PDA medium for seven days

采集地点 Source of isolate	采集寄主 Host	采集部位 Tissue	菌株编号 Isolate no.	菌落颜色 Colony color	生长直径（cm） Colony diameter	产孢量（×10^4个/皿） Conidial production（×10^4 spores/plate）
南平市水吉镇 Shuiji Town，Nanping City	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NS1	深褐色 Dark brown	6.85±0.32	26.20±4.38
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NS2	浅褐色 Light brown	6.72±0.21	17.20±6.46
	橘柚 Tangelo	幼果 Young fruit	NS3	浅褐色 Light brown	6.52±0.25	7.00±2.65
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NS4	深褐色 Dark brown	6.72±0.21	8.00±2.45
	橘柚 Tangelo	新稍 Young branch	NS5	灰绿色 Grey green	6.71±0.12	212.00±37.01
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NS6	深褐色 Dark brown	5.92±0.62	12.20±5.40
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NS7	深褐色 Dark brown	6.87±0.33	51.00±7.87
	橘柚 Tangelo	新稍 Young branch	NS8	深褐色 Dark brown	7.01±0.16	9.00±1.87
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NS9	浅褐色 Light brown	6.97±0.37	7.80±1.79
	橘柚 Tangelo	幼果 Young fruit	NS10	浅褐色 Light brown	6.87±0.18	3.75±0.96
南平市麻沙镇 Masha Town，Nanping City	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM1	灰褐色 Grey brown	7.66±0.15	16.40±7.80
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM2	灰褐色 Grey brown	7.44±0.49	21.60±3.29
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM3	灰褐色 Grey brown	7.31±0.17	24.80±5.26
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM4	灰褐色 Grey brown	7.36±0.13	41.60±10.41
	橘柚 Tangelo	新稍 Young branch	NM5	灰褐色 Grey brown	7.01±0.29	25.50±9.98
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM6	灰褐色 Grey brown	6.69±0.32	16.25±0.50
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM7	灰褐色 Grey brown	7.31±0.17	33.25±4.50
	橘柚 Tangelo	新稍 Young branch	NM8	灰褐色 Grey brown	7.23±0.18	24.20±5.50
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM9	灰褐色 Grey brown	7.49±0.36	22.60±13.07
	橘柚 Tangelo	幼叶 Young leaf	NM10	灰褐色 Grey brown	6.48±0.26	13.00±3.46
三明市莘口镇 Shenkou Town，Sanming City	温州蜜橘 Mikan	老叶 Old leaf	SX1	灰绿色 Grey green	6.63±0.29	180.00±38.73
	温州蜜橘 Mikan	老叶 Old leaf	SX2	深褐色 Dark brown	6.71±0.09	6.33±0.58
	温州蜜橘 Mikan	老叶 Old leaf	SX3	灰绿色 Grey green	7.17±0.13	63.00±30.93
	温州蜜橘 Mikan	老叶 Old leaf	SX4	灰褐色 Grey brown	5.69±0.33	174.00±67.68
三明市小陶镇 Xiaotao Town，Sanming City	温州蜜橘 Mikan	老叶 Old leaf	ST1	灰绿色 Grey green	7.07±0.10	46.40±12.42
	温州蜜橘 Mikan	老叶 Old leaf	ST2	浅褐色 Light brown	6.95±0.23	14.00±6.82
温州市 Wenzhou City	瓯柑 Ougan	叶片 Leaf	AaZ7	灰绿色 Grey green	7.96±0.37	46.40±21.33

2.3 病原菌的培养性状及形态学特征

在PDA平板上培养7 d后，26株菌株的菌落直径及产孢量存在一定差异（表1）。其中有11株菌株NS8、NM1~NM5、NM7~NM9、SX3和ST1的菌落直径在7.01 cm及以上，有2株菌株NS6和SX4的菌落直径小于6.00 cm，为5.92 cm和5.69 cm，其它13株菌株的菌落直径在6.48~6.97 cm之间（表1）。产孢量统计结果显示，有3株菌株NS5、SX1和SX4的产孢量超过1.74×10^6个/皿，有6株菌株NS3、NS4、NS8~NS10和SX2的产孢量不到1.00×10^5个/皿，其它17株菌株在1.22×10^5~6.30×10^5个/皿之间（表1）。

6株菌株NS1、NS4、NS6~NS8和SX2的菌落呈深褐色（图2-A），5株菌株NS2、NS3、NS9、NS10和ST2的菌落呈浅褐色（图2-B），4株菌株NS5、SX1、SX3和ST1的菌落呈灰绿色（图2-C），其它11株菌株的菌落呈灰褐色（图2-D）。26株菌株的分生孢子梗和分生孢子形态均呈现相似的形态特征，表现为分生孢子梗簇生，直立不分枝，有隔膜；分生孢子呈链状着生，约3~5个呈一链，分生孢子倒棍棒形或近椭圆形、淡褐色至褐色、兼具横隔和纵隔、顶端有喙（图2-E~G），符合链格孢属真菌的基本形态学特征，初步判断26株菌株均为链格孢菌*Alternaria* spp.。

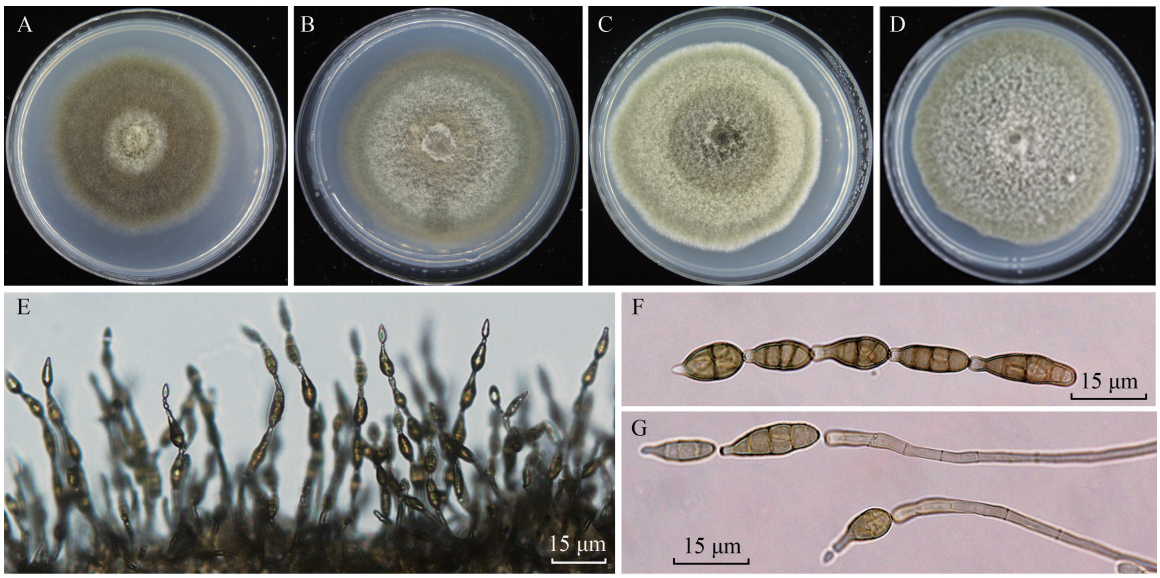

图2 福建省柑橘褐斑病病原菌菌落和分生孢子及分生孢子梗的形态特征

Fig. 2 The colony, conidia and conidiophores morphology of citrus brown spot pathogens in Fujian Province

A~D：代表性菌株NS1、ST2、SX1、NM1的菌落形态；E~G：分生孢子梗及分生孢子形态图。A–D：The colony morphology of typical strains NS1, ST2, SX1, NM1; E–G：the morphology of conidiophores and conidia.

2.4 病原菌的致病性验证

利用分生孢子液点接橘柚幼嫩叶片发现，分离的26株菌株中有22株能感染寄主，并引起类似褐斑病症状，且症状与接种阳性对照菌株AaZ7叶片的症状一致，有4株菌株NS6、NS7、NM3和SX3接种后叶片未见发病症状；同时，切取发病叶片病健交界处组织，进行病原菌分离培养，得到与田间分离到的链格孢形态特征一致的菌株（图3），确认该病害为链格孢引起的柑橘褐斑病。

2.5 福建省柑橘褐斑病菌遗传多样性分析

通过对*endoPG*基因序列进行PCR扩增和测序分析，每株菌株选取413 bp可靠序列，与已报道的链格孢菌*endoPG*序列进行BLAST比对，一致性达98%，包含22个SNP位点。

系统进化树显示，福建省采集的26株柑橘褐斑病菌菌株均聚在已报道的4个柑橘链格孢分支Clade1~Clade4中（图4）。其中，有21株菌株NM1~NM10、NS1~NS4、NS6~NS10、ST1~ST2和国内湖南省、广东省、广西壮族自治区的柑橘链格孢菌株聚在分支Clade4，虽然草莓链格孢*A. fragaria*和日本梨链格孢*A. gaisen*也出现在该分支，但二者属于非柑橘链格孢，因此分支Clade4是目前国内特有的柑橘链格孢分支；有3株菌株NS5、SX3、SX4和国内湖南省、浙江省、重庆市、云南省的柑橘链格孢菌株聚在分支Clade3，该类群还包括国外的柑橘链格孢菌株*A. turkisafria* EGS 44_159、*A. perangusta* EGS 44_

160、*A. alternate* EGS 45_007和非柑橘链格孢菌株*A. limoniasperae* BC2_RLR_1s、PR325、*A. mali* EGS 38_029、*A. tenuissima* EGS 34_015，因此分支Clade3是国内外兼有的柑橘链格孢进化分支；有1株菌株SX1和国内湖南省、重庆市、浙江省的柑橘链格孢菌株聚在分支Clade1，该类群也包括国外的柑橘链格孢菌株*A. citriarbusti* SH_MIL_15s、*A. toxicogenica* PR320和非柑橘链格孢菌株*A. arborescens* EGS 39_128、*A. alternata* EGS 34_039、EGS 34_016，因此分支Clade1也是国内外兼有的柑橘链格孢进化分支；有1株菌株SX2和国外的柑橘链格孢菌株*A. tangelonis* EV_MIL_2s、SH_MIL_4s、烟草链格孢菌株*A. longipes* EGS 30_033聚在分支Clade2，因此前国内未发现该分支的菌株，所以菌株SX2是国内首次发现的分支Clade2菌株。表明福建省具有已报道的全部4个柑橘链格孢进化类群，在病菌遗传多样性上较国内其它省份和国外更丰富。

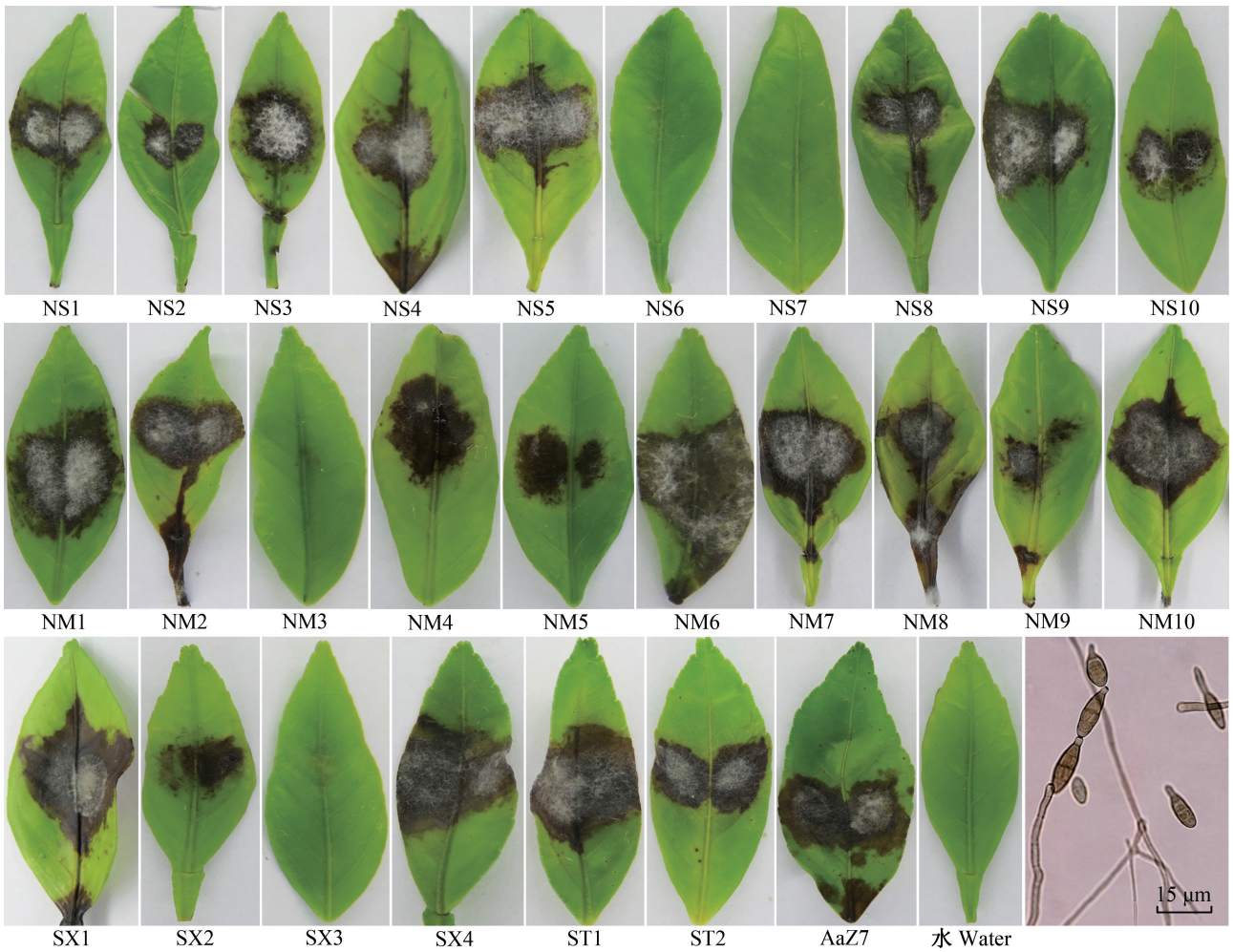

图3 26株柑橘褐斑病菌菌株的致病性验证及病叶上分离的病原菌形态特征

Fig. 3 Pathogencity verification of pathogens and morphology of pathogens isolated from diseased leaves

3 讨论

本研究通过对福建省南平市和三明市的疑似柑橘褐斑病病样进行病原菌的分离及纯化，并基于生物学特征、致病性验证和分子生物学鉴定结果，确认了柑橘褐斑病在福建省已发生。目前，柑橘褐斑病在我国云南、重庆、浙江、广西、广东、湖南和海南等省（自治区、直辖市）均已发生（赵圆等，2013），再加上本研究中的福建省，表明该病害的发生范围已经覆盖了国内整个华南及东南地区的柑橘产区。早在1991年，以色列就报道了橘柚褐斑病的发生（Solel，1991），但在国内橘柚上发现褐斑病尚属首次，综合国内红橘、瓯柑、椪柑、贡柑、杂柑、八月橘、天草和默科特等品种上的褐斑病发生案例（李红叶等，2014；赵圆等，2014），表明柑橘褐斑病菌的寄主品种具有广泛性。

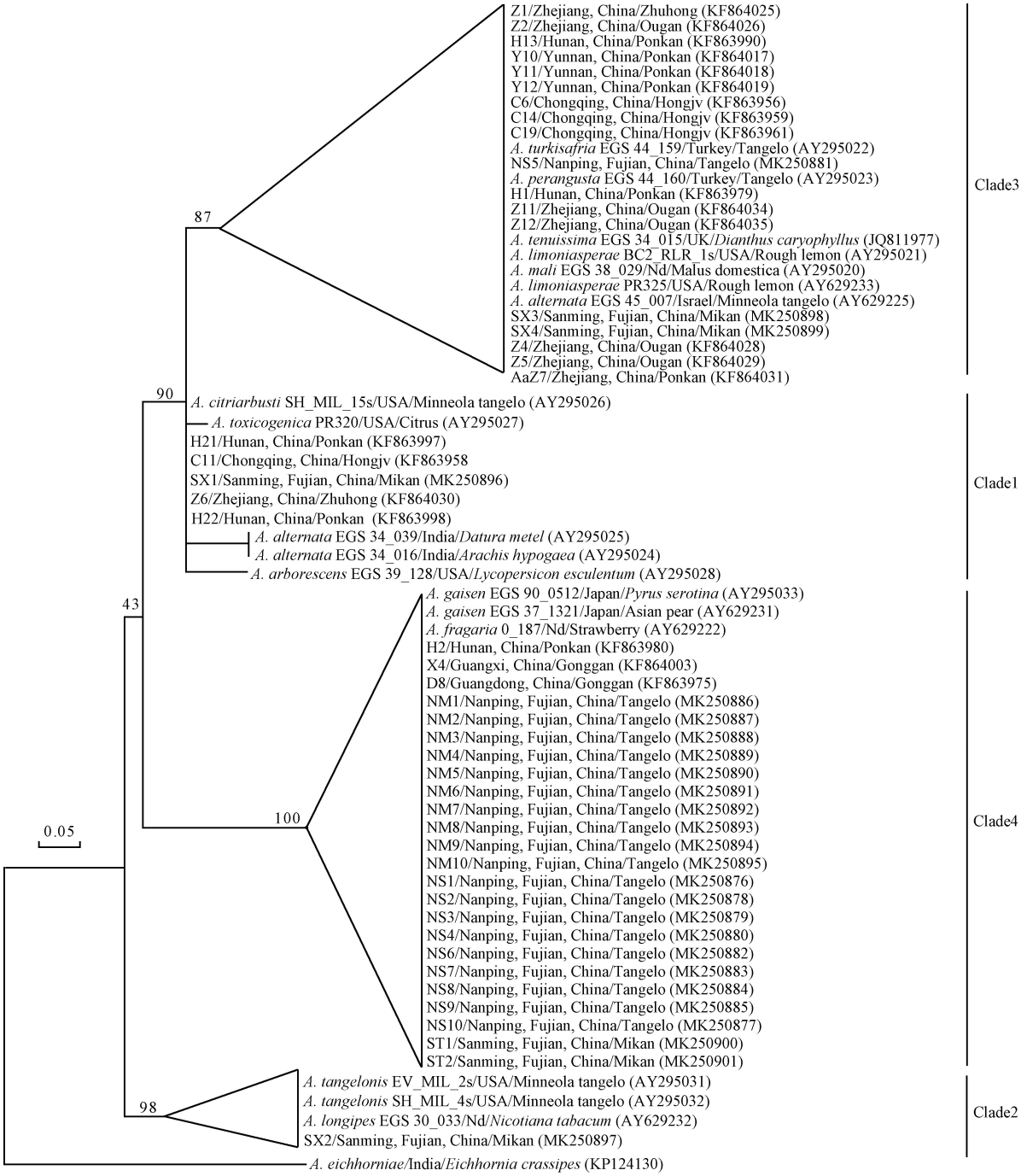

图4　基于*endoPG*基因采用最大似然法构建福建省柑橘褐斑病菌与其它相关菌株的系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree of Fujian citrus brown spot strains and other related strains based on *endoPG* gene sequences with maximum likelihood method

菌株按照菌株名称或编号/产地/寄主（序列登录号）格式列出。Nd代表不明确。The strains are listed in the format strain name or number/location/host（sequence accession number）. Nd means not defined.

陈昌胜等（2011）报道在分离柑橘褐斑病菌时，在PDA培养基中加入多菌灵有助于减少炭疽菌污染，易得到纯化的链格孢菌株。由于多菌灵是一种抗真菌药剂，为了避免其对链格孢生长、产孢等性状的影响，本研究没有在培养基中添加多菌灵，只采用常规分离方法，经过摸索发现组织表面消毒时用0.1%升汞处理60~90 s后清洗分离即可得到单一的链格孢菌株，很少发现污染菌。本研究致病性验证试验采用离体嫩叶进行接种，致病菌株产生的病斑与田间自然发生的病斑相比，外围的黄色晕圈不明显，这与Wang et al.（2018）报道的褐斑病菌离体接种症状相似。赵圆等（2014）已验证鉴定了柑橘褐斑

病菌能产生寄主专化性毒素，在毒性和致病性方面具有重要作用，可导致病斑坏死和褪绿斑。本研究结果说明离体叶片接种与田间自然侵染相比，病原菌在产生毒素及其致病力方面可能具有一定差异；但菌株NS8和NM2接种叶片上发现有沿叶脉扩展的坏死斑，印证了李红叶等（2014）之前报道的柑橘褐斑病菌产生的毒素可沿叶脉传导加速病害扩展的机制。

目前对于柑橘褐斑病菌链格孢菌种名尚未统一，多沿用交链格孢*A. alternata*为种名，并根据寄主致病性差异被分成2种致病型（Kohmoto et al.，1993；李红叶等，2014）。本研究在对分离的26株菌株进行菌落形态、直径和产孢量等生物学性状分析时，发现不同菌株在不同性状之间的表现没有规律性，如生长快的菌株产孢量有高有低，菌落颜色也不尽相同，说明生物学性状不能作为柑橘链格孢菌种群分类的参考依据；且菌株间在分生孢子和分生孢子梗形态上也未见明显差异，进一步支持从形态学上难以对柑橘褐斑病菌进行分类的结论。分子系统发育分析发现福建省的柑橘褐斑病菌均能聚类于已报道的4个链格孢菌进化分支里，但这些分支里除了交链格孢菌外，还发现一些非柑橘链格孢菌，如草莓链格孢、日本梨链格孢、苹果链格孢和烟草链格孢等也和柑橘褐斑病菌聚在一起，说明侵染柑橘的链格孢菌和一些非柑橘链格孢菌存在非常近的亲缘关系，也表明基于单一靶标基因分析对柑橘褐斑病菌进行定种也存在局限。此外，本研究采集的26株菌株中有22株能回接寄主致病，发病率约为85%，与Huang et al.（2015）报道的发病率相似，但4株无致病性链格孢菌在进化树上并未聚在一起，而是与致病性链格孢菌分别聚在分支Clade3和Clade4中，说明致病性的有无也不能作为柑橘褐斑病菌分类的参考依据。Stewart et al.（2014）基于*endoPG*、OPA1-3、OPA2-1及非编码侧翼区Flank3序列，采用基因谱系的溯宗分析法对各柑橘品种上142株褐斑病菌进行系统发育分析，发现这些菌株可分为2个系统发育种，但具体种名仍未确定。

综上，本研究通过对福建省柑橘褐斑病菌的鉴定以及遗传多样性分析，确认了柑橘褐斑病在福建省已发生，发现柑橘褐斑病菌在国内外不同地区和国内不同省份间均具有遗传多样性，而且在福建省鉴定到了隶属新的进化分支菌株，结合该病害具有暴发性危害、化学防治见效慢和抗病品种稀缺等问题（Vicent et al.，2009；胡军华等，2015），加强对该病害病原菌变异的研究与监测十分重要。而对于病原菌种名的确定，今后应进一步扩大病样采集范围并进行病原菌分离以及多靶标基因系统发育树构建，结合柑橘褐斑病菌的生物学特性、寄主品种范围、遗传多样性等进行分析，从而准确鉴定柑橘褐斑病菌的种类及致病型，这对于柑橘褐斑病的防控也具有重要意义。

参 考 文 献（References）

Chen CS, Huang F, Cheng L, Feng CG, Huang TJ, Li HY. 2011. Identification of the pathogenic fungus causing brown spot on tangerine (*Citrus reticulata* CV. Hongjv). Acta Phytopathologica Sinica, 41(5): 449−455 (in Chinese) [陈昌胜, 黄峰, 程兰, 冯春刚, 黄涛江, 李红叶. 2011. 红橘褐斑病病原鉴定. 植物病理学报, 41(5): 449−455]

Cobb N. 1903. Letters on the diseases of plants-*Alternaria* of the citrus tribe. Agricultural Gazette of New South Wales, 14: 955−986

Gao FL, Zou WC, Xie LH, Zhan JS. 2017. Adaptive evolution and demographic history contribute to the divergent population genetic structure of *Potato virus Y* between China and Japan. Evolutionary Applications, 10(4): 379−390

Hu JH, Liu RP, Wang XL, Zhou N, Hong QB, Yao TS, Li TS, Jiang D, Cao Li, Li HJ. 2015. Evaluation of *Citrus* germplasm resistance to *Alternaria alternata*. Journal of Fruit Science, 32(4): 672−680 (in Chinese) [胡军华, 刘荣萍, 王雪莲, 周娜, 洪棋斌, 姚廷山, 李太盛, 江东, 曹立, 李鸿筠. 2015. 不同柑橘属种质对柑橘褐斑病菌的抗性评价. 果树学报, 32(4): 672−680]

Huang F, Fu YS, Nie DN, Stewart JE, Peever TL, Li HY. 2015. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. Fungal Biology, 119(5): 320−330

Huang F, Zhu L, Hou X, Li HY. 2012. Identification of the pathogenic fungus causing brown spot on Ougan. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, (9): 1281−1282 (in Chinese) [黄峰, 朱丽, 侯欣, 李红叶. 2012. 瓯柑褐斑病病原鉴定. 浙江农业科学, (9): 1281−1282]

Kohmoto K, Itoh Y, Shimomura N, Kondoh Y, Otani H, Kodama M, Nishimura S, Nakatsuka S. 1993. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. Phytopathology, 83(5): 495−502

Kong XW, Tang FY, Lü WW, Zhang Q, Tang KZ. 2018. Optimization of protoplast preparation and regeneration conditions of *Alternaria alternata*. Journal of Plant Protection, 45(6): 1431−1432 (in Chinese) [孔向雯, 唐飞艳, 吕韦玮, 张倩, 唐科志. 2018. 柑橘褐斑病菌原生质体制备与再生条件的优化. 植物保护学报, 45(6): 1431−1432]

Li HY, Meng XF, Fu YS, Huang F, Chen ZL, Yang XP, Wang YG,

Huang HH. 2014. *Alternaria* brown spot of citrus: the risk and management strategy. Journal of Fruit Science, 32(5): 969−976 (in Chinese) [李红叶, 梅秀凤, 符雨诗, 黄峰, 陈再廖, 杨小平, 王一光, 黄海华. 2014. 柑橘链格孢褐斑病的发生为害风险和治理对策. 果树科学, 32(5): 969−976]

Peever TL, Canihos Y, Olsen L, Ibanez A, Liu YC, Timmer LW. 1999. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. Phytopathology, 89(10): 851−860

Peever TL, Ibanez A, Akimitsu K, Timmer LW. 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. Phytopathology, 92(7): 794−802

Pegg KG. 1966. Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of Emperor mandarin. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science, 23: 15−28

Shabana YM, Charudattan R, Elwakil MA. 1995. Evaluation of *Alternaria eichhorniae* as a bioherbicide for water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in greenhouse trials. Biological Control, 5(2): 136−144

Shi Q. 2014. Status and development direction of citrus industry in Fujian Province. Southeast Horticulture, (5): 36−38 (in Chinese) [施清. 福建柑橘产业现状与发展方向. 东南园艺, (5): 36−38]

Simmons EG. 1999. *Alternaria* themes and variations (226−235): classification of citrus pathogens. Mycotaxon, 70: 263−323

Solel Z. 1991. *Alternaria* brown spot on Minneola tangelos in Israel. Plant Pathology, 40(1): 145−147

Song Y, Fan YL, Wu LJ, Zhang ZF, Liu YH, Liu TX. 2014. Comparison and optimization of genomic DNA extraction from endosymbionts of aphids. Journal of Plant Protection, 41(6): 643−648 (in Chinese) [宋月, 樊永亮, 武丽娟, 张战凤, 刘艳红, 刘同先. 2014. 蚜虫内共生菌基因组DNA提取方法的比较和优化. 植物保护学报, 41(6): 643−648]

Stewart JE, Timmer LW, Lawrence CB, Pryor BM, Peever TL. 2014. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. BMC Evolutionary Biology, 14(1): 38

Vicent A, Armengol J, García-Jiménez J. 2009. Protectant activity of reduced concentration copper sprays against *Alternaria* brown spot on 'Fortune' mandarin fruit in Spain. Crop Protection, 28(1): 1−6

Wang MS, Yang X, Ruan RX, Fu HL, Li HY. 2018. *Csn5* is required for the conidiogenesis and pathogenesis of the *Alternaria alternata* tangerine pathotype. Frontiers in Microbiology, 9: 508

Whiteside J. 1976. A newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. Plant Disease Reporter, 60(4): 326−329

Zhao Y, Wang LJ, Tang KZ. 2013. Research progress of citrus brown spot. Northern Horticulture, (19): 186−189 (in Chinese) [赵圆, 王玲杰, 唐科志. 2013. 柑橘褐斑病研究进展. 北方园艺, (19): 186−189]

Zhao Y, Wang LJ, Wang XF, Tang KZ, Zhou CS, Li TS. 2014. Identification of the pathogenic fungus causing brown spot in two tangerine hybrid varieties. Journal of Fruit Science, 31(2): 292−295 (in Chinese) [赵圆, 王玲杰, 王雪峰, 唐科志, 周常勇, 李太盛. 2014. 杂柑褐斑病的病原鉴定. 果树学报, 31(2): 292−295]

（责任编辑：李美娟）