

青海省樱桃叶斑病原菌的分离与鉴定

刘 俏, 宁楠楠, 马永强*, 郭青云*

(青海大学农林科学院, 青海省农业有害生物综合治理重点实验室, 农业农村部西宁作物有害生物科学观测实验站, 青藏高原生物技术教育部重点实验室, 西宁 810016)

摘要 为明确引起青海省樱桃叶斑病原菌的种类,本研究从西宁市城北区、海东市乐都区和贵德县的樱桃上采集有叶斑症状的叶片,采用组织分离法分离出病原菌,通过观察病原菌的形态特征,结合 rDNA-ITS、*EF-1 α* 和 *Alt a 1* 基因序列分析对病原菌的种类进行了鉴定,并用柯赫氏法则进行验证。结果表明,共获得 279 株病原菌菌株,分属链格孢 *Alternaria alternata*、细极链格孢 *A. tenuissima* 和刺盘孢属 *Colletotrichum* spp., 分离频率分别为 84.95%、5.02% 和 10.03%。采用柯赫氏法则进行离体叶片致病性测定,接种叶片 100% 发病,说明引起青海省樱桃叶斑病的病原菌为链格孢、细极链格孢和刺盘孢属真菌,且链格孢为主要病原菌。该研究结果可为青海省樱桃叶斑病的综合防治提供理论依据。

关键词 樱桃; 叶斑病; 链格孢属; 刺盘孢属; *Alt a 1* 基因; 系统发育

中图分类号: S 436.62 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019567

Isolation and identification of the pathogen causing leaf spot on cherry in Qinghai province

LIU Qiao, NING Nannan, MA Yongqiang*, GUO Qingyun*

(Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University; Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management; Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests in Xining, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biotechnology (Qinghai University), Ministry of Education, Xining 810016, China)

Abstract In order to confirm the pathogen of cherry leaf spot in Qinghai province, the typical diseased cherry leaves were collected from Chengbei district of Xining city, Ledu district and Guide county of Haidong city. The pathogen was isolated by tissue separation method and identified by morphological observation and sequence analysis of rDNA-ITS, *EF-1 α* and *Alt a 1* genes. The pathogenicity of the strains were tested by Koch's postulates. The results showed that 279 strains were obtained, belonging to *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* and *Colletotrichum* spp., with the isolation frequencies of 84.95%, 5.02% and 10.03%, respectively. Koch's postulates test demonstrated that 100% incidence was found on the inoculated leaves, indicating that the pathogens causing cherry leaf spot disease in Qinghai province are *A. alternata*, *A. tenuissima* and *Colletotrichum* spp., and *A. alternata* is the main pathogen. The results provide a theoretical basis for the comprehensive prevention and control of cherry leaf spot in Qinghai province.

Key words cherry; leaf spot; *Alternaria* spp.; *Colletotrichum* spp.; *Alt a 1* gene; phylogeny

樱桃 *Prunus avium* 又名迎庆果、含桃,蔷薇科李属落叶乔木果树。因果实色泽鲜艳,营养丰富,酸甜可口,而深受人们的喜爱,有“百果第一枝,早春第一果”的美誉^[1]。世界上樱桃主要分布在美国、加拿大、欧洲等北半球国家,在国内作为果树栽培的樱桃

有中国樱桃、甜樱桃、酸樱桃和毛樱桃,主要分布在山东、陕西、四川等地^[2]。由于其果实经济价值高,近年来,在我国各省市得到大面积推广栽培,我国樱桃的栽培面积日益增加,目前已居世界首位^[3]。随着栽培面积的不断扩大,发生在樱桃上的病害也呈

收稿日期: 2019-10-22

修订日期: 2019-11-22

基金项目: 农业部“948”项目(2015-Z71);青海省科技厅科技合作专项(2017-HZ-815);国家外专局成果示范项目(GS20190144001)

* 通信作者 E-mail: 马永强 mayongqiang_163@163.com, 郭青云 guoqingyunqh@163.com

现出明显加重的趋势。目前,国内外危害櫻桃产业的病害主要有櫻桃褐斑病^[4]、流胶病^[5]、根癌病^[6]、灰霉病^[7]、褐腐病^[8]和叶斑病^[9]等。其中櫻桃叶斑病是世界范围内危害櫻桃产业的真菌性病害,在欧美国家发生极其严重,给当地果农造成了巨大经济损失,严重阻碍了櫻桃产业的健康发展^[10-15]。目前,引起櫻桃叶斑病的病原菌有 *Blumeriella jaa-pii*^[16]、*Calonectria ilicicola*^[17]、*Pseudocercospora pruni-persicicola*^[18]、*Cylindrosporium padi*^[19] 和 *Phoma herbarum*^[20]。此外, Thomidis 和 Tsipouridis^[9]于 2006 年报道了希腊櫻桃叶斑病的病原菌为链格孢属真菌中的小孢子种链格孢 *Alternaria alternata*。我国学者赵远征等^[21]于 2013 年在大櫻桃果实上分离出链格孢,并证实了该种病原菌人工有伤接种可侵染叶片。但在自然条件下由链格孢属真菌和刺盘孢属真菌引起櫻桃叶斑病的研究在国内尚未见报道。

本研究组在 2017 年—2019 年对青海省櫻桃病害进行系统调查时发现两种新的叶部病害普遍发生。在发病最为严重的 7、8 月份,病株率高达 100%。发病叶片形成圆形或近圆形的褐色或紫红色病斑,大小不等。发病严重时,病斑相互连接,扩展至整个叶面,导致光合作用严重受阻,树势衰弱,第二年果实产量降低。为明确青海省櫻桃叶斑病的病原菌,本研究采用组织分离技术对病原菌进行分离,柯赫氏法则进行致病性测定,结合形态学和分子生物学手段对病原菌进行鉴定,以期为青海省櫻桃叶斑病病原菌的科学诊断和病害的综合防治提供理论基础和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 病叶的采集

櫻桃病叶于 2017 年—2019 年采自青海省西宁市城北区、海东市乐都区和贵德县。叶斑病 A 共采集 90 片病叶,其中西宁市城北区 3 片,海东市乐都区 76 片,贵德县 11 片;叶斑病 B 共采集 44 片病叶,其中海东市乐都区 40 片,贵德县 4 片。采集发病症状典型的新鲜櫻桃病叶放入采样袋内,及时带回实验室分离。

1.2 病原菌的分离与纯化

采用组织分离法^[22]对病原菌进行分离,用 PDA 培养基培养 3~5 d 后,在无菌条件下用打孔器在菌

落边缘切取直径为 5 mm 的菌饼接种在 PDA 平板上,进行纯化和转接培养。纯化 2~3 次后,将菌株接种在试管斜面 PDA 培养基上,置于 4℃ 保存备用。

1.3 病原菌的形态学鉴定

用灭菌打孔器在菌落边缘切取直径为 5 mm 的菌饼接种在 PDA 和 PCA 培养基的中央,每天观察并记录菌落的形状、大小、颜色以及菌丝的生长状况等形态特征。为了更清晰地观察病原菌的形态特征,在 PCA 培养基上斜插无菌盖玻片,待菌落生长 7 d 后,取出 PCA 培养基中的插片,置于载玻片上,滴一滴清水,制成临时玻片,于显微镜下观察记录病原菌的菌丝形态,分生孢子梗和分生孢子的形状、大小、颜色、着生方式以及有无隔膜等特征,并参照张天宇^[23]对链格孢属真菌种级形态的描述及 Sutton^[24]对刺盘孢属的分类方法鉴定病原菌的种类。

1.4 病原菌的分子生物学鉴定

采用 CTAB 法^[25]提取病原菌的总 DNA。分别以通用引物 ITS1 和 ITS4^[26]、EF1-728F 和 EF1-986R^[27]、Alt-for 和 Alt-rev^[28]进行 PCR 扩增,所用引物见表 1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系均为 25 μ L: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L(含 Mg^{2+}),模板 DNA 0.5 μ L, dNTPs 1.0 μ L,引物各 0.5 μ L(10 μ mol/L),5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L,用 ddH₂O 补齐。94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。扩增完成后,在 1% 琼脂糖凝胶中通过 150 V 和 100 mA 电泳检测 5 μ L 扩增产物 20 min,用 SanPrep 柱 DNA J 凝胶回收试剂盒(SK8131,上海生工)回收 PCR 扩增产物,并送至上海生工进行双向测序。测序结果与 GenBank 数据库中的核酸序列进行 BLAST 同源性比较分析。利用 ClustalX 1.8 和 MEGA 5.1 进行序列间的比对分析,将 3 条基因序列按照 rDNA-ITS、EF1 α 和 *Alt a 1* 的顺序进行多基因序列整合,以邻接法(NJ)构建菌株的系统发育树,并用自展法(bootstrap method)进行检验,重复 1 000 次,分析该菌与同属菌株间的亲缘关系^[1]。

1.5 病原菌的致病性测定

采用离体叶片接种方式进行病原菌的致病性测定。将纯化后的病原菌菌株接种在 PDA 平板上,25℃ 恒温,黑暗倒置培养 6 d。用灭菌打孔器在菌落边缘打出直径为 5 mm 的菌饼,接种在健康櫻桃叶片

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

通用引物 Universal primer	序列(5'-3') Sequence
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCTTACC
Alt-for	ATGCAGTTCACCACCATCGC
Alt-rev	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC

上。采用有伤(针刺)和无伤两种接种方式,先用自来水冲洗掉叶片表面的杂质,再用 75%乙醇消毒 30 s,灭菌水冲洗 3 次,用灭菌滤纸将叶片表面的水分吸干后,进行有伤和无伤接种,每个叶片接种 6 个菌饼,重复 3 次,用空白 PDA 培养基作为对照。置于 25℃的恒温培养箱中,黑暗培养 7 d 后调查发病率,并对发病叶片再次进行病菌分离和鉴定。具体方法是用灭菌剪刀在发病叶片病健交界处剪取 0.5 cm × 0.5 cm 的病组织小块,于超净工作台上用 75%乙醇消毒 3 min,无菌水冲洗 3 次,放在灭菌滤纸上晾干后,接种在 PDA 平板上,置于 25℃恒温培养箱中培养,待菌落长出后进行形态学和分子生物学鉴定。

发病率 = 发病叶片数 / 接种叶片总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 发病症状

叶斑病 A 发病初期在叶片上形成大小不一的褐色斑点,后病斑逐渐扩大为圆形或近圆形褐色斑,直径为 2.23~11.67 mm,病斑处干枯、皱缩,略微凹陷,且产生同心轮纹,中间为黄褐色或浅褐色,病健交界处深褐色且随着病斑的不断扩大产生离层,常由此脱落形成穿孔。病斑背面直径为 2.30~11.35 mm,颜色较正面浅,为黄褐色,同心轮纹不明显。发病严重时,病斑相互连接形成不规则的病斑块,且扩展范围不受叶脉限制。发病严重的叶片失水严重,萎蔫、皱缩、柔韧性降低,尤其是病斑处因干枯而出现裂痕(图 1)。叶斑病 B 发病叶片形成圆形或近圆形的紫褐色病斑,直径为 1.47~4.60 mm,病斑内部很小部分为黄褐色,向外为紫色环,且最外层有紫红色光晕。病健交界处不产生离层,不形成穿孔。病斑背面为紫红色,直径为 1.13~4.52 mm。发病严重时,病斑相互连接,扩展整个叶面,使叶片干枯、皱缩(图 2)。



图 1 樱桃叶斑病 A 田间发病症状

Fig. 1 Symptoms of leaf spot A of cherry in the field



图 2 樱桃叶斑病 B 田间发病症状

Fig. 2 Symptoms of leaf spot B of cherry in the field

2.2 病原菌的分离与纯化

对两种叶斑病的病原菌进行分离和纯化,共获得 279 株分离物,其中从叶斑病 A 的病叶中分离出 153 株,包括西宁 3 株,海东 135 株,贵德 15 株。通过培养形态和镜检分别将西宁 3 株分类命名为

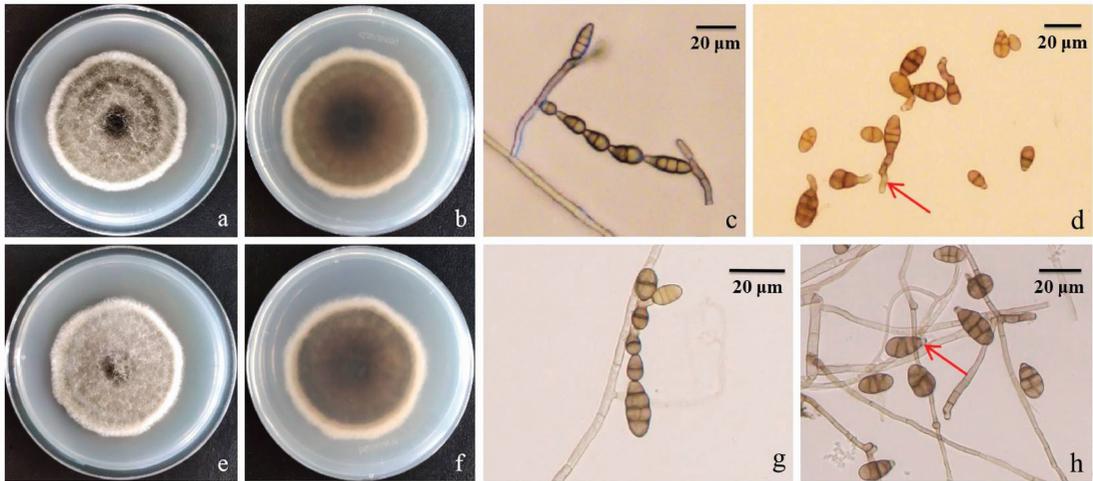
CBX001;海东 135 株分类命名为 HS002(11 株)、LD002(3 株)、GM001(5 株)、JX001(5 株)、LJH001(22 株)、LJH002(2 株)、YR001(2 株)、TGW001(78 株)、TGW003(7 株);贵德 15 株分类命名为 GDX001(4 株)、GDX003(2 株)、GDD001(5 株)和 GDH001

(4 株)。从叶斑病 B 的病叶中共获得 126 株病原菌株,包括海东 113 株,分别命名为 TGT001(82 株)、TGT002(28 株)和 TGT003(3 株);贵德 13 株,均命名为 GDY001。

2.3 病原菌的形态学鉴定

病原菌株 CBX001、HS002、LD002、GM001、JX001、LJH001、YR001、TGW001、GDX001、GDD001、GDH001、TGT001 和 GDY001 在 PDA 平板上菌落为圆形,呈灰黑色或墨绿色绒状,边缘整齐,背面深橄榄绿或黑色。培养初期,菌丝呈放射状生长,为白色,后逐渐变为灰白色、灰色或黑色,多卷曲交织成绒毛状。气生菌丝发达,致密,生长迅速,7 d 后菌落直径达 9 cm

(图 3 a 和 b)。在显微镜下,病原菌的菌丝为无色,宽 $3\sim 5.5\ \mu\text{m}$,有隔膜。分生孢子梗浅褐色或棕褐色,着生于菌丝末端或侧面,直立或屈膝状弯曲,有分隔,大小为 $(42.3\sim 96.5)\ \mu\text{m}\times(3.2\sim 4.7)\ \mu\text{m}$ 。分生孢子黄褐色或褐色,长椭圆形、卵形、棍棒状或倒梨形,有 $1\sim 5$ 个横隔膜, $0\sim 3$ 个竖或斜隔膜,分隔处大多具有缢缩现象,大小为 $(9.6\sim 35.5)\ \mu\text{m}\times(6.5\sim 15.5)\ \mu\text{m}$ 。分生孢子着生于分生孢子梗顶端或侧面,呈链状生长,每条链上有 $2\sim 6$ 个孢子。分生孢子链具有二次分支现象,形似树状。分生孢子多数具有喙,短喙为浅褐色柱状或锥状,长喙棕褐色且具有分隔,大小为 $(3.2\sim 21.3)\ \mu\text{m}\times(3.4\sim 5.1)\ \mu\text{m}$ (图 3 c 和 d)。



a和b: 菌株HS002在PDA平板上的形态特征; c: 分生孢子链; d: 分生孢子(箭头所指为喙); e和f: 菌株HSZ002在PDA平板上的形态特征; g: 分生孢子链; h: 分生孢子(箭头所指为喙)
a and b: Morphological characteristics of strain HS002 on PDA plate; c: Chain of conidia; d: Conidia (arrow points to beak); e and f: Morphological characteristics of strain HSZ002 on PDA plate; g: Chain of conidia; h: Conidia (arrow points to beak)

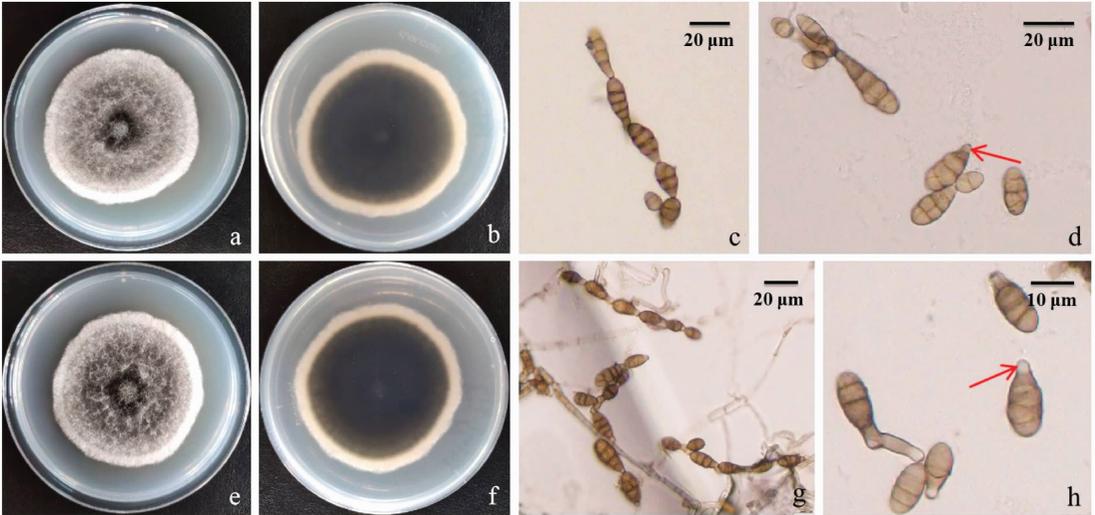
图 3 病原菌株 HS002 和 HSZ002 的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of the strain HS002 and HSZ002

菌株 LJH002、TGW003、GDX003 和 TGT003 在 PDA 上菌落为圆形,呈灰褐色或墨绿色绒状,边缘整齐,背面深橄榄绿或黑色。菌丝粗壮,菌落粗糙,培养初期菌丝呈放射状生长,为白色,后逐渐变为灰色、墨绿色或黑色。气生菌丝发达,致密,生长迅速,9 d 后菌落直径达 9 cm(图 4 a 和 b)。分生孢子梗浅褐色,多数单生于菌丝侧面,偶有分支,直立或略弯曲,有分隔,大小为 $(26.5\sim 83.9)\ \mu\text{m}\times(3.6\sim 5.2)\ \mu\text{m}$ 。分生孢子浅褐色或褐色,椭圆形、卵形、棍棒状,少数倒梨形,有 $1\sim 7$ 个横隔膜, $0\sim 5$ 个竖或斜隔膜,分隔处有明显缢缩现象,成熟的孢子常有 $1\sim 4$ 个主横隔膜因较粗而颜色加深,为黑褐色,大小为 $(15.7\sim 46.8)\ \mu\text{m}\times(7.2\sim 15.7)\ \mu\text{m}$ 。分生孢子呈链状生长,不分支或

少分支,每条链上有 $6\sim 10$ 个孢子。喙或假喙柱状或锥状,浅褐色,有隔膜,基部略微膨大,大小为 $(3.3\sim 3.4)\ \mu\text{m}\times(3.4\sim 4.9)\ \mu\text{m}$ (图 4 c 和 d)。

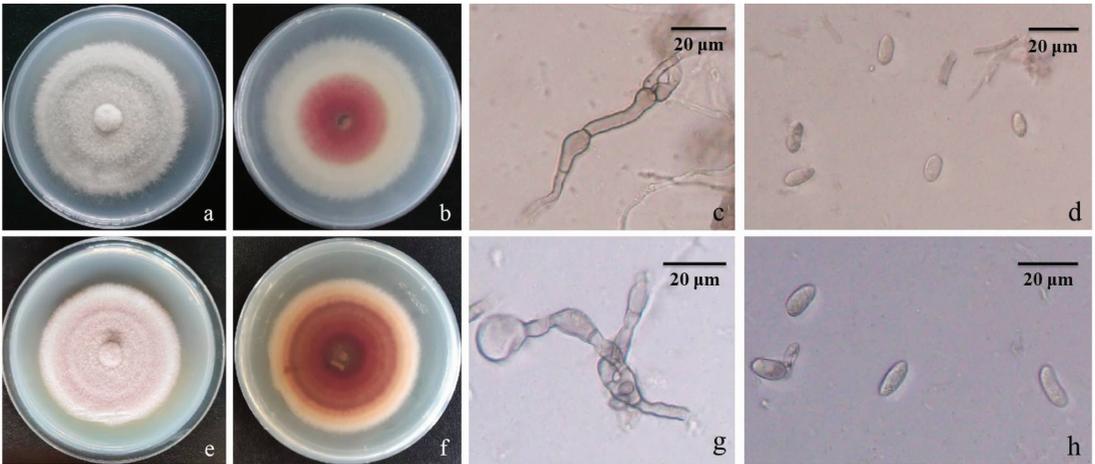
菌株 TGT002 在 PDA 平板上菌落圆形,呈粉红色、灰白色或灰褐色毛绒状,边缘整齐,背面粉红色、橘黄色或紫褐色。培养初期,菌丝呈白色或粉红色,后逐渐变为灰白色或灰色,且菌落出现同心轮纹。气生菌丝发达、致密,生长迅速,6 d 后菌落直径达 4.8 cm(图 5 a 和 b)。病原菌菌丝直径为 $1.92\sim 5.79\ \mu\text{m}$,透明且有隔膜。分生孢子梗无色,着生于菌丝侧面,单生且有隔膜,具有分枝。分生孢子梭形、圆柱状,光滑透明,无隔膜,大小为 $(10.72\sim 15.82)\ \mu\text{m}\times(3.75\sim 6.86)\ \mu\text{m}$ (图 5 c 和 d)。



a和b: 菌株GDX003在PDA平板上的形态特征; c: 分生孢子链; d: 分生孢子(箭头所指为喙); e和f: 菌株GDX003-HJT在PDA平板上的形态特征; g: 分生孢子链; h: 分生孢子(箭头所指为喙)
a and b: Morphological characteristics of strain GDX003 on PDA plate; c: Chain of conidia; d: Conidia (arrow points to beak); e and f: Morphological characteristics of strain GDX003-HJT on PDA plate; g: Chain of conidia; h: Conidia (arrow points to beak)

图4 病原菌株 GDX003 和 GDX003-HJT 的形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of the strain GDX003 and GDX003-HJT



a和b: 菌株TGT002在PDA平板上的形态特征; c: 分生孢子梗; d: 分生孢子; e和f: 菌株TGT002-HZ在PDA平板上的形态特征; g: 分生孢子梗; h: 分生孢子
a and b: Morphological characteristics of strain TGT002 on PDA plate; c: Conidiophore; d: Conidia; e and f: Morphological characteristics of strain TGT002-HZ on PDA plate; g: Conidiophore; h: Conidia

图5 病原菌株 TGT002 和 TGT002-HZ 的形态特征

Fig. 5 Morphological characteristics of the strain TGT002 and TGT002-HZ

2.4 病原菌的分子生物学鉴定

提取分类命名后 18 株病原菌的总 DNA, 经 PCR 扩增、测序后将结果提交至 NCBI 网站进行 BLAST 同源性比较分析。结果表明, 基于 rDNA-ITS 基因序列所测长度为 545~583 bp, *EF-1 α* 基因所测序列长度为 253~285 bp, *Alt a 1* 基因所测长度为 480~532 bp。将病原菌的 rDNA-ITS、*EF-1 α* 和 *Alt a 1* 基因序列合并构建系统发育树, 结果表明, 13 株菌株以 100% 支持率与 *A. alternata* 聚为同一支, 4 株菌株与 *A. tenuissima* 以 100% 支持率

聚为同一支(图 6)。病原菌 TGT002 构建的系统发育树结果显示, 该菌与刺盘孢属真菌中的多个种聚为同一支(图 7)。

2.5 279 株病原菌的鉴定结果和分布

结合病原菌的形态特征和系统发育分析结果, 从叶斑病 A 病叶中分离出的 153 株病原菌被鉴定为链格孢属中的两个小孢子种: 链格孢 142 株和细极链格孢 11 株, 分离频率分别为 92.8% 和 7.2%。西宁、海东和贵德三个地区的不同采集地点均分离出了链格孢菌, 其中西宁 3 株、海东 126 株、贵德 13

株;而只有在海东和贵德分离出了细极链格孢,分别为 9 株和 2 株。从叶斑病 B 病叶中分离出的 126 株病原菌中,95 株被鉴定为链格孢,3 株被鉴定为细极链格孢,28 株被鉴定为刺盘孢属,分离频率分别为

75.4%、2.4% 和 22.2%。海东和贵德两个采集地点均分离出了链格孢,其中海东 82 株、贵德 13 株;而 3 株细极链格孢和 28 株 *Colletotrichum* spp. 均从海东櫻桃病叶上分离得到。

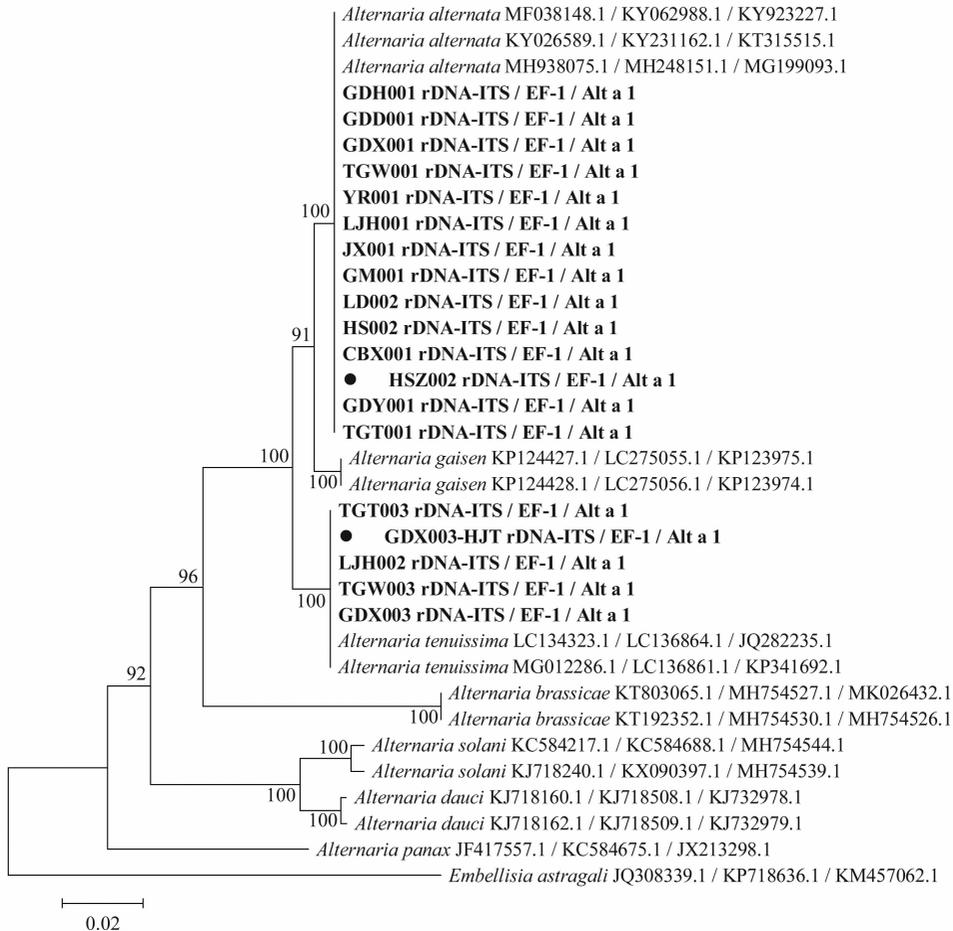


图 6 基于 rDNA-ITS, EF-1 α 和 Alt a 1 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 6 NJ phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS, EF-1 α and Alt a 1 gene sequences

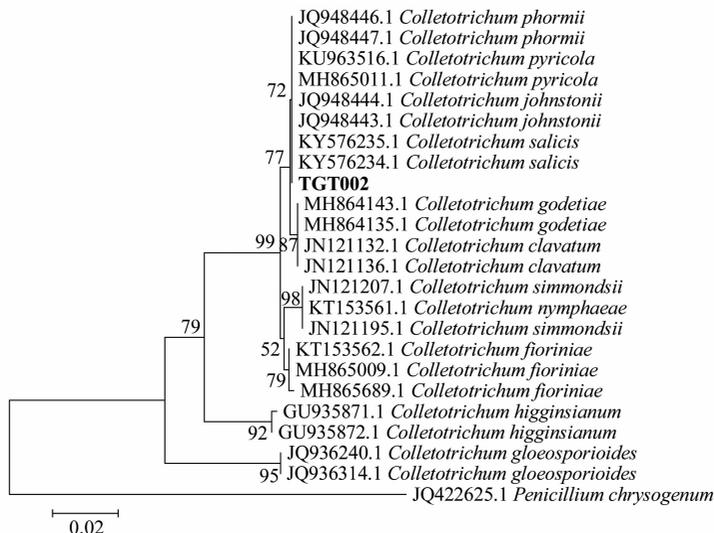


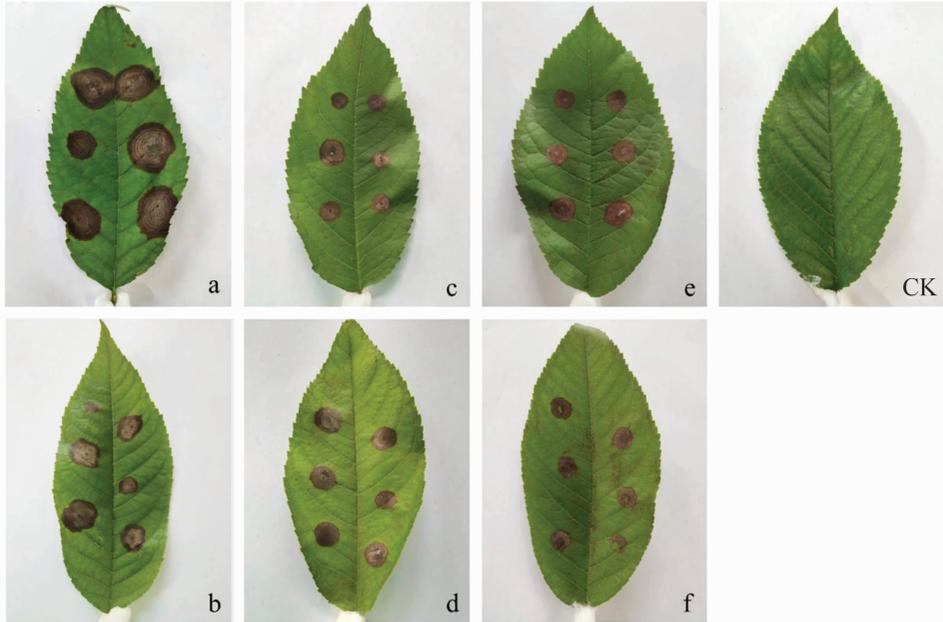
图 7 基于 rDNA-ITS 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 7 NJ phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS gene sequence

2.6 病原菌的致病性测定

分别从三类菌株中各选取 1 株代表性菌株 HS002(链格孢,乐都)、GDX003(细极链格孢,贵德)和 TGT002(刺盘孢属,乐都)进行致病性测定,结果表明,3 株菌株接种的叶片均在接种后第 3 天开始发病,且有伤和无伤接种均可发病,发病率为 100%。菌株 HS002 和 GDX003 接种的叶片发病初期病斑呈暗褐色,后病斑逐渐扩大为圆形或近圆形褐色斑,病斑处出现同心轮纹,与田间自然发病症状相同;菌株

TGT002 接种的叶片病斑呈褐色,大小不等,后病斑逐渐扩大为圆形红褐色或紫褐色斑,病斑处干枯且出现裂痕,而对照组叶片未发病(图 8)。从菌株 HS002、GDX003 和 TGT002 接种发病叶片上再次进行病菌分离,分别将病原菌命名为 HSZ002、GDX003-HJT 和 TGT002-HZ。经镜检后其形态(图 3e~h、图 4e~h 和图 5e~h)与上述供试菌株形态一致,且 HSZ002 和 GDX003-HJT 在系统进化树上与供试菌株聚为一支(图 6)。



a: 菌株HS002有伤接种; b: 菌株HS002无伤接种; c: 菌株GDX003有伤接种; d: 菌株GDX003无伤接种; e: 菌株TGT002有伤接种; f: 菌株TGT002无伤接种; CK: 对照(左: 有伤接种, 右: 无伤接种)
a: The inoculation with injury of strain HS002; b: The inoculation without injury of strain HS002; c: The inoculation with injury of strain GDX003; d: The inoculation without injury of strain GDX003; e: The inoculation with injury of strain TGT002; f: The inoculation without injury of strain TGT002; CK: Control (inoculation with injury on the left, inoculation without injury on the right)

图 8 樱桃叶斑病原菌 HS002、GDX003 和 TGT002 菌饼接种发病症状

Fig. 8 Symptoms of cherry leaf spot inoculated with mycelium pellets of HS002, GDX003 and TGT002 isolates

3 讨论

本研究结合形态学和分子生物学手段,最终将青海省樱桃叶斑病的病原菌鉴定为链格孢、细极链格孢和刺盘孢属,分离频率分别为 84.95%、5.02% 和 10.03%,且链格孢为引起青海省樱桃叶斑病的主要病原菌。这是国内首次发现在自然条件下链格孢属真菌和刺盘孢属真菌能够引起樱桃叶斑病。

世界上已报道的链格孢属真菌有 500 多种,且 95%寄生在不同植物上,具有寄主范围广,传播途径多,侵染能力强和危害程度大等特点^[29]。该类菌种引发的病害在经济作物、粮食作物和果蔬生产中均有发生^[30],严重阻碍了我国农业生产的发展。

与其他真菌相比,链格孢属真菌具有明显的特征,易于区分,但种级间的特征存在很大变异,特别是属内的小孢子种极易受培养条件的影响而产生趋同现象,使链格孢属真菌难以鉴定到种^[31]。传统的链格孢属真菌分类方法以形态学为主,系统发育为辅,这种方法在一定程度上满足了一些菌种的分类要求,但易受人为因素和环境条件的干扰,使得菌种之间的进化距离和亲缘关系不能被准确反映,菌种的鉴定结果也存在一定的偏差^[32]。近年来,随着分子生物学技术,尤其是 PCR 技术的广泛应用,使得人们从分子水平上认识到菌种的遗传和进化情况,更能准确地进行菌种鉴定,基于此技术,一些研究者结合形态特征对链格孢属种级分类鉴定及其系统发

育做出了广泛的研究:宋顺华等^[33]、Hong 等^[34]和赵金梅等^[35]利用 rDNA-ITS 序列对病原菌进行了分类鉴定,赵艳琴等^[36]利用 rDNA-ITS 和 *EF-1 α* 基因序列鉴定了病原菌的种类;赵圆等^[37]和岳海梅等^[38]利用 *endo PG* 序列,曲文文等^[31]利用 ITS 序列并结合随机片段 *OPA2-1* 和 *OPA1-3* 基因序列对链格孢属种间的进化情况及其亲缘关系进行了系统发育分析。

本研究利用 rDNA-ITS、*EF-1 α* 和 *Alt a 1* 三个基因序列对致病菌株的系统发育进行了研究,这些序列在一定程度上反映了菌种的进化程度和亲缘关系的远近,但 rDNA-ITS 和 *EF-1 α* 基因序列却很难区分链格孢属真菌中形态相近的小孢子种,由此推测 rDNA-ITS 和 *EF-1 α* 基因在链格孢属真菌的遗传进化中存在一定的变异性,这与张荣等^[39]和岳海梅等^[40]的研究结果相似。特异性基因位点 *Alt a 1* 基因的保守性较其他已知基因位点高,且在链格孢属不同种间遗传信息差异大,可以将病原菌准确鉴定到种,Hong 等^[28]也对此进行过详细的研究并得到相同的结果。本研究还单独利用 rDNA-ITS 序列对刺盘孢属进行系统发育分析,但该序列不能将病原菌准确鉴定到种。正如符丹丹^[41]在对中国苹果炭疽病病原菌遗传多样性研究中所发现的那样,ITS 序列在对刺盘孢属真菌中部分种进行鉴定时很难将其准确区分。因此,对刺盘孢属进行准确鉴定还需探索更多保守性较强的特异性基因位点。

本研究鉴定出的 3 种病原菌均为国内首次发现其在自然条件下能够侵染櫻桃叶片,引发叶部病害。本研究结果可为这 3 种病原菌的进一步研究和青海省櫻桃叶斑病的有效防控提供依据。

参考文献

- [1] 孙杨,韩伟,孙玉刚,等. 山东地区櫻桃褐斑病原菌鉴定及 rDNA-ITS 序列分析[J]. 中国农业科技导报,2017,19(7):44-49.
- [2] 孙杨,付全娟,孙玉刚,等. 櫻桃褐斑病原菌生物学特性及品种抗性评价[J]. 植物保护,2017,43(4):110-114.
- [3] 黄贞光,刘聪利,李明,等. 近 20 年国内外甜櫻桃产业发展动态及对未来的预测[J]. 果树学报,2014,31(S1):1-6.
- [4] GUO Yinglan, LIU Xijin. Studies on the genus *Pseudocercospora* in China I [J]. *Mycosystema*, 1989, 8(2): 225-240.
- [5] 徐丽,王甲威,陈新,等. 甜櫻桃流胶病原菌的分子鉴定和致病性检测[J]. 植物病理学报,2015,45(4):350-355.
- [6] 彭子嘉,隋韵静,沈阔程,等. 四川泸定櫻桃根癌病风险分析[J]. 中国南方果树,2018,47(5):94-96.
- [7] 王燕,王春伟,王琳,等. 櫻桃灰霉病菌 LFD-RPA 快速检测方法的建立[J]. 植物病理学报,2019,20(7):1-13.
- [8] 刘志恒,白海涛,杨红,等. 大櫻桃褐腐病菌生物学特性研究[J]. 果树学报,2012,29(3):423-427.
- [9] THOMIDIS T, TSIPOURIDIS C. First report of *Alternaria* leaf spot on cherry trees in Greece [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(5): 680.
- [10] WHARTON P S, IEZZONI A, JONES A L. Screening cherry germ plasm for resistance to leaf spot [J]. *Plant Disease*, 2003, 87(5): 471-477.
- [11] JOSHUA J, MMBAGA M T. Perpetuation of cherry leaf spot disease in ornamental cherry [J]. *Journal of Phytopathology*, 2015, 163(3): 194-201.
- [12] GREEN H, BENGTSSON M, DUVAL X, et al. Influence of urea on the cherry leaf spot pathogen, *Blumeriella jaapii*, and on microorganisms in decomposing cherry leaves [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(9): 2731-2742.
- [13] DÍAZ R, ZAS R, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J. Genetic variation of *Prunus avium* in susceptibility to cherry leaf spot (*Blumeriella jaapii*) in spatially heterogeneous infected seed orchards [J]. *Annals of Forest Science*, 2007, 64(1): 21-30.
- [14] TEZCAN H. An outbreak of cherry leaf spot (*Blumeriella jaapii*[Rehm] Arx.) on sweet cherry in Canakkale province, Turkey [J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 795(2): 965-968.
- [15] BLUMER S. Beiträge zur Kenntnis von "Cylindrosporium padi" [J]. *Phytopathologische Zeitschrift*, 1958, 33(3): 263-290.
- [16] ANNESI T, MOTTA E, FORTI E. First report of *Blumeriella jaapii* teleomorph on wild cherry in Italy [J]. *Plant Disease*, 1997, 81(10): 1214.
- [17] SILVA G S, CUTRIM F A, FERREIRA F A. Leaf spot and fruit rot of barbados cherry caused by *Calonectria ilicicola* [J]. *Fitopatologia Brasileira*, 2001, 26(1): 101.
- [18] CHOI I Y, BRAUN U, PARK J H, et al. First report of leaf spot caused by *Pseudocercospora pruni-persicicola* on sweet cherry in Korea [J]. *Plant Disease*, 2014, 98(5): 693.
- [19] KHAN N A, BHAT M A, AHMAD K, et al. First record of cherry leaf spot caused by *Cylindrosporium padi* (P. Karst.) from India [J]. *Applied Biological Research*, 2014, 16(1): 122-123.
- [20] KUMLA J, SUWANNARACH N, LUMYONG S. First report of *Phoma* leaf spot disease on cherry palm caused by *Phoma herbarum*, in Thailand [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2016, 38(1): 103-106.
- [21] 赵远征,刘志恒,李俞涛,等. 大櫻桃黑斑病原菌鉴定及其致病性研究[J]. 园艺学报,2013,40(8):1560-1566.
- [22] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [23] 张天宇. 中国真菌志:链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [24] SUTTON B C. The Coelomycetes [M]. England: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

- [22] 张智, 郑乔, 张云慧, 等. 草地贪夜蛾室内种群抗寒能力测定[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 43 - 49.
- [23] 张悦, 邓晓悦, 张雪艳, 等. 取食不同食物的草地贪夜蛾的过冷却点和体液冰点[J/OL]. 植物保护: 1 - 6[2019 - 11 - 26]. <https://doi.org/10.16688/j.zwbh.2019608>.
- [24] 郭井菲, 何康来, 王振营. 草地贪夜蛾的生物学特性、发展趋势及防控对策[J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(3): 361 - 369.
- [25] 秦玉川, 杨建才. 一种便携式测定昆虫过冷却点的方法[J]. 昆虫知识, 2000(4): 236 - 238.
- [26] ASAHINA E. Frost resistance in insects [J]. *Advances in Insect Physiology*, 1970, 6: 1 - 49.
- [27] 鹿金秋, 王振营, 何康来, 等. 桃蛀螟越冬老熟幼虫过冷却点测定[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 44 - 47.
- [28] FULLER B J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state [J]. *CryoLetters*, 2004, 25(6): 375 - 388.
- [29] 史彩华, 胡静荣, 李传仁, 等. 环境胁迫下昆虫的耐寒适应机制研究进展[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 21 - 28.
- [30] 江幸福, 罗礼智, 李克斌, 等. 甜菜夜蛾抗寒与越冬能力研究[J]. 生态学报, 2001(10): 1575 - 1582.
- [31] JENSEN P, OVERGAARD J, LOESCHCKE V, et al. Inbreeding effects on standard metabolic rate investigated at cold, benign and hot temperatures in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2014, 62: 11 - 20.
- [32] 何莉梅, 葛世帅, 陈玉超, 等. 草地贪夜蛾的发育起点温度、有效积温和发育历期预测模型[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 18 - 26.
- [33] 霍鸣飞, 吕建华, 刘淑丽. 不同低温驯化处理对重要储粮害虫过冷却点和冰点的影响[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2016, 46(6): 665 - 669.
- [34] BÜRGI L P, MILLS N J. Cold tolerance of the overwintering larval instars of light brown apple moth *Epiphyas postvittana* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56(11): 1645 - 1650.
- [35] WILLIAMS C M, NICOLAI A, FERGUSON L V, et al. Cold hardiness and deacclimation of overwintering *Papilio zelicaon* pupae [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2014, 178: 51 - 58.
- [36] WILLIAMS C M, CHICK W D, SINCLAIR B J. A cross-seasonal perspective on local adaptation: metabolic plasticity mediates responses to winter in a thermal-generalist moth [J]. *Functional Ecology*, 2015, 29(4): 549 - 561.
- [37] 张徐, 吕宝乾, 金启安, 等. 低温对椰心叶甲成虫体内几种抗寒物质含量的影响[J]. 热带作物学报, 2013, 34(5): 942 - 946.
- [38] 岳雷, 周忠实, 刘志邦, 等. 不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫耐寒性生理指标的影响[J]. 昆虫学报, 2014, 57(6): 631 - 638.
- [39] 谢殿杰, 张蕾, 程云霞, 等. 不同温度下草地贪夜蛾年龄-阶段实验种群两性生命表的构建[J]. 植物保护, 2019, 45(6): 20 - 27.
- [40] 谢殿杰, 张蕾, 程云霞, 等. 温度对草地贪夜蛾飞行能力的影响[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 13 - 17.
- [41] 吴秋琳, 姜玉英, 吴孔明. 草地贪夜蛾缅甸虫源迁入中国的路径分析[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 1 - 6.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 55 页)

- [25] MURRAY M, THOMPSON W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321 - 4326.
- [26] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. *Application Environment Microbiology*, 1995, 61(4): 1323 - 1330.
- [27] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553.
- [28] HONG S G, CRAMER R A, LAWRENCE C B, et al. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42(2): 119 - 129.
- [29] 曾向萍, 符美英, 何舒, 等. 大麻叶斑病病原菌鉴定[J]. 分子植物育种, 2018, 16(21): 7094 - 7098.
- [30] 陈冠州, 沈会芳, 林壁涛, 等. 蜘蛛兰红斑病的病原鉴定[J]. 广东农业科学, 2015, 42(9): 73 - 76.
- [31] 曲文文, 刘霞, 杨克强, 等. 山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 121 - 128.
- [32] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1): 101 - 106.
- [33] 宋顺华, 马乐乐, 宁利园, 等. 北京西瓜嫁接苗褐斑病原鉴定[J]. 植物保护学报, 2017, 44(5): 865 - 866.
- [34] 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.
- [35] 赵金梅, 高贵田, 谷留杰, 等. 中华猕猴桃褐斑病原鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 中国农业科学, 2013, 46(23): 4916 - 4925.
- [36] 赵艳琴, 于华荣, 石凯, 等. 高粱链格孢叶斑病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2017, 47(2): 282 - 285.
- [37] 赵圆, 王玲杰, 王雪峰, 等. 杂柑褐斑病的病原鉴定[J]. 果树学报, 2014, 31(2): 292 - 295.
- [38] 岳海梅, 庄华, 孙广宇, 等. 银杏内生小孢子链格孢的分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(7): 191 - 196.
- [39] 张荣, 岳海梅, 孙广宇. 小孢子链格孢 OPA2-1 核苷酸序列分析及系统发育研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 553 - 557.
- [40] 岳海梅, 张荣, 孙广宇. 小孢子链格孢 endoPG 基因核苷酸序列分析及系统发育研究[J]. 菌物学报, 2007, 26(2): 202 - 210.
- [41] 符丹丹. 中国苹果炭疽病原菌的遗传多样性[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.

(责任编辑: 田 喆)