研 究 简 报
Research Notes

辽宁省北镇市葡萄叶斑病的病原鉴定

刘 梅， 王彩霞， 燕继晔， 贾静怡， 李兴红*

（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，北京 100097）

摘要 近年来辽宁省北镇市出现一种葡萄叶斑病，症状表现为圆形或椭圆形小黑斑，病斑周围褪绿变黄，为明确引起该病的病原菌，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、*GAPDH*、*CHS*-1、*ACT*、*TUB2* 基因）和形态学特征观察对纯化后的菌株进行鉴定，并结合柯赫氏法则对其进行验证。结果确定病原菌为平头炭疽菌 *Colletotrichum truncatum*.

关键词 葡萄； 叶斑病； 多基因系统发育； 平头炭疽菌

中图分类号： S 436.631.1 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2019631

Identification of the pathogen causing leaf spot on grape in Beizhen city of Liaoning province

LIU Mei， WANG Caixia， YAN Jiye， JIA Jingyi， LI Xinghong*

（*Institute of Plant Protection and Environmental Protection*, *Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences*, *Beijing Key Laboratory for Environmental Friendly Management on Fruit Diseases and Pests in North China Fruits*, *Beijing* 100097, *China*）

Abstract In recent years, a grape leaf spot disease appeared in Beizhen city of Liaoning province. The symptoms included small black round or oval spots, around the spots leaf faded green and turned yellow. Based on tissue isolation method, multi-gene phylogenetic analysis (ITS, *GAPDH*, *CHS*-1, *ACT*, *TUB2*), morphological characters and Koch's postulates, the pathogen was identified as *Colletotrichum truncatum*.

Key words grape; leaf spot; multi-gene phylogeny; *Colletotrichum truncatum*

葡萄为葡萄科葡萄属落叶藤本植物，原产于欧洲和亚洲西部[1]，是世界上种植面积最大的水果之一。我国葡萄产量和种植面积长期位居世界前列[2-3]。在葡萄栽培过程中，有时会在叶片上出现由真菌侵染形成的大小形状不一的斑点，具有传染性，造成叶片局部坏死甚至整片枯黄脱落，对葡萄生产造成不利影响。

目前国内外已经报道的葡萄真菌性叶斑病主要有褐纹病[4-5]、大褐斑病[6-8]、小褐斑病[7-8]、轮斑病[9]、壳针孢叶斑病[10]、环纹叶枯病[10]、假尾孢叶斑病[11]和尾孢叶斑病[12]、角斑叶焦病、叶枯病、黑痣病、枝孢叶斑病[13-14]，*Neopestalotiopsis vitis*[15]、*Cladosporium hebeiense*[16]引起的葡萄叶斑病，以及由链格孢 *Alternaria alternata*、葡萄链格孢 *A. viniferae* 和乔木链格孢 *A. arborescens*[17]引起的葡萄叶斑病等。近年来辽宁北镇葡萄上出现叶斑病症状，表现为叶上出现圆形或椭圆形小黑斑，病斑周围褪绿变黄，影响叶片功能，进而影响果实产量和品质。

为明确引起该病害的病原菌，对病样进行分离培养，采用多基因系统发育分析结合形态学特征对分离得到的病原菌进行鉴定，以期为该葡萄叶斑病的发生和防治提供参考。

收稿日期： 2019-11-19 **修订日期**： 2020-02-01
基金项目： 国家葡萄产业技术体系（CARS-29-bc-2）；北京市科技计划项目（D171100001617002）
* 通信作者 E-mail：lixinghong1962@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及寄主：从辽宁北镇采集出现圆形或椭圆形小型黑色病斑、周围出现褪绿变黄的葡萄叶斑病病叶 15 片，带回实验室进行组织分离。致病性测定所用‘夏黑’葡萄叶片采自北京葡萄与葡萄酒工程技术研发中心。

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，121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

试剂及仪器：十六烷基三甲基溴化铵（cetyltrimethylammoniumbromide，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；其他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 病原菌的分离与纯化

采用常规组织分离法[18]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 的方形组织，用 75％乙醇消毒 30 s，无菌水清洗 3 次，晾干后置于 PDA 平板上，将培养皿置于 25℃、L//D＝12 h//12 h 条件的培养箱中培养，采用单孢分离法进行菌种纯化，将纯化菌株编号为 JZB330152，并在 4℃冰箱保存备用。

1.2.2 病原菌的分子生物学鉴定及系统发育树构建

采用 CTAB 法提取菌株的基因组 DNA。分别利用 rDNA 转录间隔区 ITS 通用引物 ITS-4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）/ITS-5（5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′）[19]、3-磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH* 基因的引物 GDF（5′-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3′）/GDR（5′-GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT-3′）[20]、几丁质合酶 *CHS*-1 基因的引物 CHS-79F（5′-TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG-3′）/CHS-345R（5′-TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG-3′）[21]、肌动蛋白 *ACT* 基因的引物 ACT-512F（5′-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3′）/ACT-783R（5′-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3′）[22]、β-微管蛋白 *TUB*2 基因的引物 BT-2F（5′-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3′）/BT-4R（5′-CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC-3′）[23]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，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/）对所有序列进行比对，利用 BioEdit 7.0.9.0 软件进行多基因序列整合，而后利用 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 形态学观察

将纯化后的菌株在 PDA 平板上于 28℃、L//D＝12 h//12 h 的条件下培养 7～10 d，观察记录菌落形态如形状、颜色、质地等。在显微镜下观察分生孢子、分生孢子盘的形态特征并测量分生孢子大小，共测量 30 个分生孢子。

1.2.4 致病性测定

选取健康成熟的‘夏黑’葡萄叶片，用 1％NaClO 表面消毒 30 s，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，用血球计数法配制浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液备用。采用滴接法对离体叶片分别进行刺伤和无伤接种。每片叶 4 个接种点，于主叶脉两侧各 2 个且对称，一侧刺伤接种，另一侧无伤接种，每点接种孢子悬浮液 20 μL，共处理 9 片叶，重复 3 次，以无菌水为空白对照。接种后将叶片置于 25℃、相对湿度 90％下进行黑暗培养 24 h，之后在相对湿度 65％、光周期 L//D＝12 h//12 h 条件下培养。观察并记录叶片的发病情况，接种部位出现褐色病斑即为开始发病，直至出现与田间相似的症状时对病斑再次进行组织分离，观察分离物与接种菌株的形态特征，完成柯赫氏法则验证。

2　结果与分析

2.1　病原菌的分子生物学鉴定

利用 ITS、*GAPDH*、*CHS*-1、*ACT* 与 *TUB*2 共 5 个基因序列对所得菌株进行 PCR 特异性扩增,分别得到长度为 528、290、249、272 bp 和 497 bp 的片段,以 *Colletotrichum lindemuthianum* CBS144.31 作为外群经 MP 法构建系统发育树,结果显示:JZB330152 与平头炭疽菌 *Colletotrichum truncatum*(CBS 151.35^T)聚在同一支上,自展支持率为 100%(图 1)。

图 1　用最大简约法基于 ITS、*GAPDH*、*CHS*-1、*ACT*、*TUB*2 序列构建的系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree based on combined ITS, *GAPDH*, *CHS*-1, *ACT* and *TUB*2 sequences by maximum parsimony analysis

2.2　病原菌的形态学特征

PDA 培养基上病原菌菌落圆形,边缘整齐,菌丝较稀疏,紧贴培养基生长,初期菌落边缘为白色,中心为浅灰色,后期菌落颜色变为深褐色;分生孢子盘黑色堆状突起;分生孢子呈无色,无分隔,新月或镰刀形,两头钝尖,大小为(15.32～28.51)μm×(3.33～6.62)μm。依据形态鉴定和系统发育分析,将葡萄叶斑病的病原菌鉴定为平头炭疽菌 *Colletotrichum truncatum*(图 2)。

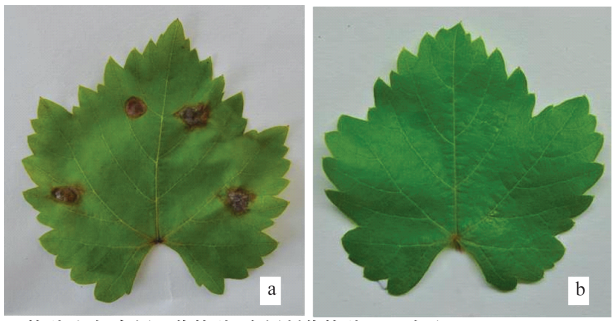
a, b: 菌落形态; c, d: 分生孢子
a, b: Colony; c, d: Conidia

图 2　葡萄叶斑病病原菌 *Colletotrichum truncatum* 的形态特征(标尺=20 μm)

Fig. 2　Morphological characteristics of *Colletotrichum truncatum* causing grape leaf spot disease (scale bars=20 μm)

2.3　致病性测定

无伤和刺伤接种'夏黑'葡萄叶片,接种后 3 d 均开始发病,7 d 病斑逐渐向周边扩展,病斑颜色变深,成暗褐色。对照叶片未发病。对发病叶片再次进行组织分离,分离物与原始分离菌株一致,完成柯赫氏法则验证(图 3)。



a: 接种叶片(左侧无伤接种, 右侧刺伤接种); b: 对照
a: Inoculated leaves (left: no wound inoculation; right: wounded inoculation); b: CK

图 3 室内离体葡萄叶片接种病原菌 7 d 时的发病症状

Fig. 3 The symptoms of infected grape leaves 7 days after inoculation with the pathogen

3 讨论

本研究对采自辽宁省北镇市的感病葡萄叶片进行了病原菌的分离纯化、形态鉴定、致病性测定及柯赫氏法则验证。并对病原菌的 ITS、*GAPDH*、*CHS*-1、*ACT* 与 *TUB*2 基因进行系统发育分析，结果显示，病原菌与平头炭疽菌 *Colletotrichum truncatum* 模式菌株 CBS 151.35^{T} 聚在同一支上，且自展支持率为 100%，结合形态学特征将引起葡萄叶斑病的病原菌鉴定为 *C. truncatum*。

在葡萄的栽培中，炭疽病是一种重要的常见病害，主要为害葡萄果实，一般造成葡萄减产 10%～20%，日本[24]、澳大利亚[25]等国家报道引起葡萄果实炭疽病的病原菌为胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 和(或)尖孢炭疽菌 *C. acutatum*，国内报道引起葡萄炭疽病的病原菌有胶孢炭疽菌、*C. viniferum*、*C. fructicola*以及 *C. aenigma* 和 *C. hebeiense*[26-28]，2016 年笔者在湖北发现 *C. nymphaeae* 引起‘红地球’葡萄嫩梢枯死[29]。目前在我国，平头炭疽菌可危害番茄、火龙果、南瓜等[30-33]，但平头炭疽菌侵染葡萄仅在瑞士有过报道[34]，我国尚未见相关的研究报道。

据调查，在北镇由炭疽病菌引起的葡萄叶斑病在夏季雨季过后发病严重，说明炭疽病的发生与雨水关系密切，高温高湿的环境有利用于病原菌的生长，因此在病害易发生的季节应加强果园管理，及时清除病叶，避免通风不良、浇水过多的情况发生，病害发生严重时，需选择合适的杀菌剂进行防治。Greer 等的研究显示，胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌在侵染特性和对杀菌剂的敏感性方面表现不同。尖孢炭疽菌侵染速度快于胶孢炭疽菌，并且对克菌丹、三环唑的敏感性要显著高于尖孢炭疽菌。而胶孢炭疽菌对苯菌灵的敏感性要高于尖孢炭疽菌[25]。邓维萍等的报道也证实了这点[27]。因此需对平头炭疽菌对杀菌剂的敏感性进行测定，以筛选出高效、安全的药剂投入到葡萄叶斑病的防治中，结合农业栽培、生物防控等多种措施，构建完善的综合防控技术体系，防控病害的进一步发生和蔓延。

参考文献

[1] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京：中国农业出版社，2005.

[2] 刘涛，马龙，堵年生. 葡萄的生物学作用研究进展[J]. 自然杂志，2002，24(2)：81－87.

[3] 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 & Biology，2005，42(2)：119－129.

[4] 范咏梅，郝敬哲，张明智，等. 新疆葡萄褐纹病病原鉴定及症状识别[J]. 植物保护，2007，33(3)：140－142.

[5] 宋卫翠，郭庆元，王洪凯，等. 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[J]. 新疆农业科学，2014，51(5)：893－901.

[6] 柴兆祥. 兰州地区葡萄褐斑病发生为害及菌种鉴定[J]. 甘肃农业大学学报，2001，36(1)：61－64.

[7] 王国珍，樊仲庆，茹庆华，等. 宁夏贺兰山东麓葡萄病害调查[J]. 北方园艺，2002，26(6)：64－65.

[8] 梁春浩，刘丽，臧超群，等. 葡萄褐斑病品种抗性鉴定及其病原菌的生物学特性[J]. 吉林农业大学学报，2014，36(4)：401－406.

[9] 姚敏. 葡萄 2 种常见叶部病害的识别与防治[J]. 农业灾害研究，2015，5(9)：5－10.

[10] 王忠跃. 中国葡萄病虫害与综合防控技术[M]. 北京：中国农业出版社. 2009.

[11] LIANG Chunhao，JAYAWARDENA R S，ZHANG Wei，et al. Identification and characterization of *Pseudocercospora* species causing grapevine leaf spot in China [J]. Journal of Phytopathology，2015，164 (2)：75－85.

[12] 郭英兰，刘锡琎. 中国真菌志·第二十卷·菌绒孢属、钉孢属、色链隔孢属[M]. 北京：科学出版社，2003：189.

[13] DEIGHTON F C. Three fungi on leaves of *Vitis* [J]. Transactions of the British Mycological Society，1976，67(2)：223－232.

[14] WILCOX W F，GUBLER W D，UYEMOTO J K. Compendium of grape diseases，disorders，and pests [M]. Second Edition. Front Matter，2016：5－6.

[15] JAYAWARDENA R S，LIU Mei，MAHARACHCHIKUMBURA S N，et al. *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China [J]. Phytotaxa，2016，258(1)：63.

[16] WANG Caixia，ZHANG Wei，LIU Mei，et al. *Cladosporium hebeiense* sp. nov.，pathogenic on grape leaves in China [J]. Mycotaxon，2019，133(4)：643－654.

(下转 206 页)

病的发生较为普遍，平均发病率为 25.08%，病情指数为 8.24。冬作区马铃薯粉痂病在部分产区有发生，平均发病率为 4.93%，病情指数为 2.39。与 10 年前相比，目前云南省马铃薯粉痂病发生危害程度大幅降低。

参考文献

[1] 杨艳丽. 云南马铃薯生产技术案例与评价[M]. 北京：科学出版社，2018：1－22.

[2] 桑月秋，杨琼芬，刘彦和，等. 云南省马铃薯种植区域分布和周年生产[J]. 西南农业学报，2014，27(3)：1003－1008.

[3] 杨艳丽. 云南马铃薯产业技术与经济研究[M]. 北京：科学出版社，2016：15－31，134－170.

[4] 刘霞，杨艳丽，罗文富. 云南省马铃薯粉痂病发生情况初步研究[J]. 植物保护，2006，32(3)：63－67.

[5] 张智芳，杨海鹰，云庭，等. 几种化学药剂处理对马铃薯粉痂病的防治效果[J]. 中国马铃薯，2016，30(3)：175－180.

[6] 余光海，黄吉会，付兆聪，等. 云南省会泽县马铃薯粉痂病发生情况调查分析初报[J]. 中国植保导刊，2008(11)：21－22.

[7] 惠娜娜，李继平，李建军，等. 甘肃省马铃薯窖藏期粉痂病的初步调查[J]. 中国蔬菜，2009(21)：24－25.

[8] 惠娜娜，李继平，王立，等. 土壤中马铃薯粉痂病菌的简易检测方法[J]. 中国蔬菜，2012(10)：80－82.

[9] 刘霞. 云南省马铃薯粉痂病病原及分布研究[D]. 昆明：云南农业大学，2006.

[10] 许春燕. 云南冬作马铃薯粉痂病发生情况及粉痂菌的定量检测[D]. 昆明：云南农业大学，2008.

[11] MERZ U. Infectivity, inoculum density and germination of *Spongospora subterranea* resting spores: a solution-culture test system [J]. Bulletin OEPP, 1989, 19: 585－592.

（责任编辑：杨明丽）

（上接 188 页）

[17] 王彩霞，李兴红，魏艳敏，等. 引起葡萄叶斑病的链格孢种类的初步鉴定[J]. 植物保护学报，2019，46(1)：175－183.

[18] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京：中国农业出版社，1998.

[19] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic, New York, Academic Press, 1990：315－322.

[20] TEMPLETON M D, RIKKERINK E A, SOLON S L, et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulatas* [J]. Gene, 1992, 122(1): 225－230.

[21] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553－556.

[22] BENSCH K, GROENEWALD J Z, BRAUN U, et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium* [J]. Studies in Mycology, 2015, 82: 23－74.

[23] DAMM U, CANNON P F, WOUDENBERG J C. *Colletotrichum boninense* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73 (1): 1－36.

[24] SUZAKI K. Improved method to induce sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal fungus of grape ripe rot [J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77(2)：81－84.

[25] GREER L A, HARPER J D, SAVOCCHIA S, et al. Ripe rot of south-eastern Australian wine grapes is caused by two species of *Colletotrichum*: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* with differences in infection and fungicide sensitivity [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2011, 17(2)：123－128.

[26] PENG Lijuan, SUN Tao, YANG Youlian, et al. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China [J]. Mycoscience, 2013, 54(1)：29－41.

[27] 邓维萍，杨敏，杜飞，等. 云南葡萄产区葡萄炭疽病病原鉴定及致病力分析[J]. 植物保护学报，2013，40(1)：61－67.

[28] YAN Jiye, RUVISHIKA S J, ISHANI G, et al. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China [J]. Fungal Diversity, 2014, 71(1): 233－246.

[29] LIU Mei, ZHANG Wei, ZHOU Ying, et al. First report of twig anthracnose on grapevine caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China [J]. Plant Disease, 2016, 100(12): 2530.

[30] CHAI Ali, ZHAO Yanjie, SHI Yanxia. et al. Identification of *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler causing anthracnose on pumpkin in China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(1): 121－124.

[31] CHENG B P, HUANG Y H, PENG A T. et al. First report of leaf and fruit spot of *Citrus reticulate* Blanco cv. NianJu caused by *Colletotrichum truncatum* in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(3): 422.

[32] DIAO Yongzhao, ZHANG Can, LIN Dong, et al. First report of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of tomato in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(5): 687.

[33] GUO L W, WU Yixin, HO H H, et al. First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China [J]. Journal of Phytopathology, 2013, 162(4): 272－275.

[34] CASIERI L, HOFSTETTER V, VIRET O, et al. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2009, 48(1): 73－83.

（责任编辑：杨明丽）