植物保护学报 Journal of Plant Protection，2018，45(2)：393-394 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2016133

北京市葡萄炭疽病病原菌的分子鉴定

Molecular identification of the pathogen causing grape anthracnose in Beijing

刘 梅[1] Jayawardena R. S.[1,2] 刘 阳[1] 邢启凯[1] 燕继晔[1] 李兴红[1*]

（1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所，北京 100097；2. 泰国皇太后大学真菌研究所，清莱 57100）

Liu Mei[1] Jayawardena R. S.[1,2] Liu Yang[1] Xing Qikai[1] Yan Jiye[1] Li Xinghong[1*]

（1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Centre of Excellence in Fungal Research, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand）

葡萄是北京市重要的经济作物，葡萄炭疽病是栽培中的常见病害，造成减产10%~20%。近年来，常采用多基因系统发育分析结合形态学特征鉴定该病病原菌，日本（Suzaki，2011）、澳大利亚（Greer et al.，2011）等国家将其鉴定为胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和（或）尖孢炭疽菌 *C. acutatum*，我国将其鉴定为 *C. gloeosporioides*、*C. viniferum*、果生刺盘孢 *C. fructicola*、隐秘刺盘孢 *C. aenigma* 和 *C. hebeiense*（邓维萍等，2013；Peng et al.，2013；Yan et al.，2015）。本研究于2014—2015年采集北京市郊区主要葡萄园的葡萄炭疽病样进行病原菌分离鉴定，以期为该病害的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料及培养基：2014—2015年于北京市7个区8个葡萄园的15个葡萄品种上采集葡萄炭疽病果25份，用常规组织分离法进行病原菌分离，获得31株菌，依次编号为JZB330084~JZB330114。选取市售健康无伤的夏黑葡萄品种果实作为接种材料。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。

试剂及仪器：CATB，美国Sigma公司；*Taq* DNA聚合酶、PCR缓冲液和dNTP等，宝生物工程（大连）有限公司。C1000 PCR仪、电泳系统、GelDocTMXR凝胶成像仪，美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

菌株致病性测定：将各纯化菌株于28℃下在PDA平板培养7 d后打取直径4 mm的菌丝块。将健康无伤的夏黑葡萄果粒经1%次氯酸钠消毒后，每个菌株选取10个果粒，用接种针刺伤后将菌丝块接种于伤口处，保鲜膜包裹，放入垫有湿润滤纸和棉花的塑料盒内，于28℃、相对湿度80%条件下培养，以接种空白PDA培养基为对照。7 d后观察果粒发病情况，以果粒表面凹陷、出现轮纹状排列小黑点或粉红色孢子角视为发病。对发病果粒重新进行组织分离和单孢纯化，获得纯培养物并与原接种菌株进行比较。

病原菌的分子鉴定：采用CTAB法提取病原菌基因组DNA，分别扩增ITS、*TUB2*、*GADPH*、*CHS*、*ACT* 部分相关序列，PCR产物由生工生物工程（上海）股份有限公司测序。测序结果在DNAMAN软件中拼接后提交到GenBank中进行比对，下载相关炭疽菌属菌株的相应序列，分别合并各菌株5个基因序列，采用Clustal X对序列进行比对分析，并利用PAUP 4.0软件以最大简约法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 葡萄炭疽病病原菌的致病性

分离获得的31株菌均可使夏黑葡萄果粒发病，引起腐烂症状。致病力强的菌株在接种第5天后即表现出明显症状，接种第7天除对照无发病症状外，所有接种果粒全部发病，接种症状与田间葡萄炭疽病发病症状相同。对发病果粒进行组织分离，获得的病原菌与原接种菌株一致，依据柯赫氏法则证明接种菌即为葡萄炭疽病的病原菌。

2.2 葡萄炭疽病病原菌的分子鉴定

将31株菌的ITS、*TUB2*、*GADPH*、*CHS*、*ACT* 序列提交至GenBank，获得155条序列登录号，其中28株菌的5个相关序列与NCBI上的 *C. viniferum* 相关序列同源性为99%~100%；而有2株菌（JZB330092和JZB330094）与隐秘刺盘孢的相关序列同源性为99%~100%；有1株菌（JZB330091）与果生刺盘孢的相关序列同

基金项目：国家现代农业（葡萄）产业技术体系（CARS-30），北京市农林科学院青年基金（QNJJ 201515）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：lixinghong1962@163.com；收稿日期：2016-07-06

源性为99%~100%。选取28株*C. viniferum*中的3株构建系统发育树(图1),发现北京市葡萄炭疽病病原菌有3种,其中*C. viniferum*占90.3%,分布最广,是优势种;隐秘刺盘孢和果生刺盘孢分别占6.5%和3.2%。

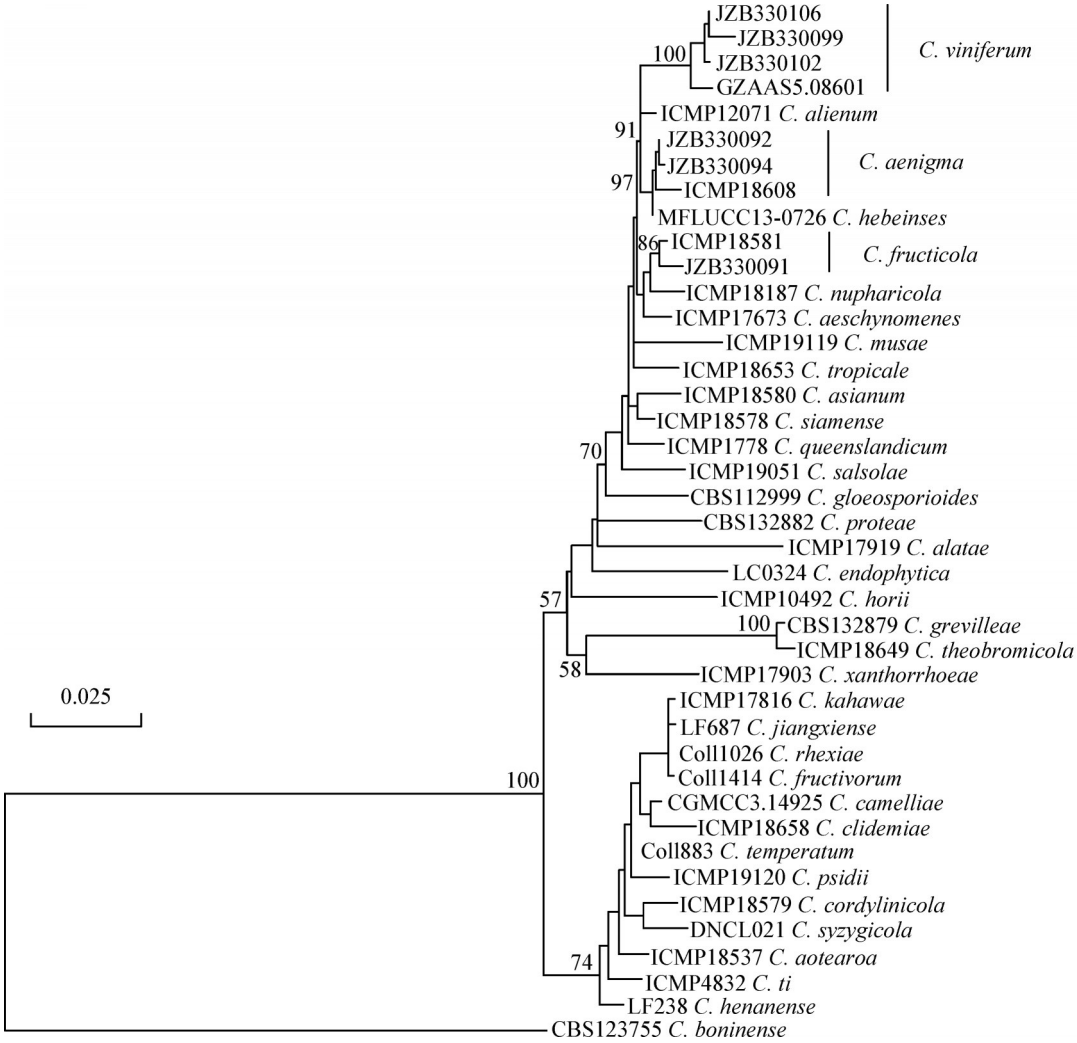

图1 基于ITS、*TUB2*、*GADPH*、*CHS*、*ACT*序列构建葡萄炭疽病菌与其相关菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Colletotrichum* sp. and related isolates based on combined ITS, *TUB2*, *GADPH*, *CHS* and *ACT* sequences

3 讨论

本研究确定了北京市葡萄炭疽病的病原菌为*C. viniferum*、隐秘刺盘孢和果生刺盘孢,其中*C. viniferum*是主要病原菌。前2种病原菌与Yan et al.(2015)的报道一致,Peng et al.(2013)在贵州省发现果生刺盘孢能够引起葡萄炭疽病,而在北京市是首次发现果生刺盘孢是葡萄炭疽病的病原菌。本试验仅初步明确了不同种的葡萄炭疽病病原菌在北京市的分布情况,有关病原菌侵染机制和防治措施等需进一步研究。

参 考 文 献(References)

Deng WP, Yang M, Du F, Yang JZ, Zhu SS. 2013. Identification of the pathogen causing grape anthracnose in Yunnan and its pathogenicity. Journal of Plant Protection, 40(1): 61−67 (in Chinese) [邓维萍, 杨敏, 杜飞, 杨积忠, 朱书生. 2013. 云南葡萄产区葡萄炭疽病病原鉴定及致病力分析. 植物保护学报,40(1): 61−67]

Greer LA, Harper JDI, Savocchia S, Samuelian SK, Steel CC. 2011. 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. Australian Journal of Grape and Wine Research, 17(2): 123−128

Peng LJ, Sun T, Yang YL, Cai L, Hyde KD, Bahkali AH, Liu ZY. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. Mycoscience, 54(1): 29−41

Suzaki K. 2011. Improved method to induce sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal fungus of grape ripe rot. Journal of General Plant Pathology, 77(2): 81−84

Yan JY, Jayawardena MMRS, Goonasekara ID, Wang Y, Zhang W, Liu M, Huang JB, Wang ZY, Shang JJ, Peng YL, et al. 2015. Diversity species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. Fungal Diversity, 71(1): 233−246

(责任编辑:李美娟)