

甘肃省樱桃黑斑病原菌的分离及鉴定

杨丽萍¹, 金梦军¹, 崔凌霄¹, 李统华¹, 安杰¹, 魏立娟¹, 畅涛², 杨成德^{1*}

¹甘肃农业大学植物保护学院·甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070;

²陕西上格之路生物科学有限公司, 西安 710400)

摘要:【目的】明确引起甘肃省樱桃黑斑病的病原菌种类, 为该病害的诊断和防治提供依据。【方法】以采自甘肃省天水市秦州区的樱桃黑斑病叶片为材料, 用组织分离法对致病菌分离, 通过柯赫氏法则验证其致病性, 结合形态学和分子生物学方法鉴定病原菌。【结果】从发病叶片中分离得到9株分离物, 经致病性测定, 分离物 TYY2、TYY6 和 TYY9 有致病性, 且与田间发病症状基本一致。利用过敏原基因(Alta1)、钙调蛋白基因(CAL)和质膜腺苷三磷酸基因(ATPase)特异性引物进行 PCR 扩增和测序, 序列分析表明 TYY2 菌株与交链格孢(*Alternaria alternata*) 同源性分别为 99.15%(登录号: MG199093)、98.75%(登录号: MG925123) 和 99.23%(登录号: MH492681), 且在系统发育树上聚在一起; TYY6 菌株与细极链格孢(*A. tenuissima*) 同源性分别为 99.73%(登录号: KY561842)、99.72%(登录号: MG925159) 和 99.92%(登录号: MF073265), 且在系统发育树上聚在一起; TYY9 菌株与交链格孢(*A. alternata*) 同源性分别为 100.00%(登录号: MG199093)、100.00%(登录号: KJ920975) 和 99.49%(登录号: MG736305), 且在系统发育树上聚在一起。【结论】根据 TYY2、TYY6 和 TYY9 菌株的形态特征和基因序列鉴定结果, 将樱桃黑斑病原菌 TYY2 和 TYY9 菌株鉴定为交链格孢(*A. alternata*), TYY6 鉴定为细极链格孢(*A. tenuissima*), 为国内首次报道细极链格孢引起樱桃黑斑病。

关键词: 樱桃黑斑病; 病原菌; 鉴定; 细极链格孢

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)06-0891-09

Isolation and identification of the pathogen causing cherry black spot in Gansu province

YANG Liping¹, JIN Mengjun¹, CUI Lingxiao¹, LI Tonghua¹, AN Jie¹, WEI Lijuan¹, CHANG Tao², YANG Chengde^{1*}

¹College of Plant Protection, Gansu Agricultural University/Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, Gansu, China; ²Shaanxi Shanggezhu Biological Science Co., Ltd., Xi'an 710400, Shaanxi, China)

Abstract: 【Objective】Cherry black spot disease caused by *Alternaria* spp., induces rot and shrinkage fruit and perforated leaves. It tends to be serious over the years and affects the economic benefits of the cherry industry. *Alternaria* spp. are common pathogens, and they have cultural diversity, strong adaptability and broad hosts. It is important to clarify the pathogen species causing cherry spot for the diagnosis and comprehensive control of the disease. 【Methods】Based on the tissue isolation method, the cherry leaves with black spot collected from Qinzhou district, Tianshui city, Gansu province. The pieces of the leaves (5 mm×5 mm) were disinfected with 10% sodium hypochlorite and cultured on PDA plate. After 3 days, the edge of colony were picked to purify and then stored at 4 °C. In order to determine the pathogenicity of the isolates with the postulates of Koch's, the isolates cultured for 7 days were diluted to suspensions (10⁸ spore per mL), and then were sprayed on the healthy cherry leaves with wound stabbed with insect needle, respectively. The cherry leaves inoculated with sterile

收稿日期: 2019-11-19 接受日期: 2020-03-10

基金项目: 甘肃省农牧厅产业技术体系(GARS-GC-2)

作者简介: 杨丽萍, 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物病害及综合防治方面的研究。Tel: 18153959400, E-mail: 1132828516@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0931-7632161, E-mail: yangcd@gsau.edu.cn

water were used as a control. All treatments were moisturized with sterile cotton wool and placed in incubator at 25 °C. The assay was repeated three times. The pathogens were identified through microscopic observation of the morphological characteristics of hyphae, conidia and sporulation. To further identify the pathogens, the DNAs of the them were extracted with the OMEGA fungal extraction kit (D3195-01), and the sequence of them were amplified with the *Alternaria* major allergen gene (Alta1), calmodulin gene (CAL) and plasma membrane adenosine triphosphatase gene (ATPase), respectively, and the products detected by 1% agarose gel electrophoresis were sequenced by Xi'an TSINGKE Zexi Biotechnology Co., Ltd. The phylogenetic tree was constructed by the Blast comparison and the neighboring method (NJ) by MEGA 7.0 to identify the taxonomic status of the pathogens on cherry black spot. **【Results】**9 isolates, named TYY1-9, were isolated from the collected leaves of cherry infected by the black spot disease. After 5 days of inoculation, the cherry leaves inoculated with the isolates TTY2, TYY6 and TYY9 exhibited infected symptoms. Among them, the isolate TTY2 produced dark brown irregular lesions on the leaves and gray black mold layer on the back of the leaves. The isolate TTY6 induced browned leaves and black mold layer on the lesions. In addition, the leaves inoculated with isolate TYY9 showed brown spots and inconspicuous concentric stripes. The symptoms appeared on the inoculated leaves were similar to that collected from field, however the control was asymptomatic. The diseased leaves were isolated again and the isolates TTY2, TYY6 and TYY9 were obtained. According to Koch's postulates, it was concluded that all three isolates were pathogens causing cherry black spot. After culturing on PDA plate for 7 days at 25 °C, the colony of TTY2 was concentric with white and dark green, and aerial hyphae was hyaline, and the size of conidia was 7.68-32.31 μm×3.50-8.32 μm. The strain TYY6 was dark green with irregular edges. Conidia were single or skewered, mostly stick-shaped, a few were oval or round, light brown or brown, with 1-4 septa, 0-5 longitudinal membranes, and spore size was 51.51-7.44 μm × 3.85-8.65 μm. The strain TYY9 was gray to dark gray round colony on the PDA plate, and the back of the colony was black. The conidia size was 7.46-34.85 μm×3.58-10.67 μm, with 1-6 septa and 0-4 mediastinum. To further classify the taxonomic status of the pathogens, the specific primers of *Alternaria* major allergen gene (Alta1), calmodulin gene (CAL) and plasma membrane adenosine triphosphatase gene (ATPase) were used to amplify the genomic DNA of the 3 isolates. The results indicated that the TTY2 were 99.15% (accession number: MG199093), 98.75% (accession number: MG925123) and 99.23% (accession number: MH492681) identical to the three sequences of *A. alternate*, respectively. The identities of three genes for the strain TYY6 were 99.73% (accession number: KY561842), 99.72% (accession number: MG925159) and 99.92% (accession number: MF073265) in comparison to the sequence of *A. tenuissima*. In addition, the identities of genes for the strain TYY9 were 100.00% (accession number: MG199093), 100.00% (accession number: KJ920975) and 99.49% (accession number: MG736305) in comparison to the sequence of *A. alternate*. **【Conclusion】**9 isolates were isolated from the cherry leaves with black spot, and the isolates TTY2, TYY6 and TYY9 were confirmed as pathogens causing cherry black spot in Tianshui city. Combined with morphological characteristics and phylogenetic analysis, strain TYY6 was identified as *A. tenuissima*, which was firstly reported on cherry in China, and the strains TTY2 and TYY9 were identified as *A. alternate*. Therefore, the quantity and species of pathogens causing cherry black spot disease should be comprehensively considered in the diagnosis and the control of the disease.

Key words: Cherry black spot; Pathogen; Identification; *Alternaria tenuissima*

甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 为蔷薇科李属樱亚属植物^[1], 原产于欧洲, 引入中国栽培已有一百多年。在我国发展较快, 因其成熟期早, 经济效益高, 是目前栽培效益最高的果树之一。甜樱桃果实外观鲜艳、风味独特、营养丰富, 有研究表明, 适量食用樱桃可以软化血管缓解疲劳, 降低血糖控制糖尿病, 防治痛风等^[2-5]功效。据报道, 截止 2018 年底, 甘肃省天水市秦州区樱桃栽培面积达 5 333 hm², 产量 3.25 万 t, 产值超过 6.17 亿元^[6]。基于 2001—2017 年全球樱桃产量及贸易数据, 中国樱桃进口可能的数量缺口为 0.9 万 t^[7], 市场供不应求。随着樱桃种植面积扩大, 树势的衰老, 栽培面积不合理, 果树管理技术提高较慢, 病害日益严重。目前国内外报道的樱桃病害有由葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 引起的流胶病^[8]; 核果钉孢菌 (*Passalora circum-scissa*) 引起的樱桃褐斑穿孔病^[5], 使樱桃叶片产生黄褐斑, 干化皱缩而形成孔洞; 根癌病由根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 引起的一种细菌性病害^[9]; 褐腐病菌 (*Monilia fructigena*) 引起樱桃褐腐病使果实脱落腐烂^[10]; 灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 危害樱桃花, 叶片和果实^[11]。据国内外报道, 引起樱桃黑斑病和果腐病的主要病原菌是交链格孢 (*A. alternata*)^[12-13] 和樱桃链格孢 (*A. cerasi*)^[14], 而链格孢的其他种对樱桃的侵染未见报道。

链格孢 (*Alternaria*) 属子囊菌 Ascomycota 座囊菌纲 Dothideomycetes 格孢腔菌目 Pleosporales 格孢腔菌科 Pleosporaceae, 具有适应性强、寄主范围广和危害严重等特点, 是极为常见的一种病原菌^[15]。全世界已描述的 500 个链格孢真菌种级分类单位中^[16], 95% 以上寄生在植物上, 可引起多种作物发生病害, 如莴笋叶斑病^[17]、棉花轮纹斑病^[18]、胡萝卜黑腐病^[19] 和番茄早疫病^[20]。据报道, 细极链格孢 (*A. tenuissima*) 可引起马铃薯黑斑病, 导致植株枯萎和叶片坏死, 严重时也可侵染块茎^[21], 葡萄穗轴褐枯病 (*grape Alternaria rot*) 危害葡萄穗轴、果梗和叶片^[22], 还可引起五味子叶枯病^[23] 和大麦叶枯病^[24] 等多种病害发生。2018 年在甘肃省天水市秦州区 10 个樱桃园共 2.33 hm² 进行调查时, 在 4 个果园均发现樱桃黑斑病, 引起叶片产生大面积褐色病斑, 果实品质降低, 产量大幅度减少, 严重影响该产业的经济效益。笔者以樱桃黑斑病发病叶片为材料, 对

其病原菌进行分离、致病性测定和鉴定, 以期明确病原菌种类, 为樱桃黑斑病的诊断和综合防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

樱桃黑斑病样本于 2018 年 8 月 22 日采于甘肃省天水市秦州区, 樱桃品种为‘美早’。

1.2 病原菌的分离和纯化

采用组织分离法进行病原菌分离。于樱桃叶片病健交界处剪取 5 mm×5 mm 的病组织, 10% 次氯酸钠消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 无菌滤纸吸干表面水分。将病组织置于 PDA 培养基上, 每皿 4 片, 并于 25 °C 恒温培养箱中培养 3~4 d, 待长出菌丝后, 挑取菌落边缘菌丝进行纯化, 并转接试管 4 °C 保存。

1.3 致病性测定

采用有伤接种法和摩擦接种法进行致病性测定。将纯化后的菌株培养 7 d 后, 打直径为 5 mm 的菌饼, 置于 100 mL PDA 培养液中, 于 25 °C 条件下震荡培养 72 h, 用倍数稀释法将孢子悬浮液进行稀释, 最后用血球计数板统计每 mL 孢子个数, 稀释制成孢子悬浮液 (10⁸ 个·mL⁻¹)。采用无菌水清洗后的新鲜、健康樱桃叶子进行接种试验。用针刺和石英砂摩擦两种方法造成微伤口, 每片叶子接稀释后孢子悬浮液 (10⁸ 个·mL⁻¹) 1 mL, 均匀涂抹于叶片, 叶柄用湿润的脱脂棉包裹, 将其置于有无菌滤纸的培养皿中, 并向滤纸加少量水以保证湿度, 3 次重复, 无菌水喷洒叶片表面作为对照, 保湿 2 d 后, 连续观察发病情况。待叶片发病后, 对病原菌进行再次分离, 将分离菌株与接种菌株进行菌落及孢子形态比较, 确定其是否具有致病性。

1.4 病原菌鉴定

1.4.1 形态鉴定 将纯化后的菌株接于 PDA 培养基上, 7 d 后观察其菌落形态; 用显微镜观察其菌丝、分生孢子和产孢结构的形态特征并拍照, 对病原菌进行形态鉴定^[25]。

将滤纸裁成与载玻片大小相同, 并将其中间剪成 1 cm×2 cm 的空隙, 贴于载玻片, 再将水琼脂用移液枪滴于空隙中。待水琼脂凝固后, 把菌株转接于水琼脂上, 在滤纸上每天加 2 次 (500 μL) 无菌水, 放置于 25 °C 培养箱上 5 d。在显微镜下观察其产

孢表型。

1.4.2 分子生物学鉴定 (1)DNA 提取。将纯化的菌株接于 PDA 培养基上培养,7 d 后根据 OMEGA 真菌 DNA 提取试剂盒步骤提取。

(2)PCR 扩增。将所提取的病原菌 DNA 用核糖体 RNA 序列(ITS)、过敏原基因(Alta1)、钙调蛋白基因(CAL)和质膜腺苷三磷酸基因(ATPase)进行 PCR 扩增,扩增引物如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer information

目标基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
ITS 序列 ITS sequence	ITS1 ITS4	5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
过敏原 Alta1 序列 Allergen Alta1 sequence	Alt-R Alt-F	5'-ACG AGG GTG AYG TAG GCG TC-3' 5'-ATG CAG TTC ACC ACC ATC GC-3'
钙调蛋白 CAL 序列 Calcium barine CAL sequence	CALDR1 CALDF1	5'-CTT CTG CAT CAT CAY CTG GAC G-3' 5'-AGC AAG TCT CCG AGT TCA AGG-3'
质膜腺苷三磷酸 ATPase 序列 Plasma membrane adenosine triphosphate ATPase sequence	ATPDF1 ATPDR1	5'-ATC GTC TCC ATG ACC GAG TTC G-3' 5'-TCC GAT GGA GTT CAT GAT AGC C-3'

ITS 在 20 μL 反应体系中完成扩增,包括 10 μL Mix, 1 μL DNA, ITS1 和 TTS4 各 0.5 μL , 8 μL ddH₂O。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

Alta1 在 25 μL 反应体系中完成扩增,包括 12 μL Mix, 1 μL DNA, Alt-R 和 Alt-F 各 1 μL , 10 μL ddH₂O。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

CAL 在 25 μL 反应体系中完成扩增,包括 12 μL Mix, 1 μL DNA, CALDR1 和 CALDF1 各 1 μL , 10 μL ddH₂O。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

ATPase 在 25 μL 反应体系中完成扩增,包括 12.5 μL Mix, 1 μL DNA, ATPDF1 和 ATPDR1 各 1 μL , 9.5 μL ddH₂O。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

取 3 μL PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送往西安擎科泽西生物科技有限公司测序。

采用软件 MEGA7.0 以邻接法 (NJ) 构建系统发育树。

2 结果与分析

于甘肃省天水市秦州区,采集樱桃叶片样品。

发病初期,病叶出现黑色点状小斑点,之后逐渐扩展为近圆形或不规则,中央灰白色,边缘黑褐色病斑,病健交界明显;严重时病斑扩大连成片状,叶片焦枯;有时会造成叶片穿孔,叶片残缺,甚至脱落(图 1)。



图 1 樱桃叶片发病症状

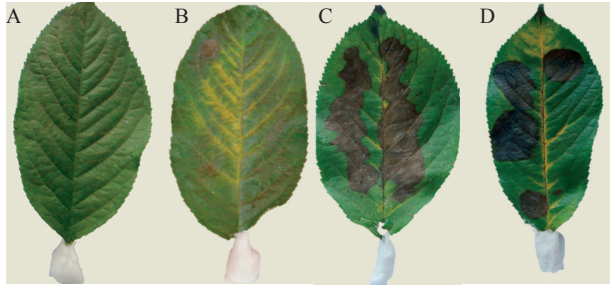
Fig. 1 Symptoms of cherry leaf disease

2.1 病原菌分离和致病性测定

采用组织分离法对不同的发病叶片从病健交界处的植物组织进行分离,纯化得到 9 株分离物,编号为 TYY1-9,并将其保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

9 株分离物接种健康樱桃叶片,接种 5 d 后, TYY2、TYY6 和 TYY9 以针刺法和石英砂摩擦法接种后叶片均发病,其中 TYY2 分离物使叶片产生深褐色不规则病斑,叶片背面有灰黑色霉层(图 2-B)。TYY6 分离物使大部分叶片变褐,病健交界明

显,病斑处产生黑色霉层(图 2-C)。TYY9 分离物使叶片产生褐色病斑,病斑中有不明显同心轮纹状(图 2-D)。3 株分离物均可侵染叶片,表现出明显的发病症状,而对照未发病(图 2-A)。对发病部位再次分离,通过对分离菌株与接种菌株进行菌落及孢子形态比较,均可再次分别获得接种分离物 TYY2、TYY6 和 TYY9,确定 3 种分离物均为樱桃黑斑病的病原菌。



A. 对照;B. 菌株 TYY2 接种症状;C. 菌株 TYY6 接种症状;D. 菌株 TYY9 接种症状。

A. CK; B. Symptoms of TYY2 strain; C. Symptoms of TYY6 strain; D. Symptoms of TYY9 strain.

图2 病原菌致病性测定

Fig. 2 Pathogenicity test

2.2 病原菌的鉴定

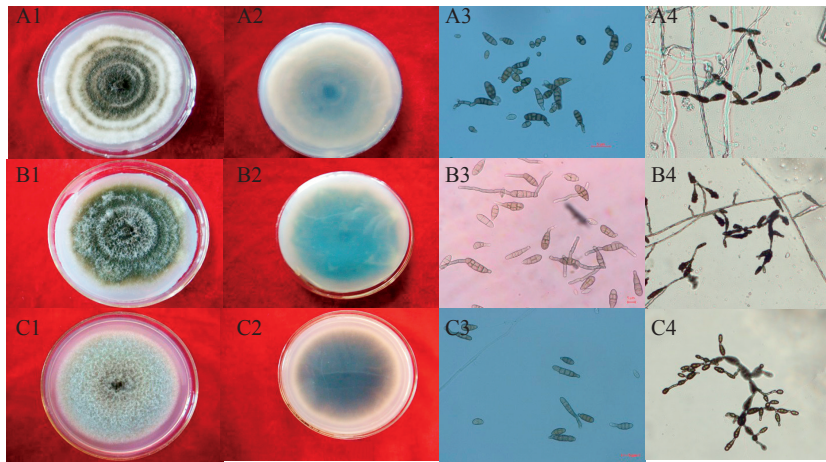
2.2.1 形态特征观察 TYY2 菌落和菌体形态。分离物 TYY2 在 PDA 培养基上 25 °C 培养 7 d, 菌落呈圆形, 1~3 d 菌落为白色, 3 d 后颜色逐渐变为灰绿色或墨绿色, 外围新生菌丝为白色, 菌落呈白色与墨绿色的同心轮纹状(图 3-A1); 菌落背面为灰白色(图 3-A2)。菌丝和气生菌丝较发达, 生长较密集, 呈絮状, 最初菌丝颜色为无色, 无隔, 随着时间的变化, 菌丝变为多分支, 多隔, 颜色为褐色或深褐色。分生孢子梗单生或簇生, 分隔, 褐色或深褐色。分生孢子单生或串生, 倒棍棒, 梨形, 卵圆形, 褐色或淡褐色, 有缢缩或无缢缩(图 3-A3), 具有 2~6 个隔膜, 0~3 个纵横隔膜, 大小为(7.68~32.31) μm ×(3.50~8.32) μm 。分生孢子有喙或无喙, 喙为圆柱状, 长度 2.32~13.04 μm , 淡褐色, 有隔(0~3 个)或无隔, 有的在分生孢子侧面生出产孢结构(称为假喙), 喙长为 2.12~9.95 μm 。产孢表型矮树状分支, 可产生二次分支(图 3-A4), 一般支链 1~7 个。

TYY6 菌落和菌体形态。菌株 TYY6 在 PDA 培养基上 25 °C 培养 7 d, 形成墨绿色近圆形菌落, 菌落边缘不整齐, 较薄, 外围菌落表面有稀疏的白色菌丝(图 3-B1), 背面呈黑色(图 3-B2)。菌丝有

隔膜, 多呈锐角分支状, 新生菌丝为无色, 随着时间的增长老旧菌丝变为浅褐色或褐色。分生孢子梗产于菌丝, 有隔膜, 单生或部分簇生, 竖直或少数略弯曲, 淡褐色或者褐色, 底部稍稍膨大。分生孢子单生或串生, 多为棍棒状, 少数为卵圆形或者圆形, 淡褐色或褐色(图 3-B3), 具有 1~4 个隔膜, 0~5 个纵膜, 隔膜处有缢缩, 孢子大小为(51.51~7.44) μm ×(3.85~8.65) μm 。产生喙和假喙(转变为产孢结构), 柱状, 有隔膜(0~5 个), 淡褐色, 喙长为 2.4~32.30 μm 。产孢表型矮树状的分生孢子短链生(图 3-B4), 一般支链 2~6 个, 可进行二次分支。

TYY9 菌落和菌体形态。人工培养 7 d 后, 菌落在 PDA 培养基上呈灰色至暗灰圆形菌落, 中间略微凸起, 气生菌丝和菌丝发达(图 3-C1), 菌落背面呈黑色(图 3-C2)。新生菌丝为无色无隔, 老旧菌丝褐色有隔。分生孢子梗淡褐色或褐色, 单生或簇生, 有均匀的隔, 直立或弯曲, 有的呈二叉状分枝。分生孢子单生或短链生, 倒棍棒形、卵圆形, 褐色或深褐色, 表面光滑或有刺状凸起, 有纵横分隔, 分隔处平滑或有缢缩(图 3-C3)。孢子大小为(7.46~34.85) μm ×(3.58~10.67) μm , 具 1~6 个横隔, 0~4 个纵隔。分生孢子有喙或无喙, 喙呈柱状形, 直立或略弯曲, 0~5 个隔膜, 颜色较孢身浅, 喙长为 0~21.83 μm 。产孢表型树状短链生(图 3-C4), 产生 1~6 个分生孢子。

2.2.2 分子生物学鉴定 对致病菌株 TYY2、TYY6 和 TYY9 进行 DNA 提取, 以提取的总 DNA 为模板, 使用引物 ITS 基因序列进行 PCR 扩增, 条带清晰无拖带现象, 获得大小为 540、576 和 578 bp 的片段。将致病菌的 ITS 扩增序列与 Gene Bank 中 ITS 经 BLAST 分析, 结果显示, 三株菌株与交链格孢菌 (*A. alternata*) 和细极链格孢菌 (*A. tenuissima*) 的同源性相近, 无法将其区分。因此选用过敏原基因 (Alta1)、钙调蛋白基因 (CAL) 和质膜腺苷三磷酸基因 (ATPase) 的特异性引物进行 PCR 扩增。Alta1 引物获得大小分别为 471、498 和 482 bp 的片段, CAL 引物获得大小分别为 813、816 和 795 bp 的片段, ATPase 引物获得大小分别为 1 174、1 193 和 1 194 bp 的片段。将 Alta1、CAL 和 ATPase 3 种扩增序列提交至 NCBI 基因库中进行序列比对, 并构建系统发育树, 由图 4 可知, TYY2 菌株的 3 种引物扩增产物均与交链格孢 (*A. alternate*) 同源性分别为



A1. TYY2 菌落正面; A2. TYY2 菌落背面; A3. TYY2 孢子形态; A4. TYY2 产孢表型。 B1. TYY6 菌落正面; B2. TYY6 菌落背面; B3. 孢子形态; B4. TYY6 产孢表型。 C1. TYY9 菌落正面; C2. TYY9 菌落背面; C3. TYY9 孢子形态; C4. TYY9 产孢表型。

A1. Positive side of TYY2 colony; A2. Reverse side of TYY2 colony; A3. Spore morphology of TYY2; A4. Sporulation phenotype of TYY2. B1. Positive side of TYY6 colony; B2. Reverse side of TYY6 colony; B3. Spore morphology of TYY6; B4. Sporulation phenotype of TYY6. C1. Positive side of TYY9 colony; C2. Reverse side of TYY9 colony; C3. Spore morphology of TYY9; C4. Sporulation phenotype of TYY9.

图3 病原菌的菌落形态和分生孢子形态特征

Fig. 3 Colony and conidia morphology of pathogenic fungi

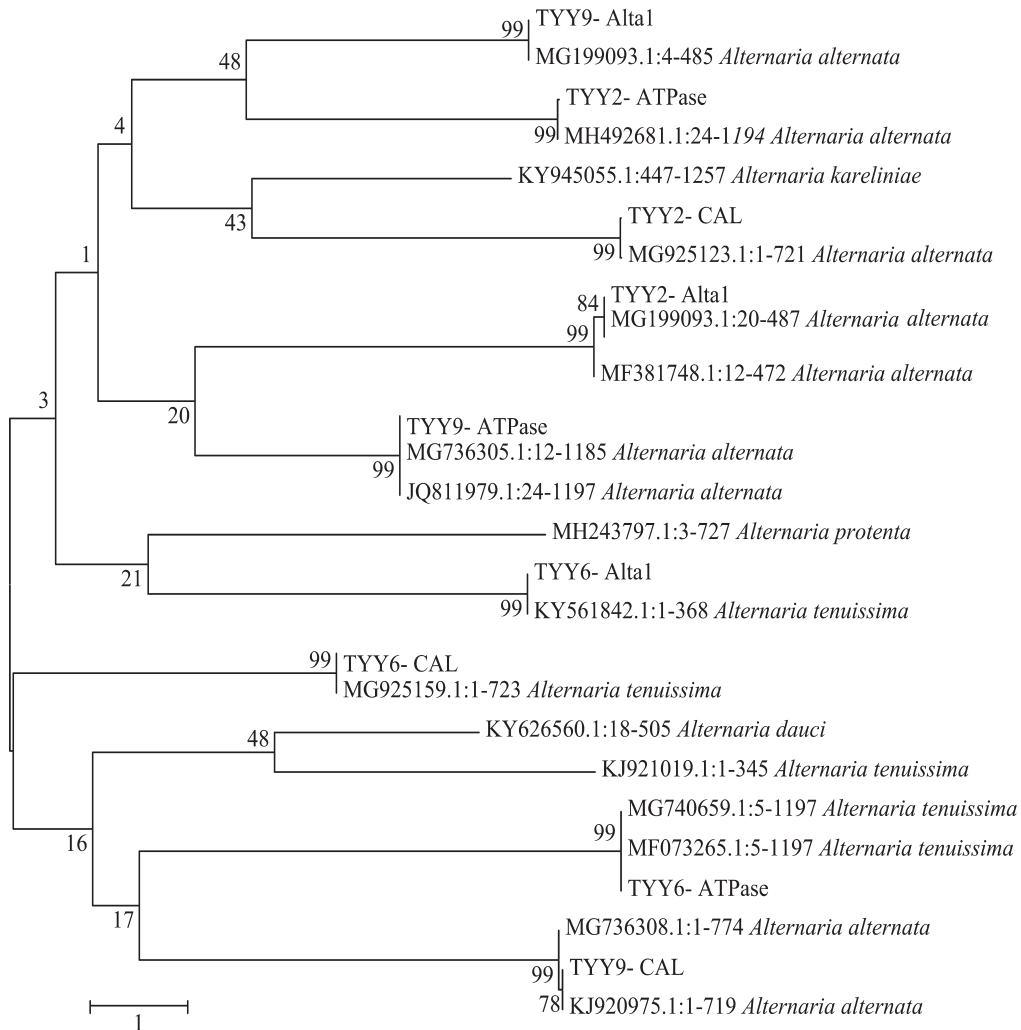


图4 基于 Alta1、CAL 和 ATPase 的 TYY2、TYY6 和 TYY9 菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of TYY2, TYY6 and TYY9 strains based on Alta1, CAL and ATPase gene sequences

99.15% (登录号: MG199093)、98.75% (登录号: MG925123) 和 99.23% (登录号: MH492681), 且在系统发育树上聚在一起; TYY6 菌株的 3 种引物均与细极链格孢 (*A. tenuissima*) 同源性分别为 99.73% (登录号: KY561842)、99.72% (登录号: MG925159) 和 99.92% (登录号: MF073265), 且在系统发育树上聚在一起; TYY9 菌株的 3 种引物均与交链格孢 (*A. alternate*) 同源性分别为 100.00% (登录号: MG199093)、100.00% (登录号: KJ920975) 和 99.49% (登录号: MG736305), 且在系统发育树上聚在一起。结合 TYY2、TYY6 和 TYY9 菌株的形态特征, 鉴定 TYY2 和 TYY9 为交链格孢 (*A. alternate*), TYY6 为细极链格孢 (*A. tenuissima*)。

3 讨论

本研究从樱桃叶片中分离到 9 株分离物, 经致病性测定分离物 TYY2、TYY6 和 TYY9 使樱桃叶片产生典型的黑褐色病斑, 即菌株 TYY2、TYY6 和 TYY9 为天水樱桃黑斑病的病原菌, 且与赵远征^[13]报道的樱桃叶片发病症状相似, 都产生黑褐色病斑且有灰色霉层产生, 但与田间症状相比, 病斑颜色及发病程度略有差异, 这可能是由室内离体叶片接种后寄主抗病性、温度和湿度条件等差异所致, 也可能是因为田间的发病症状是由 2 个种复合感染的结果, 具体原因有待进一步研究; 通过形态学特征和多基因序列分析, 将菌株 TYY2 和 TYY9 鉴定为交链格孢 (*A. alternate*), TYY6 鉴定为细极链格孢 (*A. tenuissima*), 均为小孢子类群, 细极链格孢在我国引起樱桃黑斑病是首次报道。本研究中, 菌株 TYY2 菌落形态与刘峰等^[26]报道的交链格孢 (*A. alternate*) 培养性状一致, 菌株 TYY6 培养性状与孟婷婷等^[27]、钱恒伟等^[28]和杨超等^[22]对细极链格孢 (*A. tenuissima*) 报道一致, 菌株 TYY9 形态特性与朱晓琴等^[29]报道的交链格孢 (*A. alternate*) 形态一致。但菌株 TYY2 和 TYY9 之间的培养性状存在差异, 说明同一种病原菌具有不同的培养性状, 在营养丰富的人工培养基上分生孢子形态又常常产生趋同现象, 其小孢子种形态特征极易受环境因素的影响, 进一步说明根据培养性状无法确定其分类地位^[30]。据报道, 同一种病原菌在不同地区致病力具有差异, 如同种链格孢的不同菌株对葡萄同一部位的致病性有差异^[31], 蕉斑镰刀菌株种间致病力存在显著

差异^[32]。本研究中, TYY9 菌株较 TYY2 菌株的致病性强, 可能是由种内存在的遗传分化造成^[31], 但具体原因有待进一步研究。近年来, 细极链格孢在国内外引起多种病害的发生, 包括猕猴桃果实疮痂病^[33]、红枣黑斑病^[34]和蓝莓叶斑病^[35], 其不仅通过菌丝和孢子侵入寄主, 还能在寄主植物上分泌毒素, 人畜食用后会对健康造成危害, 甚至会引起癌变^[36]。因此, 由细极链格孢引起的樱桃黑斑病防治应受到关注。

本研究将形态特征与分子生物学方法相结合对病原菌进行鉴定, 并且使用多种基因序列对其进行多基因比对和构建系统发育树, 相对更加准确的鉴定了病原菌, 但是该病原菌的寄主范围及致病机制等目前尚未明确, 有待进一步研究。

参考文献 References:

- [1] 王宝刚, 李文生, 侯玉茹, 常虹, 周家华, 石磊, 张开春. 甜樱桃果实成熟过程中糖累积与品质形成研究[J]. 果树学报, 2017, 34(5): 576-583.
WANG Baogang, LI Wensheng, HOU Yuru, CHANG Hong, ZHOU Jiahua, SHI Lei, ZHANG Kaichun. Sugars accumulation and quality in the fruits of sweet cherry during ripening[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(5): 576-583.
- [2] SEERAM N P, MOMIN R A, NAIR M G, BOURQUIN L D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries[J]. Phytomedicine, 2001, 8(5): 362-369.
- [3] SEYMOUR, MITCHELL E, SINGER, ANDREW A M, BEN-NINK, MAURICE R. Cherry-enriched diets reduce metabolic syndrome and oxidative stress in Lean Dahl-SS rats[J]. The FASEB Journal, 2007, 21(5): A103.
- [4] KELLEY D S, RASOOLY R, JACOB R A, KADER A A, MACKAY B E. Consumption of bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women[J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(4): 981-986.
- [5] 刘保友, 张伟, 栾炳辉, 王英姿. 大樱桃褐斑病病原菌鉴定与田间流行动态研究[J]. 果树学报, 2012, 29(4): 634-637.
LIU Baoyou, ZHANG Wei, LUAN Binghui, WANG Yingzi. Identification of pathogen and epidemic dynamics of brown spot of sweet cherry[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(4): 634-637.
- [6] 郭引强. 甘肃秦州大樱桃销售难的现状与分析[J]. 果树实用技术与信息, 2019(3): 45-48.
GUO Yinqiang. Present situation and analysis of difficulties in sales of large cherry in Qin Zhou, Gansu Province[J]. Fruit Tree Practical Technology and Information, 2019(3): 45-48.
- [7] 彭世广. 中美贸易摩擦背景下中国樱桃进口潜力分析[J]. 农业展望, 2019, 15(5): 98-102.

- PENG Shiguang. Import potential of China's cherries under the background of Sino-US trade fricti[J]. *Agricultural Outlook*, 2019,15(5): 98-102.
- [8] 徐丽,王甲威,陈新,魏海蓉,宗晓娟,刘庆忠. 甜樱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.
XU Li, WANG Jiawei, CHEN Xin, WEI Hairong, ZONG Xiaojuan, LIU Qingzhong. Identification and pathogenicity detection of the cherry gummosis pathogen[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2015, 45(4): 350-355.
- [9] 彭子嘉,隋韵静,沈阔程,蒋利华,山春艳,余仲东. 四川泸定樱桃根癌病风险分析[J]. *中国南方果树*, 2018, 47(5): 94-96.
PENG Zijia, SUI Yunjing, SHEN Kuocheng, JIANG Lihua, SHAN Chunyan, YU Zhongdong. Risk analysis of cherry root cancer in Luding, Sichuan[J]. *South China Fruits*, 2018, 47(5): 94-96.
- [10] 刘志恒,白海涛,杨红,唐爽爽,魏美娜,黄欣阳,李俞涛. 大樱桃褐腐病菌生物学特性研究[J]. *果树学报*, 2012, 29(3): 423-427.
LIU Zhiheng, BAI Haitao, YANG Hong, TANG Shuangshuang, WEI Meina, HUANG Xinyang, LI Yutao. Biological characteristics of *Monilia fructigena* as pathogen of brown rot in sweet cherry[J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(3): 423-427.
- [11] 王燕,王春伟,王琳,荆琦,高海馨,余廷濠,王美琴,张作刚,王建国. 樱桃灰霉病菌 LFD-RPA 快速检测方法的建立[J/OL]. *植物病理学报*:1-13[2019-11-04]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000453>.
WANG Yan, WANG Chunwei, WANG Lin, JING Qi, GAO Haixin, YU Tinghao, WANG Meiqin, ZHANG Zuogang, WANG Jianming. Development of LFD-RPA assay for rapid detection of *Botrytis cinerea* in cherry[J/OL]. *Acta Phytopathologica Sinica* :1-13[2019-11-04]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000453>.
- [12] THOMIDIS T, TSIPOURIDIS C. First report of *Alternaria* leaf spot on cherry trees in Greece[J]. *Plant Disease*, 2006, 90(5): 680-680.
- [13] 赵远征,刘志恒,李俞涛,周思,黄欣阳. 大樱桃黑斑病原鉴定及其致病性研究[J]. *园艺学报*, 2013, 40(8): 1560-1566.
ZHAO Yuanzheng, LIU Zhiheng, LI Yutao, ZHOU Si, HUANG Xinyang. Studies on identification and pathogenicity of cherry black spot caused by *Alternaria alternata*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(8): 1560-1566.
- [14] 朱建兰,常永义. 樱桃黑色轮斑病的病原菌鉴定及其生物学研究[J]. *中国果树*, 2004(3): 12-15.
ZHU Jianlan, CHANG Yongyi. Identification and biological study of pathogenic bacteria of cherry black round spot disease[J]. *China Fruits*, 2004(3): 12-15.
- [15] WOUDEBERG J H C, GROENEWALD J Z, BINDER M, CROUS P W. *Alternaria* redefined[J]. *Studies in Mycology*, 2013, 75(1): 171-212.
- [16] 冯倩倩,陈东亮,程曦,董然,李明远,黄丛林. 万寿菊黑斑病的研究进展[J]. *北方园艺*, 2015(20): 181-185.
FENG Qianqian, CHEN Dongliang, CHENG Xi, DONG Ran, LI Mingyuan, HUANG Conglin. Research progress on marigold black spot disease[J]. *Northern Horticulture*, 2015(20): 181-185.
- [17] 郭润婷,石延霞,赵倩,李宝聚. 莴笋链格孢叶斑病原鉴定[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(3): 418-422.
GUO Runtong, SHI Yanxia, ZHAO Qian, LI Baoju. Identification of the pathogens causing leaf spot on lettuce[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2018, 48(3): 418-422.
- [18] 王雅静,李郁婷,刘泉,吴学宏. 棉花轮纹斑病研究进展及防控策略[J]. *植物保护*, 2018, 44(4): 9-14.
WANG Yajing, LI Yuting, LIU Quan, WU Xuehong. Research progress in and integrated management strategies for controlling cotton *Alternaria* leaf spot[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(4): 9-14.
- [19] 赵晓军,周建波,殷辉,封云涛,庄飞云. 胡萝卜黑腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. *植物保护*, 2015, 41(6): 79-82.
ZHAO Xiaojun, ZHOU Jianbo, YIN Hui, FENG Yuntao, ZHUANG Feiyun. Pathogen identification and biological characteristics of carrot black rot[J]. *Plant Protection*, 2015, 41(6): 79-82.
- [20] 卢钟彦,梁巧兰,何武学. 番茄早疫和晚疫病病原菌鉴定及室内药剂的筛选[J]. *草原与草坪*, 2016, 36(1): 83-88.
LU Zhongyan, LIANG Qiaolan, HE Wuxue. Identification on pathogen of two main tomato diseases and fungicides screening in laboratory[J]. *Grassland and Turf*, 2016, 36(1): 83-88.
- [21] 李雅南, Sayed Rashad Ali Shah, 孙少慧, 白艳菊, 吕典秋, 姜丽丽, 闵凡祥, 高云飞, 马纪, 王晓丹, 金光辉. 黑龙江省马铃薯叶斑类病害 *Alternaria* 属病原组成和分布[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(3): 1077-1083.
LI Yanan, Sayed Rashad Ali Shah, SUN Shaohui, BAI Yanju, LÜ Dianqiu, JIANG Lili, MIN Fanxiang, GAO Yunfei, MA Ji, WANG Xiaodan, JIN Guanghui. Composition and distribution of *Alternaria* species causing foliar diseases on potato in Heilongjiang Province of China[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(3): 1077-1083.
- [22] 杨超,张国丽,任毓忠,钟杨琼,高祥雷,李卓,张亚平,李国英. 北疆沿天山北坡一带葡萄穗轴褐枯病原菌的鉴定[J]. *植物保护*, 2017, 43(3): 129-135.
YANG Chao, ZHANG Guoli, REN Yuzhong, ZHONG Yangqiong, GAO Xianglei, LI Zhuo, ZHANG Yaping, LI Guoying. Identification of the pathogens of grape spike-stalk brown along the Tianshan Mountains[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(3): 129-135.
- [23] 刘博,傅俊范,周如军,严雪瑞,薛腾,潘争艳. 五味子叶枯病原菌鉴定[J]. *植物病理学报*, 2008, 38(4): 425-428.
LIU Bo, FU Junfan, ZHOU Rujun, YAN Xuerui, XUE Teng, PAN Zhengyan. Identification of pathogen causing leaf blight on *Schisandra chinensis*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2008,

- 38(4): 425-428.
- [24] 罗臻,张敬泽,胡东维. 大麦叶枯病菌的生物学特性[J]. 植物保护学报,2008,35(5): 469-470.
LUO Zhen, ZHANG Jingze, HU Dongwei. Biological characteristics of *Alternaria tenuissima*, the pathogen of barley leaf blight [J]. Journal of Plant Protection, 2008, 35(5): 469-470.
- [25] 张天宇. 中国真菌志(第十六卷)链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003: 19-41.
ZHANG Tianyu. Chinese fungi (Vol.16): *Alternaria* [M]. Beijing: Science Press, 2003: 19-41.
- [26] 刘峰,杨文香,张娜,赵京献,郭伟珍,张汀,刘大群. 花椒枯穗病病原鉴定[J]. 植物病理学报,2013,43(3): 310-313.
LIU Feng, YANG Wenxiang, ZHANG Na, ZHAO Jingxian, GUO Weizhen, ZHANG Ding, LIU Daqun. Identification of the pathogen of *Zanthoxylum bungeanum* ear blight[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(3): 310-313.
- [27] 孟婷婷,刘闯,齐鹰博,代汉萍,刘艳茹,严雪瑞. 树莓茎溃疡病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国植保导刊,2019, 39(5): 15-20.
MENG Tingting, LIU Chuang, QI Yingbo, DAI Hanping, LIU Yanru, YAN Xuerui. Identification of pathogen of raspberry stem canker and its biological characteristics[J]. China Plant Protection, 2019, 39(5): 15-20.
- [28] 钱恒伟,徐鹏程,迟梦宇,黄金光. 尖孢镰刀菌与极细链格孢复合侵染引起甘薯茎枯病[J]. 植物保护学报,2017,44(5): 867-868.
QIAN Hengwei, XU Pengcheng, CHI Mengyu, HUANG Jinguang. Mixed infection by *Fusarium oxysporum* and *Alternaria tenuissima* on sweet potato *Fusarium wilt*[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(5): 867-868.
- [29] 朱晓琴,宋自力,裴冬丽. 河南省商丘市草莓根腐病病原菌的分离和鉴定[J]. 植物保护学报,2017,44(2): 349-350.
ZHU Xiaoqin, SONG Zili, PEI Dongli. Isolation and identification of strawberry root rot pathogen in Shangqiu, Henan Province [J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(2): 349-350.
- [30] 张敬泽,张天宇,王瑾. 链格孢属种间培养性状的分类研究[J]. 浙江农业大学学报,1997,23(5): 511-514.
ZHANG Jingze, ZHANG Tianyu, WANG Jin. Classification of *Alternaria* species based on their cultural characters[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1997, 23(5): 511-514.
- [31] 王彩霞,李兴红,魏艳敏,燕继晔,王勇,张玮. 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.
WANG Caixia, LI Xinghong, WEI Yanmin, YAN Jiye, WANG Yong, ZHANG Wei. Identification of *Alternaria* species causing leaf spots in grapes[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(1): 175-183.
- [32] 庄义庆,何东兵,王源超,郑小波. 水生病原菌—蕉斑镰刀菌菌株的筛选及其致病性测定[J]. 中国生物防治,2008,24(3): 262-266.
ZHUANG Yiqing, HE Dongbing, WANG Yuanchao, ZHENG Xiaobo. Screening and pathogenicity test of *Fusarium stoveri* isolated from *Alternanthera philoxeroides*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(3): 262-266.
- [33] MA J, LI H X, WANG X Y, GUO M. *Alternaria tenuissima* causing fruit scab disease on *Actinidia chinensis* in Anhui Province [J]. China Plant Disease, 2019. doi:10.1094/pdis-09-19-1835-pdn.
- [34] 宋博,徐兵强,朱晓锋,阿布都克尤木·卡德尔,杨森. 南疆红枣黑斑病病原鉴定及其保守基因序列分析[J]. 植物病理学报, 2017,47(3): 411-415.
SONG Bo, XU Bingqiang, ZHU Xiaofeng, Abudu Keyimu · Kader, YANG Sen. Identification of jujube black spot pathogens in Southern Xinjiang and its sequence analysis of conserved genes[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(3): 411-415.
- [35] 余磊,赵建荣,徐胜光, RARISARA I, 苏源,裴卫华,孔垂思. 云南蓝莓叶斑病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2015, 45(2): 216-219.
YU Lei, ZHAO Jianrong, XU Shengguang, RARISARAI, SU Yuan, PEI Weihua, KONG Chuisi. Identification of the pathogen causing *Alternaria* leaf spot on blueberry in Yunnan[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(2): 216-219.
- [36] MORENO M Á P, ALONSO I G, DE SANTOS R M, LACARRA T G. The importance of genus *Alternaria* in mycotoxins production and human diseases[J]. Nutricion Hospitalaria: Organo Oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral, 2012, 27(6): 1772-1781.