

云南葡萄产区葡萄炭疽病病原鉴定 及致病力分析

邓维萍 杨敏 杜飞 杨积忠 朱书生*

(云南农业大学, 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 为了明确引起云南葡萄产区炭疽病的病原种类, 利用形态鉴定和特异性引物分子检测相结合的方法对从云南省主要葡萄产区采集的 60 株炭疽病菌菌株进行了鉴定。葡萄炭疽病菌菌株的菌落形态和生长速率与对照菌株尖孢炭疽菌 *Colletotrichum acutatum* 差异不明显, 但其分生孢子大小显著小于尖孢炭疽菌, 附着胞深褐色, 球形或不规则形。胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 特异性引物 CgInt/ITS4 从供试葡萄炭疽病菌菌株基因组 DNA 中扩增出 1 条约 500 bp 的特异性条带, 而尖孢炭疽菌特异性引物 CaInt2/ITS4 对葡萄炭疽病菌无扩增条带。研究表明, 引起云南葡萄主产区炭疽病的病原为胶孢炭疽菌; 供试胶孢炭疽菌对红提葡萄均有致病力, 但菌株致病力差异较大, 对番茄和草莓存在交叉侵染的能力, 且对多菌灵的敏感性较尖孢炭疽菌高。

关键词: 葡萄炭疽病; 胶孢炭疽菌; 致病力; 多菌灵

Identification of the pathogen causing grape anthracnose in Yunnan and its pathogenicity

Deng Weiping Yang Min Du Fei Yang Jizhong Zhu Shusheng*

(Key Laboratory of Agro-Biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan Province, China)

Abstract: A total of 60 *Colletotrichum* spp. isolates from anthracnose rot lesions of grapes collected from main grape-growing areas in Yunnan were identified using morphological method and species-specific primers in order to make sure of the pathogen causing grape anthracnose. There was no significant difference in colony morphotype and colony growth rate between strains from grapes and *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds ex J. H. Simmonds strains, but the conidial size of grape anthracnose strains significantly smaller than that of *C. acutatum* strains. The conidial appressoria of *Colletotrichum* spp. isolates from grapes were brown, spherical and irregularly lobed. The genome of 60 isolates had been amplified to produce DNA fragments of 500 bp with species-specific primers CgInt/ITS4 for *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., while no fragments for primers CaInt2/ITS4 of *C. acutatum*. These results indicated that the pathogen of grape anthracnose in Yunnan was *C. gloeosporioides*. Additionally, significant differences were found in pathogenicity of the strains which were all pathogenic to *Vitis vinifera* cv. Red Globe. These isolates could also infect fruits of tomato and strawberry, suggesting that the potential for cross-infection existed among grape, tomato and strawberry. All isolates were more sensitive to carbendazim than that of *C. acutatum* strains.

基金项目: 云南省科技创新强省计划(2007AB007), 国家自然科学基金(30800731), 国家“973”项目(2011CB100400)

作者简介: 邓维萍, 女, 1979年生, 博士研究生, 研究方向为葡萄病害控制, E-mail: dwp212@sina.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: shushengzhu79@126.com, Tel: 0871-5220591

收稿日期: 2012-09-03

Key words: grape anthracnose; *Colletotrichum gloeosporioides*; pathogenicity; carbendazim

炭疽菌属真菌引起的炭疽病是世界范围内农业生产中发生普遍且危害较重的植物病害,对许多林木、果树、蔬菜、花卉、茶树、药用植物以及大田作物等造成严重的经济损失^[1]。葡萄是云南省重要的经济作物,但由于7—9月葡萄成熟期与雨季重叠,常导致葡萄炭疽病暴发流行,造成葡萄果实腐烂脱落,严重影响产量和品质^[2]。炭疽菌属约有100余个种^[3],其中造成葡萄果实腐烂的主要有胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 和尖孢炭疽菌 *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds ex J. H. Simmonds^[4]。1891年, Southworth^[5]将引起美国葡萄炭疽病的病原鉴定为胶孢炭疽菌。Melksham等^[6]和 Yamamoto等^[7]报道,引起澳大利亚和日本葡萄炭疽病的病原为尖孢炭疽菌。而 Dykin & Milholland^[8]及 Kummuang等^[9]分别在美国圆叶葡萄 *Vitis rotundifolia* 和韩国葡萄炭疽病病斑上同时分离到了胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌。我国北京、山东、河北、河南、广西、新疆及辽宁等葡萄产区炭疽病的病原均为胶孢炭疽菌^[10-11],目前尚未见尖孢炭疽菌引起葡萄炭疽病的报道。

传统炭疽病菌的分类鉴定主要依据形态和培养性状,但由于炭疽菌属种间形态较为相近,且随着寄主与病原菌之间相互协同进化,形态学上的分类标准更为模糊^[12],因此仅根据形态特征区分胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌并不准确^[13]。近年来,随着分子生物学技术的发展,分子技术已成为许多物种包括炭疽菌属真菌鉴定及系统进化研究的工具。其中,rDNA内转录间隔区(internal transcribed spaces, ITS)的序列信息已被广泛应用于鉴定不同的生物种及亚种^[14]。如基于ITS序列差异设计的尖孢炭疽菌特

异性引物 CaInt2/ITS4 和胶孢炭疽菌特异性引物 CgInt/ITS4 已成功地用于橄榄和葡萄上炭疽病菌的分子检测^[15]。此外,胶孢炭疽菌对苯并咪唑类杀菌剂的敏感性较尖孢炭疽菌高的特性也常被用于区分这两种炭疽菌^[4]。

本试验利用形态学鉴定结合特异性引物 PCR 方法对云南省葡萄主产区的葡萄炭疽病菌进行鉴定,并对其培养性状、致病力、交叉侵染能力及对多菌灵敏感性进行了分析,以期明确引起云南葡萄产区炭疽病的病原种类,为田间病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:于2007—2009年在云南葡萄主产区弥勒县水晶葡萄园和宾川县、富民县、石林县及丘北县红提葡萄园中随机采集水晶和红提炭疽病病果,撕下病健交界处果皮于1.5%次氯酸钠溶液中浸泡消毒2~3 min,无菌水冲洗3次,用灭菌滤纸吸干水分,于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上培养,单孢纯化后于25℃恒温培养5 d后保存。试验共分离获得60株葡萄炭疽病菌菌株(表1)。对照菌株:6株尖孢炭疽菌菌株 p1、p2、p3、p4、h1 和 la22 由中国农业大学种子病理药理实验室提供,其中 p1、p2、p3 和 p4 分离自福建漳州枇杷病样, h1 和 la22 分离自湖南长沙辣椒病样。于 PDA 培养基上纯化培养后保存备用。

供试品种:红提葡萄、番茄和草莓均从云南当地农贸市场购得。

供试药剂和仪器:98.9%多菌灵(carbendazim)原药,由中国农业大学种子病理药理实验室提供,将

表1 云南葡萄炭疽病菌菌株主要采集信息

Table 1 Main collection data of *Colletotrichum* strains isolated from grape anthracnose samples in Yunnan

采样地 Origin	菌株数 No. of isolates	菌株 Isolate	采样时间 Year	寄主 Host
弥勒县 Mile County	24	m-d-1 ~ m-d-24	2007	水晶 Crystal grape
	8	m-w-1 ~ m-w-8	2008	水晶 Crystal grape
	2	m-z-1, m-z-2	2008	水晶 Crystal grape
宾川县 Binchuan County	6	b-j-1 ~ b-j-6	2008	红提 Red globe grape
富民县 Fumin County	5	f-1 ~ f-5	2009	红提 Red globe grape
石林县 Shilin County	7	s-1 ~ s-7	2008	红提 Red globe grape
丘北县 Qiubei County	8	q-1 ~ q-6, y-x-1, y-y-1	2009	红提 Red globe grape

其溶于 99.5% N, N - 二甲基甲酰胺(利安隆博华(天津)医药化学有限公司)配制为质量浓度 1×10^4 mg/L 的母液备用。徕卡 DM 2000 显微镜,德国徕卡仪器有限公司;9700 型 Veriti 96 孔热循环 - 梯度 PCR 仪,美国应用生物系统公司;Image Quant 300 凝胶成像分析系统,美国通用公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定:形态学鉴定:参照 Choi 等^[16]的方法将采集分离到的葡萄炭疽病菌菌株和对照菌株尖孢炭疽菌菌株纯化接种于 PDA 平板上,置于 25 °C 恒温培养箱黑暗培养 6 d,观察记录菌落正、反面颜色和菌落直径^[12],根据菌落颜色、是否分泌色素及是否有轮纹对 60 株葡萄炭疽病菌菌株进行分组。菌株产孢后用无菌水将孢子洗脱并配制成孢子悬浮液,于显微镜下观察分生孢子形态,每个菌株随机选取 30 个孢子,测量其横、纵径。分子鉴定:采用 CTAB 法^[17]提取供试菌株的基因组 DNA,分别用胶孢炭疽菌特异性引物 CgInt (5'-GACCCTCCCGGC-CTCCC GCC-3')-ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3')^[18]和尖孢炭疽菌特异性引物 CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3')-ITS4^[19]对 60 株葡萄炭疽病菌菌株和 6 株尖孢炭疽菌菌株进行 PCR 扩增。每个 PCR 体系为 25 μ L,其中包括 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.15 μ L、10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L、dNTPs 2.0 μ L、20 μ mol/L 引物各 1 μ L、模板 DNA 1 μ L,以灭菌 ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,60 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 2 min,共 32 个循环;72 °C 延伸 10 min。取 2 μ L 反应产物,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像分析系统中分析 PCR 产物片段大小。

1.2.2 菌株致病力测定:选择新鲜、健康的红提葡萄果实,用 1.5% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 2 min,无菌水冲洗 3 次,置于超净台上吹干。将供试葡萄炭疽病菌和尖孢炭疽菌菌株在 PDA 平板上于 25 °C 下培养至产孢,配制为 10^5 个/mL 的孢子悬浮液,用 20 μ L 孢子悬浮液分别对红提果实进行非伤口接种,然后置于垫有吸水纸的塑料盒内(RH = 100%),25 °C 黑暗培养,以 20 μ L 无菌水接种为对照。每处理 10 颗葡萄,重复 3 次。观察发病情况,接种第 9 天测定病斑面积,将病斑面积 *S* 分为 5 个区间: $S > 4 \text{ cm}^2$, $3 \text{ cm}^2 < S \leq 4 \text{ cm}^2$, $2 \text{ cm}^2 < S \leq 3 \text{ cm}^2$, $1 \text{ cm}^2 < S \leq 2 \text{ cm}^2$ 和 $S \leq 1 \text{ cm}^2$,分析菌株致病力差异。

1.2.3 菌株交叉侵染能力测定:选择在红提葡萄上

不同致病力的葡萄炭疽病菌菌株和 6 株尖孢炭疽菌菌株,测定其对番茄和草莓果实的致病力。将菌株在 PDA 平板上活化后,于 25 °C 黑暗培养,产孢后用无菌水将孢子洗脱,分别配制成 10^5 个/mL 孢子悬浮液。选择新鲜、健康的番茄和草莓果实,用 1.5% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 2 min,无菌水冲洗 3 次,置于超净台上吹干。用 20 μ L 孢子悬浮液分别对处理后的番茄和草莓进行非伤口和伤口接种,然后置于垫有吸水纸的塑料盒内(RH 为 100%),25 °C 黑暗培养。每处理 10 颗番茄或草莓,重复 3 次,以 20 μ L 无菌水接种为对照。观察发病情况,接种第 5 天测定病斑面积 *S*,不发病记为 - ; $S \leq 1 \text{ cm}^2$,记为 + ; $1 \text{ cm}^2 < S \leq 5 \text{ cm}^2$,记为 ++ ; $5 \text{ cm}^2 < S \leq 10 \text{ cm}^2$,记为 +++ ; $S > 10 \text{ cm}^2$,记为 ++++。从番茄和草莓发病部位重新分离病原菌,观察菌落特征及分生孢子形态,与接种菌株比较。

1.2.4 菌株对多菌灵敏感性测定:采用菌丝生长抑制法^[20]测定葡萄炭疽病菌和尖孢炭疽菌对多菌灵的敏感性。测定葡萄炭疽病菌对多菌灵敏感性采用多菌灵浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/L 的含药平板,测定尖孢炭疽菌对多菌灵敏感性采用多菌灵浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、5.0、10.0、50.0 和 100.0 mg/L 的含药平板。分别以加入等体积 N, N - 二甲基甲酰胺的 PDA 平板为对照。于供试菌株菌落边缘取直径 5 mm 的菌饼,菌丝面朝下接种于含药 PDA 培养基平板中央,置于 28 °C 恒温培养箱内黑暗培养,4 d 后测量菌落直径。以药剂质量浓度的对数为横坐标、抑制率概率值为纵坐标,计算毒力回归方程及有效抑制中浓度 EC_{50} 值。胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌对多菌灵的抗性划分标准为: $EC_{50} \geq 100$ mg/L 为高抗; $1.0 \text{ mg/L} < EC_{50} < 100 \text{ mg/L}$ 为抗性; $EC_{50} \leq 1.0 \text{ mg/L}$ 为敏感^[21]。

1.3 数据分析

数据处理采用 SPSS 13.0 软件,用 Duncan 氏多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄炭疽病菌形态特征

根据菌落在 PDA 培养基上形态可将 60 株葡萄炭疽病菌菌株分为 A ~ F 6 组(表 2)。A 组:菌落正面菌丝白色,背面浅黄色,有黑色素形成的围绕菌落中心的同心轮纹或斑块;B 组:菌落正面菌丝白色,背面浅黄色,无黑色色素生成;C 组:菌落正面菌丝

浅灰色,背面橙色,有黑色素形成的同心轮纹或斑块;D组:菌落正面菌丝浅灰色,背面橙色,无黑色素生成;E组:菌落正面菌丝鼠灰色,背面棕黑色,有浅橙色同心轮纹;F组:菌落正面菌丝鼠灰色,背面棕黑色。供试的枇杷和辣椒尖孢炭疽菌菌落正面颜色为白色、浅灰色和鼠灰色,背面颜色为浅黄色和橙

色。葡萄炭疽病菌 A~D 组及 F 组菌株菌落生长速率均大于供试的 6 株尖孢炭疽菌菌株, E 组菌株菌落平均直径为 5.3 ± 2.3 cm, 小于尖孢炭疽菌菌株 p2 和 la22 的的菌落直径, 但大于另外 4 株尖孢炭疽菌菌株(表 2)。故根据菌落形态和生长速率不能确定云南葡萄炭疽病的病原。

表 2 葡萄炭疽病菌和尖孢炭疽菌菌落直径和孢子大小

Table 2 Colony diameter and conidial size of *Colletotrichum* isolates from grape and six *Colletotrichum acutatum* isolates

供试病原菌 Pathogen	菌落平均直径(cm) Colony average diameter	孢子大小 Conidial size (μm)		
		纵径 Length	横径 Width	
葡萄炭疽病菌 <i>Colletotrichum</i> strains isolated from grape	A 组 Group A	6.6 ± 1.7 ab	36.94 ± 2.20 b	11.29 ± 0.71 c
	B 组 Group B	6.7 ± 1.1 ab	36.87 ± 7.56 b	12.27 ± 1.89 c
	C 组 Group C	6.1 ± 1.2 bc	34.42 ± 3.88 b	11.55 ± 1.05 c
	D 组 Group D	7.1 ± 1.3 a	39.02 ± 1.33 b	12.58 ± 0.05 c
	E 组 Group E	5.3 ± 2.3 c	14.61 ± 0.57 c	12.46 ± 1.19 c
	F 组 Group F	6.6 ± 1.2 ab	28.54 ± 1.81 c	19.44 ± 1.83 b
尖孢炭疽菌 <i>Colletotrichum</i> <i>acutatum</i>	p1	3.2 ± 0.1 d	53.64 ± 3.23 a	20.32 ± 0.76 b
	p2	5.9 ± 0.5 bc	58.18 ± 1.51 a	22.99 ± 0.73 a
	p3	5.2 ± 0.4 c	53.68 ± 3.06 a	19.96 ± 0.67 b
	p4	3.7 ± 0.3 d	44.32 ± 1.93 b	22.73 ± 1.06 a
	la22	5.4 ± 0.1 c	50.38 ± 2.29 a	20.90 ± 1.37 b
	h1	2.1 ± 0.1 d	56.49 ± 1.72 a	23.79 ± 0.62 a

注:数据为平均数 \pm 标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏多重比较在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Note: Data are mean \pm SE. Data followed by different letters in the same column are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple comparison.

葡萄炭疽病菌菌株分生孢子盘黑色,丛生,无刚毛。分生孢子梗无色至褐色,具分隔,顶生分生孢子(图 1-a、b)。分生孢子无色、单胞,有隔,具 1~2 个油球,圆柱形、棒状或椭圆形,大多两端钝圆。分生孢子萌发时产生的附着胞深褐色,球形或不规则形(图 1-c)。供试尖孢炭疽菌分生孢子除 p4 为两端

均尖的纺锤形外,其它 5 株均为一端渐尖的圆柱形。比较分析表明,供试葡萄炭疽病菌孢子大小为 $14.61 \sim 39.02 \mu\text{m} \times 11.29 \sim 19.44 \mu\text{m}$, 显著小于尖孢炭疽菌($P < 0.05$)(表 2)。从附着胞形态、孢子形态和大小初步推断云南葡萄炭疽病的病原菌是胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.。

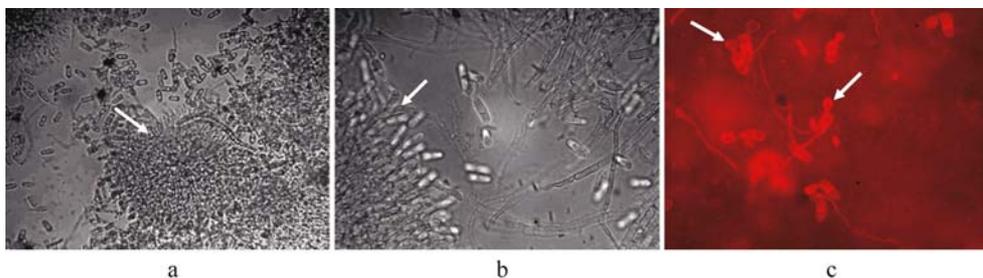


图 1 葡萄炭疽病菌分生孢子盘及附着胞形态

Fig. 1 The acervulus and appressorium morphology of *Colletotrichum* strains on grapes

注:a、b: 分生孢子盘; c: 附着胞。Note: a, b: Acervulus; c: appressorium.

2.2 菌株特异性引物扩增

胶孢炭疽菌特异性引物 CgInt/ITS4 能从 60 株葡萄炭疽病菌菌株基因组 DNA 中扩增出 1 条约

500 bp 的特异性条带,而对 6 株尖孢炭疽菌无特异性扩增;尖孢炭疽菌特异性引物 CaInt2/ITS4 对葡萄炭疽病菌菌株无特异性扩增,但能从 6 株尖孢炭疽

菌基因组 DNA 中扩增出约 500 bp 的特异性条带(图 2)。据此可进一步确定云南葡萄炭疽病由胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 引起。

2.3 菌株致病力差异比较

致病力测定结果显示,尖孢炭疽菌非伤口接种红提后没有明显症状,而葡萄胶孢炭疽菌菌株非伤口接种红提均出现典型的炭疽病症状。接种第 6 天在接种点周围出现浅褐色水渍状斑点,之后斑点逐步连成暗褐色不规则形大病斑,第 9 天各菌株接种红提的发病率达 100%,后期病斑迅速扩大并凹陷,表面有粘稠状橙色孢子堆。病斑大小分析表明,供

试菌株间致病力差异较大,接种第 9 天在红提上病斑面积 $S(\text{cm}^2, \text{余同})$ 为 0.25 ~ 4.84。m-d-18 和 q-6 在红提上 $S > 4$,致病力相对最强;5 株菌株 $3 < S \leq 4$,致病力中等;7 株菌株 $2 < S \leq 3$,致病力稍弱;6 株菌株 $1 < S \leq 2$,致病力较弱;剩余 40 株菌株 $S \leq 1$,致病力最弱。除宾川外, $S \leq 1$ 的菌株占各采样地菌群的比例均大于 60%,富民甚至达 100%,仅弥勒和丘北分别有 2.94% 和 12.50% 的菌株 $S > 4$ 。而宾川各有 33.33% 的菌株 $0 < S \leq 1$ 、 $2 < S \leq 3$ 和 $3 < S \leq 4$ 。取发病组织再次进行病原分离,均得到与原接种菌性状一致的培养物。

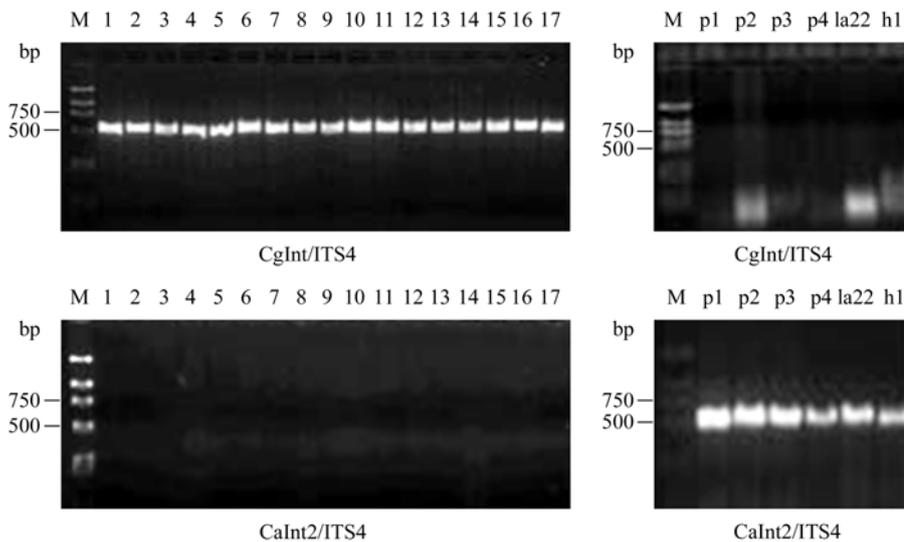


图 2 葡萄炭疽病菌和尖孢炭疽菌菌株基因组 DNA 特异性引物扩增产物

Fig. 2 Polymerase chain reaction amplification products of genomic DNA of *Colletotrichum* strains from grape and six *Colletotrichum acutatum* isolates using species-specific primers

注: M: 分子量标记; 1 ~ 17: 葡萄炭疽病菌菌株; p1 ~ p4: 枇杷上分离的尖孢炭疽菌菌株; la22, h1: 辣椒上分离的尖孢炭疽菌菌株。
Note: M: Maker; 1 - 17: *Colletotrichum* strains from grape; p1 - p4: *C. acutatum* strains isolated from loquat; la22, h1: *C. acutatum* strains isolated from chilli.

2.4 菌株交叉侵染能力

选择在红提葡萄上致病力相对最强的菌株 m-d-18,致病力中等的菌株 b-j-4,致病力稍弱的菌株 m-d-11,致病力较弱的菌株 m-d-13 和 5 株致病力最弱的菌株 m-d-8、m-d-12、m-w-8、f-5 和 s-4 对番茄和草莓果实进行伤口和非伤口接种。伤口接种 5 d 后病斑面积测定表明,9 株葡萄胶孢炭疽菌菌株对番茄和草莓均有致病力,且对草莓致病力较强,草莓上 $S > 10$;非伤口接种 5 d 后,9 株胶孢炭疽菌菌株对草莓均有较强致病力,但仅对红提具有较弱致病力菌株 m-d-13 和弱致病力菌株 s-4、m-w-8 对番茄有致病力,而对红提有较强致病力菌株并不能使番茄产生明显病症(表 3)。非伤口接种时,6 株尖孢炭疽

菌菌株中仅 p3 对番茄和草莓致病, $S < 0.05$ 。进行伤口接种时,尖孢炭疽菌菌株对番茄和草莓均有致病力,但致病力较弱, $S < 0.35$ (表 3)。

2.5 供试菌株对多菌灵的敏感性

供试 60 株葡萄胶孢炭疽菌中有 42 个菌株对多菌灵敏感,其 EC_{50} 小于 1.0 mg/L,平均为 0.67 ± 0.21 mg/L,占全部菌株的 70%;16 个菌株 EC_{50} 在 1.0 ~ 100.0 mg/L 之间,平均为 1.58 ± 0.60 mg/L,为抗性菌株;仅有 2 个菌株为 EC_{50} 大于 100 mg/L 的高抗菌株。6 株尖孢炭疽菌中除 la22 的 EC_{50} 为 18.04 mg/L 外,其余菌株的 EC_{50} 均大于 100 mg/L。可见,葡萄胶孢炭疽菌菌株对多菌灵较敏感,而尖孢炭疽菌菌株对多菌灵的敏感性较低。

表 3 葡萄胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌对番茄和草莓果实的致病力比较
Table 3 Compare of pathogenicity of 9 *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from grapes and six *Colletotrichum acutatum* isolates to fruits of tomato and strawberry

供试病原菌 Pathogen	菌株 Isolate	番茄 Tomato		草莓 Strawberry	
		非伤口接种 Non-wound inoculation	伤口接种 Wound inoculation	非伤口接种 Non-wound inoculation	伤口接种 Wound inoculation
胶孢炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	m-d-18	-	+	++++	++++
	b-j-4	-	+	++++	++++
	m-d-11	-	+	++++	++++
	m-d-13	+	+++	++++	++++
	f-5	-	+	++++	++++
	m-d-8	-	++	++++	++++
	m-d-12	-	+	++++	++++
	s-4	+	++	++++	++++
	m-w-8	+	+	+++	++++
尖孢炭疽菌 <i>C. acutatum</i>	p1	-	+	-	+
	p2	-	+	-	+
	p3	+	+	+	+
	p4	-	+	-	+
	la22	-	+	-	+
	h1	-	+	-	+

注: - : 不发病; + : 病斑面积(cm^2) $S \leq 1$; ++ : $1 < S \leq 5$; +++ : $5 < S \leq 10$; ++++ : $S > 10$ 。Note: - : No symptom; + : lesion area (cm^2) $S \leq 1$; ++ : $1 < S \leq 5$; +++ : $5 < S \leq 10$; ++++ : $S > 10$ 。

3 讨论

Sutton^[22]研究表明,胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌在形态学特征如菌落形态和颜色、菌丝生长速率、分生孢子和附着胞形态等方面有区别。胶孢炭疽菌菌丝一般为灰色,菌落生长较快,而尖孢炭疽菌菌丝常为浅粉色、肉色、橙色或橄榄绿色,生长较慢^[1]。本试验中葡萄炭疽病菌与尖孢炭疽菌在 PDA 上菌落均呈白色、浅灰色和鼠灰色,两者颜色无明显差异。这在有关澳大利亚葡萄尖孢炭疽菌^[15]、山药胶孢炭疽菌^[23]和韩国葡萄胶孢炭疽菌^[24]的研究中也曾发现。另外,本试验中虽绝大多数供试葡萄炭疽病菌菌株在 25 °C、PDA 平板上黑暗培养 6 d 后菌落平均直径大于尖孢炭疽菌,但按菌落形态分组的 E 组菌落平均直径比尖孢炭疽菌 p2 和 la22 小,这与尖孢炭疽菌比胶孢炭疽菌生长速率慢的结论并不完全一致^[24-25]。胶孢炭疽菌分生孢子通常为圆柱形或棒形,大多两端钝圆,部分一端稍尖,而尖孢炭疽菌分生孢子呈两端均尖的纺锤形^[24]。本试验分离的葡萄炭疽病菌分生孢子为一端稍尖的圆柱形、棒形或椭圆形,而尖孢炭疽菌分生孢子形态与之差异不明显,既有两端均尖的纺锤形,也有一端稍尖的圆柱形。但葡萄炭疽病菌孢子大小明显小于尖孢炭疽

菌。同时,葡萄炭疽病菌分生孢子萌发时形成的附着胞为球形和不规则形,而尖孢炭疽菌为球形,这与 Hong 等^[24]对葡萄胶孢炭疽菌附着胞的描述一致。本试验利用胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌特异性引物对所有供试菌株进行检测,60 株葡萄炭疽病菌菌株仅对胶孢炭疽菌特异性引物有扩增条带,证明云南省主要葡萄产区的炭疽病菌为胶孢炭疽菌。

苯并咪唑类杀菌剂是控制炭疽病最为有效的杀菌剂之一^[14]。有研究表明,绝大多数胶孢炭疽菌对苯并咪唑类杀菌剂的敏感性较尖孢炭疽菌高^[4, 21]。本试验结果表明,葡萄胶孢炭疽菌对多菌灵的敏感性显著高于尖孢炭疽菌,这与柑橘胶孢炭疽菌及橡胶胶孢炭疽菌对苯并咪唑类杀菌剂的敏感性均高于其尖孢炭疽菌的表现一致^[21, 26]。

弄清病原菌群体内致病性的分化或变异情况,对制定防治对策和指导抗病育种具有重要意义。本试验结果表明,所有葡萄胶孢炭疽菌菌株对红提均有致病性,但菌株间致病力差异较大,除宾川外各采样地致病力较弱菌株所占菌群比例均超过 60%。这可能与胶孢炭疽菌具有广泛的寄主范围有关。Alahakoon 等^[27]研究表明,在人工接种的条件下各种热带、亚热带和温带水果上的胶孢炭疽菌之间存在交叉侵染的能力。本试验中对红提致病力较弱的

菌株对番茄的致病能力相对较强,各菌株对草莓均有较强致病力。炭疽菌属对最适寄主的可塑性较强,对红提弱致病力菌株在自然选择和协同进化过程中有可能更适应番茄和草莓。葡萄胶孢炭疽菌对番茄和草莓的交叉侵染能力使得葡萄园周围种植的番茄和草莓成为葡萄炭疽病翌年的孢子接种源,从而加剧该病的发生和危害,因此在葡萄园周围尽量不要种植可作为炭疽病病原菌替代寄主的植物。

参 考 文 献(References)

- [1] Sutton B C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. // Bailey J A, Jeger M J. *Colletotrichum* biology, pathology and control. UK: CAB International, Wallingford, 1992: 1 - 26
- [2] 穆玉侠. 葡萄炭疽病的发生与防治. 安徽农学通报, 2005, 11(4): 106
- [3] Damm U, Cannon P F, Woudenberg J H C. *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 2012, 73(1): 1 - 36
- [4] Wharton P S, Diéguez-Urbeondo J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 2004, 61(1): 3 - 22
- [5] Southworth E A. Ripe rot of grapes and apples. *Journal of Mycology*, 1891, 6(4): 164 - 173
- [6] Melksham K J, Weckert M A, Steel C C. An unusual bunch rot of grapes in sub-tropical regions of Australia caused by *Colletotrichum acutatum*. *Australasian Plant Pathology*, 2002, 31(2): 193 - 194
- [7] Yamamoto J, Sato T, Tomioka K. Occurrence of ripe rot of grapes (*Vitis vinifera* L.) caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, 1999, 65(1): 83 - 86
- [8] Daykin M E, Milholland R D. Infection of blueberry fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*, 1984, 68(11): 948 - 950
- [9] Kummuang N, Smith B J, Diehl S V, et al. Muscadine grape berry rot diseases in Mississippi: disease identification and incidence. *Plant Disease*. 1996, 80(3): 238 - 243
- [10] 雷百战, 李国英. 新疆葡萄炭疽病原的鉴定及其生物学特性的研究. 石河子大学学报, 2004, 22(4): 298 - 300
- [11] 李洋, 刘长远, 陈秀蓉, 等. 辽宁省葡萄炭疽菌鉴定及对多菌灵敏感性研究. 植物保护, 2009, 35(4): 74 - 77
- [12] Cai L, Hyde K D, Taylor P W J, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 183 - 204
- [13] Sreenivasaprasad S, Mills P R, Meehan B M, et al. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 1996, 39(3): 499 - 512
- [14] Peres N A R, Souza N L, Zitko S E, et al. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 2002, 86(6): 620 - 624
- [15] Whitelaw-Weckert M A, Curtin S J, Huang R, et al. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology*, 2007, 56(3): 448 - 463
- [16] Choi Y W, Hyde K D, Ho W H. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 1999, 3: 29 - 38
- [17] McGarvey P, Kaper J M. A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques*, 1991, 11(4): 428 - 430, 432
- [18] Mills P R, Sreenivasaprasad S, Brown A E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 98(1/3): 137 - 143
- [19] Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown A E, et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, 1996, 45(4): 650 - 655
- [20] Quiroga E N, Sampietro A R, Vattuone M A. Screening antifungal activity of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 74(1): 89 - 96
- [21] Peres N A R, Souza N L, Peever T L, et al. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*, 2004, 88(2): 125 - 130
- [22] Sutton B C. *The Coelomycetes; fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980
- [23] Abang M M, Winter S, Green K R, et al. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, 2002, 51(1): 63 - 71
- [24] Hong S K, Kim W G, Yun H K, et al. Morphological variations, genetic diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 2008, 24(3): 269 - 278
- [25] Su Y Y, Noireung P, Liu F, et al. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. *Mycoscience*, 2011, 52: 376 - 382
- [26] 张春霞, 何明霞, 李加智, 等. 云南西双版纳地区橡胶炭疽病病原鉴定. 植物保护, 2008, 34(1): 103 - 106
- [27] Alahakoon P W, Brown A E, Sreenivasaprasad S. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1994, 44(2): 93 - 103

(责任编辑:吴竞一)