

鲜食葡萄贮运期黑斑病害致病病原菌分离鉴定

朱志强^{1,3}, 集贤¹, 兰青阔², 赵新², 张小栓³, 张平¹

(1.国家农产品保鲜工程技术研究中心 农业农村部农产品贮藏保鲜重点实验室, 天津 300384;
2.天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津 300384; 3.中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: **目的** 通过研究鲜食葡萄黑斑病害的致病病原菌分离和鉴定, 为鲜食葡萄采后病害防控措施开发提供理论支撑。**方法** 选用贮藏后的马奶等 4 个鲜食葡萄品种为研究对象, 用组织分离法对引起黑斑病害的病原菌进行分离纯化, 在 PDA 培养基上, 观察拟菌株形态以及菌丝和孢子形态特征, 采用有伤和无伤活体接种健康果实, 并观察其发病特征, 应用 ITS 通用引物对病原菌 DNA 进行扩增并测序。**结果** 分离出 3 种优势致病菌 (A, B 和 C), 检出频率分别为 75.0%, 32.0% 和 42.11%。有伤和无伤活体接种均具有致病性, 且有伤大于无伤。对比《真菌鉴定手册》, 初步确定拟菌株 A 为链格孢霉, 拟菌株 B 为灰葡萄孢霉, 拟菌株 C 为拟茎点霉, 采用 rDNA-ITS 序列分析法证实拟菌株 A 与 KJ489375.1、GU190188.1 的序列相似度达到 99%, 结合两者结果确定主要致病病原菌为链格孢霉属小孢子种。**结论** 明确引起鲜食葡萄贮运期黑斑病害的主要致病病原菌为链格孢霉属小孢子种。

关键词: 黑斑病; 致病病原菌; 分离鉴定; ITS 序列分析; 链格孢霉

中图分类号: S435.313+.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2020)21-0031-07

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.21.005

Isolation and Identification of Pathogens Causing Grape Blackspot during Storage and Transportation

ZHU Zhi-qiang^{1,3}, JI Xian¹, LAN Qing-kuo², ZHAO Xin², ZHANG Xiao-shuan³, ZHANG Ping¹

(1.Key Laboratory of Agro-Products Storage Ministry of Agriculture, National Engineering and Technology Research Center for Preservation of Agricultural Products, Tianjin 300384, China;

2.Institute of Tianjin Agriculture Quality Standard and Testing Technology, Tianjin 300384, China;

3.College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: The work aims to provide theoretical support for development of prevention and control measures for post-harvest disease of grape by isolation and identification of pathogenic bacteria of fresh grape black spot disease. The article used four table grapes (MANAI grape etc.) during storage as testing material to separate and purify pathogenic bacteria which caused disease of black spot disease. The colonial morphology on PDA medium and microscopic characteristics of spores and hyphae morphology of every quasi strain was analyzed. The epidemiological characteristics on berry inoculated with and without wound. ITS universal primers were applied to amplify the genomic DNAs of pathogenic bacteria and sequence the fragments. Three priori pathogenic pseudo strains (identified as A, B and C) were isolated

收稿日期: 2020-04-24

基金项目: 天津市青年科研人员创新研究与实验项目 (201920); 天津市自然科学基金 (17JCQNJC14700); 国家葡萄产业技术体系 (CARS-29-jg-1)

作者简介: 朱志强 (1978—), 男, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为农产品采后生理与贮藏保鲜技术。

通信作者: 集贤 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为农产品贮藏与加工技术。

and the frequency of them was detected as 75.0%, 32.0% and 42.11% in sequence. Grape, inoculated with and without wound with three pseudo strains, were pathogenic, and there were higher pathogenicity in those with wound than those without wound. By comparison with the fungus identification manual, the article preliminarily judged that pseudo strain A, B and C was *Alternaria*, *Botrytis cinerea* and *Phomopsis*, respectively. The sequence analysis of rDNA-ITS confirmed that the sequence similarity between strain A and KJ489375.1 and GU190188.1 was 99%. The main pathogenic fungus was confirmed to be *Alternaria alternata*. The main pathogen causing the black spot disease in fresh grape during storage and transportation is *Alternaria alternata*.

KEY WORDS: black spot; pathogen; isolation and identification; ITS sequences analysis; *Alternaria*

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 含有大量的糖、有机酸、氨基酸、矿物质、花青素及维生素等多种营养物质^[1], 具有很高的营养和食疗价值, 味道甜美, 营养丰富, 深受消费者喜爱。我国葡萄资源丰富, 近年来栽培面积不断增加, 2017 年栽培总面积达 7033 km², 位居世界第 2, 产量达 1308.3 万 t, 位居世界第一^[2]。葡萄树已经发展成为多个产地果农的主栽树种, 对增加当地经济收入具有十分重要的意义。葡萄果实含糖量高、果皮薄、果肉软、果汁多, 很容易在贮运过程中遭受病原菌的侵染, 严重影响贮运和销售, 制约葡萄产业的发展。研究显示, 引起葡萄采后腐烂的病害有灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*)、青霉 (*Penicillium* sp.)、黑曲霉 (*Aspergillus*)、根霉 (*Rhizopus*)、链格孢霉 (*Alternaria* sp.)、拟茎点霉 (*Phomopsis* sp.) 等 6 个属的真菌^[3-4]。其中灰葡萄孢霉是采后葡萄的主要病害之一^[5-7], 侵染后, 果穗上会滋生灰白色菌丝, 还与其它病原菌相互作用, 参与侵染寄主植物组织过程, 导致葡萄活细胞组织死亡, 果实出现腐烂变质现象^[8]。笔者在生产调查中发现, 部分果粒表皮上发生了黑色斑病害症状, 且贮藏后期明显增多, 严重影响果实的感官品质。有研究报道, 生长在田间的葡萄, 其枝、叶、果实上会出现黑色、褐色侵染症状, 经分离鉴定有链格孢霉^[9-11], 但在贮藏期果粒的黑斑病害症状与其在田间的外观有较大区别, 果实表面被侵染后会滋生大量的黑色物质, 针对该病害致病病原菌是否与田间一致, 以及病害症状的详细特征则鲜有报道, 有必要对其进行研究。

文中采集贮藏期的鲜食葡萄, 对其黑斑病害症状情况和病原菌进行形态学分离和鉴定, 并结合分子生物学方法对其进行分析, 明确致病病原菌, 为后期开展针对贮运病害的防控措施进行研究提供理论依据。

1 实验

1.1 材料与试剂

主要材料: 青果皮葡萄 (马奶、保尔加尔) 和紫果皮葡萄 (克瑞森、黑王) 等 4 个葡萄品种, 其中克瑞森、马奶和保尔加尔于 2018 年 9 月 18 日采自河北省张家口市涿鹿县东孤山村, 黑王果实于 2018 年 9

月 16 日采自天津市西青区九百禾葡萄园。在贮藏过程中, 分别挑选出侵染黑斑病的果粒样品备用。

主要试剂: 市售新鲜马铃薯块, 培养基; 葡萄糖、琼脂, 天津科威试剂公司; Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 回收试剂盒、dNTP、DNA Ladder Mix maker、枪头、PCR 管、离心管等, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; pMD®18-T Vector 连接试剂盒, Takara, D101A; Dream Taq-TM DNA Polymerase, MBI, EP0702; 琼脂糖, BBI, AB0014。

1.2 仪器与设备

主要仪器与设备: 电子天平, LP1200S, 德国赛多利斯公司; 超净工作台, SW-CJ-2FD, 苏州净化设备有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, SQ510, 重庆雅马科技有限公司; 体式显微镜, 显微镜, 奥林帕斯; 电子数显卡尺, 桂林量具刃具有限公司; 测序仪, Applied Biosystems, 3730XL; DNA 电泳槽, 北京六一仪器厂, DYCP-31DN; 稳压电泳仪, 北京六一仪器厂, DYY-5; 电热恒温水槽, 上海一恒科学仪器有限公司, DK-8D; 凝胶成像仪, 上海复日科技仪器有限公司, FR980; 恒温培养箱, 太仓市科教器材厂, DHP-9162; 恒温摇床, 太仓市实验设备厂, TH2-C; PCR 仪, Applied Biosystems, 2720 thermal cycler; 冷冻高速离心机, BBI, HC-2518R; Surf 系列精密单道可调移液器, 上海生工生物工程股份有限公司, SP10-1000。

1.3 处理与方法

1.3.1 马铃薯蔗糖培养基制备

按照马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g 和蒸馏水 1 L 的配方制作马铃薯蔗糖 (PDA) 培养基, 灭菌后倒入培养皿备用。

1.3.2 葡萄贮藏期间病原菌的分离、纯化和形态鉴定

分别选取了 4 个品种的被侵染典型黑斑病葡萄果实, 用 70 % (体积分数) 酒精擦拭葡萄表面进行灭菌, 然后根据组织培养法^[12]在果粒病健交接处切取样品, 置于 PDA 培养基上, 每个培养皿接种 3 块果样, 重复做 5 个培养皿。在 25 °C 恒温培养箱中培养

5 d, 统计出现的菌种（拟）种类及其检出频率。选取可通过肉眼鉴别出的不同种类的菌株，用直径为 5 mm 的打孔器打出菌饼，转接到新 PDA 培养基上，每种菌株接 3 个培养皿，每皿中接 2 块菌饼，在 25 °C 培养箱中培养。未分离的菌株继续纯化，纯化到每个培养皿为单一菌株为止。

定期观察培养皿中纯化后的菌株情况，记录菌落的生长速度、颜色特征和菌丝体形态。在显微镜下观察各菌落分生孢子器、分生孢子梗及分生孢子的特征。参考薛婷等^[13]的方法进行分类。

检出频率=某种菌落检出数/菌落检出总数×100%。

1.3.3 致病性检验

挑选已经纯化好的新鲜菌落培养皿，在病原菌菌落边缘打孔制成直径为 5 mm 的菌块，把菌块接种在健康果实上，分为有伤接种（灭菌大头针刺破果皮 5 个孔）、无伤接种以及空白对照（培养基）^[7,14]。每处理组各接种 20 个葡萄粒，将接种后的葡萄果粒放入灭菌完的内置湿润纱布的塑料盒中，然后装入灭菌密封袋中，在 25 °C 恒温恒湿环境下培养，5 d 后观察并记录病斑的生长直径和菌斑致病率^[15]。

致病率=侵染病果粒数/接种果粒总数×100%

1.3.4 rDNA-ITS 的检测

1) DNA 提取。取无污染病原菌菌丝单一菌落的培养皿，委托上海生工生物工程股份有限公司进行分析。将菌丝匀浆液吸到灭菌的离心管（1.5 mL）中，按照 SK8259（真菌）试剂盒的操作步骤进行基因组 DNA 的提取，利用琼脂糖凝胶（0.8 g/L）电泳法检测 DNA。提取的 DNA 定量后稀释，作为 PCR 反应的模板。

2) PCR 扩增。菌种鉴定所用引物见表 1。PCR 反应体系：0.2 μL 酶液，0.5 μL Template（基因组 DNA，20~50 ng/μL），2.5 μL 缓冲液（10×），1 μL dNTP（2.5 mmol/L），0.5 μL 上游引物 F（10 μmol/L），0.5 μL

下游引物 R（10 μmol/L）和双蒸 H₂O，加双蒸 H₂O 至 25 μL。PCR 反应程序：在 94 °C 下预变性 4 min；在 94 °C 下变性 45 s，在 55 °C 下中退火 45 s，在 72 °C 下维持 1 min，进行 30 个循环；在 72 °C 下延伸 10 min。凝胶电泳：反应结束后，在 1 g/L 琼脂糖凝胶（150 V，100 mA）上电泳 20 min，用凝胶成像仪进行拍照。纯化回收：PCR 产物电泳条带切割所需 DNA 目的条带，纯化方式参考说明书（SK8131），PCR 产物用 PCR 引物直接测序。序列比对：将 18SrDNA 序列在核糖体数据库中进行比对，将测序结果输入 NGBI 基因数据库，进行同源序列搜索，比较未知菌株与已知菌株相应序列的同源性。

2 结果与分析

2.1 葡萄黑斑病害的表观特征现象

由图 1 可知，通过肉眼外观观察，黑斑病害多发生在葡萄果粒腰部、肩部和果蒂部，出现时多数情况为单个斑点，与灰葡萄孢霉相比，侵染速度缓慢。发病初期葡萄果皮上有不规则的近圆形淡褐色色斑，果皮表面光滑干燥，病健边界不清，然后逐渐扩大，形成黑色或褐色斑；病斑处果肉变色、松软、萎缩，果梗上发病时呈暗黄色，果梗失水、干缩、失绿，侵入果刷时导致果实脱粒。病果后期病斑处发黑、皱缩，极易感染其它病害。从果肉来看，在病害初期，组织截面的果肉组织坏死，深入果肉约 1~2 mm，变软萎蔫，向果心部萎缩，在果蒂部位，果刷组织与果肉形成离层，造成脱粒。在病害后期，由于其它病原菌的交叉影响作用，果肉严重向果肉内部皱缩，果肉塌陷，果皮表面生长出浓厚的黑色菌斑物质，有的粘接牢固，有的即触即脱落。生产实际调查显示，该病斑一般在贮藏后期（2 个月以上）发现较多，后期越来越严重，且在黑斑病害发生时，常伴随有灰霉病害症状。

表 1 菌种鉴定所用引物
Tab.1 Primers for strain identification

所属类别	名称	序列 5'类别 1	扩增序列	PCR 长度/bp
真菌	NS1 NS6	GTAGTCATATGCTTGTCTC GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	18S rDNA	1300 左右



图 1 4 个品种葡萄果面黑斑病害情况
Fig.1 Black spot disease on grape surface of 4 varieties

2.2 病原菌的分离、纯化及形态鉴定

2.2.1 分离和纯化

对从葡萄表面分离出的各种病原菌进行肉眼观察和鉴别,记录并分析各菌落颜色、大小和菌落形态上存在的明显差异。在分离5 d时,统计菌种种类和各菌株检出频率,结果见表2。

表2 黑斑病病原菌种类及其检出频率
Tab.2 Types and corresponding detection frequency of pathogen with black spot

葡萄品种	菌落种类	检出频率/%
马奶	A _m	42.11
	B _m	10.53
	C _m	5.26
	D _m	10.53
	E _m	15.79
	F _m	5.26
	G _m	10.53
保尔加尔	A _b	75.00
	B _b	6.25
	C _b	18.75
克瑞森	A _k	12.00
	B _k	8.00
	C _k	32.00
	D _k	4.00
	E _k	8.00
	F _k	4.00
	G _k	32.00
黑王	A _h	17.24
	B _h	10.34
	C _h	13.79
	D _h	10.34
	E _h	3.45
	F _h	10.34
	G _h	27.59

注:大写字母表示分离得到的拟菌株;m, b, k 和 h 分别表示马奶、保尔加尔、克瑞森和黑王等品种

在培养5 d时,从马奶果实中分离得到7种拟菌株,共19个菌落,拟菌株A_m和E_m检出频率较高,拟菌株F_{A_m}(42.11%)>F_{E_m}(15.79%)。从保尔加尔果实中分离得到4种拟菌株,共15个菌落,拟菌株A_b和D_b检出频率较高,拟菌株F_{A_b}(75.00%)>F_{C_b}(18.75%)。从克瑞森果实中分离得到7种拟菌

株,共25个菌落,拟菌株C_k和G_k检出频率(32.00%)高于其它。从黑王果实中分离得到7种拟菌株,共27个菌落,拟菌株G_h和A_h检出频率较高,且F_{G_h}(27.59%)>F_{A_h}(17.24%)。

再经后期观察,初步确定了在马奶果实中的菌株A_m(检出频率为42.11%)、保尔加尔果实中的A_b(检出频率为75.00%)、克瑞森果实中的C_k和G_k(检出频率均为32.00%)、黑王果实中的G_h(检出频率为27.59%)为主要疑似致病病原菌。将统计出的优势菌株再经形态学比对,在保尔加尔果实中的菌株A_b与在克瑞森果实中的菌株C_k及在黑王果实中的菌株G_h相似,被认为同一种菌株。将菌株A_b、菌株C_k、菌株G_h重新编号为拟菌株A;将克瑞森果实中的菌株G_k重新编号为拟菌株B;将马奶果实中的菌株A_m重新编号为拟菌株C。表2中的其它拟菌株B, D, E和F,经后期反接种到葡萄果实表皮试验,肉眼观察结果显示,病害生长特征与采样果实表面黑斑病害症状明显不相似,故文中未再列出。

2.2.2 拟菌株形态学鉴定

拟菌株A培养皿的生长情况和显微镜形态见图2。菌落生长迅速,在PDA培养基中25℃的恒温恒湿条件下培养5 d,菌落直径达到46.19 mm,培养7 d时增加到62.54 mm,培养9 d时长满整个培养皿,菌落边缘为清晰的白色菌丝,之后生长为墨绿色,后期变为黑绿色,培养基背面为黑色。分生孢子梗有分枝,直立,褐绿色;顶端扩大具有多个孢子痕;分生的孢子会形成孢子链,孢子有喙或无喙,横隔膜3~5个,纵、斜隔膜1~4个,分隔处不缢缩或略缢缩,呈椭圆形或手雷状。根据所观察到的菌落特征以及孢子的形态特征与《真菌鉴定手册》对比,初步将拟菌株A确认为链格孢霉(*Alternaria*)。

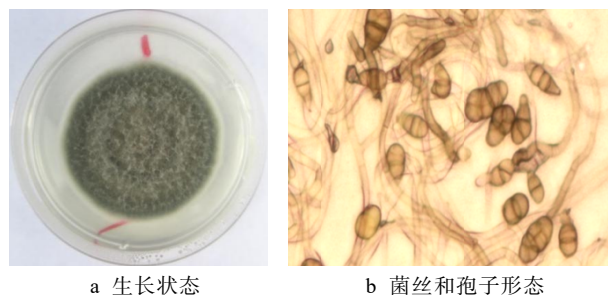


图2 拟菌株A培养皿的生长情况和显微镜形态(40倍)
Fig.2 Growth state of quasi strains of A on petri dish and morphology of microscope (40×)

拟菌株B培养皿生长情况和显微镜形态见图3。拟菌株B菌落前期生长较快,后期生长速度稍有下降,培养5 d时直径为44.18 mm,培养7 d时直径为55.78 mm,培养9 d时增加到61.23 mm。生长初期,菌丝为灰白色,随后变为灰褐色,似老鼠毛;生长后

期，出现黑色菌核，形状不规则。分生孢子梗丛生，先是灰色而后变成浅褐色；顶端膨大或尖削，有小突起；分生孢子单生在小突起上，呈卵形或亚球形。根据菌落特征以及孢子的形态特征观察，初步将拟菌株 B 确认为灰葡萄孢霉（*Botrytis cinerea*）。

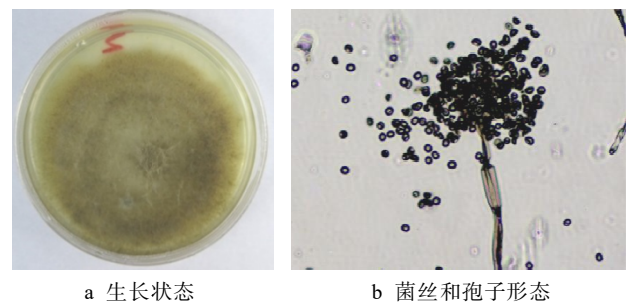


图 3 拟菌株 B 培养皿生长情况和显微镜形态（40 倍）
Fig.3 Growth state of quasi strains of B on petri dish and morphology of microscope (40×)

拟菌株 C 培养皿生长情况和显微镜形态见图 4，培养 5 d 时菌落直径为 18.04 mm，培养 7 d 时增加到 20.33 mm。该菌落生长缓慢，菌落起初形成厚密的菌丝垫，边缘出现黄色晕圈。随后，新生的菌丝呈白色，继而生长为橘黄色，后期变为黑色，形成明暗交替的同心纹状。该菌丝透明且有分枝，分生孢子器中产生了 2 种孢子梗，一种孢子梗顶端尖锐，单个单生，呈透明的椭圆形孢子，另一种孢子梗较短，孢子则弯曲较长，呈蠕虫状，后期黑色菌丝所形成的分生孢子器不规整子囊孢子呈透明、椭圆形。根据对比初步将拟菌株 C 确认为拟茎点霉（*Phoma*）。

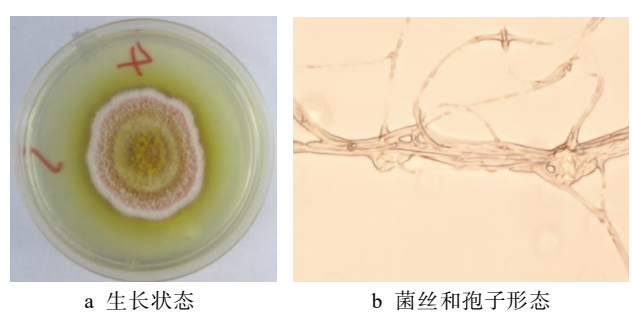


图 4 拟菌株 C 培养皿生长情况和显微镜形态（40 倍）
Fig.4 Growth state of quasi strains of C on petri dish and morphology of microscope (40×)

2.3 拟菌株致病性检验

由表 3 可知，筛选出有伤接种的 3 个拟菌株均引起葡萄果实发病，且与无伤相比，有伤接种的 3 个菌株更易侵染葡萄果实并使其染病。拟菌株 A 和 B 在培养 3 d 和 5 d 时，在有伤和无伤两种接种情况下，致病率均为 100%，拟菌株 C 在有伤接种情况下致病率为 100%，无伤状态下为 70%。

表 3 不同接种方式下病原菌致病率情况 Tab.3 Pathogenic rate of pathogens by different inoculation ways				
拟菌株	致病率/%			
	有伤(3 d)	有伤(5 d)	无伤(3 d)	无伤(5 d)
拟菌株 A	100	100	100	100
拟菌株 B	100	100	100	100
拟菌株 C	100	100	70	70
对照	0	0	0	0

由表 4 可知，随着培养时间的延长，在果实表面接种的 3 个拟菌株菌落直径都逐步增加，拟菌株 A 和 B 生长迅速，伤口处表现出明显的腐烂症状。培养 5 d 时，有伤接种，拟菌株 A 菌斑直径达到(21.92±2.86) mm，拟菌株 B 为(18.04±2.56) mm；无伤接种时，较有伤接种生产缓慢，拟菌株 A 菌斑直径为(12.27±3.40) mm，拟菌株 B 菌斑为(9.46±2.64) mm；拟菌株 C 只有在有伤接种的情况下略有生长，病斑直径为(7.05±2.64) mm，在无伤接种的情况下生长非常缓慢，病斑直径仅为(5.16±0.24) mm；对照组均未发病。接种拟菌株 A 的果粒后期（培养 15 d 以上）果肉严重侵染，向果肉内部腐烂，果肉褐变严重，菌斑菌丝由白色转黑色，与果肉不易分离；拟菌株 B 果粒表面滋生白色菌丝，侵染果肉致使果肉腐烂，但未显示有黑色菌丝，果肉也未见转黑褐色；拟菌株 C 侵染特征与黑斑病害不相似。综上可知，拟菌株 A 是葡萄果实黑斑病害的主要致病菌。

表 4 不同接种方式下病原菌菌斑生长情况 Tab.4 Growth of pathogen plaque by different inoculation ways				
拟菌株	菌斑生长直径/mm			
	有伤(3 d)	有伤(5 d)	无伤(3 d)	无伤(5 d)
拟菌株 A	16.56±1.89	21.92±2.86	11.46±2.50	12.27±3.40
拟菌株 B	14.35±1.78	18.04±2.56	9.38±2.18	9.46±2.64
拟菌株 C	6.59±0.60	7.05±2.64	5.26±0.23	5.16±0.24
对照	5.00±0	5.00±0	5.00±0	5.00±0

2.4 拟菌株致病菌的分子生物学鉴定

为了进一步确认通过肉眼与显微镜观察方法确定的拟菌株分离结果，采用分子生物学方法对 3 种拟菌株再次进行分析。

2.4.1 基因组 DNA 的提取

采用 SK8259（真菌）试剂盒操作，通过琼脂糖凝胶电泳分析，结果见图 5。

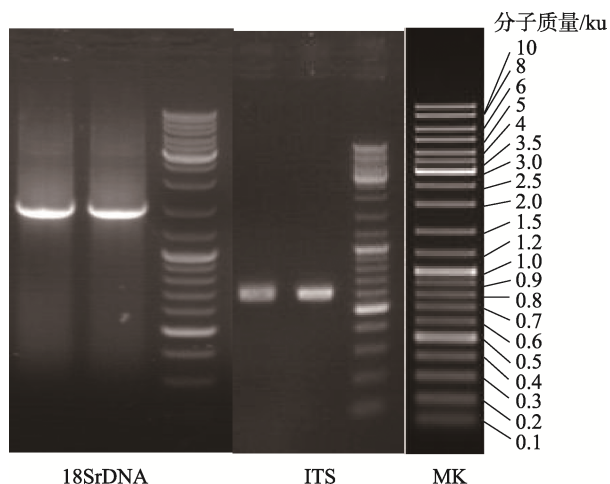


图5 电泳图

Fig.5 Electrophoretogram

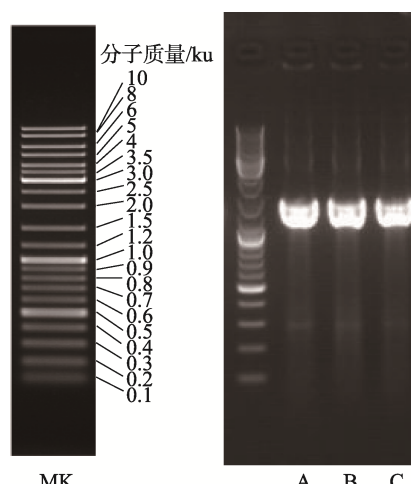


图6 ITS PCR产物电泳图

Fig.6 Electrophoretogram of ITS PCR product

通过观察分析, SK8259 (真菌) 试剂盒提取的样品菌株的基因组 DNA 条带清晰, 可以用于下一步的 PCR。

2.4.2 rDNA-ITS PCR 扩增

以 NS1、NS6 为引物, 经 PCR 扩增, 得到的产物条带特异性好, 扩增的产物大小约为 1300~1500 bp 之间, 见图 6。

2.4.3 rDNA-ITS 序列测定与比对

将扩增得到的各分离菌株的 ITS PCR 产物进行纯化和测序, 得到的序列与 GenBank 上的已知序列进行 BLAST 比对。将拟菌株 A、B 和 C 的 ITS 序列与 GenBank 中已有的相关菌株的 ITS 序列进行同源性搜索。结果见表 5。

表5 拟菌株 rDNA-ITS 序列比对
Tab.5 rDNA-ITS sequence alignment of quasi strains

种类	结果描述	匹配分值	总体分值	覆盖率/%	E 值	一致性/%	登录号
拟菌株 A	链格孢霉属	2606	2606	100	0.0	99	KJ489375.1
	链格孢霉属	2606	2606	100	0.0	99	GU190188.1
拟菌株 B	灰葡萄孢霉	2619	2619	100	0.0	100	CP009808.1
拟菌株 C	拟茎点霉属	2608	2608	100	0.0	99	AB252869.1

3 个拟菌株经过测序分析, 确定拟菌株 A 的 rDNA-ITS PCR 扩增片段长度为 1417 bp; 拟菌株 B 为 1418 bp; 拟菌株 C 为 1418 bp。拟菌株 A 的 ITS 序列与 KJ489375.1、GU190188.1 的序列相似度为 99%, 拟菌株 B 的 ITS 序列与 CP009808.1 的序列相似度为 100%, 拟菌株 C 的 ITS 序列与 AB252869.1 的序列相似度为 99%, 因此, 通过 rDNA-ITS 序列分析与李朋华^[16]的研究对比, 确定拟菌株 A 为葡萄黑斑病害处出现的真菌, 其为链格孢霉属小孢子种 (*Alternaria alternata*)。此外, 经检索调查显示, 枣、梨等果皮黑斑 (黑点) 病害症状^[17-20]也主要由浸染链格孢霉所致, 该实验结果与文中结果相似。

3 结语

文中结合生产实际调查, 利用组织分离法进行致病病原菌的分离, 从果肉中分离出 7 种拟菌株, 其中

3 种为优势致病菌拟菌株 A、B 和 C, 检出频率最为 75.0%, 32.0%和 42.11%, 3 种菌株的有伤和无伤活体接种均具有致病性, 且浸染致病性有伤接种大于无伤接种, 对比《真菌鉴定手册》, 初步确定拟菌株 A 为主要的病原菌 (链格孢霉), 拟菌株 B 为灰葡萄孢霉, 拟菌株 C 为拟茎点霉, 再结合 rDNA-ITS 序列分析法, 证实拟菌株 A 与 KJ489375.1、GU190188.1 的序列相似度都达到 99%, 确定主要致病菌为链格孢霉属小孢子种 (*Alternaria alternata*)。

实验还显示, 链格孢霉在浸染葡萄果实时, 往往伴随着其它病害交叉侵染其它健康果实, 在有伤接种后, 个别果实接种后症状与贮藏期症状有一定差异, 因此, 葡萄黑斑病致病菌是否存在复合侵染的关系, 致病病原菌的侵入顺序、发病时间以及环境因子是否对黑斑病害的发病有影响还需要进一步的深入研究, 为了解该病害的发病规律以及防治提供更多理论依据。

参考文献:

- [1] 陈树俊. 葡萄的营养与保健[J]. 农产品加工, 2008(10): 18—19.
CHEN Shu-jun. The Nutrition and Health Care of Grapes[J]. Farm Products Processing, 2008(10): 18—19.
- [2] 中华人民共和国农业农村部. 中国农业统计资料[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 50.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Agricultural statistics of China[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2017: 50.
- [3] 许玲, 王彦章, 丰田秀吉, 等. 病原真菌对葡萄采后果粒脱落的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 839—841.
XU Ling, WANG Yan-zhang, TOYODA H, et al. Role of Fungal Pathogens in the Postharvest Abscission of Grape Berries[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(4): 839—841.
- [4] 宋开艳. 葡萄采后病害病原菌致病特点及拮抗菌的筛选[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2011: 17.
SUN Kai-yan. Pathogenic Characteristics and Antagonistic Microorganisms Screening of Postharvest Disease of Grapes[D]. Alar: Tarim University, 2011: 17.
- [5] 冯琳燕. 葡萄采后灰霉病病原菌致病类群的分类与鉴定[C]// 中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集, 2008: 284.
FENG Lin-yan. Classification and Identification of Gray Mold Pathogenic Groups Isolated from Post-harvested Grape Berries[C]// Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology(2008), 2008: 284.
- [6] 张路. 红提葡萄生物污染调控与全程质量控制技术研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016: 42—43.
ZHANG Lu. Research of Biological Contamination and Quality Control in Process on Red Globe Grapes[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016: 42—43.
- [7] 卜歆, 寇莉萍. 初加工葡萄贮藏期间病原菌分离与鉴定[J]. 保鲜与加工, 2006(6): 39—41.
BO Xin, KOU Li-ping. Separation and Identification of Pathogen During Preservation of Original-processed Grape[J]. Storage and Process, 2006(6): 39—41.
- [8] 邓毅, 杨雪莲, 刘进平, 等. 鲜食葡萄保鲜研究新进展[J]. 绿色科技, 2017(5): 29—31.
DENG Yi, YANG Xue-lian, LIU Jin-ping, et al. Research on Preservation Progress of Table Grapes[J]. Journal of Green Science and Technology, 2017(5): 29—31.
- [9] 孙蕴晖, 张中义. 云南葡萄病害研究初报[J]. 云南农业大学学报, 1990(3): 150—156.
SUN Wen-hui, ZHANG Zhong-yi. Study on Grape Diseases in Yunnan Province[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 1990(3): 150—156.
- [10] 马俊义, 朱晓华, 赵林忠, 等. 葡萄穗轴褐枯病初步研究[J]. 新疆农业科学, 2004(5): 353—354.
MA Jun-yi, ZHU Xiao-hua, ZHAO Lin-zhong, et al. Preliminary Study on Spike-stalk Brown Spot of Grape[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2004(5): 353—354.
- [11] 聂继云. 葡萄实用栽培技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2017: 52—53.
NIE Ji-yun. Practical cultivation Techniques of Grape[M]. Beijing: Science and Technology of China Press, 2017: 52—53.
- [12] 孙俊. 榛子叶斑病病原菌生物学特性研究[C]// 中国植物病理学会 2016 年学术年会论文集, 2016: 89.
SUN Jun. Biological Research of Spot Pathogen on Hazelnut Leaf[C]// Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology(2016), 2016: 89.
- [13] 薛婷, 陈丽, 李喜宏, 冯丽琴. 蒜薹采后病原真菌鉴定及侵染特点的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 513—515.
XUE Ting, CHEN Li, LI Xi-hong, FENG Li-qing. Study on the Pathogen Identification and Infection Characteristics of Post-harvest Pathogens for Garlic Sprouts[J]. Journal of Anhui Agriculture, 2006, 34(3): 513—515.
- [14] 集贤, 张平, 李志文. 纳他霉素对葡萄采后交链孢菌的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 308—311.
JI Xian, ZHANG Ping, LI Zhi-wen. Inhibition Effect of Natamycin on Grape *Alternaria* sp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(3): 308—311.
- [15] 许玲, 徐灵芝, 张维一, 等. 葡萄采后病原菌种类及发病规律研究[J]. 八一农学院学报, 1995(2): 31—35.
XU Ling, XU Ling-zhi, ZHANG Wei-yi, et al. A Preliminary Study on the Pathogens and Disease Condition of Postharvest Berry Rot of Main[J]. Journal of August 1st Agriculture College, 1995(2): 31—35.
- [16] 李朋华. 部分链格孢属真菌的形态学及多基因鉴定[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016: 27.
LI Ming-hua. Identification of Partial *Alternaria* by Morphology and Multiple-gene Analysis [D]. Zhengzhou: Henan Agriculture University, 2016: 27.
- [17] 郝莉花, 董彩文, 陈春生, 等. 红枣贮藏期间主要病原真菌的分离、鉴定与 ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 304—307.
HAO Li-hua, DONG Cai-wen, CHEN Chun-sheng, et al. Isolation, Identification and ITS Sequence Analysis of Major Pathogenic Fungi during Storage of Jujube[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2016, 44(2): 304—307.
- [18] 何丽. 新疆枣果黑斑病菌交链格孢菌产生毒素种类及其致病作用研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2017: 11—12.
HE Li. Mycotoxins Analysis to *Alternaria alternata* that Mainly Pathogen of Jujube Black Spot and Toxins Caused Disease Effect to Jujube in Xinjiang[D]. Shihezi: Shihezi University, 2017: 11—12.
- [19] 杨晓平, 胡红菊, 王友平, 等. 梨黑斑病原菌的生物学特性及其致病性观察[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 680—684.
YANG Xiao-ping, HU Hong-ju, WANG You-ping, et al. Biological Characteristics and Pathogenicity of Pear Black Spot by *Alternaria Alternata* (Fr)Keissl[J]. Journal of Huazhong Agricultura University, 2009, 28(6): 680—684.
- [20] 吴玉鹏, 赵晓梅. 不同产地库尔勒香梨萼端黑斑病原菌的分离鉴定[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(1): 116—122.
WU Yu-peng, ZHAO Xiao-mei. The Separation and Identification of the Pathogenic Bacteria of KORLA Pear Calyx End Black Spot Disease in Different Growing Area[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2018, 55(1): 116—122.