

酿酒葡萄新病害——葡萄顶枯病

李 华, 李茹一, 王 华

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 葡萄顶枯病 (*Eutypa dieback*) 是欧洲、澳洲及美洲多见的酿酒葡萄毁灭性病害。通过从不同葡萄园采集病株并进行分离、培养出的菌株经过培养性状观察初步筛选, 其后进行分子生物学鉴定。结果表明, 经特定引物 PCR 扩增后, 分离出的菌株经形态学鉴定以及分子生物学鉴定为 *Eutypella vitis*。 *Eutypella vitis* 为国外已鉴定的葡萄顶枯病的致病病原菌。

关键词: 酿酒葡萄; 葡萄顶枯病; PCR; 分子生物学鉴定

中图分类号: S663.1; Q81 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2007)05-0048-03

New Disease for Wine-making Grape——*Eutypa Dieback*

LI Hua, LI Ru-yi and WANG Hua

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: *Eutypa dieback* is a ruinous disease for wine-making grape, which is frequent in Europe, Australia and America. The ill strains were collected from different vineyards and then separated, then the cultured strains underwent culture character observe and primary screening for molecular biological identification. The experimental results revealed that the separated strains were identified as *Eutypella vitis* after PCR by specific primer. *Eutypella vitis* had already been identified as the pathogenic bacteria of *Eutypa dieback* abroad.

Key words: wine-making grape; *eutypa dieback*; PCR; molecular biological identification

葡萄(*Vitis Vinifera*)在中国有着漫长的栽培历史。随着葡萄酒工业在中国的发展, 20世纪80年代后期到90年代, 国内出现了酿酒葡萄引种高峰期。大多数酿酒葡萄品种引自欧洲并在中国葡萄产区广泛栽培。

近几年, 在我国的许多葡萄产区相继出现病害症状: 新梢生长缓慢, 萎黄, 着生的叶子带有卷曲或者变色, 多年生主干发病部位呈灰褐色或紫褐色坏死, 变硬。且已有大量葡萄坏死, 对葡萄园的产量造成很大的经济损失。根据病状, 我们怀疑为葡萄顶枯病(*Eutypa Dieback*)。为此对病原菌进行分离、培养、分子鉴定, 以期为病害的发现和防治提供依据。

葡萄顶枯病是一种严重的腐烂性病害。直到1973年, 澳大利亚的科学家才确定这种病害是由子囊菌门, 弯孢壳属的 *Eutypa armeniaca* Hansf. and M.V. Cater 引起的, 其后更名为 *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul^[1]。近年来, 许多学者的研究表明与 *Eutypa lata* 同属或者近属关系的真菌也能造成葡萄顶枯病的症状^[2,3]。美国、新西兰、

希腊、法国、澳大利亚和瑞士都相继报道了此病害的发病情况。

因葡萄顶枯病主导病原菌 *Eutypa lata* 菌丝生长慢、易被其他腐生菌覆盖、人工培养不易产生有性世代, 所以利用形态学鉴定十分困难。近年来, 大量的分子生物学方法运用到病害鉴定中, 大大提高了鉴定的速度和准确性。2000年, Pascal Lecomte 等人利用特异引物对病原菌 *Eutypa lata* 进行快速 PCR 扩增鉴定^[4]。其后 P.E. Rolshausen 等人在2004年利用 PCR-RFLP 方法对其进行了补充, 更能精确地鉴定主导病原菌 *Eutypa lata* 及相近属的差异性^[2]。本文应用了 PCR、PCR-RFLP 以及 DNA 测序对国内病株进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 取材及病原菌的分离培养

本研究的试验材料来自陕西杨凌张家岗葡萄酒学院葡萄试验站。取材品种为1999年栽种的梅鹿特。

2005年3月中旬, 选取具有新梢生长缓慢、萎黄、着

基金项目: 国家科技部星火计划项目(2005EA850056)。

收稿日期: 2007-03-19

作者简介: 李华(1959-), 男, 重庆梁平人, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子生物学及葡萄与葡萄酒。

通讯作者: 李华, 029-87092107, E-mail: putj@263.net。

生的叶子带有卷曲或变色者,多年生主干发病部位呈灰褐色或紫褐色坏死,变硬的多年生枝条或枝干作为研究对象。将枝干的表皮剥去,再将枝条横切露出其横截面,以取得污染度最小的分离材料。具体步骤参照 Munkvold,G.P. 的研究^[9]。在枝条横截面坏死边缘或者坏死部分的外部边缘上取薄木片 5 mm × 5 mm。将薄木片经过 75%乙醇表面消毒 30 s, 后经过 0.1% L 汞液浸泡 3 min, 用无菌水反复冲洗 3 次。处理过的薄木片用无菌滤纸吸干后放置在 PDA 培养基上进行培养,25℃ 下黑暗培养 3~4 d 后观察。待菌丝体长出以后, 参见 Munkvold 进行培养性状的观察, 初步筛选菌株^[9]。

1.2 DNA 的提取

为提高 DNA 的提取量, 将筛选得到的菌株进行液体培养, 72 h 后取菌丝经冷冻干燥处理, 采用 CTAB 法提取 DNA^[6]。

1.3 PCR 以及 PCR-RFLP

我们选取 Pascal Lecomte 设计的特定引物中的两组, 来对菌株分别进行 PCR 扩增。其中的 Lata 1 (5 - GAGCTACCTGTAGCCCGCTG - 3), Lata2- 2 (5 - GACGTCAGCCGTGACACACC - 3) 是根据 ITS 区和 5.8S 区设计的引物, SCA10A (5 - TAGTGGTGTCAAGT - GAAAGG - 3), SCA10B (5 - GTGCTAAAGCT - TAAAATCCC - 3) 是根据 RAPD 序列设计的引物^[4](引物由上海生工合成)。Lata 1 和 Lata2- 2 所用 PCR 体系采用 25 μL 的体系。每个引物的最终浓度为 0.2 μM^[4], 循环体系由 37 个循环所构成: 在 94℃ 的条件下预变性 4 min, 94℃ 的条件下将其变性 30 s, 退火温度为 65℃, 然后在 72℃ 的条件下延伸 1 min。最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。SCA10A 和 SCA10B 引物所用 PCR 体系采用 25 μL 的体系。每个引物的最终浓度为 0.2 μM^[4], 循环体系由 37 个循环所构成: 在 94℃ 条件下预变性 4 min, 94℃ 的条件下将其变性 30 s, 退火温度为 60℃, 然后在 72℃ 的条件下延伸 1 min。最后一个循环在 72℃ 延伸 7 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用荧光染料溴乙锭(EB) 染色, 在紫外光下观察 DNA 条带, 用凝胶成像系统输出照片, 并进行有关的数据分析。

PCR-RFLP 方法, 使用引物为 ITS1(5 - TCCGTAG - GTGAACCTGCGG - 3) 和 ITS4 (5 - TCCTCCG CT - TATTGATATGC - 3), PCR 体系都采用 25 μL 的体系。每个引物的最终浓度为 0.2 μM^[4], 循环体系由 37 个循环所构成: 在 94℃ 的条件下预变性 4 min, 在 94℃ 条件下将其变性 30 s, 退火温度为 50℃ 50 s, 然后在 72℃ 的条件下延伸 50 s, 最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。后用限制性内切酶为 Alu I 作酶切(购自 FERMENTAS 公

司), 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 用荧光染料溴乙锭(EB) 染色, 在紫外光下观察 DNA 条带, 用凝胶成像系统输出照片, 并进行有关的数据分析^[2]。

1.4 核苷酸序列测定

使用引物 ITS1(5 - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3) 和 ITS4(5 - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3), PCR 体系都采用 25 μL 的体系。每个引物的最终浓度均为 0.2 μM^[4], 循环体系由 37 个循环构成: 在 94℃ 的条件下将其变性 30 s, 退火温度为 50℃ 50 s, 然后在 72℃ 的条件下延伸 50 s。后将 PCR 扩增产物经纯化后送至西北农林科技大学生物技术中心进行测序。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

将从病株上分离筛选后的菌株(A.B.C.D.E) 通过引物 SCA 10A 和 SCA 10B 进行 PCR 扩增后, 都没有 PCR 扩增产物, 见图 1。用引物 Lata 1 和 Lata2- 2 进行 PCR 扩增后, 仅有菌株 A 有 PCR 扩增产物, 但产物条带大小与 Lecomte et al(2000) 的研究所描述的主导病原菌 *Eutypa lata* 的条带大小不相同^[4], 见图 2。

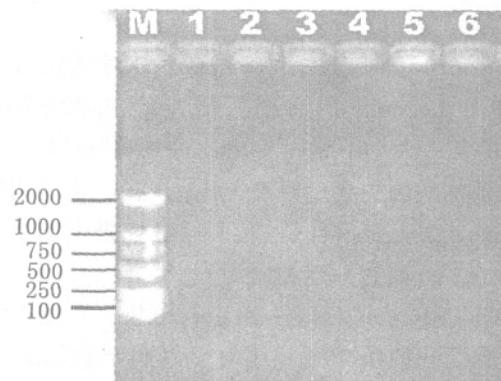


图 1 利用引物 SCA 10A 和 SCA 10B 的 PCR 放大结果

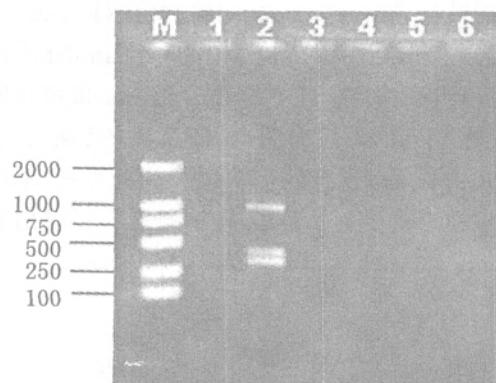


图 2 利用引物 Lata 1 和 Lata 2-2 进行 PCR 的放大结果

2.2 PCR-RFLP 试验结果

用菌株 A 提取的 DNA 以 1 倍的浓度和稀释 10 倍

的浓度分别进行 PCR- RFLP 分析。经 5.8S-ITS 区扩增后用 *Alu I* 酶切后可得到两条大小分别约为 0.3 kb 及 0.2 kb 的条带, 见图 3。

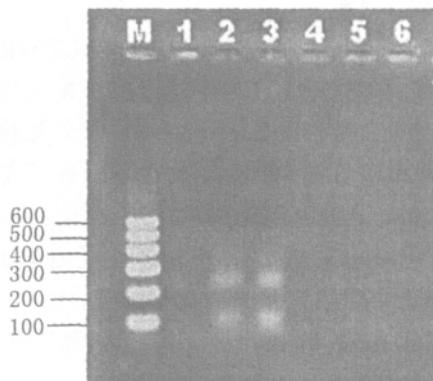


图3 利用限制性内切酶 *Alu I* 进行酶切后结果

2.3 序列分析结果

将菌株 A 进行序列测定的结果在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行对比分析, 结果表明, 所测菌株的序列与子囊菌门, 弯孢聚壳属的 *Eutypella vitis* (AY462568) 的 ITS 序列有 100% 的同源性。

3 结论与讨论

如图 2 所示, 引物 *Lata 1* 和 *Lata 2-2* 对菌株 A 扩增后的条带与 Lecomte 的研究所描述的主导病原菌 *Eutypa lata* 的条带大小不相同^[4], 由此可见, 菌株 A 并非是国外葡萄顶枯病的主导病原菌 *Eutypa lata*。由于引物 *Lata 1* 和 *Lata 2-2* 为专一性引物, 所以我们推测菌株 A 可能与 *Eutypa lata* 具有一定的同源性。

利用 PCR- RFLP 来对菌株 A 进行分析, 将图 3 与 Rolshausen 所记载的条带图片比对, 以确定菌株 A 与 *Eutypa lata* 的关系。对比结果显示, 菌株 A 与多个致病菌条带相似。为了准确鉴定, 将菌株 A 进行 5.8S-ITS 区序列分析。结果与 *Eutypella vitis* 的同源性达到 100%, 所以菌株 A 鉴定为 *Eutypella vitis*。2005 年, Jordan.S 等人证明此病菌具有致病性, 且能与 *Eutypa lata* 造成相同的病症, 只是在相同的发病时间内, 所造成的病症要比主导病原菌 *Eutypa lata* 所致的症状轻^[3]。由此可见, 本试验所采集发病枝条是受 *Eutypella vitis* 侵染, 呈现出葡

萄顶枯病 (*Eutypa dieback*) 的症状。

图 1 中 PCR 扩增所用引物 *SCA 10A* 以及 *SCA 10B* 并未对所有分离菌株扩增出条带, 而引物 *Lata 1* 和 *Lata 2-2* 对菌株 A 扩增出了条带, 这就验证了 Pascal Lecomte 文中所述由 RAPD 所设计的引物 *SCA 10A* 和 *SCA 10B* 要比 ITS 区设计的引物 *Lata 1* 和 *Lata 2-2* 的专一性以及灵敏度低。

综上所述, 可见本试验所选取的葡萄园病株所出现的症状确实为葡萄顶枯病 (*Eutypa dieback*), 但其致病病原菌却与国外的主导病原菌 *Eutypa lata* 不同, 经鉴定为 *Eutypella vitis*。本试验首次在国内发现了葡萄顶枯病, 一旦此病害在葡萄园中蔓延, 将会导致毁灭性灾害。但是目前国内对此病害并没有任何的鉴定和防治措施, 因此, 使国内的葡萄园种植者了解此病害, 正确的早期诊断此病害具有重要的意义。关于在中国其他葡萄产区是否存在此病害以及致病病原菌是否为 *Eutypella vitis* 还需要进行更多的研究。

致谢: 感谢西北农林科技大学生物技术中心主任, 陕西省农业分子生物学重点实验室主任, 长江学者康振生教授在试验过程中的支持, 以及西北农林科技大学植物保护学院导师黄丽丽教授的帮助。

参考文献:

- [1] 李华. 葡萄病虫害的合理防治 [M]. 陕西: 陕西人民出版社, 2004. 37- 39.
- [2] Rolshausen R E., Trouillas F., Gubler, W. D. Identification of *Eutypa lata* by PCR-RFTR [J]. *Plant Dis*, 2004, 88: 925- 929.
- [3] Jordan S, Schilder A. *Eutypella vitis*, a potential pathogen of grapevines in Michigan (Abstr.) [J]. *Phytopathology*, 2005, 95, (6): .
- [4] Lecomte P., Peros, J.-P. Blancard, D., Bastien, N., et al. PCR assays that identify the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 4475- 4480.
- [5] Munkvold G.P. *Eutypa dieback* of grapevine and apricot [Z]. *Online Plant Health Progress*, 2001. doi: 10.1094/PHP- 2001- 0219- 01- DG.
- [6] J.L. Cenis. Rapid extraction of fungal DNA for PCR Amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(9): .

(上接第 47 页)

- [3] 王箴. 化工辞典 (第二版) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1992. 292.
- [4] 中国医药化司上海化学试剂采购站. 试剂手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 242- 243.
- [5] 韩英. 配制酒的沉淀成分分析方法 [J]. *酿酒科技*, 2001, (2): 73- 74.
- [6] 张林生. 水的深度处理与回用技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 52.
- [7] Mark M. Jones, T. Netterville et al. *Chemistry* [M]. Man and Society Philadelphia. Saunders College, 1980. 12- 13.
- [8] 国家出入境检验检疫局. 中国出口食品卫生注册管理指南 [M]. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 2001. 345- 347.