

银耳好食脉孢霉分子鉴定及敏感药剂初筛

潘丽歌, 何培新, 武晓瑞

(郑州轻工业学院, 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要:采用 ITS 序列分析技术对严重危害银耳栽培的病原真菌的分类地位和对该病原菌敏感的杀菌药剂进行了分析研究。结果表明:该病原真菌为好食脉孢霉;病原菌初步敏感药剂筛选表明,稀释 400 倍的 50% 多菌灵可湿性粉剂对好食脉孢霉菌丝生长的抑制效果为 91.1%,但随着药剂浓度降低,抑制效果明显下降;三唑酮和百菌清的抑制作用较强;代森锰锌和高纯蓝粉的抑制作用较差。

关键词:ITS 序列分析;好食脉孢霉;银耳生产;杀真菌剂

中图分类号:S 567.3⁺4 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)15-0171-03

银耳是我国传统名贵食用菌,具有润肺生津、滋阴养胃、益气和血、补脑强心的功效,还有提神益气、滋嫩皮肤、恢复肌肉疲劳、抵抗肿瘤等作用。我国是世界第一大银耳生产国,2008 年产量超过 30 万 t。然而,杂菌污染为银耳大规模生产带来了严重损失。最近在河南省安阳县银耳栽培现场发现了一种真菌感染,杂菌孢子通过接种穴、菌袋砂眼或料袋系口侵入,菌丝稀疏,污白色,生长迅速,产生白色、浅黄色至浅橙色的孢子堆,菌袋污染部分不能正常出耳,且传染性极强,为银耳栽培带来了较大损失。病原菌在 PDA 平板上培养,菌丝蛛网状,镜检可看到典型的脉孢霉成串分生孢子。然而,该病原菌的银耳菌袋污染症状及人工培养特征与典型的红色链孢霉和白色链孢霉(好食脉孢霉 *Neurospora sitophila*)均有所不同^[1-2],根据形态学特征难以确定其

分类地位。随着分子生物学技术的发展,内转录间隔区序列(Internal transcribed sequence, ITS)分析技术越来越多地应用于真菌种属水平的分类鉴定,成为非专业分类学者从事菌物研究的有效手段^[3]。现采用 ITS 序列分析技术,验证银耳链孢霉病原菌的分类地位,并初步筛选该病原菌敏感的杀菌药剂,对指导银耳生产具有一定的实际意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 试验菌株 Neu-Tr-f-1 分离自银耳污染菌袋,根据形态特征鉴定为脉孢霉(*Neurospora* sp.)。根据该菌株 ITS 序列的 BLAST 比对结果,从基因库中选取相近种 7 份材料用于 ITS 序列分析(表 1)。

1.1.2 杀菌剂 50% 多菌灵可湿性粉剂(河北冠龙农化有限公司);75% 百菌清可湿性粉剂(四川川东农药化工有限公司);25% 三唑酮可湿性粉剂(山东荣邦化工有限公司);80% 高纯蓝粉可湿性粉剂(山东荣邦化工有限公司);80% 代森锰锌可湿性粉剂(山东荣邦化工有限公司)。

第一作者简介:潘丽歌(1987-),女,硕士,现主要从事霉菌生物技术研究工作。

收稿日期:2012-05-07

Study on Browning Types of 'Nanguo' Pear Juice During Process

LIU Yan-ji¹, SONG Si-yuan¹, TIAN Xiao-yan²

(1. College of Bioscience and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: By examining HMF, PPO, chlorogenic acid and amino acid N, the browning type of 'Nanguo' pear juice in seven different stages were studied. The results showed that the enzymic browning existed before sterilization period. Non-enzymatic browning was contributed in periods of adding pectinase, sterilization and storage.

Key words: 'Nanguo' pear; enzymic browning; maillard reaction; browning type

表 1 供试菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株名	学名	ITS 序列基因号
脉孢霉 Neu-Tr-f-1	<i>Neurospora</i> sp.	无
好食脉孢霉	<i>N. sitophila</i>	GU192459
好食脉孢霉 FGSC 1135	<i>N. sitophila</i>	AF388926
四孢脉孢霉	<i>N. tetrasperma</i>	AY681194
四孢脉孢霉 GrS 11	<i>N. tetrasperma</i>	FJ904922
间型脉孢霉 FGSC 1762	<i>N. intermedia</i>	AF388923
粗糙脉孢霉	<i>N. crassa</i>	AY681193
<i>N. panmonica</i> CBS 270. 91	<i>N. panmonica</i>	GQ922532

1.1.3 培养基 土豆-葡萄糖-琼脂(PDA)培养基(土豆 200 g,葡萄糖 10 g,琼脂 20 g,自来水 1 000 mL,pH 自然)用于病原菌的分离和培养;不加琼脂的土豆液体培养基用于真菌菌丝体培养。

1.2 试验方法

1.2.1 ITS 序列测定 供试 Neu-Tr-f-1 菌株在 PDA 培养基上活化培养,试管斜面内加入 5 mL 无菌生理盐水,制备孢子悬浮液。孢子悬浮液适当稀释后接种土豆液体培养基,31℃静置培养 5 d。捞取菌丝体,用 4 层无菌纱布挤干游离水分,取 1 g 左右菌丝体,加液氮充分研磨成粉末,迅速转移至 1.5 mL 离心管中,采用 UNIQ-10 柱式通用 DNA 提取试剂盒(上海生工)提取基因组 DNA。采用通用引物 ITS-1 和 ITS-4 扩增 ITS 区域的特异性 DNA 序列,引物序列、PCR 扩增体系、PCR 反应程序以及 PCR 产物的检测方法等参照文献[4]。PCR 扩增产物经 UNIQ-10 柱式 DNA 切胶回收试剂盒(上海生工)纯化后直接测序。测序工作由上海生物工程研究所完成。

1.2.2 DNA 序列数据分析 将 Neu-Tr-f-1 菌株的 DNA 序列提交基因库比对,根据比对结果选取相近种的 7 份基因材料。将 8 份序列用 Clustal X 软件进行初步比对,剔除前后不一致的序列。用 MEGA 3.1 软件做进化分析,UPGMA(非加权组平均法)聚类分析,对得到的进化树进行自举法分析,随机种子缺省构建系统发育树。

1.2.3 敏感药剂初筛 每个 250 mL 三角瓶中分装 100 mL 土豆液体培养基,灭菌、冷却后加入过滤除菌的供试药剂。每种杀菌剂试验 5 种药物浓度(稀释 400、600、800、1 200 和 1 600 倍),以不加药剂为对照,每种处理设 3 次重复。药液与培养基混合均匀后接种 1 mL 脉孢霉孢子悬浮液(浓度为 10^8 个/mL),31℃、150 r/min 振荡培养 3 d,抽滤收集菌丝体,60℃干燥至恒重,称量并计算平均值(g)。按照公式计算各种药剂的抑菌效果。抑菌效果(%)=[(对照菌丝干重-处理菌丝干重)/对照菌丝干重]×100%。

2 结果与分析

2.1 Neu-Tr-f-1 菌株的分子鉴定

根据测序波形图,剔除两端可能不准确的序列,获得 Neu-Tr-f-1 菌株保守核糖体 DNA(rDNA)序列。该序列共 536 个碱基(图 1),其中 1~177 为部分 ITS₁ 序列,178~280 为 5.8S rDNA 序列,281~488 为 ITS₂ 序列,489~536 为部分 28S rDNA 序列。

```
CTCCACAAACCATCGGAATCTTACCCGTACGGTTGCCCTCGCGCTGGCGGTCCGGA
AAGGCCCTCGGGTCTCCCGGATCTCGGGTCTCCCGCTCGCGGAGGCTGCCCGCG
GAGTGCCGAACTAACTCTTGATATTTTATGCTCTCTGAGTAAACTTTTAAATAAG
TCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAITCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCTCGCCAGTATTCTGGCGAGCATGCTGTTGAGCGCTCAITTCACCATCAAGC
TCTGCTTGCGTTGGGGATCGCGGCTGCCCGCGTCCCTCAAATCAGTGGCGGGCTC
GCTAGTCACACCGAGCGTAGTAAGTCTACATCGCTATGTCGTCGCGCGGTTCTTGC
CGTAAACCCCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCGCGTGAAT
TAAGCAGATCAAGCC
```

图 1 Neu-Tr-f-1 菌株的保守 rDNA 序列

Fig. 1 The conservative ribosomal DNA sequence of Neu-Tr-f-1 strain

将获得的 Neu-Tr-f-1 菌株的保守 rDNA 序列提交基因库,BLAST 比对结果表明,该菌株与 2 株好食脉孢霉的序列同源性均在 99%以上。基于相近种 8 份材料的进化分析,获得了系统发育树(图 2)。从图 2 可以看出,供试 Neu-Tr-f-1 菌株与 2 株好食脉孢霉(AF388926 和 GU192459)聚在一起,表明与形态分类结果一致,试验菌株为好食脉孢霉。此外,选取的 5 种、8 份脉孢霉材料在很小的进化距离(0.0028)聚在一起,表明好食脉孢霉、四孢脉孢霉、间型脉孢霉、粗糙脉孢霉和 *N. panmonica* 亲缘关系较近。常规脉孢霉属真菌分类和鉴定主要依靠子囊孢子的数量和微观形态,而相近物种的形态特征比较接近,仅依靠形态特征进行分类鉴定,容易得出不科学的结果[5]。因此,ITS 等保守基因序列分析技术在脉孢霉属真菌的分类与鉴定中具有重要的应用价值。

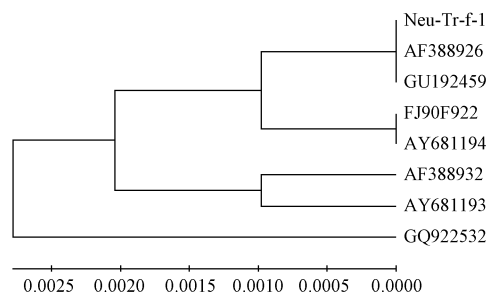


图 2 相近脉孢霉 ITS 序列系统发育分析聚类图

Fig. 2 Phylogenetic analysis of related *Neurospora* fungi based on ITS sequences

2.2 好食脉孢霉敏感药剂

5 种供试杀菌剂对银耳好食脉孢霉菌丝生长均有不同程度的抑制作用,而且随着药剂浓度的增加,抑菌

效果也逐渐增强(图 3)。相对而言,多菌灵、百菌清和三唑酮的抑制效果较好。稀释 400 倍的 50%多菌灵可湿性粉剂(1.25 g/L)的抑菌效果为 91.1%,但随着稀释度的增加,抑菌效果明显下降。稀释 400 倍的 75%百菌清可湿性粉剂(1.875 g/L)的抑菌效果为 92.0%,稀释 800 倍(0.938 g/L)仍可超过 80%。25%三唑酮可湿性粉剂在稀释 400~1 600 倍(0.156~0.625 g/L)的浓度范围内,对银耳好食脉孢霉菌丝的抑菌效果均较好,分别为 86.1%、84.6%、84.1%、73.7%和 67.9%。因而,多菌灵、三唑酮和百菌清在银耳好食脉孢霉的防治中具有较大的应用价值。高纯蓝粉和代森锰锌的抑菌效果相对较差,在银耳好食脉孢霉的防治中应用价值较小。

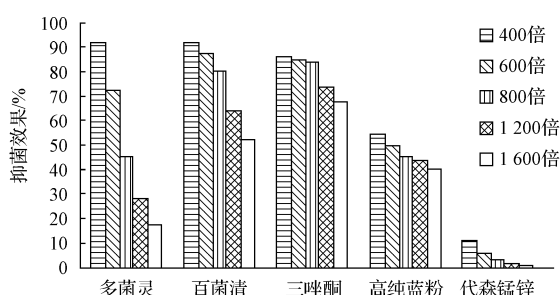


图 3 供试 5 种药剂的抑菌效果

Fig. 3 The inhibitory effect of 5 tested fungicides

3 结论与讨论

该试验采用 ITS 序列分析技术确证了一种严重危害银耳栽培的病原真菌为好食脉孢霉;多菌灵、三唑酮和百菌清对病原真菌的孢子萌发和菌丝生长均具有较强的抑制作用,而代森锰锌和高纯蓝粉的抑制作用较差。

位于真菌 18S rDNA 和 28S rDNA 之间的 ITS 区,包括进化上高度保守的 5.8S rDNA 和包含有 rDNA 前体加工信息的 2 个间隔区 ITS₁ 和 ITS₂。ITS 区域序列分析广泛应用于真菌系统学研究和真菌属、种水平的分类鉴定。好食脉孢霉及相近真菌形态差异较小,非专业分类学者较难把握。该研究表明,ITS 序列分析可应用于脉孢霉属真菌的分类鉴定。常规形态特征结合 ITS 序列分析技术的应用,对快速、准确确定食用菌病原真菌的分类地位,进而进行生物学特性和有针对性的防治技术研究,具有一定的应用价值。

该研究表明,稀释 400 倍的 50%多菌灵可湿性粉剂及一定浓度的百菌清和三唑酮对好食脉孢霉的菌丝生长具有一定的抑制作用,可用于污染早期杂菌菌丝生长的控制,栽培前后菇房及周边环境的消毒等。银耳为绿色无公害食品,市场销售特别是出口对产品的安全性要求极为严格。因此,使用敏感杀菌剂防治银耳好食脉孢霉时,要注意施药时机、剂量等,避免出现银耳农药残留超标等食品安全问题。

参考文献

- [1] 吴小平,彭建升,刘盛荣.食用菌污染袋白色链孢霉分离鉴定及特性初探[J].中国食用菌,2008,27(3):58-60.
- [2] 史磊.食用菌链孢霉防治[J].中国林副特产,2010(6):74-75.
- [3] 何培新,刘伟.桑黄真菌的分子鉴定及分子系统学初探[J].湖北农业科学,2009,48(4):778-780.
- [4] 刘如钢,魏涛,何培新,等.裸盖菇属的真菌鉴定及分子系统学初探[J].微生物学通报,2006,33(2):44-47.
- [5] Dettman J R, Harbinski F M, Taylor J W. Ascospore morphology is a poor predictor of the phylogenetic relationships of *Neurospora* and *Gelasinospora*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2001, 34:49-61.

Molecular Identification and Primary Screening of Sensitive Fungicides for *Neurospora sitophila*

PAN Li-ge, HE Pei-xin, WU Xiao-rui

(School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: A pathogen seriously harming the production of *Tremella fuciiformis* was confirmed and sensitive fungicides were screened by ITS sequence analysis. The results showed that the pathogenic fungi was *Neurospora sitophila*. The study of sensitive fungicides screening suggested that the inhibitory rate of carbendazim at the concentration of 1.25 g/L on the growth of *N. sitophila* was 91.1%, however, the inhibitory rates decreased significantly with the increase of the drug dilution. Moreover, chlorothalonil and triadimefon also exhibited strong inhibitory effects. The inhibitory effects of the high pure blue powder and mancozeb were poor.

Key words: ITS sequence analysis; *Neurospora sitophila*; *Tremella fuciiformis* production; fungicides