

蓝莓叶穿孔病菌鉴定及其生物学特性研究

严雪瑞, 周 源, 赵睿杰, 代汉萍, 傅俊范

(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以蓝莓产区发现的一种新病害蓝莓叶穿孔病样为供试病菌,采用柯赫氏证病法则、形态学测定、ITS 和 EF-1 α 序列比对鉴定和常规病原菌生物学特性研究技术,研究了该病的致病菌,致病菌的分类地位、致病菌在不同培养条件下菌丝生长和孢子萌发的特性。结果表明:引起蓝莓叶穿孔病的致病菌为 *Alternaria alternata*,该菌在供试条件下菌落生长以 PDA 为最优培养基,30℃ 为最佳生长温度,最佳 pH 5,最佳氮源为甘氨酸,最佳碳源为葡萄糖;孢子萌发最佳条件为 30℃,pH 5,2%甘氨酸,2%葡萄糖。病原菌菌丝致死温度为 56℃、10 min。

关键词:蓝莓;叶斑病;链格孢菌;鉴定;ITS;生物学特性

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0123-05

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科越橘属灌木。蓝莓果实呈蓝色,近圆形,常食可增强视力,提高免疫力,是我国新兴发展起来的第三代水果。由链格孢(*Alternaria alternata*)引起的叶斑病是蓝莓“蓝丰”品种上的一种新病害。调查发现该病主要危害山东蓝莓主产区的“蓝丰”品种,发病率可高达 75%。侵染叶片初期形成圆形或近圆形病斑,病斑中心逐渐呈灰褐色,随着病斑扩展后期多个病斑汇合形成不规则形状。病斑中部枯死部分薄而脆,遇外力如风、雨等影响常易脱落,形成穿孔(图 1A、B)。

链格孢菌(*A. alternata*)作为链格孢属(*Alternaria* Nees)的模式种,在农业上是重要的致病真菌^[1]。近年来国内外关于链格孢菌引起的病害有很多报道,2011 年 Ravi 等^[2]曾在印度首次发现链格孢菌引起落葵叶斑病;Parkunan 等^[3]首次报道美国香蕉叶斑病。在我国大樱桃果实上有该致病菌的报道^[4],病害导致作物减产,造成严重的直接经济损失。由链格孢菌引起的果实斑点类病害也有相关报道,2013 年 Palou^[5]首次报道西班牙棕榈果黑斑病,我国也有关于柑橘褐斑病的报道,病害

发病率高,造成果树减产,果实品质下降,经济损失巨大。

由于国内对由链格孢菌(*A. alternata*)引起的蓝莓叶斑病尚鲜见报道,其发病特点和防治方法尚不明确,鉴定明确该致病菌及其生物学特性十分必要,从而可初步确定其对不同环境条件的适应性和敏感性,以期为该病害的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病菌自 2012 年 9 月采集于山东省胶南地区的蓝莓叶穿孔病样,并通过单孢分离方法获得纯培养。

1.2 试验方法

1.2.1 致病性测定方法 选用健康的 2 年生蓝莓植株,采用无伤接种、针刺接种、孢子悬浮液(无菌水配制浓度为 1×10^6 个/mL)等方法在叶片上进行接种,每种方法重复 3 次,每次重复 5 个叶片。以无菌水作对照,28℃ 恒温保湿培养。

1.2.2 病原菌形态鉴定方法 将纯化菌株接种于 PDA 和 PCA 平板,25℃ 恒温黑暗培养 7 d,观察菌落性状。产孢后观察孢子形态及产孢表型,测量孢子大小^[6]。

1.2.3 病原菌分子鉴定方法 获得病原菌总 DNA 后,采用真核生物核糖体 DNA 通用引物 ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC -3') 对 ITS 进行扩增,采用 EF-1 α 特异性引物 EF1-F(5'-TGCGCTATTCTCATCATYGC 3') 和 EF1-R(5'-AGAGGAGGGTAGTCAGTG 3') 对病菌 EF-1 α 进行扩增^[7]。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,由上海生工生物工程技术有限公司进行测序,测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析。

第一作者简介:严雪瑞(1977-),女,博士,副教授,研究方向为园艺植物病害。E-mail:zbyxr@126.com

责任作者:傅俊范(1958-),男,博士,教授,研究方向为病害流行与药用植物病害。E-mail:fujunfan@163.com

基金项目:国家农业部公益性行业(农业)科研专项资助项目(201103037);沈阳市科技计划资助项目(F12-132-3-00);辽宁“百千万人才工程”培养经费资助项目(2010921068);辽宁省高等学校优秀人才支持计划资助项目(LR2011018)。

收稿日期:2014-04-17

1.2.4 菌落生长特性研究方法 采用培养 5 d 的菌落进行试验,打取 5 mm 菌饼,测试其在不同培养条件下的菌落生长特性。每处理 3 次重复,采用交叉法测量菌落直径,以菌落直径大小来评价生长的好坏。测试条件包括不同培养基(查比、水琼脂、蓝莓-琼脂、燕麦片、PSA、PDA、PA 7 种培养基);不同氮源(以查氏培养基为基础,分别加入 2% 浓度的磷酸二氢铵、甘氨酸、硝酸钾、氯化铵、硫酸铵、草酸铵、硝酸铵 7 种氮源);不同碳源(以 PA 为基础,分别加入 2% 浓度量的葡萄糖、麦芽糖、果糖、木糖、乳糖、半乳糖、蔗糖和可溶性淀粉 8 种碳源);不同光照条件(光暗交替、全光照、全黑暗 3 种模式);不同温度(5、10、15、20、25、30、35℃ 7 个梯度);不同 pH 值(用 0.1 mol/mL HCl 和 0.1 mol/mL NaOH 将 PDA 培养基分别调至 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10 共计 8 个梯度)。菌丝致死温度测定方法采用试管水浴测定法^[6],确定最终致死温度。

1.2.5 孢子萌发特性研究方法 孢子萌发测定所需碳源、氮源、温度梯度、不同 pH 值同 1.2.4,采用凹玻片萌发法^[8],另设等量无菌水作为对照,滴于凹玻片上,重复 10 个视野。

2 结果与分析

2.1 柯赫氏法则证病结果

3 种接种处理均可发病,对照处理不发病。接种 3 d 后症状显现,针刺接种较其它 2 种方式发病显快。15 d 后观察发病症状与自然发病症状相同,再次分离,从接种病斑中获得了与原接种菌株相同的病原菌(图 1C、D)。

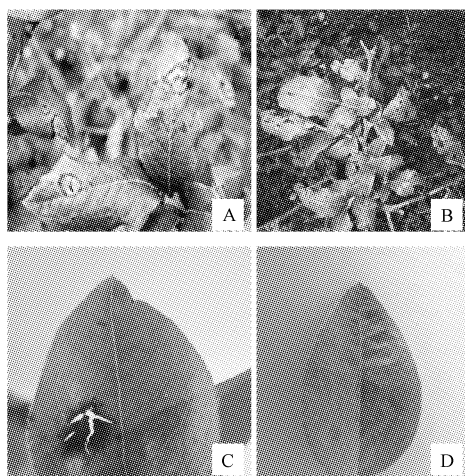


图 1 蓝莓轮斑病症状

注:A、B:田间发病症状,C:无伤口孢子接种,D:对照。

Fig. 1 Symptom of blueberry

Note: A, B: Symptom in the field, C: Inoculated without wound by conidia suspension, D: CK.

2.2 病原菌鉴定结果

病原菌菌落在 PDA 培养 7 d 后,呈灰色至暗青褐色,基内菌丝或气生菌丝发达(图 2A)。分生孢子梗单生或簇生,直立或弯曲,分隔,褐色或淡褐色,随着产孢作合轴式延伸,(15.0~80.0) μm \times (3.0~8.0) μm (图 2D)。分生孢子单生或短链生,倒梨形,卵形或倒棍棒形,淡褐色或褐色,表面光滑或具疣突,孢身(25.0~35.0) μm \times (7.5~14.5) μm ,横隔膜 3~8 个,纵、斜隔膜 0~3 个,有的分隔处隘缩,短喙柱状(图 2C)。PCA 上培养菌落呈轮纹状(图 2B),产孢表型呈矮树状分枝,支链一般长 1~5 个孢子,可进行二次分枝(图 2E)。该病原菌形态鉴定结果为交链孢(*Alternaria alternata*)。

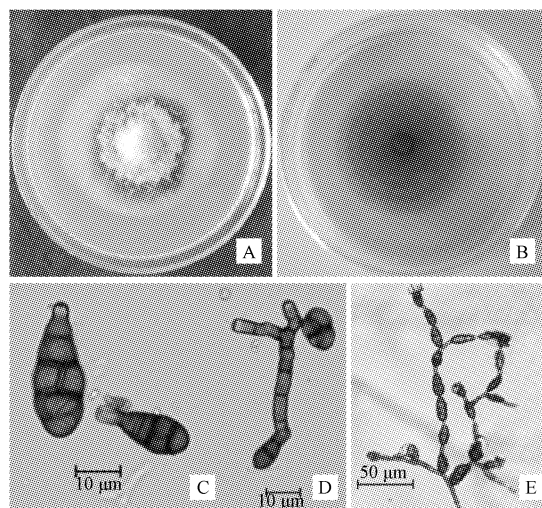


图 2 病原菌形态

注:A:PDA 菌落,B:PCA 菌落,C:分生孢子,D:分生孢子梗,E:产孢表型。

Fig. 2 The morphology of *Alternaria alternata*

Note: A: Colony on PDA, B: Colony on PCA, C: Conidium, D: Conidiophore, E: Sporulation pattern.

对该菌的 ITS 和 EF-1 α 进行 PCR 扩增,分别得到 550 bp 和 900 bp 的片段。将其测序后在 NCBI 中进行 BLAST 比对分析,结果表明其与 GenBank 中收录的 *Alternaria alternata* 菌株同源性高达 100%(GenBank 登录号分别为:JF835834, DQ677927)。

2.3 病原菌生物学特性测定结果

2.3.1 菌落生长特性结果 由图 3~8 可知,供试菌落生长以 PSA、PDA 为最佳生长培养基,以甘氨酸硝酸钾为最佳氮源,喜葡萄糖、蔗糖、麦芽糖,对光照不敏感,在 30℃ 时生长较 25℃ 好,表明其为高温型真菌,最适 pH 值为 5。菌丝在供试条件下 56℃、10 min 死亡。

2.3.2 孢子萌发特性结果 由图 9~12 可知,供试菌的孢子萌发氮源中以甘氨酸溶液为最佳,萌发率为 86.5%;

碳源中以葡萄糖为最佳,萌发率高达 90%;温度试验表明其在 5℃时萌发率仅为 25%,25℃增至 80%,30℃时高

达 100%;孢子萌发喜酸性条件,在 pH 为 3~6 时萌发率均较高,维持在 80%左右。

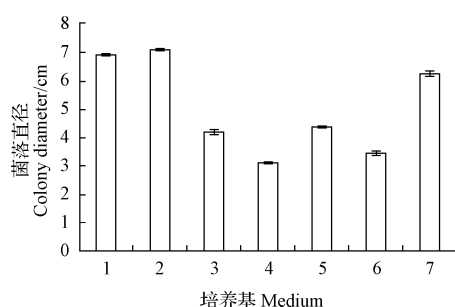


图 3 不同培养基对交链孢菌丝生长的影响

注:1. PDA;2. PSA;3. PA;4. 水琼脂;5. 蓝莓-琼脂;6. 查比;7. 燕麦。

Fig. 3 Effect of different cultural medium on mycelium growth of *A. alternata*

Note: 1. PDA; 2. PSA; 3. PA; 4. WA; 5. Blueberry-agar; 6. Czapck; 7. OA.

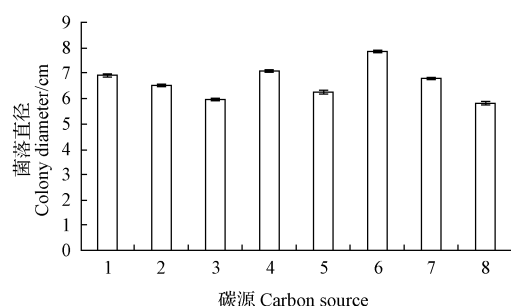


图 5 不同碳源对交链孢菌丝生长的影响

注:1. 葡萄糖;2. 乳糖;3. 果糖;4. 蔗糖;5. 半乳糖;6. 麦芽糖;7. 木糖;8. 可溶性淀粉。

Fig. 5 Effect of carbon source on mycelium growth of *A. Alternata*

Note: 1. Dextrose; 2. Lactose; 3. Fructose; 4. Sucrose; 5. Galactose; 6. Maltose; 7. Xylose; 8. Amidulin.

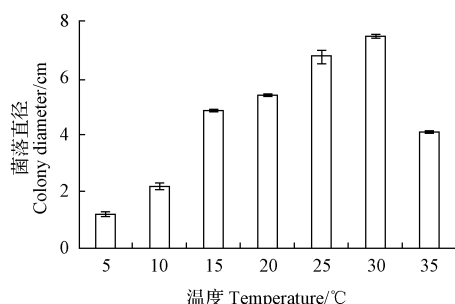


图 7 不同温度对交链孢菌丝生长的影响

Fig. 7 Effect of temperature on mycelium growth of *A. alternata*

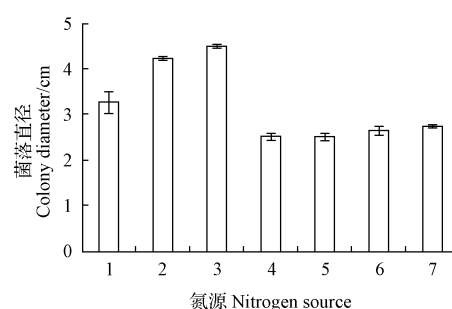


图 4 不同氮源对交链孢菌丝生长的影响

注:1. 磷酸二氢铵;2. 甘氨酸;3. 硝酸钾;4. 氯化铵;5. 硫酸铵;6. 草酸铵;7. 硝酸铵。

Fig. 4 Effect of nitrogen source on mycelium growth of *A. Alternata*

Note: 1. NH₄H₂PO₄; 2. Glycine; 3. KNO₃; 4. NH₄Cl; 5. (NH₄)₂SO₄; 6. NH₄C₂O₄; 7. NH₄NO₃.

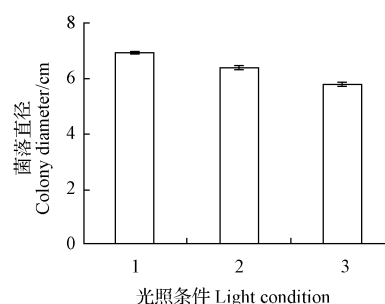


图 6 光照条件对交链孢菌丝生长的影响

注:1. 全光照;2. 光暗交替;3. 全黑暗。

Fig. 6 Effect of light condition on mycelium growth of *A. alternata*

Note: 1. Light; 2. Alternating light and dark; 3. Dark.

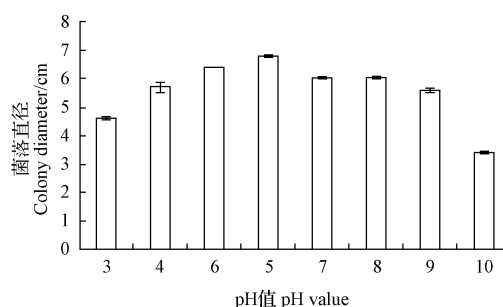


图 8 不同 pH 值对交链孢菌丝生长影响

Fig. 8 Effect of pH value on mycelium growth of *A. alternata*

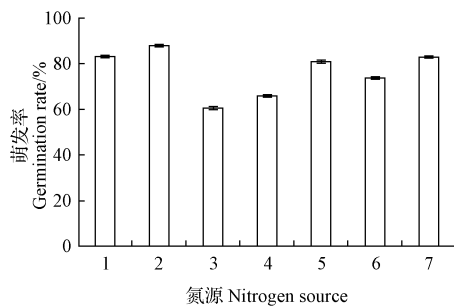


图9 不同氮源对交链孢菌孢子萌发的影响

注:1. 磷酸二氢铵;2. 甘氨酸;3. 硝酸钾;4. 氯化铵;5. 硫酸铵;6. 草酸铵;7. 硝酸铵。

Fig. 9 Effect of nitrogen source on spore germination of *A. Alternata*

Note:1. NH₄H₂PO₄;2. Glycine;3. KNO₃;4. NH₄Cl;5. (NH₄)₂SO₄;6. NH₄C₂O₄;7. NH₄NO₃.

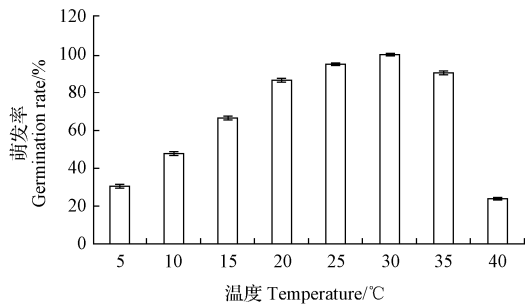


图11 不同温度对交链孢菌孢子萌发的影响

Fig. 11 Effect of temperature on spore germination of *A. alternata*

3 讨论

蓝莓叶穿孔病菌通过伤口侵入比自然侵入更容易发病,高温高湿条件下发病较快,病斑后期受外力影响中部易脱落形成穿孔。Luan 等^[9]曾报道在辽宁大连发现由细极链格孢(*A. tenuissima*)引起蓝莓叶斑。Simmons^[10]提出产孢表型是区分细极链格孢 *A. tenuissima* 和链格孢 *A. alternata* 的主要依据。根据 Simmons 的建议,课题组进行了产孢表型的测定,结果表明蓝莓穿孔病菌在 PCA 培养基上产孢表型为具备次级三级分枝的类型,而据报道 *A. tenuissima* 产孢表型并不分枝。故该研究认为,引起山东蓝莓叶穿孔的病原菌为 *A. alternata*,而非 *A. tenuissima*。

该研究采用分子鉴定和形态学相结合的方法来鉴定蓝莓叶穿孔病。分子研究 ITS、EF-1 α 鉴定结果表明该病菌属于链格孢小孢子组,与 *A. alternata* 和 *A. tenuissima* 亲缘关系较近,进而测定的形态学研究表明该病菌为 *A. alternata*。Andrew 等^[11]、曲文文等^[12]认为仅凭借 ITS、EF-1 α 等几个基因无法区分链格孢属小孢子种间差异,还需借助形态学将其进一步区分。

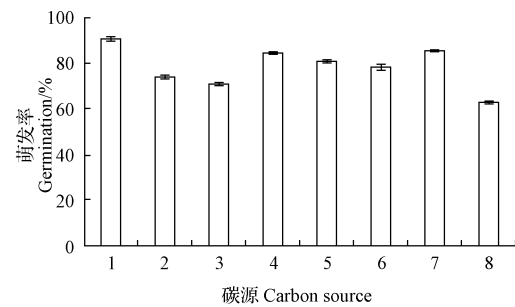


图10 不同碳源对交链孢菌孢子萌发的影响

注:1. 葡萄糖;2. 乳糖;3. 麦芽糖;4. 蔗糖;5. 半乳糖;6. 果糖;7. 木糖;8. 可溶性淀粉。

Fig. 10 Effect of carbon source on spore germination of *A. alternata*

Note:1. Dextrose;2. Lactose;3. Maltose;4. Sucrose;5. Galactose;6. Fructose;7. Xylose;8. Amidulin.

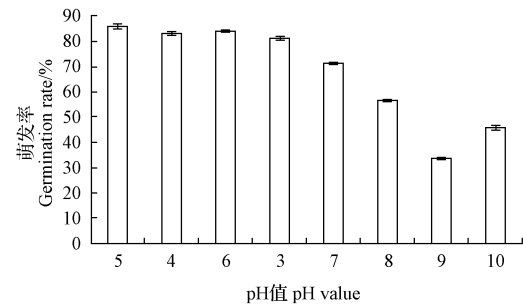


图12 不同 pH 对交链孢菌孢子萌发的影响

Fig. 12 Effect of pH value on spore germination of *A. alternata*

该菌的病原生物学特性研究表明菌落生长以 PDA 为最优培养基,30℃为最佳生长温度,pH 5.0 为最佳 pH,甘氨酸为最佳氮源,葡萄糖为最佳碳源,孢子萌发最佳条件为 30℃,pH 5.0,2%甘氨酸,2%葡萄糖。病原菌菌丝致死温度为 56℃、10 min。这些特性反映了病菌的生长特性,对于田间病害预测预报、病害抑菌试验的研究提供了基础。

参考文献

- [1] 张天宇. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2003:16,32-36.
- [2] Ravi S N, Sreeramulu N. First report of leaf blight of *Basella alba* caused by *Alternaria alternata* in India[J]. Plant Dis, 2011, 95:1476.
- [3] Parkunan V. First report of *Alternaria* leaf spot of banana caused by *Alternaria alternata* in the United States [J]. Plant Dis, 2011, 97:1116.
- [4] Zhao Y Z, Liu Z H. First report of black spot disease caused by *Alternaria alternata* on cherry fruits in China [J]. Plant Dis, 2012, 96:1580.
- [5] Palou L. First report of *Alternaria alternata* causing postharvest black spot of fresh date palm fruit in Spain[J]. Plant Dis, 2013, 97:286.
- [6] 刘志恒, 白海涛, 杨红, 等. 大樱桃褐腐病菌生物学特性研究. [J]果树学报, 2012, 29(3):423-427.
- [7] 王勇. 细极链格孢属、匍柄霉属及其近似属的形态学与分子系统学研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2010.

蓬蘽悬钩子水杨酸提取工艺及含量变化研究

赵伟伟, 李爱民, 张正海, 张悦, 陈晓丹

(中国农业科学院 特产研究所, 吉林, 长春 130112)

摘要:以蓬蘽悬钩子为试材,通过正交实验,对蓬蘽悬钩子中游离态与结合态水杨酸的提取工艺条件进行了优化,并测定了蓬蘽悬钩子生长期各器官中水杨酸含量。结果表明:游离态水杨酸提取最佳工艺条件为以乙腈为提取溶剂,加入磷酸,超声 15 min;结合态水杨酸提取最佳工艺条件为以乙醚为提取溶剂,加入磷酸,超声 15 min。蓬蘽悬钩子新梢和果实中游离态与结合态水杨酸含量变化趋势相似($r=0.868^{**}$ 和 0.986^{**})。开花期前,新梢水杨酸含量较高(1.179 mg/g);开花期至果实发育期(青果期),新梢水杨酸含量呈下降趋势;果实着色期至充分成熟期,新梢水杨酸含量呈上升趋势;8月上中旬果实采摘后,新梢水杨酸含量急剧上升(1.434 mg/g)。总之,果实水杨酸含量在整个发育期呈下降趋势,发育期(青果期)果实水杨酸含量比成熟期高。

关键词:蓬蘽悬钩子;水杨酸;提取工艺

中图分类号:S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0127-04

蓬蘽悬钩子(*Rubus crataegi folius*)属蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus*)树莓亚属(*Ideobatus*)多年生落叶

第一作者简介:赵伟伟(1987-),男,硕士,现主要从事药用植物资源等研究工作。E-mail:hkdzww@163.com.

责任作者:李爱民(1956-),男,硕士,研究员,现主要从事野生果树及药用植物的栽培和育种等工作。E-mail:zuojianglam@163.com.

基金项目:吉林省科技厅科技支撑资助项目(20130206070NY)。

收稿日期:2014-04-29

灌木型果树,果实也称为树莓(*Raspberries*),中医称为覆盆子。覆盆子(青果期果实)水杨酸含量较高,能抑制前列腺素 H_2 合成酶的转录,减少促炎性潜在肿瘤前列腺素的合成从而达到抗癌的作用,定期摄取含水杨酸的食物可以减少癌症等疾病的发生^[1]。同时,覆盆子还可作为发汗剂,是治疗感冒、流感、咽喉炎的良药。我国东北拥有丰富的蓬蘽悬钩子资源,选取优化的提取工艺,研究悬钩子不同生育期水杨酸含量变化,对合理开发利用

[8] 金静,刘会香.广玉兰黑斑病原菌的生物学特性研究[J].山东农业大学学报,2009,40(3):325-328.

[9] Luan Y S. First report of *Alternaria tenuissima* causing disease on blueberry in China[J]. Plant Dis, 2007, 91: 464.

[10] Simmons E G. *Alternaria: An identification manual*[M]. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Netherlands, 2007.

[11] Andrew M, Peever T L, Pryor B M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex[J]. Mycologia, 2009, 101(1): 95-109.

[12] 曲文文,刘霞,杨克强,等.山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育[J].植物保护学报,2012,39(2):121-128.

Study on Identification and Biological Characteristics of Caused Agent of Leaf Perforation on Blueberry

YAN Xue-rui, ZHOU Yuan, ZHAO Rui-jie, DAI Han-ping, FU Jun-fan

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Taking sample of leaf perforation identified in blueberry production areas as test material, based on Koch's postulates, morphological characters, rDNA-ITS and EF-1 α sequences blust and biological characters method, the pathogenic bacteria, classification status of pathogenic bacteria, pathogen mycelia growth and spore germination under different culture conditions were studied. The results showed that the pathogen was identified as *Alternaria alternata*, the mycelia grew best on PDA media, under 30°C, pH 5, dextrose and glycine were the best carbon and nitrogen source respectively. The spore germination condition was 30°C, pH 5, 2% glycine and 2% dextrose suspension, the mycelia died under 56°C for 10 min.

Key words: blueberry; leaf spot; *Alternaria alternata*; identification; ITS; biological characteristics