

DOI:10.11937/bfyy.201524030

蓝莓贮藏期病原真菌的分离与鉴定

郭晓月, 丁雅迪, 邓佳, 刘惠民, 叶维雁, 刘鹏

(西南林业大学 林学院, 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要:为明确云南省玉溪市蓝莓采后贮藏期引起果实腐烂的病原真菌种类,以来自澄江地区的蓝莓鲜果贮藏自然发病的果实为试验材料,采用组织分离法分离培养病原菌,经形态学观察和 ITS rDNA(Internal transcribed spacer)区序列测定分析,对相关病原真菌进行了分类鉴定。结果表明:从采后贮藏过程中发生病害的蓝莓果实上分离到 3 株病原真菌,经鉴定 3 株真菌分别为枝孢菌属(*Cladosporium*)、链格孢属(*Alternaria*)和匍柄霉属(*Stemphylium*);该研究可为澄江地区蓝莓贮藏期腐烂病害的预防和控制及进一步深入研究提供一定的参考理论依据。

关键词:蓝莓;病原真菌;分离;鉴定

中图分类号:S 663.209⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0104-05

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科(Vacciniaceae)越橘属(*Vaccinium*)植物,为多年生灌木小浆果果树。蓝莓果实为蓝色,果肉细腻,甜酸适口,种子极小,香气清爽宜人,为鲜食佳品,其营养丰富、口感独特,倍受消费者青睐。蓝莓富含钾、锌、铁、锰等微量元素,并含有花青素、花色苷、儿茶酸等多酚类物质,具有活化视网膜功效,有改善视力、抗氧化、抗癌及延缓脑神经衰老等作用^[1-2],被誉为“21 世纪的保健黄金”。因此,国际粮农组织将其列为人类五大健康食品之一,并被誉为“浆果之王”^[3-5]。

蓝莓果为呼吸跃变型果实,云南省蓝莓一般成熟于 6—8 月,属高温多雨季节,果实产期短,其采后呼吸作用旺盛,各种生理代谢加快,又因蓝莓果实皮薄质软,含水量高,易受机械损伤和病原菌感染而腐烂变质,导致果实耐藏性特别差。蓝莓采后常温下可放置 5~15 d,但因夏季温度较高,果实常出现失水萎蔫、软化、褐变、腐烂等症状,其商品经济价值和流通消费受到严重影响。研究表明,蓝莓果实在室温 22℃条件下,2~4 d 开始腐烂,而在 4℃条件下可贮藏 7 周。近年来,国内外蓝莓消费需求上升,产量迅速增加,贮藏果品潜在效益较高,7—9 月鲜销价格在 70~240 元/kg 之间,而蓝莓果实贮藏现多采用冷藏法抑制细菌的滋生,但贮藏效果并不十分明显^[5-7]。目前,国内的蓝莓产业化已初步形成,因此,

蓝莓贮藏期病原菌的鉴定防治研究是有必要的。国外关于蓝莓贮藏病害的研究报道主要集中在采后病害防治,而在国内,针对北方地区栽培的蓝莓采后病害致病病原菌已经分离鉴定出几种常见的真菌,包括灰葡萄孢、草酸青霉、褐孢霉、链格孢和枝顶孢等^[8]。

该试验采用传统形态学鉴定及分子生物学方法,对采后蓝莓果实病原真菌的分离鉴定,为蓝莓果实采后的病害防治提供一种可靠便捷的鉴定方法,并为延长蓝莓贮藏保鲜期提供一定的理论依据和技术指导;同时为明确南方地区引种栽培的蓝莓贮藏期的致病病原真菌种类做了进一步研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 蓝莓果实采摘于云南省澄江县试验基地,菌株分离是蓝莓自采后于常温下(温度 18~22℃)贮藏 3~7 d 自然发病的果实。蓝莓采摘后立即运回实验室,选择无病虫、无损伤且大小一致的健康果实作为试验材料。用无菌水清洗后于室温贮藏,待发现发病的蓝莓后取出,从新发病的蓝莓果实的病害处获得分离材料。

1.1.2 培养基 PDA 培养基(马铃薯蔗糖琼脂培养基):去皮马铃薯 200 g,琼脂 15~20 g,葡萄糖 20 g,pH 自然,煮沸后取过滤液,加水补足 1 L,121℃灭菌 18 min。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离与鉴定 从蓝莓果实的病发交接处取果皮组织,用无菌水冲洗 3 次后,置于 PDA 培养基上,置于 28℃恒温培养;待菌丝长出,观察分离菌株菌落的外观形态,挑选生长形态外观不同的病原真菌,挑取边缘菌丝转接到 PDA 培养基上培养,每个培养平板上转接三等分线中点稍靠外位置的 3 点位置进行纯化,于

第一作者简介:郭晓月(1989-),女,硕士研究生,研究方向为果树学。E-mail:qiang_yuer@163.com.

责任作者:邓佳(1983-),女,博士,讲师,现主要从事果树培育与利用等研究工作。E-mail:dengjia1983@163.com.

基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(2014Y331);国家自然科学基金资助项目(31460214)。

收稿日期:2015-07-27

28℃条件下培养数天,纯化后,将获得的单一菌落纯化3次以上后将其转接到PDA斜面培养基上,待菌丝长出后于4℃冰箱中临时保存。

1.2.2 病原菌的形态学鉴定 将纯化后的病原菌置于培养基中培养5~10 d,观察其纯化菌株的菌落形态、性状、色泽。将分离出的3株真菌L-10、L-11、L-12分别挑取少量菌丝放在载玻片上,用蒸馏水稀释后放到倒置荧光显微镜下观察,使用AxioVision Rel 4.8软件进行拍照,观察其菌株的分生孢子及分生孢子梗的形状、色泽、分生孢子纵横隔膜的数目等性状,再通过与有关书籍文献对比,参照有关真菌形态学鉴定手册,进行初步的鉴定分离出的病原菌种类。

1.2.3 病原菌的分子鉴定 首先,提取病原真菌DNA。将纯化的菌株用盖玻片刮下,放到含有液氮的研钵中,进行研磨,研磨过程中需要不断加入液氮,研磨至细粉后转入2 mL的离心管中,4℃保存备用。DNA的提取采用Bio Teke 基因组DNA提取试剂盒提取法提取,提取后放置-20℃冰箱中保存备用。提取的目的DNA在含有荧光染色剂的1.2%琼脂糖凝胶上水平电泳检测,并用凝胶成像系统观察照相。然后,对ITS序列进行PCR扩增。目的基因的PCR扩增采用真菌通用引物为ITS4和ITS5^[9],正向引物ITS-4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',反向引物ITS-5:5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'(引物由硕阳生物技术有限公司合成)。反应采用25 μL真菌PCR反应体系如表1。

表1 PCR反应体系

成分 Component	体积 Volume/μL
2×MASTER Mix	12.5
模板 DNA	1.0
ITS4 (10 μmol/L)	1.0
ITS5(10 μmol/L)	1.0
补充 ddH ₂ O 至	25.0

1.2.4 相似性分析 按上述的组分配制好反应液,混匀后进行PCR反应,PCR扩增反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,56℃退火45 s,72℃延伸1 min,此程序进行30个循环;72℃延伸10 min。然后4℃保存。

将获得的PCR产物在含有染色剂的1.5%琼脂糖凝胶上水平电泳检测40 min(120 V)。在紫外灯下检测PCR产物大小,并用凝胶成像系统观察照相。将上述所得的PCR产物进行双向测序(PCR产物的纯化及序列测定由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成),利用Bio Edit和DNAMAN软件处理测序结果后,将其提交到GenBank中的核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>),使用GenBank^[10]中的Blastn软件在线比对,并下载相似的参比ITS rDNA序列,然后用MEGA 6.0软件构建系统发育树并对其序列的相似性进行分析。

2 结果与分析

2.1 病害发生症状

蓝莓果实腐烂初期产生浅灰色绒状物或白色霉状物,约1~3 mm,腐烂的速度较慢,发病部位没有一定的规律。后期呈褐色,在其适宜的条件下,从发病到全果腐烂只需7 d,蓝莓果实也会全部腐烂。有些果实在腐烂区域的表面有白色菌丝,表现为带有边缘的,呈褐色或黑色,有扁平的或塌陷的斑点,后期的腐烂区形成较大。

2.2 病原菌的传统形态学鉴定结果及生理生化测定结果

病原真菌的菌落形态特征如下(图1),菌株L-10的菌落整体呈现深色,其表面为青黑色,背面深青到黑色,菌落呈圆环状散射,7 d左右菌落直径约为3~4 cm。菌株L-11的菌落表面初无色或淡色,后由浅褐色灰至青褐色,中心部位为白色,菌落呈棉絮状,其背面随着菌落的生长颜色逐渐加深至深褐色,外缘呈散射状。菌株L-12的菌落为白色,较厚,背面观察外缘呈散射状,中间比外缘颜色浅,围绕各环痕膨大部分各有一条暗色带,7 d左右菌落直径约为3~4 cm。

真菌倒置荧光显微镜下镜检观察结果(图2)如下:菌株L-10的分生孢子顶生或侧生,形成短孢子链,椭圆形,0~1个隔膜。大多数无隔膜,基部有孢痕。淡褐色,平滑。菌株L-11分生孢子梗上面具短分枝的孢子链,(33.0~75.0) μm×(4.0~5.5) μm;分生孢子为短链生,表面光滑,具1~5个横隔膜和0~4个纵斜隔膜,形态、大

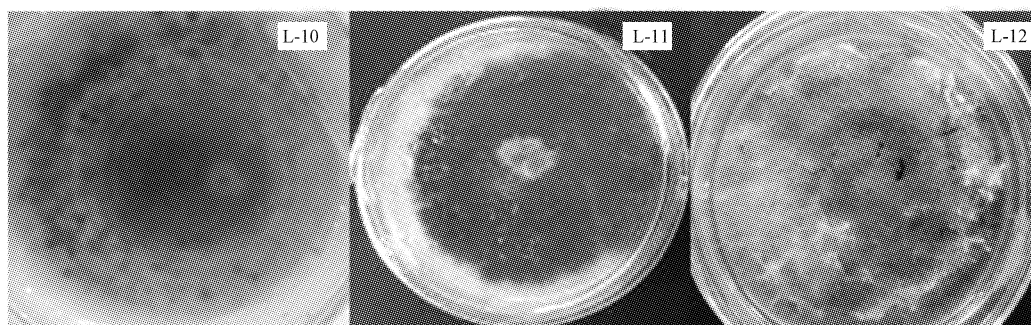


图1 病原菌在PDA培养基上的菌落特征

Fig.1 Colony morphology of pathogen on PDA media

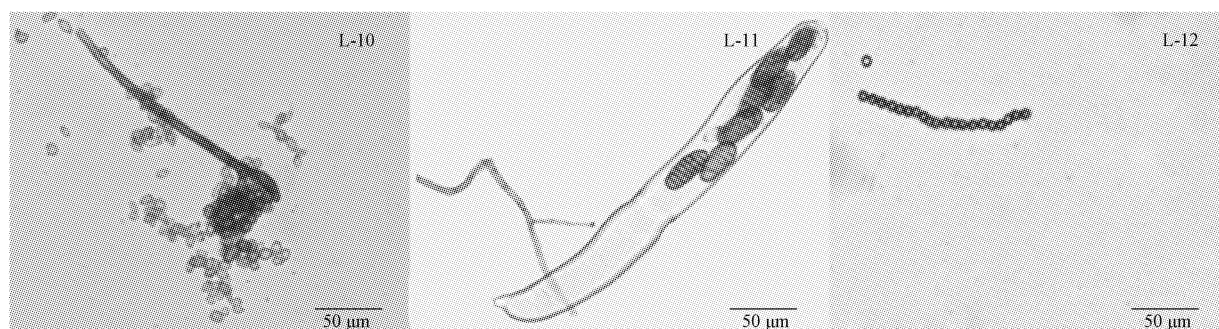


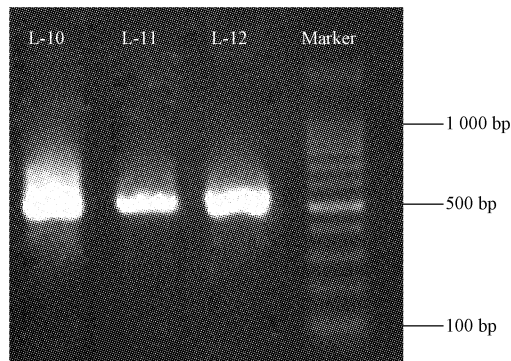
图2 显微观察图

Fig. 2 Microscopic observation

小变异幅度大,倒棍棒形,卵形,倒梨形或近椭圆形,淡褐色至褐色。菌株 L-12 的分生孢子梗常簇生,从一半埋生的子座上生出,分生孢子具纵横隔膜, $(27 \sim 42) \mu\text{m} \times (24 \sim 30) \mu\text{m}$, 生孢子为短链生。

2.3 病原菌分子鉴定结果

2.3.1 序列测定 以真菌通用引物 ITS4 和 ITS 作为引物,对蓝莓采后贮藏期分离出的 3 株病原细菌进行 ITS rDNA 扩增,扩增的电泳检测结果见图 3,均能得到单一,清晰稳定的条带。从测序结果可以得知:L-10、L-11、L-12 这 3 株菌株测得的 rDNA-ITS 序列全长依次为 557、571、582 bp。



注:泳道 1 为 L-10,泳道 2 为 L-11,泳道 3 为 L-12,泳道 4 为 Marker 1 500。

Note: Lane 1 is L-10, Lane 2 is L-11, Lane 3 is L-12, Lane 4 is Marker 1 500.

图3 ITS rDNA 片段扩增后电泳检测图谱

Fig. 3 The results of PCR amplification for ITS rDNA sequences

2.3.2 同源性分析 将上述所得供试菌株的 PCR 产物测序,测序结果用 DNAMAN 软件拼接,拼接结果于 www.ezbiocloud.net 进行序列比对与同源性分析。由表 2 可知,所测真菌菌株 L-10 的 ITS 序列与 *Cladosporium tenuissimum*^T (EU272491.1) 同源性高达 100%;菌株 L-11 的 ITS 序列与 *Alternaria radicina*^T HB1(FJ958190.1) 同源性高达 97.91%;菌株 L-12 的 ITS 序列与 *Stemphylium solani*^T SS21(AF203448.1) 同源性高达 99.59%。将所

测得菌株的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 数据库中进行比对,下载与之最近模式菌株序列,然后通过 Clustal W 和 MEGA 6.0 分析软件对所有序列进行比对并构建其系统发育树,结果如图 4 所示。根据 ITS rRNA 序列相似性达到 97% 以上则认为是同一个属^[10],若序列相似性小于 96%~97% 的可以认为不是同一个种,小于 93%~95% 的可以认为不是同一个属^[11-12] 的划分原则,确定分离得到的 3 株病原真菌 L-10、L-11 和 L-12 皆为半知菌亚门,其分别属于枝孢菌属(*Cladosporium*)、链格孢属(*Alternaria*)、匍柄霉属(*Stemphylium*)。由表 2 和图 4 可看出,2 次比对分析结果相同,L-10、L-11 和 L-12 分别隶属于 3 个系统发育分支,分别为枝孢菌、链格孢、匍柄霉属分支,皆属于半知菌亚门。

表2 病原菌的序列比对结果

Table 2 Pathogens sequence alignment results

菌株	近源菌(GenBank 登录号)	相似性
Strain	Genetic strain (GenBank accession number)	Similarity/ %
L-10	<i>Cladosporium tenuissimum</i> ^T (EU272491.1)	100.00
L-11	<i>Alternaria radicina</i> ^T HB1(FJ958190.1)	97.91
L-12	<i>Stemphylium solani</i> ^T SS21(AF203448.1)	99.59

综上所述,该研究分离得到 3 株引起蓝莓贮藏期腐烂的优势真菌,经过形态学观察并结合 ITS rDNA 序列分析鉴定,3 株真菌分别属于枝孢菌属、链格孢属、匍柄霉属。

3 讨论

在此之前,课题组已从蓝莓贮藏期病害中分离出 3 株病原真菌,而引起果品腐败的微生物通常包括细菌、霉菌和酵母,以细菌和霉菌引起的果品腐败最为常见,且霉菌是新鲜果品中的常见腐败菌。该研究针对南方地区蓝莓贮藏期病害中分离纯化出的病原真菌,通过传统形态学及分子生物学鉴定,确定引起澄江地区贮藏期蓝莓腐烂的病原真菌是枝孢菌属、链格孢属、匍柄霉属,3 种真菌皆属于半知菌亚门,为腐烂致病菌。此 3 类真菌可导致贮藏期蓝莓腐烂,其中链格孢菌为重要病原菌。据报道,陈存坤等^[13] 在杏贮藏过程中分离鉴定出链格孢菌,宋开艳等^[14] 也在南疆葡萄贮藏过程中分离鉴定

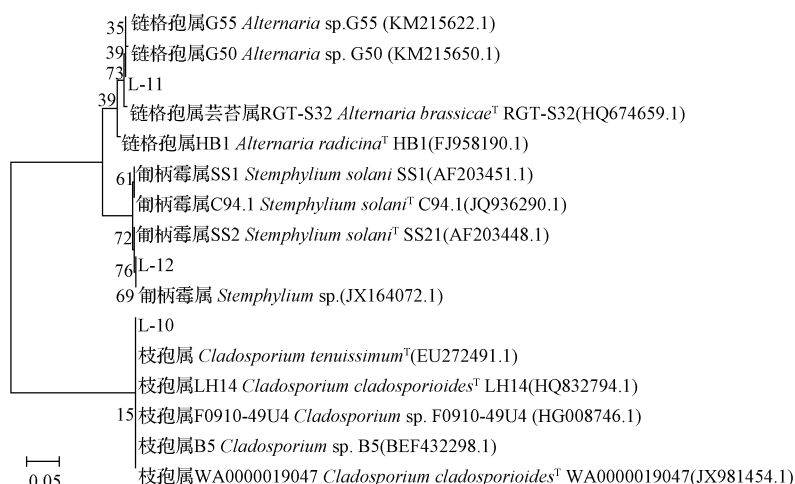


图4 致病真菌的系统发育树

Fig. 4 Pathogenic fungi phylogenetic tree

出链格孢菌。霉菌侵染果后,不仅果实外观被影响且降低果实品质,甚至还能产生毒素,危害到人体的健康。甄应中等^[15]研究发现,粮食中的链格孢在温度为25℃、湿度为33%~50%的条件下,容易产生链格孢霉毒素,且毒性较强,能使人体细胞的DNA损伤,其危害较大,所以有效控制链格孢霉菌侵染对果蔬品质控制方面也至关重要。据报道,晋知文等^[16]在菠菜叶斑病样本中分离出的病原菌为匍柄霉属;杜公福等^[17]对海南蔬菜匍柄霉叶斑病病原菌进行了鉴定,发现有7种病原菌。而此次关于蓝莓贮藏期病害分离鉴定的枝孢菌属、匍柄霉属在国内外却鲜有报道。目前,该课题组对已鉴定的致病病原菌做不同处理条件的抑菌试验,进一步对云南澄江地区蓝莓贮藏期的致病菌进行研究确认,以期探讨预防贮藏期蓝莓腐烂的方法。因该试验仅对蓝莓贮藏期病原真菌进行了初步分析,其贮藏期传播途径、发生规律、致病机制还有待进一步研究。

总结上述结果表明,蓝莓果实的腐烂组织中存在有害真菌类群,有报道表明,低温贮藏、紫外辐照、高压静电场和天然植物精油处理都具有抑制病菌生长的作用。低温贮藏简单且易操作,但贮藏的效果并不显著,而辐射保鲜受到辐射源材料及成本的限制,植物精油也有抑菌防腐的能力,但尚在研究中^[18]。随着我国蓝莓栽培面积的不断扩大和消费需求的迅速增长,研究开发出成本低廉、操作简便、安全高效的保鲜方法是今后蓝莓保鲜技术研究的重点。

参考文献

- [1] 李金星,胡志和. 蓝莓花青素的研究进展[J]. 核农学报,2013,27(6): 817-822.
- [2] 修英涛,常凤英,姜河,等. 我国蓝莓(越桔)栽培研究现状及发展措施[J]. 辽宁农业科学,2003(3):21-23.

- [3] 夏岩. 伊春市蓝莓产品市场营销策略浅析[J]. 东方企业文化,2012(22):170.
- [4] 梁晓晶. 笃斯越橘离体培养及植株再生研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [5] 王芳,刘华,陈文荣,等. 贮藏温度对蓝莓活性成分及抗氧化活性的影响[J]. 宁夏大学学报(自然科学版),2011,32(2):172-175.
- [6] 韩国辉,龙治坚,范理璋,等. 蓝莓 SCOT 标记分析体系的建立与优化[J]. 中国农学通报,2014,30(25):136-141.
- [7] 张平,李江阔,张鹏,等. 蓝莓塑料箱式气调保鲜技术研究[J]. 保鲜与加工,2010(3):9-11.
- [8] 梁晨,刘翠,赵洪海,等. 蓝莓贮藏期病原菌的鉴定及病菌的温度效应[C]. 中国植物病理学会2010年学术年会论文集,2010:108-113.
- [9] WILLIAMS R H, WARD E, MCCARTNEY H A. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores[J]. Applied and Environmental Microbiology,2001,67(6):2453-2459.
- [10] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology Evolution,2007,24:1596-1599.
- [11] DEVEREUX X R, HE S H, DOYLE C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family[J]. Bacteriol,1990,172(7):3609-3619.
- [12] VAISHAMPAYAN P, MIYASHITA M, OHNISHI A, et al. Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2009,59(5):1094-1099.
- [13] 陈存坤,高芙蓉,冯叙桥,等. 杏贮藏过程中主要致病菌的分离与鉴定[J]. 保鲜与加工,2014,14(6):30-33.
- [14] 宋开艳,再那吉阿米尼古丽,冯宏祖. 新疆葡萄采后致病菌分离鉴定及拮抗菌的筛选[J]. 新疆农业科学,2011,48(5):871-876.
- [15] 甄应中,韩绍印,王秀林,等. 关于链格孢的毒性及其产毒条件的研究[J]. 真菌学报,1988,7(4):245-251.
- [16] 晋知文,周艳芳,石延霞,等. 菠菜匍柄霉叶斑病的诊断及防治[J]. 中国蔬菜,2015(3):70-71.
- [17] 杜公福,周艳芳,石延霞,等. 海南省冬季北运蔬菜匍柄霉叶斑病病原的鉴定[J]. 植物学报,2013,39(2):122-127.
- [18] 楚文靖,郇海燕,陈杭君,等. 蓝莓贮藏保鲜技术研究进展[J]. 食品工业,2015,36(6):253-259.

DOI:10.11937/bfyy.201524031

人参果贮藏期腐烂病原菌研究

陈丽华¹, 何鹏飞^{1,2}, 吴毅歆^{2,3}, 何月秋^{2,3}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650217;
3. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘 要:以腐烂人参果为试材, 采用致病力检测、形态观察和 rDNA-ITS 序列分析方法, 研究了贮藏期腐烂病原菌种类及致病力。结果表明:接骨木镰刀菌 *Fusarium sambucinum*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 均能引起人参果和番茄果实腐烂, 2 株接骨木镰刀菌形态特征、致病力有一定差异, 也能引起带伤马铃薯出现典型干腐病症状。

关键词:人参果; 腐烂病害; 接骨木镰刀菌; 立枯丝核菌; 灰葡萄孢

中图分类号:S 567.5⁺.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0108-06

人参果(*Solanum muicatum*)属茄科半木质化多年生蔬菜、水果兼观赏型草本植物, 别名香艳茄、长寿果、香瓜茄等, 原产于南美洲的秘鲁、哥伦比亚和智利安第斯山高地, 1985 年 9 月由华南植物园从新西兰首次引入中国大陆^[1]。其果实皮薄肉厚, 腹内无核, 可食率达 95% 以上, 果肉清香味美, 且富含许多果蔬不含的微量元素“硒”, 以及较高的钙元素和大量的维生素, 具有治疗高血压和抗癌的功效, 因此被誉为“生命火种”、“补钙新秀”、“防癌之王”。此外, 因其果皮呈淡绿色至奶油色, 常带有紫色或紫红色条纹, 而被用作盆景。

目前新西兰和澳大利亚把它作为水果进行商品化生

产, 鲜果畅销日本、欧美等国。我国安徽、江苏、福建、云南、黑龙江的部分地区也大力发展人参果产业^[2]。随着种植面积的不断扩大, 人参果病害发生越来越严重, 影响其产量和品质, 且大面积生产势必增加储藏果实数量。据报道人参果主要病害与茄科蔬菜相似, 在种植区常见病害主要有病毒病、黑斑病、煤污病^[3]、灰霉病^[4]等, 目前对储藏期病害的报道却极少。2008 年胡佳等^[2]从越南进境人参果样品中, 首次检测到人参果炭疽病。课题组于 2014 年 10 月, 从贮藏的人参果中发现腐烂病果, 病果表面长有灰色、白色、红色霉状物, 或开裂, 裂缝中有白色菌丝。该研究旨在分离鉴定病果上的病原菌, 为人参果贮藏期病害防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

腐烂人参果标本于 2014 年 10 月在云南省昆明市水果市场收集。马铃薯干腐病病原由云南农业大学杨艳丽教授惠赠。

第一作者简介:陈丽华(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail:951245313@qq.com.

责任作者:何月秋(1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物病理学。E-mail:ynfh2007@163.com.

基金项目:云南科技支撑计划资助项目(2014BB018)。

收稿日期:2015-07-31

Separation and Identification of Pathogenic Fungi in Blueberry Storage Period

GUO Xiaoyue, DING Yadi, DENG Jia, LIU Huimin, YE Weiyan, LIU Peng

(Academy of Forestry, Southwest Forestry University/Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: In order to determine the pathogenic fungi species of storage rot blueberry in Yuxi City, Yunnan Province, the fruits were collected at Chengjiang County. Naturally infected fruits were used as material. Pathogenic bacteria was cultivated with tissue isolation. After the isolation and purification of fungi, pathogenic fungi were identified with morphological observation, ITS rDNA (Internal transcribed spacer) area sequence analysis. The results showed that three pathogenic fungi were separated from the disease occur on blueberry fruit during storage. Three fungi were *Cladosporium*, *Alternaria* and *Stemphylium*. The results of this study provided a theoretical foundation for blueberry storage rot disease prevention and control in Chengjiang County.

Keywords: blueberry; pathogenic fungi; isolation; identification