

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.089

红枣贮藏期间主要病原真菌的分离、鉴定与 ITS 序列分析

郝莉花¹,董彩文²,陈春生²,纵伟²

(1. 河南省产品质量监督检验院,河南郑州 450000; 2. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南郑州 450002)

摘要:为了解红枣贮藏期间主要病原真菌的污染情况,首先对红枣表面的真菌进行分离,然后经过形态观察,并结合 ITS 序列扩增、测序和序列比对,对分离的相关病原菌进行鉴定。结果显示,有 8 种真菌菌系在红枣表面上出现。其中,链格孢菌(*Alternaria* spp.)和青霉(*Penicillium* spp.)是主要的菌株,而链孢霉属(*Neurospora* spp.)、纸葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)是在红枣贮藏期间新发现的 2 种真菌。本研究结果为控制红枣采后病害提供了依据。

关键词:红枣;贮藏期;病原真菌;ITS 序列分析

中图分类号: TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0304-04

枣属于鼠李科枣属植物。枣树品种多、适应性强,其果实具有丰富的营养,受到消费者的青睐,但鲜枣在自然条件下不耐贮藏。目前,由于对贮藏期间枣中病原菌种类及侵染原因缺乏了解,不能采取有效的控制措施,导致病害现象时有发生,因真菌病害侵染而导致的腐烂率达到 30% 以上,引起红枣品质变差,难以食用,造成严重的损失^[1-4]。因此,研究引起红枣病害的病原菌,从而控制其采后病害,具有重要的意义。近年来,已有研究从贮藏的红枣鲜果中分离并采用形态学的方法鉴定出贮藏过程中引起腐烂病害的一些主要病原真菌^[5-8],但采用 ITS 序列分析红枣表面真菌的研究还少见报道。因此,本研究对红枣表面的真菌进行分离,通过 ITS 序列扩增、测序和序列比对,对分离的相关病原菌进行鉴定。为针

对性地采取措施对致腐病原菌进行控制提供依据^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 干红枣产自河南省新郑市,放在无菌样品袋中,室温放置 1 个月。*Taq* 酶和 dNTP 购于 TaKaRa 公司。真菌 DNA 提取试剂盒购于 Omega 公司。

1.1.2 培养基 孟加拉红培养基(蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、孟加拉红 0.033 g/L、氯霉素 0.1 g/L、琼脂 20 g/L),用蒸馏水溶解以上成分,然后及时加入孟加拉红溶液。氯霉素先用少量乙醇溶解后再加入到培养基中,121 ℃灭菌 20 min。

马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA):先称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切成小块,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,纱布过滤后再加 2% 葡萄糖和 2% 琼脂,121 ℃灭菌 15 min。

1.1.2 实验仪器 PCR 仪产自德国 Eppendorf 公司,电泳仪

植物资源,2014,33(5):61-63,66.

[6]夏从龙,周浓,陈立师,等. 滇重楼不同生长发育期有效成分的变化规律[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1624-1625.

[7]张烨,赵倩,高科江,等. HPLC 测定不同生长年限滇重楼中薯蓣皂苷元含量[J]. 安徽农业科学,2011,39(6):3280-3281,3285.

[8]陈士林,郭宝林,张贵君,等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1043-1055.

[9]孙素琴,周群,陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定[M]. 北京:化学工业出版社,2010:74.

[10]刘飞,王元忠,邓星燕,等. 红外光谱结合光谱检索对石斛品种的鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(6):1548-1552.

[11]颜茜. 中药重楼及其伪品开口箭的 FTIR 分析与鉴别[J]. 光散射学报,2013,25(1):85-91.

[12]吴瑾光. 近代傅里叶变换红外光谱技术及应用(上卷)[M]. 北京:科学技术文献出版社,1994:654.

收稿日期:2015-02-14

基金项目:国家质检总局科技项目(编号:2013QK232)。

作者简介:郝莉花(1979—),女,硕士,工程师,从事食品安全检测工作。E-mail:zzulisp@126.com。

检索的方法对滇重楼生长年限进行鉴别是一种基于植物光谱信息的统计分类方法。重楼主根的化学成分及含量受品种、生态环境、栽培技术等因素的影响,本研究结果虽然有很好的效果,但由于试验中全部样品均来自同一产地且样品数量较少,因此所用鉴别方法的有效性还需进一步研究。尽管如此,本研究仍然为重楼药材生长年限的鉴别提供了一种新思路。

参考文献:

- [1]李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:243.
- [3]欧立军. 重楼属药用植物研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(20):9471-9472.
- [4]赵东兴,李春,赵国祥,等. 云南地道药材滇重楼的研究进展[J]. 热带农业科学,2014,34(1):42-47.
- [5]赵庭周,王卜琼,马青,等. 滇重楼采收期研究[J]. 中国野生

和电泳槽产自北京六一生物科技有限公司,微量移液器产自德国 Eppendorf 公司,洁净工作台产自江苏苏净集团有限公司,立式自动电热压力蒸汽灭菌器产自合肥华泰医疗设备有限公司,恒温培养箱产自上海鸿都电子科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 干枣贮藏期间病原菌的分离、纯化 分别从 3 批样品袋中各随机选取 20 颗干枣。将每个干枣放入盛有 100 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中,置摇床上振荡 30 min。从每瓶混合液中取 1 mL 溶液加入灭菌平皿中,倒入适量的孟加拉红培养基混匀制成平板,每瓶混合液做 3 个平行平板,凝固后的平板置于 28 °C 培养箱中培养,隔天进行观察。当培养出的菌落直径达到约 1 cm 时,用接种针挑取少量菌丝接入另一个含 PDA 培养基的培养皿内进行培养;重复以上操作 2~3 次后可以得到纯化的菌种,保存备用。

1.2.2 病原真菌总 DNA 的提取 将试验菌株的菌丝接种到 PDA 液体培养基中,28 °C、200 r/min 振荡培养 2 d。过滤收集菌丝体,经过洗涤和干燥倒入液氮进行研磨,将匀浆液吸到 1.5 mL 灭菌离心管中,按照试剂盒的操作步骤进行基因组 DNA 的提取,0.8% 琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA。提取的 DNA 定量后稀释,作为 PCR 反应的模板。

1.2.3 rDNA-ITS 序列的扩增 真菌 ITS 区扩增通用引物为 ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') 和 ITS-4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体

系为 50 μ L (10 \times 缓冲液 5 μ L), dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 用无菌水补足至总体积 50 μ L。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物加 1 μ L 6 \times 上样缓冲液,在 2% 琼脂糖凝胶上 120 V 电泳 35 min,用凝胶成像仪进行拍照。引物合成、PCR 产物纯化及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.4 主要病原真菌的形态 显微镜观察真菌形态。

1.2.5 序列比对和系统发育树的构建 将测序结果输入 NCBI 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。同时,提取相关菌株的 ITS 区基因序列,与试验菌株序列一起用 Clustal X 软件进行排列,用 MEGA 6.0 软件按照相关参数和模型构建进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离纯化

干枣表面分离的病原菌样品在 PDA 培养基中 28 °C 培养 4 d 后生成的菌落,在颜色大小和菌落形态特征上都存在差异。28 °C 培养条件下 XZJ2、XZJ3、XZJ4、XZJ7、XZJ10 菌株在 PDA 培养基上生长较好,在 5 d 内大量生长,可以看到较为密集的菌丝薄层,其中 XZJ3 和 XZJ7 开始分泌色素。而 XZJ9 在 PDA 培养基上生长缓慢,5 d 内仍然没有大量生长(图 1)。

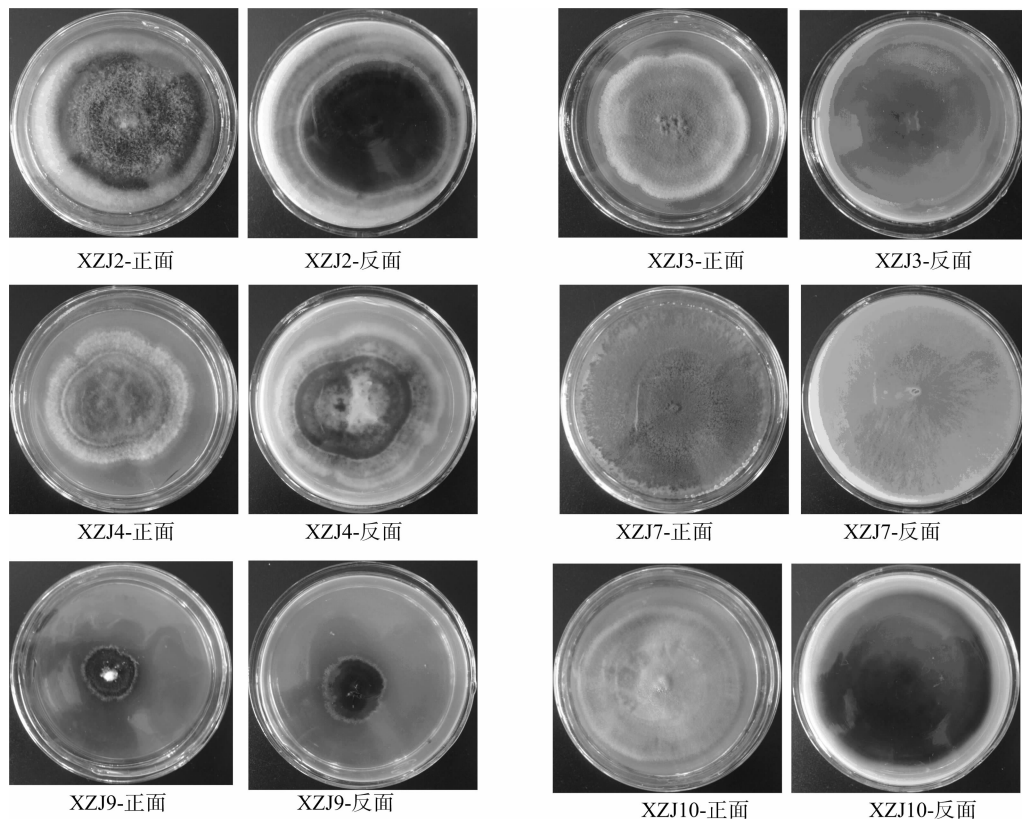


图1 部分分离菌株的形态

2.2 基因组 DNA 的提取

采用试剂盒提取真菌基因组 DNA,经琼脂糖凝胶电泳分析(图 2)。

利用 DNA 试剂盒提取的真菌基因组 DNA 条带比较清

晰,能够用于下一步的 PCR。

2.3 rDNA-ITS PCR 扩增

以 ITS5、ITS4 为引物,经 PCR 得到的产物条带特异性好,约 600 bp (图 3)。

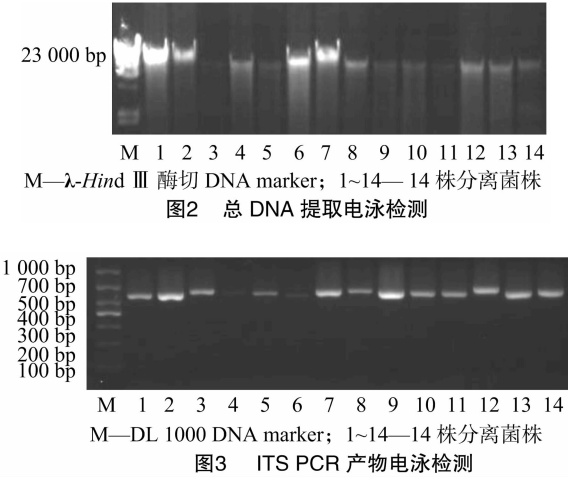


表 1 提交菌株的 ITS 序列登录号和序列比对信息

编号	登录号	综合得分最高菌株	同源性 (%)
XZJ1	KM396417	链格孢菌 <i>Alternaria</i> sp.	100
XZJ2	KM396418	芸薹链格孢 <i>Alternaria brassicae</i>	99
XZJ3	KM457627	构巢裸胞壳 <i>Emericella nidulans</i>	99
XZJ4	KM457628	淡紫拟青霉 <i>Paecilomyces</i> sp.	96
XZJ5	KM457629	绳状青霉菌 <i>Penicillium funiculosum</i>	99
XZJ6	KM457630	<i>Penicillium crustosum</i>	100
XZJ7	KM457631	绿色木霉 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
XZJ8	KM457632	<i>Thielavia subthermophila</i>	99
XZJ9	KM457633	纸葡萄穗霉 <i>Stachybotrys chartarum</i>	99
XZJ10	KM457634	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100
XZJ11	KM457635	毛壳菌 <i>Chaetomium</i> sp.	99

红枣表面上检出的菌落数分别是 2.2、1.5 个。

2.5 ITS 区 rDNA 同源性比对与系统发育分析

由于链格孢菌是主要的优势菌株,将分离得到的菌株 XZJ1 和 XZJ2 的 ITS 区 rDNA 基因部分序列与 NCBI 基因数据库内登录的已知菌株(表 2)的相应序列进行比对,序列通过 Clustal X 软件进行排列,然后利用 MEGA 6.0 软件以 NJ 法构建系统发育树(Bootstraps = 1 000)(图 4)。从链格孢菌的系统发育分析结果可以看出菌株 XZJ1 和 XZJ2 与 *Alternaria* sp.、*Alternaria brassicae*、*Alternaria alternata*、*Alternaria tenuissima* 等处于同一分枝。

表 2 用于序列比对与发育分析的链格孢属菌株信息

菌种名	登录号	菌种名	登录号
链格孢菌 <i>Alternaria</i> sp.	KC178621	<i>Alternaria alternata</i>	JN618076
芸薹链格孢 <i>Alternaria brassicae</i>	JF439441	<i>Alternaria porri</i>	JF422721
<i>Alternaria arborescens</i>	AF404667	<i>Alternaria tenuissima</i>	JN542519
<i>Alternaria citri</i>	DQ339104	胡萝卜链格孢 <i>Alternaria dauci</i>	KC584192
<i>Alternaria solani</i>	EU617717	粗链格孢 <i>Alternaria crassa</i>	AB678215
<i>Alternaria sesami</i>	JF780940	番茄链格孢 <i>Alternaria tomato</i>	JX418359
<i>Alternaria macrospora</i>	KC584204	曼陀罗生链格孢 <i>Alternaria daturicola</i>	AY372685
<i>Alternaria alstroemeriae</i>	AB678214	梨黑斑链格孢 <i>Alternaria gaisen</i>	AF314581
<i>Alternaria longipes</i>	KJ722535	<i>Alternaria daucifolii</i>	KC584193
<i>Alternaria tomatophila</i>	JN542557	感染链格孢 <i>Alternaria infectoria</i>	AJ276058
<i>Alternaria radicina</i>	AF307015	百日菊链格孢 <i>Alternaria zinniae</i>	AY372682
<i>Alternaria smyrnii</i>	AF229456	万寿菊链格孢 <i>Alternaria tagetica</i>	KC584221
<i>Alternaria dianthi</i>	AY154702	<i>Alternaria petroselini</i>	AF229454
<i>Alternaria axiaeriisporifera</i>	KC584184	链格孢 <i>Alternaria carotiincultae</i>	AF229465
<i>Alternaria ellipsoidea</i>	KC584196	纸链格孢 <i>Alternaria chartarum</i>	EF568098
<i>Alternaria gypsophilae</i>	KC584199	桂竹香链格孢 <i>Alternaria cheiranthi</i>	AF229457
<i>Alternaria cinerariae</i>	AY154700	<i>Alternaria nobilis</i>	KC584208
<i>Alternaria alli</i>	DQ323683	<i>Alternaria vaccariae</i>	KC584223
<i>Alternaria saponariae</i>	KC584215		

3 结论

通过形态学并结合 rDNA ITS 序列分析,从干枣中分离出 7 种真菌,分别是链格孢菌(*Alternaria* spp.)、青霉(*Penicillium* spp.)、木霉菌(*Trichoderma* spp.)链孢霉属(*Neurospora* spp.)、毛壳属(*Chaetomium* spp.)、梭孢壳属(*Thielavia* spp.)、纸葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)、构巢裸胞壳(*Emericella nidulans*)。其中,链格孢菌(*Alternaria* spp.)和青

霉(*Penicillium* spp.)是红枣干果贮藏期的优势病原菌,也是引起红枣鲜果病害的主要病原菌。同时,通过构建链格孢菌的系统进化树,发现本研究鉴定出的 2 个菌株 XZJ1 和 XZJ2 与 *Alternaria* sp.、*Alternaria brassicae*、*Alternaria alternata*、*Alternaria tenuissima* 处于同一分枝,而这些链格孢菌菌株也在别的品种的红枣中发现^[1,5,7-8,11-13]。除已经报道的真菌以外,本研究从红枣中还鉴定出 2 种新的真菌,即链孢霉属(*Neurospora* spp.)和纸葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)。这在以

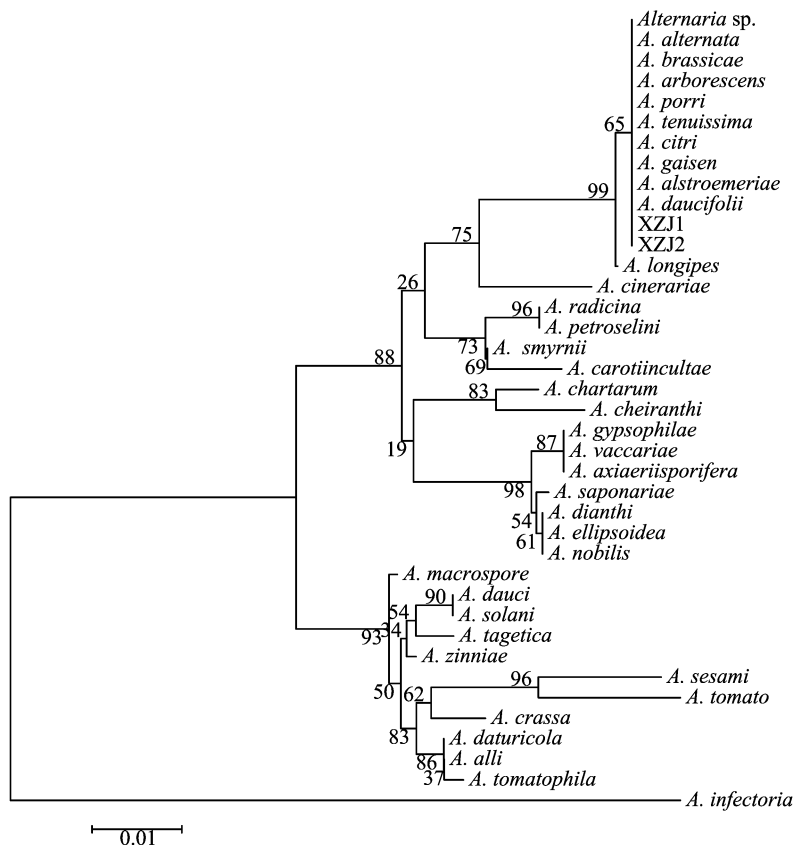


图4 ITS 区 rDNA 序列构建的链格孢属系统进化树

前的红枣贮藏期真菌研究中未见报道。关于这 2 种真菌的作用还需进一步研究。同时,根据已经鉴定的引起红枣病害的真菌种类,对它们的 ITS 序列进行比对、分析,从而设计特异性引物,对不同的病原菌种类进行 PCR 鉴定,从而建立红枣病原菌的快速检测方法^[14-15]。

参考文献:

- [1] 甘瑾,唐文林,潘禄,等. 灵武红枣采后病原菌的分离及天然抗菌物质的筛选[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007,35(10):81-86.
- [2] 刘炳仁. 冬枣高效栽培技术[M]. 北京:科学技术文献出版社,2007.
- [3] 王绪芬. 提高冬枣产量和品质的关键技术[J]. 北方园艺,2008(9):91-92.
- [4] 刁小琴,张有林,关海宁. 冬枣采后病害及其防治技术[J]. 中国果树,2006(1):42-45.
- [5] 沙月霞,邢敏,唐文林,等. 红枣贮藏期病原菌系的多样性[J]. 西北农业学报,2009,18(2):287-292.
- [6] 吴兴梅,孙蕾,刘元铅,等. 冬枣贮藏期主要病害的研究[J]. 经济林研究,2003,21(2):19-22.
- [7] 任玉锋,马爱瑛,刘雅琴,等. 灵武红枣采后主要病原真菌的鉴定[J]. Food Researchs & sdevelopment,2012,3(9):128-130.
- [8] 夏宏,夏青,王春生,等. 鲜枣贮藏期致病病原菌种类研究[J]. 中国生态农业学报,2007,15(3):117-119.
- [9] Ippolito A, Nigro F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruit and vegetables[J]. Crop Protection,2000,19:715-723.
- [10] Janisiewicz W J, Tworkoski T J, Sharer C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruit with a simple method to study competition for nutrients[J]. Phytopathology, 2000,90(11):1196-1200.
- [11] 刘万臣,关文强,刘兴华,等. 3 种鲜枣贮藏期致病真菌的检测及定性研究[J]. 食品科技,2007(8):237-240.
- [12] 田蕴慧,薛梦林,赵国柱,等. 冬枣贮藏期病害病原菌的鉴定[J]. 果树学报,2010,27(3):422-426.
- [13] 李静琴,陈亮,岳贵龙,等. 冬枣储藏期致病真菌分离鉴定及广谱拮抗菌株的筛选[J]. 河南工业大学学报:自然科学版, 2013,34(2):62-66.
- [14] Suanthie Y, Cousin M A, Woloshuk C P. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*[J]. Journal of Stored Products Research,2009, 45(2):139-145.
- [15] Pedersen LH, Skouboe P, Boysen M, et al. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 35(2): 169-177.