

马永强. 甘肃省苹果炭疽病病原鉴定及 ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 89–91.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.024

甘肃省苹果炭疽病病原鉴定及 ITS 序列分析

马永强^{1,2}

(1. 青海省农林科学院, 青海西宁 810016; 2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃兰州 730070)

摘要:果实炭疽病是苹果生产中常见的重要病害之一。通过形态特征结合病原菌的内部转录间隔区(internal transcribed spacer sequence, 简称 ITS)区域比对分析, 确定引起甘肃苹果果实炭疽病的病原为胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)。

关键词:甘肃省; 苹果炭疽病; 胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*); ITS 序列分析

中图分类号: S436.611.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0089-02

果实炭疽病是苹果生产中普遍发生的重要病害, 包括果实上的苦腐病(bitter rot of apple)和叶片上的叶枯病(*glomerella leaf spot*)^[1]。典型的苹果炭疽病病菌通常仅危害果实, 引起果实表面形成圆形病斑, 后期产生呈同心轮纹状排列的小粒点, 病部横切剖面呈圆锥形, 果肉变褐腐烂, 具苦味^[2]。苹果炭疽病在世界上所有气候温暖湿润、适宜种植苹果的地区和国家都有发生, 如美国、澳大利亚、英国、法国、德国、丹麦、保加利亚、荷兰、俄罗斯、巴西、墨西哥、日本、韩国等^[3]。苹果果实炭疽病通常在果实近成熟时开始发病, 采收后贮藏期间继续发展, 造成采前大量落果和采后贮藏中发生果腐, 病果率达 30% 左右, 严重可达 50%~60%, 我国每年因炭疽病造成的果品采后损失为 20%~30%, 采后果实腐烂已是生产中的突出问题^[4]。2013 年笔者调查了甘肃省苹果主产区果实炭疽病的发病率, 通常在 0.8%~13.6%, 属轻、中度发生。通过采样和室内分离鉴定, 旨在明确病原菌的种类, 为生产中科学制定防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 病样标本采集及病原菌分离

2013 年 9 月从甘肃省陇南市礼县永平乡、永兴乡、祁山乡、天水麦积区伯阳镇、清水县永清镇等苹果主产区采集炭疽病病样, 苹果品种为红元帅。病原菌的分离采用常规组织分离法, 对采集的病样进行分离纯培养后, 将菌种保存在试管斜面上。

1.2 致病性测定

致病性测定参照张荣等的方法^[5]。选择有代表性的菌株, 将供试菌株移于 PDA(potato dextrose agar)培养基斜面上培养, 7 d 后用无菌水洗下分生孢子, 配置成分生孢子悬浮液, 浓度为 1×10^5 个/mL。取健康的红元帅苹果, 用自来水清洗表面, 70% 乙醇表面消毒, 自然风干, 将捆扎在一起的 5 根

7 号昆虫针于乙醇灯上烧灼消毒, 冷却后, 扎刺果实, 形成深度 2.5 cm 的伤口, 用移液枪向伤口中注入 20 μ L 孢子悬浮液, 25 $^{\circ}$ C 恒温箱内保湿培养。对照用无菌水接种。每处理设 3 个重复。观察病记录接种结果。对接种发病的病斑再次进行组织分离。

1.3 病原菌形态鉴定

选取具有代表性的菌株移植于 PDA 平板上, 置于 25 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养, 观察病原菌在 PDA 平板上的菌落特征、培养性状, 7~10 d 后, 挑取分生孢子团, 进行镜检, 观察分生孢子的形态特征, 并用显微测微尺测量分生孢子大小。

1.4 病原菌 ITS 序列测定与分析

病原菌的 DNA 提取和核糖体 rDNA 的内部转录间隔区 ITS 区域的扩增与测序委托上海基康生物技术有限公司完成。

1.4.1 DNA 提取 病原菌 DNA 提取采用 White 等的方法^[6]。

1.4.2 核糖体 rDNA ITS 区域的扩增与测序 扩增所用引物为 ITS 区通用引物 ITS1-F(5'-CTTGCTCATTTAGAGGAAG-TAA-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[7]。PCR 反应体系总体积为 25.0 μ L: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, 模板 2.0 μ L, 超纯水 14.3 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L 反应产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外投射仪下检测 PCR 产物大小, DNA Marker DL 2000。用北京博大泰克生物工程有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒, 扩增产物上样 ABI3730DNA 测序仪检测, 采用双脱氧测序法, 测序引物为 ITS1-F/ITS4, 进行双向测序。

1.4.3 病原菌 rDNA ITS 序列分析 选择具有代表性的菌株, 将所测得到菌株 ITS 的序列加入到 NCBI(美国国家生物技术信息中心)网站, 利用“Nucleotide-nucleotide BLAST”程序, 与 GenBank 中海量的微生物序列进行比对, 查找相似性较高的序列, 并以 FASTA 的格式从 GenBank 下载。所有的序列用 Clustal X(1.83)进行校排。校排结果用人工借助 BioEdit 5.0.9.1 进行修正。最后用序列分析软件 MEGA 5.10 进行最大简约法(maximum parsimony)分析, ITS 序列构建系

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技创新专项(编号: 2011GAAS06)。

作者简介: 马永强(1983—), 男, 甘肃平凉人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物病害研究。E-mail: mayongqiang_163@163.com。

统树时重复 1 000 次得到最大简约树。

2 结果与分析

2.1 致病性测定

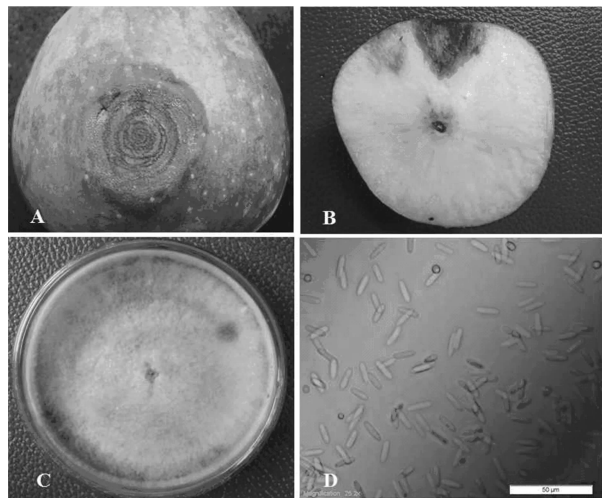
将分离纯化好的代表性菌株 tj4927 接种健康的红元帅苹果,3 d 后,接种病菌的苹果开始发病,10 d 后,症状表现明显,初发病时,果面上出现浅褐色、有清晰边沿的针头大的圆形小斑,以后逐渐扩大,病部色泽随之加深,并向下凹陷,苹果表面产生圆形的同心轮纹状病斑,其上产生黑色颗粒(分生孢子盘)(图 1-A),切开后果实内呈漏斗状(图 1-B),发病症状与田间一致;对照苹果果实未见发病。对接种发病的病斑再次进行病菌分离,结果表明,分离得到的病原菌与接种的病原菌培养性状一致,说明分离得到的病原菌为苹果炭疽病病原菌。

2.2 病原菌形态鉴定

将菌株 tj4927 接种于 PDA 平板培养基上培养 7 d 左右即长满培养皿,边缘整齐,浅灰色至鼠灰色,气生菌丝绒状,产生黑色的分生孢子堆,后期产生橘红色分生孢子团(图 1-C);分生孢子单胞、无色、椭圆形或圆筒形,两端钝圆,大小($11 \sim 20$) $\mu\text{m} \times (3.0 \sim 4.5)$ μm (图 1-D)。根据培养性状及分生孢子形态特征,菌株 tj4927 鉴定为胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)。

2.3 病原菌 ITS 序列分析

以葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)种为外群,通过



A—接种后苹果表皮症状; B—接种后苹果内部症状;
C—病原菌在PDA培养基上的特征; D—病原菌分生孢子

图1 苹果病原菌的测定结果

种间 ITS 序列构建系统树,如图 2 所示。通过系统树分析可知,4 种不同种类炭疽菌与菌株 tj4927、tj4953、tj4989、tj4967、tj4977、tj4963、tj4982 和 tj4979 聚在同一分支上,且菌株 tj4927、tj4953、tj4989、tj4967、tj4977、tj4963、tj4982 和 tj4979 与已知菌 AJ301919 和 AJ301988 以 100% 的支持强度聚集在同一分支上,应为同一种,即胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)。

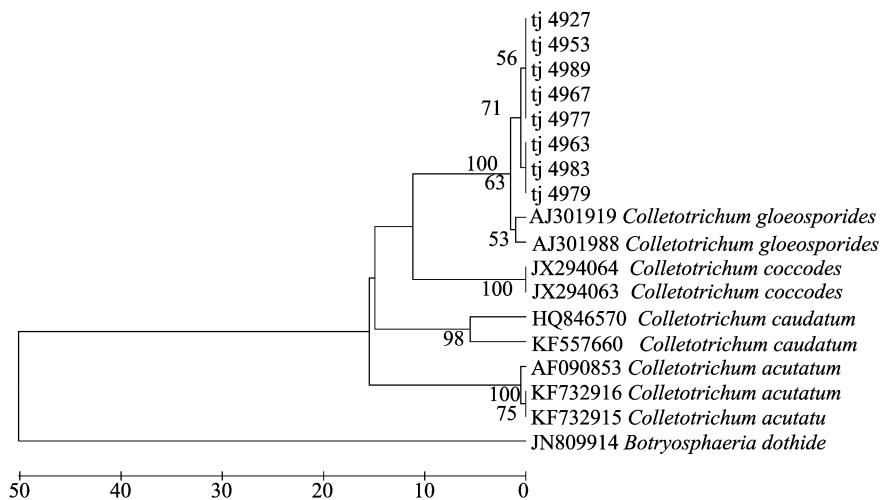


图2 病原菌 ITS 序列构建的系统树

3 讨论

王晓鸣等最早将我国苹果炭疽病的病原鉴定为胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[8],此后一直认为我国苹果炭疽病的病原为胶孢炭疽菌,生产中防治也是针对这一种病原菌进行。Sutton 首次提出尖孢刺盘孢(*Colletotrichum acutatum*)是引起苹果炭疽病的病原菌之一^[9],此后美国、日本、挪威等国均有研究表明,苹果炭疽病由 *C. gloeosporioides* 和 *C. acutatum* 2 种病原引起^[10-13]。张荣等研究了陕、豫 2 省苹果炭疽病病原菌后发现,尖孢刺盘孢(*C. acutatum*)可引起苹果果实炭疽病^[5]。符丹丹通过苹果炭疽病菌内转录间隔区序列(ITS)、肌动蛋白(ACT)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceralde-

hyde-3-phosphate dehydrogenase,简称 GAPDH)、几丁质酶(CHS-1)和 β -微管蛋白 2(TUB2)单基因及多基因联合的系统发育分析方法对辽宁、山东、河南和陕西等省苹果主产区苹果炭疽病进行鉴定,确定我国苹果炭疽病病原菌可分为 7 个分类单元,包括 6 个已知种、1 个新种,其中引起果实苦腐病的病原菌有 6 个种,分别为异国刺盘孢(*C. alienum*)、果生刺盘孢(*C. fructicola*)、胶孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)、睡莲刺盘孢(*C. nymphaeae*)、暹罗刺盘孢(*C. siamense*)和新种—东方刺盘孢(*C. orientalis*),苹果炭疽叶枯病的病原分 2 个种,即隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)和果生刺盘孢(*C. Fructicola*),说明苹果炭疽病病原菌复杂多样^[1]。

本研究通过形态特征结合病原菌的内部转录间隔区 ITS

安曼云,焦丽丽,伊 炜,等. 云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌的研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):91-93.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.025

云南松毛虫肠道中产脂肪酶菌的研究

安曼云¹,焦丽丽¹,伊 炜²,崔立华¹

(1. 云南经济管理学院工程学院,云南昆明 650106; 2. 云南省林业职业技术学院,云南昆明 650205)

摘要:采用微生物筛选培养和酶学方法,研究了云南松毛虫肠道内产脂肪酶菌群及产酶特性,为松毛虫的综合开发利用提供理论依据。结果表明,从云南松毛虫幼虫肠道内共分离筛选获得 193 株产脂肪酶的菌株,涉及 3 个菌属: 82 株假单胞菌属(*Pseudomonas*)、67 株芽孢杆菌属(*Bacillus*)和 44 株克雷伯氏菌属(*Klebsiella*);其中,假单胞菌属为优势菌群,占总菌株数量的 42.49%;供试的 9 株菌株表现出不同的产脂肪酶活性,并从中筛选得到了 1 株高产脂肪酶菌株 P-50,最适作用温度为 35℃,pH 值为 8,经发酵至 60 h 时生长量达到最大,在 48 h 左右时酶活性达到最高;P-50 初步确定为中温产碱性脂肪酶菌。

关键词:云南松毛虫;产脂肪酶菌;酶活性;假单胞菌属

中图分类号: Q814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0093-03

近年来,随着胃肠道微生态理论的深入研究,有关昆虫肠道微生物的研究已成为新热点^[1-2]。脂肪酶是一类特殊酯键水解酶,广泛存在于动植物组织微生物体中,其中发现能产脂肪酶的细菌约有 28 个属^[3-4]。目前,已在多种昆虫肠道中发现各类产酶菌群,并对酶学性质进行了研究,昆虫肠道中存在不同功能的菌群^[5-8]。由于微生物脂肪酶作用的温度和 pH

值范围比动植物脂肪酶的更宽,易获得较高纯度酶制剂,适合于工业上大规模生产^[9-10]。因此,不断筛选出具有新特性和高活性的脂肪酶是一项非常有意义的工作。

云南松毛虫(*Dendrolimus houi* Lajonquiere)属鳞翅目(Lepidoptera)枯叶蛾科(Lasiocampidae),是林业的重大害虫之一,但是从营养学和资源学的角度来看,它又具有极大的开发利用价值^[11-12]。目前国内外对松毛虫的研究主要集中在防治方面,且在相关产酶微生物资源研究时,多从土壤、淤泥中分离筛选,但对松毛虫的利用以及肠道微生物的研究报道较少^[13]。由于松毛虫长期食用多种松类针叶,对松油脂有着特殊的消化体系,可能肠道内存在着特殊的微生物菌群资源^[14-15]。因此,本研究拟以云南松毛虫为试验材料,研究松

收稿日期:2016-11-01

基金项目:云南省应用基础研究计划青年项目(编号:2014FD070)。

作者简介:安曼云(1984—),女,甘肃张掖人,硕士,讲师,主要从事植物学方面的研究。E-mail:344745803@qq.com。

通信作者:崔立华,硕士,副教授,主要从事植物学方面的研究。E-mail:895987674@qq.com。

区域比对分析,确定引起甘肃省苹果果实炭疽病的病原为胶孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*),有关甘肃省苹果炭疽病病原菌的多样性有待进一步研究。

参考文献:

- [1]符丹丹. 中国苹果炭疽病病原菌的遗传多样性[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [2]王 薇,符丹丹,张 荣,等. 苹果炭疽叶枯病病原学研究[J]. 菌物学报,2015,34(1):13-25.
- [3]González E, Sutton T B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple in three orchards in north Carolina[J]. Plant Disease, 2004, 88(12): 1335-1340.
- [4]吴芳芳,檀根甲,陈仁虎. 苹果果实炭疽病的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(1):29-33.
- [5]张 荣,王素芳,崔静秋,等. 陕、豫两省苹果炭疽病病原鉴定[J]. 中国农业科学,2009,42(9):3224-3229.
- [6]White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. New York: Academic Press, 1990:54-55.
- [7]Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for

- basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2):113-118.
- [8]王晓鸣,李建义. 陕西省炭疽菌的研究[J]. 真菌学报, 1987, 6(4):211-218.
- [9]Sutton B C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* [M]. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureau International, 1992:112-114.
- [10]Biggs A R. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. [J]. Plant Disease, 1999, 83(11):1001-1005.
- [11]González E, Sutton T B, Correll J C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests[J]. Phytopathology, 2006, 96(9):982-992.
- [12]Chung W H, Ishii H, Nishimura K, et al. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan[J]. Plant Disease, 2006, 90(4):506-512.
- [13]Guerber J C, Liu B, Correll J C, et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility[J]. Mycologia, 2003, 95(5):872-895.