陈　汝,王金政,薛晓敏,等. 红富士苹果果实炭疽病病菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):79 – 81.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2017.11.021

红富士苹果果实炭疽病病菌的分离与鉴定

陈　汝, 王金政, 薛晓敏, 王贵平
(山东省果树研究所,山东泰安 271000)

摘要:采集具有炭疽病症状的红富士果实样品进行组织分离、培养,获得苹果炭疽病菌株(编号为 Acg1),采用形态学、分子生物学相结合的方法对其进行鉴定。根据分离菌株的菌落、分生孢子形态特征、rDNA – ITS 序列分析将分离到的 Acg1 菌株鉴定为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)。

关键词:苹果;炭疽病菌;分离;鉴定;胶孢炭疽菌
中图分类号: S436.611.1+2　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2017)11 – 0079 – 02

我国是世界苹果生产第一大国[1],红富士是从普通富士的芽变中选育出的着色系的统称,病害是制约苹果产业发展的重要因子。李保华等针对苹果病害管理中存在的问题进行分析并对苹果病害方面的研究进展进行综述[2]。炭疽菌属(*Colletotrichum*)是一类重要的植物病原真菌,可引起果实和叶子发生炭疽病害,并广泛分布于热带、亚热带地区[3]。近年来,炭疽菌属分类研究一直是国内外研究热点,并且分子生物学技术广泛应用于炭疽菌的分类研究[4-7]。研究表明,胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是苹果生长期和贮藏期的主要侵染性病害,是造成产量和品质损失的主要原因之一[8-10]。本研究从疑似炭疽病的红富士发病果实上采用组织分离法获得炭疽病源菌株,并采用 rDNA – ITS 序列分析和形态学相结合的方法对其进行鉴定,为苹果炭疽病害的生物防控提供依据并奠定基础。

1　材料与方法

1.1　样品采集

具有炭疽病症状的红富士果实样品采自山东省果树研究所天平湖基地红富士苹果园。

1.2　病原菌的分离及形态特征观察

采用组织分离法。先用 70% 乙醇表面消毒具有炭疽病症状的红富士苹果样品,再用灭菌的解剖刀在病健交界处切下 3 mm × 5 mm 的组织块,用 70% 乙醇消毒 1 min,再用 0.1% 氯化汞处理 40 s,最后用无菌水冲洗干净后置于 PDA 培养基上,25 ℃下暗培养 3 d,挑取单个菌落菌丝,转移到新的 PDA 平板培养基上,25 ℃下暗培养 6 d,保存得到的纯菌株,观察并记录菌落形态学特征,挑取分生孢子进行显微形态观测并记录孢子的形状大小。

1.3　DNA 提取和 PCR 扩增

真菌总 DNA 提取采用 OMEGA 公司试剂盒,提取的 DNA 溶解后于 – 20 ℃贮存备用。以菌丝总 DNA 为模板,对 ITS 区进行扩增,以 ITS1(5′ – CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA – 3′)[11]、ITS4(5′ – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3′)[12] 为引物(由上海铂尚生物技术有限公司合成)。

25 μL PCR 反应体系:2.5 μL 10 × PCR buffer(2.50 mmol/L,含 Mg^{2+})、2.00 μL dNTPs(2.50 mmol/L)、0.50 μL ITS1(10.00 μmol/L)、0.50 μL ITS4(10.0 μmol/L)、0.75 μL DNA 模板、0.25 μL(5.00 U/μL) *Taq* 酶、18.50 μL 灭菌水。

PCR 扩增反应在 BIO – RAD S1000™ PCR 扩增仪上进行。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,52 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。

PCR 产物由 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物回收纯化后与 pMD 18 – T 载体连接,转化感受态细胞(大肠杆菌 DH5α),挑取阳性克隆送上海铂尚生物技术有限公司进行测序。

1.4　序列分析及构建系统进化树

所得序列在国际核酸数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)中进行同源序列搜索。将分离菌株序列用 Clustal X 软件[13]进行多个序列比对,并与 GenBank 中的相关序列进行同源性比较,然后用 MEGA 4.1 软件中邻位加入(neighbor – joining,简称 NJ)构建系统发育树。

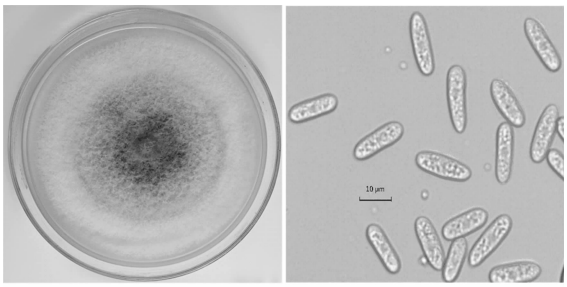
2　结果与分析

2.1　病原菌形态特征

经组织分离,获得病原物的纯培养物(编号为 Acg1),PDA 培养基上 25 ℃培养,菌落呈圆形生长,边缘规则,气生菌丝较发达,初期为白色,培养 4 ~ 6 d 后逐渐变为浅灰色至灰黑色(图 1 – A)。菌落在 25 ℃时的生长速率是(11.90 ± 0.61)mm/d。后期产生橘红色分生孢子团,分生孢子长椭圆形,分生孢子表面光滑,无色,单胞,圆柱形或椭圆形,多数两端钝圆,大小为(17 ~ 22.6 × 4.0 ~ 6.0)μm(n = 50)(图 1 – B)。以上结果显示,菌株形态特征与符丹丹等描述的苹果炭

收稿日期:2016 – 11 – 21
基金项目:国家自然科学基金(编号:31600021);国家重点研发计划(编号:2016YFD0201100);国家现代苹果产业技术体系项目(编号:CARS – 28);农村领域国家科技计划(编号:2014BAD16B02 – 2);山东省自然科学基金(编号:BS2015NY008)。
作者简介:陈　汝(1985—),女,山东济宁人,博士,助理研究员,主要从事果园微生物与栽培生理研究。E – mail:chenrugss@163.com。
通信作者:王金政,研究员,主要从事水果遗传育种与栽培技术研发方面的研究。E – mail:wjz992001@163.com。

疽菌的形态[14]基本一致。因此,红富士苹果的炭疽病原菌可以初步确定为炭疽菌属。



A：PDA平板上的菌落形态　　B：分生孢子

图1　病原菌形态特征

2.2　序列分析和构建系统进化树

以纯培养物总 DNA 为模板,ITS1、ITS4 为引物,经 PCR 扩增,获得大小为 584 bp 的 rDNA－ITS 基因片段。Blast 搜索结果显示,该片段与炭疽菌的同源性高达 99% 以上。采用 Clustal X 软件多序列比对后用 MEGA 4.1 软件构建系统进化树,结果显示,从染病红富士果实分离的炭疽病菌株与 *C. gloeosporioides*(GenBank 编号为 EU552111)、*C. gloeosporioides*(GenBank 编号为 AJ301908)、*C. gloeosporioides*(GenBank 编号为 GU174543)、*C. gloeosporioides*(GenBank 编号为 KC122769)聚在同一分支上(图 2)。据此,将该炭疽病原菌鉴定为苹果炭疽菌(*C. gloeosporioides*)。

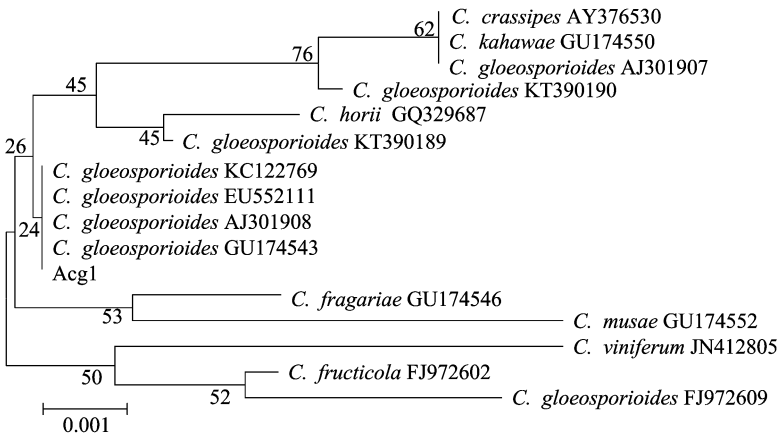


图2　基于 rDNA-ITS 序列的炭疽菌菌株系统发育树

3　结论与讨论

炭疽病是危害苹果生产的重要病害,严重影响苹果的产量及品质。炭疽菌种类多、变异大,种间形态学特征近似,仅基于形态学的炭疽菌鉴定是不够准确的。随着分子生物学的发展,分子技术广泛用于植物病原菌的分类与鉴定。近年来,rDNA 核酸序列逐渐应用于真菌分类鉴定系统中,相对保守的 18S、28S 区域用于属、种的分类鉴定,而变异性较大的 ITS 区域能反映出种间以及种内不同个体间的差异。国内学者依据病原菌形态特征及 DNA 序列分析的方法对苹果[14]、蓝莓[6]、茶树[7]、甜柿[15]炭疽病菌进行鉴定,表明炭疽病菌在果树上存在多样性。

苹果炭疽病菌主要包括胶孢刺盘孢[*Colletotrichum gloeosporioides*(Penz.)Penz. &Sacc.]和尖孢刺盘孢[*Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds]两大复合类群中的物种[14]。本研究根据传统的真菌形态学鉴定及病原菌 rDNA－ITS 序列的同源性与系统聚类分析结果,确定采集的具有炭疽病症状的红富士果实样品中分离得到的病原菌是胶孢刺盘孢。今后将对更多苹果园中感病样品进行分析,炭疽菌的准确鉴定能为炭疽病的防治提供理论依据。

参考文献:

[1]刘军弟,霍学喜,韩明玉,等. 中国苹果产业发展现状及趋势分析[J]. 北方园艺,2012(20):164－168.

[2]李保华,王彩霞,董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题[J]. 植物保护,2013,39(5):46－54.

[3]Ramdial H,Rampersad S N. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper(*Capsicum annuum* L.) in Trinidad[J]. Phytoparasitica,2015,43(1):37－49.

[4]Weir B S,Johnston P R,Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. Studies in Mycology,2012,73:115－180.

[5]Cannon P F,Damm U,Johnston P R,et al. *Colletotrichum*－current status and future directions[J]. Studies in Mycology,2012,73:181－213

[6]徐成楠,王亚南,胡同乐,等. 蓝莓炭疽病病原菌鉴定及致病性测定[J]. 中国农业科学,2014,47(20):3992－3998.

[7]刘　威,叶乃兴,陈玉森,等. 茶树炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 的鉴定及系统发育分析[J]. 茶叶科学,2014,34(1):95－104.

[8]Velho A C,Alaniz S,Casanova L,et al. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay[J]. Fungal Biology,2015,119(4):229－244.

[9]周慧杰,郭　玲. 苹果炭疽病菌生物学特性研究[J]. 北方园艺,2012(22):133－135.

[10]李　娜,檀根甲,李增智. 苹果炭疽菌低毒性菌株生物学特性的研究[J]. 激光生物学报,2008,17(1):64－69.

[11]Gardes M,Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes－application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology,1993,2:113－118.

[12]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,1990:315－322.

谭　卓,朱　峰,朱晓峰,等. 委内瑞拉链霉菌 Snea253 杀线虫活性化合物的分离纯化与结构鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):81 – 84.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2017.11.022

委内瑞拉链霉菌 Snea253 杀线虫活性化合物的分离纯化与结构鉴定

谭　卓[1], 朱　峰[1], 朱晓峰[1], 杨传旭[1], 王媛媛[3], 段玉玺[1], 刘晓宇[2], 陈立杰[1]
(1. 沈阳农业大学植物保护学院,辽宁沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学理学院,辽宁沈阳 110866;
3. 沈阳农业大学生物科学技术学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:为研究委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)Snea253 发酵液中具有杀线虫活性的脂溶性化学成分,利用薄层层析、柱层析、高效液相色谱等技术对其活性成分进行分离与纯化,以南方根结线虫二龄幼虫为靶标进行活性跟踪,通过 HRMS、^{1}H – NMR、^{13}C – NMR 等现代波谱技术,鉴定其结构为邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate,简称 DBP)。进一步检测 DBP 对 9 种植物病原真菌和 3 种细菌的抑菌活性发现,该化合物对粉红聚端孢菌(*Trichothecium roseum*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)也具有抑制作用。

关键词:委内瑞拉链霉菌 Snea253;邻苯二甲酸二丁酯;结构解析;南方根结线虫;粉红聚端孢菌;巨大芽孢杆菌
中图分类号: S432.4^{+}5　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2017)11 – 0081 – 04

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是我国乃至世界农业生产上影响最大的一类线虫病害,严重影响蔬菜、水果和其他各种农林作物的生产[1]。目前针对线虫病害的高效化学农药如涕灭威、溴甲烷等因环境安全问题陆续被禁用或被限制使用,因此寻找替代高效低毒、低残留的有效杀线虫剂成为当今世界的研究热点。放线菌中以链霉菌属产生的生物活性物质最多,如阿维菌素是灰色链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)发酵产生的大环内酯类抗生素[2],已被证明具有高效广谱杀线虫活性。尼可霉素是从唐德链霉菌(*St. tendae*)的发酵液中分离的一种核苷肽基抗生素[3],含有 20 多个组分,很多组分有活性,可以有效防治线虫,且对动物、蜜蜂和植物安全。梅岭霉素是由南昌链霉菌(*St. nanchangensis*)产生的十六元大环内酯类抗生素,与阿维菌素母核一致[4],具有广谱杀虫活性,尤其对小杆线虫具有非常好的活性,只需要 5 mg/L 即可达 100% 的致死率[5]。

委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)Snea253 菌株(ZL200810010465.X)是本研究团队前期研究发现的高效杀线虫菌株,其代谢物对大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、北方根结线虫(*M. hapla*)的二龄幼虫均具有较高的生物活性[6-7]。李玲玉等通过萃取操作将 Snea253 的发酵液分为水溶性和脂溶性 2 部分,并从水溶性部分中分离纯化得到具有杀线虫活性的氨基糖类化合物[8]。本研究采用薄层层析、柱层析、高效液相色谱等技术从 Snea253 发酵液中分离纯化具有杀线虫活性的脂溶性化合物,通过 HRMS、^{1}H NMR、^{13}C NMR 等现代波谱技术进行结构解析,并进一步检测该化合物对农业常见致病菌的抑制活性,为该菌株的产业化生产奠定理论研究基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　供试菌株　委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*)Snea253 菌株,已经获得国家发明专利授权(ZL200810010465.X)[6]。由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.2　供试病原菌　真菌:粉红聚端孢菌(*Trichothecium roseum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、茄腐镰孢(*Fusarium solani*)、白头翁叶斑病菌(*Ascochyta anemones*)、人参黑斑病菌(*Alternaria panax*)、番茄早疫病菌(*Alternaia solani*)、玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、向日葵菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),均由沈阳农业大学

收稿日期:2016 – 03 – 03
基金项目:国家自然科学基金(编号:31171823、31471748);天柱山学者支持计划(编号:20120101)。
作者简介:谭　卓(1989—),女,辽宁阜新人,硕士,研究方向为植物线虫学,E – mail:1053161197@qq.com;共同第一作者,朱　峰(1985—),男,山东济宁人,博士,研究方向为植物线虫学,E – mail:zhufeng0726@163.com。
通信作者:陈立杰,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病理学和植物线虫学的教学和科研工作,E – mail:chenlijie0210@163.com;刘晓宇,博士,副教授,主要从事天然产物化学研究,E – mail:xwlkitty@tom.com。

[13]Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL – X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876 – 4882.
[14]符丹丹,庄杰丽,张　荣,等. 苹果炭疽病病原菌 ISSR – PCR 反应体系的优化及遗传多样性分析[J]. 植物保护学报,2013,40(3):231 – 236.
[15]余贤美,侯长明,王　洁,等. 次郎甜柿炭疽病菌的分离鉴定及其 rDNA – ITS 序列分析[J]. 经济林研究,2014,32(1):45 – 50.