

欧阳辉,张伟达,程少波,等. 库尔勒香梨黑头病病原菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):116-119.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.026

库尔勒香梨黑头病病原菌的分离鉴定

欧阳辉, 张伟达, 程少波, 陈国刚, 江 英

(石河子大学食品学院,新疆石河子 832000)

摘要:为了分离、鉴定库尔勒香梨黑头病病原菌,并结合形态学和分子生物学等手段对致病菌进行鉴定,采用马铃薯葡萄糖琼脂平板法对致病菌株进行分离纯化,观察病原菌株的菌落特征,通过显微镜观察病原孢子形态特征,并根据回接试验确定其致病性能。结果表明,从病梨萼端表面及香梨生长环境中共分离出 11 株菌株,综合病原菌菌落形态、孢子显微结构及回接试验,筛选出 2 株候选菌株(SY-6、XL-6),其回接香梨的病症与正常发病的香梨较相似。通过十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)法提取病原菌 DNA,经 rDNA 内转录间隔区(ITS-rDNA)基因片段测序及美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)网站的同源性比对,鉴定得出 SY-6、XL-6 均属于链格孢属。结果共分离出 2 株链格孢属病原菌,致病症状与自然发病的香梨较相似,结果与笔者所在课题组的前期研究结果相吻合,从而为研究病原菌致病机制提供了参考。

关键词:库尔勒香梨;黑头病;致病菌;鉴定

中图分类号: S436.612.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)14-0116-04

库尔勒香梨是新疆地区最主要的特色果品之一,由于其皮薄汁丰、品质优良而享誉全国。新疆得天独厚的地理优势和气候条件造就了库尔勒香梨独特的口感和品质,库尔勒香梨果实大小适中,形如纺锤,果皮黄绿,果味浓芬,果肉酥脆爽口,清甜多汁,其含糖量约为 10%,含水量约为 86%,同时富含多种维生素^[1]。库尔勒香梨不但具有很高的食用价值,还有润肺、凉心、消疾、驱毒、切片贴烫火伤止痛不烂等药用功效,深受广大消费者青睐。

近年来,新疆香梨的种植面积及贮藏容量在逐年增加。据统计,截至 2016 年,新疆香梨种植面积达 7 万 hm²,产量为 114 万 t^[2],2016 年仅出口产值便达 407.62 万美元。由于经济价值高,种植面积不断扩增、产量高,香梨的贮藏保鲜成为一个关键问题,经过多年技术攻关,贮藏冷库成为目前果农的一项选择,但是香梨在贮藏过程中容易受到病害影响,例如冻害、病虫害、褐斑病、轮纹病、炭疽病、青霉病、褐腐病及黑头病等^[3],这些病害严重降低了商品价值,尤其是库尔勒香梨黑头病,其发病率高达 10%,已经成为制约香梨鲜果品质提升的主要问题。2011 年,唐文娟等通过对黑头病病原菌致病性的研究发现,其主要侵染特征^[4]表现为果实萼端深绿色,且硬度较高;发病初期萼端果皮变黑色,表皮切开后才发现果肉有浅褐色蜂窝状坏死现象,且表现呈现未病变状态的果肉组织略有苦味;发病后期黑头部位稍有塌陷,萼端产生黑色霉层,病斑边缘处果皮变为黑色,病斑与内部好果肉的交界非常明显,呈蜂窝状的黑头病部位在伴随黏稠黑汁状物质产生的

同时,存在侵染性腐烂由果皮向果肉逐渐扩散的现象。由于该疾病在香梨贮藏期间高发,同时又严重影响香梨的贮藏品质,所以为了降低香梨发病造成的经济损失,同时避免这种病害长期存在,对黑头病致病菌的研究是非常必要的。

本研究采用分子生物学和形态学相结合的方法对病原菌进行鉴定,以期对香梨黑头病抗病机制的研究及防治提供理论依据,从而降低黑头病发病率,延长香梨贮藏时间,提高香梨品质并促进其产业发展。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究所用库尔勒香梨(健康果及病果)均于 2016 年采自库尔勒市冷藏库及气调库;库尔勒香梨树叶及土壤样本采自新疆生产建设兵团第二师 28 团香梨果园。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基^[5],购自青岛海博生物技术有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)提取液(200 mL)^[6],购自生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA 纯化试剂盒,购自北京全式金生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS),购自北京博奥拓达科技有限公司;酚-三氯甲烷-异戊醇混合液,购自北京索莱宝科技有限公司;Gold View,购自北京博奥拓达科技有限公司。

LabCycler-PCR 扩增仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Thermo Fisher Scientific);QUANTUM ST4 全自动凝胶成像仪,北京五洲东方科技发展有限公司;1645056 高压电泳仪,北京六一生物科技有限公司;FRESCO 21 离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Thermo Fisher Scientific)。

1.2 菌株的分离纯化及保存

1.2.1 环境中病原菌的筛选 准确称取 10.0 g 土壤样品,于 PDA 液体培养基中富集,在摇床上于 28 ℃、120 r/min 培养 48 h,吸取 200 μL 培养液至 PDA 固体培养基上,涂布均

收稿日期:2018-03-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560468)。

作者简介:欧阳辉(1992—),男,安徽六安人,硕士研究生,主要从事农产品加工贮藏方面的研究。E-mail:296399903@qq.com。

通信作者:陈国刚,博士,教授,主要从事农产品加工贮藏方面的研究。E-mail:Cgg611@163.com。

匀,于 28 ℃ 倒置培养。从梨树枝条上摘取大小形态完整、无明显病态的叶片,用 75% 乙醇棉球擦拭表面,再用无菌水冲洗 3 次后自然晾干。用灭菌的打孔器取直径为 0.5 cm 的叶片切片,放置于 PDA 固体培养基中,于 28 ℃ 倒置培养。待长出菌落后,将所有菌落采用划线法或点植法转接纯化,直至出现单一稳定的菌落。菌落每次转接均设 3 组重复。将最终分离的菌落回接未染病香梨进行致病性能的确定。

1.2.2 发病香梨表面病原菌的分离筛选 依据柯赫氏法则^[7]从库尔勒香梨的病健相接处切下 3 处病变组织,在 PDA 固体培养基上,于 28 ℃ 培养。待长出菌落后,将所有菌落采用划线法或点植法转接纯化 5 次,直至分离出菌落大小、形状、颜色、表面光滑湿润程度、菌丝生长速度、菌丝形状、产孢情况、孢子颜色、形状等一致的若干菌株^[8]。病变香梨样品有 15 个,每个香梨设 3 组平行,菌落每次转接均设 3 组重复。最终将初分离得到的菌落回接到未致病香梨果实上得到致病香梨,进而与未致病香梨比较,进行致病性能的确定。

1.2.3 病原菌的保存 用液体培养法将分离纯化后的致病菌培养至对数期,保存于 50% 灭菌甘油(用蒸馏水配制)中,于 -80 ℃ 保存。与此同时,将病原菌接种在斜面固体 PDA 培养基中,培养 3 d 后,于 4 ℃ 保存备用。

1.3 菌株的形态学鉴定

将已分离纯化的菌种接种在 PDA 固体培养基平板上,于 28 ℃ 培养,自第 4 天开始观察菌落的生长状况。病原菌菌落形态:观察分离培养基上病原菌的菌落形态(包括形状、大小、菌落色泽、菌落表面结构、菌落渗出物及菌落边缘特征)。菌落形态特征的描述参照《真菌鉴定手册》^[9]《中国真菌志》^[10]《植物病原真菌学》^[11]及《真菌的形态和分类》^[12]。

1.4 回接试验

从气调贮藏库选取健康的库尔勒香梨果实,于室温放置 6 h 后,在无菌条件下,用 75% 乙醇棉球表面擦拭消毒,后用无菌水冲洗 5 次,自然晾干,进行接种。用无菌打孔器在库尔勒香梨萼部分别打 3 个直径为 0.5 cm、深度为 0.2 cm 的孔用于接种,取相同直径的病原菌饼接种于打孔处,将单果实独立分装于无菌密封袋中,室温存放。用分离出的每个病原菌分别接种香梨果实,每个菌种为 1 个处理,每个处理重复 3 次。在 25 ℃、相对湿度(RH)保持在 90% 以上培养 5~15 d 后对其进行观察,若症状与致病香梨症状一样,则初步确定该菌株为病原菌。

1.5 病原菌分子生物学鉴定

1.5.1 病原菌的 DNA 提取 采用 CTAB 法对病原菌 DNA 进行提取。

1.5.2 PCR 扩增病原菌内转录间隔区(ITS 区) ITS-rDNA 基因片段扩增采用通用引物,上引物为 ITSF(5'-TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3'),下引物为 ITSr(5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3')。20 μL PCR 扩增体系如下:1 μL DNA 模板,0.5 μL 上游引物,0.5 μL 下游引物,10 μL 预混液 Mix,8 μL ddH₂O。PCR 反应程序如下:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 7 min。

反应完成后,取 3 μL PCR 产物,加 1 μL 6 × loading buffer,混匀后点样于 0.8% 琼脂糖凝胶,电泳后在紫外光下观察特异性条带。

1.5.3 PCR 扩增产物的纯化回收 PCR 扩增产物经全式金琼脂糖回收试剂盒回收纯化。

1.5.4 ITS 区基因的克隆转化 将回收纯化产物与 T 载体(PMD19-T)连接(载体与目的片段摩尔比为 1:3),然后转化 *Escherichia coli* 感受态,筛选阳性克隆^[13],进行测序。

1.5.5 质粒提取及测序 筛选阳性克隆,于 37 ℃ 摇床培养 12 h,提取大肠杆菌质粒,送相关公司测序。质粒提取步骤参考温建新等的大肠杆菌质粒提取方法^[14]。ITS-rDNA 测序由北京华大基因研究中心完成。将测序结果在美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中进行同源序列比对(BLAST),获得重复率最高的相关属及相关种的基因序列,并根据遗传距离计算结果绘制系统发育树。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离筛选

以贮藏于冷库的自然发病香梨及生长环境中采集的土壤、树叶为材料,经分离筛选、纯化,得到 11 株病原菌,其中从土壤中分离出 1 株(命名为 TR-1),从树叶中分离出 5 株(分别命名为 SY-2、SY-3、SY-4、SY-5、SY-6),从病梨中分离出 5 株(分别命名为 XL-2、XL-3、XL-4、XL-5、XL-6)。

通过观察病原菌菌落形态,发现 2 株菌 SY-6、XL-6 在生长初期为灰白色,气生菌丝薄层絮状,随着生长时间的延长及孢子的产生,逐渐表现为浅绿色直至褐色,菌落有明显的同心轮纹,中心突起且泛白,质地紧致,呈毡状,表面呈现沟纹状,基底为墨绿色,生长后期培养基呈黑色,菌落边缘处有 1 道宽约 0.2~0.4 cm 的白色菌丝体。这与笔者所在课题组前期研究结果,即黑头病病原菌链格孢属的菌落形态较接近,初步判定菌株 SY-6、XL-6 为链格孢属。

2.2 病原菌的显微观察

通过对菌株进行显微观察,在高倍镜下观察孢子形态,由图 1 可以看出,SY-6、XL-6 病原菌孢子串生、有横隔且孢子呈长卵形,与链格孢属较为相似。

2.3 回接试验

将分离纯化得到的致病菌株(SY-6、XL-6)采用有伤回接(菌饼)法进行试验,由图 2 可知,接种后香梨的发病症状与自然发病香梨相似。2 株致病菌于库尔勒香梨上在生长初期为灰白色,气生菌丝薄层絮状,随着生长时间的延长,逐渐变为浅绿色直至褐色,菌落有明显的同心轮纹,中心突起且泛白,质地紧致、毡状,表面呈现沟纹状,基底为墨绿色,生长后期培养基呈黑色,菌落边缘处有 1 道宽约 0.2~0.4 cm 的白色菌丝体。初步判定病原菌株 SY-6、XL-6 为链格孢属。

2.4 黑头病致病菌的分子生物学鉴定

2.4.1 致病菌的 DNA 提取及扩增 采用 CTAB 法提取菌株(SY-6、XL-6)的基因组 DNA,并进行 PCR 扩增,以 ITSF、ITSr 通用引物扩增致病菌的 ITS-rDNA,对 PCR 扩增产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,PCR 扩增产物均有条带,且条带单一,无其他杂带出现,电泳结果见图 3,根据电泳图中 marker II 分子量大小的比对可知,致病菌的 ITS-rDNA 基因序列片段大约为 600 bp。

2.4.2 PCR 产物回收纯化 将 PCR 扩增产物经全式金琼脂糖回收试剂盒回收纯化,并进行电泳检测。由图 4 可以看出,

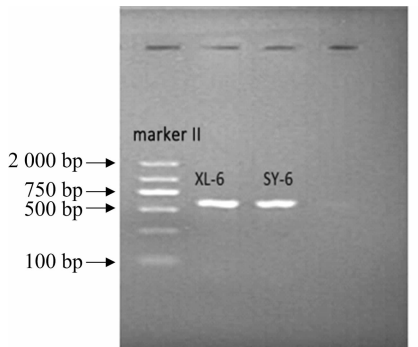
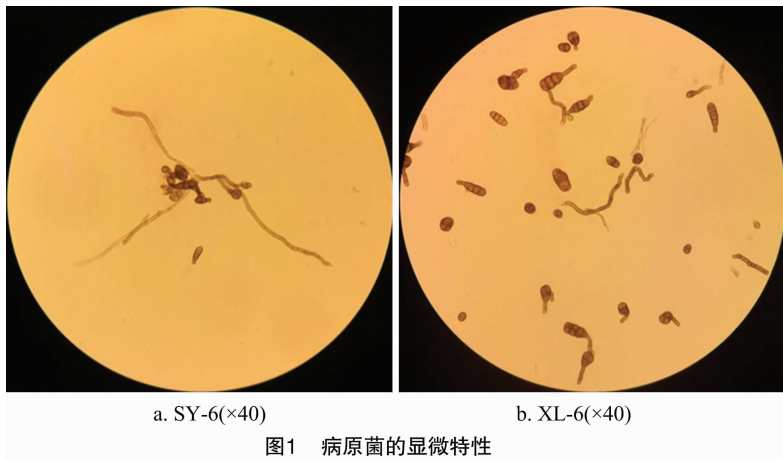


图3 相关致病菌 DNA 的 PCR 扩增产物
琼脂糖凝胶电泳检测结果

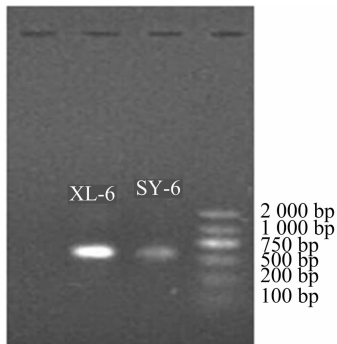


图4 相关致病菌 DNA 回收纯化琼脂糖凝胶电泳检测结果

回收结果均有带,且条带单一,回收效果良好。

2.4.3 克隆转化及质粒提取 将纯化后的 DNA 由 T 载体转入大肠杆菌感受态细胞,进行抗生素蓝白选择性培养,成功挑选白色单菌落,于 37 ℃ 摇床培养 10 ~ 12 h 后,提取质粒,质

粒提取结果表明,SY - 6、XL - 6 条带清晰明亮,质粒提取较成功,电泳检测结果见图 5。

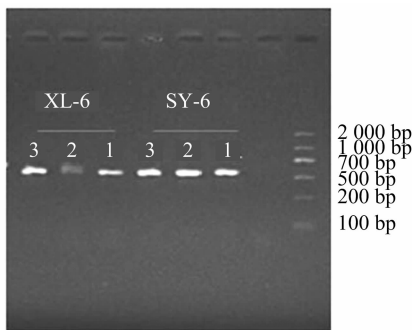
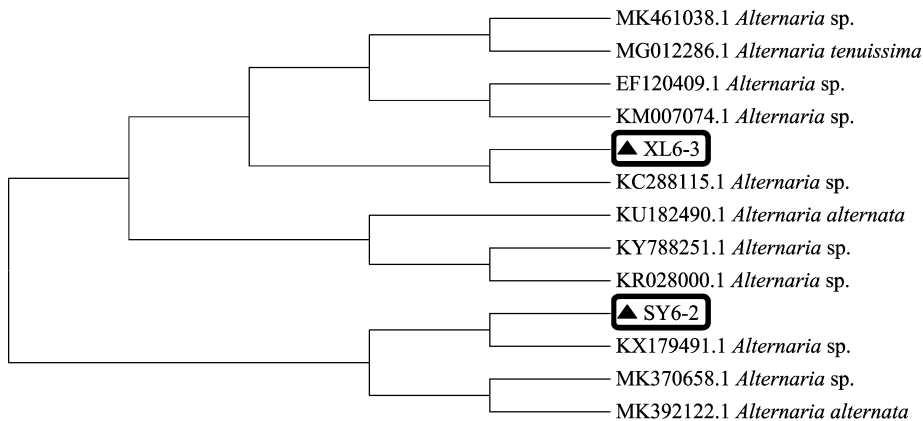


图5 质粒提取效果

2.4.4 测序及建树 对于同一致病菌,选取 2 支最清晰的条带进行测序。结果表明,菌株 SY - 6、XL - 6 的核苷酸序列得到了有效扩增。将基因序列结果提交至 NCBI 数据库中进行检索,将致病菌基因序列通过 BLAST 工具进行同源性比对。选取同源性高于 95% 的 10 株菌,使用 MEGA v. 6.0 软件系统进行发育树的构建,详见图 6。由系统发育树可知,黑头病致病菌 SY - 6、XL - 6 与链格孢属 (*Alternaria* sp.) 基因序列的同源性相近,即亲缘关系近,说明与该种群的系统发育关系最为相近,结合 SY - 6、XL - 6 菌株的形态学特性和 ITS - rDNA 基因组序列分析,判定菌株 SY - 6、XL - 6 为链格孢属。

3 讨论

“黑头病”是库尔勒香梨贮藏过程中一种新型、高发性病



S6-2—致病菌 SY-6; X6-3—致病菌 XL-6。Bootstrap 验证次数为 1 000 次。Alternaria sp.—链格孢属; Alternaria alternata—链格孢菌; Alternaria tenuissima—极细链格孢菌

图6 基于 ITS-rDNA 序列的黑头病致病菌的系统发育树

症,是致病性极强的病害,它的致病性给果农带来了较大的经济损失。为了改善这一病害症状,关于病原菌个体属性及后期对库尔勒香梨侵染机制的研究至关重要。传统形态学特性会由于致病菌生长环境因素的变化,而可能对致病菌的鉴定作出错误的判断,因此,应结合分子生物学鉴定方法。通过对库尔勒香梨“黑头病”致病菌进行分离纯化,使用传统形态学、分子生物学 ITS - rDNA 序列的比对方法,可以有效鉴定致病菌。目前,ITS - rDNA 序列分析方法已经被广泛应用于真菌鉴定中,但是某些真菌采用 ITS - rDNA 序列区间的分析鉴定很难将致病菌鉴定到种,在本研究中,病原菌经鉴定为链格孢属。

植物受到病原菌感染后,自身也有其相应的反应机制,会产生一系列防卫作用来抵御病原菌的侵染^[15]。这些反应包括一系列寄主植物组织和细胞结构的变化、生理生化反应的变化、病程相关蛋白的诱导产生和细胞的坏死等^[16]。Pereira 等研究西洋梨群对黄花菜匍柄霉 (*Stemphylium vesicarium*) 进行防御反应背后的分子机制,建立了 cDNA 文库用于识别耐药品种 (Ercolini) 和易感品种 (Rocha) 之间差异表达的基因,分析揭示了一些与胁迫和防御有关的转录本^[17]。Swarupa 等构建了抑制消减杂交 (SSH) 文库,研究了香蕉对枯萎病的抗性基因,通过香蕉中感染尖孢镰孢芝麻专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp.) 的对比基因型,鉴定出在枯萎病期间上调的基因^[15]。可以看出,研究寄主植物对病原菌感染的抗性防卫机制对于提高植物自身的抗病性极为重要。因此,后期对库尔勒香梨“黑头病”致病菌分子侵染机制以及相关抗性基因的研究将会为防治库尔勒香梨黑头病提供理论参考。

4 结论

通过对库尔勒香梨黑头病病原菌的筛选、纯化和鉴定,得出以下结论:从生长环境和病梨表面共分离出 11 株致病菌,通过观察菌落形态特征及孢子显微结构,发现 XL - 6、SY - 6 与笔者前期研究发现的引发库尔勒香梨黑头病的链格孢属较为相似,最终通过 ITS - rDNA 基因序列同源性比对,确定 XL - 6、SY - 6 致病菌为链格孢属。

参考文献:

- [1] 唐文娟. 香梨贮藏期间黑头病病原菌的分离鉴定及发病规律研究[D]. 石河子:石河子大学,2011:1-2.
- [2] 张旭升. 库尔勒香梨种植户施肥用药行为与认知研究[D]. 阿拉尔:塔里木大学,2017:15-17.
- [3] 李自芹. SA、紫外线和苯甲酸钠对库尔勒香梨采后黑头病的抗病性及贮藏品质的影响研究[D]. 石河子:石河子大学,2013:2-4.
- [4] 唐文娟,陈君慧,任雷厉,等. 库尔勒香梨“黑头病”病原菌的分离和初步鉴定[J]. 食品工业科技,2011,32(3):366-369.
- [5] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1979:83.
- [6] 刘丽,张永军,许长征,等. 一种改良的 CTAB 法提取产多糖真菌 DNA[J]. 中国生物工程杂志,2014,34(5):75-79.
- [7] 付娟妮,刘兴华,蔡福带,等. 石榴采后腐烂病病原菌的分子鉴定[J]. 园艺学报,2007,34(4):877-882.
- [8] 许玲,李学文,滕康宁. 果蔬采后致病真菌的检测及其控制[J]. 食品科学,2003,24(7):155-158.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:83.
- [10] 张中义,刘云龙,张陶,等. 中国真菌志 第十四卷 枝孢属、黑星孢属、梨孢属[C]//中国植物病理学会代表大会暨学术研讨会. 北京,2002.
- [11] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [12] 戴芳澜. 真菌的形态和分类[M]. 北京:科学出版社,1987:94-95.
- [13] 章鹤. 鸭 HO 和 BVR 基因片段的克隆及 mRNA 表达量的研究[D]. 南京:南京农业大学,2009:19-21.
- [14] 温建新,李俊,周顺,等. 大肠杆菌质粒 DNA 提取方法的优选[J]. 西南农业学报,2007(4):825-828.
- [15] Swarupa V, Ravishankar K V, Rekha A. Characterization of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp., cubense infection in banana using suppression subtractive hybridization and gene expression analysis[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2013, 83(4):1-7.
- [16] 赵娟. 梨果实愈伤组织对致腐真菌侵染的生理响应机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012:3-8.
- [17] Pereira V T, Sousa L, Sousa A T, et al. Mechanisms of resistance/tolerance of *Pyrus communis* to *Stemphylium vesicarium*. A transcriptome analysis[J]. Agroforestry Systems, 2015, 89(6):991-1017.