

刘晓勤,张锐利. 基于高通量测序技术的红枣黑斑病病原菌分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):108-112.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.020

# 基于高通量测序技术的红枣黑斑病病原菌分离与鉴定

刘晓勤<sup>1</sup>, 张锐利<sup>2</sup>

(1. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300;

2. 塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆阿拉尔 843300)

**摘要:**通过探究造成南疆红枣黑斑病的主要病原菌类别,为该病的靶向防治奠定理论基础。采用高通量测序技术和传统分离鉴定相结合的方法分别对南疆的喀什、和田、阿克苏等 3 个地区患病红枣黑斑部位进行病原菌鉴定。结果表明,从 27 个样品中获得 91 137 个高质量序列,其中相对丰度最高的菌门是子囊菌门,相对丰度最高的菌属是链格孢属(*Alternaria*),3 个地区链格孢属的相对丰度分别是 99.98%、98.15%、99.92%,其他菌属的相对丰度均在 0.95% 以下。通过对患病果实样品和代表菌株进行组织分离、形态学观察、分子生物学分析和病理学接种试验,明确造成南疆红枣黑斑病的主要病原菌是链格孢(*Alternaria alternata*),占 85.6%。

**关键词:**南疆地区;红枣黑斑病;高通量测序;病原鉴定

**中图分类号:** S436.65      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0108-04

红枣具有丰富的营养和药用价值,近年来已成为新疆农民增收致富的支柱型产业<sup>[1]</sup>;然而,红枣黑斑病的发生严重阻碍了新疆红枣产业的可持续发展。该病害于 2009 年在新疆和田和阿克苏地区被发现,2011—2016 年新疆枣园陆续被感染,发病率高达 50%,部分枣园发病率高达 70%<sup>[2]</sup>,给当地经济造成了严重损失,因此对引起红枣黑斑病病原菌的研究刻不容缓。

目前,对造成红枣黑斑病病原的鉴定还存在争议,林忠敏等研究认为,山西省红枣黑斑病病原菌为交链孢属(*Alternaria*)和茎点属(*Phoma* sp.)<sup>[2]</sup>;靳增军等报道河北冬枣黑斑病病原物为毁灭茎点霉(*Phoma destructiva* Plowr.)和链格孢(*Alternaria alternata*)等 2 种<sup>[3]</sup>;刘晓琳等研究认为,新疆部分地区红枣黑斑病病原菌为链格孢<sup>[4]</sup>,由此,推测地域不同可能造成红枣黑斑病病原的不同。

传统的分离鉴定方法在分析链格孢属形态特

征复杂等问题时,准确鉴定菌属种存在一定困难和局限性<sup>[5]</sup>。近年来,高通量测序技术因耗时短、效率高、成本低、准确性高和针对性强等特点,广泛应用于土壤<sup>[6]</sup>、肠道<sup>[7]</sup>、叶片和果实<sup>[8]</sup>等领域。因此,本研究基于高通量测序技术进行预判后,结合传统鉴别方法<sup>[2-4]</sup>,有针对性地进行分离鉴定和回接验证,2 种方法取长补短、互为印证,为后续拮抗菌的精准筛选和靶标防治奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

患病骏枣果实样品于 2018 年 11 月从南疆的喀什、和田、阿克苏等 3 个地区 9 个患病枣园采集,3 个地区的编号分别为喀什地区 J1、和田地区 J2、阿克苏地区 J3(表 1)。

试验在新疆塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室进行。供试枣果为农一师十团骏枣成熟期果实,用于致病性测定。培养基有 PDA 培养基<sup>[9]</sup>、WA 培养基<sup>[9]</sup>。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 的提取和 MiSeq 测序** 果实 DNA 的提取使用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒(MP),用 NanoDrop-2000 测定 DNA 浓度,然后将质量合格的 DNA 样品送上海派森诺生物科技股份有限公司使用 Illumina (MiSeq)平台对真菌 ITS 区进行双端测序。

收稿日期:2020-05-27

基金项目:国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目(编号:U1703234);北京化工大学和塔里木大学联合基金(编号:TDBHLH201705)。

作者简介:刘晓勤(1988—),女,四川人,硕士研究生,从事新疆红枣链格孢毒素污染发生规律及防治研究。E-mail:348200557@qq.com。

通信作者:张锐利,副教授,研究方向为食品化学及其安全等。E-mail:zrl\_p@sina.com。

1.2.2 数据分析 用 DADA2 方法进行去引物、质量过滤、去噪、拼接和去嵌合体,得到高质量的序列;用 QIIME2 (2019.4)软件和 R 软件中 ggplot2 对测序结果进行数据分析。

1.2.3 病原物分离与纯化 对患病枣果实进行表面清洗消毒后,取患病枣果实病健交界处的果肉,采用组织分离法<sup>[10]</sup>分离菌株,后在培养基 WA 上进行纯化菌株,将纯化的菌株进行编号,置于 -80 ℃ 保存备用。

1.2.4 致病性测定 从枣果黑斑病的分离物中挑选 53T-3、50T-2、47T-2、224T-1、224T-7、HP-1、AH-2、3T-3 和 10T-5 等 9 株代表菌株,通过离体菌块贴接法测定其致病力。将纯化后的菌株接种至 PDA 培养基在 28 ℃ 条件下培养 6 d,用无菌的 1 mL 移液枪头从底端打取生长较好的连同培养基一起的菌块;选取健康无外力损伤的枣果实,用无菌水清洗,后用 75% 乙醇进行表面消毒,在超净工作台中晾干;用无菌牙签刺孔,将菌饼的菌面朝下接种至枣果实刺孔处,同时用 PDA 培养基饼块作对照;将接有有菌菌饼和无菌饼块的枣果分别放入铺有湿润无菌棉的玻璃罐中,每株菌接种 3 个健康果实,接种完毕后置于 28 ℃ 培养箱中,有光照和无光照 12 h 交替培养;每 24 h 观察记录果实表面变化情况,待 6 d 后对患病果肉部分进行菌株再分离。

1.2.5 病原菌鉴定

1.2.5.1 菌株形态观察 将病原菌的单孢菌株接于 PDA 培养基,28 ℃ 恒温光暗交替培养 6 d,记录其形态特征,参照张天宇的方法<sup>[5]</sup>在显微镜下观察分生孢子、分生孢子梗、喙的形态和成链情况。

1.2.5.2 菌株分子鉴定 选取不同地区的 9 株菌,编号分别为 53T-3、50T-2、47T-2、224T-1、224T-7、HP-1、AH-2、3T-3 和 10T-5;分别在培养基 PDA 上培养 6 d,后用无菌一次性 1 mL 蓝色移液枪头底端打取菌块接种在 PDA 培养基上,28 ℃ 恒温条件下 12 h 白昼交替培养 7 d 后收集菌

丝体,用试剂盒 (TIANGEN Plant Genomic DNA Kit) 进行基因组 DNA 提取。以菌株基因组 DNA 为模板,以 Beta-F 和 Beta-R<sup>[11]</sup> 为引物扩增代表菌株的  $\beta$ -tubulin 基因;将 PCR 产物送生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序,将测序结果在 BLAST 数据库中进行比对,获得同源性较高的菌株序列,通过 MEGA6 软件构建系统进化树,确定菌株亲缘关系,明确菌株分类学地位。

2 结果与分析

2.1 物种组成分析

从喀什、和田、阿克苏等 3 个地区 27 个样品中共获得 91 137 个高质量序列,各水平 OTUs 数量由高到低排列依次为和田地区 > 阿克苏地区 > 喀什地区 (图 1);共检测出 3 个菌门分别是子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、被孢霉菌门 (Mortierellomycota),其中子囊菌门 (Ascomycota) 是物种数量最多的菌门 (表 1),8 个纲、12 个目、15 个科和 19 个属;3 个地区相对丰度最高的菌属是链格孢属 (*Alternaria*),相对丰度分别为喀什地区 99.98%、和田地区 98.15%、阿克苏地区 99.92%,其他菌属的相对丰度均在 0.95% 以下 (图 2);高通量测序结果表明,导致红枣黑斑病主要病原菌属为链格孢属。

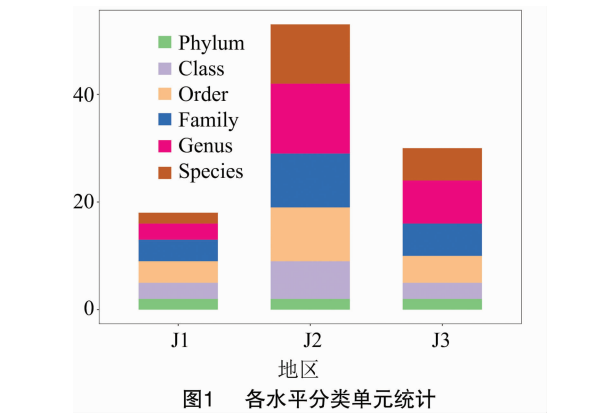


图1 各水平分类单元统计

表 1 门水平的 OTU 数

门	J1		J2		J3	
	OTUs	相对丰度 (%)	OTUs	相对丰度 (%)	OTUs	相对丰度 (%)
子囊菌门 (Ascomycota)	71 871	99.98	71 168	98.15	71 865	99.92
担子菌门 (Basidiomycota)	0	0	24	0.03	5	6.95 × 10 <sup>-5</sup>
被孢霉菌门 (Mortierellomycota)	3	4.17 × 10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0
unclassified_Fungi	0	0	4	4.56 × 10 <sup>-5</sup>	0	0
unidentified	0	0	678	0.94	4	4.17 × 10 <sup>-5</sup>

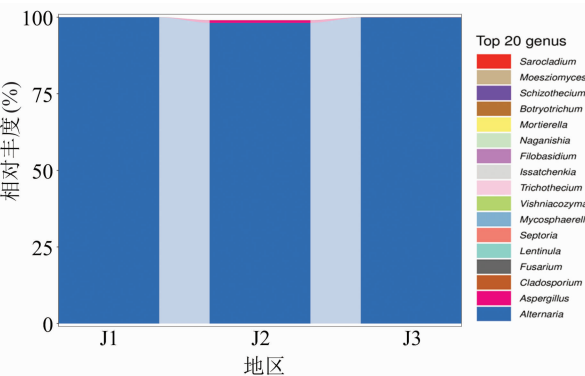


图2 属水平的物种相对丰度

2.2 病原物的分离结果

通过传统的组织分离法增加样品数量,从 81 份患病果实样品中分离获得 90 株分离物,依据菌落形态初步确定 77 株链格孢菌占 85.6% ,7 株镰刀菌占 7.8% ,3 株青霉菌占 3.3% ,3 株其他菌占 3.3% (表 2);因此,推测导致红枣黑斑病的主要病原菌是链格孢菌。

2.3 病原菌鉴定

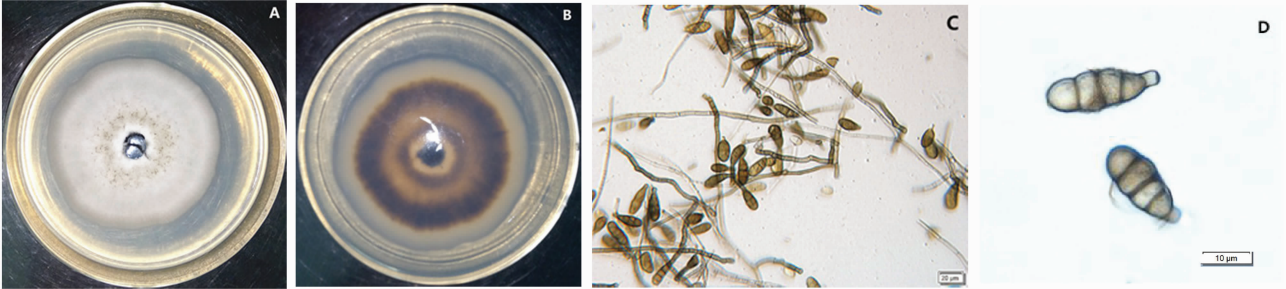
2.3.1 形态学鉴定 将分离获得的 53T-3、50T-2、47T-2、224T-1、224T-7、HP-1、AH-3、3T-3、

表 2 病害果实采集分离统计表

地区	采样地点	病果数 (个)	分离物种类及数量(株)			
			链格孢菌	镰刀菌	青霉菌	其他
喀什地区	喀什 53 团	10	8	1	1	0
	喀什 50 团	10	9	0	0	1
	喀什 47 团	10	10	0	0	0
和田地区	和田 224 团 1 连	10	7	2	1	0
	和田 224 团 7 连	10	8	1	0	1
	和田皮山农场	10	9	1	0	0
阿克苏地区	阿克苏红旗坡农场	10	8	1	1	0
	阿克苏 3 团	10	9	1	0	0
	阿克苏 10 团	10	8	1	1	0
总数		90	77	7	3	3

10T-5 等 9 株菌在 PDA 培养基上 28 ℃ 条件下培养 6 d,从图 3-A、3-B 可见,菌落颜色初期为白色,后逐渐变为灰色至淡褐色,边缘整齐;从图 3-C、3-D 可见,分生孢子梗单生或簇生,或直或弯,淡褐色至褐色,(30.0~71.0) μm × (3.9~5.4) μm。分生孢子单生或链生,表面光滑,有横、纵隔膜,倒

棍棒形或卵形,淡褐色至褐色,孢身(22.0~40.1) μm × (8.1~13.3) μm。依次对菌株的菌落、分生孢子梗和分生孢子所呈现出来的颜色变化、形态特征等参照文献[5]进行鉴定,初步鉴定其为链格孢(*Alternaria alternata*)。



A—菌落形态正面；B—菌落形态背面；C—分生孢子梗形态；D—分生孢子形态

图3 病原菌菌落形态及分生孢子形态

2.3.2 分子生物学鉴定 通过传统组织分离后进行 PCR 扩增获得  $\beta$ -tubulin 基因,后在数据库中进行比对构建系统发育树(图 4),所有供试菌株与 *A. alternata* 聚在同一个单源分支上,同源性的 99%。

UPGMA 聚类分析结果表明,3 个地区的样品聚类在一起(图 5)。图 4、图 5 均表明导致南疆 3 个地区红枣黑斑病的主要病原菌是 *A. alternata*。

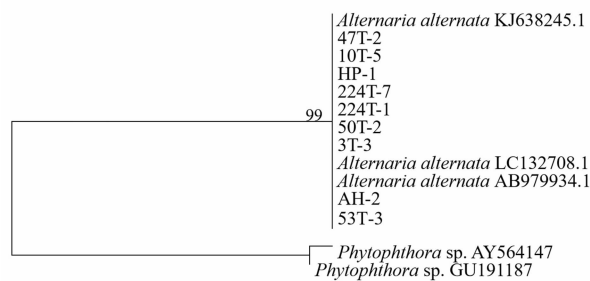


图4 基于EF-1α构建的系统发育树

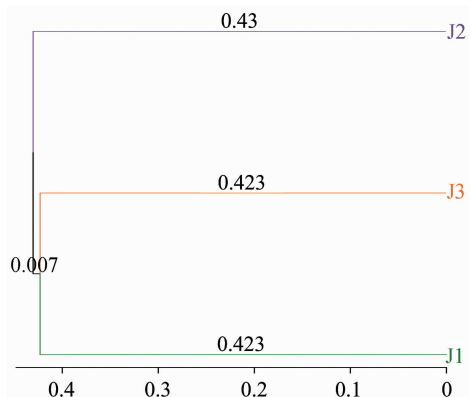


图5 基于样本距离矩阵的UPGMA聚类树

## 2.4 致病性测定

将分离获得的代表菌株回接至健康的骏枣果实上,枣果在接种病原菌 20 d 后,接种部位开始形成病斑,呈黑色,病斑逐渐扩大(图 6-B),接种病

症与田间症状相同(图 6-C),致病性测定结果表明,导致红枣黑斑病的主要病原菌是 *A. alternata*。



A—CK; B—病原菌接种症状; C—自然患病症状

图6 病原菌接种病症

## 3 讨论

目前,关于造成红枣黑斑病病原的研究报道较多;但可能因地域或品种不同,不同学者的研究结果各有不同。王军等鉴定了山东省部分县(市)冬枣黑斑病病原为细链格孢菌 [*A. alternata* (Fr.) Keissler]<sup>[12]</sup>;宗淑萍等发现河北省冬枣黑点病病原菌为桑壳小圆孢菌 (*Coniothyrium* Sacc.)、仁果茎点霉 (*Phoma pomorum* Thum) 以及细链格孢 [*A. alternata* (Fr.) Keissler]<sup>[13]</sup>;包慧芳等研究认为,新疆部分地区红枣黑斑病病原为链格孢 (*A. alternata*)<sup>[14]</sup>。本研究结果表明,针对南疆地区红枣黑斑病的病原研究很有必要。

因链格孢属种类多、形态特征复杂多变,传统的分离鉴定手段一部分主要依靠肉眼判断,主观性较强,一些细微差异可能被忽视,准确率降低。随着研究对象范围的扩大和数量的增加,传统的分离鉴定存在耗时长、效率低、成本高等局限性,在一定

程度上影响了后续试验的深入开展,而高通量测序技术的应用<sup>[6-8]</sup>可弥补传统分离鉴定的不足,也为导致红枣缩果病等其他病害病原的准确鉴定和靶向防治提供思路。当然要想达到高效防治,还须对病原菌的生活习性、侵染时机以及发病条件等方面进行深入系统的研究。

本研究采用高通量测序技术和传统分离鉴定相结合的方式,对南疆喀什、和田、阿克苏等 3 大红枣产区患病枣园中患病骏枣进行样品采集,通过对病原物进行组织分离、形态学观察、病理学接种试验和分子生物学分析,结果表明,链格孢 (*A. alternata*) 为主要的病原菌,试验结果与向征等的研究结果<sup>[15-16]</sup>一致。

### 参考文献:

- [1] 付威,何荣,坎杂,等. 红枣力学特性的试验研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2013,31(4):518-522.
- [2] 林忠敏,赵晓军,赵子俊,等. 红枣果实黑斑病的病原分离和鉴定[J]. 山西农业科学,2001,29(1):74-77.



孙 凯,陈夕军,沈迎春,等. 江苏省栝楼烂果病病原鉴定及室内防治药剂筛选[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):112-116.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.021

# 江苏省栝楼烂果病病原鉴定及室内防治药剂筛选

孙 凯<sup>1</sup>, 陈夕军<sup>1</sup>, 沈迎春<sup>2</sup>, 徐冬祥<sup>3</sup>, 陈 宸<sup>1</sup>, 黄奔立<sup>1</sup>

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省农药总站, 江苏南京 210017;

3. 江苏省阜宁县植保植检站, 江苏阜宁 224499)

**摘要:**为明确江苏省栝楼果实腐烂病病原并选择对其有效的防控药剂,从田间采集病果,经单孢分离后,运用形态学和分子生物学方法进行鉴定。根据菌丝形状、菌落特征、孢子形态与类型,并结合病菌 ITS 区序列分析,明确引起江苏省栝楼果实腐烂病的病原菌为拟茎点霉。室内毒力测定结果表明,吡唑醚菌酯、咪鲜胺、多菌灵、戊唑醇、啞菌酯、丙硫菌唑和中生菌素等药剂对该病菌均有较高的毒力,抑制中浓度( $EC_{50}$ )为 0.005 5 ~ 19.947 3 mg/L;而噻呋酰胺、多抗霉素和春雷霉素对该病菌基本无抑制作用,即使浓度大于 200 mg/L,菌丝生长抑制率也仅为 20% ~ 30%。明确病原物及化学药剂对该病菌的毒力,将为该病的发生、流行和防控研究提供理论依据。

**关键词:**病原鉴定;毒力测定;杀菌剂;烂果病;栝楼

**中图分类号:** S435.67      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0112-05

栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim),葫芦科栝楼属多年生藤本植物,又称瓜蒌、药瓜、野瓜、吊瓜、野葫芦等,是一种重要的中药材。《神农本草经》中将之归为药之中品,注“味苦寒、主消渴、身热、烦满

大热、补虚安中、续绝伤”;《本草纲目》中认为栝楼有治痰热咳嗽、胸痹、结胸、肺痿咳血、消渴、黄疸、便秘和痈肿初起的功能<sup>[1]</sup>。2019 年末至今,新型冠状病毒肺炎肆虐全国,并在世界多个国家和地区蔓延。马婧等基于冠状病毒的木瓜样蛋白酶(papain-like proteases, PLP)进行中药成分-靶点分子对接筛选发现,栝楼中有 5 种活性成分可与 PLP 形成复合物,其中主要活性成分为栝楼酯碱,说明栝楼可作为防治新冠肺炎的汤剂成分<sup>[2]</sup>。而且,以栝楼为主要成分的多种中药汤剂对其他急慢性肺病均有较好的临床效果<sup>[3-5]</sup>。

收稿日期:2020-03-11

基金项目:江苏省特经作物适用农药筛选与监测服务项目(编号: NJDCX-202001020701)。

作者简介:孙 凯(1995—),男,江苏常州人,硕士研究生,主要从事植物病害绿色防控研究。E-mail:2243449705@qq.com。

通信作者:陈夕军,博士,副教授,主要从事农作物病害绿色防控研究。E-mail:xjchen@yzu.edu.cn。

[3]靳增军,刘春琴,甄文超,等. 冬枣黑疗病病原菌鉴定[J]. 华北农学报,2006,21(增刊1):162-165.

[4]刘晓琳,刘 玉,马 荣,等. 新疆枣果黑斑病病原菌鉴定及生物学特性[J]. 西北林学院学报,2015,30(3):132-138.

[5]张天宇. 中国真菌志:链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003:281.

[6]Teixeira L C R S, Peixoto R S, Cury J C, et al. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica[J]. ISME Journal, 2010, 4(8):989-1001.

[7]Yatsunenko T, Rey F E, Manary M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. Nature, 2012, 486(742):222-227.

[8]魏玉洁,邹 弯,马文瑞,等. 应用高通量测序技术研究新疆产区葡萄果实、叶片及果园土壤微生物多样性[J]. 食品科学,2018,39(6):162-170.

[9]杜 娟,任 娟,赵思峰,等. 新疆马铃薯疮痂病原的鉴定

[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2010,28(4):414-417.

[10]冉俊祥,肖杰文,杨占臣,等. 美国大豆中链格孢的分离鉴定研究[J]. 植物检疫,2011,25(3):17-21.

[11]Peever T L, Su G, Carpenter-Boggs L, et al. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species[J]. Mycologia, 2004, 96(1):119-134.

[12]王 军,辛玉成. 冬枣黑斑病病原的分离与鉴定[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2007,24(1):21-23.

[13]宗淑萍,杨文香,刘大群,等. 冬枣黑点病病原鉴定[J]. 华北农学报,2006,21(5):105-107.

[14]包慧芳,王 宁,侯 敏. 新疆红枣黑斑病病原菌鉴定及拮抗细菌筛选[J]. 新疆农业科学,2016,53(9):1667-1673.

[15]向 征,钟聪慧,胡 军,等. 新疆枣果黑斑病病原鉴定[J]. 新疆农业科学,2013,50(5):845-850.

[16]董 宁,冯宏祖,王 兰,等. 南疆骏枣黑斑病症状表现及病原菌鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(6):922-927.