

余甘果采后黑疗病病原的分离与鉴定

郑毅, 姜少娟, 邓建梅

(攀枝花学院 生物与化学工程学院, 干热河谷特色生物资源开发四川省高校重点实验室, 四川 攀枝花 617000)

摘要: 为了寻找余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)果实采后黑疗病的有效防治措施,在金沙江干热河谷地区采集有典型黑疗病症状的余甘果,通过恒温恒湿储藏研究其发病规律,分别采用常规组织分离法和孢子侵染法进行病原分离和致病性研究,并对具有致病性的菌株进行常规形态学鉴定和rDNA-ITS序列分析。结果表明,余甘果储藏7 d后发病开始增多,到13 d发病率达到11.7%。从果实病健交界处分离获得4个菌株,其中菌株Pmy028回接感染率最高,15 d达到93.3%,确定其为余甘果采后黑疗病的病原,经鉴定属于链格孢属菌株(*Alternaria* sp.)。

关键词: 余甘子; 采后病害; 病原; 鉴定; ITS; 链格孢

中图分类号: S435.67 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)03-0089-04

Isolation and Identification of Pathogen Causing Black Spot of *Phyllanthus emblica* L. Fruit in Post-harvest Period

ZHENG Yi, JIANG Shao-juan, DENG Jian-mei

(Key Laboratory of Dry-hot Valley Characteristic Bio-resources Development in University of Sichuan Province, School of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, China)

Abstract: The occurrence regularity and pathogenesis of black spot of *Phyllanthus emblica* L. fruit in post-harvest period were clarified so as to find the control measures. Fruit with typical black spot symptoms in the dry-hot valley of Jinsha river was collected and stored under constant temperature and humidity to study the occurrence regularity. The pathogenic micro-organisms were isolated by routine organization separation method and their pathogenicity was studied by spore infection method. At last, general morphology identification as well as rDNA-ITS sequence analysis was conducted for identification of the pathogenic strains. The results showed that the occurrence of black spot of *P. emblica* L. fruit began to increase after 7 day of storage and reached to 11.7% after 13 days. Four strains were isolated from the junction of healthy and infected issues, of which Pmy028 strain had the highest infection rate after inoculation, reaching 93.3% after 15 days, demonstrating that it was the pathogen causing black spot of *P. emblica* L. fruit in post-harvest period. Pmy028 was identified as *Alternaria* sp.

Key words: *Phyllanthus emblica* L.; post-harvest disease; pathogen; identification; internal transcribed spacer; *Alternaria* sp.

余甘子(*Phyllanthus emblica* L.),又名滇橄榄,大戟科叶下珠属小乔木或灌木植物,原产于印度、巴基斯坦、斯里兰卡等地^[1],我国南方热带、亚热带地区有广泛分布,特别是在金沙江干热河谷地区分布较为集中,其抗旱性强,是当地优势植物^[2]。余

甘果含多种生物活性成分,能药食兼用,我国记载其使用已有2 000 a历史,现代药理研究表明其具有抗菌、抗氧化、抗癌、降脂、降血压等多重功效^[3]。余甘果采收后如无机械损伤贮藏于阴凉处,保存时间可达20~40 d,但部分会受到曲霉属(*Aspergillus*)、

收稿日期:2013-08-07

基金项目:四川省2010年科技基础平台建设子项目(2060503)

作者简介:郑毅(1978-),男,四川德阳人,副教授,硕士,主要从事应用微生物学与果蔬加工研究。E-mail:armmu@163.com

青霉属(*Penicillium*)真菌感染而腐烂^[4]。近年来发现,余甘果贮藏过程中还会感染一种黑疗病,影响其保藏和产品加工。为此,调查了余甘果采后黑疗病的发病规律,并对病原进行分离,开展了致病性研究和病原鉴定,为减少该病的发病率,延长果实的储藏时间提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 生物材料 余甘子成熟果实,2011年12月至2012年3月采集于金沙江干热河谷地区的盐边县、米易县和仁和区(均属攀枝花市)。

1.1.2 主要仪器与试剂 仪器:高压灭菌锅、超净工作台、微量移液器、生化培养箱、恒温恒湿箱、低温冰箱、数码显微镜、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻离心机、台式离心机、PCR仪等;试剂:次氯酸钠、无水乙醇、葡萄糖、琼脂、EDTA-2Na、Tris、溴化乙锭、*Taq* 酶、dNTP、DNA Marker、合成引物等。

1.2 方法

1.2.1 发病规律的调查 选取自然采集无机械损伤的新鲜余甘子果实 1 000 枚,置于 15℃、空气湿度 60%的恒温恒湿箱中,隔天观察一次,统计黑疗病发病情况。

1.2.2 病原菌分离 采用 PDA 培养基,按照常规方法^[5]进行组织分离培养。取表现典型症状的余甘果,先用 70%乙醇进行表面消毒,再用新配制的 3%次氯酸钠溶液表面灭菌 30 s,然后无菌水清洗 3 次;每一病斑于病健交界处分离 5 块病组织,同一病斑的病组织块放于同一个培养皿中,在 25℃生化培养箱中培养。共设计 30 个重复(分离 3 个批次,每批次重复数为 10 个),以健康果为对照。培养 4~10 d,观察并及时挑取长出的菌丝,进行编号、纯化、归并,并进行数据统计,有效菌株用 PDA 斜面保存于 4℃冰箱。

1.2.3 致病性测定 采用孢子侵染法^[6]。将分离到的疑似病原菌在 PDA 培养基上培养 7 d,加无菌水制成孢子悬浮液,孢子浓度为每视野 40~60 个孢子(400×)。选用新鲜健康余甘果,用 3%次氯酸钠溶液对果实表面消毒,无菌水冲洗 3 次。用直径为 0.5 cm 的无菌滤纸片,蘸取孢子悬浮液后轻贴于余甘果表面,余甘果表面分为有伤、无伤 2 种情况,有伤处理即用灭菌的医用针头刺伤果皮造成伤口后接种,各设计 60 个重复(3 个批次,每批次重复数为 20 个),以无菌水处理作对照(CK)。接种后的余甘果在 25℃的生化培养箱中培养,每天观察、记录果实

发病情况,3~15 d 统计发病情况,并根据科赫法则按 1.2.2 进行病原的再次分离和观察。

1.2.4 病原菌的形态观察与初步鉴定 将纯化的病原采用 PDA 平板培养,观察菌落形态,采用插片培养对其分生孢子形状、大小等进行观察测量,根据上述特征参照文献^[7]对其进行种属初步鉴定。

1.2.5 病原菌的分子生物学鉴定 采用 rDNA-ITS 序列分析对病原进行分子鉴定。将病原的菌丝接种于液体 PDA 中,取培养的菌丝球用液氮充分研磨,采用 CTAB 法提取病原菌的总 DNA^[8]。采用真菌 rDNA 通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增, ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系为 20 μL,PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,24 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测后,委托上海美吉公司进行纯化,并运用 ABI3730XL 测序仪进行测序。所得序列经拼接后提交至 GenBank,利用 Blast 进行相关序列的同源性比较,获取的同源序列采用 MEGA(4.0)构建系统进化树,以明确该病原菌的分类地位。

2 结果与分析

2.1 余甘果黑疗病的特征及发病规律

发病果果皮并无损伤,初期出现黄褐色至黑褐色小点,逐渐扩大成圆形或不定形的暗黑色病斑,病斑周围常有黄色晕圈,边缘呈放射状,病斑直径约 2~5 mm(图 1)。从图 2 可以看出,果实储藏 7 d 后发病率开始增加,到 13 d 发病率达到 11.7%,之后发病率增长缓慢,一个果有 2 个或 2 个以上病斑的比率即多斑病果率随时间增加而增加,15 d 的比率为 8.4%。



图 1 余甘果采后黑疗病典型症状

2.2 病原菌的分离结果

分离到的病原菌经纯化后归并为 4 株,编号为 Pmy011、Pmy017、Pmy028、Pmy032,分离概率分别

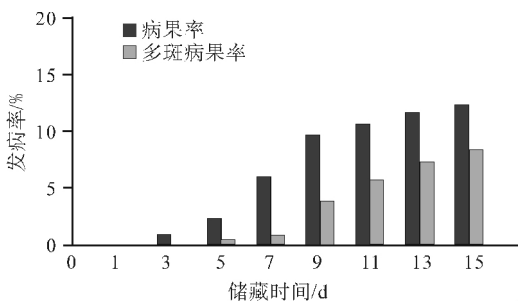


图 2 余甘果采后黑疗病发病规律

为 19.3%、12.0%、35.7%、3.7%。健康果对照组亦能分离到菌株,推测其为余甘果内生真菌,未作深入研究。

2.3 病原菌致病性测定结果

菌株 Pmy011、Pmy017、Pmy032 接种余甘果后,有伤、无伤组果实均未表现明显症状,发病率低于 5%,与无菌水对照组的数据接近,说明这 3 个菌株不是病原。菌株 Pmy028 接种余甘果后,有伤组中 3 d 即有果实表现明显症状,7 d 发病率达到 78.3%,15 d

的发病率为 93.3%,病斑呈圆形、深褐色,与黑疗病自然发病症状相似。从接种发病部位的病健组织交界处,可再分离到与接种菌株菌落培养性状和分生孢子形态相似的菌株,从而确定 Pmy028 菌株为余甘果黑疗病的病原。而无伤组在接种后 3 d 未发现明显症状,7 d 发病率为 8.3%,15 d 发病率也仅为 13.3%,分析无伤组发病率低的原因是余甘果外果皮致密,表面有一层天然果蜡,病原孢子难于侵入。

2.4 病原菌的形态学鉴定

对病原菌 Pmy028 进行分离和纯化培养后,观察到其菌落及显微特征如图 3 所示。PDA 上培养 7 d 菌落呈灰黑色,背面呈黑色。菌丝直径 2~4 μm ,其分生孢子梗单生或簇生,直立,淡褐色至褐色;分生孢子单生或短链生,倒棍棒形,淡褐色至褐色,具纵横隔膜,分隔处稍缢缩,孢子大小为(4.0~15.0) $\mu\text{m} \times$ (12.0~40.0) μm ,2~6 个横隔膜,0~3 个纵斜隔。根据以上形态特征,判断 Pmy028 属于链格孢属菌株(*Alternaria* sp.)。



图 3 病原菌株 Pmy028 菌落培养特征(A)及分生孢子显微形态特征(B、C)

2.5 ITS 序列分析结果

扩增菌株 Pmy028 的 ITS 序列,得到大约 500 bp 的片段,测序后采用 Blast 分析并构建系统进化树。从图 4 可以看出,菌株 Pmy028 (GenBank 序列号为

KC831441) 与 GenBank 中菌株 *A. altmate* (JQ809323.1)、*A. tenuissima* (KC329619.1)、*A. longipes* (JF802112.1)、*A. arborescens* (JF802098.1) 的同源性均为 100%,从而可以确认菌株 Pmy028 为链格孢属菌株。

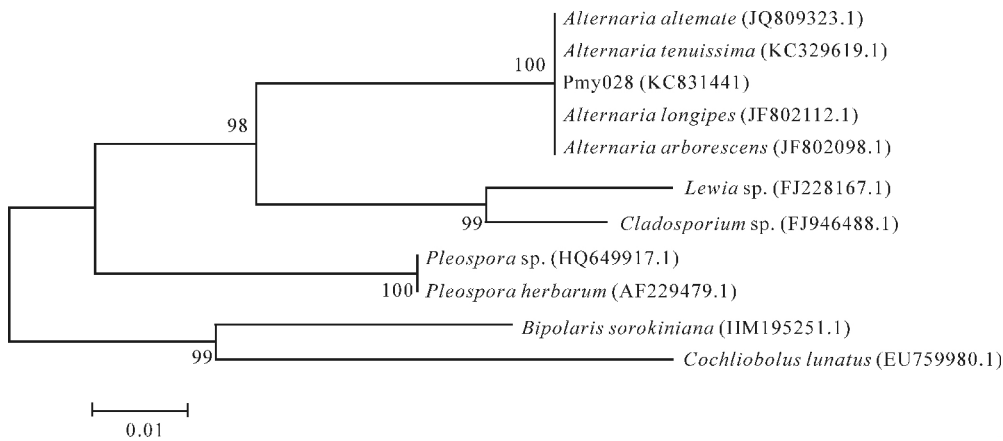


图 4 病原菌株 Pmy028 rDNA-ITS 序列同源性比较的树状分析

3 结论与讨论

通过对余甘果采后黑疔病病原的分离、致病性研究和鉴定,可以得知,余甘果采后黑疔病的病原是链格孢属菌株(*Alternaria* sp.),为今后余甘果采后黑疔病的防控提供了理论依据。链格孢属(*Alternaria*)真菌是极为常见的一类分生孢子菌,全世界已描述的 500 个链格孢菌种级分类单位中,95% 以上寄生在植物上,引起多种植物病害,给农业生产和贮运中的农产品造成重大损失^[9]。在引起水果病害方面,王友升等^[10]报道,链格孢属真菌引起安哥诺李果实产生腐烂病斑;宗淑萍等^[11]报道,链格孢属真菌引起冬枣黑点病;唐淬^[12]报道,链格孢属真菌引起柑橘褐斑病。

本研究采用 rDNA-ITS 序列分析对病原菌株 Pmy028 进行了分子鉴定,但其 ITS 序列与多种链格孢属真菌 ITS 序列同源性为 100%,说明仅依靠 ITS 序列分析不能鉴定链格孢小孢子种,还需要通过多个位点的保守基因分析等技术手段进行种间鉴别。

何彩梅等^[13]报道,在研究余甘子内生真菌时分离得到了链格孢属菌株。魏宇昆^[14]曾提出内生真菌是植物病原菌进化枝中的一个分枝,某些病原菌在特定条件下毒力消失或减小,在植物体内维持平衡的拮抗,即成为植物的内生真菌,但当环境条件发生改变,其毒力还有可能恢复,从而导致宿主出现发病症状。因此,推测链格孢引起余甘果采后出现黑疔病的发病机制也有可能如此,但还需要进一步研究验证。

参考文献:

- [1] 刘凤书,侯开卫,李绍家,等. 余甘子的保健价值及开发利用前景[J]. 自然资源学报,1993,8(4):299-306.
- [2] 李巧明,赵建立. 云南干热河谷地区余甘子居群的遗传多样性研究[J]. 生物多样性,2007,15(1):84-91.
- [3] 杨顺楷,杨亚力,杨维力. 余甘子资源植物的研究与开发进展[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(6):846-854.
- [4] 姚小华,盛能荣,卞尧荣,等. 余甘子果实贮藏保鲜初步研究[J]. 经济林研究,1990,8(2):31-38.
- [5] 甘瑾,唐文林,潘禄,等. 灵武长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.
- [6] 罗建军,刘琼光,何衍彪,等. 广东菠萝心腐病病原鉴定[J]. 广东农业科学,2012(13):90-92.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [8] 杨腊英,黄华平,唐复润,等. 香蕉炭疽菌 rDNA ITS 区的分子鉴定与检测[J]. 植物病理学报,2006,36(3):219-225.
- [9] 谢红辉. 链格孢属部分种的分类研究现状[J]. 农业研究与应用,2012(6):28-33.
- [10] 王友升,陈玉娟,张燕. 李果实贮藏期间 4 株病原真菌的分离、鉴定及碳源代谢指纹图谱分析[J]. 食品科学,2012,33(13):235-239.
- [11] 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.
- [12] 唐淬. 柑橘黑斑病、褐斑病的分离鉴定及分子检测[D]. 重庆:西南大学,2012.
- [13] 何彩梅,魏大巧,李海燕. 云南元江干热河谷五种优势植物的内生真菌多样性[J]. 生态学报,2011,31(12):3315-3321.
- [14] 魏宇昆. 内生真菌与禾本科植物的共生机制研究进展[J]. 中国农学通报,2010,26(12):295-300.