

猕猴桃青霉病病原菌鉴定及中草药提取物对其抑菌效果

程小梅^{1,2}, 彭亚军³, 杨 玉^{1,2}, 徐 海^{1,2}, 罗赛男^{1,2}, 卜范文^{1,2*}

(1. 湖南省农业科学院园艺研究所, 长沙 410125; 2. 农业部华中地区果树科学观测实验站, 长沙 410125;
3. 湖南省农业科学院植物保护研究所, 长沙 410125)

摘要 为了解决猕猴桃真菌病害导致的贮运难题, 作者从湖南、陕西两个猕猴桃主产区采集的病果中分离获得青霉菌株 Q-1, 应用 rDNA-ITS 分子标记、BLASTn 比对, 结合传统真菌形态学鉴定, 确定该致病菌为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。利用带药培养基法筛选出对侵染猕猴桃的青霉菌有最佳抑制作用的中草药提取物, 猕猴桃果实采后刺伤接种 Q-1, 研究中草药提取物对果实病斑直径的影响。结果表明: 川芎、肉桂、高良姜的乙醇提取物对青霉均有较好的抑制效果, 菌丝生长相对抑制率分别达到 92.79%、77.67%、78.49%, 其中以川芎的抑菌效果最佳。猕猴桃果实在贮藏期接种 Q-1 菌株后, 中草药提取物处理可显著抑制果实病斑扩大。

关键词 猕猴桃; 青霉; 鉴定; 中草药提取物

中图分类号: S436.634 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2017282

Identification of the pathogen causing fruit penicilliosis on kiwifruit and the inhibition effect of Chinese herb extracts on the pathogen

CHENG Xiaomei^{1,2}, PENG Yajun³, YANG Yu^{1,2}, XU Hai^{1,2}, LUO Sainan^{1,2}, BU Fanwen^{1,2}

(1. Hunan Horticultural Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China;
2. Scientific Observation and Experiment Station of Fruit Trees in Central China, Ministry of Agriculture, Changsha 410125, China; 3. Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract The aim of this study is to solve the difficulties of fungal diseases in postharvest storage and transit of kiwifruit. The pathogen of kiwi penicilliosis was isolated from the diseased kiwifruit collected from main production areas of Hunan and Shaanxi provinces and was named Q-1. Based on rDNA-ITS sequence analysis, BLASTn alignment and traditional morphological identification, the pathogen was identified as *Penicillium oxalicum*. The Chinese herb extracts with the best inhibiting effects to *Penicillium oxalicum* were screened by drug-containing PDA plates, and their effects on controlling disease of kiwifruit inoculated with *P. oxalicum* were also investigated. The results showed that ethanol extracts of rhizoma ligusticum wallichii, cinnamon and galangal all had good inhibiting effects on *P. oxalicum*, with the inhibition ratio of 92.79%, 77.67%, and 78.49% on mycelial growth, respectively, among which extract of rhizoma ligustici wallichii had the best antifungal activity. During kiwifruit storage, Chinese herb extracts treatment significantly decreased the lesion diameter of kiwifruit inoculated with *P. oxalicum*.

Key words kiwifruit; *Penicillium*; identification; Chinese herb extract

猕猴桃是一种深受消费者喜爱的水果, 营养极为丰富。维生素 C 含量高, 同时还含大量的糖、蛋白质、氨基酸等多种有机物和人体必需的多种矿物质。

猕猴桃果实青霉病是我国猕猴桃贮藏期的主要病害, 在湖南、陕西等猕猴桃主产区发生比较普遍, 症状为在果面受损伤处呈现青绿色霉层, 易于识别。

收稿日期: 2017-07-31 修订日期: 2017-09-27

基金项目: 湖南省农业科技创新资金[湘农科科(2017)18号]

* 通信作者 E-mail: bufanwen@126.com

病原为多种青霉,主要由伤口侵入,引起腐烂。青霉不仅引起猕猴桃腐烂,还危害柑橘、苹果、梨、哈密瓜等的叶片和果实,引起各种贮藏病害^[1-2]。常用于水果贮藏保鲜的抗真菌作用较强的中草药成分主要有丁香、木香、大黄、荆芥、肉桂、茵陈蒿、川芎、肉豆蔻、黄连、黄芩、紫草和黄柏等^[3-7]。本研究从湖南、陕西两大猕猴桃主产区采集了青霉危害的样本,对该病菌的致病力、形态学、分子生物学特性进行比较分析,同时筛选出对分离菌株有较强抑菌作用的中草药提取物,以期对猕猴桃贮藏期真菌病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猕猴桃青霉病病果采自湖南永顺、凤凰,陕西眉县、周至4个猕猴桃主产区的5个果园,每个果园分别采集样品6份,共计30份。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L。

试剂及仪器:PCR扩增仪为TaKaRa Bio Inc.生产的TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600;核酸电泳仪为ADVANCE-BIO Co., Ltd生产的Mupid;蛋白质电泳仪为上海天能生产的EPS300;电泳成像装置采用Pharmacia Biotech ImageMaster® VDS;DNA测序仪为Applied Biosystem生产的ABI PRISM™ 3730XL DNA Sequencer;循环测序试剂盒采用Big-Dye® Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit;川芎、肉桂、高良姜原料均购于安徽蜀中医药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化、致病性测定及柯赫氏法则验证

将发病的果实表皮用清水清洗干净,切取5 mm×5 mm的病组织数块,用75%的乙醇消毒10 s,随后放入0.1%升汞消毒5 min,取出后用无菌水冲洗3次,将病组织放入马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板中,在28℃黑暗培养,分离纯化得到供试菌株。将分离纯化的菌株在PDA平板上28℃培养3~5 d后用打孔器打取直径4 mm的菌丝块。每个处理选取健康的猕猴桃果实10个,用接种针在果实腰部将果实刺伤后将菌饼有菌丝的一面紧贴于果实伤口处,

菌丝块表面覆盖湿棉球,放入瓷盘中密封保湿,逐日观察各处理的发病情况。以接种不含菌PDA为对照。从接种后发病的果实上再次分离、纯化和培养病原菌,并与原菌株进行比较。

1.2.2 病原菌的形态学观察

将菌株接种到PDA平板上于培养箱中28℃避光培养2 d,在显微镜下观察病原菌的分生孢子形态。

1.2.3 病原菌的分子生物学鉴定

从PDA平板上用牙签挑取少量菌体于50 μL裂解缓冲液(TaKaRa Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR, Code No. 9164)中,在80℃下,变性15 min,变性后离心取上清作为模板。使用TaKaRa Fungi Identification PCR Kit (Code No. RR178)扩增目的片段。PCR反应体系为50 μL,其中,DNA模板(变性反应液)1 μL,PCR Premix 25 μL,ITS Forward primer (20 pmol/μL) 0.5 μL,ITS Reverse primer (20 pmol/μL) 0.5 μL,ddH₂O 23 μL。扩增程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 5 min;扩增完毕,取10 μL扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶进行电泳检测^[8]。PCR产物送宝生物工程(大连)有限公司测序。将所得的序列提交到GenBank核酸序列数据库中,获得登录号。同时将序列作同源相似性差异分析,确定该菌株的分类地位,用NJ法(neighbor-joining method)构建系统进化树。

1.2.4 中草药提取物对青霉的抑菌作用

精选川芎、高良姜、肉桂原料切碎后,取肉桂粗粉各10 g。分别以乙醇为溶剂,索氏法提取3.2 h,提取液过滤,减压回收乙醇至无醇味,热水分散后放冷,石油醚(60~90℃)脱脂3次,水液浓缩,80℃干燥成干浸膏,粉碎成细粉供试^[9]。分别配制肉桂、高良姜、川芎提取液母液330 mg/mL备用。取配制好的中草药提取液母液与PDA培养基混合均匀制成浓度为8.25 mg/mL的带药培养基,将其倒入9 cm培养皿中,以相同量的无菌水代替中草药母液作为对照^[10]。提取物对青霉的抑菌效果采用改良的菌丝生长速率法^[11-13],即在含药培养基中央用直径为4 mm的打孔器打孔,注入50 μL 1.0×10⁶个/mL的青霉孢子悬浮液,培养箱28℃培养72 h后观察试验结果。采用十字交叉法测量各菌落直

径,计算各处理菌落直径的平均值和菌丝生长相对抑菌率。

抑菌率= $\frac{ck-c}{ck} \times 100\%$;

公式中 ck 为对照组菌落的净生长量, c 为中草药处理组菌落的净生长量。

1.2.5 中草药提取物对猕猴桃果实损伤接种青霉的抑菌效果

选取外观整齐、无病虫害和机械损伤的猕猴桃用75%乙醇消毒,晾干备用。用接种针在果实表面穿刺接种,对照组只接种 Q-1 病原菌,处理组先接种孢子浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 的青霉孢子悬浮液 50 μ L,稍晾干后接种中草药提取物处理液,同时设有空白对照。伤口晾干后将果实放在包装盒中,外套塑料袋保湿,于 26℃ 贮藏。每隔 2 d 观察发病率和病斑直径。持续观察 7 d。每个处理设 3 次重复,每重复 8 个果实,果实损伤接种后病斑直径测量采用十字交叉法^[14]。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃青霉病病原菌的筛选分离及致病性测定

从 30 份样品中共分离到 6 株具有较强致病性的青霉,健康猕猴桃接种这 6 株青霉后,其发病症状与自然发病症状一致,所有对照均无发病症状。对接种后发病的组织进行再次分离均能得到与原来接种的菌落特征相同的分离物^[15]。后续试验取菌株 Q-1 进行。



a: 刺伤对照; b: 刺伤接种
a: Negative control of wound inoculation; b: Wound inoculation

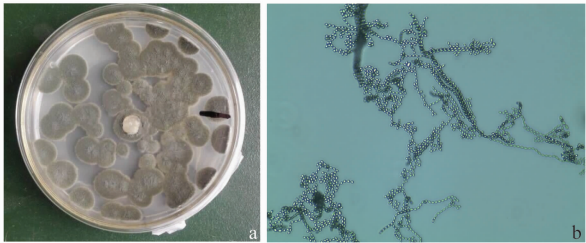
图 1 Q-1 菌株对猕猴桃的致病性

Fig. 1 Pathogenicity assay of Q-1 to kiwifruit

2.2 猕猴桃果实上分离青霉的形态学特征

如图 2a 所示,菌株 Q-1 在 PDA 培养基上的菌落为暗青色,粉粒状,生长速度较快,边缘呈白

色。从背面观察培养基,发现培养基由浅黄色慢慢变为黄褐色,并随着培养时间的延长而逐渐加深。分生孢子呈念珠状串生,单孢无色,近球形(图 2b)。



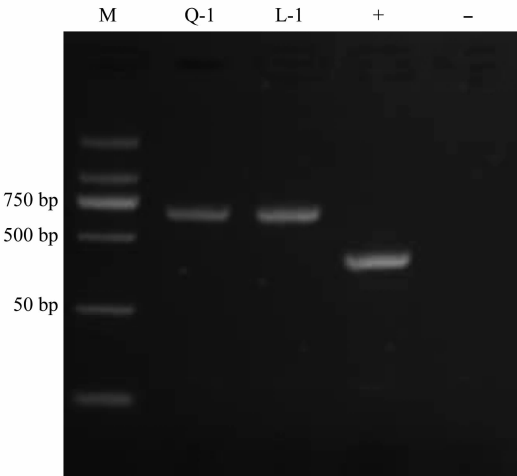
a: PDA 平板上培养的菌落; b: PDA 培养基上分生孢子(40×)
a: Mycelium colonies cultured on PDA plate; b: Conidia on PDA plate (40×)

图 2 猕猴桃果实上分离的青霉 Q-1 的形态特征

Fig. 2 Morphology of *Penicillium* sp. strain Q-1 from kiwifruit

2.3 猕猴桃果实上分离青霉的分子生物学鉴定

将菌株 Q-1 的 ITS 基因序列提交至 GenBank,获得登录号 MF669724。病原菌的琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。菌株 Q-1 和菌株 L-1 为作者从猕猴桃感病果实中分离出的具有代表性的菌株。将所得序列作同源相似性分析,确定了该菌株的分类地位,构建了系统进化树,结果(图 4)表明,菌株 Q-1 与登录号 KP735935.1 和登录号 KX674635.1 的同源性最高,综合比较病原菌的形态学特征结合序列比对结果可以得出,菌株 Q-1 为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*^[16]。



M: DL2000 DNA Marker; Q-1: Q-1 产物; L-1: L-1 产物; +: 阳性对照; -: 阴性对照
M: DL2000 DNA Marker; Q-1: Q-1 product; L-1: L-1 product; +: Positive control; -: Negative control

图 3 病原菌的 PCR 产物电泳结果

Fig. 3 Electrophoretic results of PCR products of ITS gene in the pathogen

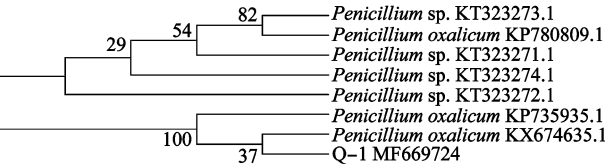


图 4 Q-1 菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Q-1 strain

2.4 几种中草药提取物对青霉的抑菌情况

表 1 结果可以看出肉桂、高良姜和川芎提取物均对 Q-1 的抑菌效果良好,尤其是川芎提取物对 Q-1 的抑菌率最高,达到了 92.79%。

表 1 几种中草药提取物对 Q-1 的抑菌作用¹⁾

Table 1 Inhibition effect of several Chinese herb extracts on mycelial growth of Q-1

中草药提取物 Chinese herbal medicine	菌落直径/cm Colony diameter	抑菌率/% Inhibitory rate
肉桂提取物 Cinnamon extract	(1.92±0.06)bB	(77.67±0.73)bB
高良姜提取物 Galangal extract	(1.85±0.04)bB	(78.49±0.47)bB
川芎提取物 Rhizoma ligustici wallichii extract	(0.62±0.10)cC	(92.79±1.20)aA
CK	(8.60±0)aA	—

1) 同一列数据后标示的大写和小写字母分别表示 0.01 和 0.05 差异显著水平。下同。
Different capital and lowercase letters in the same column indicated the significant difference at 1% and 5% levels, respectively. The same below.

2.5 中草药提取物对猕猴桃果实采后刺伤接种 Q-1 的病斑直径的影响

猕猴桃果实接种 Q-1 菌株 4 d 后,病斑直径不断增加,但中草药提取物处理显著抑制了果实病斑的扩大(图 5)。综合比较川芎、高良姜、肉桂三种提取物的处理结果,川芎提取物的抑制效果最突出,高良姜提取物其次,最后为肉桂提取物。

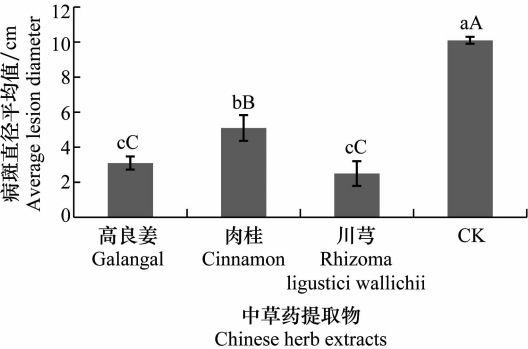


图 5 中草药提取物对果实采后接种 Q-1 的病斑直径的影响

Fig. 5 Effects of Chinese herbal medicine extracts on lesion diameter on kiwifruits inoculated by Q-1

3 结论与讨论

中草药提取物具有良好的杀菌作用,对人体和环境无危害,增加了水果食用的安全性,用于水果保鲜有很好的效果。将中草药提取物应用到食品防腐的最大优点就是腐烂率低,很少甚至不影响食品的原有风味。同化学合成的防腐剂相比,中草药提取物不仅无毒,对人体健康也有裨益。再者,中草药简单易得、取材容易、经济实惠,中草药提取物替代化学合成保鲜剂用于水果贮藏保鲜有着广阔的发展前景。本研究对猕猴桃青霉病病原菌进行了筛选、鉴定,应用 rDNA-ITS 分子标记分析、BLASTn 比对,结合传统真菌形态学鉴定,确定致病菌 Q-1 为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。作者从众多中草药提取物中筛选出川芎、高良姜、肉桂三种中草药提取物对猕猴桃青霉病病原菌抑菌效果较好,将三种抑菌效果较好的中草药提取物用于猕猴桃果实采后刺伤接种青霉的防腐,发现对病斑直径的扩大仍有较好的抑制作用。在后续的试验中作者会进一步验证在本试验中发挥抑菌作用的几种中草药提取物的主要抑菌成分,力争将本试验结果可以直接应用于生产实践、解决猕猴桃贮藏难题。

参考文献

[1] 闵晓芳,邓伯勋,陈丽锋,等. 柑橘采后致病青霉的鉴定[J]. 果树学报,2007,24(5):653-656.
[2] YU Ting, LI Hongye, ZHENG Xiaodong. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections [J]. International Journal of Food Microbiology 2007, 114(3): 261-266.
[3] 曾荣,陈金印,张阿珊,等. 植物提取液对柑桔采后青霉、绿霉抑菌活性的研究[J]. 江西农业大学学报,2010,32(6):1142-1145.
[4] 曾荣,张阿珊,陈金印,等. 植物源防腐剂在果蔬保鲜中应用研究进展[J]. 中国食品学报,2011,7(4):161-165.
[5] 陈玉环,彭旋,陈楚英,等. 三颗针提取液复合涂膜对“纽荷尔”脐橙贮藏保鲜的影响[J]. 江西农业大学学报,2016,38(3):469-475.
[6] 张阿珊,曾荣,陈金印,等. 丁香提取液对脐橙采后生理相关酶活性的影响[J]. 江西农业大学学报,2011,33(6):1067-1071.
[7] 陈楚英,陈明,陈金印,等. 壳聚糖涂膜对新余蜜橘常温贮藏保鲜效果的影响[J]. 江西农业大学学报,2012,34(6):1112-1117.
[8] 段爱莉,雷玉山,孙翔宇,等. 猕猴桃果实贮藏期主要真菌病害的 rDNA-ITS 鉴定及序列分析[J]. 中国农业科学,2013,46(4):810-818.

综合以上试验研究结果,从防治效果、增产效果及投入成本等多因素考虑,建议从发病初期开始施药,使用 300 g/L 苯甲·丙环唑 EC 3 000 倍液配施 0.136% 赤·吲乙·芸苔 8 000 倍液 1 次,随后连续喷施 300 g/L 苯甲·丙环唑 EC 3 000 倍 2 次,间隔约 10 d,可在减少农药使用量的同时,有效防治花生网斑病并能提高花生荚果产量。此外,在不同时期进行杀菌剂交替使用,以延缓抗药性的产生,降低防治成本,达到有效控制病害的目的。

参考文献

- [1] 徐秀娟,崔凤高. 中国花生网斑病研究[J]. 植物保护学报, 1995,22(1):70-74.
- [2] KOKALIS-BURELLE N, PORTER D M, RODRIGUEZ-KABANA R, et al. Compendium of peanut disease [M]. USA American Phytopathological Society, 1997: 39-40.
- [3] SUBRAHMANYAM P, SMITH D H. Effect of host genotype on incubation period, receptivity, lesion diameter, and leaf area damage of *Didymella arachidicola* on peanut [J]. Peanut Science, 1987, 14(2): 90-94.
- [4] 全鑫,宋玉立,何文兰,等. 花生网斑病国内外研究进展[J]. 河南农业科学,2008(7):13-16.
- [5] 傅俊范,王大洲,周如军,等. 辽宁花生网斑病发生危害及流行动态研究[J]. 中国油料作物学报,2013,35(1):80-83.
- [6] 傅俊范,崔建潮,周如军,等. 辽宁花生主栽品种(系)对褐斑病和网斑病抗性鉴定[J]. 植物保护,2015,41(1):171-173.
- [7] 陈华,李志敏,杨海棠,等. 花生叶斑病、网斑病的综合防治技术[J]. 河南农业科学,2004(9):91.
- [8] 刘美昌,丰燕,冯志花,等. 新型杀菌剂防治花生网斑病的效果[J]. 山东农业科学,2004(3):58-59.
- [9] 王建伟. 推广节约农药生产技术 减少面源污染 促进循环农业发展[J]. 河北农业科学,2012,16(11):50-52.
- [10] 吴定邦,王东明,马勇. 浅谈农药减量使用的技术措施[J]. 安徽

农学通报,2010, 16(6):106-107.

- [11] 周长勇,刘伟中,郭小山. 爱苗在花生上应用试验初报[J]. 安徽农学通报,2011,17(24):61-62.
- [12] 陈发宏,荣维国. 爱苗的防病效果及增产效果分析[J]. 安徽农学通报,2007,13(22):89.
- [13] 王伟. “爱苗”防治草莓白粉病的试验[J]. 安徽农业科学,2007, 35(22):6844.
- [14] REUVENI M, SHEGLOV D. Effects of azoxystrobin, difenconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit [J]. Crop Protection, 2002, 21(10): 951-955.
- [15] 刘燕菁,范玉,张旭光,等. 丙环唑在香蕉和土壤中的消解动态及残留安全性评价[J]. 植物保护,2010,36(2):109-111.
- [16] 何晶晶,周如军,崔健潮,等. 不同杀菌剂对花生网斑病菌室内毒力测定及田间防效研究[J]. 中国油料作物学报,2015, 37(4):525-531.
- [17] 袁虹霞,孙炳剑,李洪连,等. 花生品种(系)对叶斑病的抗性鉴定[J]. 河南农业科学,2004,33(12):35-38.
- [18] WOODWARD J E, BRENNEMAN T B, KEMERAIT R C, et al. Management of peanut diseases with reduced input fungicide programs in fields with varying levels of disease risk [J]. Crop Protection, 2010, 29(3): 222-229.
- [19] 牛海龙,王义生,李伟堂,等. 防治花生叶斑病药剂筛选[J]. 辽宁农业科学,2016(5):20-23.
- [20] 晏立英,宋亚辉,倪皖莉,等. 三种杀菌剂在不同生态区对花生叶斑病的防治效果[J]. 中国油料作物学报,2016,38(5):644-648.
- [21] 傅华龙,何天久,吴巧玉. 植物生长调节剂的研究与应用[J]. 生物加工过程,2008,6(4):7-12.
- [22] 刁春玲,刘芳,宋宝安. 农用杀菌剂作用机理的研究进展[J]. 农药,2006,45(6):374-377.
- [23] 刘美昌,马世洪,张佃文,等. 花生网斑病防治技术研究[J]. 花生科技,1999(S1):436-438.
- [24] 梁英,赵志伟,孙国臣,等. 4 种农药及植物生长调节剂在花生上的应用效果[J]. 农业科技与装备,2014(2):25-26.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 189 页)

- [9] 吴新安. 中草药提取物对几种植物病原菌的抗菌活性研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2002.
- [10] 孙伟,蒋红云,张燕宁,等. 55 种中草药提取物对 2 种植物病原菌的生物活性[J]. 植物保护,2011,37(3):124-127.
- [11] 陈年春. 农药生物测定[M]. 北京:北京农业大学出版社,1991: 176-781.
- [12] 陈仕江,丁伟,杨帮,等. 10 种中药植物对 4 种植物病原真菌的生物活性研究[J]. 西南农业学报,2005,3(18):311-314.
- [13] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版

社,1994.

- [14] 朱玉燕,邬波龙,姜天甲,等. 外源草酸对猕猴桃采后果实扩展青霉生长及展青霉素积累的影响[J]. 果树学报,2015,32(2): 298-303.
- [15] 赵金梅,高贵田,谷留杰,等. 中华猕猴桃褐斑病病原鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 中国农业科学,2013,46(23):4916-4925.
- [16] 李黎,陈美艳,张鹏,等. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(3):527-528.

(责任编辑:杨明丽)