采后橄榄果实果腐病菌的分离与鉴定

陈南泉[1,2]，陈艺晖[1,2]，林河通[1,2]，林艺芬[1,2]，王慧[1,2]

（1.福建农林大学食品科学学院，福建福州 350002）（2.福建农林大学农产品产后技术研究所，福建福州 350002）

摘要：果腐病是导致采后橄榄果实腐烂的主要病害。为明确导致采后橄榄果实果腐病的病原菌种类，本文以福建省主栽橄榄品种‘长营’果实为研究对象，试验采用组织分离法和传统纯化培养法分离采后橄榄果实果腐病病原菌，并用柯赫氏法则测定其致病性；利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒法提取橄榄果实果腐病病原菌 DNA，运用 PCR 技术对其 rDNA-ITS 基因序列进行扩增，并测定扩增产物的核苷酸序列，再用局部序列比对基本检索工具(BLAST)方法对测序结果进行同源性分析；采用 MEGA 6.0 软件的邻接法（Neighbor-joining，NJ）构建橄榄果实果腐病病原菌系统发育树，结合形态学、分子生物学及系统发育分析法鉴定橄榄果实果腐病病原菌种类。结果表明，导致采后橄榄果实果腐病的病原菌为小孢拟盘多毛孢（*Pestalotiopsis microspora*）。本研究为进一步控制采后橄榄果实果腐病、延长橄榄果实贮藏保鲜期提供科学依据。

关键词：橄榄；果实；采后病害；果腐病；病原菌；分离与鉴定

文章篇号：1673-9078(2016)10-138-142 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.022

Isolation and Identification of the Pathogen Causing Fruit Rot in Harvested Chinese Olives

CHEN Nan-quan[1,2], CHEN Yi-hui[1,2], LIN He-tong[1,2], LIN Yi-fen[1,2], WANG Hui[1,2]

(1.College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China) (2.Institute of Postharvest Technology of Agricultural Products, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Fruit rot is a major disease symptom in harvested Chinese olive fruit. In order to clarify the chief pathogens causing fruit rot in harvested Chinese olives, the fruit of ‘Changying’ Chinese olive [*Canarium album* (Lour.) Raeusch ‘Changying’], a main Chinese olive cultivar in Fujian Province, was used for isolating pathogens causing fruit rot via tissue isolation and traditional pure culture, followed by pathogenicity verification of the isolated pathogen by Koch’s postulates. The DNA of the isolated pathogen was extracted by fungal genomic DNA-isolation methods, polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify rDNA internal transcribed spacer-region sequences, and the amplified product was sequenced. The homologous nucleotide sequences of the pathogen were further analyzed using the basic local alignment search tool (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). The corresponding phylogenetic tree for the isolated pathogen was constructed using the neighbor-joining method combined with morphological, molecular biology, and phylogenetic analysis to identify the pathogenic bacterial species causing ‘Changying’ Chinese olive fruit rot. The results showed that *Pestalotiopsis microspora* was the pathogen causing fruit rot in harvested Chinese olives. These findings provide a scientific basis for fruit-rot control and extension of the storage life of Chinese olives.

Key words: *Canarium album* (Lour.) Raeusch; fruit; post-harvest disease; fruit rot disease; pathogen; isolation and identification

橄榄[*Canarium album* (Lour.) Raeusch]，又名白榄、青果、青橄榄等，属橄榄科(*Burseraceae*)橄榄属(*Canarium* Linn.)常绿果树。中国是世界上橄榄栽培面积最大、产量最多的国家，主要分布于福建、广东、广西和台湾等省（区），在云南、浙江南部、四川等地均有少量种植[1]。橄榄果实营养丰富，含有 17 种人体所需要的氨基酸，鲜果具有生津润喉、去脂减肥、开胃健脾、去除口嗅等功效。但采后橄榄果实不耐贮藏，鲜果在室温下容易腐烂而引起采后橄榄果实大量损失、严重影响其经济价值。因此，研究明确引起采后橄榄果实腐烂变质的原因成为控制采后橄榄果实损失、延长其保鲜期和提高其经济价值的关键。前人研究认为，病原菌侵染是引起采后橄榄果实腐烂的主要原因，其中果腐病是采后橄榄果实最主要的腐烂症状之一[2,3]。目前，采后橄榄果实果腐病病原菌的鉴定只

收稿日期：2015-10-04

基金项目：福建省科技计划项目（2015N0002）；福建省自然科学基金项目（C94015）；福建农林大学高水平大学建设项目（612014042）

作者简介：陈南泉（1991-），男，硕士生，研究方向：农产品加工及贮藏工程

通讯作者：林河通（1967-），男，博士，教授，博士生导师，研究方向：农产品加工及贮藏工程

停留在传统的常规形态学特征观察上，但是橄榄果实果腐病病原菌的菌丝、子实体和菌落等形态特征容易受培养条件等因素的影响。因此，通过形态学特征观察来鉴定橄榄果实果腐病病原菌不仅难度大，而且无法准确鉴定到种的水平。

前人研究发现，真菌的rDNA-ITS区（核糖体DNA转录间隔区）具有保守性和种间特异性[4]，可用于真菌物种的分类鉴定。徐详彬等[5]利用真菌 rDNA-ITS片段所具有的特性，快速、准确地鉴定出壶瓶枣缩果病的主要病原菌为链格孢菌(*Altemaria alternata*)、青霉菌(*Penicilium expansum*)和芽枝孢菌(*Cladosporium tenuissimum*)；徐成楠等[6]以 ITS-1 和 ITS-4 为引物，利用 PCR（聚合酶链式反应，Polymerase chain reaction）技术对蓝莓炭疽病菌的 rDNA-ITS 特性片段进行扩增，结合系统发育分析方法准确鉴定出蓝莓炭疽病的主要病原菌为胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌。目前国内外尚未见利用真菌 rDNA-ITS 特性片段来鉴定采后橄榄果实果腐病病原菌的研究报道。因此，本文在分离导致采后橄榄果实果腐病病原菌的基础上，结合传统形态鉴定，应用 rDNA-ITS 对橄榄果实果腐病病原菌进行分子鉴定，旨在明确导致采后橄榄果实果腐病的病原菌种类，为进一步控制采后橄榄果实果腐病、延长橄榄果实贮藏保鲜期提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 橄榄果实的采集及病原菌分离

2014 年 10 月至 11 月，从福建省闽侯县白沙镇绿百合农场随机挑选 10 棵橄榄树采集成熟橄榄果实 10 份。从 10 份橄榄果实中各挑选 50 个健康果实，用 75%酒精浸泡 3 min 后再用 1% NaClO 溶液浸泡 10 min，然后用无菌水清洗 5 次，晾干后置入灭菌广口瓶，并置于人工气候箱（28 ℃、RH 95%）贮藏，待果实发病后挑选具有明显果腐病症状的橄榄果实作为供试病果。参考方中达[7]的方法，沿果实病健交界处切取大小约为 1 cm×1 cm 的组织块若干，用 75%酒精浸泡 30 s 后再用 1% NaClO 溶液浸泡 10 min，最后用无菌水清洗 5~7 次。将经表面消毒的组织块移至混有 100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 PDA 培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基）上，28 ℃培养 48 h 后挑取菌落边缘菌丝进行纯化。以取 1 mL 最后一次清洗的无菌水均匀涂布于上述 PDA 培养基上，28 ℃培养 48 h 作为对照组。

1.2 分离菌株致病性测定

遵循科赫氏法则[6]对分离菌株进行致病性测定：将纯化得到的分离频率最高的菌株接于 PDA 上 28 ℃恒温恒湿培养 3 d 后，采用损伤接种（针刺）法将菌饼（φ=5 mm）接种于经 75%酒精表面消毒、无菌水清洗并晾干后的健康果实上，置于塑料托盘内密封包装，28 ℃保湿培养，逐日观察并记录果实发病情况，重复 3 次。以接种无菌 PDA 培养基块作为对照。对回接后具有明显果腐病症状的病果进行致病菌分离、纯化，观察分离得到的菌株与接种菌株的差异性。

1.3 病原菌形态学特性分析

参考 Sajeewa 等[8]、葛起新等[9]和 Jeewon 等[10]的相关记载，根据病原菌在 PDA 培养基上的培养性状、菌落颜色，分生孢子形态、大小、颜色等特征进行形态鉴定。

1.4 病原菌 DNA 提取、rDNA-ITS 区扩增及系统进化分析

病原菌接种于铺有无菌玻璃纸的 PDA 培养基上 28 ℃培养 5 d 后刮取约 2 g 菌丝，参考柳涛等[11]、Lisa 等[12]的方法提取病原菌基因组 DNA。ITS 序列扩增引物为：ITS-1（5'-TCCGTAGGTGAACTGCGG-3'）和 ITS-4（5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）[13]。PCR 反应体系（20 μL）：10×Ex Taq buffer 2.0 μL，2.5 mM dNTP Mix 1.6 μL，引物各 0.8 μL，病菌 DNA(Template) 0.5 μL，5u Ex Taq 0.2 μL，无菌超纯水 14.1 μL。PCR 扩增程序：95 ℃、5 min；95 ℃、30 s，55 ℃、30 s，72 ℃、40 s，35 个循环；72 ℃、10 min。阴性对照为无菌超纯水代替病原菌 DNA。扩增产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测、并送往上海生工生物技术有限公司测序。

将获得的 rDNA-ITS 序列提交到 GenBank，并运用 BLAST 分析方法对病原菌 rDNA-ITS 序列的测序结果进行同源性比较，并从数据库中选取相关物种的 rDNA-ITS 基因序列，然后用 MEGA 6.0[14]软件的邻位加入（neighbor-joining，NJ）法构建系统发育树[15,16]。

2 结果与分析

2.1 病害症状及病原菌分离

橄榄果腐病主要发生在贮藏期间，在发病初期，橄榄果皮表面出现带有微量灰白色菌丝的不规则形状黑褐色小斑点（图 1a）；发病中期菌丝快速生长（图 1b）；在发病后期，果实表面覆盖大量灰白色菌丝体，

而菌丝体的表面常有黑色小粒点状的分生孢子盘，果皮则发生凹陷，并伴有橘黄色晕圈（图 1c）。

参考方中达的方法[7]，对导致采后橄榄果实果腐病的病原菌进行分离，经纯化后得到分离频率最高的菌株（编号为 GL-3）。本文对 GL-3 菌株进行属和种的鉴定。



图 1 病害症状

Fig.1 Disease symptoms

注：a，发病前期；b，发病中期；c，发病后期。

2.2 致病性测定

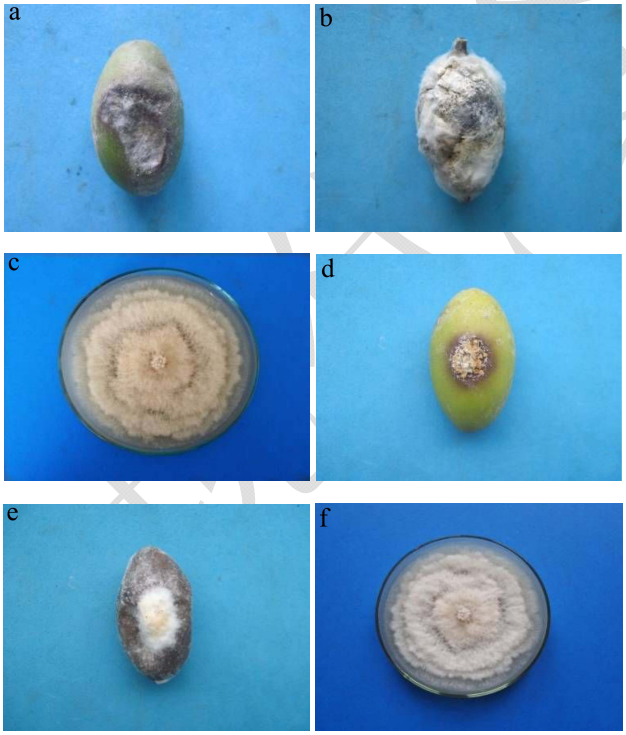


图 2 自然发病症状与人工接种发病症状

Fig.2 Symptoms of natural and artificial inoculation

注：d，人工接种前期；e，人工接种后期；f，人工接种再分离菌落；a，自然发病前期；b，自然发病后期；c，自然发病分离菌落。

接种 GL-3 菌株菌丝块 3 d 后，橄榄果实全部发病。初期接种点颜色变褐色并长有微量白色菌丝（图 2d），之后病斑不断扩大、果皮凹陷、菌丝布满整个果实（图 2e），与自然状态下的发病症状相似（图 2a、图 2b），对接种果实再次分离、纯化得到的菌株菌落形态特征（图 2f）与自然状态下分离得到的菌落形态特征相似（图 2c），据此判断 GL-3 菌株为橄榄果腐病的主导病原菌。

2.3 病原菌培养性状及形态学特征

GL-3 菌株在 PDA 培养基上菌落白色，生长繁茂，偶见花瓣式轮纹（图 3a），在菌丝层表面有黑色的小粒点和霉状物，分别为分生孢子盘和散生的分生孢子，也有黑色团粒状的分生孢子盘埋生于菌丝层下（图 3b）。分生孢子 5 细胞，纺锤形，直或稍弯曲，17.5~24.8 μm×5.1~7.0 μm，中间 3 个细胞近同色，上 2 个细胞颜色较深，第 3 个细胞颜色略浅；顶胞无色，具有 2~3 根顶端附属丝，长 8.5~23.8 μm；尾胞无色，锥形，具有中生式柄 1 根，长 1.3~5.8 μm（图 3c）。结合培养性状和形态学特征，参考 Sajeewa 等[8]、葛起新等[9]和 Jeewon 等[10]的相关记载，初步鉴定 GL-3 菌株为小孢拟盘多毛孢（*Pestalotiopsis microspora*）。

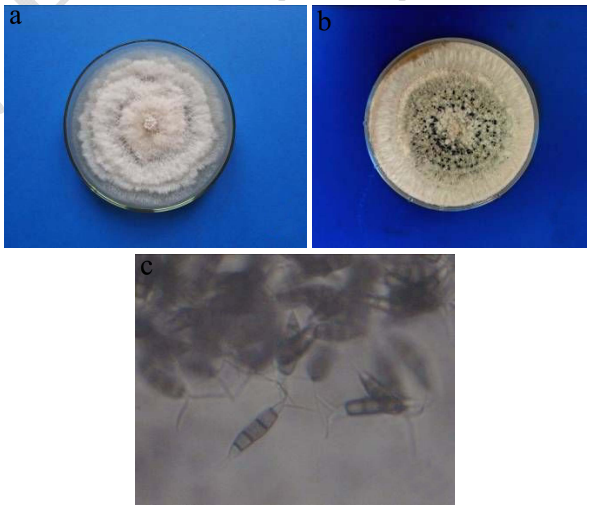


图 3 小孢拟盘多毛孢菌的形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of *Pestalotiopsis microspora*

注：a，病原菌菌落形态；b，病原菌产孢菌落形态；c，病原菌分生孢子。

2.4 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

以 ITS-1 和 ITS-4 为通用引物扩增 GL-3 菌株的 rDNA-ITS 序列，将得到的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，检测结果显示单一条带，无非特异扩增现象，菌株 ITS 序列片段大小为 600 bp 左右(图 4)。

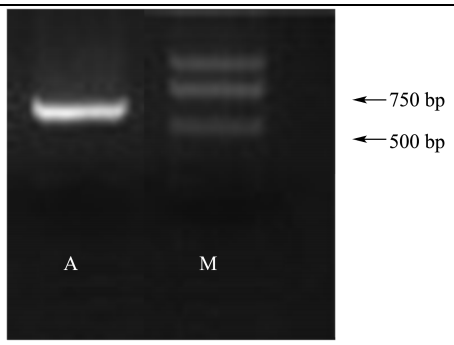


图 4 病原菌 PCR 扩增产物凝胶电泳检测

Fig.4 Gel electrophoresis of pathogen PCR-amplification results

注：A，GL-3；M，Marker dl2000。

```
  1 taggtgaacc  tgcggaggga  tcattataga  gttttctaaa  ctcccaaccc  atgtgaactt
 61 accattgttg  cctcggcaga  agctgctcgg  tgcaccctac  cttggaacgg  cctaccctgt
121 agcgccttac  cctggaacgg  cttaccctgt  aacggctgcc  ggtggactac  caaactcttg
181 ttatttttatt  gtaatctgag  cgtcttattt  taataagtca  aaactttcaa  caacggatct
241 cttggttctg  gcatcgatga  agaacgcagc  gaaatgcgat  aagtaatgtg  aattgcagaa
301 ttcagtgaat  catcgaatct  ttgaacgcac  attgcgccca  ttagtattct  agtgggcatg
361 cctgttcgag  cgtcatttca  accttaagc  ctagcttagt  gttgggagcc  tactgctttt
421 gctagctgta  gctcctgaaa  tacaacggcg  gatctgcgat  atcctctgag  cgtagtaaat
481 ttttatctcg  cttttgactg  gagttgcagc  gtctttggcc  gctaaatccc  ccaatttttta
541 atggttgacc  tcggatcagg  taggaatacc  cgctgaactt  aagcatatca  ataagcggag
```

图 5 GL-3 菌株的 rDNA-ITS 的全序列

Fig.5 The full-length sequence of rDNA-ITS derived from GL-3

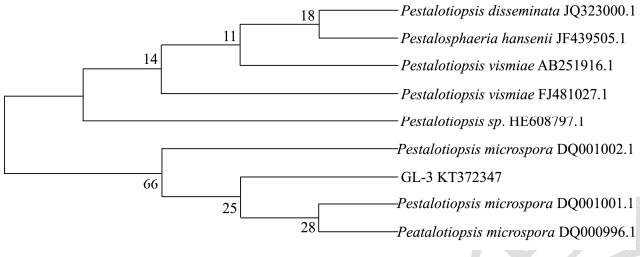


图 6 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树(NJ 法)

Fig.6 Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method based on rDNA-ITS sequences

测序结果（图 5）表明，GL-3 菌株的 rDNA-ITS 序列的 600 个核苷酸序列得到有效扩增。将测序结果提交到 GenBank（登录号为 KT372347），并进行 BLAST 分析，结果表明 GL-3 菌株 ITS 序列与小孢拟盘多毛孢菌 ITS 序列同源性达 99%~100%。选取同源性较高的真菌 ITS 序列与菌株 GL-3 的 ITS 序列进行比较，建立系统发育树（图 6）。由系统发育树可知，GL-3 菌株与 *Pestalotiopsis microspora*（登录号：DQ001001.1，DQ000996.1）菌株属于系统发育树的同一分支，亲缘关系最近，且同源性达 99%以上。

3 结论

3.1 果腐病是采后橄榄果实贮藏期的主要病害，引起橄榄果实大量损失、严重影响其经济价值。本研究通过对贮藏期具有明显果腐病症状的橄榄果实进行病原菌的分离、筛选，结合形态学、分子生物学和系统发育学分析方法鉴定其为小孢拟盘多毛孢菌（*Pestalotiopsis microspora*），与前人张绍升等[2]通过形态学方法鉴定橄榄果腐病主要病原菌为尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum* Schlecht.）的结果不同，我们认为本文通过形态学、分子生物学、系统发育学等方法的鉴定结果更具科学性。国内外研究发现，小孢拟盘多毛孢菌具有寄主多样性的特征，是全世界范围内许多果树及经济作物上的重要致病菌，Lisa 等[12]研究发现小孢拟盘多毛孢菌能够引起番石榴果实发生疮痂病，严重影响其经济价值；张传清等[17]研究发现小孢拟盘多毛孢菌在山核桃果实幼果至果实成熟期间导致果实黑斑病，严重影响山核桃果实的产量和品质；Shen 等[18]在油棕叶片上发现小孢拟盘多毛孢菌是引起油棕叶斑病的主要病原菌。

3.2 小孢拟盘多毛孢菌的准确鉴定对于控制采后橄榄果实果腐病，延长采后橄榄果实的贮藏期具有重要意义。然而，基于形态学特征不能准确鉴定小孢拟盘多毛孢菌，主要原因在于其种间形态学特征较为相似，无法鉴定到种的水平。随着近年来分子生物学及分子系统学分析方法的快速发展，为小孢拟盘多毛孢的准确分类鉴定提供有力依据[12,18]。本研究结合形态学、分子生物学及系统发育学分析方法，明确了采后橄榄果实果腐病的病原菌为小孢拟盘多毛孢（*Pestalotiopsis microspora*）。这一结果为研究采后橄榄果实果腐病的发生发展规律、降低采后橄榄果实的损失量提供了重要的参考依据。

参考文献

[1] 陈南泉,刘译蔓,林河通,等.橄榄果实采后病害和保鲜技术研究进展[J].包装与食品机械,2015,2(33):49-53
CHEN Nan-quan, LIU Yi-man, LIN He-tong, et al. Advances in post-harvest disease and storage technology of chinese olive fruit [J]. Packaging and Food Machinery, 2015, 2(33): 49-53

[2] 张绍升,肖荣凤,林乃铨,等.福建橄榄真菌性病害鉴定[J].福建农林大学学报:自然科学版,2002,2(31):168-173
ZHANG Shao-sheng, XIAO Rong-feng, LIN Nai-quan, et al. Diagnosis of Chinese olive fungal diseases in Fujian, China [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2002, 2(31): 168-173

[3] 戚佩坤.广东果树真菌病害志[M].北京:中国农业出版社,2000
QI Pei-kun. Fungorum disease of fruit tree, Guangdong [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000

[4] Hibbett D S. Ribosomal RNA and fungal systematics [J].

Transactions of the Mycological Society of Japan, 1992, 33: 533-556

[5] 徐祥彬,赖童飞,景云飞,等.山西壶瓶枣缩果病病原菌分离与鉴定[J].植物病理学报,2009,39(3):225-230
XU Xiang-bin, LAI Tong-fei, JING Yun-fei, et al. Isolation and identification of the pathogens of jujube (*Zizyphus jujuba* cv. Huping) fruit shrink disease in Shanxi [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(3): 225-230

[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
XU Cheng-nan, WANG Ya-nan, HU Tong-le, et al. Identification and pathogenicity of pathogen causing *Anthracnose* on *Vaccinium* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(20): 3992-3998

[7] 方中达.植病研究方法(第三版)[M].北京:中国农业出版社,1998
FANG Zhong-da. Methodology for plant pathology (Third edition) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998

[8] Sajeewa N M, Liang D G, Ekachai C. *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity [J]. Fugal Diversity, 2011, 50(1): 167-187

[9] 葛起新,陈育新,徐同.中国真菌志-拟盘多毛孢属[M].北京:科学出版社,2009
GE Qi-xin, CHEN Yu-xin, XU Tong. Flora *Fungorum Sinicorum-Pestalotiopsis* [M]. Beijing: Science Press, 2009

[10] Jeewon R, Liew C, Hyde K. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and *Allied Genera* inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters [J]. Molecular Phylogenetic and Evolution, 2002, 25(3): 378-392

[11] 柳涛,童军茂,马伟荣,等.哈密瓜采后冷藏中主导病原菌的分离鉴定[J].现代食品科技,2013,8(29):2030-2034
LIU Tao, TONG Jun-mao, MA Wei-rong, et al. Separation and identification of main pathogen in Hami melon during cold storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 8(29): 2030-2034

[12] Lisa M K, Maile E V, Francis T Z. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium* Guajava, in Hawaii [J]. Plant Disease, 2006, 90(1): 17-23

[13] Samad J. Molecular phylogeny of endophytic isolates of *Ampelomyces* from Iran based on rDNA-ITS sequences [J]. Molecular Biology Reports, 2015, 1(42): 149-157

[14] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 3(12): 2725-2729

[15] 刘小莉,周剑忠,王英,等.虫草属真菌的 ITS 序列分析和系统发育研究[J].现代食品科技,2009,5(25):478-480
LUI Xiao-li, ZHOU Jian-zhong, WANG Ying, et al. ITS sequence analysis and phylogentic study of *Cordyceps* spp. [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 5(25): 478-480

[16] 罗惠波,杨晓东,杨跃寰,等.浓香型大曲中可培养真菌的分离鉴定与系统发育学分析[J].现代食品科技,2013,9(29):2047-2052
LUO Hui-bo, YANG Xiao-dong, YANG Yue-huan, et al. Isolation, indentification and phylogenetic analysis of culturable fungi in Luzhou-flavor Daqu [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 9(29): 2047-2052

[17] 张传清,徐志宏,孙品雷,等.新病害-山核桃果实黑斑病病原菌的鉴定[J].植物保护,2010,36(4):160-162
ZHANG Chuan-qing, XU Zhi-hong, SUN Pin-lei, et al. Identification of the pathogen causing a new disease-nut black spot on *Carya cathayensis* [J]. Plant Protection, 2010, 36(4):160-162

[18] Shen H F, Zhang J X, Lin B R. First report of *Pestalotiopsis microspora* causing leaf spot of oil palm (*Elaeis guineensis*) in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(10): 1429