

# 哈密瓜采后冷藏中主要病原菌的分离鉴定

柳涛, 童军茂, 马伟荣, 王坚, 单春会

(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

**摘要:** 通过对新疆哈密瓜采后冷藏过程中自然发病的果实进行病原菌的分离筛选, 明确引起采后哈密瓜腐烂的主要病原菌的种类。试验采用传统纯培养法、稀释平板涂布法和真菌基因组 DNA 提取试剂盒法对主要病原菌进行分离筛选及 DNA 的提取。通过生理生化实验对主要病原菌的生理学特性进行初步研究, 并对病原菌的 26S rRNA 基因的序列进行同源性分析。以 NL1 和 NL4 为通用引物进行致病菌的分离鉴定, 分离筛选出 5 株主要病原菌, 最终筛选出主要病原菌为镰孢属(*Fusarium*)、葡萄穗霉属(*Stachybotrys*)、青霉属(*Penicillium*)、赤霉属(*Gibberella*)。其中 BJ-M 菌株和 BJ-M1 菌株均属于镰孢属; BJ-M2 菌株属于赤霉属; BJ-M3 菌株属于葡萄穗霉属; BJ-Q 菌株属于青霉属。本研究通过对主要病原菌的分离鉴定为延长哈密瓜的贮藏保鲜期提供理论依据和技术指导。

**关键词:** 哈密瓜; 病原菌; 分离筛选; 26SrDNA

文章编号: 1673-9078(2013)8-2030-2034

## Separation and Identification of Main Pathogen in Hami Melon during Cold Storage

LIU Tao, TONG Jun-mao, MA Wei-rong, WANG Jian, SHAN Chun-hui

(Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** Pathogenic bacteria which may cause the rot of melon was separated and identified from rotting postharvest Xinjiang Hami melon during cold storage, by using traditional pure culture method, dilution spread plate method and fungal genomic DNA isolation Kit method. The physiological and biochemical properties of the strains, as well as their 26s rRNA gene sequence, were analyzed. Taking NL1 and NL4 as the universal primers, 5 strains of pathogenic bacteria were separated and confirmed as *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Penicillium* and *Gibberella*. The BJ-M and BJ-M1 strains belonged to the genus *Fusarium* and BJ-M2 strains belonged to *Gibberella*. BJ-M3 strains belonged to *Stachybotry* and BJ-Q strains belong to the genus *Penicillium*. This research may provide theoretical basis for storage period of Hami Melon by investigation of the pathogenic bacteria.

**Key words:** melon; pathogen; screening; 26SrDNA

哈密瓜是新疆特色果蔬资源, 味甜色美, 具有极佳的品质, 深受国内外广大消费者的青睐。然而, 多年来哈密瓜采后腐烂一直是制约新疆哈密瓜生产发展的最大瓶颈, 病原菌的侵染是造成哈密瓜在贮藏过程中腐烂的主要原因。研究发现, 造成哈密瓜采后贮藏期间腐烂的主要病原菌包括根霉属(*Rhizopus*); 镰孢属(*Fusarium*); 链格孢属(*Alternaria*); 青霉属(*Penicillium*)等。青霉菌(*Penicillium*)和镰刀菌(*Fusarium sp*)是引起哈密瓜在低温贮藏或冷藏运输过程中导致其腐烂的优势病原菌。据张辉等<sup>[1]</sup>、赵劫<sup>[2]</sup>的报道, 哈密瓜在整个生长发育过程中均可受到病原菌潜伏侵染, 网纹期为

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 石河子大学自然科学基金(4002901)

作者简介: 柳涛(1986-), 男, 硕士, 从事果蔬贮藏与保鲜的科研工作

通讯作者: 童军茂(1963-), 男, 教授, 硕士, 从事果蔬贮藏与保鲜的科研与教学工作

病原菌侵染的重要时期。迄今为止, 有关对哈密瓜致病性的研究报道甚少, 且大部分对哈密瓜病原菌的研究均停留在形态学观察等初级研究阶段, 通过对主要病原菌的研究, 对探究采后哈密瓜的致病机理有着非常重要的意义。本试验分离和筛选出了引起哈密瓜采后腐烂的 5 株主要致病菌, 在形态学特征、生理生化特征的基础上, 进行生物学鉴定, 将引起采后哈密瓜腐烂的致病菌鉴定到属和种, 为哈密瓜的长期贮藏保鲜提供参考依据。

病原真菌 DNA 的提取方法众多, 如 CTAB 法、SDS 法、氯化苄法和 Biospin 真菌提取试剂盒法等, 且不同种类真菌通常采用的引物类型也不同。本试验采用 Biospin 真菌提取试剂盒法, 以 NL1 和 NL4 为通用引物进行致病菌的鉴定。不同的方法和条件都有各自的优势和不足, 研究发现, 含有相同序列的真菌引物因序列的不同而分属不同的种, 反之, 引物序列相

同的真菌也不一定属于同一个种, 如何能快速准确的得到病原真菌的基因序列, 有待于进一步的深入研究。通过研究导致哈密瓜采后腐烂的优势致病菌为延长哈密瓜的贮藏保鲜期奠定一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原料

哈密瓜采摘于新疆吐鲁番地区, 冷藏条件下放置, 备用。

培养基采用 PDA 培养基<sup>[3]</sup>和改良的 Czaper 液体培养基<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.2 试剂与仪器

Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒, 杭州博日科技有限公司; 蜗牛酶 (Snailase)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、山梨醇、琼脂糖、乙醇、柠檬酸钠, 其余试剂, 国产分析纯。

数显不锈钢电热培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 生化培养箱, 上海博迅医疗设备厂; 电泳仪, 北京市六一仪器厂; PCR 仪, 电热恒温干燥箱上海跃进医疗器械厂; 高速冷冻离心机为 Thermo 公司 Fresco 21 型; 凝胶成像系统, BioRad 公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术公司等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 冷藏条件下哈密瓜主要病原菌的分离筛选及保藏

采用稀释平板涂布法对冷藏条件下腐烂的哈密瓜组织进行分离筛选, 将腐烂的哈密瓜组织用灭菌的生理盐水做 10 倍梯度的稀释, 混合均匀后, 用移液枪分别吸取  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  七个稀释梯度的样品稀释液各 0.2 mL 涂布于 PDA 培养基中, 每个稀释梯度涂布 3 个平板, 设 3 个重复, 恒温培养箱中 28 °C 的条件下培养 5~7 d。待长出菌落后, 转接划线培养 3~5 次, 直至长出单一稳定的菌落, 从而达到对哈密瓜病原菌的初步分离筛选。病原菌的保藏过程是液体纯培养物离心后, 加入一定量的马铃薯培养液悬浮, 再加入一定量 30% 的灭菌甘油冷冻保存于实验室 -80 °C 的冰箱中, 备用。

#### 1.2.2 病原菌菌落形态的鉴定

菌落形态: 观察分离培养基平板上菌落的形态 (形状、色泽、大小、边缘、表面特性等)。菌落特征的形态描述参照《真菌鉴定手册》<sup>[5]</sup>。

$$\text{生长速率 (mm/d)} = \frac{\text{培养7天时菌落直径 (mm)} - 5(\text{mm})}{\text{培养天数 (mm)}}$$

#### 1.2.3 病原菌最适生长温度的测定

采用平板培养-菌落直径测量法, 将菌种接种在改良的察氏培养基平板上培养 5 d 后, 用直径 0.5 cm 的打孔器在超净工作台上分别打取直径均匀一致的菌丝块, 移入新的察氏培养基培养平板中央 (直径 10 cm), 每个培养平板中央放 1 块菌丝, 接种后分别放在 5 °C、10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 七个温度梯度的电热恒温培养箱中培养。培养 5 d 后, 分别用十字交叉法测量各温度处理下的菌落直径, 菌落的生长速率计算公式为:

#### 1.2.4 病原菌最适 pH 值的测定

将菌种接种在察氏培养基平板上培养 7 d 后, 在超净工作台上, 用直径 0.5 cm 的打孔器分别打取直径均匀一致的菌丝块, 分别接种于 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 的 7 个梯度的察氏培养基培养平板中央 (直径 10 cm), 每个培养平板放 1 块菌丝, 接种后放在 25 °C 的电热恒温培养箱中。培养 7 d 后, 分别用十字交叉法测量各温度处理下的菌落直径。

#### 1.2.5 病原菌 DNA 的提取

病原菌 DNA 的提取采用 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒法。

#### 1.2.6 PCR 扩增和系统进化分析

基因通用引物: NL1: (正向引物 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'), NL4: (反向引物 5'-GGTCCGTGTTTC AAGACGG-3')。应用真菌基因通用引物 26S rDNA 进行 PCR 扩增<sup>[6]</sup>, PCR 反应程序为: 预变性 94 °C 4 min, 变性 94 °C 1 min, 退火 54 °C 1 min, 延伸 72 °C 1 min, 35 个循环。将扩增后的样品产物置于 4 °C 的冰箱中, 保存备用, 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 照相保存。PCR 产物经纯化后, 采用自动测序仪直接测序。测序结果用 GenBank<sup>[7]</sup>数据库进行同源序列在线进行搜索 (BLAST), 从数据库获得相关属和种的基因序列, 建立系统发育树。用 Clustal X1.83 软件将序列进行排列<sup>[8]</sup>, 用 MEGA v.4.0<sup>[9]</sup>软件中的 neighbor-joining 分析法构建系统发育树, 采用 Bootstraps 法进行检验, 重复次数为 1000。

#### 1.2.7 数据统计分析

实验结果数据采用 Origin8.0 软件作图和 SPSS 统计软件分析, 数据均进行三次重复, 采用新复极差分析法进行实验, 以  $P < 0.05$  统计学意义即有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 哈密瓜主要病原菌的分离筛选

以新疆哈密瓜为原料, 分别选取贮藏过程中发病的不同腐烂类型的哈密瓜为研究对象, 经过分离筛选及纯化, 最终得到 5 株引起哈密瓜腐烂的主要病原菌, 分别编号为 BJ-Q、BJ-M、BJ-M1、BJ-M2、BJ-M3。

### 2.2 病原菌菌落形态的鉴定

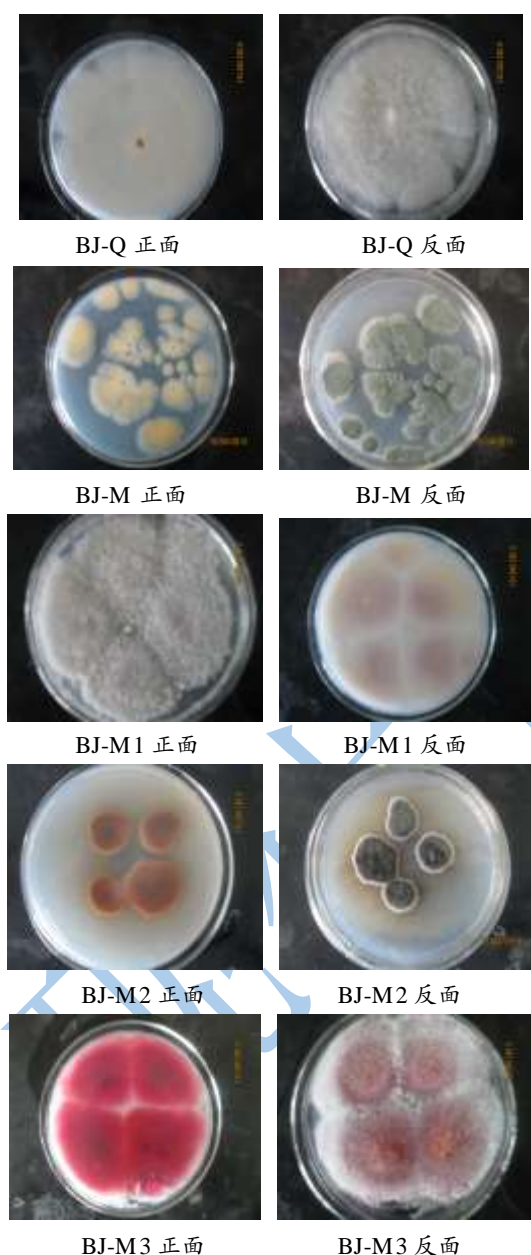


图 1 西瓜中分离所得病原菌菌落形态

Fig.1 Colonial morphology of the pathogenic strains separated from watermelon

将 5 株病原菌在 25 ℃ 条件下培养 3 d 后, PDA 培养基上形成颜色和形态不同的菌落形态:

BJ-Q 菌株: 气生菌丝为白色, 边缘不规则, 菌落中央隆起, 在培养基中产生大量粉末状菌丝, 菌丝在生长过程中产生色素使菌丝呈现墨绿色。

BJ-M 菌株: 气生菌丝为白色, 菌丝生长迅速, 中央隆起, 边缘不规则, 在培养基中产生大量菌丝呈棉絮状, 菌丝在培养基中生长呈现白色。

BJ-M1 菌株: 气生菌丝为白色, 中央隆起, 边缘不规则, 在培养基中产生大量菌丝呈短绒状, 菌丝在培养基中生长呈现灰黑色。

BJ-M2 菌株: 气生菌丝为白色, 菌丝生长迅速, 中央隆起, 在培养基中产生大量菌丝呈棉絮状, 菌丝在培养基中生长呈现白色。

BJ-M3 菌株: 气生菌丝为白色, 菌丝生长迅速, 中央隆起, 边缘不规则, 在培养基中产生大量菌丝呈棉絮状, 菌丝在培养基中生长呈现白色。

### 2.3 病原菌最适生长温度和 PH 值的确定

#### 2.3.1 最适生长温度的确定

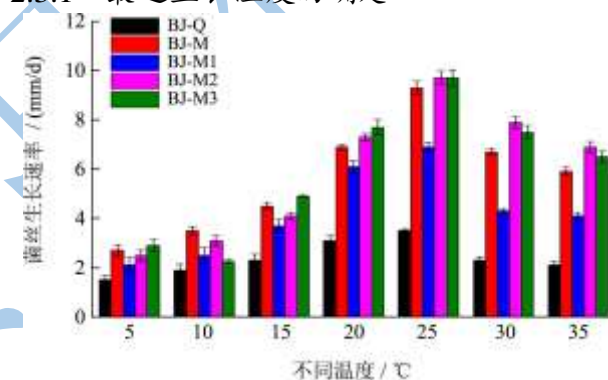


图 2 不同温度条件下菌丝生长速率

Fig.2 The mycelium growth rate at different temperatures

由图 2 可知, 5 株哈密瓜主要病原菌在培养 5 d 后, 观察菌丝生长情况, 每天记录菌落直径的大小, 5 d 后计算菌丝的生长速率, 结果表明: 5 株菌均在 25 ℃ 时菌落的生长速率最大, 所以 25 ℃ 为哈密瓜主要病原菌的最适生长温度, 这与霉菌的最适生长温度较接近。

#### 2.3.2 最适 pH 值的确定

由图 3 分析可知, 5 株主要病原菌在培养 7 d 后, 记录菌落直径的大小, 计算菌丝的生长速率, 试验结果表明: 当 pH 值为 6 时 BJ-Q 的菌丝生长速率最大, pH 值为 7 时 BJ-M2 菌株的菌丝生长速率较大, BJ-M、BJ-M1 和 BJ-M3 的菌丝生长速率在 pH 为 8 时达到最大, 所以 BJ-Q 菌株的最适生长 pH 值为 6, BJ-M2 菌株的最适生长 pH 值为 7, 而 BJ-M、BJ-M1、BJ-M3 三株菌的最适生长 pH 值为 8, 这与霉菌的最适生长 pH 值相近。

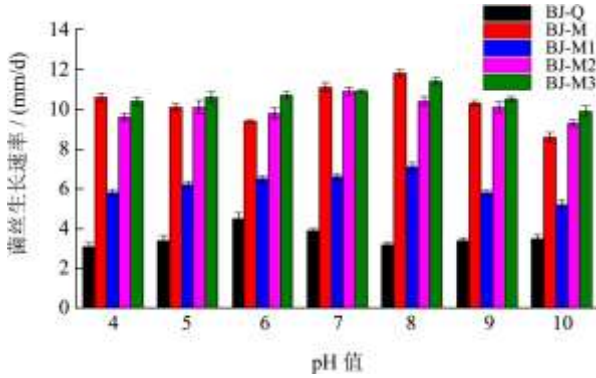


图3 不同PH值条件下菌丝生长速率

Fig.3 The mycelium growth rate at different pHs

### 2.4 基于部分 26S rRNA 基因扩增和系统发育

#### 分析

以 NLI 和 NL4 为通用引物特异扩增霉菌的 26S rDNA, 将得到的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 最后于紫外凝胶成像系统上观察并拍照, 电泳结果显示 PCR 扩增产物均为单一的条带, 无非特异扩增现象, 凝胶电泳检测结果如图 4 所示。根据 Marker 分子量大小得到 5 株病原菌的序列片段大小长度均为 600 bp 左右, 与相关霉菌的基因序列片段大小一致。

将从自然腐烂的哈密瓜中分离筛选出的主要病原菌菌株的部分 26S rRNA 基因序列提交 NCBI 检索系统, 通过 BLAST 工具在 GenBank 数据库中基因序列进行同源性比对, 以病原菌同源性最高的序列构建系统发育树 (如图 4)。26S rDNA 区域序列比较分析构建了主要病原菌菌株系统发育树。由系统发育树可以看出 BJ-M 菌株与 *Fusarium subglutinans* 亲缘关系最近, 基因序列同源性均为 100%, 说明此种霉菌族群的系统发育关系非常接近, 结合 BJ-M 菌株的形态学特征、生长特征和 26S rDNA 序列分析, 将该菌株鉴定为镰孢属; BJ-M1 菌株与 *Fusarium tricinctum* 亲缘关系最近, 序列同源性均在 99% 以上, 形成一个簇群, 结合 BJ-M1 菌株的形态学特征、生长特征和 26S rDNA 序列分析, 将该菌鉴定为镰孢属; BJ-M2 菌株与 *Gibberella moniliformis* 亲缘关系最近, 序列同源性均在 99% 以上, 形成一个簇群, 结合 BJ-M2 菌株的形态学特征、生长特征和 26S rDNA 序列分析, 将该菌鉴定为赤霉属; BJ-M3 菌株与 *Stachybotrys chartarum* 的亲缘关系达到 97%, 结合 BJ-M3 菌株的形态学特征、生长特征和 26S rDNA 序列分析, 说明 BJ-M3 菌株属于葡萄穗霉属。BJ-Q 菌株与 *Penicillium italicum* 的亲缘关系达到 97%, 结合 BJ-Q 菌株的形态学特征、生长特征、26S rDNA 序列分析, 说明 BJ-Q 菌株属于

青霉属。

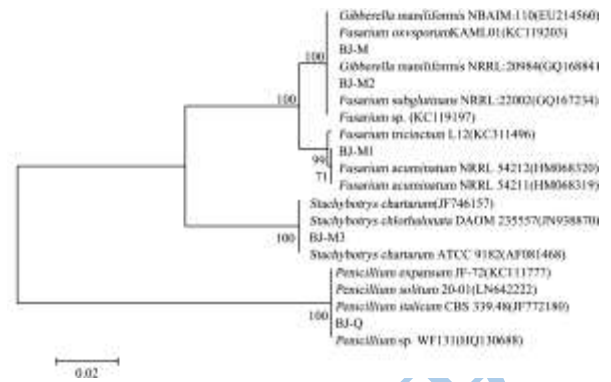


图4 基于 26S rDNA 序列的 5 株霉菌菌株的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of the 5 yeasts strains based on partial 26S rDNA sequences

电泳图如图 5:

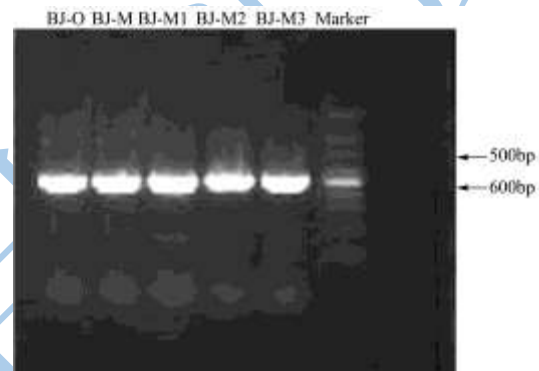


图5 病原菌 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.5 pathogen PCR amplification result agarose gel electrophoresis of pathogen

### 3 结论

以新疆特色果蔬资源哈密瓜为主要原料, 对冷藏过程中发病的哈密瓜进行分离筛选及鉴定, 得出以下结论:

3.1 分离筛选的 5 株主要病原, 通过菌落形态, 生理生化特性及基因序列的同源性比对, 最终确定了 BJ-M 菌株和 BJ-M1 菌株属于镰孢属; BJ-M2 菌株属于赤霉属; BJ-M3 菌株属于葡萄穗霉属; BJ-Q 菌株属于青霉属。

3.2 分离筛选出的 5 种菌株是引起哈密瓜采后冷藏过程中导致其腐烂的优势病原菌, 而青霉属是冷藏条件下引起哈密瓜采后腐烂的最主要因素。

3.3 病原菌鉴定常采用传统方法, 如根据菌落的形态学、生理生化特性和一般的生理学实验来进行分离鉴定, 这使得哈密瓜采后主要病原菌的研究只停留在初级阶段。随着分子生物学的迅猛发展, 对哈密瓜主要病原菌进行更深入的研究将成为可能, 对延长哈密瓜的贮藏保鲜期具有十分重要的意义。

## 参考文献

- [1] 张辉,李学文.新疆哈密瓜果实潜伏侵染真菌种类研究[J].新疆农业科学,2002,3:127-130  
Zhang H, Li X W. Xinjiang hami melon fruit latent infection of fungi species research [J]. XINJIANG AGRICULTURAL SCIENCES, 2002, 3: 127- 130
- [2] 赵劫.厚皮甜瓜主要采后病害的潜伏侵染及生物学控制[D].兰州:甘肃农业大学,2003  
Zhao jie. Thick skin melon latent infection and biological control of postharvest diseases of major [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2003
- [3] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995  
Chen T S. The manufacture and application of microbial culture medium [M]. Beijing:China agriculture press, 1995
- [4] 李宝聚,陈立芹,孟伟军,等.温湿度调控对番茄灰霉病菌产生的细胞壁降解酶的影响[J].植物病理学报,2003,33(3): 209-212  
Li B J. Chen L Q, Meng W J, et al. Temperature and humidity control of bacteria cell wall degradation enzymes of tomato grey mould was grasped [J]. Plant Pathology Report, 2003, 33(3): 209-212
- [5] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001  
Dong X Z, Cai M Y. Common bacteria manual system identification [M]. Beijing: Science press, 2001
- [6] Deming J W, Huston A L. An oceanographic perspective on microbial life at low temperature with implications for polar ecology, biotechnology and astrobiology [M]. In: Seckbach J. (Ed). Cellular origins and life in Extreme Habitats, Dordrecht, Kluwer Publishers, 2000
- [7] Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, et al. GenBank [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 12- 17
- [8] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 25: 4876-4882
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology Evolution, 2007, 24: 1596-1599