

香蕉采后果实炭疽病菌的鉴定及其生物学特性

张德涛 高艳丽 黄永辉 杨媚 周而勋

华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 采用组织分离法从表现炭疽病症状的采后香蕉果实中分离到4个炭疽病菌菌株。通过观察这4个菌株的菌丝生长速率、孢子萌发、附着胞形成和致病性,发现4个菌株的菌丝生长速率无显著差异,但菌株X4的孢子萌发率、附着胞形成率和致病力明显高于其他3个菌株。采用传统的形态学鉴定方法,并结合ITS序列分析技术,鉴定菌株X4为芭蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)。生物学特性的观察结果表明:菌株X4菌丝生长温度范围是10~35℃,最适生长温度是28℃,其分生孢子萌发和附着胞形成的适宜温度范围是25~30℃,分生孢子在28℃萌发率最高;光照对菌丝生长速率、分生孢子和附着胞形成无显著影响;适宜菌丝生长和孢子萌发的pH值为5.0~8.0,最适pH值为6.0;菌株的菌丝和分生孢子的致死温度均为50℃/10 min。

关键词 香蕉;采后病害;果实炭疽病;病原菌鉴定;生物学特性

中图分类号 S 432.4⁺4; S 436.67 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0438-05

香蕉采后果实腐烂是制约我国香蕉产业发展的重要因素。由炭疽菌(*Colletotrichum* spp.)引起的香蕉果实炭疽病,以及由镰孢菌(*Fusarium* sp.)和轮枝菌(*Verticillium* sp.)等真菌复合侵染引起的冠腐病又是导致香蕉采后果实腐烂的重要原因^[1]。香蕉炭疽病菌具有潜伏侵染的特性,在幼果期即可侵入,以附着胞及侵染丝形式潜伏于果皮中^[2],在香蕉果实采后贮藏、保鲜和销售过程中才表现出症状,引起香蕉果实果皮褐变,果肉逐渐腐烂,严重影响果品价值。目前多采用杀菌剂浸果防治,以延长货架期^[3]。随着人们环保意识的觉醒和病原菌抗药性的出现,生物防治已经成为控制香蕉果实采后病害的研究热点。但是,无论是化学防治还是生物防治,都是建立在对病原菌的准确鉴定和对病原菌生物学特性充分了解的基础上的。由于炭疽菌的形态变异较大,近似种之间的分类特征差异微小,因此对引起香蕉炭疽病的炭疽菌种类一直存在争议。

目前,国内外学者认为引起香蕉果实炭疽病的病原菌主要有芭蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)^[4-5]。Alzaemey等^[6]研究了pH值、温度、水和CO₂浓度对香蕉炭疽病菌(*C. musae*)孢子萌发和菌丝生长的影响。刘

秀娟等^[7]、杨叶等^[8]和胡美姣等^[9]曾对采自我国海南、广东、广西和云南的香蕉炭疽菌的致病性、培养形状和生物学特性进行了研究。笔者采用传统的真菌形态学鉴定方法,并结合分子生物学技术,对从广州香蕉果实上分离得到的香蕉炭疽病菌X4菌株进行了种类鉴定,并对该菌株的一些生物学特性进行了观察,旨在为香蕉采后果实炭疽病的综合防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离和纯化

采用组织分离法^[10],从表现典型炭疽病症状的香蕉果实皮部病斑病健交界处分离病原菌,在水琼脂上进行单孢分离后,将单孢子移到PDA平板上培养5~6 d,观察菌落形态并于4℃保存备用。

1.2 菌株致病性的测定

采用针刺接种法,对分离到的香蕉果实炭疽病菌的4个菌株进行致病性测定。将直径5 mm的菌丝块接种于外表健康基本完全成熟的香蕉果实上,同时以接种空白培养基为对照,每处理重复3次。接种处理完后放置于28℃保湿培养,3 d后观察其发病情况。

收稿日期: 2010-11-18

基金项目: 国家现代农业(香蕉)产业技术体系建设专项(nycytx-33-06)

张德涛, 硕士研究生。研究方向: 植物病原真菌学。E-mail: detaozhang1985@gmail.com

通讯作者: 周而勋, 博士, 教授。研究方向: 植物病原真菌学和分子植物病理学。E-mail: exzhou@scau.edu.cn

1.3 菌丝生长速率、孢子萌发和附着胞形成的观察

对分离到的香蕉果实炭疽病菌4个菌株的菌丝生长速率、孢子萌发和附着胞形成情况进行比较。将培养4 d的直径5 mm的菌丝块放于直径9 cm的PDA平板中央,每个菌株重复3次,在28℃下培养,待生长最快的菌株长满平板时,用十字交叉法测量菌落直径。

将配制好的孢子悬浮液滴在载玻片上,于28℃下保湿培养,每个菌株重复3次,10 h后观察孢子萌发、附着胞形成情况。孢子萌发的标准为芽管长度 $\geq 1/2$ 孢子长度。按以下方法计算萌发率和附着胞形成率:

$$\text{孢子萌发率} = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{检查总孢子数}} \times 100\%$$

$$\text{附着胞形成率} = \frac{\text{形成附着胞数}}{\text{萌发孢子数}} \times 100\%$$

1.4 菌株的鉴定

通过试验观察,发现菌株X4在致病力、孢子萌发率和附着胞形成率等方面明显高于其他3个菌株,因此选择菌株X4进行形态学和分子生物学鉴定。

1) 形态学鉴定。将菌株X4接种于PDA平板上,25℃下培养,观察该菌株在培养基平板上的菌落形态、生长情况、颜色以及孢子形状、大小等。

2) 分子生物学鉴定。将菌株X4接种到PDB培养液,在25℃、200 r/min的条件下振荡培养3 d后收集菌丝体,采用DNA提取试剂盒(美国OMEGA公司)提取其基因组DNA,置于-20℃冰箱保存备用。采用真核生物rDNA的通用引物ITS5和ITS4对rDNA的2个内转录间区和5.8S区段进行PCR扩增^[11]。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,用DNA凝胶回收试剂盒U-gene Gel Extraction Kit II纯化目的片段,送交北京奥科基因公司测序。将测定的ITS序列递交GenBank获得登录号(HQ607779),并用BLAST软件与GenBank中已知的ITS序列进行同源性比对,在分子水平上确定香蕉炭疽病菌菌株X4的分类地位。

1.5 菌株X4的生物学特性观察

1) 温度对菌丝生长和孢子萌发的影响。将直径5 mm的炭疽病菌菌丝块接种于PDA平板中央,分别置于10、15、20、25、28、30、35、40℃等8个不同温度下培养,4 d后测量菌落直径;将适当浓度的孢子悬浮液滴在载玻片上,然后将其放入垫有湿滤纸的培养皿内,分别置于上述温度下培养,10 h后取出

盖玻片在显微镜下检查孢子萌发和附着胞形成情况。试验每处理重复3次。

2) 光照对菌丝生长和孢子萌发的影响。将涂有孢子悬浮液的载玻片分别置于完全黑暗、光暗交替(12 h)和完全光照3个条件下,28℃下培养,10 h后镜检孢子萌发情况;将炭疽病菌菌丝块接种于PDA平板中央,分别置于上述3个条件下,28℃下培养4 d后测量菌落直径。试验每处理重复3次。

3) pH值对菌丝生长和孢子萌发的影响。用磷酸缓冲液将PDA培养基的pH值调成3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0等8个梯度,将病菌菌丝块接种于不同pH值的PDA平板上,28℃培养4 d后测量菌落直径,并用0.1 mol/L HCl和0.1 mol/L NaOH将灭菌水调节成3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0等10个不同pH值的水溶液,用该水溶液配孢子悬浮液(50个/视野),并滴于载玻片上,于28℃保湿培养10 h后镜检孢子萌发情况。试验每处理重复3次。

4) 菌丝和孢子致死温度的测定。分别设置35、40、45、50、55、60、65、70℃等8个不同温度。在灭菌试管中加2 mL灭菌水,在水浴锅中预热到所需温度后放入直径5 mm的炭疽病菌菌丝块,水浴10 min后放在水中冷却,然后取出菌丝块在PDA平板上于28℃倒置培养4 d,以不经处理的菌丝块为对照,以菌丝不生长的处理温度为致死温度。孢子悬浮液经不同温度水浴处理10 min后取40 μL滴在载玻片上,28℃保湿培养14 h后镜检孢子萌发情况。统计萌发率和附着胞形成率,以孢子不萌发的处理温度为孢子致死温度。试验每处理重复3次。

5) 病菌在灭菌水中的萌发。取20 μL孢子悬浮液分别与等量(20 μL)的灭菌水混合,滴在盖玻片上,分别于2、4、6、8、10、12、14、16、18 h后镜检其萌发和附着胞形成情况。试验每处理重复3次。

2 结果与分析

2.1 病菌的分离纯化和致病性

从香蕉果实上分离得到4个培养性状不同的香蕉炭疽病菌菌株(分别记为X1、X2、X3、X4)。以针刺法在香蕉果实上分别接种上述4个菌株后均能造成香蕉果实发病。接种3 d后,菌株X1、X2、X3、X4造成的病斑平均直径分别为2.72、0.78、2.82、3.03 cm,从这些病斑上都能够再分离到与原接种菌株相同的炭疽病菌菌株。依据柯赫氏法则,说明

这4个菌株都是引起香蕉果实炭疽病的病原菌。

接种试验结果表明:病斑初期圆形、淡褐色、水浸状,随后病斑迅速扩大成同心轮纹状凹陷,病斑

颜色加深;后期在病部可见橘红色粘孢团,其中菌株X4引起的病斑最大,致病力最强,发病后期病部产生大量橘红色粘孢团(图1)。



A. CK 为不接种对照,1~3 均为 X4 菌株接种 CK non-inoculation control, 1-3 inoculated with isolate X4;
B. 后期产生橘红色粘孢团 Production of orange red sticky conidial masses on a mature lesion.

图1 菌株 X4 在香蕉果实上人工接种的发病症状

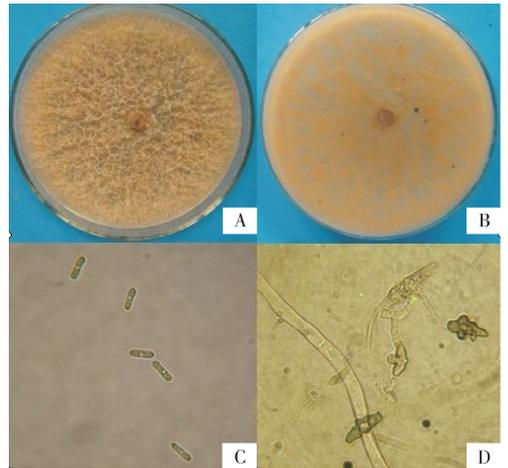
Fig. 1 Symptoms of banana fruit artificially inoculated with isolate X4

2.2 菌丝生长和孢子萌发

测定结果表明,分离得到的4个菌株菌丝生长速率无明显差异,培养4d即可长满直径9cm的平板,但分生孢子萌发和附着胞形成有很大差别。菌株X1和X3分生孢子的萌发较少,孢子萌发率分别为3.15%和1.67%,不形成附着胞;菌株X2分生孢子的萌发率为3.26%,但部分萌发孢子可以形成附着胞;菌株X4分生孢子的萌发率最高(48.21%),萌发后的孢子基本上都能形成附着胞。测定结果表明菌株X4的致病力也是最强的,因此选择菌株X4作为继续研究的供试菌株。

2.3 病菌 X4 菌株的鉴定

1) 菌株 X4 的形态学鉴定。在 PDA 培养基上,菌落圆形,边缘整齐平坦,气生菌丝絮状或绒毛状,一般培养 4 d 即可长满整个平板(图 2-A)。在菌丝生长过程中会产生大量的分生孢子,使得菌落呈现橘红色,培养后期产生橘红色粘孢团,培养基内散生小黑点(图 2-B)。在显微镜下观察,分生孢子梗为无色,单胞,圆筒形或棒形,较长,大约为分生孢子长度的 2~3 倍;分生孢子为圆柱形或圆筒形(图 2-C),单胞,无色,两头较大,中间稍凹陷,有时有 1~2 个油球,(12~18.5) $\mu\text{m} \times$ (4.5~5.5) μm ;附着胞扁球形,棒形或不规则形,褐色(图 2-D),(10~17.5) $\mu\text{m} \times$ (4.5~7.0) μm 。菌株 X4 的分生孢子及附着胞的形态特征和大小与张中义等^[16]对芭蕉炭疽菌(*C. musae*)的描述相符。



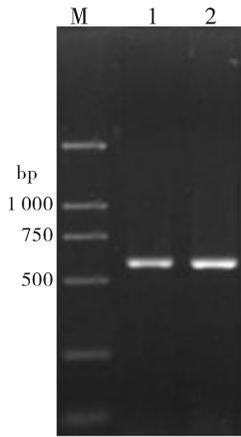
A, B. 菌落形态 Colony morphology; C. 分生孢子 Conidia; D. 附着胞 Appressorium.

图2 菌株 X4 的菌落和孢子形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of colony and conidia of isolate X4

2) 菌株 X4 的分子生物学鉴定。从图 3 可以看出,菌株 X4 用引物 ITS4 和 ITS5 扩增出的特异性条带位于分子标记物 500~750 bp 之间,大约为 600 bp。这与 White 等^[12]所描述的一致,测序结果显示其 PCR 扩增序列为 563 bp。

将菌株 X4 的 ITS 序列提交到 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 同源性比对,结果表明菌株 X4 与 *C. musae* 同源性为 99%。结合形态学鉴定的结果,可将菌株 X4 鉴定为芭蕉炭疽菌(*C. musae*)。



M:DNA 分子质量标记 DNA marker; 1,2:菌株 X4 基因组 DNA 的 PCR 扩增产物 PCR products of isolate X4.

图3 菌株 X4 基因组 DNA 的 PCR 电泳结果

Fig. 3 Electrophoretogram of PCR products of isolate X4

2.4 菌株 X4 的生物学特性

1) 温度对菌丝生长、分生孢子萌发的影响。试验结果表明,在 PDA 培养基上,菌株 X4 的菌丝生长温度范围是 10~35 °C,最适生长温度是 28 °C,35 °C 下生长极其缓慢,40 °C 时不能生长,低温对菌丝生长并无致死作用,只能抑制生长,恢复常温后菌丝体仍可恢复生长。在 25~30 °C 之间较适宜菌株 X4 的分生孢子萌发,28 °C 的萌发率最高,低温和高温都不适合孢子萌发;在 25~30 °C 之间较有利于附着胞的形成,附着胞的形成率均在 90% 以上。

2) 光照对菌丝生长、孢子萌发的影响。在 PDA 培养基上,菌株 X4 在连续光照、12 h 光暗交替、完全黑暗 3 种光照处理下培养 4 d 后菌落直径分别为 7.42、7.80、7.90 cm,统计分析结果表明,它们之间不存在显著差异($P=0.01$)。但在光照条件下较有利于分生孢子的形成。菌株 X4 的分生孢子在上述 3 种光照处理下培养 10 h 后,孢子萌发率分别为 62.63%、65.44%、67.58%,附着胞形成率分别为 91.68%、90.89%、90.06%,统计分析结果表明,它们之间均不存在明显差异。

3) pH 值对菌丝生长、分生孢子萌发的影响。试验结果表明,在 PDA 培养基上,菌株 X4 菌丝生长的 pH 范围为 3.0~10.0,分生孢子萌发的 pH 值范围是 3.0~11.0,较适宜于菌丝生长和孢子萌发的 pH 值范围为 5.0~8.0。在酸性和碱性条件下,菌丝生长受到明显抑制,菌丝生长畸形。较适宜于分生孢子和附着胞形成的 pH 值范围为 5~7,最适 pH 值为 6.0,这时的孢子萌发率为 71.07%,附着

胞形成率高达 91.79%,说明菌株 X4 的分生孢子偏酸的环境下易萌发和形成附着胞。

4) 菌丝和分生孢子的致死温度。试验结果表明,经 35~50 °C 处理 10 min 后,菌株 X4 菌丝还能够生长,分生孢子亦能萌发,然而菌丝生长速度和分生孢子萌发率、附着胞形成率均随温度升高而下降,说明有部分分生孢子在处理过程中丧失了萌发力。经 55 °C 处理 10 min 后,菌株 X4 菌丝在 PDA 平板上不能生长,分生孢子在水中也不能萌发,表明香蕉炭疽病菌菌丝和分生孢子的致死温度均为 55 °C。

5) 菌株 X4 的分生孢子在水中的萌发。试验结果表明,初始分生孢子萌发较少,随着时间的增加,萌发率不断升高,在 12 h 后分生孢子萌发和附着胞形成趋于稳定,萌发率和附着胞形成率都在 90% 左右,因此水中观察炭疽病菌孢子萌发应选 12~14 h 为宜。在 24 h 时观察菌株 X4 形成附着胞情况,发现在灭菌水中孢子只要萌发就会形成附着胞。

3 讨论

本试验从发病的香蕉果实上分离纯化到 4 个香蕉炭疽病菌菌株,结果表明菌株 X4 的孢子萌发率、附着胞形成率和致病力均高于其他 3 个菌株。根据其形态学特征,结合基因组 DNA 的 ITS 序列同源性的比较分析,发现该菌株与文献报道的芭蕉炭疽菌(*C. musae*)的形态基本一致,ITS 序列的同源性高达 99%,因此将菌株 X4 鉴定为芭蕉炭疽菌(*C. musae*)。李梅婷等^[13]从未发病的香蕉叶柄、叶脉和未成熟果皮等组织中分离获得香蕉内生炭疽病菌菌株,经鉴定这些菌株均为芭蕉炭疽菌。通过接种试验证实这些菌株对香蕉有致病性,说明所分离的香蕉内生炭疽菌是香蕉炭疽病的潜伏侵染菌源。

在对菌株 X4 的生物学特性观察时发现,该菌在 35 °C 下生长极其缓慢,40 °C 时不能生长,10 °C 下菌丝生长缓慢且孢子不能萌发,菌丝和分生孢子的致死温度均为 55 °C/10 min,因此将香蕉采后果实贮存于 10 °C 以下和 35 °C 以上有可能会减轻病害的发生。DeCosta 等^[14]就曾报道过将香蕉果实在 50 °C 温水中浸泡 3 min,可明显地控制炭疽病和冠腐病的发生,而不影响香蕉的品质,而且与拮抗菌结合起来处理的防效更好,这可为香蕉采后果实炭疽病的防治开辟新的途径。适合菌株 X4 菌丝生长和分生孢子萌发的 pH 值为 5.0~8.0,最适的 pH 值为 6.0;不同光照条件对菌丝生长速率影响差异不

显著,但在 PDA 平板上有利于分生孢子的萌发和附着胞的形成。这与文献报道的结果一致^[8-9]。

参 考 文 献

- [1] MUIRHEAD I F, JONES D R. Postharvest diseases In [M]// JONES D R. Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford, : CABI Publishing, 2000: 190-211.
- [2] SWINBURNE T R, BROWN A E. Appressoria development and quiescent infections of banana fruit by *Colletotrichum musae* [J]. Trans Br Mycol Soc, 1983, 80: 176-178.
- [3] 刘朝祯, 王壁生, 戚佩坤. 香蕉刺盘孢及其所致香蕉炭疽病的化学防治 [J]. 植物病理学报, 1990, 20(3): 179-182.
- [4] 曾大兴, 戚佩坤, 姜子德. 香蕉炭疽菌菌株亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 324-329.
- [5] 张荣意, 徐碧玉, 金志强. 香蕉果实潜伏炭疽菌 1 个特异片段的获得 [J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 52-56.
- [6] ALZAEEMEY A B, MAGAN N, THOMPSON A K. *In vitro* studies of the effect of environmental conditions on the anthracnose pathogen of bananas, *Colletotrichum musae* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1994, 33(4): 369-381.
- [7] 刘秀娟, 黄圣明, 杨叶, 等. 不同地区潜伏侵染香蕉果实的炭疽菌生物学特性研究 [J]. 热带作物学报, 1996, 17(1): 38-44.
- [8] 杨叶, 唐广缘, 黄意毅, 等. 海南省香蕉果实潜伏炭疽菌生物学特性研究 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 337-342.
- [9] 胡美姣, 李敏, 高兆银, 等. 香蕉炭疽病菌不同菌株的特性比较 [J]. 热带作物学报, 2007, 28(2): 87-91.
- [10] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 1-427.
- [11] WHITE T J, BRUNS T D, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// INNIS M A, SNINSKY D H, WHITE T J. PCR Protocols. London: Academic Press Inc, 1990: 315-322.
- [12] 张中义, 冷怀琼, 张志铭, 等. 植物病原真菌学 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988: 394-397.
- [13] 李梅婷, 张绍升. 香蕉内生炭疽菌鉴定及致病性测定 [J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(2): 128-131.
- [14] DECOSTA D M, ERABADUPITIYA H R U T. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005, 36(1): 31-39.

Identification and biological characteristics of the anthracnose pathogen of postharvest banana fruit

ZHANG De-tao GAO Yan-li HUANG Yong-hui YANG Mei ZHOU Er-xun

College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract Four isolates of the anthracnose pathogen were isolated from postharvest banana fruits displaying anthracnose symptoms by using tissue isolation technique. The differences in mycelial growth rate, conidial germination, appressorium formation and pathogenicity of the four isolates were compared under the same conditions. The results showed that there was no significant difference in the mycelial growth rate, but the percentages of conidial germination and appressorium formation, and the pathogenicity of isolate X4 were significantly higher than those of the other 3 isolates. The isolate X4 was identified as *Colletotrichum musae* based on the classical morphological taxonomy combined with the technique of ITS sequence analysis. Meanwhile, the effects of temperature, illumination and pH value on the mycelial growth, conidial germination and appressorium formation of isolate X4 were investigated. The results indicated that the temperatures for the mycelial growth were ranged from 10-35 °C, with an optimum of 28 °C and the suitable temperatures for conidial germination and appressorium formation were from 25-30 °C, with an optimum of 28 °C. Illumination had no significant effect on the linear growth of mycelium, conidial germination and appressorium formation. The pH values for the mycelial growth and conidial germination were 5.0-8.0, with an optimum of pH 6.0. The lethal temperature of conidia and mycelia explored further were 50 °C/10 min.

Key words banana; postharvest diseases; fruit anthracnose; pathogen identification; biological characteristics