

进境加拿大大麦中真菌病害的分离与鉴定

张莹, 罗加凤*, 胡佳续, 刘鹏, 林宇, 廖芳

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 分离与鉴定进境加拿大大麦中真菌病害。**方法** 从进境加拿大大麦的可疑种子及病残体中分离获得真菌菌株, 并对所分离的菌株进行培养性状及形态学观察, 同时对核糖体 DNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)扩增和测序, 进行鉴定。**结果** 共分离出 21 个真菌菌株, 鉴定出 6 个菌种, 包括黑麦麦角菌(*Claviceps purpurea*)、梨孢镰刀菌(*Fusarium poae*)、燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)、细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)、大麦网纹病菌(*Pyrenophora teres*)、颖枯壳针孢(*Phaeosphaeria nodorum*)。**结论** 做好进境大麦的检疫、监管工作, 对保障啤酒工业安全生产、防止外来危险性病原菌在我国定殖、流行以致造成危害具有极其重要的意义。

关键词: 大麦; 真菌; 啤酒; 分离; 鉴定

Isolation and identification of fungal disease on barley imported from Canada

ZHANG Ying, LUO Jia-Feng*, HU Jia-Xu, LIU Peng, LIN Yu, LIAO Fang

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and identify the fungal disease from barley imported from Canada. **Methods** Fungal isolates were collected from invaded seeds and stems of barley imported from Canada. Species of fungal were identified based on morphological characteristics, culture patterns and molecular methods. **Results** Twenty-one fungal isolates were collected, and 6 species of fungal were identified, including *Claviceps purpurea*, *Fusarium poae*, *Fusarium avenaceum*, *Alternaria tenuissima*, *Pyrenophora teres* and *Phaeosphaeria nodorum*. **Conclusion** It is very important to carry out the inspection and administration of imported barley, for guaranteeing the safety production in beer industry, and preventing imported dangerous pathogens.

KEY WORDS: barley; fungal; beer; Isolation; identification

1 引言

随着啤酒产业的不断升级以及啤酒行业竞争的不断加剧, 对酿造啤酒原料大麦的质量要求也越来越高。大麦在中国种植历史悠久, 中国种植的大麦, 只有一半作为啤酒酿造的原料, 其余质量差的, 都转

化为价格较低的饲料。中国啤酒业消耗的大麦, 50%左右都依赖进口。我国这几年大麦进口量呈上升趋势, 进口大麦来源国主要集中在澳大利亚、法国以及加拿大 3 个国家^[1]。

随着人民生活水平的提高, 对高品质啤酒的需求量也不断增长, 进口大麦的质量直接影响酿造啤

*通讯作者: 罗加凤, 研究员, 主要从事植物病害检疫工作。E-mail: luojf@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: LUO Jia-Feng, Professor, Animals, Plants and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.158, Jingmen Road, Free-trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: luojf@tjciq.gov.cn

酒的等级,同时,进境大麦中携带大量病菌残体,而不少病菌可通过种子和病菌残体远距离传播,因此,对进口大麦进行健康检测,提高酿造啤酒品质、防止危险性病菌传入我国,是十分必要的。

2 材料与方法

2.1 菌种的分离

供试大麦样品为加拿大进境大麦。挑取可疑大麦种子及植株病菌残体,将供试样品用1%次氯酸钠表面消毒5 min,灭菌水冲洗3次,在无菌操作条件下,移至含有青链霉素的PDA培养基中,25℃条件下培养,5 d后观察,可疑菌落PDA培养基上纯化,25℃培养5 d后,观察菌落特征,制片镜检。

2.2 菌种鉴定

挑取纯化的菌丝,用商业化试剂盒提取基因组DNA。

利用ITS4/ITS5引物进行PCR扩增,PCR反应体系总体积30 μL,包含:缓冲液10×buffer 3.0 μL; dNTP 2.0 μL; Taq聚合酶2 U; 引物各1 μL; DNA模板1 μL(30 ng/μL); ddH₂O补足至30 μL。反应程序:94℃预变性4 min; 94℃变性30 s, 58℃复性30 s, 72℃延伸45 s, 35个循环; 72℃延伸7 min。

扩增产物在2.0%琼脂糖凝胶1×TAE缓冲液中电泳,EB染色后凝胶成像,如有目标片段大小的单带出现,扩增产物进行序列测定。将测序获得的序列与NCBI网站GenBank中相关序列进行同源性比对分析。

3 鉴定结果

经过纯化培养,得到21株菌株,通过培养形状及形态学观察,初步鉴定为*Claviceps* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Pyrenophora* sp., *Phaeosphaeria* sp. 5个属的真菌。

用引物ITS4/ITS5对病原菌的rDNA区段的内转录间隔区进行PCR扩增,获得约600碱基长度的序列,通过与GenBank中的DNA序列进行比对分析,发现其分别与*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., 1886 (Genbank 登记号: HQ379700.1)、*Fusarium poae* (Peck) Wollenw., 1914 (Genbank 登记号: KC758865.1)、*Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire., 1933 (Genbank 登记号: KJ082100.1) 同源性均为100% ;

Claviceps purpurea (Fr.) Tul., 1853 (Genbank 登记号: AB162147.1)、*Pyrenophora teres* Drechsler., 1923 (Genbank 登记号: FJ907534.1)、*Phaeosphaeria nodorum* (E.Müll.) Hedjar., 1969 (Genbank 登记号: AF181708.1) 同源性均为99%,测序结果与形态鉴定相符。

3.1 黑麦麦角菌(*C. purpurea*)

属于囊菌亚门(Ascomycotina),核菌纲(Pyrenomycetes),球壳菌目(Sphaeriales),麦角菌科(Clavicipitaceae),麦角菌属(*Claviceps*)。寄生于大麦、小麦、黑麦等禾本科植物上,是一种重要种传病原菌。麦角菌在穗上先分泌含有大量分生孢子的蜜汁,在子房内繁殖发育,经2~3周后,即在子房内形成紫黑色的菌核,露出子房外,菌核黑色、坚硬、角状,形状同麦粒,又象动物的角,所以称为麦角^[2,3]。

麦角不仅造成农作物减产等经济损失,还因为其含有的生物碱对人畜有毒,而致使麦角污染的谷物不能使用或降低使用等级^[4,5]。进境大麦用于啤酒酿造,对大麦质量的要求非常严格,而感染麦角菌的大麦的含量一旦超标,将对酿造啤酒的品质产生严重影响。

3.2 镰刀菌属(*Fusarium* sp.)

主要为燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)、梨孢镰刀菌(*F. poae*)。大麦赤霉病俗称“烂麦头”,是大麦的主要病害之一,主要危害穗部、秆部等,严重影响大麦的产量和质量。引起大麦赤霉病的病原为禾谷镰刀菌,在不同大麦产区,还有其他镰刀菌,也可以引起大麦赤霉病,其中就包括燕麦镰刀菌和梨孢镰刀菌^[6]。镰刀菌的次级代谢产物真菌毒素对动物和人体有不同程度的致病、致癌作用。

另外,Prentice等^[7,8]指出,啤酒喷涌是由霉菌引起的,特别是镰孢霉菌参与诱发啤酒喷涌的影响最大。啤酒喷涌是指开盖后二氧化碳突然冒出,导致酒体内很细的泡沫溢出瓶外,严重时,1~2 s内大半瓶啤酒剧烈外喷,从而影响啤酒的质量。啤酒喷涌并不是由镰刀菌本身产生的,而是镰刀菌与麦粒相互作用,在制麦过程中产生呕吐毒素以及大麦或麦芽中的输水蛋白造成啤酒喷涌^[9-12]。

3.3 细极链格孢(*A. tenuissima*)

该菌能产生多种真菌毒素,引起种子化学成分

的变化,降低营养价值,导致种子存活力下降,甚至失活。除了对种子直接造成危害外,该病菌还能引起作物根、茎、叶病害,如引起大麦叶枯病、根腐病等症状。

3.4 大麦网斑病菌(*P. teres*)

带该菌种子可引起大麦网斑病,它以病叶片上产生综合交错的网纹而得名,该病广泛分布于世界各地,可造成叶片枯死、穗小粒秕,甚至不能抽穗,影响制啤酒的工艺品质,对产量也影响较大,是大麦的重点防治对象。

3.5 颖枯壳针孢(*P. nodorum*)

颖枯壳针孢无性型称,与麦类壳多孢斑点病菌(*Stagonospora avenae*)以及壳多孢属多种真菌复合引起麦类颖枯病^[13]。受害植株穗粒减少,籽粒皱缩,出粉率降低,早期受害还能影响成穗率,引起高达53%的减产^[14]。

4 结论与讨论

大麦是酿造啤酒的重要原料,其质量的优劣直接影响酿造啤酒的品质。原料大麦在田间自然生长过程、收获、运输、仓储期间会不同程度地受到来自空气、土壤等周围环境中微生物的侵染,而大麦表面附着各类微生物在制麦过程中会在麦芽表面繁殖,影响制麦过程及麦芽品质。

大麦,是重要的经济作物。我国每年进口大量大麦,主要是用于高品质啤酒的酿造。目前,我国对于大麦真菌病害的研究主要集中在病原鉴定、致病性测定、发病原因及发生规律、防治途径等方面^[15,16]。而针对进境大麦真菌病害对啤酒安全生产的研究较少。

本研究从进境大麦种子中检测鉴定出5属6种真菌,均属大麦致病性真菌,其中麦角菌、镰刀菌、链格孢菌的次级代谢产物会产生真菌毒素,对动物和人体有不同程度的影响。我国每年进口大量的大麦,带菌情况较为复杂,做好进境大麦的检疫、监管工作,对保障啤酒工业安全生产、防止外来危险性病原在我国定殖、流行以致造成危害具有极其重要的意义。

参考文献

- [1] 程燕,李先德. 中国与世界大麦主要出口国生产贸易的比较分析[J]. 世界农业, 2012, 2:23-29.
Cheng Y, Li XD. Comparative analysis on production and trade of the main exporting countries between China and world. [J]. World Agr, 2012, 2:23-29.
- [2] 张中义,冷怀琼,张志明,等. 植物病原真菌学[M]. 成都:四川科学技术出版社,1986.
Zhang ZY, Leng HQ, Zhang ZM, et al. Plant pathogenic mycology [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1986.
- [3] 刘跃庭,罗加凤,牛春敬,等. 进口大豆中菌核和麦角的鉴别[J]. 植物检疫, 2013, 27(1): 30-33.
Liu YT, Luo JF, Niu CJ, et al. Comparison of sclerotia (*Sclerotinia sclerotorum*) and ergot (*Claviceps*) in imported soybean [J]. Plant Quarant, 2013, 27(1): 30-33.
- [4] 邵秀玲,厉艳,魏晓棠,等. 浅析进口小麦种截获的有害生物——麦角[J]. 植物检疫, 2006, 20(3): 150-151.
Shao XL, Li Y, Wei XT, et al. Analysis on the pest species of the imported wheat——*Claviceps* [J]. Plant Quarant, 2006, 20(3): 150-151.
- [5] 刘家熙. 麦角菌[J]. 生物学通报, 1997, 32(4): 17.
Liu JX. *Claviceps* [J]. Bull Biol, 1997, 32(4): 17.
- [6] 何家泌. 小麦赤霉病菌源种类和禾谷镰刀菌的特性及变异研究综述[J]. 国外农学: 植物保护, 1992, 5(4): 9-11.
He JM. Overview of Characteristics and variation of species of *Fusarium* sp. and *Fusarium graminearum* of wheat [J]. Foreign Agr: Plant Prot, 1992, 5(4): 9-11.
- [7] Prentice N, Sloey W. Studies on barley microflora of possible importance to malting and brewing quality [J]. Proc Am Soc Brew Chem, 1960: 28-34.
- [8] Gjertsen P, Trolle B, Anderson K. Studies on gushing caused by microorganisms, specially *Fusarium* sp. [J]. Proc Congr Eur Brew Conv, 1965, 10: 428-438.
- [9] Schwarz PB, Casper HH, Beattie S. Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing [J]. J Am Soc Brew Chem, 1995, 53(3): 121-127.
- [10] Sarlin T, Nakari Setälä T, Linder M, et al. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt [J]. J Inst Brew, 2005, 111(2): 105-111.
- [11] Sarlin T, Vilpolal A, Kotaviita E, et al. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain [J]. J Inst Brew, 2007, 113(2): 147-153.
- [12] 王晋,钱竹,石维忱,等. 梨孢镰刀菌的疏水蛋白对啤酒喷涌的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 31-34.
Wang J, Qian Z, Shi WC, et al. Effect of Hydrophobic Protein of *Fusarium poae* on Beer Gushing [J]. Food Ferment Ind, 2009, 35(2): 31-34.
- [13] 华丽,王定国,黄挺,等. 危害美国小麦的3种检疫性病原真菌[J]. 植物检疫, 2010, 24(1): 30-33.
Hua L, Wang DG, Huang T, et al. Three Kinds of Quarantine

Pathogen Fungi on American Wheat [J]. Plant Quarant, 2010, 24(1): 30-33.

- [14] Arseniuk E, Cral T, Scharen AL. Seasonal patterns of spore dispersal of *Phaeosphaeria* spp. and *Stagonospora* spp. [J]. Plant Dis, 1998, 82: 187-194.

- [15] 陈健, 乔海龙, 陈和, 等. 大麦病害及其特征[J]. 江西农业学报, 2009, 21(5): 77-80.

Chen J, Qiao HL, Chen H, *et al.* Barley diseases and their characteristics [J]. Acta Agric Jiangxi, 2009, 21(5): 77-80.

- [16] 沈瑞清, 张萍. 宁夏大麦种子寄藏真菌的鉴定及致病性测定 [J]. 麦类作物, 1998, 18(2): 52-54.

Shen RQ, Zhang P. Identification and pathogenicity determination on fungal of Ningxia barley seed [J]. Trit Crops, 1998, 18(2): 52-54.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张莹, 助理农艺师, 主要从事植物病害检疫工作。

E-mail: zhangy10@tjciq.gov.cn



罗加凤, 研究员, 主要从事植物病害检疫工作。

E-mail: luojf@tjciq.gov.cn