

谢美华,李 霖,李雪玲,等. 云南红豆杉叶斑病原菌的分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):146-149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.050

云南红豆杉叶斑病原菌的分离鉴定和生物学特性

谢美华¹, 李 霖², 李雪玲¹, 杨海艳¹, 王振吉¹, 范树国¹

(1. 楚雄师范学院化学与生命科学系/云南省高校应用生物学重点实验室, 云南楚雄 675000;

2. 楚雄医药高等专科学校信息中心, 云南楚雄 675000)

摘要:对红豆杉叶斑病进行病原鉴定,并研究其生物学特性和杀菌剂对其抑制作用。结果表明,该病原菌为交链孢属真菌;该病原菌最适宜生长的碳源为可溶性淀粉,氮源为硝酸钠。菌丝适宜生长的温度范围较窄,最适菌丝生长的温度是 28 ℃;菌丝适宜生长的 pH 值范围较广,在 pH 值 2.5 ~ 10.9 之间均能生长;光周期对菌落生长的影响不大。供试的杀菌剂中以百菌清的抑菌效果最好。

关键词:云南红豆杉;叶斑病;病原鉴定;生物学特性;交链孢属

中图分类号: S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0146-04

云南红豆杉(*Taxus yunnanensis* Cheng et Lu)别称紫杉、赤柏松,属红豆杉科乔木,产于云南西北部及西部、四川西南部与西藏东部,是生产紫杉醇的主要树种^[1-3]。云南红豆杉是集用材、药用、绿化于一体的珍贵树种,特别是其紫杉醇含量

远远高于其他红豆杉树种^[4]。紫杉醇具有抗癌活性,云南红豆杉的野生资源比较少,人工培育红豆杉是目前获取紫杉醇最可行、有效的途径^[1,5]。为了更好地保护野生云南红豆杉野生资源,大力培育后续产业,以满足市场对云南红豆杉资源的需求,近年来在云南丽江、大理、楚雄和丘北等地建立了云南红豆杉人工种植林。由于云南红豆杉的广泛栽培,病害发生严重,尤其是云南红豆杉叶片叶斑病现象日趋普遍,影响了树势生长及药用、观赏价值。分离与鉴定病原菌是开展云南红豆杉抗病防治研究的基础。本试验从自然感病的云南红豆杉上分离纯化得到 1 株对云南红豆杉具有寄生作用的真菌,利用传统的形态学观察与现代分子生物学技术相结合的方法,对云南红豆杉叶斑病原菌进行了鉴定,并依据其形态特点与培养性状进行了初步研究,为云南红豆杉叶斑病的防治

收稿日期:2014-01-17

基金项目:云南省应用基础计划(编号:2011FZ186);云南省高校科技创新团队支持计划(编号:IRTSTYN);楚雄师范学院基金(编号:10YJYB02);楚雄师范学院大学生创新创业训练计划(编号:2013cxcy04)。

作者简介:谢美华(1981—),女,云南楚雄人,硕士,实验师,主要从事植物病理学及真菌病害研究。E-mail:xiemeihua@cxte.edu.cn。
通信作者:杨海艳,博士,高级实验师,主要从事植物病理学及真菌病害研究。Tel:(0878)3100784;E-mail:haiyang@cxte.edu.cn。

病毒紫外检测均呈典型核蛋白吸收曲线,透射电镜观察到类似的病毒粒子,检测浓度在 4.09 mg/mL 以上。进一步使用 3 种提纯病毒免疫新西兰大白兔,制备了 3 种病毒的抗血清。经测定,制备的 3 种抗血清效价分别达 1:12 800(WYMV)、1:25 600(BaYMV)、1:6 400(CWMV)。CWMV 特异性较强,同属的 WYMV 与 BaYMV 抗体存在较弱的血清学交叉反应,为了避免检测中出现假阳性问题,笔者对检测样品及抗体进行倍比稀释方阵试验,确定了能够避免交叉反应的稀释倍数,建立了 3 种抗体的 TAS-ELISA 检测方法,并对田间样品进行了应用检测。虽然之前已有这 3 种病毒相关抗体的报道^[8-9],但是制备抗体的毒源材料有差异,制备抗体的效价也不同。应用笔者建立的 3 种抗体的 TAS-ELISA 方法对田间样品检测结果显示,3 种病毒在江苏省均有分布,特别是 WYMV 在江苏省 7 个县(市)均有分布,带毒率也较高,说明 WYMV 对江苏省小麦的危害仍然存在。

参考文献:

[1] 陈剑平. 中国禾谷多黏菌传麦类病毒研究现状与展望[J]. 自然

科学进展,2005,15(5):524-533.

- [2] 孙炳剑,羊 健,孙丽英,等. 禾谷多黏菌传小麦病毒病的分布及变化动态[J]. 麦类作物学报,2011,31(5):969-973.
- [3] 施农农,陈剑平,Adams M J. 中国大麦黄花叶病毒分离物的分子变异[J]. 病毒学报,1999,15(4):339-347.
- [4] Ye R, Zheng T, Chen J, et al. Characterization and partial sequence of a new furovirus of wheat in China[J]. Plant Pathology, 1999, 48(3): 379-387.
- [5] 於 春. 植物病毒衣壳蛋白进入叶绿体的离体跨膜运输研究[D]. 南京:南京农业大学,2008.
- [6] 吕典秋,李学湛,何云霞,等. 烟草花叶病毒(TMV)和马铃薯 X 病毒(PVX)的提纯及抗血清的制备[J]. 中国马铃薯,2000,14(4):212-214.
- [7] 于 翠,吴建祥,周雪平. 番茄花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用[J]. 微生物学报,2002,42(4):453-457.
- [8] 陈剑平,董玛佳,阮义理. 大麦黄花叶病毒(BaYMV)的提纯[J]. 植物病理学报,1989,19(1):35-39.
- [9] 陈剑平,阮义理,董玛佳. 大麦黄花叶病毒粒子的性质及抗体的制备[J]. 浙江农业科学,1988(5):239-241,232.

奠定了基础,同时也为进一步了解该病害的发病规律提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

云南红豆杉叶斑病叶片采自云南省楚雄市西山,用组织分离法分离病原菌,经科赫氏法鉴定其为云南红豆杉叶斑病的病原,菌株编号为 hongdoushan02。

1.2 病原菌的鉴定

1.2.1 形态学鉴定 利用显微镜观察纯化分离到的病原菌,并对其进行形态鉴定。

1.2.2 病原菌 rDNA - ITS 序列扩增和分析 用 CTAB 法提取病原菌全基因组 DNA,进行 ITS - PCR 扩增。引物序列为 ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'; ITS5: 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'。PCR 反应体系总体积 25 μ L,反应各成分终浓度为: *Taq* 酶 0.02 U/ μ L、引物 0.4 μ mol/L、DNA 模板 20 ng/ μ L、dNTPs 0.4 μ mol/L、2 \times PCR 反应缓冲液。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 复性 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物送北京百泰克生物技术有限公司测序,所得序列在 NCBI 上比对,下载与其相似性较高的序列及其近似属的序列,用 BioEdit、Clustal X 和 MEGA 4.1 软件采用 NJ 法进行系统分析,构建系统进化树。

1.3 生物学特性研究^[6-7]

1.3.1 不同碳源和氮源对菌落生长的影响 以察氏培养基为基础培养基,分别以葡萄糖、甘油、D-果糖、D-半乳糖、乳糖、可溶性淀粉等量取代其碳源;分别以硫酸铵、硝酸铵、甘氨酸、L-苯丙氨酸、牛肉膏、蛋白胨取代氮源。每种培养基中分别接种直径为 5 mm 的菌块,25 $^{\circ}$ C 恒温黑暗培养,5 d 后用“十”字交叉法测量菌落直径。每个处理设 3 个重复。

1.3.2 不同温度对菌落和分生孢子萌发的影响 取直径为 5 mm 的菌块接种于察氏培养基中央,分别在 5、10、15、20、25、28、30、32、35、40、45 $^{\circ}$ C 黑暗下恒温培养,5 d 后测量菌落直径。用无菌水制备菌悬液,滴于载玻片上,培养条件同菌落培养,24 h 后镜检孢子萌发率,每次检 100 个孢子。每个处理设 3 个重复。

1.3.3 不同 pH 值对菌落和分生孢子萌发的影响 将高压灭菌后的察氏培养基 pH 值分别调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、10.9 倒平板,取直径 5 mm 的菌块接种于察氏培养基中央,黑暗条件下 25 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后测量菌落直径。用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠和 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液将分生孢子悬浮液 pH 值调配为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、10.9,置于 25 $^{\circ}$ C 恒温箱黑暗培养,24 h 后镜检萌发率,每次检 100 个孢子。每个处理设 3 个重复。

1.3.4 不同光照处理 取直径为 5 mm 的菌块接种于察氏培养基中央,分别置于 24 h 光照、12 h/12 h 光暗交替、24 h 黑暗环境中,25 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后测量菌落直径。用无菌水制备菌悬液,滴于载玻片上,培养条件同菌落培养,24 h 后镜检孢子萌发率,每次镜检 100 个孢子。每个处理设 3 个重复。

1.4 不同杀菌剂对菌落生长的影响

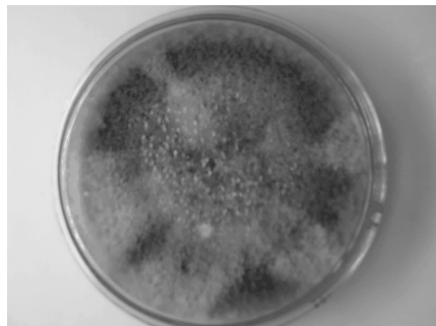
将代森锰锌、百菌清、敌克松、咪霜·锰锌和扑海因用无

菌水按其常用倍数稀释,每 10 mL 培养基中加入 1 mL 药液制成含药液的平板,对照组加入等量无菌水。取 5 mm 菌块置于察氏培养基平板中央,25 $^{\circ}$ C 黑暗培养 5 d 后测量菌落直径。每个处理设 3 个重复。

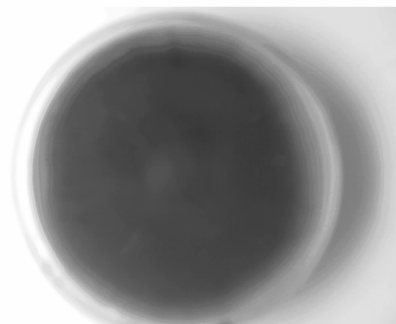
2 结果与分析

2.1 云南红豆杉病原菌的鉴定

2.1.1 形态学鉴定 该病主要发生在叶部,发病初期叶片中部出现多个黄褐色病斑,病斑边缘黑色,随着病情的发展,可延伸至整个叶片,使叶片枯萎死亡。在 PDA 培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 6 d 菌落直径达 4 cm,菌落青灰色相间,圆形、规则,边缘整齐,菌丝絮状,培养一段时间后可看到培养皿盖上有水珠;背面轮纹状,中心圆褐色,外围一环黄色;菌落生长缓慢(图 1)。菌丝有隔,淡褐色,产孢细胞孔生式产孢,合轴式延伸或有时不再延伸;分生孢子多串生(向顶系列),有的单生,卵形或倒棍棒形,具喙,淡橄榄褐至橄榄褐色或褐色,光滑,具横隔膜及纵向隔膜,大小(2.4~6.2) μ m \times (2.9~7.1) μ m(平均 2.65 μ m \times 6.65 μ m)。分生孢子顶端或喙部,常孔生式产生新的分生孢子,如此联系产生,形成分枝或不分枝的孢子链(图 2、图 3)。



A. PDA培养基正面



B. PDA培养基背面

图1 病原菌在PDA培养基上的菌落形态

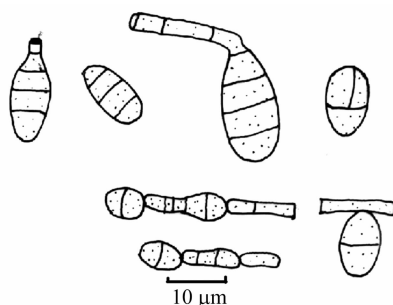


图2 病原菌分生孢子



图3 病原菌分生孢子和分生孢子梗(40×)

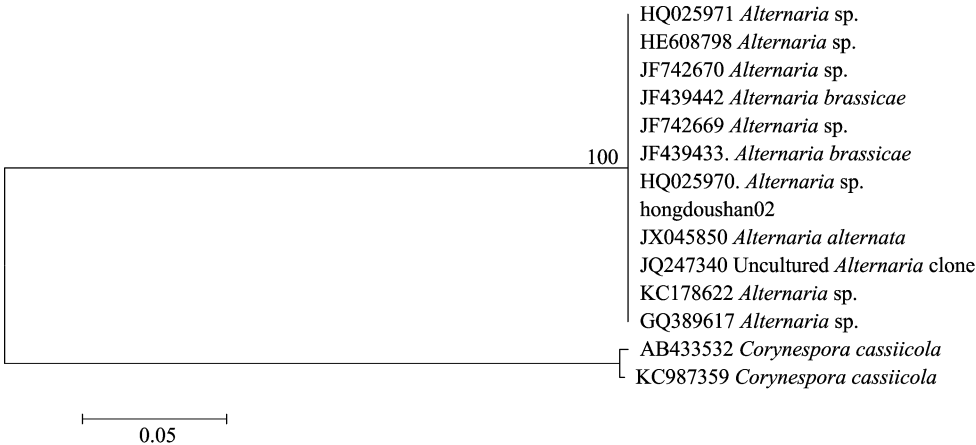


图4 基于 5.8S rDNA-ITS 碱基序列构建的系统树

2.2 不同氮源和碳源对 hongdoushan02 菌落生长的影响

试验结果(表 1)表明,该菌对供试的 7 种氮源和碳源均能利用,菌落在不同氮源和碳源培养基上生长速度有明显差异。最适该菌生长的氮源是硝酸钠,与牛肉膏、蛋白胨和甘氨酸差异不显著,与其他氮源差异显著($P < 0.05$)。最适该菌生长的碳源是可溶性淀粉,与蔗糖和 D-半乳糖差异显著($P < 0.05$),与其他碳源差异不显著。

表 1 不同氮源和碳源对 hongdoushan02 菌株生长的影响

氮源	菌落直径 (cm)	碳源	菌落直径 (cm)
硫酸铵	3.15 ± 0.03d	葡萄糖	4.00 ± 0.14a
硝酸铵	4.15 ± 0.11c	D-果糖	4.30 ± 0.06a
甘氨酸	4.40 ± 0.03ab	甘油	4.25 ± 0.03a
L-苯丙氨酸	3.37 ± 0.04d	D-半乳糖	1.73 ± 0.02c
牛肉膏	4.50 ± 0.06ab	乳糖	3.30 ± 0.10a
蛋白胨	4.47 ± 0.07ab	可溶性淀粉	4.32 ± 0.06a
硝酸钠	4.70 ± 0.20a	蔗糖	4.12 ± 0.12b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同光照对 hongdoushan02 菌株生长的影响

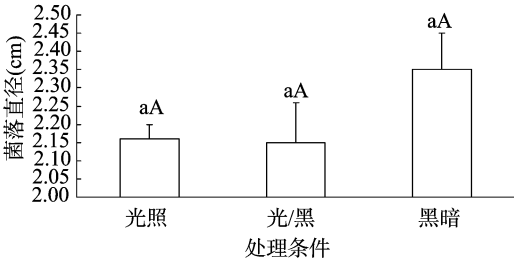
通过 24 h 光照、12 h 光/暗交替、黑暗培养,结果(图 5)表明,有无光照对菌落生长的影响差异不显著。

2.4 不同温度对 hongdoushan02 菌株生长的影响

试验结果(图 6)表明,该病原菌所能适应的温度范围较窄,只能在 15~30℃ 范围内生长,最适的生长温度是 28℃,与 25℃ 处理差异显著($P < 0.05$),与其他处理差异极显著($P < 0.01$)。该病原菌在 5、10、32℃ 及以上温度不能生长。

2.1.2 病原菌 rDNA-ITS 序列分析 将 hongdoushan02 菌株的 5.8S rDNA-ITS 序列在 NCBI 里进行序列比对,结果显示 hongdoushan02 与交链孢属(*Alternaria* sp.)、白菜黑斑病菌(*A. brassicae*)、烟草赤星病菌(*A. alternata*)和 Uncultured *Alternaria* clone 同源性最高,下载它们的序列,以 *Corynespora cassiicola* 为外群,用 BioEdit、Clustal X 和 MEGA 4.1 软件采用 NJ 法进行系统分析,构建系统进化树(图 4)。结果显示,与其遗传距离较近的有 4 个种,属内节点支持率为 1.00,结合其形态特征的观察研究,供试菌株 hongdoushan02 为丝孢纲(Hyphomycetes)丝孢目(Hyphomycetales)暗色孢科(Dematiaceae)交链孢属^[8-16],病原菌的种待定。

HQ025971 *Alternaria* sp.
HE608798 *Alternaria* sp.
JF742670 *Alternaria* sp.
JF439442 *Alternaria brassicae*
JF742669 *Alternaria* sp.
JF439433. *Alternaria brassicae*
HQ025970. *Alternaria* sp.
hongdoushan02
JX045850 *Alternaria alternata*
JQ247340 Uncultured *Alternaria* clone
KC178622 *Alternaria* sp.
GQ389617 *Alternaria* sp.
AB433532 *Corynespora cassiicola*
KC987359 *Corynespora cassiicola*



柱上不同小写、大写字母分别表示差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$);图6、图7、图8同

图5 不同光照对菌株生长的影响

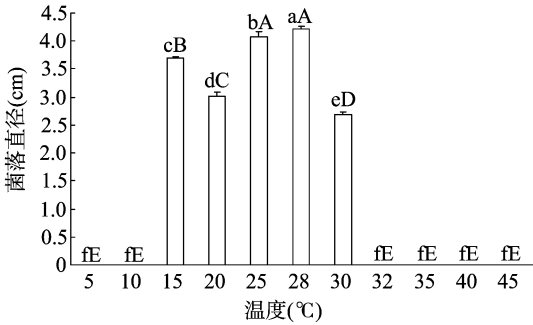


图6 不同温度对菌株生长的影响

2.5 不同 pH 值对 hongdoushan02 菌株生长的影响

试验结果(图 7)表明,菌丝生长适应的 pH 值范围较广,在 pH 值 2.5~10.9 之间均能生长,不同的 pH 值条件下菌丝的生长差异不显著。

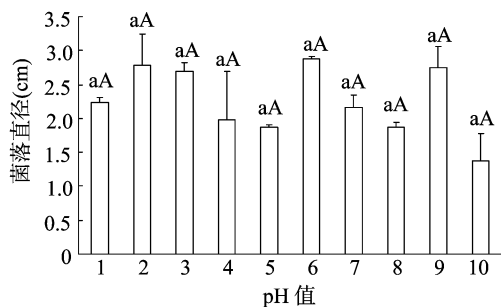


图7 不同 pH 值对菌株生长的影响

2.6 不同杀菌剂对菌株生长的影响

试验结果(图8)表明,与对照相比,5种广谱杀菌剂对该菌的生长均有抑制作用。百菌清对该菌的抑制效果最好,随后依次是扑海因、咪霜·锰锌、代森锰锌,效果最差的是敌克松。百菌清的抑菌效果和扑海因差异不显著,与咪霜·锰锌差异显著,与敌克松和代森锰锌差异极显著。

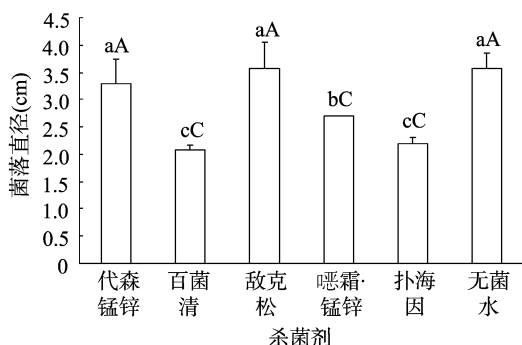


图8 不同杀菌剂对菌株生长的影响

3 结论与讨论

3.1 病原菌的分离鉴定

云南红豆杉更新能力差,对生长环境有较高要求,天然分布区域狭窄,生长缓慢,对生存空间竞争能力差。为了满足市场对云南红豆杉资源的需求,近年来云南省多个地区已进行大量的人工栽培。本研究通过对云南红豆杉叶斑病病原菌进行分离纯化,利用形态学特征观察并结合分子生物学手段进行分析鉴定^[11-12],结果表明,两者的鉴定结果相互吻合一致,初步推测病原菌为交链孢属真菌。

3.2 病原菌生物学特性研究

本研究结果表明,该菌对供试的7种氮源和碳源均能利用,菌落在不同氮源和碳源培养基上生长速度有明显差异,最适该菌生长的氮源是硝酸钠,最适该菌生长的碳源是可溶性淀粉。该病原菌适宜生长的温度范围较窄,最适菌丝生长的温度是28℃,在5、10、32℃及以上温度条件下停止生长;菌丝适宜生长的pH值范围均较广,在pH值2.5~10.9之间

均能生长;有无光照对菌落生长影响不显著。

3.3 广谱杀菌剂对该菌生长的影响

在本研究中5种广谱杀菌剂对该菌的生长均有抑制作用。百菌清对该菌的抑制效果最好,随后依次是扑海因、咪霜·锰锌、代森锰锌,效果最差的是敌克松。该菌的生物学特性研究都是在实验室中进行,相对于人工大面积种植时复杂的生长环境,实验室的环境相对单一。因此,要确定该病害的生物学特性,哪一种杀菌剂对该菌的抑制作用最好,还有待进一步的大田试验研究。

参考文献:

- [1] 李良群,杨艳光,曾英,等. 云南红豆杉内生真菌 *Talaromyces* sp. T1BF 的化学成分研究[J]. 广西植物,2011,31(5):699-701.
- [2] 刘万德,苏建荣,王梦君,等. 滇西北云南红豆杉种群空间分布格局[J]. 西北林学院学报,2012,27(6):131-138.
- [3] 苏建荣,臧传富,刘万德,等. 光质对云南红豆杉生长及紫杉烷含量影响的研究[J]. 林业科学研究,2012,25(4):419-424.
- [4] 王磊,张劲峰,欧晓昆,等. 丽江试验区须弥红豆杉幼苗生长特征及紫杉醇含量变化研究[J]. 西部林业科学,2013,42(4):58-62.
- [5] 郑法新,程璐,李侠,等. 一株产紫杉醇云南红豆杉内生真菌分离和筛选[J]. 江苏农业科学,2010(5):440-443.
- [6] 李庆华. 云南红豆杉扦插繁殖技术研究[J]. 林业调查规划,2012,37(6):126-130.
- [7] 赵永生,赵俊雄,张静华. 云南红豆杉资源保护与开发利用前景[J]. 中国民族民间医药,2011,20(13):28,31.
- [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979.
- [9] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [10] Hidaka Y, Kaneda T, Amino N, et al. Chinese medicine, Coix seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells[J]. Biotherapy,1992,5(3):201-203.
- [11] Lee M Y, Lin H Y, Cheng F, et al. Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) bran[J]. Food and Chemical Toxicology,2008,46(6):1933-1939.
- [12] 刘艳,叶建仁. 植物病害潜伏侵染研究进展[J]. 南京林业大学学报,2002,24(5):69-72.
- [13] 刘纪凤,范运梁. 植物叶片病害的发生与防治[J]. 现代农业科技,2008(20):115,117.
- [14] 马琼,秦恩华,李又萍. 魔芋白绢病病原菌的分离鉴定[J]. 安徽农业科学,2005,33(12):2307,2320.
- [15] 赵国柱,张天宇. 中国砖格孢菌研究 I. 砖格孢属[J]. 菌物系统,2003,22(1):19-22.
- [16] 巴尼特 H L,亨特 B B. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧,译. 北京:科学出版社,1977:66-67,78-79,82-83,130-131,132-133,152-153.