

姜晓龙, 金磊磊, 陈辉辉, 等. 1株侵染蓖麻的葡萄座腔菌菌株鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 319-322.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.104

1株侵染蓖麻的葡萄座腔菌菌株鉴定

姜晓龙^{1,2}, 金磊磊¹, 陈辉辉^{1,2}, 喻镇东^{1,2}, 邵荣², 许伟², 陈集双¹

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 210000; 2. 盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏盐城 224000)

摘要:从江苏盐城地区种植的蓖麻上采集分离到1株编号为YDJ08的病原菌。通过形态学观察和分子生物学研究对其进行鉴定, 结果显示: 在PDA培养基上, 真菌菌落形态为圆形, 菌落初期为白色, 后转变为黑色, 分生孢子呈梭形、薄壁、外壁光滑、无色; 病原菌在蓖麻植株上接种后表现为木质部变黑; ITS和 β -tubulin序列分析表明该菌株与GenBank中葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的序列相似性分别高达100%和99%。综合形态学和序列比对分析推断该菌株为葡萄座腔菌。这是首次报道侵染蓖麻的葡萄座腔菌, 该菌株的ITS和 β -tubulin序列的GenBank登录号为KJ530706、KJ530707。

关键词:蓖麻; 葡萄座腔菌; 侵染; ITS-rDNA; β -tubulin; 序列分析

中图分类号: S432.4⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0319-04

葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)真菌属于子囊菌(*Ascomycota*)葡萄座腔菌科(*Botryosphaeriaceae*) [葡萄座腔菌目(*Botryosphaeriales*)], 是一类重要的植物病原真菌。这类真菌分布广泛, 种类繁多, 其寄主主要为具有经济价值的树种, 如苹果树、梨树、栗子树、桉树等。葡萄座腔菌科真菌既能作为植物病原菌引起树木溃疡病, 又能作为内生真菌寄生于植物组织内部, 同时还能作为腐生真菌存活于某些死亡的植物组织上^[1-3]。笔者从江苏盐城地区种植的疑似溃疡病的蓖麻植株上采集、分离到1株病原真菌, 命名为YDJ08。基于DNA的分子生物学研究方法发展至今已经广泛应用于葡萄座腔菌属的鉴定^[4-7], 本试验对该菌株进行了形态学研究和分子生物学研究。通过ITS-rDNA和 β -tubulin基因序列分析, 证实该真菌为葡萄座腔菌, 为葡萄座腔菌与蓖麻的侵染关系及其可能对蓖麻种植产生的影响研究提供基础理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试样采集

2012年9月于江苏海洋产业研究院采集疑病蓖麻植株, 置于4℃保存。

1.2 病原真菌的分离和纯化

参考方中达的方法^[8], 切取5 mm病健交界处的组织, 先用75%乙醇处理15~20 s, 然后用0.1% HgCl₂处理15~20 s, 最后用无菌水漂洗3次, 用无菌滤纸吸干后, 置于PDA培养基平板上, 28℃黑暗培养5 d, 用接种针挑取菌落边缘菌丝转接至新鲜的PDA培养基上, 纯化后制成斜面, 4℃保存。

1.3 病原菌的形态学观察

取斜面保存的纯化菌转接至PDA培养基上活化培养, 28℃培养15 d, 观察其生长状态并拍照记录以下特征: 菌落的生长速度、形状、表面和边缘特征、大小、色泽、菌落质地、颜色以及产孢能力。用插片法制片观察菌丝显微形态。如果不产孢采用诱导的方式获得孢子: 取健康的马尾松针或者蓖麻秸秆, 剪成5 cm的小段, 灭菌。配制水琼脂培养基, 待培养基凝固后, 在表面放置3段松针或蓖麻秸秆, 接入培养4~5 d的YDJ08菌株PDA培养物, 28℃暗培养20 d后, 置于室温下继续光照培养40 d, 观察真菌子实体的形成, 再挑取子实体进行镜检孢子。

1.4 病原菌的致病性测定

在实验室进行盆栽蓖麻接种试验, 供试品种为淄蓖5号。致病性测定采用菌丝接种法: 将分离纯化后的真菌接种至PDA上培养7 d, 用灭菌打孔器在菌落边缘取直径为4 mm的菌饼。用无菌刀片将蓖麻主枝刮伤, 将菌饼紧贴伤口处, 用蘸有无菌水的脱脂棉和塑料膜进行包裹, 每天喷雾保湿。刮伤接种3株, 空白的PDA培养基块对照3株。每天观察发病情况, 取发病部位进行显微观察以及发病植株重新分离病原菌并鉴定。

1.5 真菌的分子生物学鉴定

1.5.1 真菌基因组的提取 将纯化的菌丝接种于PD液体培养基中, 28℃、180 r/min摇床培养3 d。过滤收集菌丝体, 冷冻干燥, 通过改良的CTAB法提取真菌基因组DNA^[9], 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取结果, DNA置于-20℃保存备用。

1.5.2 真菌ITS-rDNA和 β -tubulin基因序列分析 以基因组DNA为模板, 采用核糖体基因组转录通用引物ITS4(5'-TCCTCCGCTTATGTGATATGC-3')和ITS5(5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3')进行ITS序列扩增^[10], 用真菌微管蛋白基因序列通用引物Bt2a(5'-GGTAACCAAATCG-GTGCTGCTTTC-3')和Bt2b(5'-ACCCTCACTGTAGTGAC-CCTTGGC-3')进行 β -tubulin基因序列扩增^[11]。ITS扩增反应体系包括: 超纯水 37.5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L,

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30971898)。

作者简介: 姜晓龙(1989—), 男, 江苏常州人, 硕士研究生, 从事植物病毒和真菌病毒研究。E-mail: jiang773507166@126.com。

通信作者: 陈集双, 教授, 博士生导师, 从事植物真菌病毒、植物反应器、秸秆资源化和产业化利用等研究。E-mail: biochenjs@163.com。

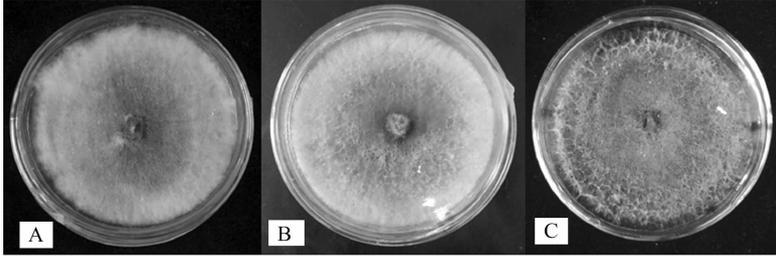
20 $\mu\text{mol/L}$ ITS4 和 ITS5 引物各 1 μL , 模板 DNA (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 1 μL , 2.5 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 4 μL , 5 U/ μL *rTaq* DNA 聚合酶 0.5 μL 。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存; β -tubulin 扩增条件同 ITS 扩增条件。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测拍照后, 用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (TaKaRa) 进行回收纯化, 具体步骤参见使用说明书。纯化后的产物送南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 测得序列在 NCBI 中使用 Blast 在线比对分析, 使用

ClustalW 进行多重比对, NJ (Neighbour - Joining) 进化树构建与分析使用 MEGA 5.1 软件。

2 结果与分析

2.1 菌落形态特征和培养性状

分离纯化的菌株在 PDA 培养基上培养, 菌落呈现圆形或不规则形, 菌落生长初期为白色, 3~4 d 即可长满直径 9 cm 的平板, 5~6 d 后变为灰色, 15 d 后变为黑色, 气生菌丝比较发达, 旺盛时可至平板顶盖出 (图 1)。



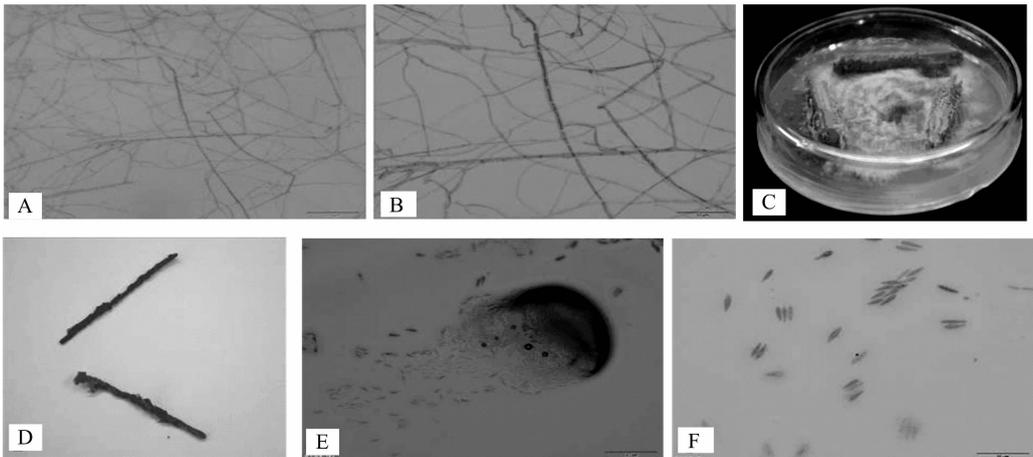
A、B、C 分别为培养 3、7、15 d 的菌落, 培养温度 28 $^{\circ}\text{C}$

图1 菌株 YDJ08 在 PDA 平板上的菌落形态

从光学显微镜下可以看到菌丝直径为 3~5 μm , 分枝与主枝成直角, 部分成锐角, 有明显的隔膜 (图 2 - A、图 2 - B), 但是在显微镜下未见有分生孢子产生。用灭菌的松针和蓖麻秸秆经 10 d 培养后可诱导其产生子实体。

诱导出的子实体个体较大, 直径有 1~3 mm, 形状为球形, 多为表生, 湿度较大时, 子实体还会有褐色的液体物质溢出 (图 2 - C、图 2 - D)。据报道葡萄座腔菌能产生分生孢子,

分子孢子呈纺锤形或者梭形, 无色, 单胞, 内含多个不规则油滴, 也有不产生孢子的^[12]。菌株 YDJ08 在 PDA 培养基上不产孢, 经诱导产生子实体后, 在光学显微镜下可以看到分生孢子: 分生孢子体呈球形, 黑色 (图 2 - E); 分生孢子呈梭形、薄壁、外壁光滑、有 3~5 个隔、无色、分生孢子大小范围 (15~30) $\mu\text{m} \times$ (5~10) μm (图 2 - F)。根据以上形态特征, 初步判定其为葡萄座腔菌。



A、B—菌丝体的形态; C、D—蓖麻秸秆和松针诱导的子实体; E—分生孢子器; F—分生孢子

图2 光学显微镜下 YDJ08 的菌丝、分生孢子体与分生孢子形态以及诱导产生的子实体

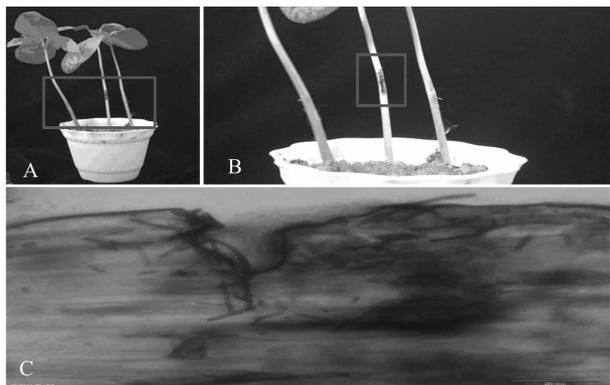
2.2 致病性测定结果

将菌株 YDJ08 以菌饼接种法对健康蓖麻植株进行致病性测定。结果表明, 共接种 3 株, 2 株发病轻微, 1 株发病较重。没有接种的淄蓖 5 号的试验部位出现了一些被手术刀划伤的痕迹, 没有其他的现象, 接种菌饼的主枝上 3 d 产生黑褐色斑点, 经 7 d 左右枝条变成黑褐色, 有溃烂现象 (图 3)。从接种发病的主枝的病健交界处取发病组织重新分离纯化, 发现重新分离的病原菌与接种的菌株菌落形态和孢子形态完全一致。因此, 可以判断葡萄座腔菌对蓖麻有致病性。

2.3 ITS - rDNA 和 β - tubulin 序列分析

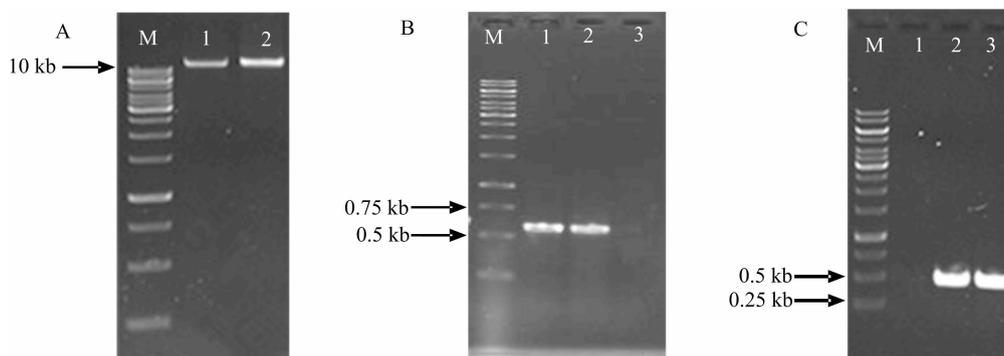
提取的基因组 DNA 条带单一明亮, 扩增效果较好 (图 4 - A)。ITS - rDNA 扩增序列包括 18S 和 28S 部分序列以及 ITS1、ITS2 和 5.8S 的全部序列^[13], 一般大小在 500~1 000 bp 之间, 本试验测得的 ITS 大小为 559 bp (图 4 - B), GenBank 登录号为 KJ530706。 β - tubulin 扩增序列大小为 413 bp (图 4 - C), GenBank 上的登录号为 KJ530707。

将所测序列在 GenBank 数据库中进行 BLASTN 比对, 前 100 条相似的序列全部属于葡萄座腔菌的 ITS 区段, 同源性在



A—整株发病情况；B—局部发病情况，从左往右依次为无菌水对照组、试验组、空白琼脂组；C—发病部位的显微观察

图3 YDJ08 在淄蓖 5 号上的致病性测定结果



A—YDJ08 基因组 DNA，1、2—菌株的2个纯化样品；B—ITS PCR 产物，1、2—PCR 产物，3—阴性对照；C— β -tubulin PCR 产物，1—阴性对照，2、3—PCR 产物；M—1 kb DNA Marker

图4 菌株 YDJ08 基因组 DNA 及 ITS 和 β -tubulin PCR 产物电泳结果

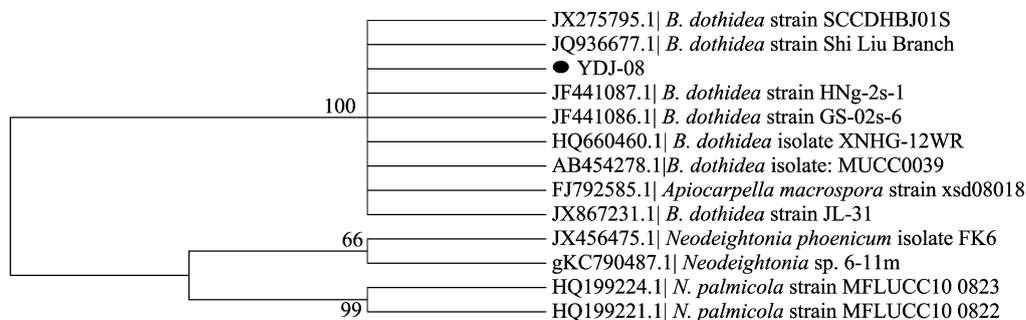


图5 菌株 YDJ08 的 ITS 序列与 GenBank 中相关序列的 ITS 系统进化树

进化树构建采用 NJ 方法，每个节点上的数字代表 1 000 次 Bootstrap 重复中支持该节点方式的百分比，Bootstrap < 50% 的未显示。

3 结论与讨论

葡萄座腔属真菌自从发现以来一直作为植物病原菌被广泛研究，由于其分布广泛，发病率高，经常给生态和经济林木造成严重的损失。杨树溃疡病是由葡萄座腔菌引起的一类最常见的病害^[13]，国内最早的报道是 1955 年发生在北京某苗圃，症状主要发生在大枝和主干上，发病初期会在光皮杨树树皮上形成许多近圆形小泡状的病斑，随后病斑逐渐增大至直

径 1 cm 左右，形成圆形小泡。用手按压小泡有无色液体流出；在粗皮杨树上则形成水渍状病斑并伴有红褐色液体流出，后期病斑失水干瘪，形成一个圆形、黑褐色的坏死斑。发病严重时，病斑布满整个树干，最后枯死^[14-17]。葡萄座腔菌属真菌引起的梨轮纹病和苹果轮纹病也是常见的果树类病害，梨轮纹病发生的部位包括枝干、果实、叶片，都会产生圆形的病斑，并逐渐扩大，引起树枝干枯，叶片干枯早落，果实腐败^[18]，何开平等对梨轮纹病的发病规律进行了研究并提出了较好的预防措施^[19-20]，但未见有相关报道称其引起蓖麻产生危害。本研究从疑似病症的蓖麻上分离得到 1 株葡萄座腔菌，通过病原菌致病力测定，发现其对蓖麻会产生类似的溃疡病病害，

99% ~ 100%，覆盖率为 99% ~ 100%。由于同源性很高，仅选取几种有代表性的菌株进行进化树分析，同时选取同为葡萄座腔菌科的格孢腔菌属的 ITS 序列进行外族比对。所选取的序列用 ClustalW 进行多级比对之后，用 MEGA 5.1 软件构建 NJ 进化树（图 5）。进化树分析结果显示菌株 YDJ08 与葡萄座腔菌在同一分支内，格孢腔菌属真菌则独立成簇。将所测 β -tubulin 序列在 GenBank 中进行 BLASTP 比对，相似性序列全部来源于 *Botryosphaeria*，相似性高达 99% ~ 100%，覆盖率也高达 99% ~ 100%，有同源性的还有葡萄座腔菌科球壳孢目叶点霉属（*Phyllosticta*）真菌。根据 ITS 构建进化树的方法，选取同为葡萄座腔菌科的格孢腔菌属的 β -tubulin 序列进行比对，用 MEGA 5.1 软件构建进化树（图 6）。进化树分析显示 YDJ08 与葡萄座腔菌同为一簇。结合形态学特征、ITS 以及 β -tubulin 序列比对结果，证实从蓖麻上分离的真菌 YDJ08 是葡萄座腔菌。

径 1 cm 左右，形成圆形小泡。用手按压小泡有无色液体流出；在粗皮杨树上则形成水渍状病斑并伴有红褐色液体流出，后期病斑失水干瘪，形成一个圆形、黑褐色的坏死斑。发病严重时，病斑布满整个树干，最后枯死^[14-17]。葡萄座腔菌属真菌引起的梨轮纹病和苹果轮纹病也是常见的果树类病害，梨轮纹病发生的部位包括枝干、果实、叶片，都会产生圆形的病斑，并逐渐扩大，引起树枝干枯，叶片干枯早落，果实腐败^[18]，何开平等对梨轮纹病的发病规律进行了研究并提出了较好的预防措施^[19-20]，但未见有相关报道称其引起蓖麻产生危害。本研究从疑似病症的蓖麻上分离得到 1 株葡萄座腔菌，通过病原菌致病力测定，发现其对蓖麻会产生类似的溃疡病病害，

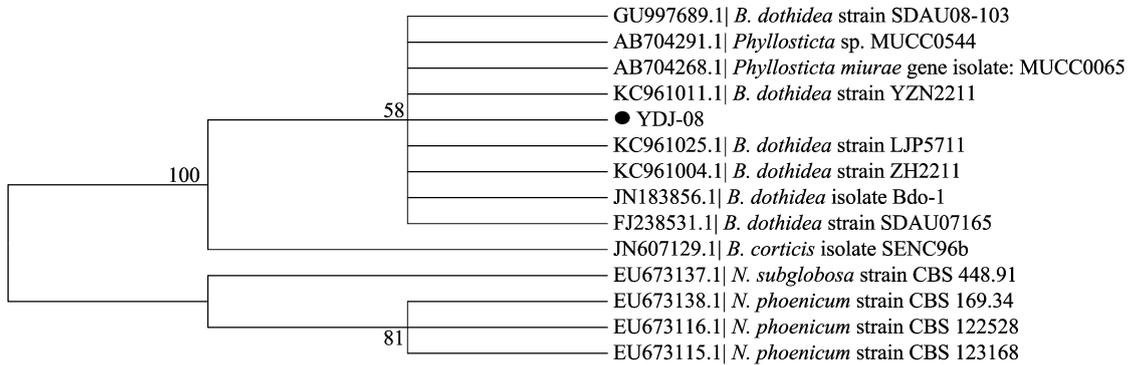


图6 菌株YDJ08的 β -tubulin序列与GenBank中相关序列的 β -tubulin系统进化树

枝干变黑,溃烂。本研究结果以期望对其可能引起的蓖麻病害提供一定理论基础。

用分子生物学方法鉴定真菌随着基因技术的发展也越来越普及。余仲东等就用真菌的生理形态结合 ITS - rDNA 技术分析来自我国的苹果轮纹病菌、苹果干腐病菌、梨轮纹病菌、桃树流胶病菌,并认定这些病菌和葡萄座腔菌亲缘关系近,结果支持葡萄座腔菌与贝伦格葡萄座腔菌(*B. berengeriana*)为同物异名的观点^[5]。Slippers 等利用 ITS - rDNA、 β -tubulin等分子生物学技术比较澳大利亚和南非当地的桉树品种和外来品种相关的葡萄座腔菌属,并确定了5个 *Fusicoccum* - like 无性型种:*B. australis*、*B. dothidea*、*B. eucalypticola*、*B. eucalyptorum* 和 *B. parva*,却未得到之前常见报道于桉树上存在的 *B. ribis*^[21]。Denman 等利用形态学和 ITS - rDNA 序列确定了感染山龙眼的5个葡萄座腔菌属,并解析了它们在全球的分布,但该研究报道的某些种实际是代表一个种的复合体^[22]。由于葡萄座腔属真菌跟其宿主和分布有着广泛的关系,仅从形态学不能完全解释清楚真菌种群之间的相互关系,有必要结合形态学和分子生物学遗传进化特征对其进行更科学、更准确的分类。

葡萄座腔菌引起的蓖麻病害尚未见报道,本研究从发病蓖麻植株上分离得到1株真菌,采用 ITS - rDNA 和 β -tubulin 基因序列分析,结合菌株的形态学特征对葡萄座腔属真菌进行了准确的鉴定,同时作了致病力测定,发现其确实会对蓖麻产生病害,最终确定此植物病原菌为葡萄座腔菌。

参考文献:

- [1] Pavlic D, Slippers B, Coutinho T A, et al. Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to eucalyptus[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(4): 624 - 636.
- [2] Sandra D W, Taylor J E, Kang J C, et al. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re - evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny[J]. *Studies in Mycology*, 2000(45): 29 - 140.
- [3] Slippers B, Wingfield M J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants; diversity, ecology and impact[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2007, 21(2): 90 - 106.
- [4] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(13): 3785 - 3786, 3792.
- [5] 余仲东, 赵官成, 淡静雅, 等. 葡萄座腔菌属 ITS - nrDNA 的分子系统学分析[J]. *菌物学报*, 2010, 29(2): 285 - 293.
- [6] Mohali S R, Slippers B, Wingfield M J. Identification of Botryosphaeriaceae from eucalyptus, acacia and pinus in Venezuela[J]. *Fungal Diversity*, 2007, 25(25): 103 - 125.
- [7] Slippers B, Smit W A, Crous P W, et al. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world[J]. *Plant Pathology*, 2007, 56(1): 128 - 139.
- [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122 - 145.
- [9] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1985, 1(1): 17 - 20.
- [10] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA - ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. *东北农业大学学报*, 2007, 38(1): 101 - 106.
- [11] Slippers B, Crous P W, Denman S, et al. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea* [J]. *Mycologia*, 2004(96): 83 - 101.
- [12] 徐成楠, 周宗山, 迟福梅, 等. 越橘葡萄座腔菌枝枯病的病原菌鉴定[J]. *园艺学报*, 2013, 40(2): 231 - 236.
- [13] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. *陕西农业科学*, 2004(4): 35 - 37.
- [14] 张星耀, 骆有庆, 王鸿斌. 中国森林重大生物灾害[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 93 - 139.
- [15] 钟兆康. 几种杨树溃疡病的识别与防治[J]. *林业科技通讯*, 1985(6): 28 - 31.
- [16] 王云飞, 郭勇, 朱百忍. 杨树溃疡病的发病症状及防治技术[J]. *现代农业科技*, 2007(21): 83.
- [17] 王义勋, 陈京元, 蔡三山, 等. 杨树溃疡病研究进展[J]. *湖北林业科技*, 2008(3): 39 - 41, 50.
- [18] 李明桃. 梨轮纹病的发生规律及防治技术[J]. *农业灾害研究*, 2013, 3(4): 25 - 28.
- [19] 何开平, 张俊伟, 吴楚. 梨轮纹病研究进展[J]. *中国植保导刊*, 2013, 33(6): 21 - 25.
- [20] 田路明, 周宗山, 董星光, 等. 梨轮纹病研究进展[J]. *中国果树*, 2013(4): 74 - 77.
- [21] Slippers B, Fourie G, Crous P W, et al. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced eucalyptus trees in Australia and South Africa [J]. *Studies in Mycology*, 2004, 50: 343 - 358.
- [22] Denman S, Crous P W, Groenewald J Z, et al. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with proteaceae based on morphology and DNA sequence data[J]. *Mycologia*, 2003, 95(2): 294 - 307.