

七叶树溃疡病病原真菌的分离与鉴别

余仲东¹, 张 振¹, 贺 伟²

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2 北京林业大学 林学院, 北京 100083)

【摘 要】 【目的】分离和鉴别引起七叶树溃疡病的病原菌, 为制定合理的防治技术提供依据。【方法】采用组织分离培养、人工接种、形态观察及核糖体转录间隔区序列(ITS-rDNA)分析, 对引起七叶树溃疡病的水渍型溃疡病病原菌 NW397 和干腐型溃疡病病原菌 NW336 2 种真菌进行鉴别与比较。【结果】引起七叶树溃疡病的病原为 2 种不同的真菌, 并表现出不同的危害特征。水渍型溃疡病菌 NW397 ITS-rDNA 序列与多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea* Sacc.) 等的序列同源性高达 99%; 干腐型溃疡病菌 NW336 ITS-rDNA 序列与乌饭树拟茎点菌(*Phomopsis vaccinii*) 等的同源性高达 95% 以上。【结论】七叶树水渍型溃疡病菌定名为多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea* Sacc.), 干腐型溃疡病菌定名为梨干枯拟茎点菌(*Phomopsis fukushii* Tanaka et Mill.)。

【关键词】 七叶树; 溃疡病菌; 致病性; 核糖体转录间隔区序列

【中图分类号】 S763.15

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)05-0119-05

Isolation and identification of two kinds of canker pathogen of *Aesculus chinensis*

YU Zhong-dong¹, ZHANG Zhen¹, HE Wei²

(1 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: 【Objective】 The research studied the isolation and identification of the canker pathogen occurred on *Aesculus chinensis* Beg. 【Method】 Traditional Kock's technology and ITS sequence analysis technology were used to identify and compare two canker pathogens: NW397 and NW336. 【Result】 Two kinds of canker pathogen of *Aesculus chinensis* were identified. Pathogen of immerse canker had over 99% homogeneous with fungi *Botryosphaeria dothidea* Sacc. Pathogen of dry rot canker had over 95% homogeneous with fungi *Phomopsis vaccinii*, and so on. 【Conclusion】 The pathogen of immerse canker (isolate NW397) was identified as *Botryosphaeria dothidea* Sacc., and the dry rot pathogen (isolate NW336) was identified as *Phomopsis fukushii* Tanaka et Mill. They were two different pathogen fungi with different disease symptoms.

Key words: *Aesculus chinensis* Beg.; canker pathogen; pathogenesis; ITS-rDNA

七叶树(*Aesculus chinensis* Beg.)属于七叶树科(Hippocastanaceae)七叶树属(*Aesculus* L.),为世界著名的观赏树种之一^[1]。七叶树具有良好的药用价值,各部分均可药用,内服可治疗间歇性发热,外用可治疗各种皮肤溃疡;七叶树的果实或种子,富

含七叶素,称为“婆罗子”,是畅销国内外的名贵中药^[2-4],其果实还被用于治疗神经痛和风湿病、各种血管疾病。七叶树原产黄河流域,天然分布在海拔 1 000 m 以下的山坡和林中,以河北、陕西、山西、河南、江苏、浙江等分布较多,多野生,呈零星分布。甘

* [收稿日期] 2008-07-07

[基金项目] 科技部自然科技资源共享平台(2005DKA2107-7);陕西省自然科学基金(陕自 C113)

[作者简介] 余仲东(1970—),男,四川威远人,副教授,主要从事森林病理学研究。E-mail:yu-10083@163.com

[通信作者] 贺 伟(1955—),男,陕西彬县人,教授,博士生导师,主要从事森林病理学研究。

肃的文县、武都、康县、徽县、天水等地也有分布。是我国优良的绿化和造林树种^[5]。

近年来,在陕西的宝鸡、杨凌、西安等地七叶树上,出现水渍型和腐烂型 2 种不同类型而危害严重的溃疡病,初期二者症状无明显差别,均可侵染七叶树的主干、主枝,造成流水流胶或大面积干腐,严重者引起枝条枯死甚至苗木死亡,对苗期和新栽植的行道树危害严重。为探明该病的发生发展规律,本试验对发生在陕西省七叶树上的 2 种溃疡病菌进行了初步研究,尤其是对其致病性、培养特征、形态特征和分类学归属进行了研究,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 七叶树溃疡病病原菌的采集、分离和鉴别

于 4 月初采集发病枝干组织,以常规组织分离方法进行组织分离,接种在 PDA 培养基上,25 ℃ 下暗培养,将获得的分离物纯化后保存备用。根据培养生物学特性和子实体形态结构进行初步鉴别。

1.2 七叶树溃疡病病原菌的致病性测定

采 2 年生枝条,截成 20 cm 的小段,顶端用石蜡密封后插在烧杯中进行全光照水培。按 Koch's 法则,用 $\Phi=0.5$ cm 打孔器打孔接种,保湿膜保湿培养,10 d 后揭开保湿膜继续培养,并进行观察测定,

每个菌株接种重复 10 次,并设 1 个对照。

1.3 七叶树溃疡病病原菌的核糖体转录间隔区 (ITS-rDNA) 序列分析

将菌块接种在 PA 液体培养基中振荡培养约 7 d 后,抽滤菌丝,并按余仲东等^[6]的方法提取 DNA。用通用引物扩增 rDNA 的 ITS 全序列(引物序列为 ITS1:5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3'; ITS4:5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')。PCR 反应体系为 50 μ L,其中 10 $\times$ buffer 液 5 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 1 μ L,ITS1(10 μ mol/L) 2.5 μ L,ITS4(10 μ mol/L) 2.5 μ L, *Taq* 酶(1 U/ μ L,上海生工)4 μ L,模板 DNA 2 μ L,ddH₂O 30 μ L。反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,57.3 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。ITS 序列经纯化后送上海生工进行双向测序。将序列用软件 Chromas. exe 整合后送 GenBank,并用 MegAlign 进行比对和 Blastn 软件进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 七叶树溃疡病病原菌的分离

七叶树溃疡病水渍型病斑首先出现在树干基部,中后期病斑扩大并出现流水、流胶症状,韧皮部变色,形成层完好,病斑扩展较慢(图 1-A,B)。

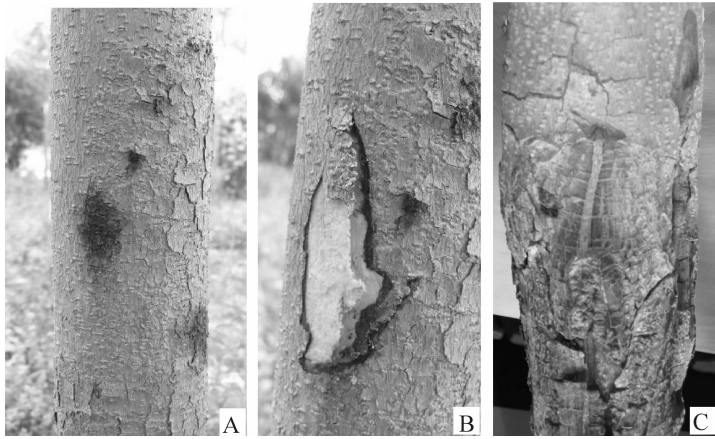


图 1 七叶树溃疡病的症状

A,B. 水渍型溃疡病; C. 干腐型溃疡病

Fig. 1 Canker symptoms of *Aesculus chinensis* Beg.

A, B. Symptom of immerse canker; C. Symptom of dry rot canker

从水渍型病斑分离出的病株代号为 NW397,保存于西北农林科技大学林学院森林病理室。NW397 在 PDA 培养基上的特征与杨树溃疡病菌多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的特征类似,初期菌落白色,中后期菌落由墨绿色变为黑褐

色,气丝黑褐色,在菌落中部集中且发达,不易产孢(图 2-A)。腐烂型病斑形成较水渍型病斑晚,在 4 月下旬。病斑纵向扩展速度快,初期肿胀,流水后很快风干并干缩,呈现典型的干腐型,形成层变色坏死(图 1-C)。从干腐型病斑分离出的病株代号为

NW336,保存于西北农林科技大学林学院森林病理室。NW336 在 PDA 培养基上生长较快,初期菌落白色,中后期菌落变为黄白色,菌落较干硬,气丝不发达,容易产生褐色子实体(图 2-B)。NW336 的分生孢子器球形,大小为 $336\sim370\text{ }\mu\text{m}$,分生孢子有 β 和 α 型 2 种类型,其中 β 型分生孢子丝状无色,大小

为 $(25.46\sim24.68)\text{ }\mu\text{m}\times(1.5\sim2.0)\text{ }\mu\text{m}$; α 型分生孢子椭圆形无色,大小为 $(5.70\sim6.80)\text{ }\mu\text{m}\times(2.3\sim3.0)\text{ }\mu\text{m}$;分生孢子梗丝状,无色(图 3),初步将 NW336 定名为梨干枯拟茎点菌(*Phomopsis fukushii* Tanaka et Mill)。

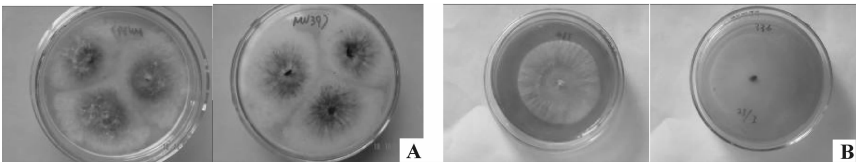


图 2 七叶树溃疡病菌 NW397(A)和 NW336(B)在 PDA 培养基上的培养特征(正反面)
Fig. 2 Culture characteristics of isolateNW 397(A)and NW336 (B)(up and down sides)

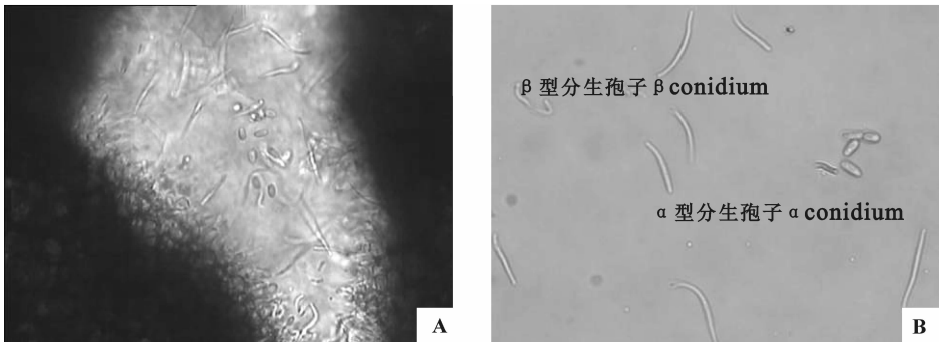


图 3 七叶树干腐型溃疡病病原菌的显微结构($\times 400$)
A. 分生孢子器; B. 分生孢子

Fig. 3 Microscope characteristics of dry rot pathogen($\times 400$)
A. Pycnidium; B. Conidium

2.2 七叶树溃疡病病原菌的致病性测定

种试验结果见图 4。

七叶树溃疡病病原菌 NW336 和 NW397 的接

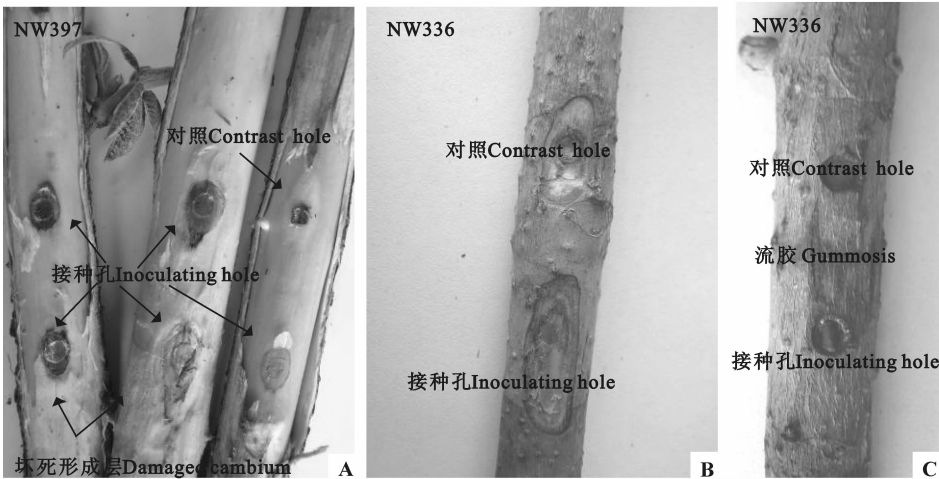


图 4 七叶树溃疡病病原菌 NW397 和 NW336 的接种试验结果
A. 接种 NW397 后症状; B. 接种 NW336 后症状; C. 接种 NW336 后流胶症状

Fig. 4 Inoculation of isolate NW397 and NW336

A. Symptom of inoculating isolate NW397; B. Symptom of inoculating isolate NW336; C. Gummosis symptom of inoculating isolate NW336

接种 NW397、NW336 后,七叶树枝条均出现明显的病害症状,其中 NW397 所致病斑扩展慢,但病斑下陷和韧皮部变色早且明显(图 4-A);接种 NW336 后,病害症状出现较慢,约 20 d 后,病斑出现不明显的干缩,揭开皮层,可看见病菌沿形成层进行扩展,形成层和韧皮部大面积坏死,尤其是纵向扩展面积大(图 4-B,C)。初步确定 NW336 和 NW397 均为七叶树溃疡病病原菌。

2.3 七叶树溃疡病病原菌的 ITS-rDNA 序列分析

NW397 由于培养中不易产孢,所以在鉴别上有

困难,而利用分子标记进行疑难种鉴别已成为一种有效手段^[7]。七叶树溃疡病菌 NW397 和 NW336 的 ITS-rDNA 序列比对结果见图 5。

由图 5 可知,NW397 和 NW336 在 ITS-rDNA 序列上存在很大差别,其中 NW336 的 ITS-rDNA 序列(GenBank 接受号:EU520104)全长 580 bp。Blastn 分析表明(表 1),NW336 与腐皮壳属(*Diaporthe*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)等有很高的同源性(95%以上)。



图 5 七叶树溃疡病菌 NW397 和 NW336 ITS-rDNAR 序列的比对结果
阴影示不同碱基

Fig. 5 Pair comparison of ITS-rDNA sequence between isolate NW336 and NW397
The shadow shows different bases

表 1 七叶树溃疡病病原菌 NW336 ITS-rDNA 序列的同源性比较

Table 1 Homogeneous comparison of isolate NW336

接受号 Accession	种名 Species	同源性/% Homogeneous	接受号 Accession	种名 Species	同源性/% Homogeneous
AF001018.2	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97	AF001021.2	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	96
EF419998.1	<i>Fungal endophyte</i>	97	EU571100.1	<i>Phomopsis vaccinii</i>	96
EF432278.1	<i>Diaporthe</i> sp.	96	AB302243.1	<i>Phomopsis</i> sp.	99
EU571101.1	<i>Diaporthe eres</i>	96	AB107890.1	<i>Phomopsis</i> sp.	96
EU571099.1	<i>Diaporthe eres</i>	96	EF432257.1	<i>Diaporthe</i> sp.	95
EU571098.1	<i>Phomopsis vaccinii</i>	96	AJ293877.1	<i>Phomopsis quercina</i>	97
EU571097.1	<i>Phomopsis vaccinii</i>	96	AJ293876.1	<i>Phomopsis quercina</i>	97
EU561633.1	<i>Phomopsis vaccinii</i>	96	EU571096.1	<i>Phomopsis vaccinii</i>	95
AF103001.1	<i>Phomopsis amygdali</i>	96			

表 2 表明, NW397 (GenBank 接受号 EU847423)与多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria do-*

thidea)等真菌高度同源(99%),初步将 NW397 定名为多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*

Sacc.)。

表 2 七叶树溃疡病病原菌 NW397 ITS-rDNA 序列的同源性比较
Table 2 Homogeneous comparision of isolate NW397

接受号 Accession	种名 Species	同源性/% Homogeneous	接受号 Accession	种名 Species	同源性/% Homogeneous
EU520213.1	<i>Botryosphaeria berengeriana</i>	99	AY786321.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
EU520230.1	<i>Dothiorella gregaria</i>	99	AY786320.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
EU520204.1	<i>Dothiorella gregaria</i>	99	AY640254.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
EU600291.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99	EU520184.1	<i>Botryosphaeria ribis</i>	99
EU441944.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99	EU080907.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
AB369469.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99	EF638769.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
EU162756.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99	EF638768.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
EF638749.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99	EF638767.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99
AY786322.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99	EF638766.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99

3 讨 论

茎点霉(*Phomopsis*)是林木上常见的病原菌,大多数致病性较弱,多为伤口侵染,危害衰弱树木,但通常不会引起树木死亡,部分该属病菌具有较强的致病性,可直接导致树木死亡^[8]。本研究中,梨干枯拟茎点菌(*Phomopsis fukushii* Tanaka et Mill)造成的病斑多出现在树木的西南面,并与冻伤、日灼密切相关。接种试验表明,病原菌侵入七叶树韧皮部后,主要沿形成层纵向扩展,因而干腐型病斑均较大,由于健康愈伤组织的生长而常在病斑周围形成隆起,多年存在。

葡萄座腔菌(*Botryosphaeria* Sacc.)可危害包括针叶树在内的 20 多个科 51 个属的寄主树木,尤其是杨柳科、蔷薇科、忍冬科等阔叶树种受害最为严重,分布极为广泛,可引起树木溃疡、流水流胶、枝枯、花果腐烂等症状^[9-11]。目前,有关该属真菌的系统学关系,特别是无性型的归属还存在争议,鉴定有性型种多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)与茶藨子葡萄座腔菌(*B. ribis*)、帕尔瓦葡萄座腔菌(*B. parva*)等的区别还有困难,主要是因为种间差别细微、大多数种培养时不容易产生孢子,尤其是有性繁殖体结构的差别较小^[12]。Saccorda 首次将多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的无性型鉴定为七叶树壳梭孢(*Fusicoccum fesculi*)^[13-14],而有的文献鉴定为 *Dothiorella gregaria* ^[15-16]。本研究中,七叶树水渍型溃疡病病原菌暂以多主葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea* Sacc.)命名,其无性阶段还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 徐 文,陈西仓,张振纲. 七叶树的栽培技术与开发利用 [J]. 中国野生植物资源,2003(3):34-36.

Xu W,Chen X C,Zhang Z G. The technique of cultivation and utilization on *Aesculus chinensis* Bge. [J]. Chinese Wild Plant resources,2003(3):34-36. (in Chinese)

[3] 陈西仓,张振纲. 七叶树的开发利用 [J]. 特种经济动植物,2003(4):25-26.

Chen X C,Zhang Z G. The utilization of *Aesculus chinensis* Bge. [J]. Special Economic Animal and Plant,2003(4):25-26. (in Chinese)

[4] 冯 凯,邵 丽,刘 杨,等. 七叶树开发及培育技术 [J]. 河南林业科技,2007(3):77-78.

Feng K,Shao L,Liu Y,et al. The technique of cultivation and utilization on *Aesculus chinensis* Bge. [J]. Journal of Henan Forestry Science and Technology,2007(3):77-78. (in Chinese)

[5] 魏远新,郭 莉. 七叶树的生物学特性及其发展利用 [J]. 安徽农业科技,2007,22(3):48.

Wei Y X,Guo L. Biological characteristics and the utilization of *Aesculus chinensis* Bge. [J]. Anhui Agriculture,2007,22(3):48. (in Chinese)

[6] 余仲东,曹支敏. 杨树溃疡病菌、苹果轮纹等病菌的 ITS-rDNA-RFLP 解析 [J]. 中国森林病虫,2004,24(2):15-17.

Yu Z D,Cao Z M,Zhang X Y. ITS-rDNA-RFLP analysis of poplar canker, apple ring rot pathogens and other related pathogens [J]. Forest Pest and Disease,2004,24(2):15-17. (in Chinese)

[7] 余仲东,曹支敏,张星耀. 真菌核糖体基因间隔区的研究概况 [J]. 西北林学院学报,2000,15(2):107-112.

Yu Z D,Zhang X Y,Cao Z M. Advances in the study of ribosomal DNA internal gene region in fungi [J]. Journal of Northwest Forestry University,2000,15(2):107-112. (in Chinese)

[8] Arnold R H,Straby A E. *Phomopsis elaeagni* on Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) in Canada [J]. Plant disease,1973,53(4):183-187.

[9] 余仲东,高爱琴. *Dothiorella gregaria* 对蔷薇科等寄主致病性测定 [J]. 中国森林病虫,2004,23(4):21-23.

Yu Z D,Gao A Q. Pathogenic variation of *Botryosphaeria dothidea* causing poplar canker [J]. Forest Pest and Disease,2004,23(4):21-23. (in Chinese)