

## 红哺鸡竹异香柱菌的形态学和分子鉴定

李洪滨<sup>1</sup>, 朱诚棋<sup>2</sup>, 周 湘<sup>1</sup>, 马良进<sup>1</sup>, 苏 秀<sup>1</sup>

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 竹丛枝病是普遍发生并导致竹林退化的最具破坏性的病害之一。研究该病害的病原对于该病的防治有重大的意义。异香柱菌属 *Heteroepichloë* 箬竹异香柱菌 *Heteroepichloë sasae* 是引起竹子丛枝病的病原之一。利用形态学结合系统发育分析的方法, 对采自浙江桐乡的红哺鸡竹 *Phyllostachys iridescens* 丛枝病病原进行了分离鉴定。结果表明: 根据该分离物的形态特征、平板纯培养物的培养特征以及基于内源转录间隔区-核糖体 DNA(ITS-rDNA) 序列的系统发育分析, 最终确定为箬竹异香柱菌。该分离物与红哺鸡竹丛枝病的关系还需进一步研究。图 5 参 14

**关键词:** 森林保护学; 红哺鸡竹; 丛枝病; 箬竹异香柱菌; 植原体; 系统发育分析

**中图分类号:** S763.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2016)06-1040-05

## Morphological and molecular identification of *Heteroepichloë sasae* isolated from *Phyllostachys iridescens*

LI Hongbin<sup>1</sup>, ZHU Chengqi<sup>2</sup>, ZHOU Xiang<sup>1</sup>, MA Liangjin<sup>1</sup>, SU Xiu<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. School of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

**Abstract:** Witches'-broom, one of the most common diseases of bamboo, induces extremely destructive deterioration of bamboo stands. This study on the pathogens of witches'-broom was conducted to help control the disease. Branches of *Phyllostachys iridescens* were collected from Tongxiang City in Zhejiang Province, which suffered from witches'-broom, and its pathogen, *Heteroepichloë sasae*, was studied by morphologic and phylogenetic methods. Results showed that according to morphological, cultural, and phylogenetic characteristics *Heteroepichloë sasae* was isolated from infected *Phyllostachys iridescens* branches. However, the relationship between this isolate and witches'-broom disease needs further study. [Ch, 5 fig. 14 ref.]

**Key words:** forest protection; *Phyllostachys iridescens*; witches'-broom; *Heteroepichloë sasae*; phytoplasma; phylogenetic analysis

竹子是多年生的禾本科 Gramineae 植物。中国约有竹子 39 属 500 余种。红哺鸡竹 *Phyllostachys iridescens* 广泛分布在浙江、江苏、湖北等省, 是非常重要的经济和观赏竹。竹子丛枝病(witches'-broom of bamboo) 又名扫帚病, 鸟巢病, 能导致竹子生长衰退, 严重影响竹子质量以及出笋率, 降低其观赏性, 甚至竹子大面积枯死。虽然国内已有一些有关竹子病原菌的研究报道<sup>[1-2]</sup>, 但有关竹子丛枝病病原的研究报道相对较少。竹子丛枝病病原复杂, 涉及多个病原物如竹针孢座囊菌 *Aciculosporium take*, 竹暗球腔菌 *Phaeosphaeria bambusae*, 异香柱菌属 *Heteroepichloë* 以及植原体(phytoplasma)等, 也有多种病原物混合侵染的报道<sup>[3]</sup>。竹香柱型丛枝病在中国报道的较少, 其病原菌包括籐竹香柱菌 *Epichloë bambusae* 和箬竹香柱菌 *Epichloë sasae* 等 2 种。朱熙樵<sup>[4]</sup>曾在浙江省境内的短穗竹 *Brachystachyum densiflorum*, 淡

收稿日期: 2015-11-20; 修回日期: 2015-12-23

基金项目: 浙江省重中之重林学一级学科开放基金项目(KF201330); 浙江省教育厅资助项目(Y201431042)

作者简介: 李洪滨, 从事林木病原微生物鉴定研究。E-mail: 240615800@qq.com。通信作者: 苏秀, 实验师, 从事林木病理学研究。E-mail: suxiu@zafu.edu.cn

竹 *Phyllostachys glauca*, 白哺鸡竹 *Phyllostachys dulcis* 及毛竹 *Phyllostachys edulis* 上收集到籼竹香柱菌的标本; 王华清等<sup>[5]</sup>也从毛竹上采集到籼竹香柱菌的样品。2002 年, 日本学者 TANAKA 等<sup>[6]</sup>根据形态学结合分子检测的结果, 将这 2 种菌更名为籼竹异香柱菌 *Heteroepichloë bambusae* 和箬竹异香柱菌 *H. sasae*。目前, 国内明确的报道是 *H. sasae* 能引起箬竹丛枝病<sup>[1,7-8]</sup>及短穗竹丛枝病<sup>[9]</sup>。对于植原体与真菌复合侵染引起丛枝病的情况, 有研究发现, 水竹 *Phyllostachys heteroclada* 丛枝病病枝的电镜观察中同时存在类细菌、植原体和瘤座菌菌丝, 并且类细菌的培养液接种健康株后能诱发水竹丛枝病<sup>[10]</sup>; 朱熙樵等<sup>[11]</sup>从竹瘤座菌 *Balansia take* 引起的竹丛枝病病枝中发现有植原体的存在。本研究应用形态学特征观察结合聚合酶链式反应检测手段, 对浙江桐乡市红哺鸡竹丛枝病枝进行了病原物的分离与分子鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

红哺鸡竹健康株和丛枝病株均于 2014 年 4 月采自浙江省桐乡市灵安镇。采集的新鲜样品直接用于试验或保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 形态观察 观察采集到的新鲜子实体的颜色、大小及质地; 作真菌子座横截面的徒手切片, 观察真菌的子囊壳、子囊及子囊孢子。

1.2.2 分离培养及培养特征观察 取新鲜的子实体, 将它切成 2~3 mm 的小段, 用体积分数为 75% 的乙醇浸泡 2~3 s 后, 再用体积分数为 10% 的次氯酸钠消毒 3~5 min, 最后用无菌水漂洗, 用灭菌滤纸控干后移植于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上, 放入 25  $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱培养。隔 24 h 观察并记录真菌的生长状况。

1.2.3 红哺鸡竹丛枝病真菌的分子检测 ①植物总 DNA 的提取。分别称取 0.1 g 真菌子座及平板菌丝体, 采用 Takara 各种材料全基因组提取试剂盒(Takara, 中国大连)的方法提取总 DNA, 浓度检测合格后, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。②聚合酶链式反应扩增。聚合酶链式反应的引物为真菌内源转录间隔区-核糖体 DNA(ITS-rDNA)区段通用引物对 ITS1F/ITS4, 用 *Taq* 酶(Takara, 中国大连)进行扩增, 具体反应体系参照说明书。聚合酶链式反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 35 个循环中, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。产物于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。③聚合酶链式反应产物的电泳检测及序列测定。聚合酶链式反应产物在 10  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  琼脂糖凝胶, 150 V, 25 min 电泳检测后, 委托杭州皓丰生物技术有限公司测序。

1.2.4 红哺鸡竹丛枝病植原体的分子检测 ①植物总 DNA 的提取。称取 0.1 g 感病及健康的红哺鸡竹植株的韧皮部组织, 采用常规的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法分别提取总 DNA, 浓度检测合格后, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。②聚合酶链式反应扩增。参照邱并生等<sup>[12]</sup>的方法, 采用巢式聚合酶链式反应的方法扩增植原体。所用引物为植原体通用引物 R16mF2/R16mR1 及 R16F2/R16R2<sup>[13]</sup>, 用 *Taq* 酶(Takara, 中国大连)进行扩增。第 1 轮以植株的总 DNA 为模板, R16mF2/R16mR1 为引物, 聚合酶链式反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 35 个循环中, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。第 2 轮用第 1 轮扩增产物的 50 倍稀释液为模板, R16F2/R16R2 为引物, 退火温度提高到 60  $^{\circ}\text{C}$ , 其余条件与第 1 轮相同。聚合酶链式反应产物的电泳检测及序列测定与 1.2.3 相同。

1.2.5 序列同源性比较及系统发育树构建 从美国生物技术信息中心(NCBI)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载与本实验所得序列相关的基因序列, 并使用 MEGA 6.06<sup>[14]</sup>数据软件中的 neighbor-joining 法构建进化树, 其中 'bootstrap' 设定为 1 000 次重复, 遗传距离使用 MEGA 6.06 数据软件中提供的 'Jukes and Cantor' 法进行计算。

## 2 结果与分析

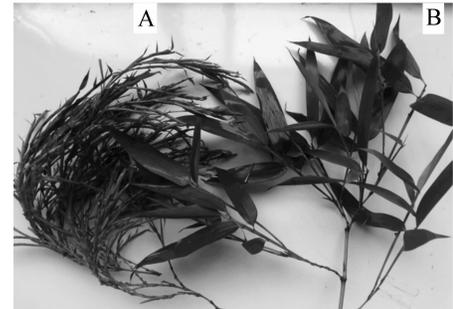
### 2.1 感病植株症状表现

红哺鸡竹丛枝病多发于老竹林以及缺乏管理且过密的竹林, 发病时间多为 4 月初至 7 月中旬, 发病症状为个别竹枝发病, 进而扩展到其他枝条。发病的竹枝呈现扫把状, 分枝增多, 竹叶明显变小, 叶片

的颜色也较正常叶片淡(图1)。

## 2.2 红哺鸡竹丛枝真菌的形态特征

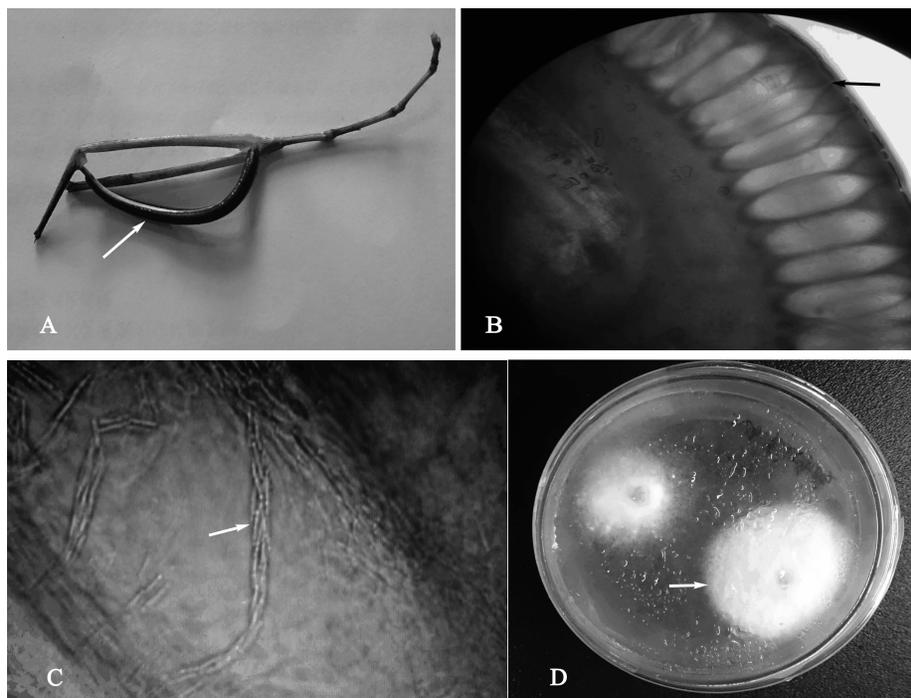
子座包裹于竹叶鞘中,为弯曲杆状,中间稍厚,两端稍细,形如香柱,为肉质质地,长度约为3~7 cm,呈灰色或者黑色,中轴有一浅黄色线状条带连接两端(图2A),切开后内部为绿色。子囊壳大多为长圆形或卵圆形,紧密地着生于子座外侧,颜色为褐色或暗红色,成熟的子囊壳外侧有一孔状开口(图2B),隐约可见内部长条状子囊(图2C)。组织分离实验发现,该菌生长极其缓慢,容易被杂菌污染,常规组织分离15 d左右才长出菌丝体,菌丝为纯白色的毛绒状,菌正反面菌丝颜色一致(图2D)。在对该菌落的逐步观察记录中发现,该菌在组织分离20~30 d生长速度最快,之后生长减缓。



A. 感病植株; B. 健康植株。

图1 红哺鸡竹丛枝病症状

Figure 1 Witches'-broom symptom of infected *Phyllostachys iridescens*



A. 子座; B. 子囊壳; C. 子囊; D. PDA培养基上纯培养的菌落形态。

图2 子实体和菌落形态

Figure 2 Fruiting bodies and colony

## 2.3 红哺鸡竹丛枝真菌的分子检测

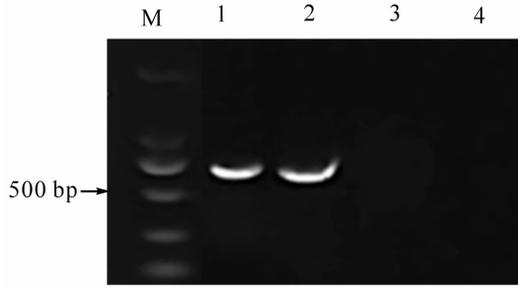
以真菌 ITS-rDNA 区段通用引物 ITS1F/ITS4 作为引物,从红哺鸡竹子座及平板菌丝体中扩增到了约600 bp的片段(图3),与预期大小相符;而健康组织及双蒸水的对照中没有出现特异扩增带,说明该病样中确实有真菌存在。

## 2.4 红哺鸡竹丛枝植原体的 PCR 检测结果

利用巢式聚合酶链式反应技术从表现症状的红哺鸡竹的韧皮部组织中没有扩增出片段,而从阳性对照桑萎缩病样品(本实验保存)中扩增到了约1.2 kb的预期大小的片段(图4)。说明感病红哺鸡竹没有受到植原体的侵染。

## 2.5 红哺鸡竹丛枝真菌序列分析及系统进化树构建

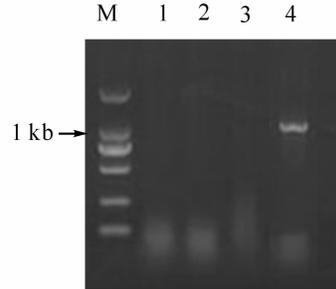
红哺鸡竹丛枝真菌经测序列得到545 bp的ITS-rDNA序列,将该序列与美国生物技术信息中心中的基因序列进行比对。结果表明:该病原菌与异香柱菌属 *Heteroepichloë* 的2个代表种 *sasae*-K, *sasae*-H (GeneBank 登录号: AB065430.1 和 AB065432.1)的同源性高达97%。从美国生物技术信息中心下载相关



M. DNA 分子量标准；1. 病片子座；  
2. 子座平板培养物；3. 健康植株；  
4. 双蒸水作为空白对照。

图 3 红哺鸡竹丛枝真菌 ITS-rDNA 序列聚合酶链式反应扩增电泳图

Figure 3 PCR amplification of ITS-rDNA of fungi



M. DNA 分子量标准；2. 红哺鸡竹丛枝病株；  
3. 健康植株；3. 双蒸水作为空白对照；4. 桑  
萎缩病植原体作为阳性对照。

图 4 红哺鸡竹丛枝植原体 16S rRNA 基因序列聚合酶链式反应扩增电泳图

Figure 4 PCR amplification of 16S rRNA gene of phytoplasma associated with *Phyllostachys iridescens* witches'-broom

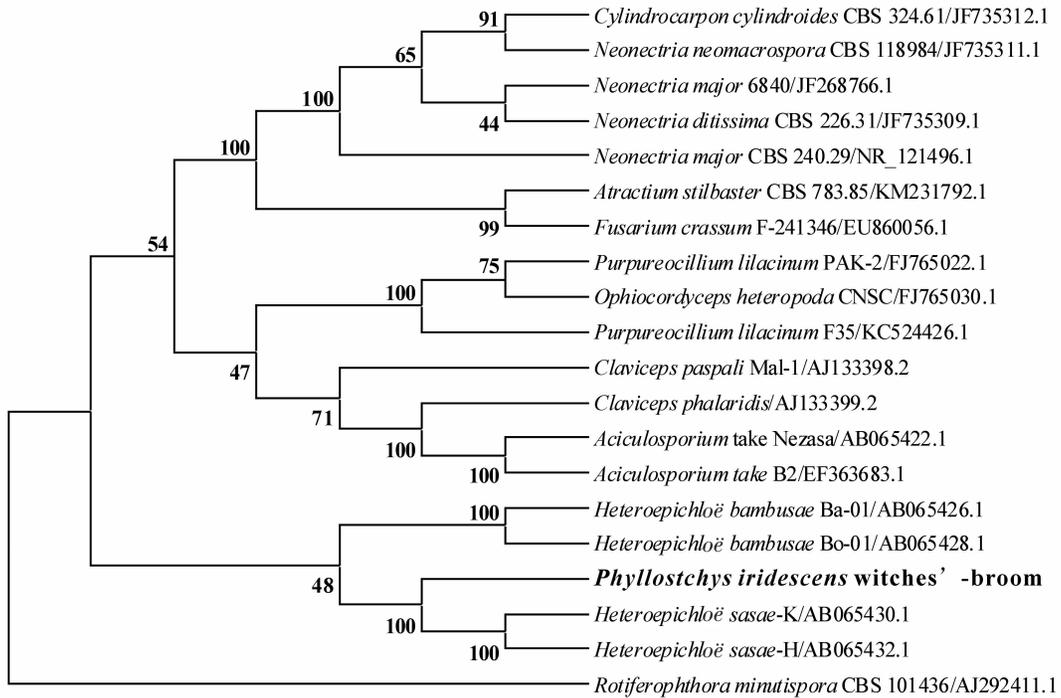


图 5 利用邻接法构建的基于 ITS-rDNA 序列的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree based on ITS-rDNA sequences of *Ph. iridescens* witches'-broom and related fungi constructed with the neighbor-joining method

的 ITS-rDNA 序列，并构建系统发育进化树(图 5)，结果可见：分离自红哺鸡竹的丛枝真菌与 *Heteroepichloë sasae*-K 和 *Heteroepichloë sasae*-H 的亲缘关系最近，此节点支持率为 100%。

### 3 结论与讨论

本研究通过形态学特征观察和聚合酶链式反应检测从红哺鸡竹丛枝病枝中检测到了 1 种真菌，并根据 ITS-rDNA 序列一致性和系统进化树分析结果，明确该真菌为箬竹异香柱菌 *Heteroepichloë sasae*。

目前，已知竹香柱型丛枝病病原有箬竹香柱菌和箬竹香柱菌 2 种。前者的子座为微黄色，平板培养物分生孢子较短，后者子座为紫色，分生孢子较长，其余构造没有显著差异<sup>[6]</sup>。采自浙江桐乡红哺鸡竹丛枝病的子座颜色为深紫色，与箬竹香柱菌更为接近；而本试验中，平板纯培养物未能见到分生孢子产生，这也许跟培养时间、温度、营养有关系。本试验采用的是 PDA 培养基及 25 °C 的培养条件，今后可以对这些条件做些调整进行进一步的研究。系统发育学上，ITS-rDNA 系统发育树显示，采自红哺鸡竹

丛枝病的试验菌株与异香柱菌属 *Heteroepichloë* 构成一个分支, 且与 *Heteroepichloë sasae* 高度聚类, 节点支持率达到了 100%, 说明它们的亲缘关系很近, 可以解释为红哺鸡竹丛枝病的试验菌株为 *H. sasae* 的 1 个分离物, 由于寄主不同, 产生了一些遗传上的差异。

国内异香柱菌引起竹丛枝病的报道较少, 对 *H. sasae* 和 *H. bambusae* 这 2 种病原的描述也比较简单。本研究从红哺鸡竹丛枝病枝上分离到的真菌与程燕林等<sup>[9]</sup>在短穗竹丛枝病枝上分离鉴定的真菌均为箬竹异香柱菌。这将该真菌的寄主范围又进一步扩大, 但该真菌是否为红哺鸡竹丛枝病的病原菌, 还需要进一步的致病性实验验证。中国竹丛枝病发生十分普遍, 有必要对不同竹种上的香柱菌进行详细的形态学以及分子系统学的研究以确定其分类地位。

#### 4 参考文献

- [1] 徐梅卿, 戴玉成, 范少辉, 等. 中国竹类病害记述及其病原物分类地位(上)[J]. 林业科学研究, 2006, **19**(6): 692 - 699.  
XU Meiqing, DAI Yucheng, FAN Shaohui, et al. Records of bamboo disease and the taxonomy of their pathogens in China ( I ) [J]. *For Res*, 2006, **19**(6): 692 - 699.
- [2] 徐梅卿, 戴玉成, 范少辉, 等. 中国竹类病害记述及其病原物分类地位(下)[J]. 林业科学研究, 2007, **20**(1): 45 - 52.  
XU Meiqing, DAI Yucheng, FAN Shaohui, et al. Records of bamboo disease and the taxonomy of their pathogens in China ( II ) [J]. *For Res*, 2007, **20**(1): 45 - 52.
- [3] 杨永刚, 吴小芹. 竹丛枝病病原研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28**(1): 144 - 148.  
YANG Yonggang, WU Xiaoqin. Research progress on pathogens of witches' broom of bamboo [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2011, **28**(1): 144 - 148.
- [4] 朱熙樵. 竹类几种丛枝病的特征[J]. 森林病虫通讯, 1985, **4**(2): 42 - 44.  
ZHU Xiqiao. The characteristics of several kinds of bamboo witches' broom [J]. *For Pest Dis*, 1985, **4**(2): 42 - 44.
- [5] 王华清, 陈岭伟, 李馥纯, 等. 广东省毛竹丛枝病研究初报[J]. 森林病虫通讯, 1999, **18**(3): 22 - 26.  
WANG Huaqing, CHEN Linwei, LI Fuchun, et al. Moso bamboo witches' broom in Guangdong Province [J]. *For Pest Dis*, 1999, **18**(3): 22 - 26.
- [6] TANAKA E, TANAKA C, TSUDA M, et al. *Heteroepichloë*, gen. nov. (Clavicipitaceae; Ascomycotina) on bamboo plants in East Asia [J]. *Mycoscience*, 2002, **43**(2): 87 - 93.
- [7] 张立钦, 王雪根. 中国竹类真菌资源[J]. 竹子研究汇刊, 1997, **18**(3): 66 - 72.  
ZHANG Liqin, WANG Xuegen. Fungus research of bamboos in China [J]. *J Bamboo Res*, 1997, **18**(3): 66 - 72.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [9] 程燕林, 侯成林, 高健. 短穗竹上一种异香柱菌的形态学及分子鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2009, **31**(1): 84 - 90.  
CHENG Yanlin, HOU Chenglin, GAO Jian. Identification of *Heteroepichloë* species on *Brachystachyum densiflorum* by morphology and phylogeny [J]. *J Beijing For Univ*, 2009, **31**(1): 84 - 90.
- [10] 林雪坚, 吴光金, 徐静辉. 水竹丛枝病的研究(I)症状和病原[J]. 中南林学院学报, 1987, **7**(2): 132 - 135.  
LIN Xuejian, WU Guangjin, XU Jinghui. Study on witches' broom of fishscale bamboo ( I ) symptoms and pathogens [J]. *J Cent South For Coll*, 1987, **7**(2): 132 - 135.
- [11] 朱熙樵, 黄金生. 关于类菌原体引起丛枝病的探讨[J]. 竹子研究汇刊, 1992, **11**(1): 4 - 9.  
ZHU Xiqiao, HUANG Jinsheng. Approach on witches' broom of bamboos caused by mycoplasma like organism [J]. *J Bamboo Res*, 1992, **11**(1): 4 - 9.
- [12] 邱并生, 李横虹, 史春霖, 等. 从我国 20 种感病植物中扩增植原体 16S rDNA 片段及其 RFLP 分析[J]. 林业科学, 1998, **34**(6): 67 - 74.  
QIU Bingsheng, LI Henghong, SHI Chunlin, et al. Amplification of phytoplasma 16s rDNA from 20 infected plants in China and their RFLP analysis [J]. *Sci Silv Sin*, 1998, **34**(6): 67 - 74.
- [13] LEE I M, HAMMOND R W, DAVIS R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of Mycoplasma-like organisms [J]. *Phytopathology*, 1993, **83**(8): 834 - 842.
- [14] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, **30**(12): 2725 - 2729.