

柳杉瘿瘤病病原菌鉴定

龚小峰¹, 朱云峰², 刘 亮³, 杨淑贞³, 葛晓峰¹, 甘其兴⁴, 叶建仁⁵, 蒋 平²

(1. 上海市嘉定区林业站, 上海 201800; 2. 浙江省林业有害生物防治检疫局, 浙江 杭州 310003; 3. 浙江天目山国家级自然保护区 管理局, 浙江 临安 311311; 4. 上海市马陆镇林业站, 上海 嘉定 201800; 5. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 柳杉瘿瘤病是浙江天目山国家级自然保护区柳杉 *Cryptomeria fortunei* 上一种非常严重的病害。通过形态学、致病性试验, 以及结合核糖体 ITS (internal transcribed spacer) 基因序列分析, 确定引起柳杉瘿瘤病病原是拟隐孢壳属真菌 *Cryptosporiopsis* sp.。图 3 参 10

关键词: 森林保护学; 病原菌; 形态学; 致病性; 柳杉; 分子系统学

中图分类号: S763.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2011)02-0339-04

Causal agent of *Cryptomeria fortunei* gall disease

GONG Xiao-feng¹, ZHU Yun-feng², LIU Liang³, YANG Shu-zhen³, GE Xiao-feng¹,
GAN Qi-xing⁴, YE Jian-ren⁵, JIANG Ping²

(1. Forest Station of Jiading District, Shanghai 201800, China; 2. Forest Pest Control and Quarantine Bureau of Zhejiang Province, Hangzhou 310003, Zhejiang, China; 3. Management Office, National Nature Reserve of Mount Tianmu, Lin'an 311311, Zhejiang, China; 4. Forest Station of Malu Town, Shanghai 201800, China; 5. School of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: To determine the casual agent of *Cryptomeria fortunei* gall disease, which is very serious, this study was conducted in the National Nature Reserve of Mount Tianmu, Zhejiang Province using pathogenic morphology, pathogenicity testing, and ribosomal DNA intergenic transcribed spacer (rDNA ITS) sequence analysis. Results revealed that the pathogen causing the gall disease of *C. fortunei* was *Cryptosporiopsis* sp. [Ch, 3 fig. 10 ref.]

Key words: forest protection; pathogen; morphology; pathogenicity; *Cryptomeria fortunei*; molecular systematics

浙江天目山国家级自然保护区地处浙江省西北部, 区内拥有世界上罕见的巨大柳杉 *Cryptomeria fortunei* 林^[1], 总面积约为 267 hm²。近年来, 天目山柳杉群呈现出衰退的现象, 柳杉瘿瘤病正是柳杉衰退的主要原因。在中国, 虽然该病害已存在多年, 但未见该病害的研究报道, 这给天目山古柳杉林的复壮造成了困难。笔者对天目山柳杉瘿瘤病病原致病性、分类进行研究, 以为控制瘿瘤病的发生提供科学依据。

1 试验材料与方法

1.1 病原菌的分离培养

选取具有典型症状的病瘤, 直接切取病瘤表层的子实体组织小块(约 0.5 cm × 0.5 cm), 用次氯酸钠消毒 7 ~ 8 min, 经无菌水漂洗 4 ~ 5 次后, 将组织块放入含有柳杉汁的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基

收稿日期: 2010-07-08; 修回日期: 2010-11-03

基金项目: “十一五”浙江省科学技术重点项目(2006C22062); 浙江省林业科研成果推广项目(05A03)

作者简介: 龚小峰, 助理工程师, 硕士, 从事植保植检研究。E-mail: 0118110 @163. com

平皿中,置于 25 ℃恒温条件下培养,菌落形成后进行纯化培养,用光学显微镜(Leica301 -185.104-000 Canon poweshot s50)进行形态学特征观察和摄影^[2]。

1.2 致病性测定

选用 3~4 年生生长势一致的健康柳杉幼苗为接种对象。用分离纯化的菌株制备孢子悬浮液(10^5 个孢子 \cdot mL⁻¹)。接种前,接种部位(柳杉幼苗中部枝干叶腋处)进行 2 种处理:酸处理(pH 4.5)和无酸处理。酸处理是将接种柳杉苗用 pH 4.5 酸喷洒处理 60 d,接种后采用 pH 4.5 酸进行保湿。将制备的孢子悬浮液进行无伤接种,设 10 个重复 \cdot 处理⁻¹,以无菌水为对照。接种后的柳杉幼苗放置在相对湿度 100%和温度(22±2) ℃的保湿棚中培养,期间进行正常的栽培管理,定时观察发病情况。同时,对接种发病后产生的瘿瘤重新进行组织分离培养。

1.3 菌丝体培养及其 DNA 提取

选用获得菌株接入液体 PDA 培养基中,25 ℃震荡培养 5 d 后,滤出菌丝,用于 DNA 提取。提取方法参见张敬泽等^[3-6]的方法。

1.4 rDNA ITS(internal transcribed spacer)区序列的聚合酶链式反应(PCR)扩增

以提取的真菌 DNA 作为模板,用真菌通用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGC TTATTGATATGC)进行 rDNA ITS 区序列扩增^[7]。反应在 25.00 μL 体系中进行,体系含有 10× 缓冲液(buffer) 2.50 μL,三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs) 2.00 μL, *Taq* 酶 0.25 μL,引物各 1.00 μL, DNA 模板 1.00 μL,双蒸水(ddH₂O) 6.25 μL。反应程序为:94 ℃预变性 5 min;进入循环,94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存。用 UNIQ-10 柱式试剂盒(编号 DV805A, TaKaRa)纯化 PCR 产物。产物连接后用 PMD19-T 感受态细胞进行电转化。将连接产物转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 培养 24 h 后长出大量蓝白斑,挑取白斑,以 ITS1, ITS4 为引物进行菌落 PCR 筛选,选择阳性克隆用于测序。

1.5 序列分析与数据处理

测序后的 rDNA ITS 序列用 Clustal X 程序进行序列的联配 185(alignment)比较、编辑,将序列提交 GenBank 核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行同源性比较分析。

2 结果分析

2.1 病原菌的分离与致病性测定

通过大量组织分离,在加有柳杉汁的 PDA 培养基上分离到的优势菌株(F1 菌株)。选用 F1 菌株进行接种试验。经接种试验,该真菌对柳杉幼苗表现出与自然发病相似的症状。其中,10 株经过酸(pH 4.5)处理的柳杉幼苗有 4 株发病,发病率为 40%;而未经酸处理的仅有 1 株发病,发病率为 10%,而以水为对照处理的柳杉幼苗没有 1 株发病。显然,酸性条件有利于病原菌的侵入和病害的发生。接种试验结果表明:该菌潜伏侵染时间较长,接种 30 d 后才能观察到典型的症状(图 1-A)。形成的瘤状突起呈淡褐色,半球形,豆粒大小。随着时间的延长,形成的瘤状突起逐渐增多。图 1-B 显示接种 90 d 后的症状,与自然发病症状相似(图 1-C)。



图 1 人工接种和自然发生的柳杉瘿瘤病症状比较

Figure 1 Comparison of symptoms of *Cryptomeria fortunei* gall disease on artificial inoculation and nature occurrence plants

从发病后的柳杉结瘤部位再进行组织分离，获得的真菌与接种菌株的形态学特征一致，从而证实这些分离菌株是引起柳杉瘿瘤病的病原菌。

2.2 病原菌的形态学特征

在 PDA 培养基上生长 5 d，菌落呈暗灰色，边缘整齐，中部隆起，气生菌丝生长旺盛，絮状至绒毛状(图 2-A)。菌落背面呈现放射状或略呈放射状，中间灰绿色，边缘白色。菌落培养 10 d 后呈褐色，中部颜色较深，边缘较浅(图 2-B)，直径 4 ~ 5 cm。培养 25 d 左右，菌落上开始出现黑色球形的分生孢子器，分生孢子无色至浅褐色，单胞(图 2-C)，丛状分生孢子梗。

大型孢子为椭圆形，无色至褐色，顶端具油球， $10.4 \sim 13.0 \mu\text{m} \times 21.8 \sim 28.6 \mu\text{m}$ ；小型分生孢子短棒型， $1.4 \sim 2.0 \mu\text{m} \times 10.8 \sim 12.4 \mu\text{m}$ 数量较多，这些特征符合陈善铭等^[8]在中国农作物病虫害中关于苹果 *Malus pumila* 牛眼烂果病中拟隐孢壳属 *Cryptosporiopsis* 真菌的形态学特征。

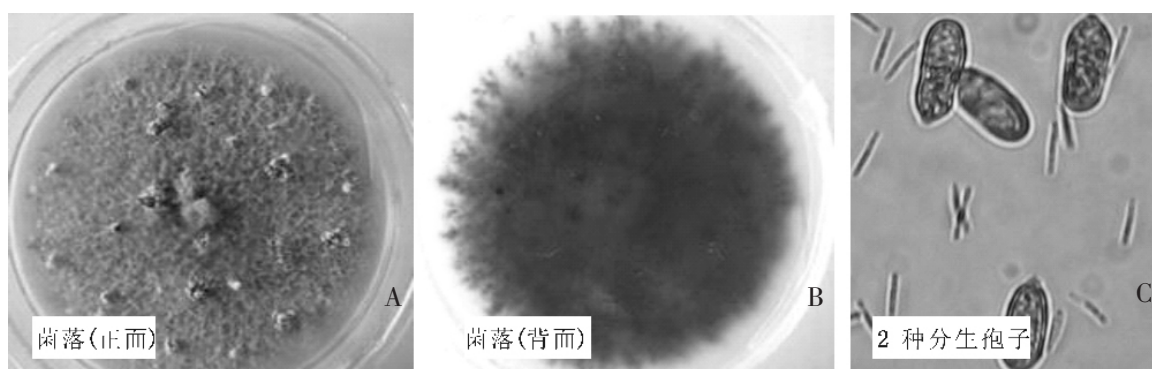


图 2 柳杉瘿瘤病菌的培养形态特征

Figure 2 Colony and conidial morphology of the pathogen of gall disease on *Cryptomeria fortunei*

2.3 基因间隔(ITS)序列分析结果

以病原菌菌株的 DNA 作为模板，用通用引物 ITS1/ITS4 扩增，产生一个大约 600 bp 的 DNA 片段。将 ITS-PCR 片断与 PMD19-T 进行连接，连接产物电转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 的感受态细胞，进行蓝白筛选，选择插入片段长度与克隆片段长度一致的克隆用来测序。经上海生物工程技术有限公司测序后，得到病原菌菌株 rDNA ITS 基因片段，基因序列如图 3 所示，不包括引物结合区，所得到的序列长度为 620 bp；将该序列到 GenBank 中利用 Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) 进行序列比对(登记号 ZHNT91B01R)，结果显示，该病原菌菌株的 ITS 序列同无柄盘菌属 *Pezicula*(拟隐孢壳属有性态)的 ITS 序列的同源性最高，同源性分别达到 97% ~ 99%。由于该病原菌在人工培养条件下未发现子囊、子囊孢子的存在，人工培养下处于无性阶段，因此，将该病原菌株确定为拟隐孢壳属 *Cryptosporiopsis* 真菌，

```

1  ACAACGGATC TCTTGTTCT GGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA TAAGTAATGT
61  GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA CATTGC GCCC CTGTTGTTTC
121  CGGGGGGCAT GCCTGTTCGA GCGTCATTAC AACCCCTCAAG CTCTGCTTGG TCTTGGGCGT
181  CACCGGTCCC CGGTGTGCCT TAAAATCAGT GGCGGCGCCG TCTGGCTCTA AGCGTAGTAC
241  ATACTCTCGC TACAGACGCC CGGCG GATGC TGGCCAGCAA CCCCC AATCT ATCAAGGTTG
301  ACCTCGGATC AGGTAGGGAT ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGAAATCT
361  CTAGAGGATC CCCGGGTACC GAGCTCGAAT TCACTGGCCG TCGTTTTACA ACGTCGTGAC
421  TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGAC CACATCCCCC TTTCGCCAGC
481  TGGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG CAGCCTGAAT
541  GGCGAATGGC GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC
601  ATATGGTGCA CTCTCAGTAC

```

图 3 病原菌菌株的 ITS 基因序列

Figure 3 Sequence of ITS rDNA of pathogens

这与形态学鉴定的结果相一致。

3 讨论

在柳杉瘿瘤病病原研究方面,日本对该病的研究较多。1903年,草野俊助首次报道引起柳杉瘿瘤病的致病菌是带瘤凹球壳菌 *Nitschkea tuberculifera*。1933年,北岛君三再次确认病原菌为带瘤凹球壳菌。1986年,福田健二、铃木和夫对此提出疑问,认为引起该病的病原菌可能是子囊菌亚门腔菌纲 *Botryosphaeria* 属的一种,并建议作进一步的研究,但至今对柳杉瘿瘤病病原的确定尚有争议^[9-10]。本研究通过形态学描述、致病性接种试验以及分子系统学,将柳杉瘿瘤病病原鉴定为拟隐孢壳属 *Cryptosporiopsis* 的真菌,该病原菌在柳杉上是首次报道,但由于受到研究深度的限制,我们暂时尚不能确定该病原菌种的归属和是否为新种,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 夏爱梅, 达良俊, 朱虹霞, 等. 天目山柳杉群落结构及其更新类型[J]. 浙江林学院学报, 2004, **21** (1): 44 - 50.
XIA Aimei, DA Liangjun, ZHU Hongxia, et al. Community structure and regeneration pattern of *Cryptomeria fortunei* in Mount Tianmu of Zhejiang, China [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2004, **21** (1): 44 - 50.
- [2] 张昕, 张立钦, 王记祥, 等. 天目山柳杉瘿瘤病病原菌观察[J]. 浙江林业科技, 2008, **28** (2): 55 - 57.
ZHANG Xin, ZHANG Liqin, WANG Jixiang, et al. Observation on pathogenetic fungi of gall disease on *Cryptomeria fortunei* in Tianmu Mountain [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, **28** (2): 55 - 57.
- [3] 于淑玲. 真菌的分子生物学鉴定方法[J]. 邢台师范高专学报, 2002, **17** (4): 64 - 65.
YU Shuling. How to discern fungi in molecule biology [J]. *J Xingtai Sen Teach Coll*, 2002, **17** (4): 64 - 65.
- [4] COOKE D E L, DRENTH A, DUNCAN J M, et al. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes [J]. *Fungal Genet Biol*, 2000, **30** (1): 17 - 32.
- [5] FÖRSTER H, CUMMINGS M P, COFFEY M D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI [J]. *Mycol Res*, 2000, **104** (9): 1055 - 1061.
- [6] 张敬泽, 徐同, 何黎平. 浙江无核柿炭疽病菌鉴定及附着胞形成过程中的核相变化[J]. 菌物学报, 2005, **24** (3): 446 - 456.
ZHANG Jingze, XU Tong, HE Liping. Anthracnose pathogen on *Diospyros kaki* 'Wuheshi' and its nuclear behavior in process of appressorium formation [J]. *Mycosystema*, 2005, **24** (3): 446 - 456.
- [7] COOKE D E L, DUNCAN J M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat [J]. *Mycol Res*, 1997, **101** (6): 667 - 677.
- [8] 陈善铭, 齐兆生. 中国农作物病虫害: 下册[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [9] 宫崎潤二, 桑原康成. スギ二段林におけるスギこぶ病に関する研究(Ⅱ)13年生時の被害状況と材質への影響[J]. 日林九支研論文集, 2001 (54): 95 - 98.
- [10] 福田健二, 鈴木和夫. スギこぶ病の解剖学的観察[J]. 日本林学会誌, 1986, **68** (11): 462 - 466.