

阿克苏地区胡杨树腐烂病菌系统发育分析

王雅荻¹, 贾文浩², 何全龙², 张王斌^{2*}, 朱悦²

¹塔里木大学植物科学学院, 新疆 阿拉尔

²塔里木大学南疆农业有害生物综合治理重点实验室, 新疆 阿拉尔

Email: 314785383@qq.com, *zwbzky@163.com

收稿日期: 2021年3月8日; 录用日期: 2021年5月20日; 发布日期: 2021年5月27日

摘要

以阿克苏地区农田防护林胡杨树(*Populus euphratica*)腐烂病病菌为研究材料, 采用常规组织分离法进行分离纯化, 观察形态学特征并结合ITS与 β -tubulin序列进行鉴定。利用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 进行序列分析。结果表明代表菌株的菌落形态为白色、羽毛状, 有气生菌丝产生, 后期出现黑色产孢体。分生孢子器浅埋于树皮, 器壁黑褐色、内陷, 孔口1个, 分生孢子器由9至14个小腔室组成, 共用壁, 呈散射状分布, 形态学特征均符合金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*), ITS与 β -tubulin序列与金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)同源性高达99%以上。通过致病性测定显示分离菌为胡杨的致病菌与新疆巴州胡杨腐烂病病原菌相同。

关键词

胡杨树, 腐烂病, 金黄壳囊孢, 鉴定

Phylogenetic Analysis of Rot Pathogens of *Populus euphratica* in Aksu Region

Yadi Wang¹, Wenhao Jia², Quanlong He², Wangbin Zhang^{2*}, Yue Zhu²

¹College of Plant Science, Tarim University, Alar Xinjiang

²Southern Xinjiang Key Laboratory of Integrated Pest Management of Tarim University, Alar Xinjiang

Email: 314785383@qq.com, *zwbzky@163.com

Received: Mar. 8th, 2021; accepted: May 20th, 2021; published: May 27th, 2021

*通讯作者。

Abstract

Populus euphratica rot pathogen surrounding farmland shelterbelt was used as the research material in the Aksu region, and was isolated and purified by conventional tissue separation method. Morphological characteristics were observed and ITS and β -tubulin. The phylogenetic tree was constructed using Neighbor-joining (NJ) for sequence analysis. The results show that the colony morphology of the strain was white and feathery, with the generation of air-borne mycelium and the emergence of black sporogenesis in the later period. Conidia are shallowly buried under the bark, with conidium wall dark brown and sunken, and 1 orifice. Conidia are composed of 9 to 14 small cavities, sharing the same wall, with scatter-like distribution. Morphological characteristics are consistent with *C. chrysosperma*. Both are in line with *C. chrysosperma*. Biological analysis shows that the ITS and β -tubulin sequences are more than 99% homologous to *C. chrysosperma*. It is the same as the pathogen of *Populus euphratica* in Bazhou, and the pathogen of *Populus euphratica*.

Keywords

Populus euphratica, Canker Pathogen, *Cytospora chrysosperma*, Identification

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胡杨(*Populus euphratica*)作为新疆绿洲农业主要的防护林具有防风、防沙和抗旱的作用,是新疆农业生产的一道天然屏障[1]。不仅可以确保农作物稳产高产、能够改善农田小生态系统[2],对旅游业的经济也起到积极作用,具有观赏价值。有研究显示新疆的农田防护林的生态服务价值巨大,可达上千亿元[3]。近年来阿克苏地区主要防护林胡杨树腐烂病发生严重,造成了许多胡杨树势衰弱,发生死亡,给依赖于防护林发展的绿洲农业带来了危害,同时也制约了胡杨旅游业的发展。腐烂病是一种对林果树木危害极大的病害,严重影响树木的寿命[4]。腐烂病会造成树木抗逆性变弱,树枝或树干腐烂干枯,最终导致木质部和形成层细胞死亡,进而影响树体的营养供给造成死亡[5]。我国目前腐烂病主要发生于苹果、梨树、杨树、柳树和核桃等植物上[6][7][8]。其中引起苹果树腐烂病病原菌为黑腐皮壳菌(*Valsa mali*) [8]、梨树腐烂病病原菌为梨黑腐皮壳菌(*Valsa ambiens*) [9],而引起杨树、柳树和核桃腐烂病病原菌都为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*) [10][11]。胡杨分布新疆、青海、甘肃、内蒙古、宁夏等省区[12],胡杨腐烂病的发生在新疆巴音郭楞蒙古自治州、甘肃民勤都分别有报道[13][14],其他地区暂未发现报道。为防止胡杨腐烂病给阿克苏地区农田防护林带来更大的损失,针对阿克苏地区胡杨腐烂病的病原菌作出调查,从形态学出发,以分子手段辅助,分析明确该地区胡杨腐烂病种类,并且研究是否与其他地区为同种病原菌,从而为是否可以采取综合的、通用的防治手段提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

具有代表供试病样:病样采集地点与名称见表1。

Table 1. Disease-like information of tested rot
表 1. 供试腐烂病病样信息

分离株 Isolote	寄主 Host	地点 Origin
HY-1	胡杨(<i>Populus euphratica</i>)	阿拉尔市十二团
HY-2	胡杨(<i>Populus euphratica</i>)	阿拉尔市十二团
HY-3	胡杨(<i>Populus euphratica</i>)	阿拉尔市工业园区
HY-4	胡杨(<i>Populus euphratica</i>)	阿克苏地区温宿县
HY-5	胡杨(<i>Populus euphratica</i>)	阿克苏地区温宿县

2.2. 方法

2.2.1. 病原菌分离纯化

将采集的病样先用清水清洗 2~3 次,再用蒸馏水清洗 2~3 次晾干待用。从病健交界处切取 0.5 cm 大小的小病样,75%酒精浸泡 30 s,次氯酸钠浸泡 30 s,无菌水浸泡 2 min。均匀放置 5 块病样于 PDA 培养基中,25℃黑暗条件下培养 3 d 左右。待长出菌落时进行分离纯培养并保存于-4℃待用。

2.2.2. 致病性测定

将保存的菌株接种于 PDA (Potato Dextrose Agar) 平板 25℃培养 3 d,接种方法参考唐俊煜[15]略有改进。在塔里木大学校内分别采集胡杨树 1~2 年生健康枝条,剪成 10 cm 左右的短枝,用自来水清洗 2~3 次,再用蒸馏水清洗 2~3 次,并用 75%酒精擦拭消毒。将 16×24 cm 消毒盘用处理枝条的方法进行处理后,在消毒盘上铺上 2 层无菌纱布,将其置于无菌操作台用紫外灯灭菌 5 min。将 5 mm 打孔器烧烫后,在处理过的枝条上进行烫伤打孔,将培养 3 d 的菌株用 5 mm 打孔器打成菌饼接种于枝条上,置于消毒盘,做 5 个重复。向消毒盘加入适量的无菌水,用保鲜膜进行封口。将其置于 25℃培养箱培养,每天观察发病情况。

2.2.3. 形态学鉴定

将保存的确认胡杨树腐烂病菌进行活化后,接种于 PDA 培养基,置于 25℃培养箱。观察记录菌落形态学的特征。将长有分生孢子器的胡杨树腐烂病病样进行横纵切片,并置于体视显微镜下观察分生孢子器外部形态,横纵切面形态特征及腔室数量并测量分生孢子器和分生孢子大小[16]。

2.2.4. 分子辅助鉴定

1) 菌体收集及 DNA 的提取

将培养 3 d 的菌株用打孔器取 5~6 个菌饼放置于含有 50 mL PDA 的 150 mL 的锥形瓶中,置于 25℃摇床 160 rpm/min 培养 5 d。用无菌处理的纱布过滤菌块,用无菌水冲洗 3 次,再用灭菌的滤纸吸干水分,经冷冻干燥后,保存于-80℃超低温冰箱中备用。采用改良的 CTAB 法提取胡杨树腐烂病病原菌总 DNA [17]。

2) ITS 与 β -tubulin 基因的扩增

利用真菌通用引物 ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对病原菌的 ITS 进行扩增。PCR 反应程序为 55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s;利用真菌通用引物 Bt2a (5'-GGTAACCAATGCTGCTTTC-3')和 Bt2b (5'-ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC-3')对病原菌的 β -tubulin 基因进行扩增 PCR。ITS 片段的 PCR 选用 12.5 μ l 体系:2.5 μ l 10× Buffer, 2 μ l dNTP (2.5 mM each), 上游引物和下游引物各 0.5 μ l (10 μ M), 0.15 μ l Ex Taq 酶(5 U/ml), 1 μ l 的 DNA 模板,最后用 ddH₂O 补足

12.5 μ l (TaKaRa)。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 重复进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 10 $^{\circ}$ C 保存。Tub 片段 PCR 选用 12.5 μ l 体系: 2.5 μ l 10 \times Buffer, 1.8 μ l dNTP (2.5 mM each), 上游引物和下游引物各 0.5 μ l (10 μ m), 0.2 μ l Ex Taq 酶(5 U/ml), 1 μ l 的 DNA 模板, 最后用 ddH₂O 补足 12.5 μ l (TaKaRa)。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 重复进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 10 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖进行电泳检测后, 由上海生工科技股份有限公司进行测序。

3) 系统发育树的构建

将 ITS 与 β -tubulin 序列提交至 NCBI 中的 GenBank 查找同源序列并下载, 利用 MEGA 5.0 软件通过邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树进行序列分析。

3. 结果分析

3.1. 致病性测定

在健康胡杨树枝条离体接种胡杨腐烂病菌株后, 均引起枝条发病。接种第 7 d 接种部位出现褐色、水渍状病斑, 并且树皮凹陷, 后期病斑扩展至整个枝条。接种第 10 d 接种枝条上产生小黑点, 并伴有橘黄色的分生孢子角出现(图 1(F))。对照未出现任何症状。经过科赫氏法则验证, 分离株即为致病菌。

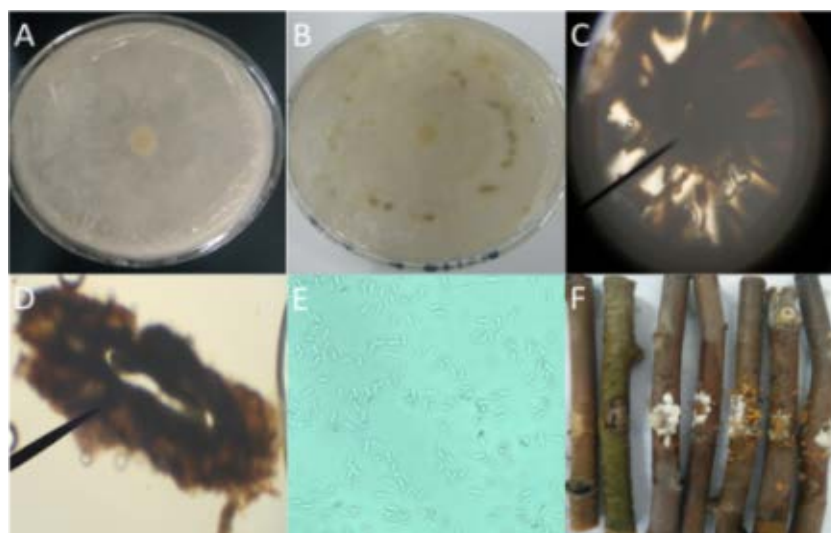


Figure 1. Morphological characteristics of the pathogen and Pathogenicity Determination of canker on *Populus euphratica*. Note: A and B: Colony morphology; C: Pycnidium cross-sections; D: Pycnidium longitudinal section; E: Conidia (four hundred); F: Pathogenicity determination

图 1. 胡杨树腐烂病病原形态特征及致病性测定。注: A 和 B: 菌落形态; C: 分生孢子器横切; D: 分生孢子器纵切; E: 分生孢子(400); F: 致病性测定

3.2. 形态学鉴定

将胡杨树腐烂病菌株 HY1 等 5 个不同地区的菌株接种在 PDA 培养基, 3 d 菌落白色, 羽毛状, 有气生菌丝产生(图 1(A)), 后期出现黑色产孢体(图 1(B))。病样表面分布有黑色突出小点, 在潮湿环境下放置 12 d 后有橘黄色分生孢子角产生。分生孢子器浅埋于树皮, 器壁黑褐色、内陷, 孔口 1 个。将小黑点切片发现分生孢子器 9 至 14 个小腔室组成, 共用壁, 呈放射状分布。分生孢子器横切大小为 0.382 mm~0.815 mm, 纵切大小为 0.153 mm~0.790 mm (图 1(C)和图 1(D))。分生孢子无色, 月牙形, 大小为(3.0~5.10) μ m

× (1.20~1.84) μm (图 1(E))。依据形态特征初步将五个分离株初步鉴定为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*) [18] [19]。将病原菌培养 3 d 菌落白色, 羽毛状, 有气生菌丝产生, 后期出现黑色产孢体。病样在潮湿环境下放置数天后有橘黄色分生孢子角产生。分生孢子器浅埋于树皮, 器壁黑褐色、内陷, 孔口 1 个。分生孢子器横切大小为 0.382 mm~0.815 mm, 纵切大小为 0.153 mm~0.790 mm。分生孢子无色, 月牙形, 大小为(3.0~5.10) μm × (1.20~1.84) μm。并且与巴音郭楞蒙古自治州、民勤的胡杨树腐烂病为同种致病菌。

3.3. 分子鉴定

菌株 HY1 和 HY2 的 ITS 序列大小为 590 bp, β -tubulin 序列大小为 500 bp。将序列提交至 GenBank, 通过 BLAST 进行序列比对。将菌株 HY1、HY2、HY3、HY4 和 HY5 的 ITS 序列与相似度高的序列构建系统进化树, 分析发现与 *Cytospora chrysosperma* (MK061533、MH195202、KP114134、KP114129 和 KC880153)关系最近(图 2(A))且能看出于其他属间存在差异。将菌株 HY1、HY2、HY3、HY4 和 HY5 的 β -tubulin 序列与相似度高的序列构建系统进化树, 分析发现与 *Cytospora chrysosperma* (KT590410、KT590406、KP117038)关系最近(图 2(B)), 进一步确认为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)。

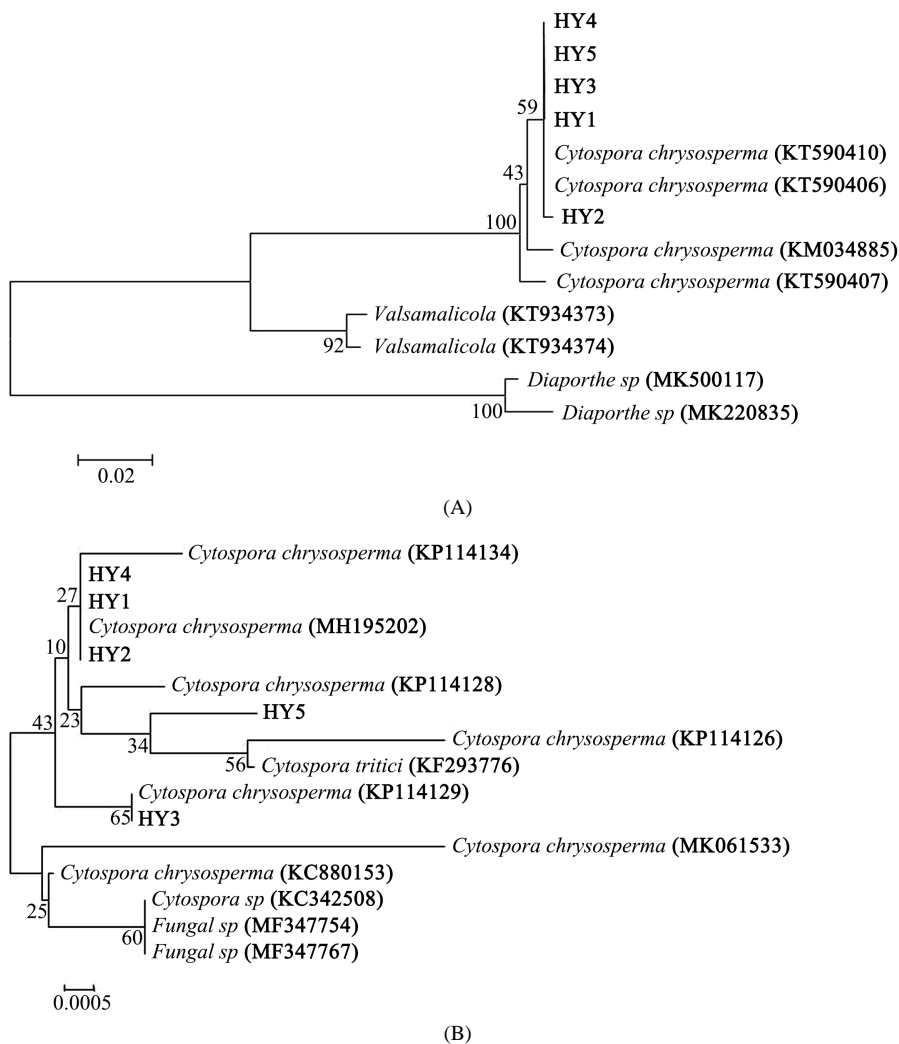


Figure 2. Phylogenetic tree based on ITS sequences and β -tubulin sequences
图 2. 基于 ITS 序列和 β -tubulin 序列构建的系统发育树

4. 讨论

本文主要对在阿克苏地区发现的胡杨腐烂病病菌进行系统发育分析, 通过对其病原菌柯赫氏法则验证、观察形态学特征、并以分子学手段辅助分析。郭开发等研究发现塔里木河下游铁门关市胡杨树腐烂病病原菌为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*) [14]。这与本研究结果一致。引起新疆阿克苏地区胡杨树腐烂病病原菌同为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)。有报道的胡杨腐烂病有新疆、甘肃, 其他暂未发现。并且新疆与甘肃胡杨腐烂病致病菌的种类是否和当地林果树木腐烂病为同种病原, 是否同为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)还有待研究。在新疆, 邵延慧等研究发现新疆塔里木河流域的柳树腐烂病病原菌为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)、新疆南疆的核桃腐烂病病原菌也为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)。唐俊煜研究发现南疆地区枣树腐烂病病原菌同为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*) [20]。说明在新疆南疆地区的林果树木腐烂病的主要致病菌之一为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)防止胡杨腐烂病与果树相互侵染, 在果园防护林的选择上, 可以避开可能交互感病品种。并且在胡杨风景区等旅游场所避开果树种植[21]。胡杨、杨树、柳树腐烂病致病菌同为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*), 除危害果树, 对行道树以及护边林危害也十分严重, 以上五种树之间可能会存在交互侵染, 可以继续存在交互侵染研究。

5. 结论

对新疆阿克苏地区塔里木河流域周围的胡杨树腐烂病病原菌进行分离纯培养, 通过致病性测定, 结合形态学及分子鉴定结果, 确定该病病原菌为金黄壳囊孢(*C. chrysosperma*)。金黄壳囊孢菌(*C. chrysosperma*)不同地理来源的菌株在遗传多样性上有较明显的相关性[22]。

基金项目

大学生创新创业项目, 项目编号: 201910757015。

参考文献

- [1] 张江. 塔里木河下游不同林龄胡杨水分利用策略的探究[D]: [硕士学位论文]. 石河子: 石河子大学, 2018.
- [2] 孙钦明. 新疆典型沙区区域防风固沙体系协同配置研究[D]: [博士学位论文]. 石河子: 石河子大学, 2016.
- [3] 马荣, 赵颖, 尹永香, 等. 不同来源金黄壳囊孢菌的培养性状及对 3 个品种杨树的致病性研究[J]. 新疆农业大学学报, 2018, 41(5): 339-345.
- [4] 朱玉伟, 桑巴叶, 王永红, 等. 新疆农田防护林生态系统服务功能价值核算[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(6): 302-307.
- [5] Biggs, A.R. (1989) Integrated Approach to Controlling Leucostoma Canker of Peach in Ontario. *Plant Disease*, **73**, 869-874. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0869>
- [6] Trouillas, F.P. and Gubler, W.D. (2016) *Cryptosphaeria dieback* of Fremont Cottonwood Caused by *Cryptosphaeria pullmanensis* and *C. multicontinentalis* in California. *Plant Disease*, **100**, 777-783. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-0972-RE>
- [7] 郭开发, 王刚, 吴彩兰, 等. 新疆南疆核桃树腐烂病菌鉴定[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(3): 496-501.
- [8] 邵延慧, 张王斌, 刘振亚, 等. 新疆南部塔河流域柳树腐烂病病原菌的鉴定[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(8): 1481-1488.
- [9] Adnan, F., Khan, A., Zaib, U., et al. (2017) Surveillance of Apple Canker and Identification of Canker Pathogen in Apple Orchards at District Ziarat (Balocistan). *The Pakistan Journal of Biotechnology*, **14**, 771-775.
- [10] Zhu, J., Cheng, C., Yang, X.L., et al. (2016) Culturing Phenotypes and Pathogenicity of Pear *Valsa* Canker Pathogens from China's Main Pear Production Areas. *Journal of Nanjing Agricultural University*, **39**, 235-241.
- [11] Ma, R., Zhu, Y.F., Fan, X.L., et al. (2016) Canker Disease of Willow and Poplar Caused by *Cryptosphaeria pullmanensis* Recorded in China. *Forest Pathology*, **46**, 327-335. <https://doi.org/10.1111/efp.12261>
- [12] Fan, X., Hyde, K.D., Liu, M., et al. (2015) *Cytospora* Species Associated with Walnut Canker Disease in China, with

Description of a New Species *C. gicalocus*. *Fungal Biology*, **119**, 310-319.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.011>

- [13] 刘仪. 胡杨分布的新发现[J]. 干旱区地理, 1987(2): 14.
- [14] 马述宏, 马存世, 李文华, 等. 民勤石羊河国家湿地公园胡杨病害及其防治对策[J]. 甘肃林业科技, 2015, 40(2): 38-40.
- [15] Lawrence, D.P., Holland, L.A., Nouri, M.T., *et al.* (2018) Molecular Phylogeny of *Cytospora* Species Associated with Canker Diseases of Fruit and Nut Crops in California, with the Descriptions of Ten New Species and One New Combination. *IMA Fungus*, **9**, 333. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2018.09.02.07>
- [16] 郭开发, 吴彩兰, 方晓翠, 等. 塔里木河下游胡杨树腐烂病原鉴定[J]. 中国森林病虫, 2015, 34(5): 1-4.
- [17] Haugland, R.A., Brinkman, N. and Vesper, S. (2002) Evaluation of Rapid DNA Extraction Methods for the Quantitative Detection of Fungi Using Real-Time PCR Analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **50**, 319-323. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00037-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00037-4)
- [18] 杨明秀, 宋瑞清. 中国金黄壳囊孢菌的致病性分化及遗传多样性[J]. 林业科学, 2013, 49(6): 115-121.
- [19] 张俊娥, 梁英梅, 田呈明. 金黄壳囊孢菌分生孢子器发育过程研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(5): 573-581.
- [20] 唐俊煜. 新疆绿洲生态枣园林木腐烂病菌种类鉴定及交互侵染机制研究[D]: [硕士学位论文]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2016.
- [21] 曹素芳, 毕淑海, 李红旭, 等. 甘肃梨产区腐烂病发生现状及防治措施[J]. 中国果树, 2016(6): 90-93.
- [22] 范鑫磊. 中国黄河流域壳囊孢属的分类和系统学研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京林业大学, 2016.