

文章编号: 1000-5862(2015)01-0106-05

井冈山毛竹病斑表面可培养真菌的 分离及多样性研究

张志斌¹, 刘 德¹, 熊瑶瑶¹, 汪 涯², 刘易鑫³, 朱 笃^{1, 2*}

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022;

2. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330013;

3. 江西省林业科学院, 江西 南昌 330032)

摘要: 为了解毛竹表面病害可培养真菌的多样性, 采用组织分离法对井冈山毛竹病斑表面真菌进行了分离, 并对其 ITS-rDNA 序列进行系统发育分析, 同时研究了其多样性。结果表明: 所分离的 30 株真菌可归属于 12 个属, 以链孢霉属 *Fusarium* (占比 20.00%)、交链孢属 *Alternaria* (占比 13.33%) 和赤霉属 *Gibberella* (占比 10.00%) 为优势类群, 多样性指数的计算反映出所获得的毛竹表面真菌菌群具有不同的丰富度及均匀度。

关键词: 毛竹; ITS-rDNA 序列分析; 多样性指数

中图分类号: Q 33 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.01.20

0 引言

竹类植物是重要的可再生资源, 竹林被人们称为“第二森林”, 是人类的天然氧吧, 在原木替代品、工业原料、食品材料、医药保健材料等方面有着广泛的应用^[1]。毛竹是我国竹类品种中经济价值高、分布广的优良竹种, 因具有生长快、产量高、材质好等特点而有着广泛的分布^[2-3]。随着毛竹林经营水平的提高和面积毛竹纯林的增加, 毛竹病虫害发生呈现多样化发展。竹子为无性繁殖植物, 在竹子上寄生、腐生、习居的生物较多, 生物多样性较稳定, 其中以真菌为最多^[4]。C. Mohanan 对亚洲竹类病害进行调查, 发现有多种真菌、细菌及病毒等不同种类、不同类型的病原物侵害竹类 26 个属中的 170 个种^[5]。在中国竹类真菌病害中主要有毛竹枯梢病、基腐病、竹秆褐腐病、竹叶锈病、竹秆锈病、竹黑粉病、竹赤团子病、竹肉球病、竹黑痣病、竹丛枝病等^[6-7]。

近年来, 本课题组对江西省的毛竹林进行调查, 在井冈山国家级自然保护区发现毛竹林感染了一种

竹秆病害, 该病不同于以往所报道的竹林病害特征, 根据病原形态初步命名为菱斑病。同时对该病斑的表面微生物进行了初步分离, 将分离的致病微生物进行了大田实验, 获得了一些致病信息^[8]。为了进一步确定该类病害的致病菌株, 本文以井冈山国家级自然保护区天然毛竹林为研究对象, 系统调查了竹秆病斑表面真菌的数量, 并依据 ITS-rDNA 序列特征对分离的 30 个菌株进行了鉴定和系统发育多样性分析, 初步获得了天然毛竹林病斑可培养真菌种群的多样性信息, 以期确定该病病原菌提供菌种资源, 也为下一步进行田间生物防治提供基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集及真菌的分离

从江西省井冈山国家级自然保护区毛竹栽培地采集发病的毛竹, 采样时选取相近年龄的发病植株, 在原地处理好材料, 用无菌袋分装带回实验室于 24 h 之内取染病毛竹的竹竿病健交界处, 采用常规组织分离法^[9], 对样品进行真菌分离。所得菌株在

收稿日期: 2014-07-09

基金项目: 国家自然科学基金(81260617)和江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室开放基金(YRD201401)资助项目。

通信作者: 朱 笃(1971-) 男, 江西高安人, 教授, 博士, 主要从事微生物资源与代谢工程研究。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)分离纯化,获得纯菌株于4℃斜面保藏待用。

1.2 真菌的形态学鉴定

依照真菌的经典分类鉴定方法^[10],结合菌株菌落形态特征,包括形状、质地、颜色、边缘特征等情况,初步去重复后确定形态种。

1.3 真菌 ITS-rDNA 区扩增、测序和序列分析

形态去重复后的菌株采用 CTAB 的方法提取基因组 DNA^[11]。采用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 ITS 序列^[12]。PCR 反应体系为:模板 DNA 2 μL、10 × PCR buffer 5 μL、*Taq* DNA 聚合酶 2.5 Unit、dNTP (2.5 mmol · L⁻¹) 4 μL、引物各 3 μL,补充去离子水至 50 μL。反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 40 s; 60℃, 40 s; 72℃ 40 s,共 34 个循环;72℃ 5 min。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生物技术有限公司)纯化,送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。序列提交到 GenBank 核酸序列数据库并得到登号,采用软件 ClustalX 1.81 进行多序列的比较,比对结果采用 MEGA 4.0 软件进行系统进化树的构建。

1.4 真菌多样性分析

所分离真菌的生物多样性采用 Shannon-Wiener 指数(H)和 Simpson 指数(D)进行分析。 $H = -\sum P_i \ln P_i$, $D = 1 / \sum P_i^2$,其中 P_i 为属于种 i 的个体在全部个体中的比例;采用 Evenness 指数(J)分析群落物种分布的均匀程度。 $J = H / \ln S$,其中 H 为 Shannon-Wiener 指数, S 为物种总数目^[13]。

2 结果与分析

2.1 毛竹病害的症状特点

前期调查表明,井冈山毛竹林新病害主要危害2年生以上的毛竹,病菌由外而内逐渐深入竹腔,导致竹秆腐烂至整株枯死,该病原为竹节间密布菱状病斑,并成块状扩散。根据病原形态初步命名为菱斑病。图1为调查取样健康毛竹和发病毛竹的示意图。

2.2 毛竹病斑部位真菌的分离

利用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)对毛竹菱斑病样品组织块进行分离,在总共108块毛竹病斑组织中分离获得30株真菌。根据菌株菌落大小、颜色,其中18株是菌落表型有差异的微生物,图2为部分分离菌落形态特征。



图1 健康毛竹与毛竹菱斑病病变图

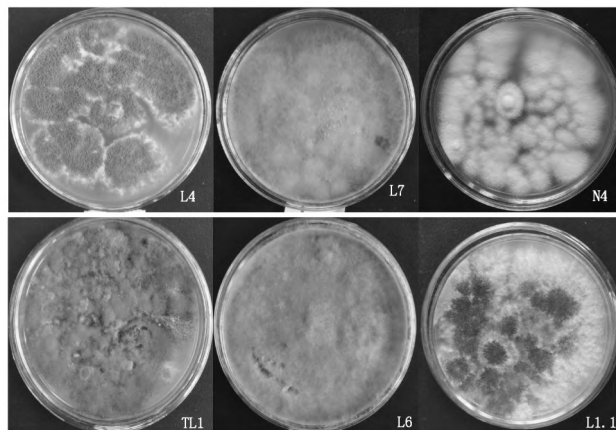


图2 部分纯化微生物的菌落形态

2.3 毛竹病斑部位真菌的多样性

对30株分离培养物的 ITS 进行序列测定,将获得的序列通过 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已报道的序列进行相似性比对分析,其中29株与 GenBank 中已报道菌株具有较高的相似性($\geq 97\%$),1株相似性只有92%(见表1)。多样性指数分析表明:分离自毛竹病斑的真菌 Shannon 多样性指数为2.3898, Simpson 多样性指数为0.8933,均匀度指数为0.7026。

2.4 毛竹病斑部位真菌的系统发育学分析

根据菌株菌落大小、颜色等形态特征去重复后选择18株形态种用于分子鉴定,利用真菌 ITS 序列的通用引物进行 PCR 扩增,扩增的目的片段送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序片段用 BLAST 软件与 GenBank 的 ITS 序列进行同源性比较,用于进化树构建的菌株的名称和序列登录号如表1。将形态种 ITS-rDNA 测序后经 BLAST 比对,MEGA4.0 构建 Neighbor-joining 系统进化树(见图3)。

16S rDNA 序列分析表明,分离得到的30株真菌都属于子囊菌(100%),主要分属于12个属,其中2株不能确定种属地位(见表1);在属的水平上以链孢霉属 *Fusarium*、交链孢属 *Alternaria* 为优势类群,分别占总菌株数的20.00%和13.33%(见表1)。

3 讨论

微生物是生态系统中重要的组成部分,其群落结构组成及其变化在一定程度上影响着植物的质量及其健康状况,植物的健康除与土壤环境息息相关外,也与周边空间环境微生物密切相连^[14-15]。目前

土壤微生物多样性及功能菌株的筛选已引起国内外学者的极大重视^[16],对土壤微生物群落结构的研究日益增多,但是对与植物周边环境相关的表面微生物及其多样性的研究在国内及国际上报道不多,这些极有可能与植物地上组织病害侵染有关^[17]。

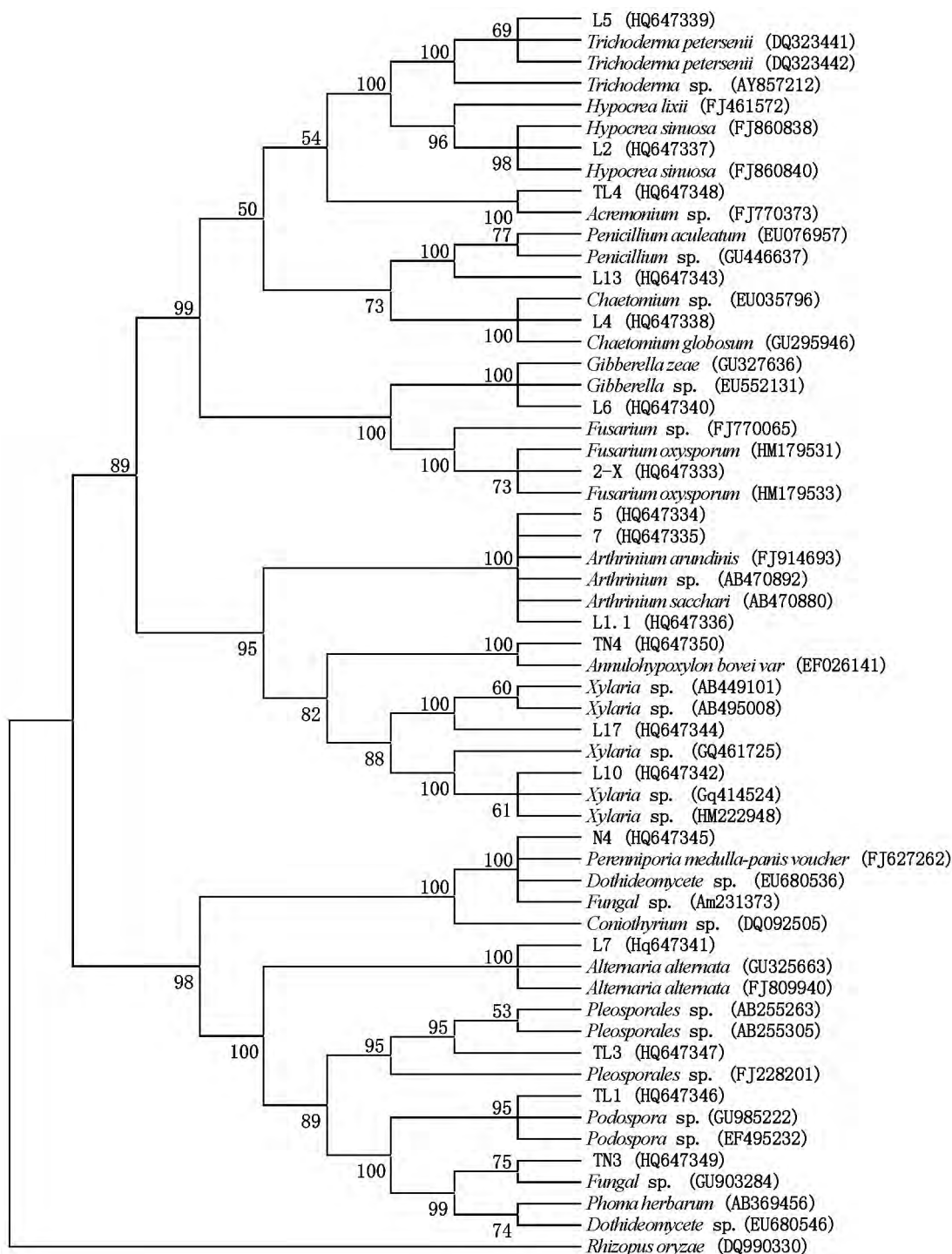


图3 邻接法构建 ITS 序列的系统进化树

本文从井冈山毛竹病斑组织中分离获得真菌 30 株,根据菌落形态特征和 ITS 序列鉴定将其归属

为 *Fusarium*、*Alternaria*、*Gibberella*、*Arthrimum*、*Xylaria* 和 *Podospira* 等 12 个属,还包括 2 个未确定的潜

在新属; 多样性指数分析表明分离自毛竹病斑的真菌 Shannon 及 Simpson 多样性指数分别为 2.389 8 和 0.893 3 均匀度指数为 0.702 6 这些结果表明毛竹真菌多样性较丰富. 李潞滨等^[18]对毛竹根际土壤可培养细菌和放线菌多样性研究表明天然毛竹林根

际具有较为丰富的可培养微生物种群多样性, 并存在一些潜在的新的微生物菌种资源研究. 周春来等^[19]对竹类病原真菌进行统计发现其多达 440 多种, 而中国境内竹类病害病原物就多达 208 种, 这充分证明竹类病原菌具有丰富的种群多样性.

表 1 菌株的名称和序列登录号表

Phylogenetic group(genus)	Representative isolate(accession No.)	No. of strainsin OTU	Nearest type strain (accession No.)	Sequence identity /%
<i>Fusarium</i>	2-X(HQ647333)	6	<i>Fusarium oxysporum</i> (HM179531)	99
<i>Trichoderma</i>	L5(HQ647339)	1	<i>Trichoderma gamsii</i> (EF488141)	99
<i>Gibberella</i>	L6(HQ647340)	3	<i>Gibberella zeae</i> (HM769950)	99
	5(HQ647334)		<i>Arthrinium sacchari</i> (AB470880)	99
<i>Arthrinium</i>	7(HQ647335)	3	<i>Arthrinium sacchari</i> (AB470880)	99
	L1. 1(HQ647336)		<i>Arthrinium sacchari</i> (AB470880)	99
<i>Unidentified</i>	N4(HQ647345)	2	<i>Paraconiothyrium</i> (EU295647)	98
	TN3(HQ647349)		<i>Fungal</i> sp. (GU903284)	99
<i>Podospora</i>	TL1(HQ647346)	2	<i>Podospora</i> sp. (EF495232)	99
<i>Pleospora</i>	TL3(HQ647347)	1	<i>Pleosporales</i> sp. (AB255263)	99
<i>Alternaria</i>	L7(HQ647341)	4	<i>Alternaria alternata</i> (GU325663)	99
<i>Hypocrea</i>	L2(HQ647337)	2	<i>Hypocrea sinuosa</i> (FJ860838)	98
<i>Chaetomium</i>	L4(HQ647338)	1	<i>Chaetomium globosum</i> (GU295946)	99
	L10(HQ647342)		<i>Xylaria</i> sp. (GQ414524)	99
<i>Xylaria</i>	L17(HQ647344)	3	<i>Xylaria</i> sp. (AB495008)	98
	TN4(HQ647350)		<i>Annulohyphoxylon bovei</i> (EF026141)	98
<i>Acremonium</i>	TL4(HQ647348)	1	<i>Acremonium</i> sp. (FJ770373)	92
<i>Penicillium</i>	L13(HQ647343)	1	<i>Penicillium aculeatum</i> (EU076957)	98

一些植物表面真菌能侵染植物并使其宿主致病. 吕康生等^[20]从感病的杂交竹中分离出 10 株镰刀菌(*Fusarium*) , 并认为其中 6 种分离菌都是杂交竹枯萎病的病原菌, 该病的病原到底是镰刀菌属的一种还是多种, 以及该病的发病规律和防治措施等值得进一步研究. 马桂莲等^[21]通过分离、接种、再分离首次证实杂交竹梢枯病的病原为暗孢节菱孢菌(*Arthrinium phaeospermum*) . 本文从井冈山毛竹菱斑病中分离到许多致病真菌, 如 *Trichoderma*、*Fusarium*、*Arthrinium* 和 *Gibberella* 等, 该类病害是否与分离所得的病原真菌有关, 是由一种还是多种菌混合作用相关, 这些都有待于进一步研究.

4 参考文献

[1] 王玲. 竹类植物的工业利用途径综述 [J]. 安徽农业科学 2011 39(17) : 10294-10296.

[2] 邱尔发 洪伟 郝郁善. 中国竹子多样性及其利用评述 [J]. 竹子研究汇刊 2001 20(2) : 11-14.

[3] 熊彩云 刘东明 黎美莲 等. 江西毛竹林主要病虫害的综合防治策略 [J]. 世界竹藤通讯 2006 4(4) : 40-42

[4] 徐天森 王浩杰. 中国竹子主要害虫 [M]. 北京: 中国林业出版社 2004.

[5] Mohanan C. Diseases of bamboo in Asia: An illustrated manual [M]. Beijing: International Network for Bamboo and Rattan ,1996.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 王海霞 徐小军 彭九生 等. 井冈山毛竹菱斑病病原菌的分离与鉴定 [J]. 竹子研究汇刊 2012 ,31(2) : 42-46.

[9] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社 ,1998.

[10] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社 ,1979.

[11] Guo L D ,Hyde K D ,Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. New Phytol 2000 ,147(13) : 617-630.

- [12] Jin S L, Kwan S K, Hack S J. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences [J]. FEMS Microbiol Lett 2000, 187(1): 89-93.
- [13] 杜少康, 陈双林, 林岱, 等. 银杏叶部内生真菌多样性的研究 [J]. 菌物学报 2009, 28(4): 504-511.
- [14] 王雪梅, 曲建升, 李延梅, 等. 生物多样性国际研究态势分析 [J]. 生态学报 2010, 30(4): 1066-1073.
- [15] 刘开朗, 王加启, 卜登攀, 等. 环境微生物群落结构与功能多样性研究方法 [J]. 生态学报 2010, 30(4): 1074-1080.
- [16] 王启明, 彭仁, 陈文静, 等. 苯酚降解菌的筛选及降解性能研究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2012, 36(3): 317-320.
- [17] 沙月霞. 红枣贮藏期果面微生物多样性 [J]. 生态学报 2011, 31(2): 483-490.
- [18] 李璐滨, 刘敏, 杨淑贞, 等. 毛竹根际可培养微生物种群多样性分析 [J]. 微生物学报 2008, 48(6): 772-779.
- [19] 周春来, 吴小芹, 吉静, 等. 竹类病害研究进展 [J]. 林业科技开发 2010, 24(5): 8-13.
- [20] 吕康生, 陆小妹. 撑×绿杂交竹^{3#}枯死原因研究初报 [J]. 广西植保 2004, 17(2): 1-4.
- [21] 马桂莲, 胡国良, 俞彩珠, 等. 高节竹梢枯病原菌及其生物学特性 [J]. 浙江林学院学报 2003, 20(1): 41-48.

The Diversity and Isolation of Endophytic Fungi on the Lesion Surface of Jianggangshan *Moso Bamboo*

ZHANG Zhibin¹, LIU De¹, XIONG Yaoyao¹, WANG Ya², LIU Yixin³, ZHU Du^{1, 2*}

(1. Key Lab of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China; 2. Key Lab of Bioprocess Engineering, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang Jiangxi 330013, China; 3. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang Jiangxi 330032, China)

Abstract: To obtain the information of the cultivable fungi diversity at the lesion surface of *Moso Bamboo*, the lesion surface of Jianggangshan *Moso Bamboo* was isolated strains by tissue isolation method, the ITS-rDNA sequence and the diversity of the cultured fungi were analyzed. A total of 30 strains of fungi was isolated. As a result of morphological identification 12 genera were obtained, of which *Fusarium* (20.00%), *Alternaria* (amounting to 13.33% of the total) and *Gibberella* (10.00%) were dominant. Populations of fungi on surface of the *Moso Bamboo* indicated different abundance and uniformity.

Key words: *Moso Bamboo*; ITS-rDNA sequence analysis; diversity index

(责任编辑: 刘显亮)