

# 茶树内生球座菌的鉴定及遗传多样性分析

杨民和<sup>1,2</sup>, 徐焰平<sup>1</sup>, 苏经迁<sup>1</sup>

(1. 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350108; 2. 福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心, 福建 福州 350108)

**摘要:** 以分离自茶树和山茶等植物的 25 个内生球座菌分离物为材料, 采用形态学、18S rDNA 序列分析和 ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> 序列分析相结合的方法, 对这些球座菌分离物进行鉴定; 并应用简单序列重复区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat polymorphism, ISSR) 对这些菌株的遗传多样性进行分析。结果表明: 所获得的 25 个球座菌分离物虽然在 PDA 培养基上的菌落形态和生长速度存在较明显的差异, 但形态学特征、18S rDNA 序列和 ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> 序列分析表明这些菌株均属于芒果球座菌 (*Guignardia mangiferae*)。通过 ISSR 分析, 从 35 个随机引物中筛选出 10 个表现多态性的引物, 扩增后共获得 88 个 ISSR 标记, 其中多态性标记 76 个, 占 86.3%。以相异距离 0.29 为标准, 可以将此 25 个菌株划分为 3 个遗传聚类群, 在 PDA 上形态相似、生长速度相近的菌株聚为一群; ISSR 分析结果还显示芒果球座菌在山茶中具有更为丰富的遗传多样性。

**关键词:** 茶树; 芒果球座菌; 内生真菌; 鉴定; 遗传多样性

中图分类号: Q756; Q939 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0946-10

## Characterization and Genetic Diversity Analysis of Endophytic *Guignardia* Isolated from *Camellia sinensis*

YANG Min-he<sup>1,2</sup>, XU Yan-ping<sup>1</sup>, SU Jing-qian<sup>1</sup>

(College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 2. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** *Guignardia* sp. is a cosmopolitan endophyte of tea plants. 25 isolates of *Guignardia* sp. from *Camellia sinensis*, *C. japonica* and other plants in Fujian Province were identified. And their genetic diversity was assessed using technique of inter-simple sequence repeat (ISSR). The 25 isolates were divided into two groups based on colony morphology and growth rates on PDA media. But the results of 18S rDNA sequence and ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> sequence analysis showed that these isolates corresponded well with that of *G. mangiferae*. Based on morphology, 18S rDNA sequence and ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> sequence analysis, these 25 isolates were identified as *Guignardia mangiferae*. 8 primers which showed polymorphism after PCR were selected from 35 random primers. A total of 88 reproducible ISSR fragments were scored among 25 *Guignardia* isolates, of which 76 fragments (86.3%) were polymorphic. In 0.26 dissimilarity distance cluster analysis showed the existence of 3 distinct genetic groups in 25 individuals. These isolates which showed similar colony morphology

收稿日期: 2010-09-23

基金项目: 福建省自然科学基金重点项目 (B0620005)

作者简介: 杨民和 (1964—), 男, 江西进贤人, 教授, 博士。1985年7月本科毕业于江西农业大学植物保护系; 2001年3月博士毕业于浙江大学植物病理学专业。现为福建师范大学生命科学学院生物工程系主任。研究方向为: 微生物资源及代谢产物。主编新世纪教材《微生物学》, 参编《微生物工程》; 主持《微生物学》省级精品课程。现主持福建省自然科学基金重点项目等3项, 参加福建省科技厅专项等2项, 发表学术论文近60篇, E-mail: minhe214@fjnu.edu.cn。

and growth rate on PDA media were clustered into one group. The results of ISSR analysis also suggested that isolates of *Guignardia* sp. from *C. japonica* were more polymorphic than that from *C. sinensis*.

**Key words:** *Camellia sinensis*; *Guignardia mangiferae*; endophytic fungi; identification; genetic diversity

球座菌属(*Guignardia*)及其无性型(*Phyllosticta*)是常见的植物寄生真菌,有些是腐生菌或植物的病原菌,有些则以潜伏状态长期生活于植物的组织中,在植物组织衰老或逆境条件下,才表现一定的致病性<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明,球座菌寄主广泛,在不同类型的植物中都可以分离获得<sup>[2-3]</sup>。其中,芒果球座菌(*G. mangiferae*)是一种寄主植物众多、分布十分普遍的植物内生真菌,与一些植物的病原球座菌如柑桔球座菌(*G. citricarpa*)同时发生,从形态上难于区分,影响对植物病原真菌的鉴定和对病害的诊断,给柑桔黑斑病的检疫造成一定的困难<sup>[4-6]</sup>。

对茶树(*Camellia sinensis*)内生真菌的系统分离和调查发现,球座菌是生活于茶树叶片组织中的优势菌。在成熟茶树叶片组织中,球座菌分离率高达79.51%,在茶树的生长季节里,球座菌可以长期生活于茶树组织中,对茶树不表现可见的病害作用<sup>[7-8]</sup>。研究还发现,球座菌在山茶(*C. japonica*)、油茶(*C. oleifera*)及其它植物中也有广泛的分布,在山茶和油茶叶片组织中,分离率分别达到25.82%和73.29%<sup>[9]</sup>。

但是,对分离自茶树和油茶的球座菌进行纯培养的结果表明:内生球座菌在菌落形态和生长速度方面存在比较明显的差异。鉴于我国在植物内生球座菌方面缺乏系统的资料,这些真菌与茶树病原菌之间的关系尚不清楚,本研究采用形态学和分子生物学方法(18S rDNA序列分析和ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub>序列分析)相结合,对分离自健康茶树和山茶体内的球座菌进行了鉴定;并应用简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat polymorphism, ISSR)对这些菌株的遗传多样性进行分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

25个芒果球座菌菌株用于本研究中,其中有15个菌株分离于茶树,8个菌株分离于山茶,2个菌株分离于蛇足石杉(*Huperzia serrata*)。供试菌株的编号、寄主植物及样品采集地点等见表1。

表1 供试内生球座菌菌株

Tab.1 Tested strains of *Guignardia* spp. in this study

菌株编号 Isolate code	寄主植物 Plant host	地点 Site	菌株编号 Isolate code	寄主植物 Plant host	地点 Site
Nsy-01	茶树	福建农林大学	Ymy-01	茶树	福建安溪
Nsy-02	茶树	福建农林大学	Ymy-02	茶树	福建安溪
Nsy-04	茶树	福建农林大学	Ymy-10	茶树	福建安溪
Nsy-10	茶树	福建农林大学	Ymy-11	茶树	福建安溪
Nsy-11	茶树	福建农林大学	Xhy-01	山茶	福建师范大学
Nsy-12	茶树	福建农林大学	Xhy-02	山茶	福建师范大学
Nsy-13	茶树	福建农林大学	Xhy-03	山茶	福建师范大学
Sy-01	蛇足石杉	福建三明	Xhy-04	山茶	福建师范大学
Sy-02	蛇足石杉	福建三明	Xhy-05	山茶	福建师范大学
N-3	茶树	福建农林大学	Xhy-06	山茶	福建师范大学
N-4	茶树	福建农林大学	Xhy-07	山茶	福建师范大学
N-5	茶树	福建农林大学	Xhy-08	山茶	福建师范大学
Nmy-01	茶树	福建农林大学			

### 1.2 培养基

(1) 固体培养基: 马铃薯培养基(PDA), LB培养基, LB/AMP平板培养基。

(2) 液体培养基: SOB培养基, SOC培养基, 查氏液体(Czapek)培养基。

### 1.3 芒果球座菌的培养及产孢诱导

将分离获得的球座菌菌株移植到PDA平板上,置于28℃恒温下培养,观察它们的菌落形态、颜色

变化、产孢情况并拍照。纯培养的结果表明,这些球座菌菌株在 PDA 培养基上难于产生产孢结构和孢子。因此,进一步的研究,我们采用 2 种方法进行产孢诱导。第 1 种是挑选表面健康无病斑、成熟的茶树叶片,经表面消毒后放在网袋中以保持通气,3 个月后可以一些叶片表面观察到黑色小点;其次,每隔 2~3 d 往叶片表面洒无菌水,以保持叶片的湿润;再过 7~15 d 后,随机用徒手切片观察叶片表明产生的真菌结构<sup>[10]</sup>。第 2 种方法是将茶树叶片高压灭菌后,接入球座菌菌株,置于常温下培养,约 1~2 个月后可在茶叶表面观察到有真菌产孢结构产生。其后制片镜检,观察产孢结构形态,测量孢子大小并拍照保存。

#### 1.4 基因组 DNA 的提取和纯化

从在 PDA 平板上培养 5 d 的菌落边缘用打孔器打出直径为 8 mm 的圆形菌丝块,接种到 50 mL PDA 液体培养基中,28 °C 条件下 200 r/min 振荡培养 3 d;4 °C 条件下 12 000 r/min 离心收集菌体,用无菌水洗涤 2 次,再用灭菌生理盐水洗 2 次,其后在冷冻干燥器中干燥,去除水分,-20 °C 过液后备用。

(1) 将上一步收集到的菌丝放到研钵中用液氮研磨,研磨后称取 0.1 g 菌丝粉末,放入 10 mL 的 EP 管中,每管迅速加入 2 mL DNA 抽提液,DNA 抽提液成分为(4 mL 0.5 mol/L Tris-HCl pH 8.0、250 μL 0.5 mol/L EDTA pH 8.0、1 mL SDS 10% pH 7.2、4.75 mL 无菌水配成 10 mL),再加入 1 mL Tris-饱和酚:氯仿(1:1),充分涡旋,4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min。(该步骤可以重复 2 次);(2) 取上清液 1.5 mL (1 管约能取出 1.8~2.0 mL),再次放入 10 mL EP 管中,加入 5 μL RNase,37 °C 水浴 30 min;(3) 加入等体积的氯仿,混匀后,4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min;(4) 取上清液至新的 1.5 mL 的 EP 管中,1 管 500 μL,加入 2 倍体积的无水乙醇,再加入总体积 1/10 的 3 mol/L NaAc (pH 5.2,用冰醋酸调 pH 值),-20 °C 下静置 30 min;(5) 4 °C,12 000 r/min 下离心 15 min,弃上清,加入 500 μL 体积分数为 75% 乙醇,4 °C,12 000 r/min 离心 10 min;(6) 重复(5) 步骤 1 次;(7) 弃上清,自然风干,后用 TE 或者灭菌的高纯水(25 μL)溶解,-20 °C 保存备用。

用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶,0.5 × TBE 为电泳缓冲液,5 V/cm 电压,上样 2 μL 电泳检测,用 DNA Marker 指示分子量,电泳后在含有溴化乙锭(1 mg/mL) 中染色,凝胶成像仪观察并照相<sup>[11]</sup>。

#### 1.5 18S rDNA 的扩增

扩增所用的引物为 18S 上游引物 5'-CCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' 和 18S 下游引物 5'-CCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCT-3' 均由宝生物工程有限公司(大连)合成。扩增反应在 15 μL 体系,依次加入下列试剂:ddH<sub>2</sub>O 9.3 μL;10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 1.5 μL;dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 1 μL;18S 上游引物(10 pmol/L) 1 μL;18S 下游引物(10 pmol/L) 1 μL;模板 DNA 1 μL(20~50 ng);TaKaRa *rTaq* 酶 0.2 μL(5 U/μL)。在 Mastercycler 按以下程度进行 PCR 扩增:5 °C 预变性 5 min;然后 94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶,0.5 × TBE 为电泳缓冲液,5 V/cm 电压,上样 2 μL 电泳检测,用 DNA Marker 指示分子量,电泳结束后溴化乙锭(1 mg/mL) 中染色,凝胶成像仪观察并照相<sup>[11]</sup>。

#### 1.6 rDNA ITS 序列的扩增

扩增和测序所用的引物为 ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 和 ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAAGG-3',均由宝生物工程(大连)有限公司合成。扩增反应在 25 μL 体系中进行,依次加入下列试剂:ddH<sub>2</sub>O 16.75 μL;10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 2.5 μL;dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2.5 μL;ITS4 (10 pmol/L) 1 μL;ITS5(10 pmol/L) 1 μL;模板 DNA 1 μL(20~50 ng);TaKaRa *rTaq* 酶 0.25 μL(5 U/μL)。在 Mastercycler 按以下程度进行 PCR 扩增:95 °C 预变性 5 min;然后 94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 50 s,共进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶,0.5 × TBE 为电泳缓冲液,5 V/cm 电压,上样 2 μL 电泳检测,用 DNA Marker 指示分子量,电泳完在含有溴化乙锭(1 mg/mL) 中染色,染色完凝胶成像仪观察并照相。扩增产物纯化检测、大肠杆菌的培养、生长及感受态细菌的制备及 TA 克隆按常规方法进行<sup>[12]</sup>。

#### 1.7 序列测定和系统发育树的构建

将提取的质粒 DNA 直接送上海生工生物工程公司,用 377 型 DNA 测序仪(美国 PE 公司)进行序列测定。正向引物 M13<sup>+</sup>(5'→3') 进行测定,对正向无法测通的片段用反向引物 M13<sup>-</sup>(3'→5') 再测,反向序列经 BioEdit version 5.0.6 软件反向(reverse) 互补后与正向序列进行连接形成 5'→3' 完整序列<sup>[1]</sup>。

将所测序列输入 BioEdit 软件中,用 Clustalw 进行序列对准(alignment),对所有序列进行对准前均需进行序列判读以减少读序的错误。

从 GenBank 下载的序列先根据扩增序列归类,再输入 BioEdit 软件进行比对。对于同一个种的序列,如果和大多数序列相差太多则作为错误序列加以排除;如果和大多数序列相差不多,但和该种其它的序列相差太多,则作为疑难种进行标记。用 MEGA version 3.0 中的 NJ( Neighbor - Joining) 方法生成系统树,用 Bootstrap 对系统树进行检验,1 000 次重复<sup>[13]</sup>。

### 1.8 ISSR 引物筛选及 ISSR - PCR

从不同群体(分离自茶树、山茶和蛇足石杉)中随机抽取 2 个菌株进行引物筛选。从 5' 端标记的 CGA5' DHB( CGA)<sub>5</sub> 和 CCA5' DD( CCA)<sub>4</sub>( D、H、B 分别代表 A、G、C、T 中任意 1 种) 一共 36 条引物中选取了 9 条扩增条带清晰、重复性好的引物用于全部 25 个样本菌株的分析<sup>[14]</sup>。所用引物由上海生工生物技术有限公司合成。扩增反应体系为 25  $\mu$ L,依次加入下列试剂: ddH<sub>2</sub>O 18.3  $\mu$ L; 10  $\times$  PCR Buffer ( Mg<sup>2+</sup> Plus) 2.5  $\mu$ L; dNTP Mixture( 各 2.5 mmol/L) 1.5  $\mu$ L; 引物( 10 pmol/L) 1.5  $\mu$ L; 模板 DNA 1  $\mu$ L ( 20 ~ 50 ng); TaKaRa *rTaq* 酶 0.2  $\mu$ L( 5 U/ $\mu$ L)。在 Mastercycler 按以下程度进行 PCR 扩增: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53.5  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶 0.5  $\times$  TBE 为电泳缓冲液 3 V/cm 电压,上样 10  $\mu$ L 电泳检测,用 DNA Marker 指示分子量,电泳结束后溴化乙锭( 1 mg/mL) 染色,凝胶成像仪观察并照相。

实验重复 2 次,且每次的 PCR 产物均电泳 3 次,以确认扩增条带的可重复性。

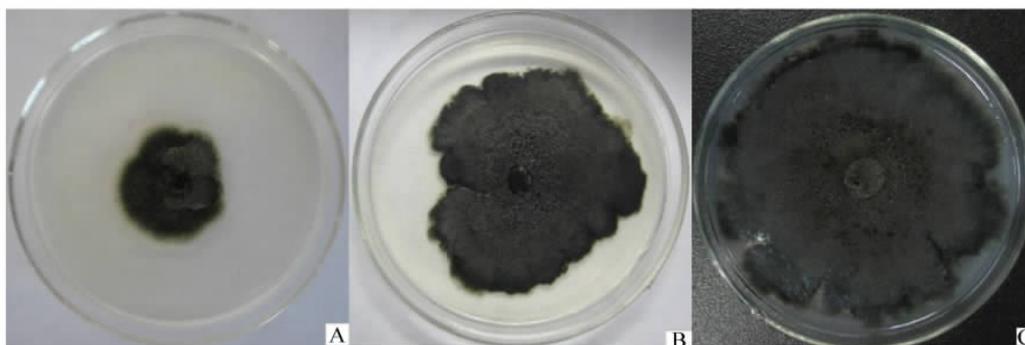
### 1.9 数据统计与分析

ISSR-PCR 结束后,将 PCR 扩增的 DNA 条带转换成二进制数据,对电泳条带进行记录,在相同位置出现条带的记为 1,无条带的记为 0。将统计完的数据利用 NTSYS-pc Version 2.0 软件构建 UPGMA( un-weighted pair-group method with arithmetic averages) 树状图<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 芒果球座菌不同菌株的菌落特征

25 个内生球座菌菌株纯培养后,在 PDA 培养基上的菌落形态明显分成 2 类。第 1 类在 28  $^{\circ}$ C 培养条件下,刚开始长出的菌丝呈白色,后面逐渐变绿;培养 3 d 后的菌落平滑,呈暗绿色或者灰橄榄色,边缘刚长出的菌丝呈白色并有凹陷,成锯齿状;随着培养时间的延长,菌落的颜色逐渐变绿变深,到最后几乎呈黑褐色或黑橄榄色( 图 1)。



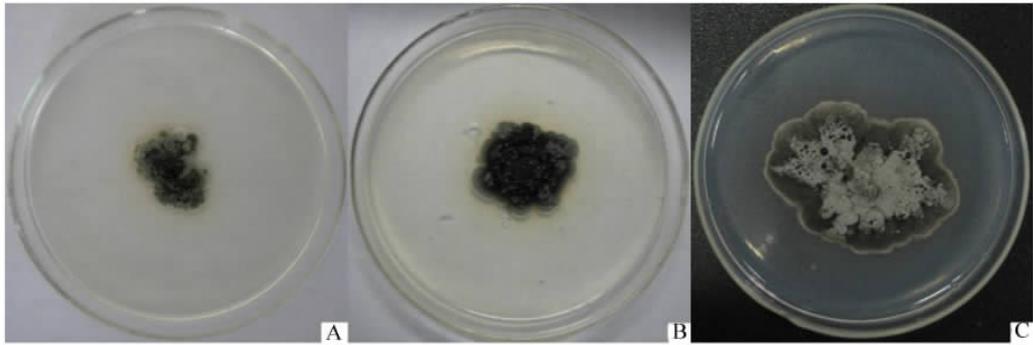
A: 生长 5 d 菌落形态; B: 生长 10 d 菌落形态; C: 生长 15 d 菌落形态。

A: colony morphology after 5 days; B: colony morphology after 10 days; C: colony morphology after 15 days.

图 1 菌株 Nsy-12 在 PDA 上的菌落特征

Fig. 1 Colony morphology of strain Nsy-12 on PDA media

第 2 类在 28  $^{\circ}$ C 培养条件下,刚开始长出的菌丝也呈白色,后面逐渐变绿,培养 3 d 后的菌落平滑,呈暗淡的绿色或者灰橄榄色,边缘刚长出的菌丝呈白色并有凹陷;但是和第 1 类不一样的是,这些凹陷边沿圆滑,不呈锯齿状,并且生长速度比较慢;随着时间的延长,菌落的颜色逐渐变绿变深,但是菌落表面出现灰白色绒毛,之后菌落表面被灰白色绒毛覆盖( 图 2)。



A: 生长 5 d 菌落形态 ,B: 生长 10 d 菌落形态 ,C: 生长 15 d 菌落形态。  
A: colony morphology after 5 days ,B: colony morphology after 10 days ,C: colony morphology after 15 days.

图 2 菌株 Ymy-02 在 PDA 上的菌落特征

Fig. 2 Colony morphology of strain Ymy-02 on PDA media

这 2 类菌株的生长速度也有一定的差异(表 2)。第 1 类菌株的生长速度较快,15 d 后可长满整个 9 cm 培养皿平板,这些菌株大部分都分离自茶树,仅有 Xhy-08 分离自山茶。而第 2 类菌株生长速度较慢,15 d 后生长速度最快的菌株 Xhy-02 菌落的直径也只有 5.9 cm;而且培养 15 d 后,菌体生长几乎停止,菌落不再增大,菌丝逐渐老化;这些菌株主要来自山茶,少数分离自茶树。

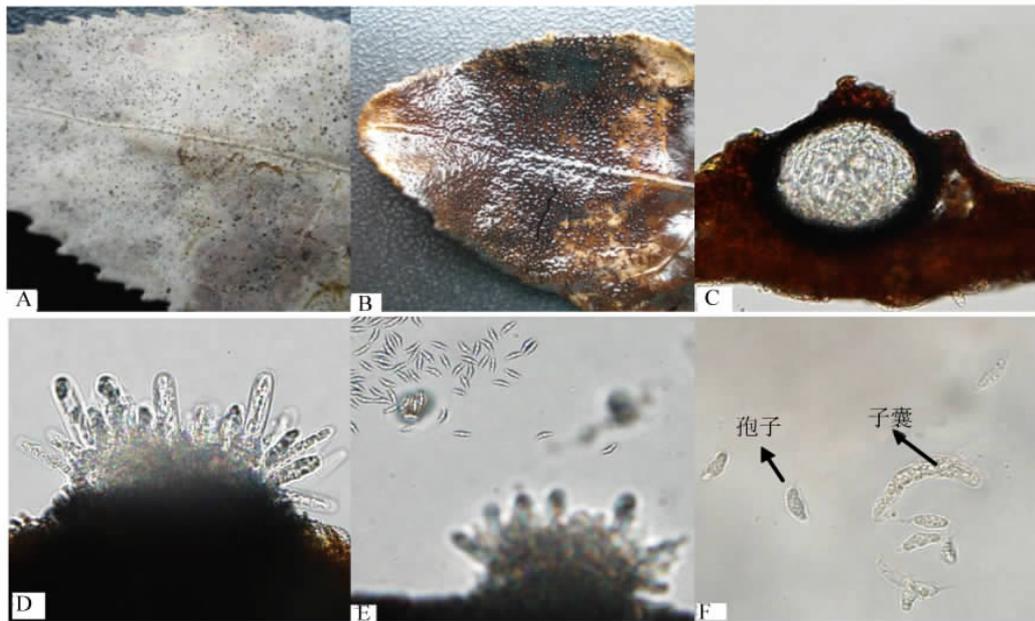
表 2 内生球座菌菌株在 PDA 上生长速度比较(28 °C)

Tab. 2 Growth rate of endophytic *Guignardia* isolates on PDA media (28 °C)

菌株编号 Isolate code	5 天后菌落直径/cm Colony diamant after 5 days	10 天后菌落直径/cm Coloby diamant after 10 days	15 天后菌落直径/cm Colony diamant after 15 days
N3	4.5	7.4	长满平板(=9)
N4	3.4	6.2	长满平板(=9)
N5	4.9	7.4	长满平板(=9)
Xhy-01	2.7	3.5	5.4
Xhy-02	2.7	4.1	5.9
Xhy-03	1.0	1.7	2.7
Xhy-04	1.6	2.1	3.0
Xhy-05	1.2	1.9	2.8
Xhy-06	1.6	2.2	3.1
Xhy-08	3.9	7.5	长满平板(=9)
Nmy-01	5.1	7.5	长满平板(=9)
Ymy-01	1.3	2.1	3.7
Ymy-02	2.2	3.3	4.6
Ymy-10	4.4	7.0	长满平板(=9)
Ymy-11	2.8	4.0	5.7
Nsy-01	3.4	5.9	长满平板(=9)
Nsy-04	4.6	7.5	长满平板(=9)
Nsy-11	3.2	7.2	长满平板(=9)
Nsy-12	3.2	6.0	长满平板(=9)
Nsy-13	2.5	3.6	长满平板(=9)

## 2.2 芒果球座菌的繁殖体形态观察

置于透气袋中的茶叶在 3 个月,腐败的茶叶表面呈现灰褐色,其上产生许多的黑色小点(图 3-A)。徒手切片后镜检,发现其产孢结构为子囊壳(图 3-C),子囊壳产生于寄主植物的表皮下,呈球形、近



A. 自然条件下茶叶表面产生的繁殖体; B. 人工培养茶叶表面产生的繁殖体; C. 子囊座; D. 子囊座中的子囊; E. 子囊孢子; F. 子囊和子囊孢子。

A. Propagula on the leaf of *C. sinensis* produced in tea plantation; B. Propagula on the leaf of *C. sinensis* produced in artificial inoculation; C. Ascostroma; D. Ascus in the ascostroma; E. Ascospore; F. Ascus and Ascospore.

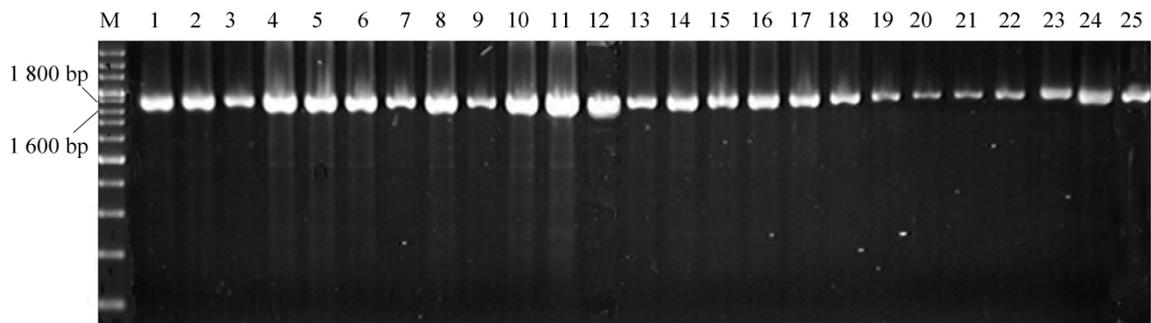
图 3 内生球座菌形态特征

Fig. 3 Morphology of endophytic *Guignardia* sp.

球性或梨形;子囊棍棒状,成束地生于子囊壳内,无侧丝(图 3-D);内有 8 个子囊孢子,排列成 2 行;子囊孢子纺锤形,无色单胞,大小为(14.0~19.0) μm × (3~5) μm(图 3-E、F)。人工培养条件下,培养 30 d 后,可见茶树叶片为黑褐色,其上密集产生大量的黑色小点(图 3-B)。镜检也可观察到子囊壳、子囊和子囊孢子等真菌形态,和以上观察到的结构没有明显的差异。对照魏景超<sup>[15]</sup>《真菌鉴定手册》,将该菌初步鉴定为球座菌属(*Guignardia*)的真菌。

### 2.3 18S rDNA 扩增产物的电泳检测

运用 PCR 技术从 25 个内生球座菌菌株基因组 DNA 中特异扩增了 18S rDNA 的序列,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,染色后发现所有菌株的基因组 DNA 的扩增产物均为一清晰条带,无其它杂带产生,分子量估计为 1 700 bp(图 4)。扩增产物经胶回收纯化后用于 TA 克隆及序列测定。



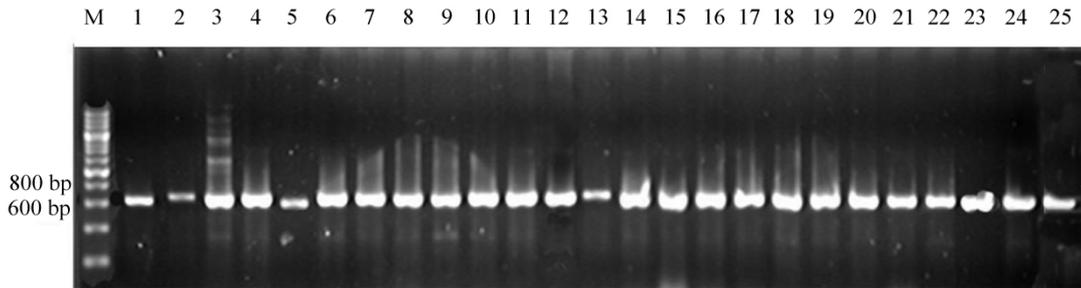
M: 200 bp DNA Ladder Marker, 1: Nsy-01, 2: Nsy-02, 3: Nsy-04, 4: Nsy-10, 5: Nsy-11, 6: Nsy-12, 7: Nsy-13, 8: Sy-01, 9: Sy-02, 10: N3, 11: N4, 12: N5, 13: Nmy-01, 14: Ymy-01, 15: Ymy-02, 16: Ymy-10, 17: Ymy-11, 18: Xhy-01, 19: Xhy-02, 20: Xhy-03, 21: Xhy-04, 22: Xhy-05, 23: Xhy-06, 24: Xhy-07, 25: Xhy-08.

图 4 25 个菌株 18S 引物 PCR 产物电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis of amplification products with the primer 18S

### 2.4 rDNA ITS 序列扩增产物的电泳检测

运用 PCR 技术从 25 个内生球座菌菌株基因组 DNA 中特异扩增了 rDNA 的 ITS 序列,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,染色后发现除 N<sub>sy</sub>-04 外,其它菌株的基因组 DNA 的扩增产物均为一清晰条带,无其它杂带,分子量约为 600 bp(图 5),扩增产物经胶回收纯化后用于 TA 克隆。



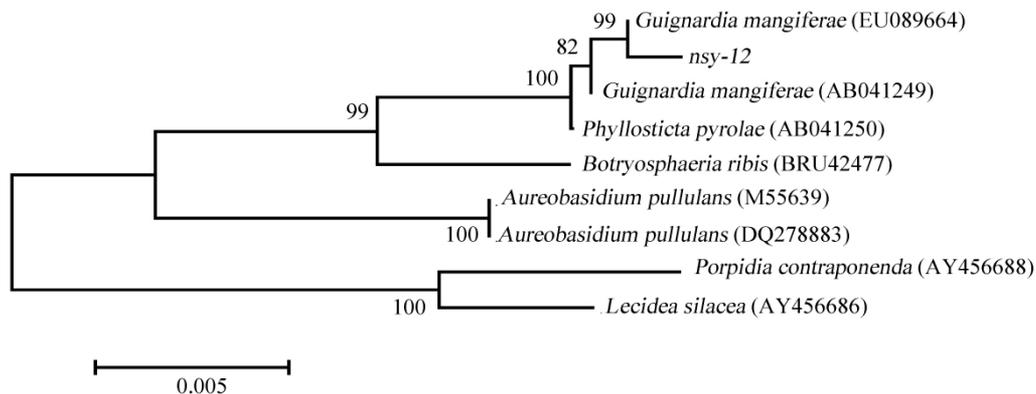
M: 200 bp DNA Ladder Marker, 1: N<sub>sy</sub>-01, 2: N<sub>sy</sub>-02, 3: N<sub>sy</sub>-04, 4: N<sub>sy</sub>-10, 5: N<sub>sy</sub>-11, 6: N<sub>sy</sub>-12, 7: N<sub>sy</sub>-13, 8: S<sub>y</sub>-01, 9: S<sub>y</sub>-02, 10: N<sub>3</sub>, 11: N<sub>4</sub>, 12: N<sub>5</sub>, 13: N<sub>my</sub>-01, 14: Y<sub>my</sub>-01, 15: Y<sub>my</sub>-02, 16: Y<sub>my</sub>-10, 17: Y<sub>my</sub>-11, 18: X<sub>hy</sub>-01, 19: X<sub>hy</sub>-02, 20: X<sub>hy</sub>-03, 21: X<sub>hy</sub>-04, 22: X<sub>hy</sub>-05, 23: X<sub>hy</sub>-06, 24: X<sub>hy</sub>-07, 25: X<sub>hy</sub>-08.

图 5 25 个菌株 ITS(ITS4-ITS5) 引物 PCR 产物电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis of amplification products with the primer ITS4-ITS5

### 2.5 18S rDNA 序列的分析及系统发育树的构建(以 nsy-12 为例)

用 Mega3.0 软件根据 nr18S rDNA 序列用 Neighbor-Joining 方法构建系统树(图 6),由图 6 可知,菌株 nsy-12 与 *Guignardia mangiferae* (EU089664) 聚在一支上,其 bootstrap 值为 99%,而其又与 *Phyllosticta pyrolae* (AB041250), *Guignardia mangiferae* (AB041249) 共同聚成 1 个大支,其 bootstrap 值为 100%。这一结果与 Jukes-Cantor 距离系数的分析结果相一致,初步认为菌株 nsy-12 可能与芒果球座菌 [*Guignardia mangiferae* (EU089664)] 为同一物种。



Nucleotide: Kimura 2-parameter pairwise deletion, bootstrap = 1 000; 节间数字代表 bootstrap 支持值; bar 代表遗传距离( nsy-12 为本实验所测,其余的样品序列来自 GenBank)。

Nucleotide: Kimura 2-parameter pairwise deletion, bootstrap = 1 000. The numbers in each node represents bootstrap support value. Genetic distance scale = 0.005. nsy-12 was examined by the authors, other sequences were obtained from GenBank.

图 6 基于 18S rDNA 序列所得的 NJ 树型图

Fig. 6 The NJ tree based on 18SrDNA sequences

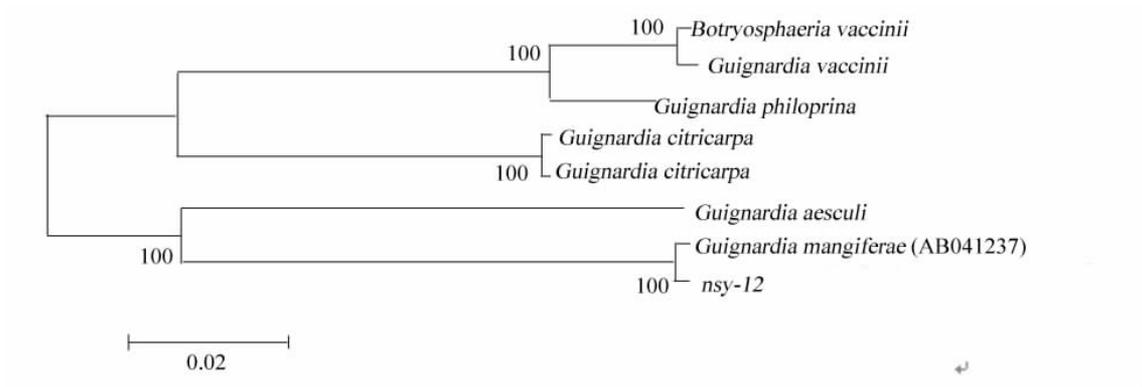
### 2.6 rDNA ITS 序列测序结果与分析

测序后对所获得的 rDNA 序列进行分析,所有 25 条序列的长度均介于 601 ~ 604 bp。它们之间碱基差异很小,有些序列之间的碱基序列是一致的。差异最大的两个序列之间也只有 11 个碱基不同,序列均以 Sequin 软件提交到 NCBI,登陆号为 EU677799-EU677819。

### 2.7 rDNA ITS 序列的分析及系统发育树的构建(以 nsy-12 为例)

用 Mega3.0 软件根据 rDNA ITS 序列用 Neighbor-Joining 方法构建系统树,由图 7 可以知道,菌株 nsy-12

与 *Guignardia mangiferae*( AB041237) 聚为一支, 而且其 bootstrap 值达到了 100% , 与 Jukes-Cantor 距离系数的分析结果相一致。这一结果, 结合形态学特征, 说明 nsy-12 与 *Guignardia mangiferae*( AB041237) 属同一物种。



Nucleotide: Kimura 2-parameter pairwise deletion ,bootstrap = 1 000; 节间数字代表 bootstrap 支持值; bar 代表遗传距离( nsy-12 为本实验所测, 其余的样品序列来自 GenBank) 。

Nucleotide: Kimura 2-parameter pairwise deletion ,bootstrap = 1 000. The numbers in each node represents bootstrap support value. Genetic distance scale =0.02. nsy-12 was examined by the authors ,other sequences were obtained from GenBank.

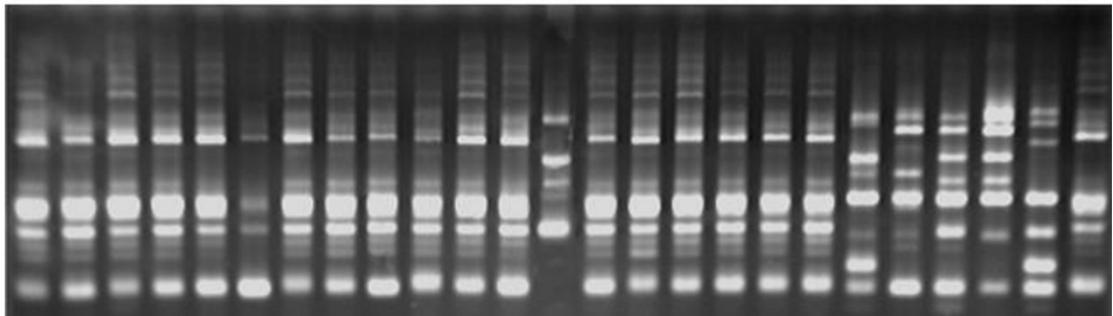
图 7 基于 rDNA ITS 区域碱基序列所得的 NJ 树型图

Fig. 7 The NJ tree based on nrDNA ITS region sequences

### 2.8 ISSR 结果与遗传多样性分析

从 35 个引物中筛选出表现多态性的引物 10 个, 对 25 个菌株共获得 88 个 ISSR 标记, 其中多态性标记 76 个, 占 86.3%。扩增后所标记的 DNA 片段结果如图 8 和图 9, 本文中只列出 2 个引物 ISSR14 (5'-CGAATTCGACGACGACGA-3') 和 ISSR32(5'-CCA AAC CACCACCACCACCA-3') 的电泳结果, 其它引物的扩增结果及电泳图未显示。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

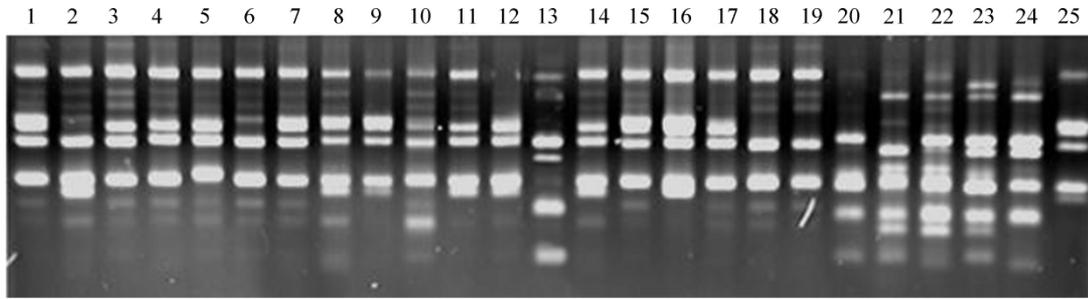


1: Nsy-01 ,2: Nsy-02 ,3: Nsy-04 ,4: Nsy-10 ,5: Nsy-11 ,6: Nsy-12 ,7: Nsy-13 ,8: Sy-01 ,9: Sy-02 ,10: N3 ,11: N4 ,12: N5 ,13: Nmy-01 ,14: Ymy-01 ,15: Ymy-02 ,16: Ymy-10 ,17: Ymy-11 ,18: Xhy-01 ,19: Xhy-02 ,20: Xhy-03 ,21: Xhy-04 ,22: Xhy-05 ,23: Xhy-06 ,24: Xhy-07 ,25: Xhy-08.

图 8 25 个菌株引物 14 ISSR - PCR 产物电泳图谱

Fig. 8 Electrophoresis of amplification products with the primer ISSR14

用 Ntsys 软件对 25 个供试菌株的 DNA 扩增结果进行聚类分析( 图 10) 。结果显示, 当以相异距离 0.29 为标准, 可以将 25 个菌株被划分为 3 个遗传聚类组。其中 A 组由 20 个菌株组成, B 组和 C 组分别仅由 3 个和 2 个菌株组成。从茶树中分离到的所有 15 个菌株、从蛇足石杉中分离到的 2 个菌株和从山茶中分离到的 3 个菌株共处于 1 个聚类组, 这些菌株共同组成 A 组。而从山茶中分离到的大部分菌株聚类于另 2 个聚类组, 其中 Xhy-03 和 Xhy-07 组成 B 组, Xhy-04、Xhy-05 和 Xhy-06 构成 C 组。结果表明, 从山茶中分离到的菌株分布于更多的聚类组, 显示出更高的遗传变异度。说明茶树中芒果球座菌遗传多样性比较贫乏, 而在山茶中的遗传多样性比较丰富。



1: Nsy-01 ,2: Nsy-02 ,3: Nsy-04 ,4: Nsy-10 ,5: Nsy-11 ,6: Nsy-12 ,7: Nsy-13 ,8: Sy-01 ,9: Sy-02 ,10: N3 ,11: N4 ,12: N5 ,13: Nmy-01 ,14: Ymy-01 ,15: Ymy-02 ,16: Ymy-10 ,17: Ymy-11 ,18: Xhy-01 ,19: Xhy-02 ,20: Xhy-03 ,21: Xhy-04 ,22: Xhy-05 ,23: Xhy-06 ,24: Xhy-07 ,25: Xhy-08.

图9 25个菌株引物32 ISSR-PCR产物电泳图谱

Fig.9 Electrophoresis of amplification products with the primer ISSR32

### 3 小结和讨论

#### 3.1 茶树内生球座菌的分类地位

通过诱导、观察 nsy-12 菌株的子囊和子囊孢子发生,发现子囊壳为埋生,球形或扁圆形,孔口扁平或呈乳头状突起;子囊孢子椭圆形,无色,双胞大小相等,初步鉴定其为球座菌属 (*Guignardia*) 真菌<sup>[1]</sup>。其 18S rDNA 扩增产物为 1 686 bp,在 NCBI 经 BLAST 比对后构建进化树,其与 *Guignardia mangiferae* (EU089664) 聚在一枝,序列同源率为 99%。进一步实验得出菌株 nsy-12 的 rDNA ITS 序列为 601 bp。经 BLAST 搜索比对,该序列包括了 *Guignardia mangiferae* (AB041237) 中部分 18S rDNA 序列,全部 ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> 序列和部分 28S rDNA 序列,两个序列的碱基组成相同,且具有 100% 的同源性。通过系统发育树聚类分析,两者聚在同一枝上,表明菌株 nsy-12 是芒果球座菌 (*G. mangiferae*)。采用相同的方法,证实本文中所涉及的其他 24 个菌株均为芒果球座菌(结果未显示)。

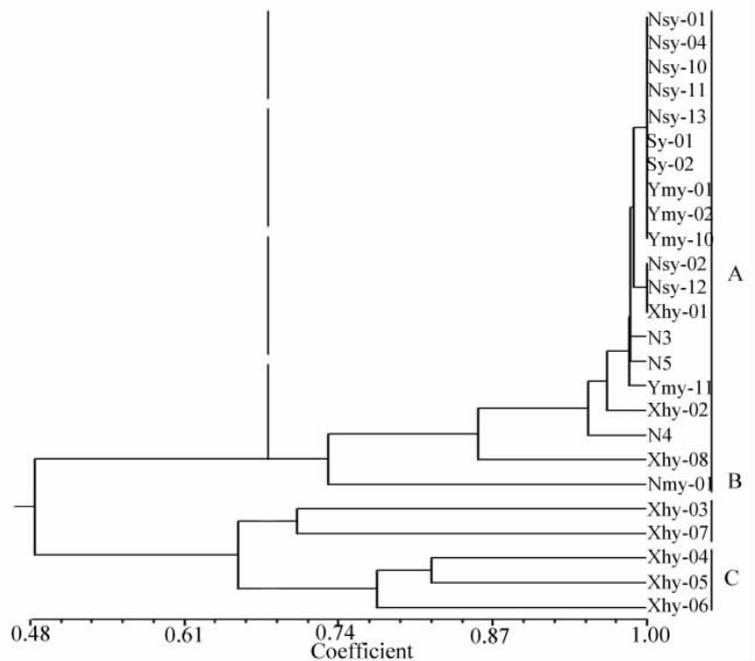


图10 25个芒果球座菌菌株的ISSR遗传分析聚类图

Fig.10 Dendrogram of cluster among 25 *Guignardia mangiferae* isolates based on ISSR analysis

本研究中的 25 个芒果球座菌分离物,根据它们在 PDA 培养基上的菌落形态和生长速度,可以明显区分为 2 类。1 类生长速度快,菌落边缘黑褐色,不整齐,有锯齿状凹陷(图 1);另 1 类生长速度慢,菌落边缘灰白色,比较平滑,不呈锯齿状(图 2)。从在 PDA 上的生长速度和菌落形态观察,本研究中的芒果球座菌与 Baayen 等<sup>[3]</sup>、Godrigues 等<sup>[1]</sup>和 Baldassari 等<sup>[5]</sup>的描述有差异。这些研究者发现,芒果球座菌在固体培养基上生长快,产生边缘平滑内陷菌落;而将生长速度慢,菌落致密,边缘不凹陷的分离物鉴定为柑桔球座菌。本研究中 25 个芒果球座菌分离物在 PDA 上的菌落和生长特性表现出多样性,但分子生物学的数据表明,这些菌株均为芒果球座菌。

#### 3.2 芒果球座菌的遗传多样性

分离所获得的 25 个菌株中,它们在 PDA 培养基上有不同的菌落形态,生长速度也不尽相同。通过

对这些菌株的 ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> 和 18S 区段进行分析后发现它们均属同一个种,这说明单纯从传统的形态学方法来鉴定真菌有可能不够准确。进而通过 ISSR 聚类分析,发现这 25 个菌株明显地分成 3 大类,而且生长速度和形态相似的菌株聚在了同一枝。这和遗传学上的基因型会决定表现型的原理是一致的。我们认为这些菌株可能是同一种中的不同突变株,具体情况如何,有待进一步研究证实。

我们对这 25 个菌株 rDNA 的 ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> 和 18S 区段进行分析,发现它们的序列之间虽有一定的差异,但差异并不大。但是通过 ISSR 分析,却发现有些菌株的基因型之间的差异较大。这和 Rodrigues 等<sup>[1]</sup>从柑桔中分离到的芒果球座菌的结果是一致的。笔者认为有可能芒果球座菌是一种对寄主专一性要求不高的内生真菌,在不同的植物中广泛存在。芒果球座菌在许多的热带植物中都有发生<sup>[1]</sup>,本实验室对包括茶树、山茶、油茶、蛇足石杉等不同植物的内生真菌分离发现,芒果球座菌在福建分布也非常普遍<sup>[2,7,16]</sup>。芒果球座菌在茶树中可以通过垂直传播和水平传播两种方式进行传播<sup>[9]</sup>。通过垂直传播,芒果球座菌可以在同一种植物的亲代和子代之间传递;而通过水平传播,它不仅可以从同一种植物的亲代传给子代,还可以从一种植物传到另一种植物,也就是有了新的寄主。芒果球座菌从一种寄主转移到另一种寄主的时候,它可能要有生理适应的阶段,而在这个阶段就有可能是通过基因的改变来调整自己的代谢方式以适应新的寄主。从 ISSR 聚类分析发现,在山茶中的芒果球座菌基因型变化较大。在病原菌的研究中,起源中心往往也是该物种遗传多样性最丰富的区域<sup>[17]</sup>,我们推测内生真菌也具有这一规律,相对于茶树,芒果球座菌最初可能来源于山茶,因为芒果球座菌在山茶中的遗传多样性更为丰富。

### 3.3 芒果球座菌与植物病害

目前研究较多的是发生于柑橘类植物中的芒果球座菌。柑橘类植物黑斑病是由球座菌属的另一种菌——柑桔球座菌(*G. citricarpa*)引起的。而它的菌落形态和从柑橘类植物中分离到的芒果球座菌很相似,用肉眼难于区别,曾有将芒果球座菌误认为是黑斑病菌的先例<sup>[17-18]</sup>。在南非、新西兰和南美的一些国家,柑橘出口到欧洲和美洲是他们重要的经济收入<sup>[3,6,18]</sup>。但是柑桔黑斑病是欧美国家的检疫性病害,他们检测柑橘是否有黑斑病往往是直接从组织中分离,这样就容易造成两菌的混淆,给商家造成无谓的损失。因此,怎样快速区别芒果球座菌和柑桔黑斑病菌成了研究热点<sup>[3-4,6]</sup>。

在茶树病原菌中,也有一种引起茶云纹叶枯病<sup>[19]</sup>的山茶球座菌(*Guignardia camelliae*)其无性态为山茶炭疽菌(*Colletotrichum camelliae*)<sup>[1]</sup>。茶云纹叶枯病是一种重要茶树病害,本研究及我们前期研究的结果表明,芒果球座菌是茶树组织中一种优势内生真菌,在福建、江西及浙江茶区的分布非常普遍。芒果球座菌与山茶球座菌之间的关系如何,以及芒果球座菌是否导致茶树的病害,需要作进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] Rodrigues K F, Sieber T N. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> sequences[J]. Mycological Research 2004, 108(1): 45-52.
- [2] 陈晖奇,徐焰. 茶树内生真菌的分离及其在寄主组织中的分布特征[J]. 莱阳农学院学报:自然科学版 2006, 23(4): 250-254.
- [3] Baayen R P, Bonants P J. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*) [J]. Phytopathology 2002, 92(5): 464-77.
- [4] Meyer L, Slippers B. Two distinct *Guignardia* species associated with citrus in South Africa [J]. S Afr J Sci 2001, 97: 191-194.
- [5] Baldassari R B, Wickert E. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus spp.* [J]. Eur J Plant Pathol, 2007, 120(2): 103-110.
- [6] Meyer L, Sanders G M. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. [J]. Plant Disease 2006, 90(1): 97-101.
- [7] 戴清良,徐焰平. 内生炭疽菌在茶树体内的分布及其内生特性[J]. 林业科学 2008, 44(5): 84-89.
- [8] 卢东升,王金平. 茶树内生真菌的种类及分布[J]. 河南农业科学 2007(10): 54-56.
- [9] 徐焰平,黄薇,王国红等. 芒果球座菌在茶园的分布、传播和自然循环[J]. 林业科学 2009, 45(4): 65-71.
- [10] Wali P R, Ahlholm J U, Helander M, et al. Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloe festucae* in fine fescue populations [J]. Microbiol Ecology, 2007, 53(1): 20-29.

- [3]李卫东 贺建华, 黄国林 等. 不同施肥方式对柑橘树生长及生理特性的影响[J]. 湖南农业科学, 2005(6): 36-38.
- [4]覃光明. 几种施肥配方对温州蜜柑品质及产量的影响[J]. 中国南方果树, 1999 28(2): 19-20.
- [5]陈守一 彭玉基, 杨再英. 柑橘果实膨大期增进果实品质的氮磷钾平衡施肥研究[J]. 广西园艺, 35(4): 3-4.
- [6]鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [7]方同军. 尿素地面撒施不科学[J]. 农家参谋, 1997(11): 12.
- [8]李玉梅 李三明. 林果土壤肥科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.
- [9]汪远品 何腾兵. 水稻土中尿素损失的初步研究[J]. 贵州农业科学, 1989(5): 10-13.
- [10]石岩 位东斌, 于振文 等. 施肥深度对旱地小麦氮素利用及产量的影响[J]. 2001, 15(3): 180-183.
- [11]史吉平, 张夫道 林葆. 长期施用氮磷钾化肥和有机肥对土壤氮磷钾养分的影响[J]. 土壤肥料, 1998(1): 7-10.
- [12]Lewis E T, Racz G J. Phosphorus movement in some calcareous and noncalcareous soils[J]. Can J Soil Sci, 1969 49: 305-312.
- [13]Elrashidi M A, Alva A K, Huang Y F. Accumulation and downward transport of phosphorus in Florida soils and relationship to water quality[J]. Communications in Soil Sciences and Plant Analysis, 2001 32(19/20): 3099-3119.
- [14]黄绍文 金继运. 土壤钾形态及其植物有效性研究进展[J]. 土壤肥料, 1995(5): 23-29.
- [15]Mercik S, Nemeth K. Effects of 60-year N, P, K and Ca fertilization on EUF-nutrient fractions in the soil and on yields of rye and potato crops[J]. Plant and Soil, 1985 83(1): 151-159.
- [16]于杰 孙丽 胡永红. 长期定位施肥条件下淮北潮土钾素的变化研究[J]. 江苏农业科学, 2004(6): 157-160.

(上接第 955 页)

- [11]张志华, 洪葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(2): 39-43.
- [12]Martin K J, Rygielwicz P T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts[J]. BMC Microbiology, 2005 5: 28.
- [13]Kumar S, Tamura K. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004 5: 150-163.
- [14]王子迎 王源超. 中国和美国大豆疫霉群体遗传结构的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 215-223.
- [15]魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [16]谢丽华 徐焰平. 茶树品种、叶片生育期和茶叶化学成分对内生真菌的影响[J]. 菌物研究, 2006 3(4): 35-41.
- [17]Peres N A, Harakava R. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. Plant Disease, 2007 91(5): 525-531.
- [18]Everett K R, Rees-George J. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis[J]. Plant Pathology, 55: 194-199.
- [19]陈雪芬. 中国农业百科全书——植物病理学卷[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 81-82.