

文章编号: 1001-1498(2007)01-0021-08

树木溃疡病重要病原葡萄座腔菌属、种及其无性型研究

王金利¹, 贺伟^{2*}, 秦国夫³, 陶万强¹, 赵俊⁴, 田淑敏⁴

(1. 北京市林业保护站, 北京 100029; 2. 北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083;

3. 辽宁省鞍山市政府, 辽宁 鞍山 114002; 4. 国家林业局森林病虫害防治总站, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 本实验在我国的多种树木上采集了 56 个溃疡病标本, 采用形态学方法和分子生物学方法 (ISSR 技术) 研究病原菌。通过徒手切片和石蜡切片观察, 供试病原菌有性型为 *Botryosphaeria dothidea*; 无性型特征与国外所报道的七叶树壳梭孢 (*Fusicoccum aesculi*) 一致。根据 ISSR 技术得到的系统树显示, 供试菌株与国外提供的 *F. aesculi* (有性阶段为 *B. dothidea*) 菌株以 100% 相似性聚为一类。因此, 实验采集的树木溃疡病菌是 *B. dothidea*, 其无性型不是 *Dothiorella gregaria*, 而是 *F. aesculi*, 故应使用 *F. aesculi* 作为 *B. dothidea* 的无性型名称。此外, 通过国内的 *B. dothidea* 和国外已发表的 *B. ribis* 的特征对照, 发现二者确实不同: *B. ribis* 的分生孢子宽度大于 8.0 μm, L/D 值的平均值小于 2.6; 而本实验测量的 *B. dothidea* 的分生孢子宽度在 6.2~7.6 μm 之间, L/D 值的平均值在 2.9~3.6 之间; ISSR 所得系统树也显示二者属于不同的种。所以 *B. dothidea* 和 *B. ribis* 是两个不同的种, 而不是同物异名。

关键词: 葡萄座腔菌; 小穴壳属; 壳梭孢属; 无性型; 同物异名

中图分类号: S718.81

文献标识码: A

Study on the Anamorph and Species of *Botryosphaeria*, the Important Pathogen of Tree's Canker

WANG Jin-li¹, HE Wei², QIN Guo-fu³, TAO Wan-qiang¹, ZHAO Jun⁴, TIAN Shu-min⁴

(1. Beijing Municipal Forestry Protection Station, Beijing 100029, China; 2. The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education,

Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Anshan Municipal Government of Liaoning Province, Anshan 114002, Liaoning, China;

4. General Station of Forest Pest Management, State Forestry Administration, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: The authors collected canker specimens on many trees in China and isolated the pathogen and inoculated *Populus ×beijingensis* in order to confirm pathogenicity. The morphologic method and ISSR technique were applied to analyze the phylogeny, and the result was compared to foreign's. According to the morphologic character of conidiophore, The species collected was *Botryosphaeria dothidea*, whose morphological character of anamorph accorded with *Fusicoccum aesculi* reported by foreign countries. According to the dendrogram generated by UPGMA cluster analysis of the ISSR fingerprints from the authors' isolates and *F. aesculi* come from foreign countries, both were classified to one cluster by similarity 100%. So the authors concluded that the pathogen of canker collected was *B. dothidea*, which anamorph was not *Dothiorella gregaria*, but *F. aesculi*, and *F. aesculi* could be used as anamorph of *B. dothidea*. Moreover, *B. ribis* was not obtained in the experiment, but it was different from *B. dothidea* in China, according to the character of *B. ribis* was republished abroad. The conidial width of *B. ribis* was over 8.0 μm,

收稿日期: 2006-07-18

基金项目: 国家自然科学基金 (项目编号: 39970617)

作者简介: 王金利 (1978—), 男, 河北唐山人, 工程师, 从事森林病理研究及林业保护工作。

* 通讯作者。

but the conidial width of *B. dothidea* was 6.2 ~ 7.6 μm . The ratio of conidial length and width of *B. dothidea* was over 2.9, but *B. ribis* was below 2.6. It could be concluded that *B. ribis* and *B. dothidea* were different species from the dendrogram generated by UPGMA cluster analysis of the ISSR fingerprints. So, *B. ribis* and *B. dothidea* were different species, not synonym.

Key words: *Botryosphaeria*; *Dothiorella gregaria*; *Fusicoccum aesculi*; anamorph; synonym

葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria* Ces. & De Not.) 真菌是世界范围广布的一类病原菌,在我国分布于东北、华北、西北和江淮等广大区域,它们引起的多种树木溃疡病是目前我国重大生物灾害之一,受到广泛的关注^[1]。但迄今为止,引起我国树木溃疡病的葡萄座腔菌属病菌的种类仍有不同的称谓,病菌的无性型与国际上不一致,需要加以研究。

葡萄座腔菌属病菌种类及其无性型的关系,是一个颇为繁难的问题。由于葡萄座腔菌属真菌的有性阶段在自然条件下很少出现,所以本属真菌多数情况下只能根据无性型的特征进行分类和鉴定,而本属真菌无性型的种间特征很相似,不容易把有性型和无性型正确地对应起来。

Cesati和 De Notaris^[2]在建立 *Botryosphaeria* 属时,描述了模式标本 *B. dothidea*。Saccardo^[3]首次将 *B. dothidea* 的无性型鉴定为 *Fusicoccum aesculi* Corda,但由于 Corda^[4]建立新属 *Fusicoccum* 时没有指明模式标本 *F. aesculi* 的存放地点,致使后来者无法验证模式标本,从而对 Saccardo 鉴定的 *F. aesculi* 持有疑问,所以 Petrak^[5]将 *B. dothidea* 的无性型鉴定为 *Dothiorella* Sacc; Shear et al.^[6]将 *B. ribis* 的无性型命名为 *Dothiorella gregaria* Sacc。但 Sutton^[7]认为,虽然 Saccardo 没有看到 Corda 的模式标本,但是 Saccardo 的描述和绘图与 Corda 的绘图极其相似,表明 Saccardo 的鉴定是正确的,指出 *B. dothidea* 和 *B. ribis* 的无性型都是 *F. aesculi*。此后, Maas & Uecker^[8]、Pennycook et al.^[9]、Morgan et al.^[10]、Rayachhetry et al.^[11] 和 Phillips et al.^[12] 分别对 *B. dothidea* 的无性型进行了详细研究,结果一致同意 Sutton 的结论,否定了 *Dothiorella gregaria*。此外, Crous 和 Palm^[13] 重新检查 *Dothiorella* Sacc 属的模式标本,认为 *Dothiorella* 与 *Diplodia* Sacc 是同物异名;而且 *Dothiorella* 属名存在歧义^[14],未被 Sutton 承认^[7]。因此,国际上目前只承认 *B. dothidea* 与 *F. aesculi* 的对应关系。此外, *B. ribis* 和 *B. dothidea* 被许多学者认为是同物异名^[8],也有一些作者把二者看作两个独立的种,但

新近的研究表明 *Botryosphaeria dothidea* 和 *Botryosphaeria ribis* 是不同的种^[15], *B. ribis* 的无性型为 *Fusicoccum* sp.

在我国, *B. dothidea*^[16~18] 和 *B. ribis*^[19,20] 分别被作为杨树溃疡病病菌有性型的名称,而以 *Dothiorella gregaria* 作为其无性型的名称;在果树上,使用 *B. ribis* 作为桃树流胶病病原菌的名称,无性型为 *D. gregaria*^[21];有的学者则将 *B. dothidea* 和 *B. ribis* 视为同物异名,无性型为 *Dothiorella gregaria*^[18,20,22,23]。张星耀等^[24,25]用 28S rDNA - RFLP 和 RAPD 方法分析了葡萄座腔菌属及相关属的菌株,结果表明:所有供试菌株都能扩增出稳定一致的 28S rDNA 条带,6种内切酶不能区分葡萄座腔菌属内部的 28S rDNA 差异。鉴于国内外对 *B. dothidea* 的无性型的名称有不同的称谓,本文作者在国内多种树木上采集了由葡萄座腔菌属真菌引起的溃疡病标本,进行病原菌的分离培养,并向美国威斯康星大学 Glen R. Stanosz 教授索要了 4 个菌株,利用常规形态特征鉴定和分子生物学方法 (ISSR, Inter-simple sequence repeats)^[26],从形态和分子两方面把收集到的国内外菌株进行了对比,以澄清我国由葡萄座腔菌属真菌引起的树木溃疡病的病菌种类及其无性型的种类和名称,这对于树木溃疡病菌的系统学、病害流行病学研究及病害防治都有重要意义。

1 材料和方法

1.1 标本采集和菌株分离

本试验共采集了 6 个省 (市) 13 个地区的 16 个树种 (阔叶树 11 个属和针叶树 2 个属) 的 56 个溃疡病标本 (其中 33 个标本用于本实验研究)。将所有标本进行分离培养 (PDA 培养基), 得到目标菌株。

1.2 致病性测定

北京杨是一个易感染溃疡病的树种,选取北京杨做接种对象,目的是检测所有分离菌株是否有致病性,亦可获得分生孢子器,用做形态鉴定。选取不同寄主、不同地点的有代表性的菌株 (表 1); 选取直

径约 2 cm 的北京杨 2 年生枝条,截成长 40 cm,在其上打孔接种。每个菌株接种 3 个枝条,每个枝条接种 3 个点。接种后放入 25 °C 培养箱中保湿培养,每天进行观察。

表 1 实验所选用菌株

标本 菌株号	用途	真菌名称	寄主	采集地点
94-128	a, c	<i>B. ribis</i>	<i>M elaleuca quinquenervia</i>	Florida, USA
97-5	a, c	<i>B. dothidea</i>	苹果 <i>Malus</i> sp.	Wisconsin, USA
97-88	a, c	<i>Fusicocuum luteum</i>	中华猕猴桃 <i>Actinidia chinensis</i> Planch	New Zealand
96-29	a, c	<i>B. parva</i>	苹果 <i>Malus</i> sp.	New Zealand
9907-1	a, c		北京杨 <i>Populus ×beijingensis</i> W. Y. Hsu	北京昌平马池口
9908	a, c		富士苹果 <i>Malus pumila</i> Mill	北京十三陵
9910-1	a, c		中林杨 <i>Populus nigra</i> L. × <i>P. sinonii</i> Carr.	北京昌平马池口
0001-2	a, c		合欢 <i>Albizia julibrissin</i> Durazz	河南
0004	a, c		彰武小钻 <i>Populus ×xiaozhuanica</i> W. Y. Hsu et Liang cv. 'Zhangwu'	辽宁阜新
0104	a, c		毛白杨 <i>P. tomentosa</i> Carr	河南修武
0213	a, b, c		北京杨	北京林业大学
0233	a		柳树 <i>Salix</i> sp.	北京大东流苗圃
0234	a		柳树	北京大东流苗圃
0250	a, b, c		槐树 <i>Sophora japonica</i> Linn	北京大东流苗圃
0252	a, b, c		核桃 <i>Juglans regia</i> Linn	河北滦县
0253	a, c		苹果 <i>Malus pumila</i> Mill	北京海淀区东北旺
0221	b, c		北京杨	北京怀柔区渤海镇
0233	b, c		柳树	北京大东流苗圃
0234	b, c		柳树	北京大东流苗圃
0235	b, c		柳树	北京大东流苗圃
0240	b, c		欧美杨 107 杨 <i>P. ×euramericana</i> (Dode) Guineir cv. 'Neva'	北京大东流苗圃
0241	b		北京杨	北京大东流苗圃
0243	b		核桃	北京林业大学
0246	b, c		杨树 <i>Populus</i> sp.	江苏新沂
0002-2	c		毛白杨	辽宁沈阳
0107	c		雪松 <i>Cedrus diodora</i> (Roxb.) G Don	山西长治
0202-3	c		毛白杨	辽宁沈阳
0209	c		北京杨	北京海淀区清华园
0227	c		核桃	北京怀柔区
0239	c		海棠 <i>M. spectabilis</i> (Ait) Borkh	北京大东流苗圃
0245	c		核桃	北京林业大学
0251	c		板栗 <i>Castanea mollissima</i> Blume	北京怀柔
0254	c		柳树	北京海淀区东王庄

注: a:致病性测定所选用的菌株,其中,菌株 94-128、97-5、97-88 和 96-29 均由美国威斯康星大学的 Glen R. Stanosz 教授提供。接种、培养等试验均在室内严格控制条件下进行,接种发病检查后的枝条及时销毁; b:用于致病菌形态鉴定的标本; c:用于 ISSR 分析的菌株。

1.3 形态观察和鉴定

1.3.1 材料 选取有典型子座的标本进行形态观察和鉴定(表 1)。

1.3.2 徒手切片观察 采用徒手切片法观察野外采集标本、室内 PDA 培养和人工接种发病枝条上产生的子实体特征。在油镜(目镜 100 ×)下随机测量 50 个孢子,典型切片进行拍照。

1.3.3 石蜡切片观察^[27] 在徒手切片的基础上,制做石蜡切片,观察形态特征。选取新鲜的有典型症状的病斑,切成约 4 mm ×3 mm 的块状,用福尔马林-醋酸-酒精固定液(FAA)固定 18 h 以上,然后制作石蜡切片。选取典型的切片进行显微观察和

拍照。

1.4 ISSR 技术

1.4.1 菌株选择 选择不同寄主不同地点的有代表性的菌株,用于 ISSR 分析。实验所选菌株见表 1。

1.4.2 DNA 提取

1.4.2.1 菌丝培养 使用灭菌的 cellophane 膜(121 °C, 30 min)培养菌丝。在接种前,取一张膜覆盖在培养皿中的培养基表面,然后将所选菌株接种到膜上,25 °C 下培养。菌丝可以透过膜吸收营养而在膜上面生长,菌丝容易收集。生长 3~4 d 后,在 cellophane 膜上生长一层菌丝,用镊子和刀片将

这层菌丝掀起,50 ℃下干燥后保存备用。

1.4.2.2 DNA提取方法 在 Yao Y.-J *et al* [28] 的提取方法基础上加以改进,用于本实验的 DNA 提取。取约 20 mg 干菌丝,加液氮研磨成粉末,移至 1.5 mL eppendorf 管中,加 65 ℃ 预热的 CTAB 提取液 (2% CTAB, 1.4 mol · L⁻¹ NaCl, 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol · L⁻¹ EDTA) 700 μL,放入 65 ℃ 水浴锅中温浴 40 min,期间摇晃几次,使其充分裂解。从水浴锅中取出后,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1),摇晃 10 min,离心 10 min (12 000 rpm · min⁻¹),取上清液,转入另外一个管中,再加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提一次;取上清,加等体积的氯仿/异戊醇抽提 2 次;取上清液,加入 2/3 体积的 -20 ℃ 的异丙醇沉淀 DNA,放入 -20 ℃ 下 15~30 min。取出后离心 8 min (10 000 rpm · min⁻¹),弃掉液体,加入 -20 ℃ 下的 70% 酒精洗涤沉淀 2 次,晾干,加 100 μL TE 溶液 (10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, pH 值 8.0,含 RNAase A 10 μg · mL) 溶解 DNA,37 ℃ 水浴 1 h 去除 RNA, -20 ℃ 下保存备用。

1.4.3 引物筛选和反应条件优化 根据 Hantula *et al* 及 Zhou Shiguo *et al* [29~33] 所用 ISSR 引物的结果,从中选取 8 个效果较好的引物,通过上海基康生物公司合成 (表 2)。

表 2 ISSR 引物及退火温度

引物序列	退火温度 /	参考文献
5 DDB ^a (CCA) ₅	49	Hantula, <i>et al</i> [29]
5 (CAG) ₅	64	Zhou Shiguo, <i>et al</i> [30]
5 HYH (GTG) ₅	64	Zhou Shiguo, <i>et al</i>
5 DHB (CGA) ₅	61	Müller, <i>et al</i> [31]; Burgess, <i>et al</i> [32]
5 BDB (ACA) ₅	49	Hantula, <i>et al</i> [33]
5 BBB (GAA) ₃ GAA	45	Hantula, <i>et al</i>
5 HYH (GT) ₇	58	Zhou Shiguo, <i>et al</i>
5 BBD (AAC) ₅	45	Zhou Shiguo, <i>et al</i>

注: a: B 代表碱基 C, G 或 T; D 代表碱基 A, G 或 T; H 代表碱基 A, C 或 T; U 代表碱基 A, C 或 G

1.4.4 PCR 扩增检测 使用 ABM-2400PCR 仪进行 ISSR (Inter simple sequence repeats) 扩增。按已经优化的反应条件扩增所有 DNA (Taq DNA 聚合酶、dNTP 由华美公司生产),用 1.8% 琼脂糖凝胶 (0.5 × TBE 缓冲液) 检测 PCR 产物,加样量为 8 μL, DNA 片断大小用 2 kb Marker (华美生物公司) 标记,

3 V/cm × 3 h, EB 染色 20 min, 紫外光检测。实验重复两次。

1.4.5 ISSR 结果统计分析 根据 PCR 产物图谱中 Marker 的大小分别判读所扩增 DNA 片段的大小,标记基因位点,分别统计每个菌株各个位点的特征,有带标记为 1,无带则标记为 0,得到一个二进制矩阵,使用软件 NTSYSpc 2.02 分析矩阵,构建系统树。

2 结果与分析

2.1 致病性测定结果

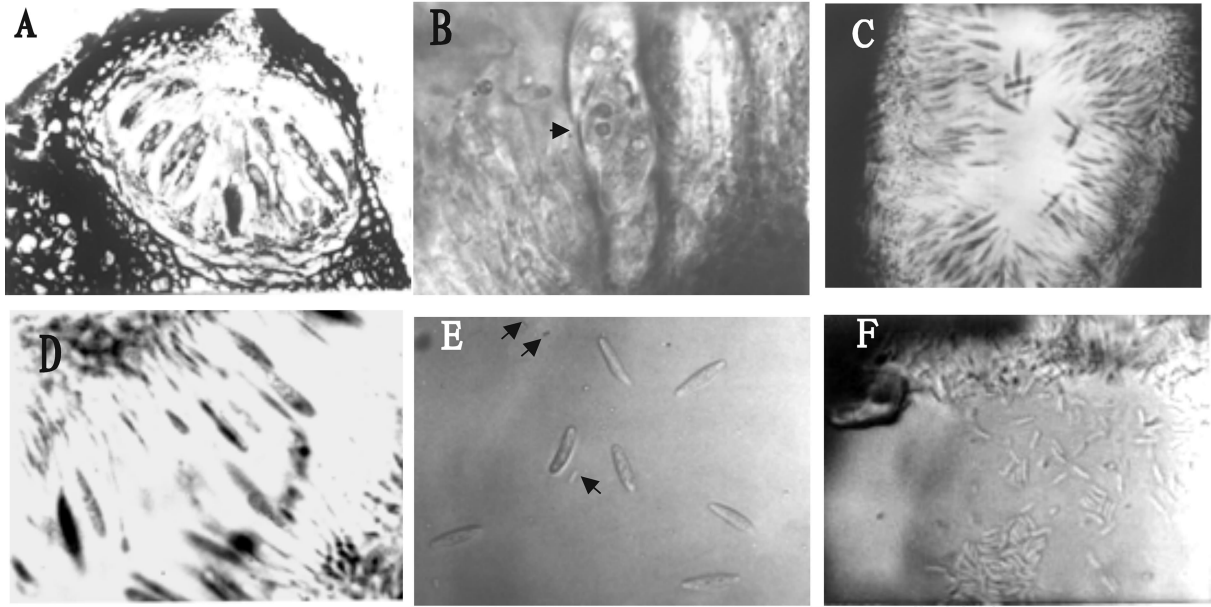
接种 9 d 后,枝条开始发病。12 d 时所有菌株 (包括美国的 4 个菌株) 均导致发病,但发病程度有比较显著的差别,其中从北京杨上分离的菌株 9907-1 造成的病斑最宽,从苹果上分离的菌株 9908 造成的病斑最小。来自美国的 4 个菌株也在北京杨枝条上引起病斑。对照无病斑。

2.2 形态观察和鉴定结果

野外采集的标本上的有性阶段很难看到,只在个别标本中观察到少量的子囊 (图 1A),子囊双层壁,56.8~81.5 × 14.8~22.3 μm,子囊孢子半透明、薄壁、单细胞,20.0~27.5 × 7.5~10 μm (图 1B)。

载孢体从单腔结构 (图 1C) 到多腔的真子座结构,在有些分生孢子器中可看到有瓶梗结构的产孢细胞 (图 1D);产孢细胞以全壁芽生方式产生第一个分生孢子,后为内壁芽生,可连续产生多个分生孢子,分生孢子梗基部分枝;分生孢子无色透明、无隔,纺锤形或椭圆形,一部分分生孢子基部截形,其它的分生孢子两端钝圆形,在萌发前出现分隔,一般 1~3 隔;在多数分生孢子器中均有小分生孢子 (图 1E)。产小分生孢子细胞瓶梗形,多 1~3 隔,幼嫩时小分生孢子与产分生孢子细胞之间无隔,成熟时产生明显的分隔;小分生孢子短棒状,两端钝圆、无色透明、无隔 (图 1F)。

大、小分生孢子可独立地产生于不同的子座中,也可同时产生于同一子座内的不同的分生孢子器中,有时还可在同一分生孢子器内发现大小两种分生孢子。另外,在同一子实体中偶尔同时观察到子囊孢子和分生孢子。



A 子囊腔和子囊 B 子囊及子囊孢子 C 分生孢子器 D 大分生孢子和分生孢子梗 E 大分生孢子 (夹杂小分生孢子, 箭头所指) F 小分生孢子, 其中 A、C 为石蜡切片 (600 ×); B、D、E、F 为徒手切片 (B、E、F, 1 500 ×; D, 600 ×)

图 1 所采集标本的显微特征

2.3 ISSR 实验结果

2.3.1 ISSR 反应条件的确定 通过调整反应体系中各成分的浓度 (主要是 Mg^{2+} 、模板 DNA 浓度) 和 PCR 温度循环条件, 使扩增效果达到最佳。据 Hantula 等^[29], PCR 扩增需要 95 预变性 10 min, 而且需要热启动。但经本实验研究和改进, 不进行热启动, 用 95 预变性 5 min 同样可以达到预定效果。经过反复调整, 最后确定反应体系 (25 μ L) 包括: 灭菌去离子水 14.3 μ L; 2.5 \times buffer 2.5 μ L (终浓度为 1 \times); 25 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$ 3 μ L (终浓度 3 mmol \cdot L⁻¹); 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP (dAPT, dTTP, dCTP 和 dGTP) 2 μ L (终浓度为 200 mmol \cdot L⁻¹); Taq DNA 聚合酶 1U (华美公司); 25 mmol \cdot L⁻¹ 引物 2 μ L (终浓度为 2 mmol \cdot L⁻¹); 模板 DNA 1 μ L (约 10 μ g), 阳性对照加 1 μ L 灭菌去离子水。扩增反应循环为: 首轮循环 95 \times 5 min 变性, 退火 1 min, 72 \times 1 min 延伸; 然后执行 30 个循环: 94 \times 1 min 变性, 合适的温度退火 1 min (见表 3), 72 \times 1 min 延伸; 最后 72 延伸 7 min, 反应循环结束后, 4 $^{\circ}$ C 下保存, 待凝胶电泳检查结果。

2.3.2 ISSR 扩增结果 选用 5 DDB (CCA)₅、5 (CAG)₅、5 HYH (GTG)₅ 和 5 DHB (CGA)₅ 4 个引物, 扩增所有供试菌株。电泳分析后, 经凝胶成像系统拍照得到图谱。

表 3 ISSR 引物的合适程度

引物序列 ^a	退火温度 /	适用程度 ^b
5 DDB (CCA) ₅	49	+++
5 (CAG) ₅	64	+++
5 HYH (GTG) ₅	64	+++
5 DHB (CGA) ₅	61	+++
5 BDB (ACA) ₅	49	+++
5 BBB (GAAA) ₃ GAA	45	+
5 HYH (GT) ₇	58	++
5 BBD (AAC) ₅	45	++

注: a: B 代表碱基 C, G 或 T; D 代表碱基 A, G 或 T; H 代表碱基 A, C 或 T; U 代表碱基 A, C 或 G b: +++ 代表适用于所有菌株; ++ 代表适用于大部分菌株; + 代表仅适用于部分菌株

2.3.3 生成系统树 (见图 2) 从图中可以看出, 组的 7 个菌株, 包括美国威斯康星大学提供的菌株 97-5 (无性型 *F. aesculi*, 有性型 *B. dothidea*), 以 92% 的相似性聚在一起; 组的 7 个菌株以 89.5% 的相似性聚在一起; 组的 9 个菌株以 93.5% 的相似性聚在一起; 0239 和 0246 分别以 83% 和 78% 的相似性与 组聚在一起; 、 、 与菌株 0239、0246 又以 70% 的相似性聚在一起, 构成 *B. dothidea* 组; 而 94-128 (*B. ribis*)、97-88 (*F. lutuon*) 和 96-29 (*B. parva*) 则分别独立成一个分枝, 所有的菌株以 62% 的相似性聚在一起。从图中可得知本属的 4 个种的亲缘关系: *B. dothidea* 与 *B. ribis* 的关系较近, 与 *B. parva* 的关系最远; 而且 *B. dothidea* 与 *B. ribis* 的关

系并不是种内关系,已经上升到种间关系,*B. ribis*,*B. lutea* (*F. lutuam*),*B. parva*同*B. dothidea*的关系均为种间关系,这样就进一步证明了*B. dothidea*和*B. ribis*为种间关系,并非同物异名。菌株 0253 是从苹果轮纹病的病斑中分离而来,在图 2 中以

96%的相似性与菌株 0234 和 0104 (*B. dothidea*)聚在一起,而苹果轮纹病的病原菌在国内近年来被认为是*B. berengeriana*^[34~36],而 Sutton^[7]将*B. dothidea*和*B. berengeriana*看作同物异名。上述 ISSR 实验的结果支持了 Sutton 的观点。

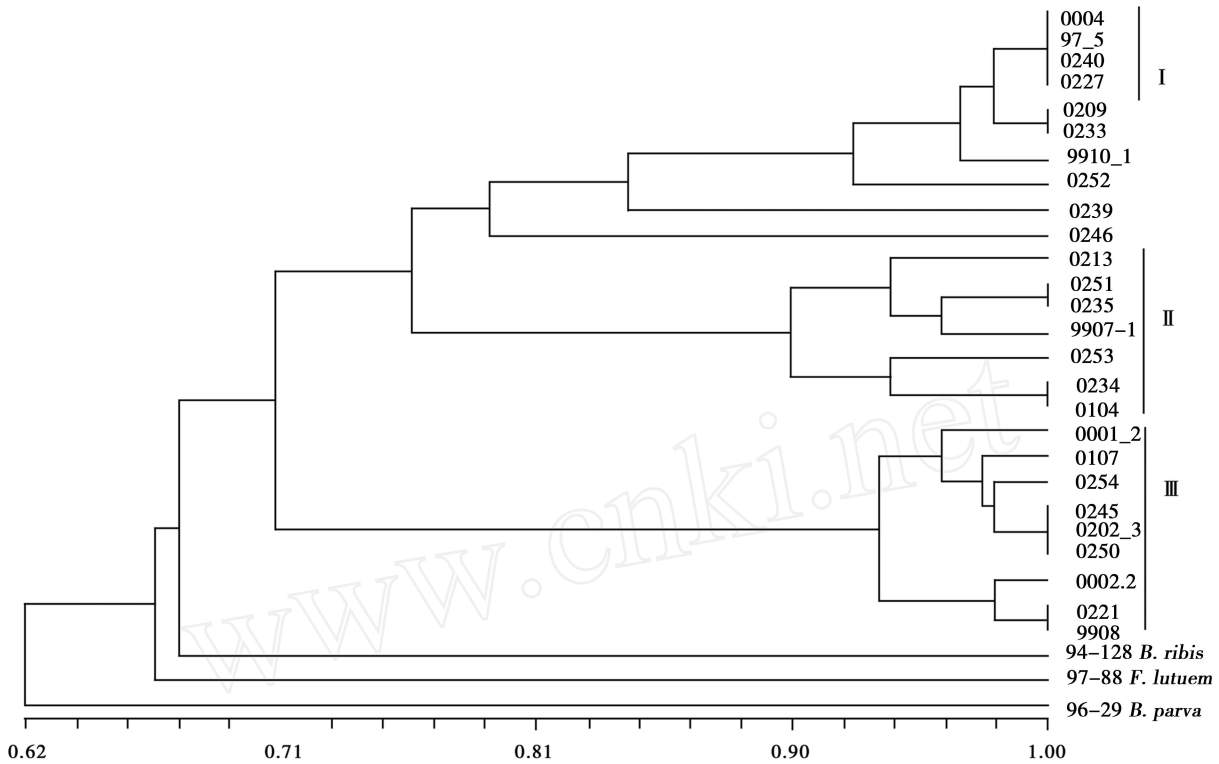


图 2 UPGMA 分析 ISSR 指纹所得到的葡萄座腔菌属及其相关属的系统树 (标尺的值代表相似性)

3 结论与讨论

3.1 结论

本实验观察到的病原菌有性型的特征:子囊双层壁,56.8~81.5 × 14.8~22.3 μm,子囊孢子半透明、薄壁、单细胞,20.0~27.5 × 7.5~10 μm。向玉英^[18]所报道的杨树溃疡病菌 *Botryosphaeria dothidea* (认为无性型是 *D. gregaria*) 的测量值 (49.0~68.0 × 11.0~21.3; 15.0~17.4 × 7~11.0)。Phillips *et al* 描述 *B. dothidea* (无性型为 *Fusicoccum aesculi*): 子囊埋于寄主表皮下,子囊双囊壁,92~132 × 16~24 μm,子囊孢子薄壁,透明,单细胞,15~28 × 6~12 μm; Pennycook & Samuels 测量 *B. dothidea* (无性型为 *Fusicoccum aesculi*) 的子囊孢子为 22.8 × 9.3 μm。据此可以看出,本实验所观察到病原菌的有性型为 *Botryosphaeria dothidea*。

根据本实验所观察到的无性阶段的特征,对比参考文献中 *Botryosphaeria dothidea* 的无性型的特征

(表 4 和表 5),实验所观察的寄主组织病斑标本和培养基上的葡萄座腔菌属的无性型特征与 Pennycook & Samuels, Maas & Uecker, Phillips & Lucas 报道的 *B. dothidea* 的无性型 *Fusicoccum aesculi* Corda 的特征相近。因此,从形态特征和分子证据 (ISSR 系统树) 两方面均可判定,本实验所采集的树木溃疡病病原菌 *B. dothidea* 的无性型为 *Fusicoccum aesculi*。所以,我国的 *B. dothidea* 无性型也应为七叶树壳梭孢 *Fusicoccum aesculi*。

经过许多人的研究,现在 *Fusicoccum* 属的特征主要有:载孢体有不同类型,从单室的分生孢子器型到复杂的多室的真子座结构^[10];产生分生孢子细胞瓶梗形,向顶层出,第一个分生孢子以全壁芽生方式产生,分生孢子薄壁、透明、无隔、纺锤形,有绝对截形的基部^[9],在同一位置增生导致环周加厚或向顶层出产生环痕,老的产分生孢子细胞是内壁芽生的^[14];分生孢子大小变化较大 (表 4)。

表 4 已报道的 *Botryosphaeria dothidea* 的无性型特征

名称	载孢体	产孢方式和特征	分生孢子 / μm	参考文献
<i>Fusicoccum aesculi</i>	真子座	全壁芽生, 瓶梗	20.0~26.0 \times 5.0~6.0	Pennycook & Samuels ^[9]
未命名	分生孢子器	全壁芽生, 瓶梗	(16.5~)18.4 (~20) \times (6.3~)6.9 (~8)	Maas & Uecker ^[8]
未命名	真子座	全壁芽生, 瓶梗	15.0~22.5 \times 4.5~7.5	Phillips & Lucas ^[12]
<i>F. aesculi</i>	分生孢子器或真子座	初为全壁芽生后为内壁芽生, 环痕	18.0~25.0 (~30) \times 4.0~4.5 (~5.0)	Crous & Palm ^[13]
<i>Dothionella gregaria</i>	分生孢子器		19.4~29.1 \times 5.0~7.0	向玉英 ^[18]
<i>E. aeseuli</i>	分生孢子器到真子座	全壁芽生, 后内壁芽生, 瓶梗	(大小见表 5)	本研究结果

表 5 采自中国树木溃疡病标本分生孢子的测量值

标本号	来源	分生孢子类型	分生孢子大小 (长 \times 宽) / μm	长宽比 (L/D)
0213	北京杨	大	(14.5~)20.5 (~26.0) \times (4.0~)7.0 (~8.0)	(2.1~)3.1 (~5.1)
0221	北京杨	小	(1.9~)3.0 (~4.6) \times (0.8~)1.0 (~1.2)	(1.8~)3.0 (~5.0)
0233~0235	柳树	大	(20.0~)24.7 (~32.5) \times (6.0~)7.6 (~10.0)	(2.2~)3.3 (~5.0)
		小	(3.0~)4.1 (~5.0) \times (1.8~)2.2 (~2.5)	(1.7~)1.9 (~2.0)
0240	欧美杨	小	(1.8~)2.9 (~4.1) \times (0.7~)1.0 (~1.3)	(1.8~)2.9 (~4.4)
0241	北京杨	大	(19.0~)21.6 (~25.0) \times (5.5~)7.0 (~7.5)	(2.7~)2.9 (~4.4)
		小	(2.2~)3.4 (~4.8) \times (0.9~)1.2 (~1.5)	(1.8~)2.9 (~4.8)
0243	核桃	大	(19.6~)23.5 (~31.0) \times (4.0~)6.2 (~7.9)	(2.9~)3.8 (~5.7)
0246	杨树	大	(11.9~)21.5 (~28.9) \times (4.9~)7.0 (~10.0)	(2.7~)3.1 (~4.4)
0250	槐树	小	(3.0~)4.0 (~5.8) \times (0.9~)1.1 (~1.5)	(2.5~)3.0 (~3.7)
0252	核桃	大	(17.3~)22.5 (~29.1) \times (4.2~)6.4 (~8.0)	(2.2~)3.6 (~5.5)

此外, 虽然本实验没有分离到 *B. ribis*, 但通过国内的 *B. dothidea* 和国外已发表的 *B. ribis* 的特征^[37]对照, 发现二者确实不同: *B. ribis* 的分生孢子宽度大于 8.0 μm , L/D 值的平均值小于 2.6^[38]; 而本实验测量的 *B. dothidea* 的分生孢子宽度在 6.2~7.6 μm 之间, L/D 值的平均值在 2.9~3.6 之间; 从 ISSR 的结果也可以进一步证明二者属于不同的种。所以 *Botryosphaeria dothidea* 和 *Botryosphaeria ribis* 是两个不同的种, 而不是同物异名。

3.2 讨论

我国幅员辽阔, 树种资源丰富, 气候差异较大, 葡萄座腔菌属的种类应该相对比较丰富, 本实验分离的 53 个菌株都是葡萄座腔菌 (*B. dothidea*), 需进一步扩大标本采集范围, 确定我国是否有 *B. ribis* 以及更全面地掌握我国葡萄座腔菌属病原菌种类和分布情况。

大分生孢子的特征在葡萄座腔菌属及相关属的分类中倍受关注, 而小孢子的特征没有被充分利用。一些作者在观察标本时曾发现小分生孢子^[9~12], 但都未用于本属真菌的分类; Rayachhetry *et al*^[11] 报道小分生孢子不萌发, 与本实验结果一致, Phillips *et al*^[12] 报道 *Botryosphaeria populi* 除了有大分生孢子外, 还有一种 4~5.5 \times 2 μm 的小分生孢子, 被认为是精子, 但没有说明是否能萌发; Sandra Denman *et*

al^[39] 报道 *Fusicoccum proteae* 中除了有 (20~)22~25 (~30) \times (4.5~)5~6 μm 的大分生孢子, 有褐色、厚壁、无隔、多疣和滴状斑点, 近圆柱形或窄椭圆形的 (7~)8~11 (~14) \times 2.5~3.5 μm 的小分生孢子以外, 还有一种大小 5~7 \times 1.5~2 μm , 透明、光滑、无隔、棒状, 有圆形末端的孢子, 被认为是精子。鉴于对小分生孢子的了解较少, 小分生孢子的形成过程及其在生活史中的作用还有待于进一步研究。

苹果轮纹病的病原是 *B. berengeriana* de Not f sp. *piricola* (Nose) Koganezawa et Sakuma, 被认为是苹果干腐病原 *B. berengeriana* de Not 的专化型, 二者的中文学名经中国科学院微生物研究所郑儒永教授拟名, 干腐病原 *B. berengeriana* 称贝伦格葡萄座腔菌, 轮纹病原 *B. berengeriana* f sp. *piricola* 称贝伦格葡萄座腔菌梨生专化型^[35]。本实验中所分离的来自苹果轮纹病的菌株 0253 经 ISSR 分析, 和 *B. dothidea* 紧密地聚在一起, 说明二者应属于同一个种。但由于本实验只分离了一个苹果轮纹病的菌株, 代表性不强, 需要在以后的实验中进一步验证。

此外, 作者已经得到国内葡萄座腔菌的无性型为 *Fusicoccum aesculi* 的 ITS 序列证据, 正在整理, 待发表中。

参考文献:

- [1] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 93 ~ 110
- [2] Cesati V, De Notaris E G. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri più o meno appartenential genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuito a Glada Person. Commentario della Società Crittogamologica [M]. Italiana, 1863, 1: 177 ~ 240
- [3] Saccardo P A. Conspectus generum fungorum italiae inferiorum nempe ad *Sphaeropsidea*, *Melanconieae* et *Hyphomyceteae pertinentium*, systemate sporologico dispositum [J]. Michelia, 1880, 2: 1 ~ 38
- [4] Corda A C I. Stum's Deutschlands Flora [M], 1829, 3: 105 ~ 136
- [5] Petrak F. Beiträge zur Kenntnis der Pilzflora der südlichen Alpenländer und Norditaliens [J]. Annls Mycol, 1922, 20: 126 ~ 159
- [6] Shear C L, Stevens N E, Wilcox M S. *Botryosphaeria* and *Physalospora* on currant and apple [J]. J Agriculture Research, 1924, 28: 589 ~ 598
- [7] Sutton B C. Coelmycetes [M]. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, 1980
- [8] Maas J L, Uecker F A. *Botryosphaeria dothidea* cane canker of thornless blackberry [J]. Plant Disease, 1984, 68: 720 ~ 726
- [9] Pennycook S R, Samuels G J. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa*, kiwifruit in New Zealand [J]. Mycotaxon, 1985, 24: 445 ~ 458
- [10] Morgan J G, White J F. Notes on Coelmycetes II. Concerning the *Fusicoccum* anamorph of *Botryosphaeria ribis* [J]. Mycotaxon, 1987, 30: 117 ~ 125
- [11] Rayachhetry M B, George M B, Roger S W, et al. Characteristics of the *Fusicoccum* anamorph of *Botryosphaeria ribis*, a potential biological control agent for *Melaleuca quinquenervia* in South Florida [J]. Mycologia, 1996, 88 (2): 239 ~ 248
- [12] Phillips A J L, Lucas M T. The taxonomic status of *Macrophoma flaccida* and *Macrophoma reniformis* and their relationship to *Botryosphaeria dothidea* [J]. Sydowia, 1997, 49 (2): 150 ~ 159
- [13] Crous P W, Palm M E. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum* [J]. Sydowia, 1999, 51 (2): 167 ~ 175
- [14] Ainsworth G C. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (6th ed) [M]. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1961
- [15] 王金利, 秦国夫, 贺伟, 等. 葡萄座腔菌及其相关真菌的系统学研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2003, 22 (3): 32 ~ 36
- [16] 向玉英. 杨树溃疡病 [A]. 见: 中国林业科学研究院. 中国森林病害 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1984: 79 ~ 80
- [17] 向玉英, 花晓梅, 赵经周, 等. 杨树水泡型溃疡病的发生及病原菌生物学特性的研究 [J]. 植物病理学报, 1981, 11 (4): 27 ~ 34
- [18] 向玉英, 花晓梅, 赵经周. 杨树水泡型溃疡病病原菌鉴定 [J]. 微生物学报, 1979, 19 (1): 57 ~ 63
- [19] 周仲铭. 杨树溃疡病 [A]. 见: 袁嗣令. 中国乔、灌木病害 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 2 ~ 95
- [20] 李传道. 树木的溃疡病 [J]. 南京林产工业学院学报, 1979 (1): 22 ~ 35
- [21] 陈祥照. 桃树流胶病的研究 病原特性及发病规律 [J]. 植物病理学报, 1985, 15 (1): 53 ~ 57
- [22] 张星耀. 森林生物灾害控制的新世纪策略及其实施基础 [A]. 见: 中国林业科学院. 面向 21 世纪的林业——可持续发展全球战略下的林业科学技术 [M]. 北京: 中国林业科技出版社, 1998: 341 ~ 345
- [23] 唐明, 陈辉, 商鸿生. VA 菌根真菌提高杨树抗溃疡病机制的研究 [J]. 林业科学, 2000, 36 (2): 87 ~ 92
- [24] 张星耀, 赵士光, 朴春根, 等. 树木溃疡病原真菌类群分子遗传多样性研究 I——小穴壳属、壳孢属、壳囊孢属、盾壳霉属分类地位的分子证明 [J]. 林业科学, 1999, 35 (3): 34 ~ 40
- [25] 张星耀, 赵士光, 吕全, 等. 树木溃疡病原真菌类群分子遗传多样性研究 II——*Botryosphaeria* 属 28S rDNA-PCR-RFLP 和 RAPD 解析 [J]. 林业科学, 2000, 36 (2): 75 ~ 81
- [26] 王金利, 贺伟, 关玲. ISSR 技术在菌物研究中的应用 [A]. 见: 中国林学会. 首届中国林业学术大会论文集 [C]. 北京: 当代中国出版社, 2006: 45 ~ 48
- [27] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1979
- [28] Yao Y J, Pegler D N, Chase M W. Application of ITS (nrDNA) sequences in the phylogenetic study of *Tyromyces* sp. [J]. Mycological Research, 1999, 103: 219 ~ 229
- [29] Hantula J, Mäkelä M M. Variation within *Grænniella abietina* in Finland and other countries as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS) [J]. Mycological Research, 1997, 101 (2): 169 ~ 175
- [30] Zhou Shiguo, Smith D R, Stanosz G R, et al. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting [J]. Mycological Research, 2001, 105 (8): 919 ~ 926
- [31] Michael M M, Mäkelä M M, Jarkko Hantula. Diversity of *Tiarosporella parva* in Finland, Norway and Switzerland [J]. Mycological Research, 1998, 102 (10): 1163 ~ 1168
- [32] Burgess T, Wingfield M J, Wingfield B W. Simple sequence repeats markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (1): 354 ~ 362
- [33] Hantula J, Maarit E, Kaitera J, et al. Genetic variation of the resin rot fungus in Finland as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS) [J]. Eur J Path, 1998, 28: 361 ~ 372
- [34] 陈策. 苹果果实轮纹病研究进展 [J]. 植物病理学报, 1999, 29 (3): 193 ~ 198
- [35] 李美娜, 王金友, 周宗山, 等. 苹果轮纹烂果病菌的侵染时期及影响因素 [J]. 中国果树, 2001, 5: 8 ~ 12
- [36] 赵白鸽, 孔建, 王文夕, 等. 枯草芽孢杆菌 B-903 对苹果轮纹菌的抑菌作用及其对病害的控制效果 [J]. 植物病理学报, 1997, 3: 213 ~ 214
- [37] Grossenbacher J G, Duggar B M. A contribution to the life history, parasitism, and biology of *Botryosphaeria ribis* [J]. New York: Agriculture Experiment Station Technical Bulletin, 1911, 18: 114 ~ 188
- [38] Smith D R, Stanosz G R. Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs [J]. Mycologia, 2001, 93 (3): 505 ~ 515
- [39] Sandra Denman, Pedro W C. A taxonomic reassessment of *Phyllachora proteae*, a leaf pathogen of *Proteaceae* [J]. Mycologia, 1999, 91 (3): 510 ~ 516