•研究报告•

新疆不同来源金黄壳囊孢的多样性

赵颖^{1#} 马荣^{1#} 尹永香² 张志东³ 田呈明^{4*}

1 (新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

2 (新疆农业大学林业研究所, 乌鲁木齐 830052)

3 (新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

4 (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)

摘要: 为明确新疆不同寄主及地理来源的金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)的多样性, 探讨种内亲缘关系和多样性差异。作者通过记录菌株在PDA培养基上的菌落颜色、形状、子实体形态等特征, 并应用Biolog-FF技术及ISSR分子标记技术, 比较了来自新疆5个地区5种寄主上的47株金黄壳囊孢的培养特征、生理生化特征及遗传多样性。结果表明47株金黄壳囊孢依据培养特征可划分为15种类型。不同类型菌株在碳源利用及代谢能力上存在差异, 各菌株对碳源的利用数量随着培养时间的增长逐渐增多。菌株882利用的碳源数量最多, 培养120 h可利用28种不同碳源, 碳源代谢能力中等; 菌株812-1利用的碳源数量最少, 培养120 h仅利用7种碳源, 代谢能力较低; 菌株1074-2、847、934、891-1、896、740具有单独利用碳源的能力。基于遗传相似性系数进行聚类分析, 结果显示遗传相似性系数为0.58时, 47个菌株被划分为两大类群, 其中第二类群菌株的培养特征为: 菌落白色、子实体较小且分布密集。供试金黄壳囊孢的多样性主要受自身遗传结构的影响, 不同寄主种类和地理来源对多样性的影响不显著。

关键词: 金黄壳囊孢; 培养性状; Biolog-FF技术; ISSR分子标记

Diversity of *Cytospora chrysosperma* from different hosts in Xinjiang

Ying Zhao^{1#}, Rong Ma^{1#}, Yongxiang Yin², Zhidong Zhang³, Chengming Tian^{4*}

1 College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052

2 Forestry Research Institute, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052

3 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091

4 Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education College of Forestry, Beijing 100083

Abstract: *Cytospora chrysosperma* is a very important pathogenic fungus that can infect many different trees. Currently, the diversity, phylogenetic and genetic relationships of *C. chrysosperma* remain unclear as host differences could cause substantial genetic and diverse differences among *C. chrysosperma* strains. To analyze the genetic, phylogenetic, and current diversity of *C. chrysosperma*, physiological and biochemical characteristics and genetic tests were performed from different hosts in Xinjiang. Using molecular markings Biolog-FF and ISSR, 47 strains of *C. chrysosperma* have been divided into 15 types. Strains were cultured and displayed varying culture characteristics and carbon source utilization and metabolic capacity traits. Each strain tended to utilize more carbon over time, however, strains varied in their carbon source preferences and metabolic capacities. Using cluster analysis, 47 strains of *C. chrysosperma* divided into two clusters based on genetic similarity (0.58), suggesting genetic structure is essential to understanding *C. chrysosperma* diversity, as host species and geographical origins were not significant.

Key words: *Cytospora chrysosperma*; cultural characteristics; Biolog-FF; ISSR

金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)隶属子囊菌门间座壳目黑腐皮壳科壳囊孢属(Kirk et al, 2008),

是全球范围内重要的林木病原菌之一。在我国广泛分布于东北、华北以及西北地区(向玉英, 1987; 范

收稿日期: 2019-05-29; 接受日期: 2019-08-09

基金项目: 国家自然科学基金(31460198)和中央高校基本科研业务费专项资金(2019GJZL01)

共同第一作者 Co-first authors

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: chengmt@bjfu.edu.cn

鑫磊, 2016), 能够危害多种植物, 尤其在杨、柳、榆、槐、核桃、苹果、梨等树种上发生普遍, 严重时会造成树木死亡(臧睿等, 2012)。树木受金黄壳囊孢危害后发病初期树皮变色, 后期在死亡枝条或受害的树皮上形成突出的埋生子实体, 树皮上可见明显的小黑点, 在潮湿的环境下常有红色、橘黄色或淡黄色的卷须状分生孢子角溢出(周仲民, 1990)。同时研究发现不同来源的金黄壳囊孢的培养性状也存在差异。国内外关于金黄壳囊孢的多样性开展过一些研究, Abbasi等(2011, 2015)利用RAPD和ISSR标记分析, 认为金黄壳囊孢的遗传分化与地理来源不相关。不同派系杨树上金黄壳囊孢的遗传变异与地理来源有一定的关系(杨明秀, 2014)。

新疆特殊的地理环境和气候条件孕育着种类多样的壳囊孢属真菌, 其中以金黄壳囊孢分布最为广泛, 在前期的研究过程中发现新疆不同来源的金黄壳囊孢的菌落颜色主要有白色、黄色、红色和深灰色, 菌落的形状和分子孢子器的类型存在分化现象, 不同类型金黄壳囊孢的致病性存在显著差异(马荣, 2017; 马荣等, 2018), 而不同培养性状的金黄壳囊孢的碳源代谢特征、培养性状分化现象与该菌的来源及其在生长过程中的代谢水平是否具有相关性, 尚未开展过相关研究。针对这一科学问题, 本研究在全疆范围内收集壳囊孢属真菌, 用形态学和分子生物学方法从5个地区5种不同寄主上收集到47株金黄壳囊孢菌株, 通过形态标记结合生理生化标记及ISSR分子标记技术探讨新疆不同来源金黄壳囊孢的种内遗传差异, 以期为该菌种类的准确鉴定及田间症状的准确诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

通过前期研究共筛选出采自新疆塔城、吐鲁番、昌吉、喀什、哈密等5个地区的杨树、柳树、苹果树、榆树和红端木等新疆地区广泛栽培的5种植物上的47株金黄壳囊孢菌株, 所有菌株保存于新疆农业大学林木保护实验室, 详细信息见表1。

1.2 菌株的活化及培养特征的观察

用直径为5 mm的打孔器在活化培养3 d后的平板上选取生长一致的菌饼, 转接至新的PDA平板中央, 25℃恒温培养, 每个菌株设置3个重复(刘晓琳

等, 2015), 每天观察记录菌落的颜色、形状、表面形态、有无子实体产生及子实体的分布等特征。

以菌落颜色、形状、表面形态、有无子实体产生及子实体的分布, 采用NTSYS Version 2.10软件对供试菌株进行模糊聚类(Rohlf, 1987; 杨华, 2008^①)。

1.3 Biolog FF测定

空白接种液: 将2.5 g结冷胶和0.3 g吐温40加入到1,000 mL沸水中, 随后停止加热, 继续搅拌至完全溶解直至溶液呈透明状。分装到直径20 mm、长150 mm的试管中, 每管装16 mL, 121℃灭菌30 min备用。

接种液的制备: 收集定量纯化培养5 d的菌丝至1.5 mL无菌Eppendorf管中, 用灭菌玻璃棒研磨菌丝至完全溶解, 以空白接种液调整浊度, 利用浊度仪校准后使供试菌株的浊度值界于75% ± 3%范围内, 最后用八道电动移液器将接种液注入FF微平板, 28℃恒温培养(贾夏等, 2013; 吴照祥等, 2015)。

在FF微平板上培养72 h、96 h、120 h后分别置于Biolog菌种鉴定仪上, 分别读取不同孔的OD₅₉₀和OD₇₅₀值, 利用SPSS软件基于公式计算碳源的利用数量及代谢能力。碳源利用数量为[(OD₅₉₀ - OD₇₅₀) - R]^①的值大于0.25的孔的数量, 其中R是对照孔的吸光度值(杜萍等, 2012)。通过方差分析分析不同时间点样本的平均颜色变化率(AWCD)差异, $AWCD = [\sum (C_i - R)]/n$ (其中, C_i 即 $C_{590} - C_{750}$, n 为碳源数 = 95) (Khalil et al, 2009)。比较不同菌株吸光度值的变化幅度, 变化幅度越大其具有的碳源利用能力越强(王强等, 2010)。

FF-IF板上95种碳源按化学基团性质被分成8类: 碳水化合物、羧酸及其衍生物、氨基酸、聚合物、醇类、胺类、磷酸盐类、油脂类(张惠艳等, 2015)。

1.4 供试菌株的遗传多样性研究

1.4.1 基因组DNA的提取及供试引物

从普洛麦格生物技术有限公司购置了基因组提取试剂盒完成了菌株的基因组DNA提取。从28条ISSR引物中筛选出条带清晰、重复性好且多态性较丰富的10条引物(张俊娥等, 2017), 对金黄壳囊孢遗传多样性进行分析。引物由上海生工生物工程有限公司合成(表2)。

^① 杨华 (2008) 不结球白菜的收集、保存与遗传多样性分析. 硕士学位论文, 华中农业大学, 武汉。

表1 本研究中供试菌株的相关信息

Table 1 Related information of the isolates in this study

菌株 Isolate	寄主 Host	采集时间 Collecting time	采集地点 Location
319-1	苹果 <i>Malus</i> sp.	2011/8/7	昌吉吉木萨尔县 Jimusar County, Changji Prefecture
790-2	苹果 <i>Malus</i> sp.	2015/6/28	塔城地区塔城市 Tacheng, Tacheng Prefecture
908	苹果 <i>Malus</i> sp.	2015/7/17	塔城地区乌苏市 Wusu, Tacheng Prefecture
936	苹果 <i>Malus</i> sp.	2015/8/4	塔城地区塔城市 Tacheng, Tacheng Prefecture
701	榆树 <i>Ulmus</i> sp.	2015/4/18	吐鲁番市鄯善县 Shanshan County, Turpan City
1155	榆树 <i>Ulmus</i> sp.	2015/8/20	昌吉州奇台县 Qitai County, Changji Prefecture
600-2	胡杨 <i>Populus euphratica</i>	2012/8/20	喀什地区泽普县 Zepu County, Kashgar Prefecture
626	新疆杨 <i>Populus alba</i>	2012/8/20	喀什地区喀什市 Kashgar City, Kashgar Prefecture
686-1	山杨 <i>Populus davidiana</i>	2014/8/31	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
686-2	山杨 <i>Populus davidiana</i>	2014/9/1	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
702	小叶杨 <i>Populus simonii</i>	2015/4/18	吐鲁番市鄯善县 Shanshan County, Turpan City
737	钻天杨 <i>Populus nigra</i>	2015/6/4	哈密地区哈密市 Hami City, Hami Prefecture
739	钻天杨 <i>Populus nigra</i>	2015/6/4	哈密地区哈密市 Hami City, Hami Prefecture
740	钻天杨 <i>Populus nigra</i>	2015/6/4	哈密地区哈密市 Hami City, Hami Prefecture
742	钻天杨 <i>Populus nigra</i>	2015/6/4	哈密地区哈密市 Hami City, Hami Prefecture
793	俄罗斯杨 <i>Populus russkii</i>	2015/6/29	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
882	北京杨 <i>Populus beijingensis</i>	2015/7/22	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
891-1	俄罗斯杨 <i>Populus russkii</i>	2015/7/17	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
891-3	俄罗斯杨 <i>Populus russkii</i>	2015/7/17	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
904	大叶杨 <i>Populus lasiocarpa</i>	2015/7/16	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
914-1	杨树 <i>Populus</i> sp.	2015/7/21	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
934	新疆杨 <i>Populus alba</i>	2015/8/3	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
1074-2	胡杨 <i>Populus euphratica</i>	2015/8/26	吐鲁番市托克逊县 Toxon County, Turpan City
1076	胡杨 <i>Populus euphratica</i>	2015/8/26	吐鲁番市托克逊县 Toxon County, Turpan City
812-1	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/1	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
835-1	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/11	塔城地区托里县 Tori County, Tacheng Prefecture
839-2	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/2	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
839-3	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/2	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
847	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/6	塔城地区裕民县 Yumin County, Tacheng Prefecture
856-1	疏锯齿柳 <i>Salix serrulatifolia</i>	2015/7/29	塔城地区沙湾县 Shawan County, Tacheng Prefecture
755-2	红瑞木 <i>Swida alba</i>	2015/6/4	哈密地区哈密市 Hami City, Hami Prefecture
874-2	旱柳 <i>Salix matsudana</i>	2015/7/26	塔城地区沙湾县 Shawan County, Tacheng Prefecture
895-2	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/17	塔城地区乌苏市 Wusu City, Tacheng Prefecture
896	灰柳 <i>Salix cinerea</i>	2015/7/14	塔城地区托里县 Tori County, Tacheng Prefecture
897	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/14	塔城地区托里县 Tori County, Tacheng Prefecture
901	疏锯齿柳 <i>Salix serrulatifolia</i>	2015/7/14	塔城地区托里县 Tori County, Tacheng Prefecture
919-1	旱柳 <i>Salix matsudana</i>	2015/7/22	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
933	金丝垂柳 <i>Salix × aureo-pendula</i>	2015/8/3	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
935	金丝垂柳 <i>Salix × aureo-pendula</i>	2015/8/3	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
942	旱柳 <i>Salix matsudana</i>	2015/8/4	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
944-2	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/8/10	哈密地区哈密市 Hami City, Hami Prefecture
976-1	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/8/10	五家渠市 Wujiaqu City
976-2	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/8/10	五家渠市 Wujiaqu City
863	旱柳 <i>Salix matsudana</i>	2015/7/29	塔城地区沙湾县 Shawan County, Tacheng Prefecture
921	柳树 <i>Salix</i> sp.	2015/7/31	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
922	疏锯齿柳 <i>Salix serrulatifolia</i>	2015/7/31	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture
930-1	疏锯齿柳 <i>Salix serrulatifolia</i>	2015/8/3	塔城地区塔城市 Tacheng City, Tacheng Prefecture

1.4.2 ISSR-PCR反应体系及程序

ISSR-PCR反应体系40 μL: 10 × Buffer 4 μL, dNTP 3.2 μL, 上游引物(Primer 1): 2 μL (10 μM), 下游引物(Primer 2): 2 μL (10 μM), DNA (50 ng/μL) 2 μL, *Taq*酶(5 U/mL) 0.2 μL, ddH₂O 26.6 μL。PCR扩增程序为: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 退火1 min, 72℃延伸2 min, 变性-退火-延伸循环35次; 最后72℃延伸10 min。退火温度设定见表2。

1.4.3 数据的统计分析

对 ISSR-PCR 电泳图谱上重复出现的清晰条带记为“1”, 相同位置上没有出现条带的记为“0”, 建立[0,1]矩阵。应用 PopGen3.20 软件进行遗传多样性分析, 使用 NTSYSpc 2.10 软件进行加权聚类分析。分析金黄壳囊孢的总基因多样性(*Ht*)、种群内遗传多样性(*Hs*)和遗传分化系数(*Nei*, 1973)。

2 结果

2.1 不同来源金黄壳囊孢的培养性状及聚类分析

金黄壳囊孢的菌落颜色主要有: 白色、米黄色、菌落颜色主要有: 白色、米黄色、土黄色、灰色、深灰色和橘红色; 菌落形状均为绒毛状; 菌落的表面形态分别是菌丝稠密且无同心轮纹、菌丝稠密且有同心轮纹和菌丝稀疏且无同心轮纹等3种类型; 子实体的大小可分为大(直径2–5 mm)和小(直径 < 2 mm)两类; 子实体的分布主要有: 稀疏型(< 20个/皿)、密集型(> 100个/皿)和聚生型(表3)。

表3 本研究中PDA平板上金黄壳囊孢形态性状观测项目及赋值

Table 3 Observation items and assignment of morphological characteristics of *Cytospora chrysosperma* on PDA in this study.

观察项 Item	代表值 Value					
	0	1	2	3	4	5
菌落颜色 Colony color	白色 White	米黄色 Light yellow	土黄色 Khaki	灰色 Gray	深灰色 Dark gray	桔红色 Orange
菌落形状 Colony shape	圆形生长 Circular growth	辐射状生长 Radial growth	—	—	—	—
表面形态 Surface morphology	菌丝稠密 Hyphae dense	菌丝稠密 Hyphae dense	菌丝稠密 Hyphae dense	菌丝稠密 Hyphae dense	菌丝稠密 Hyphae dense	菌丝稀疏 Hyphae sparse
	平伏 Flat exhibition	轻微凸起 Slight raised	轻微凸起 Slight raised	凸起 Raised	凸起 Raised	轻微凸起 Slight raised
	无轮纹 No concentric ring	无轮纹 No concentric ring	有轮纹 Concentric ring	无轮纹 No concentric ring	有轮纹 Concentric ring	无轮纹 No concentric ring
有/无子实体 Sporulation	子实体小 Small sporophore	子实体小 Small sporophore	子实体大 Larger sporophore	子实体大 Larger sporophore	—	—
	密集型 Intensive	稀疏型 Sparse	稀疏型 Sparse	聚生型 Concentrated	—	—
色素分泌 Pigment secretion	米白色 Creamy-white	米黄色 Light yellow	土黄色 Khaki	灰色 Gray	黑色 Black	桔红色 Orange

表2 本研究中ISSR引物序列

Table 2 The sequence of ISSR primers used in this study

编号 No.	引物 Primer	引物序列(5'–3') Primer sequence (5'–3')	退火温度 Annealing temp. (°C)
1	IJ-5	GAGAGAGAGAGAGATG	52
2	IL-7	ACAACACACACACAC	52
3	IJ-7	GGGTGGGGTGGGGTG	52
4	IJ-9	AGATGTGTGTGTGTGTG	52
5	IJ-8	ATAAGAGAGAGAGAGAG	52
6	ID-8	GTGCGTGCGTGCGTGC	52
7	IL-3	CACGAGAGAGAGAGAGA	52
8	IQ-2	CCAAACCACCACCACCACCA	53
9	IJ-3	AGAGAGAGAGAGAGATC	53
10	IJ-4	GAGAGAGAGAGAGATC	53

将菌落特征的非数值型培养性状转化为数值型, 使用NTSYSpc2.10软件进行UPGMA聚类分析后得出, 当遗传相似性系数为0.28时, 47株金黄壳囊孢依据菌落颜色被分为6个类群: 白色(分支A、D、B、G、E、F、C); 灰色(分支J、K); 黄色或灰黄色且子实体较大(分支I、M); 深灰色(分支O、N); 红色(分支H); 黄色子实体较小(分支L) (图1)。

当遗传相似性系数为0.52时, 47株菌株被划分为15个类群, 其中类群一(分支A)的表型特征为: 菌落白色, 子实体较小且分布密集, 包含菌株933、919-1、626、739、904、812-1; 类群二(分支D)的表型特征为: 菌落白色, 子实体较小且分布稀疏, 包

图1 47株金黄壳囊孢培养性状聚类图。A–O表示具有不同培养性状特征的分支；数字代表菌株编号，菌株信息见表1。

Fig. 1 The UPGMA dendrogram of 47 *Cytospora chrysosperma* isolates based on morphological characteristics. A–O, Branches with different culture traits. The numbers represent strain numbers, which correspond to those in Table 1.

含菌株：701、702、737、874-2；类群三(分支B)的表型特征为：菌落白色，子实体较大且分布稀疏，包含菌株：319-1、908、1155、600-2、895-2、897、901、930-1、976-1、1076、835-1；类群四(分支G)的表型特征为：菌落白色，子实体聚生，包含菌株：740；类群五(分支E)的表型特征为：菌落白色，菌丝绒毛状，无子实体产生，包含菌株：935、914-1、856-1；类群六(分支F)的表型特征为：菌落白色，无子实体产生，包含菌株：891-1；类群七(分支C)的表型特征为：菌落白色，菌丝棉絮状，无子实体产生，包含菌株：936、922、742；类群八(分支J)的表型特征为：菌落灰色，子实体较小且分布密集，包含菌株：686-2、793、942、944-2；类群九(分支K)的表型特征为：菌落灰色，无子实体产生，包含菌株：1074-2；类群十(分支I)的表型特征为：菌落黄色，

子实体较大且分布稀疏，包含菌株：921、976-2、891-3；类群十一(分支M)的表型特征为：菌落灰色，子实体较大且分布稀疏，包含菌株：686-1、790-2、839-2、839-3；类群十二(分支O)的表型特征为：菌落深灰色，子实体较小且分布密集，包含菌株：896；类群十三(分支N)的表型特征为：菌落深灰色，无子实体产生，包含菌株：847；类群十四(分支H)的表型特征为：菌落红色，无子实体产生，包含菌株：934；类群十五(分支L)的表型特征为：菌落黄色，子实体较小且分布稀疏，包含菌株：882、863、755-2。这表明各菌株亲缘关系的远近与菌株的培养性状密切相关。

2.2 不同类型金黄壳囊孢对95种碳源的利用数量及代谢活性

供试菌株在3个不同的培养时间即72 h、96 h和

120 h后,对碳源的利用数量随着培养时间的增长逐渐增多(图2)。在培养120 h后,各菌株的碳源利用总数分别为:28种(菌株882)>26种(菌株1074-2)>25种(菌株935)>23种(菌株686-2、921、702、740)>22种(菌株922、847)>21种(菌株934、891-1、896)>19种(菌株839-2)>15种(菌株897)>7种(菌株812-1),供试菌株平均利用碳源数量约为21种;不同菌株的碳源代谢能力分别为:847>896>935>702>1074-2>882>740>934>891-1>922>921>897>839-2>812-1>686-2(图2)。

不同菌株在碳源利用数量及代谢能力上存在较大差异。菌株882利用的碳源数量最多,在培养120 h后可利用28种不同碳源,其碳源代谢能力中等;菌株812-1利用的碳源数量最少,在培养120 h后仅可利用7种碳源,其代谢能力较低。菌株847和686-2可利用的碳源数量分别为22种和23种,接近不同类型菌株碳源利用平均值,但二者在碳源代谢能力上明显不同:菌株847在三个不同培养时间内的吸光度值变化幅度最大,其代谢能力最强;菌株686-2的变化幅度最小,代谢能力最弱。

2.3 15种不同类型金黄壳囊孢对碳源利用情况的分析

将15种不同类型菌株对95种碳源中主要利用的15种碳源进行了分析(表4)。其中,菌株897、686-2、891-1、1074-2、922、935对15种碳源的平均利用率较高。812-1利用碳源数量最少,仅能利用7种碳源。15种不同表型的金黄壳囊孢菌对吐温80、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、糊精、D-果糖、a-D-葡萄

糖、D-甘露糖、D-核糖、D-木糖的平均利用率均较高。

2.4 存在单独利用碳源的菌株

当遗传相似性系数为0.52时,在培养性状聚类图中呈现单独分支的6株菌株具有单独利用碳源的能力(表5)。其中,分支K的菌株1074-2能利用L-谷氨酸和L-丙胺酰胺;菌株分支N的菌株847能利用溴代丁二酸;分支H的菌株934能利用腺苷;分支F的菌株891-1能利用L-乳酸和L-苯丙氨酸;分支O的菌株896能利用L-海藻糖;分支G的菌株740能利用P-羟基苯乙酸、琥珀酰胺酸和L-天门冬氨酸。

2.5 47株不同来源金黄壳囊孢遗传结构和亲缘关系聚类分析

金黄壳囊孢总的基因多样性(*Ht*)为0.3652,种群内的基因多样性(*Hs*)为0.2429,遗传分化系数为0.3349,表明种群内的遗传变异占66.41%,说明金黄壳囊孢的遗传变异主要存在于种内。5个地区的金黄壳囊孢间的基因流为0.9929。

47份金黄壳囊孢依据遗传相似性系数矩阵,使用NTSYSpc2.10软件进行UPGMA聚类分析(图3)。当遗传相似性系数为0.58时,来自于5个地区的47株金黄壳囊孢可分为两个不同的类群:第一个类群包含了来源于北疆的40个菌株(菌株908、702、891-1、740、1074-2、882、914-1、891-3、936、863、921、922、942、856-1、901、874-2、319-1、935、835-1、847、839-3、839-2、934、737、976-2、896、930-1、895-2、701、742、793、944-2、1155、755-2、897、790-2、1076、976-1、686-2、686-1)和1个南疆喀什地区的菌株600-2,其中存在单独利用碳源

图2 不同类型金黄壳囊孢碳源利用数量及代谢活性随时间变化图(菌株编号含义见表1)
Fig. 2 Changes in the amount of *Cytospora chersosperma* carbon source utilization and metabolic activity over time. The strain numbers are the same to Table 1.

表4 本研究中不同类型金黄壳囊孢对主要碳源的利用情况(菌株编号含义见表1)

Table 4 The utilization of carbon type by *Cytospora chrysosperma* in this study. The strain numbers are the same to Table 1.

碳源种类 Carbon source type	吸光度值 Absorbance value (Ci-R)															平均吸光度值 Average absorbance value
	812-1	897	1074-2	686-2	921	922	839-2	847	934	882	702	891-1	896	740	935	
吐温80 Tween 80	0.735	0.715	0.296	0.525	0.334	0.472	0.332	0.305	0.349	0.290	0.598	0.458	0.401	0.812	0.700	0.488
苦杏仁苷 Amygdalin	—	0.282	0.274	0.322	0.276	0.583	0.653	0.254	0.418	0.284	0.396	0.475	0.493	0.313	0.330	0.357
D-阿拉伯糖 D-Arabinose	0.685	0.632	0.821	0.521	0.266	0.709	0.624	0.250	0.419	0.272	0.499	0.557	0.425	0.426	0.307	0.494
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	0.688	0.627	0.670	0.568	0.285	0.724	0.453	0.375	0.582	0.266	0.629	0.496	0.285	0.259	0.304	0.481
糊精 Dextrin	0.392	0.686	0.661	0.782	0.503	0.447	0.438	0.345	0.414	0.264	0.543	0.522	0.469	0.479	0.369	0.488
D-果糖 D-Fructose	—	0.678	0.891	0.669	0.401	0.404	0.471	0.303	0.503	0.282	0.616	0.578	0.406	0.259	0.726	0.479
α-D-葡萄糖 α-D-glucose	0.385	0.669	0.500	0.766	0.334	0.379	0.572	0.301	0.347	0.464	0.618	0.689	0.535	0.287	0.551	0.493
D-甘露糖 D-Mannitol	—	0.899	0.563	0.741	0.336	0.312	0.314	0.510	0.992	0.610	0.297	0.508	0.314	0.251	0.416	0.471
D-核糖 D-ribose	0.658	0.691	0.451	0.613	0.541	0.892	0.562	0.510	0.349	0.554	0.432	0.401	0.526	0.276	0.353	0.521
水杨苷 Salicin	—	0.394	0.534	0.323	0.342	0.359	0.335	0.523	0.318	0.282	0.463	0.579	0.551	0.331	0.334	0.378
蔗糖 Sucrose	—	0.28	0.430	0.255	0.349	0.498	—	0.305	0.349	—	0.356	0.252	—	0.343	0.518	0.262
D-木糖 D-xylose	0.756	0.686	0.270	0.592	0.336	0.518	0.423	0.347	0.319	0.666	0.293	0.592	0.406	0.356	0.514	0.472
富马酸 Fumaric acid	—	0.354	0.361	0.378	0.436	0.381	—	1.522	0.314	0.595	0.280	0.625	—	0.294	0.517	0.404
琥珀酸 Butanedioic acid	—	0.371	0.360	0.255	0.348	0.331	—	0.400	0.279	0.346	0.649	0.535	—	0.284	0.326	0.299
L-天门冬酰胺 L-asparagine	—	1.246	0.460	0.578	0.436	0.304	0.306	0.453	0.258	0.329	0.284	0.410	0.260	0.265	0.954	0.436
平均吸光度值 Average absorbance value	0.287	0.614	0.503	0.526	0.368	0.488	0.366	0.447	0.414	0.367	0.464	0.512	0.338	0.349	0.481	

表中为处理120 h后的数据 Data in the Table are those having been processed for 120 h

表5 本研究中存在单独利用碳源的菌株及利用种类

Table 5 Strains and types of carbon sources that used carbon sources alone in this study

菌株 Strain	碳水化合物 Carbohydrate	羧酸及其衍生物 Carboxylic acids and derivatives	氨基酸 Amino acid	磷酸盐类 Phosphates	胺类 Amine
1074-2	—	—	L-谷氨酸 L- glutamate	L-丙胺酰胺 L-alamide	—
847	—	溴代丁二酸 Bromosuccinic acid	—	—	—
934	—	—	—	—	腺苷 Adenosin
891-1	—	L-乳酸 L-lactic acid	L-苯丙氨酸 L- phenylalanine	—	—
896	L-海藻糖 L-trehalose	—	—	—	—
740	—	p-羟基苯乙酸 p-hydroxy acid	琥珀酰胺酸 Succinamic acid	—	—
			L-天门冬氨酸 L-aspartic acid		

的6个菌株均来自第一类群；第二个类群包含了来自于北疆的5个菌株(菌株919-1、904、933、739、812-1)和南疆的1个菌株626，表明金黄壳囊孢的亲缘关系与地理来源无明显相关性。

此外，22株来源于柳树的金黄壳囊孢中有19株位于第一大类群，3株(919-1、933、812-1)位于第二类群；18株来自杨树的菌株中有15株位于第一大类群，3株(菌株626、739、904)位于第二大类群，表明

图3 47株金黄壳囊孢的ISSR聚类分析图(当遗传相似性系数为0.58时, 47个菌株被分为类群I和类群II; 菌株编号同表1)

Fig. 3 The UPGMA dendrogram of 47 *Crtospora chrysosperma* isolates with PCR-ISSR. The 47 strains were divided into group I and group II when genetic similarity coefficient was 0.58. Strain numbers see Table 1.

金黄壳囊孢的亲缘关系与寄主来源无显著相关性。

3 讨论

国内关于金黄壳囊孢多样性的研究中菌株主要来自于杨树和柳树, 本研究的供试菌株来自全疆的5个地区5种寄主, 为开展新疆金黄壳囊孢的多样性提供了较为丰富的标本来源。研究表明47株金黄壳囊孢在培养性状上存在明显的类群分化, 这与张星耀等(2007)的研究结果一致。依据培养特征将供试的47个菌株划分为15个类群, 各类群中菌落颜色及孢子分布相同的菌株聚为一个类群, 表明金黄壳囊孢表型丰富且存在变异。

金黄壳囊孢的遗传分化系数(G_{st})为0.3349, 表明金黄壳囊孢遗传变异主要存在于居群内部, 居群间基因交流频繁, 与臧睿等(2012)的研究结果较为相近, 其认为陕西省苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)基

因多态性的遗传变异主要存在于群体内部(89.1%), 居群间存在广泛的基因交流。

冀瑞卿等(2010)通过rDNA-ITS序列测定及生理学特性分析得出金黄壳囊孢对葡萄糖和蔗糖的利用率相对较高, 本研究首次通过Biolog-FF技术从碳源代谢水平上分析金黄壳囊孢的多样性。研究发现各菌株在碳源利用数量及碳源代谢水平上存在较大差异, 菌株882利用的碳源数量最多, 代谢碳源的能力较高; 812-1利用的碳源数量最少, 代谢碳源能力最低。本研究还发现在形态聚类图中具有独立分支的6个菌株具有独立利用碳源的能力, 这种现象的原因有待进一步研究。

本研究将来自新疆5个地区5种寄主的47株金黄壳囊孢在亲缘关系上划分为两大类群, 聚类结果与菌株的地理来源和寄主种类无明显相关性, 这与现有的研究结果较为一致(田呈明等, 2000; 李正力

等, 2011; 刘钰娇等, 2014), 而杨明秀(2014)利用 RAPD、SRAP 技术分析了不同省份金黄壳囊孢的遗传多样性, 认为 *C. chrysosperma* 的遗传多样性与地理来源有一定关系。本研究中的第二大类群在培养性状聚类中均属于类型 A (白色, 子实体小密集型), 在生理生化特性中属于碳源利用数量最少、代谢活性最低的类群, 利用独立碳源的 6 株菌株在培养性状亲缘聚类中各自单独聚为一个类群, 这表明金黄壳囊孢的遗传多样性、培养性状及生理生化特性之间存在明显相关性, 杨明秀(2014)研究中国 10 省金黄壳囊孢的菌落特征和遗传多样性时也得出了相近的结论。

综上所述, 新疆不同地理来源和不同寄主上金黄壳囊孢从表型上划分为 15 个类群, 为新疆不同类型金黄壳囊孢的准确鉴定提供了依据; 不同表型的菌株在对碳源的利用数量和利用能力方面存在差异; 新疆金黄壳囊孢个体的划分与寄主和地理来源无显著相关性, 但是与表型特征和理化特征具有相关性。

参考文献

- Abbasi K, Abbasi S, Fotouhifar KB, Zebarjahi AR (2015) Study of genetic diversity in *Cytospora chrysosperma* isolates obtained from walnut trees in Iran using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48, 327–335.
- Abbasi K, Abbasi S, Fotouhifar KB, Zebarjahi AR, Cheghamirza K (2011) Genetic diversity of *Cytospora chrysosperma* isolates obtained from Iranian walnut trees using molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, 10, 15710–15716.
- Du P, Liu JJ, Shen LD, Hu BL, Zeng JN, Chen QZ, Shou L, Liao YB (2012) Diversity of microorganisms in sediments of the Jiaojiang estuary as estimated by Biolog and PCR-DGGE. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 32, 1436–1444. (in Chinese with English abstract) [杜萍, 刘晶晶, 沈李东, 胡宝兰, 曾江宁, 陈全震, 寿鹿, 廖一波 (2012) Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析椒江口沉积物微生物多样性. *环境科学学报*, 32, 1436–1444.]
- Fan XL (2016) Phylogeny and Taxonomy of *Cytospora* in Yellow River Region of China. PhD dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. (in Chinese with English abstract) [范鑫磊 (2016) 中国黄河流域壳囊孢属的分类和系统学研究. 博士学位论文, 北京林业大学, 北京.]
- Ji RQ, Li Y, Song RQ, Wang YJ (2010) Cultural characteristics and rDNA ITS sequence analysis of *Cytospora chrysosperma*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 32, 483–487. (in Chinese with English abstract) [冀瑞卿, 李玉, 宋瑞清, 王月杰 (2010) 金黄壳囊孢菌 rDNA ITS 序列测定及生理学特性. *吉林农业大学学报*, 32, 483–487.]
- Jia X, Dong SM, Zhou CJ (2013) Effects of Biolog Eco-plates incubation time on analysis results in microbial ecology researches. *Journal of Basic Science and Engineering*, 21, 10–19. (in Chinese with English abstract) [贾夏, 董岁明, 周春娟 (2013) 微生物生态研究中 Biolog Eco 微平板培养时间对分析结果的影响. *应用基础与工程科学学报*, 21, 10–19.]
- Khalil S, Alsanius BW (2009) Utilisation of carbon sources by *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* species as determined by Biolog® microplate assay. *Open Microbiology Journal*, 3, 9.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW (2008) *Dictionary of the Fungi*. CABI, Wallingford.
- Li ZL, Huang LL, Kang ZS, Zang R (2011) Polymorphism of *Valsa mali* collected in Yangling Shaanxi using SRAP markers. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 20, 190–195. (in Chinese with English abstract) [李正力, 黄丽丽, 康振生, 臧睿 (2011) 陕西杨凌地区苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali*) 基因多态性的 SRAP 分析. *西北农业学报*, 20, 190–195.]
- Liu XL, Liu Y, Ma R, Liang YM, Chen BJ, Yan J (2015) Identification and biological characteristics of the pathogen causing *Jujube* black spot in Xinjiang. *Journal of Northwest Forestry*, 30, 132–138. (in Chinese with English abstract) [刘晓琳, 刘玉, 马荣, 梁英梅, 陈宝军, 闫军 (2015) 新疆枣果黑斑病原菌鉴定及生物学特性. *西北林学院学报*, 30, 132–138.]
- Liu YJ, Wang J, Wang ST, Wang YN, Hu TL, Cao KQ (2014) RAPD analysis of genetic diversity of apple tree rot pathogens in Hebei Province. *China Fruits*, (5), 20–24. (in Chinese) [刘钰娇, 王娟, 王树桐, 王亚南, 胡同乐, 曹克强 (2014) 河北省苹果树腐烂病菌遗传多样性的 RAPD 分析. *中国果树*, (5), 20–24.]
- Ma R (2017) Taxonomy and Phylogeny of *Cytospora* in Xinjiang, Northwest of China. PhD dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. (in Chinese with English abstract) [马荣 (2017) 新疆壳囊孢属真菌的分类及系统学研究. 博士学位论文, 北京林业大学, 北京.]
- Ma R, Zhao Y, Yin YX, Li Y, Tian CM (2018) Study on the culture characteristics of *Cytospora chrysosperma* from different sources and the pathogenicity to three poplar species. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 41, 339–345. (in Chinese with English abstract) [马荣, 赵颖, 尹永香, 李瑜, 田呈明 (2018) 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. *新疆农业大学学报*, 41, 339–345.]
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70, 3321–3323.
- Rohlf FJ (1987) NTSYS-pc: Microcomputer Programs for Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis. American

- Statistician, 41, 330.
- Tian CM, Kang ZS, Li ZQ, Zhao YX, Zhang H (2000) Analysis of the genetic specialization of *Melampsora larici-Populina* with RAPD markers. *Scientia Silvae Sinicae*, 36(5), 54–58. (in Chinese with English abstract) [田呈明, 康振生, 李振岐, 赵彦修, 张慧 (2000) 落叶松-杨栅锈菌遗传分化的RAPD分析. 林业科学, 36(5), 54–58.]
- Wang Q, Dai JL, Wu DQ, Yu Y, Shen TL, Wang RQ (2010) Statistical analysis of data from BIOLOG method in the study of microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 30, 817–823. (in Chinese with English abstract) [王强, 戴九兰, 吴大千, 余悦, 申天琳, 王仁卿 (2010) 微生物生态研究中基于BIOLOG方法的数据分析. 生态学报, 30, 817–823]
- Wu ZX, Hao ZP, Chen YL, Zeng Y, Guo LP, Huang LQ, Wang Y, Chen BD (2015) Characterization of fungal community composition and carbon source utilization in the rhizosphere soil of *Panax notoginseng* suffering from root-rot disease. *Mycosystema*, 34, 65–74. (in Chinese with English abstract) [吴照祥, 郝志鹏, 陈永亮, 曾燕, 郭兰萍, 黄璐琦, 王勇, 陈保冬 (2015) 三七根腐病株根际土壤真菌群落组成与碳源利用特征研究. 菌物学报, 34, 65–74.]
- Xiang YY (1987) The Disease and Prevention of Poplar. China Forestry Publishing House, Beijing. (in Chinese) [向玉英 (1987) 杨树病害及其防治. 中国林业出版社, 北京.]
- Yang MX (2014) The Genetic Diversity of *Cytospora chrysosperma* and the Defense Mechanisms of Poplar. PhD dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. (in Chinese with English abstract) [杨明秀 (2014) 中国金黄壳囊孢菌遗传多样性及杨树防御机制研究. 博士学位论文, 东北林业大学, 哈尔滨.]
- Zang R, Huang LL, Li ZL, Gao XN, Kang ZS (2012) Polymorphism analysis of *Valsa mali* isolated from Shaanxi Province using ISSR markers. *Acta Phytophylacica Sinica*, 39, 51–57. (in Chinese with English abstract) [臧睿, 黄丽丽, 李正力, 高小宁, 康振生 (2012) 陕西省苹果树腐烂病菌基因多态性的ISSR分析. 植物保护学报, 39, 51–57.]
- Zhang HY, Li YJ, Gu JG, Dong XX, Shang P (2015) On carbon metabolism of fungi in chlortetracycline degradation based on Biolog-FF system. *Microbiology China*, 42, 1241–1247. (in Chinese with English abstract) [张惠艳, 李艳菊, 顾金刚, 董晓霞, 尚攀 (2015) 基于Biolog-FF技术的金霉素降解真菌的碳代谢特征研究. 微生物学通报, 42, 1241–1247.]
- Zhang JE, Fan XL, Liang YM, Tian CM (2017) Analysis of appearance features and genetic diversity of *Cytospora chrysosperma* causing poplar canker. *Journal of Beijing Forestry University*, 39, 76–86. (in Chinese with English abstract) [张俊娥, 范鑫磊, 梁英梅, 田呈明 (2017) 杨树腐烂病菌表观特征及遗传多样性分析. 北京林业大学学报, 39, 76–86.]
- Zhang XY, Chen HY, Liang J, Tian CM, Lü Q (2007) Cultural morphology and vegetative compatibility of *Cytospora chrysosperma* isolate. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 35, 99–105. (in Chinese with English abstract) [张星耀, 陈海燕, 梁军, 田呈明, 吕全 (2007) 金黄壳囊孢菌(*Cytospora chrysosperma*)的培养性状和营养体亲和性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 35, 99–105.]
- Zhou ZM (1990) Forest Pathology. China Forestry Publishing House, Beijing. (in Chinese) [周仲民 (1990) 林木病理学. 中国林业出版社, 北京.]

(责任编辑: 郭良栋 责任编辑: 时意专)