

卢松茂, 陈振东, 林秀香, 等. 基于 rDNA-ITS 序列的天门冬拟茎点霉与相似种的系统发育关系[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 62-67.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.009

基于 rDNA-ITS 序列的天门冬拟茎点霉与相似种的系统发育关系

卢松茂, 陈振东, 林秀香, 郑少缘, 余智城

(福建省热带作物科学研究所, 福建 漳州 363001)

摘要: 芦笋茎枯病由天门冬拟茎点霉(*Phomopsis asparagi*)引起, 为明确 *P. asparagi* 与寄生在其他蔬菜、水果和经济林木等植物上的拟茎点霉不同种之间的系统发育关系, 对分离至福建漳州的 *P. asparagi* 菌株及从 GenBank 下载的相关菌株的 35 条 ITS 序列进行多序列比对分析, 并用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。系统发育分析结果显示: 35 个菌株被划分为 I、II 和 III 组群; *P. asparagi* 与葡萄拟茎点霉(*P. viticola*)、叶下朱生拟茎点霉(*P. phyllanthicola*)、杨桃拟茎点霉(*P. averrhoae*)、大豆茎溃疡病菌(*Diaporthe phaseolorum*)聚在 I 组群的 A 亚群, 它们的系统学关系最近; 大豆拟茎点霉(*P. longicolla*)、大豆间座壳菌(*Diaporthe sojae*)、褐纹拟茎点霉(*P. vexans*)、光叶子花拟茎点霉(*P. glabrae*)、柑橘间座壳菌(*Diaporthe citri*)、黄瓜间座壳菌(*Diaporthe sclerotoides*)聚在 II 组群, 它们与 *P. asparagi* 的系统学关系较远; 昏暗拟茎点霉(*P. obscurans*)单独聚在最远的分支上(III 组群), 其与 *P. asparagi* 的系统学关系最远。

关键词: 天门冬拟茎点霉; 拟茎点霉属; 核糖体 DNA 内转录间隔区; 分子系统学

中图分类号: S644.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)01-0062-06

Phylogenetic relationships of *Phomopsis asparagi* and related speices based on internal transcribed space of ribosomal DNA (rDNA-ITS) sequences

LU Song-mao, CHEN Zhen-dong, LIN Xiu-xiang, ZHENG Shao-yuan, YU Zhi-cheng

(Fujian Institute of Tropical Crops, Zhangzhou 363001, China)

Abstract: To define the phylogenetic relationships of *Phomopsis asparagi* and related speices that parasitized other vegetables, fruits and economic trees, 35 internal transcribed space (ITS) of ribosomal DNA (rDNA-ITS) sequences of *P. asparagi* isolated from Zhangzhou city of Fujian province and the related speices downloaded from GenBank were together processed by multiple sequences alignment analysis, and the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method. The *Phomopsis* strains were clustered into group I, group II and group III. *P. asparagi*, *P. viticola*, *P. phyllanthicola*, *P. averrhoae* and *Diaporthe phaseolorum* were clustered together in subgroup A of group I. They were closely related, but were relatively differentiated to some extent. *P. longicolla*, *Diaporthe sojae*, *P. vexans*, *P. glabrae*, *Diaporthe citri* and *Diaporthe sclerotoides* were clustered in group II. They had a distant relationship with *P. asparagi*. *P. obscurans* was clustered in the farthest distance clade (group III), indicative of the farthest phylogenetic relationship with *P. asparagi*.

Key words: *Phomopsis asparagi*; *Phomopsis*; internal transcribed space (ITS) of ribosomal DNA; molecular phylogenetics

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 福建省公益类科研院所专项(2010R1030-1)

作者简介: 卢松茂(1983-), 男, 福建永定人, 本科, 助理研究员, 主要从事植物病理学研究。(Tel) 13860897573; (E-mail) songmaolu@163.com

通讯作者: 林秀香, (Tel) 0596-6101151

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)又名石刁柏,素有“蔬菜之王”的美称,富含多种氨基酸、蛋白质、维生素及人体所需的微量元素等^[1]。中国已成为世界上生产和出口芦笋数量最大的国家^[2]。芦笋茎枯病(*Asparagus stem blight*)是芦笋的一种毁灭性病害,其病原菌最初由 Saccardo^[3]命名为天门冬茎点霉(*Phoma asparagi*),而后 Bubak^[4]将其更正为天门冬拟茎点霉(*Phomopsis asparagi*),并一直沿用到现在。当前,*P. asparagi* 在国内外的芦笋产区均有发生危害,国内主要分布在福建、山东、海南、山西、河南、台湾等省^[5-7],国外主要分布在美国、欧洲、澳大利亚、意大利、新西兰、希腊等国家^[8-10]。在发病严重的地区发病率达 100%^[11-12],病情指数达 50~70^[13],导致芦笋植株整株干枯,严重影响芦笋的品质和产量。

核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS)序列是介于 18S rDNA、5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的区域,该区域进化速度较编码区快,在种内不同菌株间高度保守,而在真菌的种间存在着丰富的变化^[14-15]。rDNA-ITS 序列测定和比对为大量生物的系统发育和亲缘关系的鉴定提供了有价值的参考,已被广泛应用于亲缘关系较近分类群的系统发育研究^[16]。Murali 等^[17]利用 rDNA-ITS 序列分析结果表明寄生在柚木上的内生菌 *Phomopsis* 存在多个不同的组群。Kanematsu 等^[18]从形态特征观察和 ITS 序列分析认为寄生在蔷薇科果树上的 *Phomopsis* 与 *P. asparagi* 在分子系统发育上存在差异。目前,尚未见基于 rDNA-ITS 序列对 *P. asparagi* 与寄生在其他蔬菜、果树和经济林木上的 *Phomopsis* 菌株进行系统发育分析的研究报道。本研究对分离自福建漳州不同地区的 3 个 *P. asparagi* 菌株的 ITS 序列进行测定,并对 *P. asparagi* 菌株与 GenBank 中登录的寄生在其他蔬菜、果树和经济林木上的 19 个种的拟茎点霉菌株的 ITS 序列(共 35 条)进行多序列比对分析,以进一步揭示 *P. asparagi* 与拟茎点霉属其他重要种的系统发育关系,为 *P. asparagi* 的分子鉴定及其分子进化关系研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

于 2010~2013 年,在福建省东山县芦笋产区和福建省热带作物科学研究所内芦笋试验地采集具有

芦笋茎枯病典型症状的茎秆组织,采用常规组织分离法^[19]对病斑上的病菌进行分离和纯化,并参照卢松茂等^[20]方法进行形态特征鉴定和致病性测定,获得 3 个 *Phomopsis asparagi* 菌株(PDL、PQW、PWF),在恒温培养箱中 25℃、12 h 光暗交替条件下用燕麦培养基(OA)培养 7 d,备用。

1.2 菌丝体的收集及基因组 DNA 的提取

将已在燕麦培养基(OA)上 25℃条件下生长 7 d 的 3 个 *Phomopsis asparagi* 菌株(PDL、PQW、PWF)菌落边缘分别切取直径为 5 mm 的菌饼,接种至装有 100 ml 马铃薯葡萄糖液体培养基(PD)的三角瓶上,每瓶接 3 块菌饼,在 25℃、120 r/min 条件下振荡培养 7 d。用纱布过滤菌液,获得菌丝置于无菌的滤纸上吸去水分,55℃下烘 30 min。采用十二烷基硫酸钠(SDS)法提取基因组 DNA^[21]。

1.3 PCR 扩增及测序

利用真菌 ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和下游引物 ITS4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3') 扩增病菌 rDNA-ITS 序列。PCR 反应体系组成为:10×Buffer(含 MgCl₂) 2.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 0.5 μl, ITS1 和 ITS4 (10 μmol/L) 各 1.5 μl, Taq (5 U/μl) 0.2 μl, 模板 DNA 1 μl, ddH₂O 17.8 μl。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物用质量分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将条带清晰的 PCR 扩增产物送上海生工双向测序。

1.4 供试菌株 ITS 序列分析

将供试菌株 PDL、PQW、PWF 的 ITS 序列分别与 GenBank 中核酸数据库进行 BLAST 分析,比较同源性。用 Clustal X、SeqMan 等软件分析供试菌株 PDL、PQW、PWF 与已发表的 *P. asparagi* 菌株(GenBank 登录号:JQ070363)的核糖体 DNA-ITS 序列差异,分析其 5.8S 及其侧翼的 ITS 区的变异情况。

1.5 基于 ITS 序列构建系统发育树

将供试菌株(PDL、PQW、PWF)及来自 GenBank 登录的寄生在其他蔬菜、果树、经济林木等上的 35 个拟茎点霉菌株(表 1)的 ITS 序列用 Clustal X 软件进行多序列比对分析,并用 MEGA5.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,Bootstrap 检验 1 000 次。

表 1 35 个拟茎点霉菌株及来源

Table 1 35 *Phomopsis* strains and their sources

种 名	寄主	来源	登录号	种 名	寄主	来源	登录号
<i>Phomopsis fukushii</i>	沙梨	日本	JQ807468	<i>Phomopsis ternstroemia</i>	厚皮香	中国	KC153098
<i>Phomopsis fukushii</i>	沙梨	日本	JQ807469	<i>Phomopsis averrhoae</i>	杨桃	中国	AY618930
<i>Phomopsis viticola</i>	葡萄	美国	HQ288249	<i>Phomopsis averrhoae</i>	未知	印度	JN638437
<i>Phomopsis viticola</i>	葡萄	美国	HQ288246	<i>Phomopsis ternstroemia</i>	厚皮香	中国	KC153099
<i>Phomopsis vexans</i>	茄子	印度	KJ002791	<i>Phomopsis glabrae</i>	叶子花	中国	AY601918
<i>Phomopsis vexans</i>	茄子	印度	KJ002790	<i>Phomopsis longanae</i>	荔枝	意大利	JX417145
<i>Phomopsis obscurans</i>	草莓	中国	HM013820	<i>Phomopsis phyllanthicola</i>	马尾松	中国	FJ441632
<i>Phomopsis longicolla</i>	大豆	美国	FJ785439	<i>Phomopsis phyllanthicola</i>	阴香	中国	JN107737
<i>Phomopsis longicolla</i>	大豆	美国	FJ785438	<i>Phomopsis castaneae</i>	板栗	中国	JF957786
<i>Diaporthe sojae</i>	野生大豆	美国	KC343201	<i>Diaporthe citri</i>	柑橘	印度	KJ477016
<i>Diaporthe sojae</i>	野生大豆	美国	KC343200	<i>Diaporthe citri</i>	柑橘	印度	KJ477017
<i>Phomopsis mali</i>	红豆杉	中国	KF574900	<i>Phomopsis perniciosa</i>	樱桃	中国	JF812647
<i>Phomopsis asparagi</i>	芦笋	中国	JQ070363	<i>Phomopsis asparagi</i> (PDL)	芦笋	中国	KJ801804
<i>Phomopsis azadirachtae</i>	苦楝树	印度	KC631323	<i>Phomopsis asparagi</i> (PQW)	芦笋	中国	KJ801805
<i>Phomopsis azadirachtae</i>	苦楝树	印度	KC631322	<i>Phomopsis asparagi</i> (PWF)	芦笋	中国	KJ801806
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	芒果	中国	KC492471	<i>Diaporthe sclerotioides</i>	黄瓜	荷兰	AF439626
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	芒果	中国	KC492468	<i>Diaporthe sclerotioides</i>	黄瓜	日本	AB201439
<i>Phomopsis glabrae</i>	葫芦	科特迪亚	KF317654				

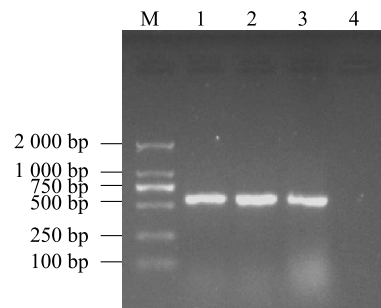
2 结果与分析

2.1 供试菌株核糖体 ITS 序列分析

分别以提取的 PDL、PQW 和 PWF 菌株基因组 DNA 为模板,用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增,产物经电泳后均得到大小约为 600 bp 的 DNA 片段(图 1)。上海生工双向测序结果显示, PDL、PQW 和 PWF 菌株的片段大小与预测的较为一致,它们的 ITS 序列长度分别为 585 bp、585 bp、587 bp。将 PDL、PQW 和 PWF 菌株的 ITS 序列提交至 NCBI 后,获取登录号分别为 KJ801804、KJ801805、KJ801806。三者的 ITS1-5.8S-ITS2 序列的一致性达 100%,其中 rDNA-ITS1 全长为 173 bp,5.8S 全长为 159 bp,rDNA-ITS2 全长为 160 bp。它们与 *P. asparagi* 菌株 Pa1100 (GenBank 登录号: JQ070363) ITS1-5.8S-ITS2 序列的同源性达 99.8%,仅在 rDNA-ITS2 有 1 个碱基的差异,由碱基 A→G 单碱基转换。由此说明 *P. asparagi* 同种内的不同个体之间的 ITS 序列是非常保守的。

2.2 基于 ITS 序列的拟茎点霉菌株的系统发育分析

将 35 个拟茎点霉菌株的 ITS 序列进行多序列比对分析,采用 Neighbor-Joining 法构建了系统发育树,结



M: DL-2000 marker; 1: PDL 菌株; 2: PQW 菌株; 3: PWF 菌株; 4: ddH₂O。

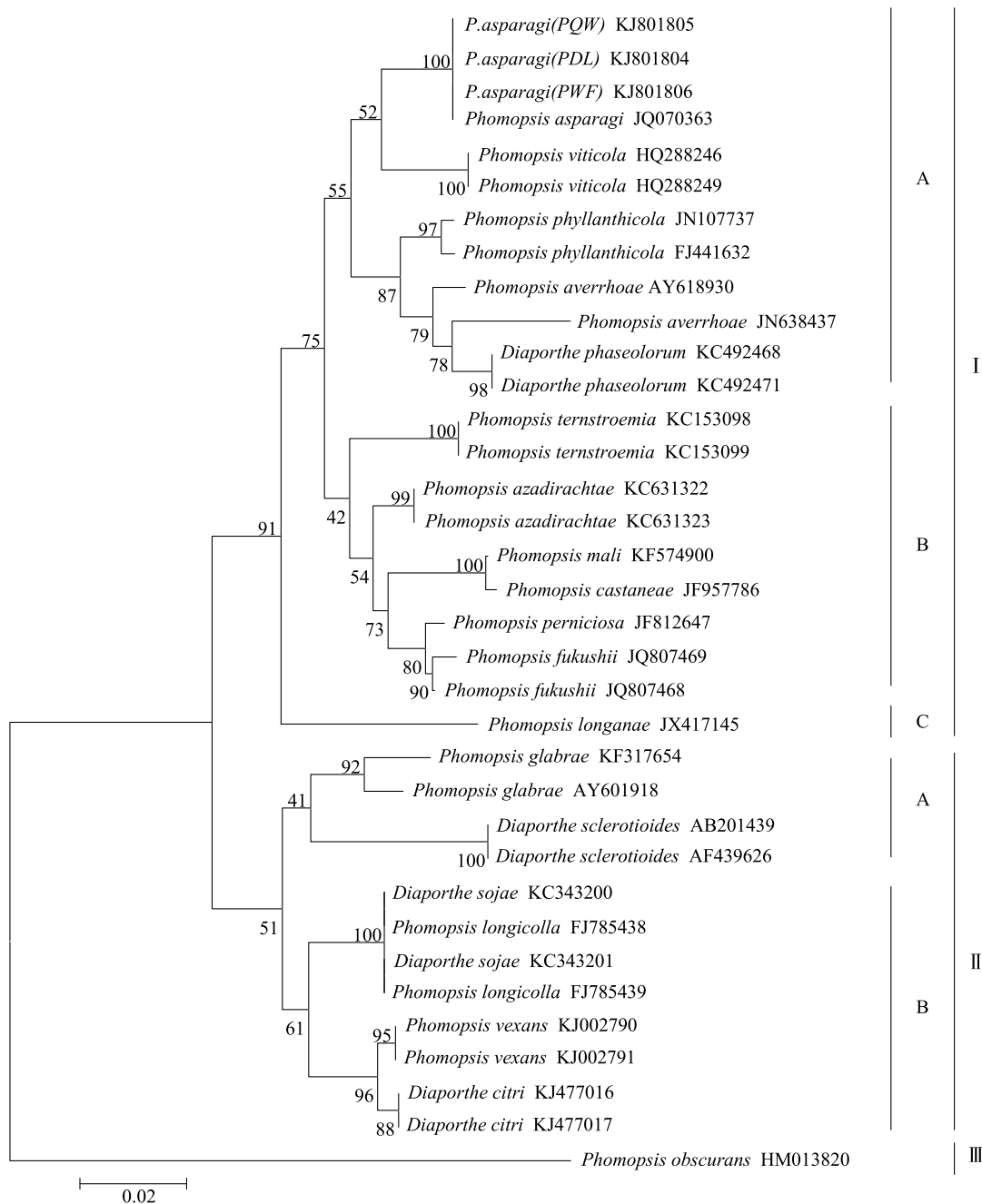
图 1 3 株 *P. asparagi* 菌株的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products of three strains of *P. asparagi*

果(图 2)显示,35 个菌株被划分为 I、II 和 III 组群,且除 *Diaporthe sojae*、*Phomopsis longicolla*、*P. mali* 和 *P. castaneae* 外,同一组群的不同种分别聚在不同的分支上,表明寄生在蔬菜、水果和经济林木等植物上的拟茎点霉之间的 ITS 序列存在一定差异。其中,*P. asparagi* 与寄生葡萄的 *P. viticola*、马尾松的 *P. phyllanthicola*、杨桃的 *P. averrhoae*、芒果的 *Diaporthe phaseolorum* 等菌株聚在 I 组群的 A 亚群,它们之间的 ITS 序列差异小,

表明它们之间的亲缘关系近,但又存在一定分化;I组群 B 亚群的拟茎点霉(*P. ternstroemia*、*P. azadirachtae*、*P. mali*、*P. castaneae*、*P. pernicios**a*、*P. fukushii*)及 C 亚群的拟茎点霉(*P. longanae*)与 *P. asparagi* 的亲缘关系次之;寄生在葫芦、黄瓜、野生大豆、大豆、茄子和柑橘

等植物上的拟茎点霉分别聚在II组群的 A 和 B 亚群,该组群的菌株与 *P. asparagi* 的 ITS 序列差异较大,它们之间的亲缘关系较远;而单独聚在III组群的寄生草莓的 *P. obscurans* 菌株与 *P. asparagi* 的 ITS 序列差异最大,表明它们之间的亲缘关系最远。



分支处数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复),代表分类单位被聚在一起的几率(%)。I、II 和 III 代表 3 个组群;A、B 和 C 代表 3 个亚群。

图 2 基于 *P. asparagi* 及其近似种的 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *P. asparagi* and related speices based on their rDNA-ITS sequences

3 讨论

拟茎点霉属真菌已描述有 400 多个种^[22], 主要为植物致病菌、植物内生菌或腐生菌, 甚至危害人和动物^[23], 其分类主要依据形态特征、培养特征和寄主范围^[24], 但其分子进化关系尚不十分清楚。rDNA-ITS 序列已广泛应用于真菌的分子鉴定、亲缘关系分析及系统发育研究。陈永青等^[25]采用 rDNA-ITS 序列分析法对寄生在木棉、发财树、榴莲、番石榴、芒果、杨梅、柚等植物上的拟茎点霉属 7 个种 15 个菌株进行了系统发育分析, 但未涉及 *P. asparagi*。杨迎青等^[7]对河北、江西、海南、山东和福建等 5 省区的天门冬拟茎点霉的形态特征及 ITS 序列进行分析, 证实了 *P. asparagi* 存在地域差异, 但未研究 *P. asparagi* 与近似种如 *P. viticola*、*P. longicolla*、*P. obscurans*、*P. vexans*、*P. fukushii* 等的分子进化关系。本研究探明了 *P. asparagi* 与寄生在蔬菜、水果和经济林木等植物上的拟茎点霉属重要种的系统发育关系, 为 *P. asparagi* 的分子鉴定及亲缘关系分析提供一定的理论参考。

杨迎青等^[7]研究认为 *P. asparagi* (JQ619526) 与 *P. phyllanthicola* (JN107737) 聚在一起, 且支持率达 92%, 它们的亲缘关系最近, 而本研究结果显示, *P. asparagi* (KJ801804、KJ801805、KJ8018046、JQ070363) 与 *P. phyllanthicola* (JN107737) 不聚在同一分支上, 这可能与不同的 *P. asparagi* 菌株有关。

系统发育树显示, 寄生红豆杉的 *P. mali* (KF574900) 菌株与寄生板栗的 *P. castaneae* (JF957786) 菌株聚在同一分支上, 且自展支持率为 100%, 表明它们的 ITS 序列差异小, 推测为异名同物, 但有待对它们的形态特征进行分析验证。同时, 寄生大豆的 *P. longicolla* (无性态) 菌株和寄生野生大豆的 *Diaporthe sojae* (有性态) 菌株也聚在同一分支上, 且自展支持率为 100%, 这与 Gomes 等^[23]报道它们属于同 1 个种是一致的。Zhang 等^[26]认为尽管序列有相似之处, 但 *P. longicolla* 与 *Diaporthe sojae* 为不同的种, 这可能与不同的分离菌株 (*P. longicolla* 和 *Diaporthe sojae*) 存在差异有关。

本研究中用于分析的拟茎点霉菌株的 ITS 序列有 3 个为自测序列, 其余大部分为已发表文献中的 ITS 序列, 这为数据分析的准确性及代表性提供重要基础, 但它们的形态特征及生物学特性等差异有待进一步的比较分析。

参考文献:

- [1] 陈 罡, 管安琴, 卢显宇, 等. 盐胁迫对不同基因型芦笋萌发的影响及盐碱地育苗技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 136-138.
- [2] ZHANG Y P, CHEN G G, LUO S C, et al. Stress physiology and virulence characterization of *Phomopsis asparagi* (Sacc.) bubak isolated from asparagus in Jiangxi province of China [J]. Aricultural Science & Technology, 2012, 13(7): 1502-1508.
- [3] SACCARDO P A. Fungi veneti novi vel critici vel mycologiae venetae addendi [J]. Seriei VIII. Michelia, 1878, 1: 239-275.
- [4] BUBAK F. Zweiter beitrage zur pilzflora von montenegro [J]. Bull Herb Boissier Ser, 1906, 2(6): 393-408.
- [5] 郑元梅, 陈福如, 陈赛云, 等. 芦笋茎枯病的研究 I, 症状, 侵染期及侵菌源[J]. 江西植保, 1987 (1): 7-10.
- [6] 王元珪, 王述彬. 芦笋茎枯病的初步研究[J]. 江苏农业科学, 1988(3): 30-31.
- [7] 杨迎青, 李湘民, 孟 凡, 等. 芦笋茎枯病菌的鉴定及区域差异性分析[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 315-320.
- [8] 张岳平, 瞿华香, 罗绍春, 等. 一些重要作物拟茎点霉属病原生物学及致病机制研究概况[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 327-332.
- [9] ELENA K. First report of *Phomopsis asparagi* causing stem blight of asparagus in Greece[J]. Plant Pathology, 2006, 55(2): 300.
- [10] DAVIS R D. Asparagus stem blight recorded in Australia [J]. Australasian Plant Pathology, 2001, 30(2): 181-182.
- [11] 路广明. 芦笋茎枯病的症状及防治方法[J]. 蔬菜, 2001(9): 26.
- [12] 林添发. 芦笋茎枯病的预测预报[J]. 福建农业科技, 2001(4): 27.
- [13] 苗华民, 侯绪友, 孟凡明, 等. 芦笋茎枯病原菌及其生物学研究[J]. 植物保护学报, 1991, 18(1): 87-90.
- [14] 陈庆和, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病菌原鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 112-116.
- [15] 胡中会, 赵立华, 严恩平, 等. 云南烟草赤星病菌及近似种 rDNA-ITS 序列分析[J]. 云南农业大学学报, 2012, 27(5): 670-676.

- [16] 楼兵干,张炳欣. 基于 rDNA ITS 序列探讨部分腐霉种的系统发育与其形态特征[J]. 菌物学报,2005,24(2):207-220.
- [17] MURALI T S, SURYANARAYANAN T S, GEETA R. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(7): 673-680.
- [18] KANEMATSU S, MINAKA N, KOBAYASHI T, et al. Molecular phylogenetic analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer regions and comparison of fertility in *Phomopsis* isolates from fruit trees[J]. Journal of General Plant Pathology, 2000, 66(3): 191-201.
- [19] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [20] 卢松茂,罗金水,李丽容. 芦笋茎枯病菌鉴定及寄主范围研究 [J]. 福建热作科技,2010,35(3):4-6.
- [21] 罗金水,张汉荣,卢松茂,等. 琯溪蜜柚黑斑病菌分离鉴定及其致病性测定[J]. 福建热作科技,2011,36(4):1-5.
- [22] 陆家云. 植物病原真菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社,2001.
- [23] GOMES R R, GLIENKE C, VIDEIRA S I R, et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi[J]. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2013, 31: 1-41.
- [24] UDAYANGA D, LIU X, MCKENZIE E H C, et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens [J]. Fungal Diversity, 2011, 50(1): 189-225.
- [25] 陈永青,姜子德,戚佩坤. RAPD 分析与 ITS 序列分析在拟茎点霉分类鉴定上的应用[J]. 菌物系统,2002,21(1):39-46.
- [26] ZHANG A W, RICCIONI L, PEDERSEN W L, et al. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean[J]. Phytopathology, 1998, 88(12): 1306-1314.

(责任编辑:袁 伟)