

油茶上几株类似盘多毛孢菌的鉴定

姜育龙¹, 周应科^{2*}, 马可臻³, 毛杨柳³, 于雪腾³, 刘依³, 侯成林³

(1. 安徽省旌德县庙首林场, 旌德 242604; 2. 华北理工大学矿业工程学院, 唐山 063210;

3. 首都师范大学生命科学院, 北京 100048)

摘要: 类似盘多毛孢属真菌 (*Pestalotiopsis*-like fungi) 是油茶上重要的病原菌, 能够引起病害并造成损失。从安徽省旌德县庙首林场油茶病叶中分离到 6 株类似盘多毛孢属真菌, 采用形态学结合 3 基因 (*ITS+TUB+TEF*) 分子系统学分析鉴定。结果显示, 6 株类似盘多毛孢属真菌属于 4 个种, 其中 *Pestalotiopsis chamaeropsis* 为已知种, 系油茶上首次报道, 其余 3 个为系统发育种, 由于缺乏足够菌株, 没有进一步描述, 菌株致病性也需要进一步研究。研究结果预示油茶中可能有更多的未描述的类似盘多毛孢属的种。应对全国油茶类似盘多毛孢属真菌的进行全面系统的调查研究, 为油茶病害防治和抗病育种提供基础数据。

关键词: 类似盘多毛孢属; 分子系统分析; 形态学; 鉴定; 油茶

中图分类号: S763.15

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0609-08

Identification of several strains of *Pestalotiopsis*-like fungi from *Camellia oleifera*

JIANG Yulong¹, ZHOU Yingke², MA Kezhen³, MAO Yangliu³, YU Xueting³, LIU Yi³, HOU Chenglin³

(1. Miaoshou Forest Farm, Jingde 242604;

2. College of Mining Engineering, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;

3. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract: *Pestalotiopsis*-like fungi are important pathogens of *Camellia oleifera*, causing diseases and damages. Morphology combined with the molecular phylogenetic analysis of three genes (*ITS+TUB+TEF*) were used to identify six strains of *Pestalotiopsis*-like fungi, which isolated from the leaf of *Camellia oleifera* in Miaoshou Forest Farm, Jingde County, Anhui Province. The results showed that there were six strains belonging to four species of *Pestalotiopsis*-like fungi. The known specie of *Pestalotiopsis chamaeropsis* was firstly reported on *Camellia oleifera*. Due to the lack of sufficient strains, the other strains were described as phylogenetic species. The results indicated that there might be many undescribed species of *Pestalotiopsis*-like fungi on *Camellia oleifera*. Thus, a comprehensive and systematic investigation on the *Pestalotiopsis*-like fungi of *Camellia oleifera* in China is necessary for disease control and resistance breeding of *Camellia oleifera*.

Key words: *Pestalotiopsis*-like fungi; molecular phylogenetic analysis; morphology; identification; *Camellia oleifera*

油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 是中国特有的木本油料树种, 其种子生产的茶油不饱和脂肪酸含量高达 90% 以上, 是理想的优质食用油。不仅维生素含量丰富, 而且可增强人体免疫力, 具有很高的经济价值^[1]。近些年, 随着我国油茶栽培面积的迅速扩大, 一些油茶品种受到病原微生物危害也越来越严重, 已成为油茶栽培推广亟待解决的问题, 如胶

孢炭疽引起的炭疽病 [*Glomerella cingulate* (Stonem.) Spanld et Sctenk]、油茶伞座孢引起的软腐病 [*Myrothecium camelliae* Liu, Wei et Fan] 等^[2-4]; 其中拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 真菌能够引起油茶多种病害, 如油茶灰斑病 [*Pseudopestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert]、油茶枯梢病 [*Pestalotiopsis microspora* (Speg.) G.C. Zhao & N. Li]、油茶叶枯病

收稿日期: 2017-04-17

基金项目: 教育部博士点基金 (20131108110003) 和华北理工大学科学研究基金项目 (Z201311) 共同资助。

作者简介: 姜育龙, 高级工程师。E-mail: yljjiang008@163.com

* 通信作者: 周应科, 博士研究生, 讲师。E-mail: yingke5168@sohu.com

[*Pestalotiopsis furcata* Maharachch. & K.D. Hyde]; 油茶褐斑病 [*Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert] 和油茶枝枯病 [*Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert] 等^[5-7]。

拟盘多毛孢属属于圆孔壳科 (Sporocadaceae)^[8-10], 其模式种是 [*Pestalotiopsis maculans* (Cda.) Nag Raj]^[11]。由于拟盘多毛孢属种间的形态学差异较小, 分类体系不够完善, 造成在种的水平上界定模糊^[12-13]。鉴于此, Maharachchikumbura 等^[13]采用形态学结合多基因分子系统学方法将拟盘多毛孢属的系统学位置重新划分, 即把原拟盘多毛孢属划分为 3 个属: 拟盘多毛孢属、新拟盘多毛孢属 (*Neopestalotiopsis*) 和假拟盘多毛孢属 (*Pseudopestalotiopsis*), 三者统称为类拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis-like*), 并逐渐被广泛学者所接受。

最近作者对安徽省旌德县庙首林场人工油茶林病害调查发现, 一些油茶植物叶片受到病原真菌的危害, 其症状与之前报道的叶枯病大致相似, 并从病斑周边分离得到 6 株类拟盘多毛孢属真菌。鉴于侵染油茶的类拟盘多毛孢属病原菌的报道都是基于形态学鉴定^[14-15], 本研究采用形态学结合多基因 (*ITS*, *TUE* 和 *TEF*) 利用系统学分析对分离得到的 6 株菌株类拟盘多毛孢属真菌进行鉴定。研究结果对油茶病害种类的确定和油茶的抗病育种以及生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

感病油茶叶片采自安徽旌德县庙首林场人工油茶林。

表 1 用于系统学分析的种及其在 GenBank 中的登录号
Table 1 Species used in the molecular analyses and their respective GenBank accession numbers

种类 Species	分离物 Isolate	登录号 GenBank accession number		
		<i>ITS</i>	<i>TUB</i>	<i>TEF</i>
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	OP118	KC537808	KC537822	KC537815
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	CBS110.20	KM199342	KM199442	KM199540
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	ICMP 6088	JX399006	JX399037	JX399070
<i>P. anacardiacearum</i>	IFRDCC 2397	KC247154	KC247155	KC247156
<i>P. arenga</i>	CBS 331.92	KM199340	KM199426	KM199515
<i>P. arceuthobii</i>	CBS434.65	KM199341	KM199426	KM199516
<i>P. australasiae</i>	CBS 114126	KM199297	KM199409	KM199499
<i>P. australis</i>	CBS 111503	KM199331	KM199382	KM199557
<i>P. biciliata</i>	CBS 124463	KM199308	KM199399	KM199505
<i>P. brassicae</i>	CBS 170.26	KM199379	---	KM199558
<i>P. camelliae</i>	CBS 443.62	KM199336	KM199424	KM199512
<i>P. chamaeropsis</i>	CBS 113604	KM199323	KM199389	KM199471
<i>P. chamaeropsis</i>	CBS113607	KM259325	KM199390	KM199472
<i>P. clavata</i>	MFLUCC 12-0268	JX398990	JX399025	JX399056
<i>P. colombiensis</i>	CBS 118553	KM199307	KM199421	KM199488
<i>P. diversiseta</i>	MFLUCC 12-0287	JX399009	JX399040	JX399073
<i>P. disseminata</i>	---	AB251918	AB453891	AB453849
<i>P. ericacearum</i>	IFRDCC 2439	KC537807	KC537821	KC537814
<i>P. furcata</i>	MFLUCC12-0054	JQ683724	JQ683706	JQ683740
<i>P. funerea</i>	ML4DY	EF055197	EF055234	---
<i>P. gaultheria</i>	IFRD 411-014	KC537805	KC537819	KC537812
<i>P. grevillea</i>	CBS 114127	KM199300	KM199407	KM199504
<i>P. hawaiiensis</i>	CBS 114491	KM199339	KM199428	KM199514
<i>P. heterocornis</i>	PN3DW	EF055198	EF055235	---
<i>P. hollandica</i>	CBS 265.33	KM199328	KM199388	KM199481
<i>P. humus</i>	CBS 115450	KM199319	KM199418	KM199487
<i>P. inflexa</i>	MFLUCC 12-0270	JX399008	JX399039	JX399072
<i>P. intermedia</i>	MFLUCC 12-0259	JX398993	JX399028	JX399059
<i>P. knightiae</i>	CBS 111963	KM199311	KM199406	KM199495

续表 1 Continued the table 1

<i>P. jesteri</i>	CBS 109350	KM199380	KM199468	KM199554
<i>P. kenyana</i>	CBS 442.67	KM199302	KM199395	KM199502
<i>P. linearis</i>	MFLUCC 12-0271	JX398992	JX399027	JX399058
<i>P. longiseta</i>	MAFF 752008	AB482206	AB453900	AB453857
<i>P. malayana</i>	CBS 102220	KM199306	KM199411	KM199482
<i>P. microspora</i>	YS26	JN861776	JN861771	---
<i>P. monocaheta</i>	CBS 144.97	KM199327	KM199386	KM199479
<i>P. novaehollandiae</i>	CBS 130973	KM199337	KM199425	KM199511
<i>P. proteacearum</i>	CBS 111522	KM199294	KM199394	KM199493
<i>P. papuana</i>	CBS 331.96	KM199321	KM199413	KM199491
<i>P. parva</i>	CBS 265.37	KM199312	KM199404	KM199508
<i>P. portugalica</i>	CBS 393.48	KM199335	KM199422	KM199510
<i>P. rhododendri</i>	IFRDCC 2399	KC537804	KC537818	KC537811
<i>P. rosea</i>	MFLUCC12-0258	JX399005	JX399036	JX399069
<i>P. scorparia</i>	CBS 176.25	KM199330	KM199393	KM199478
<i>P. spathulata</i>	CBS 356.86	KM199338	KM199423	KM199513
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	CBS 263.33	KM199316	KM199414	KM199489
<i>P. teleopa</i>	CBS 113606	KM199295	KM199402	KM199498
<i>P. trachicarpicola</i>	IFRDCC 2403	KC537809	KC537823	KC537816
<i>P. unicolor</i>	MFLUCC 12-0275	JX398998	JX399029	JX399063
<i>P. verruculosa</i>	MFLUCC 12-0274	JX398996	---	JX399061
<i>Pseudopestalotiopsis. camelliae</i>	CGMCC3.9192	JN943622	JQ683704	JQ683736
<i>Ps. cocos</i>	CBS27229	KM199378	KM199467	KM199553
<i>Ps. smithae</i>	MFLUCC12-0125	KJ503812	KJ503816	KJ503819
<i>Ps. theae</i>	SC011	JQ683726	JQ683710	JQ683742

注: ---表示缺失。Note: “---”means that no sequence was available.

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离 取油茶病害叶片病健交界处组织,洗净病斑表面晾干,用75%酒精涂擦病斑,在无菌操作台中,参考韦继光等^[16]的方法,将切成大小为5 mm直径的发病叶片依次放入75%酒精消毒15 s,3%次氯酸钠消毒3 min,无菌水冲洗3次,每次5~6 s,最后用已灭菌的滤纸吸干接种到PDA培养基上。25℃恒温保湿培养6 d后用接种针转接至PDA平板上培养4 d筛选出优势菌,将优势菌纯化后获得纯培养物。分离菌株保存于首都师范大学微生物实验室,菌株保藏号为CNUZ-2110、CNUZ-2111、CNUZ-2114、CNUZ-2115、CNUZ-2123和CNUZ-2128。

1.2.2 形态学观察 将纯化的菌株转接到PDA培养基上继续培养,待菌落长大并产生孢子后,采用Nikon DXm1200C体视镜观察实验中分离得到的不同表型的真菌菌丝在PDA平板上的状态、正反面的颜色;用Olympus BX51正置显微镜观察产孢细胞、分生孢子以及菌落特征(表2)。显微镜观察分生孢子进行20次重复记录。

1.2.3 DNA提取、扩增和测序 根据Guo等^[17]的方法用试剂盒从新鲜菌丝中提取总DNA。然后对*ITS*、*TUB*和*TEF*基因进行扩增。不同的基因分别采用不同的引物来处理:ITS1f/ITS4^[18], T1/Bt-2b^[19-20],和EF1-728F/EF-2^[21-22]。*ITS*和*TEF*扩增的条件是根据Crous等^[23]提供的方法,*TUB*扩增的条件是根据Lee等^[24]提供的方法。PCR产物由中科西林(北京,中国)纯化和编辑。新序列提交到GenBank数据库。本研究中的其他序列从GenBank下载(表1)。

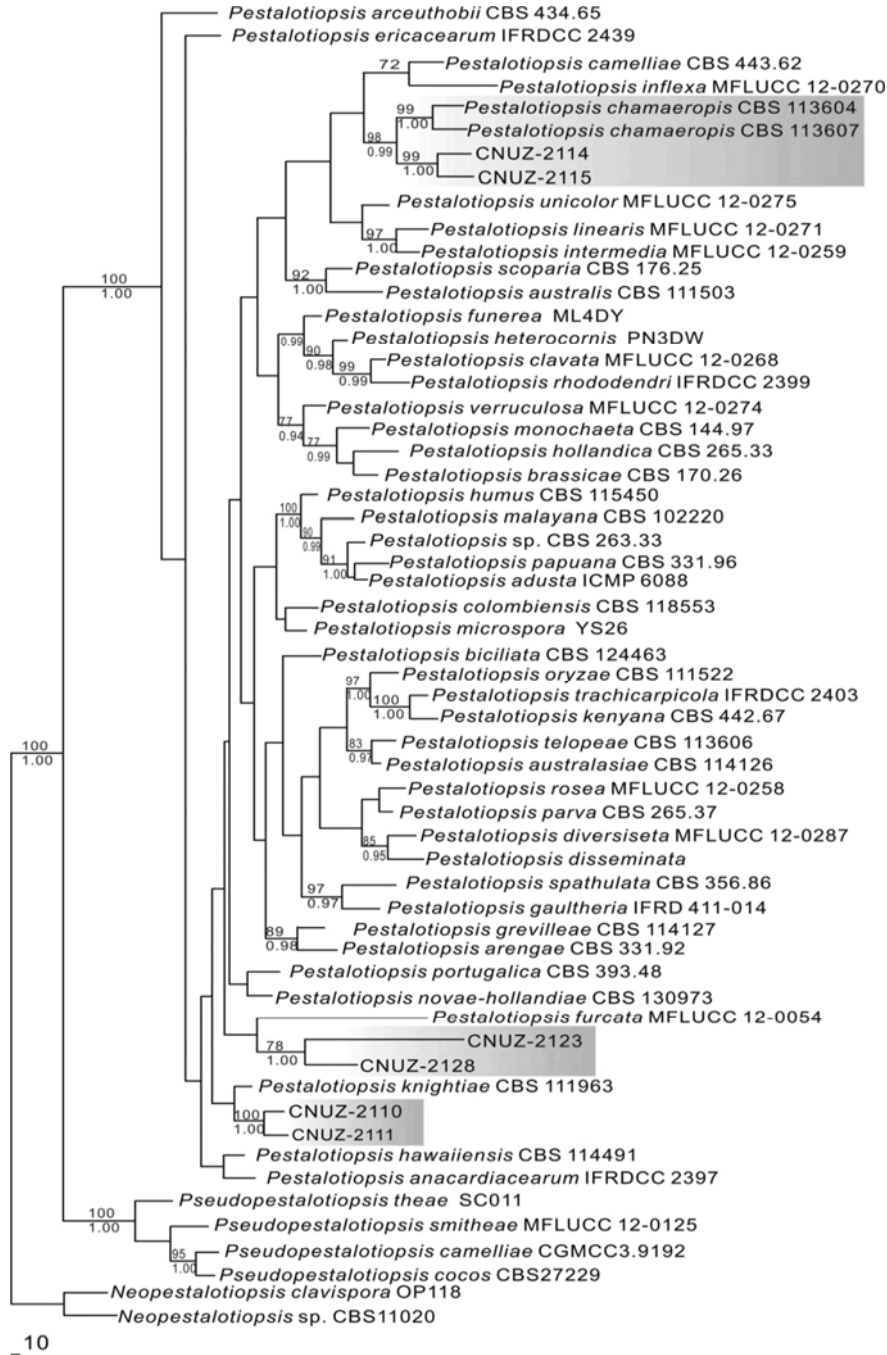
1.2.4 分子系统学分析 本研究中其他序列是根据BLAST搜索结果并参考文献^[13,25]从GenBank中下载。使用Clustal X 1.81^[26]软件处理三基因(*ITS+TUB+TEF*)组合序列数据。然后使用默认设置的MAFFT v.7- <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>^[27]将比对的序列进一步处理,构建了*Pestalotiopsis*-like系统发育树。使用PAUP(简约性分析)V.4.0B10^[28]进行最大简约分析(MP)。排除了不明确排列的区域,并将缺口作为缺失数据处理。计算在不同最优标准下产生的树的树长度指数(TL)、一致性指数(CL)、保留指数(RI)、重定

标一致性指数 (RC) 和同型指数 (HI)。最大简约分析^[29]通过产生的 1 000 次自举重复来评价最简约树的坚固性, 进行 kishino-Hasegawa 测试^[30]以在不同最优性标准下推断的属是否显著不同。此外, 利用 MrModeltest 2.2^[31]来获得最理想的核苷酸模型。并且用 MrBayes 3.1.2^[32-33]进行分析。MP 和

Bayesian 分析的详细方法和参数遵循 Maharachchikumbura 等的方法^[34]。

2 结果与分析

系统学分析显示, 最大简约和贝叶斯分析构建系统发育树, 二者具有相似性的拓扑结构 (见图 1



Neopestalotiopsis sp. CBS11020 和 *Neopestalotiopsis* *clavispora* OP118 用于外类群。自举支持值高于 70, 贝叶斯后验概率值高于 0.95 在图中显示

Data were analyzed with random addition sequence, unweighted parsimony and treating gaps missing data. *Neopestalotiopsis* sp. CBS11020 and *Neopestalotiopsis clavispora* OP118 are placed as outgroup. Bootstrap support value above 70% and Bayesian posterior probability values above 0.95 are shown above

图 1 来自油茶及相关的类似盘多毛孢属种的三基因组合 (*ITS+TUB+TEF*) 构建的最大简约系统树

Figure 1 Maximum parsimony phylogram generated from combine three genes(*ITS,TUB* and *TEF*) analysis of species of *Pestalotiopsis* from *Camellia oleifera* and other available *Pestalotiopsis* spp.

表 2 从油茶分离到的类似盘多毛孢属种的形态学比较

Table 2 Morphological comparison of *Pestalotiopsis* species from *Camellia oleifera*

菌株 Strains	分生孢子器 Conidiamata	产孢细胞 Conidiogenous cell	分生孢子 Conidia	
			基部细胞 Basal cell	第 2 细胞 The 2 nd cell
CNUZ-2110	椭圆形, 直径约为 200~400 μm	分散的, 壶腹形或瓶形	基部圆锥形截面, 皱褶, 细胞壁薄, 长度为 2~ 4 μm	浅棕色 5.5~7 μm
CNUZ-2111	椭圆形, 直径约为 200~380 μm	分散的, 壶腹形或瓶形	基部圆锥形截面, 皱褶, 细胞壁薄, 长度为 2 ~ 4 μm	浅棕色 5.5~7.5 μm
CNUZ-2114	椭圆形, 直径可达到 500 μm ,	分散或集聚的, 纺锤形 或椭球形	纺锤状, 椭球状, 直至稍弯曲, 细胞壁薄, 长度为 3~5 μm	橄榄色 4.5~6.5 μm
CNUZ-2115	椭圆形, 直径可达到 500 μm	分散或集聚的, 纺锤形 或椭球形	纺锤状, 椭球状, 直至稍弯曲, 细胞壁薄, 长度为 3~5 μm	橄榄色 5~7 μm
CNUZ-2123	椭圆形, 直径约为 200~350 μm	分散的, 椭球形	圆锥或倒圆锥形, 皱褶, 细胞壁薄, 长度为 2 ~4 μm	橄榄色 5~8.5 μm
CNUZ-2128	椭圆形, 直径约为 200~350 μm	分散或集聚的, 椭球形	圆锥或倒圆锥形, 皱褶, 细胞壁薄, 长度为 4~6 μm	橄榄色 5~7.5 μm

分生孢子 Conidia			附属丝 Appendage	
第 3 细胞 3rd cell	第 4 细胞 4th cell	顶端细胞 Apical cell	顶端 Apical	基部 Basal
浅棕色 5.5~8 μm	浅棕色 6~7.5 μm	基部圆锥形截面, 细胞壁薄, 长度为 2~4 μm	2~3 条管状的顶端附属丝, 未分枝, 12~16 μm	单个, 居中, 3~5 μm
浅棕色 5.5~7.5 μm	浅棕色 6~8 μm	基部圆锥形截面, 细胞壁薄, 长度为 2~4 μm	2~3 条管状的顶端附属丝, 未分枝, 12~16 μm	单个, 居中, 3~5 μm
橄榄色 4.5~6.5 μm	橄榄色 4.5~6 μm	纺锤状, 椭球状, 直至稍弯曲, 细胞壁薄, 长度为 3~5 μm	2~3 条管状的顶端附属丝, 未分枝, 12~15 μm	单个, 居中, 5~6.5 μm
橄榄色 4.5~6.8 μm	橄榄色 4.5~6.5 μm	纺锤状, 椭球状, 直至稍弯曲, 细胞壁薄, 长度为 3~5 μm	2-3 条管状的顶端附属丝, 未分枝, 12~15 μm	单个, 居中, 5~6 μm
橄榄色 6.5~9.5 μm	橄榄色 6~9 μm	圆锥或倒圆锥形, 皱褶, 细胞壁薄, 长度为 3~4 μm	2~3 条管状的顶端附属丝, 未分枝, 10~15 μm	单个, 居中, 5~8 μm
浅棕色 6.5~8.5 μm	浅棕色 6~8 μm	圆锥或倒圆锥形, 皱褶, 细胞壁薄, 长度为 4~6 μm	2~3 条管状的顶端附属丝, 未分枝, 15~19 μm	单个, 居中, 5~9 μm

简约树)。序列数据矩阵由 6 个新测序的类似盘多毛孢菌株序列(CNUZ-2110、CNUZ-2111、CNUZ-2114、CNUZ-2115、CNUZ-2123 和 CNUZ-2128) 和 53 个从 GenBank 中下载的序列组成, 共有 2 080 个碱基包括缺失碱基(ITS:1~576、TUB:577~1 244 和 TEF:1 245~2 080)。矩阵的简约分析产生单个简约树(图 1)($TL=1 180$ 、 $CI=0.580$ 、 $RI=0.709$ 、 $RC=0.455$ 和 $HI=0.420$)。从图 1 系统树上可以看出, 来自油茶病斑上的 6 个菌株形成 3 个分支。

第 1 分支包括菌株 CNUZ-2114 和 CNUZ-2115, 二者形成支持值很高分支 ($BP=99$, $PP=1.00$), 并与 *Pestalotiopsis chamaeropsis* 形成一个支持值非常高的姐妹关系 ($BP=98$, $PP=0.99$)。CNUZ-2114 和 CNUZ-2115 之间的 ITS、TUB 以及 TEF 序列的相似性非常高, 分别为 99%、100%和 100%, 形态学也高度一致(见表 2), 因此可以确定为同一种的 2 个菌株。它们与 *Pestalotiopsis chamaeropsis* 虽然是姐妹关系, 但其系列相似性非常高, 分别为 ITS (99%)、

TUB (100%) 和 TEF (99%), 菌落形态、分生孢子形态与大小也基本一致。从表 2 和图 2 结果显示: CNUZ-2114 和 CNUZ-2115 的产孢细胞是分散的或集聚的, 其形状为纺锤形或椭球形; 分生孢子大小为 21~25.5 μm ; 顶端附属丝为 2~3 条, 长度为 12~16 μm , 未分枝, 基部附属丝单个, 且居中。二者的主要形态特征与 *Pestalotiopsis chamaeropsis* 的主要形态特征基本一致。由此可以确定菌株 CNUZ-2114、CNUZ-2115 与 *Pestalotiopsis chamaeropsis* 为同一种。

菌株 CNUZ-2123 和 CNUZ-2128 形成第 2 个支持值较高进化分支 ($BP=78$, $PP=1.00$), 但二者在 ITS、TUB 以及 TEF 碱基序列比对的相似性分别为 97%、92%和 91%, 因此可以确定这 2 个菌株为不同种。形态上也支持分子系统学研究结果。从表 2 和图 2 可以看出: 菌株 CNUZ-2123 的产孢细胞为近圆柱形, 其分生孢子长度为 20.5~27 μm , 顶端附属丝为 2~3 条, 未分枝, 长度为 12~17 μm , 基

部附属丝单个,且居中;菌株 CNUZ-2128 的产孢细胞为近圆柱形,分生孢子大小为 23~28 μm ,顶端附属丝为 2~3 条,未分枝,长度为 15~19 μm ,基部附属丝为单个,且居中。尽管菌株 CNUZ-2123 和 CNUZ-2128 在菌落形态和分生孢子大小方面均相似。但在分生孢子中的有色孢上差异显著。菌株 CNUZ-2123 的有色孢为橄榄色的同色,而菌株 CNUZ-2128 为杂色孢(前 1 个有色孢为橄榄色,后 2 个有色孢为浅棕色)。二者与亲缘关系最近的

Pestalotiopsis furcata^[35]的碱基序列相似性分别为 ITS 92%、91%, TUB 83%、83%和 TEF 92%、93%。形态上,两者与 *Pestalotiopsis furcata* 差异明显,菌株 CNUZ-2123 和 CNUZ-2128 分生孢子的顶端附属丝均为 2~4 个(大多数 3),而 *P. furcata* 分生孢子的顶端附属丝为 5~9 个,大多数为 8,由此可以认为三者互为不同的种。因此分子数据和形态上都支持 CNUZ-2123 和 CNUZ-2128 为 2 个不同的系统发育种。

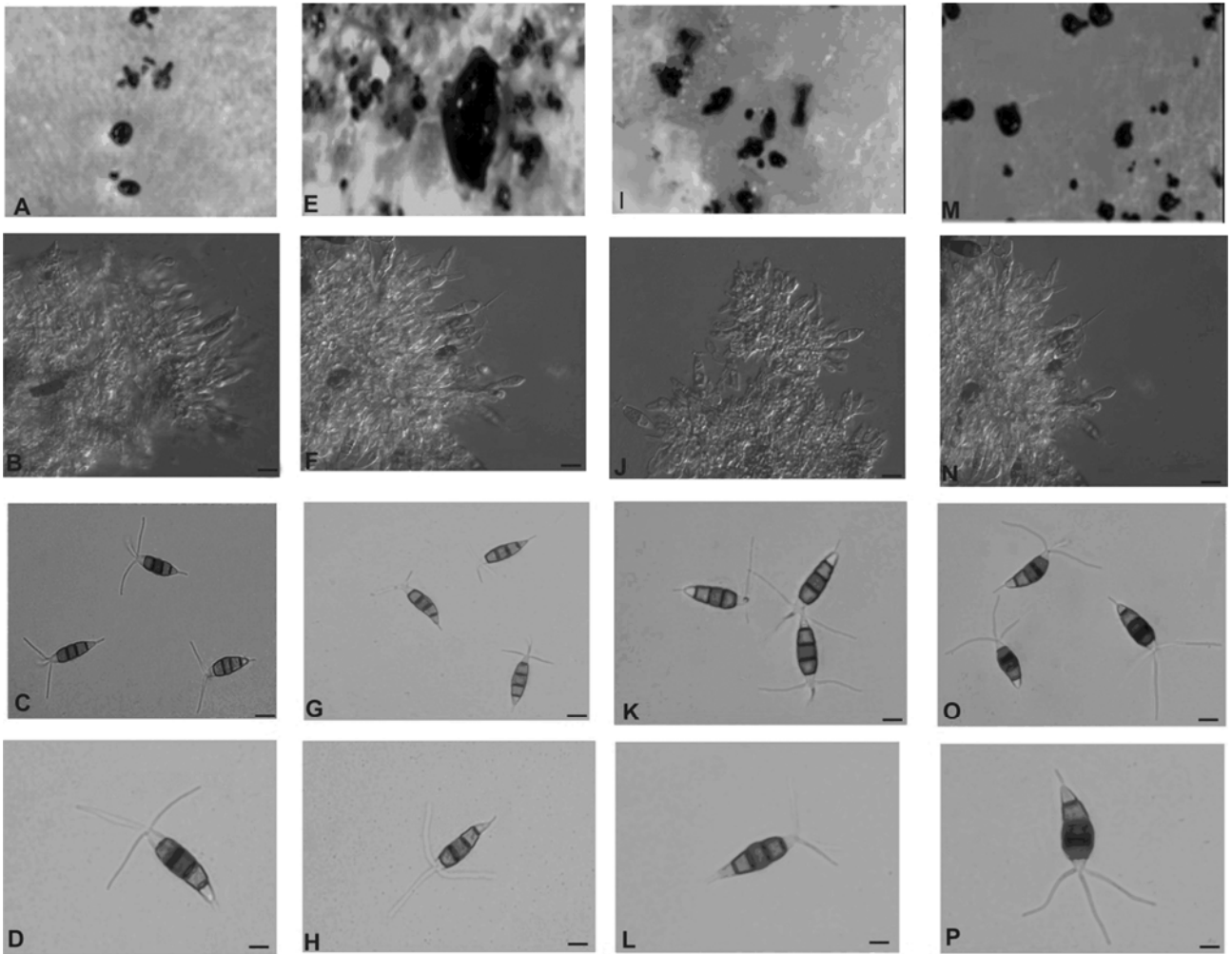


图 2 A~D: 菌株 CNUZ-2110 or CNUZ-2111; E~H: 菌株 CNUZ-2114 or CNUZ-2115; I~L: 菌株 CNUZ-2123; M~P: 菌株 CNUZ-2128; A、E、I、M: 分生孢子器在平板上的形态; B、F、J、N: 产孢细胞; C~D、G~H、K~L、O~P: 分生孢子(比例尺为 10 μm)

Figure 2 A-D.CNUZ-2110 or CNUZ-2111;E-H.CNUZ-2114 or CNUZ-2115;I-L.CNUZ-2123,M-P.CNUZ-2128;A, E,I and M. Conidiomata on PDA; B,F,I and N.Conidiogenous cells;C-D, G-H, K-L, O-P:conidia (bars =10 μm)

菌株 CNUZ-2110 和 CNUZ-2111 形成第 3 个支持值高的进化枝 ($BP=100$, $PP=1.00$), 并与 *Pestalotiopsis knightiae* 形成姐妹关系, 但支持值非常低。菌株 CNUZ-2110 与 CNUZ-2111 在 ITS、TUB 以及 TEF 的碱基序列比对的相似性分别为 100%、99%和 100%, 因此这 2 个菌株应该是同一种的不同

菌株。在形态上, 菌株 CNUZ-2110 与 CNUZ-2111 菌落形态相似、分生孢子器及分生孢子形状与大小也大致相同。表 2 和图 2 显示: 二者分生孢子产孢细胞均分散, 其形状为壶腹形或瓶形; 分生孢子大小为 21~26.5 μm , 顶端附属丝为 2~3 条, 长度为 12~16 μm ; 未分枝, 基部附属丝为单个, 且居中。

因此 CNUZ-2110 与 CNUZ-2111 为同一种。*Pestalotiopsis knightiae* 与 CNUZ-2110 与 CNUZ-2111 是弱姐妹关系, 各基因相似性比对结果为: ITS (98%)、TUB (97%) 和 TEF (95%)。二者与 *Pestalotiopsis knightiae* 在分生孢子的附属丝附着顶端细胞位置明显不同, *P. knightiae*^[13]的顶端附属丝附着在顶端细胞的不同位置。因此菌株 CNUZ-2110 或 CNUZ-2111 与 *P. knightiae* 为不同的种, 菌株 CNUZ-2110 和 CNUZ-2111 应为一个未描述的系统发育种。

3 讨论

早期类似盘多毛孢菌鉴定主要是依据孢子形态学及其寄主^[13], 由于类似盘多毛孢菌寄主非常广泛而孢子又非常相似, 因此造成了该类群分类学混乱^[36]。最近 Maharachchikumbura 等^[13]建议采用形态学结合分子数据来鉴定类似盘多毛孢菌。

本研究对分离自油茶病斑的类似盘多毛孢进行鉴定, 结果显示菌株 CNUZ-2110 与 CNUZ-2111 为同一种, 但与相邻的种 *Pestalotiopsis knightiae* 亲缘关系非常模糊, 因此菌株 CNUZ-2110 与 CNUZ-2111 可能是未被描述种, 但目前分离的菌株太少, 因此它们只是一个系统发育种, 未来需要借助更多的菌株来佐证。菌株 CNUZ-2114 与 CNUZ-2115 为同一种。无论在分子数据还是形态学方面都支持其为 *Pestalotiopsis chamaeropsis*, 但之前从未在油茶上报过 *P. chamaeropsis*, 因此它是油茶上首次报道的种。菌株 CNUZ-2123 和菌株 CNUZ-2128 无论分子鉴定还是形态学鉴定都是 2 个不同种。然而所分离到菌株数量少, 因此也只是一个系统发育种, 将来需要分离更多的菌株并借助其他基因序列来重新分析其在类似盘多毛孢属中的系统位置^[37]。

目前油茶报道类似盘多毛孢种有油茶灰斑病病原 (*Pseudopestalotiopsis theae*)、油茶枯梢病病原 (*Pestalotiopsis microspora*)、油茶叶枯病病原 (*Pestalotiopsis furcata*)、油茶褐斑病病原 (*Pestalotiopsis guepinii*) 和油茶枝枯病病原 (*Pestalotiopsis funerea*)。本实验只分离到 *Pestalotiopsis chamaeropsis* 和 3 个未被描述的系统发育种。它们与油茶上已知并且具有 3 基因序列种, 如 *Ps. theae*、*P. microspora*、*P. furcata*、和 *P. funerea* 亲缘关系都较远。由于 *P. guepinii* 在 GenBank 中只有 ITS 序列 (TUB 和 TEF 序列缺失), 没有包括在分子系统学分析中, 但形态上与 3 个未知种差异显

著。*P. guepinii* 的分生孢子顶端附属丝多且很发达, 其顶端附属丝为 3~5 个, 长度大致在 16.5~26.1 μm ^[38]。而 3 个未被描述系统发育种的分生孢子的顶端附属丝最多不超过 3 个, 其附属丝长度在 13~19 μm 之间。由此判定它们各自为不同的种。

本实验只对油茶上的 6 个菌株进行初步鉴定, 其致病性还没有进行测试, 因此有待进一步回接寄主进行验证。油茶栽培涉及南方十几个省市, 近年来栽培面积有不断扩大之势, 类似盘多毛孢病原菌的危害也呈蔓延之势^[39]。从本实验的研究结果来看, 一个林场小范围的油茶上的类似盘多毛孢多达 4 种, 也从侧面反映出油茶上的类似盘多毛孢真菌具有高度多样性。因此建议对全国油茶栽培区类似盘多毛孢真菌进行全面调查摸底, 为这些病原引起的病害研究提供基础数据。

参考文献:

- [1] 刘跃进, 欧日明, 陈永忠. 我国油茶产业发展现状与对策[J]. 林业科技开发, 2007, 21(4): 1-4.
- [2] 戴芳澜. 真菌的形态和分类[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [3] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984.
- [4] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [5] 李河, 周国英, 刘君昂. 油茶叶枯病菌的生物学特征[J]. 经济林研究, 2009, 27(1): 88-90.
- [6] 曹志华, 束庆龙, 张鑫. 安徽油茶病害发生与识别[J]. 安徽林业科技, 2011, 37(1): 55-58.
- [7] 廖仿炎, 赵丹阳, 秦长生, 等. 油茶枝干病虫害研究现状及防治对策[J]. 广东林业科技, 2015, 31(2): 114-124.
- [8] BARR M E. *Pestalospaeria*, a new genus in the Amphispheariaceae[J]. Mycologia, 1975, 67(1): 187-194.
- [9] BARR M E. Prodrum to nonlichenized, pyrenomycetous members of class Hymenozomycetes[J]. Mycotaxon, 1990, 39: 43-184.
- [10] KANG J C, HYDE K D, KONG R Y C. Studies on Amphispheariales: The Amphispheariaceae (*sensu stricto*)[J]. Mycol Res, 1999, 103(1): 53-64.
- [11] NAG RAJ T R. Redisposals and redescription in the *Monochaetia-Seiridium*, *Pestalotia-Pestalotiopsis* complexes. II. *Pestalotiopsis besseyii* (Guba) comb. nov. and *Pestalospaeria varia* sp. nov.[J]. Mycotaxon, 1985, 22: 52-63.
- [12] TEJESVI M V, TAMHANKAR S A, KINI K R, et al. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmacologically important medicinal trees[J]. Fungal Divers, 2009, 38(10): 167-183.
- [13] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, HYDE K D, GROENEWALD J Z, et al. *Pestalotiopsis* revisited[J]. Stud Mycol, 2014, 79: 121-186.
- [14] 吴光金, 林雪坚, 戚佩坤. 油茶软腐病病原菌的鉴定

- [J]. 华南农学院学报, 1981, 2(4): 85-92.
- [15] 王金平, 卢东升. 茶树轮斑病的发生及病原菌分生孢子萌发特性[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 30-32.
- [16] 韦继光, 徐同, 郭良栋, 等. 根据形态学和分子系统学特征界定拟盘多毛孢属的种[J]. 广西农业生物科学, 2005, 24(4): 304-313.
- [17] 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(3): 617-630.
- [18] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[C]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [19] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [20] O'DONNELL K, CIGELNIK E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 7(1): 103-116.
- [21] O'DONNELL K, KISTLER HC, CIGELNIK E, et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2044-2049.
- [22] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553-556.
- [23] CROUS P W, VERKLEY G J M, CHRISTENSEN M, et al. How important are conidial appendages?[J]. *Persoonia*, 2012, 28(1): 126-137.
- [24] LEE S, GROENEWALD J Z, CROUS P W. Phylogenetic reassessment of the coelomycete genus *Harknessia* and its teleomorph *Wuestneia* (*Diaporthales*), and the introduction of *Apharknessia* gen. nov[J]. *Stud Mycol*, 2004, 50: 235-252.
- [25] JAYAWARDENA R S, ZHANG W, LIU M, et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China[J]. *Fungal Biol*, 2015, 119(5): 348-361.
- [26] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [27] KATO H, TOH H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program[J]. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4): 286-298.
- [28] SWOFFORD D L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony (and Other Methods) [M]. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- [29] HILLIS D M, BULL J J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis[J]. *Syst Biol*, 1993, 42(2): 182-192.
- [30] KISHINO H, HASEGAWA M. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea[J]. *J Mol Evol*, 1989, 29(2): 170-179.
- [31] NYLANDER J A A. MrModeltest v2.2. Program distributed by the author: 2[EB/OL]. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004. (<http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>).
- [32] HUELSENBECK J P, BOLLBACK J P. Empirical and hierarchical Bayesian estimation of ancestral states[J]. *Syst Biol*, 2001, 50(3): 351-366.
- [33] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [34] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, GUO L D, CAI L, et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species[J]. *Fungal Divers*, 2012, 56(1): 95-129.
- [35] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, CHUKEATIROTE E, GUO L D, et al. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea) [J]. *Mycotaxon*, 2013(1): 47-61.
- [36] 李曼, 陈唯王, 韦继光, 等. 广西 3 科植物内生拟盘多毛孢多样性[J]. *生物多样性*, 2012, 20(6): 703-709.
- [37] JEEWON R, LIEW E C, SIMPSON JA, et al. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 27(3): 372-383.
- [38] KARACA G H, ERPER I. First report of *Pestalotiopsis guepinii* causing twig blight on hazelnut and walnut in Turkey [J]. *Plant Pathol*, 2001, 50(3): 415-415.
- [39] 束庆龙, 张良富. 中国油茶栽培与病虫害防治[M]. 北京: 中国林业出版社, 2009.