

古柏树新病原菌—拟黄薄孔菌分析鉴定

商圆圆¹ 张恩奎² 孙晓琳¹ 霍存录¹ 冯望¹ 吴颖¹ 贺新生

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010; 2. 金堂县林业局, 四川 金堂 610400)

摘要:以翠云廊古柏树上采集到的拟黄薄孔菌(*Antrodia subxantha*)为材料,经戴玉成和贺新生教授通过形态观察分析将其命名为:拟黄薄孔菌(*Antrodia subxantha* Y. C. Dai & X. S. He.)。为了进一步证明其是否为新的树木病原菌物种,和与其它物种的亲缘关系,首次对此真菌采用形态分析和构建 ITS 序列系统发育树进行分子生物学分析,发现该物种被单独的聚类成为一个种,与其最新发现的西加薄孔菌(*Antrodia sitchensis*)同源相似度为 94%,并结合形态学上的差异,结果证明其是四川古柏树上的一种新病原菌,它能够引起古柏树树根和树干褐腐病,最终导致树木枯死。

关键词:拟黄薄孔菌; 柏树; 形态学分析; 同源性分析

中图分类号: S763.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5508(2013)02-0024-03

Analysis and Identification of a New Pathogenic Fungus (*Antrodia subxantha*) Growing on the Ancient *Cupressus funebris* Trees

SHANG Yuan-yuan¹ ZHANG En-kui² SUN Xiao-lin¹ HUO Cun-lu¹
FENG Wang¹ WU Ying¹ HE Xin-sheng¹(1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan;
2. Jintang Forestry Administration, Jintang 610400, Sichuan, China)

Abstract: *Antrodia subxantha* was collected on the dead wood of the ancient *cupressus funebris* trees growing along the Cuiyun Gallery. It was identified as a new species named for *Antrodia subxantha* on morphology by professors He Xinsheng and Dai Yucheng. In order to prove it as a new species for the first time, the morphology analysis and molecular techniques analysis were adopted to establish ITS sequences. As a result *Antrodia subxantha* was discovered to be able to be clustered as a new species, and its homologous similarity was 94% with *Antrodia sitchensis*. Finally, it was further proved as a new species on the ancient *cupressus funebris* trees in Sichuan, could cause the roots and trunk brown rot, eventually and led the trees to become dead.

Key words: *Antrodia subxantha*, *Cupressus funebris*, Morphology analysis, Homology analysis

柏树(*Cupressus funebris* Endl.)为常绿乔木,属于柏科(Cupressaceae)柏木属(*Cupressus*)^[1],有22属约150种,中国有8属30种,是我国亚热带代表性针叶树种之一^[2]。由于柏科植物对气候和土壤有很强的适应能力,自然分布广,树干直,适应性广,在山地绿化、防风固沙及水土保持等方面起着重要

作用^[3]。此外很多古柏树林,历经千年沧桑而仍完好茂盛,生机盎然,例如由近万株森森古柏组成的翠云廊,现在已经成了著名的风景旅游区^[4]。这些千年古柏同样也面临着越来越多的病虫及病原真菌的威胁,现在非常有必要及时对这些柏树的威胁因素进行较为深刻的认识和研究^[7]。

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 西南科技大学研究生创新基金项目(12ycjj23)。

作者简介: 商圆圆(1987-),女,硕士研究生,从事菌物学研究。

通讯作者: 贺新生(1965-),男,教授,从事菌物资源研究。E-mail: hexinsheng@swust.edu.cn

近年来,笔者在四川省剑阁县、江油市、梓潼县、都江堰市等地的汉代古柏树上发现了一种新的病原真菌,引起古柏树树根和树干褐腐病,最终导致树木枯死。该菌属于菌物界(Fungi),担子菌门(Basidiomycota),伞菌亚门(Agaricomycotina),伞菌纲(Agaricomycetes),多孔菌目(Polyporales),拟层孔菌科(Fomitopsidaceae),薄孔菌属(*Antrodia* P. Karst)。在形态学分析的基础上,本文利用分子系统学方法对其构建同源树,以更加客观准确地判定其是否为一新种,也更加直观的分析拟黄薄孔菌的系统发育关系。由于拟黄薄孔菌对柏木有着很强的腐朽作用,所以对于古柏和木材质量的保护也要相应的提高,从而警惕类似病原真菌的侵入和防治。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟黄薄孔菌子实体 2010 年 5 月 3 日由贺新生教授采集于四川省剑阁县翠云廊张飞井旁的柏树枯木上。标本保存在西南科技大学微生物实验室,编号为:164。

表 1 供试菌株及其 ITS 序列登录号

Table 1 The ITS accession number of test strains from GenBank

Genbank No.	Species
JN182921	拟黄薄孔菌(<i>Antrodia subxantha</i>)
AY966451	西加薄孔菌(<i>Antrodia sitchensis</i>)
AJ006681	黄薄孔菌(<i>Antrodia xantha</i>)
EU232207	高山薄孔菌(<i>Antrodia alpina</i>)
GU991578	波浪薄孔菌(<i>Antrodia sinuosak</i>)
EU232196	波浪薄孔菌(<i>Antrodia sinuosa</i>)
EU232194	香味薄孔菌(<i>Antrodia odora</i>)
EU232211	木炭样薄孔菌(<i>Antrodia carbonica</i>)
AJ416069	扁瓶小孔菌(<i>Oligoporus placentas</i>)
EU340898	大薄孔菌(<i>Antrodia macra</i>)
AJ006680	白色薄孔菌(<i>Antrodia albidia</i>)
FM872461	刺柏薄孔菌(<i>Antrodia juniperina</i>)

1.2 试验方法

1.2.1 形态学观察

首先对采集的子实体进行形态观察。组织分离得到纯菌种,挑取少量菌肉于 PDA 基础培养基上,在 25 °C 进行活化培养,然后挑取部分菌丝接种于含有 PDA 基础培养基的培养皿上,25 °C 下培养,观察菌落形态。最后将菌丝置于光学显微镜下观察其菌丝的形态结构。

1.2.2 获得 ITS 序列

首先,提取总脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic

acid, DNA),采用十六烷基三甲基溴化铵法(Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide, CTAB),用 Lifefeng DNA 纯化试剂盒进行纯化,1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。然后以总 DNA 为模板,ITS1 和 ITS4 为引物进行聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)反应。采用 25 μL 的反应体系:2.5 μL 10 × buffer,2.0 μL 4 种 dNTP 混合物,ITS1 和 ITS4 引物各 2.0 μL,0.5 μL TagDNA 聚合酶,1.5 μL Mg²⁺,12.5 μL ddH₂O,2.0 μL DNA 模板。反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 s,55 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 50 s,72 °C 延伸 10 min,循环 35 次,4 °C 保存。1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。将理想的 PCR 产物寄送到生工生物工程(上海)有限公司进行测序,获得所需的 ITS 序列数据。

1.2.3 构建系统发育树

将已经获得的拟黄薄孔菌的 ITS 序列,在 GenBank 通过 NucleiBlast 软件搜索出与之高相似的相关物种的 ITS 序列。然后利用 DNAMAN(6.0.3.99 版本)对所有的序列进行比对和构建同源树,确立拟黄薄孔菌的分类学地位和系统发育关系。最终确定其物种后,将拟黄薄孔菌的 ITS 序列上传到 NCBI 数据库,并获得序列号。

2 结果与分析

2.1 子实体和菌丝的形态特征

该菌春夏秋季发生在柏树树干枯朽部位、树干基部树皮、树根上,当年连续生长。如图 1,担子果 1 a 生,平伏贴生,易与基质分离。新鲜时脆蜡质、软木质,干燥后变硬、脆,整体鲜黄色,易开裂成不规则的片状。菌管表面鲜黄色,干燥后变为黄白色、黄色,长 3 mm ~ 4 mm;菌管层黄色、黄白色,分层不明

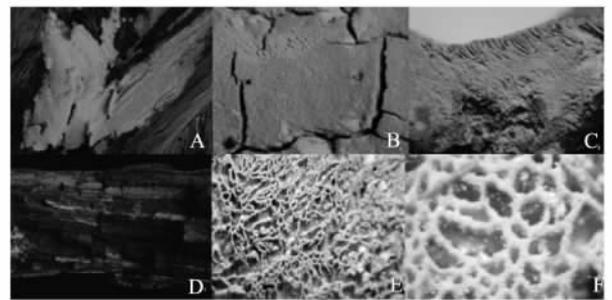


图 1 拟黄薄孔菌子实体形态

Fig. 1 The morphology of the fruiting bodies of *Antrodia subxantha*

A. 柏树枯木上的子实体; B. 菌管表面; C. 子实体横切面; D. 柏树木材褐色腐朽; E. 菌管; F. 菌管

显 粉笔质 ,不易与菌肉分离 ,非放射状。孢子印白色。担孢子腊肠形、弯圆柱形 ,略弯曲 ,无色 ,薄壁 ,光滑 ,与 Melzer 和棉兰试剂均无变色反应 ,大小为 $2 \sim 3.5 \times 0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 。

菌丝系统 3 型 ,生殖菌丝 ,具锁状联合 ,薄壁 ,通常分枝 ,交织排列 ,直径 $2 \mu\text{m} \sim 2.5 \mu\text{m}$; 骨架菌丝占多数 ,厚壁 ,扭曲 ,常分枝 ,强烈交织排列 ,直径 $5 \mu\text{m} \sim 6 \mu\text{m}$,缠绕菌丝尖细 ,分枝发达 ,直径 $0.5 \mu\text{m} \sim 1.5 \mu\text{m}$ 。菌管菌丝与菌肉菌丝相似。

培养特征如图 2 ,在琼脂培养基上菌丝先稀疏 ,呈白色、黄白色 ,后变密集、鲜黄色、黄色 ,菌丝具有爬壁性 ,可以直接形成子实体。菌丝具有明显的锁状联合。

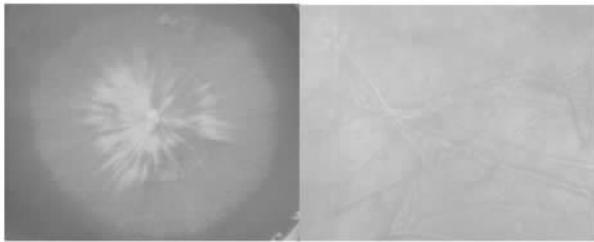


图 2 拟黄薄孔菌菌落及菌丝体形态

Fig. 2 The colony morphology and mycelium form of *Antrodia subxantha*

2.2 系统发育树分析

将拟黄薄孔菌的 ITS 序列 (632bp) 转化成 Fast 格式 ,并上传至 GenBank ,通过 Blast 比对 ,获得最大相似序列 (表 1) ,并将已测序列上传至 NCBI 数据库 ,获得的序列号 JN182921。然后结合已报道的拟黄薄孔菌的物种的 ITS 序列 ,利用 ClustalX 进行多重比对 ,最后用 DNAMAN (6.0.3.99 版本) 软件对这 12 个供试菌株的 ITS rDNA 序列进行分析 ,得到系统发育树 (图 3) 可看出 ,拟黄薄孔菌在分子系统

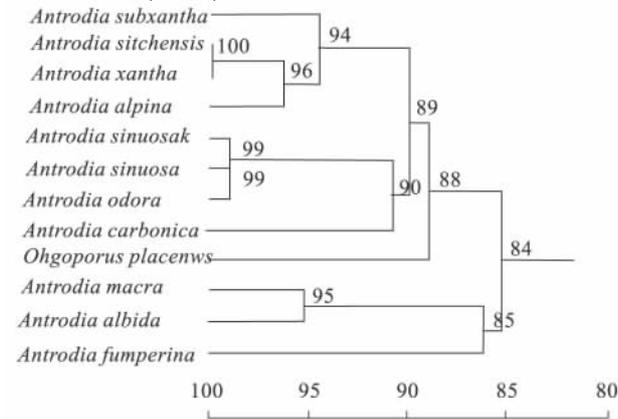


图 3 基于拟黄薄孔菌的 ITS 同源性分析

Fig. 3 Phylogeny and relationships of *Antrodia* sp. based on ITS sequences

的分析中属于薄孔菌属 (*Antrodia*) ,且较明显的区别于其它的菌株 ,单独聚类为一种。与已知的西加薄孔菌 (*Antrodia sitchensis*) 和黄薄孔菌 (*Antrodia xantha*) 的同源相似度为 94%。

3 讨论

拟黄薄孔菌 *Antrodia subxantha* Y. C. Dai & X. S. He. 属于菌物界 (*Fungi*) 担子菌门 (*Basidiomycota*) 拟层孔菌科 (*Fomitopsidaceae*) 薄孔菌属 (*Antrodia* P. Karst)。在系统进化树中将 12 种薄孔菌物种聚为了四大类 ,其中拟黄薄孔菌以 94% 的相似度与细加薄孔菌 *Antrodia sitchensis* (Baxter) Gilb. & Ryvarden 聚类在一起 ,依据 ITS 序列的分类标准可判定二者为不同种。虽然在子实体形态上与黄薄孔菌 *Antrodia xantha* (Fr.) Ryvarden 和西加薄孔菌 *Antrodia sitchensis* 最相似 ,但该种子实体颜色更加鲜艳 ,为亮黄色 ,完全平伏贴生 ,没有发现形成层架状、蹄状的子实体。且显微观察发现该种孢子 (大小为 $2 \sim 3.5 \times 0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$) 明显小于黄色薄孔菌和西加薄孔菌 ,其中黄色薄孔菌孢子大小为 $4.2 \sim 5.0 \times 1.2 \mu\text{m}$,西加薄孔菌的孢子大小为 $4.5 \sim 5.5 \times 1.8 \sim 2.2 \mu\text{m}$ ^[8-11]。

此外薄孔菌属中的大部分的物种的菌丝系统为二体型 ,分为生殖菌丝和骨架菌丝 ,而拟黄薄孔菌的菌丝为 3 型菌丝系统 ,具有生殖菌丝 ,菌管菌丝和菌肉菌丝 ,其中骨架菌丝与菌肉菌丝相似。拟黄薄孔菌在江油市六合乡、梓潼县七曲山大庙 ,成都青城山、绵阳江油市和梓潼县的古柏树上也均发现有存在 ,树龄超过 1 500 a ~ 2 000 a ,一般生长在柏树树枝、树根、树皮还有枯树桩上 ,对于柏木的腐蚀能力强 ,在树根和树干表面引起褐色腐朽 ,最后导致全株植物枯死。可见其对于柏树生长和木材质量的影响比较广泛的 ,所以今后要加强对该种菌生长条件观察和防治方法的研究 ,为古柏名木的保护提供必要的科学依据。

参考文献:

[1] 李林初 ,傅煜西. 柏木属的核型及细胞地理学研究 [J]. 植物分类学报 ,1996 ,34 (2) : 117 ~ 123.
 [2] 牟林春 ,王丽 ,姚丽 ,等. 中国柏木属 (*Cupressus* L.) 植物的 petG-trnP 序列分析及其系统学意义 [J]. 四川大学学报 ,2005 ,42 (5) : 1033 ~ 1037.
 [3] 江泽平 ,王豁然. 柏科分类和分布: 亚科、族和属 [J]. 植物分类学报. 1997 ,35 (3) : 236 ~ 248. (下转第 105 页)

气候变化对枯凋落物分解速率的影响,也不能模拟森林病虫害干扰造成的林木生长速率减少的影响。

3 对四川林业碳计量体系研建的启示

3.1 加强政府主导、行业协调

随着气候变化国际谈判进程的推进,林业碳汇与计量问题将进一步受到社会的广泛关注,已逐渐成为影响国家发展、政策制定的主要因素之一。因而,林业碳计量体系研建不能仅仅局限于林业行业本身,应该更多地与国土、能源、气象等政府部门协调统一,强化政府主导能力,协调有关的各个行业,动员各方面的力量,更多、更好地提供多方面的技术资料 and 权威参考,为气候变化管理、计量活动、行动计划等提供有效的管理基础。

3.2 加强林业碳计量的深入研究

由于陆地生态系统的碳源/汇的复杂性和时空异质性以及缺乏必要和可靠的活动水平和相关参数,要准确计量林业活动的碳源/汇非常困难,估算的不确定性较高。目前,主要发达国家均采用了较高层次的碳计量方法和其本国的参数,一些国家还建立了专门的碳计量系统或体系,以满足 UNFCCC 和《京都议定书》的履约需求。由于缺乏相关活动水平数据和碳计量方面的准确参数,我国林业碳计量与主要发达国家还有较大差距。因此,迫切需要加强相关的基础研究,收集和完善的参数,以提高当前和未来履约能力。

3.3 提高保护环境的公众意识

公益事业需要社会公众的支持与参与,需要广泛开展社会教育与宣传。气候变化和林业碳计量是个新事物,普及基础知识和扩大宣传很重要,必须重视对社会公众,尤其是青少年的宣传教育,逐步提高公众意识。为此,对宣传的重视尤其是宣传手段、技术细节的重视值得我们学习参考,除了开展人员培训、国际交流、专题报道外,还应该结合各自业务分别搭建网络信息平台,为信息的及时发布和互相交流提供快速便捷的渠道。

参考文献:

- [1] 吴建国,张小全,徐德应. 土地利用变化对生态系统碳汇功能影响的综合评价[J]. 中国工程科学, 2003, 5(9): 65~71.
- [2] 李怒云,宋维明. 气候变化与中国林业碳汇政策研究综述[J]. 林业经济, 2006, 10(5): 60~64.
- [3] 张小全,朱建华,侯振宏. 主要发达国家林业有关碳源汇及其计量方法与参数[J]. 林业科学研究, 2009, 22(2): 285~293.
- [4] 张小全,陈先刚,武曠红. 土地利用变化和林业活动碳变化测定与监测中的方法学问题[J]. 生态学报, 2004, 17(24): 2068~2072.
- [5] 斐阳,黄军英. 加拿大应对气候变化新举措[J]. 全球科技经济瞭望, 2011, 26(3): 18~22.
- [6] 刘莉,崔志强,许琛. 加拿大温室气体减排策略及启示[J]. 环境保护, 2007, (24): 91~93.
- [7] 商贵铎. 基于 CBM-CFSS 模型的森林管理研究——以江西省造林对生态系统碳循环的影响模拟为例[D]. 山东大学.
- [8] 中国气象局培训中心课题组. 各国气候变化应对体制研究报告[C]. 2005.

(上接第 26 页)

- [4] 龚国堂,陈俊华,黎燕琼,等. 四川盆地四种柏木林分类型的水文效应[J]. 生态学报, 2011, 33(10): 2716~2726.
- [5] 张敏,林丽花,马守春. 世界柏树王园生态旅游环境容量测定[J]. 林业调查规划, 2009, 34(5): 119~122.
- [6] 汤发兴. 云南千年名木古树[J]. 云南林业, 2010, 31(4): 48.
- [7] 郑建. 古柏树主要害虫的发生及持续性防治[J]. 植保技术, 2010, 10: 47.
- [8] 戴玉成,贺新生,王贺岷元,等. 东喜马拉雅山地区木材腐朽菌

- 研究 2. 四川青城山的木材腐朽菌[J]. 菌物学报, 2012, 31(2): 168~173.
- [9] 杜萍,崔宝凯,王伟. 华东地区木腐菌研究 3. 中国薄孔菌属小记及一新记录种[J]. 菌物学报, 2009, 28(1): 44~48.
- [10] Yu Chengdai, Tuomo Niemela. Changbai wood-rotting fungi 13. *Antrodia sensulato* [J]. Ann. Bot. fennio, 2002, 39: 257~265.
- [11] 刘春静,于成志,戴玉成. 中国多孔菌一新记录种——西加薄孔菌[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(2): 3~4.