

海南橡胶树棒孢霉落叶病菌毒素蛋白基因检测与致病性分析

曲建楠¹, 陈迪², 侯巨梅², 刘震², 崔佳¹, 刘铜^{2*}, 左豫虎^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319; 2. 海南大学热带农林科学院, 海口 570228)

摘要 Cassiicolin 毒素蛋白是橡胶树棒孢霉落叶病菌的主要致病因子。本研究对分离自海南省 5 个市县的橡胶树棒孢霉落叶病菌进行了鉴定, 形态学鉴定结合分子生物学鉴定结果表明, 病原菌为多主棒孢。利用 Cassiicolin 毒素不同亚型编码基因特异性引物和菌饼活体接种法分别鉴定了分离菌株的毒素蛋白类型和致病性, 结果显示, 分离的 35 个菌株都含有 Cas5 基因, 未发现含其他类型的毒素基因, 表明海南橡胶树棒孢霉落叶病菌为含 Cas5 毒素蛋白优势群体; 所有菌株对橡胶树品种 'RRIM600' 都能够致病, 但是在不同抗性品种上致病性存在一定差异。

关键词 橡胶棒孢霉落叶病; 多主棒孢; 毒素; 致病性

中图分类号: S 435.76 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019110

Isolation, identification of the cassiicolin and pathogenicity analysis of *Corynespora* leaf fall disease of *Hevea brasiliensis* in Hainan

QU Jiannan¹, CHEN Di², HOU Jumei², LIU Zhen², CUI Jia¹, LIU Tong^{2*}, ZUO Yuhu^{1*}

(1. College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract Cassiicolin is the main pathogenic factor of *Corynespora cassiicola*. In this study, pathogens were isolated from *Hevea brasiliensis* samples infected with *Corynespora* leaf fall disease collected from five cities and counties of Hainan province, and were identified as *C. cassiicola* by morphological and molecular methods. The cassiicolin subtypes and pathogenicity of isolates were analyzed by using specific primers of cassiicolin and inoculation with fungus cake *in vivo*. The results showed that 35 isolates of *C. cassiicola* contained Cas5 protein, and no other types of proteins were found. It indicated that Cas5 was the dominant population in Hainan. All isolates of *C. cassiicola* were found to be pathogenic in 'RRIM600' rubber species, but they also showed different pathogenicity in different rubber varieties with resistance to *C. cassiicola*.

Key words *Corynespora* leaf fall disease; *Corynespora cassiicola*; cassiicolin; pathogenic

橡胶树 *Hevea brasiliensis* 属于大戟科三叶橡胶属, 其产物天然橡胶作为重要的工业原料, 广泛运用于农业、工业、国防、交通、日常生活和医药卫生领域等方面^[1]。由多主棒孢 *Corynespora cassiicola* 引起的橡胶棒孢霉落叶病是橡胶树 *Hevea brasiliensis* 上一种重要的叶部病害, 给我国橡胶生产带来严重的危害^[2]。2010 年, Shimomoto 等利用延

伸因子(EF-1 α)、微管蛋白(β -tubulin)和钙调蛋白(Calmodulin)序列对不同地区和不同作物中分离得到的多主棒孢进行了同源性分析^[3]。Barthe 等研究表明, 橡胶树多主棒孢产生的 cassiicolin 毒素蛋白是该病菌的主要致病因子, 并且在不同的菌株中存在不同毒素蛋白亚型^[4]。Déon 等根据多主棒孢中 Cas 基因的差异, 将病原菌分为 6 个毒素亚

收稿日期: 2019-03-06

修订日期: 2019-04-23

基金项目: 海南大学高层次人才引进科研启动基金(KYQD(ZR)1732); 海南省自然科学基金(319MS015)

致谢: 感谢海南大学林春花老师对本试验技术上的指导!

* 通信作者 E-mail: 刘铜 liutongamy@sina.com; 左豫虎 zuoyuhu@163.com

型^[5]。2016 年刘先宝等报道中国橡胶树多主棒孢优势群体为 *Cas5* 亚型,在海南发现存在一株含有 *Cas2* 亚型的菌株,推测是来源于其他作物^[6]。Shuib 等鉴定发现马来西亚橡胶树多主棒孢主要为 *Cas0* 与 *Cas5* 亚型^[7]。Déon 等从巴西巴伊亚无病症橡胶树叶片中分离到的多主棒孢中检测到了 *Cas3* 和 *Cas4* 亚型^[8]。Tran 等研究发现 *Cas1* 亚型毒素比 *Cas5* 亚型毒素对橡胶树叶片致病性更强^[9]。近年来,海南橡胶树棒孢霉落叶病在苗圃和幼龄树上的危害有加重趋势^[10],是否有新的毒素蛋白亚型出现和致病性分化尚未见报道。本研究拟从海南各主要植胶产区采集、分离橡胶树棒孢霉落叶病菌菌株,通过毒素蛋白基因检测和致病性分析,以期明确海南橡胶树棒孢霉落叶病菌群体毒素类型和致病性变化情况,为科学防治海南橡胶树棒孢落叶病提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

于 2017 年 5、7 月和 11 月,参照《橡胶树主要病害诊断与防治原色图谱》^[11]中橡胶树棒孢霉落叶病病斑形态特征,分别在海南省儋州市、白沙黎族自治县、五指山市、乐东黎族自治县和保亭黎族自治县橡胶林采集橡胶树棒孢霉落叶病的病叶。

健康橡胶苗‘文昌 11’‘热研 7-33-97’‘热研 7-20-95’‘热研 8-79’‘RRIM600’,由国家橡胶树种质资源圃提供。

葡萄糖、琼脂糖、无水乙醇为生工生物工程(上海)股份有限公司提供。50×TAE、PGM-T Ligation Kit 为天根生化科技(北京)有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 病原菌的分离与纯化

在海南大学海甸校区热带农林学院植物病害防控实验室采用组织分离法进行病原菌分离。选取叶片新鲜、病斑清晰的橡胶树叶片,利用手术剪在无菌操作台中剪取病健交界处约 0.5 cm×0.5 cm 病叶组织,用 75%乙醇浸泡 3~5 s,然后用无菌水清洗 3~5 次,转接于 PDA 培养基平板上,28℃培养 3~4 d,待长出菌丝后挑取到新的 PDA 平板上,转接 3~4 次。将纯化得到的病原菌进行单孢分离,转接到 PDA 试管斜面,4℃保存备用。

1.2.2 致病性分析

将‘文昌 11’‘热研 7-33-97’‘热研 7-20-95’‘热研 8-79’‘RRIM600’移栽至海南大学海甸校区实验基地。每个品种各 50 株,株高约 1 m,每株 8~10 个分枝,21~30 片叶,待移栽橡胶树苗生长出 3~5 个新分枝,选取中部健康叶片,进行室外活体接种。在每个叶片叶脉左侧中间处用无菌牙签轻微刺伤并接一个菌饼,空白对照为刺伤后接种 PDA 培养基,每个品种接种 9 个叶片,套袋保湿培养。接种 9 d 后,记录发病情况,试验重复 3 次。根据柯赫氏法则,待叶片发病后与自然发病叶片症状进行比较,并重新分离病原菌,与原接种菌进行比较。

1.2.3 病原菌形态学鉴定

将分离纯化的病原菌接种于 PDA 平板上,28℃培养,观察 7 d 菌龄的菌落形态特征、颜色,并记录其生长速度。利用涂布器将在 PDA 平板上生长 10 d 的病原菌菌丝刮去,并利用三层灭菌纱布包裹培养皿口,在人工气候箱中,28℃光照培养 3 d,然后加入适量无菌水并利用涂布器轻刮平板,利用三层纱布过滤,得到病原菌孢子悬浮液用于分生孢子形态观察。病原菌分生孢子形态参照《真菌鉴定手册》^[12]进行比对鉴定。

表 1 本研究所用的引物及其序列

Table 1 The sequence of all primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	来源 Origin	用途 Purpose
ITS	ITS4	TCCTGCGCTTATTGATATGC	本研究	鉴定病原菌
	ITS5	GGAAGTGAAGTCGTAACAAGG		
<i>βtubulin</i>	tub-F1	CCTCCAAACCGGTCAATG	Shimomoto ^[3]	
	tub-R2	CTGGGTCAACTCGGGGAC		
<i>EF-1α</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone & Kohn ^[15]	
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCTTACC		

续表 1 Table 1(Continued)

基因 Gene	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	来源 Origin	用途 Purpose
Cas1	CasF18	CCCAAGATACATGTTTGAATGT	Déon ^[5]	鉴定病原菌毒素亚型
	CasR27	CCACACAAAGCAAGATACAGAATGAGC		
Cas2	CasF17	GGATTTGCCTGAGATCCTA	Déon ^[8]	
	CasR24	CAAACAATGCTAACCAAAACAAAC		
Cas3, Cas4	CasF20	GTCGGCTAACTTGGGAAAAACTCT	Déon ^[8]	
	CasR28	GCAGGAAGCAAAACACAGAACAAG		
Cas5	CasF19	CGGGGAGGTATCAGGTGTGAGATA	Déon ^[8]	
	CasR26	CAGAACAAGCCAAAAGAGAACTAC		
Cas6	CasF16	GCTTGATTTGCCTGTGAGATACT	Déon ^[8]	
	CasR25	AAAACGATGCTAAACAAAAGGA		

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定

为了更精确地鉴定病原菌,通过 CTAB 法^[14]提取 DNA,利用通用引物 ITS、延伸因子(*EF-1 α*)和微管蛋白基因(*β tubulin*)^[3-4](表 1)进行 PCR,回收 PCR 产物,将产物连接到 PGM-T 载体,送至广州天一辉远公司进行测序,将测序结果在 NCBI 进行比对分析。

将获得的 ITS 序列、延伸因子(*EF-1 α*)序列和微管蛋白(*β -tubulin*)序列分别与 GenBank 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中 18 株棒孢属菌株 BS2、ST3、T1、FN3、GEV1559、NRC2-1、EH-1070、HLH-1-1、ZM160181、KMC1、CCC85、XQ3-1、FCC90、ACC42、PCC86、CGJ1、CBS 135133、CPC 31708 和长喙壳菌 MUCL44885、尖孢镰刀菌 R1、疫霉 Ps-737、灰葡萄孢 F734 的 ITS 序列、延伸因子(*EF-1 α*)序列和微管蛋白(*β -tubulin*)序列进行比较,利用 MEGA 7 进行聚类分析,构建系统发育树。

1.2.5 毒素蛋白亚型鉴定

利用 6 种毒素亚型 *Cas1*、*Cas2*、*Cas3*、*Cas4*、*Cas5* 和 *Cas6* 特异性引物^[5,8](表 1)对病原菌毒素亚型鉴定,回收 PCR 产物,将产物连接到 PGM-T 载

体,送至广州天一辉远公司进行测序,将测序结果在 NCBI 进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离与纯化

从儋州市、白沙黎族自治县、五指山市、保亭黎族苗族自治县、乐东黎族自治县橡胶林采集的病叶中分别获得 19、6、2、1 和 7 株病原菌,共 35 株病原菌。根据其采集的地点及叶片的采集顺序进行编号,对纯化后的病原菌进行形态观察。

2.2 致病性分析

通过致病性鉴定,35 株分离菌株均能侵染‘RRIM600’橡胶树。有 7、9、21、28 株分离菌株分别能够侵染‘文昌 11’‘热研 7-33-97’‘热研 8-79’‘热研 7-20-95’叶片并导致发病(表 2),有 6 株病原菌 DZ-27、DZ-123、DZ-131、BS-35、BS-37、BS-43 对供试的 5 个橡胶树品种均具有侵染性,它们分别分离自儋州市与白沙黎族自治县的橡胶树病叶。这些结果表明海南省橡胶树棒孢落叶病菌在不同抗性橡胶树品种上的致病性不同,所有分离菌株对‘RRIM600’都具有致病性。

表 2 35 株病原菌对 5 个橡胶树品种的致病性¹⁾

Table 2 Pathogenicity of 35 strains of *Corynespora cassiicola* against five varieties of *Hevea brasiliensis*

菌株编号 Strain no.	采集地区 Collection region	采集地点 Location	对不同橡胶树品种的致病性 Pathogenicity on different rubber varieties				
			RRIM600	热研 7-20-95	热研 8-79	热研 7-33-97	文昌 11
			RRIM600	Reyan 7-20-95	Reyan 8-79	Reyan 7-33-97	Wenchang 11
DZ-13	儋州市	海南大学儋州校区	+	+	+	-	-
DZ-15	儋州市	海南大学儋州校区	+	+	-	-	-
DZ-16	儋州市	海南大学儋州校区	+	+	+	-	-
DZ-23	儋州市	儋州市农场五队	+	+	-	-	-
DZ-24	儋州市	儋州市农场五队	+	+	-	-	-
DZ-25	儋州市	海南大学儋州校区	+	+	+	-	-
DZ-26	儋州市	海南大学儋州校区	+	+	+	-	-

续表 2 Table 2(Continued)

菌株编号 Strain no.	采集地区 Collection region	采集地点 Location	对不同橡胶品种的致病性 Pathogenicity on different rubber varieties				
			RRIM600	热研 7-20-95	热研 8-79	热研 7-33-97	文昌 11
			RRIM600	Reyan 7-20-95	Reyan 8-79	Reyan 7-33-97	Wenchang 11
DZ-27	儋州市	儋州市农场五队	+	+	+	+	+
DZ-28	儋州市	儋州市农场五队	+	+	-	-	-
DZ-33	儋州市	儋州市农场五队	+	-	-	-	-
DZ-34	儋州市	儋州市农场五队	+	-	+	-	-
DZ-123	儋州市	儋州市农场九队	+	+	+	+	+
DZ-127	儋州市	儋州市农场九队	+	+	+	+	-
DZ-129	儋州市	儋州市农场九队	+	+	-	+	-
DZ-131	儋州市	儋州市农场九队	+	+	+	+	+
DZ-134	儋州市	儋州市农场九队	+	+	+	-	-
DZ-135	儋州市	儋州市农场九队	+	+	-	-	-
DZ-137	儋州市	儋州市农场九队	+	+	+	-	-
DZ-138	儋州市	儋州市农场九队	+	+	+	-	-
BS-35	白沙黎族自治县	龙江农场	+	+	+	+	+
BS-36	白沙黎族自治县	龙江农场	+	-	-	-	-
BS-37	白沙黎族自治县	龙江农场	+	+	+	+	+
BS-39	白沙黎族自治县	龙江农场	+	+	+	-	+
BS-41	白沙黎族自治县	龙江农场	+	+	-	-	-
BS-43	白沙黎族自治县	龙江农场	+	+	+	+	+
WZS-65	五指山市	五指山	+	-	-	-	-
WZS-72	五指山市	五指山	+	-	-	-	-
BT-110	保亭黎族苗族自治县	金江农场	+	-	-	-	-
LD-112	乐东黎族自治县	山荣农场	+	+	+	-	-
LD-113	乐东黎族自治县	山荣农场	+	+	+	-	-
LD-114	乐东黎族自治县	山荣农场	+	-	-	-	-
LD-115	乐东黎族自治县	山荣农场	+	+	+	+	-
LD-116	乐东黎族自治县	山荣农场	+	+	-	-	-
LD-117	乐东黎族自治县	山荣农场	+	+	+	-	-
LD-119	乐东黎族自治县	山荣农场	+	+	+	-	-

1) “+”为接菌橡胶树叶片形成明显病斑,表示菌株对该橡胶树品种致病,“-”为接菌橡胶树叶片未形成明显病斑或无病斑,表示菌株对该橡胶树品种不致病。

When expanding lesions in inoculated leaves are observed, the isolate is rated virulent (+). When no lesion or nonexpanding pinpoint lesions in inoculated leaves are observed, the isolate is rated avirulent (-).

室外接菌试验表明,品种‘RRIM600’叶片发病率达 100%,但不同菌株引起的发病程度有差异,空白对照未发病。发病橡胶树叶片病斑呈鱼骨状,与自然条件下橡胶树棒孢霉落叶病病斑相同。在接菌保湿培养的第 9 天,采集发病的橡胶树叶片,对其病菌进行再分离,35 株病原菌均与供试菌株菌落形态相同,病菌回收率为 100%,确定其为橡胶树棒孢霉落叶病的致病菌。

2.3 病原菌形态学鉴定

参照《橡胶树主要病害诊断与防治原色图谱》^[12]中菌落生长及形态特征,对病原菌进行初筛,

发现 35 株病原菌均疑似为多主棒孢。利用 PDA 培养基对 35 株病原菌进行培养,发现所有菌株第 3 天均产生大量气生菌丝,菌丝丛生,呈绒毛状;随着培养天数的增加,基生菌丝逐渐变成褐色或黑色,气生菌丝呈灰色或白色绒毛状,菌落边缘呈灰色或白色菌圈,部分菌落产生红褐色色素(表 3)。对 35 株病原菌进行孢子形态观察,发现 35 株病原菌孢子均为顶生,单生,呈倒棍棒状,直立或略弯曲,大小为(30~60) $\mu\text{m} \times (3 \sim 10) \mu\text{m}$,有 3~16 个隔(图 1)。与《真菌鉴定手册》^[13]描述的橡胶树多主棒孢菌的形态相似,可初步鉴定为多主棒孢。

表 3 多主棒孢菌落形态特征

Table 3 Colony morphology of *Corynespora cassiicola*

编号 No.	气生菌丝 Aerial hypha		基生菌丝 Basal hypha		色素 Pigment	菌落形态 Colony morphology
	颜色 Color	生长速度/mm·d ⁻¹ Growth rate	颜色 Color	生长速度/mm·d ⁻¹ Growth rate		
DZ-13	白色	5.7	黑褐	4.4	红褐色	近圆形,致密,边缘参差不齐呈褐色
DZ-15	灰白	4.9	黑白	4.1	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-16	灰色	6.0	黑白	5.3	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-23	白色	5.8	黑褐	3.3	红褐色	近圆形,致密,边缘参差不齐呈褐色
DZ-24	灰色	4.8	黑白	3.9	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-25	灰色	4.7	黑白	3.9	无	近圆形,致密,边缘参差不齐呈白色
DZ-26	灰色	5.2	黑褐	4.4	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
DZ-27	灰色	4.6	黑白	3.8	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-28	灰色	8.0	黑色	8.0	无	圆形,致密,边缘平滑
DZ-33	灰色	4.3	黑白	3.9	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-34	白色	5.2	黑褐	4.0	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
DZ-123	灰色	5.1	黑白	4.4	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-127	灰色	5.2	黑白	3.7	无	近圆形,致密,边缘参差不齐呈白色
DZ-129	灰白	8.0	黑白	5.0	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-131	灰白	4.7	黑褐	2.8	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
DZ-134	灰色	4.5	黑褐	3.4	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
DZ-135	白色	4.8	黑白	4.8	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
DZ-137	灰白	4.1	黑褐	2.6	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
DZ-138	灰白	8.0	黑白	5.0	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
BS-35	灰色	5.4	黑白	4.7	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
BS-36	灰白	4.4	黑白	3.1	无	近圆形,致密,边缘参差不齐呈白色
BS-37	白色	5.1	黑褐	4.2	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
BS-39	白色	5.3	黑白	4.6	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
BS-41	灰白	5.3	黑白	4.3	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
BS-43	白色	5.5	黑白	4.6	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
WZS-65	灰白	5.5	黑白	4.7	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
WZS-72	灰白	5.0	黑白	3.7	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
BT-110	白色	5.3	黑褐	4.3	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
LD-112	灰白	4.4	黑褐	3.3	红褐色	圆形,致密,边缘平滑呈褐色
LD-113	白色	5.2	黑白	4.4	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
LD-114	灰色	3.6	黑白	3.3	无	圆形,致密,边缘平滑呈白色
LD-115	灰白	5.5	黑白	4.9	无	圆形,致密,边缘平滑
LD-116	灰色	4.9	黑白	4.0	无	圆形,致密,边缘平滑
LD-117	灰白	4.5	黑白	3.3	无	圆形,致密,边缘平滑
LD-119	白色	4.3	黑褐	3.2	红褐色	圆形,致密,边缘平滑

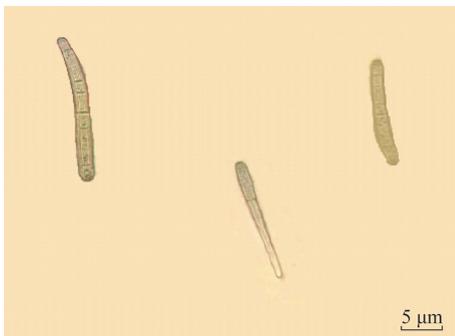


图 1 橡胶棒孢霉落叶病病原菌分生孢子形态

Fig. 1 Conidial morphology of *Corynespora cassiicola*

2.4 病原菌分子鉴定

分别利用 ITS、延伸因子(EF-1 α)和微管蛋白(β -tubulin)通用引物对 35 株病原菌进行 PCR 检测,均得到单一条带。将测序结果通过 NCBI 比对,发现所有菌株与所报道的多主棒孢具有 99%以上同源性。进一步将 35 株病原菌与 18 株已鉴定的棒孢属菌株、蛇口目杆菌 *Ophiostoma bacillisporum*、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、疫霉菌 *Phytophthora niederhauserii* 和灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 的 rDNA-ITS, EF-1 α , β -tubulin 进行遗传进化分析,35 株菌株与已知的棒孢属多主棒孢聚集

在一起,表明分离获得的 35 株病原菌为多主棒孢 *C. cassiicola*(图 2)。

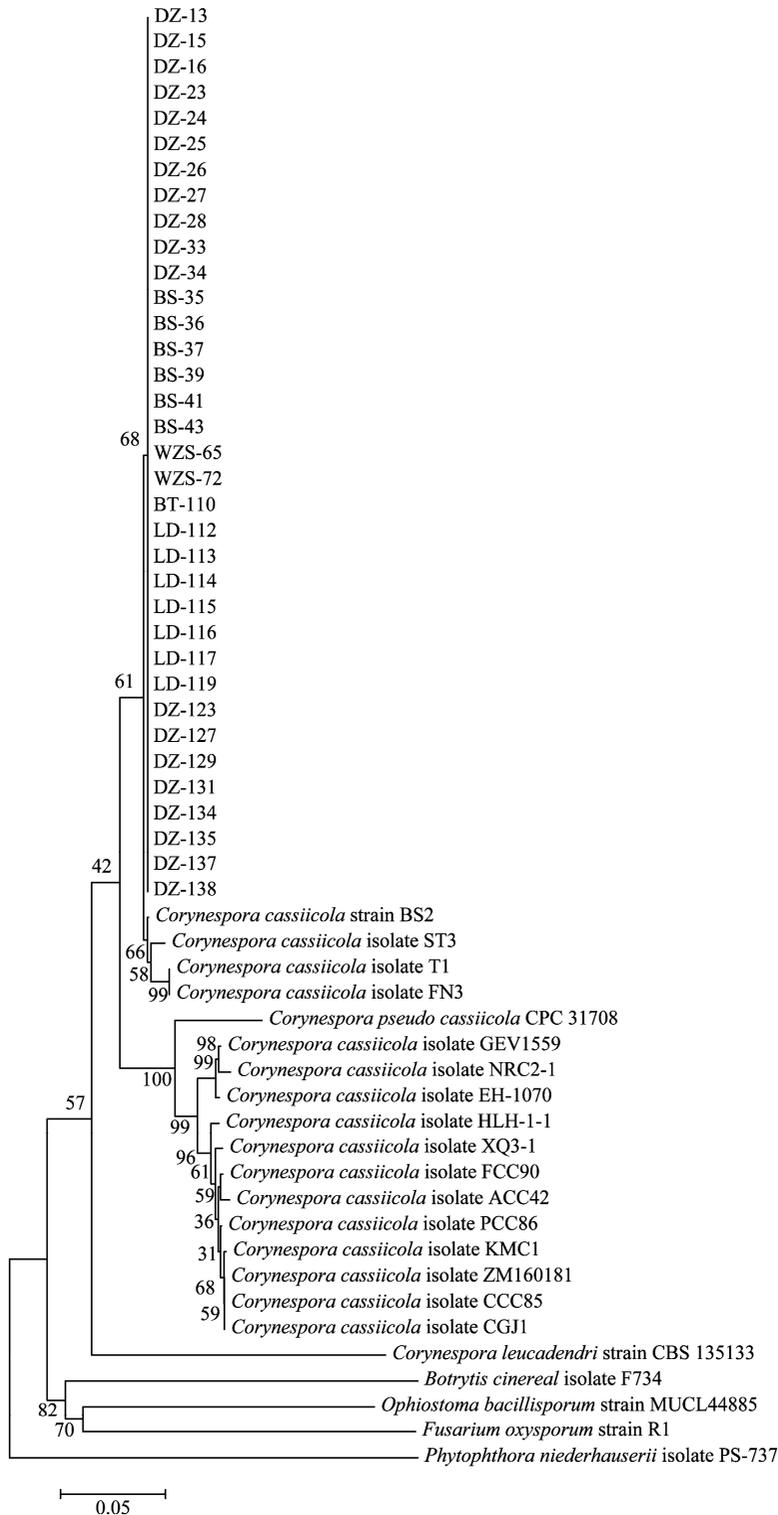


图 2 基于 rDNA-ITS, *EF-1 α* , *β -tubulin* 序列构建的系统发育树

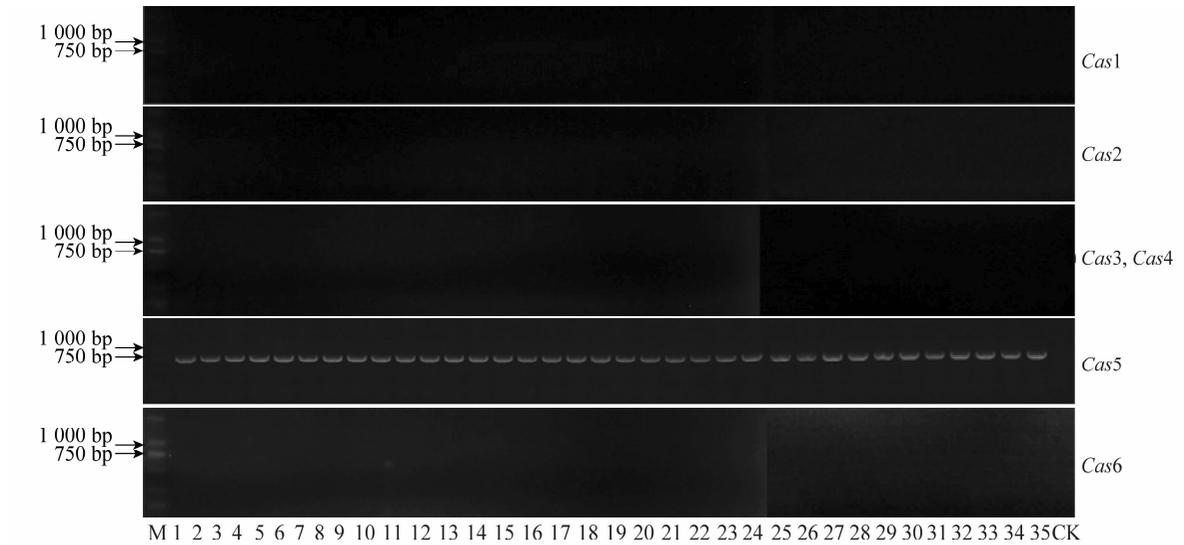
Fig. 2 Phylogenetic tree constructed with the neighbor-joining(NJ) method based on rDNA-ITS, *EF-1 α* and *β -tubulin* sequences

2.5 毒素蛋白亚型的检测

利用特异性毒素亚型鉴定引物 *Cas1*、*Cas2*、*Cas3*、*Cas4*、*Cas5*、*Cas6* 对 35 株病原菌进行检测,仅

有 *Cas5* 引物能扩增出一条电泳条带。通过测序和 NCBI 对比,结果显示 35 株病原菌均携带 *Cas5* 基因,即 35 株多主棒孢均属于 *Cas5* 亚型(图 3),表明

海南橡胶树棒孢霉落叶病菌为含 Cas5 毒素蛋白优势群体。



M: 2000 bp Marker; 1~35 分别代表 DZ-13、DZ-15、DZ-16、DZ-23、DZ-24、DZ-25、DZ-26、DZ-27、DZ-28、DZ-33、DZ-34、DZ-123、DZ-127、DZ-129、DZ-131、DZ-134、DZ-135、DZ-137、DZ-138、BS-35、BS-36、BS-37、BS-39、BS-41、BS-43、WZS-65、WZS-72、BT-110、LD-112、LD-113、LD-114、LD-115、LD-116、LD-117、LD-119, CK: 水
M: 2000 bp Marker; 1-35 represent *C. cassiicola* isolate DZ-13, DZ-15, DZ-16, DZ-23, DZ-24, DZ-25, DZ-26, DZ-27, DZ-28, DZ-33, DZ-34, DZ-123, DZ-127, DZ-129, DZ-131, DZ-134, DZ-135, DZ-137, DZ-138, BS-35, BS-36, BS-37, BS-39, BS-41, BS-43, WZS-65, WZS-72, BT-110, LD-112, LD-113, LD-114, LD-115, LD-116, LD-117 and LD-119, respectively. CK: Water

图 3 不同菌株中毒素蛋白基因 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR amplification of Cassiocolin gene from *Corynespora cassiicola* isolates

3 讨论

Déon 在 2014 年利用 ITS 对来自不同作物的 128 株多主棒孢进行了同源性分析, 研究结果显示 128 株多主棒孢可分为 7 个分支, 其中含相同毒素基因的多主棒孢分别聚类到同一分支, 表明含不同毒素亚型的菌株存在遗传上的分化^[6]。本研究同时利用 ITS、延伸因子(EF-1 α)和微管蛋白(β -tubulin)对橡胶树上分离得到的病原菌进行遗传进化关系分析, 35 株病原菌都聚集在同一分支, 尚未发现海南省橡胶树棒孢霉落叶病原菌存在遗传分化。

刘先宝等在 6 个省的 5 个物种中进行多主棒孢的分离鉴定与毒素蛋白亚型检测, 在海南省橡胶树中分离得到 14 株多主棒孢, 其中 13 株中检测到 Cas5 毒素蛋白, 1 株中检测到 Cas2 毒素蛋白, 推测含 Cas2 基因的菌株可能来自于其他作物, 并非来自橡胶树^[7]。本研究于 2017 年 5、7 月和 11 月, 在海南省橡胶主产区橡胶树中分离得到 35 株多主棒孢, 橡胶树棒孢霉落叶病菌毒素蛋白亚型检测结果表明所有供试菌株只含有 Cas5, 均未检测出其他毒素蛋白。因此可以明确海南橡胶树棒孢落叶病菌的毒素蛋白为 Cas5 亚型。

通过对 35 株多主棒孢进行致病性检测, 得到 6 株强致病性菌株, 分别来自海南省北部的儋州市与白沙黎族自治县, 而在海南省中部及南部的保亭黎族苗族自治县、五指山市和乐东黎族自治县分离得到的多主棒孢致病性较弱, 推测海南省多主棒孢的致病性可能与地理位置有关。35 株多主棒孢对不同橡胶树品种的致病性有较大差异, 采用抗病品种可以有效防治该病。另外, 对所有供试分离菌株在同一橡胶树品种做致病性检测时, 发现其致病性也存在明显的差异。因此推测该病原菌除了 Cas5 毒素蛋白为重要致病因子外, 可能还存在其他的致病因子。

参考文献

[1] 祁栋灵, 王秀全, 张志扬, 等. 中国天然橡胶产业现状及其发展建议[J]. 热带作物学报, 2013, 33(2): 79-87.
[2] 李宝聚, 高苇, 石延霞, 等. 多主棒孢和棒孢叶斑病的研究进展[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 171-176.
[3] SHIMOMOTO Y, SATO T, HOJO H, et al. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan [J]. Plant Pathology, 2010, 60(2): 253-260.
[4] BARTHE P, VALÉRIE P R, FRÉDÉRIC B, et al. Structural analysis of cassiocolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola* [J]. Journal of Molecular Biology,

2007, 367(1): 89–101.

- [5] DÉON M, BOURRE Y, GIMENEZ S, et al. Characterization of a cassiicolin-encoding gene from *Corynespora cassiicola*, pathogen of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Plant Science*, 2012, 185–186(4): 227–237.
- [6] 刘先宝, 李博勋, 陈珊, 等. 国内橡胶树多主棒孢 *Cassiicolin* 毒素多样性及致病性分析[J]. *热带作物学报*, 2016, 37(10): 1969–1973.
- [7] SHUIB S S, DÉON M, MAHYUDDIN M M, et al. Cassiicolin genes among *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia [J]. *Journal of Rubber Research*, 2011, 18(2): 109–126.
- [8] DÉON M, SCOMPARIN A, TIXIER A, et al. First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil [J]. *Fungal Diversity*, 2012, 54(1): 87–99.
- [9] TRAN D M, ANDRÉ C D, DÉON M, et al. Genetic determinism of sensitivity to *Corynespora cassiicola* exudates in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J/OL]. *PLoS ONE*, 2016, 11(10): e0162807. DOI:10.1371/journal.pone.0162807.
- [10] 李博勋, 刘先宝, 林春花, 等. 国内橡胶树主要种质对棒孢霉落叶病的抗性评价[J]. *植物保护*, 2014, 40(5): 86–92.
- [11] 黄贵修, 高宏华. 橡胶树主要病害诊断与防治原色图谱[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 6–11.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 552–553.
- [13] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法[J]. *菌物系统*, 2001, 20(4): 575–577.
- [14] DÉON M, FUMANAL B, GIMENEZ S, et al. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis* [J]. *Fungal Biology*, 2014, 118(1): 32–47.
- [15] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes [J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553–556.
- (责任编辑: 田 喆)
- (上接 109 页)
- [21] LIU Wanxue, WANG Wenxia, ZHANG Yibo, et al. Adult diet affects the life history and host-killing behavior of a host-feeding parasitoid [J]. *Biological Control*, 2015, 81: 58–64.
- [22] 肖悦, 王文霞, 张毅波, 等. 补充非寄主食物对芙新姬小蜂和潜蝇姬小蜂控害行为为权衡的影响[J]. *环境昆虫学报*, 2016, 38(6): 1231–1236.
- [23] 刘培培, 庄欣鑫, 肖悦, 等. 高温下成虫食物对芙新姬小蜂生活史及控害潜力影响[J]. *环境昆虫学报*, 2018, 40(2): 452–460.
- [24] LIU Wanxue, WANG Wenxia, WANG Wei, et al. Characteristics and application of *Diglyphus* parasitoids (Hymenoptera; Eulophidae; Eulophinae) in controlling the agromyzid leafminers [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 4(4): 427–437.
- [25] TAGAMI Y, DOI M, SUGIYAMA K, et al. Survey of leafminers and their parasitoids to find endosymbionts for improvement of biological control [J]. *Biological Control*, 2006, 38(2): 210–216.
- [26] 杨月梅, 轩景丽, 叶福宇, 等. 中国新发现芙新姬小蜂孤雌产雌品系的分子鉴定及其内共生菌 *Rickettsia* 的检测[J]. *昆虫学报*, 2017, 60(5): 582–593.
- [27] BODIN A, JALOUX B, DELBECQUE J P, et al. Reproduction in a variable environment: how does *Eupelmus vuilleti*, a parasitoid wasp, adjust oogenesis to host availability? [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2009, 55(7): 643–648.
- [28] LIU Wanxue, WANG Wei, CHENG Lisheng, et al. Contrasting patterns of ovarian development and oogenesis in two sympatric host-feeding parasitoids, *Diglyphus isaea* and *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera; Eulophidae) [J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2014, 49(2): 305–314.
- [29] HEIMPEL G E, DE BOER J G. Sex determination in the Hymenoptera [J]. *Annual Review of Entomology*, 2008, 53(1): 209–230.
- [30] VAN DER KOOI CASPER J, MATTHEY-DORET C, SCHWANDER T. Evolution and comparative ecology of parthenogenesis in haplodiploid arthropods [J]. *Evolution Letters*, 2017, 1(6): 304–316.
- [31] STOUTHAMER R, LENTEREN J C V. The use of unisexual wasps in biological control [M]//VAN LENTEREN J C. Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures. CABI Publishing, 2003: 93–113.
- [32] MA W J, SCHWANDER T. Patterns and mechanisms in instances of endosymbiont-induced parthenogenesis [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2017, 30(5): 868–888.
- [33] YE Fuyu, ZHU Chaodong, YEFREMOVA Z, et al. Life history and biocontrol potential of the first female-producing parthenogenetic species of *Diglyphus* (Hymenoptera; Eulophidae) against agromyzid leafminers [J/OL]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3222. DOI:10.1038/s41598-018-20972-3.
- [34] ADACHI-HAGIMORI T, MIURA K, ABE Y. Gene flow between sexual and asexual strains of parasitic wasps: a possible case of sympatric speciation caused by a parthenogenesis-inducing bacterium [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2011, 24(6): 1254–1262.
- [35] JERVIS M, FERNS P. Towards a general perspective on life-history evolution and diversification in parasitoid wasps [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2011, 104(2): 443–461.
- [36] HEIMPEL G E, COLLIER T R. The evolution of host-feeding behaviour in insect parasitoids [J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 1996, 71(3): 373–400.
- (责任编辑: 田 喆)