

# 内生大豆间座壳 *Diaporthe sojae* 的子囊壳促生培养及鉴定

豆明珠, 蒲顺昌, 闫淑珍, 陈双林

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 本文介绍了对野大豆内生间座壳真菌的子囊壳促生培养方法, 结合形态特征和分子序列对分离和培养的野大豆内生间座壳真菌进行了鉴定. 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和水琼脂培养基(WA), 接种分离获得的野大豆内生间座壳菌株 DYYP4342 菌饼, 同时分别在接种菌饼两侧平行放置灭菌大豆茎秆和灭菌松针, 以诱导野大豆内生间座壳 *Diaporthe sojae* 在大豆茎秆和灭菌松针上产生子囊壳, 之后在 25 ℃、12 h 光照与 12 h 黑暗交替处理下培养, 添加灭菌大豆茎秆和灭菌松针的培养基中持续产生子囊壳, 数量显著多于对照组马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和水琼脂培养基(WA). 通过形态特征和 rDNA-ITS 分子序列鉴定该分离菌株为大豆间座壳 *Diaporthe sojae*, 该菌此前被报道发生在栽培大豆上, 引起茎荚枯病, 作为内生真菌在野大豆上则为首次记录, 文中比较了野大豆内生 *Diaporthe sojae* 与栽培大豆上发生的 *Diaporthe sojae* 及其他 *Diaporthe* 种的差异. ITS 序列系统发育分析结果支持 *Diaporthe kochmanii* 为 *Diaporthe sojae* 的命名异名的观点.

**[关键词]** 野大豆, 内生真菌, 子囊壳, 培养方法

**[中图分类号]** Q945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2021)04-0060-09

## Perithecia of Promoting Culture and Identification of Endophytic *Diaporthe sojae*

Dou Mingzhu, Pu Shunchang, Yan Shuzheng, Chen Shuanglin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** In this paper, a method for increasing the quantity and promoting the maturity of perithecia of an endophytic *Diaporthe* species from *Glycine soja* is introduced and described. The morphological characteristics and molecular sequence of the isolates and cultures of endogenous mesial shell fungi from *Glycine soja* are identified. Potato dextrose agar(PDA) and water agar(WA) were used to inoculate the isolated *Glycine soja* endogenous mesocapsid strain cake, while sterilized soybean stalks and extinct bacteria were placed in parallel on both sides of the inoculated fungal strain pine needles, which are used to induce to produce perithecia on sterilized soybean stalks and sterilized pine needles, and then cultured at 12 h light vs. 12 h dark and 25 ℃, perithecia were continuously produced in the medium with sterilized soybean stalks and sterilized pine needles, and the number was significantly greater than that in the medium of PDA. The isolate was identified as *Diaporthe sojae* by its morphological characteristics and molecular sequence. This species was previously reported to occur on *Glycine max*, causing stem blight, and it was the first record on *Glycine soja* as endophytic fungi. The results of phylogenetic analysis of ITS sequences support *Diaporthe kochmanii* is an idea of naming a different name for *Diaporthe sojae*.

**Key words:** *Glycine soja*, endophytic fungi, perithecia, culture method

*Diaporthe* 在世界范围内分布, 其生活方式包括内生菌、腐生菌和病原菌<sup>[1]</sup>. *Diaporthe* 由 Nitschke<sup>[2]</sup> 引入, 是间座壳科 Diaporthaceae 的模式属, 该属以 *Diaporthe eres* 为模式种. 目前的国际藻类、真菌和植物的命名规则(ICN)要求对多型性真菌使用单一名称<sup>[3]</sup>. Rossman 等<sup>[4]</sup> 基于命名优先原则决定使用该属较早的有性型名称 *Diaporthe* 来代替其无性型名称 *Phomopsis*, 解决该属的命名问题. *Diaporthe* 包括有性型和无性型两种状态, 有物种名记录的 *Diaporthe* 为 1 072 个, *Phomopsis* 为 989 个(Index Fungorum 2019), 但目前未能完全对其无性型和有性型的物种完成一一对应. Gomes 等<sup>[5]</sup> 详细描述了 *Diaporthe* 中的 54 个物种, 包括

收稿日期: 2021-01-26.

基金项目: 国家科技基础性工作专项(2013FY110400).

通讯作者: 陈双林, 博士, 教授, 研究方向: 黏菌, 大型真菌, 植物内生真菌. E-mail: chenshuanglin@njnu.edu.cn

它们的形态和分子序列信息. Dissanayake 等<sup>[6]</sup>重点研究了目前已知的 171 种通过培养或直接测序它们的主模式标本、附加模式标本、等模式标本或新模式标本进行识别的物种. 目前迫切需要重新制定 *Diaporthe* 的物种划分<sup>[7]</sup>. 间座壳属的形态学特征主要包括两部分<sup>[8]</sup>. 间座壳属 *Diaporthe* 的形态分类存在着物种界限模糊的问题<sup>[9]</sup>, 尤其是子囊壳大小、子囊的大小和子囊孢子的大小等, 在相近物种之间经常存在交叉, 迫切需要重新制订间座壳属 *Diaporthe* 物种划分的形态学标准<sup>[7]</sup>, 因此, 子囊壳、子囊和子囊孢子的成熟度对于间座壳属真菌的准确鉴定至关重要.

Guarnaccia 等<sup>[1]</sup>采用在 WA 培养基上放置无菌松针对分离自欧洲葡萄的间座壳属 *Diaporthe* 真菌进行产孢诱导, 从而获得了成熟的子囊壳, 实现了准确的物种鉴定和描述. 李会平等在 WA 培养基上放置大豆茎秆诱导了所培养的 *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* 产生大量子囊壳<sup>[10]</sup>. 不论是野外直接获得的间座壳属 *Diaporthe* 真菌标本, 还是在实验室分离的间座壳属 *Diaporthe* 真菌培养物, 都存在着如何保证获得足够多的和成熟的子囊壳用于间座壳属 *Diaporthe* 的准确鉴定这一问题. 2017 年 7 月—2018 年 7 月, 在分离野大豆 *Glycine soja* 内生真菌时, 获得了 1 株间座壳属 *Diaporthe* 真菌. 然而, 该菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上仅产生为数不多的子囊壳, 使得不能对其进行准确的物种鉴定. 为此, 本研究探索了对野大豆内生间座壳真菌的子囊壳促生培养, 并结合形态特征和分子序列对分离和培养的野大豆内生间座壳真菌进行鉴定.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

野大豆 *Glycine soja* Sieb. et Zucc. 植株样品于 2017 年 8 月 7 日从山东东营黄河三角洲国家级自然保护区外围区(118°59'9"E, 37°45'38"N)采集, 按照 Sun 等<sup>[11]</sup>的组织分离法进行内生真菌的分离, 分离培养基为改良的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA). 其中, 从野大豆叶片中分离的菌株 DYYP4342 初步鉴定为间座壳属 *Diaporthe* 真菌, 菌种保存于南京师范大学微生物菌种保藏中心(MCCNNU).

#### 1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL.

水琼脂培养基(WA): 琼脂 10 g, 水 1 000 mL.

改良的 PDA: 每 1000 mL PDA 培养基中添加 50 mL 野大豆汁液.

#### 1.1.3 试剂

乳酸酚棉蓝染色液; 5% KOH; 2% CTAB; 3 mol/L NaAc; 氯仿-异戊醇(24:1); Taq DNA 聚合酶; 10× PCR buffer, DL2000 Marker; rDNA-ITS 的 PCR 扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 子囊壳的促生培养

将长度为 5 cm 的松针和大豆茎秆分别置于蓝口玻璃瓶中(250 mL), 在 121 °C、15 min 高压条件下灭菌 2 次, 分别获得灭菌松针、灭菌大豆茎秆. 从 PDA 平板上生长旺盛的野大豆内生间座壳菌株 DYYP4342 菌落边缘, 以无菌打孔器取直径为 10 mm 的菌饼, 转接到直径为 9 cm 培养皿中的 PDA 平板和 WA 平板上, 在培养基上菌饼的两侧平行放置灭菌松针或灭菌大豆茎秆. 设置 6 组处理, 分别是在 WA 平板和 PDA 平板上仅接种菌饼、在 WA 平板和 PDA 平板上接种菌饼的同时加放灭菌松针或灭菌的大豆茎秆, 每组处理 3 次重复. 在 25 °C、12 h 光照培养与 12 h 暗培养交替处理条件下培养. 培养 20 d 与 30 d 后在 Nikon C-LEDs 复合显微镜下, 用 Canon DS126311 数码相机拍摄子囊壳的外观特征并进行计数<sup>[12]</sup>. 因子囊壳聚生, 故以子座作为统计单位进行子囊壳的计数.

采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA), 采用 Tukey 检验进行显著性差异检验<sup>[13]</sup>.

#### 1.2.2 形态特征观察

将分离菌株接种于 PDA 平板上, 于 25 °C 暗培养 7 d 后, 观察菌落正反面的颜色和气生菌丝的疏密程度等菌株 DYYP4342 的培养特征. 挑取成熟子囊壳, 在 JSZ6 体式显微镜(南京江南永新光学有限公司)下徒手切片. 将切片材料置于载玻片上, 滴加 5% KOH, 再滴加乳酸酚棉蓝染色液, 封盖. 在显微镜下观察并

利用 BX53F 显微数码测量系统 (Olympus, Japan) 测量成熟子囊、子囊孢子的大小,对选定的结构进行 30 次测量,并计算出平均值和标准差(SD). 范围被表示为 min.-max.×min.-max. (mean+SD). 显微图像采用带有微分干涉对比度(DIC)的 Imager A1 显微镜 (Carl Zeiss, Germany) 在 200×与 630×放大倍数下拍摄.

1.2.3 菌株的 ITS 序列获得和系统发育分析

按照 Guo 等<sup>[14]</sup>的方法,用无菌牙签从平板上刮取培养 7 d 的菌株 DYYP4342 菌丝体,采用 CTAB 法提取菌丝 DNA. 采用真菌通用引物 ITS1-F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3') 扩增核糖体内转录间隔区 (rDNA-ITS1), 其中 ITS1-F 为正向引物,ITS4 为反向引物. PCR 反应体系为 25 μL,含有 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液 12.5 μL、正向引物和反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、DNA 样品 1 μL 和灭菌去离子水 9.5 μL. 反应条件为 95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 变性 1 min,退火 50 ℃ 1min,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min. PCR 扩增产物质量采用 1%琼脂糖凝胶电泳法检测,扩增产物交由上海生工生物工程公司测序.

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中对所测菌株 DYYP4342 的 ITS 序列进行 BLAST 比对. 下载 GenBank 中豆科植物上发生的 12 种间座壳属 *Diaporthe* (主要为模式标本分离株 ex-type 或附加模式标本分离株 ex-epitype) 的 30 条 ITS 序列,使用 MAFFT 7.0 软件 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) 对测序序列和下载序列进行在线多序列比对,然后使用 MEGA 7.0 软件进行比对序列的手动截齐调整. 参照 Dissanayake 等从 GenBank 中下载 *Diaporthe corylina* CBS 121124 菌株的 ITS 序列 (KC343004) 作为外群,基于贝叶斯推断法 (Bayesian inference, BI) 使用 MrBayes 3.1.2 软件构建贝叶斯系统发育树,使用 FigTree v1.4.3 与 Adobe Illustrator CC2019 软件对构建的进化树进行编辑标示.

表 1 用于系统发育分析的 GenBank 中间座壳属真菌的 ITS 序列信息  
Table 1 GenBank accession numbers of *Diaporthe* species treated in the phylogenetic analysis

物种	菌株	宿主	国家	序列号	参考文献
<i>Diaporthe. aspalathi</i>	CBS 117169 *	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	KC343036	Dissanayake et al. 2017
	CBS 117168	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	KC343035	Dissanayake et al. 2017
	CPC5430	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	DQ286278	Johan C et al. 2006
<i>Diaporthe. aspalathi</i>	CBS 117169 *	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	KC343036	Dissanayake et al. 2017
	CBS 117168	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	KC343035	Dissanayake et al. 2017
	CPC5430	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	DQ286278	Johan C et al. 2006
<i>Diaporthe ambigua</i>	CBS117371	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	DQ286265	Johan C et al. 2006
	CPC5409	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	DQ286269	Johan C et al. 2006
	CPC5412	<i>Aspalathus linearis</i>	South Africa	DQ286270	Johan C et al. 2006
<i>Diaporthe caulivora</i>	CBS 127268 ****	<i>Glycine max</i>	Croatia	KC343045	Dissanayake et al. 2017
	CBS 178.55	<i>Glycine soja</i> ,	Canada	KC343046	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe eres</i>	AR5193 **	<i>Ulmus</i> sp.	Germany	KJ210529	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe kochmanii</i>	BRIP54033 *	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	JF431295	Thompson et al. 2011
<i>Diaporthe longicolla</i>	FAU644	<i>Glycine max</i>	USA	KJ590730	Dissanayake et al. 2017
	ATCC60325 *	<i>Glycine max</i>	USA	KJ590728	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe melonis</i>	CBS507.78 ***	<i>Cucumis</i>	USA	KC343142	Udayanga et al. 2015
	FAU641	<i>Cucumis melo</i>	USA	KJ590701	Udayanga et al. 2015
	FAU626	<i>Cucumis melo</i>	USA	KJ590704	Udayanga et al. 2015
<i>Diaporthe masirevicii</i>	BRIP57892a *	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	KJ197277	Thompson et al. 2015
	BRIP 54256	<i>Glycine max</i>	Australia	KJ197276	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe miriciae</i>	BRIP54736j *	<i>Helianthus annuus</i>	Australia	KJ197282	Thompson et al. 2015
	BRIP 55662c	<i>Glycine max</i>	Australia	KJ197283	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe novem</i>	CBS 127269	<i>Glycine max</i>	Croatia	KC343155	Udayanga et al. 2015
	CBS 127271	<i>Glycine max</i>	Croatia	KC343157	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AR4203 **	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	KJ590738	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe sojae</i>	FAU635 **	<i>Glycine max</i>	USA	KJ590719	Dissanayake et al. 2017
	CBS 116019	<i>Caperonia palustris</i>	USA	KC343175	Dissanayake et al. 2017
	DP0601	<i>Glycine max</i>	USA	KJ590706	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe sojae</i>	CBS 100.87	<i>Glycine soja</i>	Italy	KC343196	Gomes et al. 2013
	CBS 180.55	<i>Glycine soja</i>	/	KC343200	Gomes et al. 2013
	CBS 659.78	<i>Glycine soja</i>	USA	KC343201	Gomes et al. 2013
<i>Diaporthe ueckerae</i>	FAU656 *	<i>Cucumis melo</i>	USA	KJ590726	Dissanayake et al. 2017
	LGMF947	<i>Glycine max</i>	Brazil	KC343203	Dissanayake et al. 2017
<i>Diaporthe corylina</i>	CBS 121124	<i>Corylus</i> sp.	China	KC343004	Dissanayake et al. 2017

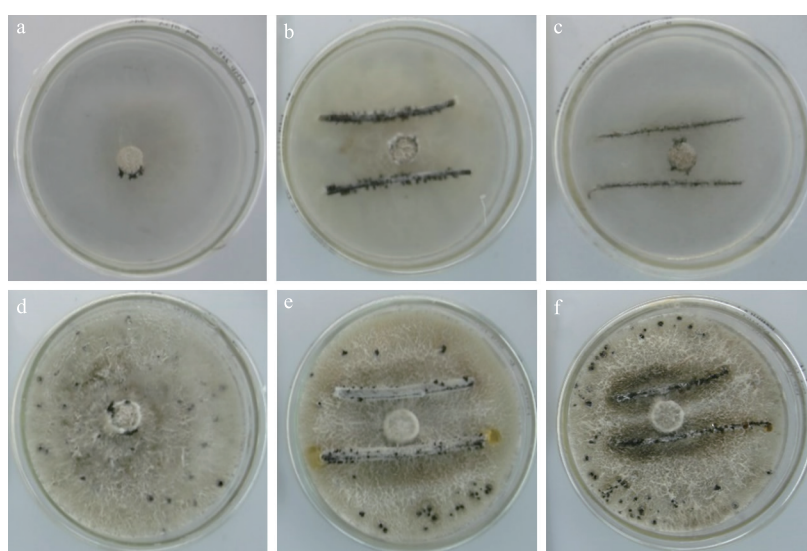
注: \* 标记的为模式标本; \*\* 标记的为附加模式标本; \*\*\* 标记的为等模式标本; \*\*\*\* 标记的为新模式标本分离株的序列.

## 2 结果与讨论

### 2.1 子囊壳在培养基和植物材料上的发生

#### 2.1.1 子囊壳在培养基和植物材料上的培养特征

野大豆内生间座壳菌株 DYYP4342 在大豆茎秆和松针上都能够产生多于在单纯的 PDA 平板和 WA 平板上的子囊壳(图 1). 在 WA 平板,子囊壳发生在菌饼边缘(图 1a);当存在有大豆茎秆或松针时,子囊壳既可出现在菌饼边缘,也可出现在大豆茎秆或松针附近,但更多地是在整个大豆茎秆或松针上发生(图 1b,c). 在 PDA 平板上,子囊壳最初发生在菌饼边缘,随着培养时间的延长,子囊壳会散生于在 PDA 平板各处,一般埋生于 PDA 内,而以喙突出于培养基外(图 1d);当存在有大豆茎秆时,子囊壳既出现在菌饼边缘,也可散生于 PDA 上,或在大豆茎秆上发生(图 1e);当存在有松针时,子囊壳在菌饼边缘、PDA 表面和松针上都有发生,但是以松针周围的培养基上发生的最多(图 1f).



a-c 分别为 WA、WA+灭菌的大豆茎秆和 WA+灭菌的松针上的菌落图,d-f 分别为 PDA、PDA+灭菌的大豆茎秆和 PDA+灭菌的松针上的菌落图.

图 1 野大豆内生间座壳菌株 DYYP4342 在不同培养基上的生长状态(接种后培养 30 d)

Fig. 1 The colony of endophytic *Diaporthe* fungal strain DYYP4342 isolated from *Glycine soja* on different medium (30 days after inoculation)

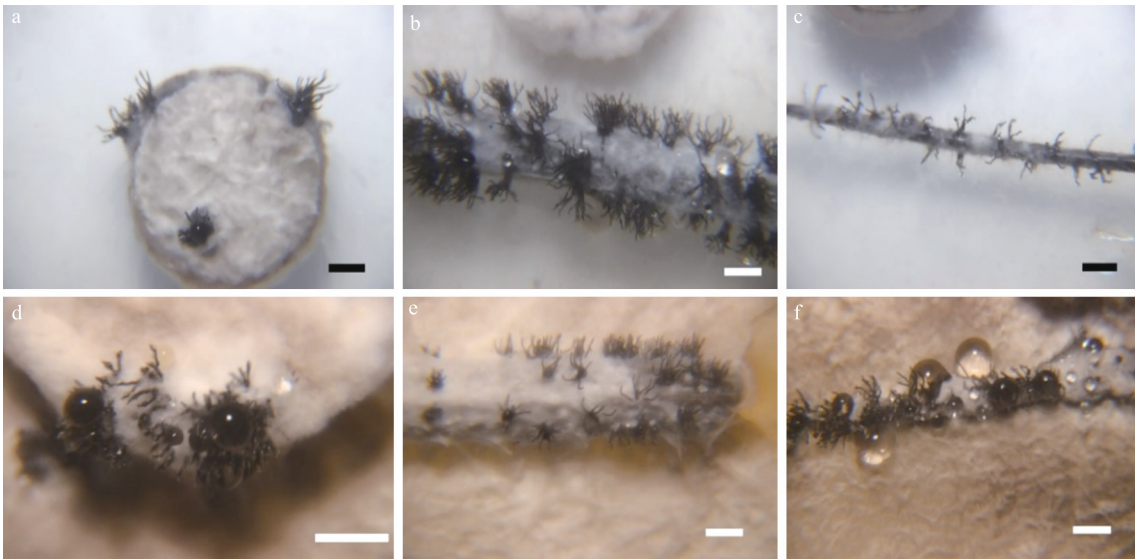
#### 2.1.2 子囊壳在培养基和植物材料上的发生数量

在培养基上添加无菌大豆茎秆或者松针会明显地促进野大豆内生间座壳 *Diaporthe* 菌株 DYYP4342 子囊壳的产生,且这些子囊壳主要发生在大豆茎秆或者松针上(图 2). 野大豆内生间座壳 *Diaporthe* 菌株 DYYP4342 的子囊壳埋生于培养基内或者大豆茎秆、松针内,大多聚生,极少单生,孔口形成较长的喙突出于基质外(图 2).

在体式显微镜下对不同培养基不同介质诱导产生的子囊壳的形态进行观察,不同介质诱导产生的子囊壳的成熟度及形状略有不同. 在 WA 和 PDA 培养基中,添加无菌大豆茎秆作为诱导介质所产生的子囊壳相较于添加无菌松针作为诱导介质所产生的子囊壳的成熟度要高,并且添加无菌大豆茎秆作为诱导介质所产生的子囊壳为球状而添加无菌松针作为诱导介质所产生的子囊壳更为细长(图 2b,e);不添加诱导介质的对照组 WA 与 PDA 平板上所产生的子囊壳的形状差异不大(图 2a-d).

对分离菌株促进产生的子囊壳进行了分析. 结果表明,添加无菌植物材料会促进间座壳属 *Diaporthe* 内生真菌子囊壳产生. 培养 20 d 时在 WA 培养基中添加大豆茎秆时产生的子囊壳平均值为  $(88 \pm 8.71)$  个/皿与对照组 WA 培养基子囊壳数量  $(3 \pm 1)$  个/皿相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ). WA 培养基中添加无菌松针时产生的子囊壳平均值为  $(15.3 \pm 1.53)$  个/皿与对照组 WA 培养基子囊壳数量  $(3 \pm 1)$  个/皿相比没有显著性差异(图 3A). PDA 培养基中添加大豆茎秆产生的子囊壳为  $(63 \pm 7.2)$  个/皿与对照组 PDA 培养基子囊壳数量  $(30.3 \pm 6.65)$  个/皿相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ). PDA 培养基中添加无菌松针产生的子囊壳为  $(53 \pm 11.53)$  个/皿

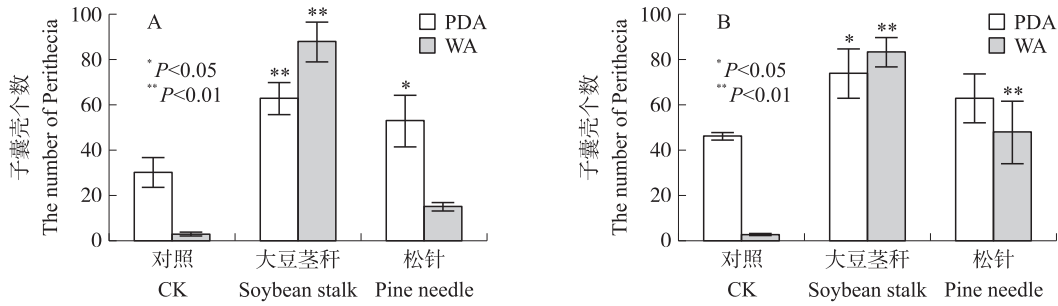




a-c 分别为 WA 菌饼、WA 上灭菌大豆茎秆和 WA 上灭菌松针上产生的子囊壳,d-f 分别为 PDA 菌饼、PDA 上灭菌大豆茎秆和 PDA 上灭菌松针上产生的子囊壳,标尺=2 000  $\mu\text{m}$ .

图 2 野大豆内生间座壳菌株 DYYP4342 的子囊壳在不同培养基上的发生状态(接种后培养 30 d)

Fig. 2 The perithecia appearance of endophytic *Diaporthe* fungal strain DYYP4342 isolated from *Glycine soja* on different medium (30 days after inoculation)



A 为不同培养基诱导子囊壳的产生(20 d),B 为不同培养基诱导子囊壳的产生(30 d).色柱上方\*表示经 Tukey 检验在  $P < 0.05$  水平与对照组相比差异显著,\*\*表示经 Tukey 检验在  $P < 0.01$  水平与对照组相比差异极显著.

图 3 不同时间子囊壳的产生个数

Fig. 3 Number of *p* produced perithecia at different times

时与对照组 PDA 培养基(30.3 $\pm$ 6.65)个/皿相比子囊壳数量差异显著( $P < 0.05$ )(图 3A). 培养 30 d 时在 WA 培养基中添加大豆茎秆产生的子囊壳为(100 $\pm$ 7.81)个/皿与对照组 WA 培养基(3.3 $\pm$ 0.58)个/皿相比子囊壳数量差异极显著( $P < 0.01$ ). WA 培养基上添加无菌松针产生的子囊壳为(57.6 $\pm$ 16.56)个/皿与对照组 WA 培养基(3.3 $\pm$ 0.58)个/皿相比子囊壳数量差异极显著( $P < 0.01$ )(图 3B). 在 PDA 培养基中添加大豆茎秆产生的子囊壳数量(88.6 $\pm$ 13.05)个/皿与对照组 PDA 培养基(55.3 $\pm$ 2.08)个/皿相比子囊壳数量差异显著( $P < 0.05$ ). 在 PDA 培养基中添加无菌松针产生的子囊壳数量为(75.6 $\pm$ 13.05)个/皿与对照组 PDA 培养基子囊壳数量(55.3 $\pm$ 2.08)个/皿相比子囊壳数量没有显著性差异(图 3B).

## 2.2 菌种鉴定

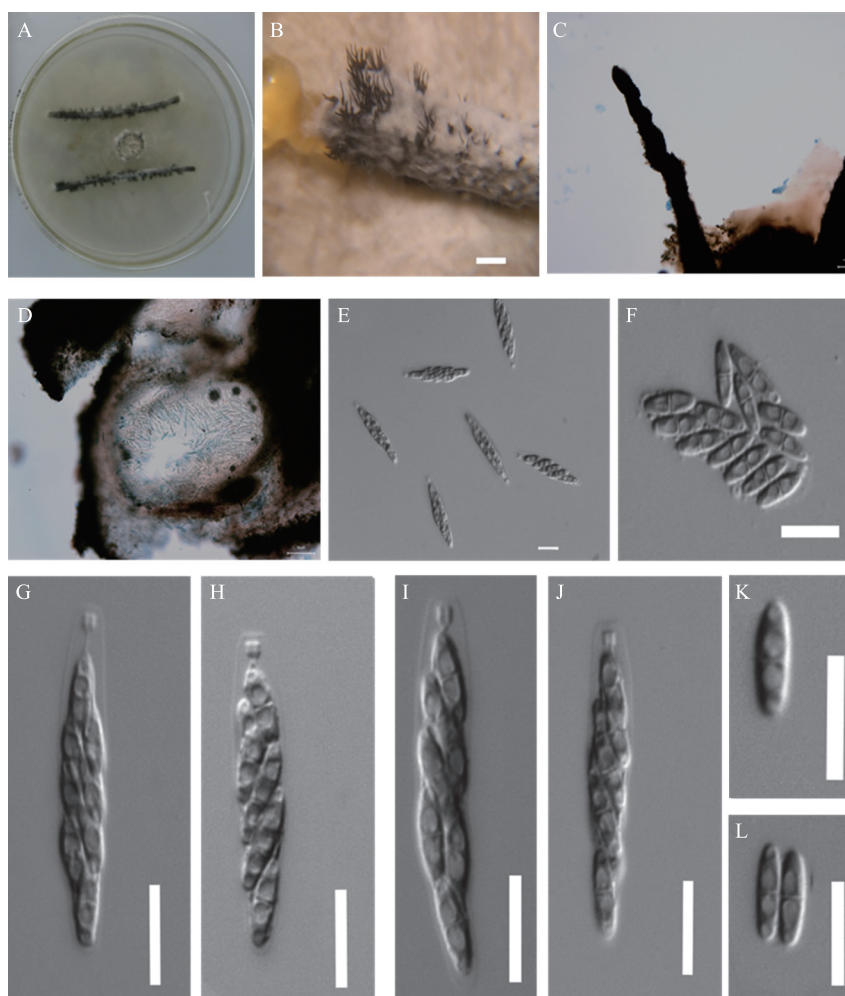
### 2.2.1 形态特征鉴定

从野大豆 *Glycine soja* 叶片中分离获得的内生真菌菌株 DYYP4342 在 PDA 平板上 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 7 d, 菌落直径可达 9.0 cm. 菌丝初期呈白色,边缘规则,气生菌丝发达致密,呈毯状,后期逐渐转为灰色或淡黄褐色. 有性型特征:子囊壳黑色,球状或近球状,聚生,埋生于基质内,具有伸出基质的乳突状突起,突起(喙)长 728.2  $\mu\text{m}$ ~2278.3  $\mu\text{m}$ . (图 4B,C);子囊壳直径为 261.5  $\mu\text{m}$ ~303.2  $\mu\text{m}$ (图 4D)无侧丝. 子囊单囊壁,无柄、棍棒状,内含 8 个子囊孢子,顶端有明显的顶环(图 4E,G-J). 子囊大小:(35.18~42.97) $\times$ (6.25~8.61)  $\mu\text{m}$ (av. $\pm$ SD:(38.39 $\pm$ 1.8) $\times$ (7.23 $\pm$ 0.58), $n = 30$ ). 子囊孢子透明,重叠单列,椭圆形或梭状

(图 4K~L),二室的,有 4 个水滴状斑点,中间为较大的水滴状斑点,两端则为较小的水滴状斑点,子囊孢子大小:  $(8.02 \sim 11.66) \times (2.23 \sim 3.54) \mu\text{m}$  (av.  $\pm$ SD:  $(9.98 \pm 0.75) \times (3.03 \pm 0.24)$ ,  $n = 30$ ) (图 4F, K~L). 在所有的培养条件下均未观察到无性型分生孢子器、 $\alpha$  型分生孢子和  $\beta$  型分生孢子。

根据形态特征鉴定为大豆间座壳 *Diaporthe sojae* Lehman.

宿主-喜树 *Camptotheca acuminata*, 辣椒 *Capsicum annuum*, 柑橘属 *Citrus* sp., 甜瓜 *Cucumis melo*, 大豆 *Glycine max*, 向日葵 *Helianthus annuus*, 琉璃菊 *Stokesia laevis*, 葡萄 *Vitis vinifera*<sup>[14-20]</sup>. 在野大豆 *Glycine soja* 上还没有 *Diaporthe sojae* 的报道。



A 在 WA+无菌大豆茎秆上的菌落图; B PDA+无菌大豆茎秆诱导产生的子囊壳; C 乳突状突起(喙); D 子囊壳横切图; E 子囊; F 子囊孢子; G-J 子囊; K-L 子囊孢子 Bars. B=2000  $\mu\text{m}$ ; C-D=50  $\mu\text{m}$ ; E-L=10  $\mu\text{m}$ .

图 4 大豆间座壳

Fig. 4 *Diaporthe sojae*

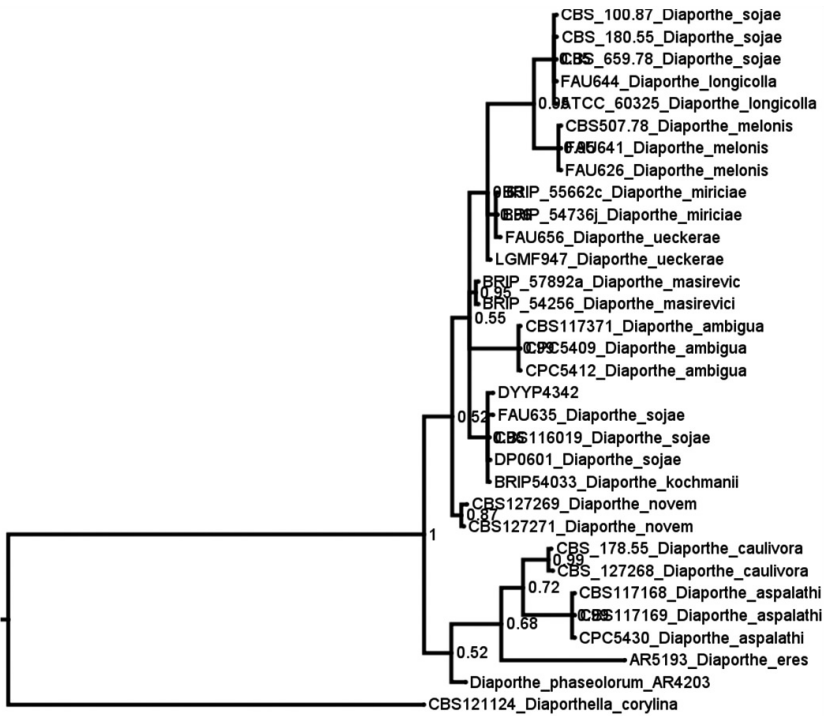
在野大豆 *Glycine soja* 上还没有 *Diaporthe sojae* 的报道,已经在栽培大豆 *Glycine max* 上报道的间座壳属 *Diaporthe* 真菌则有: *Diaporthe caulivora*、*Diaporthe novem*、*Diaporthe longicolla*、*Diaporthe phaseolorum*、*Diaporthe aspalathi*、*Diaporthe eres*、*Diaporthe masirevicii*、*Diaporthe miriciae*、*Diaporthe sojae*、*Diaporthe melonis*、*Diaporthe ueckerae*. 尽管野大豆 *Glycine soja* 与栽培大豆 *Glycine max* 是近缘种,是其直接祖先<sup>[21]</sup>,但是,对于大豆间座壳 *Diaporthe sojae* 而言,野大豆 *Glycine soja* 属于其新被发现的宿主. 在野大豆 *Glycine soja* 分离大豆间座壳 *Diaporthe sojae* 时,选择的是无病害的健康植株组织,因此,该菌是符合内生真菌的定义的<sup>[22]</sup>,而对于其在野大豆中的作用,则需要进一步的研究。

### 2.2.2 系统发育分析

基于 rDNA-ITS 构建的贝叶斯系统发育树(图 5)表明,分离自野大豆 *Glycine soja* 的间座壳属 *Diaporthe* 内生真菌菌株 DYYP4342 与 *Diaporthe sojae* FAU635、*Diaporthe sojae* CBS116019 和 *Diaporthe sojae* DP0601

聚为分支 VII, 构成一个独立的支系, 且获得良好支持 (BPP = 0.96, BPP = Bayesian posterior probabilities), 因此支持了根据形态特征获得的鉴定结果, 从野大豆中分离的间座壳属内生真菌菌株是大豆间座壳 *Diaporthe sojae*. 这一分支中还有发生在向日葵上的 *Diaporthe kochmanii* BRIP54033, 本研究结果支持了 Udayanga 等<sup>[15]</sup> 的基于形态分类学和分子系统学的意见, 即 *Diaporthe kochmanii* 不是一个独立的物种, 应归于 *Diaporthe sojae*.

贝叶斯分析基于最适模型 GTR+I+G. 在系统发育树中, 共有 12 个分支, 其中 11 个分支对应于大豆 *Glycine max* 中已报道的 11 种间座壳属 *Diaporthe* 物种, 且每一分支都具有较高的贝叶斯后验概率 (图 5), 支持了这些形态学物种的独立性. 分支 I 为 (Hobbs) Santos 等<sup>[18]</sup> 最初发现的、已知在阿根廷、美国、中国分布的 *Diaporthe longicolla*; 分支 II 为 Beraha & O'Brien 最初发现的、已知在巴西、德国、美国分布的 *Diaporthe melonis*; 分支 III 为 Shivas, Thompson & Tan 最初发现的、已知在澳大利亚分布的 *Diaporthe miriciae*; 分支 IV 为 Udayanga & Castlebury 最初发现的、已知在中国、美国分布的 *Diaporthe ueckerae*; 分支 V 为 Shivas, Morin, Thompson & Tan 最初发现的、已知在澳大利亚分布的 *Diaporthe masirevicii*; Santos, 分支 VII 为 Vrandecic & Phillips 最初发现的、已知在克罗地亚、意大利、南非、美国分布的 *Diaporthe novem*; 分支 IX 为 (Athow & Caldwell) Santos, Vrandecic & Phillips 最初发现的、已知在阿根廷、巴西、加拿大、日本、韩国等分布的 *Diaporthe caulivora*; 分支 X 为 Jansen, Castlebury & Crous 最初发现的、已知在阿根廷、南非、美国分布的 *Diaporthe aspalathi*; 分支 XI 为 Nitschke 最初发现的、已知在中国、意大利等分布的 *Diaporthe eres*; 分支 XII 为 (Cooke & Ellis) Saccardo 最初发现的、已知在巴西、中国、美国等分布的 *Diaporthe phaseolorum*; 除 11 种在大豆 *Glycine max* 上发生的间座壳属真菌外, 分支 VI 为南非豆科植物南非红茶 *Aspalathus linearis* 上的 *Diaporthe ambigua*, 并且与大豆 *Glycine max* 上的间座壳属真菌具有较密切的亲缘关系.



分支上的值显示的是贝叶斯法推理的后验概率 (BPP ≥ 0.85)

图 5 基于 BI 的 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogram generated from Bayesian analysis based on rDNA-ITS regions

### 3 结论

本研究选择的植物材料大豆 *Glycine max* 为大豆间座壳 *Diaporthe sojae* 在自然条件下的宿主之一, 另一植物材料松针目前尚未报道为 *Diaporthe sojae* 的宿主. 本研究针对不同植物材料这一影响因素对大豆间座壳 *Diaporthe sojae* 子囊壳的促进产生进行了比较研究, 提供了有一定说服力的结果, 不同植物材料对大豆间座壳 *Diaporthe sojae* 有性型子囊壳的产生结果不同, 无菌大豆茎秆在 WA 和 PDA 培养基中比无菌

松针在 WA 和 PDA 平板上促进产生的子囊壳的数量多。子囊壳促进实验的方法对于间座壳属 *Diaporthe* 的其他物种的有性型的人工培养观察具有一定的参考意义,在进行间座壳属 *Diaporthe* 物种的有性型的培养中可添加该物种分离的常见宿主植物材料以促进其产生成熟子囊壳。本实验中对子囊壳进行计数时以子座为单位进行计数这可能会低估了每皿中子囊壳的数量。

通过对成熟子囊壳切片进行形态学鉴定和基于 rDNA-ITS 进行的系统发育分析,确定了该株分离自野大豆内生真菌的间座壳属 *Diaporthe* 的明确物种。Udayanga 等对大豆、瓜类植物中的 *Diaporthe sojae* complex 进行了基于 ITS/EF/TUB/CAL/HIS 的系统发育及致病性分析,认为 *Diaporthe longicolla*、*Diaporthe phaseolorum*、*Diaporthe sojae*、*Diaporthe melonis*、*Diaporthe ueckerae* 等属于 *Diaporthe sojae* complex。然而,在本研究中仍然将它们作为不同的物种进行完整的形态与系统发育比较。在本研究中主要用于比较的为从 Dissanayake 等对间座壳属 174 个物种的系统发育分析中选择出的在大豆宿主中发现的 11 个间座壳属物种。其中在本研究的系统发育树分支 I 中 Gomes 等将菌株 CBS 180.55 *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*、CBS 659.78 *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* 归为 *D. sojae*。Huang 等将 CBS 100.87 *Phomopsis longicolla*、CBS 180.55 *Diaporthe sojae* 归为 *Diaporthe longicolla*。本研究在分别使用 *D. sojae* 的附加模式标本的分离株 (ex-epitype) 的序列 FAU635 与 *D. longicolla* 模式标本的分离株 (ex-type) 的序列 ATCC60325 进行系统发育树的构建,CBS 180.55 *D. sojae*、CBS 659.78 *D. sojae*、CBS 100.87 *Phomopsis longicolla* 与 *D. longicolla* 聚类为一支建议可以归入 *D. longicolla*。分支 III 中分离自甜瓜 *Cucumis melo* 的菌株 FAU656 \* 为 Udayanga 等建立 *Diaporthe ueckerae* 时的模式标本的分离株 (ex-type),在本研究中发现其与 *Diaporthe miriciae* 聚为一支。分离自野大豆的菌株的显微形态与 *Diaporthe phaseolorum* 很接近,但仔细比对分离自野大豆的菌株 DYYP4342 子囊孢子的大小为  $8.02-11.66 \times 2.23-3.54 \mu\text{m}$  与 Udayanga 等描述的 *Diaporthe phaseolorum* ( $9.7)12 \times 3.5(-4.3)$  有略微差异,子囊孢子的宽度要略窄。子囊孢子大小更接近于 *Diaporthe sojae* ( $9)9.5-11.9(-12) \times 3-4 \mu\text{m}$ ,并且在系统发育树分支 VII 中与物种 *Diaporthe sojae* 附加模式标本的分离株 (ex-epitype) 聚类为一支。故而结合形态与系统发育分析,分离自野大豆的间座壳属菌株应为 *Diaporthe sojae*。

本研究从野大豆植株中分离鉴定出的 *Diaporthe sojae* 为该物种在野大豆宿主中的首次记录。*Diaporthe sojae* 建种于 1923 年,Lehman 分离自美国北卡罗来纳州大豆 *Soja max* (L.) Piper,根据原始文献,*Diaporthe sojae* 的名称来源于其宿主 *Soja max* (L.) Piper,并且子囊壳仅在培养中可出现<sup>[23]</sup>,*Diaporthe sojae* 可以感染大豆的茎,豆荚和叶子,引起大豆荚和茎枯病。

#### [参考文献]

- [1] GUARNACCIA V, GROENEWALD J Z, WOODHALL J, et al. *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe[J]. Persoonia, 2018, 40: 135-153.
- [2] SENANAYAKE I C, CROUS P W, GROENEWALD J Z, et al. Families of Diaporthales based on morphological and phylogenetic evidence[J]. Studies in mycology, 2017, 86: 217-296.
- [3] KIRK P M, STALPERS J A, BRAUN U, et al. A without-prejudice list of generic names of fungi for protection under the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants[J]. IMA fungus, 2013, 4(2): 381-443.
- [4] ROSSMAN A Y, ADAMS G C, CANNON P F, et al. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use[J]. IMA fungus, 2015, 6(1): 145-154.
- [5] GOMES R R, GLIENKE C, VIDEIRA S I, et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi[J]. Persoonia, 2013, 31: 1-41.
- [6] DISSANAYAKE A J, PHILLIPS A J L, HYDE K D, et al. The current status of species in *Diaporthe*[J]. Mycosphere, 2017, 8(5): 1106-1156.
- [7] SANTOS L, PHILLIPS A J L, CROUS P W, et al. *Diaporthe* species on Rosaceae with descriptions of *D. pyracanthae* sp. nov. and *D. malorum* sp. nov[J]. Mycosphere, 2017, 8(5): 485-511.
- [8] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, HYDE K D, JONES E B G, et al. Families of Sordariomycetes[J]. Fungal diversity, 2016, 79(1): 1-317.
- [9] UDAYANGA D, CASTLEBURY L A, ROSSMAN A Y, et al. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex[J]. Fungal diversity, 2014, 67: 203-229.
- [10] 李会平, 师情, 王凯. 大豆茎溃疡病菌子囊壳诱导及孢子萌发方法探索[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 436-439.



- [11] SUN X, DING Q, HYDE K D, et al. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest[J]. Fungal ecology, 2012, 5(5): 624–6321.
- [12] PHOOKAMSAK R, NORPHANPHOUN C, TANAKA K, et al. Towards a natural classification of *Astrosphaeriella*-like species; introducing *Astrosphaeriellaceae* and *Pseudoastrosphaeriellaceae* fam. nov. and *Astrosphaeriellopsis*, gen. nov[J]. Fungal diversity, 2015, 74(1): 143–197.
- [13] BAI Q, ZHAI L, CHEN X, et al. Biological and molecular characterization of five *Phomopsis* species associated with pear shoot canker in China[J]. Plant disease, 2015, 99(12): 1704–1712.
- [14] CHANG C Q, XI P G, XIANG M M, et al. New species of *Phomopsis* on woody plants in Hunan Province[J]. Mycosystema, 2005, 2: 145–154.
- [15] UDAYANGA D, CASTLEBURY L A, ROSSMAN A Y, et al. The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops[J]. Fungal biology, 2015, 119(5): 383–407.
- [16] HUANG F, UDAYANGA D, WANG X, et al. Endophytic *Diaporthe* associated with *Citrus*, A phylogenetic reassessment with seven new species from China[J]. Fungal biology, 2015, 119: 331–347.
- [17] ZHANG A W, HARTMAN G L, RICCIONI L, et al. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues[J]. Plant disease, 1997, 81: 1143–1149.
- [18] SANTOS J M, VRANDEČIĆ K, COSIĆ J, et al. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia[J]. Persoonia, 2011, 27: 9–19.
- [19] SOGONOV M V, CASTLEBURY L A, ROSSMAN A Y, et al. Leaf inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales[J]. Studies in mycology, 2008, 62: 1–79.
- [20] VRANDEČIĆ K, COSIĆ J, RICCIONI L, et al. *Phomopsis longicolla* a new pathogen on *Abutilon theophrasti* in Croatia[J]. Plant pathology, 2004, 53: 251.
- [21] NAWAZ M A, YANG S H, REHMAN H M, et al. Genetic diversity and population structure of Korean wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) inferred from microsatellite markers[J]. Biochemical systematics and ecology, 2017, 71: 87–96.
- [22] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves[C]//ANDREWS J H, HIRANO S S. Microbial ecology of leaves. New York: Springer, 1991.
- [23] LEHMAN S G. Pod and stem blight of soybean[J]. Annals of missouri botanical gardens, 1923, 10: 111–178.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第52页)

- [30] GORDEN K K B, QIU X X, BINSFELD C C A, et al. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazo-quinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides[J]. The journal of immunology, 2006, 177(10): 6584–6587.
- [31] HEMMI H, KAISHO T, TAKEUCHI O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway[J]. Nature immunology, 2002, 3(2): 196–200.
- [32] WANG Z, CHEN Z, XU S, et al. ‘Obesity’ is healthy for cetaceans? Evidence from pervasive positive selection in genes related to triacylglycerol metabolism[J]. Scientific reports, 2015, 5: 14187.
- [33] FUHRMAN J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. Nature, 1999, 399(6736): 541–548.
- [34] JIANG S, STEWARD G, JELLISON R, et al. Abundance, distribution, and diversity of viruses in alkaline, hypersaline Mono Lake, California[J]. Microbial ecology, 2004, 47(1): 9–17.
- [35] WOMMACK K E, COLWELL R R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2000, 64(1): 69–114.
- [36] MANTOVANI M, RUSCHEL A R, PUCHALSKI A, et al. Diversity of species and successional structure of a secondary formation in an Atlantic rain forest[J]. Scientia forestalis (Brazil), 2005, (67): 141–142.
- [37] SUTTLE C A. Marine viruses—major players in the global ecosystem[J]. Nature reviews microbiology, 2007, 5(10): 801–812.
- [38] WEITZ J S, WILHELM S W. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles[J]. F1000 biology reports, 2012, 4: 17.

[责任编辑:黄 敏]