

DOI:10.11937/bfyy.201606028

朝天委陵菜白粉病病原菌鉴定

裴冬丽¹, 刘筱斐², 陈 柯²

(1. 商丘师范学院 生命科学学院, 植物与微生物互作重点实验室, 河南 商丘 476000; 2. 河南省商丘市第一高级中学, 河南 商丘 476000)

摘 要:以感病的朝天委陵菜(*Potentilla supina*)叶片为试材, 采用病原学及分子生物学方法, 研究了河南商丘地区朝天委陵菜白粉病病原菌的系统进化关系。结果表明: 该病原菌分生孢子梗直立, 圆柱形, 简单无分枝, 大小为(90~180) $\mu\text{m} \times$ (10~17) μm , 分生孢子透明, 椭圆形, 有明显的纤维体, 大小为(17~33) $\mu\text{m} \times$ (13~18) μm , 4~6个串生; 病原菌接种叶片病症与自然状态一致, 白色菌丝体部分覆盖上层叶表面, 随着病菌的发展, 菌丝蔓延至覆盖整个叶子表面; 对其核糖体 DNA 内转录间隔区(ITS)序列进行 PCR 扩增、测序获得 563 bp 序列(GenBank 登录号 KR049083)。经 MEGA 3.1 软件分析, 其与来自佩兰(*Herb eupatorii*)棕丝单囊白粉菌(*Podosphaere fusca*)的序列(GenBank 登录号 JX548297)聚为一支, 而与来自同属另 4 个种的 ITS 序列亲缘关系较远。研究表明, 河南省商丘地区的朝天委陵菜白粉菌为棕丝单囊白粉菌(*Podosphaera fusca*)。

关键词:朝天委陵菜; 白粉菌; ITS 序列; 分子系统学鉴定

中图分类号:S 432.44 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0112-04

朝天委陵菜(*Potentilla supina*)属蔷薇科(Rosaceae)委陵菜属(*Potentilla*)植物, 有清热解毒、凉血、止痢功用。朝天委陵菜白粉菌可侵染植株叶的两面、叶柄、茎和花萼上, 开始形成白色、圆形斑点, 最后覆盖成片, 导致植株衰老、枯萎。郑儒永等^[1]研究表明, 寄生于朝天委陵

菜的白粉菌主要有羽衣草单囊壳(*Sphaerotheca aphani-*)和粉孢属(*Oidium* spp.)。但在中国尚鲜有发现棕丝单囊白粉菌(*Podosphaere fusca*)寄生于朝天委陵菜的报道。棕丝单囊白粉菌分布、寄主范围非常广泛, 可侵染包括菊科、蔷薇科在内的多种植物。2013 年春季到秋季, 河南省商丘地区的朝天委陵菜发生了严重的白粉菌侵染现象, 该研究对朝天委陵菜白粉菌进行初次报道, 主要从形态学、致病性及分子系统学 3 个方面进行鉴定, 对朝天委陵菜白粉菌的系统进化及其进一步的防治具有重要意义。

第一作者简介:裴冬丽(1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向为植物分子遗传学。E-mail: peidongli@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31571997); 河南省教育厅资助项目(13B210199, 15A180019)。

收稿日期:2015-12-22

Influence of Meteorological Conditions on *Grapholita molesta* Overwintering Larvae Coming Out and the Law of *Grapholita molest* in Central Liaoning Area

ZHOU Dasen, GONG Weimin, LI Jieping, ZHAO Zhangwu

(College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: Taking representative pear gardens as research objects, the effect of meteorological condition on overwintering larvae coming out and the occurrence rule were studied by using sex pheromone and recording the local meteorological conditions in three consecutive years. The results showed that overwintering larvae of the oriental fruit moth unearthed was mainly influenced by temperature. When the air temperature was about 13°C, the larvae began to come out. And in a temperature range, higher temperature would not accelerate larval emergency. Rainfall could regulate the larval emergency by changes of temperature. The oriental fruit moth had 3-4 generations per year depending on the temperature of the local position.

Keywords: *Grapholita molesta*; sex pheromone; temperature; occurrence rule; peak

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料朝天委陵菜感病叶片,于2013年6月取自商丘师范学院校园内。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌形态学鉴定 采用台盼蓝染色法^[2]制片,对朝天委陵菜白粉菌进行显微镜检。将感染白粉菌的叶片(避其主脉)剪成方块(1.5 cm×1.5 cm),用卡诺固定液脱去叶绿素(一般过夜处理),然后置于0.3%台盼蓝溶液中染色,并于常温过夜,而后用蒸馏水洗4~5次(每次5 min),再依次置于30%、50%、70%酒精中脱色。处理的叶片制成水装片后,显微镜检,观察其显微形态,并测量其分生孢子和分生孢子梗的大小。

1.2.2 病原菌致病性鉴定 用毛笔轻扫感病叶片表面的孢子及菌丝并收集起来,用无菌水配成 5×10^4 个/mL浓度的悬浮液,将其喷洒至5株健康的朝天委陵菜植株叶片部位,并以无菌水接种5株健康植株作为对照,将试验组植株与对照组植株分开培养,培养条件为温度25℃/20℃(白天/黑夜),湿度50%。健康植株发病后,将其症状和自然发病的症状相比较,且再次对该病原菌进行显微形态学观察。

1.2.3 病原菌分子系统学鉴定 1)白粉菌DNA的提取:参照庄彩云等^[3]的方法,提取朝天委陵菜白粉病病原菌DNA。从染有白粉菌的叶子上收集白粉菌孢子及菌丝,放入1.5 mL离心管中,于-20℃保存。取少量白粉菌(约100 μL)于离心管中,加入100 μL 2% CTAB提取液用组织研磨棒研磨(研磨时间一般为8~15 min),加5倍体积(约500 μL)的2% CTAB提取液,58℃水浴1 h(期间上下颠倒离心管若干次)后冷却至室温;加等体积(约600 μL)氯仿:异戊醇(24:1)混匀,4℃,10 000 r/min离心10 min;取上清,加1/10体积(约40 μL)的10% CTAB,震荡后加等体积(约440 μL)的氯仿:异戊醇(24:1),4℃,10 000 r/min离心10 min;取上清,加等体积(约400 μL)的异丙醇,震荡摇匀,于-20℃放置30 min;4℃,12 000 r/min离心10 min;取沉淀,加1 000 μL的70%酒精洗涤,4℃,12 000 r/min离心5 min,共洗3次,取沉淀,晾干(超净工作台上),加适量(25~30 μL)无菌ddH₂O,-20℃下保存备用。取5 μL DNA产物,1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像系统检测。2)PCR扩增ITS序列:使用宝生物工程(大连)有限公司合成的真菌核糖体ITS区段的通用引物ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3')、ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')^[4],PCR反应体系(共20 μL):模板DNA 2 μL、引物ITS1 1 μL、引物ITS4

1 μL、dNTP(各2.5 mmol/L) 1.6 μL、10×扩增buffer 2 μL、灭菌ddH₂O 11.9 μL、Taq酶0.5 μL。PCR反应程序为94℃预变性3 min、94℃变性45 s、52℃退火45 s、延伸72℃ 1 min共进行30个循环、最后72℃延伸10 min、4℃保存。将取出的PCR产物保存于冰箱-20℃。3)PCR产物的纯化:琼脂糖凝胶电泳检测后的PCR产物进行割胶,参照TaKaRa琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒说明书对其进行纯化。4)PCR扩增产物克隆与测序:将PCR扩增产物纯化后克隆至pMD18-T载体上,转化至*Escherichia coli* DH5α感受态细胞中,在100 mL LB固体培养基中加入100 μL浓度为0.1 g/mL的Amp(Ampicillin,氨苄青霉素),20 μL浓度为20 mg/mL的X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside,5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖),40 μL浓度为100 mmol/L的IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷),转化克隆,参照蓝白斑筛选的原理,挑取白色阳性菌落,培养至液体LB培养基中。将培养成功的菌株提取质粒,质粒PCR阳性菌落送南京金斯瑞生物技术有限公司测序。5)rDNA-ITS序列分析:搜索GenBank核酸序列数据库获得与朝天委陵菜白粉菌同源性高的ITS序列(含5.8S)区。选取商丘地区的*Podosphaera fusca* ITS序列及*Podosphaera*属其它种的一些序列进行比对。对获得的ITS序列用Clustal X程序进行对位排列,分析序列采用MEGA 3.1软件,选取基于Kimura-2-Parameter双参数模型,系统发生关系的推演依照邻近距离法(Neighborhood-Joining)构建系统进化树获得。检验系统进化树的可靠性采用bootstrap法,循环为1 000次。

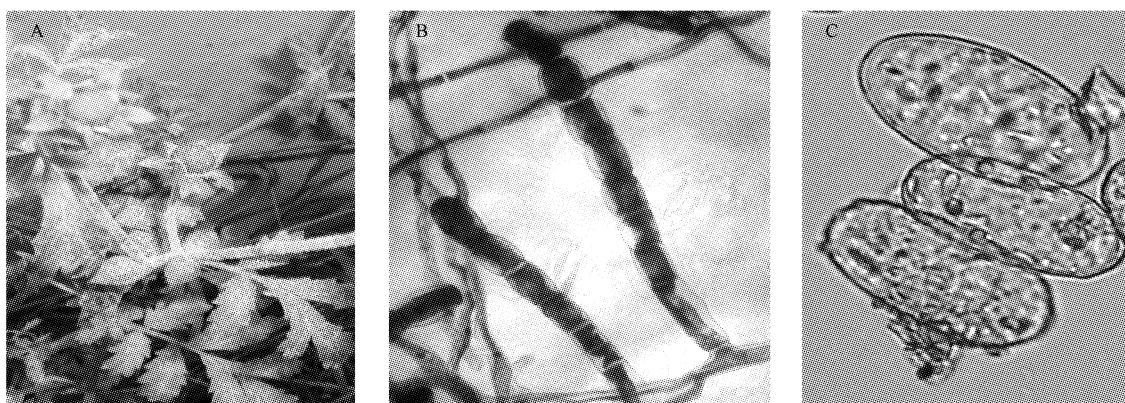
2 结果与分析

2.1 病原菌形态学鉴定

朝天委陵菜叶片两面均被该病原菌感染,且病原菌也生于植株叶柄、茎和花萼上,形成白色圆形的小斑点,慢慢扩大成斑片,最终覆盖于整个叶面(图1A)。镜检发现该白粉菌分生孢子梗直立、圆柱形、简单无分枝,大小为(90~180) μm×(10~17) μm,分生孢子形成在分生孢子梗上,串生,4~6个(图1B);分生孢子透明,椭圆形,有明显的纤维体,大小为(17~33) μm×(13~18) μm(图1C)。没有观察到病原菌的子囊壳。初步鉴定该白粉菌为棕丝单囊白粉菌(*Podosphaera fusca*)^[5]。

2.2 病原菌致病性鉴定

接种白粉菌10 d后,5株健康的朝天委陵菜叶片开始发病,与自然条件下发病植株叶片病症一致,而另5株对照植株则没有发病。挑取接种后发病叶片的病菌进行镜检,对比后发现其显微特征与自然状况下的病原菌相同。



注:A,自然发病叶片;B,朝天委陵菜白粉病原菌的分生孢子梗;C,分生孢子(比例尺=10 μm)。

Note:A,disease leaves in the natural state;B,the conidiophore of *Podosphaera fusca*;C,conidia of *Podosphaera fusca* (Scale bar=10 μm).

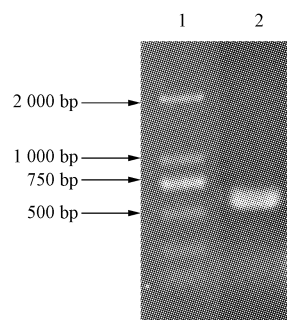
图1 朝天委陵菜白粉菌的病症与显微形态特征

Fig. 1 The macroscopic and microscopic morphology of *Podosphaera fusca* on *Potentilla supine*

2.3 病原菌分子系统学鉴定

白粉菌 DNA 的提取方法为改良的 CTAB 法,PCR 反应所用引物为真菌核糖体 ITS 区通用引物 ITS1 和 ITS4,扩增 rDNA 基因区 ITS 片段,电泳检测后得出 PCR 反应获得的目的片段为 600 bp 左右(图 2)。

获得的目的片段经测序得知序列长度为 563 bp。BLASTn 分析后发现 1~30、31~207、208~461、462~506、507~563 bp 分别为部分 18S rDNA 序列、ITS1 全序列、5.8S rDNA 全序列、ITS4 全序列、部分 28S rDNA 序列(图 3)。



注:1,DL 2 000 Marker;2,ITS 序列 PCR 扩增产物。

Note:1,DL 2 000 Marker;2,PCR product of ITS regions.

图2 朝天委陵菜白粉病原菌 ITS 的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of the *Podosphaera fusca* ITS regions

```

1  tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta CTGAGCGCGA GGCCCCGCG CGCGCAAGCG
61 CTGCGGCGGT TGACCCTCCA CCCGTGTGAA CTCTTATCTG TTGCTTTGGC GGGCCGGGCT
121 CGACCTGCCG GCTCCGGCTG GCGAGTGCCC GTCAGAGAAG CCCCAACTCG TGCTGTGAGT
181 GTTGTCTGAG GAAATGTGGA ATTAGTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGCTCTGGCA
241 TCGATGAAGA ACGCAGCGAA AIGCGATAAG TAAITGTAAT TGCAGAATTT AGTGAATCAT
301 CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCGG GCATTCCGAG GGGCATGCCT GTTCGAGCGT
361 CAGAACACCC CTCAAGCCTG GCTTGGTCTT GGGGCTCGCC GGCTCGGCGG CCCCTAAACG
421 CAGTGGCGGT GCTGTTGTGC TCTCCGCGTA GTCATGTATC TCGCGACAGA GCGGTGACGG
481 CACCCGCCAG AACCCAGTC TTTGGATgac cteggatcag gtagggatac ccgctgaact
541 taagcatatc aataagcgga gga
  
```

注:阴影部分为 5.8S rDNA 全序列。

Note: The shaded part is 5.8S rDNA sequence.

图3 朝天委陵菜白粉菌 ITS 核酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence structure of the *Podosphaera fusca* ITS regions

经 BLASTn 分析朝天委陵菜白粉菌序列,于 GenBank 中搜寻到 *Podosphaera* 属不同种的 3 条高度同源的 ITS 序列,利用 MEGA 3.1 软件做邻近距离法(N-J)分析,进化枝经 Bootstrap 重复 1 000 次测试>77%的支持强度(图 4)。由病原菌 N-J 系统进化树可知,商丘地区朝天委陵菜白粉菌分离种 SQ1 的 ITS 序列与来自蔷薇科寄

主佩兰(*Herb eupatorii*)的 *Podosphaera fusca* (GenBank 登录号 JX548297)聚为一支,自展支持率达到 98%,亲缘关系十分近;与另外 3 条 *Podosphaera hibiscicola*、*Podosphaera phaseoli* 和 *Podosphaera balsaminae* 的 ITS 序列亲缘关系较远。因此,进一步说明河南商丘地区的朝天委陵菜白粉病原菌为 *Podosphaera fusca*。



图4 根据 ITS 序列构建的病原菌 N-J 系统进化树

Fig. 4 Neighbor-joining consensus tree of *Podosphaera fusca* based on ITS regions

3 结论与讨论

朝天委陵菜乙酸乙酯萃取物能明显提高肝糖原的含量,从而降低血糖^[6]。朝天委陵菜乙醇提取物具有明显的抗肝损伤作用^[7]。且朝天委陵菜为早春品质上乘的野菜,我国人民食用已久。该研究对于朝天委陵菜白粉菌的防治具有一定的理论意义。

郑儒永等^[1]研究认为,棕丝单囊白粉菌主要寄生于菊科(Asteraceae)植物上,如:三叶鬼针草、牛蒡、金盏菊、向日葵、蒲公英等。前期研究表明棕丝单囊白粉菌还可寄生于蔷薇科植物佩兰(*Herb eupatorii*)上^[8],而该研究首次报道了棕丝单囊白粉菌于蔷薇科植物朝天委陵菜的寄生。

真菌核糖体 rDNA ITS 序列因其种间变异丰富,种内保守性较高,受外界环境条件影响小^[8-10],故该方法能快速、高效地鉴别真菌种类。该研究中对朝天委陵菜白

粉菌 ITS 序列鉴定的结果与传统形态学、致病性鉴定结果一致,进一步验证了 ITS 序列分子系统鉴定的准确性。

参考文献

- [1] 郑儒永,余永年. 中国真菌志-白粉菌目[M]. 北京:科学出版社,1987:325.
- [2] HUANG C C, GROOT T, MEIJER-DEKENS F, et al. The resistance to powdery mildew(*Oidium Lycopersici*) in *Lycopersicon species* is mainly associated with hypersensitive responses[J]. European Journal of Plant Pathology, 1998, 104:399-407.
- [3] 庄彩云,李潞滨,胡陶,等. 适用于 rDNA ITS 分析的兰属菌根真菌培养及 DNA 提取方法[J]. 北京农学院学报, 2007, 22(3):4-6.
- [4] WANG X Z, XU B Y, WANG P, et al. Identification of powdery mildew pathogen and ribosomal DNA-ITS sequence analysis on melon[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013(4):10-18.
- [5] BRAUN U, TAKAMATSU S. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences; some taxonomic consequences[J]. Schlechtendalia, 2000(4):1-33.
- [6] 郑光海,朴惠顺. 朝天委陵菜乙酸乙酯萃取物对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的降糖作用研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(4):416-417.
- [7] 郑光海,朴惠顺. 朝天委陵菜乙醇提取物对 CCl₄ 致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3):311-312.
- [8] DING J P, PEI D L, ZHANG Q C, et al. First report of powdery mildew caused by *Podosphaera fusca* on *Herba eupatorii* in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(7):95.
- [9] 王文静,裴冬丽,马原松,等. 商丘地区番茄白粉菌的鉴定[J]. 河南大学学报, 2009, 39(5):505-508.
- [10] 马原松,裴冬丽,王文静,等. 河南省几种白粉菌的 ITS 序列分析[J]. 河南农业科学, 2012, 41(9):87-90.

Identification of Powdery Mildew of *Potentilla supine*

PEI Dongli¹, LIU Xiaofei², CHEN Ke²

(1. Key Laboratory of Plant-microbe Interactions, Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000; 2. Shangqiu First Senior High School, Shangqiu, Henan 476000)

Abstract: Taking infected leaves of *Potentilla supine* as material, using etiological and molecular systematic identification methods, the phylogenetic evolution relationship of powdery mildew on *Potentilla supine* was studied in Shangqiu, Henan of China. The results showed that conidiophores of pathogenic fungi were cylindrical, vertical, simple and unbranched, measuring (90—180) $\mu\text{m} \times (10—17) \mu\text{m}$; conidia revealed hyaline, ellipsoid, possessing conspicuous fibrosin bodies measuring (17—33) $\mu\text{m} \times (13—18) \mu\text{m}$, and 4—6 conidia formed in chains; pathogenicity of inoculated leaves had no difference with leaves in natural state, symptoms began as white mycelium partially covering upper leaf surfaces; as the disease progressed, it spread to cover entire leaf surfaces; internal transcribed spacer (ITS) sequence of its ribosomal DNA was amplified by PCR and sequenced to obtain the 563 bp target fragment (GenBank accession No. KR049083). Sequence analysis by MEGA 3.1 software revealed that ITS sequence and one sequence from *Herb eupatorii*, *Podosphaera fusca* (GenBank accession No. JX548297) gathered together, distantly related to the ITS sequence of other four species in the same genus. The research showed that powdery mildew pathogen of *Potentilla supina* in Shangqiu was *Podosphaera fusca*.

Keywords: *Potentilla supina*; powdery mildew; ITS sequences; molecular systematics identification