

# 草本药用植物猪殃殃白粉菌分子生物学鉴定

裴冬丽<sup>1</sup>, 朱晓琴<sup>1</sup>, 王书楠<sup>1</sup>, 王玉景<sup>1</sup>, 李成伟<sup>2</sup>

(1. 商丘师范学院 生物与食品学院, 植物与微生物互作河南省高校重点实验室, 河南 商丘 476000;

2. 河南科技学院 生命技术学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:**以河南商丘地区草本药用植物猪殃殃白粉菌为试材, 采用分子系统学方法研究了其形态学、致病性鉴定、分子生物学鉴定及其系统进化关系, 以期为白粉病的防治提供理论依据。结果表明: 猪殃殃白粉菌着生于叶的两面及茎上, 随着病原菌的发展, 蔓延至覆盖整个叶子表面。显微分析结果表明, 病原菌分生孢子梗直立,  $(100 \sim 260) \mu\text{m} \times (10 \sim 12) \mu\text{m}$ , 产生 2~3 个未成熟的分生孢子。足细胞  $(28 \sim 65) \mu\text{m} \times (9 \sim 11) \mu\text{m}$ , 紧邻着 2~3 个短细胞。分生孢子桶-柱形,  $(22 \sim 42) \mu\text{m} \times (15 \sim 20) \mu\text{m}$ 。对其核糖体 DNA 内转录间隔区 (ITS) 序列进行 PCR 扩增, 测序获得 632 bp 序列, GenBank 登陆号为 KX396590。经 MEGA 5.0 软件分析, 其与奥隆特高氏白粉菌 *Golovinomyces orontii* ITS 序列 AB430813 序列聚为一枝, 而来自其它属种白粉菌的 5 条 ITS 序列亲缘关系较远。河南商丘地区的猪殃殃白粉菌为奥隆特高氏白粉菌 *G. orontii*。

**关键词:**猪殃殃; 白粉菌; ITS 序列; 形态学鉴定; 致病性鉴定; 分子系统学

**中图分类号:**S 432.44 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)09-0149-04

猪殃殃 (*Galium aparine*) 属茜草科 (Rubiaceae) 拉拉藤属 (*Galium*) 草本植物<sup>[1]</sup>, 其嫩苗可食用, 茎和叶干后可用于制作香料或调味品。全草均可入药, 入药有利尿解毒、凉血消肿、消炎降火等功效, 还可用于治疗物理创伤、止痛、中耳炎、疖肿等。猪殃殃感染白粉菌后最初生于叶的两面, 随着病菌的不断发展, 白粉菌蔓延至覆盖整个叶子表面。《中国真菌志》有记录俄国猪殃殃 *Galium ruthenicum* 白粉菌为 *Erysiphe galii*<sup>[2]</sup>, 而鲜见有关猪殃殃 *G. aparine* 的报道。该研究主要

从形态学、致病性及分子生物学 3 个方面对河南省商丘地区猪殃殃白粉菌进行鉴定, 并进一步分析该病原菌的系统进化, 以期为防治猪殃殃白粉菌提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试染有白粉菌的猪殃殃叶片, 于 2015 年 4 月在商丘师范学院文化路校区苗圃内收集。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 病原菌形态学鉴定

对染有白粉病的猪殃殃叶片进行固定、染色、漂洗、脱色处理。将感染白粉菌的猪殃殃叶片 (整片), 用卡诺固定液脱去叶绿素 (10 h); 染色采用 0.3% 台盼蓝溶液, 在室温下放置一夜; 再将过夜放置的叶片用无菌水清洗 3~4 次; 接着分别用浓度为 30%、50% 和 70% 的酒精脱色。制片, 显微镜检, 测量分生孢子及孢子梗的大小。

**第一作者简介:**裴冬丽 (1971-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物抗病分子生物学教学与科研等工作。E-mail: peidongli@126.com.

**责任作者:**李成伟 (1972-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物分子遗传学等研究工作。E-mail: lichengweiwau@hotmail.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 (15A180019, 15A210045)。

**收稿日期:**2017-12-27

### 1.2.2 病原菌致病性鉴定

参照王建设等<sup>[3]</sup>的方法,采摘感染白粉菌的猪殃殃叶片,并收集白粉菌,与蒸馏水混合均匀制成菌液,每毫升含大约5万个菌体,均匀喷洒在5株正常猪殃殃植株的叶片表面,再用蒸馏水喷洒至另5株正常植株叶片上作为对照,使二者的培养和生长条件相同且相互不影响。培养一段时间,待试验组植株患白粉病长出菌斑后,观察植株症状及白粉病病原菌显微形态,并与自然条件下患病植株及病原菌进行对比。

### 1.2.3 病原菌分子生物学鉴定

采用庄彩云等<sup>[4]</sup>方法,提取猪殃殃白粉病病原菌DNA。引物ITS1(5'TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG3')、ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')是由生物工程公司合成的真菌核糖体ITS区段的通用引物<sup>[5]</sup>。PCR反应体系20  $\mu$ L:2  $\mu$ L模板DNA、1  $\mu$ L ITS1引物、1  $\mu$ L ITS4引物、2  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer、1.6  $\mu$ L 2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTP、0.5  $\mu$ L Taq 酶(Mg<sup>2+</sup>)、11.9  $\mu$ L 灭菌 ddH<sub>2</sub>O。PCR扩增过程,先94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,52 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环35次;72 $^{\circ}$ C 10 min。将PCR扩增产物保存在-20 $^{\circ}$ C下待用。取PCR扩增产物跑1%琼脂糖凝胶电泳,电泳后用EB染色,凝胶成像系统检测后,然后将目的产物割胶,并按照DNA凝胶纯化试剂盒步骤对凝胶中的PCR产物纯化收集。将纯化后的PCR产物与

pMD18-T载体连接,将携带目的基因的载体转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中。用蓝白斑筛选的原理,以涂布法在100 mL LB固体培养基(加入100  $\mu$ L 0.1 g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Amp, 20  $\mu$ L 20 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> X-gal, 40  $\mu$ L 100 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> IPTG)上进行培养克隆,待培养基中长出蓝白斑落,选出合适的白色菌落送到生物技术公司做正反双向测序。

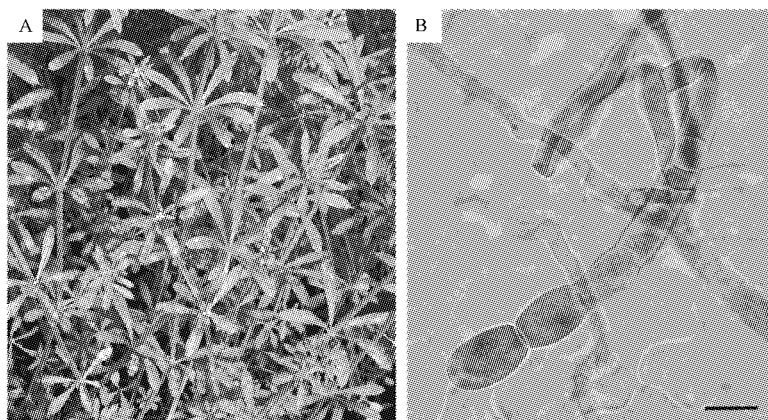
### 1.2.4 病原菌系统进化分析

NCBI的GenBank核酸序列数据库中BLAST获取与猪殃殃白粉菌同源性较高的ITS序列(含5.8 S)。将商丘地区猪殃殃ITS序列与其它序列进行比对,用MEGA 5.0软件进行对位排列和分析,并对序列做邻近距离法(N-J)分析构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌形态学鉴定

猪殃殃白粉菌初生于叶的两面,亦生茎上及果上,随着病菌的生长,菌体面积逐渐扩大并布满整个叶子表面(图1A);显微分析结果表明,分生孢子梗,(100~260) $\mu$ m $\times$ (10~12) $\mu$ m,产生2~3个未成熟的分生孢子。足细胞(28~65) $\mu$ m $\times$ (9~11) $\mu$ m,紧邻着2~3个短细胞。分生孢子桶-柱形,(22~42) $\mu$ m $\times$ (15~20) $\mu$ m。



注:A.自然发病叶片;B.猪殃殃白粉菌的分生孢子梗;C.猪殃殃白粉菌的分生孢子。比例尺=10  $\mu$ m。

Note: A. Disease leaves in the natural state; B. The conidiophore of *G. orontii* on *G. aparine*; C. The conidia of *G. orontii* on *G. aparine*. Scale bar=10  $\mu$ m.

图1 猪殃殃白粉菌叶片病症及显微形态学特征

Fig. 1 Plant symptoms and microscopic morphology of *G. orontii* on *G. aparine*

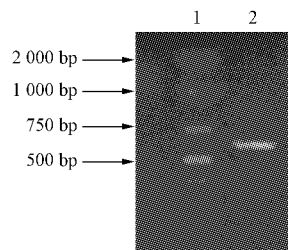
## 2.2 病原菌致病性鉴定

试验组植株喷洒白粉菌悬浮液 15 d 后,植株叶片上开始生长白粉菌斑,其发病特征与在自然环境中感染白粉菌的特征相同,而喷洒蒸馏水的对照植株未发病。挑取试验组植株叶片上接种的白粉菌制成装片并进行显微镜检,观察后发现其显微形态学特征与外界环境中自然生长的病原菌的一致。

## 2.3 病原菌分子生物学鉴定

猪殃殃基因组 ITS 序列 PCR 扩增产物经过凝胶电泳,EB 染色,在凝胶成像系统下观察见图 2。对照 2 000 Marker 可知 PCR 扩增得到的基因片段长度大约 600 bp。经生物公司测序得到 rDNA 基因片段序列,含有 632 个碱基对。在 BLASTn 中分析可知,1~53 bp 为 18S rDNA 序

列,54~240 bp 为 ITS1 全序列,241~394 bp 为 5.8S rDNA 全序列,395~559 bp 为 ITS2 全序列,560~632 bp 为部分 28S rDNA 序列(图 3)。该菌株命名为 Shangqiu ZYY1。



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 猪殃殃白粉病病原菌 ITS 的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of the *G. orontii* ITS regions

1	cttggcalt	tagaggaagt	aaaagtcgta	aCAAGGTTTC	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG
61	GATCATTACA	GAGCGTGAGA	CTCGGCCCGG	GCGTGTCCCG	CGTGTGAGT	CGACCCCTCCA
121	CCCGTGTGTA	CTTTATCTGT	TGCTTTGGCG	GGCCAGGTGC	CTGGCGCCGA	CCGGCTTCGT
181	GCTGGCTCGT	GTCGCGCAAA	GACCCAACCT	AACTCGTGTT	GTCGTGTAGT	CTGAGGAAGA
241	AATATTGAAT	TGTTAAACT	TTCAACAACG	GATCTCTGG	CTCTGGCATC	GATGAAGAAC
301	GCAGCGAAAT	GCGATAAGTA	ATGTGAATTG	CAGAATTAG	TGAATCATCG	AATCTTTGAA
361	CGCACATTGC	GCCCCTTGGT	ATTCGAGGG	GCATGCCTGT	TCGAGCGTCG	TCACACCCCC
421	TCAAGCCGCG	CCGTGTGTGT	GGCTTGGTGT	TGGGGCTCGT	CCGTCGGGCG	GCCCTTAAAG
481	ACAGTGGCGG	TGCCGTTGTG	GTCTCTACGC	GTAGTACGAT	TCTCGCGACA	GAGCGGCAGC
541	GGCGGCTTGC	CAATCAATCC	TTTCTTTTAA	AAGGTTGACC	TCGAATCAGG	TAGGGATGCC
601	CGCTGAACCT	AAgcataatca	ataagcggag	ga		

图 3 猪殃殃白粉菌 ITS 序列结构

Fig. 3 Nucleotide sequence structure of the *G. orontii* ITS regions

## 2.4 病原菌系统进化树构建

将猪殃殃白粉菌 ITS 序列与其它不同属种白粉菌的 6 条 ITS 序列进行比对,利用 MEGA 5.0 软件对 7 条序列分析并做邻近距离法(N-J)分析得出进化树(图 4),由 N-J 系统进化树可知,猪殃殃白粉菌与来自奥隆特高氏白粉菌 *G. orontii* 的 AB430813 聚为一枝,自展支持率达到 99%,亲缘关系十分近;与 5 条来自 *Erysiphe cichoracearum*、*E. cichoracearum*、*G. fischeri*、*E. reginae* 和 *G. sonchicola* 的 ITS 序列亲缘关系较远,表明该病原菌为 *G. orontii*。

## 3 讨论

猪殃殃全草均可入药,在全国大部分地区有分布<sup>[6]</sup>。时国庆等<sup>[7]</sup>分析猪殃殃的提取物,发现



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 *G. orontii* based on ITS regions

其含有潜在的抗癌活性成分,具有开发新型抗肿瘤药物的潜能。有报道称猪殃殃中的 1,3-二羟基蒽醌具有使斜纹夜蛾抗拒进食的活性<sup>[8-9]</sup>,可见猪殃殃还可作为生物防治农药添加剂。

白粉菌种类较多,中国真菌志白粉菌目报道中国白粉病有 56 个种和 5 个变种,寄生于 33 科 108 属 237 种上<sup>[2]</sup>,而现在越来越多的对白粉病菌的鉴定研究扩展了白粉菌的种类及其寄主范围。对病原真菌进行鉴定时,由于分子生物学方法的诸多优点和可靠性,已广泛应用该方法对真菌进行种间鉴别及种内分类<sup>[10]</sup>。对于白粉菌的分类及鉴定,该方法同样适用。除此之外,GenBank 等数据库中的大量生物学信息可为物种鉴定的提供辅助资料,使真菌分类更加准确、有效。

#### 参考文献

- [1] 彭学岗,王金信,段敏,等. 中国北方部分冬麦区猪殃殃对苯磺隆的抗性水平[J]. 植物保护学报,2008,35(5):459-462.
- [2] 郑儒永,余永年. 中国真菌志-白粉菌目[M]. 北京:科学出版社,1987.
- [3] 王建设,陈杭. 甜瓜抗白粉病鉴定[J]. 华北农学报,2000,15(1):125-128.
- [4] 庄彩云,李璐滨,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.
- [5] WANG X Z, XUB 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(2):10-18.
- [6] 赵思佳,杨柳,高昂,等. 猪殃殃属药学研究概况[J]. 安徽农业科学,2011,39(31):19086-19087.
- [7] 时国庆,赵文恩,王永胜. 猪殃殃提取物不同极性部位抗白血病活性比较[J]. 安徽农业科学,2011,39(20):67-89.
- [8] 骆传启,吴照喜. 竹叶柴胡与猪殃殃的鉴别[J]. 时珍国医国药,2004,15(11):767.
- [9] 蔡小梅,王道平,杨娟. 猪殃殃挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(22):1031-1035.
- [10] 蒋盛岩,张志光. 真菌的分子生物学鉴定方法研究进展[J]. 生物学通报,2002,37(10):4-6.

## Molecular Identification of Powdery Mildew of Medicinal Herb *Galium aparine*

PEI Dongli<sup>1</sup>, ZHU Xiaoqin<sup>1</sup>, WANG Shunan<sup>1</sup>, WANG Yujing<sup>1</sup>, LI Chengwei<sup>2</sup>

(1. School of Biology and Food Sciences, Shangqiu Normal University/Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions, Shangqiu, Henan 476000; 2. School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

**Abstract:** *Galium aparine* powdery mildew detected in Shangqiu of Henan was used as experiment material, morphological, etiological and molecular systematic identification, and phylogenetic evolution relationship of the powdery mildew were identified by molecular systematics methods, in order to provide a theoretical basis for its prevention and treatment. The results showed that the powdery mildew was grown on two sides of leaves and stems, then covering the whole leaf surface with the pathogen progress. The conidiophores were erected,  $(100 - 260) \mu\text{m} \times (10 - 12) \mu\text{m}$ , with 2 - 3 immature spores. The foot cells were  $(28 - 65) \mu\text{m} \times (9 - 11) \mu\text{m}$ , next to 2 - 3 short cells. The spores were cylindrical,  $(22 - 42) \mu\text{m} \times (15 - 20) \mu\text{m}$ . Internal transcribed spacer (ITS) sequence of the pathogen ribosomal DNA was amplified by PCR and sequenced to obtain the 632 bp with the GenBank accession number KX396590 and sequence analysis by MEGA 5.0 software revealed this ITS sequence and one sequence of *Golovinomyces orontii* (GenBank accession number AB430813) were gathered together, distantly related to the ITS sequence of other five species in the same genus. The results showed that pathogen of *G. aparine* powdery mildew in Shangqiu was *G. orontii*.

**Keywords:** *Galium aparine*; powdery mildew; ITS sequences; morphological identification; etiological identification; molecular systematics