

丁锦平,张庆琛,裴冬丽,等. 枸杞白粉病的病原菌鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):137-139.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.045

枸杞白粉病的病原菌鉴定

丁锦平¹, 张庆琛¹, 裴冬丽¹, 李建涛¹, 李成伟²

(1. 商丘师范学院生命科学院植物与微生物互作重点实验室,河南商丘 476000; 2. 周口师范学院,河南周口 466000)

摘要:为了鉴定河南省商丘地区感染枸杞的白粉菌,采用形态学鉴定、致病性鉴定、分子生物学鉴定方法对该地区感染枸杞的白粉菌病原菌及系统进化关系进行研究。结果表明,分生孢子梗直立,大小为 $(82 \sim 172) \mu\text{m} \times (10 \sim 25) \mu\text{m}$,分生孢子串生,呈圆柱形、长椭圆形,大小为 $(20 \sim 36) \mu\text{m} \times (10 \sim 18) \mu\text{m}$,附着胞呈乳头形;病原菌接种叶片病症与自然状态一致,形成薄而边缘不明显的白色斑片;对其核糖体 DNA 内转录间隔区(ITS)序列进行 PCR 扩增、测序获得 594 bp 序列(GenBank 登录号:JX546296.1),经 BLAST 比对分析发现,该序列与 ITS 序列同源性 100%;用 MEGA5.1 软件分析其与来自穆氏节丝壳(*Arthrocladiella mougeotii*)的 AB022380.1、AF455748.1、AB329690.1、AF073358.1 白粉菌的系统关系,结果表明,河南省商丘地区感染枸杞的白粉菌为穆氏节丝壳。

关键词:枸杞;白粉菌;形态学;致病性;鉴定;ITS 序列

中图分类号: S432.4⁺4;S435.671 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0137-02

枸杞(*Lycium chinense*)是茄科植物中的名贵药材和滋补品^[1]。枸杞白粉病主要危害叶片,使得叶面覆满白色霉斑(初期)、粉斑(稍后),严重时枸杞植株外呈一片白色,病株光合作用受阻,最终致使叶片逐渐变黄、易脱落。感染枸杞的白粉病分布在国外许多区域^[2-4],本研究首次报道了枸杞白粉菌在河南省商丘地区的发生,并对其进行了致病特异性分析、形态学及分子生物学鉴定。试验采用真菌核糖体 ITS 通用引物 ITS1、ITS4 成功克隆了枸杞白粉菌 rDNA 的 ITS 区段,并对其序列测定,通过与 GenBank 中报道的 ITS 序列进行比较分析,对枸杞白粉菌进行系统研究与鉴定,以期为进一步的枸杞白粉菌系统进化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料为 2013 年 7 月取自商丘师范学院校园的野生枸杞感染叶片。

1.2 病原菌形态学鉴定

对感染植株的菌斑采用台盼蓝染色的方法^[5]进行表型观察。将感染叶片沿着主脉剪成 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$ 块状,浸没于固定液 $V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{冰乙酸}}=3:1$ 中脱去叶色;将叶片组织转入 0.3% 台盼蓝溶液中,于常温过夜染色;用 2.5 g/mL 水合三氯乙醛脱色后再用蒸馏水冲洗数次,制成装片镜检。

1.3 病原菌致病性鉴定

收集病叶表面孢子于无菌水中,配成 5 万个/mL 的分生

孢子悬浮液,采用喷雾法再接种至健康的枸杞植株上,并使用无菌水接种健康植株作对照。接种发病后,与自然状态发病的症状进行比较,并再次收集接种植株叶片病菌,进行显微形态学鉴定,比较与自然发病病原菌的异同。

1.4 病原菌分子生物学鉴定

参照庄彩云等的方法^[6]提取枸杞叶片上白粉菌 DNA。采用真菌核糖体 ITS 区段通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3')^[7]进行 PCR 扩增。20 μL PCR 反应体系:2 μL 10 \times PCR Buffer、1.6 μL dNTP(2.5 mmol/L)、各 0.6 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物[生工生物工程(上海)有限公司合成]、0.2 μL Taq 聚合酶(5 U/ μL)、14 μL ddH₂O、1 μL 模板。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g/L}$ EB)电泳检测。

参照 TaKaRa 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒说明书纯化 PCR 产物,克隆至 pMD18-T 载体上,再转化至 DH5 α 中,经蓝白斑筛选、质粒 PCR 检测,将获得的阳性株送南京金斯瑞生物科技有限公司进行正反双向测序。

在 GenBank 核酸序列数据库中搜寻、下载与枸杞白粉菌目的序列高度同源的 ITS 序列,利用 Clustal X 软件进行全序列匹配,用 MEGA5.1 软件选择基于 Kimura-2-Parameter 双参数模型,用邻接连接法(Neighborhood-Joining, N-J)构建系统进化树并分析亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态学鉴定

该病原菌感染枸杞叶 2 面,形成薄而边缘不明显的白色斑片(图 1-A)。显微镜观察发现,分生孢子梗直立,大小为 $(82 \sim 172) \mu\text{m} \times (17 \sim 25) \mu\text{m}$,包含 1 个足细胞(图 2-A),2~3 个短细胞;分生孢子串生,圆柱形、长椭圆形,大小为 $(20 \sim 36) \mu\text{m} \times (10 \sim 18) \mu\text{m}$ (图 2-C);孢子单边萌发芽管

收稿日期:2014-11-06

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:142102110174);河南省科技厅基础与前沿项目(编号:142300410321);河南省教育厅科学技术重点研究项目(编号:14B210038)。

作者简介:丁锦平(1976—),女,河南新乡人,博士,副教授,主要从事植物与病原菌互作研究。E-mail:jinpding@163.com。

通信作者:李成伟,博士,教授,主要从事植物与病原菌互作研究。E-mail:lichengweiwau@hotmail.com。

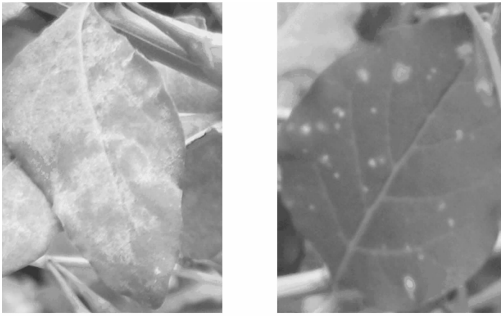
(图 2 - B);没有观察到病原菌的子囊壳。初步鉴定该白粉菌为穆氏节丝壳(*Arthrocladiella mougeotii*)。

2.2 病原菌致病性鉴定

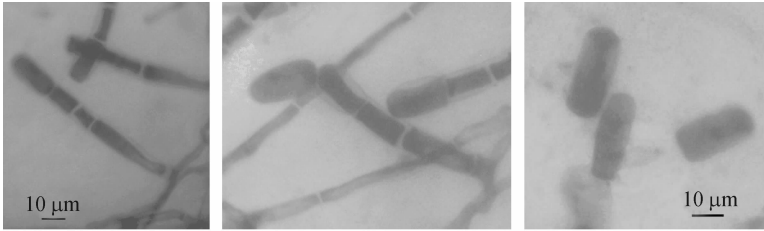
接种白粉菌 10 d 后,健康枸杞叶片开始发病(图 1 - B);18 d 后观察发现其与自然状态叶片病症一致,而对照无病症。镜检再接种叶片的病菌,证实接种病菌显微形态学特征与原病原菌相同。结果进一步表明,该病原菌为穆氏节丝壳。

2.3 病原菌分子系统学鉴定

扩增真菌核糖体 ITS 区段,获得 594 bp 的目的片段(图 3)。通过测序和 BLASTn 分析,发现该病原菌 rDNA ITS 序列长度为 594 bp,其中 1 ~ 31 bp 为部分 18S rDNA 序列,32 ~



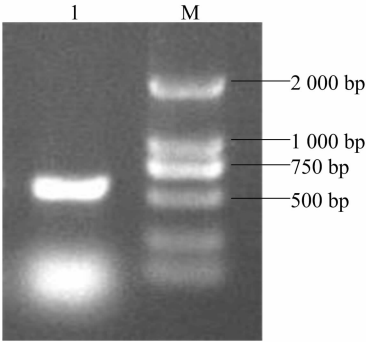
A. 自然发病叶片 B. 接种 10 d 发病叶片
图1 枸杞白粉菌感染的植株叶片



A.分生孢子梗 B.萌发出芽管的分生孢子 C.成熟脱落的分生孢子
图2 枸杞白粉菌的显微形态结构

219 bp 为 ITS1 全序列,220 ~ 373 bp 为 5.8S rDNA 全序列,374 ~ 535 bp 为 ITS2 全序列,535 ~ 594 bp 为部分 28S rDNA 序列(图 4)。该序列在 GenBank 中的登录号为 JX546296.1。

将枸杞白粉菌 JX546296.1 序列进行 BLASTn 分析,选取 4 条高度同源的 ITS 序列与河南省商丘地区采集的 3 个白粉病菌,并利用 MEGA5.1 软件作邻近接连法(N-J)分析,进化枝经 Bootstrap 重复 1 000 次测试,达到 100% 的支持强度(图 5)。由病原菌 N-J 系统进化树可知,相同穆氏节丝壳属种序列分别聚为一支;JQ010848(续断菊)与来自车前寄主 JQ845878.1 聚为一支,自展支持率达到 100%,亲缘关系十分近;凤仙花白粉菌亲缘关系较远。结果表明,来自商丘地区的枸杞白粉菌为穆氏节丝壳。



1—ITS 序列 PCR 产物; M—DL2000
图3 枸杞白粉菌核糖体 ITS 区段的 PCR 扩增结果

1 TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGCGTGAGACTCTGCCCGGGCGTCCCCGCGCGCAGAGTCGACCCCTCCACCCGT
89 GTTGACTTATCTCGTGTGCTTTTGCGGGGCGGGCTTCGCGTCCGCCGCCCTGCGGCTGGAGCGTGTCCGCCAAGACCCAACCTAA
177 CTCGTGGTATCGTGTGCTGAGGAAGAATATTGAATCATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA
264 CGCAGCGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGCATTCCG
351 AGGGGCGATGCCTGTTCGAGCGTCGTCACTCCCTCACGCCGACCCGTGTGTGTGGCGTGGTGTGGGGCTCGCCTGTTCGGCGGCC
439 TTAATAACGAGTGGCGGTGCGCTGCGTGGACTCTACGCGTAGTACTTTTCTCGCGACAGGGCGGCGCGGTGACTGGCCAGCAAGTCCA
527 TTTTCTCGGAAGACCTCGAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

图4 枸杞白粉菌ITS核酸序列 (JX546296.1)

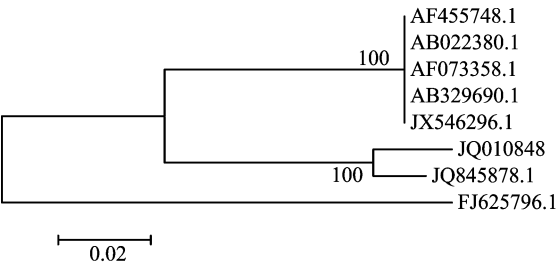


图5 依据 ITS 序列构建的病原菌 N-J 系统进化树

3 结论与讨论

穆氏节丝壳白粉菌属白粉菌目(Erysiphales)白粉菌科

(Erysiphaceae)节丝壳属(*Arthrocladiella*),寄生于茄科枸杞属植物上^[2,8]。已有的感染白粉菌枸杞的报道来自日本、朝鲜、澳大利亚^[2]等国外许多区域,并且病原菌都为穆氏节丝壳。本研究报道了枸杞白粉菌在中国河南省商丘地区野生枸杞种上的发生,形态学鉴定发现,该病原菌分生孢子梗直立、圆柱形、简单无分枝、大小为(82 ~ 172) μm × (17 ~ 25) μm,,分生孢子串生、圆柱形、无明显纤维体、大小为(20 ~ 36) μm × (10 ~ 18) μm,分生孢子的端头萌发出长而无分枝的芽管,附着胞呈乳头形,该病原菌为穆氏节丝壳,这与国外报道一致^[2-4]。利用 ITS 序列等分子系统学鉴定进一步确定了该病原菌为穆氏节丝壳,本研究报道的枸杞是河南省商丘地区穆氏节丝壳寄主的新记录种,为进一步探讨枸杞白粉菌系统进

李云,季蒙,孙旭,等. 9 个种源兴安落叶松一年生实生苗生长规律[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):139-142.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.046

9 个种源兴安落叶松一年生实生苗生长规律

李云¹,季蒙²,孙旭¹,范菁芳¹,王志波²,贾洪远³,张桂兰⁴

(1. 内蒙古农业大学,内蒙古呼和浩特 010019; 2. 内蒙古林业科学研究院,内蒙古呼和浩特 010010;

3. 内蒙古扎兰屯市林业局,内蒙古扎兰屯 162650; 4. 内蒙古察右后旗林业局园林管理所,内蒙古察右后旗 012400)

摘要:为了指导兴安落叶松培育良种壮苗及合理引种,利用有序样本聚类分析法对 9 个种源兴安落叶松一年生播种苗苗高进行生长时期的划分,并对各种源苗高和地径进行 Logistic 拟合。结果表明:9 个种源兴安落叶松一年生播种苗苗高和地径年生长用 Logistic 方程可以很好拟合,各种源苗高拟合的相关系数均达到 0.99 以上,地径拟合的相关系数均在 0.95 以上。利用有序样本聚类分析方法划分苗高的生长阶段显示各种源生长盛期起始时间和持续时间各不相同。阿里河种源兴安落叶松进入生长盛期最早,生长盛期持续时间也最长,盛期生长量占年总生长量的 87.02%;阿木尔、呼中、莫尔道嘎的生长初期较长,生长盛期少于 60 d,盛期生长量占年总生长量的比值小于 60%。由 Logistic 方程划分的苗高生长盛期与用有序样本聚类法划分的生长盛期基本一致,苗高生长盛期主要在 7 月上旬到 9 月中旬,连日生长量最大的时间出现在 7 月底到 8 月中旬。由 Logistic 方程划分的各种源地径生长盛期起始时间及生长盛期持续时间差异很大,其中阿木尔种源地径生长盛期起始最早,持续期长达 110 d;嫩江和阿里河种源地径生长盛期起始晚,持续期也最短,生长盛期还不足 50 d。地径连日生长量最大的时间除克一河种源出现在 7 月底外,其他种源比较一致,都在 8 月中上旬。

关键词:兴安落叶松;苗高;地径;有序样本聚类分析;生长时期;Logistic 拟合

中图分类号: S791.222.05 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0139-04

兴安落叶松(*Larix gmelinii* Rupr.)是松科落叶松属的高大乔木,是大兴安岭地带性植被的主要组成树种,耐寒、喜光、抗性强、易更新^[1],也是我国东北主要造林树种之一^[2],在我国用材树种中占据重要地位,是我国经济建设所需木材的主

要来源^[3]。目前,我国对兴安落叶松的生长规律研究主要是利用解析木的数据通过方程拟合来研究树高、胸径、材积与年龄间的关系^[4-9]以及利用树高、胸径来推测材积生长^[10],但只是定性划分了一年生苗木的苗高生长时期^[11]。掌握幼苗的生长节律,确定其生长盛期及生长速度可以更好地培育、管理苗木,提高其经济、生态价值^[12]。目前,扎兰屯地区兴安落叶松人工造林面积不断扩大,播种育苗量迅速增加,种子来源范围较广,因此对不同种源兴安落叶松幼苗生长规律进行研究,探讨其生长规律具有重要意义。

采用有序样本聚类分析法对一年生苗木生长时期进行定

收稿日期:2014-07-04

基金项目:林业公益性行业科研专项(编号:201104101)

作者简介:李云(1988—),女,陕西柞水人,硕士研究生,从事水土保持与荒漠化防治研究。E-mail:15947039347@163.com。

通信作者:季蒙,高级工程师,从事树木引种、育种及林业生态规划研究。E-mail:jimeng04@tom.com。

化奠定了基础。

本研究还发现,rDNA ITS 序列分子系统鉴定与传统形态学、致病性鉴定结论具有一致性,这是基于真菌的 ITS 序列受外界环境影响小、种间存在丰富变异、种内有较高保守性的缘故^[9-10]。结果表明,rDNA ITS 序列分子系统鉴定方法可以高效、快速地鉴定真菌。

参考文献:

[1] 杨庆仙. 名贵中药材——枸杞[J]. 中国林业,1997(8):40.

[2] 中国科学院中国孢子植物志编纂委员会. 中国真菌志:第一卷 白粉菌目[M]. 北京:科学出版社,1987:68-70.

[3] Braun U. The powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe[M]. Stuttgart:Gustav Fischer Verlag,1995:1-337.

[4] Mori Y, Sato Y, Takamatsu S. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA[J]. Mycologia,2000,92:74-93

[5] 裴冬丽. 凤仙白粉病的病原菌鉴定[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2011,39(2):115-118.

[6] 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):4-6,31.

[7] Szentiványi O, Kiss L, Russell J C, et al. *Ampelomyces* mycoparasites from apple powdery mildew identified as a distinct group based on single-stranded conformation polymorphism analysis of the rDNA ITS region[J]. Mycological Research,2005,109(Pt 4):429-438.

[8] 刘铁志. 内蒙古白粉菌分类及区系研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2007.

[9] Li C W, Pei D L, Wang W J, et al. First report of powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici* on tomato in China[J]. Plant Disease,2008,92(9):1370.

[10] 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:自然科学版,2009,39(5):505-508.