

张菊,张怡,曹鹏,等.艾草白粉病的病原菌鉴定[J].江苏农业科学,2016,44(8):178-180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.048

艾草白粉病的病原菌鉴定

张菊¹,张怡¹,曹鹏²,安一博²,黄辉²,袁俊慧²,王瑞瑞²,李成伟¹

(1.周口师范学院植物遗传与分子育种重点实验室,河南周口 466000; 2.周口师范学院生命科学与农学院,河南周口 466000)

摘要:为了研究周口地区出现的艾草白粉病菌的种类和系统进化关系,为其防治及系统进化提供理论依据,采用显微形态学观察、致病性检测、分子生物学检测的方法对其进行鉴定,并构建系统进化树进行分析。结果表明,艾草白粉病菌分生孢子长度平均约为 34.57 μm ,宽度平均约为 18.36 μm ,以约 3~8 个分生孢子串生在分生孢子梗上,附着胞少裂片对生。根据病原菌的 rDNA-ITS 序列(GenBank 登录号为 KF056818)建立进化树分析可知其与来自韩国、日本的 *Golovinomyces artemisiae* 聚在 1 支上,登录号分别为 KJ136112、AB077654,而与同属的另外 1 个种亲缘关系较远。分析认为,河南周口地区的艾草白粉病菌为 *G. artemisiae*。

关键词:艾草白粉病菌;分子鉴定;进化树

中图分类号: S435.672 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0178-03

艾草(*Atemisia argyi*)别称艾蒿,属菊科(Asteraceae)蒿属(*Artemisia*)植物,全草入药,具有温经、去湿、平喘、利胆、止血、消炎、抗过敏等作用,故药物学家李时珍对艾草推崇有加,并记录在《本草纲目》中。目前,白粉病是艾草的主要病害,叶片、叶柄及茎危害较重,病部生有或薄或厚的白色无定形斑片,严重时致整个植株死亡。虽然化学农药对白粉病的防

治有一定的作用,但长期使用农药可能会造成农药残留并影响艾草本身的药性,因此难以保证艾草的药用品质。已有学者对艾草白粉病^[1-3]进行过研究,在青岛、甘肃、塔里木盆地等的艾草植株上出现蒿白粉病菌,但仅限于对其形态学的研究,至今未发现运用形态学和分子生物学相结合的方法对艾草白粉病菌进行研究的报道。因此,针对在河南周口发现的艾草白粉病菌,对其进行形态学、致病性、分子生物学的研究,以期对艾草白粉病菌系统进化及防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

感染白粉病菌的艾草植株取自周口师范学院校园内。

1.2 白粉病菌的形态观察

首先采取感病叶片,通过二氨基联苯胺(3,3'-diamino-

收稿日期:2015-12-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31272168);河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:14A180038);周口师范学院青年科研基金(编号:zknuc0205)。

作者简介:张菊(1984—),女,河南商城人,硕士,主要从事分子及微生物研究。E-mail:zjt603@126.com。

通信作者:李成伟,博士,教授,主要从事植物与微生物互作研究。E-mail:lichengweiwau@hotmail.com。

[14]张狄.百莲子花芽分化及其开花机理研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2011.

[15]王志清,潘步昌.光周期诱导园艺植物成花机理及花期调控综述[J].四川林勘设计,2012:12-16.

[16]杨玉芳.观赏植物花期调控的方法及探讨[J].山西农业科学,2008,36(7):46-48.

[17]何井瑞.火柴头生殖器官的多样性[D].扬州:扬州大学,2007.

[18]张立莎.苹果花芽形态分化及花孕育相关基因的克隆和表达研究[D].保定:河北农业大学,2009.

[19]张智,任立中.桃树花芽分化和胚胎发育初步观察[J].安徽农学院学报,1985(1):18-22.

[20]杨小明,李成琼,宋洪元,等.春甘蓝花芽分化至抽薹过程中生理生化指标的变化[J].中国蔬菜,2009(24):19-23.

[21]陶月良,曾广文,朱诚.黄瓜花芽起始分化的形态解剖研究[J].广西植物,2002,22(3):228-231.

[22]贺丹,高小峰,吕博雅,等.牡丹、芍药花芽分化的形态学研究[J].河南农业科学,2014,43(12):117-120,124.

[23]张丹丹,王莹,荀志丽,等.单、重瓣玉簪花器官分化和花形态

学比较研究[J].电子显微学报,2014,33(3):271-277.

[24]黄济明,杨建瑛,林国栋.麝香百合花芽分化过程的观察[J].园艺学报,1985,12(3):204-206.

[25]王家艳,刘芳,苏欣,等.细叶百合鳞茎花芽分化过程观察[J].草业科学,2014,31(5):878-883.

[26]安黎哲,康文隽,曾福礼.番茄花芽分化特点的研究[J].兰州大学学报:自然科学版,1991,27(1):86-90.

[27]van Meulebroek L, van den Bussche J, Steppe K A. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1260(1260):67-80.

[28]冯慧,王建红,王茂良,等.激素在植物开花结果中的作用[J].北京园林,2006,22(77):28-30.

[29]王姗,张荣良,郝霞,等.空气凤梨 *Tillandsia bergeri* 花芽分化时期叶片内源激素含量的变化[J].中国农学通报,2013,29(22):142-146.

[30]曲波,张微,陈旭辉,等.植物花芽分化研究进展[J].中国农学通报,2010,26(24):109-114.

benzidine tetrahydrochloride, DAB) 和台盼蓝染色后在显微镜下进行形态观察^[4]。同时剪取 1 cm × 1 cm 大小的感病叶片, 经真空镀金后, 在 Quanta 200 型扫描电子显微镜的高真空环境下进行观察。参数设置如下: 预设驻留时间为 6 μs, 灯丝电压为 25.00 kV。

1.3 白粉病菌总 DNA 的提取、ITS 序列的克隆及测序

1.3.1 病原菌总 DNA 的提取 总 DNA 的提取方法参考生工生物工程(上海)股份有限公司的试剂盒。

1.3.2 ITS 序列的克隆及测序 ITS 序列采用真菌核糖体区段通用引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') 和 ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') 进行扩增。白粉病菌 ITS PCR 扩增体系为 20 μL: 总 DNA 模板 1 μL, ITS1 2 μL, ITS4 2 μL, ddH₂O 5 μL, Taq Mix 10 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 48 ℃ 45 s, 72 ℃ 60 s, 38 个循环; 72 ℃ 5 min。

PCR 反应结束后取 5 μL PCR 产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将所得到的目的条带经胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]纯化, 连接到 pMD18-T 载体上, 再转化至大肠杆菌 DH5α 中, 经质粒 PCR 检测阳性菌株后, 将其送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序分析。

1.4 ITS 序列的系统进化树构建

在 NCBI 的 GenBank 数据库中搜索与艾草白粉病菌 ITS 序列高度同源的序列, 下载不同地区的 *G. artemisiae* ITS 序列, 采用 Clustal X (1.83 版) 进行序列的完全比对, 利用 MEGA5.0 软件中的邻近法 (Neighbor - Joining, N - J) 生成艾草白粉病菌的系统进化树, 用自展法对系统进化树进行检验, 自展数为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 白粉病菌的形态观察

艾草白粉病菌主要侵染叶片正面, 也可侵染叶片背面, 发病初期叶片表面出现白色无定形斑片, 随后逐渐扩大并连成片状白粉斑, 即为病原菌分生孢子、分生孢子梗和菌丝体。病菌严重时, 白粉斑布满整个叶片, 更为严重时可导致整个植株死亡。

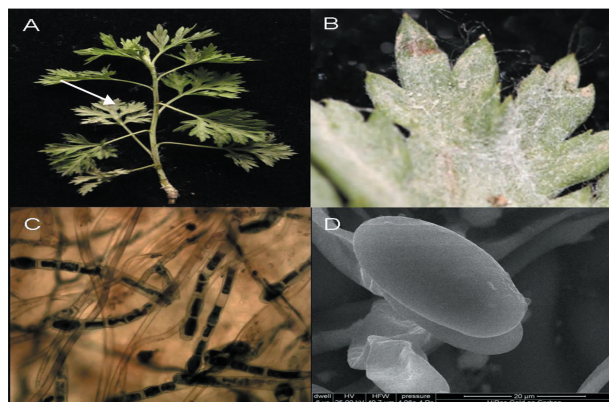
将感病叶片经真空镀金后在扫描电镜下进行观察, 同时采用 DAB 和台盼蓝对其染色, 在显微镜下进行形态观察, 艾草白粉病菌的分生孢子成串且呈椭圆形或柱形, 单个分生孢子长度平均约为 34.57 μm, 宽度平均约为 18.36 μm, 以约为 3~8 个分生孢子串生在分生孢子梗上, 附着胞少裂片对生 (图 1)。

2.2 病原菌的致病性鉴定

根据科赫氏法则, 对病原菌进行致病性检测, 收集感病植株上的白粉病菌接种至健康的艾草植株上, 15 d 后叶片出现白色的粉状物, 且与自然状态发病叶片上的症状类似 (图 2 - A)。取发病艾草叶片染色后在显微镜下观察, 其特征与自然发病叶片的显微形态观察特征相同 (图 2 - B), 因此初步鉴定此病原菌为 *G. artemisiae*。

2.3 ITS 序列的扩增及分析

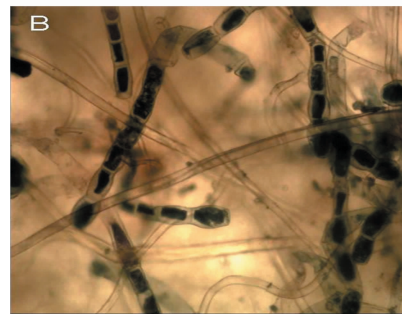
本试验通过真菌核糖体 ITS 区通用引物 ITS1 和 ITS4, 以艾草白粉病菌总 DNA 为模板, PCR 扩增艾草白粉病菌核糖体的 ITS 区, 经 38 个循环后得到 553 bp 的目的片段 (图 3)。将 ITS 序列上传至 NCBI 的 GenBank 数据库中, 得到艾草白粉病



A—艾草白粉病症状特征; B—A图中箭头的放大;
C—艾草白粉病菌分生孢子梗; D—艾草白粉病菌的分生孢子
图1 艾草白粉病菌的症状与显微形态



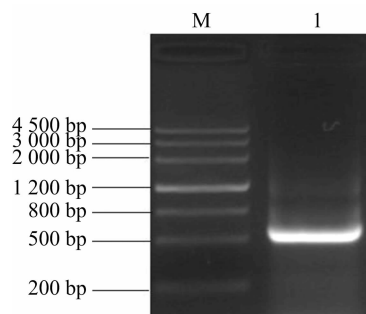
A. 接种艾草白粉病菌后的症状特征



B. 接种艾草白粉病菌的显微形态

图2 接种艾草白粉病菌的症状与显微形态

菌 ITS 序列的登录号为 KF056818。在 NCBI 中进行 BLAST, 与其他同源序列比对分析后发现, 周口地区艾草白粉病原菌 ITS 区段核苷酸编码序列中, 1~178 位为 ITS1 区段序列, 179~331 位为 5.8S rDNA 全序列, 332~493 位为 ITS2 区段序列, 494~553 位为 28S rDNA 序列。



M—DL 4 500 marker; I—艾草白粉病菌 ITS

图3 艾草白粉病菌的 ITS 序列

2.4 系统发育树的构建

在 GenBank 核酸数据库中,对艾草白粉病菌 *G. artemisiae* 进行 BLASTn 同源序列搜索,构建系统发育进化树,发现目的序列 KF056818 与来自韩国的青蒿(登录号 KJ136112)、日本的杭白菊(登录号 AB077654)的白粉病菌亲缘关系最近,

聚在 1 个进化支上;同时与来自美国艾草和日本魁蒿、山地蒿、滨菊上的白粉病菌(登录号分别为 AB077659、AB077649、AB769433)均达到 99% 同源,而与来自阿根廷茜草科蓬子菜上的 *G. riedlianus*(登录号 AB769420)亲缘关系最远,同源性仅为 93% (图 4)。

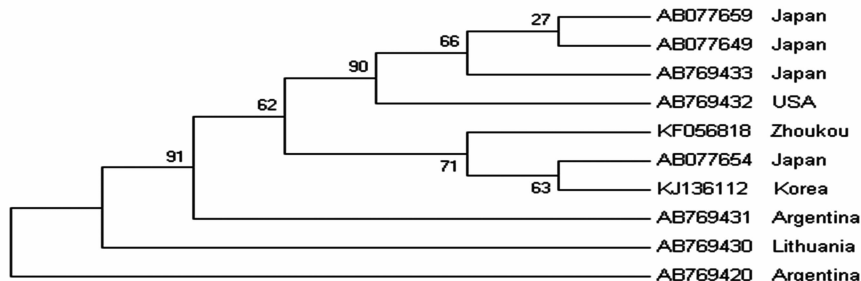


图4 根据 ITS 序列构建的艾草白粉病菌 N-J 系统进化树

3 讨论

据报道,艾草叶片中含有天然药物活性成分,加工的艾叶具有血管舒张^[5]、抑制血小板聚集^[6]、抗诱变、抗真菌活性、抗灰霉病等作用^[7]。另外,蒿类植物中的黄酮提取物已被证实有抗炎、抗氧化、抗菌等多种功效^[8]。在药用植物的生产过程中,病虫害问题已日渐突出,因此掌握药用植物病害的种类及危害情况对于开展防治及深入研究具有极其重要的意义。

在真菌的鉴定过程中,通常采用形态学方法,通过观察真菌的形态大小、形状来进行分类,但此法往往受人为、环境因素影响导致不能准确判断物种之间的进化关系^[9]。真菌 rDNA - ITS 序列在进化过程中保守性较强,有助于各种族之间亲缘关系的确定。但更多学者认为,rDNA - ITS 序列分析虽有优点,但并不能单独以这种方法鉴定出所有真菌种类,宜采用与传统的形态学鉴定相结合的方法鉴定真菌种类^[10]。

本研究利用 rDNA - ITS 序列在真菌鉴定上的应用,建立系统进化树分析可得,周口地区的艾草白粉病菌与韩国青蒿(KJ136112)、日本杭白菊(AB077654)的白粉病菌同源性均达到 99%,但艾草白粉病菌却未能与其寄主为同一属的青蒿聚在同一支,来自日本寄主为魁蒿(AB077659)、山地蒿(AB077649)和立陶宛的中亚苦蒿(AB769430)均为蒿属的不同小种,却未能聚在 1 支,不同属的青蒿、杭白菊却聚在同一支,因此推测白粉病菌进化与自身小种进化有关。然而刘先宝等学者对海南的野艾蒿白粉病菌进行 rDNA - ITS 序列鉴定认为,其与菊科黄瓜菜的叉丝单囊壳白粉菌高度同源^[11],这与本研究结果有一定的差异。通过查阅文献发现,白粉病菌虽具有专化性^[12-14],但不一定只侵染某一种特定的植物,如番茄白粉病菌可侵染除茄科以外的葫芦科的部分植物^[15-16],同时地域差异也可能造成白粉病菌的变异。

本研究运用显微形态学和分子生物学相结合的方法,对河南周口地区艾草白粉病菌进行分析鉴定,对河南省艾草白粉病菌的分类及防治艾草白粉病具有重要的意义。

参考文献:

[1] 孔涛,梁晨,李宝筠,等. 青岛崂山的重寄生菌白粉寄生孢及其寄主多样性[J]. 菌物学报,2012,31(1):74-85.

[2] 王生荣,窦彦霞,朱克恭. 甘肃贵清山的白粉菌种类初步调查[J]. 甘肃农业大学学报,2002,37(4):416-420.

[3] 徐彪. 塔里木盆地荒漠野生植物寄生真菌研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2008.

[4] 张怡,张佩佩,马晓萌,等. 河南两地市小麦白粉病菌的分子鉴定和进化分析[J]. 华北农学报,2012,27(1):189-192.

[5] Yoshikawa M, Shimada H, Matsuda H, et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vaso-relaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* Levl. et Vant.: moxartenone and moxartenolide[J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44(9):1656-1662.

[6] Zhong Y Y, Cui S L. Effective chemical constituents of *Artemisia argyi* Levl. et Vant for inhibition of platelet aggregation[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1992, 6:17-23.

[7] Guan W Q, Li S F, Yan R X, et al. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide[J]. Natural Product Research, 2006, 20(11):992-998.

[8] 张赞彬,李彩侠,吴亚卿. 黄酮类化合物的研究进展[J]. 食品与机械, 2005, 21(5):70-73.

[9] 刘春来,文灵芝,杨明秀,等. rDNA - ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. 东北农业大学学报,2007,38(1):101-106.

[10] 燕勇,李卫平,高雯洁,等. rDNA - ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(10):1958-1961.

[11] 刘先宝,高宏华,蔡吉苗,等. 9 种热区植物白粉病菌的 rDNA - ITS 序列及系统发育分析[J]. 热带作物学报,2013,34(1):98-104.

[12] 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.

[13] 李彤霄. 河南省小麦白粉病发生等级预测技术[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):116-118.

[14] 李小霞,肖仲久. 烟草白粉菌对烟草重要防御酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):148-149.

[15] Huang C C, Biesheuvel J, Lindhout P, et al. Host range of *Oidium lycopersici* occurring in the Netherlands[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106(5):465-473.

[16] Lebeda A, Mieslerová B. Identification, occurrence and host range of tomato powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in the Czech Republic[J]. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 1999, 34(1/2):13-25.