

# 狭叶十大功劳白粉病发生调查 及其病原鉴定

刘乔丽<sup>1</sup>, 欧阳兵<sup>2</sup>, 周求根<sup>3</sup>, 李霖<sup>1</sup>, 刘登全<sup>1</sup>, 蒋军喜<sup>1\*</sup>

(1.江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2.江西省万安县农业局, 江西 万安 343800; 3.井冈山应用科技学校, 江西 吉安 343009)

**摘要:** 对江西农业大学校园内狭叶十大功劳白粉病症状进行描述, 调查发生情况, 并对其病原菌进行了形态和分子生物学鉴定。狭叶十大功劳白粉病主要为害叶片, 通常在叶片正面形成白色粉状霉层, 严重时导致叶片变形; 该病终年可见, 新叶、嫩枝于4月上旬开始发病, 8—11月为发病盛期, 空旷处植株发病重于树荫处。对该病菌的有性态和无性态进行了观测, 其有性态和无性态分别与文献对多丝叉丝壳 *Microsphaera multappendicis* Z. Y. Zhao & Yu 和亚麻粉孢 *Oidium lini* Skoric 的描述相吻合; 对该病菌的 rDNA-ITS 区段进行了 PCR 扩增、序列测定和序列分析, 发现该序列与 GenBank 中多丝叉丝壳对应序列的同源性达 99%。根据对病菌的形态和分子生物学鉴定结果, 认为江西农业大学校园内狭叶十大功劳白粉病的病原为子囊菌门多丝叉丝壳 *M.multappendicis*, 其无性态为半知菌类亚麻粉孢 *Oidium lini*。

**关键词:** 狭叶十大功劳白粉病; 病害调查; 病原鉴定; 多丝叉丝壳

中图分类号: S763.15 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)03-0474-04

## Occurrence of Powder Mildew of *Mahonia fortunei* and Identification of Its Pathogen

LIU Qiao-li<sup>1</sup>, OUYANG Bin<sup>2</sup>, ZHOU Qiu-gen<sup>3</sup>, LI Lin<sup>1</sup>,

LIU Deng-quan<sup>1</sup>, JIANG Jun-xi<sup>1\*</sup>

(1.College of Agronomy, JXAU, Nanchang 330045, China; 2.Wan'an Agriculture Bureau of Jiangxi Province, Wan'an 343800,China;3.Jinggangshan School of Applied Science and Technology, Ji'an 343009, China)

**Abstract:** The symptoms of powder mildew of *Mahonia fortunei* on the campus of Jiangxi Agricultural University (JXAU) were described, its incidence and severity were investigated, and its pathogen was identified by using morphological and molecular biological method. The results showed that powder mildew of *Mahonia fortunei* occurred mainly in leaves. The diseased leaf usually displayed a layer of powdery white mold on its front side, and the severely diseased leaf often became deformed. The disease occurred all the year, with new leaves and new shoots being infected in early April, and with August to November as the peak period of the disease. The disease in sunshine was more severe than in shadow. The morphological characteristics and size of the teleomorph and anamorph of its pathogen were microscopically observed and measured, and they were in coincidence with description of *Microsphaera multappendicis* Z. Y. Zhao & Yu and *Oidium lini* Skoric in existing literatures, respectively. The rDNA-ITS region of the pathogen was PCR-amplified, sequenced and sequence analyzed, the sequence had 99% homology with corresponding sequence of *M.multappendicis*. Based

收稿日期: 2012-02-05 修回日期: 2012-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960213)

作者简介: 刘乔丽(1987—), 女, 硕士生, 主要从事分子植物病理学研究, E-mail: lq10351602@163.com; \*通讯作者: 蒋军喜, 教授, 博士, E-mail: jxjiang64115@yahoo.com.cn。

on the results of the morphological and molecular biological identification of the pathogen, *M. multappendicis* in ascomycota is considered as the pathogen of powder mildew of *Mahonia fortunei* on the campus of JXAU, and *O. lini* in imperfect fungi is anamorph of the pathogen.

**Key words:** powder mildew of *Mahonia fortunei*; investigation of plant disease; identification of pathogen; *Microsphaera multappendicis*

狭叶十大功劳 *Mahonia fortunei* (Lindl.) Fedde 为小檗科十大功劳属常绿灌木, 其树姿优美、典雅, 是一种宝贵的园林观赏植物, 既可作为林缘下木或绿篱栽培, 也是草坪、花坛优良的点缀树种, 同时又是一种宝贵的药用植物<sup>[1-3]</sup>。狭叶十大功劳在江西农业大学校园成片种植, 常引得路人驻足观赏。然而, 近年来狭叶十大功劳白粉病发生严重, 使其观赏价值受到严重影响。有关狭叶十大功劳白粉病的病原菌报道不一, 目前网上多报道为毡毛单丝壳菌 *Sphaerotheca pannosa* (有性态), 并认为其无性态为白尘粉孢 *Oidium leucoconium*, 而相关文献则认为其有性态为多丝叉丝壳 *Microsphaera multappendicis*, 无性态为亚麻粉孢 *Oidium lini*<sup>[4-5]</sup>。江西农业大学校园内的狭叶十大功劳白粉病究竟由何种病菌引起, 目前尚不清楚。为此, 在对该病害进行调查的同时, 采用形态观察和分子生物学方法对其病菌进行了种类鉴定, 以期为该病的进一步研究和防治打下良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病情调查

于2011年1—12月, 对狭叶十大功劳白粉病发生时期、为害程度和发病症状进行跟踪调查; 在病害发生高峰期(11月中旬)对生长于空旷处和树荫下的狭叶十大功劳各随机选取10株300片叶(每株30片叶)进行病叶率和病情指数调查, 病情分级标准参照文献[6-7]及结合本病实际情况制订。0级, 完全无病; 1级, 叶片发病, 但病斑面积<总叶面积的10%; 3级, 病斑面积≥总叶面积的10%; 5级, 病斑面积≥总叶面积的30%; 7级, 病斑面积≥总叶面积的50%; 9级, 病斑面积≥总叶面积的70%, 直至全叶枯死。

### 1.2 病菌形态鉴定

挑取病叶表面白色粉状霉层和黑色小粒点制片镜检, 观察病菌无性子实体及有性子实体的形态, 并测量其大小, 将镜检结果与已有文献[8-11]进行比对, 对病菌种类进行鉴定。

### 1.3 病菌分子鉴定

用刀片刮取病叶表面白色粉状霉层收集菌体, 取菌体1g, 用CTAB法<sup>[12]</sup>提取病菌基因组DNA, 以基因组DNA为模板, 采用真核生物通用引物对ITS1/ITS4 (ITS1 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和ITS4 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' )<sup>[11]</sup>扩增rDNA-ITS序列。PCR反应在50 μL体系中进行, 依次加入以下试剂: ①ITS1 (10 pmol/L) 1 μL; ②ITS4 (10 pmol/L) 1 μL; ③DNA模板2 μL; ④2×Taq PCR MasterMix 25 μL; ⑤ddH<sub>2</sub>O 21 μL, 混匀后按以下程序进行PCR扩增: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环, 最后一次循环后, 72℃补平10 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测符合要求后进行纯化回收, 回收产物交由天根生化科技(北京)有限公司进行测序, 获得的序列递交NCBI数据库进行序列鉴定, 用计算机分析软件DNASar (Madison Wisconsin, USA) 和DNAMAN (Lynnon Biosoft, USA) 进行同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 症状描述

狭叶十大功劳白粉病发生于叶片、叶柄和茎上, 主要为害叶片, 且以植株上部叶片为主, 下部叶片发病较少。叶片正面最初产生白色圆形小霉斑, 霉斑逐渐扩大成白色圆形的粉霉斑, 粉霉斑很快蔓延而覆盖整枚叶片, 叶片背面霉斑很少。至秋末冬初, 白色粉状霉层上产生成片的黄褐色至黑褐色针头大小颗粒, 为病菌的有性态闭囊壳。叶片发病严重时扭曲变形。

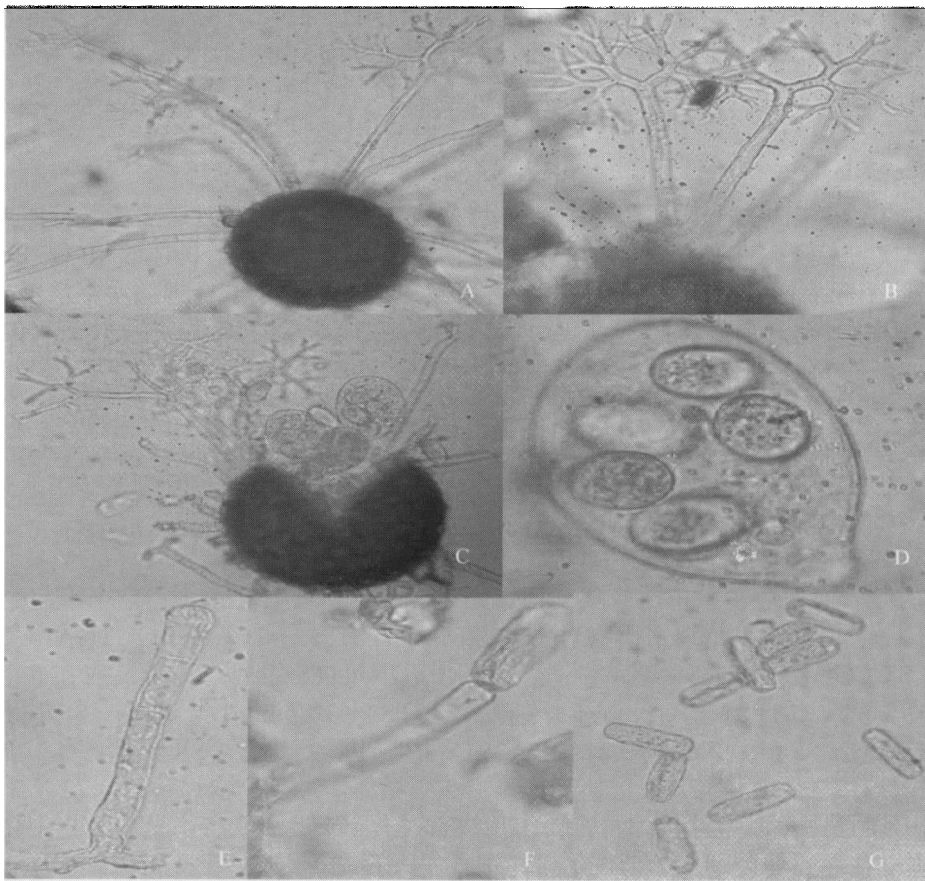
### 2.2 病情调查

狭叶十大功劳白粉病在江西农业大学校园终年可见, 新叶、嫩枝于4月上旬开始发病, 至7月份一般发病不重, 8—11月为发病盛期, 12月份以后病情逐渐消退。于11月中旬对生长于空旷处和树荫

底下的狭叶十大功劳各随机选取 10 株 300 片叶进行病叶率和病情指数调查, 结果生长于空旷处狭叶十大功劳白粉病的病叶率和病情指数分别为 75.1% 和 62.1, 而生长于树荫底下病害的病叶率和病情指数分别为 95.1% 和 85.0, 后者发病明显高于前者。

### 2.3 病菌形态特征

病菌闭囊壳黄褐色至黑褐色, 球形, 直径 100.0~132.5  $\mu\text{m}$ , 平均 120.35  $\mu\text{m}$ ; 附属丝 10~27 根, 生于闭囊壳赤道部, 丝状, 无色, 0~3 个分隔, 基部平均直径约 6.5  $\mu\text{m}$ , 幼嫩附属丝不分枝, 长度 20.0~250.0  $\mu\text{m}$ , 平均 98.8  $\mu\text{m}$ , 成熟附属丝 2~6 次叉状分枝, 长度 80.0~340.0  $\mu\text{m}$ , 平均 181.0  $\mu\text{m}$ 。子囊 6~14 个, 近球形、广卵形或椭圆形, 大小(35.0~72.5)  $\mu\text{m}$  × (16.3~47.5)  $\mu\text{m}$ , 有短柄或柄不明显; 子囊孢子 3~6 个, 多数 4 个, 椭圆形或卵形, 无色, 大小(20.0~29.0)  $\mu\text{m}$  × (10.0~13.8)  $\mu\text{m}$ 。分生孢子梗无色, 有 1~2 隔, 大小(50.0~92.5)  $\mu\text{m}$  × (9.3~14.5)  $\mu\text{m}$ , 梗上常顶生 1 个分生孢子, 分生孢子很少在梗上成串着生。分生孢子近长方形或腰果形, 无色, 表面有皱褶, 大小(27.5~40.0)  $\mu\text{m}$  × (10.0~15.0)  $\mu\text{m}$ 。查阅相关文献[8-11], 发现狭叶十大功劳白粉病菌有性态的形态特征与多丝叉丝壳 *Microsphaera multappendicis* Z.Y. Zhao & Yu 的特征相符, 无性态的形态特征与亚麻粉孢 *Oidium lini* Skoric 的特征相符。



A:完整的闭囊壳; B:附属丝; C:闭囊壳破裂后露出子囊; D:子囊及子囊孢子; E:分生孢子梗; F:分生孢子梗上着生分生孢子; G:分生孢子

A. Intact cleistothecium; B. Appendages; C. Asci coming out from broken cleistothecium; D. Ascus and ascospore; E. Conidiophore; F. conidium producing from conidiophore; G. conidia

图 1 狭叶十大功劳白粉病菌形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of pathogen of powder mildew of *Mahonia fortunei*

### 2.4 病菌分子鉴定

以提取的狭叶十大功劳白粉病菌基因组 DNA 为模板, 以 ITS1/ITS4 为引物, 对其 rDNA-ITS 区段进行 PCR 扩增, 获得长约 650 bp 的 DNA 片段 (图 2), 测序表明该片段在去除引物序列后实际长度为 612 bp (序列已递交 GenBank 中, 正在等待分配基因登录号), 将此序列在 NCBI 网站上进行 blast 同源性搜索, 发现与多丝叉丝壳 *Microsphaera multappendicis* 伊朗分离株 (基因登录号: AB104520.1, 异

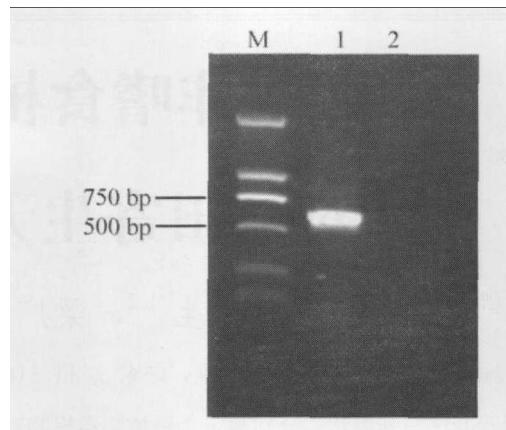
名白粉叉丝壳 *Erysiphe multappendicis*) 对应序列的同源性达 99%, 而与其他病菌如豌豆白粉菌 *Erysiphe pisi* (FJ378871.1)、三叶草白粉菌 *Erysiphe trifolii*(FJ378883.1)、三叶草多丝壳 *Microsphaera trifolii* (AB167524.1) 等对应序列的同源性最高只有 97%。

### 3 讨论

狭叶十大功劳白粉病是近年来江西农业大学校园发生普遍而严重的病害, 该病在其他省份有研究<sup>[4-5, 14-15]</sup>, 但在江西无研究报道。本病菌的有性态鉴定参考了尽可能多的文献, 但主要依据是文献[8], 该文献记述了叉丝壳属 (*Microsphaera*) 55 个种的形态特征, 笔者从寄主种类、菌丝体着生部位、闭囊壳直径大小, 附属丝的长度及根数、闭囊壳内子囊的个数及子囊内子囊孢子的数目等多方面, 将本研究结果与 55 个种一一比对, 结果与多丝叉丝壳 (*Microsphaera multappendicis*) 基本吻合, 从而将江西农业大学校园内狭叶十大功劳白粉病菌鉴定为 *Microsphaera multappendicis* Z. Y. Zhao & Yu, 鉴定结果与张林燕等<sup>[4]</sup>对南京狭叶十大功劳白粉病菌的鉴定结果相同, 而与网上普遍报道的毡毛单丝壳菌 *Sphaerotheca pannosa* 有别; 对病菌的无性态鉴定主要依据文献[11], 将其鉴定为亚麻粉孢 *Oidium lini* Skoric, 鉴定结果与赵桂华等<sup>[5]</sup>对江苏省狭叶十大功劳白粉病菌的鉴定结果相同。与此同时, 笔者对该病菌的 rDNA-ITS 区段进行了扩增和序列测定, 由序列同源性比对结果可知, 该病菌也属于多丝叉丝壳 (异名: 多丝白粉菌)。综上所述, 笔者认为将江西农业大学校园内狭叶十大功劳白粉病菌的有性态和无性态分别鉴定为多丝叉丝壳 (*Microsphaera multappendicis*) 和亚麻粉孢 *Oidium lini*, 应该是明确可靠的。研究中也发现, 狭叶十大功劳白粉菌闭囊壳上有的附属丝呈叉状, 有的不分叉呈菌丝状, 不分叉时有可能将本病菌鉴定为白粉菌属 (*Erysiphe*) 的真菌, 同时这也可能是造成狭叶十大功劳白粉菌同物异名的重要原因之一。

### 参考文献:

- [1] 武建勇. 亟待关注的“十大功劳”植物[J]. 大自然, 2009(1): 48-49.
- [2] 董雷, 杨晓虹, 刘银燕, 等. 十大功劳属植物的药理作用研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(6): 72-75.
- [3] Li X R, Zhu Y, He X B. Evaluation of antimicrobial activity of certain Chinese plants used in folkloric medicine[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(4): 569-572.
- [4] 张林燕, 叶建仁. 狭叶十大功劳白粉病病原菌鉴定及化学防治的研究[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(6): 17-19.
- [5] 赵桂华, 姚源, 赵明扬, 等. 亚麻粉孢引起的狭叶十大功劳白粉病[J]. 中国森林病虫, 2007, 26(5): 43-44.
- [6] 盛宝钦, 段霞谕. 对记载小麦成株期白粉病“0-9 级法”的改进[J]. 北京农业科学, 1991, 9(1): 38-39.
- [7] 蒋军喜, 赵玉琼, 李庚花. 金丝桃叶尖焦枯病原初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(5): 767-769.
- [8] 郑儒永, 余永年. 中国真菌志: 白粉菌目[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 167-232.
- [9] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 48-149.
- [10] 张中义, 冷怀琼, 张志铭, 等. 植物病原真菌学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988: 166-170.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1979: 196, 492.
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [13] Schmidt O, Moreth U. Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification[J]. Wood Science and Technology, 2002, 36(5): 429-433.
- [14] 沈洁, 徐薇玉, 管丽琴. 狭叶十大功劳白粉病防治技术初报[J]. 上海农业科技, 2007(3): 104-105.
- [15] 余雯雯, 束庆龙, 徐其东. 十大功劳白粉病发生规律与防治方法研究[J]. 中国园艺文摘, 2009(12): 4-6.



M: D2000 marker; 1: 狭叶十大功劳白粉病菌; 2: 阴性对照。  
M: D2000 marker; 1: pathogen of *Mahonia fortunei* powder mildew; 2: negative control.

图2 狭叶十大功劳白粉病菌 rDNA-ITS 区段 PCR 电泳图  
Fig.2 Electrophoresis of PCR product from rDNA-ITS of pathogen of *Mahonia fortunei* powder mildew