

南宁市桑白粉病病原菌种类鉴定

韩宁宁¹, 黄元腾吉¹, 李 峰², 苏广林¹, 廖咏梅^{1*}

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西大学生命科学学院, 南宁 530005)

摘要 桑白粉病是桑树的重要病害,分为桑里白粉病和桑表白粉病。通过形态特征观察和 ITS、D1/D2 序列分析,明确桑里白粉病的病原菌为桑生球针壳 *Phyllactinia moricola*;桑表白粉病的病原菌为桑白粉菌 *Erysiphe mori*。桑钩丝壳 *Uncinula mori* 是桑白粉菌的异名。

关键词 桑里白粉病; 桑生球针壳; 桑表白粉病; 桑白粉菌

中图分类号: S 888.716 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018327

Identification of the pathogens of mulberry powdery mildew in Nanning

HAN Ningning¹, HUANG Yuantengji¹, LI Feng², SU Guanglin¹, LIAO Yongmei¹

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract Powdery mildew is an important disease on mulberry, which is divided into mulberry powdery mildew on leaf back and mulberry powdery mildew on leaf surface. Based on morphological characteristic and the nucleotide sequences of ITS and D1/D2, it was confirmed that the pathogen causing powdery mildew on the leaf back was *Phyllactinia moricola*, and the pathogen causing powdery mildew on the leaf surface of mulberry was *Erysiphe mori*. *Uncinula mori* is the synonym of *Erysiphe mori*.

Key words mulberry powdery mildew on leaf back; *Phyllactinia moricola*; mulberry powdery mildew on leaf surface; *Erysiphe mori*

随着国家“东桑西移”战略的实施,近年来广西大力发展桑蚕业,2012年,广西桑园面积 16.88 万 hm^2 ,蚕茧产量 25.60 万 t,蚕丝产量 2.88 万 t^[1],位居全国第一;至今,在全国范围内,广西桑蚕产业仍占第一位^[2]。桑白粉病是桑上的一种重要病害,病害的发生导致桑叶产量降低、质量变劣,喂食感染白粉病的桑叶的家蚕体质弱,易诱发蚕病,蚕茧量、茧层量、茧层率均降低,严重影响蚕丝产业^[3]。根据白粉产生的部位不同分为桑里白粉病和桑表白粉病。桑里白粉病在桑叶背面产生白粉斑,在白粉斑相应的桑叶正面可见淡黄褐色病斑^[3];桑表白粉病可在桑叶正背面产生白粉斑,但以叶面为主。有关桑白粉病的病原菌种类,早年郑儒永等^[4]根据形态特征和寄主范围鉴定桑里白粉病的病原菌为桑生球针壳 *Phyllactinia moricola*,桑表白粉病的病原菌为桑钩丝壳 *Uncinula mori*;随着分子生物学技术的发展,结合形态学特征和核苷酸序列的分析,白粉菌的分

类系统被多次修订,多种植物白粉病病原菌的种名也发生了变化。有关桑白粉病菌的分子生物学鉴定,仅见杨俐针对来自云南的菌株进行了鉴定,报道桑里白粉病的病原菌为桑生球针壳 *P. moricola*^[5],但未见基于分子生物学基础鉴定桑表白粉病菌种类的报道。本文针对南宁市发生的桑里白粉病和桑表白粉病,结合形态特征和分子生物学技术,鉴定其病原菌的种类,对规范使用桑白粉病菌的学名具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 桑白粉病标本的采集及其病原菌形态特征观察

于广西大学农场采集桑白粉病标本,用刀片轻轻刮取叶片表面的白色粉状物、用毛笔轻轻扫下桑叶片表面的黑色小颗粒,用光学显微镜(OLYMPUS CX31)观察病原菌的形态特征。

参考陈廷速等^[6]的甘蔗根系染色方法稍作改进后对桑白粉病病叶进行脱色,观察病原菌的菌丝体

收稿日期: 2018-07-23

修订日期: 2018-09-11

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目-重大专项计划(桂科重 14121002-4-4)

* 通信作者 E-mail: liaoym@gxu.edu.cn

形态特征。透明:将发病嫩叶切成 1 cm×1 cm 的正方形小块,放入 50 mL 离心管中,加入 20%KOH 溶液浸没叶片,离心管放入 90℃ 的水浴锅中,水浴 90 min,取出后室温放置 20 d;脱色:将浸泡 20 d 的离心管中的 KOH 溶液倒掉,加入碱性 H₂O₂ (10% 的 H₂O₂ 30 mL,氨水 3 mL,蒸馏水 967 mL),漂白 60 min;染色:将离心管中的脱色液倒掉,加入 5%乙酸 95 mL 和黑墨水 5 mL 的混合液,66℃ 水浴染色 30 min;褪色:染色完成后,倒去染色液,用清水冲洗数次,然后清水浸泡 30 min。将叶片取出置于载玻片上,盖上盖玻片轻压,用光学显微镜观察。

1.2 病原菌 ITS 和 28S rRNA D1/D2 区域序列分析

用毛笔分别扫下桑里白粉病叶片背面的白色粉状物、桑表白粉病叶片正面的黑色小颗粒,用 Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit(杭州博日科技有限公司)提取真菌基因组 DNA,用真菌的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer,ITS)和 28S rRNA D1/D2 区域引物进行 PCR 扩增。ITS 引物:ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'^[5]; 28S rRNA D1/D2 区域引物:NL1: 5'-GCA TAT CAA

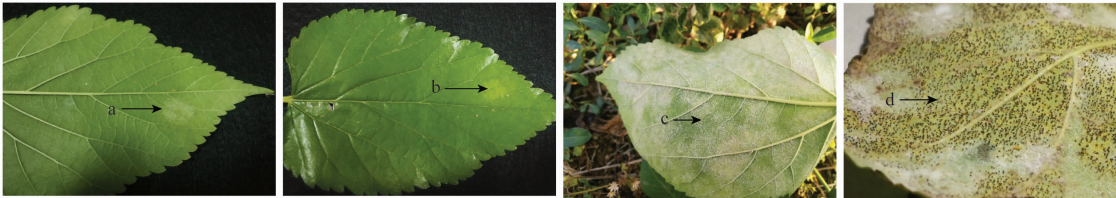
TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'^[7]。

PCR 反应体系 20 μL:模板 DNA 1.0 μL(20 ng/μL)、上下游引物各 1.0 μL(10 μmol/L)、2×Es Taq Master Mix(北京康为世纪生物科技有限公司)10.0 μL、ddH₂O 7.0 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s,ITS 48℃ 退火 30 s,D1/D2 50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,进行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,获得清晰的单一预期条带后直接送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将所得序列在 NCBI 的 GenBank 中与已知序列进行 BLAST 比对。

2 结果与分析

2.1 桑里白粉病的症状

桑里白粉病发病初期叶背产生白色近圆形或不规则形的小粉斑,后向四周扩展成边缘不明显的白色斑片,严重时整个叶片背面布满白粉,即病原菌无性阶段的分生孢子,在白斑相应的桑叶正面可见淡黄褐色病斑。在南宁市,12 月初,病斑上产生黄褐色和黑色小颗粒,为病原菌有性阶段的闭囊壳(图 1)。



a: 叶片背面出现白色粉斑; b: 叶片正面出现黄色斑点; c: 白粉布满整个叶片背面; d: 黑色小颗粒-闭囊壳
a: Round and white powder spot on leaf back; b: Yellow lesion on leaf surface; c: Powder spot covering leaf back; d: Small black particles-cleistothecia

图 1 桑里白粉病的田间症状

Fig. 1 Symptoms of mulberry powdery mildew on leaf back in the field

桑表白粉病菌丝体在叶片正面展生至不定形白斑,严重时白斑连成片,叶片背面无明显症状。在南宁

市,12 月初,白斑周围产生黑色小颗粒,即病原菌有性阶段的闭囊壳,同时病斑周围的叶片变黑,变硬(图 2)。



a: 叶片正面出现白色粉斑; b: 圆斑中心白色,边缘黑色; c: 黑色小颗粒-闭囊壳
a: White powder spot on leaf surface; b: White in the center of the powder spot and black at the edges; c: Small black particles-cleistothecia

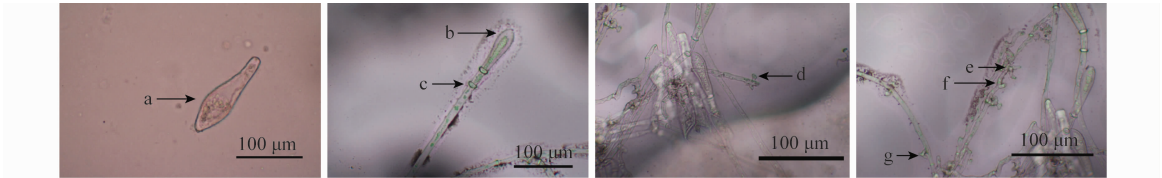
图 2 桑表白粉病的田间症状

Fig. 2 Symptoms of mulberry powdery mildew on leaf surface in the field

2.2 桑里白粉病菌的形态特征

分生孢子单生在菌丝顶端,棍棒状,无色,大小为 (55~85) μm×(20~30) μm。菌丝无色,细长无分枝,顶端逐渐变粗,中间无隔膜,仅在顶端与分生孢子相

连接处有 2 个相邻的隔膜,隔膜相距 30~50 μm,成熟的分生孢子从最顶端的隔膜处断裂。菌丝体上有对生的附着胞,少数两个附着胞生在一侧,也有少数单生一个附着胞(图 3)。



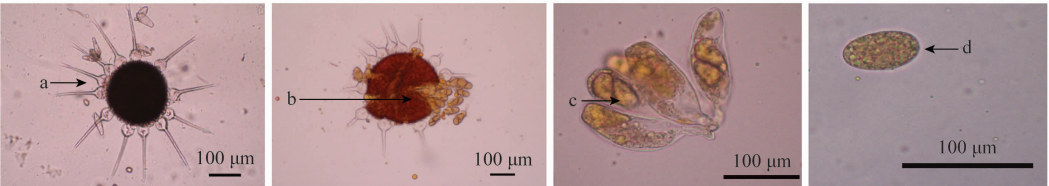
a: 分生孢子; b: 分生孢子单生在菌丝顶端; c: 菌丝与分生孢子相连处有2个环形的隔膜; d-e: 菌丝上对生的附着胞; f-g: 菌丝上单生的附着胞
a: Conidium; b: Single conidium on the top of hypha; c: Two circular septa between hypha and conidium; d-e: Paired appressoria on the hypha; f-g: Single appressorium on the hypha

图 3 桑里白粉病菌的菌丝体、分生孢子及附着胞

Fig. 3 Morphology of mycelia, conidia and appressoria of the pathogen causing mulberry powdery mildew on leaf back

成熟的闭囊壳球形,黑褐色,直径为 130~280 μm ; 附属丝 4~25 根,顶端刚直且尖,基部膨大成球状; 子囊 5~45 个,椭圆形有柄,黄色,柄聚在一起,大小为 (50~100) μm $\times$ (15~50) μm ; 子囊孢子 2~3 个,黄色,单胞,卵圆形,大小为 (20~45) μm $\times$ (15~30) μm 。

这些特征与杨俐^[5]描述的桑生球针壳 *Phyllactinia moricola* 特征一致。另外发现未完全成熟的闭囊壳黄褐色,没有附属丝或只有基部的球状体,未完全成熟的闭囊壳里也有子囊和子囊孢子(图 4)。



a: 带有针状附属丝的闭囊壳。附属丝基部膨大成球状; b: 闭囊壳释放子囊; c: 子囊; d: 子囊孢子
a: Cleistothecium with needle-like appendages (the base of appendages are swollen into spherical); b: Cleistothecium releasing asci; c: Asci; d: Ascospores

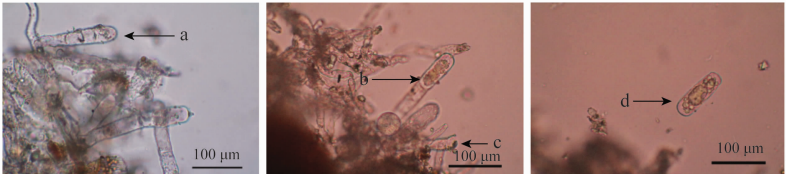
图 4 桑里白粉病菌的闭囊壳及子囊孢子

Fig. 4 Morphology of cleistothecium and ascospores of pathogen of mulberry powdery mildew on leaf back

2.3 桑表白粉病菌的形态特征

菌丝体透明,有分枝,有隔膜;分生孢子单生,由

分生孢子梗顶端断裂形成短圆柱形或椭圆形的分生孢子,无色或淡黄色;直径 50~70 μm (图 5)。



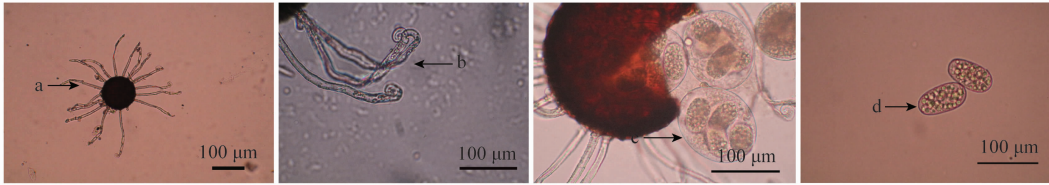
a: 分生孢子梗; b: 分生孢子单生在菌丝顶端; c: 附着胞; d: 分生孢子
a: Conidiophores; b: Single conidium on the top of conidiophore; c: Appressoria; d: Conidium

图 5 桑表白粉病菌的分生孢子梗及分生孢子

Fig. 5 Morphology of conidiophores and conidia of the pathogen causing mulberry powdery mildew on leaf surface

闭囊壳散生,黑褐色,球形或扁球形,直径 75~120 μm 。附属丝 8~22 根,长度为闭囊壳直径的 1~1.5 倍,顶端有曲膝状弯曲,上部稍粗,少数上下等粗,基部无隔膜。子囊 3~4 个,圆形或卵圆形,大小为

(50~80) μm $\times$ (35~60) μm 。子囊孢子 3~5 个,卵圆形,无色或浅黄色,大小为 (20~40) μm $\times$ (12~19) μm (图 6)。这些特征与 Meeboon 等^[7]描述的桑白粉菌 *Erysiphe mori* 的形态特征一致。



a: 闭囊壳; b: 附属丝顶端弯曲; c: 子囊; d: 子囊孢子
a: Cleistothecium; b: Appendages with bent top; c: Asci; d: Ascospores

图 6 桑表白粉病菌的闭囊壳和子囊孢子

Fig. 6 Morphology of cleistothecium and ascospores of the pathogen causing mulberry powdery mildew on leaf surface

2.4 桑里白粉病菌 ITS 区域序列分析

用 ITS1 和 ITS4 引物对 PCR 扩增出的 ITS 序列长度为 620 bp(图 7),经过 BLAST 分析,与 NCBI 的 GenBank 中桑生球针壳 *P. moricola*(AB080540. 1)的同源性为 99%,覆盖率为 99%。

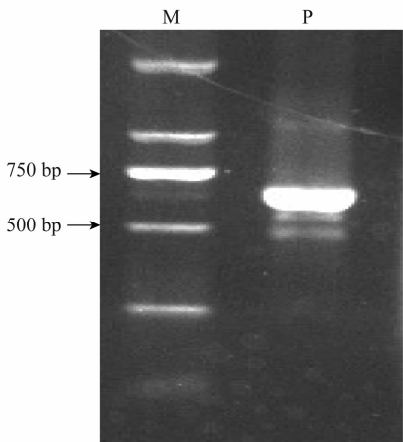


图 7 桑里白粉病菌的 ITS 区域 PCR 产物的电泳图
Fig. 7 Electrophoretogram of the PCR products of the ITS region of the pathogen causing mulberry powdery mildew on leaf back

结合所观察的形态特征,确定桑里白粉病的病原菌为桑生球针壳 *Phyllactinia moricola*,隶属于子囊菌门 Ascomycotina、白粉菌目 Erysiphales、白粉菌科 Erysiphaceae、球针壳属 *Phyllactinia*,与杨俐^[5]报道的结果一致。

2.5 桑表白粉病菌的 ITS 和 28S rRNA D1/D2 区域的 PCR 扩增及序列分析

2.5.1 桑表白粉病菌 ITS 的 PCR 扩增及序列分析

用 ITS1/ITS4 引物扩增出桑表白粉菌的 ITS 序列长度为 622 bp(图 8),经过 BLAST 分析,与 NCBI 的 GenBank 中的桑白粉菌 *Erysiphe mori*(KY910120. 1)的同源性 99%,覆盖率 96%。

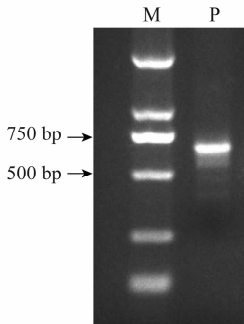


图 8 桑表白粉菌的 ITS 区域 PCR 产物的电泳图
Fig. 8 Electrophoretogram of the PCR products of the ITS region of the pathogen causing mulberry powdery mildew on leaf surface

2.5.2 桑表白粉病菌 28S rRNA D1/D2 区域 PCR 产物扩增及序列分析

D1/D2 引物对扩增出桑表白粉病菌的序列长度为 591 bp(图 9),经过 BLAST 分析,与桑白粉菌 *E. mori*(LC028994. 1)的同源性为 99%,覆盖率为 98%。

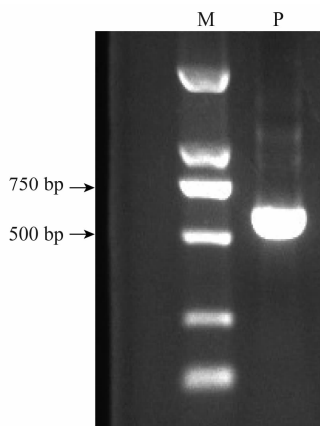


图 9 桑表白粉菌 28S rRNA D1/D2 区域 PCR 产物的电泳图
Fig. 9 Electrophoretogram of the PCR products of the 28S rRNA D1/D2 region of the pathogen causing mulberry powdery mildew on leaf surface

结合形态特征观察和 ITS、28S rRNA D1/D2 区域的序列分析,确定桑表白粉病的病原菌为桑白粉菌 *Erysiphe mori*,隶属于子囊菌门 Ascomycotina、白粉菌目 Erysiphales、白粉菌科 Erysiphaceae、白粉菌属 *Erysiphe*。

3 结论与讨论

白粉菌的传统分类方法主要依据其寄主和有性世代闭囊壳内子囊的个数及子囊孢子的数目来进行的^[8]。但近年来,随着分子生物学和扫描电镜技术在病原菌鉴定中的广泛应用,发现传统的分类方法并不全面,有些有性世代相同,但无性态的分生孢子却截然不同^[9]。Braun 把白粉菌属分为三个组,即白粉菌属的白粉菌组 *Erysiphe* sect. *Erysiphe*,戈洛文组 *Erysiphe* sect. *Golovinomyces* 和鼬瓣花白粉菌组 *Erysiphe* sect. *Galeopsidis*。这三个组的无性型明显不同,其中 *Erysiphe* sect. *Erysiphe* 组的在一天内只产生一个分生孢子,为单生型(Pseudoidium 型),分生孢子梗具有裂片状附着器;其他两个组的分生孢子均为串生的^[10]。因此,将分生孢子单生的保留在白粉菌属 *Erysiphe* 内^[12],Gelyuta 1988 年将串生的 *Erysiphe* sect. *Golovinomyces* 提升为属,

identification of wasps using principal component associative memories [J]. Image and Vision Computing, 1999, 17(12): 861 – 866.

[10] SCHRÖDER S, DRESCHER W, STEINHAGE V, et al. An automated method for the identification of bee species (Hymenoptera: Apoidea)[C]//Proceedings of the International Symposium on Conserving Europe’s Bees, Londres, Reino Unido. 1995: 6 – 7.

[11] TOFILSKI A. DrawWing, a program for numerical description of insect wings [J]. Journal of Insect Science, 2004, 17(4): 1 – 5.

[12] WATSON A T, O’NEILL M A, KITCHING I J. Automated identification of live moths (Macrolepidoptera) using digital automated identification system (DAISY)[J]. Systematics and Biodiversity, 2004, 1(3): 287 – 300.

[13] MAYO M, WATSON A T. Automatic species identification of live moths [J]. Knowledge-Based Systems, 2007, 20(2): 195 – 202.

[14] ZHU Leqing, ZHANG Zhe. Auto-classification of insect images based on color histogram and GLCM. 2010 [C]//Yantai: International Conference on Fuzzy System & Knowl, 2010: 2589 – 2593.

[15] YANG Heping, MA Chunsen, WEN Hui, et al. A tool for developing an automatic insect identification system based on wing outlines [J]. Scientific Reports, 2015(5): 12786.

[16] 潘鹏亮, 沈佐锐, 杨红珍, 等. 三种绢蝶翅脉数字化特征的提取及初步分析[J]. 动物分类学报, 2008, 33(3): 566 – 571.

[17] 潘鹏亮, 刘红敏, 张方梅, 等. 四种网蝽科昆虫外部形态特征提

取与分析[J]. 四川动物, 2017, 36(5): 531 – 539.

[18] 于新文, 沈佐锐, 高灵旺, 等. 昆虫图像几何形状特征的提取技术研究[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(3): 47 – 50.

[19] 蔡小娜, 黄大庄, 沈佐锐, 等. 用于昆虫分类鉴定的几何形态计量学方法研究: 相对扭曲分析[J]. 生物数学学报, 2016(2): 254 – 262.

[20] 潘鹏亮, 沈佐锐, 高灵旺, 等. 昆虫翅脉特征自动获取技术的初步研究[J]. 昆虫分类学报, 2008, 30(1): 72 – 80.

[21] POINAPEN D, KONOPKA J K, UMOH J U, et al. Micro-CT imaging of live insects using carbon dioxide gas-induced hypoxia as anesthetic with minimal impact on certain subsequent life history traits [J]. BMC Zoology, 2017, 2 (9): 13.

[22] FRANCOY T M, WITTMANN D, DRAUSCHKE M, et al. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: Two fast and efficient procedures [J]. Apidologie, 2008, 39(5): 488 – 494.

[23] GILCHRIST A S, CRISAFULLI D C A. Using variation in wing shape to distinguish between wild and mass-reared individuals of Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2006, 119(2): 175 – 178.

[24] CHANG Xiaoli, ZHAI Baoping, LIU Xiangdong, et al. Effects of temperature stress and pesticide exposure on fluctuating asymmetry and mortality of *Coper a annulata* (Selys) (Odonata: Zygoptera) larvae [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 67(1): 120 – 127.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 70 页)

即戈洛文属 *Golovinomyces* (U. Braun) V. P. Gelyuta^[10]; 以触瓣花白粉菌 *Erysiphe galeopsidis* 为模式种建立了一个新属, 定名为新白粉菌属 *Neoerysiphe* U. Braun^[11]。现在, 该分类方法已被大多数学者认可。狭义的白粉菌属 *Erysiphe* s. str. 在形态上与钩丝壳属 *Uncinula* 十分接近, 并通过一些中间类群彼此相连。钩丝壳属的种在假孢抱支系中构成了基部的一个亚分支, 包括大多数钩丝壳属的种和几个狭义白粉菌属的种^[10]。因此 Braun & Takamatsu 将钩丝壳属作为白粉菌属 *Erysiphe* 的异名^[12], 桑钩丝壳 *Uncinula mori* 作为原钩丝壳属中的一种, 也应该归为白粉菌属。

本文通过对病原菌的形态特征观察和 ITS、D1/D2 基因的序列分析, 明确了桑里白粉病的病原菌为桑生球针壳 *Phyllactinia moricola*; 桑表白粉病的病原菌为桑白粉菌 *Erysiphe mori*, 桑钩丝壳 *Uncinula mori* 这个学名不再使用, 是桑白粉菌的异名。

参考文献

[1] 韦海玲. 桑断枝烂叶病的病原菌种类鉴定[D]. 南宁: 广西大学, 2015.

[2] 祁广军. “东桑西移”背景下广西蚕业发展实证研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.

[3] 徐伟芳, 王爱印, 舒平, 等. 几种常见桑树病害的识别与防治[J]. 蚕业通讯, 2015, 35(2): 22 – 30.

[4] 郑儒永, 余永年. 中国真菌志: 第一卷白粉菌目[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1 – 552.

[5] 杨俐. 云南桑白粉病病原菌 *Phyllactinia moricola* 的鉴定及分生孢子发芽特性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.

[6] 陈廷速, 李松, 张金莲, 等. 丛枝菌根(AM)真菌对甘蔗根系侵染研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(5): 1757 – 1760.

[7] MEBOON M, TAKAMATSU S. New records of *Erysiphe* sect. *Uncinula* spp. (Erysiphales) from Thailand and *E. liquidambaris* var. *acalycinae* var. nov [J]. Mycoscience, 2017, 58: 236 – 241.

[8] 郑儒永, 陈桂清. 中国钩丝壳属的分类研究 I. 中国钩丝壳一种的讨论[J]. 微生物学报, 1977, 17(3): 189 – 197.

[9] 古玉环, 张兴礼. 白粉菌分类中无性型特征的研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 1993(2): 46 – 50.

[10] 刘淑艳, 高松. 白粉菌属级分类系统的讨论[J]. 菌物学报, 2006(1): 152 – 159.

[11] BRAUN U. Some critical notes on the classification and generic concept of the Erysiphaceae [J]. Schlechtendalia, 1999, 3: 49 – 55.

[12] BRAUN U, TAKAMATSU S. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysiphaceae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* inferred from rDNA ITS sequences-some taxonomic consequences [J]. Schlechtendalia, 2000, 4: 1 – 33.

(责任编辑: 田 喆)