

河南周口地区篇蓄白粉病菌的鉴定与进化分析

王伟^{1,2},徐克东²,于德水²,李成伟^{2,3},吴建宇¹

(1.河南农业大学 生命科学学院,河南 郑州 450002;2.周口师范学院 植物遗传与分子育种重点实验室,河南 周口 466001;3.河南科技学院,河南 新乡 453007)

摘要:通过形态观察、分子鉴定、科赫法则验证和系统进化分析对河南周口地区篇蓄所感病原菌进行鉴定。结果表明:该病原菌菌丝体外生,菌丝有隔膜。分生孢子梗圆柱形,包含 3 个细胞;分生孢子串生,近柱形,大小为(22.0~35.5) μm ×(10.5~16.5) μm 。闭囊壳近卵形,含有 3~5 个子囊孢子。科赫法则检测发现,病原菌回接发病与自然发病症状一致。分子生物学和系统进化分析结果显示,该病原菌 ITS 序列(KX757832.1)与已报道的蜡叶峨参独活白粉菌(KF111807.1)、洋常春藤独活白粉菌(KP055630.1)、胡萝卜独活白粉菌(KC480605.1)和酸模独活白粉菌(KY073878.1)序列聚为一枝,其同源性分别为 98.40%、98.57%、98.40%和 98.57%。初步推测,河南周口地区篇蓄所感白粉病原菌为独活白粉菌。

关键词:篇蓄;白粉病菌;科赫法则;独活白粉菌

中图分类号:S436.43

文献标志码:A

篇蓄(*Polygonum aviculare*)为一年生蓼科草本植物,广泛分布于我国各地。篇蓄作为一种传统中草药,《本草纲目》中记载,“治霍乱,黄疸,利小便及小儿魇病”,还可用来治疗皮肤病、关节炎等疾病^[1,2]。现代研究表明,篇蓄富含篇蓄甙、槲皮素、伞形花内酯、东莨菪素与阿魏酸等^[3],对革兰氏阳性和阴性菌均有抑制作用,抑制肿瘤细胞和癌细胞的生长,有抗氧化、杀螨虫等功效,其提取物具有免疫调节和抗炎活性^[4-6]。

篇蓄真菌性病害主要有锈病、炭疽病^[7]等,而关于篇蓄白粉病至今鲜有报道。白粉病是一种活体寄生真菌性病害,危害包括小麦^[8]、大麦^[9]、番茄^[10-13]、黄瓜^[14]和胡萝卜^[15]等多种植物。白粉病主要发生在植物叶片与茎上,发病的叶片表面形成白色菌丝体,可覆盖整个叶片,影响其光合作用,造成植株生长缓慢、矮小。同时,发病叶片表面形成黄色斑点,造成植物叶片发黄、卷曲,甚至脱落。

本研究首次报道了河南周口地区篇蓄所发生的真菌性病害,并对该病原菌进行形态学分析、真菌核糖体 DNA(Ribosomal DNA, rDNA)转录间隔区(Internal transcribed spacers, ITS)序列克隆与分析^[16-18]、科赫回接表型分析以及系统发育树构建,从而鉴定出篇蓄所感病原菌即白粉病菌的种类,为系统研究白粉病菌进化和针对性防治等研究提供了科学依据和基因资源。

1 材料和方法

1.1 实验材料

取自周口师范学院试验园区。

1.2 实验方法

1.2.1 病原菌形态学分析

收稿日期:2018-11-21;修回日期:2019-05-10.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31872129);国家自然科学基金委员会与国际农业研究磋商组织合作研究项目(3171101241);河南自然科学基金项目(162300410107).

作者简介:王伟(1991-),男,河南社旗人,河南农业大学在读硕士研究生,研究方向为植物病原菌互作。

通信作者:李成伟(1972-),男,教授,博士生导师,主要从事植物与病原菌互作研究,E-mail:lichengwei@163.com.

吴建宇(1964-),男,教授,博士生导师,主要从事植物与病原菌互作研究,E-mail:wujianyu40@126.com.

宏观分析 对藜蒿发病的部位直接拍照(Canon, 600D),记录藜蒿的发病部位和发病症状。

显微分析 取藜蒿的发病叶片,置于 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DAB(二甲氨基偶氮苯)染液中,于光下染色 8 h.取出叶片,避开主叶脉,将其剪成大小为 1 cm^2 的叶盘,于卡诺氏固定液(V 无水乙醇:V 冰醋酸=3:1)中脱色 12 h,倒掉脱色液,并加入新的卡诺氏固定液,重复几次,直至叶片完全脱色.将脱色后组织放入 0.3% 的台盼蓝溶液中,沸水煮沸 1 min,冷却 30 min,无菌水冲洗 3~4 次,压片,于光学显微镜(Olympus BX41)下观察.观察菌丝的生长情况,记录分生孢子、分生孢子梗的形态,并对其大小进行测量记录。

1.2.2 病原菌回接致病性检测

利用科赫法则,回接病原菌进行致病性检测、病症表型分析与发病比例统计.收集发病藜蒿叶子表面的病原菌孢子,利用无菌水配成浓度为 $2 \times 10^6 (\text{mL})^{-1}$ 的孢子悬浮液.回接藜蒿幼苗为驯化培养 30 d 的组培苗(株高约 10~15 cm).处理组、对照组 I 与对照组 II,每组 10 株,各设置 3 组重复,分别置于不同的光照培养箱,培养温度 $22\text{ }^\circ\text{C}$,湿度 80%,光周期(L/D=12 h/12 h, $120\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).采用喷雾法对处理组接种孢子悬浮液,对照组 I 接种无菌水,对照组 II 不接种孢子悬浮液与无菌水.藜蒿回接发病后,与自然发病的藜蒿症状进行对比观察、分析,并对其进行 DAB-台盼蓝染色,压片、镜检阅片。

1.2.3 病原菌分子鉴定

病原菌总 DNA 的提取 参照 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程股份有限公司,上海)的说明书,提取藜蒿白粉病菌基因组总 DNA。

PCR 扩增体系与条件 利用真菌 rDNA 的 ITS 序列高度同源的特性,设计真菌 rDNA 的 ITS 序列的通用引物 ITS1 [5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'] 和 ITS4 [5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'],用于 PCR 扩增.所用引物均由生工工程有限公司(上海)合成.PCR 扩增的体系为 $30\text{ }\mu\text{L}$:白粉病菌 DNA $2\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物(ITS1、ITS4)各 $1\text{ }\mu\text{L}$, $2 \times \text{KAPA HIFI HotStart ReadyMix}$ $15\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $11\text{ }\mu\text{L}$. PCR 反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $52\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,共 28 个循环, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳(Gel-Red 染色)检测,切胶 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

PCR 产物纯化回收和测序 采用薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(捷瑞,上海)回收 PCR 产物,检测回收率.将 PCR 纯化产物与 pEASY-Blunt simple(全式金,北京)克隆载体进行连接,然后将重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,利用含有硫酸卡那霉素的 LB 固体平板进行筛选,挑取阳性克隆,并测序.菌液样品测序由生工工程有限公司(上海)完成。

1.2.4 序列分析和系统进化树构建

在 NCBI 数据库中检索并下载已报道的白粉病菌 ITS 序列,利用 MEGA4.1 软件进行分析.采用邻近连接法(Neighborhood-joining, NJ),基于 Kimura-2-parameter 双参数模型构建系统进化树,进行亲缘关系分析.使用 DNAMAN4.0 软件对 ITS 序列进行相似性比对。

2 结果

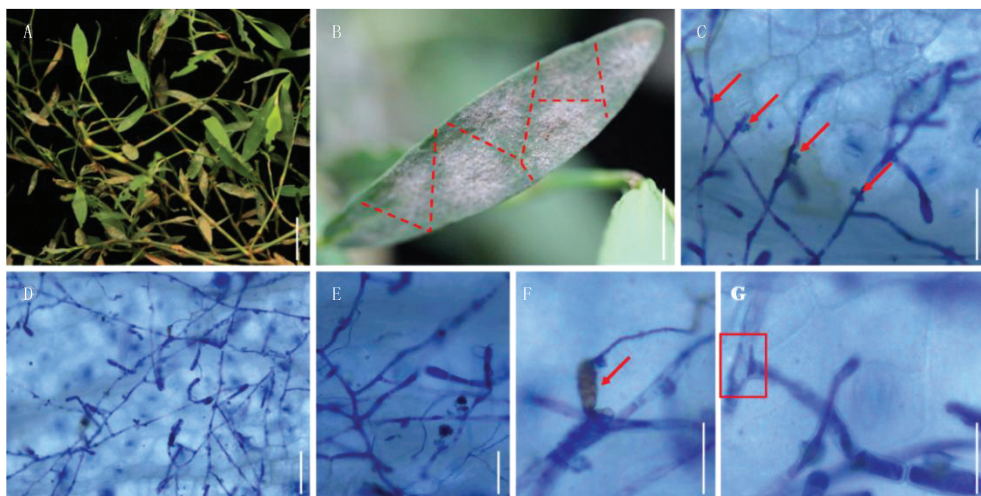
2.1 病原菌的形态学分析

病原菌主要侵染藜蒿叶片的正反面及茎部.叶片感染病原菌后形成多处薄且无定形的白色斑片,斑片形态明显,但边缘不规则(图 1 A 和 B).发病后期,白色斑片可以相互愈合,铺满全叶,造成叶片略黄化、卷曲,甚至脱落,但斑片可存留(图 1 A 和 B).显微镜下,该病原菌菌丝体属体外生型,平直,有明显分支,具有隔膜(图 1 D 和 E).其附着胞具有明显裂片(图 1 C,红色前头所示).分生孢子梗圆柱形,由 3 个细胞组成;脚胞直立、柱状(图 1 G).分生孢子串生、近柱形,单孢、无色,且无纤维体,大小为 $(22.0 \sim 35.5)\text{ }\mu\text{m} \times (10.5 \sim 16.5)\text{ }\mu\text{m}$ (图 1 E).子囊近卵形、壁薄,具有短柄,大小为 $(55.0 \sim 75.5)\text{ }\mu\text{m} \times (35.0 \sim 45.5)\text{ }\mu\text{m}$,内有子囊孢子 3~5 个(图 1 F).形态学结果初步鉴定该病原菌为白粉病菌。

2.2 科赫法则-致病性检测

孢子悬浮液接种 8 d 后,藜蒿植株开始发病,叶片出现微小白色斑片等症状;15 d 后,处理组的 30 株藜蒿幼苗均出现了不同程度的发病症状,其症状与自然发病状态一致,而对照组 I、对照组 II 均无发病症状,处

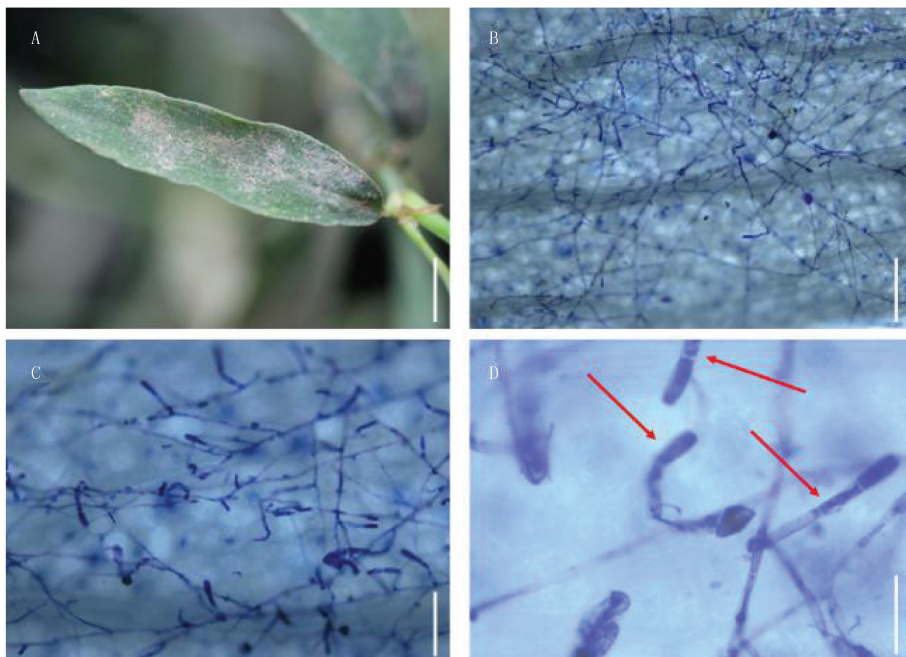
理组的回接发病率为 100%。对接种发病叶片表面的病原菌进行显微镜观察发现,其显微形态与自然发病显微形态一致,再次鉴定该病原菌为白粉病菌。



A. 发病植株, bar 为 2 cm; B. 发病叶片(示白色斑片), bar 为 0.5 cm; C-G. 病原菌 DAB-台盼蓝染色: C. 附着胞(红色箭头所示), bar 为 150 μm ; D. 菌丝体, bar 为 75 μm ; E. 分生孢子梗, bar 为 150 μm ; F. 子囊(红色箭头所示), bar 为 50 μm ; G. 脚胞(红框所示), bar 为 50 μm .

图 1 蒺藜白粉病病症和病原菌显微结构

Fig.1 The symptoms and microstructure observation of powdery mildew on *P. aviculare*



A. 发病叶片, bar 为 0.5 cm; B-D. DAB-台盼蓝染色: B 和 C. 菌丝体, bar (B) 为 500 μm , bar (C) 为 300 μm ; D. 分生孢子梗(红色箭头所示), bar 为 100 μm .

图 2 病原菌回接发病病症和显微结构

Fig.2 The back inoculation symptoms and microstructure observation of powdery mildew on *P. aviculare*

2.3 病原菌分子生物学鉴定

该病原菌 ITS 序列全长为 684 bp,其中,1~67 bp 为 18S rRNA 部分序列,68~286 bp 为 ITS1 全序列,287~440 bp 为 5.8S rRNA 全序列,441~625 bp 为 ITS2 全序列,626~684 bp 为 28S rRNA 部分序列.该序

列在 NCBI GenBank 登录号为 KX757832.1.系统进化分析结果显示,该病原菌 ITS 序列与已报道的韩国蜡叶蛾参独活白粉菌(KF111807.1)^[19],以及在中国发现的洋常春藤独活白粉菌(KP055630.1)^[20]、胡萝卜独活白粉菌(KC480605.1)和酸模独活白粉菌(KY073878.1)序列聚为一枝,ITS 序列同源性分别为 98.40%、98.57%、98.40%和 98.57%。本研究中所得到的 98%以上的同源性,显示本研究篇蓄所感白粉与已报道的多个独活白粉菌具有较高同源性,属于一种独活白粉菌(图 3)。

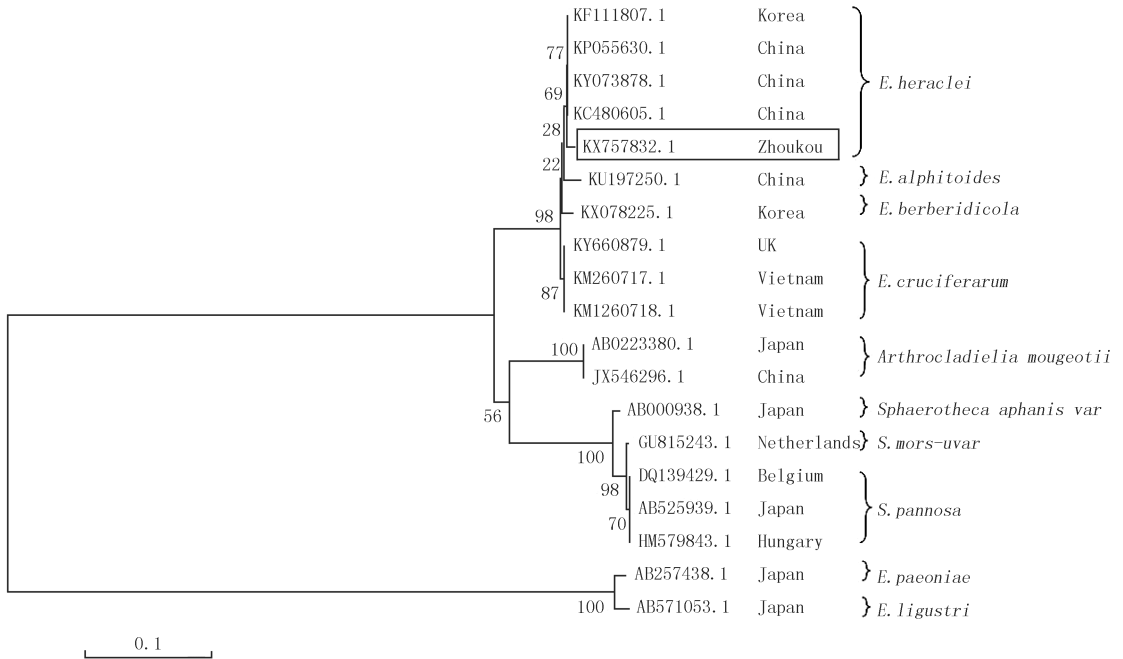


图3 篇蓄白粉病菌的NJ系统进化树

Fig.3 The NJ phylogenetic tree of powdery mildew on *P. aviculare*

3 讨论

目前,我国中医药已传播到世界上 183 个国家和地区,国务院颁布的《中医药发展战略规划纲要(2016—2030年)》明确了全面提升我国中药产业发展水平,加强中药资源保护利用,推进中药材规范化种植等工作目标。河南是我国悠久中药文化的重要发源地之一,就大宗中草药的种植业已形成了四大怀药、冬凌草、丹参、金银花、连翘、柴胡等十大中药材种植基地。篇蓄、龙葵等草药富含多种次生代谢物,具有重要基础研究价值、临床应用前景,在河南周口等地区已形成多处规模化种植园区。然而,目前关于篇蓄白粉病的研究鲜有报道,因此开展有关篇蓄白粉病菌的种类鉴定、基础研究等工作显得尤为迫切。

本研究中,发病篇蓄叶片表面形成白色斑片较薄、菌丝具隔膜、附着胞具明显裂片、子囊近卵形,与白粉病菌的发病症状相同,并且该病原菌回接发病的病症与自然状态一致。白粉菌 rDNA 中的 5.8S、18S 和 28S rRNA 序列具有很高的异种同源性,而 ITS 序列属于中度保守区域,表现为种内相对一致、种间差异较大,因此 ITS 序列可以作为真菌种类鉴定与分类的分子依据。分子生物学鉴定与系统进化分析结果显示,该病原菌 ITS 序列与我国洋常春藤、胡萝卜、酸模,以及韩国蜡叶蛾参所感独活白粉菌的 ITS 序列的同源性高达 98%以上,在发育树上聚为一枝,鉴定该病原菌为一种独活白粉菌。

另外,白粉菌虽为专性寄生真菌,通常一个种以不超过一个科的植物为其主要寄主范围。但是,通过本研究,我们发现独活白粉菌却可以寄生于伞形科植物(蜡叶蛾参^[19]、胡萝卜^[15])以外的多科植物,如五加科的洋常春藤^[20]、蓼科的皱叶酸模(JX888470.1)^[21]及本研究中的篇蓄,已超出了单科宿主的范畴;同样,蓼白粉

菌可以在蓼科植物上发病,如珊瑚藤(LC163917.1)^[22]、竹节蓼(LC163911.1)^[22]和荞麦(KP076437.1)等,亦能在其他科植物上发病,如藜科的甜菜(KF925326.1)^[23]和豆科的绿豆(HM208718.1)。

本实验通过形态学观察、分子生物学鉴定和科赫法则及系统进化树构建等方法对蒺藜白粉病菌进行了分析鉴定,确定了蒺藜所感白粉病菌的种类。该结果为白粉病菌的快速鉴定和分类提供了一条便捷的方法,也为白粉病菌的致病机理和防止提供了基因资源和研究思路。同时,该研究也为其他类型真菌的分类和鉴定提供了研究思路和参考方法。

参 考 文 献

- [1] González Begné M, Yslas N, Reyes E, et al. Clinical effect of a Mexican sanguinaria extract (*Polygonum aviculare* L.) on gingivitis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 74(1): 45-51.
- [2] Granica S, Czerwińska M E, Żyzyńska-Granica B, et al. Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. [J]. *Fitoterapia*, 2013, 91: 180-188.
- [3] Seo S H, Lee S H, Cha P H, et al. *Polygonum aviculare* L. and its active compounds, quercitrin hydrate, caffeic acid, and rutin, activate the Wnt/ β -catenin pathway and induce cutaneous wound healing[J]. *Phytotherapy Research*, 2016, 30(5): 848-854.
- [4] Haeng P S, Sung Y Y, Jin N K, et al. Anti-atherosclerotic effects of *Polygonum aviculare* L. ethanol extract in ApoE knock-out mice fed a western diet mediated via the MAPK pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151(3): 1109-1115.
- [5] Salama H M, Marraiki N. Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2010, 17(1): 57-63.
- [6] Tunón H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1995, 48(2): 61-76.
- [7] 刘丽萍, 靳晓山, 杨梁玉, 等. 蒺藜炭疽病原菌分离与鉴定[C]. //中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集, 海口, 2015-01.
- [8] 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.
- [9] Jørgensen J H. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley[J]. *Euphytica*, 1992, 63(1/2): 141-152.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 刘淑艳, 刘微, 姜文涛. 新番茄粉孢菌 *Oidium neolycopersici* 生物学特性的研究[J]. *菌物学报*, 2012, 31(1): 68-73.
- [13] 刘微, 刘淑艳, 李玉, 等. 番茄白粉病的病原菌鉴定[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(1): 11-15.
- [14] Kooistra E. Powdery mildew resistance in cucumber[J]. *Euphytica*, 1968, 17(2): 236-244.
- [15] Wang Y, Xu K D, Zhang Y, et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe heraclei* on carrot in central China[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(2): 277.
- [16] Hirose S, Tanda S, Kiss L, et al. Molecular phylogeny and evolution of the maple powdery mildew (*Sarwadaea*, *Erysiphaceae*) inferred from nuclear rDNA sequences[J]. *Mycological Research*, 2005, 109(8): 912-922.
- [17] Mori Y, Sato Y, Takamatsu S. Molecular phylogeny and radiation time of Erysiphales inferred from the nuclear ribosomal DNA sequences [J]. *Mycoscience*, 2000, 41(5): 437-447.
- [18] Mori Y, Sato Y, Takamatsu S. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA [J]. *Mycologia*, 2000, 92(1): 74-93.
- [19] Han K S, Cho S E, Park J H, et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe heraclei* on chervil in Korea [J]. *Plant Disease*, 2014, 98(3): 426.
- [20] Li J, Liu S Y, Jiang W T, et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe heraclei* on *Hedera helix* in China [J]. *Plant Disease*, 2015, 99(6): 888.
- [21] Lee H B. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe heraclei* on curled dock (*Rumex crispus*) in South Korea [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(3): 427.
- [22] Meeboon J, Takamatsu S. Notes on powdery mildews (*Erysiphales*) in Thailand IV. *Erysiphe* species on Malvaceae, Menispermaceae, Moraceae, Nyctaginaceae, Polygonaceae, Solanaceae and Urticaceae [J]. *Trop Plant Pathol*, 2017, 42(6): 485-494.
- [23] Bolton M D, Neher O T. First report of Q₀I-insensitive powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) on sugar beet in the United States [J]. *Plant Disease*, 2014, 98(7): 1004.

Identification and phylogenetic analysis of powdery mildew on *Polygonum aviculare* in Zhoukou, Henan Province

Wang Wei^{1,2}, Xu Kedong², Yu Deshui², Li Chengwei^{2,3}, Wu Jianyu¹

(1.College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2.Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China;

3.Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: In this study, the morphological observation, molecular identification, Koch's postulates verification and phylogenetic analysis were used to identify the pathogen on *Polygonum aviculare* in Zhoukou, Henan province. The results showed that the mycelia were exogenously and the hypha were separate. The conidiophore was cylindrical, which contains three cells. The string of conidia were near column, scale was $(22.0-35.5) \mu\text{m} \times (10.5-16.5) \mu\text{m}$. The cleistothecium was nearly ovoid and contains 3-5 ascospores. The symptoms of inoculation pathogen was same to the nature, which was identified through Koch's postulates. The internal transcribed spacer (ITS) (KX757832.1) sequence is clustered with *Erysiphe heraclei* on *Anthriscus cerefolium* (KF111807.1), *Hedera helix* (KP055630.1), *Daucus carota* (KC480605.1) and *Rumex acetosa* (KY073878.1) in one clade, the sequence similarity were 98.40%, 98.57%, 98.40% and 98.57% respectively. We presume that the pathogen infected on *P. aviculare* was *E. heraclei* in Zhoukou.

Keywords: *Polygonum aviculare*; powdery mildew; Koch's postulates; *Erysiphe heraclei*

[责任编辑 王凤产 杨浦]

(上接第 106 页)

Mechanism of colorectal cancer induced by *fusobacterium nucleatum*

Wang Ruifei^{1,2}, Liu Jinjing^{2,3}, Wang Lingli², Li Peng², Liu Xingyou²

(1.College of life science, Henan normal university, Xinxiang 453003, China;

2.Biotechnology research center, Xinxiang college, Xinxiang 453003, China;

3.College of life science, Cornell university, New York, NY14853, America)

Abstract: Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumor. Studies had shown that *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*) can promote the occurrence of CRC. The most important carcinogenesis mechanisms of *F.nucleatum* are chronic infection forming an inflammatory environment, interaction of surface characteristic factors of *F.nucleatum* with immune cells, activate multiple signaling pathways, immune suppression and immune evasion. However, there are some uncertainty carcinogenesis mechanisms about *F.nucleatum*, but this paper summarizes all the known mechanisms by referring to a large number of literatures, and this providing information for further study. The characteristic factors of *F.nucleatum* such as FadA, Fap2 and LPS may play an important role in the development of CRC. This molecules may provide new targets, drugs, and strategies for therapeutic intervention.

Keywords: *fusobacterium nucleatum*; colorectal cancer; mechanism; treatment

[责任编辑 王凤产 杨浦]