# 河南省商丘市豇豆白粉病病原菌鉴定

# Identification of a powdery mildew pathogen on *Vigna unguiculata* in Shangqiu City, Henan Province

裴冬丽 韩 霜

（商丘师范学院生物与食品学院，植物与微生物互作河南省高校重点实验室，河南 商丘 476000）

Pei Dongli Han Shuang

（Henan Provincial Key University Laboratory for Plant-Microbe Interactions, School of Biology and Food, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan Province, China）

豇豆俗称豆角、姜豆、带豆，属豆科豇豆属一年生植物，是我国广泛栽培的蔬菜作物之一，不仅营养丰富，富含维生素和蛋白质，还具有健脾、补肾、益气等药用价值。豇豆白粉病是较常见且危害严重的一种病害，在我国南北菜区均普遍发生，病害流行季节可造成植株叶片大量发病枯死，从而降低产量和品质（杨显芳和孔凡彬，2011）。2019年9—11月在河南省商丘市睢阳区菜园豇豆植株上发现了较严重的白粉病症状。在感病初期，叶片表面和茎上可观察到白色的圆形斑点，随后孢子和菌丝形成厚的不规则白斑，覆盖整个叶片表面，叶片发黄并枯萎，严重时减产50%以上。目前关于豇豆白粉病病原菌的报道较少。为明确豇豆白粉病病原菌，本试验自河南省商丘市睢阳区菜园采集具有典型白粉病症状的豇豆病叶，对其进行形态学观察、致病性分析和分子生物学鉴定，以期为该病害的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试植物：2019年9月自河南省商丘市睢阳区菜园采集具有典型白粉病症状的豇豆病叶。健康豇豆植株，品种为之豇28-2，浙江农业科学院园艺研究所提供。

试剂及仪器：*Taq*酶，宝生物工程（大连）有限公司；其他试剂均为国产分析纯。DM2500生物显微镜，德国Leica公司；Eppendorf AG 22331Hamburg PCR仪，德国Eppendorf公司；EC570-90电泳仪，美国Thermo公司。

### 1.2 方法

豇豆白粉病田间症状及其病原菌形态学鉴定：2019年9月自河南省商丘市睢阳区菜园采集具有典型白粉病症状的豇豆病叶，避开主脉将叶片剪成1.5 cm×1.5 cm大小叶盘，于固定液（无水乙醇与冰醋酸体积比为3∶1）中侵泡24 h，将脱色后叶盘转入试管中，用0.3%台盼蓝溶液浸没，70~80℃水浴1 min后，过夜；依次用30%、50%和70%酒精浸泡10 min脱色，制成装片，于显微镜下观察病原菌的形态特征，并测量其分生孢子和分生孢子梗的大小，观察50个视野，每个视野观察5个分生孢子。

豇豆白粉病病原菌致病性测定：用毛刷将病叶表面孢子刷至无菌水中，配制浓度为$5\times10^6$个/mL的分生孢子悬浮液。采用喷雾法将其接种至健康豇豆植株上，每株接种量为20 mL，以接种等量无菌水为对照，每个处理分别接种5株。发病后观察其病症，并于显微镜下观察病原菌形态特征，与自然发病的形态特征进行比较。

豇豆白粉病病原菌分子生物学鉴定：采用CTAB法提取病原菌的基因组DNA。采用真菌核糖体ITS区段通用引物ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）/ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGG-3′）进行PCR扩增，引物委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成。20 μL PCR反应体系：DNA 2 μL、上下游引物各1 μL、dNTP 1.6 μL、10×Buffer 2 μL（含$Mg^{2+}$）、$ddH_2O$ 11.9 μL、*Taq*酶0.5 μL。PCR反应条件：94℃预变性3 min；94℃变性45 s，52℃退火45 s，72℃延伸1 min，35个循环；72℃再延伸10 min，4℃保存。取5 μL PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，回收后进行测序。将序列上传至GenBank中进行BLAST比对，选取亲缘性相近的已

基金项目：国家自然科学基金（31902066），河南省高校科技创新团队（21IRTSTHN025）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：peidongli@126.com；收稿日期：2020-08-19

知菌株的ITS序列，采用MEGA 7.0软件应用邻接法构建系统发育进化树，用于检验支持率的重复抽样次数为1 000次。

## 2 结果与分析

### 2.1 豇豆白粉病田间症状及其病原菌的形态学特征

豇豆叶片产生白粉状斑，严重时白粉能够覆盖整个叶片，并使其逐渐发黄、脱落。白粉病病原菌菌丝为丝状，表生，以吸器侵入寄主表皮细胞内吸取养分。分生孢子呈近柱形或桶形，有纤维体，大小为20~39 μm×16~22 μm，分生孢子梗稍弯曲，无分支，大小为80~200 μm×8~16 μm，末端有3~5个未成熟的分生孢子，串生，自上而下顺序成熟脱落。足细胞呈圆柱形，大小为22~60 μm×5~16 μm，紧邻着1~3个短细胞。菌丝有隔，分支，宽为5~8 μm。未观察到白粉菌闭囊壳。

### 2.2 豇豆白粉病病原菌的致病性

健康豇豆叶片接种白粉菌孢子悬浮液8 d后，叶片开始发病，出现微小白色斑点，16 d后豇豆植株出现不同程度的发病症状，与自然状态下一致，对照组无病症。其病原菌与自然状态下病原菌显微下形态特征相同，鉴定其为引起豇豆白粉病的病原菌。

### 2.3 豇豆白粉病病原菌分子生物学鉴定

豇豆白粉病病原菌ITS序列全长为563 bp，菌株命名为SQDoujiao2（GenBank登录号为MN880477）。经BLAST比对分析，该菌株ITS序列与苍耳叉丝单囊壳白粉菌*Podosphaera xanthii*（GenBank登录号为MG754404）ITS序列相似性达99.29%。SQDoujiao2白粉病病原菌ITS序列与苍耳叉丝单囊壳白粉菌ITS序列聚为一支，自展支持率高达99%，与其他种的亲缘关系较远，故将其鉴定为苍耳叉丝单囊壳白粉菌*P. xanthii*（图1）。

## 3 讨论

梁巧兰等（2010）报道苍耳叉丝单囊壳白粉菌可侵染9种瓜类植物和绿豆、红小豆、向日葵，但其是否侵染豇豆未进行研究。本研究经形态学观察、致病性分析及分子生物学鉴定将河南省商丘市豇豆白粉病病原菌鉴定为苍耳叉丝单囊壳白粉菌，而中国科学院中国孢子植物志编辑委员会（1987）报道豇豆属植物白粉病的病原菌主要为蓼白粉菌*Exysiphe polygoni*，与本研究结果不同。而李国景等（2006）将长豇豆白粉病病原菌鉴定为瓜类叉丝单囊壳白粉菌*Sphaerotheca fuliginea*（异名：*Podosphaera fuliginea*）。下一步应对苍耳叉丝单囊壳白粉菌对豇豆的侵染途径及其致病分子机理进行研究，为豇豆白粉病的防治提供理论依据。

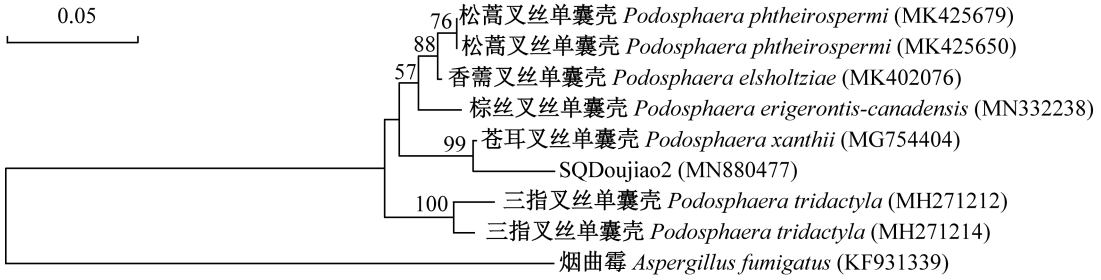


**图1 基于ITS序列采用邻接法构建菌株SQDoujiao2及相关菌株的系统进化树**

Fig. 1 Consensus tree of strain SQDoujiao2 and the related strains based on ITS sequences using neighbor-joining method

## 参 考 文 献（References）


Editorial Committee of Chinese Spore Flora, Chinese Academy of Sciences. 1987. Flora Fungorum Sinicorum I: Erysiphales. Beijing: Science Press, pp. 121 (in Chinese) [中国科学院中国孢子植物志编辑委员会. 1987. 中国真菌志第1卷: 白粉菌目. 北京: 科学出版社, pp. 121]

Li GJ, Liu YH, Zhu ZJ, Wu XH, Wang BG. 2006. Effects of silicon and powdery mildew on chlorophyll fluorescence characteristics and activities of disease resistance-related enzymes in leaves of *Asparagus bean*. Journal of Plant Protection, 33(1): 109−110 (in Chinese) [李国景, 刘永华, 朱祝军, 吴晓花, 汪宝根. 2006. 硅和白粉病对长豇豆叶片叶绿素荧光参数和抗病相关酶活性的影响. 植物保护学报, 33(1): 109−110]

Liang QL, Xu BL, Yan HX, Chen RX, Xue YY. 2010. Hull-less pumpkin powdery mildew and its host range. Mycosystema, 29(5): 636−643 (in Chinese) [梁巧兰, 徐秉良, 颜惠霞, 陈荣贤, 薛应钰. 2010. 南瓜白粉病病原菌鉴定及寄主范围测定. 菌物学报, 29(5): 636−643]

Yang XF, Kong FB. 2011. The occurrence regularity and comprehensive prevention and control technology of cowpea powdery mildew. Agricultural Technology Service, 28(7): 1002 (in Chinese) [杨显芳, 孔凡彬. 2011. 豇豆白粉病的发生规律及综合防治技术. 农技服务, 28(7): 1002]


（责任编辑：张俊芳）