

基于形态学和分子生物学手段鉴定植物病原真菌-白粉病菌

Identification of Plant Pathogenic Fungi (Powdery Mildews) Based on Morphological Characteristics and Molecular Analysis

段晓¹, 郭浩冉¹, 夏恺桐¹, 朱墨^{1,2,*}

¹河南师范大学生命科学学院, 新乡, 河南

²河南省农业微生物生态与技术国际联合实验室, 新乡, 河南

*通讯作者邮箱: zhumo@htu.edu.cn

引用格式: 段晓, 郭浩冉, 夏恺桐, 朱墨. (2022). 基于形态学和分子生物学手段鉴定植物病原真菌-白粉病菌. *Bio-101* e2204666. Doi: 10.21769/BioProtoc.2204666.

How to cite: Duan, X., Guo, H. Y., Xia, K. T. and Zhu, M. (2020). Identification of Plant Pathogenic Fungi (Powdery Mildews) Based on Morphological Characteristics and Molecular Analysis. *Bio-101* e2204666. Doi: 10.21769/BioProtoc.2204666. (in Chinese)

摘要: 真菌病害严重威胁植物健康。白粉病是最常见的植物真菌病害之一, 严重危害植物生长发育。白粉病菌是典型的植物专化性病原真菌, 不同植物上的白粉病病原菌种类不同, 且白粉病菌寄主范围十分广泛, 仍有大量植物白粉病病原菌信息仍不明确。因此快速准确的鉴定白粉病菌种类是进行植物保护的必要手段。白粉病菌的鉴定通常采用形态学与分子生物学结合的方法。本文通过图、文及视频介绍有关白粉病菌的鉴定, 主要包括形态学观察、PCR 扩增内部转录间隔区 (ITS) 区域并测序、ITS 的进化关系分析、病原菌侵染实验。本方法操作简单, 快速高效, 运用最基础的分子生物学实验进行操作即可获得准确的病原鉴定结果。通过植物病原真菌的鉴定, 可以确定真菌病害的种类, 从而针对性的开展防控, 减少植物真菌病害造成的各种损失, 为植物真菌病害的综合防治奠定基础。

关键词: 植物, 真菌, 病害, ITS, 测序, 菌种鉴定, 系统发育分析

研究背景

真菌无处不在, 种类繁多, 据估计全世界有真菌 150 万种, 已报道的有 10 万余种。许多真菌是野生和栽培植物的病原菌, 能引起植物病害, 真菌病害是植物病害中最大的一

类，约占全部植物病害的 70%- 80%。几乎每种作物上都有一到几种真菌病害，多的有十几种 (DEAN et al., 2012)，白粉病是目前世界公认植物十大真菌病害之一，因产生大量覆盖于宿主表面的白色或无色的分生孢子而得名(Glawe, 2008)。白粉菌能够侵染多种植物的地上部分，包括多种农作物和经济作物的叶、茎、花和果实，严重影响植物的生长发育和结实 (Braun et al., 2002)。虽然有关于植物上感染常见的白粉病菌已有详细研究，但很多白粉菌种类及其宿主尚不清楚。同时，由于不同植物上的白粉病病原菌分类不同，且白粉病菌寄主范围十分广泛且可能扩大，仍有大量植物白粉病病原菌信息仍不明确。当前对于白粉菌分类等基础学科研究相对匮乏，严重影响白粉菌的深入研究。

早期阶段有关于白粉菌的分类大多依据其形态学的特征。随着测序技术的发展，现阶段白粉菌的分类研究不仅依据其形态学特征，同时通过对其保守序列的测序及其生物进化发育关系，更准确的鉴定白粉菌种类 (Braun, 2012)。快速准确的鉴定白粉病菌种类是进行植物保护的必要手段。本文通过图、文及视频介绍有关白粉病菌的鉴定，以期提供实验简单且快速高效的操作方法，准确鉴定白粉菌种类，同时为后续针对性的开展白粉菌的鉴定及综合防治奠定理论依据和基础 (视频 1, 2)。



视频 1. 你经常见到，但不熟悉的植物致病真菌白粉菌



视频 2. 鉴定流程

材料与试剂

1. 植物叶片
2. 离心管 (Biosharp, catalog number: BS-15-MA)
3. 枪头 (Biosharp, catalog number: BS-10-T)
4. SDS (Solarbio, catalog number: S1010)
5. NaCl (天津市德恩化学试剂有限公司)
6. Tris-HCl (Solarbio, catalog number:T8230)
7. EDTA (Invitrogen, catalog number: AM9262)
8. DEPC water (Thermo Fisher, catalog number: AM9906)
9. 醋酸纤维素(Aladdin , catalog number:C106244-250g)
10. 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) (Solarbio, catalog number:P1012)
11. 氯仿 (洛阳昊华化学试剂有限公司, catalog number:865-49-6)
12. 醋酸钠 (Ambion, catalog number:17888)
13. 乙醇 (天津市德恩化学试剂有限公司)
14. 冰乙酸 (天津市天力化学试剂有限公司)
15. 乳酸 (天津市瑞金特化学品有限公司)
16. 丙三醇 (洛阳昊华化学试剂有限公司)
17. 0.4%台盼蓝染色液 (Solarbio, catalog number:C0040)
18. PCR反应 Mix Taq: 2xEs Taq MasterMix (Dye) (康为世纪生物科技有限公司, catalog number: CW0690M)
19. ITS 通用引物 (英潍捷基(上海)贸易有限公司)
20. DL2000 marker (宝日医生物技术(北京)有限公司, Takara, catalog number: 3427A)
21. 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (赛默飞世尔科技有限公司)
22. pMD™ 19-T Vector Cloning Kit (宝日医生物技术(北京)有限公司, Takara, catalog number: 6013)
23. DH5α Competent Cells (CW BIO, catalog number: CW0808)
24. 酵母提取物 (OXOID, YEAST EXTRACT, catalog number: LP0021)
25. 胰蛋白胨 (OXOID, TRYPTONE, catalog number: LP0042)
26. 琼脂粉 (biosharp, catalog number: BS195-500g)

27. 琼脂糖 (英潍捷基(上海)贸易有限公司, Invitrogen, catalog number: 75510019)
28. ddH₂O
29. Cellulose acetate (Aladdin, C106244-250g)
30. 丙酮 (洛阳昊华化学试剂有限公司, 31025)
31. TAE 电泳缓冲液 (50x 储存液, 1 L) (见溶液配方)
32. LB 固体培养基 (100 mL) (见溶液配方)
33. 醋酸纤维素 (500 mL) (见溶液配方)
34. 氨苄青霉素 (Solarbio, catalog number: A8180)

仪器设备

1. 多功能台式离心机(Beckman coulter, Allegra X-30R Centrifuge)
2. PCR 仪(Bio-Rad, C1000 Touch™ Thermal Cycler, S2015000932)
3. 电泳仪(Tanon, EPS-300, 20132055)
4. 光照培养箱 (上海精宏实验设备有限公司 (GZP, 350S))
5. SIM-F140 制冰机 (SANYO, SIM-F140, 04070077)
6. 蒸汽灭菌器 (Tomy Digital Biology, Tomy SX-500, 16J-1085)
7. 海尔立式超低温保存冰箱 (青岛海尔集团, DW-88L388)
8. 移液器 (Eppendorf)
9. 摇床 (精宏, THZ-312, 2003663)
10. 普通光学显微镜 (舜宇光学科技有限公司,Sunny Optical, EX30,04060092)
11. 核酸电泳仪 (WEALTEC, GES)
12. 制胶板 (WEALTEC, GES)
13. 电泳仪 (天能 Tanon, EPS300)

软件和数据库

1. NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
2. MEGA-X (10.1.8, <http://www.megasoftware.net/>)

实验步骤

白粉菌的采集

将感染真菌病害的植物叶片剪下，放入干净透气的信封中，备用。

一、 基于形态学鉴定白粉病菌

1. 将收集到的带有白粉病的叶片剪成约 1cm x1cm 的叶段，有菌生长的一面朝上，放在铺有滤纸的培养皿中，加入脱色液脱色，直至叶片完全透明或者呈现浅黄色；
2. 脱色后的叶片转移到以乳酸、甘油、水(1: 1: 1, v/v/v) 浸湿的滤纸上，滴加 0.4% 台盼蓝染色 3 小时后进行显微镜观察 (Zhu et al., 2017) (图 1，视频 3)。

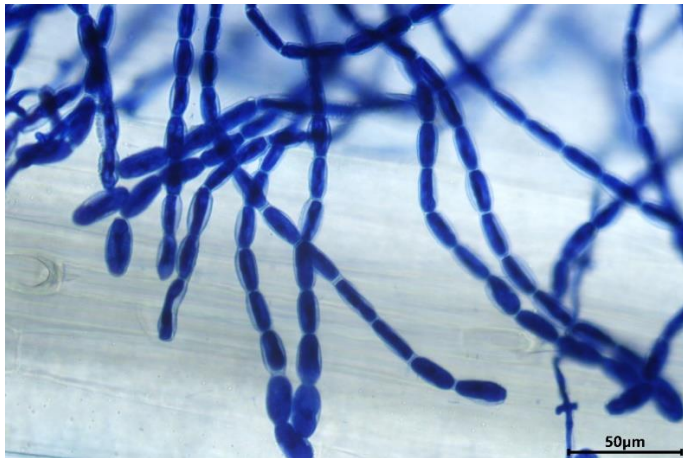


图 1. 染色后的小麦白粉菌在光学显微镜下的形态结构图



视频 3. 接菌实验

二、 基于分子生物学鉴定白粉病菌

1. 白粉菌 DNA 的提取

提取液组分表 (现配现用, 10mL)

反应组分	加样量
20% SDS	2.5 mL
1 M NaCl	1.5 mL
1 M Tris-HCl pH 9.0	500 μ L
0.5 M EDTA	100 μ L
0.1% DEPC water	5.4 mL

提取步骤:

- 在感染白粉病的植物叶片上刷上 5% (w/v) 丙酮溶解的醋酸纤维素, 待其完全干后揭下粘有白粉病的醋酸纤维素薄膜。
- 预冷离心机至 2 °C, 适量液氮倒入研钵中预冷, 加入少许石英砂, 放入 9~12 片粘菌的醋酸纤维素薄膜, 倒入液氮, 待液氮即将挥发完毕时, 迅速用力研磨直至白色粉末出现。
- 将粉末倒入盛有 2-5 mL 提取液的大离心管中, 振荡混匀, 室温静置 15 min, 用剪过的枪头分装到小离心管中, 室温, 1,4000 \times g, 离心 5 min。
- 转移上清至新的离心管中, 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 剧烈震荡 2 min。
- 2 °C, 1,6100 \times g 离心 5 min, 转移上清到新的离心管中。
- 上述管中加入等体积的氯仿/异戊醇, 剧烈震荡 2 min。
- 2 °C, 1,6100 \times g 离心 5 min, 转移上清至新的离心管中。加入上清 0.1 倍体积的 pH 5.2 的 3M 醋酸钠, 混匀, 加入 2.5 倍体积的 100%乙醇, -20 °C 过夜沉淀。
- 2 °C, 1,6100 \times g 离心 30 min, 立即吸弃上清。加入 500 μ L 冰的 75%乙醇洗涤沉淀, 2 °C, 1,6100 \times g 离心 5 min, 重复洗涤过程一次。
- 吸弃上清, 室温 30 min 晾干。
- 加入适量的 DEPC 水溶解, 离心 15 s。

k. 加入 RNA 酶消化掉 RNA, -20 °C 保存。

2. 白粉菌核糖体 ITS 区域 PCR 扩增

50 μ L 反应总体系包含:

反应组分	加样量
2x Es Taq MasterMix(Dye)	25 μ L
Forward Primer	2.5 μ L
Reverse Primer	2.5 μ L
Template DNA	1 μ L
ddH ₂ O	19 μ L

其中引物为 ITS 通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')以及 PMITS1(5'-TCGGACTGGCCYAGGGAGA-3')和 PMITS2(5'-TCACTCGCCGTTACTGAGGT-3') (Cunnington et al., 2003; White et al., 1990), 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司和成。PCR 扩增参数: 94 °C 预变性, 5 min; 94 °C 变性, 1 min; 54 °C 复性, 1 min; 72 °C 延伸, 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

3. PCR 产物电泳检测

PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶, 电压 70 V, 时间 60 min 电泳检测, 片段大小一般在 500-700 bp。(图 2)

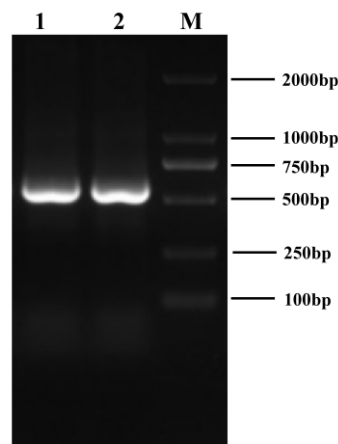


图 2 利用 ITS 引物进行 PCR 扩增白粉菌 ITS 区电泳图。1, 2: 白粉菌样本; M: Marker。

4. 目的片段的回收

采用赛默飞胶回收试剂盒对检测到的目的片段进行回收，步骤如下：

- a. 将盛有包含目的片段胶块的离心管中加入 600 μL 的 Binding Buffer，放入水浴锅中，60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min，直至胶块完全溶解。
- b. 将约 800 μL 溶好的胶液转移至胶纯化柱中，12,000 $\times g$ ，离心 1 min，弃去离心管底部的废液，将柱子放回。
- c. 在纯化柱中再次加入 100 μL 的 Binding Buffer，12,000 $\times g$ ，离心 1 min，弃去离心管底部的废液，将柱子放回。
- d. 在柱子中加入 700 μL 的 Wash Buffer，12,000 $\times g$ ，离心 1min，弃去离心管底部的废液，将柱子放回。
- e. 离心 1 min，将柱子放入一个新的离心管中，加入 30 μL 的 Elution Buffer，12,000 $\times g$ ，离心 1 min，管底的溶液即为回收好的 DNA 溶液，放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5. 目的片段的克隆

a. 连接

1) 室温下（20 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ ）按照如下体系操作（各反应组分均在冰上解冻）：

反应组分	加样量
纯化后的 PCR 产物	4.5 μL
pMD 19-T Vector (50 ng/ μL)	0.5 μL
Solution I	5 μL
总体积	10 μL

2) 反应体系准备完毕后，用移液器轻轻吹打混匀或轻弹管底混匀，低速瞬时离心，收集所有液体至管底。

3) 室温下连接 2-4 h。

b. 转化

- 1) 50 μL 的感受态细胞在冰上解冻，轻弹几次将细胞均匀悬浮；
- 2) 加入 5 μL 的连接液，轻轻混匀，冰浴 30 min；

- 3) 42 °C 热击 45 s, 快速放入冰浴 2 min;
- 4) 加入 500 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基, 37 °C, 180 rpm 振荡培养 40-50 min;
- 5) 4,000 $\times g$, 离心 1min, 吸弃部分上清, 保留 250 μL , 轻弹悬浮菌体, 取 100 μL 菌液涂在带有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基上, 氨苄青霉素浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- 6) 培养箱 37 °C 倒置过夜培养;
- 7) 菌落 PCR 验证 :2 \times Es TaqMasterMix (Dye) 5 μL , Forward Primer(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , Reverse Primer(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 3 μL ; 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶, 电压 100 V, 时间 30 min 电泳检测。

6. 一代测序

根据菌落 PCR 验证的结果, 挑选阳性菌落, 送至中美泰和(北京)生物技术有限公司进行测序。

7. 测序结果分析

整理测序结果后, 先在 NCBI 数据库进行 BLAST 分析, 再进一步进行系统发育分析, 在 NCBI 中的 GenBank 核酸序列数据库中查找、下载并选取高度同源序列进行同源性比较, 利用 MEGA-X 软件构建生物进化树并分析亲缘关系, 采用 Maximum likelihood 法, bootstrap value 设置为 1000, 确定病原菌的分类地位(视频 4, 5)。



视频 4. 构建进化树



视频 5. 序列上传

溶液配方

1. TAE 电泳缓冲液（50x 储存液，1 L）

反应组分	加样量
Tris	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA (PH=8.0)	100 mL

蒸馏水定容到 1 L，室温放置，用时稀释到 1x 工作液。

2. LB 固体培养基（100 mL）

反应组分	加样量
NaCl	1 g
TRYPTONE	1 g
YEAST EXTRACT	0.5 g
Agar	1.8 g

加入 100 mL 蒸馏水和 1 个磁力搅拌器，放入高压蒸汽灭菌锅，121 °C 灭菌 30 min。

待温度降至 40 °C 左右，加入抗生素混匀后倒板。

3. 醋酸纤维素(500 mL)

样品名称	加样量
丙酮	500 mL
醋酸纤维素	25 g

放入磁力搅拌器使醋酸纤维素完全溶解，室温放置。

4. 脱色液(500 mL)

样品名称	加样量
无水乙醇	250 mL
冰乙酸	250 mL

致谢

采用本实验方法发表的文章如下：（Zhu et al., 2017, zhu et al., 2019, 2020a and 2020b, 2021a, 2021b, 2021c and 2021d, 2022a and 2022b）。

参考文献

1. Braun, U., Cook, R., Inman, A. J., and Shin, H. D. 2002. The taxonomy of powdery mildew fungi. In (pp. 13-54).
2. Braun, U. 2012. Taxonomic manual of Erysiphales (powdery mildews). *CBS biodiversity series*, 11.
3. Cunnington, J. H., Takamatsu, S., Lawrie, A. C., and Pascoe, I. G. 2003. [Molecular identification of anamorphic powdery mildews \(Erysiphales\)](#). *Australasian Plant Pathology*, 32(3): 421-428.
4. DEAN, R., VAN KAN, J. A. L., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., RUDD, J. J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J., and FOSTER, G. D. 2012. [The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology](#). *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 414-430.
5. Glawe, D. A. 2008. [The powdery mildews: a review of the world's most familiar \(yet poorly known\) plant pathogens](#). *Annu Rev Phytopathol*, 46: 27-51.
6. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.
7. Zhu, M., Riederer, M., and Hildebrandt, U. (2017). Very-long-chain aldehydes induce appressorium formation in ascospores of the wheat powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. *Fungal biology* 121(8): 716-728.

8. Zhu, M., Riederer, M. and Hildebrandt, U. (2019). [UV-C irradiation compromises conidial germination, formation of appressoria, and induces transcription of three putative photolyase genes in the barley powdery mildew fungus, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*](#). *Fungal Biology* 123(3): 218-230.
9. Zhu, M., Ji, J., Zhao, M., Chai, J. and Li, Y.-F. (2020a). [First Report of Powdery Mildew Caused by an *Erysiphe* sp. on *Aristolochia debilis* in China](#). *Plant Disease* 104(7): 2028-2028.
10. Zhu, M., Zhao, M., Ji, J., Yang, C., Chai, J. and Li, Y.-F. (2020b). [First Report of *Arthrocladiella mougeotii* Causing Powdery Mildew on *Lycium chinense* in Henan, China](#). *Plant Disease* 104(11): 3071-3071.
11. Zhu, M., Ji, J., Duan, X. and Li, Y.-F. (2021a). [First Report of *Golovinomyces cichoracearum* Causing Powdery Mildew on *Zinnia elegans* in China](#). *Plant Disease* 105(4): 1213.
12. Zhu, M., Duan, X., Guo, H., Huang, W., Quan, K., Yan, X., Ji, J., Li, Y.-F. and Li, Z. (2021b). [Occurrence of Powdery Mildew Caused by *Erysiphe buhrii* on *Dianthus chinensis* in Inner Mongolia, China](#). *Plant Disease* 105(12): 4154.
13. Zhu, M., Ji, J., Duan, X., Shi, W., and Li, Y.-F. (2021c). [First Report of Powdery Mildew Caused by *Blumeria graminis* f. sp. *bromi* on *Bromus catharticus* in China](#). *Plant disease*, 105(4): 1211.
14. Zhu, M., Ji, J., Shi, W., and Li, Y.-F. (2021d). [Occurrence of Powdery Mildew Caused by *Blumeria graminis* f. sp. *poae* on *Poa pratensis* in China](#). *Plant disease*, 105(4): 1212-1212.
15. Zhu, M., Duan, X., Zeng, Q., Cai, P., Shi, W. and Qiu, Z. (2022a). [Podospaera xanthii causing powdery mildew on *Impatiens balsamina* in China](#). *Canadian Journal of Plant Pathology* 44(3): 354-360.
16. Zhu, M., Duan, X., Cai, P., Li, Y.-f. and Qiu, Z. (2022b). [Deciphering the genome of *Simplicillium aogashimaense* to understand its mechanisms against the wheat powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*](#). *Phytopathology Research* 4(1): 16.