

# 几种白粉病菌的显微形态学分析

李成伟, 姚晓惠, 裴冬丽, 马原松, 王 琴  
(商丘师范学院 生命科学系, 河南 商丘 476000)

**摘要:** 运用微分干涉显微镜分别观察了南瓜、凤仙花、黄瓜及番茄叶片上白粉病菌的显微形态, 对侵染这几类植物的白粉病菌的分生孢子的形状、大小、分生孢子梗的形状以及孢子梗上着生分生孢子的数目等进行了比较, 结果表明, 它们的分生孢子的大小、分生孢子梗的形状及孢子梗上着生分生孢子的数目都有所不同, 进而证明这些白粉病菌不是同一个物种。

**关键词:** 南瓜; 凤仙花; 黄瓜; 番茄; 白粉病菌; 显微形态学分析

**中图分类号:** R322.7, Q 336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)05-0068-05

## The Resource Collection and Microscopic Analysis of Powdery Mildew Fungi

LI Cheng-wei, YAO Xiao-hui, PEI Dong-li, MA Yuan-song, WANG Qin  
(Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China)

**Abstract:** Microscopic observations of powdery mildew fungi on pumpkin (*Cucurbita moschata*), garden nalsam (*Impatiens balsamina*), cucumber (*Cucumis sativus*) and tomato (*Solanum esculentum*) were conducted in the paper. The result indicated that the size of the conidia, the number of conidia on conidiospore and the shape of conidiospore of these powdery mildew fungi on different plants are different, manifesting that these powdery mildew fungi are from different species.

**Key words:** Pumpkin; Garden nalsam; Cucumber; Tomato; Powdery mildew fungus; Microscopic analysis

白粉病菌是一类广泛传播的植物病原真菌, 包括 500 多种, 但是每种白粉菌都有特定的寄主, 因此这类真菌属专性寄生真菌 (obligate parasitic fungus)。具有白色菌丝 (hyphae) 和粉状孢子, 在表皮细胞中产生吸器 (haustorium) 等特点<sup>[1]</sup>。它在寄主植物的表面产生大量的气生菌丝, 有的在气生菌丝上产生分生孢子梗和分生孢子, 肉眼看上去好像染了一层白粉, 因此被称为白粉病菌<sup>[2]</sup>。白粉病菌主要侵染叶片, 病初多在叶面上出现白色霉点, 往后会逐渐扩展为霉斑, 最后扩大连成一片, 使整个叶面布满白色粉状物, 后期会在白色霉斑上出现许多黑色小颗粒。多从下部叶片先发病, 逐渐向上部叶片扩展。白粉菌有时也会感染嫩茎和花, 除豌豆荚发现白粉

病菌外, 在果实上很少见到<sup>[3]</sup>。

白粉病菌是植物的专化性病原真菌, 对农作物的危害很大, 比如黄瓜白粉病, 从萌发到侵入需要 24 h, 在最适条件下潜伏期为 5 d, 7 d 后就开始形成分生孢子分散传播, 进行再侵染, 该病对黄瓜生产带来的危害严重, 在苗期造成黄瓜生长减弱甚至死亡, 生育期造成瓜果畸形, 导致严重的经济损失<sup>[4]</sup>。鉴此, 调查、研究白粉病菌, 收集各种植物的白粉病资源, 对筛选抗原, 培育和推广抗病品种有很重要的意义。

笔者在研究植物病原真菌的过程中, 运用微分干涉显微镜观察了南瓜、凤仙花、黄瓜及番茄叶片上的白粉病菌的显微形态结构。若在普通显微镜下观察, 白粉病菌的菌丝和分生孢子较模糊, 易发生变

收稿日期: 2008-01-03

基金项目: 国家自然科学基金 (3060413); 教育部科学技术研究重点项目 (207064); 河南高校杰出人才科研创新工程项目 (2007KYCX017); 留学回国人员科研启动基金资助

作者简介: 李成伟 (1972-), 男, 河南民权人, 副教授, 博士, 主要从事植物与病原体互作、抗性分子育种和生物反应器制药研究。

形、移位、给人假象等现象,效果不太理想,而微分干涉显微镜较好地解决了这一问题。

1 材料和方法

1.1 材料

供试试剂有卡诺氏液(冰醋酸与无水乙醇以1:3体积比混合)、台盼兰染液(台盼兰粉0.3g,溶于100mL生理盐水中,加热使之完全溶解,用滤纸过滤除渣,装入瓶内室温保存备用)、不同浓度酒精溶液。

供试材料为感染白粉病的南瓜叶片、凤仙花叶片、黄瓜叶片(取自商丘师范学院生命科学系试验园)和番茄叶片(取自中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验田)。

1.2 方法

将感染白粉病菌的南瓜叶片、凤仙叶片、黄瓜叶片和番茄叶片用双面刀片切成6mm×7mm的小片,分别放入卡诺氏液中进行固定脱色,到叶绿素褪去为止,记时。然后将脱色后的各种叶片取出分别放入对应的台盼兰染液中染色,记时。染色完毕后将各种叶片取出依次放入不同浓度的酒精溶液(30%,40%,50%,60%,70%)中进行梯度清洗,清洗后放入盛有蒸馏水的小烧杯中,然后制作装片(蒸馏水做浮载剂),进行显微镜观察、测量、拍照,并记录各种植物叶片上白粉病菌的分生孢子的大小及数目。

2 结果与分析

2.1 褪绿和染色时间

对材料进行褪绿时,设置不同的时间脱色,然后进行效果观察,结果发现,在常温下,感染白粉病菌的南瓜叶片需脱色5h,凤仙叶片和黄瓜叶片需脱色4.5h,而感染白粉病菌的番茄叶片在常温下褪绿效果一直不是很好,而在沸水中脱色30min则比较理想。进行台盼兰染色时,将南瓜叶片、凤仙叶片、黄瓜叶片和番茄叶片分别放入装有台盼兰染液的试管,在水浴锅中煮沸染色,时间分别需要1min,1min,1min,1.5min。

2.2 感染白粉病菌的南瓜叶片的显微观察结果

在微分干涉显微镜下观察感染白粉病菌的南瓜叶片,可看到有许多的菌丝,菌丝上面着生有不分枝的分生孢子梗和分生孢子,每个分生孢子梗上一般着生有3~5个串生的分生孢子,分生孢子大小一般在20~25μm×13~24μm(图1,表1)。

有资料表明,该病主要由瓜类单丝壳菌(*Sphaerotheca cucurbitae*)侵染所致<sup>[1]</sup>。经分析,本次采集的白粉菌的分生孢子的大小、分生孢子梗的形状以及在分生孢子梗上着生分生孢子的数目与常见的瓜类单丝壳菌的非常相似,初步认定,采集的白粉病菌就是*S.cucurbitae*,但是需要进一步验证。

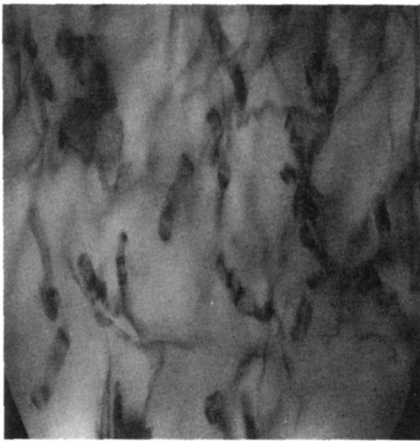


图1 南瓜叶片上白粉病菌的显微形态

表1 4种植物叶片上的白粉病菌分生孢子显微形态比较

植物名称	大小(μm)	形状	在孢子梗上的着生方式	每个分生孢子梗上着生的分生孢子数(个)
南瓜	20~25×13~24	椭圆形	串生	3~5
凤仙花	30~66×9~21	椭圆形	串生	2~5
黄瓜	20~25×13~24	椭圆形	串生	1~3
番茄	51~85×13~21	椭圆形	单生	1

2.3 感染白粉病菌的凤仙花叶片的显微观察结果

通过微分干涉显微镜观察到凤仙花叶片上的白粉病菌也有许多菌丝,菌丝上面着生有不分枝的分生孢子梗和分生孢子,分生孢子梗较长,每个分生孢子梗上一般着生有2~5个串生的分生孢子,分生孢子大小一般在30~66μm×9~21μm(图2,表1)。

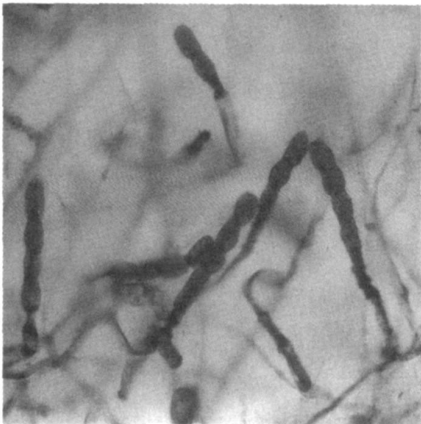


图2 凤仙花叶片上的白粉病菌的显微形态

有研究表明, 该病主要由凤仙花科内丝白粉菌 (*Leveillula balsaminacearum*) 或半知菌亚门粉孢菌 (*O.balsamii* Mont) 侵染所致<sup>[12]</sup>。但本次采集的白粉菌的归属需要进一步的研究才能确定。

2.4 感染白粉病菌的黄瓜叶片的显微观察结果

经过微分干涉显微镜的观察, 可看到感染白粉病菌的黄瓜叶片上有白粉病菌丝, 但菌丝不多, 菌丝上面着生有不分枝的分生孢子梗和分生孢子, 分生孢子梗短, 每个分生孢子梗上一般着生有 1~3 个串生的分生孢子, 分生孢子大小一般在 20~25 μm×13~24 μm (图 3, 表 1)。

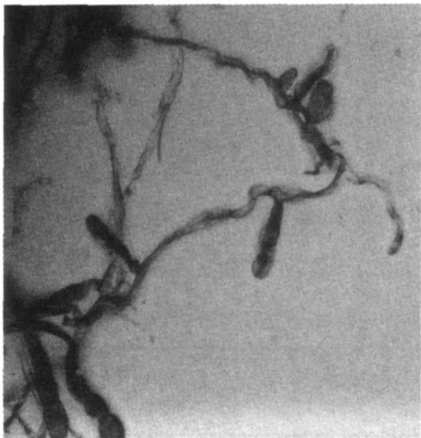


图 3 黄瓜叶片上的白粉病菌的显微形态图

已有资料表明, 该病主要由瓜类单丝壳菌侵染所致<sup>[11]</sup>。但是, 本次采集的白粉菌的分生孢子的大小和分生孢子在孢子梗上着生数目的情况都表明该白粉病菌可能不是 *S. cucurbitae*, 但需要进一步的试验来确认。

2.5 感染白粉病菌的番茄叶片的显微观察结果

在微分干涉显微镜下观察到番茄叶片上的白粉病菌菌丝有些是内生的, 菌丝上面着生有不分枝的分生孢子梗和分生孢子, 分生孢子梗长, 每个分生孢子梗上着生一个单生的分生孢子, 分生孢子大小一般为 51~85 μm×13~21 μm (图 4, 表 1)。

已有资料表明, 番茄白粉病可由鞑靼内丝白粉菌 (*L. taurica*), *Oidium lycopersici* 和 *O. neolycopersici* 侵染所致<sup>[13]</sup>, 有性阶段会形成闭囊壳, 球形, 有丝状的附属丝, 但在国内仅发现无性阶段, 没有发现有性阶段<sup>[11]</sup>。根据 *L. taurica* 生长在叶片的远轴面, 而 *O. lycopersici* 和 *O. neolycopersici* 生长在叶片的近轴面的特征差异<sup>[9]</sup>, 可以初步排除所采的白粉病菌不属于 *L. taurica*, 因为本研究所采集的白粉病菌生长在叶片的近轴面。同样, 根据 *Oidium lycopersici* 孢子在孢子梗上串生, 而 *O. neolycopersici*

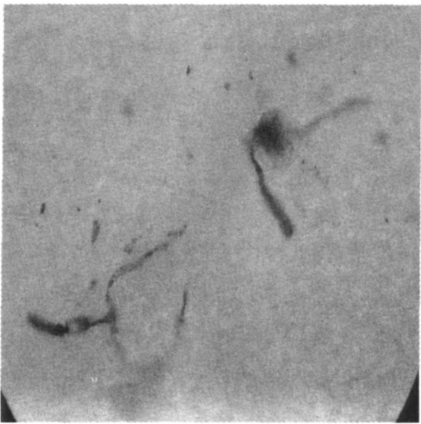


图 4 番茄叶片上的白粉病菌的显微形态

孢子在分生孢子梗上呈单生状态的差异<sup>[9]</sup>, 可以初步判定供试的白粉病菌属于 *O. neolycopersici*, 随后进行的 ITS 分析可以帮助我们进一步确定供试番茄白粉病菌的归属。

2.6 4 种植物叶片上的白粉病菌的显微形态比较

通过显微观察和测量发现, 南瓜、凤仙花和黄瓜上的白粉病菌的分生孢子发生方式都为串生, 而番茄白粉病菌的分生孢子发生方式单生。南瓜与黄瓜上的白粉病菌分生孢子的大小和形状相似, 但是孢子梗上着生的分生孢子数的范围不尽相同。凤仙花上的分生孢子的大小与南瓜和黄瓜不同。番茄上的白粉病菌的分生孢子较南瓜、黄瓜和凤仙花的分生孢子大, 详见表 1。

3 讨论

在本次试验中, 叶面病菌的染色是进行显微样品制备的关键环节, 不同的染色方法往往直接影响到最终的结果分析。一般要先进行组织透明处理以减少叶片色素, 但处理以后的组织透性增强, 染料容易进入, 从而增加背景着色, 加大了观察难度, 由于微分干涉显微镜能给出透明体正确表面形貌, 具有成像清晰, 立体感强, 分辨率高等特点<sup>[14]</sup>, 因此, 多采用微分干涉显微镜 (或激光共聚焦扫描显微镜) 来排除这种干扰<sup>[15]</sup>。真菌的染色方法有很多种, 这里选用台盼兰染液进行染色, 简便, 易操作。

白粉菌的寄主大概有 10000 种之多, 分属于 1600 属, 169 科和 44 个门。多数寄主是双子叶植物 (161 科, 9000 种)。只有 8 个科的 662 个种的寄主是单子叶植物, 而且大部分是禾本科 (*Gramineae*)<sup>[16]</sup>。寄主既包括栽培种又包括野生种, 有些属的白粉菌专门寄生草本, 例如 *Erysiphe*, *Leveillula*, *Sphaerotheca* 等; 有些专门寄生木本, 例如 *Po-*

*dospaera*, *Microspora*, *Uncinula*, *Phyllactinia*, *Pleochaeta* 等, 在 2 个组中也有个别例外<sup>[17, 18]</sup>。有许多寄主可以被不止一个属的白粉菌感染, 例如 *Erysiphe* 和 *Sphaerotheca* 都可以感染黄瓜, *Erysiphe*, *Leveillula* 和 *Sphaerotheca* 都可以在番茄上寄生<sup>[18]</sup>。有些白粉菌种可以有 1 000 个寄主植物, 例如 *Erysiphe cichoracearum* 可以在 1 753 个植物上生长<sup>[16]</sup>。这么大的寄主范围并不意味着各个菌株都有一样的寄主范围, 有的菌株可能只在一种植物上生长, 例如, *Sphaerotheca fuliginea* 的寄主只有茄子<sup>[19, 20]</sup>。其他菌株有一个相对较宽的寄主范围, 如以茄子为寄主的 *Erysiphe* sp. 的一个菌株也可以感染番茄和烟草, 一定程度上感染黄瓜<sup>[21]</sup>。对白粉病菌寄主范围的研究费时、费力、易污染, 而且温室中材料的基因型有限, 气候条件单一都有可能使研究可行性降低<sup>[22, 23]</sup>, 因此, 有关寄主范围的准确信息还很缺乏。

通过微分干涉显微镜的观察和检测, 发现几种不同植物上白粉病菌分生孢子的大小、分生孢子在孢子梗上着生方式以及着生分生孢子的数目都有所不同。相关资料表明, 侵染这 4 种植物叶片的病原菌中, 侵染南瓜叶片和黄瓜叶片的白粉病病原一般来自同一物种的白粉病菌, 但是我们的试验结果表明, 两者单个分生孢子梗上的分生孢子数范围有所不同, 我们推测所采集的南瓜和黄瓜上白粉病菌可能不是同一物种, 或者二者虽然为同一物种, 但是由于采集的时期不同造成了分生孢子梗上的分生孢子数范围不同, 确切的结论还有待进一步的试验验证。已有资料和本试验结果都表明, 侵染风仙花叶片和番茄叶片的白粉病病原与侵染黄瓜和南瓜的白粉病菌是不同的。近期还发现, 辽宁抚顺的番茄白粉病菌与北京的白粉病菌可能不是同一种白粉病菌, 因为抚顺的番茄白粉病菌的分生孢子在孢子梗上的着生方式为 4~5 个分生孢子聚生(未发表的数据)。白粉病菌是专性寄生菌, 无法在培养基上培养, 因此, 准确预测各类白粉病菌的种类, 并及时监测其小种分化, 是开展白粉病防治, 引进抗原材料和选育抗病品种的基础<sup>[24]</sup>, 这是该领域当前的研究热点之一。近年来, 已有研究者开始从分子水平上研究真菌分类, 克隆和测序了真菌核糖体基因, 根据序列特点进行真菌分类, 鉴定和系统发育的研究有很多报道, 这将是今后白粉病菌研究的一个新热点<sup>[25, 26]</sup>。

致谢: 感谢中国农业科学院蔬菜花卉研究所王晓宣博士和李君明博士提供番茄白粉病菌和番茄种质材料。

# 参考文献:

- [1] Spencer D M. The powdery mildews[ M ]. Academic Press, 1978; 1—32.
- [2] 卢东升. 信阳地区白粉病菌的研究[ J ]. 信阳师范学院学报, 1994, 7(1): 79—81.
- [3] Cai-Cheng Huang. How do plant species defend themselves against *Oidium lycopersici* [ M ]. Wageningen University PhD thesis, 2000; 4—9.
- [4] 张雪辉. 室内黄瓜白粉病防治方法研究[ J ]. 河北师范大学学报, 2005, 29(3): 190—192.
- [5] Saenz G S, Taylor J W. Phylogeny of the *Erysiphales* (powdery mildew) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences[ J ]. Canadian Journal of Botany, 1999, 77: 150—168.
- [6] Chaure P, Gurr S J, Spanu P. Stable transformation of *Erysiphe graminis* an obligate biotrophic pathogen of barley[ J ]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 205—207.
- [7] Takamatsu S. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Ersiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences[ J ]. Mycoscience, 2004, 45: 147—157.
- [8] Daughtrey M L, Wick R L, Peterson J L. Compendium of flowering potted plant diseases[ M ]. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1995: 90.
- [9] Bélanger R R, Bushnell W R, Dik A J *et al.* The Powdery Mildews: A comprehensive treatise[ M ]. American Phytopathological Society, St. Paul MN, 2002; 13—55.
- [10] D A Glawe, R Hummel G Jack. First report of powdery mildew of kalanchoe blossfeldiana caused by *sphaerotheca fuliginea* (*Podosphaera fuliginea*) in the Pacific Northwest[ M ]. Plant Health Progress 2003.
- [11] 刘树生, 曹若彬, 朱国念. 蔬菜病虫害防治手册[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 1995; 165—166, 202—203.
- [12] 陆家云. 植物病害诊断[ M ]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1997; 47.
- [13] Chengwei Li. Transcriptional, microscopic and macroscopic investigations into monogenic and polygenic interactions of tomato and powdery mildew[ M ]. Wageningen University PhD thesis, 2005; 10—11.
- [14] 徐毓娴, 蔡昕, 董小满 等. 可定量测量的透射式微分干涉显微镜系统[ J ]. 清华大学学报 2003, 43(2): 149—151.
- [15] 胡东维. 小麦白粉菌早期发育与侵染行为的细胞学研究[ J ]. 西北农业大学学报, 1997, 25(1): 1—6.
- [16] Amano K. Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi[ M ]. Japan Scientific Society Press, Tokyo, Japan, 1986.

(下转第 75 页)

2.7 不同光照对菌株 Snef85 菌丝生长和孢子着生的影响

试验结果表明,光照对菌丝的生长影响甚微(表7)。全黑暗条件下菌丝生长速度稍快于全光照和光暗交替的条件。全光照条件下孢子形成速度较快,但对产孢量影响不大。因此,全黑暗条件下有利于该菌株生长。

表 7 不同光照条件下 Snef85 的菌落生长速度及孢子着生情况

光照	菌落直径(mm)			72h 孢子分布直径 (mm)	孢子疏 密程度
	24h	48h	72h		
全光照	21.3	63.9	满	64.1	++++
光暗交替	20.4	64.9	满	61.1	++++
全黑暗	22.8	68.8	满	70.3	++++

3 结论与讨论

木霉菌菌株 Snef85 不同浓度的发酵液对根结线虫有不同的作用效果。在原液(1×),5×,10×,15×和20×稀释液浓度下,对根结线虫二龄幼虫的校正死亡率分别是98.12%,93.21%,59.56%,41.66%,13.85%。通过对其生物学特性的研究表明,菌株 Snef85 在 PDA 培养基上保持了最佳的生长态势;为该菌株较适宜的培养基;以葡萄糖为最佳碳源,以丙氨酸为最佳氮源;菌丝最适生长温度范围为25~30℃;在酸性和中性条件下菌落生长好于碱性条件,在pH为5~6的条件下生长较适宜;光照对其菌丝生长影响较小,全黑暗条件稍好于全光照和光暗交替。

目前,真正以木霉菌生产的生防制剂在生产上应用还不普遍,高效、稳定且适合工厂化的菌株不多,需要更广泛地研究其生物学特性,为持续农业提供更多的物质贮备和为木霉生产提供可靠的科学依据<sup>[6]</sup>。总之,木霉菌菌株 Snef85 是很有开发应用潜力的防治根结线虫的木霉菌,对其鉴定以及对发酵液中有效代谢产物的分离提纯工艺还需进一步研究,该菌株对环境的安全性评价也需要深入探讨。

参考文献:

[1] Barker K R, Townshend J L, Bird G W, *et al.* Method for evaluating pesticides for control of plant pathogens (Hickey K D, eds)[M]. St Paul, MN: APS Press, 1986: 283—296.

[2] Sharma D D. Effect of culture filtrates of biocontrol agents on larval mortality of *Meloidogyne incognita*, in comparison with Rugby 10G[J]. Indian Journal of Sericulture, 1999, 38(2): 152—154.

[3] Ansari M A, Rupela O P, Douaik A, *et al.* Effect of culture filtrates of *Pseudomonas striata*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride* and *Aspergillus awamori* on egg hatch of *Meloidogyne javanica*[J]. International Journal of Nematology, 2002, 12(2): 131—136.

[4] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[5] 高克祥, 项存悌, 骆会欣, 等. 木霉菌株 T88 生物学特性的研究[J]. 东北林业大学学报, 1995, 23(2): 33—39.

[6] 李立平, 段德芳. 植物生物学特性及拮抗作用研究进展[J]. 植物医生, 2006, 19(4): 4—6.

(上接第 71 页)

[17] Hirata K. Some problems noticed while investigating the host range of Erysiphaceae[J]. Trans Mycol Soc Japan, 1957, 6: 3—8.

[18] Hirata K. Notes on host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi. VI. distribution of the hosts of the powdery mildew fungi in the families of angiosperms[J]. Trans Mycol Soc Japan, 1976, 17: 36—62.

[19] Abiko K. Studies on the specialization of parasitism of *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) pollacci. I. powdery mildew fungi parasitic on cucurbits eggplant, edible burdock and Japanese butterbur[J]. Annals Phytopathol Soc Japan, 1978, 44: 612—618.

[20] Abiko K. Studies on the specialization of parasitism of *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) pollacci. I. powdery mildew fungi parasitic on weeds[J]. Bulletin of the Vegetable and Ornamental Crops Research Station, Series A, 1982, 10: 63—67.

[21] Whipps J M, Helyer N L. Occurrence of powdery mildew on aubergine in West Sussex[J]. Plant Pathol, 1994, 43: 36—48.

[22] Niks R E. Nonhost plant species as donors for resistance to pathogens with narrow host range. I. determination of nonhost status[J]. Euphytica, 1987, 36: 841—852.

[23] Wicks T J, Clare B G. Powdery mildew on tomatoes[J]. Australasian Plant Pathol, 1981, 10: 36—37.

[24] 王娟, 宫国义, 郭绍贵, 等. 北京地区瓜类蔬菜白粉病菌生理小种分化的初步鉴定[J]. 中国蔬菜, 2006(8): 7—9.

[25] 杨红, 李颖, 关国华, 等. 尖孢镰刀菌异核体及其不同核型分离子 rDNA ITS 区序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 381—384.

[26] 李敏权, 张自和, 柴兆祥, 等. 紫花苜蓿白粉病病原鉴定[J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 3(27): 303—306.