

文章编号: 1674-7054(2017)02-0147-06

橡胶树白粉病菌在疏水介质表面的 侵染特征和 RNA 提取

梁 鹏 李 响 何其光 刘文波 缪卫国 郑服从

(海南大学 热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

摘 要: 将白粉菌孢子接种到石蜡膜(parafilm) 介质表面, 观察不同温度条件下橡胶树白粉菌(*Oidium heveae* B. A. Steinmann) 菌株孢子在疏水介质上的侵染过程, 确定 0 ~ 24 hpi 孢子侵染结构发育特征, 提取侵染发育过程白粉菌的总 RNA, 采用 RT-PCR 扩增分析 18S 保守基因并评价其质量。结果表明: 橡胶树白粉菌孢子在 15 ~ 34 °C 温度条件下接种于 parafilm 介质表面能萌发并形成附着胞, 萌发和附着胞形成的适温范围 22 ~ 28 °C, 最适离体诱导温度 22 °C。孢子在 parafilm 介质表面 0 ~ 24 hpi(hour Post inoculation) 侵染发育过程可分为未萌发(0 hpi) 、萌发(4 hpi) 、附着胞形成(6 ~ 8 hpi) 和次生附着胞形成(16 ~ 24 hpi) 等 4 个阶段; 采用改良 Trizol 方法提取白粉菌孢子侵染发育过程 4 个阶段总 RNA, 可满足转录组文库要求, 并扩增 18S 序列, 进化分析显示其与白粉菌物种为同一分支。结果表明, 病原菌孢子在 22 ~ 28 °C 温度条件下能够在介质表面形成侵染结构, 0 ~ 4, 6 ~ 8, 16 ~ 24 hpi 侵染发育阶段总 RNA 可用于转录组测序分析研究。

关键词: 橡胶树白粉菌; 萌发; 附着胞; 疏水介质

中图分类号: S 432.4⁺4

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.02.003

橡胶树白粉病是由粉孢属的橡胶粉孢(*Oidium heveae* B. A. Steinmann) 侵染引起的病害^[1-2], 该病菌广泛分布于全球各橡胶种植区, 也是我国植胶区早春防治“两病一虫”的重点^[3]。白粉菌病原孢子在寄主橡胶上的侵染发育过程包括萌发、附着胞形成、侵入并形成吸器、表生菌丝体扩展和分生孢子形成等阶段, 其萌发适温范围为 16 ~ 32 °C, 侵染、扩展、产孢的适温范围为 15 ~ 25 °C, 温度和相对湿度是影响橡胶白粉菌发育侵染的主要影响因素^[4-5]。由于橡胶树白粉菌是专性寄生菌, 无法在人工培养基离体培养^[6], 难以进行遗传操作, 因此更多研究集中在其细胞学观察和防治上, 目前尚未培育出生产上大规模推广的抗白粉菌橡胶树品系, 关于橡胶树白粉菌致病基因功能验证的分子实验体系尚未建立, 病原菌致病机理亦缺乏详尽的研究^[7]。通过真菌 DNA 试剂盒和 Trizol 方法获取的白粉菌 DNA/RNA 能够满足构建基因组/转录组文库要求^[8], 但现有方法收集提取的白粉菌实际上是孢子和菌丝组织混合体, 缺少不同侵染发育过程中白粉菌组织的培养收集和 RNA 提取手段, 无法开展侵染过程中功能基因的表达研究。笔者通过观察橡胶白粉菌在疏水介质表面萌发和附着胞形成, 确定菌株孢子在介质表面的侵染发育过程, 提取相应阶段组织总 RNA 并评价其质量, 采用 RT-PCR 扩增分析 18S 保守基因, 旨在为进一步开展转录组测序分析和基因表达研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与植物材料 选用橡胶树白粉菌菌株 HO-73, 采自海南省儋州市橡胶林, 经单斑分离纯化后保

收稿日期: 2016-12-15

修回日期: 2017-02-11

基金项目: 国家重大基础研究计划(2011CB111612); 国家自然科学基金(31160359); 国家农业产业技术体系建设(CARS-34-GW8); 教育部博士点基金(20104601110004); 海南大学科研启动资金(kyqd1006)

作者简介: 梁鹏(1987-) 男, 海南大学热带农林学院 2014 级博士研究生, E-mail: jpdairy@163.com

通信作者: 缪卫国(1969-) 男, 博士, 教授, 主要从事分子植物病理等研究, E-mail: weiguomiao1105@126.com

存于海南大学环境与植物保护学院分子植物病理学实验室,采用橡胶 7-33-97 品系传代培养。

1.2 仪器和试剂 石蜡膜(parafilm) 购自美国 BEMIS 公司,真菌 RNA 试剂盒、胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司,PCR Mix 购自北京天根公司,反转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司, pMD18-T 载体购自 Takara 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 橡胶树白粉菌孢子在介质表面侵染过程观察 选取橡胶 7-33-97 品系嫁接苗 7~10 d 叶龄叶片作为培养材料,采用接菌培养 12 d 后 HO-73 的 24 h 龄新鲜分生孢子作为实验菌源。接种前 24 h 轻摇叶片抖落老孢子,以新生 24 h 龄分生孢子作为接种材料,确保实验中孢子活力及侵染结构发育均一性。用软毛刷将叶片表面新鲜分生孢子均匀刷落在 1.5 cm × 1.5 cm 石蜡膜(parafilm) 介质表面,置于底部有湿润滤纸的培养皿中,并在介质表面微喷无菌水水滴。培养皿避光保存,同批次设置 15, 18, 22, 24, 26, 28, 32, 34 °C 温度梯度,相对湿度 50%~80%,分别在接种 2, 4, 6, 8 hpi(hour post inoculation) 时段取出镜检白粉病菌孢子,并记载孢子萌发率和附着胞形成率。

将 parafilm 介质置于底部有湿润滤纸的保鲜盒(40 cm × 30 cm) 中,接种方法同上。根据温度对侵染发育的影响设置最佳培养温度,相对湿度 50%~80%,保鲜盒避光密封保存。根据橡胶树白粉菌侵染结构发育过程,培养至侵染结构发育所需时段(0, 4, 6, 8, 16, 24 hpi) 后将介质取出。每个观察时段均剪下 1 小片(1.5 cm × 1.5 cm) 接菌介质,显微镜下计数孢子萌发和附着胞形成率,并观察白粉菌在各时段的发育特征,其余部分则用于侵染发育阶段的总 RNA 提取。

以芽管长度达到孢子长径的一半记为萌发,统计 100 个分生孢子的萌发率、附着胞形成率(孢子萌发率 = 已萌发的孢子数/总孢子数; 附着胞形成率 = 附着胞数/孢子萌发数)^[9],每个处理重复 3 次,实验重复 3 次。采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行处理和图表制作。

1.4 侵染阶段总 RNA 提取 每次提取先加 2 mL 预冷的 Trizol 裂解液于介质上,用涂抹棒蘸取裂解液反复涂刮接菌介质表面,待介质上的裂解液内可见白色粉状物或出现浑浊时,用移液器收集裂解液转移到预冷的 2.0 mL 离心管中,每管分装 1 mL,振荡混匀 30 s,并确保离心管中无真菌团块,室温静置 10 min。每离心管加入 250 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min。4 °C 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。转移上层水相到新的 RNase free 2 mL 离心管中。加入 1/3 溶液体积的醋酸钾(pH6.0),颠倒混匀,4 °C 8 000 r · min⁻¹ 离心 1 min,室温静置 5 min。加入与混合液等体积的异丙醇,充分混匀,置于 -80 °C 2 h 以上。4 °C 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。小心移去上清,加入 100 μL DEPC 水溶解沉淀。随后参照真菌 RNA 试剂盒提取方法中洗脱步骤进行,加入 350 μL RB,250 μL 70% 的乙醇,7 μL β-巯基乙醇,颠倒混匀。将总体积 700 μL 的样品转移至 RNA mini column 管中,4 °C 10 000 r · min⁻¹ 离心 30 s。最后用 100 μL DEPC 水洗脱,-80 °C 保存备用^[8,10]。

1.5 18S 基因扩增和分析 各侵染发育时段(0, 4, 6, 8, 16, 24 hpi) 白粉菌 RNA 反转录为 cDNA,反转录按照反转录试剂盒说明进行 cDNA 第 1 链合成。采用 SR7R-SR5 引物对扩增真菌 18S 基因,SR7R-SR5 引物序列(5'-3') 为 SR7R-AGTTAAAAAGCTCGTAGTTG, SR5-GTGCCCTTCCGTCATT^[11]。反应体系为 Primer F (10 μmol · L⁻¹) 1 μL, Primer R (10 μmol · L⁻¹) 1 μL, PCR Mix 10 μL, ddH₂O 7.3 μL, cDNA 0.7 μL, 总体积 20 μL。扩增程序: 95 °C 变性 5 min, 然后 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物电泳检测后回收、克隆并送至华大基因科技股份有限公司进行测序。将测序得到的 18S 序列输入 NCBI 做 Blastn 同源比对,寻找同源性最高序列,并下载近源物种的 18S 基因序列。用 Bioedit 和 MEGA5.0 软件对同源序列进行多序列比对和系统发育分析,以最大似然法(Maximum Likelihood Method, ML)^[12] 构建系统进化树,根据贝叶斯信息量准则(Bayesian Information Criterion, BIC)^[13] 判断最适进化模型, Bootstrap 法进行自举检验,重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 橡胶树白粉菌在疏水介质上的萌发和附着胞形成 橡胶树白粉菌接触到 parafilm 介质 2 hpi 即开始萌发(图 1), 在 22~26 °C 温度下培养 4 h 后, *O. heveae* 分生孢子平均萌发率超过 40%。在 22~28 °C 范围内, 孢子在 8 hpi 时段萌发率达到 60%, 其中在 22 °C 萌发率最高, 达到 63.33%; 8 hpi 时段 22, 24, 26, 28,

32 ℃ 处理萌发水平差异不显著 ($P > 0.05$)。培养时间延长至 4 h 后, 孢子在 22 24 26 28 32 ℃ 温度下萌发率显著高于 15 18 34 ℃ 温度处理下萌发状况 ($P < 0.05$); 统计发现, 孢子在 15 ℃ 和 34 ℃ 处理下萌发率增长缓慢, 至 8 hpi 时段萌发率均为 31.0%。这说明过高或过低温度均不利于白粉菌的萌发, 特别是高温可能对孢子萌发存在抑制作用。

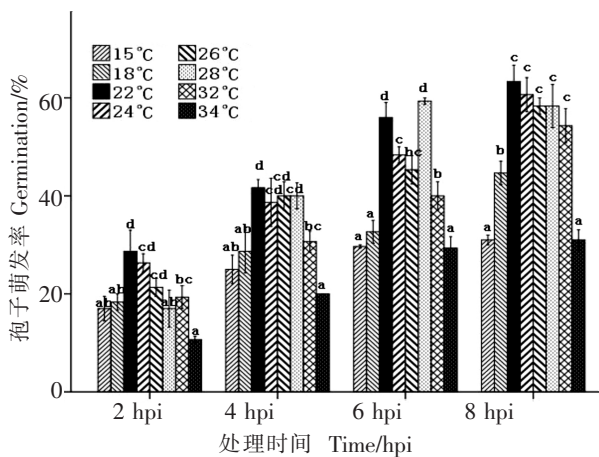


图1 不同温度对白粉菌孢子在 Parafilm 膜表面萌发的影响
不同字母表示不同温度组间差异显著($P < 0.05$);下同
Fig.1. The impact of different temperatures on *O. heveae* conidium germination on parafilm surface
Different letters mean significant difference between different temperature groups ($P < 0.05$), hereinafter

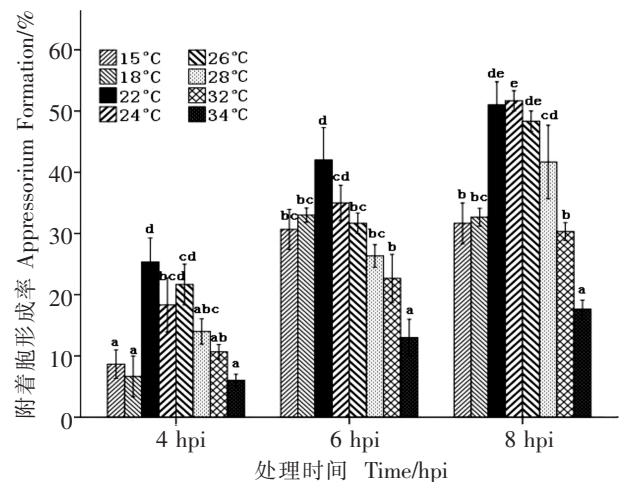


图2 不同温度对白粉菌在 parafilm 膜表面附着胞形成的影响
Fig.2 The impact of different temperatures on *O. heveae* appressorium formation on parafilm surface

观察发现 *O. heveae* 在 parafilm 介质上培养 4 h 能产生附着胞(图2)。培养时间延长至 6 h 后, 白粉菌在介质上的附着胞形成率随温度变化接近正态分布。在 22 24 26 28 ℃ 培养 8 h, 白粉菌附着胞形成率分别为 52.67% 53.33% 48.33% 41.67%。方差分析结果表明 22 ~ 28 ℃ 处理下附着胞形成率显著高于其他温度 ($P < 0.05$)。这说明 *O. heveae* 附着胞形成的适宜诱导温度是 22 ~ 28 ℃。对比发现 34 ℃ 处理下 8 hpi 附着胞形成率最低, 仅为 17.67%, 低温 15 ℃ 条件下也只有 31.67%; 说明在离体条件下温度是影响 *O. heveae* 附着胞形成的关键因素, 其中高温对橡胶树白粉菌侵染发育具有强抑制作用。

白粉菌在 parafilm 上萌发和附着胞形成统计结果表明, 孢子能够在 parafilm 介质上萌发和形成附着胞, 且温度是侵染发育的关键因素。对比不同温度对孢子萌发和附着胞形成的影响发现, 侵染发育适宜温度范围是 22 ~ 28 ℃。在适温范围内, 培养时间延长至 8 h 时萌发和附着胞形成无显著差异 ($P < 0.05$)。由于 22 ℃ 条件下萌发率最高, 已知孢子萌发是真菌形成附着胞并侵染寄主的前提, 故选取 22 ℃ 作为 *O. heveae* 人工介质接种的温度。

2.2 橡胶树白粉菌侵染结构发育阶段观察 橡胶树白粉菌孢子接种 parafilm 上侵染结构见图3, 白粉菌分生孢子单细胞, 呈椭圆形, 两端钝圆。分生孢子通常在近末端产生萌发芽管, 每个细胞长出 1 个芽管, 芽管顶端膨大形成附着胞, 孢子、芽管、附着胞均无色。0 hpi 时段将孢子轻刷到介质后马上镜检观察, 该时期孢子通常形态饱满呈椭圆状(图3A)。4 hpi 部分孢子开始萌发并发育出细长芽管, 平均萌发率达到 45.6% (图3B, 表1); 6 hpi 芽管顶端开始膨大, 并在顶端分化形成掌状附着胞(图3C, 表1); 8 hpi 观察发现芽管分化成掌状附着胞后继续伸长, 该时段附着胞形成率为 53.6% (图3D, 表1); 16 hpi 后可观察到明显的附着胞分瓣结构, 芽管继续伸长, 部分孢子芽管顶端开始再次膨大(图3E, 表1); 24 hpi 时段发现部分孢子发育出次生附着胞, 同时萌发率和附着胞形成率分别达到 71.0% 和 68.6% (图3F, 表1)。结果表明, parafilm 介质诱导下橡胶树白粉菌孢子在 0 4 6 8 16 24 hpi 时段侵染结构发育存在明显差异。结合 6 个观察时段的萌发率和附着胞形成率统计(表1), 可以大致确定侵染结构发育过程与接菌时段的对应关系, 分别为未萌发(0 hpi)、萌发(4 hpi)、附着胞形成(6 8 hpi)和次生附着胞形成(16 24 hpi)等 4 个侵染发育阶段。

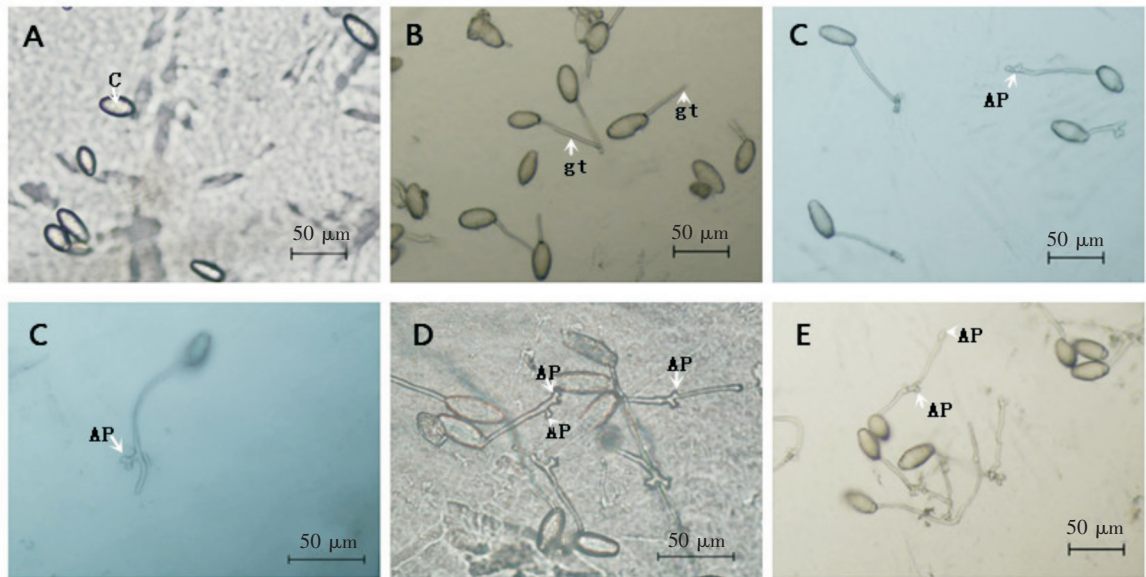


图 3 橡胶树白粉菌不同发育时段的形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of *O. heveae* at different infection stages

A: 0 hpi 分生孢子 (200 ×) ; B: 4 hpi 孢子萌发 (200 ×) ; C: 6 hpi 附着胞形成 (200 ×) ; D: 8 hpi 附着胞形成 (400 ×) ; E: 16 hpi 次生附着胞形成 (400 ×) ; F: 24 hpi 次生附着胞形成 (200 ×) 。 c: 分生孢子; gt: 芽管; AP: 附着胞
A: 0 hpi conidium (200 ×) ; B: 4 hpi conidium germination (200 ×) ; C: 6 hpi appressorium formation (200 ×) ; D: 8 hpi appressorium formation (400 ×) ; E: 16 hpi secondary appressorium formation (400 ×) ; F: 24 hpi secondary appressorium formation (200 ×) . c: conidium; gt: germination tube; AP: appressorium. Bar: 50 μm

表 1 橡胶树白粉菌在 parafilm 表面侵染形态特征统计

Tab. 1 Statistics of morphological features of infection structures of *O. heveae* on parafilm surface

形态特征 Morphological feature	0 hpi	4 hpi	6 hpi	8 hpi	16 hpi	24 hpi
孢子萌发率 Germination/%	0a	45.6 ± 3.12b	52.1 ± 2.35c	62.3 ± 1.35d	66.7 ± 1.54e	71.0 ± 1.69f
附着胞形成率 Appressorium/%	0a	16.3 ± 4.25b	44.7 ± 3.36c	53.6 ± 2.84d	59.8 ± 3.32e	68.6 ± 2.49f

注: 平均值以平均值 ± 标准误表示 不同字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Mean value is expressed as Mean ± SE. Different letters mean significant difference between different groups ($P < 0.05$)

2.3 橡胶树白粉菌侵染发育特征阶段
RNA 提取 根据橡胶树白粉菌在 parafilm 上侵染发育过程 , 分别提取 22 ℃ 处理下 0 4 6 8 16 24 hpi 时段总 RNA。电泳结果表明 , 各侵染阶段样品出现 2 条条带 , 分别对应 28S 和 18S rRNA , 其中 28S 条带大约是 18S 条带亮度的 2 倍 , 表明提取的总 RNA 完整度较好。核酸定量检测结果显示 $A_{260/280}$ 数值在 1.95 ~ 2.25 之间 , 质量浓度达到 150 mg · L⁻¹ 以上 (表 2) , 表明提取的 RNA 纯净且浓度较高。

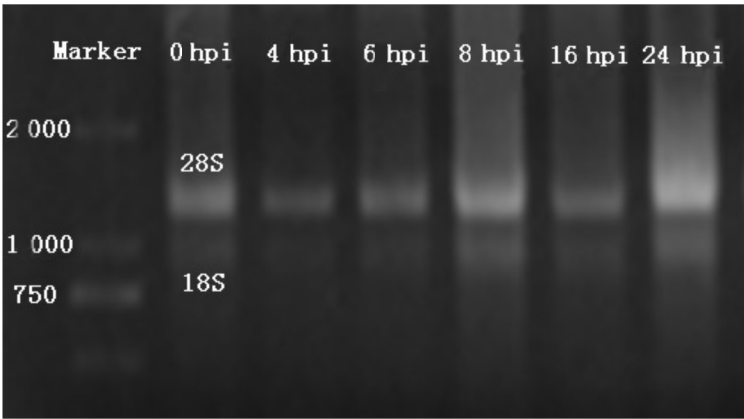


图 4 RNA 提取电泳

Fig. 4 RNA extracted and analyzed with electrophoresis agarose gel
M: 2 000 bp marker

表 2 白粉菌侵染发育特征时段 RNA 质量检测
Tab. 2 Detection of RNA quality of *O. heveae* isolated at different infection stages

RNA 指标/时段 Index/Time	0 hpi	4 hpi	6 hpi	8 hpi	16 hpi	24 hpi
浓度 Concentration/(mg · L ⁻¹)	225.6	178.3	156.5	320.0	188.5	276.5
<i>A</i> _{260/280}	2.02	2.18	2.09	1.98	1.94	1.98
<i>A</i> _{260/230}	1.95	1.98	2.23	2.17	2.25	2.09

2.4 橡胶树白粉菌 18S 序列扩增和进化分析 采用 SR7R-SR5 引物对扩增 *O. heveae* 18S 基因片段,6 个时段均克隆到大于 500 bp 的片段(图 5),经 30 个扩增循环 10 μL 点样所得条带亮度较为一致,证明提取的 RNA 样品同样可用于橡胶白粉菌基因功能表达验证实验。

Blastn 比对结果显示,橡胶树白粉菌 18S 序列(518 bp)的同源序列主要来自白粉菌目白粉菌科物种。系统发育分析表明橡胶树白粉菌与百里香白粉菌(*Erysiphe friesii*)相似性高达 99%,并与拟南芥白粉菌(*Golovinomyces orontii*)、桑叶背白粉菌(*Phyllactinia moricola*)、枸杞白粉菌(*Arthrocladiella mougeotii*)、鞑靼内丝白粉菌(*Leveillula taurica*)、葡萄白粉菌(*Uncinula necator*)等聚为同一分支(图 6)。这表明 *O. heveae* 和白粉菌科各属真菌亲缘关系较近(表 3)。大麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)则出现在另一分支,在 ML 分析中发现橡胶树白粉菌与 *Magnaporthe oryzae*、*Colletotrichum truncatum* 等死体寄生植物病原菌进化分歧较大。

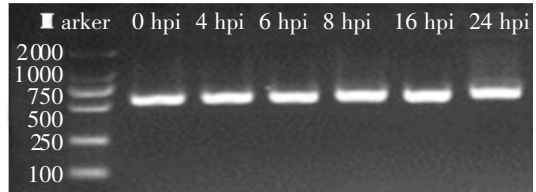


图 5 18S 基因在不同时段的表达
Fig.5 Expression of 18S gene at different infection stages
M: 2 000 bp marker

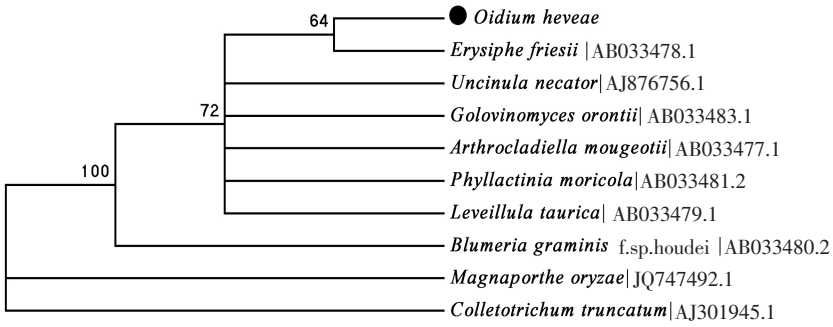


图 6 橡胶树白粉病菌系统发育分析
Fig.6 Phylogenetic analysis of *Oidium heveae*

4 讨 论

由于橡胶树白粉菌为活体专性寄生真菌,无法离体纯培养,目前尚未发现有性世代,这为病原的培养收集、细胞学观察和下游分子生物学实验带来了极大困难。笔者以培养 12 d 后新鲜孢子为菌源,观察橡胶树白粉菌在疏水石蜡膜上侵染发育过程,发现 0~24 hpi 侵染发育过程可分为未萌发(0 hpi)、萌发(4 hpi)、附着胞形成(6~8 hpi)和次生附着胞形成(16~24 hpi)等 4 个形态显著的发育阶段。对比发现离体状态下病原菌侵染发育前期过程与在寄主叶片上相似,都能产生芽管和附着胞等侵染结构,由于疏水介质无法为病原菌生长提供营养,无法长时间培养直至产生分生孢子完成侵染循环。单家林等发现寄主叶片角质层厚度、叶片生长老化速度、原生质体积等组织结构特征与对白粉抗病性有密切关系^[14];巴西橡胶树属大戟科乔木,叶片生长速度较慢且适宜侵染时期短,造成实验取材不易,而在 parafilm 疏水介质上观察白粉菌侵染无需染色脱色等步骤,保存了病原菌原始形态,实验证明疏水介质可作为观察病原孢子侵染发育前期形态变化的理想材料。高宏华等的研究发现,橡胶树白粉菌孢子在寄主上萌发适温范围 16~32 ℃,侵染、扩展、产孢的适温范围 15~25 ℃^[4]。本研究结果表明,孢子在 15~34 ℃温度条件下接种 Parafilm 表面

均可萌发并形成附着胞,侵染发育适宜温度范围为 22 ~ 28 °C 这与前人研究结果存在一定差异;实验中观察到高温显著抑制孢子萌发和附着胞形成,这印证了温度是影响 *Oidium heveae* 发育侵染的主要因素^[6]。

对模式真菌稻瘟病菌的研究表明,寄主表面疏水性、硬度和营养饥饿等因素均可影响病原真菌附着胞的分化^[15-18]。稻瘟病菌孢子在投影胶片(Duplicate film)表面可侵染形成附着胞,通过形态特征将 0 ~ 30 hpi 划分为未萌发、萌发、附着胞形成、附着胞成熟和侵染栓形成等阶段^[19]。本研究通过石蜡膜(parafilm)诱导橡胶树白粉菌侵染发育,并选取橡胶树白粉菌同一批次新鲜分生孢子接种,保证 *O. heveae* 孢子 在介质上侵染发育状态的均一性。结合改进的 Trizol 方法提取侵染时段总 RNA,并在 0, 4, 6, 8, 16, 24 hpi 时间段 RNA 扩增分析 18S 基因,经定量测定显示 RNA 浓度及完整性符合 Illumina 转录组文库要求,并可用于下一步功能基因表达实验。笔者选用的培养 12 d 后新鲜橡胶白粉菌孢子形态饱满,活力旺盛,适宜作为植物-病原互作和离体侵染发育研究的材料。骆红梅等的研究表明,附着胞成熟阶段差异表达基因数显著高于诱导形成阶段^[19],本实验中考虑到橡胶树白粉菌在活体叶片和疏水基质表面 0 ~ 24 hpi 侵染发育过程相似,而侵染器官形成需要大量基因按照既定程序表达,故对这一过程的形态划分和 RNA 提取有助于了解侵染过程的分子细节。

参考文献:

- [1] Limkaisang S, Komuin S, Furtado E L, et al. Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree [J]. *Mycoscience*, 2005, 46: 220 - 226.
- [2] 李增平, 郑服丛. 热区植物常见病害诊断图谱 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 160.
- [3] 张宇, 王萌, 杨叶, 等. 防治橡胶树白粉病 15% 乙嘧酚磺酸酯热雾剂的研制 [J]. *中国热带农业*, 2011(4): 45 - 47.
- [4] Tum, Cai H, Hua Y, et al. In vitro culture method of powdery mildew (*Oidium heveae* Steinmann) of *Hevea brasiliensis* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(68): 13167 - 13172.
- [5] 高宏华, 刘先宝, 罗大全, 等. 橡胶白粉菌(*Oidium heveae* Steinmann) 基因组 DNA 的提取方法 [J]. *热带农业科学*, 2008, 27(6): 8 - 11.
- [6] 陆大京, 周启昆, 余卓桐, 等. 橡胶树白粉病病原菌生物学研究 [J]. *热带作物学报*, 1982, 3(2): 63 - 70.
- [7] 张新春, 刘详民, 王家保, 等. 橡胶树白粉病病原菌与寄主互作的超微结构观察 [J]. *热带作物学报*, 2010, 3(12): 2250 - 2254.
- [8] 万三连, 梁鹏, 宋风雅, 等. 橡胶树白粉菌收集及 DNA 和 RNA 提取方法比较 [J]. *广东农业科学*, 2013(11): 134 - 139.
- [9] 刘先宝, 高宏华, 黄贵修, 等. 橡胶树白粉病菌 rDNA-ITS 序列及其系统发育分析 [J]. *热带作物学报*, 2008, 29(2): 215 - 219.
- [10] 刘先宝, 高宏华, 蔡吉苗, 等. 9 种热区植物白粉病菌的 rDNA-ITS 序列及系统发育分析 [J]. *热带作物学报*, 2013, 34(1): 98 - 104.
- [11] 张敬泽, 胡东维. 影响柿树炭疽菌孢子萌发、附着胞形成及致病性的环境因子 [J]. *植物生理学报*, 2004, 34(2): 154 - 161.
- [12] Liu T B, Lu J P, Liu X H, et al. A simple and effective method for total RNA isolation of appressoria in *Magnaporthe oryzae* [J]. *J. of Zhejiang Univ. Sci. B*, 2008, 9(10): 811 - 817.
- [13] Lydolph M C, Jacobsen J P, Gilbert M T, et al. Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA [J]. *American Society for Microbiology*, 2005, 71(2): 1012 - 1017.
- [14] Luo A, Qiao H, Zhang Y, et al. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1): 242.
- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111 - 120.
- [16] Xiao J Z, Watanabe T, Kamaku R T, et al. Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*: physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation [J]. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1994, 44: 227 - 236.
- [17] Lee Y H, Dean R. Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 115: 71 - 75.
- [18] Talbot N J, Mccafeerty H R K, MA M, et al. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression [J]. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1997, 50: 179 - 195.
- [19] 骆红梅, 金庆超, 彭友良, 等. 疏水表面诱导稻瘟病菌侵染结构发育过程的基因表达谱分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(6): 1034 - 1041.

(下转第 167 页)

Newly Recorded Vascular Plants in Hainan , China

ZHANG Kai¹ , DONG Shiyong² , WU Tingtian¹ , LI Donghai¹ , YANG Xiaobo¹

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China; 2. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization , South China Botanical Garden , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510650 , China)

Abstract: A survey of plant resources was made in September 2016 in the Wuzhishan National Nature Reserve to inventory the plant resources and biodiversity of the National Nature Reserve. In this survey the genus *Petrosavia* Becc. , represented by *Petrosavia sakuraii* (Makino) J. J. Sm. ex Steenis and two ferns , namely *Asplenium* × *xinyiense* Ching & S. H. Wu (*Aspleniaceae*) *Metathelypteris uraiensis* (Rosenst.) Ching (*Thelypteridaceae*) , were recorded for the first time in Hainan Island , Hainan Province , China.

Keywords: new record; ferns; *Petrosavia*; Hainan Island

(上接第 152 页)

Total RNA Isolation and Observation of Infection Structures of *Oidium heveae* Induced by Hydrophobic Substratum

LIANG Peng , LI Xiang , HE Qiguang , LIU Wenbo , MIAO Weiguo , ZHENG Fucong

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource/Institute of Tropical Agriculture and Forestry , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: HO-73 strain of *Oidium heveae* B. A. Steinmann was cultured on parafilm surface at different hours post inoculation (hpi) under different temperatures to observe its infection process and the infection structure formation of its conidia. *O. heveae* was cultured at the temperatures ranging from 15 °C to 34 °C and the suitable temperatures for conidium germination and appressorium formation ranged from 22 °C to 28 °C with the optimal temperature being 22 °C. The infection process of the conidia of the strain from 0 – 24 hpi was divided into 4 stages: no germination at 0 hpi , germination at 4 hpi , appressorium formation at 6 , 8 hpi and secondary appressorium formation at 16 , 24 hpi. Total RNA of the strain was isolated from the cultures at different infection stages from 0 hpi to 24 hpi. The 18S rRNA was detected by RT-PCR at all the infection stages and analyzed by using the phylogenetic relationship. Total RNAs of the conidia at the four infection stages were isolated by using the modified Trizol method. The 18S rRNA of *O. heveae* was detected in all the conidia by RT-PCR , and clustered to the same branch as *Erysiphaceae* by using phylogenetic analysis. The result indicated that the infection structures of *O. heveae* were successfully developed on parafilm surface at a temperatures ranging from 22 °C to 28 °C , and that the total RNA extracted from the cultures at 0 , 4 , 6 , 8 , 16 and 24 hpi can be used for 18S amplification.

Keywords: *Oidium heveae* B. A. Steinmann; germination; appressorium; hydrophobic substratum