

马铃薯早疫病病原菌的分离鉴定及品种早疫病抗性评价

李秀华, 梁瑞萍, 张仙保, 李文霞*, 王亮明 (包头市农牧业科学研究院, 内蒙古包头 014013)

摘要 为明确包头地区马铃薯早疫病的病原菌, 采用常规组织分离法进行分离纯化, 依据病原菌的形态特征和致病性, 将分离病原菌初步确定为链格孢属 *Alternaria*。rDNA-ITS 序列分析表明, 病原菌 rDNA-ITS 区大小为 542 bp, 经 Blast 比对, 该菌 ITS 序列与链格孢属 *Alternaria* 同源性 100%。同时, 对部分马铃薯品种的早疫病抗性进行室内接种鉴定, 结果表明, 供试 12 个马铃薯品种中, 仅“中薯 3 号”病情指数为 23.44, 属中抗品种, 其余品种均是早疫病抗性品种。

关键词 马铃薯早疫病; rDNA-ITS 序列分析; 接种鉴定; 抗性品种

中图分类号 S435.32 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)22-0086-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.22.021

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of the Pathogens of Potato Early Blight and Evaluation of Potato Varieties Resistance to Early Blight
LI Xiu-hua, LIANG Rui-ping, ZHANG Xian-bao et al (Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences in Baotou, Baotou, Inner Mongolia 014013)

Abstract In order to identify the pathogen of potato early blight in Baotou area, routine tissue separation method was used, according to the morphological characteristics and pathogenicity of the pathogen, the isolated pathogen was preliminarily identified as *Alternaria*. Sequence analysis showed that the rDNA-ITS region of the pathogen was 542 bp. Blast comparison showed that ITS sequence of the pathogen had 100% homology with *Alternaria*. Meanwhile, the resistance of some potato varieties to early blight was identified by indoor inoculation. The results showed that only the disease index of “Zhongshu 3” was 23.44, which was a moderately resistant variety among the 12 potato varieties, and the other varieties were early blight resistant varieties.

Key words Potato early blight; rDNA-ITS sequence analysis; Inoculation identification; Resistant varieties

马铃薯早疫病(potato early blight)俗称夏疫病、轮纹病或干斑病,在我国和世界各马铃薯产区分布较为普遍,严重地块发病率大于 80%,减产达 30%以上^[1-4]。该病主要为害叶片,也能侵害叶柄、茎和薯块。叶上病斑最初为褐色圆形斑点,以后逐渐扩大成圆至近圆形,褐色至暗褐色,病斑边缘明显,有清晰的同心轮纹,有时病斑外缘有较窄的黄色晕圈。据报道,马铃薯早疫病主要由茄链格孢菌(*Alternaria solani*)引起^[5],另有研究表明马铃薯早疫病的病原菌分别为 *Alternaria solani* 和 *Alternaria alternata*^[6]。包头地区是内蒙古自治区种薯和商品薯的主产区之一,早疫病是常发病害,危害较为严重。为确定当地早疫病病原菌的归属,笔者采用常规组织分离法对包头地区的马铃薯早疫病病原菌进行分离鉴定,并利用苗期喷雾接种对部分马铃薯品种早疫病抗性进行鉴定,以期对包头地区马铃薯早疫病的综合防控提供科学依据。

1 材料与方

1.1 病原菌的分离和纯化 2019 年 6 月陆续在包头市农牧业科学研究院院内和固阳县马铃薯试验区采集具典型同心轮纹的马铃薯早疫病病叶,依据常规组织分离法进行病原菌的分离、纯化,得到供试菌株,命名为“mls1”。将病原菌保存于 PDA 斜面上,置于 4℃ 冰箱保存。

1.2 病原菌的形态学观察 用直径 5 mm 的打孔器在菌落边缘打取一圈菌饼,挑针挑取菌饼接种于新的 PDA 平皿上,

28℃ 恒温黑暗培养 3~7 d。肉眼观察菌落颜色、形态、气生菌丝特点,OLYMPUS CX31 显微镜下观察病原菌的形态结构。4~10 d 后显微镜下观察分生孢子形态,测量分生孢子的大小,包括长、宽、横纵隔膜数、孢子颜色等。参考张天宇等^[7-8]对链格孢属的特征描述进行鉴定。

1.3 病原菌的致病性测定 病原菌置于 PDA 固体培养基上 28℃ 恒温黑暗培养,7 d 后用无菌水洗脱分生孢子,利用血球计数板制备成 1×10^7 个/mL 孢子悬浮液。采用离体叶片法^[9],取新鲜无病虫害的马铃薯叶片,无菌水冲洗后置于 75% 乙醇中振荡消毒 2 min,无菌水漂洗 3 次,置于铺有无菌湿滤纸的平皿内。采用涂抹法将孢子悬浮液接种于消毒后的马铃薯叶背面,空白对照以无菌水处理,置于 25℃ 光照培养箱内培养,接种后每 24 h 观察 1 次。依据柯赫氏法则,发病后从病斑处再次分离病原菌,并与原接种菌进行比较。

1.4 病原菌 rDNA-ITS 序列鉴定 收集在 PDA 平板上培养 8~10 d 的早疫病菌丝体,采用 CTAB 法提取病原菌基因组 DNA^[10]。利用真菌核糖体 rDNA 转录间隔区(ITS)PCR 扩增的通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对提取的真菌总 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL):2.0 μL dNTPs(10 mmol/L),5.0 μL 10×Reaction buffer(with MgCl₂),0.5 μL Taq 聚合酶(5 U/μL),ITS1(10 μmol/L)和 ITS4(10 μmol/L)各 2.0 μL,2.0 μL 模板 DNA(30 ng/μL),11.5 μL ddH₂O。反应条件:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 45 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪 GelDoc-it² imager 下观察照相,观察到预期条带后,PCR 产物委托上海生工生物工程有限公司进行测序。

基金项目 内蒙古自治区科技计划项目“马铃薯种薯露地繁育提质增效关键技术研究”;内蒙古自治区马铃薯种业技术创新中心项目。

作者简介 李秀华(1981—),女,山东成武人,高级农艺师,硕士,从事作物育种与栽培研究。* 通信作者,研究员,从事作物育种与栽培方面研究。

收稿日期 2021-11-09;修回日期 2021-12-22

1.5 抗病性接种鉴定 试验于 2020 年 5 月 10 日在包头市农牧业科学研究院育苗温室进行,供试品种购自内蒙古自治区固阳县精诚脱毒马铃薯繁育中心,种薯级别为原原种,经催芽后种植于花盆内,花盆内为育苗基质。每个品种播种 25 盆,每盆 1 粒,共计 12 个品种,3 次重复。6 月 2 日参试品种全部出苗。于 4 叶期喷雾接种鉴定菌株分生孢子悬浮液,分生孢子浓度为 1×10^4 个/mL,保湿(RH=100%)48 h 后常规管理。温室温度为 20~32 ℃。接种 3 d 后开始观察,第 7 天对供试品种逐叶按照 9 级标准调查发病率和病情指数。

马铃薯早疫病病害分级标准^[11],0 级:叶片无病斑;1 级:病斑面积占整个叶面积 5% 及以下;3 级:病斑面积占整个叶面积 6%~10%;5 级:病斑面积占整个叶面积 11%~20%;7 级:病斑面积占整个叶面积 21%~50%;9 级:病斑面积占整

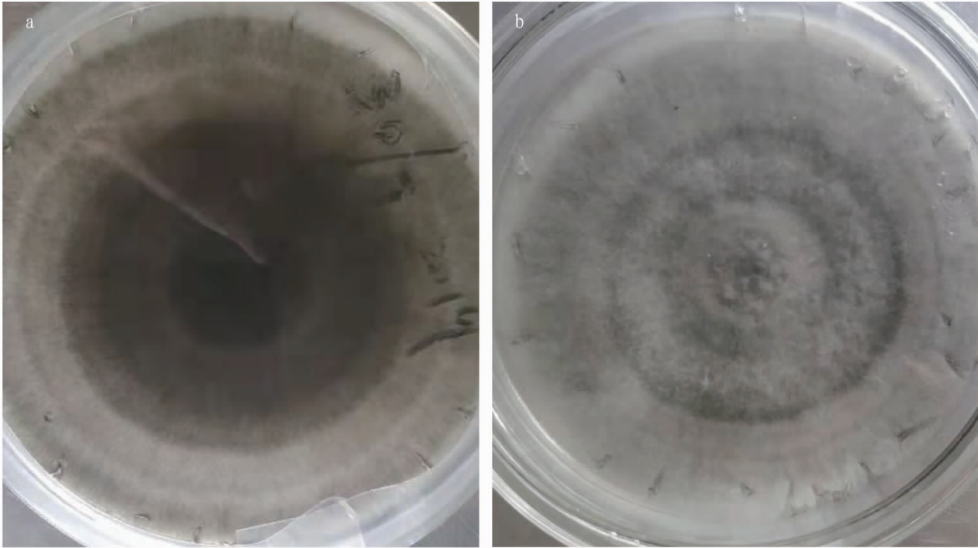
个叶面积 50% 以上。抗病性评价标准^[12]:免疫(I),病情指数 0;高抗(HR),病情指数 0~0.10;抗病(R),病情指数 0.11~20.00;中抗(MR),病情指数 20.01~40.00;中感(MS),病情指数 40.01~60.00;感病(S),病情指数在 60.01 以上。

发病率(%)= 发病叶片数/调查叶片数×100

病情指数(%)= $\frac{\sum(\text{各级病叶数}\times\text{各级代表值})}{\text{调查总叶数}\times\text{最高级别代表值}}\times 100$

2 结果与分析

2.1 病原菌形态特征 将马铃薯早疫病病原菌“mls1”接种在 PDA 培养基上,于 28 ℃ 恒温黑暗培养,如图 1 所示,其气生菌丝体生长快,较发达,初期气生菌丝灰白色,约 4 d 后转为灰绿色。PDA 平皿上培养菌落形成以接种菌饼为中心的同心圆,约 8 d 长满直径 9 cm 的培养皿。如图 2 所示,显微



注:a.培养 7 d 时菌落背面形态;b.培养 7 d 时菌落正面形态
Note: a. The back culture characteristics on the 7th day; b. The frontal culture characteristics on the 7th day

图 1 马铃薯早疫病病原菌培养特性
Fig.1 Culture characteristics of potato early blight



图 2 马铃薯早疫病“mls1”分生孢子形态
Fig.2 Morphologic characteristics of conidia of potato early blight “mls1”

镜下观察到气生菌丝有隔膜和分支,分生孢子梗颜色黄褐色,单生或呈分支状,较菌丝短且宽,宽 5~10 μm。28 ℃ 恒温黑暗培养至 4 d 后,显微镜下可观察到分生孢子,由孢子梗顶端产生,单生或簇生,淡黄色至黄褐色,形态多样,为短棍形、梨形、长椭圆形等。1~4 个横隔膜,0~3 个纵、斜隔膜,大小多在 (30~70) μm×(15~25) μm,多数顶端具喙,喙宽约 5 μm。

2.2 病原菌致病性 将分离纯化后得到的马铃薯病原菌“mls1”菌株的分生孢子悬浮液接种于马铃薯健康离体叶片上,25 ℃ 恒温保湿光照培养,约 4 d,接种“mls1”菌株的叶片出现典型的同心轮纹症状,空白对照无症状。对接种后表现典型早疫病症状的马铃薯病斑进行再分离、纯化,得到与原菌株一致的病原菌。依据柯赫氏法则,证实标记为“mls1”的原接种菌株为马铃薯早疫病的病原菌。

2.3 病原菌 rDNA-ITS 序列鉴定 利用 CTAB 法提取病原菌“mls1”基因组 DNA,如图 3 所示,马铃薯早疫病菌基因组 DNA 大小约在 5 000 bp,无降解,无污染。所提 DNA 经超微

量分光光度计 Thermo NanoDrop 2000 定量到 30 ng/μL, 备用。利用真菌核糖体 rDNA 转录间隔区(ITS) PCR 扩增的通用引物 ITS1 和 ITS4 对提取的真菌总 DNA 进行 PCR 扩增, 在早疫病病原菌基因组 DNA 中扩增出 1 条 540 bp 左右的片段。PCR 产物委托上海生工生物工程有限公司进行测

序, 结果表明, 病原菌“*mls1*”的 rDNA-ITS 区大小为 542 bp, 将该序列与 GenBank 中已登录序列进行 Blast 比对。如图 4 所示, 该菌 ITS 序列与链格孢属 *Alternaria* 同源性高, 为 100%, 结合形态特性确定该病原菌为链格孢属真菌。

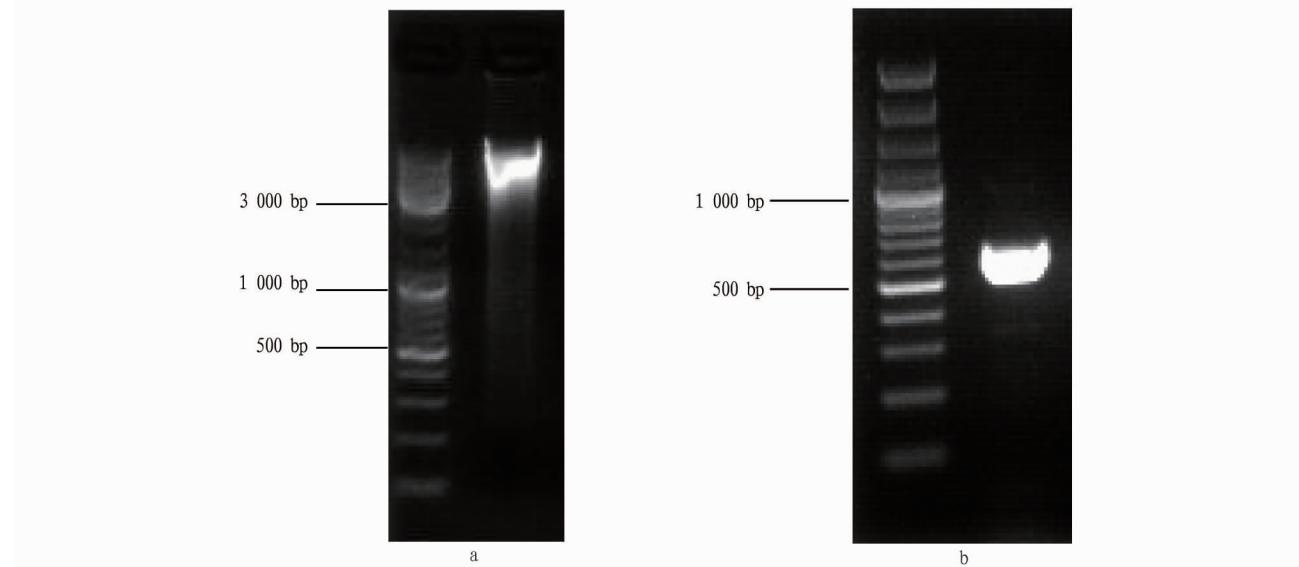


图 3 马铃薯早疫病病原菌“*mls1*”基因组 DNA (a) 和 ITS 区 PCR 扩增产物 (b)

Fig.3 Genomic DNA of potato early blight pathogen “*mls1*” (a) and PCR amplification products of Internal Transcribed Spacer (b)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Alternaria alternata FC-7054 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA_partial and complete sequence	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	590	LC586226.1
Alternaria alternata isolate CD1 small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal transcribed spacer...	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	563	OK062076.1
Alternaria alternata isolate PBR-Aa2 small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal transcribed sp...	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	571	OK042281.1
Alternaria alternata isolate MBPER001B small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal transcribed...	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	584	OK037574.1
Alternaria alstroemeriae isolate 1-92 small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal transcribed sp...	Alternaria alstro...	1002	1002	100%	0.0	100.00%	571	OK011827.1
Alternaria alstroemeriae isolate 1-4 internal transcribed spacer 1_partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and...	Alternaria alstro...	1002	1002	100%	0.0	100.00%	559	OK011825.1
Alternaria sp. strain LK4 internal transcribed spacer 1_partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr...	Alternaria sp.	1002	1002	100%	0.0	100.00%	576	MZ682167.1
Alternaria alternata isolate Aa14 small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal transcribed spacer...	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	614	MZ577141.1
Alternaria angustiovoidea strain FKII_L8_BK_P2B small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal tr...	Alternaria angusti...	1002	1002	100%	0.0	100.00%	558	MT704925.1
Alternaria angustiovoidea strain FKII_L2_CM_DRAB1 internal transcribed spacer 1_partial sequence: 5.8S riboso...	Alternaria angusti...	1002	1002	100%	0.0	100.00%	544	MT704920.1
Alternaria alternata isolate CP-02-1 small subunit ribosomal RNA gene_partial sequence: internal transcribed spa...	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	559	MZ568117.1
Alternaria alternata isolate S2 internal transcribed spacer 1_partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	Alternaria alternata	1002	1002	100%	0.0	100.00%	545	MZ565498.1

图 4 马铃薯早疫病病原菌 ITS 序列 Blast 比对结果

Fig.4 Results of Blast comparison of potato early blight pathogens Internal Transcribed Spacer

2.4 不同品种马铃薯早疫病抗性接种鉴定 温室对 12 个马铃薯品种早疫病抗性接种鉴定, 发现接种后 3 d 马铃薯叶片开始出现发病点, 之后病斑开始扩展, 约 7 d 形成轮纹状病斑, 部分叶片干枯, 之后发病进展缓慢。在供试的 12 个马铃薯品种中, 仅“中薯 3 号”病情指数为 23.44, 依据抗病性评价标准可知, 其对早疫病抗性评价是中抗。除“中薯 3 号”外, 其余品种均是早疫病抗性品种, 其中“荷兰 15”发病率和病情指数最高(表 1)。

3 结论与讨论

马铃薯早疫病在内蒙古马铃薯主产区是常发病害, 尤其夏季雨热同期发病较重, 可侵染块茎, 对马铃薯产量造成一定影响^[13-15]。该研究利用 rDNA-ITS 序列鉴定, 将所分离马铃薯早疫病菌株鉴定到链格孢属(*Alternaria*), 未鉴定到种, 这与已有报道类似^[16-17], 下一步需设计特异性引物, 再次进行鉴定。

表 1 不同马铃薯品种抗病性接种鉴定

Table 1 Inoculation identification of potato varieties resistance to early blight at seedling stage

序号 No.	品种 Varieties	发病率 Morbidity // %	病情指数 Disease index	评价 Evaluation
1	龙薯 4 号	15	1.71	R
2	陇薯 3 号	42	6.39	R
3	荷兰 15	76	10.00	R
4	民丰红	47	5.18	R
5	冀张薯 14	11	1.22	R
6	华颂 7 号	34	4.26	R
7	后旗红	9	1.18	R
8	中薯 3 号	84	23.44	MR
9	中薯 21 号	15	1.74	R
10	冀张薯 12 号	19	2.15	R
11	冀张薯 8 号	35	5.08	R
12	斯凡特	33	6.48	R

下的标准双头率最大,达 87.96%。

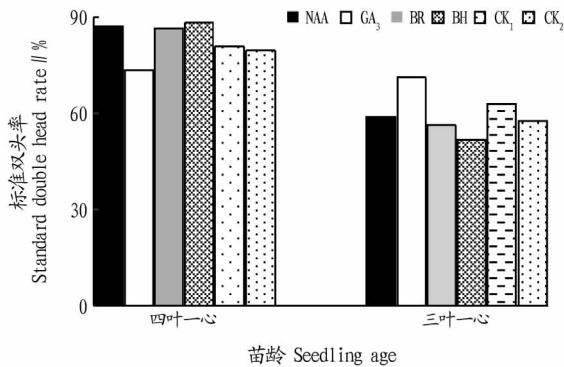


图7 不同生理苗龄对甜瓜嫁接双头苗标准双头率的影响

Fig.7 Effects of different physiological seedling ages on the standard double-headed percentage of muskmelon grafted double-headed seedlings

3.2 不同时期双头处理对甜瓜双头生长的影响 王希波等^[9]在研究番茄双头双断根嫁接育苗关键技术时,所选用时期为三叶一心。该研究不同生理苗期各个指标分析结果显示,四叶一心时,CK₂处理下的双头长度最小,为 1.79 cm,而偏离度最大,为 0.29;最低标准双头率为 GA₃处理时的 73.33%。三叶一心时,NAA处理双头长度最大,达 1.73 cm;最小偏离度为 GA₃,为 0.30;最高标准双头率为 GA₃处理的 70.96%。综上所述,四叶一心时期的各个测量指标明显优于三叶一心时期,植株长势良好,为双头均匀的甜瓜嫁接双头苗最适处理时期,该结果与其他研究结果不一致,可能原因一是不同作物种间具有差异性,二是不同打顶方式对植株生长所产生的差异影响。

(上接第 88 页)

同时,接种鉴定了包头地区一些市场栽培品种对早疫病的抗性,其中“中薯 3 号”属于中抗品种,其余属于抗性品种,在抗性品种中“荷兰 15 号”病情指数最高。赵艳群等^[18]对部分马铃薯品种的早疫病田间抗性进行评价,其中“中薯 3 号”同为中抗品种,但病情指数高于该试验。Stewart 等^[19]以 14 个基因型马铃薯为试材,对其早疫病抗性进行了评价,认为温室接种鉴定和田间自然发病抗性鉴定结果一致。梁伟伶^[20]对部分马铃薯品种进行了田间抗性鉴定和接种鉴定,评价结果略有不同。

参考文献

- [1] SHAHBAZI H, AMINIAN H, SAHEBANI N, et al. Effect of *Alternaria solani* exudates on resistant and susceptible potato cultivars from two different pathogen isolates[J]. Plant pathology journal, 2011, 27(1): 14-19.
- [2] SHTIENBERG D, BERGERON S N, NICHOLSON A G, et al. Development and evaluation of a general model for yield loss assessment in potatoes[J]. Phytopathology, 1990, 80(5): 466-472.
- [3] 李笑硕, 张庆平, 曹春梅, 等. 不同药剂防治马铃薯早疫病、晚疫病药效试验[J]. 内蒙古农业科技, 2006(2): 37, 48.
- [4] 范子耀, 王文桥, 孟润杰, 等. 马铃薯早疫病病原菌鉴定及其对不同药剂的敏感性[J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 69-74.
- [5] 何凯, 杨水英, 黄振霖, 等. 马铃薯早疫病病原菌的分离鉴定和生物学特性研究[J]. 中国蔬菜, 2012(12): 72-77.
- [6] KAPSA J. Early blight (*Alternaria* spp.) in potato crops in Poland and results of chemical protection[J]. Journal of plant protection research, 2004,

3.3 打顶方式对甜瓜双头生长的影响 王希波等^[9]在番茄双头苗的研究中选用的打顶方式为常规打顶方式,即采用割除一心的方法在三叶一心时期进行打顶处理;考虑到精准去除顶端优势问题,试验在割除一叶一心的方式下得出最适处理时期为四叶一心,因此不同打顶方式的最适处理时期应存在差异。蒋重君^[10]通过对水稻进行不割叶与割半叶的研究表明,适当割叶,既减少传粉障碍,又维持较高的同化能力,有利于受精结实。由此可见当叶片差距悬殊时,适当割叶对植株的生长发育有一定影响,基于操作难易程度以及伤口愈合安全性考虑,该试验采用割除一叶一心的方式在三叶一心、四叶一心时期进行打顶处理,通过割半叶或者 1/3 叶的方式与完全叶进行对比,仍值得探究。

参考文献

- [1] 联合国粮食及农业组织.FAOSTAT 数据库[DB/OL].[2021-03-14].http://www.fao.org/faostat/en/#data.
- [2] 余冬冬. 阎良区甜瓜产业现状调查和发展设想[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [3] 王喜庆. 嫁接甜瓜防病增产效果初步研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(2): 22-23.
- [4] 王娟娟, 李莉, 尚怀国. 我国西瓜甜瓜产业现状与对策建议[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(5): 69-73.
- [5] 张娟, 李凤春, 张春梅, 等. 甜瓜嫁接技术研究初探[J]. 蔬菜, 2021(4): 16-18.
- [6] 高丽红, 陈义, 田永强. 番茄一苗双头嫁接育苗关键技术[J]. 农业工程技术, 2020, 40(4): 22-24.
- [7] 李田, 刘海河, 张彦萍, 等. 外源赤霉素对厚皮甜瓜坐果节位叶片早衰与内源激素含量的影响[J]. 农药学报, 2018, 20(5): 618-624.
- [8] 朱秀红, 任方方, 茹广欣, 等. 赤霉素对盐胁迫下泡桐种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 种子, 2021, 40(6): 31-37.
- [9] 王希波, 张祺恺, 张金亮, 等. 番茄双断根双头嫁接育苗关键技术[J]. 中国蔬菜, 2019(6): 98-100.
- [10] 蒋重君. 咸二〇不育系大面积春繁亩产超 400 斤的技术经验[J]. 湖南农业科学, 1986(5): 13-15.
- [11] 44(3): 231-238.
- [7] 张天宇. 中国真菌志: 第 16 卷 链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [8] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [9] GORGOLOUS S G, DEKKER J. Detection and measurement of fungicide resistance general principles[J]. FAO plant protection bulletin, 1982, 30(2): 39-71.
- [10] 杨水英, 韩海波, 孙现超, 等. 重庆稻瘟病菌群体遗传多样性分析[J]. 河南农业科学, 2008, 37(11): 76-79.
- [11] 国家质量技术监督局. 农药田间药效试验准则(一)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [12] 张子君, 邹庆道, 李海涛, 等. 番茄早疫病抗病性鉴定研究[J]. 北方园艺, 2005(1): 53-55.
- [13] 李宏伟, 李秀华, 王林海, 等. 包头地区近 46 年农业热量资源的时空变化特征[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(35): 149-154.
- [14] 杨丽桃, 郭斌煜, 郭景山, 等. 内蒙古中西部地区气候条件与马铃薯产业重要性的分析[M]//金黎平, 吕文河. 马铃薯产业与美丽乡村(2020). 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2020: 163-168.
- [15] 朱杰华. 马铃薯早疫病防治[J]. 农村科学实验, 2015(10): 21.
- [16] 马荣群, 宋正旭, 黄粤, 等. 马铃薯早疫病病原 rDNA-ITS 区序列分析[J]. 内蒙古农业科技, 2007(5): 21-22, 41.
- [17] 何劲, 康冀川, 谢红艳, 等. 我国部分区域链格孢属 rDNA ITS 区序列分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2425-2427.
- [18] 赵艳群, 武奇伟, 任飞娥, 等. 马铃薯品种对早疫病、晚疫病和晚疫病的田间抗性评价[J]. 中国马铃薯, 2021, 35(2): 164-169.
- [19] STEWART S, BRADSHAW J E. A glasshouse test for assessing resistance to early blight (*Alternaria solani*) [J]. Potato research, 1993, 36(1): 35-42.
- [20] 梁伟伶. 马铃薯对早疫病抗性机制及化学防治研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009: 12-16.