



张抒,范国权,董学志,等. 马铃薯银屑病形态学鉴定及分子生物学检测[J]. 黑龙江农业科学,2022(7):65-69.

# 马铃薯银屑病形态学鉴定及分子生物学检测

张抒<sup>1</sup>,范国权<sup>1</sup>,董学志<sup>1</sup>,高艳玲<sup>1</sup>,魏琪<sup>1</sup>,孙晶<sup>1</sup>,刘凯<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;2. 黑龙江省农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为促进马铃薯银屑病的分子生物学检测,从内蒙古牙克石地区马铃薯库房中采集了疑似马铃薯银屑病的样品,进行形态学鉴定,并对马铃薯银屑病分子生物学检测方法进行了筛选。结果表明,经形态学观察,块茎样品病斑特征符合“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”中描述的病斑特征及病原菌特征。进一步利用常规 PCR 和巢式 PCR 对疑似样品进行了检测,两种方法均可扩增出特异性目的条带。目的序列经过测序,其序列与 CBS640.85 菌株(MH861907.1)序列的相似度达到 100%。经形态学及分子生物学鉴定,可以证明在内蒙古牙克石地区马铃薯库房中采集的疑似马铃薯银屑病样品确为马铃薯银屑病,同时也证明本研究中采用的常规 PCR 和巢式 PCR 方法均可用于马铃薯银屑病的检测。

**关键词:**马铃薯;银屑病;PCR;巢式 PCR

马铃薯银屑病(Potato Silver Scurf),又称银色粗皮病,由茄长蠕孢菌(*Helminthosporium solani* Dur. & Mont)引起<sup>[1]</sup>,为真菌界(Fungi),有丝分裂孢子真菌(Mitosporic Fungi)的长蠕孢属,茄长蠕孢菌。在世界范围内广泛分布,是一种在马铃薯仓储期比较常见的病害,可以通过带病

土壤和种薯传播。马铃薯银屑病也曾被列入《全国农业植物检疫性有害生物分布行政区名录》。马铃薯银屑病最早在 1871 年莫斯科被报道,随后智利、加拿大、摩洛哥、印度、英国、美国等多个国家相继发现了该病害。Ryu 等<sup>[2]</sup>2001 年在云南省昆明、楚雄、寻甸和昭通等地发现了马铃薯银屑病,并对马铃薯银屑病的培养性状和形态学特征进行了研究。据报道,2007 年河北围场也发现了马铃薯银屑病<sup>[3]</sup>。该病害之所以被称为银屑病,是因为其损伤大部分呈银色,有时周皮外层也可呈青铜色或金色,这是由于周皮细胞色素损失,导

收稿日期:2022-04-20

基金项目:黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX19-06)。

第一作者:张抒(1984—),男,硕士,助理研究员,从事马铃薯病虫害检测及研究。E-mail:88075700@qq.com。

## Pathogen Identification and Medicament Control of Tobacco Damping-off in Yanbian

GAO Chong<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>2</sup>, SUN Li-juan<sup>1</sup>, AN Cheng-rong<sup>1</sup>, LI Rong-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Da-zhi<sup>3</sup>, WU Guo-he<sup>1</sup>

(1. Tobacco Institute, Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing 133400, China; 2. Changchun Branch, Jilin Tobacco Corporation Company, Changchun 130000, China; 3. Yanbian Branch, Jilin Tobacco Corporation Company, Yanji 136200, China)

**Abstract:** In order to clarified the species of pathogens causing tobacco damping-off in Yanbian and carried out scientific pesticide prevention and control, identification of pathogens by cultivation properties and morphological characteristics identification was carried, and toxicity of 15 fungicides to pathogen were determined by mycelium growth rate method, with controlled effect experiment of 25% azoxystrobin SC. The results showed that pathogen causing tobacco damping-off disease in Yanbian was *Pythium aphanidermatum*, 25% azoxystrobin SC had the highest toxicity,  $EC_{50} \leq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the average control effect of its 1 000-fold solution reached 84.00%, which was significantly different from that of the control treatment. Therefore, 25% azoxystrobin SC can be used as a control agent or a rotation agent for tobacco damping-off.

**Keywords:** Yanbian; tobacco damping-off; *Pythium cucurbitum*; pathogen identification

致病斑呈现金属光泽<sup>[4]</sup>。马铃薯银屑病通常不会影响马铃薯收获期的产量,但感染块茎表面由于病斑的出现而失水,这会导致贮藏期间马铃薯减重。有试验证实失水会造成市售马铃薯减产 13%<sup>[5]</sup>。马铃薯银屑病菌在自然侵染的土壤中可以存活 1 年以上<sup>[6]</sup>,4 年未种植马铃薯的农田土壤中仍然能分离出马铃薯银屑病病原菌<sup>[7]</sup>。

现国内对马铃薯银屑病的研究较少,现行标准中,国家标准“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”中仅规定了形态学检疫鉴定方法,缺少相应的分子生物学检测技术标准。本研究从马铃薯库房中采集了疑似马铃薯银屑病的样品,进行了形态学鉴定,并对马铃薯银屑病分子生物学检测方法进行了筛选,以期为该病害的分子生物学检测提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料采集于内蒙古牙克石地区,在该地区马铃薯库房中发现了症状类似于“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”中描述的疑似马铃薯银屑病的块茎,采集样本并带回实验室进行进一步的形态学及分子生物学鉴定。

### 1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定 将疑似马铃薯银屑病块茎放在培养皿上,并置于保鲜盒中,室温 48 h 保湿培养(表 1)。经过保湿培养后,通过解剖镜观察块茎表面病斑并拍照,按照“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”中描述的鉴定特征进行形态学初步鉴定。

表 1 样品及处理方法

样品编号	来源	检测前处理
1	内蒙古牙克石马铃薯库房	经室温 48 h 保湿培养
2	内蒙古牙克石马铃薯库房	室温放置,未经保湿培养

马铃薯块茎病斑症状特征鉴定:疑似马铃薯银屑病块茎在未经保湿培养情况下,用解剖镜观察块茎表面病斑特征,根据“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”7.1.1 中描述,马铃薯银屑病菌主要侵染马铃薯块茎,在马铃薯周皮上形成圆形的病斑,病斑褐色至灰色。病斑深度多局限在周皮,不扩展到块茎内部,病斑最终表现为银色。在储藏期,被侵染的薯块表皮最终表现为皱缩的特征,由于受伤表皮水分过度蒸发,病斑最终表现为褐色,部分周皮可能脱落。

病原菌特征鉴定:在块茎表面除病斑特征外,还需观察块茎上病原菌特征,根据“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”7.1.2 中描述,病斑上子实体(分生孢子梗和分生孢子)多发生在病斑的边缘,新侵染的病斑更为明显,可见黑色的霉层(分生孢子)<sup>[8]</sup>。

保湿培养后病原菌特征鉴定:经室温 48 h 保湿培养后,在解剖镜下观察块茎表面病原菌特征,根据“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”7.2 中描述,经保湿培养后,马铃薯银屑病菌可产生透明的菌丝,菌丝分隔并分枝;分生孢子无分枝,具分隔。分生孢子轮生在分生孢子梗末梢,状似“圣诞树”。分生孢子梗直立,两壁平行生长。分生孢子宽 7~8  $\mu\text{m}$ 、长 18~64  $\mu\text{m}$ 。分生孢子最多 8 个分隔、暗褐色、基部圆、尾端细<sup>[8]</sup>。

1.2.2 分子生物学鉴定 分别将样品病斑部表皮切下,利用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。通过普通 PCR 及巢式 PCR 进行检测。

普通 PCR 检测:ITS (Internal Transcribed Spacers) 内转录间隔区具有很高的拷贝数,并包含保守与变异序列,通过保守序列中的变异位点设计引物进行特异性扩增比较是一种常用的病原真菌检测方法。本研究采用的普通 PCR 方法为 Olivier 等<sup>[9]</sup>根据 ITS (Internal Transcribed Spacers) 的保守区域设计的引物 HSF19/HSR447,PCR 程序详见表 2,用 1% 琼脂糖电泳检测。

巢式 PCR 检测:巢式 PCR 方法为将外围引物 PCR 产物作为模板进行第二次巢式 PCR 扩增,具有很高的灵敏度和特异性。本研究采用了 Cullen 等<sup>[10]</sup>根据马铃薯银屑病病原菌 ITS 保守区域设计的 Hs1F1/Hs2R1 作为外围引物,巢式引物为 Hs1NF1/Hs2NR1,提取样品总 DNA 后,以经外围引物扩增获得的 PCR 产物作为模板,进行第二次巢式 PCR 扩增,反应程序详见表 2,用 1% 琼脂糖电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学初步鉴定结果

2.1.1 块茎病斑特征 由图 1 可知,在马铃薯周皮上形成圆形有金属光泽的银色病斑,只局限在周皮,不扩散到块茎内部。在病斑上可见黑色的霉层(分生孢子)。经形态学观察,特征符合“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”中 7.1 描述的病斑特征及病原菌特征。

表 2 普通 PCR 及巢式 PCR

项目	引物		反应程序	片段大小/bp	参考文献
普通 PCR	HSF19:AAGGACATTACGTTTCAGCG HSR447:AGAAGCGCAATGTGCTGCACGAG		94 ℃ 预变性 2 min	447	Olivier 等 <sup>[9]</sup>
			94 ℃ 变性 60 s		
			62 ℃ 退火 30 s		
			72 ℃ 延伸 120 s		
			72 ℃ 延伸 10 min		
巢式 PCR	外围引物	Hs1F1:GTTTCAGCGGCCGCAAGGCT Hs2R1:CCAGGGCTTCAAGAAGCGCA	95 ℃ 预变性 2 min	447	Cullen 等 <sup>[10]</sup>
			95 ℃ 变性 45 s		
			66 ℃ 退火 60 s		
			72 ℃ 延伸 90 s		
			72 ℃ 延伸 5 min		
	巢式引物	Hs1NF1:GAACCCTCTGTCTACCTGTA Hs2NR1:ACGAGAAGCTGGCACGACCG	95 ℃ 预变性 2 min	371	
			95 ℃ 变性 45 s		
			60 ℃ 退火 60 s		
			72 ℃ 延伸 90 s		
			72 ℃ 延伸 5 min		



图 1 块茎病斑特征

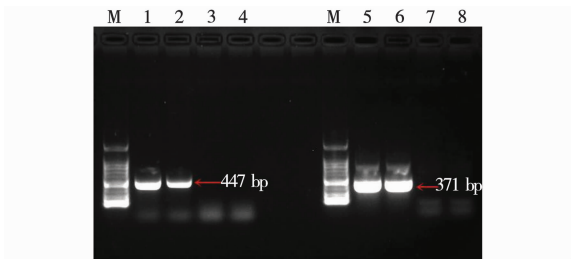
2.1.2 保湿培养后病原菌特征 保湿培养后,通过解剖镜观察块茎表面病斑,放大 63 倍后,可清晰观察到马铃薯银屑病菌产生的透明菌丝,以及分生孢子轮生在分生孢子梗末端,状似“圣诞树”等特征(图 2)。以上特征符合“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”7.2中对于马铃薯银屑病病原菌特征的描述。



图 2 保湿培养后病原菌特征

2.2 分子生物学鉴定结果

分别对 1 号样品和 2 号样品病斑部表皮进行分子生物学检测,结果如图 3 所示,普通 PCR 及巢式 PCR 均可扩增出清晰明亮的目的条带,将 PCR 产物进行测序,经片段拼接后,在 NCBI 上进行 BLAST 比对,所得片段与 CBS640.85 菌株(MH861907.1)序列的相似度达到 100%。



M. DNA Maker;泳道 1.1 号样品普通 PCR 扩增;泳道 2.2 号样品普通 PCR 扩增;泳道 3.健康马铃薯块茎;泳道 4.健康马铃薯块茎;泳道 5.1 号样品巢式 PCR 扩增;泳道 6.2 号样品巢式 PCR 扩增;泳道 7.健康马铃薯块茎;泳道 8.健康马铃薯块茎。

图 3 普通 PCR 及巢式 PCR 电泳结果

### 3 讨论

虽然马铃薯银屑病通常不会对产量造成较大影响,但会大幅度降低马铃薯的商品性,无论对于种薯繁育和商品薯生产来说都会造成较大经济损失。现国内对于马铃薯银屑病的相关研究及报道非常少,重视程度也非常低,现行国家标准“GB 18133—2012 马铃薯种薯”也未将其列入各级种薯需满足的质量要求项。由于杀菌剂抗药性的积累以及马铃薯异地调种,导致马铃薯银屑病发病率呈上升趋势,除本研究在内蒙古采集到的马铃薯银屑病样品外,云南、河北等地也均有发生,因此在马铃薯生产尤其是种薯繁育过程中应提高重视,尽快制定出有效的防控措施,并在种薯检测项目中增加马铃薯银屑病检测。

根据国家标准“GB/T 28093—2001 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法”要求,完整的马铃薯形态学鉴定流程中,在进行“马铃薯块茎症状特征鉴定”以及“保湿培养病原菌特征鉴定”后,还需要鉴定 PDA(马铃薯培养基)培养后的病原菌特征。具体方法为:在马铃薯块茎表面的病斑处切取直径 7 mm 的小块,用 1.0% 次氯酸钠消毒 30 s,用灭菌的蒸馏水冲洗两次,灭菌滤纸吸干水分,放置在 PDA 培养基上,在  $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下培养 14~21 d。经 PDA 培养后分离物在 PDA 培养基上形成暗褐色至黑色菌落,浅棕色的分生孢子群分布在培养基表面。菌丝在 PDA 上的生长速度为  $1.15\sim 1.78\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下光照培养比黑暗培养的生长速度快。随培养时间的增加,分生孢子梗颜色从浅灰色变为褐色,无分枝,1~6 根丛状生长,基部球形,7~19 个隔膜,大小为  $150\sim 550\text{ }\mu\text{m}\times 7.0\sim 10.0\text{ }\mu\text{m}$ 。分生孢子近无色至褐色,单个或成簇地自分生孢子梗基端往上呈轮状排列,直或稍弯,顶端渐尖,略呈锥形,3~8 个隔膜,大小为  $20\sim 80\text{ }\mu\text{m}\times 7.5\sim 10.0\text{ }\mu\text{m}$ ,与自然薯块上产生的分生孢子大小基本相同。由于本研究重点在于进行快速高效的分子生物学检测,因此只完成了形态学初步鉴定,未进行 PDA 培养后的病原菌鉴定,在后续的研究中要加以完善<sup>[8]</sup>。

马铃薯银屑病的检测方法主要有形态学方

法、分子生物学方法以及生物学鉴定方法,其中分子生物学检测方法无疑是更快速高效的。本研究中采用的引物 HSF19/HSR447 是由 Oliver 等<sup>[9]</sup>根据马铃薯银屑病病原菌 ITS 的保守区域设计的,并利用这对引物对 90 个北美和欧洲的真菌菌株进行过测试,其中 48 个马铃薯银屑病菌株获得了扩增产物,而 42 个其他真菌菌株则没有获得扩增产物。Cullen 等<sup>[11]</sup>设计了另外一对引物 Hs1F1/Hs2R1,并利用其对马铃薯银屑病侵染的块茎组织、单孢分离物、菌株等共计 35 个样品进行了测试,均扩增出了片段大小为 447 bp 的扩增产物,并对这 35 个分离物的分生孢子、分生孢子梗、菌落形态等进行了形态学鉴定,结果证实利用分子生物学方法和传统的形态学方法获得了一致的结果。Errampalli 和 Saunders 等<sup>[12-13]</sup>也采用同样的方法对马铃薯银屑病样品进行了检测,证实了 PCR 方法与传统的形态学方法同样可靠。传统的形态学方法通常需要 14~28 d 的鉴定周期,而 PCR 方法只需要 2 d 就可以完成马铃薯银屑病样品的检测。

本研究中采用的第二种分子生物学检测方法为巢式 PCR 方法,该方法是由 Cullen 等<sup>[10]</sup>根据马铃薯银屑病病原菌保守区域设计引物,引物分为外围引物 Hs1F1/Hs2R1 和巢式引物 Hs1NF1/Hs2NR1,巢式 PCR 方法为将外围引物 PCR 产物作为模板进行第二次的巢式 PCR 扩增,扩增后可以分别获得片段大小为 447 和 371 bp 的产物。并利用接种无菌土壤的方法测试了该方法的灵敏度,表明可以在接种  $1.5\text{ 个孢子}\cdot\text{g}^{-1}$  的土壤中检测到马铃薯银屑病菌,并且在马铃薯块茎、自然侵染的土壤中同样可以检测到。

本研究结合形态学鉴定再次证实了普通 PCR 引物(HSF19、Hs2R1)和巢式 PCR 引物(Hs1F1、Hs2R1; Hs1NF1、Hs2NR1)的可靠性。因此,建议增加银屑病分子生物学检测方法标准,完善检测技术体系。马铃薯银屑病分子生物学检测技术标准的建立可以准确地鉴定早期或轻症感染银屑病的薯块,从而实现早发现早处理,降低病害危害,实现产品提质增效。

## 4 结论

经形态学初步鉴定及分子生物学检测,证实  
在内蒙古牙克石地区马铃薯库房中采集的疑似马  
铃薯银屑病样品确实为侵染了马铃薯银屑病的块  
茎,同时也证实了本研究中采用的普通 PCR(引  
物 HSF19、Hs2R1)和巢式 PCR(引物 Hs1F1、  
Hs2R1;Hs1NF1、Hs2NR1)检测方法可靠,均可  
用于马铃薯银屑病的检测。

### 参考文献:

[1] 刘会梅,王向军. 马铃薯银屑病研究新进展[J]. 植物检疫, 2008(4):249-252.

[2] RYU K Y,罗文富,杨艳丽,等. 云南省马铃薯银屑病(*Helminthosporium solani*)的研究[J]. 中国马铃薯, 2001, 15 (4):195-199.

[3] TIAN S M,CHEN Y C,ZOU M Q, et al. First report of *Helminthosporium solani* causing silver scurf of potato in Hebei Province, North China [J]. Plant Disease, 2007, 91:460.

[4] WALE S,CATTLIN N,刘孟君,等. 原色马铃薯病虫害及失调症诊断与防控手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2021:33-34.

[5] GEARY, BRAD, JOHNSON D A, et al. Silver scurf, an emerging potato disease[J]. American Journal of Potato Research,2001,78:454.

[6] MERIDA C L, LORIA R. Survival of in soil and *in vitro*

colonization of *Helminthosporium solani* senescent plant tissue[J]. American Potato Journal,1994,71:591-598.

[7] BAINS P S,BISHT V S,BENARD D A, et al. Soil survival and thiabendazole sensitivity of *Helminthosporium solani* isolates from Alberta[J]. Canada Potato Research, 1996, 39:23-30.

[8] 刘伟,严进,王秀芬,等. 马铃薯银屑病菌检疫鉴定方法: GB/T 28093-2001[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

[9] OLIVIER C, LORIA R. Detection of *Helminthosporium solani* from soil and plant tissue with species-specific PCR primers [J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 168: 235-241.

[10] CULLEN D W, LEES A K, TOTH I K, et al. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers[J]. European Journal of Plant Pathology,2001,107:387-398.

[11] CULLEN D, ERRAMPALLI D. PCR detection of *Helminthosporium solani*, the causal agent of silver scurf of potato[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2000, 22:183.

[12] ERRAMPALLI D, SAUNDERS J, CULLEN D. A PCR-based method for detection of potato pathogen in silver scurf in fected tuber tissue and soils[J]. Journal of Microbiological Methods,2001,44(1):59-68.

[13] SAUNDERS J, ERRAMPALLI D, CULLEN D. Detection of *Helminthosporium solani*, the casualagent of silver scurf of potato with PCR[J]. Canadian Journal of Plant Pathology,2000,22:174.

## Identification of Potato Silver Scurf Disease by Morphological and Molecular Biology Technology

ZHANG Shu<sup>1</sup>, FAN Guo-quan<sup>1</sup>, DONG Xue-zhi<sup>1</sup>, GAO Yan-ling<sup>1</sup>, WEI Qi<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, LIU Kai<sup>2</sup>  
(1. Industrial Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;  
2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** In order to promote molecular biology detection of potato silver scurf disease, in this study, the samples suspected to be potato silvers curf disease from a storage room in Yakeshi Area of Inner Mongolia were morphologically identified. And the molecular biology detection methods of silver scurf were screened. The results showed that the characteristics of tuber lesions conformed to the characteristics of lesions and pathogens described in "GB/T 28093—2001 Method for quarantine and identification of potato silver scurf disease" by morphological observation. These suspected samples were detected by conventional PCR and nested PCR, and both of them could amplify specific target bands. The target sequence was sequenced, and its sequence similarity compared with CBS640. 85 strain (MH861907. 1) reached 100%. The samples collected from Yakeshi Area of Inner Mongolia were identified as potato silver scurf disease by morphological and molecular biology methods. It also proved that both conventional PCR and nested PCR methods can be used for the detection of potato silver scurf disease.

**Keywords:** potato; silver scurf disease; PCR; nested PCR