

# 洋葱紫斑病病原菌鉴定及生物学特性

王 勇, 周雪梅, 盛 洁, 宋 策, 陈 龙, 陈 典

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**以黑龙江省3个地区洋葱紫斑病植株为试材,采用组织分离法分离洋葱紫斑病病原菌,对获得菌株进行致病性测定、形态学鉴定以及16s rDNA ITS序列分析,并研究其生物学特性。结果表明:该致病菌为葱链格孢菌(*Alternaria porri* (Ell.) Cifferri),该菌株在以葡萄糖为碳源时产孢量最高,但菌丝生长量最低;在以氯化铵为氮源时菌丝生长量和产孢量都达到最高。32℃,pH 7,光照条件为12 h光照/12 h黑暗交替培养菌丝生长量最高;24℃,pH 8,连续黑暗条件下产孢量最高。

**关键词:**洋葱紫斑病;葱链格孢菌;菌丝生长;产孢特性

**中图分类号:**S 633.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)23-0111-06

洋葱(*Allium cepa* L.)属百合科葱属二年生草本植物,其营养价值较高,在欧美素有“蔬菜皇后”之美誉<sup>[1]</sup>。紫斑病是百合科葱属蔬菜的一种常见病害,是洋葱生长期的多发性病害之一,主要危害洋葱叶片及花梗<sup>[2]</sup>,会造成洋葱大量减产,影响洋葱的品质和产量。在大蒜紫斑病的研究中,早有关于大蒜紫斑病病原菌分离鉴定和生物学特性的相关报道,确定其致病菌为链格孢属<sup>[3-4]</sup>。在大葱紫斑病研究中,关于葱紫斑病病原菌分生孢子萌发条件和杀菌剂筛选<sup>[5]</sup>以及防治措施<sup>[6]</sup>的相关报道居多。近年来,在洋葱紫斑病研究中,也有关于洋葱紫斑病原菌防治<sup>[7]</sup>以及杀菌剂筛选<sup>[8]</sup>的研究,而对于洋葱紫斑病原菌的分离鉴定和生物学特性还缺乏系统性的报道。为此,该试验采集黑龙江省洋葱种植区的感病叶片,分离纯化紫斑病病原菌,根据形态学以及16s rDNA ITS序列分析进行病原菌鉴定,并进一步研究病原菌的生物学特性,从而为洋葱的抗病育种和预防病害大面积发生提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

样品采集于黑龙江省哈尔滨市东北农业大学园艺

试验站、齐齐哈尔市梅里斯区大八旗村、宁安市宁安镇红城村,3个试验地皆为洋葱多年栽植地,洋葱紫斑病发病较为严重。

### 1.2 试验材料

供试材料采集于3个试验地的洋葱紫斑病发病植株病健交界处。病原菌分离培养采用PAD培养基(马铃薯蔗糖琼脂培养基)<sup>[3]</sup>。

### 1.3 试验方法

试验于2015年5月至2016年4月在东北农业大学园艺学院园艺试验站和园艺作物生物学与种质创制重点实验室进行。

**1.3.1 病原菌的分离与纯化** 取洋葱病健交界处组织,利用常规组织培养法<sup>[9]</sup>,接种于PDA培养基上,置于25℃恒温箱中黑暗培养6 d后,挑取边缘菌丝接种于PDA培养基上,直至出现生长整齐一致且无杂菌的单菌落,将纯化后的病原菌接种于PDA培养基斜面培养,并置于4℃冰箱中保存。

**1.3.2 致病性测定** 将单孢分离得到的孢子接种到PDA培养基上继续培养,繁殖出孢子后配制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>的孢子悬浮液,利用喷雾法对洋葱无菌苗叶片下部接种,3次重复,每次重复选取15株洋葱苗,以接种无菌水为对照,10 d后调查发病情况,统计病情指数。定期观察感病洋葱苗叶发病情况并根据其病情指数分级标准,记录洋葱发病的病情指数。紫斑病分级标准见方中达<sup>[9]</sup>《植病研究方法》。病情指数 =  $\sum(\text{病级数}) \times (\text{该病级株数}) / (\text{调查总数} \times \text{最高病级数}) \times 100$ 。

**1.3.3 病原菌形态学鉴定** 将在PDA培养基上单孢分

**第一作者简介:**王勇(1971-),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:yongwang@neau.edu.cn.

**责任作者:**陈典(1953-),男,教授,硕士生导师,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:lwang2002@163.com.

**基金项目:**黑龙江省基金资助项目(C2015017);黑龙江省攻关资助项目(GA15B103-7)。

**收稿日期:**2016-09-21

离获得的致病菌株在 25℃ 黑暗下培养 6 d 后,观察纯化菌株的菌丝致密状态、色泽等特征,并在光学显微镜下观察并记录分生孢子的大小、纵横隔等形态特征。

1.3.4 病原菌分子生物学鉴定 用 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取病原菌基因组 DNA。对菌株进行 ITS 区域扩增,引物序列为:ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),反应体系为 25  $\mu$ L,其中包括 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer,1.5  $\mu$ L  $Mg^{2+}$  (25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),0.8  $\mu$ L dNTPs (2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),100 ng DNA 模板,引物 ITS1 和 ITS4 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L,0.5  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>),再用 ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存,再进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.5 病原菌生物学特性测定 将该菌接种于不同试验条件下的培养基上,第 2、3、6 天利用十字交叉法测量菌落直径,计算菌丝平均生长速率。在第 8 天时,用含 0.05% 吐温-20 的无菌水 20 mL 刮下菌落及孢子,装广口瓶中充分摇匀,用 2 层纱布过滤得菌悬液,用血球计数器在显微镜下测量孢子含量,并最终计算出每皿产孢子数。碳源采用蔗糖、葡萄糖、果糖、乳糖、麦芽糖和淀粉,分别按上述碳源 3% 的量配置 PAD 培养基。25℃ 黑暗条件下恒温培养,每处理重复 3 次;氮源采用硝酸铵、氯化铵、磷酸氢二铵、甘氨酸、组氨酸、硝酸钾、牛肉膏和蛋

白胨,分别按上述氮源 0.5% 的量配置 PAD 培养基,25℃ 黑暗条件下恒温培养,每处理重复 3 次;温度设置 18、20、22、24、26、28、30、32、34℃ 共 9 个梯度,此外设置 40、45、50、55、60、65℃ 共 6 个温度梯度测定孢子致死温度,每处理重复 3 次;光照设置 24 h 光照、12 h 光照/12 h 黑暗、24 h 黑暗,共 3 个处理,每处理重复 3 次;设置 pH 5~10,利用 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HCl 和 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaOH 调节,共计 6 个处理,每处理重复 3 次。

#### 1.4 项目测定

菌丝平均生长速率的计算公式:平均生长速率 (cm  $\cdot$  d<sup>-1</sup>)=(测定菌落平均直径-菌饼直径)/培养天数。

#### 1.5 数据分析

发病指数利用 SPSS 软件进行方差分析;DNA 产物送上海派森特公司进行测序,测序结果至 NCBI 网站,以 Blast N 进行搜索比对,并下载相似参比的 ITS rDNA 序列,以 MEGA 5.10 软件构建系统进化树;生物学特性研究以 DPS 进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 病害特征描述

洋葱紫斑病发病症状为发病初期出现白色斑点或水浸状白斑,病斑扩大呈纺锤形或长椭圆形,中部稍凹陷,延续扩展呈褐色或暗紫色,周围有黄色晕圈,发病后期形成同心轮纹,湿度大时斑面上覆盖一层黑褐色霉粉状霉。



图 1 洋葱紫斑病症状

Fig. 1 Symptoms of onion violet leaf spot

### 2.2 病原菌致病性测定

从病健交界处分离得到 H、Q、M 3 种菌株共 48 株,分离频率分别为 72.90%、16.67% 和 10.44%,H 菌株为优势菌株。将单孢分离后的 3 种菌株的孢子悬浮液进行回接鉴定,其中 H 菌株接种 10 d 后,洋葱叶均出现侵染现

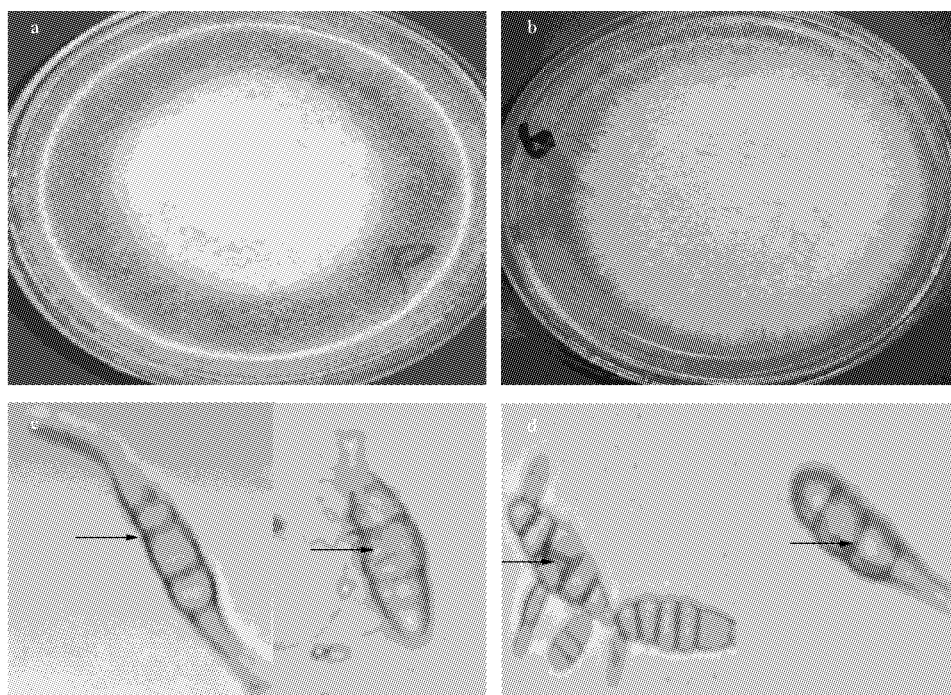
象,表现出洋葱紫斑病病症,病情指数为 65.72%,病情指数较重。因此,确定 H 菌株为洋葱紫斑病致病菌。

### 2.3 病原菌的形态学鉴定

H 菌平均菌落直径为 57.84~64.35 mm,菌落呈白色规则圆形,菌丝致密。随着培养时间的延长,产生分生孢

子,在光学显微镜下观察分生孢子为淡褐色或褐色,多单生,棍棒状,具横膜3~9个,纵隔膜1~6个,喙部(嘴孢)直

或略弯曲。根据《中国真菌志》<sup>[10]</sup>将H菌初步鉴定为葱链格孢菌(*Alternaria porri* (Ell.) Cifferri)(图2)。



注:a~b.在PAD培养基上6d菌落特征;c~d.分生孢子(比例尺:c,d=20 μm)。

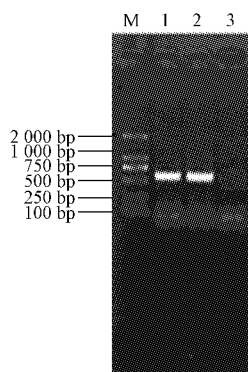
Note:a~b. 6-day-old colony on PAD;c~d. Conidia(Scale:c,d=20 μm).

图2 洋葱紫斑病原菌形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of pathogen bacteria of onion violet leaf spot

#### 2.4 病原菌的分子鉴定

以ITS1和ITS4进行H菌株的16s rDNA ITS区扩增,得到一条540 bp左右的DNA片段(图3),送生物工程公司测序后,将所得序列在NCBI的数据库中进行BLAST分析,发现该片段与GenBank中登录号为DQ323700.1、AF229470.1等菌株的序列一致性为100%。



注:M为DL2000 Marker;1,2为菌株H扩增结果;3为负对照。

Note: M,DNA Marker;1,2,Amplification of H DNA;3,CK.

图3 致病菌株H rDNA ITS的PCR扩增

Fig. 3 PCR of pathogenic strain H by primers ITS1 and ITS4

又进一步利用MEGA 5.10软件构建进化树,进行聚类分析。聚类分析结果表明H菌株与葱链格孢菌(*Alternaria porri* (Ell.) Cifferri)聚在一起(图4),自展支持率达到50%以上,具有较高同源性。进一步确定了H菌为葱链格孢菌(*Alternaria porri* (Ell.) Cifferri)。

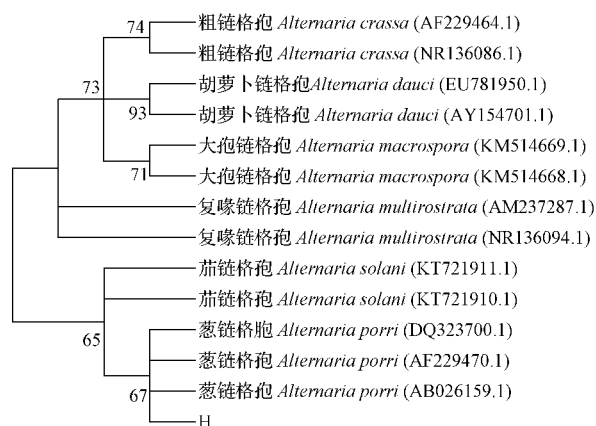


图4 病原菌H rDNA ITS序列聚类图

Fig. 4 Pylogenetic tree based on ITS sequence of pathogenic strain H

## 2.5 致病菌株 H 的生物学特性研究

2.5.1 环境对致病菌菌丝生长的影响 致病菌 H 可利用多种形式的碳源,但在以葡萄糖作为碳源的培养基上,菌丝生长速率显著低于其它碳源,而在以果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和淀粉等作为碳源的其它 5 种培养基上都生长良好,5 种碳源对菌丝生长的影响差异不显著(图 5a)。致病菌 H 可以对多种氮源进行利用,但利用效率不同,其中以氯化铵作为氮源,菌丝生长速率最高。总体来讲,对复杂氮源的利用要低于简单氮源,对铵态氮的利用要低于硝态氮(图 5b)。致病菌 H 对温度的适应

性较强,菌丝在 26~32 °C 都能很好的生长且随着温度的升高,至 32 °C 菌丝达到最快生长速度,温度再升高至 34 °C,菌丝的生长速度急剧下降(图 5c)。在 pH 5~10 的范围内,虽然致病菌菌丝都可生长,但在偏酸和偏碱的条件下,菌丝的生长速率显著低于 pH 7 条件下菌丝的生长,因此,菌丝的最适生长环境为中性(图 5d)。光照试验表明,致病菌对光照条件不敏感,全光、全暗和 12 h 光照/12 h 黑暗交替条件下菌丝平均生长速率间没有显著差别(图 5e)。

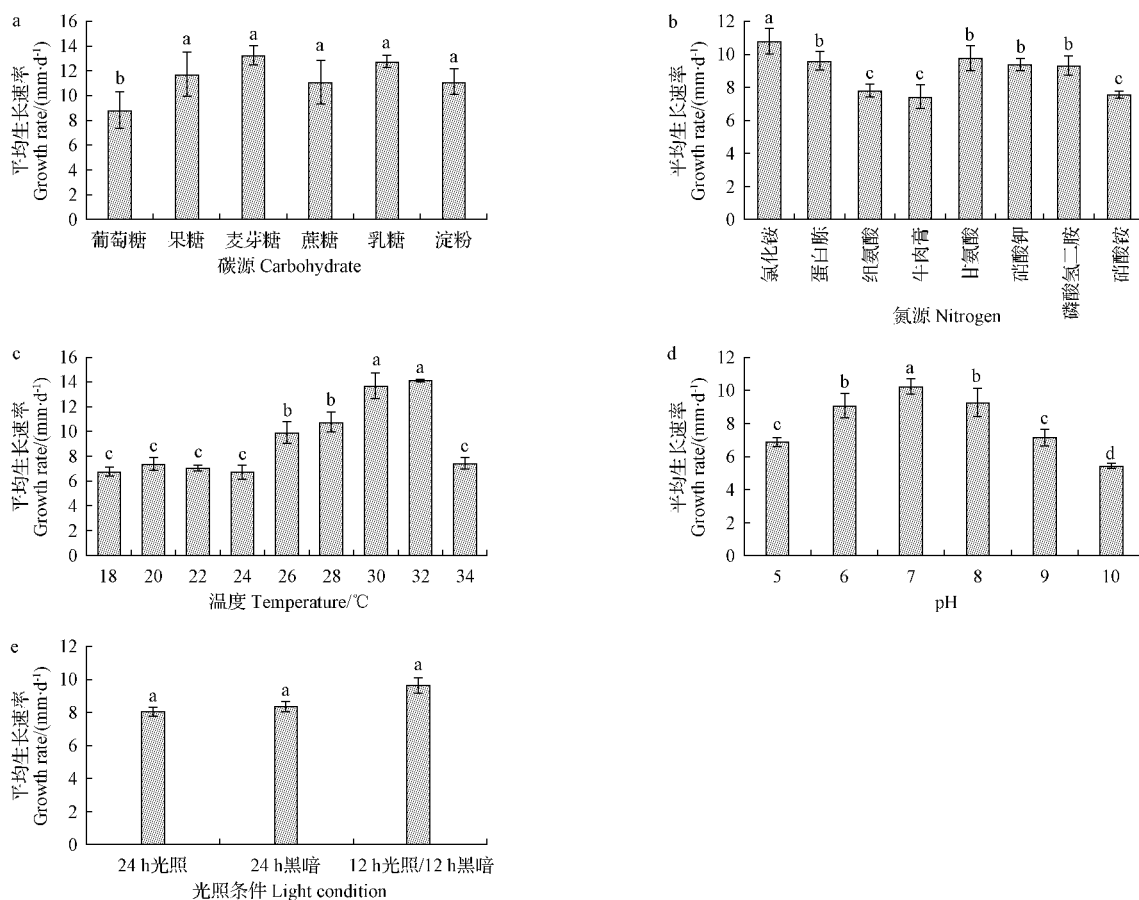


图 5 环境对致病菌菌丝生长的影响

Fig. 5 Effects of environmental factors on mycelium growth of *Alternaria porri* (Ell.) Cifferri

2.5.2 环境对致病菌产孢量的影响 不同碳源试验表明,与菌丝生长对碳源的反应不同,致病菌 H 在葡萄糖为碳源时产孢量最多,显著地高于其它碳源,而淀粉最不适于产孢(图 6a)。不同的氮源对病原菌产孢影响显著,当以硝酸钾作为氮源时产孢量最低,以氯化铵作为氮源时产孢量最高(图 6b)。低温和高温均不利于产孢,温度 22~26 °C 是病原菌的适宜产孢温度,并

且 22 °C 产孢量最多(图 6c);在 40~45 °C 孢子萌发率呈显著下降趋势,55 °C 为致病菌分生孢子致死温度(图 6d)。致病菌 H 菌株在偏碱性的条件下适于产孢,在 pH 为 8~10 的范围内,产孢量都高于中性及酸性条件,以 pH 8 下孢子最多(图 6e)。光照条件抑制病原菌产孢,孢子产量以全暗、光暗交替、全光递次下降(图 6f)。

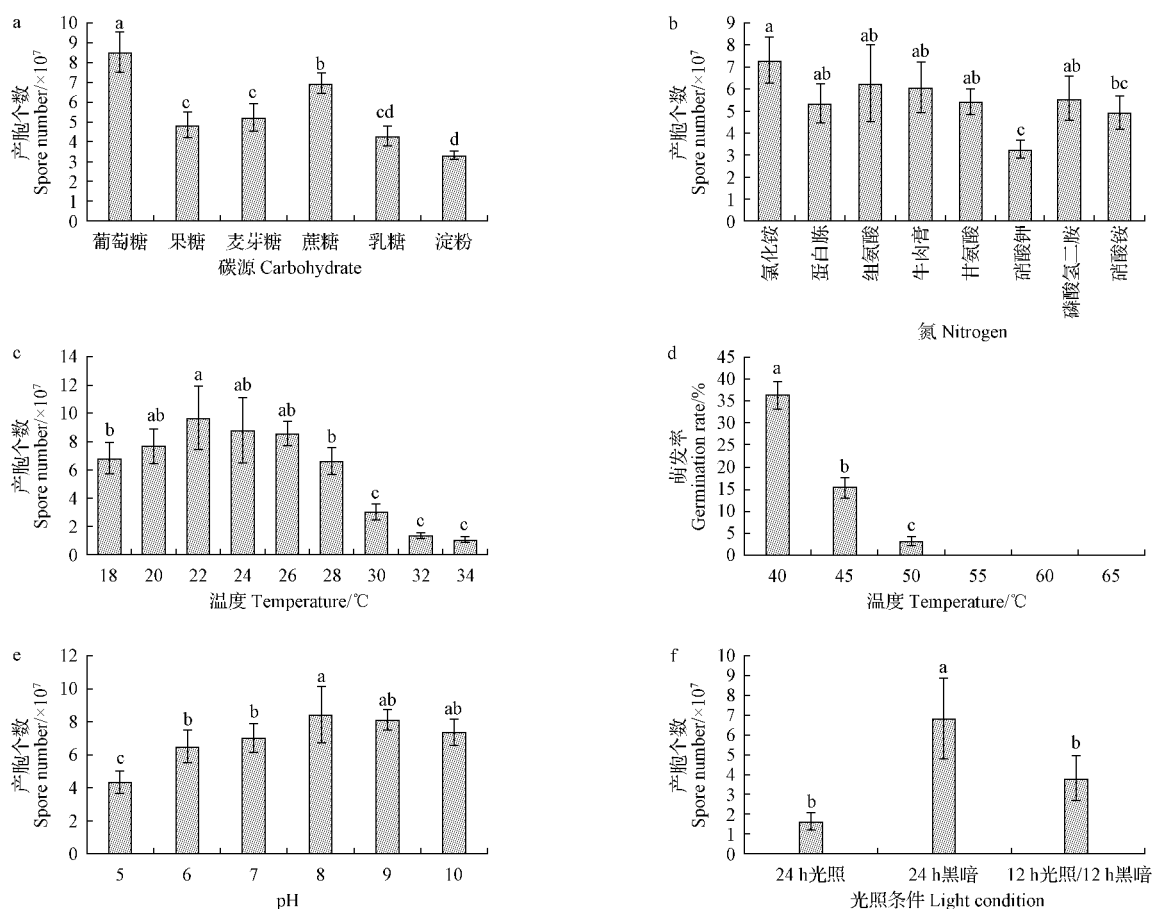


图6 环境对致病菌产孢量的影响

Fig. 6 Effects of environmental factors on spore number of *Alternaria porri* (Ell.) Cifferri

### 3 讨论

该试验于洋葱种植区采集病样,以柯赫式法则分离鉴定出致病菌。通过形态学观察以及 16s rDNA ITS 序列分析确定洋葱紫斑病致病菌为葱链格孢(*Alternaria porri* (Ell.) Cifferri)。葱链格孢是百合科葱属植物的一种常见致病菌,它可以在大蒜、大葱上造成紫斑病,程智慧等<sup>[3]</sup>报道大蒜紫斑病致病菌也为葱链格孢(*Alternaria porri* (Ell.) Cifferri)。而链格孢菌的其它菌属对于植物的危害也有相应的报道,例如茄链格孢菌(*A. solani* (Ell.&Mart.) Sorauer),属半知菌亚门真菌,为番茄早疫病病原菌<sup>[11-12]</sup>;芸薹链格孢(*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc)<sup>[13]</sup>,可导致十字花科蔬菜作物黑斑病。

在碳源利用上,洋葱紫斑病菌对麦芽糖的利用率相对较高,但与除葡萄糖以外的其它碳源相比差异不显著。而在葡萄糖为碳源时菌丝生长量最低但产孢量最高,这和严雪瑞等<sup>[14]</sup>对研究蓝莓叶穿孔致病菌链格孢菌中认为的葡萄糖为碳源时产孢量最高的结果相一致,说明葡萄糖是适宜生殖生长的碳源,而对营养生长是不适宜的,表明洋葱紫斑病菌的营养生长和生殖生长是相互

矛盾的。在氮源利用上,以氯化铵为氮源时,菌丝生长和产孢量都达到最高,而范文忠等<sup>[15]</sup>在研究不同碳氮源对4种链格孢菌生长的影响得出大葱紫斑病菌对于硝酸铵的利用较好,这与该研究结果不一致,但与该研究认为的洋葱紫斑病菌对于复杂氮源的利用要低于简单氮源,对铵态氮的利用要低于硝态氮的结果相吻合。在研究温度对洋葱紫斑病菌影响时发现,26~32℃是菌丝生长的适宜温度范围,菌丝生长的最适温度为32℃,20~26℃是产孢适宜的温度范围,产孢培养的最适温度为22℃;在研究光照对洋葱紫斑病菌影响发现,12 h光照/12 h黑暗交替培养是菌丝生长的适宜条件,而产孢量最多是在全暗条件下,连续光照具有明显抑制紫斑病菌的菌丝生长和产孢的作用,这与程智慧等<sup>[3]</sup>在研究大蒜紫斑病致病菌生物培养特性所表明的最适菌丝生长温度条件结果不一致而光照条件一致,表明大蒜紫斑病菌和洋葱紫斑病菌具有一定的相似性但可能是不同的生理小种。在病原菌孢子致死温度方面表明,55℃为该菌的致死温度,高于芸薹链格孢菌<sup>[16]</sup>和玉米链格孢菌<sup>[17]</sup>分生孢子的致死温度。然而 pH 也是病菌生长和

产孢的重要影响因子,该研究结果表明该菌以 pH 7 菌丝生长量最高,以 pH 8 产孢量最高,与程智慧等<sup>[3]</sup>在大蒜链格孢菌属分离中的结果相一致,而周兵等<sup>[18]</sup>研究了空心莲子草的致病菌链格孢菌在 pH 7.5 时产孢量最高,这与该研究的结果不同,但与该研究认为的链格孢菌在弱碱性条件下产孢最多的观点一致,因此在碱性潮湿粘重土壤更易导致洋葱紫斑病严重发生。

该研究经形态学鉴定和 16s rDNA ITS 序列分析确定洋葱紫斑病的致病菌为葱链格孢菌,但该菌是否存在不同的生理小种有待进一步研究。由于该试验只在黑龙江地区进行了采样,未在其他洋葱主栽区如山东、云南等中、短日照洋葱主栽区采样,下步工作可考虑进行多种不同地域、不同生态型的采样,以使研究出的结果更具有普遍性。

### 参考文献

- [1] 李祥睿. 洋葱的营养保健功能与开发利用[J]. 中国食物与营养, 2009(9): 55-57.
- [2] 王芳德. 洋葱紫斑病的发生与防治[N]. 山东科技报, 2016-05-09(002).
- [3] 程智慧, 沈永杰. 大蒜紫斑病菌的分离及培养条件研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(2): 274-278.
- [4] 沈永杰. 大蒜紫斑病菌生物学特性及粗毒素培养条件研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [5] 温嘉伟, 朱琳, 牟喜涛, 等. 葱紫斑病发生及防治若干问题的初步研究 I. 分生孢子萌发侵染、潜育显症及杀菌剂筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(1): 33-36.

- [6] 董建国. 大葱紫斑病的发生及防治方法[J]. 现代农村科技, 2015(20): 28.
- [7] SAVITHA A S, AJIGHKUMAR K, RAMESH G. Integrated disease management of purple blotch [*Alternaria porri* (Ellis) Cif] of onion[J]. Pest Management in Horticultural Ecosystems, 2014, 20(1): 97-99.
- [8] RAO A S, GANESHAN G, RAMACHANDRA Y L, et al. Bioefficacy of fungicides against *Alternaria porri* (Ellis) Cif. causing purple blotch of onion (*Allium cepa* L.)[J]. Environment and Ecology, 2015, 33(1): 99-104.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [10] 张天宇. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] 乔镜澄, 麻杰. 番茄黑斑病病原菌: 链格孢菌的分离与鉴定[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2015(6): 91-94.
- [12] 卢钟彦, 梁巧兰, 何武学. 番茄早疫和晚疫病病原菌鉴定及室内药剂的筛选[J]. 草原与草坪, 2016(1): 83-88.
- [13] 刘丽, 刘长远, 汪岐禹. 大白菜黑斑病病原鉴定及品种抗性评价[J]. 辽宁农业科学, 2015(1): 80-81.
- [14] 严雪瑞, 周源, 赵睿杰, 等. 蓝莓叶穿孔病菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 北方园艺, 2014(16): 123-127.
- [15] 范文忠, 李进, 高郁芳. 不同碳氮源对四种链格孢菌生长的影响[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(9): 1795-1797.
- [16] 马海霞, 刘影, 屈直, 等. 芸薹链格孢菌孢子萌发及附着胞形成的初步定量研究[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(4): 393-397.
- [17] 王媛媛, 刘彬, 周园园, 等. 玉米链格孢病菌生物学特性及防治药剂离体活性筛选[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, 46(5): 538-542.
- [18] 周兵, 陈洁, 马胜平, 等. 空心莲子草致病菌链格孢菌不同菌株的致病性及培养条件[J]. 西南农业学报, 2016, 29(2): 321-326.

## Pathogen Identification and Biological Characteristics of Onion Violet Leaf Spot

WANG Yong, ZHOU Xuemei, SHENG Jie, SONG Ce, CHEN Long, CHEN Dian

(Department of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** The plant of onion violet leaf spot was used as test material which was isolated from onion in three areas of Heilongjiang Province. The pathogen of onion violet leaf spot was isolated by tissue isolation, and the pathogen was identified by morphological and 16s rDNA ITS sequence analysis and the biological characteristics were conducted. The results showed that the pathogen of onion violet leaf spot was *Alternaria porri* (Ell.) Cifferri. When glucose was used as carbon source, the spore production was the highest, but the amount of mycelium growth was the lowest. When the ammonium chloride was the nitrogen source, the amount of mycelium growth and spore production reached the highest. The mycelium growth was the highest at 32 °C, pH 7, and the condition was 12 h light 12 h dark alternate culture; the spore production was the highest at 24 °C, pH 8 under continuous dark conditions.

**Keywords:** onion violet leaf spot; *Alternaria porri* (Ell.) Cifferri; mycelial growth; sporulation characteristics