

# 北京市平谷地区番茄枯萎病病原鉴定

李园 张大燕 徐文元 郭美霞 曹焯程\*

( 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193 )

**摘要:** 对采集于北京市平谷地区的番茄枯萎病病株进行病原菌的分离、纯化, 并进行病原菌的形态学观察与分子生物学技术诊断鉴定。结果表明: 北京平谷地区番茄枯萎病主要由尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 侵染所致, 另外也可能存在串珠镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 的复合侵染。

**关键词:** 番茄; 枯萎病; 鉴定

中图分类号: S641.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 ( 2011 ) 22/24-0122-03

## Identification of Tomato Wilt Pathogen in Pinggu District of Beijing

LI Yuan, ZHANG Da-yan, XU Wen-yuan, GUO Mei-xia, CAO Ao-cheng\*

( Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China )

**Abstract:** The research work described in this paper was mainly about the segregation, purification and identification of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) wilt pathogen in the susceptible plant collected from Pinggu district in Beijing. The results of morphological observation and molecular biological techniques identification showed that *Fusarium oxysporum* was the main causing agent for tomato wilt. Besides, *Fusarium proliferatum* may be the complex infected agent.

**Key words:** Tomato; Wilt; Identification

枯萎病主要危害番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)、辣椒等作物的茎部维管束。发病初期, 植株中、下部叶片在中午时呈褐色萎蔫, 早晚恢复正常; 随病害发展, 植株中、上部更多叶片开始发病萎蔫, 但不脱落; 至最后全株叶片萎蔫发黄, 整株枯死。病症有时仅出现在茎的一边, 或一片叶一边发黄而另一边正常。剖视茎、叶柄及果柄, 可见其维管束均呈褐色。潮湿环境下, 病株茎基部产生粉红色霉 ( 黄绍岗, 1994; 徐艳辉 等, 2008 )。病程进展较慢, 15 ~ 30 d 才枯死, 无乳白色黏液流出, 有别于青枯病。发病率 15% ~ 20%, 严重时植株全部枯死, 对产量造成很大的损失 ( 程爱响, 2010 )。本试验对北京平谷地区的番茄枯萎病病株进行分离、纯化, 运用分子生物学技术对病原菌进行诊断鉴定, 以期防治番茄枯萎病提供参考。

## 1 材料与方方法

### 1.1 番茄枯萎病病组织采集

2010 年 12 月于北京市平谷区温室进行样品采集, 主要采集番茄病株的茎、叶部分 5 ~ 10

收稿日期: 2011-08-03; 接受日期: 2011-10-11

基金项目: 现代农业产业技术体系北京市果类蔬菜创新团队项目, 国家自然科学基金项目 ( 31101462 )

作者简介: 李园, 女, 助理研究员, 主要从事土传病原菌分子检测鉴定及土壤消毒技术方面的研究, E-mail: liyuancaas@126.com

\* 通讯作者 ( Corresponding author ): 曹焯程, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事土壤消毒技术方面的研究, E-mail: caoac@vip.sina.com.cn

株,将所采集的番茄病组织(图1)保存于4℃冰箱备用。



图1 供试番茄枯萎病病组织

## 1.2 番茄枯萎病病原分离与鉴定

采用PDA+S培养基对采集到的番茄枯萎病病原菌进行分离。培养基成分:1 000 mL灭菌水,38 g马铃薯葡萄糖琼脂,5 g琼脂,0.05 g硫酸链霉素。病原菌的分离培养采用常规组织分离法,从病株根部切下3 mm×3 mm×1 mm的小块,放入70%酒精消毒30 s,然后转入1%次氯酸钠溶液浸泡2 min,用无菌水清洗3次,置于PDA+S培养基上,在25℃培养箱内恒温培养7 d(郑莉等,2006)。培养皿内观察病菌形态。

## 1.3 菌丝体收集及DNA提取

在无菌操作台上,用刀片轻轻刮下培养皿中病原菌菌丝,并将其收集至EP管中。采用TakaRa试剂盒进行DNA提取。

## 1.4 PCR鉴定

PCR反应体系(50 μL):5 U·μL<sup>-1</sup>Taq酶0.25 μL,10×PCR buffer(Mg<sup>2+</sup>plus)5 μL;2.5 mmol·L<sup>-1</sup>dNTP Mixture 4 μL;10 ng模板DNA 1 μL;10 μmol·L<sup>-1</sup>ITS1/ITS4引物各1 μL;灭菌双重蒸馏水补足至50 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火40 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物于1%琼脂糖凝胶进行检测,电压85 V,电泳时间30 min,Bio-rad凝胶成像仪进行观测、拍照。

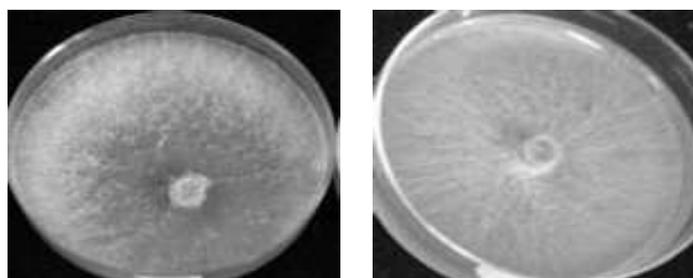
## 1.5 数据分析

试验数据在GeneBank中进行Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)序列比对,分析序列同源性。

# 2 结果与分析

## 2.1 番茄枯萎病病原菌

如图2所示,对采集到的番茄枯萎病病原进行分离培养后得到的菌落呈圆形,菌丝细



尖孢镰刀菌

串珠镰刀菌

图2 番茄枯萎病病原菌菌落

绒状, 蓬松。菌落呈白色或边缘白色, 向内逐渐变成粉红色。

对番茄枯萎病病原菌菌落进行显微镜镜检, 该病原菌大型分生孢子镰刀形, 无色, 弯曲, 2~5个隔膜, 多数为3个隔膜, 大小为(19~45)  $\mu\text{m} \times$  (2.5~5.0)  $\mu\text{m}$ , 基部具足细胞; 小型分生孢子椭圆形或卵形, 无色, 单孢或双孢, 大小为(5~26)  $\mu\text{m} \times$  (2.0~4.5)  $\mu\text{m}$ ; 厚垣孢子球形, 多数单孢, 平滑或皱缩, 顶生或间生。初步认定该病原菌为镰刀菌。

## 2.2 番茄枯萎病病原分子鉴定

番茄枯萎病病原 ITS-PCR 鉴定结果如图3所示, 条带大小为500~700 kb, 清晰单一, PCR产物直接送华大基因公司进行测序。

## 2.3 序列信息及比对结果

测序结果显示, ITS序列全长为538 bp, GeneBank中 Blast序列比对结果显示, 与尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)序列同源性高达100%; 另一份样品测序结果显示, ITS序列全长为534 bp, GeneBank中 Blast

序列比对结果显示, 与串珠镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)序列同源性高达99%。

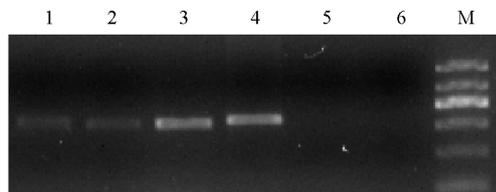


图3 番茄枯萎病病原 ITS-PCR 鉴定结果  
M, DNA Marker II; 1~4, 病原菌样品; 5~6, 无DNA对照。

## 3 小结

经过病原菌的分离纯化、形态学观察及分子生物学技术鉴定, 初步结果表明北京市平谷地区番茄枯萎病主要由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)侵染所致。另外也可能存在串珠镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)的复合侵染。

### 参考文献

- 程爱响. 2010. 大棚番茄枯萎病的诊断和防治新技术. 中国瓜菜, (1): 45-46.  
黄绍岗. 1994. 番茄枯萎病及其防治方法. 广西植保, (3): 29-30.  
徐艳辉, 李焯, 许向阳. 2008. 番茄枯萎病的研究进展. 东北农业大学学报, 39(11): 128-134.  
郑莉, 朱秋珍, 冯自立, 黄俊斌. 2006. 草莓枯萎病病原菌鉴定及其生物学特性. 湖北农业科学, 45(2): 194-196.

## 《中国蔬菜》参考文献著录格式

著录采用著者-出版年编码制, 按 GB/T 7714—2005 要求列出各项, 文献的作者全部著录, 一律姓在前, 名在后。西文或俄文等作者姓的首字母大写, 名可缩写为首字母(大写)。如为译文, 则作者处著录原作者姓名, 译者姓名置于题名或书名之后。专著的出版地不详时要注明“〔出版地不详〕”或“〔S.l.〕”; 出版者不详时应注明“〔出版者不详〕”或“〔s.n.〕”, 但不能同时出现。页码应著录引文所在的起止页码。

期刊的著录格式: 王玉峰. 2007. VA 菌根真菌在马铃薯上的应用效果. 中国蔬菜, (2): 30-31.

van Doorn W G. 2003. Flower opening and closure: a review. Journal of Experimental Botany, 54: 1801-1812.

专著的著录格式: Krumbein A, Schonhof I. 2001. Influence of temperature and irradiation on glucosinolates in broccoli heads//Pfannhauser W, Fenwick G R, Khokhar S. Biologically-active phytochemicals in food. Cambridge: Royal Society of Chemistry: 477-479.

论文集的著录格式: Restaino F, Perrone D, Correale A. 1998. New parthenocarpic genotypes of eggplant suitable for greenhouse cultivation//Palloix A, Daunay M C. Xth Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Paris: INRA Paris: 273.

学位论文的著录格式: 陈新娟. 2006. 中国芸薹属蔬菜硫代葡萄糖苷及其影响因子研究〔博士论文〕. 杭州: 浙江大学