

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 曹塍程*

(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 (程爱昀, 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): 曹塍程, 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⁻¹ *Taq* 酶 0.25 μL，10 × PCR buffer（Mg²⁺ plus）5 μL；2.5 mmol · L⁻¹ dNTP Mixture 4 μL；10 ng 模板 DNA 1 μL；10 μmol · L⁻¹ 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。

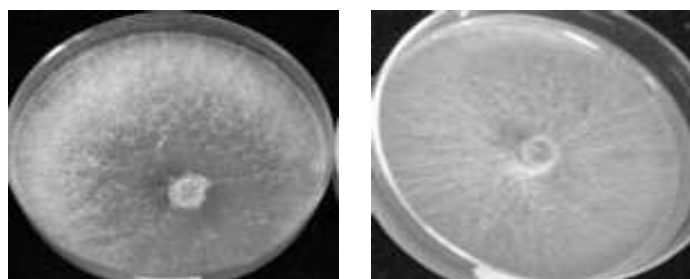
1.5 数据分析

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 $(19 \sim 45) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$, 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 $(5 \sim 26) \mu\text{m} \times (2.0 \sim 4.5) \mu\text{m}$; 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%。

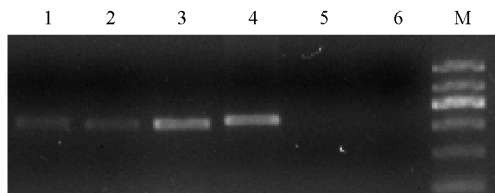


图 3 番茄枯萎病病原 ITS-PCR 鉴定结果

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

- 程爱昀. 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, 李烨, 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