

番茄茎枯病病原菌鉴定

裴冬丽¹, 洪权春¹, 丁锦平¹, 李成伟^{1,2*}

(1. 商丘师范学院 生命科学院, 植物与微生物互作重点实验室, 河南 商丘 476000;

2. 周口师范学院 生命科学院, 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南 周口 466001)

摘要: 番茄茎枯病主要危害番茄的茎和果实, 严重影响番茄的产量和品质, 为此, 采用组织分离法对河南商丘地区番茄茎枯病病原菌进行分离、纯化, 测定其致病性, 并进行形态学和分子生物学鉴定。结果表明, 番茄茎枯病病原菌为链格孢菌(*Alternaria alternata*), 其 rDNA ITS 序列与 GenBank 中苹果链格孢菌(*A. alternata*)的 ITS 序列同源性为 100%, 与链格孢属的其他小孢子种聚在一个大的分支上。番茄茎枯病病原菌的鉴定为该病害的防治奠定了基础。

关键词: 番茄茎枯病; 病原鉴定; 链格孢菌; ITS 序列

中图分类号: S436.412.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)06-0095-03

Identification of Pathogen Causing Tomato Stem Blight

PEI Dong-li¹, HONG Quan-chun¹, DING Jin-ping¹, LI Cheng-wei^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions, Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China; 2. Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: Tomato stem blight mainly causes stems and fruits hurt, resulting in reduced yield and quality. The pathogen of this disease was isolated by tissue isolation way, and further pathogenicity test, morphological and molecular identification were done. The results showed that the pathogen was *Alternaria alternata*, whose rDNA ITS sequence shared a 100% identity with the ITS sequence of *Alternaria alternata* from apple, and was clustered in one branch with other small-spored species of *Alternaria* Nees. Identification of the pathogen of tomato stem blight will provide theoretical basis for control of the disease.

Key words: tomato stem blight; pathogen identification; *Alternaria alternata*; internal transcribed spacer sequence

番茄是我国栽培面积最大、种植最广泛的蔬菜之一, 在我国乃至世界蔬菜生产和供应中具有举足轻重的地位。但是番茄病虫害发生较为严重, 影响了番茄的产量和品质^[1-2]。近年来, 随着番茄种植面积的扩大, 番茄茎枯病的发生逐渐加重, 使番茄一般减产 50%, 发病严重的地块减产 80% 以上。番茄茎枯病又称黑霉病, 主要危害番茄的茎和果实。茎部病斑开始呈椭圆形或梭形、褐色、凹陷、溃疡状, 然后沿着茎扩展到整个植株, 严重的患病部位呈深褐色、

干腐状, 病菌可侵入维管束内。番茄茎枯病菌可侵染绿果或红果, 开始为灰白色、小斑块, 随后病斑扩大并凹陷, 颜色变暗, 长出黑霉, 引起番茄果腐^[3]。

2011 年夏季, 河南省商丘市番茄蔬菜园区田庄发生了严重的茎枯病, 造成番茄产量明显下降。本研究对该病病原菌进行了分离、纯化和致病性测定, 并进行形态学和分子生物学鉴定, 以明确番茄茎枯病病原菌的种类, 为监测其小种分化及进一步有效防治番茄茎枯病奠定基础。

收稿日期: 2012-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071807)

作者简介: 裴冬丽(1971-), 女, 河南虞城人, 副教授, 博士, 主要从事植物与病原体分子互作研究。E-mail: peidongli@126.com

* 通讯作者: 李成伟(1972-), 男, 河南民权人, 教授, 博士, 主要从事分子植物遗传学研究。

1 材料和方法

1.1 病原菌的分离纯化

感染茎枯病的番茄植株采自商丘市田庄蔬菜园区,采用传统的组织分离法进行病原菌的分离与纯化^[4]。于番茄病健交界处切下数块病斑茎段组织(约 5 mm),用 75% 的乙醇表面消毒 10 s,10% 的次氯酸钠消毒 5 min 后,无菌水漂洗 3~5 次,接种于 PDA 培养基上,于 28 °C 下平板倒置培养。菌落长出后,挑取少许菌丝接种于新的 PDA 培养基上,28 °C 下培养。重复操作,直至最终获得纯培养物。

1.2 菌落培养特征及形态鉴定

挑取上述分离菌株(编号:SQLGB-1)菌落的单个孢子于 PDA 培养基上培养,28 °C 下培养 4~5 d 后,肉眼观察菌落特征;于微分干涉显微镜下观察病原菌的形态结构,测量分生孢子的大小,包括长度、宽度、喙长、横纵隔膜数等。

1.3 病原菌致病性测定

采用孢子悬浮液针刺法接种,用浓度为 5×10^5 个/mL 的番茄茎枯病菌孢子悬浮液对健康番茄植株茎部的针刺伤口接种,之后用塑料袋套袋保湿 24 h,接种 7 d 后观察植株发病症状,并对再次分离的病原菌进行显微形态学鉴定。

1.4 病原菌分子鉴定

挑取分离菌株的少量菌丝于 1.5 mL 离心管中,加入少量石英砂研磨,采用 CTAB 法提取病菌的总 DNA^[5]。PCR 扩增反应所用引物为核糖体 DNA(rDNA)内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)的通用引物 ITS1 和 ITS4^[6]。PCR 采用 20 μ L 反应体系,包括模板 DNA 2 μ L(约 50 ng),10 \times Buffer 2 μ L,2.5 mmol/L 的 dNTP 1.6 μ L,25 mmol/L 的 Mg^{2+} 1.6 μ L,10 pmol/ μ L 的上下游引

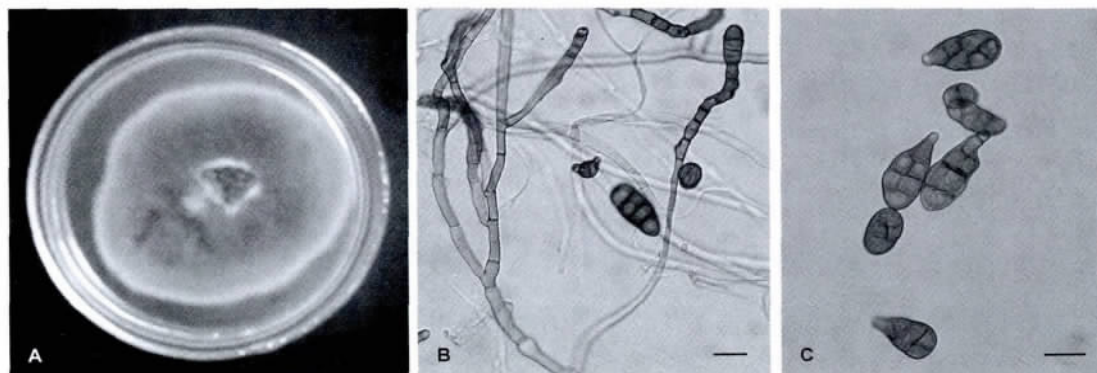
物各 1 μ L,5 U/ μ L 的 Taq 聚合酶 0.2 μ L,ddH₂O 10.6 μ L。反应条件为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,用宝生物工程(大连)公司的凝胶纯化试剂盒纯化后克隆至 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌感受态细胞,采用质粒 PCR 鉴定出阳性菌落,送南京金斯瑞生物科技有限公司进行正反双向测序。

将所得菌株的 rDNA ITS 序列与 GenBank 核酸数据库中的序列进行 BLASTn 比对。进一步采用软件 Clustal X 和 MEGA 3.1 软件,对该菌株 ITS 序列与 GenBank 中链格孢属(*Alternaria* Nees)已知其他种的 ITS 序列进行同源性分析,并构建 Neighbor-Joining 系统进化树,以 Bootstrap 检验系统树的可靠性,重复 1 000 次,发育系统树节点支持率 >50% 认为可信度较高。

2 结果与分析

2.1 病原菌的培养性状和形态特征

病原菌菌落特征为:菌落圆形、平铺,培养初期浅灰色,5 d 后变为灰黑色,边缘为灰白色,菌落直径约 80 mm(图 1A)。病原菌产生大量具有分支、隔膜的棕色菌丝,直径 1~7 μ m;分生孢子梗单生或簇生,褐色,有隔,直立,稍弯曲,末端为分生孢子(图 1B);分生孢子大部分为单生,个别短链生,砖格状,倒梨形,褐色,具纵横隔膜,通常 3~7 个横隔膜,0~3 个纵向或斜向隔膜,分隔处稍缢缩,具浅色的短喙或无喙,喙长不超过孢子长度的 1/3,孢子大小为 (10~40) μ m \times (7~12) μ m,喙长 0~3 μ m(图 1C)。依据形态学特征,将该病原菌初步鉴定为链格孢菌(*Alternaria alternata*)^[7]。



A. 菌落; B. 分生孢子梗和菌丝; C. 分生孢子; 比例尺为 20 μ m

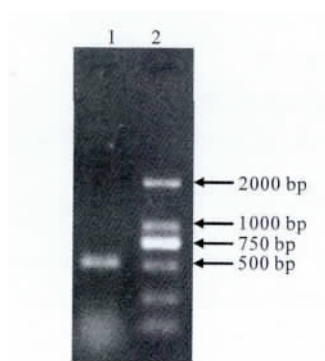
图 1 病原菌的培养性状和形态特征

2.2 病原菌的致病性测定结果

孢子悬浮液接种健康番茄植株 7 d 后,植株出现明显的茎枯病发病症状,与自然发病症状相似,病斑呈椭圆形或梭形、褐色、凹陷、溃疡状,严重的患病部位呈深褐色、干腐状,病菌可侵入维管束内。在显微镜下观察再次分离获得的病原菌形态特征,与 2.1 描述一致。

2.3 病原菌 rDNA ITS 序列分析

PCR 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测,得到一条大小约 600 bp 的条带(图 2)。测序结果表明,病原菌菌株的 rDNA ITS 序列大小为 570 bp,包括部分 18S rDNA、ITS1 区段序列、5.8S rDNA 全序列、ITS2 区段序列和部分 28S rDNA 序列,将其提交至 GenBank 中,登录号为 JX993756。将该序列于 GenBank 核酸序列数据库中进行 BLASTn 比对,发现其与苹果上链格孢菌的 ITS 序列(登录号:GQ249171)具有 100% 的相似性,覆盖率为 100%,与上述的形态学判断结果一致,进一步证明了番茄茎枯病病原菌为 *Alternaria alternata*。构建该菌株(SQLGB-1)与 GenBank 中链格孢属不同种的系统进化树(图 3),结果表明,该菌株与链格孢属的 3 个小孢子种(*A. gaisen*、*A. pomicola*、*A. tenuissima*)关系密切,聚为一支,而链格孢属的另 2 个大孢子种(*A. sesamicola*、*A. solani*)因其距离较远聚为另一个分支。



1. ITS 扩增产物; 2. DNA 2 000 bp Marker

图 2 番茄茎枯病分离菌株 ITS 扩增产物

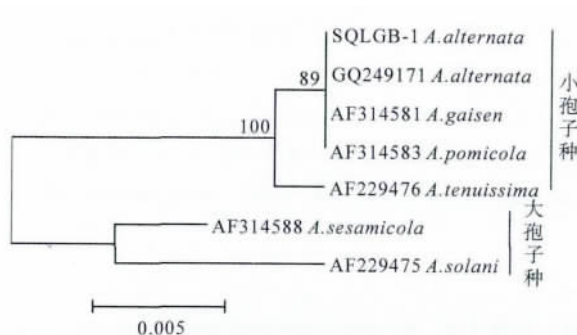


图 3 番茄茎枯病分离菌株与链格孢属不同种 ITS 序列的系统进化树

3 结论与讨论

本研究根据番茄茎枯病病原菌的培养菌落形态、分生孢子特征、致病性测定和 rDNA ITS 序列分析结果,判定河南商丘地区番茄茎枯病的病原菌为链格孢菌(*A. alternata*),与王晓娟等^[3]报道的番茄黑霉病病原菌一致。Simmons 依据真菌产孢类型和孢子形态,将链格孢属划分为 14 个种^[8],其中链格孢菌(*A. alternata*)寄主范围广泛,可寄生于多种植物组织上或腐生于多种有机质和土壤中^[9]。Akhtar 等 1994 年、2004 年分别报道了巴基斯坦番茄链格孢菌(*A. alternata*)的发生情况,该菌作为一种腐生菌使番茄叶、茎枯萎,果实腐烂,导致番茄产量显著下降^[10-11]。河南商丘地区番茄茎枯病病原菌的鉴定为番茄茎枯病的深入研究及防治提供了一定的理论指导和依据。

参考文献:

- [1] 尹元拴,张治家,张琦. 番茄灰霉病田间药效试验[J]. 山西农业科学, 2005, 33(4): 69-70.
- [2] 郝永娟,王万立,金凤媚,等. 天津市番茄黄化曲叶病毒病的发生与防治[J]. 天津农业科学, 2010, 16(2): 48-50.
- [3] 王晓娟,尹同萍,牛蕴华,等. 番茄黑霉病的发生及早期预防[J]. 蔬菜, 2002(1): 26.
- [4] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] 庄彩云,李潞滨,胡陶,等. 适用于 rDNA ITS 分析的兰属菌根真菌培养及 DNA 提取方法[J]. 北京农学院学报, 2007, 22(3): 4-6.
- [6] Kiss L, Takamatsu S, Cunningham J H. Molecular identification of *Oidium neolycopersici* as the causal agent of the recent tomato powdery mildew epidemics in North America[J]. Plant Disease, 2005, 89(5): 491-496.
- [7] Shakir A S, Mirza J H, Akhtar K P. New records of *Alternaria* species from Pakistan[J]. Pakistan Journal of Phytopathology, 1997, 9: 102-104.
- [8] Simmons E G. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge[M]//Chelkowski J, Visconti A. *Alternaria* biology, plant diseases and metabolites. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1992: 1-35.
- [9] 傅本重,王政又,伍建榕,等. 昆明美人蕉黑斑病菌——链格孢 *Alternaria alternata* [J]. 菌物学报, 2012, 31(4): 645-647.
- [10] Akhtar K P, Matin M, Mirza J H, et al. Some studies on the post harvest diseases of tomato fruits and their chemical control[J]. Pakistan Journal of Phytopathology, 1994(6): 125-129.
- [11] Akhtar K P, Saleem M Y, Haq M A. New report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of tomato in Pakistan[J]. New Disease Reports, 2004, 9: 43.