

doi:10.11937/bfyy.20171124

赤峰地区番茄灰叶斑病病原菌的鉴定

周艳芳, 赵伟强, 王燕春

(赤峰市农牧科学研究院, 内蒙古 赤峰 024031)

摘要:以番茄灰叶斑病为研究对象,采用形态学鉴定、致病性检测和分子生物学等方法,研究了赤峰地区番茄灰叶斑病的病原菌种类,以期为该病害的防治提供参考依据。结果表明:病原菌(ZTWYF16081515)分生孢子淡褐色,长方形至圆柱形,大小为 $(21.4\sim 71.9)\mu\text{m}\times(10.5\sim 27.3)\mu\text{m}$ 。分离菌株喷雾接种,7 d后番茄叶片上形成典型的番茄灰叶斑病病斑。核糖体 RNA 基因内转录间隔区(ITS)和 *gpd* 区的 PCR 产物经测序后进行 BLAST 分析,均表明该菌与茄霉 *S. solani* 的 ITS 和 *gpd* 序列 100% 相同,确定该病原为茄霉 *S. solani*。

关键词:赤峰;番茄灰叶斑病;病原菌;茄霉

中图分类号:S 432.4⁺4 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2017)22-0055-04

我国对番茄灰叶斑病的报道最早于 2002 年,当时山东鱼台县的 3 万个番茄大棚中发生了番茄灰叶斑病,病棚率为 43%,2003 年番茄灰叶斑病发病率为 90%,有的地块最高减产 80%^[1]。2005 年贵州省贵阳市的几个地区均发生了番茄灰叶斑病危害,其中息烽县养龙司蔬菜基地的 23.3 hm² 番茄,有 40% 减产、13% 绝收^[2]。祝海燕等^[3]、李宝聚等^[4]、刘国华^[5]、杨琦凤等^[6]、杜自海等^[7]陆续报道了番茄灰叶斑病在山东、海南、山西、重庆以及河北等地区的发生情况,造成番茄减产 20%~40%,有的地块甚至绝收。在赤峰市元宝山区 2014 年 2 月首次发现了番茄灰叶斑病,发病率达到 60%。2015 年和 2016 年在赤峰市喀喇沁旗、松山区等地再次发现该病害的发生,病棚率达到 80%。

国外有报道称引起番茄灰叶斑病的病原菌有 3 种,分别是 *S. solani*、*S. floridanum* 和 *S. botryosum* f. sp. *lycopersici*^[8]。方中达^[9]、王就光^[10]认为造成番茄灰叶斑病的病原是 *S. solani*,薛峰等^[11]研究表明引起山东泰安地区番茄叶部病斑的病原菌为 *S. lycopersici*。韩长志^[12]对河北地区百利番茄灰叶斑病病原进行了鉴定,发现引起番茄灰叶斑病的病菌为 *S. solani* 及另外 2 种未知病原菌。因此,鉴于国内外对番茄灰叶斑病的病原报道不统一的状况,有必要对引起番茄灰叶斑病的病原菌进行研究,以明确赤峰地区番茄灰叶斑病的病原。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料于 2016 年在番茄灰叶斑发病较严重的喀喇沁旗王爷府镇进行采集。病原菌分离培养采用 PCA 培养基(马铃薯胡萝卜琼脂培养基)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离和纯化

采用组织分离法^[13],在病斑的病健交界处剪成 4~5 mm 的小块,用 75% 酒精表面消毒 1 min,然后用无菌水清洗 2 次。用消毒镊子把病样从无

第一作者简介:周艳芳(1986-),女,硕士,助理研究员,现主要从事植物病虫害等研究工作。E-mail: yecaode@126.com.

责任作者:王燕春(1980-),女,博士,研究员,现主要从事植物病虫害等研究工作。E-mail: ychunwang@163.com.

基金项目:内蒙古农牧业科学院青年创新基金资助项目(2015QNJJN12)。

收稿日期:2017-07-10

菌水中取出,放于 PCA 平板内,每板接种 1~3 块,重复 2 次,用封口膜把培养皿封好。将平板放于 28℃ 下暗培养,待菌丝长出后挑取菌落边缘置于 PCA 平板上纯化,28℃ 暗培养 7 d 后,挑取病原菌保存于 5 mL PCA 离心管斜面中,4℃ 保存备用。

1.2.2 病原菌形态学及分子生物学的鉴定

将纯化的病原菌(ZTWYF16081515)在 400 倍光学显微镜下观察,记录分生孢子梗及分生孢子特征。

采用 CTAB 法^[14]提取病原菌 DNA。rDNA ITS PCR 引物为通用引物 ITS1(5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGC-3')和 ITS4(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')。gpd 基因引物为 gpdf(5'-GCACCGACCACAAAATC-3')和 gpdr(5'-GGGCCGTCAACGACCTTC-3')^[15]。设 5 次重复。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,并用凝胶成像仪进行观察并拍照。

1.2.3 病原菌致病性的田间检测

将经鉴定后的病原菌配成浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的孢子悬浮液。当番茄长至 2~3 片真叶时,采用喷雾法接种,将孢子悬浮液均匀喷洒于番茄叶片的正背面,以液体不滴落为宜,接种 20 棵番茄苗,以喷施无菌水为对照。置于 25℃,100% 相对湿度的生化培养箱中培养 24 h,在温室中进行培养(20~24℃)。观察记录发病时间及病情指数。番茄灰叶斑病的病情指数分级标准^[12]。0 级:叶片上无明显病斑;1 级:叶片上有 1~2 个病斑;2 级:叶片上有 3~7 个病斑;3 级:叶片上有 8~10 个病斑,病斑交界明显,有一定的褪绿、萎蔫症状;4 级:叶片上病斑 10 个以上,病斑交界不明显,出现连片现象,并且叶片出现严重的褪绿、萎蔫症状。

1.3 数据分析

采用 Clustal X1.83 和 MEGA 7.0.26 软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 赤峰地区番茄灰叶斑病的症状

番茄灰叶斑病主要危害叶片。发病初期叶片病斑初为褐色小点,后逐渐扩大为圆形或近圆形。发病后期受叶脉限制呈不规则形,有的病斑连成

片呈不规则形。病斑中央灰白色至黄褐色,边缘深褐色,具有黄色晕圈;有的病斑上具有同心轮纹,发病后期病斑穿孔破裂,与番茄早疫病症状相近(图 1-A),叶片背面病斑颜色稍浅(图 1-B)。发病严重时病斑布满整个叶片,使叶片干枯脱落,甚至整个枝条变黄干枯(图 1-C)。

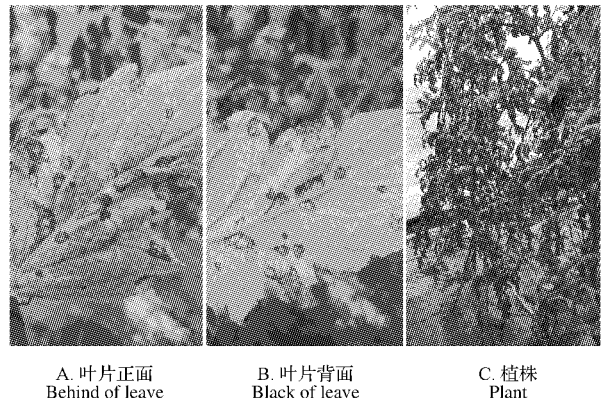


图 1 番茄灰叶斑病症状

Fig. 1 Symptoms of tomato gray leaf spot

2.2 番茄灰叶斑病原菌的显微形态

该病原菌分生孢子梗叶两面生,单生或 2~3 根簇生,圆柱形、光滑,具隔膜,淡褐色,膨大部深褐色,直立或弯曲,具层出梗 0~4 个,分生孢子梗大小为 $(44.9 \sim 130.2) \mu\text{m} \times (4.6 \sim 7.1) \mu\text{m}$ 。分生孢子单生,淡褐色、长方形至圆柱形,基部顿圆或稍尖、光滑或具微疣,具 1~3 个横隔膜,数个纵斜隔膜,在中间横隔膜处缢缩;分生孢子大小为 $(21.4 \sim 71.9) \mu\text{m} \times (10.5 \sim 27.3) \mu\text{m}$,长宽比平均值为 2:1,脐部深褐色(图 2)。与番茄匍柄霉(*S. lycopersici*)和茄匍柄霉(*S. solani*)进行形态学比较^[16](表 1),初步鉴定赤峰市番茄灰叶斑病原菌为茄匍柄霉(*S. solani*)(图 2)。

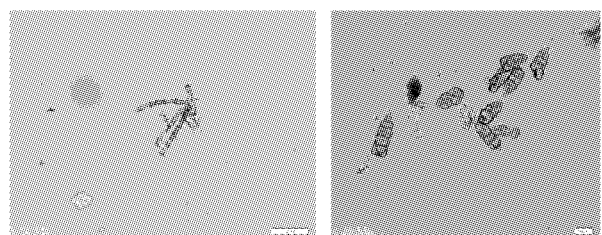


图 2 试验菌株的病原菌形态

Fig. 2 Morphology of pathogen of trial fungus

表 1 试验菌株与番茄匍柄霉和茄匍柄霉形态学比较

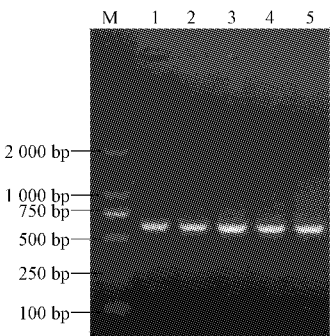
Table 1 Morphological comparison of among *S. lycopersici*, *S. solani* and trial fungus

μm

	番茄匍柄霉 <i>S. lycopersici</i>	茄匍柄霉 <i>S. solani</i>	试验菌株 Trial fungus
大小 Size	(49.5~75.5)×(15.0~21.0)	(23.0~75.0)×(14.0~25.0)	(21.4~71.9)×(10.5~27.3)
长/宽 Lenght/Weight	3 : 1	2 : 1	2 : 1

2.3 rDNA ITS 与 *gpd* 基因序列分子鉴定结果

试验菌株(ZTWYF16081515)经 rDNA ITS1 和 ITS4 引物进行 PCR 扩增后,利用琼脂糖凝胶电泳检测,获得 5 条大小一致约 600 bp 的清晰条带(图 3)。经 *gpdf* 和 *gpdr* 引物扩增后,获得 5 条大小一致约 1 000 bp 的清晰条带(图 4)。经测序后的 rDNA ITS 和 *gpd* 序列提交至 GenBank,进行 BLAST 对比分析,用最大简约法构建系统发育树。结果表明试验菌株 rDNA ITS 和 *gpd* 区均与茄匍柄霉 *S. solani* 聚在一起,具有较高同源性(图 5)。同时比对显示,其 ITS 和 *gpd* 碱基序列与茄匍柄霉 *S. solani* 的碱基序列 100%相同,进一步确定了试验菌株为茄匍柄霉 *S. solani*。



注:M, DL 2000 Marker;1~5. 试验菌株。下同。

Note:M, DNA Marker;1-5. Amplication of trial fungus.

The same below.

图 3 试验菌株经 rDNA ITS 引物的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR result of trial fungus by primers ITS1 and ITS4

2.4 田间接种鉴定

接种后 2 d,番茄叶片上开始出现小斑点。接种后 7 d,番茄叶片上形成典型的番茄灰叶斑病病斑(图 6),病情指数达到 45%。对照均不发病。对接种后的病斑再次进行病原菌分离,经形态学与分子鉴定,得到与原分离菌株一致的病原菌。根据柯赫氏法则^[17],证明接种菌株为番茄灰叶斑病原菌。

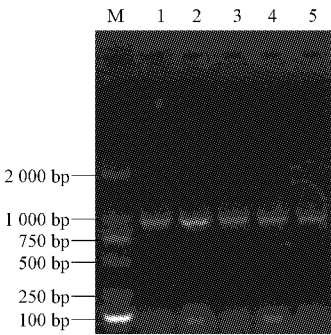
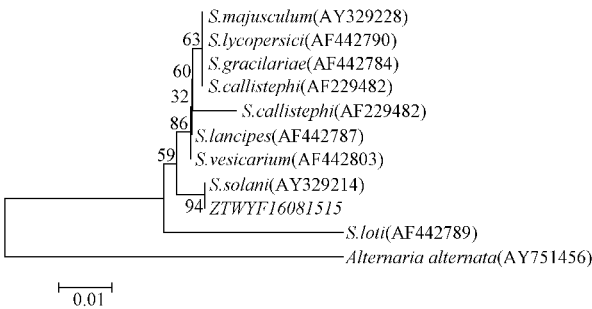
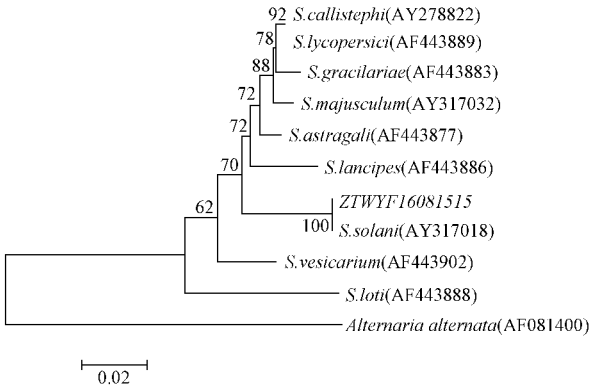


图 4 试验菌株经 *gpd* 引物的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR result of trial fungus by primers *gpdf* and *gpdr*



rDNA ITS 引物序列 Primer sequence of rDNA ITS



gpd 引物序列 Primer sequence of *gpd*

图 5 试验菌株系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of trial fungus

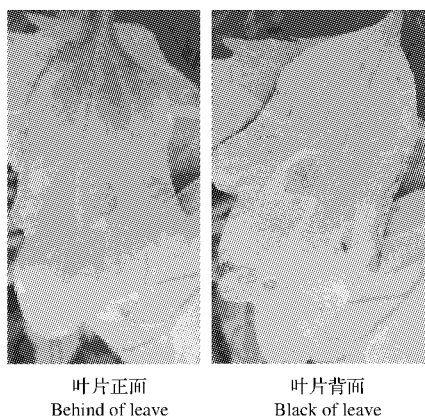


图6 人工接种后番茄灰叶斑病的发病症状

Fig. 6 Symptoms of *S. solani* on leaves caused by artificial inoculation

3 结论

该研究结果表明病原菌分生孢子梗单生或2~3根簇生、圆柱形、淡褐色、直立或弯曲,具层出梗0~4个,大小为 $(44.9\sim 130.2)\mu\text{m}\times(4.6\sim 7.1)\mu\text{m}$ 。分生孢子单生、淡褐色、长方形至圆柱形、基部顿圆或稍尖、光滑或具微疣,具1~3个横隔膜,数个纵斜隔膜,大小为 $(21.4\sim 71.9)\mu\text{m}\times(10.5\sim 27.3)\mu\text{m}$,长宽比平均值为2:1。病原菌形态学特征与茄萁柄霉(*S. solani*)相似。经系统发育树聚合试验结果表明,试验菌株与茄萁柄霉 *S. solani* 聚在一起,碱基序列100%相同。结合形态学和分子生物学鉴定结果,将赤峰地区番茄灰叶斑病的病原菌确定为茄萁柄霉 *S. solani*。

参考文献

- [1] 刘安敏,孙家栋,陶秀珍,等. 保护地番茄灰叶斑病的发生与综合防治[J]. 中国植保导刊,2004(4):23-24.
- [2] 李苑群,廖晨鹭,魏明山. 高山地区延晚番茄灰叶斑病综合防治技术[J]. 长江蔬菜,2006(5):33.
- [3] 祝海燕,王海峰,郎德山,等. 推广抗 TYLCV 番茄品种注意防治灰叶斑病[J]. 中国蔬菜,2013(1):24-25.
- [4] 李宝聚,周艳芳,李金萍,等. 番茄萁柄霉叶斑病(灰叶斑病)的诊断与防治[J]. 中国蔬菜,2010(23):24-26.
- [5] 刘国华. 襄汾县日光温室番茄灰叶斑病发生特点及防控措施[J]. 中国农技推广,2012,28(12):46-47.
- [6] 杨琦凤,潘光辉,汝学娟,等. 重庆地区番茄灰叶斑病的发生与防治[J]. 南方农业,2012,6(6):28-29.
- [7] 杜自海,张建英. 注意防治番茄灰叶斑病[J]. 农药市场信息,2013(17):41.
- [8] GRAHAM J H, ZEIDERS J H. Pathogenicity, and morphology of some leucumicolous and related species of *Stemphylium*[J]. Phytopathology, 1960, 50:757-760.
- [9] 方中达. 中国农业植物病害[M]. 北京:中国农业出版社,1979.
- [10] 王就光. 彩图蔬菜病害诊治手册[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [11] 薛峰,张修国,王勇,等. 中国萁柄霉研究 II:一新种及四个中国新纪录[J]. 菌物学报,2005,24(3):322-329.
- [12] 韩长志. 番茄灰叶斑病病原鉴定及其生物学特性研究[D]. 保定:河北农业大学,2007.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [14] 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京:科学出版社,2002.
- [15] 王勇. 细基格孢属、萁柄霉属及其近似属的形态学与分子系统学研究[D]. 泰安:山东农业大学,2010.
- [16] 张天宇. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [17] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,2000.

Pathogen Identification of Tomato Gray Leaf Spot in Chifeng

ZHOU Yanfang, ZHAO Weiqiang, WANG Yanchun

(Chifeng Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Chifeng, Inner Mongolia 024031)

Abstract: Tomato gray leaf spot was used as object, the pathogen of tomato gray leaf spot in Chifeng were studied by morphological, pathogenicity testing and molecular sequence analysis. The results showed that conidia were light brown, rectangle or cylindrical, size was $(21.4\sim 71.9)\mu\text{m}\times(10.5\sim 27.3)\mu\text{m}$. After spraying inoculation with spore suspension, typical spots appeared on the leaves of tomato in 7 days. PCR product were sequenced after BLAST analysis, rDNA ITS and *gpd* of ZTWYF16081515 revealed 100% nucleotide identity to that of *S. solani*. It came into conclusion that the pathogen causing leaf spot of tomato in Chifeng to be identified as *S. solani*.

Keywords: Chifeng; gray leaf spot of tomato; pathogens; *Stemphylium solani*