

番茄灰霉病菌的鉴定及系统发育树分析

王瑞虎¹, 关鑫¹, 陈秀玲¹, 王傲雪^{1,2}

(1. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:从感染番茄灰霉病的病果上分离并纯化得到菌株 t08016b, 其形态学特征与灰葡萄孢属极其相似。通过扩增菌株 t08016b 的 18S rDNA 及内转录间隔区(ITS)序列, 对其进行分子鉴定和分类。结果表明: 该菌的 18S rDNA 序列与 *Botryotinia fuckeliana* (EF110887.1) 的同源性为 99.94%; ITS rDNA 序列与 *Botryotinia fuckeliana* (AB444949.1) 的同源性为 100%, 无碱基差别。对菌株 t08016b 进行系统发育树分析, 表明 t08016b 属于灰葡萄孢属。利用该菌对健康番茄进行侵染, 番茄灰霉病的发病率可达 97%, 证明其具有致病力。综合形态学鉴定、分子鉴定及致病力分析, 表明菌株 t08016b 是一株具有强致病力的灰葡萄孢菌。

关键词:番茄灰霉病; 灰葡萄孢菌; 菌种分离; 鉴定

中图分类号:S 436.412.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0127-05

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)属半知菌亚门丝孢纲丝孢目淡色菌科葡萄孢属弱寄生病原菌, 简称灰霉菌,

有性阶段为富克尔核盘菌(*Sclerotinia fuckeliana* de Bary)。灰霉菌的寄主范围相当广泛, 能够侵染近 200 多种植物^[1], 除危害葫芦科、茄科蔬菜外, 菜豆、韭菜、洋葱也均能受其危害, 病菌可危害叶、茎、花及果实, 近年在发病严重的地块和时期, 出现了“花脸斑”和茎基部腐烂的现象^[2-3]。

番茄灰霉病是一种世界性的重要病害, 极大影响了番茄产量, 严重时减产可达 20%~30% 以上。由于在番茄中还没有发现灰霉病的直接抗源材料, 所以番茄灰霉病是难以防治的一种病害。并且在一般条件下, 灰葡萄孢菌的生长速度要比曲霉、青霉、根霉等腐生真菌慢

第一作者简介:王瑞虎(1987-), 男, 硕士, 研究方向为植物生物技术。E-mail: wangruihu@yahoo.com.cn.

责任作者:王傲雪(1973-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: wangaoxue@yahoo.com.

基金项目:教育部高校博士点专项科研基金资助项目(20092325110001); 教育部科学技术研究重点资助项目; 黑龙江省教育厅新世纪优秀人才资助项目(1251-NCET-004)。

收稿日期:2012-12-17

参考文献

[1] 张权炳. 矿物源农药在柑桔等果树病虫害无公害防治中的应用(一)[J]. 中国南方果树, 2005, 34(5): 77-78.

[2] 韩盛, 杨渡, 徐万里, 等. 8 种生物源和矿物源农药防治加工番茄细菌性斑点病试验[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(11): 2258-2261.

Effect of Fungicide of Fossil Origin (M1 Water Agent) on the Plants and Determination of Control Effect to Tomato Leaf Mould

LI Yong-gang, LI Ying-mei, WEN Sheng-yan, XI Qi-xin

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

Abstract: Taking fungicide of fossil origin (M1 water agent) as the material, the toxic effect of M1 on germination capacity of seeds and root growth of tomato, cucumber, pepper and control effect of M1 against tomato leaf mould were studied by using single factor and effect testing method. The results showed that M1 had no effect on germination capacity of seeds and root growth. And the phytotoxicity of M1 on the plants did not take place. Tomato leaf mould caused by *Fulvia fulva* had effectively been prevented by using M1 with field efficacy, which control effect was 78.32%. So the study laid the groundwork for further research and application of M1.

Key words: fungicide of fossil origin; water agent; tomato leaf mould; control effect; phytotoxicity

很多,而且也会受到这些真菌的抑制,所以给分离工作带来很大的困难。分离灰葡萄孢菌,研究其生理生化特征,并从分子水平对其进行进一步鉴定,为建立快速、灵敏和稳定的番茄灰霉病早期分子诊断方法提供理论基础,并对灰霉病的防治具有一定的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄灰霉病病样采自东北农业大学园艺试验站大棚栽培番茄(*Solanum lycopersicum*)果实。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):按常规方法制备。BC培养基:麦芽汁琼脂培养基与马铃薯葡萄糖琼脂培养基等量混合,调到pH 4。燕麦琼脂培养基(OA):燕麦片 30 g,琼脂 17~20 g,定容至 1 000 mL。PDA+番茄汁(1:1)培养基(PDAT)。马铃薯胡萝卜琼脂培养基(PCA):马铃薯 20 g,胡萝卜 20 g,琼脂 17~20 g,定容至 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 灰葡萄孢菌分离和纯化 菌株的分离纯化参照常规方法并略加修改^[4-6]。将带有明显的灰霉病病症的番茄果实表面用 10%的次氯酸钠溶液浸泡 5 min 后用无菌水冲洗 3 次,切去病健交界处组织分别接种到 PDA、BC、OA、PDA+番茄汁(1:1)培养基上培养。20℃培养 1~2 d 后,选择含与灰葡萄孢菌形态相似的单菌落平板,从上挑取单菌落分别接到新的各自对应的培养基上,直到菌落表现均匀一致为止。将纯化后的菌株标记为“t08016b”且接种到 PCA 斜面培养基上,20℃下培养 3 d 后放到 4℃冰箱保藏以备长期使用。为了保证病原菌存活,维持其致病力,每 90 d 在 BC 培养基上继代 1 次。

1.2.2 形态学鉴定 将菌种分别接种于 PDA、BC、OA、PDA+番茄汁(1:1)培养基上,20℃倒置培养。参照魏景超^[4]对培养特征、形态特征进行观察并记录,以确定该菌株的种属地位。培养特征主要包括菌落形状、生长速度、菌落表面特征、菌落边缘特征、菌落质地、颜色等;形态特征的观察在电子显微镜下进行,包括菌丝体大小、形状、表面特征及是否有横隔、孢子大小、形状、类型、颜色等。

1.2.3 分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取供试菌株的总 DNA,进行 PCR 扩增、纯化、连接及测序。18S rDNA 扩增采用通用引物 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')/NS8(5'-TCCGCAGGTTTCACCTACGGA-3')进行。PCR 采用 50 μL 反应体系:10×buffer(Mg²⁺) 5.0 μL、MgCl₂ 4.0 μL、dNTP(2 mM) 5.0 μL、Taq 酶(MBI,1 U/μL)1.0 μL、引物(10 μM)各 2.0 μL、霉菌总 DNA 2.0 μL 和 ddH₂O 29 μL。PCR 反应条件:94℃预

变性 5 min;94℃变性 40 s,57℃退火 40 s,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物于 1%的琼脂糖凝胶上电泳,利用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)纯化 PCR 产物。利用 pEASY-T1CloningVector 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)连接,转化后,进行蓝白斑筛选。将选取的阳性克隆的菌液置 LB 液体培养基中 37℃,180 r/min 培养过夜,将培养过夜的阳性克隆菌液送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。5.8S rDNA-ITS rDNA 50 μL PCR 反应体系:ddH₂O 33.5 μL,10×buffer(-Mg²⁺) 5.0 μL,dNTP(2 mM) 5.0 μL,通用引物(10 μM)ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 2.0 μL,通用引物(10 μM)ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 2.0 μL,Taq 酶(MBI,1 U/μL)0.5 μL,霉菌总 DNA 2.0 μL。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物于 1%的琼脂糖凝胶上电泳,利用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)纯化回收目标 DNA 片段,并将目标片段连接到 pEASY-T1(北京全式金生物技术有限公司)载体上,转化后,进行蓝白斑筛选。将挑取的阳性克隆置于 LB 液体培养基中 37℃,180 r/min 培养过夜,将培养过夜的阳性克隆菌液送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。将测序获得的 18S rDNA 和 5.8S rDNA-ITS rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,取相似性最高的序列和测定序列在 Clustal X 软件包中进行完全比对。用 Mega 4.0 软件分析,自展数据集为 1000,采用邻位相连(Neighbor-joining)算法^[8],经 Consensus 程序计算多数一致树构建系统进化树。进化距离用 Kimura 双参数模型^[9]。

1.2.4 致病力鉴定 取适量的 08016 番茄种子,用 10%次氯酸钠稀溶液浸泡 10 min 后用无菌水冲洗干净,再用 55℃的温水浸种 10 min,捞出后用清水浸种 12 h,用纱布将种子包好放置到 28℃的培养箱内催芽,每天投洗 2 次,待露白后播种。将种子播到灭菌的育苗土中,2 叶期分苗,5 叶期接种。用含有 0.1% Tween 20 和 1% KH₂PO₄的无菌水配制浓度为 10⁶ 个孢子/mL 的孢子悬浮液喷雾接种,接无菌水作为对照。保持温度(20±1)℃,相对空气湿度 90%以上,10 d 后进行病害调查,隔 10 d 再调查 1 次。此期间进行正常的栽培管理。供试菌株接种番茄 15 株,重复 3 次。病害分级标准:0 级:无病;1 级:1/4 以下叶片发病;2 级:1/4~1/2 叶片发病;3 级:1/2~3/4 叶片发病;4 级:3/4 以上叶片发病。

2 结果与分析

2.1 培养基选择

由于灰葡萄孢在一般条件下的生长速度比叶霉、曲霉、木霉和根霉等腐生真菌慢很多,而且也容易受到这些真菌的抑制,所以选择合适的分离培养基对灰葡萄孢的快速分离至关重要。选用常规适宜真菌生长的培养基 PDA、BC、OA 的同时,受到灰葡萄孢分离自番茄的启示,配制 PDA+番茄汁(1:1)培养基。研究发现,灰葡萄孢在分离培养基 OA 和 PDA+番茄汁(1:1)上生长速度都很慢,而且菌丝也极为稀疏。相反,叶霉、曲霉、木霉和根霉等杂菌生长速度比灰葡萄孢快很多,所以这 2 种培养基不适合分离灰葡萄孢菌。灰葡萄孢在分离培养基 PDA 上生长速度相对较快,但产孢量少,并且培养后期其它杂菌容易在培养基上占优势。在分离培养基 BC 上,灰葡萄孢的生长速度快于其它杂菌,且一直处于优势生长,5 d 后菌落就已布满 90 mm 的培养皿,13 d 后已经形成菌核。具体生长情况见表 1。因此,BC 培养基适合于分离灰葡萄孢,在此培养基上,灰葡萄孢的生长速度比常见的伴生杂菌生长速度快,表现为优势菌。

表 1 菌株在不同培养基上的生长情况

Table 1 The growth of strains on different medias

培养基	菌株	直径/mm							
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	13 d
OA	灰葡萄孢	0	4	7	15	被杂菌抑制不再生长			
	杂菌	2	10	29	40	布满			
PDAT	灰葡萄孢	2	7	15	21	被杂菌抑制不再生长			
	杂菌	4	13	33	49	布满			
PDA	灰葡萄孢	3	10	20	35	2 种菌边缘相接,以后杂菌成优势菌			
	杂菌	3	5	18	45				
BC	灰葡萄孢	4	14	33	60	浅白色	浅灰色	深灰色	灰褐色
	杂菌	0	6	13	21	布满	布满	无菌核	有菌核

注:培养皿直径为 90 mm。

2.2 形态学鉴定

观察灰葡萄孢在不同培养基上的形态特征及其在各种培养基上的生长特性。测量 7 d 内菌落的直径变化

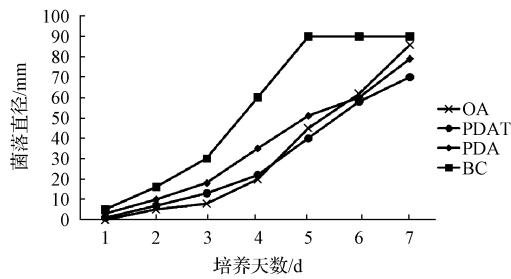


图 1 灰葡萄孢菌在不同培养基上的生长速度

Fig. 1 *Botrytis cinerea* growth rate on different medias

(图 1),对第 7 天的菌落形态特征进行描述(表 2),在第 10 天时观察其显微特征并用血球计数板计数确定产生的孢子数(表 2、3)。结果表明,灰葡萄孢菌适宜在 BC 培养基上生长,PDA 培养基次之,在 OA、PDAT 培养基上较差,表现为菌丝稀疏,生长缓慢;灰葡萄孢菌在 OA 培养基上产孢量最高,PDA 培养基次之,BC、PDAT 培养基上产孢量最低。对照陈景超^[4]和张中义^[10],再结合病害症状和病原菌形态,将菌株 t08016b 初步归属为葡萄孢属(*Botrytis*)。

表 2 灰葡萄孢菌在不同培养基上的形态特征

Table 2 *Botrytis cinerea* morphological characteristics on different medias

	PDA	BC	OA	PDAT
直径/mm	79	布满	86	70
表面特征	菌丝稀疏	菌丝稠密	菌丝较稠密	菌丝稀疏色
灰白色	灰白色	深灰色	灰色	浅白色
边缘特征	向外辐射	菌丝贴壁	菌丝贴壁	菌丝稀疏
颜色	深灰色	灰黑色	灰褐色	灰色
是否产孢	否	是	是	否
分生孢子梗较长,数根丛生,具隔,淡褐色,顶端呈 1~2 次分枝;分枝顶端稍膨大呈头状,其上密生小柄,产生大量分生孢子;分生孢子圆形至椭圆形,无色至淡灰褐色,单胞,表面光滑,大小(7.55~16.13)μm×(6.31~10.23)μm				

注:培养皿直径为 90 mm。

表 3 灰葡萄孢菌在不同培养基上的产孢量

Table 3 Sporulation of *Botrytis cinerea* on different media

培养基	PDA	BC	OA	PDAT
产孢量/×10 ⁵ ·皿 ⁻¹	987	98	1 300	92

2.3 菌株 DNA 的纯度检测及 18S rDNA 和 5.8S rDNA-ITS 序列 PCR 克隆

采用 CTAB 法提取供试菌株的总 DNA,提取出的菌株 DNA,经紫外分光光度计测定,OD₂₆₀ 为 0.0872,OD₂₈₀ 为 0.0471,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.85,符合对 DNA 提取的纯度要求。以此 DNA 为模板,通过 PCR 反应,得到长度约为 1 700 和 600 bp 的片段,与预期结果一致。纯

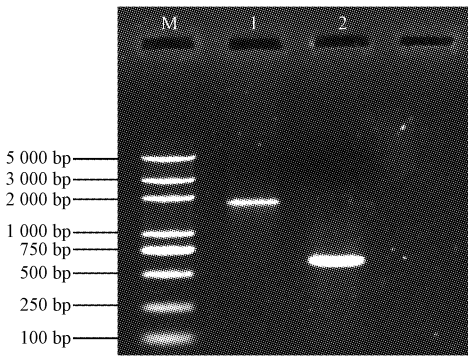


图 2 18S rDNA 和 5.8S rDNA-ITS PCR 纯化的产物

Fig. 2 Purified PCR products of 18S rDNA and 5.8S rDNA-ITS

化回收目标 DNA 片段(图 2)与载体连接并进行测序,测序得 18S rDNA 序列长度为 1 701 bp,将所测序列在 GenBank 中注册,获取基因序列号为 JX875915; 5.8S rDNA-ITS 序列长度为 568 bp,将所测序列在 GenBank 中注册,获取基因序列号为 JX875916。

2.4 系统发育分析

2.4.1 18S rDNA 序列的系统发育分析 将菌株 t08016b 的 18S rDNA 的序列与 GenBank 数据库中已经收录的序列进行 Blast 分析表明,菌株与灰葡萄孢菌的同源性最高。在同源性最高的序列中挑选 18 个菌株的 18S rDNA 序列与菌株 t08016b 构建系统发育树如图 3 所示。由图 3 可知,18S rDNA 序列系统进化分析显示,该菌株

同样与灰葡萄孢菌的同源性最高,其中与 *Botryotinia fuckeliana* (EF110887.1) 的同源性为 99.94%,只有 1 个碱基差别。

2.4.2 5.8S rDNA-ITS 序列的系统发育分析 将菌株 t08016b 的 5.8S rDNA-ITS 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比较,发现菌株与灰葡萄孢菌的 5.8S rDNA-ITS 自然类聚。在聚类的序列中,菌株 t08016b 与它们的同源性都高于 98%。挑选 25 个菌株的 5.8S rDNA-ITS 序列与菌株 t08016b 构建的系统发育树如图 4 所示。从图 4 中也可以看出,该菌株与灰葡萄孢菌的同源性最高,其中与 *Botryotinia fuckeliana* (AB444949.1) 的同源性为 100%,无碱基差别。

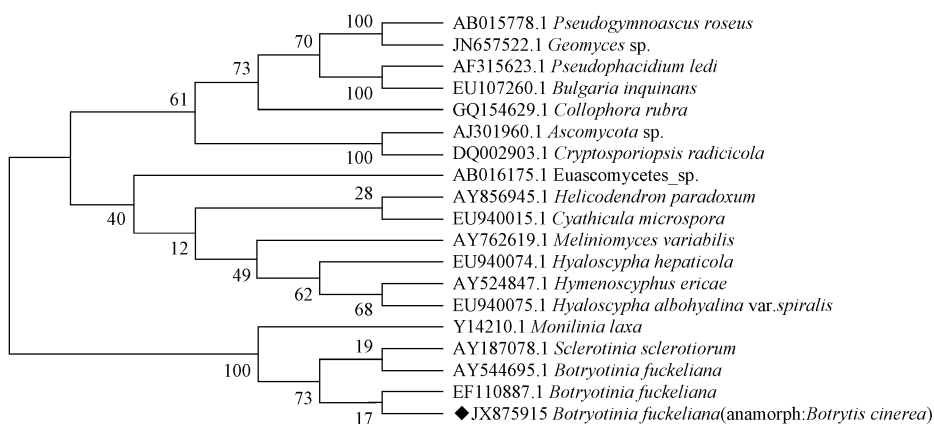


图 3 菌株 t08016b 依据 18S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree between strain t08016b and related strains based on 18S rDNA sequence
(The 18S rDNA sequences were all from NCBI)

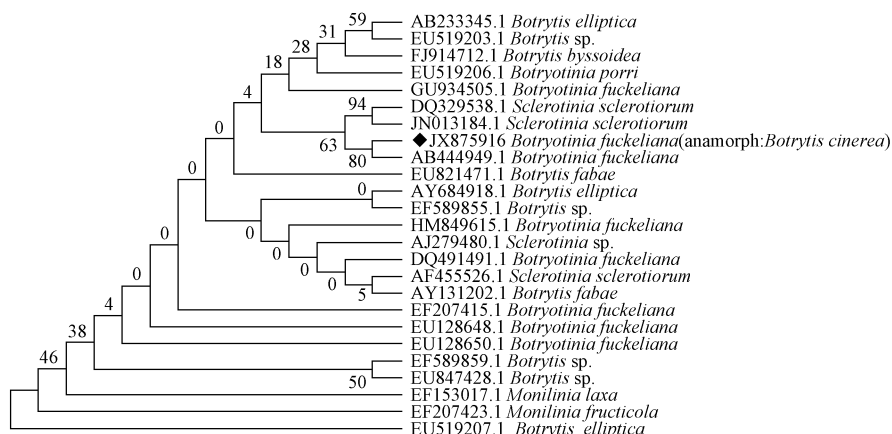


图 4 菌株 t08016b 依据 5.8S rDNA-ITS 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree between strain t08016b and related strains based on 5.8S rDNA-ITS sequence
(The 5.8S rDNA-ITS sequences were all from NCBI)

2.5 致病力鉴定结果

番茄植株接种灰葡萄孢菌后的发病情况如表 4 所示。由表 4 可知,接种番茄灰葡萄孢菌后的发病率第 1

次调查和第 2 次调查分别为 76% 和 97%,而对照基本未发病。这说明该菌株即为番茄灰霉病的致病菌,并且保持了其致病力,与预期效果一致,可以应用到今后的科

表4 灰葡萄孢菌接种番茄致病力调查

Table 4 Pathogenic force survey with *Botrytis cinerea* to tomato

处理	发病率/%	
	第1次调查	第2次调查
接菌处理	76	97
对照 CK	0	1

学试验过程中。

3 讨论

分类鉴定是一项基础而重要的工作,关于菌种鉴定方法的研究已有很多报道,传统的菌种鉴定往往是以形态特征和生理生化指标为基础,但对相关属、复合种或亚种的鉴定分类时只用传统的菌株鉴定方法往往不够准确。利用真菌较保守的 18S rDNA 以及 5.8S rDNA-ITS 序列进行系统发育聚类分析和真菌的多样性研究已经成为有效而快速的手段^[11]。该研究结合形态特征和分子生物学方法,鉴定了 t08016b 为灰葡萄孢菌。结果表明,分离灰葡萄孢要采用适当的分离源,利用 BC 培养基能很好的分离灰葡萄孢,在这种培养基上,灰葡萄孢的生长速度比常见的伴生杂菌生长速度快;燕麦琼胶培养基(OA)上灰葡萄孢产孢量较高,可能燕麦中有促进灰葡萄孢产生孢子的因子。可以根据不同的目的选用合适的培养基。采用 18S rDNA 序列分析和 5.8S rDNA-ITS 序列方法能够较好地推断各类群之间的亲缘关系,进一步验证了菌株 t08016b 为灰葡萄孢菌。

对于形态与生理特性比较接近,利用传统菌种分类手段很难进行分类鉴定的近缘种,分子生物学方法是个很好的补充。并且对菌株 t08016b 就行回接于番茄,通过与对照组相比,番茄的发病率很高,再次确认了该菌株即为灰葡萄孢菌,且保藏的该菌株可运用于以后的抗病性鉴定试验过程。

参考文献

- [1] Prina T L. Infection strategies of botrytis cinerea and relate necrotrophic pathogens[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [2] 李保聚,朱国仁. 番茄灰霉病发展症状诊断及综合防治[J]. 植物保护, 1998, 24(6): 18-20.
- [3] 吕佩珂. 中国蔬菜病虫害原色图谱(第三版无公害)[M]. 北京: 农业出版社, 2002.
- [4] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [5] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [6] 张中义. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [7] 张继民. 灰葡萄孢的分离方法[J]. 安徽机电学院学报, 1998, 13(2): 26-30.
- [8] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method for reconstructing trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [9] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120.
- [10] 张中义. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] 何玉华, 戈梅, 盛下放, 等. 一株抗肿瘤活性的粗榧内生真菌的鉴定及其产物特性初步研究[J]. 生命科学研究, 2007, 11(3): 233-237.

Identification and Phylogenetic Tree Analysis of Tomato Gray Mould Pathogen

WANG Rui-hu¹, GUAN Xin¹, CHEN Xiu-ling¹, WANG Ao-xue^{1,2}

(1. College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Strain t08016b, which morphological characteristics was very similar to the *Botrytis* spp., was isolated and purified from infected tomato fruits with typical symptoms of grey mold rot. The sequences of 18S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA of strain t08016b were specifically amplified and sequenced using universal primer pairs NS1/NS8 and ITS4/ITS5. The results showed that the 18S sequence of t08016b had 99.94% similarity with *fuckeliana fuckeliana* (EF110887.1) and the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence had 100% similarity with *Botryotinia fuckeliana* (AB444949.1). The results of sequence alignment and neighbor-joining tree of 18S and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA showed that t08016b was one strain of *Botryotinia fuckeliana*. The incidence of tomato grey mould could up to 97% after infected by strain t08016b which indicated that t08016b possess strong pathogenicity. Comprehensive morphological identification and molecular identification and pathogenicity analysis, indicated that strain t08016b was a *Botrytis cinerea* strain with strong pathogenicity.

Key words: tomato gray mould; *Botrytis cinerea*; strain isolation; identification