

引用格式:

周鹏泽, 王晓敏, 孔维康, 王林, 白圣懿, 李小红, 郭猛, 程国新. 银川市番茄白粉病病原菌的鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(2): 196–200.

ZHOU P Z, WANG X M, KONG W K, WANG L, BAI S Y, LI X H, GUO M, CHENG G X. Identification of pathogen causing tomato powdery mildew in Yinchuan[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(2): 196–200.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



银川市番茄白粉病病原菌的鉴定

周鹏泽¹, 王晓敏^{1,2,3,4*}, 孔维康¹, 王林¹, 白圣懿¹, 李小红¹, 郭猛^{1,2,3,4}, 程国新^{1,2,3,4}

(1.宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2.宁夏现代设施园艺工程技术研究中心, 宁夏 银川 750021; 3.宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 宁夏 银川 750021; 4.宁夏设施园艺(宁夏大学)技术创新中心, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 对宁夏银川市收集的番茄白粉病病叶上的病原菌进行分离、纯化, 分别进行形态学和分子生物学鉴定。形态学鉴定结果表明: 银川市番茄白粉病病原菌分生孢子单生, 呈卵圆形或腰鼓状; 其顶端位置萌发出芽管, 芽管末端生有乳突状附着胞, 附着胞亦着生于菌丝上; 分生孢子梗直立不分支; 未发现闭囊壳。对病原菌的内部转录间隔区序列进行比对, 其与新番茄粉孢菌(*Oidium neolycopersici*)的一致性达 99%以上。形态学鉴定结合分子生物学鉴定结果表明, 引起银川市番茄白粉病的病原菌为新番茄粉孢菌。

关 键 词: 番茄; 白粉病菌; 形态学鉴定; 内部转录间隔区鉴定; 银川市

中图分类号: S436.412.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)02-0196-05

Identification of pathogen causing tomato powdery mildew in Yinchuan

ZHOU Pengze¹, WANG Xiaomin^{1,2,3,4*}, KONG Weikang¹, WANG Lin¹, BAI Shengyi¹,
LI Xiaohong¹, GUO Meng^{1,2,3,4}, CHENG Guoxin^{1,2,3,4}

(1.School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2.Modern Facility Horticulture Engineering Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 3.Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Yinchuan, Ningxia 750021, China; 4.Facility Horticulture(Ningxia University) Technology Innovation Center, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Pathogen of tomato powdery mildew in Yinchuan of Ningxia was isolated and purified, then characterized by morphology and molecular biology methods. Morphology of the pathogen showed that its conidia were solitary, oval or drum shaped; germ tubes germinated at the top of conidia, mastoid appressorium formed at the end of germ tubes which also occurred on hyphae; conidiophores were erect and unbranched; no closed capsule was found. Internal transcribed spacer sequence alignment showed the pathogen have more than 99% consistency with the *Oidium neolycopersici*. Morphological and molecular biological identification showed that the pathogen causing tomato powdery mildew in Yinchuan was *Oidium neolycopersici*.

Keywords: tomato; powdery mildew; morphology identification; internal transcribed spacer (ITS) identification; Yinchuan

收稿日期: 2021-03-10

修回日期: 2022-01-05

基金项目: 国家自然科学基金委地区项目(31860561); 宁夏回族自治区科学技术厅重点研发项目(2019BBF02022); 2016 年度教育部春晖计划项目(教外司[2016] 2083 号)

作者简介: 周鹏泽(1996—), 男, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究, 347987760@qq.com; *通信作者, 王晓敏, 博士, 副教授, 主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究, wangxiaomin_1981@163.com

1900 年, SALMON 首次在意大利发现番茄白粉病, 将病原菌鉴定为蓼白粉菌^[1]。后来日本、澳大利亚、荷兰等多个国家陆续报道发生番茄白粉病^[2-10], 番茄白粉病已成为一种全球性真菌病害, 其中引起日本、英国、加拿大、匈牙利和西班牙番茄白粉病的病原菌被鉴定为蓼白粉菌(*Erysiphe polygoni*), 而引起荷兰、澳大利亚、法国和保加利亚番茄白粉病的病原菌被鉴定为番茄粉孢菌(*Oidium lycopersici*)。

中国最早的白粉病发病记录由日本学者泽田兼吉于 1919 年在台湾报道, 病原菌被鉴定为蓼白粉菌^[2]; 随后新疆^[11]、黑龙江^[12-13]、辽宁^[14]等地都有番茄白粉病的报道, 但病原菌的鉴定结果并不相同, 其中新疆地区发现的番茄白粉病病原菌无性世代为 *Oidiopsis taurica* Salmon, 有性世代为 *Leveillula taurica* (Lev.) Arn.(Lt); 黑龙江地区的番茄白粉病病原菌只发现了无性世代, 为 *O.taurica*; 引起辽宁地区白粉病的病原菌为蓼白粉菌。近年来吉林、河南等多个省份均有番茄白粉病病原菌是新番茄粉孢菌(*O.neolycopersici*)的报道^[15-18]。

笔者随机采集宁夏银川市宁夏大学实验农场温室内的番茄白粉病病叶, 对其病原菌分离、纯化后进行形态学鉴定, 结合基于 ITS 区的分子生物学鉴定方法, 对该病原菌 ITS 区进行序列比对和系统发育树构建, 以期银川番茄白粉病防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 4 月, 于宁夏回族自治区银川市永宁县宁夏大学实验农场的温室内随机采集番茄白粉病病叶。

白粉病感病番茄品种 Moneymaker (MM), 由西北农林科技大学巩振辉教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离和纯化

观察并记录番茄发病后病叶病斑的颜色、大小和形状。采用刷叶法对病叶进行菌种分离。采用单孢直接挑取分离白粉菌进行纯化^[18], 经纯化后的白粉菌用于形态学鉴定和分子生物学鉴定。

1.2.2 番茄白粉菌的鉴定

参考肖仲久等^[19]的方法, 利用奥林巴斯 sc180 光学显微镜对番茄白粉菌形态进行观察并拍照。

使用 BioSpin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取白粉病菌的 DNA, 采用核酸蛋白检测仪检测 DNA 吸光值和浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 经检测后的 DNA 稀释至 20~50 ng/μL。利用通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 进行 PCR 反应, 参考 Takara Ex Taq 酶使用说明书设计 PCR 体系, 反应体系 20 μL: 5 μmol/L Ex Taq 0.2 μL, 10×Ex Taq Buffer 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mix 1.6 μL, 20 μmol/L ITS1 1.0 μL, 20 μmol/L ITS4 1.0 μL, DNA 0.5 μL, ddH₂O 13.7 μL。反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 25 个循环; 72 °C 再延伸 10 min, 4 °C 保存。

1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 目的条带交奥科鼎盛生物科技有限公司测序。将测得的序列利用 SeqMan 软件进行测序信号峰图拼接, 得到完整序列后, 于 NCBI 中进行核酸序列比对, 分别确定 18S、ITS1、5.8S、ITS2、28S 位点, 随后选取 ITS1 至 ITS2 之间序列于 DNAMAN 中进行多序列比对, 利用 Mega7 构建系统发育树。

1.2.3 病原菌的验证

按照科赫氏法则进行病原菌的验证。将已鉴定的番茄白粉病病原菌接种于 MM 番茄叶片上^[20], 在光照培养箱中培养^[21]。20 d 后观察分离出的病原菌是否为番茄白粉病病原菌。

2 结果与分析

2.1 银川番茄白粉病病原菌的分离纯化结果

银川番茄白粉病发病部位多位于叶片和叶柄, 先从下部叶片发病, 逐渐向上部叶片蔓延。发病初期, 叶片表面出现褪绿小点并变黄, 局部有白色粉状物(图 1-1), 白色粉状物斑块较稀疏, 后逐渐加厚、扩大, 形成不规则的粉斑(图 1-2); 发病后期, 粉斑

逐渐连成片并覆盖大部分叶片, 叶片大面积褪绿, 变为褐色, 逐渐枯萎(图 1-3)。

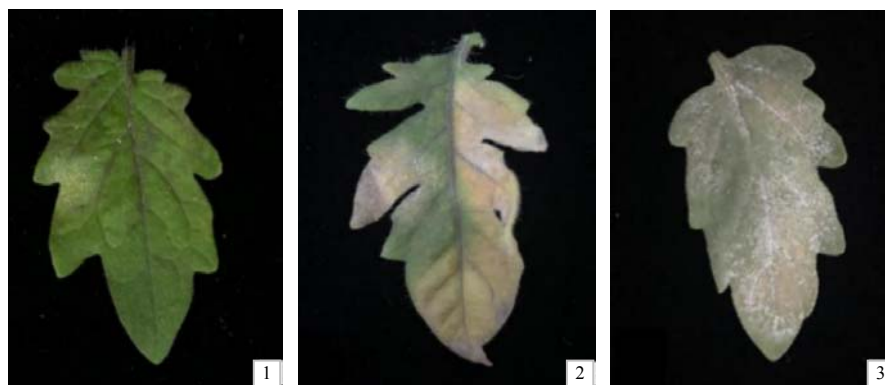
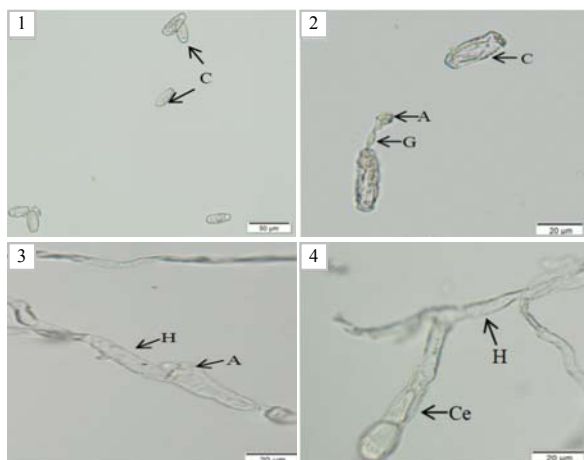


图 1 银川番茄叶片白粉病发病情况

Fig.1 The symptoms of tomato powdery mildew

2.2 银川番茄白粉病病原菌的鉴定结果

银川番茄白粉病病原菌的分生孢子全部单生, 呈卵圆形或腰鼓状, 大小为 $10.0\sim 32.6\ \mu\text{m}\times 5.7\sim 15.6\ \mu\text{m}$ (图 2-1); 分生孢子顶端萌发, 产生芽管, 芽管末端生有乳突状附着胞(图 2-2); 附着胞亦着生于菌丝上(图 2-3); 分生孢子梗直立、不分支, 长度为 $37.5\sim 100.8\ \mu\text{m}$ (图 2-4); 未发现闭囊壳, 由此可鉴定为新番茄粉孢菌。



A 附着胞; C 分生孢子; Ce 分生孢子梗; G 芽管; H 菌丝。

图 2 番茄白粉病病原菌的形态

Fig.2 Morphological characteristics of the pathogen fungus of tomato powdery mildew

白粉菌 DNA 经 PCR 扩增后在 $500\sim 750\ \text{bp}$ 出现清晰的单一条带, 测序得知该条带长度为 $640\ \text{bp}$, 符合目的 ITS 序列的条带大小, 其中, 在总长为 $640\ \text{bp}$ 的 ITS 序列中 ITS1 至 ITS2 之间序列位点为 $31\sim 582$, 长度为 $552\ \text{bp}$ 。

将银川市番茄白粉病病原菌 ITS1 至 ITS2 之间序列($552\ \text{bp}$)于 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索, 将相似性较高的新番茄粉孢菌序列进行多序列比对分析, 结果如图 3 所示。银川市番茄白粉病病原菌与已鉴定的匈牙利(On EU047567 Hungary)、韩国(On KC213756.1 South Korea)、日本(On AB808583.1 Japan)、塞尔维亚(On JQ619840.1 Serbia)、中国海南(On MH137258.1 Hainan China)、中国河南(On EU828521.1 Henan China)、中国黑龙江(On JQ972700.1 Heilongjiang China)新番茄粉孢菌的相似性为 100%; 与法国(On HQ286688.1 France)和中国台湾(On GU358451.1 Taiwan China)新番茄粉孢菌的相似性分别达到 99.82%和 99.63%。

分别选取 NCBI 上已提交的不同来源的新番茄粉孢菌(On)、番茄粉孢菌(Ol)、蓼白粉菌(Ep)、鞑靼内丝白粉菌(Lt)菌株与分离的菌株 ITS 全长序列构建系统进化树(图 4), 结果银川市番茄白粉病病原菌归为新番茄粉孢菌(On)分支, 同属于蓼白粉菌(Ep)的 3 个菌株亲缘关系较远, 番茄粉孢菌(Ol)和鞑靼内丝白粉菌(Lt)分支与新番茄粉孢菌(On)分支关系较远。值得关注的是, 番茄粉孢菌 Ol AF229019.1 USA 和新番茄粉孢菌(On)在同一分支, 主要因为番茄粉孢菌与新番茄粉孢菌 ITS 序列间存在比较高的保守性, 而新番茄粉孢菌 On GU358451.1 Taiwan China ITS 序列个别位点的碱基突变, 所以未被归入新番茄粉孢菌分支。

On EU047567 hungary	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On KC213756.1 South Korea	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On GU358451.1 Taiwan China	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On ITS Sequence Yinchuan China	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On MH137258.1 Hainan China	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On EU828521.1 Henan China	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On JQ972700.1 Heilongjiang China	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On HQ286688.1 France	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On AB808583.1 Japan	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On JQ619840.1 Serbia	GTCGCTGCCCGTACGGACATGTGTCGGCCGCCACCGGTTTCGACTGGAG	101-150
On EU047567 hungary	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On KC213756.1 South Korea	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On GU358451.1 Taiwan China	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On ITS Sequence Yinchuan China	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On MH137258.1 Hainan China	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On EU828521.1 Henan China	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On JQ972700.1 Heilongjiang China	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On HQ286688.1 France	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On AB808583.1 Japan	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On JQ619840.1 Serbia	TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC	321-370
On EU047567 hungary	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On KC213756.1 South Korea	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On GU358451.1 Taiwan China	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGAAAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On ITS Sequence Yinchuan China	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On MH137258.1 Hainan China	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On EU828521.1 Henan China	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On JQ972700.1 Heilongjiang China	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On HQ286688.1 France	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On AB808583.1 Japan	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470
On JQ619840.1 Serbia	GTCGCGTTGCGGCAGCTCTTAAAGATAGTGGCGGTCCTGGCGTGGGCTCT	421-470

图 3 新番茄白粉病病原菌的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of the pathogen fungus of tomato powdery mildew

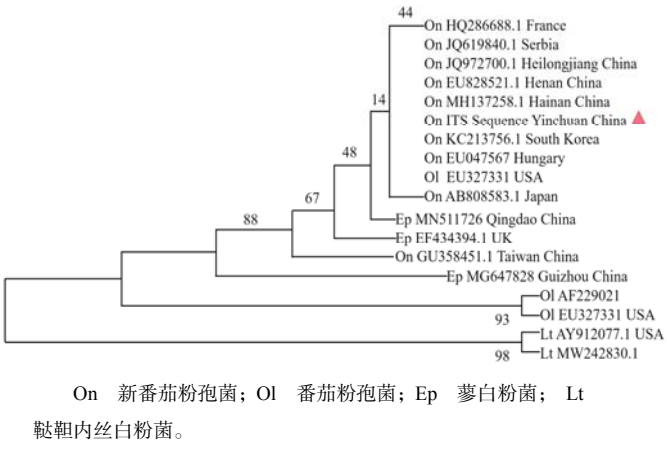
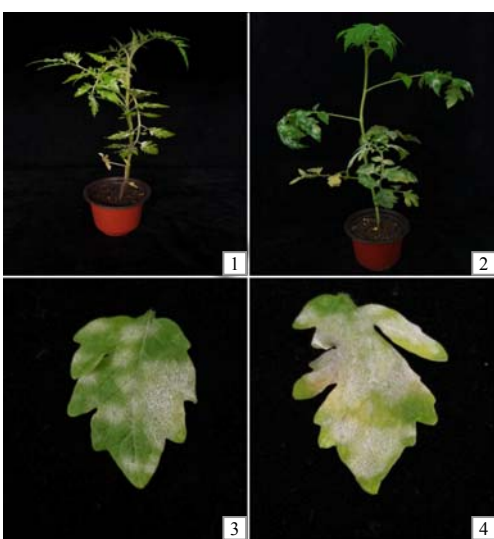


图 4 基于 5.8S rDNA 及 ITS1 和 ITS2 基因序列构建的番茄白粉菌系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Tomato Powdery mildew based on 5.8S rDNA、ITS1 and ITS2 gene sequences

2.3 番茄白粉病病原菌验证结果

如图 5 所示, 人工接种 20 d 的 MM 番茄叶片局部褪绿变黄, 并在表面形成明显的白色粉状物(图 5-2、图 5-4), 与采集到的番茄白粉病病叶发病症状(图 5-1、图 5-3)一致, 说明鉴定后的病原菌和接种前的病原菌具有相同致病性, 为同一种病原菌。



1 采集的番茄白粉病发病植株; 2 回接病原菌的发病番茄植株; 3 采集的番茄白粉病病叶; 4 回接病原菌的发病番茄叶片。

图 5 科赫氏验证结果

Fig. 5 Verification results based on Koch postulates

3 讨论

番茄白粉病是生产中的主要病害之一, 目前已报道的番茄白粉菌有番茄粉孢菌、新番茄粉孢菌、蓼白

粉菌、拟粉孢菌以及辣椒拟粉孢菌^[22]。本研究形态学鉴定银川番茄白粉病病原菌为新番茄粉孢菌,这与李帅等^[18]的新番茄粉孢菌形态特征结果一致。

对银川市番茄白粉病菌进行多序列比对和进化树分析,从分子水平上确定此菌为新番茄粉孢菌。序列比对中发现法国和中国台湾报道的新番茄粉孢菌 ITS 序列与新番茄粉孢菌的其他菌株存在差异,表现为两者特定位点的碱基发生突变,可能是因为其生理小种进化所导致。与新番茄粉孢菌相比,目前有关番茄粉孢菌、蓼白粉菌和鞑靼内丝白粉菌 ITS 全长序列的报道有限,故在构建进化树时所用上述 3 种菌株的 ITS 序列相对较少。

参考文献:

- [1] 刘薇,刘淑艳,李玉,等. 番茄白粉病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 11–15.
- [2] ABIKO K. Influence of temperature and humidity on development of tomato powdery mildew[J]. Annual Report of the Kansai Plant Protection Society, 1978, 20: 49–52.
- [3] PRICE T V. Powdery mildew of tomato in Australia, Australasian[J]. Plant Pathology, 1981, 10: 38–40.
- [4] PATERNOTTE S J. Echte meeldauw in tomaat geen echte bedreiging[J]. Groenten en Fruit. 1988, 43: 30–31.
- [5] FLETCHER J T, SMEWIN B J, COOK R T A. Tomato powdery mildew[J]. Plant Pathology, 1988, 37(4): 594–598.
- [6] BURGERJON A, NICOT P C, BERTRAND F, et al. Early powdery mildew of greenhouse-grown tomatoes in France[J]. Phytopathology, 1990, 80: 1063.
- [7] NESHEV G. Powdery mildew(*Oidium* sp.) on tomatoes in Bulgaria[J]. Phytoparasitica, 1993, 21(4): 339–343.
- [8] BELANGER R R, JARVIS W R. Occurrence of powdery mildew(*Erysiphe* sp.) on greenhouse tomatoes in Canada[J]. Plant Disease, 1994, 78: 640.
- [9] KISS L. Occurrence of a new powdery mildew fungus (*Erysiphe* sp.) on tomatoes in Hungary[J]. Plant Disease, 1996, 80: 224.
- [10] OLALLA L, TORÉS J A. First report of powdery mildew of tomato caused by an *Erysiphe* sp. in Spain[J]. Plant Disease, 1998, 82(5): 592.
- [11] 贾菊生. 新疆番茄病害一新记录——番茄白粉病[J]. 植物保护, 1990, 16(4): 54.
- [12] 程志明. 黑龙江番茄新病害番茄白粉病[J]. 北方园艺, 1992(6): 40.
- [13] 王世喜, 赵博虎, 金辉, 等. 番茄白粉病的发生与防治[J]. 植物保护, 1993, 19(5): 50.
- [14] 房德纯, 王振东, 刘志恒, 等. 番茄新病害—白粉病[J]. 辽宁农业科学, 1992(5): 51–52.
- [15] 王文静, 裴冬丽, 马原松, 等. 商丘地区番茄白粉菌的鉴定[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 505–508.
- [16] TSAY J G, CHEN R S, WANG H L, et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe diffusa*, *Oidium neolycopersici*, and *Podosphaera xanthii* on papaya in Taiwan[J]. Plant Disease, 2011, 95(9): 1188.
- [17] 姜文涛, 刘淑艳, 王丽兰. 甘肃加工番茄白粉病病原菌的鉴定[J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 93–94.
- [18] 李帅, 朱路路, 李景富, 等. 黑龙江省番茄白粉病病原鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(4): 112–114.
- [19] 肖仲久, 李小霞, 李斌. 贵州省南瓜白粉病病原菌初步鉴定[J]. 北方园艺, 2012(9): 146–148.
- [20] 刘淑艳, 刘微, 姜文涛. 新番茄粉孢菌 *Oidium neolycopersici* 生物学特性的研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(1): 68–73.
- [21] 郑坤, 姜景彬, 康立功, 等. 番茄白粉病苗期抗病性鉴定方法及抗病种质资源筛选[J]. 植物保护, 2012, 38(5): 105–123.
- [22] 李金萍, 白全江, 周艳芳, 等. 李宝聚博士诊病手记(四十四)两种病原菌引起的番茄白粉病的诊断与防治[J]. 中国蔬菜, 2012(3): 23–25.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗 维