

甜瓜镰刀菌果腐病新病原菌 *Fusarium incarnatum* 的鉴定及生物学特性

王 燕¹, 王春伟^{1,*}, 王 琳², 李志远¹, 张曦倩¹, 刘 峥¹, 陈二毛¹,
王美琴¹, 张作刚¹, 王建明^{1,*}

(¹ 山西农业大学农学院, 山西太谷 030801; ² 山西出入境检验检疫局检验检疫技术中心运城分中心, 山西运城 044600)

摘 要: 采用常规组织分离法对采自山西省太谷县疑似镰刀菌引起的甜瓜果实新病害进行病原菌分离, 根据柯赫氏法则明确其致病性。基于形态特征以及核糖体内转录间隔区 (rDNA-ITS)、转录延伸因子 (*EF-1 α*)、组蛋白 (*Histone 3*) 和线粒体中核糖体小亚基 (*mtSSU*) 序列分析, 鉴定该病原菌为变红镰刀菌 (*Fusarium incarnatum*)。病原菌的生物学特性测定结果表明, 菌丝生长和产孢最适培养基均为马铃薯蔗糖琼脂培养基 (PSA); 温度为 20 ~ 35 °C 菌丝生长较快, 20 ~ 25 °C 产孢量最大; 羧甲基纤维素钠、淀粉和木糖等碳源适合菌丝生长, 产孢的最佳碳源为乳糖; 病原菌在多种氮源上均能较好生长, 产孢的最佳氮源为酵母粉; pH 为 8 时菌丝生长最快, 不同 pH 处理的产孢量间差异不显著; 病原菌在全光照和全黑暗条件下能较好生长, 不同光照条件下产孢量差异不显著; 菌丝致死温度为 61 °C (10 min), 分生孢子致死温度为 56 °C (10 min)。

关键词: 甜瓜; 果腐病; 变红镰刀菌; 鉴定; 生物学特性

中图分类号: S 652

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 03-0529-11

Identification and Biological Characteristics of a Novel Pathogen *Fusarium incarnatum* Causing Muskmelon Fruit *Fusarium* Rot

WANG Yan¹, WANG Chunwei^{1,*}, WANG Lin², LI Zhiyuan¹, ZHANG Xiqian¹, LIU Zheng¹, CHEN Ermao¹, WANG Meiqin¹, ZHANG Zuogang¹, and WANG Jianming^{1,*}

(¹ College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; ² Yuncheng Sub-center, Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technology Center, Yuncheng, Shanxi 044600, China)

Abstract: A novel disease of suspected *Fusarium* fruit rot was observed on muskmelon in Taigu County, Shanxi Province. The isolate was obtained from diseased sample by conventional tissue isolation method. The pathogenicity was confirmed by Koch's postulates. The pathogen was identified as *Fusarium incarnatum* based on morphological characteristics and the sequence analysis of rDNA-ITS, *EF-1 α* , *histone 3* and *mtSSU*. The results of biological characteristics showed that PSA medium was most conducive to mycelium growth and sporulation; the ideal temperature conditions for mycelium growth and sporulation were in the range of 20 – 35 °C and 20 – 25 °C, respectively; the suitable carbon sources for

收稿日期: 2018 – 12 – 17; **修回日期:** 2019 – 03 – 06

基金项目: 山西省应用基础研究项目 (201701D221191); 山西农业大学科技创新基金项目 (2016YJ11, 2016YJ12)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chunwei314319@163.com, jm.w@163.com)

mycelium growth were CMC-Na, starch and xylose, the optimal carbon source for sporulation was lactose. The pathogen could grow fastly on the medium with kinds of nitrogen sources, the optimal nitrogen source for sporulation was yeast powder. The optimal pH for mycelium growth was 8. The full illumination and full darkness was suitable for mycelium growth. The sporulation under pH and light conditions had not significant difference. The mycelial lethal temperature was at 61 °C for 10 min, and the spore lethal temperature was at 56 °C for 10 min.

Keywords: muskmelon; fruit rot; *Fusarium incarnatum*; identification; biological characteristics

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 在果实成熟及贮运期极易被病菌侵染, 造成果实腐烂变质。引起甜瓜果实腐烂的病原真菌种类较多, 有曲霉菌 (*Aspergillus* spp.)、青霉菌 (*Penicillium* spp.)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.)、匍枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*)、链格孢菌 (*Alternaria alternata*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、终极腐霉 (*Pythium ultimum*)、粉红聚端孢 (*Cephalothecium roseum*)、拟茎点霉 (*Phomopsis* spp.) 等 (李敏权 等, 2001; 柴兆祥 等, 2004; 蒋贤权 等, 2007; 张有林 等, 2010; Mckeen & Thorpe, 2011; 刘志恒 等, 2013; Deng et al., 2015), 其中镰刀菌是主要病原菌。目前已报道的腐皮镰刀菌 *Fusarium solani* (Zhang et al., 1999)、砖红镰刀菌 *Fusarium lateritium* (柴兆祥 等, 2005) 和木贼镰刀菌 *Fusarium equiseti* (肖敏 等, 2011) 均可引起甜瓜果腐病。

2017 年 5 月, 在山西省晋中市太谷县发现一种疑似镰刀菌引起的甜瓜果实新病害, 症状为成熟果实变软腐烂, 发病部位凹陷, 产生大量白色霉层, 且在连续阴雨天气发病较重, 发病率约为 10%。本研究采用组织分离法对病原菌进行分离纯化, 通过柯赫氏法则完成致病性测定, 基于形态特征和核糖体内转录间隔区 (rDNA-ITS)、转录延伸因子 (*EF-1 α*)、组蛋白 (*Histone 3*) 和线粒体中核糖体小亚基 (*mtSSU*) 基因序列分析将病原菌鉴定到种, 并测定了病原菌的生物学特性, 为进一步研究病害的发病规律及防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 病害样品的采集及病原菌的分离

2017 年 5 月 20 日, 在山西省晋中市太谷县山西农业大学巨鑫大学生创业园甜瓜种植基地采集到疑似病害样本材料, 并记载危害症状特点。采用组织分离法进行病原菌的分离, 采用单孢分离法纯化分离物 (方中达, 1998)。

1.2 致病性测定

分离物在 PDA 上培养 7 d 后, 用灭菌的接种针挑取分生孢子, 使用无菌水配制成浓度为 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹ 的孢子悬液。选用健康无病的甜瓜果实, 以 2% 的 NaClO 溶液浸泡 2 min, 用无菌水冲洗、晾干。以消毒的接种针在果实上刺出伤口, 在伤口处接种孢子悬液 20 μ L; 每处理接种 3 个果实, 以清水作对照, 设 3 次重复。于 25 °C 保湿培养, 分别在 3 d 和 7 d 时观察结果。从接种发病的果实上再次分离病原菌, 完成柯赫氏法则验证。

1.3 病原菌形态鉴定

将菌株转接于 PDA 和 CLA 培养基平板上, 7 d 后观察菌落培养特征, 15 d 后在 OLYMPUS DP72

光学显微镜下观察分生孢子的形态、颜色、大小, 以及厚垣孢子的有无和分生孢子梗等特征, 将病原菌初步鉴定到种 (Leslie & Summerell, 2006)。

1.4 病原菌分子鉴定

将菌株转接于 PDA 平板上培养 7 d 后, 刮取新鲜菌丝, 使用 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (杭州博日科技有限公司) 提取真菌的 DNA。分别使用通用引物 ITS4 和 ITS5, EF-1 和 EF-2, H3-1a 和 H3-1b, MS3F 和 MS3R 对真菌 DNA 的 rDNA-ITS (Fogliata et al., 2013)、*EF-1 α* (Palmore et al., 2010)、*Histone 3* (Glass & Donaldson, 1995) 和 *mtSSU* (Stenglein et al., 2010) 基因序列进行 PCR 扩增。反应体系 25 μ L: 12.5 μ L Premix Taq (TaKaRa Taq Version 2.0 \times dye), 10 μ mol \cdot L⁻¹ 上、下游引物各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物测序后得到的序列在 GenBank 上用 BLAST 进行同源性比较, 下载同源序列, 利用 BioEdit 7.0.9 对每个碱基进行人工校对, 利用 MEGA5.05 软件以邻位法构建系统发育树。

1.5 病原菌的生物特性测定

1.5.1 培养基对菌丝生长和产孢量的影响

将病原菌菌饼 (直径 6 mm) 分别转接于 PDA、PSA、PCA、MEA、OA、Richard、Crapek、CYA、SNA、CMA 培养基平板中央, 于 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 测量菌落直径。然后在平板中加入 10 mL 无菌水混合均匀, 即得病原菌的孢子悬液, 使用血球计数板测定产孢量 (方中达, 1998)。

1.5.2 温度对菌丝生长和产孢量的影响

将病原菌菌饼 (直径 6 mm) 转接于 PDA 平板中央, 将培养温度设为 5、10、15、20、25、30 和 35 $^{\circ}$ C, 7 d 后测量菌落直径和产孢量。

1.5.3 pH 对菌丝生长和产孢量的影响

使用浓度为 0.1 mol \cdot L⁻¹ 的 HCl 和 NaOH 调节 PDA 培养基的 pH 为 4、5、6、7、8 和 9, 将病原菌菌饼 (直径 6 mm) 转接后, 于 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 测量菌落直径和产孢量。

1.5.4 碳源和氮源对菌丝生长和产孢量的影响

碳源: 基础培养基为 Crapek 培养基, 分别用葡萄糖、木糖、乳糖、麦芽糖、D-果糖、甘露醇、山梨醇、羧甲基纤维素钠、甘油和淀粉代替蔗糖作为唯一碳源。

氮源: 基础培养基为 Crapek 培养基, 分别用尿素、胱氨酸、天门冬酰胺、酵母粉、氯化钠、硫酸铵、甘氨酸、牛肉膏、蛋白胨和硝酸铵代替硝酸钠作为唯一氮源。

将病原菌菌饼 (直径 6 mm) 转接于不同碳源和氮源的平板中央, 于 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 测量菌落直径和产孢量。

1.5.5 光照对菌丝生长和产孢量的影响

将病原菌菌饼 (直径 6 mm) 转接于 PDA 平板, 培养条件为 24 h 全光照, 12 h 光照/12 h 黑暗, 24 h 全黑暗, 于 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 测量菌落直径和产孢量。

1.5.6 病原菌菌丝和分生孢子致死温度

设置 40、45、50、55、60 和 65 $^{\circ}$ C 温度梯度, 每个温度下放入孢子悬液和装有 10 个菌饼的试管处理 10 min, 冷却降温后吸取 100 μ L 孢子悬液涂在 PDA 平板上, 随机取 5 个菌饼转接在 PDA 平板上, 培养 3 d 后。根据是否有菌丝生长, 确定致死温度范围。在致死温度范围内, 进一步以 1 $^{\circ}$ C 为单位设置温度梯度, 确定致死温度。

1.6 数据处理与统计分析

各试验处理均设 3 次重复。试验数据使用 Excel 2007 计算平均值及标准偏差, 使用 DPS 9.50 软件的 Duncan's 新复极差法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 病害的发病症状

该病害主要危害成熟的甜瓜果实, 发病部位出现水浸状病斑, 略有凹陷, 病斑逐渐向外扩展, 发病部位呈褐色, 出现白色霉层, 后期湿度大时发病部位布满白色菌丝层, 形成明显凹陷, 颜色变为深褐色, 出现腐烂症状 (图 1, A)。

2.2 致病性测定

通过组织分离法从发病果实上获得病原菌分离物, 采用离体刺伤接种法将其接种于健康果实上。接种后的症状初期为水浸状病斑, 接种 3 d 后病斑为褐色, 凹陷, 着生大量白色菌丝 (图 1, B), 接种 7 d 后病斑严重凹陷腐烂, 在果面形成空洞, 并产生白色菌丝层 (图 1, C), 其症状与自然发病症状一致, 而清水对照处理果实未发病 (图 1, D)。重新对接种发病的果实进行病原菌分离, 获得与接种菌菌落特征一致的分离物。

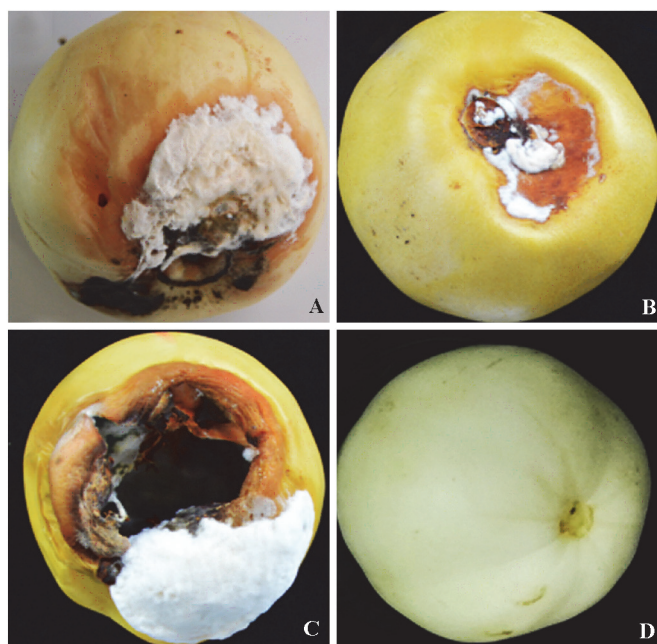


图 1 甜瓜镰刀菌果腐病的自然发病 (A) 和人工接种孢子悬液 3 d (B)、7 d (C) 症状和清水对照 (D)
Fig. 1 Natural symptom of muskmelon fruit *Fusarium* rot (A), symptom at 3 days (B) and 7 days (C) after inoculating conidia suspension and sterilized water (D)

2.3 病原菌的形态特征

病原菌于 25 °C 在 PDA 上培养 7 d, 菌落直径为 72 mm。菌落圆形, 产生了大量绒状气生菌丝, 初期为白色, 后逐渐变为橘黄色 (图 2, A), 培养基背面为米黄色 (图 2, B)。大型分生孢子镰刀

形, 两端逐渐变细, 具有明显足胞, 具 3~5 个分隔, 大小为 $21.12 \sim 33.39 \mu\text{m} \times 3.64 \sim 6.23 \mu\text{m}$ (图 2, C); 中型分生孢子纺锤形, 3~5 个分隔, 大小为 $8.36 \sim 13.25 \mu\text{m} \times 2.25 \sim 4.89 \mu\text{m}$ (图 2, D); 小型分生孢子椭圆形, 无分隔, 大小为 $4.25 \sim 9.98 \mu\text{m} \times 1.56 \sim 3.13 \mu\text{m}$ (图 2, E)。未见厚垣孢子。分生孢子梗在气生菌丝上形成, 顶端可产生大型分生孢子 (图 2, F)。

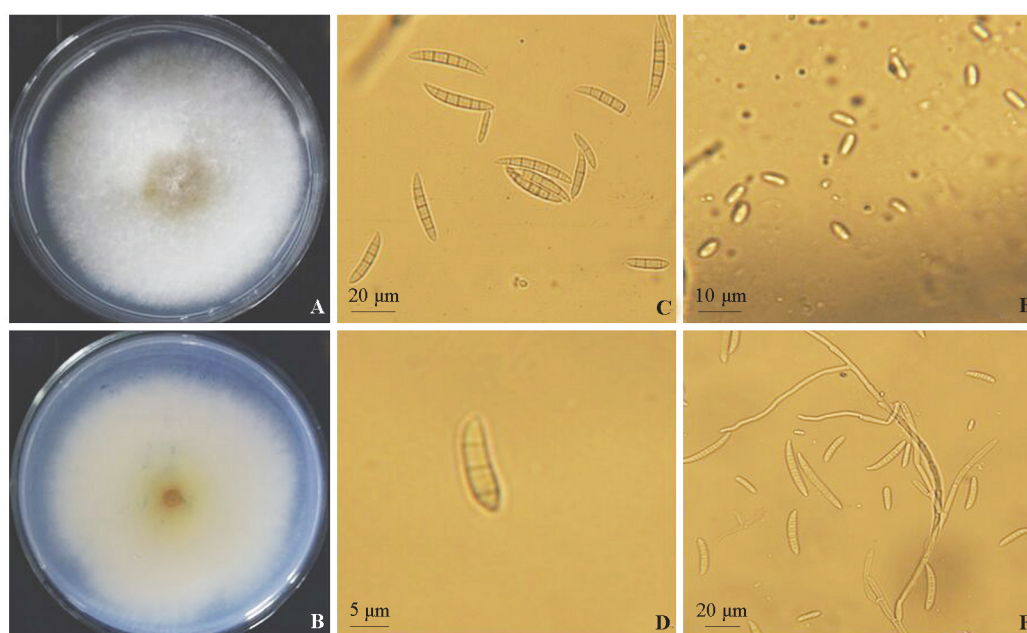


图 2 甜瓜镰刀菌果腐病病原菌形态特征

A: PDA 培养基上菌落正面形态; B: PDA 培养基上菌落背面形态; C: 大型分生孢子; D: 中型分生孢子;
E: 小型分生孢子; F: 分生孢子梗。

Fig. 2 Morphological characteristics of the pathogens causing muskmelon fruit *Fusarium* rot

A: Colony on PDA (surface); B: Colony on PDA (bottom); C: Macroconidia; D: Mesoconidia;
E: Microconidia; F: Conidiophore.

2.4 病原菌的分子鉴定

提取病原菌的 DNA, 对 rDNA-ITS、*EF-1α*、*Histone 3* 和 *mtSSU* 基因序列进行 PCR 扩增, 获得片段大小分别为 573、688、510 和 685 bp, 序列提交至 GenBank, 获得登录号分别为 MH979697、MH979698、MH979696 和 MH979695。

将 rDNA-ITS 序列与 GenBank 上的序列进行 Blast 比对, 与 *Fusarium sacchari* NCCPF: 580033 (KM921664)、*Fusarium equiseti* PAK54 (KY523100)、*Fusarium equiseti* FUS-18 (MH879583)、*Fusarium incarnatum* strain gss207 (MH290470) 和 *Fusarium incarnatum* strain gss210 (MH290471) 的同源性均在 99% 以上。将 *mtSSU* 序列 Blast 比对, 与 *Fusarium oxysporum* Fus-var-9 (KU170556)、*Fusarium udum* F3 (KU158814)、*Fusarium equiseti* HS1 (MF471698) 和 *Fusarium incarnatum* R3.3 (KX218396) 的同源性均在 99% 以上。因此 rDNA-ITS 和 *mtSSU* 序列不能将该菌株鉴定到种。

基于 *EF-1α* 序列 (MH979698) 与 GenBank 中 *Fusarium* 属的相关序列构建系统发育树 (图 3), 其与 KF255470 *Fusarium incarnatum*、KY785018 *Fusarium incarnatum*、JX269001 *Fusarium incarnatum* 和 F255476 *Fusarium incarnatum* 聚于同一分支; 基于 *Histone 3* 序列 (MH979696) 与 GenBank 中

Fusarium 属 8 个种的基因序列构建系统发育树 (图 4), 其与 GQ915477 *Fusarium incarnatum* 和 KX681562 *Fusarium incarnatum* 聚于同一分支, 且支持率为 100%, 明显远离 *Fusarium* 属的其他种。

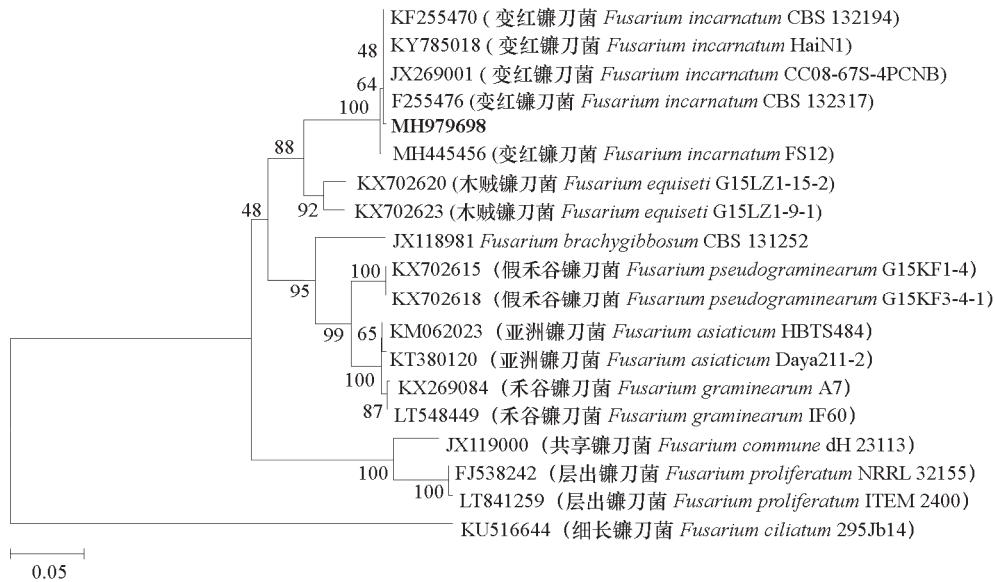


图 3 基于 *EF-1α* 基因序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on *EF-1α* sequences

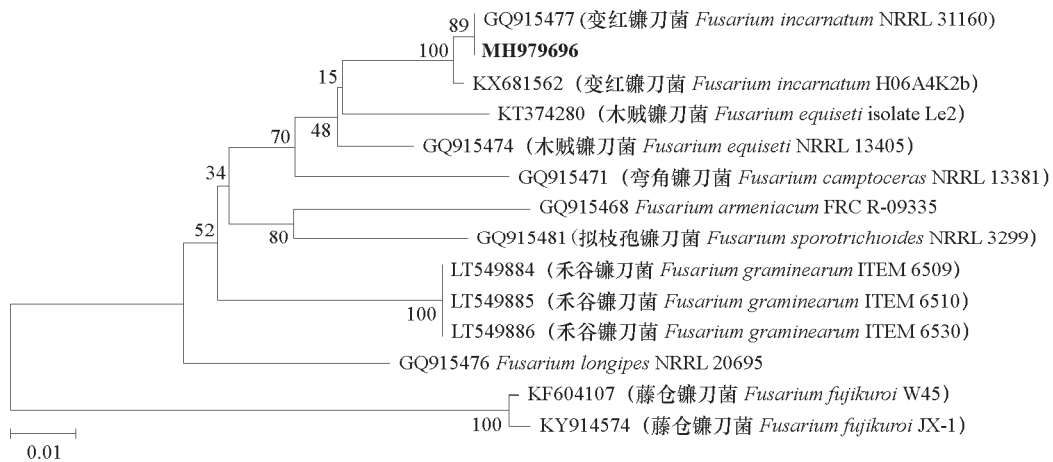


图 4 基于 *Histone 3* 基因序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on *Histone 3* sequences

2.5 病原菌的生物学特性

2.5.1 培养基对菌丝生长及产孢的影响

病原菌在不同培养基上的菌丝生长及产孢情况如表 1 所示。病原菌在 PSA, PCA 和 MEA 上菌丝生长较快, 菌落直径为 74.67 ~ 76.33 mm; 在 OA、Crapek 和 PDA 培养基上, 菌落直径均在 70 mm 以上; 在 CYA 培养基上生长最慢。病原菌在 PSA 和 Richard 培养基上产孢量最大, 分别为 3.12×10^7 和 3.10×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 在 MEA 上产孢量最低。

表 1 培养基对菌丝生长和产孢的影响
Table 1 Effect of culture media on mycelium growth and sporulation

培养基 Culture media	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ (10^7 个 \cdot mL $^{-1}$) Sporulation
PDA	71.33 \pm 11.50 ab	2.47 \pm 1.11 b
Richard	68.33 \pm 14.84 ab	3.10 \pm 1.31 a
Crapek	72.00 \pm 2.65 ab	0.23 \pm 0.03 d
MEA	74.67 \pm 1.53 a	0.02 \pm 0.03 e
PCA	75.33 \pm 6.43 a	2.57 \pm 1.26 b
PSA	76.33 \pm 4.04 a	3.12 \pm 1.12 a
SNA	63.33 \pm 1.15 ab	0.32 \pm 0.29 d
CYA	46.00 \pm 2.65 c	1.75 \pm 0.20 c
CMA	58.67 \pm 5.77 bc	2.15 \pm 0.63 bc
OA	72.67 \pm 2.08 ab	0.15 \pm 0.05 d

注: 同列不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Data followed by different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.5.2 温度对菌丝生长及产孢的影响

病原菌菌丝在 5 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 均能生长及产孢, 20、25、30 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 菌丝生长较快, 30 $^{\circ}\text{C}$ 时菌落直径为 82.33 mm; 20 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 时产孢量最大, 分别为 3.05×10^7 和 2.93×10^7 个 \cdot mL $^{-1}$ (表 2)。

表 2 温度对菌丝生长和产孢量的影响
Table 2 Effect of culture temperature on mycelium growth and sporulation

温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ (10^7 个 \cdot mL $^{-1}$) Sporulation
5	7.67 \pm 0.58 d	0.30 \pm 0.18 d
10	13.54 \pm 1.25 d	0.52 \pm 0.20 d
15	42.47 \pm 3.25 c	1.35 \pm 0.13 bc
20	56.78 \pm 1.35 b	3.05 \pm 0.10 a
25	76.67 \pm 7.64 a	2.93 \pm 0.99 a
30	82.33 \pm 2.52 a	1.92 \pm 1.09 b
35	67.33 \pm 2.52 ab	2.03 \pm 1.33 b

注: 同列不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Data followed by different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.5.3 pH 对菌丝生长及产孢的影响

病原菌菌丝在 pH 4 ~ 9 范围内均能生长及产孢, pH 为 8 时菌丝生长较快, 菌落直径为 71.67 mm; 不同 pH 处理的产孢量间差异不显著 (表 3)。

表 3 pH 对菌丝生长和产孢量的影响
Table 3 Effect of pH on mycelium growth and sporulation

pH	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ (10^7 个 \cdot mL $^{-1}$) Sporulation
4	44.67 \pm 0.58 d	2.07 \pm 1.07 a
5	53.00 \pm 2.00 bcd	2.85 \pm 3.42 a
6	63.67 \pm 7.77 ab	2.80 \pm 3.14 a
7	61.00 \pm 8.19 abc	3.60 \pm 1.39 a
8	71.67 \pm 5.69 a	3.32 \pm 0.93 a
9	48.67 \pm 3.51 cd	1.12 \pm 0.85 a

注: 同列不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Data followed by different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.5.4 碳源和氮源对菌丝生长和产孢的影响

病原菌在 11 种供试碳源上均可生长，但利用程度不同，在含有羧甲基纤维素钠、淀粉和木糖的培养基上生长较好，菌落直径分别为 71.00、70.67 和 70.67 mm；在含有乳糖的培养基上产孢量最大，为 2.85×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ （表 4）。

病原菌在多种氮源上均能较好生长，在以酵母粉为氮源的培养基上产孢量最高（表 4）。

表 4 不同碳源及氮源对菌丝生长和产孢量的影响
Table 4 Effect of different carbon and nitrogen sources on mycelium growth and sporulation

碳源或氮源 Carbon source or nitrogen source	营养物 Nutrient	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ (10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) Sporulation
碳源 Carbon source	蔗糖 Sucrose	68.33 ± 2.31 ab	1.57 ± 0.13 b
	葡萄糖 Dextrose	67.67 ± 0.58 ab	0.45 ± 0.09 c
	木糖 Xylose	70.67 ± 2.08 a	1.65 ± 0.08 b
	乳糖 Lactose	58.67 ± 2.89 def	2.85 ± 0.83 a
	麦芽糖 Maltose	64.67 ± 0.58 abc	2.07 ± 0.69 b
	D - 果糖 D-fructose	59.00 ± 3.61 cdef	0.95 ± 0.21 c
	甘露醇 Mannitol	64.00 ± 1.73 abcd	0.80 ± 0.09 c
	山梨醇 D-Glucitol	58.33 ± 1.53 ef	0.75 ± 0.26 c
	羧甲基纤维素钠 CMC-Na	71.00 ± 3.61 a	0.42 ± 0.20 c
	甘油 Glycerol	61.00 ± 1.00 bcde	0.52 ± 0.23 c
	淀粉 Starch	70.67 ± 1.15 a	1.73 ± 0.16 b
氮源 Nitrogen source	氯化钠 Sodium chloride	55.00 ± 3.61 bc	0.45 ± 0.17 bc
	尿素 Urea	72.33 ± 2.52 ab	0.87 ± 0.48 c
	胱氨酸 Cystine	62.67 ± 2.52 ab	0.12 ± 0.03 c
	天门冬酰胺 Asparagine	71.67 ± 10.41 ab	1.27 ± 0.46 bc
	酵母粉 Yeast powder	83.50 ± 0.71 a	4.15 ± 2.87 a
	硫酸铵 Ammonium sulfate	41.00 ± 7.94 c	0.20 ± 0.09 c
	硝酸钠 Sodium nitrate	61.00 ± 1.74 b	0.33 ± 0.08 bc
	甘氨酸 Glycine	71.67 ± 10.41 ab	0.60 ± 0.22 bc
	牛肉膏 Beef extract	73.33 ± 2.89 ab	2.03 ± 0.68 b
	蛋白胨 Peptone	72.50 ± 3.54 ab	0.40 ± 0.13 bc
	硝酸铵 Ammonia nitrate	73.33 ± 2.89 ab	0.30 ± 0.05 c

注：碳源或氮源中同列不同小写字母表示各处理间差异显著（ $P < 0.05$ ）。

Note: Data of carbon sources or nitrogen sources followed by different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.5.5 光照对菌丝生长和产孢的影响

病原菌在全光照和全黑暗条件下能较好生长，菌落直径分别为 69.00 和 75.00 mm；不同光照条件下产孢量差异不显著（表 5）。

表 5 光照对菌落生长和产孢的影响
Table 5 Effect of light on mycelium growth and sporulation

处理 Treatment	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ (10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) Sporulation
全光照 Full illumination	69.00 ± 14.11 a	2.68 ± 1.10 a
全黑暗 Full darkness	75.00 ± 0.50 a	3.38 ± 2.63 a
12 h 光照/12 h 黑暗 12 h illumination/12 h darkness	56.67 ± 5.03 b	3.08 ± 0.65 a

注：同列中不同小写字母表示各处理间差异显著（ $P < 0.05$ ）。

Note: Data followed by different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.5.6 病原菌致死温度

将病原菌菌饼于 61 °C 以上温度处理 10 min 后, 菌丝不能再生, 由此确定菌丝致死温度为 61 °C, 10 min; 将孢子悬液于 56 °C 以上温度处理 10 min, 孢子不能再萌发, 确定孢子致死温度为 56 °C, 10 min。

3 讨论

镰刀菌属 (*Fusarium* Link.) 在自然界分布广泛, 是一类重要的植物病原真菌, 在寄主上常见的症状有根茎、腐烂、萎蔫、果腐、叶斑等, 可造成严重经济损失 (Leslie & Summerell, 2006; Leyva-Madrigal et al., 2015)。变红镰刀菌 (*F. incarnatum*) 可引起魔芋贮藏期干腐病 (周洁 等, 2018; Ding et al., 2018)、核桃溃疡病 (Seta et al., 2004; Singh et al., 2011)、枣黑斑病 (Guo et al., 2016)、玉米茎腐病 (Gai et al., 2016) 等病害。尽管已有腐皮镰刀菌 (Zhang et al., 1999)、砖红镰刀菌 (柴兆祥 等, 2005) 和木贼镰刀菌 (肖敏 等, 2011) 引起甜瓜果腐病的相关报道, 但变红镰刀菌 (*F. incarnatum*) 引起的甜瓜果腐烂病, 本文属首次报道。

镰刀菌属真菌种类多, 且形态存在多型性和变异性, 具有种内遗传分化水平高和菌株间生理分化显著的特点 (李新凤 等, 2015), 常存在过渡类型, 被认为是真菌类群中在形态分类上最难鉴定的属之一 (王琳 等, 2017)。本研究中基于形态特征与 rDNA-ITS、*EF-1 α* 、*Histone* 和 *mtSSU* 等序列分析相结合, 完成病原菌的鉴定。镰刀菌的 rDNA-ITS 区段可作为镰刀菌分类鉴定的依据, 但不能区分遗传关系近的菌种, *mtSSU* 基因对于大多数镰刀菌的鉴定能力有限 (雷娅红 等, 2016)。本研究中使用 rDNA-ITS 和 *mtSSU* 序列, 不能将该菌株鉴定到种, 与以上结论一致。王琳等 (2017) 对 625 株镰刀菌菌株的 rDNA-ITS、*EF-1 α* 和 *β -tubulin* 序列比对分析, 表明 rDNA-ITS 的鉴定能力最差, *EF-1 α* 序列的遗传变异最适用于镰刀菌种类的鉴定。雷娅红等 (2016) 筛选出 *EF-1 α* 基因可作为鉴定镰刀菌属的 DNA 条形码, 费诺亚 (2018) 通过 *EF-1 α* 、 *β -tubulin* 及 *Histone 3* 序列, 完成了引起蓝莓根腐病的木贼镰刀菌的鉴定。变红镰刀菌 (*F. incarnatum*) 与木贼镰刀菌 (*F. equiseti*) 为近缘种, 较难区分, 常以 *Fusarium incarnatum-equiseti* 复合种存在 (Ramdial et al., 2017; Jacobs et al., 2018)。本研究结果表明 rDNA-ITS 和 *mtSSU* 序列不能将二者区分, 而基于 *EF-1 α* 和 *Histone 3* 序列可对变红镰刀菌 (*F. incarnatum*) 进行准确鉴定, 为其快速分子检测及系统发育分析奠定基础。

生物学特性研究表明该病原菌在 5 ~ 35 °C 均能生长及产孢, 20 ~ 35 °C 菌丝生长较快, 20 ~ 25 °C 时产孢量大, 这与病原相同的魔芋贮藏期干腐病菌 (周洁 等, 2018) 和忍冬致病镰刀菌 (毕淑娟 等, 2012) 的报道相似。2017 年 5 月太谷县最高温度 19 ~ 36 °C, 最低温度 5 ~ 18 °C, 降雨量 19.2 mm, 温度条件能满足病原菌生长及产孢要求, 且降雨加重病害发生。尽管病原菌 5 ~ 35 °C 均能生长及产孢, 但不同温度差别较大, 30 °C 下菌落直径为 82.33 mm, 而 5 °C 下仅为 7.67 mm; 20 °C 下产孢量为 3.05×10^7 个 \cdot mL⁻¹, 而 5 °C 下仅为 0.30×10^7 个 \cdot mL⁻¹, 因此在生产中尤其是贮运期应注意控制温度条件, 低温冷藏能显著减少病原菌的生长及繁殖速度。病原菌在全光照和全黑暗条件下能较好生长, 不同光照条件下产孢量差异不显著, 说明光照条件对病原菌生长和产孢影响不大。羧甲基纤维素钠、淀粉、木糖和蔗糖等碳源有利于病原菌菌丝生长, 酵母粉为氮源有利于菌丝生长和产孢, 与周洁等 (2018) 和毕淑娟等 (2012) 的研究结论一致。本研究结果表明乳糖有利于病原菌产孢, 但忍冬致病镰刀菌以果糖为碳源产孢量最高, 明显高于蔗糖, 说明虽然同为变红镰刀菌 (*Fusarium incarnatum*), 不同菌株间生物学特性亦有所差异。病原菌在 pH 4 ~ 9 范围内均能生

长及产孢, pH 8 菌落生长最快, pH 7 最有利于产孢, 这与魔芋贮藏期干腐病菌(周洁 等, 2018)和忍冬致病镰刀菌的 pH 条件类似。病原菌适合在中性略偏碱性环境中生长, 因此生产中适当调节土壤 pH, 可在一定程度上减轻病害发病发生。

References

- Bi Shu-juan, Liu Yu-xia, Wang Fei, Liu Hong-yan, Dong Cheng-ming. 2012. Biological characteristics of two pathogenic *Fusarium* species from honeysuckle. Journal of Henan Agricultural Science, 41 (6): 115 – 118. (in Chinese)
- 毕淑娟, 刘玉霞, 王 飞, 刘红彦, 董诚明. 2012. 2 种忍冬致病镰刀菌的生物学特性研究. 河南农业科学, 41 (6): 115 – 118.
- Chai Zhao-xiang, Li Jin-hua, Li Min-quan, Hao Feng-xia. 2004. Isolation of the pathogens of muskmelon fruit rot and toxin bioassay of the predominant pathogen. Chinese Journal and Applied Environmental Biology, 10 (5): 671 – 674. (in Chinese)
- 柴兆祥, 李金花, 李敏权, 郝风霞. 2004. 白兰瓜果腐病病原菌的分离鉴定及优势病菌的毒性测定. 应用与环境生物学报, 10 (5): 671 – 674.
- Chai Zhao-xiang, Li Jin-hua, Li Min-quan, Fan Xiao-jun. 2005. Identification of the superior pathogen of muskmelon fruit rot and producing condition of its conidium. Journal of Fruit Science, 22 (1): 40 – 43. (in Chinese)
- 柴兆祥, 李金花, 李敏权, 樊小军. 2005. 白兰瓜果腐病优势病菌鉴定及其产孢条件研究. 果树学报, 22 (1): 40 – 43.
- Deng J J, Bi Y, Zhang Z K, Xie D F, Ge Y H, Li W H, Wang J J. 2015. Postharvest oxalic acid treatment induces resistance against pink rot by priming in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. Postharvest Biology and Technology, 106: 53 – 61.
- Ding Z L, Wu J P, Yang C Z, Zhou J, Jiao Z B, Guo F L. 2018. First report of *Fusarium meridionale* and *Fusarium incarnatum* causing dry rot of Konjac in China. Plant Disease, 102 (1): 247 – 247.
- Fang Zhong-da. 1998. Plant pathology research methods. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社.
- Fei Nuo-ya. 2018. Identification and biological characteristics of root rot pathogen on blueberry[M. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 费诺亚. 2018. 蓝莓根腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[硕士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Fogliata G M, Martínez C V, Acosta M E, Muñoz M L, Ploper L D. 2013. First report of *Fusarium* rot caused by *Fusarium oxysporum* on lemon in Tucumán, Argentina. Plant Disease, 97 (7): 989.
- Gai X T, Yang R X, Pan X J, Yuan Y, Wang S N, Liang B B, Gao Z G. 2016. First report of *Fusarium incarnatum* causing stalk rot on maize in China. Plant Disease, 100 (5): 1010.
- Glass N L, Donaldson G C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61 (4): 1323 – 1330.
- Guo K F, Sun J, Zhao S F, He L. 2016. Black spot disease of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba*) caused by *Fusarium incarnatum* in China. Plant Disease, 100 (2): 529.
- Jacobs A, Mojela L, Summerell B, Venter E. 2018. Characterisation of members of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex from undisturbed soils in South Africa. Antonie van Leeuwenhoek, 111 (11): 1999 – 2008.
- Jiang Xian-quan, Wang Wei, Tang Jian-hui, Guo Yu-ren. 2007. Characteristics and biocontrol of phomopsis rot on postharvest rock melon. Acta Phytopythologica Sinica, 34 (2): 129 – 135. (in Chinese)
- 蒋贤权, 王 伟, 唐建辉, 郭玉人. 2007. 甜瓜采后拟茎点霉菌腐烂病及其生物防治. 植物保护学报, 34 (2): 129 – 135.
- Lei Ya-hong, Kuang Wei-gang, Zheng Chun-sheng, Li Xiu-zhang, Gao Wen-na, Li Chun-jie. 2016. Detection and identification of the genus *Fusarium* by DNA barcoding. Journal of Plant Protection, 43 (4): 544 – 551. (in Chinese)
- 雷娅红, 况卫刚, 郑春生, 李秀璋, 高文娜, 李春杰. 2016. 基于 DNA 条形码技术对镰刀菌属的检测鉴定. 植物保护学报, 43 (4): 544 – 551.
- Leslie J F, Summerell B A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames: Blackwell Publishing.

- Leyva-Madrigal K Y, Larralde-Corona C P, Apodaca-Sánchez M A, Quiroz-Figueroa F R, Mexia-Bolaños P A, Portillo-Valenzuela S, Ordaz-Ochoa J, Maldonado-Mendoza I E. 2015. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Phytopathology*, 163 (6): 486 - 497.
- Li Min-quan, Xu Bing-liang, Xu Peng, Xue Li. 2001. Preliminary identification of causal organisms of muskmelon postharvest fruit rot disease. *Journal of Gansu Agricultural University*, 36 (4): 405 - 408. (in Chinese)
- 李敏权, 徐秉良, 徐 鹏, 薛 莉. 2001. 厚皮甜瓜郁金香采后腐烂病害的病原分离鉴定. *甘肃农业大学学报*, 36 (4): 405 - 408.
- Li Xin-feng, Wang Jian-ming, Zhang Zuo-gang, Hao Xiao-juan, Zhang Zu-wei, Tian Hong-xian. 2015. Analysis of genetic diversity and cross-species transferability based on *Fusarium oxysporum* EST-SSR markers. *Journal of Plant Protection*, 42 (5): 777 - 786. (in Chinese)
- 李新风, 王建明, 张作刚, 郝晓娟, 张祖维, 田宏先. 2015. 尖镰孢菌 EST-SSR 遗传多样性分析及通用性评价. *植物保护学报*, 42 (5): 777 - 786.
- Liu Zhi-heng, Hou Yue, Hu Ji-xiang, Teng Xiao-fei, Huang Xin-yang, Wang Shi-wei, Zhao Ting-chang. 2013. Identification and biological characteristics of muskmelon fruit rot pathogen in Liaoning Province. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (1): 89 - 97. (in Chinese)
- 刘志恒, 侯 悦, 胡积祥, 滕晓菲, 黄欣阳, 王世维, 赵廷昌. 2013. 辽宁省甜瓜果腐病原菌鉴定及生物学特性初探. *园艺学报*, 40 (1): 89 - 97.
- McKeen C D, Thorpe H J. 2011. A pythium root rot of muskmelon. *Canadian Journal of Botany*, 46 (10): 1165 - 1171.
- Palmore T N, Shea Y R, Childs R W, Sherry R M, Walsh T J. 2010. *Fusarium proliferatum* soft tissue infection at the site of a puncture by a plant: recovery, isolation, and direct molecular identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (1): 338 - 342.
- Ramdlal H, Latchoo R K, Hosein F N, Rampersad S N. 2017. Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Phytopathology*, 107 (1): 109 - 120.
- Seta S, Gonzalez M, Lori G. 2004. First report of walnut canker caused by *Fusarium incarnatum* in Argentina. *Plant Pathology*, 53 (2): 248 - 248.
- Singh B, Kalha C S, Razdan V K, Verma V S. 2011. First report of walnut canker caused by *Fusarium incarnatum* from India. *Plant Disease*, 95 (12): 1587.
- Stenglein S A, Rodriguero M S, Chandler E, Jennings P, Salerno G L, Nicholson P. 2010. Phylogenetic relationships of *Fusarium poae* based on *EF-1 α* and *mtSSU* sequences. *Fungal Biology*, 114 (1): 96 - 106.
- Wang Lin, Li Xin-feng, Xu Yu-mei, Chang Yin-dong, Wang Jian-ming. 2017. Analysis of population distribution and genetic variation of plant pathogenic *Fusarium* in Shanxi Province. *Scientia Agricultura Sinica*, 50 (10): 1802 - 1816. (in Chinese)
- 王 琳, 李新风, 徐玉梅, 畅引东, 王建明. 2017. 山西省植物病原镰孢菌种群分布及遗传变异分析. *中国农业科学*, 50 (10): 1802 - 1816.
- Xiao Min, Ji Xun-cong, Wang Yun-qin, Chen Mian-cai, Rui Kai, Zhang Rong-yi. 2011. Research of chemical control on muskmelon *Fusarium* rot in Hainan Island. *Journal of Changjiang Vegetables*, (2): 63 - 65. (in Chinese)
- 肖 敏, 吉训聪, 王运勤, 陈绵才, 芮 凯, 张荣意. 2011. 海南岛甜瓜镰刀菌果腐病药剂防治研究. *长江蔬菜*, (2): 63 - 65.
- Zhang You-lin, Zhang Run-guang, Sun Gang, Chen Ting. 2010. Study on postharvest physiology, storage diseases and quality changes of Jiashi muskmelon. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (6): 1220 - 1228. (in Chinese)
- 张有林, 张润光, 孙 刚, 陈 婷. 2010. 伽师瓜采后生理、贮期病害及贮藏保鲜技术. *中国农业科学*, 43 (6): 1220 - 1228.
- Zhou Jie, Ding Zi-li, Yang Chao-zhu, Wen Liang, Jiao Zhen-biao, Wu Jin-ping. 2018. Pathogen identification of dry rot of *Amorphophallus konjac* in storage period and indoor fungicide-screening. *China Plant Protection*, 38 (2): 11 - 16. (in Chinese)
- 周 洁, 丁自立, 杨朝柱, 温 亮, 矫振彪, 吴金平. 2018. 魔芋贮藏期干腐病原菌鉴定及室内药效初报. *中国植保导刊*, 38 (2): 11 - 16.