广西厚皮甜瓜根腐病病原菌鉴定及抗病种质筛选

叶云峰[1],解华云[1],杜婵娟[2],李天艳[1],赵廷昌[3],杨　迪[2],
覃斯华[1],黄金艳[1],洪日新[1],何　毅[1],付　岗[2]

(1.广西壮族自治区农业科学院园艺研究所　南宁　530007;　2.广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所　南宁　530007;　3.中国农业科学院植物保护研究所　北京　100093)

摘　要:根腐病是近年上升为广西地区大棚厚皮甜瓜生产上的重要病害,严重影响甜瓜产业的健康发展。为明确该病害病原菌的分类地位并获得抗病种质材料,对病原菌进行分离纯化和致病性测定,结合形态学和分子生物学特征对病原菌进行分类鉴定,并通过苗期抗病性鉴定方法筛选抗病种质材料。结果表明,致病菌株的菌落和分生孢子形态特征与前人报道的腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)一致。基于 rDNA-ITS 序列构建系统发育树,致病菌株与腐皮镰孢菌聚于同一最小分支,据此将广西厚皮甜瓜根腐病的病原菌鉴定为腐皮镰孢菌。从 27 份厚皮甜瓜种质材料中,筛选到抗性水平为高抗的材料 3 份,分别为 M87、M102 和 M125;抗性水平为抗的材料 6 份,分别为 M23、M78、M84、M100、M112 和 M123。明确了广西地区的根腐病病原菌种类,筛选出高抗根腐病的厚皮甜瓜种质资源,为选育抗根腐病的厚皮甜瓜新品种奠定了基础。

关键词:厚皮甜瓜;根腐病;分离鉴定;腐皮镰孢菌;抗病性

中图分类号:S652　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1673-2871(2022)04-027-06

Pathogen identification and disease resistant germplasm screening of melon root rot in Guangxi

YE Yunfeng[1], XIE Huayun[1], DU Chanjuan[2], LI Tianyan[1], ZHAO Tingchang[3], YANG Di[2], QIN Sihua[1], HUANG Jinyan[1], HONG Rixin[1], HE Yi[1], FU Gang[2]

(1. Horticultural Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China; 2. Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007,Guagnxi, China; 3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Melon root rot has become an important disease in Guangxi in recent years, which seriously affects the healthy development of melon production. In this study, the pathogen was isolated and purified, the pathogenicity was tested, and identification was performed using both morphological and molecular characteristics. Furthermore, melon germplasm materials were screened for resistance by seedling tests. The results showed that the morphological characteristics of colony and conidia of the pathogenic strains were consistent with those of *Fusarium solani*. The phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS sequence show that the pathogenic strains and *F. solani* clustered in the same smallest branch. Therefore, the pathogen causing melon root rot in Guangxi was *F. solani*. Among 27 melon germplasm tested, M87, M102 and M125 showed high resistance level to the pathogen, and M23, M78, M84, M100, M112 and M123 showed resistant level. The pathogen species of melon root rot in Guangxi area was determined, and the resistant melon germplasm were identified in this study. Our research laid the foundation for the breeding of melon varieties resistant to root rot.

Key words: Muskmelon; Root rot; Isolation and identification; *Fusarium solani*; Disease resistance

厚皮甜瓜(*Cucumis melo* L. ssp. *melo*)是广西地区重要的园艺作物和经济作物,栽培面积约 0.67 万 hm^2,南宁市和北海市为主要种植区,柳州市、来宾市、桂林市等地区也有少量种植。在广西,

收稿日期:2021-12-08;**修回日期:**2022-02-21

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0201300);广西重点研发计划资助项目(桂科 AB21196045);国家现代农业产业技术体系广西创新团队项目(nycytxgxcxtd-17-04);广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2021YT045;桂农科 2021YM05)

作者简介:叶云峰,女,副研究员,从事西甜瓜病害防治研究。E-mail:yeyunfeng111@126.com

通信作者:付　岗,男,研究员,从事热带作物病害防治研究。E-mail:fug110@gxaas.net

厚皮甜瓜必须在保护地内种植才能获得成功[1]。温暖湿润的亚热带气候使得甜瓜在该地区每年可以种植2茬，但高温多雨的气候特点，加之2茬种植缺乏轮作机制，致使该地区甜瓜病害发生程度远高于北方地区，土传病害尤甚。近年来，甜瓜根腐病发生严重，并感染所有当地主栽品种，造成大量植株在瓜采收前10~15 d开始整株萎蔫枯死，病株果实不能正常膨大和成熟，品质和产量显著下降。发病率普遍达20%以上，严重的大棚发病率在80%~100%，减产20%~40%，严重制约了广西甜瓜产业的健康发展。

我国其他地区也有甜瓜根腐病发生的报道。20世纪80年代末，该病害首先在新疆喀什地区巴楚、伽师、岳普湖等县开始发生，90年代初迅速传遍喀什地区各县市，重病田发病率达100%，造成毁灭性损失[2]。20世纪90年代至21世纪初，山东费县甜瓜根腐病造成20%以上的减产[3]。甜瓜根腐病蔓延快、危害大、造成的损失重，于21世纪初发展成为我国西北和东部地区的重要病害之一[4]。

目前，国内已报道能引起甜瓜根腐病的病原菌有多种，分别是腐皮镰孢菌（*Fusarium solani*）[4-6]、黑点根腐病菌（*Monosporascus cannonballus*）[7]、黑腐病菌（*Thielaviopsis basicola*）[8]和尖孢镰孢菌（*Fusarium oxysporum*）[9]等。国外报道的甜瓜根腐病菌主要有黑点根腐病菌（*M. cannonballus*）[10-12]、腐皮镰孢菌（*F. solani*）[13-14]、瓜果腐霉（*Pythium aphanidermatum*）、立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）和层出镰刀菌（*F. proliferatum*）[15]等。而引起广西地区厚皮甜瓜根腐病的病原菌分类地位尚未明确。

甜瓜根腐病属于土传病害，防治困难。目前，尚无高效防治方法，而筛选抗病种质资源、选育和应用抗病品种，是最安全、有效的防治措施。国内外目前关于甜瓜根腐病抗源筛选研究的报道极少。仅见国内的杨颖等[4]从薄皮甜瓜种质资源中鉴定筛选到高抗材料16份，为挖掘抗病基因资源改良厚皮甜瓜根腐病抗性打下了基础。国外未见有相关研究报道。

为了明确广西地区厚皮甜瓜根腐病病原菌的分类地位和筛选抗病种质材料，笔者对采集于厚皮甜瓜主产区南宁市和北海市的病样进行病原菌分离纯化，通过致病性测定试验确定病原菌株，结合形态学和分子生物学特征对病原菌进行分类鉴定。同时，通过苗期抗病性鉴定方法从厚皮甜瓜种质资源中筛选抗病材料，旨在为甜瓜根腐病的防治和抗病育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供致病性测定的厚皮甜瓜品种为北甜1号，是当地主栽品种之一，易感根腐病。供抗病性鉴定的27份厚皮甜瓜材料是由广西壮族自治区农业科学院园艺研究所通过多年自交纯化和筛选获得的纯系材料，编号分别为：M5、M23、M57、M63、M66、M73、M75、M77、M78、M79、M81、M84、M85、M87、M88、M90、M93、M95、M97、M100、M102、M106、M108、M112、M123、M125和M128。

1.2 病害症状观察及病样采集

2021年3—6月在厚皮甜瓜整个生长期观察甜瓜根腐病的发生发展情况，并进行记录和拍摄。在广西南宁市武鸣区和北海市银海区等厚皮甜瓜主产区采集病样，两地种植品种均为北甜1号，种植时间为3月上旬，株距0.6 m，行距1.0 m，武鸣区采样地连片种植面积6.7 hm^2，采集病样6份，样品编号为T1~T6，银海区采样地连片种植面积10 hm^2，采集病样6份，样品编号为T7~T12。取样时注意区分根腐病和枯萎病病株，根腐病病株茎基部维管束不变褐或者变褐但不向茎蔓扩展，环境湿度大时，茎基部有白色霉状物，茎蔓裂口处无琥珀色胶状物溢出，病部无缢缩；枯萎病病株维管束变褐，逐步向茎蔓扩展，环境湿度大时，茎基部有白色或粉红色霉状物，茎蔓裂口处有琥珀色胶状物溢出，病部稍缢缩。

1.3 病原菌的分离纯化

采用组织分离法进行病原菌分离。从病株根部的病健交界处切取5 mm×3 mm×1 mm的组织块，75%乙醇消毒20 s，0.1%升汞消毒1 min，无菌水清洗4次，置于PDA平板培养基上，每皿放3个组织块，每份样品分离3皿，28 ℃下培养4 d，选择出现率高且形态一致的菌落，采用单孢分离法进行菌株纯化。

1.4 病原菌的致病性测定

从纯化获得的菌株中选5株代表性菌株接种于PDA培养基上，28 ℃培养12 d，用无菌水将培养基上的分生孢子洗下，制成浓度为1×10^6个•mL^{-1}的孢子悬浮液备用。甜瓜种子于32 ℃下催芽48 h后种于70孔的育苗盘上，于育苗棚内生长7 d后，甜瓜幼苗的子叶展平，将其从营养杯中轻柔拔出，将根部置于孢子悬浮液中浸泡15 min后再植入育苗盘中，以清水浸根的植株为对照，每个菌株接种

20 株幼苗，3 次重复。用薄膜覆盖保湿 48 h，温度保持在 25~35 ℃。定期观察植株发病情况，确定发病症状与根腐病症状是否一致，如果一致，从发病组织上进行病原菌分离，并确定分离所得菌株与接种菌株形态特征是否一致，如果一致可确定为病原菌。

1.5　病原菌的分类鉴定

1.5.1　*病原菌的形态学鉴定*　将具有致病性的菌株接种至 PDA 培养基上，28 ℃培养 7 d，观察记录菌落生长情况和形态特征，在光学显微镜下观察产孢结构及分生孢子的形态，并测量 50 个分生孢子的大小。

1.5.2　*病原菌的分子生物学鉴定*　采用真菌 DNA 提取试剂盒（北京索莱宝生物科技有限公司）对 5 个病原菌株的总 DNA 进行提取。使用通用引物 ITS1（5’- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3’）和 ITS4（5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’）对病原菌的核糖体转录间隔区序列（ITS）进行基因扩增。PCR 反应体系和反应程序参考叶云峰等[16]的方法。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测确认有目标条带后，委托北京擎科生物科技公司进行测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对，并采用 MEGA-X 软件的 Neighbor Joining 法构建基于 rDNA-ITS 基因的系统发育树，以确定病原菌的分类地位。

1.6　甜瓜种质材料的抗病性鉴定

试验于 2021 年 8—10 月在南宁市西乡塘区可利村的大棚育苗基地开展。病原菌的培养及孢子悬浮液的制备、接种和甜瓜材料的种植参考 1.4 的方法，每份材料接种 10 株幼苗，3 次重复，定期观察和记录发病情况。接种病原菌 40 d 时，对种质材料进行抗性水平鉴定，抗性划分标准参考杨颖等[4]的标准，略作修改（表 1）。

表 1　甜瓜根腐病抗性分级标准

病级	分级标准	抗性水平
Ⅰ	幼苗子叶碧绿	高抗（HR）
Ⅱ	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
Ⅲ	幼苗子叶全部变黄或枯死	感（S）
Ⅳ	幼苗基部真叶黄化或枯死	高感（HS）

2　结果与分析

2.1　病害症状

该病害主要发生在大棚甜瓜生长中后期，坐果后 15~20 d 开始有少量植株出现叶片黄化并萎蔫的症状，萎蔫植株早晚可恢复正常，反复 3~5 d 后，整株萎蔫枯死不再恢复。在坐果后 30~35 d（收瓜前 10 d 左右），发病达到高峰期，出现大量萎蔫枯死植株（图 1-A）。病株果实较正常植株的果实小，不能正常膨大和成熟。植株根部皮层褐色干腐，容易断根，须根少（图 1-B、C）。环境湿度大时，茎基部产生少量白色霉状物。剖开茎基部，有部分病株可看到茎基部维管束变褐色，但不向茎蔓扩展（区别于枯萎病）。如碰到连续阴雨天后天气忽然变晴的情况，病害发生严重。

2.2　病原菌的分离纯化

分离的病样组织块被培养 4 d 后，共长出 103 个真菌菌落，其中有 89 个白色菌落形态一致，占总数的 86.4%，所有病样的分离物中都有这种菌落，每

注：A. 田间植株萎蔫症状；B~C. 根部腐烂症状。

图 1　厚皮甜瓜根腐病田间症状

份病样选择其中 1 个菌落进行单孢分离纯化，共获得 12 个纯化的菌株，编号为 TG1~TG12，与病样编号 T1~T12 相对应。

2.3　病原菌的致病性测定

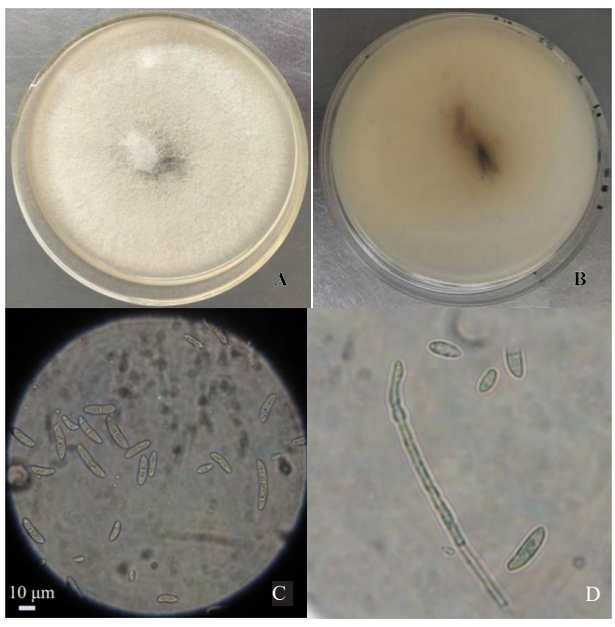
接种病原菌后 20~25 d，所有处理的植株都开始出现病症，子叶陆续开始黄化或枯死；接种后 30~35 d，基部真叶开始黄化或枯死，根部出现褐色病斑或腐烂（图 2-A）；55~65 d，整株叶片黄化或枯死（图 2-B）。对照植株无症状（图 2-C）。对病株根部进行病原再分离，得到的菌株形态特征与接种菌株一致，表明接种的菌株是甜瓜根腐病的病原菌。

注：A. 接种后 30 d 的发病症状；B. 接种后 65 d 的发病症状；C. 对照。

图 2　厚皮甜瓜接种病原菌后的发病症状

2.4　病原菌的分类鉴定

2.4.1　*病原菌的形态学鉴定*　在 PDA 培养基上，菌落圆形、平铺，气生菌丝白色、绒毛状（图 3-A），培养基背面乳白至黄褐色，有蓝色色素（图 3-B）。菌丝无色、分枝、平滑，具隔膜。小型分生孢子肾形或卵圆形，（5.1~15.5）μm×（2.9~4.6）μm。大型分生孢子纺锤形、直或稍弯曲，两端钝圆，顶孢稍弯，多为 1~3 个隔膜，（22.9~33.5）μm×（4.4~6.4）μm（图 3-C）。产孢细胞为长筒形单瓶梗（图 3-D），长在气生菌丝上。



注：A. 菌落正面形态；B. 菌落背面形态；C. 大、小型分生孢子形态；D. 产孢细胞形态。

图 3　病原菌形态特征

2.4.2　病原菌的分子生物学鉴定　经PCR扩增和电泳检测，5个菌株TG1、TG3、TG5、TG7和TG8均获得长度约为530 bp的电泳条带。扩增产物经测序，均获得了对应的rDNA-ITS基因序列。5段基因序列（GenBank登录号：OL308582~OL308586）分别在NCBI数据库中进行了BLAST同源性比对。结果表明，与这些序列同源性最高的均为腐皮镰孢菌（*F. solani*）的菌株，同源性均达99%以上。采用MEGA-X软件构建了系统发育树（图4），结果表明，5个菌株的rDNA-ITS基因序列均与*F. solani*聚于同一最小分支。结合形态学和分子生物学鉴定结果，将广西厚皮甜瓜根腐病的病原菌鉴定为腐皮镰孢菌（*F. solani*）。

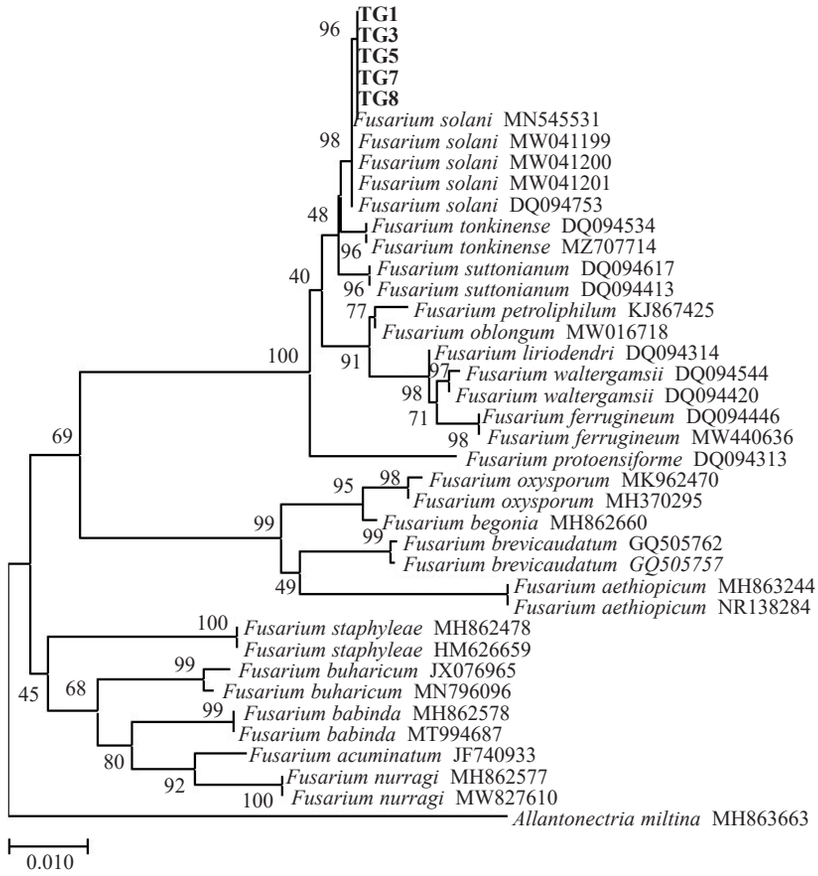


图4　基于rDNA-ITS序列的病原菌菌株与其他相关菌株的系统发育树

2.5　甜瓜种质材料的抗病性鉴定

抗病性鉴定结果表明，不同甜瓜材料的抗性水平不同，在27份甜瓜材料中表现高抗的材料有3份，分别为M87、M102和M125，占供试材料的11.11%；表现抗的材料有6份，分别为M23、M78、M84、M100、M112和M123，占供试材料的22.22%；表现感的材料有7份，占供试材料的25.93%；表现高感的材料有11份，占供试材料的40.74%（表2）。

3　讨论与结论

根腐病近年来在广西大棚厚皮甜瓜主产区发生日益严重，并上升为重要病害之一。本试验对该病的病原菌进行分离和致病性测定，并结合形态学和分子生物学特征将其鉴定为腐皮镰孢菌（*F. solani*）。鉴定结果与北京[4]、新疆[5]、山东费县[6]等地区的甜瓜根腐病菌鉴定结果一致。此外，甘肃省中部半干旱种植区的甜瓜根腐病菌被鉴定为黑点根腐病菌（*M. cannonballus*）[7]。甘肃皋兰地区的甜瓜根腐病菌被鉴定为尖孢镰孢菌甜瓜专化型（*F. oxysporum* f. sp. *melonis*）及黑点根腐病菌（*M. cannonballus*）[9]。黑龙江省齐齐哈尔地区的甜瓜根腐病菌被鉴定为黑腐病菌（*T. basicola*）[8]。可见，在我国能引起甜瓜根腐病的病原菌多样化，因此，及时、准确鉴定出病原菌的分类地位，有利于病害的针对性防控和降低经济损失。

据报道，由腐皮镰孢菌引起的甜瓜根腐病在不同生育期的发病症状和类型不同，主要有猝倒型

表 2　不同厚皮甜瓜种质材料对甜瓜根腐病的抗性水平

序号	材料编号	发病情况	抗性水平
1	M5	幼苗子叶枯死	感（S）
2	M23	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
3	M57	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
4	M63	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
5	M66	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
6	M73	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
7	M75	幼苗子叶枯死	感（S）
8	M77	幼苗子叶枯死	感（S）
9	M78	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
10	M79	幼苗子叶枯死	感（S）
11	M81	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
12	M84	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
13	M85	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
14	M87	幼苗子叶碧绿	高抗（HR）
15	M88	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
16	M90	幼苗子叶枯死	感（S）
17	M93	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
18	M95	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
19	M97	幼苗子叶全部变黄或枯死	感（S）
20	M100	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
21	M102	幼苗子叶碧绿	高抗（HR）
22	M106	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）
23	M108	幼苗子叶全部变黄	感（S）
24	M112	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
25	M123	幼苗子叶呈黄绿色	抗（R）
26	M125	幼苗子叶碧绿	高抗（HR）
27	M128	幼苗基部真叶枯死	高感（HS）

（苗期发生）、根腐型（各生育期均可发生）、萎蔫型（伸蔓期、开花坐果期发生）和果腐型（中后期发生）[3,5]。经调查，广西地区的厚皮甜瓜根腐病症状主要是萎蔫型，其症状与甜瓜枯萎病症状极其相似，需仔细区分并采取对应的防治措施。

国内外关于甜瓜根腐病抗源筛选研究的报道极少。仅见国内的杨颖等[4]开展了相关研究，认为厚皮甜瓜根腐病抗源贫乏，于是从薄皮甜瓜种质资源中鉴定筛选到高抗材料 16 份，表明薄皮甜瓜种质资源中蕴含着对改良厚皮甜瓜根腐病抗性有潜在利用价值的基因资源。本试验对 27 份厚皮甜瓜材料进行了苗期抗病性鉴定，筛选到抗性水平为高抗和抗的材料分别为 3 份和 6 份，表明厚皮甜瓜种质材料中也蕴含抗病基因资源，下一步有望从更多的厚皮甜瓜种质材料中挖掘高抗资源。此外，在厚皮甜瓜材料的苗期抗病性鉴定试验中，发现厚皮甜瓜在接种病原菌后发病进程比杨颖等[4]描述的薄皮甜瓜的发病进程更加缓慢。本试验在参考薄皮甜瓜根腐病抗性分级标准的基础上，结合厚皮甜瓜接种病原菌后的实际发病情况，制定了适用于厚皮甜瓜的根腐病抗性分级标准，为后续开展厚皮甜瓜材料抗病性评价提供借鉴。

本试验首次明确了广西地区厚皮甜瓜根腐病病原菌为腐皮镰孢菌（*F. solani*），并筛选到抗性水平为高抗和抗的材料共 9 份，为甜瓜根腐病的防治和抗病育种奠定了基础。

参考文献

[1] 洪日新，叶云峰，覃斯华，等．广西甜瓜 70 年发展回顾与展望[J]．中国瓜菜，2019，32（8）：40-44．

[2] 杨来新，罗国亮，阿不力米提，等．新疆甜瓜根腐病发生危害及防治[J]．植物保护，2004，30（4）：86-87．

[3] 董勤成，闵召成，孙自喜，等．瓜类根腐病的发生及防治[J]．长江蔬菜，2007（11）：29-30．

[4] 杨颖，耿丽华，王建设，等．甜瓜根腐病病原分离与抗源鉴定[J]．华北农学报，2010，25（4）：218-220．

[5] 杨来新，罗国亮，阿不力米提．新疆甜瓜根腐病研究初报[J]．新疆农业科学，2004，41（3）：185-189．

[6] 康锋，王贤磊，李冠．新疆甜瓜枯萎病、根腐病病原菌鉴定[J]．新疆农业科学，2010，47（6）：1166 -1171．

[7] 何苏琴，白滨．甜瓜黑点根腐病菌 *Monosporascus cannonballus* 在中国大陆的首次报道[J]．植物保护，2010，36（4）：116-119．

[8] 张韦，袁晓莉，李文辰，等．甜瓜黑根腐病发病原因及防治措施[J]．黑龙江农业科学，2019（8）：62-64．

[9] 吴会杰，严蕾艳，郭珍，等．黑点根腐病菌和镰孢菌复合侵染引起的甜瓜根腐病的鉴定[J]．中国瓜菜，2021，34(10)：15-19．

[10] MARKAKIS E A，TRANTAS E A，LAGOGIANNI C S，et al．First report of root rot and vine decline of melon caused by *Monosporascus cannonballus* in Greece[J]．Plant Disease，2018，102（5）：1036．

[11] CORREIA K C，SILVA E K C，CÂMARA M P S，et al．Fitness components of *Monosporascus cannonballus* isolates from northeastern Brazilian melon fields[J]．Tropical Plant Pathology，2014，39（3）：217-233．

[12] ANTONELLI M，REDA R，ALEANDRI M P，et al．Plant growth-promoting bacteria from solarized soil with the ability to protect melon against root rot and vine decline caused by *Monosporascus cannonballus*[J]．Journal of Phytopathology，2013，161（7/8）：485-496．

[13] NASCIMENTO P G M L，AMBROSLO M M Q，FREITAS F C L，et al．Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices[J]．European Journal of Plant Pathology，2018，152（2）：433-446．

[14] HASAN F A，HUSSEIN H Z．Genetic Diversity of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*，the causal root and crown rot of cucurbits（melon）by using molecular markers and control[J]．American Journal of Plant Sciences，2016，7（15）：2151-2172．

[15] PIVONIA S，COHEN R，KAFKAFI U，et al．Sudden wilt of melons in southern Israel：Fungal agents and relationship with plant development[J]．Plant Disease，1997，81（11）：1264-1268．

[16] 叶云峰，杜婵娟，覃斯华，等．甜瓜尾孢叶斑病病原分离与鉴定[J]．南方农业学报，2018，49（3）：476-480．