

寿光设施番茄死棵病原真菌的分离及鉴定

程琳¹, 李珊珊², 武玉芬¹, 李艳青³, 张海娟⁴, 魏美甜⁵

(1. 山东寿光蔬菜种业集团有限公司 山东寿光 262700; 2. 中国农业大学 北京 100083;
3. 潍坊科技学院 山东寿光 262700; 4. 淄博市数字农业农村发展中心 山东淄博 255020;
5. 山东省寿光蔬菜产业集团有限公司 山东寿光 262700)

摘要:为了明确寿光地区番茄死棵病害发生分布情况及其真菌病原菌种类,采用随机调查的方法对寿光地区8个设施番茄产区进行病害调查,并从死棵病株中分离纯化菌株,通过形态学、分子生物学和人工接种等方法对病原菌进行了鉴定。结果表明,寿光大部分设施番茄产区均有死棵病害发生,平均发病率为13.3%。共分离获得真菌菌株249株,鉴定出2种镰刀菌,分别为尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌,其中尖孢镰刀菌的分离频率较高,属于优势菌属,又进一步鉴定为尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型、番茄枯萎病生理小种1和生理小种3。针对不同的病原菌,可以制定有效的策略,进行针对性的病害防控,为设施番茄安全生产及抗病育种提供重要依据。

关键词:番茄死棵;尖孢镰刀菌;病原菌鉴定;优势菌种

中图分类号:S641.2+S626.5

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2023)09-07-09

Isolation and identification of pathogenic fungi from dead tomato plants in Shouguang facilities

CHENG Lin¹, LI Shanshan², WU Yufen¹, LI Yanqing³, ZHANG Haijuan⁴, WEI Meitian⁵

(1. Shandong Shouguang Vegetable Seed Industry Group Co.Ltd., Shouguang 262700, Shandong, China; 2. China Agricultural University, Beijing 100083, China; 3. Weifang University of Science & Technology, Shouguang 262700, Shandong, China; 4. Zibo Digital Agriculture Rural Development Center, Zibo 255020, Shandong, China; 5. Shandong Shouguang Vegetable Industry Group Co.Ltd., Shouguang 262700, Shandong, China)

Abstract: In order to clarify the occurrence and distribution of tomato plant dead diseases in Shouguang area and the fungal pathogens, the random method was used to investigate the diseases in 8 facility tomato production fields in Shouguang area, and the strains were isolated and purified from the tomato plant dead. The pathogens were identified by morphology, molecular biology and artificial inoculation. The results showed that tomato plant dead occurred in most of the tomato production areas in Shouguang, with an average incidence rate of 13.3%. A total of 249 fungal strains were isolated and two species of *Fusarium* were identified, named *F. oxysporum* and *Fusarium solium*. Among them, *F. oxysporum* has a higher isolation frequency and belongs to the dominant genus. *F. oxysporum* was further identified as *F. oxysporum* tomato neck rot root rot specialization type, tomato fusarium wilt physiological race 1 and physiological race 3. To sum up, the fungal pathogens that cause tomato plants dead in Shouguang area are *F. solium*, *F. oxysporum* tomato neck rot root rot specialization, Fusarium wilt physiological race 1 and physiological race 3, and there are pathogenic bacteria compound infection. According to different pathogenic bacteria, effective strategies can be formulated to carry out targeted disease prevention and control, which provides important basis for safe production and disease resistance breeding of tomato in facilities.

Key words: Dead tomato plant; *F. oxysporum*; Pathogen identification; Dominant strain

我国是世界上番茄种植面积最大、产量最高的国家^[1]。山东省是我国番茄种植的主产区之一,寿光蔬菜种植面积近4万hm²,其中设施番茄的栽培面积占寿光设施栽培面积的30%左右。近年来,随着农

业种植结构调整、商业品种推广单一、田间管理不当以及气候条件的影响,番茄死棵现象的发生及危害逐年加重,成为制约番茄产业发展的重要因素之一^[2-3]。

收稿日期:2023-04-20;修回日期:2023-07-28

基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程 2021LZGC017);山东省重点研发计划(竞争性创新平台项目 2022CXPT011);山东省重点研发计划(农业良种工程 2022LZGCQY003);山东省重点研发计划(泰山产业领军人才工程 LJNY202027)

作者简介:程琳,女,高级农艺师,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:chenglinyy1130@126.com

在引起番茄死棵的病害因素中,枯萎病和番茄颈腐根腐病是主要真菌病害。番茄枯萎病是由尖孢镰刀菌番茄专化型 *FOL* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 侵染所引起的土传病害。尖孢镰刀菌的不同菌株对不同品种的番茄存在致病能力的差异,因此相关研究人员又将番茄枯萎病菌分为不同的生理小种,即生理小种 1、2、3^[4-8]。番茄颈腐根腐病 (*Fusarium crown and root rot, FCRR*) 是由尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型 *FORL* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) 引起的一种与番茄枯萎病症状极为相似的真菌土传病害。张斌等^[9]对江苏省分离获得的茄病镰刀菌进行回接试验,32个茄病镰刀菌菌株均能引起番茄植株产生根部腐烂、萎蔫等症状。周黎等^[10]研究认为引起新疆地区番茄根腐病的病原菌除了尖孢镰刀菌,还有茄病镰刀菌和串珠镰刀菌。程琳^[11]、李景富等^[12]对山东番茄死棵病害进行研究,经鉴定认为致病菌为尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型。张秀等^[13]对山东省6个地区的病原菌鉴定,发现寿光地区为番茄枯萎病生理小种3。

尖孢镰刀菌分布广、寄主多、侵染能力强,不同地区引起死棵病害的病原菌种类存在一定的差异,在实际的栽培过程中发病症状很难区分,因此加大了该病害的防治难度。为此,笔者的试验拟通过对寿光地区设施番茄死棵病害进行调查,了解目前寿光地区设施番茄死棵病害的发病情况。同时分离番茄死棵真菌病害的病原物,结合形态学观察、分子生物学鉴定和人工接种等方法确定病原菌种类,为今后寿光地区番茄死棵病害防治工作及番茄抗病育种提供一定的参考和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于2021年5—12月在山东省寿光市寇家坞、田柳镇、稻田镇、古城番茄小镇、野虎村、王家尧、化龙镇、蔬菜小镇等8个地方进行,在种植番茄的温室大棚中选取发生死棵病害的番茄植株96株,包括大粉果系列、大红果系列、草莓番茄系列和樱桃番茄系列各24株。

致病性测定所用的番茄为山东寿光蔬菜种业集团提供的黄金明珠,为黄色大果番茄,产自西安市航丰种业有限公司,对番茄枯萎病和番茄颈腐根腐病均为高感。

1.2 方 法

1.2.1 番茄死棵病害的发生情况调查 对8个种

植番茄的产区进行病害随机调查。调查方法为随机取样法,在每个地区随机选取3个温室大棚进行田间调查,每个温室大棚内采取平行线取样法,随机选取5~6垄进行番茄死棵病害的调查,并进行病害发生率的统计。同时观察病株的病症并拍照及采集。发病率/% = 发病株数/调查总株数×100。

1.2.2 病原菌的分离纯化 采用组织分离法,用灭菌的剪刀剪取大小为0.5~1.0 cm²根部及根茎部的病健交界处组织,用75%酒精消毒后,放入PDA培养基中,然后放入27℃恒温培养箱中培养。3~4 d后观察其生长情况,并用单孢分离法进行纯化。

1.2.3 病原菌的鉴定 采用形态学观察、分子生物学鉴定及致病性测定3种方法对分离到的病原菌进行鉴定。

(1)形态学观察:依据Booth分类系统^[14]同时参考《常见镰刀菌鉴定指南》^[15],观察菌落的大小、形状、颜色,以及分生孢子形态、大小等特征,对分离到的菌株进行形态学鉴定。

(2)分子生物学鉴定:采用真菌DNA快速提取试剂盒提取病原菌DNA,提取物于-20℃保存。利用真菌rDNA转录间隔区通用引物ITS1/ITS4^[16]进行PCR扩增,产物采用1%琼脂糖凝胶电泳检测。后将未纯化的PCR产物送到华大基因青岛分公司进行正向测序,分离所得的菌株的rDNA-ITS序列运用GenBank中的数据库中Nucleotide BLAST进行同源性比对分析,结合病原菌形态特征,判断所分离菌株的种类,确定分类地位。参考Hirano和Arie^[17]的方法,用3对特异性引物sp13f/r、sp23f/r、spr1f/r进行尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型及枯萎病生理小种的鉴定。PCR反应产物采用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

(3)致病性测定:根据Koch氏法则进行分离物的回接测定。每种致病菌中选取8个有代表性的菌株,用打孔器在分离纯化培养后的菌落边缘取直径1 cm菌饼3片,放入装有150 mL PDB培养基的三角瓶中,在150 r·min⁻¹、27℃下摇2~3 d后用4层纱布过滤,用血球计数板进行计数,用无菌水配制成孢子浓度为1×10⁷ CFU·mL⁻¹的孢子悬浮液。

采用浸根法接种。待番茄长到2~3叶1心时,将番茄苗连根拔起,用自来水冲去根部土粒,然后用无菌的小刀将主根根基部切一个小伤口,在已配好的孢子悬浮液中浸泡15 min后,转移到装有无菌土的营养钵中定植,放入温度为25~30℃的温室中培养。每个菌株3个重复,每个重复10个处理,以清水作为对照,15 d后统计其发病情况。病情指

表1 病情指数分级标准
Table 1 Grading standard of disease index

病级	枯萎病	根腐病
0	无症状	无症状
1	1~2片子叶明显变黄以至脱落	根基部变褐,不软腐,不缢缩,叶片健康,根无明显病斑
2	1~2片真叶变黄或全株发黄,叶片萎蔫下垂	根基部变褐,并有明显缢缩,叶尖或叶片发黄,根变褐

数= Σ (病级株数×各病级数值)/(总株数×最高级别)。病情指数分级标准见表1。

1.3 数据处理

采用DPS(9.01)进行数据处理和完全随机设计单因素试验方差分析。

2 结果与分析

2.1 田间发病症状

发病初期可以观察到整棵番茄植株的下部叶片首先出现变黄、萎蔫的现象(图1-A),病株根基部



注:A. 田间成株发病症状; B. 根基部发病症状; C. 维管束发病症状。

图1 番茄死棵病的病害症状

Fig. 1 Symptoms of dead tomato plant

会产生深褐色的病斑,在空气湿度大时会有比较浅的粉红色的霉层产生(图1-B),将植株的根茎部剖开,会发现维管束产生褐变,且出现髓部中空的现象(图1-C)。

2.2 寿光地区设施番茄死棵病害发生与分布情况

调查结果见表2,寿光大部分番茄产区均有死棵病害发生,且分布比较广泛,平均发病率为13.3%。其中以大粉果和草莓番茄系列品种发病最重,属于高感品种。田柳镇的平均发病率最高,为37.5%,单个棚内的发病率最高可达57.1%。处于开花坐果期的野虎村和稻田镇发病率较低,平均发病率低于0.5%。不同产区、同一产区不同棚室之间死棵病的发病率存在差异。

2.3 形态学观察

病原菌分离后培养产生菌落的形态大致可分为4种类型,观测结果如图2所示。第I种类型的菌株菌落初为粉紫色,菌丝茂密,呈绒毛状,菌落背面

带有紫红色色素;第II种类型的菌株菌落初为白色,菌丝毛绒状且茂密,略带粉状,菌落中心略有凸起,背面变为浅紫色;第III种类型的菌落初为淡粉色,菌丝与前两种类型相比较稀疏,菌落中心也有略微的凸起,菌落背面中心呈现紫色;第IV种类型的菌落白色,呈圆形,菌丝絮状致密,菌落背面中心呈现枯黄色。I、II、III菌株初步鉴定为尖孢镰刀菌,IV为茄病镰刀菌。孢子菌丝和形态显微观察如图3所示,尖孢镰刀菌大型分生孢子纺锤形,有3~5个隔膜,3个的居多,大小为(27~47) μm ×(3~5) μm ,无色细胞多;小型分生孢子卵形或长椭圆形,大小(5~12) μm ×(2.2~3.5) μm ,无色,单孢;厚垣孢子圆形或椭圆形,单孢顶生或间生于菌丝之上,大小为(11.2~16.0) μm ×(9.5~11.3) μm 。茄病镰刀菌分生孢子呈典型的镰刀状,1~5层隔膜。

2.4 分子生物学鉴定

2.4.1 分离病原菌的 rDNA-ITS 分子生物学鉴定

表2 寿光市番茄死棵病害调查结果

Table 2 The investigation result of dead tomato plant in Shouguang

地点	设施类型	生育期	发病率/%	平均发病率/%
古城番茄小镇1号棚	日光温室,无土栽培	结果期	16.1	14.9 ab
古城番茄小镇2号棚	日光温室,无土栽培	结果期	10.7	
古城番茄小镇3号棚	日光温室,无土栽培	结果期	17.9	
田柳镇1号棚	日光温室	结果期	55.4	37.5 a
田柳镇2号棚	日光温室	结果期	57.1	
田柳镇3号棚	日光温室	结果期	0.0	
蔬菜小镇1号棚	日光温室	结果期	12.0	16.0 ab
蔬菜小镇2号棚	日光温室	结果期	18.0	
蔬菜小镇3号棚	日光温室	结果期	18.0	
寇家坞1号棚	日光温室	结果期	3.9	4.2 b
寇家坞2号棚	日光温室	结果期	0.0	
寇家坞3号棚	日光温室	结果期	8.7	
野虎村1号棚	日光温室	开花坐果期	0.8	0.3 b
野虎村2号棚	日光温室	开花坐果期	0.0	
野虎村3号棚	日光温室	开花坐果期	0.0	
王家尧1号棚	日光温室	结果期	14.9	14.8 ab
王家尧2号棚	日光温室	结果期	6.1	
王家尧3号棚	日光温室	结果期	23.4	
化龙镇1号棚	日光温室	结果期	46.2	18.5 ab
化龙镇2号棚	日光温室	结果期	1.0	
化龙镇3号棚	日光温室	结果期	8.3	
稻田镇1号棚	日光温室	开花坐果期	0.8	0.5 b
稻田镇2号棚	日光温室	开花坐果期	0.6	
稻田镇3号棚	日光温室	开花坐果期	0.0	

注:同列数字后不同小写字母表示在0.05水平差异显著。下同。

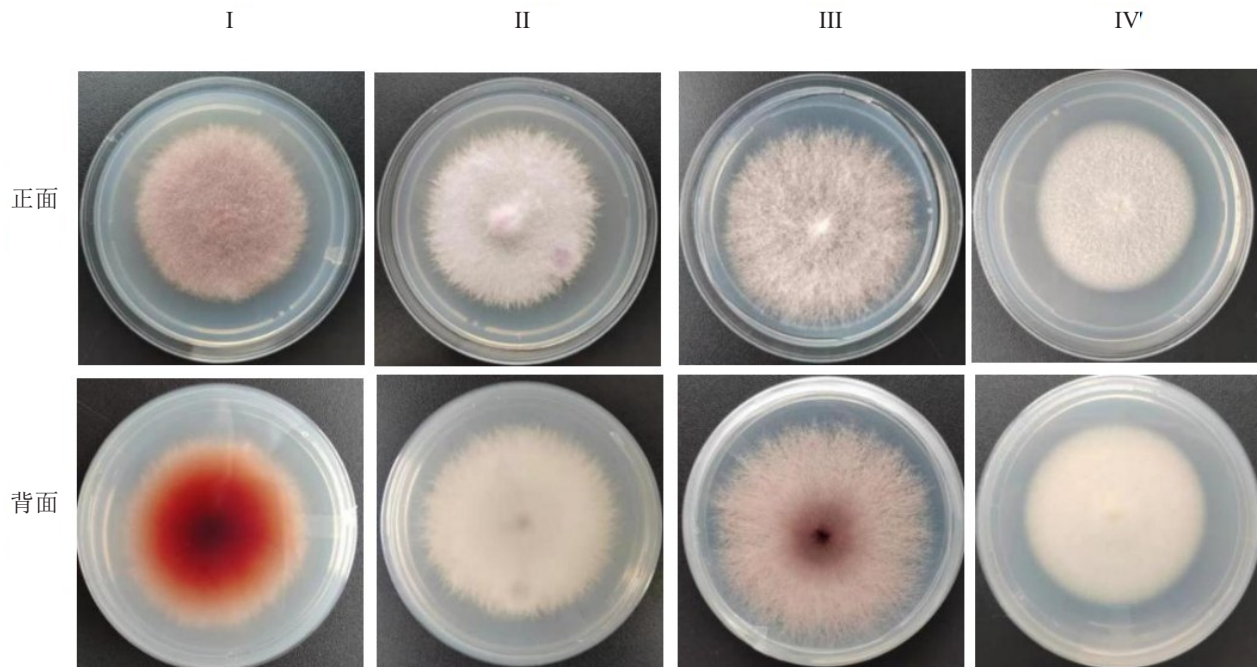
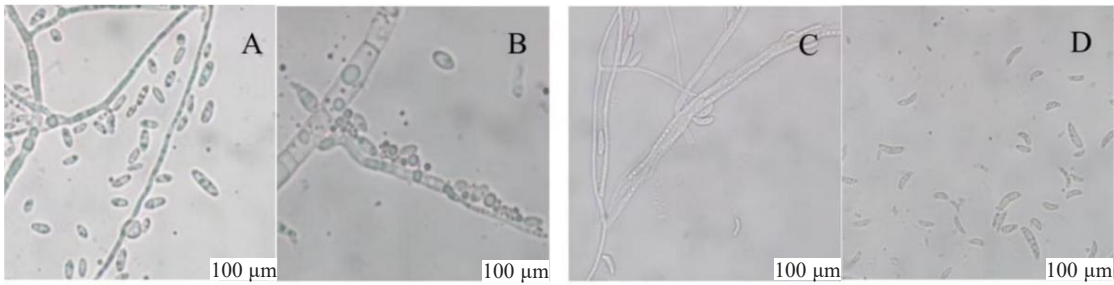


图2 4种类型菌株在PDA培养基上培养5d后的菌落形态

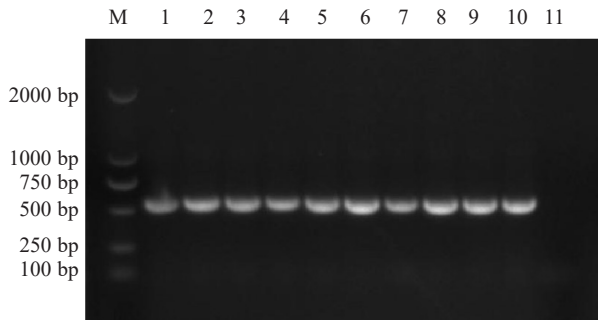
Fig. 2 Colony morphology of 4 strains cultured on PDA medium for 5 days



注:A和B为尖孢镰刀菌;C和D为茄病镰刀菌。

图3 孢子形态观察

Fig. 3 Observation of spore morphology



注:M. DL2000 marker; 1~9. 稻田镇分离的病原菌;10. 对照菌株;11. 清水对照。

图4 病原菌 rDNA-ITS 区域 PCR 扩增

Fig. 4 PCR amplification of rDNA-ITS from pathogenic bacteria

对所有分离得到的 249 株病原真菌 DNA 进行 rDNA-ITS 区域特异性扩增,将胶回收后测序,在 NCBI 中进行序列比对,构建进化树,其中稻田镇分离的病原真菌凝胶电泳结果见图 4,序列同源性比对结果见表 3,进化树构建见图 5。结果显示,249 株病原真菌中有 202 株与尖孢镰刀菌的同源性较高,其余的 47 株与茄病镰刀菌有较高的同源性,且相似度均在 97%以上。

2.4.2 尖孢镰刀菌的特异性引物鉴定 对 202 个已经鉴定为尖孢镰刀菌的菌株进行尖孢镰刀菌的特异性引物 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测,其中稻田镇部分样品电泳检测结果见图 6、图 7 和图 8。结果表明,77 株为尖孢镰刀菌枯萎病生理小种 1,111 株为尖孢镰刀菌枯萎病生理小种 3,14 株为尖孢镰刀菌颈腐根腐病专化型。

2.5 山东寿光地区分离病原菌的种类及发生情况分布

对鉴定到的真菌病原菌的种类和分布分析见表 4,发现尖孢镰刀菌的分离频率最高,属于优势菌属,不同地区引起死棵的病原和优势菌种不尽相同,同一地区存在病原菌混合侵染的现象。8 个产

表3 序列同源性比对

Table 3 Sequence homology alignment

序号	菌株编号	片段长度/bp	同源比对结果	相似度/%
1	D2-1-1	503	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
2	D2-2-2	494	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
3	D2-2-1	519	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
4	D2-2-3	512	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
5	D2-3-1	515	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
6	D2-3-2	505	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
7	D3-1	507	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
8	D3-2	505	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
9	D3-3	506	<i>Fusarium oxysporum</i>	99

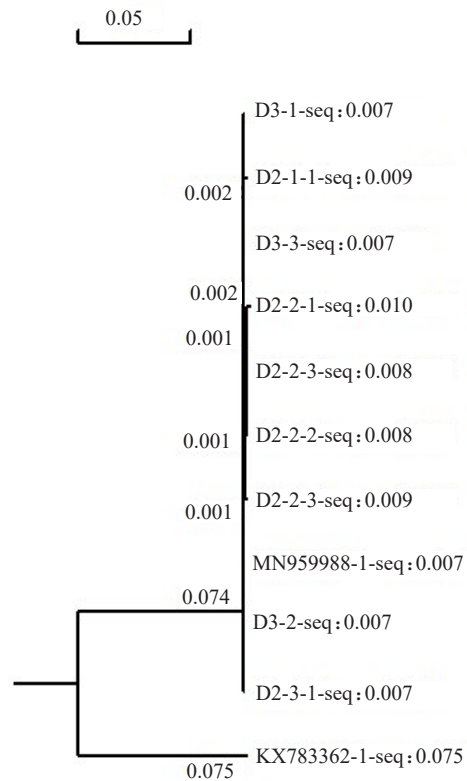
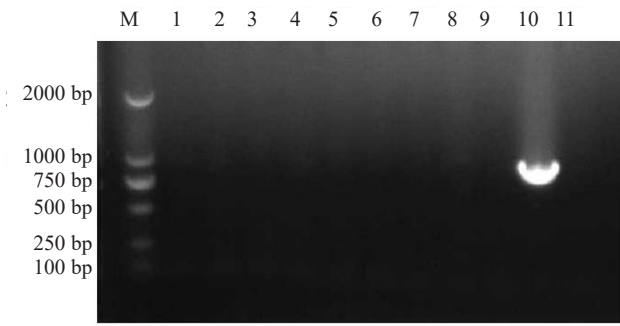


图5 进化树构建

Fig. 5 Evolutionary tree constructing



注: M. DL2000 marker; 1~9. 稻田镇分离的病原菌; 10. 对照菌株; 11. 清水对照。下同。

图6 稻田镇分离的病原菌尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型特异性引物(sprlf/sprlr)扩增

Fig. 6 Specific primer (sprlf/sprlr) amplification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* from Daotian town

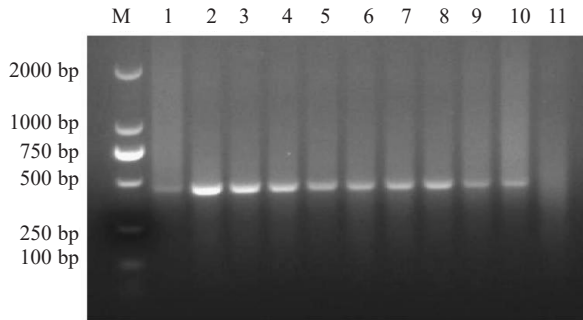


图7 稻田镇分离的病原菌尖孢镰刀菌番茄枯萎病生理小种特异性引物(sp13f/sp13r)扩增

Fig. 7 Specific primer (sp13f/sp13r) amplification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from Daotian town

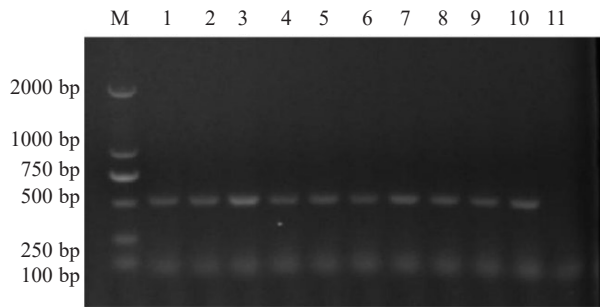


图8 稻田镇分离的病原菌尖孢镰刀菌番茄枯萎病生理小种特异性引物(sp23f/sp23r)扩增

Fig. 8 Specific primer (sp23f/sp23r) amplification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from Daotian town

区中有6个产区的优势菌株都含有枯萎病生理小种1和生理小种3,其中王家尧和化龙镇包含了4种菌种,但优势菌株存在较大差异,分别为茄病镰刀菌和尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型。

2.6 分离病原菌的致病性鉴定

表4 致病菌种类的地理分布

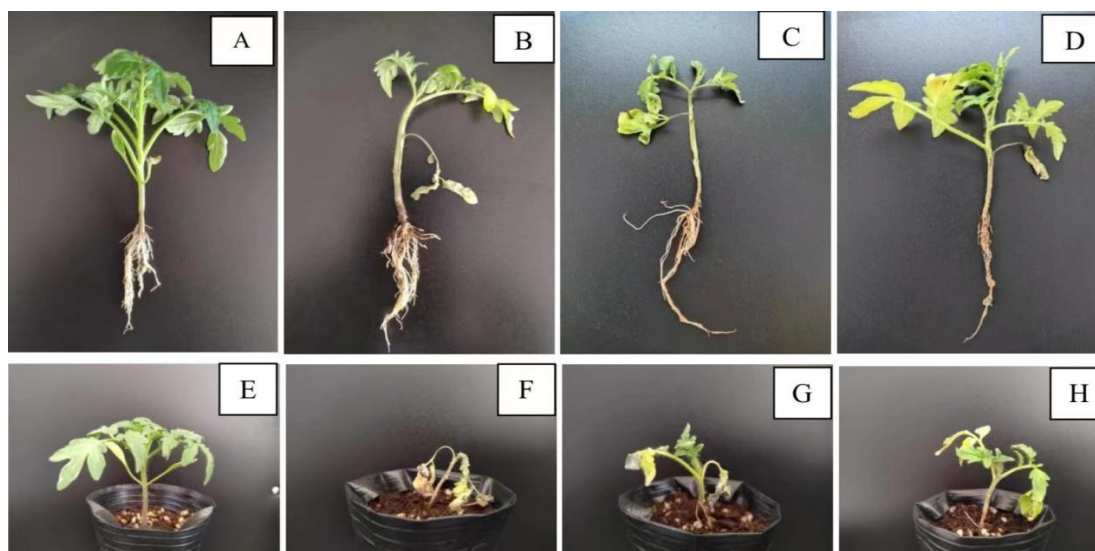
Table 4 Geographical distribution of pathogenic bacteria species

采集地	项目	真菌病原菌			合计
		尖孢镰刀菌 <i>fol-1</i>	茄病镰刀菌 <i>fol-3</i>	茄病镰刀菌 <i>FORL</i>	
古城番茄小镇	株数	20	40	1	61
	频率/%	8.03	16.06	0.40	24.50
田柳镇	株数	13	1	15	29
	频率/%	5.22	0.40	6.02	8.31
蔬菜小镇	株数	16	54	3	73
	频率/%	6.43	21.69	1.20	29.32
寇家坞	株数	7	1		8
	频率/%	2.81	0.40		3.21
野虎村	株数		10		10
	频率/%		4.01		4.01
王家尧	株数	8	3	3	19
	频率/%	3.22	1.20	1.20	7.63
化龙镇	株数	3	3	11	9
	频率/%	1.20	1.20	4.42	3.61
稻田镇	株数		9		9
	频率		3.61		3.61
共计	株数	77	111	14	47
	频率/%	30.92	44.58	5.62	18.88

人工接种试验结果表明,尖孢镰刀菌菌株具有致病性,只是同一类型的不同菌株之间致病力存在较大差异。依据柯赫氏法则,从接种发病番茄苗的病健交界处按照本文材料与方法中病原分离鉴定描述的方法重新分离、纯化和鉴定,得到的尖孢镰刀菌菌株与接种的尖孢镰刀菌形态一致,证明所接菌株为番茄死棵病害的病原真菌。图9显示的是尖孢镰刀菌的发病症状,主要表现为:叶片由下至上逐渐枯黄(图9-B~D、G、H),茎基部有深褐色病斑(图9-B~C),有的会出现溢缩,拔出病株,可见根部发育较差,须根较少,变为黄褐色(图9-C~D)。

2.6.1 尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型(*FORL*)人工接种鉴定 试验结果见表5,在尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型接种试验中,不同菌株的发病率和病情指数存在差异,其中发病率最高可达100%,分别为菌株H1GJ8-2和H2-6-1,发病率最低为菌株H1-1-3,发病率为0。致病力最强的为H2-6-1,病情指数为85.83。

2.6.2 尖孢镰刀菌番茄枯萎病生理小种1(*fol-1*)人工接种鉴定 试验结果见表6,在尖孢镰刀菌番茄枯萎病生理小种1接种试验中,不同菌株的发病率和病情指数存在差异,其中发病率最高达到



注:A、E 为清水对照(CK);B~D 为根茎部发病症状;F~H 为整株发病症状;B、F 接种尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型病原菌;C、G 接种尖孢镰刀菌枯萎病生理小种 1;D、H 接种尖孢镰刀菌枯萎病生理小种 3。

图 9 尖孢镰刀菌发病症状

Fig. 9 Symptoms of *Fusarium oxysporum*

表 5 病原菌 *FORL* 人工接种鉴定

菌株号	接种数	发病数	发病率/%	平均发病率/%	病情指数	平均病情指数
W9-2	10	7	70	76.67 d	22.62	24.17 d
	10	9	90		31.54	
	10	7	70		18.35	
W9GJ-2	10	4	40	36.67 e	9.44	9.17 e
	10	4	40		8.96	
	10	3	30		9.11	
W9GJ-3	10	9	90	86.67 c	27.85	29.17 d
	10	9	90		30.18	
	10	8	80		29.48	
H1-1-3	10	0	0	0.00 f	0.00	0.00 f
	10	0	0		0.00	
	10	0	0		0.00	
H1GJ8-2	10	10	100	100.00 a	63.54	63.42 b
	10	10	100		67.21	
	10	10	100		59.51	
H1-1-11	10	10	100	96.67 ab	63.41	59.17 b
	10	10	100		62.59	
	10	9	90		51.51	
H2-6-1	10	10	100	100.00 a	82.95	85.83 a
	10	10	100		83.54	
	10	10	100		91.00	
H1-8-21	10	9	90	90.00 bc	48.69	44.17 c
	10	9	90		38.51	
	10	9	90		45.31	
CK(清水)	10	0	0	0.00 f	0.00	0.00 f
	10	0	0		0.00	
	10	0	0		0.00	

表 6 病原菌 *fol-1* 人工接种验证结果

菌株号	接种数	发病数	发病率/%	平均发病率/%	病情指数	平均病情指数
W6-2	10	7	70	56.67 c	20.34	15.83 c
	10	4	40		14.51	
	10	6	60		12.64	
W4-1	10	8	80	86.67 a	27.92	29.17 b
	10	9	90		26.51	
	10	9	90		33.08	
W1GJ-3	10	9	90	90.00 a	66.87	70.00 a
	10	9	90		75.62	
	10	9	90		67.51	
H1GJ 4-11	10	8	80	83.33 ab	29.62	30.83 b
	10	7	70		28.64	
	10	10	100		34.23	
H1GJ2-11	10	10	100	93.33 a	77.65	64.17 a
	10	9	90		52.19	
	10	9	90		62.67	
K1-1	10	8	80	93.33 a	49.86	59.17 a
	10	10	100		55.64	
	10	10	100		72.01	
SC7-32	10	7	70	60.00 bc	19.15	17.50 c
	10	4	40		14.62	
	10	7	70		18.73	
SC9GJ-1-31	10	7	70	50.00 c	11.96	12.50 c
	10	6	60		13.82	
	10	2	20		11.72	
CK(清水)	10	0	0	0.00 d	0.00	0.00 d
	10	0	0		0.00	
	10	0	0		0.00	

93.33%,有2个菌株,分别为H1GJ 2-11和K1-1,最低为菌株SC9GJ-1-31,发病率为50.00%,致病力最强的为W1GJ-3,发病率和病情指数分别为90.00%和70.00。

2.6.3 尖孢镰刀菌番茄枯萎病生理小种3(*fol-3*)人工接种鉴定 试验结果见表7,尖孢镰刀菌番茄枯萎病生理小种3接种试验中,不同菌株的发病率和病情指数存在差异,其中发病率最高的为菌株W1-1和K2-2,发病率为100%,病情指数最高的菌株为W1-1,病情指数为80.00。菌株W8-1的发病率和病情指数最低,分别为13.33%和3.33。

表7 病原菌*fol-3*人工接种鉴定

菌株号	接种数	发病数	发病率/%	平均发病率/%	病情指数	平均病情指数
W1-1	10	10	100	100.00 a	82.46	80.00 a
	10	10	100		78.18	
	10	10	100		79.36	
W8-1	10	2	20	13.33 c	3.92	3.33 g
	10	2	20		6.07	
	10	0	0		0.00	
W1-21	10	9	90	93.33 a	70.35	62.34 bc
	10	10	100		65.51	
	10	9	90		51.15	
H2GJ-2-1	10	9	90	90.00 a	43.13	53.33 cd
	10	8	80		48.62	
	10	10	100		68.24	
H2GJ-5-1	10	10	100	73.33 ab	41.25	35.00 e
	10	6	60		28.96	
	10	6	60		34.79	
H2GJ-8-1	10	5	50	83.33 a	45.31	48.33 d
	10	10	100		45.58	
	10	10	100		54.10	
SC6GJ-2-1	10	9	90	93.33 a	71.33	70.83 ab
	10	9	90		68.94	
	10	10	100		72.22	
SC8-2-32	10	7	70	56.67 b	14.89	17.50 f
	10	4	40		19.21	
	10	6	60		18.40	
K2-2	10	10	100	100.00 a	74.86	74.17 a
	10	10	100		79.15	
	10	10	100		68.50	
CK(清水)	10	0	0	0.00 c	0.00	0.00 g
	10	0	0		0.00	
	10	0	0		0.00	

2.6.4 茄病镰刀菌人工接种鉴定 试验结果见图10,在茄病镰刀菌的接种试验中,番茄植株生长正常,未见发病症状。



图10 茄病镰刀菌人工接种鉴定

Fig. 10 Identification of artificial inoculation of *Fusarium solaniae*

3 讨论与结论

通过对寿光地区日光温室种植的番茄死棵病害田间调查,发现寿光大部分番茄产区均有死棵病害发生。在引起番茄死棵的病害因素中,枯萎病和番茄颈腐根腐病是主要的真菌病害。

由于病原菌的种类繁多,个体多态性丰富,许多种的分生孢子形态相似,如果仅仅是通过形态观察进行鉴定,还很难能够准确地确定其种类。崔萍等^[18]根据形态学鉴定和ITS序列同源性分析,准确地将分离得到的镰刀菌鉴定为尖孢镰刀菌。刘晖^[19]、郑贵彬等^[20]运用特定品种鉴定生理小种,发现造成山东、西安枯萎病发生的病原菌均为生理小种1,但是由于品种存在特殊性,不能普遍适用。Chang等^[21]对山西省17个地区的病原菌进行鉴定,发现同时存在生理小种1,2和3,其中生理小种1最普遍。笔者通过借鉴前人的研究,在形态观察的基础上,利用分子生物学手段对病原菌种类进行鉴定,提高了番茄死棵病原真菌鉴定结果的准确性。

张斌等^[9]对江苏省分离获得的茄病镰刀菌进行回接试验,32个茄病镰刀菌菌株均能引起番茄植株产生根部腐烂、萎蔫等症状。笔者在对分离菌株进行人工接种鉴定时,发现接种茄病镰刀菌的番茄未发病。笔者的研究结果与前人的相关报道并不相同,可能与病原菌种类、菌株致病力强弱、接种条件等密切相关,与此同时受时间限制和试验条件的影响,笔者的研究未能对分离出来的47个茄病镰刀

菌菌株全部进行回接验证,关于茄病镰刀菌的致病性还需要进一步探究。

张秀等^[13]对山东省6个地区的病原菌进行鉴定,发现寿光地区为番茄枯萎病生理小种3。笔者通过特异性引物对尖孢镰刀菌进行鉴定,发现引起寿光地区番茄死棵的真菌病原菌为尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型,枯萎病生理小种1和生理小种3,而且存在病原菌复合侵染的情况。而在我国的黑龙江、河北、山西、湖北、四川等地,也有相关的病害研究及报道,说明采集时间及地点不同,在病原菌种类上会存在一定的差异。

综上所述,寿光大部分番茄产区均有死棵病害发生,主要由茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌番茄颈腐根腐病专化型,枯萎病生理小种1和生理小种3引起,而且存在病原菌复合侵染的情况。通过对寿光不同地区番茄死棵病害致病菌种类及优势种群的研究可以制定有效的策略,进行针对性的病害防控,为优质番茄安全生产和抗病育种提供重要依据。

参考文献

- [1] 崔锦,王丽萍.番茄育种现状及发展趋势[J].安徽农学通报,2021,27(6):21-23.
- [2] 樊根强,汤明强,张志昌.大棚番茄根腐病的发生与防治[J].长江蔬菜,2004(9):33-33.
- [3] 邹庆,张子君,张逸,等.抗病耐贮运番茄新品种“辽红八号”的选育[J].园艺与种苗,2016(9):10-11.
- [4] GERDEMANN J W, FINLEY A M. The pathogenicity of race 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Phytopathology, 1951, 41: 238-244.
- [5] YAMAMOTO I H, KOMADA K, KUNYASU M, et al. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato[J]. Proceedings of the Kansai Plant Protection Society, 1974, 16: 17-29.
- [6] SATO R, ARAKI T. On the tomato root-rot disease occurring under vinyl-house conditions insouthern Hokkaido[J]. Annual Report of the Society Plant Protection of North Japan, 1974, 25: 5-13.
- [7] GRATTIDGE R. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland[J]. Plant Disease, 1982, 66(1): 165.
- [8] GABE H L. Standardization of nomenclature for pathogenic race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1975(64): 156-159.
- [9] 张斌,杨晓云,陈志谊.番茄枯萎病致病镰刀菌种类鉴定及优势种群的研究[J].植物病理学报,2016,46(4):561-565.
- [10] 周黎,李国英,丁建军.新疆加工番茄根腐病病原的分离和鉴定[J].新疆农业科学,2008,45(1):130-134.
- [11] 程琳,张生,李艳青,等.番茄颈腐根腐病原菌鉴定与抗病种质材料的筛选[J].园艺学报,2016,43(4):781-788.
- [12] 李景富,孙亚莉,赵婷婷.番茄颈腐根腐病菌分离鉴定与生物学特性研究[J].东北农业大学学报,2018,49(2):22-30.
- [13] 张秀,刘蕾,王辉,等.山东省番茄尖孢镰刀菌的分离及鉴定[J].山东农业科学,2019,51(12):78-81.
- [14] BOOTH C. The genus *Fusarium*[J]. England: Commonwealth Mycological Institute, 1971, 1-23.
- [15] 王洪辰,郑重,叶琪明,等.常见镰刀菌鉴定指南[M].北京:中国农业科技出版社,1996.
- [16] WHITE D C, FINDLAY R H. Biochemical markers for measurement of predation effects on the biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial biofilms[J]. Hydrobiologia, 1988, 159(1): 119-132.
- [17] HIRANO Y, ARIE T. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and Races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Gen Plant Pathol, 2006, 72(5): 273-283.
- [18] 崔萍,安慧,张楠,等.番茄枯萎病病原菌鉴定与巧抗菌筛选[J].西南农业学报,2013,26(3):1038-1043.
- [19] 刘晖,郑是琳,黄艳萍.番茄枯萎病生理小种及其生物学特性研究初报[J].山东农业大学学报,1991,22(4):356-360.
- [20] 郑贵彬,王发科.西安地区番茄枯萎病尖孢镰刀菌的生理型鉴定[J].植物病理学报,2000,30(3):30-31.
- [21] CHANG Y D, DU B, LING W, et al. A study on the pathogen species and physiological races of tomato *Fusarium* wilt in Shanxi, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(6): 1380-1390.