

新疆喀什地区甜瓜根腐病病原菌及其致病性

赵梦娟^{1,2}, 周婷婷², 韩盛², 古勤生³, 吴会杰³, 麦合木提江·米吉提¹,
张泽一¹, 美热邦·牙克甫⁴, 玉山江·麦麦提²

(1. 新疆农业大学农学院·农林有害生物监测与安防重点实验室 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆维吾尔自治区农业科学院植物保护研究所·农业农村部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室 乌鲁木齐 830091; 3. 中国农业科学院郑州果树研究所 郑州 450009; 4. 新疆维吾尔自治区农业技术推广总站 乌鲁木齐 830049)

摘要:为明确新疆喀什地区伽师县甜瓜根腐病病原菌种类及致病性,对该地区的甜瓜根腐病样品进行采集、病原分离与鉴定,通过组织分离法分离纯化病原菌,并完成柯赫氏法则验证,结合形态学特征和多基因(ITS+TEF1- α +RPB2)系统发育分析鉴定分离菌株。结果显示,伽师县甜瓜根腐病原菌主要为镰状孢新赤壳菌(*Neocosmospora falciformis*)、大豆镰刀菌(*Fusarium glycines*)和腐皮新赤壳菌(*N. solani*)。其中,菌株 Z3、Z11 和 Z27 致病性强,将其接种至同一甜瓜品种测定致病力,均能显著降低甜瓜植株的根长、株高、茎鲜质量和根鲜质量,病情指数分别为 68、84 和 74。菌株 Z11(*F. glycines*)的致病力最强。首次鉴定出镰状孢新赤壳菌和大豆镰刀菌为新疆甜瓜根腐病的致病病原,丰富了甜瓜根腐病的病原学研究,为甜瓜根腐病的诊断、防治以及抗病育种奠定了理论基础。

关键词:甜瓜;根腐病;镰状孢新赤壳菌;大豆镰刀菌;致病力测定

中图分类号:S652

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2025)07-025-09

Root rot pathogens of melon and their pathogenicity in Kashi, Xinjiang

ZHAO Mengjuan^{1,2}, ZHOU Tingting², HAN Sheng², GU Qinsheng³, WU Huijie³, Maihemutijiang·Mijiti¹,
ZHANG Zeyi¹, Meirebang·Yakepu⁴, Yushanjiang·Maimaiti²

(1. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University/Key Laboratory of Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests, Urumqi 830052, Xinjiang, China; 2. Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Oasis, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Urumqi 830091, Xinjiang, China; 3. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; 4. Xinjiang Uyghur Autonomous Region Agricultural Technology Extension Station, Urumqi 830049, Xinjiang, China)

Abstract: In order to clarify the pathogen species and their pathogenicity of melon root rot in Gashi county, Kashgar region, Xinjiang. Samples of melon root rot were collected, pathogen isolated and identification. The pathogens were isolated and purified by tissue isolation method, and veriflicated by Koch's law. Then pathogens were identified by combining morphological characteristics and phylogenetic analysis based on multi-loci (ITS+TEF1- α +RPB2). The results showed that the pathogens of melon root rot in Gashi county were mainly *Neocosmospora falciformis*, *Fusarium glycines* and *N. solani*. Among them, strains Z3, Z11 and Z27, with high pathogenicity, were inoculated on the same melon variety to determine the pathogenicity. The results demonstrated that these three strains significantly reduced the root length, plant height, stem mass and root mass of melon seedlings, with the disease indexes of 68, 84 and 74 for Z3, Z11 and Z27, respectively. Strain Z11 (*F. glycines*) had the strongest pathogenicity. In this study, *N. falciformis* and *F. glycines* were identified for the first time as pathogens of melon root rot in Xinjiang, which enriched the etiology of melon root rot and provided a theoretical basis for the diagnosis, control and resistance breeding of melon root rot.

Key words: Melon; Root rot; *Neocosmospora falciformis*; *Fusarium glycines*; Pathogenicity test

收稿日期:2025-02-08;修回日期:2025-03-19

基金项目:新疆维吾尔自治区重大专项(2023A02009)

作者简介:赵梦娟,女,在读硕士研究生,研究方向为瓜类作物病虫害防治。E-mail:810776916@qq.com

通信作者:玉山江·麦麦提,男,研究员,主要从事瓜类作物病虫害防治研究。E-mail:yushanjiang@xaas.ac.cn

甜瓜(*Cucumis melo* L.)是葫芦科黄瓜属的一种一年生蔓性草本植物^[1],因具有较高的营养价值和经济价值而被广泛种植。近10年新疆甜瓜种植面积维持在4万hm²以上,产量维持在200万t以上,占全国甜瓜产量的16%左右,在全国排名第二。2023年新疆甜瓜种植面积约4.584万hm²,其中以吐鲁番地区和喀什地区为主要种植区,喀什地区的甜瓜种植面积达2.22万hm²,约占新疆甜瓜种植总面积的一半,在种植规模上具有明显优势^[2-3]。近年来,由于常年的连作,喀什地区伽师县的甜瓜生产面临着根腐病、枯萎病等土传病害的严重困扰。这些病害难以通过传统方法有效根除,对甜瓜产业的健康发展造成重大威胁。

甜瓜根腐病通常由多种病原菌复合侵染引起,目前我国已报道的能引起甜瓜根腐病的病原菌主要包括尖孢镰刀菌甜瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, FOM)、腐皮镰孢菌(*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.)、黑点根腐病菌(*Monosporascus cannonballus*)以及黑腐病菌(*Thielaviopsis basicola*)^[4-8]。国外报道的引起甜瓜根腐病的病原菌为镰状镰刀菌(*Fusarium falciforme*)、镰状孢新赤壳菌(*Neocosmospora falciformis*)和层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)等^[9-11]。

20世纪80年代末,新疆喀什地区巴楚县首次发现了甜瓜根腐病。该病害迅速传播至周边县市,特别是疏附县和疏勒县,重病田的发病率达100%。经鉴定,导致该病的致病病原为腐皮镰刀菌(*F. solani*)^[12]。2010年,康锋等^[13]证实造成昌吉地区甜瓜根腐病的病原也是腐皮镰刀菌(*F. solani*)。目前,关于新疆甜瓜根腐病及其主要病原菌的研究相对较少,新疆甜瓜主产区——喀什地区伽师县尚未见有关甜瓜根腐病及其病原菌的系统鉴定报道。为了明确新疆喀什地区伽师县甜瓜根腐病病原菌的分类地位和致病力,笔者对在伽师县采集的病样进行病原菌的分离纯化,通过形态学鉴定及多基因联合分析和柯赫氏法则验证,鉴定引起伽师县甜瓜根腐病的主要致病菌种类,分析其致病力,以期对甜瓜根腐病的准确诊断、有效防治以及抗病育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

20份甜瓜病样于2023年8月采自新疆喀什地区伽师县甜瓜种植地,采集具有明显腐烂症状的甜

瓜植株地下部分(包括根和部分茎部)作为待测样品,4℃保存。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)、燕麦琼脂培养基(OA)、合成低营养培养基(SNA),均购自新疆鼎枫生物科技有限公司。

甜瓜品种为新密杂11号(86-1),属厚皮中晚熟类型,购自于昌吉市金土地种子有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化 取甜瓜病株的根、茎部病变组织,用自来水冲洗10 min,晾干表面水分。采用常规组织分离法^[14]进行病原菌的分离和纯化:在无菌操作台切取甜瓜病健交界处5 mm×5 mm的样本,依次用75%乙醇消毒30 s、无菌水漂洗3次、2%次氯酸钠消毒1 min,再用无菌水冲洗3次,除去表面多余的无菌水并置于灭菌滤纸上干燥。随后,将根茎组织(每皿4块)放置于PDA培养基上,每个处理重复3次。28℃恒温暗培养3 d后,挑取菌落边缘菌丝进行纯化,纯化多次直至菌落单一且形态一致,获得纯培养物。根据采集年份、地点和每株病样的分离数量对获得的纯化株系进行命名和编号,并将其保存于新疆农业科学院植物保护研究所瓜类作物病虫害综合防控创新团队实验室。

1.2.2 分离菌株的柯赫氏验证 参照何苏琴等^[6]采用的胚根接种法进行致病性测定。种子首先用3%次氯酸钠浸泡1 min,并用灭菌水反复冲洗干净,放入垫有灭菌滤纸的培养皿中于28℃恒温箱中催芽,挑选胚根长约5 mm的发芽种子,移入直径为90 mm的放有湿润灭菌滤纸的培养皿中。从纯化获得的菌株中选3株代表性菌株接种于PDA培养基上,取直径为5 mm的菌饼贴接到选取的胚根上,随后在28℃黑暗环境中保湿培养,每天观察并拍照记录,直至表现症状,以正常培养的植株为对照。每个菌株接种10粒发芽种子,3次重复。按照上述步骤从发病部位再次分离病原体,然后将重新分离得到的真菌与原始接种的真菌进行比较,根据形态学特征和*TEF1-α*序列确定病原菌。

1.2.3 病原菌形态学鉴定 将通过柯氏验证为病原菌的菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、燕麦琼脂培养基(OA)和合成低营养培养基(SNA)3种培养基上。在分离纯化的菌株平板上打取直径为5 mm的菌饼,分别接种到PDA和OA培养基上,28℃恒温暗培养5 d,观察并拍照记录菌落的生长特征,包括菌落颜色和气味等;接种到SNA

培养基用于观察分生孢子梗、大型分生孢子等形态学结构。在尼康 Digital Sight 10 正置微分干涉显微镜和尼康 SMZ 1500 体视显微镜下,以水为浮载剂制片观察其形态学特征并拍照记录。每个特征值至少测量 30 个数据。

1.2.4 病菌多基因联合分析 根据菌落生长特征和形态学结构对病原菌进行特征观察,并通过分子生物学技术进一步鉴定。采用 CTAB 法^[15]提取于 PDA 培养基上 28℃暗培养 7 d 的菌丝体(50~60 mg)DNA。以提取的基因组 DNA 作为模板,分别用引物 ITS1/ITS4、EF1/EF2 和 5f2/7cr 对内转录间隔区(ITS)、翻译延伸因子 1- α (*TEF1- α*)和 RNA 聚合酶 II 第二大亚基(*RPB2*)等目的基因进行 PCR 扩增(表 1),以 ddH₂O 作为对照组模板^[16]。PCR 反应体系为 25 μ L,包括 1 μ L 的正向和反向引物(10 pmol $\cdot\mu$ L⁻¹),12.5 μ L 的 2 $\times$ Taq 聚合酶(Dream Taq Green DNA Polymerase),9.5 μ L 的 ddH₂O 和 1 μ L 的基因组 DNA(100 ng $\cdot\mu$ L⁻¹)。PCR 扩增条件参照 O'Donnell 等^[17-18]的报道。使用 1.0%的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检测,合格的产物送至新疆有康生物有限公司进行双向测序。

表 1 ITS、*TEF1- α* 和 *RPB2* 基因 PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR amplification of ITS, *TEF1- α* and *RPB2* genes

目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>TEF1-α</i>	EF-1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC
	EF-2	GGARGTACCAGTSATCATG
<i>RPB2</i>	5f2	GGGGTGATCAGAAGAAGGC
	7cr	CCCATGGCTTGTTTGCCCAT

在 GenBank 中使用 NCBI 的 BLAST-n 工具对测序获得的序列进行比对。根据 ITS、*TEF1- α* 和 *RPB2* 等不同基因片段的 BLAST 检索结果,从 NCBI 数据库中选取具有代表性的序列构建多基因片段数据集,采用邻接法(N-J 法)通过 MEGA 11 构建系统发育树进行系统发育分析。

1.2.5 病原菌的致病力测定 孢子悬浮液的制备:在纯化的菌株菌落边缘取直径为 5 mm 的 10 个菌饼,放入盛有马铃薯葡萄糖液体培养基的三角瓶中,封口后置于恒温摇床(25℃,180 r $\cdot$ min⁻¹)振荡培养 72 h,用 4 层纱布过滤菌丝以获得孢子悬浮液。将孢子悬浮液离心后弃去培养液,用无菌水将孢子

浓度调至 5 $\times$ 10⁶ 个 $\cdot$ mL⁻¹。

试验于 2024 年 5 月在新疆农业科学院植物保护研究所气候培养室内进行,以清水为对照,采用完全随机处理,参照周红梅等^[19]浸根接种的方法,将试验所需要用到的种子首先用 3%次氯酸钠浸泡 1 min,并用灭菌水反复冲洗干净,放入垫有灭菌滤纸的培养皿中 28℃恒温箱中催芽,待胚根长出 5 mm 时播种于装有灭菌珍珠岩的 72 孔穴盘中,子叶展平期(2 叶 1 心)拔出幼苗,用水轻轻洗净根部,在 5 $\times$ 10⁶ 个 $\cdot$ mL⁻¹ 的孢子悬浮液中浸根 15 min 后,移栽至装有灭菌营养土的塑料营养钵(6.5 cm $\times$ 6.5 cm)中。每个菌株接种 10 株幼苗,设置 3 次重复,接种的幼苗均置于人工气候箱中,白天 25~28℃,夜间 20~25℃。

接种后第 7 天开始观察并记录植株表现,接种第 14 天时,倒扣轻轻去除花盆,用清水反复冲洗甜瓜幼苗,再用滤纸吸干植株表面水分。用直尺和千分之一天平测量 3 种菌株处理下的生物量(根长、株高、鲜质量、干质量),每个菌株处理统计 10 株幼苗,3 次重复,每种菌株处理共统计 30 株幼苗,并采用单因素方差分析确定均值之间的差异显著性。参考周婧等^[20]的评级标准评估幼苗/根系症状,结合实际略有修改。0 级:幼苗发育良好,根系无明显症状;1 级:幼苗发育迟缓,根茎处开始出现浅褐色病变,侧根数量稍微减少;2 级:幼苗生长受阻,根茎处褐色病变加深,侧根数量明显减少;3 级:幼苗出现萎蔫症状,根茎处出现褐色缢缩变黑,并开始向根尖蔓延,侧根大量减少;4 级:幼苗死亡,根部整体坏死,基本无侧根;5 级:幼苗于 2 周内死亡。

病情指数 = $\sum$ (各病情等级数 $\times$ 该病情植株数)/(最高病情等级数 $\times$ 调查总株数) $\times$ 100^[21]。

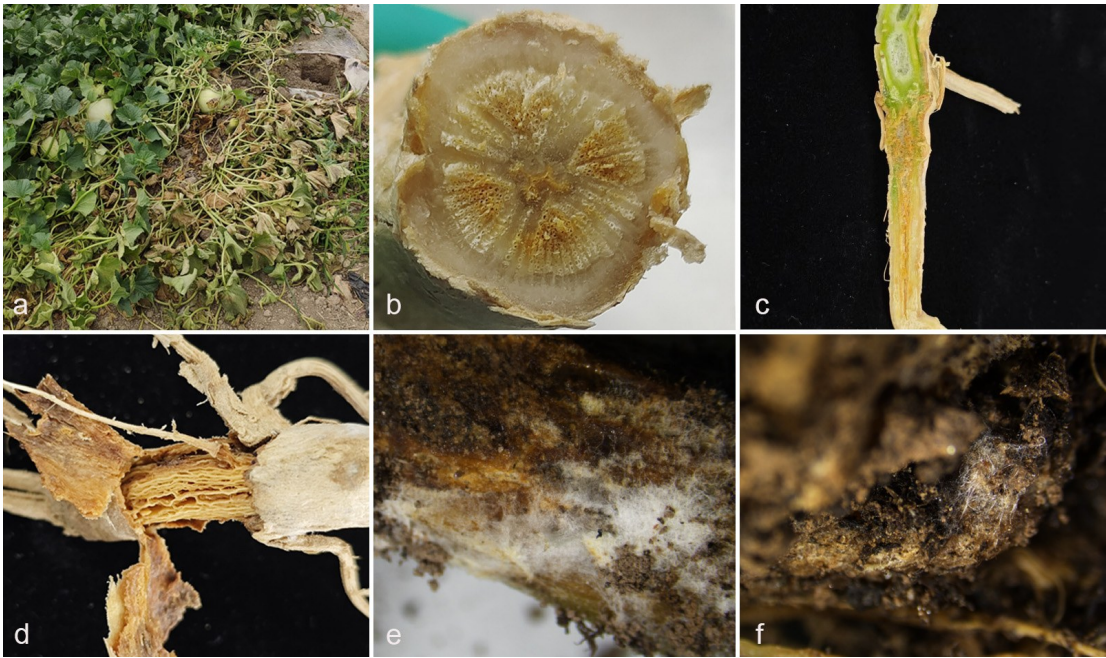
1.3 数据分析

使用 Excel 2021 整理数据,采用 IBM SPSS Statistics 27 软件对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 甜瓜根腐病症状

甜瓜感染根腐病后,早期症状表现为部分叶片轻微黄化和失水萎蔫,萎蔫植株于早晚时可恢复正常。随着病情加重,整株萎蔫枯死且不再恢复。在坐果后期,病情达到高峰,植株整株萎蔫干枯死亡(图 1-a)。从外部可见根茎部呈现褐色轻微腐烂,剖开茎基部时,可见部分病株的维管束变褐色,但病变不向茎蔓扩展(图 1-b~c)。有部分根部腐烂较



注:a. 甜瓜根腐病田间症状;b~c. 根茎部横、纵切面维管束变褐;d. 根表皮腐烂;e~f. 根部表面菌丝。

Note: a. Field symptoms of root rot of melon; b-c. Browning of vascular bundles in transverse and longitudinal sections of roots and stems; d. Root epidermal rot; e-f. Mycelium on root surface.

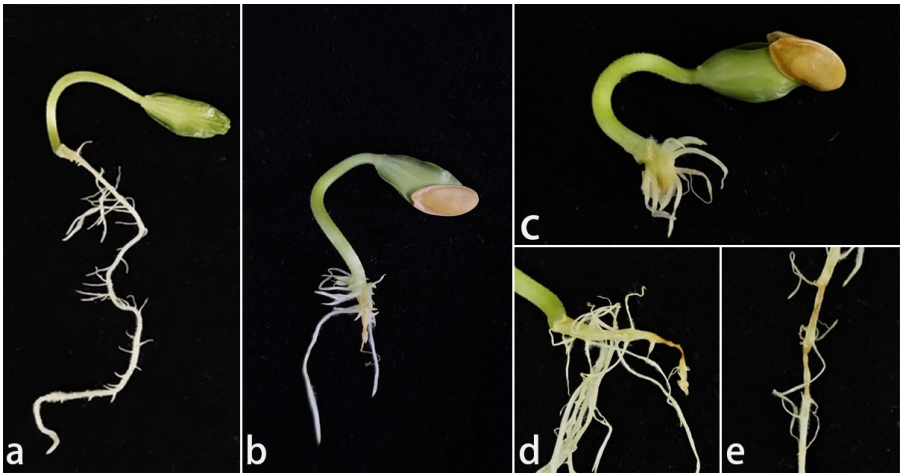
图 1 甜瓜根腐病发病症状
Fig. 1 Symptoms of root rot in melon

为严重,维管束已纤维化,外、中皮层消失,只剩一层外表皮,稍微用力即可轻松剥落(图 1- d)。部分根部样品采集时根表面还有白色菌丝(图 1- e~f)。

2.2 病原菌的分离纯化和致病性鉴定

从 20 份甜瓜病样中共分离纯化出 48 个菌株,将其分别编号为 Z1~Z48。根据菌落及显微特征,将其归为 3 个形态型,每个形态型选择其中 1 株典型

菌株作为代表进行致病性测定。结果显示,菌株 Z3、Z27、Z11 在接种甜瓜胚根 3 d 后表现出典型的根腐病症状。症状表现为:对照组表现正常(图 2-a);接种菌株 Z3 的甜瓜胚根接种部位表现出轻微褐色坏死,须根减少或成簇状(图 2-b);接种菌株 Z27 的甜瓜胚根接种部位生长受到抑制,须根减少或成簇状,无明显主根(图 2-c);接种菌株 Z11 的甜瓜胚根出现



注:a. 对照组;b. 接种 Z3 菌株;c. 接种 Z27 菌株;d~e. 接种 Z11 菌株。

Note: a. Control; b. Inoculation with strain Z3; c. Inoculation with strain Z27; d-e. Inoculation with strain Z11.

图 2 甜瓜胚根接种 3 种真菌后的发病症状
Fig. 2 Symptoms of melon embryonic roots after inoculation with three species of fungi

坏死,主根和须根均停止生长(图 2-d~e)。从接种病菌发病的甜瓜根部组织中再次分离出与原接种菌株一致的分离物。鉴定结果表明,Z3、Z27、Z11 为新疆喀什地区伽师县甜瓜根腐病的致病菌。

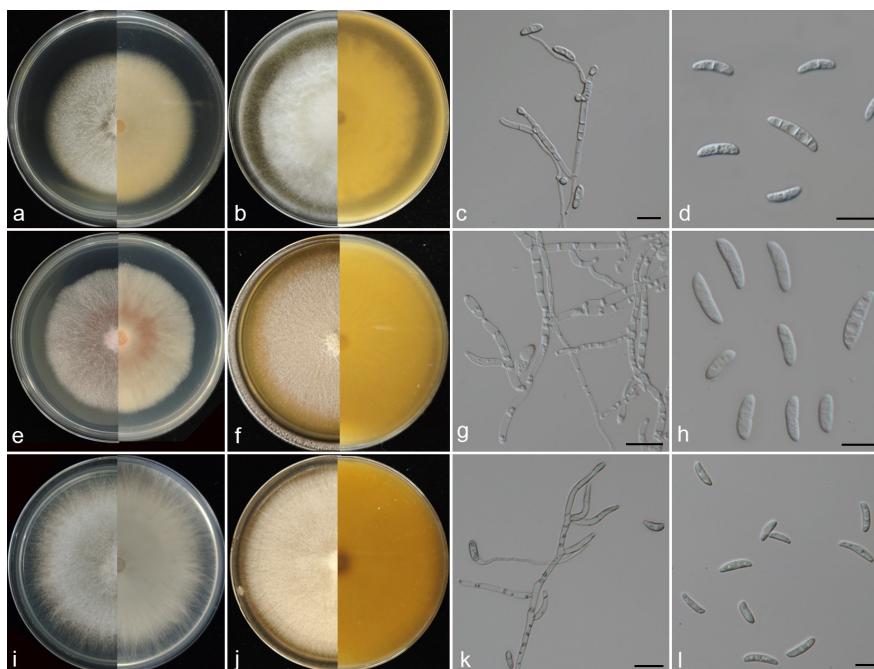
2.3 甜瓜根腐病致病菌形态特征

Z3 菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后,菌落为规则的圆形,边缘整齐,具丰富的白色绒毛状气生菌丝,培养基背面为淡黄色。PDA 培养基上只产生少量的小型分生孢子(图 3-a),会产生特殊气味。在 24 °C 条件下,PDA 培养基上菌落的平均径向生长率为 $7.5\sim 8.0\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 3-a)。在 OA 培养基上菌丝更为丰富,菌落中央有白色的菌丝堆积隆起呈圆形,平均径向生长率为 $7.8\sim 8.5\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 3-b)。在 SNA 培养基上可产生大型分生孢子。大型分生孢子散生于气生菌丝上,呈较细长的梭形,两端渐尖,具有 1~4 个隔膜,大小为 $(18.9\sim 41.9)\mu\text{m}\times(5.1\sim 5.9)\mu\text{m}$;小型分生孢子着生于单生瓶梗上,在瓶梗顶端聚成球团,单胞,卵圆形或椭圆形,具有 0~1 个隔膜,大小为 $(12.8\sim 18.8)\mu\text{m}\times(2.5\sim 5.0)\mu\text{m}$ 。分生孢子梗从菌丝侧枝或末端直接分化,顶端形成单瓶梗(图 3-c~d)。

Z11 菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后,菌落形

状呈圆形,边缘呈不规则锯齿状或丝状,菌丝为白色,中央略带淡紫色,随着培养时间延长,菌落中央的紫色略有加深。PDA 培养基上可直接产孢,但未见大型分生孢子,有特殊刺激性气味。在 24 °C 条件下,PDA 培养基上菌落的平均径向生长率为 $8.5\sim 9.0\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 3-e)。在 OA 培养基上菌丝呈均匀白色且湿润,菌落紧贴培养基,有特殊气味,平均径向生长率为 $9.0\sim 9.8\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 3-f)。病原菌形态特征:大型分生孢子弯曲,呈纺锤形,两端钝尖,具有 2~4 个隔膜,大小为 $(22.1\sim 37.9)\mu\text{m}\times(4.1\sim 5.9)\mu\text{m}$;小型分生孢子主要通过单瓶梗产生,呈椭圆形或卵圆形,具有 0~1 个隔膜,大小为 $(10.8\sim 19.1)\mu\text{m}\times(2.5\sim 4.0)\mu\text{m}$ 。分生孢子梗直接从菌丝分化,短小且密集,瓶梗单生呈近圆柱形(图 3-g~h)。

Z27 菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后,菌落形状呈圆形,菌丝体为白色絮状,朝四周呈放射形生长,具丰富的白色气生菌丝。PDA 培养基上可直接产生大、小型分生孢子,无特殊气味。在 24 °C 条件下,PDA 培养基上菌落的平均径向生长率为 $9.0\sim 9.5\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 3-i)。OA 培养基上菌丝呈均匀白色,无特殊气味,菌丝体较 PDA 更丰富,平均径向生长率为 $9.2\sim 10.2\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ (图 3-j)。病原真菌形态



注:a~d 为 Z3 菌株;a. PDA 培养基;b. OA 培养基;c. 分生孢子梗;d. 分生孢子。e~h 为 Z11 菌株;e. PDA 培养基;f. OA 培养基;g. 分生孢子梗;h. 分生孢子。i~l 为 Z27 菌株;i. PDA 培养基;g. OA 培养基;k. 分生孢子梗;l. 分生孢子。标尺大小 bar=20 μm 。

Note: a-d for Z3 strain; a. PDA medium; b. OA medium; c. Conidiophores; d. Conidia; e-h for Z11 strain; e. PDA medium; f. OA medium; g. Conidiophores; h. Conidia; i-l for Z27 strain; i. PDA medium; g. OA medium; k. Conidiophores; l. Conidia. Scales size bar=20 μm .

图3 病原菌菌落及形态特征

Fig. 3 Pathogens colonies and morphological characteristics

特征:大型分生孢子呈镰刀形或长柱形,稍弯曲,两端渐尖,通常具有 3~5 个横隔膜,大小为(22.1~31.9) $\mu\text{m}\times(4.1\sim6.1)\mu\text{m}$;小型分生孢子呈椭圆形或卵圆形,无明显隔膜,大小为(10.8~19.1) $\mu\text{m}\times(2.5\sim4.0)\mu\text{m}$ 。分生孢子梗细长,直接生于菌丝或短侧枝上,瓶状顶端开口产孢,颈部细长(图 3-k~l)。

2.4 系统发育分析

笔者成功获得 Z3、Z11 和 Z27 菌株的 ITS、*TEF1- α* 和 *RPB2* 基因,获得 Z3 菌株的目的基因长度为 547、708 和 965 bp,获得 Z11 菌株的目的基因长度为 532、672 和 952 bp,获得 Z27 菌株的目的基因长度为 566、726 和 944 bp。将 3 株菌株的 ITS 序列与 GenBank 上的序列进行 Blast 比对,发现 Z3 菌株与 *N. falciforme* CBS 475.67 (MH859035)、*N. floridanum* NRRL 62628 (KC 691563) 和 *N. suttonianum* NRRL 32858 (NR_172216) 的同源性均在 99% 以上;Z11 菌株与 *N. foetens* CBS 110286 (NR_159865)、*N. inflexum* NRRL 20433 (NR_152941) 和 *F. andiyazi* MRC 6122 (KR909401) 的同源性均在 99% 以上;Z27 菌株与 *N. rubicola* CBS 101018 (NR_154227) 和 *N. gamtoosense* CBS 146502 (MW 173063) 的同源性均在 99% 以上,因此 ITS 序列不能将以上 3 种菌株鉴定到种。

基于 *TEF1- α* 和 *RPB2* 序列与 GenBank 中 *Fusarium* 属和 *Neocosmospora* 属的相关序列(表 2)联合构建多基因系统发育树。结果表明,菌株 Z3 与 *N. falciformis* (CBS 141594) 聚在系统发育树的同一

表 2 下载的用于多基因系统发育分析物种、菌株及序列
Table 2 Downloaded species, strains and sequences for multigene phylogenetic analysis

菌株 Strain	菌株号 Strain number	GenBank 登录号 GenBank accession number	
		<i>TEF1-α</i>	<i>RPB2</i>
<i>Neocosmospora falciformis</i>	CBS 475.67	LT 906669	LT 960558
<i>Neocosmospora falciformis</i>	CBS 141593	KF 597797	KF 680011
<i>Neocosmospora falciformis</i>	CBS 141594	KF 597814	KF 680005
<i>Neocosmospora kurunegalenis</i>	CBS 119599	DQ 247511	LR 583838
<i>Neocosmospora martii</i>	CBS 115659	JX 435156	JX 435256
<i>Neocosmospora martii</i>	CBS 142423	LT 746216	LT 746329
<i>Neocosmospora noneumartii</i>	CBS 115658	LR 583630	LR 583852
<i>Neocosmospora pisi</i>	CBS 123669	LR 583636	LR 583862
<i>Neocosmospora solani</i>	CBS 101018	LR 583651	LR 583878
<i>Neocosmospora solani</i>	CBS 208.29	LR 583650	LR 583877
<i>Neocosmospora tonkinensis</i>	CBS 115.40	LT 906672	LT 960564
<i>Fusarium curvatum</i>	CBS 238.94	MH 484984	MH 484893
<i>Fusarium glycines</i>	CBS 144745	MH 485032	MH 484941
<i>Fusarium acutatum</i>	CBS 402.97	KR 071754	KT 154005
<i>Fusarium fujikuroi</i>	CBS 221.76	AB 725605	KU 604255
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS 144134	MH 485044	MH 484953
<i>Fusarium oxysporum</i>	CBS 144135	MH 485045	MH 484954
<i>Fusarium ananatum</i>	CBS 118516	MT 010996	MT 010966
<i>Fusarium nirenbergiae</i>	CBS 840.88	MH 484978	MH 484887
<i>Dactylonectria torresensis</i>	CBS 129086	JF 735870	KM 232347

分枝,菌株 Z11 与 *F. glycines* (CBS 144745) 聚在系统发育树的同一分枝,菌株 Z27 与 *N. solani* (CBS 101018) 聚在系统发育树的同一分枝(图 4)。

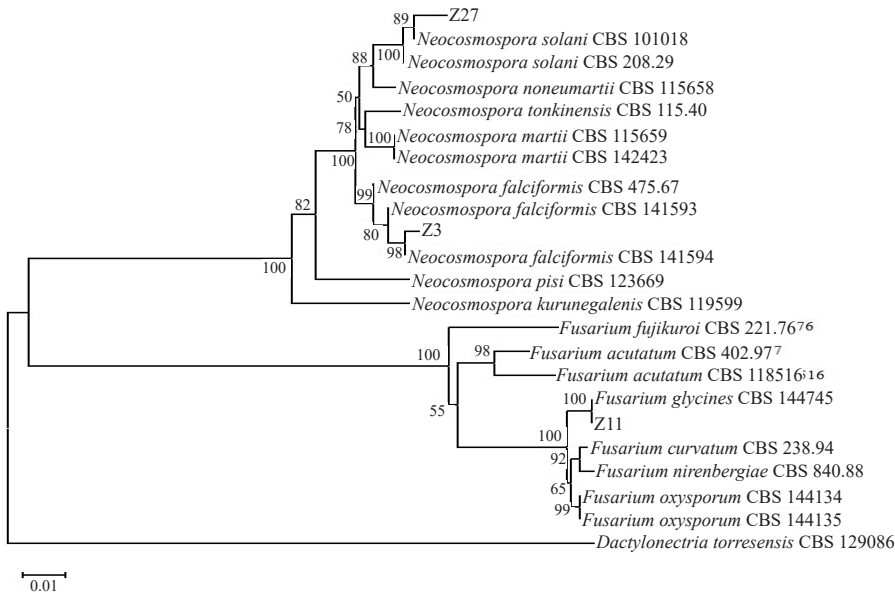
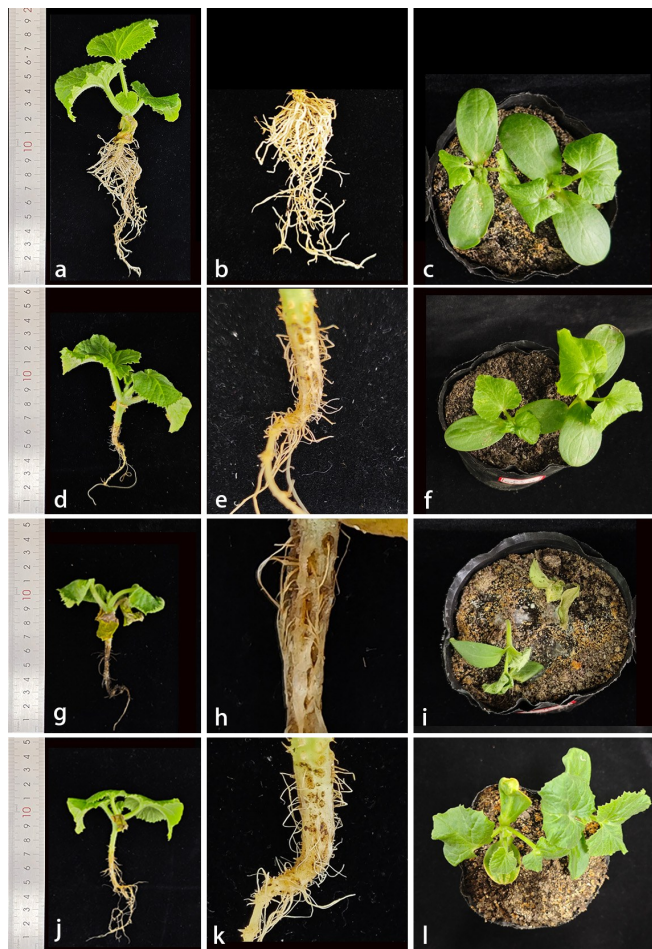


图 4 基于 *TEF1- α* 和 *RPB2* 构建的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on *TEF1- α* and *RPB2*

2.5 病菌致病力测定

采用浸根接种法,将分离得到的代表菌株 Z3、Z11 和 Z27 接种于甜瓜幼苗上。甜瓜幼苗在接种 Z11 菌株 7 d 后出现轻微萎蔫症状,接种 10 d 后,大部分叶片出现萎蔫症状;接种 14 d 后,表现出黄叶、萎蔫甚至死亡。将甜瓜幼苗拔出,可见甜瓜幼苗的根部至茎基部表皮已基本腐烂,75%的根系已坏死,丧失吸水等基本功能,整株幼苗完全萎蔫。在接种 Z3 和 Z27 菌株 7 d 后并未出现明显的病症,植株整体看起来较健康;接种 14 d 后,植株表现出轻微萎蔫症状,出现部分黄叶,生长迟缓,将植株根部拔起,发现植株根系出现 25%~50%的坏死,须根大量减少(图 5)。对照组(清水处理)幼苗正常生长,无萎蔫症状。重新分离接种的病原菌均获得与接种时相同的病原菌;清水对照(CK)未分离到病原菌。



注:a~c. 对照组 14 d;d~f. 接种 Z3 菌株 14 d;g~i. 接种 Z11 菌株 14 d;j~l. 接种 Z27 菌株 14 d。

Note: a-c. Control 14 d; d-f. Inoculated with Z3 strain 14 d; g-i. Inoculated with Z11 strain 14 d; j-l. Inoculated with Z27 strain 14 d.

图 5 甜瓜幼苗接种 3 种病原菌后的发病症状
Fig. 5 Symptoms of melon seedlings after inoculation with three pathogens

由表 3 可知,接种 3 株真菌后幼苗发病率均为 100%,其中接种 Z11 菌株的病情指数为 84,高于 Z3 和 Z27 菌株,表明 Z11 菌株对甜瓜幼苗致病力最强,Z27 菌株次之,Z3 菌株最弱。

表 3 分离的 3 株真菌对甜瓜致病力测定
Table 3 Determination of pathogenicity of three isolated fungal strains on melon

菌株 Strain	发病率 Incidence disease rate/%	病情指数 Disease index (DI)
CK	10	4
Z3	100	68
Z11	100	84
Z27	100	74

通过测定甜瓜幼苗的茎长、根长及生物量等指标,探究 Z3、Z11、Z27 等 3 株病原菌接种 14 d 对甜瓜幼苗生物量影响的差异性。由表 4 可知,与对照组(CK)相比,3 株真菌对幼苗生长均表现出显著的抑制作用,且不同菌株间作用程度存在差异。CK 组茎长、根长、茎鲜质量、根鲜质量、茎干质量和根干质量均显著高于所有病原菌处理组。其中,Z11 对茎长和根长的抑制作用最强,均显著低于 Z3 和 Z27。Z3、Z27 的茎鲜质量和茎干质量均显著高于 Z11,但三者的根鲜质量和根干质量均无显著差异。综上,Z3、Z11、Z27 等 3 株真菌均显著抑制甜瓜幼苗生长,其中 Z11 的抑制作用最强,而 Z3 与 Z27 对部分指标(如茎鲜质量、茎干质量)的抑制作用相对较弱。以上数据表明,上述 3 株根腐病病菌对宿主植物的影响存在特异性,可能与菌株代谢产物或侵染能力差异有关。

3 讨论与结论

近年来,新疆甜瓜主产区喀什地区伽师县的甜瓜根腐病发生日益严重,已成为威胁当地甜瓜产业的重要土传病害。为明确该地区甜瓜根腐病病原菌种类,笔者针对在伽师县采集的患病甜瓜植株进行了病原菌的分离鉴定及致病力测定。结果表明,该地区甜瓜根腐病病菌分离株 Z3、Z11 及 Z27 为致病菌。经柯赫氏法则验证,结合形态特征和多基因序列联合分析,明确了分离株 Z3 为镰状孢新赤壳菌(*N. falciformis*)、Z11 为大豆镰刀菌(*F. glycines*)、Z27 为腐皮新赤壳菌(*N. solani*)。尽管许多研究表明,尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 是甜瓜根部病害的主要病原体,但在本研究中喀什地区伽师县的甜瓜病株中未检测到该菌。

新赤壳菌属(曾被称为腐皮镰刀菌复合种)真

表 4 分离的 3 株真菌接种 14 d 后对甜瓜幼苗生长的影响

Table 4 Effects of three isolated strains of fungi on the growth of melon seedlings after inoculation 14 d						
处理 Treatment	茎长 Stem length/cm	根长 Root length/cm	茎鲜质量 Stem fresh mass/g	根鲜质量 Root fresh mass/g	茎干质量 Stem dry mass/g	根干质量 Root dry mass/g
CK	13.63±1.23 a	8.02±1.01 a	2.76±0.29 a	1.10±0.40 a	0.21±0.04 a	0.07±0.02 a
Z3	7.33±1.16 b	5.99±0.92 b	1.70±0.43 b	0.27±0.16 b	0.16±0.02 b	0.03±0.01 b
Z11	4.69±0.44 d	4.32±0.52 c	1.36±0.39 c	0.15±0.04 b	0.15±0.02 c	0.03±0.01 b
Z27	6.06±0.89 c	5.62±0.50 b	1.67±0.50 b	0.22±0.07 b	0.16±0.02 b	0.03±0.01 b

注:不同小写字母表示不同菌株处理在 0.05 水平上具有显著差异。
Note: Different lowercase letters indicate that the difference is significant among different strain treatments at 0.05 level.

菌能够引起多种严重的植物病害,如马铃薯干腐病^[22]、柑橘根腐病^[23]、大豆猝倒病^[24]等,造成严重的经济损失。镰状孢新赤壳菌(*N. falciformis*)最初被命名为镰状头孢子菌(*Cephalosporium falciforme*),这一名称是在 1951 年由 Carrión^[25]提出的。后来,该菌被重新命名为镰状孢镰刀菌(*F. falciforme*),并归入镰刀菌属^[26]。新赤壳菌属在 2015 年重新启用,截至 2019 年该属共发现不少于 66 个物种^[27]。国际上已报道该菌可引起甜瓜根腐病,González 等^[10]于 2020 年首次报道 *N. falciformis* 可导致西班牙甜瓜枯萎病和根腐病;2023 年 Sabahi 等^[28]从伊朗的甜瓜根腐病植株中分离出了 *N. falciformis*,并通过试验证明 *N. falciformis* 可引起伊朗甜瓜和其他葫芦科作物(包括西瓜、黄瓜、西葫芦、南瓜和葫芦)的整株萎蔫和根腐症状。国内仅在薯蓣(山药)上报道该菌^[29],未见甜瓜上关于该菌的报道,而笔者在新疆喀什地区的甜瓜根腐病样品中分离获得该菌。这是该菌在国内甜瓜上的首次发现,并通过致病力测定验证该菌可导致甜瓜根腐病,为新疆甜瓜根部病害的针对性防控奠定了基础。

腐皮新赤壳菌(*N. solani*)最早于 1842 年被描述为腐皮镰刀菌(*F. solani*),2015 年 Lombard 等^[27]对其进行了重新鉴定,将其命名为腐皮新赤壳菌。中国甜瓜上关于该菌的记录最早由戴芳澜^[30]发现并报道。该菌在新疆地区的报道始于 2004 年杨来新等^[12]。随后,2010 年康锋等^[13]进一步研究昌吉地区的甜瓜根腐病,明确其病原菌为腐皮镰刀菌(*F. solani*)。本研究也发现腐皮新赤壳菌(*N. solani*)为甜瓜根腐病的致病菌,与前人的研究结果一致。关于大豆镰刀菌(*F. glycines*)的研究报道较少,仅有 Lombard 等^[31]于 2019 年报道,在意大利的罗勒上和南非的大豆上分离到该菌。本研究在新疆喀什地区的甜瓜根腐病样品中分离获得该菌,这是该菌在国内首次被发现,并通过致病力测定验证该菌可导致甜瓜根腐病。

综上所述,笔者结合形态特征及基因序列分析结果,鉴定到新疆喀什地区伽师县甜瓜根腐病病原菌为镰状孢新赤壳菌(*N. falciformis*)、大豆镰刀菌(*F. glycines*)以及腐皮新赤壳菌(*N. solani*)。3 株真菌均能显著降低甜瓜植株的茎长、根长、茎鲜干质量和根干鲜质量,且菌株 Z11 致病力强于菌株 Z3 和 Z27。研究结果为伽师县甜瓜根腐病的早期诊断与针对性的科学防治奠定了基础。

参考文献

[1] 李毅杰,原保忠,别之龙,等.不同土壤水分下限对大棚滴灌甜瓜产量和品质的影响[J].农业工程学报,2012,28(6):132-138.

[2] 国家统计局农村社会经济调查司.中国农村统计年鉴[M].北京:中国统计出版社,2020.

[3] 袁瑞帆,王福红,夏咏.新疆西瓜甜瓜产业发展现状及对策建议[J].食品安全导刊,2024(29):176-179.

[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] 耿丽华,白庆荣,王建设,等.甜瓜镰孢根腐病菌生物学特性研究[J].中国农学通报,2010,26(7):229-232.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 王志慧,霍向东,李江峰,等.哈密淖毛湖主栽甜瓜病原微生物分离及鉴定[J].新疆农业科学,2022,59(5):1223-1230.

[9] SILVA S G A, COSTA M M, CARDOSO A M S, et al. *Fusarium falciforme* and *Fusarium suttonianum* cause root rot of melon in Brazil[J]. Plant Pathology, 2023, 72(4): 721-730.

[10] GONZÁLEZ V, GARCÍA-MARTÍNEZ S, RUIZ J J, et al. First report of *Neocosmospora falciformis* causing wilt and root rot of muskmelon in Spain[J]. Plant Disease, 2020, 104(4): 1256-1258.

[11] NOGUEIRA G D A, CONRADO V S C, DE ALMEIDA FREIRES A L, et al. Aggressivity of different *Fusarium* species causing fruit rot in melons in Brazil[J]. Plant Disease, 2022, 107(3): 886-892.

[12] 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.

- [13] 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.
- [14] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.
- [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] CROUS P W, LOMBARD L, SANDOVAL-DENIS M, et al. *Fusarium*: More than a node or a foot-shaped basal cell[J]. Studies in Mycology, 2021, 98:100116.
- [17] O' DONNELL K, CIGELNIK E, NIRENBERG H I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex[J]. Mycologia, 1998, 90:465-493.
- [18] O' DONNELL K, SUTTON D A, RINALDI M G, et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying *Fusaria* from human and animal infections[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(10):3708-3718.
- [19] 周红梅,毛爱军,张丽蓉,等.黄瓜枯萎病接种方法及抗性遗传的研究[J].华北农学报,2010,25(4):186-190.
- [20] 周婧,高增贵,何秀玲,等.甜瓜枯萎病拮抗内生细菌筛选研究[J].北方园艺,2008(2):225-227.
- [21] BORA T, ÖZAKTAN H, GÖRE E, et al. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(8/9):471-475.
- [22] CARPENTER C W. Some potato tuber-rots caused by species of *Fusarium*[J]. Journal of Agricultural Research, 1915, 5:183-209.
- [23] SANDOVAL-DENIS M, GUARNACCIA V, POLIZZI G, et al. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species[J]. Persoonia, 2018, 40:1-25.
- [24] AOKI T, O' DONNELL K, SCANDIANI M M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*[J]. Mycoscience, 2005, 46(3):162-183.
- [25] CARRIÓN A L. *Cephalosporium falciforme* sp. nov. a new etiological agent of maduromycosis[J]. Mycologia, 1951, 43(5):522-523.
- [26] SUMMERBELL R C, SCHROERS H J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(8):2866-2875.
- [27] LOMBARD L, VAN DER MERWE N A, GROENEWALD J Z, et al. Generic concepts in *Nectriaceae*[J]. Studies in Mycology, 2015(80):189-245.
- [28] SABAH F, BANIHASHEMI Z, MIRTALEBI M, et al. Molecular variability of the *Fusarium solani* species complex associated with *Fusarium* wilt of melon in Iran[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(4):486.
- [29] ZHANG X, LI L R, YANG J Y, et al. Rot on rhizomes and adventitious root of *Dioscorea polystachya* caused by *Fusarium falciforme* in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(5):1544.
- [30] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社,1979.
- [31] LOMBARD L, SANDOVAL-DENIS M, LAMPRECHT S C, et al. Epitypification of *Fusarium oxysporum* - clearing the taxonomic chaos[J]. Persoonia, 2019, 43:1-47.