

西瓜斑枯病病原菌分离鉴定及特异性引物设计

王海艳¹, 张玉阁², 杨 猛², 徐晓竹¹, 金炳奎¹, 刘金宝¹

(1. 潍坊市植物基因组分子育种重点实验室·优奈尔生物科技有限公司 山东潍坊 261100;

2. 郭牌农业西甜瓜研究院·潍坊郭牌农业科技有限公司 山东潍坊 261100)

摘要: 西瓜斑枯病是设施西瓜栽培中的一种重要病害, 长期以来因病原鉴定不明确和缺乏早期诊断技术, 严重限制了生产中对该病害的绿色防控。为解决这一问题, 本研究于 2022—2025 年从山东温室西瓜产区系统采集典型病样, 通过组织分离、柯赫氏法则验证及多基因系统发育分析, 最终明确该病害由瓜类尾孢(*Cercospora citrullina*)引起。进一步基于病原菌保守序列设计特异性引物 Cer-F/Cer-R, 经条件优化可在退火温度 ≥ 69.5 °C 下特异性扩增出 301 bp 条带, 最低检测限达 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 且与 *Alternaria* spp.、*Fusarium* spp.、*Stagonosporopsis* spp.、*Colletotrichum* spp. 等 7 种常见西瓜病原菌均无交叉反应。本研究明确了山东地区西瓜斑枯病的病原为 *C. citrullina*, 并建立了一种适用于早期检测的高特异性、高灵敏度的 PCR 鉴定技术, 可为该病害的田间实时监测与绿色综合防控提供可靠的技术支撑。

关键词: 西瓜; 斑枯病; 病原鉴定; *Cercospora citrullina*; 特异性引物

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)04-042-08

Identification and specific primers design for detection of watermelon spot disease

WANG Haiyan¹, ZHANG Yuge², YANG Meng², XU Xiaozhu¹, JIN Bingkui¹, LIU Jinbao¹

(1. Weifang Key Laboratory of Plant Genome and Molecular Breeding/UNELL Biotechnology Co., Ltd., Weifang 261100, Shandong, China;

2. Guopai Agricultural Watermelon and Melon Research Institute/Weifang Guopai Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Weifang 261100, Shandong, China)

Abstract: Watermelon spot disease, one of the important diseases in greenhouse watermelon cultivation, has been a major constraint on the effective implementation of green control measures due to unclear pathogen identification and lack of early diagnostic techniques. From 2022 to 2025, this study focused on the primary greenhouse watermelon production areas in Shandong, China. Typical watermelon spot samples were systematically collected, and the pathogenic fungus was isolated through tissue separation, further verified for pathogenicity using Koch's postulates, and identified based on morphological characteristics and multilocus phylogenetic analysis. The pathogen was determined to be *Cercospora citrullina*. Specific primers (Cer-F/Cer-R) were designed based on conserved regions of the pathogen's genome. After optimizing reaction conditions, a specific 301 bp fragment was successfully amplified at an annealing temperature ≥ 69.5 °C, with the limit of detection of $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Specificity assays demonstrated no cross-reaction with seven common watermelon pathogens, including *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., and *Stagonosporopsis* spp., *Colletotrichum* spp., confirming high specificity. This study confirms *C. citrullina* was the causal agent of watermelon spot disease in Shandong and establishes a highly specific and sensitive PCR-based detection method, providing technical support for early monitoring and green management of the disease.

Key words: Watermelon; Spot disease; Pathogen identification; *Cercospora citrullina*; Specific primer

西瓜[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai var. *lanatus*]作为葫芦科中具有重要经济价值的作物之一, 全球年产量已超过亿吨, 其中我国是最

大的生产国, 贡献率达 59.29%(FAO), 稳居世界首位。近年来, 设施栽培技术的广泛应用显著提升了种植效率并延长了供应周期, 有效突破了对自然条

收稿日期: 2025-07-15; 修回日期: 2025-09-13

基金项目: 山东省重点研发计划(2024LZGCQY016); 潍坊市科学技术发展计划(2023ZJ1142)

作者简介: 王海艳, 女, 助理研究员, 主要从事西瓜、甜瓜分子育种与病害防控工作。E-mail: why200806@126.com

通信作者: 刘金宝, 男, 农艺师, 研究方向为西瓜分子育种与智慧栽培。E-mail: 1724894426@qq.com

件的依赖。然而,这种集约化模式形成的半封闭微环境(温湿度升高、光照减弱)也为多种病原微生物的繁殖与传播提供了有利条件。研究表明,此类环境严重加剧了西瓜炭疽病、白粉病等传统叶部病害的发生^[1-3]。值得注意的是,土传病害虽可通过嫁接技术实现有效防控,但针对炭疽病、白粉病、细菌性角斑病等叶部病害群体的防治仍面临较大挑战^[4-6]。据田间调查,由于这些病害在发病初期症状高度相似(如病斑褪绿),导致瓜农的误诊率在60%以上,严重影响了防治措施的及时性和准确性。此外,西瓜炭疽病、果斑病等采后病害在贮运过程中引发的果实腐烂问题也造成了严重的经济损失,产量损失可达10%~15%,严重时高达40%以上,甚至绝收^[7-9]。

根据2022—2025年开展的植保调查,在山东省潍坊市设施西瓜主要产区,一种新生病害呈现出明显的暴发趋势。该病害的主要症状表现为子叶、茎蔓、叶片及果实表面出现特异性黑色坏死斑,严重地块的发病率超过75%,严重影响西瓜的生产和贮运。其发病症状与西瓜炭疽病、叶枯病非常相似,然而传统的防治策略在应对该病害时效果不佳。为明确该病害的病原分类地位,本研究采用多相分类鉴定体系,结合病原菌形态学特征、分子系统发育分析以及致病性验证等多种方法进行综合判断。同时,基于病原体基因组序列信息,开发出适用于早期诊断的标记技术。通过构建针对该病害的特异性防控体系,旨在解决当前田间“同症异菌”现象带来的识别困难与防治低效问题,从而为设施西瓜产业的可持续发展提供科学依据和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 病害样本采集与症状记录

本研究于2022—2025年西瓜生长季,在山东省潍坊市西瓜设施栽培主产区以及部分超市,系统开展病害样本采集工作。选取当地主栽品种蓝籽、明美和妙彤(由优奈尔生物科技有限公司提供)为研究对象,重点针对10余个西瓜种植基地进行检测。采集样本涵盖典型的病害特征:子叶与叶片上的近圆形至不规则坏死斑,病斑中央呈灰白色或浅褐色坏死,边缘深褐色至黑色,外围环绕明显的黄色晕圈;茎蔓梭形或条状病斑;以及表面有坏死病斑的果实样本(排除机械损伤、虫害及非生物胁迫样本)。样本采集后通过4℃冷链运输

系统实时(≤ 2 h)运抵至实验室。

1.2 病原菌的分离与鉴定

1.2.1 病原菌的分离纯化 采用植物组织分离法进行病原菌分离^[10]。对病健交界组织依次进行2% NaClO(90 s)、75%乙醇(30 s)消毒以及无菌水冲洗(3次)。随后切取5 mm×5 mm组织块接种于PDA培养基,28℃恒温暗培养5~7 d。从初代菌落边缘挑取单菌丝尖端,连续转接3次获得纯培养物。从不同发病组织(叶片/茎秆/果实)共分离获得4株病原菌(菌株UNL090101~UNL090104),于-80℃条件下保存于潍坊市植物基因组分子育种重点实验室。经菌落形态比对,4株菌株呈现高度一致性,最终选取菌株UNL090101进行后续试验。

1.2.2 形态学鉴定 将菌株UNL090101接种于PDA培养基平板上,于28℃恒温条件下避光培养10 d,观察并记录菌落特征。由于该病原菌在培养基上产孢量非常少,但是病斑上可见产孢结构,笔者选取具有明显病症的西瓜叶片、果实及茎蔓,采集病原菌分生孢子制备临时装片,进行显微观察,测量超过50个成熟分生孢子的长度和宽度,并记录其隔膜数量、基部形态及表面纹饰特征。

1.2.3 分子生物学鉴定 采用改良CTAB法提取菌株UNL090101的菌丝基因组DNA^[11],分别用通用引物ITS1/ITS4^[12]、EF1-728F/EF1-986R^[13]、CYLH3F/CYLH3R^[14]、ACT-512F/ACT-783R^[13]扩增*C. citrullina* UNL190101的核糖体内转录间隔区(nuclear ribosomal internal transcribed spacer region, ITS)、翻译延伸因子1- α (translation elongation factor 1- α , TEF1)、组蛋白H3(histone H3, HIS3)和肌动蛋白(actin, ACT)基因片段。PCR反应体系为:DNA模板1 μ L、2×Taq PCR Mix 25 μ L、正反向引物(10 μ mol·L⁻¹)各2 μ L,去离子水20 μ L,共50 μ L。ITS序列扩增反应程序为:94℃预变性4 min;94℃变性45 s、54℃退火45 s、72℃延伸45 s,35个循环;72℃延伸10 min。TEF-1、HIS、ACT序列扩增与ITS序列扩增体系和反应程序相同,退火温度分别为53、59、62℃。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳进行分析(130 V, 60 min),以DL2000 DNA Marker为分子质量标准,验证目标条带大小及特异性。随后送至生工生物工程(上海)股份有限公司(青岛部)进行测序。

将西瓜斑枯病菌的ITS、TEF1、HIS3和ACT基因的核苷酸序列提交至GenBank数据库,利用NCBI BLASTn工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Blast.cgi),将上述序列与 GenBank 数据库中收录的相关病原菌参考序列进行同源性比对分析。基于 BLAST 比对结果,从 GenBank 数据库下载代表性相关病原菌的 *ITS*、*TEF1*、*HIS3* 和 *ACT* 基因同源序列。使用 MEGA 软件(v.5.05)进行多基因联合系统发育分析。采用最大似然法构建系统发育树,并用 Bootstrap 法评估系统发育树的置信度,重复次数为 1000 次。综合序列比对结果和多基因联合系统发育树的拓扑结构,确定目标菌株 UNL090101 的分类学地位。

1.3 致病性测定

将通过组织分离获得的西瓜斑枯病菌菌株 UNL090101 接种于 PDA 培养基平板,在 28 °C 恒温培养箱中培养 10 d 后,使用直径为 6 mm 的无菌打孔器切取含有菌丝的菌饼。取 5 个菌饼置于含有 2 颗破碎珠和 1 mL 无菌水的 1.5 mL 离心管中,利用破碎仪(型号:Tissuelyser-192;强度:60.00 Hz;时长:240 s)对菌丝组织进行充分破碎,制备成菌悬液。随后取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于直径为 9 cm 的 PDA 培养基平板上,置于 28 °C 条件下继续培养 3 d,为后续试验备用。

选取健康且无机械损伤的蓝籽西瓜叶片、子叶、茎蔓和果实作为接种材料,依次进行无菌水冲洗、晾干处理,随后采用 75%乙醇表面消毒 30 s,再用无菌水彻底冲洗并晾干。使用灭菌接种针对拟接种部位制造微伤口:叶片、子叶和茎蔓刺破表皮即可;果实则形成深度 1~2 mm、直径约 2 mm 的创口,每个接种点仅针刺一次。利用 6 mm 的打孔器从上述培养 3 d 的菌落边缘切取菌饼,并将含菌丝面紧密贴附于寄主组织伤口处。对照组接种不含菌丝的 PDA 培养基饼。每种器官设置 15 个独立接种位点,整个试验重复 3 次。接种后的西瓜材料置于 28 °C、空气相对湿度 90% 的黑暗条件下保湿培养,定期记录各处理的发病进程。从典型病斑边缘重新分离病原菌,对其形态学特征和分子生物学特性进行鉴定,并与原始接种菌株 UNL090101 进行比对分析,验证其一致性,完成柯赫氏法则验证^[15]。

1.4 特异性检测引物开发

1.4.1 特异性引物设计 为开发针对西瓜斑枯病菌(*C. citrullina*)的特异性分子检测引物,本研究从公共数据库(GenBank)中获取并整理了 30 余株具有代表性的尾孢属(*Cercospora* spp.)真菌的 *ITS* 核苷酸序列。同时,还收集了引起西瓜主要病害(包

括但不限于枯萎病、蔓枯病、灰霉病、炭疽病等)的病原真菌以及西瓜寄主本身的 *ITS* 序列作为对照参考。利用多序列比对软件 MEGA5(v.5.05)对所获得的 *ITS* 序列进行系统比对分析,重点筛选西瓜斑枯病菌 *ITS* 区域中存在的独特核苷酸变异位点。基于比对结果,在该病菌 *ITS* 序列的特异性区域设计了一对候选引物(引物设计软件 Primer5): Cer-F(正向引物)和 Cer-R(反向引物)。

1.4.2 特异性引物的 PCR 反应条件优化与特异性验证 为评估引物 Cer-F 和 Cer-R 的特异性,本研究采用西瓜寄主基因组 DNA 以及多种常见病原真菌的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。测试的病原菌包括链格孢菌(*Alternaria* spp.)、葡萄孢菌(*Botrytis* spp.)、芽枝霉菌(*Cladosporium* spp.)、帚枝霉菌(*Sarocladium* spp.)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、镰刀菌(*Fusarium* spp.)、蔓枯病菌(*Stagonosporopsis* spp.)、尾孢菌(*Cercospora* spp.)、炭疽病菌(*Colletotrichum* spp.)。PCR 反应体系为 10 μ L:模板 DNA (50 ng \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, 2 \times Taq PCR Mix 5 μ L, Cer-F (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.4 μ L, Cer-R (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.4 μ L, 无菌双蒸水(ddH₂O) 3.2 μ L。PCR 扩增程序如下,阶段 1:94 °C 预变性 5 min;阶段 2:94 °C 变性 30 s,退火 30 s(退火温度分别为 65、66.5、68、69.5、71、72.5 °C,共设置 6 个梯度),72 °C 延伸 30 s,共 35 次循环;阶段 3:72 °C 终延伸 10 min;阶段 4:4 °C 保持。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析(130 V, 60 min),以 DL2000 DNA Marker 为分子质量标准,并在紫外凝胶成像系统下观察与记录结果,用于评估引物的特异性并确定最佳退火温度。

1.4.3 引物灵敏度测定 为精准测定引物 Cer-F/Cer-R 对西瓜斑枯病菌基因组 DNA 的检测下限(limit of detection, LOD),本研究使用 *C. citrullina* 基因组 DNA 进行梯度稀释试验。初始 DNA 浓度(ρ , 后同)经 NanoPhotometer[®] N50 (Implen) 测定为 15 ng \cdot μ L⁻¹ (15 000 pg \cdot μ L⁻¹),随后在 TE 缓冲液(10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, pH 8.0)中依次稀释至 3000、1500、300、150、100 和 75 pg \cdot μ L⁻¹。使用引物 Cer-F/Cer-R 进行扩增(方法参考 1.4.2),以能稳定扩增出清晰的 301 bp 特异性条带为阳性判定标准,每个稀释梯度设置 3 次技术重复。

1.4.4 病样检测 为评估引物 Cer-F/Cer-R 对西瓜斑枯病菌早期侵染阶段的检测灵敏度,本研究设计了时间梯度接种试验。选取生长状态良好的健康

西瓜幼苗,在其真叶表面采用针刺法接种含有 *C. citrullina* 的菌饼(具体方法参考 1.3)。分别在接种后 1、2、3、4、5 d 采集接种部位的叶片组织,并同步设置阴性对照组(接种不含菌丝的 PDA 培养基饼,处理方法与接种组一致)。植物基因组 DNA 采用改良 CTAB 法^[6],并使用引物 Cer-F/Cer-R 进行扩增(方法参照 1.4.2),扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离分析,预期扩增片段大小为 301 bp。

2 结果与分析

2.1 病害症状

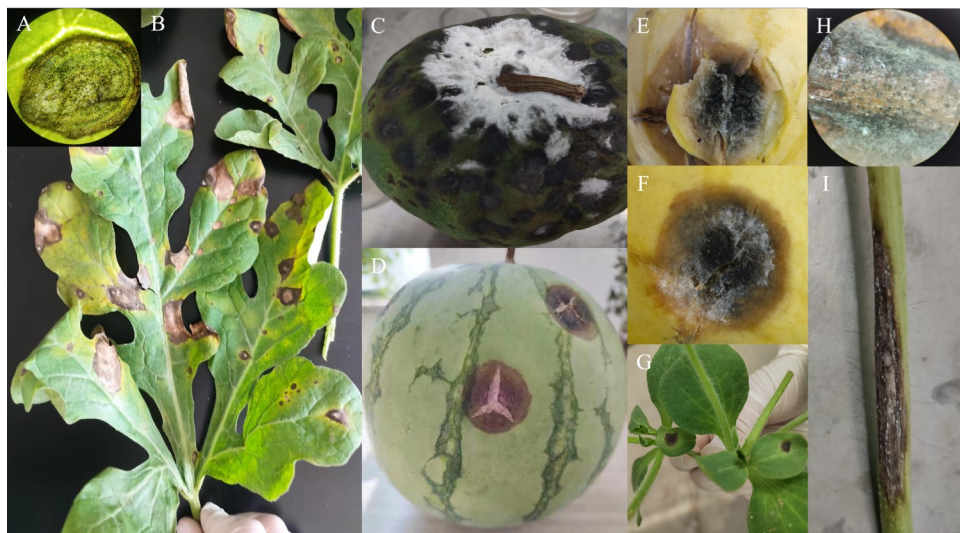
2022—2025 年在山东省 10 余个西瓜种植基地调查发现,该病害主要发生在温室栽培环境中,具有全生育期侵染的特点。病原菌可系统性侵染西瓜植株多个器官,包括子叶、真叶、茎蔓及果实,其中典型症状表现为渐进性发展的黑色坏死病变。此病害在夏季和秋季发病较重,发病率在 10%~30%,在重病区(尤其是连续阴雨条件下),发病率高达 75% 以上。

由图 1 可知,在子叶和真叶上,初期病斑为黑褐色小点,随后逐渐扩展为近圆形至不规则形病斑,呈现出典型的“蛙眼状”结构,中央呈灰白色或浅褐色坏死区,边缘深褐色至黑色,外围伴有明显的黄色晕圈。在高湿条件下,病斑中央密集产生黑

色颗粒状子座及分生孢子梗束,并呈同心轮纹状排列,这是病害发展的重要标志。发病后期,多个病斑融合,导致叶片大面积焦枯,严重影响植株的光合能力,常引发中后期早衰现象。茎蔓受害后形成梭形或条状坏死斑,病斑可深入维管组织。当病斑环绕茎一周时,会阻断养分运输,造成病斑以上部位萎蔫枯死,降低坐果率并影响果实品质。果实表面最初出现水渍状小斑点,随后发展为圆形坏死斑,与西瓜炭疽病症状相似,易发生误诊。其核心鉴别特征在于病斑表面形成的黑色子座及放射状分生孢子梗束。在高湿环境下,病斑表面可见灰白色的霉层(由分生孢子梗和丝状分生孢子组成),而西瓜炭疽病则表现为粉红色孢子角;干燥条件下,病斑开裂呈特征性的“三叉星”状纹路,剖检病果可见皮下果肉褐变失水,呈棕褐色至黑色的海绵状坏死,区别于炭疽病所引起的腐烂型病变。因此,根据该病菌的侵染部位以及发病特征,将此病害命名为斑枯病。

2.2 病原菌的形态学鉴定

供试病原菌在 PDA 培养基平板上于 28 °C 黑暗条件下培养时,表现出相对缓慢的生长速率。培养 15 d 后,菌落直径通常可达 52.42 mm。菌落初期呈白色,气生菌丝丰富呈絮状,边缘整齐光滑,中央区域明显隆起(图 2-A~B)。值得注意的是,在

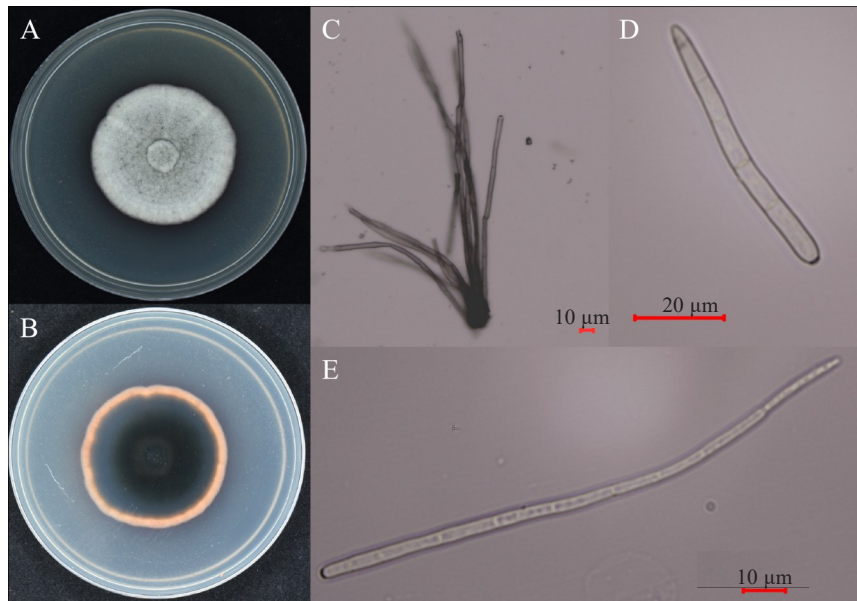


注:A. 叶片病斑放大图;B. 叶片发病症状;C 和 F. 高湿条件下果实发病症状;D. 低湿条件下病果症状;E. 果实内部病斑症状;G. 子叶发病症状;H. 瓜蔓病斑放大图;I. 瓜蔓发病症状。

Note: A. Enlarged image of leaf lesions; B. Symptoms of leaf disease; C and F. Symptoms of fruit disease when humidity is high; D. Symptoms of fruit disease when humidity is low; E. Internal symptoms of fruit lesions; G. Symptoms of cotyledon disease; H. Enlarged image of vine lesions; I. Symptoms of vine disease.

图 1 西瓜斑枯病在不同部位的症状表现

Fig. 1 Symptom of watermelon spot disease on different parts



注:A~B. PDA 培养基上的菌落(A: 正面;B: 背面);C. 分生孢子梗;D~E. 分生孢子。
 Note:A-B. Colony on PDA(A: Front; B: Reverse); C. Conidiophores; D-E. Conidia.

图2 分离株 UNL090101 的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the isolate UNL090101

PDA 培养基上该菌株产孢能力极弱,仅产生少量分生孢子。为诱导产孢并观察产孢结构,从发病的西瓜叶片、果实及茎蔓的典型病斑中采集病原菌分生孢子,并制成临时装片进行显微观察。结果显示(图 2-C~E),病原菌的分生孢子梗可直接由菌丝或子座上产生,单生或以稀疏簇状形式出现。分生孢子梗呈浅褐色至中度褐色,基部颜色较深,不分枝,形态多样,可直立或呈不同程度的膝状弯曲,顶端可见明显的产孢痕;长度变化范围较大,为 20.03~304.08 μm ,宽度为 3.41~6.41 μm 。分生孢子无色透明,形态呈针形至细线形,直或略带弯曲,具有多个横隔膜,隔膜数通常为 5~12 个。基部平截状,具明显或不明显的脐点;顶端则表现为尖锐或渐尖状。分生孢子长度范围为 22.53~243.97 μm ,宽度为 3.16~7.02 μm 。

综合上述典型形态特征,包括丰富的浅色气生菌丝、缓慢的菌落生长速度,以及关键的分生孢子与分生孢子梗形态特征(如无色、多隔、针形至线形的分生孢子,以及浅褐色、不分枝、具膝状弯曲和产孢痕的分生孢子梗),该病原菌符合尾孢属(*Cercospora* spp.)真菌的经典分类学标准^[6]。因此,结合形态学观察结果,初步将该分离菌株鉴定为尾孢属真菌(*Cercospora* spp.)。

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

为明确菌株 UNL090101 的分类地位,笔者通

过 PCR 技术扩增其核糖体内转录间隔区(ITS)、翻译延伸因子 1-alpha(TEF1)、组蛋白 H3(HIS3)和肌动蛋白(ACT)基因片段。扩增产物经纯化后获得 ITS(505 bp)、TEF1(267 bp)、HIS3(363 bp)和 ACT(159 bp)的基因序列。上述序列提交至 GenBank 国际核酸序列数据库,并分别获得登录号 ON849061、ON890306、ON890308 和 ON890307。通过多基因联合系统发育分析,将上述序列与 GenBank 中尾孢属(*Cercospora*)相关菌株同源序列进行比对,基于最大似然法构建系统发育树(图 3)。结果表明,菌株 UNL090101 与瓜类尾孢(*Cercospora citrullina*)的参考菌株中多个代表性菌株序列高度同源,共同聚类于一个支持率较高的单系分支中。相比之下,该菌株明显区别于 *Cercospora* 属内其他种(如 *C. cf. malloti*, *C. alchemillicola* 等)及近缘属的代表菌株,显示出较远的亲缘关系。综合菌株 UNL090101 的形态学特征及上述多基因系统发育分析结果,明确了引起西瓜斑枯病的病原菌为 *Cercospora citrullina*。

2.4 病原菌致病性测定

本研究依据柯赫氏法则验证 *Cercospora citrullina*(西瓜斑枯病菌)的致病性。采用无菌针刺接种法,将 UNL090101 菌株制备的菌饼接种于健康西瓜植株的真叶、子叶、果实及茎蔓表面,同时设置接种不含菌丝的 PDA 培养基饼做对照组。接种后,

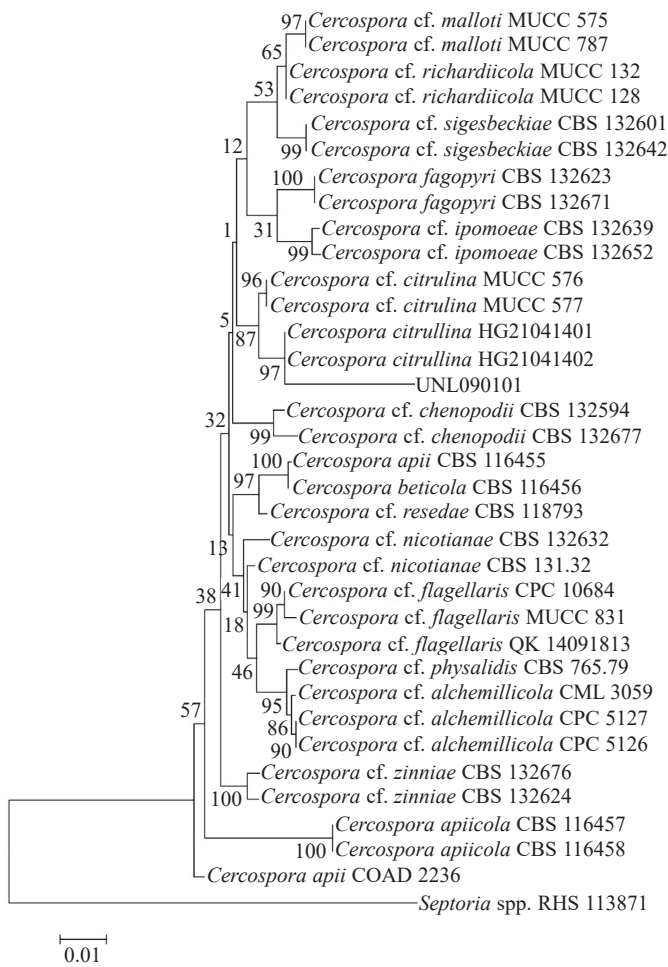


图3 基于尾孢属 *ITS-TEF1-HIS3-ACT* 基因序列联合构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on combined *ITS-TEF1-HIS3-ACT* sequences of *Cercospora*

植株置于人工气候培养箱中,在 28 °C、90%相对湿度条件下进行黑暗保湿培养,用以模拟适宜发病的环境条件。接种 4 d 后观察发现,所有接种 *C. citrullina* 的处理部位均表现出典型的坏死症状(图 4)。进一步从典型发病部位(病斑边缘)进行再分离培养,成功获得了与原始接种菌株在形态学特征及分子序列方面完全一致的病原菌。相比之下,所有对照植株的相应接种部位均未出现任何病斑或异常症状。上述结果符合柯赫氏法则的各项验证标准,进一步表明 *Cercospora citrullina* 是引起西瓜斑枯病的真正致病菌。

2.5 特异性引物开发

2.5.1 特异性引物设计 本研究基于尾孢属真菌 (*Cercospora* spp.)及其近缘种的 *ITS* 序列开发特异性检测引物。通过比对该属 30 余个菌株的 *ITS* 序列,并结合西瓜主要病原菌及宿主基因组数据进行多序列比对与系统发育分析,筛选出 *Cercospora* *ITS* 区域的保守区与变异区,筛选出尾孢属特异性靶标位点,据此设计出可精准识别该病原菌的分子引物组合 Cer-F (5'-GGGCGACCCTGCCGTTTCG-3')/Cer-R (5'-GACTTTGAGGCGCGCGGAACA-3'),可特异性地扩增出 301 bp 目标片段。

2.5.2 退火温度优化及特异性检测 本研究选取引物 Cer-F/Cer-R 对西瓜常见病原菌进行特异性验证。*Cercospora* spp. 以及健康西瓜 DNA 作为对照进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳分析结果表明,仅 *C. citrullina* (西瓜斑枯病菌)样本中稳定出现 301 bp 的特异性条带,而其他供试病原菌及西瓜健康组织

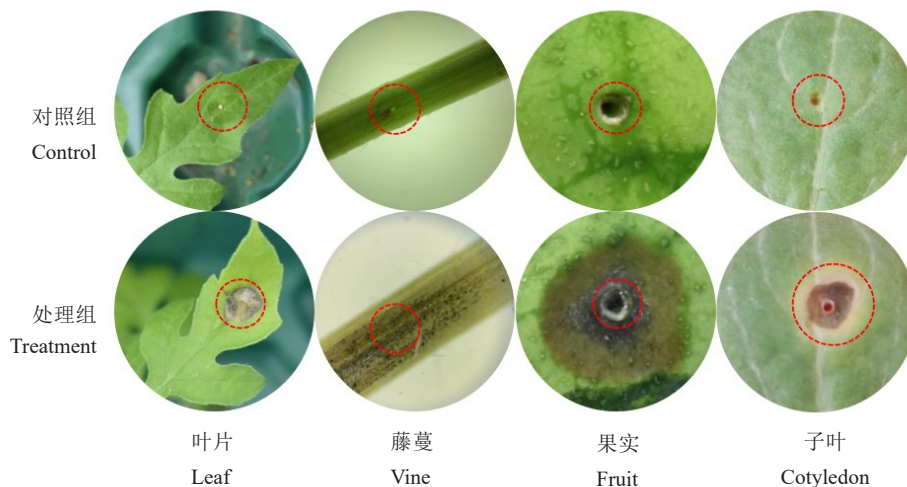
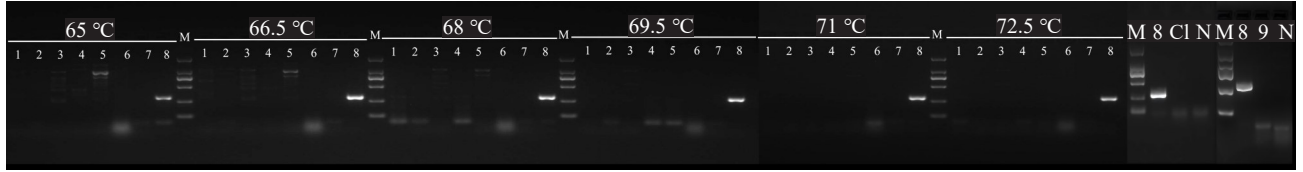


图4 *C. citrullina* 侵染西瓜叶片、果实、瓜蔓和子叶引起的症状(接种后 4 d)

Fig. 4 Symptoms caused by the infection of *C. citrullina* on leaf, fruit, vine and cotyledon of watermelon (4 days post inoculation)

均未产生任何扩增产物(图5)。本研究进一步开展了退火温度梯度优化试验。结果表明,当退火温度 $\leq 68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,除目标条带外,在灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)样品中偶尔出现非特异性扩增;然而,当退火温度 $\geq 69.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,仅能在*C. citrullina* DNA模板中稳定且清晰地检测到301 bp的目标条带,其余所

有对照样品(包括西瓜样本)均无扩增信号(图5)。综上所述,在优化后的反应条件下(退火温度 $\geq 69.5\text{ }^{\circ}\text{C}$),引物 Cer-F/Cer-R 对*C. citrullina*表现出高度特异性,能有效排除西瓜常见病原菌及寄主基因组DNA的干扰,适用于西瓜斑枯病菌的特异性分子检测与精准鉴定。



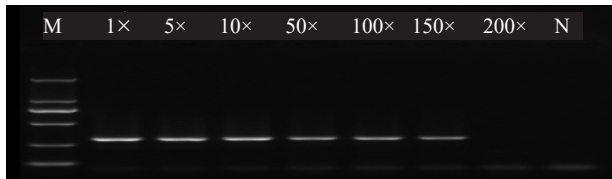
注:1~9 分别为链格孢菌、芽枝霉菌、葡萄孢菌、帚枝霉菌、灰葡萄孢菌、镰刀菌、蔓枯病菌、瓜类尾孢菌、炭疽病菌;Cl. 西瓜;M. DL2000 DNA 分子质量标准;N. 阴性对照。

Note: 1-9 represents *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Sarocladium* spp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Stagonosporopsis* spp., *Cercospora citrullina*, *Colletorichum* spp., respectively; Cl. *Citrullus lanatus*; M. DL2000 DNA Marker; N. Negative control.

图5 西瓜斑枯病菌特异性引物检测结果

Fig. 5 Detection results of watermelon spot disease pathogen-specific primers

2.5.3 引物灵敏度检测 本研究采用梯度稀释法评估引物 Cer-F/Cer-R 的检测灵敏度,将初始浓度 $15\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的DNA模板分别稀释至3000、1500、300、150、100和 $75\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 进行PCR扩增。结果显示,引物在DNA浓度低至 $100\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时仍能有效扩增出301 bp的特异性条带(图6),证实其具备检测微量病原菌DNA的能力,可满足实际病害诊断的灵敏度需求。



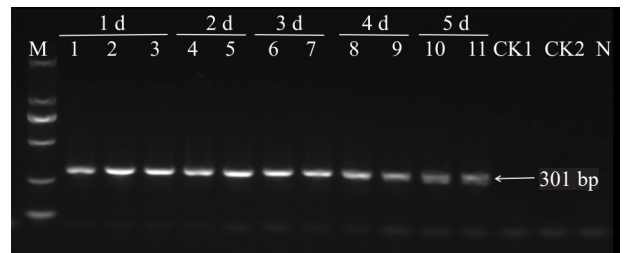
注:M. DL2000 DNA 分子质量标准;1 \times . $15\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (原液);5 \times . $3000\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;10 \times . $1500\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;50 \times . $300\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;100 \times . $150\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;150 \times . $100\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;200 \times . $75\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;N. 阴性对照。

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1 \times . $15\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (original sample); 5 \times . $3000\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 10 \times . $1500\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 50 \times . $300\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 100 \times . $150\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 150 \times . $100\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 200 \times . $75\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; N. Negative control (no template DNA).

图6 引物敏感度检测

Fig. 6 Primer sensitivity assay

2.5.4 病样检测 采用特异性引物 Cer-F/Cer-R,对病原菌接种后1~5 d的样品进行PCR扩增检测。结果表明,在接种后1 d的样品中即可检测到目标病原菌的特异性扩增条带,表明该病原菌在感染初期(接种后24 h内)即可被有效识别(图7)。这为西瓜斑枯病的早期诊断提供了可靠的技术支持。



注:M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~11 代表接种病样;CK1、CK2 为未接种样本;N 为阴性对照。

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1-11 represents inoculated samples; CK1 and CK2 represent non-inoculated control samples; N represents negative control (no DNA template).

图7 病样检测结果

Fig. 7 Detection results of disease samples

3 讨论与结论

据报道,*Cercospora citrullina* 主要侵染葫芦科作物(西瓜、甜瓜、冬瓜和南瓜等),并引起叶部枯死症状^[17-19]。陈益果等^[20]、曾蓉等^[21]曾报道该病害在西瓜叶片上的发生,但其研究局限于叶部发病情况。笔者通过系统性病原分离、纯化、鉴定及致病性测定,明确了该病原菌除侵染叶片外,还可侵染西瓜的子叶、茎蔓和果实,并引发特征性的坏死病斑,从而拓展了对*C. citrullina* 致病范围的认识。

值得注意的是,*C. citrullina* 在西瓜子叶和叶片发病初期所表现的症状,与炭疽病、叶枯病、细菌性叶斑病、蔓枯病等极为相似^[22-27];其在果实上引起的病斑也与西瓜炭疽病难以区分^[20],而此前研究并未明确提供这几种病害的鉴别方法。这种症状相似性易导致田间误诊,进而引发药剂误用或防治时机

延误,最终对温室西瓜的生产、采后贮藏及运输环节带来严重风险。本研究不仅确定了 *C. citrullina* 为山东潍坊地区温室西瓜斑枯病的病原菌,还系统描述了其在子叶、叶片、茎蔓和果实上的详细症状特征。该病原菌在叶片上产生的病斑虽与其他叶部病害存在相似性,但具有独特的形态学特点:病斑外围常具明显黄色晕圈,边缘呈深褐色至黑色,中心颜色较浅,后期可见黑色小点(分生孢子器),整体呈“蛙眼状”。然而,在西瓜的茎蔓、果实、子叶及叶片发病初期,*C. citrullina* 虽同样引发圆形坏死斑,却较少表现典型的“蛙眼状”特征。鉴于该病原菌可在西瓜多个部位引起显著斑枯症状,且易与炭疽病、叶枯病等混淆,笔者建议将由其引起的系统性病害正式命名为“西瓜斑枯病”,该命名可更准确反映其病原特性与核心症状,有助于统一病害识别与防控标准。

ITS 基因序列因在种间和种内鉴定中的高特异性,常被用作系统分类的分子标记^[28]。针对西瓜斑枯病与炭疽病症状相似的问题,为实现早期准确诊断,笔者基于 *C. citrullina* 的 *ITS* 序列设计并筛选出一对高特异性的 PCR 引物 Cer-F/Cer-R。验证结果表明,该引物能从感染组织中稳定扩增出一条 301 bp 的特异性条带,且与西瓜其他常见病原菌(包括炭疽病菌)无交叉反应。该分子检测方法的建立为西瓜斑枯病的早期快速鉴定及针对性地防治提供了可靠的技术依据。

综上所述,笔者通过整合形态学特征与多基因位点(*ITS-TEF1-HIS3-ACT*)系统发育分析,明确山东地区温室西瓜斑枯病的病原菌为 *Cercospora citrullina*。该病原菌具系统侵染能力,可在子叶、真叶、茎蔓和果实上诱发典型枯斑症状。基于特异性 *ITS* 序列开发的引物 Cer-F/Cer-R 可实现早期检测,灵敏度达 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (DNA 浓度)。本研究结果为西瓜斑枯病精准鉴定与高效防控提供了分子技术支撑。

参考文献

- [1] 柯佩佩,卿东山,戴思慧,等.瓜类炭疽病研究进展[J].中国瓜菜,2024,37(6):1-8.
- [2] 张慧青,孙玉燕,范敏.西瓜炭疽病研究进展[J].浙江农业科学,2020,61(2):292-295.
- [3] 刘欣,程瑞,徐兵划,等.西瓜抗白粉病研究进展[J].中国瓜菜,2024,37(11):1-9.
- [4] 张浩,梁文志.西瓜种植中主要病害及防治措施[J].种子科技,2020,38(17):85-86.
- [5] 周文静.海南大棚西瓜主要病原真菌鉴定及化学防治初步研究[D].海口:海南大学,2012.
- [6] 姚辉.西瓜主要病虫害及防治方法[J].世界热带农业信息,2024(7):61-63.
- [7] 郭玉人,王琪昶,张文献,等.早佳西瓜几个改良组合抗枯萎病、炭疽病性苗期鉴定[J].上海农业学报,2003,19(4):85-86.
- [8] 赵廷昌,杨玉文,关巍,等.甜瓜细菌性果斑病科学防控技术[J].农化市场十日讯,2019(11):43-44.
- [9] 蔡馥宇,关巍,乔培,等.瓜类细菌性果斑病研究新进展[J].中国瓜菜,2017,30(11):1-5.
- [10] 方中达.植物病理学研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1988:122-145.
- [11] 张颖慧,魏东盛,邢来君,等.一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J].微生物学通报,2008,35(3):466-469.
- [12] WHITE T J, BRUNS S, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. New York: Academic Press, 1990:315-322.
- [13] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. Mycologia, 1999,91(3):553.
- [14] CROUS P W, GROENEWALD J Z, RISEDE J M, et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: Species with clavate vesicles[J]. Studies in Mycology, 2004,55:213.
- [15] SARWAT M, NEGI M S, LAKSHMIKUMARAN M, et al. A standardized protocol for genomic DNA isolation from *Terminalia arjuna* for genetic diversity analysis[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2006,9(1):86-91.
- [16] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,2007.
- [17] 郭英兰,刘锡璉.中国真菌志(第24卷尾孢菌属)[M].北京:科学出版社,2005.
- [18] RENNERBERGER G, GERARD P, KEINATH A P. Factors influencing the occurrence of foliar pathogens in commercial watermelon fields in South Carolina based on stratified cluster sampling[J]. Plant Disease, 2019,103(3):484-494.
- [19] 叶云峰,杜婵娟,覃斯华,等.甜瓜尾孢叶斑病原菌分离与鉴定[J].南方农业学报,2018,49(3):476-480.
- [20] 陈益果,张有民,王迪轩.西瓜尾孢叶斑病(斑点病)的显微镜识别与综合防治[J].长江蔬菜,2019(19):57-58.
- [21] 曾蓉,徐丽慧,陈灏岚,等.西瓜叶斑病原菌的鉴定及室内药剂筛选[J].植物保护,2024,50(4):310-317.
- [22] 黄蔚,崔丽红,谢王超,等.西瓜新炭疽病原菌分子鉴定及其生物学特性初探[J].中国农学通报,2022,38(1):131-136.
- [23] 唐爽爽,刘志恒,余朝阁,等.辽宁省西瓜炭疽病原菌鉴定及生物学特性研究[J].植物保护,2014,40(4):38-44.
- [24] 吾建祥.啞啞铜防治西瓜细菌性叶斑病效果好[J].农药市场信息,2011(8):38.
- [25] 戴富明,刘少华,任小杰,等.西瓜蔓枯病分子诊断技术研究[J].植物病理学报,2006,36(5):439-445.
- [26] 佚名.西瓜细菌性病害的识别与防治技术[J].吉林蔬菜,2017(5):30.
- [27] 张洪顺,高淑兰,卢雪志.西瓜叶枯病和黑斑病的发生与综合防治[J].吉林蔬菜,2008(6):36-37.
- [28] 朱玉贤,李毅,郑晓峰,等.现代分子生物学[M].6版.北京:高等教育出版社,2025.