

文章编号: 1674-7054(2020)03-0310-04

海南薄皮甜瓜枯萎病病原菌鉴定及抗病砧木的筛选

黄文枫¹, 胡艳平², 朱白婢³

(1. 海南省农业科学院 蔬菜研究所, 海口 571100; 2. 海南省蔬菜生物学重点实验室, 海口 571100;

3. 海南省蔬菜育种工程中心, 海口 571100)

摘要: 海南冬春季薄皮甜瓜露地生产土传病害发生严重, 严重影响产量。笔者从患病薄皮甜瓜茎组织分离病菌, 经过病原菌形态、rDNA ITS 序列鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), 通过凯氏验证该病原菌为致病菌。接种病原菌孢子液, 从致病性、形态学和分子生物学等方面进行了鉴定分析, 并以‘美浓’品种为对照, 对‘银光’、‘厦利’、‘广砧 1 号’、‘大白’、‘连大’、‘砧 8’、‘大正’、‘壮土’和‘甬砧’等 9 种砧木的抗病性进行检测, 以筛选出抗性好的薄皮甜瓜砧木品种。结果表明: ‘广砧 1 号’、‘连大’、‘厦利’、‘甬砧’、‘砧 8’砧木的发病率为 0, 可以作为嫁接砧木的候选品种。

关键词: 甜瓜; 真菌病害; 抗病砧木

中图分类号: S 436.5; S 652

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.03.008

海南省冬春季种植的薄皮甜瓜上市早、糖度高、品质优, 年均播种面积 3 000 ~ 4 000 hm², 因经济效益好、栽培周期短, 已成为当地农民增收的主要产业之一。近年来随着复种指数的提高, 连作障碍严重, 土传病害频发, 减产问题十分突出。为了明确该病的病原种类及其分类地位, 笔者在病菌分离的基础上, 从致病性、形态学和分子生物学等方面进行了鉴定分析, 并接种不同砧木品种进行抗性试验, 以期筛选出抗性好的砧木品种, 促进薄皮甜瓜产业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本实验病株采自海南省海口市永兴镇薄皮甜瓜产区, 抗病砧木品种见表 1。

1.2 病原菌的分离纯化 田间采集的病枝用 75% 酒精进行表面消毒 30 s, 灭菌水冲洗干净, 超净台晾干后剪取病健交界组织块 0.1 ~ 0.5 cm², 放置在 PDA 平板上, 27 °C 培养 3 ~ 5 d, 挑取新长的菌丝到空白 PDA 平板上进行纯化培养。

1.3 病原菌的形态观察 观察在 PDA 上纯化培养的病原菌菌落形态, 显微镜观察菌丝形态。

1.4 病原菌的分子鉴定 提取 PDA 平板上的病原真菌 DNA, 采用真菌通用引物 ITS1, ITS4 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 25 μL, 包括 DNA 模板 1 μL, 引物各 1 μL, MIX 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。取 5 μL PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 送样至广州华大科技有限公司进行测序, 在 NCBI 进行 BLAST 比较。

1.5 病原菌接种实验 将分离的真菌在 PDA 培养基上大量扩繁, 放入生化培养箱 27 °C 黑暗培养, 待菌丝长满培养皿后, 将其移出置室内自然光照刺激其产孢。1 周后, 用无菌水洗出孢子, 镜检, 用血细胞计数板计算孢子含量, 按每盆 1 × 10⁷ 个 · mL⁻¹ 的孢子量加入无菌土壤。播种薄皮甜瓜‘美浓’种子, 观察出苗及发病情况。

收稿日期: 2019-11-11

修回日期: 2019-12-28

基金项目: 海南省创新能力建设计划项目(KYYS-2018-10); 国家西甜瓜产业技术体系资助项目(CARS—25)

第一作者: 黄文枫(1974-), 园艺师, 本科。研究方向: 蔬菜育种与栽培技术研究。E-mail: Aju993@163.com

1.6 抗病砧木筛选方法 枯萎病病菌接种以‘美浓’自根苗为对照(CK), 筛选出对枯萎病抗性较强的砧木品种, 具体方法如下: (1) 接种体准备: 将枯萎病病原菌接种于装有米粒饭的三角瓶中。25 ℃ 培养 10~15 d 备用; (2) 接种方法: 用 2 L 蒸馏水洗培养皿上的孢子, 血球计数板镜检记数, 达到 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 将不同砧木品种幼苗(子叶期, 即一叶一心时) 拔起植株并用清水清洗根部, 轻微伤根部后在菌悬液蘸根 15 min, 然后定植营养钵(12 cm \times 15 cm) 中, 正常管理, 每个处理定植 24 株; (3) 发病株鉴定: 定植后约 50 d 即初果期, 根据薄皮甜瓜枯萎病田间典型表现症状(发病初期: 病株叶片下而上逐渐萎蔫、似缺水状, 中午更明显, 早晚尚能恢复, 数日后整株叶片严重萎蔫下垂、不能再恢复正常, 整株死亡), 将病茎纵剖, 维管束呈黄褐色鉴定为发病株。

2 结果与分析

2.1 甜瓜枯萎病症状 薄皮甜瓜枯萎病是由真菌引致的植物病害, 症状包括严重的点斑、凋萎或叶、花、果、茎或整株植物的死亡。生长迅速的甜瓜的幼嫩组织常被侵袭, 导致植株不能正常结实(图 1)。病原菌为土传病害, 从幼嫩的根部侵入植株, 向上延伸发展。病害后期植株茎杆内部略呈现褐色(图 2)。

2.2 病原菌形态特征及分子鉴定 甜瓜枯萎病病原菌在 PDA 培养基上生长缓慢, 外部菌丝为灰白色, 中间菌丝在培养基里的呈现淡粉色(图 3)。提取病原菌丝 DNA 进行 ITS 序列扩增(图 4), 测序结果 546 bp 碱基与 *Fusarium oxysporum* f. sp. (GenBank: GU247453.1) 相似度达到 99%。

2.3 病菌柯氏法则验证 将病原菌在 PDA 培养基上进行扩大培养, 待菌丝长满培养皿后转入室内光照刺激产孢, 用灭菌水洗下孢子镜检后接入无菌土, 播种薄皮甜瓜‘美浓’种子, 待发芽后持续观察发病情况。取发病症状为子叶萎蔫、真叶黄化、呈猝倒状的植株(图 5), 按照 1.4 的方法重新分离该病原菌(图 6), 进行柯赫氏法则验证。

2.4 抗病砧木田间发病状况 2018-05-05 定植, 2018-06-25 试验植株初果期, 检测发病情况, 结果见表 2。对照‘美浓’的发病率为 83.33%; 新土佐类型的砧木品种中‘甬砧’、‘广砧 1 号’、‘砧 8’的发病率都为 0, ‘银光’的发病率为 12.5%; 中国南瓜类型中‘连大’、‘夏利’的发病率为 0, ‘壮士’的发病率为 25.0%。

表 1 薄皮甜瓜抗病砧木品种及来源

Tab. 1 Disease-resistant varieties of thin-skinned muskmelon and their sources

代号 Code	品种 Variety	来源 Source
CK	美浓	农友种苗(中国)有限公司
1	银光	北京育正泰种子有限公司
2	夏利	厦门好利得种苗有限公司
3	广砧1号	广西绿海种业公司
4	大白	海南富友种苗有限公司
5	连大	海南琼研瓜菜良种有限公司
6	砧8	农友种苗(中国)有限公司
7	大正	江苏正大种子有限公司
8	壮士	农友种苗(中国)有限公司
9	甬砧	宁波市农科院蔬菜研究所



图 1 薄皮甜瓜枯萎病病状图

Fig. 1 Symptom of fusarium wilt on thin-skinned muskmelon



图 2 病原菌室内分离

Fig. 2 Indoor isolation of the pathogens of fusarium wilt

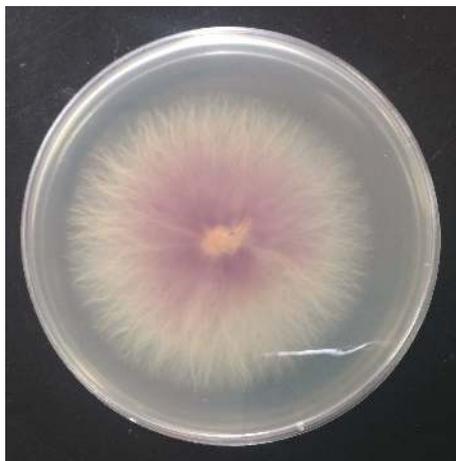


图3 PDA平板上病原菌菌落

Fig. 3 Colonies of the pathogens on PDA

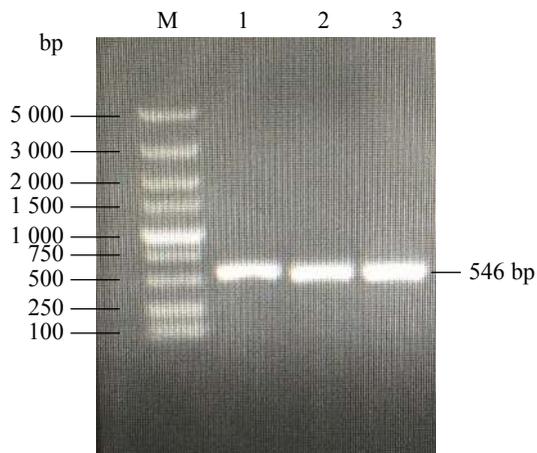


图4 PCR扩增电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR product



图5 室内接种病原菌发病状况

Fig. 5 Muskmelon seedlings inoculated with the pathogens indoor



图6 PDA平板上病原菌菌落

Fig. 6 Pathogen colonies on the PDA plate

表2 薄皮甜瓜抗病砧木田间发病情况

Tab. 2 Field infection of thin-skinned muskmelon rootstocks with fusarium wilt pathogen

砧木类型 Rootstock	品种 Varieties	定植株 Plants planted	发病株 Plants infected	发病率% Infection rate
新土佐	CK(美浓)	24	20	83.33
	银光	24	3	12.50
	甬砧	24	0	0
	广砧1号	24	0	0
	大白	24	2	8.33
	砧8	24	0	0
中国南瓜	连大	24	0	0
	大正	24	2	8.33
	壮士	24	6	25.00
	厦利	24	0	0

注: 2018-06-25定植的盆栽接种枯萎病菌试验结果。

Note: Experiment of potted muskmelon plants inoculated with fusarium wilt pathogen and planted on 25 June 2018.

3 讨论

甜瓜枯萎病是典型的土传真菌病害,在植株整个生育期均可发生,但以开花坐果期发病最重。枯萎病菌受到瓜类蔬菜根系分泌物的刺激,在适宜的温、湿度下萌发出芽管,从根部、根尖或伤口侵入,刺穿

表皮、皮质组织, 进入维管束, 在导管内生长发育。病菌在导管内分泌果胶酶、纤维素酶分解破坏细胞, 使有毒物质堵塞导管, 阻碍水分的运输, 当植物蒸发量大时, 供水不足而导致萎蔫, 严重的出现死秧^[1]。朱利林等^[2]通过鉴定发现海南省哈密瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌甜瓜专化型引起。本研究从海南薄皮甜瓜主产区的田间薄皮甜瓜病株上分离到病原菌, 经形态学及 rDNA 序列测定鉴定为尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)。将该病原菌孢子液加入土壤, 播种薄皮甜瓜种子, 幼苗生长约 3 周后发病, 再次从茎部分离病原菌和分子检测, 证明与接种病菌一致。

枯萎病具有明显的寄主专化型, 利用这一特性进行嫁接栽培, 可有效防止瓜类枯萎病的发生。最常用的砧木是南瓜, 嫁接后可显著提高甜瓜抗枯萎病的能力, 但不同品种的南瓜砧木抗病能力差异明显^[3]。利用抗病南瓜种间杂交种作砧木, 能更显著增强西甜瓜的生长势、抗逆性, 有效防止甜瓜土传病害的发生, 降低连作障碍的不良影响, 最终达到抗病、优质、高产的目的。如大和农园株式会社培育出的新土佐系列, 韩国神砧、甜香砧系列, 台湾农友种苗的‘壮士’, 宁波市农业科学研究所的甬砧系列砧木等^[4]。本研究将 9 种不同的甜瓜砧木接种薄皮甜瓜枯萎病原菌、以‘美浓’为对照, 后定植于营养钵中, 在初果期 (约 50 d) 观察田间发病情况, 筛选出 5 种发病率为 0 的抗病砧木品种: ‘广砧 1 号’、‘连大’、‘厦利’、‘甬砧’、‘砧 8’, 为薄皮甜瓜的嫁接砧木品种筛选提供抗病性依据。

参考文献:

- [1] 王虹周, 晓静, 李金玲, 等. 甜瓜枯萎病及其综合防治[J]. *农业科技通讯*, 2019(5): 313 – 315.
- [2] 朱利林, 景晓辉, 吴伦英, 等. 海南哈密瓜枯萎病病原菌的鉴定[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(3): 504 – 507.
- [3] 周小林. 甜瓜枯萎病致病专化型测定及其所致病害防治技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [4] 攸学松, 朱莉, 曾剑波, 等. 西甜瓜砧木育种研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(20): 52 – 56.

Pathogen Identification of Muskmelon Wilt in Hainan and Selection of Muskmelon Wilt-resistant Rootstocks

HUANG Wenfeng¹, HU Yanping², ZHU Baibi³

(1. Vegetable Research Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences Haikou, Hainan 571100, China;

2. Hainan Key Laboratory of Vegetable Biology Haikou, Hainan 571100, China;

3. Hainan Research Center for Vegetable Breeding, Haikou, Hainan 571100, China)

Abstract: Soilborne diseases occur seriously in the field of muskmelon (*Cucumis melo* L) in winter and spring in Hainan in recent years, which severely affects the yield of muskmelon. The pathogens were isolated from the stem tissue of the muskmelon seedlings infected with the soilborne diseases, and identified as *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by morphology and rDNA ITS sequence. Nine rootstock varieties of muskmelon were inoculated with the spores solution of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* with Meinong muskmelon variety as the control to determine their resistance to muskmelon wilt caused by *F. oxysporum* f.sp. *melonis* to select resistant rootstocks. The results showed that the control Meinong muskmelon variety had an incidence of muskmelon *Fusarium* wilt of 83.33%, while the rootstock varieties Guangzhen 1, Lianda, Xiali, and Yongzhan had no incidence of *Fusarium* wilt, and can hence be used as candidates for disease-resistant root stocks for muskmelon.

Keywords: muskmelon; fungal disease; disease-resistant root stock

(责任编辑: 钟云芳)