

## 黄瓜种传镰刀菌种类的鉴定及其致病性研究

蒋荷<sup>1</sup> 李旭<sup>1</sup> 郑慧慧<sup>1</sup> 吴学宏<sup>1\*</sup> 杨腊英<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院/农业部植物病理学重点开放实验室,北京 100193;

2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所,海南 儋州 571737)

**摘要** 为明确我国主栽黄瓜品种的种子中携带镰刀菌的种类及其危害,对来自我国黄瓜主产区 21 个黄瓜品种的种子进行种传镰刀菌检测,从种胚和种子外部分离得到镰刀菌分离物 9 个,采用形态学及分子生物学的方法进行鉴定,并研究其对黄瓜种子发芽和幼苗致病性的影响。结果表明:9 个分离物中,4 个分离物为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),4 个分离物为串珠镰刀菌(*F. moniliforme*),1 个分离物为再育镰刀菌(*F. proliferatum*)。4 个尖孢镰刀菌分离物对黄瓜种子发芽均有显著影响,发芽指数、活力指数、根长和鲜重等指标均显著降低,且能导致黄瓜幼苗出现典型的枯萎症状,经柯赫氏法则检验证明其具有致病性。其他分离物对黄瓜种子发芽也有一定的抑制作用,但没有致病性。

**关键词** 黄瓜; 种传镰刀菌; 种类鉴定; 种子发芽; 致病性

**中图分类号** S 431.192

**文章编号** 1007-4333(2013)02-0086-07

**文献标志码** A

## Study on identification of cucumber seedborne *Fusarium* species and testing of their pathogenicity

JIANG He<sup>1</sup>, LI Xu<sup>1</sup>, ZHENG Hui-hui<sup>1</sup>, WU Xue-hong<sup>1\*</sup>, YANG La-ying<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology/Key Laboratory of Plant Pathology of Ministry of Agriculture,

China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou Hainan 571737, China)

**Abstract** In order to study the seedborne *Fusarium* species and their harmness of cucumber seeds of popularly planted varieties, cucumber seeds of twenty-one varieties from cucumber-growing regions in China were collected for *Fusarium* detection. Nine *Fusarium* isolates were isolated from seed embryos and seed surface. The isolates were identified using morphology and DNA sequencing analysis. Effects on seed germination and pathogenicity of these *Fusarium* isolates were determined. Results showed that the nine *Fusarium* isolates belong to three species, i. e. *Fusarium oxysporum* (4 isolates), *F. moniliforme* (4 isolates) and *F. proliferatum* (1 isolate). The four *F. oxysporum* isolates had significant effect on seed germination, compared to the control treatment. The values of the germination index, the seedling vigor index, root length and fresh weight of seedlings decreased significantly in the treatment of *F. oxysporum*. Results also showed that the isolates of *F. oxysporum* were pathogenic to seedlings of cucumber and caused typical wilt symptoms on leaves, fulfilling Koch's postulates. All the other five isolates of *Fusarium* had suppressive effect on seed germination of cucumber, but they were not pathogenic to cucumber seedlings. To our knowledge, this is the first report of the seedborne *F. oxysporum* pathogenic to cucumber seedlings in China.

**Key words** cucumber; seedborne *Fusarium oxysporum*; species identification; seed germination; pathogenicity

收稿日期: 2012-06-21

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目资助(200903049)

第一作者: 蒋荷, 硕士研究生, E-mail: jianghecau@gmail.com

通讯作者: 吴学宏, 副教授, 主要从事作物镰刀菌病害及化学防治研究, E-mail: wuxuehong@cau.edu.cn

黄瓜在国内外市场上备受青睐。据报道,我国黄瓜种植面积每年可达 125.3 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>,不仅供应国内市场还出口到新加坡和日本等国家,成为重要的创汇农产品。黄瓜枯萎病作为世界范围内一种毁灭性土传病害<sup>[2-3]</sup>,是生产上制约黄瓜产量和品质的重要因素之一。黄瓜枯萎病主要由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)引起<sup>[2]</sup>,另外也有报道表明串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)、球茎状镰刀菌(*F. bulbigenum*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)、黄色镰刀菌(*F. culmorum*)、接骨木镰刀菌(*F. sambucinum*)和异孢镰刀菌(*F. heterosporium*)等其他种类的镰刀菌可引起类似的根部病害<sup>[4]</sup>。

黄瓜枯萎病除了可以通过土壤传播外,国内外许多研究表明其还可以通过种子传播。埃及、印度和巴西的研究报道显示,黄瓜种子可以携带包括镰刀菌在内的多种病原菌,其中镰刀菌为优势菌群<sup>[5-6]</sup>。从种子上分离得到的镰刀菌种类主要包括:*F. oxysporum*、*F. solani*<sup>[6]</sup>、*F. moniliforme*<sup>[7]</sup>和轮枝镰刀菌(*F. verticillioides*)<sup>[8]</sup>,这些种传镰刀菌对黄瓜种子发芽和幼苗生长都具有不同程度的抑制作用。*F. oxysporum*、*F. solani*和*F. moniliforme*可降低种子发芽率,影响胚根和胚芽的生长<sup>[8-9]</sup>; *F. verticillioides*影响黄瓜种子的生理质量<sup>[8]</sup>;黄瓜种子的外部和内部均可检测到*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*,它能够引起典型的黄瓜枯萎病症状。本实验室对我国北京和吉林产区的10个黄瓜品种的种子进行带菌检测,发现黄瓜种子可以携带包括镰刀菌在内的多种真菌<sup>[10]</sup>,但尚未针对黄瓜种传镰刀菌的具体种类及其致病性进行深入研究。目前国内还未见黄瓜种传镰刀菌方面的系统研究报道。因此,本研究通过分析黄瓜种子上所携带镰刀菌的具体种类及其对种子发芽和幼苗致病性的影响,旨在为我国黄瓜生产上品种的选择提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 黄瓜种子

市售黄瓜品种21个:新春早黄瓜、京龙早多瓜、京龙绿龙、唐秋10号和大唐王子来自黑龙江省;津研4号、中农6号、中农14号和中农203来自辽宁省;津研4号来自内蒙古自治区;金棚宝来自山东省;露丰来自江苏省;世纪春秀来自河南省;燕白黄

瓜来自重庆市;大白黄瓜和春秋旱黄瓜来自四川省;唐山秋瓜来自湖北省;乐满田1号、金满田和华优一号来自广东省;新黄瓜3号来自海南省。

### 1.2 培养基

PDA培养基、CLA培养基、LB液体培养基、LB固体培养基和Armstrong液体培养基按文献<sup>[11]</sup>配制。

### 1.3 试剂

Taq reaction buffer, dNTP(10 mmol/L each), Taq DNA Polymerase(北京全式金生物技术有限公司);寡聚核苷酸引物(北京三博远志生物技术有限公司);pMD-19克隆载体;40 mg/mL X-gal, 500 mmol/L IPTG(北京天根生物技术公司);DNA回收试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 黄瓜种传镰刀菌检测

参考文献<sup>[10,12]</sup>对黄瓜种子进行种传镰刀菌检测。

1)种子外部带菌检测。每个品种随机选取200粒种子,放入100 mL烧杯中,加入25 mL无菌水充分振荡10 min,吸取悬浮液1 mL,以4 000 r/min的转速离心20 min,弃上清液,再加入500  $\mu\text{L}$ 无菌水将管底沉淀充分悬浮后,吸取100  $\mu\text{L}$ 加入到冷却好的PDA平板上,涂匀;相同操作条件下,以100  $\mu\text{L}$ 无菌水涂匀PDA平板为空白对照。每个处理4次重复。放置于25~28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中12 h光照/黑暗交替条件下培养5~7 d后观察,记录种子外部带菌种类和分离比例。

2)水洗种子及种子内部带菌检测。将1)中用无菌水洗涤后的种子放置在灭菌滤纸上,待充分晾干后摆放在PDA平板上,每皿摆放15粒种子,每个处理4次重复。同时将每个品种剩余的种子在5% NaClO溶液中浸泡消毒4 min,用无菌水冲洗3次。晾干后取40~80粒种子将其果皮和种胚解剖开,将种胚再放置在1% NaClO溶液中浸泡消毒1 min,然后用无菌水冲洗3次。将同一品种的种皮和种胚充分晾干后分别均匀摆放在PDA平板上,每皿摆放15粒或15个完整的组织块,每个处理4次重复。放置于25~28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中12 h光照/黑暗交替条件下培养5~7 d后检查,记录种子带菌情况、不同部位的真菌种类和分离频率。

### 1.4.2 黄瓜种传镰刀菌的鉴定

1)形态学鉴定。将分离得到的镰刀菌进行单孢分离纯化后培养于PDA和CLA培养基上,观察菌落形态、色素情况以及大型分生孢子、小型分生孢子、厚垣孢子着生情况及形态、分生孢子梗形态,测量大型分生孢子、小型分生孢子及厚垣孢子大小,进行形态学鉴定。

2)分子生物学鉴定。采用CTAB法<sup>[13]</sup>提取镰刀菌基因组DNA,使用真菌rDNA ITS通用引物<sup>[14]</sup>以及翻译延伸因子基因(TEF-1 $\alpha$ )、 $\beta$ 微管蛋白基因( $\beta$ -tubulin)<sup>[15]</sup>等三对引物对镰刀菌分离物的基因组DNA进行PCR扩增。回收PCR产物,与载体连接后,转化至大肠杆菌感受态细胞中,将转化成功的感受态细胞送至上海英骏生物技术有限公司进行测序,登录GenBank进行BLAST分析,确定分离物的具体种类。

### 1.4.3 黄瓜种传镰刀菌对种子发芽的影响和幼苗致病性

1)镰刀菌孢子悬浮液的制备。参考文献<sup>[12]</sup>的方法将镰刀菌分别接种在PDA平板培养基上,放置于25℃下黑暗培养7d,沿菌落边缘打取直径为6mm的菌饼,接入装有100mL Armstrong培养液的250mL三角瓶内,每瓶接6个菌饼,置于25℃,100r/min的摇床上培养48h后,将摇培液用4层纱布过滤,收集滤液于100mL烧杯中,用血球计数板计算孢子悬浮液浓度。用Armstrong培养液配制成 $10^6$ 个/mL的孢子悬浮液。

2)黄瓜种传镰刀菌对种子发芽的影响。随机取籽粒饱满的黄瓜种子,在1%次氯酸钠溶液中浸泡10min,然后用无菌水冲洗3次,晾干;将晾干后的种子分别浸入制备好的9株镰刀菌孢子悬浮液中,以Armstrong液体培养基作为对照,12h后,将表面的水分吸干后备用;每个处理8次重复,每次重复15粒种子,进行随机排列;参考国际种子检验规程中的滤纸卷法进行发芽试验,观察黄瓜种子发芽情况<sup>[16]</sup>。按照下述公式统计种子发芽势和发芽率,计算发芽指数和活力指数。采用SAS软件对试验结果进行方差分析和Duncan法多重比较。

发芽势/%=(第4天发芽种子数/检测种子总数) $\times 100$

发芽率/%=(第8天发芽种子数/检测种子总

数) $\times 100$

发芽指数( $G_i$ )= $\sum(G_t/D_t)$

式中: $G_t$ 为逐日发芽数, $D_t$ 为相应的发芽日数。

活力指数( $V_i$ )= $G_i \times S_x$

式中: $G_i$ 为发芽指数, $S_x$ 为第10天幼苗的平均鲜重,g。

3)黄瓜种传镰刀菌对幼苗的致病性。采用浸种子胚根法进行致病性试验。随机选取籽粒饱满的黄瓜种子,在1%次氯酸钠溶液中浸泡10min后用无菌水冲洗干净,置于灭菌滤纸上晾干,经30℃催芽24h,然后将发芽露白的黄瓜种子分别浸入制备好的孢子悬浮液中10min,以Armstrong培养基浸种处理作为阴性对照,以黄瓜枯萎病菌参考菌株(大连民族学院吕国忠教授提供)的孢子悬浮液浸种处理作为阳性对照,将处理后的黄瓜种子播种于装有无菌土的塑料盆中,覆土0.5cm;每个处理10次重复,每次重复4粒种子,进行随机排列,在温室中(白天气温20~25℃,夜晚气温15~18℃)培育,播种2周后开始观察记录发病情况,计算发病率。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜种传镰刀菌的情况

从新春早黄瓜、唐山秋瓜、中农6号、中农203、华优一号和新黄瓜3号等6个品种的水洗黄瓜种子上分离得到6个镰刀菌分离物,依次命名为HLJ-XC-S、HB-TS-S、LN-ZN6-S、LN-ZN203-S、GD-HY-S和HN-XH-S;分别从新春早黄瓜、春秋早黄瓜和唐山秋瓜等3个品种的种子外部、种皮和种胚上分离得到3个镰刀菌分离物,依次命名为HLJ-XC-X、SC-CQ-P和HB-TS-R。将分离物纯化、保存备用。

### 2.2 黄瓜传镰刀菌的鉴定

#### 2.2.1 形态学鉴定

HLJ-XC-S、SC-CQ-P、LN-ZN203-S和GD-HY-S等4株分离物在PDA培养基上菌落呈白色至浅红色,产生淡紫色、红褐色至深紫色色素,气生菌丝棉絮状至毛毡状,边缘规则,25和30℃条件下培养4d后菌落平均生长直径分别介于43.0~54.3mm之间和40.8~54.5mm之间;小型分生孢子数量多,着生于短而稀疏分枝的分生孢子梗旁伸出的单出瓶状小梗上,为卵圆形至纺锤形,多数较为平直;大型分生孢子着生于较复杂的具分枝的分生孢

子梗上,为纺锤形或美丽型,两端比较均匀得变尖,多数具3个分隔,少数有4~5个分隔,基孢足跟较为明显;厚垣孢子球形,表面光滑,直径8.0~12.0  $\mu\text{m}$ ,多单独生长,间生或顶生;产孢细胞短,单瓶梗(表1)。4株分离物初步鉴定为 *F. oxysporum*。

HLJ-XC-X、LN-ZN6-S、HN-XH-S 和 HB-TS-R 等4株分离物在PDA培养基上菌落呈现白色至粉红色,产生橘红色至深紫色色素,气生菌丝卷毛状至毡状,边缘较规则或不规则,25和30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养4d后菌落平均生长直径介于42.2~48.8 mm之间和52.0~58.1 mm之间;小型分生孢子数量较多,单出、侧生;锥形的瓶状小梗在气生菌丝上形成,很少在短的侧枝上成长,顶部渐窄;小型分生孢子呈典型的链状排列,纺锤形至棍棒形,具有稍平展的基部,偶尔具有一个分隔;有些很少形成大型分生孢子,但有时可在菌丝侧枝上的分生孢子梗上形成;分生孢子梗由一个生有2~3个顶生瓶状小梗的单个细胞组成,或者可以形成2~3个梗基,依次生成单个的桶形至棍棒形的瓶状小梗;大型分生孢子为不对称的拟纺锤形,具有伸长的常常是尖而弯曲的顶细胞和具有小柄的基部细胞,1~3个分隔,在菌丝和分生孢子中均不生成厚垣孢子(表1)。4株分离物初步鉴定为 *F. moniliforme*。

HB-TS-S在PDA培养基上菌落呈紫红色,产生紫红色色素,气生菌丝棉絮状,边缘规则,25和30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下4d后菌落平均生长直径分别为39.0和49.1 mm;小型分生孢子数量多且较大,为卵圆形至椭圆形,多数较为平直,具1~2个分隔;大型分生孢子数量较少,与小型分生孢子很难区分,多数为椭圆形,具1~3个分隔,无厚垣孢子形成(表1)。初步鉴定为 *F. proliferatum*。

### 2.2.2 分子鉴定

1) rDNA ITS序列比对结果。真菌 rDNA 通用 ITS1/ITS4 引物扩增出的片段大小约为550 bp。HLJ-XC-S、SC-CQ-P、LN-ZN203-S 和 GD-HY-S 的序列与 *F. oxysporum* (GenBank 登录号为 JF776163.1、HM043738.1、GU565571.1、AB470894.1、FJ233193.1、EF590328.1、EF495230.1、DQ459007.1、DQ452454.1、DQ452450.1、AY188919.1、JF429684.1、DQ453704.1 和 AY684920.1) 同源性达到100%; HN-XH-S 和

HB-TS-R 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 JF499676.1、GU982311.1、GQ466390.1、EU151483.1、EU151481.1、EU151480.1、EU151477.1、EU151475.1、EU151474.1、EU151473.1、EU151471.1、EU151470.1、EU151469.1、EU151468.1 和 EU151467.1) 同源性达到100%; LN-ZN6-S、HLJ-XC-X 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 JF499676.1、GU982311.1、EU151483.1、EU151481.1、EU151480.1、EU151477.1、EU151476.1、EU151475.1、EU151474.1、EU151473.1、EU151471.1、EU151470.1、EU151469.1、EU151468.1 和 GQ466389.1) 同源性达到99%; HB-TS-S 的序列与 *F. proliferatum* (GenBank 登录号为 HQ113948.1、FJ040179.1、EU151490.1、EU151489.1、EU151486.1 和 EU151484.1) 同源性达到100%。

2) 翻译延伸因子基因序列比对结果。翻译延伸因子基因引物扩增出的片段大小约为700 bp。GD-HY-S、SC-CQ-P、HLJ-XC-S 和 LN-ZN203-S 的序列与 *F. oxysporum* (GenBank 登录号为 DQ837690.1、DQ837692.1、DQ452427.1、DQ837688.1、DQ837686.1、DQ837685.1、DQ837684.1、DQ837683.1、DQ837682.1、DQ837681.1、DQ837673.1、DQ837672.1、DQ837671.1、DQ837670.1、DQ837669.1、DQ837668.1、DQ837667.1 和 DQ837666.1) 同源性达到99%; LN-ZN6-S、HB-TS-R 和 HN-XH-S 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 JF740717.1、JF270248.1、AB674289.1、GQ848530.1、JF270237.1、EF453022.1 和 HQ622574.1) 同源性达到100%; HLJ-XC-X 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 AB674287.1) 同源性达到100%; HB-TS-S 的序列与 *F. proliferatum* (GenBank 登录号为 FJ538244.1、FJ538242.1、JF270303.1、AF336913.1、JF740713.1、JF747030.1 和 AF291058.1) 同源性达到99%。

3)  $\beta$ 微管蛋白基因序列比对结果。 $\beta$ 微管蛋白基因引物扩增出的片段大小约为1400 bp。GD-HY-S、SC-CQ-P、HLJ-XC-S 和 LN-ZN203-S 的序列与 *F. oxysporum* (GenBank 登录号为 EF450110.1

和 AB587042.1) 同源性均达到 99%; HLJ-XC-X 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 FN545358.1、FN545359.1 和 AB587058.1) 同源性达到 100%; HN-XH-S 和 LN-ZN6-S 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 AB587058.1) 同源性达到 100%; HB-TS-R 的序列与 *F. moniliforme* (GenBank 登录号为 FN545356.1、FN545363.1、FN545358.1、FN545359.1、FN545362.1 和 FN545357.1) 同源性达到 99%; HB-TS-S 的序列与 *F. proliferatum* (登录号为 AF336910.1、AF291055.1 和 AB587055.1) 同源性达到 98%。

结合形态学和分子鉴定结果, HLJ-XC-S、LN-ZN203-S、GD-HY-S 和 SC-CQ-P 等 4 株分离物为 *F. oxysporum*; HLJ-XC-X、LN-ZN6-S、HN-XH-S 和 HB-TS-R 等 4 株分离物为 *F. moniliforme*; HB-TS-S 为 *F. proliferatum*。

### 2.3 种传镰刀菌对黄瓜种子发芽的影响

供试的 9 株镰刀菌分离物对黄瓜种子发芽有不同程度的影响, 所有处理在株高和活力指数等指标上与对照相比显著降低; 其中, HLJ-XC-S 和 LN-ZN203-S 对种子发芽的抑制作用最强, 经处理的黄瓜种子各项发芽指标均与对照存在显著差异, GD-HY-S、SC-CQ-P 的孢子悬浮液处理后, 种子发芽势、发芽率显著降低(表 2)。

### 2.4 种传镰刀菌对黄瓜幼苗的致病性

接种 HLJ-XC-S、LN-ZN203-S、SC-CQ-P 和 GD-HY-S 等 4 株镰刀菌后, 部分植株出现了典型的枯萎症状, 叶片顶端或边缘出现枯萎病斑, 病健交界处发黄, 叶片变色、下垂, 随后病斑沿叶片边缘扩大, 逐渐黄化萎蔫, 植株根部维管束出现明显变褐、萎蔫症状。幼苗的发病率分别为 75.0%、60.0%、47.5% 和 55.0%, 与参考菌株相比, 致病性强弱存在一定的差异。在出现病斑的叶片和根部病健交界处分离病菌并纯化, 经过形态观察和分子鉴定确定从发病植株分离得到的镰刀菌与用于接种的镰刀菌相同, 完成柯赫氏法则, 说明这 4 株镰刀菌对黄瓜具有致病性。而接种其余 5 株镰刀菌的植株未出现病害症状。

## 3 讨论

本研究通过对我国黄瓜主产区的 21 个品种进行

种传真菌检测, 明确了供试黄瓜种子的健康状况, 并从种皮、种胚和种子外部分离得到镰刀菌属真菌, 包括: *F. oxysporum*, *F. moniliforme* 和 *F. proliferatum*。国内外已有研究结果中, 从黄瓜种子上检测到并鉴定的镰刀菌主要有 *F. solani*、*F. moniliforme*、*F. oxysporum* 和 *F. verticillioides* 等, 其中在种子外部分离到的镰刀菌有 *F. solani*、*F. moniliforme* 和 *F. oxysporum*, 在种胚上分离到的镰刀菌是 *F. verticillioides*<sup>[6-9]</sup>。而除了在种子外部和种胚上分别分离得到 *F. moniliforme* 和 *F. oxysporum* 之外, 还在种子外部分离得到了 *F. proliferatum*, 但未分离得到 *F. solani*, 与已有报道存在一定的差异。所有镰刀菌分离物对黄瓜种子发芽都有一定程度的抑制作用, 且其中的 4 株 *F. oxysporum* 对黄瓜具有致病性, 这与国外的研究结果相似。引起黄瓜枯萎病的病原菌为尖孢镰刀菌黄瓜专化型<sup>[2]</sup>, 本研究中黄瓜种子上分离得到的尖孢镰刀菌是否为黄瓜专化型, 还需通过接种葫芦科其他属的植物如西瓜、甜瓜、南瓜和葫芦等检验其致病性进行确认。

镰刀菌属真菌广泛分布在自然界中, 寄生或腐生, 是目前为止人类发现的最重要的植物病原真菌之一<sup>[17]</sup>, 也是真菌中最难鉴定和最具经济价值的属之一。传统的方法是依据它的形态学特征进行分类鉴定, 但是镰刀菌的形态和生物学性状常产生较大变异, 因而采用传统方法, 往往难以区分形态和特性相近的种, 并且以形态学为基础的检测方法存在工作量大、检测周期长、结果不准确等缺陷。近年来, 随着分子生物学技术领域的巨大进步, 使镰刀菌的快速检测和鉴定成为可能。其中利用 PCR 扩增病原菌核糖体 ITS、 $\beta$ -tubulin、mtSSU-rDNA、EF-1 $\alpha$ 、Nir 和 IGS 等基因序列区段成为快速、准确、简便鉴定、检测镰刀菌及相关病害诊断的方法<sup>[18]</sup>。本研究结合形态学和分子鉴定手段, 将 9 株镰刀菌分离物分别鉴定为 *F. oxysporum*、*F. moniliforme* 和 *F. proliferatum*。

本试验在前期已有研究方法和成果的基础上对我国市场上常用商品化黄瓜种子进行了带菌检测, 首次将我国市售黄瓜种子所带镰刀菌鉴定到种水平, 明确了所有种传镰刀菌对黄瓜种子发芽和幼苗生长的影响及其致病性, 为生产中科学选择黄瓜品种提供了理论参考。

表 1 9 株镰刀菌的形态特征与分子鉴定

Table 1 Morphology and DNA sequence analysis of nine seedborne *Fusarium* isolates

菌株 Strains	小型分生孢子大小/ $\mu\text{m}$ Size of microconidia	大型分生孢子大小/ $\mu\text{m}$ Size of macroconidia	ITS 序列 BLAST 结果 BLAST of ITS sequence	TEF 序列 BLAST 结果 BLAST of TEF sequence	$\beta$ -tubulin 序列 BLAST 结果 BLAST of $\beta$ -tubulin sequence	鉴定结果 Identification results
	HLJ-XC-S	$(7.3 \pm 1.7) \times (3.2 \pm 1.3)$	$(18.5 \pm 3.5) \times (3.8 \pm 0.8)$	<i>F. oxysporum</i> (100%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)
GD-HY-S	$(6.3 \pm 0.7) \times (2.6 \pm 0.3)$	$(18.2 \pm 2.8) \times (3.88 \pm 0.3)$	<i>F. oxysporum</i> (100%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i>
SC-CQ-P	$(6.3 \pm 2.7) \times (3.6 \pm 1.4)$	$(18.8 \pm 3.4) \times (4.0 \pm 0.5)$	<i>F. oxysporum</i> (100%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i>
LN-ZN203-S	$(7.1 \pm 0.7) \times (2.5 \pm 0.3)$	$(19.0 \pm 4.9) \times (3.9 \pm 0.8)$	<i>F. oxysporum</i> (100%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i> (99%)	<i>F. oxysporum</i>
HLJ-XC-X	$(6.9 \pm 1.3) \times (3.17 \pm 0.5)$	$(15.7 \pm 2.8) \times (3.9 \pm 0.8)$	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i>
LN-ZN6-S	$(7.6 \pm 1.2) \times (3.3 \pm 0.3)$	$(17.8 \pm 2.3) \times (4.0 \pm 0.5)$	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i>
HN-XH-S	$(8.1 \pm 1.45) \times (3.6 \pm 0.4)$	$(20.5 \pm 4.11) \times (4.3 \pm 0.6)$	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i>
HB-TS-R	$(7.7 \pm 1.5) \times (3.1 \pm 0.4)$	$(19.3 \pm 3.5) \times (3.8 \pm 0.2)$	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (100%)	<i>F. moniliiforme</i> (99%)	<i>F. moniliiforme</i>
HB-TS-S	$(12.8 \pm 1.8) \times (4.7 \pm 0.3)$	$(18.0 \pm 4.5) \times (4.8 \pm 0.6)$	<i>F. proliferatum</i> (100%)	<i>F. proliferatum</i> (99%)	<i>F. proliferatum</i> (98%)	<i>F. proliferatum</i>

注：括号内数据表示某种镰刀菌与 GenBank 中相同种类镰刀菌的同源性。

Note: Identity of between one *Fusarium* species and the corresponding *Fusarium* species in GenBank are shown in parentheses.

表 2 种传镰刀菌对黄瓜种子发芽的影响

Table 2 Effect of seedborne *Fusarium* on cucumber seed germination

处理 Treatments	第 4 天 Fourth day			第 8 天 Eighth day			第 10 天 Tenth day		
	发芽势/% Germination energy	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index	发芽率/% Percentage germination	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index	株高/cm Height of plant	根长/cm length of root	单株鲜重/g Fresh weight of each plant
CK	92.2 a	13.1 ab	305.5 a	92.2 a	33.1 a	463.3 a	5.7 a	14.4 a	0.26 a
HLJ-XC-S	37.7 cd	11.0 bc	192.5 bc	62.2 c	26.5 cd	141.2 d	0.8 d	6.0 c	0.20 bc
GD-HY-S	64.5 b	11.1 bc	213.2 b	71.5 bc	21.5 e	371.8 b	3.6 b	13.6 ab	0.26 a
SC-CQ-P	46.7 bc	11.3 b	205.4 bc	76.7 bc	24.4 d	59.2 e	1.2 d	2.0 d	0.21 abc
LN-ZN203-S	26.0 d	9.1 c	102.1 d	38.2 d	26.4 cd	233.8 c	2.6 c	8.3 c	0.18 c
HLJ-XC-X	88.0 a	12.8 abc	219.8 b	88.0 a	21.2 e	366.2 b	2.7 c	14.4 a	0.26 a
LN-ZN6-S	96.7 a	12.2 abc	115.1 cd	96.7 a	29.5 abc	213.4 c	1.1 d	8.9 bc	0.18 c
HB-TS-S	36.7 cd	9.4 d	226.1 b	95.8 a	29.9 abc	368.5 b	3.7 b	13.7 ab	0.24 ab
HB-TS-R	93.3 a	10.8 cd	100.2 de	93.3 a	24.3 d	168.0 d	0.9 d	6.3 d	0.19 bc
HN-XH-S	90.0 a	14.5 a	232.4 b	85.6 a	27.5 bcd	378.9 b	3.1 bc	14.9 a	0.23 abc

注：同一列的相同字母表示在  $P_{0.05}$  水平下没有差异。Note: Values followed by the same letters within a column are not significantly different at  $P_{0.05}$  level.

## 参 考 文 献

- [1] 王惠哲,李淑菊,霍振荣,等. 探讨黄瓜枯萎病 DNA 遗传多态性研究的可能性[J]. 天津农业科学,2006,12(3):4-7
- [2] Owen J H. *Fusarium* wilt of cucumber[J]. Phytopathology, 1955,45:435-439
- [3] Shen W, Lin X, Zhang H, et al. Land use intensification affects soil microbial populations, functional diversity and related suppressiveness of cucumber *Fusarium* wilt in China's Yangtze River Delta[J]. Plant Soil, 2008,306(1/2):117-127
- [4] Ilieva E, Mladenov M, Ali A Z. Species composition of the pathogens of *Fusarium* disease of glasshouse cucumber[J]. Gradinarska I Lozarska Nauka, 1980,17(1):69-75
- [5] Braccini A L, Dhingra O D. Identification of fungi associated with soybean (*Glycine max* (L) Merrill) and cucumber (*Cucumis sativus* L) seeds by different detection methods[J]. Revista UNMAR, 1996,18(3):495-503
- [6] Badr A E, Dougdoug K A, Embaby E M. Pathogens associated with vegetable seeds used in producted agriculture[J]. Faculty of Agriculture, Zagazig University, 1997,35(3):1293-1313
- [7] Ruhul A B M, Rashid M M, Meah M B. Efficacy of garlic tablet to control seed-borne fungal pathogens of cucumber [J]. Journal of Agriculture and Rural Development, 2009,7(1/2):135-138
- [8] Menezes V O, Pedroso D C, Piveta G, et al. Detection and influence of *Fusarium* spp in physiological quality of cucumber seeds[J]. Ciencia Rural, 2011,41(2):193-199
- [9] Pushpa K, Borkar G M, Patil D V. Studies on seed borne pathogens of pumpkin, cucumber, watermelon and mushmelon [J]. Journal of Soils and Crops, 1999,9(2):234-238
- [10] 毕扬,王燕,张文华,等. 黄瓜种子带菌检测及杀菌剂消毒处理效果[J]. 种子,2007,26(1):11-14
- [11] 蒋荷. 黄瓜种传镰刀菌的初步研究[D]. 北京:中国农业大学,2012
- [12] 吴学宏,刘西莉,刘鹏飞,等. 西瓜种子带菌检测及杀菌剂消毒处理效果[J]. 农药学报,2003,5(3):39-44
- [13] O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg H I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex[J]. Mycologia, 1998,90(3):465-493
- [14] Fakhfakh M M, Yahyaoui A, Rezgui S, et al. Identification and pathogenicity assessment of *Fusarium* spp sampled from durum wheat fields in Tunisia [J]. African Journal of Biotechnology, 2011,34(10):6529-6539
- [15] O'Donnell K, Cigelnik E, Casper H H. Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum* [J]. Fungal Genetics and Biology, 1998,23(1):57-67
- [16] 国际种子检验协会(ISTA). 国际种子检验规程[M]. 农业部全国农作物种子质量监督检测中心,浙江大学种子科学中心,译. 北京:中国农业出版社,1996:15-18,127
- [17] Summerell B A, Salleh B, Leslie J F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification[J]. Plant Disease, 2003,87(2):117-128
- [18] 陈剑山,郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(13):3785-3786,3792

责任编辑:苏燕