

黄瓜根腐病致病病原的鉴定

王惠哲¹, 李淑菊², 马德华², 董金皋¹

(1. 河北农业大学 植保学院, 河北 保定 071001; 2. 天津市黄瓜研究所, 天津 300192)

摘要: 在天津市及周边地区采集病株进行组织分离, 同时分离到两类病原菌, 经初步的生物学特性鉴定表明, 引起黄瓜根腐病的主要病原菌为甜瓜疫霉、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌。经接种试验, 认为甜瓜疫霉为主要致病菌。

关键词: 黄瓜根腐病; 病原菌鉴定; 致病性

中图分类号: S436.421.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)02-0074-04

Identification of the Pathogen of Cucumber Root Rot

WANG Hui zhe¹, LI Shu-ju², MA De-hua², DONG Jin gao¹

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. Tianjin Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

Abstract: Pathogens are isolated from diseased cucumber plants collected in Tianjin and regions close to it, and two kinds of pathogens are isolated at the same time, primary biological characteristic identification shows that *Phytophthora melonis*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* (Mart) Sacc are the main pathogens. Inoculation experiment indicates *Phytophthora melonis* play a main role on the infection.

Key words: Cucumber root rot; Pathogen identification; Pathogenicity

黄瓜根腐病在各地普遍发生, 是继疫病、枯萎病之后的又一毁灭性土传病害, 该病一般在结瓜期发病, 蔓延快、为害重、损失大, 发病率轻者 30%~40%, 重者 70%~80%。病菌主要侵染根部, 初呈水浸状, 后呈浅褐色湿腐, 主根受害后引起根茎部缢缩, 病部腐烂处的维管束变褐, 但不向上扩展, 可与枯萎病相区别; 后期病部往往变糟, 组织破碎, 仅留下丝状维管束。病株地上部初期症状不明显, 随病情发展中午叶片萎蔫, 早晚恢复, 严重的则多不能恢复而枯死, 植株呈现青枯状。

有关黄瓜根腐病的文献报道认为, 引起黄瓜根腐病的主要病原菌是镰刀菌^[1, 2]和腐霉菌^[3~5]。根腐病的病因较为复杂, 可能存在病菌的复合侵染, 不同地区的主要致病菌也可能有所不同, 为此我们从 1999~2002 年在天津及周边地区采集黄瓜根腐病株, 并进行病原分离、鉴定, 以确定致病病原, 为进行

有效防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病原菌的分离和纯化

1999~2002 年采自天津市及周边地区黄瓜根腐病病株, 从显症后不同时间的病株根及根茎部各切取 5 mm² 病健交界处组织一块, 在无菌条件下用常规方法进行组织分离、单孢纯化, 分离获得菌株按不同类型编号、转管, 共分离到 88 个菌株, 保存于 4℃ 冰箱待鉴定。

1.2 黄瓜根腐病病原菌的鉴定

纯化后菌株在 PDA 平板上培养, 观察培养性状, 经初步鉴定全部分离菌株可归为两类, 即疫霉属 (*Phytophthora*) 和镰刀菌属 (*Fusarium*), 分别参照郑小波^[6]、陆家云^[7]和王拱辰^[8]的方法作进一步形态鉴定。

收稿日期: 2002-08-08

作者简介: 王惠哲 (1978-), 女, 河北定州人, 在读硕士, 主要从事黄瓜病害研究工作, 李淑菊为通讯作者。

1.3 黄瓜根腐病病原菌优势菌的致病性检测和回接试验

根据柯赫氏法则, 选用致病力强的菌株进行回接, 将孢子悬浮液接种到健康无病的黄瓜植株上, 检测菌株的致病力及病症, 从接种后发病的植株上再进行病原菌分离, 进一步确定分离菌株是否为致病菌。

1.3.1 疫霉属菌株回接试验 选用天津市黄瓜研究所提供的长春密刺、Q22 黄瓜材料(以下同), 采用蘸根接种法和茎部伤口贴菌法接种。

1.3.2 镰刀菌回接试验 采用孢子悬浮液胚根接种法^[9]和蘸根接种法接种。

1.3.3 两类菌致病关系试验 参照任光地的方法^[10], 供试植株蘸根接种, 先接疫霉菌, 待 24 h 后, 再接镰刀菌, 对照只接疫霉菌, 观察记载发病情况。

用同样方法先接镰刀菌, 待 24 h 后再接疫霉菌, 对照接种镰刀菌, 观察记载发病情况。

2 结果与分析

1999~ 2002 年从天津及周边地区黄瓜根腐病

严重地块采集发病症状明显的病株 48 株, 其中 43 株分离到病菌, 分离率为 89.6%, 有 51.16% 的病株同时分离到两类真菌, 分别为疫霉和镰刀菌, 并分别选取典型菌株进行种的鉴定, 各地区分离的病原菌大致相同。

2.1 疫霉菌生物学特性鉴定

2.1.1 培养特性 用 5 mm 直径的打孔器在已培养的菌落边缘打取菌块, 置于 PDA 平板上(26 ± 1)℃下培养, 设 4 次重复, 第 3 d 和第 5 d 测量菌落扩展直径及日平均菌丝生长速度, 并在第 5 d 观察、测量菌丝宽度, 描述菌落形态。

该菌培养特性见表 1, 在 PDA 上菌落灰白色, 生长较疏松, 边缘较平滑, 不整齐, 菌落花瓣型(P 型)。镜检可见菌丝无隔, 宽 3.5~ 7.5 μm, 菌丝分枝处稍缢缩, 分枝角度较大。

2.1.2 形态特征 将在 PDA 上培养后的病菌打菌块, 置于灭菌的培养皿中加无菌水, 再在其中加入几块黄瓜叶, 诱导孢子囊的产生, 室温培养, 观察孢子囊的形态。另外在 PDA 平板上, 25℃条件下培养 5 d 后, 观察有无厚垣孢子和膨大菌丝体的产生。

表 1 疫霉菌的培养特性

菌株 代号	PDA 上菌落直径(mm)		平均生长速度 (mm/d)	菌丝		菌落	
	3 d	5 d		分枝	宽度(μm)	颜色	形状
F000- 1	24.24	43.59	9.67	分枝处稍缢缩, 分枝角度较大	3.5~ 7.5	灰白色	花瓣型

在 PDA 培养基上培养一段时间后, 划断菌丝可产生孢子囊, 或 PDA 上培养后的菌块置于灭菌三角瓶中, 加无菌水, 并在其中加入小块的黄瓜叶片也可诱导孢子囊的产生。黄瓜叶片上产生的孢子囊卵形或长椭圆形, 顶生式, 单生, 不易脱落, 有层出现象, 孢子囊有乳头状突起, 但突起较低, 较扁平, 黄褐色, 大小为 45~ 55 μm × 27.5~ 37.5 μm。长宽比为 1.467~ 1.636: 1。无菌水中产生的孢子囊顶端平没有乳突, 大小为 22.5~ 55 μm × 15~ 35 μm。菌丝易产生瘤状或节状膨大菌丝体, 为姜瓣状或不规则的圆形或近圆形, 有时形成结节状菌丝, 菌丝间不形成厚垣孢子。

2.1.3 根据致病病原菌疫霉菌典型菌株的培养性状及形态特征, 参考郑小波^[6]和陆家云^[7]的鉴定方法, 可以确定其为甜瓜疫霉 (*Phytophthora melonis*), 79.07% 的病株分离出该病菌。

2.2 镰刀菌生物学特性鉴定

2.2.1 培养特性 用 5 mm 直径的打孔器在 4 个典型代表菌株的菌落边缘打取菌块, 置于 pH 5.6 左右的 PSA 平板上 25℃条件下培养, 检测 96 h 后的菌落直径, 并观察菌落形态及气生菌丝形状。将培养物培养 4 d 后, 取出置于室内散射光下 14 d 后记载色泽变化, 试管斜面表层的颜色为 PSA 基物表面色泽, 观察培养基有无变色记为基物色泽; 观察在米饭培养基和 Bilay's 培养基上色泽记载综合的颜色^[8]。4 个典型菌株的培养特性见表 2。

2.2.2 形态特征观察 参照王拱辰的方法^[8], 选用上述 4 个典型菌株, 在 PSA 平板, 25℃下培养, 观察小型分生孢子的数量、形状、着生方式及孢子大小、有无分隔, 每菌株测量 30 个孢子; 大型分生孢子及其顶胞、基胞形状, 孢子分隔数及其大小; 厚垣孢子形状及其着生方式。

表 2 镰刀菌的培养特性比较

菌株 代号	生长速度 (mm/ d)	不同培养基上培养物色泽					PSA 上气生菌丝
		PSA			米饭	修改的 Bilay's	
		菌 丝	基物表面	基 物			
F000- 2- 1	9.95~ 12.69	白至粉白	肉色	不变色	浅桃红色	气生菌丝少, 白色	绒状
F025- 2- 1	8.94~ 10.13	白至浅灰色 间土黄色*	肉色	不变色	淡咖啡色	气生菌丝少, 白色 有时间土黄色*	薄绒状
F043- 2	4.58	灰白色		桔黄色	淡咖啡色	气生菌丝少, 白色	絮状
F027- 2- 1	15.69	白色	肉色	土黄色		气生菌丝少, 桔黄色	丛卷毛状

注: * 表示间有土黄色分生孢子座

在培养初期, 用 Bilay's 等透明度大的培养基培养, 后用头部扁平的解剖针挑取一薄片基物连同菌丝体平放在载玻片上, 加盖玻片, 将水从盖玻片边缘加入, 让菌丝慢慢伸展开, 观察产孢细胞。

观察结果证明, 镰刀菌的 4 个典型菌株均可产生大、小两种类型分生孢子, F000- 2- 1 小型分生孢子数量多, 大型分生孢子数量很少, 镰刀形, 顶胞

较均匀的逐渐变尖, 基胞略呈三角形, 多数 3 隔; 产孢细胞短, 单瓶梗; 厚垣孢子很容易产生, 球形, 单生或对生, 偶有串生。F025- 2- 1 小型分生孢子非串生; 大型分生孢子较宽, 马特型, 两端稍钝, 顶胞尖, 基胞圆形, 具有 2~ 5 个分隔; 产孢细胞为长筒形单瓶梗, 少分枝; 厚垣孢子球形, 单生或对生, 其他特征见表 3。

表 3 镰刀菌的形态特征比较

菌株 代号	小型分生孢子			大型分生孢子			厚垣孢子	产孢细胞
	形 状	分 隔	大小(μm)	形 状	分 隔	大小(μm)		
F000- 2- 1	卵或肾形	0 或 1	4.75~ 22.5 × 2.5~ 5.0	镰刀形	3 隔为主	15.5~ 31.5 × 2.75~ 5.0	球形, 单或对生, 偶有串生	短, 单瓶梗
F025- 2- 1	卵或肾形	0 或 1	5.0~ 26.25 × 2.5~ 5.5	马特型	3 隔为主	22.5~ 50.0 × 4.5~ 6.0	球形, 单或对生	长筒形单瓶 梗, 少分枝
F043- 2	卵至长圆形	0 或 1		拟纺锤形	3 隔为主		2~ 3 个在一起 球形, 间生、单	二分叉状, 长单瓶梗
F027- 2- 1	倒卵形	0 或 1		镰刀形	3 隔为主		生或串生	多芽生

2.2.3 根据致病菌镰刀菌典型菌株的培养性状及形态特征, 对照《真菌鉴定手册》^[11] 和《The Genus *Fusarium*》^[12] 进行鉴定, F000- 2- 1 菌株为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、F025- 2- 1 菌株为茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、F043- 2 菌株为腹状镰刀菌(*Fusarium ventricosum*)、F027- 2- 1 菌株为半裸镰刀菌(*Fusarium semitectum*); 在分离菌株中以尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌为主, 分别有 46.51%, 23.26% 的病株分离出这两种菌, 只有 2.32% 的病株能分离出腹状镰刀菌和半裸镰刀菌。

2.3 黄瓜根腐病病原菌致病性测定和回接试验结果

病原菌接种试验表明, 甜瓜疫霉蘸根接种不同黄瓜材料可使黄瓜苗不同程度发病, 呈典型根腐状,

从病株可再分离获得和接种菌相同的病原菌; 贴接不同黄瓜材料茎基部、叶片、叶腋处也都发病。尖孢镰刀菌胚根接种不同黄瓜材料, 有高抗材料出现, 感病材料发病前或发病后也可分离到原病菌; 茄病镰刀菌胚根接种无发病株出现, 但再分离也可分离到原病菌; 尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌蘸根接种也无发病株出现。清水对照均未发病也未检出病原菌。

试验表明, 先接种疫霉后接镰刀菌的植株和先接镰刀菌后接疫霉的植株均表现出典型的根腐症状, 再分离均得到两种病原菌; 只接疫霉的植株表现出典型的根腐症状, 再分离得到原病菌; 而只接镰刀菌的未表现症状, 再分离也得到原病菌。说明疫霉是引致黄瓜根腐病的主要致病菌, 但镰刀菌在其中也有相应的作用, 测定结果见表 4。

表 4 黄瓜根腐病病原菌致病性测定

黄瓜材料	疫霉	尖孢镰刀菌	茄病镰刀菌	先接疫霉后接镰刀菌	先接镰刀菌后接疫霉	ck
长春密刺	+	-	-	+	+	-
Q22	+	+	-	+	+	-

注: + 表示发病, - 表示不发病

3 结论与讨论

从黄瓜病株根部及茎基部分离出 3 种主要病原菌, 经鉴定表明, 这些分离菌分别为甜瓜疫霉、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌。致病性测定结果表明, 甜瓜疫霉是引起黄瓜根腐病的又一致病菌, 且是天津及周边地区黄瓜根腐病的主要致病菌, 与前人的报道有所不同。

从疫霉的培养特性以及形态特征上看, 与陆家云等^[7]报道的黄瓜疫病菌甜瓜疫霉基本相似, 菌丝分枝处有缢缩现象只是未提及, 本研究与余永年^[13]的相关叙述一致, 根据其培养特性以及形态特征, 我们认为天津及周边地区黄瓜根腐病的致病菌仍可以暂定为甜瓜疫霉(*Phytophthora melonis*)。

在实际生产中还没有发现抗根腐病的黄瓜品种, 而尖孢镰刀菌接种结果却有“高抗品种”出现, 茄病镰刀菌接种后也不发病, 但此“高抗品种”不抗甜瓜疫霉菌。由于所采集的病株大部分都能同时分离到两类病原菌, 因此, 上述结果除说明甜瓜疫霉致病力强, 是天津地区主要致病菌外, 还说明尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌也是致病菌之一, 至少能够表明它们和黄瓜根腐病的发生有一定的关系, 可能是接种条件或发病条件不适宜, 或是病菌的潜育期比较长而未观察到典型的根腐病症状, 因此关于镰刀菌和黄瓜根腐病的关系还应做深入研究。

关于甜瓜疫霉菌引起黄瓜根腐病以及从根部感染方面的研究尚未见有相关的报道, 通过试验我们明确了甜瓜疫霉能引起黄瓜的根腐病, 且能够从根部侵染, 但它的致病机制还不清楚, 这也有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Сайфутдинова М. 李宏科, 译. 保护地上的黄瓜和番茄根腐病[J]. 植物病理学文摘, 1986, (3): 39- 40.

[2] 吕佩珂, 李明远, 吴钜文, 等. 中国蔬菜病虫原色图谱[M]. 北京: 农业出版社, 1992.

[3] 西安市农业科学研究所. 黄瓜腐霉根腐病的防治研究[J]. 微生物学通报, 1978, 5(1): 5- 6.

[4] Stanghellini M E, White J G, Tomlinson J A, *et al.* Root rot of hydroponically grown cucumbers caused by zoospore - producing isolates of *Pythium intermedium*[J]. Plant Disease, 1988, 72(4): 358- 359.

[5] Green H , Jensen D F. Population studies of *Trichoderma harzianum* and *Pythium* spp and biological control of damping- off and root rot of cucumber in peat following substrate amendment with oatmeal[J]. Bulletin OILB SROP, 1992, 15(1): 42- 44.

[6] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.

[7] 陆家云, 龚龙英. 南京地区黄瓜疫病菌的鉴定及生物学特性的研究[J]. 南京农学院学报, 1982, (3): 27- 35.

[8] 王拱辰, 郑 重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.

[9] 翁祖信, 蒋兴祥, 肖小文. 黄瓜枯萎病抗病性鉴定方法研究——胚根接种法[J]. 中国蔬菜, 1985, (2): 30- 33.

[10] 任光地. 辣椒疫病病原研究[J]. 甘肃农业科技, 1990, (10): 33- 35.

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

[12] Booth C. The Genus *Fusarium*[M]. Printed in Great Britain by The Eastern Press Limited, 1971.

[13] 余永年. 中国真菌志: 霜霉目[M]. 北京: 科学出版社, 1998.