

不同 pH 值对黄瓜枯萎病致病菌生长影响的研究

李亚航, 施艳娥, 巴顿, 丁卓, 崔浩楠

(河北科技师范学院园艺科技学院/河北省特色园艺种质挖掘与创新利用重点实验室, 河北 秦皇岛 066000)

摘要: 黄瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 侵染所引起的黄瓜病害, 明确尖孢镰刀菌的侵染条件对于黄瓜枯萎病的防治具有重要意义。为了探究不同 pH 值条件对尖孢镰刀菌生长状态的影响, 本试验设置了不同 pH 值梯度的 PDA 培养基与 PDB 培养基, 观察测定不同培养基中尖孢镰刀菌的生长速度与菌落形态, 以期探索最适宜黄瓜枯萎病发生的 pH 值条件。结果发现黄瓜枯萎病致病菌在 PDA 培养基中最适条件为 pH 5.5~9.0 (实际为 4.5~6.5), 且在不同 pH 值下的形态也有差异; 在 PDB 培养基中, pH 11 处理下的病原菌生长情况最差, 这说明菌落不适宜在碱性环境下的 PDB 培养基中生长。因此, 尖孢镰刀菌适宜在 pH 4.5~6.5 范围内生长。

关键词: 尖孢镰刀菌; pH 值; PDA 培养基; PDB 培养基

中图分类号: S436.421.1+3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)05-0069-05

Study on the Effect of Different pH Environments on the Growth of Cucumber *Fusarium* Wilt Pathogen

LI Yahang, SHI Yan'e, BA Dun, DING Zhuo, CUI Haonan

(College of Horticulture Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology/Hebei Provincial Key Laboratory of Germplasm Mining and Innovative Utilization of Characteristic Gardening, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract: Cucumber wilt a cucumber disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Clarifying the environmental conditions under which cucumber wilt disease infects cucumbers is of great significance for the prevention and control of cucumber wilt disease. In order to investigate the effect of different pH conditions on the growth status of cucumber wilt pathogen, this experiment configured PDA and PDB media with different pH gradients, observed and measured the growth rate and colony morphology of cucumber wilt pathogen in different media, in order to explore the most suitable pH for the occurrence of wilt disease. The results showed that the optimal pH for PDA culture medium was 5.5~9.0 (actually 4.5~6.5), and the morphology of the bacteria also varied at different pH levels. In the PDB medium, the growth of the pathogen under pH 11 treatment was the worst compared to other pH treatments, indicating that the colony was not suitable for growth in the PDB medium under alkaline conditions. Therefore, *Fusarium oxysporum* is suitable for growth within the pH range from 4.5 to 6.5.

Key words: *Fusarium oxysporum*; pH; PDA; PDB

黄瓜枯萎病主要是由尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 引起, 其存在两种专化型, 包括尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 和尖孢镰刀菌半黄瓜专化型 (*F. oxysporum* f. sp. *rasicis-cucumerinum*)^[1], 其中尖孢镰刀菌黄瓜专化型为优势菌群, 仅对黄瓜有致病性^[2]。就目前来

说, 尖孢镰刀菌黄瓜专化型存在 4 个生理小种, 我国的是生理小种 4 号^[3-4]。

黄瓜枯萎病是一种危害性极强的世界性土传病害, 病原菌对植物的维管束进行破坏, 使植物吸收运输水分的能力受到影响, 最终导致植株枯死^[5-6]。在黄瓜整个发育时期都有危害, 连作地更加严重^[7]。发病率一般在 10%~30%, 在某些年份能达到 50%, 且存在绝产的可能性^[8]。目前防治黄瓜枯萎病的措施主要包括化学防治^[9-10]、抗枯萎病品种选育^[11-12]、生物防治^[13-15]等。这些方法对于黄瓜枯萎病的防治具有重要意义。

收稿日期: 2024-01-15

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目 (QN2022068); 河北省自然科学基金青年项目 (C2022407038)

作者简介: 李亚航 (1998-), 男, 在读硕士, 主要从事黄瓜分子遗传育种研究。

pH值对枯萎病致病菌生长发育有重要的影响,周梦^[16]在pH 4.5~7.5范围内对黄瓜枯萎病致病菌进行研究,发现在根际pH 5.5时致病能力最强;在根际pH 6.5时致病能力最弱。姚梦碟^[17]的研究结果与周梦^[16]几乎一致,将黄瓜枯萎病致病菌在PDA培养基和PDB培养基中分别培养,最终发现黄瓜枯萎病致病菌在pH 5.5时生长最好且致病能力最强。李望梅等^[18]在pH 3~11范围内对香蕉枯萎病致病菌在PDA、PDB以及Czapek培养基中进行培养,结果发现pH 5~7范围内最适宜其生长,pH<5或pH>7时生长受到影响。彭双等^[19]研究了土壤pH值对西瓜枯萎病致病菌和黄瓜枯萎病致病菌的影响,结果发现在pH 4~5.5范围内适宜病原菌生长。而康萍芝等^[20]对黄瓜枯萎病致病菌的生物学特性进行研究,发现最适宜黄瓜枯萎病致病菌生长的条件为pH 6~9,pH 7~9时孢子萌发率较高,同时发现,在PDA培养基和PSA培养基中生长速率最快、产孢量及孢子萌发率较高。目前,黄瓜枯萎病致病菌在PDA培养基和PDB培养基中最适pH值的研究报道较少。PDA培养基和PDB培养基中含有丰富的营养物质,相对于土壤来说,更易改变pH值,容易对不同土壤环境进行模拟研究。PDA培养基和PDB培养基加热后pH值会发生一定变化^[21-22]。因此,为探究黄瓜枯萎病致病菌在不同pH值下的生长情况,本研究设置14个pH值梯度进行观测。范围为pH 4.5~11.0,每隔0.5设置一个梯度,共计14个处理,重复3次。确定黄瓜枯萎病致病菌最适生长pH值,对防治黄瓜枯萎病和抗枯萎病品种培育具有重要意义。

1 材料与方 法

尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*),来源于田间病菌分离纯化。

PDA培养基:取200 g马铃薯切块,加水煮沸10 min,四层纱布过滤后加入20 g葡萄糖和20 g琼脂,搅拌加水至1 000 mL,分别倒入14个锥形瓶中调节至pH 4.5~11.0,每0.5为一个梯度,灭菌后接种菌株,暗培养18 d,从第四天开始测量菌落直径,共测量15 d。

PDB液体培养基:取200 g马铃薯切块,加水煮沸10 min,四层纱布过滤后加入20 g葡萄糖,搅拌加水至1 000 mL;分别倒入14个锥形瓶中调节至pH 4.5~11.0,每0.5为一个梯度,灭菌后接种菌株,暗培养6 d,每天测量OD₆₀₀值。

2 结果与分析

2.1 不同pH值的PDA培养基对黄瓜枯萎病致病菌生长的影响

2.1.1 PDA固体培养基高温灭菌前后pH值的变化

由表1可知,pH 4.5、5.0、5.5的PDA培养基经过高温灭菌后pH值略有变化;而pH 6.0~11.0的培养基pH值明显降低,尤其在pH 7.0~11的培养基;pH 7.5~10.5区间内的培养基降为弱酸性。

表1 PDA固体培养基高温灭菌前后pH值变化

编号	灭菌前	灭菌后
1	4.5	4.5~5.0
2	5.0	4.5~5.0
3	5.5	5.0~5.5
4	6.0	5.0~5.5
5	6.5	5.5~6.0
6	7.0	5.5~6.0
7	7.5	6.0~6.5
8	8.0	6.0~6.5
9	8.5	6.0~6.5
10	9.0	6.0~6.5
11	9.5	6.0~6.5
12	10.0	6.0~6.5
13	10.5	6.0~6.5
14	11.0	7.0~7.5

2.1.2 不同pH值下黄瓜枯萎病致病菌的生长情况

由表2、表3可知,pH 4.5~7.0条件下菌落直径与pH值呈极显著正相关关系,在此区间内,随着

表2 黄瓜枯萎病致病菌接种7 d后的直径及日生长速率

编号	pH	直径/mm	日生长速率/mm
1	4.5	63.50	9.07
2	5.0	66.67	9.53
3	5.5	77.67	11.10
4	6.0	75.17	10.74
5	6.5	76.67	10.96
6	7.0	79.83	11.40
7	7.5	69.83	9.97
8	8.0	72.50	10.36
9	8.5	67.17	9.60
10	9.0	76.17	10.96
11	9.5	71.33	10.19
12	10.0	84.33	12.04
13	10.5	48.17	6.89
14	11.0	35.00	5.00

表3 pH 4.5~7.0条件下菌落直径与pH值相关性分析
($P<0.01$)

		pH值	菌落直径
pH值	皮尔逊相关性	1	0.792**
	Sig.(双尾)		0.000
	个案数	18	18
直径	皮尔逊相关性	0.792**	
	Sig.(双尾)	0.000	
	个案数	18	18

pH值的增加,菌落的直径也呈现出增加的趋势。pH 10.5与pH 11.0的菌落直径与其他处理有较大差异,黄瓜枯萎病致病菌在这两个pH值条件下生长缓慢且菌丝稀疏,说明枯萎病菌不适合在pH 10.5和pH 11.0的PDA平板上生长。

2.1.3 培养14 d后不同处理的菌落情况

经过14 d培养后,不同处理的菌落呈现出较明显的差异。pH 5.0的菌落呈现肉色,较薄;pH 6.0的菌落呈现出较淡的粉色,菌丝粉白色致密且呈放射状,分布均匀饱满;pH 7.0的菌落呈较深粉色和白色菌丝,分布较均匀;pH 8.0的菌落呈现更深的粉红色,有凸起絮状,分布较均匀;pH 10.0的菌丝呈现白色絮状,但比较疏松;pH 11.0条件下呈现白色凸起絮状菌丝,分布较少且薄,在中心及附近位置生长少量菌丝。

不同pH值下培养基颜色存在差异,肉眼观察发现pH 4.5~11.0的颜色由浅至深,从淡黄色到浅棕色再到棕黑色变化,pH 4.5的培养基颜色最浅,为淡黄色;pH 11.0的PDA培养基颜色最深,为棕黑色。

2.1.4 不同处理条件下菌落长满所需时间

第六天9:00,pH 6.0的处理中一板直径为85 mm,而其余2板未长满;第七天9:00,pH 10.0的处理中有2板长满菌落,另一板菌落直径为83 mm,接近长满,21:00,pH 10的3板均长满菌落;第十四天9:00,pH 7的处理中1板长满菌落;21:00,pH 9的处理中1板长满菌落;第十五天9:00,pH 5.5的处理中一板直径为85 mm,pH 7.0的处理中剩余2板也长满菌落,21:00,pH 9.0的处理中又有1板长满菌落。

经过15 d的菌落直径测量,最终pH 7.0、pH 10.0处理的3个平板均长满菌落,pH 9.0处理的2个平板长满菌落,pH 6.0和pH 5.5的处理中均只有1板长满,其余处理菌落均未长满平板。

2.2 不同pH值下PDB培养基对黄瓜枯萎病致病菌生长的影响

2.2.1 PDB液体培养基灭菌前后pH值的变化

由表4可知,PDB液体培养基在经过高温灭菌后,pH 4.5、5.0、5.5的培养基pH值略有变化;而pH 6.0~11.0的培养基pH值明显下降,pH 8.0~10.0的培养基在高温灭菌后pH值低于pH 7.5培养基的pH值,总体徘徊在5.98~6.30之间;在灭菌前呈碱性的培养基中仅有pH 11.0的培养基在灭菌后仍呈现碱性。

表4 PDB培养基高温灭菌前后pH值的变化

编号	灭菌前	灭菌后
1	4.5	4.50
2	5.0	4.75
3	5.5	5.05
4	6.0	5.16
5	6.5	5.50
6	7.0	5.65
7	7.5	6.30
8	8.0	6.20
9	8.5	6.05
10	9.0	6.00
11	9.5	5.98
12	10.0	6.13
13	10.5	6.45
14	11.0	8.35

2.2.2 不同pH值下PDB液体培养基对黄瓜枯萎病致病菌浓度的影响

由表5、表6可知,黄瓜枯萎病菌OD₆₀₀值与pH值之间相关性较低。另外,在pH 11.0的培养基内菌落生长明显不如其他处理,由此可见pH 11.0的PDB培养基不适合黄瓜枯萎病致病菌生长。

2.2.3 不同pH值下PDB液体培养基对黄瓜枯萎病致病菌形态的影响

由图1可知,pH 4.5~11的PDB培养基中的菌丝和孢子近乎一致,并无明显差异,说明黄瓜枯萎病菌在此pH值范围内均能生长。

3 讨论与结论

黄瓜枯萎病致病菌尖孢镰刀菌(黄瓜专化型)通过菌丝及孢子在土壤中传播。姚梦碟^[17]、Frans等^[23]研究发现尖孢镰刀菌在pH 4.0~7.0范围内均能够生长,而在pH 5.0~7.0范围内孢子能够正常萌发。另外,姚梦碟^[17]发现在PDA培养基中病原

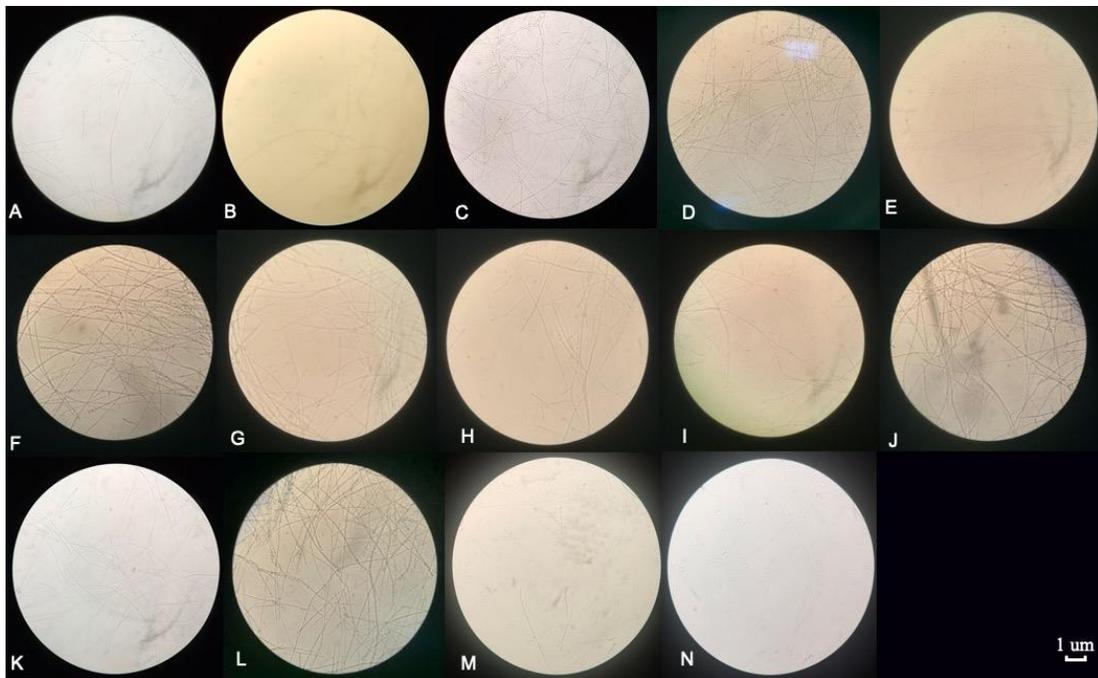
表5 不同pH值下PDB培养基中菌落OD₆₀₀值的变化

编号	pH值	OD ₆₀₀ 值
1	4.5	0.763
2	5.0	0.872
3	5.5	0.811
4	6.0	0.825
5	6.5	0.830
6	7.0	0.640
7	7.5	0.818
8	8.0	0.812
9	8.5	0.796
10	9.0	0.776
11	9.5	0.728
12	10.0	0.772
13	10.5	0.811
14	11.0	0.563

表6 菌落OD₆₀₀值与pH值相关性分析($P<0.01$)

		pH值	OD ₆₀₀ 值
pH值	皮尔逊相关性	1	-0.169
	Sig.(双尾)		0.391
	个案数	28	28
OD ₆₀₀ 值	皮尔逊相关性	-0.169	1
	Sig.(双尾)	0.391	
	个案数	28	28

菌适合在pH 5.5~7.5范围内生长;在PDB培养基中酸性环境对菌丝生长的影响更显著。本实验也证实了其在pH 4.5~11.0范围的PDA培养基和PDB培养基内均能够生长,同时在pH 4.5~7.0菌落直径随pH值的上升而增加,因高温会使培养基pH值发生变化(PDA培养基加热后为4.5~7.5;



注:A~N对应pH4.5~11.0

图1 不同pH值下PDB培养基中的黄瓜枯萎病致病菌的菌丝及孢子

PDB培养基加热后为4.5~8.35),这与姚梦蝶^[17]、Frans等^[23]结果近似。尖孢镰刀菌在pH 10.5和pH 11.0的PDA培养基中,生长慢且菌丝稀疏;在PDB培养基中,pH 11.0处理生长状态最差。周梦^[16]的研究表明尖孢镰刀菌在碱性条件下不利于分泌毒素。

黄瓜枯萎病致病菌在pH 4.5~11.0的PDA固体培养基中,平均生长速度最快是pH 10.0处理,但菌丝相对稀疏,越靠近平板边缘越稀疏;而在pH 6.0的其中1板上,生长速度最快且生长茂密,综合来说,黄瓜枯萎病致病菌在PDA培养基中最

适酸碱度为pH 5.5~9.0,而最不适合生长的处理是pH 10.5和pH 11.0,生长速度慢且菌丝生长稀疏,这与周梦^[16]、姚梦蝶^[17]、康萍芝^[20]、郑肖兰^[24]等研究结果相似,黄瓜枯萎病致病菌在不同pH值中的生长存在差异。

在不同pH值梯度的PDA培养基与PDB培养基上接种尖孢镰刀菌菌株,观察并测定其生长速度与菌落形态,结果发现在PDA培养基中最适范围为pH 5.5~9.0(实际为4.5~6.5),且在不同处理病菌的形态也有差异;在PDB培养基中,pH 11.0菌落生长情况最差。因此,黄瓜枯萎病致病菌适

宜在 pH 4.5~6.5 范围内生长。

参考文献:

- [1] Lievens B, Claes L, Vakalounakis D J, et al. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(9): 2145-2161.
- [2] 兰成忠. 黄瓜枯萎病菌 LAMP 检测及贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 生防机制研究[D]. 南昌:江西农业大学, 2021.
- [3] 翁祖信, 徐新波, 冯东昕, 等. 黄瓜枯萎病菌生理小种研究初报[J]. 中国蔬菜, 1989(1): 19-21.
- [4] 黄仲生, 杨玉茹, 朱晓丹, 等. 中国黄瓜枯萎病菌生理小种鉴定研究进展[J]. 华北农学报, 1994, 9(4): 81-86.
- [5] 徐彦刚, 贺振, 李瑞, 等. 黄瓜枯萎病研究进展[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(6): 1-6.
- [6] Bani M, Rispaill N, Evidente A, et al. Identification of the Main Toxins Isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* Race 2 and Their Relation with Isolates' Pathogenicity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(12): 2574-2580.
- [7] 杨倩, 薛璐, 郭慧, 等. 植物根际促生菌防治黄瓜枯萎病的研究进展[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(1): 1-8.
- [8] 郭嘉华, 武兆昕, 李蕾, 等. 西芹腐根二次酮层物对黄瓜枯萎病的诱导抗性及其转录组学分析[J]. 植物病理学报, 2022, 52(3): 364-376.
- [9] 马永强. 16% 噁霉灵·咯菌腈悬浮剂防治黄瓜枯萎病田间防效试验[J]. 青海农林科技, 2019(2): 79-81.
- [10] Shi X G, Qiao K, Li B T, et al. Integrated management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* in cucumber by combined application of abamectin and fludioxonil[J]. Crop Protection, 2019: 126-132.
- [11] 周红梅, 董从娟, 张海英, 等. 黄瓜抗枯萎病基因连锁分析和定位[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 1980-1986.
- [12] Jing P, Jun X, Xu X W, et al. Inheritance and Quantitative Trait Locus Mapping of *Fusarium* Wilt Resistance in Cucumber.[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1425.
- [13] 李鸿坤, 米佳雯, 池明, 等. 放线菌菌株 HJG-5 生防剂型的研制及对黄瓜枯萎病的防治效果[J]. 西北农业学报, 2020, 29(7): 1087-1094.
- [14] Redda E T, Ma J, Mei J, et al. Biological Control of Soilborne Pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*) of Cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp.[J]. Journal of Life Sciences, 2018, 12(1): 1-12.
- [15] Cong Y Z, Fan H D, Ma Q F, et al. Mixed culture fermentation between *Rhizopus nigricans* and *Trichoderma pseudokoningii* to control cucumber *Fusarium* wilt[J]. Crop Protection, 2019, 124: 104857.
- [16] 周梦. 根际 pH 值对黄瓜枯萎病发生的影响机制[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [17] 姚梦碟. 土壤 pH 值对黄瓜枯萎病发生的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2021.
- [18] 李望梅, 张立丹, 刘芳, 等. pH 值对香蕉枯萎病菌 4 号生理小种生长的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3286-3294.
- [19] 彭双, 王一明, 叶旭红, 等. 土壤环境因素对致病性尖孢镰刀菌生长的影响[J]. 土壤, 2014, 46(5): 845-850.
- [20] 康萍芝, 白小军, 张丽荣, 等. 尖孢镰刀菌黄瓜专化型生物学特性研究[J]. 北方园艺, 2018(22): 65-69.
- [21] 杨勇, 张凤英, 陈岑. PDA 培养基改良配方的研究[J]. 酿酒科技, 2012(4): 29-31.
- [22] 戴肖东, 张丕奇, 马庆芳. PDA 培养基灭菌前后 pH 值变化及对黑木耳菌丝生长的影响[J]. 食用菌, 2008(6): 30-31.
- [23] Frans M, Aerts R, Van L S, et al. Environmental effects on growth and sporulation of *Fusarium* spp. causing internal fruit rot in bell pepper[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(4): 875-883.
- [24] 郑肖兰, 崔昌华, 冯慧丽, 等. 尖孢镰刀菌西瓜专化型菌株的生物学特性[J]. 热带作物学报, 2006(1): 97-100.

(责任编辑:范杰英)