

调 查 研 究

Investigations

北京地区主栽西瓜品种种子携带真菌检测及鉴定

耿丽华, 宋顺华, 芦钰, 史越, 徐秀兰*

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点试验室,

农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097)

摘要 用离体平皿法对北京西瓜产区主栽的 11 个西瓜品种进行种子带菌检测、分离纯化和形态学、ITS 序列比对, 确定其属或种地位。结果表明: 不同品种所带真菌种类有差异, 种子表面携带的优势菌群主要为曲霉属 *Aspergillus* spp.、青霉属 *Penicillium* spp.、链格孢属 *Alternaria* spp. 和镰刀菌属 *Fusarium* spp.; 种子内部寄藏真菌主要为青霉属、根霉属 *Rhizopus* spp. 和曲霉属。种子外部检出的主要病原菌有镰刀菌属的 *F. verticillioides*, *F. proliferatum* 及茎点霉 *Phoma* sp.; 种子内部检出的病原菌有 *F. verticillioides* 和 *F. oxysporum*。不同品种间种子表面携带真菌量与种子内部携带真菌率差异显著, 但种子外部带菌量和内部种仁带菌率之间无显著相关性。本研究对开展西瓜种子处理研究有借鉴意义。

关键词 西瓜; 种子带菌; 真菌鉴定

中图分类号: S 482.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.03.027

Detection and identification of seed-born fungi of main watermelon varieties in Beijing area

Geng Lihua, Song Shunhua, Lu Yu, Shi Yue, Xu Xiulan

(Vegetable Research Centre, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Urban Agriculture(North), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China)

Abstract Seed-born fungi of 11 main watermelon varieties sold in Beijing were detected by culture test, and further purified and identified by morphology and ITS sequencing. The results indicated that seed-born fungi were different among varieties. The dominant seed-borne fungi on the seed surface were *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp.. The genus of *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. and *Aspergillus* spp. were the main internal seed-born fungi. *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *Phoma* sp. were isolated from external seed, and *F. oxysporum* and *F. verticillioides* were isolated from internal seed. Both the amounts of fungi on seed surface and infection rate of internal seeds were significantly different among varieties. However, there was no correlation between the amount of fungi from seed surface and the infection rate from internal seeds. The result of this study will be helpful for development of seed treatment in watermelon production.

Key words watermelon; seed-borne fungi; fungi identification

我国是世界上最大的西瓜生产和消费国。西瓜种植面积居世界首位, 约占世界总面积的 40%。西瓜在我国南北地区种植普遍, 有良好的经济效益^[1-2]。由于目前主流的西瓜品种均为杂交种, 必须每年购买商业种进行播种, 采取有效措施提高商业种的质量是西瓜实际生产中需要解决的重要问题。本试验通过对北京主要西瓜种植地区的 11 个

西瓜品种种子进行检测, 旨在了解西瓜种子携带真菌情况, 为后续实际生产过程中进行种子处理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试西瓜品种

供试西瓜品种共 11 个, 分别为‘暑宝 6 号’、‘天

收稿日期: 2016-06-21 修订日期: 2016-08-29

基金项目: 北京市自然科学基金(6154024); 现代农业产业技术体系北京市西瓜创新团队专项; 北京市农林科学院新学科培育(KJCX20150202)

* 通信作者 E-mail: xuxiulan@nercv.org

骄二号’、‘超越梦想’、‘绿小帅’、‘红小帅’、‘四季小凤’、‘特大早春红玉’、‘全美 2K’、‘北农福田’、‘京欣一号’、‘北农天骄’。其中‘绿小帅’和‘四季小凤’产自甘肃,其余均产自新疆。

1.2 种子带菌检测

1.2.1 种子外部带菌检测

每个品种随机选取 100 粒种子,放入灭菌的 250 mL 三角瓶中,加 50 mL 无菌水并充分振荡,吸取全部悬浮液,4 000 r/min 离心 10 min,倒去上清液,加 1 mL 无菌水均匀悬浮沉淀,取适量悬浮液用无菌水进行系列梯度稀释,每个稀释梯度菌悬液吸取 100 μ L 均匀涂布到直径 9 cm 的 PDA 平板上(PDA 中加 0.06% 乳酸抑制细菌),每个浓度 3 皿,置于 20℃ 恒温箱中黑暗条件下培养,5 d 后观察记录平板上的菌落总数,根据稀释倍数和检测种子数计算种子外部携带的孢子负荷量和检出真菌的分离比例。每个供试品种重复 4 次。

孢子负荷量(cfu/粒)=3 皿菌落总数/0.3 mL $\times$ 稀释倍数/100;

分离比例(%)=(某类真菌菌落个数/菌落总数) $\times$ 100。

1.2.2 种子内部带菌检测

每个供试品种随机选取 40 粒种子在 1% 的次氯酸钠溶液中浸泡 1 min,然后用无菌水冲洗 3 次,在培养皿底部铺两层灭菌滤纸,将种子倒入其中,用无菌滤纸吸干种子表面的无菌水;然后用无菌解剖刀将种子解剖为种皮和种胚,将种皮和种胚分别均匀摆放在直径为 15 cm 的 PDA 平板上,每个平皿摆放 20 块组织,每个品种种皮和种仁分别摆放两个平皿;25℃ 恒温箱中黑暗条件下培养,7 d 后观察记录。每个供试品种重复 4 次。

种子带菌率(%)=(带菌种子数/检测种子总数) $\times$ 100;

种子带镰刀菌率(%)=(带镰刀菌种子数/检测种子总数) $\times$ 100;

某菌分离频率(%)=(带某类菌种子数/带菌种子总数) $\times$ 100。

1.2.3 蔓枯病菌检测

每个供试品种随机选取 150 粒种子,用 0.5% 的次氯酸钠溶液浸泡 10 min 消毒,采用滤纸发芽法,25℃ 暗培养 10 d 后观察发芽情况,将疑似病株

转移至另一纸床上于 25℃,12 h 光照,12 h 黑暗条件下,培养 4~5 d。在解剖镜中找到分生孢子器或假囊壳,而后用电子显微镜观察孢子的大小形态等进行形态学鉴定^[3]。

1.3 种子带菌鉴定

将分离到的各种真菌转移到 PDA 培养基进行纯化、转管保存、通过镜检进行形态学鉴定。同时将纯化菌株送至三博远志公司(北京)进行真菌 ITS 测序。通过序列比对确定其属地位。

1.4 数据处理与分析

不同品种的带菌率差异采用 SAS 软件进行分析;种子外部带菌量和内部带菌率相关性分析采用 Minitab 回归分析。

2 结果与分析

2.1 西瓜种子外部带菌检测结果

检测结果(表 1)表明,种子外部带菌量差异较大,在所检测的 11 个品种中,‘超越梦想’外部带菌量最高,每粒种子的平均孢子负荷量为 22 cfu,且与其他品种差异显著;‘天骄二号’、‘红小帅’、‘四季小凤’、‘全美 2K’及‘北农福田’种子外部孢子负荷量为 0。种子外部携带的优势菌群为链格孢属 *Alternaria* spp.、青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.;此外,还有镰刀菌属 *Fusarium* spp.、木霉属 *Trichoderma* spp.、毛霉属 *Mucor* spp. 和根霉属 *Rhizopus* spp.。其中致病菌包括串珠镰刀菌 *Fusarium verticillioides*、层出镰刀菌 *F. proliferatum* 及茎点霉 *Phoma* sp.。

2.2 西瓜种子内部带菌检测结果

2.2.1 种皮带菌率

不同品种种皮带菌率差异较大(表 2),‘超越梦想’种皮带菌率最高,为 10.6%,与除‘特大早春红玉’和‘京欣一号’外的其他品种差异显著;‘北农天骄’种皮没有检测到真菌。种皮携带的优势菌群为链格孢属 *Alternaria* spp.、青霉属 *Penicillium* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.;此外还有木霉属 *Trichoderma* spp.、镰刀菌属 *Fusarium* spp.。其中 3 个品种‘超越梦想’、‘天骄二号’、‘全美 2K’检出镰刀属致病菌 *F. oxysporum* 及 *F. verticillioides*。品种‘红小帅’只检测到了青霉属真菌,而‘特大早春红玉’、‘四季小凤’及‘北农福田’只检测到了曲霉属真菌。

表 1 西瓜种子外部携带真菌检测结果¹⁾

Table 1 Genera and frequencies of fungi isolated from watermelon seed surface

品种 Cultivar	孢子负荷量/ cfu·粒 ⁻¹ Amount of spores	分离频率/% Frequencies of genera							
		镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	链格孢属 <i>Alternaria</i>	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	青霉属 <i>Penicillium</i>	根霉属 <i>Rhizopus</i>	毛霉属 <i>Mucor</i>	木霉属 <i>Trichoderma</i>	其他 Others
暑宝 6 号 Shubao 6 hao	(1.0±0.8)b	—	—	—	80.0	—	—	—	20.0 (<i>Aureobasidium</i> sp.)
天骄二号 Tianjiao 2 hao	(0.0±0.0)b	—	—	—	—	—	—	—	—
超越梦想 Chaoyuemengxiang	(22.0±5.8)a	—	—	26.7	46.7	—	6.7	—	20.0 (<i>Myrmecridium</i> sp., <i>Talaromyces</i> sp.)
绿小帅 Lvxiaoshuai	(5.5±1.0)b	11.1	16.7	36.1	25.0	—	—	—	11.1 (<i>Leptosphaerulina</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Coprinellus radians</i> , <i>Ascomycete</i> sp.)
红小帅 Hongxiaoshuai	(0.0±0.0)b	—	—	—	—	—	—	—	—
四季小凤 Sijixiaofeng	(0.0±0.0)b	—	—	—	—	—	—	—	—
特大早春红玉 Tedazaochunhongyu	(1.7±0.9)b	—	—	57.1	—	14.3	—	—	28.6 (<i>Phoma</i> sp.)
全美 2K Quanmei 2K	(0.0±0.0)b	—	—	—	—	—	—	—	—
北农福田 Beinongfutian	(1.7±0.5)b	—	—	—	—	66.7	33.3	—	—
京欣一号 Jingxinyihao	(4.7±1.2)b	—	75.0	—	—	25.0	—	—	—
北农天骄 Beinongtianjiao	(0.0±0.0)b	—	—	—	—	—	—	—	—

1) 表中同列数值带有相同字母的差异性不显著($P\leqslant0.05$);—表示未分离到该类真菌。下同。
Means followed by the same letter within a column are not significantly different at $P\leqslant0.05$; — indicated the genera were not detected.
The same below.

表 2 西瓜种子种皮携带真菌检测结果

Table 2 Genera and frequencies of fungi isolated from watermelon seed hull

品种 Cultivar	带菌率/% Infection rate	分离频率/% Frequencies of genera							
		镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	链格孢属 <i>Alternaria</i>	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	青霉属 <i>Penicillium</i>	毛壳属 <i>Chaetomium</i>	木霉属 <i>Trichoderma</i>	其他 Others	
暑宝 6 号 Shubao 6 hao	0.6 b	—	—	—	—	100.0	—	—	
天骄二号 Tianjiao 2 hao	0.6 b	100.0	—	—	—	—	—	—	
超越梦想 Chaoyuemengxiang	10.6 a	37.5	6.3	12.5	31.3	—	—	12.5 (<i>Villosiclava virens</i> , <i>Coprinellus radians</i>)	
绿小帅 Lvxiaoshuai	1.3 b	—	100.0	—	—	—	—	—	
红小帅 Hongxiaoshuai	1.3 b	—	—	—	100.0	—	—	—	
四季小凤 Sijixiaofeng	0.6 b	—	—	100.0	—	—	—	—	
特大早春红玉 Tedazaochunhongyu	9.4 a	—	—	100.0	—	—	—	—	
全美 2K Quanmei 2K	1.3 b	33.3	—	66.7	—	—	—	—	
北农福田 Beinongfutian	0.6 b	—	—	100.0	—	—	—	—	
京欣一号 Jingxinyihao	6.9 ab	—	—	57.1	—	—	42.9	—	
北农天骄 Beinongtianjiao	0.0 b	—	—	—	—	—	—	—	

2.2.2 种仁带菌率

各品种种仁带菌率差异较大(表 3),‘红小帅’、‘绿小帅’种仁带菌率最高,分别为 6.9%和 6.3%,与除‘暑宝 6 号’以外的其他品种差异显著;‘北农天骄’种仁没有检测到任何真菌。种仁携带的优势菌群为镰刀菌属 *Fusarium* spp.、青霉属 *Penicillium* spp. 和

曲霉属 *Aspergillus* spp.;此外还有毛霉属 *Mucor* spp. 和木霉属 *Trichoderma* spp.。其中‘暑宝 6 号’只检测到了青霉属真菌,而‘特大早春红玉’、‘四季小凤’只检测到了曲霉属真菌。此外,‘天骄二号’、‘超越梦想’、‘红小帅’和‘全美 2K’4 个品种的种仁也检测到镰刀菌属致病菌 *F. oxysporum* 及 *F. verticillioides*。

表 3 西瓜种子种仁携带真菌检测结果¹⁾
Table 3 Genera and frequencies of fungi isolated from seed kernel

品种 Cultivar	带菌率/% Infection rate	分离频率/% Frequencies of genera							
		镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	链格孢属 <i>Alternaria</i>	曲霉属 <i>Aspergillus</i>	青霉属 <i>Penicillium</i>	弯孢属 <i>Curvularia</i>	毛霉属 <i>Mucor</i>	木霉属 <i>Trichoderma</i>	其他 Others
暑宝 6 号 Shubao 6 hao	4.4 ab	—	—	—	100	—	—	—	—
天骄二号 Tianjiao 2 hao	0.6 cd	100.0	—	—	—	—	—	—	—
超越梦想 Chaoyuemengxiang	2.5 cd	50.0	—	25.0	—	—	—	25.0	—
绿小帅 Lvxiaoshuai	6.3 a	—	—	68.0	32.0	1.0	—	—	—
红小帅 Hongxiaoshuai	6.9 a	10.0	—	—	90.0	—	—	—	—
四季小凤 Sijixiaofeng	0.6 cd	—	—	100.0	—	—	—	—	—
特大早春红玉 Tedazaochunhongyu	3.1 bcd	—	—	100.0	—	—	—	—	—
全美 2K Quanmei 2K	3.8 bc	20.0	—	80.0	—	—	—	—	—
北农福田 Beinongfutian	3.1 bcd	—	—	—	—	—	—	—	100.0 (<i>Lichtheimia</i> sp., <i>Coprinellus radians</i>)
京欣一号 Jingxinyihao	2.5 cd	—	—	66.7	—	—	33.3	—	—
北农天骄 Beinongtianjiao	0.0 d	—	—	—	—	—	—	—	—

2.3 种子携带蔓枯病菌检测结果

所有品种的检测样本均未检测出携带蔓枯病菌。

2.4 种子外部带菌量和内部带菌率的相关性分析

种子不同部位带菌量相关性分析结果表明:种子外部带菌量与种皮带菌率呈显著正相关关系($P=0.015<0.05$)(图 1);而外部带菌量与种仁带菌率并无相关性。种子内部种皮与种仁带菌率无相关性(表 4)。说明种子外部携带真菌量可以推测种皮的感染情况,但是不能推测种仁的感染情况。

3 结论与讨论

本文对北京地区的 11 个市售西瓜品种的种子进行携带真菌检测,结果表明不同品种之间携带真菌情况差异较大。西瓜种子外部携带的优势菌群隶属于

链格孢属、青霉属、曲霉属及根霉属;种子内部寄藏的真菌主要隶属于青霉属、曲霉属、镰刀菌属及链格孢属。种子内部主要的致病菌为镰刀菌属 *F. oxysporum*、*F. verticillioides*;种子外部携带的致病菌主要为 *F. verticillioides*、*F. proliferatum* 及茎点霉 *Phoma* sp.。

表 4 种子不同部位带菌量相关性分析结果
Table 4 Correlation analysis of the amount of fungi isolated from different seed structures

类别 Item	相关系数(<i>r</i>) Correlation coefficient	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
种表和种皮 Seed surface vs Seed hull	0.705	0.015
种表和种仁 Seed surface vs Seed kernel	0.027	0.938
种皮和种仁 Seed hull vs Seed kernel	−0.021	0.952

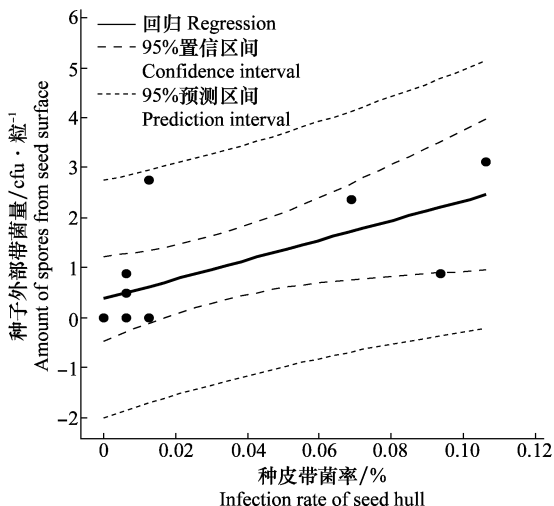


图1 种子外部带菌量与种皮带菌率的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of the amount of spores isolated from seed surface and infection rate of seed hull

在受检的 11 个品种中,在 3 个品种上检测到了链格孢属真菌。大多数情况下,链格孢为附生真菌,但也有链格孢属真菌如 *A. cucumerina*、*A. cucurbitae* 在适宜的环境条件下可以引起西瓜幼苗感病^[4-5]。在‘绿小帅’、‘超越梦想’、‘红小帅’、‘全美 2K’上均检测到了尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。吴学宏等的试验表明,用西瓜种传尖孢镰刀菌处理西瓜种子后,其发芽势、发芽率和发芽指数均显著降低^[6]。此外,还分离到了弯孢霉 *Curvularia lunata* (‘绿小帅’)、茎点霉 *Phoma* sp. (‘特大早春红玉’、‘绿小帅’)及绿核菌 *Villosiclava virens* (‘超越梦想’)等植物病原菌。与吴学宏等 2003 年针对西瓜种子的带菌检测结果^[7]相比,此次检验的种子带菌率大大降低,也说明了商品种种子健康质量有所提高。

蔓枯病(gummy stem blight)又称黑腐病,是影响西瓜产量的重要病害之一,同时果实品质也会受到极大影响,蔓枯病是种传病害,种子携带病菌率在 5%~30%^[8]。试验表明种子携带蔓枯病菌对西瓜种子发芽率及幼苗的长度、鲜重等指标均有影响^[9]。所以在西瓜种子健康检测中检验蔓枯病菌的携带情况是很有必要的。在此次试验中检测的 11 个品种中均没有检出携带蔓枯病菌。

对种子不同部位带菌量相关性分析可以发现,

种子外部带菌量与种皮带菌率相关,而与种仁带菌率不相关。推测可能是由于制种公司在制种过程中对种子进行了一些处理,消除了种子外部的部分真菌,而目前的种子处理并不能高效地降低种子内部种仁的带菌量,从而导致种子外部未检出真菌,而种子内部检测到一定比例的病菌。因此,种子外部带菌量的高低并不能用来推断种子内部带菌情况。

已有试验证明适当的药剂消毒处理可以有效地降低种子真菌携带量,并对西瓜苗期的病害有一定的防治效果^[10-11]。而在对种子进行适当的药剂处理后配合催芽可以有效提高出苗率^[12]。种子是丰产的基础,如何有效提高种子的质量,降低商业种携带植物病原菌量,提高种子出芽率是我们需要进一步研究的课题。

参考文献

- [1] 中国农业科学院郑州果树研究所. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [2] 程美仁. 西瓜种子带菌检验方法及次氯酸钠消毒的效果[J]. 北方园艺, 1995(1): 32-33.
- [3] ISHI-Cb 2.2-Vegetables Blotter Assay, *Didymella bryoniae*-Cucurbit, Version 0.4, 2000. [EB/OL]. <http://www.seed-health.org/seed-health-methods>.
- [4] 贾菊生, 李新辉. 新疆瓜类由链格孢霉(*Alternaria*)侵染所致两类叶斑病的纪录及鉴别[J]. 新疆农业科学, 2002, 39(6): 348-351.
- [5] 崔迪, 王继华, 陈捷, 等. 链格孢属真菌对农作物的危害[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2005(4): 87-91.
- [6] 吴学宏, 韩鲁明, 陈倩, 等. 西瓜种传镰刀菌形态和分子鉴定及其对种子发芽的影响[J]. 植物病理学报, 2009, 39(2): 118-124.
- [7] 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]. 农药学学报, 2003, 5(3): 39-44.
- [8] 云晓敏, 孔祥飞, 刘明辉, 等. 西瓜蔓枯病菌对西瓜种子发芽和幼苗生长发育的影响[J]. 种子, 2006, 25(8): 60-61.
- [9] 刘书林, 顾兴芳, 石延霞, 等. 瓜类蔬菜蔓枯病研究概况[J]. 中国蔬菜, 2013(18): 1-10.
- [10] 李健强, 沈其益. 杀菌剂处理种子防治作物种苗期病害研究进展[J]. 中国农学通报, 1994, 10(6): 16-19.
- [11] 张龔, 寇明明, 孙小武. 西瓜播种前种子处理概述[J]. 中国瓜菜, 2007(4): 29-31.
- [12] 徐秀兰, 宋顺华, 耿丽华, 等. 种子处理对西瓜出苗率和幼苗长势的影响[J]. 中国瓜菜, 2014(6): 15-17.

(责任编辑: 杨明丽)