宋卓琴,梁峥,贾民隆,等.仙客来枯萎病病原鉴定及其生物学特征研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):49-57.
Song Z Q, Liang Z, Jia M L, et al.Identification of the pathogen and biological characteristics of of *Cyclamen persicum* wilt disease[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):49-57.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202404026

仙客来枯萎病病原鉴定及其生物学特征研究

宋卓琴[1],梁峥[1],贾民隆[1],段九菊[1],王玉川[2],曹冬梅[1*]

(1.山西农业大学 园艺学院,山西 太原 030031;2.长治市乐彩生物技术有限公司,山西 长治 046600)

摘　要:[目的]本文旨在明确仙客来枯萎病病原、病原菌的生长特性及病害的发生规律。[方法]采用组织分离法从叶柄部获得病原菌,并对其从形态学、分子生物学进行鉴定,通过设定不同的温度梯度研究病原菌的生长特性,结合生产实际设置T1(昼温控制在20～25 ℃)、T2(昼温控制在25～30 ℃)、T3(昼温控制在30～35 ℃)3个处理进行盆栽试验,研究温室中仙客来枯萎病发生规律。[结果]仙客来发病初期呈萎蔫状,逐渐叶片黄化变褐,叶柄前期水渍状软化、逐渐出现缢缩、变褐,球茎腐烂变软,整个植株的维管束受损,颜色发暗,直至坏死;分离纯化病原菌,由病原菌分生孢子的形态特征、rDNA－ITS和*TEF1*－α基因序列分析,鉴定仙客来枯萎病病原菌为尖孢镰孢仙客来专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*);由生物学特征显示病原菌菌丝生长、分生孢子萌发的最适温度为25～30 ℃,菌丝的平均生长速率为7.46 mm•d^{-1},分生孢子的平均萌发率可达到90.22%;盆栽试验,仙客来从开始发病到整株死亡一般是5～8 d,病情发展迅速,昼温控制在25～30 ℃,发病最快,接种病原菌后9 d开始发病,第18 d全部发病;其次为T3处理,T1处理发病最慢。[结论]仙客来枯萎病发病早期呈萎蔫状,其发生与温度密切相关,将温度控制至低于25 ℃可有效降低仙客来枯萎病的发生率。

关键词:仙客来; 枯萎病; 尖孢镰孢; 温度
中图分类号:S682.2+62　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)05-0049-09

仙客来(*Cyclamen persicum* Mill.),原产于地中海地区,是报春花科仙客来属的多年生草本植物,其叶片呈心形,有绿色、银色斑纹,花形似兔耳,花色丰富,已成为世界范围内深受欢迎的盆栽和园林景观植物[1]。然而,由于受到生物与非生物胁迫,仙客来的总产量在下降[2],其中,山西地区的生产量占比已由40%降低到不足5%,全球范围内由于病害直接造成的损失量可达到20%[3]。目前,仙客来常见的生物性病害有6种,分别为枯萎病、病毒病、软腐病、炭疽病、灰霉病、叶斑病,其中枯萎病是危害比较大的病害之一。枯萎病主要是由镰孢菌(*Fusarium* spp.)引起的真菌病害,从苗期到花期的整个生长期均可发生,发病植株主要表现为发育迟缓、叶片局部或全部黄化、萎蔫、维管束组织受损,最终枯死。其发病率一般在20%～40%,严重时可达60%～90%[4],每年仙客来由于枯萎病,直接造成的损失可达到2%～5%。

目前,国内外关于仙客来枯萎病的相关报道主要集中在病害防治方面。O'Neill和Minuto就研究了杀菌剂与拮抗菌对仙客来枯萎病的综合防治效果[5-6],随后美国、法国、韩国、日本、墨西哥等地均有仙客来枯萎病大量发生的报道[4,7-13]。Lutz[14]提出,在干旱、炎热等条件胁迫下可加速仙客来枯萎病的发生,最好的防治措施就是做好温室的环境卫生。黄建明等[15]采用甲壳素、放线菌、枯草杆菌制成的生物制剂对仙客来枯萎病进行防治。石延霞[16]选用新型化合物苯并噻二唑甲酸三氟乙酯在仙客来幼苗期叶面喷施对仙客来枯萎病进行防治。Ahmad等[2]研究了鼠尾草提取物对仙客来枯萎病的抑制效果。刘伟等[17]又比较研究了

收稿日期:2024-04-10　　**修回日期**:2024-05-28
基金项目:山西省农业科学院优秀青年基金项目(YCX2020YQ11),2024年度"特""优"农业高质量发展科技支撑工程项目(TYGC24-58)
作者简介:宋卓琴(ORCID:0009-0001-6913-4512),助理研究员,硕士,研究方向:观赏植物的病理生物学,E-mail: zhuoqin0355@126.com
*通信作者:曹冬梅(ORCID:0009-0004-7519-2227),研究员,博士,研究方向:观赏植物的栽培与育种,E-mail: caodm787@163.com

7种药剂对仙客来枯萎病的防治效果。但,目前仙客来枯萎病仍没有较好的防治措施。

早在上世纪九十年代英国Neill、意大利Minuto等人就提出仙客来枯萎病病原菌为尖孢镰刀菌[5-6]。2012年,阿根廷Lori等[11]从仙客来枯萎病典型病株上分离得到64株尖孢镰刀菌,并对其致病性进行了研究。2021年5月,仙客来枯萎病在伊朗大面积发生,发病率达到10%~48%,2022年,伊朗科学家Mokhtarnejad[12]对病原菌的形态特征和同源性进行了研究。虽然对于仙客来枯萎病病原菌的研究国外已有少量的报道,但镰刀菌的分生孢子形态变异性强,常存在很强的地域性,并且缺乏从致病性、形态特征、发病规律及生物学特性等方面的系统研究。本项目组采集了枯萎病典型病株,对病症进行了详细的描述,通过病原菌的形态学特征及基因分析明确了病原菌,结合盆栽试验研究了温度对枯萎病发生的影响,以期为仙客来枯萎病的诊断及防治措施的制定提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2020年10月,在山西省长子县方兴仙客来种植基地采集具有仙客来枯萎病典型病状的植株,编号后带回实验室,对植株病害的症状特征进行记录,品种为山脊系列,致病性测定及盆栽试验选用的品种为哈利奥系列,由大宁隆泰双创农林科技有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 病株的组织观察

分别取病株的根、块茎、叶柄、叶片及花梗等组织,采用徒手切片法[18],用刀片将组织分别横切和纵切,切成厚度为20 μm的薄片,制成临时玻片在显微镜下进行观察、拍照。

1.2.2 病原菌的分离纯化及致病性测定

采用组织分离法进行病原菌分离,采用稀释平板法获得单孢菌落[19]。用解剖刀切取具有典型症状的发病植株的叶柄,先用0.05% NaClO、0.1% Tween-80浸泡10 min,再用无菌水冲洗30 min,直到无沫,用75%的酒精浸泡30 s,无菌水浸泡1 min,HgCl浸泡1 min,无菌水4 min处理4次,切成长约3~5 mm的小块置于PDA培养基,27 ℃培养3 d长出菌落后,挑取无杂菌的菌落边缘菌丝,接入含50 μg·L^{-1}细菌抑制剂羧苄青霉素的PDA液体培养基中,25 ℃、110 r·min^{-1}培养24 h,采用单孢法进行纯化,用无菌水将菌液稀释至10^{-5},取25 μL涂布于PDA,27 ℃、培养3 d,挑取单孢菌落进一步培养获得纯化菌株并于4 ℃保存。

根据柯赫法则将分离得到的病原菌进行回接。分离纯化的病原在PSA培养基上27 ℃培养5 d活化后,用打孔器在菌落边缘取直径5 mm菌饼4片,放入PSA液体培养基,25 ℃、110 r·min^{-1}培养3 d,用血球计数板对分生孢子量进行计数,配制浓度为1.0×10^{7} CFU·mL^{-1}的孢子悬液,采用灌根法对病原菌进行回接。具体为:取健康的仙客来植株,于仙客来植株茎基部两侧3 cm处伤根,将50 mL孢子悬液灌注在根部附近基质中,分别以PSA液体和清水作对照,设3次重复,于27 ℃培养,待植株发病后,观察植株感病形态,并选取具有典型症状的叶柄再次分离,观察其形态学特征与原接种菌株是否一致。

1.2.3 仙客来枯萎病病原菌的形态学鉴定

将分离纯化后病原菌转接在PDA上,27 ℃条件下培养7 d,观察记录菌落形态特征。具体方法:采用插片培养法,将盖玻片45°斜插在培养基上,待菌丝长到盖玻片边缘时取出,在光学显微镜下观察分生孢子和分生孢子梗的形态特征、测定分生孢子的大小,并进行初步鉴定[20]。

1.2.4 病原菌的分子鉴定

使用真菌通用引物ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3′)和ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)[21]、EF-1(5′-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3′)和EF-2(5′-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3′)[22],对病原菌核糖体内转录间隔区(rDNA-ITS)、翻译延伸因子-1α(Translation Elongation Factor 1 α,*TEF1*—*α*)基因组序列进行PCR扩增,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将病原菌接入PDA培养基培养7 d后,取新鲜菌丝,使用Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒提取DNA。PCR反应体系25 μL:12.5 μL*Taq* PCR Master Mix,10 μmol·L^{-1}上、下游引物各1.0 μL,DNA模板1 μL,ddH_2O 9.5μL。PCR扩增程序:95 ℃预变性3~5 min;94 ℃变性30 s,55~60 ℃退火25~30 s,72 ℃延伸

30～50 s,35个循环;72 ℃修复延伸5～8 min。扩增产物测序后,将得到的序列上传GenBank与已有基因序列进行同源性比较,利用PAUP4.0b10软件以邻位法构建系统发育树[23]。

1.2.5　温度对仙客来枯萎病病原菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响

试验温度分别设为5、10、15、25、30、35 ℃等6个处理,3次重复,菌落直径采用十字交叉法测定,再计算菌丝生长速率;分生孢子萌发率采用涂片法测定,具体参考殷辉的方法[23],将孢子悬浮液接种于涂布有PDA培养基的载玻片,将其置于干燥器于不同温度下培养12 h,然后放在显微镜下观察分生孢子的萌发情况,每个视野镜检300个左右的分生孢子,每个处理重复3次,统计萌发率。

1.2.6　温度对仙客来植株发病情况的影响

采用盆栽试验,在人工气候室内模拟生产中温室的控温状况进行,试验分3个处理,分别为T1(昼温控制在20～25 ℃)、T2(昼温控制在25～30 ℃)、T3(昼温控制在30～35 ℃)。随机区组设计,每个处理15盆,3次重复,同时各处理设空白对照(清水)5盆,每盆一株,株龄为6月龄,常规水肥管理,夜温控制在15～20 ℃。

仙客来枯萎病病情分级标准:0级,无病症的健康植株;1级,全株1/4及以下叶片变黄,茎叶轻微症状;2级,1/4以上至1/2叶片变黄,植株轻度萎蔫,茎基部轻度变褐;3级,全株1/2至3/4变黄,植株中度萎蔫,茎中度变褐;4级,3/4以上或全株叶片变黄,地上部分全部萎蔫至倒伏枯死[15,24]。

病情指数(DSI)=100×[∑(各级发病级数×该级别的植株数)/(供试植株×最高级代表值)]。

发病率=处理发病株数/处理重复次数×100%

1.3　统计分析

采用SPSS 24.0软件进行数据统计及显著性水平检验,采用Microsoft Excel 2010软件制作图表、数据计算。

2　结果与分析

2.1　仙客来枯萎病的发病症状及其组织解剖结构

仙客来健康植株(图1A),叶色浓绿、叶柄挺直。感染枯萎病后,初期首先茎基部叶片沿主脉局部变黄(图1E),叶柄部分呈水渍状、软化,有些叶柄中部表皮纵裂(图1H),导致叶片下垂(图1B);发病中期(图1C),大部分的叶片出现黄化,叶片黄化的部分增加,且颜色逐渐加深,部分开始由黄变褐变暗(图1F),部分叶柄发生缢缩、叶片垂挂,茎基部干枯颜色变深变褐(图1I);发病后期(图1D),叶片变枯黄色、干枯(图1G),最后全叶萎蔫,叶柄干枯、呈褐色,湿度大时,叶柄基部会长出白色、淡红色菌斑(图1J-图1K)。球茎被侵染后,输导组织病部呈棕色,湿度大时会并发软腐病,球茎腐烂变软(图1L-图1M)。

从仙客来病株的组织解剖照片可明显看出,病原是从植株表皮伤口侵入植物体,穿过皮层的薄壁细胞,直至进入维管束(图2A),然后随维管束进行纵向侵染,与正常植株的维管束组织(图2B)相比,植株感病后,叶柄、花梗的维管束颜色加深,逐渐变为黄色、棕褐色(图2D-图2E),从叶柄的纵切图可看出感病的维管束细胞内有棕褐色物质沉积(图2C),感病叶片的主脉和侧脉维管束颜色均加深变褐(图2F-图2G),球茎感病后,输导组织病变,导管的颜色逐渐变深,由浅棕至棕红色,由纵切图明显看出管壁上出现棕色物质,随物质的增多颜色逐渐加深(图2H-图2I),根部导管感病后颜色也随之改变(图2J),影响植株体内营养物质与水分的运输,使整株表现为萎蔫状态,由于白天温度高,代谢旺盛,发病初期常表现出白天叶片萎蔫,疑似缺水状态,夜间又恢复正常,随着病情加重直至整株死亡。

2.2　仙客来枯萎病病原菌的形态学特征和致病性

在PDA培养基上生长,病原菌菌丝呈绒毛状,无色、纤细,菌落平贴伸展,圆形,产淡粉紫色色素,后期产生暗蓝色或蓝黑色菌核(图3A),PDA培养基上主要产生小型分生孢子,很少产生大型孢子,自选产孢培养基上可产生大量的大型分生孢子,分生孢子梗整体围绕菌丝呈轮生生长(图3B),产孢细胞着生在菌丝短分枝的顶端,有小的凸起呈瓶状(图3C-图3D)。小型分生孢子多数是单孢,卵圆形或肾形,直或弯曲,无色,从单瓶状小梗上产生,大小为5.12～17.54 μm×2.53～4.24 μm;大型分生孢子,呈小舟形,纺锤形至镰孢形,略弯曲,两端略尖(图3E),有3～4个隔膜,5个隔膜以上的孢子少见,基部有小柄,壁薄,无色,大小为27.46～57.63 μm×3.22～5.56 μm,一般不产生厚垣孢子,分生孢子萌发时芽管从分生孢子的尖

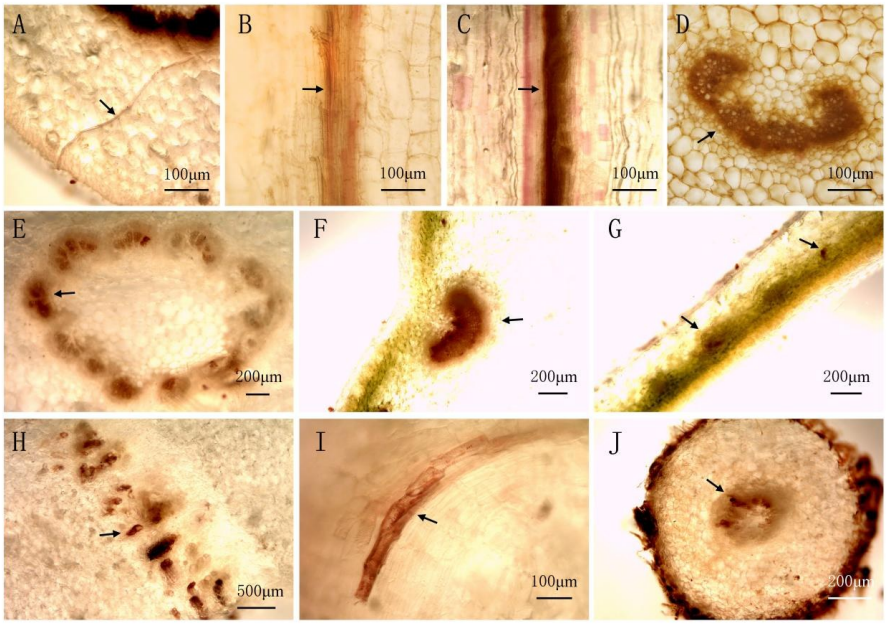


A:正常植株;B:发病初期;C:发病中期;D:整株枯死;E:发病早期叶片症状;F:发病中期叶片症状;G:发病后期叶片症状;H—K:发病叶柄症状;L:发病球茎横切图;M:发病球茎纵切图

A: Normal plant; B: Early stage symptoms of the plant; C: Mid—stage symptoms of the plant; D: wilted plant; E: Early stage leaf symptoms; F: Mid—stage leaf symptoms; G: Late stage leaf symptoms; H—K: Symptoms on the petiole; L: Necrosis in the transverse section of diseased bulb; M: Necrosis in the longitudinal section of diseased bulb

图1 仙客来枯萎病的发病症状类型

Fig.1 Symptoms patterns of cyclamen wilt disease



A:病菌菌丝侵入皮层;B:正常叶柄纵切;C—D:发病叶柄纵切、横切;E:发病花梗横切;F:发病叶主脉症状;G:发病叶侧脉;H—I:发病球茎横切、纵切;J:发病根部横切

A: Fungal hyphae invaded the cortex; B: Asymptomatic petiole longitudinal section; C—D: Necrosis in the longitudinal and transverse section of diseased petioles; E: Necrosis in the transverse section of diseased peduncle; F: Necrosis in the lateral vein of the diseased leaves; G: Necrosis in the main vein of the diseased leaves; H—I:Necrosis in the longitudinal and transverse section of diseased bulb; J: Necrosis in the transverse section of diseased root

图2 仙客来枯萎病发病症状的显微结构

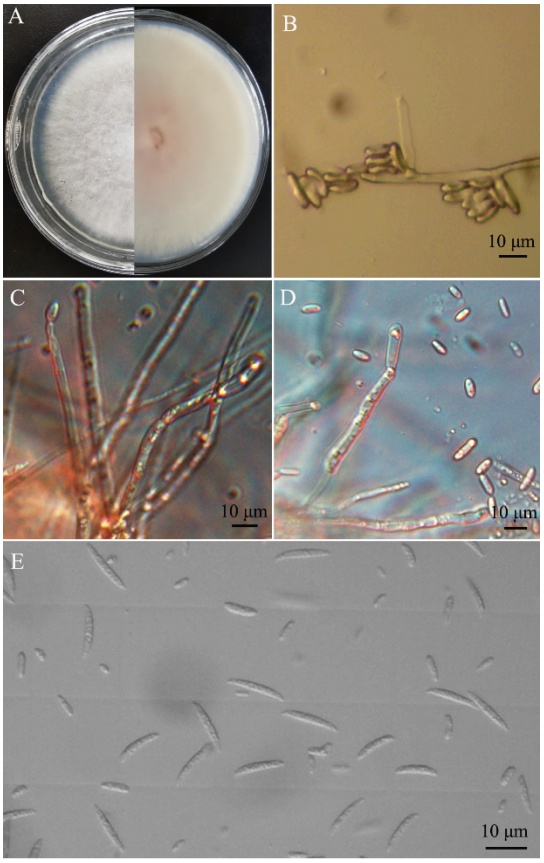
Fig.2 Microscopic structure of the symptoms of cyclamen wilt disease

端处萌发。

将组织分离纯化后的病原菌进行回接,用孢子悬浮液接种健康的仙客来植株,以PDA培养基、无菌水作对照,25 ℃、相对湿度60%条件下,第7～10天植株可明显观察出枯萎病的症状。其中有伤口的植株发病明显快于无伤口植株,叶肉和叶脉出现褪绿,叶片失去膨压,开始下垂。第13天,叶片50%以上部位变黄褪绿,叶柄水渍化,下部叶柄萎缩、抽干,颜色逐渐变深呈褐色。第15天叶片全部失绿萎蔫,叶柄感病部位深褐色,叶柄从染病部位折倒。从病株发病叶片的叶柄中再次分离,得到的病菌形态与原接种菌一致,且对照组仙客来均未发病,符合柯赫氏法则,证明原病株为仙客来枯萎病的病原菌。

2.3　仙客来枯萎病病原菌的分子鉴定

仙客来枯萎病病菌的代表菌株Xiankelai002的ITS和*TEF1-α*基因序列长度分别为517 bp和516 bp。将所获得的序列提交至GenBank,登录号分别为:pp516425、pp532869。将ITS序列与NCBI数据库中相近菌株的序列进行BLAST比对,发现其与镰孢属的6个种*Fusarium circinatum*(OR731198、OR758520)、*Fusarium foetens*(OP163641、OP163641)、*Fusarium oxysporum*(PP596543、PP710671、PP596539)、*Fusarium pseudoanthophilum*(OR758519)、*Fusarium solani*(OP363852)的相似性为100%,使用ITS确定菌株Xiankelai002为镰孢属真菌,但是无法准确鉴定到具体种。



A:菌落在PDA上的形态;B:分生孢子梗;C－D:产孢细胞;E:分生孢子

A: Views of the surface and the bottom of the colony from the PDA; B: Spore stem; C－D: conidiogenous cells; E: Conidia

图3　仙客来枯萎病病原菌形态特征

Fig.3　Morphological characteristics of the pathogen of cyclamen wilt disease

以*TEF1-α*基因序列构建系统发育树表明,仙客来枯萎病病菌的代表菌株Xiankelai002与尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)的4种专化型*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*(菌株GR_FOA1、GR_FOA179)、*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*(菌株F40、PDA3b)、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*(菌株MIAE01669)、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*(菌株FOC-OR9)以100%的自展支持率聚为一个分支,与镰孢属其他种明显区分开来(图4)。在4种不同专化型中,仙客来枯萎病病菌的代表菌株Xiankelai002与*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*(MIAE01669)的亲缘关系最近,聚为一个分支,综合形态学特征、ITS和*TEF1-α*基因分析,确定仙客来枯萎病的病原菌为尖孢镰孢仙客来专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*)(图4)。

2.4　温度对仙客来枯萎病病原菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响

温度对病原菌菌丝生长和分生孢子的萌发有显著影响,由图5A可见,菌丝随温度的升高生长速率逐渐加快,到25 ℃的时候到达高峰,且显著高于其它处理,超过30 ℃后生长速率迅速下降,菌丝生长的平均速率为7.46 mm·d^{-1}。由图5B可看出,病原菌的分生孢子萌发率也是随温度的升高萌发率逐渐增加,到25 ℃的时候到达高峰,且显著高于其它处理,超过25 ℃分生孢子的萌发率下降,35 ℃的萌发率高于20 ℃但不显著,说明适合病原菌萌发的最适温度仍为25～30 ℃,分生孢子的平均萌发率为90.22%。

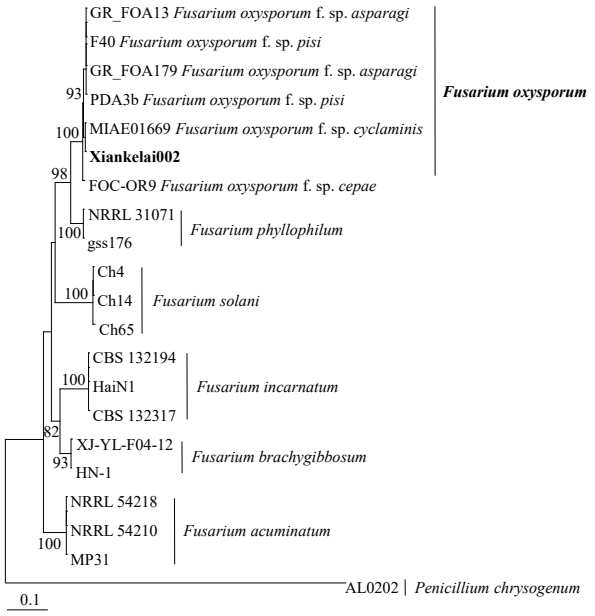
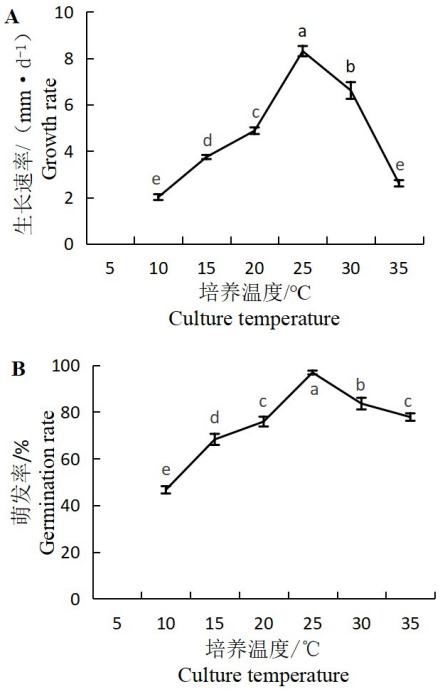


图4 基于 *TEF1-α* 基因序列构建的系统发育树

Fig.4 The phylogenetic tree constructed based on *TEF1-α* gene sequences



A为温度对菌丝生产速率的影响,B为温度对分生孢子萌发的影响,图中不同小写字母表示各处理间的差异显著性($P<0.05$)

A shows the effect of temperature on mycelial production rate, while B shows the effect of temperature on conidia germination. The values in the figure are the mean ± SD. Different lowercase letters indicate significant differences in mean values through LSD testing ($P<0.05$)

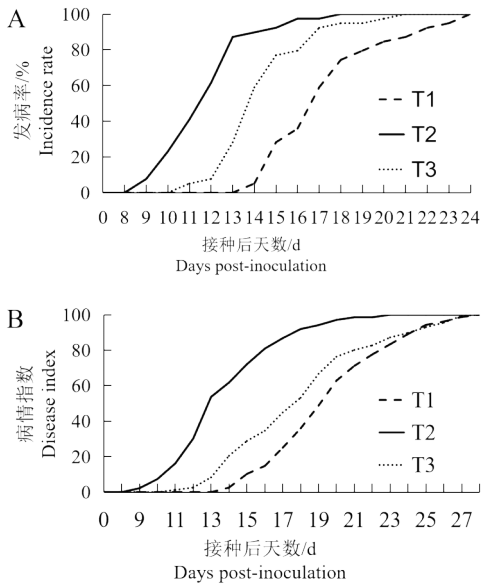
图5 温度对菌丝生长及分生孢子萌发的影响

Fig.5 Effects of temperature on mycelial growth rate and conidial germination rate

2.5 温度对仙客来植株发病情况的影响

盆栽试验结果表明:健康的仙客来植株接种病原菌孢子悬液后,9~14 d开始出现病症,由图6A可见,T2处理植株最先发病,接种后9 d开始发病,到第14天,发病率已经达到了89.74%,显著高于其它处理,第18天全部植株发病;其次是T3处理,接种后11 d开始发病,到第14天,发病率为58.97%,第21天植株全部发病;发病最晚的是T1处理,接种后14天发病,第24天植株全部发病。

从病情指数(图6B)可以看出仙客来从开始发病到全部死亡大概为15~18 d,从单株来看,从开始发病到全部死亡一般是5~8 d,病情发展迅速,T2处理发病快、且发展迅速,到第14天病情指数已经超过50,接种后第23天植株全部死亡,T3处理和T1处理,均为接种后第28天植株全部死亡,T1处理发病最晚但是病情发展快。



A为温度对仙客来枯萎病发病率的影响,B为温度对仙客来枯萎病病情指数的影响

A showed the effect of temperature on incidence rate of *C. persicum* wilt, B showed the effect of temperature on the disease index of *C. persicum* wilt

图6 温度对仙客来枯萎病的发病率和病情指数的影响

Fig.6 Effects of temperature on the incidence rate and disease index of cyclamen wilt

3 讨论

植物枯萎病是一种维管束病害[25],病原从表皮伤口侵入仙客来体内,穿过皮层的薄壁细胞,直

至进入维管束,然后随维管束进行纵向侵染,植株感病后,内部维管束组织受损明显,维管束颜色加深,逐渐变为黄色、棕褐色,内部茎基部缢缩、褐变,叶柄软化、下垂,叶片黄化、萎蔫。仙客来作为一种重要的盆栽花卉,发病后严重影响其观赏性。王瑞瑞研究指出,尖孢镰刀菌在植物的维管束组织中,产生毒素主要为镰刀素酸(FSA),依靠植物的蒸腾作用,使毒素在维管束中扩散,导致组织细胞死亡[26]。

植物枯萎病作为一种世界性的土传真菌病害[27],对其病原菌的研究较多,且主要是集中在蔬菜、水果、粮食等,对观赏植物研究的报道较少,目前已报道的有菊花[28-29]、百合[24]、箭叶海芋[30]、合欢[31]等。由于镰刀菌属分生孢子,形态多样,常受环境条件影响发生变异,遗传分化显著,通过形态鉴定困难且耗时长。较多研究者选择rDNA-ITS和*TEF1*—α基因进行镰刀菌的种类鉴定[32-34]。本研究中,基于rDNA-ITS、*TEF1*—α基因系统发育分析与形态学特征相结合,确定仙客来枯萎病的病原菌为尖孢镰孢仙客来专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*),这是国内首次对仙客来枯萎病进行分子生物学鉴定,与国外的相关报道相似[12],由于地域、环境等的不同,在形态上存在差异,本研究分离的病原菌产生的大型分生孢子一般有3～4个隔膜,5个隔膜以上的孢子少见,一般不产生厚垣孢子。

生物学特性显示,病原菌在10～35 ℃均能生长和萌发,在25～30 ℃菌丝生长速度和分生孢子的萌发率最高,这与病原菌相同的非洲菊根腐病病原菌[35]、合欢枯萎病病原菌[32]的报道相似。本研究进一步通过盆栽试验验证,当昼温控制在25～30 ℃时,仙客来发病快,发病率、病情指数均高,死亡快。通过调查发现,山西长子县仙客来盆花整个生育期均有枯萎病的发生,进入7、8月份发病率达到高峰,主要是由于夏季高温导致,这与试验研究结果一致。由盆栽试验得出,严格控制温室温度在25 ℃以下,可有效减缓病原菌的生长繁殖速度,减少传播源,降低枯萎病的发生率,提高盆花品质。这与Lutz[14]提出观点相似,仙客来在开始开花的时候发病率最高在43%～71%,82 ℉是病原菌的最佳生长温度。

4　结论

通过形态学和分子生物学手段,将仙客来枯萎病病原菌Xiankelai002鉴定为尖孢镰孢仙客来专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*),该病原菌具有强的致病性,对温度的适应性强,在PDA培养基上菌丝生长、孢子萌发的最适温度为25～30 ℃,仙客来植株感染病原菌后,从开始发病到全部死亡一般是5～8 d,温室生长环境昼温超过25 ℃后,仙客来枯萎病的发病率、病情指数迅速增加。

参　考　文　献

[1]包满珠. 花卉学[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社, 2011:308.
Bao M Z. Floriculture [M]. Third Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2011:308.

[2]Ahmad H, Matsubara Y. Suppression of Fusarium wilt in *Cyclamen* by using sage water extract and identification of antifungal metabolites[J]. Australasian Plant Pathology, 2020, 49(3): 213-220.

[3]Rodríguez-Parra J A, Moreno-López J P, González-Almario A. *Dickeya solani*, *Pectobacterium atrosepticum* and *Pseudomonas asplenii*: causal agents of bacterial soft rot in *Cyclamen* plants (*Cyclamen persicum* Mill.) in Colombia[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2022, 44: 485-503.

[4]Elmer W H. Influence of inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* and sodium chloride on Cyclamen and the development of Fusarium wilt[J]. Plant Disease, 2002, 86(4): 389-393.

[5]O' Neill T M. Evaluation of fungicides against Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*) of cyclamen [J]. Annals of Applied Biology, 1995, 126: 20-21.

[6]Minuto A, Migheli Q, Garibaldi A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen[J]. Crop Protection, 1995, 14(3): 221-226.

[7]Lecomte C, Edel-Hermann V, Cannesan M A, et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: underestimated genetic diversity [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 145(2): 421-431.

[8]Kim J Y, Kim H G, Hong S S, et al. Occurrence of *Fusarium* wilt on *Cyclamen* casued by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* and selection of resistant cultivars[J]. Research in Plant Disease, 2003, 9(2): 79-84.

[9]Maya M A, Matsubara Y I. Tolerance to *Fusarium* wilt and anthracnose diseases and changes of antioxidative activity in mycorrhizal cyclamen[J]. Crop Protection, 2013, 47: 41-48.

[10]Leyva-Mir S G, Tovar-Pedraza J M, Camacho-Tapia M, et al. First report of *Phytophthora tropicalis* causing wilt of *Cyclamen persicum* in Mexico[J]. Plant Disease, 2016, 100

(8): 1796.

[11]Lori G A, Petiet P M, Malbrán I, et al. *Fusarium* wilt of cyclamen: Pathogenicity and vegetative compatibility groups structure of the pathogen in Argentina[J]. Crop Protection, 2012, 36: 43-48.

[12]Mokhtarnejad L, Farzaneh M. First report of occurrence *Fusarium* wilt on cyclamen caused by *Fusarium oxysporum* in Iran[J]. Journal of Plant Pathology, 2023, 105(2): 607.

[13]Gültekin M A, Polat Z, Palacıoğlu G, et al. First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on *Cyclamen persicum* in Turkey[J]. Journal of Plant Pathology, 2022, 104(1): 469.

[14]Lutz J. How to diagnose and defend against *Fusarium* wilt in *Cyclamen*[J]. Greenhouse Grower, 2019, (3):37.

[15]石延霞,杜青山,安智慧,等. 苯并噻二唑甲酸三氟乙酯诱导仙客来抗枯萎病的研究[J]. 中国生物防治学报,2011,27(3):378-382.

Shi Y X, Du Q S, An Z H, et al. Study on resistance of *Cyclamen* to *Fusarium* wilt induced by 1,2,3-benzothiadiazole-7-carboxylic acid, 2, 2, 2-trifluoroethyl ester [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(3): 378-382.

[16]黄建明,郑志兴,尉文彬,等.甲壳素等生物制剂对仙客来枯萎病的防治效果及生长促进作用研究[J].中国植保导刊,2007(10):12-13,8.

Huang J M, Zheng Z X, Yu W B, et al. Studies on the effects of biological agents (chitin) on controlling *Fusarium oxysporum* and on promoting growth in *C. persicum*[J]. China Plant Protection, 2007(10): 12-13,8.

[17]刘伟,王立达,马晨,等. 仙客来枯萎病药剂防治效果初探[J]. 中国植保导刊,2022,42(1):74-76.

Liu W, Wang L D, Ma C, et al. Preliminary study on the control effect of chemicals against *Cyclamen persicum* wilt[J]. China Plant Protection,2022,42(1):74-76.

[18]张书敏,刘红云,程金金,等. 快速徒手切片法观察谷子和水稻叶片显微结构[J]. 基因组学与应用生物学,2015,34(7):1527-1530.

Zhang S M, Liu H Y, Cheng J J, et al. Free-hand section techniques for clear observation of cell structures of millet (*Setaria italica*) and rice (*Oyrza sativa*) leaves[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(7): 1527-1530.

[19]方中达.植病研究方法[M].第3版.北京:中国农业出版社,2007:198.

Fang Z D. Research methods for plant diseases[M]. Third Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2007:198.

[20]Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. Ames: Blackwell Publishing, 2006:176-179.

[21]White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 18(1): 315-322

[22]Wang H, Xiao M, Kong F R, et al. Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and an *in vitro* antifungal susceptibility study [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(5): 1890-1898.

[23]殷辉,周建波,常芳娟,等. 枣果贮藏期红粉病菌鉴定及环境因子对其分生孢子萌发的影响[J]. 植物病理学报,2018,48(1):16-24.

Yin H, Zhou J B, Chang F J, et al. Identification of the pathogen causing pink mold rot in stored jujube fruit and effects of environmental factors on conidial germination [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(1): 16-24.

[24]任胜林,梅慧玲,李映萱,等. 百合枯萎病病原菌的分离鉴定及其接种浓度对发病程度的影响[J]. 南京农业大学学报,2020,43(6):1097-1106.

Ren S L, Mei H L, Li Y X, et al. Isolation and identification of lily *Fusarium* wilt pathogen and the effect of spore suspension concentration on the extent of disease[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(6): 1097-1106.

[25]Fernandes L B, Ghag S B. Molecular insights into the jasmonate signaling and associated defense responses against wilt caused by *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 174: 22-34.

[26]王瑞瑞,王敏,曾吉兴,等. 镰刀菌酸在尖孢镰刀菌侵染过程中的产生规律及运输过程探究[J]. 植物病理学报,2022,52(3):465-475.

Wang R R, Wang M, Zeng J X, et al. Study on the production and transportation of Fusaric acid during *Fusarium oxy*sporum infection [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(3): 465-475.

[27]张斌,杨晓云,陈志谊. 番茄枯萎病致病镰刀菌种类鉴定及优势种群的研究[J]. 植物病理学报,2016,46(4):561-565.

Zhang B, Yang X Y, Chen Z Y. Identification of the pathogenic and dominant *Fusarium* species causing tomato Fusarium wilt [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2016, 46(4):561-565.

[28]曹瑱艳,申屠旭萍,俞晓平.杭白菊枯萎病的病原菌分离鉴定及淀粉酶产色链霉菌对其防治效[J].中国生物防治学报,2019,35(2):265-271.

Cao T Y, Shentu X P, Yu X P. Identification of the pathogens causing *Fusarium* wilt disease in *Chrysanthemum morifolium* Ramat and control effect of *Streptomyces diastatochramogenes* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(2): 265-271.

[29]李媛媛,刘晔,柳丽娜,等. 茶用菊苗期枯萎病抗性鉴定技术研究[J]. 核农学报,2020,34(8):1666-1673.

Li Y Y, Liu Y, Liu L N, et al. Study on identification techniques of resistance to *Fusarium oxysporum* at seedling stage of *Chrysanthemum* for tea [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(8): 1666-1673.

[30]赵京鹏. 广州九种观赏植物真菌性病害病原鉴定[D]. 广州:仲恺农业工程学院,2020.

Zhao J P. Identification of pathogens of nine fungal diseases of ornamental plants in Guangzhou [D]. Guangzhou: Zhongkai

University of Agriculture and Engineering, 2020.

[31]蔡悦,王储炎,黄明华,等. 合欢枯萎病菌的分离鉴定和培养特性[J]. 浙江农业学报,2019,31(4):588-599.
Cai Y, Wang C Y, Huang M H, et al. Identification of *Fusarium* pathogens of *Albizia julibrissin* wilt and their cultural characteristics [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2019, 31(4): 588-599.

[32]马国苹,华晖晖,梁芷健,等. 甜瓜种子携带的镰刀菌种类鉴定及其致病性研究[J]. 植物病理学报,2019,49(6):730-737.
Ma G P, Hua H H, Liang Z J, et al. Studies on taxonomic identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with muskmelon seeds[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, 49(6): 730-737.

[33]Cao S, Yang N B, Zhao C, et al. Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China [J]. Journal of General Plant Pathology, 2018, 84(5): 321-329.

[34]盖晓彤,卢灿华,户艳霞,等. 云南省烟草镰刀菌根腐病病原鉴定[J]. 中国烟草学报,2023,29(3):74-83.
Gai X T, Lu C H, Hu Y X, et al. Identification of pathogens causing tobacco fusarium root rot in Yunnan tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2023, 29(3): 74-83.

[35]陈文乐.福建省三明地区非洲菊根腐病病原菌生物学特性与杀菌剂田间筛选[J].中国农学通报,2023,39(28):107-111.
Chen W L. Biological characteristics of *Gerbera jamesonii* root rot pathogen and field screening of efficient fungicides in Sanming of Fujian Province[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2023,39(28): 107-111.

Identification of the pathogen and biological characteristics of of *Cyclamen persicum* wilt disease

Song Zhuoqin[1], Liang Zheng[1], Jia Minlong[1], Duan Jiuju[1], Wang Yuchuan[2], Cao Dongmei[1*]

(*1.College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, China; 2.Changzhi Lecai Biotechnology Co., Ltd., Changzhi 046600, China*)

Abstract: [Objective] This research aimed to identify the pathogen of cyclamen wilt disease, the growth characteristics of the pathogen, and the occurrence pattern of the *Cyclamen persicum* wilt disease. [Method] The pathogen was isolated from the petiole using tissue isolation method and identified through morphological and molecular biological analysis. The growth characteristics of the pathogen were studied under different temperature gradients. Pot experiments were conducted with three temperature treatments: T1 (day temperature controlled at 20～25 ℃), T2 (day temperature controlled at 25～30 ℃), and T3 (day temperature controlled at 30～35 ℃) to investigate the occurrence pattern of cyclamen wilt disease in a greenhouse. [Result] Early symptoms of cyclamen wilt disease included wilting, followed by leaf yellowing and browning, petiole softening with water-soaked appearance, and eventually constriction and browning. The tubers were rotted and soften with the entire plant's vascular bundles damaged and darkened until necrosis occurred. The pathogen was isolated and purified and identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. cyclaminis based on conidial morphological characteristics, rDNA-ITS, and TEF1-α gene sequence analysis. The optimal temperature for mycelial growth and conidia germination was found to be 25～30 ℃, with an average growth rate of 7.46 mm·d^{-1} and the average conidial germination rate of up to 90.22%. In potted experiment, cyclamen generally progressed from initial infection to complete plant death in 5～8 days, with the fastest disease development at 25～30 ℃. The disease began 9 days after inoculation and was fully developed by the 18th day. T3 treatment was the second fastest, while T1 treatment resulted in the slowest disease progression. [Conclusion] Early symptoms of *C. persicum* wilt disease were characterized by wilting, and the disease occurrence was closely related to temperature. Controlling the temperature to below 25 ℃ can effectively reduce the incidence of cyclamen wilt disease.

Keywords: *Cyclamen persicum*, *Fusarium* wilt disease, *Fusarium oxysporum*, Temperature

(编辑:吕俊俐)