

黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定及抗病鉴定方法筛选

王喜庆, 贾云鹤, 尤海波

(黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要:从黑龙江省西瓜主产区采集枯萎病病样 8 份, 从病原菌生理小种鉴定入手, 研究了黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种的分化, 并筛选出抗病性鉴定的方法, 并对 26 份西瓜育种材料进行抗病性鉴定。结果表明: 黑龙江省西瓜主产区采集的 8 个菌株侵染西瓜的枯萎病发病率都在 70% 以上, 轻度侵染黄瓜和甜瓜, 发病率在 20% 以下, 8 个菌株都为西瓜专化型镰刀菌。黑龙江省西瓜枯萎病的主要致病菌为生理小种 1; 西瓜抗枯萎病鉴定最佳方法为 1×10^5 孢子/mL 的孢子悬浮液、浸根接种法、在子叶展平时进行接种; 从 26 份西瓜材料中筛选出西瓜高抗枯萎病材料 3 份, 即 07W26、07W28、BW19, 发病率 $< 20\%$ 。

关键词:西瓜枯萎病; 生理小种; 抗病鉴定

中图分类号:S 436.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0103-05

西瓜枯萎病是一种世界性的严重土传真菌性病害, 该病是由尖镰孢菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. *spniueum*(E. F. Smith) Snyder & Hansen) 侵染引致的维管束系统病害。西瓜枯萎病在我国各地西瓜生产中均有发生。枯萎病导致西瓜减产, 甚至绝产。1894 年美国的 Smith 首次报道西瓜枯萎病, 自此, 有关此病的研究报道逐渐增多, 研究领域也包括病原、传播途径、致病机制、抗病机制、抗病育种及综合防治等方面^[1-3]。国际上公认的西瓜枯萎病菌有 3 个生理小种, 即生理小种 0 号、1 号、2 号。其中生理小种 2 号的侵染性最强^[4-7]。

第一作者简介:王喜庆(1973-), 男, 硕士, 副研究员, 硕士生导师, 国家西甜瓜产业技术体系哈尔滨综合试验站站长, 现主要从事瓜类育种与栽培技术等研究工作。E-mail: xiqingwang100@163.com.

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-26-27); 黑龙江省农业科学院创新工程重点资助项目。

收稿日期:2012-10-22

我国大多数学者研究认为, 中国以生理小种 1 号占主导, 除以上 3 个生理小种外, 还有其它的小种分化^[8-9]。近年来, 黑龙江省西瓜生产每年因枯萎病导致减产 10% 左右, 已成为西瓜生产的限制因素之一^[10]。该试验从病原菌生理小种鉴定入手, 研究了黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种的分化, 并筛选出抗病性鉴定的方法, 并对一些育种材料进行抗病性鉴定, 以期抗病育种打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

西瓜枯萎病病原菌来源: 枯萎病菌的病样采集自黑龙江省西瓜主产区, 分离后进行单孢培养, 获得 8 个菌株 FON-1~FON-8。

致病力测定采用中抗西瓜品种“京欣 1 号”。

专化型鉴定的其它材料为: 西瓜材料为中抗品种“京欣 1 号”, 其它种类作物和品种有黄瓜品种“816”、甜瓜品种“龙甜 4 号”、南瓜品种“谢花面”、葫芦品种“京欣砧 1 号”、冬瓜品种“绿皮大冬瓜”。

Abstract: The total flavonoids of *Platycladus orientalis* leaves was extracted with alcohol-water solution by heating to reflux for 2 hours, and the insecticidal activities of extracts were detected against *Aphis sophoricola* Zhang. The results showed that the total flavonoids of indoor leaf bioassay were toxic to *Aphis sophoricola* Zhang with LC_{50} of 13.71 mg/mL. The results of the control efficiency determination experiment in the field indicated that the control efficiency of the total flavonoids was 85.19% against the insect when the concentration of extracts was 30 mg/mL. Therefore, the total flavonoids of *Platycladus orientalis* leaves had a good insecticidal activity against *Aphis sophoricola* Zhang.

Key words: leaves of *Platycladus orientalis*; total flavonoids; *Aphis sophoricola* Zhang; insecticidal activity

鉴别寄主:采用国际通用的生理小种鉴别寄主 Sugar Baby、Charleston Gray、Calhoun Gray、PI296341。

苗期抗性鉴定方法筛选所用的西瓜材料为感病品种‘Sugar baby’。

抗性材料筛选的西瓜材料为该研究室的 BW 系列 17 份材料,外引的 1002、1003、1004、1005、1006、1007、07W26、07W27、07W28 等 9 份材料,一共 26 份西瓜材料。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的生理小种鉴定 病原菌致病力和专化型鉴定:将分离的各单孢菌株接种于西瓜、黄瓜、甜瓜、南瓜、冬瓜等鉴别材料,进行专化型鉴定和致病力测定。致病力测定和专化型鉴定所用材料需待坐果后进行发病率调查。生理小种鉴定:接种物制备:将单孢纯化的菌株接种于 PDS 培养基上,置 25℃ 恒温箱中培养 10~15 d。用无菌水冲洗孢子,制成孢子悬浮液(浓度 10^5 个孢子/mL),以备接种时用。接种鉴定方法:将病原菌配成浓度为 1×10^5 个孢子/mL 的孢子悬浮液。当幼苗子叶平展、真叶刚露时,采用浸根接种法(同 1.2.2)进行接种。接种后避光培养 2 d,以后正常管理。接种后 15 d 调查枯萎率及病情指数等。每处理 40 株苗,重复 3 次,枯萎率取平均值。西瓜枯萎病生理小种对比鉴定见表 1。西瓜枯萎病分级标准见表 2,病情指数 = $\sum(\text{各级株数} \times \text{发病级数}) / (\text{总株数} \times \text{最高发病级数}) \times 100\%$ 。

表 1 西瓜枯萎病菌生理小种对比鉴定

Table 1 Contrast identification of watermelon fusarium wilt physiological races

鉴别寄主	生理小种 Physiological races		
Differential host	0	1	2
Sugar Baby	S	S	S
Charleston Gray	R	S	S
Calhoun Gray	R	R	S
PI296341	R	R	R

注:S:枯萎率 $\geq 33\%$;R:枯萎率 $< 33\%$ 。表 6 同。

Notes:S, Wither rate $\geq 33\%$;R, Wither rate $< 33\%$ 。The same as Table 6.

表 2 西瓜枯萎病分级标准

Table 2 Grading standard of watermelon fusarium wilt

级数 Grade	症状 Symptoms
0	无症状
1	晴天中午子叶萎蔫或部分子叶、真叶轻微萎蔫,夜间能恢复
2	1 个真叶萎蔫或子叶萎蔫较重
3	子叶及 60% 以上真叶萎蔫,阻碍发育
4	整株萎蔫,60% 以上枯死,心叶成活
5	植株严重萎蔫并枯死

1.2.2 苗期抗性鉴定方法筛选 采用 3 因素 3 水平的正交实验设计,采用土壤接种法、浸根接种法、灌根接种法;菌液浓度分别为 1×10^4 孢子/mL、 1×10^5 孢子/mL、 1×10^6 孢子/mL;苗龄为子叶展平、1 片真叶、2 片真叶。土壤接种法:将病菌接种在玉米砂培养基(玉米粉 1 份,细砂 2 份,搅拌均匀后装在广口瓶内或罐头瓶内,在

0.2 MPa 压力下灭菌 1 h 备用)中,于 25℃ 恒温箱中培养,隔天振动培养瓶,取菌丝体用清水冲洗,加少许砂与菌丝体混合拌入土壤中,装钵,将供试植株移植到营养钵,温室中培养,保持白天 20~30℃,观察记录发病程度。浸根接种法:将消毒催芽的种子播种在装有消毒土的育苗盘里,当 1~2 片真叶展平时,将苗取出,将根部土壤抖去,并用自来水冲洗干净根系,剪去 0.2 cm 根尖部分,浸入孢子悬浮液 10 min 后,移植到装好消毒土的营养钵中,置于条件相同的温室中培养,15 d 后调查,记录发病情况。灌根接种法:将 1~2 片真叶展平的幼苗移栽于装有无菌土的营养钵中,缓苗后土壤干透时用移植铲在植株附近插入土壤,灌入孢子悬浮液,置于上述条件相同的温室中培养,15 d 后调查统计,记录发病情况。苗期抗性鉴定试验在黑龙江省农业科学院园艺分院温室内进行,3 次重复,供试品种为感病品种‘Sugar baby’。供试菌株为 FON-1,每处理 10 株。接种后 15 d 进行调查,记录发病情况,统计发病程度。该试验的 $L_9(3^4)$ 正交实施方案见表 3。

表 3 西瓜枯萎病苗期抗性鉴定实施方案

Table 3 Methods of watermelon seedling stage Fusarium wilt identification

试验号	处理方法	孢子悬浮液浓度	苗期阶段
Test No.	Methods	Spore suspension concentration/孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$	Seeding stage
1	1(土接)	$1(1 \times 10^4)$	1(子叶展平)
2	1(土接)	$2(1 \times 10^5)$	2(1 片真叶)
3	1(土接)	$3(1 \times 10^6)$	3(2 片真叶)
4	2(灌根)	$1(1 \times 10^4)$	3(2 片真叶)
5	2(灌根)	$2(1 \times 10^5)$	1(子叶展平)
6	2(灌根)	$3(1 \times 10^6)$	2(1 片真叶)
7	3(浸根)	$1(1 \times 10^4)$	2(1 片真叶)
8	3(浸根)	$2(1 \times 10^5)$	3(2 片真叶)
9	3(浸根)	$3(1 \times 10^6)$	1(子叶展平)

1.2.3 抗性材料筛选 通过抗性鉴定方法研究,确定最佳人工接种鉴定方法、接种浓度和苗龄。接种体的制备同 1.2.1。供鉴定材料 98 份,3 次重复,每重复 10 株,接种后 15 d 调查发病情况,并计算病情指数。病情分级标准同生理小种鉴定。抗性分级按 Elmstrong 和 Hopkins(1981)对抗性的分级方法,将供试材料划分为 4 种类型,即高抗(HR),枯萎率小于 20%;中抗(MR),枯萎率 21%~50%;轻抗(SR),枯萎率 51%~80%;感病(S),枯萎率 80%~100%。

2 结果与分析

2.1 黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定

2.1.1 西瓜枯萎病菌致病力测定和专化型鉴定 西瓜枯萎病的病原菌菌落形态见图 1,显微观察到的小孢子形态见图 2。表 4 是 8 个菌株的西瓜枯萎病菌在不同葫芦科作物致病力的表现及专化型的鉴定结果。由表 4 可知,枯萎病菌在 6 个寄主的枯萎病发病率表现不同。

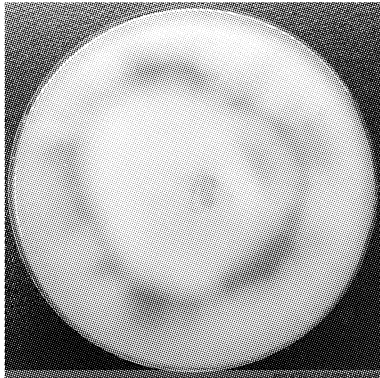


图1 菌落照片

Fig.1 Bacterial colonies photos

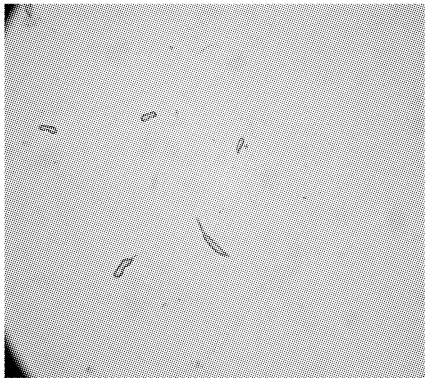


图2 小孢子显微图(400倍)

Fig.2 Microspore micrograph(400 times)

表5 不同菌株的致病力测定

Table 5 Determination of the virulence of different strains

菌株 Bacterial strain	FON4	FON5	FON2	FON3	FON1	FON7	FON8	FON6	CK
枯萎率 Wither rate/%	93.5aA	87.2abAB	87.0abAB	76.3bB	76.2bB	76.1bB	75.0bcBC	74.3bcBC	0dD

注:小写字母和大写字母分别代表5%和1%水平的差异显著性。

Note: The small letters and capital letters mean significant difference at 5% and 1% level respectively.

表6 黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定结果

Table 6 Identification results of watermelon fusarium wilt physiological races in Heilongjiang

菌株编号 Strains	调查株数 Number of investigation/株	Sugarbaby 枯萎率 Sugarbaby wither rate/%	Charleston Gray 枯萎率 Charleston Gray wither rate/%	Calhoun Gray 枯萎率 Calhoun Gray wither rate/%	PI296341 枯萎率 PI296341 wither rate/%	抗性反应 Resistance reaction	生理小种 Physiological race
FON1	120	77.8	55.6	30.5	0	SSRR	1
FON2	120	88.2	46.5	22.6	0	SSRR	1
FON3	120	76.5	38.6	18.9	0	SSRR	1
FON4	120	92.7	45.2	29.8	0	SSRR	1
FON5	120	88.9	55.6	24.4	0	SSRR	1
FON6	120	75.6	41.7	25.5	0	SSRR	1
FON7	120	77.5	38.2	12.9	0	SSRR	1
FON8	120	75.6	42.4	11.1	0	SSRR	1

为 $\geq 33\%$,具有明显的感病性;在寄主 Calhoun Gray 和 PI296341 上表现为 $< 33\%$,呈现抗病反应。根据鉴别寄主对西瓜枯萎病菌系的抗感反应,黑龙江省西瓜枯萎病菌系主要为生理小种 1。

2.2 西瓜枯萎病苗期抗性鉴定方法筛选

由表 7 可以看出,采用 1×10^5 孢子/mL 的孢子悬浮

菌株 FON-1~FON-8 都严重侵染西瓜,致病力强,枯萎病发病率 70%以上;轻度侵染黄瓜、甜瓜寄主,发病率为 20%以下;不侵染黄瓜南瓜和葫芦寄主。所以,以上 8 个病原菌均为尖孢镰刀菌西瓜专化型。将 8 株菌株分别接种于“京欣 1 号”西瓜苗上,发病后统计枯萎病发病率。通过方差分析和多重比较,发现菌株致病力存在显著差异。致病力最强的菌株是 FON4,枯萎率为 93.5%,最弱为 FON6,枯萎率为 74.3%,不同菌株的致病力差异见表 5。

表4 西瓜枯萎病菌专化型鉴定

Table 4 Forma specialis identification of watermelon fusarium wilt

发病率 Morbidity/%	FON1	FON2	FON3	FON4	FON5	FON6	FON7	FON8
西瓜 Watermelon	76.2	87.0	76.3	93.5	87.2	74.3	76.1	75.0
黄瓜 Cucumber	12.1	13.0	15.5	16.0	12.6	11.9	15.6	15.6
甜瓜 Melon	15.5	17.9	18.2	15.8	19.2	16.8	17.0	18.0
葫芦 Calabash	0	0	0	0	0	0	0	0
冬瓜 White gourd	0	0	0	0	0	0	0	0
南瓜 Pumpkin	0	0	0	0	0	0	0	0

2.1.2 西瓜枯萎病菌生理小种鉴定 将尖孢镰刀菌西瓜专化型的上述 8 个病原菌,接种 4 个国际公认鉴别寄主 Sugar Baby、Charleston Gray、Calhoun Gray 和 PI296341,根据美国马里兰州大学 Zhou X G 的研究结果:枯萎率 $< 33\%$ 为抗病性反应,枯萎率 $\geq 33\%$ 的为感病性反应。鉴定结果见表 6 和图 3。8 个病原菌分离物的枯萎率在寄主 Sugar Baby、Charleston Gray 上都表现

液、浸根接种法、在子叶展平时进行接种可达到理想的发病情况,所以最佳的苗期抗性鉴定方法为 1×10^5 孢子/mL 的孢子悬浮液、浸根接种法、在子叶展平时进行接种。

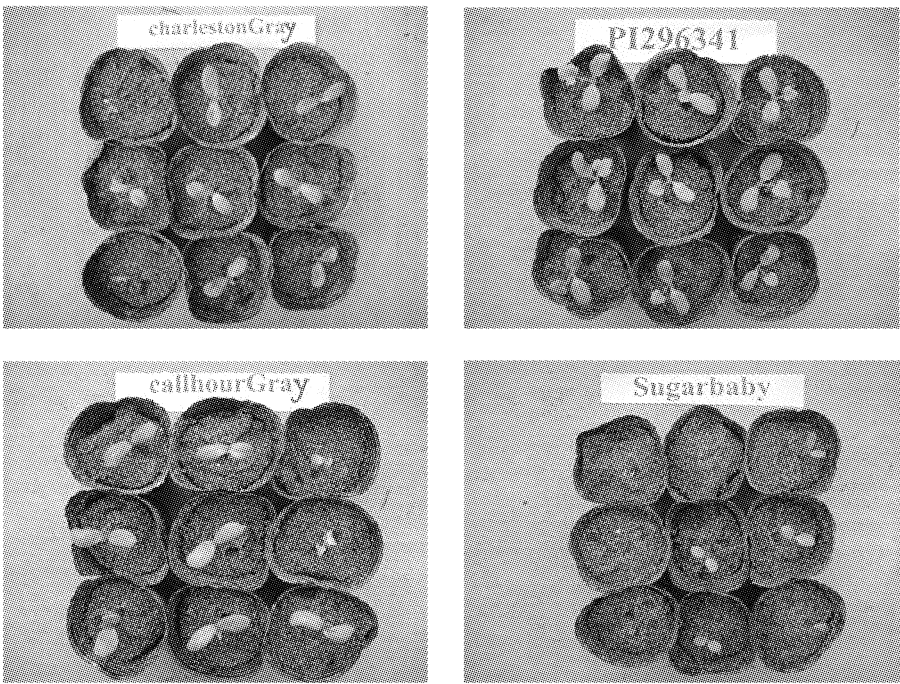


图 3 生理小种鉴定图片

Fig. 3 Photos of identification physiological races

表 7

不同接种条件下 Sugar baby 的枯萎病发病率

Table 7

Sugar baby blight morbidity under different inoculation condition

%

接种方法 Vaccination methods	菌液浓度 Bacteria liquid concentration/孢子·mL ⁻¹								
	1×10 ⁴			1×10 ⁵			1×10 ⁶		
	子叶展平	1片真叶	2片真叶	子叶展平	1片真叶	2片真叶	子叶展平	1片真叶	2片真叶
土壤接种法 Soil inoculation	47.7	37.8	28.9	53.5	36.7	26.5	49.8	50.3	30.9
浸根接种法 Leaching grounded	58.9	57.6	35.5	74.5	43.2	29.5	73.4	55.6	29.8
灌根接种法 Irrigation grounded	32.9	33.7	20.5	44.9	34.3	22.9	60.7	44.5	30.6

2.3 不同西瓜材料枯萎病抗性鉴定

选取黑龙江地区的主要致病生理小种,以黑龙江省农业科学院园艺分院的 FON-1 为供试菌株,进行不同西瓜材料的抗病性鉴定。由表 8 可知,07W28、07W26、BW19 为高抗病材料,发病率<20%,病情指数分别为 18.51%、17.22%和 18.52%;BW25、BW1、BW2 为感病

材料,发病率分别为 82.97%、88.65%和 91.35%,病情指数分别为 88.41%、89.14%和 93.56%;13 份轻抗材料的发病率在 52.51%~72.23%,病情指数为 53.64%~73.45%;7 份中抗材料,发病率为 38.46%~48.81%,病情指数为 37.22%~48.95%。

表 8

不同西瓜品种枯萎病抗性鉴定

Table 8

Different watermelon variety blight resistance identification

品种 Varieties	来源 Origin	调查株数 Number of investigation	枯萎率 Wither rate/%	病情指数 Disease index/%	抗性 Resistance
1002	俄罗斯	120	48.81	38.24	中抗
1003	俄罗斯	120	40.97	39.72	中抗
1004	俄罗斯	120	65.61	64.13	轻抗
1005	意大利	120	52.51	53.64	轻抗
1006	意大利	120	69.95	61.47	轻抗
1007	意大利	120	38.46	37.22	中抗
07W25	法国	120	44.61	45.52	中抗
07W26	法国	120	15.57	17.22	高抗
07W28	法国	120	17.95	18.51	高抗
BW7	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	38.96	42.31	中抗
BW19	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	17.64	18.52	高抗
BW35	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	46.28	43.84	中抗
BW28	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	46.54	48.95	中抗
BW25	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	82.97	88.41	感病
BW1	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	88.65	89.14	感病

续表 8

品种 Varieties	来源 Origin	调查株数 Number of investigation	枯萎率 Wither rate/%	病情指数 Disease index/%	抗性 Resistance
BW2	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	91.35	93.56	感病
BW3	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	54.25	55.65	轻抗
BW4	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	53.26	58.91	轻抗
BW5	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	54.56	56.32	轻抗
BW6	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	58.45	59.52	轻抗
BW8	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	65.34	67.87	轻抗
BW9	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	66.75	75.45	轻抗
BW10	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	67.81	71.34	轻抗
BW11	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	57.82	59.09	轻抗
BW12	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	71.23	73.45	轻抗
BW13	黑龙江省农业科学院园艺分院	120	58.92	60.24	轻抗

3 结论与讨论

在黑龙江省西瓜主产区采集的 8 个菌株侵染西瓜的枯萎病发病率都在 70% 以上,轻度侵染黄瓜和甜瓜,发病率在 20% 以下,8 个菌株都为西瓜专化型镰刀菌。目前国际上公认的尖镰孢西瓜专化型生理小种有 3 个,即小种 0、小种 1 和小种 2^[7]。2009 年美国马里兰州大学的研究人员又发现了致病力更强的新枯萎病小种,可以侵染 PI296341,命名为小种 3。各小种的地理分布不尽一致,对西瓜造成的危害也不同。该试验结果显示,黑龙江省西瓜枯萎病的主要致病菌为生理小种 1。利用黑龙江省西瓜枯萎病的主要致病菌株进行苗期抗性鉴定的最佳的苗期抗性鉴定方法为 1×10^5 孢子/mL 的孢子悬浮液、浸根接种法、在子叶展平时进行接种。该研究筛选出西瓜抗枯萎病高抗材料 3 份,07W28、07W26、BW19,发病率小于 20%。

参考文献

- [1] 马国斌,林德佩,王叶筠,等. 西瓜枯萎病菌镰刀菌酸对西瓜苗作用机制的初步探讨[J]. 植物病理学报,2000,30(4):373-374.
- [2] 向鲲鹏. 西瓜枯萎病病原菌生物学特性及生物防治的初步研究[D].

雅安:四川农业大学,2008.

- [3] 许勇,张海英. 西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究[J]. 遗传学报,2000,27(2):151-157.
- [4] 安美君,吴凤芝,刘博. 黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定及部分西瓜品种抗病鉴定[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2009,27(5):494-500.
- [5] Freeman S, Zveibil A, Vintal H, et al. Isolation of non-pathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis for bio-logical control of fusarium wilt in cucurbits[J]. Phytopathology,2002,92(2):164-168.
- [6] Ioannou N, Poullis C A, Heale J B. Fusarium wilt of watermelon in Cyprus and its management with soil solarization combined with fumigation or ammonium fertilizers[J]. Bulletin OEPP,2000,30(2):223-230.
- [7] Zhang X P, Bill R. Inheritance of resistance to race 0,1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. *spineum* watermelon (Citrullus sp. PI296341) [J]. CGC report,1993,16:77-78.
- [8] 王冬梅,王纯利,曲丽红,等. 新疆西瓜枯萎病生理小种初探[J]. 新疆农业大学学报,1998,21(2):115-118.
- [9] 吴营昌,王守正,李洪连,等. 瓜类枯萎病菌尖镰孢专业化型研究初报[J]. 河南农业大学学报,1996,30(1):89-92.
- [10] 王喜庆. 黑龙江省西瓜甜瓜生产现状、存在的问题和对策[J]. 中国瓜菜,2008(2):53-54.

Identification of Physiological Races and Screening of Disease-resistant Methods of Watermelon Fusarium Wilt Pathogen in Heilongjiang Province

WANG Xi-qing, JIA Yun-he, YOU Hai-bo

(Department of Horticulture, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: Collecting eight watermelon fusarium wilt pathogen disease samples from the watermelon main producing areas of Heilongjiang province, the pathogens physiological species were identified firstly, and fusarium wilt pathogen species differentiation were studied in Heilongjiang, identification methods of resistance wilt were screened, and resistance of 26 breeding materials were indentified. The results showed that the incidence of water melon fusarium wilt reached above 70% after using 8 strains collected from the watermelon main producing area in Heilongjiang province infected melon; cucumber and melon were mild infected, and the incidence was below 20%, 8 strains were all watermelon special fusarium bacteria watermelon wilt pathogen was physiological race 1 in Heilongjiang province. The best methods of disease-resistant identification in watermelon dusarium should be vaccination in unfolding stage of the cotyledon by dipping root inoculation with 1×10^5 spores/mL spore suspension. Three dusarium wilt highly resistant materials were selected.

Key words: watermelon fusarium wilt; physiological races; pathogen; biological characteristics