

DOI:10.11937/bfyy.201616025

黄瓜棒孢叶斑病菌的毒力分化及 AFLP 分析

张艳菊¹, 刘奇¹, 刘东¹, 秦智伟², 周秀艳¹, 刘大伟¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:以 6 个黄瓜品种(系)为试材,以来自山东、辽宁、黑龙江的 200 个黄瓜棒孢叶斑病菌为供试菌株,采用苗期接种鉴定及 AFLP 分子标记技术,研究了黄瓜棒孢叶斑病菌的毒力分化。结果表明:黄瓜棒孢叶斑病菌存在生理小种分化现象,并将 200 个菌株分为 4 个生理小种,初步筛选出 D0330、D1306、D0649 和 D2025 作为研究黄瓜棒孢叶斑病菌生理小种分化的鉴别寄主备选材料;AFLPs 与菌株的地理来源无关,与毒力存在相关性。

关键词:黄瓜棒孢叶斑病;多主棒孢霉;毒力分化;AFLP

中图分类号:S 436.421.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)16-0092-07

近年来,由多主棒孢霉 *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) 侵染引起的黄瓜棒孢叶斑病已由次级病害上升为主要病害,严重影响黄瓜生产。自发现以来,病情发展迅速,危害十分普遍,尤以保护地受害严重。田间发病一般减产 20%,严重时可达 60%~70%^[1-2]。20 世纪 60 年代,戚佩坤等^[3]曾报道该菌可侵染黄瓜,但直至 20 世纪 90 年代后,李宝聚等^[4]才报道该病在沈阳部分地区造成危害。目前在欧洲、美国、韩国、日本等国家,以及我

国的宁夏、上海、广东、山东、河南、河北、甘肃、黑龙江等地均有黄瓜棒孢叶斑病发生的报道^[5-16]。

多主棒孢霉的寄主范围广泛,能够侵染橡胶、木瓜、大豆、番茄和黄瓜等 380 个属内的 530 种植物^[17]。国内外研究学者对来自不同寄主的多主棒孢霉进行了毒力分化的研究,表明多主棒孢霉存在寄主专化性^[5,18-21]。但针对黄瓜棒孢叶斑病菌对不同黄瓜品系的毒力分化的研究却鲜有报道。黄瓜棒孢叶斑病的防治主要有应用抗病品种、药剂防治及生物防治等措施,其中最经济有效的方法是选育和种植抗病品种。明确病菌的毒力分化及各地优势小种是抗病品种选育和利用的基础,因此,黄瓜棒孢叶斑病菌毒力分化的研究变得尤为重要。

AFLP 技术是基于 PCR 反应的一种选择性扩增限

第一作者简介:张艳菊(1968-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物病原生物学及植物病害综合防治。E-mail:zhangyanju1968@163.com.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C201428)。

收稿日期:2016-04-20

Establishment of Regeneration System for *Cucumis melo* L. cv. 'Jiashi' of Xinjiang Melon

DU Shanshan, LI Siyi, WANG Dong, LI Guan

(College of Life and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract: A high efficiency and rapid regeneration system of thick-skinned muskmelon had been set up using cultivars 'Jiashi' cultured in the media with different hormone of 6-Benzolaminopurine(6-BA) and silver nitrate(AgNO₃). The 5 days sterile cotyledon of 'Jiashi' were cultured in media with different 6-BA concentration. The effect of different AgNO₃ concentration added in media with the most appropriate 6-BA concentration was discussed. The results showed that the MSB medium containing 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA was the most suitable for inducing adventitious buds with an average rate of 75%. The MSB medium containing 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 2.0 mg · L⁻¹ AgNO₃ was the best suitable for inducing adventitious buds with an average rate of 65%, there were most of single adventitious buds, this combination could save time of regeneration system. Adventitious buds were able to elongation on MSB medium with 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg · L⁻¹ GA₃, adventitious buds elongated and grew well. Regenerated shoots were rooted on MSB medium with 0.01 mg · L⁻¹ NAA.

Keywords: melon; 6-BA; AgNO₃; regeneration system

制性片段的方法。由于不同物种的基因组 DNA 大小不同,基因组 DNA 经限制性内切酶酶切后,产生分子量大小不同的限制性片段^[22-24]。目前,国内鲜见利用 AFLP 分子标记技术对黄瓜棒孢叶斑病菌多主棒孢霉进行遗传多样性分析的报道。该研究从病菌毒力分化和遗传多样性 2 个方面对来自黑龙江、辽宁和山东的黄瓜棒孢叶斑病菌进行研究,旨在明确我国黄瓜棒孢叶斑病菌是否存在毒力分化现象,初步筛选适合我国黄瓜棒孢叶斑病菌生理小种鉴定的鉴别寄主,探讨病菌群体遗传结构与毒力的关系,以期为黄瓜棒孢叶斑病抗病育种及品种的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:2013 年 4—6 月,采集来自黑龙江哈尔滨、山东寿光及辽宁海城 3 个城市的黄瓜棒孢叶斑病病叶,采用组织分离法进行分离^[25],经形态学和分子生物学鉴定,并按照柯赫氏法则进行致病性测定后,共获得 200 个多主棒孢霉致病菌株。采集地点及菌株编号见表 1。

供试黄瓜品种:高代纯合自交系 D0330、D1306、D2025、D0651、D0732 和 D0649 共 6 个黄瓜品系用于病菌毒力测定,供试品系由东北农业大学黄瓜课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 黄瓜棒孢叶斑病菌的毒力测定 于黄瓜 1 片真叶期,采用喷雾法进行接种^[26]。孢子浓度为 1.0×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种温度 26 $^{\circ}\text{C}$,保湿 24 h,7~10 d 后调查发病情况。病害调查采用王惠哲等^[27]的分级标准,0 级,无病症;1 级,叶面出现少量病斑;2 级,病斑占叶面积 1/3 以下;3 级,病斑占叶面积 1/3~1/2;4 级,病斑占叶面积 1/2~2/3;5 级,病斑占叶面积 2/3 以上。计算病情指数。病情指数 = $\frac{\sum_{i=0}^n (\text{各级病株数} \times \text{各级值})}{(\text{调查总株数} \times \text{最高级值})} \times 100$ 。抗性分级标准^[28],免疫(I): $DI=0$;高抗(HR): $DI<15$;抗病(R): $15 \leq DI < 35$;中抗(MR): $35 \leq DI < 55$;感病(S): $55 \leq DI < 75$;高感(HS): $DI \geq 75$ 。

1.2.2 黄瓜棒孢叶斑病菌 AFLP 分析 基因组 DNA 的提取采用 SDS 法^[28-29]。AFLP 反应体系与程序参考张艳菊等^[30]方法。引物人工接头由上海生工合成,选择性扩增使用了 9 种 *EcoRI* 引物和 9 种 *MseI* 引物共 64 个引物组合。扩增产物利用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,75 W 恒功率电泳 120 min。采用银染方法检测电泳结果。

1.3 数据分析

引物的扩增结果运用 NTSYS(2.1 版)软件进行统计分析,采用 UPGMA 法构建分子系统树。

2 结果与分析

2.1 黄瓜棒孢叶斑病菌毒力分化

200 个黄瓜棒孢叶斑病菌株在 6 个黄瓜品系上的毒力测定结果见表 1。

表 1 供试菌株来源及毒力

Table 1 Origins and virulence of all strains

菌株 Pathogens	来源 Origin	自交系 Selfing line						小种 Race
		D0330	D1306	D2025	D0651	D0732	D0649	
HB-1gm	哈尔滨市光明村	R	R	MR	S	S	S	1
HB-2nc	哈尔滨香坊农场	R	MR	MR	S	S	S	1
HB-3dn	哈尔滨东北农大	R	S	MR	S	HS	S	3
HB-4xj	哈尔滨市薛家村	R	S	S	HS	HS	S	4
SD-1lv	寿光市留吕镇	R	S	MR	S	HS	S	3
SD-2lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	HS	HS	HS	1
SD-3lv	寿光市留吕镇	R	R	S	HS	HS	S	2
SD-4lv	寿光市留吕镇	R	R	S	HS	HS	S	2
SD-5lv	寿光市留吕镇	S	HS	HS	S	S	S	4
SD-6lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	S	HS	HS	1
SD-7lv	寿光市留吕镇	R	S	MR	S	HS	S	3
SD-8lv	寿光市留吕镇	MR	HS	HS	S	S	HS	4
SD-9lv	寿光市留吕镇	S	HS	S	S	HS	HS	4
SD-10lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	HS	HS	S	1
SD-11lv	寿光市留吕镇	MR	HR	S	HS	S	S	2
SD-12lv	寿光市留吕镇	MR	S	S	S	HS	S	4
SD-13lv	寿光市留吕镇	MR	MR	MR	S	HS	HS	1
SD-14lv	寿光市留吕镇	R	S	MR	HS	HS	HS	3
SD-15lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	HS	HS	HS	1
SD-16lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	S	HS	S	1
SD-17lv	寿光市留吕镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
SD-18lv	寿光市留吕镇	MR	S	HS	S	S	HS	4
SD-19lv	寿光市留吕镇	MR	S	HS	S	HS	S	4
SD-20lv	寿光市留吕镇	MR	S	MR	S	HS	S	3
SD-21lv	寿光市留吕镇	R	S	MR	S	HS	S	3
SD-22lv	寿光市留吕镇	MR	S	MR	S	HS	S	3
SD-23lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	S	S	S	1
SD-24lv	寿光市留吕镇	R	HS	S	S	S	S	4
SD-25lv	寿光市留吕镇	MR	S	HS	HS	HS	S	4
SD-26lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	HS	S	S	1
SD-27lv	寿光市留吕镇	S	S	HS	S	S	HS	4
SD-28lv	寿光市留吕镇	R	MR	MR	S	S	HS	1
SD-29lv	寿光市留吕镇	R	S	S	S	S	S	4
SD-30lv	寿光市留吕镇	MR	S	MR	HS	HS	HS	3
SD-31lv	寿光市留吕镇	MR	HS	S	S	S	HS	4
SD-32lv	寿光市留吕镇	R	S	MR	S	HS	S	3
SD-33lv	寿光市留吕镇	R	S	MR	HS	S	S	3
SD-34lv	寿光市留吕镇	R	HS	MR	S	HS	HS	3
SD-35lv	寿光市留吕镇	R	S	S	S	HS	S	4
SD-36lv	寿光市留吕镇	R	S	HS	HS	HS	S	4
SD-37hl	寿光市化龙镇	R	MR	HS	HS	S	HS	2
SD-38hl	寿光市化龙镇	MR	S	HS	S	HS	HS	4
SD-39hl	寿光市化龙镇	MR	MR	HS	HS	S	S	2
SD-40hl	寿光市化龙镇	MR	S	HS	S	HS	S	4
SD-41hl	寿光市化龙镇	R	S	MR	S	HS	HS	3
SD-42hl	寿光市化龙镇	MR	S	MR	S	HS	S	3
SD-43hl	寿光市化龙镇	R	S	MR	S	S	HS	3
SD-44hl	寿光市化龙镇	MR	R	MR	S	S	HS	1
SD-45hl	寿光市化龙镇	R	S	MR	S	S	S	3
SD-46hl	寿光市化龙镇	R	S	MR	S	S	S	3

表 1(续)

Table 1(Continued)

菌株	来源	自交系 Selfing line						小种
Pathogens	Origin	D0330	D1306	D2025	D0651	D0732	D0649	Race
SD-47hl	寿光市化龙镇	MR	S	HS	S	HS	HS	4
SD-48hl	寿光市化龙镇	R	MR	MR	S	HS	HS	1
SD-49hl	寿光市化龙镇	R	S	S	S	HS	S	4
SD-50hl	寿光市化龙镇	MR	HS	S	HS	S	HS	4
SD-51hl	寿光市化龙镇	MR	MR	MR	S	S	HS	1
SD-52hl	寿光市化龙镇	R	HS	S	HS	HS	S	4
SD-53hl	寿光市化龙镇	R	HS	MR	HS	HS	S	3
SD-54hl	寿光市化龙镇	R	MR	MR	S	S	S	1
SD-55sj	寿光市孙家集镇	R	R	MR	S	S	S	1
SD-56sj	寿光市孙家集镇	R	HS	MR	HS	S	HS	3
SD-57sj	寿光市孙家集镇	MR	HS	S	S	S	HS	4
SD-58sj	寿光市孙家集镇	MR	HS	S	S	S	HS	4
SD-59sj	寿光市孙家集镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
SD-60sj	寿光市孙家集镇	R	MR	MR	S	S	S	1
SD-61sj	寿光市孙家集镇	R	S	MR	S	S	HS	3
SD-62sj	寿光市孙家集镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
SD-63sj	寿光市孙家集镇	R	S	MR	S	HS	S	3
SD-64sj	寿光市孙家集镇	R	MR	MR	S	HS	HS	1
SD-65sj	寿光市孙家集镇	R	MR	MR	S	S	S	1
SD-66sj	寿光市孙家集镇	R	MR	MR	S	S	HS	1
LN-1wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-2wx	海城市温香镇	R	S	HS	HS	HS	S	4
LN-3wx	海城市温香镇	R	R	S	S	S	HS	2
LN-4wx	海城市温香镇	R	MR	HS	S	S	HS	2
LN-5wx	海城市温香镇	MR	HS	S	HS	HS	S	4
LN-6wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-7wx	海城市温香镇	MR	S	S	S	S	S	4
LN-8wx	海城市温香镇	MR	S	HS	S	S	HS	4
LN-9wx	海城市温香镇	MR	MR	S	S	S	S	2
LN-10wx	海城市温香镇	R	MR	MR	S	S	HS	1
LN-11wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	HS	S	HS	4
LN-12wx	海城市温香镇	MR	HS	MR	HS	HS	S	3
LN-13wx	海城市温香镇	R	S	HS	S	S	HS	4
LN-14wx	海城市温香镇	R	R	HS	S	HS	HS	2
LN-15wx	海城市温香镇	MR	HS	S	S	S	HS	4
LN-16wx	海城市温香镇	MR	MR	HS	S	HS	HS	2
LN-17wx	海城市温香镇	R	MR	S	S	S	HS	2
LN-18wx	海城市温香镇	MR	S	HS	S	S	HS	4
LN-19wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	HS	S	HS	4
LN-20wx	海城市温香镇	R	MR	MR	S	S	S	1
LN-21wx	海城市温香镇	MR	S	HS	S	S	HS	4
LN-22wx	海城市温香镇	MR	S	HS	S	S	HS	4
LN-23wx	海城市温香镇	MR	MR	HS	S	S	S	2
LN-24wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	S	HS	4
LN-25wx	海城市温香镇	MR	S	MR	S	S	HS	3
LN-26wx	海城市温香镇	R	S	MR	HS	S	S	3
LN-27wx	海城市温香镇	R	S	MR	HS	HS	HS	3
LN-28wx	海城市温香镇	MR	S	MR	S	S	HS	3
LN-29wx	海城市温香镇	R	HS	MR	HS	HS	HS	3
LN-30wx	海城市温香镇	R	MR	MR	S	HS	HS	1
LN-31wx	海城市温香镇	MR	S	HS	HS	S	HS	4
LN-32wx	海城市温香镇	MR	HS	S	HS	S	HS	4
LN-33wx	海城市温香镇	MR	S	S	HS	HS	S	4
LN-34wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	HS	S	HS	4
LN-35wx	海城市温香镇	MR	S	MR	HS	S	HS	3
LN-36wx	海城市温香镇	MR	HS	MR	HS	HS	HS	3
LN-37wx	海城市温香镇	MR	S	S	HS	S	HS	4
LN-38wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	S	S	4

表 1(续)

Table 1(Continued)

菌株	来源	自交系 Selfing line						小种
Pathogens	Origin	D0330	D1306	D2025	D0651	D0732	D0649	Race
LN-39wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	HS	S	4
LN-40wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	S	HS	4
LN-41wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-42wx	海城市温香镇	MR	R	HS	S	S	S	2
LN-43wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-44wx	海城市温香镇	R	MR	S	S	S	S	2
LN-45wx	海城市温香镇	R	S	S	S	HS	HS	4
LN-46wx	海城市温香镇	R	S	MR	HS	S	S	3
LN-47wx	海城市温香镇	R	MR	MR	HS	S	HS	1
LN-48wx	海城市温香镇	R	S	MR	S	HS	S	3
LN-49wx	海城市温香镇	MR	HS	HS	S	HS	HS	4
LN-50wx	海城市温香镇	R	S	MR	S	S	HS	3
LN-51wx	海城市温香镇	R	S	S	S	S	HS	4
LN-52gw	海城市感王镇	MR	MR	MR	HS	S	S	1
LN-53gw	海城市感王镇	MR	MR	HS	HS	S	S	2
LN-54gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	HS	HS	4
LN-55gw	海城市感王镇	R	S	S	HS	HS	HS	4
LN-56gw	海城市感王镇	MR	S	HS	HS	S	HS	4
LN-57gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	S	HS	4
LN-58gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-59gw	海城市感王镇	R	HS	HS	HS	S	S	4
LN-60gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-61gw	海城市感王镇	MR	MR	S	S	HS	S	2
LN-62gw	海城市感王镇	MR	S	S	S	S	S	4
LN-63gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	HS	HS	4
LN-64gw	海城市感王镇	R	HS	S	S	HS	S	4
LN-65gw	海城市感王镇	R	MR	MR	S	HS	S	1
LN-66gw	海城市感王镇	MR	MR	MR	HS	S	S	1
LN-67gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-68gw	海城市感王镇	MR	S	S	S	S	S	4
LN-69gw	海城市感王镇	MR	S	HS	HS	S	S	4
LN-70gw	海城市感王镇	MR	HS	S	HS	S	HS	4
LN-71gw	海城市感王镇	MR	S	HS	S	HS	HS	4
LN-72gw	海城市感王镇	R	S	MR	S	HS	S	3
LN-73gw	海城市感王镇	MR	HS	S	S	S	HS	4
LN-74gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-75gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	HS	HS	HS	4
LN-76gw	海城市感王镇	MR	HS	MR	HS	HS	HS	3
LN-77gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	HS	S	HS	4
LN-78gw	海城市感王镇	MR	MR	MR	S	S	HS	1
LN-79gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	S	S	HS	4
LN-80gw	海城市感王镇	MR	S	HS	HS	S	HS	4
LN-81gw	海城市感王镇	R	HS	HS	S	S	HS	4
LN-82gw	海城市感王镇	MR	S	HS	S	S	S	4
LN-83gw	海城市感王镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-84gw	海城市感王镇	R	S	S	S	S	S	4
LN-85wt	海城市望台镇	R	S	S	HS	S	S	4
LN-86wt	海城市望台镇	MR	MR	S	S	HS	S	2
LN-87wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	HS	HS	4
LN-88wt	海城市望台镇	R	MR	R	HS	S	S	1
LN-89wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-90wt	海城市望台镇	MR	HS	MR	HS	S	HS	3
LN-91wt	海城市望台镇	R	S	HS	S	HS	HS	4
LN-92wt	海城市望台镇	R	S	HS	HS	S	S	4
LN-93wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-94wt	海城市望台镇	R	R	MR	S	HS	S	1
LN-95wt	海城市望台镇	R	R	HS	HS	S	S	2
LN-96wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	S	HS	4

表 1(续)

Table 1(Continued)

菌株 Pathogens	来源 Origin	自交系 Selfing line						小种 Race
		D0330	D1306	D2025	D0651	D0732	D0649	
LN-97wt	海城市望台镇	MR	S	HS	HS	HS	HS	4
LN-98wt	海城市望台镇	R	S	S	HS	HS	S	4
LN-99wt	海城市望台镇	MR	HS	S	S	S	HS	4
LN-100wt	海城市望台镇	R	HS	S	HS	HS	HS	4
LN-101wt	海城市望台镇	MR	S	MR	S	S	S	3
LN-102wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-103wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	S	S	HS	4
LN-104wt	海城市望台镇	R	HS	S	S	S	S	4
LN-105wt	海城市望台镇	MR	HS	S	HS	S	S	4
LN-106wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-107wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-108wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	S	HS	4
LN-109wt	海城市望台镇	R	HS	S	HS	S	S	4
LN-110wt	海城市望台镇	R	S	MR	S	S	HS	3
LN-111wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	HS	HS	S	4
LN-112wt	海城市望台镇	MR	HS	HS	S	S	S	4
LN-113wt	海城市望台镇	MR	S	HS	HS	S	HS	4
LN-114gj	海城市郭家村	MR	HS	S	HS	HS	HS	4
LN-115gj	海城市郭家村	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-116gj	海城市郭家村	R	HS	S	HS	HS	S	4
LN-117gj	海城市郭家村	R	S	HS	S	S	HS	4
LN-118gj	海城市郭家村	MR	MR	HS	HS	HS	S	2
LN-119gj	海城市郭家村	MR	S	HS	HS	S	HS	4
LN-120gj	海城市郭家村	MR	HS	HS	HS	HS	HS	4
LN-121gj	海城市郭家村	MR	HS	HS	HS	S	S	4
LN-122gj	海城市郭家村	R	MR	MR	HS	HS	HS	1
LN-123gj	海城市郭家村	R	HS	HS	HS	S	HS	4
LN-124gj	海城市郭家村	MR	S	S	S	HS	HS	4
LN-125gj	海城市郭家村	MR	S	HS	S	S	S	4
LN-126gj	海城市郭家村	MR	MR	HS	S	S	S	2
LN-127gj	海城市郭家村	MR	S	HS	HS	HS	S	4
LN-128gj	海城市郭家村	MR	HS	HS	HS	HS	HS	4
LN-129gj	海城市郭家村	R	S	HS	HS	HS	HS	4
LN-130gj	海城市郭家村	R	R	R	HS	HS	HS	1

在 6 个黄瓜品系中,以 D0330 抗病性最强,病情指数在 15.0~54.0,对供试菌株都表现为抗性;在寄主 D0651、D0732 及 D0649 上,病情指数均高于 55.0,对供试菌株都表现为感病或高感。在寄主 D1306 上,病情指数在 24.0~100.0,对 11 个菌株表现为抗病,对 40 个菌株表现为中抗,对 74 个菌株表现为感病,对 75 个菌株表现为高感;在寄主 D2025 上,病情指数在 24.0~100.0,对 2 个菌株表现为抗病,对 66 个菌株表现为中抗,对 46 个菌株表现为感病,对 86 个菌株表现为高感。以上说明供试菌株在寄主 D1306 和 D2025 上存在毒力分化现象。

根据寄主 D0330、D0649、D1306 和 D2025 对 200 个菌株抗感反应的不同,将菌株分为 4 个生理小种。由表 2 可知,1 号生理小种毒力最弱,D0330、D1306 和 D2025 对其均表现为抗病,D0649 表现为感病;1 号生理小种共包含 32 个菌株,占有菌株的 16.0%。2 号生理小种和 3 号生理小种毒力中等,D0330 和 D1306 对 2 号生理小种表现抗病,D0649 和 D2025 对 2 号生理小种表现为感

病,2 号生理小种共包含 20 个菌株,占有菌株的 10.0%。D0330 和 D2025 对 3 号生理小种表现抗病,D0649 和 D1306 对 3 号生理小种表现为感病,3 号生理小种共包含 37 个菌株,占有菌株的 18.5%。4 号生理小种毒力最强,D1306、D0649 和 D2025 均表现为感病,只有 D0330 表现抗病,4 号生理小种共包含 111 个菌株,占有菌株的 55.5%。

D0330 对所有菌株均表现为抗病;D0649 对所有菌株均表现为感病;D1306 对 26% 的菌株表现为抗病,对 74% 的菌株表现为感病;D2025 对供试菌株的抗感比例几乎为 1:2。D0330、D0649、D1306 和 D2025 被初步筛选作为进一步研究黄瓜棒孢叶斑病菌生理小种分化的鉴别寄主备选材料。

表 2 生理小种类型

Table 2 Type of physiological race

生理小种类型 Type of physiological race	黄瓜品种 Cucumber cultivars				比例 Percentage/%
	D0330	D2025	D1306	D0649	
1	R	R	R	S	16.0
2	R	S	R	S	10.0
3	R	R	S	S	18.5
4	R	S	S	S	55.5

将菌株地理来源与生理小种类型进行分析,3 个地区的菌株生理小种存在多样性。由表 3 可知,除哈尔滨菌株不包含 2 号生理小种外,山东寿光及辽宁海城均包含 4 个生理小种。哈尔滨菌株较少,无法分析优势小种;山东寿光除 2 号生理小种较少外,其余 3 个生理小种所占比例相近;辽宁海城地区 4 号生理小种为优势小种,所占比例为 66.9%。

2.2 AFLP 分析

在选取的 64 对引物组合中,筛选出 9 对多态性好、带型清晰的引物组合。利用这 9 对引物组合对 200 个供试菌株进行 AFLP 分析,得到清晰的电泳谱带(图 1)。从表 4 可以看出,不同引物组合扩增出的谱带数存在差异,谱带最多的引物组合 E12/M15,扩增出 6 354 条带,最少的引物组合 E14/M12,扩增出 1 458 条带。9 对引物共扩增出 26 136 条带,每对引物平均扩增条带数 2 904 条,其中多态性带 10 579 条,占扩增总带数的 40.47%,每对引物平均扩增多态性带 1 175 条(表 4)。

表 3 生理小种的分布

Table 3 Distribution of race

来源 Origin	生理小种类型 Type of physiological race				数量 Number
	1	2	3	4	
黑龙江省哈尔滨市	2(50.0%)	0(0%)	1(25.0%)	1(25.0%)	4
山东省寿光市	18(27.3%)	5(7.6%)	20(30.3%)	23(34.8%)	66
辽宁省海城市	12(9.2%)	15(11.6%)	16(12.3%)	87(66.9%)	130
总计	32	20	37	111	200

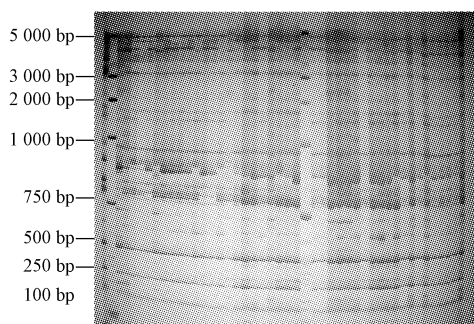


图1 部分棒孢叶斑病菌应用引物
E12/M15 的 AFLP 扩增结果

Fig. 1 AFLP amplification result of *Corynespora cassiicola* isolates using primer E12/M15

表4 9对引物对200个菌株的AFLP扩增结果

Table 4 Amplified result of 200 *Corynespora cassiicola* isolates by 9 pairs of primers

代码 Code	引物组合 Primer	总带数 Number of amplified bands	多态性带 Number of polymorphic bands	多态性带百分率 Percentage of polymorphic bands/%
1	E12/M15	6 354	2 700	42.49
2	E12/M18	1 798	725	40.32
3	E12/M16	2 000	650	32.50
4	E13/M11	1 944	748	38.47
5	E14/M12	1 458	479	32.85
6	E14/M16	4 183	1 416	33.85
7	E15/M15	2 107	1 015	48.17
8	E17/M12	2 756	1 022	37.08
9	E19/M13	3 536	1 824	51.58

2.3 黄瓜棒孢叶斑病菌的遗传多样性分析

利用 NTSYS 软件对 AFLP 数据进行分析,得到黄瓜棒孢叶斑病菌间的聚类树状图。由图 2 可知,菌株间的相似系数在 0.56~0.98,平均为 0.77,黄瓜棒孢叶斑病菌遗传分化较大,群体遗传多样性比较丰富。在相似系数为 0.78 时,供试的菌株被划分为 5 个类群(AFLP groups,简称 AGs),分别为 AGI、AGII、AGIII、AGIV 和 AGV。AGI类群包含 110 个菌株,病情指数在 64.0~100.0,毒力均较强,全部为生理小种 4 号,均来自山东或辽宁。AGII类群共计 57 个菌株,病情指数在 35.0~60.0,中等毒力,包含生理小种 2 号和生理小种 3 号,来自山东或辽宁。AGIII类群包含 29 个菌株,所有菌株毒力最弱,均为生理小种 1 号,来自山东或辽宁。AGIV类群包含 3 个菌株,均来自哈尔滨,生理小种有 1 号、3 号和 4 号。AGV类群仅 1 个菌株为生理小种 1 号,毒力最弱,来自黑龙江省哈尔滨市。

3 讨论与结论

黄瓜棒孢叶斑病是一种气传病害,以菌丝体或分生孢子随病残体在土壤中或其它寄主植物上越冬,病原菌存活力较强,目前该病已发展成为主要病害,给黄瓜生

产造成了严重损失。对于黄瓜棒孢叶斑病菌在黄瓜上的生理分化的研究还比较少。陆宁海等^[26]曾研究了 Xin-1, Xin-2, Xin-3, Xin-4 等 4 个黄瓜棒孢叶斑病菌株对同一感病黄瓜品种的毒力,发现毒力有较明显差异,推测可能是病原菌存在生理分化现象,但所用菌株量及黄瓜品种均太少,仅 4 个菌株,对于黄瓜棒孢叶斑病菌在黄瓜上是否存在生理分化现象还未可知。该研究从 6 个黄瓜品系中最终筛选出 D0330、D0649、D1306 和 D2025 为我国黄瓜棒孢叶斑病菌生理小种鉴定的鉴别寄主;并根据 4 个鉴别寄主抗感反应,将 200 个菌株分为 4 个生理小种。1 号生理小种毒力最弱,2 号和 3 号生理小种毒力中等,4 号生理小种毒力最强,且所占比例最大,达到了 55.5%。将菌株地理来源与生理小种类型进行分析,3 个地区的菌株生理小种存在多样性。除黑龙江哈尔滨菌株不包含 2 号和 4 号生理小种外,山东寿光及辽宁海城均包含 4 个生理小种。山东寿光地区的 1、3、4 号生理小种所占比例相近;辽宁海城地区 4 号生理小种为优势小种,所占比例为 65.4%。

国内外对多主棒孢霉的遗传多样性研究方法,主要集中于利用 ISSR^[31-32]、RFLP^[33]、RAPD^[34] 等分子标记方法。SILVA 等^[35]采用 RAPD 标记和 ITS-rDNA RFLP 技术,分析 32 株斯里兰卡橡胶树棒孢叶斑病原菌种群分化,结果显示,所有菌株的 ITS 区扩增片段及 RAPD 随机引物扩增产物片段具有高度的一致性。QI 等^[36]利用 ISSR 标记分析我国云南和海南橡胶上 24 株多主棒孢遗传多样性,证明我国橡胶多主棒孢存在 4 个 ISSR 类群,但所获得的 ISSR 类群与菌株的致病力和形态特征间不存在相关性。国内外学者对黄瓜棒孢叶斑病菌遗传多样性分析的研究较少。该研究利用 AFLP 分子标记对 200 个菌株进行遗传多样性分析,在选取的 64 对引物组合中,筛选出 9 对多态性好、带型清晰的引物组合。利用这 9 对引物组合对 200 个供试菌株进行 AFLP 分析,明确了 AFLPs 与菌株的地理来源无关,与毒力存在相关性。

参考文献

- [1] 蓝国兵,谭耀华,何自福,等. 黄瓜褐斑病(*Corynespora cassiicola*) 在广东首次报道[J]. 植物保护, 2012, 38(5): 197-200.
- [2] 杨双娟,顾兴芳,张圣平,等. 黄瓜棒孢叶斑病(*Corynespora cassiicola*) 的研究概况[J]. 中国蔬菜, 2012(4): 1-9.
- [3] 戚佩坤,白金铠,朱桂香. 吉林省栽培植物真菌病害志[M]. 北京: 科学出版社, 1960: 479-480.
- [4] 李宝聚,高苇,石延霞,等. 多主棒孢和棒孢叶斑病的研究进展[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 171-176.
- [5] DIXON L J, SCHLUB R L, PERNEZNYET K, et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*[J]. Phytopathology, 2009, 99: 1015-1027.
- [6] MUHAMAD Z R, HOSNEARA K, MAKOTO U, et al. Suppression by red light irradiation of *Corynespora* leaf spot of cucumber caused by *Corynes-*

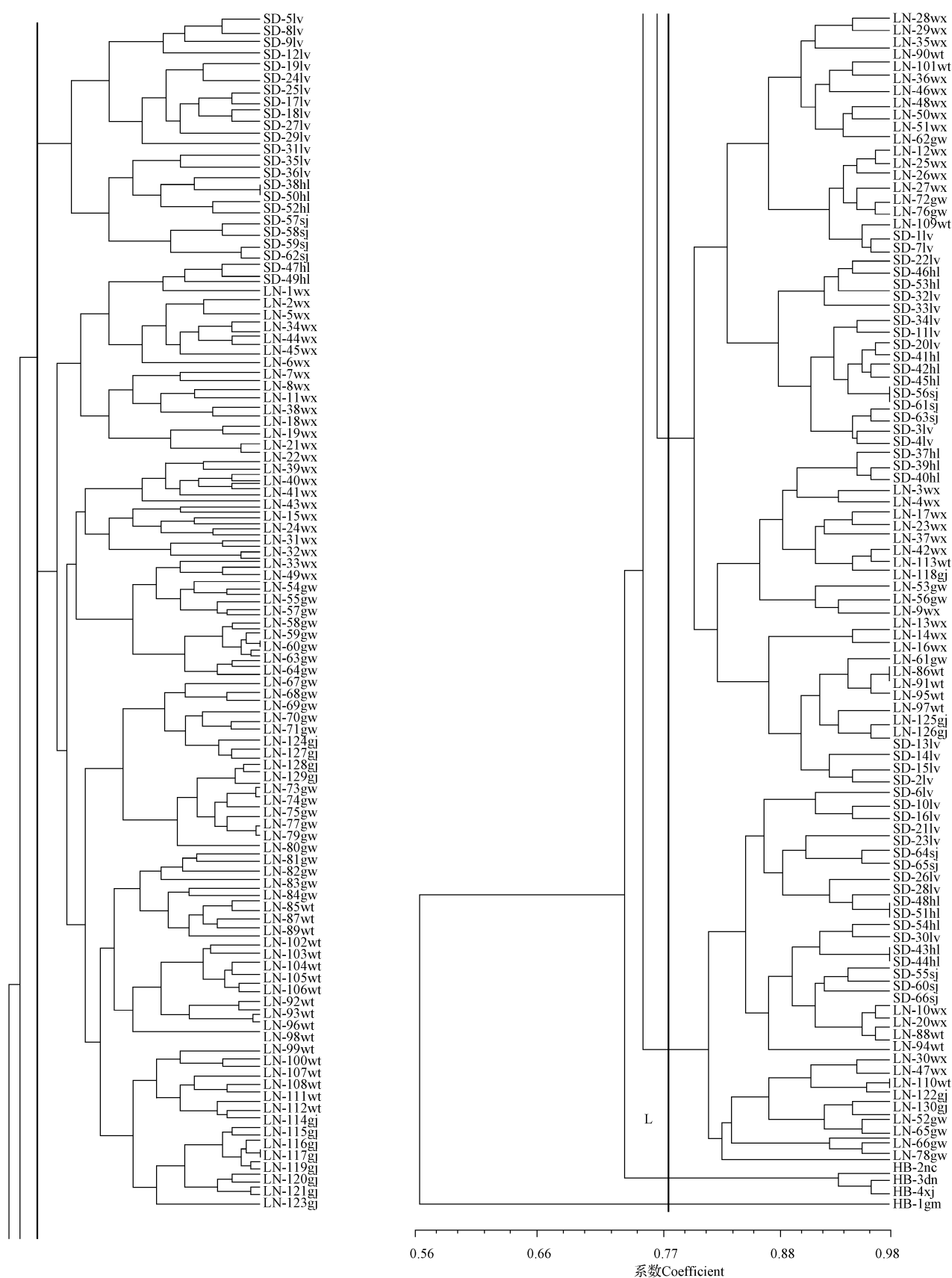


图 2 200 个黄瓜棒孢叶斑病菌株 AFLP 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of *Corynespora cassiicola* isolates based on AFLP

pora cassiicola [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158: 378-381.

[7] TERAMOTO A, MARTINS M C, FERREIRA L C, et al. Reaction of hybrids, inhibition *in vitro* and target spot control in cucumber [J]. Hort Bras, 2011(29): 342-348.

[8] FURUKAWA T, USHIYAMA K, KISHI K. *Corynespora* leaf spot of scarlet sage caused by *Corynespora cassiicola* [J]. J Gen Plant Pathology, 2008, 74: 117-119.

[9] 查仙芳, 朱猛蒙, 王国珍, 等. 宁夏首次发现黄瓜靶斑病 [J]. 宁夏农林科技, 2009(2): 40.

[10] 曾蓉, 陆金萍, 戴富明. 上海地区黄瓜靶斑病原鉴定及 ITS 的分析 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2011, 4(29): 13-16.

[11] 李长松, 张眉, 李林, 等. 山东省黄瓜棒孢叶斑病(褐斑病)病原菌鉴定和防治 [J]. 中国蔬菜, 2009(18): 29-33.

[12] MIYAMOTO T, ISHII H, SEKO T, et al. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan [J]. Plant Pathology, 2009, 58: 1144-1151.

[13] 刘智慧, 倪守煜, 刘会清. 张家口市保护地黄瓜靶斑病的发生与防治 [J]. 植物保护, 2012(11): 41-42.

[14] 柳晓玲, 魏周玉, 王安士, 等. 几种药剂防治日光温室黄瓜靶斑病田间效果 [J]. 甘肃农林科技, 2012, 5(41): 57-61.

[15] 张艳菊, 刘东, 马柏壮, 等. 黑龙江省黄瓜棒孢叶斑病发生情况调查及病原鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(9): 34-39.

[16] 纪军建, 张小风, 王文桥, 等. 黄瓜褐斑病化学药剂防治研究进展 [J]. 河北农业科学, 2010, 14(8): 28-31.

[17] WEN C L, MAO A J, DONG C J, et al. Fine genetic mapping of target leaf spot resistance gene 3 in cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Theor Apple Genet, 2015, 128(12): 2495-2506.

[18] SILVA W P K, KARUNANAYAKE E H, WIJESUNDERA R L, et al. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*: A possible relationship between host origin and virulence [J]. Mycological Research, 2003, 107: 567-571.

[19] 高苇, 李宝聚, 石延霞, 等. 河北青县黄瓜棒孢叶斑病病原菌种群分化的研究 [J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 9-15.

[20] SHIMOMOTOAB Y, SATO C T, HOJOD H, et al. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan [J]. Plant Pathology, 2011, 60(2): 253-260.

[21] 高苇, 李宝聚, 石延霞, 等. 多主棒孢菌在黄瓜、番茄和茄子寄主上致病力的分化 [J]. 园艺学报, 2011, 38(3): 465-470.

[22] 蔡邦平, 陈俊愉, 张启翔, 等. 应用 AFLP 分析梅根系与其根围土壤

丛枝菌根真菌 DNA 多态性差异 [J]. 菌物学报, 2015, 34(6): 1118-1127.

[23] FATIH M T, SENER K, PATHOGENICITY. Vegetative compatibility and amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-cucumerinum isolates from Turkish greenhouses [J]. Phytoparasitica, 2010, 38(3): 253-260.

[24] GORT G, EEUWIJK F A V. Review and simulation of homoplasy and collision in AFLP [J]. Euphytica, 2012, 183(3): 389-400.

[25] 方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.

[26] 陆宁海, 吴利民, 田雪亮, 等. 黄瓜褐斑病菌侵染条件及致病性研究 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(10): 2186-2187.

[27] 王惠哲, 李淑菊, 管炜. 黄瓜褐斑病抗源鉴定与抗性遗传分析 [J]. 中国瓜菜, 2010(1): 24-25.

[28] 伏颖, 吴元华, 穆凌霄, 等. 烟草靶斑病菌基因组 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化 [J]. 烟草科技, 2011(11): 71-75.

[29] 王建明, 李蕊倩, 畅引东, 等. 尖孢镰刀菌及芬芳镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 337-344.

[30] 张艳菊, 陈霞, 刘东, 等. 黄瓜枯萎病菌遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(3): 301-304.

[31] QI Y, XIE Y, ZHANG X, et al. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola* [J]. Molecular Biotechnology, 2009, 41: 145-151.

[32] NGHIA A N, JUGAH K, SUNDERASAN E, et al. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia [J]. Mycopathologia, 2008, 166(4): 189-201.

[33] MARINE D, BORIS F, STEPHANIE G, et al. Diversity of the *cassiicola* gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis* [J]. Fungal Biology, 2014, 118(1): 32-47.

[34] TAKEUCHI T, KUBO C, ISHII H. Sensitivity of Chiba Prefecture isolates of *Corynespora cassiicola*, the cause of *Corynespora* leaf spot on cucumber, to several fungicides [J]. Annual Report of the Kanto-Tosan Plant Protection Society, 2006, 53: 55-60.

[35] SILVA W P K, DEVERALL B J, LYON B R. Molecular physiological and pathological characterization of *Corynespora* leaf spot fungi from rubber plantations in Sri Lanka [J]. Plant Pathology, 1998, 47: 267-277.

[36] QI Y X, ZHANG X, PU J J, et al. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 130: 83-95.

Virulence Differentiation and AFLP Analysis of *Corynespora cassiicola*

ZHANG Yanju¹, LIU Qi¹, LIU Dong¹, QIN Zhiwei², ZHOU Xiuyan¹, LIU Dawei¹

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract: Taking six cucumber cultivars as materials and 200 *Corynespora cassiicola* strains isolated from Shandong, Liaoning and Heilongjiang Province as test strains, the virulence differentiation of *C. cassiicola* was tested by using the method of seeding artificial inoculation and AFLP. The results showed that D0330, D1306, D0649 and D2050 could be used as differential hosts setting for *C. cassiicola* and the 200 strains could be divided into 4 races by the differential hosts. Genetic diversity analysis for the 200 strains was carried out using AFLP markers which suggested that AFLPs were unrelated with the geographical origin but with the virulence.

Keywords: cucumber target leaf spot; *Corynespora cassiicola*; virulence differentiation; AFLP