

doi:10.11937/bfy.20184205

西瓜种质资源枯萎病抗性鉴定

王志强¹, 刘声锋¹, 尚建立², 郭松¹, 杨万邦¹, 田梅¹

(1. 宁夏农林科学院 种质资源研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘要:以西瓜为试材,采用2种鉴定方法研究了18份种质资源的枯萎病抗性情况。结果表明:供试种质中没有西瓜枯萎病免疫的品种。苗期人工接种法鉴定出高抗西瓜枯萎病材料9份,占参试材料50%;抗病材料1份,感病材料4份,高感病材料4份。其中高抗材料中K1和K4死苗率最低为2%,比高抗对照品种Sugarlee死苗率低。用分子鉴定的方法鉴定出抗病材料6份。苗期田间接种鉴定和分子鉴定结果吻合率达到66.67%。

关键词:西瓜;种质资源;枯萎病;抗性;鉴定

中图分类号:S 651 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2019)13-0073-04

西瓜枯萎病是半知菌亚门尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveurn*, FON)侵染所致,是世界范围内西瓜生产中导致产量和品质下降最严重的一种真菌土传病害。虽然从20世纪起我国就开展了西瓜枯萎病的抗病育种工作,同时也选育出一些抗枯萎病西瓜品种并在全国范围内推广应用,但目前仍未有对西瓜枯萎病免疫的西瓜种质资源。有文献报道的尖孢镰刀菌西瓜专化型生理小种有4个,0、1、2、3^[1-3]。生理小种1是致病力最强、存在范围最广的重要生理小种。虽然药剂也能防治西瓜枯萎病的发生,但收效甚微,嫁接栽培仍然是生产上广泛采用的防治枯萎病的有效途径,但由于嫁接栽培后,西瓜品质受到明显影响^[4-6]。因此,选育抗枯萎病的

西瓜品种是防治西瓜枯萎病最安全经济的途径。

抗枯萎病种质资源的鉴定和利用工作是选育抗西瓜枯萎病新品种的基础,一直受到种质资源利用、遗传育种、植物病理和生产部门的广泛重视,通过鉴定种质资源的抗性,不仅为抗病育种提供抗源或抗性亲本,同时为不同抗性品种的合理轮作提供理论依据。现以18份西瓜种质资源为研究对象,采用人工接种鉴定和分子标记鉴定相结合的方法,鉴定西瓜种质资源的枯萎病抗性水平,以期西瓜抗病育种中亲本的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018年4月15日进行芽播,5月11日进行病情最后调查。供试西瓜种质材料为宁夏农林科学院种质资源研究所保存的西瓜育种资源,共计18份。抗病对照为Sugarlee(国家中期库编号为X261),感病对照为Sugarbaby(国家中期库编号为X216),来源于中国农业科学院郑州果树研究所国家西瓜甜瓜中期库。

供试枯萎病菌生理小种1由中国农业科学院郑州果树研究所提供。使用前用麦粒扩繁培养25 d后与灭菌沙土按1:50比例混合备用。

1.2 试验方法

每个品种取种子150粒,室温浸种24 h,

第一作者简介:王志强(1979-),男,硕士,副研究员,现主要从事西瓜栽培和育种等研究工作。E-mail:wzq2003135@163.com.

责任作者:刘声锋(1964-),男,本科,研究员,现主要从事西瓜栽培和育种等研究工作。E-mail:shengfeng.liu@163.com.

基金项目:宁夏农林科学院农业科技自主创新专项资助项目(NKYJ-18-10);中国科学院“西部之光”人才培养计划资助项目;现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-26-41)。

收稿日期:2019-02-18

33 ℃催芽 36 h 播种。接种采用麦粒沙菌土法,将准备好的菌土用营养钵装好,温室内加温苗床播种,每营养钵 5 粒,3 次重复,设感病和抗病对照和保护行。

1.2.1 DNA 提取

每个品种取 50 粒种子,浸种、催芽、播种后,随机选择 10 株,取少量新鲜子叶,混合提取 1 份 DNA 样品。DNA 提取使用天根 Plant Genomic DNA Kit(离心柱型),提取到的 DNA 定量后将浓度统一稀释为 100 ng · μL⁻¹ 备用。

1.2.2 PCR 扩增

分子标记使用 dCAPS 标记 502124_fon^[8],上游引物序列为 5'-AACACCACCCACTTTG-GAGCTTCG-3',下游引物序列为:5'-TTT-TAGGGTGAAAATGGGTATTGTA-3'。

1.2.3 PCR 反应体系

扩增反应体系 25 μL,包括西瓜叶片总 DNA (100 ng · μL⁻¹) 1 μL,上游和下游引物 (10 μmol · mL⁻¹) 体积 1 μL,2 × Power Taq PCR MasterMix 12.5 μL,ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应程序:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 20 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃延伸 5 min;dCAPS 产物使用 Thermo Scientific 公司的 TaqI 进行酶切,酶切体系为 15 μL;含 10 × Buffer 1.5 μL,H₂O 8 μL,限制性内切酶 TaqI 0.5 μL,PCR 产物 5 μL。酶切反应条件为 65 ℃过夜,4 ℃保存。

酶切产物采用 8.0% 聚丙烯酰胺电泳,银染色后拍照分析。酶切后电泳出现 96 bp 单条带判定为感病品种,出现 116 bp 单条带判定为抗病

品种,同时出现 2 个条带判定为抗/感病杂合品种。

1.3 项目测定

病情调查:播种 10 d 后开始发病调查,记载出苗和发病情况,20 d 后待感病和抗病对照品种分别达到预期病级后,最后一次统计各品种的活苗数量,计算病情。病情计算方法为:

死苗率(%) = (出苗数 - 活苗数) / 出苗数 × 100。

抗病性分级^[7]:高抗(High resistance, HR):0 ≤ 死苗率 ≤ 20%;抗病(Resistance, R):20% < 死苗率 ≤ 40%;中抗(Moderately resistance, MR):40% < 死苗率 ≤ 60%;感病(Susceptibility, S):60% < 死苗率 ≤ 80%;高感(High susceptibility, HS):死苗率 > 80%。按照以上方法,2018 年 4 月 15 日进行芽播,5 月 11 日进行病情最后调查。

2 结果与分析

2.1 苗期枯萎病抗性鉴定

表 1 表明,供参试的 18 份材料没有枯萎病免疫品种。所有材料均有不同程度的死苗率,枯萎病抗性水平差异很大。通过苗期枯萎病抗性鉴定,鉴别出高抗枯萎病材料 9 份,占参试材料 50%,其中 2 份材料 K1 和 K4 枯萎病抗性比对照高抗品种 Sugarlee 高,死苗率较对照 Sugarlee 低,仅有 2%;抗病材料 1 份,死苗率为 37.68%;感病材料 4 份;高感病材料 4 份,其中 1 份材料 K16 死苗率达到 100%。鉴定结果与育种过程中实际情况吻合。

表 1 枯萎病抗性鉴定结果

Table 1 Results of resistance identification to fusarium wilt in watermelon

编号 Code	出苗数 Number of seedlings/株	出苗率 Emergence rates/%	死苗数 Number of dead seedlings/株	死苗率 Dead seeding rate/%	苗期接种鉴定 Inoculation identification	分子鉴定 Molecular identification
K1	150	100.00	3	2.00	高抗(HR)	抗
K2	147	98.00	96	65.31	感病(S)	感
K3	146	97.33	97	66.44	感病(S)	感
K4	150	100.00	3	2.00	高抗(HR)	抗
K5	150	100.00	6	4.00	高抗(HR)	抗
K6	145	96.67	129	89.00	高感(HS)	感
K7	145	96.67	116	80.00	感病(S)	感
K8	139	92.67	21	15.11	高抗(HR)	感
K9	149	99.33	126	84.56	高感(HS)	感
K10	141	94.00	138	97.87	高感(HS)	抗

表 1(续)
Table 1(Continued)

编号 Code	出苗数 Number of seedlings/株	出苗率 Emergence rates/%	死苗数 Number of dead seedlings/株	死苗率 Dead seeding rate/%	苗期接种鉴定 Inoculation identification	分子鉴定 Molecular identification
K11	148	98.67	6	4.05	高抗(HR)	感
K12	140	93.33	20	14.29	高抗(HR)	感
K13	145	96.67	6	4.14	高抗(HR)	抗
K14	138	92.00	101	73.19	感病(S)	抗
K15	150	100.00	25	16.67	高抗(HR)	抗
K16	122	81.33	122	100.00	高感(HS)	感
K17	138	92.00	52	37.68	抗病(R)	抗
K18	150	100.00	12	8.00	高抗(HR)	感
Sugarbaby(CK)	136	90.67	134	98.53	高感(HS)	感
Sugarlee(CK)	150	100.00	6	4.00	高抗(HR)	抗

2.2 分子标记鉴定

图 1 表明,从 18 份材料鉴定出抗病品种 8 份,感病品种 10 份。综合苗期接种抗性鉴定和分子鉴定,发现苗期接种抗性鉴定结果和分子鉴定结果不完全一致,有的结果完全相反。采用 2 种鉴定方法均表现出抗病的品种有 6 份,分别是 K1、K4、K5、K13、K15 和 K17,占鉴定材料总数比例为 33.33%。采用 2 种鉴定方法均表现出感病的品种有 6 份,占总数比例也为 33.33%,由此表明,分子鉴定结果与苗期接种田间鉴定的符合率为 66.67%。尚有 33.33%的品种分子鉴定与苗期田间抗性鉴定结果不相符。这可能与开发分子标记使用的抗性品种其抗性机理和试材种质遗传多样性有关。

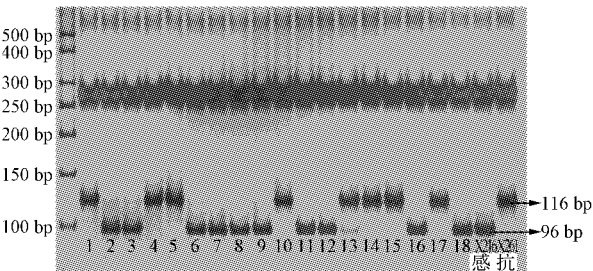


图 1 分子标记鉴定结果

Fig. 1 Results of molecular identification

3 结论与讨论

采用 2 种鉴定方法对 18 份栽培西瓜二倍体种质资源进行了枯萎病抗性鉴定。结果表明供试种质中没有对西瓜枯萎病免疫的品种。苗期田间

接种法鉴定出高抗西瓜枯萎病材料 9 份,占参试材料 50%;抗病材料 1 份,感病材料 4 份,高感病材料 4 份。其中高抗材料中 K1 和 K4 发病率最低为 2%,较高抗对照材料 Sugarlee 发病率还低 2%。用分子鉴定的方法鉴定出抗病材料 6 份。苗期田间接种鉴定和分子鉴定结果吻合率达到 66.67%。尚有 33.33%的品种分子鉴定与苗期田间抗性鉴定结果不相符。

已有研究表明尖孢镰刀菌的致病机理主要是阻塞西瓜植株导管和分泌镰刀菌酸。尖孢镰刀菌能够分泌果胶酶、纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶等降解植物细胞壁,细胞壁被破坏后,果胶会阻塞植株的导管,阻碍植物水分的吸收,致使植株萎蔫^[9]。尖孢镰刀菌生成的致病毒素镰刀菌酸,学名为 5-丁基-2-嘧啶甲酸,能够损伤植物根系细胞膜,破坏根系细胞的通透性,降低线粒体活性氧含量,阻止 ATP 的合成,导致植物根系水分吸收受阻、生长受到抑制^[10]。也有研究表明西瓜幼苗横剖结构中导管的分布和数目及细胞壁的加厚程度与西瓜枯萎病抗性密切相关^[11],证明西瓜枯萎病抗性强的品种在解剖结构上,主要表现为导管管腔小,细胞壁厚。因此,在西瓜枯萎病抗性鉴定上,除了利用苗期接种抗性鉴定和分子标记鉴定外,也可以根据解剖结构的不同简单快捷断定西瓜材料枯萎病的抗性。

西瓜枯萎病抗性分子标记已有多位学者开展研究并取得较好验证效果。张屹等^[12]以感病品种 BlackDiamond 为母本,以 CalhounGray 为父本,采用 BSA 法进行区间定位,依据 11 份栽培西瓜质量测序信息,获取位于定位区间内的候选

SNP位点,设计CAPS/dCAPS标记,开发了与Fon-1紧密连锁的7716_fon、7419_fon和4451_fon标记。经过张屹等^[13]选用20份西瓜品种进行验证,人工接种鉴定西瓜枯萎病抗性与使用7716_fon标记分子检测方法鉴定结果基本吻合。焦荻等^[8]根据以上研究基础,获得新的SNP位点,设计3个标记,分别为502124_fon、708995_fon和1271530_fon。李娜等^[14]也利用高抗材料‘ZXG01478’为母本与高感病材料‘14CB11’杂交,利用杂交后代开发了与Fon-1紧密连锁新的标记Indel_fon。

该研究的分子标记鉴定采用的是焦荻等^[8]开发的502124_fon,分子鉴定结果与苗期接种鉴定结果符合率为66.67%,没有达到完全吻合,低于张屹等^[12]利用164份西瓜育种材料的鉴定结果符合率98.7%,与李娜等^[14]利用130份西瓜材料的鉴定结果符合率70.8%相近。出现这一现象的原因,可能与试材种质资源的遗传多样性及枯萎病抗性机理和遗传机制不同有关。随着西瓜枯萎病抗性研究的逐步深入,连锁更为紧密且遗传距离更近的遗传标记将会得到开发和利用,将更好的用于西瓜抗枯萎病的分子辅助育种。

参考文献

[1] 张华峰,王迎儿,马海荣,等.嫁接砧木对小果型西瓜生长、产量和品质的影响[J].中国瓜菜,2013,26(6):38-40.

[2] 张兆辉,牛青,杨晓峰,等.不同砧木嫁接对西瓜生长、果实品质及丰产性的影响[J].中国农学通报,2015,31(7):72-75.

[3] 刘新华,曹春信,刘林,等.不同砧木对嫁接西瓜生长和果实品质的影响[J].浙江农业学报,2015,27(6):966-969.

[4] 应泉盛,何勇,王迎儿,等.不同砧木嫁接对西瓜果实品质的影响机理研究[J].浙江农业学报,2017,29(4):590-596.

[5] 赵利强.不同种类砧木嫁接对西瓜生长发育和果实品质的影响[D].武汉:华中农业大学,2014.

[6] 朱迎春,孙德玺,邓云,等.野生西瓜嫁接对大果型西瓜生长及品质的影响[J].中国瓜菜,2017,30(12):30-32.

[7] 马双武,刘君璞.西瓜种质资源描述规范和数据标准[M].北京:中国农业出版社,2005.

[8] 焦荻,任毅,官国义.四倍体西瓜抗枯萎病生理小种1分子标记辅助选择技术研究[J].园艺学报,2015,42(6):1112-1120.

[9] KING B C, WAXMAN K D, NENNI N V, et al. Aresenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012(4):4.

[10] BANI M, RISPAL 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.

[11] 张显,王鸣.西瓜枯萎病抗性机制的研究[J].西北农业大学学报,1989,17(4):29-35.

[12] 张屹,张海英,郭绍贵,等.西瓜枯萎病菌生理小种1抗性基因连锁标记开发[J].中国农业科学,2013,46(10):2058-2093.

[13] 张屹,刘建雄,梁志怀,等.不同西瓜品种枯萎病抗性鉴定方法比较[J].长江蔬菜,2015(12):50-52.

[14] 李娜,王吉明,尚建立,等.西瓜枯萎病生理小种1抗性QTL精细定位与InDel标记开发[J].中国农业科学,2017,50(1):131-141.

Identification of Resistance to *Fusarium* Wilt in Watermelon Germplasm

WANG Zhiqiang¹, LIU Shengfeng¹, SHANG Jianli², GUO Song¹, YANG Wanbang¹, TIAN Mei¹

(1. Genetic Germplasm Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450009)

Abstract: Watermelon was used as test material, *Fusarium* wilt resistance of 18 watermelon germplasms were identified by two methods. The results showed that immune varieties were not found in tested material. 9 cultivars were high resistance, accounted for 50%; 1 cultivar was resistance; 4 cultivars were susceptibility; 4 cultivars were high susceptibility. Dead seedlings rate of K1 and K4 were 2%, less than the sugarlee control cultivars. 6 cultivars showed resistance by using molecular identification. The coincident rate of artificial inoculation at seedling stage and molecular identification was 66.67%.

Keywords: watermelon; germplasm; *Fusarium* wilt; resistance; identification