

西瓜枯萎病菌生理小种分化研究^{*}

王浩波^{**} 王 鸣

(西北农业大学 陕西杨陵 712100)

摘要 用浸根接种法对来自全国八省(市)、自治区的西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium f. sp. niveum*, FON) 10个分离物进行了生理小种分化鉴定研究。根据这10个分离物在6个鉴别寄主上的反应,初步把它们划分为小种0, 1, 2, 3, 计4个生理小种。同时对这10个西瓜枯萎病菌分离物(FON isolates)的菌丝体进行了过氧化物酶同工酶(POD)聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。电泳图谱的分析结果支持了浸根接种鉴定的结论。

关键词 西瓜枯萎病菌; 生理小种分化; 同工酶电泳

西瓜枯萎病是由尖镰孢菌西瓜专化型所引起的土传病害,是西瓜生产中的主要限制因素。枯萎病菌西瓜专化型的不同分离物间存在明显的小种分化现象。Sleeth最先指出西瓜枯萎病菌生理小种分化的迹象^[1]; Crall首次真正明确了小种分化的存在^[2]; Cirulli把来自意大利的西瓜枯萎病菌分离物划分为小种0和小种1^[3]; 1973年又报道在以色列存在致病性更强的小种2^[4]; 以后在美国也发现小种2的存在^[5]; 此外还有报道在法国、西班牙、澳大利亚等国都存在有生理小种分化^[6]。

关于我国西瓜枯萎病菌生理小种分化情况,仅有张兴平、王鸣首次做过研究报道^[7,8]。他们的研究结果与国外的结果不完全一致,其研究将生理小种2的病菌分离物又区分为2个组(group),并指出对一些病菌分离物的确切归属尚待进一步研究。本研究采用苗期浸根接种法辅以最新的鉴定手段——菌丝体过氧化物酶同工酶电泳分析,以确切查明西瓜枯萎病菌在我国的生理小种分化情况。

1 材料与方法

试验于1991年在西北农业大学西甜瓜研究室的温室和干旱半干旱研究中心的生物大分子实验室内进行。

1.1 浸根接种鉴定 病原菌分离物依次编号为FON-1(北京通县),FON-2(河北邢台),FON-3(上海),FON-4(北京大兴),FON-5(湖南),FON-6(河南郑州),FON-7(新疆),FON-8(陕西富平),FON-9(山西),FON-10(陕西大荔)。鉴别品种为Sugar Baby(SB), Sugarlee(S1),Crimson Sweet(CS),Charleston Gray(ChG)和Calhoun Gray(CaG),5个品种均来源于美国。另加我国的1个感病品种兴城红(Xingcheng Red,代号Xing)。

温室内苗期鉴定采用浸根接种法。每分离物每品种接种10株,3次重复共30株,以无菌水浸根为对照。试验前10个病原菌分离物都在郑杂5号西瓜上进行复壮后经单孢分离。具体

* 国家自然科学基金资助项目

** 现在郑州市蔬菜研究所工作

收稿日期 1993-03-01

接种方法、接种浓度和时间以及接种后的管理和记载均同张兴平、王鸣^[7,9]。

1.2 菌丝体 POD 同工酶电泳分析 将西瓜枯萎病菌的 10 个分离物分别接入 PS 液体培养基中,于 27℃ 左右振荡培养 15 天,用真空泵抽气过滤,所取菌丝再用蒸馏水冲洗 4~5 次,用干净滤纸吸去多余水分。每一分离物称取菌丝体约 1.0 g (鲜重),加样品提取液^[10] 1 ml,置冰冻研钵上磨碎后再用超声波处理。用超速离心机离心 30 min (4℃, 10000r/min),取上清液备用。

POD 聚丙烯酰胺凝胶电泳按张自立、俞新大方法^[10]。凝胶板只制分离胶板,凝胶浓度为 7.5%, pH 8.9。电泳采用 LKB 多用电泳系统。每样槽点样 10 μ l,点样前预电泳 10 min,电泳开始前 10 min 保持 85 mA, 4℃,后调至 120 mA, 4℃,直至 2.5~3 h 电泳结束。染色采用联苯胺法^[10]。拍照和绘模式图并记录电泳结果。

2 结果与分析

2.1 苗期浸根接种鉴定结果

西瓜幼苗经人工接种后第 5 天开始发病,记录死株数,每 2 天统计 1 次,直至感病品种充分发病为止(接种后 17 天)。各品种接种后第 17 天的最终枯萎率见表 1。

表 1 不同西瓜品种对不同 FON 分离物的反应

Table 1 The reaction of the different watermelon cultivars to the different FON isolates*. (%)

寄主 Host	病原菌分离物 FON Isolate									
	FON-1	FON-2	FON-3	FON-4	FON-5	FON-6	FON-7	FON-8	FON-9	FON-10
SB	36.7	53.3	40.0	73.3	73.3	63.3	73.3	43.3	50.0	73.3
S1	26.7	23.3	23.3	26.7	20.0	23.3	33.3	23.3	33.3	33.3
CS	20.0	30.0	20.0	30.0	33.3	36.7	46.7	33.3	70.0	60.0
Xing	36.7	43.3	50.0	96.7	36.7	56.7	76.7	36.7	60.0	93.3
ChG	13.3	3.3	23.3	26.7	33.3	23.3	33.3	0.0	50.0	66.7
CaG	16.7	33.3	3.3	0.0	56.7	33.3	23.3	16.7	53.3	40.0

注:接种后第 17 天的枯萎率 Note: The wilt rate of the 17th day after inoculation

将表 1 的数字按全国西瓜抗枯萎病育种协作组统一规定的抗感分级(R: mortality <35%, S: mortality $\geq$ 35%)简化处理如表 2。由表 2 可明显看出各西瓜品种的鉴别反应及枯萎病菌分离物的小种分化情况。根据参试的 10 个西瓜枯萎病菌分离物在鉴别寄主上的反应,可将它们划为小种 0, 1, 2b*, 3, 计 4 个生理小种。小种 0 仅对 2 个感病品种有毒性, FON-6 和 FON-7 除对 2 个感病品种 SB 和 Xing 表现较强毒性外,还对中抗品种 CS 表现毒性,因此把它们划为小种 1。FON-5 除对 2 个感病品种致病外还对 CaG 有毒性,而 CaG 是国外研究者广泛应用的一个抗小种 0, 1 感小种 2b 的鉴别寄主,据此 FON-5 当属不同于 FON-6 和 FON-7 的小种 2b。

表 2 西瓜枯萎病菌生理小种分化及其在西瓜品种上鉴别反应

Table 2 The suggested races of FON isolates and their differential reactions on watermelon cultivars*

品 种 Cultivar	小种 0 Race 0		小种 1 Race 1	小种 2 Race 2	小种 3 Race 3
	FON-1 FON-3 FON-8	FON-2 FON-4 FON-8	FON-6 FON-7	FON-5P	FON-9 FON-10
SB	S		S	S	S
Xing	S		S	S	S
SL	R		R	R	R
CS	R		S	R	S
ChG	R		R	R	S
CaG	R		R	S	S

Note: R: mortality <35% S: mortality $\geq$ 35%.

* 由于此生理小种 2b 与国外报道的生理小种 2 有某些差异,因此定名为 2b,以示区别

FON—9, FON—10 毒性最强, 除 SL 对其有一定抗性外, 其它鉴别寄主均表现感病, 显然它们与小种 1, 小种 2b 都不同, 据此试验结果应划小种 3。

2.2 西瓜枯萎病菌分离物 POD 同工酶电泳结果

由于从菌丝内提取酶相当困难, FON—2 分离物没有提取成功。由图 1 可以看出, 西瓜枯萎病原菌的 POD 同工酶的基本谱型由 5 条酶带组成。分析病原菌各分离物的 POD 同工酶电泳图谱, 结合前述浸根接种鉴定结果, 可以明显看出, 小种 0 的特征酶带为 PX_1 , PX_2 和 PX_3 , 而 PX_4 在小种内则不同分离物表现不同。小种 1 的特征酶带为 PX_3 和 PX_5 。小种 2b 的特征酶带为 PX_2 , PX_3 。小种 3 的特征酶带为 PX_1 、 PX_3 。由此可见, 西瓜枯萎病菌 POD 同工酶可以很好地把不同生理小种区分开来。尽管同一小种的不同分离物之间在酶带深浅及一些弱带上也有差别, 但小种与小种间的差别更大更明显。试验证明, 完全可以用 POD 同工酶所获得的特征酶带区分不同的生理小种。同时也支持了我们采用苗期浸根接种的鉴定结果的正确性。各生理小种的 POD 同工酶的特征酶谱如图 2。

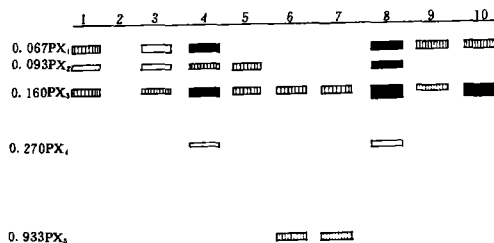


图 1 西瓜枯萎病菌各分离物的 POD 同工酶图谱
Fig1 The POD isoenzymic zymogram of FON isolates

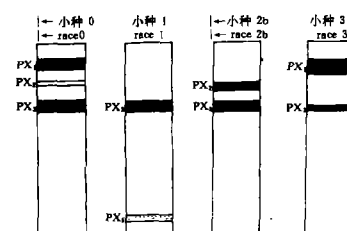


图 2 各生理小种 POD 同工酶特征酶谱
Fig2 The specific zymogram of POD isoenzyme of FON races

3 讨 论

试验结果表明, 我国不同地区的西瓜枯萎病病原菌确实存在着生理小种分化。我们划分的生理小种与国外 Netzer 和 Marty 等^[4,5,11]划分的生理小种不完全一致。其中的生理小种 2b 显然是不同的。国外划分的小种 2 除鉴别寄生 PI296341 对其有抗性外, 其余所有品种都表现高度感染^[11]。而我们划分的小种 2 却有 3 个品种对其具有抗性。另外我们还鉴定出了不同于国外已报道的任何小种的新生理小种——生理小种 3。就我国西瓜栽培历史之悠久, 面积之广大等方面来说, 我国西瓜枯萎病菌小种分化不同于美国、以色列等国是完全有可能的。我们试验采用的鉴别寄主也不完全相同于国外采用的鉴别寄生, 但这些鉴别寄主对区分我国西瓜枯萎病菌生理小种是有效的。因此在参考和选用国外所用的鉴别寄主的基础上, 通过试验探索建立我国自己的一套鉴别寄主是十分必要和有效的。

本试验结果与张兴平、王鸣^[7,8]的初步研究结果是相似的, 但又有某些差别, 主要是小种 0 和小种 1 上的不同。这可能主要是由于鉴别寄主的不同所致。1987 年 Martyn 的研究就表明, 现有的鉴别寄主还没有明确区分小种 0 和小种 1 的品种^[5]。由于缺乏区分小种 0 和小种 1 的适宜鉴别寄主, 必然会在不同的试验当中由于采用不同的寄主而把同样的分离物划入不同的小种中去。此外张兴平、王鸣的试验把生理小种 2 暂时划为不同的 2 个组。并指出其进一步的划分有待继续研究确定。根据本试验的结果, 认为可以把这 2 个组明确划为两个不同的生理小种, 即小种 2b 和小种 3。用病原菌菌丝体的 POD 同工酶电泳分析结果也进一步印证了

我们的划分是客观的、正确的。

同工酶是基因表达的产物。应用同工酶或可溶性蛋白电泳法来鉴别区分不同的生理小种,是在分子水平上对其生理分化的直接鉴定。此法国内外仅在玉米小斑病菌上有过成功报道^[12]。我们首次将 POD 同工酶的电泳分析用于西瓜枯萎病病原菌的生理分化研究中,证明不同的生理小种有其不同的特征酶带,应用这种方法完全可以有效快速地鉴别出不同的生理小种,是鉴别病原菌生理小种的一个崭新而重要的有效手段。

参 考 文 献

- 1 Sleeth B. Pages 3~23 in: W. V. Agric. Exp. Sta. Bull. 1934. 257
- 2 Crall J M. Phytopathology, 1973, (53): 873
- 3 Cirulli M. Actas Congr. Union Fitopathol. Mediter. Oeiras, 3rd. 1972. 491~500
- 4 Netzer D and Dishon I. 2nd Intl. Congr. Plant Pathol. Minneapolis, MN. (Abstr) 1973.
- 5 Martyn R D. Plant Disease, 1987, (71): 235~236
- 6 Armstrong G M and Armstrong J K. Phytopathology, 1978, (68): 19~28
- 7 张兴平, 王鸣. 果树科学, 1991, 8 (1): 31~34
- 8 Zhang Xingping and Wang Ming. In: Abstracts of XXIII International Hort. Congress, Florence, Italy ISHS. 1989.
- 9 王鸣. 长江蔬菜, 1991, (2): 41
- 10 张自立, 俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理. 高等教育出版社, 1990, 395~399
- 11 Martyn R D and Netzer D. Hort science, 1991, (26): 429~432
- 12 崔洋, 刘克明, 魏建昆. 华北农学报, 1991, 6 (1): 48~52

STUDIES ON THE PHYSIOLOGICAL RACE DIFFERENTIATION OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *NIVEUM*

Wang Haobo and Wang Ming

(Northwestern Agricultural University Yangling, Shaanxi 712100)

ABSTRACT

Ten isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) from eight provinces (cities or autonomous regions) in China are identified by root dip inoculation. Based on the reactions of the ten isolates on six differential host, four physiological races, Race 0, Race 1, Race 2 and Race 3 are suggested primarily. The peroxidase (POD) isoenzymic polyacrylamide gel electrophoresis of the mycelia of the ten isolates are analysed. The POD isoenzyme zymograms of the isolates support above result. The identification method of physiological race differentiation of FON isolates in China was discussed as well.

Key words *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; Physiological race differentiation; Isoenzyme eletrophoresis