研究论文

中国蔬菜
CHINA VEGETABLES

2006(5):13～15

不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌的影响

韩 雪 潘 凯 吴凤芝

摘 要 对6个抗枯萎病性能不同的黄瓜品种根系分泌物进行了收集和测定,采用培养基培养的方法研究其对黄瓜枯萎病病原菌孢子萌发、菌丝生长及病原菌生物量的影响。结果表明,抗病品种根系分泌物对以上3项指标有显著的抑制作用,感病品种则有显著的促进作用,中抗品种没有明显作用。抗病品种根系分泌物中糖类物质含量亦明显低于感病品种,中抗品种则介于两者之间。

关键词 黄瓜 枯萎病病原菌 抗病性 根系分泌物

黄瓜枯萎病是一种分布较广、为害较重、防治困难的典型的世界性根际土传病害,随着连作年限的增加,发病率明显增高,严重威胁和阻碍着黄瓜生产的发展。植物根系分泌物作为寄主自身抗病性的第一阶段(侵染前阶段)起着不可忽视的作用,不少学者已在其他病害研究中发现根系分泌物与植物抗性有密切关系[1]。吴凤芝等[2]研究表明,黄瓜感病品种的根系分泌物对枯萎病病原菌菌丝生长有促进作用,但是抗病品种的根系分泌物对病原菌有何影响未做研究。为此,本试验选用了具有不同抗病性的黄瓜品种,研究其根系分泌物对枯萎病病原菌孢子萌发、菌

韩 雪,女,硕士研究生,东北农业大学园艺学院,150030
潘凯,吴凤芝(通讯作者,电话:0451-55190278,E-mail:wufz@neau.edu.cn),通讯地址同第1作者
收稿日期:2005-11-15;修回日期:2006-01-19
基金项目:国家自然科学基金项目(30370819,30571264)

3 讨论

获得的转基因植株能否保持外源基因稳定性,即稳定地遗传给后代,直接关系到基因工程新品种培育。一般来说,农杆菌转化的外源基因整合位点较稳定,常在T-DNA 25 bp处与植物细胞整合,大多数是单位点整合,整合的外源基因保持其结构的完整性,变化很少;整合的外源基因常以单或低拷贝T-DNA为主,也有少数多拷贝T-DNA以首尾相连形式在单位点整合,因而具有更高的稳定性。本试验通过农杆菌介导法获得的转基因番茄果实即将收获,*LycB*基因能否表达并在后代中稳定遗传,有待进一步研究。

参考文献

1 龚学臣,季静,抗艳红,等.八氢番茄红素合成酶基因(*PSY*)对大豆的遗传转化.大豆科学,2005,24(1):30～33
2 高蓝,傅建熙,王建华.转基因番茄研究进展.西北农业大学学报,2000,6(3):90～95
3 王关林,方宏筠.植物基因工程.北京:科学技术出版社,2002.386～389

Transfer of Para-carotene Biosynthesis Enzyme Gene(LycB) into Tomato

Kang Yanhong[1], Ji Jing[2], Wu Dong[3], et al ([1]Department of Agriculture Sciences, Hebei North University, Zhangjiakou 075131; [2]College of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072; [3]Institute of Chemical Defence)

Abstract The tomato genetic transformation system was established by cocultivated cotyledons of four varieties of tomato with agrobacterium tumefaciens EHA 101 including the plasmid pEbisLycBHyg. Then *LycB* gene can be transformed into tomato via agrobacterium tumefaciens. Regeneration plants of tomato were obtained by callus inducing, bud inducing, striking root cultivation and hygromycin screening in selective condition. PCR and PCR-Southern analysis of these resistant plants proved that *LycB* has been transferred into genome of tomato. The factors affecting genetic transformation were also investigated.

Key words *LycB*, Tomato, Cotyledon, Transformation

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

丝生长及病原菌生物量的影响,为进一步研究黄瓜的自毒作用及其与连作障碍的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试黄瓜品种:中农 13号、哈农长密、津春 3号、中农 1101、津研 4号、秋棚 4号,种子均由哈尔滨市农业科学研究所提供。

病原菌:尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*)由东北农业大学试验实习基地温室内的黄瓜枯萎病病株中分离。

1.2 不同黄瓜品种的抗性鉴定

采用蘸根接种法进行黄瓜品种抗性鉴定[3,4],待第 1片真叶展开时接种,孢子浓度为 1×10^{7} · mL^{-1}。置于 25～28 ℃温室中正常管理,接种 15 d后调查发病率,计算病情指数。

植株病情分为 5级:0级—植株生长健壮,无任何症状;1级—子叶症状轻微,生长基本正常;2级—植株轻度萎蔫,或 1片子叶黄化;3级—植株中度萎蔫,子叶下垂或僵化,严重扭曲;4级—植株严重萎蔫,倒伏,枯死。

$$\text{病情指数 (DI)}=\frac{\sum(\text{各级病株数}\times\text{相对级数值})}{\text{调查总株数}\times\text{最高病级数}}\times100$$

群体抗性分级标准[3]:高抗(HR),0 <DI≤10;抗病(R),10 <DI≤30;中抗(MR),30 <DI≤50;感病(S),50 <DI≤70;高感(HS),70 <DI≤100。

1.3 根系分泌物的收集和处理

种子用无菌水冲洗数次,浸种、催芽后分别播种于盛有酸洗石砾的苗盘中,每品种 20粒,3次重复,生长过程中不断加入蒸馏水和无机营养液。第 2片真叶展开时,将黄瓜幼苗完整取出,先用蒸馏水淋洗根系 4次,然后再用去离子水淋洗 2次,最后将幼苗植入一定量的去离子水中培养 3 d,收集培养液,并用布氏漏斗过滤,再将滤液于真空旋转蒸发器中浓缩至 20 mL,于 - 20 ℃冰箱中冷藏备用。将根系分泌物编号,中农 13号(Ⅰ)、哈农长密(Ⅱ)、津春 3号(Ⅲ)、中农 1101(Ⅳ)、津研 4号(Ⅴ)、秋棚 4号(Ⅵ),以无菌水作对照。

1.4 根系分泌物对孢子萌发的影响

采用凹玻片法,将不同品种的根系分泌物分别定量加入凹槽中,再定量加入孢子悬浮液,混合后将凹玻片放入加盖瓷盘中。25 ℃恒温培养,12 h后镜检孢子萌发情况,6次重复,每次检查 10个视野,计算孢子萌发率。

1.5 根系分泌物对菌丝生长的影响

先制备 PDA培养基,倒培养基时加入 1/4的用细菌过滤器过滤的根系分泌物提取液,再将同龄等量的菌饼分别接种于不同品种的根系分泌物培养基上,3次重复。将平板倒置,25 ℃恒温培养,每隔 24 h用游标卡尺测量菌落直径即为菌丝长度,共测 5次,计算平均值。

1.6 根系分泌物对病原菌生物量的影响

将同龄等量的菌饼分别接种于不同品种的根系分泌物培养基上,6次重复。将平板倒置,25 ℃恒温培养,于第 3、5天用干重比色法[5]测定微生物的生物量。

1.7 根系分泌物中糖类成分及含量的测定

用蒽酮比色法[6]测定不同黄瓜品种根系分泌物中可溶性糖、葡萄糖及蔗糖含量。

2 结果与分析

2.1 不同黄瓜品种的抗性鉴定结果

表 1表明,中农 13号、哈农长密是抗性品种,津春 3号、中农 1101是中抗品种,秋棚 4号是感病品种,津研 4号是高感品种。该试验结果与种子标签上的标识一致。

表 1 不同黄瓜品种的抗性鉴定结果

品 种	发病率/%	病情指数	抗性
中农 13号	36.36	25.33	R
哈农长密	28.25	20.17	R
津春 3号	60.00	38.33	MR
中农 1101	57.50	44.17	MR
津研 4号	83.33	72.67	HS
秋棚 4号	80.75	68.25	S

注:R—抗病,MR—中抗,S—感病,HS—高感

2.2 不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌孢子萌发的影响

由表 2可见,处理Ⅰ、Ⅱ孢子萌发率显著低于其他处理;处理Ⅲ、Ⅳ孢子萌发率显著低于处理Ⅴ、Ⅵ,但显著高于对照,处理Ⅴ、Ⅵ孢子萌发率最高。说明抗病品种根系分泌物对枯萎病病原菌孢子萌发有一定的抑制作用,感病品种有促进作用,中抗品种亦略有促进作用。

2.3 不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌菌丝生长的影响

由表 2可见,枯萎病病原菌在黄瓜根系分泌物培养基上培养到第 3天时,处理Ⅰ、Ⅱ菌丝生长开始受到抑制;培养到第 4、5天时,处理Ⅰ、Ⅱ菌丝长度显著低于对照,处理Ⅲ、Ⅳ与对照无显著差异,而处理Ⅴ、Ⅵ显著高于对照。说明抗病品种根系分泌物对菌丝生长有一定的抑制作用,感病品种有一定的

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌孢子萌发、菌丝生长和病原菌生物量的影响

处理	孢子萌发率	菌落直径 /cm					病原菌生物量 /mg	
	%	第 1天	第 2天	第 3天	第 4天	第 5天	第 3天	第 5天
Ⅰ	26.59 a	1.35 ±0.05 a	2.61 ±0.12 b	3.86 ±0.14 b	5.12 ±0.14 cd	6.47 ±0.20 c	46.22 ±2.04 c	61.97 ±1.82 d
Ⅱ	24.77 a	1.32 ±0.05 a	2.60 ±0.09 b	3.85 ±0.16 b	5.10 ±0.20 d	6.44 ±0.12 c	43.91 ±1.60 c	59.75 ±1.89 d
Ⅲ	48.72 c	1.38 ±0.08 a	2.71 ±0.10 ab	4.21 ±0.12 a	5.40 ±0.21 bcd	6.85 ±0.16 b	51.63 ±2.12 b	84.26 ±2.13 c
Ⅳ	48.88 c	1.39 ±0.07 a	2.73 ±0.13 ab	4.22 ±0.13 a	5.42 ±0.22 bc	6.88 ±0.19 b	52.25 ±2.14 b	86.61 ±1.99 c
Ⅴ	53.37 d	1.41 ±0.08 a	2.77 ±0.07 ab	4.30 ±0.16 a	5.79 ±0.12 a	7.39 ±0.23 a	57.54 ±2.23 a	94.58 ±1.71 b
Ⅵ	60.83 d	1.42 ±0.08 a	2.79 ±0.09 a	4.31 ±0.17 a	5.84 ±0.21 a	7.40 ±0.15 a	60.21 ±2.15 a	98.62 ±2.00 a
对照 (CK)	37.90 b	1.41 ±0.08 a	2.74 ±0.10 ab	4.23 ±0.07 a	5.46 ±0.09 b	6.89 ±0.22 b	51.93 ±1.88 b	84.32 ±1.66 c

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著 (α = 0.05),下表同

促进作用。

2.4 不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌生物量的影响

枯萎病病原菌在黄瓜根系分泌物培养基上培养到第 3、5天时,处理 Ⅰ、Ⅱ的病原菌生物量显著低于对照,处理 Ⅲ、Ⅳ与对照无显著差异,处理 Ⅴ、Ⅵ显著高于对照 (表 2)。说明抗病品种根系分泌物对病原菌的生物量有抑制作用,感病品种有促进作用,而中抗品种无显著作用。

2.5 不同抗性黄瓜品种根系分泌物中糖类成分和含量的差异

抗病品种根系分泌物中的葡萄糖、蔗糖、可溶性糖含量均显著低于中抗品种及感病品种,中抗品种中的葡萄糖、蔗糖、可溶性总糖含量均显著低于感病品种 (表 3)。

表 3 不同抗性黄瓜品种根系分泌物中糖类成分和含量

处理	葡萄糖 /μg·株$^{-1}$	蔗糖 /μg·株$^{-1}$	可溶性糖 /μg·株$^{-1}$
Ⅰ	182.36 ±3.84 d	13.12 ±0.29 e	118.94 ±3.81 d
Ⅱ	68.25 ±3.55 e	2.91 ±0.31 e	99.95 ±3.27 e
Ⅲ	94.92 ±3.93 c	5.59 ±0.44 d	126.40 ±3.79 c
Ⅳ	100.30 ±3.42 c	7.78 ±0.43 c	132.89 ±3.88 c
Ⅴ	131.41 ±3.81 b	9.46 ±0.36 b	180.24 ±4.10 b
Ⅵ	142.68 ±3.24 a	10.34 ±0.38 a	196.59 ±3.56 a

3 结论与讨论

本试验用培养基培养的方法研究了不同抗性黄瓜品种根系分泌物对枯萎病病原菌的影响。结果表明,黄瓜抗病品种根系分泌物对病原菌孢子萌发、菌丝生长和病原菌生物量都有一定的抑制作用,而感病品种根系分泌物则有促进病原菌生长的作用,中抗品种仅对病原菌孢子萌发有促进作用,对菌丝生长和病原菌生物量无显著影响。说明黄瓜对枯萎病等土传病害的抗性与根系分泌物对病原菌的作用有密切关系,不同抗性品种根系分泌物对病原菌的化感作用不同。该研究结果与吴凤芝等[2]的研究结论一致。黄瓜根系分泌物中糖类物质含量与其对枯萎病的抗性呈负相关,该结果与袁虹霞等[7]的研究结果相似。

黄瓜根系分泌物中物质成分繁多,不仅有糖类,还有维生素、氨基酸、酚酸等成分,本试验只是做了初步研究,根系分泌物中哪种物质对病原菌起主要作用,还有待进一步研究。

参考文献

1 北京农业大学植保系植物生态病理教研室. 植物根际生态学与根病生物防治进展. 北京:中国人民大学出版社, 1991. 208～264
2 吴凤芝,孟立君,文景芝. 黄瓜根系分泌物对枯萎病菌丝生长的影响. 中国蔬菜, 2002(5): 26～27
3 方中达编. 植病研究法. 北京:中国农业出版社, 1998. 63～64
4 陆世钧,吉果建富,石内仁治,等. 黄瓜抗枯萎病苗期鉴定. 上海蔬菜, 1995(1): 30～32
5 杨革编. 微生物学实验教程. 北京:科学出版社, 2004. 50～53
6 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导. 北京:高等教育出版社, 2004. 127～129
7 袁虹霞,李洪连,王烨,等. 棉花不同抗性品种根系分泌物分析及其对黄萎病菌的影响. 植物病理学报, 2002(2): 127～131

Effect of Root Exudates from Cucumber Cultivars on Pathogen of Fusarium Wilt

Han Xue, Pan Kai, Wu Fengzhi (Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract The root exudates from 6 cucumber cultivars with different resistance to Fusarium wilt were collected, and their effects on pathogen spore germination, mycelium growth and biomass were tested with medium culture. The results showed that the root exudates from resistant cultivars had significant suppression to the three indexes mentioned above. The root exudates from susceptible ones had an opposite effect to the pathogen. The sugar content in the root exudates of susceptible cultivars was much lower than that of resistant ones.

Key words Pathogen, Cucumber Fusarium wilt, Resistance, Root exudates, Inhibition

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net