

河北省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定与 AFLP 分析

段会军, 张彩英, 李喜焕, 郭小敏, 王省芬, 马峙英

(河北农业大学/河北省作物种质资源重点实验室, 保定 071001)

摘要: 【目的】明确河北省西瓜枯萎病菌生理小种类型和遗传多样性, 为西瓜抗病育种和西瓜枯萎病的综合防治提供依据。【方法】本文对采自河北省 12 个西瓜种植地区的 46 个西瓜枯萎病菌菌株和 4 个已知生理小种的菌株进行了致病性测定和 AFLP 分析。【结果】根据菌株对 3 个鉴别寄主表现出的致病性强弱, 将河北省 46 个西瓜枯萎病菌菌株划分为 3 个不同的生理小种, 即 0 号、1 号和 2 号, 分别占供试菌株的 17.4%、65.2% 和 17.4%, 其中 1 号生理小种为优势小种, 分布在河北省所有西瓜种植区。21 对 AFLP 引物对供试菌株扩增出 1 157 条带, 其中多态性带 389 条, 占总带数的 33.6%。河北省西瓜枯萎病菌的遗传距离变化在 0.33~0.95 之间, 平均为 0.66, 群体遗传多样性比较丰富。基于 AFLP 标记聚类分析表明, 50 个菌株被划分为 3 个类群 (AFLP Groups, AGs)。AGI 包含 4 个菌株, 均为 2 号生理小种; AGII 包括 4 个菌株, 均为 0 号生理小种; AGIII 包括 42 个菌株, 以 1 号生理小种为主 (32 个), 占该类群的 76.2%。【结论】河北省西瓜枯萎病菌存在明显的致病性分化, 其 AFLP 类群划分与致病性鉴定划分的生理小种之间存在一定相关性, 但与菌株的地理来源无关。

关键词: 西瓜; 西瓜枯萎病菌; 生理小种; 致病性; AFLP

Identification of Physiological Races and AFLP Analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* from Hebei Province

DUAN Hui-jun, ZHANG Cai-ying, LI Xi-huan, GUO Xiao-min, WANG Xing-fen, MA Zhi-ying

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: 【Objective】To make clear the types of physiological races and genetics diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum* in Hebei Province, and provide the basis for disease-resistant breeding and integrated control of watermelon wilt. 【Method】Forty-six isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* from 12 watermelon growing areas of Hebei Province and 4 identified physiological races were tested to identify their pathogenicity and analyze genetic diversity by using AFLP technology. 【Result】Isolates(46 of them) were classified into three physiological races according to the reaction types on three identified hosts, namely race 0 (17.4%), race 1 (65.2%) and race 2 (17.4%), respectively. Race 1 was predominant, and distributed all the watermelon growing areas. Using 21 pairs of AFLP primer pairs, a total of 1 157 bands were amplified, of which, 389 (33.6%) were polymorphic. Genetic distance of 46 isolates based on AFLP markers ranged from 0.33 to 0.95, averaged 0.66. This showed that the genetic diversity was high among the tested isolates. When all of polymorphic bands were analyzed by clustering, 50 isolates were classified into 3 groups (AFLP groups, abbreviated AGs). AGI and AGII included 4 race2 and 4 race 0, respectively. In AGIII, among the 42 isolates, 32(accounted for 76.2%) belonged to physiological race 1. 【Conclusion】The above results showed that there existed obvious differentiation of the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in Hebei Province, and AFLP groups were generally related with the different races. However, there was no relationship between the AFLP groups and geographic regions of isolates.

Key words: Watermelon; *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; Physiological race; Pathogenicity; AFLP

收稿日期: 2005-11-20; 接受日期: 2007-02-15

基金项目: 河北省自然科学基金 (303188), 河北省教育厅科研基金 (2002141)

作者简介: 段会军 (1965-), 男, 河北清苑人, 教授, 博士, 研究方向为植物抗病育种。通讯作者马峙英 (1958-), 男, 河北新乐人, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物遗传育种与分子生物学。E-mail: mzhy@hebau.edu.cn

0 引言

【研究意义】西瓜枯萎病又称西瓜萎蔫病或蔓割病,是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)引起的一种世界性土传病害,也是目前西瓜生产上危害最严重的一种病害。河北省是西瓜种植大省之一,西瓜枯萎病的发生极为普遍,造成的损失非常严重。【前人研究进展】世界各国的专家和学者在有关西瓜枯萎病方面做了大量研究,在生理小种鉴定方面报道了很多结果^[1-8]。近年来,随着分子生物学技术的发展,RAPD、RAMS等分子标记技术已被广泛地应用于病原真菌的鉴定^[9]、分类^[10]及群体遗传多样性^[11]研究中。【本研究的切入点】AFLP标记技术^[12]是用来检测基因组限制性酶切片的一种DNA指纹技术,结合了RFLP的准确性和PCR的高效性。自AFLP技术诞生以来,除了应用于动物、植物研究以外,也成功地应用于植物病原真菌研究中^[13-16]。目前,AFLP技术以其重复性好、效率高的特点被广泛

应用于镰刀菌的遗传研究^[17,18],但在西瓜枯萎病菌研究中的应用还未见报道。【拟解决的关键问题】本文利用苗期接种方法对河北省西瓜枯萎病菌进行生理小种的鉴定,同时利用AFLP技术从分子水平上对河北省西瓜枯萎病菌的遗传分化进行分析,以明确河北省西瓜枯萎病菌生理小种类型和遗传多样性,为西瓜抗病育种和西瓜枯萎病的综合防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 2001~2002年,从河北省西瓜主产区采集西瓜枯萎病标样,经单孢分离、培养和专化型鉴定,选取具有西瓜枯萎病菌典型特征的46个单孢菌株作为供试菌株。以西北农林科技大学张显先生惠赠的2号生理小种FON50菌株,新疆农业大学王纯利先生惠赠的0号生理小种FON47菌株、1号生理小种FON49菌株及北京市农林科学院李兴红女士惠赠的1号生理小种FON48菌株作为对照菌株(表1)。菌株编号按照材料采集顺序及病原菌拉丁学名*Fusarium*

表1 供试西瓜枯萎病菌菌株的来源和生理小种鉴定结果

Table 1 Sources and identified physiological race results of the *Fusarium oxysporum* isolates of watermelon

名称 Name	地理来源 Source	生理小种 Race	名称 Name	地理来源 Source	生理小种 Race
FON 1	成安 Chengan	1	FON26	涿鹿 Zhuolu	2
FON 2	丰南 Fengnan	1	FON27	迁安 Qianan	1
FON 3	隆尧 Longyao	2	FON28	武安 Wuan	1
FON 4	滦南 Luannan	1	FON29	安新 Anxin	1
FON 5	定州 Dingzhou	1	FON30	文安 Wenan	1
FON 6	高邑 Gaoyi	1	FON31	献县 Xianxian	2
FON 7	抚宁 Funing	2	FON32	高碑店 Gaobeidian	0
FON 8	昌黎 Changli	1	FON33	邢台郊区 Xingtai	1
FON 9	丰南 Fengnan	1	FON34	沧县 Cangxian	1
FON10	大名 Daming	0	FON35	巨鹿 Julu	1
FON11	广平 Guangping	1	FON36	固安 Guan	0
FON12	平乡 Pingxiang	0	FON37	黄骅 Huanghua	1
FON13	霸州 Bazhou	1	FON38	晋州 Jinzhou	1
FON14	宣化 Xuanhua	1	FON39	河间 Hejian	1
FON15	深泽 Shenze	2	FON40	东光 Dongguang	2
FON16	承德 Chengde	1	FON41	新乐 Xinle	1
FON17	望都 Wangdu	2	FON42	青县 Qingxian	0
FON18	清苑 Qingyuan	1	FON43	定兴 Dingxing	1
FON19	高阳 Gaoyang	1	FON44	唐山郊区 Tangshan	0
FON20	丰润 Fengrun	1	FON45	威县 Weixian	1
FON21	衡水郊区 Hengshui	1	FON46	故成 Gucheng	1
FON22	平泉 Pingquan	1	FON47	新疆0号小种 Xinjiang	0
FON23	怀来 Huailai	2	FON48	北京1号小种 Beijing	1
FON24	灵寿 Lingshou	0	FON49	新疆1号小种 Xinjiang	1
FON25	安国 Anguo	0	FON50	美国2号小种 USA	2

oxysporum f. sp. *niveum* 首字母而命名。

1.2 生理小种鉴定

1.2.1 鉴别寄主 为了研究上述菌株的致病性, 采用国际上公认的 3 个西瓜品种即 Sugar Baby、Charleston Gray 和 Calhoun Gray 作为鉴别寄主, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2.2 致病性测定及数据处理 采用蘸根接种法测定各菌株的致病性。接种菌液的浓度为 1×10^5 个孢子/ml, 当鉴别寄主子叶平展时, 用无菌水冲净西瓜幼苗, 将根在孢子悬浮液中浸泡 5 min, 然后移入盛有灭菌蛭石的塑料营养钵中。每钵移栽 3 株, 每菌株接种 20 株, 3 次重复。待发病后, 每 2 d 统计一次发病率, 直至发病 25 d 时终止调查。根据苗期抗性分级标准^[19]对枯萎病抗性进行分级。

1.3 供试菌株 DNA 的提取

参考前人 CTAB 方法^[20,21]提取病菌 DNA。

1.4 AFLP 体系与程序

1.4.1 酶切 酶切体系总体积为 20 μ l [DNA (150 ng· μ l⁻¹) 3.0 μ l, NEB Buffer 2.0 μ l, BSA 0.2 μ l, *Eco*RI 3U, *Mse*I 3U, 加 ddH₂O 补足体积至 20 μ l], 37℃ 酶切 2 h。

1.4.2 连接 在酶切完成的每个 DNA 样品中加入 5 μ l 混合液 [1.0 μ l (50 pmol· μ l⁻¹) *Mse*I adapter 和 0.5 μ l (5 pmol· μ l⁻¹) *Eco*RI adapter (上海生工合成), 1.0 μ l (3U· μ l⁻¹) T₄ DNA ligase (Promega 公司产品), T₄ buffer 0.5 μ l, 10 mmol·L⁻¹ ATP 1.8 μ l, ddH₂O 0.2 μ l], 37℃ 连接 10 h。连接完成后, 将连接产物先于 65℃ 变性 10 min, 以使连接酶和限制性内切酶失去活性, 再用 1×TE (pH8.0) 将连接产物稀释 10 倍进行预扩增。

1.4.3 预扩增 取 5 μ l 连接稀释后的 DNA 样品, 加入 15 μ l 混合液 [10×PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.0 μ l, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 1.6 μ l, *Mse*I primer (M00, 50 ng· μ l⁻¹) 0.6 μ l, *Eco*RI primer (E00, 50 ng· μ l⁻¹) 0.6 μ l, *Taq* DNA polymerase (5U· μ l⁻¹) 0.1 μ l (大连宝生物产品), ddH₂O 10.1 μ l], 混合后, 向每管中加入 15 μ l 矿物油, 按如下程序进行 PCR 扩增: 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 10℃ 保温。预扩增结束后, 取 5 μ l 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测预扩增效果。另取 5 μ l 预扩增产物加入 45 μ l 1×TE (pH8.0) 稀释 10 倍进行选择扩增。其余产物于 -20℃ 下保存。

1.4.4 选择性扩增 取 5 μ l 稀释的预扩增产物, 加入 15 μ l 反应液 [10×PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.0 μ l; 2.5

mmol·L⁻¹ dNTP 1.8 μ l; *Taq* DNA polymerase (5U/ μ l) 0.15 μ l; *Mse*I primer (50 ng· μ l⁻¹) 0.8 μ l; *Eco*RI primer (50 ng· μ l⁻¹) 0.8 μ l; ddH₂O 9.45 μ l] 混合后, 向每管中加入 15 μ l 矿物油。按如下程序进行 PCR 扩增: 95℃ 2 min; 95℃ 50s, 65℃ (每循环降低 0.7℃) 40s, 72℃ 1 min, 13 个循环; 95℃ 50s, 56℃ 40s, 72℃ 1 min 31 个循环; 72℃ 10 min, 10℃ 保温。扩增后的样品与 10 μ l Loading buffer 混合, 95℃ 变性 10 min, 立即转移至冰浴冷却。

1.5 电泳 利用 6% 聚丙烯酰胺变性胶进行电泳, 80W 恒功率电泳 1.5 h。电泳结束后采用银染方法进行染色。

1.6 数据分析 对电泳结果采用有带记为“1”、无带记为“0”的方法记录谱带。利用 NTSYS 分析软件计算两两菌株间的 Dice 相似系数, 并利用 UPGMA 法进行聚类分析, 建立聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 生理小种鉴定结果

3 个鉴别寄主分别接种 50 个菌株后, 呈现出明显的抗感反应。西瓜品种 Sugar Baby 对所有菌株表现感病; Charleston Gray 对菌株 FON10、FON12、FON24、FON25、FON32、FON36、FON42、FON44、FON47 表现抗病, 对其它菌株表现感病; Chlhoun Gray 对菌株 FON3、FON7、FON15、FON17、FON23、FON26、FON31、FON40、FON50 表现感病, 对其他菌株表现为抗病。根据供试 46 个西瓜枯萎病菌菌株对 3 个鉴别寄主的致病性, 将其划分为 0 号、1 号和 2 号 3 个生理小种 (表 1), 分别包括 8, 30 和 8 个菌株, 占供试菌株的 17.4%、65.2% 和 17.4%。由此可见, 河北省西瓜枯萎病菌存在明显的生理小种分化。

2.2 AFLP 扩增结果

利用筛选的 21 对引物组合对 50 个供试西瓜枯萎病菌菌株进行 AFLP 分析, 均得到清晰的电泳谱带 (图 1)。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/M12 扩增出 68 条带, 最少的引物组合 E35/M47 扩增出 38 条带 (表 2)。结果表明, 21 对引物共扩增出 1 157 条带, 每对引物平均扩增条带数 55.1, 其中多态性带 389 条, 占扩增总带数的 33.6%, 每对引物平均扩增多态性带 18.5。

2.3 基于 AFLP 技术对西瓜枯萎病菌的遗传多样性分析

利用 NTSYS 分析软件, 对扩增出的 389 条多态

表 2 21 对引物对 50 个菌株的 AFLP 扩增结果

Table 2 Amplified result of 50 *Fusarium oxysporum* isolates by 21 primer pairs

代号 Code	引物组合 Primer combination	总带数 Total bands	多态性带 Polymorphic bands	多态性带百分率(%) Percent of polymorphic bands
1	E12/M11	66	16	24.24
2	E12/M12	68	35	51.47
3	E12/M13	64	24	37.5
4	E12/M16	55	21	38.18
5	E12/M15	66	19	28.79
6	E12/M18	58	29	50.00
7	E12/M17	53	11	20.76
8	E12/M23	54	26	48.15
9	E12/M22	59	16	27.12
10	E12/M21	53	13	24.53
11	E12/M59	41	21	51.22
12	E19/M11	56	14	25.00
13	E19/M13	49	9	18.37
14	E19/M16	58	16	27.59
15	E13/M01	56	18	32.14
16	E13/M02	51	8	15.69
17	E14/M11	58	11	18.97
18	E14/M12	62	28	45.16
19	E35/M47	38	9	26.68
20	E37/M47	49	30	61.22
21	E38/M61	43	15	34.88

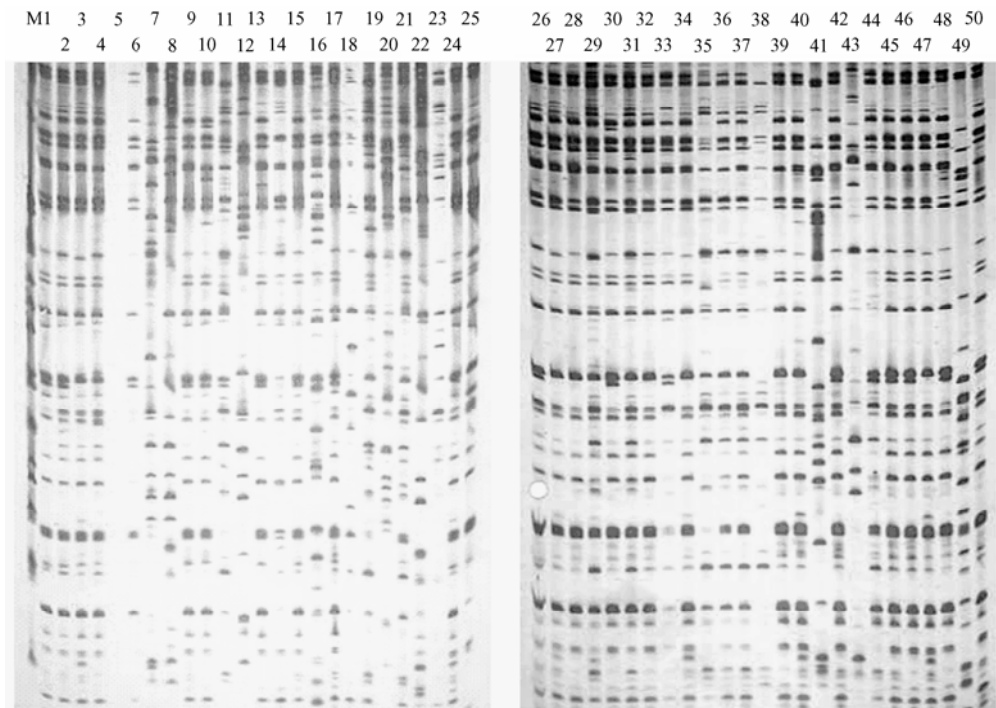


图 1 E12/M12 引物扩增结果

Fig. 1 Amplified result of isolates of *Fusarium oxysporum* by E12/M12

性带，计算 50 个菌株两两之间的 Dice 相似系数。结果河北省西瓜枯萎病菌相似系数变化在 0.33~0.95 之间，平均为 0.66，说明河北省西瓜枯萎病菌遗传分化较大，群体遗传多样性比较丰富。

2.4 AFLP 聚类分析

以 UPGMA 进行聚类分析，建立聚类树状图（图

2），在 0.52 的 Dice 相似系数水平上，供试的 50 个菌株被划分为 3 个类群（AFLP groups，简称 AGs），分别为 AGI、AGII 和 AGIII。

AGI 类群：包括 4 个菌株，分别由来自深泽的 FON15、望都的 FON17、献县的 FON31 和东光的 FON40 组成，其中 FON17 与 FON31 关系较近。

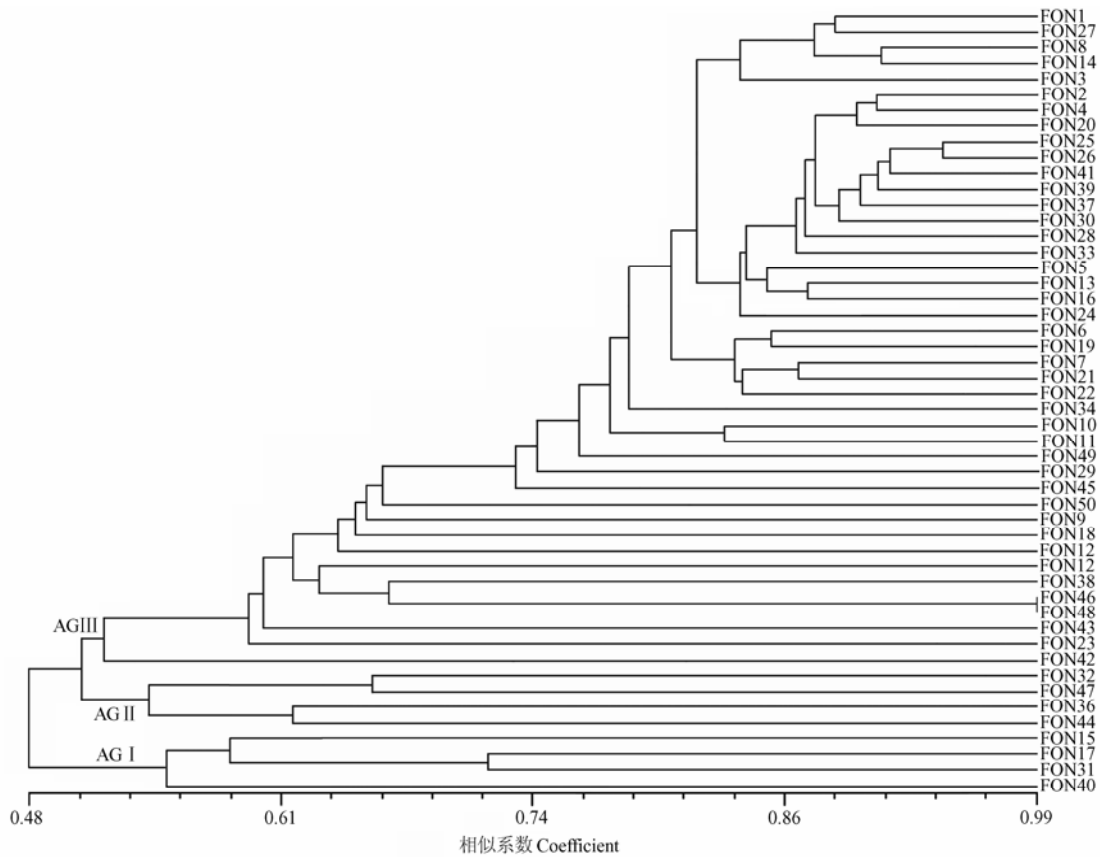


图 2 50 个西瓜枯萎病菌菌株的 AFLP 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 50 isolates based on AFLP

AGII 类群：由 FON32、FON36、FON44 和 FON47 4 个菌株组成，分别来自高碑店、固安、唐山郊区和新疆。FON32 与 FON47 关系较近，FON36 与 FON44 关系较近。

AGIII 类群：包括 42 个菌株，该类群又可进一步被划分为多个亚群。其中 FON42 独立成为一个亚群，它与其它菌株的遗传距离相对较远，其余菌株组成的亚群遗传距离较近。

2.5 AFLP 类群与生理小种的关系

从聚类结果可以发现，AGI 类群的 4 个菌株均为 2 号生理小种；AGII 类群的 4 个菌株均为 0 号生理小

种；AGIII 类群的 42 个菌株，以 1 号生理小种为主，有 32 个菌株（占 76.19%），此外，还包括 5 个 0 号生理小种和 5 个 2 号生理小种。西瓜枯萎病菌的 AFLP 类群与以鉴别寄主划分的生理小种之间存在一定的相关性。进一步分析还发现，来自同一地区的菌株被划分在不同的 AGs 中，如来自保定的 9 个菌株被划分在 AGI、AGII 和 AGIII 类群中。同样，在同一类群中包括不同地区的菌株，如 AGI 类群包括来自沧州、保定、石家庄等不同地区的菌株，所以基于 AFLP 多态性而划分的西瓜枯萎病菌菌株类群与菌株地理来源无关。

3 讨论

3.1 关于西瓜枯萎病菌生理小种分化及分布

本试验对西瓜枯萎病菌的致病性分化研究结果同顾卫红^[5]、周凤珍^[6]、王冬梅^[7]、马立新^[8]等的研究结果一致,与 Netzer^[3]、Martyn^[4]研究结果不同,特别是 2 号生理小种,Netzer 和 Martyn 划分的 2 号小种对 PI296341 西瓜品种没有或有轻度致病,对其余品种包括 Calhoun Gray 高度致病。本研究划分的 2 号小种对 Calhoun Gray 品种的致病性只达到中度水平。划分结果不同的原因可能是中国的生理小种类型与国外的小种类型存在差异或鉴别寄主的遗传背景不同。本试验鉴定的 3 个生理小种中,0 号生理小种占 17.4%,1 号生理小种占 65.2%,2 号生理小种占 17.4%。可见,河北省西瓜枯萎病菌以 1 号生理小种为主,几乎覆盖了河北省所有西瓜种植区,成为河北省西瓜枯萎病菌的优势小种;0 号生理小种和 2 号生理小种为劣势小种,0 号生理小种分布在廊坊、保定、石家庄、邢台、邯郸等冀中和冀南区域,2 号生理小种分布在邢台、石家庄、保定、秦皇岛、张家口等冀中和冀北区域。针对河北省西瓜枯萎病菌小种分化和分布的特点,应在生理小种 2 号存在的地区种植美国、西农 8 号等高抗品种,其它地区可种植中抗以上的品种。同时应该加紧抗枯萎病种质资源的筛选和创新,特别是加强野生资源的收集鉴定和利用工作。野生半野生西瓜对西瓜枯萎病菌具有很强的抗病性,为培育和利用对西瓜枯萎病菌不同生理小种具有复合抗性的西瓜新品种提供了物质基础。

3.2 西瓜枯萎病菌的遗传多样性

基于 AFLP 多态性数据计算得到的河北省西瓜枯萎病菌的遗传相似系数变化在 0.33~0.95 之间,平均为 0.66,从分子水平上证明西瓜枯萎病菌群体遗传多样性比较丰富。原因可能有两个方面,一是西瓜枯萎病主要靠种子带菌传播,外来的西瓜枯萎病菌传入河北省;另一原因是随着抗病品种的应用以及气候条件的变化,当地菌株发生突变,形成了适应新品种和当地自然条件的新菌株。

3.3 AFLP 类群与生理小种之间的关系

本研究中河北省西瓜枯萎病菌基于 AFLP 的类群划分与致病性测定划分的生理小种之间存在一定相关性,但也有一定的差异。究其原因可能是:①所选用鉴别寄主不能完全区分不同生理小种。关于西瓜枯萎病菌生理小种鉴别寄主的问题,国内外学者进行了大

量的研究,认为 Sugar Baby 是对任何小种都感病的寄主,Calhoun Gray 抗 0 号和 1 号生理小种而感 2 号生理小种,但是至今没有明确抗 0 号而感 1 号小种的适宜寄主。国外倾向于把 Charleston Gray 作为区分 0 号和 1 号小种的鉴别寄主,但是在不同试验中对同一菌株的反应不同,对中抗品种的毒力有差异。我国学者提出,应增加一些中抗品种,以提高区分 0 号小种和 1 号小种的准确性。②AFLP 分子标记揭示的是病原菌整个基因组的差异,而不仅仅是致病性的差异。

虽然本研究没有寻找到能够完全准确区分 3 个生理小种的 AFLP 标记,但是进一步考察单一引物对不同生理小种菌株的扩增结果,发现部分引物在很大程度上可以区分 3 个生理小种的菌株,这为发现西瓜枯萎病菌不同生理小种的特异性分子标记,建立其分子鉴定和检测技术,促进西瓜枯萎病菌的深入研究展示了良好的前景。

4 结论

4.1 用 3 个鉴别寄主将河北省西瓜枯萎病菌划分为 3 个生理小种,其中 1 号生理小种为优势小种,分布在河北省所有西瓜种植区;2 号生理小种主要分布在保定、石家庄、邢台等地区;0 号生理小种主要分布在邯郸、邢台、石家庄、保定等地区。

4.2 利用 AFLP 进行的遗传多样性分析结果表明,河北省西瓜枯萎病菌的遗传距离变化在 0.33~0.95 之间,平均为 0.66,群体遗传多样性比较丰富。

4.3 基于 AFLP 聚类分析结果,将河北省西瓜枯萎病菌划分为 3 个类群,AFLP 类群与致病性鉴定划分的生理小种之间存在一定相关性,与菌株的地理来源没有关系。

References

- [1] Crall J M. Physiologic specialization in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. (Abstr.) *Phytopathology*, 1963, 53: 873.
- [2] Cirulli M, Variation of pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and resistance in watermelon cultivars. *Actas Congr Union Fitopat Mediter Oeira*, 3rd p. 1972: 491-500.
- [3] Netzer D. Physiological races and soil population level of *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytoparasitica*, 1976, 4 (2): 131-136.
- [4] Martyn R D. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2: A highly aggressive new race to the United States. *Plant Disease*, 1987, (3): 233-236.
- [5] 顾卫红, 王燕华, 宋荣浩. 上海地区西瓜枯萎病病原菌生理小种

- 初探. 上海农业学报, 1994, 10(3): 63-67.
- Gu W H, Wang Y H, Song R H. Study on differentiation of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in Shanghai. *Acta Agriculturae Shanghai*, 1994, 10(3): 63-67. (in Chinese)
- [6] 周凤珍, 康国斌. 北京地区西瓜枯萎病菌生理小种分化研究. 植物保护, 1996, 22(4): 14-16.
- Zhou F Z, Kang G B. Physiological race of watermelon *Fusarium wilt* in Beijing. *Plant Protection*, 1996, 22(4): 14-16. (in Chinese)
- [7] 王冬梅, 王纯利, 曲丽红, 王惠玲. 新疆西瓜枯萎病菌生理小种初探. 新疆农业大学学报, 1998, 21(2): 115-118.
- Wang D M, Wang C L, Qu L H, Wang H L. A preliminary study on differentiation of physiological races of *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Xinjiang. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 1998, 21 (2): 115-118. (in Chinese)
- [8] 马立新, 高复兴, 刘爱新, 张玉勋. 山东西瓜枯萎病菌致病性分化及品种抗性的初步研究. 植物保护, 1993, 19 (4): 5-8.
- Ma L X, Gao F X, Liu A X, Zhang Y X. A preliminary study on the differentiation of *Fusarium oxysporum* *F. niveum* and resistance of cultivars in Shandong province. *Plant Protection*, 1993, 19(4): 5-8. (in Chinese)
- [9] Nicholson P, Kezanoor H Z, 苏海. 用 RAPD 分析和 DNA 指纹鉴别玉米小斑病菌 O、C、T 三个小种. 植物病理学报, 1993, 23(2): 114.
- Nicholson P, Kezanoor H Z, Su H. Using RAPD analysis and genetic fingerprinting to differentiate isolates of race O, C and T of *Cochliobolus heterostrophus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1993, 23(2): 114. (in Chinese)
- [10] Alalounakis D J, Fragkiadakis G A. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting. *Ecology and Population Biology*, 1999, 89(2): 161-168.
- [11] Tooley P W, O'Neill N R, Goley E D, Carras M M. Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* species by RAM and AFLP analyses. *Phytopathology*, 2000, 90: 1126-1130.
- [12] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application*. Publication, No. EP. 0534858.A1.1993
- [13] Bao J R, Fravel D R, O'Neill N R, Lazarovits G, Berkum P-van, Van-Berkum P. Genetic analysis of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plants. *Canadian Journal of Botany*, 2002, 80 (3): 271-279.
- [14] Majer D, Mithen R, Lewis B G, Vos P, Oliver R P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*, 1996, 100: 1107-1111.
- [15] Baayen R P, O'Donnell K, Bonants P J M, Cigelnik E, Kroon L P N M, Roebroek E J A, Waalwijk C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 2000, 90: 891-900.
- [16] Sivaramakrishnan S, Seetha K, Singh S D, Kannan S. Genetic variability of *Fusarium wilt* pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. *Mycopathologia*, 2002, 155(3): 171-178.
- [17] Abd-Elsalam K A, Khalil M S, Aly A A, Asran-Amal A. Genetic diversity among *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* isolates revealed by UP-PCR and AFLP markers. *Phytopathologia Mediterranea*, 2002, 41: 252-258.
- [18] Lakhdar B, Michael B, Zohra F, Zouaoui B, Imad E. Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *African Journal of Biotechnology*, 2004, 3(1): 25-31.
- [19] Martyn R D, Bruton B.D. An initial survey of the United States for races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Horticulture Science*, 1989, 24: 696-698.
- [20] Rogers S O, Rehner S, Bledsoe C, Mueller G J, Ammirati J F. Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridization. *Canadian Journal of Botany*, 1989, 67: 1235-1243.
- [21] Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (1): 471.

(责任编辑 王红艳)