

黄瓜抗枯萎病离体鉴定技术的研究

赵秀娟, 吴定华

(华南农业大学园艺系, 广东 广州 510642)

摘要: 通过比较 10 种具有不同枯萎病抗性的黄瓜材料对两类选择压力的反应, 确定离体抗性鉴定的适宜选择压力为 FOC(the culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 原液和 1 mg/L FA(fusaric acid)粗制品溶液, 适宜的鉴定时间为愈伤组织诱导期。黄瓜材料离体培养物对选择压力的反应与材料苗期抗病性比较一致。

关键词: 黄瓜; 枯萎病; 抗性离体鉴定; 组织培养; 选择压力

中图分类号: S642.4

文献标识码: A

黄瓜是我国主要蔬菜之一, 随着栽培面积的发展, 黄瓜枯萎病日趋严重, 已成为生产上的重要病害。由于生产上还缺乏有效的防治方法, 选育抗病品种成为防治该病的有效措施, 而抗病鉴定工作又是抗病育种的重要环节。如目前大多采用的温室或大田人工苗期接种鉴定方法, 该法占地多, 时间长, 工作量大, 受季节、气候限制, 实验结果易受环境条件的影响而不稳定。用组织培养方法进行离体鉴定, 能在一定程度上克服上述不足。因此, 作者对大田抗性和离体抗性之间的关系, 离体鉴定的适宜选择压力及区分抗、感材料的标准进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 供试黄瓜材料: 长春密刺、湘黄一号、春园四号、津研四号、绿宝选、绿宝选×长春密刺(F₁)、春园四号×津研四号(F₁)、湘黄一号×津研四号(F₁)、湘黄一号×绿宝选(F₁)、春园四号×绿宝选(F₁)。

(2) 供试病原菌: 从华南农业大学蔬菜场、广州市郊的岑村、长槎等地的黄瓜枯萎病株中分离, 由华南农业大学戚佩坤教授鉴定, 并经致病性测定, 供试病原菌为 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen, 属于生理小种四号。

1.2 方法

(1) 供试黄瓜材料苗期抗病性鉴定: 采用翁祖信等^[1]报道的胚根接种法。病情指数(D.I.)分级标准参考李树德等^[2]: 0~15 为高抗(HR), 15~30 为抗病(R), 30~55 为中抗(MR), 55~70 为感病(S), 70~100 为高感(HS)。

(2) 黄瓜愈伤组织的诱导、分化及植株再生: 将黄瓜无菌苗的真叶、子叶切成 0.5 cm×0.5 cm 大小

的叶碟、下胚轴切成 0.5 cm 的切段分别接在 Z₁(MS+BA_{1.5}+NAA_{0.7})、Z₂(MS+BA_{1.0}+NAA_{1.2})、Z₄(MS+BA_{1.6}+NAA_{0.4}) 脱分化培养基上; 诱导出的愈伤组织切成 0.5 cm×0.5 cm 大小转入 D₃(MS+BA_{1.5}) 培养基上进行再分化, 再生芽接入 MS 培养基诱导生根。培养条件是温度范围 21~27℃, 光照 8 h/d。

(3) 两类致病物质的制备及毒力测定: 按仇元等^[3]介绍的方法制备 FOC(the culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 原液; 按 Gaurman^[4]介绍的方法制备 FA(fusaric acid)粗制品溶液。参考仇元等^[3]、周凯南等^[5]对两类致病物质进行毒力测定。

(4) 两类选择压力对试材离体培养物的影响: 以 FOC 原液、1 mg/L FA 粗制品溶液为选择压力, 采用点滴法接种致病物质。

在愈伤组织诱导期: 真叶在 Z₁ 培养基上, FOC 以每块外植体滴加 0.2 mL, FA 粗制品以每块外植体滴加 0.1 mL; 子叶在 Z₂、下胚轴在 Z₄ 培养基上, FOC、FA 粗制品均以每块外植体滴加 0.3 mL; FOC 以 Richard 培养液和蒸馏水作对照, FA 粗制品溶液以蒸馏水作对照, 每瓶 5 块, 每处理 6~10 瓶, 重复 3 次; 2~4 d 观察记录外植体变黄白情况, 并计算病情指数。变黄白程度分为 4 级: 0 级——无病症(不变色); 1 级——边缘开始至 1/3 面积变色; 2 级——1/3 至 2/3 面积变色; 3 级——全部变色。抗病性分级标准: 0~20 为 R, 20~50 为 MR, 50~70 为 S, 70~100 为 HS。

在愈伤组织形成期: 愈伤组织切成 0.5 cm×0.5 cm 大小接在 D₃ 培养基上, 每块愈伤组织滴加 0.3 mL 致病物质; 对照、处理、重复同愈伤组织诱导期; 4~8 d 观察愈伤组织褐变情况, 并计算病情指数。褐

变程度分为 4 级, 同愈伤组织诱导期. 抗病性分级标准: 0~20 为 R, 20~40 为 MR, 40~60 为 S, 60~100 为 HS.

对生根的影响: 将 FOC 原液、1 mg/L FA 粗制品溶液分别以体积分数 50%、40% 加入 MS 培养基中, 高压灭菌. 接入黄瓜小苗和再生小苗. 以 MS 培养基作对照, 每处理 3 株, 重复 3 次, 2 周后观察发根情况.

2 结果与分析

2.1 供试黄瓜材料苗期抗病性鉴定

实验结果表明: 长春密刺为抗病型 (DI 为 25.82), 湘黄一号、春园四号、绿宝选 $\times$ 长春密刺、春园四号 $\times$ 津研四号、湘黄一号 $\times$ 津研四号为中抗型 (DI 为 42.70~54.78), 湘黄一号 $\times$ 绿宝选、春园四号 $\times$ 绿宝选、津研四号为感病型 (DI 为 56.16~68.85), 绿宝选为高感型 (DI 为 70.92). 5 个杂交一代材料采用高感 $\times$ 抗病、中抗 $\times$ 感病、中抗 $\times$ 高感组合. 其中中抗 $\times$ 高感的 2 个材料鉴定结果为中抗与感病之

间, 偏向感病, 与李树德等^[2]报道的结果有差异. 这可能与实验误差、双亲基因型及抗性遗传有关.

2.2 适宜的离体选择压力及接种方法

本实验曾用 0.25、0.5、0.8、1 mg/L FA 粗制品溶液对黄瓜试材不同阶段培养物进行鉴定, 发现 1 mg/L FA 粗制品溶液为最适宜的选择压力, 效果明显, 症状表现快速; 在以 φ (FOC) 分别为 30%、50%、80% 及 FOC 原液进行离体鉴定时, 以 FOC 原液的鉴定结果最明显, 且症状表现时间短, 是适宜的选择压力. 接种 FOC、FA 粗制品溶液采用点滴法和加到培养基中的方法, 结果以点滴法较好, 症状表现更快, 操作简便, 重复性好, 且更接近自然压力.

2.3 两类选择压力对试材离体培养物的影响

(1) 对愈伤组织诱导期的影响: 由表 1 可以看出, FOC、FA 粗制品溶液对真叶、子叶、下胚轴在愈伤组织诱导期的影响, 总体上都有明显的抗、感趋势, 抗性差异显著, 与苗期抗性较一致. 其中对真叶外植体影响最大, 依次是下胚轴、子叶. 对照 Richard 培养液影响很小, 病情指数为 0~1.8, 蒸馏水的为 0.

表 1 FOC、FA 粗制品溶液对 3 种外植体在愈伤组织诱导期的影响¹⁾
Tab. 1 The effect of FOC and FA crude extracts to 3 explants in callus indutive period

品种 ³⁾ varieties ¹⁾	真叶 true leaf				下胚轴 down-embryonic root				子叶 seminal leaf			
	FOC		FA		FOC		FA		FOC		FA	
	抗病性 disease DI		抗病性 disease DI		抗病性 disease DI		抗病性 disease DI		抗病性 disease DI		抗病性 disease DI	
	resistance		resistance		resistance		resistance		resistance		resistance	
L	18.20a	R	26.50a	MR ²⁾	12.75a	R	19.80a	R	11.80a	R	19.25a	R
N	40.0b	MR	43.54bc	MR	30.35b	MR	39.50b	MR	29.85b	MR	32.72b	MR
Q	43.67b	MR	48.42c	MR	32.46bc	MR	36.82b	MR	30.0b	MR	29.85b	MR
W $\times$ L	38.67b	MR	40.0b	MR	33.33bc	MR	35.67b	MR	30.85b	MR	33.33b	MR
N $\times$ J	40.75b	MR	46.85bc	MR	35.50bc	MR	45.67c	MR	33.33b	MR	40.0c	MR
Q $\times$ J	42.80b	MR	50.86c	S ²⁾	40.75c	MR	45.67c	MR	36.25b	MR	44.67c	MR
N $\times$ W	69.86c	S	76.60d	HS ²⁾	50.92d	S	66.67d	S	48.46c	MR ²⁾	49.86d	MR ²⁾
Q $\times$ W	72.14c	HS ²⁾	78.25 d	HS ²⁾	57.92e	S	68.75d	S	50.87c	S	59.33e	S
J	77.78d	HS ²⁾	86.84e	HS ²⁾	56.80e	S	69.60d	S	52.23c	S	68.75f	S
W	80.0d	HS	90.80e	HS	62.40e	S ²⁾	78.24e	HS	59.92d	S	73.24f	HS

1) 同列数字之间字母相同表示差异不显著 (SSR 测验, $\alpha=0.05$); 2) 表示与苗期抗性不一致; 其中 FOC、FA 的 DI 分别为 4、2 d 的病情指数; 3) 长春密刺、湘黄一号、春园四号、津研四号、绿宝选分别以 L、N、Q、J、W 表示

(2) 对愈伤组织形成期的影响: 由表 2 可见, FOC、FA 粗制品溶液对下胚轴、真叶、子叶在愈伤组织形成期的影响, 总体上都有比较明显的抗、感趋势, 抗性差异较显著, 与苗期抗性比较一致. 其中对下胚轴愈伤组织影响较大, 其次是真叶、子叶愈伤组织. 对照对愈伤组织形成期无影响.

(3) 对生根的影响: 由表 3 可见, 黄瓜小苗在含有 FOC、FA 粗制品溶液的培养基中, 其根长明显小于

对照, 根数与对照相差不大, 但有少数上位根, 且发根比对照迟 4~6 d; 株高也明显小于对照, 真叶数与对照相同, 但真叶只有对照的 1/4~2/4 大小. 说明 FOC、FA 粗制品溶液对生根有影响, 且对植株的生长也有抑制作用, 使植株矮化, 真叶变小. 从根长差值看, 抗、感材料间有一定的差异, 即抗性材料根长差值较小, 而感性材料较大, 抗、感趋势比较明显.

表 2 FOC、FA 粗制品溶液对 3 种外植体在愈伤组织形成期的影响¹⁾
Tab. 2 The effect of FOC and FA crude extracts to 3 explants in callus formative period¹⁾

品种 ³⁾ varieties	下胚轴 down-embryonic root				真叶 true leaf				子叶 seminal leaf			
	FOC		FA		FOC		FA		FOC		FA	
	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI	抗病性 disease resistance DI
L	24.48 a	MR ²⁾	18.86a	R	16.67a	R	17.33a	R	14.0a	R	15.0a	R
W×L	38.78b	MR	38.78b	MR	26.67b	MR	36.75cd	MR	23.32bc	MR	24.78b	MR
N	36.15b	MR	37.50b	MR	33.33c	MR	35.0c	MR	21.67b	MR	29.67bc	MR
Q	38.78b	MR	39.26b	MR	33.33c	MR	28.67b	MR	25.0bc	MR	27.36b	MR
N×J	39.45b	MR	39.26b	MR	36.75d	MR	39.26cd	MR	26.66c	MR	33.33c	MR
Q×J	38.92b	MR	41.0b	S ²⁾	37.42d	MR	38.78c	MR	28.33c	MR	34.34c	MR
N×W	51.34c	S	45.48c	S	39.45de	MR ²⁾	40.0d	MR ²⁾	38.34d	MR ²⁾	38.34c	MR ²⁾
Q×W	54.92c	S	48.72c	S	41.72e	S	45.6e	S	40.67d	S	43.8d	S
J	56.71c	S	49.0c	S	43.34e	S	47.38e	S	46.89e	S	44.47d	S
W	66.82d	HS	57.14d	S ²⁾	50.01f	S ²⁾	51.32e	S ²⁾	48.42e	S ²⁾	44.74d	S ²⁾

1) 同列数字之间字母相同表示差异不显著(SSR 测验, $\alpha=0.05$); 2) 表示与苗期抗性不一致, 其中 FOC、FA 的 DI 均为 8 d 的病
情指数; 3) 长春密刺、湘黄 一号、春园四号、津研四号、绿宝选分别以 L、N、Q、J、W 表示

表 3 FOC、FA 粗制品溶液对生根的影响¹⁾
Tab. 3 The effect of FOC and FA crude extracts to rooting¹⁾

品种 ²⁾ varieties ²⁾	根长 root length/ cm		株高 plant height/ cm		根长差值 difference of root length	
	FOC	FA	FOC	FA	FOC	FA
L	0.730(3.30)	0.78(3.48)	7.2(8.5)	6.2(8.1)	2.570a	2.70a
W×L	0.262(2.95)	0.42(3.13)	5.0(7.6)	6.0(8.4)	2.688a	2.71a
N	0.285(3.38)	0.45(3.83)	5.7(9.0)	5.0(7.5)	3.095b	3.38bc
Q	0.293(3.41)	0.49(3.82)	6.3(9.0)	5.5(7.0)	3.117b	3.33b
N×J	0.220(3.39)	0.72(4.16)	5.7(8.9)	7.5(9.8)	3.170b	3.44c
Q×J	0.710(3.99)	0.43(3.91)	6.0(8.5)	5.0(8.5)	3.280b	3.48cd
N×W	0.480(3.95)	0.65(4.17)	6.3(9.1)	5.5(10.1)	3.470c	3.52cd
Q×W	0.166(3.82)	0.61(4.10)	5.6(9.2)	5.4(7.8)	3.654d	3.49cd
J	0.165(3.86)	0.43(3.99)	5.2(8.7)	6.5(9.0)	3.695d	3.56d
W	0.132(3.94)	0.56(4.13)	5.0(10.5)	5.0(9.5)	3.808d	3.57d

1) 表中根长差值为对照根长-处理根长, 同列字母相同表示差异不显著(SSR 测验 $\alpha=0.05$), 括号内数字为对照; 2) 长春密
刺、湘黄号、春园四号、津研四号、绿宝选分别以 L、N、Q、J、W 表示

3 结论

3.1 试材在愈伤组织诱导期及愈伤组织形成期对 FOC、FA 粗制品溶液的抗性表现与苗期抗病性较一致。但在愈伤组织诱导期鉴定结果更明显, 且整个鉴定过程只需 8~15 d, 相对愈伤组织形成期的离体鉴定(整个过程需 30 d 左右)时间较短。因此, 在实际应用中, 可把愈伤组织诱导期作为最适宜的离体鉴定时间。

3.2 两类选择压力 FOC、FA 粗制品溶液进行离体鉴定, 以 FOC 原液、1 mg/L FA 粗制品溶液的鉴定结果较明显, 症状表现快速, 且与苗期抗性比较一致。

3.3 实验采用点滴法接种 FOC、FA 粗制品溶液快于把它们加到培养基中的方法, 在两类选择压力 FOC、FA 粗制品溶液作用下愈伤组织变褐及外植体变黄白, 这与 FA 作用机理相符。利用外植体、愈伤组织颜色的变化及变色面积的大小等作为区分抗、感材料的标准, 比较直观, 容易掌握。

3.4 本实验建立的黄瓜抗枯萎病离体鉴定技术、以及所得的鉴定结果与苗期抗病性较一致, 可用于抗源筛选、品种(系)抗性鉴定, 及在抗病突变体离体筛选等方面有较广阔应用前景。本研究的离体鉴定方法是传统人工接种鉴定技术的改进和补充, 可减轻田间鉴定的工作量, 缩短育种周期。

A Parasitism Model of *Trichogramma pretiosum* to
the Eggs of *Plutella xylostella* (L.)

HE Yu-rong¹, Lü Li-hua², PANG Xiong-fei¹

(1 Laboratory of Insect Ecology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

(2 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, the rotational composite design of quadratic regression was used to study the effects and interactions of four factors (the number of parasitoids released, the density of host eggs, the size of searching patch and the size of the crops) on parasitism of *Trichogramma pretiosum* to the eggs of the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* in the field. It was showed that the number of parasitoids released, the size of the crops and the size of searching patch influenced parasitism significantly in turn. The density of host eggs had only minor effect on parasitism. Interaction between the number of parasitoids released and the size of the crops was the most dominant factor among interaction of different factors affecting parasitism of *T. pretiosum*. *T. pretiosum* had a strong searching capacity to the egg of DBM, but there existed interference between individuals. Based on the data a quadratic regression parasitism model of *T. pretiosum* to the eggs of DBM was constructed.

Key words: *Trichogramma pretiosum*; *Plutella xylostella* (L.) (DBM); the rotational composite design of quadratic regression; parasitism; a quadratic regression parasitism model

【责任编辑 周志红】

(上接第 41 页)

参考文献:

[1] 翁祖信, 蒋兴祥, 肖小文. 黄瓜枯萎病抗病性鉴定方法研究——胚根接种法[J]. 中国蔬菜, 1985 (2): 30—33.

[2] 李树德, 方智远, 李明远, 等. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 420—421, 439—444.

[3] 仇元, 段应科. 棉花枯萎病菌菌系培养滤液致萎力测定[J]. 植物生理学报, 1963 6(2): 215—223.

[4] GAUMAN E. Fusaric acid as a wilt toxin[J]. Phytopathol, 1957, 47: 342—357.

[5] 周凯南, 张立修, 吕士恩, 等. 植物致病镰刀菌毒素滤液浸苗鉴定作物苗期抗病性[J]. 山东农业大学学报, 1989, (4): 45—49.

Studies on Techniques of *in vitro* Evaluation of Fusaric
Wilt-Resistance in Cucumber

ZHAO Xiu-juan, WU Ding-hua

(Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Influence of two kinds of selection agents on the tissue culture of ten genotypes with different resistance to fusarium wilt in cucumber were studied. The results showed that the suitable agents of *in vitro* evaluation were the culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (FOC) and 1 mg/L crude fusaric acid (FA) extracts, and the suitable period for identification was the induction of callus phase. The tissue culture resistance to agents showed consistence with the seedling resistance to the pathogen.

Key words: cucumber; fusaric wilt; resistance evaluation *in vitro*; tissue culture; selection agent

【责任编辑 柴焰】