

豇豆枯萎病抗病性鉴定技术研究

张衍荣^{1,2}, 李桂花¹, 何自福³, 王小菁², 曹 健¹

(1 广东省农业科学院 蔬菜研究所, 广东 广州 510640; 2 华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631;
3 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 为了寻找豇豆抗枯萎病的抗病材料及其准确有效的抗病性鉴定方法, 对胚根接种法和剪根接种法进行了分析比较, 对广东省常种的 28 个豇豆品种(系)进行了抗性鉴定。结果表明: (1) 苗期剪根接种法最适宜进行豇豆品种抗性鉴定, 该法发病快, 方法简单、有效; (2) 从 28 份豇豆品种(系)中鉴定出抗病材料 3 份, 中抗材料 12 份, 感病材料 8 份, 高感材料 5 份, 其中“丰产二号”为优质最抗枯萎病的品种。

关键词: 豇豆; 枯萎病; 抗性鉴定

中图分类号: S432.21

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0022-04

Studies on techniques for evaluating the resistance in yardlong bean to fusarium wilt

ZHANG Yan-rong^{1,2}, LI Gui-hua¹, HE Zi-fu³, WANG Xiao-jing², CAO Jian¹

(1 Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3 Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Two techniques, radicle-soaking and seedling root-cutting inoculation, were established according to the effects of disease rate in seedling stage for evaluation of resistance of yardlong bean (*Vigna sesquipedalis*) to fusarium wilt disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*). 28 lines were screened for resistance against this pathogen. The results showed that root-cutting inoculation method was suitable for evaluating the resistance of yardlong bean seedling. Among 28 lines, there were 3 resistant, 12 middle, 8 susceptible and 5 high susceptible. The line Fengchan No2 was the resistant with good pod quality.

Key words: yardlong bean; fusarium wilt; resistance evaluation

豇豆枯萎病是由尖孢镰刀菌嗜导管专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* 所引起的一种重要病害, 国内外许多豇豆产区都普遍发生, 特别是在高温高湿的条件下, 产量损失可达到 70% 左右。近年来华南地区豇豆枯萎病已经成为影响产量和品质的第一大病害, 常在结荚期引起植株大面积枯死。对于该病, 国外在品种筛选、抗性生理、抗性蛋白提取方面取得了较大进展, 筛选出了 Syumari、California Blackeye27 等抗性品种^[1,2], 对豇豆不同品种接种前

后总苯酚、PRO、POD、PAL 等的变化进行了分析^[3,4], 提取了相对分子质量为 6 800 与 1×10^4 的抗菌蛋白^[5]。国内在 20 世纪 80 年代曾对抗原进行过筛选^[6], 但许多品种已经被淘汰。有关抗病性鉴定技术的研究迄今尚少见报道。本研究开展了豇豆苗期抗病性鉴定技术探讨, 并对来自全国各地在华南地区种植较多的 28 个品种(系)进行了抗性鉴定, 以期为抗病育种提供理论依据。

收稿日期: 2004-09-24

作者简介: 张衍荣(1968—), 男, 副研究员, 华南师范大学在读博士研究生; E-mail: zhangyr68

@yeah.net

基金项目: 广东省农业重点攻关项目(20034155)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试品种(系) 益农 607、福建黄金桂、桂林王中王、美国冠军、宁豇三号、天宇 9 号、穗郊 101、扬豇 40、广西金绿肉、华珍甜豆、江西银月亮、春宝二号、神禾三尺绿、之豇 28、之豇 28—2、江西特长 80、华赣矮豇、华赣银豇、华赣 998、丰产二号、丰产三号、丰产六号、广丰 7 号、揭上二号、美国无架豆、高产四号、特青一号、谭岗油青。接种方法试验材料主要为丰产二号、丰产三号、丰产六号、之豇 28—2。

1.1.2 供试菌种 由广东省农业科学院植物保护研究所提供,从广东省内豇豆产区分离豇豆枯萎病菌共 25 份,经病原菌致病性试验,从中选择致病力具有代表性的单孢菌株(编号为 DOK-6)用于本试验。

1.2 方法

1.2.1 接种浓度试验 将新鲜菌块用马铃薯葡萄糖液体培养基在 28℃培养箱中振荡培养 7 d,菌液过滤,离心,弃上清液,将沉淀孢子稀释配成 1×10^6 、 6×10^6 、 3×10^7 、 1×10^8 mL⁻¹等 4 个浓度,在 27~33℃下用剪根接种法在幼苗长齐 2 片真叶时剪幼根接种,第 7 d 开始调查发病率,第 25 d 的调查结果作为鉴定依据,每次试验重复 3 次。

1.2.2 接种方法试验 胚根接种法^[7]:将种子用 55℃温水浸种 2 h,清水冲洗干净,置 28℃恒温箱催芽,待胚根长至 0.5~1.0 cm 时,浸入含孢子 6×10^6 mL⁻¹菌液中 15 min,沥除菌液播种。播种地为大棚地,播种前 1 周土地用 1:50(体积比)福尔马林进行消毒,重复 3 次,每重复 30 株。大棚内温度为 27~33℃,相对湿度为 60%~90%。

剪根接种法:将种子用 55℃温水浸种 2 h,清水

冲洗干净,育苗盆播种,当幼苗长齐 2 片真叶时拔出,剪去主根的 1/2,浸入含孢子 6×10^6 mL⁻¹菌液中 15 min,移栽大棚内,大棚地播种前 1 周用福尔马林进行消毒,重复 3 次,每重复 30 株。大棚内温度为 27~33℃,相对湿度为 60%~90%。

1.2.3 病圃鉴定试验 将种子用 55℃温水浸种 2 h,清水冲洗干净,枯萎病严重的连作地播种,重复 3 次,每重复 30 株,按大田常规管理。

1.2.4 病情调查与分级方法^[7,8] 调查病情分 3 次,第 1 次为感病材料之豇 28—2 发病率达 20%时,第 2 次在盛发期,第 3 次在病情基本稳定时,由病级计算病情指数(DI)。以第 3 次调查的病情指数为鉴定依据。病级分级标准:0 级—无症状;1 级—胚轴或子叶出现轻微病症,但生长正常;3 级—胚轴或子叶出现明显坏死斑,或 1 片子叶黄化,影响生长;5 级—2 片子叶黄化,或 1 片子叶枯死;7 级—2 片子叶生长僵化,植株部分萎焉或停止生长;9 级—整株萎焉、倒伏或枯死。

抗性评价标准:按病情指数(DI)分别划分为高抗(HR): $0<DI\leq 15$;抗(R): $15<DI\leq 35$;中等(M): $35<DI\leq 55$;感(S): $55<DI\leq 75$;高感(HS): $DI> 75$ 。

2 结果与分析

2.1 不同接种浓度比较

以丰产二号和之豇 28—2 为材料,从表 1 可看出,剪根接种法鉴定抗性以菌液孢子数不超过 3×10^7 mL⁻¹为好,否则高浓度会造成抗感品种之间无抗性差异。综合 4 个浓度处理所得的发病情况,以孢子数 6×10^6 mL⁻¹最好,既能在较短时间内(25 d)鉴定出抗感品种,又能充分反映出抗性差异,符合豇豆品种在田间的实际表现。

表 1 不同接种浓度的鉴定效果

Tab. 1 Effect of different inoculate concentration

孢子数 concentration /mL ⁻¹	病情指数 disease index(7 d)		病情指数 disease index(15 d)		病情指数 disease index(25 d)	
	丰产二号	之豇 28—2	丰产二号	之豇 28—2	丰产二号	之豇 28—2
	Fengchan No2	Zhijiang 28—2	Fengchan No2	Zhijiang 28—2	Fengchan No2	Zhijiang 28—2
1×10^6	0	0	7.2	11.5	19.3	54.2
6×10^6	0	0	14.3	36.7	31.2	84.0
3×10^7	3.2	5.3	30.6	58.9	48.4	89.7
1×10^8	3.8	4.0	34.7	68.1	64.5	97.6

2.2 不同接种方法比较

用胚根接种法和剪根接种法对 4 份材料进行的抗性鉴定结果(表 2)表明,2 种方法接种的品种间的抗性差异基本一致,但剪根接种法更能反映品种间

的差异,时间也较短。试验中剪根接种法从接种到发病稳定所需时间平均为 24.3 d,胚根接种法为 52.5 d,而应用胚根接种时有以下几方面不足:(1)种子催芽会因品种和个体差异造成不一致,为了保证胚根

伸长一致, 需较多的种子; (2)发芽率与成苗生长势的差异常造成结果不一致, 试验中发现丰产六号的陈年种子虽然催芽时胚根长度与丰产三号的新鲜种子一致, 但播种后部分幼苗生长势较差, 发病快, 出

现相反的试验结果. 剪根接种法是在幼苗长齐真叶后接种, 淘汰了部分不良幼苗, 试验结果比较接近病圃实际情况, 这从表 2 中也可反映出来.

表 2 不同接种方法的鉴定效果

Tab. 2 Effect of different inoculate methods

品系 line	胚根接种法 radical-soaking		剪根接种法 seedling root-cutting		病圃鉴定 natural grow	
	病情指数	抗级	病情指数	抗级	病情指数	抗级
	disease index	classification	disease index	classification	disease index	classification
丰产二号 Fengchan No2	12. 7	HR	22. 3	R	23. 5	R
丰产六号 Fengchan No6	30. 9	R	47. 2	M	37. 1	M
丰产三号 Fengchan No3	46. 5	M	66. 5	S	63. 1	S
之豇 28-2 Zhijiang28-2	63. 7	S	94. 7	HS	76. 3	HS

2.3 不同品种(系)间抗性比较

对 28 份豇豆材料进行剪根接种法鉴定结果(表 3)表明, 不同材料对枯萎病抗性存在显著差异, 其中

抗性材料 3 份, 中抗材料 12 份, 感病材料 8 份, 高感材料 5 份. 同时对 28 份材料也进行了病圃发病鉴定, 鉴定出抗性材料3份, 中抗材料9份, 感病材料

表 3 不同材料的抗性鉴定效果

Tab. 3 Evaluation of resistance in 28 lines

品系 line	剪根接种鉴定 seedling root-cutting			病圃鉴定 natural grow		
	病情指数	抗级	名次	病情指数	抗级	名次
	disease index	classification	rank	disease index	classification	rank
丰产二号 Fengchan No2	24. 6	R	1	27. 1	R	1
谭岗油青 Tangangyouqing	32. 5	R	2	32. 5	R	2
丰产六号 Fengchan No6	34. 8	R	3	33. 5	R	3
扬豇 40 Yangjiang 40	41. 2	M	4	36. 5	M	5
益农 607 Yinong 607	42. 8	M	5	35. 6	M	4
华赣 998 Huagan 998	46. 9	M	6	68. 0	S	19
神禾三尺绿 Shenhesanchili	47. 9	M	7	51. 3	M	10
桂林王中王 Guilinwangzhongwang	48. 6	M	8	83. 3	HS	27
华赣银豇 Huaganyinjiang	49. 1	M	9	53. 6	M	11
华珍甜豆 Huazhentiandou	49. 4	M	10	55. 0	M	12
宁豇三号 Ningjiang No3	50. 2	M	11	50. 3	M	9
福建黄金桂 Fujianhuangjingui	52. 1	M	12	47. 5	M	7
广丰 7 号 Guangfeng No7	52. 5	M	13	45. 1	M	6
春宝二号 Chunbao No2	53. 3	M	14	48. 1	M	8
江西特长 80 Jiangxitechang 80	54. 6	M	15	65. 4	S	18
天宇 9 号 Tianyu No9	60. 0	S	16	70. 7	S	21
美国无架豆 American wujiadou	60. 3	S	17	64. 8	S	17
广西金绿肉 Guangxijinlurou	62. 0	S	18	56. 4	S	13
丰产三号 Fengchan No3	62. 5	S	19	63. 1	S	16
穗郊 101 Suijiao 101	64. 6	S	20	86. 0	HS	28
高产四号 Gaochan No4	65. 3	S	21	60. 4	S	14
揭上二号 Jieshang No2	65. 6	S	22	62. 1	S	15
华赣矮豇 Huaganaijiang	71. 2	S	23	68. 4	S	20
特青一号 Teqing No1	76. 0	HS	24	73. 5	S	22
之豇 28 Zhijiang 28	80. 2	HS	25	78. 5	HS	25
之豇 28-2 Zhijiang 28-2	84. 5	HS	26	76. 9	HS	23
江西银月亮 Jiangxiyinyueliang	93. 9	HS	27	78. 0	HS	24
美国冠军 American guanjun	94. 8	HS	28	81. 1	HS	26

10 份, 高感材料 6 份。从剪根接种法和病圃发病鉴定结果比较, 其中 23 份材料抗性分级结果一致, 4 份材料相差 1 个级别(华赣 998、江西特长 80、穗郊 101、特青一号在剪根接种鉴定中分别为 M、M、S、HS, 在大田自然鉴定中则分别为 S、S、HS、S), 1 份材料(桂林王中王)相差 2 个级别(在剪根接种鉴定中为 M, 在大田自然鉴定中为 HS), 这一结果表明大多数材料苗期剪根接种鉴定与病圃自然鉴定是一致的, 少数材料的抗性结果不一致。除了材料的苗期与成株期抗性可能不同外, 病圃多病菌侵染也会造成一定的影响。

3 讨论

在抗病性鉴定效果上剪根接种法比胚根接种法更接近品种的实际情况, 能在 25 d 左右鉴定出品种之间的差异, 也不受种子差异的影响, 这对进行种质资源的鉴定提供了保障。发病程度除与接种浓度呈正相关趋势外, 接种后幼苗生长的温湿度也会影响发病的快慢, 同一个浓度在人为控制的生长条件下如人工气候箱内要比大棚内发生快而严重, 因为人工气候箱内所设定的是最有利于枯萎病发生的条件。因此, 在生产实践中, 为使品种抗病性差异充分表现, 又能在较短时间内得出结果并降低试验成本, 本研究认为接种菌液孢子数为 $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 最适合于生产中应用。

华南地区高温高湿的气候使得豇豆枯萎病的发生日益严重, 同时也为抗病性的筛选提供了条件, 本研究中鉴定出的抗病材料均来自于华南地区, 说明抗原的分布与该病的分布有密切的关系, 这与方木壬^[6]的结果是一致的。丰产二号、谭岗油青、丰产六号这 3 份材料均为油青类型品种, 对积温和光照有一定的要求, 只能在华南地区种植才会正常地开花结果, 如何正确地将这些材料的抗性优点进行转移, 这仍是一项需要进一步研究的课题。我国豇豆资源

非常丰富, 仅仅依靠大田病区的自然发病率来进行品种抗性鉴定不但时间长、数量有限, 而且也是不准确的。本研究所采用的苗期人工剪根接种法和抗性评价分级标准可以进行大量的育种材料的初步筛选或淘汰, 加快选择的进度, 及时地为生产和育种者提供抗病材料和品种(系)。

参考文献:

[1] FUJITA S, MURATA K, SHIMADA H, et al. A new adzuki bean variety “Syman” with soil-borne disease resistance and excellent processing quality[J]. Bulletin of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations, 2002 (82): 31—40.

[2] EHLERS J D, HALL A E, PATEL P N, et al. Registration of California Blackeye 27 cowpea[J]. Crop Science, 2000, 40: 3, 854—855.

[3] USHAMALINI C, RAJAPPAN K, GANGAHARAN K. Changes in biochemical constituents of cowpea due to seed-borne fungi[J]. Indian Phytopathology, 1998, 51: 3, 258—260.

[4] USHAMALINI C, RAJAPPAN K, MANICKAM K. Suppression of phenol and defense related enzymes in cowpea seed by seed-borne fungi[J]. Acta Phytopathologica et Entomologia Hungarica, 1999, 34: 1—2, 51—55.

[5] CARVALHO A O, MACHADO O L T, da CUNHA M. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in vigna unguiculata seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39: 2, 137—146.

[6] 方木壬, 黄健坤. 豇豆枯萎病抗原筛选研究[J]. 华南农业大学学报, 1984, 5(4): 57—61.

[7] 方秀娟, 韩旭, 顾兴芳, 等. 黄瓜品种(系)对枯萎病的苗期抗性鉴定与筛选[A]. 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[C]. 北京: 科学出版社, 1995. 417—419.

[8] 侯安福, 尹彦. 黄瓜枯萎病抗性遗传规律的研究[A]. 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[C]. 北京: 科学出版社, 1995. 439—444.

【责任编辑 柴 焰】