

辣椒疫病抗性离体叶鉴定法研究

李智军^{1,2}, 龙卫平¹, 郑锦荣¹, 雷建军²

(¹广东省农业科学院良种苗木中心, 广东广州 510640; ²华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

摘要: 通过比较疫病抗性不同的 2 个辣椒 *Capsicum annuum* L. 品种的离体叶接种浓度、发病温光条件及叶位对抗性鉴定结果的影响, 确定了辣椒疫病抗性离体叶鉴定技术, 即在辣椒初花期至始果期以自生长点倒数的第 4—6 展开叶作为测定叶, 用 0.1 mL 游动孢子 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种, 在 25 °C 光照 (3 000 lx) 12 h/d 的发病条件下, 可获得理想的抗性鉴定效果. 利用该鉴定法对 38 份辣椒材料进行了抗性鉴定, 并与喷雾法和灌根法的鉴定结果进行了比较, 结果表明离体叶法能有效地区分出辣椒品种对疫病的抗性. 根据抗级划分, 离体叶法的鉴定结果与两者的吻合率分别为 76.3% 和 68.4%.

关键词: 辣椒; 疫病; 离体叶; 抗性鉴定

中图分类号: S432-21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2007)02-0047-05

In vitro Leaf Technique for the Evaluation of Pepper

Resistance to *Phytophthora capsici*

LI Zhi-jun^{1,2}, LONG Wei-ping¹, ZHENG Jin-rong¹, LEI Jian-jun²

(¹ Seed and Seedling Centre, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

² College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: An in vitro leaf technique was developed to quickly detect pepper resistance to *Phytophthora capsici* by comparing the effects of inoculum concentrations, temperature/light condition for disease development and leaf position on coincidence of resistance of two pepper varieties with different degrees of resistance. The results showed that the optimal leaves for in vitro identification were the fourth to sixth expanding leaves counted from the growing point at early flowering stage to the beginning-fruiting stage, and the suitable inoculation volume was 0.1 mL at zoospores $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ and subsequently incubated at a condition of 25 °C with 12 h light (3 000 lx)/d. Using this technique, 38 pepper varieties/lines were screened and their resistant difference was compared with those assessed by spraying and root-irrigating methods. It was proved that in vitro leaf technique was effective to evaluate the resistance of pepper. Based on the classification of resistance, the result by in vitro leaf method had 76.2% and 68.4% similarity to those by spraying and root-irrigating method, respectively.

Key words: pepper; *Phytophthora* blight; in vitro leaf; resistance evaluation

由辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* Leonian 引起的辣椒疫病是影响我国辣椒 *Capsicum annuum* L. 生产的主要病害之一. 选育抗疫病的辣椒品种是防治其危害的一条有效途径, 而辣椒疫病抗性品种选育的关键在于抗源的鉴定和抗性转育材料的筛选. 目前, 辣椒疫病的抗性鉴定有多种方法, 其中主要采用

灌根法、喷雾法和伤茎法^[1-6]. 尽管这 3 种基本鉴定法均可有效鉴定出辣椒对疫病的抗性, 但由于接种后均会严重危害被测植株乃至死亡, 因此在利用有性杂交技术重组抗性基因后进行后代抗性材料筛选时以及需要对其他性状进行调查分析时难于利用. 离体接种鉴定可弥补这一不足, 至今已有应用离体

收稿日期: 2006-07-05

作者简介: 李智军 (1965—), 男, 副研究员, 博士; E-mail: lizhijun04@yahoo.com.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004A20103001); 广州市科技攻关重点项目 (2005Z2-E0071)

叶片接种进行辣椒疫病抗性鉴定的报道,但鉴定效果不很一致,且对离体叶鉴定技术仍然缺乏系统的研究^[7,9]。因此,笔者对辣椒疫病抗性的离体叶鉴定技术进行研究,通过比较接种浓度、发病温光条件和接种叶位对离体叶鉴定效果的影响,确定了有效的离体叶鉴定方法,并利用其对38份辣椒材料的疫病抗性进行了鉴定,同时与喷雾法和灌根法的鉴定结果进行了比较和评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 选用分离自广州地区的辣椒疫霉菌株‘ZLT0566’,将保存于石蜡油中的菌株转接至胡萝卜琼脂(CA)培养基上,在25℃黑暗条件下培养4d使其活化后备用。

1.1.2 供试品种 离体叶鉴定法试验采用来源于泰国的疫病抗性品种‘Bangchang’和高感疫病的甜椒品种‘茄门’,鉴定法比较研究使用38份辣椒材料,其中‘都椒10号’、‘红丰404’等31份品种(系)引自国内外不同地区,‘F24’、‘208-3-1-1-2’等7份自交系为自行筛选的辣椒育种材料。2组试验于2005年8—12月进行,用于离体叶鉴定法试验的辣椒材料定植于塑料大棚内,栽培管理按常规进行。

1.2 方法

1.2.1 离体叶接种方法 按郑小波^[10]的方法制备游动孢子悬浮液,并根据试验调节至所需浓度。在初花期至始果期期间,从田间采集叶片,用灭菌水冲洗干净后,以无菌纱布吸除表面水分,然后在瓷盘(50 cm×30 cm或30 cm×25 cm)内垫上2层湿润纱布,将叶片正面朝上排放于其上。准确吸取游动孢子接种液0.1 mL滴于叶片中央,用透明保鲜膜小心密封瓷盘保湿,之后置于各试验设定的温光条件下促使发病。接种后每隔12或24 h调查记录1次发病情况。病斑分级标准为0级:无病症;1级:病斑限于接种液边缘外0.5 cm以内;2级:病斑扩展到接种液边缘外0.5 cm至病斑占1/3叶面积;3级:1/3<病斑占叶面积≤1/2;4级:1/2<病斑占叶面积≤3/4;5级:病斑占叶面积3/4以上。以接种叶平均病级作为鉴定效果分析和抗性分级的指标。

1.2.2 接种浓度试验 设4个接种浓度,即游动孢子 2×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 和 5×10^4 mL⁻¹。离体叶使用自生长点倒数的第4展开叶,每品种接种10片叶片。接种后,置于25℃、光照(3 000 lx)12 h/d的培养室内让叶片自然发病。

1.2.3 发病温光条件试验 接种后发病温度及光照条件各设3个水平,分别为25、28和31℃及黑

暗、光照(3 000 lx)12和24 h/d,两者组合成9个处理,于人工气候箱(RXZ-260B,宁波江南)进行试验。离体叶使用倒数的第4和第6展开叶,接种游动孢子 2×10^4 mL⁻¹,每个处理接种10片叶。

1.2.4 接种叶位试验 用倒数的第2、4、6和8展开叶,接种游动孢子 2×10^4 mL⁻¹,接种后置于25℃、光照(3 000 lx)12 h/d的人工气候箱内发病。采用随机区组设计,3次重复,每重复接种10片叶。

1.2.5 离体叶法抗性鉴定及与喷雾法和灌根法的比较 用上述试验确定的可获最佳鉴定效果的离体叶鉴定技术对38份辣椒材料进行抗性鉴定。喷雾法鉴定参考Kim等^[11]的方法,接种苗龄6~7叶期(30 d),接种游动孢子 2×10^4 mL⁻¹,用喷雾器于17:00左右对植株叶片进行喷雾接种,每品种接种30~33株,接种量约1 mL/株,接种后覆盖塑料薄膜保湿14 h以上,于接种后第3 d调查植株的发病情况,病症分级标准为0级:无病症;1级:生长点或心叶发病,病斑呈水渍状;2级:植株上部1/3叶片发病,茎顶部变褐2 cm以内;3级:植株1/2叶片发病,茎上部1/3发病;4级:植株2/3叶片发病,茎部1/2以上发病;5级:枯死。灌根法接种鉴定参照易图永等^[8]的方法,接种苗龄、接种浓度及接种株数同喷雾法,接种量为3 mL/株。

2 结果与分析

2.1 接种浓度的比较

接种浓度对感病品种‘茄门’和抗病品种‘Bangchang’离体叶病级及其差值的影响见图1。接种游动孢子超过 1×10^4 mL⁻¹时,感、抗2品种的叶片发病程度均不随着接种孢子数的增加而加剧,接种游动孢子 2×10^3 mL⁻¹时,发病相对延迟,但对病斑的扩展速度无影响。从感病品种与抗病品种的病级差值看,用游动孢子 1×10^4 、 2×10^4 、 5×10^4 mL⁻¹接种时,病级差值在接种后第4 d基本上达到最大,可维持到接种后第5 d,3个浓度之间无明显差异。接种游动孢子 2×10^3 mL⁻¹时,感、抗品种的病级差值在接种后第5 d后才达到最大,与高浓度的无差异。上述结果显示,接种低浓度时亦可区分感、抗品种的抗性,但由于其潜育期相对延长,而且维持最大病级差值的时间较短,抗性鉴定时较难把握。在合适的接种浓度范围内,考虑到制备游动孢子悬浮液时浓度会出现较大的偏差,因此认为以中间浓度的游动孢子 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ mL⁻¹为好。原因是在不同批次的试验或不同时期的抗性鉴定过程中接种浓度即使产生差异也不致影响鉴定结果及其可比性,且相对可节省接种液及减轻工作量。

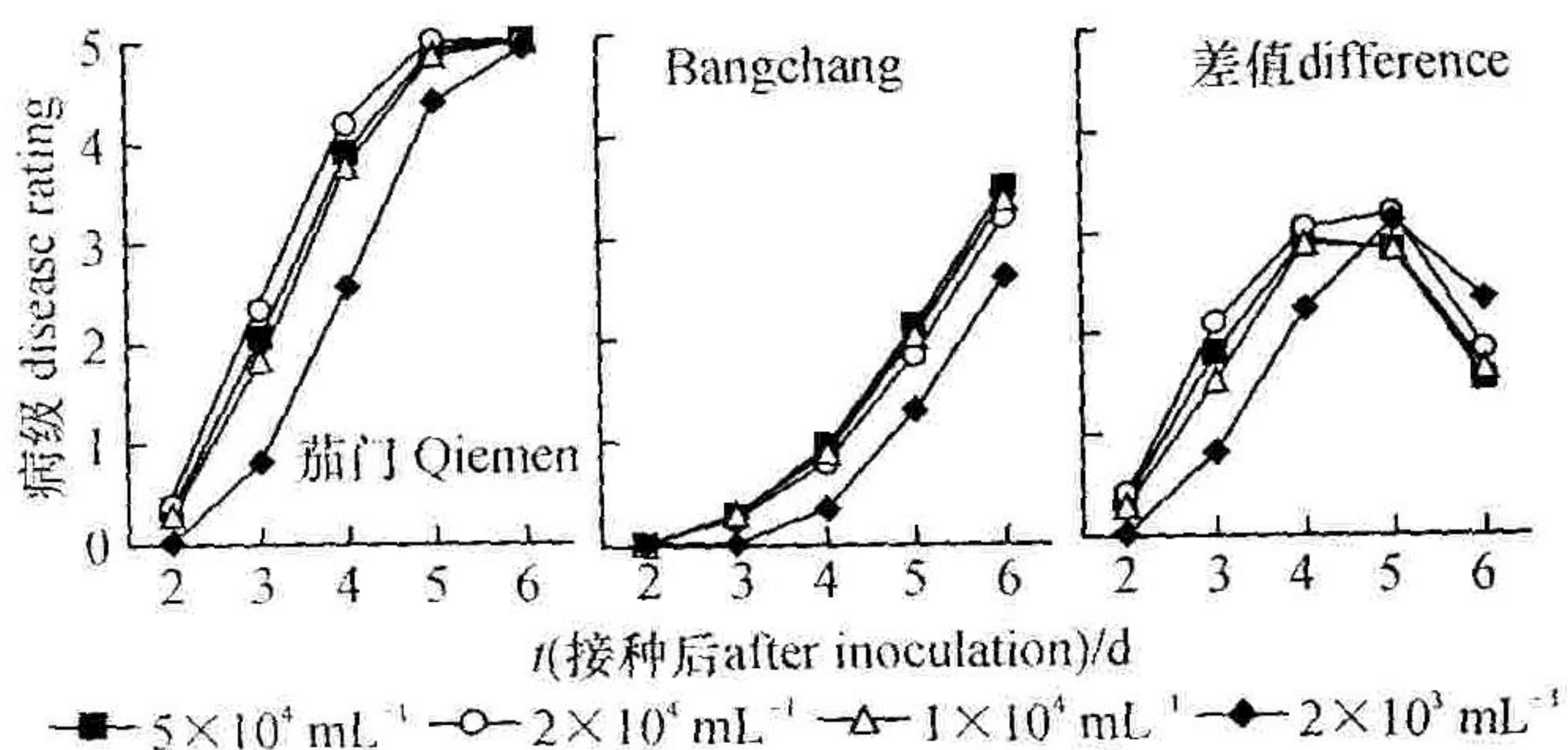


图1 接种浓度对疫病抗性不同的2个辣椒品种离体叶病级及其差值的影响

Fig. 1 Effects of different inoculum concentrations on the disease rating of detached leaves of two varieties with different degrees of resistance to *Phytophthora capsici* and their difference

2.2 发病温光条件

接种后温度与光照对感、抗2品种叶片发病的影响见表1. 第4、6展开叶在接种后4 d的发病程度受温光条件的影响表现相同趋势,在黑暗条件下感、抗2品种的发病在25~31℃范围内基本上不受温度的影响,但是在光照条件下其发病程度均比黑暗条件下的要减轻,这种减轻作用在25和28℃下光照越长越加明显,而且抗病品种‘Bangchang’的减轻程度远大于感病的甜椒‘茄门’. 从感、抗品种间的病级差值不难看出,在黑暗下离体叶接种难于区分感、抗品种的抗性差异,但是在光照条件下病级差值显著增大,差值最大的是25℃、光照12 h/d的温光条件. 由此,认为这一条件为离体叶鉴定抗性时的理想发病温光条件.

2.3 接种叶位的比较

利用上述试验确定的适合接种浓度和发病温光条件对不同叶位的抗性进行了测定,结果如图2所示. 感、抗2品种接种后第4 d的叶片发病病级均随着叶龄增加显著降低,表明叶片的抗性随发育而增强,尤其是抗病品种‘Bangchang’,这种倾向更加明显. 从感、抗品种间的发病病指差值看,叶龄较小的第2展开叶的差值为0,差异最大的是第6展开叶,其次是第4和8展开叶,但第4、6、8展开叶三者之间的差异不大,由此可见用离体叶鉴定辣椒疫病抗性时应采用叶龄相对较大的展开叶,然而由于第8展开叶在鉴定后期容易出现黄化现象,对病级的判定有较大的影响,因此认为用离体叶鉴定抗性时,宜选用第4至第6展开叶.

2.4 抗性鉴定及鉴定法比较

根据2.1~2.3的试验结果,用第6展开叶作为鉴定叶,以游动孢子 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种液接种,在

表1 发病温光条件对感抗辣椒品种离体叶病级及差值的影响

Tab. 1 Effects of temperature and light conditions on the disease rating of detached leaves of two varieties with different degrees of resistance to *Phytophthora capsici* and their difference

$\theta/^\circ\text{C}$	t (光照 light)/h	品种 variety	病级 disease rating (4 d)	
			第4展开叶	第6展开叶
			the 4th expending leaf	the 6th expending leaf
31	0	茄门	5.0	5.0
		Bangchang	4.8	4.2
		差值	0.2	0.8
	12	茄门	4.7	4.7
		Bangchang	3.9	2.4
		差值	0.8	2.3
	24	茄门	4.8	4.1
		Bangchang	4.2	2.5
		差值	0.6	1.6
28	0	茄门	5.0	5.0
		Bangchang	4.7	4.3
		差值	0.3	0.7
	12	茄门	4.7	4.6
		Bangchang	1.6	1.4
		差值	3.1	3.2
	24	茄门	4.4	4.2
		Bangchang	1.1	1.3
		差值	3.3	2.9
25	0	茄门	5.0	4.8
		Bangchang	4.8	4.4
		差值	0.2	0.4
	12	茄门	4.4	4.3
		Bangchang	0.7	0.5
		差值	3.7	3.8
	24	茄门	4.1	3.7
		Bangchang	0.6	0.5
		差值	3.5	3.2

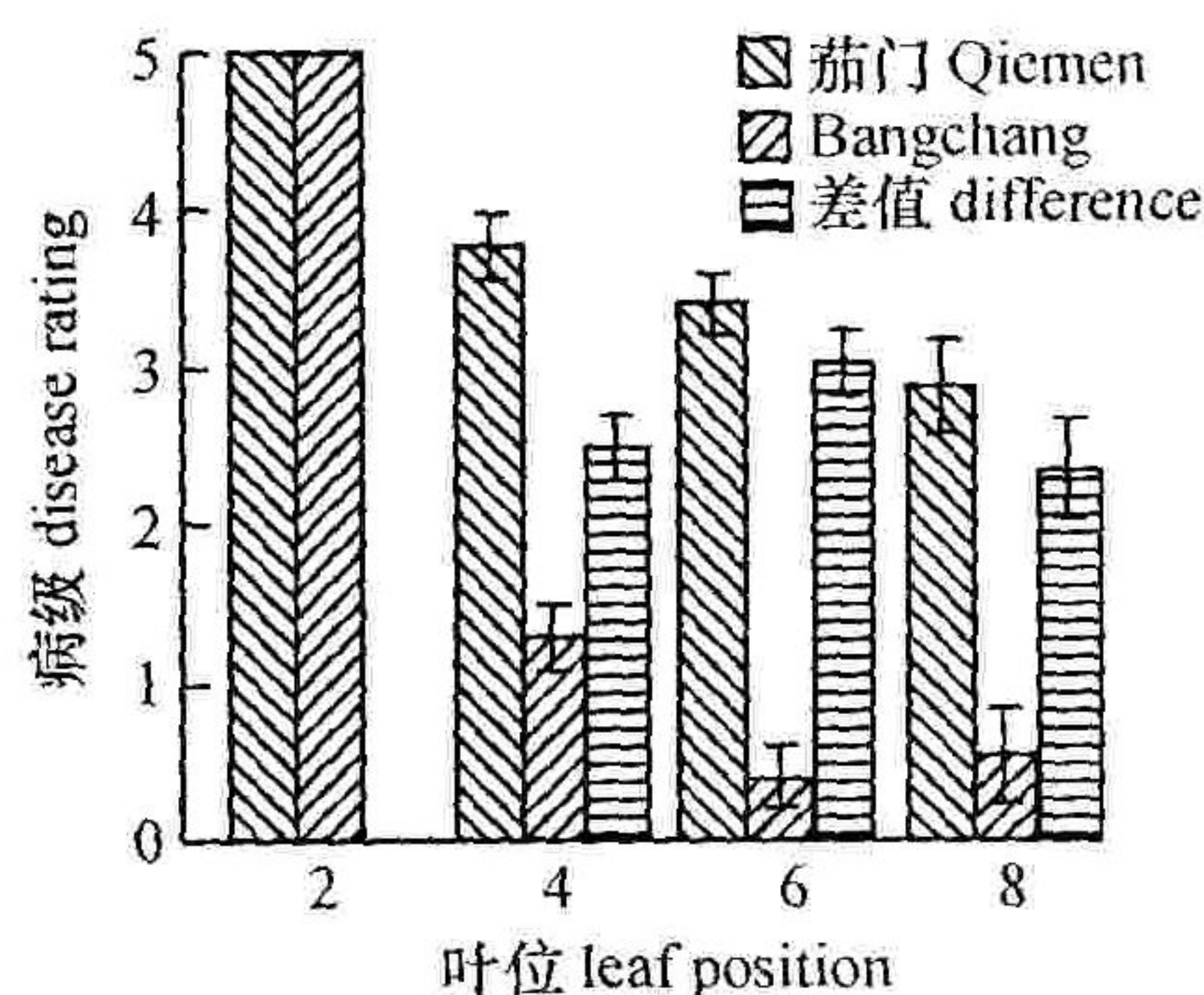


图2 叶位对疫病抗性不同的两个辣椒品种离体叶病级及其差值的影响

Fig. 2 Effects of leaf position on disease rating of detached leaves of two varieties with different degrees of resistance to *Phytophthora capsici* and their difference

25 ℃、光照(3 000 lx)12 h/d的发病条件下,对38份辣椒材料进行了抗性测定,其结果与利用喷雾法和灌根法的苗期抗性鉴定结果并列于表2.表2显示,离体叶法可有效将38份辣椒材料对疫霉菌的抗性区分开,病级范围0.1~5.0(相当于病情指数2~100),表明鉴定效果极佳.用此法鉴定出高抗材料1份,抗病材料6份,中抗材料6份,感病材料25份,其中表现抗性的材料13份,占鉴定材料总数的

表2 离体叶法的疫病抗性鉴定结果及与喷雾法和灌根法的比较

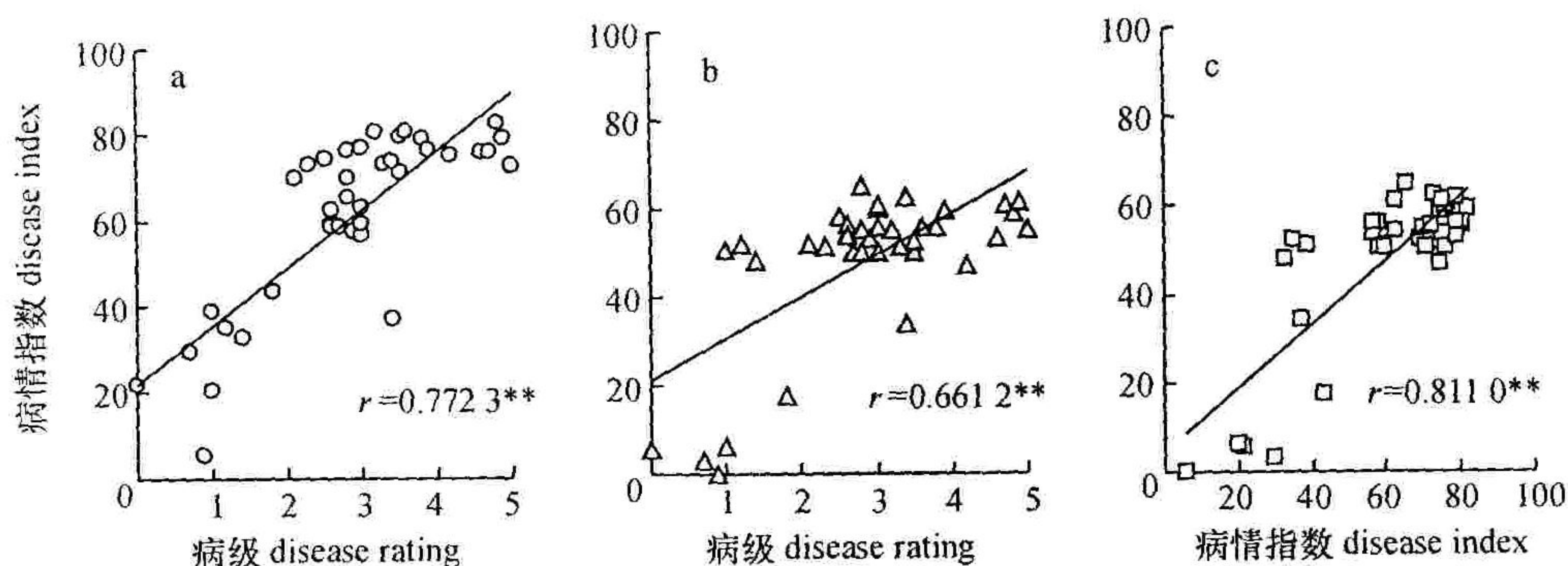
Tab. 2 The resistance of peppers to *Phytophthora capsici* identified by *in vitro* leaf method and comparison with spraying and root-irrigating methods

材料 material	类型 ¹⁾ type	离体叶法 detached leaf		喷雾法 spraying		灌根法 root-irrigating	
		病级	抗级 ²⁾	病情指数	抗级 ²⁾	病情指数	抗级 ²⁾
		rating	classification	disease index	classification	disease index	classification
Bangchang	C	0.1	HR	21.8	R	5.5	HR
Perennial	C	0.7	R	29.7	R	3.0	HR
PI201232	C	0.9	R	5.6	HR	0.0	I
都椒10号 Dujiao No. 10	C	1.0	R	38.8	MR	50.9	S
PBC602	C	1.0	R	20.5	R	6.1	HR
红丰404 Hongfeng No. 404	C	1.2	R	35.2	MR	52.1	S
P4496	C	1.4	R	32.5	MR	48.0	MR
广椒2号 Guangjiao No. 2	C	1.7	MR	37.0	MR	33.9	MR
F24	L	1.8	MR	38.0	MR	17.6	R
208-3-1-1-2	L	2.0	MR	56.4	S	55.8	S
东方神剑 Dongfangshenjian	C	2.1	MR	69.5	S	52.0	S
镇研12号 Zhenyan No. 12	C	2.3	MR	72.7	S	51.5	S
茂椒7号 Maojiao No. 7	C	2.5	MR	74.5	S	58.2	S
亚丰216号 Yafeng No. 216	C	2.6	S	58.4	S	56.2	S
P5110	C	2.6	S	59.4	S	54.2	S
安徽4号 Anhui No. 4	C	2.6	S	62.4	S	53.9	S
F36	L	2.7	S	58.2	S	50.3	S
粤丰4号 Yuefeng No. 4	C	2.8	S	76.4	S	50.3	S
野崎 Yeqi	C	2.8	S	65.3	S	64.8	S
枫叶29号 Fengye No. 29	C	2.8	S	70.0	S	54.7	S
194-2-1-2	L	2.9	S	57.0	S	53.3	S
045-1-10-1-1-1	L	3.0	S	59.4	S	50.3	S
京椒14号 Jingjiao No. 14	C	3.0	S	63.0	S	60.6	S
安徽5号 Anhui No. 5	C	3.0	S	76.8	S	60.6	S
武丰1号 Wufeng No. 1	C	3.2	S	80.7	S	55.3	S
金刚式 Jingangshi	C	3.3	S	72.7	S	51.5	S
97031	L	3.4	S	73.3	S	62.4	S
高峰羊角 Gaofengyangjiao	C	3.5	S	70.9	S	50.3	S
雷丰6号 Leifeng No. 6	C	3.5	S	79.4	S	52.7	S
绿早生 Luzaosheng	C	3.6	S	80.6	S	55.8	S
超茂5号 Chaomao No. 5	C	3.8	S	78.8	S	55.8	S
CNPH703	C	3.9	S	76.3	S	59.4	S
安徽2号 Anhui No. 2	C	4.2	S	74.8	S	46.7	MR
京椒2号 Jingjiao No. 2	C	4.6	S	75.2	S	53.3	S
茄门 Qiemen	C	4.7	S	75.2	S	60.6	S
Early calwonder	C	4.8	S	82.3	S	58.8	S
198-1-2	L	4.9	S	78.8	S	61.2	S
宝丰牛角 Baofengniujiao	C	5.0	S	72.1	S	55.2	S

1) C: 商品种(cultivar), L: 自交系(inbred line); 2) 免疫(I), 病情指数(DI)=0或病级(DR)=0; 高抗(HR), $0 < DI \leq 10$ 或 $0 < DR \leq 0.5$; 抗病(R), $10 < DI \leq 30$ 或 $0.5 < DR \leq 1.5$; 中抗(MR), $30 < DI \leq 50$ 或 $1.5 < DR \leq 2.5$; 感病(S), $DI > 50$ 或 $DR > 2.5$

34.2%,基本包括了由喷雾法和灌根法鉴定的抗性材料.从抗级划分结果看,离体叶法的鉴定结果较接近于喷雾法,而与灌根法的鉴定结果有较大差距,与两者的吻合率分别为76.3%和68.4%.另外,对3组数据用SPSS软件进行了相关性分析(图3),它们之

间均存在极显著的正相关性,其中喷雾法与灌根法鉴定结果的相关系数为 $r=0.8110^{**}$,表明两者的鉴定结果最为一致,而离体叶法与喷雾法和灌根法鉴定结果的相关系数分别为 $r=0.7723^{**}$ 和 $r=0.6612^{**}$,这与抗级划分得出的结果是一致的.



a: 离体叶法(X轴)与喷雾法(Y轴); b: 离体叶法(X轴)与灌根法(Y轴); c: 喷雾法(X轴)与灌根法(Y轴)

a: between detached leaf (X-axes) and spraying (Y-axes) methods; b: between detached leaf (X-axes) and root-irrigating (Y-axes) methods; c: between spraying (X-axes) and root-irrigating (Y-axes) methods

图3 利用3种鉴定法测定的辣椒疫病抗性的相关性

Fig. 3 Correlations between the results obtained by three methods for evaluation of resistance to *Phytophthora capsici* in pepper

3 讨论与结论

本研究确定了作为辣椒疫病抗性离体叶鉴定技术的适宜接种浓度、发病温光条件及鉴定叶位,用其可有效鉴定出感抗辣椒材料对疫霉菌的抗性差异.但是,离体叶仅是植株的一部分,用其进行抗性鉴定时独立于根茎,不存在系统抗性反应,因此其抗性鉴定结果的代表性是关系到能否确切鉴定和筛选到抗性材料的关键.本研究用确定的离体叶法对38份辣椒材料的疫病抗性进行了鉴定,并和非离体的喷雾法及灌根法比较,结果表明利用其进行的抗性鉴定结果与2个非离体鉴定法的鉴定结果具有极显著的正相关性,说明该法是有代表性的.从抗性鉴定结果的符合程度及相关性分析,离体叶法与喷雾法的鉴定结果基本接近,但比起喷雾法不仅不伤害植株而且具有发病条件容易控制的优点,因此可代替喷雾法.此外,本研究还表明应用离体叶法鉴定出的具有抗性的材料几乎包含了由喷雾法和灌根法鉴定的抗性材料,因此初步认为利用离体叶法筛选疫病抗性资源或材料时不会造成抗性材料的遗漏或抗性基因的丢失.至于离体叶法与灌根法的鉴定结果有一定差距,可能是由于一些辣椒材料的叶对疫霉菌的抗性基因不同于根的抗性基因所致^[12].因此,为了全面了解和确定辣椒育种材料的疫病抗性,离体叶法最好与较接近于疫霉菌自然发病过程的灌根法并用.

参考文献:

[1] BOSLAND P W, LINDSEY P L. A seedling screen for

phytophthora root rot of pepper, *Capsicum annuum* [J]. Plant Dis, 1991, 75:1048-1050.

- [2] 冯东昕,李宝栋.辣椒疫病病原菌及抗病育种研究进展[J].中国蔬菜,1999(2):48-52.
- [3] 李林,齐军山,李长松,等.主要辣椒品种对疫病、根腐病的抗性鉴定[J].山东农业科学,2001(2):29-30.
- [4] 杨君丽,王淑燕.辣椒不同品种苗期对疫霉菌抗性比较[J].北方园艺,2002(6):66.
- [5] HARTEMAN G L, WANG F C. Phytophthora blight of pepper: screening for disease resistance [J]. Tropical Pest Management, 1992, 38(3):319-322.
- [6] 毛爱军,胡洽,耿三省.辣椒疫病菌接种鉴定技术研究[J].北京农业科学,1998,16(2):21-24.
- [7] 方文慧,葛长鹏,常彩涛.辣椒疫病接种鉴定方法的筛选[J].天津农业科学,1996,2(3):12-13.
- [8] 易图永,张宝玺,谢丙炎,等.辣椒疫病三种接种方法的比较[J].中国蔬菜,2003(2):16-18.
- [9] 彭化贤,刘波微,李薇.四川辣椒疫霉菌生物学特性和辣椒抗霉疫病性鉴定方法初探[J].云南农业大学学报,2005,20(1):140-144.
- [10] 郑小波.疫霉菌及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1997:10-132.
- [11] KIM Y J, HWANG B K, PARK K W. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici* [J]. Plant Dis, 1989, 73:745-747.
- [12] WALKER S J, BOSLAND P W. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1999, 124:14-18.

【责任编辑 柴 焰】