

番茄愈伤组织对青枯病菌及其培养滤液的抗性研究

汪国平¹ 吴定华¹ 曾宪铭²

(1 华南农业大学园艺系, 广州, 510642; 2 华南农业大学资源与环境学院)

摘要 观察了 5 个抗青枯病水平不同的番茄品种(品系)的愈伤组织对青枯菌平板培养滤液及活菌体的反应. 结果表明, 抗病材料愈伤组织较为敏感, 处理后较早出现褐变、崩溃等较重的受害症状, 感病材料的症状出现较慢、较轻; 番茄愈伤组织的离体抗性与田间抗性呈相反趋势.

关键词 番茄; 愈伤组织; 青枯菌; 离体抗性

中图分类号 S 432. 21

番茄青枯病是我国南方番茄生产的重要病害, 对生产造成很大损失. 抗病育种是当前防治该病的最有效手段. 在常规育种中, 已找到一些抗源材料, 但有些材料的抗性基因与多种不良农艺性状连锁遗传, 且抗性随菌系和环境不同而变化, 为了获得能直接利用的抗源材料, 已开始采用离体筛选的方法 (Toyoda et al, 1989; Baruah et al, 1995), 以综合性状优良的感病品种作起始材料, 通过施加毒素压力, 对成千上万个细胞进行选择, 得到的抗病突变体, 具有对病害的可遗传抗性. 离体筛选方法由 Carlson (1973) 首次应用于筛选抗烟草野火病突变体, 20 多年来抗病突变体的筛选研究有很大进展, 该方法能进行有效选择的前提是离体抗性与田间抗性表现相一致. 本研究观察了 5 个抗性水平不同的番茄品种(品系)其离体抗性和田间抗性之间的对应关系, 以期能为番茄抗青枯病突变体的离体筛选积累资料.

1 材料与方 法

1. 1 供试番茄材料

高抗青枯病品系湘引、亚鲜; 中抗品系 GA₂₆感病品种台鲜、Floradade. 材料均为经多代自交后的纯合系, 田间抗性水平经多次鉴定(乐素菊等, 1995).

1. 2 青枯菌分离、平板培养滤液制备及毒性生物测定

从华南农业大学园艺系蔬菜试验场番茄病株上分离获得番茄青枯病病原菌 (*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) 致病型菌株, 经鉴定为小种 1 生化型 III.

青枯菌置酵母浸膏——营养琼脂培养基(NBY)平板上, 在 30℃下生长 2 d, 刮下菌苔并加蒸馏水悬浮, 使浓度达到 3×10^{14} CFU · L⁻¹, 剧烈振荡 15 min, 离心除去菌体, 上清液经 0. 45 μm 孔径滤膜过滤后即制得平板培养滤液.

平板培养滤液毒性的生物测定按 Husain 等(1958)的方法.

1.3 番茄组织培养

将 5 个材料的无菌苗真叶切成 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的小块, 置于脱分化培养基 (MS + KT 4 mg/L + IAA 4 mg/L) 上诱导愈伤组织。

1.4 平板培养滤液对番茄愈伤组织的影响

在 5 个材料的愈伤组织块上分别滴加 0.04、0.02、0.01 mL 平板培养滤液原液之后, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养, 观察愈伤组织受害情况, 并计算病情指数。

愈伤组织块受害程度的分级标准为: 0 —— 健康; 愈伤组织块浅黄、致密; 1 —— 愈伤组织块开始褐变; 2 —— 愈伤组织块 1/3 褐变; 3 —— 愈伤组织块 2/3 褐变; 4 —— 愈伤组织块 2/3 褐变, 组织开始崩溃; 5 —— 愈伤组织块全部褐变, 组织严重崩溃。

1.5 青枯菌活菌体对愈伤组织的影响

将斜面培养的青枯菌稀释为 3 种浓度: 1×10^{12} 、 1×10^9 、 $1 \times 10^6\text{ CFU} \cdot \text{L}^{-1}$, 各取菌悬液 0.02 mL, 分别滴加到 5 个材料的愈伤组织块上, 接种后置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养, 观察方法同 1.4。

2 结果与分析

2.1 培养滤液毒性的生物测定结果

采用平板培养滤液作为选择压力, 以减少常规液体培养时滤液中残留的细菌培养基成分在进一步试验中的不良影响。

平板培养滤液中毒性成分含量较液体培养滤液 [按 Gowda 等 (1980) 的方法制备, 培养 3 d] 高, 台鲜插条在平板培养滤液原液中 5 h 时完全萎蔫, 即使将原液稀释 16 倍, 10 h 插条萎蔫级值仍可达 4; 而液体培养滤液中的台鲜插条 10 h 后仍不表现萎蔫症状。

2.2 番茄愈伤组织诱导

所用的脱分化培养基对 5 个材料都适合, 出愈率均达 100%, 15 d 时愈伤组织表现为致密、浅黄色、无芽、叶分化, d 为 0.7~1 cm, 生长一致的愈伤组织, 使得抗性反应的比较可以在相同生理状态下进行。

2.3 供试材料愈伤组织对平板培养滤液反应的差异

愈伤组织对平板培养滤液的反应非常敏感, 滴加 0.04 mL 后 12 h 即开始褐变, 24 h 时受害症状极为严重。从 24 h 时的病情指数可以看出 (表 1): 随着培养滤液滴量的加大, 受害程度增加; 抗病材料与感病材料的愈伤组织对平板培养滤液的反应在滴量大于 0.02 mL 时存在明显差异, 反应的整体趋势为前者敏感, 后者迟钝, 即愈伤组织对培养滤液的抗性与材料田间抗病性水平呈相反趋势。

平板培养滤液明显抑制愈伤组织的再分化, 30 d 时, 0.01 mL 滴量组 5 种材料愈伤组织中有 19%~27% 能再分化形成盲芽 (即只长出粗壮叶片, 没有顶芽), 0.02 mL 组再分化率低于 10%, 5 种材料之间的再分化率无明显差异, 0.04 mL 组没有再分化现象; 而对照组 30 d

表 1 滴加平板培养滤液后 24 h 愈伤组织的病情指数¹⁾

基因型	平板培养滤液滴量/mL			CK(水)
	0.04	0.02	0.01	
湘引	64 a	59 a	32 a	0
亚鲜	60 ab	41 b	31 a	0
GA ₂₆	57 b	43 b	28 a	0
台鲜	37 c	36 c	31 a	0
Floradade	41c	37 c	29 a	0

1) 表中数字为 3 次重复平均值; 各相同滴量中字母相同者表示差异不显著; 邓肯氏检验, $\alpha = 0.05$

时再分化率为 100%。

2.3 各供试材料愈伤组织对活菌体的反应差异

接种活菌体后,抗病材料湘引、亚鲜的受害症状在较短时间内开始出现,12 h 时可见褐变,48 h 时愈伤组织已基本褐变死亡、崩溃严重、褐色物质向培养基中扩散明显;感病材料台鲜、Floradade 的愈伤组织受害症状出现晚,程度很轻,48 h 时仍基本保持原来愈伤组织的颜色,较少出现崩溃,几乎没有褐色物质,中抗材料 GA₂₆ 的症状表现和感病材料相似。抗、感材料之间的这种反应差异,与 Huang 等(1986)在马铃薯愈伤组织上接种青枯菌后的情况类似。

从活菌体接种后 48 h 愈伤组织的病情指数(表 2)可知,这种反应差异在不同浓度时均存在;从症状出现的早、晚及严重程度来看,离体抗性与田间抗性的趋势相反。

至 30 d 时观察,感病材料愈伤组织也死亡,组织轻度崩溃,但褐色物质不明显;抗、感材料愈伤组织都没有再分化现象。

表 2 活菌体接种后 48 h 愈伤组织的病情指数¹⁾

基因型	菌悬液浓度/CFU·L ⁻¹			CK(水)
	1×10 ¹²	1×10 ⁹	×10 ⁶	
湘引	81 a	65 a	63 a	0
亚鲜	79 a	60 a	47 b	0
GA ₂₆	28 b	21 b	24 c	0
台鲜	25 b	23 b	23 c	0
Floradade	24b	21 b	9 d	0

1)表中数字为 3 次重复平均值;各相同滴量中字母相同者表示差异不显著;邓肯氏检验,α=0.05

3 结论与讨论

3.1 番茄愈伤组织无论是对青枯菌平板培养滤液还是活菌体的反应趋势都是抗性材料敏感、感病材料迟钝,离体抗性表现和大田抗性表现相反。Huang 等(1986; 1989)及 Allen 等(1991)认为马铃薯上的这一现象与过敏性反应有关,并进一步确定愈伤组织褐变、崩溃是由青枯菌分泌的聚半乳糖醛酸酶(PG)引起。试验结果表明,在番茄愈伤组织上也存在类似过敏反应,这种反应不仅在以活菌体接种时产生,用其培养滤液处理时亦同样可以产生,有可能过敏反应的引发物及 PG 酶也存在于培养滤液中。

3.2 由于压力作用的结果是抗性愈伤组织死亡更快,据此可以推断:在愈伤组织上进行番茄抗青枯病突变体筛选的难度较大。试验中,虽然感病材料愈伤组织经平板培养滤液处理后,通过延长培养时间,得到了再分化的盲芽,但这不一定是抗病变异体。因为抗病材料的愈伤组织其再分化率并不比感病材料高,两者间不存在明显差异。抗、感材料的愈伤组织,经平板培养滤液处理后均有再分化现象,可能是由于毒素作用后的愈伤组织中,有些未被毒素致死的细胞,能逐渐适应毒性逆境而发生再分化。Toyoda 等(1989)用青枯菌液体培养滤液对番茄愈伤组织进行离体筛选,未获得理想结果,把再生植株经田间接种鉴定,仅表现为症状的出现时间推迟,由于未对这种抗性作遗传分析,故未能排除下述可能性:这种抗性的表现,实质上是再生植株当代对青枯菌分泌的毒素产生了暂时的生理适应性。

参 考 文 献

乐素菊,吴定华,梁承愈. 1995. 番茄青枯病的抗性遗传研究. 华南农业大学学报, 16(4): 91~95

Allen C, Huang Y, Sequeira L. 1991. Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. Mol Plant-Microb Interact, 4(2): 147~154

- Baruah S J N, Deka P C. 1995. *In vitro* selection of tomato plants resistant to *Pseudomonas solanacearum*. *Acta Hort*, 392: 115 ~ 121
- Carlson P S. 1973. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science*, 180: 1366 ~ 1368
- Gowda S S, Rai P V. 1980. Phyto-toxic glycopeptide produced by *Pseudomonas solanacearum*. I. Methods of preparation, physical and chemical characterisation. *Phytopath Z*, 98: 68 ~ 75
- Huang Y, Helgeson J P, Sequeira L. 1986. Differential responses of potato tissue culture to inoculation with strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 76: 1137
- Huang Y, Helgeson J P, Sequeira L. 1989. Isolation and purification of a factor from *Pseudomonas solanacearum* that induces a hypersensitive-like response in potato cells. *Mol Plant-Microb Interact*, 2 (3): 132 ~ 138
- Husain A, Kelman A. 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 48: 155 ~ 165
- Toyoda H, Shimizu K, Chatani K, et al. 1989. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture. *Plant Cell Reports*, 8(6): 317 ~ 320

DIFFERENTIAL RESPONSES OF TOMATO CALLI TO *Pseudomonas solanacearum* AND ITS PLATECULTURAL FILTRATES

Wang Guoping¹ Wu Dinghua¹ Zeng Xianming²

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

2 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ.)

Abstract

The responses of calli derived from five tomato genotypes to the bacterial suspensions and the platecultural filtrates of *Pseudomonas solanacearum* were studied. The calli from resistant genotypes were sensitive, which browned rapidly and collapsed heavily, in comparison with that from susceptible ones. The invitro resistances showed a tendency to be contrary to the resistances infield.

Key words tomato; callus; *Pseudomonas solanacearum*; in vitro resistance