

西瓜炭疽病人工接种鉴定的新方法

——离体叶接种和 AD 评价法¹

文生仓² 王 鸣

(西北农业大学瓜类研究室, 陕西杨陵·712100)

摘 要 对具有不同抗性水平的3个西瓜品种进行了离体叶人工接种炭疽病抗性鉴定方法的研究。结果表明,离体叶与幼苗人工接种同样能够真实地反映西瓜品种固有的抗病性,且能节省菌液、劳力、试材和费用,并对环境条件更易控制,简便易行,可以广泛采用。该法用注射器悬滴接种,菌液浓度为 1×10^6 孢子/mL。接种叶片的叶龄为15~20 d,接种后3 d开始发病,第6 d调查统计病情指数。品种抗病性可以用平均病斑直径(AD), $AD = \frac{\sum (\text{发病病斑直径})}{\text{接种总滴数}}$ 和病情指数(DI)两种标准进行评价,其中用AD进行品种抗病性评价减少病级划分中的人为误差,更为客观简便,可以取代DI在离体叶人工接种西瓜炭疽病抗性鉴定中广泛采用。

关键词 西瓜,离体叶,接种,炭疽病,抗病性

中图分类号 S436.429

Colletotrichum lagenarium 是作物西瓜、甜瓜和南瓜等葫芦科作物炭疽病的致病因子^[1],该病是潮湿条件下的瓜类作物果实和叶片上最为严重的世界性病害^[2]。采用人工接种法对西瓜品种进行炭疽病抗性研究受到各国西瓜育种家的广泛重视。Goode^[3]和 Dutta等^[4]在 *C. lagenarium* 生理小种分化研究中,采用苗期、成株期和果实发育期接种病原菌,证明其结果基本一致。以后人们在抗性鉴定中一般都采用苗期人工接种方法。我国西瓜抗炭疽病育种起步较晚,刘莉、王鸣^[4]对西瓜离体幼苗人工接种鉴定法和常规的幼苗人工接种鉴定法进行了比较研究,认为二者同样能真实地体现西瓜品种固有的抗感水平。Suhag 和 Duhan^[5]曾对葫芦的离体叶接种 *C. lagenarium* 研究了炭疽病流行的最佳条件,但未进行品种抗病性鉴定的研究。Cucuzza^[6]等曾用喷雾接种法接种苜蓿的离体子叶,精确地测定出了其对三叶草刺盘孢菌(*Colletotrichum trifolii*)的抗性。研究认为,此法可以作为温室筛选抗病品种的替代方法。

由于离体叶人工接种鉴定法与常规的苗期人工接种鉴定法相比具有许多优点,例如:节省菌液、劳力、试材和设备,且易控制环境条件,结果更为准确可靠。本试验的目的是对这种离体叶人工接种鉴定的新方法进行系统地研究,为西瓜炭疽病抗性人工接种鉴定、筛选及抗病育种提供有效的手段。

1 材料和方法

1.1 品种来源

供试的 Charleston Gray、Congo 西瓜品种对瓜类炭疽病菌生理小种1分别表现抗病

收稿日期:1993-06-09。

1 自然科学基金资助项目;2 现在海南现代农艺研究所工作。

和中度抗病反应^[3], 兴城红被证明是感病品种^[4], 均为引自国内外的代表品种, 并经过多年自交纯化。

1.2 病原菌的收集与鉴定

供试的西瓜炭疽病菌分离物“A-1”采自本研究在陕西杨陵试验田中的西瓜罹病果实, 并经过初分离、再分离和单孢分离。分离方法参照刘莉、王鸣^[4]所采用的方法。通过镜检菌丝和分生孢子以及回接鉴定, 证明该分离物确为典型的西瓜炭疽病菌, 并经鉴定属于瓜类炭疽病菌生理小种1。

1.3 西瓜炭疽病抗性人工接种鉴定方法

西瓜幼苗人工接种炭疽病抗性鉴定于1981年9月25日至10月17日在温室进行, 接种方法参照文献[4]。

离体叶人工接种鉴定在西北农业大学园艺系组织培养室进行。将不同浓度的孢子悬浮液, 用微量注射器悬滴法接种于西瓜的离体叶片中, 并以接种无菌水为对照。接种后在空气相对湿度(RH)95%~100%, 温度25~26℃条件下, 保湿保暗25h, 之后给以日光灯照明, 日照时数为每日16h。6d后调查统计病斑直径及病情指数。

在品种抗病性评价中, 我们用了2个评价标准: 平均病斑直径(AD)和病情指数(DI), 其分级标准如下:

$AD = \sum(\text{发病病斑直径}) / \text{接种总滴数}$, 根据AD的抗病分级标准为:

0.00mm 免疫	<0.50mm 高抗	0.51~1.50mm 抗病
1.51~2.00mm 中抗	2.01~3.00mm 感病	>3.01mm 高感

DI的计算参照文献[4]采用的标准, 根据离体叶接种鉴定的特点, 将炭疽病根据病斑直径(D)分级如下:

0级: 0.0mm	1级: 0.1~1.0mm	3级: 1.1~2.0mm
5级: 2.1~3.0mm	7级: 3.1~4.0mm	9级: 4.1mm以上

$DI = \left[\sum(\text{各级病斑数} \times \text{该病级代表数}) / (\text{最高级代表级} \times \text{调查总病斑数}) \right] \times 100$,

采用病情指数对抗病性进行分级, 其分级标准与幼苗人工接种鉴定法相同, 即:

0% 免疫	11%以下 高抗	12%~33% 抗病
34%~55% 中抗	56%~77% 感病	78%以上 高感

2 结果与讨论

2.1 西瓜离体叶人工接种炭疽病抗性鉴定方法的研究

2.1.1 不同接种浓度试验 在抗病性鉴定中选择适宜的接种浓度是很重要的。接种浓度过大或过小都不能真实地反映品种的抗病性。参考前人试验中采用的接种浓度, 根据离体叶接种特点, 本试验设置了4个浓度处理, 即 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 孢子/mL。接种后3个抗性不同的品种的感病表现见表1。

由表1看出, 在 1×10^4 孢子/mL浓度下, 感病品种兴城红表现抗病, 中抗品种Congo表现高抗, 抗病品种Charleston Gray则表现免疫。在 10^5 孢子/mL浓度下, 虽然抗病品种Charleston Gray表现了抗病反应, 但中抗品种Congo也表现抗病, 感病品种兴城红则表现中抗反应。因此, 这2个接种浓度压力太小, 不能真实地反映品种的抗感水平。在 10^7 孢子

/mL 浓度下,接种后发病迅速,第6 d 调查,3个品种均表现高度感病和感病,也不能清楚地区分它们的抗病性。在 10^5 孢子/mL 浓度下,3个抗性不同的西瓜品种均表现出了它们所固有的抗病性,品种间抗病性差异明显。因此在离体叶人工接种鉴定中,适宜的接种浓度确定为 10^6 孢子/mL。

表1 不同接种浓度下的发病情况比较

品 种	接种孢子浓度(孢子/mL)				
	0(CK)	10^4	10^5	10^6	10^7
	AD(mm)				
兴城红	0.00	0.56	1.89	3.01	4.56
Charleston Gray	0.00	0.00	0.78	1.11	2.67
Congo	0.00	0.08	0.89	1.67	3.33
	DI				
兴城红	0.0	13.3	39.2	71.3	98.3
Charleston Gray	0.0	0.0	14.5	21.1	60.7
Congo	0.0	7.4	20.8	37.8	74.4

2.1.2 不同叶态及叶龄接种试验 选用兴城红西瓜品种的子叶10 d 以下叶龄的幼叶15~20 d 的成龄叶和25 d 以上的老龄叶等4种不同的叶态或叶龄,用 10^5 孢子/mL 的孢子悬浮液进行接种试验,结果见表2。

表2 不同叶态、叶龄的叶片接种后抗病性比较

叶态及叶龄	开始发病 d 数	病斑连片所需 d 数	腐烂	备注
子 叶	接种后2 d	接种后3 d	+	
10 d 以下幼叶	接种后2~3 d	接种后6 d	+	
15~20 d 成龄叶	接种后3 d	病斑不连片	-	AD:2.89mm DI:168.3
25d 以上老叶	接种后2~3d	接种后6d	+	

结果表明,子叶接种后第2 d 便开始发病,第3 d 各个接种点滴的发病病斑便迅速扩大连成一片,到第4 d 整片子叶腐烂。10 d 以下叶龄的幼叶和25 d 以上的老龄叶在接种后2~3 d 开始发病,到第6 d,各接种点发病病斑迅速扩大,大部分连接成片,病斑小难以区分。用15~20 d 的成龄真叶接种后第3 d 开始发病,第6 d 统计发病情况,病斑直径很易测得,未发病的孢子液滴亦清晰可见,统计的 AD 为2.89 mm,DI 为68.3,表现了感病反应。因此在西瓜炭疽病离体叶人工接种抗性鉴定中,适宜的接种浓度为 10^6 孢子/mL 并以选用15~20 d 叶龄的功能叶为宜。

2.1.3 不同保湿方式试验 对兴城红西瓜品种15~20 d 成龄叶片的剪口进行了3种处理:①保持自然状态(不处理);②用脱脂棉缠封;③用石蜡封固。3种处理均平放于覆有4层无菌水饱和的吸水纸培养盘中,以 10^6 孢子/mL 的孢悬浮液悬滴法接种后,培养盘上的塑料薄膜盖严保湿,观察发病情况。结果见表3。

结果表明,用脱脂棉缠封剪口的成龄叶片在接种后第2 d 便开始发病,而且发病部位多在叶柄近端处,并不一定在接种菌液的部位发病,而且病斑成片,叶柄基部腐烂,到第6 d 全叶腐烂。在剪口保持自然状态下,发病部位也不一定在接种菌液的部位,大部分也在

叶柄近端处,到第6 d 叶柄基部也开始腐烂,病斑连成一片,与前者类似。只有用石蜡封固剪口的叶片接种后发病正常,各接种点发病的病斑及未发病的孢子液滴均清晰可见,可以清楚地进行观察统计。

表3 离体叶剪口不同处理方法的病情比较

剪口处理	开始发病天数	发病部位	病斑可否分辨
棉花缠封	接种后2 d	叶柄近端处	—
不处理	接种后2~3 d	叶柄近端处	—
石蜡封固	接种后3 d	接种点	+

以上研究结果表明,采用西瓜离体叶进行人工接种炭疽病的抗性鉴定最佳的技术规程是:用微量注射器进行滴法接种,适宜的叶龄为15~20 d 的成龄叶,孢子液浓度以 10^6 孢子/mL 为宜。此外,接种叶片的剪口应用石蜡封固。接种后平放于铺有4层用无菌水饱和的吸水纸的培养盘中,其上用塑料薄膜盖严保湿,温度24℃左右,相对湿度100%,保持24 h 黑暗,其后改为日光灯照明,光周期为日照时数16 h,6 d 后统计发病情况,计算病情指数及平均病斑直径。

2.2 用西瓜离体叶及幼苗人工接种进行炭疽病抗性鉴定的结果

采用以上技术规程,于1991年9月8日至10月25日对 Charleston Gray、Congo 和兴城红西瓜品种进行离体叶人工接种炭疽病的抗性鉴定,并于同年9月5日至10月17日进行了西瓜炭疽病幼苗人工接种抗性鉴定,以比较它们的研究结果(表4和表5)。

表4 西瓜离体叶人工接种炭疽病抗性鉴定结果

品 种	接种滴数	发病率	AD(mm)	(DI)
兴城红	30	90.0	3.01	78.9
Congo	30	56.7	1.63	40.6
Charleston Gray	30	33.3	1.21	20.3

表5 西瓜品种苗期人工接种炭疽病抗性鉴定结果

品 种	调查株数	发病率(%)	(DI)
兴城红	30	93.3	82.3
Congo	30	50.0	39.6
Charleston Gray	30	36.7	18.9

由表4和表5可以看出,采用离体叶和幼苗人工接种鉴定法对西瓜炭疽病抗性进行鉴定所得结果是一致的,感病品种兴城红的病情指数分别为78.9和82.3,发病率分别为90.0%和93.3%,表现感病反应;抗病品种 Charleston Gray 的病情指数分别为20.3和18.9,发病率分别为56.7%和50.0%,表现抗病反应;中抗品种 Congo 的病情指数分别为40.6和39.6,发病率分别33.3%和36.7%,表现中抗反应。上述数据不但抗性趋势一致,而且绝对数值也很相近。充分说明这两种鉴定方法均能真实地反映西瓜品种固有的抗病性,但用离体叶进行人工接种鉴定具有多种优点,因而可用以代替传统的幼苗接种法对西瓜进行

炭疽病的抗性鉴定、筛选和抗病育种。

2.3 西瓜离体叶人工接种抗性鉴定中抗病性评价标准的比较研究

将表4简化可以得到表6.

表6 抗性鉴定中两种抗病性评价标准的比较

品种	AD(mm)	(DI)
兴城红	3.01(S)*	78.9(S)
Congo	1.63(MR)	40.6(MR)
Charleston Gray	1.21(R)	20.3(R)

*S:感病,MR:中抗,R:抗病

由表6可以看出,用 AD 和 DI 对各品种进行抗病性评价所得结果完全一致,AD 能够真实地体现病原菌的致病力和西瓜品种固有的抗病性,这表明可以用 AD 代替 DI 衡量品种的实际抗病性。另外,从 AD 的计算公式($AD = \sum \text{发病病斑直径} / \text{接种总滴数}$)也可以发现其合理性,AD 的分母为接种总滴数,是发病接种滴数与未发病接种滴数之和,分子又是各病斑直径的总和,它实际上已包含了发病率,同时也将致病力的强弱(病斑大小)纳入公式之中。采用 AD 评价抗病性不需要象 DI 那样进行繁琐的病级划分和计算,并可减少 DI 在分级、观察和计算中的人为误差。因此,我们认为在西瓜离体叶人工接种炭疽病的抗性鉴定中,完全可以用 AD 作西瓜品种抗病性评价的客观而实用的标准而予以推广应用。

参 考 文 献

1 Monroe J. Goode. Physiological specialization in colletotrichan. *Phytopathology*,1958,48,79~83

2 Dixon G R. *Colletotrichum lagenarium*. In: *Vegetable Disease*. Hong Kong,1981,319~327

3 Dutta S K et al. Observations on the physiological races of colletotricham lagenariumsm. *Botanial Genette*,1960,121(8):163~166.

4 刘莉、王鸣. 西瓜种质资源苗期对炭疽病抗性的研究. *中国西瓜甜瓜*,1990,1,9~13

5 Suhag L S Duhan J C Perpetuation and spidemiology of anthracnose disease of bottlegourd caused by colletotrichum lagenarium in north India. *Indian Phytopathology*,1984,37(2):218~222

6 Cucuzza J D. et al. In vitro assay of excised cotyledons of alfalfa(*Melicago statian*)to screen for resistance to Colletolricun trifoli. *Plant Disease*,1986,70(2):111~115

A New Method for Identifying
Colletotrichum lagenarium of Watermelon

—Inoculating with Detached Leavesand Judging Resistance with AD Standard

Wen Shengcang Wang Ming

(*The Laboratory of Melon Crops,Northwestern Agricultural University,Yangling,Shaanxi,712100*)

Abstract Three watermelon cultivars (Xingcheng Red, Charleston Gray and Congo)with different levels of resistance were identified using artificial inoculation method with detached leaves. The results showed that the detached leaves and Young seedling

artificial inoculation were able to reflect the distinctive disease resistance of watermelon cultivars accurately so that spore suspension, labor and materials and cost were reduced, and the environmental conditions were easy to control; and the method was easy to operate and wide to use; The microinjector was used in suspension inoculation. And the optimum spore concentration for inoculation was 1×10^6 spores/mL. The inoculated detached leaves presented symptoms at 3 days after inoculation, and their disease severity indexes were surveyed at 6 days after inoculation. The resistance to anthracnose of watermelon cultivars was judged by two standards, such as average diameter of lesion (AD, $AD = \text{summation of the diameters of lesions} / \text{total drops of inoculation}$) and disease index (DI), of which using AD to carry out evaluation of disease resistance might diminish man-made error in growing disease scales, which is more objective and simpler. Also, AD can be extensively used in identification of resistance to anthracnose of watermelons instead of disease index of disease index (DI).

Key words watermelon, detached leaves inoculation, anthracnose, disease resistance