

# 西瓜疫病苗期灌根接种抗性鉴定方法的研究

王永琦, 张 显, 咸 丰, 王军辉

(西北农林科技大学 园艺学院 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以不同抗性西瓜品种为材料,用游动孢子液灌根接种法进行西瓜疫病苗期抗性研究。结果表明:采用游动孢子液灌根接种法进行西瓜疫病苗期接种适宜浓度是 $1 \times 10^6$  个孢子/mL;适宜的接种苗龄为2片真叶期;调查和鉴定苗期抗病性的最适时期为接种后的12~15 d。

**关键词:**西瓜疫病;灌根接种法;苗期;抗性鉴定

**中图分类号:**S 436.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)11-0182-03

西瓜疫病也叫疫霉病,俗称瓜瘟,是西瓜上发生的一种毁灭性病害。疫病发病周期短,流行速度快,一旦染病很难治愈,给西瓜生产造成很大的经济损失。目前在生产上主要依靠化学药剂进行防治,但由于化学药剂的防治受多种环境因素的影响,防治受到限制,防效不显著,同时会造成生态环境的污染。因此,抗病育种显得尤为重要。抗病性鉴定筛选工作是抗病育种的重要环节和手段,通过人工接种进行抗病性鉴定筛选,可明确抗性种质,有利亲本选择,缩短育种进程,提高抗病育种效率。目前对西瓜疫病的抗性筛选未形成一套具体的研究方法。该试验以对西瓜疫病具有不同抗性的西瓜品种为试验材料,用游动孢子液灌根接种法从接种浓度、接种时期、接种后最佳病情调查时期等方面进行研究,提出一套准确而实用的西瓜疫病苗期人工接种抗性鉴定、筛选的方法和程序,为开展西瓜抗病育种工作提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2009年10~12月在西北农林科技大学园艺学院实验室进行。西瓜品种为:“京父-3”(抗病品种)、

“GS-37”(感病品种)、“G-5-12”(高感品种),西瓜品种及由西瓜疫霉菌均由西北农林科技大学园艺学院西瓜课题组提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 病原菌的提取** 将被感染的西瓜植株取下,用灭菌手术刀在病健交界处切取小段,用75%的酒精浸泡2~3 s,无菌水冲洗3次,再用0.1%的升汞浸泡2~3 min,然后用无菌水冲洗3遍,并用无菌吸水纸吸干表面的水分,在无菌操作下,用刀片、剪刀等器具,削去蔓的皮,然后取中间维管束组织,用剪刀剪成数枚小块,分散移植到PDA培养基上<sup>[1]</sup>,在28℃按培养3~4 d后进行纯化、扩繁。纯化后的菌株保存在PDA斜面上,置4℃冰箱中贮存备用。对分离保存的菌株,用柯赫氏法则进行回接,观察症状表现与原发病株症状相同,进行再分离,在显微镜下观察分离菌体与原接种菌株相同。

**1.2.2 菌液的制备** 将供试菌株转移到盛有PAD培养基的培养皿上,置于28℃恒温培养箱内暗培养,待菌落长满培养皿时,放到40W日光灯下照射7 d<sup>2</sup>,诱导孢子囊的产生,备用。向诱好孢子囊的培养皿中加入10 mL无菌水,于4℃冰箱中放置30 min,诱导游动孢子释放,随后室温光照2 h后用消毒毛笔刷洗培养基表面,双层纱布过滤<sup>2</sup>,收集游动孢子悬浮液,用血球计数板镜检游动孢子,并调整悬浮液中游动孢子数量到所需浓度时立即使用。

**1.2.3 西瓜苗的培养** 西瓜育苗选用中型塑料育苗钵,育苗基质用草炭、珍珠岩按3:1的比例配制,1 m<sup>3</sup>基质加100 g多菌灵进行基消毒,用55℃温水浸泡种子,用水量为种子量的3倍左右,并不断搅拌,待水温降低至30℃时取出种子,再用2%的漂白粉消毒10 min,用清水冲洗干净,在室温下浸种6~8 h,然后用清水冲洗2~3遍,搓洗掉种子上的粘液。将种子装入小烧杯中,用湿

**第一作者简介:**王永琦(1983-),男,山西永济人,在读硕士,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: 181784736@qq.com。

**通讯作者:**张显(1961-),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,现主要从事蔬菜作物育种与生物技术研究工作。E-mail: zhangxian098@126.com。

**基金项目:**国家“西甜瓜产业技术体系”西北旱作栽培岗位科学家资助项目(nycytx-36-1-02-06);国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD01A7-6-01)。

**收稿日期:**2010-03-09

布盖好,置于 30℃下催芽,待种子露白时直接播于育苗钵中,深度 1 cm 左右<sup>[3-4]</sup>。播种后放于 GXZ 型智能光照培养箱中,昼温 30℃,夜温 24℃,待出苗后给予光照(22 000 lx),12 h/d。每个处理 10 株,3 次重复。

1.2.4 不同接种浓度试验 将游动孢子悬浮液设为  $1\times 10^7$ 、 $1\times 10^6$ 、 $1\times 10^5$  个孢子/mL 3 个梯度,蒸馏水为对照,采用灌根法接种于二叶期的无菌苗上。方法借鉴林柏青<sup>[5]</sup>的灌根法,在距幼苗根部约 0.5 cm 处扎 1 个 3 cm 深的孔,将 3 mL 浓度为  $10^7\sim 10^5$  个/mL 的孢子悬浮液注入孔内。于 25~28℃,相对湿度 95%~100% 的黑暗条件下保湿 24 h,以后给予正常的光周期,观察发病情况(放于 GXZ 型智能光照培养箱中,培养条件同 1.2.3)。

1.2.5 不同幼苗形态接种试验 接种苗龄分 3 个时期:子叶期、二叶期、四叶期,孢子悬浮液浓度采用  $1\times 10^6$  个孢子/mL,采用灌根法,其它同“1.2.4”。

1.2.6 接种后不同时期调查病情试验 于二叶期用灌根法接种,浓度为  $1\times 10^6$  个孢子/mL。从接种后的第 6 天开始,每天调查发病率和病情指数,观察病情发展情况,以确定 1 个最适调查时期。

1.2.7 病情分级 参考辣椒疫病的分级标准<sup>[6]</sup>和南瓜疫病的分级标准<sup>[7]</sup>将西瓜幼苗对疫病的抗性分为 0、1、2、3、4、5 共 6 级。0 级:无任何症状;1 级:幼苗茎基部出现缢缩,植株倒伏,但不萎蔫;2 级:幼苗茎基部出现缢缩,但缢缩面不超过株高的 1/3,茎部褐色水渍状病斑,子叶萎蔫,植株倒伏;3 级:幼苗茎部缢缩面超过整株的 1/3,但不超过株高的 2/3,缢缩部褐色,子叶干枯;4 级:幼苗茎部缢缩面超过株高的 2/3 或蔓延至全茎,缢缩部黑褐色,子叶干枯,真叶萎蔫;5 级:植株枯死。病情指数(DI)计算公式如下:病情指数(DI)=[ $\sum$ (病级数值 $\times$ 该病级病株数) $\times 100$ ]/(病级最高值 $\times$ 调查株数)。抗性分级标准:免疫(I):病情指数为 0;高抗(HR):病情指数为  $0<DI\leq 10$ ;抗病(R):病情指数  $10<DI\leq 30$ ;中抗(MR):病情指数  $30<DI\leq 50$ ;感病(S):病情指数  $50<DI\leq 70$ ;高感(HS):病情指数  $70<DI\leq 100$ 。

2 结果与分析

2.1 不同接种浓度对发病的影响

由表 1 可知,在  $1\times 10^5$  个/mL 孢子浓度下,高感品种“G-5-12”表现感病;感病品种“GS-37”表现中抗,发病率降低,而且发病时间较长,不利于病情调查;抗病品种“京父-3”表现高抗,均不能真实反映品种的抗性水平。在  $1\times 10^7$  个/mL 孢子浓度下,由于浓度过高,高感品种“G-5-12”的病情指数接近了 100,发病过重;感病品种“GS-37”表现高感;抗病品种“京父-3”表现感病,也不能真实的反映 3 个品种的抗性水平。在  $1\times 10^6$  个/mL 孢

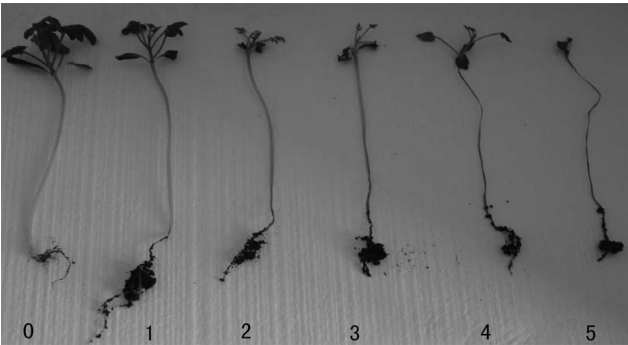


图 1 病情等级从左至右依次为 0、1、2、3、4、5 级

子浓度下,抗病品种、感病品种与高感品种的病情指数差异明显,容易区分抗感品种。因此在苗期人工接种鉴定中,适宜的接种孢子液浓度确定为  $1\times 10^6$  个/mL。

表 1 接种浓度对发病的影响

接种浓度 /个 $\cdot$ mL <sup>-1</sup>	病情指数			发病率/%		
	抗病 品种	感病 品种	高感 品种	抗病 品种	感病 品种	高感 品种
$1\times 10^7$	61.1	75.3	90.2	72.2	100.0	100.0
$1\times 10^6$	21.1	51.4	76.7	25.0	76.7	100.0
$1\times 10^5$	10.0	45.3	53.3	14.7	66.7	83.3

2.2 不同苗龄接种对发病影响

由表 2 可知,随着苗龄的增长,植株的抗病性增强,发病率降低。子叶期、2 片真叶期和 4 片真叶期的病情指数差异达到显著水平,子叶期的感病品种“GS-37”与高感品种“G-5-12”的发病率和病情指数都很高;二片真叶期的抗病品种“京父-3”、感病品种“GS-37”与高感品种“G-5-12”的病情指数差异也达到显著水平,发病率和病情指数大小适中,适合进行抗病性鉴定。

表 2 不同苗龄接种对发病的影响

接种苗龄	病情指数			发病率/%		
	抗病 品种	感病 品种	高感 品种	抗病 品种	感病 品种	高感 品种
子叶期	32.6a	73.3a	85.3a	63.3	96.4	100.0
二叶期	21.1b	51.4b	76.7b	25.0	76.7	100.0
四叶期	8.6c	40.2c	56.7c	20.0	50.0	80.0

2.3 接种后不同调查时期病情发展情况调查结果

感病品种“GS-37”与高感品种“G-5-12”在接种后第 6 天开始出现病株,抗病品种“京父-3”在第 7 天有少数病株出现。在接种后的 8~11 d 里,各品种的发病指数均有不同程度上升,说明在这段时间里病情发展较快。第 11 天后,各品种的病情指数的发展趋于平缓。接种 15 d 后,高感品种“G-5-12”的病情发展得过于严重,而且感病品种“GS-37”的病情指数也上升较高。由此认为,在接种后第 12 天,这 3 个不同抗性的品种都表现出其客观的抗病性,在第 12~15 天这个时期内,病情指数比较

稳定,进行病害程度调查是适宜的。

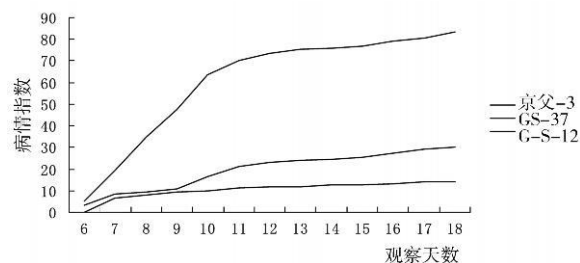


图2 不同抗性品种接种后病情发展

### 3 讨论

#### 3.1 接种浓度对西瓜疫病抗性鉴定的影响

刘学敏<sup>[8]</sup>认为南瓜疫病适宜的接种浓度为5 000~10 000个/mL,而该试验中在西瓜上灌根接种疫霉菌的适宜浓度为 $10^6$ 个/mL。孢子悬浮液浓度过大,致使发病较快且重,抗病品种在高浓度下会成为中抗,感病品种会成为高感,掩盖了品种的真实抗性;如果浓度过小,则病害潜育期长,受周围环境影响过大,抗病品种在低浓度下会显示高抗,反映的准确性受到限制。感病品种和高感品种在低浓度下随接种时间的延长抗性级别分别各升高一级,使品种的真实抗性表现不明显,给育种工作带来困难。

#### 3.2 接种苗龄对西瓜疫病抗性鉴定的影响

周克琴等<sup>[7]</sup>认为南瓜疫病接种的适宜苗龄为2片真叶期;在西瓜上,宋荣浩等<sup>[9]</sup>认为西瓜接种蔓枯病的苗龄为3~4片真叶期,崔召明<sup>[7]</sup>认为西瓜接种炭疽病的适宜苗龄为2片真叶期。即使同一品种,接种的病菌不同,接种的适宜苗龄也有差异。该试验认为随着苗龄的

增长,西瓜植株对疫病的抗性也有所增强,4片真叶期接种,发病时间长,延长了鉴定时间,影响了品种的真实抗性。所以2片真叶为西瓜疫病接种的适宜苗龄。

#### 3.3 调查时期对西瓜疫病抗性鉴定的影响

易图永等<sup>[9]</sup>认为辣椒接种辣椒疫病后第7天是病情调查的适宜时期;周克琴等<sup>[7]</sup>认为南瓜植株接种疫病后72 h为调查的适宜时期。该试验研究发现在接种西瓜疫病后,随着调查时间的延长各品种的病情指数均不同程度升高。在接种第11天后,各品种的病情指数的发展趋于平缓,此时为病情调查的最佳时期。因此在第12~15天这个时期内,病情指数比较稳定,进行病害程度调查是适宜的。

#### 参考文献

- [1] 周长久,王鸣,吴定华,等.现代蔬菜育种学[M].北京:科学技术文献出版社,1996:205-206.
- [2] 王晓敏,巩振辉,逯红栋,等.辣椒疫霉菌孢子诱导技术研究[J].西北农业学报,2006,15(2):59-62.
- [3] 华小平,赵守桂,沈军,等.无籽西瓜穴盘苗的标准化生产及产后管理技术[J].中国种业,2005(7):57-58.
- [4] 陈小青,徐胜利.温室快速无土培育西瓜嫁接育苗技术[J].上海蔬菜,2004(1):57-58.
- [5] 林柏青,张松林.辣椒品种抗疫病鉴定方法初步研究[J].中国蔬菜,1994(4):21-24.
- [6] 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.
- [7] 周克琴.籽用南瓜疫病苗期抗性鉴定方法及抗病材料筛选的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2001.
- [8] 刘学敏,张俊华.接种体和接种部位对南瓜疫病接种效果的影响[J].植物保护学报,1999,26(1):95-96.
- [9] 宋荣浩,戴富明,杨红娟,等.西瓜品种资源对枯萎病和蔓枯病的抗性鉴定[J].植物保护,2009,35(1):117-120.

## Study on Identification Methods of Watermelon Phytophthora Blight Resistance with Irrigation Inoculation at Seedling Stage

WANG Yong-qí, ZHANG Xian, XIAN Feng, WANG Jun-hui

(Department of Horticulture Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** On the basis of root irrigation method with swarm spore fluid, this paper describes the research about watermelon resistance to phytophthora blight at the seedling stage, in which watermelon cultivars with different phytophthora blight resistances were used as the testing material. The results showed that the suitable concentration for inoculation of watermelon at the seedling stage of phytophthora blight was  $1 \times 10^6$  pfu/mL by adopting the root irrigation method with swarm spore fluid; the suitable inoculation seedling age was at the 2 true leaves stage; the most suitable time to investigate and identify the resistance to phytophthora blight at the seedling stage was 12~15 d after inoculation.

**Key words:** watermenlon phytophthora blight; root irrigation method; seedling stage; identification of resistance