

甜瓜苗期复合接种多抗性方法研究

张学军^{1,2}, 李霖华^{1,2}, 张 龔^{1,2}, 王登明^{1,2}, 伊鸿平^{1,2}

(1. 新疆农业科学院哈密瓜研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 海南省甜瓜西瓜遗传育种重点实验室, 海南 三亚 572014)

摘 要:以“风味 4 号”、“风味 5 号”、“黄皮 9818”、“雪里红”、“金凤凰”、“红心脆”、“仙果”甜瓜为试材,研究了单一接种法和复合接种法的抗性鉴定,并用 SPSS 13.0 软件进行相关性分析。结果表明: $r_a=0.86042$, $r_b=0.98590$, $r_c=0.95806$, $r_d=0.61513$,表明 2 种接种方法之间呈显著的正相关;经双样本等方差分析, t 值都小于 $t_{0.01}=4.604$,各种病害单一接种与复合接种的病情指数在 0.01 水平差异均不显著,说明用复合接种法进行多抗性鉴定是可行的。

关键词:甜瓜;多抗性;复合接种

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0138-03

甜瓜是一种重要的果蔬作物,其果实香甜可口、含有人体所必需的各种营养成分,属于世界十大水果之一。全世界每年甜瓜的种植总面积约为 71.7 万 hm^2 ,总产量约 12 182 000 t,并且呈现出逐年递增的趋势^[1]。瓜类枯萎病、白粉病、霜霉病和蔓枯病是生产上普遍发生的重要病害,各地均有不同程度的发生。从国内选育的品种看,数量虽多,但高品质的少,至今国内还没有选育出高抗、多抗和耐湿耐高温的优良品种。前人已做过黄瓜 3 种病害的多抗性鉴定技术(枯萎病-霜霉病-炭疽病,枯萎病-炭疽病-疫病,枯萎病-霜霉病-角斑病,霜霉病-角斑病-黑星病)^[2-4],王艳飞等^[5]对枯萎病、白粉病、霜霉病和黑星病 4 种病害的苗期多抗性鉴定方法进行了初步试验和评价,赵国云等^[6]对枯萎病-白粉病-炭疽病-黑星病的苗期多抗性复合接种鉴定方法的研究,都认为该方法切实可行。

现综合前人的研究,进行了甜瓜枯萎病-白粉病-霜霉病-蔓枯病的苗期多抗性复合接种鉴定方法的研究,并与各病害的单一接种相比较,目的是建立一套合适的 4 种病害接种的多抗性鉴定方法,进而使甜瓜抗源亲本的筛选及品种的多抗病性鉴定更加快速、简便和准确,提高筛选效率,加速育种进程,为甜瓜多抗病育种提供理论依据。

第一作者简介:张学军(1980-),男,硕士,助理研究员,研究方向为甜瓜西瓜抗病育种。E-mail:zxj333@126.com.

责任作者:伊鸿平(1963-),男,硕士,研究员,研究方向为甜瓜西瓜遗传育种。E-mail:yhp2387@yahoo.com.cn.

基金项目:新疆自治区高技术研究与发展资助项目(201111119);国家西甜瓜产业技术体系资助项目(CARS-26-04);三亚市院地科技合作资助项目(2010CZ05)。

收稿日期:2012-09-19

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试甜瓜材料,A:“风味 4 号”,B:“风味 5 号”,C:“黄皮 9818”,D:“雪里红”,E:“金凤凰”,F:“红心脆”,G:“仙果”,均由新疆农业科学院哈密瓜研究中心提供;供试菌株:甜瓜白粉病(*Podosphaera xanthii*)和霜霉病(*Pseudoperonospora cubensis* Rostov.)来自田间新鲜病叶室内扩繁待用,枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* (Leach)Syn)和蔓枯病(*Didymella bryoniae* (Auerw.)Rehm)为海南省甜瓜西瓜遗传育种重点实验室分离、鉴定保存^[7]。

1.2 试验方法

试验在三亚温室大棚内进行。甜瓜种子放置在电恒温烘箱中,温度 38~72℃,梯度干热消毒 2~5 d,再将消毒后的干种子用 0.1% 升汞消毒 10 min,清水冲洗干净后于 28~29℃ 恒温箱内催芽,出芽后播于以椰糠和黄砂(4:1)混合物为基质的营养钵,放在 28℃ 左右的温室大棚内正常管理。3 次重复,单一接种每重复 20 株,复合接种每重复 30 株。

1.2.1 单一接种法 枯萎病:采用胚根接种法^[8-9],在三角瓶中加少许玉米粒,加水浸泡 1~2 min,将水倒出,121℃ 灭菌 25 min,接菌培养 10~15 d 后,用无菌蒸馏水冲洗玉米粒,用血球计数板镜检计数孢子浓度,制备成浓度为 5×10^6 /mL 孢子悬浮液,再将胚根长 0.5 cm 左右的种子浸泡在菌液中 30 min 后立即播种,然后在温室内正常管理。白粉病:采用刷叶法^[10],在第 1 片真叶展开时,用特制的软毛刷将 5×10^3 /mL 的孢子悬浮液均匀地刷到甜瓜植株叶片上,20~25℃ 黑暗保湿 12 h,然后在温室内正常管理。霜霉病:在第 2 片真叶展开时,采用真叶点滴法接种^[11],主要是参考子叶点滴法,接种浓度为

4×10^3 /mL(孢子囊),用移液器进行接种,接种量 0.04 mL, 20~25℃黑暗保湿 12 h,然后在温室内正常管理。蔓枯病:在第 3 片真叶展开时,采用茎针刺接种法^[12],把病菌液孢子数 5×10^5 /mL 的悬浮液接种在被鉴体的第 2~3 片真叶之间茎上,使用 2 mL 的注射器 5 号针头刺到茎上,再在伤口上滴上 1 滴孢子悬浮液,25~28℃黑暗保湿 12 h,然后在温室内正常管理。

1.2.2 复合接种法 设不接种病菌的为空白对照。于种子萌发后待胚根长 0.5 cm 左右时用胚根接种法接种枯萎病菌;待第 1 片真叶展开时,采用刷叶法在植株的第 1 真叶上用软毛笔涂接白粉病菌;3~4 d 后待第 2 真叶展平时,采用真叶点滴法接种霜霉病菌;7~8 d 后待第 3 片真叶展开时采用茎针刺法接种蔓枯病。各病菌接种浓度和方法同上单一接种法。

1.2.3 病害调查 4 种病害的分级标准,除霜霉病、蔓枯病^[13-14]外,其它按照甜瓜种质资源描述规范和数据标准进行^[15]。枯萎病接种后第 10 天开始发病,第 14 天能够确定个体间强弱的差异;白粉病接种第 5 天开始发病;霜霉病接种后第 4 天左右开始出现病斑,第 7 天第 1 次发病结束;蔓枯病接种后第 3 天开始发病。总之,枯萎病接种后 14 d 调查病情,白粉病、霜霉病接种后 8~10 d 调查病情,蔓枯病接种后 5 d 调查病情。白粉病病情调查:接种 8~10 d 调查白粉病发病情况,调查病情分级标准如下:0 级:无病症;1 级:病斑面积占叶面积的 1/3 以下,白粉模糊不清;2 级:病斑面积占叶面积的 1/3~2/3,白粉较为明显;3 级:病斑面积占叶面积的 2/3 以上,白粉层较厚,连片;4 级:白粉层浓厚,叶面开始变黄,坏死面积占叶面积的 2/3 以下;5 级:叶片坏死面积占叶面积的 2/3 以上。霜霉病病情调查:接种 8~10 d 调查霜霉病发病情况,调查病情分级标准如下:0 级:无症状;1 级:接种点出现轻微病斑,其直径小于 0.5 cm;2 级:病斑直径 0.5~1.5 cm;3 级:接种点黄化面积占子叶面积的 1/2 以下,或坏死斑面积占叶面积 1/3 以下;4 级:坏死斑面积占叶面积 1/3~2/3;5 级:坏死斑面积占叶面积 2/3 以上。蔓枯病病情调查:接种 5 d 调查蔓枯病发病情况,调查病情分级标准如下:0 级:未侵染;1 级:水浸状病斑环在茎上扩展 0~1.5 cm;2 级:水浸状病斑环在茎上扩展 1.5~3.0 cm;3 级:水浸状病斑环在茎上扩展 3.0~4.0 cm;4 级:水浸状病斑环在茎上扩展 4.0~4.5 cm;5 级:水浸状病斑环在茎上扩展 4.5 cm 以上。计算平均病情级数、计算公式为: $RI = \sum x_i n_i / N$, 式中, RI-平均病情级数, x_i -病害级别, n_i -相应病害级别的株数, N-调查总株数。根据平均病情级数和下列说明,确定材料抗病性级别:1:高抗(HR)($R1 < 1.0$);3:抗 R($1.0 \leq R1 < 2.0$);5:中抗(MR)($2.0 \leq R1 < 3.0$);7:感(S)($3.0 \leq R1 < 4.0$);9:高感(HS)($R1 \geq 4.0$)。枯萎病病情

调查:接种 14 d 调查枯萎病发病情况,计算枯萎病发病率。计算公式: $R(\%) = n/N$, 式中: R-枯萎病发病率%, n-发生枯萎病株数, N-接种株数。根据枯萎病发病率的高低和下列说明,确定材料抗病性级别:1:高抗(HR)($R < 20\%$);3:抗(R)($20\% \leq R1 < 40\%$);5:中抗(MR)($40\% \leq R1 < 60\%$);7:感(S)($60\% \leq R1 < 80\%$);9:高感(HS)($R1 \geq 80\%$)。

1.3 数据分析

用 SPSS 11.0 软件进行方差分析和相关性统计分析^[16]。

2 结果与分析

2.1 复合接种法与单一接种法的相关性分析

对 2 种不同接种方法的调查结果用 SPSS 11.0 软件进行相关性分析,经双样本等方差分析,结果 t 值都小于 $t_{0.01} = 4.604$, $r_a = 0.86042$, $r_b = 0.98590$, $r_c = 0.95806$, $r_d = 0.61513$,表明复合接种法和单一接种法之间呈显著的正相关,说明用复合接种法进行多抗性鉴定是可行的(表 1)。各种病害单一接种与复合接种的平均病级数在 0.01 水平,没有显著性差异,也表明该试验复合接种法在苗期是可行的(表 2)。

表 1 复合接种与单一接种抗性比较

材料	白粉病平均病级数			霜霉病平均病级数			蔓枯病平均病级数			枯萎病均发病率/%		
	(a)		t 值	(b)		t 值	(c)		t 值	(d)		t 值
	单接	复接		单接	复接		单接	复接		单接	复接	
“风味 4 号”	2.90	1.97	0.5269	2.10	2.31	0.2145	2.00	2.37	2.3456	33	37	2.3689
“风味 5 号”	3.33	2.29	0.5269	3.17	3.06	0.1012	3.33	3.22	1.2023	43	57	3.4526
“黄皮 9818”	3.87	2.43	1.0047	3.10	2.96	0.4895	2.33	2.31	0.1123	40	53	1.2578
“雪里红”	2.73	1.98	0.1124	1.07	1.08	0.0122	2.67	2.81	0.8956	50	53	0.8915
“金凤凰”	3.03	2.41	0.4005	1.50	1.39	0.8695	2.76	2.83	2.0126	43	63	4.0010
“红心脆”	3.97	2.84	1.3630	3.57	3.28	1.2659	3.73	3.91	1.2036	53	77	3.9985
“仙果”	3.76	2.84	1.2155	2.97	2.66	2.3698	3.10	3.40	3.5698	37	67	4.0089

注: $t_{0.01} = 4.604$; $r_a = 0.86042$, $r_b = 0.98590$, $r_c = 0.95806$, $r_d = 0.61513$ 。

表 2 复合接种与单一接种条件下不同品种间抗性比较

材料	白粉病平均病级数		霜霉病平均病级数		蔓枯病平均病级数		枯萎病平均发病率/%	
	单接	复接	单接	复接	单接	复接	单接	复接
“风味 4 号”	2.90a	1.97a	2.10c	2.31c	2.00d	2.37cd	33a	37a
“风味 5 号”	3.33a	2.29a	3.17ab	3.06ab	3.33ab	3.22ab	43a	57ab
“黄皮 9818”	3.87a	2.43a	3.10ab	2.96b	2.33cd	2.31cd	40a	53a
“雪里红”	2.73a	1.98a	1.07d	1.08d	2.67bcd	2.81bc	50a	53a
“金凤凰”	3.03a	2.41a	1.50d	1.39d	2.76bc	2.83b	43a	63b
“红心脆”	3.97a	2.84a	3.57a	3.28a	3.73a	3.91a	53a	77bc
“仙果”	3.76a	2.84a	2.97b	2.66bc	3.10ab	3.40ab	37a	67b

注:小写字母表示在 0.01 水平上差异显著。

2.2 复合接种与单一接种条件下不同品种间多抗性比较

由表 2 可知,各个品种对霜霉病和蔓枯病的抗性存在一定的差异,但是对白粉病和枯萎病所表现的抗性基本没差异,“风味 4 号”对 4 种病害具有较好的多抗性,高

抗白粉病和蔓枯病,抗枯萎病和霜霉病,在复合接种条件下,其白粉病、霜霉病和蔓枯病的平均病级数分别为1.97、2.31、2.37,枯萎病的发病率37%;总之,每个品种复合接种表现的抗性要高于单一接种,该试验认为可能是前期接种病原菌诱导植株产生植保素类物质,植株对病原菌产生一定的抗性,抑制病害的继续发展,其作用机理有待进一步研究。

3 结论与讨论

通过试验确定了该4种病害的多抗性接种程序和方法:枯萎病采用胚根接种法,笔涂法接种白粉病,真叶点滴法接种霜霉病,针刺法接种蔓枯病。接种顺序为:待胚根长至0.5 cm左右时先接种枯萎病菌,之后当2片真叶展开时,在存活的植株上第1片真叶用毛笔涂接种白粉病菌。接种浓度分别为:枯萎病 5×10^6 /mL,白粉病 5×10^3 /mL,霜霉病 4×10^3 /mL,0.04 mL,蔓枯病 5×10^5 /mL。接种温度为白粉病20~25℃;3~4 d后第2真叶完全展开采用真叶点滴法接种霜霉病菌,接种温度为20~25℃,接种后保湿24 h,以后夜间覆盖塑料薄膜保湿2~3 d;7~8 d后待第3片真叶完全开时采用针刺法接种蔓枯病,接种温度为25~28℃左右,接种后保湿12 h,之后正常管理。

在初步试验中采用枯萎病、疫病、白粉病、霜霉病的接种程序,其中枯萎病和疫病对植株都是致命的,接种后几天内植株基本全部死亡,无法进行多抗性苗期鉴定试验,最后经过筛选,以及根据生产中病害发生的严重度选用枯萎病、白粉病、霜霉病、蔓枯病的接种程序。利用该方法可筛选出兼抗性较好的育种材料,为甜瓜的多抗育种提供了理论依据。该接种方法适合大量抗源材料的筛选,但对感枯萎病材料如需知道其它抗病性,需要进行单独接种试验。

甜瓜病害多抗性筛选技术由于利用同一植株即可

鉴定多种病害,因此大大缩短了鉴定周期,提高了选择效率,同时可以节约种子等试验材料和试验空间,尤其是在种质资源短缺的情况下其优点更为突出。多抗性鉴定结果与单抗性鉴定结果相关性高、准确、科学。

参考文献

- [1] 王坚. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [2] 张光明,王冰,谭增亮. 黄瓜苗期接种多抗性鉴定方法研究初报[J]. 中国蔬菜,1991(1):219-222.
- [3] 王冰,顾三军,孙小镭. 黄瓜苗期复合接种多抗性鉴定方法研究[J]. 山东农业科学,1997(1):238-241.
- [4] 李淑菊. 黄瓜苗期人工接种抗病性鉴定技术[J]. 天津科技,1999(6):36.
- [5] 王艳飞,李平,王惠哲. 黄瓜枯萎病、白粉病、霜霉病和黑星病苗期多抗性鉴定方法的评价[J]. 中国蔬菜,2007(3):27-28.
- [6] 赵国云,王惠哲,李淑菊. 黄瓜病害苗期多抗性鉴定方法的评价[J]. 北方园艺,2008(9):178-180.
- [7] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [8] 翁祖信,蒋兴祥,肖小文. 黄瓜枯萎病抗病性鉴定方法研究—胚根接种法[J]. 中国蔬菜,1985(2):30-33.
- [9] 吴学宏,郝京京,王红梅,等. 西瓜枯萎病菌几种接种方法比较实验[J]. 中国蔬菜,2003(3):38-39.
- [10] 王迪,田丽美,李德泽,等. 甜瓜白粉病苗期接种方法和接种浓度的研究[J]. 北方园艺,2010(11):185-186.
- [11] 翁祖信,冯东昕,李宝栋. 黄瓜霜霉病抗病性鉴定技术研究初报[J]. 中国蔬菜,1991(4):7-9.
- [12] 高田藤也,周凤珍. 甜瓜蔓枯病抗病性鉴定技术[J]. 蔬菜,1985(4):24,36.
- [13] 江姣,李伟,羊杏平,等. 甜瓜蔓枯病致病力测定及接种方法的比较[J]. 江苏农业科学,2007(5):89-91.
- [14] 王超,刘宏宇,王鸿鹤. 黄瓜育种材料苗期抗霜霉病快速鉴定方法[J]. 北方园艺,2000(6):34-35.
- [15] 马双武. 甜瓜种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [16] 随益虎. 利用SPSS for Windows进行实验结果的统计分析—方差分析(续)[J]. 农业网络信息,2005(9):24-25.

Study on the Method of Identification for Multiple Disease Resistance in Melon Seedling Stage

ZHANG Xue-jun^{1,2}, LI Mei-hua^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2}, WANG Deng-ming^{1,2}, YI Hong-ping^{1,2}

(1. The Research Center of Hami-melon, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. Key Laboratory of Melon and Watermelon Genetic Breeding in Hainan, Sanya, Hainan 572014)

Abstract: Taking 7 melon varieties 'Fengwei No. 4', 'Fengwei No. 5', 'Huangpi 9818', 'Xuelihong', 'Jinfenhuang', 'Hongxincui' and 'Xianguo' as materials, the resistance identification of single inoculation method and multi-inoculation method were studied. Relativity analysis was done with SPSS 13.0 software. The results showed that the $r_a = 0.86042$, $r_b = 0.98590$, $r_c = 0.95806$, $r_d = 0.61513$, the two kinds of methods had distinct positive correlation, and the disease index of the two kinds of methods was not significant in 0.01 level, which confirmed the multi-inoculation method was feasible.

Key words: melon; multi-resistant; multi-inoculation