

甜(辣)椒病毒病多抗性 鉴定方法研究

阎素珍 杨永林 王慧

(吉林省蔬菜科学研究所·长春)

摘要 本研究以甜(辣)椒CMV、TMV为主要病毒病原。通过几年研究确立了辣椒品种抗病性鉴定适宜的毒病原接种浓度,CMV为5—10倍,TMV为10—80倍;辣椒品种抗病性鉴定的最佳接种苗龄是2—5叶期。品种(系)抗病性鉴定,宜用单独接种方法。复合性抗病性鉴定,先接CMV后接TMV为宜,也可两种病毒1:1混合同时接种。大量筛选抗源材料时,可在单独接种鉴定的基础上,用病圃接种和田间混合筛选法,不仅能减少工作量,并提高了抗病品种筛选的准确度。环境条件对品种的抗病性影响较大,适宜接种温度为25—28℃,最高不超过30℃,湿度对症状类型也有一定影响,高湿条件下易产生坏死症状。本研究为多抗性鉴定的规范化,提供了科学依据。

关键词: 甜(辣)椒,病毒,抗病性

培育抗病品种是防治甜(辣)椒病毒病最经济,有效的途径,而快速准确的抗病性鉴定方法,则是筛选抗源,评价育种材料和品种的抗病性乃至抗病育种的关键环节。国内、外对有关蔬菜病毒病抗性鉴定的方法虽有报导,但对甜(辣)椒病毒病抗病性鉴定方法的专题研究都不多。我们经多年研究摸索出一套甜(辣)椒病毒病(TMV CMV)多抗性的鉴定方法,报告如下:

材料与方法

一、毒病原纯化、繁殖及接种液的配制
毒病原是从甜(辣)椒病毒病株上分离获得的,经过生物学,血清学和电泳学检测,确认是CMV和TMV两种病毒。经株系分化研究确认是当前危害甜(辣)椒的主导株系,CMV为80701—5,TMV791013。使用前在枯斑寄主上单斑分离3—5次,然后转接到

系统寄主上繁殖,接种后12—15天采收病叶,研磨匀浆,每克含CMV的鲜病叶加5毫升TMV病叶加10毫升0.1M磷酸缓冲液(0.1MKH₂PO₄+0.1M铜试剂、PH=7),用双层纱布过滤或离心去渣。接种时加600—800目金刚砂做磨料。

二、毒病原的保存方法 1.活体保存法:CMV和TMV都可在系统感病寄主上长期活体保存,每年转接繁殖2—3次,抽苔或植株生长过旺时打顶,用其分枝继续繁殖。为防止保存期病毒的致病性发生变异,在使用前转接到原感病寄主(辣椒)上复壮一次。2.冷冻干燥保存法:接种繁殖12—15天后,采收症状明显的鲜病叶,剪成细丝,装入称量瓶内的滤纸上,瓶内滤纸下(约占瓶容量的1/3—1/2)装有干燥剂无水氯化钙,用凡士林密封,装好后置于-20℃低温冰箱或0—4℃的普通冰箱中保存。3.鲜冻保存法:用上述法采收的鲜病叶,放于塑料袋中,直接置于-20℃低温冰箱中鲜冻保存。

(保存期间不能再化冻)。

三、鉴别寄主植物的培育与接种 供试寄主植物种子,均用10%磷酸三钠溶液浸泡20—30分钟消毒,再用清水洗净后播于消毒的育苗盘或花盆内。育苗土经蒸气消毒2小时(1.5磅/平方英寸)。待幼苗子叶展开后,按设计需苗数移植到消毒的花盆中,在防虫温室或网室内培育,幼苗2—5叶期接种(根据寄主种类而定)。

四、试验设计 1. 接种毒源浓度试验: CMV的稀释倍数为5、10、20、40、80倍, TMV为10、20、40、80、100倍(每克鲜病叶加缓冲液毫升数),接种幼苗为三道筋麻辣椒。3叶期接种,各浓度均接20株,留5株不接种做空白对照。调查其症状,病情指数及座果株率。2. 辣椒品种抗病性鉴定的适宜接种苗龄试验: 分6批播种,每隔15天左右播一批,每批保苗30株。最后一批苗展开子叶时,其它各批即为2叶期、5叶期、7叶期、花蕾期、座果期,各批同时接种,各处理接种10盆(每盆3株),留10株不接种做对照。调查症状、病情指数、座果率。3. TMV和CMV接种顺序试验: 在感病寄主三道筋麻辣椒上试验了TMV和CMV接种顺序及其混合(1:1)接种,共6个处理。设单接TMV和CMV及不接种3个对照。幼苗3叶期时,在2片真叶、1片子叶上接种第一种病毒;5叶期时,在第4和第5片叶上接种第二种病毒。接种后,将5株摘心,5株不摘心,对比观察症状和病情。以后又用16个不同的品种重复上述试验,试验分单接CMV、单接TMV、CMV+TMV(1:1混合)三种处理,各处理接种30株,设不接种为对照,调查病情指数,评价不同接种方法对品种抗病性的影响。4. 环境条件(温、湿度)对甜(辣)椒抗病毒病的影响试验: 在网室条件下用TMV和CMV分四批接种麻辣三道筋(耐TMV、感CMV)、B12—2(耐CMV、感TMV)两个品种。每个品种接种12盆,设不接种为对照。接种后3—5天调查局部症状,15—20天调查病指。用自记温、湿度计记录这段时间的温、湿度。5. 苗期人工接种和田间自然诱发联合鉴定抗病性研究: 即第一年在病圃中播种100—150个品种,每品种留60株左右,3—4叶期用喷枪接种TMV,然后令其在病圃中自然诱发感染其它病毒(蚜传的CMV为主)。调查抗病性,并选留抗病单株。第二年在温室或网室内播种上年选留的抗病株,2—3叶期人工接种抗病育

种的目标病毒(CMV或TMV,或CMV+TMV),各接种20—30株,调查抗病性后再选留抗病单株。第三年在田间播种第二年选留的抗病单株,每份材料50—100株,调查田间抗病性并选留抗病自交系单株。

五、病害及品种抗病性的分级标准与调查方法 1. 症状符号说明: 系统症/局部症, S—系统症, /La—局部枯斑(a为直径), N—坏死症, M—花叶, SP—斑点, b—斑区, C—褪绿, mM—轻花叶, Ri—环纹, F—厥叶, Li—线状叶, Mal—畸形花叶, y—黄化, Str—N茎部条斑坏死, VN—脉坏死, Vc明脉, Stu—矮化, AP—落叶, JD—顶尖坏死, Dip—榆叶纹, “—”无症状。2. 病害分级标准: 0级: 无任何症状。I级: 心叶明脉或轻花叶或接种叶急性坏死斑点。Ⅱ级: 心叶和中部叶均中度花叶, 但无皱缩畸形, 有时茎上产生坏死点。Ⅲ级: 系统重花叶和皱缩花叶, 植株轻度矮化或茎上有坏死条斑。Ⅳ级: 全株畸形花叶或厥叶, 植株明显矮化(为健株的2/3—1/2)或茎、枝、叶脉系统坏死。Ⅴ级: 植株严重畸形, 丛枝矮化, 停止生长(低于健株1/2)或全株严重系统坏死至全株枯死。3. 品种或抗源抗病性分类标准: 免疫(I): 病情指数=0。高抗(HR): 病情指数≤5。抗病(R): 病情指数5.1—15。耐病(T): 病情指数15.1—30。感病(S): 病情指数>30。

结果与分析

1. 毒病原浓度试验: CMV和TMV的不同浓度接种液都使辣椒感病(表), 但发病程度不同, 稀释倍数愈小感病愈重。CMV在5—10倍条件下病情指数较稳定, 品种抗病性类型呈典型的感病(S)型; 20倍以上病指迅速下降, 感病品种也表现为耐病(T)型; 80倍时, 感病品种变成了抗病(R)型。TMV10—40倍下接种效果无明显变化, 品种抗病性也表现较典型的感病(S)型。

2. 接种苗龄试验结果: 从试验结果中看到的现象可以说明, 无论用CMV或TMV接种时, 苗龄愈小抗侵染能力愈弱, 子叶期接种的植株基本不能生长与结果, 甚至迅速死掉, 很难正确评价品种的抗病性。花蕾期以后接种, 花蕾发育受到影响, 但植株生长和座果不受影响, 系统症状很轻, 病情指数也相对降低, 这时也很难用病级区分品种的抗感

性差异。而2—5叶期接种,病情指数及症状比较稳定,是鉴定辣椒品种抗病毒病的最佳龄期。与国外(日本)的试验结果基本一致。

3. TMV和CMV接种顺序试验:先接种TMV的植株坏死较严重,对以后接种CMV有一定干扰;而先接CMV,后接TMV的,两种病毒反应的干扰较小,病情指标为75.55,比单接TMV或CMV的病增加33.33或13.33。CMV和TMV同时混合接种效果也较好。重复进行CMV+TMV(1:1)混合接种和TMV、CMV的单独接种的对比试验,结果抗源PRT·C—1是抗CMV和TMV的抗源,在三种接种情况下均表现抗病,所以用混合毒原接种时,仍表现抗病,不可能淘汰掉,而抗TMV感CMV的PRT·C—3在混合接种后,表现为感病型(S),其抗TMV的性状被筛除了。单抗CMV的B12—2在混合接种后表现感病,抗CMV的性状也被筛除了。所以在品种(系)抗病性鉴定时以单独接种为宜;在筛选多抗性抗源时,为简化抗源筛选的程序,可在单抗鉴定的基础上,采用混合接种。

4. 温湿度对甜(辣)椒抗病性影响的试验:试验结果表明,第二批和第三批接种的(8月上旬至9月中旬)比第一批和第四批接种的更感病,症状明显,此期的平均温度为15.7—22.3℃,而第一批和第四批是处于高温或低温季节,病指明显下降。接种后湿度大(下雨)出现坏死条斑症状较多,特别是抗性强的品种表现更为明显,如第二批接种后(3/8)遇到连雨天,B12—2(抗CMV)就出现较多的条斑坏死株,病指为20.37,高于其它几次鉴定。麻辣(耐TMV)也出现坏死株(JDStr—SN),病指为83.30,明显高于1、3、4次鉴定。

5. 苗期人工接种和田间自然诱发抗病性鉴定的试验结果表明,以联合法筛选的抗源,其苗期接种CMV后表现的抗病性与田间抗病性基本一致。这说明CMV在田间占主导地位。在CMV流行年,田间自然诱发鉴定的可信度较高,而对TMV的抗病性鉴定,还以人工接种较为可靠。因此,人工接种TMV后,再自然诱发感染CMV,是联合筛选多抗性抗源的可行方法。

结论与讨论

1. 抗病性鉴定时采用的接种液浓度,CMV的最佳稀释倍数为5—10倍,TMV的范围较广,但以10—40倍为佳。

2. 甜(辣)椒品种抗病性鉴定的最佳接种苗龄是2—5叶期,同时也应考虑接种液浓度,浓度提高时,苗龄应适当加大。

3. 品种(系)抗病性鉴定以先接种CMV,后接种TMV或分别接种CMV或TMV为宜。从大批量试材中筛选双抗性抗源时,以混合接种法较好,既快速又省工,且筛选出的抗源多具有水平抗性。

4. 品种抗病性受温湿度条件影响较大,在适宜的温度范围内品种抗病性才能得到充分表现,过高或过低都影响抗病性鉴定。研究表明,20—25℃为最适范围。湿度对症状类型的表现也有一定影响。

5. 苗期人工接种和田间自然诱发联合鉴定方法是筛选抗源的有效方法,采用这一方法筛选出的抗源,多数兼具垂直抗性和水平抗性。

CMV和TMV接种液浓度试验结果表

毒源	调查项目	接种液浓度					
		5倍	10倍	20倍	40倍	80倍	100倍
CMV	症状	Mal/N	M	M	M	M	—
	病情指数	64.44	44.44	17.76	16.67	7.01	—
	抗病类型变化	S	S	T	T	R	—
TMV	症状	—	M	M	M	M	M
	病情指数	—	37.78	28.80	35.55	26.67	17.28
	抗病类型变化	—	S	S(T)	S	T	T

(参考文献略 收稿时间1990年8月11日邮码130000)