

番茄 TMV、叶霉病、枯萎病苗期多抗性鉴定方法研究

许向阳, 李景富, 孙清芳

(东北农业大学园艺学院 哈尔滨 150030)

摘要: 番茄苗期单一接种和复合接种都能准确地反映出品种的抗病性, 对生产上常见的番茄叶霉病、TMV、枯萎病的最佳鉴定方法如下: 2片真叶接种 TMV, 采用摩擦法接种, 接种量为 1 g 病叶加 0.01 Mph 7.0 的磷酸缓冲液或蒸馏水 10 ml(毫升), 接种后第 3 d(天)复接一次, 接种后 20 d(天)调查病情; 3片真叶接种叶霉病, 采用喷雾法接种, 接种量 10^6 个孢子/ml(毫升), 接种后 18 d(天)调查病情; 4片真叶接种枯萎病, 采用灌根法接种, 接种量 10^7 个孢子/ml(毫升), 接种后 21 d(天)调查病情。

关键词: 番茄 TMV; 枯萎病; 叶霉病

中图分类号: S641.2 S332.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2002)03-0038-03

在生产过程中番茄有多种病害发生, 随着番茄抗病育种工作的不断深入, 单一的接种方法已经不能满足抗病育种工作的需要了。由于番茄苗期的抗病性和成株的抗病性相同, 且苗期鉴定周期短, 速度快, 能够节省大量的人力、物力, 因此番茄苗期抗病性鉴定方法的研究越来越受到人们的重视。

对番茄单一病害的苗期接种鉴定方法已经十分完善, 国内目前对 TMV、叶霉病和枯萎病的同株多抗性鉴定有初步的研究, 其难点在于叶霉病和枯萎病的发病条件差异较大, 尤其对湿度的差异非常明显, 所以通常采用分株单一接种叶霉病和枯萎病, 或用离体叶片接种叶霉病, 在离体叶片接种叶霉病的同时或以后, 再对其幼苗接种 TMV 或枯萎病。目前的番茄抗病育种工作急需番茄常见病害的多抗性鉴定方法来筛选抗源材料。本实验要达到的目的就是番茄 TMV、叶霉病和枯萎病苗期多抗性鉴定方法进行筛选, 已确定最佳的多抗性鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试的 TMV 病毒 东北农业大学园艺学院番茄课题组保存的 TMV1 株系。

1.1.2 供试的枯萎病原菌 东北农业大学园艺学院番茄课题组分离、提纯、鉴定、繁殖的番茄枯萎病生理小种 1。

1.1.3 供试的叶霉病原菌 东北农业大学园艺学院番茄课题组保存的叶霉病的混合小种 1.2.3, 小种 1.3, 和小种 3 而以小种 1.2.3 为主。

1.1.4 供试的番茄品种 不含任何抗病基因的番茄品种早粉 2 号。

1.2 实验方法

1.2.1 病原菌的制备

1.2.1.1 实验用烟草花叶病毒的制备 在当地主栽品种上采集感染 TMV 的病叶, 在斑枯寄主上单斑分离 3~5 次, 经过鉴别寄主谱法鉴定, 确认是 TMV 病毒。然后接种到系统寄主三生烟上繁殖。为了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(番茄早粉 2 号)上复壮一次。

备用。

1.2.1.2 实验用番茄枯萎病原菌的制备 样本采集: 2000 年在东北农业大学园艺试验站番茄保护地生产棚内, 采集 4 份发病植株近地面茎段的样本, 用 PSA 培养基进行分离。组织分离培养: 将近地面部约 3 cm(厘米)的茎蔓标样, 用 70% 酒精擦洗, 进行表面消毒, 再用 0.1% 升汞浸泡 1~2 min(分), 再用无菌水冲洗 3~5 次, 置于无菌滤纸上, 吸干水分, 在无菌操作下, 用刀片先削去茎的外皮, 取中间维管束组织约 2~5 mm(毫米), 剪成数枚小块, 放在铺有 PSA 培养基的培养皿中, 每皿 4 块, 置于 25℃ 恒温中培养 2~3 d(天)后, 当菌落直径长至 2~3 cm(厘米)大时, 镜检各菌落, 以确定目标菌落, 在无菌操作下, 从目标菌落的边缘部分挑取一小块带有菌落的培养基, 接种于 PSA 培养基上, 在上述相同条件下培养。单孢分离: 将分离得到的培养物在无菌条件下, 用无菌水配成孢子悬浮液展平在 PSA 平皿上, 使每个皿中约有 6~8 个孢子, 然后, 按单孢分离的操作程序接种。寄主范围的测定: 为进一步确定该菌株为番茄专化型, 将供试菌株接种到番茄, 辣椒, 黄瓜, 茄子, 花椰菜上, 采用浸根接种法, 接种的孢子浓度为 10^7 个/ml(毫升), 15 d(天)后调查发病率及病情指数。生理小种鉴定: 采用国际上通用的鉴别寄主谱法鉴定, 结果表明该枯萎病原菌为番茄专化型, 生理小种 1。

1.2.1.3 实验用番茄叶霉病原菌的制备 在生产田中采集主要栽培番茄品种上的叶霉病孢子 15 份, 用 PSA 培养基在 22℃~28℃ 的条件下培养。经鉴定后再进行单孢分离, 获得各菌株单孢后代的纯培养, 然后进行生理小种的鉴定。番茄叶霉病生理小种的鉴定采用国际上通用的鉴别寄主谱法。本次实验采用 1.2.3、1.3、3 三个小种的混合物进行鉴定。

1.2.2 实验设计 本实验是在东北农业大学园艺实验站的 3 个塑料中棚中进行, 2000 年 6~9 月进行正式试验。实验采用单因子设计, 一个水平, 3 次重复, 每个处理 15 株。实施方案详见表 1。

1.2.3 实验用苗的准备 将感病品种早粉 2 号的种子先用 0.1% 的升汞溶液浸泡 10 min(分), 然后用清水洗净, 再用 60℃ 的温水浸种 15 min(分), 用清水浸种 12 h(小时)后, 在 25℃~28℃ 恒温箱内催芽, 待胚芽露出后播种在灭菌的营

养土中,当幼苗长到一片真叶的时候移栽到 10 cm(厘米)×10 cm(厘米)的营养钵中。等到 2 片真叶充分展平后进行接种。接种后置于消毒的塑料中棚中。

1.2.4 接种方法

1.2.4.1 TMV 的接种方法 TMV 接种采用磨擦接种。接种浓度为 1 g(克)病毒叶加蒸馏水 10 ml(毫升)。第一次接种 3 d(天)后回接一次,接种后在最适合的时期进行病情调查。

1.2.4.2 枯萎病的接种方法 本次实验采用灌根法,每株灌菌液 10 ml(毫升),菌液孢子浓度为 10⁷ 孢子/ml(毫升)。接种后在最适合的时期进行病情调查。

1.2.4.3 叶霉病的接种方法 将保存菌种经 PSA 培养基培养增殖后,用无菌水配成菌悬液,菌液的浓度为 10⁶ 个孢子/ml(毫升)。用喷雾法将菌液喷于番茄真叶的背面。接种后在最适合的时期进行病情调查。

1.2.5 接种后的管理 由于不同病害要求的最佳发病条件相差很大,所以不同的时期采取不同的温度和湿度管理方法。当接种 TMV 后,白天气温保持在 25 ℃~32 ℃,夜间 18 ℃~20 ℃,空气相对湿度控制在 50%~60%。当接种枯萎病后,白天气温保持在 25 ℃~28 ℃,夜间 20 ℃~22 ℃,相对湿度 50%~70%。当接种叶霉病后,白天气温保持在 25 ℃~30 ℃,夜间 20 ℃~22 ℃,空气相对湿度 85%~100%。所有的时间都采取正常的光照条件。

1.2.6 抗性鉴定的分级标准

1.2.6.1 TMV 抗性分级标准 TMV 单株病情的分级标准:0 级:无任何症状;1 级:明脉,轻花叶;3 级:心叶及中部叶片花叶;5 级:心叶及中部叶片花叶,少数叶片畸形,皱缩或植株轻度矮化;7 级:重花叶,多数叶片畸形,皱缩或植株矮化;9 级:重花叶,畸形,植株明显矮化,甚至死亡。TMV 群体病情

表 1 TMV、叶霉病和枯萎病苗期多抗性鉴定实施方案

处理代号	接种时期	接种方法	接种浓度
A1	2 真叶接 TMV	摩擦法	1:10
	3 真叶接叶霉病	喷雾法	10 ⁶ 孢子/ml
	4 真叶接枯萎病	灌根法	10 ⁷ 孢子/ml
A2	2 真叶接 TMV	同上	同上
	3 真叶接枯萎病		
	4 真叶接叶霉病		
A3	2 真叶接叶霉病	同上	同上
	3 真叶接枯萎病		
	4 真叶接 TMV		
A4	2 真叶接叶霉病	同上	同上
	3 真叶接 TMV		
	4 真叶接枯萎病		
A5	2 真叶接枯萎病	同上	同上
	3 真叶接叶霉病		
	4 真叶接 TMV		
A6	2 真叶接枯萎病	同上	同上
	3 真叶接 TMV		
	4 真叶接叶霉病		
A7	2 真叶接 TMV	同上	同上
A8	2 真叶接枯萎病		
A9	2 真叶接叶霉病		

分级标准:免疫:病情指数为 0 植株不带毒;高抗:0<病情指数<2;抗病:2<病情指数<15;耐病:15<病情指数<30;感

病:病情指数>30。

1.2.6.2 枯萎病的抗性分级标准 枯萎病单株病情分级标准:0 级:无症状;1 级:1 片或 2 片叶子变黄,以致脱落;2 级:1~2 片真叶变黄或全株变黄,叶萎蔫下垂;3 级:全株明显萎蔫或真叶严重变黄,生长受抑制,矮化;4 级:全株严重萎蔫,以致枯死。枯萎病群体病情分级标准:高抗:0<病情指数<10;抗病:10<病情指数<30;感病:病情指数>30。

表 2 TMV、叶霉病和枯萎病苗期多抗性鉴定
各处理的病情指数(重复 1)

苗龄 处理	2 片真叶	3 片真叶	4 片真叶
A1	TMV51.2	叶霉病 56.3	枯萎病 63.7
A2	TMV52.8	枯萎病 64.1	叶霉病 47.6
A3	叶霉病 57.3	枯萎病 60.2	TMV——
A4	叶霉病 57.3	TMV40.6	枯萎病 52.4
A5	枯萎病 64.8	叶霉病 52.7	TMV——
A6	枯萎病 64.3	TMV——	叶霉病——
A7	TMV51.8		
A8	枯萎病 59.9		
A9	叶霉病 54.2		

表 3 TMV、叶霉病和枯萎病苗期多抗性鉴定
各处理的病情指数(重复 2)

苗龄 处理	2 片真叶	3 片真叶	4 片真叶
A1	TMV52.8	叶霉病 54.9	枯萎病 61.3
A2	TMV51.	枯萎病 62.7	叶霉病 50.3
A3	叶霉病 55.2	枯萎病 62.4	TMV——
A4	叶霉病 56.9	TMV43.7	枯萎病 49.5
A5	枯萎病 62.1	叶霉病 51.4	TMV——
A6	枯萎病 61.7	TMV——	叶霉病——
A7	TMV48.5		
A8	枯萎病 63.3		
A9	叶霉病 56.8		

表 4 TMV、叶霉病和枯萎病苗期多抗性鉴定
各处理的病情指数(重复 3)

苗龄 处理	2 片真叶	3 片真叶	4 片真叶
A1	TMV50.8	叶霉病 55.0	枯萎病 62.5
A2	TMV50.3	枯萎病 62.8	叶霉病 40.6
A3	叶霉病 57.0	枯萎病 63.1	TMV——
A4	叶霉病 55.3	TMV43.2	枯萎病 48.4
A5	枯萎病 63.3	叶霉病 51.6	TMV——
A6	枯萎病 64.3	TMV——	叶霉病——
A7	TMV50.6		
A8	枯萎病 63.1		
A9	叶霉病 56.1		

——表示由于发病过重而造成植株死亡或者无法进行准确的病情调查。

1.2.6.3 叶霉病的抗性分级标准 叶霉病单株病情的分级标准:0 级:无症状;1 级:接种叶出现褪绿至黄色病斑;3 级:接种叶病斑上产生少量白色菌丝,无孢子;5 级:接种叶病斑上产生菌丝和孢子;7 级:接种叶病斑上产生大量菌丝和大量

芹菜苗期温度与早期抽苔

鞠 剑 峰

芹菜(*Celery Apium graveolens* Linn Var *dulce* DC)为伞形科植物。属低温性作物,生长适温为 10℃~18℃,但芹菜耐寒性弱、不耐霜冻,在生育期间感受低温、长日照则提早进行花芽分化、抽苔开花。由于提早花芽分化而减少了叶数降低产量;同时,养分中心转移、降低品质和产量,甚至得不到产品。本试验旨在探索苗期温度与芹菜抽苔的关系,以便在生产中尽量避免提早抽苔。

1 试验处理及方法 3月上旬在温室播种箱内播种,3叶期将其中一个播种箱放在温床内,使其感受低温,另一个仍放在温室内使其感受高温。4月下旬定植到大棚,小区面积 1.5 m²(平方米),三次重复、每穴双株。供试品种为天津芹菜。

表 1 芹菜苗期温度调查比较

处理	高温(平均℃)	差值	低温(平均℃)	差值
高温(温室)	23.1	+4.2	9.6	+5.3
低温(温床)	18.9	0	4.3	0

注:高温为中午 12 点测值平均,低温为早 5 点测值平均。

2 试验结果及分析 从表 2 中可以看到,高温处理抽苔率只有 2.56%,而低温处理的提早抽苔率却已达到

21.15%,比苗期高温处理的高 18.59%。芹菜是绿体春化型,苗期满足低温条件后即进行花芽分化,并在以后的长日照条件下抽苔。下面进行抽苔数的方差分析。由表 3 可见,二者之间存在着极显著差异,说明苗期高温处理抽苔数极显著少于低温处理,这个差异是处理效应。

表 2 苗期高低温处理抽苔数调查

处理	平均抽苔数(株)	差值	百分率(%)	差值
高温(温室)	5.33	-38.67	2.56	-18.59
低温(温床)	44.00	0	21.15	0

注:调查株数为每 15 m² 内 208 株。

表 3 芹菜苗期高低温处理抽苔数的方差分析

变异来源	平方和	自由度	方差	F	F _{0.05}	F _{0.01}
品种间	2989.33	1	2989.33	33.904**	7.71	21.20
误差	352.67	4	88.17			
总和	3342	5				

3 结果及讨论 由于芹菜是绿体春化型,多在三叶期后在低温条件下感受低温,通过春化阶段、分化花芽,然后在长日照条件下提早抽苔。芹菜分苗后的温度条件是决定能否提早抽苔的重要因素。在本试验条件下,温床育苗条件下提早抽苔率高,严重影响产量和品质;而在温室条件下则有效地防止了芹菜的提早抽苔。因此生产中,在育苗期间严格避免夜间低温是降低提早抽苔率的有效措施。芹菜育苗以温室为最好,如采用温床育苗,要提高温度,尤其是提高夜间温度。

(黑龙江农业职业技术学院,佳木斯 154007)

孢子,并且菌丝发展到上部叶,但无孢子;9级:接种叶病斑上生有大量孢子。叶霉病群体病情分级标准:免疫(I):不侵染,病情指数为 0;高抗(HR):0<病情指数<5;抗病(R):5<病情指数<15;耐病(T):15<病情指数<30;感病(S):病情指数>30。

2 结果与分析

以上各处理的每种病害的病情指数如表 2、3、4 所示。

对以上数据进行方差分析和 F 检测的结果表明,单一接种和复合接种对鉴定材料的抗病性影响差别不显著,都能在苗期准确地鉴定出材料的抗病性。A3、A5、A6 处理都因一种病害发生严重而影响其他病害的调查,而 A1、A2、A4 处理较理想,但后接枯萎病有利于病害的调查,此外, A4 组合先接种叶霉病,高温高湿的环境不利于 TMV 和枯萎病的发生,因此 A1 处理是最理想的组合。即 2 片真叶接种 TMV,采用摩擦法,接种量为 1 g(克)病叶加 0.01 M、pH7.0 的磷酸缓冲溶液或蒸馏水 10 ml,接种后第 3 d(天)复接一次,接种后 20 d(天)调查病情。3 片真叶接种叶霉病,采用喷雾法,菌液的浓度为 10⁶ 个孢子/ml,接种 18 d(天)后调查病情。4 片真叶接种枯萎病,采用灌根法,菌液孢子浓度为 10⁷ 孢子/ml,接种 21 d(天)后调查病情。

3 讨论

3.1 由于病原菌的致病性是一个复杂的因子,因菌系、接种物的生活力和环境的不同而有差异,所以本实验在每次接种鉴定时都设有感病的对照品种,以保证鉴定结果的准确性。

3.2 病原菌有不同的生理小种(或株系),它们分布的地域不

一,因此要根据当地生理小种(或株系)分布情况来确定研究目标。

3.3 为了能真实反映材料的抗性水平,要选择适宜的病原菌浓度和苗龄。

3.4 根据不同病害对环境要求的不同,采取阶段化的温度管理来满足不同病害的要求。

3.5 在番茄生产中,往往有几种不同病害同时侵染,关于不同病害之间相互作用有待于进一步研究。

4 结论

番茄 TMV, 叶霉病和枯萎病苗期多抗性鉴定的最佳组合为:2 片真叶接种 TMV, 采用摩擦法, 接种量为 1 g(克)病叶加 0.01 M、pH7.0 的磷酸缓冲溶液或蒸馏水 10 ml 接种后第 3 d(天)复接一次, 接种后 20 d(天)调查病情;3 片真叶接种叶霉病, 采用喷雾法, 菌液的浓度为 10⁶ 个孢子/ml, 接种 18 d(天)后调查病情;4 片真叶接种枯萎病, 采用灌根法, 菌液孢子浓度为 10⁷ 个孢子/ml, 接种 21 d(天)后调查病情。

参考文献

- [1] 陈卫东. 番茄病研究初报[J]. 华中农学院学报, 1982.
- [2] 裴维潘. 植物病毒学[M]. 农业出版社, 1982.
- [3] 张环. 北京主要菜区番茄叶霉病菌寄生性分化初步研究[J]. 中国蔬菜, 1992(2).
- [4] 吴国顺. 日本对几种蔬菜病害抗病性鉴定方法的研究[J]. 中国蔬菜, 1994(1).
- [5] 张文淑等. 番茄种质资源对晚疫病和病毒病的抗性鉴定[J]. 作物品种资源, 1987. 3.