

doi:10.11937/bfyy.20174655

番茄早疫病抗性材料的苗期接种鉴定

尚春明, 高振江, 李秀华, 高 娃, 王亮明, 姚慧静

(包头市农业科学研究所, 内蒙古 包头 014013)

摘 要:以番茄品种‘1501 黄’为试材, 采用喷雾接种法, 研究了 4 株茄链格孢菌 (*Alternaria solani*) 的致病性和分生孢子适宜接种浓度, 于番茄苗期接种鉴定其抗性水平, 以期番茄早疫病的抗病育种提供依据。结果表明: GY7 和 GY9 为番茄早疫病致病菌株, 适宜接种浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$; 分生孢子形态各异, 倒棍棒至长椭圆形, 0~7 个横隔膜, 0~3 个纵隔膜, 大小多在 $(60 \sim 150) \mu\text{m} \times (15 \sim 30) \mu\text{m}$, 具喙, 喙宽约 $5 \mu\text{m}$; 供试 15 份番茄材料中有 9 份属于早疫病抗性材料, 3 份中抗材料, 3 份中度感早疫病材料。

关键词:番茄早疫病; 分生孢子; 接种鉴定; 抗性材料

中图分类号: S 436.412.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2018)14-0001-05

番茄早疫病又称轮纹病, 是由茄链格孢菌 (*Alternaria solani*) 所致的一种常发病害, 也是一种世界性病害。除危害番茄外, 还可危害茄子、辣椒和马铃薯等茄科作物^[1-3]。在美国、澳大利亚、以色列等地发病率均很高, 严重时可使产量损失 35%~78%^[4]。蔬菜和马铃薯是包头地区的主导产业, 每年 7—8 月因气候条件适宜早疫病发生及流行, 给当地茄科作物生产带来极大损失。

抗病育种是解决早疫病的有效途径, 研究表明苗期接种鉴定可真实反映材料抗性水平, 之后将筛选出的抗性材料运用到抗病育种中, 因此材料抗性水平的接种鉴定是抗病育种的重要环节^[5-7]。

该研究以番茄品种‘1501 黄’为试材, 采用喷雾接种法, 研究 4 株茄链格孢菌的致病性和分生孢子适宜接种浓度, 于番茄苗期接种鉴定供试

番茄材料的抗病性, 以期番茄早疫病的抗病育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试茄链格孢菌 (*Alternaria solani*) GY6、GY7、GY8、GY9, 由中国农业大学植物病理系惠赠。供试番茄材料的来源及背景见表 1。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 自来水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 菌落培养特性和形态学观察

用直径 5 mm 的打孔器在菌落边缘打取一圈菌饼, 挑针挑取菌饼接种于新的 PDA 平皿, 28 ℃ 恒温黑暗培养 3~7 d。肉眼观察菌落颜色、形态、气生菌丝特点, OLYMPUS CX31 显微镜下观察病原菌的形态结构。4~10 d 后显微镜下观察分生孢子形态, 测量分生孢子的大小, 包括长、宽、横纵隔膜数、孢子颜色、喙长等。参考张天宇^[8]和孙霞^[9]对链格孢的特征描述进行鉴定。

1.2.2 致病性测定

试验于 2017 年 7 月 15 日在包头市农业科学研究所智能温室内进行, 50 孔穴盘内播种番茄材

第一作者简介: 尚春明 (1960-), 男, 本科, 研究员, 现主要从事番茄育种等研究工作。E-mail: qingqing841124@163.com.

责任作者: 高振江 (1964-), 男, 本科, 研究员, 现主要从事植物保护等研究工作。E-mail: 13314861886@126.com.

基金项目: 内蒙古自治区科学技术厅资助项目 (201602033)。

收稿日期: 2018-02-23

料‘1501黄’,育苗基质为草炭:蛭石按照3:1混合而成。于番茄4叶期时,分别喷雾接种GY6、GY7、GY8和GY9的分生孢子悬浮液,分生孢子浓度为 1×10^5 个 \cdot mL $^{-1}$ 。每处理一个穴盘,3次重复,遮阴保湿(RH=100%)48 h后常规管理,1周后调查发病率和病情指数。为确定适宜的接种浓度,将其中具有致病力菌株的分生孢子浓度调至 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个 \cdot mL $^{-1}$ 3种浓度,喷雾接种,每处理25株,3次重复,保湿(RH=100%)48 h后常规管理,环境温度为20~30℃。1周后调查发病率和病情指数。发病率(%)=发病叶片数/调查叶片数 \times 100。病情指数(%)=

$$\frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级别代表值}} \times 100。$$

1.2.3 抗病性接种鉴定

试验于2017年7月9日在包头市农业科学研究所智能温室内进行,50孔穴盘内育苗,共计15份番茄材料,每份材料播种25穴,每穴2粒种子,3次重复。7月19日出苗完毕,7月23日间苗,每穴一苗。于番茄4叶期时喷雾接种适宜浓度的分生孢子悬浮液。保湿(RH=100%)48 h后常规管理。此期环境温度为20~32℃。接种1周后,逐叶按0~4级标准^[10]调查发病率和病情指数。病情分级方法,0级:叶片上无病斑;1级:病斑面积占羽状叶的1/4以下;2级:病斑面积占羽状叶的1/4~1/2;3级:病斑面积占羽状叶的1/2~3/4,近一半小叶枯死;4级:病斑面积占羽

状叶的3/4以上,一半以上或全部小叶枯死。

抗病性评价标准参照相关文献^[10],依据番茄幼苗实际发病情况调整为:免疫(I):病情指数为0;抗病(R):病情指数在0.1~20.0;中抗(MR):病情指数在20.1~30.0;中感(MS):病情指数在30.1~40.0;感病(S):病情指数在40.1~60.0;高感(HS):病情指数在60.1以上。

1.3 数据分析

利用Excel 2007软件整理数据,利用SPSS软件新复极差法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 菌落培养特性和形态学观察

番茄早疫病菌在PDA培养基上于28℃恒温黑暗条件下培养,气生菌丝生长快、发达,约7 d长满9 cm的平皿,新生气生菌丝灰白色,随培养时间的延长,菌落颜色由浅绿逐渐呈灰绿、灰褐色,培养至10 d后菌落呈黑褐色。显微镜下观察可观察到气生菌丝有隔膜和分支,新生菌丝比老菌丝略细。分生孢子梗较菌丝颜色深而短,可分叉,有隔膜,大小(50~90) μ m \times (6~12) μ m。一般培养到4 d后可通过显微镜观察到孢子。分生孢子由孢子梗顶端产生,单生,淡黄色至黄褐色,其形态各异,倒棍棒至长椭圆形,0~7个横隔膜,0~3个纵隔膜,大小多在(60~150) μ m \times (15~30) μ m,具喙,喙宽约5 μ m。

2.2 致病性测定

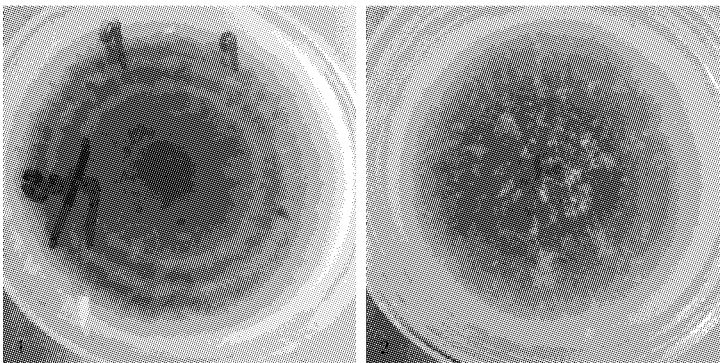
将GY6、GY7、GY8和GY9的分生孢子悬浮液喷雾接种于4叶期番茄材料‘1501黄’3 d后,GY7和GY9处理均出现水渍状暗褐色病斑,1周后小病斑逐渐扩大为具同心轮纹的不规则形或近圆形,边缘多呈浅绿色或黄色。依据柯赫氏法则,对发病组织进行再分离培养,得到了与原接种菌培养特性和形态特征一致的分离菌,证明表现病害确为番茄早疫病,GY7和GY9菌株具有较强的致病性,而GY6和GY8属非致病菌。

将GY9的分生孢子浓度调至 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个 \cdot mL $^{-1}$ 3种浓度喷雾接种,结果如表2所示,随接种浓度增大,番茄幼苗的发病率和病情指数也随之增大,且处理间差异显著。因此接种浓度影响番茄材料的抗病性评价。为保证

表1 材料来源与背景

Table 1 Source and background of materials

材料 Material	来源 Source	背景 Background
‘2177-03-14-20-01++’	荷兰	系选高代
‘403’	荷兰	系选高代
‘326-11-101’	天津农科院	白果强丰
‘906’	美国	杂一代父本
‘7120’	以色列	杂一代后代系选高代
‘V20’	以色列	杂一代后代系选高代
‘87(906-01-01-06-021’	美国	系选高代
‘773-10-24-06TY++’	荷兰	系选高代
‘PLWS-12-09’	荷兰	分离后代
‘1501黄’	山西大黄156	常规品种
‘2177-001-08-03’	日本	系选高代
‘♀24-18’	日本	复合杂交后代分离系
‘好韦斯906亲本’	美国	杂一代后代系选
‘701-32-01♀’	中国农科院	中杂9号
‘韩3♂’	韩国	系选高代



注:1. 培养 7 d 菌落背面;2. 培养 7 d 菌落正面。
Note:1. The back of bacterial colony on the 7 days;2. The front of bacterial colony on the 7 days.

图 1 番茄早疫病菌培养特性
Fig. 1 Culture characteristics of *Alternaria solani*

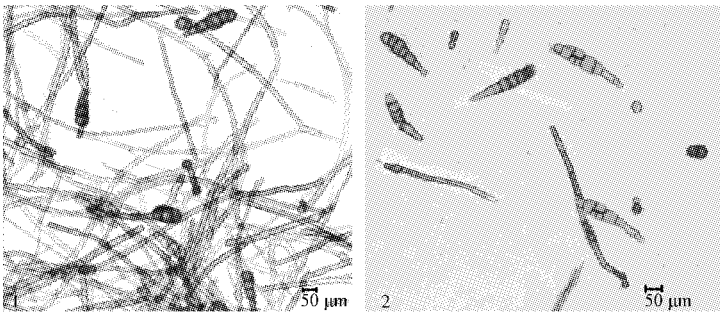


图 2 番茄早疫病菌分生孢子形态
Fig. 2 Morphologic characteristics of conidia of *Alternaria solani*

后续定植试验的顺利完成,在此选择孢子浓度为 1×10^6 个 \cdot mL $^{-1}$,相应发病率为 89.67%,病情指数为 31.42。

表 2 不同接种浓度对番茄幼苗的致病性
Table 2 Pathogenicity of different inoculation concentration of conidia on tomato seedlings

接种孢子浓度 Inoculated spores concentration /(个 \cdot mL $^{-1}$)	发病率 Morbidity /%	病情指数 Disease index
1×10^5	64.67c	20.25c
1×10^6	89.67b	31.42b
1×10^7	99.67a	41.92a

注:不同小写字母表示 0.05 水平显著。下同。
Note: Values with different lowercase letters show significantly different at 0.05 level. The same below.

2.3 抗病性接种鉴定

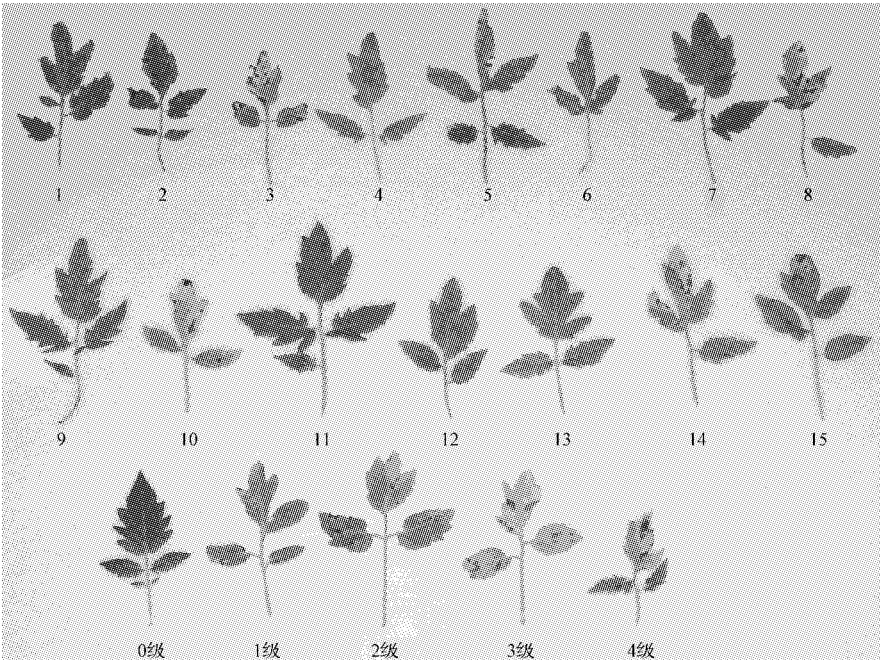
15 份番茄材料苗期早疫病接种鉴定情况如

表 3 所示,可以得出不同材料间早疫病抗性差异显著。就发病率而言,‘326-11-101’ ‘773-10-24-06TY++’和‘韩 3♂’显著高于其它材料,‘2177-001-08-03’ ‘♀ 24-18’和‘好韦斯 906 亲本’发病率显著低于其它材料。对于病情指数,‘326-11-101’的病情指数达到 38.75%,显著高于其它材料,其抗病性评价相应为中度感早疫病;‘773-10-24-06TY++’ ‘1501 黄’ ‘701-32-01♀’和‘韩 3♂’的病情指数其次,其中‘701-32-01♀’ ‘韩 3♂’依据病情指数二者均对早疫病具有中度抗性,‘773-10-24-06TY++’和‘1501 黄’的抗病性评价为中度感早疫病;材料‘403’的病情指数为 25.58,属于中抗水平。其余 9 份番茄材料均为早疫病抗性材料。图 3 为 15 份番茄材料苗期接种发病情况,各材料所示均为材料内典型发病程度的叶片,可直观看出各材料间的早疫病抗性差异。

表 3 不同番茄材料抗病性接种鉴定

Table 3 Inoculation identification of tomato germplasm resistance to early blight at seedling stage

序号 Serial number	材料 Material	发病率 Morbidity/%	病情指数 Disease index	评价 Evaluation
1	‘2177-03-14-20-01++’	23.33e	7.08e	R
2	‘403’	90.33c	25.58c	MR
3	‘326-11-101’	95.67a	38.75a	MS
4	‘906’	18.00f	4.50f	R
5	‘7120’	17.33f	4.33f	R
6	‘V20’	59.00d	14.75d	R
7	‘87(906-01-01-06-021’	8.67g	2.17fg	R
8	‘773-10-24-06TY++’	97.67a	31.92b	MS
9	‘PLWS-12-09’	7.00gh	1.75g	R
10	‘1501 黄’	91.33bc	32.08b	MS
11	‘2177-001-08-03’	4.33h	1.08g	R
12	‘♀24-18’	4.67h	1.17g	R
13	‘好韦斯 906 亲本’	4.33h	1.08g	R
14	‘701-32-01♀’	94.67ab	30.00b	MR
15	‘韩 3♂’	97.00a	29.92b	MR



注:图中各序号所代表材料与表 3 相同。

Note: The material represented in the sequence of the graph is the same as that of Table 3.

图 3 15 份番茄材料早疫病抗性接种情况

Fig. 3 Inoculation identification of 15 tomato germplasms resistance to early blight at seedling stage

3 结论与讨论

该试验研究了现有 4 株茄链格孢菌(*Alternaria solani*)的致病性,分生孢子适接种浓度,并利用喷雾接种法在番茄苗期进行接种鉴定,结

果表明,供试 15 份番茄材料中有 9 份属于早疫病抗性材料,3 份中抗材料,3 份中度感早疫病材料。

分生孢子是番茄早疫病菌的可靠接种形式,在材料的抗病性鉴定中所需孢子量大,但该病原菌在一般人工培养基上不易产孢,培养基类型、光

照和培养温度以及培养时间等均对产孢有较大影响^[2-3,5,11],为此课题组经过大量试验,摸索出一套简单易行方法:选用 PDA 培养基,在活化有茄链格孢菌的平板生长 3~5 d 后,用直径 5 mm 的打孔器在菌落边缘打取一圈圆形,接种于新的 PDA 培养基平板,28 ℃ 恒温黑暗培养 7 d 至菌丝覆盖培养皿后,倒入约 500 μL 的无菌水,将气生菌丝刮除,28 ℃ 恒温黑暗培养 3 d,可镜检到大量分生孢子,刮取制成孢子悬浮液,将这些平板在相同条件下继续培养 3 d 后又可获得大量孢子,即实现扩繁一批菌种,至少得到供 2 次接种鉴定的分生孢子量。RODRIGUES 等^[12]指出菌丝损伤是诱导 *A. solani* 产孢的初始刺激,菌丝损伤可抑制 *A. solani* 气生菌丝的营养生长^[13],使其转为生殖生长,且其气生菌丝能产生抑制分生孢子产生的物质^[14]。

参考文献

- [1] 邵玉琴,吕佩珂. 番茄早疫病发生、流行与生态因子关系的研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版),1993,24(2):208-211.
- [2] 吴仁峰,汪志红. 番茄早疫病研究概述[J]. 中国植保导刊,2009,29(3):16-18.
- [3] 王彦杰,刘守伟,李景富. 番茄抗早疫病育种研究进展[J]. 东北农业大学学报,2004,35(5):616-621.
- [4] VLOUTOGLOU, KALOGERAKIS S N. Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants[J]. Plant Pathology, 2000, 49: 339-345.
- [5] 张绍松,宋令荣,杨家奎. 番茄早疫病病原菌的生物学特性[J]. 云南农业科技,1994(3):13-15.
- [6] 张子君,邹庆道,李海涛. 番茄早疫病抗病性鉴定研究[J]. 北方园艺,2005(1):53-55.
- [7] 张振粉,杨成德,陈秀蓉. 甘肃省番茄早疫病菌致病力测定及品种田间抗病性鉴定[J]. 甘肃农业大学学报,2010,45(6):114-117.
- [8] 张天宇. 中国真菌志(第十六卷)链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [9] 孙霞. 链格孢属真菌现代分类方法研究[D]. 泰安:山东农业大学,2006.
- [10] 王发科,郑贵斌. 番茄早疫病抗病性鉴定方法[J]. 植物病理学报,1992(2):168.
- [11] 刘丽丽,朱杰华,崔亚婧,等. 培养条件对茄链格孢产孢的影响[J]. 菌物学报,2014,33(3):659-667.
- [12] RODRIGUES T T M S, LUIZ A, MAFFIA L A, et al. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*[J]. Tropical Plant Pathology, 2010, 35(4):203-212.
- [13] 朱宗源,黄晓敏,吕云华. 诱导茄链格孢分生孢子形成的新技术[J]. 菌物学报,1985,4(3):180-184.
- [14] LUKENS R J, HORSFALL J G. Glycolate oxidase, a target for antisporulants[J]. Phytopathology, 1968, 58(12):1671-1676.

Inoculation Identification of Tomato Germplasm Resistance to Early Blight at Seedling Stage

SHANG Chunming, GAO Zhenjiang, LI Xiuhua, GAO Wa, WANG Liangming, YAO Huijing
(Institute of Agricultural Sciences of Baotou, Baotou, Inner Mongolia 014013)

Abstract: The tomato variety ‘Huang 1501’ was used as material, the pathogenicity of 4 strains of *Alternaria solani*, appropriate inoculum concentration of conidia and inoculation identification of tomato germplasm were studied at seedling stage by spraying inoculation in order to provide basis for disease resistance breeding of tomato early blight. The results showed that GY7 and GY9 were the pathogens of tomato early blight, and the suitable inoculation concentration was 1×10^6 spores $\cdot \text{mL}^{-1}$. Conidia vary in shape, from the rod to the long oval. Every conidia possessed 0—3 vertical diaphragm(s) and 0—7 diaphragms. The size of conidia were ranged by $(60-150) \mu\text{m} \times (15-30) \mu\text{m}$ and the beak width of conidia were about $5 \mu\text{m}$. Inoculation identification showed that there were 9 resistant germplasm, 3 moderately resistant germplasms and 3 moderately susceptible germplasms.

Keywords: tomato early blight; conidiospore; inoculation identification; resistant germplasm

doi:10.11937/bfyy.20180325

黄瓜霜霉菌对氟吗啉的抗药性风险研究

付璐¹, 付涵¹, 张星哲², 张笛¹, 张奥¹, 张艳菊¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 牡丹江分院, 黑龙江 牡丹江 157041)

摘要: 丙烯酰胺类杀菌剂氟吗啉具有高效环保、对作物及人畜安全、农用成本低等优点, 在生产中广泛使用。为明确黄瓜霜霉菌对氟吗啉的抗药性, 采用离体叶盘漂浮法测定了我国广东省、湖北省、江苏省、山东省、北京、辽宁省、吉林省和黑龙江省 8 个省份 13 个黄瓜主产区 69 个黄瓜霜霉菌菌株对氟吗啉的敏感性及其抗性水平。结果表明: 黄瓜霜霉菌对氟吗啉的 EC_{50} 为 $0.217\ 2\sim 2.464\ 3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, EC_{50} 平均值为 $0.728\ 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。供试的 69 个菌株中有 2 个敏感菌株、60 个低抗菌株和 7 个中抗菌株, 无高抗菌株。除山东省的供试菌株对氟吗啉的抗性风险较高以外, 其余省份对氟吗啉抗性风险相对较低。总体来说, 黄瓜霜霉菌对氟吗啉尚处于低抗阶段。

关键词: 黄瓜霜霉菌; 氟吗啉; 抗药性

中图分类号: S 436.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2018)14-0006-07

黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.) 是继番茄、卷心菜和洋葱之后的第四大种植蔬菜, 大多数种植于温带和热带地区^[1-2]。我国是黄瓜次生起源地之一, 拥有丰富的黄瓜种质资源, 但病害对其生产造成了极其严重的威胁^[3-4]。其中由藻界卵菌纲古巴假霜霉菌 (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov.) 侵染引起的黄瓜霜霉病是黄瓜生产中的高发病害, 也是黄瓜生产上的一种毁灭性病害。防治黄瓜霜霉病的方法中化学防治具有快速高效、使用方法简便等优点^[5]。化学药剂氟吗啉 (flumorph, SYP-L190) 为丙烯酰胺类杀菌剂, 是我国第一个具有自主知识产权且已

商品化的新型杀菌剂, 也是第一个获得中国发明专利和美国发明专利的新农药品种, 主要用于防治由霜霉属、假霜霉属、疫霉属等卵菌纲病菌侵染引起的植物病害, 具有高效、低毒、兼具治疗与保护活性、增产效果显著等特点^[6]。

植物病原菌对常年使用的高效内吸杀菌剂普遍产生了不同程度的抗药性。*P. cubensis* 被国际杀菌剂抗性委员会 (FRAC) 认为是世界上抗性风险较高的 10 个病菌之一^[7]。由于氟吗啉具有非常强的选择性和位点专一性, 在使用中可能会导致病原菌对其产生抗药性。朱书生^[8]建立了黄瓜霜霉菌对氟吗啉的敏感基线, 通过室内及田间抗药性风险评估表明黄瓜霜霉菌抗药性突变体表现出和敏感菌株相似或更强的竞争力, 预示田间自然情况下抗药性菌株存在着可能形成优势菌群而导致药剂防治失败的潜在风险。同年, 黄进^[9]通过室内和大棚抗性诱导方法研究黄瓜霜霉菌对氟吗啉的抗性情况的结果表明, 田间黄瓜霜霉菌对氟吗啉的抗性水平尚处于低抗阶段, 室内黄瓜霜霉菌对氟吗啉的抗性略有上升, 但上升速度很缓慢。卢晓红等^[10]研究发现黄瓜霜霉菌对氟吗啉具有一定的抗性风险。ZHU 等^[11]的研究表明药

第一作者简介: 付璐 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物病原生物学。E-mail: 1210226570@qq.com.

责任作者: 张艳菊 (1968-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物病原生物学及有害生物综合治理等研究工作。E-mail: zhangyanju1968@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31171792); 黑龙江省自然科学基金重点资助项目 (ZD2016003); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划资助项目 (UN-PYSCT-2016146)。

收稿日期: 2018-03-28