

大蒜叶枯病抗性鉴定方法的筛选

程晓兰 程智慧* * 邹燕 牛青

西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌, 712100

摘要 为了建立大蒜叶枯病抗性鉴定的方法, 根据田间调查结果选取对大蒜叶枯病不同抗性的3个品种G087、G064、G039作为鉴别品种, 对病菌离体接种鉴定中不同孢子悬浮液浓度、病菌接种部位、接种后不同培养温度、不同株龄接种, 以及活体接种方法进行了比较和筛选。结果表明: 采用4~5叶期大蒜的离体叶片, 叶面或叶背接种, 接种病菌孢子悬浮液浓度 10^6 个/mL, 接种后置于21℃温度条件下培养7d, 统计病情指数和品种抗性类型, 鉴定结果与品种的抗病水平一致; 离体接种鉴定比活体接种法更简便、快速; 离体和活体鉴定结果均与品种田间抗病性一致, 可作为大蒜品种资源叶枯病抗性鉴定技术。

关键词 大蒜叶枯病; 抗性; 活体鉴定; 离体鉴定

中图法分类号 S 432.2⁺1; S 436.33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0026-05

大蒜叶枯病 (garlic tip blight) 是真菌性病害, 有性阶段病原菌为枯叶格孢腔菌 *Pleospora* (子囊菌亚门), 无性阶段为匍柄霉 *Stemphylium* (半知菌亚门), 并以无性阶段侵染为主。由于耕作制度和栽培生态环境的不断变化, 大蒜病害呈不断上升趋势, 尤其是大蒜叶枯病, 常常大面积发生, 造成严重的经济损失^[1-2]。

选育和利用抗病品种是防治大蒜叶枯病的一项重要措施, 但目前国内外尚未见关于大蒜叶枯病抗病性鉴定方法的研究报道。笔者根据田间调查情况选择有代表性的3个品种分别进行离体接种 (不同孢子悬浮液浓度、不同温度、不同部位、不同株龄) 和活体接种进行抗病性鉴定^[3-4], 旨在建立一套既简便, 又能准确反映大蒜叶枯病抗病性的离体接种鉴定方法, 为大蒜叶枯病的有效防治和栽培品种的选择提供科学依据。

材料与方 法

供试材料

鉴定品种为西北农林科技大学大蒜品种资源课题组收集保存, 根据对田间大蒜品种资源调查结果筛选出并对大蒜叶枯病具不同抗性的3个大蒜代表品种, 其中 G087、G064、G039 分别为抗病、中抗和

感病品种。

供试菌种为笔者所在课题组从陕西杨凌大蒜田间分离纯化并鉴定保存的大蒜叶枯病菌。

试验方法

采用活体和离体接种2种方法对3个大蒜品种进行抗性鉴定。活体接种采用非伤口接种法即孢子悬浮液喷洒法和伤口接种法; 离体接种采用不同浓度 (孢子数 10^5 、 10^6 、 10^7 个/mL) 的叶枯病菌孢子悬浮液、不同的温度 (18℃、21℃、24℃)、不同的部位 (叶面和叶背)、不同的株龄 (2~3叶期、4叶期、5叶期)^[5-8]。

1) 孢子悬浮液的配制。将大蒜叶枯病菌种接种到直径9cm培养皿的PDA培养基上进行扩繁, 置于光照培养箱中, 温度21℃下培养, 待菌丝长满整个培养皿时用黑布包起来, 大约10d时取出, 在无菌条件下向培养皿里加入无菌水, 用毛笔刷孢子, 用血球计数板计数配成叶枯病菌孢子悬浮液。

2) 大蒜接种苗的种植。将大蒜种瓣用40%甲醛300倍液浸泡消毒3h, 用清水冲洗15min, 然后种植于装有用敌克松进行灭菌后的土壤营养钵中, 置于温室培养。

3) 活体接种方法。参考方中达的方法进行^[9]。

孢子悬浮液喷洒法: 在已灭菌的容积为100mL

收稿日期: 2009-04-22; 修回日期: 2009-08-08

* 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD07B02) 和国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903018-7) 资助

* * 通讯作者, E-mail: chengzh @nwsuaf.edu.cn

程晓兰, 女, 1980年生, 硕士研究生。研究方向: 园艺植物种质资源生理生态。E-mail: lanlan594 @163.com

喷雾里加入浓度为 10^6 个/mL 的叶枯病菌孢子悬浮液(孢子悬浮液中滴 1 滴 Tween 20 以助于吸附),将孢子悬浮液接种于 3 个品种的植株上(每个植株约接种 1 mL)。每个处理设 3 次重复,以喷无菌水为对照。接种后放置在暗处 24 h 并保湿使孢子萌发,之后使其在温度 21 左右的环境条件下自然发病。

伤口接种法:用已灭菌的小刀在大蒜叶中部垂直于叶脉处割 1 个长约 0.5 cm 的小伤口,然后滴 1 滴浓度为 10^6 个/mL 的叶枯病菌孢子悬浮液。每个处理设 3 次重复,设割伤处滴 1 滴无菌水为对照。之后的处理方法参照孢子悬浮液喷洒法。根据离体接种预试验结果,叶中部打孔所得叶圆片接种后变化较明显,所以本试验活体接种法中伤口接种选在叶中部进行,离体接种的叶段也取自叶中部。

活体鉴定大蒜叶枯病分级标准^[10]:0 级,无病;1 级,叶片上有零星病斑或叶尖干枯面积占整片叶的 5% 以下;3 级,病斑面积占整片叶的 6%~25%;5 级,病斑面积占整片叶的 26%~50%;7 级,病斑面积占整片叶的 51%~75%;9 级,病斑面积占整片叶的 76% 以上。

采用计算病情指数定量评价其抗病性,并依据病情指数大小,将抗性水平分为免疫(I)、高抗(HR)、抗病(R)、中抗(MR)、感病(S)、高感(HS) 6 个级别:免疫(I),病情指数为 0;高抗(HR),病情指数为 1~10;抗病(R),病情指数为 10.1~20;中抗(MR),病情指数为 20.1~30;感病(S),病情指数为 30.1~40;高感(HS),病情指数为 40.1 以上。

4) 离体接种适宜大蒜叶枯病菌孢子悬浮液浓度的确定。在直径为 9 cm 的培养皿里垫 1 层滤纸,加入 3 mL 的 10 mg/kg 的激动素溶液作培养介质兼防绿保衰,将镜检确定无叶枯病菌孢子的健康大蒜嫩叶洗净后吸干表面水分,用已灭菌的剪刀剪成约 1 cm 的叶段移入培养皿中,用血球计数板计数,配成浓度分别为 10^5 个/mL、 10^6 个/mL、 10^7 个/mL 的叶枯病菌孢子悬浮液,用移液枪均匀地给每个叶段加 0.05 mL,每个培养皿接种 20 个叶段,设 3 个重复,对照每个叶段加 0.05 mL 无菌水,用封口膜将培养皿封严,在 21、3 000 lx(12 h/d) 的培养箱中培养,7 d 后调查发病情况,并计算病情指数^[11],筛选最佳叶枯病菌孢子悬浮液浓度。

离体鉴定大蒜叶枯病分级标准^[12]:0 级,叶片绿色;1 级,叶片褪绿;3 级,叶片轻黄,黄色面积大

于等于 1/3 小于 2/3 全叶面积;5 级,叶片黄色,黄色面积大于等于全叶面积的 2/3;7 级,叶片黄褐或青褐色。

$$\text{病情指数} = \frac{\text{各级病叶数} \times \text{相应级别}}{\text{调查总叶数} \times \text{最高病级}} \times 100$$

5) 离体接种后适宜培养温度的确定。按本文“1.2”中 4) 的方法,接种叶枯病菌孢子悬浮液的浓度为 10^6 个/mL,接种后放置于 18、21、24 条件下培养,7 d 后调查病情指数,筛选最佳培养温度。

6) 离体接种适宜部位的确定。按本文“1.2”中 4) 的方法,接种大蒜叶枯病菌孢子悬浮液浓度为 10^6 个/mL,分为叶面接种和叶背接种 2 种方法。叶面接种时叶正面朝上放置于培养皿中,叶背接种时叶背面朝上放置于培养皿中。接种后置于 21 条件下培养,7 d 后调查病情指数,筛选最佳接种部位。

7) 离体接种后适宜株龄的确定。按本文“1.2”中 4) 的方法,接种大蒜叶枯病菌孢子悬浮液浓度为 10^6 个/mL,分别于大蒜品种处于 2~3 叶期、4 叶期、5 叶期的时候接种。接种后置于 21 条件下培养,7 d 后调查病情指数,筛选最佳接种株龄。

结果与分析

叶枯病菌活体接种的抗性鉴定

在接种 8~10 d 后,用目测法观察并记载 3 个大蒜品种各供试叶片上的发病程度,然后每隔 7 d 调查 1 次,连续调查 3 次(表 1)。

试验结果表明,活体接种采用的非伤口接种法,即孢子悬浮液喷洒法和伤口接种法,在植株接种 8 d 后都有发病症状,可见该病菌孢子主要通过自然孔口、伤口侵染大蒜植株。

相关性分析结果表明,G087 大蒜品种 2 种接种方法的相关系数为 0.993,G064 大蒜品种 2 种接种方法的相关系数为 0.962,G039 大蒜品种 2 种接种方法的相关系数为 0.979,而且差异都不显著($P > 0.05$)。这说明 2 种接种方法都可以对大蒜叶枯病抗性进行鉴定,且鉴定结果基本一致。

不同浓度孢子悬浮液离体接种的抗性鉴定

本试验中 3 个大蒜品种接种不同浓度叶枯病菌孢子悬浮液离体鉴定结果可以看出,当接种叶枯病菌孢子浓度 10^5 个/mL 时 3 个品种病情指数都低,不能客观反映品种间的抗病性差异;当浓度为 10^7 个/mL 时,抗病品种 G087 病情指数比感

表 1 不同抗性大蒜品种叶枯病抗性活体接种鉴定结果评价¹⁾

Table 1 Evaluation on the resistant level of different resistant garlic cultivars in vivo test

品种 Cultivar	接种方法 Methods of inoculation	接种后 8 d 8 d after inoculation		接种后 15 d 15 d after inoculation		接种后 22 d 22 d after inoculation		接种后 29 d 29 d after inoculation	
G087	伤口 Wounded	3.1	HR	6.9	HR	7.8	HR	13.0	R
	喷洒 Spraying	1.4	HR	6.5	HR	6.9	HR	11.9	R
G064	伤口 Wounded	6.9	HR	10.8	R	23.7	MR	23.8	MR
	喷洒 Spraying	2.3	HR	13.2	R	26.1	MR	23.0	MR
G039	伤口 Wounded	13.9	R	15.6	R	18.5	R	31.5	S
	喷洒 Spraying	5.6	HR	8.9	HR	11.1	R	18.5	R

1) . 病情指数 Disease index; . 反应型 Reaction type.

病品种 G039 病情指数还高,这与田间调查结果不一致。只有接种浓度为 10^6 个/mL 时,3 个不同抗性大蒜品种的病情指数结果与田间调查结果基本一致(表 2)。

表 2 孢子悬浮液离体接种后大蒜的病情指数和反应型

Table 2 Disease index and cultivar reaction type of garlic cultivars with different concentration of spore suspension inoculation in vitro

品种 Cultivar	10^5 /mL	10^6 /mL	10^7 /mL
G087	13.1(R)	18.6(R)	35.2(S)
G064	14.0(R)	20.4(MR)	24.3(MR)
G039	14.3(R)	33.8(S)	33.1(S)

不同温度离体接种孢子悬浮液的抗性鉴定

在不同温度下离体鉴定大蒜叶枯病抗性结果表明,18 时病情指数偏低;24 病情指数偏高,抗病品种 G087 病情指数比其他 2 个品种还高,这与田间调查结果不一致。18 和 24 下的病情指数结果难以反映 3 个品种的抗病性差异,但 21 下病情指数与田间调查结果基本一致,所以 21 是离体接种适合的培养温度(表 3)。

表 3 不同温度下离体接种后大蒜的病情指数和反应型

Table 3 Disease index and reaction type of garlic cultivars with different culture temperature inoculation in vitro

品种 Cultivar	18	21	24
G087	15.2(R)	17.1(R)	42.1(HS)
G064	19.5(R)	28.6(MR)	30.5(S)
G039	26.0(MR)	31.4(S)	42.1(HS)

不同部位离体接种孢子悬浮液的抗性鉴定

由 3 个大蒜品种叶枯病离体鉴定结果可知,采用叶面接种和叶背接种都能如实反映不同品种对叶枯病的抗感性。

统计分析结果表明,同一品种采用叶面接种和叶背接种,发病情况和抗感类型无显著性差异($P > 0.05$),说明叶面接种和叶背接种均适于大蒜叶枯病抗性鉴定(表 4)。

表 4 不同部位离体接种后大蒜的病情指数和反应型

Table 4 Disease index and cultivar reaction type of garlic cultivars with different inoculation position in vitro

品种 Cultivar	叶面接种 Inoculation on leaf face	叶背接种 Inoculation on leaf back
G087	16.4(R)	13.5(R)
G064	26.4(MR)	22.4(MR)
G039	32.9(S)	32.3(S)

不同株龄离体接种的抗性鉴定

本试验中 3 个大蒜品种 3 个时期叶枯病离体鉴定结果表明,2~3 叶期鉴定结果与田间表现不一致,抗病品种 G087 大蒜品种的病情指数比感病品种 G039 大蒜品种的病情指数还高;4 叶期和 5 叶期鉴定结果与田间的表现基本一致($F = 15.34$),品种间离体接种结果有显著差异($P < 0.05$),G087 大蒜品种抗病性强,属于对叶枯病不敏感的抗病品种;G064 大蒜品种属于中等抗病的品种;G039 大蒜品种属于对叶枯病敏感的感病品种(表 5)。

表 5 不同株龄离体接种后大蒜的病情指数和反应型

Table 5 Disease index and reaction type of garlic cultivars with inoculation on leaves of different age plant in vitro

品种 Cultivar	2~3 叶期 2~3 leaf stage	4 叶期 4 leaf stage	5 叶期 5 leaf stage
G087	39.8(S)	16.4(R)	13.5(R)
G064	35.1(S)	21.3(MR)	27.5(MR)
G039	26.5(MR)	34.4(S)	30.2(S)

讨 论

代表性大蒜品种的选择依据

根据田间调查结果,G087 病情指数为 16.7,G064 病情指数为 20.2,G039 病情指数为 30.4,分别为抗病、中抗和感病品种,G087 叶短而窄,叶片硬而挺直,开张度小,叶绿素含量高;G064 叶最大且最宽,叶绿素含量较高;G039 叶较长而宽,叶绿素含量低^[13]。本试验主要依据田间病害调查结果,选择 3 个代表性品种 G087、G064、G039 分别作为抗病、中

抗和感病品种,建立大蒜叶枯病离体鉴定方法。

大蒜叶枯病离体鉴定和活体鉴定的差异

大蒜叶的构造和其它单子叶植物一样,叶片剖面可分为表皮(上表皮、下表皮)、栅栏组织、海绵组织、维管束、乳汁管和气孔等。大蒜叶枯病菌主要以子囊壳随病残体在土壤中越冬,第2年散发出子囊孢子进行初侵染,病部产生分生孢子再借风雨、气流等进行再侵染。活体接种方法分为无伤口接种法即孢子悬浮液喷洒法和伤口接种法,试验证明病菌孢子主要经自然孔口和伤口侵入寄主。由试验结果可以看出,活体接种后,刚开始病情指数偏低,各品种之间无差异,而在接种15 d后不同的品种发病情况才表现出差异。G064大蒜品种采用孢子悬浮液喷洒法活体鉴定时,接种后29 d的病情指数比接种后22 d低,这是因为接种后22 d调查时发病在9级的叶片在接种后29 d调查时已经枯死,不能算作功能叶。G039大蒜品种采用孢子悬浮液喷洒法发病情况和田间调查结果有异,可能是这种方法接种时G039叶片较小,保绿时间较长,发病不充分,通过叶片表皮气孔感染叶枯病菌的能力低,所以导致发病情况出现异常。

活体鉴定大蒜叶枯病抗性时孢子悬浮液喷洒法对叶片的喷洒量难以均匀,而伤口接种法对叶片的伤口大小也难以均匀,伤口处于叶片的位置不一定,从而使2种活体鉴定方法接种后发病不均匀,造成致病性不稳定,影响鉴定结果。另外,活体接种的方法鉴定周期长,与活体鉴定相比离体鉴定在人工控制的生长环境下进行,其周期较短,只需大约1周的时间就可完成整个鉴定过程,而且不影响植物的生长。所以离体鉴定的方法更适用于对大蒜品种叶枯病的抗性鉴定。

离体鉴定大蒜叶枯病抗性适宜条件的选择

活体接种方法的研究结果表明,大蒜叶枯病菌孢子主要通过自然孔口和伤口侵入大蒜植株,在进行离体接种鉴定时,大蒜叶段上或在伤口周围病菌都能侵入。本试验结果表明,给大蒜叶片离体接种3个不同浓度的叶枯病菌孢子悬浮液,浓度为 10^5 个/mL时发病较慢,接种7 d后的病情指数都偏低,感病品种表现为抗病,结果与田间调查结果不一致;浓度为 10^7 个/mL时发病快,到后期3个品种发病都较严重,接种7 d后抗病品种G087表现为感病,这与田间调查结果有异;浓度为 10^6 个/mL时,接种后的结果与田间调查结果基本相符。植物对真菌

性病害的抗性除决定于自身的抗性机制外,还与接种的病原浓度有关,病原浓度过低,品种的抗感性差异难以体现出来,病原浓度过高,抗病品种也会表现出感病症状^[6],因此,浓度为 10^6 个/mL的叶枯病菌孢子悬浮液是合适的离体接种浓度^[14]。

大蒜叶枯病的发病最适温度为 $15\sim 25$ 。在本试验设置的18、21、24 3个离体接种温度中,18 时发病较慢,病情指数都较小,感病品种G039表现为中抗,这与田间调查结果不一致;24 时发病快,后期发病重,抗病品种G087都表现为高感,表现不出对叶枯病菌的不敏感性,这与田间调查结果也不一致。只有在21 时3个品种的抗性分级明显,且与田间调查结果一致,所以适宜的离体接种温度为21。

叶面离体接种和叶背离体接种结果差异不显著,这可能是由于大蒜叶正面和背面角质层分布、表皮细胞分布、气孔分布、叶绿素含量等没有明显差异^[15]。所以离体接种时选择叶面和叶背均可。

本试验在3个大蒜品种处于2~3叶期、4叶期、5叶期时分别进行离体鉴定,在2~3叶期接种的结果为抗病品种G087病情指数高于其它2个品种,这与田间结果不一致,但4叶期和5叶期接种的结果与田间调查结果基本一致。株龄过小,难以获得准确的鉴定结果,这可能是由于植株刚发芽不久,过于幼嫩,抗病系统发育还不完善,4叶期以后鉴定才能较准确地反映品种间的抗性差异。但越到后期,鉴定所需时间和成本也随之增加,而且要获得无菌叶片的难度也加大。所以当大蒜品种株龄在4叶期、5叶期时采叶片进行离体接种,有利于各个品种抗病性差异的充分表现。

本试验首次对大蒜叶枯病的抗性鉴定方法进行研究,试验结果表明:活体接种和离体接种方法的鉴定结果都能如实地反映供试品种的田间抗性,但离体接种法比活体接种法更简便、快速;离体叶面接种和叶背接种的鉴定效果基本一致;离体鉴定接种的适宜孢子悬浮液浓度为 10^6 个/mL,适宜培养温度为21,适宜株龄为4~5叶期。

参 考 文 献

- [1] 朱秋兵. 大蒜叶枯病的发生与防治[J]. 上海蔬菜, 2004(3): 50.
- [2] 郑露,董伊丹,吕娟娟,等. 几种杀菌剂对大蒜白斑病的防治效果[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(2): 151-155.

- [3] 邹燕,程智慧,程晓兰,等.大蒜紫斑病抗性鉴定方法的研究[J].园艺学报,2009,36(5):763-770.
- [4] 毛军需,李有.豫西百合病害种类的调查与分析[J].华中农业大学学报,2007,26(3):302-305.
- [5] 刘波微,彭化贤,陈素清.番茄灰霉病拮抗木霉菌的筛选及效果评价[J].西南农业学报,2007,20(4):651-653.
- [6] 单连民,单志慧,周新安,等.不同浓度锈菌对大豆叶片的致病反应[J].中国油料作物学报,2008,30(3):337-341.
- [7] 韩美丽,陆荣生,霍秀娟.番茄枝条离体鉴定品种青枯病抗性影响因素研究[J].广西农学报,2007,22(5):14-17.
- [8] 肖德海,郑秀真.大蒜叶枯病的发生与防治技术[J].现代农业科技,2007:15:75.
- [9] 方仲达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998:64-137.
- [10] 杨德良,宋文宏,茶枝雄.10%世高水分散粒剂防治大蒜叶枯病[J].中国蔬菜,2001(1):30-31.
- [11] 张志宏,刘艳,高秀岩,等.草莓抗白粉病的离体鉴定及农药的筛选[J].园艺学报,2004,31(4):505-507.
- [12] 刘爱媛.豌豆离体叶片鉴定白粉病抗性方法[J].植物保护学报,2002,29(2):119-123.
- [13] 程智慧,杜慧芳,孟焕文,等.大蒜品种资源叶部性状研究[J].江苏农学院学报,1997,18(1):69-72.
- [14] ZHENG L, HUANG J, HSIANG T. First report of leaf blight of garlic (*Allium sativum*) caused by *Stemphylium solani* in China[J]. Plant Pathology, 2008, 57:380.
- [15] 贺学礼.植物学[M].西安:陕西科学技术出版社,2001:51-120.

Screen of Evaluation Methodology of Garlic Resistance to Tip Blight

CHENG Xiao-lan CHENG Zhi-hui ZOU yan NIU qing

Horticulture College, Northwest A & F University, Shaanxi, Yangling 712100, China

Abstract The purpose of the experiment is to establish an evaluation method of garlic resistance to tip blight. According to the results of field investigation, the experiment collected 3 cultivars G087, G064, G039 with different disease resistance to garlic tip blight as the identification cultivars. The spore suspension concentration, the spore inoculation position and the culture temperature after inoculation and the plant age for *in vitro* identification and the methods for *in vivo* identification have been compared and screened. The investigating disease index and the cultivar resistant types were measured and the best *in vitro* identification results which was in agreement with the resistance level of the identification cultivars were gotten under the conditions as follows: the inoculating leaves at 4~5 leaf stage of plant, inoculating on leaf face or leaf back, inoculating spores at the concentration of 10^6 /mL, culturing the inoculated leaves at the temperature of 21 for 7 days. Both *in vitro* and *in vivo* identification results were in agreement with field disease resistance of the identification cultivars. However, the *in vitro* identification was simpler and faster than the *in vivo* identification. The established *in vitro* identification technology in this experiment is simple in method, short in identification cycle duration and accurate in result, which can be used to evaluate the disease resistance of garlic germplasm resources to tip blight.

Key words garlic tip blight; resistance; identification *in vivo*; identification *in vitro*

(责任编辑:陈红叶)