

绿豆尖镰孢枯萎病抗性鉴定方法

朱琳, 孙素丽, 孙菲菲, 段灿星, 朱振东

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 绿豆是我国的主要食用豆类之一。由尖镰孢引起的绿豆枯萎病是一种严重的土传病害, 病原菌从根部侵入, 引起植株矮化, 叶片黄化、枯萎, 根茎部维管束变褐, 严重时导致植株死亡。防治枯萎病最经济、有效的方法是培育利用抗病品种。本研究在控制条件下以具有不同抗性表型绿豆品种为材料, 分别对接种方法、植株生育期、接种体浓度、接种体处理时间及接种后植株培养温度等影响绿豆抗性表型的因素进行比较研究, 以期建立一个快速、准确和高效的绿豆枯萎病抗性鉴定方法, 为抗病资源的筛选和抗病育种提供技术支持。结果表明, 绿豆枯萎病苗期抗性鉴定最适宜的接种方法为剪根浸根法, 最适宜接种体浓度为 $10^5 \sim 10^6$ 孢子/mL, 接种最佳植株生育期为 2 叶期, 最短有效接种体浸根时间为 2 min, 最适宜发病温度为 25 °C, 接种后 14 d 调查病情。

关键词: 绿豆; 枯萎病; 尖镰孢; 抗性鉴定

The Method for Evaluation of Mung Bean Resistance to Fusarium wilt

ZHU Lin, SUN Su-li, SUN Fei-fei, DUAN Can-xing, ZHU Zhen-dong

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Mung bean [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek] is one of the most important grain legumes in China, which is often incorporated into various multiple crops and intercropping systems because it is a short-duration legume crop and can improve soil fertility by rhizosphere atmospheric nitrogen-fixing. Fusarium wilt, caused by the fungal pathogen *F. oxysporum*, is a severe soil-borne disease and seriously limits the yield of mung bean in China. *F. oxysporum* can infect mung bean at all phenological growth stages. This pathogen firstly infects roots of plants and cause symptoms including leaf chlorosis and necrosis, vascular discoloration of roots and stems. Lastly, the seriously infected plants of mung bean wilt and died. Management of Fusarium wilt is very difficultly due to its soil-borne pathogen and long-term survival in soil. The reproductive and vegetative structures produced by *F. oxysporum* include microconidia, macroconidia, and chlamydospores. The interaction of *F. oxysporum* with nematodes adds additional constraints to the management of this disease. Deployment of resistant cultivars is the most economic and effective way to control this disease. In this study, the mung bean cultivars with contrasting resistant phenotype were used as plant materials (Yulv 2 and Bao 200612-6-1 are resistance cultivars, Jilv 7 and Bailv 6 are susceptible cultivars), and the factors affecting resistance phenotype including inoculation method (root cutting inoculation, root dipping inoculation and radicle socking inoculation), plant development stage (2 leaf age, 3 leaf age and 4 leaf age), inoculum concentration (10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 spore/mL), inoculum treatment time (30 s, 1 min, 2 min, 4 min and 6 min) and inoculated plants incubation temperature (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C), were comparatively analyzed. In order to reduce the error, wilt disease severity of mung bean was assessed u-

收稿日期: 2016-12-05 修回日期: 2016-12-28 网络出版日期: 2017-06-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170613.0841.012.html>

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-09); 作物种质资源保护子项目 (2016NWB036-12); 中国农业科学院科技创新工程项目; 科技部、财政部国家科技基础条件平台 (NICGR2016-008)

第一作者主要从事绿豆病害研究。E-mail: 429599571@qq.com

通信作者: 朱振东, 主要从事豆类病害及抗病性研究。E-mail: zhuzhendong@caas.cn

sing a scale of 0-4. A disease index (DI) was recorded on each plant based on the severity of the leaf disease lesions and differences of replications were analyzed using standard error (SD) and subjected to one-way ANOVA analyses, and means of different treatments were compared by Duncan's new multiple range method. The resistance phenotypic results using different inoculation method showed that significant differences were observed among three inoculation methods, but only root cutting inoculation gave repeatable, accurate and consistent results. Significant differences were also observed between the plant development stages. We obtained accurate and consistent results by inoculating the plants at 2 leaf age, which can shorten inoculation period and accelerate identification process. There were no significant differences between the results by inoculation concentration of 10^5 and 10^6 , however, the significant difference were observed between $10^5 \sim 10^6$ and 10^4 , $10^5 \sim 10^6$ and 10^7 , respectively. So, 10^5 and 10^6 spore/mL were optimum inoculation concentration, which was consistent with those of other diseases. When the inoculum treatment time was 2-4 min, there was no significant difference between the four cultivars, which could reflect the actual resistance level of four cultivars. As for incubation temperature, there was no significant difference between 25 °C and 30 °C, even the disease index of four mung bean cultivars at 25 °C was higher than at 30 °C, and the results could reflect the actual resistance level of each cultivar. However, the significant difference existed between 25-30 °C and both 20 °C and 35 °C. As for surveyed period, the results had no significant difference between 14 d and 21 d although the disease index after inoculation 21 d was higher than those at 14 d. But significant difference was observed between 14-21 d and 7 d. Our results indicated that scoring results between 14-21 d after inoculation could accurately distinguish the resistance level among the tested materials. The optimal survey period should be at 14 days after inoculation under considering the experimental cycle and timeliness. In conclusion, the root cutting technique was the optimal inoculation method. The seedling of mung bean at 2 leaf age was suitable to inoculation with pruned roots dipped in spore suspension of 10^5 - 10^6 spore/mL for 2 min. Inoculated plants should be incubated at 25 °C. The survey time of disease scoring can effectively shorten experimental period at 14 days after inoculation. This method was rapid and effective for evaluation of mung bean resistance to *Fusarium* wilt in controlling condition, which would provide technical support for mung bean germplasm resistance screening and breeding program.

Key words: mung bean; *Fusarium* wilt; *Fusarium oxysporum*; resistance evaluation

绿豆 (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) 属于豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionaceae) 菜豆族 (Phaseoleae) 豇豆属 (*Vigna* Savi) 一年生草本植物, 是我国的主要食用豆类之一^[1]。绿豆起源于印度-缅甸地区东北部, 现在东亚各国普遍种植, 非洲、欧洲、澳大利亚、加拿大、美国也有少量种植^[2-4]。绿豆在我国已有 2000 多年的栽培历史, 具有很高的食用和药用价值, 是广受欢迎的医食同源作物^[5-6]。此外, 绿豆还具有生育期短, 固氮能力强, 生长适应性广泛等特性, 是农业种植结构调整中主要的间、套、轮作和养地作物^[7]。

尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 是引起作物枯萎病的重要病原真菌, 常造成重大的产量和经济损失^[8]。由尖镰孢引起的绿豆枯萎病是一种严重的土传病害, 病原菌从根部侵入, 造成植株矮化、叶片黄化枯萎、维管束变褐, 严重时导致死亡^[9-10]。近年

来该病在我国绿豆产区普遍发生, 尤以西北、华北和东北地区最为严重, 田间发病时产量损失可达 30% 以上, 甚至绝产, 严重影响绿豆的生产。由于尖镰孢产生的厚垣孢子可以在土壤中长期存活, 作为侵染源在绿豆的各个时期均可进行侵染, 因此, 该病害的防治十分困难。实践证明, 防治作物枯萎病最经济有效的方法是利用抗性品种^[8-12]。

为了有效的控制绿豆枯萎病, 急需培育抗病品种。抗病品种的选育需要有效的抗源, 而建立准确、有效的抗病性鉴定方法是筛选抗性资源的基础。本研究在前期实验的基础上, 以 4 个遗传背景和抗性表型明确的绿豆品种为寄主材料, 在控制条件下, 筛选绿豆抗枯萎病鉴定的最佳接种方法、植株生育期、接种体浓度、接种体处理时间、接种后最适培养温度及病情调查时间, 以期建立一种快速、简单、有效、准确的绿豆枯萎病抗性评价方法, 为绿豆抗枯萎病资

源筛选提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 在前期的实验中已初步筛选一些抗性品种,在此基础上选用4个抗性表型和遗传背景明确的绿豆品种豫绿2号、保200612-6-1、冀绿7号、白绿6号用于抗性鉴定方法筛选。豫绿2号和保200612-6-1为高抗枯萎病品种,冀绿7号和白绿6号为高感枯萎病品种,分别由南阳市农业科学院、保定市农业科学院、河北省农林科学院和白城市农业科学院提供。

1.1.2 接种体 本实验采用尖镰孢菌株FO8进行接种鉴定。FO8由本课题组从河北省保定市田间绿豆枯萎病病株上分离纯化后保存。

1.2 方法

1.2.1 植株培育及接种体制备 绿豆种子播种于以蛭石为基质的纸杯中,每杯播种15粒,每个绿豆品种播种3杯,播种后于25℃温室中培养,根据实际情况适量浇水,待幼苗2片真叶完全展开后(筛选植株最佳接种生育期试验除外),选取10株健康、长势一致的幼苗用于接种。

将保存于-80℃的菌株FO8在PDA培养基上活化,然后再转接到新PDA培养基上培养5d,用打孔器制取直径为5mm的菌饼,取5块放入盛有100mL绿豆汤液体培养基^[13]的三角瓶中,置于25℃、100r/min条件下振荡培养3~4d,用4层纱布过滤后,12000r/min离心,弃上清,用自来水稀释,用血球计数板计算产孢量,之后将孢子悬浮液浓度调整至试验所需浓度。

1.2.2 接种方法 采用剪根浸根法、直接浸根法和胚根接种法3种方法进行接种。(1)剪根浸根法:参考杨宇红等^[14]甘蓝枯萎病接种方法并稍作修改,即将纸杯剪开,抖落幼苗培养蛭石,用自来水洗净根部,剪去约1/3根系,之后将根系浸泡在孢子悬浮液中;(2)直接浸根法:将纸杯剪开,抖落掉蛭石,用自来水冲洗幼苗根系后直接浸泡在孢子悬浮液中;(3)胚根接种法:参考张衍荣等^[15]豇豆枯萎病接种方法并稍作修改,即绿豆种子用75%的酒精消毒5min,然后用无菌水冲洗2遍,将种子转移到放有湿润滤纸的培养皿中,25℃培养,待胚根长至5~10mm,用孢子悬浮液浸泡30min,最后移栽到以蛭石为基质的纸杯中。

1.2.3 植株生育期 分别在绿豆2叶期、3叶期、4

叶期采用剪根浸根法接种。

1.2.4 接种浓度 用 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 孢子/mL接种体浓度分别进行接种处理。

1.2.5 接种体处理(浸根)时间 设计5个处理时间,分别为30s、1min、2min、4min和6min。

1.2.6 培养温度 设4个处理,即接种后分别置于20℃、25℃、30℃、35℃的培养箱中,观察记录植株发病情况,确定最适宜发病温度。

1.2.7 病情调查时间 设置3个病情调查时间,即接种后7d、14d和21d各调查1次,观察记录植株发病情况,确定最适宜调查时间。

除各项单因子实验按照设计的方法进行外,余下的均按以下方法进行:在绿豆2叶期采用剪根浸根法接种,并用绿豆汤液体培养基制备绿豆枯萎病菌孢子悬浮液,在浓度为 10^6 孢子/mL的孢子悬浮液中浸根2min,然后移栽于装有蛭石的纸杯中。接种幼苗置于25℃、12h光照/12h黑暗交替条件下培养,接种后14d调查病情。所有处理均设3次重复,每重复10株苗。试验重复2次。

1.3 病情调查与评价

病害严重度分级标准:绿豆苗期接种枯萎病菌的发病症状表现为植株叶片黄化、枯萎、植株枯死。根据症状特征,参考孙文姬等^[16]棉花尖镰孢枯萎病级划分标准,建立绿豆尖镰孢枯萎病0~4级标准。0级:叶片无症状;1级:叶片边缘或叶尖轻微褪绿变黄,黄化面积 $\leq 25\%$;2级:叶片黄化面积 $25\% < A \leq 50\%$;3级:叶片重度黄化或萎蔫面积 $50\% < A \leq 75\%$;4级:叶片完全枯萎。

于接种后14d调查发病程度(筛选最佳调查时间试验除外),记录每个植株的病级数,按以下公式计算病情指数:

病情指数(DI) = \sum (各级病叶数 × 各级代表值) / (调查总叶数 × 最高级代表值)

抗性评价标准:抗性评价按病情指数划分,高抗(HR): $0 < DI \leq 15$;抗(R): $15 < DI \leq 35$;中抗(MR): $35 < DI \leq 55$;感(S): $55 < DI \leq 75$;高感(HS): $75 < DI$ 。

1.4 统计分析方法

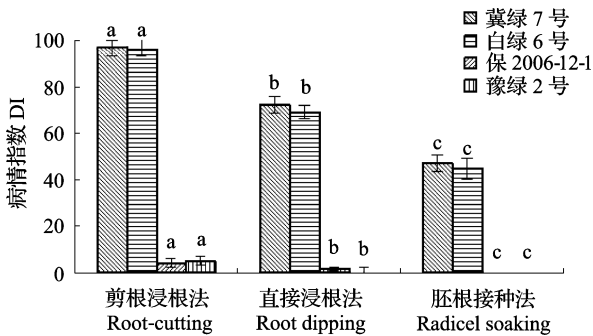
应用Word 2010、SAS统计软件处理原始数据,Duncan氏新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 抗病性鉴定方法筛选

2.1.1 不同接种方法的结果比较 用剪根浸根法、

直接浸根法和胚根接种法 3 种方法接种,4 个具有不同抗性表型的绿豆品种的病情指数均存在显著差异($P < 0.05$) (图 1)。采用剪根浸根法,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 5.0 和 4.3,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 97.3 和 95.1,表现为高感,4 个品种的抗性表型与预期的结果一致。采用直接浸根法,豫绿 2 号和保 200612-6-1 病情指数分别为 1.3 和 1.7,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号病情指数分别为 72.3 和 69.3,表现为感病,与剪根浸根法的结果比较,高感品种冀绿 7 号和白绿 6 号的病情相对较轻、潜育期长。胚根接种法接种 14 d 后,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数均为 0,表现为高抗;高感品种冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 47.0 和 42.7,表现为中抗,与预期的结果差异较大,该方法不能作为绿豆枯萎病抗性鉴定的接种方法。通过 3 种接种方法的比较,本研究认为剪根浸根接种是绿豆枯萎病抗性鉴定的最佳接种方法。



图中小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著,下同

Different capitals represent significant difference at the $P < 0.05$ level, respectively by DMRT, the same as below

图 1 不同接种方法对绿豆枯萎病表型的影响

Fig.1 Effect of different inoculation methods on Fusarium wilt phenotype in mung bean

2.1.2 植株生育期对枯萎病表型的影响 分别在 2 叶期、3 叶期、4 叶期采用剪根浸根法接种 4 个绿豆品种,接种后 14 d 各品种的病情指数见图 2。在 2 叶期接种,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 4.6 和 5.3,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 92.3 和 94.0,表现为高感;3 叶期接种,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 1.6 和 1.9,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 70.3 和 71.9,表现为感病;4 叶

期接种,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 0.7 和 1.0,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 58.3 和 63.9,表现为感病;在 3 叶期和 4 叶期接种,两个高感病品种冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数在 55.0 ~ 75.0 范围,与预期的表型不符。4 个绿豆品种在 2 叶期接种的病情指数显著高于 3 叶期和 4 叶期接种的病情指数,表明随着绿豆苗龄的增大,在一定程度上降低了绿豆对枯萎病的感病性。因此,绿豆抗枯萎病鉴定以 2 叶期接种比较适宜。

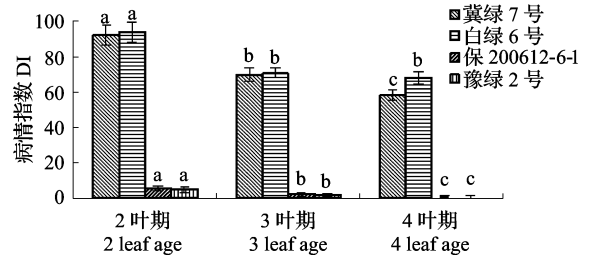


图 2 植株生育期对绿豆枯萎病表型的影响

Fig.2 Effect of developmental stage on Fusarium wilt phenotype in mung bean

2.1.3 接种体浓度对枯萎病表型的影响 采用剪根接种方法用 4 个接种体浓度分别接种 4 个绿豆品种。接种后 14 d 结果表明,当接种体浓度为 10^4 孢子/mL,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数均为 0,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 47.0 和 31.3,表现为抗病和中抗;用该浓度接种,高感绿豆品种发病轻且潜育期较长,结果与预期表型不符。当接种体浓度为 10^5 孢子/mL 和 10^6 孢子/mL 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数均小于 15.0,表现为高抗;冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数均大于 75.0,表现为高感,与预期的表型一致。当接种体浓度为 10^7 孢子/mL 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 12.7 和 19.7,表现为高抗和抗病,保 200612-6-1 发病略重,与预期的表型有一定差异;冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数都为 100.0,表现为高感。从图 3 可看出,4 个绿豆品种的病情指数在接种体浓度为 10^6 时虽然高于接种体浓度为 10^5 ,但两者之间不存在显著性差异($P \geq 0.05$),而用这两个接种浓度接种时 4 个绿豆品种的病情指数与用 10^4 或 10^7 接种时的病情指数均存在显著差异。通过比较,接种浓度在 $10^5 \sim 10^6$ 孢子/mL 时,病情指数能够准确地区分绿豆品种间的抗性表型,因此,此浓度范围为适宜的接种浓度 (图 3)。

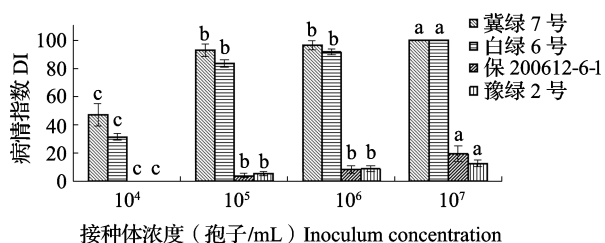


图 3 不同接种体浓度对绿豆枯萎病抗性表型的影响

Fig. 3 Effect of different inoculum concentrations on Fusarium wilt phenotype in mung bean

2.1.4 接种体处理时间对枯萎病表型的影响 当用孢子悬浮液浸根 30 s 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数都为 0,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 59.0 和 48.1,表现为感病和中抗;当浸根时间为 1 min 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 2.0 和 1.1,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 70.0 和 64.5,表现为感病;当浸根时间为 2~6 min 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数均小于 15.0,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数均大于 75.0,表现为高感。浸根 30 s 和 1 min 时高感品种病情较轻,表型与预期结果不符;浸根时间为 2~6 min 时,4 个绿豆品种表型与预期结果一致,且均能准确区分品种抗感差异。浸根时间为 2~4 min 时 4 个品种的病情指数的差异均不显著 ($P \geq 0.05$),能够反映出每个品种的实际抗性水平(图 4),故绿豆枯萎病接种时间以浸根 2 min 为最省时有效的接种时间。

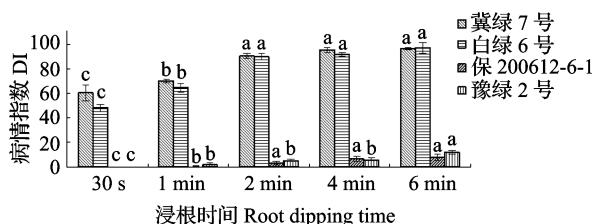


图 4 不同浸根时间对绿豆枯萎病表型的影响

Fig. 4 Effect of root dipping time on Fusarium wilt phenotype in mung bean

2.1.5 接种后培养温度对枯萎病表型的影响 接种后培养温度在 25 °C 时,4 个绿豆品种的病情指数高于在 30 °C 培养时的结果,但两者之间不存在显著性差异 ($P \geq 0.05$),而 25 °C 和 30 °C 条件下 4 个品种的病情指数与 20 °C 和 35 °C 之间的差异都达到了显著水平(图 5)。接种后培养温度为 20 °C 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 1.0 和

0.67,表现为高抗;冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 66.3 和 57.7,表现为感病,与预期的表型存在差异。培养温度为 25 °C 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 6.1 和 5.3,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 93.3 和 95.0,表现为高感。培养温度为 30 °C 时,豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 2.3 和 3.0,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 85.7 和 88.9,表现为高感。培养温度为 35 °C 时,4 个品种均未发病。以上结果表明,接种植株培养温度 25~30 °C 最适宜发病,在此温度范围内,高感品种冀绿 7 号在接种后 3~4 d 即出现症状,随后病情迅速扩展,至第 9 天病情指数已超过 55.0,14 d 大部分接种植株枯萎死亡;20 °C 培养虽仍能发病,但潜伏期长,至第 6~7 天植株才出现感病症状;温度高于 35 °C 则完全不发病(图 6)。

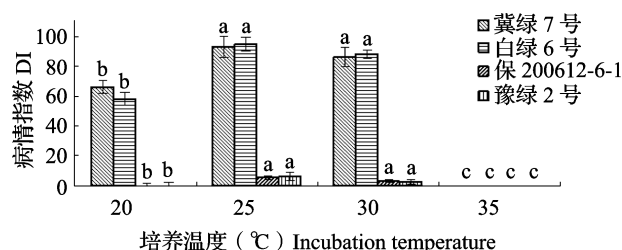


图 5 接种后不同培养温度对绿豆枯萎病表型的影响

Fig. 5 Effect of incubation temperature of inoculated plants on Fusarium wilt phenotype in mung bean

2.1.6 最佳病情调查时间的选择 接种后不同时间(7 d、14 d、21 d)调查 4 个绿豆品种病情指数。接种后 7 d 豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 0.7 和 0.5,表现为高抗,而冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 61.0 和 36.7,表现为感病和中抗。接种后 14 d 品种豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 2.7 和 4.6,表现为高抗,而冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 97.0 和 85.1,表现为高感。接种后 21 d 豫绿 2 号和保 200612-6-1 的病情指数分别为 5.3 和 8.7,表现为高抗,冀绿 7 号和白绿 6 号的病情指数分别为 100.0 和 98.7,表现为高感。虽然接种后 21 d 时各品种的病情指数高于 14 d 的结果,但两者之间不存在显著性差异 ($P \geq 0.05$),而 2 个调查时间所获得的病情指数与 7 d 的调查结果之间差异显著(图 7)。接种后 14~21 d 调查,病情指数能够准确区分各品种间的抗性差异。考虑到实验周期及时效性,接种后 14 d 可作为绿豆枯萎病抗性鉴定的调查时间(图 7)。

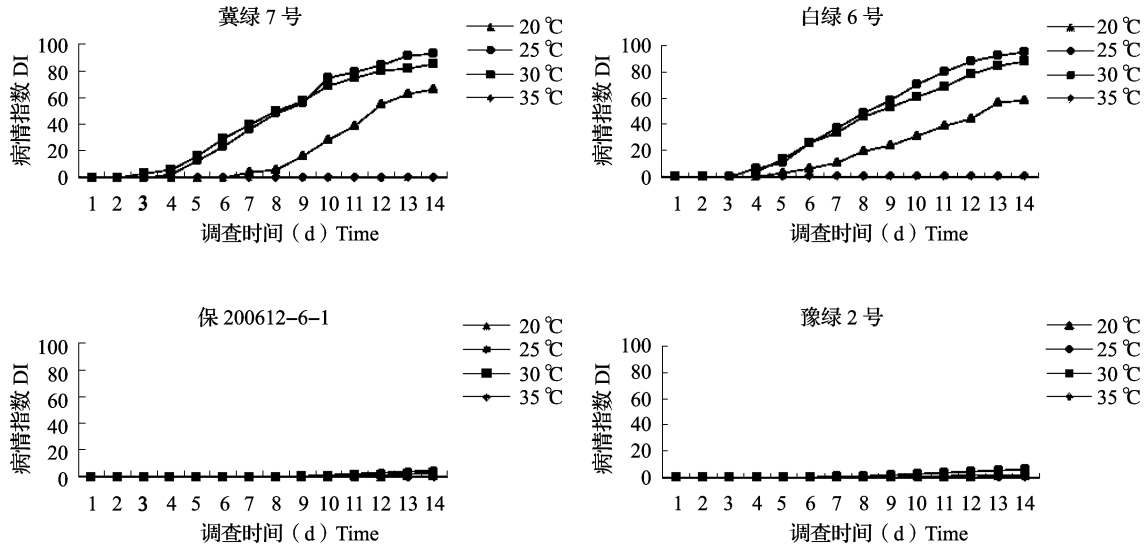


图 6 接种后培养温度对绿豆枯萎病发病进程的影响

Fig. 6 Effect of incubation temperature of inoculated plants on Fusarium wilt progress in mung bean

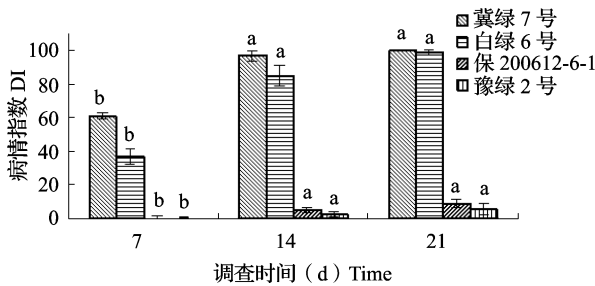


图 7 接种后最适调查时间的筛选

Fig. 7 Screening for optimum investigation time on Fusarium wilt in mung bean

3 讨论

苗期接种鉴定作物病害抗性,周期短、速度快,可节省大量人力物力^[17-19]。本实验在控制条件下对影响绿豆枯萎病表型的多个因素进行比较研究,发现接种方法、植株生育期、接种体浓度、接种后培养温度以及病情调查时间等均影响绿豆枯萎病抗性鉴定结果。

在作物枯萎病抗性鉴定中,前人已利用叶片发病程度作为抗性评价标准。孙文姬等^[16]根据叶片发病严重度将棉花枯萎病的病级划分为 0~4 级。周红梅等^[20]根据子叶发病程度也采用 0~4 级分级方法对黄瓜枯萎病病级进行划分。杨宇红等^[14]根据叶片发病严重度采用 6 级分级方法对甘蓝枯萎病进行划分,0 级:无症状;1 级:1 片叶叶脉轻微变黄;2 级:1~2 片叶叶脉轻至中度变黄;3 级:除心叶外,

其余叶片中度变黄或萎焉;4 级:全部叶片重度变黄或萎焉;5 级:叶片完全萎焉并死亡。对于不同作物,应当采用各自合适的分级标准,以准确区分抗性表型。目前,国内外在绿豆枯萎病抗性鉴定方法和病情分级等方面尚缺乏研究。绿豆枯萎病地上部分症状为叶片黄化、枯萎,茎部维管束变褐,严重时植株死亡^[9]。因此,本研究参考孙文姬等^[16]棉花枯萎病病情评价方法,建立了以叶片黄化枯萎程度作为绿豆枯萎病苗期抗性鉴定的分级标准。本研究结果证明,此标准能够准确有效地区分绿豆枯萎病抗性表型。

尖镰孢枯萎病抗性鉴定常用的接种方法有接种体浸根和土壤接菌法^[14,20-23]。土壤接菌法比较符合自然发病,但实际操作中往往出苗不均匀,且容易受其他因素影响。浸根接种分伤根、不伤根处理,伤根的途径多样,其中剪根浸根法被广泛应用于多种作物的抗性鉴定中。本实验结果显示,与直接浸根接种相比,剪根浸根接种具有避免植株漏接、用菌量少、发病快而整齐、鉴定结果准确稳定等优点。

在不同的生育期植物所表现出的抗性水平不同。一般来说,随着生育期的增大,植株的感病性会随之降低^[13,16]。本研究结果表明,绿豆在 2 叶期接种的病情指数显著高于 3 叶期和 4 叶期接种的病情指数,表明随着苗龄的增大,在一定程度上降低了对枯萎病的感病性。另外,植株苗龄的增大,移栽相对困难、移栽后缓苗慢,且实验周期长,而在 2 叶期接种容易操作,且接种后缓苗快,发病均匀,实验周期

短,因此,绿豆抗枯萎病鉴定以2叶期接种比较适宜。

不同的接种体浓度也影响枯萎病的病情发展。一些研究表明,随着接种体浓度的增大,感病和抗病品种的发病程度均逐渐增加。接种体浓度过高容易造成抗病品种发病过重,而接种体浓度过低造成抗、感品种之间的抗性差异降低,不利于抗性资源筛选。因此,接种浓度过高或过低均会影响抗性鉴定的准确性^[24-25]。本实验结果表明,接种体浓度 $10^5 \sim 10^6$ 孢子/mL能够准确区分出绿豆抗、感枯萎病资源,此浓度范围适宜于绿豆枯萎病抗性鉴定。

接种体处理时间对绿豆枯萎病表型影响较小。选择合理的处理时间可明显缩短实验周期,提高工作效率^[14,26]。本研究表明,接种体分别浸根2 min和4 min时,4个绿豆品种的病情指数无显著性差异,均准确反映出其预期表型。处理时间较短,如为30 s和1 min,病情发展相对较慢,需要较长的发病时间才能获得准确的结果。由于抗性资源筛选工作量较大,选择接种体浸根时间为2 min,可以提高工作效率。

温度是影响尖镰孢枯萎病病情发展的一重要因素。温度不仅可明显影响病原菌的生长速度、产孢量等,也影响病原菌孢子的萌发和侵染,而且对植物的生长发育、抗性表达也具有很大的影响^[27]。据研究,20~30℃是棉花、甘蓝、蚕豆等许多作物枯萎病的适宜发病温度范围,温度高于32℃时,则延缓病害的发展^[28-32]。本实验结果显示,接种后植株培养温度以20~30℃为绿豆枯萎病有效发病温度,以25~30℃为最适宜发病的温度范围,能够快速有效地鉴定品种枯萎病表型。在20℃条件下,接种绿豆植株虽能发病,但病情发展缓慢;温度高于35℃,接种绿豆植株则完全不发病,此结果与棉花^[29]、甘蓝^[14]等作物枯萎病研究结果一致。

苗期接种鉴定简便、有效,能够在短时间内得到抗性鉴定结果。然而病情的发展是一个动态的过程,因此选择一个合理的调查时间尤为重要^[33-40]。本实验选择3个病情调查时间(7 d、14 d和21 d),结果表明虽然接种后21 d时,抗、感品种的病情指数均高于14 d时的结果,但两者之间不存在显著性差异,而这两个调查时间所获得的病情指数与7 d的调查结果之间差异显著。接种后14~21 d调查,病情指数能够准确区分抗、感品种间的抗性水平,但接种后14 d调查可以缩短实验周期,提高接种效率。

综合本研究的结果,建立了一个快速、准确、高效的绿豆抗枯萎病鉴定方法,即培育绿豆幼苗至2叶期,取出植株洗净后剪除1/3根系,在浓度为 $10^5 \sim 10^6$ 孢子/mL接种体中浸根2 min,接种后在温度25℃条件下培养14 d后调查病情。该方法能准确评价绿豆对枯萎病的抗性水平,鉴定结果稳定,适用于对绿豆枯萎病的抗源筛选以及品种的抗性鉴定,同时也为研究绿豆抗枯萎病机制、抗性遗传以及抗病育种奠定基础。

参考文献

- [1] 林汝法,柴岩,廖琴,等.中国小杂粮[M].北京:中国农业科学技术出版社,2002:192-209
- [2] Nair R M, Yang R Y, Easdown W J, et al. Biofortification of mung bean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human health [J]. *J Sci food Agr*, 2013, 93 (8): 1805-1813
- [3] Schafleitner R, Nair R M, Rathore A, et al. The AVRDC—the world vegetable center mung bean (*Vigna radiata*) core and mini core collections [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 (1): 344
- [4] 乔玲,陈红霖,王丽侠,等.国外绿豆种质资源农艺性状的遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(5):986-993
- [5] 郑卓杰.中国食用豆类学[M].北京:中国农业科学技术出版社,1995:141-166
- [6] 任红晓,程须珍,徐东旭,等.应用SSR标记分析中国北方名优绿豆的遗传多样性[J].植物遗传资源学报,2015,16(2):395-399
- [7] Li L, Yang T, Redden R, et al. Soil fertility map for food legumes production areas in China [J]. *Sci Rep*, 2016, 6, doi:10.1038/srep26102
- [8] 刘波,朱育菁,周涵韬,等.农作物枯萎病的研究进展[J].厦门大学学报:自然科学版,2004,43(8):47-58
- [9] 朱振东,段灿星.绿豆病虫害鉴定与防治手册[M].北京:中国农业科学技术出版社,2012:17-19
- [10] Hall C, Heath R, Guest D. The infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australian cotton [J]. *Australas Plant Path*, 2013, 42 (1): 1-8
- [11] Cianchetta A N, Davis R M. Fusarium wilt of cotton: management strategies [J]. *Crop Prot*, 2015, 73: 40-44
- [12] McGovern R J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum* [J]. *Crop Prot*, 2015, 73: 78-92
- [13] Yuan S, Zhou M. A major gene for resistance to carbendazim, in field isolates of *Gibberella zeae* [J]. *Can J Plant Pathol*, 2005, 27 (1): 58-63
- [14] 杨宇红,吕红豪,杨翠荣,等.甘蓝枯萎病苗期抗性鉴定技术及抗源筛选[J].植物保护学报,2011,38(5):425-431
- [15] 张衍荣,李桂花,何自福,等.豇豆枯萎病抗病性鉴定技术研究[J].华南农业大学学报,2005,26(3):22-25
- [16] 孙文姬,陈其焕,马存,等.棉花种质资源抗枯、黄萎病鉴定[J].中国农业科学,1990,23(1):89
- [17] 翟文慧,张涛涛,胡俊,等.大白菜黑腐病鉴定的湿度试验及其苗期与成株期抗性的相关分析[J].中国蔬菜,2010(10):59-63
- [18] 王神云,吴强,王红,等.结球甘蓝根肿菌鉴定和种质抗性评价[J].植物遗传资源学报,2016,17(6):1123-1132
- [19] 龚振平,于拴仓,苏同兵,等.大白菜骨干自交系的苗期抗病性评价[J].植物遗传资源学报,2015,16(6):1194-1205
- [20] 周红梅,毛爱军,张丽蓉,等.黄瓜枯萎病接种方法及抗性遗传的研究[J].华北农学报,2010,25(4):186-190
- [21] Wang C, Roberts P A. A Fusarium wilt resistance gene in *Gossypium barbadense* and its effect on root-knot nematode-wilt disease

- complex [J]. *Phytopathology*, 2006, 96(7):727-734
- [22] Sanogo S, Zhang J F. Resistance sources, resistance screening techniques and disease management for Fusarium wilt in cotton [J]. *Euphytica*, 2015, 207(2):255-271
- [23] 吴学宏, 郝京京, 王红梅, 等. 西瓜枯萎病菌几种接种方法比较试验[J]. *长江蔬菜*, 2003(3):38-39
- [24] Hao J J, Yang M E, Davis R M. Effect of soil inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 on disease development in cotton [J]. *Plant Dis*, 2009, 93(12):1324-1328
- [25] Caligiore Gei P F, Valdez J G, Piccolo R J, et al. Influence of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion [J]. *Trop Plant Pathol*, 2014, 39(1):19-27
- [26] 彭姗, 吕学莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法[J]. *棉花学报*, 2008, 20(3):174-178
- [27] 蓝江林, 刘波, 肖荣凤, 等. 温度对几种作物尖孢镰刀菌菌株生长的影响[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2004, 43(8):67-70
- [28] Villegas-Fernández A, Sillero J, Rubiales D. Screening faba bean for chocolate spot resistance: evaluation methods and effects of age of host tissue and temperature [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2012, 132(3):443-453
- [29] 缪卫国, 陈向东, 张升, 等. 温度对棉花枯萎病发生、发展的影响温度对棉花枯萎病发生、发展的影响[J]. *新疆农业科学*, 2000(S):199
- [30] 刘方志. 棉花枯萎病的发生影响因子浅析[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(24):13234-13235
- [31] 郭予元, 吴孔明. 中国农作物病虫害[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2014:1001-1003
- [32] Kondo N, Tomooka N. New sources of resistance to *Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola* in *Vigna* spp. [J]. *Plant Dis*, 2012, 96(4):562-568
- [33] Pouralibaba H, Rubiales D, Fondevilla S. Identification of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* in Spanish lentil germplasm [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2015, 143(2):399-405
- [34] Aguiar F M, Michereff S J, Boiteux L S, et al. Search for sources of resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) in okra germplasm [J]. *Crop Breed Appl Biot*, 2013, 13(1):33-40
- [35] Cabral C S, Ailton R. Screening of lettuce accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 [J]. *Trop Plant Pathol*, 2013, 38(4):275-281
- [36] Taylor A, Vagany V, Barbara D J, et al. Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay [J]. *Plant Pathol*, 2013, 62(1):103-111
- [37] Oumouloud A, Torres R G, Garcés-Claver A, et al. Differential response of Cucumis melo to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 isolates [J]. *Crop Prot*, 2013, 44:91-94
- [38] Abdullaev A A, Salakhutdinov I B, Egamberdiev S S, et al. Analyses of Fusarium wilt race 3 resistance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Genetica*, 2015, 143(3):385-392
- [39] Anjani K, Raof M, Desai A. Evaluation of world castor (*Ricinus communis* L.) germplasm for resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini*) [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2014, 139(3):567-578
- [40] Rispaill N, Rubiales D. Identification of sources of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Dis*, 2014, 98(5):667-673