

花椰菜黑腐病苗期抗性鉴定方法研究

姚玉荣^{1,2}, 霍建飞¹, 郝永娟¹, 贾海燕¹, 王万立¹

(1.天津科润农业科技股份有限公司/蔬菜种质创新国家重点实验室, 天津 300384; 2.天津市植物保护研究所, 天津 300384)

摘要 为建立快速、高效的花椰菜黑腐病苗期抗性鉴定技术,以黑腐病病原 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 为菌源,高感黑腐病的花椰菜品种 Y1-2 为试验材料,研究了接种菌液浓度、苗龄、接种方法以及发病温度等因素对抗病性鉴定的影响,建立了优化的花椰菜黑腐病人工接种方法。结果表明,抗病性接种适宜条件为接种菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,接种时期为 4~5 叶期,喷雾法接种,发病温度 28 ℃。该方法鉴定结果能够客观反映花椰菜品种的抗病性。

关键词 花椰菜; 黑腐病; 抗性鉴定

中图分类号 S436.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)14-0137-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.14.038



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Resistance Identification Method of Black Rot at Seedling Stage of Cauliflower

YAO Yu-rong^{1,2}, HUO Jian-fei¹, HAO Yong-juan¹ et al (1. Tianjin Kernel Vegetable Research Institute/State Key Laboratory of Vegetable Germplasm Resources Innovation, Tianjin 300384; 2. Tianjin Plant Protection Institute, Tianjin 300384)

Abstract In order to develop a rapid and efficient technique for evaluation of resistance to black rot by using artificial inoculation with the pathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and the cauliflower variety Y1-2, the effects of inoculation concentration, seedling age, inoculation method and temperature were studied. The optimizing artificial inoculation methods for black rot identification were set up. The results showed that the key procedure was spraying inoculum liquor of 1×10^8 CFU/mL on seedling with 4-5 true leaves stage keeping at 28 ℃. The identification results of the established assessment system can objectively and effectively reflect the resistance of cauliflower.

Key words *Brassica oleracea* var. *botrytis*; Black rot; Resistance identification

十字花科蔬菜黑腐病是由野油菜黄单孢菌野油菜致病变种 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pam.) Down 引起的一种世界性重要病害^[1-2]。20 世纪 50 年代末在华北地区发生^[3],80 年代在全国各地普遍流行,极大威胁着十字花科蔬菜的生产,严重时减产 70%^[4]。种子带菌是黑腐病的主要侵染源和重要传播方式,其带菌率达 0.03% 就能造成生产上黑腐病暴发^[5]。生产上黑腐病的防治方法主要包括化学药剂防治,农事操作如轮作、清楚病残体等,但最经济、有效的防治措施为选育抗病品种。

苗期人工接种是筛选抗病品种和种质资源创新的前提条件。不同作物抗病性鉴定方法不同。研究发现,萝卜、甘蓝黑腐病鉴定时接种浓度为 1×10^8 CFU/mL 时利于发病^[6];大白菜黑腐病抗病鉴定接种物最佳浓度为 3.0×10^8 CFU/mL^[7]。不同作物接种最佳苗龄不同,萝卜接种最佳苗龄为 5~6 叶期^[8],甘蓝最佳苗龄为 4~6 叶期^[9]。近年来,随着我国菜田复种指数提高,花椰菜黑腐病的发病程度和发病率呈上升趋势,筛选花椰菜黑腐病抗源十分必要,但关于花椰菜黑腐病抗病性鉴定方法尚未见系统报道。

笔者以天津地区花椰菜主产区致病力强的黑腐病病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 为菌源,以天津科润农业科技股份有限公司蔬菜研究所高感黑腐病品种 Y1-2 为试验材料,研究了接种浓度、苗龄、接种方法以及发病温度对抗病性鉴定的影响,建立了优化的花椰菜黑腐病苗期接种鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试菌株:黑腐病菌野油菜黄单孢菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 简称 Xcc) 由天津市植物保护研究所蔬菜病害实验室分离保存。

供试品种:花椰菜高代纯合自交系 Y1-2(高感)、EC-247(抗病)、EC-455(抗病)、EC-464(抗病),由天津科润农业科技股份有限公司蔬菜研究所提供。

将供试花椰菜种子在 50 ℃ 热水中处理 10 min,播种于育苗穴盘内。育苗基质为蛭石:草炭:土壤 = 1:1:2,灭菌后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 抗病鉴定方法。抗病鉴定方法参考《中国主要蔬菜抗病育种》^[10],并加以改进。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{发病叶数} \times \text{相应病级数})}{(\text{调查总叶数} \times 9)} \times 100$$

病情分级标准:0 级.无病症;1 级.叶片有黑色枯死点,无扩展;3 级.病斑向外扩展,占叶面积 5% 以下;5 级.病斑向外扩展,占叶面积 5%~25%;7 级.病斑向外扩展,占叶面积 25%~50%;9 级.病斑向外扩展,占叶面积 50% 以上。

抗病性标准:免疫(I).病情指数为 0;高抗(HR).0<病情指数≤11.11;抗病(R).11.11<病情指数≤33.33;耐病(T).33.33<病情指数≤55.55;感病(S).55.55<病情指数≤67.77;高感(HS).67.77<病情指数≤100。

1.2.2 不同接种菌液浓度。将培养 24 h 的菌液浓度调节至 1×10^6 、 1×10^8 、 1×10^{10} CFU/mL 3 个浓度。

1.2.3 不同接种寄主苗龄。接种苗龄为 2~3 叶期、4~5 叶期、6~7 叶期、8~9 叶期,接种菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL。

1.2.4 不同接种方法。花椰菜黑腐病主要通过伤口和水孔

基金项目 蔬菜种质创新国家重点实验室开放课题(201802)。

作者简介 姚玉荣(1986—),女,河北唐山人,助理研究员,从事蔬菜病害防治研究。

收稿日期 2020-01-14

侵入,参照李永镐等^[11]的方法并略有改进,采用剪叶、喷雾法进行比较。剪叶法:用灭菌的医用剪刀沾取接种物在完全展开的叶片尖端垂直于主脉的方向剪掉0.5~1.0 cm,每剪1次沾取1次菌液;喷雾法:用小型喷雾器将接种物喷洒到植株上。2种接种方法在接种前后保湿24 h。

1.2.5 不同发病温度。采用“1.2.1”确定的最佳菌液浓度,采用喷雾法接种于4~5叶期的花椰菜幼苗上,温度设置为24、26、28、30℃。

1.3 花椰菜苗期抗病鉴定技术的验证 将建立的人工接种鉴定技术对已知抗性的5个花椰菜品种进行苗期抗性鉴定,设置3次重复,每个重复10株,对等量的无菌水作空白对照。

1.4 数据分析 试验数据采用Microsoft office Excel 2010分析,统计分析采用SPSS 21软件,采用Duncan's新复极差法($P<0.05$)进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同接种菌液浓度对接种效果的影响 不同接种菌液浓度下,花椰菜幼苗黑腐病发病率病情指数随着菌液浓度增加而增大,各处理间差异显著(表1)。其中接种菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL时,发病率为82.14%,病情指数为69.21,能够真实反映出花椰菜Y1-2本身抗性,菌液浓度为 1×10^6 CFU/mL时,发病较轻,品种表现为抗性,不能真实反映植株本身的抗性;菌液浓度为 1×10^{10} CFU/mL时,发病率达93.33%,病情指数为83.78,发病严重,不能体现品种的真实抗性。菌液接种浓度 1×10^8 CFU/mL为最佳接种浓度。

表1 不同接种菌液浓度对接种效果的影响

Table 1 Effects of inocula concentrations on inoculation efficiency

接种菌液浓度 Inocula concentration CFU/mL	发病率 Disease incidence %	病情指数 Disease index	抗性水平 Resistance level
1×10^6	42.47 c	15.14 c	R
1×10^8	82.14 b	69.21 b	HS
1×10^{10}	93.33 a	83.78 a	HS

注:同列不同小写字母表示不同浓度间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different concentrations ($P<0.05$)

2.2 不同接种寄主苗龄对接种效果的影响 4个苗龄试验中2~3叶期接种时,由于幼苗较小,接种后发病面积较大,发病严重,平均发病率达96.34%,病情指数为85.53(表2)。苗龄为4~5叶期发病率为75.00%,病情指数为68.51,适合用于苗期接种。苗龄6~7叶及8~9叶,幼苗较大,抗性增强,病情指数为50.91和31.35,抗性水平表现为耐病和抗性,不能真实反映品种抗性。因此4~5叶期的苗龄适合花椰菜苗期抗黑腐病接种鉴定。

2.3 不同接种方法对接种效果的影响 剪叶法接种较喷雾法接种发病快,剪叶法接种2 d开始发病,而喷雾法第4天开始发病。接种10 d后调查,剪叶法和喷雾法接种的发病率为100%和81.61%,病指指数为85.37和67.93(表3),2种方法均可用于花椰菜苗期接种鉴定,但由于喷雾法操作快捷,因

此选择喷雾法进行花椰菜苗期黑腐病接种鉴定。

表2 不同接种寄主苗龄对接种效果的影响

Table 2 Effects of growth stages of plants on inoculation efficiency

苗龄 Seedling stage	发病率 Disease incidence//%	病情指数 Disease index	抗性水平 Resistance level
2~3	96.34	85.53	HS
4~5	75.00	68.51	HS
6~7	69.33	50.91	T
8~9	70.24	31.35	R

表3 不同接种方法对接种效果的影响

Table 3 Effects of methods on inoculation efficiency

接种方法 Inoculation method	发病率 Disease incidence//%	病情指数 Disease index	抗性水平 Disease level
剪叶法 Leaf cutting method	100.00	85.37	HS
喷雾法 Spraying method	81.61	67.93	HS

2.4 不同发病温度对接种效果的影响 由表4可知,处理温度为24℃时,花椰菜Y1-2表现为抗性,温度为26℃时,表现为感病,这2个温度均不能表现出品种的真正抗性,不能用于苗期抗病性鉴定。温度为28和30℃时均表现为高感,但30℃时,植株几乎全部死亡,无法计算病情指数。适宜花椰菜苗期黑腐病抗病性鉴定的温度为28℃。

表4 不同发病温度对接种效果的影响

Table 4 Effect of temperature on inoculation efficiency

温度 Temperature ℃	发病率 Disease incidence//%	病情指数 Disease index	抗性水平 Resistance level
24	55.00	23.69	R
26	81.40	57.01	S
28	84.34	73.37	HS
30	100.00	—	—

2.5 花椰菜苗期抗性鉴定技术的验证 根据上述结果对已知抗性的5份品种进行接种鉴定。结果显示,5份品种抗性表现与已知抗性相符,该试验建立的花椰菜苗期抗性鉴定技术能够客观反映试验材料的抗性水平(表5)。

表5 花椰菜苗期抗性鉴定技术的验证

Table 5 Verification of the inoculation technique of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cauliflower

材料 Material	已知抗性水平 Known resistance	验证病情指数 Verified disease index	验证抗性水平 Verified resistance
EC-245	R	17.51	R
EC-248	HS	64.52	HS
EC-455	R	26.15	R
EC-464	R	34.77	R
EC-468	R	28.13	R

3 结论与讨论

该试验结果表明,在一定范围随着接种菌物浓度的提高,黑腐病发病率和病情指数增加,最佳接种浓度为 1×10^8 CFU/mL,这与李永镐等^[11]的甘蓝黑腐病苗期接种浓度结果一致。苗龄比较结果显示,4~5 叶期适宜苗期接种,苗龄小发病重,苗龄大植株本身抗性增强,均无法体现品种真实抗性。喷雾接种法是国内外最普遍采用的接种方法,Bandyopadhyay 等^[12]认为黑腐病作用位点为水孔。喷雾接种后病原菌在水孔处扩展蔓延,能够全面反映寄主的抗病性,而且该方法具有简单、快捷、高效等特点,适合花椰菜黑腐病的抗性鉴定。龚静等^[13]采用喷雾方法对 38 个甘蓝品种进行抗病性鉴定,结果显示该方法能够准确区分抗感材料。研究发现随着温度升高,花椰菜对黑腐病的抗性降低,与甘蓝及大白菜对黑腐病的研究结果相一致^[14-15]。

该研究建立和优化了花椰菜黑腐病苗期抗病性鉴定方法,即喷雾法接种,菌液浓度 1×10^8 CFU/mL,苗龄 4~5 叶期,发病温度 28 ℃,接种 7 d 后调查发病情况。该方法鉴定结果准确,能够客观反映花椰菜品种的抗性。植物对病害的抗病性表现受多方面因素的影响,全面准确鉴定不同品种抗黑腐病的表现,仍需要进一步研究。

参考文献

[1] WILLIAMS P H, STAUB T, SUTTON J C. Inheritance of resistance in cab-

- bage to black rot[J]. *Phytopathology*, 1972, 62:247-252.
- [2] SINGH B K, SINGH B, SINGH P M. Breeding cauliflower: A review[J]. *International journal of vegetable science*, 2018, 24(1): 58-84.
- [3] 黄德芬,李成琼,司军,等.甘蓝黑腐病生理小种划分及其抗病性鉴定研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2011(18): 6-10.
- [4] 李明远.十字花科蔬菜黑腐病的发生与防治[J]. *当代蔬菜*, 2004(11): 36-37.
- [5] 张杨,李金萍,周慧敏,等.李宝聚博士门诊手记(三十九)十字花科蔬菜细菌性黑腐病的发生规律及防治[J]. *中国蔬菜*, 2011(17): 23-25, 65.
- [6] 张玉勋,曲士松,黄宝勇,等.萝卜种质资源抗黑腐病鉴定[J]. *山东农业科学*, 2000(6): 33-34.
- [7] 解永梅,张薇,赵永强,等.山东省白菜黑腐病苗期抗病性鉴定方法[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(6): 661-662.
- [8] 甘彩霞,何云启,崔磊,等.萝卜黑腐病苗期抗病性鉴定方法的研究[J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(12): 3057-3060.
- [9] 崔瑞峰,孙九光,张光星.甘蓝黑腐病苗期抗病性鉴定[J]. *北方园艺*, 2008(6): 201-203.
- [10] 李树德.中国主要蔬菜抗病育种进展[M].北京:科学出版社, 1995: 80-81.
- [11] 李永镐,徐丽波.甘蓝黑腐病苗期抗病性鉴定方法的研究[J]. *东北农业大学学报*, 1990, 21(2): 125-129.
- [12] BANDYOPADHYAY S, CHATTOPADHYAY S B. Incidence of black rot of cabbage and cauliflower under different conditions of infection[J]. *Indian journal of agricultural sciences*, 1985, 55(5): 350-354.
- [13] 龚静,朱玉英,吴晓光.甘蓝黑腐病抗性材料筛选及接种方法的研究[J]. *上海农业科技*, 2001(4): 87, 77.
- [14] STAUB T, WILLIAMS P H. Factors influencing black rot lesion development in resistant and susceptible cabbage[J]. *Phytopathology*, 1972, 62(7): 722-728.
- [15] 芦燕,张鲁刚.陕西省大白菜黑腐病苗期人工接种抗性鉴定方法研究[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(4): 219-222.

(上接第 128 页)



图 15 水科技组合设备

Fig.15 Water Science and technology combination equipment

新颖是其具有特殊魅力的重要方面,需要通过科学严谨的理论分析方法从产业链、景观设计、植物搭配、科技显性化设计、展陈系统设计、互动产品创意等方面针对水主题场馆进一步加以梳理并掌握其规律,该研究通过对水主题场馆规划

设计原则的梳理以及莘县鱼水情莘馆、益阳水舞湘情馆和大同乐享水乡馆 3 个案例的展示和分析,以期能在相关业务中提供一定的借鉴。

参考文献

- [1] 农业部农产品加工局.关于大力发展休闲农业的指导意见[A].2016-07-08.
- [2] 田亦平,陈奕捷,范子文.南京农业嘉年华考察报告[J]. *北京农业职业学院学报*, 2012, 26(2): 12-17.
- [3] 中国农业嘉年华发展研究报告[R].2018.
- [4] 杨骁.北京农业嘉年华调查分析与思考[J]. *北京农业职业学院学报*, 2019, 33(3): 5-9.
- [5] 赵鹏,陈燕红,傅长智,等.对莘县农业嘉年华的分析思考[J]. *现代园艺*, 2019(3): 50-51, 57.
- [6] 张天柱.农业嘉年华规划、建设与案例分析[M].北京:中国轻工业出版社, 2017: 28-29.
- [7] 李菲菲,王先杰.农业嘉年华景观规划设计研究:以北京室内农业嘉年华为例[J]. *北京农业职业学院学报*, 2016, 31(3): 95-99.
- [8] 胡明.我国传统古代农用水车灌溉技术考[J]. *兰台世界*, 2015(25): 136-137.
- [9] 栗亚飞,冯文佳,王萌萌,等.浅析农业科技创新在农业嘉年华的作用[J]. *现代园艺*, 2019(13): 193-195.
- [10] 王爱玲,刘军萍,任荣,等.农业创意产业——现代农业与文化创意产业的融合[J]. *中国科技产业*, 2009(9): 78-81.
- [11] 冯文佳,栗亚飞.农业嘉年华中儿童活动景观设计:以洋河农业嘉年华为例[J]. *现代园艺*, 2019(5): 106-108.