

吴文婧, 韦永选, 周鑫, 等. 大薯组培苗抗炭疽病接种方法的比较[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 174-175, 278.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.054

大薯组培苗抗炭疽病接种方法的比较

吴文婧, 韦永选, 周鑫, 黄小龙, 许云, 黄东益

(海南大学农学院, 海南海口 570208)

摘要:炭疽病是大薯生产上最严重的病害, 迫切需要可靠的方法来筛选抗病种质。采用薯蓣上分离到的 2 份炭疽病菌株 SY01、DJ01 的分生孢子对大薯 Da87、Da115 的组培苗进行接种, 通过对病情指数的比较分析最佳的接种方法。结果表明: 大薯 Da87、Da115 对炭疽菌的抗性差异极显著, 菌株 SY01、DJ01 之间致病力差异极显著; 在筛选的接种方法中, 最佳的为使用 3×10^6 个/mL 孢子浓度的涂抹法。

关键词:大薯; 炭疽病; 接种方法; 病情指数; 抗病评价

中图分类号:S436.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0174-02

薯蓣家族广泛种植于热带和亚热带地区, 大薯被公认为是薯蓣中分布最广、最多的种^[1]。大薯(*Dioscorea alata*) 别称参薯、脚板薯、菜山药, 为薯蓣属单子叶藤本植物, 在我国长江以南地区均有种植, 是四大薯类作物中营养最丰富的作物, 在非洲一些国家是仅次于木薯的主粮。

炭疽病发病可从苗期开始一直到采收, 严重影响大薯的生长及薯块的产量。来自加勒比、南太平洋、西非和印度等国家和地区的统计结果表明, 该病严重时导致产量下降 90%, 几种常见的栽培种都缺乏抗性^[2-3]。炭疽病(胶胞炭疽菌)引起叶片坏疽并且藤蔓枯萎, 导致光合作用表面积下降并且伴随着薯块茎产量的下降。在块茎形成前或者是形成期间病害的流行对块茎产量的影响是极大的。炭疽病可发生在全株, 包括叶片、藤蔓、薯块, 带病的种薯、土壤会持续影响, 甚至导致绝种^[4]。在我国南方地区, 高温多雨的天气更有利于大薯炭疽病的发生和发展。在法国西部和尼日利亚侵染薯蓣类作物的炭疽病原菌表现出遗传性和致病性的明显差异^[5-8]。国内外大多采用离体叶片进行抗性鉴定, 笔者经过多年研究发现该法并未能完全反映种质的抗性水平且重复性比较差。由于大薯在种植时主要采用薯块育苗, 进行苗期抗性鉴定需要大量的薯块, 且生产周期上无法满足准确可靠的抗病性鉴定的试验要求。用组培苗进行大量基因型的快速筛选对于胶胞炭疽菌的毒力和侵染力的分析是精确有用的^[9], 组培苗还可用于栽培种-分离物互作的研究和研究侵染进程^[10-11]。更进一步, 组培苗可用于评价栽培种对特定分离物的反应。这些对于非当地的胶胞炭疽菌的筛选和国家交流项目的薯蓣评价是可行的^[12]。因此, 本研究欲采用已分离鉴定的炭疽病菌对大薯组培苗进行抗性鉴定, 筛选最佳的接种方

法。目前, 笔者所在课题组已经收集了我国南方地区 160 份的大薯种质资源, 建立了我国的薯蓣种质资源圃, 分离鉴定了 100 株来自薯蓣的炭疽病菌株, 建立快速有效的苗期抗性鉴定方法对于我国大薯抗性种质资源的筛选十分必要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: DJ01(分离自海南儋州大薯)、SY01(分离自海南海口山药); 供试大薯: Da87、Da115; 盆栽基质: 营养土: 陶粒: 草木灰 = 3: 1: 1。

1.2 试验方法

1.2.1 大薯组培苗的获得 以幼嫩的大薯实生苗的单个带节茎段为外植体, 经自来水冲洗 30 min, 用 75% 乙醇浸泡 15 s, 选用 0.1% HgCl₂ 处理 8~10 min, 再用无菌水洗 3~5 次。将消毒好的带芽茎段接种到培养基(MS + 3% 蔗糖 + 0.3% 植物凝胶, pH 值 5.8)中。无菌苗培养 2 个月, 选择长出 5~8 张叶且已生根的材料进行炼苗。炼苗 1 周后移栽至营养钵, 待植株叶片开始恢复生长后进行接种。

1.2.2 接种菌孢子的制备 先将菌种接在 PDA 平板上进行活化, 在 28℃ 下培养 7 d, 经过过滤纯化后收集孢子配置悬浮液。采用血球计数板计数法将供试菌株的孢子悬浮液分别配制成 3 个浓度: 3×10^5 、 3×10^6 、 3×10^7 个/mL。

1.2.3 接种方法 接种采用喷雾法、多针接种法、涂抹法进行试验。采用 2 种菌株接种 2 种大薯种质, 分别用上述 3 种浓度处理, 每个处理 10 株苗, 设置 3 株接种水作为对照, 试验重复 3 次。接种时室温为 (26 ± 2) ℃, 用塑料薄膜覆盖, 黑暗保湿 2 d, 之后揭开覆盖, 自然光照下培育。接种 12 d 后开始调查发病情况及统计病情指数。

1.2.4 病叶分级 大薯炭疽病室内苗期抗病性调查分级标准: 0 级, 无症状; 1 级, 病斑直径 0~1.0 mm, 有 1~2 张叶发病; 2 级, 病斑直径在 11~20 mm, 有 2 张真叶发病, 或有少数大斑; 3 级, 病斑直径在 21~30 mm, 并产生孢子, 或有 2 张以上叶片发病, 病株出现落叶, 株形不正常; 4 级, 有许多大斑, 大量产生孢子, 病株大量落叶, 近枯死或枯死。

(1) 病情指数。将参试品种的发病级别按病情指数计算

收稿日期: 2014-11-29

基金项目: 高等学校博士学科点专项基金(编号: 20114601110001); 海南省自然科学基金(编号: 314044)。

作者简介: 吴文婧(1981—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为薯蓣抗病育种。E-mail: wqiang_81@qq.com。

通信作者: 许云, 硕士, 副教授, 研究方向为薯蓣遗传育种。E-mail: xuyun2000513@126.com。

式换算成该种质的病情指数,换算公式如下:病情指数 (DI) = Σ (株数 \times 病级数) / (总株数 \times 最高病级数) $\times 100$ 。

(2) 抗病性评价标准。薯蓣种质炭疽病抗性鉴定分为 6 个等级^[13]: 1 级, 免疫 (immune, I), DI = 0; 2 级, 高抗 (highly resistant, HR), $0 < DI \leq 20$; 3 级, 中抗 (middle resistant, MR), $20 < DI \leq 40$; 4 级, 中感 (middle susceptible, MS), $40 < DI \leq 60$; 5 级, 感 (susceptible, S), $60 < DI \leq 80$; 6 级, 高感 (highly susceptible, HS), DI > 80。

1.2.5 菌株致病性分级 菌株致病性类型划分标准如下^[14]: 强 (A): 平均病情指数 40.1 ~ 100.0; 中 (B): 平均病情指数 20.1 ~ 40.0; 弱 (C): 平均病情指数 0.1 ~ 20.0; 无致病力 (D): 平均病情指数为 0。

1.2.6 数据分析 数据采用 SAS 软件进行 Duncans's 测验。

2 结果与分析

2.1 大薯种质的炭疽病抗性鉴定

不同处理下大薯种质的病情指数均值 (表 1) 表明: 大薯种质 Da115、Da87 对炭疽病的抗性为中感 (MS), Da115、Da87 的病情指数差异极显著, Da115 较 Da87 更易感病。

表 1 大薯种质的炭疽病抗性比较

大薯种质	病情指数均值
Da115	50.59A
Da87	42.73B

注: 同列数据后标有不同大写字母表示 Duncan's 测验中差异极显著 ($P < 0.01$)。表 2 同。

2.2 薯蓣炭疽菌菌株的致病力检测

由表 2 不同处理下薯蓣炭疽菌菌株致病后引起的病情指数均值表明: 薯蓣炭疽菌菌株 DJ01、SY01 的致病性为中致病性, 二者的致病力差异极显著, 菌株 DJ01 的致病力较强。

表 2 薯蓣炭疽菌致病性比较

菌株	病情指数均值
DJ01	51.56A
SY01	41.77B

2.3 不同接种菌液孢子浓度和不同接种方法对大薯炭疽病发病情况的影响

表 3 的 2 份炭疽菌菌株的 3 种孢子浓度接种 2 份大薯种质后的病情指数的统计结果表明: 多针接种法和涂抹法的不同孢子浓度接种后病情指数差异均达到了极显著水平; 喷雾法的孢子浓度水平为 3×10^5 、 3×10^6 个/mL 之间差异未达到极显著水平。当孢子浓度水平为 3×10^5 个/mL 时, 涂抹法和喷雾法的病情指数较低, 且差异不显著, 未达到大薯种质病情指数的均值, 不适于进行抗病性鉴定。当孢子浓度水平为 3×10^6 、 3×10^7 个/mL 时, 3 种接种方法的病情指数差异均达到了极显著水平。综合来看, 多针接种法发病早, 病情指数均高于 2 份大薯种质的平均病情指数和 2 份炭疽菌菌株的平均致病力, 当孢子浓度水平为 3×10^7 个/mL 时病情指数均值高达 90.26, 接近死亡, 因此多针接种法不适合用于大薯种质的抗病性鉴定。喷雾法总体的病情指数较低, 需要较高的孢子浓度才能达到适合的病情指数。当孢子浓度为 3×10^6 个/mL

时, 涂抹法的病情指数与大薯种质的平均病情指数和炭疽菌平均致病力较一致。因此最佳的接种方法为涂抹法, 孢子浓度水平为 3×10^6 个/mL。

表 3 不同接种方法和不同孢子浓度接种后大薯病情指数的比较

接种方法	不同孢子浓度下大薯病情指数均值		
	3×10^5 个/mL	3×10^6 个/mL	3×10^7 个/mL
多针接种法	58.28cC	72.28bB	90.26aA
涂抹法	12.42fE	40.80dD	57.99cC
喷雾法	16.11eE	25.16eE	46.68dCD

注: 数据后标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

目前, 活体接种的结果能较充分地反映植株对病原菌的抗性, 室内接种鉴定方法的研究能为抗性种质筛选提供可靠的依据。Onyeka 等用 3 份大薯炭疽菌分离物 (胶孢炭疽菌) 来评价 60 份大薯栽培种的组培苗反应, 认为组培苗提供了用于评价大量大薯种质的快速、可靠和健全的方法, 可进一步用于田间的测试, 这项技术降低了大量株系所需要的大面积土地^[12]。Akem 用喷雾法接种大薯抗病种质 Dan087、TDa86/00620、TDa316 以及感病种质 TDa85/00257、TDa86/00607、TDa85/00250 进行致病性试验, 每个植株用 2mL 孢子浓度为 1.6×10^6 个/mL 的孢子悬浮液喷雾接种, 28 d 后观察并记录植株的感病情况^[15]。炭疽病菌孢子虽然是接种在活体植株上, 但是发病周期较长。陈吉良采用大薯和山药的离体叶片进行菌株致病性鉴定和植株的抗性初筛, 初筛结果往往与田间的抗性鉴定不一致, 这可能与田间环境有较大差异相关, 也可能是离体叶片与活体植株的差异导致的^[16]。本试验中对于同一份材料的抗病等级是基于不同处理下病情指数的均值, 在 3 种接种方法中基于这个均值进行衡量, 多针接种法发病快、发病较严重, 但是较难比较种质之间的抗性差异; 喷雾法发病较慢, 需要较多的孢子进行侵染; 相比之下, 涂抹法较适中。在 3 种孢子浓度侵染时, 孢子浓度为 3×10^5 个/mL 时, 仅在多针接种法中表现出较高的病情指数, 而在涂抹法和喷雾法中均表现为较低的病情指数; 浓度为 3×10^6 个/mL 时, 多针接种法有较高的病情指数, 而喷雾法有较低的病情指数, 涂抹法较适宜; 浓度为 3×10^7 个/mL 时, 多针接种法接种的植株接近死亡, 适宜用涂抹法和喷雾法。因此, 本研究表明, 当孢子浓度水平为 3×10^6 个/mL 时, 涂抹法最适宜大薯组培苗的抗病性鉴定。

参考文献:

- [1] Anon. Annual report of project 13: Improvement of yam - based systems [R]. Ibadan, Nigeria: IITA, 1998.
- [2] Winch J E, Newhook F J, Jackson G V H, et al. Studies of *Colletotrichum gloeosporioides* disease on yam, *Dioscorea alata*, in the Solomon Islands [J]. Plant Pathology, 1984, 33 (4): 467 - 477.
- [3] McDonald F D, Alleyne A T, Ogarro L W, et al. Yam anthracnose in the English - speaking islands of the Eastern Caribbean - successes and research advances in disease management [J]. Tropical Agriculture, 1998 75: 53 - 57.

(下转第 278 页)

- tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze – thaw process[J]. Archives of Andrology,1994,33(1):11 – 15.
- [8] Cerolini S, Maldjian A, Surai P, et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage[J]. Animal Reproduction Science, 2000, 58 (1/2): 99 – 111.
- [9] Pena F J, Johannisson A, Wallgren M, et al. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate[J]. Animal Reproduction Science, 2003, 78(1/2): 85 – 98.
- [10] 张希成, 李 刚, 范青梅. 水蛭的药理作用与临床应用[J]. 中医中药杂志, 2006, 3(17): 123 – 126.
- [11] 胡传话. 牛、猪精液冷冻保存技术相关问题的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2009: 77 – 93.
- [12] Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization[J]. Journal of Andrology, 1996, 17 (2): 151 – 157.
- [13] de Lamirande E, Jiang H, Zini A, et al. Reactive oxygen species and sperm physiology[J]. Reviews of Reproduction, 1997, 2(1): 48 – 54.
- [14] Pons – Rejraji H, Sion B, Saez F, et al. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility [J]. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 2009, 37(6): 529 – 535.
- [15] 林祥潮, 黄晓东. 中药对超氧阴离子自由基清除率的测定[J]. 广州化学, 2012, 37(1): 32 – 36.
- [16] 陈 勉, 朱希强. 超氧化物歧化酶在医药临床上的研究和应用[J]. 食品与药品, 2009, 11(5): 44 – 47.
- [17] 张晓燕. 超氧化物歧化酶的研究现状及在食品中的应用综述[J]. 扬州职业大学学报, 2002, 6(1): 34 – 37.
- [18] Dodt J, Müller H P, Seemüller U, et al. The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor; application of colour carboxymethylation[J]. FEBS Letters, 1984, 165(2): 180 – 184.
- [19] Harvey R P, Degryse E, Stefani L, et al. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83 (4): 1084 – 1088.
- [20] 周小明, 陆再英. 水蛭素对培养的兔动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国循环杂志, 1996, 11(2): 103 – 105.
- [21] Nasir M A, Toth C A, Mittra R A. Recombinant hirudin for prevention of experimental postoperative intraocular fibrin[J]. American Journal of Ophthalmology, 1996, 121(5): 554 – 560.
- [22] Ogiuchi T, Hirashima Y, Nakamura S, et al. Tissue factor and cancer procoagulant expressed by glioma cells participate in their thrombin – mediated proliferation[J]. Journal of Neuro – Oncology, 2000, 46(1): 1 – 9.
- [23] 牟忠祥, 任青华, 张 博, 等. 中药水蛭素对荷瘤鼠超氧化物歧化酶及丙二醛水平的影响[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(17): 3103 – 3104.
- [24] 郭应信, 殷国前, 李佳荃. 天然与重组水蛭素对大鼠随意皮瓣淤血模型超氧化物歧化酶、丙二醛、内皮素变化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4453 – 4456.
- [25] Ou Y, Liao G, Yuan Z, et al. Protective effect of recombinant hirudin variant III against galactose – mediated rat lens epithelial cell damage[J]. Current Eye Research, 2012, 37(3): 187 – 194.
- [26] Ou Y, Geng P, Liao G Y, et al. Intracellular GSH and ROS levels may be related to galactose – mediated human lens epithelial cell apoptosis; role of recombinant hirudin variant III[J]. Chemico – Biological Interactions, 2009, 179(2/3): 103 – 109.
- [27] Desmarais W T, Bienvenue D L, Bzymek K P, et al. The 1.20 Å resolution crystal structure of the aminopeptidase from *aeromonas proteolytica* complexed with Tris; a tale of buffer inhibition[J]. Structure, 2002, 10(8): 1063 – 1072.
- Branch, 1998: 613 – 615.
- [10] Green K R, Abang M M, Iloba C. A rapid bioassay for screening yam germplasm for response to anthracnose[J]. Tropical Science, 2000, 40: 132 – 138.
- [11] Onyeka T J, Petro D, Etienne S, et al. Optimizing controlled environment assessment of levels of resistance to yam anthracnose disease using tissue culture – derived whole plants[J]. Journal of Phytopathology, 2006, 154(5): 286 – 292.
- [12] Onyeka T J, Péto D, Ano G, et al. Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the french west indies to anthracnose disease based on tissue culture – derived whole – plant assay[J]. Plant Pathology, 2006, 55(5): 671 – 678.
- [13] 王 智. 山药种质资源抗性鉴定、抗病机制研究和遗传多样性分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2004.
- [14] 李 越, 刘云龙, 李 凡, 等. 非洲菊根腐病品种抗病性鉴定及病原菌的致病性分化[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 33 – 35, 41.
- [15] Akem C N. Yam die – back and its principal cause in the yam belt of Nigeria[J]. Pakistan Journal of Biological Science, 1999, 2(4): 1106 – 1109.
- [16] 陈吉良. 薯蓣炭疽病病原菌分离鉴定及抑菌制剂的筛选[D]. 海口: 海南大学, 2011.

(上接第 175 页)

- [4] Kutama A S, Auyo M I, Binta S B, et al. Combating yam anthracnose in Nigeria; a review[J]. Standard Research Journal of Agricultural Science, 2013, 1(3): 21 – 26.
- [5] Abang M M, Hoffmann P, Winter S, et al. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria[J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(1): 21 – 27.
- [6] Abang M M, Fagbola O, Smalla K, et al. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.) [J]. Journal of Phytopathology, 2005, 153(3): 137 – 142.
- [7] Frézal L, Jacqua G, Neema C. Etude de la diversité genetique de *Colletotrichum gloeosporioides*, agent causal de l'anthracnose de l'igname blanche en Guadeloupe. [C]//Tours, France; Proceedings of the 7th International Conference on Plant Diseases, 2003.
- [8] Frézal L. Etude de la diversité génétique de *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de l'anthracnose de l'igname alata (*Dioscorea alata*) en Guadeloupe [D]. Paris, France; Université de Paris – Sud, 2005.
- [9] Abang M M, Green K R, Wanyera N W, et al. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria [C]. Ibadan, Nigeria; I Proceedings of the 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, African