

马铃薯青枯病抗性鉴定新方法

李广存, 金黎平, 谢开云, 庞万福, 卞春松, 段绍光, 屈冬玉*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要: 采用传统方法和改进方法(取名为茎枝菌液浸泡法)对马铃薯的青枯病抗性进行了鉴定和评价, 其结果是一致的, 但茎枝菌液浸泡法更加简便快速、经济有效、可操作性和可重复性更好, 并且在番茄的青枯病抗性鉴定上也得到了验证。该方法对于茄科作物的种质资源抗病性评价和筛选, 特别是对于病菌诱导产生抗性的(抗感)病植株的快速鉴定及其幼苗的先期快速筛选具有重要意义, 可望成为一种理想的茄科作物室内抗病鉴定方法。

关键词: 马铃薯; 青枯病; 茎枝菌液浸泡法

马铃薯青枯病是由青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的仅次于马铃薯晚疫病的一种细菌性病害。该病菌传播快, 寄主广, 防治困难, 发病率高, 严重者可使马铃薯减产80%, 甚至绝产^[1-2]。进行马铃薯抗青枯病种质资源的鉴定主要分为室内鉴定和田间鉴定。室内鉴定可为田间鉴定提供参考, 具有一定的优越性。可人工控制生长环境条件, 进行工厂化作业和管理, 保持条件的一致性, 不易受外界因素干扰; 可对育种研究初期获得的杂交后代, 或无性系的试管苗等进行早期大量鉴定和筛选; 也可对育成的优良材料在标准化条件下采用多个菌系(小种或致病型)和不同菌量接种, 进行抗病性鉴定和评价。目前进行马铃薯抗青枯病鉴定所采用的接种方法主要有灌根法(伤根土壤接种法、不伤根土壤接种法)和茎部毛细管菌液滴注法(即茎部刺伤微吸管滴注接种法)^[3], 另外还有水培法等^[4]。但这些接种方法具有所需时间周期较长、要求条件苛刻等不足, 本文将在此基础上结合寄主植物的水培法报道一种新的青枯病菌接种方法——茎枝菌液浸泡法。

收稿日期: 2006-04-08

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA241130); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助

作者简介: 李广存(1972-), 男, 博士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者: E-mail: dyqu@mail.caas.net.cn

1 材料与方法

1.1 供试青枯病菌株及材料

青枯病菌小种3号P041和小种1号TM60由本所植保室提供。马铃薯ED和CE分离群体的亲本为Q USW5337, Q USW7859和E 772102.37, 其中E来源于二倍体抗青枯病原始栽培种*Solanum phureja*和野生种*S. vernei*, 其遗传背景见文献[5], 抗病对照植株MS42.3源自国际马铃薯中心(International Potato Center, CIP); 番茄植株均由本所番茄组提供, 其中抗病植株39Q CLN2366A)、393(CLN2366B)、395(CLN1314G)和41Q CLN1466-65-40-15-0-12-0来源于亚洲蔬菜中心, 感病植株D3(早粉2号)、D5(中蔬6号)和D14(中蔬5号)为本所番茄组育成品种。

1.2 青枯病菌的培养

挑取致病力强的单菌落画线培养, 待长至菌苔后, 用无菌蒸馏水洗下, 用分光光度计测定其OD₆₀₀吸光值, 调整菌液浓度分别为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ cfu·mL⁻¹备用。

1.3 青枯病菌接种

1.3.1 青枯病菌小种3号接种马铃薯

茎枝菌液浸泡法的接种程序是, 取生长正常、旺盛、整齐、无其它病虫害的块茎繁殖的马铃薯植株, 待植株长至7~8片展叶时, 去除主茎顶芽,

促使侧芽生长至5~6片展叶时, 用锋利的手术刀片垂直切取带有4~5片展叶的主茎或侧枝, 首先存放于自来水中保湿, 待取完全部所需的主茎或侧枝后, 同时插入盛有不同浓度 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu·mL⁻¹ 的青枯病菌小种3号菌液的容器内进行浸泡, 做好详细标记, 并于浸泡后第3, 5, 7, 10, 14 d 逐个材料、逐枝详细调查发病期和严重程度, 同时测定第10 d 浸泡菌液的 OD₆₀₀ 值。

采用灌根法和毛细管菌液滴注法进行接菌作为对照, 所使用的菌液浓度为 1×10^8 cfu·mL⁻¹。灌根法的菌液接种量为30 mL, 且所使用的器具、土壤等均进行相应的消毒灭菌处理, 毛细管菌液滴注法接种量为30 μL。所有接种后的马铃薯植株或茎枝置于28℃可控温室内, 空气相对湿度为70%以上, 灌根法和毛细管菌液滴注法的土壤湿度为土壤最大持水量的60%左右, 调查方法同上。

三种接种鉴定方法均于不同时间连续鉴定同一批马铃薯基因型植株3次, 每次鉴定所用的每个基因型均设置3个重复, 每个重复内植株或茎枝分别来自同一基因型的不同植株。

1.3.2 青枯病菌小种1号接种番茄

分别采用茎枝菌液浸泡法和伤根灌注法对已知抗、感病番茄植株基因型进行鉴定, 每个基因型5棵番茄主茎或植株, 两种接种方法均设3次重复, 操作方法同1.3.1。接菌后的番茄植株培养在30℃, 其它培养条件及调查方法同上。

1.4 抗病性评价方法和标准

供试材料接种后, 从第2 d 开始持续观察发病情况, 以发病高峰期且最能反映抗、感病差异的调查记载数据, 参照文献[3]将植株发病严重程度分为5级。1级: 无症状, 健康; 2级: 1~2个叶片萎蔫; 3级: 3~4个叶片萎蔫; 4级: 全部叶片萎蔫; 5级: 茎枝死亡。

2 结果与分析

2.1 马铃薯茎枝菌液浸泡法与灌根法及毛细管菌液滴注法的比较

2.1.1 茎枝菌液浸泡法接菌鉴定结果

以菌液浓度 1×10^6 cfu·mL⁻¹ 为例, 接菌后第3 d, 感病植株的茎枝开始出现萎蔫, 第4 d 萎蔫程度明显加重, 个别高感植株的茎枝已大部分萎蔫, 第5 d 高感植株的茎枝已全部萎蔫, 高抗植株的茎

枝也出现萎蔫症状, 第7 d 抗病植株的茎枝萎蔫程度明显加重, 高抗植株的茎枝萎蔫程度基本不变; 第10 d 高抗植株茎枝萎蔫症状减轻, 有的已基本恢复健康, 而感病植株的茎枝则腐烂死亡, 第14 d 高抗植株的茎枝已恢复健康, 个别的已开始生根(表1)。抗感植株茎枝的发病程度与浸泡菌液的浓度和浸泡时间呈高度相关, 浸泡时间越长, 菌液浓度越高, 发病越快, 这对于研究者要求植株尽早发病, 准确确定取材时期至关重要, 试验中不同浓度的浸泡菌液浸泡植株茎枝所得的抗、感结果一致, 且每个基因型内不同植株茎枝的抗病表现也基本一致, 因此该方法对于种质资源的抗病筛选、资源评价和抗病锻炼具有重要的指导意义。同时在试验中还发现抗病植株主枝浸泡菌液后, 在其受菌液浸泡部位形成了一些瘤状乳突结构, 抗性级别越高的植株茎枝所形成的瘤状乳突结构越多, 且浸泡菌液变得澄清; 而在感病植株的茎枝上未发现有瘤状乳突结构的形成, 且其浸泡菌液的末端发生褐变, 浸泡菌液变得混浊。通过测定其 OD₆₀₀ 值发现, 随着植株感病程度的增加, 浸泡其茎枝的菌液 OD₆₀₀ 吸光值也逐步升高, 推测这可能是由于抗病植株所产生的瘤状乳突或茎枝本身能够释放一种抑菌物质所致^[6-7]。因此根据植株茎枝经菌液浸泡后所形成的瘤状乳突结构的有无、多少及浸泡菌液 OD 值的大小也可以对相应植株的抗病性进行初步判定。

2.1.2 茎枝菌液浸泡法与灌根法及毛细管菌液滴注法鉴定结果的比较

多年的实践证明, 灌根法及毛细管菌液滴注法对于马铃薯抗病性的筛选和评价是有效的, 但这些方法所需时间较长, 特别是灌根法需要3周时间, 这无疑会加大资源评价的成本。从三种方法的比较中发现, 评价结果是一致的(图1), 同时研究中还发现茎枝菌液浸泡法接种后, 植株茎枝抗病表现的变异范围小于伤根灌注法和毛细管滴注法(表2, 图2~3), 这可能是由于茎枝菌液浸泡法接种时茎枝所受伤害基本一致, 避免了伤根灌注法伤根程度不同和毛细管滴注法对不同粗细的植株茎枝所造成的伤害程度不同等引起的植株抗感表现的差异所致。采用茎枝菌液浸泡法时, 不同的浸泡菌液浓度之间存在茎枝发病早晚的差异, 菌液浓度与发病早晚存在高度相关, 菌液浓度越高, 茎枝发病越早(表1)。这对于要求待评价植株快速发病、研究植

表 1 不同接菌浓度下 3 次鉴定马铃薯茎枝的综合发病情况 (部分结果)

接菌浓度 ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)	基因型	抗性	发病严重度														
			接菌后 3 d			接菌后 5 d			接菌后 7 d			接菌后 10 d			接菌后 14 d		
			Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
1×10^5	MS42.3	R	1	1	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1
	E	MR	1	1	1	3	2	2	4	4	4	4	5	5	5	5	5
	ED11	S	2	2	2	3	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5
	ED13	R	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
	ED25	S	2	3	2	3	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5
1×10^6	MS42.3	R	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1 ^a
	E	MR	1	2	1	2	3	3	4	5	4	5	5	5	5	5	5
	ED11	S	2	3	2	3	4	3	4	5	4	5	5	5	5	5	5
	ED13	R	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1 ^a
	ED25	S	3	3	3	4	4	4	5	4	4	5	5	5	5	5	5
1×10^7	MS42.3	R	1	1	1	2	3	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1 ^b
	E	MR	2	2	2	4	3	3	5	4	4	5	5	5	5	5	5
	ED11	S	3	3	3	4	4	4	4	5	4	5	5	5	5	5	5
	ED13	R	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1 ^b
	ED25	S	3	3	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5

注: 1—健康, 2—1~2 个叶片萎蔫, 3—3~4 个叶片萎蔫, 4—全部叶片萎蔫, 5—茎枝死亡。a—茎枝恢复健康, 但一些老叶死亡; b—茎枝恢复健康, 但部分老叶死亡。



图 1 不同接种方法接种相应马铃薯植株 (茎枝) 的结果对比

株抗病基因表达、信号转导及植病互作具有重要意义。对于马铃薯而言, 浸泡菌液的浓度以 1×10^6 cfu·mL⁻¹ 为宜, 以第4或第5 d 调查结果为标准进行评价。若提高浸泡菌液的浓度, 则适当提前调查时间。

表2 三种接种方法接菌后马铃薯(茎枝)的发病情况(部分结果)

基因型	株(茎枝)抗性及总数	灌根法接菌后10 d		毛细管法接菌后7 d		茎枝菌液浸泡法接菌后5 d	
		平均值	变异范围	平均值	变异范围	平均值	变异范围
MS42.3	R 60	2.00	1~3	1.92	1~4	1.93	1~2
E	MR 76	3.33	2~4	3.33	2~4	2.83	2~3
ED11	S 55	3.93	3~5	3.65	3~5	3.36	3~4
ED13	R 82	1.83	1~4	2.56	2~4	1.91	1~2
ED25	S 83	4.35	3~5	4.00	3~5	4.11	4~5

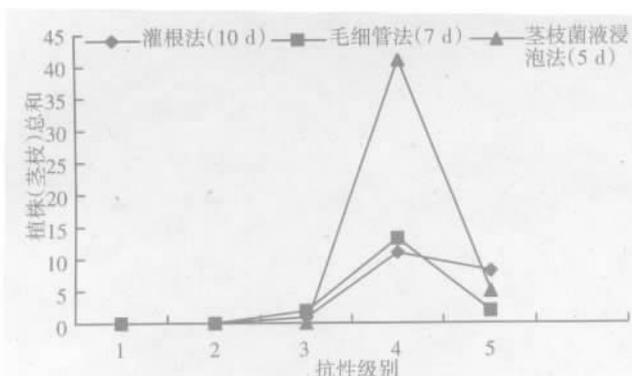


图2 三种接种方法的比较(ED25)

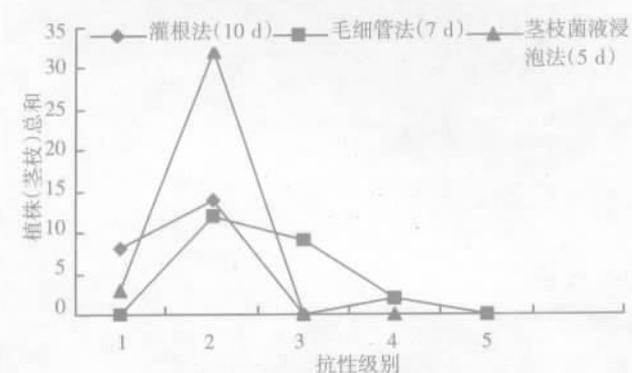


图3 三种接种方法的比较(ED13)

2.2 番茄茎枝菌液浸泡法与灌根法及毛细管菌液滴注法的比较

2.2.1 茎枝菌液浸泡法接菌鉴定结果

以菌液浓度 1×10^4 cfu·mL⁻¹ 为例, 接菌后第

3 d, 高感植株的茎枝萎蔫程度已达3级, 抗病植株的茎枝则刚开始有萎蔫症状; 第5 d 感病植株的茎枝已经全部萎蔫, 抗病植株的茎枝萎蔫程度加重; 第7 d 抗病植株茎枝的萎蔫症状减轻, 而感病植株的茎枝却已部分死亡, 第10 d 高抗植株的茎枝已基本恢复健康, 仍然存活的感病植株茎枝的萎蔫症状也有所缓解; 到第14 d, 高抗植株的茎枝已恢复健康, 仍然存活的感病植株茎枝也基本恢复健康(表3, 图4-6)。这说明当植株受病菌浸染后, 感病植株因不含有抗病因子, 无法抵御病菌的浸染而发病, 甚至死亡, 而抗病植株由于含有抗病因子, 病菌的浸染刺激激活了其体内抗病基因的表达, 抗病基因的表达产物对病菌在植株体内的存活和扩散具有一定的抑制作用, 二者经过一段时间的互作, 虽然高抗植株最初也表现出感病, 但最终仍能恢复健康, 这与前人的分析是一致的^[8]。如果接菌浓度太高, 抗病基因的表达不足以抑制病菌在植株体内的存活和扩散, 抗病植株也将感病, 且无法恢复而最终死亡。利用该方法进行抗病鉴定时, 每个基因型内不同植株茎枝的抗病表现基本一致, 表3列出了不同基因型植株茎枝的综合评价结果。

2.2.2 茎枝菌液浸泡法与灌根法鉴定结果的比较

茎枝菌液浸泡法与灌根法对于番茄的评价结果是一致的。采用茎枝菌液浸泡法时, 不同的浸泡菌液浓度之间也存在茎枝发病早晚的差异, 菌液浓度与发病早晚同样存在高度相关, 菌液浓度越高, 茎枝发病越早。对于番茄而言, 浸泡菌液的浓度以 1×10^4 cfu·mL⁻¹ 为宜, 以第5~7 d 调查结果为标准进行评价, 若要筛选高抗植株, 则可适当提高菌液浓度(如 1×10^5 cfu·mL⁻¹), 根据接菌14 d 后植株的茎枝是否可以恢复正常进行筛选。与马铃薯一样, 若提高浸泡菌液的浓度, 则适当提前调查时间。

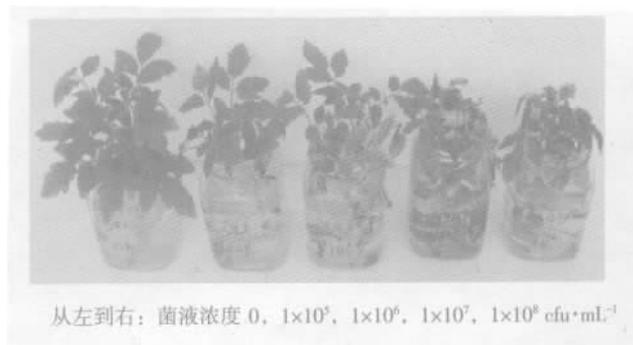


图4 抗病番茄(393)在不同接菌浓度下的抗病表现

表 3 不同菌液浓度下番茄茎枝 3 次重复的综合评价结果 (部分结果)

接菌浓度 (cfu·mL ⁻¹)	基因型	抗性	发病严重度				
			接菌后 3 d	接菌后 5 d	接菌后 7 d	接菌后 10 d	接菌后 14 d
1×10 ³	D3	S	2	2	1	1	
	D5	S	2	2	1	1	
	D14	S	2	2	1	1	
	393	R	1	1	1		
	395	R	1	1	1		
	419	R	1	1	1		
1×10 ⁴	D3	S	3	4	4 ^a	3	1
	D5	S	2	4	4 ^a	3	1
	D14	S	3	4	4 ^a	3	1
	393	R	2	2	1	1	1
	395	R	2	2	1	1	1
	419	R	2	3	2	1	1
1×10 ⁵	D3	S	3	5	5		
	D5	S	3	4	5		
	D14	S	4	5			
	393	R	3	4	4	1	1
	395	R	2	3	3	1	1
	419	R	2	3	4	3 ^b	2
1×10 ⁶	D3	S	4	5			
	D5	S	4	5			
	D14	S	4	5			
	393	R	3	4	4	2	1
	395	R	3	4	3	2	1
	419	R	4	4	4 ^b	3	2

注: 1—健康, 2—1~2 叶片萎焉, 3—3~4 叶片萎焉, 4—全部叶片萎焉, 5—茎枝死亡。a—部分萎焉的茎枝死亡, b—部分萎焉的叶片死亡。



图 5 不同浓度下抗病番茄 393 浸泡 10 d 时的生根表现



图 6 抗病性不同的番茄接菌后 14 d 的抗病表现

3 讨论

茎枝菌液浸泡法的实质就是将同一个植株或遗传背景不同的不同植株的主茎或侧枝插入盛有不同浓度菌液的容器内进行浸泡培养, 以观察其抗(感)病情况, 并且可根据需要调整浸泡菌液的浓度, 提前或推迟抗(感)病的表现。也可将要研究的多种病原菌按比例进行混合接种。该方法不仅适用于马铃薯青枯病的抗性鉴定和筛选, 对于其它易于水培的茄科作物(如番茄、烟草等)的抗性筛选和鉴定, 种质资源评价, 特别是病菌诱导产生抗性的抗(感)病植株的快速鉴定及其幼苗的先期快速筛选等同样适用。

本研究采用茎枝菌液浸泡法对马铃薯 ED 和 CE 群体进行了筛选和鉴定, 已筛选出 ED13、ED122、ED128、CE171 等 10 余份(高)抗青枯病材料和 ED130、ED25、ED11、CE100 等 20 余份高感青枯病材料(数据未列出), 并且部分材料(如 ED13、ED25 等)已被用于亲本构建杂交作图群体, 为开展进一步研究奠定了基础。

茎枝菌液浸泡法属于室内鉴定法, 与其它传统的室内接种方法相比具有独到的优越性: 简单易行。该方法只需将生理年龄一致的同一种基因型不同植株的茎枝或同一植株的主茎和侧枝剪下, 浸泡在含有一定浓度的菌液中即可, 不需将所有植株进行伤根浸染, 保证了实验试材生理年龄的一致性, 也增加了鉴定的准确性。可操作性更强, 更加经济。可通过去掉植株顶芽使其产生大量侧枝的方法获得足够数量的茎枝, 无需培养大量植株, 降低了工作量; 同一个容器内可浸泡多个植株的茎枝, 节省了空间, 并有利于控制发病条件, 更加便于管理, 有利于大量不同材料和不同基因型的鉴定; 可

通过改变浸泡菌液的浓度人为控制发病的速度, 节省时间, 降低能耗。鉴定结果的一致性更强、重复性更高。由于对每一个茎枝在菌液浸泡前均经过同样的锋利刀片的垂直切割, 所受到的伤害基本一致, 避免了伤根灌注法伤根程度不同和毛细管滴注法对不同粗细的植株茎枝所造成的伤害程度不同的弊端及由此引起的植株抗感表现的差异^[9]; 同时浸泡所用菌液均匀一致, 减少其他条件的干扰, 保证了鉴定结果的一致性和可重复性; 并且同一植株的多个茎枝可同时进行鉴定, 增加了单株鉴定的准确性, 这对于无性繁殖的作物具有重要意义。适用对象更广。大田生长的植株, 组培幼苗, 小气候环境下的植株, 开放环境下的盆栽植株和温室内盆栽植株, 植株的主枝和次生枝等均可采用该方法进行鉴定; 同时对所要鉴定的群体大小没有严格的限制, 只要每个基因型的植株茎枝能够满足 5 个以上即可。可人为控制发病时间的早晚。增加所使用菌液的浓度, 可进行植株抗病性的快速鉴定; 降低浸泡菌液的浓度, 则可推迟发病时间, 按照传统的调查方法进行调查后, 确定植株的抗病级别。鉴定后的植株可直接应用。由于用于鉴定的是植株的茎枝, 所剩余的植株没有接触病菌, 因此可直接进行应用, 而灌根法和毛细管法则不能, 这对于珍贵稀有的植株材料的保存和繁殖具有重要意义。

该方法与传统的灌根法及毛细管菌液滴注法等方法一样, 与真正的大田环境仍然存在一定的差异, 因此要最终确定种质资源的抗病性, 尚需结合大田鉴定方法共同确定。但该方法与其它室内鉴定方法相

比更加简单、便捷和经济, 可操作性与重复性更强, 对于资源材料的先期评价和筛选具有重要的指导价值和实践意义。

[参 考 文 献]

- [1] Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, et al. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen nov: Proposal of *Ralstonia pickettii* [J]. *Microbiol Immunol*, 1995, 39: 897-904.
- [2] He Liyuan. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* from China [J]. *Pl Dis*, 1987, 67: 1357-1362.
- [3] 孙惠生. 马铃薯育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 237-238.
- [4] 李乃坚, 黄爱兴, 袁四清, 等. 茄科作物抗青枯病水培法鉴定研究 II. 液体培养青枯菌的致病力 [J]. *广东农业科学*, 2000, 3: 38-40.
- [5] Qu Dongyu. Use of unreduced gametes of potato for TPS production through 4x - 2x crosses [D]. Wageningen: Wageningen Agricultural University, 1996.
- [6] 冯洁, 何礼远, 袁凤华. 马铃薯 32kD 抗菌蛋白的 cDNA 分子克隆研究 [J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7 (1): 37-40.
- [7] Feng J, Yuan F, Gao Y, et al. A novel antimicrobial protein isolated from potato (*Solanum tuberosum*) shares homology with an acid phosphatase [J]. *Biochem J*. 2003, 376 (2): 481-487.
- [8] Vasse J, Frey P, Trigalet A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 241-251.
- [9] Perera K D A, Hartman G L, Poulos J M. Introduction procedures and the evaluation of peppers for resistance to *P. solanacearum*. *Bacterial Wilt* [R]. The Australian Center for International Agricultural Research, 1992: 193-198.

A New Identification Method for *Ralstonia solanacearum* Resistance in Potato (*Solanum tuberosum* L.)

Li Guangcun, Jin Liping, Xie Kaiyun, Pang Wanfu, Bian Chunsong, Duan Shaoguang, Qu Dongyu

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

Abstract: Traditional methods and a modified identification method, named as "Stem Culture in Bacterial Solution Method", were used to identify the resistance to *Ralstonia solanacearum* in potato germplasm. The results showed that the modified identification method was more economic and repeatable, simpler and easier to be operated compared to the traditional methods. The new method also can be used to identify the resistance in tomato and tobacco germplasm.

Key Words: potato; bacterial wilt; stem culture in bacterial solution method