

# 黄瓜穴盘苗期枯萎病抗性鉴定方法及枯萎病胁迫下的生理响应

杨凡<sup>1,2</sup>, 唐艳领<sup>1</sup>, 牛莉莉<sup>1</sup>, 马凯<sup>1</sup>, 王晨阳<sup>2</sup>, 米国全<sup>1</sup>, 余其红<sup>3</sup>, 史宣杰<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院园艺研究所 郑州 450002; 2. 河南农业大学 郑州 450002;  
3. 湖北省襄阳市农业综合执法支队 湖北襄阳 441021)

**摘要:** 建立黄瓜枯萎病接种方法,旨在实现快速、准确的黄瓜种质资源抗病性筛选。利用下胚轴注射、菌土、胚根和灌根接种法对病原菌接种浓度、摇菌时间等进行了黄瓜苗期枯萎病抗性鉴定。结果表明,下胚轴注射接种法优于其他3种接种法,当病原菌孢子最适接种浓度为 $1 \times 10^6$ 孢子 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、最佳菌种摇菌时间为7 d时,可以有效区分黄瓜枯萎病抗感性差异。下胚轴注射接种法适用于黄瓜种质枯萎病抗性快速高效鉴定。

**关键词:** 黄瓜枯萎病; 尖孢镰刀菌病原菌; 抗病性鉴定

中图分类号: S642.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-2871(2022)03-081-05

## Evaluation of cucumber seedling resistance to *Fusarium* wilt and physiological response to pathogen stress

YANG Fan<sup>1,2</sup>, TANG Yanling<sup>1</sup>, NIU Lili<sup>1</sup>, MA Kai<sup>1</sup>, WANG Chenyang<sup>2</sup>, MI Guoquan<sup>1</sup>, YU Qihong<sup>3</sup>, SHI Xuanjie<sup>1</sup>

(1. Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China; 3. Agricultural Comprehensive Law Enforcement Detachment of Xiangyang City, Xiangyang 441021, Hubei, China)

**Abstract:** A fast and accurate evaluation of cucumber seedling resistance to *Fusarium* wilt is needed. We tested hypocotyl injection, pathogen infested soil, radicle and root inoculation in this study. Inoculum of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* with different concentration and medium culture periods were used for the tests. The results showed that the hypocotyl injection was better than the other three inoculation methods. The best inoculation concentration was  $1 \times 10^6$  spores $\cdot$ mL<sup>-1</sup> and the best pathogen culturing period was 7 d for identifying *Fusarium* wilt resistance in cucumber cultivars. The hypocotyl injection method is suggested for screening cucumber germplasm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*.

**Key words:** *Fusarium* wilt disease; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*; Resistance evaluation

黄瓜是世界蔬菜主栽作物之一,在我国是实现农民增收、农业增效、农村经济发展及乡村振兴的重要支柱。黄瓜枯萎病是一种全球性毁灭性病害,是植物中的“癌症”,发病率一般在15%~35%,严重时可达85%,甚至绝收<sup>[1]</sup>。随着我国设施黄瓜种植面积增加,连作栽培往往导致毁种失收,严重影响着我国不同栽培条件下黄瓜品质及产量,已经成为阻碍黄瓜生产的主要因素<sup>[2]</sup>。黄瓜枯萎病是一种导

管侵染性土壤传播病害,化学及农业等防治方法均难以控制<sup>[3]</sup>。实践证明,抗病品种培育与利用是防治黄瓜枯萎病最经济有效的手段,而制定出快速简便、准确有效的抗病性鉴定评价方法,则有助于加速抗病育种的进程<sup>[4]</sup>。

国内外对黄瓜枯萎病抗性鉴定方法多样,未有统一技术标准,特别是在苗期鉴定<sup>[5]</sup>。国外黄瓜苗期枯萎病抗性鉴定方法主要采用灌根接种、菌土接

收稿日期:2021-07-13;修回日期:2021-11-10

基金项目:河南省科技攻关项目(212102110426);河南省农业科学院科技发展专项资金(2020YQ12);河南省博士后科研项目(001702029);河南省农业科学院基本科研业务费项目(JC011)

作者简介:杨凡,男,副研究员,主要从事蔬菜工厂化育苗技术相关研究。E-mail: xiaoyuefuxiang@163.com

并列第一作者:唐艳领,女,助理研究员,主要从事设施蔬菜栽培、工厂化育苗以及相关微生物防治等研究。E-mail: tangtangyanling@126.com

通信作者:史宣杰,男,研究员,主要从事蔬菜栽培及工厂化育苗技术等相关研究。E-mail: 13803840196@139.com

种和蘸根接种等3种方法,国内流行的则是灌根、浸根和胚根等接种法,此外毒素浸根也被用来评价黄瓜枯萎病抗性<sup>[6-8]</sup>。但所采用的鉴定方法、病情分级标准等不一致,造成了抗性鉴定的准确性和稳定性差异较大,无法真实反映黄瓜品种抗病水平。因此,本试验旨在建立一套快速准确、实用稳定的人工接种抗病性鉴定技术,为提高黄瓜抗病育种效率和培育抗病品种提供技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试抗性品种博杰616和博美310,感病品种博杰605均由河南省庆发种业有限公司提供。感病品种津研4号购自于种子市场。黄瓜种子温汤处理催芽,待胚根长0.5 cm备用。各处理种子1穴1粒,播于40孔穴盘(穴盘规格:长×宽=540 mm×280 mm)。

供试病原菌为黄瓜枯萎病病原菌4号生理小种,由河南省农业科学院园艺研究所提供。采用翁祖信等<sup>[9]</sup>方法制备黄瓜枯萎病菌4号生理小种病原菌分生孢子液,稍作改动。该菌株在PDA培养基(配方:马铃薯200 g,葡萄糖15 g,琼脂粉18 g,蒸馏水1000 mL,高温湿热灭菌)上25℃黑暗条件下培养3 d,从菌落边缘取直径5 mm的菌饼3块,接种在含有100 mL PDB培养基的250 mL的三角瓶中,25℃,250 r·min<sup>-1</sup>,振荡培养5 d,取培养好的菌液用双层纱布过滤,除去菌丝,得到孢子悬浮液。用血球计数板记录孢子悬液孢子数,并将孢子悬浮液稀释不同浓度备用。

灭菌育苗基质采用欧博亚V<sub>泥炭</sub>:V<sub>珍珠岩</sub>:V<sub>蛭石</sub>=6:3:1混合物,高压消毒灭菌,装入40孔穴盘备用。

### 1.2 接种方法试验

试验于2020年10—12月在河南现代农业研究开发基地育苗温室车间进行。采用4种接种方法,分别为菌土接种法、胚根接种法、灌根接种法和下胚轴注射接种法。

菌土接种法<sup>[9]</sup>:选用灭菌基质与一定体积菌液量混合均匀,分装在40孔穴盘中,平均每穴孔含菌液量10 mL,然后将催芽种子播于穴盘内。

胚根接种法:按翁祖信等<sup>[9]</sup>的方法进行,并稍作修改,即用孢子悬浮液浸泡催芽种子20 min,然后播于穴盘内。

灌根接种法:参照周红梅等<sup>[5]</sup>的方法,略有修改。种子催芽后,播于装有灭菌基质的40孔穴盘

中。子叶展平期,在距根际1 cm处2个方向各切1刀,以 $1 \times 10^6$ 孢子·mL<sup>-1</sup>浓度接种液灌根,每穴加入10 mL孢子液。

下胚轴注射接种法:参照尤占武等<sup>[10]</sup>的方法,略有修改。种子催芽后,播于装有灭菌基质的40孔穴盘中。子叶展平期,距离下胚轴1 cm处,注射接种,接种量0.5 μL,浓度为 $1 \times 10^6$ 孢子·mL<sup>-1</sup>。

采用4种接种法接种的黄瓜幼苗均随机置于育苗车间中,白天维持在24~30℃、夜间16~20℃培养。各处理均设3次重复,每个重复30盘。接种后3、8、13、18 d观察黄瓜穴盘幼苗发病情况,调查各处理发病程度及病情指数。

### 1.3 接种浓度试验

利用筛选出的黄瓜枯萎病适宜接种方法,设枯萎病菌菌液接种浓度4个梯度处理,分别为 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 孢子·mL<sup>-1</sup>。

### 1.4 病原菌摇菌时间接种试验

利用筛选出的黄瓜枯萎病适宜接种方法和接种浓度,进行病原菌生长时间接种试验。该菌株菌块接种在含有100 mL PDB培养基的250 mL的三角瓶中,25℃,250 r·min<sup>-1</sup>,分别振荡培养3、5、7、9 d,取培养好的菌液用双层纱布过滤,除去菌丝,得到孢子悬浮液。用血球计数板记录孢子悬液中孢子数,并将孢子悬浮液孢子浓度稀释至 $1 \times 10^6$ 孢子·mL<sup>-1</sup>,备用。

### 1.5 病情调查及分级

病害严重度分级标准:接种枯萎病菌后,黄瓜穴盘苗期发病症状主要表现为植株叶片黄化、植株枯萎、甚至整株枯死。根据症状特征,参考前人黄瓜枯萎病病级划分标准,建立黄瓜枯萎病0~4分级标准(A代表萎蔫面积)<sup>[11-12]</sup>。

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≤25%;

2级:胚轴或子叶有明显坏死斑,叶片黄化或萎蔫面积25%<A≤50%;

3级:局部萎蔫,或子叶枯死,叶片重度黄化或萎蔫面积50%<A≤75%;

4级:整体萎蔫、倒伏或枯死,叶片完全枯萎。

接种后3、8、13、18 d观察,调查各处理黄瓜穴盘幼苗发病情况,并记录病级数,计算各个处理病情指数:

病情指数(DI)= $\sum$ (各级病株数×各级代表值)/  
(调查总株数×最高级代表值)。

抗性评价标准:参照司龙亭等<sup>[13]</sup>和陈振东等<sup>[14]</sup>按病情指数(DI)划分抗性评价标准,略有修改。

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): $75 < DI$ 。

### 1.6 防御酶活性和MDA含量测定

利用筛选出的黄瓜枯萎病适接种方法和最优接种浓度及病原菌最佳生长时间接种进行枯萎病胁迫下防御酶如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)活性和丙二醛(MDA)含量检测。于接种后筛选出的最优观察时间取样检测。MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定;参照刘新<sup>[15]</sup>的方法测定植物防御酶,分别以 $D_{290\text{ nm}}$ 、 $D_{470\text{ nm}}$ 、 $D_{410\text{ nm}}$ 值变化0.01为1个PAL、PPO和POD酶活性单位。

### 1.7 数据统计与分析

利用Microsoft Excel 2016软件进行图表制作,利用DPS7.05等对数据进行处理与显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种方法对黄瓜穴盘幼苗枯萎病的影响

以病原菌 $1 \times 10^6$ 孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 分生孢子浓度为原始接种量,利用下胚轴注射、菌土接种、灌根接种和胚根接种4种接种方法对供试黄瓜材料进行枯萎病抗性试验。结果表明,随着接种时间延长,黄瓜枯萎病发病程度越严重、病情指数越高。当病原菌接种8 d后,菌土法穴盘黄瓜幼苗枯萎病发病最轻,而下胚轴注射法黄瓜枯萎病发病快速整齐,病情指数较高,效果明显(表1)。两个感病品种博杰605和津研4号病情指数分别高达60.6和63.8,发病严重;而抗病品种博杰616和博美310病情指数分别为27.9和29.4,由接种3 d高抗降为一般抗性。与接种后13、18 d比,病情指数差异显著,可以作为快速高效鉴定黄瓜枯萎病时间点。经过比较分析,下胚轴注射法、菌土接种法、灌根接种法及胚根接种法不同处理方法对穴盘黄瓜幼苗枯萎病发病效果影响依次为:下胚轴注射接种法>胚根接种法>灌根接种法>菌土接种法。

表1 不同接种方法对黄瓜穴盘幼苗枯萎病的影响

接种方法	品种	3 d		8 d		13 d		18 d	
		病情指数	抗病性	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性
菌土法	博杰 616	7.5±1.2 b	HR	12.3±1.8 b	HR	20.6±3.1 a	R	27.7±3.7 a	R
	博美 310	6.8±2.1 b	HR	11.9±2.4 b	HR	21.2±3.5 a	R	27.3±3.4 a	R
	博杰 605	17.3±3.6 d	R	29.3±2.2 c	MR	39.3±4.3 b	MR	57.7±3.5 a	S
	津研 4号	16.4±3.2 d	R	28.5±1.6 c	MR	37.9±2.4 b	MR	59.8±4.1 a	S
胚根法	博杰 616	13.5±2.3 b	HR	19.8±3.2 b	R	27.3±1.7 a	R	30.4±2.4 a	R
	博美 310	13.7±2.5 b	HR	20.3±2.9 b	R	27.1±2.5 a	R	31.7±3.5 a	R
	博杰 605	31.2±2.8 d	R	50.5±2.6 c	MR	60.7±3.3 b	S	72.3±2.7 a	S
	津研 4号	30.3±4.1 d	R	51.7±3.2 c	MR	66.4±4.1 b	S	71.5±3.8 a	S
灌根法	博杰 616	5.4±1.1 b	HR	12.3±1.5 b	R	24.2±2.1 a	R	32.3±1.2 a	R
	博美 310	6.5±1.2 b	HR	11.8±1.4 b	R	23.5±1.4 a	R	33.5±1.3 a	R
	博杰 605	10.9±1.5 d	HR	45.2±1.2 c	MR	54.3±1.5 b	S	67.4±3.6 a	S
	津研 4号	11.2±1.1 d	HR	42.3±1.2 c	MR	52.7±2.3 b	S	64.2±2.5 a	S
下胚轴注射法	博杰 616	14.4±2.3 c	HR	27.9±3.2 b	R	41.4±1.7 a	MR	50.3±2.4 a	MR
	博美 310	14.9±2.5 c	HR	29.4±2.9 b	R	43.7±2.5 a	MR	52.9±3.5 a	MR
	博杰 605	28.8±2.8 c	R	60.6±2.6 b	S	75.6±3.3 a	HS	82.1±2.7 a	HS
	津研 4号	29.2±4.1 c	R	63.8±3.2 b	S	75.8±4.1 a	HS	83.4±3.8 a	HS

注:同行数字后不同小写字母表示在0.05水平差异显著,表2~3同。

### 2.2 分生孢子接种浓度对黄瓜穴盘幼苗枯萎病的影响

采用下胚轴注射法,以 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种浓度对供试黄瓜穴盘幼苗子叶展开期进行枯萎病接种(表2)。结果表明,病原菌孢子不同浓度对黄瓜幼苗枯萎病发生均有一定影响,随着病原菌孢子浓度不断增加及接种后时间延

长,黄瓜幼苗枯萎病发生越严重。各处理在接种后8 d病情指数和接种后13、18 d差异显著,可以作为快速高效鉴定黄瓜枯萎病时间点。当孢子接种浓度为 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,黄瓜苗期枯萎病发生最严重,两者之间差异不明显,但明显高于孢子接种浓度 $1 \times 10^4$ 和 $1 \times 10^5$ 孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。因此,为了有效准确鉴定黄瓜资源抗病性,本试验确定黄瓜枯萎

表2 不同分生孢子浓度对黄瓜穴盘幼苗枯萎病的影响

分生孢子浓度/(孢子·mL <sup>-1</sup> )	品种	3 d		8 d		13 d		18 d	
		病情指数	抗病性	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性
1×10 <sup>4</sup>	博杰 616	11.6±2.5 b	HR	18.3±2.1 b	R	26.1±2.6 a	R	42.4±1.5 a	MR
	博美 310	12.7±1.5 b	HR	17.4±2.2 b	R	25.3±2.4 a	R	45.3±1.7 a	MR
	博杰 605	26.4±1.7 d	R	44.2±2.3 c	MR	57.6±3.1 b	MR	71.2±2.1 a	S
	津研 4 号	25.3±1.3 d	R	46.7±1.5 c	MR	56.9±1.1 b	MR	72.3±1.9 a	S
1×10 <sup>5</sup>	博杰 616	13.2±1.2 b	HR	19.5±2.2 b	R	25.4±2.3 a	R	43.2±3.2 a	MR
	博美 310	13.5±3.4 b	HR	18.7±2.3 b	R	26.2±1.2 a	R	44.9±5.4 a	MR
	博杰 605	27.4±2.7 d	R	49.3±2.5 c	MR	58.8±1.6 b	S	71.6±3.2 a	S
	津研 4 号	26.5±3.2 d	R	48.2±2.8 c	MR	59.3±1.7 b	S	72.4±1.7 a	S
1×10 <sup>6</sup>	博杰 616	14.4±2.3 c	HR	27.9±3.2 b	R	41.4±1.7 a	MR	50.3±2.4 a	MR
	博美 310	14.9±2.5 c	HR	29.4±2.9 b	R	43.7±2.5 a	MR	52.9±3.5 a	MR
	博杰 605	28.8±2.8 c	R	60.6±2.6 b	S	75.6±3.3 a	HS	82.1±2.7 a	HS
	津研 4 号	29.2±4.1 c	R	63.8±3.2 b	S	75.8±4.1 a	HS	83.4±3.8 a	HS
1×10 <sup>7</sup>	博杰 616	17.3±1.9 c	HR	29.2±2.1 b	R	43.7±1.6 a	MR	51.2±3.2 a	MR
	博美 310	15.6±1.3 c	HR	30.1±2.4 b	R	49.2±1.2 a	MR	52.6±2.3 a	MR
	博杰 605	29.1±2.1 c	R	61.5±1.5 b	S	79.4±3.9 a	HS	83.6±3.1 a	HS
	津研 4 号	29.3±1.5 c	R	62.4±4.3 b	S	78.9±2.5 a	HS	84.9±2.8 a	HS

病原菌孢子接种适宜浓度为 1×10<sup>6</sup> 孢子·mL<sup>-1</sup>。

### 2.3 病原菌摇菌时间对黄瓜穴盘幼苗枯萎病的影响

采用下胚轴注射法,以病原菌摇菌时间 3、5、7、9 d 分别配制 1×10<sup>6</sup> 孢子·mL<sup>-1</sup> 接种浓度,对供试黄瓜子叶展开期穴盘幼苗进行枯萎病接种(表 3)。结果表明,病原菌摇菌时间对黄瓜幼苗枯萎病发生均

有一定的影响。摇菌时间为 3 d 和 5 d 时,黄瓜苗期枯萎病发生较轻,两者之间差异不明显。随着病原菌摇菌时间增长,黄瓜幼苗枯萎病发生随之加重,摇菌时间为 7 d 和 9 d 时,枯萎病发病程度明显高于摇菌时间为 3 d 和 5 d 时。因此,为了有效准确鉴定黄瓜资源抗病性,本试验确定黄瓜枯萎病病

表3 病原菌摇菌时间对黄瓜穴盘幼苗枯萎病影响

摇菌时间/d	品种	3 d		8 d		13 d		18 d	
		病情指数	抗病性	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性
3	博杰 616	10.1±2.1 b	HR	18.9±1.9 b	R	21.7±2.7 a	R	40.9±1.6 a	MR
	博美 310	10.9±2.3 b	HR	17.1±3.2 b	R	23.8±3.2 a	R	44.7±1.8 a	MR
	博杰 605	20.4±1.9 d	R	42.7±2.5 c	MR	57.9±4.1 b	MR	68.4±3.1 a	S
	津研 4 号	21.2±2.4 d	R	45.4±3.6 c	MR	55.8±2.7 b	MR	65.3±2.5 a	S
5	博杰 616	11.3±1.5 b	HR	18.4±2.5 b	R	23.7±1.8 a	R	41.6±2.3 a	MR
	博美 310	11.2±1.7 b	HR	18.3±1.6 b	R	25.1±2.7 a	R	43.2±3.1 a	MR
	博杰 605	22.3±2.4 d	R	45.6±1.8 c	MR	56.9±3.1 b	S	70.5±2.5 a	S
	津研 4 号	21.6±2.5 d	R	46.3±1.9 c	MR	57.4±2.9 b	S	74.4±1.3 a	S
7	博杰 616	14.4±2.3 c	HR	27.9±3.2 b	R	41.4±1.7 a	MR	50.3±2.4 a	MR
	博美 310	14.9±2.5 c	HR	29.4±2.9 b	R	43.7±2.5 a	MR	52.9±3.5 a	MR
	博杰 605	28.8±2.8 c	R	60.6±2.6 b	S	75.6±3.3 a	HS	82.1±2.7 a	HS
	津研 4 号	29.2±4.1 c	R	63.8±3.2 b	S	75.8±4.1 a	HS	83.4±3.8 a	HS
9	博杰 616	16.9±3.4 c	HR	29.3±1.8 b	R	45.6±3.1 a	MR	52.1±1.9 a	MR
	博美 310	17.2±2.9 c	HR	29.8±3.5 b	R	48.4±3.2 a	MR	53.2±2.6 a	MR
	博杰 605	29.1±3.1 c	R	62.3±2.7 b	S	76.9±2.7 a	HS	85.2±2.8 a	HS
	津研 4 号	28.8±2.7 c	R	61.4±2.5 b	S	77.5±2.4 a	HS	86.3±3.1 a	HS

病原菌摇菌时间为 7 d。

### 2.4 枯萎病胁迫条件下对黄瓜穴盘幼苗防御酶活性的影响

以病原菌摇菌 7 d、分生孢子浓度为 1×10<sup>6</sup> 孢子·mL<sup>-1</sup>,对黄瓜子叶展开期穴盘幼苗进行下胚轴注射接种试验。接种后 8 d(表 4),不同黄瓜品种幼苗防御酶 PAL、PPO、POD 活性均有一定变化。其中,抗病品

表4 枯萎病胁迫条件下对黄瓜穴盘幼苗防御酶活性和 MDA 含量的影响

品种	PAL 活性/ (U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	PPO 活性/ (U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	POD 活性/ (U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	b(MDA)/ (μmol·g <sup>-1</sup> )
博杰 616	39.8±1.2 a	345.2±2.4 a	39.5±3.9 a	3.5±0.5 b
博美 310	41.3±2.1 a	330.6±3.1 a	40.1±4.5 a	3.6±0.3 b
博杰 605	19.6±1.6 b	214.5±1.9 b	12.4±3.6 b	5.7±1.1 a
津研 4 号	18.7±1.8 b	208.9±2.2 b	13.6±2.8 b	5.9±0.9 a

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。



种博杰 616 和博美 310 防御酶活性高于感病品种博杰 605 和津研 4 号,抗感品种和防御酶活性成正相关。而在 MDA 含量方面,抗病品种显著低于感病品种,抗病品种与 MDA 含量呈负相关,黄瓜品种越抗病,MDA 含量越低。

### 3 讨论与结论

目前黄瓜枯萎病抗性鉴定方法主要有苗期接种和大田成株期抗性鉴定<sup>[16]</sup>,而苗期接种鉴定因周期短、发病快、操作简单等被广泛应用。黄瓜胚根接种法、菌土接种法、浸根接种法和毒素接种法等在国内使用较多,但实际操作往往造成出苗不均匀或发病轻,一定程度影响品种的抗性反应。本研究结果表明,下胚轴注射接种法具有发病快而整齐、结果准确稳定、用菌量少等优点,且操作简单。采用下胚轴注射法,黄瓜抗感性很容易区分,且 4 个黄瓜供试品种对枯萎病抗性与商品实际情况吻合。经过比较分析,不同处理方法对穴盘黄瓜幼苗枯萎病发病效果影响依次为:下胚轴注射接种法>胚根接种法>灌根接种法>菌土接种法。接种后 8 d,黄瓜枯萎病病情指数差异明显,虽然发病程度低于接种后 13 d 和 18 d 时,但是可以作为快速有效评判黄瓜抗性的依据,比国内外多数报道枯萎病评判时间提早了 3~8 d<sup>[5,8,9,14]</sup>。

田仁鹏等<sup>[17]</sup>研究表明,甘蓝枯萎病抗性鉴定接种最适浓度为  $10^6$  孢子·mL<sup>-1</sup>。李超汉等<sup>[18]</sup>研究认为孢子接种浓度以  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  孢子·mL<sup>-1</sup> 可以快速使幼苗发病。本试验采用下胚轴注射法,以  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  孢子·mL<sup>-1</sup> 接种浓度进行枯萎病接种。当孢子接种浓度为  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  孢子·mL<sup>-1</sup> 时,黄瓜苗期枯萎病发生最严重,明显高于孢子接种浓度为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  孢子·mL<sup>-1</sup> 时,这与前人研究结果一致。在病原菌菌龄和致病性试验方面,笔者发现随着病原菌摇菌时间变长,枯萎病发病程度逐渐变高,当摇菌时间为 7~9 d 时,枯萎病发病程度最高,这可能说明病原菌在生长过程中会产生毒素或代谢产物,加剧黄瓜枯萎病发生。从节省时间及能源考虑,以病原菌摇菌时间 7 d 菌龄为宜。

国内外多数研究报告表明植株遭受病原菌攻击后,会诱导植物发生防御性反应,减少活性氧对植物细胞膜系统的破坏,提高植物免疫力。苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶、多酚氧化酶活性及丙二醛含量可作为植物抗病能力生理指标。本试验通过分析丙二醛含量与枯萎病发病率之间的相关性,发

现枯萎病发病率越高,植物丙二醛含量越高。而抗病品种博杰 616 和博美 310 苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶、多酚氧化酶等防御酶活性高于感病品种博杰 605 和津研 4 号,这与徐建华等<sup>[19]</sup>、李新等<sup>[20]</sup>、马艳玲等<sup>[21]</sup>的研究结果相一致。本试验主要从枯萎病发病率与相关酶活性指标之间的关系进行了探讨,但具体到抗性品种与感病品种在酶活性高低方面单独变化趋势和相互关系及致病机制仍有待进一步探讨。

通过采用下胚轴注射接种法,明确了病原菌孢子最适接种浓度为  $1 \times 10^6$  孢子·mL<sup>-1</sup>;最佳菌种摇菌时间为 7 d 等,建立了高效、快速、准确稳定的黄瓜枯萎病苗期接种鉴定技术体系,比目前国内外多数报道枯萎病评判时间提早了 3~8 d,减少了人力物力资源浪费,加快了黄瓜抗病品种选育的进程。

### 参考文献

- [1] 杨侃侃,刘晓虹,陈宸,等. 黄瓜枯萎病研究进展[J]. 湖南农业科学, 2019, 32(6): 121-124.
- [2] 蒲子婧,张艳菊,刘东,等. 黄瓜枯萎病生物防治策略研究进展[J]. 中国蔬菜, 2011(6): 9-14.
- [3] 贾会玲,黄晓德,钱骅,等. 9 种植物精油及精油单体成分对黄瓜枯萎病的抑菌活性[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(31): 160-162.
- [4] 李亚莉,侯栋,岳宏忠,等. 33 份黄瓜核心种质对枯萎病的抗性评价及遗传特性研究[J]. 甘肃农业科技, 2018(1): 25-30.
- [5] 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.
- [6] 毛爱军,张峰,张丽蓉,等. 不同黄瓜材料对枯萎病的抗性评价[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 214-216.
- [7] 李亚莉,侯栋,岳宏忠,等. 黄瓜抗枯萎病研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2018(5): 77-80.
- [8] 翁祖信,蒋兴祥,肖小文. 黄瓜枯萎病抗病性鉴定方法研究: 胚根接种法[J]. 中国蔬菜, 1985(2): 30-33.
- [9] 李岸,蔡美杰,张鑫鑫,等. 甘蓝枯萎病苗期抗病性鉴定方法[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(10): 32-39.
- [10] 尤占武,徐丽鸣,艾瑞英. 采用下胚轴双孔注射法鉴定菜豆品种资源苗期抗枯萎病特性的结果[J]. 吉林蔬菜, 2004(2): 32-33.
- [11] 陈凤春. 黄瓜枯萎病接种方法及抗性遗传规律研究[J]. 现代农业科技, 2014(18): 142.
- [12] 陈珉. 黄瓜枯萎病抗性遗传及结构解剖的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 1999.
- [13] 司龙亭,刘洪雨,李新. 黄瓜品种对枯萎病抗性鉴定研究[J]. 农业科技与装备, 2008(1): 10-13.
- [14] 陈振东,黄如葵,黎起秦,等. 苦瓜种质资源苗期枯萎病抗性鉴定[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1776-1780.
- [15] 刘新. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [16] 林中正,魏润洁,盛云泽,等. 黄瓜枯萎病研究概述[J]. 北京农业, 2011(30): 91-92.
- [17] 田仁鹏,康俊根,耿丽华,等. 甘蓝枯萎病抗性鉴定方法研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(4): 39-42.
- [18] 李超汉,朱丽华,杨红娟,等. 西瓜种质资源的枯萎病抗性鉴定[J]. 上海农业学报, 2020, 36(4): 37-42.
- [19] 徐建华,利容千,王建波. 黄瓜不同抗病品种感染镰刀菌枯萎病菌后几种酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1995, 25(4): 239-242.
- [20] 李新,司龙亭. 黄瓜不同品种苗期感染枯萎病菌后几种酶活性的变化[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 9-11.
- [21] 马艳玲,吴凤芝,刘守伟. 抗感枯萎病黄瓜品种的病理组织结构学研究[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 81-84.