

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.2024.0056

# 苦瓜枯萎病抗性生理研究及鉴定评价体系构建

凌 怡<sup>1,2</sup>, 杨 衍<sup>2</sup>, 牛 玉<sup>2</sup>, 于仁波<sup>2</sup>, 刘昭华<sup>2</sup>, 刘平武<sup>1</sup>, 韩 旭<sup>2</sup>

(1. 海南大学热带农林学院 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 海口 571101)

**摘要:**通过苦瓜枯萎病抗性生理研究,构建高效精准的苦瓜枯萎病抗性鉴定评价体系,旨在为苦瓜抗枯萎病种质资源筛选及抗病品种选育提供理论基础。以热科2号苦瓜为试验材料,选用灌根法、胚根法和伤根法在苦瓜2叶1心期接种不同浓度的苦瓜枯萎病菌,分析不同接种时间的病情指数和生理响应的差异情况,以及不同接种方法和接种浓度对病害的影响。结果表明,采用灌根法接种 $1 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的枯萎病菌,在第25天时病情指数为37.1,显著低于 $1 \times 10^7$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、显著高于 $1 \times 10^4$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,苯丙氨酸解氨酶活性和叶绿素含量显著低于胚根法,多酚氧化酶活性与可溶性蛋白含量与胚根法相比无显著差异。在苦瓜幼苗2叶1心时采用灌根法接种 $1 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的枯萎病菌,25 d时鉴定发病情况,可作为精准高效鉴定苦瓜枯萎病抗性的体系。

**关键词:** 苦瓜; 枯萎病; 病情指数; 抗性生理; 鉴定评价技术

中图分类号: S642.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)06-069-10

## Resistance physiological study and evaluation system establishment on *Fusarium* wilt of bitter gourd

LING Yi<sup>1,2</sup>, YANG Yan<sup>2</sup>, NIU Yu<sup>2</sup>, YU Renbo<sup>2</sup>, LIU Zhaohua<sup>2</sup>, LIU Pingwu<sup>1</sup>, HAN Xu<sup>2</sup>

(1. College of Tropical Agroforestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; 2. Tropical Crop Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, China)

**Abstract:** Through the study of bitter gourd *Fusarium* wilt resistance physiology, the authors have constructed an efficient and precise identification and evaluation system for bitter gourd *Fusarium* wilt resistance, aiming to provide a theoretical basis for the screening and evaluation of *Fusarium*-resistant germplasm resources and the selection and breeding of disease-resistant varieties. In this study, Reke No. 2 bitter gourd was used as the test material, and selected the root irrigation, radicle root and injure root methods to inoculate different concentrations of *Fusarium* wilt fungus liquid at the time of two-leaf and one heart of bitter gourd, and investigated the effects of different inoculation methods and inoculation concentrations on the *Fusarium* wilt by analyzing the differences in disease index and physiological responses at different inoculation times. The results showed that the disease index was 37.1 using the root irrigation inoculated fungus with  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  at 25 d, which was significantly lower than that of  $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ , and significantly higher than that of  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ . PAL activity and chlorophyll content were significantly lower than the radicle method, and no significant difference existed between PPO activity and soluble protein content. When bitter gourd seedlings of two-leaf and one heart were inoculated with  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  fungus using the root irrigation method, the disease incidence was identified at 25 d, which can serve as an accurate and efficient identification system of bitter gourd *Fusarium* wilt resistance.

**Key words:** Bitter gourd; *Fusarium* wilt; Disease index; Resistance physiology; Identification and evaluation technology

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属葫芦科苦瓜属植物,是重要的食药同源蔬菜作物,亦是海南省冬种北运的主要蔬菜作物,占据着冬季蔬菜市场的重要份额<sup>[1]</sup>。苦瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌苦瓜专化型

(*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*)引起的一种严重影响苦瓜产量和品质的土传病害,在任何生育期均能侵染并造成危害,严重时可引起整株萎蔫死亡<sup>[2]</sup>。随着复种指数的逐年增加,苦瓜枯萎病日

收稿日期: 2024-01-25; 修回日期: 2024-04-12

基金项目: 海南省重点研发项目(ZDYF2024XDNY238); 海南省重大科技计划项目(ZDKJ2021010); 海南省冬季瓜菜产业技术体系首席科学家项目(HNARS-05-SX); 海南省冬季瓜菜产业技术体系遗传育种岗岗位专家项目(HNARS-05-G02); 海南省高层次人才项目(320RC7230)

作者简介: 凌 怡, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: 936985851@qq.com

通信作者: 刘平武, 男, 教授, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: hnulpw@hainanu.edu.cn

韩 旭, 女, 副研究员, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: hanxu\_0216@126.com

益加剧,严重制约着苦瓜产业的健康发展<sup>[3]</sup>。苦瓜枯萎病菌在土壤中的存活力和致病力较强,难防难治,选育抗病品种是最经济有效的方法,而高效精准的鉴定评价技术体系是抗病品种选育的重要基础。近年来有关瓜类作物枯萎病抗性鉴定评价的研究多集中在黄瓜和西瓜上,关于苦瓜枯萎病抗性鉴定技术的研究鲜有报道<sup>[4]</sup>,目前仍未形成精准完善的高效鉴定评价技术体系。尖孢镰刀菌常用的接种方法有灌根法、胚根法、伤根法、蘸根法、浸根法等<sup>[5]</sup>。左存武等<sup>[6]</sup>用浸根法和灌根法将 *Foc* TR4 接种不同抗性的香蕉品种,比较分析接种后香蕉的发病情况,结果表明,灌根法的接种效果最好,接种后各品种发病情况与品种本身的实际抗性最为接近。种质来源、环境条件、接种方法、接种浓度、鉴定时间等均能影响苦瓜枯萎病的抗性鉴定,因此,制定简单、高效、统一的鉴定评价技术方案是解决这一问题的重要手段。笔者以中抗枯萎病品种热科2号苦瓜为试验材料,采用不同接种方法、不同菌液浓度、不同鉴定时间等方法研究苦瓜枯萎病的抗性生理机制,综合分析病情指数、根系形态及各项生理指标等,构建高效精准的鉴定评价技术体系,为提高苦瓜种质枯萎病鉴定评价效率和精准度及抗病品种选育提供理论和技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

苦瓜品种热科2号是中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所自主选育的中抗枯萎病品种。

供试病原菌:苦瓜枯萎病致病菌尖孢镰刀菌4501(*Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae*),由广西农业科学院蔬菜研究所陈振东研究员提供。

### 1.2 方 法

试验于2023年6—7月在中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所植物培养室及抗逆生理与分子生物学实验室完成。

1.2.1 浸种催芽 供试苦瓜种子浸泡于55℃温水中8h,用湿润的4层纱布包裹种子,放置在28℃培养箱中培养2~3d,种子露白待用。

1.2.2 枯萎病菌菌液的制备 试验以清水为对照(CK),以不同孢子浓度( $1\times 10^4$ 、 $1\times 10^5$ 、 $1\times 10^6$ 、 $1\times 10^7$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ )的尖孢镰刀菌4501为处理。在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上接种尖孢镰刀菌

4501,置于28℃培养箱中培养7d,使用打孔器取直径7mm的尖孢镰刀菌菌饼接种至马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB)中,在温度为28℃、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡培养7d,然后用双层纱布过滤菌丝,留母液待用。

1.2.3 接种方法 为提高鉴定评价的精准度,所有试验均在人工培养室中进行,室内温度保持在 $(28\pm 1)$ ℃,湿度80%,光照度2500 lx。分别对灌根法、胚根法和伤根法3种接种方法的病情指数和抗病等级进行鉴定,筛选适宜的接种方法。

灌根法:将露白的苦瓜种子播种于装满灭菌基质的营养钵(7 cm $\times$ 7 cm)中,置于塑料托盘内(每个托盘放21个营养钵),每隔2d在托盘中加入500 mL水以保证基质湿润。待苦瓜幼苗生长至2叶1心时采用灌根法接种枯萎病菌<sup>[7]</sup>,在距根际1 cm处用注射器注入20 mL菌液,菌液中分生孢子浓度分别为 $1\times 10^4$ 、 $1\times 10^5$ 、 $1\times 10^6$ 、 $1\times 10^7$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,随机区组排列,3次重复,每次重复63株幼苗,共252株苗。

胚根法:种子露白后待胚根长至1 cm时采用胚根法接种枯萎病菌<sup>[8]</sup>,将种子浸泡在菌液中1 h,菌液中分生孢子浓度分别为 $1\times 10^4$ 、 $1\times 10^5$ 、 $1\times 10^6$ 、 $1\times 10^7$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,后将种子播于装满无菌基质的营养钵中,并置于塑料托盘内,随机区组排列,3次重复,每次重复63株幼苗,共252株苗。

伤根法:将露白的苦瓜种子播种于装满灭菌基质的营养钵中,并置于塑料托盘内,当幼苗长至2叶1心时采用伤根法接种枯萎病菌<sup>[9]</sup>,将幼苗根部基质洗净,剪掉根的三分之一,在孢子悬浮液中浸泡30 min,菌液中分生孢子浓度分别为 $1\times 10^4$ 、 $1\times 10^5$ 、 $1\times 10^6$ 、 $1\times 10^7$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,后将幼苗重新移栽至无菌基质中,随机区组排列,3次重复,每次重复63株幼苗,共252株苗。

1.2.4 测定指标与方法 选择2种适宜的接种方法,分别于接种后0、5、10、15、20和25 d采集根系和同一叶位(第1、2片真叶)的叶片样品,每个处理随机取9株,设3次重复,根系样品拍照用以分析根系形态,叶片用锡纸包裹迅速转移至液氮中速冻,取样完成后将叶片样品储存于-80℃超低温冰箱中,待测各项生理指标。采用胚根法接种菌液的植株在0 d时还处于种子阶段,因此在0 d时无法进行叶片取样。

取0.2 g苦瓜叶片样品放置于已预冷的研钵中,随后加入1 mL pH=7.8的磷酸缓冲液,在冰浴条

件下将其研磨成匀浆,然后使用磷酸缓冲液冲洗研钵及研磨棒,将其倒入匀浆中,使总体积为 10 mL。将样品在 4 °C 条件下进行 10 000 r·min<sup>-1</sup> 的离心操作,离心 20 min 后得到上清液,上清液作为苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)以及可溶性蛋白质的提取液。参照邹芳斌等<sup>[10]</sup>的方法测定 PAL 活性,参照郑莲姬等<sup>[11]</sup>的方法测定 PPO 活性,参照王凤婷等<sup>[12]</sup>的方法测定叶绿素含量,参照青格爾等<sup>[13]</sup>的方法测定可溶性蛋白含量。

采用万深 LA-S 系列植物图像根系分析系统对

根系形态进行分析。

### 1.3 抗病分级标准

病情指数(DI)= $\Sigma$ (病株数×该级代表值)/(总株数×最高级代表值)×100。

参考南宇航等<sup>[14]</sup>的鉴定方法,调查病情指数,植株被定为 0~5 级:0 级,无病症;1 级,子叶萎蔫或部分子叶与真叶轻微萎蔫;2 级,1 片真叶萎蔫或子叶较重萎(≤60%);3 级,子叶及部分真叶萎蔫(>60%);4 级,整株萎蔫,60%以上枯死,但心叶仍成活;5 级,整株枯死。苦瓜枯萎病病情分级详见图 1。



图 1 苦瓜枯萎病病情分级表型

Fig. 1 Phenotypes of bitter melon *Fusarium* wilt resistance

抗性分级标准:高抗(HR): $DI < 10$ ;抗病(R): $10 \leq DI < 30$ ;中抗(MR): $30 \leq DI < 50$ ;感病(S): $50 \leq DI < 70$ ;高感(HS): $DI \geq 70$ 。

### 1.4 统计分析

利用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据整理和作图,利用 SPSS26 软件进行单因素方差分析和显著性差异检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同接种方法及菌液浓度对苦瓜枯萎病病情指数的影响

如表 1 所示,不同接种方法和菌液浓度对苦瓜枯萎病发病情况的影响不同。灌根法接种的苦瓜幼苗病情指数随着菌液浓度的增加而提高,且菌液

表1 不同接种方法及不同菌液浓度对苦瓜苗期枯萎病的影响

Table 1 Effects of different inoculation methods and different fungus liquid concentrations on *Fusarium* wilt at the seedling stage of bitter melon

接种方法 Inoculation method	接菌浓度 Inoculation concentration/ (No. · mL <sup>-1</sup> )	病情指数 Disease index	抗病等级 Disease resistance grade
灌根法 Root irrigation method	1×10 <sup>4</sup>	13.33±4.36 c	R
	1×10 <sup>5</sup>	30.48±1.65 b	MR
	1×10 <sup>6</sup>	37.14±5.71 b	MR
	1×10 <sup>7</sup>	60.00±7.56 a	S
胚根法 Radicle method	1×10 <sup>4</sup>	36.19±8.73 a	MR
	1×10 <sup>5</sup>	46.67±8.73 a	MR
	1×10 <sup>6</sup>	40.00±7.56 a	MR
	1×10 <sup>7</sup>	39.05±6.60 a	MR
伤根法 Injure root method	1×10 <sup>4</sup>	53.33±3.30 b	S
	1×10 <sup>5</sup>	84.76±6.60 a	HS
	1×10 <sup>6</sup>	90.48±3.30 a	HS
	1×10 <sup>7</sup>	83.81±5.95 a	HS

注:同种方法同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different small letters in the same column indicate significant differences among different fungus liquid concentrations of the same method at 0.05 level. The same below.

浓度为 1×10<sup>5</sup> 和 1×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理间无显著差异,抗病等级分别为 R、MR、MR、S;胚根法各菌液浓度间病情指数无显著差异,抗病等级均为 MR;伤根法菌液浓度为 1×10<sup>4</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 时病情指数显著低于菌液浓度为 1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理,抗病等级分别为 S、HS、HS、HS。不同接种方法及不同菌液浓度均不同程度影响苦瓜对枯萎病的抗性表现。采用伤根法接种苦瓜枯萎病菌病情指数过高,抗病等级为感病或高感,无法准确鉴定出品种抗性。为保证苦瓜枯萎病抗性鉴定评价体系的精准性,笔者选择灌根法及胚根法进行下一步研究。

### 2.2 不同接种方法及菌液浓度对苦瓜叶片苯丙氨酸解氨酶活性的影响

如图 2 所示,灌根法接种不同浓度枯萎病菌后的苦瓜叶片 PAL 活性呈不同的变化趋势,接种后 25 d 时,菌液浓度为 1×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理苦瓜叶片及未接菌处理的苦瓜叶片 PAL 活性显著低于其他处理。胚根法接种不同浓度枯萎病菌后的苦瓜叶片 PAL 活性呈不同的变化趋势,接种 25 d 时未接菌处理的苦瓜叶片 PAL 活性低于接菌处理。采用胚根法接种浓度为 1×10<sup>5</sup> 和 1×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的枯萎病

菌液分别在 20 和 25 d 时,苦瓜叶片 PAL 活性显著高于灌根法,而接种菌液浓度为 1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 在 25 d 时显著低于灌根法。

### 2.3 不同接种方法及菌液浓度对苦瓜叶片多酚氧化酶活性的影响

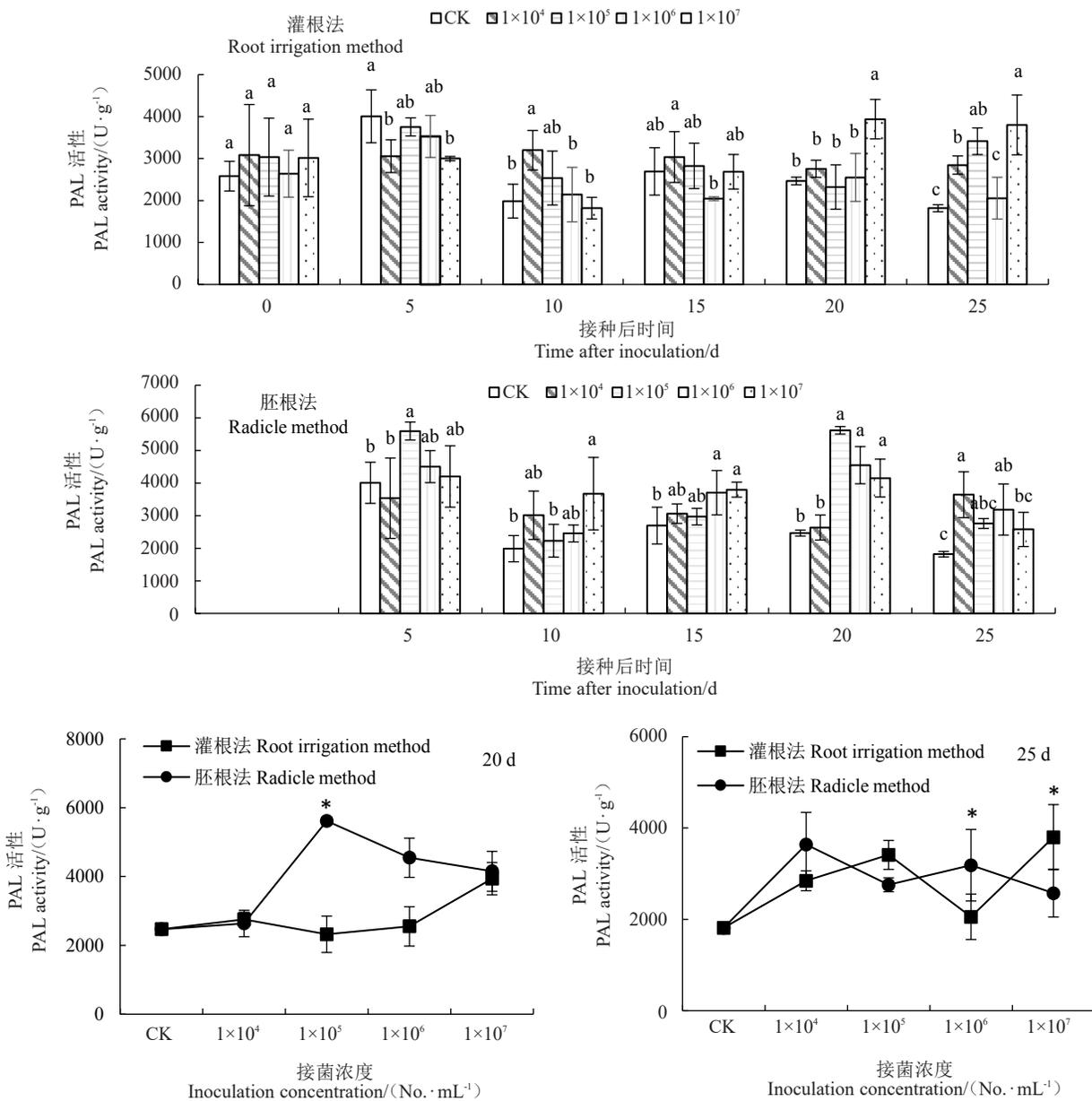
灌根法和胚根法接种不同浓度枯萎病菌后的苦瓜叶片 PPO 活性表现出不同的变化趋势(图 3)。灌根法接种后 20 d 各菌液浓度处理间 PPO 活性无显著差异,第 25 天时各菌液浓度处理间 PPO 活性高于未接菌处理,仅 1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 处理与 CK 呈显著差异。胚根法接种后 20 d,菌液浓度为 1×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理叶片 PPO 活性显著高于其他菌液浓度及未接菌处理,接种后 25 d 各菌液浓度处理间 PPO 活性无显著差异。菌液浓度为 1×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理接种后 20 d,胚根法的叶片 PPO 活性显著高于灌根法。胚根法及灌根法接种不同浓度菌液 25 d 的苦瓜叶片 PPO 活性无显著差异。

### 2.4 不同接种方法及菌液浓度对苦瓜叶片叶绿素含量的影响

灌根法接种不同浓度枯萎病菌后的苦瓜叶片叶绿素含量在 0~5 d 无显著差异,15~25 d 未接菌处理的叶片叶绿素含量显著高于接菌处理(图 4)。灌根法接种后 20 d,菌液浓度为 1×10<sup>4</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理苦瓜叶片叶绿素含量显著高于其他接菌处理,接种后 25 d,菌液浓度为 1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理叶绿素含量低于其他菌液浓度处理。胚根法接种后 20 和 25 d,未接菌处理的叶片叶绿素含量高于接菌处理;接种 20 d 后,菌液浓度为 1×10<sup>4</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 处理的苦瓜叶片叶绿素含量显著高于其他菌液浓度处理,接种 25 d,菌液浓度为 1×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 处理的苦瓜叶片叶绿素含量显著高于菌液浓度为 1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理。菌液浓度为 1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理接种后 20 d,灌根法的叶片叶绿素含量极显著或显著低于胚根法,而菌液浓度为 1×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理,灌根法显著高于胚根法。采用灌根法接种浓度为 1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的处理接种后 25 d,苦瓜叶片叶绿素含量极显著或显著低于胚根法。

### 2.5 不同接种方法及菌液浓度对苦瓜叶片可溶性蛋白含量的影响

如图 5 所示,灌根法接种不同浓度枯萎病菌后的苦瓜叶片可溶性蛋白含量呈不同的变化趋势,接种 20 d 时各处理间无显著差异,25 d 时接菌浓度为 1×10<sup>4</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的叶片可溶性蛋白含量显著低于其他



注: 不同小写字母及\*表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different small letters and \* indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 2 不同接种方法及不同菌液浓度的苦瓜叶片 PAL 活性对比分析

Fig. 2 Comparative analysis of PAL activity of bitter melon leaves with different inoculation methods and different fungus liquid concentrations

接种浓度。胚根法接种 20 d 的苦瓜叶片, 接种浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  处理的叶片可溶性蛋白含量显著高于 CK 和其他接种浓度, 25 d 时叶片可溶性蛋白含量随接种浓度的增加而降低, CK 显著高于接种处理。采用灌根法接种 20 d, 接种浓度分别为  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  处理的苦瓜叶片可溶性蛋白含量均极显著或显著低于胚根法。接种 25 d, 灌根法接种浓度分别为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  处理的苦瓜叶片可溶性蛋白含量均极显著或显著

低于胚根法。

## 2.6 不同接种方法及菌液浓度对苦瓜根系形态的影响

如表 2 所示, 灌根法接种枯萎病菌的苦瓜根系长度随菌液浓度增加呈下降趋势, 表面积和体积无显著差异, 菌液浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  处理的根尖数及分叉数显著低于其他处理。胚根法接种枯萎病菌在菌液浓度为  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  处理的根系长度显著低于  $1 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的处理, 表面积和

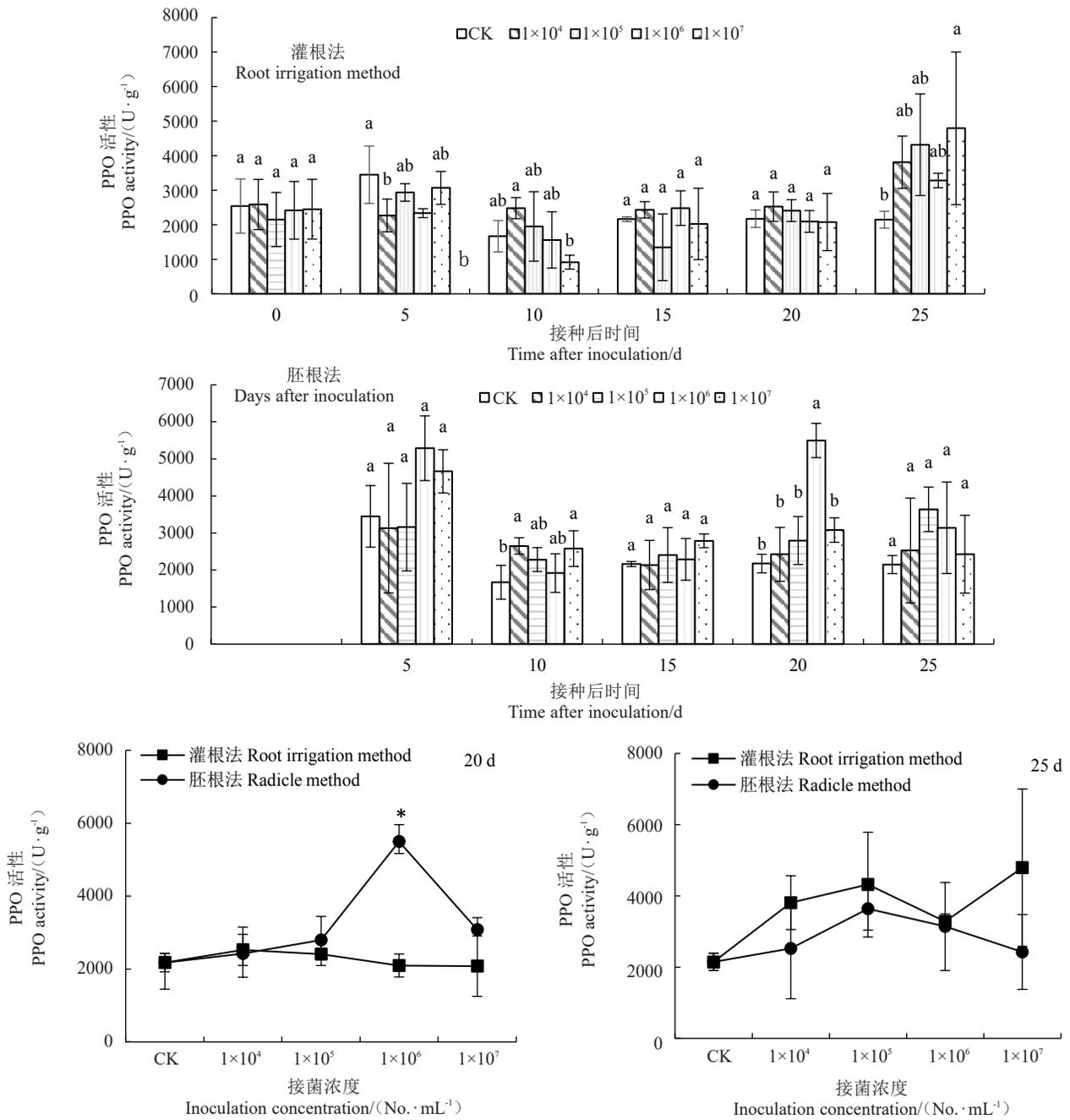


图3 不同接种方法及不同菌液浓度的苦瓜叶片 PPO 活性对比分析

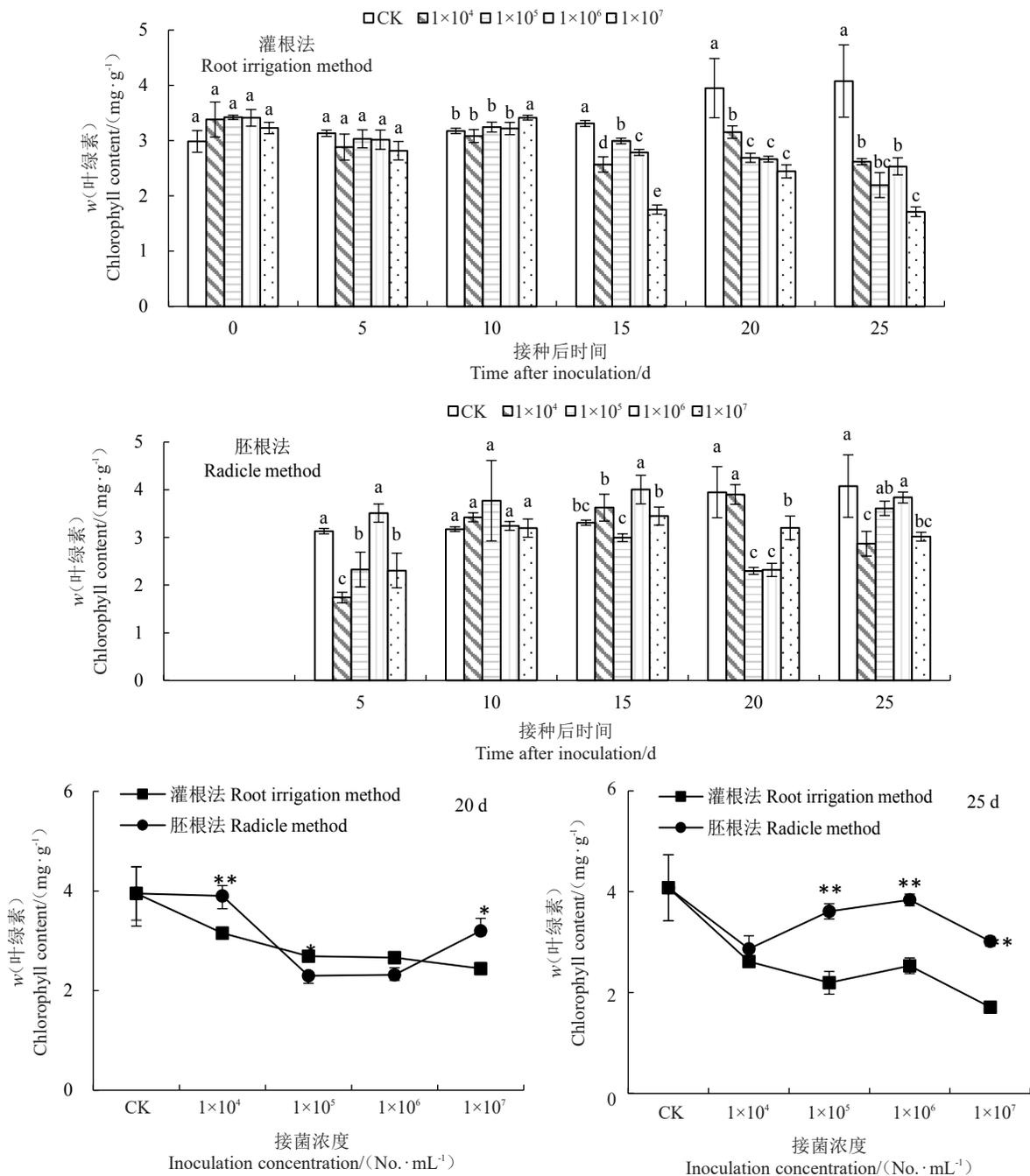
Fig. 3 Comparative analysis of PPO activity of bitter melon leaves with different inoculation methods and different fungus liquid concentrations

体积无显著差异,根尖数及分叉数随着菌液浓度的增加呈降低趋势。从对照以及灌根法、胚根法不同接种浓度处理的根系形态图(图6)可以看出,随着接种浓度的升高,植株受枯萎病菌侵染程度加重,根系生长受到的影响也加重。

### 3 讨论与结论

不同接种方法、菌液浓度、鉴定时间等均会影响抗性鉴定的准确性<sup>[15]</sup>。笔者采用3种不同方法接

种不同浓度的苦瓜枯萎病菌,通过病情指数筛选出最适宜的接种方法。经比较分析,笔者认为适用于鉴定苦瓜枯萎病的接种方法依次为灌根法、胚根法、伤根法。在3种不同接种方法中,灌根法接种枯萎病菌的优点是发病整齐且有规律性,易于鉴定植株枯萎病抗性等级。胚根法接种枯萎病菌可能由于在菌液浸种时胚根吸收的菌液不足,以致苦瓜植株发病或胚根法本身致病力弱、发病率低,品种未表现出应有抗性,不同接种浓度间病情指数无显



注:\*\*表示在 0.01 水平差异极显著。下同。

Note: \*\* indicates extremely significant difference at 0.01 level. The same below.

图 4 不同接种方法及不同菌液浓度的苦瓜叶片叶绿素含量对比分析

Fig. 4 Comparative analysis of chlorophyll content in bitter melon leaves with different inoculation methods and different fungus liquid concentrations

著差异,难以准确判断枯萎病侵染程度,不利于对苦瓜植株抗性进行分级。伤根法可能由于在接种菌液过程中进行了伤根处理导致根系损伤,使苦瓜植株受枯萎病菌的影响发病程度较重,从而导致病情指数过高且死苗过多,难以进行抗性分级,不利于筛选精准的鉴定评价体系。因此,笔者认为灌根法是最适用于接种苦瓜枯萎病菌进行抗病性鉴定

的接种方法。

接种浓度过低会导致发病率低,抗性种质假阳性现象增加,病情潜伏期长,导致鉴定周期延长,影响鉴定效率<sup>[16]</sup>;接种浓度过高,无法进行病情分级和筛选出抗性种质<sup>[17]</sup>。笔者采用 4 种不同接菌浓度对苦瓜进行枯萎病菌的接种,菌液浓度分别为 1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup>,经比较分析,认为采用

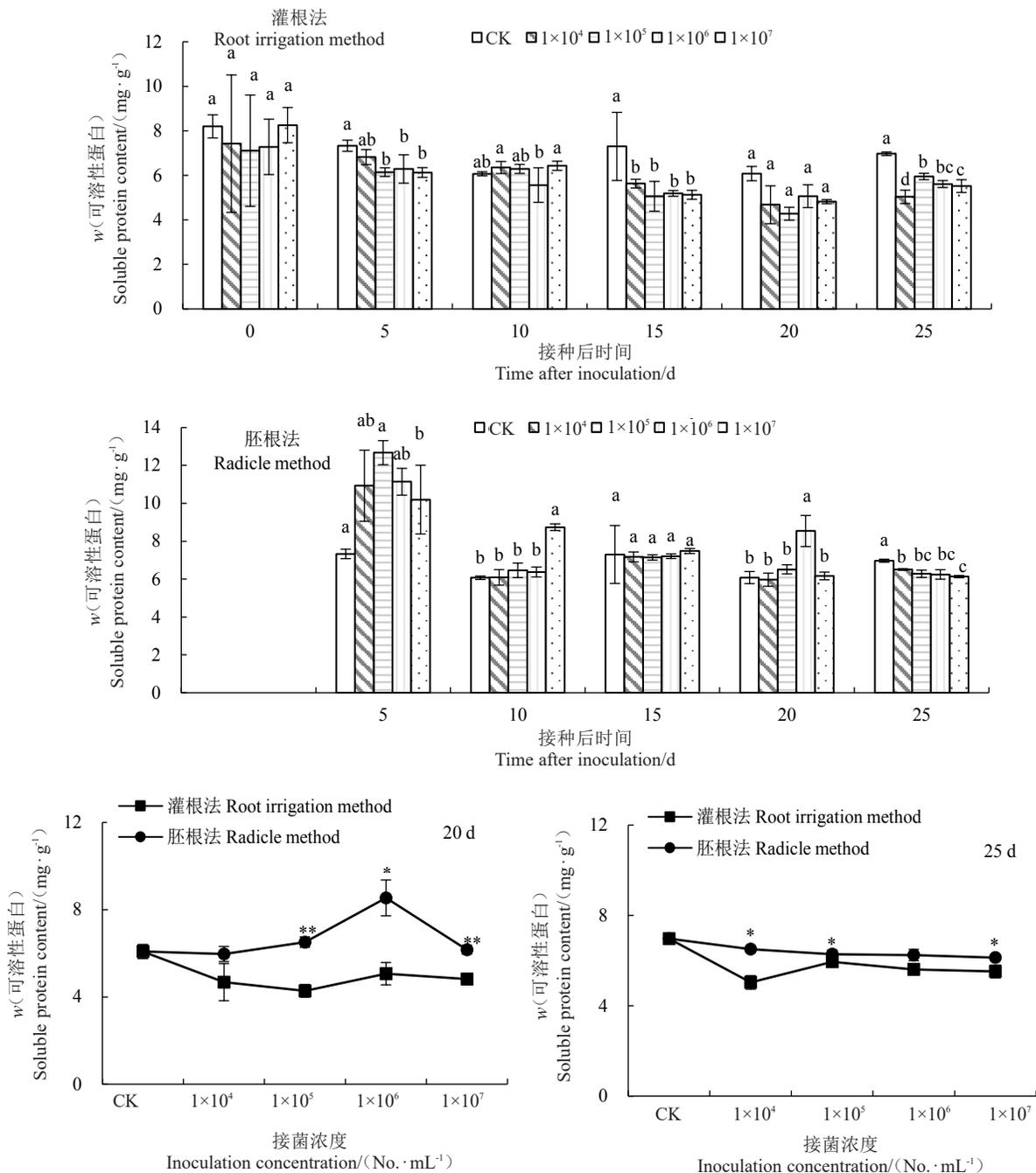


图5 不同接种方法及不同菌液浓度的苦瓜叶片可溶性蛋白含量对比分析

Fig. 5 Comparative analysis of soluble protein content of bitter melon leaves with different inoculation methods and different fungus liquid concentrations

菌液浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  对苦瓜进行枯萎病菌的接种为最适浓度, 选用灌根法接种  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的枯萎病菌的植株, 病情指数显著低于接种  $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  枯萎病菌的植株, 但显著高于接种  $1 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  枯萎病菌的植株。采用适当浓度接种枯萎病菌有利于提高苦瓜枯萎病抗性鉴定的准确性。这与前人研究结果一致, 杨凡等<sup>[18]</sup>研究认为当病原菌孢子最适接种浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  时, 能够有效区分黄瓜枯萎病抗感性差异。

苯丙氨酸解氨酶活性在植物抗病、抗虫、抗逆境胁迫等方面起重要作用<sup>[19]</sup>。在本研究中, 采用灌根法接种浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  枯萎病菌的处理, 接种 25 d 的苦瓜叶片 PAL 活性显著低于菌液浓度为  $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的处理。苦瓜幼苗遭受枯萎病菌病原菌侵染后, 叶片中 PAL 活性随着枯萎病发病率升高呈先上升后下降再上升的变化趋势, 说明 PAL 具有抵御枯萎病菌的作用。这与关峰等<sup>[20]</sup>研究结果相似, 该结果表明, 在枯萎病菌胁迫下, 苦瓜叶片中的

表 2 不同接种方法及不同枯萎病菌菌液浓度接种 25 d 的苦瓜根系形态分析

Table 2 Morphological analysis of bitter gourd roots inoculated for 25 days with different inoculation methods and different fungus liquid concentrations of *Fusarium* wilt

接种方法 Inoculation method	浓度 Concentration/ (No. · mL <sup>-1</sup> )	长度 Length/ cm	表面积 Surface area/ cm <sup>2</sup>	体积 Volume/ cm <sup>3</sup>	根尖数 Number of root tips	分叉数 Number of forks
灌根法 Root irrigation method	1×10 <sup>4</sup>	327.45±51.75 a	84.43±23.02 a	2.63±1.04 a	175.00±8.66 a	709.67±50.81 a
	1×10 <sup>5</sup>	316.58±54.40 a	100.51±29.24 a	3.72±1.56 a	119.00±8.66 b	649.00±38.11 a
	1×10 <sup>6</sup>	254.38±24.41 ab	92.26±30.15 a	5.50±2.99 a	70.33±0.58 d	283.33±17.90 c
胚根法 Radicle method	1×10 <sup>4</sup>	180.30±18.13 b	75.74±17.72 a	2.36±0.88 a	93.03±0.15 c	489.67±46.19 b
	1×10 <sup>5</sup>	569.19±76.50 a	131.67±30.07 a	3.47±1.15 a	322.00±13.86 a	1745.33±94.69 a
	1×10 <sup>6</sup>	404.48±41.33 b	141.66±29.64 a	4.78±1.47 a	226.33±2.08 b	848.00±18.19 b
	1×10 <sup>7</sup>	379.68±36.28 b	141.23±25.83 a	5.69±1.50 a	167.67±8.14 c	706.33±15.04 c
	1×10 <sup>7</sup>	309.03±28.83 b	107.22±26.44 a	3.85±1.50 a	159.00±3.46 c	590.67±32.39 d



图 6 采用灌根法、胚根法接种不同浓度枯萎病菌菌液的苦瓜根系形态对比分析

Fig. 6 Comparative analysis of root morphology of bitter gourd inoculated with different fungus liquid concentrations of *Fusarium* wilt by root irrigation method and radicle method

PAL 活性随着接种时间的延长呈先上升后趋于平稳的趋势,较对照 PAL 活性均有大幅升高,且抗病品种 PAL 活性显著高于感病品种。PAL 在苯丙烷代谢途径中起重要作用,使植物对逆境或细胞组织衰老做出应激反应,其活性与植物抗病性呈正相关<sup>[21]</sup>。

多酚氧化酶活性可作为植物抗病能力的生理指标。在本研究中,灌根法接种枯萎病菌 25 d 的苦瓜叶片 PPO 活性略高于胚根法。叶片中 PPO 活性在枯萎病菌的胁迫下,呈先下降再升高的趋势。本研究结果与前人一致,赵秀娟等<sup>[22]</sup>研究结果表明,接种后植株茎基部 PPO 活性均呈明显升高的趋势,感病自交系叶片 PPO 活性显著高于未接种对照。在苦瓜植株受到枯萎病菌胁迫时叶片防御酶系统启

动,酶活性升高,随着侵染的加剧,超出了防御酶的清除能力时,酶活性下降。

叶绿素是植物中非常重要的色素,当病原菌入侵植物后,往往导致叶绿体解体,影响叶绿体的生物合成,出现叶片褪绿、黄化或花叶等症状,从而引起叶绿素含量降低<sup>[23]</sup>。叶绿素含量的高低往往能客观反映植物抗病性的强弱<sup>[24]</sup>。随着枯萎病菌对植株侵染程度的加重,叶片萎蔫,叶绿素含量也随之降低。本研究中枯萎病菌液浓度为 1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 3 个处理接种后 20 d,胚根法接种的叶片叶绿素含量显著高于灌根法;25 d 的叶绿素含量灌根法则低于胚根法。

在植物生长发育过程中可溶性蛋白含量会发生变化,当植物组织受外界侵染时可溶性蛋白含量

也会随之变化<sup>[25]</sup>。本研究结果表明,胚根法接种枯萎病菌 20 和 25 d 的叶片可溶性蛋白含量高于灌根法。灌根法致病力强于胚根法,叶片受枯萎病菌感染程度高,枯萎病菌的侵染影响了叶片的可溶性蛋白含量,随着枯萎病菌对苦瓜幼苗的侵染,叶片中可溶性蛋白含量呈下降趋势。吴美艳等<sup>[26]</sup>研究表明,木薯苗期接种病原菌叶片的可溶性蛋白含量较不接种对照呈下降趋势,与本研究结果一致。

综上所述,笔者认为在苦瓜 2 叶 1 心时采用灌根法接种浓度为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的苦瓜枯萎病菌的孢子悬浮液 20 mL,接菌后 25 d 进行苦瓜枯萎病抗病性鉴定,是精准高效的枯萎病抗性鉴定评价技术体系。

### 参考文献

- [1] 黄庆文,刘龙心,肖日升,等.三亚市冬种苦瓜种植情况及市场行情观测[J].长江蔬菜,2019(1):61-62.
- [2] 关峰,万新建,张景云,等.苦瓜枯萎病研究进展[J].中国瓜菜,2018,31(5):1-4.
- [3] 朱天圣,戚佩坤.苦瓜枯萎病病原菌研究[J].华南农业大学学报,1998(4):14-18.
- [4] 赵秀娟,唐鑫,胡开林.苦瓜枯萎病抗性鉴定与抗性遗传规律研究[J].园艺学报,2013,40(4):685-692.
- [5] 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.
- [6] 左存武,李斌,李春雨,等.香蕉对尖孢镰刀菌热带 4 号小种的抗性评价方法的建立[J].园艺学报,2016,43(5):876-884.
- [7] 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.
- [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):30-34.
- [9] 王艳茹,杨衍,牛玉,等.苦瓜种质资源枯萎病抗性评价[J].分子植物育种,2022,20(6):1909-1922.
- [10] 邹芳斌,司龙亭,李新,等.黄瓜枯萎病抗性与防御系统几种酶活性关系的研究[J].华北农学报,2008,23(3):181-184.
- [11] 郑莲姬,钟耕,张盛林.白魔芋中多酚氧化酶活性测定及其护色研究[J].西南大学学报(自然科学版),2007,29(2):118-121.
- [12] 王凤婷,张鑫生,潘洪玉,等.蔬菜叶绿素不同提取方法的比较[J].安徽农业科学,2020,48(6):1-3.
- [13] 青格尔,雷佳,曹文,等.甘肃子午岭野生党参总黄酮、可溶性糖及可溶性蛋白含量分析[J].天津农业科学,2021,27(5):5-7.
- [14] 南宇航,朱子成,王学征,等.甜瓜种质资源苗期对枯萎病和白粉病的抗性评价[J].中国蔬菜,2016(1):37-44.
- [15] 朱琳,孙素丽,孙菲菲,等.绿豆尖镰孢枯萎病抗性鉴定方法[J].植物遗传资源学报,2017,18(4):696-703.
- [16] 李巧云,郭振峰,郝晓鹏,等.小麦茎基腐病抗性鉴定方法研究进展[J].麦类作物学报,2023,43(5):591-599.
- [17] 吴祝华,詹德智,施季森,等.毒素-MS 培养法鉴定百合对尖孢镰刀菌的抗性[J].江苏农业科学,2023,51(24):90-94.
- [18] 杨凡,唐艳领,牛莉莉,等.黄瓜六盘苗期枯萎病抗性鉴定方法及枯萎病胁迫下的生理响应[J].中国瓜菜,2022,35(3):81-85.
- [19] 向妙莲,何永明,付永琦,等.茉莉酸甲酯对水稻白叶枯病的诱导抗性及相关防御酶活性的影响[J].植物保护学报,2013,40(2):97-101.
- [20] 关峰,张景云,石博,等.苦瓜枯萎病抗性鉴定及枯萎病菌胁迫下生理响应差异分析[J].植物生理学报,2019,55(10):1481-1488.
- [21] 胡瑞波,田纪春.小麦多酚氧化酶研究进展[J].麦类作物学报,2004,24(1):81-85.
- [22] 赵秀娟,唐鑫,程蛟文,等.酶活性、丙二醛含量变化与苦瓜抗枯萎病的关系[J].华南农业大学学报,2013,34(3):372-377.
- [23] ZANINI A A, DI FEO L, LUNA D F, et al. Cassava common mosaic virus infection causes alterations in chloroplast ultrastructure, function, and carbohydrate metabolism of cassava plants[J]. Plant Pathology, 2021, 70(1):195-205.
- [24] 杨怡,田丽波,商桑,等.苦瓜叶片叶绿素响应白粉病菌感染的遗传分析[J].热带作物学报,2022,43(9):1888-1898.
- [25] 李跃建,彭云良,高荣,等.条锈菌感染后小麦体内蛋白质的变化[J].西南农业学报,2003,16(4):1-3.
- [26] 吴美艳,罗兴录,樊铸礪,等.木薯抗细菌性枯萎病生理特性研究[J].南方农业学报,2020,51(6):1353-1359.