

# 菜豆对大丽花轮枝孢菌抗性 及鉴定方法的研究

齐秀菊\* 刘俊芳\*\* 刘学民\* 刘克明\*\* 马春红\*\*

## 摘 要

本试验用根冠离体活细胞测定法和苗期浸根法测定了不同抗性的十二个菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 品种对大丽花轮枝孢菌 (*Verticillium dahliae* kleb) 毒素的敏感性, 两者的结果基本一致。经统计分析, 这两种结果呈极显著正相关。试验结果还表明: 根冠活细胞测定法比苗期浸根法快速, 简便, 准确, 可靠, 是进行菜豆抗病性鉴定和选育抗病品种等研究的一种比较理想的手段。

**关键词** 菜豆 根冠 活细胞 大丽花轮枝孢菌毒素 抗性

近年来, 国内外已有利用根冠活细胞测定法进行抗病性鉴定和选育抗病品种的研究报道。1983年 Hawes 用玉米小斑病菌毒素 (HMT) 对离体玉米根冠活细胞进行生物学测定<sup>[3]</sup>。1988年, 郭兰凯等对此法加以简化, 证实了C毒素 (HMC) 对d细胞质玉米根冠活细胞毒害作用的专效性<sup>[4]</sup>。但此法在蔬菜上进行抗病鉴定和抗病品种的选育方面, 尚未见报道。本试验采用根冠活细胞测定法用大丽花轮枝孢菌毒素对菜豆十二个品种进行抗病性鉴定, 初步肯定了此法在蔬菜上的应用价值。

## 材料和方法

### 一、材料

#### 1、供试菜豆品种12个:

88—14	88—25	美国芸豆	83—3
保丰	尼克斯	泰架豆	红旗豆
唐山芸豆	沙克沙	五月绿	双季豆

#### 2、供试大丽花轮枝孢菌菌种, 由河北省棉花研究所抗病育种组提供。

### 二、方法

\* 河北省农林科学院蔬菜研究所

\*\* 河北省农林科学院农业物理生理生化所

本试验得到研究员魏建昆、廉志宏同志的支持与指导, 在此谨致谢意。

### 1、毒素粗提

将大丽花轮枝孢菌种分别接种于两种培养基中。第一种：Fries培养基，25℃振荡培养7—8天。第二种：棉籽培养基（经高压高温灭菌100℃/1.5磅，40分钟）。25℃培养7—8天后，将Fries培养基倒入棉籽培养基中，继续培养24小时；将培养液用铺有一层湿滤纸的布氏漏斗抽滤一次，过滤液再通过三层滤纸抽滤两次，得到的过滤液为毒素粗提液原液。再将原液用无菌水稀释5倍，置冰箱备用。

### 2、根冠活细胞致死测定法

（1）幼根培养：将菜豆种子用温水（40℃）浸泡3小时，捞出，用0.01%升汞溶液表面消毒5分钟、用自来水反复冲洗后，放在铺有湿滤纸的培养皿中，25℃培养48小时，当初生根生长至2厘米时供实验用。

（2）根冠活细胞致死测定：在25毫升的烧杯中，加入备好的毒素液2毫升，切取3—4个2厘米长的根尖，放入盛有毒素的烧杯中，用液体快速混合器（3速）震荡1分钟，再放入25℃恒温生长箱中培养，1小时后取出，充分振荡均匀，从中取一滴溶液置于载玻片上，再加一滴0.05%的中性红溶液，染色10分钟，然后在显微镜下观察，并记录活细胞和死细胞的数量。

$$\text{细胞死亡率} = \frac{\text{死细胞数量}}{\text{总细胞数量}} \times 100\%$$

### 3、苗期浸根法

（1）幼苗培养：将菜豆种子按以上方法消毒催芽后，播种于育苗钵内。育苗土均经100℃/1.5磅灭菌1小时，当幼苗第3片真叶充分展开时备用。

（2）毒素浸根测定：将生长一致的菜豆幼苗挖出，充分水洗后，把幼苗根部浸入稀释5倍的毒素溶液中。每品种不少于20株，以清水浸根为对照。重复2次，24小时调查记录发病情况，以病情指数表示（本试验在20—25℃防虫人工气候室进行）。

#### （3）分级标准：

- 0级：无症；
- 1级：子叶发黄，失水下垂，真叶无症
- 2级：真叶边缘失水上卷；
- 3级：真叶萎蔫。

## 试验结果

### 一、品种鉴定情况

用稀释5倍的毒素过滤液分别处理十二个菜豆品种的根冠活细胞以及进行苗期浸根两种方法的观察结果列于表1。

由表1看出，十二个菜豆品种对大丽花轮枝孢菌毒素的抗性是不同的。用两种方法对菜豆十二个品种抗性测定的结果，除泰架豆在用离体根冠活细胞测定法中排列第7位，和在浸

表 1 大丽花轮枝孢菌毒素对 12 个菜豆品种的毒害作用\*

品 种	根冠活细胞测定法		苗期浸根法	
	细胞死亡率 (%)	位 次	病 指	位 次
88—14	29.86	1	18.5	1
88—25	36.67	2	33.33	2
美国芸豆	39.95	3	36.11	3
83—3	41.31	4	38.89	4
保丰	46.09	5	66.67	5
尼克斯	55.04	6	66.67	6
泰架豆	57.62	7	83.33	9
红旗豆	64.03	8	80.00	7
唐山芸豆	65.48	9	85.19	10
沙克沙	67.94	10	86.56	8
五月绿	78.34	11	83.33	9
双季豆	82.01	12	85.71	11

\* 结果为试验的平均值，根冠活细胞测定法每品种重复 6 次以上，每品种观察的细胞总数 400—600 个。苗期浸根法重复 2 次。

根法中病情指数偏高，排列第 9 位外，其它品种的测定结果基本一致。

## 二、两种方法的比较

### 1、两种测定方法的相关系数

在直观分析了菜豆十二个品种在两种方法中的表现后，为了进一步揭示这两种方法一致的关系，进行了相关系数的计算。统计结果： $r = 0.898$ ，说明根冠离体活细胞测定和苗期浸根这两种方法的相关性极为显著。进一步证实了根冠离体活细胞测定法的可靠性。

### 2、可重复性的比较

根冠离体活细胞测定法，条件易于人为控制，虽每个品种至少重复 6 次，有的多达 12 次，但每次重复取得数据的标准差均小于苗期浸根法（红旗豆标准差略高）。而苗期浸根法可能由于受育苗过程中对根部伤害程度等多种因素影响，标准差大于根冠离体活细胞测定方法。这就说明用离体根冠活细胞测定法要比苗期浸根法稳定可靠，精确度高（见表 3）。

### 3、潜育期、鉴定周期和使用毒素量的比较

用“根冠离体活细胞测定法”和“苗期浸根”两种方法，在十二种菜豆品种上接种稀释 5 倍的大丽花轮枝孢菌毒素液后，均可使其有效致病。但是使用根冠活细胞测定法，在接种毒素 30 分钟后，一般就可见到致死的根冠离体细胞，1 小时即可达到最佳测定时间。鉴定一次只需 2 天时间，鉴定所需的种子和毒素量也很少。而用苗期浸根法则在 12 小时后个别植株才发生轻度萎蔫，症状充分表现则需要 24 小时。鉴定周期长达 20 天，用种量和使用毒素量也较多。

由此可见，根冠离体活细胞测定法是进行抗病性鉴定的一种简便、可靠、快速、准确

表 3 两种方法在菜豆12个品种上反应稳定性比较\*

品 种	根冠离体活细胞测定法	苗期浸根法
88—14	29.85 ± 6.1	18.52 ± 17.1
88—25	36.67 ± 4.3	33.33 ± 8.7
美国芸豆	39.95 ± 6.3	36.11 ± 16.3
83—3	41.31 ± 5.5	38.89 ± 5.9
保丰	46.69 ± 8.7	66.67 ± 18.1
尼克斯	55.05 ± 9.2	66.67 ± 12.7
泰架豆	57.62 ± 8.3	83.33 ± 23.6
红旗豆	64.03 ± 10.3	80.00 ± 9.4
唐山芸豆	65.48 ± 8.32	85.19 ± 13.9
沙克沙	67.94 ± 7.8	80.56 ± 9.1
五月绿	78.34 ± 7.4	83.33 ± 7.9
双季豆	82.01 ± 6.4	85.71 ± 11.1

\* 数字是试验的平均值和标准差。

经济实用的测定方法，不但具有节省人力、物力的优点，还能快速获得抗源，为加速抗病品种提供物质基础。

## 小 结

选育抗病品种是防治蔬菜病害的经济有效途径，而抗病性鉴定工作又是抗病育种的重要环节，选用精确、快速、简便的测定方法是抗病鉴定的关键。常规鉴定方法，不仅周期长，而且容易受各种因素的干扰，既影响试验的准确性、又浪费人力物力。本试验结果表明：12个菜豆品种对大丽花轮枝孢菌毒素的抗性是有差异的；组成植株或组织的细胞对致病病菌毒素的反应要比植株个体反应敏感。从而证明了根冠离体活细胞测定的可行性，为今后蔬菜抗病性鉴定和抗病育种工作提供了一个在细胞水平上进行研究的科学方法。

根冠离体活细胞测定方法技术性强，操作要求严格，对测试材料的生长阶段，细胞自然死亡率，处理过程中的温度控制等问题有待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 王贺祥、徐孝华：棉花枯萎病菌镰刀菌酸的产生和致病力的关系，《植物病理学报》，18（2）1988：99—102
- [2] 吴海耻等：棉花黄萎病菌毒素生物测定技术初探，《山东农业大学学报》，1986：89—92
- [3] Hawes, M. C. : Technique for using isolated corn root cap cells in a sample, quantitative assay for the pathotoxin produced by *Helminthosporium* Race T. *Phytopathology* 73 (8) 1983: 1184—1187
- [4] 郭兰凯等：HMC毒素对雄花不育及正常细胞质玉米根冠活细胞的影响，《中国农业科学》22（3）1989：91—95

# Studies on Resistibility of Living Cells in Root Cap of Kidney Bean to *Verticillium Dahliae* Kleb

Qi Xiuju     Liu Xuemin

(Vegetable Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang)

Liu Junfeng   Liu Keming   Ma Chunhong

(Agro-physics, Plant Physiology and Biochemistry Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang)

## Abstract

In order to determine sensibility of twelve varieties of Kidney bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) to toxin of *Verticillium dahliae* Kleb the methods of both analysing living cells of roots cap *in vitro* and dipping roots at seedling stage were used. The results of two methods were almost same, and the two methods were significantly correlated with each other. The test results indicated that the method of analysing living cells of root cap was faster, simpler, more accurate and more reliable than the method of dipping roots at seedling stage, therefore, the former was a ideal way to identify the disease resistance of kidney bean and to breed varieties resistant to diseases by selection.

**Key words:** Kidney bean; Living cells; Root cap; *Verticillium dahliae* Kleb; Resistance