

红掌种质细菌性枯萎病的抗性鉴定分析

王 贵,李惠波,周红龙,周堂英

(云南省热带作物科学研究所,云南 景洪 666100)

摘要:种质资源是筛选抗性稳定抗原的基础,为探索红掌种质细菌性枯萎病的抗性鉴定方法,通过拉遮阳网模仿自然条件下人工接种病害,优化比较了红掌种质资源细菌性枯萎病的抗性鉴定方法。从病情指数、相对病情指数、相对抗性指数、病情发展曲线下面积 4 种评价方法的比较结果表明,相对病情指数可直观反映品种的抗性,便于年度间和研究者之间的结果比较。人工接种和蚜虫取食接种的鉴定结果基本一致。

关键词:红掌;细菌性枯萎病;抗性鉴定

中图分类号:S682 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)04-0038-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.04.0038

红掌(*Anthurium*)是多年生附生常绿草本花卉,天南星科花烛属植物,别名花烛或安祖花,原产于南美洲热带雨林中,细菌性病害(*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)是红掌的毁灭性病害,特别是红掌细菌性枯萎病危害相对严重。BIOLOG 鉴定和致病性测定结果进一步鉴定该病害的病原菌为地毯草黄单胞菌花叶万年青致病变种,由地毯草黄单胞菌花叶万年青致病变种引起的,该菌主要为害天南星科花烛属、花叶万年青属、合果芋属的植物,尤其在花烛属安祖花上最为严重。这种病害在黛粉万年青上第一次被记录^[1-3],1981 年安祖花细菌性枯萎病在夏威夷安祖花种植园大面积爆发,之后随着安祖花种植业的兴起,安祖花细菌枯萎病也迅速蔓延到全球安祖花种植区域^[4-6]。病原菌通过进口的安祖花种苗进入中国,2003 年张荣意等首先在海南省发现,蒋桂芝和郭春雷在云南西双版纳也报道了该种病原菌^[7-10]。本研究以云南省热带作物科学研究所的红掌材料为基础,参考蒋桂芝等人的研究成果进行实验^[11-12]。该病害前期无任何症状,后期发病迅速,尚无有效药物控制,在安祖花种植区域可造成 50%~100% 的种植量耗损,损失严重。基于安祖花细菌性枯萎病发病潜伏期长的特点,建立一种灵敏有效的病原菌检测技术是控制病害传播扩散的有效手段,在发病早期即可将带病植株发现并销毁,最大限度地确保植株盛

花期健康生长,减少病害所造成的经济损失。选育与种植抗病品种是防治该病的主要措施,而育种的前提是获得在当地抗性表现稳定的优良亲本,在抗性鉴定结果稳定后,进行了不同抗性试验。

1 材料与方法

1.1 材料

供试红掌种质及杂交组合共 200 份(见表 1),由云南省热带作物科学研究所(育种室)提供,包括国内外报道的抗 *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* 种质或优良种质 10 份、杂交组合 9 份。以粉冠军为抗病对照,以热情为感病对照。供试材料于 2013-2014 年在云南省热带作物科学研究所和实验基地的遮阳蓬下露天进行人工接种抗性鉴定。部分种质经多次鉴定,鉴定结果见表 1。

以蒋桂芝和郭春雷在西双版纳红掌基地鉴定的病菌为实验菌株,该细菌为云南省热带作物科学研究所活体植株携带保存。在接种前 30 d 左右在红掌嫩叶或成熟叶片上接种繁殖备用。待接种时用肉眼观察检测验证该病菌繁殖成功及菌种量适中,方可进行接种鉴定试验。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 遮阳网下防虫空地内进行,时间为 4 至 11 月份。按常规方法杂交筛选所得实生苗,共采用 180 份红掌种质,接种 353 株。人工接种方法:红掌开花时的成熟叶片,用直径 12 cm 塑料花盆移栽。成活后,采用喷壶喷洒注射器针头刺孔接种。采集经肉眼观察检测为 *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* 的新鲜病叶,在无菌豆浆机中,用 *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* 接种缓冲液打碎过滤,调

收稿日期:2014-11-12

基金项目:2013 年云南省应用基础研究资助项目(2013 FZ170)

第一作者简介:王贵(1982-),男,云南省曲靖市人,硕士,研究实习员,从事热带花卉红掌病虫害防治与抗病育种研究。
E-mail:wanggui114@163.com。

整接种液的浓度为 1:300(重量体积比)或 1:100(重量体积比)。喷口距接种物 5 cm,每株喷射接种时间约为 3 s。接种后立即用喷壶喷少量自来水,提高接种效率。

1.2.2 病情调查 红掌接种细菌性枯萎病病菌后,每 7 d 左右调查发病情况,连续调查 12~20 次,或调查至感病对照病情指数达到 80 左右。病害严重度分级参考经济作物烟草病虫害的国家标准及花卉行业标准进行(GB/T 23222-2008)^[13],0 级:全株无病;1 级:红掌叶片边缘及针孔周围出现零星病斑;3 级:上部≤1/3 红掌叶片出现水渍状病斑,叶片边缘病斑相连,症状明显;5 级:1/3~1/2 叶片面积出现病斑,或少数叶片病斑边缘变黄,中心病斑叶片枯死;7 级:2/3~3/4 红掌叶片面积有病斑,病斑叶片成片枯死或叶脉坏死;9 级:3/4~1 红掌叶片面积都是病斑,叶片枯黄病死及脱落。逐株调查发病情况。

表 1 供试红掌种质来源和特性
Table 1 Germplasm sources and characteristics of *Anthurium*

种质 Germplasms	来源 Source	特性 Characteristics	鉴定株数 Identification number of trees
粉冠军	荷兰	中抗,抗病对照	10
绿箭	荷兰	高抗	10
水晶花烛	荷兰	观叶优良品种	10
热情	荷兰	感,感病对照	10
084-5	中国云南	高抗	9
272	中国云南	高抗	9
105	中国云南	抗病优良品种	9
0832-32	中国云南	感病优良品种	9
0821-82	中国云南	中抗	9
0901-51	中国云南	抗病优良品种	9
17912	中国云南	中感	9
小 a	中国云南	感病优良品种	9
F ₁ (筛选出的 杂交实生苗)			112

1.2.3 数据处理与抗性评价 根据调查数据,分别计算发病率、病情指数、相对病情指数、相对抗性指数和病情发展曲线下面积。参照文献进行品种抗性评价。

相对抗性指数(RI)计算公式^[11]:

$$RI = \ln \frac{DI}{100 - DI} - \ln \frac{DI_0}{100 - DI_0},$$

式中,DI 为参试品种的病情指数;DI₀ 为对

照品种的病情指数(采用感病对照热情的病情指数)。

相对病情指数^[14-15] = 品种病情指数 × 校正系数 K 值,K = 感病对照规定病情指数 90.0/感病对照实际病情指数。

病情指数 =

$$\frac{\sum (\text{该病级数} \times \text{各级病株或病叶数}) \times 100}{\text{调查总株数或叶数} \times \text{最高级数}}$$

病情发展曲线下面积(AUDPC)计算公式:^[10,16-17]:

$$AUDPC = \sum [(X_i + X_{i+1})/2] \times T_i$$

式中,X_i和 X_{i+1} 分别是第 i 次记载和第 i+1 次记载的病害严重度;T_i 是第 i 次记载和第 i+1 次记载之间所间隔的天数。

1.2.4 品种抗性评价 根据相对抗性指数划分品种抗性:抗病,RI≤-2.0;中抗,-2.0<RI≤-1.0;中感,-1.0<RI<0;感病,RT≥0,参考文献^[12,17]。

参照红掌细菌性病害的病害调查情况,以感病对照品种发病最先达到感病(病情指数不低于 60)的调查数据为依据,进行抗病性评价(见表 2)。

2 结果与分析

2.1 数据处理方法比较

试验结果表明,2013 年对照品种热情接种后 14 d,植株就表现为全株针刺叶片水渍或叶片发黄,2/3 左右的叶片出现病斑,叶片表面褐色坏死,病株生长缓慢。表现为典型的红掌细菌性枯萎病症状,分别采用病情指数、相对病情指数、相对抗性指数和病情指数曲线下面积 4 种方法评价 4 个品种的抗性(见表 3),调查总株数为 353 株(见表 4)。采用病情指数评价方法,由于 2 a 间接种后发病程度差异较大(2014 年发病较重,2013 年发病较轻,可能与 2014 年雨水量较多有关),对照品种热情分别被评价为感病和中感、粉冠军分别被评价为抗和中抗。采用相对病情指数评价方法,尽管 2 a 间接种后发病程度差异较大,对照品种绿箭都被评价为高感、粉冠军被评价为中抗。采用相对抗性指数评价方法,2 a 间感病对照品种热情都被评价为感、粉冠军被评价为中抗,同样可消除年度间发病程度差异,但年度间数值难以相互比较。采用病情指数曲线下面积方法,在同一年度,可排出参试品种的相对抗性名次,年度间排序受发病程度的影响大。抗病对照品种

084-5,由于接种后不发病,采用 4 种方法评价的 消除年度间发病程度不同带来的评价偏差,直观
结果一致。综合比较,采用相对病情指数方法,可 地反映品种的内在抗性。

表 2 品种抗病性评价标准

Table 2 Varieties resistant evaluation criteria

抗感类型 Resistant and susceptible types	高抗(HR) High resistance	抗病(R) Disease resistant	中抗(MR) Moderate resistance	中感(MS) Moderate susceptibility	感病(S) Infection disease	高感(HS) High susceptivity
病情指数	0	$0 < DI \leq 20$	$20 < DI \leq 40$	$40 < DI \leq 60$	$60 < DI \leq 80$	$80 < DI \leq 100$

表 3 四种数据处理方法评价结果的比较

Table 3 Comparison on the evaluation results of four data processing methods

种质资源 Germplasm resources	年份/接种 后天数 Years/Days after inoculation	发病率 Morbidity	病情指数 Disease index	抗性评价 Evaluation of resistance	相对病情指数 Relative disease index	抗性评价 Resistance evaluation	相对抗性指数 Relative resistance index	抗性评价 Resistance evaluation	病情指数曲 线下面积 AUDPC
084-5	2013/28	0	0	HR	0	HR	< -2	R	0
	2014/7	0	0	HR	0	HR	< -2	R	0
272	2013/28	0	0	HR	0	HR	< -2	R	0
	2014/7	3.48	0.875	HR	1.64	HR	-2.36	R	105.0
粉冠军	2013/28	38.00	24.70	MR	66.49	MR	-0.23	S	395.8
	2014/7	24.67	20.22	MR	37.11	MR	-	-	-
热情	2013/28	44.70	29.10	MR	86.88	HS	0	S	1055.0
	2014/7	96.67	64.33	S	88.92	HS	0	S	1896.7

2013 年 $K=88/60.33=1.46$,2014 年 $K=88/29.1=3.02$

表 4 红掌细菌性枯萎病病害调查分析

Table 4 Anthurium bacterial blight disease survey

感病株数 Susceptible plants	感病株数比例/% Proportion susceptible plants	感病品种 Susceptible varieties	感病品种数比例/% Proportion susceptible varieties	不同病害程度株数 Number of different disease degree					
				0 级	1 级	3 级	5 级	7 级	9 级
196	55.5	87	48.3	155	196	0	0	0	0
275	77.9	136	75.6	76	264	11	0	0	0
301	85.5	150	83.3	50	171	106	24	0	0
323	91.5	161	89.4	9	158	130	45	9	2
344	97.5	176	97.8	4	107	152	66	17	7
348	98.6	178	98.9	2	68	160	82	24	17
351	99.4	178	98.9	2	16	190	128	13	4

2.2 摩擦接种与蚜虫接种方法比较

盆花红掌,喷壶针刺接种病叶汁液方法的发
病程度比旺长期蚜虫接种方法高(见表 5),每份
材料 10 株。摩擦接种 $K=88/60.33=1.46$;接种
后 7 d 调查。蚜虫接种 $K=88/29.1=3.02$,旺长
期每株接种饲毒蚜虫 10 只。接种后 15 d 调查。

对照品种热情摩擦接种后 7 d,病情指数超过 60,
达到感病程度。而蚜虫接种后 15 d,对照品种热
情的病情指数为 31.10,未达到感病程度。采用
相对病情指数评价,两种接种方法评价抗感品种
的结果比较吻合。蚜虫接种时红掌植株处于旺长
期,比针刺接种方法要晚 42 d,品种的抗性表现相

对高一些。蚜虫接种的红掌植株生育期与西双版纳景洪红掌细菌性枯萎病的田间发生时期接近。两种接种方法的发病数据,采用相对病情指数的评价结果比采用病情指数和相对抗性指数评价结果的可靠性高。通过两种接种方法,筛选出红掌高抗细菌性枯萎病抗源 084-5、272 和 105,除 084-5 外,这些抗源接种后都表现出一定程度的病害特征。

表 5 人工接种与蚜虫接种方法鉴定结果比较

Table 5 Comparison on artificial inoculation and aphid identification

鉴定材料 Identification of material	接种方法 Inoculation method	发病率/% Morbidity	病情指数 Disease index	抗性评价 Evaluation of resistance	相对病情指数 Relative disease index	抗性评价 Resistance evaluation	相对抗性指数 Relative resistance index	抗性评价 Resistance evaluation
084-5	针刺接种	0	0	HR	0	HR	<-2	R
	蚜虫接种	0	0	HR	0	HR	<-2	R
272	针刺接种	0	0	HR	0	HR	<-2	R
	蚜虫接种	0	0	HR	0	HR	<-2	R
105	针刺接种	0	0	HR	0	HR	<-2	R
	蚜虫接种	0	0	HR	0	HR	<-2	R
0901-51	针刺接种	6.50	3.70	R	24.85	R	-5.63	R
	蚜虫接种	42.33	32.17	MR	46.52	MS	-1.10	R
F ₁	针刺接种	22.00	16.80	R	44.77	HS	-0.72	MS
	蚜虫接种	94.67	61.33	S	85.92	HS	0	HS
粉冠军	针刺接种	38.00	24.70	MR	66.49	S	-0.23	MS
	蚜虫接种	85.33	58.67	MS	82.47	HS	-0.32	MS
热情	针刺接种	44.70	29.10	MR	86.88	HS	0	HS
	蚜虫接种	97.67	65.33	S	88.92	HS	0	HS

3 结论与讨论

本研究在露天遮阳蓬下,通过针刺穿孔接种红掌叶片,成功鉴定了红掌种质材料对红掌细菌性枯萎病的抗性。在露天遮阳蓬下盆栽接种,可以提高红掌植株接种量的均匀程度,增加红掌种质的适应能力。蚜虫接种时红掌种质处于旺长期,比针刺穿孔接种方法要晚 42 d,旺长期采用针刺穿孔接种,一般发病较重或接种后发病迅速。因此,本文采用的针刺穿孔接种的相对效率要比蚜虫接种方法高。在同一自然环境条件下,对 180 份红掌种质细菌性枯萎病的接种鉴定结果表明,99.4%的红掌种质不抗细菌性枯萎病,而筛选出的抗性品种不符合育种要求,这为传统的常规杂交育种带来困难,为寻求新的抗性种质,应采取转基因育种的方法。

2.3 种质资源的抗性鉴定

部分抗病亲本、优良亲本、抗病亲本和优良亲本 F₁ 组合,针刺接种红掌细菌性枯萎病株系的抗性鉴定结果(见表 5)表明:084-5 表现为高抗、272 和 105 表现为抗病、粉冠军和 0901-51 表现为中抗、热情表现为中感。抗病亲本 084-5、272 和感病或高感优良亲本 F₁ 组合均表现感病或高感,可以推测 272 和 084-5 抗源的抗性为隐性遗传。

红掌种质资源抗性评价结果,受试验方法和数据处理方法的影响。试验方法主要包括接种压力、接种时红掌的生长时期、红掌数量、红掌生长条件(盆栽盆大小、温度湿度光照条件)、发病程度、调查时期和病害严重度分级标准等的确定。参考其它经济作物的国家标准 0~9 级病级划分^[13,18-19],参照花卉行业标准^[10],有利于抗性的精确评价。试验方法要根据减少误差、抗感对照品种发病差异明显、便于病害严重度分级的原则确定。试验方法要保证感病对照品种的发病程度达到感病、抗病对照品种的发病程度达到抗病,选择在此时期调查并选择该调查数据评价抗性及进行抗性划分标准的选用。

参考红掌细菌性病害调查情况的六级划分来评价红掌种质的抗性。病情指数、相对抗性指数、

相对病情指数都是采用单次调查数据评价抗性,不能反映病情的发展。有研究引入病情发展曲线下面积(AUDPC)来评价品种的抗性^[10,14-15,20],病情发展曲线下面积综合了多次调查的数据,其数值的大小适合用于抗性排序,可避免同一次试验采用病情指数或相对病情指数排序,同一个品种在3次调查中排序位次不同的问题。但不能用于年份间、批次间和研究者间的比较。

通过对大规模红掌细菌性枯萎病的病害调查及数据分析,为下一步红掌细菌性枯萎病的预防与防治打下坚实基础,在本次试验中,观察了红掌细菌性枯萎病的发病规律,病害特点及传染途径,筛选出了优良种质及抗性种质,为下一步的分子标记及生理生化研究做准备。

参考文献:

- [1] 蒋桂芝,郭春雷.西双版纳红掌细菌性叶疫病病原菌初步研究[J].热带农业科技,2003,26(3):10-12.
- [2] 郭春雷,蒋桂芝,祝伟,等.热带植物花卉红掌叶腐病病原菌的分离与初步鉴定[J].云南大学学报:自然科学版,2003,25(S):32-34.
- [3] 姬广海,魏亚东,蒋桂芝,等.红掌细菌性疫病的病原菌初步鉴定[J].植物病理学报,2004,34(2):107-111.
- [4] 蒋桂芝.红掌栽培细菌性病害及其防治方法[J].农业与技术,2004,24(6):116-117.
- [5] 蒋桂芝.红掌细菌性叶疫病田间防治试验[J].热带农业科技,2005,28(3):16-19.
- [6] 徐学军,梁玉文,杨道兰,等.西北地区红掌病虫害防治技术[J].农林科技,2007,36(5):66-67.
- [7] 卢梦玲,周晓云,曾伟达,等.红掌细菌性疫病病原菌的PCR特异性检测[J].植物病理学报,2012,42(1):1-9.
- [8] 王钊,储丽红,赵凯,等.利用免疫磁性分离-PCR检测安

祖花细菌性枯萎病病原菌[J].园艺学报,2013,40(8):1600-1608.

- [9] 王鹏韬,杨铁顺,柯盛发,等.红掌细菌性叶疫病病原初步鉴定及防治[C]//中国植物保护学会.2008年学术年会论文集,2008:593-598.
- [10] 林大为,戴咏梅,翟建中,等. NY/T1281-2007 花卉植物真菌病害检测规程[S]. 中华人民共和国农业部.北京:中国标准出版社,2007:1-12.
- [11] 周晓云,黎扬辉,刘肃,等. NY/T1280-2007 花卉植物寄生线虫检测规程[S]. 中华人民共和国农业部.北京:中国标准出版社,2007:1-66.
- [12] 刘勇,莫笑哈,余清.云南、福建、湖南烟区烟草花叶病主要病毒种类检测及黄瓜花叶病毒亚组鉴定[J].植物病理学报,2006,36(4):310-313.
- [13] 冯晶,张忠军,李国辉.5个持久抗条锈病小麦品种的抗性组分和遗传距离的研究[J].植物病理学报,2007,37(2):175-183.
- [14] 孙希芳. CORESTA 青枯病共同试验分学组研究报告[J].烟草科技,2001(11):30-33.
- [15] 刘勇,秦西云,李文正.抗青枯病烟草种质资源在云南省的评价[J].植物遗传资源学报,2010,11(1):10-16.
- [16] 刘艳华,王志德,钱玉梅.烟草抗病毒病种质资源的鉴定与筛选[J].中国烟草科学,2007,28(5):1-4,8.
- [17] 中国烟草总公司青州烟草研究所. YC/T 39-1996,烟草病害分级及调查方法[M].北京:中国标准出版社,1996:1-8.
- [18] 中国烟草总公司青州烟草研究所. GB/T 23222-2008,烟草病虫害分级及调查方法[M].北京:中国标准出版社,2009:1-6.
- [19] 中国烟草总公司青州烟草研究所. GB/T 23224-2008,烟草品种抗病性鉴定[M].北京:中国标准出版社,2009:1-5.
- [20] 林志文,刘勇,李梅云,等.烟草种质资源抗马铃薯Y病毒病鉴定方法比较[J].中国农学通报,2010,26(19):269-274.

Resistance Research on Germplasm Resources of *Anthurium* Bacterial Blight

WANG Gui, LI Hui-bo, ZHOU Hong-long, ZHOU Tang-ying
(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100)

Abstract: Germplasm resources are the basis to screen resistance stability antigen, in order to explore the resistant and appraisal method of *Xanthomonas campestris* of *Anthurium*, taking 200 *Anthurium* germplasm as materials, pull shade nets mimic natural conditions under artificial inoculation disease, resistance evaluation method of *Anthurium Xanthomonas* were compared by artificial inoculation in plastic tunnel. The results from disease index(DI), relative disease index(RDI), relative resistance index(RI), and area under the disease progress curve (AUDPC) showed that RDI could directly reflect germplasm resistance, and convenient to compare results between years and researchers. The resistance results of germplasm evaluated by artificial mechanical inoculation and the aphid inoculation were consistent with each other.

Keywords: *Anthurium*; *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*; resistance evaluation

致谢:云南热带作物科学研究所育种室李惠波、周红龙和周堂英分别参加部分田间试验及相关工作,在此表示感谢。