

甘薯黑斑病人工接种方法研究^①

冯启涣^② 陆漱韵 王莉莉 武崇光
(农学系)

摘要 本试验对甘薯黑斑病接种方法的影响因素、发病条件、对接种用薯块的要求和抗病、感病标准品种的设置等方面进行了研究。并根据研究结果提出甘薯黑斑病采用薯块接种时,正确和规范的甘薯黑斑病鉴定操作规程及注意事项。

关键词 甘薯; 黑斑病(*Ceratocystis fimbriata*); 接种方法

中图分类号 S147

Studies on the Artificial Inoculation Method of Black Rot (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halated) of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*)

Feng Qihuan Lu Shuyun Wang Lili Wu Chongguang
(Dept. of Agronomy)

Abstract Factors influencing the successful inoculation of black rot (*C. fimbriata*) of sweet potato (*I. batatas*), as well as the optimum predisposing conditions, requirement of storage roots to be inoculated, and the proper use of the standard resistant and susceptible checks were studied. Based on the results obtained, a standard procedure for the operation of proper testing of resistance of sweet potato to black rot was established, so as to ensure reliable results.

Key words sweet potato; black rot (*Ceratocystes fimbriata*); inoculation method

甘薯在生产上极需要具有抗病虫性的品种,因而在育种中对病虫害抗性的鉴定成为必须的手段,特别希望简便、快速、准确的鉴定方法。我国自60年代以来各地陆续开展了甘薯黑斑病抗性鉴定方法的研究,先后提出田间自然诱发鉴定、田间人工接种鉴定、室内薯块、薯苗人工接种鉴定等。由于田间鉴定法费时费工,占地面积大,而且常因土壤菌量分布不均匀或其他外界条件的影响,鉴定结果往往不准确;而室内薯块、薯苗人工接种鉴定方法较易掌握,一般多采用薯块人工接种鉴定法。具体方法见参考文献^[1]。80~90年代又陆续提出了一些新方法,如测量病斑深度^[2],荧光反射目测法^[3]等,各具优缺点。量病斑深度较快速简便,但易受薯块内维管束分布的影响,如北京农大73-5-30品系是干物质含量高,抗黑斑病和茎

收稿日期: 1996-01-04

①本研究系国家“八五”攻关项目02专题

②冯启涣,北京海淀区圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

线虫病的材料,但薯块内维管束分布密,以量病斑深度为依据则该材料为感黑斑病的。荧光反射目测法,比较快速,有一定稳定性,但需要有荧光显微镜,较难普及。近年来仍一直采用室内薯块人工接种法,并作为国家审定品种对抗黑斑病鉴定的权威方法。但在使用过程中,由于种种因素的影响,造成相同材料在不同地点试验,或同一地点的多次试验结果间差异很大,甚至出现相反的结论。鉴于这种在实施过程中的发病稳定性仍存在一定问题,为改善和规范这一抗病鉴定方法,本研究从 1991 年至 1995 年采用这种方法进行抗病鉴定,连续考查出现不稳定性的原因,并找出相应的解决措施。

1 试验材料和方法

材料:供试的甘薯品种有对黑斑病表现抗、中、感的三组品种,如绵粉一号、52-45、宁 12-17;南瑞苕、胜利百号、冀 77-70;丰收白、宁二、337-1(北京农大选育)等 21 个品种。

方法:以常规薯块针刺人工接种方法(见前言)为基本方法,并对造成鉴定结果不稳定的几个问题进行试验:1. 接种方法中有关的影响因素;2. 发病条件;3. 对接种用薯块的要求;4. 抗黑斑病鉴定试验接种时的标准品种的设置。

计算的统计方法:计算出几个基本统计数,平均数(\bar{X})(厘米),标准差(S)(厘米),变异系数(CV)(%),所有计算都是以病斑为单位,仅表 3 的计算是以薯块为单位的,因为这是表达薯块间的病斑变异。部分试验进行方差分析,以比较其间的差异显著性,有些试验结果由于差异明显,未作统计分析。

2 试验结果和分析

2.1 有关接种方法的几个影响因素

2.1.1 接种用的工具 刺破薯皮,接种含黑斑病菌分生孢子的悬浮液,发病后测量病斑大小,是这种接种方法的主要手段。我们使用两种接种工具做对比试验。一种是针刺后用接种环接种,另一种是用直径约为 2 mm 的小圆钉,固定深度为 3~4 mm,刺成小圆孔,用微型注射器从小孔中注入定量的孢子液。经过观察,发现第一种用接种环接种,孢子液易在薯皮上流淌,形成不规则的印渍,影响病斑的整齐性,直接关系到病斑直径测量的稳定性。第二种,孢子液是通过注射器的针头直接送入小圆孔内,使孢子大部分直接接触及薯肉,孢子液在表面流淌的现象少,保持了孢子处于湿润的环境,有利于发病,病斑形状也多呈规则的圆形。

2.1.2 孢子液的浓度 为了了解接种用的孢子液所含的孢子数对发病有无影响,特设计了如下试验。在 150 倍显微镜下观察,每个视野平均分别是 10 个、30 个、50 个孢子的 3 个处理,3 个处理同时在 4 个品种上进行。每个品种用 5 个薯块,取薯块的中部作接种区,在一个薯块上每个处理各接种 3 个孔。把每一个薯块看作一个区组,试验数据用随机区组方差分析方法联合分析 4 个品种的结果,所得试验的平均数据见表 1。由于该试验所用薯块的贮存期超过 2 个月,品种间发病差异不大,但不影响在相同条件下比较孢子液浓度对病斑大小的影响。

表1 用不同浓度孢子液接种时黑斑病病斑的大小 cm

品 种	在不同孢子液浓度下黑斑病病斑大小		
	10 [*]	30	50
宁 12-17	0.34	0.35	0.34
郑红 3 号	0.42	0.36	0.43
宁 二	0.38	0.32	0.31
337-1	0.34	0.33	0.34
平 均	0.37	0.34	0.36

* 以孢子数目/视野 表示

方差分析结果:孢子数处理间的 F 值=1.83,差异不显著($df_1=2, df_2=32, F_{0.05}=3.30$)。说明接种的孢子数,每个视野10~50个孢子之间无明显差异。可根据情况随意采用任何一种浓度。但要求在同一次接种鉴定试验用的孢子液浓度均匀,用针管每抽取一次孢子液前都要用玻璃棒搅匀。

2.1.3 孢子液的容量 采用两个品种(郑红3号—抗病、宁二—感病),各取5个薯块,每个薯块上每个处理接种3孔,每个孔注入的孢子液容量处理分别为5,10,15,20 μL ,其中宁二品种增加2.5 μL 一个处理。每个处理15个病斑的平均直径见表2。

本试验所用薯块的贮存期超过2个月,病斑大小的变异较大。分别对两个品种的试验结果作方差分析。郑红3号处理间的 F 值=0.71($df_1=3, df_2=40$),差异不显著;宁二的处理间 F 值=0.43($df_1=4, df_2=50$),差异不显著。表明无论抗病品种或感病品种用不同容量的孢子液接种,对病斑大小的影响不大。在实际应用时,以每孔注入5~10 μL 的孢子液较为恰当。虽然用2.5 μL 接种也可以发病,但接种技术要求较高,孢子在悬浮液中分布稍有不均匀,易造成病斑大小不一,影响病斑测量结果的稳定性。孢子液容量过大,容易溢出小孔。我们观察到每孔注入20 μL 的,病斑形状明显地不够规则。

表2 不同容量的孢子液对甘薯黑斑病病斑大小的影响

品 种	统计数	2.5 [*]	5	10	15	20 μL
郑红 3 号	\bar{X}/cm		0.40	0.38	0.37	0.41
	S/cm		0.11	0.13	0.08	0.06
	$CV/\%$		27.55	33.23	21.40	14.10
宁 二	\bar{X}/cm	0.68	0.75	0.67	0.68	0.72
	S/cm	0.30	0.26	0.27	0.21	0.23
	$CV/\%$	43.76	34.36	41.14	30.13	31.98

* 孢子液容量

2.2 发病条件

对发病条件的控制,往往是接种能否成功的关键。

2.2.1 接种的时期 接种时期实际是指薯块收获后贮存一定时间其新鲜程度和新收获时薯块的新鲜程度相近似的时期,即含水量是否充足,是否受到其他病菌的侵染。表3是对贮

存期在 1 个月内和超过两个月的薯块,用相同的品种在相同的接种条件下发病的病斑大小。

表 3 不同接种时期对黑斑病病斑大小的影响

接种日期	统计数	抗病品种		感病品种	
		绵粉 1 号	52-45	丰收白	宁 二
91-10-28 (贮存期在 1 个月内)	X/cm	0.32	0.30	0.63	0.75
	S/cm	0.026	0.041	0.068	0.12
	CV/%	8.33	13.71	10.66	15.96
92-01-04 (贮存期超过 2 个月)	X/cm	0.33	0.45	0.40	0.36
	S/cm	0.075	0.037	0.12	0.02
	CV/%	22.74	8.20	29.72	5.39

试验结果表明,在两个不同时期接种的 4 个品种,仅绵粉 1 号的病斑大小相似,而其他 3 个品种均有变化。如抗病品种 52-45 的病斑变大,感病品种丰收白和宁二的病斑相对变小了,使抗、感病的表现差距大大缩小,不易得出正确的结论。又如绵粉 1 号和丰收白在贮存后期易感染干腐或软腐病,也影响黑斑病发病的整齐性,从变异系数的增大可以看出。

对一些比较容易失水的品种(多数是切干率较低的品种),接种效果差异更突出。在我们试验过的品种,如冀 77-70、丰收白等失水较快,贮存期稍长,薯皮即出现皱缩。采用这种薯块接种,即使接种条件相同,也比新鲜薯块发病困难。而像绵粉 1 号,贮存期水分保持较好,虽经历时期较长,影响也不太大。

薯块贮存期超过 2 个月,所得试验结果不太典型,不能代表该品种的真实情况,可能比正常发病更轻或更重。所以用薯块做抗黑斑病的鉴定试验,应以贮存期不超过 2 个月为宜,而且贮存期越短些越好。要保证所抽取的薯块是新鲜的,表皮不皱缩,无其他病菌侵染,才能得出较为可靠的试验结果。

2.2.2 温湿度的保持 一定的温湿度是保证发病的基本条件。温度比较容易掌握,把培养箱的温度调至 27~28℃即可,同时还要保持 90%以上的相对湿度,这在很大程度上制约了发病的速度。据了解一般做这种鉴定时,往往只能保持到 80%左右的湿度。我们经过试验认为,可以在接种后把薯块放在白瓷盘内,在旁边放上湿毛巾,盘外用塑料薄膜罩上效果较好,但必须注意各种用具的消毒。

2.2.3 培养病斑的天数 接种后在恒温条件下培养多少天后取出现观察病斑的大小,也是需要考的因素。因为甘薯对黑斑病没有绝对免疫的品种,在人工接种的条件下,给以适合的发病条件,无论是抗、感病品种都能发病。天数太少,各类品种均未发病,或病斑很小,不易区分出抗、感病的差异。培养时间过长,抗病品种有了充足的病源,也会使病斑再增大,导致抗感病之间的差异缩小,所以必须掌握好适当的培养天数。发病初期,每个薯块上接种的不同孔穴间发病快慢的差异较大。到一定天数,病斑大小才渐趋均匀,这正是观察病斑大小的恰当时间。

用农大 22 作接种培养日期的观察。用 30 个薯块,每个接种 10 个病斑,接种后从 5~17 d 每隔 2 d,测量一次病斑,并计算每个薯块病斑间的变异。对 29 个薯块(其中一块烂掉)逐

块测量病斑的纵、横直径,求平均直径,并计算每个薯块病斑间的变异系数。比较接种后 13 d, 15, 17 d 薯块病斑的变异分别比各自的前两天的变异有何变化。发现第 13 天测量的变异比第 11 天增加或减少变异的块数大致持平。接种后第 15 天观测的比第 13 天变异,有 21 个薯块病斑间变异减少,6 块增加,2 块持平。接种后第 17 天比第 15 天的变异,则有 21 个薯块的病斑间变异是增加的,7 块减少。详见表 4。

表 4 农大 22 薯块内病斑间的变异

接种后天数/d	观察薯块总数	变异增加的薯块数 ^①	变异相同的薯块数 ^②	变异减少的薯块数 ^③
13	29	13	1	15
15	29	6	2	21
17	28	21	—	7

①变异增加的薯块数;②变异相同的薯块数;③变异减少的薯块数。

从表 4 可以看出在接种后 15 d 左右观测病斑大小较合适,此时薯块内病斑的大小比较整齐,病斑的平均数代表性强。因此所用接种薯块贮存期在 2 个月以内的,接种后培养的天数在 13~15 d 时观察病斑大小较为合适。

2.3 对接种用薯块的要求

2.3.1 薯块的大小(以重量表示)影响发病的病斑大小,贮存期超过两个月的薯块尤为突出

试验做了 3 次重复,所得结果一致,都是较大的薯块(>150 g 以上)的病斑在相同条件下大于小薯块的病斑,3 次分别为 $1.19 > 0.9$, $1.06 > 0.96$, $0.98 > 0.78$ 。主要原因是薯块越小保持水分越困难,薯块含水量下降影响病斑的大小。因小薯块失水快,如果某些材料的薯块本身较小,则接种时期更应提早些,在收获后立即进行接种鉴定,而在接种时所用薯块,在材料允许的情况下,均应采用单薯重大于 150 g 以上的薯块。

2.3.2 每次接种用的样本大小

我们经过大量的专题试验,证明薯块间的病斑变异大于一个薯块内病斑间的变异。要获取比较稳定的试验结果,必须要有一定数量的薯块作样本才行,否则结果可靠性差。经试验看出样本内的变异随样本容量的增加而减少,但它们的减少不是成直线下降趋势。由 $n=3$ 增加至 5 或 7 时,样本内变异下降最快,减少误差的相对效率较高。所以样本的大小以每份材料采用 5~7 个薯块,每个薯块接种 10~15 个病斑比较合适。详细结果已另文发表^[5]。

2.3.3 薯块的接种部位

在薯块上的不同部位接种,病斑大小及其变异性均不同。我们把每一个薯块分为头、中、尾三部分,中部约占全薯块的 1/2,头、尾部各占 1/4,分别在每个部位接种,比较病斑大小及其变异。试验结果表明,薯块中部的病斑均较头、尾部的病斑大,110 个病斑平均为 $0.78 > 0.58$;病斑间的变异度则是中部小于头尾部,变异系数为 $19.75\% < 30.75\%$ 。所以接种时,针刺部位应选在中部,头、尾部不应用于接种。

2.4 抗黑斑病鉴定试验接种时的标准品种设置问题。

根据我们 5 年来进行的 20 多次试验看出用相同材料在不同次所做的试验,结果表明,病斑间的变异性均较大。因此不可能用一个绝对的数字标准来衡量抗病或感病。同一个品种的变异在不同次的试验中,其病斑大小的变异约为 10%~30% 之间,但也有一些品种在

多次试验中表现比较稳定,可用作标准品种。

通过几年按上述提出的鉴定条件,对已知是抗病和感病的 20 多个品种的病斑作观察比较,筛选出几个表现比较稳定的品种,认为可以作为抗、感病的标准品种:

抗病品种:绵粉 1 号、华北 52-45、宁 12-17,它们的病斑平均直径多在 0.4 cm 以下。

感病品种:丰收白、宁二、337-1。病斑直径在 0.6 cm 以上。

病斑大小除与品种本身的抗病性强弱有关外,还与接种时期、薯块的新鲜程度等等影响因素有密切关系,如表 3 所示即为其中一例。可见每次接种试验都应加入相应的标准品种,而不能仅和一个固定数字标准作比较。此外,标准品种也不宜把抗、感类型划分过细。我们观察过一些介于抗病与感病类型之间的品种,如南瑞苕、胜利百号、黄心薯、冀 77-70 等的病斑大小,表现不太稳定,大致介于抗病与感病类型之间,同一品种在不同次试验中,有时靠近抗病,有时则靠向感病,不是一个稳定的集团。同一品种在不同次的接种鉴定时,病斑的变异有时超过 0.2 cm 的变化。因此再划分一类中抗或中感是很困难的,即使划分了也不准确。我们建议抗黑斑病接种的标准品种仅设置抗病和感病两个类型,以免在不同次的试验或不同地点试验的鉴定结果发生矛盾现象。而介于这二者之间的品种可根据其更靠近哪一类来确定其抗、感的程度。

在每一次抗病鉴定试验中,都应设置相同的抗病和感病的标准品种,如果哪一次试验标准品种发病出现反常情况,如感病标准品种比最低标准 0.6 cm 还降低 0.2 cm 以上,则此次试验应作废。一般说,抗病品种病斑的变异性没有感病品种大。因此,若抗病标准品种比最高标准 0.4 cm 还大 0.1 cm 以上时,则此次试验亦认为不可靠,应重做。

3 结论

通过几年的系统试验,综合以上各个试验和系统观察的结果,我们认为正确和规范薯块室内人工接种法应是:

在甘薯收获后 1~2 个月(越早越好),选用单薯块重在 100~150 g 以上的 5~7 个薯块作样本。在薯块中部占全薯块 1/2 的部位,用直径约 2 mm 的圆钉刺入薯皮 3~4 mm 深度,刺孔位置尽可能选择比较光洁的表面,每个薯块刺孔 10~15 个。采用传统方法制备孢子悬浮液,用微型注射器往刺孔内注入新鲜的孢子悬浮液。浓度是 150 倍显微镜下观察,每个视野平均含 10~50 个孢子都可以,每个刺孔注入孢子液容量 5~10 μ L。每次试验均应设置抗病和感病的标准品种最少各一个。接种后的薯块置于 27~28 $^{\circ}$ C 的恒温中,切实保持相对湿度在 90%以上,放置 13~15 d。取出测量每个病斑的最大纵、横直径,用二者的平均值作为该病斑大小的代表值。和标准品种比较时,标准抗病品种的病斑平均数不得比最高标准 0.4 cm 高出 0.1 cm;标准感病品种的病斑平均数不得比最低标准 0.6 cm 少 0.2 cm,可认为该次试验有效。据此标准看所鉴定的试验材料属于哪种类型。病斑均经在 0.4(+0.1)cm 以下的为抗病类型;病斑均径大于 0.6(-0.1)cm 为感病类型。介于中间的视其更接近哪一类型就可归入那一类。以上的差异标准必须是严格按上述的规范措施和条件下接种才行。每个材料接种所用样本的薯块数不得少于 5 块,一个样本的病斑总数不得少于 50 个。统计方法一般以薯块为单位求病斑的平均数,再求样本内所有薯块的病斑平均数,以此数据作为该材料的发

病斑大小的代表值。同时还可求出薯块病斑间的变异系数,一般如变异系数小于15%,可以认为该接种结果比较可靠。

参 考 文 献

- 1 江苏省农业科学院,山东省农业科学院主编. 中国甘薯栽培学. 上海:上海科技出版社,1984. 201~203,265~268
- 2 周茂繁. 甘薯品种对黑斑病抗性快速鉴定方法初探. 华中农学院学报,1984,(4):20~24
- 3 文永昌,郑相如,陆激韵. 甘薯块根组织感染黑斑病时产生的自发荧光现象及其应用. 植物病理学报,1989,19(4):256
- 4 张黎玉,邱瑞镰等. 甘薯 F1 抗黑斑病的表现与亲本抗性水平的关系. 江苏农业科学,1994,(6),27~29
- 5 冯启涣,陆激韵,王莉莉等. 甘薯黑斑病抗性鉴定中薯块接种的抽样方法. 作物学报,1995,21(5):540~543

www.cnki.net