

### 西瓜品种枯萎病抗性评价技术规范

Technical specification for evaluating resistance of watermelon against *fusarium wilt* disease

2015 - 09 - 25 发布

2015 - 10 - 25 实施

---



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则编写。

本标准由浙江省农业厅提出。

本标准由浙江省种植业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所、浙江省农业科学院农产品质量标准研究所、浙江省农药检定管理所。

本标准主要起草人：王汉荣、杨桂玲、王连平、方丽、陆剑飞、孙彩霞。



# 西瓜品种枯萎病抗性评价技术规范

## 1 范围

本标准规定了西瓜品种枯萎病抗性评价技术的术语和定义、鉴定方法、病情调查与判定。本标准适用于西瓜品种枯萎病抗性鉴定和抗性评定。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**抗病性** disease resistance

植物所具有的能够克服或减轻病原物致病作用的可遗传性状。

### 2.2

**抗性评价** resistance evaluation

根据采用的技术标准判别植物对特定病害反应程度和抵抗水平的描述。

### 2.3

**致病性** pathogenicity

病原物所具有的破坏寄主和引起病变的能力。

### 2.4

**病情级别** disease rating

人为定量植物个体或群体发病程度的数值化描述。

### 2.5

**病原分离物** pathogen isolate

采用人工方法从植物发病部位分离获得的、在特定环境条件下培养的病原物。

### 2.6

**接种体** inoculum

用于接种以引起病害的病原物或病原物的一部分。

## 2.7

### 接种液 inoculum suspension

用于接种的、含有接种体的悬浮液。

## 2.8

### 发病率 rate of infected

发病西瓜植株数占总西瓜植株数的百分率。

## 2.9

### 病情指数 disease index (DI)

通过对植物个体发病程度（病情级别）数值的计算获得的群体发病程度的数值化描述形式，是描述发病严重度的综合指标。

## 3 鉴定方法

### 3.1 基本设备

恒温箱、超净工作台、高压灭菌锅、冰箱、可控温的温室（温度保持在20℃~28℃）、塑料盆、铝锅、电炉、培养皿、试管、剪刀、镊子、广口瓶、酒精灯、滤纸、三角瓶、恒温振荡箱培养等。

### 3.2 培养基制作

#### 3.2.1 PDA 培养基

配方为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂17 g，加蒸馏水至1 000 ml。按培养基配方称取去皮马铃薯200 g，切成小块放入锅中，加水1 000 ml，在加热器上加热至沸腾，维持30 min，用2层纱布趁热在量杯上过滤，弃滤渣，取滤液补充水分到1 000 ml；把滤液放入锅中，加入葡萄糖20 g，琼脂17 g，然后放在石棉网上，小火加热，并用玻璃棒不断搅拌，待琼脂完全溶解后，再补充水分至1 000 ml，调pH值至6.8~7.0。将配制的培养基分装入试管或500 ml三角瓶内，在试管口或三角烧瓶口上塞上棉塞或泡沫塑料塞后，再在塞子外包一层牛皮纸，用记号笔注明培养基名称、组别、配制日期。试管的分装量为其高度的1/5，灭菌后制成斜面；三角瓶的分装量以不超过其容积的一半为宜，灭菌后倒入灭菌培养皿，制成平板培养基。

#### 3.2.2 PL 液体培养基

配方为马铃薯200 g、乳糖20 g、加蒸馏水至1 000 ml。按培养基配方称取去皮马铃薯200 g，切成小块放入锅中，加水1 000 ml，在加热器上加热至沸腾，维持30 min，用2层纱布趁热在量杯上过滤，弃滤渣，取滤液补充水分到1 000 ml；把滤液放入锅中，加入乳糖20 g，用玻璃棒搅拌后放在石棉网上，小火加热至沸腾，再补充水分至1 000 ml。将配制的培养基分装入500 ml三角瓶内，在三角烧瓶口上塞上棉塞或泡沫塑料塞后，再在塞子外包一层牛皮纸，用记号笔注明培养基名称、组别、配制日期后湿热灭菌。三角瓶的分装量以不超过其容积的一半为宜。

#### 3.2.3 绿豆液体培养基

配方为绿豆40 g、氯化钠8 g，加蒸馏水至1 000 ml。按培养基配方称取绿豆40 g，放入锅中，加蒸馏水1 000 ml，在加热器上加热至沸腾，维持30 min，用2层纱布趁热在量杯上过滤，弃滤渣，取滤液补充水分到1000 ml；把滤液放入锅中，加入氯化钠8 g，用玻璃棒搅拌后放在石棉网上，小火加热至沸腾，再补充水分至1 000 ml。将配制的培养基分装入500 ml三角瓶内，在三角烧瓶口上塞上棉塞或泡沫塑料塞后，再在塞子外包一层牛皮纸，用记号笔注明培养基名称、组别、配制日期后湿热灭菌。三角瓶的分装量以不超过其容积的一半为宜。

### 3.3 病原物的准备

#### 3.3.1 病原物分离与保存

取西瓜发病植株茎部病变的维管束组织，用常规组织分离法分离枯萎病病原物。分离物经形态学或分子生物学鉴定以及在瓜类（西瓜、甜瓜、黄瓜、南瓜、冬瓜、丝瓜、葫芦等）上的致病性测定确认为尖镰孢菌西瓜专化型（*Fusarium oxysporum* Sehl. f. sp. *niveum* (E. F. Smith) Synder & Hensen）后（参见附录A），采用单孢分离进行纯化。

纯化后，将西瓜枯萎病菌接种于PDA平板培养基上，并在接种点周围放置一定数量的灭菌滤纸片，在25℃培养7 d后，取出滤纸片，经真空干燥于-20℃~-80℃的低温冰箱中保存。或将西瓜枯萎病菌接种于PDA斜面培养基上，在25℃培养7 d后，置4℃~8℃的冰箱中保存。

#### 3.3.2 鉴定用枯萎病菌株

选择当地西瓜产区分离的西瓜枯萎病菌株，该菌应属于分布较广、致病力较强的当地优势菌系。

#### 3.3.3 接种体繁殖

将保存的鉴定接种用西瓜枯萎病菌移植于PDA平板培养基上，在25℃培养7 d后，在无菌操作下，接种于装有PL液体培养基或绿豆液体培养基的三角瓶中（液体培养基的体积以三角瓶容量的30%~35%为宜），置于25℃恒温振荡箱培养中，160 r/min~180 r/min 振荡培养5 d~7 d。培养液经双层纱布过滤，滤液以4000 r/min 离心10 min，倒除上清液，加适量的无菌水稀释，得到分生孢子悬浮液，供接种用。

### 3.4 接种液浓度、鉴定生育期及接种方法

用无菌水稀释上述供接种用的分生孢子悬浮液，镜检，将孢子悬浮液稀释至 $4.0 \times 10^6$ 个/ml 配制成接种液。

采用苗期浸根接种鉴定。待穴盘中的西瓜苗长至子叶展平至真叶露尖时，小心将苗起出，尽量避免伤根，抖去珍珠岩或黄沙，置于接种液中浸根5 min，每份待鉴定的西瓜品种（系）接种30株，重复3次。接种后移栽于装有灭菌育苗基质、直径10 cm营养钵中，置温室中并及时覆膜保湿，2 d后揭膜，观察发病。

### 3.5 西瓜鉴定品种的种植管理

将待鉴定的西瓜种子经5%次氯酸钠溶液浸种10 min后，用蒸馏水清洗3次，再清水浸泡5 h后，放入垫有两层湿润滤纸的培养皿中，置于恒温箱中，在30℃~32℃恒温中催芽。为了保证植株间接种的一致性，挑选胚根长至0.2 cm~0.3 cm的种子，一起播于装有灭菌珍珠岩或黄沙的育苗盘中，每个待鉴品种（系）各播一盘。

接种后的西瓜苗，定植于装有灭菌育苗基质的直径10 cm营养钵中（定植播种前每钵先用清水浇透），每钵1株，共30株。置温室中观察发病，温室温度保持在23℃~28℃之间。钵中育苗基质的湿度保持在60%~80%为宜，早晚注意温度变化，防止温度过高和过低。整个过程不使用杀菌剂。

### 3.6 感病对照品种和抗病对照品种的确定

设置一个感病对照和一个抗病对照，抗病对照选择指标为在常规接菌量下病情指数小于20.00的品种；感病对照选择指标为在常规接菌量下病情指数大于80.00的品种。抗病对照品种可缺省，但感病对照品种不得缺省，感病对照选用本地区的常规感病品种。

## 4 病害调查与抗病性判定

### 4.1 病害调查

在接种后第15 d 逐株调查各鉴定品种（系）西瓜植株枯萎病的发病情况，记录病株数和病情级别。调查时间可根据感病对照品种病级扩展到最高病级的时间作适当调整。调查病情分级鉴定结果记录到鉴定结果原始记录表（参见附录B）。

### 4.2 调查分级标准

苗期西瓜枯萎病的主要症状为叶片先自基部向上逐渐萎蔫，似缺水状。初期中午缺水萎蔫明显，早晚尚能恢复正常；数日后，植株萎蔫不再恢复，慢慢枯死。多数情况全株发病，也有的病株仅部分茎蔓发病。发病植株茎蔓基部稍缢缩，病部纵裂，有淡红色至粉红色胶状液溢出，根部腐烂变色，纵切根茎，其维管束部分变褐色。病情分级采用0级、1级、3级、5级、7级、9级的6级分级法，各病级分级标准参见表1。

表1 西瓜植株枯萎病病级分级标准

病级	症状描述
0级	西瓜植株健康，无病症。
1级	西瓜植株茎上出现轻微病斑，但生长正常。
3级	西瓜植株茎上病斑明显，生长轻微受抑制。
5级	西瓜植株茎上病斑明显，植株顶端萎蔫，生长缓慢或僵化。
7级	西瓜植株50%以下变褐枯萎。
9级	西瓜植株50%以上变褐枯萎或枯死。

### 4.3 调查结果的统计

根据调查的结果计算各品种的发病率和病情指数。

发病率以“ $R_i$ ”计，数值以“%”表示，按式(1)计算：

$$R_i = (n_i/n_t) \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

$n_i$ ——发病株数；

$n_t$ ——总株数。

计算结果精确到小数点后两位。

病情指数以“ $DP$ ”计，按式(2)计算：



$$DI = \frac{\sum(d_c \times n_c)}{n_t \times 9} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$d_c$ ——相应病级；

$n_c$ ——各病级病株数；

$n_t$ ——总株数。

计算结果精确到小数点后两位。

#### 4.4 鉴定结果的校正

由于鉴定的外界条件，包括地区间不可能完全一致，即使同一地区年度间、批次间鉴定结果也可能存在差异。为此，应对鉴定结果进行校正，即采用相对病情指数进行校正。方法为：鉴定中必须设感病对照，在感病对照病情指数达50.00以上时进行发病调查，由于感病对照病情指数不可能刚好为50.00，为此，采用校正系数*K*来进行校正，*K*值的求法按式（3）计算：

$$K = (50.00/DI_{ck}) \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

50.00——感病对照标准病情指数；

$DI_{ck}$ ——本次鉴定感病对照病情指数。

用*K*值与本次鉴定中被鉴定品种的病情指数相乘，求得被鉴定品种的相对病情指数（*RDI*），*RDI*按式（4）计算：

$$RDI = DI \times K \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

*DI*——被鉴定品种病情指数；

*K*——校正系数。

以*K*值在0.75~1.25（相当于病情指数66.67~40.00）之间的鉴定结果为准确可靠。

#### 4.5 鉴定结果的评定

根据被鉴定品种的相对病情指数评定品种的抗性级别，各抗性级别评定标准参见表2。

表2 西瓜品种枯萎病抗性评定标准

序号	抗性类型	英文缩写	相对病情指数标准
1	高抗	HR	$0 < RDI \leq 10.00$
2	抗病	R	$10.00 < RDI \leq 30.00$
3	中抗	MR	$30.00 < RDI \leq 50.00$
4	中感	MS	$50.00 < RDI \leq 60.00$
5	感病	S	$60.00 < RDI \leq 80.00$
6	高感	HS	$80.00 < RDI \leq 100.00$

附 录 A  
(资料性附录)  
西瓜枯萎病病原

A.1 学名

尖镰孢西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* Sehl. f. sp. *niveum* (E. F. Smith) Synder & Hensen) 属真菌界 (*Fungi*)，半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)，丝孢纲 (*Hyphomycetes*)，瘤座孢目 (*Tuberculariales*)，瘤座孢科 (*Tuberculariaceae*)，镰孢属 (*Fusarium*)，美丽组 (*elegans* Wr.)，尖孢种 (*oxysporum* Schl.) 真菌。

A.2 培养特性和孢子形态

A.2.1 特性

在PDA培养基上，菌丝为白色，培养时间稍长培养基经常出现紫色，菌丝体透明，有分隔。

A.2.2 孢子形态

A.2.2.1 大型分生孢子

大型分生孢子着生在复杂而又有分枝的分生孢子梗或瘤状的孢子座上，呈镰刀形至纺锤形，椭圆型弯曲基部有小柄，两端尖，顶端呈钩状，有的呈喙状弯曲，壁薄。通常具有3个~5个分隔，以3个分隔的常见，大小为(22.8 $\mu\text{m}$ ~38.4 $\mu\text{m}$ ) $\times$ (2.6 $\mu\text{m}$ ~4.1 $\mu\text{m}$ )，黄褐色至橙色。

大型分生孢子通常有3种培养型，I型为匀称镰刀形或纺锤形，顶细胞较长，足细胞明显或不明显，多为3个分隔，属典型的尖孢类型；II型较宽短或细长，多为3个分隔，有的可多达4个~5个分隔，有时可达8个分隔；III型宽短，顶端呈钩状，有的呈喙状弯曲，上端1/3处变宽，基部细胞逐渐变窄，足细胞有或不明显，多为3个分隔，近于马特型。

A.2.2.2 小型分生孢子

多数为单胞，少数有1个分隔，通常为卵形，有时为椭圆形、倒卵形、肾形、柱形，大小为(5 $\mu\text{m}$ ~12 $\mu\text{m}$ ) $\times$ (2.2 $\mu\text{m}$ ~3.5 $\mu\text{m}$ )，通常着生于菌丝侧面的分生孢子梗，聚集成假头状。

A.2.2.3 厚垣孢子

通常单生，有时双生，多数在老熟的菌丝顶端和中间形成，有时亦可生于大型分生孢子上，表面光滑，偶有粗糙，球形至卵圆形，浅黄至黄褐色。

附 录 B  
(资料性附录)  
鉴定结果原始记录表

表B.1 给出了西瓜品种枯萎病抗性鉴定结果原始记录表

表B.1 西瓜品种枯萎病抗性鉴定结果原始记录表

品种名称	总株数	0级 株数	1级 株数	3级 株数	5级 株数	7级 株数	9级 株数	发病率/%	病情指数	相对 病情指数
鉴定地点:				接种生育期:				接种病原菌编号:		
播种日期:     年     月     日				接种日期:     年     月     日				调查日期:     年     月     日		
鉴定人:			校核人:			审核人:				
年 月 日			年 月 日			年 月 日				