

抗月季根癌病种质资源的筛选与评价

赵小兰^{1,3}, 苏晓华², 韩 益¹, 赵梁军^{1*}

(1. 中国农业大学观赏园艺与园林系,北京 100094; 2. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091;
3. 湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北 恩施 445000)

摘要:2003年和2004年5月18—20日,以根癌土壤杆菌J-5-1毒性菌株在田间接种了蔷薇属50个材料,以鉴定其对根癌病的抗性。根据发病率、肿瘤大小、肿瘤干质量以及感病后植株生长状况将植物的根癌病抗性分为高度抗病、中度抗病、中度感病、高度感病4个类型。重瓣玫瑰、黄刺梅、‘红双喜’、‘火焰’、‘蓝丝带’表现为高度抗病;多花蔷薇无刺4号、无刺3号、粉团蔷薇、白玉堂等17个材料为中度抗病;荷花蔷薇、多花蔷薇无刺11号、月季花、‘梅郎口红’‘金玛丽’等17个材料为中度感病;香水月季、‘曼海姆’、‘摩纳哥公主’、‘杨基歌’‘桔红潮’等11个材料则表现为高度感病。为克服田间鉴定的各种限制因素,对根癌病抗性的离体接种鉴定方法作了探讨。结果表明:离体嫩梢接菌后所产生的瘤状愈伤组织量可以作为区分材料根癌病抗性的依据,离体接种与田间接种鉴定结果基本一致。

关键词:蔷薇属;根癌病;抗性种质筛选

中图分类号: S685.12

文献标识码: A

Selection and Evaluation of the Resistant Resources to Rose Crown Gall Disease

ZHAO Xiao-lan^{1,3}, SU Xiao-hua², HAN Yi¹, ZHAO Liang-jun¹

(1. Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China; 3. Biological Science and Technology School, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: Fifty samples of *Rosa* spp. were inoculated with the highly virulent strain J-5-1 of *Agrobacterium tumefaciens* as *in vivo* testing for resistance to crown gall disease in 2003, 2004. According to disease incidence, tumor size and weight and the impacts on the hosts' growth, these materials were categorized as: highly resistant, moderately resistant, moderately susceptible and highly susceptible. *R. rugosa*, *R. xanthina*, *R. hybrida* 'Fire', *R. hybrida* "Double Delight", *R. hybrida* 'Blue Ribbon' were highly resistant; *R. multiflora* 'Inermis No3', *R. multiflora* 'Inermis No4', *R. multiflora* var. *cathayensis* and *R. multiflora* 'Baiyutang' and other 13 materials were grouped as moderately resistant. *R. multiflora* 'Inermis No11', *R. multiflora* f. *carnea*, *R. chinensis*, *R. hybrida* 'Rouge Meiland', *R. hybrida* 'Goldmarie' and other 12 materials were moderately susceptible. *R. × odorata*, *R. hybrida* 'Schloss Mannheim', *R. hybrida* 'Yankee Doodle', *R. hybrida* 'Princess de Monaco' and other 7 samples were highly susceptible. Furthermore, *in vitro* testing method was introduced to escape the limitations of *in vivo* testing method. It showed that the tumor size produced on the *in vitro* cultured plantlets was significant different among the samples, and it could be used as an index for the hosts' susceptibility to *A. tumefaciens*. The result of *in vitro* testing

收稿日期: 2005-05-09

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化课题(J2002-B-004);北京市科委“抗逆地被植物的培育”项目(H020620110130)

作者简介: 赵小兰(1968—),女,湖北宜昌人,副教授,博士研究生,主要从事园林植物生理生态及育种研究. E-mail: xiaolanpeng@163.com. *通讯作者, Tel. 010-62733315; E-mail: zhaolj_5073@sina.com.cn

method was basically consistent with that of *in vivo* testing method.

Key words: *Rosa* spp; crown gall disease; resistance identification

月季根癌病是由根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 引起的土传根系病害, 具有潜伏侵染和系统侵染特性^[1]。受害植株在根系、根颈处甚至茎上形成大小不一的肿瘤, 根茎发育受阻, 进而影响植株水分及养分吸收。据研究, 该病害使月季茎的增粗减少 63%, 产量减少 36%, 并缩短植株寿命^[2]。近 10 年来, 月季根癌病在中国不断蔓延, 造成严重危害^[3]。有效控制月季根癌病成为月季生产及园林应用迫切需要解决的难题。虽然以 K84、K1026 等生防菌对月季根癌病进行防治取得了一定成效, 但其应用也受到很大限制^[1,4], 选育抗病砧木和品系便成为防治月季根癌病的重要途径。筛选利用现有的抗病资源在日本、法国等国家已经取得了成效^[4~9], 但是由于不同研究者所采用的接种方法、菌株种类与浓度、评价标准以及植物所处的生长环境不同, 对同一材料的抗性鉴定得出了完全不同的结论^[5,6,9]。在中国, 关于月季根癌病的研究鲜见报道。本研究立足于月季生产与园林应用的实际问题, 从月季品种‘金玛丽’的根部肿瘤中分离了根癌土壤杆菌毒性菌株 J-5-1, 对蔷薇属 (*Rosa*) 50 个材料的根癌病抗性进行了田间接种鉴定。根据发病率、肿瘤大小、肿瘤干质量以及感病后对植株生长量的影响将材料的根癌病抗性进行了等级划分, 并获得了月季根癌病的高抗和中抗材料, 这将为月季生产、应用以及育种提供重要的基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

田间接种选取现代月季的常用砧木类型及我国园林绿化广泛应用的现代月季品种, 共 50 个材料 (表 1)。砧木由本实验室收集、繁殖, 品种月季盆栽苗购自北京滢泽花卉月季园。田间接种材料均选用 2 年生盆栽苗, 离体接种选用蔷薇属 13 个材料的无菌苗。所用的组培苗均在当年生幼嫩茎段中上部节位取材, 每个外殖体带一个腋芽, 常规灭菌处理后在添加不同激素的 MS + 3% 蔗糖 + 0.5% 琼脂 (pH 值 5.8) 的培养基上培养。培养条件为: 温度 25 ℃, 光照 2 000 lx, 光周

期 14 h/10 h, 侧芽萌发至 3 ~ 4 cm 时接种处理。

接种所用的根癌土壤杆菌菌株 J-5-1, 从月季品种‘金玛丽’的根部肿瘤中分离。病原菌的分离参考马德钦的方法^[10]。病原菌的致病性采用 Sawada 等的 PCR 方法^[11] 鉴定并进一步活体接种向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 与荷花蔷薇 (*R. multiflora* f. *carnea*) 进行验证。病原菌活化采用 YEB 培养基 (YEB 培养基: 酵母浸提物 1 g · L⁻¹, 牛肉浸膏 5 g · L⁻¹, 蛋白胨 5 g · L⁻¹, 蔗糖 5 g · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g · L⁻¹, 琼脂 15 g · L⁻¹ 或不加, pH 值 7.8)。

1.2 接种方法

田间接种鉴定于 2003 年和 2004 年 5 月 18—20 日进行。选取生长势一致的当年生枝条, 在中上部节位用解剖刀密集扎 6 个伤口, 深度达髓部, 以灭菌脱脂棉蘸取浓度为 10⁹ cfu · mL⁻¹ 的菌悬液包裹伤口, 对照为无菌水处理, 保湿 2 d。每个处理 10 ~ 15 个枝条。

离体嫩梢接种采用解剖针挑取菌苔在新长出的嫩梢上轻扎 4 个伤口。每种材料接种 10 个嫩梢, 对照为针刺处理。除部分材料的活体鉴定无法重复外, 所有实验均重复 2 次

1.3 不同接种方法植株抗病性的测定与评价

田间接种后每半个月观察记载植株的生长状况, 并分别于接种 30、60 d 时观测发病率、肿瘤的大小 (最大纵径和最大横径), 并在 60 d 时称取肿瘤干质量, 计算 2 a 的平均值。材料的抗性分级标准为: 高度抗病 (HR) (发病率 0 ~ 75%, 瘤的最大纵横径 ≤ 1.00 cm, 平均瘤质量 ≤ 1.00 g); 中度抗病 (MR) (发病率 20% ~ 90%, 瘤的最大纵横径 1.00 ~ 1.99 cm, 平均瘤质量 1.00 ~ 1.49 g); 中度感病 (MS) (发病率 100%, 瘤的最大纵横径均为 2.00 ~ 2.60 cm, 平均瘤质量 1.50 ~ 3.00 g); 高度感病 (HS) (发病率 100%, 瘤的最大纵横径 > 2.50 cm, 寄主生长明显受抑制)。

离体嫩梢接种 42 d 后测量瘤状组织的大小, 计算平均值; 同时测量接种与对照处理植株的侧梢生长量, 采用 LSD 法分析接种处理对寄主生长量的影响是否差异显著。根据肿瘤大小、对寄主生长量的影响将材料的抗性划分为 4 个类型: 高度抗病 (HR) (肿瘤纵横径 ≤ 2.0 mm); 中度抗病 (MR) (肿瘤纵横

径 2.1 ~ 4.0 mm); 中度感病 (MS) (肿瘤纵横径 > 4.0 mm, 对寄主生长量影响不显著); 高度感病 (HS) (肿瘤纵横径 > 7.0 mm, 对寄主生长量有显著影响)。

2 结果与分析

2.1 活体鉴定结果与分析

2003 年与 2004 年田间接种 50 个材料的试验结果稳定一致, 各材料之间对根癌土壤杆菌侵染的敏感性有明显差异 (表 1)。香水月季、‘曼海姆’、‘梅郎随乡曲’ 1 周后在接种部位有明显的瘤状愈伤组织产生, 而多数材料接种处理与对照并无显著差异, 均只有少量愈伤组织产生。接菌 1 个月后, 各材料的发病率、肿瘤大小出现明显的差别。

1 个月后大多数肿瘤呈现逐渐增大的趋势, 并在 2 个月时各材料之间的肿瘤大小分化更为明显, 如: 荷花蔷薇、多花蔷薇 11 号与多花蔷薇 4 号在 2 个月后才出现明显的差异, 而高度感病材料香水月季的肿瘤则无限制地生长; ‘丹顶’、‘粉梅朗’、‘绿野’、‘金奖章’、‘太阳火焰’、‘朝云’等的肿瘤则基本没有变化; ‘黄和平’、‘曼海姆’、‘摩纳哥公主’、‘杰斯特乔伊’等的肿瘤则由于接种的嫩梢逐渐干枯影响了其营养与水分积累, 体积反而变小。试验结果表明: 在以肿瘤大小作为鉴定标准时, 应以植物接菌两个月后的表现反映其抗性差异, 但对少数极感病材料的评价应综合其它观察结果; 肿瘤干质量与肿瘤大小增加的规律基本一致, 也能直观反映不同材料的抗病性差异; 同时, 试验还发现, 形成的肿瘤大小、质量一样, 但对不同寄主的生长影响却很不相同, 如接菌 2 个月后, ‘杰斯特乔伊’、‘橘红潮’、‘黄和平’生长基本停止, 无嫩梢抽出, 而‘阿林卡’、‘光谱’、‘粉和平’、‘梅朗口红’的生长几乎未受影响; ‘曼海姆’在接菌嫩梢逐渐干枯后出现植株死亡的现象, 而香水月季、‘杨基歌’、‘红帽子’生长所受影响相对较小。

根据材料的抗性分级标准, 获得高度抗病材料 5 个, 包括重瓣玫瑰、黄刺梅、‘红双喜’、‘火焰’、‘蓝丝带’; 中度抗病材料 17 个, 包括: 多花蔷薇无刺 4 号、无刺 3 号、粉团蔷薇、白玉堂等; 中度感病材料 17 个, 包括: 多花蔷薇无刺 11 号、荷花蔷薇、‘金玛丽’、‘粉和平’等; 而香水月季、‘曼海姆’、‘摩纳哥公

主’、‘杨基歌’等高度感病, 共有 11 个材料。

Zhou^[9] 曾以根癌土壤杆菌 GOU1 菌株离体接种鉴定了 24 个月季品种的根癌病抗性, 结果表明: 对肿瘤形成有高度抗性的品种占 12.5% (发病率 < 25%), 中等抗性的品种占 45.8% (发病率 25% ~ 50%); 而对肿瘤扩展有高度抗性的品种占 12.5%, 有中等抗性的品种占 66.7%。本试验结果与之较为吻合, 但在发病率上明显偏高; 而在对月季砧木的根癌病抗性鉴定方面, 两者差异较大。Zhou^[8] 试验结果表明: 供试的砧木类型均不抗肿瘤形成, 多花蔷薇形成的肿瘤最大, 且与其它种之间差异显著; 而本试验表明: 多花蔷薇种内对根癌病的抗性存在差异, 4 个类型中度抗病, 2 个类型中度感病, 没有高度感病类型, 这些差异可能来源于菌株和试验体系的不同。

在活体鉴定试验中, 不同季节接种则材料的发病率、肿瘤大小会有明显差异^[5], 因而 2 a 的接种时间均在 5 月 18—20 日, 即嫩梢萌出 4 ~ 6 cm, 此时的气温也正处于病害发生的最适宜温度 25 °C 左右。为使鉴定不受时间、环境的限制, 进一步对离体接种鉴定方法进行了探讨。

2.2 离体嫩梢接种鉴定

由图 1 可以看出, 在侧梢接种部位瘤状组织明显, 而对照的伤口处没有生成明显的愈伤组织, 说明以接种部位产生的瘤状组织量来区分材料的根癌病抗性具有可行性。表 2 为蔷薇属 13 个材料的离体接种鉴定结果。

对材料进行离体接种时发病率均达到 100%, 因而仅根据肿瘤大小和对寄主生长量的影响, 对供试材料进行了抗性划分 (表 2)。比较离体与田间活体接种鉴定结果发现, 绝大多数材料的鉴定结果一致, 如: 荷花蔷薇、‘梅口红’、‘多花蔷薇 4 号’、‘西方大帝’、‘御用马车’、‘金玛丽’。只有‘金奖章’的鉴定结果略有差异。此外, ‘萨曼莎’和‘索尼亚’分别是目前已经公认的根癌病抗病和感病材料, 本试验的鉴定结果与之吻合; 但所有材料离体接种鉴定时发病率均达 100%, 这与田间接种鉴定结果有一定差异, 与 Zhou^[8,9] 的试验结果也有差异。Zhou 以 GOU1 菌株接种快速繁殖的材料, 而本试验为避免病原菌繁殖影响寄主的营养吸收, 以 J-5-1 菌株接种外植体新萌发的侧梢, 菌株种类、材料的内源激素水平、营养状况不同可能造成了这种差异。

表1 蔷薇属50个材料对根癌病(菌株:J-5-1, 10^9 cfu · mL⁻¹)的抗性活体鉴定结果

材料名称	拉丁学名	发病率/ %	肿瘤最大横径×最大纵径/(cm×cm)		肿瘤干质量/ g	根癌病抗 性分级
			接菌后30 d	接菌后60 d		
重瓣玫瑰	<i>Rosa rugosa</i>	75	未见明显瘤状组织	0.90×0.97	0.65	HR
黄刺梅	<i>Rosa xanthina</i>	50	0.48×0.48	0.83×0.83	0.54	HR
红双喜	<i>R. hybrida</i> 'Double Delight'	0	未见明显的瘤状组织	未见明显的瘤状组织		HR
火焰	<i>R. hybrida</i> 'Fire'	10	0.50×0.50	0.64×0.80	0.33	HR
蓝丝带	<i>R. hybrida</i> 'Blue Ribbon'	0	未见明显的瘤状组织	未见明显的瘤状组织		HR
粉团蔷薇	<i>R. multiflora</i> Thunb. var. <i>cathayensis</i>	90	1.08×0.94	1.80×1.74	1.45	MR
白玉堂蔷薇	<i>R. multiflora</i> 'Baiyutang'	85	0.43×0.35	1.16×1.24	0.56	MR
多花蔷薇4号	<i>R. multiflora</i> 'Inermis 4'	80	1.10×1.02	1.68×1.48	0.68	MR
多花蔷薇3号	<i>R. multiflora</i> 'Inermis 3'	85	0.40×0.30	1.01×1.30	0.46	MR
曼尼蒂	<i>R. canina</i> 'Manetti'	80	未见明显的瘤状组织	1.50×1.87	0.74	MR
金奖章	<i>R. hybrida</i> 'Gold Medal'	25	1.14×1.15	1.10×1.23	0.28	MR
皇家巴西诺	<i>R. hybrida</i> 'Royal Bassino'	40	0.89×0.73	1.10×1.25	0.50	MR
彩云	<i>R. hybrida</i> 'Saiun'	30	0.20×0.30	1.17×1.07	0.32	MR
绿野	<i>R. hybrida</i> 'LuYe'	60	1.34×1.53	1.36×1.69	0.88	MR
绯扇	<i>R. hybrida</i> 'Hi-ohgi'	20	1.09×1.15	1.34×1.48	0.41	MR
粉梅朗	<i>R. hybrida</i> 'Pink Meiland'	70	1.37×1.21	1.43×1.35	0.34	MR
金秀娃	<i>R. hybrida</i> 'Golden Shower'	75	0.67×1.50	1.20×1.58	0.28	MR
朝云	<i>R. hybrida</i> 'Asagumo'	40	1.39×1.62	1.47×1.67	0.94	MR
现代艺术	<i>R. hybrida</i> 'Modern art'	70	1.31×1.37	1.50×2.04	1.04	MR
西方大帝	<i>R. hybrida</i> 'Royalty'	20	0.50×0.50	1.88×1.26	0.55	MR
冰山	<i>R. hybrida</i> 'Iceberg'	75	1.47×1.49	1.88×1.57	0.94	MR
丹顶	<i>R. hybrida</i> 'Tanchó'	90	1.64×1.53	1.66×1.63	1.12	MR
多花蔷薇11号	<i>R. multiflora</i> Thunb. 'Inermis 11'	100	1.01×1.11	1.93×2.10	1.56	MS
荷花蔷薇	<i>R. multiflora</i> Thunb. f. <i>carnea</i>	100	1.12×1.30	2.50×2.21	1.98	MS
月季花	<i>R. chinensis</i> Jacq.	100	1.23×1.17	1.85×2.00	1.85	MS
梅朗口红	<i>R. hybrida</i> 'Rouge Meiland'	100	2.02×1.90	2.52×2.07	2.67	MS
金玛丽	<i>R. hybrida</i> 'Goldmarie'	100	2.01×1.68	2.10×2.10	1.33	MS
阿林卡	<i>R. hybrida</i> 'Alinka'	100	1.91×2.32	2.03×2.39	2.00	MS
欢笑	<i>R. hybrida</i> 'Glad Tidings'	100	1.62×1.82	2.56×1.97	1.75	MS
坦尼克	<i>R. hybrida</i> 'Tineke'	100	2.24×2.42	2.35×2.68	2.48	MS
红葡萄酒	<i>R. hybrida</i> 'Red Wine'	100	1.28×1.78	1.85×2.37	1.86	MS
粉和平	<i>R. hybrida</i> 'Pink peace'	100	1.78×1.95	2.45×2.50	2.90	MS
光谱	<i>R. hybrida</i> 'Spectra'	100	2.05×1.99	2.34×2.51	2.37	MS
桔红火焰	<i>R. hybrida</i> 'Orange Fire'	100	2.36×2.51	2.45×2.49	2.72	MS
黄和平	<i>R. hybrida</i> 'Peace'	100	2.57×2.32	2.17×2.29	2.24	MS
捷斯特乔伊	<i>R. hybrida</i> 'Just Joey'	100	2.24×2.56	2.34×2.49	2.15	MS
巴西诺	<i>R. hybrida</i> 'Bassino'	100	1.86×1.93	2.14×2.07	1.41	MS
明星	<i>R. hybrida</i> 'Super Star'	100	1.89×1.94	1.97×2.00	1.50	MS
金徽章	<i>R. hybrida</i> 'Golden Emblem'	100	1.87×2.03	2.15×2.24	1.67	MS
香水月季	<i>R. × odorata</i>	100	2.10×2.38	4.73×4.22	11.51	HS
曼海姆	<i>R. hybrida</i> 'Schloss Mannheim'	100	3.09×3.09	2.72×2.98	4.59	HS
扬基歌	<i>R. hybrida</i> 'Yankee Doodle'	100	2.70×2.55	3.08×3.12	4.28	HS
梅朗随乡曲	<i>R. hybrida</i> 'Caprice de Meiland'	100	2.80×2.70	2.81×2.90	3.19	HS
黑魔术	<i>R. hybrida</i> 'Black Magic'	100	1.75×1.67	2.41×3.13	3.45	HS
摩纳哥公主	<i>R. hybrida</i> 'Princess de Monaco'	100	2.74×3.05	2.45×2.85	3.33	HS
御用马车	<i>R. hybrida</i> 'Imperial Garry'	100	2.26×2.29	2.36×2.63	3.08	HS
橘红潮	<i>R. hybrida</i> 'Orange Wave'	100	2.27×2.68	2.48×3.14	2.29	HS
伊丽莎白女王	<i>R. hybrida</i> 'Queen Elizabeth'	100	2.34×2.53	2.94×3.25	3.13	HS
杏花村	<i>R. hybrida</i> 'Betly prior'	100	2.20×2.17	2.66×2.68	3.27	HS
红帽子	<i>R. hybrida</i> 'Rödhätte'	100	2.32×2.45	3.13×3.80	4.08	HS

表2 蔷薇属13个材料离体嫩梢接种鉴定结果

材料名称	培养基中激素浓度/(mg·L ⁻¹)			肿瘤大小/(mm×mm)	抗性分级
	6-BA	NAA	GA ₃		
萨曼莎	2.50	0.00	0.04	2.0×2.0	HR
曼尼蒂	0.70	0.00	0.04	1.3×1.3	HR
多花蔷薇4号	0.70	0.00	0.04	3.2×3.2	MR
月季花	1.00	0.02	0.04	3.5×3.4	MR
西方大帝	2.50	0.05	0.04	2.2×2.2	MR
梅郎口红	1.50	0.00	0.04	4.3×4.3	MS
金奖章	0.70	0.00	0.04	7.7×7.5	MS
御用马车	0.70	0.00	0.04	5.4×5.3	MS
荷花蔷薇	0.70	0.00	0.04	8.3×8.6	MS
金玛丽	0.70	0.02	0.04	4.3×4.7	MS
狗蔷薇	0.70	0.00	0.04	7.8×8.4	HS
索尼亚	0.70	0.00	0.04	8.5×8.7	HS
曼海姆	1.50	0.00	0.04	7.5×7.4	HS



图1 离体嫩梢接种鉴定图(处理42 d)

2.3 月季根癌病抗病资源的评价

从表1、2得出,月季常用砧木类型中,多花蔷薇无刺3号、无刺4号、白玉堂及曼尼蒂等对根癌病有中度抗性,而荷花蔷薇、月季花、多花蔷薇无刺11号则表现为中度感病性,香水月季、狗蔷薇为高度感病。由于月季砧木的选择应该综合其嫁接亲和性、嫁接的可操作性对月季切花产量、质量的影响以及对生态环境、病虫害的抗性而定。综合本研究小组多年的研究结果^[12~14],结合本次的筛选结果,多花蔷薇无刺3号、4号、曼尼蒂是值得推荐的月季砧木;而重瓣玫瑰黄刺梅的抗性种质将为抗病砧木育种提供新的遗传资源。

在园林绿化常用的月季品种中,对根癌病的抗性也表现出较大差异。综合表1、2的筛选结果,并依据各品种的园林用途、观赏性、综合抗性等方面,‘蓝丝带’、‘红双喜’、‘彩云’、‘金玛丽’、‘梅郎口红’等可以较多应用于盆栽和地栽;而‘曼海姆’、‘摩纳哥公主’、‘橘红潮’、‘巴西诺’、‘杨基歌’、‘红帽子’等则应从园林绿地中逐渐被更替。

3 讨论

虽然近年有月季茎段上产生肿瘤的报道^[1],但根癌病主要在月季根部和根冠部发病。前人在苹果(*Malus pumila* Mill.)上的研究表明:地上部与地下部接种后产生的抗病反应高度相关,应用地上部接种能衡量供试材料对根癌病的敏感性^[15];因而本试验采用嫩枝接种方法来鉴定植物对根癌病的抗性是可行的。

Bush等^[16]在鉴定不同菊花(*Dendranthema morifolium* Tzvel.)品种对根癌病的抗性时,比较不同品种的叶圆片受农杆菌侵染与对照之间形成的愈伤组织量差异作为鉴定标准。本试验也曾以多花蔷薇无刺4号为材料摸索了叶圆片离体接种鉴定方法,处理1个月后,接菌处理的叶片边缘有褐化但中间保持绿色,对照叶圆片变褐,两者边缘均产生少量愈伤组织。2个月后,接菌处理的叶圆片中间仍然维持绿色,边缘愈伤缓慢生长并从部分愈伤组织长出不定根,对照叶片愈

伤组织停止生长,叶片死亡(图2)。接菌处理叶圆片中间的绿色和愈伤组织上不定根的发生正是根癌土壤杆菌成功入侵多花蔷薇的叶圆片,刺激其细胞分裂素、生长素大量产生后的效应;但通过处理与对照的愈伤组织产生量的差别来作为抗性鉴别的依据还有待进一步研究。

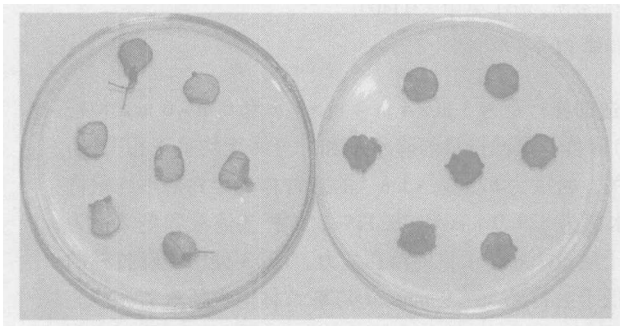


图2 叶盘法接种鉴定(左为用 *A. bacterium* J-5-1 接菌处理,右为对照)

在含有激素的培养基上进行2~3 d的预培养是目前多数离体鉴定必须的步骤;而Nam等^[17]在拟南芥上的研究发现,当以离体根段进行根癌病的抗性鉴定时,根段分开置于培养基上则必须进行预培养,但若以根束形式置于培养基上,则不需要预培养步骤,材料可以直接在无激素的培养基上生成愈伤,比较其生成量来鉴定抗性,从而排除激素对鉴定结果的影响。该方法在月季根癌病研究上的应用也正在试验中。

离体接种鉴定所需材料少,而且试验可以全年进行且操作方便;同时为深入研究抗病机理也必须建立稳定可靠的无菌接种鉴定体系,因而有必要进一步完善月季根癌病抗性鉴定的离体接种体系。

参考文献:

- [1] Marti R M, Cubero J, Daza A, et al. Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants [J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105: 39 ~ 50
- [2] Poncet J C. Impact of the crown gall disease on vigor and yield of rose trees [J]. Acta Horticulturae, 1995, 424: 221 ~ 225
- [3] 李健强. 玫瑰根癌病的初步研究(简报)[J]. 中国农业大学学报, 1996, 16(1): 28
- [4] Jones M. Behavior of a virulent strain derived from *Agrobacterium radiobacter* strain K84 after spontaneous Ti plasmid acquisition [J]. Phytopathology, 1999, 89(4): 286 ~ 292
- [5] Boelema B H. Resistance of rose rootstocks to crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*) [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1969, 75: 147 ~ 150
- [6] Ohta K. Studies on crown gall and hairy root of flower crops [J]. Shizuoka Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 1993, 16: 1 ~ 63
- [7] Reynders A S, Pelloi G, Bettachini A, et al. Tolerance to crown gall differs among genotypes of rose rootstocks [J]. HortScience, 1998, 33(2): 296 ~ 297
- [8] Zhou L, Suzuki K, Naruse T, et al. *In vitro* testing of rose rootstocks resistance to crown gall disease [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2000, 69(2): 171 ~ 175
- [9] Zhou L, Suzuki K, Naruse T, et al. Varietal differences in resistance to crown gall disease among rose cultivars by *in vitro* testing (in Japanese with English abstracts) [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1999, 68(2): 440 ~ 445
- [10] 马德钦, 林应锐, 周娟, 等. 我国啤酒花根癌土壤杆菌的初步研究 [J]. 微生物学通报, 1985, 27(1): 37 ~ 42
- [11] Sawada H, Ieki I, Matduda I. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains [J]. Applied Environmental Microbiology, 1995, 61: 828 ~ 831
- [12] 苏立峰. 三种砧木对切花品种‘红衣主教’生产特性的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001
- [13] 吕娟妃. 三种砧木对‘红衣主教’生长发育及其生理学特性的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2002
- [14] 李增武. 遮荫对野蔷薇实生苗根颈生长的影响 [J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(6): 45 ~ 49
- [15] Stover E, Walsh C. Crown gall in apple rootstocks; inoculation above and below soil and relationship to root mass proliferation [J]. HortScience, 1998, 33(1): 92 ~ 95
- [16] Bush A L, Steven G P. Cultivar-strain specificity between *Chrysanthemum morifolium* and *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Physiological and Molecular Pathology, 1991, 39: 309 ~ 323
- [17] Nam J S, Matthyse A G, Gelvin S B. Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration [J]. Plant cell, 1997, 9(3): 317 ~ 333