

苹果组培苗和温室盆栽苗对火疫病的感病性研究

李颖章 韩碧文

(中国农业大学生物学院)

V. Ognjanov

(南斯拉夫诺维萨德大学园艺系)

摘要 不同品种的苹果对梨火疫病(*Ew inia amylovora*) 菌的敏感性不同, 用盆栽苗与体外组培苗所得的结果一致, 感病快的品种体内所含的病菌数高于感病慢的品种; 外植体的生理状态对病害的发生有影响。

关键词 苹果; 梨火疫病; 敏感性

分类号 S436.611; Q944.6

Susceptibility of Apples to Fire Blight Grown in vitro and in Greenhouse

Li Yingzhang Han Biwen

(College of Biology, CAU)

V. Ognjanov

(Faculty of Agriculture, Institute for Fruitgrowing and Viticulture, 21000 Novi Sad, Yugoslavia)

Abstract The responses of susceptibility of apple cultivars to *Ew inia amylovora* were different. The number of the bacterial cells from susceptible cultivars was higher than that from resistant cultivars. Symptoms obtained *in vitro* were similar to those observed in the greenhouse. The physiological state of plantlets grown *in vitro* influenced the level and uniformity of symptoms.

Key words apple cultivars; *Ew inia amylovora*; susceptibility

火疫病 (fire blight) 是由梨火疫欧氏杆菌 (*Ew inia amylovora*, 以下简称 Ea) 引起的, 从 80 年代后期开始, 广泛传播于欧美大陆, 对苹果、梨、山楂等园艺作物危害极大。在 1992~ 1995 年期间, 仅南斯拉夫由火疫病所造成的经济损失就达 620 万马克。火疫病以其传播快、蔓延迅速、难于控制而成为研究的热点, 欧美各国目前正投入较大力量对火疫病进行多方位研究, 以寻找有效的防治方法^[1~4]。本试验进行了不同品种苹果盆栽苗和组培苗对 *E. amylovora* 感病性研究, 以筛选对 *E. amylovora* 的抗、感品种, 并对组培苗的发育时期、生理状态和培养条件与 *E. amylovora* 的互作影响进行了比较, 为进一步研究苹果的抗火疫病机理奠定基础。本文全部内容均在南斯拉夫诺维萨德大学园艺系完成。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

苹果 Idared, Prima, A vajlija, Bihorka (南斯拉夫的栽培品种) 和 Fuji (引自日本的栽培品种)

收稿日期: 1999-01-07

李颖章, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学 (西校区), 100094

1.2 病菌培养

以不同来源的5个 *E. amylovora* 菌株为病原菌: Ea1127 来自英国, 寄主为山梨; Ea311 来自南斯拉夫, 寄主为苹果; Ea7/75 来自德国, 寄主为苹果; Ea7002 来自加拿大, 寄主为苹果; Ea-4 来自南斯拉夫, 寄主为苹果。菌株接种在新鲜配制的肉汤琼脂培养基(每100 mL 含0.8 g 肉汤粉, 1.5 g 琼脂)上, 28℃ 下培养2 d, 用无菌水将其悬浮为浓度 10^7 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液。

1.3 盆栽苗试验

生长在温室盆栽的嫁接苹果苗, 当接穗长为高25~40 cm 时, 用以上5个来源的菌株分别接种, 每一品种苹果苗每菌株接种不少于8株。

接种用0.46 mm 的注射器插入苹果苗顶端幼嫩的未完全展开叶上方的茎, 在伤口处留一滴菌悬液。在不同时间, 测量茎段发生火疫病病的长度, 以发病的茎段占全部茎段长的% 表示。试验重复2次, 结果进行F 检验和邓肯多重比较。

1.4 组培苗试验

不同品种的苹果树休眠芽及开始旺盛生长的枝条作为组培的外植体供体。

休眠芽培养在BA 0.1 mg·L⁻¹, BA 0.01 mg·L⁻¹ 的Lepoive 培养基上, 扩增培养在MS 附加BA 0.5 mg·L⁻¹, BA 0.05 mg·L⁻¹, GA 0.1 mg·L⁻¹ 培养基上。当外植体长为4~5个节间时移入生根培养基(1/2MS 基本培养基附加BA 0.1 mg·L⁻¹) 上诱导生根。分别对不同品种、不同培养时期的组培苗进行以下2种方法接种:

切叶法: 将剪刀浸入到已配制好的菌悬液中2 min 后, 选取2片已完全展开的叶, 在1/2处与叶中脉垂直剪去半片叶, 将接种后的外植体重新置于新鲜的培养基中, 在相同条件下培养。

灯芯法: 将棉线浸入到已配制好的菌悬液中2~3 min, 用缝衣针将其穿于已完全展开叶的茎段节间处, 保留长约0.5 cm 的棉线于其中, 再置于上述培养基中培养。

1.5 感病外植体中所含的 *Erwinia amylovora* 菌数的测定

对切叶法和灯芯法感病后的外植体分别在不同时间随机取样, 测定每一外植体所含的Ea菌落的数量。每一取样平行进行5个重复。所取材料加1 mL 无菌的磷酸缓冲液于研钵中研磨, 再加9 mL 缓冲液使其悬浮, 系列稀释后, 取0.1 mL 菌悬液铺板于含LB 培养基中, 在28℃ 下培养2 d, 菌落计数。实验重复2次。

2 试验结果

2.1 盆栽苗的感病性

不同品种的苹果盆栽苗对不同来源的 *E. amylovora* 菌株的感病性不同(图1)。以接种非致病菌 Ea273 为对照, 与对照相比, Ea7002, Ea7/75, Ea-4 的致病力呈极显著差异($P=0.01$), Ea311 的致病力有显著差异, 而Ea1127 的致病力差异不显著。可见, 不同来源病菌菌株的致病力不同, 不同品种的苹果对同一菌株敏感性不同。随后的感病性筛选选用了Ea7002, Ea311 和Ea-4 为病原菌。

不同品种的苹果对同一梨火疫病菌株的感病性表现出不同。以Ea-4 感染5个品种的苹果, 图2所示, Prima 和 Fuji 不仅感病较慢, 并且症状的扩展也较慢, 3周后, 茎段40%~50% 感病, Idared, A vajlija, B ihorka 在感病1周后症状明显扩大, 迅速向下蔓延; 3周后, 80% 以上

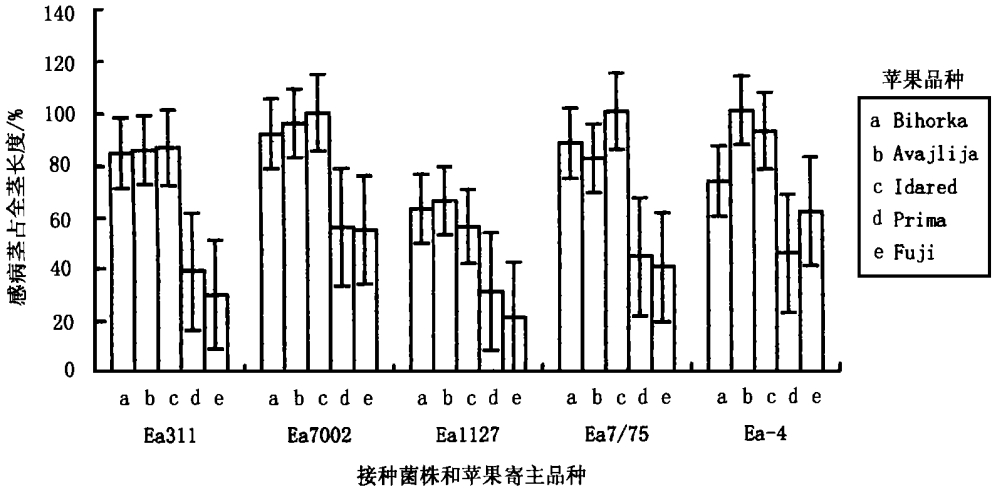


图 1 接种 15 d 后火疫病的发病程度

的茎全部感病。与前 2 品种的症状差异显著 ($P = 0.05$)。同样, 分别以 Ea7002 和 Ea331 感染苹果苗得到相同的结果。表明 Prima 和 Fuji 对 Ea 菌的抗性较 Idared, Avajlija, Bihorka 的较高。

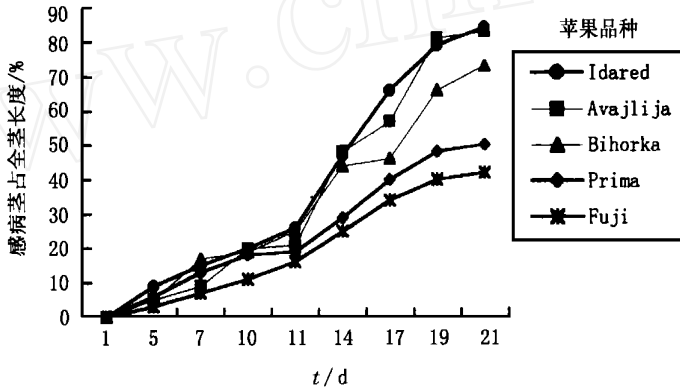


图 2 Ea-4 菌接种后不同时间苹果的感病茎的长度 (%)

2.2 组培苗的感病性

2.2.1 品种对感病性的影响 用切叶法和灯芯法对不同品种的组培苹果苗接种病菌后, 症状的发展速度有所不同。

用灯芯法接种的外植体症状发生较快。接种的当天, Idared, Avajlija 和 Bihorka 品种在所留的“灯芯”附近, 茎部出现红褐色(火疫病的最初症状)。2 d, 症状有所扩展。3 d, Prima 和 Fuji 相继在感染部位出现症状, 而 Idared, Avajlija 和 Bihorka 已在“灯芯”之上的所有茎节全部变成红褐色, 叶主脉亦变红。5 d, Idared, Avajlija 和 Bihorka 品种出现严重症状, Prima 和 Fuji 的症状始终轻于 Idared, Avajlija 和 Bihorka。

切叶法接种的外植体症状出现稍慢。接种当天无表现。2 d 时, Idared, Avajlija 和 Bihorka

所切叶片的叶脉变红。3 d 时, 症状开始逐渐扩展到茎部及相邻叶, 而 Prima 和 Fuji 品种的切叶边缘和叶脉才开始变红。感染 7 d 之后, Idared, A vajlija 和 Bihorka 出现严重症状。

在接种梨火疫病病菌后的不同时间, 分别测定 cfu 的数量。感病快的品种 Idared, A vajlija 和 Bihorka 与 Prima 和 Fuji 相比, 在前 2 d, cfu 的数量没有显著差异, 5 d 后前 3 品种的 cfu 开始明显高于 Prima 和 Fuji, 差异显著(表 1)。表明 Prima 和 Fuji 相对较抗病, Idared, A vajlija 和 Bihorka 相对较感病。

2.2.2 体外培养时间对感病性的影响 分别对体外培养不同时间、不同品种的苹果苗进行同一菌株切叶法接种, 在体外培养 4 个月、6 个月和 8 个月的 Prima, 其体内所含病菌数分别为 2.1×10^6 , 2.4×10^6 , 2.0×10^6 cfu/植株。A vajlija 所含病菌数分别为 2.7×10^7 , 2.3×10^7 和 3.0×10^7 cfu/植株。培养时间对 cfu 的影响无显著差异, 结果表明, 外植体在体外培养时间的长短对外植体的感病性不产生显著性影响。

2.2.3 生长调节剂对感病性的影响 在接种的前 1 周, 将外植体分别转移至含 BA 和 BA 及不含两者的扩增培养基中, 接种后, 在相同培养基上培养 2 周后测定其所含 cfu 的数量, 结果如表 2 所示。在含 BA 和 BA 培养基上的 Prima, A vajlija 所含 cfu 数量与不含 BA 和 BA 的培养基上的 Prima, A vajlija 所含 cfu 数量相比, 结果没有明显差异。可见, 培养基中生长调节剂对外植体的感病性没有明显影响。不论 BA 和 BA 在培养基中的存在与否, 从 A vajlija 上所测的 cfu 数量均明显高于 Prima。

表 1 不同时间、不同品种苹果感病后所含菌落(cfu)数量 cfu·株⁻¹

苹果品种	接种后时间 t/d		
	2	5	10
Prima	1.7×10^2 a	2.2×10^3 a	2.5×10^6 a
Idared	2.6×10^2 a	2.5×10^5 b	2.4×10^7 b
A vajlija	2.2×10^2 a	1.3×10^5 b	3.1×10^7 b
Bihorka	2.8×10^2 a	2.4×10^5 b	2.5×10^7 b
Fuji	2.0×10^2 a	1.6×10^3 a	2.4×10^6 a

表中小写字母相同为差异不显著, 不相同为差异显著($P=0.05$)。

表 2 培养基中生长调节剂对植株所含菌落(cfu)数量的影响

苹果品种	BA 和 BA 存在(+)/缺少(-)	cfu·株 ⁻¹
Prima	+	2.4×10^6 a
	-	2.0×10^6 a
A vajlija	+	2.7×10^7 b
	-	3.1×10^7 b

表中小写字母相同为差异不显著, 不相同为差异显著($P=0.05$)。

2.2.4 外植体的发育状态对感病性的影响 对在生根培养基上培养 4~5 周后, 已生根的外植体进行同一菌株切叶法接种, 与对照(外植体没有进行生根诱导)相比, 感病的程度和发病速度都低于对照, 在接种后的 15 d, 测定 Prima 外植体内所含菌落数, 结果为诱导生根的外植体含 2.6×10^6 cfu/植株, 无根的外植体含 3.2×10^7 cfu/植株, 差异显著。其他 4 个品种也有类似结果。可见, 外植体诱导生根后可显著降低对梨火疫病病菌的敏感性。

3 讨论

植物的抗病性受多方面因素的影响, 抗病基因是决定因素。抗病基因表达快, 产物活性强的植株抗病性就强, 反之则弱。本研究证明, 不同品种的苹果在相同的条件下对梨火疫病病菌的感染表现出不同的反应, 品种 Prima 和 Fuji 比 Idared, A vajlija, Bihorka 的发病慢且程度轻,

体内所含的菌落数低,可见 Prima 和 Fuji 的抗病性强于 Idared, A vajlija, Bihorka。

植物的抗病性还与病菌-寄主植物的相互作用密切相关^[7],而寄主植物的生理状态是影响这一相互关系的重要基础。例如,生长旺盛的植株对梨火疫病菌的敏感性高于生长缓慢的植株^[2]。离体培养在一定程度上会影响外植体的生理状态^[8,9],培养基中生长调节剂的水平和离体培养维持时间的长短会改变外植体的某些生理反应^[10-12]。从本研究结果看,苹果品种间对梨火疫病菌的敏感程度组培苗与盆栽苗相一致,Prima 和 Fuji 较抗病,Idared, A vajlija, Bihorka 相对较感病,供试的 5 个品种对梨火疫病菌的敏感性并未因其离体培养而改变。因此,利用苹果的组培苗来筛选抗火疫病品种及研究抗病的机理不仅具有一定的可靠性和便利性,而且对像火疫病这种传播快危害大的疾病的研究比在温室和田间更易于控制。

本研究还表明,根系对植株的感病程度有影响,同一品种的苹果苗在诱导生根后,其抗病能力提高。Schouten 等^[13]报道火疫病症状的发展与寄主细胞的渗透势有关,已结果实的苹果树,在果实周围的营养芽对火疫病的敏感性增加。Suleman 和 Steiner^[14]对苹果组织中的山梨醇含量和溶质势与火疫病症状发展的研究也证明了这一点:寄主细胞若能维持它们的膨压,并且水分和营养物质没有被细菌抑制,则不发生病害。根系在抗病性中的作用可能与吸收营养以及维持体内渗透势有关。这方面的研究有待进一步深入。

在体外的抗火疫病研究中,对植株的致病性测定多采用切叶法,Hammerschlag^[6]在研究梨的抗 *Xanthanomonas campestris* 菌中首次使用了灯芯法。本研究同时利用灯芯法和切叶法测定火疫病菌的致病反应,结果表明,以灯芯法接种梨火疫病菌可加快苹果的火疫病发生,灯芯法接种发病快的原因可能与叶片和茎部的细胞所含物质不同有关。Blake^[15]和 Hewill^[16]的研究曾分别证明寄主组织的淀粉含量与火疫病的敏感性之间有负相关。叶片中碳水化合物的含量高于茎段,因此,以叶片为感染部位较茎为感染部位的发病快。

参 考 文 献

- 1 Viseur J, Tapia Y, Figueroa M. *In vitro* co-culture as a tool for the evaluation of fire blight resistance in pears and apples. *Acta Horti*, 1987, 217: 273~ 282
- 2 Donovan A M, Morgan R, Valbraçpiagnani C, et al. Assessment of somaclonal variation in apple: I Resistance to the fire blight pathogen, *Ew inia amylovora*. *J Horti Science*, 1994, 69(1): 105~ 113
- 3 Norelli J L, Aldwinckle H S, Destefano-Beltran L, et al. Transgenic Malling 26 apple expressing the *attacin E* gene has increased resistance to *Ew inia amylovora*. *Euphytica*, 1994, 77: 123~ 128
- 4 Tharaud M, Laurent J, Faize M, et al. Fire blight protection with avirulent mutants of *Ew inia amylovora*. *Microbiol*, 1997, 143: 625~ 632
- 5 Norelli J L, Aldwinckle H S, Beer S V. Virulence of *Ew inia amylovora* strains to *Malus* sp. Novole plants grown *in vitro* and the greenhouse. *Phytopathology*, 1988, 78: 1292~ 1297
- 6 Hammerschlag F A. Screening peaches *in vitro* for resistance to *Xanthanomonas campestris* pv. *Pruni*. *J Amer Soc Hort Sci*, 1988, 113(1): 164~ 166
- 7 Norelli J L, Aldwinckle H S, Beer S V. Differential host × pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Ew inia amylovora*. *Phytopathology*, 1983, 74: 136~ 139
- 8 McWilliam A A, Smith S M, Street H E. The origin and development of embryo ids in suspension culture of carrot. *Ann Bot*, 1974, 38: 243~ 250

- 9 Pence V C, Hasegawa P M, Janick J. *In vitro* cotyledonary development and anthocyanin synthesis in zygotic and asexual embryos of *Theobroma cacao*. J Am Soc Hort Sci, 1981, 106: 381~ 385
- 10 Hammerschlag F A, Bauchan G R, Scorza R. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. Plant Cell Tissue & Org Cult, 1987, 8: 235~ 242
- 11 Helgeson J P, Kemp J D, Haberlach G T, et al. A tissue culture system for studying disease resistance: the black shank disease in tobacco callus cultures. Phytopathology, 1972, 62: 1439~ 1443
- 12 Huettel R N, Hammerschlag F A. The influence of cytokinin on *in vitro* screening of peaches for resistance to nematodes. Plant Disease, 1986, 70: 1141~ 1144
- 13 Schouten H J. A possible role in pathogenesis for the swelling of extracellular slime of *Erwinia amylovora* at increasing water potential. Neth J Plant Pathol, 1989, 95(Suppl 1): 169~ 174
- 14 Sulman P, Steiner P W. Relationship between sorbitol and solute potential in apple shoots relative to fire blight symptom development after infection by *Erwinia amylovora*. Phytopathology, 1994, 84: 1244~ 1250
- 15 Blake M A. The relation of growth status of apple and pear tree to injury by fire blight. N J Agric Exp Circ, 1984, 327, 1~ 4
- 16 Hewitt J L. Twig blight and blossom blight of the apple. Arkansas Agric Exp Stn Bull, 1973, 113: 493~ 505

www.cnki.net