

陕甘山桃对根癌病的抗性评价

吴静利 宗鹏鹏 严沐清 朱立新 贾克功*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 为评价陕甘山桃(*Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd)对根癌病的抗性,以实生钵苗为试材,采用人工接种的方法研究了其对根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* Conn)和发根土壤杆菌(*A. rhizogenes* Conn)的抗性。结果表明:接种后60 d,接种根癌土壤杆菌的陕甘山桃的株最大瘤径范围为0~10.1 mm,平均瘤径2.7 mm,接种发根土壤杆菌的株最大瘤径范围为0~11.6 mm,平均瘤径3.0 mm,根据抗性评价标准判定陕甘山桃群体高抗根癌土壤杆菌和高抗发根土壤杆菌。但陕甘山桃对根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌的抗性存在广泛的株间分离现象,均分离为免疫、高抗、中抗、低抗、感病和易感病6种类型,对根癌土壤杆菌免疫、高抗、中抗、低抗、感病和易感病型植株分别占群体总数的28%、33%、19%、13%、6%和1%,对发根土壤杆菌免疫、高抗、中抗、低抗、感病和易感病型植株分别占群体总数的16%、46%、15%、13%、8%和2%。陕甘山桃是优异的抗根癌病种质资源。

关键词 陕甘山桃; 根癌病; 根癌土壤杆菌; 发根土壤杆菌; 抗性评价

中图分类号 S 432.4⁺2

文章编号 1007-4333(2012)05-0076-05

文献标志码 A

Resistance evaluation of *Prunus davidiana* var. *potaninii* rehd to crown gall disease

WU Jing-li, ZONG Peng-peng, YAN Mu-qing, ZHU Li-xin, JIA Ke-gong*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract In order to find out the resistance of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd to crown gall disease, the seedlings were used as materials to study the resistance of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd to *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes*, applying the method of artificial inoculation. The results showed that *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd was excellent germplasm resource resisting to crown gall disease. In 60 days after inoculation, the range of the maximum tumor diameter of inoculation seedlings to *A. tumefaciens* Conn was 0~10.1 mm with 2.7 mm on average, while it was 0~11.6 mm to *A. rhizogenes* Conn with 3.0 mm on average. According to the resistance evaluation standard of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd to Crown Gall Disease, it highly resisted to *A. tumefaciens* Conn and it was separated into 6 types, including being immune, highly resistant, moderately resistant, low resistant, susceptible and highly susceptible and their corresponding percentages were 35%, 26%, 19%, 13%, 6% and 1% respectively. There were also the same 6 types to *A. rhizogenes* Conn, and the corresponding percentages were 27%, 35%, 15%, 13%, 8% and 2% respectively.

Key words *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd; crown gall disease; *Agrobacterium tumefaciens* conn; *Agrobacterium rhizogenes* conn; resistance evaluation

根癌病又称冠瘿病,主要是由根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* Conn)和发根土壤杆菌(*A. rhizogenes* Conn)中带致癌质粒的菌株侵染

引起的检疫性重要植物根系病害,目前在全世界60多个国家都有发生,在欧洲、北美和亚洲发生严重^[1-2]。根癌病菌可侵染93科331属643种双子叶

收稿日期:2012-03-01

基金项目:国家“948”项目(201035)

第一作者:吴静利,硕士研究生,E-mail:wujingliliuer@163.com

通讯作者:贾克功,教授,主要从事桃树栽培理论与新技术研究,E-mail:jkgong@cau.edu.cn

植物和少数裸子植物，近年来研究发现根癌菌的寄主范围亦包括不少单子叶植物^[3]。根癌病对桃树危害严重，由于根癌菌寄主种类繁多、地域分布范围广，加之特殊的致病发病机制，传统的检疫、农业、物理及化学防治均无良好效果。尽管近十几年利用生防菌制剂进行苗木蘸根防治根癌病取得了显著效果，但寻找抗根癌病种质资源、培育和使用抗病砧木仍然是防治根癌病危害的根本方法^[4]，吕淑贤等^[5]也将选用抗性砧木作为根癌病防治的首要选择。

陕甘山桃 (*Prunus davidiana* var. *Potaninii* Rehd) 属蔷薇科李属，产于陕西、甘肃及四川北部，植物学性状与山桃 (*P. davidiana* Garr.) 极为相似，但比山桃更耐旱，与栽培桃嫁接亲和性好，在产地多用作普通桃 (*P. Persica* (L.) Batch) 的砧木^[6]。陕甘山桃对根癌病的抗性尚未见研究报告，本试验研究陕甘山桃对桃树根癌菌 (*A. tumefaciens* 和 *A. rhizogenes* 中带致癌质粒的菌株) 的抗性，探明其抗根癌病种质资源价值，旨在为抗根癌病桃树砧木品种选育提供部分科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

陕甘山桃实生苗 220 株，苗干粗度 3 mm 以上。种子购于甘肃省灵台县绿源林果种苗科技中心，沙藏 100 d 后播种在营养钵内，育苗基质为蛭石、草炭和沙壤土按体积比 1 : 1 : 1 混匀而成。

10^8 cfu/mL 的根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌的菌悬液。所用菌株为本实验室自行分离、鉴定和保存的 Ap2(根癌土壤杆菌)和 Ap10(发根土壤杆菌)。

1.2 接种

接种前利用向日葵幼苗下胚轴接种法对试验用

菌株进行致病性鉴定，证明 2 个菌株均具有良好的致病性，利用 N. W. Schaad 方法^[7]鉴定 2 种菌株的生理生化特性，以确定 2 种菌株是否混淆。

将供试 220 株陕甘山桃依次编号、挂牌登记。1-100 号株接种 Ap2 号菌 (*A. tumefaciens*)，101-200 号株接种 Ap10 (*A. rhizogenes*)。于 7 月 22 日采用针刺法进行接种，接种在主茎上，每株接种 3 个位点，相邻位点间隔 1.5 cm，先用 70% 酒精擦拭接种部位，再用一次性 7 号注射器注入 1 滴 10^8 cfu/mL 的菌悬液，用蘸有菌液的脱脂棉包住接种部位，并用保鲜膜包扎保湿 2 d。201-220 号接种无菌水为对照。

1.3 抗性评价

接种 60 d 后调查瘤径大小，根据株最大瘤径评价其个体抗病性，根据平均株最大瘤径评价其群体抗病性。根据肿瘤直径大小将陕甘山桃对根癌菌的抗性分为 6 个等级，免疫 (I) 为不发病，与对照无差异；高度抗病 (HR) 为瘤径 0.1~3.0 mm；中度抗病 (MR) 为 3.1~5.0 mm；低度抗病 (LR) 为 5.1~7.0 mm；感病 (S) 为 7.1~10.0 mm；易感病 (T) 为 > 10.0 mm。

2 结果与分析

2.1 陕甘山桃对根癌土壤杆菌的抗性

接种的 100 株陕甘山桃实生苗瘤径范围为 0~10.1 mm，平均瘤径 2.7 mm (表 1、表 2)，根据抗性评价标准判定：陕甘山桃群体高抗根癌土壤杆菌，其实生群体存在显著的株间分离现象。免疫植株 28 株，高度抗病植株 33 株，中度抗病植株 19 株，低度抗病植株 13 株，感病植株 6 株，易感病植株 1 株，分别占群体植株的百分数是 28%、33%、19%、13%、6% 和 1%。

表 1 陕甘山桃对根癌土壤杆菌的抗性

Table 1 Resistance of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd. to *A. tumefaciens* Conn

株号	最大瘤径/mm	抗型	株号	最大瘤径/mm	抗性评价	株号	最大瘤径/mm	抗性评价
1	4.1	MR	35	4.0	MR	69	5.9	LR
2	7.5	S	36	4.3	MR	70	0.0	I
3	2.5	HR	37	3.0	HR	71	0.0	I
4	3.6	MR	38	0.9	HR	72	1.1	HR
5	0.0	I	39	1.6	HR	73	2.7	HR
6	0.8	HR	40	3.5	MR	74	0.0	I

续表

株号	最大瘤径/mm	抗性	株号	最大瘤径/mm	抗性评价	株号	最大瘤径/mm	抗性评价
7	0.0	I	41	0.0	I	75	0.0	I
8	3.1	MR	42	2.4	HR	76	3.5	MR
9	0.5	HR	43	4.4	MR	77	5.5	LR
10	0.0	I	44	2.0	HR	78	2.1	HR
11	0.8	HR	45	1.2	HR	79	1.9	HR
12	5.2	LR	46	0.0	I	80	0.0	I
13	7.2	S	47	0.0	I	81	0.0	I
14	5.1	LR	48	5.7	LR	82	4.3	MR
15	0.0	I	49	7.1	S	83	6.7	LR
16	6.1	LR	50	7.4	S	84	2.0	HR
17	4.8	MR	51	4.2	MR	85	0.0	I
18	4.7	MR	52	3.3	MR	86	4.7	MR
19	2.9	HR	53	0.8	HR	87	4.8	MR
20	0.0	I	54	0.0	I	88	0.0	I
21	0.9	HR	55	3.7	MR	89	1.1	HR
22	0.0	I	56	0.0	I	90	2.3	HR
23	0.0	I	57	0.8	HR	91	1.9	HR
24	8.9	S	58	0.0	I	92	3.0	HR
25	2.3	HR	59	6.2	LR	93	4.7	MR
26	7.0	S	60	2.1	HR	94	5.9	LR
27	2.8	HR	61	5.2	LR	95	2.5	HR
28	3.7	MR	62	0.0	I	96	1.3	HR
29	0.0	I	63	0.0	I	97	0.0	I
30	0.0	I	64	4.4	MR	98	1.1	HR
31	2.4	HR	65	10.1	T	99	2.8	HR
32	5.1	LR	66	5.6	LR	100	1.5	HR
33	0.0	I	67	0.0	I	μ	2.7	HR
34	1.9	HR	68	5.3	LR			

注:I为免疫,HR为高度抗病,MR为中度抗病,LR为低度抗病,S为感病,T为易感病。20株对照均未发病。 μ 为以上数据的平均值。下表同。

表2 陕甘山桃对根癌土壤杆菌的抗性分离情况

Table 2 Resistance segregation of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd. to *A. tumefaciens* Conn

抗性类型	瘤径/mm	株数	占群体百分比/%
免疫	<0.1	28	28
高度抗病	0.1~3.0	33	33
中度抗病	3.1~5.0	19	19
低度抗病	5.1~7.0	13	13
感病	7.1~10.0	6	6
易感病	>10.0	1	1

2.2 陕甘山桃对发根土壤杆菌的抗性

接种的100株陕甘山桃实生苗的瘤径范围为0~11.6 mm,平均瘤径3.0 mm(表3、表4),根据抗性评价标准判定:陕甘山桃群体高抗发根土壤杆菌,其实生群体存在显著的株间分离现象。免疫植株16株,高度抗病植株46株,中度抗病植株15株,低度抗病植株13株,感病植株8株,易感病植株2株,分别占群体植株的百分数是16%、46%、15%、13%、8%和2%。

表3 陕甘山桃对发根土壤杆菌的抗性

Table 3 Resistance of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd. to *A. rhizogenes* Conn

株号	最大瘤径/mm	抗性评价	株号	最大瘤径/mm	抗性评价	株号	最大瘤径/mm	抗性评价
101	7.2	S	135	3.7	MR	169	1.5	HR
102	6.4	LR	136	6.2	LR	170	0.9	HR
103	7.1	S	137	3.1	MR	171	3.2	MR
104	7.2	S	138	3.8	MR	172	4.6	MR
105	10.9	T	139	6.8	LR	173	1.1	HR
106	6.5	LR	140	7.0	LR	174	1.0	HR
107	0.4	HR	141	4.9	MR	175	0.8	HR
108	1.8	HR	142	4.2	MR	176	1.5	HR
109	0.0	I	143	5.4	LR	177	2.7	HR
110	7.4	S	144	3.1	MR	178	2.4	HR
111	7.4	S	145	1.8	HR	179	0.0	I
112	8.6	S	146	0.5	HR	180	2.9	HR
113	7.9	S	147	1.4	HR	181	1.4	HR
114	0.0	I	148	4.0	MR	182	2.7	HR
115	0.9	HR	149	1.3	HR	183	2.4	HR
116	11.6	T	150	0.0	I	184	0.0	I
117	5.1	LR	151	1.6	HR	185	0.5	HR
118	3.6	MR	152	0.0	I	186	0.0	I
119	8.5	S	153	0.0	I	187	2.1	HR
120	2.5	HR	154	0.0	I	188	1.1	HR
121	0.0	I	155	1.6	HR	189	1.6	HR
122	0.0	I	156	0.0	I	190	2.9	HR
123	6.8	LR	157	2.2	HR	191	0.0	I
124	2.3	HR	158	2.0	HR	192	0.0	I
125	2.1	HR	159	1.9	HR	193	4.9	MR
126	6.1	LR	160	3.5	MR	194	4.4	MR
127	6.7	LR	161	0.0	I	195	2.7	HR
128	6.8	LR	162	3.7	MR	196	1.2	HR
129	6.9	LR	163	6.2	LR	197	1.3	HR
130	0.0	I	164	1.0	HR	198	2.2	HR
131	3.6	MR	165	2.1	HR	199	2.5	HR
132	0.2	HR	166	2.2	HR	200	0.7	HR
133	1.2	HR	167	0.9	HR	μ	3.0	MR
134	0.6	HR	168	0.9	HR			

表4 陕甘山桃对发根土壤杆菌的抗性分离情况

Table 4 Resistance segregation of *Prunus davidiana* var. *potaninii* Rehd. to *A. rhizogenes* Conn

抗性类型	瘤径/mm	株数	占群体百分比/%
免疫	<0.1	16	16
高度抗病	0.1~3.0	46	46
中度抗病	3.1~5.0	15	15
低度抗病	5.1~7.0	13	13
感病	7.1~10.0	8	8
易感病	>10.0	2	2

3 结论与讨论

1) 陕甘山桃实生苗群体高抗根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌,其群体存在广泛的株间分离现象,其中存在大量高度抗病和免疫型植株,是抗根癌砧木选育的优良资源,具有重要的开发价值。

2) 采用合理的接种方法和接种部位对客观评价根癌病抗性是很重要的,前人^[8]在研究大樱桃根癌病时采用针刺接种法,人为在根部造成伤口并与癌瘤浸泡 10 h,栽入盆中,秋季挖根调查发病情况,这种方法的缺点是由于接种在根部,人为操作调查不方便;还有在苹果上的研究表明^[9],地上部与地下部在接种根癌菌后产生的抗病反应高度相关,因此可用在地上部接种来代替地下部接种;有研究^[10]采用划伤接种即用无菌刀片在根茎部斜切 1~3 cm 伤口,再将细菌悬浮液滴入伤口;还有采用掰去叶片^[11],在叶痕处用蘸有根癌菌的棉花包裹并保湿的方法进行接种;刘焕芳^[12]采用针刺法涂抹接种新鲜培养的测定菌菌苔,这几种方法的不足之处在于或是形成的伤口长短、深浅不能控制,或是接入的菌量不能控制,因而形成的根瘤大小也不具有可比性。本研究采用针刺法接入 10^8 cfu/mL 菌液的方法进行接种,伤口大小和菌量均可控制在一定的误差范围之内。

3) 客观的评价根癌病的抗性情况,一套合理完善的评价体系是必不可少的,以往的根癌病抗性研究中经常把植株的抗病性分为 5 个等级,如将桃树的抗病性分为免疫、小瘤少量、小瘤大量、大瘤少量和大瘤大量 5 个级别^[10];或按癌瘤体积大小分为抗病、中度抗病、中度感病、感病和高度感病 5 个等级^[13];还有根据瘤径大小分为免疫、高抗、中抗、中感和高感 5 个等级^[14]。这些评价标准都存在不足之处,前者在瘤大小和量多少上没有明确规定,后两者的分类等级从中抗直接到中感,在划分级别时容

易出现误差,本研究在这些评价标准的基础上拓展为 6 个等级,根据瘤径大小分为免疫、高度抗病、中度抗病、低度抗病、感病和易感病。

4) 《伯杰细菌鉴定手册》^[15]是按照致病性来划分的根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌的,但是由于产生致病性的 Ti 质粒的不稳定性,70 年代,Keane 等^[16]以生理生化特性为依据,提出在土壤杆菌内划分 2 个生物型,即生物 I 型和生物 II 型 90 年代,通过数值分类、化学分类和核算技术等,将生物型上升为种,即生物 I 型定为根癌土壤杆菌,生物 II 型定为发根土壤杆菌,尽管名称依然相同,但由于分类依据的不同,导致二者的致病情况发生了变化,根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌均可以致瘤或致丛根,本试验的接种结果表明本实验室保存的 2 种菌株均为致瘤菌株。

参 考 文 献

- [1] Kerr A. Biological control of crown gall through production of Agrocins^[J]. *Plant Dis*, 1980, 64(1): 25-30
- [2] De Cleene M, Deley J. The host range of crown gall^[J]. *Bot Rev*, 1976, 42: 389-466
- [3] Conner A J, Dommissie E M. Monocotyledonous plants as hosts for *Agrobacterium*^[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 1992, 153(4): 550-555
- [4] 王志强, Sfalanga A, Mugnai L, 等. 鉴定桃砧木对根癌病敏感性的叶圆片转化系统的建立^[J]. *果树科学*, 1996, 13(3): 145-148
- [5] 吕淑贤, 邓庆上. 果树根癌病的防治^[N]. 驻马店日报, 2011-10-10(007)
- [6] 汪祖华, 庄恩及. 中国果树志: 桃卷^[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 81
- [7] Schaad N W. 植物病原细菌鉴定实验指导^[M]. 张克勤, 译. 贵阳: 贵阳人民出版社, 1986: 28-43
- [8] 李莹莹. 大连地区大樱桃根癌病的研究^[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2008
- [9] Stover E W, Walsh C. Crown gall in apple rootstocks: Inoculation above and below soil and relationship to root mass proliferation^[J]. *HortScience*, 1988, 33: 92-95
- [10] 武荣花, 王献. 桃根癌病病原菌的分离和桃砧木抗性试验研究^[J]. *河南科学*, 2007, 25(3): 416-419
- [11] 王红艳. 樱桃核樱花根癌病病原及生物防治研究^[D]. 北京: 中国农业大学, 1998
- [12] 刘焕芳, 段成国, 陈学森, 等. 核果类果树根癌病菌寄生范围及抗性研究初报^[J]. *北方果树*, 2002(5): 4-7
- [13] 王克, 高秀萍, 傅望横, 等. 葡萄砧木对根癌病抗性的研究^[J]. *中国果树*, 1990(3): 12-16
- [14] 刘常红, 贾克功, 朱立新, 等. 毛桃对根癌病的抗性研究^[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(5): 68-71
- [15] Buchanan R E. 伯杰细菌鉴定手册^[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 345-348
- [16] Keane P J, Kerr A, New P B. Crown gall of stone fruit^[J]. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1970, 23: 585-595