月季黑斑病病原鉴定与抗性鉴定方法研究

金一锋[1]，郭广兵[1,2]，杨清淼[1,3]，侯舒媛[1,4]，亢列梅[5]，车代弟[1]

(1.东北农业大学 园艺学院，黑龙江 哈尔滨 150030；2.大庆市委组织部，黑龙江 大庆 163002；3.黑河市爱辉区人力资源和社会保障局，黑龙江 黑河 164300；4.黑河市爱辉区委组织部，黑龙江 黑河 164300；5.黑龙江省农业科学院，黑龙江 哈尔滨 150086)

摘　要：以9个月季品种为试材，对感月季黑斑病的病原菌进行分离和鉴定，研究了其病原菌孢子浓度、温度和苗龄对月季黑斑病发病的影响。结果表明：孢子浓度 2×10^5 个/mL，温度25℃，植物苗龄为二叶期时调查相应发病情况，其结果可在一定程度上初步反映月季品种真实的抗黑斑病能力。

关键词：月季；黑斑病；蔷薇盘二孢；抗性鉴定

中图分类号：S 685.12　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2013)18－0114－04

1815年月季黑斑病初次在瑞士报道，其病原菌为蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*(Lib.)Fr.)，异名蔷薇放线孢[1]。迄今为止，我国大部分的月季种植区都会有该病害的发生，破坏性极强。月季叶片上的发病率极高，初期形成直径长约1.0 mm的斑点，各斑点间相互联结成更大的斑点。黑斑病使植株生长势减弱，重者引起死亡，严重降低月季观赏价值和经济价值[2]。但在实际生产中，化学防治与生态防治等手段都达不到理想效果，所以培育出抗病的月季品种则是防治黑斑病最安全、经济、有效的途径。随着城市化进程的加快，花卉业得到大力发展，但四大切花之一月季的黑斑病病害问题尤为突出，开发和利用抗黑斑病月季品种成为了主要手段。目前，黑斑病的研究现仍集中在白菜、甘蓝等农作物上，研究方向集中于抗源的筛选、接种条件及遗传规律等方面[3]，蔷薇盘二孢引起月季黑斑病的系统研究尚鲜见报道。

该研究通过对9个月季品种进行黑斑病病原菌分离鉴定，研究了人工接种条件下影响其发病的主要因素，以期能准确建立鉴定月季抗黑斑病病性的苗期鉴定方法，为筛选抗黑斑病的月季种质资源提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试月季为有抗性差异的9个月季品种，分别为“柔情似水”、YJ“2004-4”、YJ“2004-5”3个感病强品种；“皇家巴西诺”、“金玛莉”、YJ“2004-6”3个抗性中等品种；“红帽”、“冰山”、“白玫瑰”3个抗性强品种。

供试菌株：2011年5月中旬于东北农业大学设施园艺工程中心和香坊农场月季圃地收集感黑斑病月季病叶样本30余份，分离纯化得到30个单孢系，标记为R-1～R-30，选取菌株R-1进行抗黑斑病的病性鉴定。采用组织分离法分离月季黑斑病病原菌[3-4]。

1.2　试验方法

1.2.1　病原的分离与鉴定　先将感病叶片在75%的乙醇中消毒1～2 min，然后用4%的NaClO消毒1 min，最后用无菌水冲洗3～4次。将病叶切成2 mm×2 mm的小块，保持湿润的环境，待孢子大量产生时，置于显微镜下观察，将单个孢子挑取置PDA培养基表面培养[5]。将培养基置于25℃的培养环境内，待菌丝产生分生孢子。待培养5～7 d后，将分生孢子接到PDA液体培养基中，25℃、150 r/min的恒温摇床上培养3～4 d后，真空抽滤并收集菌丝，置于液氮中保存待用。基因组DNA提取方法采用CTAB法，PCR引物设计、反应体系参考刘宝军等[2-3]方法，用引物ITS11(5′TCCGTAGGTGAACCTGCGG3′)和ITS4(5′TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′)特异性扩增ITS，经测序得到产物与NCBI已经公布的*Marssonina*属的菌株经行BLAST分析，可确定其菌株是否为蔷薇盘二孢菌株。

1.2.2　接种浓度对寄主感黑斑病的影响　选取长出3～5对复叶的月季小枝条，用自来水冲洗干净后晾干。摘除枝顶叶片，仅保留剩余的对称叶片。在超净工作台中将培养的月季黑斑病菌落挑至试管中，用解剖针小心捣碎，充分搅拌，静置5～10 min，取上清液至另一试管中，用血球计数板计数孢子，将孢子浓度调至 2×10^4、

第一作者简介：金一锋(1984-)，男，黑龙江鹤岗人，硕士，研究方向为园林植物遗传育种与病害防治。

责任作者：车代弟(1964-)，女，博士，教授，博士生导师，研究方向为园林植物遗传育种。

基金项目：哈尔滨市创新人才研究专项基金资助项目(2012RFXXN015)。

收稿日期：2013－04－15

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2×10^5、2×10^6 个/mL 的 3 个悬液，待用。于培养皿内铺 1 张滤纸，加 5 mL 无菌水，在皿内放入 4 个叶片对称且正面朝上摆放。取孢子悬浮液接种于叶片，每个叶片 4 滴，每滴 10 μL，3 次重复，接种后放置于(25±1)℃的光照培养箱内培养。待 72 h 后，用滤纸吸去悬浮液，并再次补加 5 mL 无菌水，置于 25℃培养，观察并统计病原菌潜伏期、病斑直径的大小等指标，从而计算发病率及病情指数等。发病率＝染病株数/调查总株数×100%，病情指数＝(∑各级病株数×相应病级)/(调查总株数×最高病级)×100%，病级的抗性分级为 1 级：0 mm；2 级：0～2.0 mm；3 级：2.0～3.0 mm；4 级：3.0～4.0 mm；5 级：4.0～4.5 mm；6 级：4.5～5.0 mm；7 级：＞5 mm。

1.2.3 接种温度对寄主感黑斑病的影响 按照 1.2.2 中得到的孢子悬浮液最适浓度，喷雾、接种于植物叶片，再置于 20、25、30℃的光照培养箱中，每次处理 25 株，重复 4 次。接种之后的管理与调查方式同 1.2.2。

1.2.4 接种时期对寄主感黑斑病的影响 用浓度 2×10^5 个/mL 的孢子悬浮液喷雾法接种于子叶期、二叶期、四叶期的幼苗，每次处理 25 株，4 次重复，置于(25±1)℃光照培养箱内。接种之后的管理与调查方式同 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 黑斑病病原菌形态及分子鉴定

通过组织分离法得到的月季黑斑病的病原菌转接 2 d 后可看到明显的白色菌丝体，随着培养时间的增长，菌落面积逐渐增大。15 d 后菌落上层会产生大量的白色菌丝体，下层颜色为咖啡色，菌落形态为紧凑型，菌落上面有黄色凸起。菌落形态见图 1。在显微镜下观察发现，月季黑斑病病原菌分生孢子为长卵圆形或近椭圆形，无色，双胞，2 个细胞大小不等，分隔处有缢缩，略弯曲，其形态见图 2 所示。经测定，月季黑斑病病原菌分生孢子的小孢子平均宽度为(4.89±0.52) μm，大孢子平均宽度为(5.67±0.46) μm，小孢子平均长度为(8.55±0.52) μm，大孢子平均长度为(9.62±0.39) μm，孢子平均总长度为(17.42±0.48) μm，分生孢子的平均分隔位置为(0.53±0.02)μm，平均弯曲度(148.3±9.36)°。

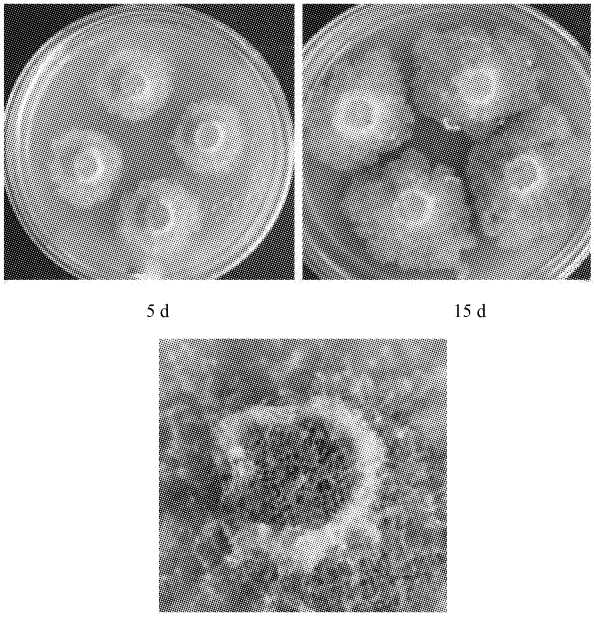

图 1 菌落的生长形态

Fig. 1 Morphology of colonies

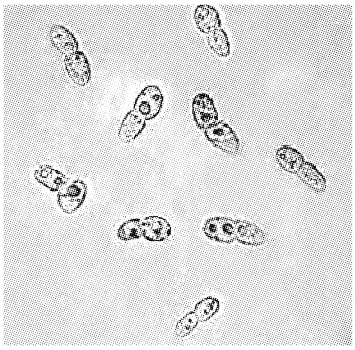

图 2 分生孢子形态(400×)

Fig. 2 Characteristics of conidia(400 times)

随机挑取分离得到的 30 个单孢系中的 3 个，其编号分别为 R-1、R-12、R-25，菌丝在液体培养及振荡培养下，提取相应基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。由图 3 可知，分离物均扩出了 580 bp 的目标条带。经测序得到，产物与 NCBI 已经公布的 *Marssonina* 属的菌株经行 BLAST 分析相似性达到了 99%，可确定其菌株为蔷薇盘二孢菌株。

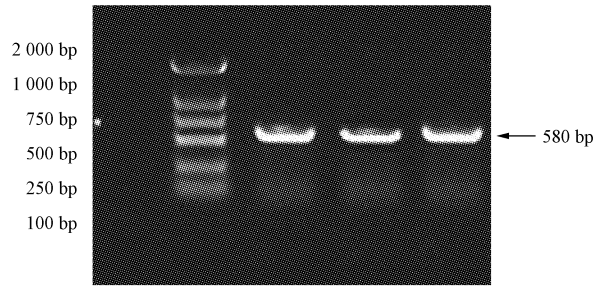

图 3 目标条带

Fig. 3 The target bands

2.2 不同接种浓度对寄主感病的影响

从表 1 可以看出，月季经梯度接种浓度处理后，9 个品种的病情指数表现为逐渐减少的趋势，但是接种浓度对供试品种的抗黑斑病的评价有较大影响。当 2×10^4 个/mL 接种浓度处理时，其感、耐、抗品种叶部病斑均未有明显表现，病情指数在 14～22 之间，均为抗病，

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

无法清晰区别抗病性。当接种浓度为 2×10^6 个/mL 时,9 个品种均发病严重,病情指数在 82～85 之间且差异不显著,掩盖了品种的真实抗病性,也不可准确得到正确的抗性评价。当浓度 2×10^5 个/mL 接种后,感病月季叶片表面呈现典型病斑,抗病月季叶片上也呈现了一定程度的病斑。从显著性分析可看到,待测品种间病症差异显著,抗病品种病情潜伏时间长,病斑小、病程进展慢,但感病品种表现则相反,而且感、抗品种间病情指数差异极显著,与品种田间抗、感表现一致,所以 2×10^5 个/mL 是抗性鉴定的最佳浓度。

表 1　不同浓度下月季黑斑病的发病情况

Table 1　The incidence of rose black spot under different concentrations

品种	2×10^4 个/mL		2×10^5 个/mL		2×10^6 个/mL	
	病情指数	抗性分级	病情指数	抗性分级	病情指数	抗性分级
“柔情似水”	22.54Aa	R	65.22Aa	S	95.20Aa	HS
YJ“2004-4”	22.12Aa	R	64.62Aa	S	94.54Aa	HS
YJ“2004-5”	22.35Aa	R	64.74Aa	S	95.38Aa	HS
“皇家巴西诺”	19.45ABa	R	43.65Bb	MR	90.05Aab	HS
“金玛莉”	20.25ABa	R	42.18Bb	MR	89.53Aab	HS
YJ“2004-6”	19.62ABa	R	43.25Bb	MR	89.82Aab	HS
“红帽”	14.78Bb	R	23.43Cc	R	82.24Ab	HS
“冰山”	14.02Bb	R	24.25Cc	R	82.62Ab	HS
“白玫瑰”	14.24Bb	R	24.23Cc	R	83.02Ab	HS

2.3　不同温度对寄主感病发病的影响

由表 2 可知,当 20℃环境下,应试品种病情指数普遍偏小,虽然感、耐、抗品种病情指数差异极显著,但抗性分级都呈中抗,分级不明显;当温度升为 30℃时,黑斑病发病情况最明显,整体病情指数偏高,且耐、抗病等级的品种病情指数上升趋势明显,最高可增幅 36.17%,感病品种上升相对慢,但是病情指数数值在 60～66,均划分为感病;当 25℃时,9 个品种的抗性分级明显,病情指数也表现为差异极显著,25℃是抗黑斑病鉴定中最佳感病发病温度。

表 2　不同温度下月季黑斑病的发病情况

Table 2　The incidence of rose black spot under different temperature

品种	20℃		25℃		30℃	
	病情指数	抗性分级	病情指数	抗性分级	病情指数	抗性分级
“柔情似水”	53.38Aa	MR	63.82Aa	S	65.80Aa	S
YJ“2004-4”	52.25Aa	MR	63.66Aa	S	65.46Aa	S
YJ“2004-5”	53.45Aa	MR	64.14Aa	S	66.14Aa	S
“皇家巴西诺”	42.52Bb	MR	46.54Bb	MR	64.42Aa	S
“金玛莉”	42.24Bb	MR	46.88Bb	MR	63.62Aa	S
YJ“2004-6”	43.72Bb	MR	47.25Bb	MR	64.14Aa	S
“红帽”	40.65Cc	MR	34.63Cc	R	60.44Ab	S
“冰山”	40.16Cc	MR	35.08Cc	R	60.80Ab	S
“白玫瑰”	40.25Cc	MR	35.24Cc	R	60.14Ab	S

2.4　不同苗龄接种对寄主感病的影响

由表 3 可知,当接种于月季植株子叶期时,发病程度普遍较轻,其中耐病品种病害发生程度下降显著,可到抗性水平;当接种于 4 片真叶期时,供试品种病情指数呈下降趋,原感病、耐病品种均表现中等抗病趋势;当接种于 2 叶期时,供试品种不仅病情指数差异显著,且抗性分级十分明确,呈现出月季植株对黑斑病抗性差异,因此 2 叶期是适宜测定月季黑斑病病情的接种苗龄。

表 3　不同苗龄下月季黑斑病的发病情况

Table 3　The incidence of rose black spot under different seedling age

品种	子叶期		2 叶期		4 叶期	
	病情指数	抗性分级	病情指数	抗性分级	病情指数	抗性分级
“柔情似水”	61.92Aa	S	65.80Aa	S	47.80Aa	MR
YJ“2004-4”	61.84Aa	S	66.16Aa	S	47.42Aa	MR
YJ“2004-5”	62.13Aa	S	66.34Aa	S	48.12Aa	MR
“皇家巴西诺”	41.22Bb	MR	54.98Bb	MR	34.45Bb	MR
“金玛莉”	40.84Bb	MR	54.76Bb	MR	34.73Bb	MR
YJ“2004-6”	40.72Bb	MR	55.21Bb	MR	35.42Bb	MR
“红帽”	22.43Cc	R	33.05Cc	R	23.12Cc	R
“冰山”	22.82Cc	R	32.88Cc	R	22.48Cc	R
“白玫瑰”	23.20Cc	R	33.26Cc	R	23.25Cc	R

3　讨论

月季黑斑病是一种极具破坏性的世界性真菌病害,主要影响月季生长和开花。虽然近些年来在月季黑斑病的研究上已经有了较大进展[6-7],但病原菌侵染月季的机制及其如何在植株体内扩展等一系列问题仍尚不明确。由于不明白其侵染机制,故不能有效控制该病。

植物的抗病情况受到诸多因素的影响,包括环境因子、致病基因、外源物及病原菌与植物相互作用等,所以准确评价某种或多种植物对某种病原菌抗病性应采用

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

同种鉴定条件与标准[8-9]。研究表明,黑斑病较易在夏秋季节发生,且以夏季高温多雨季节尤为严重,因为风、雨、高温高湿等都有利于分生孢子扩散与萌发[10-11]。该研究以致病孢子浓度、温度、接种苗龄为鉴定条件,对潜伏期、病斑直径进行鉴定分级。国外研究表明,在不同地区,月季黑斑病病原菌致病性呈现出地理差异现象。Jenkins[12]将原为同一来源的月季品种,分别种植于美国的不同地区,其感病性表现一定的差异性,研究者认为这是因为各地病原菌的致病性不同所致,并提出了蔷薇盘二孢有生理小种的看法。对于生理小种产生的病害,其生理小种的变化,可能导致完全不同的抗病性表现。蔷薇盘二孢生理小种早已被报道,所有同来源病原菌都引起不同感病表现,同时蔷薇属植株对同病原菌也未做出相同反应[3,13]。该研究中,不同品种的月季对于同一蔷薇盘二孢病原菌就表现出了不同的致病性。蔷薇盘二孢表现为抗病类型的月季品种,当致病孢子浓度高、温度高时却表现为感病类型;对感病类型,当致病孢子浓度低、温度低时却表现呈抗病型。所以生产种植、管理月季时,可以根据已有品种对不同病原菌在孢子浓度、温度、不同苗龄时的的抗性,创造合适的环境,以降低黑斑病对月季的损害为最终目标,减少化学药剂防治,为月季栽培管理提供科学依据。

参考文献

[1] 王琼.月季与玫瑰杂交以及月季抗黑斑病的初步研究[D].北京:北京林业大学,2010.

[2] 徐东生,孟志卿.月季抗黑斑病机理研究[J].安徽农业科学,2007,35(27):8532-8533.

[3] 刘宝军.月季黑斑病菌蔷薇盘二孢(*Marssinina rosae*)形态多样性、致病性多样性和遗传多样性研究[D].泰安:山东农业大学,2009.

[4] 张明忠,单丽萍,毕建杰.野蔷薇种子快速催芽技术研究[J].安徽农业科学,2009,37(22):10476-10477.

[5] 王永格,陈晓,曹全红,等.月季抗黑斑病品种的鉴定与筛选[J].北方园艺,2010(7):156-158.

[6] Blechert O,Debener T. Morphological characterization of the interaction between *Diplocarpon rosae* and various rose species[J]. Plant Pathology,2005,54:82-90.

[7] Vance M,Whitaker J M,Bradeen T D,et al. *Rdr3*,a novel locus conferring black spot disease resistance in tetraploid rose:genetic analysis,LRR profiling and SCAR marker development[J]. Theor Appl Genet,2010,120:573-585.

[8] 程茂高,乔卿梅.月季黑斑病病原的分离机防效研究[J].北方园艺,2011(9):170-172.

[9] Gachomo E W,Kotchoni S O. Microscopic and biochemical evidence of differentially virulent field isolates od *Diplocarpon rosae* causing black spot disease of roses[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2010,48:167-175.

[10] 张汉荣,罗金水,李美桂.国内外柑桔黑斑病研究进展[J].中国农学通报,2011,27(6):40-44.

[11] 徐明慧,林绍光.月季黑斑病生物学特性研究[J].云南农业大学学报,1989,4(2):134-138.

[12] Jenkins W R. Variability of pathogenicity and physiology of *Diplocarpon rosae* Wolf,the rose black spot fungus[J]. American Rose Annua,1955,40:92-97.

[13] Gachomo E W,Dehne H W,Steiner U. Microscope evidence for the hemibiotrophic nature of *Diplocarpon rosae*,cause of black spot disease of rose[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology,2006,69:86-92.

Study on Pathogen Identification and Resistance Identification Method of Rose Black Spot Disease

JIN Yi-feng[1],GUO Guang-bing[1,2],YANG Qing-miao[1,3],HOU Shu-yuan[1,4],KANG Lie-mei[5],CHE Dai-di[1]

(1. Horticulture College,Northeast Agricultural University,Harbin,Heilongjiang 150030;2. Daqing Municipal Party Committee Organization Department,Daqing,Heilongjiang 163002;3. Aihui of Heihe Human Resources and Social Security Bureau,Heihe,Heilongjiang 164300;4. Aihui of Heihe Organization Department,Heihe,Heilongjiang 164300;5. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,Harbin,Heilongjiang 150086)

Abstract:Taking nine varieties of rose as materials,the pathogen identification of rose black spot was separated and identificated,and the effect of spore concentration,temperature and seedling age on the incidence of rose black spot disease were studied. The results showed that when the concentration of spores was 2×10^5/mL,the temperature 25℃ and the age of seedling at the two leaves stage,it was just the right time to investigate the incidence. To some extent it can preliminarily reflect the true ability of the resistance to *Marssonina rosae*.

Key words:*Rosa chinensis*;black spot disease;*Marssonina rosae*;resistance identification

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn