

张真建, 向贵生, 陈敏, 等. 月季黑斑病及其抗性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(5): 78–84.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.020

月季黑斑病及其抗性研究进展

张真建^{1,2,3}, 向贵生^{1,2,3}, 陈敏^{2,3}, 王其刚^{2,3}, 唐开学^{1,2,3}, 邱显钦^{2,3}

(1. 云南大学生命科学学院, 云南昆明 650091; 2. 云南省农业科学院花卉研究所, 云南昆明 650205;
3. 国家观赏园艺工程技术研究中心, 云南昆明 650205)

摘要:月季黑斑病是世界性的病害, 发生普遍且严重, 较难防治, 其病原菌为蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)。伴随着月季定向选育工作的开展, 其病原菌易产生各类生理小种, 导致月季的抗病性逐渐变弱; 虽然喷施化学药剂的方法可以用来抑制病原菌的产生, 但化学药剂的大量使用不仅增加了生产成本, 还会导致生态环境的恶化。本文总结了月季黑斑病的发病症状、发病原因、防治方式、抗病性等, 旨在为寻找新的抗黑斑病的月季新品种提供理论上的支持, 同时为花卉抗病性的相关研究提供新的思路。

关键词:月季; 黑斑病; 防治方式; 抗病性; 抗性品种

中图分类号: S436.8⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)05-0078-07

月季(*Rosa hybrida*)系蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属(*Rosa*)植物, 既是世界上的四大鲜切花之一, 也是中国的十大传统名花之一, 享有“花中皇后”的美誉^[1]。因其花形优美、花期较长、繁殖较易、适应力强等特点, 备受人们的喜爱, 中国的许多城市将它作为市花^[2]。

月季黑斑病最初的描述可以追溯到 Fries(1815)和 Libert(1826)的报道中^[3-4], 我国安徽省在蔷薇属植物上发现第一例黑斑病。月季黑斑病广泛分布于世界各地, 发病严重且难以防治, 是一种世界性的病害^[5-6]。国内外对其的相关研究也从未间断, 但侧重点不同, 国外重点研究月季黑斑病的抗病基因^[7], 国内重点研究的有2个方面: 一是将野生型的抗病基因转移到栽培的品种中, 以期得到抗病的优良品种^[8-9]; 二是综合治理月季黑斑病, 减少不必要的损失^[10]。

月季黑斑病极易发生的季节是温暖而潮湿的夏秋两季, 其发病主要与温度、湿度密切相关。发病初中期的主要特征

为月季叶片发黄、茎部出现黑色斑点、花梗呈现紫色至黑色条斑、花瓣显现黑色斑点, 后期出现叶子全部脱落、植株死亡等一系列的问题, 这样不仅严重影响了月季的观赏价值和商业价值, 还会导致月季产品的进一步推广和使用受到限制^[11-12]。黑斑病除严重危害月季栽培品种外, 还严重危害蔷薇属的其他野生资源, 如玫瑰(*R. rugosa*)、野蔷薇(*R. multiflora*)、金樱子(*R. laevigata*)、黄刺玫(*R. xanthina*)等^[13]。

目前, 月季是世界上消费量最大的鲜切花之一, 但随着定向选育工作的不断进行、杀菌剂的不断使用, 以及新的生理小种的不断产生, 栽培月季的基因多样性逐渐降低, 抗病能力进一步减弱^[14]。喷洒杀菌剂的高成本及毁坏环境的高风险, 使得培育和选育抗性强的新品种成了新的出路^[15]。本文从月季黑斑病的发病症状、发病原因、防治方式以及抗病性展开论述, 旨在为月季黑斑病的进一步研究提供切实的理论支撑。

1 月季黑斑病概述

月季黑斑病也称月季褐斑病, 在国内外各地区普遍发生^[16-18], 严重影响月季的生长与开花, 使其失去绿化美化环境的作用。

1.1 发病症状及危害

黑斑病为世界性的病害, 主要危害月季的叶片, 其次危害嫩茎、花梗、花蕾、新梢等部位^[19-21]。叶片发病初期, 叶片正面出现不规则边缘, 第一个明显症状是叶片上侧大约1 mm的黑点^[22]; 发病中期逐渐扩展为直径为2~12 mm的不规则形的、半圆形的或圆形的黑色或深褐色的病斑, 病斑周围有黄

收稿日期: 2018-01-26

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31560565, 31160403); 国家科技支撑计划(编号: 2015BAD10B01); 云南省应用基础研究计划(编号: 2014FB158); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(编号: 2015HB078)。

作者简介: 张真建(1993—), 男, 广西钦州人, 硕士研究生, 主要从事月季抗病遗传研究。E-mail: guangxidada@163.com。

通信作者: 唐开学, 博士, 研究员, 主要从事月季遗传育种研究, E-mail: kxtang@hotmail.com; 邱显钦, 博士, 研究员, 主要从事月季抗病遗传育种研究, E-mail: xianqin711@hotmail.com。

(2): 122–127.

[3] 邹永辉, 张华. 斜纹夜蛾性诱剂在测报和防治上的应用研究[J]. 广东农业科学, 2009(8): 129–130.

[4] 王方晓, 杨可辉, 张秀衡, 等. 斜纹夜蛾性诱剂的诱蛾效果[J]. 昆虫知识, 2008, 45(2): 300–302.

[5] 刘志才. 广东佛山地区斜纹夜蛾发生规律及防治研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2005: 23–24.

[6] 黄水金. 斜纹夜蛾的抗药性及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006: 3–18.

[7] 刘路, 周琼. 昆虫性信息素的研究及其应用[J]. 华中昆虫研究, 2013(2): 323–329.

[8] 周艳波, 李克华, 关鑫, 等. 嵩明县斜纹夜蛾夏季高发期发生规律调查[J]. 云南农业, 2015(4): 35–36.

[9] 蔬菜斜纹夜蛾调查测报技术规范: DB 36/T 880—2015[S].

色的晕圈包围,病斑间可以相互融合;发病后期,叶片上的病原菌分生孢子在病斑部位呈现出疱状小点,病斑中央的组织则呈现出灰白色,并且病叶逐渐变成黄色至脱落,严重时能导致整株叶片脱落,直至植株死亡^[23]。嫩茎染病后,病斑呈现出紫色或黑色的条形或长椭圆形的斑点,病斑稍稍下陷;花梗染病后的症状和嫩茎染病后的症状类似;花蕾染病后,病斑呈现出紫黑色椭圆形斑点;新梢染病后,病斑呈现出紫黑色长椭圆形斑点,病斑稍外凸起^[23-24]。月季植株的不同部位都有不同程度的感染,这样不仅影响了植株的生长,还会导致其开花不正常或花不能开放,进而使其观赏性大大降低。研究表明,发生过黑斑病的月季品种,病叶脱落后,再次萌发的新叶更容易感染月季白粉病。

1.2 黑斑病菌的分类

黑斑病菌是一种生长缓慢的真菌,导致植株感病的病原菌有 2 种:第一种为蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*),异名称蔷薇放线孢菌(*Actinonema rosae*)^[25],属于半知菌类;另一种为链格孢菌(*Alternaria*)^[26-29]。致使月季感病的是蔷薇盘二

孢^[30-32],隶属于半活体营养型真菌^[33],有性态为蔷薇双壳菌(*Diplocarpon rosae*),属于子囊菌属;无性态为蔷薇放线孢菌,隶属于半知菌亚门(Deuteromycotina)腔孢菌纲(Coelomycetes)黑盘孢目(Melanconiales)放线孢属(*Actinonema*)。

1.3 黑斑病菌的形态

菌丝和分生孢子盘是月季黑斑病菌生长的 2 种不同的形态。分生孢子近椭圆形或长卵圆形;无色,双胞,分隔处略缢缩,2 个细胞大小不等,略微弯曲,大小为(17.5~25.2) μm × (5.0~7.5) μm ^[23,34-35](图 1-A)。分生孢子盘起初埋生于角质层下,后突破表皮,圆形至不规则形,黑色,直径为 108~198 μm ,盘下有放射状的菌丝(图 1-B)。菌丝生长于寄主角质层与表皮细胞之间,以垂直分枝的形式穿过细胞壁进入细胞,形成吸器吸收营养(图 1-C)。当处于有性态时,其子囊盘寄生于越冬病叶的表面,球形至盘形,深褐色,裂口呈辐射状;子囊圆筒形,子囊孢子长椭圆形,含 1 个隔膜,2 个细胞大小不一,其有性态很少见^[34]。

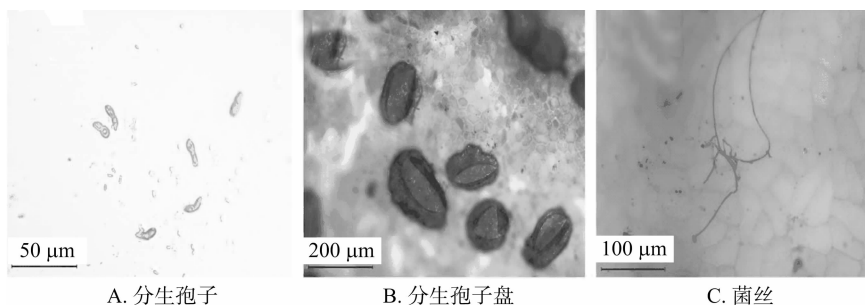


图 1 光学显微镜下月季黑斑病病原菌形态

1.4 发病原因及发病规律

1.4.1 发病原因 为了得到高抗的月季品种,必须先要了解月季黑斑病发病的原因,目前已知的诱发月季黑斑病发病的原因有很多。其一,人们对其外形、花香等的需求使得品种与日增多,多样的品种也就有了对黑斑病不同的抗性,即品种间不同的抗性^[36]。其二,孟志卿等进行了不同月季品种酶活性对抗病性的研究,证实了酶活性与品种抗病性有着密切的联系^[37]。其三,环境条件对于孢子萌发也是至关重要的因素,丁世民研究发现闷热、高湿的夏秋两季有利于月季黑斑病的发生^[38]。其四,栽培设施对月季的抗性也有影响,韩淑玲以抗病能力较强的红衣主教及抗病能力较差的卡尔红为代表来进行试验,试验证实具滴灌设备的棚内栽培比无滴灌设备(即漫灌)的棚内栽培发病轻^[39]。

1.4.2 发病规律 温度及相对湿度对分生孢子的萌发起着至关重要的作用,在温暖潮湿的环境中,病菌孢子可蔓延孳生^[40-41]。越过后冬的分生孢子在相对湿度为 23%~99%时可萌发侵入。黑斑病发病的最适温度为 17~25 $^{\circ}\text{C}$,当温度超过 30 $^{\circ}\text{C}$ 则发病减少。Drewes-Alvarez 研究表明分生孢子在 0~33 $^{\circ}\text{C}$ 的情况下都能够萌发^[42],Melching 研究表明病原菌在 6~33 $^{\circ}\text{C}$ 间均可以进行侵染^[43],而 Gachomo 等认为在 10 $^{\circ}\text{C}$ 情况下病害症状将不会出现^[44]。同样,相关研究已证实相对湿度对分生孢子的萌发也起着至关重要的作用,Arnesescu 研究表明需提前将分生孢子放在湿气环境中 15 h 才能使月季感病^[45]。并且还有一些研究发现 pH 值对于分生

孢子的萌发也有着很大的作用,Jenkins 等研究表明当 pH 值为 3.6~6.6 时,病原菌的生长势不同;当 pH 值为 4.8~5.4 时,病原菌生长最好^[46]。月季黑斑病 4 月中旬开始发病,发生的主要月份为 7—9 月,发病的首要条件是光照不足、通风不良、高温高湿^[47-48]。

1.5 月季黑斑病的致病概述

月季黑斑病菌主要以存在于芽鳞、病叶、病落叶或病枝上的菌丝体或分生孢子盘的形式越冬。菌丝体寄生在寄主角质层与表皮细胞之间,侵染时以垂直分枝的形式穿过细胞壁进入细胞,形成吸器吸收营养;分生孢子盘起初埋生于角质层下,后突破表皮。单学敏等认为月季黑斑病在某些特定的条件下能够产生有性世代,但不提供初侵染源^[49],表明月季黑斑病的初侵染源主要是越冬的菌丝体和分生孢子 2 种形式^[50]。不同的栽培方式会导致病原菌越冬部位和方式不同,露地栽培月季上的病原菌以菌丝体的形式在芽鳞、叶痕及枯枝落叶上越冬,菌丝体在翌年 5—6 月产生分生孢子进行初侵染;保护地栽培月季上的病原菌以菌丝体和分生孢子在发病部位越冬,并成为初侵染的来源。次年早春,随着休眠芽的萌发,展叶,越冬的菌丝体逐渐活跃起来,形成分生孢子盘,随后产生分生孢子完成初侵染。

分生孢子侵入的部位为叶片的表皮,潜伏期为 7~10 d,侵入叶片正面的 11 d 左右就形成分生孢子盘,侵入叶片背面的得经过 1 个月左右才能形成子实体。条件适宜情况下,分生孢子盘可破裂释放出新的分生孢子,进行再侵染。因为病

菌具有多次重复侵染的能力,所以在月季生长季节内能够重复多次发病^[23,35]。月季黑斑病的传播方式多样,一般靠机械力量传播。分生孢子借雨水、喷灌水飞溅、风、昆虫、操作人员等传播,病原菌远播的媒介还包括带病的苗木、植株及切花^[51]。

2 黑斑病的防治方式

植物病虫害的防治一般采取“以防为主、防重于治”的原则。目前,在生产和育种工作中,主要通过选择高抗的品种、加强栽培管理、混合种植多品种、药剂防治、诱导抗性和生物防治来对月季黑斑病进行防治。

2.1 选择高抗的品种

月季品种间对黑斑病的抗性是不一样的,选择种植高抗的月季品种可以从源头上遏制月季感染黑斑病。1955 年,美国科学家 Jenkins 首次研究发现,月季黑斑病各地的病原菌致病力不同,提出月季黑斑病存在地理小种的概念^[52]。选择红衣主教、大卫、萨曼莎、伊丽莎白、黑千层、和平、汤普森、喜洋洋、火烈鸟、贝拉米等^[23,51]高抗品种可有效抵御黑斑病的感染。

2.2 加强栽培管理

栽培管理得当,可以减少感病的可能性。栽培过程中,应避免湿冷、闷热、栽植过密和通风不良等容易导致月季感病的环境条件;施肥时应多施磷、钾肥,少施氮肥^[53];浇水采取滴灌、沟灌等方式,并且由于潮湿利于病原菌的侵入,因此应避免夜间浇水;松土培土可以提高月季的长势;Wolf 研究发现病菌越冬的主要部位在落叶上,在菌丝体越冬后以及萌发前的秋季或早春采用集中烧毁落叶的方式可以减少黑斑病的发生^[54],因此秋季彻底清除残枝落叶,冬季修剪病枝、病叶,集中烧毁或深埋,减少侵染源,为月季营造良好的生长环境。

2.3 混合种植多品种

混合种植,避免单一品种,可以有效遏制病原菌的传播速度,减少病害的发生。徐明慧等将抗病性较强的月季品种与严重感病的月季品种进行混栽,但前者依然不易感病^[17]。也有研究者发现混栽抗病能力不同的月季,抗病性强的依然强^[15-16]。

2.4 药剂防治

目前,可用来防治月季黑斑病的药剂种类众多。种植月季前,可用福美肿药沙进行土壤消毒,杀灭病原菌^[55]。发病前,即病原菌休眠期,在春季发芽前对植株和地面喷洒石硫合剂^[20],可以有效地清除越冬菌源。发病初期,用百菌清可湿性粉剂防治。发病期间,用甲基托布津可湿性粉剂兑水喷洒,每周 1 次,喷 3~4 次。发病严重时,可用百菌清喷洒,7~10 d 喷 1 次,连喷 3~5 次。持续使用同种药剂容易使病菌产生抗药性,所以在使用一种药剂一段时间后,应更换其他种药剂,这样防治效果更明显。

2.5 诱导抗性

植物诱导抗性可使植物获得抗性,增强对病虫害的抵御能力。Ray 等发现用真菌的弱毒菌株接种秋海棠(*Begonia evansiana*),能使秋海棠对同一真菌的强致病菌株产生抗性^[56]。除此外,水杨酸能够诱导植物系统获得抗性,金一锋用不同浓度的外源性水杨酸诱导感病与抗病的月季品种,以

此来观察水杨酸对黑斑病的抑制效果,结果表明水杨酸浓度低时,对黑斑病菌菌丝的生长起不到干扰,但随着浓度的升高,黑斑病菌丝的生长受到了明显的抑制^[57]。

2.6 生物防治

近年来生物防治的普遍流行,也给月季黑斑病的生物防治带来了启发。Muthusamy 等研究发现病原菌菌丝的生长在很大程度上受到荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* pf1)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)的抑制^[58]。寻找到能够抑制黑斑病菌的其他生物将是防治黑斑病的又一出路。

3 月季品种的抗性

不同的月季品种对黑斑病具有不同的抗性,不同地域种植的同一种品种也对黑斑病具有不同的抗性^[36]。徐明慧对金背大红、德国白、火焰 3 种月季品种接种黑斑病病原菌,并观察它们的发病率,发现发病率差别很大^[59]。黄声仪对 800 个月季品种的调查发现,不同品种间抗病性差异明显,中、高抗居多,中、高感极少数^[60]。李宏斌研究发现萨曼莎、红成功、红衣主教等红色系切花品种的抗性较弱,极易感染,而金徽章等黄色系切花品种的抗性较强,不易感染^[61]。王永格等对 15 个月季品种黑斑病的发病情况进行调查发现,15 个月季品种中有 1 个高抗,1 个中抗,2 个低抗,6 个感病,5 个严重感病^[62]。其他研究发现小姐妹月季、灌丛月季、原生种月季及藤本月季对黑斑病的抗性较强,而杂交茶香月季、微型月季、丰花月季及壮花月季的抗性较差。这为我们的育种工作提供了参考,因此在引种种植过程中应优先选择抗病性能较好的月季品种^[10,63]。

目前,野生的月季品种虽具较高的抗病性,但自然界中未发现有完全抗病的月季品种^[64-65],寻找完全抗病的品种将是之后一段时间研究的重点。

3.1 月季抗黑斑病的超微结构

黑斑病危害月季最严重的部位为叶片,吴雪芬等对 160 个月季品种调查了叶片与黑斑病间的关系,结果发现叶薄有光泽月季与叶厚无光泽月季、叶厚有光泽月季的病情差异显著^[10]。探讨月季的超微结构对于黑斑病的防治将有一定作用。病菌进入植物的主要途径为气孔,徐东生研究发现,不同月季品种嫩叶的气孔密度小于老叶,抗病品种的气孔密度远小于感病品种的气孔密度^[66]。黄晓玲等用扫描电镜和透射电镜对病原菌侵染叶片后的细胞超微结构进行了观察,发现抗病品种的后代叶片表皮有大量菌丝分布,仅少量的菌丝进入气孔内部;而感病品种叶片表皮气孔下陷,孢子附着在叶片的表面^[67]。Reddy 等也从叶片的形态上去寻找与抗黑斑病的相关特征,发现孢子较易透过表皮进行繁殖^[68]。Walker 等认为蜡质的存在对月季的抗病也是有很大作用的,因分生孢子萌发需潮湿的环境,若蜡质存在,可使水滴不残留于叶片上,减少了发病的可能^[69]。

3.2 黑斑病的生理生化机制

月季感染黑斑病后,各种生理生化水平变化显著。Kenneth Horst 研究发现月季黑斑病感染叶片后,会在病叶组织中产生乙烯^[70]。Suhaz 等研究发现叶片在受到黑斑病感染后,病原菌会产生脱落酸,使叶片早早脱落^[71]。徐明慧研究发现月季黑斑病发病高时,月季的叶绿素和氨基酸含量会下

降^[72]。孟志卿对月亮花、日晖、洛神、金石竹、茶香叶片的生理生化物质进行了测定,抗黑斑病品种的月亮花、日晖的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性均比其他感病品种的高;同一品种而言,嫩叶的酶活高于老叶^[73]。徐东生对抗黑斑病能力不同的 5 个月季品种的脯氨酸、SOD、POD 及 PPO 的含量进行了测定,发现了老叶的脯氨酸含量高于嫩叶,感病品种的脯氨酸含量会下降,抗病品种的都略有上升;抗病品种嫩叶 SOD 活性高于感病品种;与老叶相比,病叶 SOD、PPO 活性上升,POD 活性有降有升^[66]。不同抗病和感病月季品种在感染黑斑病后,其体内的酶含量会表现出不同的上升和下降趋势,根据这些酶含量的不同,可清楚地辨别感病情况。

3.3 抗性鉴定

不同的月季品种对黑斑病的抗性是不同的,目前,月季黑斑病抗性鉴定的研究很少。丁世民对月季黑斑病的发生规律做了研究,结果发现不同品种的切花月季对黑斑病的抗性会有所差异^[38]。赵玉霞对山东地界的切花月季的发病规律研究发现,黑斑病的发生与切花月季品种密切相关,不同的切花月季具有不同的抗性^[74]。马燕对月季与野生蔷薇之间的杂交品种群及其亲本采用离体叶片侵染的方法来对其进行抗黑斑病的鉴定,建立抗黑斑病等级模型,根据综合值的不同来确定不同品种的抗黑斑病等级^[64]。黄晓玲对抗感不同的现代月季杂交后代的抗病性鉴定使用的方法也是离体叶片侵染^[67]。王琼采用离体叶片侵染方法对 48 个月季品种的抗性等级进行了划分,结果发现仅有篝火、金玛丽、洛丽塔、芳纯 4 个高抗的品种^[75]。任春光等采用品种田间自然抗性鉴定法对 52 个月季品种进行抗性鉴定,结果仅发现 17 个高抗黑斑病品种^[76]。国外研究报道大卫、汤普森、月亮花、金色无暇等月季品种为高抗品种。王永格采用月季抗病品种分级标准^[77]鉴定了 15 个月季品种,仅发现至高无上 1 个高抗品种^[62]。

3.4 抗性评价

离体鉴定和田间自然抗性鉴定是鉴定月季品种抗黑斑病的方法。植物对某种病原菌的抗性鉴定不单是受单一因素的影响,而是要考虑到诸多因素,例如致病基因、环境因子、外源物以及病原菌和植物之间的作用等等,采用同种鉴定条件与标准也就成为判断植物对病原菌的抗病性要求^[78]。金一锋等对 9 个月季品种的研究发现,当孢子浓度为 2×10^5 个/mL 时,可较好地反映出抗黑斑病的能力,该孢子浓度为抗性鉴定的最佳浓度^[79]。

3.5 抗性遗传

植物的抗性是可遗传的,葛红等对不同月季品种杂交后代进行筛选,发现其抗病株率差异较大^[80]。孔畅将黑斑病抗性强的父本和母本进行杂交,将亲本基因导入后代中,得到了黑斑病抗性强的后代^[81]。黄晓玲等则认为父母本对后代的黑斑病抗性强弱都会产生一定的影响^[67]。

4 月季抗黑斑病的分子水平研究

伴随着现代分子生物学的兴起,使原本仅从植物表征上寻找抗病品种的抗病育种研究更进一步。月季抗黑斑病的机制研究主要为垂直抗性方面,如 Byrne 等研究者的染色体加

倍^[65,82],Kaufmann 的图位克隆^[83],Yan 等研究者的分子标记^[84-86],Whitaker 等的杂交及抗病表型分离^[87-89]等多种方法,Biber 等和 von Malek 等克隆得到了第一个抗病基因 *Rdr1*^[90-91],Whitaker 等克隆得到 *Rdr3* 基因^[89],并且发现了单一的显性基因控制抗性^[91-92],因此也获得了少量的抗病材料。

需要获得可遗传的抗病月季品种,不仅需要停留以筛选出花型、花色、花香等外在特征的阶段,还应该注重其内在特征,如抗旱、抗寒、抗病等。杂交育种、突变育种^[93]等常规育种方法将获得的基因或想要获得的基因添加到月季中去,并且近年来像基因工程、分子标记等非非常规的技术也逐渐被应用到育种工作中^[94-96]。

4.1 抗病基因的研究

不同月季品种间的抗黑斑病能力表现各有差异,因此可判定月季的抗病基因表达水平存在着一定的差异性。1971 年 Flor 提出了“植物对某种病原物的特异抗性取决于它是否具有相应的抗性基因”的基因对基因的抗病性学说^[97],随后国内外的研究者们对抗性基因进行了一系列的研究。先前的研究发现抗病基因诱导的后期防御的基因如几丁质酶、葡聚糖苷酶和 PR 蛋白基因导入植物使之过量表达,可以使植物获得抗性^[98]。Ballard 等利用 RFLP 和 RAPD 技术对 22 个月季品种进行抗黑斑病能力研究,结果发现不同倍数月季品种抗黑斑病能力不同,其中二倍体的月季抗性较强^[7]。von Malek 等将 RFLP 探针定位到月季染色体图谱上,发现了第一个抗黑斑病基因 *Rdr1*,随后利用 7 个 AFLP 分子标记,将 *Rdr1* 基因定位到 1.1 ~ 7.6 cM 图距之间^[99]。Debener 等将二倍体月季进行杂交,然后利用分子标记筛选到了 28 种对黑斑病有高抗性的基因型,还绘制出了染色体上 *Rdr1* 基因周围的基因排列情况^[100-101]。刘瑞峰等以粉和平叶片为试材,对其接种黑斑病菌来研究月季响应黑斑病的差异表达基因分析,结果发现响应黑斑病的基因很多,病原菌侵染植物后能引起一系列的连锁反应^[11]。

4.2 月季遗传图谱构建

遗传图谱包括经典遗传图谱、分子遗传图谱、同工酶遗传图谱 3 种^[102]。用于构建遗传连锁图谱的遗传标记主要包括形态学标记、细胞学标记、生物化学标记和 DNA 分子标记 4 种。遗传图谱的优越性在于可为性状定位、功能基因克隆、分子标记辅助选择育种等提供技术平台。

Debener 等采用 Grattapaglia 提出的“双拟测交”策略获得了二倍体野蔷薇杂交的 F_1 代,利用 305 个 RAPD 和 AFLP 分子标记对其进行了研究,建立了第一张二倍体月季遗传图谱,利用分子标记研究二倍体月季的抗性基因遗传及基因图谱构建,在此基础上,标记定位了黑斑病抗性基因 *Rdr1*^[103-105]。Crespel 等利用 AFLP 分子标记对二倍体光叶蔷薇 (*R. wichuraiana*) 和单倍体现代月季品种杂交 F_1 代为材料进行了研究,结果显示 68 和 108 个标记位点分别位于母本的 8 个和父本的 6 个连锁群中,建立了另一套二倍体月季遗传图谱,并对月季中控制花刺数量、连续开花及复花冠的基因进行了定位^[106]。Dugo 等以粉红努塞特和光叶蔷薇杂交的 96 株 F_1 代为材料,作了 133 个标记,其中 130 个 RAPD,1 个形态学标记,2 个微卫星标记,结果得出总共 14 个连锁群^[107]。Linde

等于2006年对二倍体月季的杂交 F_1 代,利用 AFLPs, RGAs 和其他标记类型构建二倍体种群的综合连锁图,分别对父母本构建了7个连锁群^[108]。

周青以古老月季品种月月粉(*R. chinensis Pallida*)和园艺品种光叶蔷薇杂交得到 F_1 代164株为材料,结合 SSR 标记及双拟测交策略构建了二倍体月季遗传图谱^[109]。除二倍体的遗传图谱外,还建立了四倍体的遗传图谱。相比较于这2种遗传图谱,二倍体遗传图谱进行性状定位时,往往效率低下,加之目前较多的月季品种为四倍体,因此难以很好地进行品种改良。Rajapakse 等以月季没有刺的茎和叶柄,采用了 AFLP、SSR 等标记手段来构建了2张四倍体月季遗传连锁图,定位了苹果酸脱氢酶基因和多刺基因位点^[110]。Zhang 等结合 Rajapakse 建立的2张四倍体月季遗传图谱,采用二倍体光叶蔷薇插入基因组文库,对含有 SSR 的序列进行分离,并通过几个 SSR 探针进行筛选,结果发现设计的 SSR 引物对中,多态性比例为57%,为之后整合二倍体和四倍体月季遗传图谱提供了工具^[111]。于超以四倍体的古老月季品种云蒸霞蔚及现代月季品种太阳城作为亲本,杂交后选择 F_1 代189株做遗传图谱分析,构建了迄今为止密度最高的月季四倍体遗传连锁图谱,并应用于数量性状的基因定位^[112]。月季遗传图谱的建立为月季抗病品种的选育提供了新的方向,基于遗传图谱来定位黑斑病抗病基因,再对抗病基因进行深入研究及利用。

4.3 分子标记辅助选择育种

随着现代分子生物学的日益发展,分子标记辅助选择育种的研究也得以日益深入^[113]。目前常用的分子标记辅助选择育种方法有 RFLP、AFLP、RAPD 和 SSR 等。相比较于传统育种的时间长、育种效率低下、盲目性和不可预测性等缺点,分子标记辅助选择育种具有以下优点:(1)在植物生长发育的任何阶段进行选择,目标性状的选择不受基因表达影响;(2)区分纯合体和杂合体可用共显性标记;(3)表型鉴定困难的性状可用基因型鉴定,如植物抗病性、抗逆性和根部性状等;(4)聚合多个有利基因提高育种效率;(5)识别不良性状连锁,有利于导入远源的优良基因^[114]。冯慧发现2n配子具有杂种和多倍体的双重优势,提倡应有效利用我国丰富的野生种质资源进行种质创新和育种^[115]。

参考文献:

- [1] 张金云,王清羿. 切花月季品种的比较及其花枝生产规律的研究[J]. 安徽农业科学,2004,32(5):945-946.
- [2] 张启翔,康红梅,唐菁,等. 切花月季无土栽培技术的研究[J]. 北京林业大学学报,2003,25(3):22-27.
- [3] Fries E M. Observationes Mycologicae[M]. 1815:1-230.
- [4] Libert M R. Mem. Soc. Linn. Paris,1826,5:404-406.
- [5] Bleichert O, Debener T. Morphological characterization of the interaction between *Diplocarpon rosae* and various rose species[J]. Plant Pathology,2005,54:82-90.
- [6] Horst R K. Westcotts plant disease handbook [M]. 7th ed. Dordrecht:Springer Science,2008.
- [7] Ballard R, Rajapakse S. DNA markers in rose and their use for cultivar identification and genome mapping, second in ternational symposium on roses[J]. Acta Horticulturae,1996(424):265-268.
- [8] 刘永刚,刘青林. 月季遗传资源的评价与利用[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(1):87-90.
- [9] 王丽勉,张启翔,高亦珂. 月季抗黑斑病的基因工程研究[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):92-95.
- [10] 吴雪芬,陈军,陈君君. 月季不同品系对黑斑病抗性调查及综防技术试验[J]. 浙江农业科学,2007(1):97-100.
- [11] 刘端峰,刘强,张非亚,等. 月季响应黑斑病的早期差异表达基因分析[J]. 园艺学报,2015,42(4):731-740.
- [12] Smith I M, Dunez J, Lelliott R A, et al. European handbook of plant diseases[M]. Oxford:Blackwell Scientific Publications,1988.
- [13] 严桂华,曹萍. 月季主要病虫害及其防治[J]. 现代农业科技,2007(22):91,97.
- [14] Munnekhoff A K, Linde M, Deneber T. The gene diversity pattern of *Diplocarpon rosae* populations is shaped by the age, diversity and fungicide treatment of their host populations[J]. Plant Pathology, 2017,66:1288-1298.
- [15] Yokoya K, Kandasamy K I, Walker S, et al. Resistance of roses to pathotypes of *Diplocarpon rosae* [J]. Ann Appl Biol, 2000, 136: 15-20.
- [16] Debener T, Byrne D H. Disease resistance breeding in rose: current status and potential of biotechnological tools [J]. Plant Science, 2014,228:107-117.
- [17] 徐明慧,林绍光. 月季黑斑病的发生、流行及防治试验[J]. 云南农业大学学报,1988,3(2):133-136.
- [18] Marchant R, Davey M R, Lucas J A, et al. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf) [J]. Molecular Breeding,1998,4(3):187-194.
- [19] 李明哲,刘彦芬,徐源,等. 月季黑斑病综合防治措施[J]. 新农业,2009(5):19.
- [20] 李凤芹. 月季叶部主要病害的识别及其防治[J]. 中国花卉园艺,2007(10):41-42.
- [21] 迟东明,岳玲,宋伟,等. 月季黑斑病抗性研究进展[J]. 辽宁农业科学,2010(3):71-72.
- [22] Gachomo E W, Kitchoni S O. Detailed description of developmental growth stages of *Diplocarpon rosae* in *Rosa*: a core building block for efficient disease management[J]. Ann Appl Biol,2007,151(2):233-243.
- [23] 张雪辉. 月季黑斑病发生特点与防治措施[J]. 现代农村科技, 2009(21):22.
- [24] 刘桂芹. 月季黑斑病防治[J]. 现代农村科技,2006(8):83.
- [25] 叶光营,吴毅伟,刘必桔. 福州区域雾霾天气时空分布特征分析[J]. 环境科学与技术,2010,3(10):114-119.
- [26] 刘跃民. 月季黑斑病的识别与防治[N]. 中国花卉报,2003-05-20.
- [27] 乔镜澄,刘宇,马敬昊,等. 番茄黑斑病病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):94-97.
- [28] 曹丽亚,陈大欢,郭荣艳,等. 多黏类芽孢杆菌 HT16 对梨采后黑斑病的抑制效果[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):107-110.
- [29] 张钰,傅俊范,周如军,等. 红花黑斑病病原菌生物学特性研究[J]. 江苏农业科学,2008(2):105-107.
- [30] Horst R K, Cloyd R A. Compendium of rose diseases and pests [M]. 2nd ed. St Paul, USA: APS Press,2007.
- [31] Black W A, Byrne D H, Pemberton H B. 645 PB 407 field study of black spot resistance in rose[J]. Hort Science,1994,29(5):525.

- [32] Gachomo E W, Seufferheld M J, Kotchoni S O. Melanization of appressoria is critical for the pathogenicity of *Diplocarpon rosae* [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37 (7): 3583 – 3591.
- [33] Gachomo E W, Dehne H W, Steiner U. Microscopic 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.
- [34] 刘宝军. 月季黑斑病菌蔷薇盘二孢形态多样性、致病性多样性和遗传多样性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [35] 王丽霞, 孙军德, 李宝聚. 月季盘二孢黑斑病的发病规律及防治技术[J]. 北方园艺, 2012(14): 135 – 137.
- [36] 王小斌, 陈柳强, 熊 实. 月季抗黑斑病的形状研究[J]. 广东园林, 1999(1): 47 – 49.
- [37] 孟志卿, 徐东生, 郭 平, 等. 几种抗黑斑病月季品种酶活性的研究[J]. 武汉大学学报, 2005(2): 278 – 282.
- [38] 丁世民, 傅海澎. 切花月季黑斑病发生规律与药剂防治研究[J]. 现代园林学报.
- [39] 韩淑玲, 丁世民. 切花月季黑斑病发生规律与药剂防治研究[J]. 职大学报, 2009(4): 92 – 93.
- [40] 程茂高, 乔卿梅. 月季黑斑病病原的分离及防效研究[J]. 北方园艺, 2011(9): 170 – 172.
- [41] 李菁博, 许桂花. 防治月季黑斑病与白粉病的经验之谈[J]. 中国花卉盆景, 2011(7): 28.
- [42] Roberts A, Debener T, Gudin S. Encyclopedia of rose science [M]. 2003: 148 – 153.
- [43] Melching L S. The effects of environmental factors and of selected chemicals upon the of rose black spot of rose [J]. Diss Abstr, 1962, 22: 3803.
- [44] Gachomo E W. Studies of the life cycle of *Diplocarpon rosae* Wolf on roses and the effectiveness of fungicides on pathogenesis [M]. Goettingen, Germany: Cuvillier Verlag, 2005.
- [45] Aronescu A. *Diplocarpon rosae* from spore germination to haustorium information [J]. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 1934, 61: 291 – 329.
- [46] 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.
- [47] 吴燕丽. 月季黑斑病的防治研究[J]. 河南农业, 2010(1): 22.
- [48] 邓小芹. 月季常见病害的发生及防治[J]. 现代农业科技, 2010(7): 191 – 192.
- [49] 曾大鹏, 单学敏. 月季黑斑病初侵染源及其防治的研究[J]. 林业科技通讯, 1992(6): 27 – 28.
- [50] Cook R. Overwintering of *Diplocarpon rosae* at Wisley [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1981, 77(3): 549 – 556.
- [51] Palmer J, Sachs I, Semeniuk P. The leafspot caused by *Marssonina rosae* observed in scanning electron and light microscopes [J]. Scanning Electron Microscope, 1978, 32(2): 1019 – 1026.
- [52] Jenkins W R. Variability of pathogenicity and physiology of *Diplocarpon rosae* Wolf, the rose blackspot fungus [J]. American Rose Annua, 1955, 40: 92 – 97.
- [53] 姚珍贵. 如何防治月季黑斑病[J]. 福建农业, 2002(10): 18.
- [54] Wolf F A. The perfect stage of *Actinonema rosae* [J]. Botanical Gazette, 1912, 54(3): 218 – 234.
- [55] 薛毅民, 李永洪. 月季黑斑病的防治技术[J]. 农业科技通讯, 2008(6): 187.
- [56] 董合忠, 李维江. 植物诱导抗病性及其利用[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2001, 18(4): 268 – 273.
- [57] 金一锋. 外源性水杨酸诱导月季对黑斑病抗性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [58] Muthusamy K, Ramanujam B, Subramanian M, et al. Influence of phylloplane colonizing biocontrol agents on the black spot of rose caused by *Diplocarpon rosae* [J]. Journal of Plant Interactions, 2007, 42: 225 – 231.
- [59] 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 – 139.
- [60] 黄声仪, 何可佳, 张华清. 月季黑斑病的研究[J]. 湖南农学院学报, 1990, 16(2): 160 – 168.
- [61] 李宏斌. 切花月季黑斑病的发生规律及其防治初探[J]. 湖北植保, 2000(4): 21 – 22.
- [62] 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.
- [63] 李 丽. 辰山植物园月季黑斑病研究[J]. 现代园林, 2013, 10(8): 36 – 39.
- [64] 马 燕, 陈俊愉. 培育刺玫月季新品种的初步研究——部分亲本与杂交黑斑病能力的研究[J]. 北京林业大学学报, 1992, 14(3): 80 – 84.
- [65] Byrne D H, Black W. The use of amphidiploidy in the development of blackspot resistant rose germplasm [J]. Acta Horticulturae, 1996, 424: 269 – 272.
- [66] 徐东生, 孟志卿. 月季抗病黑斑病机理研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8532 – 8533.
- [67] 黄晓玲, 黄 泽, 张金柱, 等. 黑斑病菌 *Diplocarpon rosae* 侵染对现代月季抗感不同杂交后代叶片超微结构的影响[J]. 作物杂志, 2016(5): 156 – 159.
- [68] Reddy S, Spencer J A. Leaflet surfaces of blackspot – resistant and susceptible roses and their reactions to fungal invasion [J]. HortScience, 1992, 27(2): 133 – 135.
- [69] Walker S. Screening roses for resistance to *Diplocarpon rosae* Second international symposium on roses [J]. Acta Hort, 1995, 424: 209 – 213.
- [70] Kenneth Horst R. Westcott's plant disease handbook [M]. 4th ed. New York: Van Nostrand Reinhold Co, 1978: 101 – 104.
- [71] Suhas P W . et al, Absciscic acid production by *Diplocarpon rose* and it role in the disease preduction [J]. Current Science, 1980, 49(6): 238 – 239.
- [72] 徐明慧. 黑斑病对月季色素及氨基酸的影响[J]. 园艺学报, 1985, 12(1): 61 – 64.
- [73] 孟志卿. 月季抗黑斑病品种酶活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(24): 7454 – 7455.
- [74] 赵玉霞, 张 岩, 贾恒菊, 等. 切花月季黑斑病发生规律与药剂防治研究[J]. 山东林业科技, 2006(5): 56 – 58.
- [75] 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.
- [76] 任春光, 姚松林, 黄承玲, 等. 月季白粉病和黑斑病的发生情况与田间抗性鉴定[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(7): 130 – 132.
- [77] 张喜萍, 许修宏, 龚东芳. 月季抗白粉病资源的筛选[J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(6): 93 – 94.
- [78] 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.
- [79] 金一锋,郭广兵,杨清森,等. 月季黑斑病病原鉴定与抗性鉴定方法研究[J]. 北方园艺,2013(18):114–117.
- [80] 葛红,黄善武. 月季抗病资源及抗病遗传[J]. 中国花卉盆景,1992(10):10.
- [81] 孔畅. 部分现代月季品种杂交结实规律初探[D]. 北京:中国农业大学,2011.
- [82] Khosravi P, Kermani M J, Nematzadeh G A, et al. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa* [J]. *Euphytica*, 2008, 160:267–275.
- [83] Kaufmann H, Mattiesch L, Lörz H, et al. Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*, a gene that confers resistance to blackspot [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 268:666–674.
- [84] Yan Z, Denneboom C, Hattendorf A, et al. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110:766–777.
- [85] Hattendorf A, Debener T. Molecular characterization of NBS – LRR – RGAs in the rose genome[J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 129:775–786.
- [86] Spiller M, Linde M, Hibrand – Saint Oyant L, et al. Towards a unified genetic map for diploid roses [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122:489–500.
- [87] Whitaker V M, Zuzek K, Hokanson S C. Resistance of 12 rose genotypes to 14 isolates of *Diplocarpon rosae* Wolf. rose blackspot collected from eastern North America [J]. *Plant Breeding*, 2007, 126:83–88.
- [88] Whitaker V M, Hokanson S C. Partial resistance to black spot disease in diploid and tetraploid roses: General combining ability and implications for breeding and selection [J]. *Euphytica*, 2009, 169:421–429.
- [89] Whitaker V M, Bradeen J M, Debener T, et al. *Rdr3*, a novel locus conferring black spot disease resistance in tetraploid rose; Genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 120:573–585.
- [90] Biber A, Kaufmann H, Linde M, et al. Molecular markers from a BAC contig spanning the *Rdr1* locus; a tool for marker – assisted selection in roses [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 120:765–773.
- [91] von Malek B, Debener T. Genetic analysis of resistance to black spot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(2):228–231.
- [92] Debener T, von Malek B, Mattliesch L. Genetic and molecular analysis of important characters in roses [J]. *Acta Hort*, 2001, 547:45–52.
- [93] 苏重娣. 月季辐射诱变育种研究[J]. 激光生物学, 1995, 4(4):748–750, 740.
- [94] 白锦荣,张启翔,潘会堂,等. 蔷薇属分子生物技术研究进展[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(6):43–49.
- [95] 邱显钦,鄢波,唐开学,等. DNA 分子标记在月季中的应用[J]. 西南农业学报, 2006, 19(2):323–329.
- [96] 邱显钦,张颢,李树发,等. 基于 SSR 分子标记分析云南月季种质资源亲缘关系[J]. 西北植物学报, 2009(9):1764–1771.
- [97] Flor H H. Current status of the gene – for – gene concept [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1971, 9:275–296.
- [98] 邓晓东,刘志昕. 植物抗病基因特征和抗病分子育种策略[J]. 热带农业科学, 1998(5):49–54.
- [99] von Malek B, Weber E W, Debener T. Identification of molecular markers linked to *Rdr1*, a gene conferring resistance to blackspot in roses [J]. *Theoretical and applied genetics*, 2000, 101(5–6):977–983.
- [100] Debener T, Mattiesch L. Genetic analysis of molecular markers in crosses between diploid roses [J]. *Acta Horticulturae*, 1996, 424:249–252.
- [101] Debener T. Marker assisted selection for blackspot resistance in roses [J]. *Acta Hort*, 2001, 547:349–352.
- [102] Staub J E, Serquen F C, Gupta M. Genetic markers map construction and their application in plant breeding. *HortSciences*, 1996, 31(5):729–741.
- [103] Debener T. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99:891–899.
- [104] Grattapaglia D, Sederoff R R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo – testcross: mapping strategy and RAPD markers [J]. *Genetics*, 1994, 137:1121–1137.
- [105] Debener T, Mattiesch L, Vosman B. A molecular marker map for roses [J]. *Acta Hort*, 2001, 547:2830287.
- [106] Crespel L, Chirrollet M, Durel C E, et al. Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105:1207–1214.
- [107] Dugo M L, Satovic Z, Millan T, et al. Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(3):511–520.
- [108] Linde M, Hattendorf A, Kaufmann H, et al. Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113:1081–1092.
- [109] 周青. 高通 SSR 标记开发及二倍体月季分子连锁图谱构建 [D]. 武汉:华中农业大学, 2014.
- [110] Rajapakse S, Byrne D H, Zhang L, et al. Two genetic linkage maps of tetraploid roses [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103:575–583.
- [111] Zhang L H, Yme D H, Ballard R E. Microsatellite marker development in rose and its application in tetraploid mapping [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2006, 131(3):380–387.
- [112] 于超. 四倍体月季遗传连锁图谱的构建及部分观赏性状的 QTLs 分析 [D]. 北京:北京林业大学, 2015.
- [113] 宋兆强,刘艳,王宝祥,等. 稻瘟病抗性基因 *Pi-ta*、*Pi-b*、*Pi54* 和 *Pi-km* 的育种利用价值评价 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5):968–974.
- [114] 张文龙,陈志伟,杨文鹏,等. 分子标记辅助选择技术及其在作物育种上的应用研究 [J]. 种子, 2008, 27(4):39–43.
- [115] 冯慧,卜燕华,戴思兰,等. 月季抗黑斑病育种研究进展 [J]. 江西农业学报, 2013, 25(4):34–37.