

杨德翠. 牡丹红斑病抗性鉴定方法研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 168-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.048

牡丹红斑病抗性鉴定方法研究

杨德翠

(青岛农业大学生命科学学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要: 红斑病是牡丹上一种普遍发生的病害, 但不同品种抗病性不同, 合适的鉴定方法将为抗病品种的准确筛选提供保障。选用抗性品种鲁荷红和感病品种赵粉作为试验材料, 对牡丹离体叶片接种和活体植株接种病原菌进行抗病性鉴定。同时, 对患病牡丹丙二醛(MDA)和过氧化氢(H₂O₂)含量进行测定。结果发现: 离体接种试验中, 鲁荷红和赵粉在选用的 3 个菌液浓度下病情指数均有显著差异, 与活体接种时得出的结论一致, 这表明离体鉴定方法可行。此外, 与对照相比, 牡丹感染红斑病后体内 MDA 和 H₂O₂ 含量均升高, 其中感病品种赵粉含量均显著高于抗病鲁荷红, 说明红斑病抗感品种生理上存在着差异。

关键词: 牡丹; 红斑病; 离体鉴定; 抗病性鉴定

中图分类号: S432.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0168-03

牡丹雍容华贵, 深受我国人民的喜爱。不但具有极高的经济价值, 也有较高的药用价值, 而且牡丹籽含油量和营养价值极高, 是一种理想的油料资源, 近年来栽培面积不断扩大^[1]。然而, 由于管理的粗放, 其病害程度逐年加重。其中发生普遍和危害严重的病害有 3 种: 红斑病、根腐病、根结线虫病^[2]。牡丹红斑病也称霉病、轮斑病, 是由牡丹枝孢霉菌(*Cladosporium paeoniae* Pass.) 引起的, 是牡丹发生最为普遍的病害之一。红斑病是一种叶部病害, 发病程度可因品种和地块的不同而不同。如在山东菏泽地区, 有高达 80% 以上的牡丹园病害发生率在 50% 左右, 且重病园发病率甚至在 90% 以上^[3-4]。受害植株光合速率降低、光合机构破坏、抗氧化酶活性发生变化^[5-6]。从外部表现看, 受害牡丹生长势差、丹皮、苗木产量低, 花色衰退, 严重时甚至死亡, 严重阻碍了牡丹产业化发展。

但不同牡丹品种抗病性不同, 为了合理利用牡丹的抗病资源, 达到控制病害的目的, 需要有效地鉴定出抗病性强的品种, 而合适的抗性鉴定方法是筛选抗性品种的保障。本试验研究抗性品种鲁荷红与感病品种赵粉离体和活体的抗病性鉴定方法, 旨在为牡丹红斑病的快速鉴定及抗病机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年秋天从菏泽采购的 2 个牡丹品种鲁荷红与赵粉移栽上盆, 花盆规格 45 cm × 32 cm, 花盆埋于大田越冬。2014 年 3 月中旬移入温室, 温室温度 20 ~ 30 ℃。常规浇水施肥管理, 植株生长正常。

1.2 试验材料培养的处理牡丹枝孢霉菌分离和培养

收稿日期: 2015-01-29

基金项目: 青岛农业大学高层次人才启动基金(编号: 631413)。

作者简介: 杨德翠(1974—), 女, 博士, 讲师, 从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail: decuiyang@163.com。

病原菌 *C. paeoniae* Pass. 来自青岛农业大学生理实验室从病叶上用组织分离法分离并鉴定的菌种。在 PDA 培养基上培养, 25 ℃ 黑暗培养 10 d, 待菌落长满培养皿时, 用无菌水冲洗培养皿, 用超声波将病原孢子散开, 分别配成浓度为 5.0 × 10⁴、2.0 × 10⁵、5.0 × 10⁵、3.5 × 10⁶ 孢子/mL 的菌液, 分别进行离体叶片和活体植株的接种。

1.3 抗病性鉴定的处理方法

离体叶片接种法: 选取鲁荷红与赵粉的枝条顶部的第 2 张、第 3 张, 叶片以 0.1% HgCl₂ 灭菌 8 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 遍, 用无菌滤纸将水分吸干。分 3 个处理, 处理 1 菌液孢子浓度为 5.0 × 10⁴ 个/mL; 处理 2 菌液孢子浓度为 2.0 × 10⁵ 个/mL; 处理 3 菌液孢子浓度为 5.0 × 10⁵ 个/mL。处理时将菌液 40 μL 滴至叶片表面, 在铺有无菌湿滤纸的培养皿中保湿, 每处理均为 50 张叶。以无菌水处理叶片作对照, 喷雾保湿。观察离体发病情况, 10 d 后统计病情指数。

活体接种法: 选取鲁荷红与赵粉长势一致的植株, 用喷雾法将 3.5 × 10⁶ 个孢子/mL 菌液喷于叶子的正反面至滴水, 对照用蒸馏水代替。参照吴玉柱等的方法^[7], 利用喷雾器喷雾保湿 3 d, 并保持温室空气湿度达 80% ~ 90%。分别于处理后的 20 d 统计 2 个品种的发病率。

1.2 牡丹病害病级鉴定标准

1.2.1 活体鉴定标准 对牡丹活体喷施处理 20 d 进行统计, 病状分级标准见表 1。

表 1 牡丹红斑病活体鉴定标准^[2]

病级	标准	级别代值
零级病害	无任何斑点	0
1 级病害	≤5 个小斑点	1
2 级病害	6 ~ 10 个小斑点	2
3 级病害	11 ~ 20 个小斑点	3
4 级病害	>20 小斑点	4

染病指数(%) = Σ(各级病株数 × 各级别代表值) / (调查总株数 × 最大级别代值)。

1.2.2 离体鉴定标准 将牡丹红斑病进行人工离体鉴定, 按

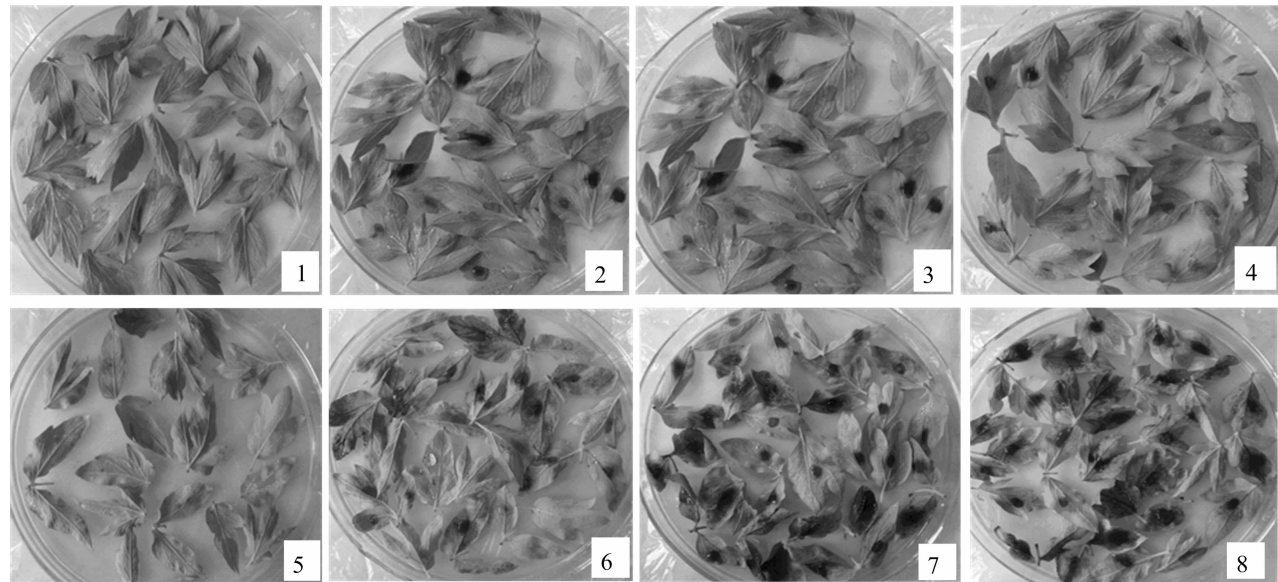
照 5 级分级方法,将病级记录。然后根据公式算出病情指数,本试验发病情况调查分为 0、1、2、3、4、5 级(表 2)。

表 2 牡丹红斑病离体鉴定标准

病级	病斑面积/叶片面积 (%)	级别代值
0	0	0
1	0~5	1
2	6~25	2
3	26~50	3
4	51~75	4
5	>75	5

染病指数(%) = Σ (各级病叶数 × 各级别代表值)/(调查总叶数 × 最大级别代值)。

1.2.3 丙二醛(MDA)和过氧化氢(H₂O₂)含量的测定 取活体处理 20 d 的牡丹枝条顶部第 2 张、第 3 张叶片进行 MDA 和 H₂O₂ 含量的测定,方法均参照文献[8],重复 3 次。



1—鲁荷红对照; 2—浓度1处理鲁荷红; 3—浓度2处理鲁荷红; 4—浓度3处理鲁荷红; 5—赵粉对照; 6—浓度1处理赵粉; 7—浓度2处赵粉; 8—浓度3处理赵粉

图1 鲁荷红与赵粉叶片离体病原菌处理发病症状

表 3 牡丹叶片离体鉴定病情指数

品种	菌液浓度(CFU/mL)	病情指数(%)
鲁荷红	5×10^4	3.1
	2×10^5	16.7
	5×10^5	18.5
赵粉	5×10^4	32.3
	2×10^5	46.4
	5×10^5	52.7

2.2 牡丹植株活体处理发病统计

对鲁荷红和赵粉植株进行病原菌液喷施,保湿 3 d 后,赵粉叶正、反面出现绿色针头状小点,5 d 时有病斑,而鲁荷红 10 d 时偶有小斑出现。30 d 左右时,可扩展成 10~25 mm 大小的病斑,呈紫红色,大多数病斑有明显的同心轮纹,近圆形,最后病斑枯连成片(表 4)。

2.3 牡丹枝孢霉菌侵染过程中 MDA 和 H₂O₂ 含量变化

MDA 是细胞膜脂过氧化的重要产物,MDA 的产生又可

数据使用 Excel 处理,用 SAS 8.1 数据处理软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 牡丹离体鉴定结果

离体叶片发病初期,叶正、反面出现绿色针头状小点,后变为水渍状圆点,发病时呈现出褐色病斑,严重时发病处变为黑色,病斑扩展迅速,相连成片,并伴有霉味。鲁荷红和赵粉的对照均没表现出发病症状,但 2 个品种在病原菌处理下均有不同程度的发病表现。在浓度为 5×10^4 孢子/mL 处理中,鲁荷红发病非常轻,而在 2×10^5 、 5×10^5 孢子/mL 处理下症状明显。赵粉在 3 个浓度下均表现出明显的病害症状,在所有浓度下病害症状均比鲁荷红重(图 1)。随着处理浓度的增大,鲁荷红和赵粉病情指数均升高,但赵粉病情指数高于鲁荷红,说明在离体处理的过程中,所使用的鉴定方法和选用的病原菌浓度是合适的(表 3)。

表 4 牡丹植株活体鉴定病情指数

品种	病叶数(张)	染病指数(%)
赵粉	87	56.6
鲁荷红	55	24.8

引起酶的变性和膜的损伤,会导致膜结构破坏,使膜透性增大,其含量高低可反映植物的受害程度。鲁荷红和赵粉在枝孢霉菌侵染 20 d 后,2 种牡丹染病后 MDA 含量均高于相应对照组,其中鲁荷红比对照 MDA 高 50%、赵粉比对照高 84.6%(图 2),表明 MDA 含量的升高反映出受伤害的程度。牡丹植株受侵染后 H₂O₂ 的含量变化规律与 MDA 相似(图 3)。由此可以判断,病原菌侵染后,MDA 和 H₂O₂ 含量升高,对细胞膜造成过氧化作用,膜受伤害。

4 讨论

牡丹不同品种对红斑病的抗性不同,为了充分利用牡丹

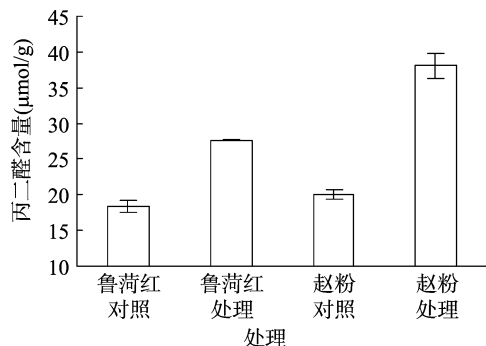
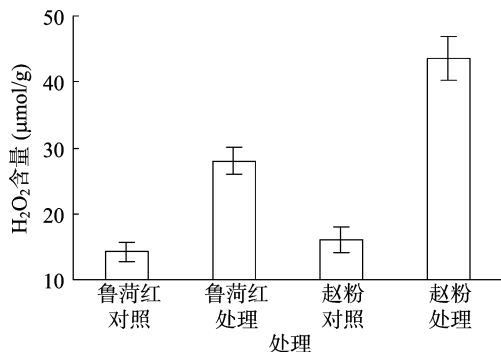


图2 牡丹枝霉菌侵染过程中MDA含量变化

图3 牡丹枝霉菌侵染过程中H₂O₂含量变化

自身的抗病性,就要充分筛选抗病性品种进行研究,发掘抗病资源。由于离体鉴定法具有快速、节省空间等优点,因此建立合适的离体鉴定方法对筛选抗性品种非常重要。

本研究选用对红斑病抗性较强的鲁荷红和抗性较弱的赵粉作为试验材料^[2,9],通过离体叶片接种病原菌和活体植株喷施病原菌,调查病情指数的大小来反映抗病性强弱。本试验结果表明,在浓度为 5×10^4 、 2×10^5 、 5×10^5 孢子/mL处理下2个品种表现出明显差异,与活体鉴定中得出的结论一致,这说明离体鉴定所选择的浓度范围是合适的,也说明离体鉴定方法的可行性。在其他一些物种中也有离体与活体鉴定结果一致的报道,如赵志祥对水稻抗瘟性离体鉴定结果与常规的活体鉴定结果高度一致^[11],黄振涛等报道小麦品种在抗秆锈病的离体鉴定方法与活体鉴定结论一致^[12]。然而,宋维富等发现小麦秆锈病离体与活体鉴定在个别品种上不完全一致^[13]。

在受病原菌侵染后,抗感品种的生理生化大部分具有差异。余文英等在甘薯抗疮痂病的研究中发现,感病品种的MDA上升幅度远高于抗病品种^[14]。本研究中受枝孢霉菌侵染的牡丹叶片中无论是MDA还是H₂O₂的含量,赵粉均显著高于鲁荷红。在牡丹藏枝红受病原菌 *Cylindrocladium cana-*

dense 侵染后也观察到MDA和H₂O₂的含量升高的现象。柯玉琴等^[15]在研究烟草青枯病的MDA和H₂O₂含量时结果相似。然而江彤等研究却表明,在接种病原菌后抗性强的烟草品种MDA含量明显高于感病品种^[14],这也许与寄主和病原的不同以及取材时间的不同有关系。

本研究中创建了牡丹红斑病的离体叶片鉴定法,在便于控制环境的条件下方便地鉴定品种抗红斑病的强弱,而且感病后MDA含量的变化也可作为抗病性强弱的参考,因此本研究结果可为牡丹抗病性的鉴定和抗病品种的筛选提供参考。

参考文献:

- [1] 周海梅,马锦琦,苗春雨,等. 牡丹籽油的理化指标和脂肪酸成分分析[J]. 中国油脂,2009,34(7):72-74.
- [2] 段瑛瑜. 菏泽地区牡丹病害调查和控制技术研究[D]. 南京:南京林业大学,2008:4-9.
- [3] 李丽. 山东地区芍药病害调查及主要真菌性病害的病原鉴定[D]. 泰安:山东农业大学,2014:12-14.
- [4] 吴玉柱,季延平,刘 慇,等. 牡丹红斑病的研究[J]. 林业科学,2005,18(6):711-716.
- [5] 杨德翠,刘 超,盖树鹏,等. 牡丹柱枝孢叶斑病(*Cylindrocladium canadense*)对叶片光合系统功能的影响[J]. 园艺学报,2013,40(3):515-522.
- [6] 杨德翠,郑国生. 柱枝孢叶斑病侵染对牡丹生理特性的影响[J]. 北方园艺,2014(1):57-61.
- [7] 吴玉柱,季延平,刘 慇,等. 牡丹红斑病发病规律的观察[J]. 中国森林病虫,2004,23(5):6-10.
- [8] 郝再彬,苍 晶,徐 仲. 植物生理实验技术[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,2002:202-212.
- [9] 薛 杰,郭 霞,马书燕,等. 菏泽牡丹主要病害的发生与防治[J]. 林业实用技术,2005(4):26-28.
- [10] 高智谋,程家高,凌云波,等. 牡丹(丹皮)病害的发生规律及其综合防治措施[J]. 安徽农业科学,2005,33(4):585-586,590.
- [11] 赵志祥. 水稻抗瘟性鉴定及稻瘟菌粗提物对水稻愈伤组织的影响[D]. 长沙:湖南农业大学,2007:26-33.
- [12] 黄振涛,姚 平,吴友三. 全国二十三个省、自治区小麦秆锈菌生理小种区系消长研究[J]. 辽宁农业科学,1986(3):21-26.
- [13] 宋维富,辛文利,曹远银,等. 小麦品种苗期秆锈病抗性离体及活体鉴定方法比较[J]. 黑龙江农业科学,2010(12):60-61.
- [14] 余文英,潘廷国,柯玉琴,等. 甘薯抗疮痂病的活性氧代谢研究[J]. 河南科技大学学报:农学版,2003,23(3):1-6.
- [15] 柯玉琴,潘廷国,方树民. 青枯菌侵染对烟草叶片H₂O₂代谢、叶绿素荧光参数的影响及其与抗病性的关系[J]. 中国生态农业学报,2002,10(2):36-39.