

调 查 研 究

Investigations

软枣猕猴桃种质资源溃疡病抗性 鉴定方法的建立与评价

温 欣¹, 秦红艳¹, 艾 军^{1,2*}, 王 月¹, 韩先焱¹, 李昌禹¹

(1. 中国农业科学院特产研究所, 长春 130112; 2. 吉林农业大学园艺学院, 长春 130118)

摘要 以 51 份软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* 种质资源为材料, 以中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch ‘红阳’、美味猕猴桃 *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* ‘徐香’为对照, 利用丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* PSAM228 对软枣猕猴桃离体枝条和叶片进行人工接种和溃疡病抗性评价。结果表明, 不同年份半木质化离体枝条接种后的感病结果基本一致并达极显著相关水平, 相关系数为 0.935 9, 半木质化离体枝条接种可作为软枣猕猴桃溃疡病抗性鉴定的方法; 根据病情指数将软枣猕猴桃种质资源按感病程度分为高抗、中抗、感病、中感和高感 5 个级别, 其中高抗资源 33 份, 中抗资源 18 份, 没有感病、中感和高感级次的种质资源。

关键词 软枣猕猴桃; 抗性评价; 细菌性溃疡病

中图分类号: S 663 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019722

Establishment and evaluation of resistance identification method for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* disease in *Actinidia arguta* germplasm resources

WEN Xin¹, QIN Hongyan¹, AI Jun^{1,2*}, WANG Yue¹, HAN Xianyan¹, LI Changyu¹

(1. Specialty Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China;
2. College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract With 51 *Actinidia arguta* resources as tested materials, and *Actinidia chinensis* Planch ‘Hongyang’ and *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* ‘Xuxiang’ as control, the resistance of the resources to canker disease was evaluated by inoculating *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* PSAM228 on the branches and leaves of *Actinidia arguta* *in vitro*. The results showed that the infection in the inoculated branches were nearly the same in two years, which reached a very significant correlation level, with the correlation coefficient of 0.935 9. Therefore, inoculation of the *in vitro* branches could be used for identification and evaluation of the resistance to canker disease in *A. arguta*. According to the disease index, the level of the disease resistance was divided into five levels, that is highly resistant, moderately resistant, susceptible, moderately susceptible and highly susceptible. There are 33 highly resistant resources and 18 moderately resistant resources, while no susceptible, moderately susceptible and highly susceptible resources.

Key words *Actinidia arguta*; disease resistance evaluation; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* disease

猕猴桃溃疡病是由丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 引起的严重的细菌性病害^[1]。因其蔓延速度快、发病范围广

和致病性强等特点, 成为危害猕猴桃植株生长、限制猕猴桃产业发展的主要病害^[2-3]。病原菌主要从气孔、皮孔及伤口等孔口侵入, 危害树干、枝条、叶片及

收稿日期: 2019-12-27

修订日期: 2020-02-24

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610342020011); 国家自然科学基金(31870673); 吉林省科技发展计划(20170203006NY)

* 通信作者 E-mail: aijun1005@163.com

花,引起树体枝干溃烂,树势衰弱,叶片萎蔫和花器受损,严重的可致全园猕猴桃树体死亡^[4-5]。研究表明,猕猴桃不同种之间抗性不同,软枣猕猴桃 *Actinidia arguta*、毛花猕猴桃 *A. eriantha* Benth. 对溃疡病抗性明显强于中华猕猴桃 *A. chinensis* Planch 和美味猕猴桃 *A. chinensis* var. *deliciosa*,但具体的评价结果受环境和评价手段的不同而有所差异^[6]。软枣猕猴桃是猕猴桃属的落叶藤本植物,对溃疡病抗性较强,至今未见果园大面积发病现象。但软枣猕猴桃不同种质资源间是否存在差异,以及种内不同种质资源的抗性变异状况等方面未见报道。本试验以 51 份软枣猕猴桃种质资源为材料,以中华猕猴桃中的高感品种‘红阳’、美味猕猴桃中的中抗品种‘徐香’为对照,采用离体半木质化枝条接种和功能叶片接种进行抗病性评价,研究不同软枣猕猴桃种质资源对溃疡病的抗性,明确不同种质间的抗性差异,筛选抗病性较强的软枣猕猴桃种质,为提高猕猴桃抗病性及抗病品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物

51 份软枣猕猴桃资源均取自中国农业科学院特产研究所软枣猕猴桃资源圃。美味猕猴桃‘徐香’和中华猕猴桃‘红阳’为盆栽材料。选取健康、生长势中庸且均匀一致的半木质化枝条和功能叶片作为试验材料。

1.1.2 供试菌种

丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) 菌株 PSAM228 为强致病力菌株,为西北农林科技大学果树病害病原生物学及综合防治研究团队实验室保存,由西北农林科技大学高小宁老师所赠。

1.2 试验方法

1.2.1 PSAM228 的 GFPuv 标记

参照黄其玲等^[7]的方法,略有改进。采用 CaCl_2 转化法对 PSAM228 菌株进行绿色荧光蛋白(GFP)标记,标记的 PSAM228 菌株(后文称 GFPuv 标记菌株)可在 485 nm 紫外激发光下通过 535 nm 滤光片观察到溃疡病菌在离体材料中的侵染状态。

1.2.2 菌液最适培养时间筛选

用接种环蘸取 PSAM228 菌液在 NA 培养基上划线,然后置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中暗培养 2 d。挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 25°C 分别振荡培养 12、18 h 和 24 h。在设定的培养时间吸取菌液,稀释后在 NA 培养基上涂板,置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱暗培养 16 h 左右,用平板计数法计算菌液浓度。

1.2.3 人工接种和抗性评价

取软枣猕猴桃不同种质资源健康、生长势中庸且均匀一致的半木质化枝条和功能叶片,先后用蒸馏水和无菌水洗净备用。参考黄其玲^[8]的接种方法并结合本试验加以改进。

1.2.3.1 半木质化离体枝条接种

枝条采用刻伤接种方法。将枝条剪成约 15 cm 长,用无菌解剖刀横切一个小口深至木质部,滴加 $20 \mu\text{L}$ 菌液后附湿润的无菌棉保湿。2018 年采用没有 GFPuv 标记的 PSAM228 菌液;2019 年采用 GFPuv 标记的 PSAM228 菌液。

1.2.3.2 离体叶片接种

2018 年采用针刺叶片法接种。用无菌接种针在叶片上每隔 1 cm 刺一个小孔(避开叶脉),布满整个叶片,并均匀地涂上没有 GFPuv 标记的 PSAM228 菌液,将叶柄处用湿润的无菌棉包好。

1.2.3.3 离体叶脉接种

2019 年采用叶脉注射法接种。即用无菌注射器从叶片基部的叶柄处注入 GFPuv 标记的 PSAM228 菌液 $20 \mu\text{L}$ 。

上述接种方法使用的菌液浓度均为 10^8 cfu/mL 。每份资源分别接种 5 个枝条和 5 片叶片,重复 3 次,接菌后的枝条和叶片放入有湿润无菌滤纸的无菌培养皿中,在 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养,定期观察枝条韧皮部颜色变化和病斑长度、叶片病斑情况。接种后 21 d 调查发病情况,刮除枝条感病部位的表皮,分别测量半木质化枝条病斑长度、叶片病斑面积和病菌沿主叶脉发展的长度。离体叶脉接种的叶片在 485 nm 紫外光激发下,通过 535 nm 滤光片可观察到 GFPuv 标记菌株发出的荧光,通过荧光可方便地测量病菌延展长度。离体枝条和叶片感病情况分为 7 级,如表 1 所示。

病情指数 = $\sum(\text{病枝数} \times \text{病级值}) / (\text{调查总枝数} \times \text{最高级值}) \times 100$ 。

参照石志军等的方法^[5]通过病情指数确定抗性。评价标准为:高抗,病情指数 ≤ 10 ;中抗, $10 < \text{病}$

情指数≤30;感病,30<病情指数≤50;中感,50<病情指数≤70;高感,病情指数>70。

表 1 软枣猕猴桃种质资源抗溃疡病分级标准

Table 1 Standard grade of resistance of <i>Actinidia arguta</i> germplasm resources to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>			
级别代表值 Grade level	分级标准 Standard grade		
	枝条发病情况 Incidence of branch	叶片发病情况 Incidence of leaf	叶脉发病情况 Incidence of leaf vein
0	无明显症状	叶片无病斑	叶脉无感病现象
1	韧皮部仅在接种处变褐色,枝条病斑长度小于 1 cm	叶片有零星病斑,病斑面积小于 1 cm ²	病菌沿叶脉扩展距离小于 1.5 cm
3	枝条皮层组织变软,韧皮部变褐,枝条病斑长度在 1~3 cm(包括 1 cm)	叶片有少量病斑,病斑面积 1~2 cm ² (包括 1 cm ²)	病菌沿叶脉扩展距离 1.5~3.5 cm(包括 1.5 cm)
5	接种部位或皮孔向外溢出少量乳白色黏液,木质部变成褐色,枝条病斑长度在 3~5 cm(包括 3 cm)	叶片有中量病斑,病斑面积 2~3 cm ² (包括 2 cm ²)	病菌沿叶脉扩展距离 3.5~5.5 cm(包括 3.5 cm)
7	韧皮部腐烂,枝条病斑长度在 5 cm 以上(包括 5 cm)	叶片有大量病斑,病斑面积大于 3 cm ² (包括 3 cm ²)	病菌沿叶脉扩展距离大于 5.5 cm(包括 5.5 cm)

1.2.4 数据分析

应用 Excel 2013、SAS 9.2 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 菌液最适培养时间

利用平板计数法得到不同培养时间菌液的浓度,12 h 菌液浓度为 10⁷ cfu/mL 左右,18 h 菌液浓度为 10⁸ cfu/mL 左右,24 h 菌液浓度为 10⁹ cfu/mL 左右。接菌浓度以 10⁸ cfu/mL 为宜,因此 18 h 为较佳培养时间。

2.2 不同软枣猕猴桃种质资源抗性鉴定与评价

通过半木质化离体枝条和成熟叶片接种,可以看出不同抗性种质半木质化枝条发病后病斑大小有明显差异(图 1),在软枣猕猴桃种质中‘桓优 1 号’发病最严重,但病斑长度与中华猕猴桃‘红阳’病斑长度差别较大;部分种质对溃疡病接近免疫,基本无发病现象,如雌性品种‘苹绿’和雄性品种‘绿王’‘61-1’等。叶片针刺接种后 21 d 在接种部位可观察到病斑,且不同抗性种质病斑面积有差异。叶脉接种后发现有些叶片表面无明显发病现象,但在波长 485 nm 紫外光激发下,叶脉处可见明显的带有绿色荧光病菌侵染现象(图 2),且不同抗性种质资源叶脉发病情况有明显差异,说明使用荧光标记的菌液接种使试验结果更加准确。但在紫外光激发下,接种 GFPuv 标记的 PSAM228 菌液的半木质化离体枝条未能清晰看见绿色荧光,因此仍以测量半木质化枝条发病的病斑长度为测量指标。

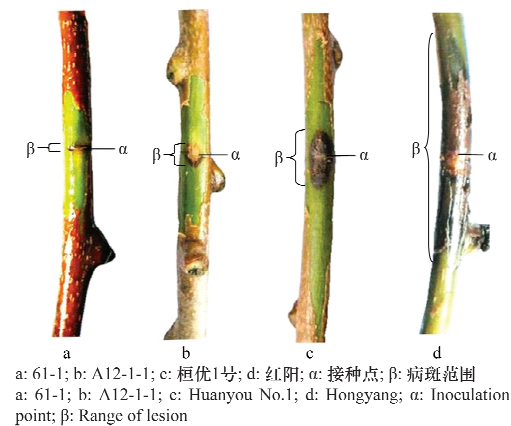
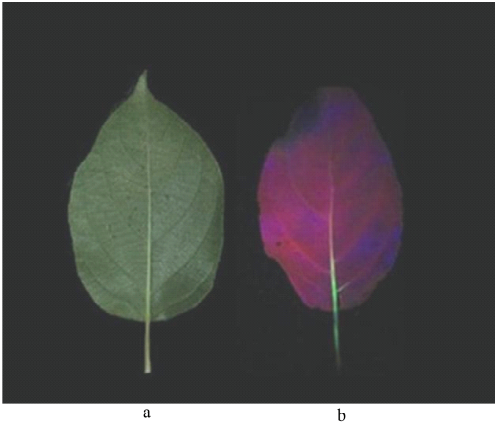


图 1 不同软枣猕猴桃种质资源和‘红阳’枝条接种丁香假单胞菌后感病情况

Fig. 1 Infection on branch of different *Actinidia arguta* germplasm resources and ‘Hongyang’ against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*



a: 自然光下拍摄发病症状不明显; b: 在波长485 nm紫外光激发下叶脉可见明显绿色荧光

a: The symptoms of the disease are not obvious under natural light shooting; b: Under the excitation of ultraviolet light with wavelength of 485 nm, the obvious green fluorescence can be seen in the vein

图 2 ‘见丰玫瑰’离体叶片叶脉接种 21 d 感病情况
Fig. 2 Symptoms on the leaves of ‘Jianfeng rose’ 21 days after vein inoculation in vitro

对半木质化离体枝条和成熟叶片发病情况统计结果(表 2)显示,不同种质资源之间感病程度存在差异,与猕猴桃高感品种‘红阳’和抗病品种‘徐香’相比,软枣猕猴桃种质资源整体对溃疡病抗性较强。差异显著性分析表明,‘桓优 1 号’与其他软枣猕猴桃溃疡病抗性差异显著。不同接种方法下软枣猕猴桃种

质病情指数的变异系数反映了群体溃疡病感病程度的差异,结果表明,半木质化离体枝条接种后软枣猕猴桃种质平均病情指数的变异系数为 61.27%,离体叶片针刺接种的变异系数为 129.84%,离体叶片叶脉接种的变异系数为 86.21%(表 3),软枣猕猴桃不同种质溃疡病抗性存在广泛变异。

表 2 连续两年枝条和叶片病情指数统计¹⁾
Table 2 Statistics of disease index of stems and leaves for two consecutive years

种质资源 Germplasm resource	病情指数 Disease index				
	2018 年枝条 Branch in 2018	2019 年枝条 Branch in 2019	两年枝条平均 Branch in two years	2018 年叶片 Leaf in 2018	2019 年叶脉 Vein in 2019
红阳 Hongyang	(73.42±9.74)a	(69.14±4.79)a	(71.28±3.02)a	(65.36±5.30)a	(71.42±1.02)a
徐香 Xuxiang	(28.57±1.00)b	(27.32±2.86)b	(27.95±0.62)b	(28.57±1.23)b	(33.33±2.82)b
桓优 1 号 Huanyou No. 1	(22.86±3.05)c	(23.65±1.42)c	(23.25±0.39)c	(0.00±0.00)n	(1.42±0.34)qr
佳园 Jiayuan	(17.53±1.83)de	(17.32±0.44)d	(17.43±0.10)d	(9.62±2.44)fghi	(15.01±1.18)fg
甜心宝 Tianxinbao	(18.57±1.54)d	(16.10±1.69)de	(17.34±1.23)d	(18.06±1.53)de	(25.87±1.04)c
见丰玫瑰 Jianfeng rose	(17.35±1.59)de	(16.35±1.58)de	(16.85±0.50)de	(17.14±0.87)e	(23.71±2.11)c
佳园 12 Jiayuan12	(16.57±2.44)efg	(15.57±1.06)e	(16.07±0.72)de	(0.00±0.00)n	(22.58±1.44)cd
丹凤 1 号 Danfeng No. 1	(13.09±1.48)hi	(17.52±3.15)cd	(15.31±2.21)ef	(8.67±0.63)ghij	(8.27±0.83)hijk
辽凤 1 号 Liaofeng No. 1	(17.81±4.93)de	(11.27±0.86)gh	(14.54±3.27)efg	(19.42±2.47)d	(6.86±0.60)klmn
A4-9-1	(14.29±1.51)fgh	—	(14.29±1.51)efg	(5.71±0.41)jk	—
A2-6-2	(14.29±0.84)fgh	(14.11±1.22)ef	(14.20±0.09)efg	(22.71±1.98)c	(11.42±0.88)h
A14-6-1	(17.14±1.00)def	(9.84±0.38)hij	(13.49±3.65)fgh	(7.32±0.93)hij	(20.11±1.40)de
A12-6-1	(12.94±1.19)hij	(13.84±2.35)efg	(13.39±0.45)fgh	(1.13±0.63)m	(9.50±0.27)hi
A12-1-1	(14.65±1.26)fgh	(11.52±1.77)gh	(13.09±1.56)fghi	(11.42±1.32)fg	(8.25±1.13)hijk
F1	(12.50±0.89)hij	(10.43±0.48)hi	(11.47±1.03)hij	(0.00±0.00)n	(14.57±2.24)fgh
T6-3-1	(12.60±1.01)hij	(9.42±1.14)hij	(11.01±1.59)hij	(0.00±0.00)n	(6.33±0.83)lmno
A14-11-2	(14.29±0.76)fgh	(7.37±3.75)jklmn	(10.83±3.46)hijk	(0.00±0.00)n	(8.29±0.37)hijk
T4-1-1	(11.43±1.03)hijk	(9.86±1.00)hij	(10.64±0.78)hijk	(6.48±1.06)ij	(7.43±1.20)jklm
瑞绿 Ruilü	(10.79±1.21)ijkl	(10.21±0.70)hi	(10.50±0.29)hijklm	(0.00±0.00)r	(6.39±0.77)lmno
T4-4-3	(15.37±2.01)fg	(4.77±0.66)no	(10.07±5.30)ijklm	(12.85±1.09)f	(17.14±1.27)ef
B8-6-2	(11.37±1.02)hijk	(8.19±1.46)ijkl	(9.78±1.59)jklmno	(1.07±0.13)m	(4.85±2.14)no
丰绿 Fenglü	(9.57±0.90)ijklm	(9.26±1.22)hijk	(9.42±0.15)jklmnop	(3.29±0.43)lm	(8.81±1.02)hij
A17-3-2	(9.32±0.46)ijklm	(9.03±1.59)hijk	(9.18±0.14)klmnop	—	(19.04±1.81)e
魁绿 Kuilü	(7.52±0.50)lmnop	(9.32±0.74)hijk	(8.42±0.90)lmnop	(5.32±1.02)jk	(2.78±0.62)pq
T9-9-3	(10.54±1.30)ijkl	(6.24±0.46)lmn	(8.39±2.15)mnopq	(0.00±0.00)n	(9.33±1.58)hi
龙城 2 号 Longcheng No. 2	(10.24±0.71)ijkl	(6.12±1.05)lmn	(8.18±2.06)nopqr	(1.84±0.36)m	(1.20±0.17)qr
A2-4-1	(8.14±1.46)klmnop	—	(8.14±1.46)nopqr	(0.00±0.00)n	—
B9-2-1	(8.57±2.33)klmno	(6.67±0.99)klmn	(7.62±0.95)pqrs	(0.00±0.00)n	(1.24±0.14)qr
A17-10-2	(7.46±1.15)lmnop	—	(7.46±1.15)pqrs	(1.26±0.16)m	(7.37±0.81)jklm
A14-7-1	(7.42±0.50)mnop	(6.59±0.85)klmn	(7.01±0.41)pqrst	(4.59±0.80)jkl	(8.06±1.08)hijk
T5-5-3	(9.19±2.29)ijklmn	(4.27±0.54)op	(6.73±2.46)pqrs	(1.80±0.55)m	(7.22±1.55)jklm
佳绿 Jialü	(9.27±1.02)ijklmn	(3.31±0.70)pq	(6.29±2.98)qrst	(0.00±0.00)n	(0.00±0.00)r
A17-1-1	(11.98±1.60)hijk	(0.00±0.00)s	(5.99±5.99)qrst	(9.44±0.85)fghij	(0.00±0.00)r
A16-7-1	(6.78±1.15)mnop	(5.01±0.62)no	(5.90±0.88)qrst	(1.72±0.24)m	(9.57±0.40)hi
亮枣 808 Liangzao 808	(9.08±1.17)jklmn	(2.45±0.54)qr	(5.77±3.31)rst	(15.14±1.14)ef	(1.13±0.18)qr
T4-2-3	(3.58±0.39)rst	(7.89±1.85)ijklm	(5.74±2.15)rst	(0.00±0.00)n	(1.92±0.78)qr
A16-9-1	(8.11±0.52)klmnop	(3.18±0.43)pq	(5.65±2.46)rst	(0.00±0.00)n	(8.53±1.35)hij
LH1402	(3.73±1.05)rst	(5.84±1.23)mno	(4.79±1.05)stu	(0.00±0.00)n	(7.56±0.57)ijkl
61-1	(5.71±0.65)opq	(3.74±0.56)opq	(4.73±0.98)stu	(0.00±0.00)n	(14.28±1.29)fgh
见丰 Jianfeng	(9.25±0.43)ijklmn	(0.00±0.00)s	(4.63±4.62)stu	(9.48±1.74)fghij	(0.00±0.00)r
婉绿 Wanlü	(6.32±0.78)mnopq	(2.58±0.31)qr	(4.45±1.87)stuv	(1.65±0.29)m	(0.00±0.00)r
馨绿 Xinlü	(4.14±0.42)qrs	(3.90±0.44)opq	(4.02±0.12)stuv	(0.00±0.00)n	(13.21±0.80)gh
T6-5-2	(5.40±1.06)opqr	(2.58±0.30)qr	(3.99±1.41)stuv	(6.18±0.95)ij	(0.00±0.00)r
苹绿 Pinglü	(7.32±0.29)mnop	(0.00±0.00)s	(3.66±3.66)tuv	(7.85±1.17)hij	(7.86±1.16)ijkl

续表 2 Table 2(Continued)

种质资源 Germplasm resource	病情指数 Disease index				
	2018 年枝条 Branch in 2018	2019 年枝条 Branch in 2019	两年枝条平均 Branch in two years	2018 年叶片 Leaf in 2018	2019 年叶脉 Vein in 2019
绿王 Lüwang	(4. 62±1. 24)pqrs	(2. 61±0. 45)qr	(3. 61±1. 00)tuv	(10. 28±1. 68)fgh	(8. 37±1. 29)hijk
T4-5-1	(6. 02±0. 75)nopq	(1. 04±0. 13)rs	(3. 53±2. 49)tuv	(0. 00±0. 00)r	(5. 28±0. 38)mno
B7-7-1	(0. 00±0. 00)v	(6. 93±1. 16)klmn	(3. 47±3. 46)tuv	(1. 15±0. 15)m	(9. 12±1. 07)hi
A14-4-2	(3. 27±0. 22)st	(2. 52±0. 33)qr	(2. 90±0. 37)uv	(19. 92±1. 54)d	(8. 04±0. 93)hijk
B6-5-2	(5. 71±1. 08)opqr	(0. 00±0. 00)s	(2. 86±2. 85)uv	(7. 14±0. 97)hij	(0. 00±0. 00)r
A13-8-1	(2. 86±0. 32)stu	(2. 74±0. 37)qr	(2. 80±0. 06)uv	(0. 00±0. 00)n	(0. 00±0. 00)r
T2-1-1	(2. 86±0. 40)stu	(0. 00±0. 00)s	(1. 43±1. 43)v	(1. 78±0. 18)m	(1. 29±0. 12)qr
B3-1-2	(1. 24±0. 34)uv	(1. 47±0. 29)rs	(1. 36±0. 11)v	(0. 00±0. 00)n	(4. 22±0. 79)op
大孤家 Dagujia	(2. 29±0. 21)stu	(0. 00±0. 00)s	(1. 15±1. 15)v	(0. 00±0. 00)n	(7. 46±0. 92)jklm

1) “—”表示无当年数据;同列数字后面的不同字母表示不同种质资源间差异显著($P<0.05$)。
“—” means no current year data. Different small letters in the same column indicate significant difference in different germplasm resources ($P<0.05$).

表 3 软枣猕猴桃种内溃疡病抗性变异

Table 3 Variation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia arguta*

接种方法 Inoculation method	病情指数 Disease index				变异系数/% Coefficient of variation
	平均值 Average	标准差 Standard deviation	最大值 Maximum value	最小值 Minimum value	
半木质化离体枝条接种 Cutting inoculation on semi lignified branches <i>in vitro</i>	8. 24	5. 05	23. 25	0. 01	61. 27
离体叶片针刺接种 Prick inoculation on leaves <i>in vitro</i>	4. 82	6. 26	22. 71	0	129. 84
离体叶脉接种 Injection inoculation on vein <i>in vitro</i>	7. 76	6. 69	25. 87	0	86. 21

2.3 不同接种方法的相关性分析

将不同接种方法获得的结果进行 Pearson 相关性分析,结果(表 4)表明,2018 年与 2019 年半木质化离体枝条病情指数呈显著正相关,相关系数 $r=0.935\ 9$;离体叶片接种和离体叶脉接种的病情指数也呈显著正相关,相关系数 $r=0.781\ 4$;离体叶片接种法与半木质化离体枝条接种法得到的结果也存在极显著正相

关关系。说明 3 种方法均可作为软枣猕猴桃种质资源溃疡病抗性的鉴定方法,半木质化离体枝条刻伤接种法得到的鉴定结果较为稳定,准确性较好。因猕猴桃溃疡病对植株危害较严重部位为枝条^[9],可以将离体枝条接种作为软枣猕猴桃溃疡病抗性鉴定的主要方法。叶片针刺接种和叶脉注射接种结果较为一致,可作为软枣猕猴桃溃疡病抗性鉴定的辅助方法。

表 4 不同接种评价方法之间病情指数相关性¹⁾

Table 4 Correlation of disease index between different inoculation evaluation methods

接种方式 Inoculation mode	S1	S2	L1	L2
S1	1			
S2	0. 935 9**	1		
L1	0. 813 3**	0. 758 3**	1	
L2	0. 853 5**	0. 848 2**	0. 781 4**	1

1) ** 表示两种接种方法接种的病情指数极显著正相关($P<0.01$);S1: 2018 年离体枝条刻伤接种;S2: 2019 年离体枝条刻伤接种;L1: 2018 年离体叶片针刺接种;L2: 2019 年离体叶片叶脉注射接种。
** indicate highly significant correlation between disease index obtained by two inoculation methods ($P<0.01$). S1: Cutting inoculation on branch *in vitro* in 2018; S2: Cutting inoculation on branch *in vitro* in 2019; L1: Prick inoculation on leaves *in vitro* in 2018; L2: Injection inoculation on leaf vein *in vitro* in 2019.

2.4 软枣猕猴桃种质资源溃疡病抗性评价

由以上数据可以看出,虽然不同接种方法得到

的结果均极显著相关,但离体枝条接菌的鉴定结果较为稳定,且溃疡病在枝条上发病较为严重,因此本

试验选用离体枝条接菌作为软枣猕猴桃溃疡病种质资源抗性评价方法。根据病情指数计算公式和抗性评价标准,将所接种的 51 份软枣猕猴桃种质资源的

抗性进行评价,评价结果如表 5 所示,其中高抗资源 33 份,占 64.71%,中抗资源 18 份,占 35.29%,没有感病、中感和高感级次的资源。

表 5 种质资源抗性评价
Table 5 Resistance evaluation of germplasm resources

抗性评价 Resistance evaluation	抗性评价标准 Resistance evaluation criteria	种质资源 Germplasm resource	种 Species
高感 Highly susceptible	病情指数>70	红阳	中华猕猴桃
中感 Moderately susceptible	50<病情指数≤70	无	
感病 Susceptible	30<病情指数≤50	无	
中抗 Moderately resistant	10<病情指数≤30	徐香 恒优 1 号、甜心宝、佳园、见丰玫瑰、佳园 12、辽凤 1 号、丹凤 1 号、A4-9-1、A2-6-2、A14-6-1、A12-6-1、A12-1-1、F1、T6-3-1、A14-11-2、T4-1-1、瑞绿、T4-4-3	美味猕猴桃 软枣猕猴桃
高抗 Highly resistant	病情指数≤10	A17-1-1、T9-9-3、B8-6-2、佳绿、龙城 2 号、T4-5-1、A17-3-2、丰绿、T5-5-3、A14-7-1、B9-2-1、61-1、A2-4-1、A16-9-1、亮枣 808、B6-5-2、见丰、苹绿、T6-5-2、A13-8-1、A14-4-2、大孤家、LH1402、T4-2-3、魁绿、婉绿、A16-7-1、A17-10-2、馨绿、T2-1-1、B7-7-1、绿王、B3-1-2	软枣猕猴桃

3 讨论

田间鉴定是果树抗病性鉴定最直观的方法,田间鉴定易受气候、地理环境以及管理措施等多种因素的影响,鉴定结果往往并不一致,需要漫长的观察周期,且存在病原菌扩散的风险。实验室离体接种法因其安全、高效、接种条件可控等优点,在果树的抗病性鉴定中被广泛应用^[10-11]。本试验选取 51 份软枣猕猴桃种质资源,通过人工离体接种评价其对溃疡病抗性。结果表明,不同年份半木质化离体枝条接种的评价结果较为一致;2018 年离体叶片接种和 2019 年离体叶脉接种的评价结果呈显著正相关。崔丽红等^[12]发现猕猴桃种质离体叶片和枝条接种溃疡病菌后,两种接种方法虽发病时间和发病率明显不同,但抗性评价结果基本一致。但张慧琴等^[13]在猕猴桃溃疡病抗病性鉴定时认为叶片接菌的评价结果并不理想,并认为离体叶片抗性评价结果不能完全代表植株的抗病性。本试验结果显示离体枝条和叶片评价结果存在显著的相关性,但结合前人研究结果和溃疡病发病特点及易感染部位,在软枣猕猴桃溃疡病抗性评价方面使用枝条作为评价材料更合适。

GFP 作为标记基因具有检测方便、易于构建载体、无毒无害等特点,不仅可作为转基因植物和动物的筛选标记,且在跟踪观察微生物上有广泛应用^[14-15]。例如周莉娟^[16]用 GFP 标记拮抗菌 bc2000,通过其表达的绿色荧光来监测它在根际及

植物组织的定殖活动,以研究标记菌株的生物学特性及生防功能。在植物抗病性研究方面,孙洪宝等^[17]利用 GFP 标记西瓜枯萎病菌,研究枯萎病菌在西瓜抗、感寄主根系中侵染和定殖动态。本试验参考黄其玲等^[7]的方法,用带有 GFPuv 基因的菌液接种,可在 485 nm 紫外光激发下更准确地观察到目的菌在叶片中的侵染状态,从而提高植株抗性评价的准确性。但在 485 nm 紫外光激发下枝条的荧光不易观察到,故 GFP 标记菌株应用于枝条抗性评价方法需进一步研究。

猕猴桃细菌性溃疡病作为对猕猴桃产业危害最严重的病害目前还无有效的防治方法,一般采用无毒苗木建园、增强园区管理、提高树体抗性和药剂防治等手段抑制病害的发生^[18]。但总体而言选育抗病品种仍是解决猕猴桃溃疡病的最有效手段^[6,19],发掘抗病种质资源是猕猴桃抗病品种选育的基础和先决条件。本试验对 51 份软枣猕猴桃种质资源和对照品种‘红阳’‘徐香’进行离体枝条和叶片接种,结果表明,51 份软枣猕猴桃种质资源全部为抗病资源,其中高抗资源 33 份,中抗资源 18 份。众多研究结果显示中华猕猴桃‘红阳’为高感品种,美味猕猴桃‘徐香’为高抗品种^[5,10]。而在本评价系统中高抗品种‘徐香’比软枣猕猴桃感病性更强。软枣猕猴桃溃疡病抗性普遍高于中华猕猴桃‘红阳’和美味猕猴桃‘徐香’,与易盼盼、张迪^[10,20]等研究结果一致。软枣猕猴桃种质资源溃疡病抗性评价的结果表明,在高抗资源中也有某些软枣猕猴桃种质

对溃疡病接近免疫,如中国农业科学院特产研究所选育出的软枣猕猴桃雌性品种‘苹绿’和雄性品种‘绿王’等,作为溃疡病抗性品种选育的育种亲本有较大的利用潜力。

参考文献

[1] TAKIKAWA Y, SERIZAWA S, ICHIKAWA T, et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1989, 55(4): 437 - 444.

[2] 张国伟, 冯建海. 猕猴桃细菌性溃疡病现状及防治方法[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(16): 80 - 81.

[3] 方炎祖, 魏凯. 猕猴桃病虫害及其防治[M]. 第 2 版. 北京: 科学普及出版社, 1992.

[4] 陈炜, 刘宁娟, 张瑜萍, 等. 猕猴桃溃疡病综合防治[J]. 西北园艺, 2019(3): 56 - 57.

[5] 石志军, 张慧琴, 肖金平, 等. 不同猕猴桃品种对溃疡病抗性的评价[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(3): 752 - 759.

[6] 王发明, 莫光辉, 叶开玉, 等. 猕猴桃溃疡病抗性育种研究进展[J]. 广西植物, 2019, 39(12): 1729 - 1738.

[7] 黄其玲, 高小宁, 赵志博, 等. GFPuv 标记猕猴桃溃疡病菌的生物学特性及其在土壤、根系中的定殖[J]. 中国农业科学, 2013, 46(2): 282 - 291.

[8] 黄其玲. 应用 GFPuv 标记技术研究猕猴桃溃疡病菌在组织中的侵染扩展动态[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.

[9] 严菊, 全刚, 刘志, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病发生特点及防治

技术[J]. 耕作与栽培, 2017(3): 62 - 65.

[10] 易盼盼. 不同猕猴桃品种溃疡病抗性鉴定及抗性相关酶研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.

[11] 张美鑫, 翟立峰, 胡红菊, 等. 梨种质资源对腐烂病抗性的室内评价[J]. 园艺学报, 2014, 41(7): 1297 - 1306.

[12] 崔丽红, 高小宁, 张迪, 等. 湘西地区猕猴桃细菌性溃疡病抗性资源筛选及其抗性机理研究[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 158 - 164.

[13] 张慧琴, 毛雪琴, 肖金平, 等. 猕猴桃溃疡病病原菌分子鉴定与抗性材料初选[J]. 核农学报, 2014, 28(7): 1181 - 1187.

[14] CHALGIE M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994, 263(5148): 802 - 805.

[15] 汪恒英, 周守标, 常志州, 等. 绿色荧光蛋白(GFP)研究进展[J]. 生物技术, 2004(3): 70 - 72.

[16] 周莉娟. GFP 在南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)拮抗菌 *Alcaligenes faecalis* 研究中的应用[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.

[17] 孙洪宝, 吕桂云, 许勇, 等. 绿色荧光蛋白(GFP)标记的尖孢镰刀菌在西瓜抗、感寄主根系中侵染和定殖[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(8): 200 - 201.

[18] 刘健伟, 王勤红, 方寒寒, 等. 猕猴桃溃疡病发生规律及综合防治方法[J]. 现代园艺, 2019(7): 178 - 180.

[19] 王振荣, 高同春, 顾江涛, 等. 猕猴桃溃疡病防治研究[J]. 安徽农业科学, 1998(4): 61 - 63.

[20] 张迪. 猕猴桃不同品种对溃疡病的抗性评价及其抗性机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 178 页)

[64] FAO/WHO. 4. 15 Imidacloprid (206) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2002, Rome, 2002: 150 - 155.

[65] FAO/WHO. 5. 34 Spinetoram (233) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2017, Geneva, 2017: 375 - 376.

[66] FAO/WHO. Spinetoram (233) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2017, Geneva, 2017: 2100 - 2110.

[67] FAO/WHO. 5. 10 Fluzifop-*p*-butyl (283) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2016, Rome, 2016: 103 - 120.

[68] FAO/WHO. 4. 17 Fenpyroximate (192) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 1995, Geneva, 1995: 83 - 86.

[69] FAO/WHO. 5. 13 Haloxifop (194) and Haloxifop-*p* [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2009, Geneva, 2009: 165 - 170.

[70] FAO/WHO. 5. 19 Prothioconazole (232) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2008, Geneva,

2008: 265 - 292.

[71] FAO/WHO. 5. 36 Triflumizole (270) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2013, Geneva, 2013: 343 - 363.

[72] FAO/WHO. 5. 7 Dichlobenil (274) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2005, Geneva, 2005: 96 - 98.

[73] FAO/WHO. 5. 20 Pinoxaden (293) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2016, Rome, 2016: 336 - 346.

[74] FAO/WHO. 5. 9 Dithiocarbamates (105)/Mancozeb (050) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2014, Rome, 2014: 117 - 120.

[75] FAO/WHO. 4. 25 Propineb (105) [R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 2004, Rome, 2004: 185 - 194.

[76] FAO/WHO. 4. 24 Thiram (dithiocarbamates) (105)[R]// Report of joint FAO/WHO meeting on pesticide residue in 1996, Rome, 1996: 83 - 84.

(责任编辑: 杨明丽)