

杨树无性系抗灰斑病 离体培养的早期选择*

苏晓华 张绮纹 曾大鹏 张祝山 邢亚杰

摘要 用田间感病、中度感病和抗病的10个杨树无性系为材料进行离体培养,在培养皿中将杨树灰斑病菌接种在小叶上。结果表明:这些无性系对接种的病菌是敏感的;无性系间在抗病性上差异较大,并且感病程度与田间观测结果基本一致。田间抗病的1、2和3号组培苗经接种后均未发病,病菌菌丝也未侵入组织内部;中度感病的5、6号组培苗接种后出现少量黄褐色斑点;而重度感病的7、8、9和10号组培苗接种点产生了褐色坏死斑,幼苗枯黄。但也有例外,4号虽然在大田中度感病,组培苗接种后却未发病。

关键词 杨树、离体培养、杨树灰斑病、早期选择

杨树灰斑病(*Coryneum populinum* Bres.)是发生在杨树(小苗到大树)上的一种主要叶部病害。尤以幼苗、幼树被害严重。分布于我国河北、辽宁、吉林和黑龙江等省。该病能使叶片提早脱落,嫩梢枯死,或造成多顶苗。据调查,该病在东北三省发病率较高,如哈尔滨市植物园8年生小青杨(*Populus pseudo-simonii* Kitag.)发病率为100%,病情指数为61。3年生小叶杨(*P. simonii* Carr.)发病率与病情指数分别为100%和89^[1]。当前,鉴定杨树对灰斑病抗性的一般方法是在大田进行,至少要经2 a以上才能得到较为可靠的结果。为了缩短抗病品种选择时间,节约投资和试验占地,有必要探索新的可行性方法,以便能通过较少的幼苗进行早期抗性检验。

目前世界上进行抗性早期选择较新的方法是借助于离体培养手段。利用此方法对细菌性病原菌抗性选择报道较多^[2,3],但有关真菌性病原菌抗性报道非常少,尤其是真菌性灰斑病国内外尚未有过报道。为了探讨真菌性病原菌抗性早期选择,在离体培养条件下对组培植株进行接种,研究不同杨树无性系对灰斑病的抗性,以便为杨树抗病测定和抗病育种提供早期鉴定依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

辽宁省锦县是杨树灰斑病高发区,1991年,在该地区大凌河林场苗圃做了杨树不同无性系

1992-11-23收稿。

苏晓华助理研究员,张绮纹,曾大鹏(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091);张祝山 邢亚杰(辽宁省锦县大凌河林场)。

*本项研究为国际粮农组织(FAO)援助中国009项目研究内容之一。

承蒙意大利杨树研究所Prof. Arru. G. M.(阿鲁先生)及中国林业科学研究院林静芳先生指教,谨此致谢。

田间灰斑病发病测试。根据测试结果选择了重感、中感和抗病三种类型的10个无性系作为试验材料(表1)。

表1 杨树灰斑病田间调查结果

编号	无性系	发病率(%)	发病指数
1	<i>P. eur.</i> 'Imperial'	0	0
2	<i>P. eur.</i> 'N2136'	0	0
3	<i>P. eur.</i> 'N3016'	0	0
4	<i>P. eur.</i> '74/76'	30	10
5	<i>P. eur.</i> '109'	50	12.5
6	<i>P. del. cl.</i> 'Lux' × (<i>P. thcv.</i> × <i>P. nigra</i>)	30	6.0
7	锦县小钻	50	12.5
8	鞍山小钻	45	11.0
9	白城小钻7402	80	32.0
10	法库1号	100	39.0

1992年春,将表1中10个无性系在中国林科院苗圃进行扦插,把发病前抽出的新梢作为离体培养的外植体材料。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的培养 采用组培方法培养无菌苗。将从中国林科院苗圃采来的新梢用洗洁精洗净,自来水冲洗后,用0.1% HgCl_2 溶液快速冲洗两次,用重蒸馏水洗净,在70%乙醇溶液中浸2~3 min,后置于0.1% HgCl_2 溶液中10~13 min,用无菌水漂洗3次。将一部分嫩梢消毒后,在吲哚丁酸(IBA)50 ppm 溶液中浸沾一下,用刀将茎段切成1.5 cm 长带芽小段置于MS培养基中培养。待小苗长出2片叶子,转移到生根培养基中培养。生根培养基:MS+NAA0.02 mg/L+蔗糖25 g/L+琼脂6 g/L。光照培养每天16 h,培养温度25~28 °C。

1.2.2 病原菌的培养 杨树灰斑病由小钻杨(*P. simonii* × *P. pyramidalis*)上分离所得。经纯化,在马铃薯蔗糖琼脂培养基上培养10 d,产生分生孢子备用。

1.2.3 病菌接种方法 选各无性系生长平展的叶片用微滴管在叶片主脉两侧各滴一滴病菌孢子悬浮液(孢子浓度为 2×10^4 个/ml)。密封培养皿,放入培养箱中培养,温度为28 °C,湿度保持在95%以上。36 d后再移入人工气象器(LH-200-Rdc RDCT)中培养。每一无性系人工接种10株组培苗,另外5株苗滴加无菌水作为对照。

2 试验结果

利用光学显微镜和扫描电镜观察10个无性系组培苗人工接种灰斑病病菌,其结果与田间自然发病基本一致。经观察,这些无性系可以被成功地接上病菌(见图版I-1)。接种一周后,将培养皿中接病菌的叶片取出,采用徒手切片法在光学显微镜下观测叶表面和横切面病菌侵染情况,发现8号鞍山小钻和10号法库1号均有菌丝从气孔处侵入,其它无性系没有出现。3周后取样用扫描电镜继续观察,除1号、2号、3号和4号外,其它无性系均有菌丝进入组织内部(见图版I-2~4)。5周后打开培养皿将接种叶片冲洗净,在光学显微镜下观察接种点并进行评价;对照无病症;1号帝国杨、2号N2136杨、3号N3016杨和4号74

杨没有症状; 5号109杨和6号杂种杨均出现少量黄褐色斑点; 而7号锦县小钻、8号鞍山小钻、9号白城小钻和10号法库1号均出现锈褐色坏死大斑点。

通过不同接种时间(10月6日、10月31日)、不同接种浓度(2×10^4 个/ml、 2×10^2 个/ml)及不同保湿度(80%左右、95%左右)的对比试验得出: 前两者均无明显的差异, 而后者差异明显。湿度如低于90%根本不发病。德国 Kechel, H. G.^[4]等在培养皿中用细菌性黑斑病菌(*Xanthomonas populi*)在杨树4个标准无性系, 即 *P. brabantica* 和 *P. forndorf* (黑杨派), *P. columbia River* 和 *P. 255/63(19)* (青杨派)上接种也曾得出, 接种六周后不同接种时期之间根本没有可评价的差别。使用不同浓度的细菌悬浮液同样没有明显的差别, 两者的不同组合也根本没有导致可确切的反应偏离。

针对外植体茎段在培养室内因光照时间不足导致其休眠, 即茎段抽出新梢及生根后很快封顶, 叶片黄化并脱落等, 采用吲哚丁酸(IBA)处理外植体, 其抽梢和生根都快于未处理的茎段, 加快了无菌苗的繁殖过程。

3 讨 论

(1) 试验结果说明, 在供试的10个无性系中, 田间表现抗病的1、2、3号杨组育苗, 经接种均未发病, 病菌菌丝也未侵入组织内部。表现中度感病的5、6号杨, 其组育苗经接种后出现少量黄褐色斑点。表现重度感病的7、8、9、10号杨组育苗的接种点产生了褐色坏死斑, 甚至幼苗枯黄。这表明, 用组育苗人工接种的方法取得了与田间病情调查基本一致的结果。证明了利用离体培养方法对杨树灰斑病进行抗性早期测定是可行的。但也有例外, 4号74杨中度感病, 但组育苗接种后却未发病。

(2) 开展这项试验时间较短, 仅测定了10个无性系, 所以这种早期检验的结论尚需进一步的研究验证。假如这种早期检验适用性得到确认, 那么人们只要在实验室控制条件下, 用较少的时间就可进行对杨树灰斑病抗性的早期选择。这将使杨树良种很快地得以推广。

(3) 在杨树微繁中, 以往用外植体叶片或茎段经愈伤分化再产生无菌苗, 培养时间长。而采用 IBA 处理外植体带芽茎段, 可促进抽梢和生根, 直接形成无菌苗。Serres, R. 等^[6]对美国栗(*Castanea dentate*)幼苗也曾用生长素(IBA)处理, 促进生长, 也看到这种处理能提高植物微繁效果, 并有益于挑选出大量抗病植株。

参 考 文 献

- 1 鞠国柱. 杨树灰斑病. 见: 中国林业科学研究院编著. 中国森林病害. 北京: 中国林业出版社, 1984, 60~61.
- 2 Mezentseva O Y. Use of tissue and cell cultures in breeding for resistance to phytopathogens. *Selektsiyai i Semenovodstvo*, 1990, 59~62.
- 3 Janssen A. 利用组培法早期测定各杨树无性系对细菌性花叶病的抗性. Meeting of the IUFRO working Party, Hann. Munden, 1989, 176~184. 国外林业文摘, 1990, (4): 36.
- 4 Kechel H G, Boden E. Fruhdiagnose Von Resistenzeigenschaften Mit Hilfe der Gewebekultur. *All. Forestzeitsch*, 1988, (49): 1351~1354.
- 5 Serres R, Read P, Hackett W. Rooting of American chestnut Microclings. *Journal of Environmental Horticulture*, 1990, 8(2): 86~88.

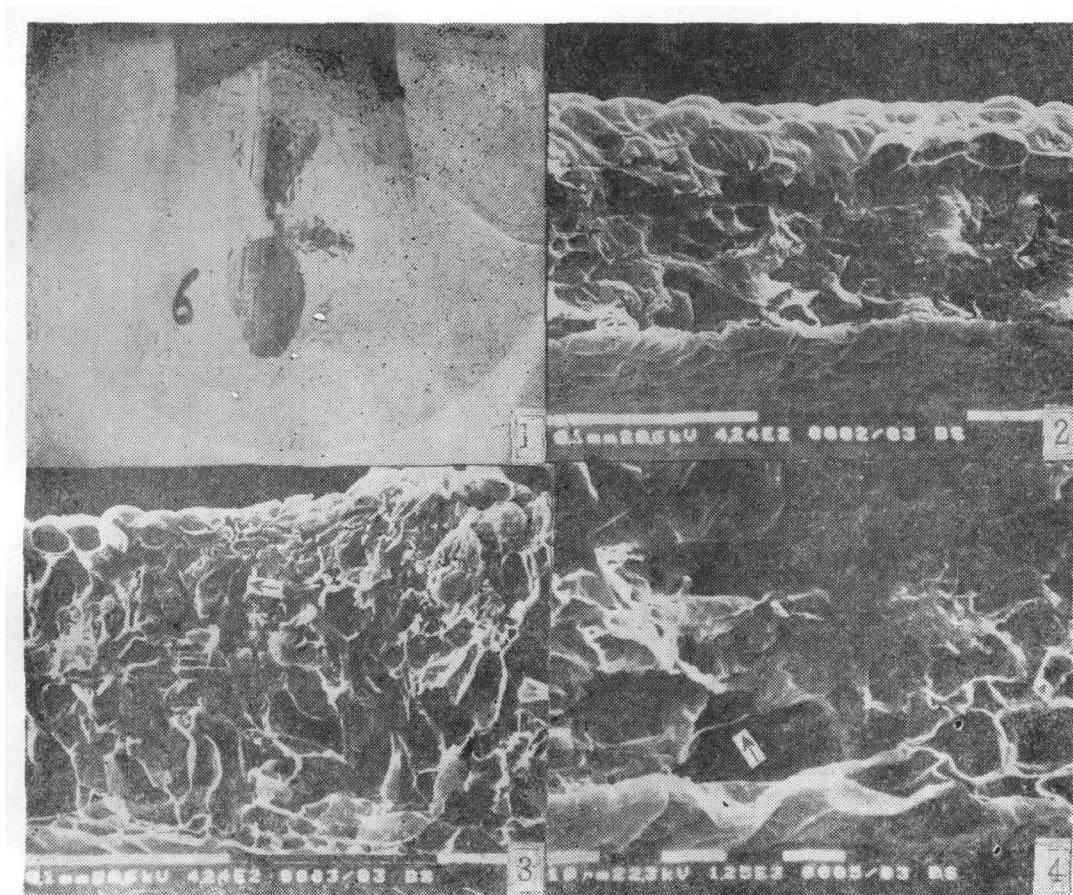
*Early Selection of Poplar Clones Resistant to
Coryneum populinum in Vitro Culture*

Su Xiaohua Zhang Qiwen Zeng Dapeng
Zhang Zhushan Xing Yajie

Abstract To explore the early selection method for Poplars to resist the infection of *Coryneum populinum* Bres., a study was conducted in the seriously infected nursery of Dalinghe Forest Farm, Jin County, Liaoning Province. According to the incidence rate and index, a total number of 10 Poplar clones of heavily-infected, medium-infected and resistant ones were selected for in vitro culture. In petri dishes, the spreading leaves of the tissue-cultured Poplar clones were selected for inoculation. A drop of the spore suspension with a concentration of 2×10^4 spores/ml was dropped at both sides of the main veins of the leaves. Electron microscope and scanning electro-microscope were used periodically to observe the changes of the leaves. The results show: ① these clones are sensitive to the inoculated fungus; ② there is a big difference in disease-resistance among the differing clones, and the infection degree is in accordance with that in the field. After inoculation the tissue cultured clones of resistant ones in the field No. 1, 2 and 3 are not infected and their hyphae don't invade the inner tissue of the leaves either. Those of the medium-infected clones: No. 5 and 6, after inoculation, appear a few yellowish-brown spots, while those of the heavily-infected clones: No. 7, 8, 9 and 10 after inoculation appear brown necrogenous spots, and the young saplings wither. This illustrates that it's possible to use in vitro culture method to conduct early testing for disease resistance.

Key words Poplar, in vitro culture, *Coryneum populinum*, early selection

Su Xiaohua, Assistant Professor, Zhang Qiwen, Zeng Dapeng (The Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091), Zhang Zhushan, Xing Yajie (Dalinghe Forest Farm of Jin County, Liaoning Province).



1. 6号杨最初接菌情况，
2. 1号杨接菌3周后横切面，无菌丝穿入；
3. 4、9号杨接菌3周后横切面，有菌丝穿入。