

抗松针褐斑病湿地松组培再生植株抗病性测定

程方^{1,2}, 叶建仁¹

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2 广东省惠州市惠城区生态公益林管理站, 广东 惠州 516001)

摘要: 采用松针褐斑病菌毒素处理湿地松瓶内组培苗和温室组培苗针叶, 采用苗圃组培苗人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液测定抗病性。结果表明: 湿地松不同家系间抗病性差异显著、同一家系不同无性系间抗病性差异也显著。湿地松瓶内组培苗各无性系抗病性强弱依次为 8#40, 8#2, 8#11, 32#3, 普通组培苗; 温室组培苗各无性系抗病性强弱依次为 32#7, 32#3, 普通组培苗。苗圃组培苗与实生苗间、组培苗不同代数间抗病性差异显著。单元回归分析表明, 瓶内测定结果与温室针叶测定结果的相关系数 $r^2 = 0.9997$ 、与苗圃接种孢子悬浮液测定结果的相关系数 $r^2 = 0.9588$ 。因此, 为了缩短选育时间, 减少成本, 一定程度上可以用瓶内抗病性测定替代室外抗病性测定。

关键词: 松针褐斑病; 湿地松; 再生植株; 抗病性测定

中图分类号: S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-0886(2018)01-0001-05

Determination of resistance to brown-spot needle blight on culture seeding of slash pine/CHENG Fang, et al. (Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forest University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Resistance of plant regeneration of *Pinus elliottii* treated by the toxin of *Lecanosticta acicola* in bottle and greenhouse and that after inoculating spore suspension of *L. acicola* in nursery were determined. The results showed that the disease resistance had significant differences among different families and among different clones of the same family. The strength order of resistance of clones in bottle were 8#40, 8#2, 8#11, 32#3, normal tissue culture, while the order in greenhouse were 32#7, 32#3, normal tissue culture. Differences of resistance between tissue culture and seedling and among different generations of tissue culture were significant. Simple regression analysis showed that the results in bottle were relevant to the results in greenhouse and nursery, and r^2 were 0.9997 and 0.9588 respectively. So in order to shorten the breeding time and reduce the costs, determination of disease resistance of the clones in bottle could be an alternative to outdoor resistance test to a certain extent.

Key words: brown-spot needle blight; slash pine (*Pinus elliottii*); plant regeneration; determination of disease resistance

松针褐斑病(*Lecanosticta acicola*)是一种重要的国内森林植物检疫对象,在我国湿地松 *Pinus elliottii* 林中普遍发生,严重影响了湿地松的推广应用。叶建仁等^[1]在福建官庄林场建立了抗病种子园,但是抗性种子产量有限,为加速湿地松优良材料的推广进程,该研究小组通过器官发生获得移栽成活的再生植株^[2-3]。植物的性状表现是基因型和环境综合作用的结果,经过人工培养的再生植株可能会出现变异,子代组培苗是否具有母株的优良抗病性,需要在组培苗生长后期进行抗病性测定。人工接种孢子悬浮液测定湿地松抗病性,需要组培再生

植株移至温室盆里或田间苗圃,而毒素检测,快捷方便;若用松针褐斑病菌毒素处理瓶内组培苗测定抗病性的结果与室外人工接种孢子悬浮液测定的结果具有相关性,则可以在瓶内测定组培苗抗病性,及时淘汰不良无性系,将会大大缩短抗病选育的时间。作者通过测定湿地松组培苗 3 个培育阶段抗病性,

收稿日期: 2016-04-05; 修回日期: 2017-10-31

基金项目: 国家林业局“948”项目“抗病松树组织培养规模化繁殖技术研究”(2011-4-69); 江苏高校优势学科资助项目

作者简介: 程方(1983—),女,四川长宁人,高级工程师,博士,研究方向森林保护学, E-mail: chf129@163.com

通信作者: 叶建仁,教授,博士生导师, E-mail: jrye@njfu.com.cn。

确定湿地松组培苗间的抗病性差异以及 3 个阶段的测定结果是否具有相关性, 以期为更早期筛选出湿地松组培苗优良抗病无性系提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试湿地松和松针褐斑病菌 南京林业大学抗病育种实验室的瓶内抗病组培苗 32#3、8#11、8#2、8#40, 普通组培苗; 温室湿地松抗病组培苗 32#3、32#7, 普通组培苗针叶; 2008 年 3 月移栽到南京林业大学南大山苗圃的湿地松组培苗和实生苗。湿地松组培苗均来自湿地松器官发生植株再生体系。南京林业大学森林病理研究组提供松针褐斑病菌。

1.1.2 松针褐斑病菌毒素 采用程方等^[4]的制备方法制备松针褐斑病菌毒素。

1.1.3 松针褐斑病菌孢子悬浮液 将松针褐斑病菌恒温 25℃ 下培养 16~20 d, 用 2% 蔗糖-灭菌水洗下分生孢子, 经两层粗纱布滤去杂物, 用血球计数板调节孢子悬浮液浓度至 3×10^7 个/mL 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 松针褐斑病菌毒素生测瓶内组培苗 采用程方等^[4]的毒素生测方法处理湿地松瓶内 32#3、8#11、8#2、8#40 和普通组培苗, 每处理 3 个重复, 每个重复 10 株苗。以培养基表面含不接菌的小麦浸提液转接普通组培苗为对照。

1.2.2 松针褐斑病菌毒素生测温室组培苗针叶 采用程方等^[4]的毒素生测方法处理湿地松温室 32#3、32#7 和一年生普通组培苗针叶, 每处理 3 个重复, 每个重复 15 根针叶。以不接菌的小麦浸提液接种普通组培苗针叶为对照。

1.2.3 苗圃组培苗人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液 用喷雾器将制备好的浓度为 3×10^7 个/mL 的松针褐斑病菌孢子悬浮液均匀喷在所选植株上, 至针叶开始有水流为止; 然后盖上塑料薄膜, 间歇向袋中喷清水保湿降温 5 d, 防止中午温度过高, 在接种植株上方搭建荫棚。以 2% 蔗糖无菌水为对照。每个处理 3 个重复, 每个重复 3~4 株苗。接种 45 d 统计感病率和感病指数。孢子悬浮液滴于凹面载玻片上分别置于苗圃薄膜棚内和室温下, 统计孢子萌发率分别约为 32% 和 27%。

1.3 感病率和感病指数统计 每天观察组培苗及针叶的发病情况; 当针叶开始发病、普遍发病时, 统计各无性系的感病指数和感病率。湿地松组培苗感

病分级标准^[5]见表 1, 针叶感病分级标准^[6]见表 2。试验结果数据采用 Excel 整理、SPSS 软件分析。

$$\text{感病指数} = \sum (\text{各级别代表值} \times \text{该级别株数}) \times 100 / \text{总株数} \times \text{发病最重级代表数值}$$

$$\text{感病率}(\%) = (\text{感病株数} / \text{接种株数}) \times 100$$

表 1 湿地松组培苗感病分级标准

级别	病害程度	代表值
I	无明显反应	0
II	针叶 1/4 以下出现症状	1
III	针叶 1/4 至 1/2 出现症状	2
IV	针叶 1/2 至 2/3 部分出现症状	3
V	针叶超过 2/3 部分出现症状	4

表 2 针叶感病分级标准

级别	病害程度	代表值
I	无病	0
II	病斑 1~5 个, 顶端未枯死; 或顶端枯死 1/4 以下, 病斑 5 个以下	1
III	病斑 6~10 个, 顶端未枯死; 或顶端枯死 1/4~1/2, 病斑 5 个以下	2
IV	病斑 11~15 个, 顶端未枯死; 或顶端枯死 1/4~1/2; 病斑 6~10 个; 或顶端枯死 1/2~3/4, 病斑 5 个以下	3
V	病斑 16 个以上, 顶端未枯死; 或顶端枯死 1/4~1/2, 病斑 11~15 个; 或顶端枯死 1/2~3/4, 病斑 6~10 个; 或顶端枯死 3/4 以上	4

2 结果与分析

2.1 湿地松瓶内组培苗的抗病性比较

2.1.1 不同家系间的抗病性比较 供试湿地松组培苗不同家系间抗病性差异显著, 抗病性强弱依次为 8#, 32#, 普通组培苗。普通组培苗的感病率和感病指数均明显高于两个抗病家系, 其中 8# 家系抗病性又明显高于 32#。感病率在 4, 7 d 时, 不同家系间差异分别都显著(图 1)。

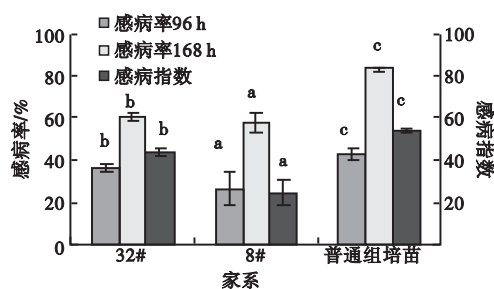


图 1 松针褐斑病菌毒素处理湿地松瓶内组培苗后的感病指数和感病率比较

2.1.2 同一家系不同无性系间的抗病性比较 湿地松瓶内组培苗同一家系不同无性系对毒素的反应差异明显, 不同无性系的抗病性差异显著。8# 的 3 个

无性系中,8#40 抗性最强,感病指数仅为 15,明显低于 8#11 的感病指数 30,比 8#2 的感病指数低 12.5。8#40 在 7 d 时感病率为 50%,比最高值 8#11 的感病率低了 12.5%,尽管 8#2 和 8#11 在初期的感病率差异不显著,但是在 7 d 时 8#40、8#2、8#11 的感病指数和感病率之间差异均分别显著($P < 0.05$) (图 2)。

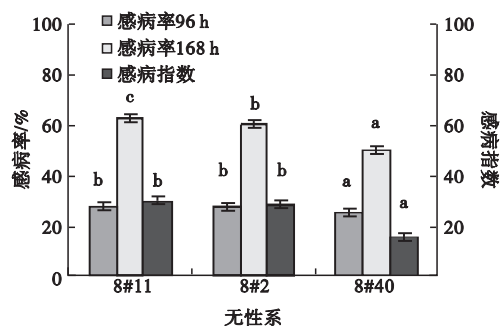


图2 松针褐斑病原菌毒素处理湿地松瓶内组培苗后同一家系的感病指数和感病率比较

2.1.3 所测无性系的抗病性比较 湿地松瓶内组培苗经松针褐斑病菌毒素处理后,4 个抗病无性系均比普通组培苗抗病性强,其中 8#40 抗性最强,第 7 天统计的感病指数仅为 15,感病率也低于普通组培苗 33.33%,各无性系抗病性强弱依次为 8#40,8#2,8#11,32#3,普通湿地松组培苗 (图 3,4,5)。

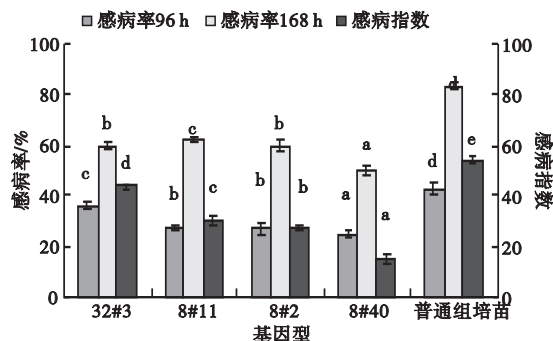


图3 松针褐斑病菌毒素处理湿地松瓶内组培苗后的感病指数和感病率比较

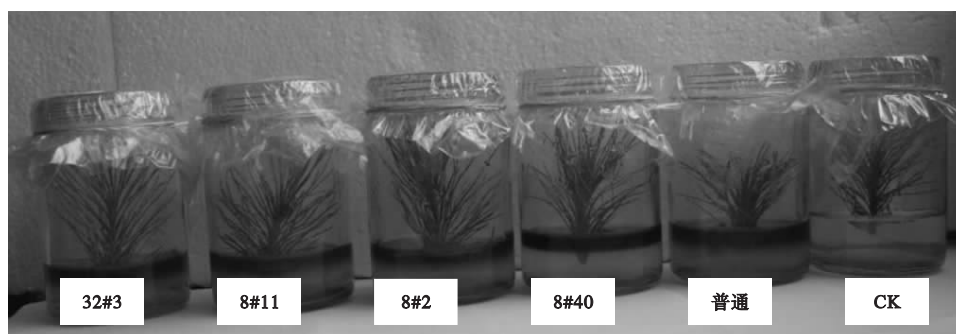


图4 松针褐斑病菌毒素处理湿地松瓶内组培苗前

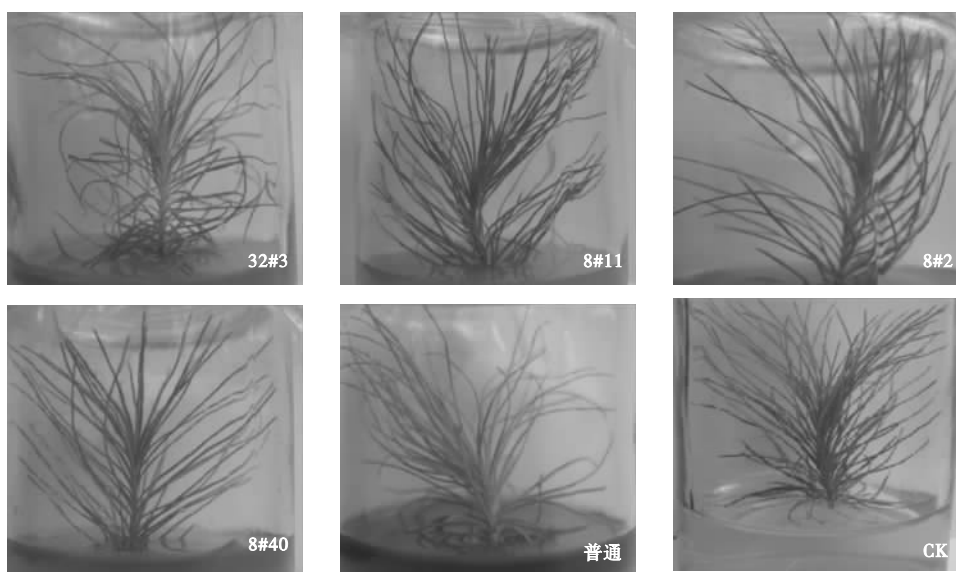


图5 松针褐斑病菌毒素处理湿地松瓶内组培苗第7天

2.2 湿地松温室组培苗不同无性系的抗病性比较 松针褐斑病菌毒素处理湿地松温室组培苗针叶 4 d 时,32#7 和 32#3 的感病率差异不显著,但在 7 d

时,32#7 感病率比 32#3 低 30%,且都明显高于普通组培苗,可见抗病性都显著高于普通组培苗 (图 6)。抗病性由强到弱为 32#7,32#3,普通组培苗。

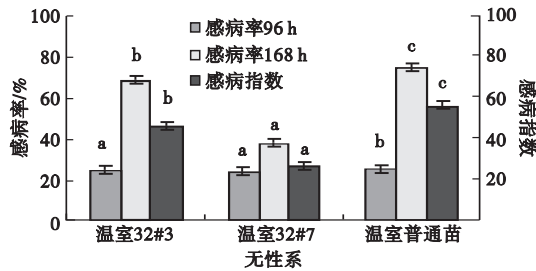


图6 松针褐斑病菌毒素处理温室湿地松组培苗针叶后不同无性系的感病率和感病指数

2.3 苗圃湿地松组培苗的抗病性比较

2.3.1 普通组培苗不同代数间的抗病性比较 人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液 20 d 时,普通组培苗 1~3 代有 2 株发现病斑,4~6 代有 2 株发病,有 1 株发病较重,7~9 代有 2 株发病。接种 45 d 时,普通组培苗 4~6 代、1~3 代均有 1 株基部发病严重,但是新叶未发病。普通组培苗 1~3 代、4~6 代

都对松针褐斑病孢子入侵反应迅速,但是 4~6 代在后期抗病性比 1~3 代强,感病指数及感病率都明显低于 1~3 代和 7~9 代;7~9 代尽管前期反应慢,但后期感病迅速,感病率达到了 100%,感病指数也高达 55.6,明显高于 1~3 代和 4~6 代。由此可知,普通组培苗 4~6 代的抗病性大于 1~3 代,大于 7~9 代(图 7,8)。

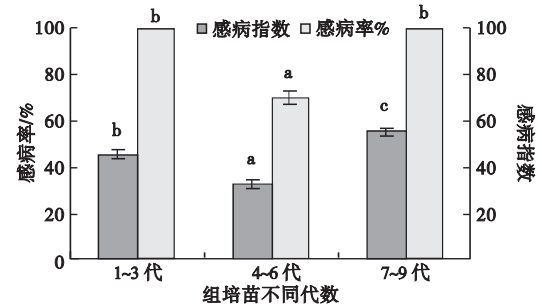


图7 苗圃普通湿地松组培苗不同代数间的感病指数和感病率比较

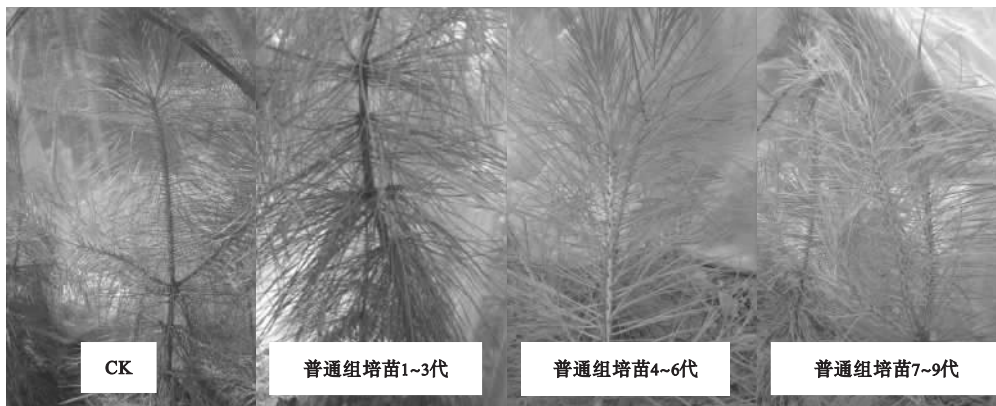
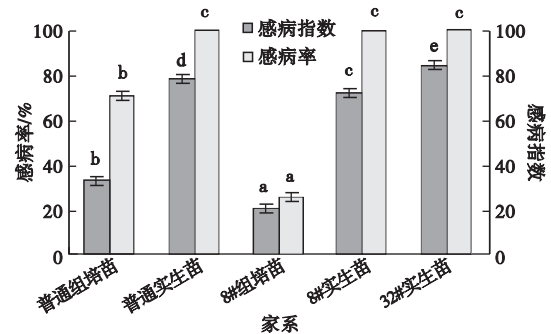


图8 苗圃湿地松普通组培苗人工接种孢子悬浮液 45 d 不同代数的感病情况

2.3.2 组培苗与实生苗间的抗病性比较 人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液 20 d 时,8#、32#家系实生苗没有表现出症状,普通实生苗个别有病斑,有 2 株苗各有 1 个病斑;45 d 时,实生苗无论是抗病的还是普通的,感病率均较高,32#家系实生苗有 6 株严重感病,8#家系实生苗和普通实生苗分别有 3 株感病严重;说明实生苗在接种前期比较耐病,发病比组培苗慢,但是在后期抗病性却不及组培苗。同期组培苗的抗病性大于实生苗,8#、32#、普通实生苗的感病率均达到了 100%,而普通组培苗只有 70%。抗病家系的组培苗与其他家系差异显著,感病率明显低于其他家系,仅为 25%。就感病指数分析,实生苗抗病性显著低于 8#抗病家系组培苗和普通组培苗(图 9,10)。各家系的抗病性强弱依次为 8#组培苗,普通组培苗,8#实生苗,普通实生苗,32#实生苗。

2.3.3 组培苗同一家系不同无性系的抗病性比较

人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液 20 d 时,8#8



有 1 株有少许病斑,8#4 有 2 株有少许病斑。同一家系不同无性系间抗病性差异显著,接种 45 d 时,8#4 只有 3 株感病,8#4 的其它植株均未感病或感病很轻,感病率仅为 12.5%,感病指数也仅为 3.1,属于高抗无性系。8#8 感病指数和感病率显著高于 8#4,但也分别仅为 9.38、37.5%,两者的抗病性都强于普通组培苗(图 11,12)。

图9 苗圃湿地松组培苗与实生苗的感病指数和感病率比较

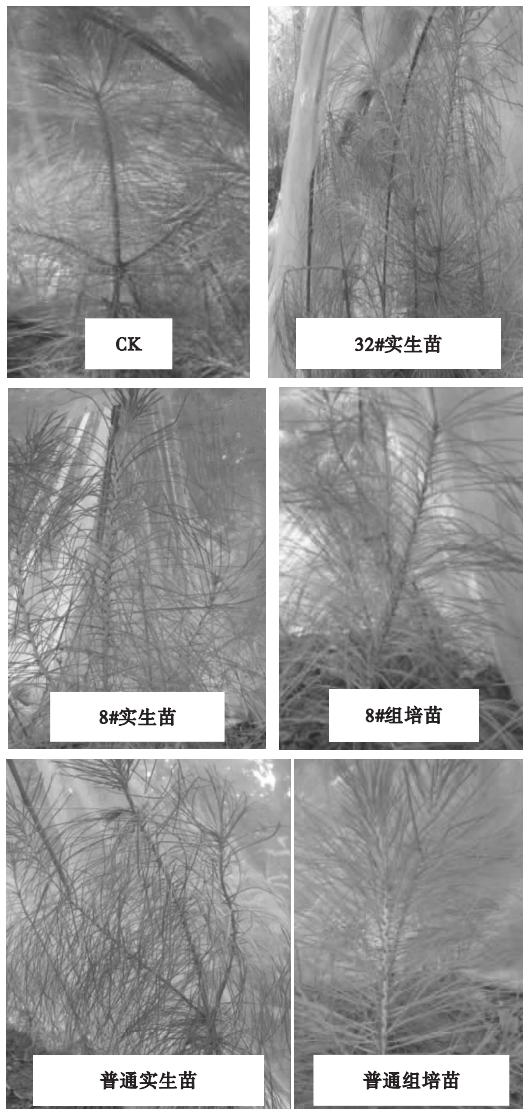


图 10 人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液 45 d 时苗圃湿地松组培苗与实生苗的感病情况

2.4 瓶内组培苗与温室苗圃组培苗抗病性测定结果的相关性 以瓶内湿地松组培苗毒素处理的感病指数为 X , 以温室湿地松组培苗针叶感病指数为 Y_1 , 通过对 CK、普通组培苗、32#3 的感病指数进行单元回归分析, 得回归方程: $Y_1 = 1.049X + 0.1055$, $r^2 = 0.9997$ 。以瓶内毒素处理的感病指数为 X , 以苗圃感病指数为 Y_2 , 通过对 CK、普通组培苗、8# 的感病指数进行单元回归分析, 得回归方程: $Y_2 = 0.5932X + 2.1248$, $r^2 = 0.9588$ 。说明瓶内组培苗的抗病性测定结果在一定程度上与室外的测定结果相关。

3 结论与讨论

强化抗病育种是发展集约人工林的迫切需要, 把育种目标转移到降低营林成本的抗性育种和材质改良方面, 保证人工林的生物学稳定性, 真正实现高

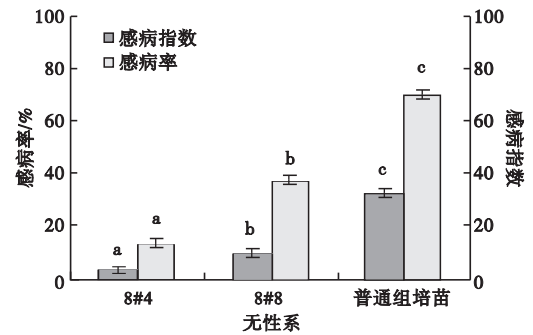


图 11 苗圃湿地松组培苗不同无性系的感病指数和感病率比较

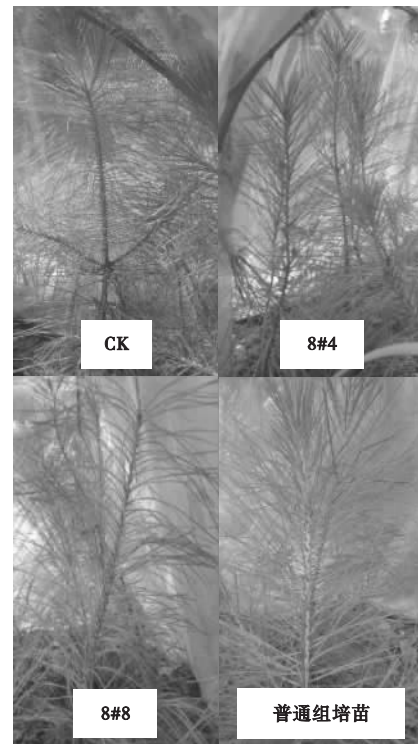


图 12 人工接种松针褐斑病菌孢子悬浮液 45 d 湿地松不同无性系的感病情况

产、优质和高效^[7]。抗病家系子代能否像亲本那样表现出高度的抗病性还得经子代抗病性测定才能确定。为准确评价某一材料的抗性, 不仅要用将来大批量造林地区的菌系接种该材料, 而且接种用菌系的取样也要充分^[7]。本研究的结果与安会翠等^[5]的研究结果一致, 不同家系的抗病性差异显著, 同一家系不同无性系的抗病性差异也显著, 组培苗代数不同抗病性也存在差异。蒋继宏等^[8]用松针褐斑病菌致病毒素处理不同抗性湿地松无性系针叶的结果与人工接种病原菌的结果存在高度相关, 14 种松树的抗病性测定也基本上能表达它们原来的抗病性。曾义^[9]用病原菌孢子人工接种和毒素粗提液生测的方法测定湿地松不同无性系的抗病性, 两种测定结果高度相关(相关系数 0.8), 说明用毒素进

(下转第 23 页)

结果表明:叶片被害率、受害叶片数与囊泡数均呈显著正相关,叶片被害率与囊泡数之间的相关程度较大($R^2=0.615$)。

根据国家林业局林业有害生物调查总则“LY/T2011—2012”危害程度分级标准,叶部害虫危害程度分级:叶片受害率% (x) $0 < x \leq 20$ 为轻度,叶片受害率% (x) $20 < x \leq 50$ 为中度,叶片受害率% (x) $x > 50$ 为重度^[6]。根据叶片被害率与囊泡数建立的线性回归方程,当叶片被害率为 20% 时,计算囊泡数为 1.2 个;当叶片被害率为 50% 时,计算囊泡数为 7.9 个。结合实际工作中监测调查情况及相关专家指导意见,参考依据线性回归方程计算所得不同被害率的囊泡数,可以提出当 $0 < \text{囊泡数} \leq 1$ 时为轻度发生; $1 < \text{囊泡数} \leq 6$ 时为中度发生;囊泡数 > 6 时为重度发生。

与以囊泡数作为榆跳象危害调查指标相比,直接统计叶片被害率具有不足之处。直接统计叶片被害率因调查人员不同而结果差异较大,由于榆跳象危害后的叶片呈孔洞状,孔洞数量从 1 个至数十个不等,是否被害及被害程度高低在于调查人员的主观判断。如果以标准枝上榆跳象成虫数量为统计指标,由于榆跳象成虫善跳跃,调查人员靠近时成虫极

易转移,利用成虫密度监测难度更大。而囊泡数量既可直接反映叶片被害程度,又可代表越冬成虫相对密度。将囊泡数作为调查指标,具有稳定性强、识别性高、操作简便、调查精度高的特点,且易于向基层推广应用,在榆跳象监测调查中有较高参考价值,但该结果与监测调查地块的选择以及监测调查人员的技术水平有关,其可靠性还需作进一步验证。

参考文献:

- [1] 司振海,邵吉祥,石用虎,等.榆跳象生物学特性观察与防治试验[J].河北林业科技,1997(2):9-11.
- [2] 李树忱,刘会波,王景昌,等.榆跳象发生与防治研究[J].森林病虫通讯,1984(3):14-15.
- [3] 王兆唐,陈元清.榆跳象研究初报[J].应用昆虫学报,1981(1):26-27.
- [4] 李晓燕.榆跳象生物学特性及防治[J].应用昆虫学报,1999(3):156-158.
- [5] 薛杰,郭霞,胡东升,等.榆跳象分布型及抽样技术的研究[J].林业科技开发,1990(2):33-36.
- [6] 全国植物检疫标准化技术委员会林业植物检疫分技术委员会.林业主要有害生物调查总则:LY/T 2011-2012, [S].北京:中国标准出版社,2012.

(责任编辑 王巧申)

(上接第 5 页)

行抗病性筛选有一定可靠性。在瓶内测定抗病性低的 32#3,温室针叶测定结果抗性也低,在瓶内测定抗病性强的 8#2 与戴培培^[10]在温室测定的结果,及本研究苗圃测定的结果一致,抗病性较强。通过单元回归分析表明湿地松组培苗在瓶内与温室、苗圃进行抗病性测定具有一定的相关性,相关系数 r^2 分别为 0.999 7 和 0.958 8,但是由于试验材料有限,数据有限,因而只能说在一定程度上可以用瓶内抗病性测定替代室外抗病性测定,要得到更为精确地相关性分析,还需要进行更多无性系的回归分析试验。

参考文献:

- [1] 叶建仁,韩正敏,李传道,等.湿地松抗褐斑病无性系种子园营建技术研究[J].南京林业大学学报(自然科学版),1991,15(2):23-29.
- [2] 何月秋.湿地松抗病家系组培繁殖技术研究[D].南京:南京林业大学,2003.

- [3] 朱丽华,张艺,吴小芹.湿地松的组织培养及植株再生[J].南京林业大学学报(自然科学版),2004,28(6):47-51.
- [4] 程方,叶建仁,刘戈,等.松针褐斑病菌毒素处理后湿地松组培苗 PAL、PPO、SOD 活性变化研究[J].林业科学研究,2012,25(4):521-525.
- [5] 安会翠,叶建仁,吴小芹,等.湿地松子代组培苗对松针褐斑病的抗性测定[J].南京林业大学学报(自然科学版),2012,36(3):9-12.
- [6] 黄向东,易正凡.松针褐斑病接种试验研究[J].湖南林业科技,1998,25(3):17-19.
- [7] 马常耕.国际林木抗病育种的基本经验[J].世界林业研究,1995(4):14-21.
- [8] 蒋继宏,李传道.湿地松对松针褐斑病的抗性测定[J].南京林业大学学报(自然科学版),1995,19(3):37-41.
- [9] 曾义.湿地松抗松针褐斑病子代抗病性的研究[D].南京:南京林业大学,2000.
- [10] 戴培培.湿地松组培快繁体系优化及再生植株性状表现[D].南京:南京林业大学,2008.

(责任编辑 李海燕)