

马尾松抗松材线虫病无性系的抗病性评价方法研究

徐六一¹, 高景斌², 章 健¹, 陈雪莲¹, 姜春武¹

(1. 安徽省林业科学研究院, 合肥 230031; 2. 安徽省林木种苗总站, 合肥 230001)

摘 要: 通过人工接种松材线虫, 研究马尾松抗性候选无性系的抗病性测定评价方法。结果表明, 大棚内接种能够加速病害的发生, 同时高温和干燥条件下, 松树树种间反应不一样, 不能真实体现出各松树种间的抗性能力, 接种测定环境适合在野外。在野外接种环境下, 火炬松抗性能力最强, 确定无性系抗性能力对照树种应为火炬松。各松树在不同接种环境下的感病率在接种第 9 周后均达到最大值, 在此时间内进行调查并分析植株的抗病能力较佳。抗性候选无性系间抗性差异极显著, 抗性候选家系的平均健全率 78.2%, 抗性无性系的平均健全率 76%, 对照使用的马尾松健全率 29.7%, 火炬松健全率 52.4%。结果显示马尾松抗性无性系的抗性水平高于火炬松 0.45 倍, 为普通对照马尾松的 1.63 倍。

关键词: 马尾松; 松材线虫; 无性系; 抗病性

中图分类号: S791.248

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)06-0848-06

Evaluation of disease resistance of clones of *Pinus massoniana* to *Bursaphelenchus xylophilus*

XU Liu-yi¹, GAO Jing-bin², ZHANG Jian¹, CHEN Xue-lian¹, JIANG Chun-wu¹

(1. Anhui Academy of Forestry, Hefei 230031;

2. The Tree and Seedling General Station of Anhui Province, Hefei 230001)

Abstract: The study was to evaluate the resistance of clones of *Pinus massoniana* to *Bursaphelenchus xylophilus* through inoculation of *Bursaphelenchus xylophilus*. The results showed that the pine wilt was seriously accelerated in the greenhouse, while the response was not the same when inoculated of *Bursaphelenchus xylophilus* at high temperature and dry conditions, so pine species inoculated in greenhouse did not truly reflect the disease resistance, and the best inoculation condition was in the field. The disease resistance of *Pinus taeda* was higher compared with other tree species, so it was chosen as the control species to identify resistance clones. The disease infection rates of all pine trees reached maximum after inoculated for 9 weeks in different inoculation conditions, so it was the best time to investigate and analyze the disease resistance of the trees. The disease resistance between candidate clones of *P. massoniana* was significant different. The average survival rate of candidate resistance families was 78.2%; the average survival rate of clones was 76%; the average survival rate of *P. massoniana* and *P. taeda* was 29.7% and 52.4%, respectively. The data showed that the resistance level of the clones of *P. massoniana* was 0.45 times higher than that of *P. taeda*, and 1.63 times than that of the common *P. massoniana*.

Key words: *Pinus massoniana*; *Bursaphelenchus xylophilus*; clone; disease resistance

林木的抗病虫性测定一般基于自然感染, 从试验林中选择抗病虫能力强的单株或抗性群体, 但这样由于林木生长周期长抗病虫测定所需时间长, 阻碍了林木育种的发展, 通过人工接种开展林木抗病虫性测定的研究也就得到高度运用。在人工接种测定中, 重要的是控制非遗传性因素的变化, 这些因素除对测定结果单独作用外, 其复杂的相互作用对

测定结果的影响也至关重要。测定环境、测定材料、接种线虫种源、接种数量、接种方法等因素在很大程度上会影响测定的效率和精度^[1-4], 测定过程应严格控制。另外, 在抗性测定的时候, 确定抗性能力标准是非常重要的, 结合生产实际需要和试验的可能性, 确定合理的抗性参照标准非常关键。

大量研究表明, 在松属树种间普遍存在抗病性

收稿日期: 2011-05-04

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项 (201004072) 资助。

作者简介: 徐六一, 男, 副研究员。E-mail: xuliuyijyou@yahoo.com.cn

差异,其中火炬松(*P. taeda*)、马尾松(*P. massoniana*)、湿地松(*P. elliottii*)对松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)病有抗性,而赤松(*P. densiflora*)、黑松(*P. thunbergii*)、琉球松(*P. luchuensis*)为易感树种^[5-6]。马尾松不同地理种源或同一树种的不同家系间抗病性存在差异^[7-8],即使在易感的松树品种中也存在抗性极高的单株^[9]。本课题利用抗性候选家系开展无性系选拔测定,选拔抗性植株建立抗性种子园。经过抗松材线虫病选育出的马尾松抗性候选家系,已具有较高的抗性水平^[10-11],但还需要开展无性系抗病性,因此,有必要研究马尾松无性系的抗病性测定及评价方法。

1 材料与方法

1.1 松树材料

试验树种:马尾松抗松材线虫病抗性候选无性系,来自中日合作马尾松松材线虫抗性育种项目选拔的抗性候选家系。

马尾松、黑松、火炬松、湿地松、黄山松自然授粉的混合家系种子培育的2年生苗。

1.2 接种用松材线虫及接种方法

接种用松材线虫:“广朱 3B”株系;抗性候选无性系接种使用“广朱 3B”株系和“全 4”株系的松材线虫混合。

松材线虫繁殖:小麦培养基灰葡萄霉菌大量繁殖松材线虫,分离并调整松材线虫悬浊液的头数浓度^[12]。

接种量:5 000 头·株⁻¹;抗性候选无性系接种量

10 000 头·株⁻¹。

接种方法:剥皮接种法^[13]。无性系嫁接苗的接种部位应在嫁接愈合口上 10 cm 处。

1.3 接种测定环境

接种测定环境:野外和大棚两种生长环境,各设 2 个试验区。大棚生长环境中设立非接种苗木,每树种各 5 株。无性系嫁接苗接种试验在野外,对照树种马尾松、火炬松各 100 株。野外及大棚试验地在接种松材线虫后均不浇水,但接种 2 周后将大棚两侧的塑料布卷起 0.5 m 高。

接种测定时间:每年 7 月 22 日开始,地点在合肥市三岗、大杨店试验地。

1.4 调查与分析

接种后每周调查 1 次,共计 12 周,第 4 个月至第 6 个月间每月调查 1 次,统计没有感病症状的健全株数和感病株数,感病症状包括:枯死、部分枯死^[14]。

相同树种内使用不同株系的接种结果统计在一起,比较其在野外和大棚的两种接种生长环境下枯死和感病的差异,分析其抗病性情况。

运用统计分析软件 SSPS15.0 版,对各种进行单因素和多因素方差分析,再制成相关图表。

2 结果与分析

2.1 松属树种间的差异

统计分析结果显示(表 1),不同树种的感病率及枯死率均达到极显著水平差异,接种株生长环境、树种与生境互作也呈极显著差异。

表 1 松树与接种生长环境间的方差分析

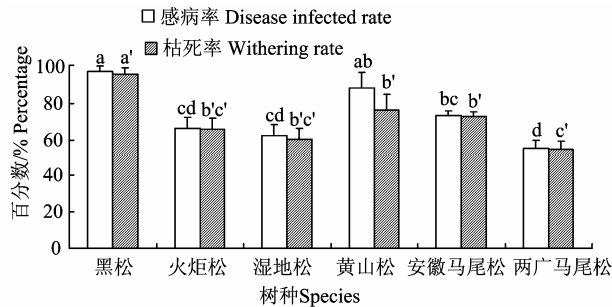
Table 1 Variance analysis of disease infection rate and decline rate in *Bursaphelenchus xylophilus* isolates

变异来源 Variation resource	指标 Index	DF	SS	MS	F	Sig.
树种 Tree species	感病率 Disease infected rate	5	24 366.736	4 873.347	16.711	0.000
	枯死率 Withering rate	5	23 496.240	4 699.248	14.964	0.000
生境 Environment	感病率 Disease infected rate	1	5 607.518	5 607.518	19.229	0.000
	枯死率 Withering rate	1	6 531.785	6 531.785	20.799	0.000
树种×生境	感病率 Disease infected rate	5	5 832.698	1 166.540	4.000	0.002
	枯死率 Withering rate	5	5 752.780	1 150.556	3.664	0.004
误差 Error	感病率 Disease infected rate	96	27 995.621	291.621		
	枯死率 Withering rate	96	30 148.510	314.047		
总变异 Total variance	感病率 Disease infected rate	107	61 840.945			
	枯死率 Withering rate	107	63 503.297			
	枯死率 Withering rate	107	63 503.297			

综合不同接种生长环境,黑松、黄山松和“安

徽马尾松”的感病率要高,火炬松、湿地松和“两

广马尾松”的感病率相对要低些(图1)。如果根据不同的接种生长环境分别统计,则发现火炬松和湿地松的感病率和枯死率在野外接种下均在40%左右(图2),而在大棚内则高达80%以上(图3)。黄山松在不同的接种生境下感病率与枯死率都存在差异,表明黄山松虽然有较高的感病性,但并非一感病就枯死,有部分植株仅表现为部分枝叶枯死的感病状态,黑松、“安徽马尾松”、火炬松在两种不同接种生境下感病率和枯死率都相差较小,表明这几种树种感病之后极易枯死。



黑松 *Pinus thunbergii*, 火炬松 *Pinus taeda*, 湿地松 *Pinus elliottii*, 黄山松 *Pinus taiwanensis*, 安徽马尾松 *Anhui Pinus massoniana*, 两广马尾松 *Pinus massoniana harry*. 下同 The same below

图1 松树间在两种接种环境综合分析下的感病性差异
Figure 1 Susceptibility differences of the pine trees under two inoculation environments

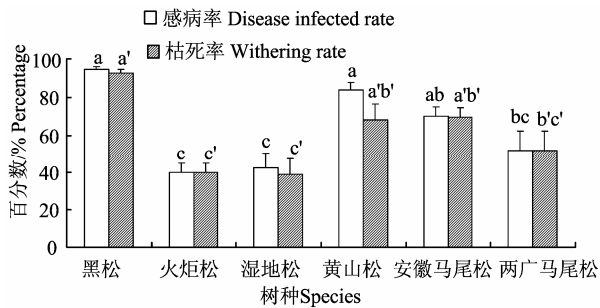


图2 松树间在野外接种生境下的感病率差异
Figure 2 Susceptibility differences of the pine trees inoculated in the wild environment

上述结果显示:各松树树种的抗性存在差异,在野外接种生长环境下抗性强弱依次为:火炬松、湿地松、“两广马尾松”、“安徽马尾松”、黄山松、黑松。但在大棚接种生长环境下抗性强弱依次为:“两广马尾松”、“安徽马尾松”、湿地松、火炬松、黄山松、黑松。引起的主要原因有,一是火炬松和湿地松在大棚接种生长环境下出现非常高的感病率和死亡率,该树种可能在高温和干燥的立地条件下

生长不利;二是“两广马尾松”在大棚的接种生长环境下出现较强的抗性,这可能与该种源地的马尾松更适应高温和干燥的环境特性有关;三是黄山松是高山树种,通常生长在海边800m以上,此次接种地处于70m左右的低海拔处,生长环境因素有着较大的改变,尽管生长特性表现良好,但在受到松材线虫危害时,其生理特性是否在环境的影响下呈现出较弱的一面,从而表现出很弱的抗性特征。根据日本松属内各树种抗性差异分析,黄山松属于抗性强的树种范围,但没有表明黄山松接种环境是否模拟高海拔环境进行的。

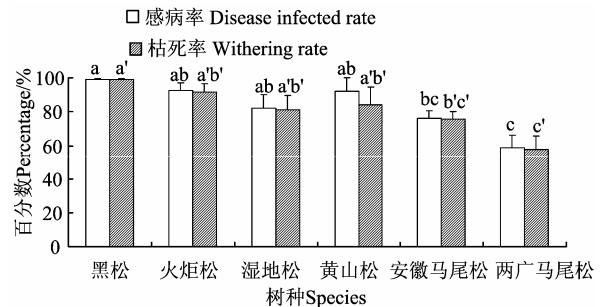


图3 松树间在大棚接种生境下的感病性差异
Figure 3 Susceptibility differences of the pine trees inoculated in the greenhouse

2.2 马尾松在接种环境间的差异

大棚内接种时温度为45℃,并持续40℃左右的温度达1个多月,较野外温度高10~15℃,大棚内的土壤干燥,出现裂纹。由表2、图4可知,野外和室内的感病率与枯死率均未达到显著水平差异,野外、室内的感病率分别为63.6%和68.9%,相差5.3%,室内的枯死率也比野外的高,差值为4.8%。显示出受危害的松树随着气温的升高和土壤干燥而死亡表现增强。

野外与大棚接种环境下马尾松家系的感病率相关性(表3),野外感病率与室内感病率相关系数为0.453,表现为有相关性,但差异未达到显著水平(P=0.120>0.05)。

野外与大棚接种环境下马尾松家系的枯死率的相关性(表4),野外枯死率与室内枯死率相关系数为0.422,表现为有相关性,但差异也未达到显著水平(P=0.151>0.05)。

2.3 松树的感病及枯死进程

人工接种松材线虫后,松树经过初现发病症状、枯萎、部分枯死、整株枯死的感病进程的变化,对接种第2周、5周、6周、7周、9周和24周后不同松树的感病率和枯死率变化进行分析。

表 2 马尾松家系在不同接种生境下的差异

Table 2 Differences among *Pinus massoniana* isolates in different inoculating environments

家系 Family	野外 Wild field		大棚 Greenhouse	
	感病率/% Disease infected rate	枯死率/% Withering rate	感病率/% Disease infected rate	枯死率/% Withering rate
和 1-1	70.1 ± 8.5	68.9 ± 7.6	84.3 ± 6.2	83.7 ± 1.2
和 1-2	95.5 ± 4.5	95.5 ± 3.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
和 1-3	68.9 ± 8.3	68.9 ± 8.3	80.0 ± 2.1	80.0 ± 2.1
和 1-4	50.0 ± 16.7	50.0 ± 16.7		
和 1-5	76.5 ± 12.9	73.5 ± 4.8	73.2 ± 1.5	73.2 ± 0.5
和 1-6	57.0 ± 9.4	57.0 ± 8.4	60.6 ± 5.3	59.1 ± 3.1
和 1-7	62.8 ± 1.7	60.3 ± 2.3	63.5 ± 2.3	61.5 ± 0.6
和 1-8	84.0 ± 5.7	84.0 ± 5.7	69.1 ± 6.1	69.1 ± 6.5
和 1-9	53.8 ± 17.3	53.9 ± 11.5	93.8 ± 2.4	93.8 ± 0.5
和 1-10	66.1 ± 23.1	66.1 ± 13.6	56.9 ± 5.3	55.2 ± 4.8
广西 1	51.9 ± 6.6	51.9 ± 6.8	72.4 ± 9.8	72.4 ± 4.3
广西 2	36.0 ± 4.2	36.0 ± 4.1	45.1 ± 2.9	43.1 ± 4.9
广西 3	33.3 ± 5.2	33.3 ± 3.9	50.0 ± 11.9	50.0 ± 11.9
广东 15	84.8 ± 9.4	84.9 ± 8.4	47.6 ± 13.1	42.9 ± 8.7

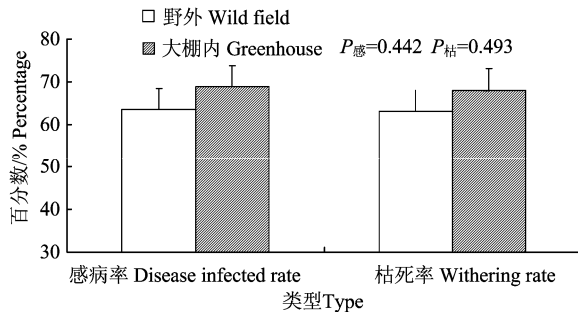


图 4 马尾松家系在野外和大棚接种生境下的差异

Figure 4 Susceptibility differences of *Pinus massoniana* families in the wild field and in the greenhouse

表 3 接种生长环境间的感病率相关性

Table 3 Relevance of disease infection rate in the inoculating environment

指标 Index	内容 Evaluation parameter	数值 Value
野外感病率 Disease infected rate in wild environment	Pearson correlation Sig. (2-tailed) N	0.453 0.120 N
大棚感病率 Disease infected rate in the greenhouse	Pearson correlation Sig. (2-tailed) N	

野外环境下接种松材线虫后感病及枯死情况表明: 马尾松的感病症状出现最快, 感病率为 52.9%, 其次为黑松的感病率 20.7%, 火炬松和湿地松感病症状才稍有表现 (图 5), 第 5 周时感病强弱程度依次为黑松、马尾松、黄山松、火炬松、湿地松。在此期间黑松、黄山松、火炬松出现快速感病, 第 7 周时除湿地松外基本达到感病最重状态, 第 9 周时各种松树均呈现出感病最大状态, 湿地松在第 7

周~第 9 周之间出现一个快速感病进程, 并超过火炬松的感病程度。

表 4 接种生长环境间的枯死率相关性

Table 4 Relevance of withering rate among the inoculating environments

指标 Index	内容 Evaluation parameter	数值 Value
野外感病率 Disease infected rate in wild environment	Pearson correlation Sig. (2-tailed) N	0.422 0.151 N
大棚感病率 Disease infected rate in the greenhouse	Pearson correlation Sig. (2-tailed) N	

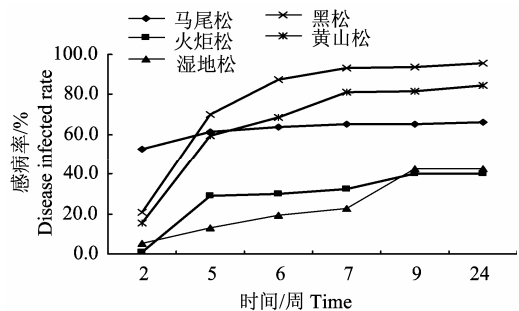


图 5 野外生境下松树的感病进程

Figure 5 Disease infection process of the pine trees in the wild environment

枯死与感病状况在第 2 周时差异很大 (图 6), 第 5 周时除马尾松枯死率达到 35.1% 之外, 其它的松树品种均在 5% 左右, 第 6 周时的枯死程度强弱依次为马尾松、火炬松、黑松、黄山松、湿地松。此时马尾松的枯死率 53.6%, 其余的均在 20% 左右。第 9 周时基本达到枯死最大状态, 其中黑松、黄山

松和湿地松在第6周~第9周中呈现出一个快速枯死进程,黄山松在第9周之后还不断出现枯死,枯死进程相对缓慢。

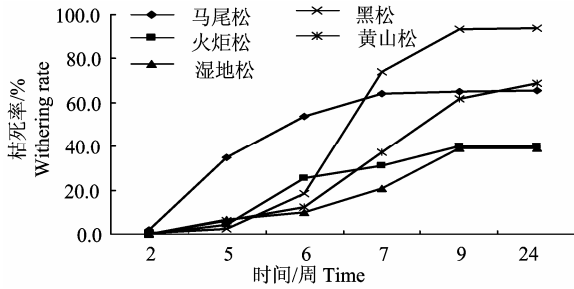


图 6 野外生境下松树的枯死进程

Figure 6 Withering process of the pine trees in the wild environment

大棚生长接种环境下株系综合统计表明,在第2周时五种松树均表现出较高的感病状况(图7),其中马尾松感病最为严重感病率约为54%,火炬松、湿地松、黄山松相对较少,感病率约为18%,第2~第5周的期间内,除马尾松外其余松树品种均处于感病高峰期,火炬松发病呈现出更为激烈的过程,第6周后除黄山松外几乎都达到了感病程度最大值,强弱依次为:黑松、火炬松、湿地松、黄山松、马尾松,黑松表现为全部感病。黄山松在第9周后感病程度达到最大值,超过了火炬松,感病进程为最缓慢的树种。

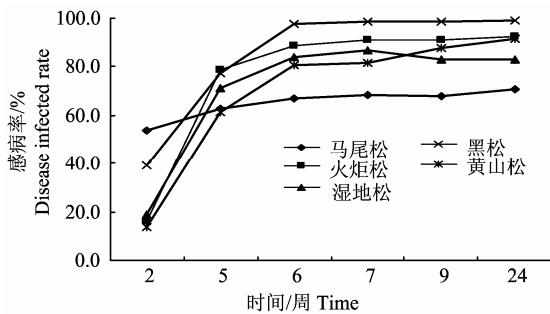


图 7 大棚生境下松树的感病进程

Figure 7 Disease infection process of the pine trees in the greenhouse

在第2周时黑松有少量枯死(图8),第2~第6周的期间内,各种松树均处于枯死高峰期,其中黑松、黄山松在第5周时枯死率为20%左右,但在第5~第6周的期间内出现急剧死亡,第7周时枯死率几乎达到最大值,强弱依次为:黑松、火炬松、湿地松、黄山松、马尾松,黑松表现为全部枯死。图中湿地松在24周的枯死率有下降,这是在9周前的调查误差导致,部分被当作枯死的苗木,其实只

是枝梢部位呈现枯死,根部还没有真正枯死,在以后的时间内又萌发出新的枝条,呈现出健康的苗木状态。

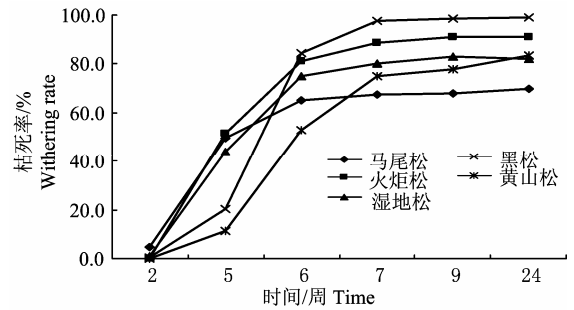


图 8 大棚生境下松树的枯死进程

Figure 8 Withering process of the pine trees in the greenhouse

表 5 马尾松抗性候选家系方差分析
Table 5 Variance analysis of candidate resistance families of *Pinus massoniana*

变异来源 Variation resource	SS	DF	MS	F	P
家系间 Inter-families	1 562.641	4	390.66	1.602	0.242
家系内 Intra-families	2 682.988	11	243.908		
总变异 Total variation	4 245.629	15			

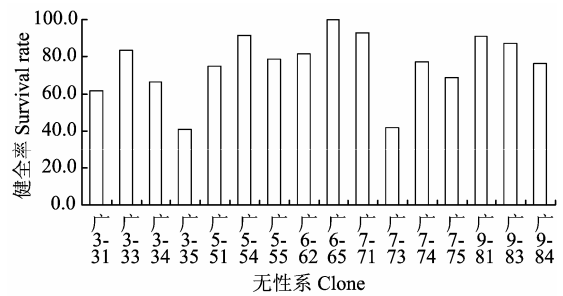


图 9 马尾松抗性无性系间健全率差异

Figure 9 The differences of the survival rates between the clones of *Pinus massoniana* with resistance

2.4 马尾松抗性候选无性系间抗性差异及抗性水平

经过接种测定选拔出的马尾松抗性候选家系,在其接种测定时候选家系间方差分析 $P>0.05$ (表5),显示抗性候选家系间的健全率差异不显著,但抗性选拔测定时实生苗家系间的健全率差异显著^[10,15],主要由于抗性候选家系是从通过对实生苗家系测定选拔而来,无性系测定结果显示评估选拔后家系的抗性相对一致性。抗性候选家系的无性系间经过 T -检验, $P<0.01$,抗性无性系间的健全率差异极显著(图9)。无性系“广6-65”的健全率100%，“广3-35”为41.2%，两个无性系的抗性能力相差1倍以上。

马尾松抗性候选家系的平均健全率 78.2%，马尾松抗性无性系的平均健全率 76%，对照使用的马尾松健全率 29.7%、火炬松健全率 52.4%。显示马尾松抗性无性系的抗性水平高于火炬松 0.45 倍、普通对照马尾松的 1.63 倍。

3 讨论

3.1 无性系测定环境宜在野外

在大棚内接种能够加速病害的发生，高温、干燥的环境能够体现出较高的感病程度，这与日本松材线虫抗性育种事业中的试验结果一致^[4]。在高温和干燥条件下松树存活的难度增大，使得生长弱、抗性能力差的松树单株能够被淘汰，但是各松树种在高温和干燥的条件下，松树自身其反应不一样，存在生长差异，其结果不是仅由松材线虫危害引起的，而是多因素综合作用的结果，不能体现其在自然环境中的真实状况^[15]。另外，松材线虫的危害是在自然环境中发生的，只有野外环境接种才能体现出各松树种间的真实抗性能力。

3.2 确定火炬松为抗性能力对照树种

在野外和大棚两种不同接种环境中，各松树种间感病和枯死状况的表现不同，在野外接种环境下，松树种间抗性强弱的顺序为：火炬松、湿地松、马尾松、黄山松、黑松，火炬松抗性能力在这五种松树中最强，这个结果同国内外相关研究者结果一致。但是，黄山松抗性能力与日本的研究不同，本研究中黄山松为弱抗性，与黑松相近，而没有表现出具有一定抗性水平^[5,11]。而在大棚生长环境下接种，火炬松和湿地松的感病率和死亡率很高，表现出弱抗病性，这个结果同相关研究结果相背，可能与其不适应高温生长环境有着直接关系。因此，在野外接种环境中，无性系抗性能力对照树种应为火炬松。

3.3 统计分析数据的时期

各松树在不同接种环境下的感病率和枯死率显示：接种后各树种的感病和枯死的变化不一致，但在接种第 9 周后均达到最大值。本研究中，随着接种时间的延长，就会出现本来已经感病的苗木由于没有完全枯死，经过一段时间后上面的枯死枝梢脱落，从杆部或根基部位重新萌发出新的枝梢，导致个别树种在 24 周时的感病症状判断失误，数据分析的结果出现误差。接种后第 9 周的健全、部分枯死、枯死的症状区别明显，因此，在接种后第 9 周后的一段时间内进行调查并分析植株的抗病能力较佳。

3.4 无性系的抗性能力评估标准

本试验在较少样本范围内，马尾松抗性候选家系间抗性差异不明显，但无性系间抗性差异极显著；全部 251 个马尾松抗性候选家系间抗性差异性情况有待进一步分析。

部分马尾松候选无性系的抗性水平低于火炬松，表明需要通过无性系抗病性测定，淘汰弱抗性，选拔出高抗性能力的马尾松无性系。试验中出现马尾松抗性候选无性系的健全率高于火炬松，说明通过抗病性测定能够选拔出高抗性的马尾松抗性无性系；并与普通对照马尾松抗性能力相比，选拔出抗性水平超过其 40%~60% 以上抗性能力的无性系是可能实现的。

参考文献:

- [1] 叶建仁. 中国森林病虫害防治现状与展望[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(6): 1-5.
- [2] 谈家金, 杨荣铮, 吴慧平. 不同地理种群的松材线虫对马尾松的致病力差异[J]. 植物检疫, 2000, 14 (6): 324-325.
- [3] 清原友也. 温度はマツノサイセンリユウを接種したく黒松に影響[J]. 林日誌, 1973, 84: 334-335.
- [4] 千吉良治, 戸田忠雄. マツノサイセンチュウ抵抗性家系の土壤乾燥時の特性とマツノサイセンチュウ抵抗性の関係[C]//日本林学会九州支部研究論文集. 1996, 48: 51-52.
- [5] Mamiya Y. Initial pathological changes and disease development in pine trees induced by the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. Ann Phytopath Soc Jpn, 1985, 51: 546-555.
- [6] 戸田忠雄, 一丸喜八朗. マツノサイセンチュウの加害性のちがい[J]. 林木育種, 特別号 1979: 42-45.
- [7] 徐福元, 葛明宏, 张培, 等. 不同马尾松种源对松材线虫病的抗病性[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(4): 85-88.
- [8] 徐福元, 葛明宏, 汪企明, 等. 马尾松种源对松材线虫病的抗性[J]. 南京林业大学学报, 1998, 22 (2): 29-33.
- [9] 杨宝君, 朱克恭, 周元生, 等. 中国松材线虫的流行与治理[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995.
- [10] 蔡卫兵, 徐六一, 席启俊, 等. 马尾松松材线虫抗性育种技术的开发[J]. 安徽农业科学, 2005, 3(2): 248-249.
- [11] 王斐, 申荷丽. 日本的松材线虫育种研究[J]. 世界林业研究, 2004, 17 (6): 44-46.
- [12] 高景斌, 戸田忠雄. 多次继代培养的松材线虫分离种群致病力变异的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34 (13): 3106-3107, 3109.
- [13] 戸田忠雄, 藤本吉幸, 一丸喜八朗. マツノサイセンチュウの接種法[J]. 林木育種, 特別号 1979: 40-42.
- [14] 陈玉慧, 叶建仁, 魏初奖. 松材线虫病诊断方法的研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2001, 25 (6): 83-87.
- [15] 徐六一, 戸田忠雄. 马尾松松材线虫抗性候补木选拔及评价的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(17): 4303-4304.