

尾叶桉作母本的种间控制授粉家系 苗期抗青枯病研究*

甘四明 白嘉雨 吴坤明 吴菊英 徐建民

摘要 对 81 个以尾叶桉为母本的种间控制授粉家系和 3 个母本的自由授粉家系进行苗期青枯病菌接种试验表明, 接种后母本家系抗病性都较差, 种间控制授粉家系间发病指数和死亡率有差异, 初步筛选出 1 个特抗家系和 49 个抗性家系。以家系抗病性评价父本树种, 细叶桉、赤桉、窿缘桉、雷林一号桉和粗皮桉选育潜力较好, 巨桉、巨尾桉和柳桉则较差。对抗性、易感和高感抗病水平各 3 个种间控制授粉家系进行接种前和接种后过氧化氢酶活性测定表明, 家系苗期青枯病抗性与接种前的酶活性相关不显著, 但与接种后酶活性上升的幅度呈强正相关, 抗性家系在接种病菌后酶活性上升幅度最大, 易感家系较小, 而高感家系则更小。苗期接种青枯病菌后, 杂种桉过氧化氢酶活性上升的幅度可作为早期抗病选育的一个重要的辅助依据。

关键词 桉树杂种 苗期接种 青枯病 过氧化氢酶

青枯病是由青枯假单孢杆菌(*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) 侵染植物后引起的一种严重的维管束病害, 广泛发生于热带、亚热带和温带地区, 受害植物达 35 科 200 多种^[1], 林木有 10 多种。1982 年, 在中国广西地区的柳桉(*Eucalyptus saligna* Smith) 和巨桉(*E. grandisi* W. Hill ex Maid.) 人工林内发现了青枯病^[2]。国外, 巴西的桉树人工林内也有青枯病的发生^[3]。在中国, 桉树青枯病还发现于广东和海南等省, 主要感病树种还有尾叶桉(*E. urophylla* S. T. Blake)、巨尾桉(*E. grandis* × *E. urophylla*) 和柠檬桉(*E. citriodora* Hook.) 等, 林地发病率达 2% ~ 10%, 严重的达 30% ~ 40%^[4]。

尾叶桉适应性强, 生长迅速, 木材造纸性能良好, 是优良的工业用材树种, 近年来在华南地区发展极为迅速。但尾叶桉对青枯病抗性不强^[5~7], 这不利于在生产上广泛应用。目前, 还没有有效的物理和化学方法可以防治青枯病, 抗病品种的选育是最主要的途径^[8]。杂交是引入外源基因的有效方法, 种间杂种可以综合亲本的优良性状, 为进一步的选育提供广阔的遗传基础^[7]。本研究通过对种间控制授粉家系进行早期抗病性选择, 可以为进一步的大田试验提供参考, 有助于选育抗、丰、优的桉树品种; 并且, 对抗病性的生化机理的探索可以为桉树抗青枯病育种提供辅助选育的依据。

1997—11—05 收稿。

甘四明硕士研究生, 白嘉雨, 吴坤明, 吴菊英, 徐建民(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

* 本研究属 1991~2000 年世行贷款造林项目“桉树速生丰产培育技术与推广”和“广东桉树工程——桉树杂交育种”的研究内容。本文为硕士论文的一部分, 承蒙华南农业大学钟伟华教授和本所邝炳朝研究员审阅, 谨致谢意。菌株采集得到广东省新会市林业局的大力支持, 试验过程得到本所分析室杨乐苏女士的大力协助, 特此致谢。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

参试材料包括尾叶桉母本的自由授粉家系 3 个和种间控制授粉家系 81 个,控制授粉的母本均为尾叶桉,父本有赤桉(*E. camaldulensis* Dehnh.) (18 个杂种,下同)、细叶桉(*E. tereticornis* Smith) (24)、窿缘桉(*E. exserta* F. Muell.) (9)、巨桉(4)、巨尾桉(6)、粗皮桉(*E. pellita* F. Muell.) (13)、柳桉(3)和雷林一号桉(*E. Leizhou* No. 1) (4)。用小塑料盆播种,出苗 30 d 后移苗到营养袋中。营养袋内基质为黄心土 4 火烧土 1 及少许复合肥,装杯前用 0.3% 的 $KMnO_4$ 消毒。移苗 45 d 后幼苗长到 8~10 对真叶时,进行青枯菌接种。

青枯菌菌株分离自广东省新会市大泽镇尾叶桉丰产林内的感病植株。将分离得到的菌株稀释后在 TTC 培养基上恒温 32℃ 培养 48 h,挑取红色毒性菌落到蛋白胨培养基上扩大培养^[9]。初选菌株接种到尾叶桉幼苗上进行毒性鉴定,把导致幼苗呈典型青枯病死亡症状的菌株用于接种试验。接种菌株用蒸馏水配成悬浮液,菌液浓度用 J-721 分光光度计比浊测定,为 1.5×10^9 细菌/mL。

1.2 接种方法

接种在苗圃内进行,采用改进的吴清平和梁子超的剪顶法接种^[5]。过程如下:用干净的剪刀剪去最顶部的一对嫩叶,然后用棉花包紧伤口,滴上细菌悬浮液,再用透明塑料薄膜包扎。苗圃内环境条件较一致,故不设重复,每个家系接种 10 株苗。接种后用 50% 的遮荫网遮荫保湿,相对湿度保持在 80% 以上,温度为白天 28~32℃,晚上 24~28℃。

1.3 发病指数评价方法

接种后第 5、10、15、20、25、30、35 d 分别按下列标准指数记录苗木的发病程度:0——苗木无症状;1——苗木无明显症状,接种的苗木顶端变黑;2——部分叶片枯萎,植株不死亡;3——苗木全株枯死。以每株苗木的最高标准指数代入公式计算各家系的发病指数,方法如下^[10]:各标准的苗木数乘以标准指数,把各乘积之和除以发病最高的标准指数后再除以苗木总数,即:

$$D = \frac{\sum_0^3 (N_i \times X_i)}{3 \times \sum_0^3 N_i}$$

其中, D 为发病指数, N_i 为某一标准指数的苗木数, X_i 为标准指数, 3 为发病最高的标准指数。

苗木观测记录完毕,随机抽取 10 株枯死苗木检查,鉴定是否为典型的青枯菌危害症状。

1.4 过氧化氢酶活性测定方法

对经过接种测定后的抗性、易感和高感 3 抗病水平各取 3 个种间控制授粉家系的未接种苗进行接种。在接种前和接种后第 6、11、16、21、26、31、36 d 分别取接种苗和不接种对照苗的顶部第 1 对或第 2 对嫩叶进行过氧化氢酶活性测定,取样时间统一为早上 8 时左右。测定方法参考 J. H. 彻里的 H_2O_2 滴定法^[11]。酶活性用每小时每克鲜重材料分解的 H_2O_2 的毫克数表示。

2 结果与分析

2.1 家系苗期抗病性

对接种后的枯死苗木随机抽查,均呈典型的青枯病症状,即茎部下端变黑,有水臭味,用锋

利小刀横切茎部, 再在切面上抹上水后有乳白色菌脓溢出, 表明苗木为青枯菌危害致死。

综合死亡率和发病指数, 可把家系对青枯病的抗病性分为 4 个水平, 即特抗、抗性、易感和高感。各抗病水平的死亡率和发病指数见表 1。初步筛选出特抗和抗性种间控制授粉家系

各 1 个和 49 个。不同树种组合平均发病指数和死亡率及其在各抗病水平的家系数见表 2。

表 2 不同父本的控制授粉家系的平均发病指数和死亡率及其在各抗病水平的家系数

抗病水平	不同父本的控制授粉家系								母本家系
	赤桉	细叶桉	窿缘桉	巨桉	巨尾桉	粗皮桉	柳桉	雷林桉	
特抗(个)	0	0	0	0	0	1	0	0	0
抗性(个)	12	17	7	1	2	6	1	3	0
易感(个)	5	4	2	2	2	1	1	1	2
高感(个)	1	3	0	1	2	5	1	0	1
平均发病指数	0.154	0.151	0.133	0.216	0.365	0.207	0.442	0.156	0.201
死亡率(%)	4.5	4.6	2.0	15.0	19.0	10.2	36.7	2.5	13.3

2.2 父本树种的抗病性潜力评价

从树种组合来看(表 2), 尾叶桉与巨尾桉、巨桉和柳桉控制授粉家系的平均发病指数和死亡率都高于母本家系平均; 与粗皮桉的控制授粉家系虽然发病指数高于母本家系平均, 而死亡率低于母本家系平均; 但与细叶桉、赤桉、窿缘桉和雷林一号桉控制授粉的家系的平均发病指数和死亡率均小于母本家系平均。表明尾叶桉与不同父本控制授粉的家系的平均发病指数和死亡率存在差异。后 4 个树种作父本的控制授粉家系在抗青枯病选育上有较好的潜力, 这与父本本身的大田抗病表现有一定的一致性^[4,5]。需要指出的是, 虽然尾叶桉与粗皮桉的控制授粉家系平均发病指数大于母本家系平均, 但其有本试验中唯一的一个特抗家系; 且该组合的 13 个家系中, 有 7 个的发病指数都小于发病指数最低的母本家系。因此, 粗皮桉也是颇具潜力的一个父本树种。

2.3 抗病性不同的控制授粉家系接种青枯菌后过氧化氢酶活性变化

抗性、易感和高感 3 抗病水平各 3 个控制授粉家系在接种青枯菌前和接种后的过氧化氢酶活性变化情况见图 1~3。结果表明, 接种前各家系苗的过氧化氢酶活性水平与不接种的对照苗相接近, 且与青枯病抗病性关系不明显, 抗性、易感和高感家系的酶活性有高低。接种后第 6 天有的家系酶活性开始上升, 有的降低, 但到第 11 天后接种家系苗的过氧化氢酶均高于对照, 到第 26 天上升的幅度达到最高值后降低, 到第 31 天后基本稳

表 1 各抗病水平的死亡率和发病指数

抗病水平	死亡率(%)	发病指数
特抗	0	0
抗性	0	0~0.25
易感	0~14.0	0.125~0.325
高感	20.0~70.0	0.275~0.750

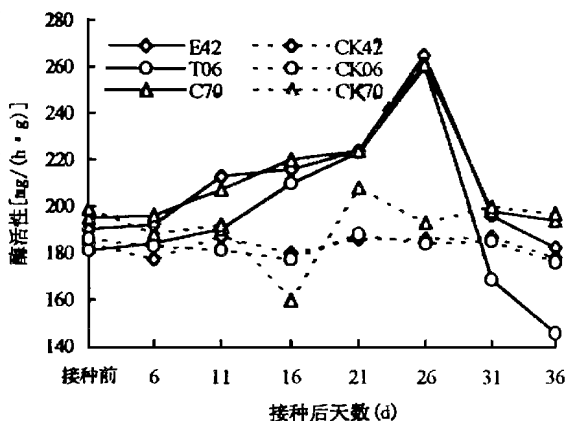


图 1 抗性家系接种青枯菌后过氧化氢酶活性变化

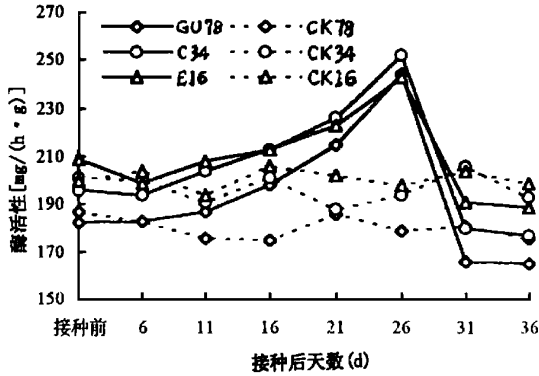


图2 易感家系接种青枯病菌后过氧化氢酶活性变化

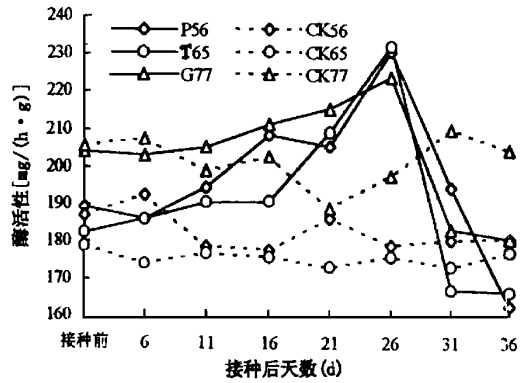


图3 高感家系接种青枯病菌后过氧化氢酶活性变化

定, 回复到接种前水平, 与对照也相近。

对比抗性、易感和高感家系接种青枯病菌后的过氧化氢酶活性上升情况, 可以看出, 抗性家系上升的幅度最大, 易感家系较小, 而高感家系上升的幅度最小。

将过氧化氢酶活性上升的幅度与病症指数作线性相关分析, $r = -0.8551^{***}$ ($r_{0.01}(2, 8) = 0.8269$), 相关极显著。因此, 控制授粉家系接种青枯病菌后过氧化氢酶活性上升的幅度与抗病性呈强正相关关系。

3 结论和讨论

(1) 桉树种间杂交是抗青枯病选育的较好方法。桉树青枯病在我国发现只有十多年的历史, 抗病选育方面的工作还不多。吴清平和梁子超^[4]、Cruz等^[12]以及Dianese和Dristig^[6]做了一些桉树树种和种源的抗病选择工作。本研究以种间控制授粉家系为材料, 选择出一些有潜力的杂交家系, 并对父本的利用潜力进行评价, 从基因重组的角度提出了一个抗病育种的方法。因此, 控制授粉家系的抗病选育是尾叶桉速生性和抗病性联合改良的一个重要途径。

(2) 控制授粉家系过氧化氢酶活性与青枯病抗性相关极显著。过氧化氢酶是一种以铁卟啉为辅基的酶, 普遍存在于动植物组织中, 它能催化对有机体有毒害作用的过氧化氢分解为水和分子氧, 对提高生物的抗寒能力, 保护有机体不受损害具有重要作用。在木麻黄上, 谢卿楣认为木麻黄小枝本身的呼吸酶活性和一些生化成分含量与青枯病抗性有关^[13]。而在本研究中, 寄主过氧化氢酶活性的升高与青枯病抗性间有显著相关, 并且酶活性的升高是在接种后特定阶段出现。这表明, 不同树种的青枯病抗性与呼吸酶的关系有异。桉树上, 苗期接种青枯菌后一定时间内, 寄主过氧化氢酶活性上升的幅度可以作为辅助抗病选择的一种重要手段, 这对缩短选育周期具有重要意义。

(3) 桉树抗青枯病苗期选择的评价。苗期人工接种与大田自然感染有一定的区别^[14]。青枯病菌是一种土壤传带为主的植物病原, 而土传系统是多组分的(Multi-component), 林地会含有寄主真正的伴随寄生物和腐生物^[14], 这与单纯的病菌接种不同。但苗期接种可以作出初步的筛选, 为大田选择提供重要参考, 并且加快育种的进程^[6]。所以, 疫区自然发病条件下的抗病性评价和人工接种的结合是有效方法。因此, 本研究的结论也有待大田试验进一步验证。

参 考 文 献

- 1 Kelman A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 1953, (99): 194.
- 2 曹季丹. 巴西柳桉、巨桉青枯病调查初报. 广西林业科技资料, 1982, (4): 30~31.
- 3 Dianese J C, Takatsu A. *Pseudomonas solanacearum*-Biovar I isoladadeeucalipto em Monte Dourado, Estado do Para. Fitopatologia Brasileira, 1985, (10): 362.
- 4 吴清平, 梁子超. 桉树抗青枯病树种的筛选. 华南农业大学学报, 1988, 9(4): 41~45.
- 5 梁子超, 郭全. 广东桉树青枯病初探. 林业科技通讯, 1986, (12): 封2, 29.
- 6 Dianese J C, Dristig M C G. Screening *Eucalyptus* selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: Hartman G J, Hayward A C (ed.). Bacterial Wilt, ACIAR Proceeding, Australia, 1992, No. 45: 206~210.
- 7 Dianese J C, Dristig M C G, Cruz A P. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. Australasian Plant Pathology, 1990, (3): 71~76.
- 8 Thurston H D. Resistance to bacterial (*Pseudomonas solanacearum*). In: Sequeira L, Kelman A (ed). Planning conference and workshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Raleigh, North Carolina, N. C. State University, 1976, 58~62.
- 9 方中达编. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1979.
- 10 Winstead N N, Kelman A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 1952, (42): 628~634.
- 11 J. H. 彻里(崔澄译). 植物分子生物学实验指导. 北京: 科学出版社, 1979.
- 12 Cruz A P, Dianese J C. Tolerancia a murcha bacteriana em eucalipto. Fitopatologia Brasileira, 1986, (11): 396.
- 13 谢卿楣. 不同种木麻黄抗青枯病与一些生理生化指标的关系. 福建林学院学报, 1991, 11(2): 192~196.
- 14 何家泌. 植物抗病遗传学. 北京: 中国农业出版社, 1994.

Seedling Resistance of Interspecific Crosses from Female *Eucalyptus urophylla* to Bacterial Wilt

Gan Siming Bai Jiayu Wu Kunming Wu Juying Xu Jianmin

Abstract In this paper 81 interspecific controlled-pollinated families and 3 open-pollinated families from female *Eucalyptus urophylla* were inoculated with *Pseudomonas solanacearum* at seedling stage. Results show that the families differ in disease index and mortality, and the three open-pollinated families perform all poor in resistance. Some interspecific resistant families were selected out. In terms of the resistance of interspecific combination, *E. tereticornis*, *E. camaldulensis*, *E. exserta*, *E. Leizhou* No. 1 and *E. pellita* are potentially good fathers, but *E. grandis*, *E. grandis-urophylla* and *E. saligna* are poor. Catalase activity before and after inoculation was determined which indicated that the increase of catalase activity was of strongly positive relation with the resistance of the families. Increase of catalase activity after inoculation could be an useful assistant index for early selection of eucalypt materials resistant to *Pseudomonas solanacearum*.

Key words *Eucalyptus* hybrids seedling inoculation *Pseudomonas solanacearum* catalase