

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220419

砧木及抗性马尾松松脂组分对松材线虫的响应

李文华^{1,2}, 刘青华^{1*}, 周志春¹, 高 凯¹, 骆定会³

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 杭州 311400; 2. 南京林业大学, 江苏 南京 210037;

3. 台州森伟林业调查规划设计有限公司, 浙江 临海 317000)

摘要: [目的] 通过对马尾松接种松材线虫, 分析接种前后松脂化学组分的变化, 为马尾松抗松材线虫病的研究提供理论基础。[方法] 以浙江省临海市 5 年生马尾松无性系为研究对象, 提取接种前和接种松材线虫 1、7、15 d 的不同砧木 (马尾松砧木和湿地松砧木)、不同抗性 (高抗和易感) 马尾松的松脂组分, 分析各松脂组分含量及动态变化; 利用松脂内所得有效萜类对松材线虫实施外源处理, 测定松材线虫存活率。[结果] 从不同砧木 (马尾松砧木和湿地松砧木)、不同抗性 (高抗和易感) 马尾松中检出 19 种主要化学组分, 其中, α -蒎烯、 β -蒎烯、水芹烯、海松酸、山达海松酸、长叶松酸/左旋海松酸、去氢枞酸、枞酸和新枞酸含量较高。接种松材线虫 1 d 时马尾松砧木中 β -月桂烯含量显著高于湿地松砧木 ($p < 0.05$); 接种松材线虫 7 d 与 15 d 时上述组分含量在不同砧木间无显著差异。不同抗性马尾松中 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯、柠檬烯、龙脑、长叶烯、 α -石竹烯、反式- β -金合欢烯和新枞酸含量在接种松材线虫后变化规律不同, 接种松材线虫 1 d 时高抗马尾松中 α -蒎烯和 β -蒎烯含量显著高于易感马尾松; 接种松材线虫 7 d 时高抗马尾松中 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和长叶烯含量显著高于易感马尾松 ($p < 0.05$); 接种松材线虫 15 d 时高抗马尾松中 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和长叶烯含量显著高于易感马尾松 ($p < 0.05$)。对上述萜类组分进行梯度浓度松材线虫外源试验: 以 $150 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度 α -蒎烯溶液处理 0.5 h 时, 松材线虫存活率达 20%; 不同浓度 β -蒎烯溶液对松材线虫抑制作用相同, $1.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度处理 0.5 h 时松材线虫存活率达 50% 左右; 以 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度柠檬烯溶液处理 0.5 h 时, 松材线虫存活率趋于零; 以 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度长叶烯溶液处理 0.5 h 时, 松材线虫存活率达 18%。[结论] 不同砧木对马尾松抗性无明显作用; 接种松材线虫后, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和长叶烯含量存在显著差异, 且均为高抗马尾松显著高于易感马尾松。 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和长叶烯低浓度下抑制松材线虫活性, 与马尾松抗性有关。

关键词: 马尾松; 松材线虫; 砧木; 抗性; 松脂组分

中图分类号: S763.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2023)04-0001-11

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 广泛分布于我国亚热带地区, 适应性强, 在土层深厚的土壤中生长较快^[1], 是我国主要的产脂、用材和荒山造林先锋树种^[2]。其松脂是由分泌细胞分泌的无色透明次生代谢产物, 可以分离成松节油和松香^[3], 主要由萜类物质组成^[4], 贮藏于松树的针叶、枝和茎的木质部和韧皮部的树脂道系统中, 在针叶树种

的防御体系中有着重要的作用^[5-7]。此外, 松脂广泛应用于香料、医药、机械、造纸、油墨等行业^[8], 也是我国重要的工业原料及可再生环保资源^[9]。

松材线虫病被称为松树的“癌症”^[10], 最快两个月内可导致感染植株死亡。马尾松常易感染松材线虫病, 但有些松树 (如湿地松、火炬松) 却明显具有抗病性。据国家林业和草原局统计, 近 30 年

收稿日期: 2022-08-23 修回日期: 2022-12-28

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2020C02007)、江西省林业局林业科技创新专项 (创新专项【2021】13号)、浙江省“十四五”育种专项林木协作组课题 (2021C02070-5-2)

* 通讯作者: 刘青华, 博士, 研究员。主要研究方向: 抗性马尾松遗传改良。Email: liuqinghua642@163.com

来, 全国因松材线虫病损失的松树累计可达数十亿株, 造成直接经济损失和生态服务价值损失高达上千亿元, 松材线虫病已成为全球森林生态系统中最具危险性、毁灭性的病害之一^[11]。

松属植物在遭受生物或非生物刺激时, 能够经树脂道分泌化学防御物质松脂进行自我保护^[12]; 受到创伤时, 其分泌的松脂将伤口封闭, 并为入侵生物制造有毒的环境^[13]。已有相关研究表明, 松脂的各类组分功能不同, 萜类化合物可以抑制细菌、真菌和病毒感染^[1, 14-15], 蒽烯类是松树防御反应的重要化合物^[16], 单萜类化合物具有良好的杀虫效果^[17]; 倍半萜类与松材线虫病抗性也有紧密联系^[18-19]。

嫁接技术可能对提高植物抗逆境能力和对病虫害抵抗能力有一定程度改善。不同砧木影响植物在胁迫环境下生长受抑制情况, 耐性强的砧木可通过调节自身生理特征以适应胁迫环境^[20]; 新疆葡萄不同砧木间也存在抗旱能力差异^[21]。本文通过分析不同砧木及不同抗性马尾松接种松材线虫后各松脂组分动态变化, 揭示砧木对马尾松抗松材线虫病影响及马尾松对松材线虫病害的响应机制, 进一步为防治马尾松松材线虫病提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

马尾松试验林设在浙江省临海市林业技术推广和场圃旅游服务总站 (28°88' N, 121°01' E), 属亚热带季风气候, 四季分明, 雨量充沛, 温暖湿润, 年平均气温 17.30 °C, 全年无霜期 242 d, 年平均降水量 1 638.10 mm, 年平均日照时数 1 936.40 h^[22], 土壤类型为红壤^[23]。试验材料取自 5 年生马尾松嫁接苗测定林, 包括共有 16 个无性系, 马尾松砧木为浙江马尾松一代良种 '5410' 种子园混合种子, 依据前期对砧木接种松材线虫, 砧木全部死亡; 湿地松砧木为 G-222 优良种子, 对砧木接种松材线虫, 致死率为 30%。两种砧木所用马尾松穗条均为休宁 5 (4 级)。根据前期安徽省林业科学研究院对马尾松无性系对松材线虫病的抗性指数测定, 划分为 1~4 级, 其中 1 级为易感, 4 级为高抗^[24]。于 2018 年选择高抗无性系休宁 5 (4 级) 和易感无性系黄山 1 (1 级) 各 10 株, 在试验前未采过松脂; 供试松材线虫材料为高致病性、高繁殖性线虫株系 '广株 3B', 此种松材线虫分离种群多次继代培养的松材线虫繁殖速度比初代培养的要慢 5~6 代, 繁

殖能力下降^[25]。试验所用线虫为从当年新枝中分离出来, 并经鉴定为 '广德 3B', 于灰葡萄孢菌落上纯培养, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 松材线虫培养及接种 将灰葡萄孢接种在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上, 于 28 °C 霉菌培养箱恒温培养 5 d。待着色菌落生长到培养皿上盖后, 将所选高致病性松材线虫材料接种到灰葡萄孢菌落中, 在 28 °C 恒温培养约 10 d, 使菌落完全被松材线虫取食。采用贝尔曼漏斗法将松材线虫分离, 12 h 后, 将其收集在 10 mL 离心管中, 无菌水冲洗 3 次, 并以 300 r·min⁻¹ 离心 5 min, 以去除上清液。将所得各离心管中的松材线虫汇集混匀, 最后制备成每 1 μL 含有 50 条松材线虫的悬浮液。

于 2018 年 7 月对马尾松接种松材线虫 (图 1)。分别选取 10 株马尾松砧木马尾松和 10 株湿地松砧木马尾松、10 株高抗马尾松和 10 株易感马尾松接种松材线虫悬浊液。参考 Liu 等^[26] 处理方法进行接种与样品采集。所取样品包括上述 40 株马尾松, 包括接种前、接种后 1、7、15 和 30 d 4 个取样时间点, 每株马尾松取 3 个重复。



图 1 松材线虫接种

Fig. 1 Inoculate pine wood nematode

1.2.2 松脂收集及化学组分分析 每个无性系采用 3 个重复, 从每个试验区系统选择了 1~2 株生长最佳的健康马尾松植株进行松脂收集测定, 在植株胸径处划出一条长约 20 cm、宽 1~2 mm、深 3~4 mm 的斜口, 采用下降式单刀采脂法收集松脂。将新鲜松脂收集于 5 mL 聚乙烯管中, 在松脂达到管体积的 2/3 时, 立即封闭管口并放入冰盒中, 置于 -20 °C 冰箱中保存待测。

利用气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS) 分析和测定松脂各组分含量。样品制备参考 Karanikas^[13] 的方法, 使用 Agilent 6890N 气相色谱和 Agilent 5975B 质谱联用, 检测马尾松的松脂组分含量。获得的片段通过与 NTST08 谱库 (National Institute of Standards and Technology, USA) 匹配来进行松脂化学组分的识别, 根据各组分与内标的面积确定各组分在松脂中的含量。

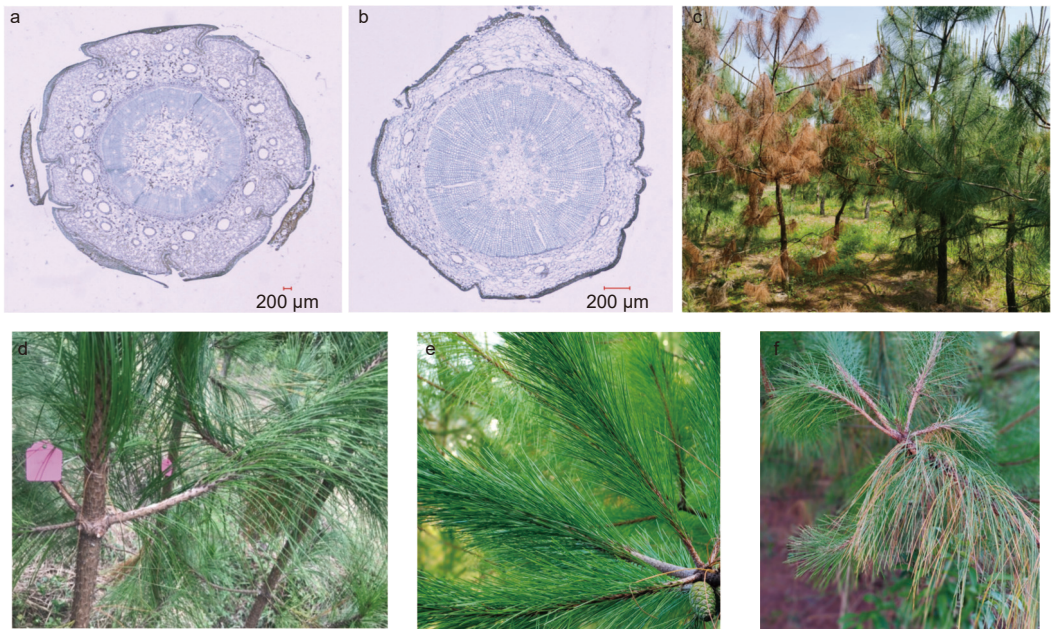
1.2.3 萜类化合物对松材线虫的影响 以前期所用灰葡萄孢菌落培养的松材线虫, 接种于 PDA 培养基中培养, 用贝尔曼漏斗法将分离出的松材线虫装在 2 mL 离心管中, 制成含有 500 条松材线虫的 1 mL 悬浊液。将纯度为 97% 的 α -蒎烯标准品、纯度为 98% 的 β -蒎烯标准品、纯度为 98% 的长叶烯标准品、纯度为 97% 的柠檬烯标准品、纯度为 97% 的 β -月桂烯标准品及 98% 的龙脑标准品以一定浓度梯度作用于松材线虫, 在 25 °C 条件下培养 24 h; 以 Triton X-100 为对照, 技术重复 3 次; 选取处理后 0.5、6、24 h 为时间节点观察线虫致死率。

2 结果与分析

2.1 砧木对马尾松抗性的影响

2.1.1 不同砧木马尾松主要松脂组分及含量 接种松材线虫后, 马尾松砧木和湿地松砧木马尾松均无发病症状 (图 2d, 2e)。对以马尾松和湿地松为砧木的马尾松松脂进行 GC-MS 检测, 选择与 NTST08 匹配度高于 90%、含量超过 0.01% 的萜类松脂化学组分 (图 3), 结果表明: 两种砧木马尾松均检测出 19 种松脂组分, 其中单萜类 6 种, 倍半萜类 7 种, 二萜类 6 种 (表 1)。通过对各松脂组分含量方差分析表明: 倍半萜含量在两种砧木马尾松间无显著差异, 平均含量约为 90.00~130.00 mg·g⁻¹; 单萜含量与二萜含量在两种砧木马尾松间存在显著差异, 其中湿地松砧木单萜含量较马尾松砧木高 9.64%, 马尾松砧木二萜含量较湿地松砧木高 2.85%。

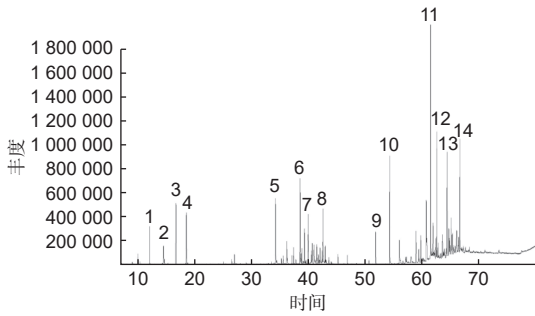
α -蒎烯含量在单萜中最高, 在不同砧木马尾松间存在显著差异 ($p < 0.05$), 且湿地松砧木含量较马尾松砧木高 8.02%。长叶烯、石竹烯和枞酸在不



注: (a) 接种松材线虫前一天易感马尾松组织切片; (b) 接种松材线虫后 1 d 易感马尾松组织切片; (c) 高抗与易感马尾松显病症状 (左: 易感马尾松; 右: 高抗马尾松); (d) 接种松材线虫 7 d 时马尾松砧木马尾松; (e) 接种松材线虫 7 d 时湿地松砧木马尾松; (f) 接种松材线虫 7 d 时易感马尾松
Notes: (a) Susceptible *P. massoniana* tissue section one day before pine wood nematode inoculation; (b) Susceptible *P. massoniana* tissue section one day after pine wood nematode inoculation; (c) Resistant and susceptible symptoms of *P. massoniana*; (d) *P. massoniana* rootstock after inoculation with pine wood nematode for 7 days; (e) *P. elliotii* rootstock after inoculation with pine wood nematode for 7 days; (f) Susceptible *P. massoniana* after inoculation with pine wood nematode for 7 days

图 2 接种松材线虫后不同砧木及不同抗性马尾松显症

Fig. 2 *P. massoniana* with different rootstocks and different resistance after inoculation with pine wood nematode



注: 1: α -蒎烯; 2: 柠檬烯; 3: β -蒎烯; 4: 水芹烯; 5: 环长叶烯; 6: 洒剔烯; 7: 长叶烯; 8: 反式- β -金合欢烯; 9: 海松酸; 10: 山达海松酸; 11: 左旋海松酸/长叶松酸; 12: 去氢枞酸; 13: 枞酸; 14: 新枞酸

Notes: 1: α -pinene; 2: Limonene; 3: β -pinene; 4: Phellandrene; 5: Longicyclene; 6: Sativene; 7: Longifolene; 8: Trans- β -farnesene; 9: Pimaric acid; 10: Sandaracopimaric acid; 11: Palustric acid/levopimaric acid; 12: Dehydroabietic; 13: Abietic acid; 14: Neoabietic acid

图3 马尾松1样品的化合物色谱峰值图

Fig. 3 Chromatogram of a *P. massoniana* sample

表1 不同砧木马尾松接种松材线虫松脂组分方差分析

Table 1 Variance analysis of oleoresin components of *P. massoniana* inoculated with pine wood nematode on different rootstocks

松脂组分 Rosin components	平均值 \pm 标准差 Mean \pm SD/mg·g ⁻¹		变异系数 CV/%		p
	马尾松砧木 Rootstock of <i>P. massoniana</i>	湿地松砧木 Rootstock of <i>P. elliotii</i>	马尾松砧木 Rootstock of <i>P. massoniana</i>	湿地松砧木 Rootstock of <i>P. elliotii</i>	
α -蒎烯 α -pinene	85.02 \pm 10.81	91.84 \pm 15.49	12.71	16.87	0.04*
β -蒎烯 β -pinene	18.15 \pm 11.21	18.22 \pm 9.68	61.74	53.16	0.99
β -月桂烯 β -laurene	1.60 \pm 1.77	0.62 \pm 1.16	110.92	185.68	0.12
柠檬烯 Limonene	2.56 \pm 3.46	3.18 \pm 4.19	135.15	131.84	0.70
水芹烯 Phellandrene	61.67 \pm 18.41	64.05 \pm 21.60	29.85	33.72	0.77
龙脑 Borneol	13.17 \pm 9.38	12.53 \pm 8.92	71.22	71.19	0.87
长叶蒎烯 Longipinene	6.62 \pm 2.86	7.47 \pm 2.06	43.16	27.84	0.41
环长叶烯 Longicyclene	14.17 \pm 3.87	12.42 \pm 3.70	27.33	27.61	0.27
洒剔烯 Sativene	22.98 \pm 19.06	19.04 \pm 10.70	82.92	56.16	0.54
长叶烯 Longifolene	17.23 \pm 1.75	13.76 \pm 1.60	10.15	11.63	0.00**
石竹烯 Caryophyllene	4.54 \pm 2.75	8.41 \pm 2.88	60.65	34.19	0.00**
α -石竹烯 α -caryophyllene	3.69 \pm 3.98	0.78 \pm 1.89	108.03	241.43	0.03*
反式- β -金合欢烯 Trans- β -farnesene	22.08 \pm 15.70	60.75 \pm 25.19	71.12	41.46	0.00**
海松酸 Pimaric acid	34.19 \pm 9.74	43.82 \pm 15.18	28.50	34.65	0.09
山达海松酸 Sandaracopimaric acid	30.44 \pm 3.37	28.22 \pm 3.09	11.07	10.83	0.11
左旋海松酸/长叶松酸 Palustric acid/levopimaric acid	401.70 \pm 39.08	373.91 \pm 26.62	9.73	7.12	0.05
去氢枞酸 Dehydroabietic	50.82 \pm 23.38	75.69 \pm 15.63	46.00	20.65	0.01**
枞酸 Abietic acid	159.91 \pm 52.52	114.42 \pm 25.16	32.85	21.99	0.01*
新枞酸 Neoabietic acid	30.57 \pm 9.65	29.18 \pm 6.70	31.56	22.96	0.69
单萜类 Monoterpenes	179.17 \pm 8.34	196.44 \pm 15.56	4.65	7.92	0.00**
倍半萜类 Sesquiterpenes	97.84 \pm 40.02	122.64 \pm 36.99	40.90	30.16	0.13
二萜类 Diterpenes	704.78 \pm 52.28	685.24 \pm 38.67	7.42	5.64	0.05*

注: *表示相关性在 $p<0.05$ 水平上显著, **表示在 $p<0.01$ 水平上显著。下同

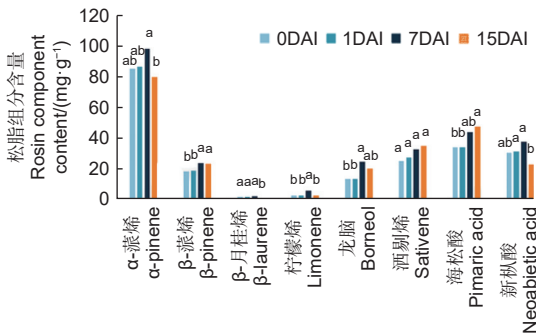
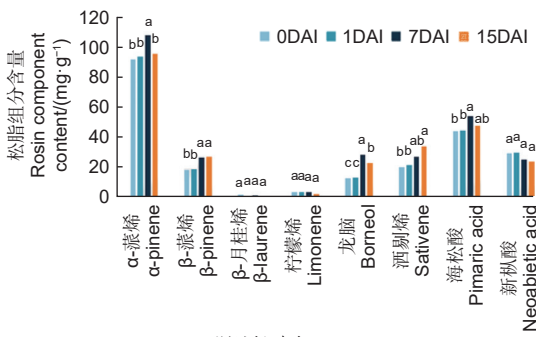
Notes: "*" indicates that the correlation is significant at the $p<0.05$ level, "**" indicates that the correlation is significant at the $p<0.01$ level. The same below

同砧木马尾松间具有显著差异 ($p<0.05$), 且湿地松砧木石竹烯含量高于马尾松砧木 85.24%、马尾松砧木长叶烯含量与枞酸含量分别高于湿地松砧木 25.22% 与 39.76%。 α -石竹烯、反式- β -金合欢烯和去氢枞酸含量在不同砧木马尾松间也存在显著差异 ($p<0.05$)。

β -蒎烯平均含量约为 17.10~19.30 mg·g⁻¹、 β -月桂烯平均含量约为 0.50~1.70 mg·g⁻¹、柠檬烯平均含量约为 1.50~4.30 mg·g⁻¹、水芹烯平均含量约为 59.00~69.00 mg·g⁻¹、龙脑平均含量约为 10.80~19.00 mg·g⁻¹, 在两种砧木马尾松间均无显著差异。长叶蒎烯、环长叶烯、洒剔烯、海松酸、山达海松酸、左旋海松酸/长叶松酸和新枞酸含量在两种砧木马尾松间也无显著差异。

2.1.2 不同砧木接种松材线虫后松脂化学组分动态变化 两种砧木马尾松接种松材线虫 1 d 后松脂

组分中萜类含量略有增加, 但均无显著差异。 α -蒎烯、 β -蒎烯和龙脑在两种砧木马尾松中含量变化规律相似。对马尾松砧木马尾松接种松材线虫后不同时间松脂化学组分均值分析 (图 4a), 结果表明: β -月桂烯、柠檬烯和新枞酸含量变化规律为先上升后下降, 且在 7 d 最大值 15 d 最小值; 海松酸含量变化规律为上升趋势, 且在 15 d 达最大值; 洒别烯等含量变化无显著差异。对湿地松砧木马尾松接种松材线虫后不同时间松脂化学组分均值分析 (图 4b), 结果显示: 海松酸含量变化规律为先上升后下降, 且 7 d 最大值 15 d 最小值; 洒别烯含量变化规律为逐渐上升, 且在 15 d 最大值。 β -蒎烯、柠檬烯和新枞酸等含量变化无显著差异。在两种砧木马尾松接种松材线虫 7 d 时, 新枞酸仅在马尾松砧木中达最大值, 而海松酸仅在湿地松砧木中达最大值, 且萜类组分含量在两种砧木马尾松间均无显著差异。

(a) 马尾松砧木 *P. massoniana* rootstock(b) 湿地松砧木 *P. elliotii* rootstock

注: 不同小写字母表示二者间差异达到显著程度, 即 $p < 0.05$ 。DAI 为接种松材线虫后时间。下同

Notes: Different lowercase letters indicate that the difference between the two has reached a significant degree, that is $p < 0.05$ level. DAI means day after inoculation. The same below

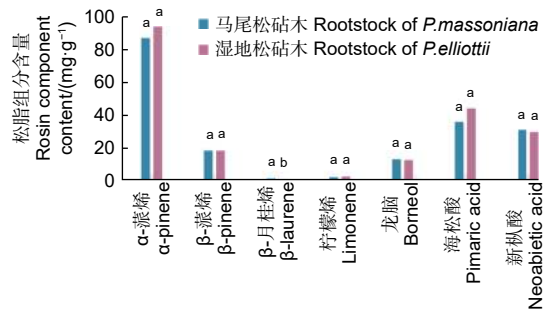
图 4 不同砧木马尾松不同接种时间松脂中的萜类组分及含量

Fig. 4 Terpenoid components and contents in pine oleoresin of *P. massoniana* with different rootstock at different inoculation times

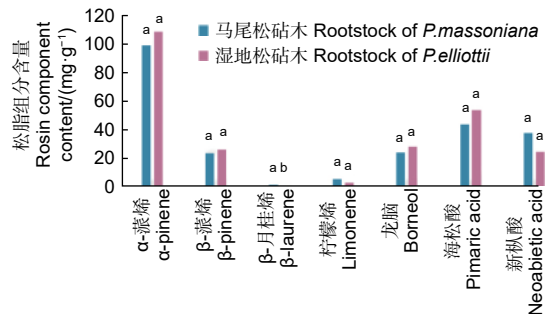
接种松材线虫后 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、龙脑、海松酸和新枞酸含量在两种砧木马尾松间无显著差异。 β -月桂烯含量在接种松材线虫 1 d 后马尾松砧木显著高于湿地松砧木 ($p < 0.05$) (图 5a); β -月桂烯含量在接种松材线虫 7 d 后马尾松砧木显著高于湿地松砧木 ($p < 0.05$) (图 5b); 在接种松材线虫 15 d 后各组分含量在马尾松砧木与湿地松砧木间无显著差异 (图 5c)。

2.2 不同抗性马尾松接种松材线虫后松脂化学组分分析

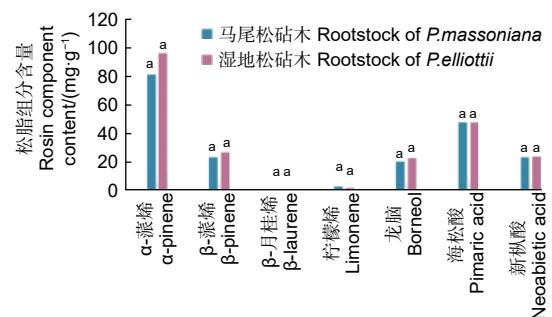
2.2.1 不同抗性马尾松主要松脂组分及含量 接种松材线虫后, 高抗马尾松无症状出现, 易感马尾



(a) 1DAI



(b) 7DAI



(c) 15DAI

图 5 不同砧木马尾松接种松材线虫 1, 7 和 15 d 后萜类含量差异分析

Fig. 5 Analysis on the difference of terpenoid content of *P. massoniana* with different stock after inoculation with pine wood nematode for 1, 7 and 15 days

松在接种后 7 d 即出现针叶枯黄现象,并在接种后 30 d 时全部枯死(图 2c, 2f)。在组织结构上,易感马尾松组织结构接种松材线虫 1 d 时有轻微损伤(图 2a, 2b)。高抗马尾松和易感马尾松松脂共检测出 19 种松脂组分,对高抗与易感马尾松松脂进行 GC-MS 检测,选择与 NTST08 匹配度高于 90%、含量超过 0.01% 的萜类松脂化学组分,结果表明:高抗与易感马尾松均检测出 19 种松脂组分,其中单萜类 6 种,倍半萜类 7 种,二萜类 6 种(表 2)。其中,高抗与易感马尾松松脂组分仅在含量上有差异,方差分析表明:高抗与易感马尾松倍半萜和二萜含量之间无显著差异,在松脂中平均含量分别约为 80.00~100.00 mg·g⁻¹ 和 680.00~710.00 mg·g⁻¹。而在单萜含量中存在显著差异,其中高抗马尾松单萜含量比易感马尾松单萜含量高 7.34%。

α -蒎烯含量在单萜中含量最高,在不同抗性马尾松间存在显著差异($p<0.05$),高抗马尾松含量

较易感马尾松含量高 9.28%。 β -蒎烯、 β -月桂烯、柠檬烯、长叶烯在不同抗性马尾松间有显著差异($p<0.05$),且除 β -月桂烯外高抗马尾松含量分别高于易感马尾松 43.70%、39.37%、4.59%。水芹烯平均含量约为 56.00~64.00 mg·g⁻¹、石竹烯平均含量约为 4.00~5.50 mg·g⁻¹。长叶蒎烯、环长叶烯、洒剔烯、 α -石竹烯、反式- β -金合欢烯、海松酸、山达海松酸、左旋海松酸/长叶松酸、去氢枞酸、枞酸和新枞酸含量在不同抗性马尾松间也无显著差异。

2.2.2 不同抗性马尾松接种松材线虫后松脂化学组分动态变化 高抗与易感马尾松接种松材线虫 1 d 后松脂组分中萜类含量略有增加,但无显著差异。对高抗马尾松接种松材线虫后不同时间松脂化学组分均值分析(图 6a),结果显示: α -蒎烯、 β -月桂烯、柠檬烯、长叶烯和 α -石竹烯含量变化规律为先上升后下降,且 7 d 达最大值 15 d 达最小值; β -蒎烯和龙脑含量变化规律先上升后下降,

表 2 不同抗性马尾松接种松材线虫松脂组分方差分析

Table 2 Variance analysis of oleoresin components of *P. massoniana* inoculated with pine wood nematode with different resistance

松脂组分 Rosin components	平均值/标准差 Mean±SD/mg·g ⁻¹		变异系数 CV/%		<i>p</i>
	高抗马尾松 Resistant	易感马尾松 Susceptible	高抗马尾松 Resistant	易感马尾松 Susceptible	
	<i>P. massoniana</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>P. massoniana</i>	
α -蒎烯 α -pinene	85.10±4.04	77.87±3.65	4.75	4.68	0.01*
β -蒎烯 β -pinene	17.69±2.45	12.31±0.92	13.87	7.50	0.00**
β -月桂烯 β -laurene	1.42±1.58	1.97±2.33	111.6	118.66	0.04*
柠檬烯 Limonene	3.08±0.55	2.21±0.28	17.95	12.48	0.02*
水芹烯 Phellandrene	60.08±7.80	60.86±3.22	12.98	5.28	0.85
龙脑 Borneol	13.34±0.14	13.12±0.10	1.04	0.80	0.02*
长叶蒎烯 Longipinene	6.79±3.04	6.29±2.87	44.7	45.62	0.79
环长叶烯 Longicyclene	14.09±4.23	14.33±3.64	30.01	25.38	0.93
洒剔烯 Sativene	22.80±8.68	20.73±10.78	38.08	51.97	0.73
长叶烯 Longifolene	16.86±0.23	16.12±0.22	1.38	1.35	0.00**
石竹烯 Caryophyllene	4.77±1.32	4.93±1.12	27.67	22.69	0.85
α -石竹烯 α -caryophyllene	4.24±0.98	4.23±1.67	23.07	39.43	0.99
反式- β -金合欢烯 Trans- β -farnesene	22.78±13.87	21.17±14.03	60.86	66.26	0.85
海松酸 Pimaric acid	31.97±4.08	33.71±2.33	12.76	6.91	0.45
山达海松酸 Sandaracopimaric acid	29.55±2.31	32.23±4.77	7.80	14.81	0.21
左旋海松酸/长叶松酸 Palustric acid/levopimaric acid	400.89±42.67	403.31±36.70	10.64	9.10	0.93
去氢枞酸 Dehydroabietic	42.34±2.34	41.58±2.01	5.52	4.83	0.59
枞酸 Abietic acid	160.57±64.52	158.59±20.00	40.18	12.61	0.95
新枞酸 Neoabietic acid	28.64±4.53	28.86±3.25	15.83	11.25	0.93
单萜类 Monoterpenes	180.69±6.87	168.34±3.69	3.80	2.19	0.01**
倍半萜类 Sesquiterpenes	92.35±26.79	87.80±25.77	29.01	29.35	0.79
二萜类 Diterpenes	693.96±73.33	698.30±54.75	10.57	7.84	0.92

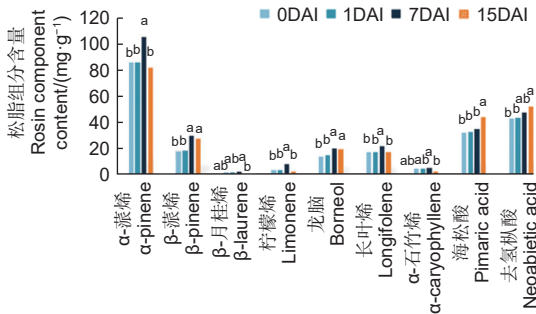
且 7 d 达最大值 0 d 达最小值; 海松酸和去氢枞酸含量变化规律为逐渐上升, 且 15 d 达最大值。对易感马尾松接种松材线虫后不同时间松脂化学组分均值分析 (图 6b), 结果显示: 含量先上升后下降且 7 d 达最大值 15 d 达最小值的为新枞酸; 含量为 7 d 达最大值 0 d 达最小值的为反式- β -金合欢烯; 含量呈上升趋势 15 d 达最大值的为海松酸和去氢枞酸; 含量 7 d 达最小值 15 d 达最大值的为水芹烯和环长叶烯; 含量呈下降趋势 15 d 达最小值的为 α -石竹烯和枞酸。

α -蒎烯和 β -蒎烯含量在接种松材线虫 1 d 后高抗马尾松显著高于易感马尾松 ($p < 0.05$) (图 7a); α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯与长叶烯含量在接种松材线虫 7 d 后高抗马尾松显著高于易感马尾松 ($p < 0.05$) (图 7b); 在接种松材线虫 15 d 后各组分在高抗与易感马尾松间无显著差异 (图 7c)。

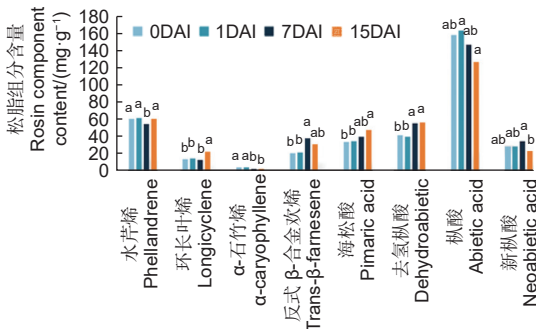
2.3 萜类对松材线虫的影响

参考马尾松松脂化学组分的主要萜类化合物含量, 检测松脂中主要萜类化合物对松材线虫的抑制作用。根据所测松脂组分含量及刘青华等^[25]研究中马尾松松脂萜类的平均含量, 设置不同浓度梯度

的 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯和长叶烯溶液, 研究相应萜类对松材线虫的影响。结果表明, 与对照组相比, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、长叶烯、 β -月桂烯和龙脑溶液的松材线虫平均存活率随着化合物浓度和处理时间的增加而逐渐下降 (图 8)。在 α -蒎烯梯度浓度溶液中, $150 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度下处理 24 h 松材线虫全部死亡, 而在 $500 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 浓度下处理 0.5 h 即造成松材线虫全部死亡 (图 8A)。在 β -蒎烯梯度浓度溶液中, 不同浓度溶液处理 0.5 h 后松材线虫致死率达约 50%, 处理 24 h 后松材线虫致死率趋于 100% (图 8B)。在长叶烯梯度浓度溶液中,



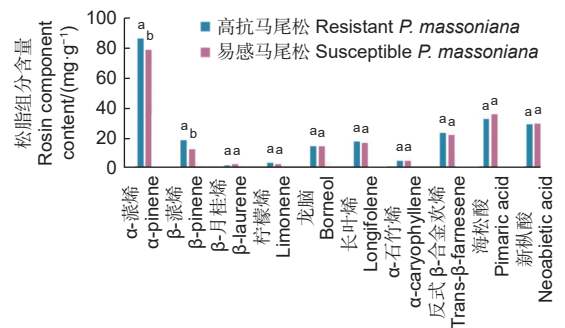
(a) 高抗马尾松 Resistant *P. massoniana*



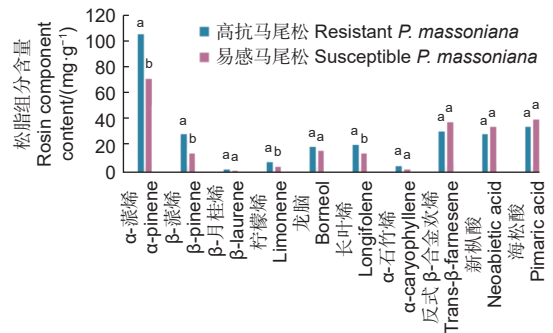
(b) 易感马尾松 Susceptible *P. massoniana*

图 6 高抗与易感马尾松不同接种时间松脂中的萜类组分及含量

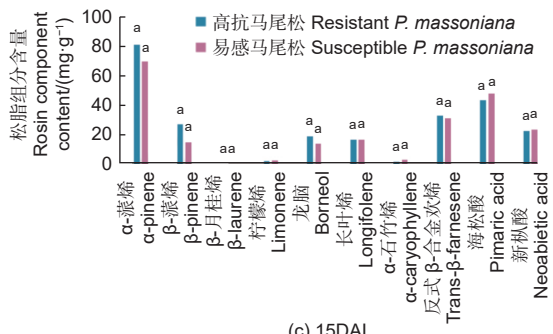
Fig. 6 Terpenoid components and contents in pine oleoresin of resistant and susceptible *P. massoniana* at different inoculation days.



(a) 1DAI



(b) 7DAI



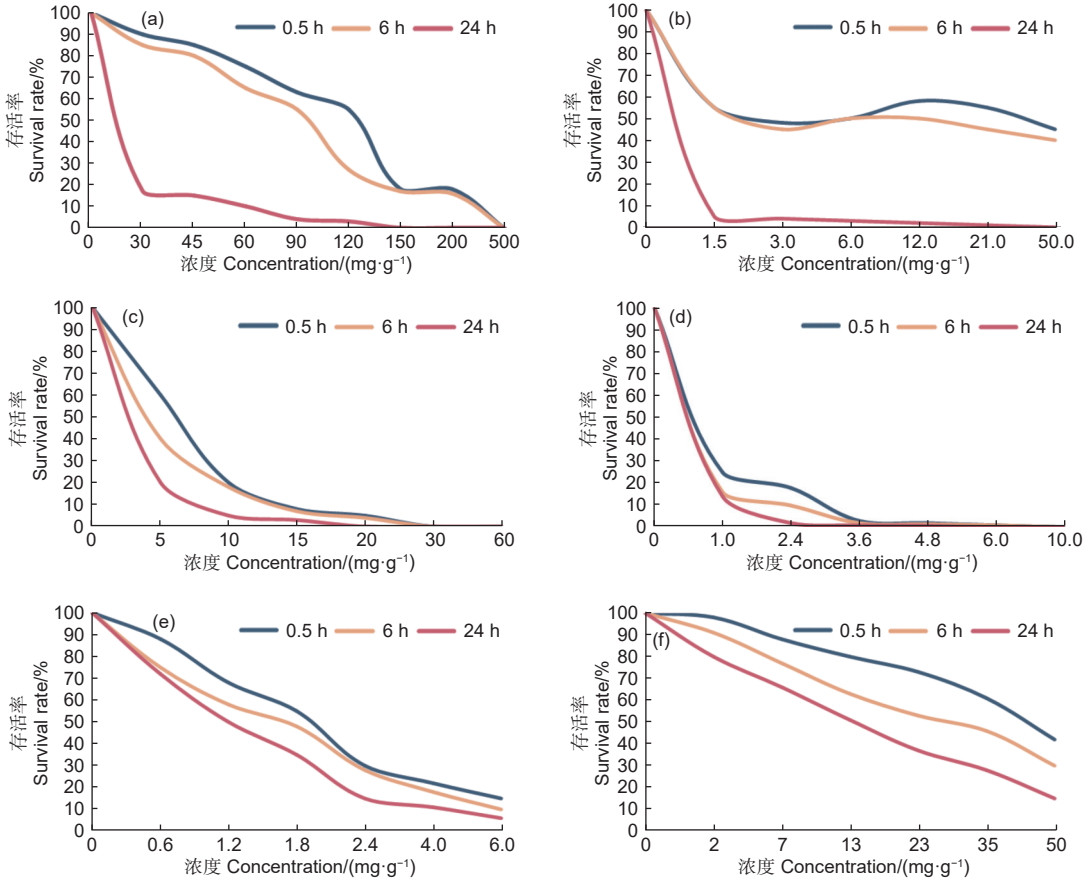
(c) 15DAI

图 7 不同抗性马尾松接种松材线虫 1, 7 和 15 d 后萜类含量差异分析

Fig. 7 Analysis on the difference of terpenoid content of *P. massoniana* with different resistance after inoculation with pine wood nematode for 1, 7 and 15 days.

10 mg·g⁻¹ 浓度下处理 0.5 h 松材线虫达 80% 致死率 (图 8C)。在柠檬烯梯度浓度溶液中, 3.60 mg·g⁻¹ 浓度下处理 0.5 h 后松材线虫致死率趋于 100% (图 8D)。在 β -月桂烯梯度浓度溶液中, 1.20 mg·g⁻¹ 浓度下处理 24 h 松材线虫致死率达

约 50%, 2.40 mg·g⁻¹ 浓度下处理 24 h 松材线虫致死率达约 85% (图 8E)。在龙脑梯度浓度溶液中, 13.00 mg·g⁻¹ 浓度下处理 24 h 松材线虫致死率达约 50%, 50.00 mg·g⁻¹ 浓度下处理 24 h 松材线虫致死率达约 80% (图 8F)。



注: (a) α -蒎烯浓度梯度; (b) β -蒎烯浓度梯度; (c) 长叶烯浓度梯度; (d) 柠檬烯浓度梯度; (e) β -月桂烯浓度梯度; (f) 龙脑浓度梯度

Note: (a) α -pinene concentration gradient(mg·g⁻¹); (b) β -pinene concentration gradient(mg·g⁻¹); (c) Longifolene concentration gradient(mg·g⁻¹); (d) Limonene concentration gradient(mg·g⁻¹); (e) β -laurene concentration gradient(mg·g⁻¹); (f) Borneol concentration gradient(mg·g⁻¹)

图 8 松脂组分体外作用松材线虫致死率

Fig. 8 Inhibitory effect of resin composition on mean fatality rate of PWN in vitro.

3 讨论

不同砧木马尾松和不同抗性马尾松树干木质部松脂中共检出 19 种组分, 与古研等^[27]和张振洪等^[28]检出的组分基本一致。 α -蒎烯、 β -蒎烯、长叶烯、水芹烯、洒剔烯、海松酸、左旋海松酸/长叶松酸、脱氢枞酸、枞酸和新枞酸为松脂中含量较高的组分。

不同砧木马尾松松脂组分含量响应松材线虫变化差异较小。松材线虫入侵松属植物后, 刺激分泌纤维素酶等细胞壁相关蛋白, 类毒液过敏原蛋白等激发寄主产生防御反应, 进而在接种后的 7 d 左右

引起萜烯类次级代谢产物的大量积累^[16]。本研究中, 在两种砧木马尾松接种松材线虫 7 d 时, 新枞酸仅在马尾松砧木中达最大值, 而海松酸仅在湿地松砧木中达最大值, 且萜类组分含量在两种砧木马尾松间均无显著差异。马尾松对松材线虫抗性可能与砧木无关, 马尾松更易感染松材线虫病可能由于自身不断进化, 形成更适宜松材线虫寄生的群体组成结构^[29]。

马尾松响应松材线虫入侵进行的主动防御造成萜烯类物质大量增加, 而不同抗性马尾松接种松材线虫后松脂组分变化情况有所不同。抗性指数越

高,产脂量越高,其单萜含量越高^[30]。高抗马尾松中 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯、柠檬烯、龙脑、长叶烯与 α -石竹烯含量在接种7 d时达最大值,含量动态变化呈先上升后下降趋势。易感马尾松中反式- β -金合欢烯、去氢枞酸与新枞酸含量在接种7 d时达最大值。接种松材线虫7 d时, α -蒎烯、 β -蒎烯、长叶烯与柠檬烯含量在高抗马尾松与易感马尾松之间存在显著差异($p < 0.05$),且均为高抗马尾松显著高于易感马尾松。Zhao等^[31]研究发现,松材线虫入侵后,马尾松释放的挥发性物质主要为 α -蒎烯、 β -蒎烯和长叶烯三种蒎烯类物质;Kuroda等^[32]研究发现,松材线虫入侵黑松后,单萜的含量明显增加,其中 α -蒎烯含量增加到健康松树的2~4倍, β -蒎烯和几种其他的单萜含量是健康松树的2~3倍;本研究结果与上述研究结果基本一致。

通过将 α -蒎烯、 β -蒎烯、长叶烯、柠檬烯、 β -月桂烯与龙脑萜类组分对松材线虫进一步梯度浓度试验表明: α -蒎烯溶液随浓度升高对松材线虫毒害作用越大,而 $150 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度下处理24 h松材线虫全部死亡。 β -蒎烯溶液不同浓度溶液处理0.5 h后松材线虫即达到约50%致死率,对松材线虫抑制作用与溶液浓度无关。长叶烯溶液随浓度升高对松材线虫抑制作用越大, $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度下处理0.5 h松材线虫达到80%致死率。柠檬烯溶液在 $3.60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度下处理0.5 h后松材线虫存活率趋于100%。 β -月桂烯 $1.20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度下处理24 h松材线虫致死率约50%。龙脑 $13.00 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度下处理24 h松材线虫致死率达约50%,且致死率升高较慢。上述结果与Liu等^[33]对马尾松研究结果相同, α -蒎烯、 β -蒎烯、长叶烯和柠檬烯在低浓度下即可抑制松材线虫的存活,是马尾松萜烯类主要防御成分;Niu等^[34]对马尾松研究也得出相似结论, α -蒎烯、 β -蒎烯等单萜类化合物在低浓度下具有抑制松材线虫繁殖的作用。

4 结论

马尾松和湿地松树干木质部松脂中共检测出19种松脂组分, α -蒎烯、 β -蒎烯、水芹烯、反式- β -金合欢烯、海松酸、山达海松酸、左旋海松酸/长叶松酸、去氢枞酸、枞酸和新枞酸在松脂中含量占比较高。松材线虫入侵树体后,萜烯类次生代谢产物在7 d后大量积累并发生显著变化。 α -蒎烯、

β -蒎烯、 β -月桂烯、柠檬烯、龙脑、海松酸和新枞酸含量在不同砧木马尾松接种松材线虫7 d时达最大值,其组分含量在两种砧木间无显著差异性,由此可得,砧木对马尾松松材线虫抗性并无影响。接种松材线虫7 d时 α -蒎烯、 β -蒎烯、 β -月桂烯、柠檬烯、龙脑、长叶烯、 α -石竹烯、反式- β -金合欢烯和新枞酸含量在不同抗性马尾松间动态变化有所不同, α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯、长叶烯为抗性马尾松显著高于易感马尾松($p < 0.05$); α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯与长叶烯低浓度下抑制松材线虫活性,与马尾松抗性有关,是马尾松萜烯类主要防御成分。

参考文献:

- [1] 刘彬,刘清华,周志春,等.马尾松 β -蒎烯合酶基因克隆以及对松材线虫侵染的响应[J].林业科学研究,2020,33(6):1-12.
- [2] 魏永成,刘清华,周志春,等.不同产脂量马尾松无性系木质部树脂道结构差异[J].林业科学,2016,52(7):8.
- [3] 尹焕焕,刘清华,周志春,等.马尾松产脂性状与生长性状的无性系变异及相关性[J].林业科学,2018,54(12):10.
- [4] TRAPP S, CROTEAU R. Defensive resin biosynthesis in conifers[J]. Annual Review of Plant Biology, 2001, 52(1): 689-724.
- [5] MARTIN D, BOHLMANN J. Chapter Two Molecular biochemistry and genomics of terpenoid defenses in conifers[J]. Recent Advances in Phytochemistry, 2005, 39(5): 29-56.
- [6] MILLER B, MADILAO L L, RALPH S, et al. Insect-induced conifer defense: White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in Sitka spruce[J]. Plant Physiology, 2005, 137(1): 369-382.
- [7] STROM B L, GOYER R A, INGRAM L L. Oleoresin characteristics of progeny of loblolly pines that escaped attack by the southern pine beetle[J]. For Ecol Manage, 2002, 158(1): 169-178.
- [8] KELKAR V M, GEILS B W, BECKER D R, et al. How to recover more value from small pine trees: Essential oils and resins[J]. Biomass and Bioenergy, 2006, 30(4): 316-320.
- [9] 朱福鸿. α -蒎烯抑制HepG2细胞增殖及相关机制研究[D].广东:广东药学院,2015.
- [10] BOLLA R I, JORDAN W. Cultivation of the pine wilt nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in axenic culture media. [J] Journal of Nematology, 1982, 14(3): 377-381.
- [11] 张华锋,陈思宇,刘刚,等.松材线虫病疫木卫生伐对马尾松纯林林分结构的影响[J].浙江农林大学学报,2020,37(4):7.
- [12] BOHLMANN J. Pine terpenoid defences in the mountain pine

- beetle epidemic and in other conifer pest interactions: specialized enemies are eating holes into a diverse, dynamic and durable defence system[J]. *Tree Physiology*, 2012, 32(8): 943-945.
- [13] KARANIKAS C, WALLKER V, SCALTSOYIANNES A, *et al.* High vs. low yielding oleoresin *Pinus halepensis* Mill. trees GC terpenoids profiling as diagnostic tool[J]. *Ann For Sci*, 2010, 67(412): 1-8.
- [14] CASSELLA S, JOHN P C, SMITH I. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection[J]. *International Journal of Aromatherapy*, 2002, 12(1): 2-15.
- [15] 占爱瑶, 由香玲, 詹亚光. 植物萜类化合物的生物合成及应用[J]. *生物技术通讯*, 2010 (1): 5.
- [16] 王 璇. 松材线虫CYP450基因与松树萜烯类物质代谢的相关性[J]. *林业科学*, 2017, 53 (6): 6.
- [17] 文福姬, 俞庆善. 植物性天然香料的研究进展[J]. *现代化工*, 2005, 25 (4): 4.
- [18] 杨宝君, 潘宏阳, 汤坚, 等. 松材线虫病[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [19] 陈根林. 松树化学分类与松材线虫病抗性研究[J]. *安徽林业科技*, 2021, 47 (5): 4.
- [20] 解 斌, 安秀红, 陈艳辉, 等. 苹果砧木对低氮胁迫的响应及适应性评价[J]. *植物营养与肥料学报*, 2022, 28 (6): 12.
- [21] 丁祥, 钟海霞, 王西平, 等. 新疆葡萄砧木叶片解剖结构观察及抗旱性评价[J/OL]. *分子植物育种*, 2023, 1-18.
- [22] 罗柠. 临海市森林城市建设规划研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2013. .
- [23] 丁泉. 临海市土地利用结构分析及其演化趋势研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2009.
- [24] 刘 彬, 刘清华, 周志春, 等. 基于高通量转录组测序筛选马尾松抗松材线虫病相关基因[J]. *林业科学研究*, 2019, 32 (5): 1-10.
- [25] 徐六一, 章 健, 高景斌, 等. 安徽省松材线虫病抗性育种研究进展[J]. *安徽林业科技*, 2013, 39 (2): 8-10.
- [26] LIU Q H, WEI Y C, XU L Y, *et al.* Transcriptomic profiling reveals differentially expressed genes associated with pine wood nematode resistance in Masson Pine (*Pinus massoniana* Lamb.)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4693.
- [27] 古 研, 赵振东, 毕良武, 等. 马尾松松节油标准样品的定值研究[J]. *生物质化学工程*, 2011, 45 (1): 4.
- [28] 王振洪, 商士斌, 宋湛谦, 等. 气相色谱用马尾松松香标准样品的研制[J]. *生物质化学工程*, 2007, 41 (6): 1-5.
- [29] 叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状, 防治技术与对策分析[J]. *林业科学*, 2019, 55 (9): 1-10.
- [30] 魏永成. 接种松材线虫后抗性马尾松的防御物质变化及转录组分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016.
- [31] ZHAO L L, WEI W, KANG L, *et al.* Chemotaxis of the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to volatiles associated with host pine, *Pinus massoniana*, and its vector *Monochamus alternatus*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2007, 33(6): 1207-1216.
- [32] KURODA K. Terpenoids causing tracheid-cavitation in *Pinus thunbergii* infected by the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1989, 55(2): 170-178.
- [33] LIU B, LIU Q H, ZHOU Z C, *et al.* Two terpene synthases in resistant *Pinus massoniana* contribute to defense against *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Plant Cell and Environment*, 2021, 44(1): 257-274.
- [34] NIU H T, ZHAO L L, LU M, *et al.* The ratio and concentration of two monoterpenes mediate fecundity of the pinewood nematode and growth of its associated fungi[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31716.

Response of Different Rootstocks and Resistant Resin Components of *Pinus massoniana* to Pine Wood Nematode

LI Wen-hua^{1,2}, LIU Qing-hua¹, ZHOU Zhi-chun¹, GAO Kai¹, Luo Ding-hui³

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, Zhejiang, China; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. Taizhou Senwei Forestry Survey Planning Design Co., Ltd., Linhai 317000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] By inoculating *Pinus massoniana* Lamb. with pine wood nematode, the changes of pine resin components before and after inoculation were analyzed, so as to provide a theoretical basis for the study of resistance of *P. massoniana* to pine wood nematode disease. [Method] The experimental material were 5-year-old clones of *P. massoniana* in Linhai City, Zhejiang Province. We extracted the pine resin components of *P. massoniana* rootstocks and *P. elliotii* rootstocks, highly resistant and susceptible *P. massoniana* inoculated with pine wood nematode for 1, 7 and 15 days and also analyzed the content and dynamic changes of each pine resin component. The effective terpenes were used to treat pine wood nematode. Then we analyzed the survival rate of pine wood nematodes. [Result] The results showed that 19 oleoresin terpenoids were identified. The abundant terpenoids were α -pinene, β -pinene, carylene, pimaric acid, sandaracopimaric acid, palustric acid/levopimaric acid, dehydroabietic acid, neoabietic acid and abietic acid. In the rootstock of *P. massoniana*, the content of β -myrcene was significantly higher than that of *P. elliotii* rootstock 1 day after inoculating with pine wood nematode ($p < 0.05$); the contents of the above components had no significant difference among different rootstocks after inoculating with pine wood nematode 7 days and 15 days. The contents of α -pinene, β -pinene, β -laurene, limonene, borneol, longifolene, α -caryophyllene, trans- β -farnesene and neoabietic acid in different resistant *P. massoniana* changed differently after inoculation with pine wood nematode. In the high resistance *P. massoniana*, the contents of α -pinene and β -pinene were significantly higher than those of susceptible *P. massoniana* 1 day after inoculating with pine wood nematode ($p < 0.05$); In the high resistance *P. massoniana*, the content of α -pinene, β -pinene, limonene and longifolene were significantly higher than those of susceptible *P. massoniana* 7 days after inoculating with pine wood nematode ($p < 0.05$); The situation was the same when pine wood nematode was inoculated for 15 days as when pine wood nematode was inoculated for 7 days. The result of gradient concentration test of the above terpenoids showed that: when the concentration of α -pinene was $150 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ for 0.5 h, the survival rate of pine wood nematode was 20%. Different concentrations of β -pinene solution had the same inhibitory effect on pine wood nematode, and the survival rate reached about 50% when treated for 0.5 h. When limonene solution concentration was $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ for 0.5 h, the survival rate of inhibited pine wood nematode was almost zero. When the concentration of longifolene was $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ for 0.5 h, the survival rate of pine wood nematode was 18%. [Conclusion] There are no obvious relationships between different rootstocks and resistance to *P. massoniana*. There are significant differences in α -pinene, β -pinene, limonene and longifolene contents between high and susceptible *P. massoniana* inoculated with pine wood nematode, and the content of high resistance *P. massoniana* was significantly higher than those of susceptible *P. massoniana*. At low concentrations α -pinene, β -pinene, limonene and longifolene inhibit the activity of pine wood nematodes, which shows the four terpenoids are related to resistance of *P. massoniana*.

Keywords: *Pinus massoniana*; *Bursaphelenchus xylophilus*; stock; resistance; rosin component