

泡桐对丛枝病原 MLO 的抗性研究*

田国忠 熊耀国 汪跃 赵丹宁 李峰 徐刚

摘要 本试验通过试验林自然发病调查、病根苗抗病性测定及 DAPI 染色等方法,对不同无性系及杂交组合的泡桐试材抗病性进行了评估。结果表明,5~6年生泡桐自然感染 MLO 后的地面部分发病现象可归纳为四种类型:丛枝型(WB)、黄化型(Y)、丛枝黄化型(WB+Y)和丛枝花变叶型(WB+P)。外部发病差异与其韧皮部筛管中 MLO 的含量有直接联系。一般情况下,MLO 的浓度高低依次为花变叶部位、丛枝部位、黄化部位、无症或健康部位。在根部 MLO 浓度低,且无性系间差异不显著。不同无性系间或杂交组合间抗病性存在明显差别。根据病状反应、病情指数和病组织 MLO 浓度测定结果,可以区分为高抗、中抗和感病三种类型。初步筛选出一批抗病性强、生长性状好有可能被利用的试材,以及生长性状差但表现出较强抗丛枝病特性的无性系或杂交组合。

关键词 泡桐无性系、类菌原体、抗病性

在我国,泡桐丛枝病在生产上成为重大问题。选用抗病品种成为泡桐良种化和农用林业发展中的迫切需要。由于 MLO 尚不能人工培养,造成泡桐抗丛枝病鉴定及抗病育种工作的诸多困难。本试验在前人研究的基础上^[1],根据无性系试验林自然发病调查,温室埋根苗抗性测定和病组织 MLO 含量测定,对无性系间抗性差异和特点,进行了分析和比较。现将结果总结如下。

1 试材和方法

1.1 试验林发病调查

1.1.1 试验地设置 试验地设在山东省兖州县林科所,三号林面积 1.3 hm²,1987年3月29日定植,样本 595 个;七号林面积 2 hm²,1986年3月27日至28日定植,样本 920 个,同一无性系或杂交组合按 3~5 株一个小区,4~5 次重复,随机排列,株行距为 4 m×5m。按常规方法管理。

1.1.2 丛枝病调查方法 自 1990年4月至1991年8月,先后4次对试验林进行丛枝病调查,逐株记载症状,并分级统计丛枝类型。丛枝症状分级标准参见李荣幸等的报道¹⁾。

1.2 埋根苗发病调查

分别于 1990年5、8月和1991年5月在试验林内挖取发病丛枝在 I~III 级之间和健康(或无症)的泡桐 1~2 年生根,随机挑选直径在 0.5~1.0 cm 的,截成长约 4~5 cm,在温室花盆中埋根育苗,在温度 20~30℃下,定期观察记载出苗率、发病率、症状类型、生长势及死苗情况。

1992—04—20 收稿。

田国忠助理研究员,熊耀国,汪跃,赵丹宁(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091);李峰,徐刚(山东省兖州县林业科学研究所)。

* 本文为“七五”国家攻关项目“泡桐属的良种选育”部分内容。试验中得到中国林科院林研所育种室朱湘渝、李淑梅、佟永昌和黄东森老师及山东省兖州县林科所其他同志协助,特此致谢。

1) 李荣幸,程绍荣,刘廷志,等.泡桐对丛枝病的抗性差异及其自然鉴定.泡桐,1987,(1):1~6.

1.3 病原 MLO 的检测

采用 DAPI 染色技术^[2,3],测定 1~2 年生粗根皮和毛细根韧皮部 MLO 含量;地上部取当年萌发丛枝的幼茎、叶柄、叶脉及花器部分,每样品徒手切片 15~20 片,按 50% 以上切片特异性荧光强度为该样品 MLO 含量标准。

2 结果和分析

2.1 试验林丛枝病调查结果

2.1.1 田间泡桐丛枝病发病类型 4~5 年生泡桐感染 MLO 后的发病现可归为四类:①丛枝型(WB);②黄化型(Y)——病树部分或全部枝条上叶片黄化,但不出现丛枝;③丛枝黄化型(WB+Y)——同一病树具丛枝和未丛枝叶片黄化症状;④丛枝花变叶型(WB+P)——丛枝条上有异常花芽分化,绿萼或花变叶。从统计结果来看(表 1),试材以 WB 型最为普遍,Y 型次之,WB+P 型比例较少。

对近 70 个不同无性系或杂交组合的泡桐发病类型、丛枝病株率及病情指数的调查统计结果,显示了不同种源的泡桐对 MLO 侵染的症状反应存在着显著差别和规律。将泡桐种间的发病反应加以比较可以发现,白花泡桐(*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.),兰考泡桐(*P. elongata* S. Y. Hu)和楸叶泡桐(*P. catalpifolia* Gong Tong)以 WB 型最为常见,其中仅楸叶泡桐中出现 WB+P 型;毛泡桐(*P. tomentosa* (Thund.) Steud.)主要以 Y 型或 WB+Y 型为主。至于杂交组合的症状则因父本、母本的遗传背景及遗传力不同而变化较大。

2.1.2 无性系和杂交组合间的抗病性

表 2 列出了对丛枝病抗病和感病的部分无性系和杂交组合。一般情况下,田间表现抗病的材料其生长性状却不理想,如 CH₂₃₈、C₁₆₁ 等生长缓慢,其胸径和材积远比感病的 C₁₃₆、C₁₀₂ 和 C₈₄₋₈₄ 等无性系要小。在调查过程中,也发现少数无性系既有良好的生长性状,又对 MLO 具有高的抗性,如 C₈₃₋₄₄、CH₉₇₋₁、C₈₄₋₂₀、C₈₄₋₂₇、C₈₄₋₅₆₋₁、C₁₃₇、CH₂₃₆₋₁ 等。

表 1 试验林丛枝病调查结果

症状	株数	三号地		七号地		
		病株率 (%)	病情指数	病株率 (%)	病情指数	
WB 型	I 级	72	14.4	45	9.0	
	II 级	89	17.8	128	17.8	
	III 级	92	18.4	101	14.1	
	IV 级	44	8.8	27	3.9	
Y 型	22	4.4	—	70	11.9	—
WB+Y 型	35	7.0	—	16	2.2	—
WB+P 型	7	1.4	—	10	1.4	—
(健康或无症)	181	36.2	—	334	46.5	—

表 2 无性系和杂交组合的田间抗性比较

抗性	无性系	杂交组合
高度 (相对丛枝率 ^① <-10%) 抗病 或相对病情指数 ^② <0)	C ₈₅₋₀₂₅ 、C ₈₅₋₀₃₃ 、C ₈₅₋₀₃₅ 、C ₄₂₇ 、楸 4、楸 12、C ₈₄₋₁₀₄ 、CH ₂₃₆₋₃ 、C ₈₄₋₁₀₃ 、C ₈₄₋₆₄ 、C ₈₄₋₂₆	CH ₂₄₁₋₄ 、CH ₅₅₋₁ 、C ₃₉₈₋₄ 、C ₈₃₋₄₄ 、C ₈₄₋₂₁ 、C ₈₄₋₂₅ 、C ₈₄₋₂₀ 、C ₈₄₋₁₄ 、C ₈₃₋₁₁₂ 、C ₈₃₋₄₅ 、CH ₂₃₈ 、CH ₂₃₆₋₁ 、CH ₆₋₁ 、CH ₄₇₋₁ 、CH ₂₃₋₁
中度 (-10%<相对丛枝率 ^① <10%) 抗病 或 10>相对病情指数 ^② >0)	C ₈₅₋₀₃₂ 、C ₈₅₋₀₂₇ 、C ₈₄₋₈₄ 、C ₈₅₋₀₀₆ 、C ₁₃₇ 、C ₈₄₋₈₃₋₁ 、C ₂₅₋₄ 、C ₈₅₋₀₃₄	CH ₂₃₃₋₂ 、CH ₇₋₁
感病 (相对丛枝率 ^① >10%) 或相对病情指数 ^② >10)	C ₁₀₂ 、C ₈₅₋₀₂₃ 、C ₈₅₋₀₂₉ 、C ₁₃₆ 、C ₈₅₋₀₂₆ 、C ₈₅₋₀₃₆ 、C ₈₄₋₈₄₋₁ 、C ₈₄₋₈₅₋₁ 、C ₈₄₋₈₅₋₂ 、C ₈₄₋₄₈ 、C ₈₅₋₀₂₈ 、C ₈₅₋₀₂₁ 、C ₈₄₋₈₄₋₂ 、楸 3、楸 9	CH ₂₄₂₋₁ 、CH ₂₃₅₋₁ 、CH ₃₂₋₁ 、C ₁₁₃ 、CH ₂₁₁₋₂ 、CH ₂₁₁₋₃ 、CH ₂₁₁₋₁ 、C ₃₇₅ 、CH ₈₂ 、C ₄₀₀₋₃ 、C ₄₀₈₋₄ 、C ₃₅₈₋₆

注:①无性系(或杂交组合)丛枝率—试验林平均丛枝率;②无性系(或杂交组合)病情指数—试验林平均病情指数。

2.2 埋根苗丛枝病调查结果

2.2.1 病、健树埋根出苗率 对 22 个无性系的病、健树埋根出苗率(%)进行方差分析, $F=1.739$, 取可靠性 95%, 则 $F_{0.05}(fD=21, fH=14)=2.38$, 故 $F < F_{0.05}$, 由此判断病与健埋根出苗率差异不显著。即感染丛枝病的泡桐, 用其根繁育苗木时, 对出苗率无显著影响, 而且所有病根苗在一个月左右才逐渐出现症状。

2.2.2 苗期发病率、症状和生长势 各无性系病树的根段萌生的泡桐苗, 其平均丛枝率为出苗数的 9.20%, 黄化株率为出苗数的 19.42%。个别未表现任何病状的无性系, 其埋根苗丛枝率却达 0.97%, 黄化株率可达 8.73%, 这意味着成树为无症状带菌体。

与成树泡桐发病情况相比, 苗期发病多为全株丛枝, 叶片黄化或整株矮化三种类型。黄化症状与成树叶片黄化相似。矮化多与黄化症状同时发生。同一无性系病根苗发病后的症状具有一致性, 而不同无性系间则存在明显差别。C₄₄₃ 为台湾泡桐 (*P. kawakamii* Ito) × 海岛泡桐 (*P. taiwaniana* Hu et Chang) 的杂交组合, 田间自然发病率为 83.33%, 病情指数为 47.92, 为所在七号地平均发病率的两倍, 其 I 级症状的病根苗的丛枝率为 50%, 丛枝苗生长衰退, 约一个月左右即枯死; 而德州毛泡桐无性系 (C₈₃₋₄₄) 成树发病率为 66.67%, 病情指数仅为 29.17, 其 I 级症状病根育苗的丛枝率仅为 4.76%, 且丛枝苗生长势较强, 3 个月后才逐渐枯死。CH₂₃₈ (台湾毛泡桐亲本) 在田间表现了良好的自然抗性, 丛枝率仅为 20%, 黄化株率为 20%, 其 I 级症状埋根苗未出现丛枝苗, 黄化株率则达 53.80%, 大部分黄化苗矮化, 一个半月后枯死, 但有两株黄化苗新出叶逐渐恢复正常而表现为隐症现象。值得注意的是 CH₂₃₆₋₁ (毛泡桐 × 兰考桐) 杂交组合, 病根苗不仅未形成丛枝, 而且部分表现黄化和矮化的病苗, 一个月之后新出叶片黄化症状消失, 且植株生长接近无症状或健康苗水平。还有一种类型, 包括 C₁₃₆ (荣成兰考桐)、C₁₃₇ (兰考桐原选一号)、C₁₂₅ (兰考桐)、C₈₄₋₈₄ (罗山白花桐) 和楸 4 (楸叶泡桐) 等, 虽在田间表现良好的速生性、较高的丛枝率和病情指数, 但其病根苗丛枝率皆为零, 黄化株率也很低。

2.3 病原 MLO 含量在寄主上的反应

2.3.1 4~5 年生病树体测定 1990 年 5、8 月, 1991 年 5 月, 先后取表现 I 至 III 级丛枝症状的病株共 32 个无性系根, 通过 DAPI 染色技术测定根部 MLO 的浓度。无论在 5 月份, 还是 8 月份 (发病盛期) 取样, 病根筛管中 MLO 特异荧光都很微弱, 因而无法用于无性系间差异比较。这与 Seemiller 等^[4] 对梨树衰退病和苹果簇叶病的研究结果有所差别。

1990 年 8 月和 1991 年 8 月取表现不同症状类型的无性系和杂交组合的地上部组织进行病原检测, 结果显示 (表 3 及图版 I-1~4) 丛枝部位韧皮部筛管中 MLO 浓度高且稳定; 具花变叶的花梗部位 MLO 特异性荧光更为强烈; 黄化叶片的叶柄及叶脉中 MLO 浓度很低; WB+Y 型病树在丛枝部位可检测到大量 MLO 荧光, 而在黄化叶片的叶脉和叶柄的韧皮部筛管中同样显示了低水平的 MLO 荧光。这反映了病状类型与 MLO 浓度之间的密切联系。

2.3.2 埋根苗测定 试验结果表明, 泡桐苗期发病反应与组织中 MLO 的浓度存在相关, 这与成树的测定结果基本一致。即 WB 型的 MLO 浓度远高于 Y 型。定期测定苗期叶柄中 MLO 浓度, 可以发现 (图 1, 图版 I-5~8), C₄₄₃ 病苗随丛枝的出现和发展, 其叶柄组织中 MLO 浓度逐渐增大, 至 6 月 25 日达到最大值, 其后维持在中等水平直至病苗枯死。C₈₃₋₄₄ 病苗虽表现典型的丛枝症状, 但叶柄中 MLO 的含量却一直处于很低的水平。C₈₅₋₀₂₈ 出苗初期生长正常, 而丛枝形成后体内 MLO 浓度增加迅速, 并且超过感病的 C₄₄₃。C₈₅₋₀₃₆ 发病初期即严重矮化, 丛枝形成

表3 4~5年生泡桐无性系和杂交组合 MLO 检测结果

症状	无性系	检测部位	MLO 荧光强度
WB 型	海岛泡桐	丛枝幼枝、叶柄及叶脉	++++
	C ₁₆₁ (毛泡桐)	无症幼枝、叶柄及叶脉	+(-)
	C ₁₂₅ (兰考泡桐)	丛枝幼茎、叶柄及叶脉	++
	楸4(楸叶泡桐)	同上	++
	C ₄₄₃ (台湾泡桐×海岛泡桐)	同上	++~++++
	C ₈₃₋₄₅ (兰考泡桐)	同上	+
	C ₈₃₋₄₄ (德州毛泡桐)	同上	+
	C ₁₃₇ (兰考原选1号)	同上	+
Y 型	C ₈₄₋₅₆₋₁ (桐陵毛泡桐)	黄化叶片的叶柄和叶脉	+(-)
	C ₈₄₋₂₆ (天然杂种)	黄化叶片的叶柄和叶脉(叶片边缘变褐)	+(-)
WB+Y 型	C ₁₃₆ (荣城兰考桐)	丛枝幼茎、叶柄及叶脉	++++
		未丛枝条上的黄化叶片、叶柄和叶脉	+(-)
WB+P 型	C ₈₅₋₀₃₆ (楸叶泡桐)	丛枝幼茎、叶柄及叶脉	++
		变态花梗	+++~++++
		CH ₂₃₈ (台湾毛泡桐亲本)	++
		变态花梗	+++

注: MLO 浓度表示: +++++ 很高; ++++ 较高; ++ 中等; + 较低; +(-) 少数切片中检测到。

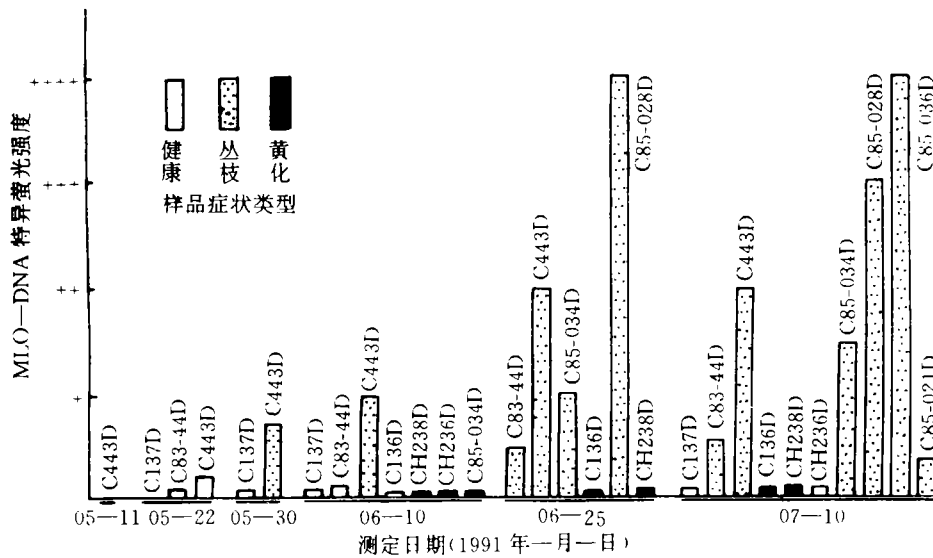


图1 埋根苗叶柄 MLO 浓度测定结果

后,叶色深绿,叶柄组织 MLO 浓度比 C₈₅₋₀₂₈ 更高。而 C₈₅₋₀₂₁ 虽然表现丛枝症状,但在其叶柄韧皮部却检测不到 MLO 特异荧光。以上结果从不同侧面反映了泡桐与病原相互作用的差异。可以认为,在病根带病前提下,无性系和杂交组合抑制 MLO 增殖和运转能力的不同,反映出苗期抗丛枝病的差异。

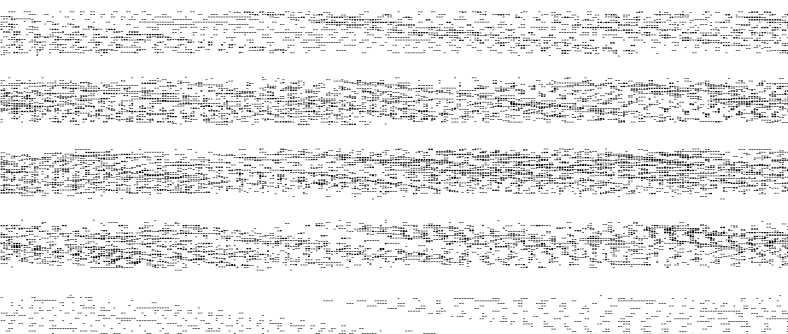
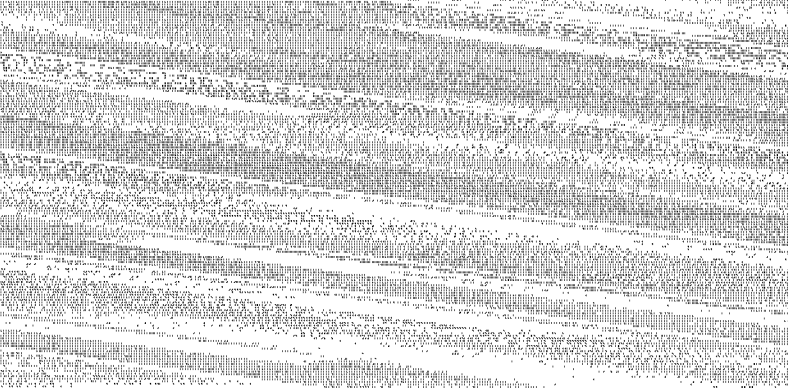
3 讨 论

在以往报道的泡桐丛枝病害调查中,常未注意黄化和花器变态症状。已有关于病毒引起泡桐花叶病的报道^[5],与 MLO 引起的黄化症状有明显差异,这可从三个方面加以说明。其一,虽然在电镜检查中未证明 MLO 的存在(受切片数量、病原浓度或样品制备过程中误差的影响),但从大量黄化叶柄纵切片中,已发现少量充满 MLO-DNA 荧光颗粒的筛管分子存在(参见图版 I-8);其二,在 WB 型成树与其埋根苗产生单纯性叶片黄化之间的联系;WB+Y 型、Y 型和埋根病苗出现叶片黄化症状的一致性;健康对照株不出现这种黄化症状,都意味着 MLO 的侵染与叶片黄化之间的密切联系;其三,由 MLO 引起的许多树木病害,象白腊树黄化病,桃 X 病、椰子树黄化病和榆树黄化病等,叶片黄化都是其典型的症状反应,而且黄化部位经电镜检查证明 MLO 含量都不高,这与本试验结果是不矛盾的^[6,7]。当然,是否会存在 MLO 与病毒复合感染的情况,尚待进一步证实。我国是泡桐原产地,本试验基本收集了国内主要种质类型,所以受试材料表现出对 MLO 的反应多样性是必然的,这为进一步开展抗病机理研究打下一定基础。根据病害调查和试验结果,可以推断,泡桐对 MLO 的抵抗作用至少存在以下几种方式:①阻止介体叶蝉和蜡象传播病原——在病害调查过程中,已发现某些试材的抗病性与阻止介体取食(叶片或幼茎表面被厚长的腺毛或分泌粘液物质)和取食后叶片形成过敏性枯死斑或穿孔有关;②将病原限制在树体的特定区域——成树泡桐受 MLO 侵染后,常常只有部分枝条丛枝,而且只有丛枝部位 MLO 能大量繁殖,从而限制了病原扩展和危害。对 WB 型不同无性系和杂交组合的生长性状统计结果表明,4~5 年生泡桐感染 MLO 后部分枝条的丛枝,对整个树体生长和材积影响减小即说明这一问题;③抑制病原增殖——寄主体内存在或诱导产生的某些物质(象酚类物质、过氧化物酶和胍胍质等)对 MLO 的增殖具有抑制作用,叶片黄化部位 MLO 浓度低,很可能是产生了对病原有毒的物质或缺少 MLO 生长和增殖的某些营养成分造成的;④寄主的速生性削弱了病原的致病作用——许多无性系象 C₁₂₅、C₁₃₆、C₁₃₇、楸 4 等的苗期抗病性可能属于此类型。进一步了解泡桐抗丛枝病原 MLO 的方式,对于根据育种目标选育抗病品种具有重要的意义。

植物 MLO 病害的抗性鉴定与其它病害相比具有更大的难度,本试验首次尝试用病根苗来研究无性系间苗期症状反应的变化,为泡桐抗丛枝病的苗期鉴定提供了一条新的思路。

参 考 文 献

- 1 苏鸿基,蔡丽杏.泡桐属对簇叶病之抗病性研究.中华林学季刊,1983,16(2):187~202.
- 2 金开璇,田国忠,汪跃.组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究.植物病理学报,1989,19(3):185~188.
- 3 田国忠.DAPI 染色技术及其在树木类菌原体病害研究中的应用.河南林业科技,1990,(3):25~27.
- 4 Seemüller E, Schaper U, Zimbelmann F. Seasonal variation in the colonization pattern of MLOs associated with apple proliferation and pear decline. Journal of Plant Diseases and Protection, 1984, 91(4): 371~382.
- 5 孙丽娟.泡桐花叶病两种病原分离物的鉴定.林业科学,1986,22(2):142~146.
- 6 Sinclair W A. Sampling and histological procedures for diagnosis of ash yellows. Plant Diseases, 1989, 73(5): 432~435.
- 7 Douglas S M. Detection of MLOs in peach and chokecherry with X-disease by fluorescence microscopy. Phytopathology, 1986, 76(8): 784~787.



Resistances of Different Clones of *Paulownia* to Witches' Broom Agent Mycoplasma-like Organism(MLO)

Tian Guozhong Xiong Yaoguo Wang Yue Zhao Danning Li Feng Xu Gang

Abstract Resistance of the clones and hybrids in genus *Paulownia* were evaluated by field investigation and DAPI staining fluorescence microscopy for MLO detection. Results showed that four types of symptoms were usually occurred in adult diseased trees, i. e. I. witches' broom (WB), II. yellowing (Y), III. witches' broom & yellowing (WB+Y), and IV. witches' broom & Phyllody (WB+P). Symptom expression of diseased trees are directly relevant to the MLO concentration within the sieve tubes of vascular tissues. In general, the MLO concentration varies from high to low in order as follows: phyllody, witches' broom, yellowing and healthy-like parts. However, MLO population in the roots of all the clones were indistinguishable by means of DAPI staining fluorescence microscopy. There were apparent differences in the resistances of various clones and hybrids to MLOs. According to the types of symptoms, disease index and MLO detection results, the testing material can be divided into three categories: high-resistant, middle-resistant and susceptible. Several good clones and hybrids with high resistance and ideal growth character were screened.

Key words *Paulownia* clone, mycoplasma-like organism (MLO), resistance

Tian Guozhong, Assistant Professor, Xiong Yaoguo, Wang Yue, Zhao Danning (The Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091); Li Feng, Xu Gang (The Forest Research Institute of Yanzhou County, Shandong Province).

“中国亚热带桉树引种和种源研究”达到国际先进水平

“中国亚热带桉树引种和种源研究”是中国林科院林业研究所等单位承担的中澳国际合作项目。该课题历时 8 a, 引进国外桉树 50 种 230 个种源, 在南方 6 省(区)营造树种/种源试验林 80 hm², 优良树种示范林 200 hm², 取得了显著成果: (1) 在多点试验基础上, 提出了巨桉 (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden)、亮果桉 (*E. nitens* (Deane & Maiden) Maiden) 等主要桉树地理种源遗传变异规律; 同时应用生物气候分析方法的林木引种驯化理论, 对巨桉、亮果桉的引种栽培适生范围进行了预测; 提出了我国桉树栽培的地理区划, 为我国桉树人工林栽培和经营提供了科学依据; 分别为西南高原、东南沿海和中亚热带中部不同气候类型区筛选出生长及经济性状具明显优势的桉树树种和优良种源, 与对照相比, 材积生长量可提高 50% 以上。目前已有 9 种桉树 35 个种源在生产中推广应用, 取得了明显的社会和经济效益。(2) 在研究过程中, 共发表论文 31 篇, 撰写专著和译著 4 部, 具有较高的学术水平, 对指导我国桉树科研、生产与教学工作有重要的参考价值。

最近, 该项研究通过了吴中伦、阳含熙、朱之悌等著名学者参加的成果评审。专家们认为: 该项研究目标起点高, 引进桉树种类多, 地域广, 工作难度大。研究成果丰富了我国林木引种驯化理论, 为其它树种的引种试验提供了可借鉴的经验。成果达到了国际同类研究的先进水平。 (郭苏)