

# 马尾松不同种源氨基酸含量与 抗松材线虫病的关系\*

徐福元 葛明宏 赵振东 朱克恭

**摘要** 在选出和验证抗病马尾松种源的基础上,研究了马尾松不同抗病性种源的树体内氨基酸含量的差异。结果表明,抗病种源在接种松材线虫前后均比较感种源含有较少的组氨酸、苏氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、酪氨酸和精氨酸等9种游离氨基酸。它们与感病指数均呈正相关,这说明游离氨基酸含量低马尾松种源抗松材线虫病。11种固态氨基酸的含量与感病指数有负相关性,说明其含量较高的种源具较强抗病性能。

**关键词** 马尾松种源 氨基酸 松材线虫病 抗病因子

据报道植物体内的氨基酸含量与植物抗病虫害性能有关,例如,天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和蔗糖均具有刺激害虫吸食的作用<sup>[1]</sup>,是抗虫水稻品种引起褐飞虱拒食的原因之一<sup>[2]</sup>。在有关松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle)的研究方面,已从40个马尾松种源中筛选出3个抗病种源(广西2号、广西3号和广东5号)。鉴于松材线虫入侵松树的木质部树脂道内,线虫危害的生活周期有2种方式,在入侵到树死亡期间取食植物细胞(薄壁细胞),树死之后,腐生生物进入死树,有细菌、真菌、非致病线虫和昆虫,松材线虫以取食真菌来维持其种群一年有余<sup>[3]</sup>。树体内营养成分的高低直接影响松材线虫的取食、生长发育和繁殖。本文选择有代表性的抗病种源广西2号、中抗种源四川2号、敏感种源陕西1号及敏感松种黑松(对照),分别对接种松材线虫前后的营养成分游离氨基酸、固态氨基酸含量与抗(感)病指数的关系进行了研究,以期发现鉴定抗病种源的简单方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试松种

从本所40个马尾松种源基因库选出的抗病种源广西2号(H)、中抗种源四川2号(M)、敏感种源陕西1号(L)和敏感松种黑松(S)。

### 1.2 接种线虫来源和方法

1997—12—20 收稿。

徐福元副研究员,葛明宏(江苏省林业科学研究所 南京 211153);赵振东(中国林业科学研究院林产化学工业研究所);朱克恭(南京林业大学)。

\* 1997~1999年国家自然科学基金资助项目“抗松材线虫病马尾松种源的化学组成及抗性机理研究”的部分内容。孙震(中国林科院林化所),张培(江苏省林科所)参加了部分工作。

松材线虫系从近期死亡的病死木分离而得,并经 PDA 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) 平板培养繁殖。接种采用“树干打孔法”,接种线虫量为 5 000 条/株。

### 1.3 发病症状进程观察标准

按徐福元<sup>[4]</sup>的分极标准进行。

### 1.4 采样及氨基酸的分析方法

1.4.1 采样 分别在接种线虫前一周(H10、M10、L10 和 S10)、接种线虫后一周(H11、M11、L11 和 S11) 和接种线虫后一月(H12、M12、L12 和 S12) 各采集 3 株松树,每株采侧枝样各 500 g,供试验分析。

1.4.2 分析仪器 用日立 835-50 氨基酸分析仪测定氨基酸成份组成和含量。

#### 1.4.3 分析步骤

(1) 游离氨基酸的提取(乙醇提取法):选取木材鲜样 5 g 切碎后,分别用 20 mL 75% 乙醇于沸水浴中回流提取 3 次并过滤,滤液合并后蒸去乙醇。加 15 mL 乙醚充分萃取除去脂溶性成分,水层以旋转蒸发器蒸发至干。干燥样品加 0.02 mol/L HCl 定容,并在 10 000 r/min 下离心 20 min,取上清液上机测定。

(2) 固态氨基酸的提取(盐酸水解法):取 50~100 mg 绝干试料于水解管中,加 10 mL 6 mol/L HCl,并将水解管与真空泵相连,抽至基本无气泡止,在真空管下用喷灯封管,并置于 110±1 烘箱内水解 24 h。打开水解管,过滤后定容。吸取 1 mL 至小烧杯中减压蒸干后,加入 1 mL 去离子水离心,取上清液上机测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 马尾松不同种源的抗病性验证

从 1996 年选出的 3 个抗病种源、11 个中等抗病种源、18 个低抗种源和 8 个敏感种源中选出 3 种有代表性的抗病类型,它们是①抗病种源广西 2 号、②中抗种源四川 2 号和③敏感种源陕西 1 号及敏感种源黑松作对照,经 1997 年 6 月 8 日的接种试验,进行抗病性验证。经观察,广西 2 号、四川 2 号、陕西 1 号和黑松的感病指数  $IP$  分别为 0、40.0、60.0 和 100.0,其抗病指数  $IR$  相反(表 1)。种源对松材线虫病的抗感病进程观察,抗病种源广西 2 号(H)的抗病性稳定,其它四川 2 号(M)、陕西 1 号(L)和黑松(S)的抗病指数下降明显,并存在很大差异(图 1)。抗病验证说明被选出抗病种源的可靠性和稳定性,其它 2 个抗病种源(GX3 和 GD5)也有同样结果,其抗病指数为 100.0。

表 1 不同种源对松材线虫病感病症状观察

种 源	抗病评价	株 数	感病指数 $IP$	抗病指数 $IR$
广西 2 号	抗病种源(H)	4	0 (c C)	100.0 (a A)
四川 2 号	中抗种源(M)	4	40.0 (b B)	60.0 (a AB)
陕西 1 号	敏感种源(L)	4	60.0 (a AB)	40.0 (b B)
黑松(对照)	敏感种源(S)	4	100.0 (a A)	0 (c C)

注:  $IP$  和  $IR$  后具不同小写字母者方差分析差异显著,具不同大写字母者差异极显著。

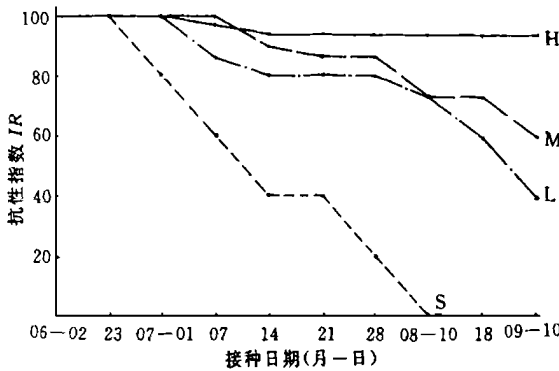


图 1 马尾松不同种源对松材线虫病的抗性进程差异

### 2.2 不同抗病性种源蛋白含量与感病性的关系

分析了抗病种源(H)、中抗种源(M)、敏感种源(L)和敏感松种黑松(S)的固态氨基酸、游离氨基酸和粗蛋白<sup>[5]</sup>(以固态与游离氨基酸之差表示)的含量及3次采样测定的蛋白的平均含量与对松材线虫病的感病指数进行相关性分析发现: 固态氨基酸与种源对松材线虫病的感病指数有较密切的相关关系, 它们的相关系数  $r$  (固态氨基酸) = - 0.780 6(表 2), 说明固态氨基酸含量高的种源抗松材线虫病。

表 2 马尾松不同种源的蛋白质含量与感病性的关系

测定对象(种源)	采样次数	固态氨基酸(g/kg)	游离氨基酸(g/kg)	粗蛋白(g/kg)
抗病(H)	3	12.056 4	3.534 5	8.521 9
中抗(M)	3	11.723 5	4.451 6	7.271 9
低抗(L)	3	11.567 4	3.184 7	8.382 7
对照黑松(S)	3	8.856 4	4.086 8	4.769 6
相关系数 $r$		- 0.780 6	0.328 4	- 0.786 6

### 2.3 不同抗病性种源氨基酸含量与感病性的关系

本试验对不同抗病种源的松材线虫病感病指数与不同时间采样(接种线虫前一周、后一周、后四周和平均)样本的游离和固态氨基酸进行了相关分析(表 3、4), 比较了差异显著性, 并评价了它们的抗性程度。

表 3 不同抗病种源游离氨基酸含量与感病指数的相关分析

氨基酸种类		相关系数 (r)			
中名	英名	接种前一周	接种后一周	接种后四周	平均
天门冬氨酸	Asp	- 0.375 1	- 0.429 4	- 0.385 1	- 0.497 5
苏氨酸	Thre	0.856 5	0.898 8	0.534 5	0.830 5
丝氨酸	Ser	0.018 2	0.116 2	- 0.587 2	0.002 5
谷氨酸	Glu	- 0.692 0	0.817 9	- 0.817 2	- 0.895 1
脯氨酸	Pro	- 0.102 9	0.401 7	- 0.249 0	- 0.153 4
甘氨酸	Gly	- 0.346 2	0.527 7	0.896 8	0.825 8
丙氨酸	Ala	0.016 5	- 0.526 3	- 0.774 4	- 0.554 6
胱氨酸	Cys	0.054 1	0.373 5	0.891 6	0.531 7
缬氨酸	Val	- 0.446 6	0.076 6	0.082 5	- 0.416 6
甲硫氨酸	Meth	0.141 1	0.859 8	0.681 5	0.529 7
异亮氨酸	Ile	- 0.167 5	0.265 9	0.994 7	0.955 6
亮氨酸	Leu	- 0.301 3	0.123 4	0.959 4	0.528 1
酪氨酸	Tyr	- 0.663 1	0.399 2	0.768 2	0.537 3
苯丙氨酸	Pheny	- 0.305 8	0.111 1	0.063 3	0.063 2
赖氨酸	Lys	- 0.421 8	- 0.072 3	0.540 7	- 0.353 7
组氨酸	His	0.891 6	0.891 6	0.891 6	0.891 6
色氨酸	Try	0.748 5	0.075 3	- 0.320 5	0.639 8
精氨酸	Arg	0.790 5	0.083 8	0.485 6	0.361 7
总 和	Total	0.205 6	0.457 3	0.289 7	0.328 4

2.3.1 游离氨基酸含量与感病指数的关系 游离氨基酸含量与感病指数呈正相关(表3)。表明抗病种源、比较敏感种源游离氨基酸的含量较低,即抗病种源感病指数随着游离氨基酸的含量降低而降低,有较明显相关趋势的为组氨酸、苏氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、酪氨酸和精氨酸等9种游离氨基酸。其中以不同采样期中的组氨酸和苏氨酸与不同抗病种源的感病指数相关显著的频次最多,而相关性最密切的为异亮氨酸和亮氨酸,相关系数分别为 $r=0.9947$ 和 $r=0.9594$ 。另外,也有谷氨酸和丙氨酸含量与感病指数呈负相关的,其它氨基酸的相关性均不明显。

2.3.2 固态氨基酸含量与感病指数的关系

(1) 固态氨基酸含量与感病指数呈负相关,说明抗病种源的固态氨基酸含量较高,相关趋势较明显的有异亮氨酸、天门冬氨酸、赖氨酸、丝氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等11种固态氨基酸(表4)。

表4 不同抗病种源固态氨基酸含量与感病指数的相关分析

氨基酸种类		相关系数 $r$			
中名	英名	接种前一周	接种后一周	接种后四周	平均
天门冬氨酸	Asp	-0.7134	-0.3267	-0.6531	-0.8286
苏氨酸	Thre	-0.6460	-0.3906	-0.5030	-0.5907
丝氨酸	Ser	-0.6652	-0.3822	-0.3920	-0.7815
谷氨酸	Glu	-0.5255	-0.3724	-0.6793	-0.6193
脯氨酸	Pro	-0.6758	-0.9844	-0.3116	-0.5271
甘氨酸	Gly	-0.7869	-0.3399	-0.3178	-0.4030
丙氨酸	Ala	-0.8001	-0.3664	-0.2978	-0.6251
胱氨酸	Cys	-0.1210	-0.0458	0.8916	0.3788
缬氨酸	Val	0.6049	-0.2776	-0.7490	-0.6691
甲硫氨酸	Meth	-0.5427	-0.2623	-0.0180	-0.3952
异亮氨酸	Ile	-0.7203	-0.4517	-0.7497	-0.8725
亮氨酸	Leu	-0.6473	-0.2671	-0.6792	-0.6878
酪氨酸	Tyr	-0.4813	-0.4736	-0.5788	-0.8577
苯丙氨酸	Pheny	0.1201	0.0182	-0.6919	-0.3722
赖氨酸	Lys	-0.8049	-0.3077	-0.6720	-0.6391
组氨酸	His	-0.7626	-0.3405	-0.7016	-0.6682
色氨酸	Try	0	0	0	0
精氨酸	Arg	-0.4963	-0.0987	-0.6229	-0.4718
总和	Total	0.6480	-0.3833	-0.7806	0.6915

(2) 固态氨基酸含量与感病指数呈正相关的仅胱氨酸一种,有较明显的相关趋势, $r=0.8916$ 。这一特殊现象有待进一步研究。

### 3 讨论

(1) 从40个马尾松种源中选出的有代表性的抗病种源广西2号、中抗种源四川2号和敏感种源陕西1号及敏感松种黑松(对照),经接种后的抗病验证,其感病进程和感病指数仍保持原有抗病水平,没有产生变异,说明抗病种源的抗病性较为稳定。

(2) 接种松材线虫后的马尾松不同抗病性种源的游离氨基酸中, 其游离氨基酸含量与感病指数存在明显正相关趋势的有组氨酸、苏氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、酪氨酸和精氨酸等 9 种。根据 Sogawa<sup>[1]</sup>、王荫长<sup>[6]</sup>、李盾<sup>[7]</sup>和张增全<sup>[8]</sup>等的研究, 叶鞘中数种游离氨基酸含量较少的水稻品种能抗褐飞虱。葛振华等<sup>[9]</sup>认为游离氨基酸总量以及其中的异亮氨酸、赖氨酸和丙氨酸含量较少的马尾松种源抗日本松干蚧。李盾<sup>[7]</sup>和李国清<sup>[2]</sup>建议将几种主要游离氨基酸(苏氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和谷氨酸、天门冬氨酸)作为鉴定或预测未知抗病花生和抗虫水稻品种的主要生化指标。本试验结果表明不同抗病性马尾松种源中的 9 种游离氨基酸也存在含量较少的趋势。这也反映用游离氨基酸的含量这一生化指标来鉴定抗病种源或抗病松种也有一定的前景。

(3) 松材线虫分泌的蛋白酶<sup>[10]</sup>和海藻糖<sup>[11]</sup>对植物蛋白质有明显的影响, 而与植物本身的抗(感)病程度有关<sup>[12]</sup>。本试验的分析结果表明, 具不同抗病性种源的 11 种固态氨基酸与松材线虫病的感病指数均有较明显的负相关趋势, 也就是说 11 种固态氨基酸含量高的马尾松种源抗松材线虫病。其抗病原因, 是物质含量高导致生长势旺盛, 产生丰富的次生代谢产物, 从而抑制了松材线虫的繁殖, 还是这些物质本身就具有抗松材线虫病的作用等有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Sogawa K. Mechanism of brown planthopper resistance in Mudgo variety of rice (Homoptera: Delphacidae). Appl. Entomol. & Zool., 1970, 5: 145 ~ 158.
- 2 李国清, 王荫长, 韩召军, 等. 南京 14 号叶鞘内的抗病因子及其对褐飞虱取食和存活的影响. 南京农业大学学报, 1996, 19(1): 42 ~ 47.
- 3 Kondo E. Pine wilt disease, nematological, entomological, and biochemical investigation, SR282, postdoctoral leaves in the department of plant pathology. University of Missouri, Columbia, 1982, 7 ~ 8.
- 4 徐福元, 席客, 徐刚, 等. 不同龄级马尾松对松材线虫病抗病的探讨. 南京林业大学学报, 1994, 18(3): 27 ~ 33.
- 5 菅原吉, 副岛正美著(张旭译). 蛋白质的定量分析(第二版). 北京: 农业出版社, 1981. 75 ~ 76.
- 6 王荫长, 李国清, 韩召军, 等. 水稻品种南京 14 号对褐飞虱抗病的研究. 褐飞虱对抗感水稻品种叶鞘内游离氨基酸的利用差异. 南京农业大学学报, 1995, 18(2): 116 ~ 119.
- 7 李盾, 王振中, 林孔勋. 花生体内多种生化因子对抗锈病性的综合作用. 华南农业大学学报, 1996, 17(2): 44 ~ 49.
- 8 张增全, 顾金炎. 褐飞虱饲料株中数种氨基酸的营养效应. 昆虫学报, 1985, 28(2): 15 ~ 21.
- 9 葛振华, 陆琴华. 马尾松抗蚧种源的皮型和内含物分析. 林业科学研究, 1992, 5(4): 483 ~ 486.
- 10 严东辉, 杨宝君. 松材线虫体外酶组成分析. 林业科学研究, 1997, 10(3): 265 ~ 269.
- 11 曹越, 沈伯葵. 松材线虫体外可溶性多糖组分的定性分析. 南京林业大学学报, 1997, 21(2): 70 ~ 73.
- 12 Strobel G A. Biochemical basis of the resistance of sugarcane to eyespot disease. J. Biol. Chem., 1973, 248: 1321 ~ 1328.

# Studies on the Relationship of Amino Acid Content of Different Masson Pine Provenances and Their Resistance to Pine Wood Nematode ( PWN)

Xu Fuyuan Ge Minghong Zhao Zhendong Zhu Kegong

**Abstract** On the basis of selected and tested resistance of masson pine (*Pinus massoniana*) provenances, and external symptoms of resistant difference of masson pine provenances, GX2(H), SC2(M), SX1(L) and black pine(S) (*P. thunbergii*) resistant to PWN (*Bursaphelenchus xylophilus*) were observed. The resistant provenance GX2 was stable ( $IR = 100.0$ ). However, those of the other provenances SC2, SX1 and black pine varied ( $IR = 60.0, 40.0$  and  $0$  respectively). Comparing with SC2, SX1 and black pine, the resistant factors in wood of GX2 were analysed and the results showed that: the factor that less sucking stimulatory of free amino acid (including His, Thre, Gly, Ile, Glu, Cys, Meth, Leu, Tyr, Try and Arg) existed in the wood of GX2 indicated it seemed to be one of the anti-feeding causes. A clear positive correlation was found between the external symptoms of index of pathogenesis ( $IP$ ) and the content of free amino acid. It indicated that the pines with low content of free amino acid are resistant to PWN and vice versa. And a negative correlation between the  $IP$  and the total crude protein and 11 stationary amino acids were also found.

**Key words** masson pine provenance *Bursaphelenchus xylophilus* amino acid resistant factor

---

Xu Fuyuan, Associate Professor, Ge Minghong (The Forestry Research Institute of Jiangsu Province Nanjing 211153); Zhao Zhendong (The Research Institute of Chemical Processing and Utilization of Forest Products, CAF); Zhu Kegong (Nanjing Forestry University).