

# 油茶抗炭疽病优良单株筛选及抗病机理研究

陈彧, 周国英\*, 宋光桃, 刘君昂, 董晓娜, 苟志辉

(中南林业科技大学 生物技术中心, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 通过 4 年自然感病性调查和 3 年人工接种鉴定, 从湖南常宁油茶基地筛选出抗病优良单株林大 140, 其自然感病率为 0, 人工接种果感病率为 0, 鲜出籽率 53%, 种仁含油率为 54%。单株抗病的生化机制结果表明: 果皮滤液孢子萌发率与感病性呈正相关; 接种 4 d 内, 过氧化物酶活性显著提高, 提高幅度与抗病性呈正相关; 超氧化物歧化酶活性下降, 下降幅度与抗病性呈正相关。

**关键词:** 油茶; 炭疽病; 抗病品种; 生化机制

中图分类号: S794.404 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0426-04

## Mechanism of resistance and *Colletotrichum gloeosporoides* in resistant individual trees of *Camellia oleifera*

CHEN Yu, ZHOU Guo-ying\*, SONG Guang-tao, LIU Jun-ang, DONG Xiao-na, GOU Zhi-hui

(Facilities of Biotechnology Central, South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China)

**Abstract:** Linda 140, a strain of the *Camellia oleifera* with high resistance, was obtained from Changning, Hunan, *Camelliae olifara* Abel produced areas. Its natural inoculation incidence was zero, fresh produced seed rate 53% and kernel oil rate 54%. The physiological biochemistry of resistance results revealed that the spore germination rate and the rate of infection had positive relativity. The POD activities were up while the SOD activities were down after inoculation. The change ranges in the POD and SOD activity was positive relativity with diseased resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* within 4 d after inoculation.

**Key words:** *Camellia oleifera*; *Colletotrichum gloeosporioides*; resistance cultivars; resistance mechanism

油茶炭疽病(*Colletotrichum gloeosporoides*)在油茶产区普遍发生, 引起严重落果、落蕾, 降低产量。目前对于该病的防治主要是通过化学防治及无公害防治<sup>[1]</sup>, 其中无公害防治包括使用生物源农药及选育抗病品种。选育抗病品种是最安全、经济、有效的途径<sup>[2]</sup>。

普通油茶(*Camelliae olifara* Abel)栽培面积大, 栽培历史长, 经过长期的自然选择, 个体间抗病性存在明显差异<sup>[3]</sup>。从普通油茶中筛选抗炭疽病优良单株, 用优株作接穗进行嫁接, 再用嫁接苗造林, 可以达到抗病高产的目的。笔者通过 4 年自然感病

性调查和 3 年人工接种鉴定, 从湖南常宁油茶基地筛选出 1 株抗病优良单株, 并初步研究了其抗病生化机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样地概况

试验地位于湖南省常宁市荫田镇和兰江乡, 地理位置分别为 112°35.5'E、26°22.8'N 和 112°22.5'E、26°21.3'N, 属中亚热带季风湿润气候, 年均温 18.1 °C, 年均降水量 1 436 mm, 无霜期 290~311 d, 年均日照 1 577.6 h。该地区油茶栽培历史长达 1

收稿日期: 2009-11-14

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD08A1104, 2009BAD B1B0204); 国家林业局重点项目(2006-47)

作者简介: 陈彧(1984—), 男, 江西吉安人, 硕士研究生, 主要从事森林病虫害研究; \*通讯作者, gyzhou2118@163.com

700 多年, 现有油茶林  $4.6 \times 10^4 \text{ hm}^2$ , 占全省油茶总面积的 3.9%, 油茶炭疽病自然发病率较低, 适合油茶抗炭疽病优良单株的筛选。

1.2 抗病性的测定

1.2.1 自然抗病性调查

从 2006—2009 年, 于每年 6 月中旬、7 月下旬及 10 月下旬, 分别进行林间自然感病率调查, 2009 年调查时统计健果数、病果数, 计算感病率。

1.2.2 人工接种抗病性测定

从 2007—2009 年, 于每年 6 月中旬至 7 月, 采用针刺法对林大 23、林大 26、林大 41、林大 140 进行林间人工接种, 每株接种 20 个健康果实, 以历史病株作对照, 接种后按常规保湿管理 4~7 d 后, 开始检查感病情况, 每隔 5 d 检查 1 次, 共检查 3 次, 记载病状特征, 计算感病率。

1.2.3 抗病性等级划分

以自然感病率为主, 结合人工接种感病率综合分析, 按文献[4]划分抗病类型。

1.3 抗病单株经济性状调查

2007—2009 年, 对油茶优良抗病单株进行主要经济性状(包括单株产果量、鲜出籽率、种仁含油率

等)的调查, 分析抗病单株的丰产性能。

1.4 单株抗病生化机制测定

1.4.1 鲜果皮浸渍液孢子萌发试验

参照文献[5]的方法, 进行鲜果皮浸渍液的制备及孢子萌发试验, 于 28 °C 恒温箱中保湿培养 8、12、24 h 后, 400 倍下计数视野中的孢子总数和萌发数, 并测量孢子芽管长度。

1.4.2 抗病单株防御酶活性的测定

从湖南省常宁油茶基地采集抗病优株林大 41、林大 140 及历史病株的健康叶片和果实, 叶片以当年新梢的第 2~4 片叶为宜, 果实以病害发生期的青果为宜, 测定 POD、SOD 活性, 参照文献[6、7]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 抗病性鉴定

2.1.1 自然抗病性

从 2006 年开始, 在广泛调查选择抗性优株的基础上, 2009 年对 4 株抗性强的优株进行详细调查, 并以历史病株作对照。调查结果列于表 1。

表 1 油茶抗病单株果实自然感病率

Table 1 Incidence of the disease in *Camellia* plant stand with different cultivars

抗病单株	自然感病率/%				2009 年总果数/个	2009 年病果数/个	2009 年落果率/%
	2006	2007	2008	2009			
林大 23	0	1.0	2.1	1.4	464	6	0.7
林大 26	0	1.7	2.3	2.2	527	12	1.4
林大 41	0	1.2	1.1	0.4	1 409	7	0.1
林大 140	0	0	0	0	1 763	3	0.0
历史病株(CK)	100	100	64	78	29	23	20.0

表 1 结果表明, 抗病优株自然感病率在 0~2.3%, 而且连续 4 年都表现高度的抗性, 符合油茶抗病选优的指标<sup>[7]</sup>。

2.1.2 人工接种抗性

2006—2009 年油茶炭疽病发生期, 在林间进行人工接种测定, 结果列于表 2。从表 2 中可以看出, 按人工接种感病率划分指标, 所鉴定植株抗病性有明显差异, 可分为 4 种类型。其中高抗和抗病类型的植株, 与自然感病性观察结果相一致。

表 2 油茶抗病单株人工接种结果

Table 2 The artificial inoculation result of *Camellia* plant stand with different cultivars

抗病单株	人工接种感病率/%					抗病类型
	2006	2007	2008	2009	平均	
林大 41	0	3.4	2.7	2.3	2.1eF	高度抗病
林大 140	0	0	0	0	0eEF	高度抗病
林大 23	5.5	9.9	10	10.8	9.0dDE	抗病
林大 26	11.8	8.7	9.7	9.1	9.8dD	抗病
林大 93	14.4	15.4	15.9	15.2	15.2cCD	易感病
林大 123	16.9	18.7	19.4	15.7	17.6cC	易感病
林大 166	69.9	78.4	89.7	88.8	81.7bB	严重感病
历史病株(CK)	100	100	98.1	100	99.5aA	严重感病

2.2 抗病单株经济性状

在观察初选抗病单株经济性状的基础上,对选定的抗性强的4株重点进行观察和调查,结果列于

表3.由表3可知,抗病单株林大140,鲜出籽率达53%,种仁含油率高达54%,基本符合全国油茶选优标准<sup>[8]</sup>.

表3 油茶抗病单株经济性状  
Table 3 The economic characters of *Camellia* plant stand with different cultivars

抗病单株	产果量/kg			平均	鲜果数/(个·kg <sup>-1</sup> )	鲜出籽率/%	种仁含油率/%
	2006	2007	2008				
林大41	20.0	9.0	27.0	18.6	30	46.7	43.8
林大140	25.0	12.0	51.0	26.0	46	53.0	54.0
林大23	8.7	9.7	11.8	10.1	126	56.0	46.1
林大26	6.9	10.0	18.0	11.6	86	43.1	46.0

2.3 单株抗病生化机制

2.3.1 鲜果皮浸提液对油茶炭疽病孢子萌发的影响

分别测定油茶炭疽病分生孢子在不同油茶抗病单株鲜果浸提液中的萌发率及芽管长度,结果见表4.由表4可知,油茶鲜果皮浸提液适合炭疽病孢子的萌发及菌丝的生长.分生孢子接种8h后,

就有大量孢子萌发,而在对照(3%的葡萄糖中)只有2%的孢子发芽.分生孢子在不同抗病单株间存在显著差异(5%),差异更明显的是芽管长度,本试验与刺伤接种试验结果相同,表明抗病株果皮中含有抑制炭疽病菌孢子萌发的某些活性物质.

表4 不同油茶抗病单株果皮浸提液对孢子萌发的影响  
Table 4 Effects of peel extract filtrates of different cultivars on the germination rates of spore

抗病单株	萌发率/%			芽管长度/μm		
	8 h	12 h	24 h	8 h	12 h	24 h
林大41	13	24	71	<1	2~4	6
林大140	6	15	68	<1	2	2~5
林大23	25	50	84	2~4	6	7~10
林大26	20	45	74	1~2	3~4	6~9
历史感病株	35	61	100	2~5	5~10	21~26
CK(3%葡萄糖)	2	14	50	<1	1~2	2~4

2.3.2 油茶果防御酶活与抗病性的相关性

分别测定不同抗病单株健康果皮中防御酶活性,过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性见表5.由表5可知,油茶抗病单株间果皮防御酶POD, SOD活性有差异.方差分析结果表明,  $F(\text{POD})=119.975 > F_{0.05}=3.34$ ,  $F(\text{SOD})=192.925 > F_{0.05}=3.34$ ,差异达极显著水平.不同单株间POD、SOD与其抗病性具明显的相关性,即自然抗病性强的,

SOD及POD活性都较高,反之,自然抗病性弱的,两者酶活较低.

3 结论和讨论

经过多年研究,筛选出4株抗病油茶优良单株,分别为高抗林大41、林大140及中抗林大23、林大26,其中林大140号在2007、2008年连续2年没有发现自然发病果实,连续3年刺伤接种不发病,表现出高度的抗病性,另外还表现出早熟、果皮薄、含油量高的优点,可以作为抗病育种的原始材料,也可直接用于生产.

油茶抗炭疽病单株抗病性是由多种因素决定的.抗病型果皮滤液中的孢子萌发率均比在感病型中低.显然,在抗病油茶果皮滤液中可能含有对炭疽病菌生长有抑制作用的物质,或者是缺少某些对

表5 抗病单株间健康果 POD、SOD 活性

Table 5 Comparison of POD and SOD enzyme at different plant to disease resistance

抗病单株	POD活性/(U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	SOD活性/(U·g <sup>-1</sup> )
林大23	6.58	71.57
林大26	6.69	73.47
林大41	9.02	78.70
林大140	9.35	81.37
历史病株(CK)	5.05	59.50

病菌生长和扩展有重要作用的物质。不同抗性的单株间, SOD、POD活性均存在一定差异。抗病性越强, SOD、POD活性越高, 抗性越弱, 两种酶活性越弱, 说明其活性与抗病性呈正相关。SOD是氧自由基清除剂, 与过敏性反应和植保素的积累有重要关系<sup>[9]</sup>, POD可催化酚类物前体聚合成木质素, 催化HRGP高级结构的形成, 起到加固植物细胞壁, 抵抗病原物入侵的作用, 另外它也是细胞内活性氧清除酶之一, 可避免活性氧的产生和积累<sup>[10]</sup>, 因此这两种酶与抗病性密切相关。笔者认为可以将油茶果接种后POD及SOD活性作为油茶品种抗性的生理生化指标。

#### 参考文献:

- [1] 周国英, 卢丽俐, 刘君昂, 等. 油茶炭疽病拮抗内生细菌的筛选[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2008, 34(6): 698-700.
- [2] 周国英, 宋光桃, 李河. 油茶病虫害防治现状及应对措施[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(6): 179-182.
- [3] 吴光金, 林雪坚, 刘志宏, 等. 普通油茶抗炭疽优良选育[J]. 林业科技开发, 1997(4): 22-23.
- [4] 吴泽民, 李宏开, 束庆龙. 现代林业研究方法[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 168-208.
- [5] 汤章城, 王国强, 史益敏, 等. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 80-81.
- [6] 周琦. 植物生理实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001: 76-79.
- [7] 全国油茶病虫害科研协作组. 油茶物种类型和单株抗炭疽病人工鉴定试行方法[J]. 亚林科技, 1979(2): 3-5.
- [8] 全国油茶良种科研协作组. 全国油茶良种、优良家系和无性系评选鉴定标准与方法[J]. 亚林科技, 1986(3): 48-49.
- [9] 匡传富, 罗宽. 烟草品种对青枯病抗病性及抗性机制的研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2002, 28(5): 395-398.
- [10] 李靖, 利容千, 袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 277-283.
- [4] Wheeler G L, Jones M A, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin-C in higher plants [J]. Nature, 1998, 393: 365-369.
- [5] Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, et al. Purification and properties of L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots[J]. J Biochem, 1995, 117: 120-124.
- [6] Ostergaard J, Persiau G, Davey M W, et al. Isolation of a cDNA coding for L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast[J]. J Biol Chem, 1997, 272: 30009-30016.
- [7] Bartoli C G, Pastori G M, Foyer C H. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV[J]. Plant Physiol, 2000, 123: 335-343.
- [8] Mapson L W, Isherwood F A, Chen Y T. Biological synthesis of L-ascorbic acid: The conversion of L-galactono- $\gamma$ -lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria[J]. Biochem J, 1954, 56: 21-28.
- [9] Imai T, Karita S, Shiratori G, et al. L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from sweet potato: Purification and cDNA sequence analysis[J]. Plant Cell Physiol, 1998, 39: 1350-1358.
- [10] Tabata K, Oba K, Suzuki K, et al. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone-dehydrogenase[J]. Plant J, 2001, 27: 139-148.
- [11] Tamaoki M, Mukai F, Asai N, et al. Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Sci, 2003, 164: 1111-1117.
- [12] Pateraki I, Sanmartin M, Kalamaki M S, et al. Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase[J]. J Exp Bot, 2004, 55: 1623-1633.
- [13] Alhaghdow M, Mounet F, Gilbert L, et al. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato[J]. Plant Physiol, 2007, 145: 1408-1422.
- [14] Von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage sites[J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14: 4683-4690.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平

(上接第 384 页)

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平