

柑橘砧木材料对根结线虫的抗性鉴定

黄金玲^{1,2} 陆秀红¹ 张禹¹ 李秋捷² 刘志明^{1,2} 黎起秦²

1. 广西农业科学院植物保护研究所/广西作物病虫害生物学重点实验室, 南宁 530007;

2. 广西大学农学院, 南宁 530005

摘要 为明确各柑橘砧木对根结线虫的抗性水平, 为生产上柑橘线虫防控提供有效措施, 采用病土接种方法对供试 14 份柑橘砧木材料进行根结线虫抗性鉴定, 并采用人工接种 2 龄幼虫的方法测定分析防御酶 POD(过氧化物酶)、PAL(苯丙氨酸解氨酶)、PPO(多酚氧化酶)的活性变化, 探讨抗性材料的抗性机制。抗性测定结果显示: 接种后土苦柚根结指数为 36.37, 根内平均雌虫数为每克根 7 头, 平均卵囊数每克根 1.3 个, 对根结线虫有抗性; 酸橘次之, 其余砧木均感病。防御酶活性测定结果显示: 接种根结 2 龄幼虫后酶的活性在抗、感材料间差异明显, 接种后 5~35 d, 抗性材料土苦柚根部的 POD、PAL、PPO 活性均高于感病材料, 表明抗病材料防御酶反应快, 积累量大, 能及时阻止线虫的侵染, 但酶积累及变化有差异。试验结果说明土苦柚对柑橘根结线虫具有较强的抗性, 是比较好的抗性砧木。

关键词 柑橘砧木; 根结线虫; 防御酶; 抗性鉴定

中图分类号 S 436.661.2⁺9

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2018)06-0025-05

柑橘是一种重要的经济作物, 具有重要经济效益和社会效益, 然而柑橘的病虫害极大地阻碍了柑橘产业的健康发展, 其中根结线虫是柑橘侵染性病害的重要病原之一。柑橘植株受害后表现为长势缓慢衰退, 叶黄果少产量低; 严重时整株凋萎枯死, 甚至大面积减产。目前对该病通常采用化学农药来防治, 但时效期比较短, 线虫很快又回升, 而且该病一旦传入并传播, 就很难彻底消灭。所以近年来生产上耗费巨资进行药剂防治, 虽然取得了一定的效果, 但是成本高, 生产者无法承受, 且因长期使用杀线剂还会造成土壤污染。

嫁接栽培是目前防治根结线虫病有效的措施之一, 砧木是果树嫁接栽培的基础, 国内外研究表明将抗线虫砧木与园艺性状良好的材料进行嫁接栽培, 不但可以有效控制线虫病的发生, 还可以达到高产稳产的效果^[1-3]。目前在黄瓜、番茄、茄子等取得了比较明显的成效^[4-7]。抗性砧木由于根的结构或者生理生化特性能抵抗 2 龄幼虫的侵入、抑制线虫的繁殖, 在一定程度上有效控制了根结线虫病的发生

生^[8-11]。不同砧木的特性各不相同, 抗根结线虫病的效果也有差别。所以筛选抗根结线虫砧木不失为防治柑橘根结线虫的一种很有效的方法。广西柑橘品种丰富, 栽培种类也很多, 不少的种质还是广西特有材料, 充分利用其优势, 筛选抗性强的砧木进行嫁接栽培, 是解决发病区柑橘种植的较为有效的途径。而目前在柑橘抗根结线虫材料筛选方面的工作还比较缺乏, 笔者通过开展柑橘砧木对柑橘根结线虫病的抗性鉴定, 并对有关生理生化指标进行测试, 以期能筛选出抗性强的砧木材料, 减轻根结线虫对柑橘的危害。

1 材料与方法

1.1 柑橘砧木的收集

通过到柑橘种质资源中心引进、到柑橘主产区采集收集广西栽培的柑橘品种及野生材料, 作为抗根结线虫的砧木筛选材料。

柑橘果实成熟后收集其种子, 将种子及时用清水清洗干净, 随后用 0.3% 高锰酸钾消毒, 清水漂洗

收稿日期: 2018-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760506); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118133); 广西农业科学院科技发展基金项目(桂农科 2015YM17, 2015JZ42, 2016JZ06, 2015JZ54); 广西作物病虫害生物学重点实验室基金项目(2016-ST-3)

黄金玲, 助理研究员, 研究方向: 植物线虫病。E-mail: huangjinling08@126.com

通信作者: 刘志明, 研究员, 研究方向: 植物线虫病。E-mail: liu0172@126.com

干净,放置阴凉处晾干,晾干后播种于消毒的沙土中,待苗出芽待用。

1.2 柑橘砧木对根结线虫抗病性鉴定

采用盆栽病土接种鉴定方法,首先从发病严重的果园采集病土,用贝曼漏斗法分离鉴定,病土中根结线虫虫口密度为每 100 mL 含 87 头幼虫,病土与沙 1:1 充分混匀后装在高 27 cm、直径 36 cm 的塑料花盆中,将同一苗龄的柑橘移栽至花盆中,每盆 3 株,每个材料重复 4 次。移栽后按常规方法管理,90 d 后小心倒出植株,用清水洗去根部基质,以株为单位调查根系长势以及根上的根结数;然后对根内线虫进行次氯酸钠-酸性品红染色,并将染色后的根系置于体视显微镜下,对全部根进行检测,计数每克根内线虫数量和根表卵块数。记录调查结果,对砧木的抗根结线虫能力进行评价。

病情指数的计算和抗性等级的划分,参考王雯君等^[12]的方法,并作适当调整。

株发病程度分为 6 级:

0 级:无根结;

1 级:1 ~ 10 个根结;

2 级:11 ~ 30 个根结;

3 级:31 ~ 70 个根结;

4 级:71 ~ 150 个根结;

5 级:大于 150 个根结。

病情指数 = $\Sigma(\text{各病级数} \times \text{该级株数}) / (\text{最高病级数} \times \text{调查总株数}) \times 100$

抗性等级划分标准:

免疫或极抗: 病情指数为 0;

高抗(I): $0 < \text{病情指数} \leq 10$;

中抗(HR): $10 < \text{病情指数} \leq 20$;

抗病(R): $20 < \text{病情指数} \leq 40$;

感病(S): $40 < \text{病情指数} \leq 60$;

高感(HS): 病情指数 > 60 。

1.3 抗根结线虫柑橘砧木防御酶活性测定

将以上方法筛选出来的高感病材料、抗性材料进行育苗,并移栽到高 15 cm、直径 12 cm 塑料营养钵,基质为灭菌的沙土,移栽成活后每株接种 2 000 头柑橘根结线虫二龄幼虫(二龄幼虫取自发病柑橘病根,从病根上挑取卵块,置于培养皿中,25 °C 下孵化 2~3 d 配成线虫液)。接种后 5、15、25、35 d 分

别取各材料的 0.5 g 根系,用以测定 POD(过氧化物酶)、PAL(苯丙氨酸解氨酶)、PPO(多酚氧化酶活)防御酶的活性,分析其变化规律与抗病性之间的关系。酶活性测定根据试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 柑橘砧木收集结果

通过到柑橘种质资源中心引进及野外收集,共收集到 14 份柑橘砧木材料,其中酸柚、酸橘、土苦柚和小柠檬为本地野生种。

2.2 柑橘砧木对根结线虫的抗性评价

对收集到的 14 份砧木材料进行抗根结线虫病的抗性鉴定。通过统计根结指数及根染色法观察根上卵囊及各龄虫态的比例,发现供试的 14 份材料均不同程度地发病,未发现免疫材料,根结指数从 36.67 到 71.67,大部分表现为感病,但对根结线虫抗感差异比较明显。抗性表现最好的是土苦柚,根结指数为 31.67,平均每克根上的雌虫仅有 7 头,产生的卵囊也比较少,平均每克根 1.3 个卵囊,达到抗病水平;其次为酸橘,该砧木根结数发生较多,病情指数为 43.33,达到低感病水平,但是根系发达,长势良好,且土壤中幼虫密度(每 100 mL 土壤含根结线虫 13.25 头)和平均卵囊数(每克根上含 0.3 个卵囊)均低于其他感病材料,表现出耐病性和一定的抗线虫繁殖能力,也是比较好的砧木选择。

2.3 防御酶活性与柑橘抗根结线虫关系

通过测定防御酶 POD、PAL、PPO 活性探讨抗性材料的抗性机制。试验结果表明,接种根结 2 龄幼虫后酶的活性在抗、感材料间差异明显。接种后 5~35 d,抗性材料土苦柚根部的 POD、PAL、PPO 活性均高于感病材料,表明抗病材料防御酶反应快,积累量大,能及时阻止线虫的侵染。

如图 1 所示,接种后 5~35 d,3 种砧木的 PAL 活性均提高了,在接种后 5~25 d 阶段,随着接种时间增加,PAL 活性持续增加,25 d 以后活性开始下降。抗病材料土苦柚 PAL 活性增加最快,接种后迅速增高,增加幅度最大为 76.5%,而同期高感病材料夏橙增加幅度仅为 12.5%,说明在抗病反应初期,PAL 起到比较关键作用。

表 1 柑橘砧木对根结线虫的抗性评价结果

Table 1 Resistance of citrus rootstock to the root-knot nematode

砧木材料 Rootstocks	土壤虫口密度/ (头/100 mL) Juvenile density	根上平均雌虫数/ (头/g) Average female	根上平均卵囊数/(个/g) Average egg mass	根结指数 Gall index	抗性水平 Designation of resistance
清香橘 Qingxiangju	16.00	16.00	0.90	46.67	感病 Susceptible
香橙 Fragrant orange	12.00	35.30	10.00	71.67	高感 Highly susceptible
血橙 Blood orange	33.50	8.00	1.50	51.67	感病 Susceptible
夏橙 Valencia	18.75	32.40	7.30	71.67	高感 Highly susceptible
沙糖橘 Shatangju	34.25	12.00	3.30	48.33	感病 Susceptible
椪柑 Ponkan	11.00	17.20	0.90	41.67	感病 Susceptible
酸柚 Sour tangelo	13.25	19.60	2.30	41.67	感病 Susceptible
酸橘 Sour tangerine	6.25	14.00	0.30	43.33	感病 Susceptible
土苦柚 Tukuyou	6.00	7.00	1.30	36.67	抗病 Resistant
红桔 Red tangerine	36.00	21.70	2.60	48.33	感病 Susceptible
小柠檬 Lemons	10.50	24.00	3.30	55.00	感病 Susceptible
大柠檬 Lemons	12.50	28.60	5.00	65.00	高感 Highly susceptible
枳壳 Citrange	12.75	36.40	24.60	70.00	高感 Highly susceptible
沙田柚 Chinese grapefruit	7.50	18.20	2.00	53.33	感病 Susceptible

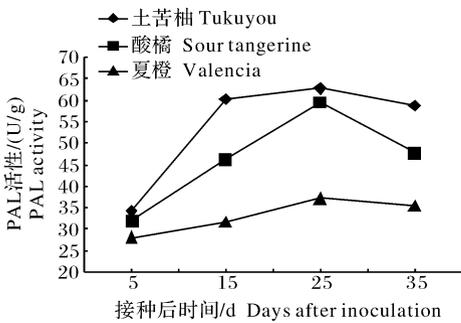


图 1 柑橘接种根结线虫后 PAL 活性
Fig.1 Dynamics of PAL activities of citrus rootstocks after inoculation

PPO 在植物体内的作用是将多酚类物质氧化成对病原物有毒性的醌类物质,并参与木质素合成以阻止线虫侵入,如图 2 所示,根结线虫侵染后,砧木根系 PPO 活性增加,前期酸橘和土苦柚 PPO 活性均比高感病材料夏橙高,特别是酸橘,增加迅速,比抗病材料土苦柚增加幅度大,说明酸橘根系内

PPO 活性对根结线虫的累加伤害响应快,但接种 15 d 达到峰值后就缓慢下降,到 25 d PPO 酶活性比抗病砧木土苦柚低,表现出耐病性。

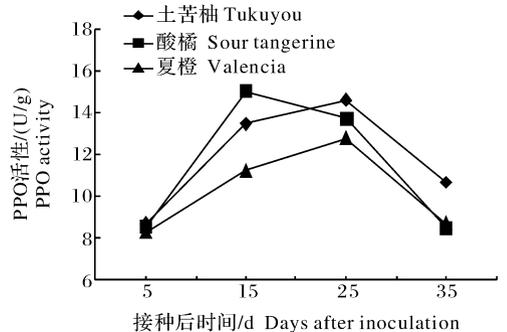


图 2 柑橘接种根结线虫后 PPO 活性
Fig.2 Dynamics of PPO activities of citrus rootstocks after inoculation

试验材料在接种根结线虫后,植株的 POD 活性均逐渐增加,土苦柚和酸橘明显高于感病植株,初期反应迅速,而高感砧木夏橙活性增加缓慢,整个试

验过程反应基本处于迟缓。土苦柚和酸橘在接种后 15 d 达到一个峰值,然后开始下降,而感病品种夏橙到 25 d 才达到一个峰值,25 d 以后趋于平稳下降,到 35 d 活性水平基本一样,说明抗性砧木的 POD 反应速度快,能及时对病害做出反应,及时遏止线虫的进一步侵染,而感病材料 POD 积累慢,积累量小,待达到高峰时线虫已侵入形成根结。

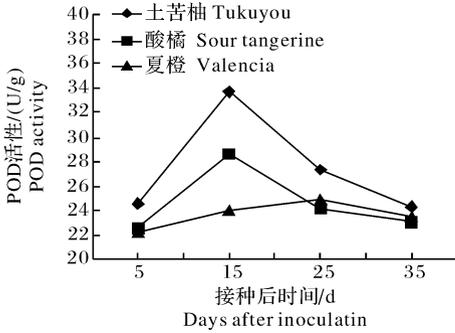


图 3 柑橘接种根结线虫后 POD 活性

Fig.3 Dynamics of POD activities of citrus rootstocks after inoculation

3 讨论

利用砧木嫁接防控病虫害具有省力化及安全化栽培的特点。巴西、美国等对柑橘砧木的选育十分重视,开展了大规模的抗性砧木选育工作,先后选育出了一批优良砧木。我国开展柑橘抗病性砧木的选育工作相对较晚,尤其是抗性砧木资源的研究与利用还处于一个比较滞后的状态。在柑橘抗原筛选鉴定方面的研究还比较少,特别是抗线虫方面的研究很少,朱伟生等^[13]对根结线虫在田间的生长规律进行观察后发现:几种砧木的抗病性差异比较大,枳和枳橙对根结线虫病具有较强抗性;吴泰旭等^[14]通过接种试验比较了枳、枳橙和酒饼勒的抗病性,试验结果显示酒饼勒对柑橘根结线虫病也具有较好的抗性,是一个具有潜力的砧木。本研究通过开展柑橘砧木对柑橘根结线虫病的抗性鉴定研究,筛选到一份抗根结线虫材料土苦柚和一份较耐病材料酸橘。

抗性鉴定标准是植物资源抗性评价、抗性种质资源筛选和抗性品种选育的基础,前人采用根结数量、根结比例、根中的线虫密度和产卵量等作为标准,而对于不同的评价标准抗性水平会有差异,木本植物更为复杂;目前多数以根结指数指标来判定植物的抗线虫性能,但也有部分学者^[15]认为这一抗性指标忽视了植物对侵入线虫的抗发育作用,而采用

卵块量等指标,其评价的客观性和准确性要远高于根结指数,所以单一的评价标准难以准确反映砧木的抗性水平,采用抗性综合评价指标能更客观地评价植物的抗根结线虫性能。同样是新疆野生櫻桃李的抗性评价,刘青等^[16]采用病情指数和根结直径对新疆野生櫻桃李抗根结线虫特性进行评价取得较理想结果;李冬梅等^[17]依据有无根结和根内雌成虫数量占接种线虫数量的百分比作为抗性评价标准,前者每株接种 2 500 条,后者每株接种 500 条,其接种虫量差别比较大,因此还要同时从接种虫量以及抗性评价对象的根系大小、生成根结数量等方面考虑。本试验主要是采用病土接种法直接接种对材料进行初步筛选鉴定,依据根结指数筛选到一个抗病材料土苦柚,另外一个材料酸橘按照评价标准应该属于感病材料,但是从其他方面考虑,其土壤中幼虫密度和平均卵囊数均低于其他感病材料,特别是平均卵囊数量远远低于其他感病材料,表现一定的抗根结线虫繁殖能力,也是比较好的砧木选择。

由于根结线虫对根系所造成的伤害是直接性的,植株受根结线虫侵染后会产生一系列的生理生化反应,来抵制根结线虫的侵入及繁殖,从而达到自身保护作用。测定根系一系列生理生化指标可以从一个侧面印证不同砧木材料对根结线虫的抗性能力,叶德友等^[18]认为 SOD、POD 及 PAL 的活性水平可以作为甜瓜属作物抗线虫病鉴定的生化指标及常规抗性鉴定方法的补充,瞿衡等^[19]也认为 POD 活性变化可以作为葡萄对南方根结线虫抗性鉴定的一个有效指标。本试验中 3 种材料 POD、PAL、PPO 的积累及变化均不一样,整个试验中抗性材料土苦柚根部的 POD、PAL、PPO 活性均高于感病材料,说明不同抗性砧木根系对根结线虫的影响不同,不同砧木抑制根结线虫侵染和繁殖的机制也不完全相同。

参 考 文 献

- [1] 朱世平,陈娇,马岩岩,等.柑橘砧木评价及应用研究进展[J].园艺学报,2013,40(9):1669-1678.
- [2] 周宝利,姜荷.茄子嫁接栽培效果和抗病增产机制的研究进展[J].中国蔬菜,2001(47):52-54.
- [3] ZHANG X B, TAO S J, WANG W H, et al. Resistance of grafted tomato with Guozhen 1 as stock against root knot nematodes in field [J]. Agricultural science & technology, 2017, 18 (10):1951-1954.

- [4] 王明耀,张桂梅,王学颖.嫁接法防治温室番茄根结线虫技术[J].现代农业科技,2016(18):104-105.
- [5] 刘鸣韬,徐瑞富,武庆顺,等.黄瓜嫁接防治根结线虫病[J].中国蔬菜,1998(5):38.
- [6] 郑长英,曹志平,陈国康,等.番茄嫁接防治温室根结线虫的研究[J].中国生态农业学报,2005,13(4):164-166.
- [7] 柴敏,齐艳花,张海芳,等.抗线虫砧木番茄果砧1号及其生产试种与示范[J].中国蔬菜,2010(21):58-59.
- [8] 贾双双,高荣广,徐坤.番茄砧木对南方根结线虫抗性鉴定[J].中国农业科学,2009,42(12):4301-4307.
- [9] 徐小明,徐坤,于芹,等.茄子砧木对南方根结线虫抗性的鉴定与评价[J].园艺学报,2008,35(10):1461-1466.
- [10] 王艳艳,辛国风,魏珉,等.黄瓜砧木对南方根结线虫生长发育的影响及其与根系分泌物的关系[J].中国生态农业学报,2015,23(7):900-905.
- [11] 陈振德,王佩圣,周英,等.不同砧木对黄瓜产量、品质及南方根结线虫防治效果的影响[J].中国蔬菜,2012(8):57-62.
- [12] 王雯君,贾克功,朱立新,等.毛桃对北方根结线虫的抗性研究[J].中国农业大学学报,2009,14(4):71-76.
- [13] 朱伟生,陈荟,兰晓瑜,等.柑橘根线虫田间消长规律及不同砧木抗病性观察[J].中国柑橘,1993,22(1):17-18.
- [14] 吴泰旭,岑伊静,邓仕杏.柑橘根结线虫抗病砧木试验初报[J].中国柑橘,1995,24(1):36.
- [15] NYCZEPIR A P, BECKMAN T G, REIGHARD G L. Reproduction and development of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on Guardian peach rootstock[J]. Journal of nematology, 1999, 31(3): 334-340.
- [16] 刘青,乔峰,朱翔,等.南方根结线虫诱发新疆野生櫻桃李形成的根结形态和发育[J].中国农业大学学报,2013,18(1):101-107.
- [17] 李冬梅,王仙林,朱立新,等.野生櫻桃李对北方根结线虫和花生根结线虫的抗性评价[J].中国农业大学学报,2013,18(1):118-122.
- [18] 叶德友,钱春桃,贾媛媛,等.黄瓜及其近缘种对南方根结线虫的抗性及其酶响应变化的研究[J].园艺学报,2009,36(12):1755-1760.
- [19] 翟衡,管雪强,赵春芝,等.中国葡萄抗南方根结线虫野生资源的筛选[J].园艺学报,2000,27(1):27-31.

Resistance evaluation of citrus rootstocks to root-knot nematode

HUANG Jinling^{1,2} LU Xiuhong¹ ZHANG Yu¹ LI Qiuji² LIU Zhiming^{1,2} LI Qiqin²

1. Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences / Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Nanning 530007, China;
2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract To understand the resistance of citrus rootstock to root-knot nematode, and provide an effective control of root knot nematodes, 14 citrus rootstocks were selected to investigate their resistance to root-knot nematodes by inoculation of infected soil. Changes in activity of defensive enzymes POD (peroxidase), PAL (phenylalanine aminolase) and PPO (polyphenol oxidase) were determined by artificial inoculation of larvae. The results showed that most rootstocks were susceptible, but “Tukuyou” was highly resistant, with a gall index of 36.37, and an average female and egg mass of 7 and 1.3 per gram in root, respectively. The activities of the enzymes were significantly different between the resistant and susceptible rootstocks, with variation of the resistant rootstock significantly higher than those of the susceptible rootstocks after inoculation. It indicated that defensive enzyme reaction and accumulation of the resistant rootstocks was fast, which could prevent the infection of root-knot nematode in time, but the enzyme accumulation amount and changes were different. “Tukuyou” had strong resistance to citrus root nematodes and was regarded as a good choice of resistance rootstock.

Keywords citrus rootstock; root-knot nematode; defensive enzyme; resistance evaluation