

文章编号: 1000-5692(2002)04-0346-04

# 松材线虫携带细菌的光镜观察与数量测定

谢立群<sup>1,2</sup>, 赵博光<sup>1</sup>, 巨云为<sup>1</sup>, 梁波<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 215037; 2. 苏州大学 生命科学学院, 江苏 苏州 215006)

**摘要:** 首次用改进的染色方法对松材线虫携带的细菌进行了光镜观察, 表明细菌存在于松材线虫的体表及线虫生活的环境中; 同时采用平板计数法统计了线虫虫体上携带的细菌数量, 平均每头线虫为 170~280 个细菌。这进一步证实了松树的萎蔫是由松材线虫及其携带的细菌造成的。图 2 参 12

**关键词:** 松材线虫; 细菌; 光镜观察

**中图分类号:** S763      **文献标识码:** A

松材线虫病是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 引起的松树 *Pinus* sp. 萎蔫性病害, 1982 年在我国首次发现以来, 至今已在江苏、浙江、山东、广东、湖北、台湾和香港等地发生, 累计枯死松树  $2 \times 10^7$  株<sup>[1]</sup>, 造成巨大经济损失及森林生态和自然景观的严重破坏。尽管该病害早在上世纪初就被发现<sup>[2]</sup>, 而且松材线虫也早在 1934 年在美国长叶松 *Pinus palustris* 上被观察到<sup>[3]</sup>, 但当时并不认为它是一种病原。直到 70 年代以后, 线虫的病原性才逐步得到证实, 明确松材线虫为松材线虫病的病原<sup>[4]</sup>, 并得到认同, 但因为该病的发病症状与其他线虫病的发生有许多不同之处, 并且病树的生理学和组织学的病变发生在线虫数量增长之前<sup>[5]</sup>, 所以人们怀疑线虫以外的其他致病物质参与了病理活动。80 年代初, Oku<sup>[6]</sup> 推测松材线虫病发生时存在的毒性物质可能与细菌有关, Kusunoki<sup>[7]</sup> 曾无意中观察到病组织的树脂道内和薄壁组织中有大量细菌存在, 赵博光等<sup>[8]</sup> 证实线虫与细菌复合侵染造成了病害的发生, 单独无菌线虫或单独细菌接种松苗都不能致使其发病, 应用抗菌素可以抑制病害的发生, 而且还用电镜观察到线虫携带细菌的情况<sup>[9]</sup>。为了进一步探讨松材线虫携带细菌的部位和数量, 我们对线虫携带细菌的情况用光学显微镜进行了观察, 对线虫携带的细菌数量进行了调查。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫来源

病木取自南京市郊区铁心桥乡当年自然发病死亡的 8~15 年生黑松 *Pinus thunbergii* 的木材中间小块, 表面有 75% 乙醇擦拭消毒, 切成火柴梗大小, 贝曼漏斗法<sup>[10]</sup> 分离线虫, 所得线虫  $1\ 500\ s^{-1}$  离心 5 min, 无菌水换洗 2 次, 备用。以上操作在无菌室中进行, 离心管、纱布等  $121\ ^\circ C$ , 6.81 kg 湿热灭菌, 刀具、镊子或用同样方法或在酒精灯上灼烧灭菌, 工作台面等用 75% 乙醇擦拭 2 次消毒。

### 1.2 细菌观察

将清水洗净的载玻片干燥后, 浸于 75% 乙醇中。使用时, 取向载玻片, 酒精灯火焰上烧干残余

收稿日期: 2002-04-23; 修回日期: 2002-07-01

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30030110)

作者简介: 谢立群(1963-), 男, 浙江诸暨人, 苏州大学副教授, 南京林业大学在读博士生, 从事植物线虫学和昆虫生态学研究。

乙醇, 冷却, 滴加 10% 蛋清溶液少许, 使其分散在载玻片上成一薄层。在体视显微镜下, 用 1 号昆虫针挑取经预处理的线虫数头于载玻片上, 自然风干, 酒精灯火焰上通过 2~3 次固定, 分别用  $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  草酸铵结晶紫混合液或  $5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  番红混合液染色 2 min, 水洗风干, Olympus VANOX 型万能显微镜油镜观察, 拍片。显微镜接目镜 5 倍, 物镜 100 倍, 36 mm 柯达胶卷 ISO200, 曝光时间自动, 冲洗成 12.7 cm 照片。

### 1.3 线虫携带的细菌数量

用 1 号昆虫针挑取 25 头经处理的线虫, 置于内含  $100 \mu\text{L}$  的灭菌水的植物组织匀浆器中充分碾磨匀浆, 加无菌水至 5 mL, 混匀后作为母液。取  $500 \mu\text{L}$  于 4.5 mL 无菌水中, 依次稀释成系列浓度, 以肉汁培养基平板计数法<sup>[10]</sup>取平板上 30~300 个左右的细菌数量的稀释度计数, 统计细菌数量, 设置 3 个重复。上述试验重复 2 次。

采用上述方法挑取线虫, 先在  $100 \mu\text{L}$  无菌水中洗涤, 再次挑取后用上述方法统计细菌数量。

### 1.4 细菌大小测量

在油镜下, 用刻度为 0.01 mm 的 Olympus 物镜测微尺校调目镜测微尺后, 测量细菌大小, 再换算成细菌菌体的实际大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌观察

细菌观察试验的结果(图 1)表明, 细菌存在于线虫体表, 这些细菌大多呈短杆状, 单个或成对出现, 同时, 在线虫周围也存在着细菌。

经测量, 细菌为短杆菌, 大小为  $0.5 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.7 \mu\text{m}$ 。

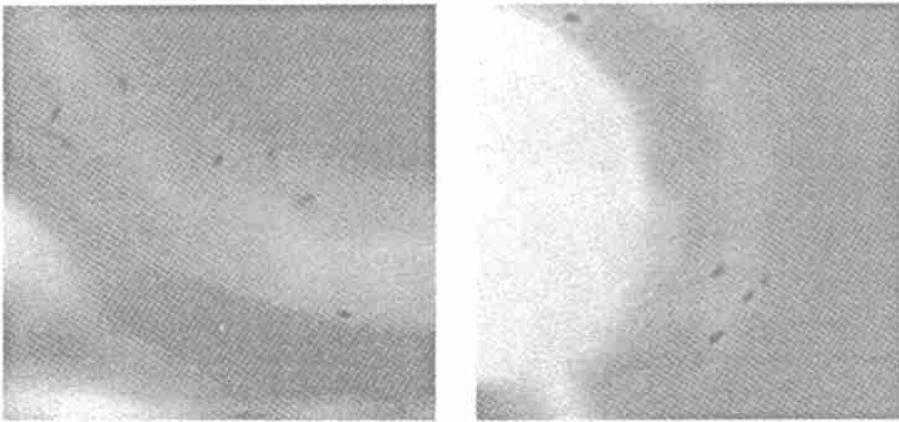


图 1 线虫虫体上的细菌

Figure 1 Bacteria carried by nematode

### 2.2 细菌计数

从试验所得的细菌平板上观察, 细菌菌落外观比较单一, 特征比较一致。细菌数量的统计结果见图 2。在直接挑取法中, 处理 1 和 2 分别为 2 次试验的 3 个重复, 处理 3 为处理 1 和处理 2 的平均值,

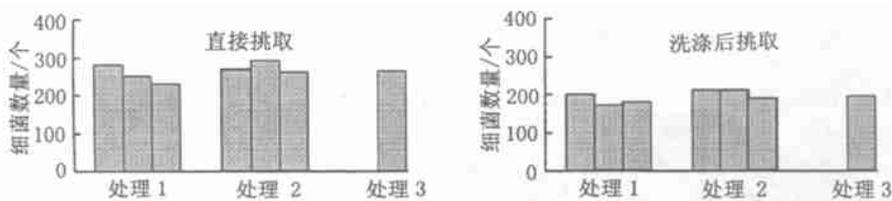


图 2 细菌数量的统计

Figure 2 The number of bacteria carried by per nematode.

可见每头线虫携带的细菌为 230~280 个, 平均每头线虫 260 个。在挑取后用无菌水洗涤的方法中, 处理 1 和 2 分别为 2 次试验的 3 个处理, 处理 3 为处理 1 和处理 2 的平均值, 每条线虫携带的细菌数量分别 170~210 个, 平均为 190 个。

### 3 结论与讨论

由于在松材线虫数量大量增长之前, 病树的生理学和组织病理学变化应发生了, 至病树死亡时, 树木内线虫数量爆炸<sup>[12]</sup>, 因此, 线虫以外的其他病原物对树木的发病起着十分重要的作用。继用电镜观察到线虫携带细菌的情况后<sup>[9]</sup>, 我们采用光学显微镜的方法, 经过多次试验和改进, 成功观察了线虫体表上携带的细菌情况, 应用光学显微镜直接观察松材线虫携带细菌, 尚属首次。

线虫携带的细菌为短杆菌, 大小为  $0.5 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.7 \mu\text{m}$ 。

线虫伴生细菌数量由于处理方法不同, 存在一定的差异。采用平板计数, 得到直接挑取的线虫上所携带细菌的数量为每头线虫 230~280 个, 若挑取后在无菌水中洗涤 1 次, 则数量为 170~210 个。利用平板法统计得到的是线虫所有伴生细菌的总活菌数, 每次测定的结果是多头线虫伴生细菌的活菌总数的平均值, 所以处理间每头线虫体表携带细菌平均值的差异较小, 而每头线虫实际携带的细菌数量差异应该比本试验测定的每头线虫携带的细菌数量差异要大。洗涤后线虫上携带的细菌数量减少, 这可能是由于在处理过程中线虫上细菌脱落, 从而使观测到的细菌数量下降。另外, 我们用染色方法观察线虫上细菌存在的情况。根据观察到的细菌数量并经初步推算, 每头线虫上细菌数量在数十至 200 头之间, 如果考虑处理过程中细菌脱落, 这个数字与平板计数法得到的每头线虫携带的细菌数量相一致。

观察线虫携带的细菌过程中, 还在线虫周围看到许多细菌。这些细菌可能是在处理过程中从线虫上落下的, 也可能是本来应存在于线虫生活的环境中, 随线虫一起携带过来的。

本试验结果表明, 线虫体表携带较多数量的细菌。由于在发病松树死亡之后, 线虫数量才迅速增长, 并且单独无菌线虫和单独细菌接种种苗都不能使细菌致病<sup>[7]</sup>, 结合发病松树迅速死亡的现象, 可以初步推测, 在松材线虫病传播和发病过程中, 线虫携带的细菌随天牛取食侵入松树后, 细菌在树体内增殖, 导致松树死亡。因此, 我们认为: 线虫与其携带的致病细菌导致了松材线虫病的发生与松树的死亡。

### 参考文献:

- [1] 潘宏阳. 当前我国松材线虫病的治理对策[J]. 森林病虫通讯, 2000, (6): 44-67.
- [2] Yano M. Investigation on the causes of pine mortality in Nagasaki Prefecture[J]. *Sarwin-Koho*, 1913, 4: 1-14.
- [3] Steiner G, Buhner E M. *Aphelenchoides xylophilus* a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber[J]. *J Agric Res*. 1934 48: 949-951.
- [4] Kiyohara, T, Suzuki K, Hashimoto H. Migration of the pine wood nematode in a pine tree at an early stage of infection[J]. *Trans Meet Jpn For Soc*, 1975 86: 299-300.
- [5] Mamiya Y. Initial pathological changes and disease development in pine trees induced by the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Ann Phytopath Soc Jpn*, 1985, 51 (4): 546-555.
- [6] Oku H, Shiraiishi T, Kurozumi S. Pine wilt toxin, the metabolite of a bacterium associated with a nematode[J]. *Naturwissenschaften*, 1980, 67: 198-199.
- [7] Kusumoki M. Symptom development of pine wilt disease-Histopathological observations with electron microscope[J]. *Ann Phytopath Soc Jpn*, 1987, 53 (5): 622-629.
- [8] 赵博光, 郭道森, 高蓉, 等. 细菌分离物 B619 与松材线虫病关系的初步研究[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24 (4): 72-74.
- [9] 赵博光, 郭道森, 高蓉. 松材线虫携带细菌部位的电镜观察[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24 (4): 69-71.
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 212-215.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 348-398.
- [12] Fukuda K, Hogetsu K, Suzuki K. Ethylene production during the symptom development of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*[J]. *Eur J For Path*, 1994, 24: 193-202.

# Observation on the bacteria carried by pine wood nematode through optical microscope and its number measurement

XIE Li-qun<sup>1,2</sup>, ZHAO Bo-guang<sup>1</sup>, JU Yun-wei<sup>1</sup>, LIANG Bo<sup>1</sup>

(1. Faculty of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Faculty of Biological Sciences, Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu, China)

**Abstract:** The bacteria carried pine wood nematode was observed using improved stained methods through optical microscope for the first time. It was found that bacteria exist on the surface and in environment of nematode. The amount of bacteria carried by nematode was counted with bacterial nutrient troth agar medium. About 170 ~ 280 bacterial cells were found on each nematode. This result further confirmed that pine wood nematode and its carrying bacteria cause the pine wilt.

**Key words:** pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*); bacteria; observation

## 我校多项科研项目获得资助

近期, 生命科学学院徐秋芳副教授的“强度经营笋用林土壤微生物生态演变与恢复机制研究”和经济管理学院高新和副教授申请的“农作物秸秆人造板技术产业化支撑体系的研究”获国家自然科学基金立项资助。生命科学学院黄坚钦副教授申请的“山核桃品质、产量遗传基础及优化控制”获浙江省自然科学基金重点重大项目立项资助。这是浙江省自然科学基金设立此类项目来, 全省林业类项目的首次立项。外语系方丽青副教授申报的“汉英思维模式的文化归因对比研究”被批准列为 2002 年浙江省哲学社会科学规划课题年度课题。工程学院孙芳利讲师申报的“竹材防腐防霉研究”获斯德哥尔摩国际科学基金的资助, 属我校首次在国际科学基金中自主争取到课题。另外已被批准立项的有全国教育科学规划课题 1 项, 浙江省教育厅 16 项, 浙江省林业局 8 项 (含 2 项重点招标项目), 临安市科技局 10 项等。