

美国松材线虫体表携带优势细菌的鉴定及致病性

曾腓力^{1,2}, 贲爱玲³, 郑敬荣¹, 韩正敏¹

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 浙江省淳安县林业局, 浙江 淳安 311700;
3. 南京晓庄学院 生物化工与环境工程学院, 江苏 南京 211171)

摘要: 为证实松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 虫株携带弱毒细菌替代强毒株系防治松树萎蔫病这一思路的可行性, 从 2 个美国松材线虫虫株体表分离并确定了优势细菌, 测定了各优势细菌的毒性和致病性, 并对这些菌株进行了初步鉴定。细菌分离结果显示: MG4, MG5, MG8 和 MG9 等 4 菌株为美国线虫体表的优势菌株。毒力测试表明, 与中国松材线虫携带的强致病菌相比, 美国松材线虫携带的 4 个菌株的产毒能力和致病性均较低, 可以作为生防细菌的候选菌株使用。经细菌的常规染色、形态学观察及 16S rDNA 序列分析, MG4, MG5, MG8 和 MG9 菌株分别被鉴定为代夫特菌 *Delftia tsuruhatensis*, 恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*, 嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 和泛菌属 1 种 *Pantoea* sp.。图 2 表 3 参 20

关键词: 森林保护学; 松材线虫; 优势细菌; 毒性; 致病性; 细菌鉴定

中图分类号: S763.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2012)05-0696-07

Identification and pathogenicity of bacterial strains carried by American pine wood nematodes

ZENG Fei-li^{1,2}, BEN Ai-ling³, ZHENG Jing-rong¹, HAN Zheng-min¹

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;
2. Forest Enterprise of Chun'an County, Chun'an 311700, Zhejiang, China; 3. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, Jiangsu, China)

Abstract: To confirm that pine wood nematodes carrying attenuated bacterial strains could alleviate pine wilt disease, bacteria were isolated from two nematodes native to America. Bacterial virulence and pathogenicity were tested with pine seedlings, and preliminary identification of predominant strains was determined using bacterial staining reactions and morphology combined with 16S rDNA sequence analysis. Results of the isolation experiment showed that the predominant bacteria which American nematodes carried were strains MG4 (*Delftia tsuruhatensis*), MG5 (*Pseudomonas putida*), MG8 (*Stenotrophomonas maltophilia*), and MG9 (*Pantoea* sp.) Virulence and pathogenicity results demonstrated that compared with the high virulent bacteria strains (*Pseudomonas fluorescense*) isolated from Chinese nematodes, toxicity and pathogenicity of bacterial strains from America were relatively low. Thus, the bacteria carried by American nematodes should be considered the candidates for biological control agents. [Ch, 2 fig. 3 tab. 20 ref.]

Key words: forest protection; *Bursaphelenchus xylophilus*; dominant bacteria; toxicity; pathogenicity; identification

松树萎蔫病是林木最重要病害之一, 能造成松树大量死亡。虽然人们对该病害有较深入的研究, 但对该病害的致病机制至今尚不十分清楚。近年来, 松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 体表所携带细菌

收稿日期: 2011-10-19; 修回日期: 2011-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170600)

作者简介: 曾腓力, 助理工程师, 从事森林病理学研究, E-mail: colly3772000@yahoo.com.cn。通信作者: 韩正敏, 教授, 博士, 从事森林保护学研究。E-mail: zmhan@njfu.edu.cn

的致病性越来越引起人们的关注^[1-4]。赵博光等^[5-6]发现，只有细菌和松材线虫同时存在的松树才会发病，并提出了松树萎蔫病是由线虫和细菌复合侵染的假说。该假说认为松树萎蔫病是松材线虫与其携带的致病细菌共同侵入寄主，在松材线虫提供保护和营养的条件下，由致病细菌分泌毒素导致寄主萎蔫和死亡。还有很多学者相继证明了感病松树体内毒素的产生与松材线虫体表携带的细菌有关^[1-3,7-12]，贲爱玲^[13]提出不同来源的松材线虫的致病力有强弱之分，而导致致病力变化的原因可能是松材线虫携带细菌的种类不同。美国被认为是松萎蔫病的发源地，虽然 36 个州都有病害的分布，但很少见到成片松树枯死，各地危害并不严重。这说明美国松材线虫体表细菌已经演替到了较高级阶段，即美国松材线虫经过长期进化，其体表携带的细菌不断演替，演替的结果是这些细菌具有繁殖能力强和致病力低等特点。根据这一思路，我们实验室提出利用美国松材线虫携带的弱致病力细菌，来替代中国松材线虫体表的细菌，从而降低中国松材线虫致病力，达到生物防治的目的。为了解美国松材线虫携带细菌的生防能力，本研究从收集的美国松材线虫虫株体表分离了优势细菌，用细菌产生的毒素粗提液，对黑松 *Pinus thunbergii* 切根苗进行生物毒性测定，并用各细菌菌株与无菌松材线虫混合接种松苗，比较各株细菌对松苗致病力的强弱，从中筛选到产毒能力低、对松苗致病性弱的细菌菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试木块为美国进口的 2 个批次的木材包装箱，分别由江苏省出入境检验检疫局安榆林和粟寒提供。供试无菌松材线虫为浙江松材线虫虫株，参照贲爱玲^[14]方法制备获得。

中国松材线虫携带优势细菌菌株分别标记为 YG1, YG2, YG3 和 YG4，分别分离自江苏、浙江、安徽和福建松材线虫虫株体表，由南京林业大学病理实验室保存。4 株菌株均为荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescence*，经测定致病性和毒性均很强^[4-5,8,13]。菌株鉴定时使用的 2 个参比菌株为金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli*，均由南京林业大学物理实验室分离和保存。

1.2 线虫和细菌分离

采用贝尔曼漏斗法分离木块中的线虫。采用稀释分离法分离线虫体表的细菌。即在无菌操作下，挑取 3~5 条线虫于灭过菌的研钵里，加 1 mL 灭菌水和少量石英砂充分研磨后，加 9 mL 无菌水稀释。取 200 μ L 稀释液在金氏培养基上涂平板，28 $^{\circ}$ C 下恒温培养 48 h。在解剖镜下根据细菌菌落在培养基上的菌落大小、外观形态特征和是否产生荧光等特性，对各细菌菌落进行识别并分离纯化和编号，统计每种细菌菌落个数和出现概率。各菌株在平板上连续划线纯化后，挑细菌单菌落接种到牛肉膏蛋白胨斜面培养基上，28 $^{\circ}$ C 恒温培养 1~2 d 后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 细菌无细胞培养液制备

细菌接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中，28 $^{\circ}$ C，135 $r \cdot \min^{-1}$ 恒温摇床振荡培养 48 h。将细菌培养液装入 10 mL 离心管内，4 $^{\circ}$ C，12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min，取上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜的细菌过滤器过滤，得到细菌滤液。用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基检验是否带菌，如带菌，重复上述操作，至滤液中不含菌体后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.4 无菌组培苗的培养

参照洪英娣方法^[4]，选取饱满黑松种子，60 $^{\circ}$ C 温水浸泡 24 h，充分吸涨后去除不饱满种子，用 1 $g \cdot L^{-1}$ 高锰酸钾处理 30 min，流水冲洗 2 h。剥去外种皮，无菌条件下用体积分数为 70% 乙醇浸泡 30 s，再用体积分数为 0.1% 升汞处理 3 min，然后用灭菌水冲洗 3 遍，挑于 Murashige-Skoog (MS) 基本培养基(琼脂取 1/2 量)上，置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱，暗培养催芽，最后把无菌发芽的种子移植到 MS 基本培养基上，25 $^{\circ}$ C，16 $h \cdot d^{-1}$ 光照条件下培养 1~2 个月备用。

1.5 细菌与无菌线虫悬浮液的制备

将上述分离的细菌单菌落分别接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基里，28 $^{\circ}$ C，135 $r \cdot \min^{-1}$ 恒温摇床上震荡培养 36 h，用牛肉膏蛋白胨液体培养基稀释菌液，调至浓度为 1×10^8 菌落形式单位(cfu) $\cdot mL^{-1}$ 的细菌悬浮液。

用灭菌水洗下预先培养好的无菌线虫，调整为 10 000 条 $\cdot mL^{-1}$ 线虫悬浮液，并用牛肉膏蛋白胨琼脂

培养基检验线虫研磨液是否带菌。将线虫悬浮液分别用灭过菌的 5 mL 离心管分装, 每管 3 mL, 每个离心管中加入 50 μL 制备好的细菌悬浮液, 混合处理 1 h, 中间不断翻倒, 使线虫与细菌充分结合后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 除去上清液, 用灭菌水定容到 3 mL 制成悬浮液, 备用。

1.6 细菌无细胞培养液毒力测定

在大广口瓶内放入 3 个小青霉素瓶, 周围加少量水保湿, 封口膜封口灭菌。在无菌条件下往每个小青霉素瓶内加入 3 mL 细菌无细胞培养液, 以灭菌水和牛肉膏蛋白胨液体培养基为对照。然后插入无菌黑松切根苗, 每个小青霉素瓶 1 株无菌苗, 封口膜封瓶口, 平放于光照培养箱内, 25 $^{\circ}\text{C}$, 16 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照条件下培养, 观察记录萎蔫情况和萎蔫时间。

1.7 细菌与无菌线虫混合悬浮液对松苗致病性测定

在广口瓶内放 3 个小青霉素瓶, 每个小青霉素瓶加 3 mL 水, 封口膜封口灭菌。在无菌条件下往每个小青霉素瓶插 1 株切根组培苗, 然后用无菌细针在无菌苗顶芽下 2 片叶子处刺个伤口, 并在伤口处附上一团无菌的脱脂小棉球(能吸附 200~300 μL 悬浮液), 再往脱脂棉球上滴 200 μL 细菌与线虫混合悬浮液, 并保证小棉球在 24 h 内保持湿润, 设重复 3 个·处理⁻¹, 以单独接种无菌线虫、野生线虫(中国浙江松材线虫)、灭菌水为对照, 接种后将广口瓶封口, 培养箱内 25 $^{\circ}\text{C}$, 16 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照条件下培养, 观察记录萎蔫情况, 参照徐福元等^[15]病害分级方法进行分级。

1.8 细菌菌株鉴定

参照《伯杰细菌鉴定手册·第 9 版》^[16], 观察各菌株在营养琼脂(NA)培养基上的菌落形态特征和一般生化检验。

采用细菌 16S rDNA 序列分析法进行细菌鉴定: 向装液量为 30 mL 营养肉汤(NB)培养基的 150 mL 三角瓶中接种供试菌株, 恒温振荡器(120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 $^{\circ}\text{C}$)振荡培养 20 h 后供菌体 DNA 提取。菌体 DNA 的提取分离、纯化使用 Fast DNA·试剂盒。以细菌的基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增^[17-18]。

通用引物序列如下: 引物 1, 8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 引物 2, 1541r: 5'-AAGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3' (上海生工生物工程技术有限公司合成)。

16 S rRNA 基因的扩增反应体系包括模板 DNA 1.5 μL , 上下游引物 50 μmol 各 0.5 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs) 4 μL , $5 \times 16.67 \text{ nkat}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ *Taq* DNA 酶 0.5 μL , $10 \times$ 缓冲液 5 μL , 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镁离子 3 μL , 重蒸水加至 50 μL 。

扩增反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后开始以下循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性反应 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火反应 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸反应 2 min, 进行 30 个循环, 12 $^{\circ}\text{C}$ 冷却恒定, 之后样品转至 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 聚合酶链式反应(PCR)产物用 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳进行分离分析。

取 5 μL 加有溴酚蓝的 PCR 产物, 经琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 在凝胶成像系统中观察、拍照, 检测有扩增带后回收送生物公司测序, DNA 序列测序由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。测序完成后, 将获得的细菌 16S rDNA 序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov 进行同源性序列检索, 选择同源性高的典型菌株 16S rDNA 序列作为参比对象, 确定菌株的分类地位^[19]。

2 结果与分析

2.1 线虫和细菌分离结果

从获得的 2 个美国木块样本中分离得到 2 个线虫虫株, 形态学观察确定分离获得的 2 个线虫虫株都是松材线虫, 分别标记为 Am-Bx1 和 Am-Bx2。从 Am-Bx1 上分离得到 6 株细菌, 分别标记为 MG1, MG2, MG3, MG4, MG5 和 MG6, 各种细菌在同一个平板培养基上出现的菌落数分别为 15(4.8%), 4(1.2%), 56(16.3%), 87(25.4%), 136(39.7%)和 45(13.1%); 从 Am-Bx2 上分离得到 4 株细菌, 分别标为 MG7, MG8, MG9 和 MG10, 各种细菌在同一个平板培养基上出现的菌落数分别为 34(11.4%), 136(45.5%), 125(41.8%)和 4(1.3%)。由此可确定 MG4, MG5, MG8 和 MG9 等 4 个菌株为优势菌株。

2.2 细菌无细胞培养液产毒测定结果

为了解细菌的产毒能力, 用细菌无细胞培养液对 1 月生黑松无菌切根苗进行生物毒性测定, 结果见

表 1。细菌无细胞培养液处理第 3 天后对松苗都表现出不同程度的毒害作用，而不同的细菌培养液的毒性强弱不一。其中中国线虫携带的几株优势细菌 YG1, YG2, YG3 和 YG4 培养液对松苗具有较强的毒性作用，在第 4 天至第 6 天就引起松苗萎蔫；美国线虫携带的优势细菌 MG4, MG5, MG8 和 MG9 的培养液表现出较弱的毒性，分别在第 9 天之后萎蔫；而用灭菌水与未接菌的空白培养基处理的对照组 2 周后仍未出现萎蔫。

表 1 不同细菌无细胞提取液处理松苗后的表现

Table 1 Wilted situation of pine seedlings treated with bacterial cell-free filtrate

处理菌株	第 3 天受害级数	第 7 天受害级数	全枯萎时间/d	处理菌株	第 3 天受害级数	第 7 天受害级数	全枯萎时间/d
MG4(美国)	-	+	9~11	YG2(中国)	+	+++	6~7
MG5(美国)	+	++	7~9	YG3(中国)	+++	++++	3~4
MG8(美国)	+	++	8~9	YG4(中国)	+++	++++	4~5
MG9(美国)	-	+	12~13	对照 1(灭菌水)	-	-	>15
YG1(中国)	++	+++	5~6	对照 2(培养液)	-	-	>15

说明：“++++”表示松苗枯萎严重并变色；“+++”表示完全失水萎蔫；“++”表示明显失水萎蔫；“+”表示略有失水症状；“-”表示新鲜，无失水表现。

2.3 细菌与线虫混合接种致病性测定结果

用各细菌菌株和无菌线虫混合悬浮液接种黑松无菌苗，测定各优势细菌的致病性，结果见表 2。其中，中国线虫携带的优势细菌荧光假单胞菌为强致病性细菌，在接种 1~2 周内松苗均出现不同程度的萎蔫状态；美国线虫携带的几株优势菌的致病性较弱，在接种 1 周后几乎没有变化，2 周后松苗才出现部分萎蔫(图 1~2)。在 2 种对照中，接种野生线虫的松苗在 2 周内出现枯萎，并在第 17 天整株萎蔫，而接种无菌线虫的松苗在 1 个月内仍没表现出萎蔫。

表 2 细菌与无菌线虫混合接种黑松苗 1 周后发病情况

Table 2 Wilted situation of pine seedlings treated with mixture of bacterium and pine wood nematodes after 7 days

处理	第 14 天受害级数	第 21 天受害级数	全枯萎时间/d	处理	第 14 天受害级数	第 21 天受害级数	全枯萎时间/d
MG4+无菌线虫	-	+	28~30	YG3+无菌线虫	+++	++++	19~21
MG5+无菌线虫	+	++	27~29	YG4+无菌线虫	++	++++	19~21
MG8+无菌线虫	-	++	>30	野生线虫	++	++++	17~19
MG9+无菌线虫	-	+	>30	无菌水	-	-	>30
YG1+无菌线虫	++	+++	22~24	无菌水+无菌线虫	-	-	>30
YG2+无菌线虫	+	+++	23~24				

说明：“++++”表示松苗枯萎严重并变色；“+++”表示完全失水萎蔫；“++”表示明显失水萎蔫；“+”表示略有失水症状；“-”表示新鲜，无失水表现。

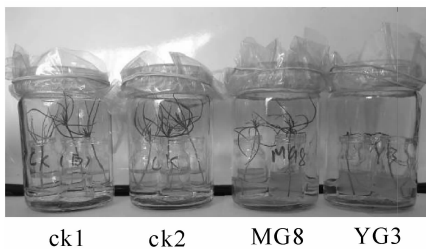


图 1 MG8 和 YG3 无细胞提取物处理 4 d 后的松苗表现

Figure 1 Effects of pine seedlings treated with MG8 and YG3 cell-free filtrate

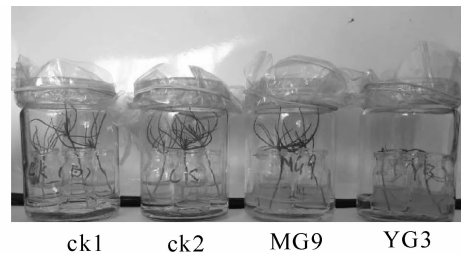


图 2 MG9 和 YG3 无细胞提取物处理 4 d 后的松苗表现

Figure 2 Effects of pine seedlings treated with MG9 and YG3 cell-free filtrate

2.4 细菌鉴定结果

细菌在牛肉膏蛋白胨琼脂平板培养基上培养 24~36 h 后, 观察供试细菌菌落形态。菌株的革兰氏染色结果及菌体的详细特征见表 3。

表 3 细菌革兰氏染色及形态特征

Table 3 Gram dyeing and cell morphology of bacteria

菌株	在 NB 培养基平板上菌落特征	革兰氏染色	细菌形状	细菌大小/ μm
MG4	菌落白色, 圆形, 半透明, 中间凸起, 边缘整齐, 黏度较小, 36 h 培养直径 2~3 mm。	G	短杆状	0.5~0.8 \times 1.7~2.2
MG5	菌落浅黄色, 圆形, 半透明, 中间凸起, 边缘整齐, 黏度小, 能产生荧光, 36 h 培养直径 1~2 mm。	G	杆状	0.7~0.8 \times 2.3~3.3
MG8	菌落浅黄色, 圆形, 半透明, 中间凸起, 边缘整齐, 黏度小, 36 h 培养直径 1~2 mm。	G	短杆状	0.6~0.9 \times 1.4~2.0
MG9	菌落浅黄色, 圆形, 半透明, 中间微凸, 边缘整齐, 黏度小, 36 h 培养直径 0.5~1.0 mm。	G	短杆状	0.5~0.6 \times 1.4~1.9
金黄色葡萄球菌	菌落菌较厚, 有光泽, 圆形, 略凸起, 36 h 培养直径 1~2 mm。	G+	球形	0.7~0.8 \times 0.7~0.8
大肠埃希菌	菌落圆形, 半透明, 边缘整齐, 表面光滑, 小凸起, 36 h 培养直径 1~2 mm。	G	杆状	0.4~0.5 \times 1.8~2.8

以 MG4, MG5, MG8 和 MG9 的基因组为模板, 用 16S rDNA 通用引物扩增, 得到约 1 500 bp PCR 产物。把扩增产物送至南京金斯瑞生物技术公司测序, 得到了 MG4, MG5, MG8 和 MG9 16S rDNA 长度分别为 1 307 bp, 1 307 bp, 1 322 bp, 1 448 bp 的片段。将获得的 4 株细菌的 16S rDNA 序列在网页上进行比对, 其中与 MG4 菌株的 16S rDNA 的序列相似度最高的菌株是代夫特菌 *Delftia tsuruhatensis*, 相似度为 100%; 与 MG5 菌株的 16S rDNA 的序列相似度最高的菌株为恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*, 相似度为 99.9%; 与 MG8 菌株的序列相似度最高的菌株是嗜麦芽宅食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*, 相似度为 100%; 与 MG9 菌株的序列相似度最高的菌株是泛菌属 *Pantoea* 的 2 个种——成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 和菠萝泛菌 *Pantoea ananatis*, 其相似度均为 99%, 所以该菌株暂不能确定到种。

3 小结与讨论

自 1982 年松材线虫传入中国以后, 其致病性发生了很大变化。表现在对马尾松 *Pinus massoniana* 的致病性增强和对雪松 *Cedrus deodara* 致病性减弱等方面。最先报道松材线虫对马尾松是弱致病的, 而后来发现中国马尾松却是主要感病树种^[9-10]; 雪松在日本是感病的而在中国是免疫的^[17-18]。这些变化唯一能解释的原因可能就是附着在松材线虫体表的细菌发生了演替。从线虫体表细菌分离结果也能看出, 在日本松材线虫体表主要致病菌为几种芽孢杆菌^[8,19], 而在中国则主要是假单胞杆菌^[4,20]。这些现象都说明, 松材线虫体表细菌的确存在演替现象, 而美国松材线虫体表细菌很可能是长期演替的结果。

如果把美国菌株释放到林区, 利用美国菌株具有的演替能力强和致病性弱等特点, 就有可能逐渐替代中国致病性强的细菌, 加速中国松林内微生物的演替过程, 达到生物防治的目的。要达到此生防目的, 首要的问题是弄清美国细菌菌株的产毒能力和致病性, 只有产毒能力和致病性都很低的菌株, 在生防中才不至于产生负面影响, 才有可能在病害控制中发挥作用。MG4, MG5, MG8 和 MG9 是南京林业大学病理实验室从美国线虫虫株体表分离的优势细菌菌株, 和中国致病性强的几个菌株比较, 不管从产毒能力还是从致病性上比较, 都相对较弱。尤其 MG9 菌株, 在产毒能力和致病性方面都表现很好, 可以作为生防菌的候选菌株进行后续研究。第 2 个问题是所筛选的细菌需要具备替代其他致病菌的功能。美国是松萎蔫病发生的原产地, 松材线虫体表细菌经过了长时间进化, 那么目前美国松材线虫体表的细菌可能是经过长期进化的结果。如果我们筛选的细菌菌株属于美国线虫体表细菌进化的产物, 那么这些(或这个)菌株就一定同时具有致病性弱和替代能力强双重功能。在本研究中仅测定了 4 个优势菌株的

毒性和致病性, 而各菌株的繁殖能力, 野外生存能力, 替代其他细菌能力等还有待进一步测定。

参考文献:

- [1] 郭道森. 松材线虫携带的致病细菌与松树萎蔫病的关系[D]. 南京: 南京林业大学, 2001.
GUO Daosen. *Relationships Between the Pine Wood Nematode-Carrying Pathogenic Bacteria and Pine Wilt Disease* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2001.
- [2] 谈家金, 王新荣, 冯志新. 松材线虫伴生细菌与松树萎蔫病关系的初步研究[J]. 植物检疫, 2001, **15** (5): 325 - 328.
TAN Jiajin, WANG Xinrong, FENG Zhixin. A preliminary study on the relationship between the bacterium accompanying *Bursaphelenchus xylophilus* and pine wilt disease [J]. *Plant Quarant*, 2001, **15** (5): 326 - 328.
- [3] 谢立群, 赵博光, 巨云为, 等. 松材线虫携带细菌的光镜观察与数量测定[J]. 浙江林学院学报, 2002, **19** (4): 346 - 349.
XIE Liqun, ZHAO Boguang, JU Yunwei, *et al.* Observation on the bacteria carried by pine wood nematode through microscope and its number measurement[J]. *J Zhejiang For Coll*, 2002, **19** (4): 346 - 349.
- [4] 洪英娣. 松材线虫携带的细菌及其致病性[D]. 南京: 南京林业大学, 2001.
HONG Yingdi. *Pathogenicity of Bacteria Carried by Pine Wood Nematodes* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2001.
- [5] 赵博光, 郭道森, 高蓉, 等. 细菌分离物 B619 与松树萎蔫病关系的初步研究[J]. 南京林业大学学报, 2000, **24** (4): 72 - 74.
ZHAO Boguang, GUO Daosen, GAO Rong, *et al.* A preliminary study on the relationship between the bacterium isolate B619 and pine wilt disease [J]. *J Nanjing For Univ*, 2000, **24** (4): 72 - 74.
- [6] ZHAO Boguang, WANG Huli, HAN Sufen, *et al.* Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China [J]. *Nematology*, 2003, **5** (6): 899 - 906.
- [7] 洪英娣, 赵博光, 曹越, 等. 松材线虫携带细菌的致病性[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2003, **26** (5): 37 - 40.
HONG Yingdi, ZHAO Boguang, CAO Yue, *et al.* Pathogenicity of bacteria carried by pine wood nematodes [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2003, **26** (5): 37 - 40.
- [8] 池树友. 松材线虫携带细菌与松材线虫的关系及其致病作用研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2003.
CHI Shuyou. *Studies on the Pathogenicity of the Bacteria Carried by Pine Wood Nematode and the Relationship Between the Bacteria and the Nematode* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2003.
- [9] 胡凯基, 王秋丽, 杨宝君. 松材线虫和拟松材线虫不同株系致病性的研究[J]. 林业科学研究, 1994, **7** (4): 381 - 385.
HU Kaiji, WANG Qiuli, YANG Baojun. Pathogenic comparison among 14 isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* collected from different regions and countries [J]. *For Res*, 1994, **7** (4): 381 - 385.
- [10] 谈家金, 杨荣铮, 吴慧平. 不同地理种群的松材线虫对马尾松的致病力差异[J]. 植物检疫, 2000, **14** (6): 324 - 325.
TAN Jiajin, YANG Rongzheng, WU Huiping. Different geographical populations of *Pinus massoniana* pine wood nematode pathogenicity difference [J]. *Plant Quarant*, 2000, **14** (6): 324 - 325.
- [11] 张治宇, 张克云, 林茂松, 等. 不同松材线虫群体对黑松的致病性测定[J]. 南京农业大学学报, 2002, **25** (2): 43 - 46.
ZHANG Zhiyu, ZHANG Keyun, LIN Maosong, *et al.* Pathogenicity determination of *Bursaphelenchus xylophilus* isolates to *Pinus thunbergii* [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2002, **25** (2): 43 - 46.
- [12] 赵博光, 郭道森. 松材线虫携带的一株细菌分离及其致病性[J]. 北京林业大学学报, 2004, **26** (1): 57 - 61.
ZHAO Boguang, GUO Daosen. Isolation and pathogenicity of a bacterium strain carried by pine wood nematode [J]. *J Beijing For Univ*, 2004, **26** (1): 57 - 61.
- [13] 贲爱玲. 松材线虫体表优势细菌的分离及定殖能力研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
BEN Ailing. *Study on Isolation and Colonization of Dominant Bacteria Carried by Pine Wood Nematode Body Wall* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.

- [14] 贲爱玲, 韩正敏, 韩旭, 等. 无菌松材线虫的获得即培养方法研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, **32** (3): 99 - 102.
BEN Ailing, HAN Zhengmin, HAN Xu, *et al.* A study of the acquisition of sterilized nematode and growth of the pine wood nematode [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2008, **32** (3): 99 - 102.
- [15] 徐福元, 席客, 徐刚, 等. 不同龄级马尾松对松材线虫病抗性的探讨[J]. 南京林业大学学报, 1994, **18** (3): 27 - 33.
XU Fuyuan, XI Ke, XU Gang, *et al.* Study on the resistances of various year classes of *Pinus massoniana* to pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Nanjing For Univ*, 1994, **18** (4): 27 - 33.
- [16] 周贤轩, 杨波, 陈新华. 几种分子生物学方法在细菌鉴定中的应用[J]. 生物技术, 2002 (6): 35 - 38.
ZHOU Xianxuan, YANG Bo, CHEN Xinhua. Application of several molecular biological methods in microbe characterization [J]. *Biotechnology*, 2004 (6): 35 - 38.
- [17] 郑敬荣. 我国雪松自然条件下对松树萎蔫病免疫机理的探讨[D]. 南京: 南京林业大学, 2003.
ZHENG Jingrong. *A Study of the Immune Mechanism of Pine Wilt Disease on Cedrus deodara Under Natural Conditions in China* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2003.
- [18] 巨云为, 赵博光, 蒲昌慧. 中日两国的松材线虫对雪松的致病力差异[J], 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, **31** (4): 139 - 140.
JU Yunwei, ZHAO Boguang, PU Changhui. Different virulence of pine wood nematode from Japan and China on *Cedrus deodara* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2007, **31** (4): 139 - 140.
- [19] KAWAZU K. Pathogenic toxins of pine wilt disease [J]. *Kagaku to Seibutsu*, 1998, **36** (2): 120 - 124
- [20] 王慧利. 我国松材线虫携带细菌的种类和分布及与松树萎蔫病的关系[D]. 南京: 南京林业大学, 2003.
WANG Huili. *The Species and Distribution of Bacteria Carried by Pine Wood Nematode and the Relationships between Bacteria and Pine Wilt Disease* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2003.