

文章编号: 1000-5692(2005)03-0310-05

# 接种松材线虫后黑松接种枝内细菌和 线虫的数量变化

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

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2 苏州大学 园林园艺系, 江苏 苏州 215006)

**摘要:** 对接种松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 后3年生黑松 *Pinus thunbergii* 接种枝内的细菌和线虫的数量变化进行了观察。结果表明: 接种后最初几天内线虫从接种点向其他部分移动缓慢; 至接种的主干上松脂减少时, 线虫开始增加, 木块组织的带菌率的变化与线虫数量的变化趋势相似, 细菌和线虫的数量与病树的症状发展密切相关。细菌的优势属为假单胞杆菌属 *Pseudomonas*。表3参9

**关键词:** 森林保护学; 松材线虫; 黑松; 细菌

中图分类号: S763 文献标识码: A

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 病近年来在我国10多个省、市、区发生和蔓延。该病传播蔓延迅速, 病程短, 病死率高, 严重威胁我国松属 *Pinus* 植物的安全, 成为我国林业建设和生态建设的心腹之患。目前该病的病理机制尚未完全明确, 但线虫携带的致病细菌参与病理活动得到越来越多的证实, 赵博光等<sup>[1~4]</sup>证实线虫与细菌复合侵染造成了病害的发生, 而且还用电子显微镜和普通光学显微镜观察到线虫携带的细菌。对松材线虫病发生过程中病树体内细菌种群的变化研究结果表明, 在非接种枝上, 以假单胞杆菌 *Pseudomonas* spp. 为主的细菌种群在松材线虫病发生过程中出现早且比例高<sup>[5]</sup>。为进一步了解松材线虫病发生初期接种枝上线虫数量和细菌种类的变化规律, 揭示该病发生过程中线虫、细菌和松树之间的相互关系, 我们对接种枝上在发病初期细菌的种类及其变化进行了研究, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试线虫和松树

从南京地区10~15年生黑松 *Pinus thunbergii* 的松材线虫病死木上分离得到线虫, 用灰葡萄孢霉 *Botrytis cinerea* 培养。

3年生黑松取自连云港市林业局下属某林场, 并上泥浆, 2002年9月20日移栽于室内栽培, “美的”牌陶瓷涡轮暖风机(广东顺德家用电器厂)加温并补湿, 控温器控制温度至28℃, 40W日光灯

收稿日期: 2004-08-25; 修回日期: 2005-03-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(3040580)

作者简介: 谢立群, 副教授, 博士, 从事植物线虫学和昆虫生态学研究。E-mail: xieliqunsz@yahoo.com.cn. 通讯作者: 赵博光, 教授, 博士生导师, 从事松材线虫病和昆虫化学生态学研究。boguangzhao@yahoo.com

照  $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 经 ZDS-10 型自动换档数字式光度计(上海市嘉定学联仪表厂)测定, 光照强度枝梢顶部为  $2\ 150 \sim 2\ 860 \text{ lx}$ , 平均  $2\ 610 \text{ lx}$ ; 枝干中下部为  $1\ 098 \sim 1\ 800 \text{ lx}$ , 平均  $1\ 408 \text{ lx}$ , 生长 1 个多月后, 去除未成活和生长不良的植株, 取成活、高度一致、生长良好的健康松树用于试验。

## 1.2 试验方法

1.2.1 接种方法 接种时间分别为 2002 年 11 月 3 日、12 月 29 日和 2003 年 1 月 5 日。选择枝条主干顶部直径为  $2 \sim 3 \text{ mm}$  处接种, 接种前先用体积分数为 75% 乙醇擦试表面, 剪去上部枝条, 套上塑料离心管(3 mL)。离心管预先截去底部并经消毒, 离心管与松枝间用封口膜包扎, 在离心管中接入线虫 2 000 条, 将离心管上端的盖子盖紧以防水分蒸发。同时设置对照组, 对照组采用相同的方法接种 3 年生黑松 2 株, 各接入无菌水 2 mL。

1.2.2 线虫和细菌数量的测定 依次在接种后第 3, 6, 11, 25 和 39 天取样, 每次取  $2 \sim 3$  株, 取样为主干直径  $2 \sim 3 \text{ mm}$  处, 调查病树体内线虫和细菌的数量, 取样时间和数量见表 1。取样时, 先切除距接种点 1 cm 部分, 剪下 20 cm 长的枝干用于试验。在无菌条件下用灭菌刀剪去枝杆上端 5 cm 后, 以中间 10 cm 长的部分用于细菌分离。用体积分数为 75% 乙醇棉球擦试表面, 灭菌解剖刀削去树皮, 再将去皮后的木质部的一部分在无菌培养皿中用手术剪和解剖刀剪削成大小约为  $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  的小块组织, 取上述组织于营养肉汤琼脂培养基(NB)平板上, 每个处理设置 3 个平板, 测定木块组织的带菌率; 剩余部分用解剖刀刨削成大小均匀的薄片, 放入 5 mL 生理盐水(含  $8.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ NaCl}$ )中, 振荡 5 min, 再浸泡 15 min 后, 取 0.5 mL 加入到 4.5 mL 生理盐水的试管中, 稀释成原液的  $10^{-1}$  和  $10^{-2}$  稀释液, 各取 1 mL 溶液用于细菌测定和分离。

收集取样枝条两端各 5 cm 长的枝干, 合并细菌分离部分剩余的外皮层和木质部部分, 切碎成火柴梗大小后, 合并, 漏斗法分离线虫, 计数。

1.2.3 细菌种类鉴定 分离得到的细菌纯化后, 观察菌落的培养性状, 并进行革兰氏染色, 观察细菌菌体形态、排列及大小等一般情况, 进行氧化酶试验和接触酶试验。根据上述结果分组, 用 API 自动鉴定系统(ATB Expression 生物-梅里埃 Bio-Merieux 公司)鉴定细菌的种类。

1.2.4 取样时黑松的发病情况 取样时 3 年生黑松发病程度和发病阶段的划分, 参照谢立群方法<sup>[9]</sup>进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同时间 3 年生黑松的病状和线虫数量

在接种后按不同的时间间隔, 分别在接种后的第 3, 6, 11, 25 和 39 天取样, 取样时松树所处的发病阶段以及取样后调查的线虫数量如表 1。从表 1 中可以看出, 接入无菌水的对照组和处理组中的接种后第 3 天和第 6 天, 按本试验的方法, 未检出线虫, 在接种后第 11 天开始, 距接种点  $6 \sim 16 \text{ cm}$  范围的主干上才能检测到有线虫的存在, 同时从表 1 中还可初步发现, 虽然总体上黑松的发病症状随着时间的推移逐渐表现, 但实际上是与树体内的线虫数量直接相关, 至接种的主干上松脂停止分泌, 针叶失绿时, 线虫数量开始增加, 而在针叶失绿(如样株 J), 枝内明显无松脂时, 线虫数量迅速增加。与野外试验的非接种枝相比<sup>[4]</sup>, 在相似的阶段中, 线虫出现的数量较多。这可能与本试验所用的黑松较小, 直接在接种枝上取样等因素有关。

### 2.2 不同时间黑松组织中的细菌检出率

不同样本的细菌检出率总结成表 2, 对照组未检出细菌, 同时按本试验的取样方法, 从接种后第 11 天开始, 木片可检测细菌, 检出率为  $12.5\% \sim 43.5\%$ , 在第 25 天的处理样株 J, 带菌率可达 100%。这说明在这一段时间内, 细菌数量增加迅速。与表 1 比较可以看出, 该黑松内线虫也开始增殖, 导致松针叶失绿, 松枝内不但无松脂分泌, 而且枝条内水分减少。

同时我们注意到无论各个处理组还是对照组, 均未见真菌菌落。

表1 3年生黑松病状及线虫数量与接种后间隔时间的关系

Table 1 The relationship between the interval after inoculation and symptom and the number of nematode in *Pinus thunbergii* seedling

编号	接种日期	取样日期	时间间隔/d	取样时黑松病状	发病阶段	线虫数量	平均线虫数
A	2003-01-05	2003-01-08	3	外观正常	1	0	0
B				外观正常	1	0	
C	2002-12-29	2003-01-04	6	外观正常	1	0	0
D				外观正常	1	0	
E	2002-11-03	2002-11-14	11	外观正常	1	8	11
F				部分针叶略失光泽	2	14	
G				外观正常	1	17	
H	2002-11-03	2002-11-28	25	针叶失去光泽	2	74	998
I				针叶失去光泽	2	51	
J				针叶失绿, 枝内无松脂, 较干燥	5	2 933	
K				针叶失去光泽, 切面无松脂	3	83	
L	2002-11-03	2002-12-12	39	针叶失去光泽, 切面无松脂	3	55	71
M (接入无菌水)	2002-11-03	2002-12-12	39	外观正常	1	0	0
N (接入无菌水)				外观正常	1	0	

表2 不同时间黑松组织的细菌检出率

Table 2 The ratio of pine timber tissue with bacteria in different intervals after inoculation

时间间隔/d	编号	总组织块中的带菌组织块个数			细菌检出率 ( $\bar{x} \pm s$ ) %
		重复1	重复2	重复3	
3	A	0/8	0/9	0/8	0±0
	B	0/8	0/7	0/8	0±0
6	C	0/9	0/8	0/7	0±0
	D	0/8	0/8	0/8	0±0
11	E	1/8	2/8	0/8	12.5±12.5
	F	2/8	3/8	1/8	25.0±12.5
	G	3/8	2/9	5/9	43.5±10.4
25	H	1/8	0/6	1/7	17.3±6.8
	I	2/7	0/8	0/8	19.1±16.5
	J	7/7	5/5	8/8	100±0.0
39	K	3/8	2/8	2/9	32.4±8.8
	L	3/8	4/8	1/8	29.2±14.4
对照组	M	0/8	0/8	0/8	0±0
	N	0/8	0/7	0/8	0±0

说明: 检出率=带菌组织块/总组织块×100%。

### 2.3 细菌种类的鉴定结果

将接种后不同阶段出现的细菌的数量和细菌种类鉴定结果总结于表3。从表中可以看出, 细菌的种类以各类假单胞杆菌和少动鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas paucimobilis* 为主, 另外还有肠杆菌类等种类。这些结果与野外把线虫接种在松树上后, 在非接种枝上取样时, 发病至中后期的细菌类群<sup>[5]</sup> 基本一致。

### 3 小结与讨论

对3年生黑松的接种后, 接种枝上线虫和细菌的数量变化表明, 接种初期, 线虫进入树体的数量

不多, 移动速度慢, 说明进入树体后最初的存活状况是线虫是否能够侵染成功的关键。随着时间的推移, 一方面线虫的死亡危险性下降, 活动性增强, 另一方面, 线虫开始繁殖, 并在树体内的扩散速度迅速增加。同时试验还发现, 虽然从总体上供试黑松随着时间的推移逐渐表现发病症状, 但实际上黑松的发病是与树体内的线虫数量直接相关, 至接种的主干上松脂减少的初期, 线虫数量开始增加, 而在针叶失绿, 枝内明显无松脂的发病中后期阶段, 线虫数量则迅速增加。

表 3 接种后不同时间下分离的细菌菌株数

Table 3 Bacilli species isolate from PWN timber after different inoculation intervals

菌株类别	时间间隔/d					对照组	总数/株
	3	6	11	25	39		
假单胞植菌 <i>Pseudomonas</i> spp.	0	0	4	2	2	0	8
少动鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	0	2	2	0	0	4
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	0	0	0	2	0	0	2
产碱菌 <i>Alcaligenes</i> spp.	0	0	0	0	2	0	2
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	1	0	0	1
嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	0	1	0	1
黏质沙雷菌 <i>Serratia marcescens</i>	0	0	1	0	0	0	1

关于线虫在接种后的活动情况, Tamura<sup>[6]</sup>的研究认为, 松材线虫接种后活动性较差, 通常在蜕皮后再向枝条迁移; Kuroda<sup>[7]</sup>的试验进一步证实, 多数线虫在接种后集中在接种点, 可达数天, 而进入木质部的线虫数量较少; Hashimoto<sup>[8]</sup>和刘军民<sup>[9]</sup>的研究均证实, 松材线虫接种后的最初几天在树体内移动缓慢, 这与本试验的结果类似, 但具体的移动时间和距离有一定的差别, 如 Tamura<sup>[6]</sup>观察到接种后 4 d 迁移距离可达数厘米, 可能的原因是接种的虫源不同。本试验使用的是人工培养的松材线虫, 对不良环境的抵抗力不强, 且各种虫态都存在, 而前者采用 4 龄扩散线虫, 同时, 接种的具体方法、松树的品种、树龄的大小、树木的生长状态和环境等因素都有可能影响线虫接种时的存活情况和侵入后线虫的移动速度。

通过木块组织的带菌率可以看出, 木块组织带菌率的变化与线虫数量的变化趋势类似, 从接种后第 11 天开始, 木片上可检测到细菌, 在第 25 天的处理中, 有的样株上带菌率可达 100%。这说明在这个发病阶段中, 细菌数量增加迅速, 而此时树体内线虫也已经开始增殖。从本试验可以明显看出, 松树症状的发展与树体内线虫和细菌的发展关系密切, 即随着树体的逐渐死亡, 细菌数量迅速增加。

细菌的种类, 以各类假单胞杆菌为主, 另外还有少动鞘氨醇单胞菌和阴沟肠杆菌类等种类。这些结果与野外接种试验中相同阶段的结果<sup>[5]</sup>基本类似, 但也有所不同。首先, 本试验得到的细菌种类复杂, 而野外接种试验中细菌种类相对简单, 这可能与取样方法及松树的大小有关。本研究所用的松树为 3 年生黑松, 取样为距接种点较近的主干上, 而野外试验所用的是 6~7 年生植株, 取样为非接种枝的侧枝上, 因此本试验分离到其他菌类的可能性相对较大。同时, 取样分离菌株少, 所以主要优势菌株比例偏低。其次, 在野外试验中, 特别是我们在春季采集的松树上自然病死木中泛菌 *Pantoea* sp. 有较高比例, 而本试验中没有分离到泛菌, 造成这种结果的原因可能是由于树体内泛菌比例较低, 试验误差造成了泛菌没有被检测到。更重要的原因可能在于发病初期树体内泛菌类较少, 而在病树的死亡后泛菌类逐渐变为优势种群, 因为即使在野外接种试验中, 泛菌类也只在发病的后期出现。

另外, 关于各种细菌所占的比例, 由于本试验分离细菌时主要取平板上不不同的菌落, 从而造成试验结果优势种类比例偏低, 而稀有种比例偏高。要避免这方面的差异, 应统计培养平板上细菌的总量和各种菌落的比例, 同时, 随机地或按菌落出现的比例挑取不同菌落, 这样就可以得到各种不同细菌数量的正确比例。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.

- [3] Zhao B G, Wang H L, Han S F, *et al.* Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China [J]. *Nematology*, 2003, 5 (6): 899-906.
- [4] 谢立群, 巨云为, 赵博光, 等. 松材线虫携带细菌的光镜观察和数量测定 [J]. 浙江林学院学报, 2002, 19 (4): 346-349.
- [5] 谢立群, 巨云为, 赵博光. 松材线虫病程中树体内线虫和细菌种群数量的动态变化 [J]. 林业科学, 2004, 40 (4): 124-129.
- [6] Tamura H. Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus* and associated bacteria to pine seedlings [J]. *Jpn J Nematol*, 1983, 13: 1-5.
- [7] Kuroda K, Ito S. Migration speed of pine wood nematodes and activities of other microbes during the development of pine-wilt disease in *Pinus thunbergii* [J]. *J Jpn For Soc*, 1992, 74: 383-389.
- [8] Hashimoto H, Sanui Y. *Behavior of the Pine Wood Nematode in a Pine Tree in Relation with Disease Development* [R]. Tokyo: Trans 85 th Ann Meet Jpn For Soc, 1974. 251-253.
- [9] 刘军民, 冯志新. 松材线虫病组织病理学研究 [J]. 植物病理学报, 1995, 25 (2): 171-174.

## Dynamics of densities of bacteria and nematode in the branches of *Pinus thunbergii* inoculated with *Bursaphelenchus xylophilus*

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

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Department of Landscape Architecture and Horticulture, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; )

**Abstract:** Changes in densities of bacteria nematode in the branches of 3-year-old *Pinus thunbergii* inoculated with pine wood nematodes were observed. In the early days after inoculation, the nematodes moved slowly to other parts of the tree. Density of the nematode began to increase when the resins in the inoculated trunk decreased. The changing tendency in the percentage of the wood blocks containing bacteria was similar to the dynamics of the nematode. The densities of the nematodes and bacteria increased in accordance with pathogenic symptom development. The dominant genus of the bacterium complex was *Pseudomonas*. [Ch, 3 tab, 9 ref.]

**Key words:** forest protection; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Pinus thunbergii*; bacteria

## 浙江林学院与中国科学院南京土壤研究所共建 森林土壤与环境联合实验室

2005年5月18日, 浙江林学院与中国科学院南京土壤研究所“共建森林土壤与环境联合实验室协议”签约仪式在校第一会议室举行。浙江林学院领导陈敬佑、周国模、方伟、鲍滨福和中国科学院南京土壤研究所领导及专家一行出席签约仪式。浙江林学院常务副院长周国模教授、中国科学院南京土壤研究所所长周健民研究员分别代表双方在协议书上签字。

浙江林学院党委书记陈敬佑教授对双方签约表示热烈祝贺。他指出, 在浙江省与中国科学院加强全面合作的大背景下, 浙江林学院与中国科学院南京土壤研究所的携手合作, 意义十分重大, 必将对学校的科学研究、学科建设乃至生态省建设起到极大促进作用。他希望以这次共建实验室为契机, 进一步加强学校与科研院所的广泛联系, 通过大家共同努力, 使双方的合作交流取得良好成效。

森林土壤与环境联合实验室的成立为系统开展我国南方森林土壤与环境研究工作搭建了一个重要的平台。随着实验室的成立, 浙江林学院与南京土壤所将通过学科交叉和优势互补, 在森林土壤质量监测与信息化管理平台建设、森林土壤生态功能、森林土壤退化机制与修复和经济林发展与土壤环境等领域开展一系列的研究工作。

签约仪式后, 浙江林学院聘请周健民、林先贵、杨林章等3位研究员为客座教授。

仪式由浙江林学院副院长方伟教授主持。