

## 松材线虫侵染对马尾松苗不同部位内生细菌菌群结构的影响

尹诗恒<sup>1,2</sup>, 张绍勇<sup>3</sup>, 刘骥骥<sup>3</sup>, 吴酬飞<sup>2,3</sup>, 王俊伟<sup>4</sup>, 李 阳<sup>2,3</sup>, 张立钦<sup>2,3</sup>

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300; 2. 湖州师范学院 浙江省媒介生物学与病原控制重点实验室, 浙江 湖州 313000; 3. 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000; 4. 烟台市昆崙山林场, 山东 烟台 264100)

**摘要:** 【目的】探究松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 侵染下松干、松针与根系部位内生细菌菌群的结构变化, 可充分挖掘马尾松 *Pinus massoniana* 内生细菌资源。【方法】采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 及高通量测序技术, 对松材线虫侵染下 3 年生马尾松不同部位内生细菌的结构多样性进行分析。【结果】①马尾松不同部位内生细菌菌群结构存在较大差异, 菌群多样性从大到小依次为松干、松针、根系。②松干部位部分细菌属在侵染 15 d 时丰度明显增加, 但苗木表面并不表现任何症状。③马尾松体内共检测到内生细菌 442 属, 分属 35 门 49 纲 110 目 210 科。其中松干与松针部位的甲基杆菌属 *Methylobacterium*、假单胞菌属 *Sphingomonas*、薄层菌属 *Hymenobacter*、泛菌属 *Pantoea*、假单胞菌属 *Sphingomonas* 与短小杆菌属 *Curtobacterium* 在侵染过程中相对丰度变化较大。【结论】松材线虫侵染下, 马尾松根部基本不受影响, 但松干部位内生细菌菌群结构变化极显著, 其次是松针。部分内生细菌可能对松材线虫病具有潜在生防效果, 有助于后期生防菌株的挖掘。在侵染高峰期实时监测干部内生细菌菌群结构变化, 有助于松材线虫病的早期诊断。图 5 表 1 参 25

**关键词:** 马尾松; 松材线虫; 内生细菌菌群; DGGE 技术; 高通量测序技术

**中图分类号:** S763      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2021)04-0846-08

## Effect of *Bursaphelenchus xylophilus* infection on the endophytic bacterial community structure in different parts of *Pinus massoniana* seedlings

YIN Shiheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Shaoyong<sup>3</sup>, LIU Sushuang<sup>3</sup>, WU Choufei<sup>2,3</sup>, WANG Junwei<sup>4</sup>, LI Yang<sup>2,3</sup>, ZHANG Liqin<sup>2,3</sup>

(1. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of Vector Biology and Pathogen Control of Zhejiang Province, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China; 3. College of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China; 4. Kunyushan Forest Farm, Yantai 264100, Shandong, China)

**Abstract:** [Objective] With an investigation of the structural changes of the endophytic bacterial flora of pine stems, pine needles and pine roots, this study is aimed to fully explore the endophytic bacterial resources of *Pinus massoniana*. [Method] DGGE and high-throughput sequencing technology was employed in the exploration of the structural changes of endophytic bacterial flora of three-year-old *P. massoniana* trees upon the infection of *Bursaphelenchus xylophilus* disease. [Result] (1) There was a significant diversity in the endophytic bacterial community structure in different parts of *P. massoniana* trees with the diversity decreasing from the pine stem to pine needles and to the root system. (2) There was significant increase in parts of the

收稿日期: 2020-09-01; 修回日期: 2021-04-02

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目子课题 (2018YFD0600201-02); 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ21C160005, LQ20C130003); 湖州市自然科学基金资助项目 (2019YZ01)

作者简介: 尹诗恒 (ORCID: 0000-0001-9927-5044), 从事马尾松内生细菌研究。E-mail: 546379920@qq.com。通信作者: 李阳 (ORCID: 0000-0003-4484-0688), 从事微生物生态研究。E-mail: 02572@zjhu.edu.cn。张立钦 (ORCID: 0000-0001-7167-6217), 教授, 博士生导师, 从事森林病理学研究。E-mail: zlwqz@zjhu.edu.cn

bacterial genera in pine stems after 15 days of infection, whereas there were no symptoms shown on the surface of the seedlings. (3) Of the 442 genera of endophytic bacteria detected in *P. massoniana* that fall into 35 phyla, 49 classes, 110 order and 210 families, the relative abundance of *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Hymenobacter*, *Pantoea*, *Sphingomonas* and *Curtobacterium* in pine stems and pine needles varies greatly throughout the infection process. [Conclusion] The effect of the infection of *B. xylophilus* disease on the structure of the endophytic bacterial flora varies from none to pretty significant to extremely significant in roots, pine needles and pine stems respectively. And some endophytic bacteria may have potential biocontrol effects on *B. xylophilus* disease, which is conducive to the excavation of later biocontrol strains. In addition, real-time monitoring of changes in the bacterial community structure of pine stems during the peak period of infection is helpful to the early diagnosis of *B. xylophilus* disease. [Ch, 5 fig. 1 tab. 25 ref.]

**Key words:** *Pinus massoniana*; *Bursaphelenchus xylophilus*; endophytic bacterial flora; DGGE technology; high-throughput sequencing technology

马尾松 *Pinus massoniana* 为松科 Pinaceae 松属 *Pinus* 的常绿大乔木, 最高达 45 m, 树皮呈红褐色, 多见于中国南方<sup>[1-2]</sup>。马尾松是中国松属中占比最大的一类树种, 因其速生和耐贫瘠的特点成为经济效益较大的用材树种之一<sup>[3]</sup>。松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 病又称松树萎蔫病, 其扩散途径主要为人类行为传播和松墨天牛 *Monochamus alternatus* 携带传播 2 种<sup>[4]</sup>, 且扩散速度快, 危害程度极高, 对林业经济和森林资源造成了极大损失<sup>[5]</sup>。因马尾松侵染初期并不表现任何特征, 一旦发病则植物开始枯萎且无法救治, 最终死亡, 所以松材线虫病也被称为“森林癌症”<sup>[6]</sup>。松材线虫病的早期研究主要集中于致病机制<sup>[7]</sup>; 后随科技和经济发展, 化学和物理防治研究逐步取得进展<sup>[8]</sup>; 近年来, 由于环境问题日益突出, 生防研究逐渐受到重视, 尤其对植物体内生防细菌的研究与应用。谈家金等<sup>[9]</sup>通过水培离体松枝得到 1 株坚强芽孢杆菌 *Bacillus firmus* GD2, 可影响松材线虫病的侵染, 首次证明茎部内生细菌与松材线虫病之间有密切联系。袁文婷<sup>[10]</sup>从马尾松与黑松 *Pinus thunbergii* 茎部分离到 9 株内生细菌, 其中 3 株对部分病原菌有一定拮抗作用。CARRELL 等<sup>[11]</sup>、IZUMI 等<sup>[12]</sup>在柔松 *Pinus flexilis*、欧洲赤松 *Pinus densiflora* 的根部与根际发现了大量不同种类的内生细菌。胡振亮等<sup>[13]</sup>从健康油松 *Pinus tabulaeformis* 根部、木质部、韧皮部及松针等 7 个部位分离到 40 株内生细菌, 其中 1 株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 可对松树枯梢病 *Sphaeropsis sapinea* 起到抑制作用。李阳<sup>[14]</sup>对健康马尾松接种清水处理与空白对照, 证实了接种产生的机械损伤与野外条件变化对菌群结构并无影响。综上可知, 自 2000 年以来, 对松科植物内生细菌相关的研究已取得一定进展, 但对马尾松不同部位内生细菌的研究并不多, 尤其缺乏高通量测序技术对松材线虫病侵染后马尾松内生细菌菌群的研究。基于此, 本研究利用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术与高通量测序技术, 探究野外接种松材线虫后马尾松不同部位内生细菌菌群的结构变化, 为松材线虫病的早期诊断和后期生防菌株的挖掘提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从杭州四季春马尾松苗圃 (30°21'42"N, 119°34'51"E) 采集 30 株 3 年生健康马尾松幼苗种植于湖州师范学院试验田中, 缓苗 15 d 后采用套管接虫法接种 24 株马尾松苗, 每株接种松材线虫 1 万条。接种当天取其中 6 株未接种苗作为空白对照, 之后每隔 15 d 取 6 株接种苗作为试验样本, 共取样 5 次, 时间为 60 d, 其间取侵染 15 d 的松干样本进行镜检, 确定松材线虫已接种成功。其中 3 株马尾松幼苗的松干、松针和根系样本分开装入自封袋, 按顺序编号并保存至 -20 ℃ 冰箱, 用于 DGGE 分析; 另外 3 株试验样本分装后按相同顺序编号保存至 -80 ℃ 冰箱中用于高通量测序。

### 1.2 方法

1.2.1 松材线虫的培养与接种 松材线虫与灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 均取自浙江农林大学生物农药高效制备技术国家地方联合工程实验室, 将松材线虫接种于布满灰葡萄孢的 PDA 培养基上, 于 25 ℃ 恒温培

养箱培养 4~6 d, 挑选其中密封完好且取食干净的培养基, 采用贝尔曼漏斗法分离松材线虫<sup>[15]</sup>。将分离得到的松材线虫液以  $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速下离心 3 min, 离心后松材线虫沉积于离心管底部, 弃上部液体并将剩余液体混匀, 最后加入无菌水与松材线虫, 按比例配制成  $10\,000\text{ 条}\cdot\text{mL}^{-1}$  的线虫悬液, 用于试验田马尾松苗接种。

**1.2.2 DGGE 技术** 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增: 采用磁珠法细菌基因组 DNA 抽提试剂盒分别提取松干、松针与根系总细菌的 DNA 后, 选用 BIO-RAD 的 T100TM Thermal Cycler PCR 仪对细菌 DNA 的 16S V3 区序列进行扩增, 扩增选择带有 GC 夹的细菌特异性引物 GC-341(cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gcg cgg ggg gcc tac ggg agg cag cag) 与 518R(att acc gcg gct gg) 进行, 其产物经体积分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测后存至  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

DGGE 凝胶电泳: 首先, 分别吸取 9.6 mL 体积分数 100% 与 6.4 mL 体积分数 0 的变性胶、6.4 mL 体积分数 100% 与 9.6 mL 体积分数 0 的变性胶于 2 个锥形瓶中, 再次吸取 80  $\mu\text{L}$  的过硫酸铵 (AP) 与 16  $\mu\text{L}$  的四甲基乙二胺 (Temed) 均加至上述 2 个锥形瓶中, 配制成体积分数为 60% 与 40% 的梯度胶, 分别倒入梯度胶电动生成器进行灌胶, 梯度胶凝固后吸取 10  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物与 5  $\mu\text{L}$  loading buffer 混合后进行点样。其次, 将点样完成的凝胶放入已预热至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  的电泳仪中, 80 V 电泳 13 h。最后待电泳完毕向凝胶倒入 0.5  $\mu\text{L}$  染色剂避光染色, 用 BIO-RAD 凝胶橙色系统获取 DGGE 电泳条带图。将 DGGE 电泳条带图导入 Quantity One 软件中进行 DGGE 图谱分析, 并利用 PAST 生物统计软件与 WPS 软件处理数据图表, 分析不同部位受松材线虫侵染后内生细菌菌群结构的差异。

**1.2.3 高通量测序技术** 委托诺禾致源生物科技有限公司对样本细菌的 DNA 进行测序, 测序平台为 Illumina NovaSeq。首先, 采用 CTAB 法对样本的细菌 DNA 进行提取, 选择带有 Barcode 的特异引物 515F 与 806R 对样本 16S V4 区进行扩增, 使用体积分数为 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测后对目的条带进行回收。其次, 使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 经 Qubit 和 Q-PCR 定量后使用 NovaSeq6000 进行上机测序得到数据。最后, 使用 FLASH 对下机数据进行拼接得到原始 Tags 数据, 在去除低质量碱基及接头污染序列后, 在 97% 的相似性水平上, 使用 Uparse 软件进行操作分类单元 (OTU) 聚类, 通过 Qiime 软件和 R 软件对样本进行群落多样性分析, 同时对比 DGGE 数据, 定性定量对内生细菌菌群结构的差异变化进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 马尾松不同部位内生细菌菌群的 DGGE 分析

**2.1.1 不同部位内生细菌菌群的 DGGE 电泳条带分析** 如图 1 所示: 松针部位空白对照组 (即侵染 0 d) 和侵染 15 d 的样品条带数量和亮度基本不变, 侵染 30 d 后条带数量增多且亮度加深, 侵染 45 d 后条带的亮度和数量进一步增加, 但侵染 60 d 后, 条带的数量减少且亮度减弱。松干部位不同侵染期样品的条带数量和亮度差异最大, 侵染 15 d 后样品条带即开始变化, 侵染 30 d 后其数量与亮度明显增加且到达高峰; 至侵染后期, 条带整体变化不明显, 但条带数量有一定的减少, 且部分条带明显增亮或减弱。相

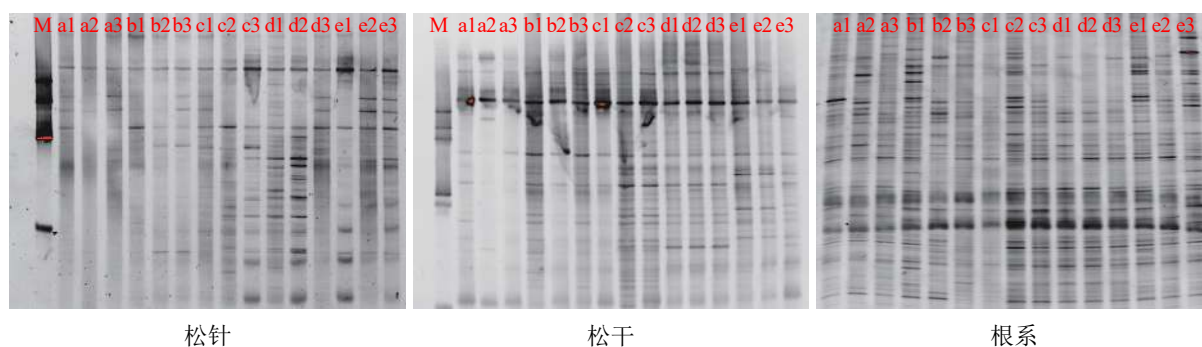


图 1 不同时期马尾松内生细菌菌群变化的 DGGE 分析图

Figure 1 DGGE analysis chart of changes in the endophytic bacterial flora of *P. massoniana* in different periods

比松干与松针，根系的变化非常小，不同侵染期条带的数目与亮度均无明显变化，整体相对稳定。

2.1.2 不同部位内生细菌菌群的差异显著性分析 如图 2 所示：松干部位侵染 0 与 60 d 样本数据的离散程度最小，中位数约 20；侵染 30 d 数据最大值可达 80，数据离散程度极大，中位数约 60；侵染 15 与 45 d 的样本数据离散程度中等，中位数约 30，其中  $P=0.000\ 8$ ，小于 0.05。松针部位各组数据的离散程度相近，除侵染 0 与 45 d 样本的中位数接近 70，剩余 3 组数据中位数约 20，其  $P=0.089\ 8$ ，大于 0.05。根系部位数据的离散程度最小，除空白对照外，不同侵染期样本中位数均接近 60，且  $P=0.714\ 4$ ，大于 0.05。

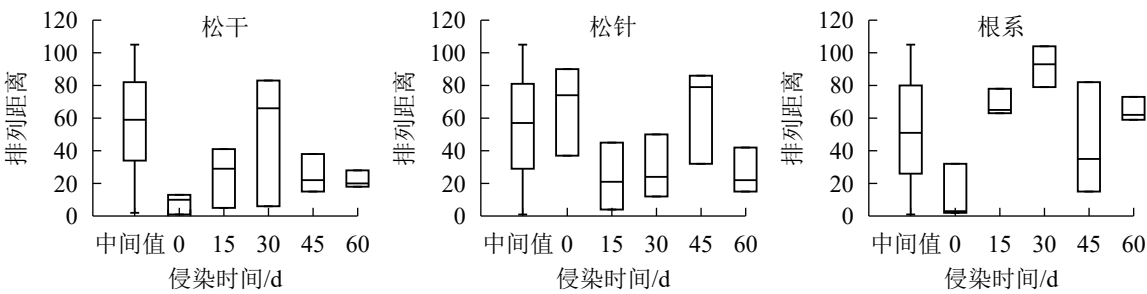


图 2 不同时期马尾松内生细菌菌群的差异箱式图

Figure 2 Box diagram of differences in endophytic bacterial flora of *P. massoniana* in different infection stages

综上所述：根系部位物种多样性整体离散程度最小，差异不显著 ( $P>0.05$ )；松干部位整体离散程度最大，且各组数据间的离散程度差异也较大，差异显著 ( $P<0.05$ )；松针部位整体离散度介于松干与根系之间，但各组数据间的离散程度基本一致，差异显著 ( $P<0.05$ )。

2.1.3 不同部位内生细菌菌群的多样性指数分析 利用 PAST 软件对条带数据进行统计分析，得到不同侵染时期马尾松内生细菌菌群的多样性指数，即香农威纳指数 (Shannon-Wiener)、均匀度指数 (Pielou) 以及丰富度指数 (Margalef)。如表 1 所示：随侵染时间延长，松干的 Shannon-Wiener 指数由 1.93 上升到 3.12，Margalef 指数由 1.01 到 3.27；松针的 Shannon-Wiener 指数从 2.06 到 2.73，Margalef 指数由 1.02 到 1.85，与松干部位变化趋势一致；根系部位的多样性数值远大于松针与松干部位，但数值间的差值极小。由此可知，随侵染时间延长，松干和松针部位内生细菌菌群的多样性都呈先增加后减少的变化趋势；根系部位的菌群结构多样性变化极小，但多样性最丰富。

2.2 马尾松不同部位内生细菌菌群结构的高通量测序分析

2.2.1 不同部位内生细菌菌群的 OUTs 聚类分析 由 OTUs 维恩图 (图 3) 可知：根系部位菌群的 OTU 数最多，为 4 523，且随侵染时间延长，OTU 数无明显变化趋势；松针与松干菌群的 OTU 总数分别为 3 833 和 3 823，且随侵染时间延长表现为持续增长的变化趋势，其中侵染 15 d 的松干部位特有 OTU 数由 48 突增至 154，变化最大。这与 DGGE 图谱分析结果相同，即松干与松针条带数目在空白对照组极少，且随侵染时间延长逐渐增多；菌群多样性变化与条带数目相同，即松干被侵染 15 d 菌群结构多样性明显增多，而松针部位菌群则随侵染时间变化逐渐增多。可见，在长期侵染过程中，松材线虫的侵染确实对不同部位细菌菌群结构的变化有较大影响，其中松干部位对松材线虫病的侵染敏

表 1 不同时期马尾松内生细菌菌群结构的多样性指数分析

| Table 1 Analysis of diversity index of the endophytic bacterial community structure of <i>P. massoniana</i> in different periods |        |                  |          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------|----------|------------|
| 部位                                                                                                                               | 侵染时间/d | Shannon-Wiener指数 | Pielou指数 | Margalef指数 |
| 松针                                                                                                                               | 0      | 2.06             | 0.88     | 1.02       |
|                                                                                                                                  | 15     | 2.39             | 0.87     | 1.39       |
|                                                                                                                                  | 30     | 2.81             | 0.86     | 2.05       |
|                                                                                                                                  | 45     | 2.92             | 0.86     | 2.33       |
|                                                                                                                                  | 60     | 2.73             | 0.86     | 1.85       |
| 松干                                                                                                                               | 0      | 1.93             | 0.70     | 1.01       |
|                                                                                                                                  | 15     | 2.68             | 0.73     | 2.15       |
|                                                                                                                                  | 30     | 3.06             | 0.76     | 2.93       |
|                                                                                                                                  | 45     | 3.22             | 0.72     | 3.58       |
|                                                                                                                                  | 60     | 3.12             | 0.73     | 3.27       |
| 根系                                                                                                                               | 0      | 3.51             | 0.74     | 4.40       |
|                                                                                                                                  | 15     | 3.58             | 0.78     | 4.41       |
|                                                                                                                                  | 30     | 3.67             | 0.79     | 4.74       |
|                                                                                                                                  | 45     | 3.50             | 0.73     | 4.30       |
|                                                                                                                                  | 60     | 3.63             | 0.77     | 4.60       |

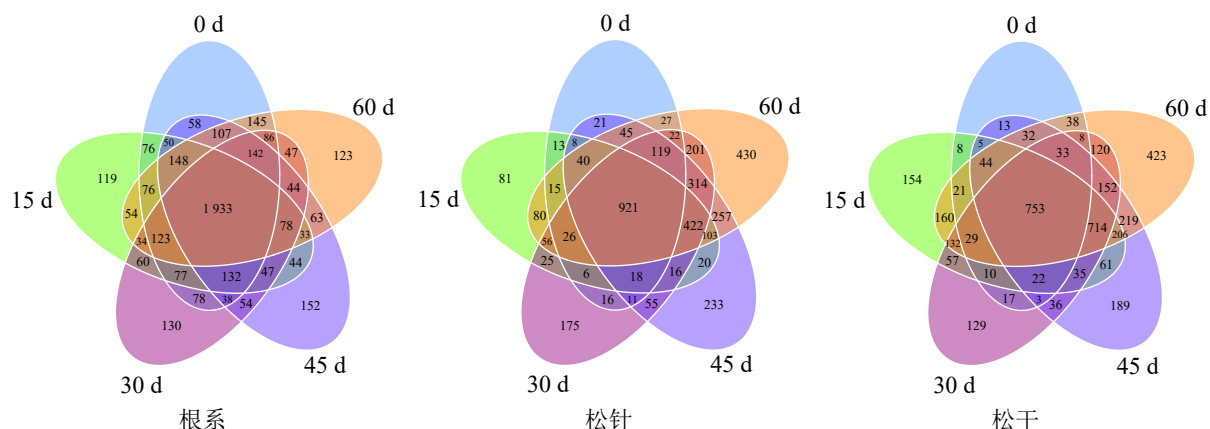


图3 不同部位内生细菌的 OTUs 维恩图

Figure 3 Venn diagram of OUTs of endophytic bacteria in different parts

感性最强, 响应速度最快; 松针次之, 根系则基本不受侵染影响。

2.2.2 不同部位内生细菌菌群的物种组成分析 综上所述, DGGE 与高通量测序结果一致, DGGE 分析能够直观地比较和分析马尾松不同部位细菌群的结构差异, 可对菌群进行定性分析, 但无法直接检测到菌群的种类, 仍需配合其他实验方法如 T 克隆。高通量测序技术则凭借其大量、速度、准确的特点可直接检测到较全面的马尾松菌群信息。本研究检测到马尾松体内细菌共 442 属, 隶属于 35 门 49 纲 110 目 210 科。

由图 4 可知: 在门水平上, 相对丰度排名前 10 的细菌分别为蓝藻细菌门 Cyanobacteria、变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteria、酸杆菌门 Acidobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、浮霉菌门 Planctomycetes、绿弯菌门 Chloroflexi、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、疣微菌门 Verrucomicrobia 及装甲菌门 Armatimonadetes, 其中分布最广、种类最多的是放线菌门与变形菌门。

由图 5 可知: 在属水平上, 松干部位侵染 0 与 15 d 菌群的种类相差非常大, 如 *Bryobacter* 属、*Pseudolabrys* 属、类诺卡氏属 *Nocardioide*s、分枝杆菌属 *Mycobacterium* 与弗莱德门菌属 *Friedmanniella*,

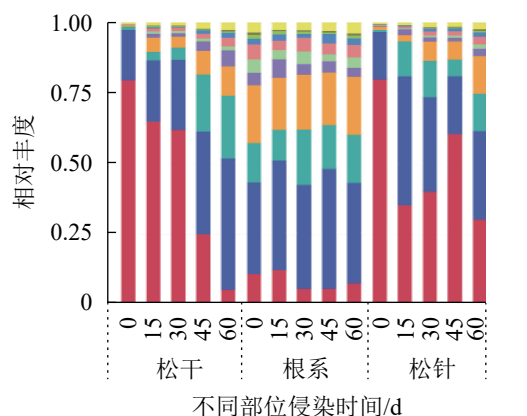


图4 门水平上排名前 10 的物种相对丰度

Figure 4 Relative abundance of the top 10 species at the phylum level

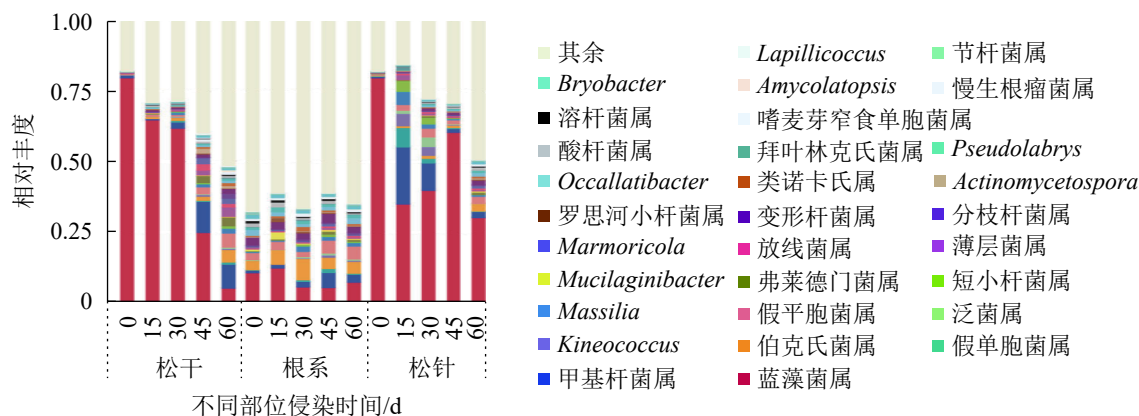


图5 属水平上排名前 30 的物种相对丰度

Figure 5 Relative abundance of the top 30 species at the genus level

在侵染 0 d 时, 上述菌群几乎没有, 侵染 15 d 后才出现; 侵染 15~60 d 相对丰度整体变化减弱, 但部分菌种如甲基杆菌属 *Methylobacterium*、假平胞菌属 *Sphingomonas* 与薄层菌属 *Hymenobacter* 在侵染后期相对丰度有所增加。与松干相比, 松针部位内生细菌菌群种类变化并不明显, 但菌群丰度变化较明显, 如泛菌属 *Pantoea* 与假平胞菌属随侵染时间延长其相对丰度整体呈先增加后减少的趋势, 甲基杆菌属、假单胞菌属 *Pseudomonas*、短小杆菌属 *Curtobacterium* 则表现为持续减少的趋势。其余菌属如蓝藻菌属 *Cyanobacteria*、伯克氏菌属 *Burkholderia*、放线菌属 *Amnibacterium*、变形杆菌属 *Gammaproteobacteria*、罗思河小杆菌属 *Rhodanobacter*、拜叶林克氏菌属 *Beijerinckia*、酸杆菌属 *Acidobacteria*、嗜麦芽窄食单胞菌属 *Stenotrophomonas*、溶杆菌属 *Lysobacter*、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和节杆菌属 *Arthrobacter* 则并无明显丰度变化。根部内生细菌菌群的种类与相对丰度则始终维持在一定水平。

### 3 结论与讨论

微生物的复杂培养条件使大部分微生物包括植物内生细菌较难使用传统分离培养法进行研究<sup>[16]</sup>。虽然松材线虫病的生防研究已取得一定进展, 如芽孢杆菌属 *Bacillus*、短小杆菌属与区文氏菌属 *Erwinia* 的生防菌株对松材线虫病的侵染可起到一定作用, 尤其是芽孢杆菌属, 但其野外生防效果普遍弱于室内实验效果<sup>[17-18]</sup>。本研究通过 DGGE 技术对不同部位的内生细菌分析发现: 松材线虫的侵入明显改变了马尾松内生细菌结构, 随侵染时间推移菌群多样性整体表现为先增加后稳定的变化趋势, 但不同部位内生细菌群的变化规律并不一致。松干部位内生细菌群在侵染 15 d 时产生较大变化, 至 45 d 时菌群差异达到显著, 到侵染 60 d 时菌群结构与侵染 45 d 基本一致; 而松针部位在侵染 30 d 才开始表现明显的菌群变化, 且多样性指数增长趋势较平缓; 根系部位内生细菌菌群结构在侵染全过程未表现出明显的动态变化, 但内生细菌的数量远大于干部与针部。由此可知, 内生细菌菌群的物种数量与丰度从大到小依次为根系、松干、松针; 内生细菌菌群结构差异从大到小依次为松干、松针、根系。说明受侵染后松干部位对松材线虫病的侵染敏感性最强, 其次是松针, 根系则基本不受松材线虫病侵染的影响。

通过高通量测序技术对马尾松不同部位内生细菌定量分析发现: 共检测到细菌 442 属, 分布于 35 门 49 纲 110 目 210 科。由 OTUs 维恩图分析可知: 不同部位内生细菌菌群结构的变化趋势与上述结果一致, 即松干部位内生细菌对松材线虫病的侵染响应最迅速, 部分内生细菌的结构在侵染 15 d 时已发生显著变化。因此, 在松材线虫传播的高峰期实时监测马尾松的菌群变化对松材线虫病的早期检测有一定的帮助。此外, 松干与松针部位的部分内生细菌相对丰度也产生了显著变化, 松干部甲基杆菌属、假平胞菌属与薄层菌属随侵染时间的增加其相对丰度显著增多; 而松针部的甲基杆菌属、假单胞菌属与短小杆菌属相对丰度随侵染时间的延长逐渐减少, 泛菌属与假平胞菌属则随侵染时间延长其相对丰度呈先增加后减少的变化趋势; 根部内生细菌菌群的种类与相对丰度则整体保持稳定。

接种植物内生菌可刺激植物产生抗性酶, 并促进植物体内抗氧化活性物质的表达, 诱导植物产生系统防御反应<sup>[19]</sup>。目前, 甲基杆菌属、假平胞菌属、薄层菌属、泛菌属、假单胞菌属和短小杆菌属的部分菌株已从广泛的生境中分离得到, 且已被发现对植物具有一定的促生或生防作用。KHAN 等<sup>[20]</sup>研究发现: 假平胞菌属中的 LK11 菌株可通过产生吲哚乙酸 (IAA) 促进植物产生诱导系统抗性 (ISR), 刺激植物对环境胁迫与病原体产生反应, 使植物启动防御机制, 提高植物抗性; 甲基杆菌属、泛菌属也可促进植物分泌细胞分裂素 (CK)、吲哚乙酸等植物激素以促进植物生长发育, 并帮助植物抵挡生物和非生物因素的侵害<sup>[21-22]</sup>; 薄层菌属与假单胞菌属也具有解磷酸钙、产铁载体等的生物特性, 铁作为植物存活和繁殖的必需微量营养素, 当达到一定含量即可促进植物生长, 从而提高植物的抗性<sup>[22-24]</sup>。虽然上述细菌属在马尾松病害防治研究中报道较少, 但已证实对其他植物的生长发育有一定的促进或阻碍作用, 尤其是假单胞菌属与泛菌属的部分菌株对松材线虫病具有生防效果<sup>[25]</sup>。综上, 推测上述细菌属中的部分菌株可对松材线虫病产生生防作用, 为后期发掘新型生防菌株提供研究方向。

### 4 参考文献

- [1] 王洪波, 牟智慧. 喀斯特与非喀斯特区域天然马尾松林碳储量差异研究——以麻江县和雷山县为例[J]. 贵州科学, 2017, 35(3): 48-53.

- WANG Hongbo, MOU Zhihui. Carbon storage difference of natural horsetail pine woods in karst and non-karst areas: a case study on Majiang and Leishan [J]. *Guizhou Sci*, 2017, **35**(3): 48 – 53.
- [2] 张华锋, 陈思宇, 刘刚, 等. 松材线虫病疫木卫生伐对马尾松纯林林分结构的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2020, **37**(4): 745 – 751.
- ZHANG Huafeng, CHEN Siyu, LIU Gang, *et al.* Effects of sanitation cutting pine wilt diseased trees on the stand structure of pure *Pinus massoniana* plantation [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2020, **37**(4): 745 – 751.
- [3] 魏永成, 刘青华, 周志春, 等. 不同抗性马尾松接种松材线虫后针叶内化学信号物质的变化[J]. 林业科学, 2018, **54**(2): 119 – 125.
- WEI Yongcheng, LIU Qinghua, ZHOU Zhichun, *et al.* Changes of chemical signals in needles of *Pinus massoniana* with different resistance after inoculation of pine wood nematode [J]. *Sci Silv Sin*, 2018, **54**(2): 119 – 125.
- [4] 任炳忠, 唐羚恒. 检疫性害虫松材线虫研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2020, **42**(1): 8 – 13.
- REN Bingzhong, TANG Linghuan. Progress in quarantine pests of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Jilin Agri Univ*, 2020, **42**(1): 8 – 13.
- [5] VICENTE C, ESPADA M, VIEIRA P, *et al.* Erratum to: pine wilt disease: a threat to European forestry [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2012, **133**(2): 497 – 497.
- [6] 张翌楠, 杨忠岐. 松褐天牛的天敌及其对寄主的控制能力研究[J]. 植物保护, 2006, **32**(2): 9 – 14.
- ZHANG Yi'nan, YANG Zhongqi. Studies on the natural enemies and biocontrol of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Plant Prot*, 2006, **32**(2): 9 – 14.
- [7] 徐小文, 王义勋, 刘星, 等. 松材线虫病致病机理的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2018, **57**(20): 5 – 8.
- XU Xiaowen, WANG Yixun, LIU Xing, *et al.* Research progress of pathogenetic mechanism of pine wilt disease [J]. *Hubei Agric Sci*, 2018, **57**(20): 5 – 8.
- [8] 潘伟华, 贾进伟, 吴继来, 等. 甲维盐注干施用对松材线虫病的防治效果分析[J]. 中国森林病虫, 2014, **33**(6): 41 – 44.
- PAN Weihua, JIA Jinwei, WU Jilai, *et al.* Control effect of trunk injection of emamectin benzoate against pine wilt disease [J]. *For Pest Dis*, 2014, **33**(6): 41 – 44.
- [9] 谈家金, 向红琼, 冯志新. 马尾松内生细菌与松材线虫病关系的初步研究[J]. 植物病理学报, 2003, **33**(5): 474 – 476.
- TAN Jiajin, XIANG Hongqiong, FENG Zhixin. A preliminary study on the relationship between the endophytic bacterium of *Pinus massoniana* and pine wood nematode disease [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2003, **33**(5): 474 – 476.
- [10] 袁文婷. 松树内生细菌种群初探及生防益菌的室内筛选[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- YUAN Wenting. *The Preliminary Research on the Flora of Endophytic Bacteria of Pine and Indoor Screening of Biocontrol Bacteria* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.
- [11] CARRELL A A, FRANK A C. *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation [J]. *Front Microbiol*, 2014, **5**: 333. doi: [10.3389/fmicb.2014.00333](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00333).
- [12] IZUMI H, ANDERSON I C, KILLHAM K, *et al.* Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees [J]. *Can J Microbiol*, 2008, **54**(3): 173 – 179.
- [13] 胡振亮, 靳轩, 庞久帅, 等. 油松内生细菌的分离及拮抗菌的筛选[J]. 中国森林病虫, 2019, **38**(4): 1 – 6.
- HU Zhenliang, JIN Xuan, PANG Jiushuai, *et al.* Isolation of endophytic bacteria and screening of antagonistic bacteria from *Pinus tabulaeformis* [J]. *For Pest Dis*, 2019, **38**(4): 1 – 6.
- [14] 李阳. 松树体内菌群对松材线虫侵染响应及 *Burkholderia pyrrhocina* JK-SH007 杀虫基因工程菌构建[D]. 南京: 南京林业大学, 2018.
- LI Yang. *Response of Pine Endophytic Bacteria Flora to Bursaphelenchus xylophilus Infection and Construction of Insecticidal Gene Engineering Bacteria with JK-SH007* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2018.
- [15] 尚征, 周立峰, 冯玥瑶, 等. 拟松材线虫个体发育研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2019, **43**(6): 11 – 17.
- SHANG Zheng, ZHOU Lifeng, FENG Yueyao, *et al.* Ontogenesis of pine parasitic nematode *Bursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2019, **43**(6): 11 – 17.
- [16] 任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 等. 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, **39**(1): 36 – 45.
- REN Huishuang, XU Weifang, WANG Aiyin, *et al.* Research on biodiversity of endophytic bacteria and the antagonistic

- endophytes in mulberry [J]. *J Southwest Univ Nat Sci Ed*, 2017, **39**(1): 36 – 45.
- [17] 卢镇岳, 杨新芳, 冯永君. 植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用[J]. 生命科学, 2006, **18**(1): 91 – 94.  
LU Zhenyue, YANG Xinfang, FENG Yongjun. Endophytic bacteria: separation, classification, colonization and application [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2006, **18**(1): 91 – 94.
- [18] 江绪文, 李贺勤. 植物内生菌防治植物寄生线虫的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(9): 7 – 12.  
JIANG Xuwen, LI Heqin. Advances in the study of endophytes to control plant parasitic nematodes [J]. *Biotechnol Bull*, 2014(9): 7 – 12.
- [19] FRANK W, BEATE A, HELMUT B, *et al*. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2005, **102**(38): 13386 – 13391.
- [20] KHAN A L, WAQAS M, ASAF S, *et al*. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium* [J]. *Environ Exp Bot*, 2017, **133**: 58 – 69.
- [21] KLIKNO J, KUTSCHERA U. Regulation of root development in *Arabidopsis thaliana* by phytohormone-secreting epiphytic methylobacteria [J]. *Protoplasma*, 2017, **254**(5): 1867 – 1877.
- [22] TAHIR M, NAEEM M A, SHAHID M, *et al*. Inoculation of pqqE gene inhabiting *Pantoea* and *Pseudomonas* strains improves the growth and grain yield of wheat with a reduced amount of chemical fertilizer [J]. *J Appl Microbiol*, 2020, **129**(3): 575 – 589.
- [23] CHO E S, PARK S L, NAM Y D, *et al*. *Hymenobacter lutimineralis* sp. nov., belonging to the family *Hymenobacteraceae*, isolated from zeolite [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, **113**(7): 947 – 957.
- [24] SCHENK P M, CARVALHAIS L C, KAZAN K. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? [J]. *Trends Biotechnol*, 2012, **30**(3): 177 – 184.
- [25] 曾腓力, 贾爱玲, 郑敬荣, 等. 美国松材线虫体表携带优势细菌的鉴定及致病性[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(5): 696 – 702.  
ZENG Feili, BEN Ailing, ZHENG Jingrong, *et al*. Identification and pathogenicity of bacterial strains carried by American pine wood nematodes [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2012, **29**(5): 696 – 702.