

植物内生菌 *Bacillus* spp. 与松材线虫病的关系研究^{*}

欧阳革成^{1,2}, 张润杰¹

(1. 中山大学昆虫学研究所 // 生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260)

摘 要: 松材线虫病是重要的森林病害, 其致病机理还没有完全研究清楚。从马尾松健康树和松材线虫病树中分离到属于芽孢杆菌 *Bacillus* spp. 的植物内生菌, 此菌及其代谢产物对断根松苗和离体松枝均有致病作用, 且致病症状与松材线虫病类似, 但对正常生长的松苗没有作用。这说明这种植物内生菌与松材线虫病有关, 是一种弱致病菌。用 1 mmol/L 的苯甲酸溶液处理接种了松材线虫的松枝, 松枝内的线虫照常增殖, 但松材线虫病得到抑制。这说明植物内生菌是导致松材线虫病的内因, 松材线虫是激发因子之一。

关键词: 松树萎蔫病; 松材线虫; 内生菌; 致病机理; 苯甲酸

中图分类号: Q968 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0082-04

材线虫病 (pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*) 是目前对森林构成严重威胁的一种松树萎蔫病, 近几年被列为我国森林病虫害之首。由于该病涉及立地环境、松树、昆虫、线虫、细菌、真菌等多种因子, 其致病机理至今还没有完全研究清楚。该病自 1905 年发现以来, 开始被认为是蛀干害虫所致, 而后认为松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (简称 *Bx*) 是该病的病原^[2]。Kawazu 等^[1] 认为松材线虫的伴生细菌是主因。赵博光等^[2] 提出松材线虫病是松材线虫与其携带的致病细菌的复合侵染病害。谈家金等^[3] 认为松材线虫的伴生细菌是该病的重要因子。我们从松材线虫病树中分离到植物内生细菌 *Bacillus* spp., 并对其与松材线虫病的关系进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 *Bacillus* spp. 菌株的分离

在广东省东莞市松材线虫病区选取发病的马尾松 *Pinus massoniana* 病树, 在附近无病区选取健康马尾松树, 锯取样木组织, 表面消毒后在灭菌钵钵中研碎, 配成悬浊液, 分别涂布于马铃薯蔗糖培养基 (PDA)、牛肉浸膏蛋白胨培养基、蔗糖蛋白胨培养基平板上。选取其中典型菌落多次划线分离纯化, 从中选取 8 个菌株分别接种于查彼培养液中振荡培养 14 d, 0.45 μm 滤膜过滤。各取 10 mL 滤液加入置有刚露白的马尾松种子的培养皿中, 放在 26 °C

相对湿度 85% 的人工气候箱中培养, 每个处理 18 粒种子。对照用灭菌查彼培养液。5 d 后计算出芽率、量取苗长, 筛选出致病菌株, 并通过菌株在不同培养基上的培养特性、革兰氏染色以及形态、芽孢和鞭毛观察, 初步鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus* spp.。

1.2 *Bacillus* spp. 的代谢毒素对正常和去根松苗的影响

如 1.1 所述方法准备 *Bacillus* spp. 的查彼培养液滤液。选取生长在培养皿中的健康马尾松苗, 加入 *Bacillus* spp. 的查彼培养液滤液 15 mL, 每个处理 36 株松苗。选取生长状况一致的马尾松苗, 剪去根部, 插入灭菌的小玻璃瓶中, 以 *Bacillus* spp. 的查彼培养液滤液注满玻璃瓶, 每个处理 12 株松苗。分别以清水和灭菌的查彼培养液作对照。

1.3 *Bacillus* spp. 对马尾松松苗和离体松枝的致病性

在广州市龙洞林场马尾松林中, 选取健康马尾松树 1 株, 剪取生长状况相似的健康松枝。

Bacillus spp. 接种于葡萄糖牛肉浸膏蛋白胨培养基 (NA) 平板上 25 °C 下培养 24 h。室内在长满盘多毛孢 *Pestalotia* sp. 的玉米粒上培养松材线虫, 松材线虫虫源和菌种均由华南农业大学线虫室提供, 分离后线虫用灭菌水反复冲洗 5 次。苯甲酸 (benzoic acid, 简称 BA) 为广州试剂厂生产, 化学纯。

以无菌水配成 5 000 条松材线虫/mL 的悬浊液,

* 收稿日期: 2004-03-22

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (021676)

作者简介: 欧阳革成 (1967 年生), 男, 副研究员; 通讯联系人: 张润杰; E-mail: lsl@zsu.edu.cn

1 mmol/L 苯甲酸+5 000 条线虫/mL 的混合液、 1.5×10^8 CFU/mL 的 *Bacillus* spp. 细菌悬浊液、5 000 条线虫+ 1.5×10^8 CFU/mL 的线虫+细菌混合液; 以自来水配成 1 mmol/L 苯甲酸溶液。

用过火的刀片, 在松枝下部切 1 伤口, 切口上加少许脱脂棉, 以 parafilm 封口膜卷成筒状, 套在松枝切口上。然后分别接种松材线虫、细菌、线虫+细菌、对照用灭菌水, 插入玻璃瓶中水培(瓶中加定量自来水); 另外一组接种松材线虫的松枝, 插入加有定量 1 mmol/L 苯甲酸溶液的玻璃瓶中培养。每处理 6 个重复。每隔 5 d 用电子天平测量一次松枝质量和玻璃瓶中的水的质量。

选取生长状况一致的马尾松苗, 在根茎部用过火的刀片轻轻划伤, 分别接种线虫、线虫+细菌、细菌, 对照用灭菌水。每处理 8 个重复。

实验结束后, 各松枝分别剪成 1 cm 的小段, 分离、计算线虫数。

2 结果与分析

2.1 *Bacillus* spp. 代谢产物对马尾松的影响

从松树中分离到多个菌株。其中 B1 (来自病树) 与 B6 (来自健康树) 的查彼培养液滤液处理的刚露白马尾松种子, 生长极差, 芽长和出芽率与对照有极显著或显著差异(表 1)。这表明 B1、B6 菌株能产生对松树有致病作用的毒素。

表 1 *Bacillus* spp. 代谢产物处理的松籽的出芽率和平均芽长¹⁾

Tab 1 Germination rate and average bud length of pine seeds treated with metabolites of *Bacillus* spp.

处理	平均芽长/cm	出芽率/%
对照	3.24±0.19 ^B	100.00 ^c
B1	0.05±0.03 ^A	11.11 ^a
B6	0.28±0.06 ^A	61.11 ^b

1) 同列数据具相同大写字母者, 表示 0.01 水平差异不显著 (Duncan 方差分析), 具相同小写字母者为 0.05 水平差异不显著 (样本频率 *t* 检验)

B1、B6 菌株在 NA 平板上均出现相同的淡黄色小型菌落, 在 PDA 平板上和查彼培养液中的培养特性也相同, 均表现为在 PDA 上生长比在 NA 平板上生长要快(接种 24 h 后, 在 PDA 平板上可出现明显可见菌落, 而在 NA 上接种 48 h 后才出现明显可见菌落), 革兰氏阳性, 内生芽孢, 菌体杆状, 周生鞭毛, 因此应是同一种细菌, 即此菌在健康松树和松材线虫病树中都存在。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版, 初步鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus* spp.。

实验结果显示, 30 d 内, *Bacillus* spp. 的查彼

培养液滤液、灭菌的查彼培养液及自来水处理正常生长的马尾松苗, 均生长良好, 没有病症出现。在对断根马尾松苗的处理中, *Bacillus* spp. 的查彼培养液滤液处理的 12 株松苗在 5 d 时即有 8 株松苗萎蔫, 与其它处理有极显著差异。各处理松苗的平均存活天数最短的是 *Bacillus* spp. 的查彼培养液滤液处理的松苗, 其次是灭菌查彼培养液处理的松苗, 最长是自来水处理的松苗(表 2)。*Bacillus* spp. 的查彼培养液滤液处理的断根松苗表现的症状是: 整株松叶迅速变黄、赤褐, 失水萎蔫, 这与线虫病的症状类似。这表明, 细菌 *Bacillus* spp. 产生的毒素对正常生长的马尾松苗无影响, 对断根马尾松苗却有致萎作用。

表 2 *Bacillus* spp. 代谢产物处理断根松苗 5 d 后的萎蔫株率和平均存活天数¹⁾

Tab 2 Wilt rate after 5 days of treatment and average survival days of pine seedlings without roots treated with metabolites of *Bacillus* spp.

处理	存活天数/d	萎蔫株率/%
细菌	9.67±2.04 ^a	66.67 ^A
查彼液	22.83±2.49 ^b	0 ^B
自来水	48.08±3.79 ^c	0 ^B

1) 同列数据具相同大写字母者, 表示 0.01 水平差异不显著 (样本频率 *t* 检验), 具相同小写字母者为 0.05 水平差异不显著 (Duncan 方差分析)

2.2 *Bacillus* spp. 对马尾松的致病性

2.2.1 *Bacillus* spp. 对离体马尾松枝的致病性 松材线虫病的主要症状是松树蒸腾作用显著下降和松针失水萎蔫。实验结果显示, 接种松材线虫、接种 *Bacillus* spp. 细菌和接种线虫+*Bacillus* spp. 细菌的松枝的相对蒸腾强度(实验处理后某一单位时间内瓶中减少的水量/实验开始前单位时间内瓶中减少的水量)下降较快, 三者之间没有显著性差异; 对照与线虫+苯甲酸处理的松枝相对蒸腾强度下降的速度差不多, 但与前三者有显著性差异。

表 3 处理 15 d 后松枝的相对蒸腾强度和相对质量¹⁾

Tab 3 Relative transpiration intensity and relative weight of treated pine twigs after 15 days of treatment

处理	相对松枝质量	相对蒸腾强度
对照	0.77±0.05 ^b	0.77±0.09 ^b
细菌	0.52±0.03 ^a	0.34±0.05 ^a
线虫	0.51±0.02 ^a	0.39±0.07 ^a
细菌+线虫	0.61±0.04 ^a	0.43±0.09 ^a
线虫+BA	0.92±0.03 ^c	0.84±0.11 ^b

1) 同列数据具相同字母者, 经 Duncan 方差分析为差异不显著 ($P>0.05$)

相对松枝质量（实验处理后某一时间的松枝质量/实验开始时的松枝质量）变化情况与相对蒸腾强度相似（表 3）。松枝的平均存活期也一样，接种线虫、接种细菌和接种线虫+细菌的松枝最短，对照和线虫+苯甲酸处理的松枝平均存活期差不多，但与前三者有显著性差异（表 4）。这表明，苯甲酸没有抑制线虫在松枝中的增殖，但抑制了松枝松材线虫病的发生发展。

表 4 各处理松枝的平均存活期和分离的平均线虫量¹⁾

Tah 4 Average number of Bx and average survival days of treated pine twigs

处理	线虫量	存活期/d
对照	—	28.50 ± 1.26 ^b
细菌	—	20.67 ± 1.28 ^a
线虫	1.92 ± 0.33 ^a	20.33 ± 1.20 ^a
细菌+线虫	1.08 ± 0.30 ^a	23.33 ± 1.12 ^a
线虫+BA	2.42 ± 0.65 ^a	29.33 ± 0.67 ^b

1) 同列数据具相同字母者，经 Duncan 方差分析为差异不显著 ($P>0.05$)

2.2.2 *Bacillus* spp. 对正常生长的马尾松苗的致病性 实验结果显示，分别接种了松材线虫、*Bacillus* spp. 和线虫与 *Bacillus* spp. 混合接种的正常松苗以及对照松苗，4 种处理的感病指数和死亡率都很低，各处理间也没有显著性差异（表 5）。

表 5 3 个月后各处理松苗的平均感病指数和死亡率¹⁾

Tah 5 Average disease index and death rate of treated pine seedlings after 3 months of treatment

处理	平均感病指数	死亡率/%
线虫	0.38 ± 0.18 ^a	37.50 ^a
细菌+线虫	0.13 ± 0.13 ^a	12.50 ^a
细菌	0.13 ± 0.13 ^a	12.50 ^a
对照	0.13 ± 0.13 ^a	12.50 ^a

1) 同列数据具相同大写字母者，表示 0.05 水平差异不显著（样本频率 t 检验），具相同小写字母者为 0.05 水平差异不显著（Duncan 方差分析）

3 讨论

大量研究表明，松材线虫病是松材线虫与某些致病微生物共同作用的结果，致萎毒素的产生是松树萎蔫致死的关键因素，由于松材线虫并不产生致萎毒素^[4]，在病树中能够产生致萎毒素的微生物，无疑与松材线虫病有关。本实验证明了 *Bacillus* spp. 能产生致萎毒素，且其对松树的致病症状与松材线虫病类似，则此 *Bacillus* spp. 与松材线虫病有

关。

Bacillus spp. 对刚露白的马尾松种子、去根的松苗和离体松枝均表现出较强的致病作用，而对正常生长的马尾松苗没有影响。这表明，*Bacillus* spp. 应是弱病原菌或机会性病原菌。有试验表明，马尾松随长势的减弱抗松材线虫病的能力减弱，松苗也一样^[5]。这表明，*Bacillus* spp. 对松树的致病特性与松材线虫病一致。

正因为 *Bacillus* spp. 是弱病原菌或机会性病原菌，才能在健康松树上存在而不导致松树发病。由于 *Bacillus* spp. 在健康松树上也存在，因此应是植物内生细菌。它在植物性培养基（PLA）上比在动物性培养基（NA）上生长更好，进一步说明了它更可能来源于植物而不是线虫。不同学者从松材线虫上分离到的微生物^[1-3]不同，也表明松材线虫携带的微生物种类是随机的，即两者之间应只是原始合作或偏利关系，而不是伴生或共生关系。一些学者用不带菌的松材线虫接种松树也能导致松材线虫病，从而推断松树本身带病原菌^[6]，这与本文结论相符。

苯甲酸通常被认为是最简单的植保素，直接抑制微生物并诱导植物其它的抗性反应。本实验中，苯甲酸没有抑制线虫在松枝中的增殖，但抑制了松材线虫病的发生和发展。这表明，植物内生菌是导致松材线虫病的关键因子之一，线虫只是刺激或诱导因子之一。即使没有松材线虫，如果另有激发植物内生致病细菌的条件存在，也会导致松树萎蔫死亡。国内许多地方大面积松树枯死，病树中仅有拟松材线虫或没有线虫，就是在松材线虫病区，也有很多病树分离不到松材线虫。这符合一些植物内生菌的发病规律：这些植物内生菌有潜在的植物致病性，它们在侵染健康植物时，不表现实质性的致病症状，但当植物受到来源于生物的或非生物的胁迫条件的威胁，造成植物自身的防御功能严重削弱时，一部分内生病原菌就会活跃地生长起来，产生毒素干扰寄主细胞通透性和植物代谢，对植物造成明显危害^[7,8]。

类似 *Bacillus* spp. 性质的、能导致松树萎蔫的植物内生菌，可能不只 1 种，也有可能因地域和树种的不同而不同，这有待于进一步研究。

参考文献:

[1] KAWAZU K. Pathogenic toxins of pine wilt disease[J]. Kagaku to Seibutsu, 1998, 36 (2): 120-124.
[2] 洪英娣, 曹越, 赵博光, 等. 松材线虫携带细菌的鉴定和毒性研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2002.

26(5): 37—40.

[3] 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(6): 326—328.

[4] 曹越, 沈伯葵. 人工培养条件下松材线虫提取物的毒性研究[J]. 南京林业大学学报, 1996, 20(4): 13—16.

[5] 徐福元, 席客, 徐刚, 等. 不同龄级马尾松对松材线虫病抗性的影响[J]. 南京林业大学学报, 1994, 18(3): 27—33.

[6] 郭道森, 赵博光, 李周直. 松材线虫病致病机理的研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(4): 64—68.

[7] 冯永君, 宋未. 植物内生细菌[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 249—252.

[8] 金玲, 巴峰. 植物微病原菌研究进展[J]. 世界农业, 1995(3): 38—39.

The Occurrence of Pine Wilt Disease Caused by
Bursaphelenchus xylophilus Related to Endophyte

OUYANG Ge cheng^{1,2}, ZHANG Run jie¹

(1. Institute of Entomology & State Key Lab for Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Pine wilt disease caused by pine wood nematodes (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, was one of main forestry diseases. Its exact pathogenic mechanism was not well known. An endophyte bacterium, which was isolated from both diseased trees infected with this disease and healthy trees of masson pine, *Pinus massoniana*, was identified as *Bacillus* spp. Both bacterium and its metabolite were pathogenic to pine seedlings without roots and twigs, and symptom caused by them was alike to that of this disease, but they had no effect on healthy seedlings. It suggested that the occurrence of this disease related to this endophyte bacterium and it was weak pathogen. Pine twigs inoculated with PWN were cultured in 1.0 mmol/L benzoic acid (BA) solution and tap water, respectively. The results showed that the development of wilt disease of twigs cultured in BA solution was restrained, although PWN in these twigs increased as normally as those in twigs cultured in tap water. It suggested that endophyte of pine tree would be the main pathogenic factor of the disease, and PWN was one of irritative factors.

Key words: pine wilt disease; *Bursaphelenchus xylophilus*; endophyte; pathogenic mechanism; benzoic acid