

三株芽胞杆菌菌株对松材线虫低温存活与繁殖的影响

严正梅 翟宁宁 谈家金* 郝德君

(南京林业大学林学院, 南方现代林业协同创新中心, 南京 210037)

摘要: 为明确细菌在松材线虫生态适应性中的作用, 本研究选择与致病相关的松材线虫伴生细菌 GD1、马尾松内生细菌 GD2 以及具有杀松材线虫活性的湿地松内生细菌 NJSZ-13 为试验对象, 测定经这 3 株芽胞杆菌菌株 3 个浓度低温驯化 10、15 和 20 d 后, 在冷冻条件下松材线虫强毒虫株 AMA3、中毒虫株 AA3 和弱毒虫株 YW4 的存活率和繁殖量。结果表明: 低温驯化 15 d 和 20 d 后 3 株菌株对不同毒力线虫的活力影响较驯化 10 d 后的更显著。在低温驯化 15 d、-20℃ 冷冻处理 1 h 后, 5×10^6 CFU/mL 浓度菌株 GD1 处理下, 虫株 AMA3、AA3 和 YW4 的存活率分别为 77.22%、83.68% 和 84.26%, 与对照差异显著; 5×10^5 CFU/mL 浓度菌株 GD1 处理下, 虫株 AMA3、AA3 和 YW4 的存活率分别为 75.76%、80.67% 和 81.50%, 与对照差异显著。 5×10^6 CFU/mL 和 5×10^5 CFU/mL 浓度菌株 GD2 处理下, 与 GD1 处理组结果相似, 菌株 NJSZ-13 处理组则与菌株 GD1 和 GD2 的结果相反。低温驯化 15 d、-20℃ 冷冻处理 1 h 后, 5×10^6 CFU/mL 浓度菌株 GD1 处理下, 虫株 AMA3、AA3 和 YW4 的繁殖量分别为 7 530、9 317 和 12 793 条/皿, 与对照 (3 192、3 840 和 5 823 条/皿) 差异显著; 5×10^5 CFU/mL 浓度菌株 GD1 处理时, 3 个虫株的繁殖量均与对照差异显著。而菌株 GD2 和 NJSZ-13 处理后, 3 个虫株的繁殖量均无显著变化。表明不同芽胞杆菌对松材线虫的低温适应性影响存在差异, 松材线虫伴生细菌 GD1 和马尾松内生细菌 GD2 能增强其低温适应性, 而湿地松内生细菌 NJSZ-13 菌株则相反。

关键词: 松材线虫; 松材线虫伴生细菌; 松树内生细菌; 低温适应性

Effects of three strains of *Bacillus* spp. on the survival and reproduction of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* at low-temperature

Yan Zhengmei Zhai Ningning Tan Jiajin* Hao Dejun

(Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu Province, China)

Abstract: In order to explore the role of bacteria in the ecological adaptability of pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, the changes of the survival and reproduction of PWNs treated with bacteria, the effects of specific bacteria (nematode-carried bacteria GD1, *Pinus massoniana* endophyte GD2 and endophyte NJSZ-13 of *P. elliotii* with nematicidal activity) on the freeze resistance of PWNs with different virulence types (strongly virulent isolate AMA3, normally virulent isolate AA3, weakly virulent isolate YW4) were studied after the three specific *Bacillus* strains at three different concentrations acclimated for 10, 15 and 20 d. The results showed that, in the low-temperature survival test, the effect of bacteria on the survival of nematodes belonging to different virulence types was more significant in the treatment group after 15 days and 20 days of low temperature acclimation than that after ten days of acclimation. The survival rates of AMA3, AA3 and YW4 were 77.22%, 83.68% and

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1200400), 南京林业大学大学生实践创新训练计划项目 (2019NFUSPITP0307)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: tanjiajin@njfu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-17

84.26%, respectively, which were significantly different from their control groups after 15 days of cryopreservation at -20°C for 1 h with 5×10^6 CFU/mL strain GD1. Under the treatment with 5×10^5 CFU/mL strain GD1, the survival rates of AMA3, AA3 and YW4 were 75.76%, 80.67% and 81.50%, respectively. The differences were significant when compared with each control group. The results of the strain GD2 treatment with 5×10^6 CFU/mL and 5×10^5 CFU/mL were similar to the results in the GD1 treatment group, while the results of the strain NJSZ-13 treatment group were opposite with GD1 and GD2 strains. In the experiment of low temperature reproduction, after 15 days of low-temperature acclimation and freezing treatment at -20°C for 1 h, under the treatment of 5×10^6 CFU/mL strain GD1, the fecundities of AMA3, AA3 and YW4 were 7 530, 9 317 and 12 793 per plate, respectively, which were significantly different from those of their corresponding control groups (3 192, 3 840 and 5 823 per plate, respectively). There were significant differences among the three strains and their control groups when treated with 5×10^5 CFU/mL. However, there was no significant change in the reproduction of the three strains after treatment with GD2 and NJSZ-13. The results suggested that different bacteria had different effects on the freezing resistance of PWNs. The nematode-carried bacteria GD1 and *P. massoniana* endophyte GD2 could enhance their low-temperature adaptability, while the *P. elliotii* endophyte NJSZ-13 was on the contrary.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; PWN-carried bacteria; pine endophyte; low-temperature adaptability

植物寄生线虫是一类专门在植物体内以活体营养为生的线虫,严重影响寄主植物的生长发育,甚至导致植物大量死亡(赵洁等,2020)。松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 是植物寄生线虫中为害严重的一种。据报道松材线虫病是全球最具危险性、毁灭性的检疫性森林病害之一(Tóth,2011),2016年该病在我国中温带地区的辽宁省首次被发现(国家林业局2017年第4号公告),于海英等(2019)进一步发现松材线虫自然感染非松属寄主长白落叶松 *Larix olgensis*、日本落叶松 *L. kaempferi* 和华北落叶松 *L. principis-rupprechtii* 等北方主要森林树种,以上研究表明松材线虫病已经向北扩散,严重威胁着我国北方森林资源和自然景观,对其进行防控已迫在眉睫。

在细菌与线虫的协同进化过程中,细菌在植物寄生线虫致病机理中扮演着重要角色(Proença et al.,2017;Wang et al.,2019),如松材线虫通过纤维素酶和果胶酸裂解酶入侵植物组织,而纤维素酶可能是通过水平基因转移从细菌或真菌中获得(Kikuchi et al.,2006;2011)。随着科学发展,人们发现松树内生细菌主要以芽胞杆菌属 *Bacillus* 和肠杆菌属 *Enterobacter* 种类为主,并且为优势菌群(Bal et al.,2012)。此外,有研究表明松材线虫的伴生细菌蜡状芽胞杆菌 *B. cereus*、巨大芽胞杆菌 *B. megaterium* 和枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 产生的有毒代谢物苯乙酸会对黑松悬浮细胞、愈伤组织以及实生苗产生毒害

作用(Kawazu et al.,1996a,b)。本实验室前期研究发现,芽胞杆菌 *Bacillus* spp. GD1、GD2 菌株可显著提高松材线虫的繁殖力和存活率,从而加强松材线虫的致病能力;而芽胞杆菌 NJSZ-13 则具有杀线活性,可提高松树的抗病能力(谈家金和冯志新,2003;尹艳楠等,2020)。随着松材线虫病疫区的北扩,松材线虫能够突破年均温 10°C 线去感染非松属寄主的原因在于线虫对低温环境有着适应性(Klosin et al.,2017;理永霞和张星耀,2018)。关于线虫低温适应性机理的研究,目前主要集中在在线虫体内海藻糖和脂肪等物质的积累方面,如昆虫病原线虫小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* 和库什代斯氏线虫 *S. kushidai* 在 5°C 、 10°C 和 15°C 低温驯化条件下都可以积累海藻糖(Ogura & Nakashima,1997;Grewal & Jagdale,2002),而线虫通过海藻糖保护自身及其共生细菌 *Xenorhabdus* spp.(Jagdale & Grewal,2003);王博文等(2017)研究结果发现,低温胁迫可正向调控松材线虫 *Bx-SCD* 基因表达,促进松材线虫脂肪积累,这可能是线虫适应低温的原因之一。但是在低温条件下细菌是否会影响松材线虫的适应力尚不清楚。

为明确细菌对松材线虫低温适应性的影响,本研究选择与致病相关的3株芽胞杆菌即松材线虫伴生细菌 GD1、马尾松内生细菌 GD2 以及具有杀松材线虫活性的湿地松内生细菌 NJSZ-13 为试验对象,测定经这3株菌株3个浓度处理后,在冷冻条件下松

材线虫强毒虫株 AMA3、中毒虫株 AA3 和弱毒虫株 YW4 的存活率和繁殖量,明确这 3 株菌株对松材线虫低温适应性的影响,以期为进一步明确其在松材线虫病中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源和菌株:松材线虫强毒虫株 AMA3 自安徽省感病黑松 *Pinus thunbergii* 上分离,中毒虫株 AA3 自安徽省感病黄山松 *P. taiwanensis* 上分离,弱毒虫株 YW4 自云南省感病思茅松 *P. kesiya* var. *langbianensis* 上分离,3 株菌株均由南京林业大学森林病理实验室保存。芽胞杆菌 GD1 菌株为自松材线虫体表分离得到的伴生细菌,芽胞杆菌 GD2 菌株为自健康马尾松中分离得到的松树内生细菌,蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* NJSZ-13 菌株为自湿地松中分离得到的具有杀线活性的松树内生细菌,所有试验菌株均由南京林业大学森林病理实验室提供。

培养基:营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基成分为氯化钠 5 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4; 营养琼脂(nutrient broth, NB)培养基成分为氯化钠 5 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4; 马铃薯葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为新鲜土豆 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

试剂和仪器:所有试剂均为国产分析纯。Leica DM500 显微镜,北京凯发旺源科技有限公司;EYELA 多室温度梯度培养箱,东京理化器械株式会社;MIR0553 恒温培养箱,日本三洋电机株式会社。

1.2 方法

1.2.1 线虫虫液的制备

松材线虫强毒虫株 AMA3、中毒虫株 AA3 和弱毒虫株 YW4 虫株均于灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 平板上培养,于冰箱 4℃ 保存。将其分别移至长满新鲜灰葡萄孢的 PDA 平板上,置于温度为 25℃、相对湿度为 60% 的恒温培养箱中全黑暗培养,待线虫将灰葡萄孢菌丝取食完后,使用贝尔曼漏斗法进行线虫的分离与收集,将收集到的 50 mL AMA3、AA3 和 YW4 虫液于 4 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入等体积 3% 的过氧化氢处理 15 min,于 4 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,无菌水冲洗 3 次,加入等体积 0.05% 硫酸链霉素处理 15 min,4 500 r/min 下离心 5 min,弃上清液,用无菌水冲洗 3 次,将虫液浓度调

至 5 000 条/mL。

1.2.2 3 株芽胞杆菌不同浓度菌悬液的制备

用接种环挑取 1 环新鲜单菌落芽胞杆菌 GD1 接入到含有 50 mL NB 培养基的 150 mL 锥形瓶中,于 28℃、220 r/min 下摇培 48 h,获得发酵液,将其在 10 000 r/min、4℃ 下离心 10 min,弃去上清液,用等量无菌水重悬菌体沉淀,并分别将其稀释成浓度梯度为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 CFU/mL 的菌悬液。芽胞杆菌 GD2 和蜡样芽胞杆菌 NJSZ-13 菌悬液的制备同芽胞杆菌 GD1。

1.2.3 冷冻处理芽胞杆菌对松材线虫存活率的影响

无菌条件下分别取浓度为 5 000 条/mL 的松材线虫强毒虫株 AMA3 虫液 5 mL,与 3 个浓度的芽胞杆菌 GD1、芽胞杆菌 GD2 和蜡样芽胞杆菌 NJSZ-13 菌悬液 5 mL 混合,即得到终浓度分别为 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 CFU/mL 的菌虫混合液,以加入等量无菌去离子水为对照。将各混合液转移到 10 mL 无菌离心管中,充分振荡摇匀后分别取 0.5 mL 接种至新培养的灰葡萄孢菌丝上,置于温度为 25℃、相对湿度为 60% 的恒温培养箱内全黑暗培养。待线虫取食完培养皿上的 3/4 菌丝时,将培养皿置于 5℃ 培养箱中分别驯化 10、15 和 20 d,每个处理 5 个重复。各处理低温驯化完成后,用贝尔曼漏斗法对其线虫进行分离,将分离得到的线虫接至 15 mL 无菌离心管中,于 3 000 r/min 下离心 3 min,弃上清液,用无菌水混匀离心冲洗 3 次,将冲洗后的各处理虫液调至 1 000 条/mL,分别取 2 mL 虫液转移至对应无菌离心管中,−20℃ 冷冻处理 1 h 后转至室温解冻松材线虫 12 h。用涡旋仪振荡混匀虫液,吸取 50 μL 虫液,在显微镜下统计松材线虫总数和存活数,计算存活率。先用移液枪多次吹打虫液,再于显微镜下用大头针搅动或刺激线虫,若虫体僵直不动则判定为死亡。存活率=线虫存活数/线虫总数 $\times 100\%$ 。每个处理 5 个重复。冷冻处理 3 株芽胞杆菌对松材线虫中毒虫株 AA3 和弱毒虫株 YW4 存活率的影响试验同强毒虫株 AMA3。

1.2.4 冷冻处理芽胞杆菌对松材线虫繁殖量的影响

根据 1.2.3 试验结果选择 3 株芽胞杆菌对松材线虫存活率影响最显著的低温驯化时间进行此试验,试验方法及步骤同 1.2.3。松材线虫在室温下解冻 12 h 后,每个处理分别挑取雌、雄成虫各 10 条置于长满灰葡萄孢的 PDA 平板中央,置于温度为 25℃、相对湿度 60% 的恒温培养箱内全黑暗培养 10 d,用贝尔曼漏斗法分离线虫并计数,以无菌去离子水为对

照,每个处理5个重复。

1.3 数据分析

采用Prism 6软件对试验数据进行双因素方差分析,应用Tukey检验法对数据进行差异显著性检验。

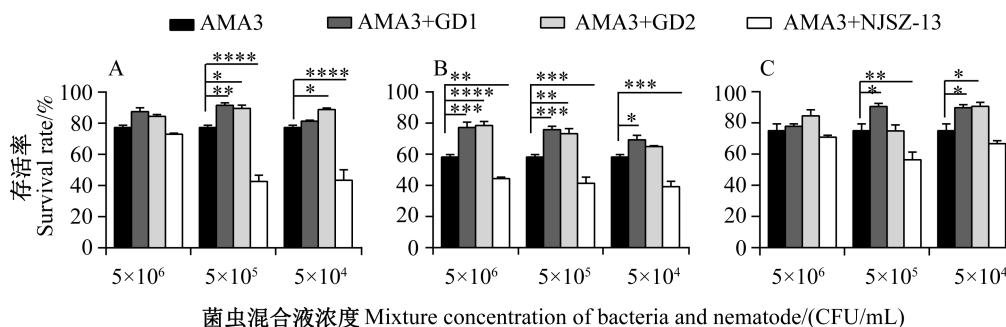
2 结果与分析

2.1 冷冻处理芽胞杆菌对松材线虫存活率的影响

2.1.1 对松材线虫强毒虫株存活率的影响

3株芽胞杆菌对强毒虫株AMA3存活率的影响存在差异,菌株GD1和GD2能显著提高强毒虫株AMA3的存活率,而菌株NJSZ-13显著降低强毒虫株AMA3的存活率,菌株GD1对强毒虫株AMA3存

活率的影响较菌株GD2更显著;同株菌株低温驯化15 d后,强毒虫株AMA3的存活率明显低于低温驯化10 d和20 d的存活率,3个驯化时间不同浓度同株菌株对强毒虫株AMA3的存活率影响趋势相同,(图1)。在低温驯化15 d、-20℃冷冻处理1 h时,5×10⁶ CFU/mL和5×10⁵ CFU/mL浓度菌株GD1处理后强毒虫株AMA3的存活率分别为77.22%和75.76%,均显著高于对照;5×10⁶ CFU/mL和5×10⁵ CFU/mL浓度菌株GD2处理后强毒虫株AMA3的存活率分别为78.46%和73.24%,均显著高于对照;3个浓度菌株NJSZ-13处理后强毒虫株AMA3的存活率分别为44.38%、41.41%和39.25%,均显著低于对照(图1)。



GD1、GD2和NJSZ-13分别为芽胞杆菌、芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌株。

GD1, GD2 and NJSZ-13 are *Bacillus* spp., *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus* strains, respectively.

图1 低温驯化10 d(A)、15 d(B)和20 d(C)后3株芽胞杆菌菌株对松材线虫强毒虫株AMA3存活率的影响

Fig. 1 Effects of three *Bacillus* spp. strains domesticated at low temperature for 10 d (A), 15 d (B) and 20 d (C) on the survival rate of strongly virulent strain AMA3 of *Bursaphelenchus xylophilus*

图中数据为平均数±标准误。****、***、**和*分别表示经Tukey法检验在 $P<0.0001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. ****, ***, ** and * indicate significant difference at $P<0.0001$, $P<0.001$, $P<0.01$ and $P<0.05$ levels by Tukey test, respectively.

2.1.2 对松材线虫中毒虫株存活率的影响

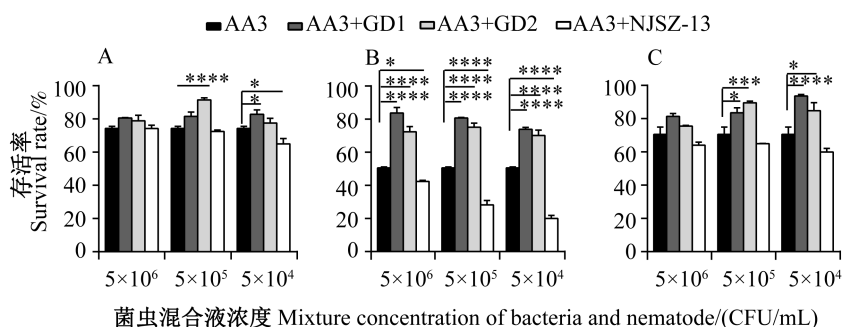
3株芽胞杆菌对中毒虫株AA3存活率的影响存在明显差异,其中菌株GD1对中毒虫株AA3存活率的影响较菌株GD2更加显著;同株菌株低温驯化15 d后,中毒虫株AA3的存活率明显低于低温驯化10 d和20 d的存活率;3个驯化时间不同浓度同株菌株对中毒虫株AA3存活率的影响趋势相同(图2)。低温驯化15 d、-20℃冷冻处理1 h时,3个浓度菌株GD1处理后中毒虫株AA3的存活率分别为83.68%、80.67%和73.91%,均显著高于对照;3个浓度菌株GD2处理后中毒虫株AA3的存活率分别为72.34%、75.08%和70.09%,均显著高于对照;3个浓度菌株NJSZ-13处理后中毒虫株AA3的存活率分别为42.37%、28.24%和20.06%,均显著低于对照(图2)。

2.1.3 对松材线虫弱毒虫株存活率的影响

3株芽胞杆菌对弱毒虫株YW4的影响存在差异,其中菌株GD1对弱毒虫株YW4存活率的影响与菌株GD2差异不显著,而菌株NJSZ-13对弱毒虫株YW4存活率的影响不明显;同株菌株低温驯化15 d和20 d后,弱毒虫株YW4的存活率明显高于低温驯化10 d的存活率;3个驯化时间不同浓度同株菌株对弱毒虫株YW4的存活率影响趋势相同(图3)。低温驯化15 d、-20℃冷冻处理1 h时,浓度5×10⁶ CFU/mL菌株GD1、GD2和NJSZ-13处理后弱毒虫株YW4的存活率分别为84.26%、76.38%和45.33%,前两者显著高于对照,后者与对照差异不显著;5×10⁵ CFU/mL浓度菌株GD1、GD2和NJSZ-13处理后弱毒虫株YW4的存活率分别为81.50%、77.75%和47.16%,前两者显著高于对照,后者与对

照差异不显著; 5×10^4 CFU/mL 浓度菌株 GD1、GD2 和 NJSZ-13 处理后弱毒虫株 YW4 的存活率分别为 84.18%、82.27% 和 62.81%, 前两者显著高于对照, 后

者与对照差异不显著。低温驯化 20 d 时的结果与低温驯化 15 d 的结果相似。



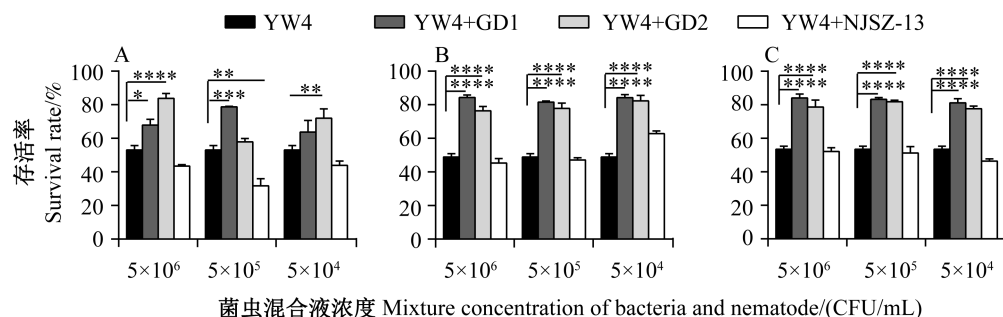
GD1、GD2 和 NJSZ-13 分别为芽胞杆菌、芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌株。

GD1, GD2 and NJSZ-13 are *Bacillus* spp., *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus* strains, respectively.

图2 低温驯化 10 d(A)、15 d(B)和 20 d(C)后 3 株芽胞杆菌对松材线虫中毒虫株 AA3 存活率的影响

Fig. 2 Effects of three *Bacillus* spp. strains domesticated at low temperature for 10 d (A), 15 d (B) and 20 d (C) on the survival rate of normally virulent strain AA3 of *Bursaphelenchus xylophilus*

图中数据为平均数±标准误。****、***、**和*分别表示经 Tukey 法检验在 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. ****, ***, ** and * indicate significant difference at $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$ levels by Tukey test, respectively.



GD1、GD2 和 NJSZ-13 分别为芽胞杆菌、芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌菌株。

GD1, GD2 and NJSZ-13 are *Bacillus* spp., *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus* strains, respectively.

图3 低温驯化 10 d(A)、15 d(B)和 20 d(C)后 3 株芽胞杆菌对松材线虫弱毒虫株 YW4 存活率的影响

Fig. 3 Effects of three *Bacillus* spp. strains domesticated at low temperature for 10 d (A), 15 d (B) and 20 d (C) on the survival rate of weakly virulent strain YW4 of *Bursaphelenchus xylophilus*

图中数据为平均数±标准误。****、***、**和*分别表示经 Tukey 法检验在 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. ****, ***, ** and * indicate significant difference at $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$ levels by Tukey test, respectively.

2.2 冷冻处理芽胞杆菌对松材线虫繁殖量的影响

冷冻处理后, 3 株芽胞杆菌对不同毒力松材线虫繁殖量的影响存在差异, 菌株 GD1 能促进不同毒力松材线虫的繁殖, 而菌株 GD2 和 NJSZ-13 的效果不明显。 5×10^6 CFU/mL 浓度菌株 GD1 处理下, 松材线虫 AMA3、AA3 和 YW4 虫株的繁殖量分别为 7 530、9 317 和 12 793 条/皿, 均显著高于对照 ($P < 0.05$); 5×10^5 CFU/mL 浓度菌株 GD1 处理下, 松材线虫 AMA3、AA3 和 YW4 虫株的繁殖量分别为 13 602、6 253 和 10 773 条/皿, 前者显著高于对照 ($P < 0.05$),

后两者与对照差异不显著; 而 5×10^4 CFU/mL 菌株 GD1 处理下, 松材线虫 AMA3、AA3 和 YW4 虫株的繁殖量分别为 4 439、4 813 和 8 273 条/皿, 与对照差异不显著(表 1)。在 3 个浓度菌株 GD2 和 NJSZ-13 处理下, 松材线虫 3 株毒力虫株的繁殖量均与对照差异不显著(表 1)。

3 讨论

低温下线虫活力是衡量线虫对低温适应性的指标(Jagdale & Grewal, 2003; Adhikari et al., 2010; 黄

瑞芬等,2014)。本研究结果显示,在低温驯化 15 d, 5×10^6 CFU/mL 浓度菌株 GD1、GD2 处理后松材线虫强毒虫株 AMA3、中毒虫株 AA3 和弱毒虫株 YW4 的存活率均高于其对照,而菌株 NJSZ-13 处理后的存活率却低于对照; 5×10^5 CFU/mL 浓度 3 株菌株处理后,结果与浓度 5×10^6 CFU/mL 处理的结果相同,表明在低温处理后菌株 GD1 和 GD2 在较高浓度下均能显著提高不同毒力松材线虫虫株的存活率。谈家金和冯志新(2003)指出菌株 GD1 和 GD2 分别为松材线虫伴生细菌和马尾松内生细菌,在常温条件下均能延长松材线虫的存活时间。菌株 NJSZ-13 是一株自湿地松分离的内生细菌,其水悬液处理松材

线虫 48 h 后,松材线虫的致死率高达 86.5%(李亮亮等,2017),而本研究结果表明菌株 NJSZ-13 处理后,松材线虫在冷冻条件下死亡率也显著上升,且低温驯化 15 d 和 20 d 后,该菌株对不同毒力线虫的存活率影响较驯化处理 10 d 更显著。黄瑞芬等(2014)研究指出,在一定条件下,驯化时间与松材线虫的存活率成正比,这也解释了本研究结果中随着低温驯化时间的延长,线虫存活率更高的原因,这也表明随着驯化时间的延长,在细菌的作用下,松材线虫对低温的适应性显著提高,这可能是导致松材线虫在我国寒冷的北方能够生存并且导致大量松属和非松属寄主感病的原因之一。

表 1 冷冻处理芽胞杆菌对不同毒力松材线虫繁殖量的影响

Table 1 Effects of *Bacillus* spp. on the reproduction of *Bursaphelenchus xylophilus* with different virulences after freezing treatment

菌株 Strain	菌量 No. of bacteria/ (CFU/mL)	不同毒力松材线虫繁殖量/(条/皿) Reproduction of different virulent <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> per dish		
		强毒虫株 AMA3 Strongly virulent isolate AMA3	中毒虫株 AA3 Normally virulent isolate AA3	弱毒虫株 YW4 Weakly virulent isolate YW4
无菌水 Sterile water (CK)		3 192±824 cd	3 840±604 bc	5 823±2 267 bc
GD1	5×10^6	7 530±2 216 b	9 317±686 a	12 793±2 815 a
	5×10^5	13 602±3 163 a	6 253±1 869 b	10 773±2 348 ab
	5×10^4	4 439±887 c	4 813±1 006 bc	8 273±352 b
GD2	5×10^6	2 717±415 cd	5 853±1 952 b	8 973±1 423 b
	5×10^5	6 989±2 700 b	4 480±312 bc	6 800±799 bc
	5×10^4	3 181±1 078 cd	4 307±1 099 bc	8 680±977 b
NJSZ-13	5×10^6	1 433±581 d	1 667±804 d	4 893±1 860 c
	5×10^5	1 812±785 d	3 000±144 c	4 267±1 211 c
	5×10^4	1 667±289 d	1 960±349 d	8 934±142 b

表中数据为平均数±标准误。同列后不同小写字母表示经 Tukey 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicated significant difference at $P<0.05$ level by Tukey test.

线虫繁殖力是衡量线虫对环境适应性的另一个重要指标(张伟等,2014)。已有研究表明在常温条件下,高浓度菌株 GD1 和 GD2 均能促进松材线虫的繁殖,且菌株 GD1 效果较菌株 GD2 更明显,并认为可能与伴生细菌 GD1 和线虫之间已存在适应性(谈家金和冯志新,2003)。本研究结果表明,低温驯化 15 d 时,芽胞杆菌对线虫存活率的影响最显著,因此本研究选取低温驯化 15 d 时的虫株进行繁殖力试验。本研究的繁殖试验结果显示, 5×10^6 CFU/mL 和 5×10^5 CFU/mL 菌株 GD1 处理后,3 株毒力松材线虫虫株 AMA3、AA3 和 YW4 的繁殖量分别是对照的 2 倍以上,表明菌株 GD1 在较高浓度下显著促进冷冻处理后不同毒力线虫的繁殖量,与谈家金和冯志新(2003)在常温下的研究规律相同。由此可见,松材

线虫伴生细菌 GD1 可以显著促进冷冻处理后线虫的繁殖力,这可能部分解释了松材线虫在传入我国北方后,由于伴生细菌的协助通过繁殖力的提高来增加自身对低温逆境的适应性。

综上所述,松材线虫伴生细菌 GD1 较松树内生细菌 GD2 在低温环境下更能显著促进不同毒力松材线虫的存活率和繁殖量,这说明线虫伴生细菌较松树内生细菌在协助松材线虫主动适应外界低温环境变化中扮演着更重要的角色。本研究虽然揭示了芽胞杆菌对于松材线虫的抗冻性具有积极的作用,但是在低温条件下,松材线虫伴生细菌与松树内生细菌是如何协助松材线虫主动适应外界低温环境变化还缺乏深入的研究。同时,芽胞杆菌对松材线虫低温适应性影响的内在机制还需进一步探索。

参考文献 (References)

- Adhikari BN, Wall DH, Adams BJ. 2010. Effect of slow desiccation and freezing on gene transcription and stress survival of an Antarctic nematode. *The Journal of Experimental Biology*, 213(11): 1803–1812
- Bal A, Anand R, Berge O, Chanway CP. 2012. Isolation and identification of diazotrophic bacteria from internal tissues of *Pinus contorta* and *Thuja plicata*. *Canadian Journal of Forest Research*, 42(4): 807–813
- Grewal PS, Jagdale GB. 2002. Enhanced trehalose accumulation and desiccation survival of entomopathogenic nematodes through cold preacclimation. *Biocontrol Science & Technology*, 12(5): 533–545
- Huang RF, Gao RH, Shi J, Song DW, Li ZM. 2014. Cold tolerance of *Bursaphelenchus xylophilus* in the Three Gorges region of Hubei Province. *Journal of Northeast Forestry University*, 42(11): 138–141 (in Chinese) [黄瑞芬, 高瑞贺, 石娟, 宋德文, 李祖梅]. 2014. 湖北三峡地区松材线虫的耐寒性. *东北林业大学学报*, 42(11): 138–141]
- Jagdale GB, Grewal PS. 2003. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *International Journal for Parasitology*, 33: 145–152
- Kawazu K, Zhang H, Kanzaki H. 1996a. Accumulation of benzoic acid in suspension cultured cells of *Pinus thunbergii* Parl. in response to phenylacetic acid administration. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, 60(9): 1410–1412
- Kawazu K, Zhang H, Yamashita H, Kanzaki H. 1996b. Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 60(9): 1413–1415
- Kikuchi T, Cotton JA, Dalzell JJ, Hasegawa K, Kanzaki N, McVeigh P, Takashashi T, Tsai IJ, Assefa SA, Cock PJA, et al. 2011. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathogens*, 7(9): e1002219
- Kikuchi T, Shibuya H, Aikawa T, Jones JT. 2006. Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3): 280–287
- Klosin A, Casas E, Hidalgo-Carcedo C, Vavouri T, Lehner B. 2017. Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science*, 356: 320
- Li LL, Tan JJ, Chen FM. 2017. The screening and identification of two bacterial strains with nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 41(4): 37–41 (in Chinese) [李亮亮, 谈家金, 陈凤毛]. 2017. 两株松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 41(4): 37–41]
- Li YX, Zhang XY. 2018. High risk of invasion and expansion of pine wood nematode in middle temperate zone of China. *Journal of Temperate Forestry Research*, 1(1): 3–6 (in Chinese) [理永霞, 张星耀]. 2018. 我国中温带面临的松材线虫入侵扩张高风险. *温带林业研究*, 1(1): 3–6]
- Ogura N, Nakashima T. 1997. Cold tolerance and preconditioning of infective juveniles of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 43: 107–115
- Proença DN, Grass G, Morais PV. 2017. Understanding pine wilt disease: roles of the pine endophytic bacteria and of the bacteria carried by the disease-causing pinewood nematode. *MicrobiologyOpen*, 6(2): e00415
- Tan JJ, Feng ZX. 2003. Effect of two bacteria strains on the survival and reproduction of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 33(6): 557–558 (in Chinese) [谈家金, 冯志新]. 2003. 2个细菌菌株对松材线虫存活与繁殖的影响. *植物病理学报*, 33(6): 557–558]
- Tóth Á. 2011. *Bursaphelenchus xylophilus*, the pinewood nematode: its significance and a historical review. *Acta Biologica Szegedensis*, 55(2): 213–217
- Wang BW, Liu WL, Wang F, Ma L, Li DL, Wang BY, Hao X. 2017. Fat accumulation in *Bursaphelenchus xylophilus* by positively regulating *Bx-SCD* under low temperature. *Journal of Northeast Forestry University*, 45(7): 89–93 (in Chinese) [王博文, 刘伟璐, 王峰, 马玲, 李丹蕾, 王步勇, 郝昕]. 2017. 低温调控 *Bx-SCD* 促进松材线虫脂肪积累. *东北林业大学学报*, 45(7): 89–93]
- Wang LS, Zhang TT, Pan ZS, Lin LL, Dong GQ, Wang M, Li RG. 2019. The alcohol dehydrogenase with a broad range of substrate specificity regulates vitality and reproduction of the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Parasitology*, 146(4): 497–505
- Yu HY, Wu H, Zhang XD, Wang LM, Zhang XF, Song YS. 2019. Preliminary study on *Larix* spp. infected by *Bursaphelenchus xylophilus* in natural environment. *Forest Pest and Disease*, 38(4): 7–10 (in Chinese) [于海英, 吴昊, 张旭东, 王立明, 张歆逢, 宋玉双]. 2019. 落叶松自然条件下感染松材线虫初报. *中国森林病虫*, 38(4): 7–10]
- Yin YN, Wu JW, Tan JJ, Hao DJ. 2020. Optimization of medium and culture conditions for *Bacillus cereus* NJSZ-13. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 40(6): 9–17 (in Chinese) [尹艳楠, 吴佳雯, 谈家金, 郝德君]. 2020. 松树内生蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株发酵培养基及条件优化. *浙江林业科技*, 40(6): 9–17]
- Zhang W, Zhang S, Kong XB, Zhao LL. 2014. Inbreeding and reproductive comparison of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Acta Ecologica Sinica*, 34(14): 3932–3936 (in Chinese) [张伟, 张帅, 孔祥波, 赵莉茜]. 2014. 松材线虫近交系培育及繁殖力比较. *生态学报*, 34(14): 3932–3936]
- Zhao J, Peng DL, Liu SM. 2020. Progresses in the researches on the effectors of plant parasitic nematodes. *Journal of Plant Protection*, 47(2): 245–254 (in Chinese) [赵洁, 彭德良, 刘世名]. 2020. 植物寄生线虫效应子研究进展. *植物保护学报*, 47(2): 245–254]

(责任编辑:张俊芳)