

# 松材线虫体壁物的厚度和糖含量比较

池树友<sup>1,2</sup> 何月秋<sup>3</sup> 贲爱玲<sup>1</sup> 韩正敏<sup>1</sup>

(1 南京林业大学森林资源与环境学院 2 宁波市森林病虫害防治检疫站 3 宁波城市职业技术学院)

**摘要:**为进一步弄清松材线虫的致病机理,该文对松树上分离的松材线虫、拟松材线虫和小杆线虫的体壁物进行了初步研究。通过电镜观察和可溶性糖含量分析,发现松材线虫体表有一层很厚的物质,而拟松材线虫和小杆线虫体表比较光滑;松材线虫比其他两种线虫体表有更多的糖类物质。研究同时提出,松材线虫和拟松材线虫体表物质的厚度和糖含量,可能与二者的致病性有密切关系。

**关键词:**松材线虫;拟松材线虫;体表物质;厚度;可溶性多糖

**中图分类号:**S763.18 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-1522(2008)01-0175-04

CHI Shu-you<sup>1,2</sup>; HE Yue-qiu<sup>3</sup>; BEN Ai-ling<sup>1</sup>; HAN Zheng-min<sup>1</sup>. **Comparison of thickness and content of soluble polysaccharose on the body surface of *Bursaphelenchus xylophilus*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2008) 30(1) 175-178 [Ch, 9 ref.]

1 College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, 210037, P. R. China;

2 Forest and Plant Quarantine Station of Ningbo City, Zhejiang Province, 315000, P. R. China;

3 Ningbo Urban Vocational Technology College, Zhejiang Province, 315211, P. R. China.

*Bursaphelenchus xylophilus* and two non-pathogenic nematodes—*B. mucronatus* and *Rhabditida* sp. were isolated from pine wood. The thickness and content of soluble polysaccharose on the body surface of *B. xylophilus* were compared. The results indicated that there was a thick substance on the body surface of *B. xylophilus*, while the bodies of *B. mucronatus* and *Rhabditida* sp. were smooth. The content of soluble polysaccharose on the body surface of *B. xylophilus* was more than that of the other two non-pathogenic nematodes. Research also shows that there is a special relationship between the thickness as well as the content of soluble polysaccharose on the surface of different *B. xylophilus* and its pathogenicity.

**Key words** *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bursaphelenchus mucronatus*; substance on body surface; thickness; soluble polysaccharose

由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* (Stainer & Buhner) Nickle)引起的松材线虫病是世界上头号林木病害。该病害的研究日本已持续了一个多世纪,我国学者也研究了 20 多年,但至今为止对于松材线虫病的致病机理还不十分清楚。松材线虫体表外有一层很厚的“角质层”,这层角质层的功能普遍认为具有抗逆作用,因为松材线虫的分散型幼虫和耐久型幼虫均具有很厚的“角质层”<sup>[1]</sup>。但也有研究认为松材线虫体表潜藏了很多细菌,而正是这些细菌产生的有毒物质,使松树细胞中毒死亡<sup>[2]</sup>。所以了解

松材线虫体表物质的厚度和种类,对揭示松材线虫病的致病机理有着积极的意义。为更能说明问题,本研究除收集松材线虫之外,还选择了拟松材线虫和小杆线虫同时进行比较研究,以期找出它们之间的规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫的来源、分离、鉴定和培养

松材线虫分离自南京市铁心桥镇感染松材线虫病枯死的马尾松(*Pinus massoniana*);拟松材线虫

收稿日期:2006-11-01

http://www.bjfujournal.cn, http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(30671683)。

第一作者:池树友。主要研究方向:森林保护学。电话:0574-87287926 Email: chishuyou@163.com 现工作单位地址:浙江省宁波市解放北路 91 号宁波市林业局森防站。

责任作者:韩正敏,教授。主要研究方向:森林保护学。电话:025-85427397 Email: zmhan@njfu.com.cn 地址:南京市龙蟠路 159 号南京林业大学森林资源与环境学院

(*Bursaphelenchus mucronatus*)分离自云南昆明自然死亡的云南松(*P. yunnanensis*);小杆线虫(*Rhabditida* sp.)分离自连云港感染松材线虫枯死时间较长的马尾松。

将采回的木段劈成小木片后,用贝尔曼漏斗法分离线虫。分离的线虫根据其口针的有无,食道腺、雌雄成虫尾部形态等,进行形态鉴定<sup>[3-4]</sup>。鉴定过的线虫,各挑取1条雌、雄成虫放在长满灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)的PDA平板上,25℃下黑暗培养,15 d后进一步鉴定,然后用灰葡萄孢菌大量培养并备用。

## 1.2 线虫的无菌化处理

将经过纯化培养的线虫先用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理5 min,无菌水换洗3次。再用0.05%的硫酸链霉素和硫酸庆大霉素(南京制药厂)混合液处理5~6次,每次处理5 min。为使抗菌素与线虫充分混合,处理时不断振荡,避免线虫沉入离心管底部。每次处理后6 000 r/min 4℃离心5 min,并用无菌水换洗3次。最后在解剖镜下挑取雌、雄成虫15~20条,置于长满灰葡萄孢菌的PDA平板上,在25℃温箱中黑暗培养。另外分别挑取15~20条松材线虫和拟松材线虫移到黑松(*P. thunbergii*)愈伤组织上进行培养。

## 1.3 线虫体表电镜观察

将培养的线虫洗下,静置后吸去上清液,往离心管底部的线虫中加入3%戊二醛固定液固定24 h。然后采取两种方法处理:①直接滴加法:用吸管吸取含线虫的固定液滴加到样品台上,自然干燥,在干燥的过程中用1%的锇酸熏蒸,喷金,用PHILIPS SEM-505型扫描电镜观察、拍片;②Fomvar膜法:吸取含线虫的固定液滴加到Fomvar膜玻片上,自然干燥,在干燥过程中用1%的锇酸熏蒸,粘台,喷金,用PHILIPS SEM-505型扫描电镜观察、拍片。

## 1.4 线虫体表可溶性多糖的萃取和测定

用少许蒸馏水洗下培养皿中的线虫或无菌线虫,经1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,并对线虫进行计数。往离心管底部线虫中加入80%的乙醇萃取24 h(不振荡),将萃取液在1 500 r/min下离心5 min,取其上清液,重复一次,合并上清液并抽滤2次,在50℃下减压蒸发除去乙醇,用1~2 mL蒸馏水洗下底部结晶,即得到线虫体表可溶性多糖萃取液<sup>[5]</sup>。

线虫体表可溶性多糖测定采用蒽酮-硫酸法<sup>[5]</sup>。先用葡聚糖溶液制作标准曲线:取0.1 g/L的葡聚糖溶液0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80 mL,用

蒸馏水补充至1 mL,分别加入4.00 mL蒽酮试剂,迅速浸于冰水浴中冷却。各管加完后一起浸于沸水浴中,管口加盖塞子以免蒸发。自水浴重新煮沸起,准确煮沸10 min取出,用自来水冷却,室温放置10 min左右,于620 nm比色,以同样处理的蒸馏水为空白对照进行比色,以光密度为纵坐标,糖含量微克数为横坐标,制作标准曲线或据此求得回归方程。

样品可溶性糖含量的测定时取线虫体表萃取液1 mL,采用蒽酮-硫酸法,求得620 nm下的光密度值,根据标准曲线或回归方程计算出样品可溶性糖的含量,每个样品重复3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同线虫体表物质的直接观察

用扫描电镜直接观察3种线虫(没经灭菌的野生线虫)的体表,可以清晰地看出,松材线虫体表覆盖着一层由黏性物质构成的膜,从厚度上看,达整个线虫横截面直径的1/5~1/4(图1、2);而拟松材线虫和小杆线虫体表光滑,均未见到明显的黏性物质(图3~5)。比较两种电镜观察中使用的固定方法,直接滴加法容易使线虫体表物质脱落(图1),而Fomvar膜法线虫体表的物质基本保持完好(图2)。

### 2.2 不同线虫体表可溶性糖含量的测定

比较3种线虫在野生状态和无菌化处理后的体表可溶性糖含量,可以看出松材线虫体表可溶性多糖含量最高,每万条线虫糖含量为59.17 μg,明显高于其他的线虫。拟松材线虫体表多糖含量为每万条41.50 μg,小杆线虫为25.26 μg。线虫经无菌化处理以后,体表可溶性多糖含量明显下降。无菌松材线虫体表可溶性多糖含量为每万条25.46 μg,比未处理前下降了33.71 μg,多糖损失率为57.3%。无菌拟松材线虫体表可溶性多糖含量为每万条17.08 μg,比未处理的拟松材线虫下降了24.42 μg,多糖损失率58.84%。无菌小杆线虫体外多糖含量比未处理前下降了6.81 μg,多糖损失率为26.96%(表1)。

表1 不同线虫体表多糖含量的测定

TABLE 1 Quantity of soluble polysaccharose extracted from different nematode bodies

	松材线虫		拟松材线虫		小杆线虫	
	野生线虫	无菌线虫	野生线虫	无菌线虫	野生线虫	无菌线虫
OD值	0.248	0.418	0.580	0.052	0.238	0.141
测定糖含量/μg	35.50	66.53	83.00	12.06	38.40	20.66
测定线虫数量/条	6 000	26 130	20 000	7 060	15 200	11 200
折算糖含量/(μg·万条 <sup>-1</sup> )	59.17	25.46	41.50	17.08	25.26	18.45



a. 整体(500×)



b. 局部放大(2 100×)

图1 直接滴加法观察到的松材线虫——体表物质脱落但还黏附在线虫两侧

FIGURE 1 Electronic microscope scan photograph of *B. xylophilus* treated with direct dript method—see a mass of substance beside the nematode body



图2 Fomvar 膜法观察到的松材线虫头部——很厚一层物质黏附在线虫体表(3 500×)

FIGURE 2 Head of *B. xylophilus* observed by electronic microscope treated with fomvar film method—see the thick substance on the surface of nematode body(3 500×)

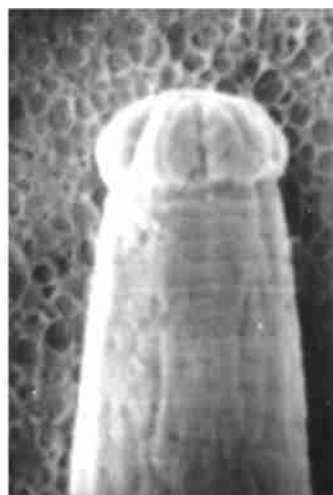


图3 Fomvar 膜法观察到的拟松材线虫头部(3 500×)

FIGURE 3 Head of *B. mucronatus* observed by electronic microscope treated with fomvar film method(3 500×)



图4 Fomvar 膜法观察到的小杆线虫中段(3 500×)

FIGURE 4 The middle part of *Rhabditida* sp. observed by electronic microscope treated with fomvar film method (3 500×)

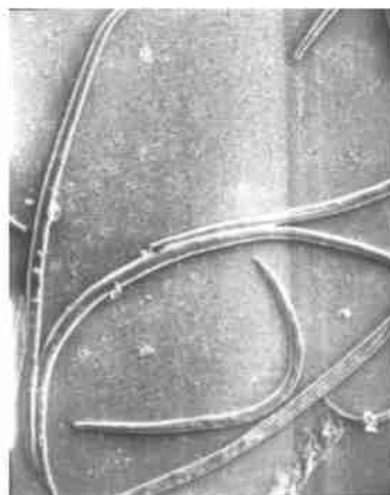


图5 直接滴加法观察到的拟松材线虫整体(300×)

FIGURE 5 Electronic microscope scan photograph of *B. mucronatus* treated with direct dript method(300×)

### 3 讨 论

松材线虫在水或其他液体浸泡时间长时, 体表物质容易脱落。我们用直接滴加法进行制片观察时, 体表物质脱落比较严重; 而用 Formvar 膜法观察, 不但处理程序简单, 更重要的是减少对线虫体表物质的洗脱, 可以基本保持线虫体表原样, 是一个很好的处理方法。

曹越<sup>[6]</sup>利用 HPLC 图谱法研究了松材线虫体表的物质, 并鉴定出体表物质中含有大量的海藻糖、葡萄糖、果糖和甘露糖等。本研究用可溶性多糖这一指标, 进行了线虫体表糖类物质的定量测定。测定结果也的确显示松材线虫比其他线虫体表有更多的糖类物质, 说明多糖是松材线虫体表中主要物质之一。

松材线虫体表物质的作用目前还不十分清楚, 但至少存在以下两方面的作用; 其一是抗逆功能, 其二是潜藏和培养致病细菌的功能, 而后者可能是最主要的。Oku 等<sup>[7]</sup>发现松材线虫体表携带了大量细菌; 赵博光等<sup>[8]</sup>不仅证实了松材线虫死尸可以为细菌提供营养, 而且证明了活的松材线虫比死尸更加有利于细菌的繁殖; Han 等<sup>[9]</sup>证明了只有松材线虫和细菌同时接种松苗才能够致病, 而二者分开接种均不能致病。这些证据连同本研究的结果均说明, 松材线虫体表有一层很厚的物质, 这层物质不但能潜藏大量细菌, 且还可以为细菌提供营养和繁殖条件。而正是这些细菌大量繁殖, 产生毒素, 致使松树细胞死亡。松材线虫致病性很强, 而拟松材线虫不致病或致病性很弱。二者的致病性可能与其体表物质的厚薄或多糖含量有着密切的关系。

#### 参 考 文 献

[1] 朱克恭. 松材线虫病研究综述[J]. 世界林业研究, 1995, 8(4): 28-33.

- ZHU K G. Summary for the pine wilt disease [J]. *World Forestry Research*, 1995, 8(4): 28-33.
- [2] 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.
- [3] 谢辉. 植物线虫分类学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000: 176-189.
- XIE H. *Taxonomy of the plant nematode* [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 2000: 176-189.
- [4] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999: 29-30.
- ZHANG S S. *Diagnosis and control on the plant nematodes disease* [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 1999: 29-30.
- [5] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 49-62.
- ZHANG W J. *Technology of biochemical study on complex amylose* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987: 49-62.
- [6] 曹越. 松材线虫病致萎毒素的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 1997.
- CAO Y. *Study on the pine wilt toxin* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 1997.
- [7] OKU H, SHIRAISHI T, KUROZUMI S. Pine wilt toxin, the metabolite of a bacterium associated with a nematode [J]. *Naturwissenschaften*, 1980, 67(5): 198-199.
- [8] 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(自然科学版), 2000, 24(4): 72-74.
- ZHAO B G, GUO D S, GAO R, et al. A preliminary study on the relationship between the bacterium isolate B619 and pine wilt disease [J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2000, 24(4): 72-74.
- [9] HAN Z M, HONG Y D, ZHAO B G. A study on pathogenicity of bacteria carried by pine wood nematodes [J]. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151(11-12): 683-689.

(责任编辑 董晓燕)