

# 黑松和马尾松苗受松材线虫侵染后部分化学物质的响应

郝德君<sup>1\*</sup>, 谈家金<sup>1</sup>, 陈凤毛<sup>1</sup>, 杨剑霞<sup>2</sup>, 戴华国<sup>2</sup>

(1. 南京林业大学, 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 江苏 南京 210037;

2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

**摘要:**为研究松材线虫侵染对寄主植物生理生化物质代谢的影响,以黑松和马尾松4~5年生苗为实验材料,测定了接种松材线虫对2种寄主植物的营养物质和次生代谢物质含量的变化及其规律。结果显示:接种松材线虫初期,黑松和马尾松的总糖含量均较高,随接种时间的延长,总糖含量呈不断下降趋势;黑松的可溶性糖含量一直降低并明显低于对照,马尾松的可溶性糖含量在侵染前期与对照相比变化不明显,而15 d后快速降低;黑松和马尾松的可溶性蛋白含量侵染前期均低于对照,后升高,再降低;黑松的单宁含量明显高于对照,马尾松的单宁含量接种第1天略低于对照,第3天后开始升高;黑松和马尾松的总酚含量均在侵染前期高于对照,而后降低。这些物质的变化趋势显示松材线虫侵染不同寄主植物的生理反应。

**关键词:**松材线虫;黑松;马尾松;营养物质;次生代谢物;接种

中图分类号:S791.24

文献标识码:A

## Physiological Response of *Pinus thunbergii* and *Pinus massoniana* to *Bursaphelenchus xylophilus* Infection

HAO De-jun<sup>1</sup>, TAN Jia-jin<sup>1</sup>, CHEN Feng-mao<sup>1</sup>, YANG Jian-xia<sup>2</sup>, DAI Hua-guo<sup>2</sup>

(1. Nanjing Forestry University, Jiangsu Provincial Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, Nanjing

210037, Jiangsu, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to study the effects of *Bursaphelenchus xylophilus* infection on the nutritional chemicals and secondary metabolites of the host plants, the total sugars, reducing sugar, soluble sugar, soluble proteins, tannins and total phenol in stem were assayed in two host plants *Pinus thunbergii* and *P. massoniana* inoculated with *B. xylophilus*. The results indicated that the total sugar concentration of both *P. thunbergii* and *P. massoniana* increased after inoculating and then decreased gradually with the extending of the attack time. The soluble sugar content of *P. thunbergii* decreased obviously, while that of *P. massoniana* changed slightly until 15 days and then decreased. The soluble protein content of both host plants decreased at first, then increased and decreased again. The tannin content of *P. thunbergii* increased all along with infecting time, whereas that of *P. massoniana* decreased in the first day and increased until 30 days. The total phenol content of *P. thunbergii* increased in the first 7 days and then decreased in the following days, but that of *P. massoniana* continued to increase after inoculating, and showed significant difference from the third day on. The changing tendency of above substances interpreted the physiopathology response of different host plant infected with *B. xylophilus*.

收稿日期:2010-08-04

基金项目:国家自然科学基金项目(30500392,30771728);国家林业局科技推广项目(T081201)

作者简介:郝德君(1971—),男,内蒙古宁城人,教授,博士生导师,研究方向为森林保护学. E-mail: dejunhao@163.com

\* 通讯作者.

**Key words:** *Bursaphelenchus xylophilus*; *Pinus thunbergii*; *Pinus massoniana*; nutritional chemicals; secondary metabolite

病原菌的致病性与植物的抗病性是生物界一种十分复杂的相互作用系统,当植物受到病原菌侵染后,植物体内会发生包含着形态、生理、生化和分子生物学等一系列的变化过程,此过程涉及植物从形态、营养质量、次生代谢物积累等方面对病原菌的抗性反应。松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner))作为松树的1种毁灭性病害,自20世纪70年代以来,国内外针对松材线虫病的致病机理和防治进行了大量研究,由于其发病致死速度快,发生隐蔽,传播途径多,适生范围广,迄今尚缺乏行之有效的控制措施,并有进一步扩散蔓延的趋势。目前,阐明松材线虫的致病机理,选育和应用抗性树种是发展松材线虫病防治对策的重要研究任务。国内外已有对松材线虫病的病理生理学方面的大量研究,如寄主松树感病后,水分生理和光合作用<sup>[1-2]</sup>、组织病理<sup>[3-6]</sup>、有机酸含量<sup>[7]</sup>、相关酶系<sup>[8-9]</sup>等均表现出明显变化,但对松材线虫与寄主互作过程中的生理化学物质的综合变化及其与病害发展的内在联系研究较少,曾有报道,松材线虫侵染后引起湿地松叶片中可溶性糖含量的增加,是寄主产生抗性的一种积极表现<sup>[10]</sup>,黑松(*Pinus thunbergii* Parl.)和马尾松(*P. massoniana* Lamb.)随着线虫侵染总酚的积累,参与了寄主的病害发展和细胞褐变坏死过程<sup>[9,11]</sup>。本项研究中,通过人工接种松材线虫,分析黑松和马尾松树体内营养物质及次生代谢产物的含量变化,旨在探讨寄主松树对松材线虫侵染的生理反应,为研究二者互作过程中致病机理和抗性机理提供一些参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试树种和松材线虫的线虫株系

2007年8月于南京林业大学实验苗圃内,挑选生长基本一致的4~5年生健康黑松和马尾松为供试植物。

松材线虫虫株FD3于2005年11月分离自福建省东山县西山岩2-(2)区小班感病马尾松上,用贝尔曼漏斗法分离线虫,消毒处理后,于灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.)上25℃培养6~7d,备用。

### 1.2 线虫的接种

采用人工皮接法接种。用灭菌的解剖刀在松苗

茎干中部偏下处由下往上割开树皮,深及木质部,但不超过茎干直径的1/3。掀开树皮塞入大小合适的灭菌棉球,并用封口膜将树皮和棉球包裹好,用微量进样器注入线虫悬浮液,加样量为5000条·(200μL·株<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>,对照注入等量无菌水。各处理接种3株松苗。

### 1.3 接种后取样及处理

分别在接种后的1、3、7、15、30d取样。试验材料取自样株茎干中部以上2~3年生枝条的树皮,每次采样量约100g,各重复间取样部位基本保持一致。带回实验室后,装入牛皮纸袋中,标明树种名称。放入105℃烘箱内,恒温10min杀菌,然后调至75℃烘样至恒质量,再用电动粉碎机粉碎,过60目筛,将过筛后的样品装入洁净干燥的广口瓶内,贴上标签,密封后置于干燥处,备用。

### 1.4 树皮内化学物质含量的测定

总糖含量的测定采用3,5-二硝基水杨酸法<sup>[12]</sup>;可溶性糖的测定采用蒽酮比色法<sup>[12]</sup>;可溶性蛋白质测定采用考马斯亮蓝法<sup>[12]</sup>;单宁测定采用盐酸-香草醛法<sup>[13]</sup>,总酚含量的测定采用Folin试剂法<sup>[14]</sup>,各化合物含量测定均重复3次。

### 1.5 数据的统计与分析

试验数据使用Excel 2003进行计算,SPSS13.0统计软件进行差异显著性检验。用Duncan's新复极差法检验接种不同时间寄主松树各种物质含量的差异显著性,用t-检验比较接种线虫和对照间各种物质含量的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫侵染对黑松、马尾松总糖含量的影响

由图1、2可知:黑松、马尾松接种松材线虫后均引起树皮总糖含量发生变化。黑松苗接种线虫第1天总糖含量明显高于对照,之后开始下降,在第3~30天接种线虫松苗的总糖含量均低于对照。马尾松苗接种线虫后总糖含量在第1~7天高于对照,随后总糖含量下降,在第15天时已低于对照,之后开始升高,至30d时又高于对照。实验结果显示:2种寄主植物接种松材线虫后总糖含量呈先升高、后降低的变化趋势,侵染前期含量升高可能是松材线虫分泌纤维素酶对细胞壁的分解而产生糖,侵染后期总糖含量降低表明寄主植物感染松材线虫后的营

养状况正在恶化,这与树体相对含水量下降,光合作用能力逐步减弱,进而引起碳水化合物合成和代谢受阻等松材线虫病的症状是一致的。2种寄主的表

现不同可能是它们对松材线虫侵染的抗性反应差异所致。

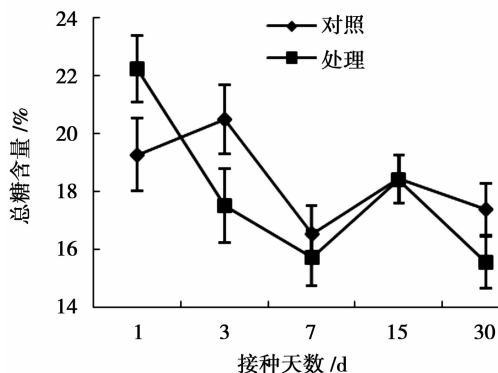


图1 松材线虫侵染对黑松总糖含量的影响(数据为平均值±标准差)

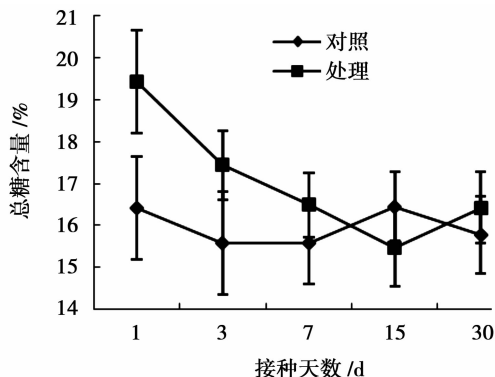


图2 松材线虫侵染对马尾松总糖含量的影响

## 2.2 松材线虫侵染对黑松、马尾松可溶性糖含量的影响

由图3可知:接种松材线虫的黑松苗可溶性糖含量在第15天前与对照黑松苗的变化趋势一致,之后快速下降,在30 d时显著低于对照( $P < 0.05$ )。由图4可看出:马尾松接种松材线虫前期可溶性糖含量的变化不明显,第1天可溶性糖含量略低于对照,在3~15 d可溶性糖含量高于对照,但两处理间差异不明显( $P > 0.05$ ),15 d后呈快速下降,第30天

的可溶性糖含量显著低于对照( $P < 0.05$ )。可溶性糖含量作为松树对松材线虫病抗性的一个理化指标<sup>[13]</sup>,黑松在接种松材线虫前期可溶性糖含量明显降低,可能消耗可溶性糖用于合成酚类物质、植保素、木质素等次生物质,接种后期可溶性糖含量快速下降,说明随着松材线虫的侵染,抗性逐渐丧失;而马尾松在线虫侵染前期可溶性糖含量变化不大,可能与其对松材线虫抗性比黑松的强有关,随着病害的发展,抗性也在逐渐减弱。

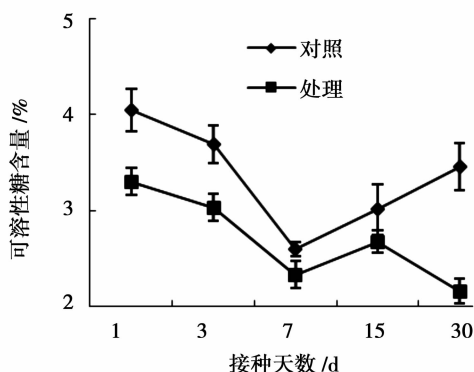


图3 松材线虫侵染对黑松可溶性糖含量的影响

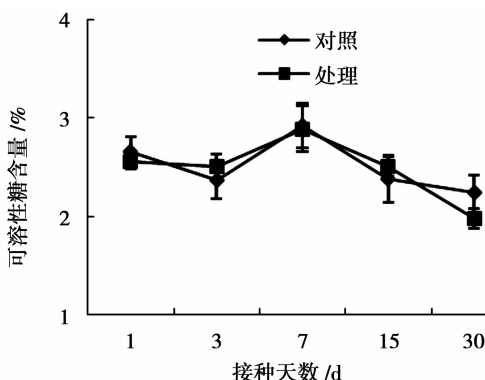


图4 松材线虫侵染对马尾松可溶性糖含量的影响

## 2.3 松材线虫侵染对黑松、马尾松可溶性蛋白的影响

由图5可知:黑松在接种松材线虫后可溶性蛋白含量呈先下降后上升再下降的变化趋势。接种松材线虫3 d内,可溶性蛋白含量低于对照,第3天后的含量略有增加并于第7~15日均高于对照,之后又呈下降趋势,在第30天时两处理间差异显著( $P < 0.05$ )。由图6可知:马尾松在松材线虫侵染后可溶性蛋白含量的变化与黑松的相同,也是呈先下降后

上升再下降的变化趋势,在第1天时低于对照,第3~15日均高于对照,第30天时又低于对照。研究结果显示:松材线虫侵染前期,可溶性蛋白含量下降说明松材线虫侵染导致代谢功能减弱,蛋白质的合成量减少或降解;侵染后期可溶性蛋白含量升高,可能是松材线虫侵染诱导寄主植物合成与抗病性相关的酶,如过氧化物酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶等<sup>[9]</sup>。随着侵染的不断加剧,抗性逐渐削弱,代谢功能进一步减弱,因而又表现为可溶性蛋白含量下降。

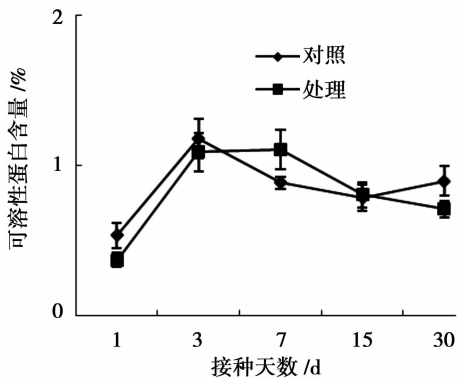


图5 松材线虫侵染对黑松可溶性蛋白含量的影响

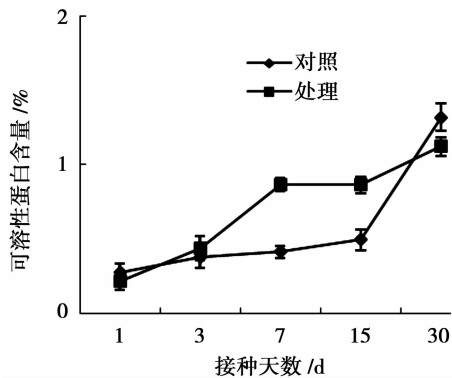


图6 松材线虫侵染对马尾松可溶性蛋白含量的影响

2.4 松材线虫侵染对黑松、马尾松单宁含量的影响

由图7可知:接种松材线虫的黑松和对照苗的单宁含量变化趋势一致,即在1~7 d内单宁含量降低,随后逐渐增加,但接种松材线虫的黑松的单宁含量均高于对照。由图8可以看出:马尾松接种松材线虫后,体内单宁含量呈上升的趋势,应为寄主植物受害后抗性反应的基本表现。

始升高,均高于对照,至第30天时单宁含量又低于对照。单宁是广泛存在于植物体内的次生代谢产物,也是重要的化学防御物质,在病害发生、发展过程中对病原物起抑制作用。黑松和马尾松接种松材线虫后,体内单宁含量呈上升的趋势,应为寄主植物受害后抗性反应的基本表现。

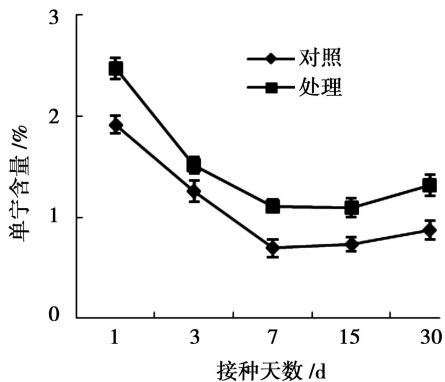


图7 松材线虫侵染对黑松单宁含量的影响

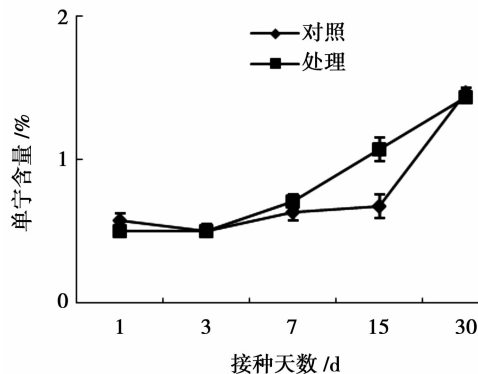


图8 松材线虫侵染对马尾松单宁含量的影响

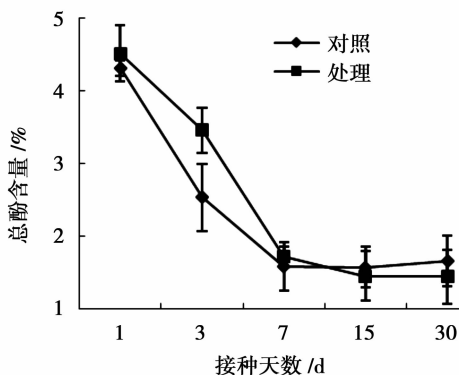


图9 松材线虫侵染对黑松总酚含量的影响

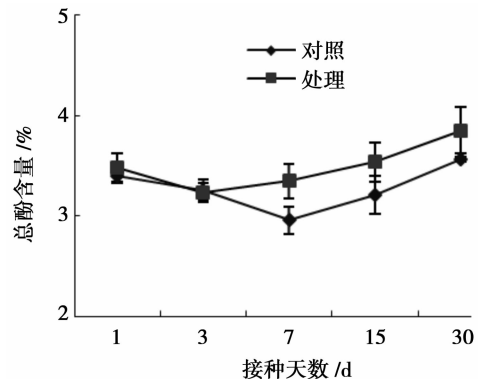


图10 松材线虫侵染对马尾松总酚含量的影响

2.5 松材线虫侵染对黑松、马尾松总酚含量的影响

由图9可知:松材线虫侵染1~7 d,黑松总酚含量升高,随着松材线虫侵染时间的延长,总酚含量

呈下降趋势,在第15、30天时低于对照。由图10可以看出:接种松材线虫的马尾松苗的总酚含量在第1天高于对照苗,之后略降低,第3天后开始升高,

第7~30天总酚含量一直显著高于对照( $P < 0.05$ )。结果说明:松材线虫侵染影响寄主植物的苯丙烷代谢途径,导致酚类物质的积累<sup>[9]</sup>。黑松在侵染后期酚类物质含量下降是为了降低酚类物质对自身的毒害作用而将其进行代谢<sup>[15]</sup>;而接种松材线虫的马尾松的总酚含量变化趋势与黑松有较大差异,在第30天时仍然保持较高含量,可能是马尾松接种松材线虫后丙氨酸解氨酶活性的变化相对滞后,与文中其它几项指标的变化相似。

### 3 结论与讨论

本研究表明,松材线虫的侵染明显影响2种寄主植物体内的生理生化物质,随着接种时间的延长,寄主体内糖类、蛋白质等营养物质和单宁、酚类等次生代谢物质发生比较明显的动态变化。可知,在松材线虫与寄主互作过程中,由松材线虫诱导的生理生化物质的变化对松材线虫病的发生发展起着非常重要的作用。

长期以来,有关松材线虫病的研究中,不同学者根据组织病理学、致病的生化因子提出各种假说来解释松材线虫病的致死原因,试图揭开松材线虫导致松树嫩梢和针叶枯萎以及植株整体死亡的机理<sup>[16-17]</sup>;但是松材线虫病的发生和发展涉及到寄主(松树)、媒介(昆虫)、病原(线虫)以及有关的微生物(真菌、细菌)等多种生物因素,这些因素之间构成了复杂的相互关系,使得其致病机理的任何一种学说尚未被大多数人接受。因此有学者提出,松材线虫病的主导因素是松材线虫,其侵染寄主松树的病程反应和新陈代谢的系列变化,是需要进一步研究的内容<sup>[17-18]</sup>,可能是揭示松材线虫致病机理的根本落脚点。

本研究仅对我国2种感病寄主黑松、马尾松受到松材线虫侵染后几种营养物质和次生代谢物质进行了初步研究,尚需对调控这些物质的酶系进行系统研究,将有助于揭示松材线虫侵染与寄主树木生理生化响应的关系,进而深入探讨松材线虫的致病机理;同时,接种松材线虫诱导寄主体内单宁和总酚等酚类物质含量的增加,可以进一步研究它们对松材线虫侵染、扩散和繁殖过程中的影响,为揭示寄主植物受害后产生的化学防御反应,进行抗性树种的

选育和利用提供思路。

### 参考文献:

- [1] Fukuda K, Hogetsu T, Suzuki K. Photosynthesis and water Status of pine-wood nematode infected pine seedlings [J]. J Jpn For Soc, 1992, 74(1): 1-8
- [2] 陈玉惠, 叶建仁, 魏初奖, 等. 松材线虫侵染对马尾松、黑松水分及其相关代谢的影响[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 201-207
- [3] Kusunoki M. Symptom development of pine wilt disease-histopathological observations with electron microscope[J]. Ann Phytopath Soc Jpn, 1987, 53(12): 622-629
- [4] 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
- [5] 金 钢, 叶建仁. 不同致病力线虫接种黑松后寄主体内组织病理学变化[J]. 南京林业大学学报, 2007, 31(4): 115-120
- [6] 苏胜荣, 李玉琴, 叶建仁. 抗性黑松接种松材线虫后的组织病理学变化[J]. 南京林业大学学报, 2008, 32(3): 95-98
- [7] 谈家金, 叶建仁, 郝德君. 黑松感染松材线虫后几种有机酸含量的变化[J]. 植物病理学报, 2008, 38(6): 649-651
- [8] 陈玉惠, 叶建仁, 魏初奖, 等. 松材线虫对黑松、湿地松幼苗活性氧代谢的影响[J]. 南京林业大学学报, 2002, 26(4): 19-22
- [9] 陈玉惠, 叶建仁, 魏初奖. 松材线虫侵染对马尾松苯丙烷类代谢的影响[J]. 林业科学, 2006, 42(2): 73-77
- [10] 曹福祥, 王 猛, 滕 涛, 等. 松材线虫对湿地松叶片质膜和可溶性糖的影响[J]. 中南林学院学报, 2006, 26(6): 169-171
- [11] 滕 涛, 曹福祥, 王 猛, 等. 松材线虫侵染对松树苯丙氨酸解氨酶及酚类物质的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, 27(3): 124-127
- [12] 李合生, 孙 群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184-199
- [13] 武予清, 郭子元. 棉花植株中的单宁测定方法研究[J]. 应用生态学报, 2000, 11(2): 243-245
- [14] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Reventos R M. Analysis of total phenols and other antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. Methods in Enzymology, 1999, 299: 152-178
- [15] 陈晓梅, 郭顺星. 植物抗病性物质的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(6): 658-664
- [16] 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
- [17] 杨宝君. 松材线虫病致病机理的研究进展[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(1): 27-31
- [18] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 15