

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 耐久型 幼虫 (L_{IV}) 携带的香茅醇假单胞杆菌 (*Pseudomonas citronellolis*) 分离与鉴定

来燕学¹, 杨忠岐^{2*}, 张慧丽³, 王小艺², 张彦龙²

(1. 浙江省宁波市森林病虫害防治检疫站, 浙江 宁波 315000; 2. 国家林业局森林保护学重点实验室, 中国林业科学研究院森林生态环境
与保护研究所, 北京 100091; 3. 宁波出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 浙江 宁波 315000)

摘要: [目的] 目前有关松材线虫与伴生细菌的关系及伴生细菌的病原作用是松树枯萎病研究的重点。为了揭示松材线虫与伴生细菌之间存在的密切关系, 作者对松材线虫 L_{IV} 幼虫携带的细菌进行了分离鉴定。[方法] 根据培养性状和 16S rDNA 序列同源性以及系统发育学等方面进行分析鉴定。[结果] 确定 L_{IV} 幼虫携带的是香茅醇假单胞杆菌 (*Pseudomonas citronellolis*), 携带率为 100%; 每条 L_{IV} 幼虫携带量在 $1.4 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^5$ 。 L_{IV} 幼虫生活在松褐天牛体内, 是引起松材线虫病侵染流行的唯一虫态; 新发现的香茅醇假单胞杆菌能分解纤维素及降解或合成萜烯和酚类化合物。[结论] L_{IV} 幼虫携带香茅醇假单胞杆菌的发现, 揭示了松树、松褐天牛、松材线虫、细菌同为一体的紧密关系, 并为揭示松树枯萎病机制提供了一种新病原和重要的研究思路。

关键词: 松树枯萎病; 松材线虫; 松褐天牛; 香茅醇假单胞杆菌

中图分类号: S763

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)01-0060-06

Isolated and Identified of the Bacteria *Pseudomonas citronellolis* from the Dauerlarva of *Bursaphelenchus xylophilus* (L_{IV})

LAI Yan-xue¹, YANG Zhong-qi², ZHANG Hui-li³, WANG Xiao-yi², ZHANG Yan-long²

(1. Ningbo Quarantine Center of Forest Pests and Disease, Ningbo 315000, Zhejiang, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. The Inspection and Quarantine Technology Center of Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of the PRC, Ningbo 315000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study is to reveal the relationship of pathogenic bacteria associated with the pine wood nematode. [Method] The bacteria carried by the dauerlarvae of *Bursaphelenchus xylophilus* (L_{IV}) were isolated, and were identified with 16S rDNA sequence homology and phylogenetic analysis. [Result] It was showed that L_{IV} could carry a large amount of bacteria and the carrying rate was as high as 100%; the amount of the bacteria carried was $1.4 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^5$ on each L_{IV} . The bacteria strain isolated from L_{IV} was identified as *Pseudomonas citronellolis*. The 16S rDNA sequence of the strain No. 14 was 1 448 bp in length and the similarity of *P. citronellolis* was 99% comparing with the data in the gene bank. [Conclusion] The preliminary conclusion is that the L_{IV} with *P. citronellolis* formed a group of the compound pathogen; L_{IV} is the only one linking pine tree with the longhorned beetle *Monochamus alternatus*; the bacteria of *P. citronellolis* could decompose cellulose and degrade or synthesis

收稿日期: 2017-11-06

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31230015); 国家公益性行业(林业)科研专项(20090425); 国家“973”计划(2012AA101503)

作者简介: 来燕学, 教授级高级工程师, E-mail: 87169312@163.com

* 通讯作者: 杨忠岐, 教授, E-mail: yangzhqi@126.com.

terpenes and phenolic compounds; The present discovery of L_{IV} carrying *P. citronellolis* suggests that the pine tree, *Monochamus alternatus*, *Bursaphelenchus xylophilus* and *P. citronellolis* may be a compacted system, and perhaps it may reveal a part of the mechanisms that the bacteria is a main factor causing pine wilt disease and killing pine tree die finally.

Keywords: Pine wilt disease; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Monochamus alternatus*; *Pseudomonas citronellolis*

松树枯萎病的流行与危害已导致世界森林生态系统产生了严重危机^[1]。对松枯萎病的发生与流行机制的研究仍在开展与不断的深入。自从日本报道松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)能引起松树枯萎后,松材线虫已被认为是松材线虫病的病原^[2-3],我国把松树枯萎病称为松材线虫病。但是随着研究的深入,发现单纯地仅以松材线虫为病原还不能解释自然界复杂多样的松树枯死现象,可能是一种(或一类)松材线虫的伴生菌参与了致死松树或产生毒素导致松树枯萎^[4-11]。进入本世纪后,有关枯萎松树内松材线虫的伴生细菌种类和病理作用及与松材线虫的关系研究报道越来越多,拓展和深化了松树枯萎病研究范围和层次^[12-15]。但现在面临的问题是,随着分离鉴定的细菌种类越来越多^[16-18],要确定究竟是哪种细菌与松材线虫最为密切,哪种细菌具有真正病原作用参与了松树枯死的过程等问题,需要深入研究。荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)是众多枯死松树内细菌中鉴定到种研究最多的菌种,但报道的只是在实验室得到的可引起黑松(*Pinus thunbergii* Parl.)苗木或细胞枯萎的一些结果^[19-22],没有在林间进行调查来证实荧光假单胞杆菌协同松材线虫促使了松树枯萎。而且荧光假单胞杆菌是一种动物病原细菌,也是一种能抑制或拮抗植物病原细菌的生物防治细菌^[23]。很少有动物病原细菌也能同时成为植物病原细菌的,这是因为动物病原细菌不能分泌产生纤维素酶,植物细胞的细胞壁对动物病原细菌具有天然的免疫性。松材线虫的耐久性幼虫(L_{IV}幼虫)是侵入松树的第一虫态,也是离开松树的最终虫态^[24]。L_{IV}幼虫体上是否携带细菌,带的是何种细菌十分值得研究。因为L_{IV}幼虫如携带细菌,表明这种细菌与松材线虫的关系密切,同时与松材线虫、松褐天牛一起参与了松树枯萎的全过程。在L_{IV}侵入松树时,携带的细菌也直接进入了松树;在L_{IV}离开松树时,这种细菌也被携带离开松树,该种细菌最有可能就是引起松树枯萎的病原细菌。按这个思路,作者开展了从松材线虫L_{IV}幼虫体上分离鉴定细菌的研究,获得了香茅醇假单胞杆

菌(*Pseudomonas citronellolis* Seubert),现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 L_{IV}幼虫分离

2012年9月上旬作者在宁波市余姚市和慈溪市松材线虫病发生流行松林内锯取当年枯死的马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)和黑松(*P. thunbergii* Parl.)树干数段,置室内养虫笼内。2013年5月中旬起随时捕获羽化出来的松褐天牛成虫,置实体显微镜下解剖松褐天牛成虫,见到有线虫析出,用细针挑出线虫到载玻片上,制成临时玻片,在显微镜下检查确认为松材线虫的L_{IV}幼虫后,再仔细观察幼虫的外部形态特征及携带微生物情况。

1.2 L_{IV}幼虫携带细菌的微量增殖

把野外采集的新鲜松针清洗晾干,用医用酒精擦针叶表面消毒后,横向剪切成长12 mm的松针段,再用手术刀纵切松针成细丝备用;用镊子把备用的松针丝移到载玻片中央,围成一个正方形后,中间加入1滴蒸馏水;用细针把解剖所得的L_{IV}幼虫挑到载玻片上,每片挑入L_{IV}幼虫5条,盖上盖玻片,制成L_{IV}幼虫携带细菌的微量增殖玻片。制作这样的玻片5片,然后置28℃恒温箱保湿培养12 h。之后,把玻片置在显微镜下定性观察细菌生长情况。细菌数量在400X镜下定性计数,分5级:大量+++ ,表示镜下细菌密集,似沙漠状;中量++ ,表示镜下细菌紧挨,均匀分布;少量+ ,表示镜下细菌稀疏;偶见+/- ,表示偶尔见有细菌;无- ,表示镜下检测不到细菌。

1.3 L_{IV}幼虫携带细菌的分离培养

用接种环蘸经过微量增殖的菌悬液,在NA平板上划线分离,经28℃培养箱中培养3 d,挑取单菌落纯化,得到的菌株为14个(分别予以编号)。

1.4 L_{IV}幼虫携带细菌16S rDNA序列分析

1.4.1 基因组DNA的提取 利用TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit提取细菌基因组DNA。

1.4.2 16S rDNA PCR 扩增 采用细菌 16S rDNA 扩增的通用引物^[25-26]。正向引物:5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3';反向引物:5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3',由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。PCR 反应体系(25 μL):10 \times buffer 2 μL ,dNTP(10 mmol \cdot L⁻¹)1 μL , MgCl₂(25 mmol \cdot L⁻¹)1.5 μL ,正向引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和反向引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 2 μL ,TaqDNA 聚合酶(5 U \cdot μL^{-1})0.2 μL , ddH₂O 15.3 μL , 模板 DNA 1 μL 。循环条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,30 次循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。PCR 产物的纯化和测序由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。

1.5 数据分析

测序后的序列经校正后,与 EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)中 16S rRNA 核酸数据进行 BLAST 比对分析,比较测试菌株同现有数据库中相应序列的相似程度。利用 ClustalX 1.8.1 进行序列比对,MEGA 5.03 软件选用 Kimura2-parameter 距离模型进行 Neighbor-joining 分析生成系统发育树,发育树用自展(Bootstrap)分析法进行检验,共循环 1 000 次。

2 结果

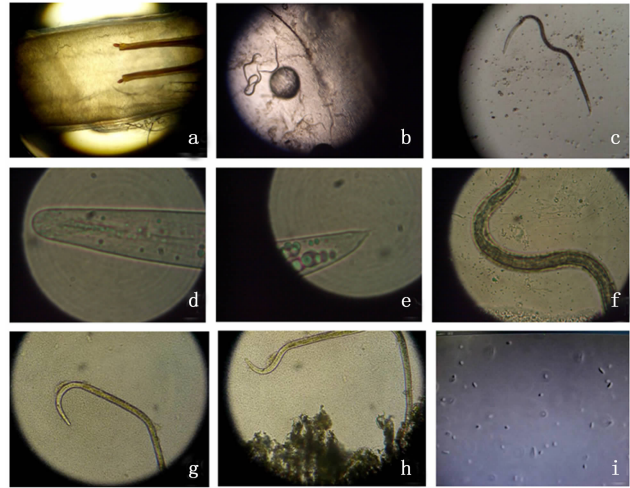
2.1 松材线虫 L_{IV} 幼虫的形态

解剖镜检松褐天牛成虫 35 头,其中 18 头成虫体内检出 L_{IV} 幼虫,占 5.14%。L_{IV} 幼虫少量分布在松褐天牛成虫体表,气管内也能检出较多 L_{IV} 幼虫,生殖器官内 L_{IV} 幼虫数量最多。本次分离细菌用的 L_{IV} 幼虫从松褐天牛雌虫生殖道内解剖得到(图 1-a, b, c)。L_{IV} 幼虫的形态特征为:头顶圆丘形,口针、食道和食道球退化不明显(图 4);尾部带有尾尖突(图 1-e);体长 L 0.6~0.7 mm,体宽 a 0.030~0.035 mm;虫体表面覆盖有厚厚的粘液,显得较胖,内部结构不透明(图 1-f);细菌携带率 100%;每条 L_{IV} 携带线虫量在 $1.4 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^5$ 。

2.2 L_{IV} 幼虫携带的细菌增殖

经玻片培养,细菌数量快速增长,12 h 后在 400X 显微镜下能见到像“沙漠似”的细菌群落(图 1-g),也可见到 L_{IV} 幼虫在细菌群落中缓慢蠕动(图 1-h);在 1 000X 下能见到杆形、长径 1.1~1.5 μm ,短径 0.4~0.5 μm 细菌颗粒(图 1-i)。这种

细菌常 2 颗串在一起,做顺时针或逆时针旋转或向前运动,这表明这种菌有鞭毛;也有单颗的,在镜下振动和移动^[27]。根据形态特征和镜下运动方式,表明这种细菌是一种假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)。



a. 松褐天牛雌性生殖系统局部;b. 松褐天牛雌虫生殖器官内壁活动的 L_{IV} 线虫;c. 挑出的 L_{IV} 线虫形态;d. L_{IV} 线虫头部;e. L_{IV} 线虫尾部;f. L_{IV} 线虫表面透明状胶质物;g. 大量细菌析出;h. 线虫在细菌群内蠕动;i. 细菌状态(1000X)

a. The vagina of female reproductive system of *Monochamus alternatus*; b. The L_{IV} in vagina of female reproductive system; c. The L_{IV} morphology; d. The head of L_{IV}; e. Tail part of L_{IV}; f. The transparent colloids of L_{IV} surface; g. A large number of bacteria; h. L_{IV} wriggling in bacteria group; i. Bacterial state (1000X)

图 1 松褐天牛雌性生殖系统与耐久型幼虫(L_{IV})形态

Fig. 1 Female of *Monochamus alternatus* ault and morphology of L_{IV} larva of *Bursaphelenchus xylophilus*

2.3 菌株形态及培养性状

假单胞杆菌菌株 14 菌体直短杆状,大小 0.4~0.5 \times 1.1~1.5 μm ,革兰氏染色阴性,在 NA 培养基上菌落圆形,暗白色,边缘整齐,低凸起。



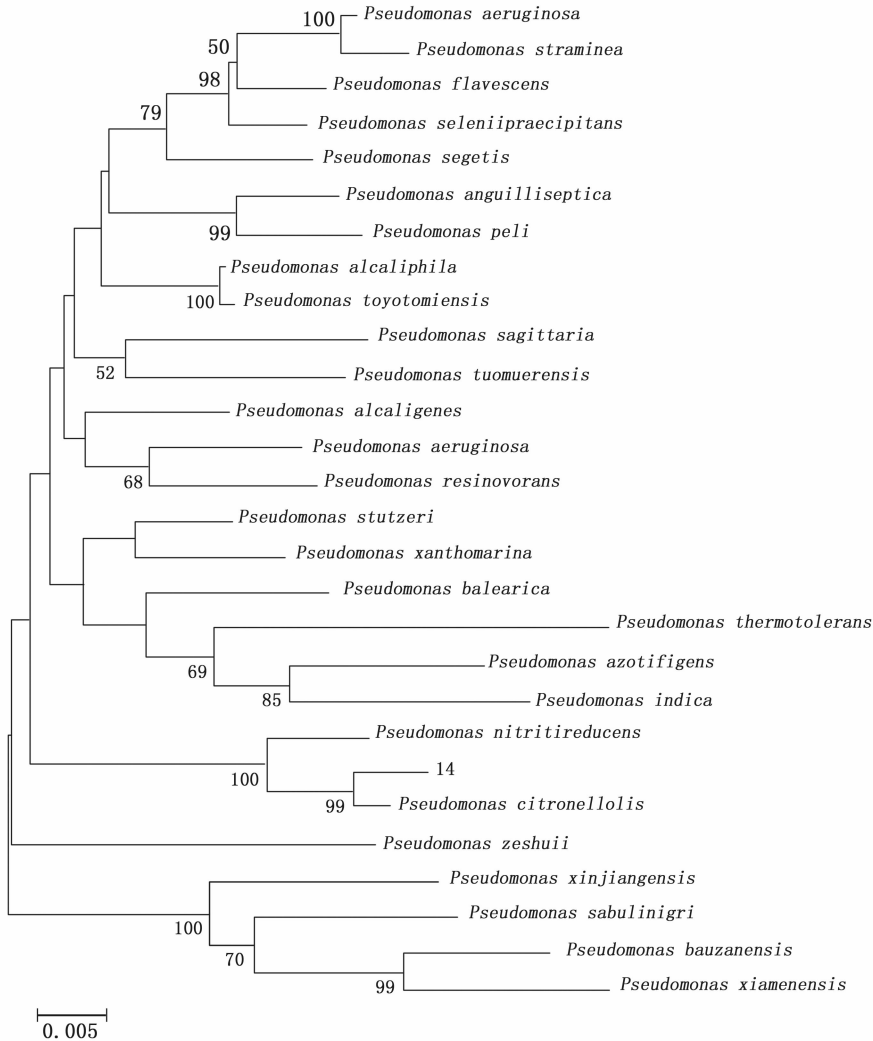
图 2 假单胞杆菌菌株 14 在 NA 培养基上的形态特征

Fig. 2 The form of the bacteria No. 14 of *Pseudomonas* on the medium NA

2.4 L_{IV} 幼虫携带细菌的 16S rDNA 序列分析

菌株 14 的 16S rDNA 序列全长 1 448 bp, 将该序列与 EzTaxon-e 中相关数据进行相似性分析, 菌株 14 和 *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332 (Z76659) 相似性达到 99%。并选取 27 个菌株的 16S rDNA 序列, 通过 MEGA 5.03 软件选用 Kimura2-parameter 距

离模型进行 Neighbor-joining 分析生成系统发育树 (图 3)。系统发育分析表明, 在与菌株 14 具有较高同源性的假单胞菌属细菌中, 其和 *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332 (Z76659) 处于同一分支, 表明菌株 14 与 *Pseudomonas citronellolis* 的亲缘关系最近。



Z76651 (*Pseudomonas aeruginosa*)、Z76653 (*Pseudomonas alcaligenes*)、AB030583 (*Pseudomonas alcaliphila*)、X99540 (*Pseudomonas anguilliseptica*)、AY691188 (*Pseudomonas argentinensis*)、AB189452 (*Pseudomonas azotifigens*)、U26418 (*Pseudomonas balearica*)、GQ161991 (*Pseudomonas bauzanensis*)、Z76659 (*Pseudomonas citronellolis*)、U01916 (*Pseudomonas flavescens*)、AF302795 (*Pseudomonas indica*)、HM246143 (*Pseudomonas nitritireducens*)、AM114534 (*Pseudomonas peli*)、Z76668 (*Pseudomonas resinovorans*)、EU143352 (*Pseudomonas sabulinigri*)、JQ277453 (*Pseudomonas sagittaria*)、AY770691 (*Pseudomonas segetis*)、FJ422810 (*Pseudomonas seleniipraecipitans*)、D84023 (*Pseudomonas straminea*)、CP002881 (*Pseudomonas stutzeri*)、AJ311980 (*Pseudomonas thermotolerans*)、AB453701 (*Pseudomonas toyotomiensis*)、DQ868767 (*Pseudomonas tuomuensis*)、AB176954 (*Pseudomonas xanthomarina*)、DQ088664 (*Pseudomonas xiamenensis*)、EU286805 (*Pseudomonas xinjiangensis*)、JN411093 (*Pseudomonas zeshuii*)。

图 3 假单胞杆菌菌株 14 的 16S rDNA 系统发育树状图

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA of the bacteria *Pseudomonas* No. 14

3 讨论

松树枯萎病病死木内除能检出病原松材线虫

外, 还能检测到其它数量庞大的寄生虫和微生物群落^[28]。这些微生物群落中, 细菌的种类和病原性及与松材线虫的关系是目前研究的重点和热

点^[4, 8, 12-13]。随着研究的深入,从枯死松木中分离所得的细菌种类越来越多,由此衍生的与松材线虫的关系也越来越复杂,如何理清这些错综复杂的关系是目前摆在植物病理学者面前的难题。笔者从松材线虫 L_{IV} 幼虫上分离得到纯净单一的细菌——香茅醇假单胞杆菌(*Pseudomonas citronellolis*),为破解这些复杂关系提供了新的思路。 L_{IV} 是松材线虫只存在于松褐天牛成虫体内的一个最特殊的虫态,是侵入松树和离开松树的唯一虫态^[29]。这个虫态携带细菌,表明松树—细菌—线虫—松褐天牛,是一个整体,构成一个完整的循环。在春夏季松褐天牛成虫携带 L_{IV} 和细菌离开枯死松树,飞向健康松树补充营养时,携带的 L_{IV} 和细菌侵入松树,细菌和线虫在健康松树内大量增殖,致死松树;次年春夏季待松褐天牛化蛹羽化为成虫时,线虫又带着细菌在松褐天牛体内集中,松褐天牛羽化出孔形成新的侵染循环。从这点推测,这种细菌必须是纯净的、对昆虫和线虫不具致病性;线虫、细菌、松褐天牛之间的关系是紧密的、稳固的、长期进化所形成的。如果是多个细菌种类就有可能存在对昆虫有致病性的细菌被 L_{IV} 带入昆虫体内,导致宿主昆虫感病,那么自然界就不可能存在这个侵染循环系统。

4 结 论

笔者从松材线虫 L_{IV} 幼虫体上分离得到的细菌是香茅醇假单胞杆菌,在有关松材线虫与细菌的文献中尚未见报道。这个菌种很值得进一步深入研究,因为它有可能是真正引起松树枯萎病的病原。首先,香茅醇假单胞杆菌是从松林土壤分离得到的细菌^[30],所以很有可能该细菌来于松树林地的枯枝落叶中,即与松树的关系密切;第二,该种细菌能产生大量高效的纤维素降解酶^[31],表明该菌能破解植物细胞壁屏障。植物细胞壁由纤维素组成,能成为树木病原的微生物必定能大量产生纤维素酶,溶解细胞壁后,致病细菌才能从植物体内吸收营养生长^[32],松材线虫也能分泌纤维素酶,许多学者认为松材线虫分泌的纤维素酶就是松树枯萎病致病物质^[33-35]。香茅醇假单胞杆菌与 L_{IV} 幼虫共生,提示促使松树枯萎的纤维素酶主要是该菌所产生的;第三,该菌能氧化萜烯类化合物和降解多种有机烃链的能力^[36-39],松树树脂道内充满了萜烯物质^[40],是松树分泌的免疫体液,该菌如进入树脂道氧化萜烯类化合物和降解多种有机烃,可能会对松树的免疫

系统起到破坏作用;第四,该菌能合成多种有机化合物^[41-42],提示进入松树后有可能合成对松树有毒的物质造成松树枯萎;第五,该菌能分泌羧化酶,氧化丙酮酸^[36],丙酮酸是植物光合作用和呼吸作用的重要中间产物,提示香茅醇假单胞杆菌进入松树体内后可能会干扰光合作用和呼吸作用。香茅假单胞杆菌的这些特殊功能,为揭示松树枯萎机制提供了一种新的病原和思路,也可能该菌就是引起松树枯萎的重要病原。这些结论值得今后进一步深入研究和证实。

参 考 文 献:

- [1] Paulo V, Manuel M. PWD: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems [M]. Springer, 2008.
- [2] Kiyohara T, Tokushige Y. Inoculation experiments of nematode, *Bursaphelenchus* sp., onto pine trees [J]. Journal of Japanese Forest Society, 1971, 53(7): 210-218.
- [3] Mamiya Y. Reproduction of pine lethal wilting disease by the inoculation of young trees with *Bursaphelenchus lignicolus* [J]. Japanese Journal of Nematology, 1972, 2: 40-44.
- [4] Oku H, Shiraishi T, Kurozumi S. Pine wilt toxin, the metabolite of a bacteria associated with a nematode [J]. Naturwissenschaften, 1980, 67: 198-199.
- [5] Tada M, Omizu A, Shiroishi M. Effect of phosphate on the growth and toxin-producing ability of a bacterium isolated from pine wood nematode *Bursaphelenchus lignicolus* [J]. Science Report of Faculty Agriculture, Okayama University, Japan, 1981, 57: 35-40.
- [6] Kawazu K, Zhang H, Kanazuki H. Accumulation of benzoic acid in suspension culture cells of *Pinus thunbergii* Parl. in response to phenyl acetic acid administration [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60: 1410-1412.
- [7] Kawazu K, Zhang H, Yamashita H, et al. Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1996, 60: 1413-1415.
- [8] Kawazu K, Kaneko N. Asepsis of the pine wood nematode isolate OKD-3 causes it to lose its pathogenicity [J]. Japanese Journal of Nematology, 1997, 27: 76-80.
- [9] Kawazu K, Kaneko N, Hiraoka K, et al. Reisolation of the pathogens from wilted red pine seedlings inoculated with the bacterium-carrying nematode, and the cause of difference in pathogenicity among pine wood nematode isolates [J]. Science Report of Faculty Agriculture, Okayama University, Japan, 1999, 88: 1-5.
- [10] 曹 越, 韩正敏, 李传道. 松材线虫病感病松树中致萎毒性物质的研究 [J]. 林业科学, 2001, 37(4): 75-79.
- [11] Han Z M, Hong Y D, Zhao B G. A study on pathogenicity of bacteria carried by pine wood Nematode [J]. Journal of Phytopathology, 2003, 151: 683-689.
- [12] 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.
- [13] 赵博光, 郭道森, 高 蓉. 松材线虫携带细菌部位的电镜观察[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2000, 24(4): 69-71.
- [14] Zhao B G, Wang H L, Han S F. Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China [J]. *Nematology*, 2003, 5: 899-906.
- [15] Zhao B G, Lin F. Mutualistic symbiosis between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria of the genus *Pseudomonas* [J]. *Forest Pathology*, 2005, 35: 339-345.
- [16] 谢立群, 巨为云, 赵博光. 松材线虫病程中树体内线虫和细菌种群数量动态变化[J]. 林业科学, 2004, 40(4): 124-129.
- [17] 王慧利, 韩素芬, 赵博光. 松材线虫携带细菌在疫区和寄主中分布及致病性研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(4): 48-53.
- [18] 巨为云, 谢立群, 杨雪云, 等. 不同来源松材线虫携带的细菌多样性[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(5): 84-85.
- [19] 池树友, 何月秋, 韩正敏, 等. 松材线虫及携带细菌对黑松复合侵染[J]. 福建林学院学报, 2008, 28(1): 92-96.
- [20] 李盛楠, 郭道森, 赵博光, 等. 荧光假单胞杆菌鞭毛蛋白对黑松细胞的致死作用[J]. 西北植物学报, 2008, 28(11): 2154-2158.
- [21] 赵博光, 李 良. 荧光假单胞杆菌培养的无细胞滤液导致松萎蔫的病理观察[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(4): 575-580.
- [22] 孔令营, 郭道森, 赵博光, 等. 荧光假单胞菌 gcm5-1a 胞外木质素过氧化物酶的初步纯化及性质研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(3): 112-116.
- [23] 陈功友, 郑铁民, 毛庆裕. 荧光假单胞杆菌和芽孢杆菌防治苹果叶果病害的研究[J]. 中国生物防治学报, 1993, 9(4): 163-166.
- [24] Lai Y X. Distribution of nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in the beetle *Monochamus alternatus* and its exiting transmission way. PWD: a worldwide threat to forest ecosystems by Paulo Vieira [C]. Manuel Moto, Springer, 2008, 243-254.
- [25] Kim O S, Cho Y J, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 716-721.
- [26] Anzai Y, Kim H, Park J Y, et al. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16Sr RNA Sequence [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(4): 1563-1589.
- [27] 平立岩. 细菌泳动时的细胞取向: 理论模拟与实验测定的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(4): 259-268.
- [28] 来燕学. 松树枯萎病枝条内的寄生虫和微生物群落[J]. 南京林业大学学报, 2006, 29(1): 49-53.
- [29] 来燕学. (拟)松材线虫耐久型四龄幼虫(LIV)的形态及其分化变异[J]. 林业科学研究, 2009, 22(2): 294-298.
- [30] Seubert W. Degradation of isoprenoid compounds by micro-organisms isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citrollolis*, n. sp [J]. *Journal of Bacteriology*, 1960, 79: 426-434.
- [31] 李 平, 王焰新, 刘 琨, 等. 高效纤维素降解菌系的构建[J]. 地球科学-中国地质大学学报, 2009, 30(3): 533-538.
- [32] Norkraus B. Degradaion of cellulose [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1963, 1: 325-350.
- [33] Odani K, Sasaki S, Nishiyama Y, et al. Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematode-cellulase as a possible candidate of the pathogen [J]. *Journal of Japanese Forestry*, 1985, 67(9): 366-372.
- [34] Yamamoto N, Odani K, Sasaki S, et al. Cellulase exudation by the pine wood nematode - detection of activity in its crawling track [J]. *Journal of the Japanese Forestry Society*, 1986, 68(6): 237-240.
- [35] Kusunoki M. Symptom development of pine wilt disease-histopathological observations with electronmicroscopes [J]. *Ann Phytopath Soc Japan*, 1987, 53(5): 622-629.
- [36] Seubert W, Remberger U. Purification and mechanism of action of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citrollolis* [J]. *Biochemistry*, 1961, 334: 401-414.
- [37] 史江红, 韩 蕊, 宿凌燕, 等. 某河水处理中17 α -乙炔基雌二醇降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学学报, 2010, 30(12): 2411-2419.
- [38] Fall R R, Brown J L, Schaeffer T L. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citrollolis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38: 715-722.
- [39] Choi Muv Huan, Sung Chul Yoon. Polyester Biosynthesis Characteristics of *Pseudomonas citrollolis* Grown on various carbon sources, including 3-Methy-Branched substrates [J]. *Applied Environment Microbiologis*, 1994, 60: 3245-3254.
- [40] Scheffer T C, Cowling E B. Natural resistance of wood to microbial deterioration [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1966, 4: 147-170.
- [41] Goss J A, Cohen N D, Utter M F. Characterization of the subunit structure of *Pyruvate carboxylase* from *Pseudomonas citronellolis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(22): 11819-11825.
- [42] Mina L, Hector R, Ray F. Multiple Acyl-Coenzyme a carboxylase in *Pseudomonas citronellolis* [J]. *Biochemistry*, 1976, 15(16): 3465-3472.

(责任编辑:彭南轩)