

黑松与松材线虫互作早期 NO 应答信号与外在因子的关系 *

俞禄珍 吴小芹 ** 叶建仁 张赛男

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 南京 210037)

摘要 松树与松材线虫互作中, NO 作为重要的信号分子参与调控寄主对松材线虫入侵的应答反应, 但松材线虫入侵寄主后, 是松材线虫还是其代谢产物激发寄主体内 NO 应答信号尚不明确。本研究用松材线虫活体、线虫分泌物、虫体研磨液等分别接种黑松, 研究接种早期黑松体内 NO 合成酶(NOS)活性和 NO 含量变化与后期松树症状发展的关系。结果表明: 采用虫体研磨液、线虫分泌物处理后黑松体内 NOS 活性和 NO 含量均升高; 各处理黑松外部均出现感病症状。说明在松树与松材线虫互作中, 除线虫活体作用外, 线虫体或分泌物中的物质也可激发松树体内 NO 应答信号的表达, 诱导下游应答响应的发生, 导致黑松感病。15~25℃条件下, 随着温度升高, 接种黑松体内 NOS 活性增强, NO 含量升高, 感病症状出现较早; 随着干旱胁迫程度的增强, 接种黑松体内 NOS 活性、NO 含量大致呈逐步升高趋势, 感病症状也较早出现。在一定范围内, 温度升高和干旱程度加剧可诱发感病黑松体内 NO 相关信号途径表达增强, 并加速病程发展。表明在一定条件下, 高温干旱环境有利于松材线虫病的发生可能与寄主体内 NO 应答信号增强有关。

关键词 松材线虫 NOS NO 线虫分泌物 环境因子

文章编号 1001-9332(2013)03-0646-07 **中图分类号** S763.1 **文献标识码** A

Relationships between nitric oxide response signal and external factors during the early interaction between *Pinus thunbergii* and *Bursaphelenchus xylophilus*. YU Lu-zhen, WU Xiao-qin, YE Jian-ren, ZHANG Sai-nan (College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Jiangsu Province Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, Nanjing 210037, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2013, 24(3): 646–652.

Abstract: In the interaction between *Pinus thunbergii* and *Bursaphelenchus xylophilus*, nitric oxide (NO) is an important signaling molecule involving in the early response of *P. thunbergii* to the invasion of *B. xylophilus*. However, it is unclear that whether the NO production by *P. thunbergii* is triggered by the invaded *B. xylophilus* or its secreted metabolites. In the present study, the *P. thunbergii* was inoculated with living *B. xylophilus*, its secretion, and the suspension of grinded *B. xylophilus*, respectively, and the nitric oxide synthase (NOS) activity and NO content in the *P. thunbergii* were detected at the early stage. In all treatments, the inoculated *P. thunbergii* appeared disease symptoms, and the NOS activity and NO content in the *P. thunbergii* inoculated with *B. xylophilus* secretion and grinded *B. xylophilus* suspension increased, suggesting that besides living *B. xylophilus*, its contents or secretion could also trigger the expression of NO response signal in *P. thunbergii*, inducing the downstream response and causing the disease development of *P. thunbergii*. With the increasing temperature at 15–25℃, both the NOS activity and the NO content in inoculated *P. thunbergii* increased, and the disease symptoms appeared earlier. The same patterns of NOS activity, NO content, and disease symptoms were also observed under increasing drought stress. It was suggested that within a definite range, increased temperature and drought stress could enhance the NO signal expression in inoculated *P. thunbergii* and accelerate its disease development, and

* 国家自然科学基金项目(30972369)、江苏省高校自然科学研究项目(11KJA22002)、“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD19B0703)、国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119200)和江苏高校优势学科建设工程项目的资助。

** 通讯作者。E-mail: xqwu@njfu.edu.cn

2012-08-27 收稿, 2013-01-06 接受。

thus, the disease development of inoculated *P. thunbergii* under high temperature and drought condition could be related to the enhancement of the NO response signal in the host.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; nitric oxide synthase; nitric oxide; secretion of nematode; environmental factor.

松材线虫病是松树的毁灭性病害。我国自1982年在南京首次发现该病以来,目前已扩展到多个省份,对我国林业生产造成了重大损失,已成为我国森林最重要的病害之一^[1-2]。近年研究发现,一氧化氮(nitric oxide, NO)是植物体内重要的信号分子,参与调控植物的生长发育过程,并在植物对病原物入侵应答反应中起着重要的作用^[3-5]。松树受松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)侵染后,松树体内会产生大量的NO,且NO作为重要的信号分子参与调控寄主对松材线虫入侵的应答反应。同时,NO合成酶(nitric oxide synthase, NOS)是调控松树体内NO产生的重要酶^[6]。植物寄生线虫对寄主造成的伤害包括两个方面:一是在组织内取食,造成机械损伤;二是食道腺产生的分泌物对寄主细胞造成直接或间接的作用^[7]。在松树-松材线虫互作早期,是松材线虫在树体内的取食、迁移作用,还是松材线虫的分泌物或虫体物质诱发了寄主NO应答信号,目前尚不清楚。研究发现,高温、干旱的气候条件有利于松材线虫病的发生和流行^[8]。而高温、干旱条件是否与寄主松树体内NOS活性、NO信号分子的积累有关也不清楚。

本研究选取对松材线虫高度感病的黑松(*Pinus thunbergii*)为材料,采用松材线虫活体、线虫分泌物、虫体研磨液等分别接种黑松,研究松树与松材线虫互作早期黑松体内NOS和NO含量变化,并跟踪观察松树外部症状,以期弄清松材线虫入侵后,寄主体内NO应答信号可能被激发的因子。同时,研究不同温度、干旱胁迫条件下接种黑松体内NOS和NO含量的变化,探讨高温或干旱胁迫条件下松材线虫病发生发展与寄主松树体内NO信号应答的相关性。这对于深入了解松树-松材线虫互作机制具有重要的参考意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试松材线虫17号虫株分离自江苏连云港感病黑松,保存于南京林业大学森林病理实验室。

线虫活体制备:采用贝尔曼漏斗法分离在灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)上纯培养保存的松材线虫,将

获得的线虫用0.1%的硫酸链霉素表面消毒5 min,用无菌水洗涤3次,配置成3000条·mL⁻¹的线虫悬浮液,即为线虫活体^[9]。

线虫分泌物的制备:分离纯培养获得的线虫,用0.1%的硫酸链霉素表面消毒5 min,再用无菌水洗涤3次,将线虫配置成1.0×10⁶条·mL⁻¹的悬浮液,然后转入无菌水中振荡培养,培养条件为25℃ 200 r·min⁻¹,72 h后4000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液经0.22 μm微膜过滤,即获得线虫分泌物粗提液^[10-11]。

线虫研磨液制备:分离纯培养保存的松材线虫,将获得的线虫用0.1%的硫酸链霉素表面消毒5 min,用无菌水洗涤3次,配置成3000条·mL⁻¹的线虫悬浮液;加无菌水冰浴研磨,得到3000条·mL⁻¹线虫的研磨液。

1.2 试验设计

采用2.5年生黑松盆栽苗进行松材线虫活体、线虫分泌物、线虫研磨液、线虫活体+分泌物处理试验,测定其对黑松体内NOS活性、NO含量的影响。供试黑松在温室内生长,日平均温度为28℃。采用人工皮接法,将松材线虫活体(每株3000条)、线虫分泌物(每株3 mL,每7 d添加1次,共添加6次)、线虫研磨液(3000条线虫研磨液/株)、线虫活体+分泌物(每株3000条活虫,且每7 d添加1次线虫分泌物,共添加6次)接种到黑松体内。前期试验表明,在日平均气温28℃条件下,接种处理24 h后,黑松体内NOS活性、NO含量达到峰值,故确定接种后24 h采样,采集针叶用于测定。将未经任何处理的松苗作为对照(CK)。每处理设5个重复。

在不同温度胁迫处理试验中,选择5年生健康日本黑松,剪取粗细大致相同(直径约0.4 cm)的松枝,放入装有自来水的玻璃容器中培养且每天换水。将黑松离体枝分别置于15、25、35℃培养箱中培养1 d后,采用人工皮接法接种松材线虫,接种量为每株2000条。在接种松材线虫后的24 h,采集针叶用于测定。采用相同温度下未经接种处理松苗离体枝作为CK。每处理设5个重复。

在不同干旱胁迫处理黑松试验中,选择5年生健康日本黑松,剪取粗细大致相同(直径约0.7 cm)

的松枝,分别放入装有0% PEG(无胁迫)、20% PEG(相当于-0.63 MPa渗透势,中强度干旱胁迫)、30% PEG(相当于-1.13 MPa渗透势,强度干旱胁迫)溶液的玻璃容器中进行不同干旱胁迫处理。松苗离体枝未经接种,插入0% PEG溶液培养的处理设为CK。将各处理黑松离体枝置于25℃培养箱中培养1 d后,采用人工皮接法接种松材线虫,接种量为每株2000条。在接种松材线虫后的24 h采集针叶用于测定。每处理设5个重复。

各接种处理后,连续观察黑松外部感病症状,统计发病率。

1.3 测定方法

NOS酶活性采用NOS试剂盒测定^[12]。将各处理0.5 g针叶放入Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液2.5 mL液氮研磨匀浆,4℃冷冻离心(10000 r·min⁻¹)15 min,上清液储存备用,参考试剂盒说明书进行测定(试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。取上清液100 μL,加入600 μL反应液(含L-精氨酸、核苷酸、钙调素、四氢、硝基四唑和氯化钙),混匀后,加入反应终止液,测定A530值。

NO含量测定采用一氧化氮检测(硝酸还原酶法)试剂盒法,购自南京建成生物工程研究所。将各处理采集的黑松针叶分别取0.5 g,用0.1 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH 7.4)液氮研磨匀浆,4℃冷冻离心(10000 r·min⁻¹)15 min,取上清液,按照试剂盒操作规程测定^[13]。取上清液100 μL,依次加入NADPH 5 μL、FAD 10 μL、NR 5 μL,混匀后37℃孵育15 min,加入LDH缓冲液10 μL、LDH 10 μL,混匀后37℃孵育5 min,再加入Griess试剂Ⅰ50 μL、Griess试剂Ⅱ50 μL,混匀后,室温孵育10 min,测定A540值。

1.4 数据处理

所有数据均采用SPSS 15.0软件进行单因素方差分析($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 松材线虫及其代谢物对黑松体内NOS活性和NO含量的影响

采用松材线虫活体、线虫分泌物、虫体研磨液等分别处理黑松,结果发现,处理24 h后,虫体研磨液处理的黑松体内NOS活性最高,甚至高于经线虫活体处理约20%;线虫分泌物处理后,黑松体内NOS活性与线虫活体处理大致相同,高于未接种处理CK约50%,但与CK相比差异未达到显著水平。线虫活

体+分泌物处理的黑松体内NOS活性要高于单独接种线虫活体、线虫分泌物处理,但差异未达到显著水平(图1)。

对各处理黑松体内NO含量测定发现,松材线虫虫体研磨液处理后,黑松体内NO含量与线虫活体处理相当,均显著高于CK;线虫分泌物处理,其体内NO含量较低,但仍高于CK约50%。线虫活体+分泌物处理后,黑松体内NO含量最高,高于单独接种线虫活体、线虫分泌物处理,其中与线虫分泌物处理间的差异达到显著水平(图1)。

这表明除松材线虫活体外,采用虫体研磨液处理可诱导黑松体内NOS活性、NO含量大量升高,且对黑松体内NOS活性、NO含量的诱导作用甚至与线虫活体处理的相当。采用线虫分泌物处理对黑松体内NOS活性、NO含量也有一定的诱导作用,但作用不及虫体研磨液明显。各处理黑松NOS活性越高,其体内NO含量也较高,进一步印证了NOS是黑松体内NO产生的重要酶。

2.2 松材线虫及其代谢物处理下黑松的发病症状

对各处理的黑松外部症状观察发现,松材线虫分泌物、虫体研磨液处理后,黑松会出现松针变软、

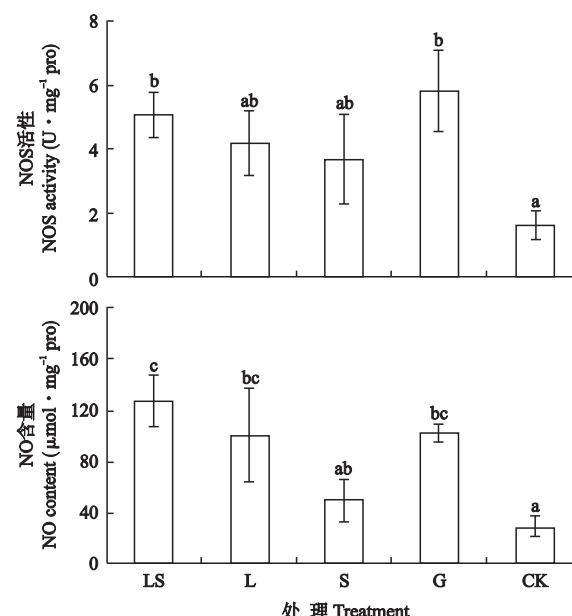


图1 不同处理黑松体内NOS活性和NO含量的变化

Fig. 1 NOS activity and NO content in *Pinus thunbergii* under different treatments.

LS:松材线虫活体+分泌物 Living *B. xylophilus* and its secretion; L:线虫活体 Living *B. xylophilus*; S:线虫分泌物 Secretion of *B. xylophilus*; G:线虫研磨液 Suspension of grinded *B. xylophilus*; CK:对照 Control。不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。Different small letters meant significant difference among treatments at 0.05 level. 下同 The same below.

发黄,梢头弯曲下垂、树脂分泌减少的症状。接种 15 d 后,接种线虫活体和虫体研磨液处理的黑松感病率为 20%;而接种线虫分泌物处理的黑松尚未发病;接种线虫活体+分泌物处理黑松感病率为 40%。30 d 后,接种虫体研磨液处理的黑松感病率达 60%;接种线虫活体处理的黑松感病率 20%;而接种分泌物的处理仍未表现出感病症状;线虫活体+分泌物处理的黑松感病率为 60%。45 d 后,接种虫体研磨液处理的黑松感病率最高,达 80%,接种线虫分泌物处理的感病率达 40%;线虫活体+分泌物处理组黑松感病率达 60% (表 1)。

2.3 不同温度下接种黑松体内 NOS 和 NO 的变化

由图 2 可以看出,在 25 和 35 ℃ 条件下,接种松

表 1 不同接种处理后黑松发病率

Table 1 Disease rate of *Pinus thunbergii* under different inoculation treatments (%)

接种后时间 Time after inoculation (d)	LS	L	S	G
10	0	0	0	0
15	40	20	0	20
30	60	20	0	60
45	60	60	40	80

LS: 松材线虫活体+分泌物 Living *B. xylophilus* and its secretion; L: 线虫活体 Living *B. xylophilus*; S: 线虫分泌物 Secretion of *B. xylophilus*; G: 线虫研磨液 Suspension of grinded *B. xylophilus*; CK: 对照 Control.

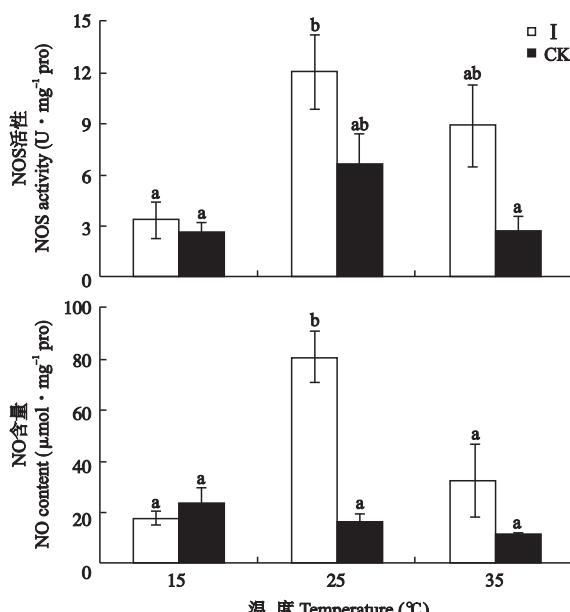


图 2 不同温度处理黑松体内 NOS 活性和 NO 含量

Fig. 2 NOS activity and NO content in *Pinus thunbergii* under different temperature treatments.

I: 接种 Inoculated.

材线虫 24 h 后,黑松体内 NOS 活性明显高于 CK;在 15 ℃ 条件下,接种黑松体内 NOS 活性与 CK 持平。在 3 个温度处理中,25 ℃ 下接种和 CK 黑松体内 NOS 活性均高于另两组处理。

25 ℃ 下,接种 24 h 后黑松体内 NO 含量亦显著高于 CK;35 ℃ 下,接种黑松体内 NO 含量高于 CK 60%,但差异不显著;而在 15 ℃ 下,其体内 NO 含量与 CK 差异不大。3 个处理中,25 ℃ 下接种黑松体内的 NO 含量明显高于 15 ℃ 和 35 ℃ 处理。这表明在 15 ~ 25 ℃ 条件下,随着温度的升高,接种松材线虫后黑松体内 NOS 活性逐步增强,NO 含量逐步升高。在一定范围内,温度升高有利于增强松材线虫入侵后寄主体内 NO 相关应答信号的表达。而在 35 ℃ 条件下,接种黑松体内 NO 相关应答信号的表达低于 25 ℃,则可能与其峰值表达时间早于 24 h 有关。

2.4 不同温度条件下接种黑松的发病情况

观察不同温度处理下接种黑松离体枝感病症状发现,接种 15 d 后,35 ℃ 处理的接种黑松枝条发病率达 66%,而 15 ℃、25 ℃ 处理中,接种黑松尚未表现出感病症状;接种 20 d 后,35 ℃ 处理的黑松已全部发病,而 15 ℃、25 ℃ 处理的黑松仍未发病。30 d 后,25 ℃ 处理接种黑松开始发病,感病率达 66%,而 15 ℃ 处理的接种黑松仍未发病。35 d 后,25 ℃、35 ℃ 处理所有接种黑松均已感病,而 15 ℃ 处理接种黑松仍未感病。这表明在 15 ~ 35 ℃ 条件下,随着温度升高,接种黑松发病更早,速率更快(表 2)。

2.5 不同干旱胁迫下接种黑松体内 NOS 活性和 NO 含量差异

由图 3 可以看出,不同干旱胁迫下,各处理接种黑松体内 NOS 活性均显著高于 CK。其中,强度干旱胁迫(30% PEG 溶液)下,接种黑松体内 NOS 活性最高,显著高于其他处理;中强度干旱胁迫(20% PEG)下,接种黑松体内 NOS 活性次之;非干旱胁迫(0% PEG)下,黑松体内 NOS 活性最低。

表 2 不同温度处理下接种黑松的发病率

Table 2 Disease rate of *Pinus thunbergii* under different temperature treatments (%)

接种后时间 Time after inoculation (d)	温度 Temperature (°C)		
	15	25	35
10	0	0	0
15	0	0	66
20	0	0	100
30	0	66	100
35	0	100	100

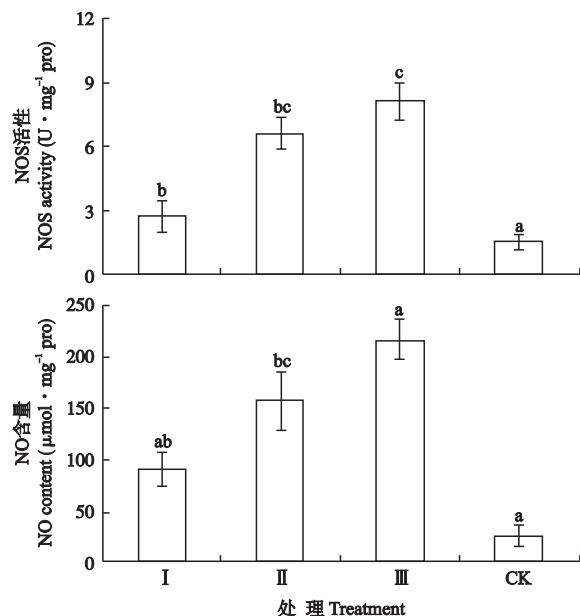


图3 不同干旱处理黑松体内 NOS 活性和 NO 含量

Fig. 3 NOS activity and NO content in *Pinus thunbergii* under different drought stresses.

I : 0% PEG; II : 20% PEG; III : 30% PEG; CK: 对照 Control.

接种 24 h 后, 中强度、强度干旱胁迫下, 接种黑松体内 NO 含量均显著高于 CK。其中, 强度干旱胁迫处理黑松体内 NO 含量高于中强度干旱胁迫; 非干旱胁迫下, 接种黑松体内 NO 含量约为 CK 的 3 倍, 但差异不显著。

这表明随着干旱胁迫程度的增加, 接种黑松体内 NOS 活性和 NO 含量大致呈现出逐步升高的趋势, 即干旱胁迫下, 受松材线虫侵染的松树体内 NO 相关信号表达增强。

2.6 不同干旱胁迫下接种黑松的发病情况

不同干旱胁迫处理下, 松材线虫侵染黑松的离体枝发病率见表 3。接种 8 d 后, 强度干旱(30% PEG 溶液)、中强度干旱(20% PEG 溶液)处理的接种黑松已开始发病, 感病率均达到 60%, 而非干旱

(0% PEG 溶液)处理的接种黑松尚未发病; 接种 11 d 后, 强度干旱处理的接种黑松发病率最高, 达 80%, 中强度干旱处理次之, 达 60%, 非干旱胁迫处理组的发病率最低, 仅为 40%; 15 d 后, 中强度、强度干旱处理的接种黑松全部发病, 而非干旱胁迫处理的发病率仅为 40%; 20 d 后, 各处理接种黑松均全部发病。这表明随着干旱胁迫程度的增加, 接种黑松离体枝的发病加快(表 3)。

3 讨 论

NO 是植物体内重要的信号分子, 参与调节植物体内多种生理过程^[14]。研究发现, NO 参与调控了感病植物体内应答响应^[15-16]。本研究表明, 松树与松材线虫互作中, 除松材线虫活体作用外, 线虫分泌物、虫体物质也可诱导寄主体内 NO 应答信号的产生; 且松材线虫体物质的诱导作用要强于线虫分泌物。同时, 一定温度、干旱条件下, 受松材线虫侵染的黑松发病严重程度与黑松-松材线虫互作早期体内 NO 应答信号较强相关。此外, 黑松体内 NO 含量高低与 NOS 活性强弱明显相关, 进一步印证了在黑松-松材线虫互作体系中, NOS 调控黑松体内 NO 含量的重要酶。

本试验中, 除松材线虫活体外, 松材线虫虫体研磨液、松材线虫分泌物处理后也可诱导黑松体内 NOS 活性增强、NO 含量不同程度地累积, 并使部分黑松萎蔫死亡, 且症状和松材线虫病的症状相同。这表明在松树-松材线虫互作过程中, 除线虫活体取食、迁移作用外, 虫体物质、虫体分泌物也可诱导寄主体内 NO 应答信号的表达, 并可能影响相应生理响应的发生。其中, 持续添加松材线虫分泌物可致部分黑松苗出现感病症状(感病率达 40%), 但首次采用松材线虫分泌物处理后, 黑松体内 NOS 活性和 NO 含量并未显著增加, 且松材线虫活体+分泌物处理的黑松体内 NOS 活性和 NO 含量也未显著高于单接松材线虫活体。这似乎表明本试验所采用的松材线虫分泌物一次性接种量并不能达到诱导黑松体内相关应答响应的发生及感病症状的出现, 只有该浓度的松材线虫分泌物持续作用才具有致病作用。汪来发等^[17]采用单独接种松材线虫分泌物的方法, 发现仅能造成松苗部分针叶枯死, 且针叶部分出现枯死的松树在 3 个月内可恢复正常生长, 松材线虫分泌物对松树有致病作用, 但与接种量有关, 这与本研究结论相似。另外, 本试验中松材线虫虫体研磨液处理的黑松体内 NOS 活性和 NO 含量显著高于接

表 3 不同干旱处理黑松离体枝的发病率

Table 3 Disease rate of *Pinus thunbergii* under different drought stresses (%)

接种后时间 Time after inoculation (d)	干旱处理 Drought stress		
	0% PEG 溶液 0% PEG solution	20% PEG 溶液 20% PEG solution	30% PEG 溶液 30% PEG solution
5	0	0	0
8	0	60	60
11	40	60	80
15	40	100	100
20	100	100	100

种线虫分泌物处理,且黑松发病率也高于线虫分泌物处理。这可能是因为线虫虫体经研磨后,其体内某些物质能够更充分地释放,诱导 NO 应答信号的表达,导致较早出现感病症状,而且症状更严重。

有研究表明,松材线虫的分泌物中含有纤维素酶,且具有致病作用^[18~19]。松材线虫伴生细菌在松材线虫致病过程中发挥明显的协同促进作用,有些伴生细菌种类还可产生导致植物细胞死亡的毒素^[20~24]。本试验中所采用的线虫分泌物为线虫水培液粗提取物,且持续添加松材线虫分泌物后,黑松才表现出感病症状,这是否与松材线虫伴生细菌产生的毒素有关?袁为敏等^[25]从松材线虫体内分离得到内生细菌,并推测内生细菌对松材线虫有一定的生理生态作用。本试验松材线虫分泌物、虫体研磨液中是否含有某些物质具有激发 NO 应答信号及致病作用,该过程是否与松材线虫的伴生细菌相关,还有待于进一步研究。

研究表明,温、湿度是影响松材线虫病程发展的重要因素^[26]。一定条件下,温度越高、天气越干旱,越有利于松材线虫病的发生和流行。本试验中,随着干旱胁迫程度的增加,接种黑松体内 NOS 活性逐步增强,NO 含量增加,其感病症状也出现较早。推测干旱的环境条件有利于松材线虫入侵后寄主体内 NO 应答信号的表达,进而导致受 NO 调控的生理生化响应的发生,加速了黑松感病症状的出现。

在不同温度处理试验中,接种松材线虫 24 h 后,25 ℃条件下接种黑松体内 NOS 活性高于 15 ℃处理,且 NO 含量更高,较早出现感病症状。这暗示在 15~25 ℃范围内,温度的升高有利于黑松松材线虫病程的发展,可能与其体内 NO 应答信号较强相关。Jikumaru 等^[27]研究表明,随着温度降低(25~16 ℃),松材线虫的运动能力降低,运动的高峰期也推迟。Ichihara 等^[28]研究发现,低温抑制松材线虫在松树茎部的运动迁徙过程,低温下,松材线虫不易侵入到松树木质部树脂道和皮层。可以推测,本试验 15 ℃下,感病松树体内的线虫运动迁徙能力弱于 25 ℃处理,因此对寄主的伤害也较小,寄主体内 NO 应答信号的反应也较弱。在 35 ℃条件下,黑松体内 NOS 活性、NO 含量均低于 25 ℃处理,即 25~35 ℃下,随着温度的升高,接种黑松体内 NO 应答信号的表达并未增强;但 35 ℃处理的黑松却更早发病,症状表现更严重。这可能与试验所选取的采样时间(接种松材线虫后 24 h)有关。前期研究表明,日平均气温 28 ℃条件下,接种松材线虫 24 h 后黑松体内 NOS

活性、NO 含量均达到最高峰,因此,24 h 为试验最佳采样监测时间。在 35 ℃条件下,松材线虫的运动、迁徙能力强,黑松体内代谢更快,因此寄主对松材线虫入侵的应答反应也更迅速,NO 应答信号可能早于 24 h 已达峰值,因此在 24 h 其体内 NO 含量虽未高于 25 ℃处理,但已较早启动相应生理响应,其感病症状较早出现。

本研究对黑松-松材线虫互作中与 NO 应答信号相关的生物因子、非生物因子进行研究,结果发现,除松材线虫活体外,一定量的线虫分泌物、虫体研磨液也能激发 NO 应答信号,且对黑松具有一定的致病作用。一定范围内的高温和干旱胁迫下,接种黑松发病程度与黑松体内 NO 应答信号存在一定的相关性。这对于深入了解松树-松材线虫互作机制具有重要参考意义。

参考文献

- [1] Nie G-H (聂谷华), Wang W-Q (王文琪). Advances and prospects of control method of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* (安徽农业科学), 2009, **37**(24): 11612~11613 (in Chinese)
- [2] Hu X (胡霞), Jiang X-J (蒋学建). Advances on biological control of pine wilt disease. *Guangxi Forestry Science* (广西林业科学), 2007, **36**(4): 199~201 (in Chinese)
- [3] Delledonne M. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, **8**: 390~396
- [4] Hancock JT, Desikan R, Clarke A, et al. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, **40**: 611~617
- [5] Wendehenne D, Durner J, Klessig DF. Nitric oxide: A new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, **7**: 449~455
- [6] Yu LZ, Wu XQ, Ye JR, et al. NOS-like-mediated nitric oxide is involved in *Pinus thunbergii* response to the invasion of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Cell Reports*, 2012, **31**: 1813~1821
- [7] Lin M-S (林茂松), Fang Z-D (方中达), Xie Y-P (谢逸萍). The reaction of the sweet potatoes to the secretions of potato rot nematode. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1993, **23**(2): 157~163 (in Chinese)
- [8] Yang B-J (杨宝君), Pan H-Y (潘宏阳), Tang J (汤坚), et al. Pine Wilt Disease. Beijing: China Forestry Press, 2003 (in Chinese)
- [9] Chen Y-H (陈玉惠), Ye J-R (叶建仁), Wei C-J (魏初奖), et al. Effects of pine wood nematode infection on metabolism of active oxygen in Japanese black pine and slash pine seedlings. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences)* (南京林业大学学报·

- 自然科学版), 2002, **26**(4): 18–21 (in Chinese)
- [10] Yan D-H (严东辉), Yang B-J (杨宝君). The enzymes in the secretions of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Forest Research* (林业科学研究), 1997, **10**(3): 265–269 (in Chinese)
- [11] Liu J (刘劼), Wu X-Q (吴小芹), He L-X (何龙喜), et al. The difference of progenitive power and superoxide anion production in *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Sciences) (南京林业大学学报·自然科学版), 2008, **32**(6): 24–28 (in Chinese)
- [12] Dong Y, Liu LQ, Guan JF. Effects of 1-methylcyclopropane on NO content, NOS activity, and H₂O₂ content in postharvest Suli pears. *Agricultural Sciences in China*, 2011, **10**: 797–804
- [13] Meng Y-Y (孟艳艳), Fan S-L (范术丽), Song M-Z (宋美珍), et al. Effects of NO on NO contents and anti-oxidative enzymes in cotton leaf at growth stage. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2011, **37** (10): 1828–1836 (in Chinese)
- [14] Tewari RK, Kumar P, Kim S, et al. Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalaenopsis* flower: An implication of NO in the senescence and oxidative stress regulation. *Plant Cell Reports*, 2009, **28**: 267–279
- [15] Zhang Y-K (张义凯), Cui X-M (崔秀敏), Yang S-X (杨守祥), et al. Effects of exogenous nitric oxide on active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics of tomato seedlings under cadmium stress. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21** (6): 1432–1438 (in Chinese)
- [16] Sudha G, Ravishankar GA. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, **71**: 181–212
- [17] Wang L-F (汪来发), Piao C-G (朴春根), Li Y (李永), et al. The pathogenic role of pine wood nematode secretions to pines. *Journal of Northwest A&F University* (Natural Sciences) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2005, **33** (suppl. 1): 178–181 (in Chinese)
- [18] Odani K, Sasaki S, Nishiyama Y N, et al. Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematodes-cellulase as a possible candidate of the pathogen. *Journal of Japanese Forestry Society*, 1985, **67**: 366–372
- [19] Tan J-J (谈家金), Feng Z-X (冯志新). Advance on physiopathology of pine wood nematode disease. *Jiangxi Science* (江西科学), 2001, **19**(1): 27–30 (in Chinese)
- [20] Chen S-C (陈守常). Advance in researches on of pathogens and pathogenetic mechanism of pine wood nematode disease. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology* (四川林业科技), 2010, **31**(1): 18–25 (in Chinese)
- [21] Zhao BG, Wang HL, Han SF, et al. Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. *Nematology*, 2003, **5**: 899–906
- [22] Zhao BG, Lin F. Mutualistic symbiosis between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Forest Pathology*, 2005, **35**: 339–345
- [23] Zhao BG, Liu Y, Lin F. Effects of bacteria associated with pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) on development and egg production of the nematode. *Journal of Phytopathology*, 2007, **155**: 26–30
- [24] Yuan W-M (袁为敏), Wu X-Q (吴小芹), Ye J-R (叶建仁), et al. Observation by transmission electron microscope and identification of endophytic bacteria isolated from *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2011, **51**(8): 1071–1077 (in Chinese)
- [25] Lin F (林峰), Zhao B-G (赵博光). Effects of pine wood nematode on propagation of its carrying bacteria. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2005, **16**(12): 2476–2478 (in Chinese)
- [26] Taketani A, Okuda M, Hosoda R. The meteorological analysis on the epidemic mortality of pine trees, with special reference to the effective accumulated temperature. *Journal of Japanese Forestry Society*, 1975, **57**: 169–175
- [27] Jikumaru S, Togashi K. Temperature effects on the transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nemata: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 2000, **32**: 110–116
- [28] Ichihara Y, Fukuda K, Suzuki K. Early symptom development and histological changes associated with migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in seedling tissues of *Pinus thunbergii*. *Plant Disease*, 2000, **84**: 675–680

作者简介 俞禄珍,女,1987年生,硕士研究生。主要从事松材线虫病研究。E-mail: yu_luzhen@sina.com

责任编辑 肖红