

赵晓佳,袁裕超,孙玉凤,等.甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和抗生素混合药剂对松材线虫病的防治效果[J].华中农业大学学报,2022,41(3):146-156.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.03.017

# 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和抗生素混合药剂 对松材线虫病的防治效果

赵晓佳,袁裕超,孙玉凤,叶建仁,谈家金

南京林业大学林学院,南京 210037

**摘要** 为进一步弄清细菌在松材线虫病中的作用,探明甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和抗生素联合应用防治松材线虫病的效果,从松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)携带的细菌中筛选出能显著促进松材线虫存活、繁殖和加重病害发生的菌株,通过药敏试验,在30种抗生素中筛选出对病害相关细菌有较强抑菌活性的高效抗生素,研究甲维盐(甲氨基阿维菌素苯甲酸盐)对松材线虫携带致病细菌的抑制作用,并将高效抗生素和甲维盐混合,采用浸渍法测定混合液对松材线虫的毒杀性以及采用灌根法测定混合液对6月生马尾松苗(*Pinus massoniana*)松材线虫病防治效果。结果显示,相比菌株AMA3-2和AMA3-3,菌株AMA3-1对松材线虫的存活、繁殖和病害发生方面具有更好的促进作用。环丙沙星和米诺环素对AMA3-1有较好的抑菌活性,而甲维盐对AMA3-1没有抑制作用。当混合液或甲维盐质量浓度为500 mg/L时,松材线虫的致死率可达80%以上。不同浓度的高效抗生素处理下,松材线虫的校正死亡率维持在较低水平(0.74%~2.43%)。当药剂质量浓度是500 mg/L时,在混合接种松材线虫和菌株AMA3-1前2d及当天根施混合液、甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的防治效果分别是50%、25%;33%、17%和17%、0%。结果表明,甲维盐或其混合液对松材线虫具有较高的毒杀作用,抗生素对其无明显的毒杀作用。一定条件下,甲维盐和抗生素混合,可提高松材线虫病的防治效果。

**关键词** 松材线虫;甲氨基阿维菌素苯甲酸盐;高效抗生素;松材线虫病;细菌

**中图分类号** S763 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)03-0146-11

松材线虫病(pine wilt disease, PWD)作为松树“癌症”对森林经济以及生态造成了极大的影响。一直以来,人们对于松材线虫病防治的重点都在杀线剂上,防治状况虽有所改善,但是仍然面临严峻的病害形势。自1980年Oku等<sup>[1]</sup>提出细菌与松材线虫病相关后,越来越多的研究者发现细菌在松材线虫病中具有重要作用<sup>[2-4]</sup>。有学者认为该病是松材线虫和致病细菌共同作用引起的复合侵染病害,二者互惠共生,在诱发寄主萎蔫方面缺一不可,且认为运用抗生素控制细菌的方法可以控制松材线虫病的发生<sup>[5]</sup>。在此基础上,一些学者开始研究用抗生素<sup>[6-7]</sup>或抗生素与杀线剂混合使用<sup>[8-9]</sup>的方法防治松材线虫病,都取得了一定的防效。可见,对松材线虫和病害相关细菌双向抑制,可能成为今后解决松材线虫病的重要方向。

甲维盐是在发酵产品阿维菌素 B1 基础上合成

的一种半合成抗生素杀虫剂,对许多害虫具有较高的毒杀活性,且对益虫影响较小,能够在保护人畜安全的情况下,对害虫进行精准防治<sup>[10]</sup>。甲维盐作为低毒、高效农药多次被证实具有较好的杀线活性,能有效地降低松材线虫病的发病率,一定程度上限制了松材线虫病的扩散<sup>[11-13]</sup>,但关于甲维盐和抗生素混合防治松材线虫病鲜有报道。本研究将对松材线虫病相关细菌有较强抑菌活性的抗生素与甲维盐混合,测定其混合液对松材线虫的毒杀作用以及松材线虫病温室防治效果,旨在为寻求更好的松材线虫病防治方法奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

松材线虫 AMA3 强毒虫株分离自安徽省感病黑松(*Pinus thunbergii*)。2年生马尾松盆栽苗由江苏沂

收稿日期:2021-12-09

基金项目:国家林草局重大应急科技项目(ZD202001)

赵晓佳, E-mail: 18438615532@163.com

通信作者:谈家金, E-mail: tanjiain@njfu.edu.cn

北园林苗木有限公司提供。98%米诺环素(二甲胺四环素盐酸盐)和98%盐酸环丙沙星购自上海麦克林生化科技有限公司。抗生素药敏片均购自杭州微生物试剂有限公司,直径为7 mm,包括:米诺环素、环丙沙星、氧氟沙星、麦迪霉素、头孢哌酮、万古霉素、头孢曲松、哌拉西林、氯霉素、多西环素、头孢唑林、氨苄西林、阿米卡星、苯唑西林、复方新诺明(SMZ/TMP)、青霉素、红霉素、诺氟沙星、羧苄西林、头孢氨苄、头孢拉定、头孢呋辛、头孢他啶、卡那霉素、新霉素、四环素、丁胺卡那、克林霉素、多粘菌素、庆大霉素。72%甲维盐原药购自河北威远生物化工股份有限公司。

NA固体培养基为蛋白胨10 g/L,牛肉膏5 g/L,氯化钠5 g/L,琼脂20 g/L,pH为7.2~7.4。NB液体培养基为蛋白胨10 g/L,牛肉膏5 g/L,氯化钠5 g/L,pH为7.2~7.4。MH固体培养基为牛肉膏2 g/L,可溶性淀粉1.5 g/L,酸水解酪蛋白17.5 g/L,琼脂20 g/L,pH为7.2~7.4。

## 1.2 细菌处理下松材线虫存活率、繁殖量的测定以及病害发生情况统计

1)松材线虫携带细菌AMA3-1、AMA3-2和AMA3-3的获得。将松材线虫AMA3接种在长满灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的PDA平板上,25℃培养5~6 d后,采用贝尔曼漏斗法分离收集线虫。将收集到的线虫悬液3 500 r/min离心3 min,弃上清,用无菌水清洗3遍以上。吸取0.5 mL松材线虫水悬液于1.5 mL灭菌的离心管里,用灭菌的研磨棒充分研磨,稀释涂布NA固体培养基,25℃倒置培养2~3 d,挑取单菌落进行纯化、培养和保存,即为松材线虫携带的细菌。

2)松材线虫预处理。将收集到的线虫水悬液与3%的过氧化氢1:1混合,静置10 min,3 500 r/min离心3 min,弃上清,用无菌水清洗3遍后用等体积0.1%的硫酸链霉素混合处理1 h,随后用无菌水洗3遍以上。

3)细菌水悬液的制备。挑取NA固体培养基上的1个单菌落于NB液体培养基中,28℃,200 r/min黑暗条件下震荡培养10 h,在8 000 r/min下离心10 min,弃上清,沉淀用无菌水清洗3次后重新悬浮,制成 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$  cfu/mL细菌水悬液,备用。

4)松材线虫存活率的测定。将线虫浓度调整为5 000条/mL,分别与3种浓度的细菌水悬液1:1混合于1.5 mL的灭菌离心管中,此时细菌的浓度为 $5 \times$

$10^7$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^5$  cfu/mL。将虫菌混合液放置于25℃培养箱中,每隔3 d在光学显微镜下观察线虫的存活情况,统计和比较不同浓度、不同细菌处理下松材线虫的存活率。每个处理重复5次,以松材线虫和无菌水等体积混合为对照。线虫虫体僵直无光泽,用大头针刺刺激不活动者,视为死亡。

线虫存活率=活虫数/线虫总数 $\times 100\%$

5)松材线虫繁殖量的测定。将线虫浓度调整为3 000条/mL,分别与3种浓度的细菌水悬液1:1混合,吸取200  $\mu$ L虫菌混合液(约300条松材线虫)放置于长满灰葡萄孢的PDA固体培养基中央,于25℃下培养,待其中1个培养皿灰葡萄孢菌丝消失时,分离线虫并计数,以松材线虫和无菌水等体积混合的处理为对照,每处理5个重复。

6)松材线虫病病害发生情况的统计。将线虫浓度调整为10 000条/mL,与浓度为 $1 \times 10^8$  cfu/mL的细菌水悬液等体积混合2 h后,采用皮接法<sup>[14]</sup>接种于2年生马尾松苗茎干中部偏下位置,在25℃的室温下进行培养。设计8个处理,每个处理接种6株马尾松:(1)AMA3-1 + AMA3;(2)AMA3-2 + AMA3;(3)AMA3-3 + AMA3;(4)AMA3-1 + 无菌水;(5)AMA3-2 + 无菌水;(6)AMA3-3 + 无菌水;(7)CK1:AMA3 + 无菌水;(8)CK2:无菌水。每株马尾松接种500  $\mu$ L松材线虫水悬液,每5 d观察马尾松苗的感病症状,统计感病率和感病指数。马尾松病情分级和病情指数的计算参照谈家金等<sup>[15]</sup>的方法,略加修改:0级正常,针叶绿色,代表值为0;1级为1/2以下针叶褪绿、1/4以下叶发黄,代表值为1;2级为1/2以上叶褪绿、1/4~3/4叶发黄,代表值为2;3级为3/4以上叶发黄、1/2以下叶变红,代表值为3;4级为1/2以上叶变红、植株濒死或死亡,代表值为4。计算公式如下:

$$\text{感病指数} = \frac{\sum(\text{各病级株数} \times \text{病级代表值})}{100 / (\text{总株数} \times \text{最高病级的代表值})}$$

$$\text{感病率} = \text{感病株数} / \text{接种总株数} \times 100\%$$

## 1.3 抗生素药敏试验

吸取100  $\mu$ L的细菌水悬液放置于MH固体培养基中,用涂布器推匀整个平板,稍晾干后,取30种抗生素药敏片置于细菌平板上,于25℃培养箱中倒置培养24 h,记录抑菌圈大小。每个处理3个重复。筛选出高效抗生素,备用。

## 1.4 甲维盐对细菌抑菌活性测定

将直径7 mm的圆形滤纸片灭菌烘干后浸泡于

预先配制好的不同质量浓度( $5 \times 10^4$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、1、0.1和0.01 mg/L)的甲维盐溶液中,10 min后取出,在超净工作台上晾干,制成含甲维盐的药敏纸片。在MH固体培养基上,用涂布器充分推匀100  $\mu$ L的细菌水悬液,放置含有甲维盐的药敏纸片。25  $^{\circ}$ C 24 h后记录抑菌圈大小,每个处理3个重复。

### 1.5 甲维盐与高效抗生素混合液对松材线虫的毒杀试验

1)不同质量浓度高效抗生素的配制。将本文“1.3”中筛选获得的高效抗生素环丙沙星和米诺环素分别称取1 g,加入1 L无菌水使其充分溶解,得到2 000 mg/L的抗生素母液。再将抗生素母液取出一定量,用无菌水分别稀释成1 000、500、250、125和31.25 mg/L的不同质量浓度的抗生素溶液。

2)不同质量浓度甲维盐的配制。将72%甲维盐原药用助溶剂二甲基甲酰胺(DMF)和乳化剂OP-10溶解制成5%的甲维盐乳油(EC),再用无菌水稀释成1 000、500、250、125和31.25 mg/L不同质量浓度的甲维盐溶液。

3)不同质量浓度甲维盐和高效抗生素混合液的配制。将双倍浓度的甲维盐和高效抗生素1:1混合于离心管中,配成质量浓度为1 000、500、250、125和31.25 mg/L的混合液。将上述不同质量浓度的高效抗生素分别与松材线虫水悬液1:1混合于1.5 mL离心管中,此时得到终质量浓度为500、250、125、62.5和15.625 mg/L的含有抗生素的虫药混合物,同理得到终质量浓度为500、250、125、62.5和15.625 mg/L含有甲维盐的虫药混合物及含有甲维盐和高效抗生素的虫药混合物。将虫药混合物放置25  $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h后,在光学显微镜下观察并记录线虫的总数和死亡数,每个处理5个重复,以线虫和无菌水等体积混合为对照组。

$$\text{线虫死亡率} = \text{死虫数} / \text{总数} \times 100\%;$$

$$\text{线虫校正死亡率} = (\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}) / (1 - \text{对照线虫死亡率}) \times 100\%。$$

### 1.6 甲维盐和高效抗生素混合液对松材线虫病的温室防效测定

1)马尾松苗预备。先将马尾松种子用无菌水冲洗干净,无菌水浸泡24 h后,用30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理30 min,用灭菌滤纸吸干水分,播种于121  $^{\circ}$ C、120 min灭菌的无菌营养土中,用少量的土覆盖其上,培养2周后移栽至一次性塑料水杯中,用无菌水定期浇水。当马尾松苗长至180 d后,将表面消毒的松材线虫

AMA3与浓度为 $1 \times 10^8$  cfu/mL的AMA3-1菌株水悬液(松材线虫的预处理和细菌水悬液的制备参照本文“1.2”)等体积混合2 h后,用灭菌的剪刀剪去马尾松顶部部分针叶,在伤口上附少许灭菌脱脂棉球,向脱脂棉上滴加40  $\mu$ L虫菌混合液(约含线虫500条),接种后24 h内不定时地向脱脂棉球补充无菌水,使灭菌棉球始终保持水润,以确保松材线虫侵入马尾松苗。

2)不同施用时间下甲维盐和高效抗生素对松材线虫病防治效果的测定。在接种前5 d、接种前2 d和接种当天以灌根法<sup>[16]</sup>向马尾松苗施药,每个施用时间下将500 mg/L甲维盐、高效抗生素以及混合液分别施入马尾松苗,每株马尾松苗施药10 mL。以灌根无菌水处理为对照,CK1、CK2、CK3和CK4均作为对照组。处理组及CK1、CK2、CK3均接种虫菌混合液。CK1接种前5 d施无菌水,CK2接种前2 d施无菌水,CK3接种当天施无菌水,CK4接种时加入无菌水。每个处理6株松苗,重复3次。

3)不同施用浓度下甲维盐和高效抗生素对松材线虫病防治效果的测定。在接种前5 d将500、250、62.5 mg/L的甲维盐,500、250、62.5 mg/L的高效抗生素,500、250以及62.5 mg/L的混合液分别以灌根法施入马尾松苗,每株马尾松苗施药10 mL。以无菌水处理为对照,CK1、CK2均施无菌水。灌根5 d后处理组及CK1接种虫菌混合液,CK2接种时加入无菌水,每处理6株马尾松苗,重复3次。

接种虫菌混合液后每2 d记录马尾松发病状况并计算感病指数,接种第7天计算马尾松感病率、死亡率以及药剂对松材线虫病的防治效果。马尾松病情分级和病情指数的计算参照Xue等<sup>[17]</sup>的方法。感病率和感病指数计算公式参照本文“1.2”,死亡率和防治效果计算公式如下:

$$\text{死亡率} = \text{死亡株数} / \text{接种总株数} \times 100\%;$$

$$\text{防治效果} = (\text{对照感病指数} - \text{处理感病指数}) / \text{对照感病指数} \times 100\%。$$

### 1.7 数据分析

使用IBM SPSS Statistics 24.0对数据进行单因素方差(One-way ANOVA)分析(显著水平为 $\alpha=0.05$ )。

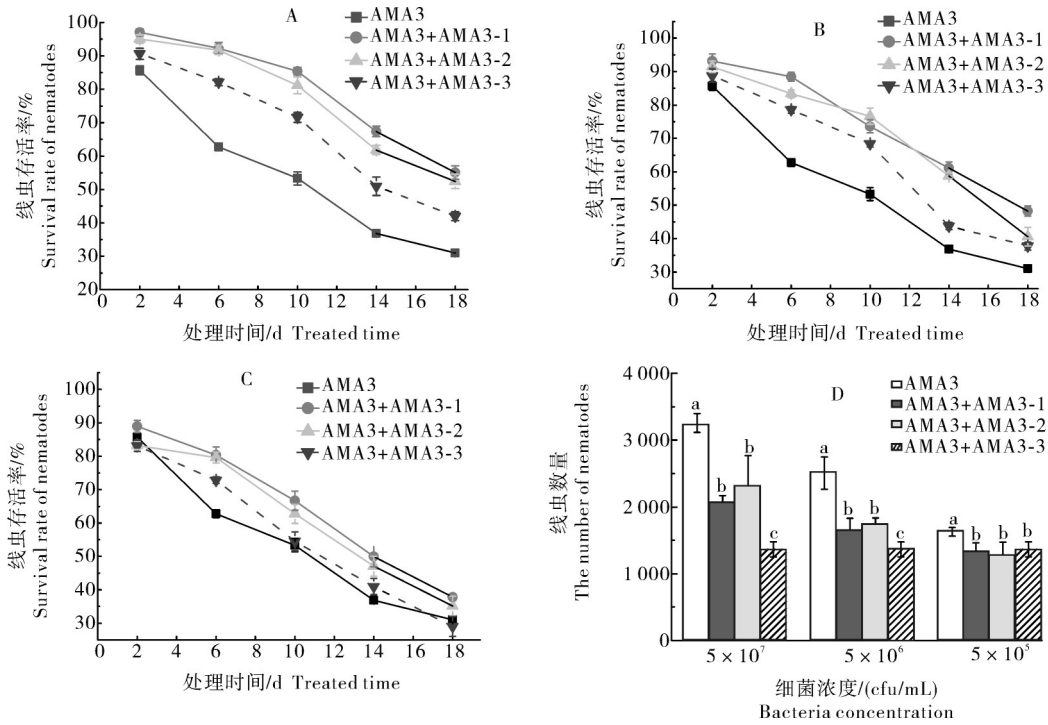
## 2 结果与分析

### 2.1 松材线虫携带细菌对松材线虫存活率、繁殖量和病害发生的影响

如图1 A—C所示,不同浓度菌株AMA3-1、







A-C:  $5 \times 10^7$  cfu/mL(A)、 $5 \times 10^6$  cfu/mL(B)和  $5 \times 10^5$  cfu/mL(C)细菌处理下松材线虫的存活率 Survival rate of *B. xylophilus* treated with bacteria ( $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$  and  $5 \times 10^5$  cfu/mL); D: 不同浓度细菌处理下松材线虫的繁殖量 Reproduction of *B. xylophilus* treated with different concentrations of bacteria; 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

图1 细菌处理下松材线虫的存活率和繁殖量

Fig.1 Survival rate and reproduction of *B. xylophilus* treated with bacteria

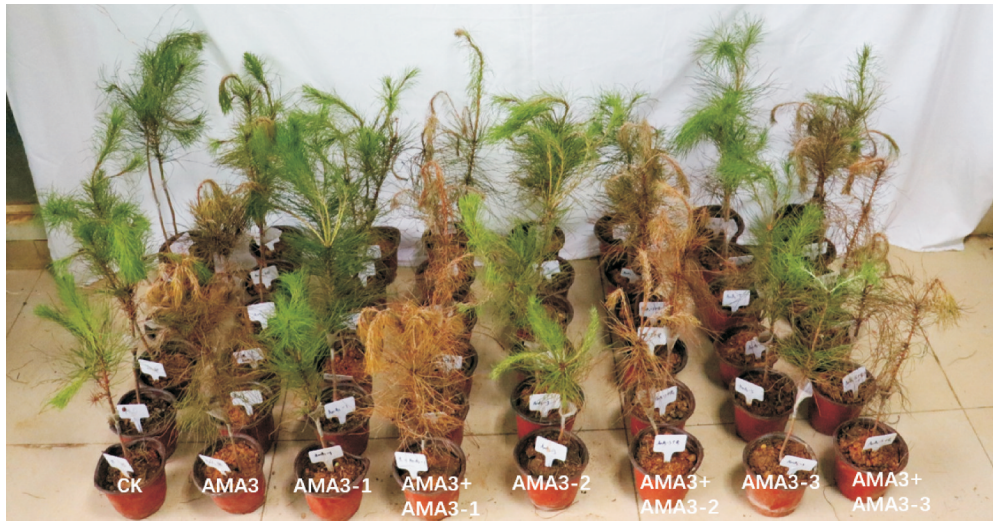


图2 2年生马尾松苗接种松材线虫后25 d的发病症状

Fig.2 Symptoms of the pine wilt disease at 25 days after being inoculated by *B. xylophilus* on two-year-old *P. massoniana*

2.3 甲维盐对松材线虫携带细菌的抑菌活性

用菌株 AMA3-1 涂布平板后,加入不同浓度甲维盐药敏片,培养 24 h,平板上均未产生抑菌圈,说明甲维盐对 AMA3-1 没有抑制作用。

2.4 甲维盐与高效抗生素混合液对松材线虫的毒杀效果

由表 3 可知,甲维盐或混合液对松材线虫的毒杀作用随着浓度的升高不断增强 ( $P < 0.05$ ),在药剂质

表 2 30 种抗生素对菌株 AMA3-1 的抑制作用  
Table 2 Inhibition of 30 kinds of antibiotics on strain AMA3-1

抗生素 Antibiotics	每片剂量/ $\mu\text{g}$ Dosage	抑菌圈直径/mm Bacteriostatic ring diameter	抗生素 Antibiotics	每片剂量 Dosage	抑菌圈直径/mm Bacteriostatic ring diameter
米诺环素 Minocycline	30	19.3 $\pm$ 0.8	青霉素 Benzylpenicillin	10 U	$\leq$ 7.0
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	18.0 $\pm$ 0.7	红霉素 Erythromycin	15 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
氧氟沙星 Ofloxacin	5	16.1 $\pm$ 1.4	诺氟沙星 Norfloxacin	10 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
麦迪霉素 Midecamycin	30	15.1 $\pm$ 0.3	羧苄西林 Carbenicillin	100 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
头孢哌酮 Efopezzone	75	14.1 $\pm$ 0.6	头孢氨苄 Cefalexin	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
万古霉素 Vancomycin	30	13.3 $\pm$ 0.5	头孢拉定 Cefradine	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
头孢曲松 Ceftriaxone sodium	30	12.2 $\pm$ 1.3	头孢呋辛 Cefuroxime	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
哌拉西林 Piperacillin	100	10.8 $\pm$ 0.2	头孢他啶 Ceftazidime	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
氯霉素 Hloroamphenicol	30	10.0 $\pm$ 0.9	卡那霉素 Kanamycin	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
多西环素 Doxycycline	30	9.4 $\pm$ 1.4	新霉素 Neomycin	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
头孢唑林 Cefazolin	30	$\leq$ 7.0	四环素 Tetracycline	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
氨苄西林 Ampicillin	10	$\leq$ 7.0	丁胺卡那 Amikacin	30 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
阿米卡星 Amikacin	30	$\leq$ 7.0	克林霉素 Clindamycin	2 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0
苯唑西林 Oxacillin	1	$\leq$ 7.0	多粘菌素 B Polymyxin B	300 IU	$\leq$ 7.0
复方新诺明(SMZ/TMP) Compound sulfamethoxazole	23.75/1.25	$\leq$ 7.0	庆大霉素 Gentamicin	10 $\mu\text{g}$	$\leq$ 7.0

量浓度为 500 mg/L 时, 甲维盐或混合液对松材线虫的致死率均达到 80% 以上, 说明甲维盐或混合液对松材线虫具有较强的毒杀作用。高效抗生素对松材线虫毒杀作用并没有随着浓度升高而有显著的变化 (P>0.05), 且不同浓度的高效抗生素处理下, 松材线虫的校正死亡率均维持在较低水平 (0.74%~2.43%), 表明高效抗生素对松材线虫无明显的毒杀作用。

表 3 甲维盐和高效抗生素混合对松材线虫的毒杀作用  
Table 3 Toxicity of emamectin benzoate and high-efficiency antibiotics to *B. xylophilus* %

质量浓度/(mg/L) Concentration	甲维盐 Emamectin benzoate		抗生素 Antibiotic		混合液(甲维盐+抗生素) Mixture (emamectin benzoate+antibiotic)	
	死亡率 Mortality	校正死亡率 Corrected mortality	死亡率 Mortality	校正死亡率 Corrected mortality	死亡率 Mortality	校正死亡率 Corrected mortality
0	2.19 $\pm$ 1.89a		2.19 $\pm$ 1.89a		2.19 $\pm$ 1.89a	
15.625	25.28 $\pm$ 3.21b	23.68 $\pm$ 3.28a	2.83 $\pm$ 0.77a	0.74 $\pm$ 0.78a	30.67 $\pm$ 4.04b	29.18 $\pm$ 4.13a
62.5	53.22 $\pm$ 1.93c	52.22 $\pm$ 1.98b	3.15 $\pm$ 1.16a	1.07 $\pm$ 1.19a	51.59 $\pm$ 4.10c	50.55 $\pm$ 4.19b
125	58.71 $\pm$ 5.85d	57.82 $\pm$ 5.97c	4.48 $\pm$ 1.85a	2.43 $\pm$ 1.89a	62.49 $\pm$ 6.10d	61.68 $\pm$ 6.23c
250	73.23 $\pm$ 2.61e	72.65 $\pm$ 2.66d	3.18 $\pm$ 0.92a	1.10 $\pm$ 0.94a	66.29 $\pm$ 3.20d	65.57 $\pm$ 3.27c
500	82.76 $\pm$ 3.24f	82.39 $\pm$ 3.31e	4.18 $\pm$ 5.28a	2.13 $\pm$ 5.40a	83.47 $\pm$ 1.24e	83.12 $\pm$ 1.27d

注 Note: 同列后不同字母表示差异显著 (P<0.05) Different letters in the same column indicate significant differences (P<0.05).

## 2.5 甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的温室防效

1) 不同施用时间下甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的防治效果。接种松材线虫后第 7 天, 对照组 CK1、CK2 和 CK3 的马尾松苗全部死亡 (表 4), 经镜

检, 体内均含有松材线虫, 而空白对照组 CK4 始终保持健康, 针叶为绿色。此时, 接种前 5 d、接种前 2 d 和接种当天用甲维盐灌根处理对松材线虫病的防治效果分别是 50%、33% 和 17%, 表明随着施药时间的提前, 甲维盐对松材线虫病具有较好的防治效果。在



接种前5 d灌根,混合液对松材线虫病防治效果为50%,与甲维盐防效相当,但高于高效抗生素(17%) ( $P<0.05$ )。在接种前2 d灌根,混合液对松材线虫病的防治效果为50%,高于甲维盐(33%)或高效抗生

素(17%) ( $P<0.05$ )。在接种当天灌根,混合液对松材线虫病的防治效果为25%,高于甲维盐(17%)或高效抗生素(0%) ( $P<0.05$ ),表明在一定条件下,甲维盐和高效抗生素混合,可提高松材线虫病的防治效果。

表4 不同施用时间下甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的防治效果

Table 4 Control effects of emamectin benzoate and high-efficiency antibiotics on the pine wilt disease under different application time

施药时间 Application time	药剂 Chemicals	感病指数 Disease index				感病率/% Disease incidence	死亡率/% Mortality	防治效果/% Control effect
		1 d	3 d	5 d	7 d			
接种前5 d 5 days before vaccination	抗生素 Antibiotics	16	50	83	83	83	83	17d
	甲维盐 Emamectin benzoate	0	0	17	50	50	50	50a
	混合液 Mixture	0	17	33	50	50	50	50a
接种前2 d 2 days before vaccination	抗生素 Antibiotics	50	67	83	83	83	83	17d
	甲维盐 Emamectin benzoate	0	17	33	67	67	67	33b
	混合液 Mixture	17	17	21	50	50	50	50a
接种当天 On the day of vaccination	抗生素 Antibiotics	33	83	88	100	100	100	0e
	甲维盐 Emamectin benzoate	33	67	75	83	83	83	17d
	混合液 Mixture	33	67	71	75	67	67	25c
	CK1	17	33	88	100	100	100	-
	CK2	17	67	83	100	100	100	-
	CK3	50	67	75	100	100	100	-
	CK4	0	0	0	0	0	0	-

注 Note:感病率、死亡率和防治效果为接种携带细菌AMA3-1的松材线虫7 d测得;同列后不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。The susceptibility, mortality and control effect were measured 7 days after inoculation with *B. xylophilus* carrying AMA3-1. Different letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ). CK1:接种前5 d施无菌水 Sterile water applied 5 days before vaccination;CK2:接种前2 d施无菌水 Sterile water applied 2 days before vaccination;CK3:接种当天施无菌水 apply sterile water on the day of vaccination;CK4:施无菌水接种无菌水 Application of sterile water after inoculation with sterile water.

2) 不同施用浓度下甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的防治效果。接种松材线虫后第7天,对照组CK1的马尾松苗全部死亡,空白对照组CK2仍然保持健康(表5)。此时,用质量浓度为500、250和62.5 mg/L的甲维盐处理对松材线虫病的防治效果分别是50%、29%和17%,用500、250和62.5 mg/L的混合液处理对松材线虫病的防治效果分别为50%、33%和17%,表明随着药剂浓度的增加,甲维盐或混合液对松材线虫病具有较好的防治效果。3种浓度处理下,混合液对松材线虫病的防治效果与甲维盐相比无显著差异( $P>0.05$ ),但显著高于高效抗生素处理( $P<0.05$ ),表明与高效抗生素相比,甲维盐或混合液对松材线虫病具有较好的防治效果。

### 3 讨论

不同地区、不同寄主松树上的松材线虫携带的细菌种类和数量有所不同<sup>[18]</sup>。针对松材线虫携带的细菌已有较多的研究<sup>[19-21]</sup>,但并没有发现松材线虫与细菌之间存在特异性和专一性,哪些细菌在松材线虫病发生中发挥着重要的作用没有定论。本研究从安徽省感病黑松的松材线虫(AMA3)虫体上分离到3株细菌:AMA3-1、AMA3-2和AMA3-3,发现这3株细菌均能促进松材线虫存活率和繁殖量,并且经接种试验发现混合接种松材线虫和3株细菌中的任何1株均能使马尾松苗发病速度快于单独接种松材线虫,说明松材线虫携带的3株细菌均能加重松材线虫病的发生,加速马尾松的死亡。相比AMA3-2和AMA3-3,AMA3-1对松材线虫的存活率、繁殖量和

表5 不同施用浓度下甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的防治效果

Table 5 Control effects of emamectin benzoate and high-efficiency antibiotics on the pine wilt disease at different application concentrations

质量浓度/(mg/L) Concentration	药剂 Chemicals	感病指数 Disease index				感病率/% Disease incidence	死亡率/% Mortality	防治效果/% Control effect
		1 d	3 d	5 d	7 d			
500	抗生素 Antibiotics	17	50	83	83	83	83	17c
	甲维盐 Emamectin benzoate	0	0	17	50	50	50	50a
	混合液 Mixture	0	17	33	50	50	50	50a
250	抗生素 Antibiotics	0	33	67	100	100	100	0d
	甲维盐 Emamectin benzoate	17	50	67	71	83	67	29b
	混合液 Mixture	17	38	50	67	67	67	33b
62.5	抗生素 Antibiotics	50	50	83	100	100	100	0d
	甲维盐 Emamectin benzoate	33	58	67	83	83	83	17c
	混合液 Mixture	17	25	67	83	83	83	17c
	CK1	17	33	88	100	100	100	-
	CK2	0	0	0	0	0	0	-

注 Note:CK1:施无菌水 Sterile water;CK2:施无菌水接种无菌水 Application of sterile water after inoculation with sterile water.

病害发生方面具有更好的促进作用。有研究表明,在寄主体内,致病细菌通过调节自身的代谢途径,如降解苯甲酸和松萜类物质,帮助线虫降解松树自身产生的保护物质,提高线虫的适应性,从而使松材线虫更能适应松树体内复杂的环境<sup>[22-23]</sup>;松材线虫感染松树后,松树体内氧化应激反应会增强<sup>[24]</sup>,而松材线虫伴生细菌可以提高松材线虫抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫的能力,从而加重病害的发生<sup>[25]</sup>;松材线虫伴生细菌能够产生致萎毒素,如苯乙酸<sup>[26]</sup>、绿脓杆菌螯铁蛋白<sup>[27]</sup>、环二肽<sup>[28]</sup>和鞭毛蛋白<sup>[29]</sup>等对寄主产生毒害作用,这些可能是细菌协助松材线虫致萎寄主的原因。但松材线虫病致病机制比较复杂,细菌在松材线虫病发生和发展中所起到的作用有待明确。本研究中,AMA3-1在提高松材线虫存活率、繁殖量和加重病害方面表现出更好的作用,这可能是由于AMA3-1与松材线虫之间具有更好的协同作用。

鉴于AMA3-1在加重松材线虫病方面有较显著作用,本研究以AMA3-1为研究对象,对其进行药敏试验,结果筛选出抑菌效果较好的环丙沙星和米诺环素2种高效抗生素。环丙沙星属于喹诺酮类抗生素,通过抑制细菌DNA的复制来杀灭细菌。米诺环素属于四环素类抗生素,通过抑制细菌蛋白质合成达到抑菌目的。如果将2种类型的抗生素混合使用,将取得更好的抑菌效果。通过甲维盐抑菌试验可

知,甲维盐对AMA3-1没有抑制作用。杀线试验中,甲维盐对松材线虫具有较高的毒杀作用,高效抗生素对其无明显的毒杀作用。通过甲维盐和高效抗生素混合应用于松材线虫病防治试验可知,当药剂质量浓度为500 mg/L时,在混合接种松材线虫和AMA3-1前2 d(当天)根施混合液、甲维盐和高效抗生素对松材线虫病的防治效果分别是50%(25%)、33%(17%)和17%(0%)。说明在松材线虫病防治方面,杀线剂(甲维盐)发挥主效作用,高效抗生素虽无法直接对松材线虫起到毒杀作用,但是通过控制松材线虫携带细菌AMA3-1的种群数量,可以提高杀线剂(甲维盐)对松材线虫病的防治效果,张志超等<sup>[6]</sup>和杨耀长等<sup>[8]</sup>也得到了相似的结论。因此,利用杀线剂和杀菌剂复配对松材线虫病进行防治可能不失为一个好的手段。

松材线虫与其携带的相关细菌可能存在某种营养共生关系。谈家金等<sup>[30-31]</sup>从松材线虫体上分离到松材线虫伴生细菌坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)GD1,且GD1可延长松材线虫的存活时间,促进其繁殖,并且发现单独接种松材线虫或GD1松枝不发病,而携带GD1的松材线虫可使病害发生。赵博光等<sup>[32]</sup>发现松材线虫优势伴生细菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)能够促进松材线虫产卵、繁殖和虫体



生长发育。何龙喜等<sup>[33]</sup>发现松材线虫携带细菌嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)在非寄生条件下对松材线虫繁殖量具有一定的负调控作用,但可增强松材线虫致病力,加速寄主松树的死亡。本研究再次证明了细菌在松材线虫病中的重要作用,展现了应用抗生素和甲维盐控制该病的良好前景。但本研究由于采用灌根法进行松材线虫病的防治试验,药剂被寄主的吸收情况可能影响到防治效果。考虑到打孔注药技术的高效性、经济性和环保性,在今后的试验中,可以采用打孔注药向林间大树注入甲维盐和抗生素,进一步研究其对林间松材线虫病的防治效果。

### 参考文献 References

- [1] OKU H, SHIRAIISHI S, OUCHI S, et al. Pine wilt toxin, the metabolite of a bacterium associated with a nematode[J]. Naturwissenschaften, 1980, 67(4): 198-199.
- [2] 洪英娣, 赵博光, 曹越, 等. 松材线虫携带细菌的致病性[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(2): 45-48. HONG Y D, ZHAO B G, CAO Y, et al. Pathogenicity of bacteria carried by pine wood nematodes[J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2003, 27(2): 45-48 (in Chinese with English abstract).
- [3] 陈阳雪, 赵晓佳, 谈家金. 松材内生细菌GD2对松材线虫入侵寄主时转录组的影响[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(5): 37-45. CHEN Y X, ZHAO X J, TAN J J, et al. Effect of *Bacillus cereus* GD2 on transcriptome of pine wood nematode invading host [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(5): 37-45 (in Chinese with English abstract).
- [4] 王华光, 李良, 巨云为, 等. 鞭毛蛋白毒素导致的黑松超微结构病理学变化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(6): 137-144. WANG H G, LI L, JU Y W, et al. Pathological changes in ultrastructure of the *Pinus thunbergii* due to flagellin toxin[J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2018, 42(6): 137-144 (in Chinese with English abstract).
- [5] 赵博光, 高蓉, 巨云为, 等. 抗生素对松材线虫病的影响[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(4): 75-77. ZHAO B G, GAO R, JU Y W, et al. Effects of antibiotics on the pine wilt disease[J]. Journal of Nanjing Forestry University, 2000, 24(4): 75-77 (in Chinese with English abstract).
- [6] 张志超, 许忠祥, 叶兼菱, 等.  $\alpha$ -三嗪吩和抗生素对松材线虫运动性的影响[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(5): 914-919. ZHANG Z C, XU Z X, YE J L, et al. Inhibitory effects of  $\alpha$ -terthienyl and antibiotics on dispersal ability of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2013, 35(5): 914-919 (in Chinese with English abstract).
- [7] 陈燕, 谈家金, 冯志新. 水合霉素对松材线虫病的影响[J]. 四川林业科技, 2004, 25(4): 7-10. CHEN Y, TAN J J, FENG Z X. Effect of oxytetracycline hydrochloride on pine wood nematode disease[J]. Journal of Sichuan forestry science and technology, 2004, 25(4): 7-10 (in Chinese with English abstract).
- [8] 杨耀长, 张志超, 王卫东, 等.  $\alpha$ -三嗪吩和恶唑酸混合应用对松材线虫病的防治作用[J]. 西部林业科学, 2021, 50(2): 93-98. YANG Y C, ZHANG Z C, WANG W D, et al. The effect of mixed application of terthienyl and oxolinic acid on *Bursaphelenchus xylophilus* disease[J]. Journal of west China forestry science, 2021, 50(2): 93-98 (in Chinese with English abstract).
- [9] KWON H R, CHOI G J, CHOI Y H, et al. Suppression of pine wilt disease by an antibacterial agent, oxolinic acid[J]. Pest management science, 2010, 66(6): 634-639.
- [10] 蒲小明, 王爱臣, 林壁润, 等. 5%甲维盐水分散粒剂防治鳞翅目害虫田间效果[J]. 广东农业科学, 2021, 48(4): 106-110. PU X M, WANG A C, LIN B R, et al. Control effect of 5% emamectin benzoate water dispersible granule against lepidoptera pests in field [J]. Guangdong agricultural sciences, 2021, 48(4): 106-110 (in Chinese with English abstract).
- [11] LEE S C, LEE H R, KIM D S, et al. Emamectin benzoate 9.7% SL as a new formulation for a trunk-injections against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of forestry research, 2020, 31(4): 1399-1403.
- [12] SOUSA E, NAVES P, VIEIRA M. Prevention of pine wilt disease induced by *Bursaphelenchus xylophilus* and *Monochamus galloprovincialis* by trunk injection of emamectin benzoate [J]. Phytoparasitica, 2013, 41(2): 143-148.
- [13] 张欣伟, 韩群琦, 汪天娜, 等. 注干用10%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐可溶粒剂的研制及对松材线虫病的防治效果[J]. 农药学报, 2019, 21(4): 538-544. ZHANG X W, HAN Q Q, WANG T N, et al. Preparation of 10% emamectin benzoate soluble granule for trunk injection and its control efficacy on pine wilt disease [J]. Chinese journal of pesticide science, 2019, 21(4): 538-544 (in Chinese with English abstract).
- [14] 朱丽华, 章欣月, 夏馨蕊, 等. 无细菌松材线虫对马尾松的致病性[J]. 林业科学, 2020, 56(7): 63-69. ZHU L H, ZHANG X Y, XIA X R, et al. Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus* on *Pinus massoniana* [J]. Scientia silvae sinicae, 2020, 56(7): 63-69 (in Chinese with English abstract).
- [15] 谈家金, 杨荣铮, 吴慧平. 不同地理种群的松材线虫对马尾松的致病力差异[J]. 植物检疫, 2000, 14(6): 324-325. TAN J J, YANG R Z, WU H P. Difference of virulence of several geographical populations of *Bursaphelenchus xylophilus* to *Pinus massoniana* [J]. Plant quarantine, 2000, 14(6): 324-325 (in Chinese with English abstract).
- [16] 翁启勇, 陈庆河, 赵健, 等. 利福平标记菌株BS1在番茄、茄子根部及土壤中的定殖动态[J]. 福建农业学报, 2003, 18(2): 87-88. WENG Q Y, CHEN Q H, ZHAO J, et al. Colonization of BS1 marked with rifampicin on roots and in root zone soil of tomato and eggplant [J]. Fujian journal of agricultural sciences, 2003, 18(2): 87-88 (in Chinese with English abstract).
- [17] XUE Q, WU X Q, WU F, et al. Transcriptome analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* uncovers the impact of *Stenotrophomon-*

- as maltophilia* on nematode and pine wilt disease[J/OL]. Forests, 2020, 11(9): 908 [2021-12-09]. <https://doi.org/10.3390/f11090908>.
- [18] 闫闯, 陈元生, 黄名广. 松材线虫的伴生微生物及其致病性研究概述[J]. 林业科技通讯, 2021(2): 24-30. YAN C, CHEN Y S, HUANG M G. Review on the companion microorganisms of pathogenicity of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Forest science and technology, 2021(2): 24-30 (in Chinese).
- [19] 巨云为, 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. JU Y W, XIE L Q, YANG X Y, et al. Varieties of bacteria carried by pine wood nematode from different sources[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2008, 36(5): 84-85 (in Chinese with English abstract).
- [20] 贲爱玲, 郑敬荣, 朱若箐, 等. 不同国家松材线虫体表携带优势细菌种类及其毒性[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(1): 89-91, 112. BEN A L, ZHENG J R, ZHU R Q, et al. Species and toxicity of predominant bacteria carried by *Bursaphelenchus xylophilus* from different countries[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2011, 39(1): 89-91, 112 (in Chinese with English abstract).
- [21] 伏艳美. 松材线虫体内细菌多样性及对宿主抗氧化作用研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2015. FU Y M. Diversity of endobacteria from pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and antioxidant effect to their host[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [22] 田雪亮. 松材线虫和拟松材线虫伴生细菌多样性及生态功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010. TIAN X L. Diversity and ecological role of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [23] CHENG X Y, TIAN X L, WANG Y S, et al. Metagenomic analysis of the pine wood nematode microbiome reveals a symbiotic relationship critical for xenobiotics degradation[J/OL]. Scientific reports, 2013, 3: 1869 [2021-12-09]. <https://doi.org/10.1038/srep01869>.
- [24] 何龙喜, 吴小芹, 俞禄珍. 不同松树与松材线虫互作中超氧自由基差异与病变的关系[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2011, 35(2): 25-30. HE L X, WU X Q, YU L Z. The relationship between difference of superoxide anion and lesion in the interaction of different varieties of pines and *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural science edition), 2011, 35(2): 25-30 (in Chinese with English abstract).
- [25] VICENTE C S L, IKUYO Y, MOTA M, et al. Pine wood nematode-associated bacteria contribute to oxidative stress resistance of *Bursaphelenchus xylophilus* [J/OL]. BMC Microbiology, 2013, 13: 299 [2021-12-09]. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-299>.
- [26] KAWAZU K, ZHANG H, KANZAKI H. Accumulation of benzoic acid in suspension cultured cells of *Pinus thunbergii* parl. in response to phenylacetic acid administration [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1996, 60(9): 1410-1412.
- [27] DANG Q L, SON S W, CHEON H M, et al. Pyochelin isolated from *Burkholderia arboris* KRICT1 carried by pine wood nematodes exhibits phytotoxicity in pine callus [J]. Nematology, 2011, 13(5): 521-528.
- [28] GUO Q Q, GUO D S, ZHAO B G, et al. Two cyclic dipeptides from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A carried by the pine wood nematode and their toxicities to Japanese black pine suspension cells and seedlings *in vitro* [J]. Journal of nematology, 2007, 39(3): 243-247.
- [29] XU Z Q, YU J, CUI L M, et al. Effects of *Pseudomonas fluorescens* flagellin on physiological and biochemical characteristics in the suspension cells of *Pinus thunbergii* [J]. European journal of plant pathology, 2013, 136(4): 729-736.
- [30] 谈家金, 冯志新. 2个细菌菌株对松材线虫存活与繁殖的影响[J]. 植物病理学报, 2003, 33(6): 557-558. TAN J J, FENG Z X. Effect of two bacteria strains on the survival and reproduction of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Acta phytopathologica sinica, 2003, 33(6): 557-558 (in Chinese with English abstract).
- [31] 谈家金, 向红琼, 冯志新. 松材线虫伴生细菌的分离鉴定及其致病性[J]. 林业科技开发, 2008, 22(2): 23-26. TAN J J, XIANG H Q, FENG Z X. A preliminary study on isolation, identification and pathogenicity of the bacterium accompanying *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. China forestry science and technology, 2008, 22(2): 23-26 (in Chinese with English abstract).
- [32] 赵博光, 刘玉涛, 林峰. 松材线虫与其携带细菌之间的相互影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2005, 29(3): 1-4. ZHAO B G, LIU Y T, LIN F. Mutual influences between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria carries [J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2005, 29(3): 1-4 (in Chinese with English abstract).
- [33] 何龙喜, 薛旗, 吴小芹. 松材线虫体内细菌对宿主繁殖和致病力的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2016, 40(3): 47-51. HE L X, XUE Q, WU X Q. Effects of endobacteria on reproduction and virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of Nanjing Forestry University (natural sciences edition), 2016, 40(3): 47-51 (in Chinese with English abstract).

## Control effect of emamectin benzoate and antibiotic mixture on pine wilt disease

ZHAO Xiaojia, YUAN Yuchao, SUN Yufeng, YE Jianren, TAN Jiajin

College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

**Abstract** In order to further clarify the role of bacteria in pine wilt disease and control effect of emamectin benzoate and antibiotic mixture on the disease, strains, which can significantly promote survival and reproduction of nematode and aggravating the disease, were screened from bacteria carried by *Bursaphelenchus xylophilus*. High-efficiency antibiotics were screened from 30 kinds of antibiotics by testing their antibiotic activity to the screened disease-related bacteria, and the inhibitory effect of emamectin benzoate on the disease-related bacteria was studied. The toxicity of high-efficiency antibiotics and emamectin benzoate mixture to *B. xylophilus* and the control effect of the mixture on pine wilt disease of 6-month-old *Pinus massoniana* seedlings was determined by the immersion method and the root filling method, respectively. The results showed that compared with strains AMA3-2 and AMA3-3, strain AMA3-1 had a better promoting effect on the survival, reproduction of the nematode and the disease. Ciprofloxacin and minocycline had better antibacterial activity against AMA3-1, but emamectin benzoate had no inhibitory effect on AMA3-1. When the mixture or emamectin benzoate was 500 mg/L, the mortality rate of *B. xylophilus* could reach more than 80%. While the corrected mortality of *B. xylophilus* maintained at a low level (0.74%-2.43%) under the treatment of different concentration of high-efficiency antibiotics. When the concentration was 500 mg/L, and application time was 2 days before inoculation (on the day of inoculation) with the mixture of *B. xylophilus* and AMA3-1, the control effect of the mixture of emamectin benzoate and high-efficiency antibiotics on the disease was 50% (25%), while that of emamectin benzoate was 33% (17%) and high-efficiency antibiotics was 17% (0%). The results showed that emamectin benzoate or its mixture had high toxicity to *B. xylophilus*, but antibiotics had no killing effect. Under certain conditions, the mixture of emamectin benzoate and antibiotic can improve the control effect on pine wilt disease.

**Keywords** *Bursaphelenchus xylophilus*; emamectin benzoate; high-efficiency antibiotics; pine wilt disease; bacteria

(责任编辑:边书京)