

文章编号:1001-1498(2014)02-0174-05

内寄生真菌 *Esteya vermicola* 对松材线虫 侵染活力的测定

杜 婷¹, 张永安^{1*}, 王玉珠¹, 曲良建¹, 王青华¹, 李占林²

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护重点实验室, 北京 100091;
2. 内蒙古赤峰市松山区岗子乡林业站, 内蒙古 赤峰 024051)

摘要:从不同培养基、不同测定方法、不同菌株、不同孢子浓度 4 个方面测定内寄生真菌 *Esteya vermicola* 孢子对松材线虫的侵染活力, 结果表明: 该真菌离体分生孢子对松材线虫有侵染活力; PDA 固体培养比 PDB 液体培养所得孢子能更有效的粘附和杀死松材线虫; 在 WA 平板上, 采用浸渍法测定孢子对线虫的侵染活力比其他处理效果好; 在供试的 3 个菌株(CUN 120806、CBS 10082 和 CBS 115803)中, CBS 115803 菌株对松材线虫具有较高侵染活性; 4 个不同浓度(1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 个·mL⁻¹)孢子对线虫的作用中, 随着孢子浓度降低, 孢子对线虫侵染能力也随之降低。

关键词: *Esteya vermicola*; 松材线虫; 侵染活力测定
中图分类号: S718.8 文献标识码: A

Infectivity Test on *Esteya vermicola* Conidia Against Pine Wood Nematode

DU Ting¹, ZHANG Yong-an¹, WANG Yu-zhu¹, QU Liang-jian¹, WANG Qing-hua¹, LI Zhan-lin²

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Gangzi Forestry Station of Songshan District, Chifeng 024051, Inner Mongolia, China)

Abstract: To explore the infect effectiveness of *Esteya vermicola* conidia shed from the conidiogenous cells to pine wood nematodes, an infectivity test was conducted from different methods, different strains and different conidia concentrations. The results showed that although the conidia shed from the conidiogenous cells, they are still able to infect pinewood nematodes. In addition, the conidia had better effectiveness on pine wood nematodes by taking immersion method than other treatments. The strains CBS 115803 had higher infect effectiveness among 3 tested strains. The adherence and mortality rate fell with the decreasing of the initial conidia concentration. These results could be used as references for application conidia to control pine wood nematode and laid basis for further researches.

Key words: *Esteya vermicola*; *Bursaphelenchus xylophilus*; infectivity test

松材线虫病是一种由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Burher))引起的松树快速枯萎死亡、连片毁灭的森林病害,一旦侵害,蔓延速度快、防治难度大、危害严重,能造成松树短期内死亡,现已被列为重要的危险性森林病害,松材线虫被 40 多

个国家立法为重点防疫对象^[1]。松材线虫主要通过天牛成虫在健康树上补充营养和在衰弱树上产卵所造成的伤口侵入寄主松树体内,取食木质部薄壁细胞和杀死皮层细胞^[2]。目前,虽然利用生防菌^[2-6]如天敌真菌、产毒真菌、虫生真菌及细菌等防治松材

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 国家林业局 948 项目“松材线虫内寄生真菌菌株及生产技术引进”(2012-4-70)

作者简介: 杜 婷(1988—),女,云南丽江人,硕士。Email: duting_x_y@163.com

线虫的研究报道较多,但由于松材线虫的隐蔽性,直接针对松材线虫的防治研究较少,其中,直接利用真菌孢子侵染松材线虫的活力测定未见报道。

Esteya vermicola (J. Y. Liou, J. Y. Shih & Tzean) 是世界上第一个被报道的松材线虫内寄生真菌,其能产生新月形和杆状两种形态的分生孢子,仅新月形孢子能粘附并侵染松材线虫。平板生测显示该菌对松材线虫有很高的侵染活力,3~7 d 内能杀死全部的被测线虫^[7]。基于现有的平板生测结果和相似真菌孢子用于防治松材线虫的实例^[8],本实验针对该内寄生真菌 *E. vermicola* 孢子对松材线虫的粘附侵染作用进行试验,以图寻找控制松材线虫更直接的方法,并为以后是否能采用该真菌孢子悬浮液进行松材线虫防治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试真菌为3个 *E. vermicola* 菌株,分别为 CNU 120806、CBS 100821 和 CBS 115803,由韩国国立忠南大学成昌根教授惠赠,在本实验室 4 ℃ 斜面保存。

供试松材线虫由中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所汪来发老师实验室提供,在本实验室利用多毛孢 *Pestalotia* sp. 培养繁殖以供试验用。

1.2 试验方法

1.2.1 真菌 *E. vermicola* 孢子悬浮液的制备 将实验室保存于斜面上的真菌 *E. vermicola* 转接到 PDA 培养基上,于 26 ℃ 恒温培养箱中培养 2 周后备用。取菌落生长旺盛的平板,用无菌吐温-80 溶液(0.05%)从培养好的平板上洗下分生孢子,装入 50 mL 离心管中,置于漩涡振荡器上充分振荡,使孢子从菌丝上脱落悬浮于溶液中。2 种培养方式获得的真菌悬浮液经抽滤装置过滤得到纯的孢子悬浮液,用血球计数板确定孢子浓度,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 不同菌株孢子悬浮液对松材线虫侵染活力的测定 将 PDA 培养得到的 3 个供试菌株孢子悬浮液分别采用浸渍法在 WA 平板上测定其对松材线虫的侵染活力。浸渍法:在直径 5 cm 小培养皿中加入 200 μL 线虫悬浮液(约 500 头),再加入 500 μL 初始浓度为 1×10^7 个·mL⁻¹ 的孢子悬浮液,混匀。每个处理 3 个重复,对照(CK)加入 500 μL 无菌水。置于 26 ℃ 培养箱中,分别于 1、2、4、6、8、10、12、24 h 和 2、3、4、5、6 d 在光学显微镜下分别观察记录起初观察到的 100 头线虫中被孢子粘附的线虫数量和死

亡线虫数量。以线虫体表被新月形孢子粘附且在线虫活动过程中不脱落视为被孢子粘附线虫;以线虫体表长出菌丝的视为死亡线虫。该试验中,以孢子对线虫的粘附率和死亡率作为判定侵染活力的 2 个指标。按以下公式计算该真菌孢子对松材线虫的粘附率和死亡率。

$$\text{线虫粘附率} = (\text{被粘附线虫数} / \text{线虫总数}) \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = (\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}) / (1 - \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

1.2.3 不同测定方法下孢子悬浮液对松材线虫侵染活力的测定 采用浸渍法和喷雾法分别在 WA 和无 WA 的培养皿中测定菌株 CBS 115803 真菌孢子悬浮液对松材线虫的侵染活力。喷雾法:在直径 5 cm 小培养皿中加入 200 μL 线虫悬浮液(约 500 头),用喉头喷雾器将初始浓度为 1×10^7 个·mL⁻¹ 的孢子悬浮液喷洒到线虫表面,使喷雾量约为 500 μL,混匀。每个处理 3 个重复,对照(CK)加入 500 μL 无菌水。浸渍法操作及观测方法同 1.2.2 节。

1.2.4 不同浓度孢子悬浮液对松材线虫的毒力测定 采用浸渍法在 WA 平板上测定不同浓度菌株 CBS 115803 真菌孢子悬浮液对松材线虫的侵染活力。操作方法和观测方法同 1.2.2 节,使其中孢子悬浮液的初始浓度分别为 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 个·mL⁻¹。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析,最小显著差数法(LSD, $P = 0.05$)进行处理间显著性检验,并用 Microsoft Excel 2007 软件作图。图中数据采用平均值 ± 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 不同菌株孢子对松材线虫侵染活力的测定

不同菌株孢子对松材线虫侵染活力的测定结果表明:菌株 CBS 115803 对松材线虫的侵染活力明显比其他菌株的高($P < 0.05$),另外 2 个菌株之间在侵染活力上差异不显著。

在培养开始的 1 h,除菌株 CNU 120806 孢子未粘附线虫外,其他菌株孢子均能粘附线虫。随着培养时间的延长,粘附率呈平缓的直线增长趋势,到 12 h 时均达到最大值,菌株 CBS 115803 孢子对线虫的粘附效果最好,粘附率达 43.22% (图 1)。从图 2 中也能明显的看到不同菌株孢子对松材线虫的粘附情况。

培养2 d后,除被菌株 CBS 115803 孢子粘附的线虫开始死亡外,未观察到其他菌株孢子粘附线虫死亡的情况。在培养的6 d中,被 CNU 120806 和 CBS 100821 菌株孢子粘附的线虫死亡率均低于10%且变化不明显,而线虫被菌株 CBS 115803 孢子粘附后第6天死亡率高达33.62% (图3)。被粘附的线虫2 d后其体表开始有菌丝长出,3、4 d后菌丝开始生长,分枝,蔓延,6 d后长出的菌丝继续产孢进行二次生长(图4)。

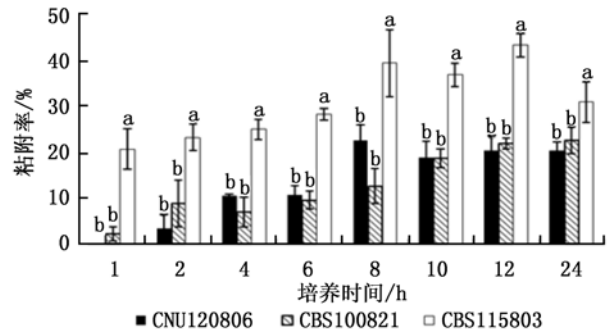


图1 E. vermicola 不同菌株孢子对 B. xylophilus 的粘附率

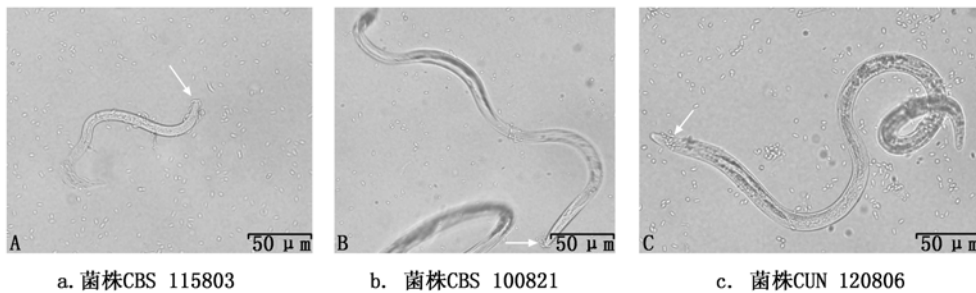


图2 不同 *Esteya vermicola* 菌株孢子对松材线虫的粘附情况

2.2 不同测定方法下孢子对松材线虫侵染活力的测定

采用浸渍法和喷雾法分别在 WA 和无 WA 的培养皿上进行 E. vermicola CBS 115803 孢子悬浮液对松材线虫侵染活力的测定,从图5、6中可知其离体孢子能粘附并杀死松材线虫。

从孢子对线虫的粘附作用来看,采用浸渍法时,试验是否在 WA 上进行对孢子粘附线虫的影响不大,但采用喷雾法时,培养6 d后,试验是否在 WA 上进行则显著影响孢子粘附率。采用浸渍法测定得到的孢子粘附率明显比喷雾法的高。随着培养时间的延长,培养12 h后各处理中粘附率均达到一个高峰,其中,采用浸渍法在 WA 上处理的孢子对线虫的

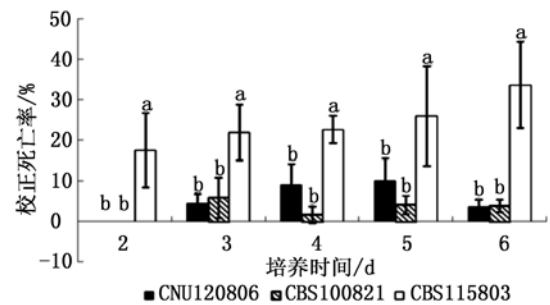


图3 E. vermicola 不同菌株孢子对 B. xylophilus 的校正死亡率

粘附效果最好,粘附率达44.01%,而采用喷雾法在无 WA 上处理的孢子对线虫的粘附效果最差,粘附率仅11.72%。

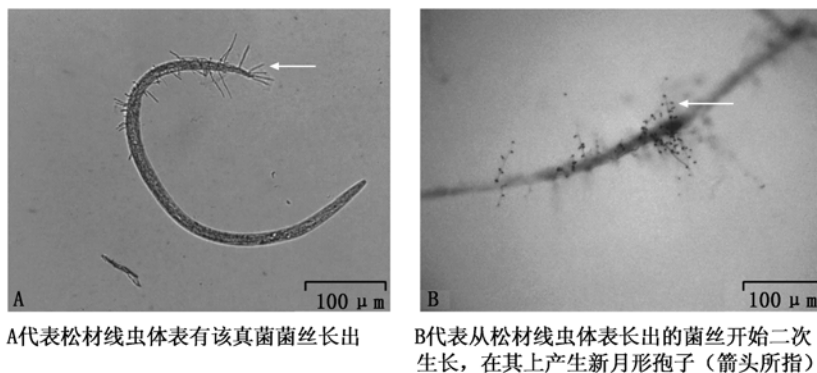


图4 松材线虫被真菌 *Esteya vermicola* 致死的情况

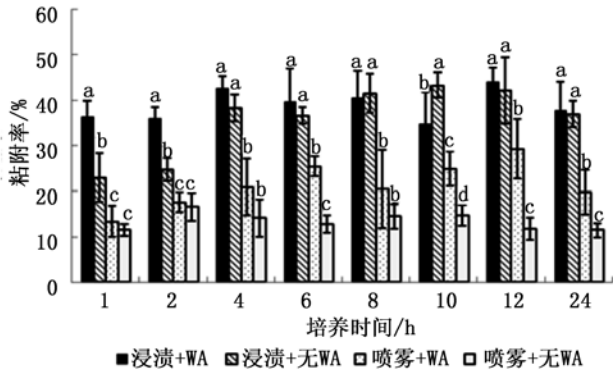


图5 不同方法测定 *E. vermicola* 孢子对 *B. xylophilus* 的粘附率

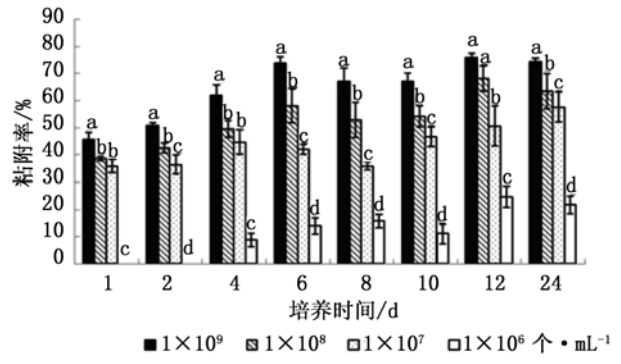


图7 不同浓度 *E. vermicola* 孢子对 *B. xylophilus* 的粘附率

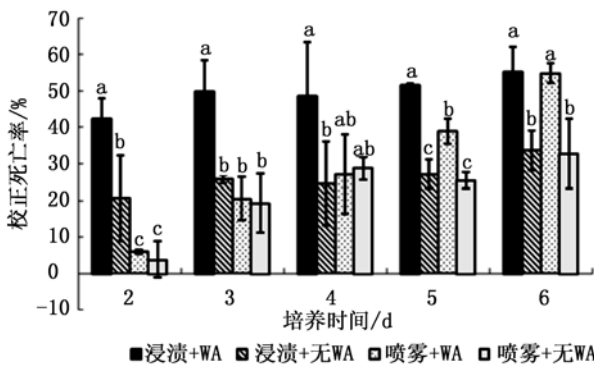


图6 不同方法测定 *E. vermicola* 孢子对 *B. xylophilus* 的校正死亡率

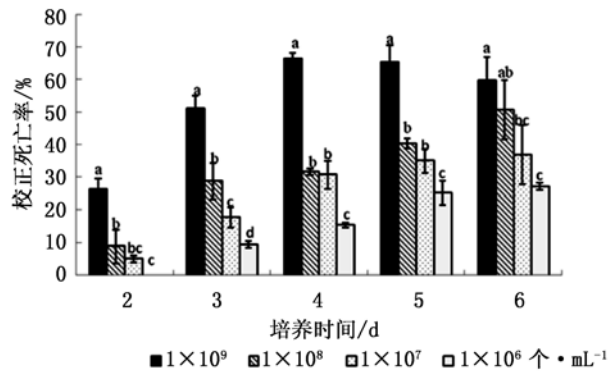


图8 不同浓度 *E. vermicola* 孢子对 *B. xylophilus* 的校正死亡率

培养 1 d 后,被孢子粘附的线虫开始死亡,相应的,采用浸渍法在 WA 上处理的线虫死亡率明显比其他处理的高 ($P < 0.05$),采用喷雾法在无 WA 上处理的孢子杀死线虫的效果最差。随着时间延长,除喷雾法在 WA 上处理的线虫死亡率呈直线上升趋势外,其他处理均无明显变化,但培养 6 d 后,因孢子粘附引起的线虫死亡率达到高峰。由图 5、6 可看出:孢子粘附效果好的处理其死亡率也相应较高,反之亦然,但其中采用喷雾法在 WA 上的处理未遵循该规律,死亡率跃居第二,几乎跟浸渍法在 WA 上的处理持平,达 55% 以上。

2.3 不同浓度孢子对松材线虫的侵染活力测定

采用浸渍法在 WA 平板上测定不同浓度孢子悬浮液对松材线虫的侵染活力(图 7、8),随着孢子浓度的降低,孢子对线虫的粘附和杀死能力都随之降低。

在培养的 24 h 内,孢子浓度为 1×10^9 个 \cdot mL^{-1} 的处理中,孢子对线虫的粘附能力明显比其他处理的强 ($P < 0.05$)。培养 1 h 后,除浓度为 1×10^6 个 \cdot mL^{-1} 处理中线虫未被孢子粘附外,其他处理中线虫均被孢子粘附。随着培养时间的延长,被孢子粘附的线虫比例缓慢增加,到 12 h 时,所有处理的孢子粘附率均达到高峰,孢子浓度为 1×10^9 个 \cdot mL^{-1} 处理的孢子粘附率高达 75.98%,比其他所有

处理的都大,浓度为 1×10^6 个 \cdot mL^{-1} 的孢子粘附率最低,仅达 24.65%,到 24 h 时粘附率保持相对稳定。

线虫死亡率变化趋势与粘附率的相似,浓度为 1×10^9 个 \cdot mL^{-1} 的孢子杀死线虫率明显比其他孢子浓度的高,且在培养 4 d 后达最大死亡率(66.49%),其他处理均在培养 6 d 后线虫死亡率达最大。孢子浓度为 1×10^6 个 \cdot mL^{-1} 的处理培养 2 d 后没有观察到死亡线虫,6 d 后死亡率也仅有 27.1%。

各浓度孢子对线虫的粘附速度相似,但高浓度孢子对线虫的杀死速度比低浓度孢子处理的快。

3 结论与讨论

本文通过不同测定方法、不同菌株、不同孢子浓度 3 个方面的试验证明了内寄生真菌 *E. vermicola* 从产孢细胞上脱落的分生孢子对松材线虫有侵染活力,被粘附的线虫 2 d 后其体表开始有菌丝长出,3、4 d 后菌丝开始生长,分枝,蔓延,6 d 后长出的菌丝继续产孢进行二次生长,室温放置 8~10 d 后线虫完全消解。

根据以往研究报道表明,关于该种真菌对松材线虫的侵染活力测定均是在真菌菌落上进行的,其中,粘附和杀死线虫的孢子均仍着生于产孢梗上。

在菌株 CBS 115803 菌落上接种线虫 24 h 后的粘附率达 100%, 4 d 后死亡率也达 100%^[9-10], 而与本试验中离体孢子对线虫的粘附率和死亡率相比, 离体的孢子对松材线虫的侵染力明显下降, 由此可看出, 脱离产孢梗的分生孢子虽然仍具有粘附作用, 但致病性相应降低。曾显雄等^[11]通过试验也得到了相似的结论, 其用挑针将菌株 ATCC 74485 菌落气生菌丝及孢子梗推倒, 或用刀背刮下粘性孢子再沾到 WA 培养基上, 发现粘附率仅为 4.5%, 表明 *E. vermicola* 新月形孢子是否着生于分生孢子梗, 对其粘附率有很大影响, 也说明离开分生孢子梗的孢子仍具有粘着能力。同样, 另一内部寄生真菌 *Hirsutella rhossiliensis* 也有类似特性, 自分生孢子梗上脱落的孢子就会失去病原性, 无法感染寄主^[12]。

尽管该真菌能产生两种形态的孢子, 仅有新月形孢子能侵染松材线虫, 因此, 真菌的侵染活力与新月形孢子的数量和比例直接相关, 新月形孢子越多, 侵染活力越高。不同菌株间孢子侵染活力的差异与新月形孢子的数量和比例相关, 但也不排除不同菌株产生的孢子本身所具有的侵染活力的高低有差异。本试验中采用的 3 个菌株中菌株 CBS 115803 离体孢子对松材线虫的粘附和杀死能力明显高于其他菌株, 此外该菌株产生新月形孢子的比例和数量最高, 其次是菌株 CBS 100821, 菌株 CNU 120806 的最低。在该试验中, 随着孢子浓度的降低, 松材线虫被粘附率和死亡率也随之降低。孢子浓度高的处理中, 单位面积孢子数量多且其中新月形孢子的数量也相对较多, 因此, 松材线虫被粘附的几率高且单个线虫体表粘附的孢子数量也较多, 之后引起的线虫死亡速度也比低浓度处理的快。根据 Wang 等^[13]在试验中采用 3×10^8 和 3×10^9 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的孢子悬浮液接种于因松萎蔫病致死的松树原木中, 2 个月后松材线虫数量分别降低 79% 和 47% 的结果表明, 高浓度的孢子液对松材线虫的影响作用更强。另外, 王松等^[14]采用绿僵菌 Mf 2 菌株测定对松材线虫的毒力试验结果也表明, 随着孢子浓度的降低, Mf 2 杀死线虫的能力降低。

本试验中采用浸渍和喷雾方式对松材线虫的侵染活力进行测定, 旨在室内试验该方法在野外喷雾进行松材线虫防治的可能性。虽然说喷雾时孢子悬浮液相对于浸渍法来说更直接的作用于松材线虫体表, 但从试验结果可知, 喷雾方式杀死线虫的效果明显低于浸渍方式。该结果可以从该真菌的侵染机制

来解释, 其中, 仅有新月形孢子能粘附到松材线虫体表, 而且新月形孢子只能进行凹面粘附, 即使喷雾方法很直接, 但是孢子是否能以凹面直接粘附到线虫体表依然是个未知数, 具体是什么原因造成这两种方法之间的差异, 需要进一步的研究。目前, 也有应用真菌 *E. vermicola* 孢子悬浮液进行松树树体试验的报道^[15]。在温室内喷洒孢子悬浮液 1 个月后的 4 龄松苗接种松材线虫, 发现松苗存活系数 (0.67) 比对照 (0.067) 高 10 倍。在一定程度上, 这些结果表明, 喷洒该真菌孢子悬浮液能保护松树免于松萎蔫病。

参考文献:

- [1] Dwinell L D. The pinewood nematode: regulation and mitigation[J]. *Annu Rev*, 1997, 35: 153 - 166
- [2] 柴希民, 蒋平. 松材线虫病的发生和防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 31 - 33
- [3] 李国红, 董锦艳, 莫明和, 等. 侧耳及相关菌对线虫的作用[J]. *中国生物防治*, 2001, 17(1): 26 - 29
- [4] 李国红, 张克勤. 一种新的杀线虫担子菌[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2001, 23(2): 149 - 152
- [5] 张立钦, 王松, 王勇军. 绿僵菌 Mf2 菌株对松材线虫的毒力测定[J]. *中国森林病虫*, 2012, 31(3): 41 - 43
- [6] 张林, 牛秋红, 董冰, 等. 松材线虫生防细菌的筛选、鉴定及其毒性因子的初步研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(8): 76 - 81
- [7] Liou J Y, Shih J Y, Tzena S S. *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan, attacking the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) [J]. *Mycol Res*, 1999, 103: 242 - 248
- [8] Saiki H, Saito T, Yoneda K, et al. Biological control of the pinewood nematode by spraying a nematode-trapping fungus [J]. *J Jap For Soc*, 1984, 66: 30 - 32
- [9] Wang C Y, Fang Z M, Sun B S, et al. High infectivity of an endoparasitic fungus strain, *Esteya vermicola*, against nematodes [J]. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46(4): 380 - 389
- [10] Wang C Y, Fang Z M, Wang Z, et al. High infection activities of two *Esteya vermicola* isolates against pinewood nematode [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(10): 581 - 584
- [11] 曾显雄, 刘瑞芬, 石如茵. 松材线虫新内部寄生菌 *Esteya vermicola* 之病原学、生理学及微细构造之探讨 [R]. 台行政院国家科学委员会专题研究计划成果报告, 1992, NSC90-2313-B-002-335
- [12] Mcinnis T M, Jaffee B A. An assay for *Hirsutella rhossiliensis* spore and the importance of phialides for nematode inoculation [J]. *J Nematol*, 1989, 21(2): 229 - 234
- [13] Wang Z, Wang C Y, Yang Z H, et al. Viability and pathogenicity of *Esteya vermicola* in pine trees [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2011, 21(4): 387 - 393
- [14] 张立钦, 王松, 王勇军. 绿僵菌 Mf2 菌株对松材线虫的毒力测定 [J]. *中国森林病虫*, 2012, 31(3): 41 - 43
- [15] Wang C Y, Fang Z M, Wang Z, et al. Biological control of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by application of the endoparasitic fungi *Esteya vermicola* [J]. *Biological Control*, 2011a, 56: 91 - 100