

季也蒙假丝酵母对松材线虫病的抑制作用

欧阳革成^{1,2}, 张润杰^{1*}

(1. 中山大学昆虫学研究所 生物防治国家重点实验室, 广州 510275; 2. 广东省昆虫研究所, 广州 510260)

摘要: 松材线虫病是重要的森林病害, 该病与松材线虫携带的病原菌和松树的内生病原菌密切相关。在室内条件下, 初步研究了从人工培养的松材线虫上分离到的菌株 C 对松材线虫病的抑制作用。在健康的水培马尾松枝上分别接种松材线虫接种液、菌株 C 接种液、松材线虫与菌株 C 的混合接种液。处理后松枝的相对重量与相对蒸腾强度均为: 接种菌株 C 的松枝 > 混合接种的松枝 > 接种线虫的松枝。处理后 15d 时, 接种线虫的松枝与混合接种的松枝的相对重量有显著性差异 ($p < 0.05$)。接种线虫松枝的存活期显著短于其它处理松枝的存活期 ($p < 0.05$)。接种菌株 C 的针叶褐变株数少于接种线虫的松枝, 两者有显著性差异 ($p < 0.05$)。从接种线虫和混合接种的所有松枝中都分离到松材线虫, 且分离出的线虫量没有显著性差异。将 8 个月生的断根马尾松苗插入菌株 C 的查彼培养液的滤液中培养, 6d 后松苗的平均感病指数和感病株率均显著少于对照 ($p < 0.05$)。这表明, 菌株 C 对松材线虫病有抑制作用, 菌株 C 培养液中产生的某些代谢物质有利于松苗的抗病和存活。菌株 C 可能抑制了松树上的内生病原菌和松材线虫携带的病原微生物, 或提高了松树的生长力和抗逆能力。经电子显微镜观察并参照 API 20 C AUX 鉴定系统鉴定, 菌株 C 为季也蒙假丝酵母 *Candida guilliermondii*。

关键词: 松树萎蔫病; 松材线虫; 季也蒙假丝酵母; 生物防治

文章编号: 1000-0933(2005)10-2658-04 中图分类号: Q938, Q948, S43, S763.1 文献标识码: A

Inhibitive effects of *Candida guilliermondii* on pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*

OUYANG Ge-Cheng^{1,2}, ZHANG Run-Jie^{1*} (1. Institute of Entomology & State Key Lab. for Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2 Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(10): 2658~2661.

Abstract: Pine wilt disease caused by pine wood nematodes, *Bursaphelenchus xylophilus*, is one of main forest disease. It was reported that pathogenic microbes accompanying pine wood nematodes and microbial endophytes of pine tree were involved in this disease. A primarily study on inhibitive effects of strain C, isolated from cultured pine wood nematodes, on pine wilt disease was carried out in the laboratory. Aquacultural exercised twigs of *Pinus massoniana* were inoculated with pine wood nematodes, strain C, and the mixture of the two former, respectively. The results showed that both relative transpiration intensity and relative weight of twigs inoculated with nematodes were the least, then those of twigs inoculated with the mixture and those of twigs inoculated with strain C. Fifteen days after treatment, relative weight of twigs inoculated with nematodes was significantly less than that of twigs inoculated with strain C ($p < 0.05$). Survival days of twigs inoculated with nematodes was significantly less than that of the others ($p < 0.05$). Number of twigs with brown stain leaves of pine twigs inoculated with nematodes was significantly more than that of twigs inoculated with strain C ($p < 0.05$). There was no significant difference between numbers of nematodes separated from twigs inoculated with nematodes and twigs inoculated with the mixture. 8-month-old seedlings of *P. massoniana* without roots were cultural exercised in filtrate of Czaper's medium of strain C and both their infected rate and disease index were significantly less than those in control treatment in 6 days later ($p < 0.05$). These

基金项目: 国家 973 资助项目 (2002CB1111405)

收稿日期: 2004-07-02; 修订日期: 2005-02-11

作者简介: 欧阳革成 (1967~), 男, 湖南邵阳人, 硕士, 副研究员, 主要从事植物保护学研究. E-mail: cpg@gdei. gd. cn

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: LS11@ZSU. EDU. CN

致谢: 承蒙华南农业大学刘琼光博士帮助鉴定菌种, 谨表谢忱

Foundation item: The National 973 Project (No. 2002CB1111405)

Received date: 2004-07-02; Accepted date: 2005-02-11

Biography: OUYANG Ge-Cheng, Master, Associate professor, mainly engaged in plant protection. E-mail: cpg@gdei. gd. cn

showed that strain C had inhibitive effects on this disease and some metabolites from strain C was in favor of antidisease and survival of pine seedlings. It was suggested that strain C inhibited pathogenic microbes accompanying nematodes and microbial endophytes of pine tree, or improved vitality and anti-adversity ability of pine tree. Strain C was identified as a strain of microzyme, *Candida guiliermondii*, by being observed under electron microscope and referring to API 20 C AUX identification system.

Key words: pine wilt disease; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Candida guiliermondii*; biocontrol

松材线虫病是重要的森林病害,分布于许多国家和地区,其致病机理至今尚未充分认识,也没有特别有效的防治措施。国内外在生物防治松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (BX)和它的媒介昆虫——松墨天牛 *Monochamus alternatus* 方面开展了许多研究工作,但还没有切实可行的办法。一些学者认为该病的主要病原是松材线虫携带的多种微生物^[1~6],这些微生物可能来源于松树的内生病原菌或在松树中普遍存在^[7,8]。本文报道从室内人工培养的松材线虫上分离到一种微生物,经鉴定为季也蒙假丝酵母 *Candida guiliermondii*,并发现它对松材线虫病有抑制作用。这一发现对松材线虫病的防治具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 松材线虫携带的微生物的分离及鉴定

松材线虫虫源由华南农业大学线虫室提供。将松材线虫在玻璃瓶中长满盘多毛孢 *Pestalotia* sp. 的玉米粒上培养,分离后线虫用灭菌水反复冲洗 5 次。用灭菌的昆虫针挑取松材线虫数条,置于马铃薯蔗糖培养基(PDA)平板上,25℃下培养 24h,再多次划线分离纯化得到菌株 C。经电子显微镜观察并参考 API 20 C AUX 鉴定系统,对菌株 C 进行菌种鉴定。

1.2 菌株 C 对松材线虫病的影响

1.2.1 菌株 C 和松材线虫接种液的准备 将菌株 C 接种于葡萄糖牛肉浸膏蛋白胨培养基(NA)平板上在 25℃下培养 24h。以无菌水配成 5000 条松材线虫/ml 的接种液、 1.5×10^8 CFU/ml 的菌株 C 接种液、5000 条线虫 + 1.5×10^8 CFU/ml 的线虫和菌株 C 混合接种液。

1.2.2 松枝的采集与接种 在广州市龙洞林场马尾松林中,选取健康马尾松 (*Pinus massoniana*) 树 1 株,剪取生长状况相似的健康松枝,带回室内水培 24h 后,选择生长状况一致的松枝用于实验。参照谈家金等方法^[4~7]在松枝下部纵切 1cm 长的伤口至木质部,切口上加少许脱脂棉,以 parafilm 封口膜卷成筒状,套在松枝切口上。用接种枪在松枝上分别接种松材线虫接种液、菌株 C 接种液和松材线虫与菌株 C 的混合接种液 1.05ml (3×0.35ml),并以灭菌水为对照。接种后松枝插入玻璃瓶中水培(瓶中加定量自来水,用胶纸封住瓶口以避免水分通过瓶口蒸发),每处理 6 个重复。

1.2.3 病情观察和数据分析 每隔 5d 用电子天平测量一次松枝重和玻璃瓶中的水重。玻璃瓶中减少的水量可视为松枝因蒸腾作用而消耗的水分,单位时间内玻璃瓶中减少的水量可视为松枝的蒸腾强度。为增加可比性,根据观察值计算以下相对变量:

$$\text{相对蒸腾强度} = \frac{\text{处理后特定时间段内瓶中减少的水量}}{\text{处理前 5d 内瓶中减少的水量}}$$

$$\text{相对松枝重} = \frac{\text{处理后特定时间的松枝重}}{\text{实验开始时的松枝重}}$$

观察针叶褐变现象;待所有松枝枯萎后,各松枝分别剪成 1cm 的小段,分离、计算线虫数。

1.3 菌株 C 的代谢产物对马尾松苗的影响

用优良马尾松种子(广东省林业局提供)播种于实验苗圃,8 个月后选取生长状况相对一致的马尾松苗,剪去根部,自来水冲洗后用于实验。

参照方中达方法^[9],将 28℃下振荡培养(150r/min)14d 的菌株 C 查彼培养液经 0.45μm 微孔滤膜过滤后注入插有去根马尾松苗的小玻璃瓶中,并以在 115℃下灭菌 30min 的查彼培养液作对照,每个处理 15 株。处理后松苗置于人工气候箱(26℃,12h : 12L : D)中培养,6d 后观察松苗的发病情况。

2 实验结果

2.1 菌株 C 的分离及鉴定

在室内人工繁殖的松材线虫虫体上仅分离到 1 种微生物,此菌在 PDA 和 NA 培养基上菌落呈白色,增殖较快。经电子显微镜观察及 API 20 C AUX 鉴定系统鉴定,属季也蒙假丝酵母 *Candida guiliermondii*。

2.2 菌株 C 对松材线虫病的影响

松材线虫病的主要症状是松树蒸腾作用显著下降和松针失水萎蔫,并有针叶褐变现象。本实验结果显示,相对蒸腾强度最小的是接种线虫的松枝,即其蒸腾强度下降最快;其次是线虫与菌株 C 混合接种的松枝和对照松枝;接种菌株 C 的松枝的相对

蒸腾强度最大(见表 1),即其蒸腾强度下降最慢。

表 1 菌株 C 对接种了松材线虫(Bx)的松枝的相对蒸腾强度和相对重量的影响

处理 Treatment	平均相对蒸腾强度±标准误 Mean relative transpiration intensity ± SE			平均相对松枝重量±标准误 Mean relative weight of pine twigs ± SE		
	d5	d10	d15	d5	d10	d15
对照 CK	1.07±0.07ab	0.98±0.07b	0.77±0.08ab	1.00±0.01a	0.97±0.02ab	0.77±0.05ab
线虫 Bx	0.79±0.04c	0.56±0.12c	0.39±0.07c	0.93±0.03a	0.69±0.07b	0.51±0.02c
菌株 C Strain C	1.21±0.07a	1.30±0.10a	1.09±0.16a	1.01±0.00a	1.01±0.01a	0.88±0.05a
线虫+菌株 C Bx + Strain C	0.89±0.06bc	0.80±0.06bc	0.59±0.13bc	0.96±0.03a	0.88±0.05ab	0.70±0.07b

表中同列数据具相同字母者,表示差异不显著($p<0.05$,Duncan 方差分析)Means with a common letter in each column do not differ significantly according to Duncan’s test ($p<0.05$)

各处理松枝的相对重量与相对蒸腾强度相类似,相对重量依次为:接种线虫的松枝<线虫与菌株 C 混合接种的松枝<对照松枝<接种菌株 C 的松枝,即其失水萎蔫程度依次降低。在处理后 15d 时,接种线虫松枝的相对重量显著小于线虫与菌株 C 混合接种的松枝(见表 1)。

各处理松枝的平均存活期,以接种线虫的松枝最短,与其它处理有显著性差异。菌株 C 接种的松枝没有针叶褐变现象,接种菌株 C 的松枝与接种线虫的松枝的针叶褐变株数有显著性差异(见表 2)。

上述实验结果显示菌株 C 增强了松枝的抗病性,对松材线虫病有明显的抑制作用。

从接种线虫和线虫与菌株 C 混合接种的所有松枝中都分离到松材线虫,分离出的线虫量没有显著性差异(见表 2),这表明菌株 C 对松材线虫在松枝中的生长繁殖没有影响。

2.3 菌株 C 的代谢物质对松苗的影响

实验显示,经菌株培养液滤液处理 6d 后的松苗的发病率和发病程度(见表 3)比对照都要低很多,其平均感病指数和感病株率与对照都有显著差异。这表明,菌株 C 培养液中产生的代谢物质有利于松苗的抗病和存活。

3 分析与讨论

实验显示,菌株 C 虽然对松材线虫在松枝中的增殖无显著影响,但对松材线虫病有显著的抑制作用,这对松材线虫病的生物防治的研究有一定的启迪和借鉴作用。该病与松材线虫携带的病原菌和松树的内生病原菌密切相关,但目前还没有对该病的病原微生物进行生物控制的研究报道。

有报道认为季也蒙假丝酵母是一种植物病害拮抗菌,对某些植物病害表现出显著的抑制效果。这表明,菌株 C 可能通过抑制松树上的内生病原菌或松材线虫携带的病原微生物而抑制了松材线虫病的发生、发展,或通过提高松树的生长力和抗逆能力,诱导松树产生抗病性来抑制病菌的增殖和病害的发生、发展。范青等发现季也蒙假丝酵母可以诱导植物产生较高水平的几丁酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性,增强对病害的抑制效果^[10]。菌株 C 在松材线虫病中的作用机理有待于进一步研究。

表 2 菌株 C 对接种了松材线虫(Bx)的松枝的存活天数(d)、针叶褐变株数和松枝中分离出的线虫量的影响

Table 2 Effects of Strain C on survival days(d), number of twigs with brown stain leaves of pine twigs inoculated with *B. xylophilus* (Bx) and number of Bx separated from these twigs

处理 Treatment	处理后 15d 时 针叶褐变株数 Number of brown stain twigs after 15d	松枝平均 存活天数± 标准误 Mean survival days ± SE	平均每枝分离出的 线虫量±标准误 Mean number of Bx separated from per twig ± SE
对照 CK	3ab	28.50±1.26a	0.00±0.00
线虫 Bx	5a	20.33±1.20b	113.50±45.97
菌株 C Strain C	0b	29.50±1.84a	0.00±0.00
线虫+菌株 C Bx + Strain C	3ab	26.33±2.23a	130.67±58.33

表中同列数据具相同字母者,表示差异不显著($p<0.05$,褐变株数为样本频率 t 检验,平均线虫量和平均存活天数为 Duncan 方差分析)Data with a common letter in each column do not differ significantly ($p<0.05$) according to Duncan’s test (Mean number of Bx and Mean survival days) or t test (Number of brown stain twigs)

表 3 菌株 C 代谢产物处理断根松苗 6d 后感病株率和平均感病指数
Table 3 Infected rate and mean disease index of pine seedlings treated by metabolites of strain C after 6 days of treatment

处理 Treatment	处理株数 Number of seedlings	感病株率(%) Infected rate (%)	平均感病指数 ±标准误 Mean disease index ± SE
菌株 C Strain C	15	26.67 a	0.19±0.09a
对照 CK	15	100.00b	0.85±0.05b

同列数据具相同字母者,表示差异不显著($p<0.05$,感病株率为样本频率 t 检验,平均感病指数为 Duncan 方差分析)Data with a common letter in each column do not differ significantly ($p<0.05$) according to Duncan’s test (mean disease index) or t test (infected rate)

References:

[1] Oku H, Shiraishi S, Ouchi S, *et al.* Pine wilt toxin, the metabolite of a bacterium associated by a nematode. *Naturwissenschaften*,1980, **67**:198~199.

[2] Oku H. Phytotoxins in pine wilt disease. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*,1990, **64**(7):1254~1257.

[3] Kawazu K, Zhang H, Yamashita H, *et al.* Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production. *Biosci. Biotech. Biochem.* , 1996, **60**(9):1413~1415.

[4] Tan J J, Wang X R, Feng Z X. A preliminary study on the relationship between the bacterium accompanying *Bursaphelenchus xylophilus* and pine wilt disease. *Plant Quarantine*,2001, **15**(6):326~328.

[5] Zhao B G, Guo D S. Isolation and pathogenicity of a bacterium strain carried by pine wood nematode. *Journal of Beijing Forestry University*,2004,**26**(1):57~61.

[6] Hong Y D, Cao Y, Zhao B G, *et al.* Studies on identification and toxicity of bacteria carried by pine wood nematodes. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)* , 2002,**26**(5):37~40.

[7] Tan J J, Xiang H Q, Feng Z X. A preliminary study on the relationship between the endophytic bacterium of *Pinus massoniana* and pinewood nematode disease. *Acta Phytopathologica Sinica*,2003,**33**(5):474~476.

[8] Ouyang G C, Zhang R J. Contributing factors and control strategies of pine wilt disease. *Chinese Journal of Applied Ecology* , 2003, **14** (10):1790~1794.

[9] Fang Z D. *Research Methods in Phytopathology* (Third Edition). Beijing: China Agricultural Press, 1998. 70.

[10] Fan Q, Tian S P, Liu H B, *et al.* Two antibiotic yeasts producing β -1,3-glucanase and chitinase and their possible inhibitive mechanism against fungus. *Chinese Science Bulletin* , 2001,**46**(20):1713~1717.

参考文献:

[4] 谈家金,王新荣,冯志新. 松材线虫伴生细菌与松树萎蔫病关系的初步研究. 植物检疫, 2001,**15**(6):326~328.

[5] 赵博光,郭道森. 松材线虫携带的一株细菌分离及其致病性. 北京林业大学学报,2004,**26**(1):57~61.

[6] 洪英娣,曹越,赵博光,等. 松材线虫携带细菌的鉴定和毒性研究. 南京林业大学学报(自然科学版),2002,**26**(5):37~40.

[7] 谈家金,向红琼,冯志新. 马尾松内生细菌与松材线虫病关系的初步研究. 植物病理学报, 2003,**33**(5):474~476.

[8] 欧阳革成,张润杰. 松树萎蔫的成因与控制策略. 应用生态学报 2003, **14**(10):1790~1794.

[9] 方中达. 植病研究方法 3 版. 北京:中国农业出版社,1998. 70.

[10] 范青,田世平,刘海波,等. 两种拮抗菌 β -1,3-葡聚糖酶和几丁酶的产生及其抑菌的可能机理. 科学通报,2001,**46**(20):1713~1717.