

伊氏杀线真菌与苏云金芽孢杆菌对松材线虫的联合毒力研究

李恩杰^{1,2}, 李娜³, 王青华², 张永安^{1,2*}, 王玉珠², 曲良建²

(1. 中国林业科学研究院华北林业实验中心, 北京 102300; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业和草原局森林保护重点实验室, 北京 100091; 3. 内蒙古农业大学林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: [目的] 探究伊氏杀线真菌与苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 对松材线虫的联合毒力。 [方法] 使用 *Esteya vermicola* 孢子悬浮液与 Bt 发酵液处理松材线虫, 通过线虫的形态变化、死亡率及死亡速度 3 个方面测定 *E. vermicola* 与 Bt 联合对松材线虫的影响。 [结果] 经过 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理过的线虫会出现内容物渗漏, 体腔收缩、弯曲、断裂的现象; 高浓度的 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 Bt 发酵液联合处理松材线虫可以明显地提高线虫的死亡率, 最高可以达到 100%; 联合处理的线虫死亡速度较快, 随着处理时间的延长, 死亡率会一直呈上升的趋势。 [结论] 应用这两种生防微生物在合适的浓度下混配能够在较短时间内提高松材线虫的死亡率。

关键词: *Esteya vermicola* 孢子悬浮液; Bt 发酵液; 松材线虫; 死亡率

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)01-0106-06

松材线虫病又名松树枯萎病 (Pine Wilt Disease), 能引起松属植物的快速萎蔫死亡、成片地毁灭, 是以松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner)) 为主要病原。松材线虫是一种重要的国家级林业检疫性有害生物, 其危害严重、防治困难^[1]。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Bt) 是世界上开发应用最为成熟的生防微生物, 自 1972 年, Prasa 等首次报道了苏云金芽孢杆菌对植物寄生线虫的毒杀作用^[2], 国内外便开始对苏云金芽孢杆菌及其代谢产物对松材线虫的毒杀作用进行研究^[3-6]。伊氏杀线真菌 (*Esteya vermicola* (liou J Y, Shih J Y & Tzean S S)) 是世界上第一个被报道的松材线虫内寄生真菌, 它产生的新月形孢子对松材线虫具有侵染活性^[7]。杜婷与 Wang 等人先后在室内、室外测定了 *E. vermicola* 对松材线虫的侵染活力^[8-9]。目前, 虽然利用生防微生物防治松材线虫的研究很多^[3-10], 但由于松材线虫的隐蔽性, 防治效果并不明显。其中将两种微生物联合起来防治松

材线虫的研究未见报道。本试验将松材线虫内寄生真菌 *E. vermicola* 孢子与苏云金芽孢杆菌代谢产物结合起来对松材线虫进行毒力研究, 以图找到控制松材线虫更有效、持续的手段, 为以后能否利用 *E. vermicola* 和苏云金芽孢杆菌联合防控松材线虫提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试伊氏杀线真菌菌株为 *Esteya vermicola* CBS 115803, 由韩国国立忠南大学成昌根教授惠赠, 在本实验 4℃ 斜面保存。供试苏云金芽孢杆菌菌株 Bt KNU-07 由本实验室斜面保存。

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研究员提供, 在本实验室利用多毛孢 *Pestalotia* sp. 培养繁殖以供测试用。

1.2 试验方法

1.2.1 松材线虫的培养及消毒 将多毛孢 *Pestalo-*

收稿日期: 2017-11-03 修回日期: 2018-03-24

基金项目: 中国林科院森环森保所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目; 伊氏真菌对松材线虫致病相关基因的研究 (CAFRI FEEP201403)、林业公益性行业科研专项: 重大森林害虫持续防控关键技术与体系研究 (201504302)

* 通讯作者: 张永安. E-mail: zhangyab@caf.ac.cn

tia sp. 接种到 PDA 培养基, 26℃ 培养 7~10 d, 菌落长满整个平板后, 无菌条件下接种松材线虫, 26℃ 放置 10 d, 待多毛孢菌丝完全消失, 采用 Benman 漏斗法分离、收集线虫^[11-12]。将收集的线虫用消毒液(0.002%的放线菌酮+0.1%的硫酸链霉素)重复消毒 2 次, 再用无菌水漂洗 3 次^[12], 配制成浓度约为 5 000 头·mL⁻¹的悬浮液。供试线虫即用即提。

1.2.2 真菌 *E. vermicola* 孢子悬浮液的制备 将保存的 *E. vermicola* CBS 115803 转接到 PDA 培养基, 置于 26℃ 恒温培养箱中培养 10 d。用无菌的 Tween-80 溶液(0.05%)从菌落生长旺盛的平板上洗下分生孢子, 装入 50 mL 灭菌离心管中, 置于涡旋振荡器上充分振荡, 使孢子尽可能从菌丝上脱落悬浮于 0.05%的 Tween-80 溶液中, 悬浮液用滤纸过滤以除去菌丝。用血球计数法确定悬浮液的孢子浓度, 置于 4℃ 保存待用^[9]。

1.2.3 *Bt* 发酵液的制备 将实验室保存于斜面上的 *Bt* KNU-07 转接到 LB 固体培养基上, 置于 26℃ 恒温培养箱中 24 h 进行活化培养。活化成功后将其接种到装有 100 mL LB 培养液的 250 mL 锥形瓶中, 置于摇床振荡培养 48 h, 摇床参数设为 150 r·min⁻¹, 28℃。将发酵的产物 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 去除菌体沉淀, 上清液用 0.22 μm 除菌过滤器过滤待用。

1.2.4 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液对松材线虫联合毒杀活性的测定 将不同浓度的 *E. vermicola* 孢子悬浮液与不同稀释倍数的 *Bt* 发酵液两两按照 1:1 (V/V) 联合处理松材线虫, 使 *E. vermicola* 孢子悬浮液最终浓度分别为 2.5 × 10⁸ spores·mL⁻¹ (高浓度)、2.5 × 10⁷ spores·mL⁻¹ (中浓度)、2.5 × 10⁶ spores·mL⁻¹ (低浓度); *Bt* 发酵液最终稀释倍数分别为 3 倍、5 倍、7 倍。各取混合液 800 μL 加入到 1.5 mL 灭菌离心管中, 再加入线虫悬浮液 200 μL, 使松材线虫的终浓度为 1 头·μL⁻¹。每个处理重复 3 次, 以无菌 LB 培养液处理为空白对照, *Bt* 发酵液为阳性对照。25℃ 静置 3 d, 每天进行取样观测。取样后 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃掉上清, 线虫漂洗 2 次, 再加入 500 μL 浓度为 2% 的 NaCl 溶液, 混匀, 取 30 μL (观察线虫总数不低于 30 头) 点到载玻片上^[6], 5 min 后在光显微镜下观察线虫死亡症状和死亡数目(僵直不动或用针尖刺激也不动即视为死亡^[13])及线虫总数。

1.3 数据处理

校正死亡率计算公式^[14]: 校正死亡率 = (处理

死亡率 - 对照死亡率) / (1 - 对照死亡率) × 100%

采用 SPSS Statistics 19.0 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 软件画图。图中数据均采用平均值 ± 标准误表示。

2 结果与分析

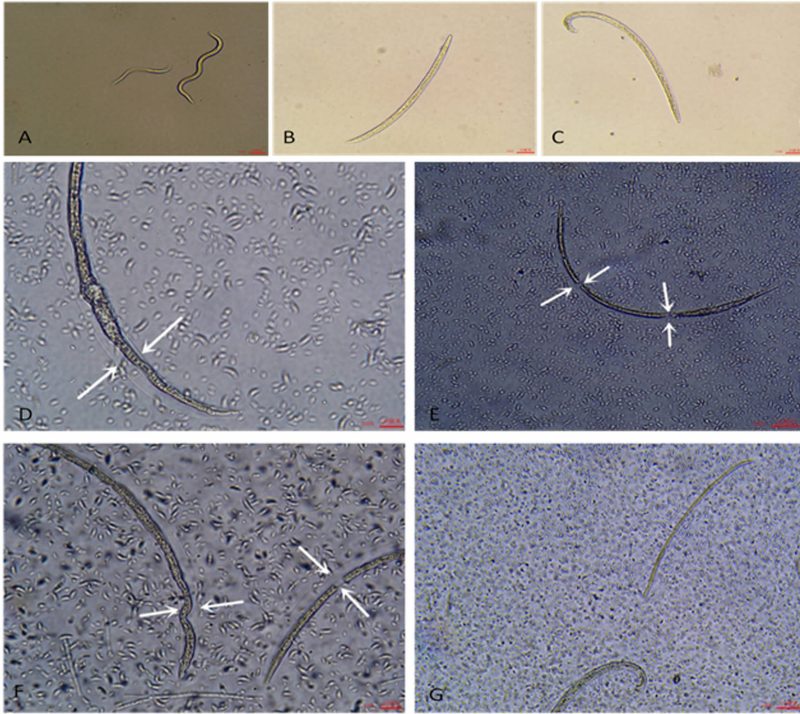
2.1 不同处理方式对松材线虫形态结构的影响

松材线虫经 *E. vermicola* 孢子悬浮液、*Bt* 发酵液以及二者联合处理后的形态观察结果如图 1 所示。图 1A 为对照组观察到的活体线虫, 线虫形态自然, 活动自如, 呈“S”型, 虫体内内容物分布均匀, 结构完整。经 *Bt* 发酵液处理 24 h 后, 约 80% 线虫虫体僵直, 最终成新月形或者直形死亡(图 1B), 剩余死亡线虫尾部弯曲成钩状(图 1C)。经 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理 3 d 后, 线虫虫体内内容物外渗、体腔收缩与表皮完全分离, 收缩后的体腔直径约为虫体直径的一半, 也有部分线虫体腔断裂(图 1D、E)。两者联合处理过的线虫死亡状态有两种, 一种与 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理过的虫体状态相似, 体腔收缩甚至弯曲、断裂等(图 1F), 一种与 *Bt* 发酵液处理过的线虫一样(图 1G)。

2.2 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液联合对松材线虫活性的影响

不同浓度的 *E. vermicola* 孢子悬浮液与不同稀释倍数的 *Bt* 发酵液的组合对松材线虫毒力测定结果表明(图 2): *E. vermicola* 孢子悬浮液浓度越大, 对线虫的致死效果越好; 随着 *Bt* 发酵液的稀释, 无论 *Bt* 单用还是与 *E. vermicola* 孢子悬浮液联合的毒力都逐渐降低。在联合处理松材线虫的条件下: 低浓度 *E. vermicola* 孢子悬浮液的毒力都比高浓度 *E. vermicola* 孢子悬浮液的毒力低 25% 左右, 与中浓度 *E. vermicola* 孢子悬浮液的毒力没有显著差异 ($P < 0.05$)。

当 *E. vermicola* 孢子悬浮液浓度为高浓度时: 与 *Bt* 发酵液联合处理松材线虫可明显地提高线虫的死亡率 ($P < 0.05$); 其中 *Bt* 发酵液稀释倍数为 3 倍时, 混合液处理的致死效果最好, 死亡率可以达到 100%; 随着 *Bt* 发酵液稀释成 7 倍, 联合处理的毒力下降了约一半, 与单用真菌孢子处理的毒力 (51.86%) 接近, 但却是仅用 *Bt* 发酵液处理的毒力 (23.86%) 的 2 倍多。当 *E. vermicola* 孢子悬浮液浓



A. 对照组;B,C. 经 *Bt* 发酵液处理的松材线虫死亡状态(僵直、尾部成钩状);D,E. 经 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理线虫 3 d 后的死亡状态:线虫表皮与体腔分离、体腔断裂(箭头所指);F,G. 联合处理的线虫虫体有体腔弯曲、断裂(箭头所指),有尾部成钩状。
 A; Control. B,C: The death situations of nematodes treated with *Bt* fermentation (stiff, tail-hooked). D,E: The states of dead nematodes treated with *E. vermicola* spore suspension for 3 days: the nematode epidermis are separated from the body cavity and the body cavity ruptured (as indicated by the arrow). F,G: The co-treated nematodes have body cavities bent and broken (as indicated by the arrow), with a hooked tail.

图1 光学显微镜观察的不同方式处理的松材线虫形态

Fig. 1 The morphology of *B. xylophilus* with different treatment under optical microscope

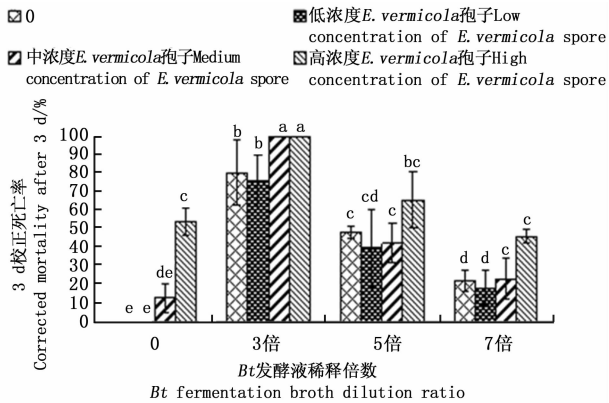


图2 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液的联合对 *B. xylophilus* 的校正死亡率
 Fig. 2 The corrected mortality of *B. xylophilus* treated with the combination of *E. vermicola* spore suspension and *Bt* fermentation broth

度为 2.5×10^6 、 2.5×10^7 spores \cdot mL⁻¹时;与 *Bt* 发酵液联合处理松材线虫并没有提高线虫的死亡率($P < 0.05$),甚至会略微降低 *Bt* 发酵液的毒力;只有中浓度的孢子悬浮液与 3 倍稀释的 *Bt* 发酵液联合处理的毒力也达到 100%。当不加 *Bt* 发酵液处理时:低浓度的 *E. vermicola* 孢子悬浮液对松材线虫没有影响,中浓度 *E. vermicola* 孢子悬浮液的毒力也仅有 10%,远低于高浓度 *E. vermicola* 孢子悬浮液的毒力(51.86%) ($P < 0.05$)。

2.3 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液联合处理时间对松材线虫的影响

3 d 内 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液联合处理的毒力变化如图 3,随着时间的延长,各种处理的线虫死亡率均呈上升趋势。在处理 3 d 内:未加 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理的线虫死亡率增长缓慢,上升幅度并不明显(图 3A);高浓度 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理过的线虫死亡速度较快,而且它们的死亡速度基本保持不变(图 3D)。

处理线虫 1 d 后:图 3B 与图 3D 相比较,低浓度

孢子悬浮液与3倍稀释的*Bt*发酵液联合的毒力翻了一倍,死亡速度最快(图3B),和高浓度*E. vermicola*孢子悬浮液与5倍、7倍*Bt*发酵液联合处理的线虫死亡速度相近(图3D)。处理2 d后:图3B与图3C相比较,低浓度*E. vermicola*孢子悬浮液与5倍稀

释的*Bt*发酵液(图3B)、中浓度*E. vermicola*孢子悬浮液与3倍稀释的*Bt*发酵液联合处理的线虫死亡速度明显加快(图3C),而其余由低浓度、中浓度*E. vermicola*孢子悬浮液处理的线虫死亡速度则放缓。

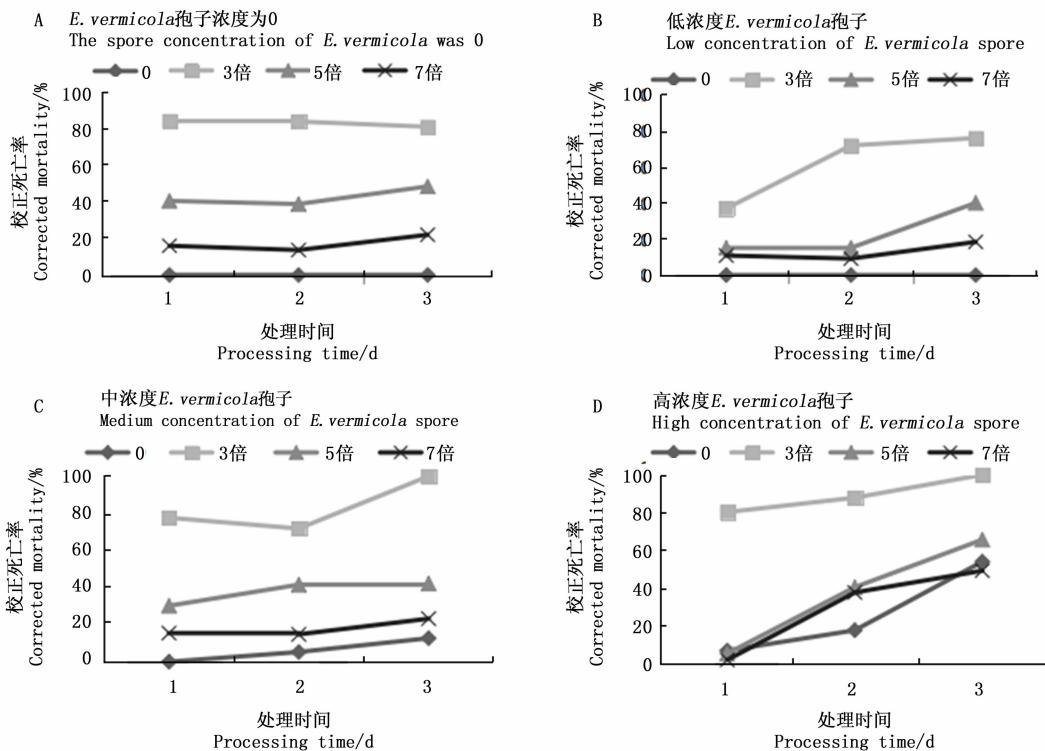


图3 *E. vermicola* 孢子悬浮液与*Bt*发酵液联合处理的*B. xylophilus*在不同时间的校正死亡率

Fig. 3 Over time—mortality of *B. xylophilus* treated with the combination of *E. vermicola* suspension and *Bt* fermentation broth

3 讨论

本试验通过研究*E. vermicola*孢子悬浮液与*Bt*发酵液联合处理过的松材线虫的形态结构、死亡率及其变化趋势证明了高浓度*E. vermicola*孢子悬浮液与较小稀释倍数的*Bt*发酵液的联合不仅会显著提高线虫的死亡率,而且会使死亡率随处理时间的延长稳步上升。由此可见高浓度*E. vermicola*孢子悬浮液与较小稀释倍数的*Bt*发酵液的联合使用不但能使毒杀松材线虫的效果叠加,还能保持线虫的死亡速度基本不变。线虫在死亡的过程中还会出现逐渐消解、内容物渗漏的症状。

以往的报道研究关于*Esteya vermicola*杀松材线虫活性的室内测定均是在平板菌落上进行的,且认为只有该菌产生的新月形孢子才能够杀松材线虫^[8,15-16]。本试验是将*Esteya vermicola*平板菌落上

的孢子洗脱下来制备成悬浮液来测定该真菌对线虫的影响^[16],结果是不论*E. vermicola*孢子悬浮液单用还是与*Bt*联合使用,线虫的死亡率都随*E. vermicola*孢子悬浮液浓度的上升而提高。Wang等将*E. vermicola*孢子悬浮液注射于被松材线虫侵染的松树中,2个月后发现高浓度(3×10^9 spores \cdot mL⁻¹)比低浓度(3×10^8 spores \cdot mL⁻¹)注射后树体内的线虫数量显著减少,且树体中的线虫数量分别降低79%与47%^[17]。可见,在野外防治过程中,提高联合处理中*E. vermicola*孢子悬浮液的浓度,可达到快速减少病树中松材线虫的数量。经过*E. vermicola*孢子悬浮液处理后无法观察到杜婷等运用真菌菌落法得到新月形孢子侵染线虫的现象^[8],但却发现了线虫体腔内容物外溢、虫体逐步被酶解消散的症状,这可能和线虫与*E. vermicola*孢子接触时所处环境不同有关,在一定程度上也可以说明*E. vermicola*孢子

在平板菌落与悬浮液中杀松材线虫的机制可能不同,还需要对两种杀线虫方式的机理与差异进行深入地研究。

联合处理时间对松材线虫的影响试验过程中,高浓度的 *E. vermicola* 孢子悬浮液处理组的毒力变化最为明显,毒力随处理时间的延长稳步上升;其它处理组的线虫死亡率上升幅度在不同处理时间段有高有低。由此说明了松材线虫的死亡速度与 *E. vermicola* 孢子悬浮液浓度和 *Bt* 发酵液稀释倍数都有关系,并且在不同时间两者所起的作用大小不同,正如添加 *E. vermicola* 孢子悬浮液的处理组线虫死亡率在 1 d 到 3 d 的上升幅度都比不加 *E. vermicola* 孢子悬浮液的处理组的大,说明了联合处理 1 d 到 3 d 是由 *E. vermicola* 孢子悬浮液起主要作用。

4 结论

本研究将 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液联合起来对松材线虫进行毒力测定,旨在室内试验二者联合对松材线虫的毒性及在野外运用该方法防治松材线虫的可能性。试验结果表明在室内这种防治思路是可行的,在 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液浓度都合适的条件下,二者之间的防治效果是可以叠加的,而且联合处理的线虫死亡速度更快。如果在野外防治中,需要考虑的因素会更多,如松树的萎蔫状况、天气、*E. vermicola* 与 *Bt* 的浓度与剂量、防治的方式(注射)与持续性、注射部位等。至于为何 *E. vermicola* 孢子悬浮液与 *Bt* 发酵液能够联合,并以较快的速度杀死松材线虫,需要进一步地探索研究。但是将两种生防微生物联合起来防治松材线虫已显现出巨大的研究价值和生防潜力。

参考文献:

- [1] Dwinell L D. The pinewood nematode: regulation and mitigation [J]. Annual Review of Phytopathology, 1997, 35:153-166.
- [2] Prasa S S V, Tilak K V B R, Gollakota K G. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root knot disease [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1972, 20(3): 377-378.
- [3] Wei J Z, Hale K, Carta L, et al. *Bacillus thuringiensis* crystal pro-

- teins that target nematodes [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2003, 100(5): 2760-2765.
- [4] 罗兰, 谢丙炎, 杨宇红, 等. 具杀线虫活性的苏云金杆菌筛选研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 314-316.
- [5] Niu Q H, Huang X W, Zhang L, et al. A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2010, 107(38): 16631-16636.
- [6] 彭双, 闫淑珍, 陈双林. 具杀线虫活性植物内寄生细菌的筛选和活性产物[J]. 微生物学报, 2011, 51(3): 368-376.
- [7] Liou J Y, Shih J Y, d Tzena S S. *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan, attacking the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) [J]. Mycological Research, 1999, 103(2): 242-248.
- [8] 杜婷, 张永安, 王玉珠, 等. 内寄生真菌 *Esteya vermicola* 对松材线虫侵染活力的测定[J]. 林业科学研究, 2014, 27(2): 174-178.
- [9] Wang Z, Zhang Y A, Wang C Y, et al. *Esteya vermicola* controls the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in pine seedlings [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1972, 20(3): 377-378.
- [10] 王修清, 王倩, 王亚萍, 等. 杀线虫真菌 Sr18 发酵液对松材线虫超微结构的影响[J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(7): 69-75.
- [11] Vignierchio D R, Schmitt R V. On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications [J]. Journal of Nematology, 1983, 15(3): 438-444.
- [12] 杨宝君, 潘宏阳, 汤坚, 等. 松材线虫病 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 141-148.
- [13] Guo Q Q, Du G C, Qi H T, et al. A nematicidal tannin from *Punica granatum* L. rind and its physiological effect on pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) [J]. Pesticide Biochemistry Physiology, 2017, 135: 64-68.
- [14] Puntener W. Manual For field Trials in Plant Protection [M]. Second ed. Ciba-Geigy Limited, Basle, 1981.
- [15] Wang Y B, Wang C Y, Wang Z, et al. Laboratory studies on the development of a conidial formulation of *Esteya vermicola* [J]. Biocontrol Science and Technology, 2012, 22(11): 1362-1372.
- [16] 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, 2011, 56: 91-100.
- [17] 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.

Study on Joint Toxicities of *Esteya vermicola* and *Bacillus thuringiensis* to Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)

LI En-jie^{1,2}, LI Na³, WANG Qing-hua², ZHANG Yong-an^{1,2}, WANG Yu-zhu², QU Liang-jian²

(1. Experimental Center of Forestry in North China, Chinese Academy of Forestry, Beijing 102300, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 3. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhehot 010019, Inner Mongolia, China)

Abstract: [**Objective**] To explore the toxicities of *Esteya vermicola* in combination with *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) against *Bursaphelenchus xylophilus*. [**Method**] The joint toxicities of *E. vermicola* and *Bt* against pine wood nematodes was measured by the morphological changes, mortality and death rate of nematodes treated with *E. vermicola* spore suspension and *Bt* fermentation supernatant. [**Result**] The results showed that the nematodes treated by *E. vermicola* spore suspension could cause leakage of body contents and shrinkage, bending and fracture of body cavity. The combination of high concentration of *E. vermicola* spore suspension and *Bt* fermentation solution could significantly increase the mortality of nematodes, with a maximum of 100%. The combined treatment of pine wood nematodes died faster, and the mortality rate would continue to rise with the extension of treatment time. [**Conclusion**] Application of these two bio-control agents at the right concentrations can increase the mortality of pine wood nematodes in a relatively short time.

Keywords: *Esteya vermicola* spore suspension; *Bacillus thuringiensis* fermentation supernatant; pine wood nematode; mortality

(责任编辑:崔 贝)