

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.03.018

# 酸碱度和松树基质对杀线菌 *Esteya vermicola* 菌丝体生长的影响

王瑞珍<sup>1,2</sup>, 温韦华<sup>2</sup>, 刘淳洋<sup>2</sup>, 崔夏<sup>2</sup>, 贺然<sup>1,2</sup>,  
曲良建<sup>1\*</sup>, 张永安<sup>1,3</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业和草原局森林保护学重点实验室, 北京 100091;  
2. 北京市植物园/北京市花卉园艺工程技术研究中心, 北京 100093; 3. 中国林业科学研究院华北林业实验中心, 北京 100000)

**摘要:** [目的] 研究 *Esteya vermicola* 真菌适应的 pH 范围, 并探讨松树成分对其生长的影响, 以期对 *E. vermicola* 菌在松树体内的定植和林业重大病害松材线虫野外的生物防治提供理论支撑。[方法] 选取 *E. vermicola* CBS115803 (EV115803) 和 *E. vermicola* CNU120806 (EV120806) 为试验对象, 测试 EV 真菌适应的 pH 范围, 并以 35 a 黑松不同器官组织配制培养基, 探究 EV 菌的生长情况, 观测各菌株生长速率、菌体量和产孢量。[结果] EV 菌适应的 pH 值范围为 5~13, 菌体量在酸性条件下产生更多的气生菌丝。PDA 中加入松树成分对 EV 菌有一定的刺激生长作用。在以松针、松树皮、松枝条为唯一营养来源时, EV 菌生长茂盛。以木质部锯末为单一营养源时, EV 菌生长缓慢。[结论] EV 菌适应的 pH 值范围为 5~13, EV 菌耐碱性极强, 且在加有松树各部位成分的培养基上生长, 菌株 EV120806 对松树培养基的适应性更强, 未来有望将 EV 菌定殖在松树中做为共生菌, 摄食入侵的松材线虫, 从而使松树具有内源的防控因子防控松材线虫。

**关键词:** 黑松; *Esteya vermicola*; 松材线虫; 生物防治

**中图分类号:** S763

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2020)03-0139-07

松材线虫病 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 是全球公认的检疫性有害生物, 是松树最大威胁, 曾给亚洲和欧洲等部分国家或地区造成了毁灭性生态损害和显著经济损失<sup>[1-2]</sup>。目前, 我国对松材线虫的防治手段主要有化学防治、物理防治、生物防治等, 但仍以化学防治为主, 如使用化学药剂久效磷、甲胺磷、阿维菌素等进行点滴注干。虽然该方法可以取得较好的防治效果, 但长期使用, 易对环境造成危害, 而且易使线虫产生抗药性<sup>[3]</sup>。在国际上, 还未见有对松材线虫进行直接大规模生物防治的实例, 因此, 对松材线虫开展生物防治还需要加快深入研究<sup>[4]</sup>。

伊氏杀线真菌 (*Esteya vermicola*, EV) 属于食线虫真菌, 是松材线虫的内寄生真菌, 它产生的

新月形孢子能够在短时间内侵染并杀死松材线虫。因其对松材线虫具有高感染性和较强致死性, 该菌有潜力成为生防菌株<sup>[5-7]</sup>。若 EV 菌成为共生真菌共存于松树体内, 则有望更高效地防治松树松材线虫。本试验通过一组试验设计, 测试适宜 EV 真菌生长的 pH 范围, 研究 EV 菌在加有松树不同部位材料的培养基上的生长繁殖情况, 探讨 EV 菌在松树体内定殖的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

*Esteya vermicola* CBS115803 (EV115803) 和 CNU120806 (EV120806)。分别购于荷兰微生物菌种保藏中心和韩国微生物保存中心。

收稿日期: 2019-11-14 修回日期: 2020-03-26

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1200400); 国家自然科学基金项目 (31800547)

\* 通讯作者: qulj2001@caf.ac.cn

## 1.2 培养基的配制

**PDA 培养基:** 马铃薯葡萄糖培养基 (美国 BD 公司), 按照说明书每升水加入 24 g 培养基和 10 g 琼脂。121 °C 高温高压灭菌 20 min。将刚经灭菌的培养基冷却至 40~50 °C, 加入相应量的浓盐酸和 10M NaOH, 将培养基 pH 值分别调至 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14, 后倒平板。待平板凝固后, 在平板中央接种新鲜 EV 菌饼 (直径 5 mm), 置于 25 °C 恒温箱中培养, 每个 pH 处理重复 3 次。

**WA 培养基:** 每升蒸馏水中加入 10 g 琼脂, 后经高压灭菌。

黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.) 材料于 2014 年采自中国林科院 (北京) 院内, 树龄约 35 a, 选取 1~5 年生新鲜小松枝及松针, 分为松针、松树皮、松针附着的小松枝和木质部 4 个部分, 用小型粉碎机粉碎, 获得松针粉末 (Y)、松树皮粉末 (P)、松针附着的小松枝粉末 (Z) 和木质部的锯末 (J)。

将 4 种松树成分分别加入到 PDA 和 WA 这两种培养基中, 按 50 mL 的培养基分别添加 5 g 的 Y、P、Z、J (质量与体积比为 10%) 比例, 配制 PDA+Y、PDA+P、PDA+Z、PDA+J、WA+Y、WA+P、WA+Z、WA+J 8 种培养基, 以上培养基 PDA 和 WA 均为自然 pH 值, pH 值为 6.5 左右。121 °C 灭菌 20 min, 制成含松树基质的培养基。分别接种 EV115803 和 EV120806 活菌菌饼 (直径 5 mm), 置于 25 °C 培养, 每天观察和测量菌落的生长情况。

## 1.3 显微形态观察

在加有不同松树部位材料的培养基上生长 15 d 的菌落边缘打取 3 个菌饼, 放入 1 mL 蒸馏水中, 震荡 10 min, 获得孢子悬浮液, 在光学显微镜下观察和拍照。

## 1.4 统计分析

利用 ANOVA 进行方差分析, 并利用 F-test 检验各个主因素及交互的显著性。若主因素及交互作用不显著, 则将其剔除并重新分析。所有分析及绘图均在 R 中完成 (版本号 3.5.0)。

# 2 结果与分析

## 2.1 pH 值对 EV 菌生长的影响

通过观察和测定 EV 菌在不同 pH 值培养基上

的菌落生长情况, 发现两株 EV 真菌在 pH5~13 培养基上均可生长, 但在  $\text{pH} \leq 4$  的平板 (琼脂不凝固) 上不能生长。这两株 EV 菌生长速度存在明显差异 (图 1)。由图 1 可看出, 在 pH 5~8 平板上, 菌株 EV115803 菌落直径均大于 EV120806 菌落直径。在 pH 5~7 时, 两菌株菌落直径均差异显著。在 pH 9~13 时, EV120806 菌落直径均大于 EV115803 菌落直径, 但只在 pH 10 时 EV115803 和 EV120806 菌落差异显著。同株菌株比较, 菌株 EV115803 在 pH 7 时菌落直径最大, 菌丝的延伸速度最快。而 EV120806 在 pH 10 菌落直径最大, 菌丝生长速度最快。当 pH 值 >7 时, 随 pH 值的增加, 两株 EV 菌菌落颜色逐渐变浅, 气生菌丝菌体量少于酸性条件下的菌体量 (图 2)。

## 2.2 PDA 中添加松树成分对 EV 菌生长的影响

在培养至 3 d 时, 与 PDA 对照相比, 菌株 EV

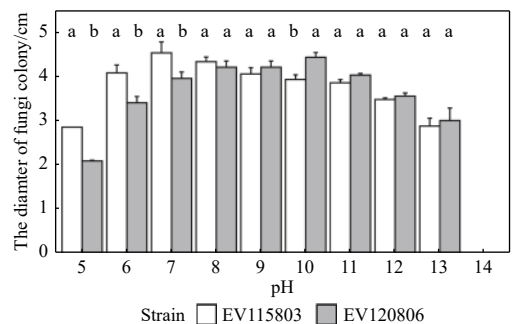


图 1 pH 对 EV 菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of pH on growth of EV strains

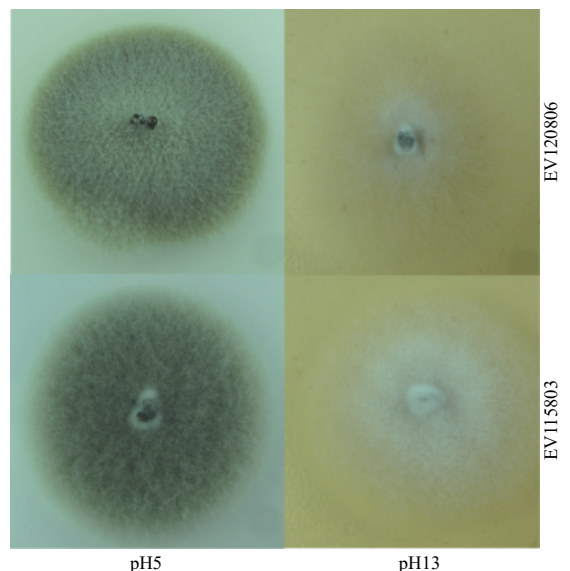


图 2 两株菌在不同 pH 培养基上的菌落形态

Fig. 2 Colony of two strains at PDA with different pH values

115803 和 EV120806 在 PDA+Y、PDA+P、PDA+Z 上气生菌丝体发达茂盛, 但在 PDA+J 培养基上两个菌株则未见生长。当培养至 5 d 时, EV115803 和 EV120806 在 PDA+J 上才见菌体生长。在 PDA+J 上, EV120806 较 EV115803 生长的快, 前者几乎是后者的两倍。当培养至 7 d、11 d 和 15 d 时, 菌株 EV115803 在 PDA 上菌落直径分别达到 3.7 cm、

6.2 cm、8.3 cm。菌株 EV115803 在 PDA+P、PDA+Z、PDA+Y 和 PDA+J 上生长较慢, 其中在 PDA+J 上的菌落生长速度最慢 (图 3 上)。菌株 EV120806 表现不同, 除对照 PDA 外, 该菌在 PDA+Z 上菌丝生长速度最快。值得关注的是, 在 7 d 时, 菌株 EV120806 在 PDA+J 上的生长速度显著高于 EV115803, 在 11 d 和 15 d 时亦是如此 (图 3 下)。

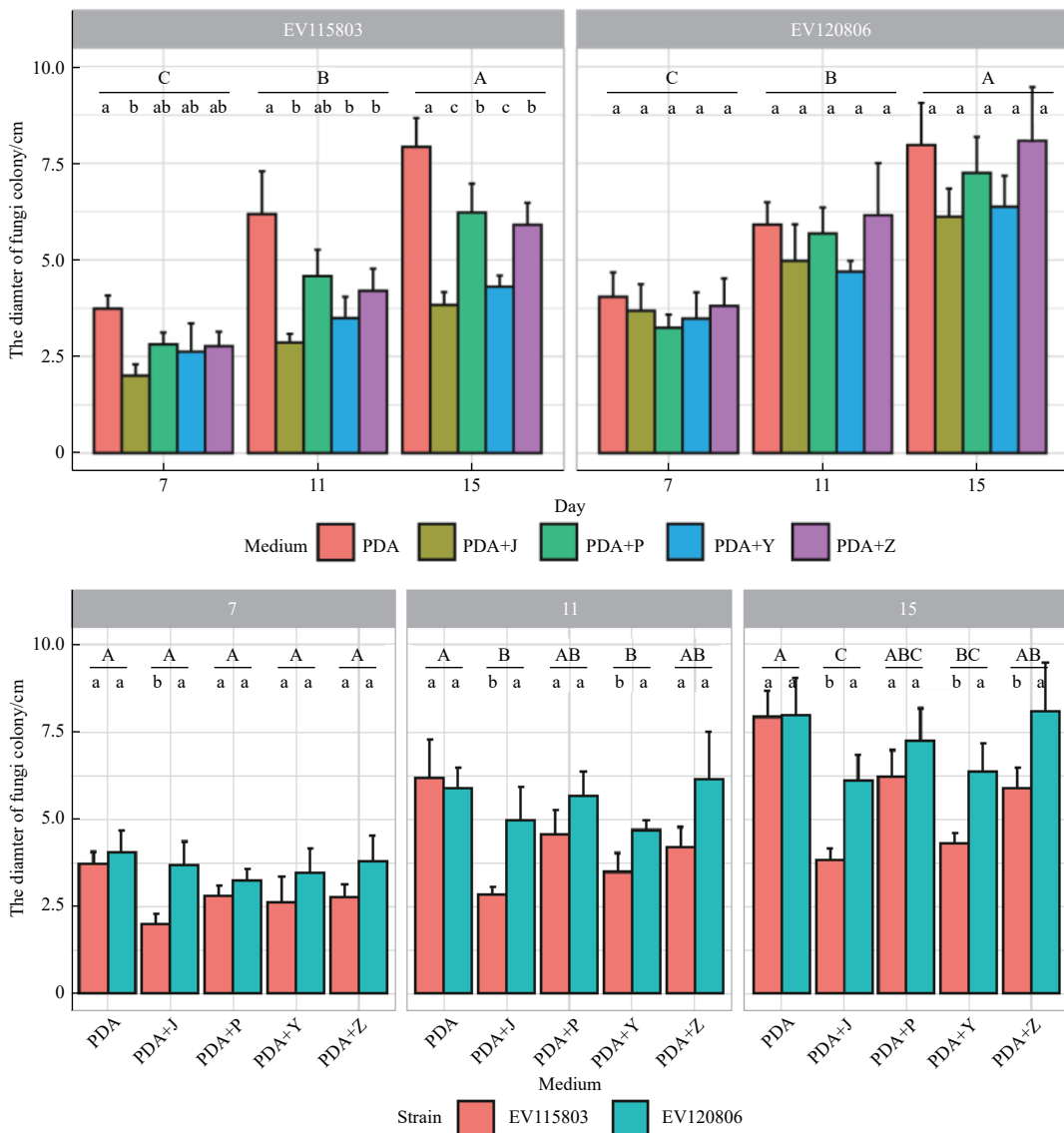


图 3 在 PDA 上添加松树成分对 EV 菌丝体生长的影响

Fig. 3 Effects of adding pine nutrients in PDA medium on mycelial growth of EV strains

从图 4 可以看出, 在 PDA 中添加松树成分, 均可促进两个菌株的菌落生长, 气生菌丝发达, 浓密。在 PDA 上, 添加松树成份更易促进菌株 EV120806 生长。生长至 30 d 时, EV120806 在 PDA+J 上的菌落直径为 8.9 cm (长满整个平板), 而 EV115803 在 PDA+J 上的菌落直径才 6.8 cm。

菌株 EV120806 产生弯月状孢子的数量 (15 d 观察时极少有杆状孢子) 也多于菌株 EV115803 (图片未显示)。

### 2.3 WA 中添加松树成分对 EV 菌生长的影响

菌株 EV115803 和 EV120806 在 WA+Y、WA+P、WA+Z 上气生菌丝发达茂盛, 但与 PDA+ 上生长相

比，其菌落稀疏。对 EV115803 菌株来讲（图 5 上），在 15 d 时，在 WA+P 上生长的菌落直径最

大；对于 EV120806 菌株来讲，在 15 d 时，在 WA+Y 上生长的菌落直径最大。当两株真菌在培养至 7 d、11 d 和 15 d 时，EV120806 菌株在 WA、WA+J、WA+P、WA+Y 和 WA+Z 上的菌落生长速度均大于 EV115803 菌株（图 5 下）。

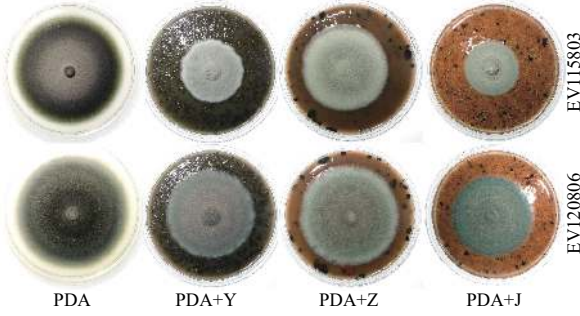


图 4 PDA 上添加不同松树成分对 EV 菌落形态的影响 (15 d)

Fig. 4 Effect of adding pine nutrients in PDA medium on colony morphology of EV (15 d)

从生长数据和菌落形态看（图 5 和图 6），2 个菌株对松针、枝条和树皮（WA+Y 和 WA+Z、WA+P）的适应能力强，气生菌丝发达，菌丝生长速度快。在 WA+J（木质部锯末）上生长较慢。生长至 30 d，EV120806 在 WA+J 上的菌落直径为 6.0 cm，而 EV115803 在 WA+J 上的菌落直径仅为 4.7 cm。

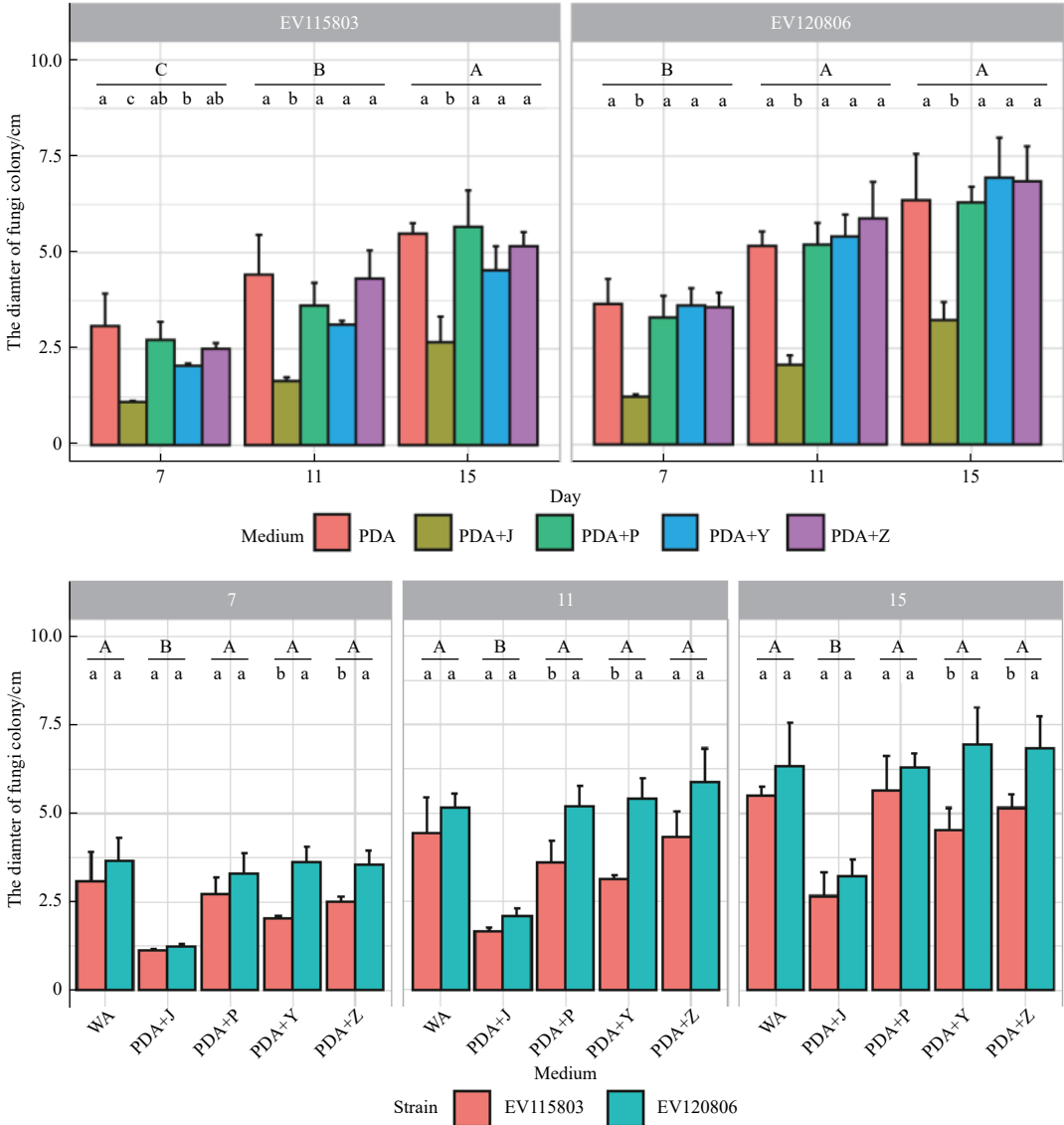


图 5 WA 培养基上添加不同松树成分对 EV 菌落生长的影响

Fig. 5 Effect of adding different pine nutrient in WA medium on EV colony growth





图6 WA培养基上添加松树成分对EV菌落形态的影响(15d)

Fig. 6 Effect of adding pin nutrients in WA medium on colony morphology of EV strains (15 d)

### 3 讨论

通过配制不同pH值的培养基试验,发现供试2株EV菌株的最适pH不同。2株EV菌可以生长的pH值范围很广(5~13),且在酸性条件下产生更多的气生菌丝。通过添加松树不同部位成份试验,在有外源营养的条件下,如在PDA上添加松针、松树皮、松树枝条和木质部锯末对EV菌生长均具有一定的刺激作用,表现为气生菌丝茂盛,单位面积的菌体量增多。当在WA上添加松针、松树皮、松树枝条成分时,2株EV菌也能茂盛生长,但以木质部锯末为单一营养源时EV菌则生长缓慢。

#### 3.1 EV菌是一种很强的耐碱微生物

在EV菌细胞内存在假单胞属的共生细菌<sup>[5]</sup>。据文献报道,许多真菌具有较宽的pH生长范围(如pH4~11)<sup>[8]</sup>。食线虫真菌 *Duddingtonia flagrans* 在pH<13的碱性条件下均可以生长<sup>[9]</sup>。近缘毛壳菌 (*Chaetomium subaffine*) 生防菌株可以在pH13时仍可生长<sup>[10]</sup>。嗜碱细菌可生长的pH范围为5.5~9.0<sup>[11]</sup>,专性嗜碱微生物可在pH11~12的条件下生长,但在中性pH条件下却不能生长。例如,巴氏芽孢杆菌 (*Bacillus pasturii*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alcalophilus*) 等细菌。一种黄杆菌 (*Flavobacterium*) 能在pH11.4的条件下生长<sup>[10]</sup>。而EV菌能在pH13的条件下生长,说明其耐碱性极强,可能与其细胞内存在的细菌有关。

#### 3.2 EV菌能否作为共生菌在松树体内定殖?

目前,在全球范围共分离出6株EV菌(CBS156.82、CBS100821、ATCC74485、CBS115803、CNU120806、NKFI32229)<sup>[11-13]</sup>,有2株(CBS156.82和ATCC74485)是从松树(*Pinus* sp., *P. thunbergii* Parl.)

中分离到的。尽管本研究所选用的2株EV菌的原始分离基质不是松属植物,如EV115803是从橡树中分离到的,而EV120806是从松林的土壤中分离到的,二者可在添加有松树成分的培养基上生长,对气生菌丝生长有刺激作用。试验结果表明,EV菌可耐受松树的抗菌物质,如松脂等。松树木质部锯末中的主要成分是木质素和纤维素,EV菌也可以在松树木质部锯末中生长,虽然生长速度显著低于松针、树皮和松枝,作者推测可能是由于锯末(木质部成分)中的松脂含量高,或是需要合成一些降解木质素或者纤维素的酶,需要较长时间调整代谢所致。许多研究表明,将生防真菌(如昆虫病原真菌)引入植物中作为共生真菌,以此产生抗菌作用或是对昆虫的摄食产生威慑作用是可行的<sup>[14]</sup>。目前,已经报道的作为植物共生菌的生防真菌有 *Beauveria bassiana*<sup>[15-20]</sup>, *Clado-sporium* spp.<sup>[21]</sup>, *Lecanicillium dimorphum*<sup>[22]</sup> 等。因此,未来有望将EV菌定殖在松树中做为共生菌,摄食入侵的松材线虫,从而使松树具有内源的防控因子,对松材线虫起到防控作用。

#### 3.3 EV菌不同培养对孢子产生的影响

据作者初步观察,EV菌在PDA上生长后期(如15天后),在菌落中央会产生大量的白色粉状的杆状孢子,菌落中央颜色较边缘浅,EV115803更易产生杆状孢子。在PDA上添加松树成分,可以促进EV菌气生菌丝体生长,而且促进弯月状孢子生长,其中以菌株EV120806最为明显。相比EV115803,EV120806或许是一个较好的菌株,有待进一步试验。我们推测,松树中的某种成分可能诱导EV菌弯月形孢子大量产生。

### 4 结论

通过pH和以松树不同部位为培养基的试验,发现EV菌适应的pH值范围为5~13,EV菌耐碱性极强,且EV菌在加有松树各部位成分的培养基上均能够生长,相比EV115803,菌株EV120806对松树培养基的适应性更强,未来有望将EV菌定殖在松树中做为共生菌,摄食入侵的松材线虫,从而使松树具有内源的防控因子防控松材线虫。

#### 参考文献:

- [1] Vicente C, Espada M, Vieira P, et al. Pine wilt disease: a threat to European forestry[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012,

- 133(1): 89-99.
- [2] 叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析[J]. 林业科学, 2019, 55(9): 1-10.
- [3] 宁 眺, 方宇凌, 汤 坚, 等. 松材线虫及其传媒松墨天牛的监测和防治现状[J]. 昆虫知识, 2005, 42(3): 264-269.
- [4] 张 镨, 梁 军, 严冬辉, 等. 中国松材线虫病研究[J]. 世界林业研究, 2010, 23(3): 59-63.
- [5] Liou J Y, Shih J Y, Tzcan S S. *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan, attacking the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. Mycological Research, 1999, 103(2): 242-248.
- [6] Wang R, Dong L, He R, *et al.* Comparative genomic analyses reveal the features for adaptation to nematodes in fungi[J]. DNA Research, 2018, 25(3): 245-256.
- [7] Wang R, Dong L, Chen Y, *et al.* *Esteya vermicola*, a nematophagous fungus attacking the pine wood nematode, harbors a bacterial endosymbiont affiliated with *Gammaproteobacteria*[J]. Microbes and Environments, 2017, 32(3): 201-209.
- [8] 王 琪. 广西龙眼真菌性病害的调查与研究[D]. 南宁, 广西大学, 2001.
- [9] 王波波. 食线虫性真菌 *Duddingtonia flagrans* 的分离, 生物学特性及体内外试验的研究[D]. 兰州, 西北民族大学, 2018.
- [10] 刘彩云, 季洪亮, 王 瑞, 等. 近缘毛壳菌生防菌株 LB-1 对几种常见植物病原真菌的拮抗作用及其生长适应性分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(2): 20.
- [11] Padan E, Bibi E, Ito M, *et al.* Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2005, 1717(2): 67-88.
- [12] 郝涤非. 极端微生物及其应用[J]. 生物学教学, 2006, 31(6): 2-4.
- [13] Chu W H, Dou Q, Chu H L, *et al.* Research advance on *Esteya vermicola*, a high potential biocontrol agent of pine wilt disease[J]. Mycological Progress, 2015, 14(12): 115.
- [14] Vega F E. Insect pathology and fungal endophytes[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 277-279.
- [15] Cherry A J, Banito A, Djegui D, *et al.* Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepidoptera; Noctuidae) in maize following seed dressing, topical application and stem injection with African isolates of *Beauveria bassiana*[J]. International Journal of Pest Management, 2004, 50(1): 67-73.
- [16] Wagner B L, Lewis L C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3468-3473.
- [17] Lewis L C, Bruck D J, Gunnarson R D, *et al.* Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic corn[J]. Crop Science, 2001, 41(5): 1395-1400.
- [18] Leckie B M. Effects of *Beauveria bassiana* mycelia and metabolites incorporated into synthetic diet and fed to larval *Helicoverpa zea*; and detection of endophytic *Beauveria bassiana* in tomato plants using PCR and ITS primers[D]. Knoxville: The University of Tennessee, 2002.
- [19] Ownley B H, Pereira R M, Klingeman W E, *et al.* *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens[M]. Trivandrum: Research Signpost, 2004: 255-269.
- [20] Ganley R J, Newcombe G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*[J]. Mycological Research, 2006, 110(3): 318-327.
- [21] Ananda K, Sridhar K R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(10): 871-878.
- [22] Gómez-Vidal S, Lopez-Llorca L V, Jansson H B, *et al.* Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi[J]. Micron, 2006, 37(7): 624-632.

## Effects of pH Value and Pine Substrate on Growth of *Esteya vermicola* Mycelia

WANG Rui-zhen<sup>1,2</sup>, WEN Wei-hua<sup>2</sup>, LIU Bo-yang<sup>2</sup>, CUI Xia<sup>2</sup>, HE Ran<sup>1,2</sup>, QU Liang-jian<sup>1</sup>, ZHANG Yong-an<sup>1,3</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 2. Beijing Botanical Garden, Beijing Floriculture Engineering Technology Research Centre, Beijing 100093, China; 3. Experimental Center of Forestry in North China, Chinese Academy of Forestry, Beijing 102300, China)

**Abstract:** [Objective] To study the pH range favoring *Esteya vermicola*, and the effects of pine substrate on the growth of *E. vermicola* so as to provide references for colonization of *E. vermicola* in *Pinus* trees and the biological control against pine wood nematodes. [Method] *E. vermicola* CBS115803 (EV115803) and *E. vermicola* CNU120806 (EV120806) were used to test their fungal pH adaptation range. The media with different parts of pine were prepared to study the growth of *E. vermicola* and to observe and measure the growth rate, mycelial amount and sporulation of each strain. [Result] *E. vermicola* was adapted to the pH range of 5 to 13, and the fungi produced more aerial hyphae under acidic conditions. PDA medium added with different parts of pine trees had a certain stimulating effect for *E. vermicola*. When pine needles, pine bark, and pine twigs were used as the only nutrient source, *E. vermicola* grew better than on WA plate. *E. vermicola* strains grew slowly when xylem sawdust was used as a single nutrient source. [Conclusion] *E. vermicola* is adapted to the pH range of 5 to 13. It is extremely resistant to alkaline and can grow on media added with different parts of pine trees. It is expected that *E. vermicola* will colonize the pine trees as symbiotic fungi against invading pine wood nematodes, so that pine trees have endogenous control factors for pine wood nematodes.

**Keywords:** *Pinus thunbergii*; *Esteya vermicola*; *Bursaphelenchus xylophilus*; Biological control

(责任编辑: 崔 贝)