

文章编号: 1000-5692(2005)04-00414-06

西南地区茶藨生柱锈重寄生菌的分离与鉴定

杨艳红^{1,2}, 陈玉惠¹, 朱云峰³

(1. 西南林学院 保护生物学学院, 云南 昆明 650224; 2. 浙江林学院 科技处, 浙江 临安 311300; 3. 浙江省森林病虫害防治检疫站, 浙江 杭州 310020)

摘要: 华山松疱锈病是华山松 *Pinus armandi* 最严重的病害之一。为了利用重寄生菌对华山松疱锈病进行生物防治, 对其病原菌茶藨生柱锈 *Cronartium ribicola* 的重寄生菌进行了分离和鉴定。依据柯赫氏三原则对分离得到的真菌进行鉴定, 得到茶藨生柱锈的重寄生菌链格孢 *Alternaria* spp., 镰刀菌 *Fusarium* spp., 棒束孢 *Isaria* sp., 拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp., 木霉 *Trichoderma* spp. 及粉红单端孢 *Trichothecium roseum*。经显微和超显微观察发现接种重寄生菌后锈孢子受到不同程度的破坏, 且不同的重寄生菌对锈孢子有不同的作用方式。图 3 表 4 参 15

关键词: 森林保护学; 重寄生菌; 茶藨生柱锈; 华山松疱锈病

中图分类号: S763.1; Q934 文献标识码: A

茶藨生柱锈 *Cronartium ribicola* 是世界林木三大病害之一——五针松疱锈病的病原菌。在我国, 该病原菌主要危害红松 *Pinus koraiensis* 及华山松 *P. armandi*, 故五针松疱锈病又被称为红松疱锈病和华山松疱锈病^[1,2]。在云南省, 华山松疱锈病的发病面积就达 5 967.9 hm², 已对长江防护林体系的建设和西部生态环境的恢复造成了严重的威胁^[3]。一种真菌生长在另一种真菌上是自然界普遍存在的现象, 这种现象被称为菌物寄生现象或重寄生现象^[4]。众多研究发现, 重寄生菌对植物病原菌有着明显的控制作用, 是一类极具生防潜力的生物资源。重寄生性也是多数生防菌的主要生防机理。所以重寄生菌的研究不仅具有理论价值而且更具有重要的应用价值。Treseder 曾报道^[9], 柱锈菌 *Cronartium* spp. 的锈子器和锈孢子在自然状态下被重寄生菌、昆虫和线虫等生物因子破坏的可能性高达 50%~60%。由此可知, 茶藨生柱锈在林间也可能存在着多种生物控制因子, 除已发现的紫色霉菌 *Tuberculina maxima*^[6,7] 和枝顶孢 *Acremonium* sp.^[8] 外, 还应该有其他的重寄生菌尚不为人所知, 所以进行该病原菌重寄生菌的分离鉴定, 从中选出生态适应性强, 防治效果好的菌株并加以开发利用, 将为可持续控制华山松疱锈病的研究奠定基础 and 提供充足的生物资源。

1 材料与方 法

1.1 材料采集

1.1.1 采集地点及时间 采集样地设在云南省昆明市东川区二二二林场、巧家县马树林场、大理洱源县罗坪山林和四川省广元县天台山林场的发病林分。材料采集时间为 3 月中旬至 5 月上旬。

1.1.2 采集方法 在各采集地随机选取 10~15 株进行锈孢子和感病枝干的采集, 每株取样数不低于 4

收稿日期: 2005-04-22; 修回日期: 2005-06-21

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2002C0047M)

作者简介: 杨艳红, 硕士, 从事森林病理学和科研管理研究。E-mail: swfcyyh@sohu.com

份。①锈孢子的采集。用小刀划破锈子器包被将锈孢子抖入已灭菌的三角瓶中, 封口胶密封后置于冰壶内, 收集到的锈孢子需在 4 °C 下低温干燥保存。②感病枝干的采集。用锯子将锈子器较多的枝干截成小段并装入干净的塑料袋内; 剥取感病树皮装入已灭菌的三角瓶内。

1.2 菌种分离

1.2.1 以锈孢子为分离材料 直接将锈孢子抖落于 PDA 平板上。

1.2.2 以保湿后锈子器中长出的菌丝体为分离材料 将感病枝干和树皮置于室温下保湿, 待锈子器表面长出菌丝体, 锈孢子堆变白后挑取少许菌丝体移入 PDA 平板。分离后的 PDA 平板于 28 °C 全黑暗培养。待 PDA 平板长出菌落后进一步纯化。记录各菌株纯化菌落的培养性状, 待菌落产生孢子或子实体后, 于显微镜下观察, 记录特征并显微计测孢子大小。查阅相关文献确定其分类地位。

1.3 重寄生菌的鉴定

以分离得到的菌株为供试菌株, 以 1.1.2 采集到的锈孢子为供试锈孢子。

1.3.1 活菌体接种锈孢子堆 将放有滤纸的培养皿高温灭菌, 在无菌条件下用滴管滴入少量无菌水浸润滤纸。滤纸上抖入一小堆锈孢子后将直径约 1 mm 的供试菌株的菌块置于锈孢子堆上。28 °C 下培养 2 d 后开始观察记录, 连续观察记录 5 d (每隔 2 d 加入一定量无菌水以保持滤纸湿润)。以不接入菌块的锈孢子堆为对照 1, 以直接将菌块置于湿润滤纸上培养的设为对照 2, 每处理均设 3 个重复。

1.3.2 接种后锈孢子的显微及超微结构观察 挑取少许接种后的锈孢子以水为浮载剂制片, 于显微镜下观察锈孢子的变化情况。选取受伤害有代表性的锈孢子进行超微结构观察, 样品送至北京中科院微生物研究所电镜室处理并进行电镜扫描。

1.3.3 TTC (2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑)法检测锈孢子活力 参照《现代植物生理学实验指南》^[9] 及张雄^[10] 的方法, 并加以改进。显微镜下观察经 TTC 处理后的锈孢子着色情况。设锈孢子完好(即形状不变, 表面疣突排列紧密不脱落)且孢子内含物被均匀染成红色的为有活力者。锈孢子活力率=有活力锈孢子个数÷视野内锈孢子总个数×100%。

1.3.4 供试菌株的再分离 从 1.3.1 各处理中变白的锈孢子堆中挑取少许锈孢子置于 PDA 平板上, 同时将置于保湿滤纸上的菌块(对照 2)也接入 PDA 平板作为对照。在 28 °C 下培养 5 d 后观察长出的菌落情况, 纯化后进行初步鉴定。每菌株均设 4 个重复。

2 结果与分析

2.1 菌种分离及鉴定结果

4 个采集地 2 种分离材料共分离得到真菌 212 株, 已初步鉴定到属的有 139 株, 分属于 8 个属。鉴定到种的有 2 种 61 株。不产孢尚不能判断其归属的有 12 个菌株。分离鉴定结果见表 1。由表 1 可知, 虽然采集地不同, 分离材料有异, 但分离所得的真菌种类不多, 各采集地分离的结果呈现出很大的相似性。粉红单端孢、链格孢、镰刀菌和壳梭孢等 4 个属的真菌出现频率还很高。

表 1 各采集地分离所得菌株数及鉴定结果

Table 1 Results of isolation and identification of strains from four plots

属(种)名	不同采集地菌株数				总计
	大理洱源	巧家马树	东川二二二	四川广元	
链格孢 <i>Alternaria</i>	11	7	11	3	32
毛壳 <i>Chaetomium</i>	1		0	1	
球毛壳 <i>C. globosum</i>		1			3
镰刀菌 <i>Fusarium</i>	5	5	1	22	33
壳梭孢 <i>Fusicoccum</i>	1	10	16	1	28
棒束孢 <i>Isaria</i>	2	3	1	0	6
青霉 <i>Penicillium</i>	5	2	1	3	11
拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i>	1	6	3	0	10
木霉 <i>Tirchodema</i>	1	8	0	9	18
粉红单端孢 <i>Trichothecium roseum</i>	31	28	0	0	59
其他	9	2	1	0	12
总计(菌株数)	67	72	34	39	212

2.2 保湿后感病枝干和病皮上锈子器及锈孢子的变化

感病枝干和树皮保温大约 20 d 后, 锈子器上会长出白色、浅红色或暗色的菌丝体。锈子器的包被碎裂消解, 锈孢子堆由鲜黄色变成白色。挑取少许锈孢子于显微镜下观察可见锈孢子或被许多菌丝缠绕、破碎(不破碎者颜色也变浅而透明), 或表面的疣大部分脱落和完全脱落, 使孢子呈圆形透明且内含物浓缩。这与杨松^[1]用黑色塑料薄膜包扎病部一段时间再解开展现到的现象相同。与杨斌等^[8]发现的重寄生菌 *Acemonium* sp. 接种后锈孢子的变化情况也一致。

2.3 重寄生菌接种试验结果

将分离所得的菌株接种锈孢子堆, 其试验结果表明各属的不同菌株表现基本一致, 以各属中有代表性的菌株为例, 试验结果见表 2~3。

表 2 接种后锈孢子堆的变化及锈孢子活力测定

Table 2 Growth of conobia and aeciospores color change and their activity after inoculation

属(种)名	菌株号	菌落的生长及锈孢子堆颜色变化								锈孢子活力/ %	
		2		3		4		5 d		接种后	对照 1
		接种后	对照 1	接种后	对照 1	接种后	对照 1	接种后	对照 1		
链格孢	MS011	+	-	+++	-	++++	-	++++	+	0	76
毛壳	LS015	-	-	-	-	-	-	+	+	80	82
镰刀菌	MM007	++	-	+++	-	++++	-	++++	+	0	59
壳梭孢	DS002	-	-	-	-	-	-	-	++	76	82
棒束孢	MM008	++	-	+++	-	++++	-	++++	++	0	82
青霉	LS011	-	-	-	-	++	-	++	-	46	59
拟盘多毛孢	MM011	+	-	+++	-	++++	-	++++	++	15	82
木霉	LS020	++	-	+++	-	++++	-	++++	+	0	59
粉红单端孢	MM005	-	-	++	-	+++	-	++	-	19	59
未知种	LS012	-	-	-	-	-	+	-	+	43	68

说明: “-” 菌块于锈孢子堆中长出菌丝但不能形成菌落, 或形成菌落但锈孢子堆无明显变化。以下 4 级菌块于锈孢子堆上均形成菌落且菌落覆盖了锈孢子堆: “+” 为锈孢子堆颜色变浅, “++” 为锈孢子堆小部分变白, “+++” 为锈孢子堆一半以上变白, “++++” 为锈孢子堆完全变白。

由表 2~3 可知, 用链格孢、镰刀菌、棒束孢、拟盘多毛孢、木霉及粉红单端孢 6 个属的真菌接种锈孢子堆, 各接种菌块均能在锈孢子堆中生长并形成菌落, 且菌落最终可覆盖整个锈孢子堆, 在菌落形成与延伸过程中, 锈孢子堆的颜色会逐渐由鲜黄变为白色, 此现象与 2.2 结果完全相同。而未接入菌块的锈孢子堆(对照 1)颜色依然为鲜黄色, 仅到了后期颜色会稍变浅或小部分变白。以上各属真菌的菌块直接置于保湿滤纸上培养(对照 2), 菌块的菌丝或不生长或生长很差只能形成稀疏的菌落, 远不及在锈孢子堆形成的菌落。随着时间

表 3 供试菌株直接置于保湿滤纸上培养(对照 2)的情况

Table 3 Growth of strains cultivating directly on water filter paper

属名	菌株号	菌落生长情况			
		2	3	4	5 d
链格孢	MS011	+	+	+	+
毛壳	LS015	-	-	-	-
镰刀菌	MM007	-	-	-	-
壳梭孢	DS002	-	-	-	-
棒束孢	MM008	-	-	-	-
青霉	LS011	+	+	++	+++
拟盘多毛孢	MM011	-	-	-	-
木霉	LS020	-	-	-	-
粉红单端孢	MM005	-	-	+	+
未知种	LS012	+	+	-	-

说明: “-” 为菌块无明显变化, 仅在菌块上长出少许菌丝, 菌丝并不延伸; “+” 为菌块上的菌丝向周围延伸形成稀疏的菌落, 其直径: 于锈孢子堆上形成的菌落直径 < 1; “++” 为菌块形成的菌落密实同于锈孢子堆上形成的菌落, 但直径比值 < 1; “+++” 为菌块形成的菌落密实同于锈孢子堆上形成的菌落, 但直径比值 ≥ 1。

的延长置于滤纸上的菌块或所形成的菌落就逐渐枯萎, 干瘪, 不再生长。除此之外, 用 TTC 检测变白的锈孢子的活力发现, 以上 6 个属真菌处理后的锈孢子活力均明显低于对照 1。上述结果表明这些真菌均有赖于锈孢子提供营养, 并通过消耗锈孢子使锈孢子失活而生长。

2.4 重寄生再分离结果

由表 4 可知, 从链格孢、镰刀菌、棒束孢、拟盘多毛孢、木霉及粉红单端孢 6 个属的真菌接种后变白的锈孢子堆上进行再分离, 均能得到与原菌株相同的真菌, 而从其他供试真菌处理后的锈孢子堆上再分离绝大多数不能得到与原菌株相同的真菌。这些都说明, 锈孢子堆由鲜黄色变为白色确实是以上 6 个属真菌的作用所致。

2.5 接种重寄生菌后锈孢子的变化

对接种重寄生菌后的孢子进行显微和超显微观察均能看到与 2.2 结果相同的现象, 而且发现重寄生菌不仅使锈孢子失活, 还对锈孢子的外部结构或内部结构造成了破坏(图 1~3)。

观察发现, 非重寄生菌(如壳梭孢, 图 1)接种后的锈孢子外形完好, 不变形, 表面疣突排列紧密与正常锈孢子无异。重寄生菌粉红单端孢和拟盘多毛孢菌丝(图 2)并未穿透锈孢子却能使孢子活力大大减弱甚至死亡; 锈孢子外观虽未受到明显的破坏, 但内含物浓缩且外壁向内凹陷。其他的重寄生菌链格孢、镰刀菌、棒束孢、木霉(图 3)的作用则不同: 其菌丝紧密缠绕锈孢子, 制片时即使反复挪动盖玻片, 甚至用解剖针挑散也不易使锈孢子和菌丝分开; 经 TTC 染色后, 锈孢子不着色, 而重寄生菌菌丝内部则呈现许多红色的小颗粒(显示其有活力), 在显微镜下还可观察到锈孢子的菌丝和红色小颗粒环状排列, 说明菌丝穿透锈孢子且在内部盘卷。扫描电镜下同样观察到菌丝穿透锈孢子且有的锈孢子上还可见到小孔和凹陷; 作用后的锈孢子外壁上的疣突易脱落, 甚至整个外壁都会脱落。这就预示着重寄生菌作用锈孢子可能存在着不同的机理。

3 结论与讨论

从锈孢子堆或保湿后变白的锈孢子堆中分离重寄生菌。重寄生菌人工接种鲜活锈孢子堆后通过培养, 又再现出锈孢子堆变白及锈孢子破碎、疣突脱落、活力丧失等典型症状, 从变白锈孢子堆上再分离重寄生菌, 鉴定仍为原菌株后即可确认茶藨生柱锈的重寄生菌(符合柯赫氏三原则)。故本研究所得的链格孢、镰刀菌、棒束孢、拟盘多毛孢、木霉及粉红单端孢为茶藨生柱锈的重寄生菌。

重寄生菌的作用机理主要有分泌毒素和分泌细胞壁降解酶 2 个方面^[12]。真菌选择的营养基质, 最终取决于其向外分泌消化酶的种类^[13]。重寄生菌已被证明可以向外分泌分解真菌细胞壁骨架成分的几丁质酶和 β -葡聚糖酶, 从而破坏寄主细胞壁的骨架结构。锈孢子的外壁主要也由 β -葡聚糖和几丁质组成^[13, 14], 其表面疣突是从孢子的初生壁发育而成的^[12], 链格孢等 4 个属的真菌均能使锈孢子表面的疣突脱落, 孢子破碎, 说明锈孢子的外壁结构已在一定程度上受到破坏。而毒素主要是作用于寄主真菌的细胞质膜和细胞内部结构, 通过影响细胞内的物质及能量代谢导致其生理失调最终使细胞死亡^[15]。拟盘多毛孢和粉红单端孢作用后的锈孢子在外观上没有明显的变化, 但孢子内部发生的变化预示着这 2 种真菌可能以分泌毒素物质为主要作用机理。基于上述分析, 筛选得到的茶藨生柱锈重寄生菌可能存在着细胞壁降解酶和毒素两方面的作用机理, 揭示不同重寄生菌伤害锈孢子的不同机理。

表 4 供试菌株再分离情况

Table 4 Results of strains after reisolation

属(种)名	菌株号	再分离所得真菌			
		I	II	III	IV
链格孢	MS011	√	√	√	√
毛壳	LS015	○	○	√	○
镰刀菌	MM007	√	√	√	√
壳梭孢	DS002	○	√	○	○
棒束孢	MM008	√	√	√	√
青霉	LS011	○	○	○	○
拟盘多毛孢	MM011	√	√	√	√
木霉	LS020	√	√	√	√
粉红单端孢	MM005	√	√	√	√
未知种	LS012	○	○	○	○

说明: √为再分离所得真菌同于对照 2(原菌株); ○为再分离所得真菌不同于对照 2。

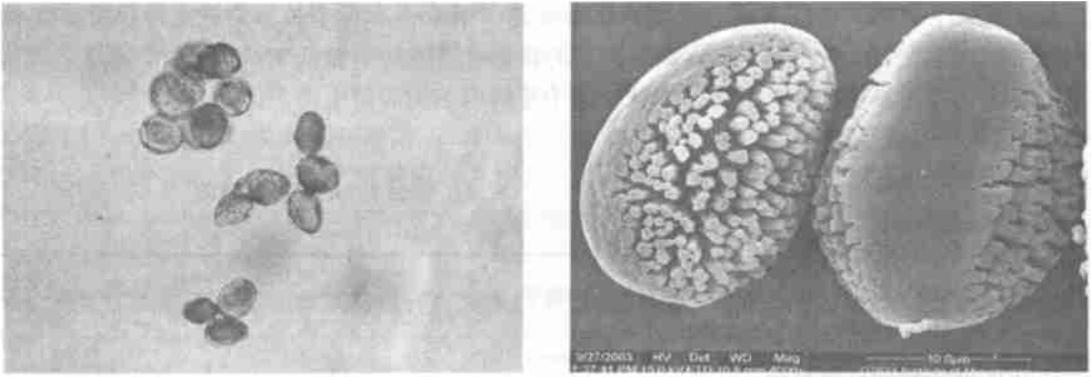


图1 壳梭孢DS002菌株接种后的锈孢子
Figure 1 Aeciospores after inoculation for *Fusicoccum* DS002

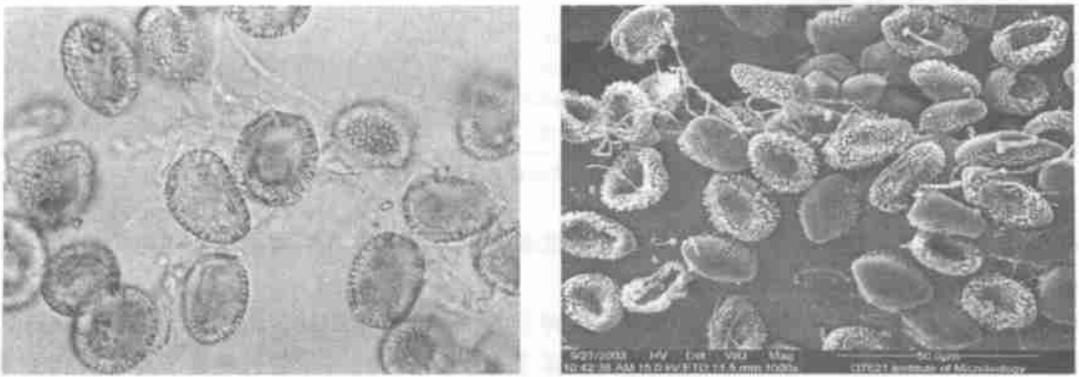


图2 拟盘多毛孢MM011菌株接种后的锈孢子
Figure 2 Aeciospores after inoculation for *Pestalotiopsis* MM011

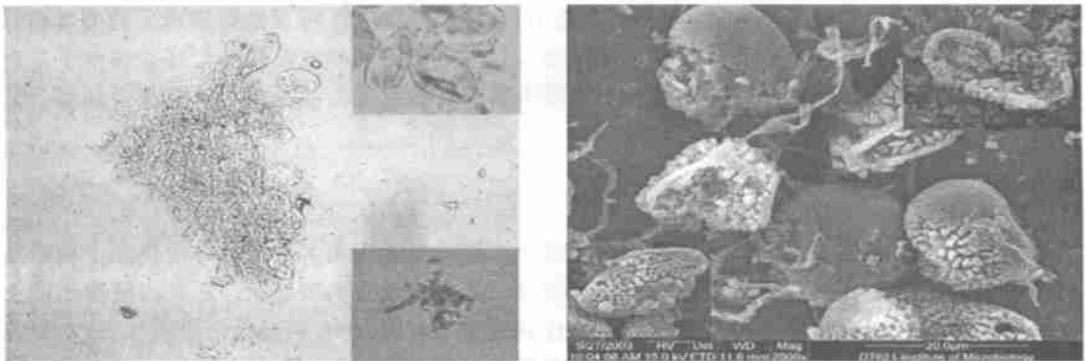


图3 木霉IS020菌株接种后的锈孢子
Figure 3 Aeciospores after inoculation for *Trichodema* IS020

进而挑选出有应用前景的重寄生菌，将为华山松疱病的生物防治提供资源和新的防治思路。

参考文献:

[1] 王元章. 中国森林病害[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984. 37-39.
 [2] 任玮. 云南森林病害[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 1992. 69-71.
 [3] 冯士明. 云南省森林植物检疫对象发生及危险性评估[J]. 中国森林病虫, 2001, (4): 31-33.
 [4] Hawksworth D L, Kirk P, M Sutton B C, et al. *Ainworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition* [M]. Cambridge: CAB International, 1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

University Press, 1995, 5—36.

- [5] Treseder K K, Allen M F. Mycological research news [J]. *Mycol Res*, 2000, **104** (11): 1 281—1 283.
- [6] Hiratsuka Y, Powell J H. *Pine Stem Rusts of Canada* [R]. Edmonton: Canadian Forest Service, 1976.
- [7] Hungerford R D. Natural inactivation of blister rust canker on western white pine [J]. *For Sci*, 1977, **23** (3): 343—350.
- [8] 杨斌, 周彤. 云南省华山松疱锈病研究[A]. 喻盛甫. 植物病理重点实验室论文集: 第 2 卷[C]. 昆明: 云南农业大学出版社, 1998. 295—305.
- [9] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 129—129.
- [10] 张雄. 用“TTC”法(红四氮唑)测定小麦根和花粉的活力及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1982, (3): 48—50.
- [11] 杨松. 云南省华山松疱锈病发生与林分条件关系及防治的初步研究[D]. 昆明: 西南林学院, 2003.
- [12] 李多川. 菌寄生真菌分子生物学研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 1998, **20** (增刊): 37—39.
- [13] Alexopoulos C J, Blackwell M, Mims C W. 菌物学概论: 第 4 版[M]. 姚建一, 李玉, 译. 北京: 中国农业出版社, 2003. 3—10.
- [14] Ekramoddoullah A K M, Jensen G D, Manning L E. Ultrastructural localization of chitin in the five spore stages of the blister rust fungus *Cronartium ribicola* [J]. *Mycol Res*, 2000, **104** (11): 1 384—1 388.
- [15] 祁高富 杨斌, 叶建仁. 植物病原真菌毒素研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2000 **24** (2): 66—70.

Isolation and identification of *Cronartium ribicola* mycoparasites in southwest China

YANG Yan-hong^{1,2}, CHEN Yu-hui¹, ZHU Yun-feng³

(1. School of Conservation Biology, Southwest Forestry College, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Department of Science and Technology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. Forest Pest Control & Quarantine Station of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, Zhejiang, China)

Abstract: *Pinus armandi* blister rust is one of the most severe diseases in *P. armandi* forest. In order to biologically control this disease with mycoparasites, isolation and identification of mycoparasites on *Cronartium ribicola* were conducted. The results showed that *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Isaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* spp. and *Trichothecium roseum* were mycoparasites in *Cronartium ribicola*. Microscopic and ultra-microscopic observation of aeciospores under ESM showed that different mycoparasites had different effects on aeciospores. [Ch, 3 fig. 4 tab. 15 ref.]

Key words: forest protection; mycoparasites; *Cronartium ribicola*; *Pinus armandi* blister rust

欢迎订阅 2006 年《贵州农业科学》

《贵州农业科学》是贵州省农业科学院主办的具有明显山区农业特色的综合类农业学术期刊。主要报道各级农业科研单位、农业院校和农业生产第一线的研究成果, 大面积高产工程的技术措施, 种养业、产品加工业增值技术, 并随时针对科研和生产中的热点、难点问题, 开辟新专栏。

该刊是国家科技部中国科技论文统计源期刊, 中国科学引文数据库来源期刊, 中国学术期刊综合评价数据库来源期刊, 《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》首批入编期刊和万方数据系统入编期刊。该刊 2000 年获首届《CAJ-CD 规范》执行优秀奖, 2002 年和 2004 年先后获得全国优秀农业期刊奖, 2004 年被列为中国科技核心期刊。

该刊为双月刊, 双月 15 日出版。A4 开本。每期定价 5.00 元, 全年 30.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅, 邮发代号: 66-6, 也可汇款到编辑部订阅。

读者范围: 大中专院校师生, 科研院所研究人员以及基层农业技术推广人员。

地址: 550006 贵阳市小河区贵州省农业科学院科技信息研究所《贵州农业科学》编辑部

电话: 0851-3760719, 3761720 (传真)。E-mail: gznk@263.net