

华山松大小蠹体内外和坑道内蓝变真菌研究^{*}

朱长俊, 唐 明, 陈 辉

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对华山松大小蠹体内外和坑道内真菌进行了分离, 各真菌的室内外人工接种和蓝变试验结果表明, 华山松大小蠹体内外和坑道内有 11 属 13 种真菌, 其中 *Alternaria humicola*、*Fusarium oxysporum*、*Leptographium qinlingensis*、*Trichodema virid*、*Verticillium* sp. 5 种真菌能够引起华山松木质部边材组织变色, 但只有 *Leptographium qinlingensis* 能够造成华山松木边材组织的蓝变, 并且也只有 *L. qinlingensis* 能够在健康华山松木质部和韧皮部组织内发育, 且与自然状态下被害华山松组织内真菌的危害性和引起的蓝变完全一致。

[关键词] 华山松大小蠹; 坑道; 蓝变真菌

[中图分类号] S763.15; S763.38

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0083-04

小蠹虫与真菌间关系的复杂性和多样性, 不仅使小蠹虫能够依赖贮菌器携带的真菌有效地克服寄主树木的多元抗性, 特别是克服寄主树木树脂类抗性^[1], 而且通过真菌在寄主树木组织内的快速发育和对寄主树木纤维素、木质素等高分子有机物的分解转化, 使小蠹虫对寄主树木营养的利用率提高^[2]。Whitney^[3]将影响小蠹虫的真菌依其与小蠹虫间的关系划分为共生和颉抗两类, 并认为蓝变真菌和酵母菌与寄主树木的死亡有关。为此, 本试验对华山松大小蠹体内外和坑道内的蓝变真菌种类进行了研究, 为揭示健康华山松被害死亡的原因和蓝变真菌在致死寄主华山松中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 华山松大小蠹体内外和坑道内真菌的分离与鉴定

分别于 1998, 1999, 2001 年的 5 月, 10 月在秦岭海拔 1 600~2 100 m 的华山松林内, 选取华山松新侵木胸高处 30 cm 厚的圆盘及枯萎木(内有华山松大小蠹成虫、幼虫、卵)和枯立木(内有华山松大小蠹母坑道、子坑道和蛹室)80~100 cm 长的木段, 带回实验室备用。

分别选取麦芽汁琼脂培养基(MEA)、PDA、Czaprek 培养基和豆芽汁培养基, 将处于新侵木、枯萎木和枯立木 3 个不同受害阶段的木材韧皮部内华

山松大小蠹坑道(侵入孔、母坑道和母坑道前方 3~5 cm 处, 子坑道、虫粪和蛹室)分别进行分离培养; 将野外采集和饥饿 48 h 后的华山松大小蠹成虫、幼虫、蛹分别分体表 75% 酒精消毒和未消毒, 并采用 Francke-Grosman 间歇灭菌法分离华山松大小蠹体内外真菌^[4]。依据真菌培养特征、菌落特征、孢子特征等形态学特性对其进行鉴定^[5, 6]。

1.2 木材蓝变试验

将健康华山松木质部组织切成大小为 2.5 cm × 2.0 cm × 0.3 cm 的木片, 用体积分数 75% 酒精表面消毒后, 置于盛有 PDA 培养基的培养皿中, 然后将上述分离的真菌在 Czaprek 培养基培养 6 d 后, 接种健康华山松木片, 在 25 °C、相对湿度 70% 的培养箱内培养。每隔 2 d 检查菌丝生长和木质部组织变色情况, 10 d 后制作石蜡切片观察菌丝在木材组织中的侵染情况^[7]。

2 结果与分析

2.1 华山松大小蠹体内外和坑道内真菌种类

通过对华山松大小蠹成虫、幼虫和蛹体内外以及华山松大小蠹坑道内真菌的分离鉴定, 共分离出真菌 11 属、13 种(表 1)。结果表明, 华山松大小蠹幼虫、蛹和成虫体内外具有与华山松大小蠹坑道内相类似的真菌区系。其中 *Leptographium*、*Alternaria*、*Trichodema*、*Fusarium* 和 *Verticillium* 属真菌出现

* [收稿日期] 2002-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30070628)

[作者简介] 朱长俊(1975-), 男, 安徽凤阳人, 助教, 硕士, 主要从事微生物学研究, 现在嘉兴学院工作。

[通讯作者] 唐 明(1962-), 女, 安徽涡阳人, 教授, 主要从事微生物学研究。

频率较高,为优势属。在坑道和坑道前端韧皮部组织、木材蓝变部位和华山松大小蠹体内外均能分离到 *L. eptoglyphum* 属真菌,与新侵木组织内真菌种类进行对比分析可以看出,*L. eptoglyphum* 属真菌在小蠹虫入侵树木中起着重要作用。

表 1 华山松大小蠹体内外和坑道内真菌种类

Table 1 Fungi species in and out body and gallery of *Dendroctonus amandi*

真菌种类 Fungi species	成虫 Adult		幼虫 Larvae		蛹 Pupa		华山松大小蠹坑道 Gallery			新侵木 Weakened tree
	体外 in vitro	体内 in vivo	体外 in vitro	体内 in vivo	体外 in vitro	体内 in vivo	母坑 Egg galleries	子坑 Larval galleries	蛹室 Pupa cells	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	+	+	+	+	+		+	+		
<i>Alternaria humicola</i> Oudemans	+		+		+		+	+	+	+
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidm.) Wint.	+	+	+		+		+	+		
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	+		+	+	+		+	+	+	
<i>Beauveria</i> sp.		+	+		+		+	+	+	
<i>Candida</i> sp.			+	+			+			
<i>Cephalosporium</i> sp.	+		+		+		+	+		
<i>Debaryomyces</i> sp.			+		+		+			+
<i>Fusarium oxysporum</i> Sahl Emend Snyd et Hansen	+	+	+				+	+	+	
<i>L. eptoglyphum qinlingensis</i> Tang	+		+	+	+		+	+	+	+
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Trichoderma virid</i> Pers. ex Fr	+	+	+		+		+	+	+	+
<i>Verticillium</i> sp.	+	+	+		+		+	+	+	

对饥饿 48 h 的华山松大小蠹成虫、幼虫和蛹间歇灭菌后,体内外分离不到任何真菌,表明华山松大小蠹幼虫和蛹体外的真菌是随小蠹虫幼虫在韧皮部内的取食而被动附着于体表的。同时,华山松大小蠹体外附着或携带的各种真菌,均可在不同被害阶段的华山松树干韧皮部或木质部组织内分离到,这说明华山松被害木韧皮部和木质部组织内的真菌,是由华山松大小蠹体外携带,并随华山松大小蠹入侵健康华山松而接种于树干组织内的,而华山松大小蠹成虫和幼虫体内的真菌则是随取食活动进入其体内的。但随着小蠹虫入侵数量的增多,真菌对寄主华山松危害性的加剧、被害华山松抗性的减弱以及真菌入侵伤口的增多和韧皮部组织内温湿度环境条件的变化,华山松树干内微环境更适合于腐生性真菌

的生长。另外,次期性小蠹的大量入侵,使更多的腐生性真菌入侵寄主树木。随着寄主华山松树势的衰弱,其组织内弱寄生性和腐生性真菌的种类多于强寄生性真菌的种类。

2.2 木材蓝变真菌及其对木材组织结构的影响
2.2.1 木材蓝变真菌 对所分离的 13 种真菌的木材变色试验结果表明,能够引起华山松木材变色的真菌包括 *Alternaria humicola*、*Fusarium oxysporum*、*L. eptoglyphum qinlingensis*、*Trichoderma virid*、*Verticillium* sp. 5 种(图 1),其中引起木材组织蓝变速度最快和着色程度最为严重的真菌为 *L. eptoglyphum qinlingensis*,该菌 8 d 内可使木材全部蓝变(图 1a,表 2)。

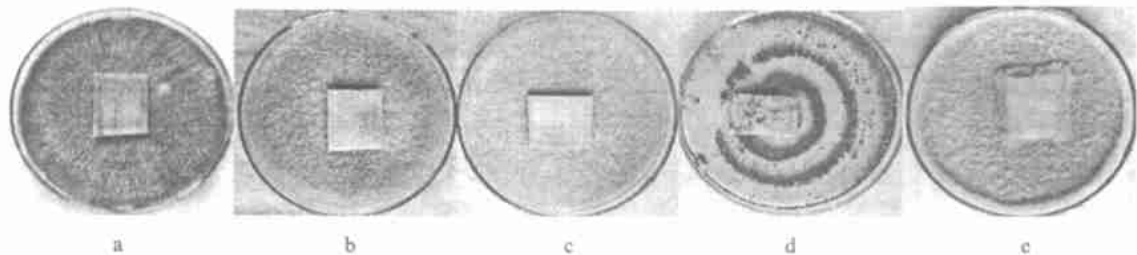


图 1 真菌变色试验

a *L. eptoglyphum qinlingensis*; b *Fusarium oxysporum*; c *Verticillium* sp.; d *Trichoderma virid*; e *Alternaria humicola*

Fig. 1 Staining test of *Pinus amandi* wood with isolates from various fungi species

对变色木块组织切片进行观察可知,引起木材变色的真菌主要有 2 类。一类是木材变色菌,其菌丝深深地侵入到木材内,使变色直达组织内部;另一类是木材表面的生长菌(或称污染菌),其仅在木材表

面生长、繁殖, 污染木材。前者由于真菌已深入到木材内部, 所以即便作表面处理, 也无法除去这类真菌, 而后者则可通过刨削除去^[8]。

表 2 蓝变真菌对华山松木材组织变色的影响

真菌种类 Fungi species	接种时间/d Inoculating time				
	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
<i>A lternaria alternata</i>	B	C	C	F	G
<i>A. hum icola</i>	A	A	B	C	D
<i>A sp ergillus nidulans</i>	A	B	B	B	B
<i>A. niger</i>	A	A	A	B	B
<i>Beauveria</i> sp.	A	A	A	A	A
<i>Candida</i> sp.	A	A	A	A	A
<i>Cep halosporium</i> sp	A	A	B	B	B
<i>Debaryomyces</i> sp.	A	A	A	A	A
<i>Fusarium oxysporum</i>	A	A	B	B	C
<i>Gliocladium</i> sp.	A	B	B	B	B
<i>L ep tographium qinlingensis</i>	B	E	G	I	I
<i>M ucor</i> sp.	A	A	B	B	B
<i>Penicillium funiculosum</i>	A	A	B	B	C
<i>Trichodema virid</i>	A	A	B	D	E
<i>Verticillium</i> sp.	A	A	B	C	D

注: A. 菌丝没有扩展到木片上, 或已扩展到木片上, 木片未变色; B. 菌丝已扩展到木片上, 并有少许变色; C. 木片纵向两端开始变色, 变色面积在 10% 以下; D. 木片变色面积为 11%~ 30%; E. 木片变色面积 30%~ 50%; F. 木片变色面积为 51%~ 70%; G. 木片变色面积为 71%~ 90%; I 木片变色面积为 91%~ 100%。

Note: A. Fungi hyphae can't expand in the xylem tissue, or fungi hyphae expanded in the xylem tissue but can't induce xylem tissue staining; B. Fungi hyphae expanded in the xylem tissue and a bit stained; C. Xylem tissue longitudinal stained and stained dimension less than 10%; D. Stained dimension between 11% to 30%; E. Stained dimension between 31% to 50%; F. Stained dimension between 51% to 70%; G. Stained dimension between 71% to 90%; I Stained dimension between 91% to 100%.

2 2 2 蓝变真菌对华山松木质部组织结构的影响

从接种华山松木质部的组织切片可以看出(图 2), 蓝变真菌 *L ep tographium qinlingensis* 对健康华山松木质部组织中树脂道泌脂细胞、管胞细胞和交叉场薄壁细胞均具有明显的分解能力, 其中对树脂道泌脂细胞的分解破坏作用最大, 并通过菌丝在轴

向树脂道、管胞细胞间和细胞内垂直扩展, 在横向树脂道、管胞细胞纹孔和交叉场薄壁细胞间横向扩展, 从而使寄主华山松树脂代谢、水分代谢紊乱或终止, 此结果与陈辉等^[9]和唐明等^[10]对自然状态下健康华山松木质部组织内真菌 *L ep tographium qinlingensis* 的危害性研究结论完全相同。

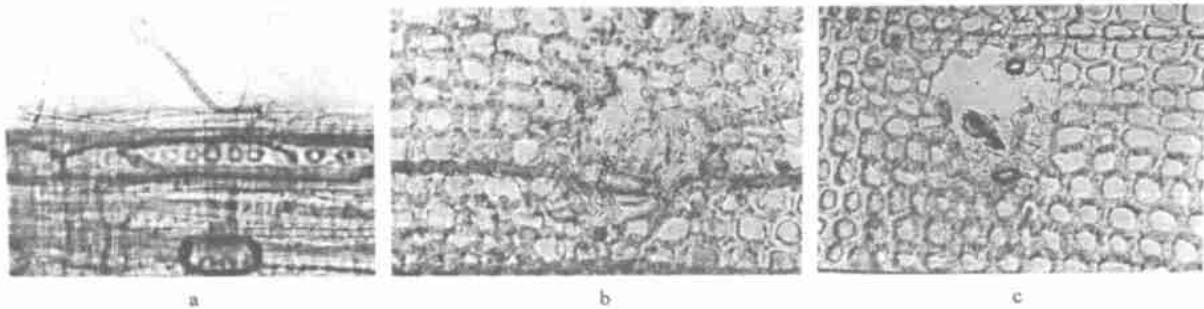


图 2 *L. qinlingensis* 对华山松木质部的危害

a *L. qinlingensis* 在木质部管胞内的菌丝(纵切, 3 3×20); b *L. qinlingensis* 在木质部树脂道内的菌丝(横切片, 3 3×20); c 健康华山松木质部树脂道(横切片, 3 3×20)

Fig 2 *L ep tographium qinlingensis* damage to the xylem of *P inus am and i*

a Fungus hyphae expand among the tracheid cells (longitudinal section 3 3×20);
b Fungus hyphae expand in the resin canal of wood tissues (transverse section 3 3×20);
c Resin canal of healthy *P inus am and i* wood tissues (transverse section 3 3×20)

3 结论与讨论

华山松大小蠹体内外和坑道内附着或生存着 11 属 13 种真菌, 其中华山松大小蠹体外携带 12 种真菌, 这些真菌既有由华山松大小蠹贮菌器携带入侵的引起寄主华山松木材蓝变的真菌, 也有由华山松大小蠹侵入孔或其他次期性小蠹虫入侵孔入侵的腐生性真菌种类。

从各真菌接种后木材组织的变色试验可以看出, *Alternaria humicola*、*Fusarium oxysporum*、*Leptographium qinlingensis*、*Trichodema virid* 和 *Verticillium* sp. 5 种真菌均能够引起华山松木材组织变色。但从变色程度和范围看, 只有 *Leptographium qinlingensis* 引起的华山松木质部边材组织变为蓝色, 而且与自然状态下华山松边材组织蓝变、着色、菌丝发育相同。而其他真菌引起的木

质部边材组织变色不仅范围局限于接种部位, 且木质部组织的变色与真菌菌丝的颜色具有极大的一致性, 即 *Alternaria humicola*、*Fusarium oxysporum*、*Trichodema virid* 和 *Verticillium* sp. 造成的华山松木材变色由真菌胞外色素引起, 并非木材组织的蓝变。

从接种华山松木材组织内真菌的发育和菌丝侵入木质部组织的切片可以看出, *Leptographium qinlingensis* 接种后, 菌丝迅速在健康华山松木质部和韧皮部组织内发育, 并通过树脂道、管胞细胞和交叉场薄壁细胞间和细胞内的扩展, 破坏树脂道树脂合成, 堵塞树脂流动, 进而扩展到整个木质部边材组织, 引起木质部边材的放射状蓝变。这一结果与自然状态下被害华山松边材组织内真菌的危害性和蓝变完全一致。

[参考文献]

- [1] Graham K. Fungal-insect mutualism in trees and timber[J]. Annu Rev Entomol, 1967, 12: 105- 126
- [2] 张立新, 李丽莎, 刘宏屏, 等. 真菌在松纵坑切梢小蠹危害中的作用初报[J]. 林业科学研究, 1995, (8): 119- 121.
- [3] Whintey H S Relationships between bark beetles and symbiotic organisms[A]. Mitton J B, Sturgeon K B. Bark beetles in North American conifers[C]. Austin: University Texas, 1982. 183- 211.
- [4] Francke-Grosman H. Ecotymbiosis in wood inhabiting insects[A]. Henry S M. Symbiosis[C]. New York: Academic, 1967. 141- 205
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [6] 齐祖同. 中国真菌志(第五卷). 曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [7] 赵桂华, 何文龙, 宋 桢. 橡胶木变色菌和霉菌的研究[J]. 云南林业科技, 1993, (1): 61- 64
- [8] 维纳尔·巴芬达姆. 木材病害与损伤及其防治[M]. 肖承刚译. 北京: 中国林业出版社, 1981.
- [9] 陈 辉, 唐 明. 华山松大小蠹共生真菌对华山松木质部为害的解剖学研究[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1391- 1395
- [10] 唐 明, 陈 辉. 华山松大小蠹共生真菌对寄主树木的影响[J]. 林业科学, 1999, 35(6): 63- 66

Blue-stain fungi in and out of *Dendroctonus amandi* and their gallery

ZHU Chang-jun, TANG Ming, CHEN Hui

(College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The isolation, inoculation and blue-stain of species fungi inner gallery of bark beetle and in and out the body *Dendroctonus amandi* were studied in Qingling Mountain. The results showed that there were 11 genera, 13 species fungi in gallery of bark beetle and in and out the body of *Dendroctonus amandi*, and 5 species fungi such as *Alternaria humicola*、*Fusarium oxysporum*、*Leptographium qinlingensis*、*Trichodema virid*、*Verticillium* sp. can induce sapwood tissue discolored in *Pinus amandi*, but just only *Leptographium qinlingensis* can induce sapwood tissue blue-stain, it was similar to the natural damaged host tree by bark beetles and pathogenic blue-stain fungi, and it can be developed in the xylem and phloem of health host tree

Key words: *Dendroctonus amandi*; gallery; blue-stain fungi