

普可尼亚厚垣菌生物防治应用价值的室内初步评估

苏莹珍,许传坤,莫明和,张克勤

(云南省生物资源开发与利用重点实验室培育基地 650091,昆明)

[摘要] 通过对 8 株普可尼亚厚垣菌(*Pochonia chlamydosporium*)的产厚垣孢子能力、在植物根际的定殖能力、分生孢子对土壤抑菌作用的敏感性及其真菌对线虫 *Panagrellus redivivus* 的固定率等 10 项评价指标的测定,初步评估了这 8 株普可尼亚厚垣菌对线虫的生物防治潜力.结果表明 366 及 284 菌株各项指标均优于其它菌株,可以作为研制线虫生防制剂的出发菌株.此外,对普可尼亚厚垣菌的室内生防评估方法进行了分析.

[关键词] 普可尼亚厚垣菌,生物防治,线虫,评估

[中图分类号] Q936, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)01-0085-05

线虫的生物防治由来已久,目前,世界上许多国家正致力于生防菌的研究与开发.能够寄生或捕食根结线虫的微生物有很多种^[1],如病毒、细菌、捕食线虫真菌和寄生真菌等.普可尼亚厚垣菌(*Pochonia chlamydosporium*)能够寄生胞囊线虫及其虫卵,对植物根结线虫具有良好的防治效果,是目前研究和开发线虫生防菌制剂的主要生防菌之一.其作为线虫生防菌替代化学农药已经开始在一些国家应用,并取得了一些成绩^[2-4].但由于土壤生态系统的复杂性,特别是土壤抑菌作用,导致生防菌的应用受到限制;同时在菌剂开发过程中,从生防菌的筛选到大田示范应用的周期较长,投入的人力物力也较多,这些都成为发展线虫生物防治产业的制约因素^[5].还没有一个统一标准的生防菌评估系统能够有效地评估根结线虫生防菌应用价值,研究生防菌风险评价的理论,并建立统一的评估标准,客观地评价线虫生防菌,减少不必要的人力物力的浪费,因此有着重要的实践意义.

目前,在线虫生物防治方面研究得比较多的是 Kerry 等人^[7],他们通过对应用 *Pochonia chlamydosporium* 防治根结线虫的研究,认为实验室初步筛选生防菌的过程包括:菌株在半无菌状况下的定殖能力、产生厚垣孢子的能力以及对虫卵的感染力.本文侧重考察 *P. chlamydosporium* 的培养特征、定殖能力、以及对线虫感染力之间的内在联系,一方面验证应用这三条标准进行筛选的可靠性;另一方面,由于本试验室原本用于生物防治的生产菌株已经退化,因而有必要筛选一株应用价值比较大的生产用出发菌株.

1 材料和方法

1.1 材料

实验菌株:*P. chlamydosporium* 菌株 ZK7、164、213、284、323、325、356、366,均由本室提供.

培养基: CMA; 麦芽糖-硝酸钠培养基(麦芽糖 10 g, NaNO₃ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, Na₂HPO₄ 0.65 g, KCl 0.5 g, 水 1000 mL, pH 6.5, 固体平板加琼脂 20 g); 沙子-玉米粉培养基(等体积沙子和玉米粉混合); WA+ 抗性固体培养基(琼脂 18 g, 水 1000 mL, 硫酸链霉素、氯霉素、孟加拉红、涕必灵、多菌灵各 37.5 mg).

宿主植物:小麦、番茄.

土壤:采自实验室苗圃.

线虫:*Panagrellus redivivus*.

分生孢子悬液制备:用灭菌 6 层擦镜纸将培养液过滤,离心收集分生孢子,用无菌水反复清洗,然后用无菌水将孢子浓度调节至 10⁶ 个/mL 备用.

线虫虫卵收集:将根结线虫(*Meloidogyne* sp.)接种于室温花盆内,栽种 2 株番茄幼苗,常规管理,待感

收稿日期 2003-10-16.

基金项目:中国科技部攻关项目(2002BA901A21),云南省应基重点项目(2000C0012Z).

作者简介:苏莹珍,1978-,女,云南大学硕士研究生,主要从事食线虫真菌方面的学习和研究,E-mail: syzcasper@hotmail.com

通讯联系人:张克勤,1958-,博士,云南大学教授,博导,主要从事食线虫真菌方面的研究,E-mail: kqzhang1@yahoo.com.cn

万方数据

病番茄苗根部产生线虫卵块时,用水洗去根部泥土,放入三角瓶内,倒入 200 mL 0.5% NaClO 溶液,用力振荡 3 min 后倒入双层筛中(上层筛孔径 250 μm ,下层筛孔径 38 μm),用无菌水冲洗后收集下层筛中的卵,制备成 1 000 粒/mL 的卵悬液备用。

1.2 方法

1.2.1 菌株生长状况测定

用直径为 5 mm 的打孔器分别接种 CMA 平板 28℃ 培养 7 d 的待测菌块于麦芽糖-硝酸钠培养基平板中央及 50 mL 液体培养基中,固体平板于 28℃ 培养 1 周后测量菌落大小,液体于摇床上 28℃、170 r/min 培养 5 d 后用血球计数板计数分生孢子的量,并将液体培养物过滤收集菌丝体烘干至恒重,称量菌体干重,每个处理各三个重复。

1.2.2 厚垣孢子的形成能力测定

用直径为 5 mm 的打孔器接种 CMA 平板 28℃ 培养 7 d 的待测菌块于灭菌沙子-玉米粉培养基内(湿度 85%),于 25℃ 培养 3 周(培养前 5 d 每天摇 1 次使接种体尽量分散),然后将培养物经过双层筛(上层孔径 38 μm ,下层筛孔径 15 μm),并用水轻轻冲洗,收集下层筛上的厚垣孢子,定容至 10 mL,用血球计数板计数厚垣孢子产量。

1.2.3 根际的定殖能力测定

将麦粒及番茄籽放入 0.5% 的 NaClO 溶液中浸泡 45 min 进行表面消毒,然后用无菌水漂洗至少 5 次,种子放入分生孢子悬液中浸润后置于无菌培养皿内自然干燥,种子分别接种于土壤、灭菌蛭石的试管中(湿度约 60%),温室中培养 10 d 后取出根系,用无菌水轻轻冲洗,无菌滤纸吸干根表水分,用电子天平称量根系鲜重,再将根剪成约 1 cm 长的根段,放置到 WA 抗性固体平板,于 25℃ 培养 2~3 d 后在 40 倍镜下检查,统计有普克尼亚厚垣菌定殖的根段数,并计算定殖率。

$$\text{定殖率} \% = \frac{\text{定殖根段数}}{\text{总根段数}} \times 100\%$$

1.2.4 杀线虫能力的测定

用平板测定法测定线虫固定能力^[6]:

在 CMA 平板中央接种直径 5 mm 的 *P. chlamydosporium* 菌块,于 25℃ 培养 7 d 待菌落长满平板后在菌落中央加入线虫悬液(约 500 条),放在超净工作台内打开培养皿盖 30 min 使多余水分蒸发,然后加盖培养 3 d 后用 5 mL 0.1% 土温-20 将线虫洗出后,在显微镜下随机观察 200 条左右的线虫,分别记录死、活线虫数,统计固定率%。

$$\text{固定率} \% = \frac{\text{死线虫数} - \text{总的线虫数} \times (1 - \text{对照杀线率})}{\text{总的线虫数}} \times 100\%$$

1.2.5 对根结线虫虫卵的相对抑制率

加入 3 mL 无菌水到六孔培养皿中,加入 1 mL 孢子悬液及 1 mL 卵悬液(约 1000 粒),7 d 后于倒置显微镜下检查孵出的死、活幼虫数及未孵出的死、活卵数,设无菌水为对照,每个处理三个重复,计算相对抑制率%。

$$\text{相对抑制率} \% = \frac{\text{对照活的幼虫及卵数} - \text{加入孢子悬液后活的幼虫及卵数}}{\text{对照活的幼虫及卵数}} \times 100\%$$

1.2.6 对土壤抑菌作用的抗性

称取 40 g 土置于直径 90 mm 培养皿中,加入 10 mL 蒸馏水搅拌均匀,室温下放置 2 d。在布氏漏斗中放置 2 cm^2 滤纸,取 200 μL 上述孢子悬液 10^6 个/mL 刮滤纸上,稍微抽滤,盖上相应大小的玻璃纸后埋入上述土壤中,室温培养 24 h 后,用胶带粘取滤纸上的孢子制片,显微镜下统计萌发与未萌发的孢子数,测定萌发率%。

$$\text{萌发率} \% = \frac{\text{已萌发孢子数}}{\text{已萌发孢子数} + \text{未萌发孢子数}} \times 100\%$$

1.2.7 数据分析方法

所有统计数据均进行方差分析,并采用 LSD 法进行多重比较,统计软件使用 SPSS11.0。

2 结果与讨论

2.1 菌株生长能力比较

根据相关资料,菌株的最适生长温度为 28℃,28℃ 时各菌株在葡萄糖-硝酸钠平板上的生长速度在置

信期间为 0.05 时差异不显著,只有 356 和 ZK7 比其他菌株的生长速度略快,而 366 生长最慢,并且由于 366 形成大量的砖格厚垣孢子使其菌落表面呈淡黄色.液体培养 5 d 后测定各株菌的分生孢子浓度及菌体干重,结果表明置信期间为 0.05 时差异性水平较显著,366 分生孢子浓度最高,为 107.5×10^4 个/mL;284 次之,为 75×10^4 个/mL.菌体干重最大的为 ZK7(0.51 g),284 最小(0.09 g).本实验各株菌产生分生孢子的数量普遍都比较少,这可能是由于采用的葡萄糖-硝酸钠培养基内含有丰富的碳氮源,利于营养菌丝的形成,而不利于分生孢子的产生.但也可能与培养时间较短有关.

厚垣孢子是一种抗逆性的休眠结构,比较容易在不利于生长的环境中产生,很难在液体培养基中产生.参考相关文献,本文采用玉米-沙石培养基^[7],在湿度为 85% 的时候能产生大量的厚垣孢子.对试验数据进行方差分析的结果表明,各菌株产生厚垣孢子的能力各不相同,366、284 所产生的砖格厚垣孢子数量最多,分别为 195×10^4 个/mL 和 100×10^4 个/mL,其它的菌株形成的厚垣孢子相对较少(表 1),213 的厚垣孢子浓度最低,没有超过 10^5 个/mL.本实验室用于生物防治的菌株 ZK7 原来能够产生大量的厚垣孢子,由于在营养丰富的培养基上传代次数较多导致 ZK7 严重退化,在培养过程中能够形成大量的气生菌丝而不容易产生厚垣孢子,分生孢子浓度仅为 1×10^5 个/mL.

表 1 菌株生长能力比较

菌株	菌落直径/cm	菌体干重/g	分生孢子浓度(10^4 个/mL)	厚垣孢子浓度(10^4 个/mL)
164	2.58	0.23	5.5	10
213	2.64	0.13	13.5	5*
284	2.78	0.09*	75.0	100
323	2.79	0.25	9.0	10
325	2.67	0.17	2.5	75
356	3.10	0.24	37.5	75
366	2.29	0.23	107.5*	195*
ZK7	3.02	0.51*	9.2	10
Means	3.0	0.21	32.5	50
LSD _{0.05} *	0.025	0.049	5.9	4.40

注:*为置信期间为 0.05 显著性差异.

2.2 定殖能力及线虫固定能力

所有供试菌株在无菌状况下的定殖能力均在 80% 以上(表 2),但各菌株之间的定殖能力差异并不显著,说明小麦、番茄的根部与生防菌亲和能力较强.原因可能是:其一,种子经过表面消毒,蛭石经过高压灭菌,生防菌在蛭石中生长时不受其它杂菌的影响,只要植物与真菌之间没有相互的抑制作用,普可尼亚厚垣菌就能很好地在植物根部定殖.其二,无菌蛭石几乎不含有有机营养成分,植物根系可能会分泌一些物质有利于菌株的生长.与无菌状况相比,供试菌株在非无菌状况的定殖率较低,但统计结果表明各菌株的定殖能力差异显著($P < 0.05$).如表 2 所示,284 定殖率最高为 54%,而 213 定殖能力最弱,仅为 17%.生防菌在非无菌状况下定殖能力除了于菌株本身特性有关以外还可能与生长环境有关,在非无菌状况下,土壤中的微生物对外来生物存在一定的抑制作用,同时由于土壤中含有一些化学物质能够抑制普可尼亚厚垣菌分生孢子的萌发,从而导致生防菌不能在植物根部很好地定殖^[8].

表 2 定殖能力及线虫固定能力

菌株	无菌状态定殖率/%	非无菌状态定殖率/%	根重/g	卵寄生率/%	线虫固定率/%	孢子萌发率/%
164	96	41	0.045	59.3	51	23.2
213	100	17*	0.03	70	52.7	38.1
284	100	50*	0.032	94	59.7*	16.6
323	94	48*	0.035	80	53.3	22.3
325	80	38	0.027	66.6	31.6	22.7
356	81	35	0.032	20	40.3	30
366	90	30	0.037	86.6	61.5*	28
ZK7	87	20*	0.035	-	45.2	36.7
Means	91	35	0.03	69.56	3.5	27.2
LSD _{0.05} *	0.055	0.11	0.014	—	14	9.8

注:*为置信期间为 0.05 显著性差异.

从表 2 中还可以看出,各菌株对线虫的固定率均远高于空白对照.表明这些菌株对线虫均有一定程度
万方数据

的固定能力,统计分析说明在 0.05 水平上各菌株之间的差异性水平显著,其中 284 和 366 对线虫的固定率较高,分别为 59.7% 和 61.5%, 325 和 356 较低,仅为 31.6% 和 40.3%。此外,对线虫固定能力强的菌株,卵寄生率也比较高,如 284 为 94%, 366 为 86.6%。

采用本实验室苗圃中的土壤对供试菌株进行分生孢子萌发试验,发现分生孢子萌发率差异性并不显著,其中 284 分生孢子萌发率最低,仅为 16.6%;而 ZK7、213 孢子萌发率相对较高,分别为 36.7% 和 38.1%,但都没有超过 40%。这说明大多数菌株的分生孢子在土壤中萌发受到很强的抑制,故以分生孢子作为菌剂防治根结线虫有时效果不明显。

普可尼亚厚垣菌在植物根部定殖时能够分泌一些物质促进植物根的生长,使植物的根系加粗变长^[11],但在本实验中,与对照相比,植物的根重差别不大,各菌株所定殖的植物根系的鲜重均约为 0.03 g (表 2),这可能与培养的时间较短有关。

2.3 相关性分析及结果

采用 LSD 法进行多重比较进行相关性分析发现,普可尼亚厚垣菌产生厚垣孢子的能力和产生分生孢子的能力各不相同,二者之间的 Peterson 指数为 0.686,在 0.01 水平显著正相关,除 284 外其余各菌株厚垣孢子浓度越大分生孢子的浓度也比较高。产生厚垣孢子的能力与菌体干重呈负相关性,相关性系数为 -0.561。气生菌丝产量越大的菌株厚垣孢子浓度较低,如 ZK7 能产生大量的气生菌丝,气生菌丝产量比较丰富,但形成的厚垣孢子较少,而 366 和 284 产生少量的气生菌丝,却能产生大量的厚垣孢子。本实验结果表明菌株产厚垣孢子能力与菌株在非无菌状况的定殖能力的相关性指数为 0.257,并没有显著相关。原因可能是由于本文用分生孢子接种,分生孢子与厚垣孢子的对环境的抗逆能力并不相同,分生孢子对不良环境的抵抗能力较差,不易在土壤中定殖,依照 Bourn J M 及 Bordallo J J 的实验^[8,10],用厚垣孢子接种土壤,接种量越大,菌株在土壤中的定殖能力越强,还能长期保持较高的 CFU 值。比较菌株产厚垣孢子的能力与 *P. redivivus* 固定率的关系发现二者呈明显的正相关性,在 0.01 水平正相关,相关性指数为 0.514,284 和 366 具有相对比较高的卵寄生率及 *P. redivivus* 固定率,它们产厚垣孢子的能力也比较强,325 产厚垣孢子的能力比较低,它对线虫的固定能力也比较弱。这可能是由于真菌在产生厚垣孢子的时候形成一些特殊的代谢产物能够很好地固定线虫。

生防菌在农业生产上应用价值的大小首先应取决于该菌株对线虫固定能力的强弱,因此在实验室内可以通过测定菌株对线虫作用力来进行初筛。由于各供试菌株在非无菌状况的定殖率与产厚垣孢子能力没有显著相关性,而生防菌能否广泛应用于田间生产就取决于菌株能否在耕作植物的根际定殖,故而在初步筛选时还应同时测定菌株的定殖能力,确定菌株与植物是否有很好的相容性。总的来说,在实验室内进行线虫生防菌初步的筛选时,应该以菌株对线虫的固定能力、在植物根际的定殖能力,参照菌株产厚垣孢子的能力作为筛选指标来对出发菌株进行初步筛选。本实验以这三项指标为主,同时综合其它参数,挑选出 284、366 菌株用于下一步的盆栽试验,以进一步评估其应用价值。

3 讨论

对线虫固定能力强的菌株如果要应用于生产,其繁殖体就必须保持长时间的生命力,并且还能在土壤中定殖。目前应用于线虫生物防治的真菌菌剂主要有捕食线虫真菌和寄生真菌,捕食线虫真菌以节丛孢属的 *Arthrobotrys irregularis* 为代表通过捕食线虫达到防治线虫目的^[11],在评估其应用价值时主要考虑的是线虫捕食率。大多数寄生真菌如 *Paecilomyces lilacinus* 及 *Verticillium. sp.* 大多数都能寄生根结线虫虫卵或胞囊线虫,由于主要的繁殖结构为菌丝和分生孢子,在评估时也以分生孢子为主。而普可尼亚厚垣菌的生长繁殖结构包括分生孢子、气生菌丝和厚垣孢子。普可尼亚厚垣菌的分生孢子较易产生,且产量较大,但分生孢子由于受到土壤的抑制作用萌发率很低,必须添加某些特定的额外碳源才能正常萌发,定殖。而厚垣孢子对土壤抑菌作用的抗性较强,可以在不添加额外的营养物质的条件下,在土壤中正常萌发^[12]。因此用厚垣孢子作为菌剂应用,其定殖能力及防效必然会高于目前主要以分生孢子作为菌剂的产品。但普可尼亚厚垣菌在液体培养的过程中几乎不产厚垣孢子,而固体培养在生产上很难控制,不容易实现大规模生产。因此,如何实现大规模生产厚垣孢子可能是线虫生物防治的一个突破口。

在普可尼亚厚垣菌生防菌的开发过程中,高效地筛选出有价值的出发菌株,同时参照一个标准的可操

作性生防评估模型有效地评估出发菌株的应用价值至关重要. Kerry 等人认为^[7], 无菌状况时 80% 的根段能够被定殖、厚垣孢子产量不低于 5×10^5 个/mL 的菌株以及卵寄生率大于 30% 的菌株可以作为初步筛选的条件. 本实验结果证明: 采用这三项指标初步筛选生产出发菌株时, 在实验室内可以快速地筛选出应用潜力比较大的菌株. 从而大大降低了盆栽实验或田间实验所需耗费的人力财力. 但这三条标准仅仅是作为初步筛选的指标, 生防菌能否应用于生产还需要进行盆栽, 田间试验. 另外, 但是从提高评估体系的准确性与可重复性看, 一个标准的筛选模型还应该明确所采用的线虫、虫卵、植物的种类、生长时期, 土壤类别成分, 同时考察菌株的生长特性. 由于条件限制所采用的菌株不多, 本研究只是在生防菌评估模型的建立方面做出了一点尝试, 而一个标准模型的建立仍需大量的工作.

[参考文献]

- [1] 汪来发, 杨宝君, 李传道. 根结线虫生物防治研究进展 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2002, 26(1): 64—68.
- [2] 祝明亮, 张克勤, 李天飞, 等. 烟草根际厚孢轮枝菌生态效应研究 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 4—8.
- [3] 孔凡玉, 王静. 烟草根结线虫病研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(3): 232—235.
- [4] Leij De, F A A M, Dennehy J A, et al. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* as biological control agent for *Meloidogyne arenaria* [J]. Review Nematology, 1991, 14 : 157—164.
- [5] Bert M Z, Joseph E. Biological Control of Plant Nematodes Current Status and Hypotheses [J]. Japanese Journal of Nematology, 1994, 24(1): 1—12.
- [6] 张克勤, 刘杏忠, 李天飞. 食线虫菌物生物学 [M]. 北京: 中国科技出版, 2000. 162.
- [7] Kerry B R, Bourne J M. A Manual for Research on *Verticillium chlamyosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes [M]. Druckform GmbH, Merckstr, Germany: International Organization for Biological and Intergrated Control of Noxious Animals and Plant, West Palearctic Regional Section(IOBC/WPRS), 2002. 25—27.
- [8] Bourne J M, Kerry B R. Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31 : 75—84.
- [9] Zaki A S, Irshad M. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review [J]. Bioresource Technology, 1996, 58(5): 229—239.
- [10] Bordallo J J, Lopez-Llorca L V, Jansson H B, et al. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fung [J]. New Phytologist, 2002, 154 : 491—499.
- [11] Bordallo J J, Lopez-Llorca L V, Jansson H B, et al. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fung [J]. New Phytologist, 2002, 154 : 491—499.
- [12] Delij A A M, Kerry BR, Dennehy J A. *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests [J]. Nematologica, 1993, 39 : 115—136.

A Preliminary Assessment on the Biocontrol Potential of *Pochonia chlamyosporium* in vitro

Su Yingzhen, Xu Chuankun, Mo Minghe, Zhang Keqin

(Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource, Yunnan University, 650091, Kunming, PRC)

Abstract In this study, the biological control potential of eight strains of *Pochonia chlamyosporium* was preliminary evaluated in vitro. By using some criteria, strain 366 and 284 were selected to further evaluation in pot experiment and field trails. We can also conclude that the abilities to produce chlamyospores, to colonise in the rhizosphere, to parasitise nematodes and nematode eggs could be taken as indicators to preliminarily evaluation of their industrial applied potential. Besides, this paper analysed the biocontrol evaluation system of *P. chlamyosporium*.

Key words : *Pochonia chlamyosporium*, biocontrol, nematode, evaluation

[责任编辑: 孙德泉]