

文章编号:1001-1498(2004)06-0777-05

# 淡紫拟青霉不同菌株对南方根结线虫 卵寄生率三种处理方法的比较

汪来发<sup>1</sup>, 王艳娜<sup>2</sup>, 朴春根<sup>1</sup>, 田国忠<sup>1</sup>, 张路平<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091;

2. 河北师范大学生命科学学院,河北 石家庄 050016)

**摘要:**利用来自不同地域的淡紫拟青霉的13个菌株,分别用其孢子液处理南方根结线虫分散卵粒、菌丝处理分散卵粒、孢子液处理卵囊以评价淡紫拟青霉对南方根结线虫的寄生性。在被试所有菌株中,同一菌株三种不同方法对根结线虫卵的寄生率相比,孢子液处理卵囊均明显高于其他两种处理。不同菌株对南方根结线虫卵的寄生率有很大的差异。三种处理方法结果显示618号菌株寄生率均为最高。菌株对卵的寄生率与菌株地理来源无明显相关性。

**关键词:**淡紫拟青霉;南方根结线虫;卵囊;分散卵粒;寄生率

**中图分类号:**S718.81 **文献标识码:**A

淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson 1974)是一种土壤及多种植物根围的习居菌。Samson 1974年在秘鲁首先从根结线虫 *Meloidogyne* sp. 卵囊中分离得到该菌,Jatala 博士 1979年首次发现该菌对南方根结线虫(*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood) 卵的寄生率高达60%~70%<sup>[1]</sup>,现已认为它是一种非常重要的植物病原线虫天敌真菌<sup>[1~3]</sup>,目前已广泛应用于防治根结线虫、孢囊线虫等有害植物线虫的防治实践中。由于化学杀线虫剂不仅会对环境造成污染,并且在使用过程中对人、畜也不安全,而淡紫拟青霉作为一种生物试剂,在杀线过程中具有高效、安全、持效长的特点<sup>[4,5]</sup>,许多试验表明其杀线活性与化学杀线剂相比较无明显差别,甚至超过化学杀线剂<sup>[6,7]</sup>,而且还能促进植物的生长<sup>[4,8]</sup>,达到增产的目的。淡紫拟青霉种内不同菌株对线虫卵的寄生率会有所差异,不同的处理方法可能对卵的寄生率也会产生影响。本试验利用不同地域分离的淡紫拟青霉不同菌株用不同方法处理南方根结线虫的卵,通过不同菌株间寄生率的比较,以期筛选出高寄生率的菌株用于生产实践。同时通过同一菌株间三种不同处理方法对根结线虫卵的寄生率的比较,为生防试验提供行之有效的试验方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株来源、培养基和孢子悬液的配制

菌株4、12、19、20、73(来源于福建),263、420、459(来源于江苏),618、623、645、647(来源于安徽),P(来源于秘鲁)。

收稿日期:2003-09-22

基金项目:国家科技部公益基础性工作课题(2001DEA10004)

作者简介:汪来发(1964—),男,安徽望江人,副研究员,博士,从事森林病理学和植物线虫学研究。

将淡紫拟青霉 13 个菌株接种在马铃薯琼脂培养基(PDA)平板上,25 ℃下培养 15 d,用无菌水将培养基上孢子洗出,用血球计数板进行计数<sup>[9]</sup>,配制成  $4.0 \times 10^6$  个  $\text{mL}^{-1}$  的孢子悬液。

### 1.2 线虫卵囊和分散卵粒的获得

在京郊马连洼温室内采集感染根结线虫的番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill. 病根,室内鉴定该病原为南方根结线虫。将带有大量卵囊的病根洗净,在解剖镜下挑取大小较为一致的卵囊,用 1% 的次氯酸钠表面消毒 3 min,用无菌水漂洗 4~5 次,备用。

将病根洗净,剪成 0.5 cm 的小段,放入 500 mL 三角瓶内,倒入 200 mL 1% 次氯酸钠溶液,用力猛摇 3 min,将卵悬液先过 200 目筛,再过 500 目筛,通过第一个筛子的卵留在第二个筛子上,用灭菌水调节,使悬浮液中卵粒为 1 000 个  $\text{mL}^{-1}$ 。

### 1.3 不同菌株孢子悬液对南方根结线虫分散卵粒孵化的影响

在经过高压灭菌的培养皿(直径 6 cm)中每皿加入 1 mL 卵悬液,处理每皿加 4 mL 孢子液,对照每皿加 4 mL 无菌水。每个菌株处理和对照各 4 个重复。25 ℃,14 d 后镜检,统计孵化线虫数、寄生卵粒数、未寄生卵粒数,其总和为 100,计算卵的相对寄生率。

### 1.4 不同菌株菌丝对分散卵粒孵化的影响

在 2% 琼脂(WA)培养基平板中央,接种一直径为 0.5 cm 在 PDA 上培养 15 d 的菌块,25 ℃下培养 5 d。在菌块边缘加 1 mL 卵悬液(1 000 粒),对照是在 WA 中央放置直径 0.5 cm 不接种的 PDA 培养基,边缘加入 1 mL 卵悬液。每个菌株处理和对照各 4 个重复。25 ℃,14 d 后镜检,统计孵化线虫数、寄生卵粒数、未寄生卵粒数,其总和为 100,计算卵的相对寄生率。

### 1.5 不同菌株孢子悬液对卵囊孵化的影响

在高压灭菌的青霉素小瓶中,每个小瓶中放置 2 个制备好的南方根结线虫的卵囊,处理每瓶加 4 mL 孢子液,对照每瓶加 4 mL 灭菌水。每个菌株处理和对照各 4 个重复。在 25 ℃条件下,14 d 后在解剖镜下计数孵化的线虫数,将卵囊压碎统计未寄生和寄生卵粒的个数,计算卵的相对寄生率。

以上 3 组试验,卵的相对寄生率(%) = (对照孵化的卵数量 - 处理孵化的卵数量) / 对照孵化的卵数量  $\times 100\%$

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌株孢子液对分散卵粒寄生率的比较

13 个菌株的孢子液对南方根结线虫分散卵粒的寄生程度有所不同。618 号菌株的卵寄生率最高,为 56.12%,P 菌株最低,为 17.35%。数据经 SPSS 软件处理后,得出邓肯氏极差测验的多重比较结果,在显著水平 95% 相对寄生率可分为 4 组(见表 1)。

### 2.2 不同菌株菌丝对分散卵粒寄生率的比较

13 个菌株的菌丝对南方根结线虫的分散卵粒均存在着有寄生性。618 号菌株的寄生率最高,为 56.66%,菌株 P 最低,为 18.43%,数据经 SPSS 软件处理后,得出邓肯氏极差测验的多重比较结果,在显著水平 95% 相对寄生率可以分为 4 组(见表 1)。

### 2.3 不同菌株孢子液对卵囊寄生率的比较

13 个菌株孢子液均不同程度对卵囊进行寄生。618 号菌株对卵囊中卵的寄生率最高,为 74.62%,P 菌株最低,为 30.58%,数据经 SPSS 软件处理后,得出邓肯氏极差测验的多重比较结

果,在显著水平 95 %相对寄生率可以分为 7 组(见表 1)。

表 1 淡紫拟青霉 13 个菌株间 3 种不同处理方法对南方根结线虫卵寄生率的比较 %

序号	菌株	孢子液处理分散卵粒 平均寄生率	菌丝处理分散卵粒 平均寄生率	孢子液处理卵囊 平均寄生率
1	618	56.12 ±2.45 a	56.66 ±3.41 a	74.62 ±1.48 a
2	647	51.02 ±1.76 a	51.53 ±2.97 ab	61.98 ±1.43 b
3	645	40.14 ±1.67 b	45.40 ±1.76 bc	57.34 ±3.23 bc
4	18	40.14 ±2.66 b	38.91 ±2.81 c	49.15 ±1.47 de
5	20	39.46 ±4.60 b	39.93 ±0.97 c	57.18 ±2.49 bc
6	623	37.07 ±2.38 b	41.64 ±3.12 c	52.11 ±2.27 cd
7	12	36.39 ±3.66 b	40.27 ±4.33 c	50.18 ±2.12 d
8	459	35.03 ±2.11 bc	37.20 ±2.95 c	50.33 ±1.42 d
9	420	33.67 ±2.80 bc	27.65 ±4.06 d	43.01 ±2.30 ef
10	263	27.55 ±2.69 bc	27.65 ±4.06 d	49.39 ±1.22 de
11	73	25.17 ±2.89 cd	20.48 ±0.86 d	46.95 ±2.82 de
12	4	20.41 ±0.88 cd	20.82 ±2.30 d	40.22 ±2.23 f
13	P	17.35 ±2.32 d	18.43 ±1.29 d	30.58 ±2.53 g

= 0.05

2.4 不同菌株寄生率与地理来源的相关性

从表 1 分析,同一地理来源的不同菌株用 3 种不同方法处理所得到的寄生率,在 = 0.05 均不能划为一组,说明不同菌株对南方根结线虫卵的寄生率与菌株的地理来源无相关性。

2.5 不同处理方法对卵寄生率的比较

同一菌株的 3 种不同方法处理,对卵的寄生率有所不同。在显著水平 95 %,菌丝处理分散卵粒和孢子液处理分散卵粒,差异性均不显著。除 12 号菌株和 420 号菌株,孢子液对卵囊的处理与其他两种处理方法所得到的相对寄生率均差异显著(见表 2)。

表 2 相同菌株 3 种不同处理对南方根结线虫卵寄生率的比较 %

菌株	孢子液处理分散卵粒	菌丝处理分散卵粒	孢子液处理卵囊
4	20.41 ±0.88 a	20.82 ±2.30 a	40.22 ±2.23 b
12	36.39 ±3.66 a	40.27 ±4.33 ab	50.18 ±2.12 b
18	40.14 ±2.66 a	38.91 ±2.81 a	49.15 ±1.47 b
20	39.46 ±4.60 a	39.93 ±0.97 a	57.18 ±2.49 b
73	25.17 ±2.89 a	20.48 ±0.86 a	46.95 ±2.82 b
263	27.55 ±2.67 a	27.65 ±4.06 a	49.39 ±1.22 b
420	33.67 ±2.80 ab	27.65 ±4.06 a	43.01 ±2.30 a
459	35.03 ±2.11 a	37.20 ±2.95 a	50.33 ±1.42 b
618	56.12 ±2.45 a	56.66 ±3.41 a	74.62 ±1.48 b
623	37.07 ±2.38 a	41.64 ±3.12 a	52.11 ±1.14 b
645	40.14 ±1.67 a	45.40 ±1.76 a	57.34 ±3.28 b
647	51.02 ±1.76 a	51.54 ±2.97 a	61.98 ±1.43 b
P	17.35 ±1.62 a	18.43 ±1.77 a	30.58 ±2.53 b

= 0.05

### 3 讨论

3 种处理方法中 618 号菌株寄生率均为最高,说明在 13 个菌株中其毒力最强,可以作为生产实践中备选菌株之一。P 菌株虽然是已用于生产实践的生防菌株,但在本组实验中寄生率最低,这可能是由于菌种在多次传代后,丧失了原有的高毒力。

*Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium chlamyosporium* Gøddard, *V. lamellicola* (F. E. V. Smith) W. Gams 常作为对根结线虫的生防菌株。Tigano 等<sup>[10]</sup>发现, *P. lilacinus* 对爪哇根结线虫 (*Meloidogyne javanica* (Trebub) Chitwood) 卵寄生性不同菌株间存在很大差异。林茂松、沈素文<sup>[11]</sup>报道中 *V. chlamyosporium* 不同来源的菌株对南方根结线虫卵寄生率差异明显。汪来发等<sup>[12]</sup>试验结果证实了 3 个不同菌种和种内不同菌株对南方根结线虫卵寄生率差异很大。本试验中 13 个菌株 3 种处理方法均显示 *P. lilacinus* 种内寄生率存在很大的差异,菌株本身的致病性与诸多因素有关,如寄主、温度、土壤湿度等环境条件以及菌株本身的基因型<sup>[13,14]</sup>。此次试验的 13 个菌株分别来自 4 个地区,而 3 种方法所得到的寄生率,在  $\alpha = 0.05$  水平不能划为一组,这说明菌株的致病性与地域的相关性不明显。而致病性与基因型相关性,要通过今后的遗传多态性的分子生物学试验来验证。

杨树军等<sup>[15]</sup>试验中, *P. lilacinus*, *V. chlamyosporium* 两种根结线虫生防菌剂对线虫卵囊和分散卵孵化均表现出了一定的抑制作用,其中淡紫拟青霉菌株 DZ1 对线虫卵囊相对抑制率和分散卵相对抑制率无显著差异。陈淑鸿等<sup>[2]</sup>试验结果,表明 *P. lilacinus* MCW18 菌株对爪哇根结线虫卵囊孵化的相对抑止率高于分散卵粒。本试验结果显示,所有菌株孢子液处理分散卵粒与菌丝处理分散卵粒寄生率差异不显著,而孢子液处理卵囊与其他两种方法相比,除与 12 号菌株菌丝处理分散卵粒、420 号菌株孢子液处理分散卵粒有组内交差现象外,其它菌株均差异显著且寄生率明显高于前两种处理。这可能与菌丝寄生卵的机制有关,在寄生过程中孢子要先附着在卵表面萌发,继而菌丝发育而缠绕整个卵,而卵囊中的粘性基质更利于孢子的附着萌发和菌丝发育,而试验中获得分散卵粒的过程使用了次氯酸钠,以便去除卵粒表面的粘性,使分散卵粒相对缺乏菌丝生长发育的营养和菌丝附着的粘性基质,致使菌丝较难生长进行侵染。在大田的生物防治过程中,根结线虫产卵均以卵囊的形式存在,而生防菌剂也多以孢子的形式施入田间,所以用孢子液侵染卵囊的试验结果来评价该菌株对卵的寄生性更科学,更接近实际。另外,在生产实践中,准确掌握根结线虫产卵囊的时期,在产卵囊前施用菌剂,会大大提高防治效率。

#### 参考文献:

- [1] Jatala P. Biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Ann Rev Phytopathol, 1986, 24: 435 ~ 439
- [2] 陈淑鸿, 高学彪. 淡紫拟青霉 MCW18 菌株对爪哇根结线虫卵孵化率的影响[J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 78 ~ 80
- [3] 华静月, 张长龄, 王东. 一种防治线虫的真菌[J]. 植物保护, 1989, 15(1): 29 ~ 30
- [4] Khan M R, Gøswami B K. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* isolate 6 against *Meloidogyne incognita* infecting tomato[J]. International Journal of Nematology, 2002, 12(1): 111 ~ 114
- [5] Sosamma V K, Koshy P K. Biological control of *Meloidogyne incognita* on black pepper by *Pasteuria penetrans* and *Paecilomyces lilacinus* [J]. Journal of Plantation Crops, 1997, 25(1): 72 ~ 76
- [6] 李芳, 张绍升, 陈家骅. 淡紫拟青霉对烟草根结线虫的防治效果[J]. 福建农业大学学报, 1998, 27(2): 196 ~ 199

- [7] Vijaya N, Sujathamma P, Savithri G, et al. Effect of biocontrol agents and Furadon 3G on the juvenile mortality of root knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. 浙江农业学报, 2002, 14(3): 159 ~ 162
- [8] 汪来发, 杨宝君, 关文刚, 等. 淡紫拟青霉和厚壁轮枝霉防治南方根结线虫 [J]. 四川农业大学学报, 1998, 16(2): 231 ~ 233
- [9] 方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 153 ~ 154
- [10] Tiganò-Milani M S, Carneiro R G, Faria M R, et al. Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces lilacinus* and *P. lilacinus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera, Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda, Tylenchidae) [J]. Biological Control, 1995, 5: 378 ~ 382
- [11] 林茂松, 沈素文. 厚壁孢子轮枝菌防治南方根结线虫研究初报 [J]. 生物防治通报, 1994, 10(1): 7 ~ 10
- [12] 汪来发, 杨宝君, 李传道. 寄生真菌对根结线虫的致病力评价 [J]. 林业科学, 1999, 35(3): 41 ~ 47
- [13] Tiganò-Milani M S, Samson R, Sobral B W S. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus* [J]. Microbiology, 1995, 141: 239 ~ 245
- [14] Tiganò-Milani M S, Honeycutt, R J, Lacey L, et al. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* strains revealed by molecular markers [J]. J. Inv Pathol, 1995, 65: 274 ~ 282
- [15] 杨树军, 夏振远, 李天飞, 等. 两种生防菌剂对南方根结线虫卵孵化的影响 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(3): 247 ~ 248

## A Comparison of Three Inoculating Methods for Egg Parasitism of *Meloidogyne incognita* by Different Isolates of *Paecilomyces lilacinus*

WANG Lai-fa<sup>1</sup>, WANG Yan-na<sup>2</sup>, PIAO Chun-gen<sup>1</sup>, TIAN Guo-zhong<sup>1</sup>, ZHANG Lu-ping<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China;

2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, Hebei, China)

**Abstract:** This study was conducted to assess the parasitism of 13 isolates *Paecilomyces lilacinus* originating from different areas on eggs of *Meloidogyne incognita*. The assay included three treatments: individual eggs treated by spore suspension, individual eggs treated by hypha of fungus, and egg masses treated by spore suspension. Parasitic rate of the same one of all isolates differed in 3 treatments, in which parasitic rate treated by spore suspension was much higher than that in the other two treatments. The results indicated that egg parasitic rate differed significantly among 13 isolates. In the three treatments, parasitic rate of isolate 618 on *Meloidogyne incognita* eggs was the highest. Parasitic rates of 13 isolates had not relation to the geographical resources of isolates.

**Key words:** *Paecilomyces lilacinus*; *Meloidogyne incognita*; egg mass; individual egg; parasitic rate