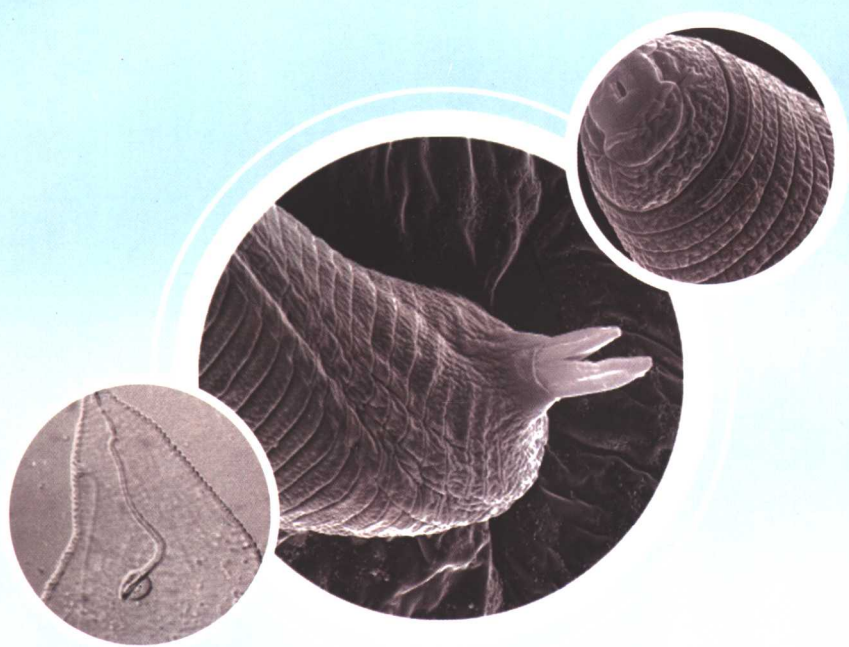


中国线虫学研究

(第一卷)

廖金铃 彭德良 郑经武 段玉玺 主编



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

中国线虫学研究·第一卷/廖金铃等主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2006.8
ISBN 7-80167-994-6

I. 中… II. 廖… III. 线虫动物—研究—中国 IV. Q959.17

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 078098 号

责任编辑: 冯凌云 杨玉文

责任校对: 贾晓红

出版者: 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电话: (010)68919709 传真: (010) 68919709

发行者: 中国农业科学技术出版社 邮编: 100081

电话: (010)68919704 传真: (010)68975144

经销者: 新华书店北京发行所

印刷者: 北京雅艺彩印有限公司

开本: 889mm × 1194mm 1/16

印张: 23

字数: 552 千字

版次: 2006 年 7 月第 1 版

印次: 2006 年 7 月第 1 次印刷

印数: 1 ~ 1 000 册

定价: 60.00 元

————— 版权所有·翻印必究 —————

前 言

植物线虫是农业生态体系中的重要组成部分，是农林业生产的重要影响因子，正日益受到国内外科学工作者的关注。近 20 多年来，我国的植物线虫学科有了较大的发展，研究工作不断深入。自 1988 年至今，已召开全国植物线虫学术研讨会 7 届，这些学术活动很好地促进了我国植物线虫学的学术交流，扩大了影响，增强了各线虫同仁的友谊。从第 5 届开始，学术交流论文分别以云南农业大学学报、沈阳农业大学学报、莱阳农学院学报的形式发表，线虫工作者普遍反映良好。为进一步提升我国植物线虫学的影响力，满足线虫工作者学术交流的需要，中国植物病理学会植物病原线虫专业委员会决定从本届（第 8 届）会议开始将论文以《中国线虫学研究》的系列论文形式出版。本届会议论文为第一卷。

《中国线虫学研究》（第一卷）共收集了 74 篇研究论文、综述和研究简报，内容涉及植物线虫的形态学和分子分类与鉴定、病害的检疫、植物线虫的生物多样性、线虫与寄主的分子互作、线虫病害的生物防治以及植物线虫病害的综合治理技术等植物线虫学研究的各个方面。基本反映了近年来我国植物线虫学工作者在相关领域的基础理论、应用基础以及病害综合治理方面的最新研究进展。

本书是我国第一部正式出版的反映植物线虫学研究的系列论文专著。得到了国家水稻生物学重点实验室、浙江大学生物技术研究所、上海衡桥仪器有限公司等的资助，我国植物线虫学界的多位专家、教授在百忙中帮助审稿，编委会的有关同志付出了辛勤的劳动，中国农业科技出版社对本书的出版给予了大力的支持和帮助。在此，我们表示衷心的感谢！

由于时间仓促，在编审过程中，本着尊重作者原意和文责自负原则，对论文基本内容未作变动，但对文中的一些错误进行了修正，对编辑体例进行了一些处理和规范。书中错误和不足之处难免，敬请作者和读者批评指正。

编者

2006 年 7 月

《中国线虫学研究(第一卷)》

编 委 会

主 编：廖金铃 彭德良 郑经武 段玉玺
副主 编：王新荣 胡先奇 谢 辉 张绍升 林茂松
编 委（按姓氏笔画排列）：
 王新荣 冯志新 刘维志 张绍升 汪来发
 陈书龙 周雪平 林茂松 武 侠 郑经武
 段玉玺 胡先奇 喻盛甫 彭云良 彭德良
 谢 辉 廖金铃
荣誉主任：冯志新 刘维志 周雪平 喻盛甫

目 录

研究论文

寄生象耳豆根结线虫上淡紫拟青霉的分离鉴定·····	卓侃等 (1)
木霉几丁质酶活及对根结线虫卵的寄生性测定·····	程丽云等 (6)
生物杀线虫剂对蔬菜南方根结线虫的室内毒力测定·····	万新龙等 (12)
大豆胰蛋白酶抑制剂与大豆对胞囊线虫抗性关系研究·····	段玉玺等 (18)
寄生南方根结线虫卵的粉红粘帚霉·····	李梅婷等 (25)
一株含 <i>cry7</i> 基因的苏云金杆菌 XZ-4-5 及其杀线虫活性研究 ·····	罗兰等 (30)
柑橘线虫病株根系及根际土壤中真菌的鉴定·····	洪彩凤等 (37)
松材线虫与拟松材线虫杂交后代群体致病性和纤维素酶活性测定·····	季宏铁等 (42)
侧耳属真菌对松材线虫作用的初步研究·····	汪来发等 (49)
大豆胞囊线虫群体的遗传变异 RAPD-PCR 研究·····	彭德良等 (54)
厚垣孢普可尼亚菌 2 个变种的鉴定·····	肖顺等 (62)
中国马铃薯上 2 种植物线虫的记述·····	徐春玲等 (66)
寄生朱顶红的短尾盾线虫·····	刘国坤等 (71)
石榴根际两种环科线虫的记述·····	周银丽等 (75)
浙江省出口盆景植物根围 3 种垫刃科线虫·····	郑炜等 (80)
MELOIDOGYNE PARAPLATANI SP. NOV. (NEMATA: TYLENCHIDA: MELOIDOGYNIDAE), A ROOT-KNOT NEMATODE FROM QINGDAO OF CHINA	
·····	Zhao Hong-hai 等 (85)
寄生水稻的南方根结线虫·····	谢志成等 (92)
河北省薯蓣红斑病病原线虫的种类鉴定·····	阎爱华等 (96)
默林线虫属中国新记录种短齿默林线虫 <i>Merlinius brevidens</i> (Allen, 1955) Siddiqi, 1970 的描述 ·····	尼秀媚等 (103)
宁波口岸进境木质包装中携带的伞滑刃属线虫的鉴定 ·····	顾建锋等 (107)
园林植物线虫种类调查 ·····	李卫芬等 (114)
辽宁省马铃薯线虫种类初步调查 ·····	姜丽等 (117)
头叶环属中国新记录种——重环头叶环线虫 <i>Lobocriconema crassian. ulatum</i> 的描述 ·····	段方猛等 (121)
拟滑刃属中国新记录种——红松拟滑刃线虫的记述 ·····	冯桂芳等 (125)
大连口岸进境种苗上截获的危险性线虫 ·····	姜丽等 (128)
云南省苹果树根际纽带亚科线虫记述 ·····	赵立荣等 (132)
贵州省枯萎松干内伞滑刃线虫种类鉴定 ·····	杨再福等 (136)

马来西亚蒲桃上线虫种类鉴定	蒋寒等 (140)
潜根属中国新记录种—野生稻潜根线虫 <i>Hirschmanniella anchoryzae</i> 的描述	刘修勇等 (144)
罗汉松四边突腔线虫 (垫刃目: 突腔科) 鉴定	王宏毅等 (148)
进口新西兰麻中检出穿刺短体线虫	江丽辉 (152)
烟草根际线虫的调查与鉴定	郑辉等 (155)
9 种杀线剂对海南主要栽培果树根结线虫病的防治	芮凯等 (158)
广东省松材线虫病监测和镜检实用技术探讨	钱明惠等 (165)
苏铁球茎腐烂病发生与长尾线虫关系初探	闫德祺等 (170)
番茄抗南方根结线虫种质材料的初步筛选	陆秀红等 (175)
主要蔬菜抗南方根结线虫材料及其利用研究进展	邓莲等 (179)
松材线虫携带菌的生理生化特性及致病力初探	张丽琳等 (185)
生防菌与大扫灭防治彩椒上的根结线虫	刘霆等 (192)
植物危险性线虫综合评价方法的研究	李一农等 (195)
云南拟松材线虫侵染周期初步研究	李丹蕾等 (202)

综 述

植物线虫寄生性相关基因的研究进展	郑静君等 (207)
荧光假单胞杆菌对植物线虫防治的前景	单长辉等 (212)
RNAi 技术在植物线虫基因功能研究上的应用	陈瑶等 (217)
单克隆抗体技术及其在植物线虫学研究中的应用	蒋立琴等 (222)
定量荧光 PCR 技术在植物线虫诊断中应用	曹爱新 (227)
环总科线虫的分类与评述	陈立杰等 (233)
香蕉穿孔线虫离体培养及其寄主适应性研究进展	耿丽凤等 (239)
秀丽新小杆线虫 microRNAs 对细胞凋亡相关基因的调控	邹一平等 (244)
浅析影响筛选杀线物质的几个问题	王媛媛等 (249)
大豆抗胞囊线虫基因研究进展	王雪等 (254)
防治大豆胞囊线虫最具潜力的生防菌——机会菌物	孙玉秋等 (261)
腐烂茎线虫 (<i>Ditylenchus destructor</i>) 为害花生	宛菲等 (267)
线虫与农业生态系统的关系及其利用	卓侃等 (273)
大豆田植物寄生线虫分布和种群密度	许艳丽 (280)
几种植物中抗线虫基因及其定位研究进展	宫卫波等 (286)
《植物线虫学》双语教学实践与思考	王新荣等 (293)
中国植物线虫学研究九十年	张绍升 (298)
松材线虫 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> 致病相关基因研究进展	彭德良等 (310)

研究简报

标明剑线虫种内群体的形态学变异	武扬等 (313)
水稻干尖线虫在水稻生长各个阶段的分布	刘维红等 (315)

昆虫病原线虫共生菌发酵液对南方根结线虫致死作用初报	王仁刚等 (317)
灌溉对麦田土壤线虫区系的影响	李秀侠等 (319)
甘薯茎线虫、鳞球茎线虫和食菌茎线虫的 PCR-RFLP 分析	季镭等 (321)
放线菌与淡紫拟青霉对根结线虫的防治	梁照文等 (323)
狮子山隔指胞胞外蛋白酶的纯化和基因克隆	杨金奎等 (325)
少孢节丛孢 HNQ11 菌株对松材线虫及象耳豆根结线虫的控制	鄢小宁等 (326)
甲基溴替代技术条件下受根结线虫侵害的番茄产量动态	陈国康等 (328)
拟松材线虫个体发育研究	李丹蕾等 (330)
爪哇根结线虫 β -1, 4-内切葡聚糖酶基因的克隆及表达研究	崔汝强等 (331)
云南拟松材线虫致病性研究	李丹蕾等 (332)
云南拟松材线虫种群 IGS 区段 DNA 序列研究	杨佩文等 (335)
抗禾谷孢囊线虫基因研究进展	翟旭光等 (339)
微生物几丁质酶及其在植物线虫病害防治等领域的应用	侯金丽等 (347)
广东省松材线虫病监测与除治技术示范	叶燕华等 (356)

寄生象耳豆根结线虫上淡紫拟青霉的分离鉴定*

卓侃, 廖金铃, 崔汝强, 伍彩飞

(华南农业大学资源环境学院植物线虫研究室, 广东广州 510642)

摘要: 象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*) 是热带和亚热带作物的一个重要潜在病原物, 该线虫可寄生携带 *Mi* 抗性基因的番茄, 生物防治有可能是未来防治象耳豆根结线虫的主要手段之一。采用卵囊分离法从海南定安木豆上的象耳豆根结线虫样品上分离得到一株真菌 MD1, 通过形态学和 rDNA-ITS PCR 直接测序法, 将该菌鉴定为淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*)。这是首次从象耳豆根结线虫上分离到淡紫拟青霉, 为象耳豆根结线虫寄生真菌的研究工作奠定了基础。

关键词: 淡紫拟青霉; 分离; 形态; 分子鉴定

Isolation and Identification of *Paecilomyces lilacinus* Parasitizing *Meloidogyne enterolobii*

ZHUO Kan, LIAO Jin-ling, CUI Ru-qiang, WU Cai-fei

(Laboratory of Plant Nematology, College of Natural Resource and

Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: *Meloidogyne enterolobii* is a threat to plants in tropic and subtropical regions and can reproduce on cultivars such as tomato with the *Mi* gene. So it is a good choice to control the species by biological control. One isolate named MD1 of *Paecilomyces lilacinus* from eggs of *M. enterolobii* was identified using morphology and rDNA-ITS PCR. *P. lilacinus* was firstly isolated from *M. enterolobii*, which promoted research on fungi parasitizing *M. enterolobii*.

Key words: *Paecilomyces lilacinus*; isolate; morphology; molecular identification

象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*) 寄主广, 可寄生携带 *Mi* 抗性基因的番茄 (*Lycopersicon esculentum*), 已成为热带和亚热带作物的一个重要潜在病原物^[1]。由于该线虫具有克服番茄 *Mi* 基因抗性的能力, 同时, 杀线虫剂通常毒性较高, 会增加环境的污染, 不符合现代生态农业可持续发展的要求。因此, 生物防治方法有可能是未来防治象耳豆根结线虫的主要手段之一。

真菌是根结线虫生物防治中研究较多的天敌生物, 是最重要的生防因子^[2]。开发研究根

* 基金项目: 广东省重点科技计划项目 (2005B20801013); 科技部十五攻关项目 (2001BA509B06)。

作者简介: 卓侃 (1979~), 男, 博士研究生, 主要从事植物线虫学研究。

通讯作者: 廖金铃, 男, 教授。主要从事植物线虫学及相关科研工作; Tel: 020-85280298, E-mail: jlliao@scau.edu.cn。

结线虫生防菌制剂的基础是分离和鉴定根结线虫的寄生菌, 而象耳豆根结线虫的寄生真菌还未见报道, 因此本研究对采集于海南省的象耳豆根结线虫样品的寄生真菌进行分离, 其中在海南定安木豆上的象耳豆根结线虫卵囊样品上分离得到一株出现频率很高的真菌, 通过形态学和 rDNA-PCR 直接测序方法对该菌进行鉴定, 为象耳豆根结线虫寄生真菌的研究工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株分离自海南定安木豆 (*Cajanus cajan*) 上的象耳豆根结线虫卵囊, 菌株现存于华南农业大学植物线虫研究室。

1.1.2 化学试剂 TRIzol 购于 Invitrogen 公司; *Ex Taq*、dNTP、DL 2000 DNA Marker 购于大连宝生物工程有限公司; 引物采用扩增丝状真菌 rDNA-ITS 区的通用引物 ITS4 和 ITS5^[3], 由上海英骏生物技术有限公司合成, 序列分别为:

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

1.2 方法

1.2.1 分离方法 采用卵囊分离法^[4]: 先配制马铃薯葡萄糖琼胶培养基 PDA, 每 1 000 ml PDA 培养基中加入 0.2 g 的氯霉素抑制细菌生长; 然后选取有根结的病根, 用清水清洗掉病根上的土壤, 挑取病根根结外的卵囊, 每个样挑选 25 个卵囊; 用 5% NaClO 消毒卵囊 3 min; 将卵囊迅速转到灭菌水中漂洗, 共漂洗 3 次; 最后将卵囊移入 PDA 中, 25℃ 培养; 每皿接 3 个卵囊; 待卵囊周围长出菌落后, 挑取边缘菌丝, 纯化, 在 PDA 上培养, 保存。

1.2.2 鉴定方法

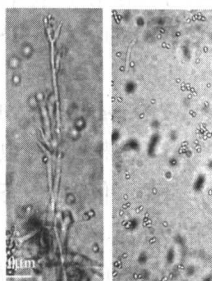
1.2.2.1 形态学鉴定 将供试菌株进行单孢分离, 获得单孢分离株后转接至 PDA 培养基, 观察菌落特征及分生孢子、分生孢子梗形态, 在 Olympus 高级显微镜下测量和拍照, 并保存至电脑中。

1.2.2.2 DNA 鉴定 采用 TRIzol 方法提取菌株基因组 DNA。(1) PCR 反应体系: DNA 模板 10~20 ng, *Ex Taq* (5U/μl) 0.125 μl, 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μl, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, 加无菌水至 25 μl。(2) 扩增条件: 94℃ 5 min; 接着 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min 共 35 个循环; 最后 72℃ 10 min。(3) PCR 反应产物电泳检测: 配制 1% 琼脂糖凝胶, 每 100 ml 琼脂糖凝胶加入 5 μl EB 替代物 GoldView。取 5 μl PCR 产物与 1 μl DNA 载样缓冲液混匀上样。在 0.5×TBE 缓冲液中以 5 v/cm 电压电泳约 30 min。用凝胶图像分析系统照相, 并储存到电脑中。(4) 测序分析: 将 PCR 产物直接送交上海英骏生物技术有限公司, 利用公司的 3730 全自动测序仪测定序列。序列分析的结果通过国际互联网进行核酸同源性检索, 检索程序主要采取 BLAST, 即核酸序列对核酸序列数据库的检索。序列分析在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行及使用软件 DNA Star。

2 结果与分析

2.1 菌株形态特征

菌落在 25℃、半光照条件下, PDA 培养基上培养 7 天, 直径可达约 3.5 cm, 正面颜色呈淡紫色, 突起, 表面粉质, 轮纹明显, 背面无色或紫红色; 菌丝无色, 有隔膜; 分生孢子梗直立, 轮状分枝, 2~4 个瓶梗轮状排列在孢子梗上, 瓶梗基部膨大, 顶端稍细长, 约 1 μm 长, 瓶梗大小为 7.5~12.5 μm $\times$ 2.5~3.0 μm , 分生孢子椭圆形至纺锤形, 表面光滑, 大小为 2.5~4.0 μm $\times$ 2.0~2.5 μm (图 1), 与文献记载的淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*)^[5,6] 特征基本相符, 初步鉴定该菌为淡紫拟青霉, 菌株编号 MD1。



a: 分生孢子梗; b: 分生孢子

图 1 淡紫拟青霉 MD1 分生孢子梗和分生孢子形态

a: conidiophores; b: conidia

Fig.1 Photomicrographs of conidiophores and conidia of MD1 isolate of *Paecilomyces lilacinus*

2.2 PCR 扩增及测序结果

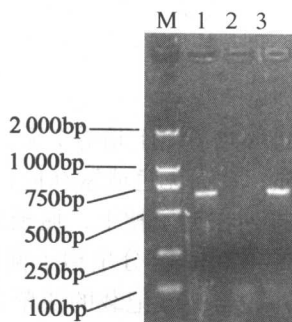
利用引物 ITS4 和 ITS5 对菌株 MD1 的 rDNA-ITS 区进行扩增, 扩增图谱见图 2。从扩增图谱可见, 该菌株扩增获得一条大约 600 bp 的 DNA 片段。

经上海英骏生物技术有限公司采用 3730 全自动测序仪对 MD1 的 rDNA-ITS 序列进行测序, 结果表明: 这个区间共有 621 个碱基。其中包括 18S RNA 基因 3' 末端 54 bp 的序列, 188 bp 的 ITS1 序列, 159 bp 的 5.8S RNA 基因序列, 161 bp 的 ITS2 序列和 28S RNA 基因 5' 端的 59 bp 的序列 (序列未给出)。

在国际互联网 (<http://www.ncbi.nih.gov>) 上, 对所测得的 MD1 菌株的 rDNA-ITS 序列用 BLAST 进行同源搜索, 得到相似性最高的均为淡紫拟青霉。随机选取基因库中的 4 个淡紫拟青霉 ITS 序列, 基因库编码分别是 AY213668、AB244777、AY213665 和 AB103380。采用 DNASTar MegAlign 分析软件对 MD1 的序列与上述 4 个序列进行多序列比较。结果发现, MD1 与 4 个序列相似性均很高, 相似系数分别为 99.5%、99.3%、99.5% 和 99.7%, 进一步证明菌株 MD1 是淡紫拟青霉。

3 讨论

从海南定安木豆上的象耳豆根结线虫卵囊样品上分离得到一株出现频率较高的真菌, 通过形态学和分子生物学鉴定为淡紫拟青霉。这是首次从象耳豆根结线虫上分离到淡紫



M: DL 2000 DNA Marker; 1, 3: 淡紫拟青霉 MD1; 2: 阴性对照

图2 淡紫拟青霉 MD1 的 rDNA ITS 区扩增电泳图

M, DL 2000 DNA Marker; 1, 3: MD1 isolate of *P. lilacinus*; 2: CK

Fig.2 Products of PCR amplified rDNA-ITS regions of MD1 isolate of *Paecilomyces lilacinus*

拟青霉。根结线虫寄生真菌的分离和鉴定是根结线虫生物防治的基础。只有对真菌进行准确的鉴定,才能进一步开发和利用该菌。仅从形态上来鉴定真菌,对非真菌分类专家来说是比较困难的。随着分子生物学的发展,利用分子手段来鉴定真菌已经成为一种可行的方法。Duke 大学的 Vilgalys 实验室根据前人的报道及他们自己的研究和检测,提供了几十条引物来扩增真菌门的一些真菌及一些真核生物 rDNA 的 ITS 区和 IGS 区^[7],我们可以利用这些引物进行 PCR 扩增,然后采用直接测序、RFLP 等方法进行鉴定,这为真菌的准确鉴定提供了一个方便、可靠的方法。

淡紫拟青霉是最重要的根结线虫生防菌之一。1979 年,国际马铃薯中心 Jatala 首先从南方根结线虫 (*M. incognita*) 卵中分离到淡紫拟青霉,并证实该菌对南方根结线虫卵的寄生率可达到 60% ~ 70%^[8]。随后,国内外线虫学者进行的很多试验都证明淡紫拟青霉能寄生南方根结线虫、爪哇根结线虫 (*M. javanica*) 等根结线虫的卵,抑制卵的孵化,减少线虫的数量和降低根结指数^[9~11],并且该菌的商品制剂也已经研制成功^[12]。在本研究的基础上,我们还进行了淡紫拟青霉 MD1 对象耳豆根结线虫的抑制作用研究,结果发现该菌对象耳豆根结线虫卵孵化的抑制率达到 55.6%,盆栽生测的抑制效果达到 55.5% (另文报道),表明 MD1 是一个有开发潜力的象耳豆根结线虫生防真菌。

参考文献

- [1] Liu Hao, Long Hai, Yan Xiao-ning, *et al.* (刘昊, 龙海, 鄢小宁等). Species identification and host range testing of a root-knot nematode infecting guava in Hainan Province [J]. Journal of Nanjing Agricultural University (南京农业大学学报), 2005, 28 (4): 55 ~ 59. (in Chinese)
- [2] Feng Zhi-xin (冯志新). Plant Nematology [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. (in Chinese)
- [3] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press, 1990: 315 ~ 322.
- [4] Wang Lai-fa, Yang Bao-jun, Li Chuan-dao. (汪来发, 杨宝君, 李传道). Evaluation of pathogenicity of parasitic fungi to root-knot nematodes [J]. Scientia Silvae Sinica (林业科学), 1999, 35 (3): 41 ~ 47. (in Chinese)
- [5] Li Tian-fei, Zhang Ke-qin, Liu Xing-zhong. (李天飞, 张克勤, 刘杏忠). Taxonomy of nematophagous fungi. [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000. (in Chinese)

- [6] Wang Ming-zu (王明祖). Studies on the fungal parasite of root-knot nematode eggs [J]. Journal of Huazhong Agricultural University (华中农业大学学报), 1992, 11 (1): 52 ~ 56. (in Chinese)
- [7] Vilgalys lab, Duke University. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.
- [8] Jatala P, Kaltenbach R, Bocangel M. Biological control of *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida* on potatoes [J]. Journal of Nematology, 1979, 11: 303.
- [9] Siddiqui Z A, Munshi A H, Mahmood I. Biological control of *Meloidogyne javanica* by some fungi in chickpea [J]. Thai J. Agric. Sci., 1996, 29: 115 ~ 123.
- [10] Li Fang, Zhang Shao-sheng, Chen Jia-hua. (李芳, 张绍升, 陈家骅). Biological control of tobacco root-knot nematodes with *Paecilomyces lilacinus* [J]. Journal of Fujian Agricultural University (福建农业大学学报), 1998, 27 (2): 196 ~ 199. (in Chinese)
- [11] Holland R J, Williams K L, Khan A. Infection of *Meloidogyne javanica* by *Paecilomyces lilacinus* [J]. Nematology, 1999, 1 (2): 131 ~ 139.
- [12] Timm M. "Biocon" controls nematodes biologically [J]. Bio. Tech., 1987, 5: 772.

木霉几丁质酶活及对根结线虫卵的寄生性测定*

程丽云¹, 吴羽平², 刘国坤¹, 张绍升²

(¹ 福建农林大学植物保护学院, 福建福州 350002;

² 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建福州 350002)

摘要: 利用还原糖法测定木霉 (*Trichoderma* spp.) 的几丁质酶活, 用水琼脂平板法测定木霉对南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 卵的寄生性。测定结果: TG050601、TL030602、TZ050618、TG040604、TZ050611、TG050617 和 TZ030901 等 7 个菌株对根结线虫卵的寄生率分别为 33.9%, 30.1%, 26.2%, 25.4%, 24.0%, 22.0% 和 21.3%, 几丁质酶活分别为 0.0300 U/ml, 0.0275 U/ml, 0.0270 U/ml, 0.0260 U/ml, 0.0258 U/ml, 0.0246 U/ml 和 0.0238 U/ml。经统计分析, 木霉对根结线虫卵的寄生率与几丁质酶活呈正相关, $R^2 = 0.955$ 。
关键词: 木霉; 几丁质酶活; 南方根结线虫; 寄生性

The Chitinase Activity and the Parasitism to the Root-knot Nematode Eggs of Seven strains of *Trichoderma*

CHENG Li-yun¹, WU Yu-ping², LIU Guo-kun¹, ZHANG Shao-sheng²

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002,

China. ² Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Fujian Agriculture and

Forestry University, Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Chitinase activity of seven strains of *Trichoderma* were tested with measuring reducing sugar, and the parasitism of these strains to Root-knot nematode eggs were tested with water agar plates. The results showed that the parasitic rate of *Trichoderma* strains TG050601, TL030602, TZ050618, TG040604, TZ050611, TG050617 and TZ030901 were 33.9%, 30.1%, 26.2%, 25.4%, 24.0%, 22.0% and 21.3% respectively, the chitinase activity were 0.0300 U/ml, 0.0275 U/ml, 0.0270 U/ml, 0.0260 U/ml, 0.0258 U/ml, 0.0246 U/ml and 0.0238 U/ml respectively. The parasitic rate were positive relatively to the chitinase activity by statistical analysis, $R^2 = 0.955$.

Key words: *Trichoderma*; Chitinase activity; *Meloidogyne incognita*; parasitism

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 在我国广泛分布并在许多作物上寄生为害^[1]。由于化学杀线虫剂在环境和食品安全等方面带来了许多问题, 因此, 植物线虫生物防治越来越受到人们的关注。木霉 (*Trichoderma* spp.) 是植物病害防治的重要真菌, 在国外, 已有用木霉防治植

* 基金项目: 福建省科技厅资助项目 (2003N030) 和福建省教育厅资助项目 (2003J004)。

作者简介: 程丽云 (1981~), 女, 福建宁德人, 从事植物病理学研究。

通讯作者: 张绍升, 男, 教授、博士生导师, 从事植物线虫学和植物病害生物防治研究;

E-mail: shaoshengzhang@126.com。

物寄生线虫的报道^[2-4]。本研究为进一步探明利用木霉防治植物线虫的前景及其机理, 选用了7株木霉, 对其几丁质酶活及对根结线虫卵的寄生性进行了测定。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

供试菌株由福建农林大学植物保护学院植物线虫研究室提供。菌株种类和编号: 绿色木霉 (*T. viride*) TG050601; 哈茨木霉 (*T. harzianum*) TL030602、TZ050618、TG040604、TZ050611、TG050617; 康氏木霉 (*T. koningii*) TZ030901。

1.2 木霉的几丁质酶活测定

1.2.1 几丁质胶体制备 将片状几丁质(中国医药集团上海化学试剂公司)用高速万能粉碎机 24 000 r/min 粉碎, 过 100 目筛。称取 5 g 几丁质粉末于内径为 9 cm 的研钵中, 加入 50 ml 36% (V/V) 的浓盐酸, 充分研磨均匀, 于 4℃ 放置 24 h; 将被盐酸溶解的糊状几丁质置于 250 ml 烧杯中, 再加入 50 ml 浓盐酸, 搅拌均匀; 加入 250 ml 50% (V/V) 乙醇, 不断搅拌至胶体充分析出; 将胶体溶液置于低速离心机, 3 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清液。于沉淀的胶体中加入适量蒸馏水, 充分搅拌, 3 000 r/min 离心 10 min; 重复此步骤直至 pH 值升至 7 左右, 最后用蒸馏水定容至 250 ml, 得到 2% (W/V) 几丁质胶体, 4℃ 保存备用^[5]。

1.2.2 几丁质液体培养基制备 KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.2 g, NaCl 0.2 g, 2% (W/V) 胶体几丁质 100 ml, 以蒸馏水定容至 1 000 ml, pH 7.0。

在 250 ml 的三角烧瓶里装 100 ml 的几丁质液体培养基, 包装好后置于灭菌锅中 0.1MPa, 121.5℃ 灭菌 20 min 备用。

1.2.3 供试菌株的几丁质液体发酵 供试菌株先在 PSA (马铃薯 200 g, 蔗糖 18 g, 琼脂 18 g, 水 1 000 ml) 平板上培养 4 天, 形成菌落后用 ϕ 6mm 的打孔器打取菌碟, 往盛有 100 ml 几丁质液体培养基的 250 ml 三角烧瓶中接入 1 块菌碟, 置于摇床中 28℃, 150 r/min 培养 72 h 后开始并每隔 24 h 测定上清液中几丁质酶的活力, 当几丁质酶活呈现下降时停止测定, 每种菌株做 3 瓶重复。

1.2.4 几丁质酶活力测定 用几丁质酶作用于几丁质胶体生成的还原糖含量来测定几丁质酶活的大小。在制备的 2% (W/V) 几丁质胶体中加入一倍体积 0.1 mol/L, pH 4.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液, 制成 pH 4.0 的 1% (W/V) 的几丁质胶体底物。

取 1 ml 发酵液 4 000 r/min 离心 5 min, 在 3 支 1.5 ml 离心管中分别加入 0.1 ml 发酵上清液和 0.1 ml 1% (W/V) 胶体几丁质, 其中 1 支加入 0.1 ml DNS 后迅速放入 100℃ 水浴 10 min 作为对照; 另外 2 支装有发酵液的离心管于 40℃ 水浴 60 min 后, 加入 0.1 ml DNS 放入 100℃ 水浴 10 min, 分别往 3 支离心管中加入 1 ml 蒸馏水, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 540 nm 测量吸光值。还原糖含量用葡萄糖作标准曲线计算。酶活力单位 (U) 以在上述反应条件下, 每 1 min 产生 1 μmol 还原糖需要的酶量计算^[6]。

1.3 木霉对根结线虫卵的寄生性测定

1.3.1 木霉孢子悬浮液的制备 供试木霉菌株分别在 PSA 平板上培养 3 天, 用 ϕ 6mm 的打孔器打取 1 块菌碟置于 1.5 ml 的 eppendorf 管中, 加入 1 ml 的无菌水在涡旋仪上振荡均匀, 制成孢子浓度为 10^6 个/ml 孢子悬浮液以备用。

1.3.2 根结线虫卵悬浮液的制备 供试线虫为南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*), 从温室培育的番茄根部根结上挑取根结线虫卵囊, 卵囊用 1% (V/V) 的 NaClO 表面静置消毒 2 min 后, 用无菌水淋洗 3 次。卵囊消毒后转入装有 1 ml 的 0.5% (V/V) 的 NaClO 的灭菌离心管中, 涡旋 3 min, 静置 30 s, 吸取上层卵悬浮液于另一离心管中, 2 000 r/min 离心 20 s, 用无菌水清洗, 反复离心 3 次, 制成的卵悬浮液在 4℃ 冰箱中保存备用^[7]。

1.3.3 水琼脂平板法测定 1% 水琼脂培养基制备: 琼脂 1 g, 水 100 ml, 在 250 ml 的三角烧瓶里装 100 ml 培养基, 包装好后置于灭菌锅中 0.1 MPa, 121.5℃ 灭菌 20 min 备用。

在直径为 8 cm 的培养皿中加入水琼脂制成平板薄层, 无菌操作将 5 μ l 的木霉孢子悬浮液滴于水琼脂平板上, 每个平板滴加 3 个等距离分布点, 并用记号笔在接菌点标记。24 h 菌丝萌发形成小菌落后, 在菌落两侧各滴 3 μ l 的根结线虫卵悬浮液, 在接卵点做标记, 另接卵粒于水琼脂平板作对照, 每一处理设 3 个培养皿 (每一处理约 100 粒卵)。用 parafilm 密封培养皿边缘, 于 28℃ 培养 7 天后, 在菌落上滴加少量无菌水, 在倒置显微镜下用羽针轻轻挑动卵粒, 如果卵粒上有菌丝长出, 视为寄生^[8]。

2 结果

2.1 木霉的几丁质酶活

不同菌株产酶活性有差异, TG050601, TL030602, TG040604 和 TZ030901 的产酶高峰期都在第 6 天, TZ050618 的产酶高峰期在第 7 天, 而 TZ050611 的高峰期在第 4 天。7 个菌株的几丁质酶活从高到低依次是 TG050601 为 0.0300 U/ml, TL030602 为 0.0275 U/ml, TZ050618 为 0.0270 U/ml, TG040604 为 0.0260 U/ml, TZ050611 为 0.0258 U/ml, TG050617 为 0.0246 U/ml, TZ030901 为 0.0238 U/ml (图 1)。

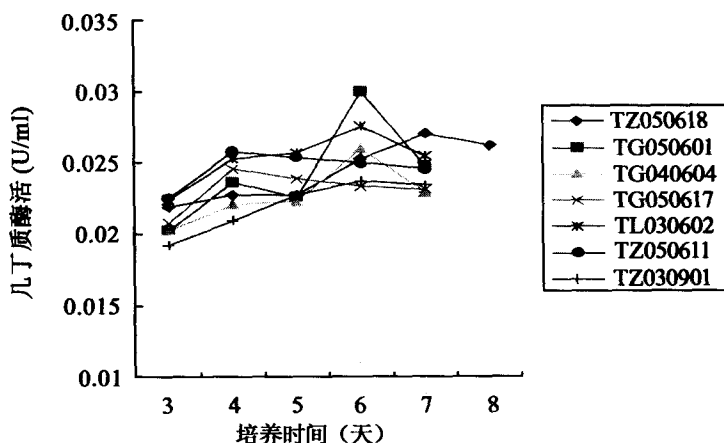


图 1 7 株木霉的几丁质酶活

Fig.1 The chitinase activity of seven stains of *Trichoderma* spp.

2.2 木霉对根结线虫卵的寄生性

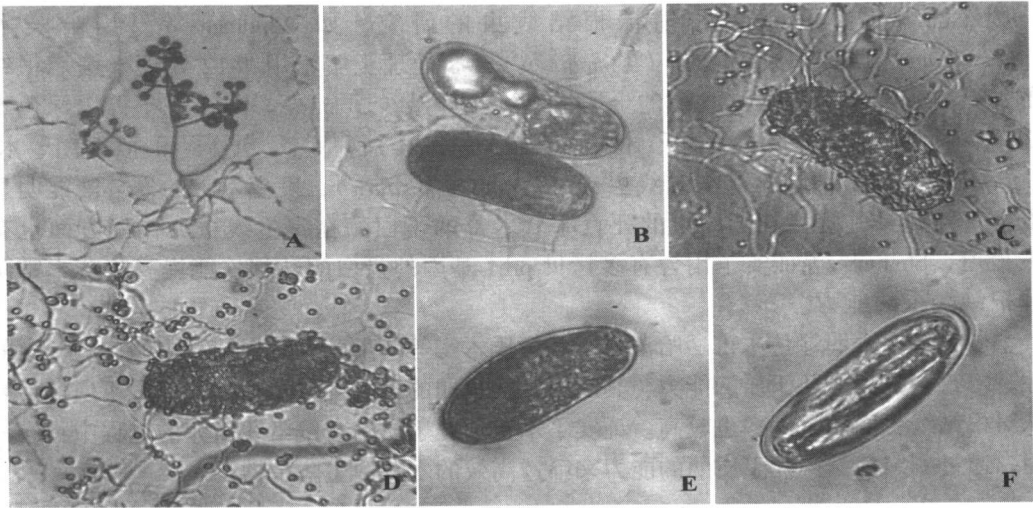
木霉在 1% (W/V) 水琼脂平板上能萌发产生菌丝、分生孢子和分生孢子梗 (图 2, A)。不同菌株对根结线虫卵的寄生能力有差异, 寄生率从高到低依次为 TG050601 > TL030602 >

TZ050618 > TG040604 > TZ050611 > TG050617 > TZ030901 (表 1)。被寄生的根结线虫卵多为胚胎早期发育的卵, 被寄生的卵粒内容物被消解 (图 2, B), 卵粒内充满菌丝 (图 2, C), 有的卵粒边缘长满了木霉的孢子 (图 2, D)。未被寄生的卵内容物完整, 卵粒边缘清晰完整 (图 2, E、F)。

表 1 木霉对南方根结线虫卵的寄生性

Tab.1 Parasitism of the *Trichoderma* spp. to eggs of *M. incognita*

菌株	寄生卵 (粒)	未寄生卵 (粒)	寄生率 (%)
TG050601	42	82	33.9
TL030602	28	65	30.1
TZ050618	22	62	26.2
TG040604	29	85	25.4
TZ050611	25	79	24.0
TG050617	26	92	22.0
TZ030901	22	83	21.3



A. 水琼脂平板上的木霉; B. 被寄生卵内容物消解; C. 卵内充满菌丝;
D. 被寄生卵产生木霉孢子; E. 未寄生的胚胎卵; F. 卵内孵化的 1 龄幼虫。

图 2 木霉对南方根结线虫卵的寄生性

Fig.2 Parasitism of *Trichoderma* to eggs of *M. incognita*

2.3 木霉的几丁质酶活与对根结线虫卵寄生率的相关性

根据 7 株木霉的几丁质酶活与其对根结线虫卵的寄生率分析显示, 木霉的产几丁质酶能力与其对根结线虫卵的寄生性呈正相关 (图 3), $R^2 = 0.955$, 差异极显著。例如 TG050601 的几丁质酶活最高, 对根结线虫卵的寄生率也最高, TZ030901 的几丁质酶活最低, 对根结线

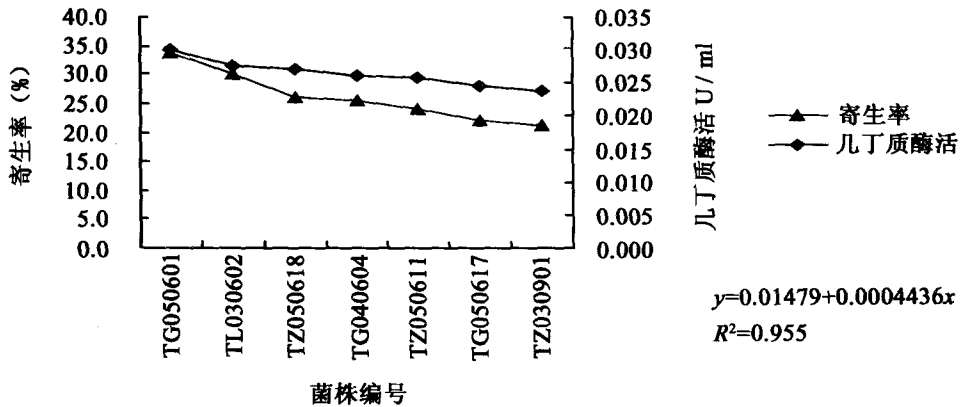


图3 木霉的几丁质酶活及对卵的寄生相关性

Fig.3 Relation between chitinase activity and parasitism to eggs of *M. incognita*

虫卵的寄生率也最低。

3 讨论

国外已开展了利用木霉防治根结线虫的研究,如 Windham 等^[2]用哈茨木霉 (*T. harzianum*) T-12 和康氏木霉 (*T. koningii*) T-8 处理土壤,用 T-12 处理土壤后根结线虫的卵减少了 47%,用 T-8 处理的土壤根结线虫卵减少了 53%。Siddiqui^[3]等用绿色木霉 (*T. viride*)、哈茨木霉、哈氏木霉 (*T. hamatum*)、康氏木霉和拟康氏木霉 (*T. pseudokoningii*) 防治爪哇根结线虫 (*Meloidogyne javanica*),发现木霉的发酵液能明显地降低卵的孵化率并提高二龄幼虫的死亡率。木霉的蛋白酶在寄生线虫卵作用方面也有了相关报道,Sharon^[4]等证实了用含有多拷贝 *prb1* 基因的蛋白酶转移株能提高哈茨木霉防治爪哇根结线虫的能力。

本研究结果表明绿色木霉、哈茨木霉和康氏木霉等 7 个菌株对根结线虫卵均有一定的寄生性,木霉菌株间产几丁质酶能力与其对根结线虫卵的寄生性呈正相关,产几丁质酶活高的菌株对根结线虫卵的寄生率也较高。证实了木霉的几丁质酶在侵染线虫卵的过程中具有一定作用,通过测定菌株产几丁质酶的能力来筛选高效的木霉菌生防菌株。

参考文献

- [1] 张绍升. 植物线虫病害诊断与治理[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999. 97 ~ 98.
- [2] Windham G L, Windham M T, Williams W P. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction [J]. Plant Disease, 1989, 73: 493 ~ 494.
- [3] Siddiqui I A, Zareen A, Javed Z M, et al. Use of *Trichoderma* Species in the Control of *Meloidogyne javanica* Root Knot Nematode in Okra and Mungbean [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2001, 4 (7): 846 ~ 848.
- [4] Sharon E, Bar-eyal M, Chet I, et al. Biological control of the Root-knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* [J]. Biological control, 2001, 3.
- [5] 张雯, 倪莉, 刘国坤等. 淡紫拟青霉产几丁质酶特性及其对根结线虫卵的侵染作用[J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21 (2): 139 ~ 142.