

农药对生防菌厚孢普可尼亚菌 ZK7 生长发育的影响*

祝明亮**

(云南省烟草科学研究所 玉溪 650106)

摘要 以 PDA 平板和 PDB 摇瓶培养法测定了 6 种常用化学农药对烟草根结线虫生防菌厚孢普可尼亚菌 ZK7 菌株孢子萌发率、平板抑制作用和液体培养生物量的影响。结果表明,生防菌 ZK7 菌株对低浓度的 6 种药剂均存在一定抗性,对不同药剂的抗性表现出差异。其中多菌灵和甲基托布津对生防菌 ZK7 菌株的抑制作用最大,其次是辛硫磷和雷多米尔,克百威和涕灭威抑制作用最小。

关键词 生防菌,厚孢普可尼亚菌 ZK7,农药,孢子萌发,菌丝生长

中图分类号 :Q935 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)05-0893-04

Influences of Pesticides on the Growth and Development of the Biocontrol Strain *Pochonia chlamydospora* ZK7*

ZHU Ming-Liang**

(Yunnan Tobacco Science Institute, Yuxi 650106)

Abstract By using PDA plate and PDB shaking culture method, the effect of six chemical pesticides on the spore germination, plate inhibition and Biomass of the biological control strains *Pochonia chlamydospora* ZK7 for tobacco root-knot nematodes were measured. Results showed that strain ZK7 is resistant to six pesticides at lower concentration and the resistance level are different among different pesticides. Carbetamide and thiophos of them have the biggest resistance, next is phoxim-methyl and metaldehyde, the last is carbophenothion and aldoxycarb.

Key words Biocontrol fungus, *Pochonia chlamydospora* ZK7, Pesticides, Spore germination, Mycelial growth

尽管生物防治受到人们越来越多的重视,但目前化学农药仍然是防治农业病虫害的主要手段之一,如何使生物防治与化学防治相结合和协调使用,最终达到控制病虫害的目的已经引起相关领域科技工作者的重视^[1-4]。厚孢普可尼亚菌(*Pochonia chlamydospora* (Goddard) Zare & W. Gams)原名厚孢轮枝菌(*Verticillium chlamydosporium* Goddard)^[5],是一种常见于土壤中的兼性寄生菌,既能在土壤中营腐生生活,又能寄生于植物根围区的球形胞囊线虫(*Globodera* spp.)、胞囊线虫(*Heterodera* spp.)和根结线虫(*Meloidogyne* spp.)等固着性较强的植物寄生线虫的雌虫、胞囊、卵囊或虫卵内^[6],因而该菌在植物寄生线虫生防研究中被国内外广泛深入研究,具有较大的生防潜力^[7]。本项目组筛选的厚孢普可尼亚菌 ZK7 菌株对烟草根结线虫具有较好的防治效

果^[8],但尚不知道该菌株对一些常用化学农药的耐药性情况。本研究测定了烟草生产中 6 种常用杀虫、杀菌和杀线剂对生防菌 ZK7 的孢子萌发率、平板抑制作用和液体培养生物量的影响,以期为该菌株生防菌剂的生产应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

生防菌厚孢普可尼亚菌(*Pochonia chlamydospora* (Goddard) Zare & W. Gams) ZK7 菌株由本课题组从根结线虫(*Meloidogyne*)卵分离筛选。

1.2 供试药剂

70% 甲基托布津可湿性粉剂(Nisso 日本曹达株式会社生产,市购),58% 雷多米尔可湿性粉剂(瑞士诺华 Novartis 产品,市购),5% 神农丹颗粒剂(山东

* 云南省烟草公司科技资助项目(No. 04A19) 科技部国家攻关项目(No. 2002BA901A21)

** 通讯作者 E-mail :mingliangzhu@hotmail.com

收稿日期:2006-12-07,修回日期:2007-04-22

华阳农药化工集团有限公司生产,市购),50%多菌灵可湿性粉剂(江苏靖江农药厂出品,市购)40%辛硫乳油(江苏宝灵化工股份有限公司生产,市购)3%克百威颗粒剂(中国丽水汇力化学有限公司产品,市购)。

1.3 培养基

PDA 和 PDB 培养基均按常规方法配制。

1.4 农药对 ZK7 菌株孢子萌发的影响

PDA 培养基灭菌冷却至 50℃~60℃时,分别加入不同药剂使最终浓度分别为 0.1μg/mL、1μg/mL、10μg/mL、25μg/mL 和 50μg/mL,倒平板冷却过夜使表面风干。ZK7 菌株接种于 PDA 平板,25℃培养 10d 后,加入 1%吐温 80 洗脱孢子,孢子液过灭菌 500 目钢筛,血球计数器测定孢子浓度,无菌水稀释到 10⁶ 个/mL。于风干加有药剂的 PDA 平板表面加盖 1.5cm² 大小的玻璃纸 3 块,三角形放置。玻璃纸上分别加入制备好的孢子悬液 10μL,25℃恒温培养 10h 后,取玻璃纸于载玻片上光学显微镜(10×40)镜检,计数萌发孢子数,以不加药剂 PDA 平板为对照,计算出各处理孢子萌发率。

1.5 农药对 ZK7 菌株的平板抑制作用

PDA 培养基灭菌冷却至 50℃~60℃时,分别加入不同药剂使最终浓度分别为 0.1μg/mL、1μg/mL、10μg/mL、25μg/mL 和 50μg/mL,倒平板冷却过夜使表面风干。将培养 1w 的 ZK7 菌株平板用打孔器(直径 3mm)制成菌丝块。将菌丝块接种至风干的 PDA 平板,每处理 3 个重复,以不加药剂 PDA 平板作对照。在 28℃恒温培养 7d 和 14d 后分别测定菌落直径。

1.6 农药对 ZK7 菌株液体培养生物量的影响

将 ZK7 菌株在 PDA 斜面培养 2w,加入无菌水充分洗脱孢子,用血球记数板记数孢子量,用无菌水使孢子浓度达到 10⁸ 个/mL。各种化学农药过滤灭菌后分别加入已灭菌 100mL 的 PDB 培养液,使最终浓度分别达到 0.1μg/mL、1μg/mL、10μg/mL、25μg/mL 和 50μg/mL,分别加入 1mL 浓度为 10⁸ 个/mL 的孢子液,室温摇床(150r/min)培养 7d 后收集菌体,120℃2h 烘干称重。每处理设 3 个重复,以不加药剂处理作对照。

1.7 统计分析

利用 DPS 软件对试验数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 农药对 ZK7 菌株孢子萌发率的影响

ZK7 菌株在 6 种农药不同浓度条件下的孢子萌发率及方差分析结果见表 1。结果显示,随着药剂浓度升高,生防菌孢子萌发率减小,不同农药对 ZK7 菌株孢子萌发率的影响也不相同。其中克百威、涕灭威和辛硫磷的抑制作用较多菌灵、甲基托布津和雷多米尔弱。方差分析表明,6 种化学农药处理对 ZK7 菌株孢子萌发率与对照均有极显著差异($P < 0.01$)。而同一药剂不同浓度处理对生防菌 ZK7 孢子萌发率与对照的差异性因药剂而异,其中多菌灵和甲基托布津对生防菌 ZK7 孢子萌发率的影响不仅 5 个不同浓度与对照存在极显著差异,而且不同浓度处理间也存在极显著差异,其余农药不同浓度与对照间分别存在极显著差异($P < 0.01$)或显著差异($P < 0.05$),而不同浓度处理间无差异显著性或分别存在极显著差异($P < 0.01$)和显著差异($P < 0.05$)。

表 1 6 种农药对 ZK7 菌株孢子萌发率的影响

处理	ZK7 菌株在不同浓度条件下的孢子萌发率(%)				
	0.1μg/mL	1μg/mL	10μg/mL	25μg/mL	50μg/mL
克百威	96.66 ± 1.39cC	95.74 ± 1.19cC	94.81 ± 1.32cBC	75.24 ± 1.11dC	64.99 ± 2.07dD
多菌灵	76.93 ± 2.08eE	54.18 ± 1.95eE	22.47 ± 2.73eE	10.65 ± 1.47gF	7.59 ± 0.88gG
雷多米尔	96.33 ± 0.80cC	94.82 ± 1.08cC	93.73 ± 1.28cC	72.45 ± 2.48eD	61.67 ± 1.56eE
涕灭威	98.26 ± 0.57bB	97.78 ± 0.74bB	96.43 ± 1.53bB	88.37 ± 1.78bB	84.50 ± 2.18bB
辛硫磷	98.49A ± 0.20bB	97.91 ± 1.32bB	94.37 ± 0.91BcC	86.42 ± 1.34cB	81.55 ± 1.84cC
甲基托布津	81.49 ± 1.23dD	65.65 ± 1.74dD	33.53 ± 1.22dD	21.92 ± 1.63fE	13.43 ± 3.30fF
对照			100 ± 0.00aA		

注:表中大写字母表示相同浓度不同药剂处理间 $P = 0.01$ 时的差异显著性,小写字母则表示 $P = 0.05$ 时的差异显著性。以下各表相同。

2.2 农药对 ZK7 菌株的平板抑制作用

ZK7 菌株在不同浓度条件下菌落生长直径及方差分析结果见表 2。从 6 种农药 5 个不同浓度对 ZK7 菌株的平板抑制作用看 ,克百威、雷多米尔、涕灭威、辛硫磷等 4 种药剂不管是在 7d 还是 14d 时所有浓度处理与对照都无显著差异 ,但随着浓度的升高表现出一定的抑制作用。而多菌灵在 0.1 和 1 μ g/mL 时差异不大 ,在 10 μ g/mL 时差异显著 ,当浓度达到 25 μ g/mL 和 50 μ g/mL 时 ZK7 菌株生长停止 ,菌

落被限制在原来接种点 ,但不会全部死亡。甲基托布津的抑制作用更明显 ,除 0.1 μ g/mL 浓度外 ,其他浓度对 ZK7 菌株的影响都比较明显 ,但不全部死亡。方差分析结果表明 ,6 种化学农药 5 个浓度处理对 ZK7 菌株平板抑制作用与对照处理间不存在差异显著性或分别存在极显著差异($P < 0.01$)和显著差异($P < 0.05$)。其中多菌灵和甲基托布津的 5 个浓度处理与对照处理间存在极显著差异 ,不同浓度处理间多数存在极显著差异。

表 2 6 种农药对 ZK7 菌株的平板抑制作用

处理		ZK7 菌株在不同浓度条件下菌落生长直径(mm)				
		0.1 μ g/mL	1 μ g/mL	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL
克百威	7d	33.8 \pm 0.85abAB	33.5 \pm 0.87aAB	33.3 \pm 0.61bA	33.1 \pm 0.40bB	33.0 \pm 0.56bA
	14d	60.8 \pm 0.89bA	60.5 \pm 0.62bAB	60.3 \pm 0.85bB	60.0 \pm 1.51bB	59.5 \pm 1.04bB
多菌灵	7d	31.8 \pm 0.30dC	30.3 \pm 0.66cC	13.3 \pm 0.85dC	10.8 \pm 0.26eE	10.5 \pm 0.62dC
	14d	53.7 \pm 1.11eC	42.0 \pm 2.59eE	31.0 \pm 1.13dD	25.5 \pm 1.61eD	22.7 \pm 0.53eD
雷多米尔	7d	33.6 \pm 1.11abAB	33.4 \pm 0.56aAB	33.1 \pm 0.53bA	32.8 \pm 0.78bB	31.8 \pm 1.21cB
	14d	60.5 \pm 1.66bA	59.7 \pm 1.04bB	59.3 \pm 1.37bB	58.3 \pm 1.31cB	58.0 \pm 1.50cB
涕灭威	7d	33.1 \pm 1.15bABc	32.5 \pm 0.87bB	31.8 \pm 0.66cB	31.5 \pm 0.62cC	31.0 \pm 0.72cB
	14d	57.4 \pm 0.61dB	56.6 \pm 0.85cC	55.8 \pm 0.43cC	55.4 \pm 0.53dC	54.7 \pm 1.08dC
辛硫磷	7d	34.0 \pm 0.62aA	33.8 \pm 0.92aA	33.6 \pm 0.95abA	33.1 \pm 0.70bB	31.7 \pm 0.61cB
	14d	61.0 \pm 0.44abA	60.2 \pm 1.13bAB	59.7 \pm 1.11bB	59.4 \pm 0.79bcB	58.6 \pm 1.49bcB
甲基托布津	7d	32.7 \pm 0.26cBC	28.3 \pm 0.42dD	13.0 \pm 0.44dC	11.7 \pm 0.66dD	11.0 \pm 1.23dC
	14d	58.7 \pm 1.04cB	47.0 \pm 1.35dD	21.3 \pm 1.66eE	18.3 \pm 0.70fE	17.5 \pm 0.50fE
对照	7d			34.0 \pm 0.34aA		
	14d			62.0 \pm 1.35aA		

2.3 农药对 ZK7 菌株液体培养生物量的影响

ZK7 菌株在不同浓度条件下液体培养生物量及方差分析结果见表 3。从 6 种农药对 ZK7 菌株液体培养生物量的影响看 ,6 种农药均有一定的影响 ,但以多菌灵、雷多米尔和甲基托布津更为明显 ,各种农药随浓度升高对 ZK7 菌株生物量的影响加大。方差分析结果表明 ,ZK7 菌株除 0.1 μ g/mL 的辛硫磷处理外 ,6 个药剂的 5 个浓度处理与对照间均存在极显著差异($P < 0.01$)。而同一药剂不同处理间 ,ZK7 菌株除 25 μ g/mL 和 50 μ g/mL 的多菌灵和甲基托布津处理间存在显著差异外 ,其余处理间存在极显著差异。

3 讨论

由于农业生态系统的复杂性 ,在有害生物综合治理过程中同时使用生物和化学防治方法控制病虫害所存在的矛盾一直都是难以解决的问题。不但在生产上使用化学农药会影响生防菌剂的防效 ,而且由于长期使用化学农药造成的土壤农残也会影响其防治效果。这种影响在不同地区间表现出高度的复杂性 ,也成为各种生防菌剂防治效果不稳定的重要原因之一。因此 ,研究开发生防菌剂时 ,考察所筛选生防菌株对农药的敏感性问题已引起较多关注^[9,10]。

表 3 6 种农药对 ZK7 菌株液体培养生物量的影响

处理	ZK7 菌株在不同浓度条件下液体培养生物量(mg)				
	0.1μg/mL	1μg/mL	10μg/mL	25μg/mL	50μg/mL
克百威	495 ± 29.51BbcC	456 ± 11.53cC	421 ± 5.29cC	358 ± 13.89cC	317 ± 9.16dCD
多菌灵	448 ± 14.73dD	354 ± 7.94fE	79 ± 8.72eD	69 ± 12.00eE	58 ± 6.56eE
雷多米尔	493 ± 26.67bcBC	440 ± 11.26dD	420 ± 7.00cC	363 ± 11.14cBC	326 ± 6.56cC
涕灭威	482 ± 4.00cBC	442 ± 6.56dD	410 ± 8.89dC	337 ± 8.66dD	310 ± 4.36dD
辛硫磷	512 ± 16.09abAB	476 ± 8.89bB	438 ± 14.11bB	379 ± 19.00bB	349 ± 14.00bB
甲基托布津	481 ± 14.00cC	366 ± 8.18eE	85 ± 8.18eD	65 ± 11.14eE	52 ± 8.18eE
对照			527 ± 8.54Aa		

厚孢普可尼亚菌 ZK7 菌株作为烟草根结线虫生防菌,必须施入土壤中对根结线虫发挥作用,因此,植烟土壤中常用杀虫、杀线和杀菌剂对生防菌的作用是影响其防治效果的重要因素。通过测定克百威、涕灭威、多菌灵、甲基托布津、雷多米尔、辛硫磷等烟草生产上常用化学农药对 ZK7 菌株生长发育的影响,可了解该菌株在烟草生产上的开发应用潜力。试验表明,ZK7 菌株对 6 种农药在低浓度时均存在一定抗性,但对不同药剂的抗性表现不同。其中克百威和涕灭威对 ZK7 菌株的影响较小,当浓度达到 50μg/mL 时 ZK7 菌株的孢子萌发率、菌落生长直径和液体培养生物量均保持在一定水平。多菌灵和甲基托布津对 ZK7 菌株菌落生长直径和液体培养生物量均表现出明显的抑制作用,但对其孢子萌发率的影响又不如对其菌丝生长的影响大,说明这 2 种药剂对 ZK7 菌株的作用主要是抑制菌丝生长,而对孢子萌发影响较小。辛硫磷和雷多米尔对 ZK7 菌株的菌丝生长和孢子萌发都比克百威和涕灭威强,但不及多菌灵和甲基托布津强。由此可见,ZK7 菌株对多菌灵和甲基托布津最为敏感,对辛硫磷和雷多米尔次之,对克百威和涕灭威具有一定抗性。由于多菌灵和甲基托布津为广谱性杀真菌剂,辛硫磷为杀虫剂,雷多米尔为杀低等真菌如霜霉、疫霉等的杀菌剂,克百威和涕灭威为杀线虫

剂,因此,ZK7 菌株对它们所表现的敏感性水平是比较可靠的。

以上实验结果表明,ZK7 菌株在使用时应尽量避免受广谱性杀真菌剂的影响,生产上使用其所制成的生防菌剂前,必须了解防治区域农药的使用情况,并采取相应的措施,才能保证其取得预期的防治效果。同时,应考虑通过物理或化学等诱变方法获得抗性水平较高的变异株,或者通过现代分子生物学技术构建高效抗药性工程菌株,进一步提高其对抗环境的抗逆性,确保其生防效果。

参考文献

[1] 黄永兵,肖炎农,周桂林,等.植物保护,2006,32(5) 55 ~ 57.
[2] 周晓榕,高翔,王建国,等.植物保护,2006,32(5) 23 ~ 25.
[3] Ehtesh aniu-haque S,Parveen S,Izhar Z, et al. Pakistan Journal of Nematology, 1995,13 :129 ~ 135.
[4] Meyer S L F,Sayre R M,Huettel R N. Journa of Nematollogy,1991,23 (4) 402 ~ 408.
[5] Zare R,Gams W,Evans H C.Nova Hedwigia,2001,73 :51 ~ 86.
[6] Leij de F A A M,Kerry B R.Nematogogica,1993,39 :115 ~ 126.
[7] Kerry B R. Annual Review of Phytopathology,2000,38 :423 ~ 441.
[8] 祝明亮,张克勤,李天飞,等.云南大学学报(自然科学版),2000,22(5) 369 ~ 372.
[9] 祝明亮,张克勤,李天飞,等.微生物学通报,2004,31(6) :95 ~ 99.
[10] 杨宇,段玉玺,陈立杰.植物保护,2006,32(4) 4 ~ 9.