

烟草根际厚孢轮枝菌生态效应研究*

祝明亮^{1,2} 张克勤² 李天飞¹ 夏振远¹

(云南烟草科学研究院生物技术重点实验室 昆明 650106)¹

(云南大学省工业微生物发酵工程重点实验室 昆明 650091)²

摘要:通过盆栽试验研究生防制剂中厚孢轮枝菌在烤烟 K326 和云 85 根际的定殖情况以及对根际微生物的影响。结果表明施入生物菌剂 2 周后厚孢轮枝菌能在烤烟外根际、根表分离到,但在根内不能分离到或分离数极少,在 4 周、6 周时外根际、根表的分离数达到最大,根内分离数仍很少,8 周时分离数又减少。制剂处理后烤烟根际细菌、真菌和放线菌数量在 2 周时明显减少,4 周时有所回升,6 周和 8 周时与对照达到平衡。结果表明厚孢轮枝菌

* 云南省“九五”攻关项目 (No. 95A4-8)

云南省“十五”攻关项目 (No. 2001 NG08)

收稿日期: 2001-01-02, 修回日期: 2001-03-09

可以在烟草外根际、根表定殖, 初期对土壤微生物具有一定的抑制作用。

关键词: 厚孢轮枝菌 ZK7, 烟草根际, 定殖, 根际微生物

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 02-0004-04

COLONIZATION OF TOBACCO RHIZOPHERE BY *VERTICILLIUM CHLAMYDOSPORIUM* GOODARD ZK7 AND EFFECT ON RHIZOPHERE MICROBES

ZHU Ming-Liang^{1,2} ZHANG Ke-Qin² LI Tian-Fei¹ XIA Zhen-Yuan¹

(key Lab. of Biotechnology, Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming 650106)¹

(Key Lab. of Industrial Microbiology & Fermentation Technology, Yunnan University, Kunming 650091)²

Abstract: A pot experiment was conducted to determine the colonization of *Verticillium chlamyosporium* Goodard ZK7 on the tobacco rhizosphere and its influence of rhizosphere microbes. The result indicated that ZK7 was isolated from tobacco rhizosphere and ectorhizosphere but not endorhizosphere two weeks, after inoculation the colony forming units of ZK7 on rhizosphere and ectorhizosphere were the higher at four and six weeks, few in endorhizosphere. By eight weeks, the CFU decreased. The amount of fungi, bacteria and actinomycetes on tobacco rhizosphere were lower at two weeks, went up again at four weeks and reached to balance at six and eight weeks by ZK7 treatment. The results demonstrated that ZK7 can colonize on rhizosphere and ectorhizosphere of tobacco.

Key words: *Verticillium chlamyosporium*, Tobacco, Rhizosphere, Colonization

厚孢轮枝菌 (*Verticillium chlamyosporium* Goodard) 是土壤及植物根际习居菌, 寄生根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 和胞囊线虫 (*Heterodera* spp.) 的雌虫和卵, 是根结线虫和胞囊线虫自然衰退的重要因子^[1,2], 在植物寄生线虫的生防上有着巨大的开发应用前景^[3-6]。本课题组分离筛选的厚孢轮枝菌 ZK7 经线虫致病性测定、温室盆栽试验、田间小区试验和大田示范证明对烟草根结线虫具有较好的防治效果^[7,8]。

在土传病害生防实践中, 生防菌被引入土壤时, 往往会受到土壤抑菌作用及生防菌与植物根部亲和能力的影响^[9], 这是生物制剂防治植物土传病害防效不稳定的重要原因之一。因此, 作为生防因子的生防菌能否在靶植物根际定殖及其对植株根际微生物区系的影响已成为筛选、评定土传病害生防菌的一个重要指标, 并最终决定该生防菌能否实现产业化及商品化生产。

为了进一步确定生防菌 ZK7 对烟草根结线虫病的防效稳定性及持久性, 为该菌剂的商品化及生物农药登记提供充分理论依据, 研究生防菌的定殖及其对土壤微生物的影响具有重要的理论意义和现实意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

ZK7 菌株分离于被自然侵染的烟草根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 卵。

1.2 供试烤烟品种

云南主栽品种 K326、云 85。

1.3 供试菌剂

由厚孢轮枝菌 ZK7 菌株发酵生产的生物杀线虫 ZK7 菌剂由云南省工业微生物发酵工程重点实验室提供。

1.4 厚孢轮枝菌 ZK7 在烟草根际的定植

1.4.1 选择性培养基: 分离厚孢轮枝菌 ZK7 的选择性培养基参照 Kerry 等^[5]。

1.4.2 供试 ZK7 菌剂含孢量的测定: 取 ZK7 菌剂, 以稀释平板计数法计数菌剂 cfu/g, 5 次重复取平均值。

1.4.3 接种线虫的制备^[10]: 取培养根结线虫的新鲜番茄土, 将病土充分混匀, 过 20 目筛, 用布氏漏斗法分离计数病土线虫含量, 5 次重复取平均值。

1.4.4 盆栽实验: 选取无病红壤土装于直径 45cm, 高 65cm 的塑料花盆, 以 1% 的斯美地 (山东鸿运烟草用药有限公司生产) 熏蒸土壤, 然后用塑料薄膜覆盖, 7d 后揭膜松土, 3d 后分别移栽 K326 和云 85 烤烟 40d 龄期的烟苗, 移栽前在塘中接种根结线虫病土, 同时施入 ZK7 菌剂, 并同塘土充分混匀, 其他措施按烤烟常规栽培方法。对照只接线虫病土, 不施生防制剂。

1.4.5 厚孢轮枝菌 ZK7 的定植: 移栽后 2 周, 4 周, 6 周, 8 周时参照孙漫红和刘杏忠的方法^[11]分别计数测定厚孢轮枝菌 ZK7 在两种烤烟外根际, 内根际和根内的定植情况。

1.5 ZK7 菌剂对烤烟根际微生物的影响

烟苗移栽后 2 周, 4 周, 6 周, 8 周分别取烟株根际土, 风干, 过 40 目筛, 加无菌水制成悬液, 梯度稀释后分别取适当浓度稀释液涂布于牛肉膏蛋白胨、高氏一号和马丁氏培养基上培养, 记录土壤中细菌、放线菌和真菌数量。

1.6 方差分析

利用绿十字预测软件分别对 ZK7 在烟草 K326 和云 85 根际的定植及对根际细菌、真菌和放线菌的影响进行单相分组组内分亚组的方差分析^[7]。

2 结果与分析

2.1 ZK7 菌剂含孢量的测定

ZK7 菌剂含孢量为 1.15×10^9 cfu/g。烟苗移栽时按 1.5g/株施用, 即菌剂施用量为 1.7×10^9 cfu/株。

2.2 根结线虫病土线虫含量测定

供接种线虫的病土线虫含量: 2 条/g 鲜土。烟苗移栽时每株接入病土 600g, 即每株接种线虫 1200 条。

2.3 厚孢轮枝菌 ZK7 在烟草根际的定植

2.3.1 厚孢轮枝菌 ZK7 在 K326 根际的定植: 2 周时 K326 外根际、根表分离到 ZK7 菌, 在根内没有分离到 ZK7 菌, 4 周、6 周时外根际、根表的分离数呈上升趋势, 而根内 4 周、6 周时都分离到少量 ZK7 菌, 到 8 周时外根际、根表的分离数减少, 根内仍可分离到极少的 ZK7 菌, 结果见表 1, 对照未分离到 ZK7 菌。

2.3.2 厚孢轮枝菌 ZK7 在云 85 根际的定植: 2 周时 ZK7 在云 85 外根际、根表分离到, 根内未分离到, 4 周时外根际、根表的分离数达到最大值, 根内分离到少量, 6 周、8 周时外根际、根表的分离数少于 4 周时, 呈下降趋势, 根内 6 周时略有增加, 8 周时减少到 4 周时的量 (表 1)。未施用生防菌剂的对照处理未分离到 ZK7。

2.4 ZK7 菌剂对烟草根际微生物的影响

ZK7 菌剂处理后对 K326 和云 85 根际细菌、真菌和放线菌数量的影响总体上都表现为减少, 在 2 周时表现极为明显, 各个类群微生物的数量都有大量的减少, 而云 85 与

K326 相比,其数量下降幅度更大。4 周时各种微生物数量有所回升,但与对照相比仍呈减少趋势。6 周和 8 周时各种微生物的数量基本与对照保持一致(表 2)。

表 1 ZK7 在烟草根际的定殖

处理		不同时间的定殖数(cfu/g)			
		2 周	4 周	6 周	8 周
K326	外根际	3.1×10^3	4.9×10^3	5.6×10^3	2.5×10^3
	根表	5.4×10^2	5.7×10^2	6.3×10^2	3.6×10^2
	根内	0	12	14	5
云 85	外根际	4.5×10^3	6.0×10^3	5.7×10^3	3.4×10^3
	根表	6.2×10^2	7.8×10^2	6.8×10^2	4.8×10^2
	根内	0	15	18	15

表 2 ZK7 菌剂处理对烟草根际微生物的影响

处理		不同时间的分离数(cfu/g)			
		2 周	4 周	6 周	8 周
CK	细菌	1.2×10^7	8.4×10^6	6.5×10^6	6.2×10^6
	真菌	4.5×10^3	7.5×10^3	6.8×10^3	6.6×10^3
	放线菌	7.5×10^5	5.6×10^5	3.7×10^5	3.5×10^5
K326	细菌	4.1×10^6	7.2×10^6	6.3×10^6	6.0×10^6
	真菌	2.9×10^3	6.5×10^3	6.7×10^3	6.7×10^3
	放线菌	3.8×10^5	5.5×10^5	3.5×10^5	3.3×10^5
云 85	细菌	3.5×10^6	6.5×10^6	6.4×10^6	6.1×10^6
	真菌	2.0×10^3	5.7×10^3	6.6×10^3	6.4×10^3
	放线菌	3.1×10^5	4.8×10^5	3.6×10^5	3.0×10^5

2.5 实验结果的方差分析

对 ZK7 在 K326 和云 85 外根际、根表及根内分离到的菌落繁殖单位(CFU)分别进行的方差分析结果表明,两种烤烟品种间、同一处理的不同时间及外根际和根表在 5% 水平差异显著,1% 水平无显著差异;外根际和根表分别与内根际间在 1% 水平差异显著。ZK7 对细菌、真菌和放线菌影响结果的方差分析表明不同时间之间在 1% 水平差异显著,同一类群微生物不同处理之间在 5% 水平差异显著,1% 水平无显著差异。

3 讨论

3.1 生防菌在烟草根际的定殖

利用微生物防治烟草根结线虫病等土传病害,其防效的稳定性和持久性与作为生防菌的微生物在靶植物根际上的定殖能力有直接关系,生防菌在靶植物根际具有较强的定殖能力是其防效稳定持久的重要保证,也是确定该菌是否具有商业开发前景的重要条件。盆栽试验表明,供试生防菌 ZK7 在施入 2 周后可在烟草外根际、根表分离到,但在根内不能分离到或分离数极少,在 4 周、6 周时外根际、根表的分离数达到最大,根内分离数仍很少,8 周时分离数又减少。说明生防制剂中生防菌 ZK7 在烟草根际具有一定的亲和能力,可以在烟草外根际、根表定殖,并可在烟草根际存活、繁殖,这为生物制剂的应用提供了理论基础。此外,生防菌 ZK7 在 K326 和云 85 上的定殖能力也表现出差异,这可能与两个品种对烟草根结线虫病抗性不同有关。

3.2 生防菌对土壤微生物的影响

生防菌同土壤微生物竞争能力的强弱是其在土壤中存活、定殖的关键。供试生防菌厚孢轮枝菌 ZK7 是习居土壤中的兼性寄生菌,也属于植物寄生线虫机会菌物,国外报道它们能产生一种肽类抗生素抑制土壤中其他微生物的活动^[12,13]。本研究实验结果表明,生防菌 ZK7 对土壤微生物具有一定的抑制作用,其拮抗性随时间延长而减弱,说明它进入土壤后,可能先产生抗生物质,抑制其他土著微生物的生长,然后开始大量生长繁殖,但随着土壤中土著微生物适应能力增强,它们之间通过竞争重新建立了新的平衡关系。

3.3 影响生防菌定殖的因素

植物根部可被微生物利用的位点一般只占到整个根表面积的 8% ~ 20%,如果生防菌早于病原菌(物)同植物种子接触,并随着根的生长而向下延伸,就能够优先占据

植物生态位点, 并定殖下来, 减少其他有害菌的位点竞争。由此说明生物制剂的配制和施用方法对其定殖具有重要影响。孙漫红和刘杏忠以生防菌作种子包衣剂研究了生防菌在大豆根际的定殖, 结果表明采用种子包衣技术可以使生防菌优先利用基质及大豆根分泌物中的各种营养, 为其早期的大量增殖、快速生长提供了条件, 使生防菌不仅在外根际、根表, 甚至在根内也能定殖下来^[11]。本研究是在烟苗移栽时施入生防菌的, 此时烟苗的根系已被一些微生物占据, 生防菌要在烟草根际定殖下来较从种子萌发生根开始困难得多, 从而在根内分离数极少。此外, 土壤的理化性质, 寄主植物的类型、品种, 土壤中其他微生物的种类及种群密度等因素都会影响到生防菌的定殖能力, 本研究中生防菌 ZK7 在 K326 和云 85 上分离数的差异就表明寄主植物品种对生防菌定殖的影响。正是诸多生态因子对生防菌定殖产生的复杂作用, 造成生物制剂防治植物病害过程中防效不稳定, 持续防效得不到保证, 这也是生物防治在有害生物综合治理中受到制约的重要原因。因此, 研究生防菌剂型配制、施用技术及其定殖条件是开发利用生防商品制剂必须解决的重要问题。

参考文献

- [1] Jatala P, Kaltenbach, R, Bocangel M. *Journal of Nematology*, 1979, 11: 303.
- [2] Kerry B R, Crump D H, Mullens L A. *Crop Protection*, 1982, 1: 99 ~ 109.
- [3] Godoy C, Rodriguez-kabana R, Morgan-jones G. *Nematropica*, 1983, 13: 201 ~ 213.
- [4] De Leij F A A M, Kerry, B R. *Nematologica*, 1992, 39: 115 ~ 126.
- [5] Kerry B R, Kirkwood I A, De Leij F A A M, *et al.* *Biocontrol Science and Technology*, 1993, 3: 355 ~ 365.
- [6] Bourne J M, Kerry B R, De Leij F A A M. *Biocontrol Science and Technology*, 1996, 6: 539 ~ 548.
- [7] 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.
- [8] 祝明亮, 夏振远, 张克勤, 等. *烟草科学研究*, 2001, 1: 72 ~ 74.
- [9] 孙漫红, 刘杏忠, 唐 霖. *菌物系统*, 1997, 16 (2): 149 ~ 154.
- [10] Barron C L. *Canada journal of Botany*, 1977, 48: 320 ~ 331.
- [11] 孙漫红, 刘杏忠. *微生物学通报*, 1998, 25 (3): 133 ~ 135.
- [12] Isogai A, Suzuki A, Higashikawa S, Kuyama S. *Agricultura and Biological Chemistry*, 1980, 44: 3029 ~ 3031.
- [13] Isogai A, Suzuki A, Higashikawa S. *Agricultura and Biological Chemistry*, 1981, 45: 1033 ~ 1034.