

# 节丛孢属丝孢菌对松材线虫和拟松材线虫的捕食\*

莫明和<sup>1,2</sup> 周 薇<sup>1</sup> 赵明莲<sup>1</sup> 张克勤<sup>1\*\*</sup>

(云南大学省工业微生物发酵工程重点实验室 昆明 650091)<sup>1</sup>

(贵州大学生物技术学院 贵阳 550025)<sup>2</sup>

**摘要:** 利用节丛孢属捕食线虫真菌的 8 个种, 11 个菌株, 对松材线虫 (Bx) 和拟松材线虫 (Bm) 进行了捕食力的测定。结果显示节丛孢属真菌对这两种线虫的捕食能力既存在种间差异, 也存在同种不同菌株间的差异。指状节丛孢的 3 个菌株 Ad-1, Ad-2, Ad-3 菌株对两种线虫均表现出较高的捕食率, 接种 7d 后对 Bx 和 Bm 的捕食率分别达到了 98.08%, 91.16%, 86.3% 和 96.28%, 90.45%, 85.38%; 同一菌株对松材线虫和拟松材线虫的捕食没有选择性。此外, 通过对松材线虫和拟松材线虫繁殖真菌的筛选实验, 肯定了利用拟松材线虫代替松材线虫进行生防菌株筛选的可行性。

**关键词:** 松材线虫, 拟松材线虫, 节丛孢属, 生物防治

**中图分类号:** S432 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0013-04

## CAPACITY OF ARTHROBOTRYS SPP. TO CAPTURE NEMATODES *BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS* AND *B. MUCRONATUS* IN VITRO

MO Ming-He<sup>1,2</sup> ZHOU Wei ZHAO Ming-Lian ZHANG Ke-Qin<sup>1</sup>

(Key Laboratory of Industrial Microbiology Fermentative Engineering  
of Yunnan University, Kunming 650091)<sup>1</sup>

(Bio-technology College of Guizhou University, Guiyang 550025)<sup>2</sup>

**Abstract:** The capacity of 11 isolates among 8 species of the genus *Arthrobotrys*, to capture *Bursaphelenchus xylophilus* (Bx) and *B. mucronatus* (Bm) was tested in vitro. Results showed that there was remarkable difference of trapping capacity between species and isolates. Three isolates (Ad-1, Ad-2, Ad-3) of *Arthrobotrys dactyloides*, were the most

\* 云南省工业微生物发酵工程重点实验室开放基金项目 (No.2000)

\*\* 通讯作者

收稿日期: 2001-02-20, 修回日期: 2001-06-07

effective to capture Bx and Bm, and up to 98.08%, 91.16%, 86.3% and 96.28%, 90.45%, 85.38% of the nematodes were trapped respectively after inoculated 7 days. There was no host specificity for a given strain to capture Bx and Bm. This indicated that Bm could be taken place Bx as the target nematode for fungal creening.

**Key words:** *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, *Arthrobotrys*, Biocontrol

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* 简称 Bx) 和拟松材线虫 (*Bursaphelenchus mucronatus* 简称 Bm) 是松树萎蔫中的两种重要线虫。在我国, 前者为检疫对象; 而后者被认为是松树无致病力或只有弱的致病力而免于检疫。这两种线虫在形态、致病性方面的部分重叠及兼具两种线虫部分特性的中间类型的存在给分类鉴定和实际工作带来了困难<sup>[1]</sup>。国内外利用种间杂交<sup>[2-4]</sup>, 致病性<sup>[5]</sup>及生物技术<sup>[6]</sup>等方法对这两种线虫的分类研究结果也无统一的定论, 有些学者认为两者可分别定为独立的种, 而有些赞成合为一个种。作者认为, 尽管在分类上仍存在分歧, 但从保护松林的角度出发, 极有必要对两者都进行防治方面的研究。据报道, 某些真菌的天然产物对松材线虫的生长和繁殖有一定的抑制作用<sup>[7-8]</sup>, 利用真菌及其产物防治松材线虫的研究正处于起步阶段。捕食线虫真菌是自然界中广为分布的线虫天敌, 这类真菌能产生各种捕食器官捕食线虫<sup>[9]</sup>。这类真菌与松材线虫和拟松材线虫之间到底是真菌被取食还是线虫被捕食或两种情况兼有是一个既有趣而又有生防意义、值得研究的问题。本文不仅针对这一问题进行了研究, 还讨论了利用拟松材线虫代替松材线虫进行生防天敌菌株筛选的可能性, 这对于防止实验过程中由于工作不慎而导致松材线虫扩散有很重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试线虫

松材线虫分离自安徽省管店林业总场枯萎马尾松; 拟松材线虫从来自广东省的仪器(光照培养箱)包装板上分离获得。线虫分离是用纱布包裹木屑直接浸泡在盛有自来水的塑料小盆中, 48h 后经沉降、离心并接种在长满禾谷镰刀菌的 PDA 培养基平板上, 培养备用。

### 1.2 线虫的定量方法

将培养的线虫用漏斗法分离后, 离心(4000r/min)浓缩, 用无菌水漂洗3次, 取500 $\mu$ L稀释到一定倍数, 在解剖镜下计数, 3次重复后, 将线虫浓度调整到1000条/mL的线虫悬液。

### 1.3 饲线虫真菌筛选

灰霉 (*Botrytis cinerea*) 分离自烟茎; 拟青霉 (*Paecilomyces* sp.) 及木霉菌 (*Trichoderma* sp.) 分离自枯萎马尾松茎干; 禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 分离自感染小麦赤霉病的病穗; 青霉 (*Penicillium* sp.) 来自实验室污染菌。将上述真菌接种于加有青霉素的 PDA 平板(直径 8.5cm)上, 25 $^{\circ}$ C 下培养 10d, 分别接入经过计数的 Bx 和 Bm 线虫 0.5mL (约 500 条), 并各设 3 个重复。继续培养 15d, 将带有线虫的培养基刮下, 用双层擦镜纸(10cm  $\times$  15cm)包裹并系紧封口, 用漏斗分离法分离 48h 后计数。

### 1.4 培养基

筛选饲线虫真菌用 PDA 培养基。捕食力测定用双层 5% CMA 培养基(玉米粉 50g, 煮沸 30min, 过滤, 水 1000mL)。底层和上层培养基的琼脂含量为分别为 2.6%, 0.8%, 先倒底层培养基约 2mm 厚, 待凝固后再倒一层很薄的上层培养基。利用这种双

层培养基可防止线虫钻入培养基。

### 1.5 捕食率的测定

供试节丛孢属捕食线虫真菌种类及来源见表2, 均保存于作者所在实验室。

捕食率的测定方法为将捕食线虫真菌接种于加有青霉素的5% CMA平板上, 25℃下培养9d后, 接入配制好的, 用禾谷镰刀菌培养的Bx和Bm线虫的线虫液1mL, 继续培养7d后分离剩下的线虫。以接入等量线虫的空白CMA平板为对照。接种第3d起, 每天观察1次捕食器官的产生及线虫被捕食的情况。

$$\text{捕食率}(\%) = \frac{\text{对照分离到的线虫量} - \text{处理分离到的线虫量}}{\text{对照分离到的线虫量}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 饲养松材线虫的理想真菌种类筛选

表1 不同真菌对Bx和Bm的培养

菌种	菌落直径 (cm)	接种线虫量(条)		线虫繁殖量( $\times 10^5$ )		繁殖倍数		统计分析 $\alpha = 0.01$
		Bx	Bm	Bx	Bm	Bx	Bm	
<i>Fusarium graminearum</i>	8.5	500	500	2.17	2.18	415	423	A A
<i>Botrytis cinerea</i>	5.7	500	500	1.07	1.09	205	211	B B
<i>Paecilomyces</i> sp.	6.2	500	500	0.82	0.83	157	160	C C
<i>Penicillium</i> sp.	6.8	500	500	0.69	0.73	132	142	CD CD
<i>Trichoderma</i> sp.	4.3	500	500	0.46	0.48	88	93	D D

注: 以上数据均为3个重复的平均值

由表1可见所试5种真菌在PDA培养基上的生长速度及饲养线虫的能力是不同的。禾谷镰刀菌的生长速度最快, 接种后6d已长满平板, 不产生分生孢子; 接种线虫15d后, Bx和Bm分别增殖了415倍和423倍。灰霉和木霉生长最慢, 接种后10d, 菌落直径分别为5.7cm和4.3cm, 且产生大量的分生孢子。在灰霉上Bx和Bm分别繁殖了205倍和211倍; 在木霉上繁殖的量最少。青霉、拟青霉培养线虫的繁殖量介于灰霉和木霉之间。统计分析显示所测5种真菌中, 禾谷镰刀菌最适于培养Bx和Bm。这一真菌不但生长快, 而且不产生分生孢子, 避免了接种线虫液携带培养真菌的分生孢子而造成污染, 影响实验结果。

### 2.2 捕食率的测定结果

见表2。

表2 节丛孢属(*Arthrobotrys*)真菌对松材线虫和拟松材线虫的捕食

菌株号	菌种	捕食器官	平均捕食率(%)		统计分析(LSD法, 5%)	
			Bx	Bm	Bx	Bm
Ad-1	<i>A. dactyloides</i>	收缩环	98.08	96.28	a	a
Ad-2	<i>A. dactyloides</i>	收缩环	91.16	90.45	a	a
Ad-3	<i>A. dactyloides</i>	收缩环	86.32	85.38	a	a
Ad-4	<i>A. dactyloides</i>	收缩环	65.85	66.09	b	b
Ac-1	<i>A. cladodes</i>	三维网	63.93	64.99	bc	b
Aov-1	<i>A. ouiformis</i>	三维网	59.72	58.85	bc	bc
Ag-1	<i>A. guizhouense</i>	三维网	53.31	51	bc	c
Aj-1	<i>A. javanica</i>	三维网	47.88	47.17	c	cd
Am-1	<i>A. musiformis</i>	三维网	43.63	42.71	cd	d
Ao-1	<i>A. oligospora</i>	三维网	31.15	31.32	cd	e
As-1	<i>A. superba</i>	三维网	27.13	26.67	d	e
LSD <sub>0.05</sub>			17.46	11.38		

从表2所示的实验结果及差异显著性分析可以看出:节丛孢属捕食线虫真菌对松材线虫及拟松材线虫的捕食能力存在着明显的种间差异。其中以指状节丛孢(*A. dactyloides*)的Ad-1, Ad-2, Ad-3菌株捕食能力最强,对Bx和Bm的平均捕食率依次分别为98.08%, 91.16%, 86.32%和96.28%, 90.45%, 85.38%。这3个菌株对线虫的捕食没有差异;多孢节丛孢(*A. superba*)的捕食能力最差,对Bx, Bm的平均捕食率仅为27.13%和26.67%。此外可以看出,所测的11种菌株按捕食率高低分为3类:高捕食力菌株,包括Ad-1, Ad-2, Ad-3,捕食器官为收缩环;中等捕食力菌株,包括Aov-1, Ad-4, Ac-1, Ag-1捕食器官主要为三维菌网;低捕食力菌株,包括Am-1, As-1, Aj-1, Ao-1,捕食器官为三维网。这3类之间对线虫的捕食力存在显著差异,而在同一类中,各菌株的差异不显著。

在同一个种不同菌株间捕食能力也存在差异。在指状节丛孢的4个菌株中,Ad-1, Ad-2, Ad-3间捕食力差异不显著,但与Ad-4菌株相比,差异达显著水平。

各菌株对Bx, Bm的捕食能力不存在差异。即是说菌株对Bx, Bm的捕食没有选择性和专化性。因此,可以考虑用Bm代替Bx进行高捕食力菌株的筛选实验,以防止在实验过程中,由于工作不慎而导致松材线虫的传播和蔓延。

### 3 讨论

松材线虫和拟松材线虫能利用多种真菌作为营养基质,进行生长和繁殖,但当把这两类线虫培养在长满捕食线虫真菌的平板上时,最终的结果是线虫被捕食而不能生存下去。这给生防领域中利用真菌来控制这两类线虫带来了希望。Cooke比较了许多能自然产生捕食器官的捕食线虫丝孢菌的生长速率,竞争性腐生能力,自然形成捕食器官能力,发现菌网产生菌的生长速率快,腐生能力最强,这些真菌对其它土壤腐生菌的竞争性很强,但相对于其它捕食机制的种类而言,竞争力很弱,其纯培养不能自发形成捕食器官。与之相反,收缩环产生菌的生长速率慢,腐生力弱,捕食力强。粘性分枝和粘球菌类与产环菌类相似,生长速率慢,捕食力强。在实验中,具有较高捕食率的种指状节丛孢的生长速度确实很慢,在CMA培养基上菌丝稀疏,能在无线虫诱导的情况下,能产生大量的收缩环。松材线虫和拟松材线虫的传播媒介是天牛,当天牛危害松树时,线虫从天牛成虫体内转移到松树体内,如何利用捕食线虫真菌来防治这类病原线虫仍有待研究。

### 参考文献

- [1] Bolla R I, Weaver C, Koslowski P, *et al.* J. Nematol., 1987, 19 (3): 304 ~ 310.
- [2] 皆川望. 植物防疫, 1987, 45 (5): 29 ~ 32.
- [3] Bolla R I, Boschert M. J. Nematol., 1993, 25 (2): 227 ~ 238.
- [4] Riga E K, Beckenbach, Webster J M. Fundamental and applies nematology, 1992, 15: 391 ~ 395.
- [5] 马承铸. 上海农业学报, 1996, 12 (1): 56 ~ 60.
- [6] 程瑚瑞. 南京农业大学学报, 1986, 2: 55 ~ 61.
- [7] Kawazu K. Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57 (1): 98 ~ 101.
- [8] 孙建华. 南开大学学报(自然科学), 1997, 30 (3): 82 ~ 87.
- [9] 张克勤. 真菌学报, 1993, 12 (3): 240 ~ 245.