

根结线虫天敌真菌的筛选研究初报

封 宇 周广泉 周志权

(广西植物研究所)

摘要 从土壤和病株上分离到10个线虫的天敌真菌菌株, 其中有三个菌株较有希望, 烛台霉属(*Candelabrella* sp.)一个, 孤孢属(*Monacrosporium* spp.)两个, 菌株代号分别为CN₇; CN₈和CN₉。

据试验: CN₇较好, 菌丝体生长的温度范围是20~33℃, 最适宜的温度范围是25~30℃, 以式捕捉环捕食线虫, 对培养基选择性不强, 最适宜的pH值是6.0~7.5, 但在pH4.5~8.0都能进收缩捕捉, 捕捉器官形成量多, 捕虫势强且稳定, 在水中也能形成捕捉环并捕食线虫。

关键词 根结线虫; 天敌真菌

线虫对植物的损害既有直接的危害, 也有继发性病害的间接危害, 因此, 线虫所造成的损失很难确切地估计。据美国推算, 接近虫害的损失, 大约10%左右。一般来说, 线虫对寄主的专化性不强, 虽还不确切知道某种线虫可以侵染所有植物, 但可能没有一种维管束植物, 对所有寄生线虫都是免疫的^[1]。故线虫病危害的广泛性和严重性可想而知。

国外在本世纪二十年代对线虫所造成的损失就给予关注, 四十年代生产出高效的杀线剂, 但连续施用化学杀线剂后, 出现了线虫密度迅速回升的现象^[1], 因而又必须增大施药量, 于是不仅农药供应紧张, 成本上升, 尤其重要的是对人畜的危害和对环境的污染更趋严重, 这样天敌真菌的利用就得到了重视, 随即在菠萝和玉米的根癌线虫, 秋海棠属植物、蔬菜和花卉等方面的根结线虫以及食用菌的食菌线虫等的防治上, 分别用了 *Arthrobotrys* spp.; *Dactylaria* spp., *Dactylella* spp. etc. 天敌真菌进行生防, 并取得明显效果^[1]。尽管如此, 天敌真菌的利用, 由于种种原因, 当前仍未得到普及。

我区近年对罗汉果根结线虫病的防治, 在某种意义上来说, 重复了上述“轨迹”, 为此我们立题对线虫天敌真菌的筛选和利用进行研究。

本文重点报道一年来对利用几个较有希望的天敌真菌方面所获得的资料, 提供生产上应用的依据。

一、筛选的方法与结果

(一) 筛选的方法

直接从不同地区富有腐植质的不同植物根际土壤中和病株的线虫上, 分离线虫的天敌真菌。

分离方法分别采用琼脂圆片法^[2], 直接解剖法^[3], 贝曼漏斗法^[3], 琼脂条带法^[2]和改进的土壤平板法^[2]等。

参加部份工作的有滕帆、廖咏梅等同志, 在此一并致以谢意。

(二) 筛选的结果

根据表1的统计,改进的土壤平板法,共获五个菌株,检出率最高,还具有方法简便的优点,只是对寄生性天敌的筛选效果不够理想。

表1 筛选结果统计

菌株的属名	入选菌株数	编号	筛选方法	选用培养基	捕食器官类型
<i>Harposporium</i> spp.	2	CN ₁	贝曼漏斗法		内寄生
		CN ₂	"		"
<i>Monacrosporium</i> spp.	3	CN ₃	改进土壤平板法	玉米粉、线虫液、兔粪	粘着网
		CN ₄	"	玉米粉	捕捉环
		CN ₅	"	玉米粉、线虫液、兔粪	粘着性分枝
<i>Dactylella</i> sp.	1	CN ₆	"	玉米粉、兔粪	粘着球
<i>Candelabrella</i> sp.	1	CN ₇	"	玉米粉、兔粪	收缩环
<i>Verticillium</i> spp.	2	CN ₈	直接解剖法		寄生
		CN ₉	"		"
<i>Paecolomyces</i> sp.	1	CN ₁₀	"		"

Duddington (1955) 指出土壤平板法筛选天敌真菌,应将培养皿置于15—20℃条件下培养两个月后镜检观察^[2]。在我们的试验中,认为培养一个月左右,加入线虫,即能促其捕捉器官的形成,同时又能将皿内滋生的杂菌(如*Pythium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. 等)清除,既便于观察,又不致将已分离出的天敌真菌遗漏,可缩短筛选期,而且实践证明温度在30℃以下,都不会影响天敌真菌的筛选,只是在不同的温度条件下,筛选菌株的适温类型可能有些不同。至于适用的培养基报道不一^[4,5],但据我们对玉米粉、兔粪和线虫液三种培养基分离同一标样的结果(表1),玉米粉培养基效果最好(筛选出5个菌株),兔粪培养基筛选出其中的4个菌株,最差的是线虫液培养基,只筛选出其中的2个菌株,但兔粪培养基色深透光性差,镜检困难,配制也较麻烦,费工费时。

根据统计,CN₃在不同地区的50个土壤标样中,从13个标样里分检出29次;CN₅在50个土壤标样的3个标样里分检出5次;CN₇仅在低海拔地区的2个标样里分离出3次;而CN₄和CN₆却都在高海拔地区的一个标样里各分检出2次;说明CN₃在土壤中的分布较广泛;同时海拔高度不同所分离到的菌株也不尽相同。

二、对CN₃、CN₅和CN₇应用前景的研究

在筛选获得的10个株号里,据各菌株培养的难易、菌丝体生长速度和茂密度、捕捉器官的形成数量以及捕食线虫的持续时间长短等因素,初选出CN₃、CN₅和CN₇三个捕食菌株,经初步鉴定分别为*Monacrosporium mengalosporum*、*Monacrosporium Psychrophilum*^[6,7,8,9]和*Candelabrella* sp. 并对他们在不同条件下捕食线虫的能力,进行了测定研究。

(一) 影响菌丝体生长的

因素 捕食器官形成量是不同菌株的重要属性之一, 菌丝体生长速度和茂密度会影响捕食器官的数量, 为此我们首先进行了菌丝体生长适宜条件的研究。

1. 温度对菌丝体生长的影响: 设 3 个温度处理 (空调

控温): 20~25℃, 25—30℃, 30—33℃; 各温限内又分 3 种培养基: 玉米粉培养基 (CMA), 兔粪培养基 (RdA) 和水琼脂培养基 (WA), pH 值 5.5 左右, 各处理均观察 6 个菌落, 记载菌落直径达 2cm 的培养天数, 结果如表 2。

从表 2 看出, CN₃和 CN₅生长适温是 20~25℃, CN₃在这温限内培养 2 天, 在 3 种培养基上菌落直径均达 2cm, CN₅则要培养 7~9 天。当温度升高到 25~30℃时, CN₃仍能缓慢生长, 在 RdA 上培养 9 天菌落直径达 2cm, 而 CN₅几乎停止生长, 说明 CN₃属中温型, CN₅属中低温型。这 2 菌株在 30~33℃的条件下, 尽管培养期长达 17 天, 仍未见生长, 转移到 20~25℃时, 一星期后又开始生长, 说明并未死亡。

CN₇在由低到高的三个不同温度处理中, 在 WA 和 RdA 上, 培养 7 天, 菌落直径均达 2cm, 在 CMA 上培养 8 天也达 2cm。因此我们认为 CN₇是一个适宜温度范围较广的高温型菌株。

2. 培养基对菌丝体生长的影响: 根据表 2 所示, CN₃在 20~25℃时, 菌落直径达 2cm, 在 3 种培养基上均需 2 天。CN₅菌落直径达 2cm 时, 在 WA 和 CMA 培养基上需 9 天, 而在 RdA 培养基上只需 7 天。CN₇在 20~25℃和 30~33℃条件下, 培养 7 天, 在 WA 和 RdA 上的菌落直径均达 2cm, 在 CMA 上达 2cm 则需 8 天; 25~30℃时, 在 3 种培养基上培养 7 天均达 2cm。这些数据说明不同的培养基对菌落生长速度有些影响, 但不显著, 特别需要提出的是在 WA 培养基上 (只含微量碳源、氮源、矿物质和生长物质), 菌丝体仍能生长 (经多次重复), 充分说明供试的 3 菌株, 都能在短期内低营养状态下, 较正常地生存, 这对生防制剂来说, 无疑是有利的。

表 3 pH 值对菌丝体生长的影响

菌 株	培养天数	组别及其 菌落大小	pH 值					
			4.5	5.0	6.0	7.0	7.5	8.0
CN ₃	3	I φcm	3.20	3.37	3.43	3.03	2.60	1.40
	3	I φcm	3.30	3.47	3.50	3.17	2.63	1.73
	6	II φcm	6.53	6.80	6.80	6.20	5.53	3.27
CN ₇ *	8	I φcm	1.90	1.83	1.97	1.03	0.63	0.20
	9	I φcm	2.00	2.40	3.03	2.13	1.13	0.53
	9	II φcm	2.43	2.67	3.03	2.37	1.13	0.57

* II、III 组培养条件是 25-30℃, I 组是 20~25℃。

从表 3 可看出, CN₃在各档次的 pH 值下均能生长, 只是 pH 值越高生长速度越慢, 适宜

表 2 温度对各菌株在不同培养基上生长的影响

菌落直径达 2cm 的天数	菌株	20~25℃			25~30℃			30~33℃		
		WA	CMA	RdA	WA	CMA	RdA	WA	CMA	RdA
	CN ₃	2	2	2	×	×	9	⊗	⊗	⊗
	CN ₅	9	9	7	×	×	×	⊗	⊗	⊗
	CN ₇	7	8	7	7	7	7	7	8	7

注: × 表示培养 12 天菌落直径仍未达到 2cm。

⊗ 表示培养 17 天菌落直径仍未达到 2cm。

的pH是中性偏酸, 而CN₇所要求的pH值比CN₃窄, 适宜pH值是5.0~6.0。

(二) 影响产孢量的因素 在观察不同温度、培养基和pH值对菌丝体生长影响的同时, 也观察了它们对产孢量的影响, 其中表4记载了不同温度、培养基对产孢量的影响。

表4 温度对各供试菌株在不同培养基上产孢量的影响

菌株	培养天数	产 孢 量 (\bar{S})								
		20~25℃			25~30℃			30~33℃		
		WA	CMA	RdA	WA	CMA	RdA	WA	CMA	RdA
CN ₃	7	14.4	101.6	48.8						
	9					96	20.0			
CN ₅	7			240~290						
	9	100~150	400~500	240~290						
CN ₇	7	86.4		180.6	92.4	504.6	200.4	72		18.0
	8		481.8						492.6	

注: \bar{S} 表示20×3视野下平均孢子数。

从表4可见, 在20~25℃条件下, CN₃和CN₅两个菌株分别培养7天和9天, 其产孢量(3×20)在WA、CMA和RdA3种培养基上分别为14.4, 101.6, 48.8; 和100~150, 400~500, 240~290。显然在营养丰富的CMA上比在营养寡薄的WA上, 其产孢量高出2~3倍多; 但当温度升到25~30℃时, 只CN₃在营养较丰富的CMA上可产生一定数量的孢子。

CN₇在供试的3个温度范围和3种培养基上均可产生一定数量的孢子, 只是营养较丰富者产孢量高而已, 说明CN₇适应温度较广。

此外, 对供试的3个菌株, 在PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)和CMA上的生长情况也作了观察; 菌落大小差别不明显, 但在菌丝体茂密度和产孢量方面, PDA优于CMA, 是否与可利用的C:N比有关, 值得进一步研究。

pH值影响孢产的时间和产孢量, 甚至孢子形态, 例如pH值7.0~7.5比pH值7.0以下的各处理产孢延迟1~2天, 产孢量明显减少, 及至pH值达到8.0时, 极难找到孢子。并且在碱性条件下孢子呈纺锤形, 顶端细胞膨大, 若将这种形态变异了的孢子重新转移到微酸性条件下培养, 又会恢复原来接近长棒形的双胞孢子。

(三) 影响捕捉器官形成的因素

1. 温度对捕捉器官形成的影响: 在对温度和营养条件影响菌丝体生长的同时观测中, 还观察了温度和营养条件对捕捉器官形成的影响, 结果见表5。

从表5统计, 捕捉器官形成适温与菌丝体生长适温基本是一致的。CN₃和CN₅在20~25℃条件下菌丝体可正常生长, 在投入线虫后, 分别在2~3天就开始形成捕捉器, 进行捕捉。但在28℃以上CN₃和CN₅都很少形成捕捉器。另据试验, 低于20(14~20)℃时, CN₃捕捉器形成量和捕捉能力与20~25℃时, 没有显著差异, 但CN₅则明显推迟捕捉器形成时间。显然捕捉器形成对温度的要求是不同菌株的种性之一。而CN₇在20~33℃的温限内均能生长, 很快形成捕捉器。

表 5 温度及营养条件对捕捉器官形成的影响

菌株	接线虫 天 数	捕 捉 器 官 数								
		20~25℃			25~30℃			30~33℃		
		WA	CMA	RdA	WA	CMA	RdA	WA	CMA	RdA
CN ₃	2	0.9	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	3.3	0.4	0.8	—	—	—	—	—	—
	6	13.3	5.3	3.1	—	—	—	—	—	—
CN ₅	2	微量	微量	微量	—	—	—	—	—	—
	3	19.6	23.9	19.7	—	—	—	—	—	—
	9	93.3	136.7	105.6	—	—	—	—	—	—
CN ₇	1	开始捕捉								
	1	104.4	94.4	92.8	137.0	207.6	206.9	154.2	248.7	204.2

2. 营养条件对捕捉器形成量的影响: 由表 5 可见, CN₃在 WA 上, 2 天开始形成捕捉器, 而在 CMA 和 RdA 上, 至少 3 天才能产生; 当接虫后第 6 天, 捕捉器形成仍以 WA 比 CMA 和 RdA 为多, 每视野(3 × 20)之比为 13.3:5.3:3.1。

CN₅不论在那种培养基上, 均在接虫 1~2 天后形成捕捉器, 差异不明显, 但接虫后的第 9 天 CMA 上的量较 RdA 和 WA 上的都多, 每视野依次是 136.7、105.6 和 93.3。

CN₇在这 3 种培养基上, 接虫一天均形成捕捉器, 但在不同营养上温度条件对其影响也不同, 在 WA 上, 从低到高 3 个温限, 每视野分别为 104.4、137.0 和 154.2; 在 CMA 上则分别为 94.4、207.6 和 242.7; 在 RdA 上为 92.8、206.9 和 204.2, 可见后 2 种培养基上形成量受温度影响较大。

因此, 我们认为营养条件对捕捉器形成量的影响较复杂, 无法概括成一种规律, 只能说不同菌株对营养的要求不同, 一般来说营养较丰富时, 受温度影响较大, 反之受温度影响较小, 至少在前期观察到这种现象。

3. 线虫的刺激对捕捉器形成量的影响: 用加否线虫处理, CN₃和 CN₅在 20~25℃, CN₇在 25~30℃ 条件下培养, 处理结果见表 6。

表 6 表明, 3 个供试菌株在加线虫后, 都能刺激它们迅速且大量地形成捕捉器, 只是不同菌株所受刺激作用不同。线虫的刺激是天敌真菌形成捕捉器的关键因素, 这与已有的报道相符^[10]。CN₃没有线虫刺激则不能形成捕捉器, 接虫后 2—3 天开始形成; CN₅虽在不接虫时也能形成少量的捕捉器(一般每视野不超过 5 个), 但接虫后平均每视野可达 136.7 个, 最高可达 230 个; CN₇在不接虫和营养较差时, 不能形成捕捉器; 营养较丰富时少量形成, 接虫 3 天后则是大量形成, 其中最多每视野可达 250 个以上。

4. 水对捕捉器形成的影响: 将培养的 CN₅(已开始形成捕捉器和捕食线虫)分成 3 组, 一组加蒸馏水使其流过菌落并展布均匀; 另一组加蒸馏水的同时加少量线虫磨碎液, 并淹没 3 天, 在淹没期间镜检, 可发现大量萌发的孢子, 但未发现捕捉器, 3 天后倾除水液, 1~2 天后观察发现凡加水或加水及线虫汁液者捕捉器形成量明显增多, 尤其是后者。第 3

表6 线虫刺激对捕捉器官形成影响及不同菌落部位捕捉器的形成量

培养基种类	加否线虫	※											
		CN ₃ (6天)				CN ₅ (9天)				CN ₇ (3天)			
		内	中	外	平均	内	中	外	平均	内	中	外	平均
WA	加	8.7	14.3	17.0	13.3	170.0	83.3	26.7	93.3	128.3	147.7	135.0	137.0
	不加	0	0	0	0	1.7	4.0	1.3	2.3	0	0	0	0
CMA	加	4.7	5.3	6.0	5.3	203.3	156.7	50.0	136.7	170.6	234.6	187.3	207.6
	不加	0	0	0	0	2.3	7.0	4.3	4.5	0.7	0	4.3	1.7
RdA	加	3.0	3.0	2.0	2.7	173.7	110.0	33.3	105.6	86.3	245.3	289.0	206.9
	不加	0	0	0	0	4.6	1.0	3.6	3.1	30.7	34.6	26.3	31.2

* 菌株及接虫天数下, 菌落内、中、外3部位形成捕捉器量及平均值。

组作为对照, 捕捉器形成量少。在CN₇培养皿内, 加水和线虫汁液处理, 并以单纯加水作对照, 2天后观察, 凡加水和线虫磨碎液者, 同一菌落有水痕处捕捉器官为181~359个/视野, 无水痕处仅为72~79个/视野; 对照只发现大量萌发的孢子而无捕捉器; 观察中还发现CN₇在水和线虫液的淹浸中仍能形成大量捕捉器, 并能正常捕食线虫。结果表明, 加水和线虫汁液能促使孢子萌发、分布, 并刺激捕食器官的形成; 但在CN₃的培养皿中加水和线虫磨碎液, 并使之淹没, 一周内连续观察, 未发现捕捉器。这可能是线虫汁液虽能刺激捕捉器形成, 但由于该菌株耐水性极差而受到抑制, 显然, 不同菌株耐水性也不同。

5. pH值对捕捉器形成的影响: 以磷酸盐缓冲液配制CMA培养基, 使其pH值分成6个档次, 供试菌株为CN₃和CN₇, 每皿加线虫500条左右, 在20~25℃条件下培养, 结果见表7。

据表7, CN₃不论从开始捕捉的时间上, 还是捕捉器形成量上来说, 都是pH值7—8最高; 而CN₇虽是pH值6.0~7.5之间捕捉器形成量最多, 捕食量也大, 但总的来说, pH值的适应范围比CN₃的宽, 尤其3天后, 捕捉器形成量的差异很小。

(四) 供试菌株捕捉器形成的特性观察:

表6说明, 不同菌株在同一菌落中, 首先开始形成捕捉器的部位不同。CN₃是在菌落中心首先开始形成, 逐渐向外扩展, 最后布满全菌落; CN₅也一样, 特别是加入线虫后; 此外, 这两菌株的捕捉器均形成于培养基的表面。而CN₇的捕捉器可在菌落的任一部位形成, 且从时间和数量上差异都不明显, 甚至孢子萌发后, 立即由芽管形成捕捉环, 培养基表面和内部都能形成捕捉器。

上述观察到的现象, CN₃和CN₅的捕捉器形成可能与菌丝体老熟度有关, CN₇则与此无

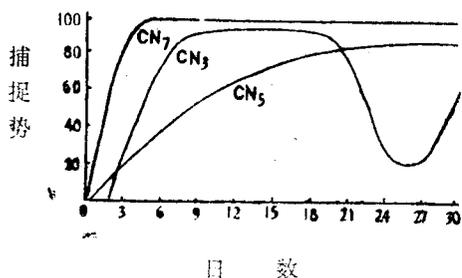
表7 不同pH值对捕捉器形成量的影响

菌株及其培养天数	CN ₃				CN ₇			
	2天	3天	4.5天	7天	1.5天	3.5天	4.5天	
pH	4.5	0	0.78	1.00	1.40	0.80	134.80	229.60
	5.0	0	0.44	0.56	1.40	0.70	128.60	210.70
	6.0	0	2.78	4.10	13.20	15.60	237.00	239.00
	7.0	微量	5.67	18.40	41.80	263.60	265.90	267.60
	7.5	微量	7.33	18.50	41.70	213.60	217.80	215.60
	8.0	微量	10.90	16.90	43.20	2.78	141.90	145.10

关,但它能在培养基质内形成捕捉器,是否是该菌株具有某种程度的厌氧特性。

三、供试菌株捕捉势的比较

通过一个月的连续观察(pH5.5, 20~25℃, CMA培养基, 不断加入活线虫), 获得3个不同的捕食线虫曲线图。



CN₇在加入线虫后的第1天就开始捕食, 2—3天后大量形成捕食器官, 在这期间不断加入线虫, 均能在1~2天内全部捕食完毕, 因此曲线稳定, 近乎一条直线; CN₃在加入线虫后第1天, 可见少量被捕食, 随菌落增大, 捕食器增多, 捕食线虫的能力逐步增强, 呈一条圆滑的抛物线; CN₅在加入线虫后, 开始捕捉的时间随培养基而定, 在WA上1.5~2.0天形成, 在CMA和RdA上3~4天才形成, 且捕捉器大量形成后, 每次加入的线虫均在2~3天内捕食完

毕, 但这种较高的捕食能力保持半个月左右后, 开始下降, 过一段时间, 捕食能力虽又回升, 总是低于第1次的捕捉势, 曲线呈马鞍形, 且是前高后低。

四、讨 论

在整个试验中所用的线虫, 既有根结线虫也有其他线虫(包括腐生线虫), 供试的3菌株均未发现捕捉上的差异。说明供试菌株的专化性不强, 这对生防的运用, 无疑是有利的, 但是也必须指出的是, 当用根结线虫为供试材料时, 未发现雌虫被捕食, 这就要求我们必须考虑与寄生性天敌真菌混合使用的必要性。

另外, 在实践中还观察到, 长期施用二溴氯丙烷的地方, 并未因此而消除根结线虫的危害; 相反在供试材料, 从未施过杀线剂的采集地里, 经过大约半年后, 虫瘿明显减少, 被害症状较前显著减轻, 这现象是否与土壤中广泛分布着多种天敌真菌, 诸如*Harposporium* spp., *Manacrosporium* spp. 和 *Candelabrella* spp. 等有关, 尚需在今后的研究中加以验证。

参 考 文 献

- [1] J.N.萨塞, W.R.詹金斯编, 毕志树、陈品三等译, 1985: 线虫学基础与进展——植物寄生虫和土壤型线虫。农业出版社
- [2] L.F.约翰逊, E.A.柯尔, 土壤植物病原菌生态研究法。北京农业大学植病研究室。
- [3] 方中达, 1979: 植物研究方法。农业出版社。
- [4] (日)土壤微生物研究会编, 叶维青译, 1983: 土壤微生物实验法。农业出版社。
- [5] 俞大绂, 1959: 植物病理学和真菌学技术汇编。人民教育出版社。
- [6] (美)H.L.巴尼特, B.B.亨特, 沈崇尧译, 1977: 半知菌属图解。科学出版社。
- [7] David Malloch, *Moulds—Their isolation, cultivation and identification*. University of Toronto Press
- [8] Cooke, R. C. and B. E. S. Godfrey 1964: A key of the nematode-destroying fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47: 61—74.

- 【9】Cooke R. C. and C. H. Dickinson, 1965: Nematode-Trappign sp. of *Dactylella* and *Monacrosporium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 48: 621~629.
- 【10】C. L. Duddington. 1956: *The Friendly Fungi*. Faber and Faber.

A PRELIMINARY STUDY OF NEMATODE-DESTROYING FUNGI OF ROOT-KNOT NEMATODE

Feng, Yu; Zhou, Guang Quan and Zhou, Zhi Quan
(Guangxi Institute of Botany)

Abstract Ten nematode-destroying fungi of root-knot nematode were obtained by direct isolation from soil and diseased root-knot nematode. Among these strains three of them were stronger, one belongs to *Candelabrella* sp. and two under the jurisdiction of *Monacrosporium* spp. respectively, the code names were CN₇, CN₈ and CN₉.

The data logging of test exhibited that CN₇ was the strongest. The range of suitable temperature for haphae growth was 20~33°C, the most suitable range was 25~30°C. It trapped nematodes by constricting rings. As for medium there was nearly no selection. The strain captured nematodes at pH 4.5—8.0, but the suitable pH was 6.0—7.5. Under this condition more preying organs were produced and capture-ability was stronger and stable. While in water preying organs were formed too and capable of capturing nematodes.

Key words Root-knot nematode; Nematode-destroying fungi