

一株真菌分离物对根结线虫致病性的研究

张 靠 稳, 刘 军 涛

(北方民族大学 生命科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 从感染根结线虫 (*Meloidgyne incognita*) 的黄瓜病根及其周围土壤中分离得到一株真菌分离物, 将其接种到根结线虫的成虫、二龄幼虫和卵上。结果表明: 分离物均可直接穿透线虫体壁进入虫体内, 很快使它们感染致死, 感染率达 100%; 培养该菌株发现: 分离物以单个游动孢子产生假根扎入基质吸收营养, 孢子体逐渐膨大, 3 d 后变为成熟的游动孢子囊释放游动孢子, 完成其生活史, 发育周期为 4 d, 无菌丝; 初步确定该真菌分离物是根结线虫的一种体外寄生性菌。

关键词: 根结线虫; 天敌真菌; 分离物; 致病性

中图分类号: S 432.4⁺4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0173-02

近几年, 随着农业产业结构的不断调整, 北方地区的保护地蔬菜生产快速发展, 蔬菜种植面积迅猛增长, 农民的经济收入显著提高。由于蔬菜生产条件的改善, 延长了北方蔬菜生产周期, 满足了城乡人民的生活需求, 同时也为生产上带来了不少新的问题, 如温室蔬菜新病害或以前发生轻微病害, 随环境的变化, 出现逐年加重的新趋势。宁夏地区也出现了上述类似情况, 贺兰山农牧场温室黄瓜根部出现的根结线虫病^[1]就是一例。此病是威胁农业生产的世界性主要病害, 发病后, 一般减产 10% 左右, 严重的高达 75% 以上。然而目前对它的防治除利用化学农药外, 尚无其它好方法。为了克服化学农药造成的环境污染, 世界各国都在寻求有效的生物防治途径, 开展根结线虫天敌微生物的研究成为热门课题^[2]。我国张克勤^[3]、奚家勤^[4]、汪来发^[5]、杨秀娟^[6]等人已有此方面的研究报道。宁夏地区的特殊土壤条件和生产环境, 是否存在着不同于其它地区的根结线虫天敌微生物值得探索。为此, 对宁夏日光温室黄瓜病根、病土样品, 进行了根结线虫天敌真菌的分离, 得到了几株寄生根结线虫的真菌分离物, 现报道的就是其中的一株分离物对根结线虫的感染致病状况。

1 材料与方法

1.1 材料

真菌分离物是前期从宁夏贺兰山农牧场温室黄瓜

病根、病土样品中, 进行真菌分离而获得的系列分离物中的一株。接种所用的根结线虫成虫、卵和二龄幼虫采自上述病区的黄瓜病根新鲜病样。

1.2 方法

1.2.1 分离物的培养与接种菌物的制备 将分离物的纯化菌种接种于 CMA^[4] 平板培养基上 (CMA: 玉米粉 20 g + 500 mL 蒸馏水, 水浴 1 h, 双层纱布过滤, 121.0℃, 灭菌 20 min), 于 25℃ 下恒温培养 4 d, 进行菌落特征描述。从培养的菌落上挑取少许菌物, 悬浮于灭菌水中, 镜检游动孢子数量, 使其浓度达 1 000 个/mL 左右即可, 待用。

1.2.2 接种用根结线虫成虫、幼虫和卵的准备 5 月份从当地温室采取发病黄瓜新鲜病根, 冲洗干净, 带回实验室, 选用鲜嫩根结, 轻轻拨开皮层, 挑出膨大的雌虫、卵块若干, 将其放在凹玻片凹处 (凹玻片预先经过消毒处理), 加几滴灭菌水, 保湿待用。按上述方法, 分出部分卵块置于 28℃ 的温箱中进行孵化, 孵化出二龄幼虫后, 保湿待用。

1.2.3 接种 用无菌的小吸管从待用的分离物游动孢子悬浮液中吸出少量菌液, 分别滴加到放有根结线虫成虫、幼虫和卵的凹玻片凹处, 重复 3 次, 凹玻片放于能够保湿的容器内, 25℃ 下恒温培养, 定时取出凹玻片进行显微镜观察, 拍照。

2 结果

2.1 分离物菌落特征

该分离物的培养, 没有菌丝体; 菌落正面为白色, 边缘呈不规则波浪状, 分界处的培养基明显凹陷; 菌落中部隆起并高低不平, 整体犹如一块伤疤; 背面略黄, 由里向外逐渐变淡; 菌落背面边缘有一圈丝状物即游动孢子囊的假根; 菌落是由许多大小不等的游动孢子囊堆集而

第一作者简介: 张靠稳 (1962-), 男, 本科, 副教授, 现从事植物生理学教学及温室蔬菜病害研究工作。E-mail: zkw620821@yahoo.com.cn.

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ0739); 宁夏教育厅高校科研资助项目 (2006JY019)。

收稿日期: 2008-08-10

成(图 1)。

2.2 分离物的生长发育

首先是成熟的游动孢子囊(图 2)通过囊壁上的出管释放出游动孢子,游动孢子游动一段时间后,静止下来,产生假根,原孢子体由小变大,内含物不断增多,最后囊

内原生质分割,形成若干游动孢子,游动孢子先在囊内慢慢转动,逐步促成囊内孢子整体旋转,旋转速度由慢到快,很快冲破孢子囊囊壁上的出管,冲出孢子囊。在 25℃下,游动孢子能游动 15~24 h,游动孢子囊发育成熟需 3 d,游动孢子囊释放完囊内游动孢子需 30 min 左右。

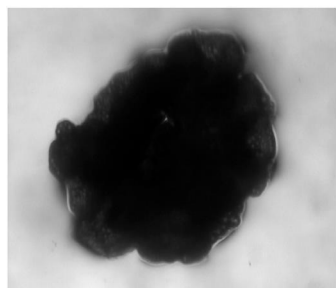


图1 分离物菌落特征(正面,40×)

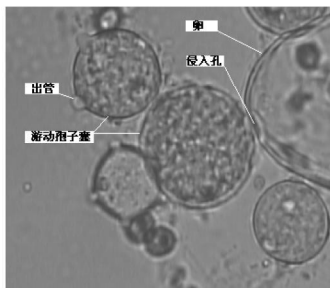


图2 分离物游动孢子囊(1000×)

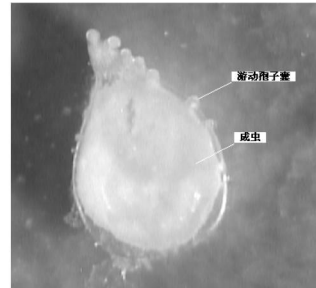


图3 分离物侵入成虫(100×)

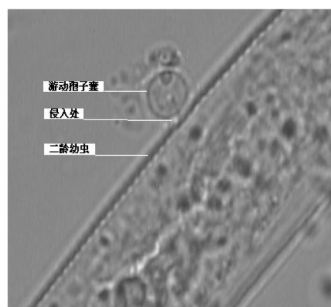


图4 分离物侵入二龄幼虫(1000×)

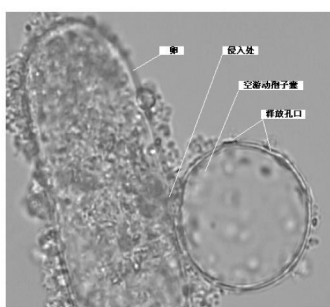


图5 分离物侵入卵(1000×)

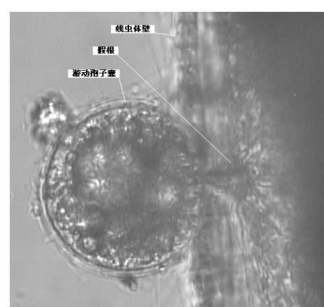


图6 分离物侵入虫体体表的假根(1000×)

2.3 分离物对根结线虫的感染致病

用分离物的游动孢子分别接种根结线虫的成虫、二龄幼虫和卵,定时显微观察,结果表明,分离物均可感染根结线虫的成虫、幼虫和卵(图 3、4、5)。3次重复表现一致,分离物对虫体的感染率达 100%。首先是分离物的游动孢子接触到根结线虫的成虫、幼虫和卵后,静止下来,游动孢子内部发生一系列的变化,转化为营养体,以出芽的方式穿透成虫、幼虫和卵的体表,之后分枝呈假根(图 6),以假根伸向虫体内部组织和器官,导致组织和器官功能衰弱,很快使其成虫、幼虫和卵受害致死。

3 讨论

该试验仅对分离物的培养特征和感染根结线虫的致病情况进行了初步研究,其分离物的细微结构、发育条件、生物学特性和分类地位等基本问题尚不清楚,有待进一步的工作。分离物能够通过体壁直接侵入根结线虫的各个发育阶段,菌体进入虫体的过程中有哪些重要的酶在发挥作用,虫体被侵入后有哪些明显反应等机理值得深入探讨。

4 结论

分离物以单个游动孢子产生假根扎入基质吸收营养,孢子体逐步膨大变为游动孢子囊,成熟后释放游动孢子,无菌丝。经查阅资料,初步鉴定为一种低等真菌。接种结果表明,分离物从根结线虫的成虫、二龄幼虫和卵的体壁外均可直接侵入,很快使它们被染致死,且感染率达 100%,初步确定此分离物为根结线虫的一种体外寄生物。

参考文献

- [1] 张靠稳 李建设.宁夏贺兰山农牧场温棚黄瓜根结线虫病发生初报[J]. 农业科学研究, 2006(4): 23-26.
- [2] 汪来发 杨宝君.根结线虫生物防治研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2002 26: 64-68.
- [3] 张克勤.食线虫菌物研究[M]. 昆明: 云南大学出版社, 2000: 71-135.
- [4] 奚家勤 祝明亮.云南省烟草根结线虫卵寄生菌的分离和筛选[J]. 烟草科技, 2004(6): 43-45.
- [5] 汪来发 杨宝君.华东地区根结线虫寄生真菌调查[J]. 菌物系统, 2001(2): 265-267.
- [6] 杨秀娟 何玉仙.福建省根结线虫卵囊真菌的分离与筛选[J]. 福建农业学报, 2000(1): 12-15.