

淡紫拟青霉在烤烟根际定殖能力分析*

祝明亮 夏振远 张克勤 李天飞 刘杏忠

摘 要

通过盆栽试验,确定了烟草根结线虫生防菌淡紫拟青霉 IPC 菌株在烤烟 K326 和云 85 根际的生长和定殖情况及其对根际微生物的影响。结果表明,施入菌剂 2 周和 4 周时淡紫拟青霉 IPC 菌株能在烤烟 K326 外根际、根表分离到,根内则不能分离到;而不同时期在烤烟云 85 的外根际、根表和根内都能分离到。在 6 周时 2 种烤烟的外根际、根表和根内的分离数达到最大,8 周时分离数减少。每个时期在 2 种烟草根际分离到 IPC 菌株的菌落繁殖单位(CFU)都是外根际最大,其次是根表,内根际最小。IPC 菌剂处理后烤烟根际细菌、真菌和放线菌的数量在 2 周比对照减少,4 周时比对照增多,6 周和 8 周时与对照接近。表明生防菌淡紫拟青霉 IPC 菌株可以在烟草外根际、根表定殖和生长,而在根内则较困难,菌剂施用 2 周时对根际土壤微生物具有一定的抑制作用,4 周后抑制作用减弱。

关键词:淡紫拟青霉 IPC 烤烟 根际 定殖 根际微生物

中图分类号:TS414 文献标识码:A 文章编号:1004-5708(2004)01-0025-04

淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson)是习居土壤中的机会菌物,对根结线虫(*Meloidogyne* spp.)和胞囊线虫(*Heterodera* spp.)的卵有很强的寄生能力,是根结线虫和胞囊线虫自然衰退的主要因子之一^[1,2],在植物寄生线虫的生防上具有较大的潜力^[3~6]。成功的生物防治依赖于对生防菌、病原物和寄主植物相互关系的彻底了解。在植物寄生线虫生防实践中,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^[7],这是生物制剂防治植物寄生线虫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生长及其对植株根际土壤微生物区系的抑制作用强弱已成为筛选、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的开发利用潜力。

本课题组分离筛选的淡紫拟青霉 IPC 菌株对烟草根结线虫具有较好的防治效果^[8],但缺乏对该菌株在烟草根际定殖能力的了解,类似的研究也少见报道。

为此,利用盆栽试验研究了该生防菌在烤烟 2 个不同品种根际的定殖情况,为利用该菌防治烟草根结线虫提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试烤烟品种为云南主栽品种 K326、云 85;供试菌剂为由淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson)IPC 菌株发酵生产的 IPC 菌剂,由云南烟草科学研究院农业所中试车间生产提供。

1.2 淡紫拟青霉 IPC 在烟草根际的定殖

1.2.1 选择培养基的制备 分离 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson(IPC)的选择性培养基配方为:10g 氯化钠、50mg 五氯硝基苯、50mg 苯来特、39gPDA 补充去离子水至 1000mL,常规高压灭菌。当温度降至 45~50℃时加入 100mg 硫酸链霉素、50mg 氯霉素、1mL 透西脱,充分混匀后到平板备用^[9]。

1.2.2 供试菌剂含孢量的测定 菌剂施用前以稀释平板计数法测定,每克菌剂菌落繁殖单位(colony forming unit,CFU),5 个重复取平均值。

1.2.3 根结线虫幼虫的孵化 从温室取出培养根结线虫的番茄根系,用自来水轻轻冲去泥土,将带根结的根系剪成小段放入三角瓶中,加入 1%次氯酸钠溶液,振荡 5min 后倒入双层筛中(上筛孔径 250μm,下筛孔

* 祝明亮,男,32岁,博士,助理研究员,云南烟草科学研究院生物技术重点实验室,昆明,650106

夏振远,李天飞,通讯地址同第一作者

张克勤,云南大学工业微生物发酵工程重点实验室,昆明,650091

刘杏忠,中国科学院微生物研究所,北京,100080

本研究为云南省“十五”攻关项目(2001NG08)

收稿日期:2003-03-10

径 $38\mu\text{m}$), 反复冲洗直到所有卵冲洗到下筛中。收集卵放入垫有滤纸的线虫分离器中, 于 25°C 培养箱孵化 3d, 即可得到大量根结线虫幼虫。取线虫液适当稀释后在倒置显微镜下计数线虫数量并稀释到 1000 条/mL 备用^[10]。

1.2.4 盆栽试验 选取无病红壤土装于直径 45cm 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 后移栽 40d 龄期的烟苗。移栽前在塘中接种刚孵化的新鲜根结线虫幼虫液 1.5mL/株, 同时施入供试菌剂 1.5g/株, 并同塘土充分混匀, 其他措施按烤烟常规栽培方法。对照只接种根结线虫幼虫, 不施生防菌剂。

1.2.5 生防菌淡紫拟青霉 IPC 的定殖 移栽后 2、4、6 和 8 周时分别取处理和对照烟根, 经以下处理: 1) 外根际定殖, 保留与根紧密结合的根际土; 2) 内根际定殖, 自来水冲洗后再用无菌水反复冲洗, 彻底除去根际土; 3) 根内定殖, 洗去根上的土, 加 2% 次氯酸钠消毒 3min, 再用无菌水冲洗。将经过不同处理的烟根剪成 0.5mm 左右的小段, 于研钵中研磨成浆状, 稀释后涂布到已制备好的选择性培养基上, $25\sim 28^\circ\text{C}$ 培养 7~10d, 计数测定菌株在烟草外根际, 内根际和根内的定殖情况。

1.3 IPC 菌剂对烟草根际微生物的影响

烟苗移栽后 2、4、6 和 8 周时分别取不同处理烤烟根际土, 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、放线菌和真菌的数量。

2 结果与分析

2.1 IPC 菌剂的含孢量测定

IPC 菌剂含孢量为 $1.65 \times 10^9 \text{cfu/g}$, 烟苗移栽时按 1.5g/株施用, 即菌剂施用剂量为 $2.5 \times 10^9 \text{cfu/g}$ 。

2.2 IPC 在烟草根际的定殖

2.2.1 IPC 在 K326 根际的定殖 IPC 在移栽后 2 周能在 K326 外根际、根表分离到, 但不能在内根际分离到; 4 周时外根际、根表的分离数增加, 而根内仍不能分离到; 6 周时外根际、根表的分离数达到最高, 根内也分离到少量; 8 周时外根际、根表分离数下降, 根内未分离到, 而相应对照处理 4 次取样均未分离到生防菌, 结果见表 1。

2.2.2 IPC 在云 85 根际的定殖 移栽后 2 周在云 85 外根际、根表分离到 IPC 菌, 同时在根内分离到少量的 IPC 菌; 4 周时在外根际、根表的分离数增加, 根内分离数量也稍有增加; 6 周时外根际、根表和根内的分离数达到最高; 8 周时外根际、根表的分离数低于 4 周和 6 周时, 而根内分离数无变化(表 1)。

表 1 IPC 在烟草根际的定殖情况

处理	不同时间的菌落繁殖单位(CFU)			
	2 周	4 周	6 周	8 周
K326 外根际	2.2×10^3	2.8×10^3	3.6×10^3	1.4×10^3
根表	4.6×10^2	5.3×10^2	6.0×10^2	2.4×10^2
根内	0	0	8	0
云 85 外根际	2.6×10^3	3.5×10^3	3.7×10^3	2.7×10^3
根表	5.5×10^2	5.8×10^2	5.9×10^2	5.4×10^2
根内	5	7	8	8
对照 外根际	0	0	0	0
根表	0	0	0	0
根内	0	0	0	0

2.3 IPC 菌剂对烟草根际微生物的影响

IPC 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比相应对照处理减少。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 2 IPC 菌剂处理对烟草根际微生物的影响

处理	根际微生物分离数(cfu/g)			
	2 周	4 周	6 周	8 周
K326 细菌	5.8×10^6	7.9×10^6	6.4×10^6	6.3×10^6
真菌	3.0×10^3	6.7×10^3	6.6×10^3	6.5×10^3
放线菌	4.3×10^5	5.4×10^5	4.1×10^5	3.4×10^5
云 85 细菌	4.3×10^6	6.3×10^6	6.7×10^6	6.4×10^6
真菌	2.3×10^3	5.6×10^3	6.5×10^3	6.6×10^3
放线菌	3.2×10^5	4.5×10^5	3.5×10^5	3.3×10^5
对照 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

3 讨论

3.1 形成植物根际的根围土壤区域是一个在时间和空间上变化的动态、复杂的栖居环境,不同土壤根际在生物、化学和物理特性方面均存在差异。盆栽试验表明,施入菌剂2周和4周时淡紫拟青霉IPC菌株能在烤烟K326外根际、根表分离到,根内则不能分离到,而不同时期在烤烟云85的外根际、根表和内根际都能分离到。在6周时,2种烤烟的外根际、根表和根内的分离数均达到最大,8周时分离数减少。每个时期在2种烟草根际分离到IPC菌株的菌落繁殖单位(CFU)都是外根际最大,其次是根表、内根际。IPC菌株在K326和云85上的定殖能力表现出差异,这可能与两个品种对烟草根结线虫病抗性不同有关。这些结果表明,生防菌剂中的淡紫拟青霉IPC菌株在烟草根际具有一定的亲和能力,可以在烟草外根际、根表,以至根内定殖,这为该菌株的开发利用提供了理论依据。

3.2 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。IPC菌剂处理后烤烟根际细菌、真菌和放线菌的数量在2周时较对照减少,4周时较对照增多,6周和8周时与对照接近。也就是说,施用2周时IPC菌株对根际土壤微生物具有一定的抑制作用,4周后抑制作用减弱。供试IPC菌株是土壤中兼性寄生菌,也属于植物寄生线虫机会菌物,国外报道这类菌能产生一种肽类抗生素抑制土壤微生物的生长。试验结果表明,淡紫拟青霉IPC对土壤微生物具有一定的抑制作用,其抑菌性随时间的延长而减弱。说明它们进入土壤后,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而数量增加,以致它们对土壤微生物抑制作用减弱并最终达到新的平衡。

3.3 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%,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,从而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。由此说明生物菌剂的配制和施用方法对其定殖也有一定影响。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

烟草根际定殖下来比从种子萌发生根开始困难得多,致使在根内分离数极少。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IPC菌株在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,这也是生物防治取得突破进展的最大障碍。因此,研究生防菌剂型配制、施用技术及其生长定殖情况是开发利用生防商品制剂必须解决的重要问题之一。

参考文献

- 1 Jatala P, Kaltenbach R and Bocangel M. Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potatoes[J]. Journal of Nematology, 1979,11:303.
- 2 Kerry B R, Crump D H and Mullens L A. Natural control of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* Woll. by soil fungi at three sites[J]. Crop Protection, 1982,1:99~109.
- 3 Jatala P. Biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Ann. Rev. Phytopathol., 1986,24:435~439.
- 4 Sayre R M, Walter D E. Factor affecting the efficacy of natural enemies of nematode[J]. Ann. Rev. Phytopathol., 1991,29:149~166.
- 5 刘杏忠,罗科,张青文. 淡紫拟青霉发酵液生理活性的初步鉴定[J]. 北京农业大学学报,1991,17(2):48,68.
- 6 王明祖,吴秋芳. 根结线虫卵寄生真菌的研究: I. 卵寄生真菌的筛选[J]. 华中农业大学学报,1990,9(3):225~229.
- 7 孙漫红,刘杏忠,唐霖. 土壤抑制作用对食线虫真菌及其制剂的影响[J]. 菌物系统(原真菌学报),1997,16(2):149~154.
- 8 祝明亮,张克勤,李天飞,等. 三种生物制剂对烟草根结线虫病防效研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2000,22(5):369~372.
- 9 Mitchell D J, Kannwischer M M E, Dickson D W. A semi-selective medium for the isolation of *Paecilomyces lilacinus* from soil[J]. Journal of Nematology, 1987,19(2):255~256.
- 10 张克勤, S. 高恩和 T. 巴巴拉. 根结线虫天敌真菌及其高效菌株筛选[J]. 真菌学报,1993,12(3):240~245.

Studies on the interactions of *Paecilomyces Lilacinus* (Thom)
samson IPC and tobacco rhizosphere

Zhu Mingliang¹ Xia Zhenyuan¹ Zhang Keqin² Li Tianfei¹ Liu Xingzhong³

1 Key Lab. of Biotechnology, Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming 650106

2 Key Lab. of Industrial Microbiology Fermentation, Yunnan University, Kunming 650091

3 Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080

Abstract

By using pot experiment, the growth and the colonization of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson IPC on the rhizosphere of flue-cured tobacco K326 and Yun85 and its influence on the rhizospheric microbes were determined. The results indicated that IPC were isolated from rhizoplane and ectorhizosphere of flue-cured tobacco K326 but could not be from its endorhizosphere in the second and fourth weeks post inoculation respectively. However, it could be isolated from rhizoplane, ectorhizosphere and endorhizosphere of Yun85 at different periods. The colony forming units of IPC on rhizoplane, ecterhizosphere and endorhizosphere of two flue-cured tobacco reached the biggest volume in the sixth week. By eighth week, the colony volume decreased. In each period, the CFU isolated of two flue- cured tobacco reached the biggest volume on the rhizoplane, less on ectorhizosphere, and least on the endorhizosphere. The amount of fungi, bacteria and actinomyces on tobacco rhizosphere after IPC treatment decreased in the second week, increased in the fourth week and reached nearly the same level to that of the control at six and eight weeks. This study suggested that the biocontrol strain *P. lilacinus* IPC could colonize and grow on rhizoplane and ectorhizosphere of tobacco, which inhibited soil microbes at early stage.

Key words: *Paecilomyces lilacinus* IPC Flue-cured tobacco Rhizosphere Colonization Rhizospheric microbes