



董丹,张涛涛,刘霆. 菌核青霉 D35 的鉴定及对黄瓜根结线虫病的防效评价[J]. 黑龙江农业科学,2022(6):57-61.

菌核青霉 D35 的鉴定及对黄瓜根结线虫病的防效评价

董 丹,张涛涛,刘 霆

(北京市农林科学院 植物保护研究所,北京 100097)

摘要:为促进南方根结线虫病的生物防治,避免产生环境污染和食品安全问题,本研究从福建省武夷山土壤中分离到菌株 D35,通过形态学特征和 ITS 序列扩增鉴定该菌株为菌核青霉,利用室内离体活性试验和温室盆栽试验研究了该菌株对黄瓜根结线虫的防治效果。结果表明:D35 菌株发酵滤液原液对南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率高达 100%,对线虫卵孵化的抑制率达 99.1%,在盆栽试验中平均防效达 77.1%,与 10%噻唑膦颗粒剂防治效果接近。综上可知,菌核青霉 D35 菌株为对根结线虫有效的生防菌株,可作为根结线虫病生物防治的新微生物资源进行开发应用。

关键词:菌核青霉;黄瓜;根结线虫

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)隶属于侧尾腺纲垫刃目异皮科根结线虫属^[1],为一类较高专业化型的杂食性植物病原线虫,在世界各地均有分布。其中南方根结线虫(*M. incognita*)寄主多达 3 000 余种,能够侵染几乎全部栽培作物的根部^[2]。近年来,随着我国温室大棚种植面积和复种指标的提高,根结线虫发病面积也在不断扩大,目前已成为设施蔬菜生产的重要障碍之一。据统计,每年由蔬菜根结线虫带来的经济损失就高达 4 亿美元^[3-4]。由于根结线虫难防难治,所以生产上大多以化学药剂防治为主,为避免产生环境污染和食品安全等问题,使用生物防治手段取代传统化学防治手段是降低根结线虫危害的主要对策之一^[5],因此针对蔬菜上根结线虫更有效安全的生物防治技术和产品越来越受到重视。黎明娟等^[6]发现绿色木霉(*Trichoderma viride*)发酵液对南方根结线虫二龄幼虫的校正死亡率高达 98.5%,对黄瓜根结线虫田间防效达 64.9%;文才艺等^[7]发现黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵液对根结线虫二龄幼虫的校正死亡率高达 97.92%,对番茄根结线虫防效达 68.57%;李芳等^[8]利用淡紫拟青霉防治烟草根结线虫病发现该菌能有效抑制烟

草根结线虫的发生并促进植物生长,病情指数下降 43.6%,植株鲜重增加 96.3%。本研究所用菌株为本实验室从福建武夷山土样中分离并筛选到的一株杀线虫活性较高的真菌菌株 D35,并对其进行了种类鉴定,通过温室盆栽试验分析该菌株对南方根结线虫的防治效果,旨在为其进一步应用和开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

南方根结线虫由北京市农林科学院植物保护研究所生防微生物研究室线虫课题组分离鉴定并保存。用于试验的南方根结线虫 2 龄幼虫在温室竹叶空心菜上扩繁,选择已成熟的褐色卵块先用 0.5%次氯酸钠消毒 3~5 min,再用无菌水冲洗 3~4 次,然后放在加有滤网的直径 90 mm 培养皿中孵化,培养皿中加少量灭菌蒸馏水,培养温度保持在 25℃,24 h 后在筛网下收集已孵化的 2 龄线虫(J2)进行试验^[7]。

D35 菌株从福建武夷山的土壤样品中,经梯度稀释分离获得,菌株保存号为 CGMCC No. 12168。供试的黄瓜品种为京津 1 号,购于京研益农(北京)种业科技有限公司。80.6%噻唑膦原油、10%噻唑膦颗粒剂(福气多)购于市场。

1.2 方法

1.2.1 菌株 D35 的形态学鉴定 将菌株 D35 进行单孢分离后,直接接种到马丁培养基上,仔细观察菌落颜色、形态和培养性状,然后挑取菌丝,并在显微镜下观察菌丝及孢子特征,再根据培养特

收稿日期:2022-02-25

基金项目:北京市农林科学院科技创新能力专项(KJ CX20200426,KJ CX20200110)。

第一作者:董丹(1981—),女,硕士,助理研究员,从事根结线虫生防资源应用研究。E-mail:dan20080801@163.com。

通信作者:刘霆(1975—),男,博士,副研究员,从事作物根结线虫病害生物防治研究。E-mail:lting11@163.com。

征按照 Bissett 分类方法进行形态学鉴定^[9]。

1.2.2 菌株 D35 的分子生物学鉴定 将单胞纯化的 D35 菌株,接入 PDB 培养基摇瓶发酵 5 d (25 ℃,180 r·min⁻¹),收集菌丝体及孢子,加入 FPCB 裂解液(上海生工股份有限公司)反复冻融,再用 CTAB 方法^[10]提取基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,用真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')进行 rDNA-ITS 片段序列扩增。PCR 扩增程序为:94 ℃ 5 min,(94 ℃ 45 s,37 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min)×35 个循环,72 ℃ 再延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,引物合成及 PCR 序列测定由北京天一辉远生物科技公司完成。将测序所得 ITS 序列提交至 NCBI 进行 BLAST 序列比对,从分子水平鉴定 D35 菌株的种类,通过 MEGA 5.0 软件构建菌株系统发育进化树。

1.2.3 菌株 D35 发酵滤液制备 取在 PDA 培养基上培养 5 d 的 D35 平板,用灭菌打孔器打取直径为 0.5 cm 的菌饼,接入 100 mL PDB 培养基中,每瓶接种 3 个菌饼,25 ℃,200 r·min⁻¹摇瓶发酵 72 h 后,12 000 r·min⁻¹离心 2 min,再用 0.25 μm 微孔滤膜滤除菌丝体,获得发酵滤液原液存于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.4 南方根结线虫卵、卵囊及 2 龄幼虫的获得 南方根结线虫用竹叶空心菜室内盆栽扩繁方式保存。接种 50 d 后,当空心菜根系上有大量卵囊出现时,将根拔下来,用水轻轻冲洗干净,小心挑下卵囊,放入 0.5% 次氯酸钠溶液中消毒 3 min,再用无菌水冲洗 3 次后,放在少量无菌水中 4 ℃ 保存备用。

另取部分卵囊放在无菌水中 25 ℃ 培养 48 h 后,每隔 24 h 收集 1 次新孵化的南方根结线虫 2 龄幼虫备用。

将病根轻轻冲洗干净,剪成约 0.5~1.0 cm 的小段,放入 500 mL 密封盒中,加 1% 次氯酸钠溶液 200 mL,剧烈震荡 3 min,用 20 目、200 目及 500 目网筛逐层冲洗,收集 500 目网筛上干净的南方根结线虫卵备用^[11]。

1.2.5 菌株 D35 发酵液对根结线虫卵孵化的影响 取 200 μL 菌株 D35 发酵滤液和 50 μL 卵悬液,放入 1.5 mL 离心管中,再以空白液体培养基和 25 μg·mL⁻¹ 的 80.6% 噻唑膦原油作为对照,各

处理重复 6 次,然后放在 25 ℃ 恒温箱中培养,7 d 后调查各处理中孵化出的根结线虫 2 龄幼虫的数量,计算孵化率和卵孵化抑制率^[12]。

1.2.6 菌株 D35 发酵滤液对南方根结线虫 2 龄幼虫活性的影响 吸取 200 μL 菌株 D35 发酵滤液,放入 48 孔细胞培养板中,每孔加入 100 μL 根结线虫 2 龄幼虫(J2)悬浮液(20 条线虫左右),以清水和 25 μg·mL⁻¹ 的 80.6% 噻唑膦原油作为对照,重复 3 次试验。室温处理 24 h 观察线虫存活情况,将虫体僵直的 J2 分离出来,放在装有 2% 生理盐水的培养皿中,在体视显微镜下用竹针拨动 J2,完全静止不动的即为已死亡个体,统计观察结果计算线虫校正死亡率^[13]。

1.2.7 菌株 D35 防治黄瓜根结线虫的盆栽试验 将 3 块菌株 D35 PDA 菌饼接种到含有 100 mL PDB 培养基的 500 mL 三角瓶中,25 ℃,200 r·min⁻¹摇瓶发酵 72 h 得到 D35 发酵液,将 D35 发酵液以 10% 接种量接种到灭菌的糙米培养基(糙米 80 g,水 125 mL)中,25 ℃,发酵 40~60 d,待 D35 孢子浓度达到 2×10⁸ 个·mL⁻¹ 时用于盆栽试验。

黄瓜育苗于直径 13 cm、高 10 cm 的营养钵中,育苗土为草炭土:蛭石:鸡粪按 5:2.5:1 比例混匀,每盆装入混合基质 150 g。在黄瓜第 1 片真叶全部展开时接种南方根结线虫,将线虫配制成 500 条·mL⁻¹ 的线虫悬浮液,在距黄瓜根 2 cm 的基质中用 1 mL 蓝枪头打 3 个 1 cm 深的小孔,将线虫悬浮液混匀后加入小孔中,每盆接种 3 mL 共计 1 500 条线虫。接种后当天进行药剂处理,菌株 D35 固体发酵物 150 kg·hm⁻² 处理、10% 噻唑膦颗粒剂 20 kg·hm⁻² (对照药剂)处理、接种线虫但不用药剂只浇等量的清水空白对照(CK),每个处理 15 株,3 次重复。药剂处理方法为:菌株 D35 固体发酵物和噻唑膦颗粒剂拌土后均匀撒施,施药后每盆浇等量的水,以不渗水为准,然后放于温室中正常管理。在接种线虫 45 d 后观察黄瓜根部情况,根据根部根结数和根结大小,记录病情级别,计算防治效果^[6]。

1.2.8 数据分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

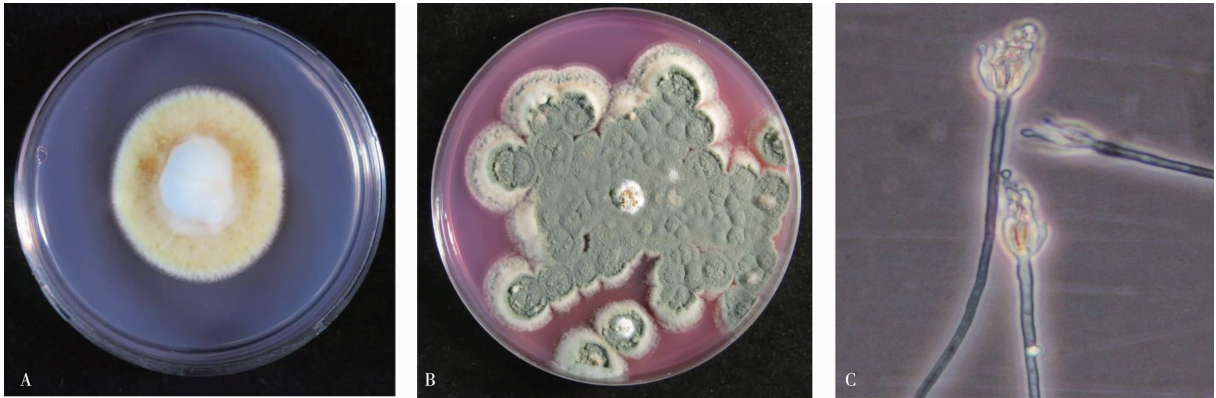
2.1 菌株 D35 形态学及分子生物学鉴定

2.1.1 形态学鉴定 菌株 D35 在马丁培养基上呈圆形菌落,初期在边缘可以看到白色菌丝,后逐

渐变为橙黄色,后期产孢量大时为暗绿色(图 1A、B)。显微镜下观察发现 D35 菌丝有横隔,在分生孢子梗顶端形成了几轮对称或不对称的小梗,形如扫帚,分生孢子球形(图 1C)。鉴于分生孢子梗和菌落等典型形态特征,初步鉴定菌株 D35 为青霉属真菌。

2.1.2 分子生物学鉴定 以菌株 D35 的 DNA 为模板,用引物 ITS1 和 ITS2 进行 rDNA-ITS 序列扩增,获得 250 bp 左右片段后测序,将得到的

rDNA-ITS 序列与 GenBank 数据库中的已知青霉属进行 BLAST 分析,选取与之同源性较高的菌株,利用软件 MEGA 5.0 进行系统发育分析、Neighbor-Joining 法构建菌株的 rDNA-ITS 系统发育树。结果表明 D35 与 *Penicillium* aff. *sclerotiorum* 聚在一个分支上,同源性为 99%,因此,结合之前的形态特征,确定菌株 D35 为菌核青霉(*Penicillium* aff. *sclerotiorum*)(图 2)。



A.菌落初期; B.5 d菌落; C.菌丝、分生孢子梗、孢子。

图 1 菌株 D35 的形态学特征

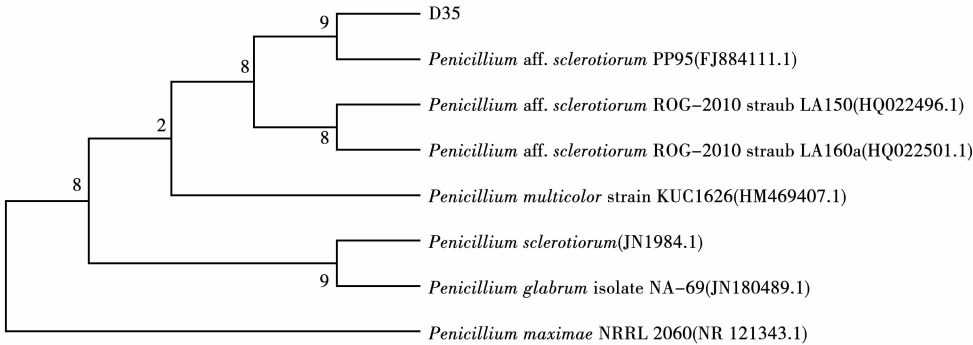


图 2 菌株 D35 的系统发育树

2.2 菌核青霉 D35 对南方根结线虫的室内离体活性测定

2.2.1 菌核青霉 D35 发酵滤液对根结线虫卵孵化的影响 调查发现菌核青霉 D35 发酵滤液对南方根结线虫卵孵化产生了强烈的抑制作用。方差分析发现菌核青霉 D35 发酵滤液与 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 80.6%噻唑膦原油抑制作用相当,两者间差异不显著(表 1)。

2.2.2 菌核青霉 D35 发酵滤液对南方根结线虫 2 龄幼虫活性的影响 用菌核青霉 D35 发酵液处理根结线虫 2 龄幼虫,24 h 后线虫虫体呈僵直状态,将线虫转移到 2%生理盐水中,在体视显微镜

下用竹针拨动仍不能恢复活性,而对照线虫活性正常。方差分析发现菌核青霉 D35 发酵滤液与 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 80.6%噻唑膦原油的抑杀作用无显著差异,校正死亡率都达到了 100%(表 1)。

表 1 菌核青霉 D35 对黄瓜根结线虫活性的影响
单位: %

处理	卵孵化率	孵化抑制率	死亡率	校正死亡率
CK	72.00 a	-	0 a	-
菌核青霉 D35	0.67 b	99.1	100 b	100
噻唑膦	0.33 b	99.5	100 b	100

注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

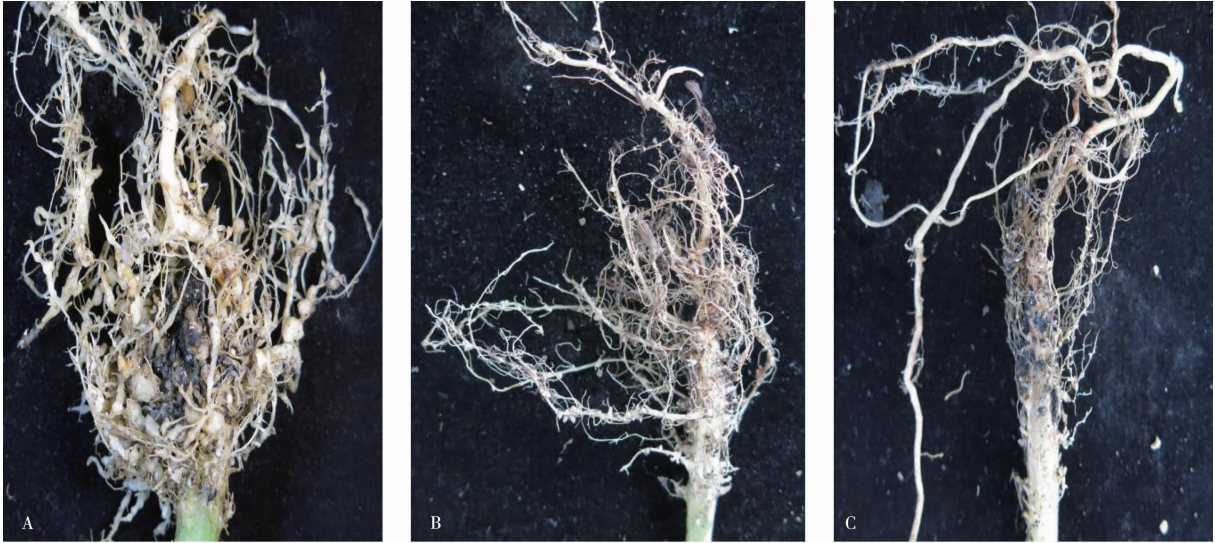
2.3 菌核青霉 D35 对黄瓜根结线虫的盆栽试验效果

接种南方根结线虫 45 d 后,调查黄瓜根结线虫为害情况发现,空白对照的黄瓜苗根结大、根结数量多且均匀地布满整个根系(图 3A)。根据根结指数计算公式,3 次试验中,对照的平均根结指数为 96.8。菌核青霉 D35 处理的黄瓜须根多,发病轻,根结小而少,3 次试验平均根结指数为 22.2 (图 3B),平均防治效果为 77.1%。在 10%噻唑膦药剂处理中根结小而少,3 次试验平均根结指数为 20.4(图 3C),平均防治效果为 78.9%。使

用 SPSS 22.0 软件对不同处理中黄瓜根结线虫平均根结指数进行方差显著性分析,发现菌核青霉菌处理、噻唑膦处理和空白对照间平均根结指数存在显著差异,菌核青霉 D35 对黄瓜根结线虫病有显著防效,与噻唑膦处理间根结指数、防治效果没有显著差异(表 2)。

表 2 菌核青霉 D35 对黄瓜根结线虫的防治效果

处理	平均根结指数	平均防治效果/%
CK	96.8 a	-
菌核青霉 D35	22.2 b	77.1
噻唑膦	20.4 b	78.9



A.空白对照; B.菌核青霉D35处理; C.噻唑膦处理。

图 3 菌核青霉 D35 对黄瓜根结线虫的盆栽防治效果

3 讨论

菌核青霉(*P. aff. sclerotiorum*)属于真菌界、子囊菌门、盘菌亚门、散囊菌纲、散囊菌亚纲、散子囊菌目、发菌科、青霉菌属。菌核(sclerotium)是一种坚硬的休眠结构,由菌丝形成^[14]。菌核青霉菌代谢产物主要包括β胡萝卜素、类胡萝卜素、菌核青霉素和菌核青霉多糖^[15-19]。菌核青霉菌分布广但不易分离得到。王衬^[20]在西沙群岛的海绵样品中分离获得了一株菌核青霉真菌 OUCM-DZ-3839,该菌株的发酵产物有明显的生物碱显色反应并对 MCF-7 具有中等细胞毒活性。陈皖红^[21]从茶叶内生真菌中分离到一株菌核青霉,可以水解酯型儿茶素和降解咖啡碱。本试验中的菌核青霉 D35 是从福建武夷山土壤样品中分离到的一种新的生防资源。本研究结果表明,它的发

酵滤液和糙米发酵物对南方根结线虫和卵具有明显的致死作用,在盆栽试验中对黄瓜根结线虫病的防效能达到 70%以上,丰富了黄瓜根结线虫病的生防资源,在黄瓜根结线虫病的生物防治方面具有较大的应用潜力。

4 结论

本试验对从福建武夷山土壤中分离到一株性状良好的真菌菌株 D35,经过形态学及分子生物学鉴定其为菌核青霉(*P. aff. sclerotiorum*)。其发酵滤液对南方根结线虫 2 龄幼虫致死率达 100%,对卵孵化抑制率达 99.1%。通过黄瓜温室盆栽试验发现,D35 处理的黄瓜苗根结少,对根结线虫具有很好的防治作用,平均防效达77.1%,与常用药剂噻唑膦平均防效差异不显著,具有良好的开发应用前景。

参考文献:

- [1] ROLAND N P, MAURICE M, JAN H. Plant nematology (in Chinese) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.
- [2] ABAD P, JÉROME G, AURY J, et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(8): 909-915.
- [3] 赵鸿, 彭德良, 朱建兰. 根结线虫的研究现状[J]. 植物保护, 2003(6): 6-9.
- [4] HUANG W K, SUN J H, CUI J K, et al. Efficacy evaluation of fungus *Syncephalastrum racemosum* and nematicide Avermectin against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on cucumber[J]. PloS One, 2014, 9(2): e89717.
- [5] 马玉琴, 魏偲, 茆振川, 等. 生防型菌肥对黄瓜生长及根结线虫病的影响[J]. 中国农业科学, 2016(15): 2945-2954.
- [6] 翟明娟, 李登辉, 马玉琴, 等. 绿色木霉菌株 Tvir-6 对黄瓜根结线虫的防治效果研究[J]. 中国蔬菜, 2017(10): 67-72.
- [7] 文才艺, 雷震, 刘霆, 等. 黑曲霉 Y-61 代谢活性物质对南方根结线虫的作用[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 157-159.
- [8] 郝冰玉. 淡紫拟青霉在我国的研究进展概述[J]. 黑龙江科学, 2016(24): 14.
- [9] BISSETT J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infra-generic classification[J]. Canadian Journal of Botany, 1991, 69: 2357-2372.
- [10] 曹宜, 刘波, 林营志, 等. 枯萎病尖孢镰刀菌的 RAPD-PCR 多态性分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004(S1): 74-79.
- [11] 高学彪, 邓穗儿, 周慧娟, 等. 淡紫拟青霉 MCWA18 菌株对南方根结线虫的寄生和防治作用[J]. 中国生物防治, 1998(4): 20-23.
- [12] ZHANG J, LI Y H, YUAN H X, et al. Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09X01 and *Bacillus cereus* isolate 09B18[J]. Biological Control, 2016, 92: 1-6.
- [13] 段玉玺, 靳莹莹, 王胜君, 等. 生防菌株 Snf85 的鉴定及其发酵液对不同种类线虫的毒力[J]. 植物保护学报, 2008(2): 132-136.
- [14] 辛桥. 菌核青霉菌 FS50 深层发酵产 Sclerotiorin 的研究[D]. 赣州: 江西理工大学, 2018.
- [15] 李乐军, 陶美华, 陈玉婵, 等. 海洋真菌菌核青霉 FS50 固体发酵代谢产物[J]. 菌物学报, 2015, 34(1): 117-123.
- [16] 么兰, 韩建荣. 不同环境因素对青霉 PT95 菌株内类胡萝卜素稳定性的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2008, 28(1): 73-76.
- [17] 赵文婧, 高宇英, 韩建荣. 外源 β -胡萝卜素、光照对青霉 PT95 菌株菌核分化和类胡萝卜素产率的影响[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 279-282.
- [18] 王红. 菌核青霉 SD-36 的遗传调控及其次级代谢产物分析[D]. 济南: 山东师范大学, 2021.
- [19] 张霞. 菌核青霉 cib-411 和绳生毛壳霉 cib-604 次级代谢产物及生物活性研发[D]. 北京: 中国科学院大学, 2021.
- [20] 王衬. 菌核青霉 OUCMDZ-3839 次生代谢产物研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [21] 陈皖红. 茶树内生真菌-菌核青霉对茶叶主要成分的影响及安全性初探[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.

Identification of *Penicillium* aff. *sclerotiorum* D35 and Its Biological Control Effect Against Cucumber Root Knot Nematode

DONG Dan, ZHANG Tao-tao, LIU Ting

(Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to promote the biological control of root knot nematode disease in South China and avoid environmental pollution and food safety problems, in this study, the strain D35 was isolated from soil of Wuyi Mountain in Fujian Province. It was identified as *Penicillium* aff. *sclerotiorum* by morphological and ITS sequence analyses. The biocontrol effect of *Penicillium* aff. *sclerotiorum* D35 on cucumber root-knot nematode was evaluated through *in vitro* activity tests and pot experiment. The results indicated that the corrected mortality rate of *Penicillium* aff. *sclerotiorum* D35 fermentation broth to *Meloidogyne incognita* J2 was as high as 100%, and the inhibition rate against egg hatching was 99.1%. The average biocontrol effect was 77.1% in the pot experiment, which was close to the control effect of 10% thiazolidine granules. In conclusion, *Penicillium* aff. *sclerotiorum* D35 strain is an effective biocontrol strain against root knot nematode, and can be developed and applied as a new microbial resource for biocontrol of root knot nematode disease.

Keywords: *Penicillium* aff. *sclerotiorum*; cucumber; root knot nematode