

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (7): 793–802; 4 July 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.010

长枝木霉对禾谷胞囊线虫的寄生和致死作用

张树武^{1,2,3,4}, 徐秉良^{1,2,3,4*}, 薛应钰^{1,2}, 刘佳^{1,3}

¹甘肃农业大学草业学院, ²草业生态系统教育部重点实验室, ³甘肃省草业工程实验室, ⁴中美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070

摘要: 【目的】明确长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 孢子悬浮液对小麦禾谷胞囊线虫 (*Heterodera avenae*) 的防治潜力和可能的作用机理。【方法】通过室内显微观察和测定不同时期长枝木霉 (*T. longibrachiatum*) 孢子悬浮液对小麦禾谷胞囊线虫 (*H. avenae*) 胞囊的寄生和致死作用及其可能的机理。【结果】显微观察结果表明, 侵染初期长枝木霉孢子寄生于胞囊的表面, 并且萌发产生大量的菌丝, 侵染后期整个胞囊被致密的菌丝包围, 胞囊内卵的胚胎发育停止和内容物凝集, 甚至有的胞囊表面突起形成深褐色的小液泡, 或者胞囊破裂和溶解。室内测定结果表明, 不同浓度长枝木霉孢子悬浮液对胞囊具有明显的寄生和致死作用, 并且其可能的寄生和致死作用机理主要是通过胞囊诱导和提高长枝木霉菌几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性, 进而使胞囊体壁溶解和内容物外渗。处理后第 18 天浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的长枝木霉孢子悬浮液对胞囊的寄生率为 93.3%, 第 10 天对胞囊孵化的相对抑制率为 93.6%; 经胞囊诱导后第 4 天浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的长枝木霉孢子悬浮液几丁质酶和葡聚糖酶活性最高为 0.78 和 0.96 U/(min·mL), 第 6 天浓度为 1.5×10^8 CFU/mL 的长枝木霉孢子悬浮液酪蛋白酶活性最高为 4.03 U/(min·mL), 并且诱导后其几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶活性随着长枝木霉孢子悬浮液浓度的增加而增加。【结论】长枝木霉对小麦禾谷胞囊线虫胞囊具有较强的寄生和致死作用, 且可能的寄生和致死作用机理主要通过胞囊诱导和提高长枝木霉菌几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性。

关键词: 长枝木霉, 小麦禾谷胞囊线虫, 寄生和致死作用

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2014)07-0793-10

小麦禾谷胞囊线虫 (Cereal Cyst Nematode, CCN) 属于植物半寄生线虫, 是近年来我国小麦上发生的一种新病害^[1]。据相关文献报道, 该线虫不仅可以寄生小麦、大麦、燕麦和黑麦等作物, 而且还能寄生不同种类的禾本科牧草, 但对小麦的危害最为

严重^[2]。国外自 1908 年在英国首次发现以来, 目前在世界上 32 个国家已有相关的报道^[3], 如在印度的拉贾斯坦, 小麦产量因之损失 47.2%, 大麦损失 87.2%^[4]。在澳大利亚的维多利亚和南澳大利亚, 小麦受害面积 200 万公顷, 严重时损失为 73% -

基金项目: 草业生态系统教育部省部共建重点实验室项目 (CY-GG-2006-013); 甘肃省农牧厅生物技术专项 (GNSW-2009-04); 甘肃省教育厅项目 (042-03)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-931-7631294; E-mail: xubl@gsau.edu.cn

作者简介: 张树武 (1986 -), 甘肃庆阳市, 硕士研究生, 从事植物病害生物防治研究。E-mail: zhangsw704@126.com

收稿日期: 2013-10-17; **修回日期:** 2014-01-27

89%^[5-6]。国内自1989年在湖北天门县首次报道以来,目前已证实该线虫在北京、山东、河南、河北和安徽等12个省(自治区、直辖市)均有分布^[7],尤其在我国小麦主产区河南省2007年普查结果显示全省18个省辖市中已有16个市区发病,发病面积为1700多万亩,占全省小麦种植总面积的23.5%,小麦产量损失为28.8% - 35.6%^[8]。另外,有关最新的报道在甘肃省部分小麦种植区也有发生,对小麦的产量和品质造成了严重的影响^[9]。因此,小麦禾谷胞囊线虫的防治开始受到了人们的关注,尤其是开发防治植物线虫病害并对环境友好的生物菌剂将成为未来研究的主导方向。

目前,小麦禾谷胞囊线虫病害的防治仍以化学防治为主,但因其具有高残留、毒性大、土壤中有益微生物被杀死^[10]、难以降解、污染地下水源和环境等一系列新问题而被禁用^[11]。鉴于化学防治的局限性和无公害生产的要求,近年来虽然关于植物线虫病害的生物防治国内外已有一些相关报道,如国内外研究和应用最多的线虫生防菌主要有淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*),但是由于其对土壤微生物的抑制作用^[12],以及已有许多临床医学报告表明淡紫拟青霉菌能感染人体或动物皮肤和组织器官^[13-14]。因而,寻找一种安全而高效的生防制剂来防治小麦禾谷胞囊线虫病害,是目前国内外研究的重点和热点之一。

木霉菌(*Trichoderma* Pers. Fr.)属于半知菌类(Deuteromycotina),丝孢纲(Hyphomycetes),丝孢目(Hyphomycetales)粘孢菌类(Gloiosporae),是一类广泛分布于土壤中的习居菌^[15]。据有关文献报道,木霉菌对一些土传植物病原菌具有很好的拮抗作用,如镰刀菌属(*Fusarium*)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)和腐霉属(*Pythium*)等^[16]。近年来,在植物病原菌拮抗方面研究和应用较多的木霉菌主要有哈茨木霉(*Trichoderma hatzianum*)和绿色木霉(*T. viride*)^[15,17],但有关长枝木霉的研究和报道较少,尤其对小麦禾谷胞囊线虫胞囊的寄生和致死作用及其可能的机理目前尚未见报道。因此,本研究通过长枝木霉孢子悬浮液对小麦禾谷胞囊线虫胞囊侵染过程的显微观察和测定,以及胞囊对长枝木霉菌几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶活性的诱导作用研究,旨在分析和讨论长枝木霉对胞囊寄生和致死作用的最佳时期、最佳浓度、有效物质和可能的机理,以便为

新型、高效的微生物型杀线剂的研制、开发和利用奠定一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株:长枝木霉(*T. longibrachiatum*)菌株由甘肃农业大学植物病理学实验室提供。

1.1.2 供试土样:病田土样于2011年7月采自甘肃省兰州市永登县和武威市民勤县等地小麦禾谷胞囊线虫发生较严重的地块。采用五点取样法采集土样,取土时将表层干土去除,取0-20 cm层的土壤,将土样装入自封袋,带回实验室备用。

1.2 长枝木霉孢子悬浮液的制备

向在PDA平板上培养6天的长枝木霉菌中加入一滴Tween-80和5 mL无菌水充分震荡使长枝木霉分生孢子脱落在无菌水中,即得到长枝木霉分生孢子悬浮液的原液,用血球计数板计数原液的浓度。然后将制备好的PDB液体培养基分装在150 mL三角瓶中,每三角瓶60 mL,并向每个三角瓶中加入1 mL长枝木霉分生孢子悬浮液,以加入1 mL无菌水和一滴Tween-80作为对照,每个处理3个重复,并置于30℃、转速为150 r/min和16 h光照的控温振荡器中培养。培养8 d后经双层滤纸过滤并用血球计数板计数原液的浓度(1.5×10^8 CFU/mL),同时依次稀释为 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 和 1.5×10^4 CFU/mL备用。

1.3 小麦禾谷胞囊线虫胞囊的分离

采用“漂浮法”分离^[18],略作修改。向土样中加入适量的自来水搅拌均匀,静置2-3 min后,把悬浮液倒入嵌在65目网筛中的25目网筛内,如此重复操作3次。然后用细水流把65目网筛中的泥沙冲去,剩余物收集在干净的烧杯中,静置2-3 min后的上层样品倒入垫有双层擦镜纸的漏斗内,过滤后的剩余物一并移入洗净的玻璃培养皿中,并在解剖镜下用镊子从中挑取新鲜而饱满的棕色胞囊,置于4℃冰箱备用。

1.4 长枝木霉对胞囊寄生和致死作用过程的显微观察

在高温灭菌的培养皿(d=6 cm)中加入10个表面消毒且发育较一致的胞囊和5 mL浓度为 1.5×10^8 CFU/mL长枝木霉孢子悬浮液,以加入5 mL无菌水

作为对照,每个处理和对照3个重复。试验在25℃下进行,每隔2d观察1次胞囊被寄生和致死的过程。

1.5 长枝木霉对胞囊的寄生和致死作用

在高温灭菌的培养皿($d = 6$ cm)中放入10个表面消毒且发育较一致的胞囊,分别加入5 mL不同浓度长枝木霉孢子悬浮液($1.5 \times 10^4 - 10^8$ CFU/mL),以加入5 mL无菌水作为对照,试验共设置5个处理和1个对照,每个处理和对照3个重复。试验在25℃下进行,10 d后镜检各处理中胞囊被寄生和孵化情况,并按照公式(1)计算胞囊寄生率和公式(2)计算胞囊孵化的相对抑制率。

$$\text{胞囊的寄生率(\%)} = \frac{\text{处理胞囊寄生的数量}}{\text{供试胞囊的数量}} \times 100 \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{胞囊孵化的相对抑制率(\%)} =$$

$$\frac{\text{对照孵化的线虫数量} - \text{处理孵化的线虫数量}}{\text{对照孵化的线虫数量}} \times 100 \quad \text{公式(2)}$$

1.6 长枝木霉产酶活性的测定

长枝木霉培养基参照 Sahebani 等^[19]方法进行培养。30℃黑暗条件下培养10 d后将培养物通过0.22 μm微孔滤膜过滤器过滤两次,除去培养物中的孢子和培养基,过滤后的培养上清液用于几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶活性的测定。几丁质酶活性测定采用还原糖法^[20],略作修改。待测定的反应混合物中含有1 mL培养上清液、0.3 mL 0.1%醋酸钠缓冲液(pH 4.7)和0.2 mL 0.5%胶体几丁质,以0.2 mL无菌水作为对照,置于50℃水浴1 h,然后4℃11000 × g离心5 min。离心后取0.75 mL上清液与0.1 mL 10 mol/L NaOH溶液混合后加入到1.5 mL离心管中,100℃水浴5 min,待冷却至室温后在530 nm吸光度下测量反应混合物吸光值。校准曲线以N-乙酰氨基葡萄糖(NAGA)作为标准测定减少的糖浓度。一个单位(U)的几丁质酶活性被定义为需要每分钟从0.5%的胶体几丁质中释放1 μmol NAGA。试验共设置5个处理和1个对照,每个处理和对照重复6次,并每天测定1次几丁质酶的活性。

葡聚糖酶活性测定参考 Kery 等^[21]报道的方法并略作修改。取0.1 mL培养上清液,加入0.8 mL 50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 6.2)和0.1 mL 10%

(W/V)葡聚糖(底物)溶液,以0.1 mL无菌水作为对照,充分混合后40℃水浴30 min。一个单位(U)的葡聚糖酶活性被定义为每分钟从10%葡聚糖中产生1 μmol还原糖(葡萄糖)。试验共设置5个处理和1个对照,每个处理和对照重复6次,并每天测定1次葡聚糖酶的活性。

酪蛋白酶活性的测定采用彭国良等^[22]方法并略作修改。酪蛋白酶活性测定以1%(W/V)的酪蛋白溶液为底物,取此溶液1.0 mL,并加入培养上清液1.0 mL,以加入1.0 mL无菌水作为对照,混合均匀后于37℃反应30 min,并加入3 mL 0.4 mol/L三氯乙酸终止反应,然后4℃11000 × g离心5 min,过滤后取1 mL过滤液和5 mL 0.55 mol/L Na₂CO₃溶液混匀后加入Folin试剂1 mL,立即混匀显色30 min,并用分光光度计在680 nm处测定吸光值,并以每分钟催化分解酪蛋白生成1 μmol酪氨酸为一个酶活单位(U)。试验共设置5个处理和1个对照,每个处理和对照重复6次,并每天测定1次酪蛋白酶的活性。

1.7 胞囊对长枝木霉产酶活性的诱导作用

在500 mL的三角瓶中加入150 mL培养基^[19],并在121℃高压灭菌30 min,以经过消毒的胞囊作为氮源和碳源,同时加入1 mL不同浓度的长枝木霉孢子悬浮液作为培养物,以未加入消毒的胞囊作为对照。30℃黑暗条件下培养10 d,然后将处理和对照的培养物通过0.22 μm微孔滤膜过滤器过滤2次,除去培养物中的孢子和培养基,过滤后的滤液用于几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶活性的测定。试验共设置5个处理和1个对照,每个处理和对照各重复6次,并每天测定1次各种酶的活性,测定方法同上。

1.8 数据统计

采用Excel 2003和SPSS 16.0软件进行数据处理、图表绘制和方差分析,并采用Duncan氏新复极差法进行处理间差异显著性检验。

2 结果和分析

2.1 长枝木霉对胞囊寄生和致死作用过程的显微观察

显微观察结果表明,长枝木霉孢子悬浮液对小麦禾谷胞囊线虫胞囊具有明显的寄生和致死作用,

且与对照均存在显著的差异。处理后第 10 天镜检观察到长枝木霉菌孢子寄生于胞囊的表面(图 1-A, B);第 12 天镜检观察到寄生于胞囊体表的孢子萌发形成大量的菌丝,整个胞囊被茂密的菌丝包围,并可观察到菌丝与胞囊接触后形成侵染钉穿透胞囊体表,使胞囊内卵的胚胎发育停止和内容物凝集,甚至有的胞囊开始皱缩变形(图 1-C, D);第 14 天有的胞囊表面出现凹凸不平,甚至有的出现畸形或者胞囊表面突起形成深褐色的小液泡(图 1-E);16 d 后镜检观察到菌丝侵入胞囊内,在胞囊内生长,胞囊内布满菌丝,大部分胞囊完全变形,甚至有的胞囊破裂,内容物外渗(图 1-F, G);18 d 后有的胞囊完全被长枝木霉菌溶解(图 1-H);对照组中则无菌丝寄生,内

容物均匀,胚胎发育良好(图 1-F),同时在后期孵化出大量的二龄幼虫。

2.2 长枝木霉对胞囊的寄生作用

不同浓度长枝木霉孢子悬浮液对胞囊的寄生率与对照相比均存在显著的差异,并且寄生率随着浓度的增大而增大,随着处理时间的延长而增大。第 18 天浓度为 1.5×10^8 和 1.5×10^7 CFU/mL 的长枝木霉孢子悬浮液对胞囊的寄生率分别为 93.3% 和 90.0%,而对照始终没有任何杂菌寄生(表 1)。

2.3 长枝木霉对胞囊的毒杀作用

与对照相比,不同浓度长枝木霉孢子悬浮液对胞囊孵化的相对抑制率随着浓度的增大而增大,其在第 10 天和第 18 天的相对抑制率较高,尤其是浓度为

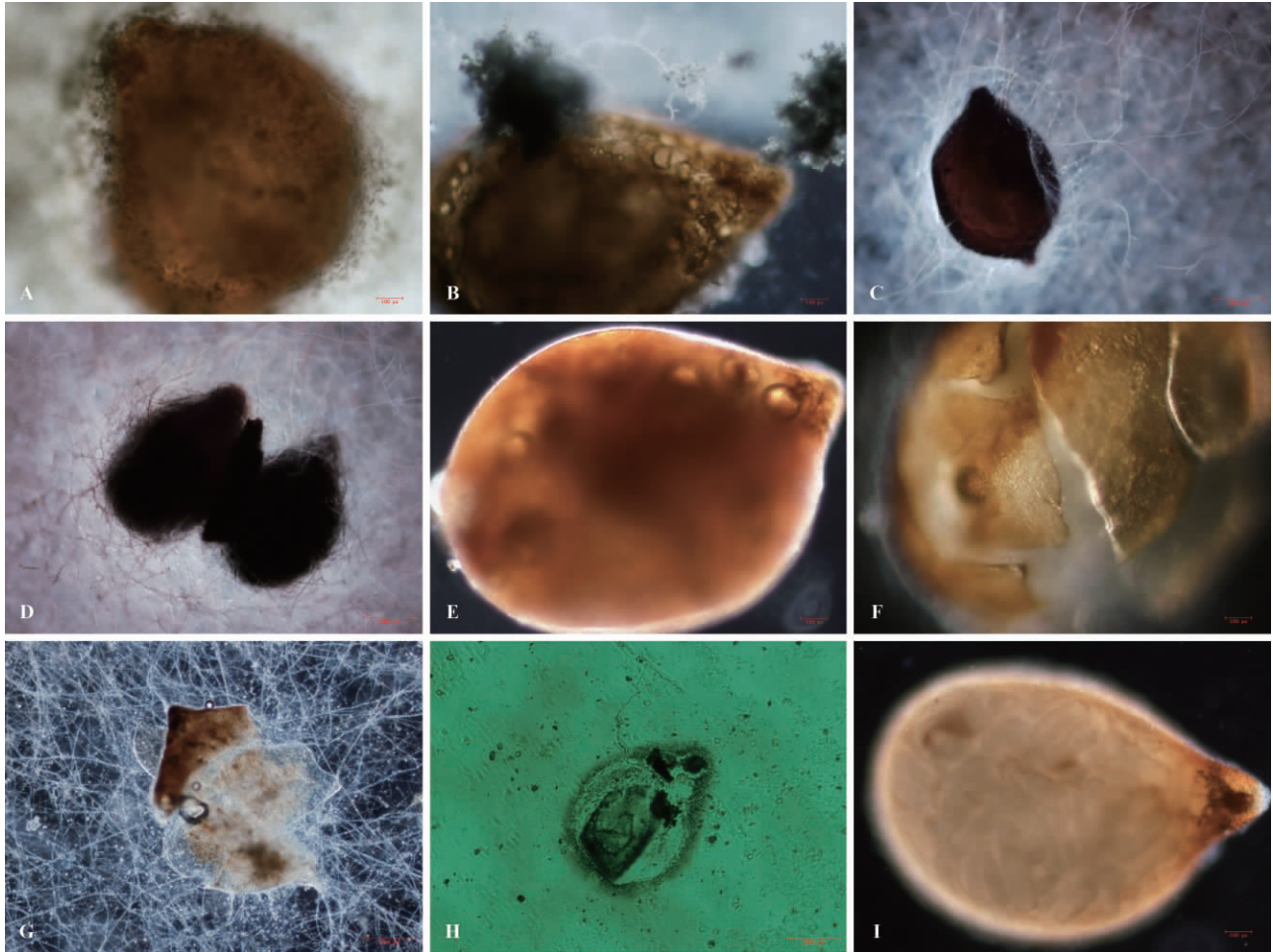


图 1. 小麦禾谷囊线虫胞囊被长枝木霉孢子悬浮液侵染后的形态特征

Figure 1. The morphological characteristics of *Heterodera avenae* cysts infected by the spore suspension of *Trichoderma longibrachiatum*. A and B: the cysts were parasitized by the spore of *Trichoderma longibrachiatum* (100 μm); C and D: the cysts were parasitized by the mycelium of *Trichoderma longibrachiatum* (200 μm); E: the cyst with engendered vacuole and deformity (100 μm); F and G: the cyst was split and parasitized by the spore suspension of *Trichoderma longibrachiatum* (100 μm); H: the cyst was dissolved by the metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* (200 μm); I: the cyst in the control group (100 μm).

1.5×10^8 CFU/mL 的长枝木霉孢子悬浮液对胞囊孵化的相对抑制率分别为 93.6% 和 91.1% (表 2)。

表 1. 长枝木霉对小麦禾谷胞囊线虫胞囊的寄生率

Table 1. Effects of *Trichoderma longibrachiatum* on the percent of *Heterodera avenae* cysts parasitized

concentration /(CFU/mL)	number of cysts parasitized					percentages of parasitism /%				
	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d
1.5×10^8	6.3 a	7.0 a	7.3 a	9.0 a	9.3 a	63.3	70.0	73.3	90.0	93.3
1.5×10^7	5.3 a	6.0 ab	6.7 ab	8.7 ab	9.0 ab	53.3	60.0	66.7	86.7	90.0
1.5×10^6	4.7 ab	5.3 b	6.0 b	7.7 b	8.3 bc	46.7	53.3	60.0	76.7	83.3
1.5×10^5	3.0 bc	3.3 c	4.3 c	6.7 c	7.7 cd	30.0	33.3	43.3	66.7	76.7
1.5×10^4	2.3 c	3.0 c	3.3 c	5.0 c	6.3 d	23.3	30.0	33.3	50.0	63.3
control	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 d	0.0 e	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

The data in the table are mean. Different lowercase letters in the same column mean significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test. The same below.

表 2. 长枝木霉对小麦禾谷胞囊线虫胞囊孵化的相对抑制率

Table 2. Effects of *Trichoderma longibrachiatum* on the relative percent of inhibition of *Heterodera avenae* cysts hatching

concentration /(CFU/mL)	number of cysts hatched					relative percentages of inhibition /%				
	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d
1.5×10^8	2.7 e	9.0 e	12.0 e	13.7 e	14.0 e	93.6	91.0	91.0	90.8	91.1
1.5×10^7	7.0 d	20.3 d	27.3 d	30.7 d	31.3 d	83.2	79.7	79.6	79.5	80.0
1.5×10^6	12.3 c	34.7 c	45.0 c	51.0 c	51.3 c	70.4	65.4	66.3	65.8	67.3
1.5×10^5	16.7 b	46.0 b	62.0 b	71.0 b	71.7 b	60.0	54.2	53.6	52.5	54.4
1.5×10^4	20.0 b	51.7 b	69.0 b	77.3 b	78.0 b	52.0	48.5	48.4	48.2	50.3
control	41.7 a	100.3 a	133.7 a	149.3 a	157.0 a	-	-	-	-	-

2.4 胞囊对长枝木霉产酶活性的诱导作用

长枝木霉孢子悬浮液对胞囊寄生和致死作用主要通过胞囊接触后,胞囊诱导其产生大量的几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶使胞囊溶解和内容物外渗。与对照相比,胞囊(图 2-A、图 3-A 和图 4-A)和胶体几丁质(图 2-B)、葡聚糖(图 3-B)和酪蛋白(图 4-B)均能够诱导和提高长枝木霉产生几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性,且处理后随着长枝木霉孢子悬浮液浓度的增加,几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性也显著的增加。在液体培养基质中加入胞囊和胶体几丁质后几丁质酶的活性在第 4 天达到最大值,且最大值分别为 0.78 和 1.02 U/(min·mL),然后呈下降趋势(图 2);在液体培养基质中加入胞囊和葡聚糖后葡聚糖酶的活性在第 4 天达到最大值,且最大值分别为 0.96 和 1.03 U/(min·mL),然后呈下降趋势(图 3);在液体培养基质中加入胞囊和酪蛋白后酪蛋白酶的活性在第 6 天达到最大值,且最大值分别为 4.03 和 4.54 U/(min·mL),然后呈下降趋势(图 4)。同时在培养的过程中处理(含有胞囊)的几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶活性显著高于对照。

3 讨论

3.1 长枝木霉对胞囊寄生和致死作用过程的显微观察

首次通过显微镜观察了不同时间段不同浓度长枝木霉孢子悬浮液对胞囊寄生和致死作用,并对其可能的作用机理进行了初步的研究。结果表明长枝木霉菌通过与胞囊相互识别后,整个胞囊被致密的菌丝包围,胞囊内卵的胚胎发育停止和内容物凝集,甚至有的胞囊表面突起形成深褐色小液泡、破裂和溶解,进而致使胞囊生理活性受到严重的影响,这可能是该菌产生的某种毒素使其生理活性受到严重的影响,也可能是该菌产生具有杀线活性的代谢产物(几丁质酶、葡聚糖酶和蛋白酶等)使虫体溶解^[23-24]。Wharton 等^[25]研究表明线虫的胞囊或卵是防御土壤微生物侵入的有效屏障,主要由几丁质(约占 40%)和蛋白质构成,这可能是土壤微生物在侵染过程中产生的几丁质酶和蛋白酶等分解胞囊或卵壳。与孙漫红等^[26]报道的一些食线虫真菌和细菌体外可以产生具有杀线活性的代谢产物基本一

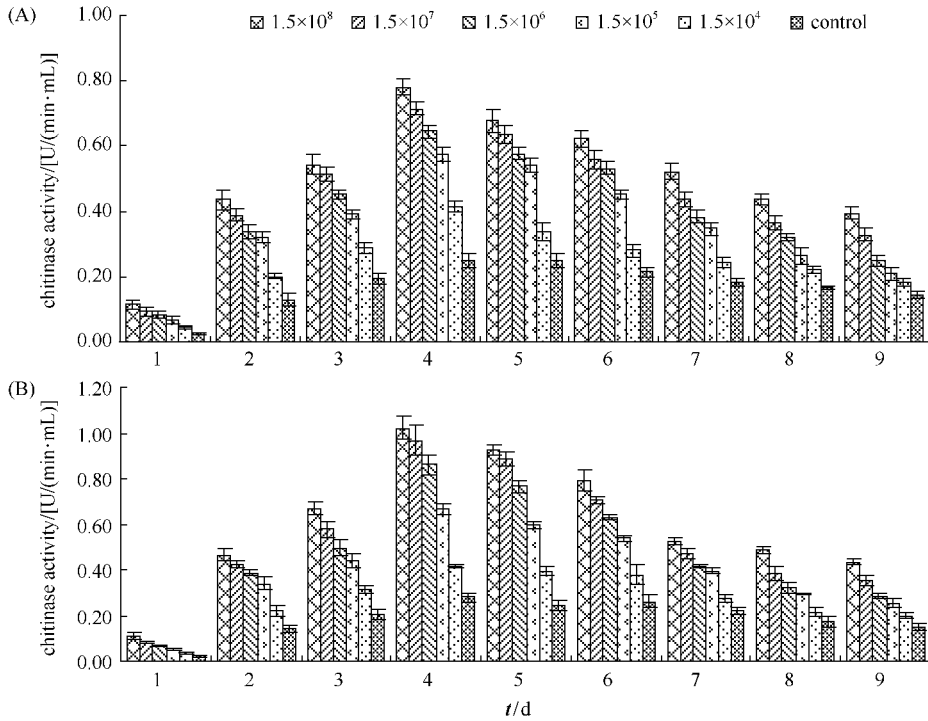


图 2. 胞囊和胶体几丁质对长枝木霉几丁质酶活性的诱导作用

Figure 2. The activity of *Trichoderma longibrachiatum* chitinase induced by nematode cysts and colloidal chitin. A: cyst; B: colloidal chitin. Small bars represent the standard errors of the means.

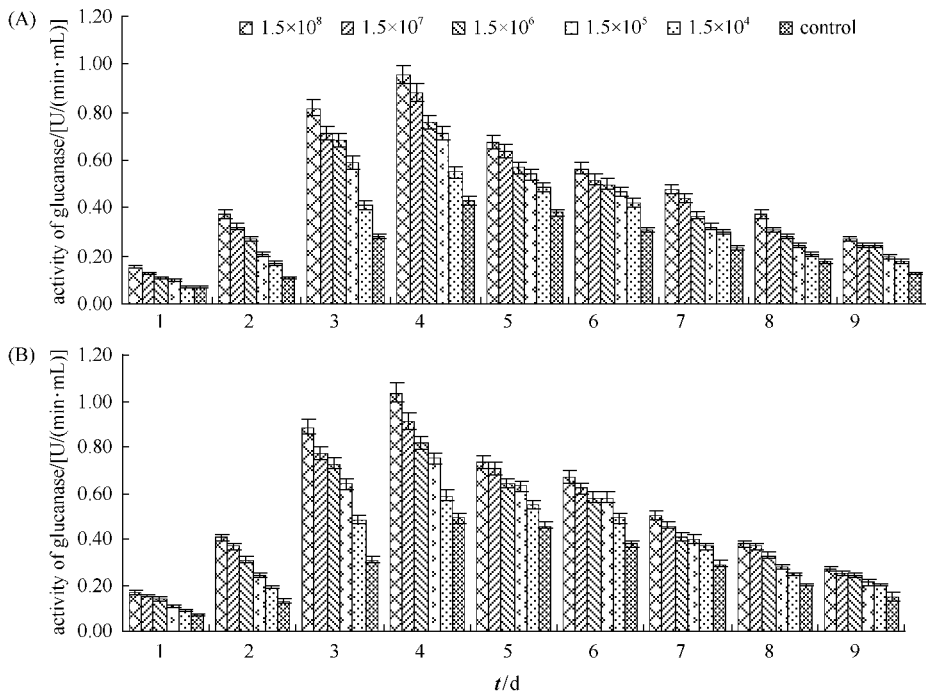


图 3. 胞囊和葡聚糖对长枝木霉葡聚糖酶活性的诱导作用

Figure 3. The activity of *Trichoderma longibrachiatum* glucanase induced by nematode cysts and glucan. A: cyst; B: glucan. Small bars represent the standard errors of the means.

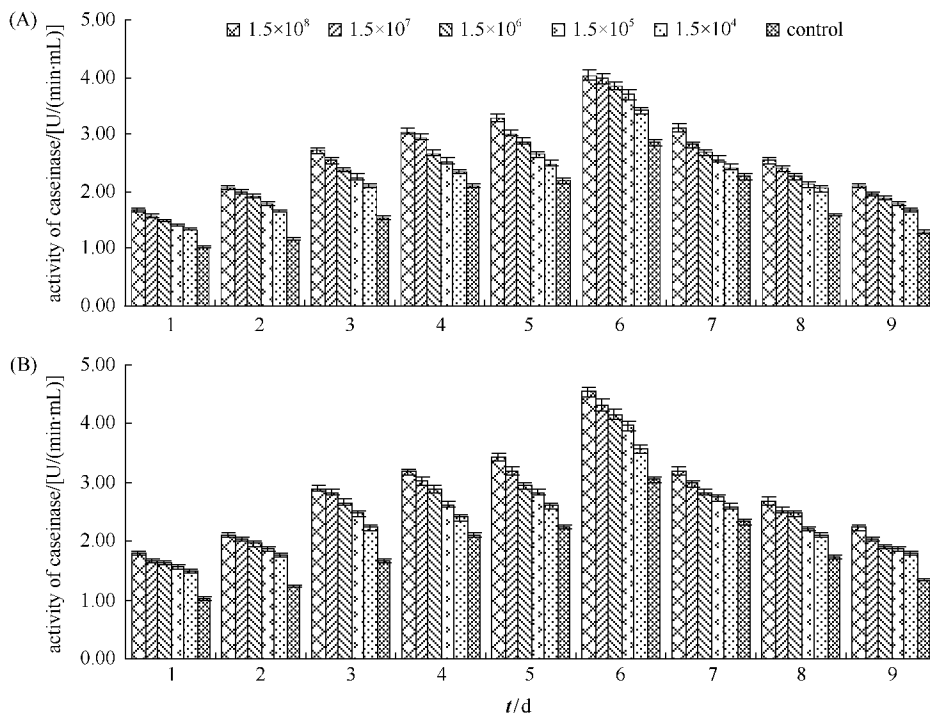


图 4. 胞囊和酪蛋白对长枝木霉酪蛋白酶活性的诱导作用

Figure 4. The activity of *Trichoderma longibrachiatum* caseinase induced by nematode cysts and casein. A: cyst; B: casein. Small bars represent the standard errors of the means.

致,例如厚垣普奇尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)产生的几丁质酶可使线虫卵停止孵化和发育^[27]。

3.2 长枝木霉对胞囊的寄生和致死作用

不同浓度长枝木霉孢子悬浮液对小麦禾谷胞囊线虫胞囊具有较强的寄生和致死作用,同时寄生和致死作用随着浓度的增大而增大,尤其浓度为 1.5×10^8 CFU/mL的长枝木霉孢子悬浮液在第18天对胞囊孵化的相对抑制率和寄生率最高。这与刘霆等^[28]研究结果基本一致,不同浓度绿色木霉发酵液对北方根结线虫卵囊活性的影响随着稀释倍数的增加而减小,原液对卵囊孵化的相对抑制率为99.45%。与杨树军等^[29]研究厚垣轮枝孢(*P. chlamydosporia*) LZ1菌株对云南烟草南方根结线虫的卵囊孵化抑制效果不一致,其对卵囊孵化的最高相对抑制率仅为67.53%,这可能与生防菌的种类、生防菌的作用机制、加入生防菌的剂量,以及生防菌的寄主范围等有关^[30]。

3.3 胞囊对长枝木霉菌产酶活性的影响

陈蕾蕾等^[31]报道表明木霉菌是重要的农业微生物资源,在植物病原菌和根结线虫的生物防治中发挥重要的作用,并且木霉菌在重寄生过程中能够

侵入或穿透宿主细胞,同时能够分泌大量的细胞壁降解酶(几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶、纤维素酶及脂酶等一系列水解酶)消解病原菌的细胞壁。同时前期研究表明几丁质、葡聚糖和蛋白质等是真菌菌丝生长所必需的,且几丁质、葡聚糖和蛋白质等是真菌细胞壁、线虫、昆虫卵和角质层等的主要成分之一^[32]。Sahebani等^[19]研究表明爪哇根结线虫卵和几丁质能够显著提高哈茨木霉几丁质酶的活性。此外,叶小波等^[33]研究表明木霉菌胞外蛋白酶在根结线虫的生物防治中发挥着重要作用。本试验结果与前期的研究结果基本一致,通过对不同浓度长枝木霉菌产几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性测定表明,寄生和致死作用主要通过诱导和提高长枝木霉菌产几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性,使胞囊破裂和溶解。

3.4 长枝木霉对胞囊的寄生和致死作用机制

据大量文献报道,木霉菌的抑菌作用机制主要包括竞争作用、重寄生作用、抗生作用和溶菌作用等方面^[15]。重寄生作用是木霉菌对病原菌的主要拮抗机制之一,通过与病原菌的识别、接触、缠绕、穿透和寄生等一系列过程,以及自身产生的真菌细胞壁

降解酶如几丁质酶和葡聚糖酶等溶解宿主细胞壁并渗透进入其细胞中,使病原真菌的生长受到抑制而死亡^[34]。Chet 等^[35]研究表明哈氏木霉(*T. hamatum*)和哈茨木霉(*T. harzianum*)产生的几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶可以使病原菌菌丝体溶解。本研究表明长枝木霉孢子悬浮液对胞囊的寄生和致死作用主要通过和胞囊接触后,胞囊能够诱导和提高长枝木霉菌产几丁质酶、葡聚糖酶和酪蛋白酶的活性,进而对胞囊达到一定的寄生和致死作用,最终使胞囊的细胞壁降解,导致胞囊内容物外渗,并使其致死,与前期的研究结果基本一致。

总之,长枝木霉孢子悬浮液在防治植物线虫病方面具有广阔的应用前景,但目前对于长枝木霉菌的研究还只是处于初级阶段,还有很多问题诸如其对入畜及植物的安全性、持久性和针对性等有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wang M, Peng D, Wu X. Studies on a cyst nematode wheat disease I. Identification of pathogen. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1991, 10 (4): 352-356. (in Chinese)
王明祖,彭德良,武学勤. 小麦胞囊线虫病的研究 I. 病原鉴定. 华中农业大学学报,1991,10(4):352-356.
- [2] Madzhidov AR. *Bidera filipjevin*. sp., (Heteroderina: Tylenchida) in Tadzhikistan. *Biologicheskie Nauki*, 1981, 83: 40-44.
- [3] Wang M, Yan J. Studies on a cyst nematode wheat disease II. Hatching of the nematode *Heterodera avenae*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1993, 12 (6): 561-565. (in Chinese)
王明祖,颜家坤. 小麦胞囊线虫病的研究 II. 病原燕麦胞囊线虫的孵化. 华中农业大学学报,1993,12(6): 561-565.
- [4] Rammah A. Cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in Morocco. *Arab and Near East Plant Protection Newsletter*, 1994, 19: 40.
- [5] Chen P, Wang M, Peng D. A study of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Wollenweber) in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1992, 22 (4): 339-343. (in Chinese)
陈品三,王明祖,彭德良. 我国小麦禾谷胞囊线虫(*Heterodera avenae* Wollenweber)鉴定研究. 植物病理学报,1992,22(4):339-343.
- [6] Fisher JM, Hancock TW. Population dynamics of *Heterodera avenae* Wollenweber in the South Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1991, 42: 53-68.
- [7] Liu W, Ma R, Yao X, Wang J, Wu Q. Preliminary studies on occurrence of cereal cyst nematode of wheat. *Journal of Triticeae Crops*, 2002, 22 (3): 95-97. (in Chinese)
刘文成,马瑞霞,姚献华,王景顺,吴秋芳. 小麦禾谷胞囊线虫病发生规律的初步研究. 麦类作物学报,2002, 22(3):95-97.
- [8] Chen P, Wang M, Peng D. Preliminary report of identification on cereal cyst nematode of wheat in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 1991, 24 (5): 89-91. (in Chinese)
陈品三,王明祖,彭德良. 我国小麦禾谷胞囊线虫(*Heterodera avenae* Wollenweber)的发现与鉴定初报. 中国农业科学,1991,24(5):89-91.
- [9] Ye W, Xu B, Peng, D, Huang W. Sequence and RFLP analysis of rDNA-ITS and 28S rDNA-D2D3 regions of *Heterodera avenae* on wheat from Gansu province in China. *Plant Protection*, 2010, 36 (3): 58-65. (in Chinese)
叶文兴,徐秉良,彭德良,黄文坤. 甘肃小麦禾谷胞囊线虫 rDNA-ITS 和 28S rDNA-D2/D3 区序列特征及 ITS-RFLP 分析. 植物保护,2010,36(3):58-65.
- [10] Xu C, Wu P, Lu Y, Xu G, Wu J. The control effect of several kinds of pesticides on celery root-knot nematode. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2006, 4 (2): 452. (in Chinese)
许长青,吴柏荣,卢跃文,徐根祥,伍建平. 几种药剂对芹菜根结线虫病防效试验. 浙江农业科学,2006,4(2):452.
- [11] Jatala P. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review Phytology Pathology*, 1986, 24: 453-489.
- [12] Zhu M, Zhang K, Li T, Xia Z, Yang S. Studying of microorganic nematicide for controlling tobacco-knot nematodes. *Journal of Yunnan University*, 2000, 22 (5): 369-372. (in Chinese)
祝明亮,张克勤,李天飞,夏振远,杨树军. 三种生物制剂对烟草根结线虫病防效研究. 云南大学学报,2000, 22(5):369-372.
- [13] Orth BR, Frei PH. Outbreak of invasive mycoses caused by *Paecilomyces lilacinus* from a contaminated skin lotion. *Annals of Internal Medicine*, 1996, 125: 799-806.
- [14] Mikami Y, Yazawa K, Fukushima K. Paecilotoxin

- production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. *Mycopathologia*, 1989, 108: 195-197.
- [15] Xu T, Liu L. Chitinases from *Trichoderma* spp. and their antagonism against phytopathogenic fungi. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32 (2): 97-102. (in Chinese)
徐同, 柳良好. 木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用. 植物病理学报, 2002, 32 (2): 97-102.
- [16] Liu L, Xu T. Induced chitinases from *Trichoderma harzianum* strains and their antagonistic activity against rice sheath blight pathogen. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33 (4): 359-363. (in Chinese)
柳良好, 徐同. 哈茨木霉几丁质酶诱导及其对水稻纹枯病菌的拮抗作用. 植物病理学报, 2003, 33 (4): 359-363.
- [17] Cai Z, Wu Q, Xu H, Zhou X, Zhang J. Advances on *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control. *Microbiology China*, 1998, 25 (5): 284. (in Chinese)
蔡芷荷, 吴清平, 许红立, 周小燕, 张菊梅. 木霉和粘帚霉的生物防治研究进展. 微生物学通报, 1998, 25 (5): 284.
- [18] 方中达. 植病研究方法. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [19] Sahebani N, Hadavi N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40: 2016-2020.
- [20] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31: 426-429.
- [21] Kery V, Kogan GZ. Hydrolysis of yeast cell wall glucan by extracellular- β -glucanases from *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology Technology*, 1991, 13 (1): 87-90.
- [22] Peng GL, Xue JL, Liu WM, Xie YP. Role of protease and chitinase of *Verticillium lecanii* in infecting scale insect cuticle. *Chinese Journal of Applied Environment Biology*, 2009, 15 (2): 220-225. (in Chinese)
彭国良, 薛皎亮, 刘卫敏, 谢映平. 蜡轮枝菌入侵蚧虫表皮过程中蛋白酶和几丁质酶的作用. 应用与环境生物学报, 2009, 15 (2): 220-225.
- [23] Sharon E, Chet I, Viterbo A, Bar-Eyal M, Nagan H, Samuels GJ, Spiegel Y. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 118: 247-258.
- [24] Pau CG, Leong CTS, Wong SK, Eng L, Jiwan M, Kundat FR, Aziz ZFBA, Ahmed OH, Majid NM. Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistic activity against *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2012, 14: 197-203.
- [25] Wharton D. Nematode eggshells. *Parasitology*, 1980, 81: 447-463.
- [26] Sun M, Liu X, Miao Z. Biological control of soybean cyst nematode. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16 (3): 136-141. (in Chinese)
孙漫红, 刘杏忠, 缪作清. 大豆胞囊线虫病生物防治研究进展. 中国生物防治, 2000, 16 (3): 136-141.
- [27] Zhang C, Wu X, Cai X. Effect of chitinases produced by *Pochonia chlamydosporia* on egg-hatching of *Meloidogyne incognita*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42 (10): 3509-3515. (in Chinese)
张成敏, 武侠, 才秀华. 厚垣普奇尼亚菌 *Pochonia chlamydosporia* 产生的几丁质酶对南方根结线虫卵孵化的影响. 中国农业科学, 2009, 42 (10): 3509-3515.
- [28] Liu T, Wang L, Duan Y, Chen L, Wang X. Effects of *Trichoderma viride* on egg hatching and juvenile mortality of *Meloidogyne halpa*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxi*, 2007, 29 (4): 567-569. (in Chinese)
刘霆, 王莉, 段玉玺, 陈立杰, 王雪. 绿色木霉对北方根结线虫的作用. 江西农业大学学报, 2007, 29 (4): 567-569.
- [29] Yang S, Xia Z, Li T, Li Y. Influence of two biocontrol fungus preparations on hatching of rhizosphere nematode eggs. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2001, 23 (3): 247-248. (in Chinese)
杨树军, 夏振远, 李天飞, 李云华. 两种生防菌剂对南方根结线虫卵孵化的影响. 西南农业大学学报, 2001, 23 (3): 247-248.
- [30] Kerry B. Biological control of nematodes: prospects and opportunities. //Maqbool MA, Kerry B. eds. Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO Plant Production and Protection Paper, 1997: 144, 79-92.
- [31] Chen L, Wang W, Zhu Q, Liu X, Du F. Research progress of extracellular proteases from *Trichoderma*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2010, 26 (3): 359-364. (in Chinese)
陈蕾蕾, 王未名, 祝清俊, 刘孝永, 杜方岭. 木霉胞外蛋白酶的研究进展. 中国生物防治, 2010, 26 (3): 359-364.

- [32] Takaya N, Yamazaki D. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. *Microbiology*, 1998, 144: 2647-2654.
- [33] Ye X, Zeng T, Jiang X. Research advances on enzymes for mycoparasitism of *Trichoderma*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2009, 25 (3): 276-280. (in Chinese)
叶小波, 曾千春, 蒋细良. 木霉菌重寄生过程中的酶学研究进展. *中国生物防治*, 2009, 25 (3): 276-280.
- [34] Xue B, Li J, Chen Y. Studies on antagonism of *Trichoderma* sp. against six pathogenic fungus and biological control. *Journal of Nanjing University*, 1995, 18 (1): 31-36. (in Chinese)
薛宝娣, 李娟, 陈永萱. 木霉菌 (TR-5) 对病原真菌的拮抗机制和防病效果研究. *南京农业大学学报*, 1995, 18 (1): 31-36.
- [35] Chet I, Baker R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizofetonia solani*. *Phytopathology*, 1981, 71: 286-290.

Parasitic and lethal action of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*

Shuwu Zhang^{1,2,3,4}, Bingliang Xu^{1,2,3,4*}, Yingyu Xue^{1,2}, Jia Liu^{1,3}

¹College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, ²Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, ³Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, ⁴Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To evaluate the potential of *Trichoderma longibrachiatum* spore suspension against *Heterodera avenae*. [Methods] The parasitic and lethal effects of *T. longibrachiatum* spore suspension against the cysts of *H. avenae* were studied *in vitro* and observed under microscope. [Results] Microscopic observation showed that the spore suspension of *T. longibrachiatum* parasitized on the cyst surface, germinated a large number of hyphae, and grew on the surface of the cyst at the initial stage. Later, the cysts were completely surrounded by dense mycelium, and the contents of digestion in cysts was lysed, even some cysts produced vacuoles, and some were split up and finally the cyst was dissolved by the metabolite of *T. longibrachiatum*. *In vitro* studies showed that high concentrations of *T. longibrachiatum* spores had strong parasitic and lethal effects on the cysts of *H. avenae*, and the probable mechanism of parasitic and lethal effects of *T. longibrachiatum* against *H. avenae* were mainly by inducing and increasing chitinase, glucanase and caseinase activity. The cysts were parasitized by 93.3% at 18 days, the hatching of cysts were inhibited by 93.6% at 10 days when treated with the concentrations (1.5×10^8 CFU/mL) of *T. longibrachiatum*. [Conclusion] *Trichoderma longibrachiatum* had strong parasitic and lethal effects on the cysts of *H. avenae*, and has the potential as a new biocontrol agent.

Keywords: *Trichoderma longibrachiatum*, *Heterodera avenae*, parasitic and lethal effects

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Grassland Ecological System of Ministry of Education and Key Laboratory Project (CY-GG-2006-013), by the Gansu Hall of Province Farming Herd Biology Technology (GNSW-2009-04) and by the Project of Education Department of Gansu Province (042-03)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-931-7631294; E-mail: xubl@gasu.edu.cn

Received: 17 October 2013/Revised: 27 January 2014