专论与综述

烟草根结线虫生物防治研究进展*

祝明亮[1] 张克勤[2] 夏振远[1] 李天飞[3]

（云南省烟草科学研究所 玉溪 653100）[1]
（云南大学省工业微生物发酵工程重点实验室 昆明 650091）[2]
（玉溪红塔烟草有限责任公司 玉溪 653100）[3]

摘要：简要介绍了烟草根结线虫生物防治生防资源收集、菌株筛选、制剂研制、生防菌相关生态学及分子标记的研究进展。

关键词：烟草根结线虫，生物防治，进展
中图分类号：Q93 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2004）06-0095-05

烟草根结线虫（*Meloidogyne* spp.）是许多国家烟草生产的限制因素之一，在我国各大烟区造成严重危害，且日趋严重，仅云南省发病面积就达40余万亩，病株造成烟叶减产30%～50%[1,2]。由于生产上缺乏抗性品种，复种指数高，化学杀线虫剂的使用受到限制等原因，使烟草根结线虫的生物防治受到广泛重视。我国在上世纪90年代初，由国内几家单位联合开展了烟草根结线虫生物防治的研究工作，经过十多年的努力，从资源收集、菌株筛选、剂型研制、生产技术、大田应用及土壤生态等方面进行大量研究，目前已研制出我国第一个以防治烟草根结线虫为主的线虫生防商品制剂—“线虫必克”，而另一个线虫生物制剂—“灭线灵”已进入最后审查阶段，并申请获得了多项国家发明专利[3]。现将烟草根结线虫生物防治研究简要介绍如下。

1 生防资源收集

生防资源的收集是开展生物防治的基础，目前已从植烟土壤及烟草根结线虫上分离了大量的根结线虫拮抗真菌。李天飞等[1]从烟草根结线虫病根及土壤中分离鉴定出5种捕食线虫真菌，节丛孢属的 *Arthrobotrys oligospora*、*A. cladodes*、*A. musiformis*，单顶孢属的 *Monacrosporium lysipaga*、*M. megalosporum* 及内寄生真菌轮枝菌属 *Verticillium* sp.。祝明亮等[4]从云南省28个县采集152个土样及发病烟根，利用直接分离法和诱集分离法分别从根结线虫卵囊、卵、雌虫和二龄幼虫分离到包括拟青霉属、镰刀菌属、轮枝菌属、木霉属、链格孢属、曲霉属、青霉属、柱孢菌属、钩丝孢属、茎点霉属、单顶孢属、节丛孢属、矛束孢属及一些不产孢的拮抗真菌400余株，其中淡紫拟青霉、厚垣孢普可尼亚菌、尖孢镰刀菌为分离频率最高，约占分离数的60%。

* 云南省“十五”攻关项目（No. 2001 NG08）
国家烟草专卖局科技项目（No. 110200101010）
科技部国家攻关项目（No.2002BA901A21）
收稿日期：2003-11-19，**修回日期**：2004-05-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2 菌株筛选

2.1 致病力测定 致病力测定是评价生防资源的基本方法，可从大量拮抗真菌中筛选出致病力较强的菌株供进一步试验。雷丽萍等[5]测定了 *A. oligospora*、*A. musiformis*、*A. cladodes*、*A. vermicola*、*M. lysipaga*、*M. megalosporum*、*M. mutabcle* 对南方根结线虫的致病力，并观察了它们的捕食过程。奚家勤测定了400余株根结线虫拮抗真菌对根结线虫卵的抑制率，其中轮枝霉属24株、拟青霉属33株、钩丝孢属4株菌对根结线虫卵的抑制率达到80%以上，其余菌株对卵的抑制率差异较大。杨树军等[6]测定了淡紫拟青霉 DZ1 菌株和厚垣孢普可尼亚菌 LZ1 菌株对云南烟草根结线虫南方根结线虫卵囊和分散卵孵化的影响，DZ1 对分散卵的相对抑制率达57.81%，LZ1 相对抑制率达27.5%，前者对卵囊孵化相对抑制率达60.38%，后者达67.53%。

2.2 温室盆栽试验 盆栽试验是在进行田间小区试验前检验生防菌株防治效果的重要步骤，可初步确定生防菌株的应用潜力。李 芳等[7]利用盆栽试验研究了淡紫拟青霉菌剂、杀线虫剂和日晒消毒土壤对烟草根结线虫病的防治效果及其对烟草植株生长的影响，结果表明，淡紫拟青霉能有效抑制烟草根结线虫的发生并促进植株生长，施用菌剂的植株病情指数比对照下降34%，根部和地上部植株鲜重、叶长和株高均有明显增加。

2.3 田间小区试验 田间小区试验是进行生物防治必不可少的环节，因其接近自然条件，其结果能客观证明生防菌株的防治效果。祝明亮等[8]通过田间小区试验，研究了3种微生物杀线虫剂 IPC，ZK7，Z412 对烟草根结线虫病的防治效果，从对烤烟的生物学性状、发病情况、经济学性状等方面进行了全面考察。从烟株生物学性状可以看出，不论是烟株株高、茎围，还是叶面积指数，不同处理均显示了一定的差异，尤其是3种微生物杀线虫剂对烟株的处理，其各项指标均优于生物农药阿巴丁及空白对照 CK 两个处理。3种微生物杀线虫剂处理对烟株生物学性状的影响以 Z412 为最佳，其次是 ZK7，最后是 IPC。从经济性状指标看，3种微生物杀虫剂处理的产量、产值、均价、上等烟比例及中上等烟比例都比生物农药阿巴丁要高得多，其中是 Z412 最高，ZK7 次之，IPC 再次之。结果表明，3种微生物杀线虫剂的防效均优于生物农药，其防治效果分别为61.7%，64.7%，70.5%。

2.4 大田示范应用 生防菌经过致病力测定、温室盆栽试验和田间小区试验初步确定对烟草根结线虫具有较好防效后，必须进行大田示范应用研究。大田示范是最直接反应生防菌剂防治效果的一种研究手段，由于其施用面积远远大于田间小区试验，其结果就更能有效评价生防菌剂的防治效果和应用潜力。雷丽萍等[9]报道了利用生防菌剂 IPC 和 VC 防治烟草根结线虫的大田效果。1995年施用生防菌剂后，1996和1997年不施用任何杀线剂，跟踪调查3年。调查结果显示，施用 IPC 和 VC 处理后，1995年到1997年的病情指数逐年降低，防治效果逐年提高，而施用化学杀线虫剂克线灵处理的病情指数则逐年升高，防治效果逐渐降低，结果说明，生防菌剂能定殖于土壤，具有持续防效，施用1年可多年防治。而化学杀线剂的作用则只能维持一年至两年，根结线虫对化学农药产生了抗药性，以后必须增施才有防治效果。祝明亮等报道了在云南省宜良县进行微生物杀线虫剂（ZK7）防治烟草根结线虫大田示范试验结果，表明使用该制剂防治烟草根结线虫病可取得较好的经济效益、生态效益和社会效益[10]。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

3 制剂研制

根结线虫生防菌剂以液体深层发酵生产，主要的菌剂剂型有浓缩液体制剂、纯孢子粉剂和复合固体粉剂3类。它们都是经过液体深层发酵后浓缩干燥加工制成。由于浓缩液体制剂和纯孢子粉剂对菌剂包装技术要求较高且产品货架期短等原因使用较少，目前主要以使用载体材料加工而成的复合固体粉剂作为生产剂型。

4 生防菌相关生态学研究

4.1 植烟土壤生态因子分析 在寄主植物—土传病菌—生防微生物之间的相互作用过程中，土壤环境控制着它们之间的最终作用结果。也就是说，一定的土壤环境决定了生长在其上植物的生长发育，决定了该植物土传病害的发生与否，也决定了该病原菌拮抗体的存在情况。可以说，土壤环境包含了自然界最复杂的生物与化学作用。土壤环境的生物因子和非生物因子，如土壤微生物、温度、湿度、质地、pH值、特定元素含量、有机质含量、重金属元素等对寄主植物—土传病害—生防微生物之间的相互作用都产生了巨大的影响。烟草根结线虫的生物防治同所有其他植物土传病害的生物防治一样，都必须对种植烟草的土壤生态环境具有充分的了解，才能更好为烟草土传病害的生物防治提供依据，才能最终解决生物防治防效不稳定、作用机制单一、防治范围较窄以及使用和生产技术不尽合理等问题。

祝明亮等[11]对云南省主要植烟区24个县共106个烟草根结线虫发病土样的研究发现，不同土样中真菌、放线菌总量相差达到2个数量级，细菌相差达到3个数量级，其土壤pH、有机质、碱解氮、有效P、速效K、Ca、Mg、Al等也表现出较大的差异，说明云南省烟草根结线虫发病土壤的各种生态因子存在明显的多样性和复杂性。这可能是生防菌防效不稳定的最主要原因，说明复杂的土壤生态环境要求生防菌具有较高的适应性。

4.2 生防菌在烟草根际的定殖 在土传病害生防实践中，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，这是生物制剂防治植物土传病害防效不稳定的重要原因之一[12]。因此，作为生防因子的生防菌能否在靶标植物根际定殖及其对植株根际微生物区系的影响已成为筛选、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能否实现产业化及商品化生产。

祝明亮等[13]通过盆栽实验研究了生防菌厚垣孢普可尼亚菌ZK7菌株在烤烟K326和云85根际的定殖情况及对根际微生物的影响。结果施入生物菌剂2周后厚垣孢普可尼亚菌能在烤烟外根际、根表分离到，但在根内不能分离到或分离数极少，在4周、6周时外根际、根表的分离数达到最大，根内分离数仍很少，8周时分离数又减少。制剂处理后烤烟根际细菌、真菌和放线菌数量在2周时明显减少，4周时有所回升，6周和8周时与对照达到平衡。结果表明厚垣孢普可尼亚菌可以在烟草外根际、根表定殖，初期对土壤微生物具有一定的抑制作用。

祝明亮利用光学显微镜和扫描电子显微镜观察了生防菌ZK7和IPC菌株在烟草根表和根内的定殖部位和定殖方式、生长和繁殖等。结果表明，生防菌ZK7和IPC菌株都能以菌丝方式稳定定殖于烟草根表不同部位，而在根内的定殖仅局限于表皮层较深的细胞组织，但不能侵入烟根的韧皮部和木质部组织。它们的菌丝能穿过甚至生长于

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表皮和皮层细胞壁而不引起任何植物细胞的破坏，结果表明它们并不是烟草根上的病原菌，而更类似于菌根菌与植物间的共生关系。

4.3 生防菌对化学农药的抗性 在许多农业系统中，生防菌剂同农用化学品的兼容性是保证其防效的一个重要特性。农用化学品中尤其常用化学农药对生防菌剂的防效具有重要影响，其原因是在生防实践中，由于单一的防治方法并不能有效控制危害，一些新型化学农药还将在一定时期内发挥其重要作用，而且由于一些地方长期大量使用巨毒、难降解的化学农药造成土壤中农药的残留，此外，植物在受到其他病原物如真菌、细菌和病毒等的危害时，需要使用其他化学药剂来控制其病害，所有这些因素都要求生防菌对化学农药具有一定的兼容性。

祝明亮测定了6种常用化学农药对生防菌ZK7和IPC孢子萌发、平板抑制作用和液体培养生物量的影响。结果表明，2株生防菌对低浓度的6种药剂均存在抗性，不同菌株对不同药剂的抗性表现出差异。其中多菌灵和甲基托布津对2株生防菌的抑制作用最大，其次是克百威和涕灭威，辛硫磷和雷多米尔抑制作用最小。

4.4 生防菌土壤抑菌作用 Dobbs和Hinson在1953年最早提出了土壤抑菌作用（fungistasis）的概念，它是指土壤中或同土壤相接触的微生物繁殖体的萌发受到抑制的现象。抑菌作用对细菌、放线菌、真菌都存在，但以真菌最为敏感。土壤抑菌作用可以使真菌孢子在土壤中保持休眠状态而存活更长时间。由此说明土壤抑菌作用可能是土传病害生防菌剂防效不稳定的重要原因之一。对于土传病害生防菌来说，往往要求它能够在土壤和植物根部定殖及繁殖，这就需要克服和解除土壤对生防菌的抑菌作用。

祝明亮测定了云南省24个县代表性土样对生防菌ZK7和IPC菌株平板培养孢子和发酵培养孢子的土壤抑菌作用，结果不同土样普遍存在土壤抑菌作用，且土样间和不同菌株抑菌作用有差异，发酵液孢子萌发率高于平板孢子萌发率。并研究了7种抗生素、8种有机物添加物和6种化学农药对2株生防菌土壤抑菌作用的解除，结果表明添加7种抗生素、6种化学农药和米糠、蚕豆秸杆、玉米秸杆和烟草秸杆能有效解除生防菌抑菌作用[13]。

5 生防菌分子标记

在生物防治过程中，所有生防制剂迄今仍有两大难题没有解决：一是田间接种效果不稳定，且随土壤类型的不同而有很大差异；二是所接菌株的存活量难以达到要求。存在这些问题的原因是缺乏对生防菌生态学知识的充分了解。解决这两个难题的关键是必须实现对生防菌在自然环境中的快速检测及明确作为生防制剂的生防菌在田间的定殖、存活及消长规律等生态学问题。随着分子生物学技术的快速发展，特别是分子标记和基因标记技术的建立与成熟，为我们对生防菌进行特殊标记提供了有效手段。通过分子标记和基因标记的生防菌释放到自然环境后，我们可以根据生防菌携带的标记基因或特定分子标记进行快速检测及生态学研究，准确掌握生防菌在自然环境中的定殖、生长及繁殖等活动规律，为生防制剂的开发利用提供理论依据，并最终发挥生物防治在病虫害综合治理中的重要作用。

祝明亮通过随机扩增DNA多态性（RAPD）、基因间区（IGS）、肠杆菌基因内重复共有序列（ERIC）、基因外回文重复序列（REP）和BOX元件等PCR扩增技术对生防菌ZK7和IPC菌株及同种或相近的对照菌株进行了分子指纹分析。用RAPD技术分别扩增

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

了生防菌 ZK7 和 IPC 菌株的 4 个特异性 DNA 片断，分别根据 4 个特异性 DNA 片段序列设计其 SCAR-PCR 引物，该引物能分别特异性扩增 ZK7 和 IPC 菌株的特异性分子标记。探针杂交的方法也证明 4 个分子标记对 2 株生防菌的高度特异性。结果表明，4 个分子标记分别对 ZK7 和 IPC 菌株具有高度特异性，SCAR-PCR 和 DNA 斑点杂交技术可用于对生防菌的快速检测及相关生态学研究。

6 结语

烟草根结线虫的生物防治从资源调查、高效生防菌株的筛选、菌剂研制及田间应用技术等方面已进行了大量研究，并在云南省烟草根结线虫的控制上初步取得了一定的成效。但是，由于生防菌株受到复杂土壤生态因子的影响，生防菌剂防效的稳定性仍然得不到保证，其原因一方面是缺乏高效稳定的生防菌株，另一方面是对生防菌施入土壤后的许多生态学问题缺乏了解。因此，根结线虫生物防治必须利用现代生物技术筛选构建高效、稳定、多功能的生产菌株，同时加强生防菌定殖、消长规律及土壤抑菌作用等生态学问题的研究，只有彻底解决了这些基础理论问题，根结线虫的生物防治才有望取得突破性的进展。

参考文献

[1] 李天飞，雷丽萍，杨 铭．中国烟草，1994，**1**：22～24.
[2] 杨 铭，秦西云，段玉琪，等．中国烟草，1995，**3**：10～15.
[3] 祝明亮，李天飞，张克勤，等．微生物学通报，2004，**31**（1）：111～114。
[4] 祝明亮，奚家勤，张克勤，等．云南大学学报（自然科学版），2004，**26**（2）：74～78。
[5] 雷丽萍，李天飞，杨 铭．中国烟草，1994，**3**：25～27.
[6] 杨树军，夏振远，李天飞，等．西南农业大学学报，2001，**23**（3）：247～248.
[7] 李 芳，张绍升，陈家骅．福建农业大学学报，1998，**27**（2）：196～199.
[8] 祝明亮，张克勤，李天飞，等．云南大学学报（自然科学版），2000，**22**（5）：369～372.
[9] 雷丽萍，李天飞，余 清，等．中国烟草科学，1998，**3**：30～32.
[10] 祝明亮，夏振远，张克勤，等．烟草科学研究，2001，增刊：72～74.
[11] 祝明亮，李天飞，夏振远，等．中国烟草学报，2003，**9**（4）：30～34。
[12] 孙漫红，刘杏忠，唐 霖．菌物系统（原真菌学报），1997，**16**（2）：149～154.
[13] 祝明亮，张克勤，李天飞，等．微生物学通报，2002，**29**（2）：5～8.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn