

捕食线虫真菌对松材线虫捕食率测定的新方法

魏志艳¹ 刘雪峰^{1*} 王伟¹ 杨民宝¹ 刘长明²

(1. 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室(东北林业大学) 哈尔滨 150040)

(2. 浙江省宁海县林特技术推广总站 宁海 315600)

摘要: 本文依据捕食线虫真菌的捕食特性以及松材线虫的生长习性,对松材线虫进行了定时、定量的测定试验,试图通过培养后线虫的种群数量变化,来摸索定量测定捕食率的方法。在漏斗法基础上进行了相应的改进,成功地摸索出3种方法捕食率测定的新方法。各方法各具优缺点,滤膜镜检法和双层镜检法的数据更精确,条切镜检法和漏斗法所测数值较粗略。因此,可依据实验的侧重点以及实验所需的精密程度,而采用最适宜的方法进行捕食率测定实验。

关键词: 捕食线虫真菌, 松材线虫, 捕食率, 方法

The New Testing Methods of Nematode-trapping Fungi to Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*

WEI Zhi-Yan¹ LIU Xue-Feng^{1*} WANG Wei¹ YANG Min-Bao¹ LIU Chang-Ming²

(1. Key Laboratory Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry Of Education(Northeast Forestry University), Harbin 150040)

(2. Ninghai Forestry Extension & Forestry Specialty Station of Zhejiang, Ninghai 315600)

Abstract: According to the predacity of the nematode-trapping fungi and the growth habit of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, this paper tested the *B. xylophilus* that cultured by the fixed time and quantities. Trying to find out the quantificational test method of trapping rate, by the change of the quantities of *B. xylophilus*. Three new methods of testing trapping rate were obtained successfully basing on the improvement of Baermann funnel method. Each method had advantage and disadvantage, Filter membrane and Double layer microscopic examination method were more precise, and bar-cutting microscopic examination and Baermann funnel method were more imprecise. Therefore, according to the emphasis point of experiment and precision degree of the test, the more suitable method for the test of trapping rate could be chosen.

Keywords: Nematode-trapping fungi, Pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, Trapping rate, Method

捕食线虫真菌是一种利用捕食器捕捉线虫的真菌^[1]。1839年Corda首先发表了节丛孢属的一些种类;1888年德国科学家Zopf对少孢节丛孢利用三维菌网

捕食线虫的全过程进行了详细地描述;1933年美国科学家Drechsler发现,捕食线虫真菌在弱营养培养基上也能生长,在线虫的诱导下,可以产生捕

食器^[2]。

松枯萎病的病原——松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*), 是使世界全世界学者、专家都头疼的一类微型动物。目前, 虽有一些化学药剂能在一定程度上减松材少线虫对松树的危害, 但还没有找到能彻底防治松枯萎病的方法或手段, 现在, 利用天敌捕杀线虫的生防技术引起一些科学家们的高度重视。Saiki等(1984)进行了用节丛孢(*Arthrobotrys* sp.)防治松材线虫的实验^[3], 肯定了节丛孢防治松材线虫的效果, 但捕食率的大小没能统计出来^[4]。

捕食率测定试验结果是否准确, 会直接影响到生物杀线虫剂的筛选和开发利用。因此, 对捕食前后线虫种群数量变化的精确统计是至关重要的一步。1917年Baermann设置了贝尔曼漏斗法和浅盘法来分离线虫, 这两种方法设备简单, 被广泛使用, 有人将其作为对线虫捕食率的测定方法, 但也存在一些弊端^[2]。结合贝尔曼漏斗法, 作者摸索出3种捕食线虫真菌对松材线虫捕食率测定的新方法, 现总结如下。

1 试验材料

松材线虫: 2006年分离于江苏省宁海市, 材线虫枯萎病黑松(*Pinus thunbergii*)病木上。

菌种: 叶状枝节丛孢(*Arthrobotrys cladodes* Drechsler)、拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis* sp.)来源同上, 分离纯化后接种于斜面中4℃冰箱内保存。

CMA培养基: 玉米粉20g, 加水适量, 微火煮沸30min, 双层纱布过滤。冷却后补足水量至1000mL, 琼脂粉15g(凝胶强度>780g/cm²)。

水琼脂培养基: 30g琼脂, 1000mL水。

2 试验方法

真菌的培养: 准确将10mL无菌的CMA培养基倒于直径为60mm的培养皿中, 厚度为5mm。待培养基凝固且无水滴时, 用直径为5mm的打孔器切取捕食线虫真菌及拟盘多毛孢菌饼, 接种于培养皿的正中心, 待菌落长满后, 25℃下培养7d。

松材线虫悬液的制备: 将用拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis* sp.)培养好的松材线虫, 在无菌的条件下, 用贝尔曼漏斗法洗脱出来并配成5000条/mL的悬浮液。

下述方法每皿均定量滴加50条线虫, 每处理设3次重复, 并分别以接有等量线虫于拟盘多毛孢平

板上作对照, 滴加线虫1d后每隔12h测量1次线虫存活的数量及产卵量, 本文采用第7天数据为例做以分析。

捕食率的计算公式为:

$$\text{捕食率} = \frac{\text{对照线虫数} + \text{对照卵数} - \text{培养后卵数}}{\text{对照线虫数} + \text{对照卵数}} \times 100\%$$

2.1 漏斗法(Baermann funnel)

在无菌的条件下, 用直径为5mm的打孔器切取捕食线虫真菌菌饼, 接种于直径60mm盛有CMA平皿的正中心, 7d后将线虫悬浮液滴加于培养好的菌落中央, 封口后置于25℃培养箱中待测, 洗脱方法采用贝氏曼漏斗法, 线虫洗脱、浓缩后在光学显微镜下观察并计数。

2.2 条切镜检法(Cut-bar)

见图1、图2。在培养好的菌落表面均匀地切除4条宽0.6cm的培养基, 使皿中形成带状观察窗, 窗与窗间隔0.6cm; 将线虫悬液滴在最中心的2个观察窗中, 封口后置于25℃培养箱中避光培养, 7d后在超净工作台中将培养皿盖打开, 用解剖镜进行目测存活的线虫数量, 测量后继续封口培养。

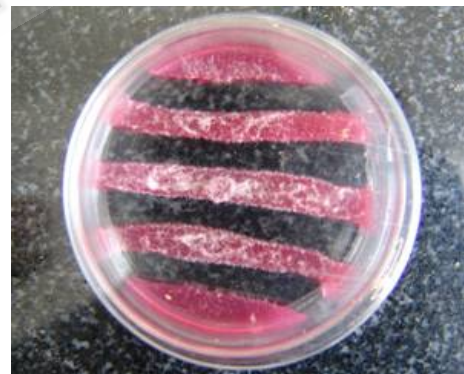


图1 条切镜检法

Fig. 1 Cut-bar



图2 条切镜检法纵切图

Fig. 2 Slitter graph of cut-bar

2.3 滤膜镜检法(Filter membrane)

见图3、图4。将孔径为5μm~7μm的滤膜放入装有CMA培养基(未灭菌)的100mL三角瓶中, 1×10⁵ Pa湿热灭菌30min; 灭菌后, 在超净工作台趁热将滤膜捞出, 迅速铺在水琼脂培养基表面, 要求与

皿壁无空隙、无气泡,冷却且无水滴后即可按照上述方法培养捕食线虫真菌;菌落长满后,将线虫悬液滴于菌落中央;计数时,用记号笔将培养皿背面划分成4个条形的区域,在超净工作台中解剖镜下观测存活的线虫数量,测量后继续培养。第一次计数后每隔3 d向所测皿中滴入0.5 mL无菌水,使滤膜充分湿润。

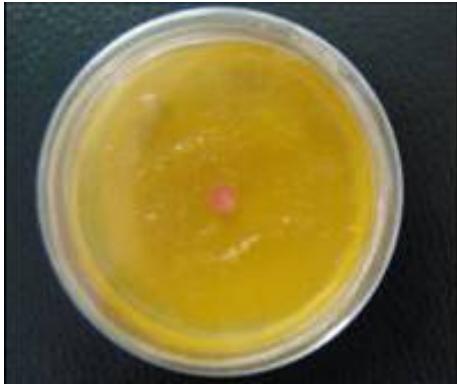


图3 滤膜镜检法

Fig. 3 Filter membrane



图4 滤膜镜检法纵切图

Fig. 4 Slitter graph of filter membrane

2.4 双层镜检法(Double microscopic-exam)

在无菌的条件下,准确将10 mL未凝固的水琼脂培养基倒于直径为60 mm的玻璃培养皿中,厚度为5 mm;待下层培养基冷却后,量取1 mL CMA培养基倒于水琼脂培养基表面,待培养基凝固且无水滴时,再用上述方法培养捕食线虫真菌;线虫悬浮液滴于菌落中央,计数方法与滤膜镜检法相同,测量后继续培养。

3 结果与讨论

4种方法最初均定量50条松材线虫,但7 d后线虫的种群变化各不相同。漏斗法的产卵量不计,捕食率高达67.00%;滤膜镜检法和双层镜检法的捕食率次之;条切镜检法的捕食率次最低。

由于方法间线虫数量不显著,因此造成捕食率差异的主要因素为产卵量的多少,所测的产卵量越多,说明其方法越接近真实值,越准确。

表3中可见,方法1和2,1和3,1和4,2和4之间有显著差异,说明双层镜检法与其他3种方法之间均有显著差异,并且其均值最大,为26,因此该方法为最佳的捕食率测定方法;方法2和3之间差异不显著,而方法2的均值大于方法3,说明滤

表1 线虫种群的变化及捕食率

Table 1 The population change and trapping rate of nematodes

方法 Method	数量 Number	线虫活虫数(条) Number of live nematodes(nematode)	产卵量(粒) Fecundity (egg)	对照线虫活虫数(条) Number of control live nematodes(nematode)	对照产卵量(粒) Control fecundity(egg)	捕食率(%) Trapping rate(%)
Baermann funnel		67	0	203	0	67.00
Cut-bar		93	4	161	20	46.40
Filter membrane		76	7	165	38	59.51
Double microscopic-exam		81	26	171	53	53.28

表2 线虫活虫数及产卵量的方差分析表

Table 2 The variance analysis of the number of live nematodes and fecundity

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	显著水平 Significant level	
线虫数 Number of nematodes	重复间	406.5	2	203.25	1.432	0.3101
	处理间	1058.25	3	352.75	2.486	0.1579
	误差	851.5	6	141.9167		
	总变异	2316.25	11			
产卵量 Fecundity	重复间	14	2	7	1.4	0.317
	处理间	1196.25	3	398.75	79.75**	0
	误差	30	6	5		
	总变异	1240.25	11			

表3 方法间产卵量的多重比较

Table 3 The multiple comparison of fecundity among different methods

方法编号 Method no.	处理 Treatment	均值 Mean	5%显著水平 Significant level 5%
1	Baermann funnel	26	a
2	Cut-bar	7	b
3	Filter membrane	4	bc
4	Double micro- scopic-exam	0	c

膜镜检法要优于条切镜检法; 方法3和4之间差异不显著, 且方法4均值最小, 仅为0, 说明条切镜检法要优于漏斗法, 漏斗法在4种方法中最不精确。

本文所述的4种方法各具优缺点, 漏斗法相对于其他3种方法计数较粗略, 因洗脱过程中线虫容易缠在滤纸上, 或由于洗脱时间较长, 充水较深, 导致缺氧, 部分线虫会死亡, 并且此法无法洗脱出线虫卵, 故产卵量无法计数, 但是线虫繁殖过程中, 卵数是很重要的指标, 忽略后势必影响测量结果, 因此, 所测数据只是粗略的数值, 且每次洗脱之后的皿不可以再用, 需做大量的重复, 工作量大, 但其培养基只有一层, 操作简单, 洗脱出的线虫比较集中, 计数快, 节省时间。因此, 该方法可在一些不计产卵量的较粗略测量试验中使用。而其余3种方法均可计数产卵量, 但仍各具特点, 采用时应视情况而定。莫明和等结合贝尔曼漏斗法, 用双层5% CMA 培养基测量捕食效果, 底层和上层培养基的琼脂含量分别为2.6%和0.8%^[5], 但存在和漏斗法同样的缺陷。

条切镜检法的优点是线虫大多集中在观察窗中活动, 培养基上的较少, 便于观察; 缺点是由于松材线虫具有较强的穿透能力, 少部分线虫钻进培养

基深处, 使测量数据不够准确。所以此法更适合于腐生性线虫的捕食率测定试验或较粗略的寄生性线虫的捕食率测定试验。滤膜镜检法的优点是线虫比较集中, 计数快, 节省时间; 缺点是因滤膜为胶质材料, 所以在短时间内容易丧失水分, 需定时向皿中注入无菌水, 比较繁琐。双层镜检法的优点是线虫均在视野范围之内; 皿内水分不易丧失。缺点是线虫活动范围稍大, 目测时间太长, 造成污染的几率比较大。

滤膜镜检法和双层镜检法均克服了线虫穿透的弊端, 较适于对松材线虫捕食率的测定。从本次试验测量活虫数量和产卵量的过程来看, 滤膜镜检法和双层镜检法的数据更可靠, 接近 *A. cladodes* 对松材线虫的捕食率的真实值, 而漏斗法使结果偏大, 条切镜检法偏小。

参 考 文 献

- [1] 张克勤, 周 薇, 何世川. 中国的捕食线虫真菌. 真菌学报, 1991, 10(2): 132-140.
- [2] 李飞天, 张克勤, 刘杏忠. 食线虫菌物分类学. 北京: 中国科学技术出版社, 2000, pp. 12-19.
- [3] Saiki H, Saito T, Yoneda K, *et al.* Biological control of the pine-wood nematode [of *Pinus densiflora*] by spraying a nematode-trapping fungus. *J Jpn For Soc*, 1984, 66(1): 30-32.
- [4] 杨宝君, 潘宏阳, 汤 坚, 等. 松材线虫病. 北京: 中国林业出版社, 2003, p.125.
- [5] 莫明和, 周 薇, 赵明莲, 等. 节丛孢属丝孢菌对松材线虫和拟松材线虫的捕食. 微生物学通报, 2002, 29(3): 13-16.