

莲子草假隔链格孢 SF-193 菌株的复壮对其产孢量和致病性的影响

聂亚锋¹, 刘长河², 李庆辉², 刘永锋¹, 刘卹洲¹, 陈志谊¹

¹江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏 南京 210014; ²南京农业大学植物保护学院,江苏 南京 210095

摘要:【背景】莲子草假隔链格孢是空心莲子草的重要生防菌,但长时间保存或继代培养会导致该菌株产孢量和致病性显著下降。【方法】通过对初始菌株回接、分离、纯化和鉴定相继获得复壮一代和二代菌株,分别在3、6、9 d后对初始菌株、复壮一代和二代菌株进行产孢培养,比较其产孢量;同时比较分析了这3代菌株的液体发酵原液和1:10 稀释液对空心莲子草的防除效果。【结果】获得了10株复壮一代和10株复壮二代菌株,20株菌对空心莲子草均有致病作用,且产生的分生孢子形态特征与初始菌株一致。与初始菌株相比,复壮菌株的产孢量显著提高且达到最大产孢量的时间显著短于初始菌株。其中,复壮二代菌株的孢子量是初始菌株的4.8倍,其次为复壮一代菌株,产孢量是初始菌株的4.1倍;复壮菌株达到最大产孢量的时间为3 d,初始菌株为6 d。复壮菌株一代和二代的原液对空心莲子草的致病性分别比初始菌株提高了4.65%和9.82%,1:10 稀释液的致病性分别提高了25.79%和16.55%。【结论与意义】对长期保存或继代培养的空心莲子草生防菌复壮可显著提高其产孢量和致病性,对维持生防菌遗传性状的稳定性和提高对空心莲子草的防效具有重要意义。

关键词: 空心莲子草; 莲子草假隔链格孢; 复壮; 产孢; 致病性

Effect of renovation of *Nimbya alternantherae* SF-193 on conidia production and pathogenicity to *Alternanthera philoxeroides*

Ya-feng NIE¹, Chang-he LIU², Qing-hui LI², Yong-feng LIU¹, You-zhou LIU¹, Zhi-yi CHEN¹

¹Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China;

²College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: 【Background】 *Nimbya alternantherae* has been considered an important biocontrol agent of *Alternanthera philoxeroides*. The capacity of conidia production and pathogenicity of the fungus had been reduced because of subculture or preservation for long periods in the lab, causing potential problems for its use in biological control projects. 【Method】The rejuvenations of *N. alternanthera* SF-193, first and second generations were obtained by the process of inoculation, isolation, purification and identification. Conidial production of the initial and the rejuvenated strain was investigated after conidial cultivation for 3, 6, 9 days. The efficiency of *A. philoxeroides* treated by the initial and the rejuvenated strains was evaluated in the field. 【Result】Ten rejuvenated first generations and ten second generation isolates were obtained. All of the rejuvenated isolates could cause foliar and stem necrosis of *A. philoxeroides* and the morphological character of conidia of rejuvenated isolates were the same as that of the initial isolate. Compared to the initial isolate, the conidial yield of rejuvenated isolate increased remarkably, and the time to peak conidial yield of rejuvenated isolate was shortened sharply. The rejuvenated second generation showed the highest conidial yield and was about 4.8 times more likely to produce conidia than the initial isolate. The times to peak conidial yield between the initial and rejuvenated isolates were 3 and 6 days, respectively. Under field conditions, the level of disease severity of *A. philoxeroides* by mycelia-blended suspensions of first generations and second generations without dilution were increased by 4.65% and 9.82% and also by 25.79% and 16.55% after mycelia-blended suspensions diluted 1:10 (V/V) with water, compared to the original isolate. 【Conclusion and significance】 It is important to sustain the genetic stability of *N. alternanthera* SF-193 and improve the efficiency of bio-control isolate against the weed by periodically rejuvenating the fungal isolates which were sub-cultured or preserved for long periods in the laboratory.

Key words: *Alternanthera philoxeroides*; *Nimbya alternantherae*; rejuvenation; conidia production; pathogenicity.

空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb 为多年生宿根草本植物,是入侵我国的一种恶性杂草,2003 年被中华人民共和国国家环境保护总局列入公布的“中国第一批外来入侵生物名单”。其特有的生态适应性和强大的繁殖力对农业生产、航道运输、生态系统和环境景观等产生了严重的危害(付文竹等,2006;沈国军等,2005)。目前,我国对空心莲子草的防治主要以化学防治为主,但化学药剂的大量使用造成了一系列环境问题。因此,人们开始探索利用病原真菌防治空心莲子草的方法。

国内外已成功筛选获得多种能够开发为真菌除草剂的潜在致病菌,如镰刀菌 *Fusarium* sp. (庄义庆等,2008; Tan *et al.*, 2002)、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (谭万忠和顾春燕,1992)、莲子草尾孢 *Cercospora alternantherae* Ellis & Langl. (Barreto & Torres, 1999) 和莲子草假隔链格孢 *Nimbya alternantherae* (Holcomb & Antonopoulos) Simmons & Alcorn (陈志谊等,2007; 向梅梅等,2002; Barreto & Torres, 1999; Pomella *et al.*, 2007) 等,其中,莲子草假隔链格孢是研究较为深入的空心莲子草致病真菌,具有开发潜力(向梅梅等,2002; Barreto & Torres, 1999)。然而,莲子草假隔链格孢 SF-193 与其他真菌一样,保存一定时间或继代培养多次后,菌种会出现老化衰退现象,导致产孢量和致病力等显著下降。目前,退化菌种复壮的方法有培养基筛选复壮法、宿主体内复壮法、原生质体分离法、组织分离法和遗传育种法等,利用这些方法分别对玉米小斑病菌 *Helminthosporium maydis* Nisikadoet Miyake、细脚拟青霉菌 *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson、双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (Lge.) Sing 等菌株进行复壮,可获得优良的菌株(崔迎等,2010; 樊晓琳等,2010; 黄基荣,1994; 李秀丽等,2008)。本文通过对室内保存2年的初始菌株进行回接复壮,获得莲子草假隔链格孢 SF-193 的复壮菌株,测定复壮菌株的产孢能力及其在田间对空心莲子草的控制效果。

1 材料与方法

1.1 初始菌株来源与培养基

供试初始菌株为江苏省农业科学院植物保护研究所生防研究室分离保存2年以上且产孢量和致病性下降的莲子草假隔链格孢 SF-193。

CA 培养基:胡萝卜 800 g、琼脂 20 g,纯净水定容至 1000 mL, pH 7.0。

PSA 培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 15 g,纯净水定容至 1000 mL, pH 7.0。

1.2 复壮菌株的分离与鉴定

1.2.1 初始菌株 SF-193 的培养与接种 将初始菌株 SF-193 菌丝块移入 PS 培养液中, 28 °C、150 r · min⁻¹ 培养 4 d, 用搅拌器将其粉碎 1 min (Waring Blender 8011S), 作为喷雾原液。按照 1:5 的比例稀释, 将其喷雾接种至田间健康的空心莲子草植株上, 7 d 后分别从叶片和茎秆上随机采集 5 个病样。

1.2.2 复壮菌株的分离、纯化 复壮菌株的分离、纯化参考方仲达(1998)的方法。用纯净水将病样冲洗干净并浸泡 2~3 h, 在病健交界处取边长约 5 mm 的病组织块, 在 75% 酒精中浸泡 30 s, 0.1% 升汞水溶液中浸泡 3~5 min, 用无菌水换洗 3 次。将病组织移入含 50 μg · mL⁻¹ 卡那霉素的 PSA 平板上, 28 °C 培养 3 d, 用灭菌的手术刀片切取菌落边缘的菌丝, 接入 PSA 斜面, 分离获得的菌株为复壮一代。对复壮一代菌株进行室内致病性测定, 选择复壮一代致病性最强的菌株, 按上述方法继续培养回接、分离和纯化, 获得复壮二代菌株。

1.2.3 复壮菌株的鉴定 取活化复壮菌株的菌丝块(直径 3 mm)接入室内培养的空心莲子草叶片上, 以初始菌株为对照, 30 °C 培养 3 d 后观察发病情况, 并测量病斑直径; 同时对初始菌株和复壮菌株做产孢培养, 显微观察分生孢子形态特征。每个处理设 3 次重复。若复壮菌株对空心莲子草有致病性且与初始菌株的分生孢子形态特征一致, 则确定其为出发菌株 SF-193 的复壮菌株。

1.3 产孢培养

将复壮菌株一代、二代和初始菌株接入 CA 培养基中, 在 25 °C、黑光灯照度 195~210 lx 的条件下分别培养 3、6、9 d, 每个菌株在各培养时间设 3 次重复。光照后保持黑暗 12 h (聂亚锋等, 2009), 参照郑小波(1997)的方法调查产孢量。每个产孢平板上加无菌水 10 mL, 用灭菌的毛笔轻轻洗落孢子, 过滤、摇匀孢子液, 分别吸取 10 μL 孢子悬浮液, 在灭菌的载玻片上划线至孢子悬浮液全部加到载玻片上, 在 10 × 10 倍视野下记录 10 μL 孢子悬浮液中所有孢子的数目, 计算产孢量。吸取、摇匀

孢子液 10 μL,滴在载玻片上,显微观察、拍照。

1.4 SF-193 复壮菌株在田间对空心莲子草的致病性

在空心莲子草生长茂盛区划分 24 个 4 m² 的小区,分别用 SF-193 初始菌株、复壮一代和二代菌株进行喷雾处理,喷雾浓度分别为各处理的原液和 1:10 稀释液,以清水处理作对照。每个浓度设 3 次重复,喷雾量为 150 mL·m⁻²,喷雾 7 d 后调查发病情况,计算病情指数。

1.5 病害严重度的调查方法

采用五点取样法,每个小区取 5 个点,每点随机调查 50 株空心莲子草,每个小区共调查 250 株,根据每株叶片、茎秆上的发病程度确定病级,计算病情指数。植株病害分级标准:0 级为叶片上无病斑;1 级为叶片上有 1~4 个病斑;2 级为叶面病斑覆盖率小于 40%,叶片无黄化;3 级为叶面病斑密集,病斑覆盖率小于 60%,叶片局部黄化;4 级为叶面病斑覆盖率大于 80%,病斑聚积成大面积坏死斑,叶片 80% 以上黄化,茎秆有零星的红色病斑;5 级为大部分叶片呈火烧状卷曲枯死或脱落,茎秆普遍发病,呈红色;6 级为叶片全部枯死或脱落,茎秆病斑连成片形成焦状病斑(聂亚锋等,2008)。空心莲子草植株病情指数按照以下公式进行计算:

病情指数 = (∑_{i=0}⁶ n_i · i / N · 6) × 100

式中,*i* 表示病级,*n* 表示植株发病为 *i* 级的株数,*N* 表示调查总株数,6 表示植株发病最高级。

1.6 数据统计与分析

对复壮获得的 20 株菌的致病性测定数据采用完全随机单因子有重复 LSD 法进行分析,采用完全随机二因子有重复 LSD 法对产孢量和田间试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 复壮菌株的分离与鉴定

室内叶片致病性测定结果表明,初始菌株经过复壮后对空心莲子草的致病性明显增强(表 1)。在复壮一代菌株中,2 株分离自病叶的菌株对空心莲子草叶片的致病性高于初始菌株,但无显著差异;3 株(1、4、5 号)分离自病茎的菌株对空心莲子草叶片的致病性显著高于初始菌株。在复壮二代菌株中,4 株分离自病叶的菌株的致病性高于初始菌株,其中,5 号菌株的致病性与初始菌株有显著差

异;4 株分离自病茎的菌株的致病性高于初始菌株,其中,1、3、5 号菌株的致病性显著高于初始菌株,且 5 号菌株的致病性最高。可见,分离自病茎的复壮二代菌株对空心莲子草的致病性最高,其次为分离自病茎的复壮一代菌株,分离自病叶的复壮一、二代菌株的致病性相对较低;同时,从病茎分离获得的致病性增强的菌株数量高于从病叶分离的菌株数量。

表 1 SF-193 复壮菌株对空心莲子草叶片的致病性(室内测定)

Table 1 Pathogenicity to the leaf of <i>A. philoxeroides</i> by the rejuvenated from SF-193 (indoor detection)			
菌株 Strain	复壮菌株来源 Source of the rejuvenated	菌株编号 No. of strain	病斑面积 Lesion area/mm ²
初始菌株 Initial strain			155.73 ± 19.0efgh
复壮一代 First generation	初始菌株病叶 Disease leaf caused by initial strain	1	96.37 ± 15.9i
		2	202.83 ± 20.6cdef
		3	182.67 ± 21.3defg
		4	138.23 ± 25.2ghi
		5	107.74 ± 20.9hi
	初始菌株病茎 Disease stem caused by initial strain	1	254.31 ± 21.7bc
		2	185.93 ± 21.7defg
		3	158.48 ± 27.7efgh
		4	268.67 ± 15.8b
		5	207.38 ± 14.5cd
复壮二代 Second generation	复壮一代病叶 Disease leaf caused by first generation strain	1	188.56 ± 21.1defg
		2	197.70 ± 12.7cdef
		3	133.24 ± 18.1ghi
		4	167.75 ± 19.7efg
		5	208.77 ± 21.1cd
	复壮一代病茎 Disease stem caused by first generation strain	1	207.96 ± 17.8cd
		2	149.10 ± 22.0fghi
		3	239.83 ± 22.5bcd
		4	199.43 ± 13.0cdef
		5	338.20 ± 22.7a

部分数据为平均值 ± 标准差。同列数据后附不同小写字母者表示差异显著 (*P* < 0.05)。下同。

Partial datas are Mean ± SD in the table. Data followed by different small letters within the same column are significant difference among treatments at *P* < 0.05. The same as below.

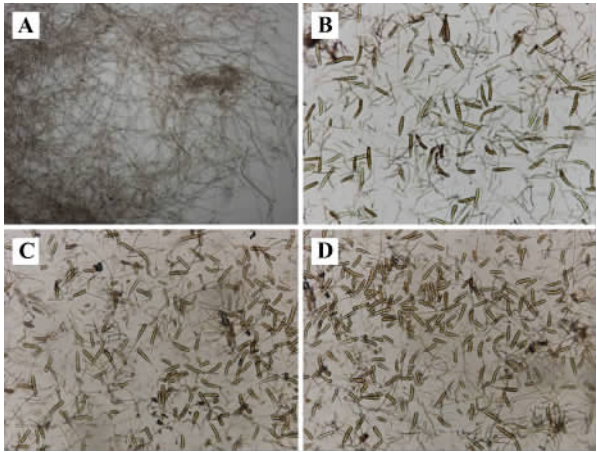
2.2 SF-193 初始菌株与复壮菌株的产孢量

初始菌株与复壮一、二代菌株产孢试验结果(表 2)表明,初始菌株经过复壮后产孢量显著提高。在黑光灯照射培养 3 d 后,复壮二代菌株的产孢量最高,是初始菌株的 4.8 倍,其次为复壮一代菌株,初始菌株的产孢量最低;培养 6 d 后复壮菌株产孢量显著下降,初始菌株产孢量达到最大,但与复壮菌株的孢子量无显著差异;培养 9 d 后,复壮菌株与初始菌株的产孢量均达到最低。可见,初始菌株经过复壮后,不仅产孢量显著增多,且达到最大

产孢量的时间也显著缩短,有利于其迅速获得分生孢子。显微观察结果(图1)显示,培养3 d后,复壮二代菌株在10×10倍视野下的分生孢子数量最多,其次为复壮一代菌株,初始菌株最少。因此,通过复壮的方法可有效解决菌株退化导致产孢量显著下降的问题。

表2 初始菌株与复壮菌株在黑光灯照射下的产孢量
Table 2 The conidial yield of the initial and the rejuvenated were cultured under black lamp

菌株 Strian	培养时间 Culture time/d	产孢量/(10 ⁴ 个·mL ⁻¹) Conidial yield /(10 ⁴ conidia · mL ⁻¹)
复壮一代 First generation	3	7.08 ± 0.66b
	6	1.89 ± 0.06c
	9	0.51 ± 0.07d
复壮二代 Second generation	3	8.21 ± 0.54a
	6	2.14 ± 0.11c
	9	0.71 ± 0.04d
初始菌株 Initial strain	3	1.72 ± 0.23cd
	6	2.25 ± 0.48c
	9	0.26 ± 0.07e



A: 未产孢的 SF-193 菌丝体; B: 初始菌株孢子数量; C: 复壮一代菌株孢子数量; D: 复壮二代菌株孢子数量。
A: Mycelium of SF-193; B: Conidia produced by the initial strain; C: Conidia produced by first generation strain; D: Conidia produced by second generation strain.

图1 SF-193 初始菌株与复壮菌株培养3 d后的分生孢子数量(10×10倍视野下)

Fig.1 The conidia produced by the initial and the rejuvenated cultured for 3 days were observed under light microscopy (magnification, 10×10)

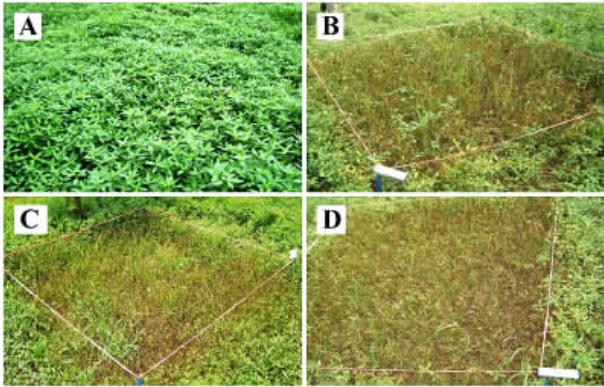
2.3 SF-193 复壮菌株在田间对空心莲子草的致病性

田间致病性测定结果(表3)表明,复壮一代和二代菌株的原液对空心莲子草的致病性与初始菌株原液相比,分别提高了4.65%和9.82%,但无显著差异。复壮一代和二代1:10稀释液对空心莲子

草的致病性显著高于初始菌株。如图2所示,经初始菌株处理后,空心莲子草的症状表现为叶片大部分黄化脱落,茎秆发病率较低;经复壮一代和二代处理后,空心莲子草的症状表现为叶片全部脱落或枯死,茎秆发病率高,小区局部可见植株死亡。因此,通过对保存时间久或继代培养次数多而导致致病性下降的菌株进行复壮有利于提高其致病性。

表3 初始菌株与复壮菌株在田间对空心莲子草的致病性
Table 3 Pathogenicity to of *A. philoxeroides* treated by the initial and the rejuvenated in plot

菌株 Strain	处理 Treatment	病情指数 Disease index	提高率 Enhancement rate/%
复壮一代 First generation	原液 Without dilution	83.42 ± 5.7ab	4.65
	1:10 稀释液 1:10 dilution with water	69.50 ± 1.3bc	25.79
复壮二代 Second generation	原液 Without dilution	87.54 ± 1.7a	9.82
	1:10 稀释液 1:10 dilution with water	64.71 ± 12.2c	17.12
初始菌株 Initial strain	原液 Without dilution	79.71 ± 1.2ab	0.00
	1:10 稀释液 1:10 dilution with water	55.25 ± 3.8d	0.00



A: 清水对照; B: 初始菌株的控制效果; C、D: 复壮一代和二代的控制效果。
A: Control; B: *A. philoxeroides* treated by the initial strain; C and D: *A. philoxeroides* treated by first and second generation strain, respectively.

图2 初始菌株与复壮菌株在田间对空心莲子草的控制效果
Fig.2 The efficiency of *A. philoxeroides* treated by the initial and the rejuvenated in the field

3 讨论

获得性状稳定的空心莲子草生防菌株是利用其进行生物防治的关键,但诸多原因可导致菌种退化与老化。例如:试验中菌株特定的遗传及生存环境发生变化,可能会造成机体内某些代谢功能紊乱;长期使用相同的培养基,其营养可能达不到菌株的生理要求,连续繁殖导致菌体生长活力减弱;频繁无性繁殖一般都是负变异占绝对优势,如果对

母种无限制地传代,就会使负变异长期积累(丁湖广,2006),当达到一定程度时,必然出现菌丝生长缓慢、目的产物产量降低等现象;另外,长期低温保藏也可能导致菌种退化,因为在这种情况下,存在低温筛选变异的潜在可能。因此,对退化菌种进行复壮尤为重要(刘海英等,2003)。

复壮是针对已发生退化的菌种进行分离改良的技术(樊晓琳等,2010)。崔迎等(2010)利用宿主体内复壮法获得了西贝碱产量比出发菌株提高 21.9% 的平贝母 *Fritillaria ussuriensis* Maxim. 内生真菌;赵丽芳等(2008)研究表明,复壮粉拟青霉菌菌株对松纵坑切梢小蠹 *Tomicus piniperda* (L.) 成虫的感病死亡率为 88.5%,比未经复壮的菌株的感病死亡率提高 39.7%。本文利用组织分离法对保存培养 2 年以上的空心莲子草生防菌莲子草假隔链格孢 SF-193 进行复壮,分离获得了产孢量与致病性明显提高的复壮菌株。该方法简单快速,没有杂菌污染,分离到的菌株均有致病性,有利于复壮菌株的快速筛选和鉴定。通过对分离到的菌株进行室内致病性测定发现,分离自病茎的菌株比分离自病叶的菌株致病性强,这可能与植物组织结构和组成相关。多年的田间试验发现,接种莲子草假隔链格孢 SF-193 后,叶片比茎秆容易发病,但茎秆发病的严重程度决定该生防菌对空心莲子草的防治效果。因此,从植株病茎分离空心莲子草病原菌可能有利于筛选到致病性更强的生防菌。退化菌株经过复壮后,其产孢能力与致病性大幅提高,对保持其亲本性状和提高其防治效果具有重要意义,同时解决了以分生孢子作为繁殖体的空心莲子草微生物除草剂菌种退化的关键问题,为进一步研发空心莲子草孢子制剂提供了材料。

参考文献

陈志谊,王晓艳,罗楚平.2007.空心莲子草病原真菌的分离筛选及其菌株 SF-193 种的鉴定.中国生物防治,23(4): 353–357.

崔迎,张志强,赵昕,陈佳丽,殷红.2010.产西贝碱内生真菌的复壮.菌物研究,8(2):41–43.

丁湖广.2006.菌种退化与老化原因及防止措施.特种经济动植物,(1):39–40.

樊晓琳,叶绿笋,边银丙.2010.双孢蘑菇菌株 As2796 的提纯复壮.食用菌学报,17(3):20–24.

方中达.1998.植物研究方法.北京:农业出版社.

付文竹,陈振亚,淮虎银.2006.空心莲子草地下茎克隆繁殖特征.生态科学,25(4):316–319.

黄基荣.1994.细脚拟青霉菌菌种保藏与复壮.微生物学通报,21(5):312–313.

李秀丽,董文琦,李运朝,贾银锁,马春红,王立安.2008.玉米小斑病菌复壮培养基的筛选.河北农业科学,12(12): 38–39.

刘海英,董月香,周廷斌,罗玉玲,孟祥元.2003.食用菌菌种的退化及复壮.食用菌,25(6):16–17.

聂亚锋,陈志谊,刘永锋,罗楚平,刘卹洲.2008.假隔链格孢 (*Nimbya alternantherae*) SF-193 防除空心莲子草田间高效使用技术的研究.植物保护,34(3):109–113.

聂亚锋,陈志谊,刘永锋,姜远来,刘卹洲,罗楚平,刘长河.2009.假隔链格孢 SF-193 的产孢特性及其分生孢子对空心莲子草的致病力.中国生物防治,25(3):260–266.

沈国军,徐正浩,俞谷松.2005.空心莲子草的分布、危害与防除对策.植物保护,31(3):14–18.

谭万忠,顾春燕.1992.空心苋炭疽菌的生物学特性及病害田间消长规律研究.云南农业大学学报,15(3):249–251.

向梅梅,曾永三,刘任,陈圣清,蔡军宏,游明龙.2002.莲子草假隔链格孢的寄主范围及对空心莲子草的控制作用.植物病理学报,32(3):286–287.

赵丽芳,王海林,陈鹏.2008.粉拟青霉菌菌株毒力复壮及其应用效应的研究.西部林业科学,37(2):21–24.

郑小波.1997.疫霉菌及其研究技术.北京:中国农业出版社.

庄义庆,何东兵,王源超,郑小波.2008.水生病原菌——蕉斑镰刀菌菌株的筛选及其致病性测定.中国生物防治,24(3):262–266.

Barreto R W and Torres A N L. 1999. *Nimbya alternantherae* and *Cercospora alternantherae*: two new records of fungal pathogens on *Alternanthera philoxeroides* (alligatorweed) in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, 28(2):103–107.

Pomella A W V, Barreto R W and Charudattan R. 2007. *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*. *Biocontrol*, 52:271–288.

Tan W Z, Li Q J and Qin G L. 2002. Biological control of alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp.. *BioControl*, 47:463–479.

(责任编辑:杨郁霞)