

文章编号: 1674-7054(2017)02-0185-05

昆虫病原线虫对南方根结线虫的抑制效果

孙燕芳, 龙海波, 岳建军, 冯推紫, 白成

(中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘要: 为明确昆虫病原线虫、异小杆线虫(*Heterorhabditis bacteriophora*) HbSD 品系对南方根结线虫的生防潜力, 在盆栽条件下, 通过测定感染南方根结线虫的番茄苗施用昆虫病原线虫悬浮液后的根结指数、卵囊数和繁殖率等指标的变化来研究该 HbSD 对南方根结线虫的抑制效果。结果表明: HbSD 3 个不同的接种时间和浓度对番茄根结指数、卵囊数和繁殖率的影响呈现出显著性差异($P < 0.05$)。其中, HbSD 悬浮液施用量 6 000 头每盆并与南方根结线虫同时接种番茄苗的处理组根上的根结指数、卵囊数和繁殖率(2.67, 53.8 和 19.77), 与对照(3.5, 82.2 和 26.81) 相比均有很大程度的减少, 对根结指数的防效可达 31.40%。

关键词: 异小杆线虫; 南方根结线虫; 根结指数; 繁殖率; 悬浮液; 抑制效果

中图分类号: S 476.15 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2017.02.010

昆虫病原线虫是昆虫专化性寄生天敌线虫, 能够主动寻找、侵入寄主、在寄主体内大量繁殖并释放共生菌导致寄主昆虫快速死亡, 具有重要的害虫生物防治价值。目前, 昆虫病原线虫作为一类新型的生物杀虫剂, 市场销售额占生物农药份额的第 2 位, 仅次于苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。国际上商品化的昆虫病原线虫产品异小杆线虫 *Heterorhabditis* 和斯氏线虫 *Steinernema* 已在北美和英国等地广泛用于防治田间害虫^[1-2]。Valle 的研究表明, 利用夜蛾斯氏线虫(*S. feltiae*) 和异小杆线虫(*H. bacteriophora*) 能够极显著地减少异常珍珠线虫在番茄植株根上所形成的根结数, 甚至能够影响卵的孵化, 异常珍珠线虫的繁殖率分别降低了 57% 和 53%^[3]。Perez 的研究结果表明, 番茄接种象耳豆根结线虫 350 个卵块 + 350 条 J2 和 175 个卵块 + 175 条 J2 并同时施用异小杆线虫 JPM4 等 4 个品系的 100 条 IJs 后, 植株根上的根结数均较对照减少, 其中, 异小杆线虫下的 1 个种和夜蛾斯氏线虫能显著抑制根结线虫卵的孵化和 J2 对根的侵染^[4]。Shapiro 等利用感染了昆虫病原线虫的大蜡螟(*Galleria mellonella*) 虫尸研究其对胡椒和西葫芦南方根结线虫病的抑制作用, 结果显示, 虫尸能减少植株根上根结数和卵囊中的卵块数^[5-6]。国内的相关报道多为综述^[2]。海南省是我国反季节蔬菜种植的重要省份之一, 但蔬菜上的根结线虫病发生危害较严重, 尤以南方根结线虫优势种群危害最大, 对蔬菜生产造成严重威胁。因此, 笔者选取本实验室前期筛选的昆虫病原线虫 *H. bacteriophora* SD 品系来开展其对南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*) 的抑制效果实验, 旨在为生物防治当地植物根结线虫提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 昆虫病原线虫 供试的昆虫病原线虫为异小杆线虫(*Heterorhabditis bacteriophora*) SD 品系, 由本研究团队诱集, 用黄粉虫老熟幼虫纯化和扩繁^[7]。扩繁收获感染期幼虫 IJs 悬浮液于 10 °C 人工气候箱备用, 试验时线虫的贮存期不超过 30 d。

1.2 植物根结线虫 供试的植物根结线虫由本实验室分离纯化和鉴定, 并使用番茄进行室内活体培养。

1.3 供试植物 选番茄品种‘特级大明星’为供试植物。

收稿日期: 2016-09-23

修回日期: 2017-01-03

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503114); 海南省国际合作专项(KJHZ2013-2)

作者简介: 孙燕芳(1986-), 女, 研究实习员, 研究方向: 生防菌研究, E-mail: syf18289369980@163.com

通信作者: 白成(1951-), 男, 研究员, 研究方向: 生物化学与生物防治, E-mail: chengbai2001@163.com

1.4 灭菌土 选蛭石、椰糠和沙土混匀后于 200 °C 条件下干热灭菌 2 h 备用。

1.5 昆虫病原线虫的扩大培养 取直径 9 mm 的培养皿,皿底垫 1 层滤纸,挑选生长健康的黄粉虫 (*Tenebrio molitor*) 未龄幼虫 10 头放入培养皿,用移液枪吸取浓度为 1 000 头·mL⁻¹ 的线虫悬浮液 1.2 mL,均匀滴加至培养皿内,盖上皿盖,室温放置 4~5 d 后检查虫体颜色变化情况,正常感染昆虫病原线虫的黄粉虫颜色变为红棕色,第 10 天收获感染昆虫病原线虫的黄粉虫尸体,参考 Kaya 等的方法^[7],收获第 2~3 天的 IJs 线虫悬浮液并在显微镜下镜检 IJs 存活率,存放于 10 °C 人工气候箱备用。

1.6 根结线虫 2 龄幼虫悬浮液的制备 采用文献 [8] 的方法从番茄根部分离南方根结线虫的卵,获得卵悬浮液于室温下孵化,每隔 48 h 将孵化的 2 龄幼虫收集于三角瓶中 4 °C 冰箱保存备用。

1.7 番茄育苗与线虫接种 番茄种子浸种后于 30 °C 培养箱内催芽,露白后播种于装有灭菌土的 1 次性纸杯内,25 °C 光照培养箱内培养,每天光照 10 h,待第 2 片真叶完全展开后,移栽至 9.5 cm × 10 cm 的塑料盆内,盆内土同上,1 周后接种。南方根结线虫接种时间为 2015-05-04,处理如下:对照,接种南方根结线虫 J2 500 头/盆;处理 1,南方根结线虫 J2 500 头/盆 + 异小杆线虫侵染期幼虫 IJs 2 000 头;处理 2,南方根结线虫 J2 500 头/盆 + 异小杆线虫侵染期幼虫 IJs 6 000 头;每个处理组的昆虫病原线虫分 3 个时期接种,接种时间为:植物根结线虫接种 2 周前;与植物根结线虫同时接种;植物根结线虫接种 2 周后,每个处理 6 株,3 次重复。南方根结线虫和昆虫病原线虫均采用悬浮液的方式施于土下约 5 cm 的根围附近,接种后放于室外生长,保持土壤湿度,30 d 后调查各处理组及对照组番茄根的发病情况、卵囊数和土内 2 龄幼虫数,计算根结指数和繁殖率。

1.8 病情指数 参照文献 [9] 的方法调查番茄幼苗发病情况,根据症状划分病情级别并计算根结指数,病情级别划分及根结指数计算公式如下:

$$RKI = \sum (S \times n) / N,$$

式中 *RKI*: 根结指数; *S*: 各病情级别代表数值; *n*: 各病情级别病株数; *N*: 调查总株数。

$$\text{防效} = (\text{对照根结指数} - \text{处理根结指数}) / \text{对照根结指数} \times 100\%。$$

表 1 南方根结线虫病情级别划分

Tab. 1 The disease severity levels of *Meloidogyne incognita*

病情级别 Disease severity	症状描述 Symptom
0	整个根系没有根结
1	根系轻微感染 根结数 10 个以下 根结百分率小于 10%
2	根结明显 根结数 10~50 个 根结百分率 11%~25%
3	根结百分率 26%~50%
4	根结百分率 51%~75%
5	根结百分率 76%~100%

1.9 繁殖系数算法 分离单株根系虫卵^[8],并在解剖镜下计数;采用 Oostenbrink 等^[10]的方法计算出繁殖率 *Rf*: $Rf = Pf/Pi$,式中 *Pf* 代表收获时卵和线虫的总数量, *Pi* 代表开始接种时的南方根结线虫 2 龄幼虫数,即 500 头。

1.10 数据分析 实验数据使用 SAS 软件进行分析,并用 DMRT 法比较各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 异小杆线虫对番茄南方根结线虫根结指数的影响 从图 1 可知,与对照相比,接种 HbSD 2 000 和 6 000 的处理组番茄根上形成的根结指数均显著降低,其中,接种 HbSD 6 000 处理组根上的根结指数较同时期接种 2 000 头的处理组上的小,根上形成的根结指数最小为 2.4,其次是接种 2 周后 2.8 和 2 周前 2.9,对南方根结线虫的抑制率分别为 31.40%、17.14% 和 15.71%。同时接种的处理组较其他 3 个组的差异均较显著,说明南方根结线虫和昆虫病原线虫同时接种能最大程度的抑制根结线虫的侵染和繁殖;HbSD 2 000 处理组的 3 个不同接种时间所形成的根结指数不存在显著差异。

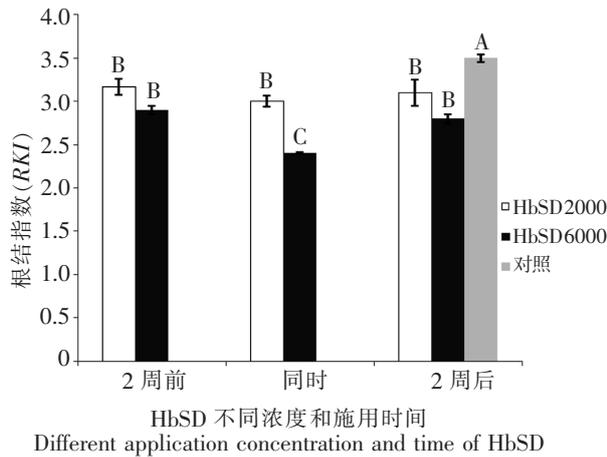


图 1 HbSD 不同浓度和施用时间对番茄根结指数的影响
Fig.1 The influence of different application concentrations and times of HbSD on root knot index (RKI) of tomato

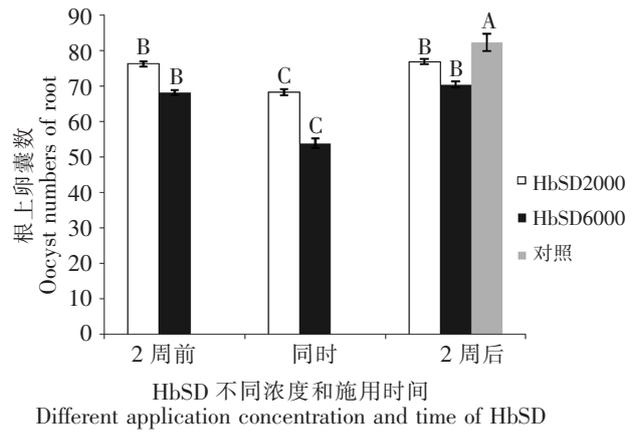


图 2 HbSD 不同浓度和施用时间对番茄根上卵囊数的影响
Fig.2 The influence of different application concentrations and time of HbSD on oocyst numbers of tomato roots

2.2 异小杆线虫对番茄南方根结线虫根上卵囊数的影响

从图 2 可知,接种了 HbSD 以后,番茄根上形成的卵囊数量较对照均有显著减少,在 HbSD 的 3 个接种时间中,HbSD 和南方根结线虫同时接种的处理组番茄植株根上形成的卵囊数要显著性少于 2 周前和 2 周后接种的处理组 ($P < 0.05$),HbSD 接种量 6 000 头与南方根结线虫同时接种的处理组植株根上形成的卵囊数 53.8 和对照 82.2 相比,对卵囊的抑制率最高 (34.5%)。HbSD 同一接种浓度的 3 个不同接种时间内 2 周前和 2 周后接种的处理组较同时接种的处理组均有较大差异,但 2 周前和 2 周后接种的处理组间不存在显著差异,这也间接说明 HbSD 和南方根结线虫同时接种能最大程度地抑制南方根结线虫对番茄的侵染。

2.3 异小杆线虫对番茄南方根结线虫繁殖率的影响

接种南方根结线虫 30 d 后统计根上卵囊内的卵粒总数和土内 2 龄幼虫总数,根据表 2 结果计算繁殖率,并进行差异显著性分析。从图 3 可知,接种 HbSD 后,各处理组的繁殖率较对照均有所下降,表明该昆虫病原线虫 HbSD 对南方根结线虫 2 龄幼虫在番茄根围的侵染和繁殖传代有抑制作用,HbSD 接种 6 000 头并与南方根结线虫同时接种的处理组上南方根结线虫的繁殖率 (19.77) 和 2 周前接种 (24.43)、2 周后接种 (25.02) 及对照 (26.81) 相比均有显著性差异 ($P < 0.05$),繁殖率较对照下降 26.25%,但 2 周前接种和 2 周后接种,南方根结线虫的繁殖率之间不存在显著差异。

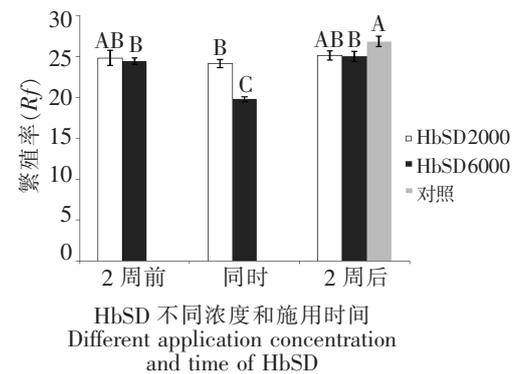


图 3 HbSD 不同浓度和施用时间对南方根结线虫繁殖率的影响
Fig.3 The influence of different application concentrations and time of HbSD on reproduction factor (Rf) of *Meloidogyne incognita*

表 2 异小杆线虫 HbSD 对番茄根上形成的卵粒数和土内 2 龄幼虫的影响

Tab.2 The effect on egg numbers of tomato roots and 2nd stage juveniles (J2) in the soil after inoculated with HbSD suspension

HbSD 施用时间 HbSD Applying time	卵粒数 Number of eggs		土内 J2 数 J2 in the soil	
	2 000 IJs/盆	6 000 IJs/盆	2 000 IJs/盆	6 000 IJs/盆
2 周前	(12 322.4 ± 457.07) bc	(12 138.6 ± 209.53) c	(89.6 ± 0.74) a	(77.6 ± 0.74) b
同时	(11 983.9 ± 240.71) c	(9 825.0 ± 148.25) d	(83.6 ± 1.93) b	(60 ± 2.09) c
2 周后	(12 476.6 ± 285.26) b	(12 421.7 ± 325.65) b	(92.4 ± 0.74) a	(89.2 ± 0.48) a
对照 CK	(12 340.6 ± 316.19) a	(12 340.0 ± 316.19) a	(89.6 ± 0.74) a	(89.6 ± 0.74) a

注:表中同列数据后不同的小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Notes: Different lowercase letters in the same column represented significant differences at $P < 0.05$

3 讨论

国内利用昆虫病原线虫防治包括金龟子、小地老虎、迟眼蕈蚊等地下害虫,表现出了较好的防治效果^[11]。笔者用盆栽实验来探索昆虫病原线虫对植物根结线虫的生防潜力,结果显示,施用异小杆线虫 HbSD 后,番茄植株根上的卵囊数、根结指数和繁殖率较对照均有很大程度的减少,对根结指数的抑制率高达 31.40%。Caccia 在番茄苗上施用昆虫病原线虫后,根结线虫的繁殖率降低了 53%,接种 30 d 后繁殖率较对照降低了 26.25%^[12]。目前,研究者都是采用大蜡螟进行昆虫病原线虫的传代^[11-12],笔者选取黄粉虫未龄幼虫来进行,不同的传代扩繁方法对昆虫病原线虫的生活力和各种生物性指标均可能造成不同程度的差异,继而影响统计分析的结果。不同寄主植物产生不同的根系分泌物,这些分泌物会影响昆虫病原线虫和植物根结线虫间的互作效果,如南方根结线虫对不同寄主植物的侵染能力呈现显著性差异^[13]。所以,该昆虫病原线虫 HbSD 对海南其他作物上的植物根结线虫的防治潜力还需进一步的试验验证。

在施用 *M. hapla* 卵 + 2 龄幼虫的前 2 周施用 *S. feltiae* 能较好的抑制植物根结线虫对番茄根的侵入^[14],而本实验的结果显示 2 种线虫同时接种能最大程度地减少番茄植株根上形成的卵囊数、根结指数和繁殖率。本实验只接种南方根结线虫 2 龄幼虫悬浮液,同时,昆虫病原线虫的传代和扩繁采用大蜡螟,且接种后番茄苗的培养条件亦不同。Caccia 曾研究施用高浓度 *H. bacteriophora* 和 *S. glaseri* 能减少南方根结线虫 2 龄幼虫的侵入^[12]。本实验选择的 2 个不同浓度的异小杆线虫悬浮液所进行的接种实验,结果同上述研究一致,但本研究昆虫病原线虫的接种浓度是否在防治南方根结线虫上为最优,以及田间的防效持久性和对后期产量的影响还需进一步研究。

昆虫病原线虫与植物根结线虫的互作与线虫的种类和所处的地理环境均有关,Enrioue 等^[14]研究发现,温度的改变能间接影响土内微生物的种类或数量以及微生物和线虫的互作等,这些改变能影响一些植物根结线虫 2 龄幼虫和卵块的行为。其次,植物根结线虫的活性还会受环境因子如湿度和光照的影响而发生不同程度的改变,继而会影响昆虫病原线虫施用后的效果。因此,后续还需进一步研究主要环境因子对昆虫病原线虫 HbSD 对植物根结线虫抑制效果的影响。

参考文献:

- [1] Grewal P S, Lewis E E, Venkatachari S. Allelopathy: a possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes [J]. *Nematology*, 1999, 1(7/8): 735 - 743.
- [2] Hazir S, Kaya H K, Stock S P, et al. Entomopathogenic nematode (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests [J]. *Turkish Journal of Biology*, 2003, 27(4): 181 - 202.
- [3] Valle E E D, Lax P, Duenas J R, et al. Effects of insect cadavers infected by and *Steinernema diaprepesi* on *Meloidogyne incognita* parasitism in pepper and summer squash plants [J]. *Crop Protection*, 2013, 40(1): 109 - 118.
- [4] Perez E, Lewis E E. Use of entomopathogenic nematodes and thyme oil to suppress plant-parasitic nematodes on English boxwood [J]. *Plant Disease*, 2006, 90(4): 471 - 475.
- [5] Shapiro-Ilan D, Lewis E E, Tedders W L. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematode applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 83: 270 - 272.
- [6] Shapiro-Ilan D, Richou H, Dolinski C. Entomopathogenic nematode production and application technology [J]. *Journal of Nematology*, 2012, 44(2): 206 - 217.
- [7] Kaya H K, Stock S P. Manual of techniques in insect pathology (Biological Techniques Series) [M]. London: Academic Press, 1997: 281 - 324.
- [8] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [9] 中华人民共和国农业部. NY/T 1857.8 - 2010 黄瓜主要病害抗病性鉴定技术规程第 8 部分: 黄瓜抗南方根结线虫病鉴定技术规程 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [10] Oostenbrink M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants [M]. *Landbouwhogeschool Wageningen*, 1966: 46.
- [11] 颜珣, 郭文秀, 赵国玉, 等. 昆虫病原线虫防治地下害虫的研究进展 [J]. *环境昆虫学报*, 2014, 36(6): 1018 - 1024.

- [12] Caccia M , Lax P , Doucet M E. Effect of entomopathogenic nematodes on the plant parasitic nematode *Nacobbus aberrans* [J]. *Biology and Fertility of Soils* , 2013 , 49(1) : 105 – 109.
- [13] 马艳粉 郝志云 肖春 等. 南方根结线虫对不同寄主植物侵染能力的比较 [J]. *安徽农业科学* 2011 , 39(24) : 14658 – 14659.
- [14] Perez E E , Lewis E E. Use of Entomopathogenic nematodes to suppress *Meloidogyne incognita* on greenhouse tomatoes [J]. *Journal of Nematology* , 2002 , 34(2) : 171 – 174.

Suppression Effect of *Heterorhabditis bacteriophora* on *Meloidogyne incognita*

SUN Yanfang , LONG Haibo , YUE Jianjun , FENG Tuizi , BAI Cheng

(Environment and Plant Protection Institute , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Haikou , Hainan 571101 , China)

Abstract: In order to understand the biocontrol potential of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* SD (HbSD) on *Meloidogyne incognita* , we inoculated HbSD infected juveniles (IJs) suspension and the 2nd stage juveniles (J2) of *M. incognita* onto potted tomatoes to test the changes of oocyst numbers on tomato roots , root knot index (*RKI*) and reproduction factor (*Rf*) to study the suppression effect of HbSD on *M. incognita*. The results showed that HbSD inoculation at the 3 different inoculation time and 2 concentrations had a significantly different ($P < 0.05$) effect on the oocyst numbers , *RKI* and *Rf*. The *RKI* , the oocyst number and the *Rf* of the treatment HbSD 6 000 IJs + *M. incognita* were 2.67 , 53.8 and 19.77 in the tomato roots , which were obviously lower than those of the control (3.5 , 82.2 and 26.81) and inhibited upto 31.40% of *M. incognita* in the tomato roots.

Keywords: *Heterorhabditis bacteriophora*; *Meloidogyne incognita*; root knots index , reproduction factor; suspension; inhibitory effect