

马鬃岭春季植物根际真菌多样性研究

沈万芳 (安徽省黄山风景区管委会园林局, 安徽黄山 245800)

摘要 研究了安徽省六安市马鬃岭自然保护区春季不同植物根际昆虫病原真菌的物种多样性及分布情况。结果表明, 通过选择培养基分离和纯化从 20 种不同植物根际共得到 306 个昆虫病原真菌菌株, 隶属于 2 科 7 属 15 种, 以球孢白僵菌数量最大, 其次是玫瑰色棒束孢和淡紫紫孢菌。

关键词 马鬃岭; 根际; 昆虫病原真菌; 分类; 多样性

中图分类号 S718.81 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)24-083-03

Research on Diversity of Insect Pathogenic Fungi on Plant Rhizosphere in Mazongling Mountains in Spring

SHEN Wan-fang (Garden Bureau of Huangshan Scenic Area, Huangshan, Anhui 245800)

Abstract The species diversity and distribution of different plants rhizosphere insect pathogenic fungi in Mazongling nature reserve in Lu'an City, Anhui Province were studied. The results showed that through culture medium isolation and purification, total 306 entomopathogenic fungi strains were obtained, belonging to 2 families, 7 genera and 15 species. The quantity of *Beauveria bassiana* ranks the first place, *Isaria fumosorosea* and *Purpureocillium lilacinum* cinerea take the second place.

Key words Mazongling; Rhizosphere; Insect pathogenic fungi; Classification; Diversity

植物根际是受植物活根影响的土壤微区, 是土壤微生物活动的重要场所之一^[1-2]。在植物根际聚居着数量巨大、种类繁多的微生物, 主要包括细菌、放线菌、真菌、线虫和原生动物等, 但这些微生物在环境中的功能目前仍了解很少, 大部分根际过程的微生物学机理尚不清楚。目前植物根际微生物的研究重点多放在细菌上, 对根际真菌的研究较少。昆虫病原真菌广泛分布于不同的生态环境中, 不但可以寄生昆虫, 而且也能在不同的生境中营腐生生活, 并且具有丰富的遗传异质性^[3]。目前已有昆虫病原真菌在植物根际和根内定殖的研究报道。例如, 绿僵菌可以在土壤中兼性腐生, 维持其种群数量, 从而起到持续防控害虫的作用, 且植物根围和根际土壤中宿存动态的变化是有差异的^[4-5]。Liao 等^[6]研究了罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)作为根际微生物促进了植物对氮的吸收并增强了植物抗病性。且有研究认为昆虫病原真菌在植物根际定殖不是随机的, 是有严格的相关性^[7]。

昆虫病原真菌杀虫剂已被广泛应用于农林业害虫防治, 如祝明亮等^[8]研究了淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)在烤烟根际的定殖情况, 发现如淡紫拟青霉是习居土壤的机会真菌, 对根结线虫(*Meloidogyne* spp.)和胞囊线虫(*Heterodera* spp.)的卵有很强的寄生能力。根际昆虫病原真菌除了可以实现地下害虫生物防治以外, 也有不少关于根际昆虫病原真菌防治植物病害报道, 如 Renwick 等^[9]通过室内生测和小麦盆栽试验发现分离自小麦根际的球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)能有效持续控制小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)。有些昆虫病原真菌定殖植物根际后具有促进植物生长等特殊功能, 如 Liao 等^[8]报道罗伯茨绿僵菌寄生昆虫后, 可将从昆虫中吸收的氮营养物质传给植物, 还可分泌各种有机酸溶解土壤中的固态磷和二氧化碳^[10], 且可以消除土壤

中的铅污染, 并能帮助植物吸收土壤中的铁和锌^[11]。但昆虫病原真菌用于生物防治往往受到防效不稳定的困扰, 其原因不仅是因为野外环境条件复杂, 可能还与生防菌株在环境中包括土壤中存活的动态变化、与寄主植物之间的存活关系不明有关。作为生防因子的生防菌株能否在靶植物根际定殖生长及其对植株根际土壤微生物区系的抑制作用的强弱已成为筛选、评定土壤害虫生防菌株的一个重要指标^[8]。研究昆虫病原菌与植物的相关性以及在植物根际定殖情况, 不仅具有重要的理论意义, 而且对于保护和促进病原真菌在植物根际中的自我维持、更合理地利用真菌控制农林业地下害虫也有重要的实践意义。为此, 笔者研究了安徽省六安市马鬃岭自然保护区春季不同植物根际昆虫病原真菌的物种多样性及分布情况, 旨在为昆虫病原真菌杀虫剂研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 培养基 选择性培养基: 马铃薯 200.00 g(削皮切碎后煮沸 20 min 左右, 过滤)、葡萄糖 20.00 g、放线菌酮 0.20 g、氯霉素 0.20 g、多果定 0.50 g、结晶紫 0.01 g、琼脂 20.00 g、水 1 000.00 g。SDAY 培养基: 葡萄糖 20.00 g、蛋白胨 10.00 g、酵母浸出粉 10.00 g、琼脂 20.00 g、水 1 000.00 g。

1.2 试验地概况 马鬃岭位于安徽省六安市金寨县南部, 境内总面积为 4 843.33 hm²。该地区气候温和, 雨量充沛, 日照充足, 无霜期长, 自然条件优越, 植被资源极其丰富, 是一座原始、古老、完美的绿色宝库。

1.3 方法

1.3.1 样品的采集。于 2015 年 3 月选取健康、生长较旺盛的植株, 去除根系表层土壤和杂物。采集草本植物根际土壤时将其整个植株连根挖出, 去除根上附着的大土块, 用毛刷将根上粘着的细土抖落, 然后将植物根放入无菌袋, 封口, 贴上标签。灌木或乔木采用铲子采集植物根系(须根), 抖落大块土壤, 收集根系带回实验室置于 4℃ 冰箱保存, 共采集植物根系样品 20 份。其中, 草本植物含有细叶麦冬、野蔷薇、紫背天葵、云台南星、铁线蕨、早熟禾、蛇莓、白叶莓、虎耳草、

大蓟、肾蕨、箬竹、络石、常春藤、天葵；灌木含有胡颓子、中华石楠、山胡椒、茶树；乔木有杉木。

1.3.2 植物根际真菌的分离和培养。①依次称取每种植物的根系 1.00 g,用无菌水冲洗植物根系去除表面大颗粒土,紧贴在根系的土壤可保留;②将清洗干净的植物根系剪成 0.5 cm 的小段,放入 100 ml 双蒸水中振荡摇匀;③取 100 μl 溶液接种于选择性培养基上,每个植物根系重复 3 次;④将接种的平皿置于 27 ℃ 培养箱中培养 20 d 左右,检查培养皿中菌落生长情况。根据培养皿内菌落的形态、大小、色泽和生长速度等特点从每个样品中尽可能多地挑选单菌落,转入 SDAY 培养基划线,纯化,保存。

1.3.3 植物根际真菌的鉴定。对分离纯化的菌株培养 6 ~ 12 d 后,依据菌落培养性状和培养特征对菌落进行归类并统计数量,在光学显微镜下进行显微形态观察,记载菌丝、孢子、产孢结构等形态特征,参照相关真菌分类文献^[12]进行真菌形态鉴定,明确其分类地位,并用显微摄影仪拍照已鉴定的真菌形态。对于形态鉴定困难的菌株,需借助分子生物学手段进一步鉴定。

1.3.4 植物根际真菌菌落的计数。培养规定天数后,采用稀释平板法统计菌落数量。虽然该研究采用的是针对分离培养昆虫病原真菌的选择性培养基,但培养基也不能满足所有昆虫病原真菌的生长需求,所以得到的数据不能完全准确地表现出土壤中昆虫病原真菌的实际数量,但是可以作为相对数值来反映根际昆虫病原真菌的数量及其分布规律^[13]。

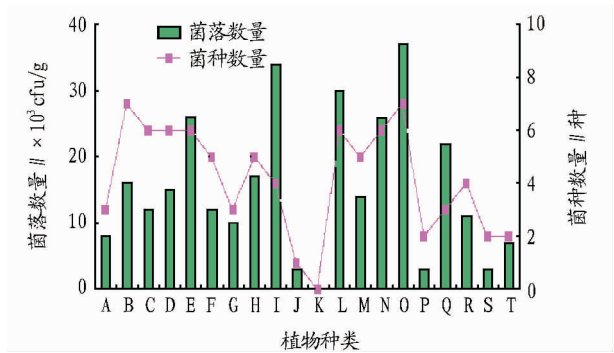
每克根系中菌落数 = 菌落数 × 稀释倍数 / 根系质量(g)

1.3.5 菌种的保存。将纯化培养的真菌接种到灭菌的甘油水溶液(甘油占 5%,无菌水占 95%)中,移至 4 ℃ 冰箱中保藏。

2 结果与分析

2.1 春季马鬃岭植物根际昆虫病原真菌的数量分析 由图 1 可知,20 种植物根际的昆虫病原真菌数量表现出一定的差异。真菌菌落数量从高到低顺序为天葵、虎耳草、箬竹、常春藤、铁线蕨、中华石楠、白叶莓、野蔷薇、云台南星、络石、紫背天葵、早熟禾、山胡椒、蛇莓、细叶麦冬、杉木、大蓟、胡颓子、茶树和肾蕨。其中,天葵根际昆虫病原真菌数量最高,为 3.7×10^4 cfu/g;而肾蕨根际昆虫病原真菌含量最低,未分离出菌落。分离到的昆虫病原真菌种类数量的变化趋势与菌落数量相似。野蔷薇和天葵根际昆虫病原菌种类最多,为 7 种,肾蕨根际未分离到真菌。由此可见,不同植物根际昆虫病原真菌种群数量差异较大。

2.2 春季马鬃岭植物根际昆虫病原真菌的科属分析 通过对马鬃岭自然保护区 15 种草本植物、4 种灌木和 1 种乔木根系采集,利用选择性培养基分离培养,共分离得到昆虫病原真菌 306 株,根据菌落形态、质地、颜色等宏观形态及显微形态特征(图 2),初步归为 2 科 7 属 15 个种。其中 12 个种为已知种,3 个为未定种。2 科分别为半知菌类的丛梗孢科和瘤座孢科。7 属分别为棒束孢属、白僵菌属、绿僵菌属、紫孢菌属、普可尼亚属、轮枝孢属和 *Simplicillium*。从梗孢科种类



注:A. 细叶麦冬;B. 野蔷薇;C. 紫背天葵;D. 云台南星;E. 铁线蕨;F. 早熟禾;G. 蛇莓;H. 白叶莓;I. 虎耳草;J. 大蓟;K. 肾蕨;L. 箬竹;M. 络石;N. 常春藤;O. 天葵;P. 胡颓子;Q. 中华石楠;R. 山胡椒;S. 茶树;T. 杉木。

图 1 不同植物根际昆虫病原真菌菌株数量和种类统计

最多,共 4 属 12 种,占全部种类的 79.99%。从表 1 可知,棒束孢属、白僵菌属和绿僵菌属为优势属,含 11 种,占春季马鬃岭自然保护区植物根际昆虫病原真菌的 73.32%。其他 4 属都只有 1 种,种数占 26.68%。可见,春季马鬃岭自然保护区不同植物根际昆虫病原真菌优势属种现象明显。

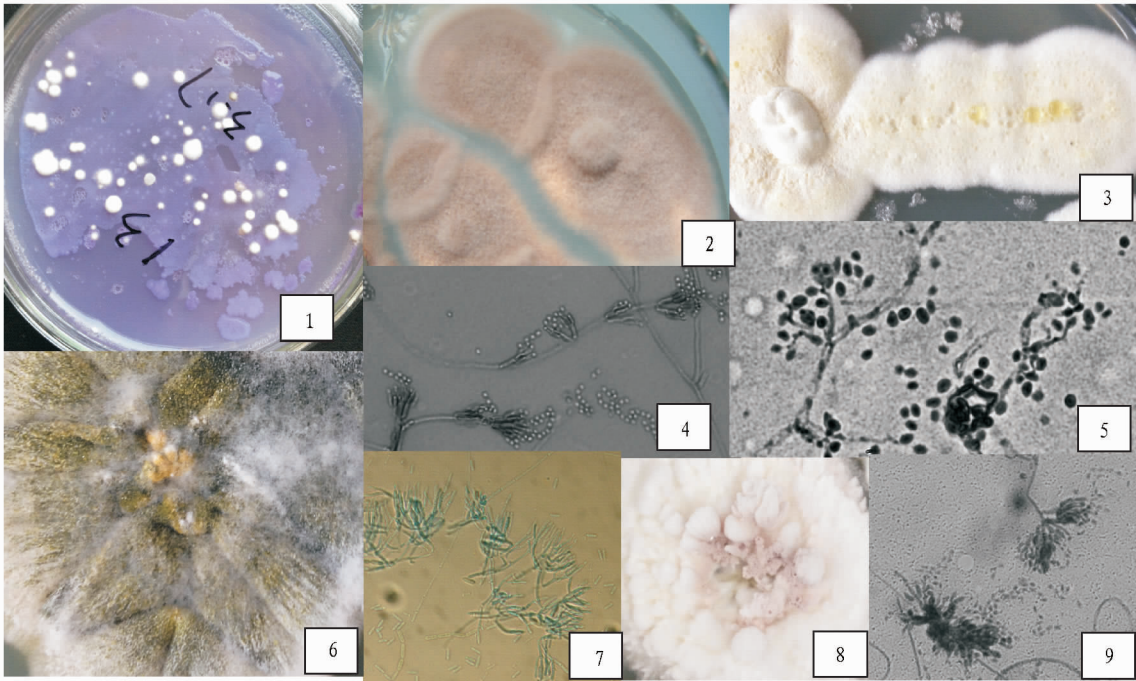
表 1 马鬃岭植物根际昆虫病原菌科、属统计

科名	属名	种数	占总种数的百分比/%
丛梗孢科	棒束孢属	7	46.66
	白僵菌属	2	13.33
	绿僵菌属	2	13.33
	紫孢菌属	1	6.67
瘤座孢科	普可尼亚属	1	6.67
	轮枝孢属	1	6.67
	<i>Simplicillium</i>	1	6.67

2.3 春季马鬃岭植物根际昆虫病原真菌的种类分布 春季马鬃岭自然保护区植物根际昆虫病原真菌的分离比率为 95%,20 种植物中仅肾蕨没有分离到昆虫病原真菌,且菌株数量和菌种都较丰富。分离出了球孢白僵菌、绿僵菌属、环链棒束孢、玫烟色棒束孢、粉棒束孢、爪哇棒束孢、轮枝孢等昆虫病原真菌。其中以白僵菌属真菌分布最广泛且菌株数量大,20 种植物根际中有 17 种植物分离出白僵菌,且所得菌落数量较大。可见,白僵菌属真菌是该区域春季植物根系优势真菌,其次是玫烟色棒束孢和淡紫紫孢菌。布氏白僵菌和普可尼亚属真菌都仅有 1 种植物根际分离到,分离比率仅为 5%(表 2)。

3 结论

试验结果表明,安徽省六安市马鬃岭自然保护区植物根际昆虫病原真菌物种多样性较丰富,共分离出 2 科 7 属 15 个种,以球孢白僵菌数量最多,其次是玫烟色棒束孢和淡紫紫孢菌。研究发现靶标昆虫和病原体大部分相互作用的位置是寄主植物根际,意味着植物根际在将来可以被考虑作为筛选真菌菌株的载体,同时也提高了利用根际微生物进行害虫防治的可能性,增加了利用昆虫病原真菌对农作物进行保护的新领域。



注:1——选择性培养基分离的菌落;2——淡紫紫孢菌菌落;3——淡紫紫孢菌显微图片;4——球孢白僵菌菌落;5——球孢白僵菌显微图片;
6——金龟子绿僵菌菌落;7——金龟子绿僵菌显微图片;8——玫烟色棒束孢菌落;9——玫烟色棒束孢显微图片。

图 2 部分分离菌株的菌落性状与显微观察

表 2 春季马鬃岭植物根际昆虫病原真菌种类及分布

菌种	细叶	野蒿	紫背	云台	铁线	早熟	蛇莓	白叶	虎耳	大蓟	肾蕨	箬竹	络石	常春藤	天葵	胡颓	中华	山胡	茶树	杉木	总数
	麦冬	薇	天葵	南星	蕨	禾		莓	草							子	石楠	椒			
球孢白僵菌	3	3	2	2	15	1	3	10	3	3	0	9	0	0	21	2	15	8	2	0	102
布氏白僵菌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
金龟子绿僵菌	1	2	0	5	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	11
黄绿绿僵菌	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4
环链棒束孢	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8	2	0	0	0	0	0	0	12
玫烟色棒束孢	0	0	4	2	1	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	5	21
粉棒束孢	0	3	0	0	0	5	0	2	0	0	0	3	0	15	0	0	0	1	0	0	29
斜链棒束孢	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	5
爪哇棒束孢	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	5
棒束孢未知种 1	0	2	1	0	0	0	0	0	5	0	0	8	0	5	0	0	0	0	0	0	21
棒束孢未知种 2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	6
淡紫紫孢菌	0	0	3	0	2	3	0	1	23	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	37
轮枝孢属	4	2	1	2	5	0	6	2	3	0	0	2	0	0	2	0	4	1	0	2	36
普可尼亚属	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Simplicillium</i>	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0	0	0	0	0	0	11
属未知种																					
总数	8	16	12	15	26	12	10	17	34	3	0	30	14	26	37	3	22	11	3	7	306

参考文献

[1] 赵官成,梁健,淡静雅,等. 土壤微生物与植物关系研究进展[J]. 西南林业大学学报,2011,31(1):83-88.

[2] 胡云飞,张玥,张彩丽,等. 茶树根系内生真菌与根际土壤真菌的季节多样性分析[J]. 南京农业大学学报,2013,36(3):41-46.

[3] 陈名君,周玉宝,黄勃. 分离自安徽土壤金龟子绿僵菌种群的遗传异质性研究[J]. 菌物学报,2013,32(2):179-191.

[4] 杨震元,赵军,郝蕾蕾,等. 用 *gfp* 基因标记法研究金龟子绿僵菌在玉米根际的定殖动态[J]. 中国生物防治,2009,25(3):215-219.

[5] SASAN R K,BIDOCHKA M J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development[J]. American Journal of Botany,2012,99(1):101-107.

[6] LIAO X G,FANG W G,LIN L C,et al. *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase(MrINV)that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization[J]. PLoS One,2013,8(10):78118.

[7] WYREBEK M,HUBER C,SASAN R K. Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity[J]. Microbiology,2011,157:2904-2911.

[8] 祝明亮,夏振远,张克勤,等. 淡紫拟青霉在烤烟根际定殖能力分析[J]. 中国烟草学报,2004,10(1):25-28.

[9] RENWICK A,CAMPBELL R,COE S. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*[J]. Plant Pathology,1991,40(4):524-532.

[10] TERRENCE H B,SAAD E H,AURELIEN L M,et al. Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soil is related to plant phylogeny[J]. The ISME Journal,2014,8:331-343.

[11] DOTANIYA M L,PRASAD D,MEENA H M,et al. Influence of phyto-siderophore on iron and zinc uptake and rhizospheric microbial activity[J]. African Journal of Microbiology Research,2013,7(51):5781-5788.

[12] 蒲垫龙,李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1996:1-674.

[13] 梁晨,吕国忠. 土壤真菌分离和计数方法的探讨[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(5):515-518.