

厚垣普奇尼亚菌 *Pochonia chlamydosporia* 产生的几丁质酶对南方根结线虫卵孵化的影响

张成敏, 武 侠, 才秀华

(青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东青岛 266109)

摘要: 【目的】卵寄生真菌厚垣普奇尼亚菌 *Pochonia chlamydosporia* 产生的几丁质酶对定居性根结类和胞囊类线虫的卵壳消解起重要促进作用。线虫卵寄生真菌产生几丁质酶的特性是评价食线虫真菌生物防治潜力的重要生化指标之一。【方法】利用 NAG 法和 pNP 法分别测定 7 株不同来源厚垣普奇尼亚菌 *Pochonia chlamydosporia* 几丁质酶的降解酶系和外切酶活性。【结果】7 个菌株都能够产生外切酶, 其中 QNAV97-2、NRRL13094、CFCC84963 和 CFCC80919 菌株能够产生几丁质降解酶系, 几丁质酶活性染色检测分别有 2 条和 4 条具有几丁质酶活性的蛋白谱带, 其中 CFCC80919 和 QNAV97-2 分别产生的 38.9 kD 和 39.8 kD 几丁质酶可能是已知的 CHI43 几丁质酶。具有几丁质降解酶活性的 4 个厚垣普奇尼亚菌对根结线虫的卵孵化抑制率为 40.32%~55.15%, 未测定出几丁质降解酶活性的 3 个菌株对根结线虫的卵孵化抑制率不足 20%。显微观察处理的南方根结线虫卵壳变形和破坏。【结论】厚垣普奇尼亚菌系产生的几丁质酶能够消解南方根结线虫卵壳, 特别是胚前发育期未成熟卵, 抑制卵孵化或杀死卵, 且在消解卵的过程中起重要作用。厚垣普奇尼亚菌的几丁质酶活性水平可能是造成该类菌杀线活性差异的原因之一。

关键词: 厚垣普奇尼亚菌; 南方根结线虫; 几丁质酶; 卵孵化

Effect of chitinases produced by *Pochonia chlamydosporia* on egg-hatching of *Meloidogyne incognita*

ZHANG Cheng-min, WU Xia, CAI Xiu-hua

(College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong)

Abstract: 【Objective】Chitinases produced by egg-parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia* have been suggested to play an important role in digestion of root knot and cyst nematode eggshells. The egg-parasitic fungi with chitinase activity is one of the most important biochemical characters in suppression of egg hatching, and can be used for evaluation of the biocontrol potential of those fungi. 【Method】The chitinolytic systems and exochitinase produced by 7 isolates of *P. chlamydosporia* were measured by means of NAG(N-acetylglucosamine) and pNP(p-nitrophenol) respectively. 【Result】The results showed that all the isolates had different levels of exochitinase activity, however only the isolates QNAV97-2, NRRL13094, CFCC84964 and CFCC80919 had activity of chitinolytic systems. On SDS-PAGE analysis with 0.01% glycol chitin, two and four protein bands with chitinase activity were detected, the chitinases of 38.9kDa and 39.8kDa produced by CFCC80964 and QNAV97-2 were believed to be the CHI43 purified in early studies. Inhibitory rates to egg hatching of *Meloidogyne incognita* by 4 isolates with chitinolytic activity were ranged from 40.32% to 55.15%, however, those by 3 isolates without chitinolytic activity were lower than 20%. Microscopy observations demonstrated that the eggshells of *M. incognita* was deformed and destroyed in the treatment of culture filtrates from *P. chlamydosporia*. 【Conclusion】It is concluded that the chitinases produced by *P. chlamydosporia* causes lysis of the eggshell of *M. incognita*, especially immature eggs at early embryonic development stage, and result in egg hatching inhibition and/or egg kill. The digestion of the eggshell by chitinase activity plays an important role in the control of *M. incognita*. Difference in chitinase activity

收稿日期: 2009-04-14; 接受日期: 2009-08-26

基金项目: 山东省良种工程重大课题“生物农药微生物种质创新与高效利用研究”、青岛市科技局课题(08-1-3-22-jch)

作者简介: 张成敏(1983-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向为线虫生物防治。E-mail: zcm1125@163.com。通信作者武 侠(1963-), 男, 吉林省吉林市人, 副教授, 博士, 研究方向为植物病原线虫生物防治。E-mail: wuxia3897@163.com

levels produced by *P. chlamydosporia* may result in their difference in nematicidal activity to nematodes.

Key words: *Pochonia chlamydosporia*; *Meloidogyne incognita*; chitinases; egg-hatching

0 引言

【研究意义】根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 病害是世界性重要的植物寄生线虫病害。近年来, 根结线虫的危害给中国的农业生产造成了严重损失, 特别是北方保护地种植的茄科和葫芦科蔬菜受害非常严重^[1-3]。根结线虫寄主范围广, 目前尚缺少抗根结线虫的商品化作物品种, 而且与非寄主植物轮作的措施在保护地内难以施行^[4-5]。化学杀线虫药剂防治根结线虫病害由于农药残留和环境污染等原因, 已经被禁用或即将被禁用。迄今生产上尚无安全有效防治根结线虫病害措施。解决目前根结线虫危害问题, 除需要加强抗线虫作物育种和抗线虫砧木的研究和利用外, 土壤微生态调控和微生物制剂的研制已成为国内外研究和应用的热点^[5-10]。生物防治是根结线虫病害可持续治理的理想途径之一^[8-9]。【前人研究进展】厚垣普奇尼亚菌 *Pochonia. Chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams 是目前国内外研究最多的线虫卵寄生真菌之一^[11-12]。该菌是一种兼性寄生菌, 其菌丝、分生孢子和厚垣孢子均能在土壤中存活, 可通过侵袭丝寄生根结线虫的卵和雌虫^[10]。该菌与线虫卵壳紧密接触后, 穿破卵壳, 进而降解卵壳、卵黄质、几丁质层和原生质体, 最终杀死卵。当厚垣普奇尼亚菌侵入雌虫或虫卵后, 就开始消解并吸收其中的营养物质, 在此过程中, 该菌通过产生枯草杆菌蛋白酶类和几丁质酶降解线虫体壁和卵壳^[13]。线虫的卵壳主要由几丁质 (约占 40%) 和蛋白质构成^[14], 是防御土壤微生物侵入的有效屏障。根结线虫卵寄生真菌厚垣普奇尼亚菌 (*P. chlamydosporia*)、萨克拉普奇尼亚菌 (*P. suchlasporia*) 和淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 能够产生几丁质降解酶系, 主要包括几丁质内切酶 (EC3.2.1.14) 和一种外切酶 (EC3.2.1.30)^[15-16]。这些几丁质降解酶在线虫卵壳降解或软化过程中发挥重要作用, 它们能够降低卵壳透性, 干扰线虫卵正常孵化或使 2 龄幼虫提早破壳而不能在土壤中存活^[15-18]。几丁质降解酶系活性的强弱是筛选和评价线虫卵寄生或产毒真菌生物防治活性的重要指标之一。【本研究切入点】本项研究应用 N-乙酰葡萄糖胺 (NAG) 法和对硝基苯 (pNP) 法分别测定厚垣普奇尼亚菌 7 株来源不同的菌株产生的几丁质酶内切酶和外切酶活性, 并对能够产生几丁

质降解酶系的菌株进行活性染色分析; 离体条件下测定厚垣普奇尼亚菌培养滤液对根结线虫卵孵化的影响。【拟解决的关键问题】分析不同厚垣普奇尼亚菌菌株产生几丁质酶活性与孵化抑制的关系, 以期为进一步评价它们的生防潜力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本试验所用的 7 个菌株来源不同, 它们分别是 QNAV97-2 (分离自大豆胞囊线虫胞囊, 黑龙江), QNAV97-5 (分离自大豆胞囊线虫胞囊, 黑龙江), QNAV97-6 (分离自大豆胞囊线虫胞囊, 黑龙江), NRRL13094 (分离自禾谷胞囊线虫胞囊, 墨西哥), 均由青岛农业大学线虫研究室保存; CFCC84963 (QNMP0214, 分离自根结线虫卵, 山东), CFCC84964 (QNZF0601-3, 分离自根结线虫卵, 山东), CFCC80919 (QNPC9908, 分离自大豆胞囊线虫, 黑龙江), 由中国林业菌种保藏中心和青岛农业大学线虫研究室保存。

1.2 产几丁质酶培养条件

250 ml 的锥形瓶内盛有 120 ml 的液体培养基 (0.2% 胶体几丁质, 0.2% Na₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% NH₄Cl, 0.05% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% CaCl₂·2H₂O 和 0.2% Tryptone, Sigma) 调 pH 为 6.0。121℃ 灭菌 30 min 备用。

将在 CMA 平板上活化 7 d 的厚垣普奇尼亚菌菌落边缘菌块 (直径 6 mm) 接种于含 120 ml 几丁质液体培养基中, 每瓶放菌块 3 个, 28℃ 150 r/min 振荡培养, 重复 3 次。从第 2 天到第 32 天, 取 1.5 ml 培养滤液, 11 000 r/min 离心 15 min, 上清液于 -20℃ 保存, 供几丁质降解酶测定, 隔天取样 1 次。

1.3 几丁质降解酶活性测定

1.3.1 几丁质降解酶系活性测定 几丁质降解酶系活性依据胶体几丁质生成的 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, NAG) 含量测定。酶促反应体系包括: 0.1 ml 菌培养滤液、0.5 ml 1.0% 胶体几丁质和 0.4 ml 0.1 mol·L⁻¹ pH 5.5 磷酸钠缓冲液。酶促反应 37℃, 150 r/min 振荡 2 h, 反应后立即加 200 μl 1 mol·L⁻¹ NaOH 中止反应, 11 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清液 500 μl 于 1 ml Schales 溶液, 沸水中显

色反应 15 min, 420 nm 波长测其吸光度。以反应前加 200 μl 1 mol·L⁻¹ NaOH 不发生酶促反应为对照, 重复 3 次。以已知含量的 N-乙酰葡萄糖胺 (NAG) (0~100 μg) 制作标准曲线, 1 个酶活单位 (U) 定义为 1 h 产生 1 μmol NAG 的酶量。

1.3.2 几丁质外切酶活性测定 几丁质外切酶 (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) 活性测定以 pNP-NAG 为底物, 测定酶促反应生成的对硝基苯酚 (pNP, p-nitrophenol) 的含量。酶促反应体系包括: 50 μl 菌培养滤液、50 μl pNP-NAG (1 mg·ml⁻¹) 和 100 μl 0.1 mol·L⁻¹ pH 5.0 醋酸缓冲液。酶促反应 37°C, 150 r/min 振荡反应 2 h, 反应后立即加 1 ml 1 mol·L⁻¹ NaOH 中止反应。混匀后立即在 405 nm 下测量其吸光度。以反应前加 1 ml 1 mol·L⁻¹ NaOH 不反应酶促反应为对照, 重复 3 次。以已知含量对硝基苯酚 (pNP) 制作标准曲线, 1 个酶活单位 (U) 定义为 1 h 产生 1 μmol pNP 的酶量。

1.4 几丁质降解酶系活性染色

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 荧光染色法^[19-21]: 在 7% 丙烯酰胺中加入糖基化几丁质 (glycol chitin) 作为几丁质酶反应底物, 4°C 下电泳, 电泳结束后, 将凝胶浸泡于 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸缓冲液 (1% Triton X-100, 1% skin milk, pH 5.0) 中, 37°C 微振荡 2 h 去除 SDS。随后, 将胶片取出置入 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸缓冲液中, 37°C 复性 6~8 h。底物胶片用 M2R 染色, 取出底物胶片放入超纯水 2 h 去除多余荧光素, 将胶片置于 UVP 紫外灯下观察, 所看到的黑色胶带即为几丁质酶活性带。

1.5 根结线虫卵悬液的制备

将感染南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 的新鲜丝瓜根, 经水冲去土壤后, 在解剖镜下直接解剖病根, 挑出卵囊, 置于含 2% NaClO 的小瓶中, 涡旋振荡, 制备浓度为 1 000 eggs/ml 的卵悬浮液, 待用。

1.6 培养滤液对卵孵化抑制率的测定

将几丁质降解酶活性高峰期的 4 个厚垣普奇尼亚菌培养滤液和根结线虫卵悬浮液加入到 24 孔板中, 各菌株均设 5 个浓度梯度, 分别为 5%、10%、15%、20% 和 25%, 以无菌水做对照, 重复 4 次, 28°C 培养 7 d (间隔 2 d 轻微晃动以保证通气)。定期观察卵壳变化情况, 7 d 统计卵孵化数, 计算卵孵化相对抑制率。

$$\text{孵化率} (\%) = (Jf \times 100) / (Ei + Ji)$$

Ei 表示起始成熟卵的数量; Ji 表示起始 2 龄幼虫的数量; Jf 表示孵化 2 龄幼虫的数量。

相对抑制率 (%) = (对照孵化率 - 处理孵化率) / 对照孵化率。

2 结果与分析

2.1 几丁质降解酶系活性测定结果

7 株厚垣普奇尼亚菌在以 0.2% 胶体几丁质作为主要碳源和氮源的半液体培养基中, 其培养滤液表现出的几丁质降解酶系活性存在明显差异, 其中 QNAV97-2、NRRL13094、CFCC84964 和 CFCC80919 的培养滤液具有几丁质降解酶系活性 (图 1), QNAV97-5、QNAV97-6 和 CFCC84963 培养滤液未测定出几丁质降解酶系活性。具有几丁质降解酶系的 4 个菌株从第 2 天开始表现出活性, CFCC80919 酶活性上升迅速, 第 12 天达到酶活性峰值 10.99 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, 随后缓慢下降; 而 QNAV97-2 和 CFCC84964 第 24 天达到酶活性高峰, 分别为 21.39 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 17.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, 至第 32 天仍保持高峰活性水平; NRRL13094 第 28 天达到酶活性峰值 15.79 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, 随后略有下降。

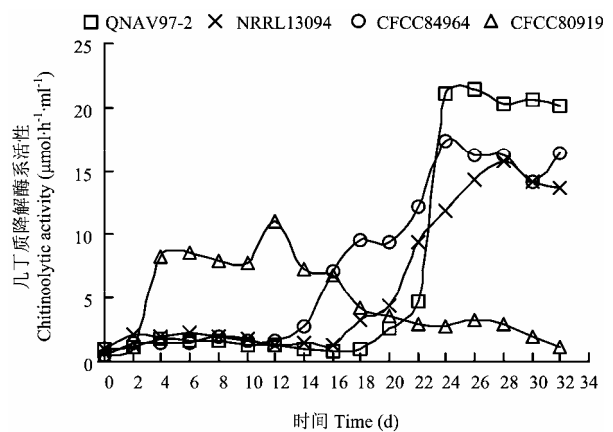


图 1 4 株厚垣普奇尼亚菌培养滤液的几丁质降解酶系活性

Fig. 1 Chitinolytic activity in culture filtrates from 4 isolates of *Pochonia chlamydosporia*

2.2 几丁质外切酶活性测定

7 株厚垣普奇尼亚菌从第 2 天开始均能产生几丁质外切酶。其中 NRRL13094、CFCC84964 培养滤液第 6 天达到酶活性高峰, 至第 32 天一直保持高水平活性, 稳定在 0.21~0.23 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ 之间; 而 QNAV97-2 培养滤液酶活性于第 4 天快速上升至 0.13 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$,

随后下降, 20 d 后又明显上升, 第 28 天达到高峰值 $0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$; CFCC80919 培养滤液酶活性第 14 天达到高峰值 $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, 随后下降 (图 2)。在未测定出几丁质降解酶系的 3 株厚垣普奇尼亚菌中, QNAV97-6 和 CFCC84963 培养滤液几丁质外切酶活性较高, 第 6 天达高峰值, 分别为 0.21 和 $0.17 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$; QNAV97-5 酶活性缓慢上升, 至第 30 天达高峰值 $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

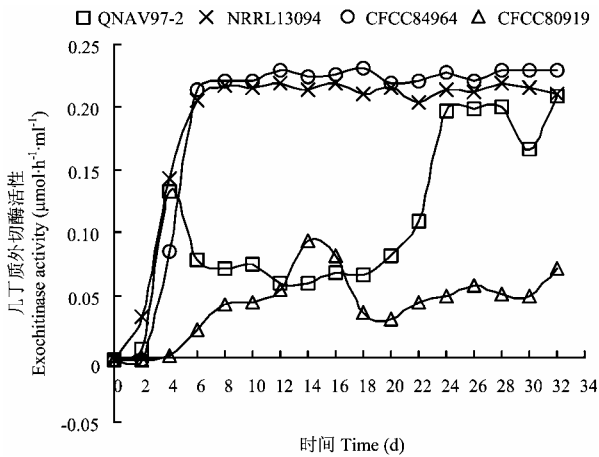


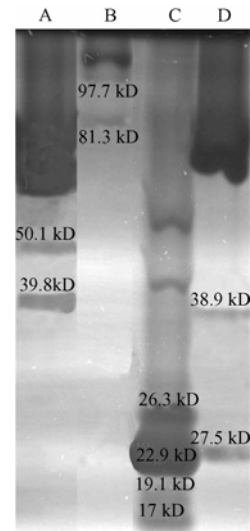
图 2 4 株厚垣普奇尼亚菌培养滤液的几丁质外切酶活性
Fig. 2 Exochitinase activity in culture filtrates from 4 isolates of *Pochonia chlamydsoporia*

2.3 几丁质酶活性染色

采用含 0.01% 糖基化几丁质改良的 SDS-PAGE 电泳活性染色检测 4 株厚垣普奇尼亚菌产生几丁质降解酶系活性, 并估算产生的几丁质酶分子量 (图 3)。CFCC84964 有 4 条几丁质酶活性谱带, 分子量分别为 17、19.1、22.9 和 26.3 kD; CFCC80919 有 2 条几丁质酶活性谱带, 分子量分别为 27.5 和 38.9 kD; QNAV97-2 有 2 条几丁质酶活性谱带, 分子量分别为 39.8 和 50.1 kD; NRRL13094 有 2 条几丁质酶活性谱带, 分子量分别为 81.3 和 97.7 kD。

2.4 几丁质酶对南方根结线虫卵孵化抑制

将 4 株厚垣普奇尼亚菌几丁质降解酶活性高峰期的培养滤液与根结线虫卵悬液混合于 28°C 下培养, 测定 4 个菌株不同浓度培养滤液对根结线虫卵孵化的抑制作用, 4 个菌株培养滤液对根结线虫的卵孵化抑制率随时间的增加而递增。同一菌株培养滤液在 5%、10%、15%、20% 和 25% 稀释浓度处理卵, 在 15%、20% 和 25% 培养滤液稀释浓度下, 7 d 卵孵化抑制率差



A: QNAV97-2; B: NRRL13094; C: CFCC84964; D: CFCC80919

图 3 4 株厚垣普奇尼亚菌几丁质酶活性染色谱带分析
Fig. 3 Analysis of chitinase activity from 4 isolates of *Pochonia chlamydsoporia* using native polyacrylamide gels

异不显著, 如 QNAV97-2 分别为 54.63%、54.95% 和 55.15%; CFCC84964 分别为 40.30%、40.74% 和 42.15%。不同菌株培养滤液在同一处理浓度下对卵孵化抑制率差异明显, 如菌培养滤液稀释为 25% 的浓度下 (7 d), 具有几丁质降解酶活性的 4 个厚垣普奇尼亚菌对根结线虫的卵孵化抑制率为 40.32%~55.15%, 5 d 后抑制率处于稳定范围; 未测定出几丁质降解酶活性的 3 个菌株对根结线虫的卵孵化抑制率不足 20%。其中 QNAV97-2 抑制率最高, 为 55.15% (图 4); CFCC84963 抑制率最低, 为 12.14%。

显微镜下观察根结线虫卵壳变化发现: 处理第 1 d, 菌株 QNAV97-2、CFCC84964 和 CFCC80919 的卵壳稍有缢缩。3 d 后菌株 QNAV97-2 和 CFCC84964 处理可以看到卵内含物聚集, 卵壳变空; 对照组中可清晰的观察到卵内的 1 龄幼虫。7 d 后, 各菌株处理的卵壳均能看到不同程度的变形和破坏, 对照组中能看看到孵化的 2 龄幼虫 (图 5)。

3 讨论

根结线虫卵寄生真菌对根结线虫病生物防治具有很大潜力^[5-7]。筛选对根结线虫卵具有高效生物防治活性微生物是生物防治的基础。线虫卵寄生真菌产生的几丁质降解酶系对定居性根结类和胞囊类线虫的卵

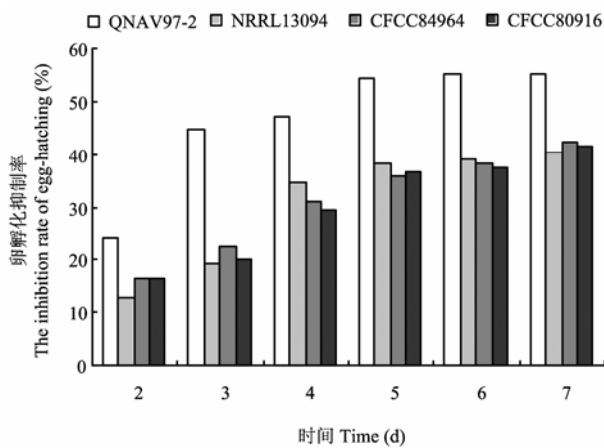
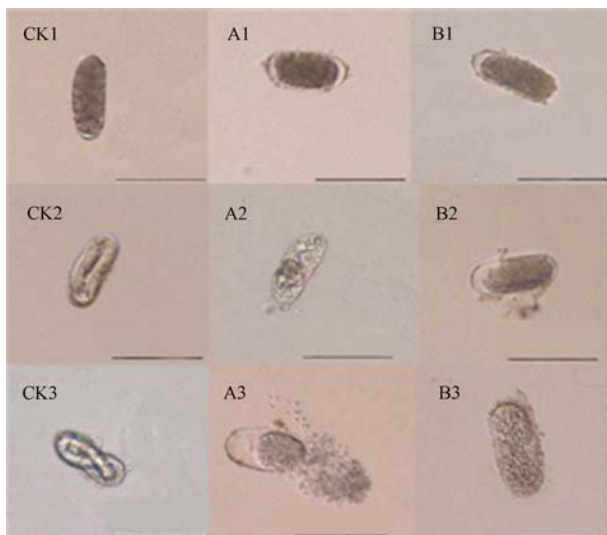


图 4 4 株 25%浓度厚垣普奇尼亚菌培养滤液对南方根结线虫卵孵化抑制效果

Fig. 4 Effects of the culture filtrates of 4 isolates from *Pochonia chlamydosporia* at the concentration of 25% on the hatching of eggs of *Meloidogyne incognita*



对照: 水; A: 菌株 QNAV97-2; B: CFCC84964。CK1, A1, B1: 处理后第 1 天南方根结线虫卵; CK2, A2, B2: 处理后第 3 天南方根结线虫卵; CK3, A3, B3: 处理后第 7 天南方根结线虫卵。比例尺 100 μm
 CK: Water; A: QNAV97-2; B: CFCC84964. CK1, A1, B1: *M. incognita* eggs on the first day; CK2, A2, B2: *M. incognita* eggs on the third day; CK3, A3, B3: *M. incognita* eggs on the seventh day. The scale bar is 100 μm

图 5 2 株厚垣普奇尼亚菌培养滤液处理对南方根结线虫卵发育的影响

Fig. 5 Effects of the culture filtrates of 2 isolates from *Pochonia chlamydosporia* on development of *Meloidogyne incognita* eggs

壳消解和被寄生起重要促进作用^[11]。

厚垣普奇尼亚菌对根结线虫的拮抗作用有不同的作用方式——寄生和卵孵化抑制。胚前发育期的卵对菌丝的侵染敏感, 含有幼虫或即将孵化 2 龄幼虫的卵不容易被侵染, 可能与被寄生卵表面的皱缩和凹陷导致降解酶系的活性减弱有关^[15-16]。卵寄生真菌分泌的几丁质酶和蛋白酶对根结线虫卵壳消解起重要作用, 这些降解酶通过降解并软化卵壳蛋白层和几丁质层, 增加卵壳透性进而穿透卵壳。线虫的卵壳是抵御土壤微生物侵染的有效屏障, 高效分泌几丁质酶和蛋白酶的卵寄生真菌对根结线虫卵寄生或孵化抑制具有巨大的生物防治潜力^[15-18]。

Tikhonov 等^[15]分离自西班牙塞维利亚禾谷胞囊线虫 (*Heterodera avenae*) 卵的厚垣普奇尼亚菌株, 静止培养产生几丁质降解酶系活性高峰出现在 18~20 d, 几丁质外切酶活性高峰出现在 25 d, 提取和纯化出 1 种分子量为 43 kD 的几丁质酶。本项研究中菌系振荡培养几丁质降解酶系活性出现的高峰 QNAV97-2 (24 d)、CFCC84964 (24 d) 和 NRRL13094 (28 d) 及 QNAV97-2 几丁质外切酶第 28 天达到高峰, 结果与 Tikhonov 等人研究结果基本吻合。而 CFCC80919 几丁质降解酶系活性高峰 (12 d) 出现早于其他 3 个菌系; CFCC84964、NRRL13094 和 CFCC80919 几丁质外切酶活性高峰分别出现在 6、6 和 14 d, 明显早于 Tikhonov 等报道的结果。根据这些菌系的培养滤液对南方根结线虫卵孵化抑制效果和卵壳破坏程度, 该菌系间几丁质降解酶系和外切酶活性高峰出现的时间与卵孵化抑制率和卵壳破坏并没有相关性; 而与未测定出几丁质酶活性的 3 个菌株差异明显。

几丁质酶活性染色分析, CFCC80919 和 QNAV97-2 分别产生的 38.9 和 39.8 kD 几丁质酶谱带认为是已知纯化的 CHI43 几丁质酶。Tikhonov 等^[16]报道的厚垣普奇尼亚菌产生的 CHI43 几丁质酶 (43 kD) 是纯化后变性电泳估算的分子量; 而本研究是应用活性电泳方法估算的分子量, 可能会有一定偏差。而其它检测出的几丁质酶为新研究结果, 有待于进一步研究。本试验测定几丁质酶分子量谱带中出现了一些黑带, 可能是由于培养滤液离子浓度引起, CFCC84964 出现的波状条带不是几丁质酶谱带。

4 结论

在生防实践中, 同种菌的不同菌系间杀线活性存

在明显差异,前人认为可能是由于菌系间的培养性状、产孢特性、菌剂剂型和土壤因子等所致^[22-25]。厚垣普奇尼亚菌分泌的几丁质酶活水平与对甜菜胞囊线虫 (*H. schachtii*) 的致病性成正相关^[23]。

本研究结果表明,厚垣普奇尼亚菌系产生的几丁质酶能够消解或软化南方根结线虫卵壳,特别是胚前发育期卵(含1龄幼虫),抑制卵孵化或杀死卵,且在寄生卵的过程中起重要作用。该菌产生几丁质酶特性是筛选根结线虫高效生防菌株的重要指标之一。

进一步研究验证几丁质酶和其它因子在卵寄生真菌对线虫卵的致病过程中的作用,评价高效产生几丁质酶的卵寄生真菌控制根结线虫病害的田间效果,为开发利用卵寄生真菌提供理论依据。

References

- [1] 沈 颖, 李锡香, 冯兰香, 王海平, 宋江萍, 杨翠荣, 龚会芝. 葫芦科蔬菜种质资源对南方根结线虫的抗性评价. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 340-342.
Shen D, Li X X, Feng L X, Wang H P, Song J P, Yang C R, Gong H Z. Evaluation of on resistance of cucurbitaceae germplasm resources to root-knot nematode. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8(3): 340-342. (in Chinese)
- [2] 董道峰, 曹志平, 王秀徽, 胡 菊, Maria Lodovica Gullino. 抗根结线虫砧木对番茄生长及产量的影响. 园艺学报, 2007, 34(5): 1305-1308.
Dong D F, Cao Z P, Wang X H, Hu J, Maria Lodovica Gullino. Effect of nematode resistant rootstocks on growth characteristics and yields of tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(5): 1305-1308. (in Chinese)
- [3] 徐小明, 徐 坤, 于 芹, 张晓艳. 茄子砧木对南方根结线虫抗性的鉴定与评价. 园艺学报, 2008, 35(10): 1461-1466.
Xu X M, Xu K, Yu Q, Zhang X Y. Screening and evaluation of eggplant rootstock for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(10): 1461-1466. (in Chinese)
- [4] Esmenjaud D, Voisin R, Van Ghelder C, Bosselut N, Lafargue B, Di Vito M, Dirlewanger E, Poëssel J L, Kleinhentz M. Genetic dissection of resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in plum, peach, almond, and apricot from various segregating interspecific *Prunus* progenies. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, 5: 279-289.
- [5] Dube B, Smart G C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, 1987, 19(2): 222-227.
- [6] Jatala P. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 1986, 24: 453-489.
- [7] Kerry B R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematode. *Journal of Nematology*, 1990, 22(4S): 621-631.
- [8] Atkins S D, Hidalgo-Diaz L, Kalisz H, Mauchline T H, Hirsch P R, Kerry B R. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) in organic vegetable production. *Pest Management Science*, 2003, 59: 183-189.
- [9] Morton C O, Hirsch P R, Kerry B R. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi-a review of the application of molecular biology to understand infection process and to improve biological control. *Nematology*, 2004, 6(2): 161-170.
- [10] Stirling G R. *Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects*. Wallingford: CABI, 1991: 106-108.
- [11] Gams W A. Contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1988, 94: 123-148.
- [12] Zare R, Gams W, Evans H C. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 2001, 73: 51-86.
- [13] Irving F, Kerry B R. Variation between strains of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, II. factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica*, 1986, 32: 474-485.
- [14] Wharton D A. Nematode egg-shells. *Parasitology*, 1980, 81: 447-463.
- [15] Tikhonov V E, Lopez-Llorca L V, Salinas J, Jansson H B. Purification and characterization chitinases from the Nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 35: 67-78.
- [16] Khan A, Williams K, Molloy M P, Nevalainen H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expression & Purification*, 2003, 32: 210-220.
- [17] Lopez-Llorca L V, Duncan G H. Effects of fungal parasites on cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae* Woll.) from naturally infested soil-a scanning electron microscopy study. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991, 37: 218-225.
- [18] Dackman C, Chet I, Nordbring-Hertz B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: Infection and enzymatic activity. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 62: 201-208.
- [19] Trudel J, Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 1989, 178: 362-366.

- [20] Guthrie J L, Khalif S, Castle A J. An improved method for detection and quantification of chitinase activities. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51: 491-495.
- [21] Zou X H, Nonogaki H, Welbaum G E. A gel diffusion assay for visualization and quantification of chitinase activity. *Molecular Biotechnology*, 2002, 22: 19-23.
- [22] Cayrol J C, Djian C, Pijarowski L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue Nématology*, 1989, 12(4): 331-336.
- [23] Kim D G, Riggs R G, Correll J C. Isolation, characterization and distribution of a biocontrol fungus from cysts of *Heterodera glycines*. *Phytopathology*, 1998, 88(5): 465-471.
- [24] Sorribas F J, Ornat C, Galeano M, Lucas S V. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science and Technology*, 2003, 13(8): 707-714.
- [25] Meyer S L F, Massoud S I, Chitwood D J, Robert D P. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 2000, 2(8): 871-879.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)

《浙江农业学报》

《浙江农业学报》——全国中文核心期刊, 英国 CAB 文摘数据库收录期刊, 中国科学引文数据库 (CSCD) 收录期刊, 中国科技核心期刊。据中国学术期刊 (光盘版) 电子杂志社关于期刊发行与传播统计报告, 《浙江农业学报》2007 年机构用户总计已达 2668 个, 分布在 10 个国家和地区, 个人读者分布在 22 个国家和地区。另据 2008 年中国学术期刊综合引证年度报告, 《浙江农业学报》5 年影响因子达到 0.770, 他引总引比为 0.93。该刊曾被浙江省推荐为国家期刊奖候选期刊, 获全国优秀农业期刊奖和浙江省优秀期刊奖。

该刊为双月刊, 大 16 开本, 封面彩色铜版纸, 逢单月 25 日出版。国内每期定价 8.00 元, 全年 6 期 48.00 元。该刊系参加“全国非邮发报刊联合征订”的期刊, 请广大订户直接向“全国非邮发报刊联合征订服务部”订阅, 地址: 300385 天津市大寺泉集北里别墅 17 号联合征订服务部; 电话: (022) 23973378, 23692479; E-mail: LHZD@public.tpt.tj.cn; 需要联合征订目录者, 可直接向征订服务部函索或上网查阅。网址: www.LHZD.com, 欢迎上网, 下载“电子订单”订阅。漏订者请直接与该刊编辑部联系。

电话: (0571) 86404157 (订刊); 传真: (0571) 86404055; E-mail: zjnyxb@126.com; http://www.zjnyxb.cn

地址: 杭州石桥路 198 号浙江省农业科学院 (310021)

开户银行: 杭州市农行机场路分理处

帐号: 浙江省农业科学院农村发展与信息研究所

312-015301040007606-55