

# 不同抑制性土壤真菌菌株对大豆胞囊线虫的抑制作用

陈井生<sup>1</sup>, 李肖白<sup>1</sup>, 李泽宇<sup>1\*</sup>, 范文艳<sup>2</sup>, 贾洪琪<sup>3</sup>, 潘红丽<sup>1</sup>, 倪洪涛<sup>3</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316; 2. 黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163316; 3. 黑龙江大学 农业与资源环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:** 利用稀释分离法, 从抑制性土壤中分离获得真菌菌株, 研究不同菌株对大豆胞囊线虫的抑制效果。结果表明, 获得的 100 株真菌中有 5 个菌株对大豆胞囊线虫胞囊孵化和二龄幼虫(J2)具有抑制活性, 分别是 Dq012、Dq059、Dq003、Dq030 和 Dq101。经 Dq012 发酵液处理后, 大豆胞囊线虫 J2 的校正死亡率达到 80.84%, 经其他 4 株真菌处理后校正死亡率均在 70% 左右。Dq012 发酵液对胞囊孵化的相对抑制率达到 87.69%, Dq003 和 Dq030 发酵液对胞囊孵化的相对抑制率也在 80% 以上。用 5 个菌株的发酵液包衣处理大豆种子, 能够抑制大豆胞囊线虫的繁殖, 其中菌株 Dq059 的抑制作用最强, Dq012 次之, Dq030 的抑制作用最弱, 抑制率分别为 83.05%、80.58% 和 41.52%。综上所述, 菌株 Dq012 对大豆胞囊线虫的抑制活性最高, 其他 4 株效果接近, 但 Dq030 对胞囊形成的抑制效果一般。

**关键词:** 抑制性土壤; 生防真菌; 大豆胞囊线虫; 抑制作用

**中图分类号:** S435.651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)07-0090-03

## Suppression of Different Fungus Strains in Suppressive Soil on *Heterodera glycines*

CHEN Jing-sheng<sup>1</sup>, LI Xiao-bai<sup>1</sup>, LI Ze-yu<sup>1\*</sup>, FAN Wen-yan<sup>2</sup>,

JIA Hong-qi<sup>3</sup>, PAN Hong-li<sup>1</sup>, NI Hong-tao<sup>3</sup>

(1. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China;

2. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163316, China;

3. Agricultural Resources and Environment Institute, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

**Abstract:** Fungi could reduce nematode population by their antagonistic behavior and showed a great potential as biocontrol agents. The strains Dq012, Dq059, Dq003, Dq030 and Dq101 were isolated from nematode-suppressive soil by dilution. The effects of different strains on egg hatching and activity of second stage juvenile (J2) of *Heterodera glycines* were tested. The results showed that the corrected mortality rate of J2 was 80.84% when treated by Dq012, and about 70% by the other strains. The suppressive percentages of cyst hatching by Dq012, Dq059, Dq003, Dq030 and Dq101 were 87.69%, 76.54%, 87.31%, 82.69% and 73.58%, respectively. The strains could disturb cyst formation on the surface of soybean root in the field. The suppression actions of Dq059 and Dq030 were the strongest and the weakest, respectively, with inhibition rates of 83.05% and 41.52%. The inhibition rate of Dq012 on cyst formation was 80.58%. In conclusion, the strain Dq012 had the highest inhibitory activity against *Heterodera glycines*, while the other

收稿日期: 2011-01-23

基金项目: 大庆市高新区创新基金(DQGX08YF020); 国家现代农业技术体系资助项目(nytx-04)

作者简介: 陈井生(1982-), 男, 内蒙古海拉尔人, 研究实习员, 硕士, 主要从事大豆胞囊线虫抗性育种和生物防治研究。

E-mail: chenjingsheng1982@hotmail.com

\*通讯作者: 李泽宇(1965-), 男, 黑龙江五大连池人, 研究员, 主要从事大豆表面活化剂和育种科研工作。

E-mail: dqnkylzy@126.com

four were similar, except that Dq030 was less effective in disturbing cyst formation.

**Key words:** Suppressive soil; Biocontrol fungus; Soybean cyst nematode; Suppression

大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) 引起的病害一般使大豆减产 10%~30%, 严重地块减产 70%~90%, 甚至绝收<sup>[1-3]</sup>。该病是制约大豆生产的主要病害, 具有较强的隐蔽性, 而且防治困难。大豆胞囊线虫病在我国各大豆主产区都有发生, 其中黑龙江大豆重茬、迎茬田受危害最为严重<sup>[3]</sup>。

近年来, 人们试图通过生物防治来控制线虫病害, 从病原物的抑制性土壤寻找有效的生防因子是生物防治中的重要途径。抑制性土壤 (suppressive soil) 又称“抑菌土”、“衰退土”, 可不同程度影响病原物存活、侵染或繁殖。真菌是大豆根际微生物多样性中的重要成员, 广泛存在于抑制性土壤中。利用生防真菌防治植物线虫病害已成为国内外生物防治研究中的一个热点。我国研究人员先后筛选获得粗皮侧耳、嗜松青霉、厚垣轮枝菌、黑曲霉、淡紫拟青霉、球孢白僵菌、尖镰孢菌等生物活性菌株<sup>[4-5]</sup>。大量研究表明, 生防真菌在生长发育和代谢过程中产生多种具有拮抗性、竞争性的次级代谢产物或酶类物质, 通过直接或间接作用, 抑制或杀死病原菌。本研究从抑制性土壤中筛选对大豆胞囊线虫具有拮抗作用的生防真菌, 旨在获得高效生防菌株, 解决生产上大豆胞囊线虫的危害问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试生防菌株的分离

2008 年从黑龙江省西部不同地点采集大豆田 5~20 cm 深处的土壤 30 份, 各 20 g。用天平称取 5 g 土壤, 倒入灭菌的 100 mL 三角瓶中, 加入 45 mL 无菌水, 摇匀静置。吸取 1 mL 土壤悬液, 加入盛有 9 mL 无菌水的灭菌试管中, 摇匀, 依次稀释成  $10^{-3}$  稀释液。吸取 1 mL  $10^{-3}$  稀释液, 用平板涂布器均匀涂布在 PDB 培养基上, 于 25℃ 培养, 分离的菌株于 4℃ 集中保存。

### 1.2 菌株培养滤液的制备

将菌株接种于含 100 mL PDB 培养基的三角瓶中, 25℃、150 r/min 振荡培养 7 d。培养好的菌株发酵液, 经布氏漏斗抽滤去除菌丝体后, 置于 4℃ 冰箱中保存备用。

### 1.3 靶标线虫体系的构建

大豆胞囊线虫分离自黑龙江省农业科学院大庆分院示范基地胞囊线虫繁殖圃, 并在温室中用高感大豆品种合丰 50 进行繁殖。接种 30~35 d 后, 用过筛法分离胞囊, 在解剖镜下挑取新鲜、饱满的胞囊, 用 0.5% 的 NaClO 处理 3 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 置

于 25℃、0.5 mmol/L ZnSO<sub>4</sub> 溶液中进行孵化。5 d 左右孵化出大量二龄幼虫 (J2), 收集并置于 4℃ 冰箱中保存备用。

### 1.4 菌株培养滤液对大豆胞囊线虫的抑制效果测定

取发酵滤液 600 mL, 放入新孵化的大豆胞囊线虫二龄幼虫 100 条, 48 h 后观察线虫的死亡情况。以无菌水培养作为对照, 计算线虫死亡率和校正死亡率, 重复 3 次。取新鲜饱满的大豆胞囊线虫胞囊, 浸泡消毒后放入自制的孵化池。每个孵化池放 1 个胞囊, 加入发酵滤液 600 mL, 以等量无菌水作为对照, 重复 3 次, 25℃ 下孵化。9 d 后观察、计数孵化出的 J2 数量, 计算相对抑制率<sup>[6]</sup>。

### 1.5 田间防效试验

1.5.1 种子处理 将保存的真菌菌株在马铃薯 (PD) 液体培养基中振荡发酵 5 d, 加入 1 mL Tween-80, 对 1% 的种子量 (合丰 50) 进行包衣处理, 待干燥后装袋、编号备用。

1.5.2 田间小区处理 田间小区处理在黑龙江省农业科学院大庆分院大豆胞囊线虫病圃中进行, 试验田为重茬大豆田, 土壤属于大豆胞囊线虫自然发病土。采用随机区组设计, 每个小区为 6 行区, 行长 2 m, 行距 0.5 m, 处理间隔 1 m。机械开沟后, 点播菌株发酵液包衣的大豆种子, 覆土, 以 PD 液体培养基处理的大豆种子为对照。试验设 3 次重复。

1.5.3 田间调查 在大豆出苗后 35 d, 待大豆胞囊线虫生长发育突破大豆根表后, 每个处理随机取 3 株苗, 调查单株大豆根系胞囊着生量<sup>[7]</sup>。调查结果采用 SPSS 分析软件进行方差分析, 用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤真菌的分离筛选结果

从 30 份抑制性土壤样品中分离获得 100 株真菌, 其中 5 株对大豆胞囊线虫有一定的抑制作用。菌株 Dq012 和 Dq059 分离自黑龙江省安达市自然衰退土; 其余 3 株采自抑病土, Dq003 和 Dq030 分离自黑龙江省齐齐哈尔市, Dq101 分离自黑龙江省大庆市。

### 2.2 不同真菌菌株对大豆胞囊线虫胞囊内卵孵化的影响

从表 1 可以看出, 供试的 5 株真菌均能够抑制大豆胞囊线虫胞囊内卵的孵化, 处理 9 d 后相对抑制率达 80.00% 以上的有 3 株, 最高为菌株 Dq012, 相对抑制率达 87.69%。Dq059 和 Dq101 2 株真菌

对大豆胞囊线虫的相对抑制率分别为 76.54%和 73.58%。

表 1 5 株真菌对大豆胞囊线虫胞囊孵化和二龄幼虫活性的影响

| 菌株    | 孵化出的<br>线虫数/条 | 相对抑制<br>率/% | 二龄幼虫的<br>死亡率/% | 校正死<br>亡率/% |
|-------|---------------|-------------|----------------|-------------|
| Dq012 | 10.67c        | 87.69       | 80.84a         | 80.84       |
| Dq003 | 11.00c        | 87.31       | 69.72b         | 69.72       |
| Dq059 | 20.33b        | 76.54       | 70.15b         | 70.15       |
| Dq030 | 15.00bc       | 82.69       | 69.45b         | 69.45       |
| Dq101 | 22.67b        | 73.58       | 70.91b         | 70.91       |
| CK    | 86.67a        | —           | 0.00c          | —           |

注: 同列数字后不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同

### 2.3 不同真菌菌株对大豆胞囊线虫二龄幼虫存活的影响

试验结果(表 1)表明, 5 株菌株发酵液对大豆胞囊线虫 J2 均有致死作用, 但作用大小存在差异。菌株 Dq012 对大豆胞囊线虫二龄幼虫表现出较高的致死活性, 处理 48 h 死亡率为 80.84%, 与其他 4 株真菌相比差异达显著水平, 其校正死亡率为 80.84%; 其他菌株对大豆胞囊线虫的致死活性处于中等水平, 多数虫体 48 h 内死亡, 线虫校正死亡率为 70%左右。

### 2.4 不同真菌菌株对大豆胞囊线虫繁殖的影响

用 5 个菌株分别处理大豆种子后, 在大豆胞囊线虫一代显囊期, 调查不同处理大豆根系的胞囊着生情况。结果发现, 其中 4 个菌株通过包衣处理大豆种子对大豆胞囊线虫的胞囊形成有明显的抑制效果(表 2), 菌株 Dq059 的抑制作用最强, 抑制率为 83.05%; 其次为 Dq012, 抑制率为 80.58%; Dq003 和 Dq101 对胞囊形成的抑制率也在 75%以上。

表 2 不同菌株包衣处理大豆种子对大豆根系胞囊形成的影响

| 菌株    | 单株胞囊数/个 | 胞囊抑制率/% |
|-------|---------|---------|
| Dq012 | 7.67c   | 80.58   |
| Dq003 | 9.33c   | 76.27   |
| Dq059 | 6.67c   | 83.05   |
| Dq030 | 23.00b  | 41.52   |
| Dq101 | 9.00c   | 77.12   |
| CK    | 39.33a  | —       |

## 3 结论与讨论

本研究从大豆胞囊线虫抑制性土壤中筛选生防真菌菌株, 利用菌株培养滤液研究其对大豆胞囊线虫胞囊内卵孵化的抑制活性和对二龄幼虫的毒性作用, 通过对大豆种子进行包衣处理, 研究其对大豆胞囊线虫雌虫繁殖的影响。其中菌株 Dq012 对大豆

胞囊线虫的抑制活性最高, 其他 4 株效果接近, 但 Dq030 对大豆胞囊线虫胞囊形成的抑制效果一般。

植物寄生线虫大部分存在自然衰退现象, 迄今为止已发现大豆胞囊线虫、小麦胞囊线虫等多种线虫具有此现象<sup>[8-9]</sup>。1981 年美国的 Hartwig 发现, 连续 5 a 种植大豆感病品种后, 大豆胞囊线虫种群数量会明显降低<sup>[10]</sup>。本研究的供试菌株分离自抑病土和自然衰退土 2 种, 均为田间抑制性土壤。目前, 对真菌作为线虫生防因子的研究大多数都集中在捕食线虫真菌和寄生线虫真菌方面。有很多真菌能产生抗生素、毒素等物质, 迄今从真菌中分离和鉴定出近 100 种具有杀线虫活性的化合物, 包括醌类、生物碱类、萜类、大环内酯类、萘类、肽类、脂肪酸类、炔类等<sup>[11]</sup>。本研究从抑制性土壤中分离对大豆胞囊线虫具有抑制活性的真菌菌株, 进一步获得了有价值的生防因子, 今后有待于对含有杀线虫活性物质的真菌代谢产物进行深入研究。

### 参考文献:

[ 1 ] 刘维志. 植物病原线虫学[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[ 2 ] 卢为国, 袁道华, 李金英, 等. 大豆抗胞囊线虫基因不同世代遗传率的变化[ J ]. 河南农业科学, 2010(2): 24-27.

[ 3 ] 陈井生, 李肖白, 李泽宇, 等. 大豆胞囊线虫生理分化与致病力变异研究进展[ J ]. 中国农学通报, 2010, 26(12): 261-265.

[ 4 ] Duan Y X, Zheng Y N, Chen L J. Effects of abiotic environmental factors on soybean cyst nematode[ J ]. Agriculture Science in China, 2009 8(3): 317-325.

[ 5 ] Liu T, Wang L, Duan Y X, *et al.* Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*[ J ]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24: 113-118.

[ 6 ] 陈井生, 陈立杰, 段玉玺, 等. 放线菌 Snea49 的分类鉴定及对胞囊线虫的活性评价[ J ]. 大豆科学, 2010, 29(4): 663-635.

[ 7 ] 陈立杰, 段玉玺, 王媛媛. 不同细菌菌株对大豆根腐病菌及胞囊线虫病的影响[ J ]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(6): 831-834.

[ 8 ] 孙漫红, 刘杏忠. 连作土壤中大豆胞囊线虫种群数量减少的原因探讨[ J ]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 353-356.

[ 9 ] Gao X, Becker J O. Population development of both sexes of *Heterodera schachtii* is diminished in a beet cyst nematode-suppressive soil[ J ]. Biological Control, 2002, 25(2): 187-194.

[ 10 ] 张炳欣. 抑病土壤和生物防治[ J ]. 中国生物防治, 1985, 1(3): 32-36.

[ 11 ] 董锦艳. 真菌杀线虫代谢物的研究进展[ J ]. 菌物系统, 2001, 20(2): 286-296.