

3株生防真菌发酵液防治大豆孢囊线虫的效果测定

李 婷 黄文坤 彭德良 孔令安 彭 焕

中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100193

摘要 为了获得更多的防治大豆孢囊线虫的微生物资源,在室内对3株生防真菌黑曲霉 NBC001、草酸青霉 NBC008 和草酸青霉 NBC012 进行大豆孢囊线虫的毒力测定和盆栽防治效果测定。结果表明,NBC001、NBC008 和 NBC012 发酵液均有杀线虫活性,2倍稀释液处理,线虫校正死亡率约90%,孵化抑制率在68%以上。盆栽试验结果发现,NBC001、NBC008 和 NBC012 发酵原液能使孢囊数分别降低50.07%、59.88%和57.45%;NBC001 和 NBC012 发酵液使株高分别增加11.3%和18.6%,NBC008 使大豆根长增加26.7%。表明菌株 NBC001、NBC008 和 NBC012 可用来防治大豆孢囊线虫。

关键词 大豆孢囊线虫;生防真菌;黑曲霉;草酸青霉;发酵液

中图分类号 S 435.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0042-05

大豆孢囊线虫(soybean cyst nematode, SCN)是危害大豆生长的一种世界性植物寄生线虫,现已在日本^[1]、中国^[2]、美国^[3]、意大利^[4]、巴西^[5]等15个国家和地区发现报道,我国安徽^[6]、北京^[7]、黑龙江^[8]、河北^[9]、甘肃和宁夏^[10]等16个省市(自治区)有发生。大豆孢囊线虫病的流行一般造成大豆减产10%~20%,重者达50%,甚至绝产^[3]。大豆孢囊线虫的防治手段主要有选育抗病品种、与非寄主轮作、化学药剂防治和生物防治。随着人们环境意识的加强,生物防治的研究显得尤为重要。

生防真菌是防治大豆孢囊线虫的重要微生物资源,其中研究较多的有厚垣孢普可尼亚菌(*Pochonia chlamydosporium*)、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)、蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)、被毛孢(*Hirsutella rhossiliensis*)和镰刀菌(*Fusarium* spp.)等。淡紫拟青霉不仅能够寄生孢囊线虫,其代谢产物对线虫也有一定抑制作用^[11],现已开发商品制剂。用食线虫真菌洛斯里被毛孢霉(*Hirsutella rhossiliensis*)孢子液处理接种二龄幼虫的大豆植株,能使线虫种群数量降低79%,使大豆增产55%^[12]。根内益生菌印度梨形孢(*Piriformospora indica*)能够降低大豆孢囊线虫卵的密度^[13]。赵晓辉等^[14]分离的镰刀菌发酵原液能够抑

制孢囊孵化并且有极强的杀线虫活性,处理1h线虫死亡率高达90%。

为了获得更多有效的大豆孢囊线虫生防资源,我们从小麦孢囊线虫上分离了3株真菌,利用其发酵液进行了室内生物测定和温室盆栽实验,测定其对大豆孢囊线虫的防治效果,以期为发展大豆孢囊线虫综合防治技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试线虫及菌株

大豆孢囊线虫4号生理小种采自中国农业科学院廊坊科研中试基地。

供试菌株采用笔者所在实验室从挪威小麦孢囊线虫上分离的黑曲霉(*Aspergillus niger*)NBC001、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)NBC008 和 NBC012。

1.2 大豆孢囊线虫的采集、卵悬浮液的制备和二龄幼虫(J2s)悬浮液的制备

孢囊采集:从农科院廊坊中试基地采集大豆孢囊线虫病土,用漂浮法将孢囊与土壤分离,强水冲洗将土壤打散搅拌,过孔径0.9 mm/0.2 mm网筛,重复3次,将孔径0.2 mm筛上的残余物用水冲至烧杯中,解剖镜下观察,挑取沉在底部的孢囊,4℃保

收稿日期:2016-03-28

基金项目:公益性行业科研专项(201503114),国家“973”计划(2013CB127502)

李 婷,硕士研究生.研究方向:线虫生物防治. E-mail: ltingsmile@126.com

通信作者:彭德良,研究员.研究方向:植物线虫与线虫病害防治. E-mail: dlpeng@ippcaas.cn

存备用。

卵悬浮液的制备:用0.5%次氯酸钠溶液将孢囊表面消毒3 min,灭菌水洗净后,用橡胶塞磨破孢囊,收集卵悬浮液,调节浓度至500个/mL。

二龄幼虫(J2s)悬浮液的制备:用0.5%次氯酸钠溶液将孢囊表面消毒3 min,灭菌水洗净后,置于孔径为0.2 mm的网筛上,将网筛放在一个干净的培养皿内,向培养皿内加水至浸没孢囊,26℃,黑暗条件下孵化。3~5 d后收集J2s,调节浓度至200头/mL。

1.3 真菌的分离及真菌发酵液的制备与处理

真菌的分离:从土壤中分离到孢囊后,用0.5%次氯酸钠溶液将孢囊表面消毒,磨破孢囊制成悬浮液,涂布在马铃薯固体培养基(PDA)上,26℃黑暗条件下培养5 d后挑取菌丝在新的PDA培养基上培养并纯化,参照《真菌鉴定手册》^[15]进行形态鉴定,同时扩增ITS片段测序鉴定(结果未发表)。

真菌发酵液的制备:用直径为1 cm的打孔器取培养10 d的真菌边缘菌丝,将菌饼接种在300 mL灭菌PDB培养基中(500 mL锥形瓶),26℃,150 r/min振荡培养120 h。4层灭菌纱布除去菌体后,过0.22 μm细菌过滤器除菌。经上述处理后作为发酵原液,同时用灭菌水制备5倍稀释液和10倍稀释液,4℃保存备用。

1.4 3株真菌发酵液杀线虫活性的测定

向24孔板中分别加入发酵原液、5倍稀释液、10倍稀释液0.5 mL,再加入0.5 mL J2s悬浮液(200头/mL),最终稀释倍数为2倍、10倍和20倍。设置NBC001、NBC008、NBC0012三个处理,以发酵培养基PDB为对照,每处理重复4次,室温放置24 h后统计线虫死亡数,线虫死亡情况用氢氧化钠刺激法判断^[16],并计算线虫死亡率和校正死亡率。试验重复2次,线虫死亡率=100%×死亡线虫数/线虫总数,校正死亡率=100%×(处理组死亡率-对照组死亡率)/(100-对照死亡率)。

1.5 3株真菌发酵液对大豆孢囊线虫卵孵化的影响

向96孔板中分别加入发酵原液、5倍稀释液、10倍稀释液100 μL,再加入大豆孢囊线虫卵悬浮液100 μL(约50个),则最终稀释倍数为2倍、10倍和20倍。将96孔板置于26℃恒温箱中孵化,12 d后统计孵化的线虫数,并计算孵化率和孵化抑制率。孵化率=100%×(孵化的线虫数/卵总个数),孵

化抑制率=100%×(对照组孵化率-处理组孵化率)/对照组孵化率。

1.6 真菌发酵液防治大豆孢囊线虫的盆栽实验

大豆种子表面用1%次氯酸钠消毒,灭菌水清洗3遍后,置于一次性培养皿中发芽。2 d后将发芽的种子种在装有灭菌土的塑料杯中,每杯3颗种子。1周后,向塑料杯中加入真菌发酵原液20 mL。设置NBC001、NBC008、NBC0012 3个处理,PDB作为对照。每个处理设置4个重复,每组实验重复2次。经发酵原液处理24 h后,在大豆根附近接种SCN二龄幼虫300条/株,2 d后第2次接种SCN二龄幼虫300条/株,接种30 d后,统计每杯根系土壤中的孢囊数量,并计算孢囊减少率,孢囊减少率=100%×(处理组孢囊数-对照组孢囊数)/对照组孢囊数,同时测量大豆植株的根长和株高。

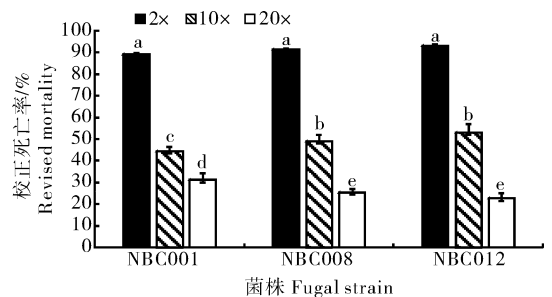
1.7 数据分析

用SPSS 20.0进行数据分析,Duncan's新复极差法进行差异性显著分析,Excel 2010作图。

2 结果与分析

2.1 3株真菌发酵液杀线虫活性的测定

室内测定不同稀释倍数真菌发酵液的杀线虫活性,结果表明,随着稀释倍数的增加,发酵液处理后,线虫的校正死亡率逐渐降低。比较3株不同发酵液的杀线虫效果发现,稀释2倍时,3株真菌发酵液的杀线虫效果差异不显著,线虫校正死亡率约90%;稀释10倍和20倍发酵液处理后,则出现较大差异,表现为NBC008和NBC012稀释10倍发酵液处理,杀线虫活性显著好于NBC001处理;而稀释20倍处理,则与之相反(图1)。



不同字母表示处理间 Duncan's新复极差法分析差异显著, $P < 0.05$ Different letters in the graph mean significantly different ($P < 0.05$).

图1 3株真菌发酵液对大豆孢囊线虫毒杀活性测定

Fig.1 Nematicidal activity of different fungal fermentation on SCN

2.2 3 株真菌发酵液对大豆孢囊线虫卵孵化的影响

经发酵液 NBC001、NBC008 和 NBC012 处理后,卵孵化率显著低于对照组,表明这 3 种发酵液均能抑制大豆孢囊线虫卵的孵化。其中 NBC001 发酵液处理卵孵化抑制率在 73% 之上,稀释 10 倍抑制作用最好,抑制率达 91.05%;NBC008 发酵液处理,卵孵化率随着稀释倍数的增加而逐渐降低,孵化抑制率最高达 91.34%;NBC012 处理卵孵化抑制率在

68% 以上,最高抑制率为 80.02% (表 1)。

2.3 3 株真菌发酵液对大豆植株生长的影响

大豆经发酵液 NBC001、NBC008 和 NBC012 处理后接种线虫,30 d 后,测量大豆的根长和株高。结果表明,NBC001、NBC008 和 NBC012 能够促进大豆植株的生长,NBC008 促进根伸长,增长率为 26.7%,NBC001 和 NBC012 促进株高的增加,增长率分别为 11.3% 和 18.6%。

表 1 真菌发酵液对大豆孢囊线虫卵孵化的影响

Table 1 Effects of fungal fermentation broth on SCN eggs

%

最终稀释倍数 Final dilution ratio	NBC001		NBC008		NBC012	
	孵化率 Hatchability	孵化抑制率 Inhibition percentage of hatchability	孵化率 Hatchability	孵化抑制率 Inhibition percentage of hatchability	孵化率 Hatchability	孵化抑制率 Inhibition percentage of hatchability
2×	4.39±1.11c	84.77	3.15±0.60b	91.34	13.53±2.62b	68.75
10×	2.58±0.59d	91.05	3.37±0.79b	90.74	8.65±1.24c	80.02
20×	7.76±1.88b	73.07	4.37±0.91b	87.99	12.59±2.46b	70.92
CK	28.82±1.79a	—	36.38±1.05a	—	43.29±0.58a	—

注:值为均值±标准误;表中不同字母表示处理间 Duncan's 新复极差法分析差异显著 ($P < 0.05$),下表同。Note: Value is mean ± SE; Different letters in the graph mean significantly different ($P < 0.05$), the same as tables below.

表 2 真菌发酵液对大豆植株生长的影响

Table 2 Effect of fungal fermentation broth on soybean growth

处理 Treatment	根长/cm Length of root	根长增长率/% Increased percentage of root length	株高/cm Height	株高增长率/% Increased percentage of plant height
NBC001	13.69±0.71b	-0.66	34.41±1.31b	11.32
NBC008	17.46±1.53a	26.73	30.67±2.27c	-0.77
NBC012	14.40±0.51b	4.52	36.65±0.91a	18.59
CK	13.78±0.40b	—	30.91±1.07c	—

注:数字前的负号代表减少。Note:“—” before number means decrease.

2.4 3 株真菌发酵液室内防治大豆孢囊线虫的效果

大豆经发酵液 NBC001、NBC008 和 NBC012 处理后接种线虫,形成的孢囊数量显著少于对照组,平均单株孢囊个数分别为 46.6、37.4、39.7,孢囊减少率分别为 50.07%、59.88%、57.45% (表 3)。NBC008 和 NBC012 的防治效果显著高于 NBC001, NBC008 和 NBC012 之间差异不显著。

表 3 真菌发酵液室内防治大豆孢囊线虫的效果测定

Table 3 Control efficiency of fungal fermentation on SCN

处理 Treatment	单株孢囊数/个 Cyst number per plant	孢囊减少率/% Cyst decrease rate
NBC001	46.58±2.16b	50.07
NBC008	37.43±1.84c	59.88
NBC012	39.69±2.94bc	57.45
CK	93.29±3.31a	—

3 讨论

利用微生物代谢产生的有毒物质来防治线虫是生物防治的手段之一。本研究利用的 3 株真菌黑曲霉 NBC001、草酸青霉 NBC008 和草酸青霉 NBC012,对大豆孢囊线虫都有较好的杀线虫作用。其 2 倍稀释液处理,线虫校正死亡率约 90% (图 1)。黑曲霉代谢产物防治根结线虫的研究较多,但在大豆孢囊线虫上的应用较少。朱晓峰等^[17]利用查氏培养基制备黑曲霉 snf009 菌株发酵液,发现它对南方根结线虫有明显毒杀作用,校正死亡率在 90% 以上,略高于本试验用马铃薯液体培养基制备的黑曲霉 NBC001 发酵液,可能的原因是这 2 种培养基不影响发酵液的组分,只影响各组分的含量,其次孢囊线虫和根结线虫本身存在很大差异,对试验结果也

有影响。snf009 的杀线虫物质主要有草酸和柠檬酸^[18],但 NBC001 的杀线虫成分还需要进一步分离鉴定。此后,李颂等^[19]还对 snf009 的防治效果以及可能的作用机制做了初步研究,结果表明黑曲霉 snf009 菌株发酵液能够显著降低根结指数和根结线虫种群数量,在一定范围内能够促进番茄的生长,提高番茄可溶性活性蛋白含量和防御酶活性。草酸青霉孢子液不仅能抑制大豆孢囊线虫卵^[20],还能抑制马铃薯孢囊线虫孵化,降低土壤中马铃薯孢囊的数量^[21],但用草酸青霉发酵液防治线虫的相关报道甚少。

卵孵化实验中,NBC001 和 NBC012 发酵液处理后,10 倍稀释液抑制孵化效果好于 2 倍稀释液,可能与 pH 值有关。本试验中制备的发酵液呈酸性,稀释后,pH 升高。一方面,pH 可能影响发酵液中有效物质的活性,随着 pH 升高,活性增加,孵化抑制率升高;同时 pH 还可直接影响卵孵化。孙晶双^[22]研究了几种不同酸对线虫孵化的影响,发现孵化抑制作用随 pH 升高逐渐降低。2 种作用叠加后出现了 10 倍稀释液处理抑制孵化效果好于 2 倍稀释液的结果,但其具体机制还需要进一步分析验证。

温室盆栽实验结果表明,NBC008 的防治效果最好,孢囊减少率为 59.88%,NBC012 略低于 NBC008,为 57.45%,但两者不存在显著差异,NBC001 最低,为 50.07%,都在 50% 以上。盆栽实验防治效果显著低于室内生物测定结果,可能的主要原因是土壤对发酵液起了稀释作用,且稀释倍数较高。但 3 种发酵液之间,室内生物测定结果和盆栽实验防治效果的趋势基本一致,NBC008 和 NBC012 优于 NBC001。NBC001、NBC008 和 NBC012 均能在一定程度上促进大豆植株的生长。NBC001 和 NBC012 发酵液使株高分别增加 11.3% 和 18.6%。NBC008 使大豆根长增加 26.7%,虽然 NBC001 使根长减少 0.7%,NBC008 使株高下降 0.8%,但和对照相比差异不显著。比较 3 种发酵液的效果发现,大豆根长和孢囊减少率呈现一致的趋势,NBC008 孢囊减少率最高,相对应根长最长,NBC012 次之,最后是 NBC001(表 2 和表 3)。而株高则不呈现这样的趋势,可能原因是线虫侵染根部,对根的影响直接且明显,而对株高的影响则主要是通过根部起作用,在根部与株高的相互作用过程中可能还存在其他的影响因素。

综合室内生物测定和盆栽实验结果,表明

NBC001、NBC008 和 NBC012 在防治大豆孢囊线虫上具有很大的应用前景,但它们能否防治其他线虫以及发酵液中具体的杀线虫活性成分如何还需要开展更多的试验研究。

参 考 文 献

- [1] ICHINOHE M. Current research on the major nematode problems in Japan [J]. Journal of nematology, 1988, 20(2): 184-190.
- [2] LIU X, LI J, ZHANG D. History and status of soybean cyst nematode in China [J]. International journal of nematology, 1997, 7(1): 18-25.
- [3] WRATHER J A, KOENNING S R, ANDERSON T R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario (1999 to 2002) [J]. Plant health progress, 2003(3): 1-16.
- [4] MANACHINI D. First report of *Heterodera glycines* Ichinohe on soybean in Italy [J]. Bolletino di zoologia agraria e di bachicoltura, 2000, 32: 261-267.
- [5] ASMUS G L, TELES T S, ANSELMO J, et al. Races of *Heterodera glycines* in the Northeast of Mato Grosso do Sul, Brazil [J]. Tropical plant pathology, 2012, 37(2): 146-148.
- [6] 张磊. 安徽淮北市大豆孢囊线虫生理小种研究初报 [J]. 大豆科学, 1988, 7(3): 251-254.
- [7] 颜清上, 陈品三, 王连铮. 北京地区大豆孢囊线虫 4 号生理小种的验证 [J]. 大豆科学, 1995, 14(4): 355-359.
- [8] 刘晓英. 黑龙江省东部大豆孢囊线虫病发生规律与防治技术研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
- [9] 张俊立, 彭德良, 曹克强. 河北省大豆孢囊线虫分子鉴定及其分布 [J]. 植物保护, 2005, 30(1): 40-43.
- [10] PENG D L, PENG H, WU D Q. First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) on soybean from Gansu and Ningxia China [J]. Plant disease, 2016, 100(1): 229.
- [11] 姜培增, 李宏园, 陈铁保. 淡紫拟青霉防治植物线虫研究进展 [N]. 中国农业科技导报, 2006, 8(6): 38-41.
- [12] ZHANG L, YANG E, XIANG M, et al. Population dynamics and biocontrol efficacy of the nematophagous fungus *Hirsutiella rhossiliensis* affected by stage of the soybean cyst nematode [J]. Biological control, 2008, 47(2): 244-249.
- [13] BAJAJ R, HU W, HUANG Y, et al. The beneficial root endophyte *Piriiformospora indica* reduces egg density of the soybean cyst nematode [J]. Biological control, 2015, 90: 193-199.
- [14] 赵晓晖, 许艳丽. 镰刀菌发酵液对大豆孢囊线虫的抑制作用 [J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 468-470.
- [15] 魏最超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 248.
- [16] CHEN S Y, DICKSON D W. A technique for determining second-stage juveniles of *Heterodera glycines* [J]. Journal of nematology, 2000, 32(1): 117-121.
- [17] 朱晓峰, 段玉玺, 陈立杰, 等. 曲霉发酵液对烟草根结线虫的作用 [J]. 农药, 2006, 45(3): 199-200.

- [18] 朱晓峰,段玉玺,李颂,等.黑曲霉发酵液中有机的分析对植物线虫的影响[J].农药,2009,48(2):137-140.
- [19] 李颂,段玉玺,朱晓峰,等.黑曲霉次生代谢产物对番茄抗根结线虫病效果的影响[J].中国蔬菜,2011(4):44-49.
- [20] 林茂松.土壤真菌防治大豆孢囊线虫的效果测定[J].中国油料作物学报,1990(3):63-65.
- [21] MARTINEZ-BERINGOLA M L, SALTO T, VAZQUEZ G, et al. *Penicillium oxalicum* reduces the number of cysts and juveniles of potato cyst nematodes [J]. J Appl Microbiol, 2013, 115(1):199-206.
- [22] 孙晶双.影响大豆孢囊线虫孵化及休眠相关因子研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2010.

Control efficiency of three fungal strains' fermentation broth on soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*)

LI Ting HUANG Wenkun PENG Deliang KONG Lingan PENG Huan

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract In order to obtain more microorganism resources to control soybean cyst nematodes (SCN), control efficiency of three fungal strains including *Aspergillus niger* NBC001, *Penicillium oxalicum* NBC008 and *P. oxalicum* NBC012 on soybean cyst nematodes were evaluated. *In vivo* analyses showed that all three fungi fermentation were lethal to nematode juveniles. The revised mortality of 2 times dilutions against SCN juveniles was about 90%, and the inhibition of egg hatchability was > 68%. The pot experiment showed that cyst number treated with NBC001, NBC008, NBC012 fermentations were reduced by 50.07%, 59.88%, 57.45%, respectively, compared with the control. The height of plant increased by 11.3% and 18.6% after treated with NBC001 and NBC012 fermentations, while the length of root increased by 26.7% after treated with NBC008 fermentations. The present investigation suggested that fermentations of NBC001, NBC008, NBC012 could be used to control soybean cyst nematode.

Keywords soybean cyst nematode; biocontrol fungus; *Aspergillus niger*; *Penicillium oxalicum*; fermentation broth

(责任编辑:边书京)