

大豆胞囊线虫胞囊内寄生真菌研究^{*}

范圣长 段玉玺^{**} 陈立杰

(沈阳农业大学线虫学研究室, 沈阳 110161)

摘要 从辽宁沈阳、黑龙江伊春、山东青岛、山西汾阳等地采集的大豆胞囊线虫土样, 经分离获得定殖于胞囊上的真菌菌株 128 株。通过测定菌株对胞囊的寄生率, 筛选出 6 株对大豆胞囊线虫有强寄生能力的胞囊内寄生真菌, 经鉴定为 *Aspergillus niger*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium semitectum*, *Verticillium chlamydosporium*, *Verticillium sp.*, *Acremonium sp.*, 其中 *Aspergillus niger*, *Fusarium semitectum* 为国内首次报道定殖于大豆胞囊线虫胞囊上的真菌。通过 6 株胞囊内寄生真菌对大豆胞囊线虫二龄幼虫毒性作用的研究, 结果表明 *Verticillium chlamydosporium* 和 *Verticillium sp.* 两株菌的发酵液对大豆胞囊线虫二龄幼虫有较强毒杀作用。

关键词 大豆胞囊线虫; 内寄生真菌; 黑曲霉; 半裸镰刀菌

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)01-0071-04

大豆胞囊线虫病害(*Heterodera glycines*)是世界大豆产区的一种重要病害, 在美国、巴西、加拿大和中国等大豆主产国, 大豆胞囊线虫病引起的损失(3, 025, 400t/年)比任何一种单一病害所造成的损失都大^[1]。近二十年来, 随着可持续农业和有机农业的发展, 人们已将该线虫防治工作的重点转向了生物防治。生物防治中研究最深入且最具生防潜力的线虫天敌是真菌。过去二十年间, 人们研究最多的是捕食线虫的真菌, 但它们对靶标线虫是非选择性的, 能够“捕获”大多数种类的线虫, 而且还能在土壤中腐生存活, 但它们不能有效地阻止土壤中线虫群体的增加, 由此人们开始转向对寄生真菌和细菌的研究^[2~3]。

目前从大豆胞囊线虫的卵、二龄幼虫(J2)、胞囊上分离到的真菌全世界已有 115 个属, 232 个种, 我国也已报道了 30 个属, 51 种真菌^[4~10], 但对其寄生性的研究很少。本文对分离自大豆胞囊线虫胞囊的内寄生真菌进行研究, 主要从其对胞囊的寄生性和这类真菌的代谢产物对 J2 的毒性作用角度加以研究, 以便获得更优良的大豆胞囊线虫的生防菌株。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

从辽宁沈阳、黑龙江伊春、山东青岛、山西汾阳等地大豆田采集大豆根际土, 采用过筛法分离获得胞囊, 经分离纯化, 共获得 128 株真菌。

1.2 供试线虫

1.2.1 大豆胞囊线虫的胞囊

室内无菌土花盆中种植接种大豆胞囊线虫 3 号生理小种的感病品种, 无菌水进行浇灌, 一个月后分离产生的新鲜胞囊(即为无菌胞囊), 冰箱中(4℃)保存备用。

1.2.2 大豆胞囊线虫二龄幼虫(J2)

大豆胞囊线虫 3 号生理小种胞囊, 0.5% NaOCl 消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次。在无菌水中进行孵化, 一周后收集孵化出的 J2, 冰箱中(4℃)保存备用。

1.3 菌株对大豆胞囊线虫胞囊寄生性的测定

无菌胞囊, 0.5% NaOCl 表面消毒 3 min, 转至菌落直径长至培养皿 1/2—3/4 的 PSA 平板培养基上, 每皿 5 个, 三次重复, 培养 10d 后, 将接种胞囊轻轻挑出(注意不要弄破胞囊), 0.5% NaOCl 表面消毒 5 min, 每个胞囊放于一个灭菌滤纸片上, 保湿培

^{*} 收稿日期: 2003-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20372046)

^{**} 通讯作者: 段玉玺 E-mail: duanyx@syau.edu.cn

作者简介: 范圣长(1977-), 男, 硕士, 研究方向为线虫生物防治, E-mail: shengchangfan.student@sina.com

养。每天定时观察长菌情况, 记载不同菌株对胞囊的寄生率。

1.4 菌株的鉴定

筛选出寄生率大于 60% 的菌株, 采用菌物分类系统^[9~13]对其进行分类鉴定。

1.5 菌株代谢产物对大豆胞囊线虫 J2 毒性作用的测定

将筛选出的菌株接至 100ml 查氏液体培养基中, 摇床 150r/min, 发酵培养一周, 发酵液经定性滤纸真空抽滤, 滤出菌丝物及孢子, 发酵液冰箱中 (4℃) 保存备用。

向 24 孔细胞培养板中加入供试线虫 J2, 每孔加入 1ml 线虫液 (约 100—200 条/ml), 再向孔中加入供试菌株发酵过滤液各 1ml, 留出空白对照分别加入 1ml 空白发酵液和 1ml 无菌水, 三次重复^[14~16]。分别于 2h、6h、12h 时观察 J2 对发酵滤液

的反应, 并在 12h 时采用 NaOH 刺激法判断线虫的死活^[17], 计算线虫死亡率。

2 结果与分析

2.1 寄生性测定

从胞囊上分离到的真菌并非都是严格意义上的寄生菌。在已分离到的 128 株真菌中, 只有 30% 的菌株对胞囊的回接率达到 50% 以上, 分离到的真菌有的可能只是定殖于胞囊上, 利用卵的分泌物或死卵营腐生生活, 或者有些是存在于胞囊表面的有强腐生能力的菌株。因此我们对分离到的菌株对胞囊进行回接试验, 从而来确定其对大豆胞囊线虫胞囊寄生能力的强弱。由表 1 可知, 通过回接试验我们可以筛选出大豆胞囊线虫的胞囊内寄生真菌, 从而再进一步研究其作为生防菌株的价值。

表 1 部分胞囊内寄生真菌对胞囊的寄生率

Table 1 The parasitic ratio of some cyst entoparasitic fungi

菌株 Strains	sf003	sf148	sf014	sf153	sf175	sf160
寄生率 The parasitic ratio (%)	75.0	75.0	100	100	75.0	90.0

2.2 真菌鉴定

对筛选出的部分菌株进行了形态学分类鉴定:

Aspergillus niger 和 *Fusarium semitectum* 两种菌为国内首次报道定殖于大豆胞囊线虫胞囊上的

表 2 筛选出的六株胞囊内寄生真菌鉴定结果

Table 2 The identification results of the six selected entoparasitic fungi of cyst

菌株号 Code of strains	sf003	sf148	sf014	sf153	sf175	sf160
国际名 Nomen usitatum	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Verticillium chlamydosporium</i>	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.
中文名 Chinese name	黑曲霉	淡紫拟青霉	半裸镰刀菌	厚垣轮枝菌	轮枝菌	枝顶孢
采集地 Collecting area	辽宁沈阳	辽宁沈阳	辽宁沈阳	辽宁沈阳	山东青岛	辽宁沈阳

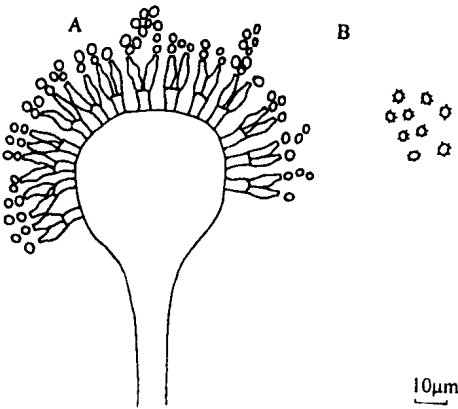


图 1 黑曲霉

Fig. 1 *Aspergillus niger*

A. 分生孢子头; B 成熟的分生孢子
A. conidial head; B mature conidia

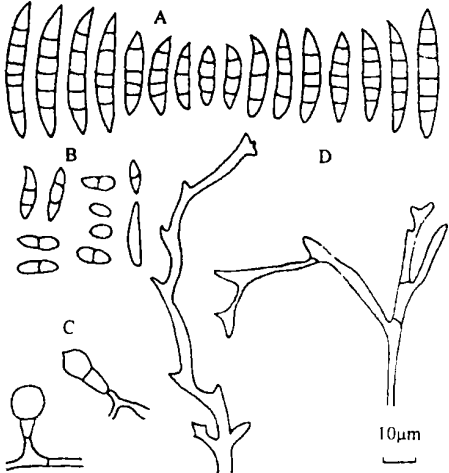


图 2 半裸镰孢菌

Fig. 2 *Fusarium semitectum*

A. 大型分生孢子; B. 小型分生孢子; C. 厚垣孢子; D. 分生孢子梗
A. macrophankton; B. microconidium; C. Chlamydosporic; D. conidiopgores

真菌种类。

Aspergillus niger Van Tieghem, 1867
分类地位: 有丝分裂孢子菌类, 丝孢纲, 丝孢目, 淡色菌科, 曲霉属, 黑曲霉(见图 1)。

PDA 培养基上 4 天菌落直径 2.6—3.5cm, 初期肉色, 后期呈黑色粉状。分生孢子头灰黑色, 黄褐色, 球形, 辐射状, 或边缘裂开呈辐射状的圆柱体。分生孢子梗无色或顶部淡黄色, 直立, 无隔膜, 200.0—470.0 μ m \times 8.70—15.0 μ m, 大型者长数毫米。顶层孢梗长瓶形, 分生孢子球形, 褐色至黑色, 初光滑后变粗糙或具细刺, 直径 2.5—5.0 μ m, 成链状串生。

Fusarium semitectum Berk. & Rav., 1875
分类地位: 有丝分裂孢子菌类, 丝孢纲, 瘤座孢目, 镰孢菌属, 半裸镰刀菌(见图 2)。

PDA 培养基上 4 天菌落直径 2.5—5.0cm, 气生菌丝棉絮状, 荷花白, 粉色至浅驼色, 培养基表层浅驼色, 培养基内部不变色; 小型分生孢子数量少, 纺

锤形, 鞋底形, 0—2 隔, 8.0—25.0 \times 3.0—7.5 μ m; 大型分生孢子纺锤形, 镰刀形, 基孢突起, 顶孢楔形, 大孢子 3—7 隔, 多数 3—5 隔。3 隔, 16.3—33.0 \times 3.8—5.5 μ m; 4 隔, 23.8—36.3 \times 3.8—5.8 μ m; 5—6 隔, 25.0—45.0 \times 4.3—5.5 μ m。厚垣孢子顶生或间生; 产孢细胞为多芽生产孢细胞(多瓶梗), 也有单瓶梗。

2.3 菌株代谢产物对大豆胞囊线虫 J2 毒性作用的测定

在 12h 的观察死亡率除 *Acremonium* sp. 外, 其余发酵液中 J2 均为不动或僵直。然而, 采用 NaOH 刺激法在 12h 时的实际死亡率仅达到 19.0%—50.1%, 其中 *Verticillium chlamydosporium*, *Verticillium* sp. 对线虫的致死率分别达到 50.0%和 50.1%(表 3)。可见, 观察死亡率不能准确鉴定大豆胞囊线虫 J2 的死活, 应采用更为可靠的方法来确定线虫是否还有活性。

表 3 6 株胞囊内寄生真菌代谢产物对大豆胞囊线虫 J2 毒性作用
Table 3 The results of the toxic effect on the culture filtrates of the six entoparasitic fungi to J2

菌株 Strains	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Verticillium chlamydosporium</i>	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.
D' 2h/%	36.3	61.7	61.3	△	△	86.4
D' 6h/%	93.4	*	72.0	80.4	*	55.6
D 12h/%	37.5	35.2	35.4	50.0	50.1	19.0

注: D' 2h: 2h 时观察死亡率; D' 6h: 6h 时观察死亡率, D 12h: 12h 时死亡率; △: 表示大部分活动性变弱; *: 表示全部不动或僵直

3 讨论

大豆胞囊线虫胞囊可以在土壤中越冬并存活数年, 是下一年大豆胞囊线虫发生的病源。本文从大豆胞囊线虫胞囊内寄生菌研究入手, 通过对定殖于大豆胞囊线虫胞囊上的真菌进行寄生性的测定, 筛选出对胞囊有强寄生能力的菌株, 为大豆胞囊线虫的生物防治打下基础。

本文研究了所筛选菌株的发酵过滤液对大豆胞囊线虫 J2 的毒性作用, 结果表明, 有强寄生能力的胞囊内寄生菌对 J2 有一定的毒杀作用。此项研究可以作为优良的胞囊内寄生生防真菌筛选的辅助手段。

参 考 文 献

1 Wrather, J. A., T. R. Anderson, D. M. Arsyad et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994–2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 孙漫红. 大豆胞囊线虫病生物防治研究[C]. 中国农业科学院硕士学位论文 2000.

3 邢丽娟. 线虫生防菌厚垣轮枝菌在大豆胞囊线虫生物防治中的应用研究[C]. 沈阳农业大学博士学位论文, 2000.

4 Carris, L. M., D. A. Glaw, C. A. Smyth et al. Fungi Associated with Populations of *Heterodera glycines* in Two Illinois Soybean Fields[J]. *Mycologia*, 1989, 81(1): 66—75.

5 Chen S. Y., D. W. Dickson, J. W. Kimbrough et al. Fungi Associated with Females and Cysts of *Heterodera glycines* in a Florida Soybean Field[J]. *Journal of Nematology*, 1994., 26(3): 296—303.

6 Kim, D. G., R. D. Riggs. Techniques for Isolation and Evaluation of Fungal Parasites of *Heterodera glycines*[J]. *Journal of Nematology*, 1994., 26(4S): 592—595.

7 林茂松. 真菌寄生大豆胞囊线虫的初步研究[J]. 生物防治通报, 1990, 6: 38—41.

8 刘杏忠, 张东升, 武修英, 等. 定殖于大豆胞囊线虫胞囊内真菌的初步研究[C]. 北京农业大学学报, 1991, 17(3): 87—91.

9 王克宁. 定殖于大豆胞囊线虫胞囊上的真菌分类研究[C]. 沈阳农业大学硕士学位论文, 1995.

10 李天飞, 张克勤, 刘杏忠. 食线虫菌物分类学[M]. 北京: 中国科

- 学技术出版社, 2000.
- 11 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
 - 12 C. 布斯. 镰刀菌属[M]. 北京: 农业出版社, 1988.
 - 13 Domsch, K. H., W. Gams. Compendium of Soil Fungi[M]. Academic Press, 1980.
 - 14 Chen S. Y., D. W. Dickson, D. J. Mitchell. Pathogenicity of Fungi to Eggs of *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 1996, 28(2): 148—158.
 - 15 Chen, S. Y., D. W. Dickson, D. J. Mitchell. Viability of *Heterodera glycines* Exposed to Fungal Filtrates[J]. Journal of Nematology, 32(2): 190—197.
 - 16 孙漫红, 刘杏忠, 晋治波. 2000. 淡紫拟青霉对大豆胞囊线虫卵及 2 龄幼虫的影响[J]. 植物保护学报. 2000, 29(1): 57—61.
 - 17 Chen, S. Y., D. W. Dickson. A Technique for Determining Live Second—stage Juveniles of *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 2000, 32(1): 117—121.

THE RESEARCH ON THE CYST ENTOPARASITIC FUNGI OF SOYBEAN CYST NEMATODE

Fan Shengchang Duan Yuxi Chen Lijie

(Nematological Laboratory, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract One hundred and twenty—eight fungi strains were isolated from the cysts of *Heterodera glycines* of the soybean rhizosphere soil in Liaoning, Hilongjiang, Shanxi, Shandong provinces. Through determining the parasitic ratio, six strains identified as *Aspergillus niger*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium semitectum*, *Verticillium chlamydosporium*, *Verticillium* sp. and *Acremonium* sp. were strong entoparasitic fungi of the cyst of *H. glycines*. *Aspergillus niger* and *Fusarium semitectum* isolated from the cyst were first reported in China. When the culture filtrates of six fungal strains were tested for their toxic effect to Second—stage Juveniles (J2) of *H. glycines*, the two strains, *Verticillium chlamydosporium* and *Verticillium* sp., had lethal effects on J2 of *H. glycines*, and their death ratios reached to 50.1% and 50.0%.

Key words Soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*); Entoparasitic fungi; *Aspergillus niger*; *Fusarium semitectum*

(接 76 页)

EXTRACTION ON SOYBEAN ISOFLAVONE BY ULTRASONIC WAVE

Xie Mingjie^{1*} Lu Min² Song Ming² Zou Cuixia² Liu Changjiang¹ Jin Fengxie

(1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, 116029;

2. College of Food, Shenyang Agriculture University, Shenyang, 110161;

3. College of Food and Fermentation Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian, 116001)

Abstract Soybean isoflavone were extracted from defatted soybean meal by ultrasonic wave and compared with heating circumfluence method. The results showed that ultrasonic method had lots of merits such as time—saving, energy—saving and high efficiency. The extraction rate of soybean isoflavone by this method for 30min was higher than that by heating—circumfluence for once, 120min about 46% and was equal to the rate of heating—circumfluence for twice, 240min.

Key words Ultrasonic extraction; Soybean isoflavone; Extraction rate