

作物轮作系统对大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌的影响

孙玉秋^{1,2}, 许艳丽¹, 李春杰¹, 潘凤娟¹, 张 原³

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所 黑土区农业生态国家重点实验室, 海伦农田生态系统国家野外观测研究站, 黑龙江 哈尔滨 150081;
2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 黑龙江省植检植保站, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要: 采用蔗糖梯度离心法和传统真菌鉴定技术, 研究定位试验条件下长期连作、麦豆迎茬、米豆迎茬和麦米豆轮作不同轮作方式下大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度和寄生真菌情况。结果表明: 连作大豆田土壤中大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌只有明尼苏达被毛孢(*Hirsutella minnesotensis*), 其它轮作方式中, 寄生真菌有2种即洛斯里被毛孢(*Hirsutella rhossiliensis*)和明尼苏达被毛孢(*Hirsutella minnesotensis*)。连作15和16 a豆田大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度低于迎茬和轮作田, 二龄幼虫被毛孢真菌寄生率则均高于其它大豆茬口。

关键词: 大豆胞囊线虫; 二龄幼虫; 寄生; 真菌

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)02-0277-04

Effects of Crop Rotation System on the Parasitic Fungi Associated with Soybean Cyst Nematode Second-stage Juvenile

SUN Yu-qiu^{1,2}, XU Yan-li, LI Chun-jie¹, PAN Feng-juan¹, ZHANG Yuan³

(1. Key Laboratory of Mollisols Agroecology, National Observation Station of Hailun Agroecology System, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, Heilongjiang; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Plant Quarantine and Plant Protection Station of Heilongjiang Province, Harbin 150090, Heilongjiang, China)

Abstract: Using sucrose gradient centrifugation and conventional fungal identification techniques to study the population density of soybean cyst nematode second-stage juvenile and their parasitized fungi *Hirsutella* spp. There were four rotation systems of soybean, including long-term soybean monoculture, corn/soybean annual rotation, wheat/soybean annual rotation, wheat/corn/soybean rotation and a control (fallow). The results showed only *Hirsutella minnesotensis* was detected in the long-term soybean monoculture field, in other rotations, there were two kinds of parasitic fungi (*Hirsutella rhossiliensis* and *Hirsutella minnesotensis*). In 15 and 16 years of continuous cropping soybean fields, the population density of soybean cyst nematode second-stage juvenile was lower than other rotation cropping fields, while parasitism of second-stage juveniles by *Hirsutella* spp. was higher than other soybean stubbles.

Key words: Soybean cyst nematode; Second-stage juvenile; Fungi

大豆胞囊线虫病(Soybean cyst nematode, SCN)是由大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)感染引起的,是大豆生产上的主要病害,危害十分严重^[1-3]。我国目前大豆胞囊线虫病危害面积很大,一般可导致大豆减产10%~30%,严重时达到50%以上,甚至绝产^[4-5]。因此,大豆胞囊线虫病的研究一直受到极大的关注。近年来,大豆胞囊线虫病生物防治逐渐成为研究的热点,其中研究较多的是利用从对线虫具有抑制性的土壤中分离出线虫的天敌以防治线虫。这些天敌包括捕食线虫真菌、寄生性真菌和细菌等^[6-7]。在大豆胞囊线虫的众多天敌

中,真菌因其种类繁多和易分离鉴定而倍受关注。迄今为止,已经报道大豆胞囊线虫不同虫态上分离到的真菌已有125属267个种,众多种类的真菌为线虫病害的生物防治提供了丰富的菌种资源^[8]。有研究表明多年连作土壤中引起大豆胞囊线虫种群数量减少的主要原因是生物因子,初步确定为食线虫真菌的作用,在这类土壤中胞囊的数量少、空胞囊多,且胞囊上有大量真菌定殖,一些土壤中发现有明显的优势种如厚垣轮枝菌(*Verticillium chamydosporium*)、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)^[9]。近年来,Chen等又发现了大豆胞囊线虫

收稿日期: 2011-02-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971900); 黑龙江科技攻关资助项目(GA09B103-10); 黑龙江省自然科学基金资助项目(C200630)。

第一作者简介: 孙玉秋(1971-),女,在读博士,研究方向为大豆胞囊线虫防控。E-mail: sunyuqiu98@163.com。

通讯作者: 许艳丽(1958-),女,研究员,博士生导师,主要从事植物线虫病害、作物病害发生、生物生态控制和土壤微生态等方面的研究。E-mail: xyll@neigahrb.ac.cn。

二龄幼虫的寄生真菌—洛斯里被毛孢 (*Hirsutella rhossiliensis*) 和明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*), 这 2 种菌物都是二龄幼虫的专性寄生菌, 对线虫种群密度的控制起着关键性的作用^[10]。中国东北及黄淮海 11 个省市的大豆主产区 146 份土样幼虫寄生菌物研究发现, 被毛孢寄生频率达到 21.9%, 且主要分布在黑龙江省^[11]。由于大豆胞囊线虫二龄幼虫直接侵染大豆根部, 因此寻找二龄幼虫寄生真菌具有潜在的生防价值。

以往研究主要集中于大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌的分离鉴定, 而关于二龄幼虫寄生真菌种类和数量是否受到作物轮作方式影响的研究少见报道, 因此, 在中国科学院海伦农业生态试验站长期定位区轮作和连作大豆田研究连作与轮作方式对大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌的影响, 以期进一步揭示大豆胞囊线虫病抑制性土壤的抑制机制, 为大豆胞囊线虫病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验设在中国科学院海伦农业生态试验站(北纬 47°26', 东经 126°3'), 试验区设置在黑土腹地, 土质为潮棕壤, 为固定场圃, 小区设置为 7 m 长, 11 m 宽, 面积 77 m²。每年有各种豆茬出现, 每个处理在一定年限循环自成轮作体系。在 15 和 16 a 的轮作体系中, 分别设有连作、轮作(小麦-玉米-大豆)、米豆迎茬(大豆-玉米-大豆)、麦豆迎茬(大豆-小麦-大豆)和休闲土壤(自 1992 年以来未种植任何作物, 但保持没有杂草)共 5 种茬口。施肥量为磷酸二铵 150 kg·hm⁻², 连续 2 a 在大豆花期取样。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 土壤样品采集 在大豆花期, 去掉 5 cm 表土, 拔出大豆根, 取 5~20 cm 耕层根围土壤, 采用“Z”字形法取样。每小区取样 10~20 个点, 每点取 100 g, 将土样充分混匀后, 用四分法取 500 g, 封口, 记好标签, 放入新的塑料袋中封好以保湿运回实验室, 于 4℃ 冰箱中保存待用。

1.2.2 二龄幼虫收集 取出冰箱中保存的土样, 每份称取 100 g 置于 250 mL 烧杯中, 加水 150 mL 浸泡 1 h 并转移到 1 000 mL 的塑料烧杯中, 1 750 r·min⁻¹ 搅拌 3 min, 用强水流冲洗土样混浊液, 静止 30 s, 过 20 目、500 目套筛, 收集 500 目筛上物于 50 mL 离心管中, 2 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加水定容至 22.5 mL 后加 70% 蔗糖溶液至 45 mL, 摇匀, 2 500 r·min⁻¹ 离心 3 min, 将含线虫的上清液过 500 目筛, 用水轻轻冲洗筛上物洗去残留的蔗糖, 收

集大豆胞囊线虫二龄幼虫于 50 mL 离心管内并于 4℃ 下存放。

1.2.3 二龄幼虫真菌寄生率测定 将收集的线虫悬液(约 15 mL)全部置于 6 孔组培板中, 在倒置显微镜 100× 下观察, 有孢子黏附于线虫体壁或菌丝长满线虫体腔的记为被寄生, 反之记为非寄生。

1.2.4 二龄幼虫寄生真菌分离纯化 采用直接分离法分离大豆胞囊线虫的二龄幼虫寄生菌物。线虫保存液经旋转震荡器充分混匀后, 吸取 1 mL 于 30 mm 塑料培养皿中, 奥林巴斯显微镜下观察。将有真菌寄生或孢子附着的大豆胞囊线虫二龄幼虫用吸管吸出后, 在无菌水中冲洗 3 次, 再用灭菌的挑针挑入加有氯霉素与链霉素的 PDA 平板中, 25℃ 培养。

1.2.5 二龄幼虫寄生真菌鉴定 主要依靠菌落形态、产孢结构及孢子等的形态特征。按 Eisenback 和 Hirschmanns 的方法进行形态学鉴定^[11]。真菌分类鉴定参考的书目主要有《Compendium of Soil Fungi》, 《Illustrated Genera of Imperfect Fungi》和《Genera of Hyphomycetes》^[12-14]。

1.3 数据分析

采用 DPS 2.0 和 Excel 2003 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 二龄幼虫寄生真菌种群

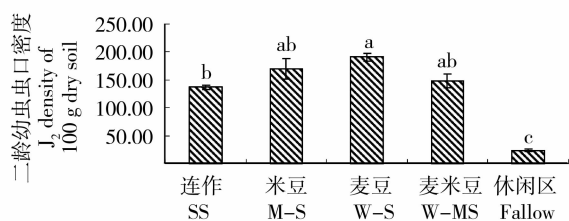
在连作 15 a 和连作 16 a 大豆田土壤中只分离到了明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*)。在米豆迎茬、麦豆迎茬和麦米豆轮作系统中, 均检测到了洛斯里被毛孢 (*Hirsutella rhossiliensis*) 和明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*) 2 种真菌, 在 15 a 休闲土壤中检测到了洛斯里被毛孢 (*Hirsutella rhossiliensis*), 16 a 休闲土壤中未检测到被毛孢真菌。

2.2 二龄幼虫虫口密度

在 15 a 轮作体系中, 对大豆连作、米豆迎茬、麦豆迎茬、麦米豆和休闲区大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度检测结果表明(图 1), 麦豆迎茬区二龄幼虫虫口密度(条·100 g⁻¹干土)最大, 明显高于其它轮作区, 其次为麦米豆轮作, 休闲区最低。

在 16 a 轮作体系中, 对大豆连作、米豆、麦豆、麦米豆和休闲区比较(图 2), 5 个试验区大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度(条·100 g⁻¹干土)为麦豆迎茬最高(176.3), 明显高于其它轮作区, 米豆迎茬次之, 然后是大豆连作, 休闲区最低(20.45)。

15 a 和 16 a 大豆轮作系统检测结果趋势一致, 都是麦豆迎茬二龄幼虫虫口密度最大, 明显高于连作, 二者差异显著。休闲区土壤中二龄幼虫数量都



SS:soybean continuous cropping; M-S:maize/soybean rotation; W-S:wheat/soybean rotation; W-M-S:wheat/maize/soybean rotation. The same as follows.

图 1 15 a 大豆轮作系统大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度

Fig.1 The density of J_2 in 15 years soybean rotation systems

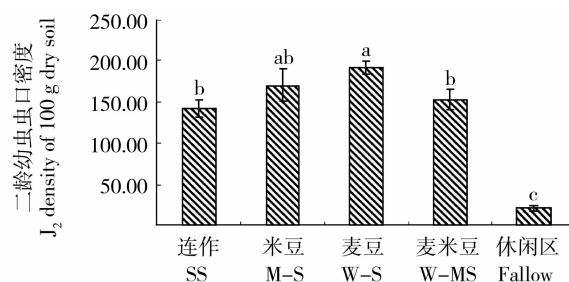


图 2 16 a 大豆轮作系统大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度

Fig.2 The density of J_2 in 16 years soybean rotation systems

最低,休闲土壤未种植任何作物,大豆胞囊线虫没有适宜寄主,所以数量少,这些幼虫可能是由于农事操作、雨水等原因被传入的。

2.3 二龄幼虫被毛孢真菌寄生率

由图 3 可知,在 15 a 轮作体系中,对大豆连作、米豆迎茬、麦豆迎茬、麦米豆轮作和休闲区大豆胞囊线虫二龄幼虫被毛孢真菌寄生率相比较,大豆连作寄生率最高,达到 38.3%,显著高于其它轮作区,米豆迎茬第二,达到 22.6%,麦豆迎茬 15.8%,麦米豆轮作 14.4%,休闲区为 0.3%。

由图 4 可知,在 16 a 轮作体系中,对大豆连作、米豆、麦豆、麦米豆和休闲区大豆胞囊线虫二龄幼虫真菌寄生率比较,大豆连作寄生率最高,达到 33.2%,显著高于其它轮作区,米豆迎茬 21.4%,麦豆迎茬 16.8%,麦米豆轮作 14.2%,休闲区为 0。

15 a 和 16 a 大豆轮作体系中,大豆胞囊线虫二龄幼虫真菌寄生率检测结果趋势基本相同,都是连作区二龄幼虫真菌寄生率最高,且与米豆迎茬、麦豆迎茬及麦米豆轮作差异显著。休闲区线虫大豆胞囊线虫二龄幼虫真菌寄生率都最低,恰好虫口密度低的大豆茬口真菌寄生率最高。

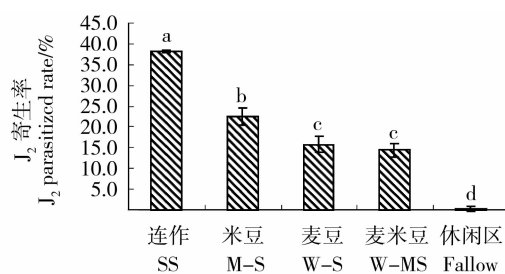


图 3 15 a 大豆轮作系统大豆胞囊线虫二龄幼虫真菌寄生

Fig.3 The parasitism of fungi colonizing SCN J_2 in 15-years soybean rotation systems

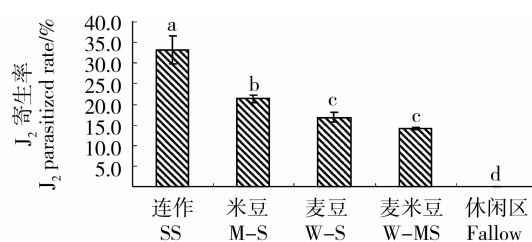


图 4 16 a 大豆轮作系统大豆胞囊线虫二龄幼虫真菌寄生率

Fig.4 The parasitism of fungi colonizing soybean cyst nematode J_2 in 16-years soybean rotation systems

3 结论与讨论

在大豆花期,连作田中的大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌只有明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*),在米豆迎茬、麦豆迎茬及麦米豆轮作田中,大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌有洛斯里被毛孢 (*Hirsutella rhossiliensis*) 和明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*) 2 种。连作田大豆胞囊线虫二龄幼虫虫口密度在 4 种轮作系统中最低,麦豆迎茬最高;而大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌则相反,即连作田高于其它 4 种轮作系统,由此说明该地块的寄生真菌可能与连作地大豆胞囊线虫衰退有关。

1981 年 Crump 等在美国田纳西州大豆种植区病土中首次发现大豆胞囊线虫雌虫的寄生真菌 *Nematophthora gynophila*、*Catenaria auxilaris* 和 *V. chlamydosporium*。中国对胞囊上定殖真菌的研究始于 20 世纪 80 年代末,林茂松从山东大豆田土壤中分离得到 100 余株真菌^[15],刘杏忠等鉴定出 24 属 30 余种食线虫真菌^[16]。

近年来的多项研究表明,在美国大豆胞囊线虫自然衰退是由于专性寄生细菌-巴氏杆菌 *Pasteuria* sp. 或食线虫真菌的作用^[17-18]。在中国,黑龙江、吉林、辽宁、山东、安徽等地都发现了大豆胞囊线虫的自然衰退现象,对土壤特性的初步研究证明线虫衰

退与食线虫真菌的作用有关^[7,9]。

Liu 等在与中国黑龙江省纬度相近的美国明尼苏达州调查发现,从明尼苏达大豆胞囊线虫上分离得到 62 个种的真菌,其中大豆胞囊线虫二龄幼虫的寄生菌物-洛斯里被毛孢 (*Hirsutella rhossiliensis*) 和明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*) 是二龄幼虫的专性寄生菌,对控制线虫种群密度起着关键性的作用^[10]。美国关于被毛孢 (*Hirsutella* spp.) 室内防效的研究结果表明,洛斯里被毛孢 (*Hirsutella rhossiliensis*) 比明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*) 防治效果更好^[19]。中国东北及黄淮海 11 个省市的大豆主产区二龄幼虫寄生菌物被毛孢土壤检出率 19.2%, 主要分布在黑龙江省,陕西、河南和辽宁也有少量分布^[11]。中国关于被毛孢 (*Hirsutella* spp.) 代谢产物对大豆胞囊线虫二龄幼虫影响的研究显示,明尼苏达被毛孢 (*Hirsutella minnesotensis*) 代谢物原液及其不同稀释度均可以显著抑制二龄幼虫的活性^[20],其抑制机制还有待于进一步研究。

通过研究长期定位区连作与轮作方式对大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌的影响,为深入研究和揭示大豆胞囊线虫病抑制性土壤抑制机制奠定了一定的基础。但是大豆胞囊线虫二龄幼虫寄生真菌与大豆胞囊线虫的互作关系及协同进化有待于更深入的研究。

致谢:中国科学院微生物研究所真菌地衣实验室为线虫寄生真菌鉴定提供了大量支持,杨恩策博士参与并协助了真菌的分离,刘杏忠研究员和孙丙达博士协助菌株的鉴定,谨表诚挚谢意。

参考文献

- [1] Wrather J A, Koenning S R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003-2005 [J]. *Journal of Nematology*, 2006, 38: 173-180.
- [2] 吴明才, 肖昌珍. 世界大豆线虫病研究概述 [J]. *湖北农业科学*, 1999 (1): 38-40. (Wu M C, Xiao C Z. Survey of study on soybean cyst nematode in the world [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 1999 (1): 38-40.)
- [3] 许艳丽, 温广月. 大豆主要病虫害研究概况 I 大豆线虫病 [J]. *大豆通报*, 2005 (1): 527. (Xu Y L, Wen G Y. Survey of study on main plant diseases and insect pests I soybean wireworm disease [J]. *Soybean Bulletin*, 2005 (1): 527.)
- [4] 朱艳, 陈立杰, 段玉玺. 不同耕作方式对大豆胞囊线虫群体数量的影响 [J]. *大豆科学*, 2007, 26 (2): 208-212. (Zhu Y, Chen L J, Duan Y X. Influence of tillage practices on the number of soybean cyst nematode population [J]. *Soybean Science*, 2007, 26 (2): 208-212.)
- [5] 阮维斌, 王敬国, 张福锁. 根际微生态系统中的大豆胞囊线虫 [J]. *植物病理学报*, 2002, 8 (3): 200-205. (Ruan W B, Wang J G, Zhang F S. The soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in rhizosphere microecologic system [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 8 (3): 200-205.)
- [6] Jaffee B A, Tedford E C, Muldoon A E. Tests for density-dependent parasitism of nematodes by nematode-trapping and endoparasitic fungi [J]. *Biological Control*, 1993, 3: 329-336.
- [7] Chen F J, Chen S Y. Mycofloras in cysts, females and eggs of the soybean cyst nematode in Minnesota [J]. *Applied Soil Ecology*, 2002, 19: 35-50.
- [8] 陈立杰, 段玉玺, 范圣长, 等. 大豆胞囊线虫病的生防因子研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2005, 33 (增): 190-194. (Chen L J, Duan Y X, Fan S C, et al. Advances in antagonists of soybean cyst nematode [J]. *Journal of Northwest Science Technology University of Agriculture and Forest*, 2005, 33 (Supply): 190-194.)
- [9] 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): 353-363. (Sun M H, Liu X Z. Suppressive soils of soybean cyst nematode in China [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30 (4): 353-363.)
- [10] Liu X Z, Chen S Y. Parasitism of *Heterodera glycines* by *Hirsutella* spp. in Minnesota soybean fields [J]. *Biological Control*, 2000, 19: 161-166.
- [11] Eisenback J D, Hirschmann H. Morphological comparison of second-stage juveniles of *Meloidogyne hapla* by SEM [J]. *Nematology*, 1979, 11: 5-16.
- [12] Domsch K H, Gams W, Anderson T H. Compendium of soil fungi [M]. London: Academic Press, 2007: 1-672.
- [13] Barnett H L, Hunter B B. Illustrated genera of imperfect fungi [M]. Minnesota: APS Press, 1998: 1-218.
- [14] Carmichael J W, Kendrick W B, Connors I L, et al. Genera of Hyphomycetes [M]. Alberta: The University of Alberta Press, 1980: 1-386.
- [15] 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 (1): 38-41. (Lin M S. Isolations of fungi parasitizing soybean cyst nematode in eastern China [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1990, 6 (1): 38-41.)
- [16] 刘杏忠, 张东升, 武修英, 等. 定殖于大豆胞囊线虫囊内真菌的初步研究 [J]. *北京农业大学学报*, 1991, 17 (3): 87-91. (Liu X Z, Zhang D S, Wu X Y, et al. Fungal colonization in cyst on soybean cyst nematode [J]. *Journal of Beijing Agricultural University*, 1991, 17 (3): 87-91.)
- [17] Atibalentja N, Noel G R, Liao T F, et al. Population changes in *Heterodera glycines* and its bacterial parasite *Pasteuria* sp. in naturally infested soil [J]. *Nematology*, 1998, 30 (1): 81-92.
- [18] Jaffee B A, Tedford E C, Muldoon A. Tests for density-dependent parasitism of nematodes by nematode-trapping and endoparasitic fungi [J]. *Biological Control*, 1993, 3: 329-336.
- [19] Chen S Y, Liu X Z. Control of the soybean cyst nematode by the fungi *Hirsutella rhossiliensis* and *Hirsutella minnesotensis* in greenhouse studies [J]. *Biological Control*, 2005, 32: 208-219.
- [20] 钱洪利, 许艳丽, 孙玉秋, 等. 明尼苏达被毛孢代谢物对大豆胞囊线虫二龄幼虫的影响 [J]. *大豆科学*, 2009, 28 (1): 118-121. (Qian H L, Xu Y L, Sun Y Q, et al. Effects of *Hirsutella minnesotensis* metabolites on soybean cyst nematode juvenile [J]. *Soybean Science*, 2009, 28 (1): 118-121.)