

大豆胞囊线虫主要寄生真菌对大豆耕作系统的响应

宋洁^{1,2}, 许艳丽^{1,2}, 姚钦²

(1. 东北农业大学 农学院 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/黑土区农业生态院重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 大豆长期连作以后, 随着土壤中大豆胞囊线虫的增多, 胞囊线虫天敌也在不断积累, 逐步形成大豆胞囊线虫抑制性土壤。真菌作为主要因子, 在抑制性土壤中发挥重要作用。为探讨大豆长期连作对大豆胞囊线虫寄生真菌的影响, 以大豆22年定位试验区为研究对象, 分离和鉴定了22年大豆连作、3年大豆连作和22年大豆轮作(小麦-玉米-大豆)土壤和土壤中大豆胞囊线虫不同虫态寄生真菌。结果表明: 大豆经过22年连作后, 厚垣轮枝菌(*Verticillium chlamydosporia*)和淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)分离数量高于3年连作和22年轮作, 其中厚垣轮枝菌的数量最高, 每克土中含有 1.5×10^4 株, 胞囊、卵和J2上分别分离到14、18和8株, 显著高于3年连作和轮作。研究结果证明了大豆经过长期连作后, 土壤中积累了大豆胞囊线虫寄生真菌, 而厚垣轮枝菌可能是抑制性土壤中的主要寄生真菌。

关键词: 连作; 大豆胞囊线虫; 抑制性土壤; 寄生真菌

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.03.0461

Response of Major Parasitic Fungi of Soybean Cyst Nematode on Different Cultivation Systems

SONG Jie^{1,2}, XU Yan-li¹, YAO Qin¹

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Mollisols Agroecology/ Northeast Institute of Geography and Agroecology Institute, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China)

Abstract: With the long-term monoculture of soybean, the cysts increased, and then the antagonists would accumulated. Fungi played an important role in soybean cyst nematode suppressive soil. The effect of soybean long-term monoculture on parasitic fungi of soybean cyst nematode was examined. Under soybean monoculture and rotation cropping (wheat/corn/soybean) for 22 years respectively, and soybean monoculture for 3 years, the parasitic fungi were isolated and identified in soil and soybean cyst nematode. The results indicated that when compared with rotation cropping for 22 years and soybean monoculture for 3 years, the percentage of *Verticillium chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* were higher in soybean monoculture for 22 years, and the percentage of *Verticillium chlamydosporia* was the highest. The amount of *Verticillium chlamydosporia* was 1.5×10^4 in soil, and the amount of the fungus was 14, 18 and 8 on cyst, egg and J2, respectively. It demonstrated that the parasitic fungi accumulated after soybean long-term monoculture, and *Verticillium chlamydosporia* might be main parasitic fungi in soybean cyst nematode suppressive soil.

Keywords: Continuous cropping; *Heterodera glycines*; Suppressive soil; Parasitic fungi

大豆胞囊线虫病(soybean cyst nematode, 简称SCN) 是大豆生产中一种常见的病害, 同时也是大豆生产中的主要限制因子之一。1981年Hartwig在美国首次发现, 大豆感病品种连续种植5年后, 大豆胞囊线虫的虫口密度显著降低, 原来发病严重的地块病情突然消失或者大大减轻, 并将这种现象称作大豆胞囊线虫自然衰退^[1]。Chen等^[2]研究发现, 长期种植大豆感病品种, 大豆胞囊线虫的种群数量与当

地平均侵染水平相比保持较低, 将这样的土壤称为大豆胞囊线虫抑制性土壤。2004年许艳丽在1991年设立的大豆连作和轮作长期定位试验区研究发现, 大豆连作7~11年的土壤中胞囊数量逐步降低, 由每克土壤中139个胞囊下降到52个^[3]。

近年来研究者发现抑制性土壤中大豆胞囊线虫的被寄生率明显升高, 大豆连作后会使得胞囊上的真菌简单化, 同时寄生率增加^[4], 并认为正是这种

收稿日期: 2015-09-12

基金项目: 国家自然科学基金(30971900)。

第一作者简介: 宋洁(1985-), 女, 博士, 主要从事农田有害生物控制研究。E-mail: songjieyabaobao@163.com。

通讯作者: 许艳丽(1958-), 女, 研究员, 博导, 主要从事植物线虫病、作物病虫害生物生态控制和土壤微生态研究。E-mail: xyll@iga.ac.cn。

寄生作用降低了大豆胞囊线虫的种群密度。大豆多年连作后形成的抑制性土壤能够有效阻碍线虫对大豆的侵染,这种抑制特性的主要原因来自于该土壤中的生物因子,并将这种特性称为生物源特性^[5-6]。2012年宋洁通过盆栽试验也证明了,引起大豆胞囊线虫自然衰退现象的主要原因为抑制性土壤中的生物因子,并且真菌起到了主要作用^[7]。赵晓辉2011年对大豆胞囊线虫抑制性土壤中的寄生真菌进行分离,共分离出真菌284株,其中优势寄生真菌为镰孢菌(*Fusarium* spp.)、木霉(*Trichoderma* spp.)、厚垣轮枝菌(*Verticillium chlamydosporium*)和淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*),这些都是常见的大豆胞囊线虫寄生真菌^[8]。抑制性土壤中蕴含着丰富的大豆胞囊线虫寄生菌物资源,并且这些寄生菌物能够寄生大豆胞囊线虫不同虫态,抑制大豆胞囊线虫种群密度。探讨抑制性土壤和土壤中大豆胞囊线虫不同虫态寄生真菌,对明确抑制性土壤抑制机理和寄生菌物的开发与利用具有重要意义。

本研究以中国科学院海伦农业生态试验站大豆22年长期定位试验区为研究对象,分别从大豆胞囊线虫抑制性土壤中、土壤中胞囊、卵和二龄幼虫(J2)上进行大豆胞囊线虫寄生真菌分离,并对分离频率较高的寄生真菌进行形态学鉴定,旨在探讨该抑制性土壤中的主要寄生真菌,为抑制性土壤深入研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA, Potato Dextrose Agar Medium)^[7]、孟加拉红培养基(Rose Bengal Medium)^[7]、2%水琼脂培养基(WA, Water Agar Medium)^[8]和抗生素(160万单位的青霉素 $0.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 100万单位的链霉素 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.2 方法

1.2.1 土壤样品采集 试验设置在中国科学院海伦农业生态试验站长期定位试验区,该试验站地处东北黑土区中部($\text{N}47^{\circ}26'$, $\text{E}126^{\circ}38'$),海拔高度为240 m,隶属于温带大陆性季风气候区,冬季寒冷干燥,夏季高温多雨,雨热同期。当地年平均气温为 1.5°C ,年平均降水量为570 mm,年平均有效积温为 2400°C 。试验区土壤类型属于典型的黑土。定位试验小区长11 m,宽7 m,面积为 77 m^2 ,3次重复。从1991年开始,设置了大豆不同耕作系统,本研究

选取定位区包括:22年大豆连作(为抑制性土壤^[9])、3年大豆连作和22年小麦-玉米-大豆轮作。2011年大豆花期(R2)进行一次采样,采用“Z”字型取样法,每个处理至少取10个点。去除0~5 cm表土,拔出大豆植株根部,取5~20 cm处的耕层大豆根围土。

1.2.2 土壤中大豆胞囊线虫寄生真菌的分离 采用混菌法分离1.2.1中不同耕作系统土壤中的大豆胞囊线虫寄生真菌。分别取不同定位区新鲜土样5 g,放入50 mL灭菌后的0.1%水琼脂中,置于摇床上 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 min后,制备成土壤悬液,然后进行 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 和 10^{-5} 的梯度稀释。将平板倒置于 25°C 恒温培养箱中暗培养。每个稀释度重复3次。每2 d观察一次,待有菌落长出后,进行计数、分离纯化。

菌落数 = 菌落平均值 \cdot 皿 $^{-1} \times$ 稀释倍数

1.2.3 大豆胞囊线虫胞囊寄生真菌的分离 将1.2.1中不同耕作系统下的新鲜土壤置于250 mL塑料烧杯中,加水浸泡1 h,用强水流冲洗至1 000 mL,静置10 s后过20目、80目标准检验套筛。用63%的蔗糖溶液收集80目筛上物于50 mL离心管中, $2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min。将上层悬浮液转移到垫有滤纸的漏斗中,在解剖镜下挑取新鲜饱满的棕色胞囊100个进行寄生真菌分离。将胞囊在1.0% NaClO溶液中进行表面消毒3 min,无菌水反复冲洗。将胞囊置于双抗水琼脂培养基上,每皿5个胞囊。 25°C 条件下恒温暗培养,当胞囊边缘长出菌丝时,转移到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上进行鉴定和计数,在 25°C 条件下恒温培养。

1.2.4 大豆胞囊线虫卵寄生真菌的分离 采用蔗糖梯度离心方法分离饱满的大豆胞囊线虫卵,将胞囊置于200目和500目的套筛上,进行破壁研磨,用清水将500目筛上的卵收集至50 mL离心管中,冲洗到25 mL刻度线,再加70%的蔗糖溶液25 mL, $2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,将分离获得的大豆胞囊线虫卵悬液,在1.0% NaClO溶液中进行表面消毒3 min,用灭菌蒸馏水进行彻底冲洗,对1 000粒卵进行寄生真菌的分离。取1 mL大豆胞囊线虫卵悬液加至水琼脂(WA)培养基上,用涂布棒将其涂布均匀后,在 25°C 条件下,进行恒温倒置培养。接种3 d后,每隔1 d在倒置显微镜下进行观察,待长出菌落后,马上挑取菌丝,转接到PDA平板上进行鉴定和计数。

1.2.5 大豆胞囊线虫 J2 寄生真菌的分离 将 1.2.1 中不同耕作系统下新鲜土壤置于烧杯中,浸泡 1 h,用强水流冲击烧杯底部,使土样完全彻底的悬浮起来。静置 30 s 后倾倒土样悬浮液过 40 目和 500 目标准检验套筛。清水收集 500 目筛上物于 50 mL 离心管中。2 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min 后倒掉上清液,保留离心管中 25 mL 的水,再加入 25 mL 70% 的蔗糖溶液,2 500 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,上清液过 500 目筛,将获得的大豆胞囊线虫 J2,在 1.0% 的 NaClO 溶液中进行表面消毒 3 min 后,挑取 50 条大豆胞囊线虫 J2 进行寄生真菌的分离。在 40 \times 倒置显微镜下挑取大豆胞囊线虫 J2,将其转移到 WA 平板上,每个平板 5 条线虫。25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下倒置培养,每隔 3 d 观察一次,当有菌落长出后,挑取菌丝转接到 PDA 平板上,进行鉴定和计数。

1.2.6 大豆胞囊线虫寄生真菌的鉴定 根据菌株的菌落形态、孢子、菌丝和产孢结构等特征来进行鉴定。挑取纯化后保存在斜面上的大豆胞囊线虫寄生真菌菌丝,转接到 PDA 平板上,25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下倒置恒温培养,首先根据菌落形态特征对其进行初步分类鉴定,然后在显微镜下对其孢子形态和产孢方式进行进一步观察鉴定。

2 结果与分析

2.1 大豆胞囊线虫寄生真菌的鉴定

对不同耕作系统的土壤和土壤中大豆胞囊线虫不同虫态寄生真菌进行分离,其中土壤中分离得到 93 株真菌,大豆胞囊线虫不同虫态分离得到 220 株真菌。这些真菌主要为镰孢菌属 (*Fusarium* spp.)、轮枝菌属 (*Verticillium* spp.)、拟青霉属 (*Paecilomyces* spp.) ,并采用形态学鉴定方法对这些主要真菌鉴定到种,鉴定结果如下:

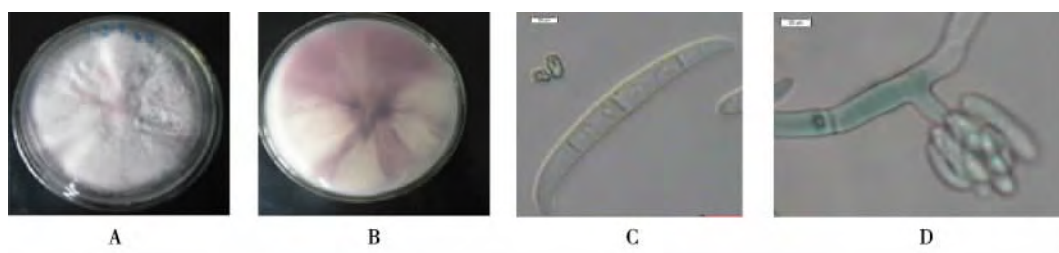
2.1.1 尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 该菌在

PDA 平板上生长,25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下黑暗培养 4 d 后菌落直径为 5.0 ~ 6.4 cm,平均 5.3 cm,7 d 后该菌落直径为 5.5 ~ 9.0 cm,平均 8.5 cm(图 1)。气生菌丝为白色,粉色至紫色,呈绒状。菌落正面无色或淡紫色,菌落背面紫色。产孢细胞呈侧生单瓶梗,较短,单生或有分枝,长度为 5.4 ~ 16.5 μm 。小型分生孢子具有 0 ~ 1 个分隔,椭圆形或肾形,假头生, (2.5 ~ 18.3) $\mu\text{m} \times$ (1.3 ~ 4.0) μm ;大型分生孢子美丽组型,镰状或稍弯,基细胞足跟明显或无,具 2 ~ 5 个分隔,大小为 (20.5 ~ 47.3) $\mu\text{m} \times$ (2.4 ~ 6.2) μm 。鉴定其为尖镰孢菌 (*F. oxysporum*)。

2.1.2 厚垣轮枝菌 (*Verticillium chlamydosporia*)

菌落在 PDA 平板上避光 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后,菌落直径达到 2.0 cm 以上,5 d 后直径则可达到 5.0 ~ 6.0 cm(图 2)。菌落正面菌丝呈致密绒毛状,菌落有褶皱,且边缘平贴,呈白色,菌落背面同样为白色。分生孢子只有一种,球形、卵形或圆形,直径约为 1.0 ~ 2.8 μm ,无色或淡褐色,单生于轮生枝上,但是很快就会脱落。分生孢子梗直立,无色,且具有隔膜,有或无分枝。厚垣孢子为顶生或单生,呈砖格状,且光滑,直径为 12.6 ~ 16.7 μm 。将其鉴定为厚垣轮枝菌 (*V. chlamydosporia*)。

2.1.3 淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 菌落在 PDA 平板上 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养 7 d 后,直径约可达到 30 mm,菌落正面呈现紫色,菌落背面则为无色至灰色,且为圆形,表面呈粉质状(图 3)。其菌丝无色,并且有隔膜。分生孢子梗为直立,长约 400 ~ 600 μm ,有 3 ~ 4 个瓶梗轮状排列在孢子梗上。分生孢子为卵圆形,且表面光滑,大小约为 (2.5 ~ 3.0) $\mu\text{m} \times$ (2.0 ~ 2.2) μm 。瓶梗基部有膨大,顶端稍细长,瓶梗为 (7.5 ~ 9.5) $\mu\text{m} \times$ (2.5 ~ 3.0) μm 。将其鉴定为淡紫拟青霉 (*P. lilacinus*)。

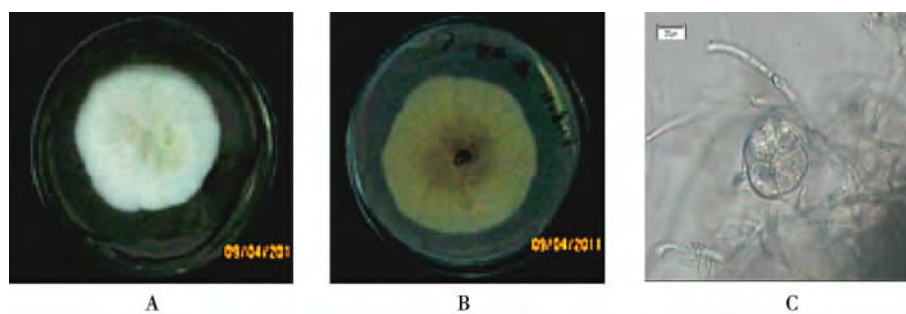


A: 菌落正面; B: 菌落背面; C: 大型分生孢子; D: 小型分生孢子。

A-B: Colony; C: Macroconidia; D: Microconidia.

图 1 尖镰孢菌

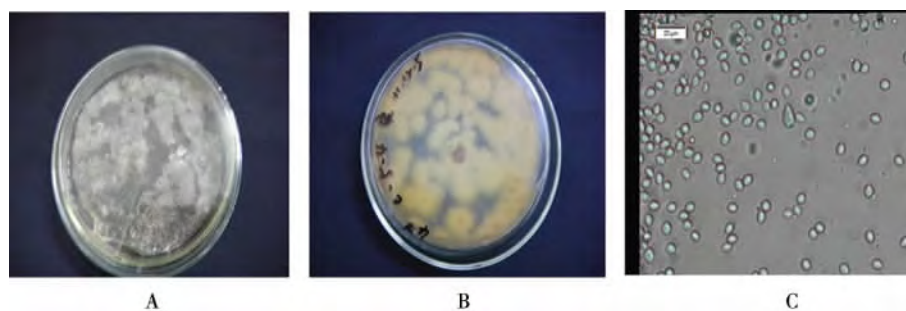
Fig. 1 *Fusarium oxysporum*



A: 菌落正面; B: 菌落背面; C: 分生孢子。

A-B: Colony; C: Croconidia.

图2 厚垣轮枝菌

Fig. 2 *Verticillium chlamydosporia*

A: 菌落正面; B: 菌落背面; C: 分生孢子。

A-B: Colony; C: Croconidia.

图3 淡紫拟青霉

Fig. 3 *Paecilomyces lilacinus*

2.2 大豆胞囊线虫不同虫态主要寄生真菌分离

2.2.1 土壤中的大豆胞囊线虫主要寄生真菌 在不同耕作系统下,分别对大豆 22 年连作、3 年连作和 22 年小麦-玉米-大豆轮作土壤中大豆胞囊线虫寄生真菌分离(表 1),22 年连作土中分离到的厚垣轮枝菌是 3 年连作的 7 倍,显著高于 3 年连作和

轮作($P \leq 0.05$)。淡紫拟青霉在 22 年连作和轮作每克土中分别含有 0.4×10^4 和 0.3×10^4 株,而 3 年连作土中没有分离到淡紫拟青霉。3 年连作下的尖镰孢菌却高于 22 年连作和轮作,这可能是由于镰孢菌是根腐病等的病原菌,连作条件下根腐病的发生较为严重,所以尖镰孢菌数量较多。

表 1 土壤中大豆胞囊线虫主要寄生真菌

Table 1 The main parasitic fungi of soybean cyst nematode in soil (strain·g⁻¹)

寄生真菌 Parasitic fungi	22 年连作 Monoculture for 22 years	3 年连作 Monoculture for 3 years	轮作 Rotation cropping
尖镰孢菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	$(1.5 \pm 1.41) \times 10^4$ a	$(2.2 \pm 4.95) \times 10^4$ a	$(1.3 \pm 2.83) \times 10^4$ a
厚垣轮枝菌 <i>Verticillium chlamydosporia</i>	$(1.5 \pm 2.83) \times 10^4$ a	$(0.2 \pm 0.71) \times 10^4$ b	$(0.5 \pm 1.41) \times 10^4$ b
淡紫拟青霉 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	$(0.4 \pm 1.41) \times 10^4$ a	0.0 ± 0.00 a	$(0.3 \pm 2.83) \times 10^4$ a
其他 Others	$(0.7 \pm 4.24) \times 10^4$ a	$(0.2 \pm 2.83) \times 10^4$ a	$(0.5 \pm 1.41) \times 10^4$ a

同行不同小写字母代表数值差异显著($P \leq 0.05$)。下同。

Different lowercase letters in the same row indicate the values have significant difference ($P \leq 0.05$). The same below.

2.2.2 大豆胞囊线虫胞囊主要寄生真菌 对长期定位区耕作系统大豆胞囊线虫寄生真菌分离(表 2) 22 年连作胞囊上每 100 个胞囊中分离到厚垣轮枝菌 14 株,显著高于 3 年连作和轮作($P \leq 0.05$)。

而淡紫拟青霉分离的结果 3 个茬口基本一致。胞囊被尖镰孢菌寄生频率最高,每 100 个胞囊中可分离到 20 株以上。

表 2 大豆胞囊线虫胞囊主要寄生真菌

Table 2 The main parasitic fungi of soybean cyst nematode on cyst(strain•100 cysts⁻¹)

寄生真菌 Parasitic fungi	22 年连作 Monoculture for 22 years	3 年连作 Monoculture for 3 years	轮作 Rotation cropping
尖镰孢菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	26 ±1. 4 a	26 ±2. 8 a	22 ±0. 7 a
厚垣轮枝菌(<i>Verticillium chlamydosporia</i>)	14 ±2. 8 a	1 ±1. 4 b	6 ±2. 1 b
淡紫拟青霉(<i>Paecilomyces lilacinus</i>)	5 ±1. 4 a	5 ±0. 7 a	6 ±0. 7 a
其他 Others	7 ±1. 4 a	7 ±2. 8 a	5 ±2. 1 a

2. 2. 3 大豆胞囊线虫卵主要寄生真菌 对大豆 22 年连作、3 年连作和 22 年小麦 - 玉米 - 大豆轮作位区大豆胞囊线虫卵寄生真菌进行分离(表 3) , 22 年连作下分离到卵寄生真菌中厚垣轮枝菌和淡紫拟青霉显著高于 3 年连作和轮作($P \leq 0.05$) 。3 个茬口下每 1 000 个卵上分别分离到厚垣轮枝菌 18 , 1 和 6 株 , 而淡紫拟青霉分离到 8 2 和 1 株。厚垣轮枝菌的分离频率最高 , 淡紫拟青霉次之。

表 3 大豆胞囊线虫卵主要寄生真菌

Table 3 The main parasitic fungi of soybean cyst nematode on egg (strain•1000 eggs⁻¹)

寄生真菌 Parasitic fungi	22 年连作 Monoculture for 22 years	3 年连作 Monoculture for 3 years	轮作 Rotation cropping
尖镰孢菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	2 ±0. 7 a	0 ±0. 0 b	0 ±0. 0 b
厚垣轮枝菌(<i>Verticillium chlamydosporia</i>)	18 ±1. 4 a	1 ±1. 4 b	6 ±2. 1 b
淡紫拟青霉(<i>Paecilomyces lilacinus</i>)	8 ±1. 4 a	2 ±0. 7 b	1 ±1. 4 b
其他 Others	12 ±4. 2 a	6 ±2. 8 a	9 ±1. 4 a

2. 2. 4 大豆胞囊线虫 J2 主要寄生真菌 在不同耕作系统下 , 对大豆胞囊线虫 J2 寄生真菌进行分离(表 4) , 22 年连作分离到的 J2 寄生真菌中厚垣轮枝菌(*Verticillium chlamydosporia*) 和淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*) 高于 3 年连作和轮作。22 年连作下 , 每 50 条 J2 上分离到厚垣轮枝菌(*Verticillium chlamydosporia*) 8 株 , 淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*) 4 株 , 尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*) 1 株。由此可以看出经过 22 年连作后 , 大豆胞囊线虫 J2 厚垣轮枝菌(*Verticillium chlamydosporia*) 和淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*) 寄生真菌分离数量显著升高。

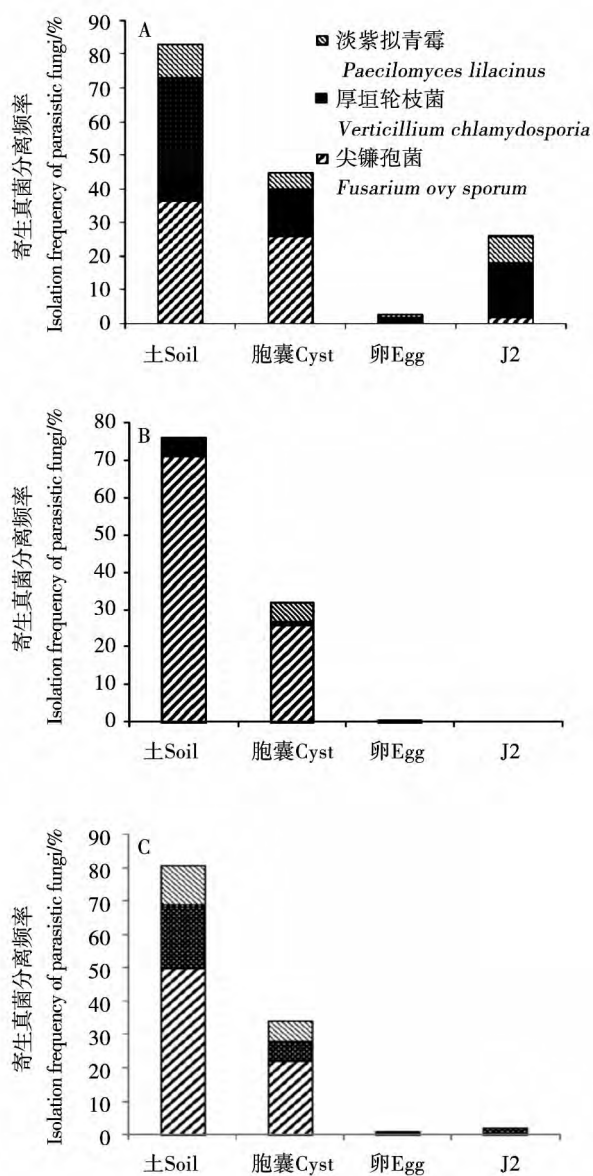
表 4 大豆胞囊线虫 J2 主要寄生真菌

Table 4 The main parasitic fungi of soybean cyst nematode on J2(strain•50 J2s⁻¹)

寄生真菌 Parasitic fungi	22 年连作 Monoculture for 22 years	3 年连作 Monoculture for 3 years	轮作 Rotation cropping
尖镰孢菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	1 ±1. 4 a	0 ±0. 0 a	0 ±0. 0 a
厚垣轮枝菌(<i>Verticillium chlamydosporia</i>)	8 ±4. 2 a	0 ±0. 0 b	1 ±0. 0 a
淡紫拟青霉(<i>Paecilomyces lilacinus</i>)	4 ±2. 1 a	0 ±0. 0 a	0 ±0. 0 a
其他 Others	6 ±4. 2 a	2 ±0. 7 a	3 ±1. 4 a

2. 3 主要寄生真菌在土壤和大豆胞囊线虫不同虫态上分离频率的比较

通过对不同耕作系统下 , 土壤、土壤中大豆胞囊线虫胞囊、卵和 J2 主要寄生真菌分离 , 均分离到了机会真菌尖镰孢菌、厚垣轮枝菌和淡紫拟青霉 , 分离频率依次为 22 年连作 > 轮作 > 3 年连作 , 抑制性土壤 > 胞囊 > J2 > 卵(图 4) 。从寄生菌种类看 , 3 个轮作系统均是土壤和胞囊中尖镰孢菌分离频率最高。而卵和 J2 中以厚垣轮枝菌的分离频率最高 , 淡紫拟青霉次之。从耕作系统看大豆 22 连作后 , 土壤和大豆胞囊线虫不同虫态中厚垣轮枝菌和淡紫拟青霉寄生真菌分离频率均显著高于 3 年连作和轮作。



A: 大豆 22 年连作; B: 大豆 3 年连作; C: 小麦 - 玉米 - 大豆轮作。

A: Soybean continuous cropping for 22 years; B: Soybean continuous cropping for 3 years; C: Rotation with wheat / corn / soybean.

图 4 不同耕作系统中土壤和大豆胞囊线虫不同虫态主要寄生真菌

Table 4 The main parasitic fungi in soil and SCN of soybean in different cultivation systems

3 结论与讨论

机会真菌广泛存在于土壤中,当土壤中存在大量大豆胞囊线虫时,为其提供了寄生条件,便可专性或兼性定殖于植物固着性线虫的胞囊、卵和 J2,从而控制线虫密度^[15]。此外,土壤环境较为复杂,土壤中的真菌常受到环境因素、耕作制度和施肥情况等因素的影响,抑制性土壤中寄生真菌的种类和

数量可能会发生改变。因此本研究针对数量较多的 3 种主要寄生真菌进行探讨,从土壤和大豆胞囊线虫不同虫态上分离大豆胞囊线虫主要寄生真菌,研究发现在不同耕作系统中大豆经过 22 年连作后形成抑制性土壤,土壤中和大豆胞囊线虫不同虫态上均分离到了机会真菌,包括尖镰孢菌、厚垣轮枝菌和淡紫拟青霉。22 年连作田厚垣轮枝菌和淡紫拟青霉的分离频率均较 3 年连作和 22 年轮作分离频率显著升高,大豆胞囊线虫卵和 J2 中,厚垣轮枝菌分离频率最高。说明大豆经过长期连作以后,土壤中大豆胞囊线虫寄生菌不断积累,呈现增加趋势,且寄生真菌厚垣轮枝菌很可能为抑制性土壤中的主要寄生真菌。

目前,世界上已报道的从大豆胞囊线虫各虫态上分离到的真菌已达到 125 个属 280 余种^[9],本研究中分离到的厚垣轮枝菌、淡紫拟青霉和镰孢菌均为大豆胞囊线虫常见寄生真菌,同时也是大豆胞囊线虫较为常见的生防菌。1991 年刘杏忠等对我国各地采集的近 50 个大豆胞囊线虫土样进行胞囊寄生真菌的分离,得到 150 余真菌,其中镰孢菌属(*Fusarium* spp.) 的分离频率最高^[10]。孙玉秋等^[11]对来自东北的 17 份大豆田土样进行卵寄生真菌的分离,结果表明在鉴定出的 24 个属中以拟青霉属(*Paecilomyces* spp.)、轮枝菌属(*Verticillium* spp.) 和镰孢菌属(*Fusarium* spp.) 的数量最多。赵晓辉等^[14]在大豆胞囊线虫抑制性土壤中分离到 6 株厚垣轮枝菌,经测定对大豆胞囊线虫的 J2 均表现出强烈的抑制作用。这些寄生真菌对大豆胞囊线虫的生防作用近几年来均有报道,不仅能够寄生胞囊线虫、根结线虫等多种植物病原线虫的卵、幼虫及成虫,而且能够抑制线虫卵孵化和 J2 活性,从而控制线虫密度^[12-13]。鲁健聪等^[16]利用从抑制性土壤中分离得到的寄生真菌尖镰孢菌、厚垣轮枝菌和淡紫拟青霉,研究其对大豆胞囊线虫的抑制作用,发现这些真菌对大豆胞囊线虫均具有很好的生防效果。大豆经过长期连作后,积累大量大豆胞囊线虫寄生真菌,蕴藏重要生防资源,因此这些寄生真菌很可能为抑制性土壤形成抑制特性的主要原因。

不同轮作系统下,胞囊和抑制性土壤中大豆胞囊线虫寄生真菌尖镰孢菌分离频率最高,但镰孢菌属中有些种是引起大豆根腐病的主要病原,且在大豆胞囊线虫侵染大豆时会不会造成复合侵染^[17],本研究尚未进行对大豆的致病性测定,镰孢菌属在大

豆胞囊线虫生物防治上的应用较少,是否能作为重要的寄生真菌还有待进一步研究。

大豆胞囊线虫是一类对寄主专一性较强的线虫。因此,在一大豆田上连续种植大豆,会使土壤中的胞囊不断积累,但在大豆经过长期连作以后,随着胞囊的增多,大豆胞囊线虫的自然天敌也随之增长,最终控制大豆胞囊线虫的种群密度,形成大豆胞囊线虫抑制性土壤。真菌作为抑制性土壤中抑制因子之一,在该生态抑制中的作用不容忽视。这些寄生真菌的比例关系和相互作用的方式,以及抑制性土壤中真菌-线虫-植物这一综合体系之间的关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hartwig E E. Breeding productive soybean cultivars resistant to the soybean cyst nematode for the southern United States [J]. Plant Disease, 1981, 65(4): 303-305.
- [2] Chen S. Suppression of *Heterodera glycines* in soils from fields with long-term soybean monoculture [J]. Biocontrol Science and Technology, 2007, 17(2): 125-134.
- [3] 许艳丽. 土壤环境对大豆胞囊线虫卵孵化影响及线虫分子诊断研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004. (Xu Y L. The effects of soil environment on soybean cyst nematode egg hatch and nematode molecular diagnosis [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2004.)
- [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. Influences of tillage practices on the number of soybean cyst nematode population [J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 208-212.)
- [5] 靳学慧, 辛惠普, 郑雯, 等. 长期轮作和连作对土壤中大豆胞囊线虫数量的影响[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(2): 189-193. (Jin X H, Xin H P, Zhen W, et al. The influence of soil on the long-term rotation and continuous cultivation on soybean cyst nematode [J]. Chinese Journal of Oil Crop Science, 28(2): 189-193.)
- [6] 孙玉秋, 许艳丽, 李春杰, 等. 作物轮作系统对土壤中大豆胞囊线虫胞囊量和单胞囊卵量的影响[J]. 农业系统科学与综合研究, 2011, 27(2): 248-252. (Sun Y Q, Xu Y L, Li C J, et al. Influence of cropping rotation systems on the volume of cysts and eggs in a single-cyst of soybean cyst nematode [J]. System Science and Comprehensive Studies in Agriculture, 2011, 27(2): 248-252.)
- [7] 宋洁. 大豆胞囊线虫抑制性土壤及其抑制因子研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012. (Song J. Suppressive soil of soybean cyst nematode and suppressive factors [D]. Harbin: Northeast Forestry University 2012.)
- [8] 赵晓晖. 大豆胞囊线虫寄生真菌及其作用研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011. (Zhao X H. Suppressive soil of soybean cyst nematode and parasitic fungi [D]. Harbin: Northeast Forestry University 2011.)
- [9] 陈立杰, 王媛媛, 朱晓峰, 等. 大豆胞囊线虫病生物防治研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(4): 393-398. (Chen L J, Wang Y Y, Zhu X F, et al. Review of the biocontrol on soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2011, 42(4): 393-398.)
- [10] 刘杏忠, 张东升, 武修英, 等. 定殖于大豆胞囊线虫内真菌的初步研究[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. Preliminary studies on the parasitic from the cyst of *Heterodera glycines* [J]. Acta Agriculturae Universitatis Atis Pekinensis, 1991, 17(3): 87-91.)
- [11] 孙玉秋, 许艳丽, 李春杰, 等. 东北地区大豆胞囊线虫卵定殖真菌的多样性研究[J]. 华北农学报, 2011, 26(2): 233-238. (Sun Y Q, Xu Y L, Li C J, et al. Mycofloras in eggs of the soybean cyst nematode in Northeast China [J]. Acta Agriculturae Boreall-Sinica, 2011, 26(2): 233-238.)
- [12] Djian C, Pijarowski L, Ponchet M, et al. Acetic acid: A selective nematocidal metabolite from culture filtrates of (*Paecilomyces lilacinus* Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai [J]. Nematologica, 1991, 37: 101-112.
- [13] Fitters P F L, Belder E, Den B E. A time-lapse technique to study the effect of fungal products on embryo-genesis of nematode eggs [J]. Mededelingen van de Faculteit Land bouw wet en schapen, Universiteit Gent, 1993, 58(2B): 751-756.
- [14] 赵晓晖, 许艳丽. 厚垣轮枝菌发酵液对大豆胞囊线虫的抑制作用[J]. 大豆科技, 2011, 20(4): 20-23. (Zhao X H, Xu Y L. The control of *Verticillium chlamydosporia* on soybean cyst nematode [J]. Soybean Science & Technology, 2011, 20(4): 20-23.)
- [15] 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. (Li T F, Zhang K Q, Liu X Z. Taxonomy of nematophagous fungi [M]. Beijing: Chinese Scientific and Technological Publication, 2000.)
- [16] 鲁健聪. 寄生真菌代谢物对大豆胞囊线虫抑制及防治[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015. (Lu J C. Suppressness and biocontrol of parasitic fungal fermentation filtrate on soybean cyst nematode [D]. Harbin: Northeast Agricultural University 2015.)
- [17] 许艳丽, 韩晓增, 王光华. 大豆重迎茬研究[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1995: 57-66. (Xu Y L, Han X Z, Wang G H. Research of alternate-year and continuous-cropping on soybean [M]. Harbin: Harbin Engineering University Press, 1995: 57-66.)