

陈秀菊, 坚晋卓, 李惠霞, 等. 2 株真菌的鉴定及对禾谷孢囊线虫的防治效果 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(1): 108-115.
CHEN Xiuju, JIAN Jinzhuo, LI Huixia, et al. Identification of two fungi strains and their control effects to cereal cyst nematode[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(1): 108-115.

2 株真菌的鉴定及对禾谷孢囊线虫的防治效果

陈秀菊, 坚晋卓, 李惠霞, 李 瑞, 卢智琴

(甘肃农业大学 植物保护学院/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】生防菌株的种类鉴定及对禾谷孢囊线虫 *Heterodera avenae* 的防治效果。【方法】以形态学特征和 rDNA-ITS 序列比对及系统发育树分析相结合的方法鉴定生防菌的种类, 测定菌株 A1 和 B1 发酵液对孢囊、卵和 2 龄幼虫的活性及对小麦孢囊线虫病的盆栽防治效果。【结果】菌株 A1 和 B1 分别鉴定为寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* 和长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum*。处理 14 d 后, A1 和 B1 的菌丝对线虫孢囊的寄生率可达 80.00% 以上。处理 12 d 后, 菌株 A1 和 B1 的发酵液原液对卵孵化的抑制率分别为 63.98% 和 67.56%, 处理 72 h 后, 对 2 龄幼虫的校正死亡率分别为 68.14% 和 92.98%。盆栽试验发现, 菌株 A1 和 B1 的 3% 菌肥培养物处理 90 d 后, 孢囊减少率分别为 31.71% 和 36.04%, 小麦根长分别增加 28.82% 和 59.62%, 株高分别增加 20.38% 和 21.43%。【结论】菌株 A1 和 B1 对禾谷孢囊线虫具有防治作用, 是 2 株极具开发潜力的生防菌株。

关键词: 寄生曲霉; 长枝木霉; 禾谷孢囊线虫; 防治效果; 生防菌株
中图分类号: S432.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)01-0108-08

Identification of two fungi strains and their control effects to cereal cyst nematode

CHEN Xiuju, JIAN Jinzhuo, LI Huixia, LI Rui, LU Zhiqin
(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University/Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: 【Objective】To identify the species of biocontrol strains and analyze their control efficiency to cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae*). 【Method】Biocontrol fungus A1 and B1 were identified according to morphological characters, rDNA-ITS sequence alignment and analysis of phylogenetic tree. The control effects of the fermentation broths of strain A1 and B1 against cysts, eggs and the second-stage juveniles (J2) and pot control effects against cereal cyst nematodes were determined. 【Result】Strain A1 and B1 were identified as *Aspergillus parasiticus* and *Trichoderma longibrachiatum* respectively. The mycelium parasitic rates of A1 and B1 on nematode cysts were over 80.00% at 14 days after treatment. At 12 days after treatment, the inhibition rates of the fermentation broths of A1 and B1 on egg hatching were 63.98 % and 67.56% respectively. The corrected mortality rates of J2 at 72 hours after treatment were 68.14% and 92.98 % respectively. At 90 days after treatment with 3% fungus fertilizer, pot experiment results showed that cyst reduction rates of A1 and B1 were 31.71% and 36.04%, the root lengths of wheat plants increased by 28.82% and 59.62%, and the plant heights increased by 20.38% and 21.43%, respectively. 【Conclusion】Strain A1 and B1 have control effects on cereal cyst nematodes and are worthy of development and utilization .

Key words: *Aspergillus parasiticus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Heterodera avenae*; control effect; biocontrol strain

禾谷孢囊线虫 *Heterodera avenae* 是重要的病原线虫, 其寄主包括小麦属、大麦属等 32 个属 60 余种禾本科作物和紫羊茅等多种杂草, 严重影响小麦、燕麦、大麦、裸大麦等作物生产^[1]。禾谷孢囊线虫病在全球多个国家均有发生和为害^[2], 一般患病麦田可减产 20%~30%^[3], 严重时可使小麦减产 50%~90%^[4]。1989 年, 该病在我国湖北首次被公开报道, 随后在北京、河南、河北、山西、陕西、内蒙古、甘肃等地相继被发现^[1, 5-8]。侵染麦类的孢囊线虫有禾谷孢囊线虫 *H. avenae*、菲利普孢囊线虫 *H. filipjevi*、麦类孢囊线虫 *H. latipons*、双膜孔孢囊线虫 *H. bifenestra* 和稀少孢囊线虫 *H. mani* 等。目前, 我国报道的种主要为 *H. avenae* 和 *H. filipjevi*^[9]。作为我国小麦种植大省, 甘肃省小麦常年种植面积超过 90 万 hm^2 , 受到禾谷孢囊线虫的严重侵害。李惠霞等^[10] 调查结果显示, 甘肃省禾谷孢囊检出率超过 47.9%, 2/3 以上的乡镇有孢囊线虫分布, 全省约 44.2 万 hm^2 小麦受禾谷孢囊线虫病为害。

禾谷孢囊线虫病主要通过土壤传播, 可通过农事操作、农业机械、人、畜、水流等途径近距离传播, 也可经暴雨、洪水、运输车辆等途径远距离传播^[11-12]。由于线虫及其寄主地理分布非常广泛, 寄主种类繁多, 易于传播扩散, 化学防治存在成本高、毒性大、易残留、破坏土壤生态、污染水源、线虫易产生抗药性等一系列弊端, 生物防治因以下优点而备受关注, 选择性强、对人及家畜无毒无害; 利用可再生资源, 低碳环保; 对环境友好, 对生态环境影响较小, 易被植物、土壤微生物和阳光降解^[13]。

在线虫病害生物防治方面研究较多的有厚垣普可尼亚菌 *Pochonia chlamydosporia*、少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora*^[14]、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*^[15] 和淡紫紫孢菌 *Purpureocillium lilacinum*^[16] 等真菌, 其中淡紫紫孢菌和厚垣普可尼亚菌已经商品化, 并广泛使用^[17-18]。目前, 用于植物线虫的生防细菌有苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*^[19]、坚强芽孢杆菌 *Bacillus firmus*^[20] 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*^[21] 等。为了进一步拓展禾谷孢囊线虫病的生防菌资源, 本研究拟对前期筛选得到的 2 株真菌的杀线虫活性进行离体活性测定和盆栽试验, 以期对禾谷孢囊线虫病生防菌的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

禾谷孢囊线虫采自甘肃省永登县受禾谷孢囊线虫侵染的麦田。

供试菌株 A1 和 B1 由甘肃农业大学植物线虫学实验室前期分离和保存。

1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定 挑取待测真菌菌丝于 PDA 培养基上, 在 25 ℃ 条件下培养 7 d 后, 观察菌株生长速度、菌落颜色及表面特征等, 在显微镜下观察菌丝、孢子, 记录菌株的形态特征。

1.2.2 分子生物学鉴定 按照生工真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取真菌基因组 DNA, -20 ℃ 保存备用。采用通用引物 ITS1(5'-CTTGGTCATTTAGAGGGAAGTAA-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCUCTTATTUATATUC-3') 进行 PCR 扩增。扩增产物送上海生物工程有限公司测序, 在 NCBI 数据库上通过 BLAST 比对分析, 用 MEGA 6.0 中的 UPGAM 法构建系统发育树。

1.2.3 禾谷孢囊线虫的采集 选择甘肃省永登县禾谷孢囊线虫发生较严重的田地, 用 Z 字形取样法采集土样, 去除表层干土, 取 0~20 cm 层的土壤, 将多点土样混合后装入封口塑料袋中, 带回实验室。用漂浮法分离孢囊, 在解剖镜下观察, 挑取饱满的棕色孢囊, 于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 卵和 2 龄幼虫悬浮液的制备 挑取饱满的棕色孢囊, 加入 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaClO 溶液, 表面消毒 3 min, 灭菌水多次清洗后, 用橡皮塞磨破孢囊后, 将卵悬浮液倒入 200 目和 500 目组合筛, 用无菌水冲洗, 收集卵悬浮液, 将卵悬浮液浓度调整为 1 000 mL^{-1} 。

4 ℃ 冰箱处理 6~8 周的禾谷孢囊线虫, 用 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaClO 溶液表面消毒 3 min, 灭菌水清洗 3~5 次后, 置于 100 目网筛上。将网筛置于灭菌培养皿里, 加灭菌水至浸没孢囊, 15 ℃ 黑暗条件下孵化。4 d 后开始收集 2 龄幼虫, 并配置成浓度为 1 000 mL^{-1} 的线虫悬浮液。

1.2.5 真菌孢子悬浮液的制备 取在 PDA 平板上培养 7 d 的菌株, 加入 1 滴吐温 80 和 2.5 mL 无菌水冲洗, 使其分生孢子脱落, 得到分生孢子悬浮液, 用血球计数板计数, 调整浓度为 1×10^7 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

1.2.6 发酵液的制备 将 2 mL 1×10^7 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的分生孢子悬浮液接种在 100 mL PD 培养液中 (150 mL 三角瓶), 26 ℃, 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 120 h。10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 10 min, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤。经上述处理后的悬浮液作为发酵原液, 同时用灭菌水制备 5 倍和 10 倍发酵液, 并测定发酵液的 pH。

1.2.7 生防菌对禾谷孢囊线虫孢囊的寄生作用 将分离出的生防菌株转移至 PDA 培养基上, 等菌

落直径长至培养皿 1/2 时,将消毒后的孢囊放入菌落边缘,每皿 10 个孢囊。培养 7 d 后,将孢囊移出培养皿,5 g·L⁻¹ NaClO 溶液表面消毒 3 min,每个孢囊单独置于经灭菌的滤纸片上,加灭菌水保湿培养,6 d 后观察菌株对孢囊的寄生作用。

1.2.8 真菌发酵液对卵孵化的影响 分别吸取 100 μL 生防菌原液 (1 倍)、5 倍、10 倍发酵液,加入到灭菌的 96 孔细胞培养板中,然后向每个孔中分别加入 200 μL 卵悬浮液。每个浓度重复 3 次,以空白培养基滤液为对照。试验在 15 ℃ 条件下,每隔 2 d 在显微镜下观察 1 次。12 d 后镜检、记录各菌株发酵液对卵孵化的影响,统计相对抑制率。

相对抑制率 = (对照的线虫数量 - 处理的线虫数量) / 对照的线虫数量 × 100%。

1.2.9 真菌发酵液对 J2 的致死作用 分别吸取 100 μL 生防菌 1 倍、5 倍、10 倍发酵液,加入无菌 96 孔细胞培养板中,每个浓度重复 3 次,然后向每个孔中分别加入 200 μL 2 龄幼虫悬浮液。试验在 15 ℃ 条件下进行,以培养基滤液为空白对照,每个处理重复 3 次。分别在 24、48 和 72 h 镜检各处理中线虫的死亡情况,用 NaOH 法测定线虫的死活,并计算死亡率和校正死亡率。

线虫死亡率 = 死亡线虫数 / 供试线虫数 × 100%,
校正死亡率 = (处理线虫死亡率 - 对照线虫死亡率) / (1 - 对照死亡率) × 100%。

1.2.10 室内防效测定 从禾谷孢囊线虫病田采集土样,过筛使每 100 g 土含 20 个孢囊,然后将病土装入直径 21 cm 的花盆,每盆约 1 500 g 土。

制备麦麸培养基,高温灭菌 (121 ℃, 30 min),

接菌后 28 ℃ 条件下培养 7 d。以 1%、2% 和 3% 的比例将其与病土混匀,装入盆中,挑选饱满的宁春 50 号种子播种,每盆 13 粒,每处理 4 盆,以不接生防真菌的病土为对照。

播种 10 d 后调查出苗率,90 d 后调查发病情况,将植株从盆中取出,尽可能保持根系完整。将植株根系用自来水冲洗干净,放在盛有清水的塑料盘中调查病情,记录土中孢囊量,计算孢囊减少率,并测量小麦的根长和株高。

孢囊减少率 = (对照孢囊数量 - 处理孢囊数量) / 对照孢囊数量 × 100%。

1.3 数据处理

用 Excel 2003 进行数据处理和表格绘制,并采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,用最小显著差异法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学鉴定

A1 菌株在 PDA 培养基 25 ℃ 条件下培养 7 d,菌落直径为 3.2~4.5 cm,菌落中央淡黄色至深绿色,边缘白色,有放射状沟纹 (图 1a)。菌落背面奶油色至淡褐色 (图 1b),产生大量分生孢子。分生孢子球形或近球形,长 4.0~6.5 μm,宽 4.5~6.0 μm,一部分菌丝形成长而粗糙的分生孢子梗,顶端产生烧瓶形顶囊,表面着生许多小梗,小梗上产生成串的分生孢子 (图 1c)。初步鉴定为曲霉属 *Aspergillus* 真菌 (注:A1 的鉴定已发表于大豆科学)。

B1 菌株在 PDA 培养基上,菌落初期白色呈毡状,后期变为浅绿色,致密地平铺在培养基平板上

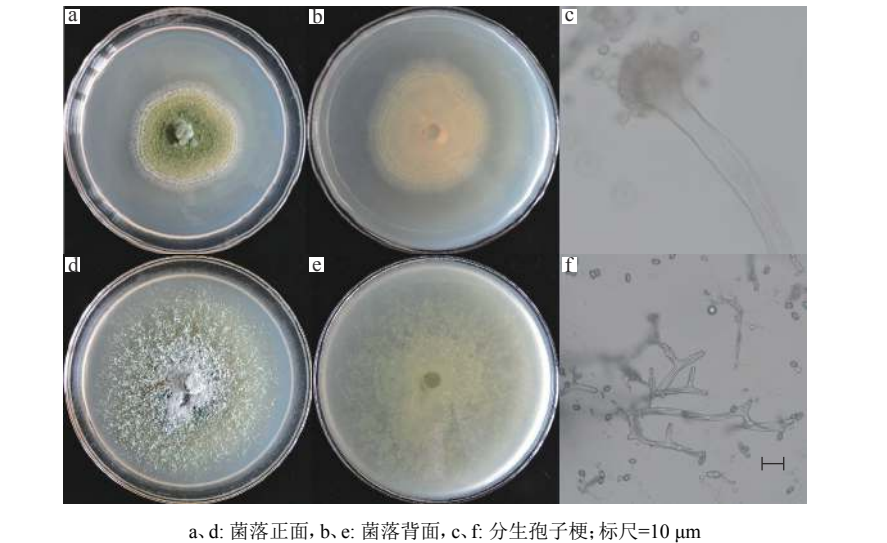


图 1 菌株 A1(a~c)、B1(d~f) 的培养性状及形态特征
Fig. 1 Cultural characteristics and morphologies of strain A1(a~c) and B1(d~f)

(图 1d), 背面黄绿色或金黄色 (图 1e), 孢子聚生成头状。瓶梗细胞单生或 2~5 个轮生。分生孢子椭圆形, 长 2.0~4.0 μm, 宽 2.5~3.8 μm, 壁光滑 (图 1f), 初步鉴定为木霉属 *Trichoderma* 真菌。

2.2 菌株的分子学鉴定

菌株 A1 和 B1 的 ITS 片段长度分别为 594 和 652 bp, GenBank 登录号分别为 MH 937578.1 和 MH 937579.1。序列经 BLAST 比对分析, 用 MEGA

6.0 中的 UPGMA 法构建系统发育树, 由图 2a 可知, 在亲缘关系上, A1 与登录号为 JF 412785.1、HQ 340102.1、AY 373859.1、MG 662404.1 的寄生曲霉聚为一支, 序列相似性为 99%, 故将其鉴定为寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus*。由图 2b 可知, 在亲缘关系上, B1 与登录号为 KU 375460.1 的长枝木霉亲缘关系最近, 序列相似性为 99%, 故将其鉴定为长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum*。

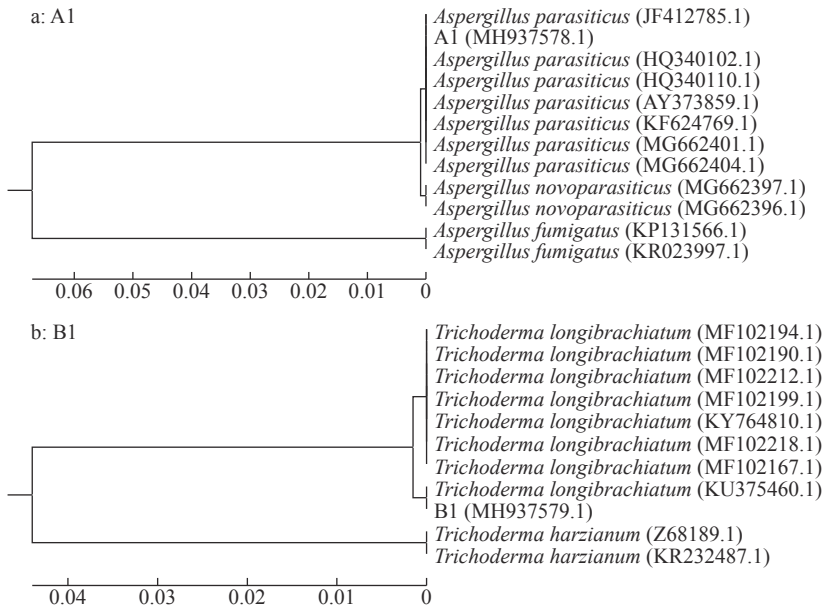


图 2 菌株 A1 和 B1 的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic trees of strain A1 and B1

2.3 生防菌对孢囊的寄生作用

从图 3 可以看出, 菌株 A1 和 B1 对禾谷孢囊的寄生率随侵染时间的增加呈直线上升趋势。在处理第 6 天, 菌株 A1 和 B1 的寄生率均在 24.00% 以上。在处理第 10 天, 菌株 A1 和 B1 的寄生率

均在 45.00% 以上。菌株 A1 和 B1 寄生率上升幅度相近, 均在第 14 天达到 80.00% 以上, 寄生率分别是 90.00% 和 83.33%。菌株 A1 在 6~14 d, 寄生率均略高于 B1。

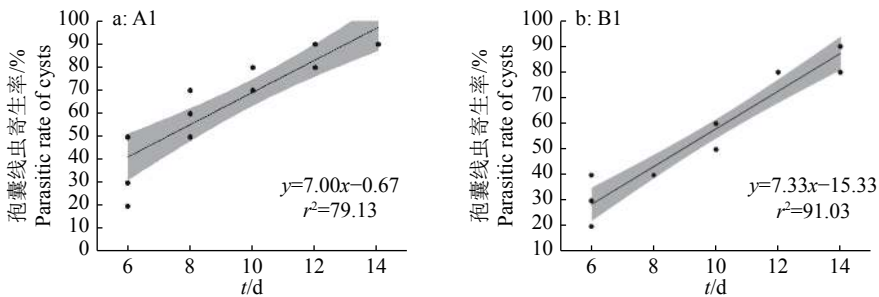


图 3 不同浸染时间 A1、B1 分生孢子悬浮液对禾谷孢囊线虫的寄生率
Fig. 3 Parasitic rates of A1 and B1 conidia suspensions to cereal cyst nematode at different time of infection

2.4 生防菌发酵液对线虫卵孵化的抑制作用

A1、B1 真菌 1 倍、5 倍、10 倍稀释发酵液对卵孵化抑制作用测定结果表明, A1 和 B1 各稀释倍数发酵液对卵孵化抑制率均在 45.00% 以上。随着发酵液稀释倍数增加, J2 孵化数量呈逐渐增加的趋势。

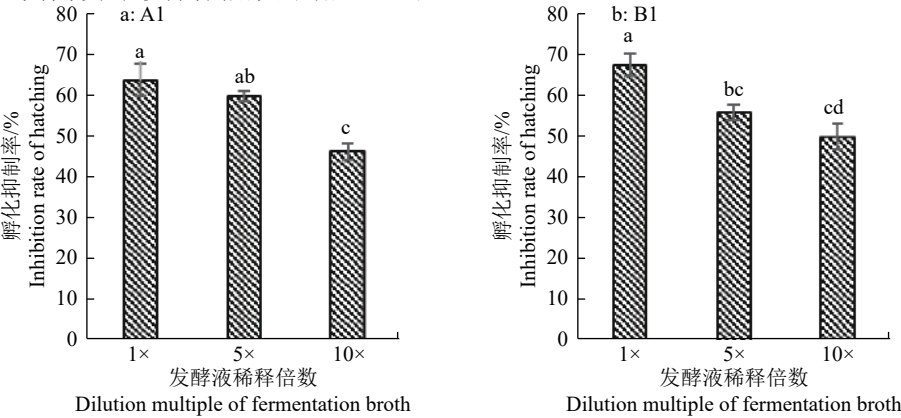
从图 4 可知, 发酵液浓度对卵孵化有显著影响 ($P<0.01$, $F=9.71$)。发酵液处理 12 d 后, A1 的 1 倍发酵液对卵孵化的抑制率为 63.98%, 1 倍和 5 倍稀释液对卵的抑制率差异不显著 ($P>0.05$), 但均显著高于 10 倍 ($P<0.05$) (图 4a)。B1 的 1 倍发酵液对卵

孵化的抑制率为 67.56%, 且显著高于 5 倍、10 倍稀释液 ($P<0.05$)(图 4b)。

2.5 生防菌发酵液对 J2 的致死作用

随着 A1、B1 真菌发酵液稀释倍数的增加, 2 龄

幼虫的死亡率总体呈减小的趋势。随着处理时间的延长, 同一浓度发酵液的校正死亡率呈显著增强趋势, 具体结果见表 1。



图柱上方不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, LSD 法)
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$, LSD method)

图 4 真菌发酵液对禾谷孢囊线虫卵孵化的影响

Fig. 4 Effects of fungal fermentation broth on egg hatching of cereal cyst nematode

表 1 真菌发酵液对禾谷孢囊线虫 2 龄幼虫的致死作用

Table 1 Lethal effects of fungal fermentation broth on the second-stage juveniles of cereal cyst nematode

菌株 Strain	t/h	最终稀释倍数 Final dilution ratio	线虫死亡数量 ¹⁾ Number of dead nematode	死亡率/% Mortality rate	校正死亡率 ^{1)/} % Corrected mortality rate
A1	24	1×	79.33±2.33a	39.67	39.36±1.17a
		5×	40.67±9.68b	20.33	19.93±4.87b
		10×	34.67±1.67b	17.33	16.92±0.84b
		CK	1.00±0.58c	0.50	
	48	1×	107.33±4.91a	53.67	51.52±2.46a
		5×	49.33±8.57b	24.67	22.43±4.30b
		10×	37.33±1.86b	18.67	16.42±0.93b
		CK	4.67±0.88c	2.30	
	72	1×	138.00±5.51a	69.00	68.14±2.83a
		5×	53.00±11.68b	26.50	24.46±0.06b
		10×	39.67±1.45b	19.83	17.61±0.75b
		CK	5.33±0.88c	2.70	
B1	24	1×	95.00±3.21a	47.50	47.24±1.62a
		5×	87.00±9.17a	43.50	43.22±4.61a
		10×	70.67±7.69a	35.33	35.01±3.86
		CK	1.00±0.58b	0.50	
	48	1×	125.00±4.51a	62.50	60.38±2.26a
		5×	105.67±12.99ab	52.83	50.69±6.52a
		10×	79.00±8.14b	39.50	37.31±4.09b
		CK	4.67±0.88c	2.30	
	72	1×	186.33±4.33a	93.17	92.98±2.23a
		5×	105.67±12.57b	52.83	51.52±6.46b
		10×	84.67±4.33b	42.33	40.73±2.23b
		CK	5.33±0.88c	2.70	

1)表中数据为平均数±标准误, 相同菌株相同时间同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, LSD法)
1)Datas in the table are means±SE, different lowercase letters in the same column of the same strain at the same time indicate significant difference ($P<0.05$, LSD method)

经菌株 A1 和 B1 的发酵液处理后, 死亡线虫数显著多于对照组 ($P<0.05$), 说明这 3 种发酵液均对线虫有致死作用。菌株 A1 发酵液处理 24、48、72 h 后线虫校正死亡率为 16.00% 以上, A1 的 1 倍稀释液在 72 h 对 2 龄幼虫的校正死亡率较高为 68.14%。菌株 B1 发酵液处理 24、48、72 h 后线虫校正死亡率为 35.00% 以上, B1 的 1 倍稀释液在 72 h 对 2 龄幼虫的校正死亡率最高为 92.98%, 显著高于 5 倍、10 倍 ($P<0.05$)。在相同处理时间和发酵液稀

释倍数下, 菌株 B1 校正死亡率均大幅高于菌株 A1。

2.6 生防菌菌肥室内防治禾谷孢囊线虫的效果

室内盆栽试验表明, 随着生防菌菌肥量的增大, 孢囊减少率持续增多。由表 2 可知, A1 的 3% 菌肥处理后, 孢囊减少率为 31.71%, 显著高于 1% 和 2% 菌肥处理 ($P<0.05$)。小麦根长增加 28.82%, 株高增加 20.38%。B1 的 3% 菌肥处理后, 孢囊减少率 36.04%, 显著高于 1% 和 2% 菌肥处理 ($P<0.05$)。小麦根长增加 59.62%, 株高增加 21.43%。

表 2 真菌对禾谷孢囊线虫病室内防治效果测定						
Table 2 Control efficiencies of the fungi on cereal cyst nematode in indoor pots						
菌株 Strain	处理 ¹⁾ Treatment	根长 ^{2)/} cm Root length	根长增长率/% Increased percentage of root length	株高 ^{2)/} cm Plant height	株高增长率/% Increased percentage of plant hight	孢囊减少率 ^{2)/} % Cyst reduction rate
A1	1%	11.35±0.32b	2.53	34.43±1.25a	11.79	4.88±1.69c
	2%	13.08±0.50ab	18.16	36.50±1.27a	18.51	11.65±0.97b
	3%	14.26±0.60a	28.82	37.23±1.31a	20.38	31.71±1.69a
	CK	11.07±1.05b		30.80±1.14b		
B1	1%	15.67±0.67a	41.55	30.62±0.59b	-0.58	7.25±2.55b
	2%	15.40±1.81a	39.11	35.39±0.34a	14.90	12.19±1.24b
	3%	17.67±0.76a	59.62	37.40±1.29a	21.43	36.04±0.72a
	CK	11.07±1.05b		30.80±1.14b		

1) 处理为生防菌菌肥与病土质量比; 2) 该列数据为平均数±标准误, 相同菌株同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, LSD法)

1) The mass ratio of fungus fertilizer to soil; 2) Datas in this column are means ± SE, different lowercase letters in the same column of the same strain indicate significant difference ($P<0.05$, LSD method)

3 讨论与结论

寄生曲霉属于半知菌亚门丝孢菌纲丝孢目从梗孢科^[22], 其广泛存在于土壤、灰尘和植物上。目前研究集中于寄生曲霉的种类鉴定和对甘蔗绵蚜、吹绵蚧等害虫的生物防治方面^[23-25], 鲜见寄生曲霉对其他植物寄生线虫有生防作用的报道。长枝木霉生长速度快、产孢量大、对植物病原菌有一定的拮抗作用, 可作为农业上重要的生防菌株^[25], 目前研究集中于其对南方根结线虫的防治及其根际定殖作用^[26]、对禾谷孢囊线虫的寄生和致死作用^[27], 但长枝木霉对禾谷孢囊线虫的盆栽防效试验的报道甚少。

生物农药源于自然, 具有作用谱广、对生态环境影响小、对人畜低毒等特点^[28-29], 筛选细菌、真菌等微生物来防治植物病原线虫, 对生态环境保护具有重要的意义。本研究筛选的具有杀线虫活性的菌

株 A1 和 B1, 经鉴定分别为寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* 和长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum*, 均对禾谷孢囊具有良好的寄生性, 分别在第 6 天、第 10 天后, 寄生率超过 50.00%, 侵染 2 周左右禾谷孢囊寄生率达 80.00% 以上, 这与迟君道等^[30]报道的结果基本一致。

卵孵化试验中, 随着菌株 A1 和 B1 发酵液稀释浓度的增大, 这 2 株菌的卵孵化率相应增大。菌株 A1 和 B1 的 1 倍稀释液 pH 分别为 4.27 和 5.72, 菌株 A1 和 B1 的 1 倍稀释液抑制卵孵化效果均好于 5 倍和 10 倍稀释液。这可能与发酵液 pH 有关, pH 可影响发酵液中杀线虫物质的活性, 还可以直接影响卵的孵化^[31]。

菌株 A1 和 B1 不同浓度发酵液对禾谷孢囊线虫 2 龄幼虫具有一定的毒杀作用, 随着菌株发酵液浓度的升高, 2 龄幼虫死亡率也相应增高, 并且随着

处理时间的延长呈上升趋势。该结果和梁晨等^[32]报道的研究结果基本一致。发酵液对线虫作用的效果与杀线虫活性物质成分的浓度和线虫裸露程度有关,呈现出浓度越低、线虫死亡率越低的规律^[33]。赵迪^[34]发现菌株 Snf 5 的杀线虫活性物质是一种强极性、弱酸性的水溶性抗生素。李玲玉等^[35]发现放线菌 Snea253 代谢产物中氨基糖类物质对线虫有毒性。Niu 等^[36]从细菌 *Bacillus nematocidal* 中分离纯化出对线虫有毒性作用的丝氨酸蛋白酶,能够很大程度上破坏线虫表皮并水解胶原蛋白和凝胶,从而使线虫死亡。刘霆等^[37]研究发现,真菌 Snf 907 代谢物,在原液、5×、10×、20×稀释浓度下,对大豆孢囊线虫 2 龄幼虫的校正死亡率分别是 96.33%、83.18%、63.15% 和 47.04%,这与本试验结果 A1 和 B1 在发酵液原液处理下,对 2 龄幼虫最高的校正死亡率分别为 68.14% 和 92.98% 相比存在差异。这可能与菌株种类、产生的活性物质类型、作用对象、对线虫的作用机理有关^[37]。各类真菌的代谢产物不同,杀线虫的活性物质也不相同,不同的孢囊线虫寄生真菌有其独特作用机理^[38]。

盆栽试验结果表明,菌株 A1、B1 的生物菌肥均能显著减少土壤中的禾谷孢囊线虫的孢囊数量,对小麦植株根长和株高有不同程度的影响。2 种菌肥可使小麦株高增加、根长增长。适量菌肥处理可显著促进小麦根的生长,与对照相比,2 种真菌 3%(w) 处理组小麦根长均增加 3 cm 以上。除 B1 1%(w) 菌肥处理除外,不同浓度的 2 种菌肥均有效促进了小麦株高增加,这与 Zhang 等^[20]的研究结果一致,但本试验中 2 株生防菌 3%(w) 菌肥处理后的孢囊减少率低于其 6%(w) 的菌剂处理,可能是由于生物菌肥中加入的生物菌种和剂量不同所致。

本研究表明菌株 A1 和 B1 在防治禾谷孢囊线虫上有较好的应用前景,且 B1 的生防效果略优于 A1。对于这 2 株生防菌的杀线虫活性物质成分、对线虫的作用机理等有待进一步深入的研究。

参考文献:

[1] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

[2] NICOL J M, RIVOAL R. Global knowledge and its application for the integrated control and management of nematodes on wheat[M]//CIANCIO A, MUKERJI K G. Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes, Dordrecht: Springer. 2008: 251-294.

[3] 张洁, 杨丽荣, 夏明聪, 等. 小麦孢囊线虫病综合防治研究进展 [J]. 河南农业科学, 2017(5): 8-14.

[4] 李红梅, 王暄, 彭德良. 小麦孢囊线虫病概况及江苏省的发生现状与防治对策 [J]. 江苏农业科学, 2010(6): 1-4.

[5] 王明祖, 彭德良. 小麦孢囊线虫病的研究: I: 病原鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 1991, 10(4): 352-356.

[6] 王振跃, 王守正, 李洪连, 等. 河南省小麦孢囊线虫病的初步研究 [J]. 华北农学报, 1993, 8(S1): 105.

[7] 刘维志, 刘修勇, 栾兆杰. 山东省菏泽市郊麦田发现燕麦胞囊线虫 (*Heterodera avenae*) [J]. 青岛农业大学学报 (自然科学版), 2005, 22(4): 266-269.

[8] 郑经武, 林茂松, 程珊瑚, 等. 安徽省小麦上两个孢囊线虫群体的鉴定 [J]. 江苏农业学报, 1996(1): 31-35.

[9] 坚晋卓. 禾谷孢囊线虫生防菌株的筛选及鉴定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[10] 李惠霞, 刘永刚, 朱锐东, 等. 甘肃省小麦禾谷孢囊线虫的发生及分布 [J]. 植物保护, 2016(3): 170-174.

[11] 刘静, 吴海燕, 彭德良. 小麦孢囊线虫的发生防治及控制策略的思考 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1629-1632.

[12] 刘刚. 农业部种植业管理司提醒: 跨区收割可传带小麦孢囊线虫 [J]. 农药市场信息, 2009(16): 42.

[13] 黄忠勤, 王波, 周兴根, 等. 小麦孢囊线虫病害发生规律、鉴定方法及防控策略综述 [J]. 麦类作物学报, 2013, 33(1): 200-206.

[14] GRONVOLD J, HENRIKSEN S A, LARSEN M, et al. Biological control, aspects of biological control: With special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals[J]. Vet Parasitol, 1996, 64(1/2): 47.

[15] 张洁. 小麦孢囊线虫病的生防微生物鉴定及球孢白僵菌 08F04 菌株对土壤微生物多样性的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.

[16] 赵培静, 任文彬, 缪承杜, 等. 淡紫拟青霉研究进展与展望 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(30): 9672-9674.

[17] 卢明科, 潘沧桑, 李舟. 厚垣轮枝孢菌 (*Verticillium chlamydosporium*) 防治植物线虫研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2004, 32(4): 103-107.

[18] 孙漫红, 刘杏忠, 缪作清. 大豆胞囊线虫病生物防治研究进展 [J]. 中国生物防治学报, 2000, 16(3): 136-141.

[19] 刘翠君, 曹春霞, 周荣华, 等. 苏云金杆菌防治大豆孢囊线虫效果试验 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 520-522.

[20] ZHANG J, LI Y, YUAN H, et al. Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09X01 and *Bacillus*

cereus isolate 09B18[J]. *Biol Control*, 2016, 92: 1-6.

[21] ALESSANDRI A, KNAP I, ZAMBELLI L S D F. Nematicidal composition comprising *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: US, 9485993[P]. 2016-11-08.

[22] 代园凤, 张承, 喻会平, 等. 一株寄生曲霉 SF-2 对甘蔗绵蚜的感染作用及其生物学特性初步研究 [J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2017, 32(6): 1006-1011.

[23] 姚粟, 李辉, 程池. 23 株曲霉属菌种的形态学复核鉴定研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(12): 37-43.

[24] 坚晋卓, 徐鹏刚, 张虎忠, 等. 真菌 AT9 对禾谷孢囊线虫的寄生作用及种类鉴定 [J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(5): 71-77.

[25] 邹积雪, 季乃云. 松节藻来源长枝木霉 DL5-4 化学成分及其生物活性研究 [J]. *化学与生物工程*, 2019(3): 13-17.

[26] 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 等. 长枝木霉 T6 菌株对黄瓜南方根结线虫的防治及其根际定殖作用 [J]. 应用生态学报, 2016, 27(1): 250-254.

[27] 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 等. 长枝木霉对禾谷孢囊线虫的寄生和致死作用[J]. 微生物学报, 2014, 54(7): 793-802.

[28] 田涛, 孙淑琴, 杨秀荣, 等. 植物病害生防细菌的筛选策略综述 [J]. *天津农业科学*, 2012, 18(5): 162-165.

[29] ABAWI G S, WIDMER T L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops[J]. *Appl Soil Ecol*, 2000, 15(1): 37-47.

[30] 迟君道, 王笑庸, 樊川, 等. 寒地大豆孢囊线虫生防菌的筛选及防治效果研究 [J]. *黑龙江科学*, 2015(5): 20-21.

[31] 李婷, 黄文坤, 彭德良, 等. 3 株生防真菌发酵液对大豆孢囊线虫的防治效果 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 42-46.

[32] 梁晨, 黄晨, 宋雯雯, 等. 菌株 S01324 对燕麦孢囊线虫的杀线活性及其种类鉴定 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(6): 838-846.

[33] 申佩娟, 苗利华, 李娜, 等. 海洋枝顶孢霉 BH0531 发酵液对根结线虫卵及二龄幼虫的影响 [J]. *中国酿造*, 2017, 36(4): 26-29.

[34] 赵迪. 菌株 Snef5 杀线虫活性物质分离纯化及相关活性基因簇分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013.

[35] 李玲玉, 赵迪, 刘晓宇, 等. 放线菌 Snea253 代谢产物及寡糖对南方根结线虫活性的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(1): 117-122.

[36] NIU Q, HUANG X, ZHANG L, et al. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes[J]. *Arch Microbiol*, 2006, 185(6): 439-448.

[37] 刘霆, 王莉, 段玉玺, 等. Snf907 真菌代谢物对大豆孢囊线虫卵及二龄幼虫的影响 [J]. *大豆科学*, 2006, 25(3): 325-328.

[38] 许艳丽, 鲁建聪, 潘凤娟. 混合寄生真菌发酵液对大豆孢囊线虫的毒力和防效 [J]. *土壤与作物*, 2018, 7(2): 248-256.

【责任编辑 霍 欢】