

HND1 生物种衣剂防治大豆胞囊线虫药效研究

杜春梅¹, 李海燕^{2,4}, 李晓明^{1,3}, 王彦杰², 刘惕若², 平文祥¹

(1. 教育部农业微生物工程技术研究中心, 微生物学黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江八一农垦大学 植物科技学院, 黑龙江 大庆 163319; 3. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000; 4. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:采用厚垣轮枝菌 HDQ18 活性产物制备的生物种衣剂 HND1 原液、稀释 5 ×、10 ×、20 ×、50 × 处理大豆胞囊线虫 J2, 研究其对大豆胞囊线虫的防效。结果表明: HND1 对 J2 有较高的毒性, 其死亡率分别为 94.0%、83.3%、61.0%、54.3%、29%。用不同剂量的 75% HND1 生物种衣剂包衣大豆种子, 在大豆出苗 1 个月后, 调查大豆根系胞囊线虫数量。结果表明: 施用 HND1 种衣剂的 3 种不同处理的平均防效分别为 45.5%、57.5%、60.5%, 均好于对照药剂 35% 多克福种衣剂。对大豆株高和根瘤数等的调查结果表明, HND1 种衣剂对大豆的生长和发育安全。

关键词:生物种衣剂; 大豆胞囊线虫; 防效

中图分类号: S482.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2009)06-1126-04

Control Effects of HND1 Biological Seed Coating on Soybean Cyst Nematode

DU Chun-mei¹, LI Hai-Yan^{2,4}, LI Xiao-ming^{1,3}, WANG Yan-jie², LIU Ti-ruo², PING Wen-xiang¹

(1. Engineering Research Center for Agricultural Microbial Biotechnology, Ministry of Education, Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences of Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang; 2. Plant Science and Technology College of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319; 3. Qiqihaer Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer, 161000; 4. Plant Protection College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Soybean cyst nematode is the most serious soybean disease in Heilongjiang province. The biological seed dressing agent HND1 is prepared with the activity metabolite produced by *Verticillium chlamyosporium* HDQ18, its control effect on soybean cyst nematode was investigated and discussed by toxic test and field experiment. The fatality rate of the original HND1 liquid and its dilution at 5, 10, 20, 50 times with water on juvenile of *H. glycines* was tested, the result showed HND1 was toxic to J2, and lethality rate was 94.0%, 83.3%, 61.0%, 54.3%, 29%, respectively. Soybean seed was coated with 75% HND1 at different coating dose, while 35% Carbofendim-Carbofendim-Thiuram was used as control pesticides. The cyst number on soybean root was investigated after soybean seedlings emerged 30 days. Results showed the control efficiencies of the treatment T_{III}, T_{IV}, T_V were up to 45.5%, 57.5%, 60.5%, respectively, which were better than that of 35% Carbofendim-Carbofendim-Thiuram seed coating agent (T_{II}). The HND1 seed coating agents were safe to soybean cultivation based on the investigation on plant height and root nodules.

Key words: Biological seed coating agent; Soybean cyst nematode; Control effect

大豆是黑龙江省主要栽培作物之一, 常年种植面积达 267 万 hm², 占全国大豆种植面积的 30% ~ 43%, 在农业生产中占有极为重要的地位^[1-2]。目前黑龙江大豆单产提高的主要障碍是大豆重迎茬减产, 而大豆胞囊线虫病 (soybean cyst nematode) 是引起大豆重迎茬减产的主要原因。该病害一般使大豆减产 10% ~ 30%, 严重地块减产 70% ~ 90%。其病

原物大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines*), 是一种世界上最为严重的经济作物病原物, 广泛分布在大豆种植区域^[3-4]。可以通过种植抗性品种、与非寄主作物轮作等方式来防治, 但这些措施存在一定的局限性。目前生产中主要采用化学药剂拌种或选用含有呋喃丹的种衣剂进行种子包衣, 防效期 1 个月左右, 但是, 由于毒性高, 污染环境, 不适宜可持续农业

收稿日期: 2009-04-16

基金项目: 黑龙江省科技计划资助项目 (GC05B201); 黑龙江省普通高校骨干教师创新能力资助项目 (1054G037); 黑龙江大学实验室开放基金资助项目。

第一作者简介: 杜春梅 (1972-), 女, 副教授。研究方向为植物病害生物防治研究。E-mail: duchunmei1972@sohu.com。

通讯作者: 平文祥, 教授, 博士生导师。E-mail: wenxiangping@yahoo.com。

的发展。因此,充分利用土壤中丰富的噬线虫真菌进行生物防治成为新药研究的热点^[5-6]。厚垣轮枝孢菌(*V. chlamyosporium*)是国内外研究最多的轮枝孢属生防真菌,在植物线虫生物防治上有重要意义^[6],能寄生甜菜胞囊线虫(*H. schachtii*)、禾谷胞囊线虫(*H. avenae*)、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、花生根结线虫(*M. arenaria*)、大豆胞囊线虫的卵和雌虫^[7-8]。从我国不同地区的大豆胞囊线虫的胞囊上分离的生防真菌中,厚垣轮枝孢菌的出现频率较高^[9-10],但该菌的不同菌株对线虫卵的寄生率的影响有很大差异,防治效果不同。目前,该菌在田间的应用剂型基本上都是以活菌孢子为有效成分的菌肥颗粒剂,防效达 59%~74%。但是活菌孢子制剂存在稳定性差、自然条件下存贮时间短,防效不稳定,受环境条件的影响较大,剂型单一,推广应用难度大等问题^[11-12]。因此,利用生防真菌代谢产物开发新的生物农药剂型成为扩展其应用领域、提高其防效稳定性的必然途径^[13]。生物种衣剂具有制剂简单、使用方便、时效期长、防效稳定、安全无毒等优点,已经成为防治土传病害的研发热点。目前还没有利用厚垣轮枝孢菌代谢物制备杀线虫生物种衣剂的报道。现从黑龙江省大豆胞囊线虫病已发生衰退的地块分离到生防真菌厚垣轮枝孢菌(*V. chlamyosporium*) HDQ18 菌株,将其发酵液制成生防种衣剂,对大豆种子进行包衣处理,测定其小区防治效果。

1 材料与方法

1.1 供试菌种和药剂

厚垣轮枝孢菌(*Verticillium chlamyosporium* var. *chlamyosporium*) HDQ18,由黑龙江大学微生物学黑龙江省高校重点实验室提供;35%多克福大豆种衣剂,由黑龙江八一农垦大学种衣剂有限责任公司提供。

HND1 种衣剂的制备:将厚垣轮枝孢菌 HDQ18 在马铃薯蔗糖液体培养基中 25℃,180 r·min⁻¹,摇瓶发酵培养 7 d,得到发酵液,加入适量的吐温 80 和其它助剂,制成有效成分为 75% 的 HND1 种衣剂(发酵液:助剂=75:25)。

1.2 防治对象和供试作物

防治对象:大豆胞囊线虫 *Heterodera glycines*;供试作物:垦丰 16 大豆(*Glycine max*),黑龙江省农垦科学院提供。

1.3 HND1 对 J2 活性的影响

设 T_I—无菌水;T_{II}—HND1 原液;T_{III}—稀释 2 倍的 HND1;T_{IV}—稀释 10 倍的 HND1;T_V—稀释 20 倍的 HND1;T_{VI}—稀释 50 倍的 HND1,共 6 个处理。在经灭菌的 24 孔细胞培养板中分别加入各处理溶液,然后各加入新孵化的大豆胞囊线虫二龄幼虫 100 每孔条。放入 25℃ 培养箱中,24 h 后记录线虫死亡率。计算校正死亡率^[14-15]。3 次重复。

1.4 HND1 的小区防效

试验于 2008 年在黑龙江八一农垦大学试验地进行。设 5 个处理。小区行长 3 m,3 次重复,随机区组排列,在大豆生长季作 3 轮小区试验。在第 3 片三出复叶展开后,大豆胞囊线虫生长发育突破大豆根表皮后,每个调查点连续拔取 20 株,调查单株大豆根系胞囊着生量^[2,16],计算防治效果,同时测量植株的根长、株高和叶片数,根瘤数,对该药剂的安全性进行评估。

处理如下:T_I—清水对照;T_{II}—35%多克福大豆种衣剂,包衣剂量 1.5%;T_{III}—75% HND1 生物种衣剂,包衣剂量 3%;T_{IV}—75% HND1 生物种衣剂,包衣剂量 4%;T_V—75% HND1 生物种衣剂,包衣剂量 5%。

2 结果与分析

2.1 HND1 对 J2 活性的影响

各药剂处理对大豆胞囊线虫二龄幼虫(J2)的影响见图 1,T_{II} 处理 24 h,J2 的死亡率为 94%,校正死亡率为 93.7%。随着稀释倍数的增加,死亡率有所降低,当稀释到 50 倍时(T_{VI} 处理),J2 的死亡率仍可达到 29%,校正死亡率为 25%。说明 HND1 对 J2 具有较强的毒性。

2.2 HND1 的小区防治效果

小区防效结果(表 1)表明,HND1 生物种衣剂对大豆胞囊线虫有较高的防治效果。T_V 处理的大豆平均单株胞囊数为 31.6 个,比清水对照少 48.4 个,防效达到 60.5%,T_{IV} 的单株胞囊数为 34.0 个,比 T_I 处理(清水)少 46 个,防效为 57.5%,二者均显著好于 T_{II} 处理(药剂对照),而 T_{III} 的防效为 45.5%,好于对照药剂,但是没有显著性差异。同 T_{II} 处理相比,全部的供试药剂都有显著的防治效果。

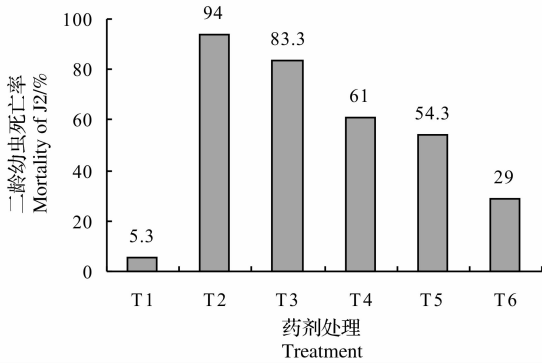


图1 HND1 对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

Fig. 1 Effect of HND1 on activity of juvenile of *Heterodera glycines*

表1 HND1 种衣剂处理对大豆根系胞囊数量的影响
Table 1 Effect of HND1 seed coating on the individual plant cyst numbers of *Heterodera glycines*

处理 Treatment	平均单株胞囊数 Average cyst number per plant	胞囊抑制率 Inhibition rate/%	株高 Plant height/cm	单株根瘤数 Root nodule number per plant
T _I	80.0a	-	13.7a	0b
T _{II}	51.2b	36.0b	13.9a	3.1a
T _{III}	43.6bc	45.5ab	13.8a	3.5a
T _{IV}	34.0c	57.5a	14.1a	4.1a
T _V	31.6c	60.5a	14.5a	3.8a

数字后字母为 Duncan 氏新复极差测验结果,表示差异显著 ($P < 0.05$)。

According to Duncan's multiple range test, the letter after numeral indicate significantly different at $P < 0.05$.

2.3 对大豆植株性状的影响

施用种衣剂与对照比较,结果表明,75% HND1 种衣剂的各剂量处理区大豆生长期及长势正常(表1),T_{III}、T_{IV}、T_V处理的株高、根瘤数略好于 T_{II} 处理于对照药剂,但差异不显著,4个药剂处理的大豆植株的根瘤数均显著多于 T_I 处理。

3 结论与讨论

目前生物防治大豆胞囊线虫病的生产剂型主要是菌肥颗粒剂,存在制剂繁琐、防效不稳定等缺点,因此,在利用抗性品种和合理轮作防治的基础上,研究对人畜毒性较小、不污染环境、使用方便、时效期长、防效高、稳定性好、不易产生抗药性等优点的生防种衣剂,对完善大豆胞囊线虫病综合防治技术,指导大豆生产,提高大豆生产面积具有现实意义。

不同包衣剂量的 75% HND1 种衣剂对大豆胞囊线虫的防治效果好于目前生产上使用的当家种衣

剂—35% 多克福大豆种衣剂,并且对大豆的生长和发育安全。但从表 1 可以看出,75% HND1 的防效并没有出现明显的随着包衣剂量的增加防效显著提高的现象,在重复试验过程中,分析原因主要是当种衣剂的用量达到种子质量的 5% 时,种衣剂过多,不能完全粘附到种子上,导致实际的包衣剂量不足 5%,由此说明在对种子进行包衣时,种衣剂的用量应适当。另外,对照药剂的包衣剂量为 1.5%,而 HND1 种衣剂的包衣剂量为 3%~5%,如果降低包衣剂量,其防效可能相应降低,甚至低于对照药剂。因此通过发酵培养基和发酵条件的优化来提高 HDQ18 菌株发酵液中活性代谢产物的含量,来降低包衣剂量,是后续工作的主要内容。

据文献报道厚垣轮枝菌 G 用量 $800 \text{ g} \cdot 667 \text{ m}^{-2}$ 防治效果为 42.9%^[17],豆丰一号对大豆胞囊线虫的抑制率可达 50%~60%^[18],在黑龙江示范的防效为 59%~74%^[7]。从小区试验的结果来看,HND1 生物种衣剂对大豆胞囊线虫的防效已经达到了文献报道的厚垣轮枝菌颗粒剂的水平。表明 HND1 生物种衣剂是一种很有潜力的生物制剂,具有很好的应用前景。

致谢:感谢沈阳农业大学段玉玺教授在研究过程中给予的支持和帮助。

参考文献

- [1] 刘丹,杜春英,于成龙.大豆在黑龙江省的生态适应性及种植格局[J].大豆科学,2008,27(3):433-441. (Liu D, Du C Y, Yu C L. Ecological adaptability evaluation and planting division of soybean in Heilongjiang province[J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 433-441.)
- [2] 柏继云,孟军,吴秋峰.黑龙江省大豆生产预警指标体系的构建[J].东北农业大学学报,2007,38(4):568-572. (Bai J Y, Meng J, Wu Q F. Construction of pre-warning indexes system of soybean production in Heilongjiang province[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(4): 568-572.)
- [3] Niblack T L. Protect your soybean profits; manage soybean cyst nematode [M]. Columbia: American Soybean Association, University of Missouri, 1993.
- [4] 刘维志.植物病原线虫学[M].北京:中国农业出版社,2000:415. (Liu W Z. Plant pathogenic nematology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 415.)
- [5] 马兰,陈效杰,姚文秋,等.黑龙江省东部地区大豆胞囊线虫防治技术研究[J].大豆科学,2007,26(2):218-222. (Ma L, Chen X J, Yao W Q, et al. Control of soybean cyst nematode in Heilongjiang province and relation with growth character[J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 218-222.)

- [6] De Leij, F A A M, Kerry B R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*[J]. *Revece Nematology*, 1991, 14(1):157-164.
- [7] 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(增刊):190-193. (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 For(Nature Science Edition)*, 2005, 33(Supplement):190-193.)
- [8] 潘凤娟, 许艳丽, 孙玉秋, 等. 我国大豆胞囊线虫生防真菌研究现状[J]. 大豆通报, 2006(4):15-17. (Pan F J, Xu Y L, Sun Y Q, et al. Advance on biological control to soybean cyst nematode by fungi in China[J]. *Soybean Bulletin*, 2006(4):15-17.)
- [9] 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):103-105. (Lu M K, Pan C S, Li Z. Advances of studies of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for plant parasitic nematodes[J]. *Journal of Northwest Science-Technology University of Agriculture(Nature Science Edition)*, 2004, 32(4):103-105.)
- [10] 范圣长, 段玉玺, 陈立杰. 大豆胞囊线虫胞囊内寄生真菌研究[J]. 大豆科学, 2004, 23(1):71-74. (Fan S C, Duan Y X, Chen L J. The research on the cyst entoparasitic fungi of soybean cyst nematode[J]. *Soybean Science*, 2004, 23(1):71-74.)
- [11] 张飞跃, 孙炳剑, 李洪连, 等. 植物寄生线虫生防因子研究进展[J]. 河南农业科学, 2008(8):14-19. (Sun F Y, Sun B J, Li H L, et al. Advance on biological control factor to plant nematode[J]. *Journal of Henan Agriculture Science*, 2008(8):14-19.)
- [12] 陈立杰, 梁文举, 等. 施用生防颗粒剂对大豆田土壤线虫群落结构和生物多样性的影响[J]. 大豆科学, 2003, 22(4):251-252. (Chen L J, Liang W J, Duan Y X, et al. Effects of bio-nematicide on community structure and bio-diversity of soil nematodes in soybean field[J]. *Soybean Science*, 2003, 22(4):251-252.)
- [13] 张晓歌, 王海宽, 王建玲, 等. Sr18 菌杀线虫代谢产物 30 L 罐发酵放大条件的优化[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2008, 28(2):1-4. (Zhang X G, Wang H K, Wang J L, et al. Fermentation optimization of nematicidal metabolites of Sr18 fungus in the scale of 30 L fermenter[J]. *Journal of Tianjin Normal University(Natural Science Edition)*, 2008, 28(2):1-4.)
- [14] 陈立杰, 段玉玺, 王媛媛, 等. 不同细菌菌株对大豆根腐病菌及胞囊线虫的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(6):831-834. (Chen L J, Duan Y X, Wang Y Y, et al. Bio-effect of different bacterial strains on soybean root rot pathogens and *Heterodera glycines*[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, 37(6):831-834.)
- [15] Chen S Y, Dickison D W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*[J]. *Journal of Nematology*, 2000, 32(1):117-121.
- [16] 吴海燕, 远方, 陈立杰, 等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(4):285-289. (Wu H Y, Yuan F, Chen L J, et al. Advances in soybean cyst nematode and mechanism of soybean resistance to *Heterodera glycines*[J]. *Soybean Science*, 2001, 20(4):285-289.)
- [17] 陈申宽, 闫路海, 刘玉良, 等. 厚垣轮枝菌 G 防治大豆胞囊线虫病的试验研究[J]. 植物医生, 2007, 20(6):28-29. (Chen S K, Yan H L, Liu Y L, et al. Control effects of *Verticillium chlamydosporium* Gon soybean cyst nematode[J]. *Plant Doctor*, 2007, 20(6):28-29.)
- [18] 陈立杰, 梁文举, 段玉玺, 等. 施用生防颗粒剂对大豆田土壤线虫群落结构和生物多样性的影响[J]. 大豆科学, 2003, 22(4):251-256. (Chen L J, Liang W J, Duan Y X, et al. Effects of bio-nematicide on community structure and bio diversity of soil nematodes in soybean field[J]. *Soybean Science*, 2003, 22(4):251-256.)

(上接第 1125 页)

- [2] 吕英华, 秦双月. 测土与施肥[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002:284-286. (Lu Y H, Qin S Y. Soil test and fertilization[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002:284-286.)
- [3] 奚振邦. 现代化学肥料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003, 133-160. (Xi Z B. Chemical fertilizer science[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003:133-160.)
- [4] 关连珠. 土壤肥料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001:178-219. (Guan L Z. Fertility of soil[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001:178-219.)
- [5] 高聚林, 刘克礼, 李惠智, 等. 大豆群体对氮、磷、钾的平衡吸收关系研究[J]. 大豆科学, 2004, 23(2):106-110. (Gao J L, Li K L, Li H Z, et al. Study on balance absorption of dry farming soybean plants to N, P, K[J]. *Soybean Science*, 2004, 23(2):106-110.)
- [6] 王超, 霍爱伟, 王季怀, 等. 不同施肥配比对大豆生长的影响[J]. 山西农业大学学报, 2007, 27(5):22-24. (Wang C, Huo A W, Wang J H, et al. The influence of different fertilizer matching to the soybean[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 2007, 27(5):22-24.)
- [7] 吴明才, 肖昌珍, 郑普英. 大豆磷素营养研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3):59-65. (Wu M C, Xiao C Z, Zheng P Y. Study on the physiological function of phosphorus to soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(3):59-65.)
- [8] 阎春娟, 韩晓增, 王树起, 等. 钾对大豆干物质积累、产量及品质的影响[J]. 大豆科学, 2008, 27(1):113-117. (Yan C J, Han X Z, Wang S Q, et al. Effect of potassium fertilizer on dry matter accumulation yield and quality of soybean[J]. *Soybean Science*, 2008, 27(1):113-117.)
- [9] 韩晓增. 大豆高产施肥技术的研究[J]. 农业系统科学与综合研究, 1998, 14(3):239-240. (Han X Z. Study of high-yield fertilization technique of soybean[J]. *System Sciences Comprehensive Studies in Agriculture*, 1998, 14(3):239-240.)