

# 3株真菌发酵液对番茄根结线虫的防治效果\*

方 治<sup>1,2</sup> 彭德良<sup>1\* \* \*</sup> 李建洪<sup>2\* \*</sup>

1. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100193;

2. 华中农业大学植物科技学院,武汉 430070

**摘要** 利用3个真菌菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 的发酵液对番茄根结线虫 2 龄幼虫进行室内离体活性测定和温室盆栽的防效试验。结果表明:供试 3 个菌株不同稀释倍数的发酵液在处理 24、48 和 72 h 对番茄根结线虫都有一定的抑制作用,其中 3 个菌株的 2 倍发酵液在处理 72 h 对番茄根结线虫 2 龄幼虫的校正抑制率分别为 95.27%、91.27%、86.58%; 4 倍发酵液在处理 72 h 对番茄根结线虫 2 龄幼虫的校正抑制率分别为 68.52%、84.05%、60.33%。在温室盆栽试验中,用 3 个菌株的 2 倍发酵液处理番茄苗,与对照相比,处理后 45 d 番茄根结线虫的减退率分别达到 46.7%、43.3%、36.7%,防治效果分别达到 23.81%、19.52%、35.71%。此外,处理后 22 d 和 45 d 的调查显示,3 个菌株的 2 倍发酵液对番茄生长有一定的促进作用。

**关键词** 番茄根结线虫; 生物防治; 真菌发酵液

**中图分类号** S 432.4<sup>+</sup>5; S 476<sup>+</sup>.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0440-04

蔬菜根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是最重要的农作物病原线虫之一。该线虫适应性强、寄主范围广、传播途径多,故防治极其困难<sup>[1]</sup>。我国蔬菜根结线虫有南方根结线虫 (*Mincognita* spp.)、花生根结线虫 (*M. arenaria*)、北方根结线虫 (*M. hapla*) 和爪哇根结线虫 (*M. javanica*)<sup>[2-3]</sup>。在北方温室大棚以南方根结线虫发生较多,在南方各地 4 种根结线虫都有发生。随着保护地栽培面积的增加,复种指数的提高,特别是节能日光温室的迅速发展,蔬菜根结线虫病发生区域不断扩大,危害日益严重。病害发生后,一般蔬菜减产 20%~30%,严重时达到 75% 以上,对蔬菜的产量和品质造成很大的影响<sup>[4-5]</sup>。

化学杀线虫剂多为剧毒农药,用量大、成本高,且带来人畜中毒、环境污染及生态破坏等严重问题<sup>[6]</sup>。溴甲烷破坏大气臭氧层,已被国际公约组织列为受控和逐步淘汰的物质,我国也已定于 2015 年禁用<sup>[6]</sup>。利用生防菌防治蔬菜根结线虫病是一种安全有效的方法,近年来出现了淡紫拟青霉、阿维菌素、线虫必克等生防制剂,在蔬菜根结线虫病防治工作中达到了较好的效果。产毒素真菌作为第 2 代线虫生防因子成为目前国内外研究非常热门的领域,国内已开始重视对杀线虫真菌毒素的研究<sup>[6]</sup>。笔者

从 55 个土壤样品中分离到 253 个真菌菌株,并从中筛选出 3 个菌株 ZB-4、ZW-3 和 XX-8,在室内测定 3 个菌株发酵液对根结线虫的抑制作用,同时在温室盆栽试验中,观察了其对番茄根结线虫的防治效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫悬浮液的制备

从中国农业科学院植物保护研究所线虫研究室培养的番茄根部挑取南方根结线虫 (*Mincognita* spp.) 新鲜卵块。在直径 3.5 cm 小培养皿中垫上纱网,将卵块置于纱网上。向培养皿中加入少许蒸馏水,保存在 4 °C 冰箱中。卵孵化时取出放在室温下,24 h 后收集 2 龄幼虫 (J2),每天收集 1 次,共收集 3 d,配制幼虫悬浮液,并将幼虫悬浮液稀释到密度为 200 条/mL 后进行室内离体测定<sup>[7]</sup>。

### 1.2 菌株发酵液的制备

将 4 °C 冰箱中保存的待测菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 (菌株分离另文发表) 分别接种到液体 PDA 培养基中,在 28 °C、180 r/min 条件下振荡培养 5 d 后用灭菌滤纸过滤,将过滤得到的上清液密封放置在 4 °C 冰箱中保存备用<sup>[8]</sup>。

收稿日期:2009-04-02; 修回日期:2010-05-12

\* 国家公益性行业科研专项 (nyhyzx07-050) 和北京市农委科技服务项目 (BJNY2007-03) 资助

\* \* 通讯作者。彭德良, E-mail: dlpeng@caas.net.cn; 李建洪, E-mail: jianhl@mail.hzau.edu.cn

方 治, 男, 1982 年生, 硕士研究生。研究方向: 生物农药。E-mail: fangzhi5804@163.com

### 1.3 室内离体测定

分别吸取 3 mL 菌株发酵液的原液、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍液, 加入到青霉素小瓶中, 每种浓度 3 次重复, 以清水作对照。然后向每个小瓶中分别加入 3 mL 密度为 200 条/mL 的新鲜根结线虫 2 龄幼虫 (J2) 悬浮液。将不同处理放置于 25 °C 恒温恒湿培养箱中, 于 24、48 和 72 h 后分别取 2 mL 不同处理的线虫悬浮液, 镜检活性抑制率。以线虫虫体僵直和呈弯月状确定为活性受到抑制。对照抑制率不超过 10%, 分别计算稀释 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍发酵液处理后线虫的校正抑制率<sup>[9-10]</sup>。

### 1.4 温室盆栽试验

在平均温度 26 °C 左右、湿度 68% 左右的温室大棚中, 将供试番茄苗种植在感染根结线虫病的病土内, 每个处理设 3 次重复, 每个重复种 12 盆番茄。每盆使用 2 倍菌株发酵液 20 mL 进行灌根处理, 以清水作对照。处理 22 d 后测量番茄株高。45 d 后取样调查, 记录单位体积土壤线虫量, 计算线虫减退率; 观察病情指数, 计算防效; 测量番茄株高和鲜质量, 计算菌株发酵液处理对番茄生长的影响<sup>[11]</sup>。

病情指数分级如下: 0 (F) 级, 根系健康, 无根结; 1 (E) 级, 根系上有少量根结, 占全根系的 1%~15%; 3 (D) 级, 占全根系的 16%~25%; 5 (C) 级, 根结线虫的程度中等, 26%~50%; 7 (B) 级, 根系根结数量很多, 占全根系的 51%~75%; 9 (A) 级, 根系根结数量特多, 占全根系的 76%~100%<sup>[6]</sup>。

$$\text{病情指数} = \frac{9A+7B+5C+3D+1E+0F}{9N} \times 100$$

上式中 A~F 为对应级别的植株数量, N 为调

查总植株数 (N=A+B+C+D+E+F)。

$$\text{线虫减退率}/\% = \frac{\text{施药前幼虫数} - \text{施药后幼虫数}}{\text{施药前幼虫数}} \times 100$$

$$\text{防治效果}/\% = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株发酵液对根结线虫活性的影响

试验结果表明, 3 个菌株发酵液在处理不同时间对番茄根结线虫 2 龄幼虫的活性都有一定的抑制作用 (表 1)。

由表 1 可知, 3 个菌株菌株发酵液处理 24、48、72 h 后对番茄线虫活性抑制率呈减小趋势, 且随着菌株发酵液稀释倍数的增加, 对番茄根结线虫的抑制率也逐渐减小。处理 24 h 后, 3 个菌株发酵液均能显著抑制番茄根结线虫的活性, 仅菌株 XX-8 发酵液稀释 16 倍后的抑制率为 50.88%, 其余均在 75% 以上。处理 48 h 后, 3 个菌株液稀释 2 倍、4 倍、8 倍的发酵液对番茄根结线虫也有显著的抑制作用, 但相对于处理 24 h 后的抑制作用有一定下降; 菌株 ZW-3 发酵液稀释 16 倍后, 对番茄根结线虫的抑制率能达到 81.61%, 另外 2 个菌株发酵液则基本上丧失活性, 其抑制率仅为 9.14% 和 2.15%。处理 72 h 后, 3 个菌株的 2 倍发酵液对番茄根结线虫的抑制作用仍然显著, 抑制率均在 85% 以上, 而稀释 4 倍和 8 倍的菌株发酵液处理对番茄根结线虫的抑制作用相对于处理 24 h 后的抑制作用显著下降; 稀释 16 倍的菌株发酵液对番茄根结线虫几乎没有抑制作用, 抑制率均在 10% 以下。

表 1 菌株发酵液对番茄根结线虫的抑制作用<sup>1)</sup>

Table 1 Inhibition of strains fermentation liquid to the tomato root-knot nematode

| 处理时间/h<br>Treatment time | 稀释倍数<br>Dilution ratio | 菌株 Strains   |               |               |
|--------------------------|------------------------|--------------|---------------|---------------|
|                          |                        | ZB-4         | ZW-3          | XX-8          |
| 24                       | 1:2                    | 95.42±0.33 a | 86.75±1.64 b  | 95.01±1.59 a  |
|                          | 1:4                    | 89.73±3.07 a | 85.25±1.61 b  | 89.95±2.03 a  |
|                          | 1:8                    | 89.21±2.20 a | 80.91±1.59 b  | 86.14±2.13 a  |
|                          | 1:16                   | 84.97±0.41 a | 77.25±3.13 a  | 50.88±8.38 b  |
| 48                       | 1:2                    | 93.47±1.62 a | 87.49±3.18 b  | 89.00±1.51 b  |
|                          | 1:4                    | 89.85±2.36 a | 86.82±1.64 a  | 87.15±10.89 a |
|                          | 1:8                    | 40.93±6.03 b | 83.43±7.80 a  | 62.80±4.45 c  |
|                          | 1:16                   | 9.14±1.69 b  | 81.61±14.07 a | 2.15±0.71 b   |
| 72                       | 1:2                    | 95.47±3.38 a | 91.39±0.94 a  | 86.80±3.64 b  |
|                          | 1:4                    | 69.85±2.75 a | 84.27±4.95 a  | 60.97±25.69 a |
|                          | 1:8                    | 23.63±5.38 a | 47.15±26.27 a | 42.38±2.16 a  |
|                          | 1:16                   | 9.00±4.32    | 2.75±1.70     | 2.29±0.50     |

1) 表中数据为平均值±标准误, 同一栏内数据后小写字母表示经 LSD 检测相互间差异显著 (P<0.05), 下表同。

Data in the table is mean±SD, means followed by the different letter within a column are significantly different (P<0.05, LSD test), the same as following tables.

## 2.2 菌株发酵液对番茄植株生长发育的影响

对番茄施用 3 个菌株的 2 倍发酵液后,与清水对照相比,不同菌株发酵液处理后番茄株高略有增加(表 2)。

由表 2 可知,3 个菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 发酵液处理 22 d 后,番茄株高的增长率分别为 22.6%、9.4%、8.2%,其中菌株 ZB-4 发酵液处理后的番茄株高显著高于对照;3 个菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 发酵液处理 45 d 后,番茄株高的增长率分别为 25.7%、18.3%、16.8%,其中菌株 ZB-4 发酵液处理后的番茄株高显著高于对照,菌株 XX-8 发酵液处理后的番茄植株鲜质量显著高于对照。说明供试 3 个菌株发酵液对番茄植株生长不仅无不良影响,而且还有一定的促进作用。

表 2 菌株发酵液对番茄植株生长的影响

Table 2 Effect of strains fermentation liquid to the tomato plant growth

| 菌株<br>Strains | 22 d 株高/cm<br>22th plant height | 45 d                  |                        |
|---------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|
|               |                                 | 株高/cm<br>Plant height | 鲜质量/kg<br>Fresh weight |
| ZB-4          | 19.57±0.89 a                    | 25.37±1.75 a          | 10.65±0.90 ab          |
| ZW-3          | 17.45±0.63 b                    | 23.90±1.44 ab         | 10.34±0.79 ab          |
| XX-8          | 17.23±0.69 b                    | 23.57±1.56 ab         | 12.36±1.01 a           |
| CK            | 15.90±0.58 b                    | 19.23±1.09 b          | 8.14±1.03 b            |

## 2.3 菌株发酵液对番茄根结线虫的防效

在温室对盆栽番茄用 3 个菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 的发酵液进行灌根处理,45 d 后取样调查,土壤中的番茄根结线虫已明显减少(表 3)。与处理前相比,3 个菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 发酵液对番茄根结线虫的减退率分别为 46.7%、43.3%、36.7%。对照处理盆栽番茄根部的土壤中线虫量有一定增加,增加率为 10%;用菌株发酵液处理后,番茄根结线虫病病情指数下降,与对照相比有显著差异,3 个菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 发酵液的防治效果分别为 23.81%、19.52%、35.71%。这说明供试 3 个菌株发酵液对番茄根结线虫病有一定的防治效果。

表 3 菌株发酵液对番茄根结线虫的防效

Table 3 Control effect of strains fermentation liquid strains to the tomato root-knot nematode

| 处理<br>Treatment | 线虫减退率/%<br>Reduce rate | 病情指数<br>Disease index | 防治效果/%<br>Control effect |
|-----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| ZB-4            | 47.33±6.52             | 59.26±5.49 b          | 23.81                    |
| ZW-3            | 43.94±5.08             | 62.59±6.81 b          | 19.52                    |
| XX-8            | 36.00±6.58             | 50.00±1.98 b          | 35.71                    |
| CK              | -10.50±6.62            | 77.78±2.27 a          | -                        |

## 3 讨 论

本试验结果表明:3 个真菌菌株 ZB-4、ZW-3、XX-8 的发酵液对番茄根结线虫 2 龄幼虫有明显抑制作用,且稀释 2 倍的发酵液抑制作用尤其显著;随着发酵液稀释倍数增加,对番茄根结线虫的抑制作用逐渐减弱;受发酵液抑制的番茄根结线虫随着时间延续,部分可恢复活性;稀释发酵液处理番茄苗后,根系上根结数目有明显减少,番茄根结线虫的侵入能力受到一定抑制,其数量也有一定减少。

本试验中温室盆栽的防效试验没有达到预期目标。由于在移栽番茄苗 1 d 之后使用菌株发酵液进行灌根处理,此时番茄根结线虫可能已经侵染番茄幼苗,故不利于菌株发酵液发挥抑制作用。在室内生测试验中,部分经处理的番茄根结线虫在 48 h 后可逐渐恢复活性。这说明 3 个真菌菌株发酵液对根结线虫的抑制效果较慢。在以后的大田试验中,应先进行药剂处理,3 d 之后再移栽番茄苗,以便提高对番茄根结线虫的防治效果。

根结线虫的生防因子有真菌、细菌、病毒、原生动物等,不同生防因子抑制根结线虫的机制不同,其中淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* 可产生几丁质酶<sup>[12]</sup>,哈兹木霉 *Trichoderma harzianum* 可产生蛋白水解酶,穿刺巴氏杆菌 *Pasteuria penetra* 可专门寄生根结线虫幼虫<sup>[13]</sup>,苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 可以产生杀虫晶体蛋白。本试验中 3 个菌株发酵液对番茄根结线虫 2 龄幼虫有很强的抑制作用。菌株中的作用活性物质以及作用机制是否与几丁质酶有关,还有待于进一步探讨。另外,本试验在分离供试菌株初期,发现其菌株发酵液菌株对甘薯茎线虫也有很强的抑制作用。供试菌株发酵液是否对其他线虫也具有抑制作用,也还有待于深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 万新龙,李建洪,彭德良.根结线虫 rDNA-ITS 片段的克隆与序列分析[J].华中农业大学学报,2007,26(5):624-628.
- [2] 彭德良.蔬菜根结线虫的发生和防治[J].中国蔬菜,1998(4):57-58.
- [3] 彭德良.番茄抗根结线虫 Mi 基因研究进展[J].沈阳农业大学学报,2001,32(3):220-223.
- [4] 赵鸿,彭德良,朱建兰.根结线虫的研究进展[J].植物保护,2003,29(6):6-9.
- [5] 陈三品,彭德良.我国花生根结线虫和小种鉴定及其细微结构

- 观察和地区分布[J]. 中国油料作物学报, 1989(2):47-50.
- [6] 孙建华, 宇克莉, 陈宏, 等. Sr18 真菌代谢物防治番茄根结线虫病研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(1):119-123.
- [7] 万新龙, 李建洪, 彭德良. 生物杀线虫剂对蔬菜南方根结线虫的室内毒力测定[J]. 中国线虫研究, 2006(1):12-17.
- [8] 刘丹丹, 段玉玺, 陈立杰. Snf 907-76 发酵液杀线虫活性测定及活性物质分离纯化[J]. 农药, 2007, 46(9):644-646.
- [9] 丁国春, 付鹏, 李红梅, 等. 枯草芽孢杆菌 AR11 菌株对南方根结线虫的生物防治[J]. 南京农业大学学报:自然科学版, 2005, 28(2):46-49.
- [10] 段旭光, 段玉玺, 陈立杰, 等. 3 株真菌发酵液对不同线虫的毒力差异[J]. 江苏农业科学, 2008(3):96-98.
- [11] OSMAN G Y. Effect of amino acids and ascorbic acid on *Meloidogyne javanica* Chitw(Tylenchidae, Nematoda)[J]. Journal of Pest Science, 1993, 66:140-142.
- [12] 陈三品, 彭德良. 淡紫拟青霉防治南方根结线虫 1 号生理小种和花生北方根结线虫试验初报[J]. 中国油料作物学报, 1989(3):45-48.
- [13] DONG L Q, YANG J K, ZHANG K Q. Cloning and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the facultative pathogen *paecilomyces lilacinus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103:2476-2488.

## Control Effect of Three Fungal Strains Fermentation Liquid to Tomato Root-Knot Nematode

FANG Zhi<sup>1,2</sup> PENG De-liang<sup>1</sup> LI Jian-hong<sup>2</sup>

1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences / State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Pests, Beijing 100193, China

2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** The three fungal fermentation liquid of ZB-4, ZW-3 and XX-8 were used in treating vegetable root-knot nematodes *in vitro* bioassay and in the greenhouse pot experiment. The results showed that: in 24, 48, 72 hours treatment, all the fermentation liquid of ZB-4, ZW-3 and XX-8 have certain inhibitory effect on root-knot nematodes at different dilution ratios. In 72 hours treatment, the 2 times dilution of the three fungi strains fermentation liquid broth showed the rectified inhibiting efficiencies to J2 as 95.27%, 91.27% and 86.58% respectively. The rectified inhibiting efficiencies to J2 of 4 times dilution were 68.52%, 84.05% and 60.33% in 72 hours. In greenhouse pot experiment, the 2 times broth of three fungi were used to treat tomato seedlings. After 45 days, compared to the control, the reducing rate of nematodes were up to 46.7%, 43.3% and 36.7% respectively. The controlling efficiencies reached 23.81%, 19.52% and 35.71% respectively. Furthermore, our investigation in 22 days and 45 days showed that the 2 times broth could promote the growth of tomatoes.

**Key words** tomato root-knot nematode; biological control; fungal fermentation liquid

(责任编辑:陈红叶)