

# 黑曲霉 Snf009 发酵液对根结线虫的毒性测定及温室防效研究

朱晓峰, 段玉玺, 陈立杰, 李 颂, 李 雪

(沈阳农业大学 植物保护学院植物线虫学研究室, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 室内测定了黑曲霉 Snf009 发酵液对南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 二龄幼虫的致死率。通过分析不同浓度的发酵液与线虫致死的相关性得到方程  $Y = 0.0752X - 0.0496$ ,  $R^2 = 0.8116$ , 根据方程计算出此发酵液对南方根结线虫的致死浓度为  $7.07 \mu\text{L/mL}$ 。通过温室番茄根结线虫防效试验可知, 菌株发酵液的防效在 30d 和 60d 能达到近 50%, 与空白对照之间差异显著。

**关键词:** 黑曲霉; 根结线虫; 防效

中图分类号: S432.4<sup>+</sup>5 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)04-0084-02

根结线虫是分布最广、危害最重的植物寄生线虫之一, 近年来蔬菜大棚中根结线虫危害已成为普遍现象, 保护地栽培的几种主要蔬菜的根结线虫病均明显重于地点、种菜年限相同、主栽蔬菜品种基本一致的露地<sup>[1]</sup>。目前, 用于防治植物寄生线虫的都是一些毒性较高的灭生性药剂, 结合现今人们对无公害蔬菜的要求, 无公害防治蔬菜根结线虫就成为蔬菜生产中的重要问题之一。鉴此, 测定了杀线虫黑曲霉 Snf009 发酵液对南方根结线虫的室内活性, 并在温室番茄上作了初步的防效试验, 现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 试材

**发酵液的制备:** 供试菌株为沈阳农业大学植物保护学院线虫研究室自行分离获得的具有自主知识产权的黑曲霉菌株 Snf009, 经研究表明, 该菌株对南方根结线虫具有明显毒杀作用<sup>[2]</sup>。该菌株发酵液的制备条件如下: 以查氏培养基 ( $\text{NaNO}_3$ : 2.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 1.0 g,  $\text{KCl}$ : 0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.5 g,  $\text{FeSO}_4$ : 0.01 g, 蔗糖: 30 g, 蒸馏水: 1000 mL) 作为发酵培养液, 在  $25^\circ\text{C}$ , 通气量为  $10 \text{ L/min}$ , 转速为  $150 \text{ r/min}$ , 自然 pH 的条件下, G UJS-50 型发酵罐

中培养 7d, 发酵原液先用布氏漏斗抽滤, 去除菌丝体及孢子体, 再用旋转蒸发仪减压浓缩至 10 倍后, 将其与乙醇以 1:5 比例混合, 置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中沉淀蛋白等大分子 12h, 再将上清发酵液用减压蒸馏除去乙醇, 保存备用。

**根结线虫的二龄幼虫:** 在温室中用盆栽的番茄繁殖根结线虫 (番茄品种用 L402), 接种南方根结线虫二龄幼虫, 当根部产生大量卵囊时, 将根取出并涮洗干净, 用镊子取卵囊于培养皿中, 用 0.5% 的次氯酸钠消毒, 再用无菌水冲洗 3 次, 备用。将消毒后的卵囊置于灭菌的培养皿中, 每天收集二龄幼虫于三角瓶中, 备用。

**药剂:** 1.8% 阿维菌素乳油 (辽宁正诺生物技术有限公司)。

### 1.2 发酵液对根结线虫二龄幼虫的活性测定

将灭菌的小皿置于灭菌的培养皿中, 在每个小皿中加入经过计数的南方根结线虫溶液  $200 \mu\text{L}$  ( $46.87 \pm 3.07$  条), 用发酵液和无菌水将每皿的发酵液浓度分别稀释为  $2 \mu\text{L/mL}$ 、 $4 \mu\text{L/mL}$ 、 $6 \mu\text{L/mL}$ 、 $8 \mu\text{L/mL}$  和  $10 \mu\text{L/mL}$  5 个浓度梯度。用无菌水做对照, 重复 5 次。置于  $25^\circ\text{C}$  培养箱中 24h, 观察记录线虫死亡情况, 计算死亡率、校正死亡率<sup>[3]</sup> 和致死中浓度。

收稿日期: 2008-10-10

基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室项目 (20060754)

作者简介: 朱晓峰 (1972-), 男, 山东滕州人, 在读博士研究生, 研究方向: 线虫生物防治。

通讯作者: 段玉玺 (1964-), 男, 辽宁海城人, 教授 博士生导师, 主要从事线虫病害生防和抗线虫资源研究。

1.3 温室防效试验

试验于2008年7月到9月在辽宁省沈阳市浑南新区前塞村进行,该村普遍种植保护地,作物以番茄和黄瓜为主,根结线虫发生严重,根据前一个生长季调查,本试验选择根结线虫在整棚均发生严重的温室大棚进行,并通过对根结线虫的形态学初步鉴定,确认大棚内根结线虫为南方根结线虫和爪哇根结线虫混合危害。

试验采用随机区组设计,试验前在试验区内以五点取样法取土样200g,采用过筛重糖离心法对土样中的根结线虫数进行计数(200g土样中根结线虫为1124±95条),试验设3个处理,分别是Snf009发酵液、清水对照和阿维菌素,每个处理长8m、宽1m,5次重复,区组内处理随机排列。

施药方法: 移苗时灌根,将Snf009发酵液稀释50倍,1.8%阿维菌素稀释2000倍和清水分别每棵苗浇灌0.2L(阿维菌素的施药量相当于3L/hm<sup>2</sup>)。

1.4 分析方法

结果用Microsoft office excel 2003分析计算,用Spss12.0软件作数据处理,Duncan's新复极差法进行多重比较。

防治效果=  $\frac{\text{对照根结数}-\text{处理根结数}}{\text{对照根结数}} \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 发酵液对根结线虫二龄幼虫的致死活性

不同浓度发酵液对二龄幼虫有较高的抑制作用(表1),各稀释浓度的发酵液与对照之间差异显著,通过分析不同浓度发酵液与根结线虫的相关性得到方程Y=0.0752X-0.0496, R<sup>2</sup>=0.8116,根据方程计算出此发酵液对南方根结线虫的致死中浓度为7.07μL/mL。

表1 不同浓度 Snf009 发酵液对南方根结线虫二龄幼虫的致死活性

菌液浓度 (μL/mL)	二龄幼虫的平均死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
2	23.28 cd	22.95
4	18.14 d	17.78
6	25.54 c	25.22
8	55.63 b	55.44
10	79.37 a	79.29
清水(CK)	0.43 e	

2.2 温室中发酵液对番茄根结线虫的防效

对温室番茄根结线虫的防效试验结果表明(表2),Snf009菌株发酵液、1.8%阿维菌素乳油和空白对照之间差异均达到了显著水平,30d和60d调查结果表明:1.8%阿维菌素乳油的防效均能达到90%以上,菌株Snf009发酵液的防效接近50%。

表2 Snf009 发酵液对温室番茄根结线虫的防治效果

处理	30d		60d	
	根结线虫数 (条)	防治效果 (%)	根结线虫数 (条)	防治效果 (%)
Snf009 发酵液	8.84b	48.60	17.94b	49.46
1.8%阿维菌素乳油	1.60c	90.70	3.46c	90.25
清水(CK)	17.20a	35.50		

3 讨论

自从1903年Metcalf首次描述了小杆线虫上黑色的曲霉属真菌对其有致死作用以来<sup>[3]</sup>,就不断有曲霉属真菌有杀线虫作用的报道。Mankau于1969年报道,黑曲霉的培养滤液对燕麦真滑刃线虫有活性<sup>[4]</sup>。1994年,Zuckerman对黑曲霉的杀线虫作用做了大量的室内和温室试验,报道了黑曲霉菌株PD-42的发酵液中主要杀线虫物质为柠檬酸和草酸,还有分子量大于8000MW的一种未测定的物质<sup>[5]</sup>。本研究中的供试菌株Snf009,经研究,其发酵液对线虫有较高的致死活性,并且温室防效试验表明,黑曲霉菌株Snf009发酵液在不添加任何助剂的情况下对番茄根结线虫病害的防效能达到近50%,此菌在开发线虫生物杀线剂方面有一定的应用潜力。

参考文献:

[1] 刘鸣韬. 北方蔬菜根结线虫病加重的原因及控制对策[J]. 河南农业科学, 2001(1): 23—24.

[2] 朱晓峰, 段玉玺, 陈立杰, 等. 曲霉发酵液对烟草根结线虫的作用[J]. 农药, 2006 45(3): 199—200.

[3] Metcalf H. Cultural studies of a nematode associated with plant decay[J]. Am Microbiol Soc Trans, 1903, 24: 89—103.

[4] Mankau R. Nematicidal activity of *Aspergillus niger* culture filtrates[J]. Phytopathology, 1969, 59: 1170.

[5] Zunkerman B M, Matheny M, Acosta N. Control of plant-parasitic nematodes by a nematicidal strain of *Aspergillus niger*[J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, 20(1): 33—43.