

# 蚯蚓粪及浸提液对番茄根结线虫的防治效果

刘大伟<sup>1,2</sup>, 韩文昊<sup>2</sup>, 张艳菊<sup>2</sup>, 吴凤芝<sup>1\*</sup>, 刘 霆<sup>3</sup>

(1. 黑龙江省高校寒地蔬菜生物学重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 3. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

**摘要:** 通过室内生测和盆栽试验, 研究了蚯蚓粪及其浸提液对南方根结线虫的防治作用。结果表明, 蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫卵囊和卵的孵化表现出明显抑制作用, 当浸提液浓度为 90%, 卵囊孵化的相对抑制率为 71.63%, 离体卵的孵化率仅为 11.88%。对 2 龄幼虫具有明显的击倒和致死作用, 当浸提液浓度为 90%, 2 龄幼虫的死亡率达 88.46%。盆栽试验表明, 栽培基质混入蚯蚓粪对番茄根结线虫病起到一定的控制作用, 当蚯蚓粪占栽培基质的比例为 75% 时, 对根结线虫病的防治效果可达 70% 以上, 但对番茄的生长产生了不良影响, 株高仅为 47.33 cm, 地上部鲜重仅为 84.15 g; 而当蚯蚓粪比例为 25% 时, 番茄的生长情况最好, 株高为 61.33 cm, 地上部鲜重为 241.65 g, 对根结线虫病的防治效果达到 36.3%。

**关键词:** 蚯蚓粪; 浸提液; 番茄根结线虫; 防治效果

中图分类号: S436.412 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2017)05-0686-06

## Evaluation of Control Effect of Vermicompost and Its Extracts on Tomato Root-knot Nematode

LIU Dawei<sup>1,2</sup>, HAN Wenhao<sup>2</sup>, ZHANG Yanju<sup>2</sup>, WU Fengzhi<sup>1\*</sup>, LIU Ting<sup>3</sup>

(1. Heilongjiang Provincial Key University Laboratory of Cold Area Vegetable Biology, Harbin 150030, China; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract:** The control effects of vermicompost and its extracts on *Meloidogyne incognita* were investigated through laboratory assays and pot experiments. The results indicated that egg hatching was significantly inhibited with increasing the extract concentration, and at the concentration of 90%, the relative inhibition rate was 71.63% and the hatchability rate was 11.88%, respectively. The knockdown rate and mortality of *M. incognita* were significantly increased with the increasing extract concentrations and treatment time. Compared with the control, the mortality rate was up to 88.46% at the concentration of 90%. Pot experiments showed that the number of root-knot was reduced and the relative control effects were significantly improved. When the dosage of vermicompost was 75%, the control efficacy could reach 70%, but the height was only 47.33 cm and the fresh weight of aerial part was 84.15 g. However, at the vermicompost dosage of 25%, the control efficacy was 36.3%, but the height is 61.33 cm and the fresh weight of aerial part was 241.65 g, which was the best treatment for the plant growth.

**Key words:** vermicompost; extract; tomato root-knot nematode; control effect

近年来, 随着保护地蔬菜种植面积的不断扩大, 受保护地密闭、高温、高湿和复种指数增加等因素的影响, 番茄根结线虫病呈逐年加重的趋势, 并且上升为蔬菜生产上的重要病害, 造成的产量损失一般为 10%~30%, 严重者高达 50% 以上<sup>[1]</sup>。目前, 防治根结线虫的措施包括化学、物理、生物等方法<sup>[2,3]</sup>。由于

收稿日期: 2017-05-21

基金项目: 黑龙江省高校寒地蔬菜生物学重点实验室开放课题基金; 黑龙江省博士后资助项目 (LBH-Z14034)

作者简介: 刘大伟, 副教授, E-mail: liudawei353@163.com; \*通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: fzwu2006@aliyun.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2017.05.016

化学杀线虫剂存在较大的环境风险, 易造成蔬菜农药残留超标, 有机磷类药剂(甲基异柳磷、灭线磷、氯唑磷、苯线磷等)和氨基甲酸酯类药剂(涕灭威、克百威等)都因高毒在蔬菜上被禁用或限用<sup>[4]</sup>, 而闷棚等物理方法效果相对不明显。因此, 亟待研究新的植物线虫病害防治措施。

许多种类的有机废弃物, 如秸秆渣、菌糠、芝麻渣、沼渣沼液、禽畜粪、绿肥、稻麦麸、粮食加工副产物等, 具有改善土壤环境、缓解连作障碍、防控土传病害和促进植物生长的作用。由于此类物质造价低廉、简单易得、来源广泛的特点, 以此类物质作为新型作物栽培防病基质的相关研究越来越多。蚯蚓粪是蚯蚓对有机废弃物进行生物降解的产物, 含有一些拮抗微生物, 对农作物土传病害的发生有较好的控制效果<sup>[5,6]</sup>。蚯蚓粪作为生物有机肥料的同时, 其防治土传病害的作用也逐步成为现阶段应用研究所关注的热点。以蚯蚓粪为底肥、添加肥和栽培基质防治土传病害的研究也多有报道。Edwards 和 Arancon<sup>[7]</sup>研究表明, 在栽培基质中添加适量的蚯蚓粪对一些常见土传病害如立枯病、枯萎病、猝倒病等具有一定的防治作用。Thoden 等<sup>[8]</sup>研究表明, 使用有机添加剂如绿肥、厩肥、堆肥是改善土壤状况和防治植物寄生线虫的有效途径之一。胡艳霞等<sup>[9]</sup>研究发现蚯蚓粪对黄瓜苗期的立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 引起的立枯病、镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 引起的枯萎病有抑制作用, 当蚯蚓粪与土体积比为 20% 时, 控害能力最好, 防治效果可达 96.1%。但目前还未见利用蚯蚓粪防治蔬菜根结线虫病的报道, 因此, 本试验开展了蚯蚓粪控制番茄根结线虫病的试验, 为研究出新型、绿色的防治根结线虫的方法奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试蚯蚓粪 蚯蚓粪由哈尔滨良顺生物科技开发有限公司提供, 是由活蚯蚓消解新鲜牛粪所得。

1.1.2 供试番茄 试验用番茄品种为硬粉 8 号, 属抗番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 非抗根结线虫的单抗品种。扩繁线虫用番茄品种为佳粉 18 号, 属抗 TY 病毒非抗根结线虫的单抗品种。

1.1.3 供试线虫 根结线虫采自北京市海淀区蔬菜大棚, 寄主植物为黄瓜, 经室内鉴定为南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*。

### 1.2 根结线虫卵、卵囊和 2 龄幼虫的准备

将采集的线虫接种于盆栽番茄中, 待番茄根部产生大量根结时, 取出根系, 用清水轻轻冲洗, 用无菌针挑取线虫卵囊并放入 0.5% NaClO 溶液中消毒 3 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 用毛刷将清洗后的卵囊转移到盛有少量无菌水的培养皿内备用; 将准备好的卵囊放入盛有无菌水的小烧杯中, 置于 25 °C 恒温箱中培养 4~7 d, 每 24 h 收集一次新孵化的 2 龄幼虫; 选取卵囊较多的根系, 剪成 0.5~1.0 cm 的小段, 放入保鲜盒中, 加入适量 1% NaClO 溶液, 密封后猛烈振荡摇晃 5 min, 将振荡后的渣滓与溶液倒入 280~500 目上下组合网筛中, 用细小水流反复冲洗, 即可在 500 目网筛上收集线虫卵并将 NaClO 溶液洗净。将卵液转移至小烧杯中备用, 用体视显微镜计量每 100 μL 卵液线虫数<sup>[10]</sup>。

### 1.3 蚯蚓粪浸提液的制备

蚯蚓粪浸提液的制备参照徐大兵等<sup>[11]</sup>的方法并稍加改动, 将所得蚯蚓粪充分风干粉碎, 过 20 目网筛, 称取 20 g 蚯蚓粪样品于 250 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 去离子水, 密封好后置于摇床内常温振荡 3 d。将振荡后的浊液摇晃均匀, 先用纱布过滤掉体积较大的残渣, 再把得到的滤液用 2 层滤纸过滤 3~4 次, 再将所得滤液置于真空抽滤漏斗过滤, 待滤液中几乎不含颗粒物质时, 停止过滤并将滤液转移至锥形瓶内, 即为试验用蚯蚓粪浸提母液。将浸提母液用无菌水分别稀释成为 10%、30%、50%、70%、90% 的稀释液。

### 1.4 蚯蚓粪浸提液对根结线虫卵囊孵化的影响

取无菌平底 24 孔细胞培养板, 每孔加入 3 枚颜色相近(鲜黄)、大小相同消毒后的卵囊, 用移液枪向孔内加入 1 mL 各浓度蚯蚓粪浸提稀释液, 以 1 mL 无菌水处理作为对照, 每个处理设置 3 次重复, 放入 26 °C 培养箱中, 9 d 后观察计数孵化出的线虫数量, 计算相对抑制率。相对抑制率 (%) = (对照卵囊孵化线虫数 - 处理卵囊孵化线虫数) / 对照卵囊孵化线虫数 × 100。

### 1.5 蚯蚓粪浸提液对根结线虫卵孵化的影响

取无菌平底 24 孔细胞培养板, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  卵液 (约 100 枚), 再用移液枪向每孔加入 0.8 mL 各浓度蚯蚓粪浸提稀释液, 以 0.8 mL 无菌水处理作为对照, 每个处理设置 3 次重复, 放入 28  $^{\circ}\text{C}$  温箱内培养, 9 d 后镜检观察孔内孵化出的线虫数和未孵化的卵数, 计算孵化率。孵化率 (%) = 孵化线虫数 / (孵化线虫数 + 未孵化卵数)  $\times$  100。

### 1.6 蚯蚓粪浸提液对根结线虫 2 龄幼虫的影响

取无菌平底 24 孔细胞培养板, 每孔加入 100 条 2 龄幼虫, 再用移液枪向每孔加入 0.8 mL 各浓度蚯蚓粪浸提稀释液, 以 0.8 mL 无菌水处理作为对照, 每个处理设置 3 次重复, 放入 26  $^{\circ}\text{C}$  温箱内培养, 24、48、72 h 后用体视显微镜观察每孔线虫的形态, 观察时可轻触 24 孔板, 若孔内线虫对外界震动并未响应, 仍保持针状或僵直状, 则可认为被击倒; 使用 NaOH 刺激法<sup>[12]</sup>判断线虫是否存活, 用 1% NaOH 溶液处理线虫, 观察线虫头部尾部的活动情况, 处理后若 3 min 内虫体保持静止状态则认为线虫死亡, 用以计算线虫 72 h 后死亡率。击倒率 (%) = 针状僵直线虫数 / 供试线虫数  $\times$  100; 死亡率 (%) = 死亡线虫数 / 供试线虫数  $\times$  100。

### 1.7 蚯蚓粪对番茄根结线虫的盆栽防治效果

试验用番茄采用育秧盘育苗, 待番茄幼苗长至 5 片叶时准备移栽。取不含根结线虫的风干壤土灭菌, 过筛 (20 目), 按照风干土:蚯蚓粪 (v/v) 为 1:0 (T1)、3:1 (T2)、1:1 (T3)、1:3 (T4)、0:1 (T5) 的比例制得 1 kg 的混合物作为番茄培养基质, 装入 2 L 的塑料盆中。选择生长状态良好且一致的番茄苗移栽至塑料盆中, 每盆一棵。待番茄苗正常生长定植后, 向每棵番茄根部接种 6000 条 2 龄幼虫。每个处理设置 5 次重复, 随机区组排列, 定期浇水除草。接种后 30 d, 调查统计番茄株高、地上部鲜重, 评估番茄的生长情况。将番茄根系连同盆内土壤一同倒出, 轻轻拍打震碎土块, 即可取出须根完整的番茄根系, 轻轻冲洗, 观察记录根系上的根结数量和根结线虫卵囊数, 计算相对防治效果<sup>[13]</sup>。相对防治效果 (%) = (对照根结数 - 处理根结数) / 对照根结数  $\times$  100。

### 1.8 数据统计与分析

试验所得数据由 NPS 软件进行方差分析, 采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚯蚓粪浸提液对根结线虫卵囊孵化的影响

由图 1 可知, 当蚯蚓粪浸提液浓度为 10% 时, 卵囊内卵孵化受到抑制, 相对抑制率达到 27.25%。浸提液浓度增加, 相对抑制率也随之增加, 当浓度为 90% 时, 相对抑制率达 71.63%, 与其他浓度的蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫卵囊孵化的相对抑制率差异显著。

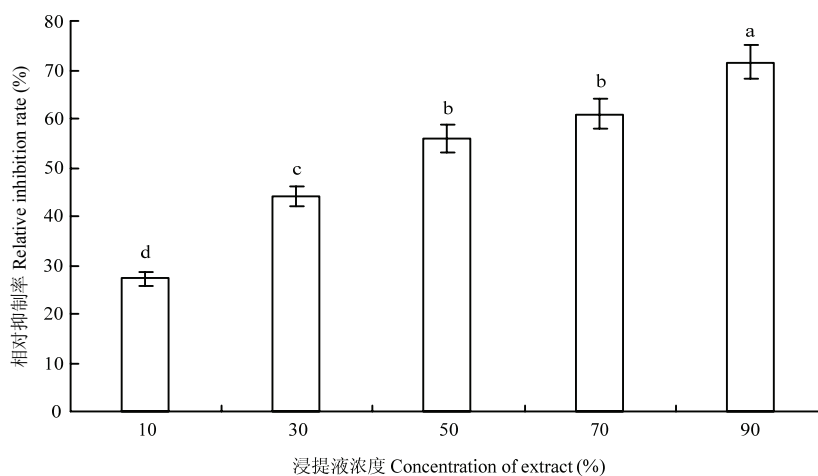


图 1 蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫卵囊孵化的影响

Fig. 1 Effects of earthworm feces extract on hatchability of *M. incognita* egg capsule

## 2.2 蚯蚓粪浸提液对根结线虫卵孵化的影响

当蚯蚓粪浸提液浓度为 10%，根结线虫卵孵化率降低 14.6%，浸提液浓度为 30%，卵孵化率明显降低（降幅达 38.85%），与 50%的浸提液浓度下的孵化率没有明显差异。随着浸提液浓度增加，根结线虫卵孵化率随之降低，当浸提液浓度为 90%，仅 11.88%的卵孵化，不同浓度下的蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫卵的孵化率差异显著（图 2）。

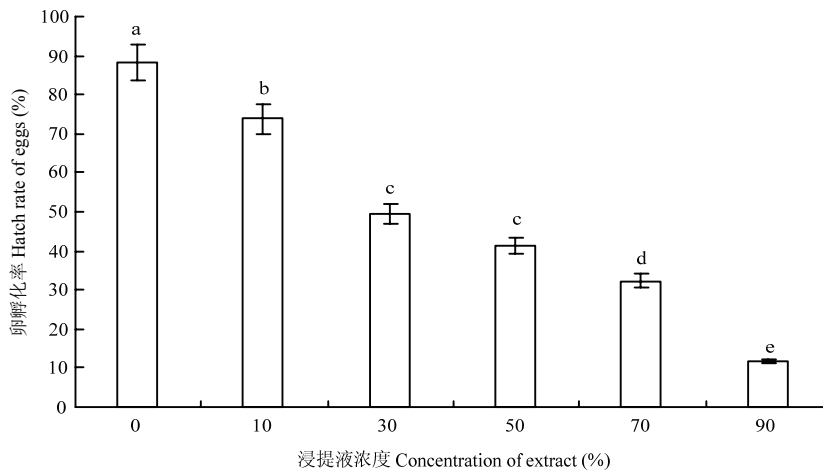


图 2 蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫卵孵化率的影响

Fig. 2 Effects of earthworm feces extract on hatchability of *M. incognita* eggs

## 2.3 蚯蚓粪浸提液对根结线虫 2 龄幼虫击倒率的影响

蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫 2 龄幼虫的击倒率随其浓度的提高和处理时间的延长而增加，不同浓度下的蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫 2 龄幼虫的击倒率有明显差异。当其浓度为 10%时，在 24、48 h 内对 2 龄幼虫的击倒率为 16.35%，72 h 的击倒率为 17.35%，较对照提高 14%。当浓度 50%时，击倒率明显提高。70%和 90%的浸提液处理 24 h 后，击倒率分别达到 59.65%和 77.88%，72 h 后达到 68.27%和 88.46%（图 3）。

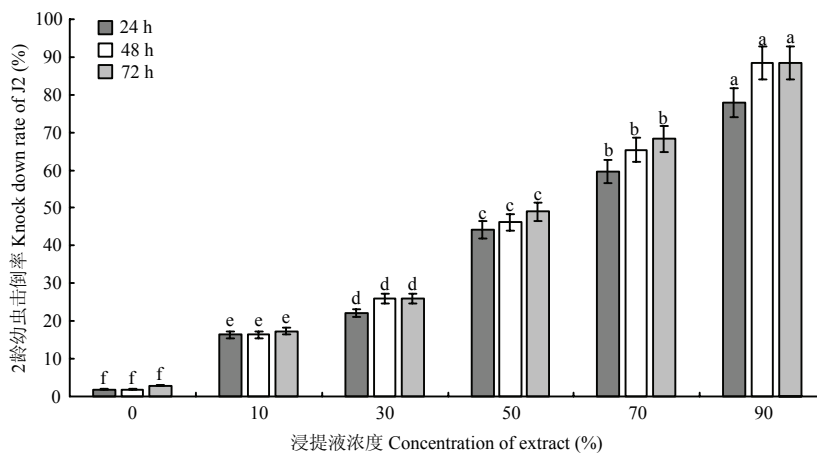


图 3 蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫 2 龄幼虫击倒率的影响

Fig. 3 Effects of earthworm feces extract on knockdown rate of *M. incognita* J2

## 2.4 蚯蚓粪浸提液对根结线虫 2 龄幼虫死亡率的影响

根结线虫 2 龄幼虫的死亡率随各处理浸提液浓度的增加而增加。当蚯蚓粪浸提液浓度为 10%时，2 龄幼虫死亡率为 18.27%，较对照提高 15.39%；当浓度为 30%时，2 龄幼虫死亡率与 10%浓度时的死亡率没有明显差别；而当浸提液浓度为 50%和 70%时，死亡率有明显增加，分别为 52.88%和 75.96%；当浸提液浓度为 90%，死亡率达 88.46%，蚯蚓粪浸提液对根结线虫 2 龄幼虫的致死作用明显增强（图 4）。

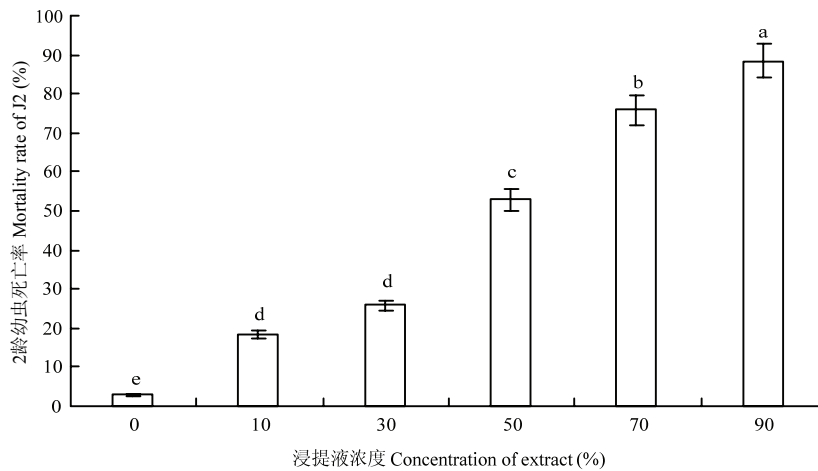


图 4 蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫 2 龄幼虫死亡率的影响

Fig. 4 Effects of earthworm feces extract on mortality rate of *M. incognita* J2

### 2.5 蚯蚓粪对番茄根结线虫的盆栽防治效果

当风干土混入蚯蚓粪后,会对番茄根结线虫病起到抑制作用,但抑制作用并非随着蚯蚓粪施用比例的增加而提高。T2 处理,即蚯蚓粪含量为 25%时,对番茄根结线虫病的防治效果达到 36.30%,优于 T3 (蚯蚓粪含量为 50%)的防治效果。T4 (蚯蚓粪含量为 75%)及 T5 (蚯蚓粪含量为 100%)处理,番茄根部的根结数明显降低,防治效果明显提高,均达 70%以上,但植株较矮,仅为 47.33 和 43.00 cm,并且地上部鲜重显著低于其他各组,仅为 84.15 和 90.85 g。而 T2 处理(蚯蚓粪含量为 25%),番茄株高为 61.33 cm,地上部鲜重为 241.65 g,均高于不含蚯蚓粪 T1 对照(表 1)。

表 1 蚯蚓粪用量对南方根结线虫的防治效果及对盆栽番茄生长的影响 (30 d)

Table 1 Effects of earthworm feces on root-knot nematode controlling and potted tomato growth (30 d)

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	每株根结数 Number of root-knot per plant	地上部鲜重 Fresh weight of aerial part (g)	防治效果 Control efficacy (%)
T1	59.00±1.58 a	104.67±1.13 a	225.00±3.54	—
T2	61.33±1.22 a	66.67±2.95 ab	241.65±1.54	36.30 b
T3	55.33±2.18 ab	76.00±2.35 ab	220.00±3.16	27.39 a
T4	47.33±1.84 bc	25.67±1.18 b	84.15±1.25	75.48 c
T5	43.00±2.24 c	29.00±1.58 b	90.85±1.17	72.29 c

注:风干土:蚯蚓粪(v/v)为 1:0 (T1)、3:1 (T2)、1:1 (T3)、1:3 (T4)、0:1 (T5);同列小写字母表示 0.05 水平上差异显著。地上部鲜重所得结果为各处理 5 个重复番茄地上部鲜重总和,不进行多重比较。

Note: Air-dried soil:earthworm feces (v/v) were 1:0 (T1), 3:1 (T2), 1:1 (T3), 1:3 (T4), 0:1 (T5); Lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level. Data of fresh weight of aerial part were mix with 5 replicates.

## 3 讨论

蚯蚓粪浸提液可以抑制南方根结线虫卵囊和卵的孵化,对 2 龄幼虫具有明显的击倒和致死作用,施用蚯蚓粪对番茄根结线虫病起到抑制作用,与对照相比,番茄根部附着的卵囊明显减少,根结数目降低,但防治效果并非随着施用蚯蚓粪比例的增加而提高。当蚯蚓粪占栽培基质比例的 75%以上时,虽对根结线虫防治效果达 70%以上,但对番茄根系发育产生了影响,根系颜色变深,主根变弱,须根变少,植株生长受到抑制,地上部鲜重显著降低。当施用蚯蚓粪的比例为 25%时,番茄的生长情况最好,同时对根结线虫病防治效果达 36.3%。因此,在番茄栽培种植过程中,向栽培介质中适量施用蚯蚓粪浸提液或直接添加 25%的蚯蚓粪对控制根结线虫病有一定效果。

以各类有机肥料浸提液防治蔬菜土传病害的研究近年来多有报道,在防治根结线虫方面,王晓云等<sup>[13]</sup>研究发现,土元粪浸提液对南方根结线虫卵孵化、2 龄幼虫活性具有抑制作用,且与浸提液浓度呈正相关。

张玥含等<sup>[14]</sup>研究表明, 蚯蚓粪浸提液可以促进黑麦草 *Lolium perenne*、高羊茅 *Festuca arundinacea* 种子萌发和生长, 以更好满足种植需要。本试验室内生测研究结果表明, 蚯蚓粪浸提液对南方根结线虫卵囊孵化、卵孵化具有显著的抑制作用, 对 2 龄幼虫具有明显的击倒和致死作用, 且上述作用随着浓度的提高而增大, 这与土元粪浸提液对南方根结线虫抑制作用的影响效果基本一致。由此推测, 在番茄生产过程中向栽培基质中施用蚯蚓粪浸提液, 具体浓度和用量需根据土壤理化性质和肥力来选择, 保证植株的正常生长。怎样的施用配方既有利于根结线虫病的防治, 又不会影响番茄的正常生长, 将是本研究今后所关注的问题。胡艳霞等<sup>[15]</sup>研究表明蚯蚓粪能诱导黄瓜产生系统抗性, 这与蚯蚓粪中的活性物质有关, 也许是蚯蚓粪中的微生物对该诱导抗性起重要作用。本试验只研究了蚯蚓粪及其浸提液对南方根结线虫的控制效果, 而抑制线虫的机制还没有进一步探讨。在后续的研究中, 将着重分析蚯蚓粪中对根结线虫有拮抗作用的微生物种类、活性及作用机制。

### 参 考 文 献

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [2] Khan A, Willams K L, Nevalainen H K M. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials[J]. *BioControl*, 2006, 51(5): 643-658.
- [3] Chitwood D J. Phytochemical based strategies for nematode control[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 221-249.
- [4] 中华人民共和国农业部公告第 199 号—公布国家明令禁止使用的农药及蔬菜、果树、茶叶、中草药材上禁用的高毒农药[A]. 2004 中国农药发展年会—农药管理与高毒农药替代战略研讨会专题报告集, 2004, 99.
- [5] 胡艳霞, 孙振钧, 王东辉, 等. 蚯蚓粪中拮抗微生物分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(1): 99-103.
- [6] 王胜, 郑仕军, 沈丽, 等. 蚯蚓粪对油菜根肿病的控制效果评价[J]. *西南农业学报*, 2010, 23(6): 1910-1913.
- [7] Edwards C A, Arancon N Q. Vermicomposts suppress plant pest and disease attacks[J]. *Biocycle*, 2004, 45(3): 51-54.
- [8] Thoden T, Gerard C, Korthals W, *et al.* Organic amendments and their influences on plant-parasitic and free-living nematodes: a promising method for nematode management[J]. *Nematology*, 2011, 13(2): 133-153.
- [9] 胡艳霞, 孙振钧, 周法永, 等. 蚯蚓粪对黄瓜苗期土传病害的抑制作用[J]. *生态学报*, 2002, 22(7): 1106-1115.
- [10] 刘维志. 植物线虫学研究技术[M]. 1995, 沈阳: 辽宁科学技术出版社.
- [11] 徐大兵, 田亨达, 张丽, 等. 用于液体肥料的堆肥浸提液提取工艺参数[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(5): 1189-1195.
- [12] Denilsonf O, Hudsonwp C, Alessandros N, *et al.* The activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne exigua*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 124(1): 57-63.
- [13] 王晓云, 王秀峰, 魏珉, 等. 土元粪及浸提液对番茄根结线虫的防治作用[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(8): 2511-2517.
- [14] 张玥含, 赵树兰, 多立安. 垃圾堆肥与蚓粪浸提液对草坪植物种子萌发及初期生长的作用[J]. *草业科学*, 2008, 25(8): 113-117.
- [15] 胡艳霞, 孙振钧, 孙永明, 等. 蚯蚓粪对黄瓜炭疽病的系统诱导抗性作用[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(8): 1358-1362.