

宁夏贺兰山农牧场日光温室根结线虫天敌真菌的分离和初步鉴定

张 靠 稳, 金 赛

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 从宁夏贺兰山农牧场日光温室采集的病根、病土样品中获得 427 个根结线虫样品, 其中 204 个雌成虫, 68 条幼虫, 155 个卵。通过分离, 从根结线虫雌成虫、幼虫和卵上共获得 83 株真菌分离物, 经初步鉴定除 13 株由于鉴定性状不明显尚未鉴定外, 其它分属于镰刀菌属(*Fusarium*)、链格孢属(*Penicillium*)和青霉属(*Alternaria*)等 9 个属, 其中镰刀菌属分离比例较高, 占分离总数的 26.5%。

关键词: 根结线虫; 天敌真菌; 分离; 鉴定; 宁夏

中图分类号: S 626.5; Q 949.32(243) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0157-03

近年来, 国内外研究人员在根结线虫的生物防治方面做了许多工作, 研究较多的是寡孢节丛孢(*Arthrobotrys oligospora*)、指状节丛孢(*A. dactyloides*)、厚垣孢普可尼亚菌(*Pochonia chlamydospora*)、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)、厚壁孢子轮枝菌(*Verticillium chlamydosporium*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等一些种类, 对根结线虫具有明显的致病作用。如“线虫必克”是一种新型微生物农药, 其主要成分是一种高效食线虫真菌——厚垣轮枝菌, 采用现代生物发酵工艺制成的线虫生防制剂, 对烟草根结线虫及其它作物线虫危害有很好防治效果^[1]。

宁夏虽然地处中国西北较为干旱的地区, 但冬季日照资源非常丰富, 因此近年来设施农业发展迅猛, 然而, 由于对病虫害的认识不足, 出现了一些当地以前没有的病虫害新种类, 温室蔬菜根结线虫病就是一例^[2]。随着时间的推移, 此病经历了由无到有, 由轻到重, 由重到稳定并逐年减轻的过程, 除人们重视采取防治措施外, 可能与土壤中根结线虫的天敌菌物种群变化有关。该研究旨在以发病的贺兰山农牧场温室为采样地, 分类采集根结线虫的卵、幼虫、雌成虫样品, 进行真菌分离和初步鉴定, 为调查、保护和利用土壤根结线虫天敌真菌提供科学依据。

1 材料与方法

第一作者简介: 张靠稳(1962-), 男, 本科, 副教授, 现从事植物生理学本科教学工作。E-mail: zkw620821@yahoo.com.cn.

基金项目: 宁夏教育厅高校科研资助项目(2006JY019); 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0739)。

收稿日期: 2009-02-27

1.1 样品采集

样品采集地点: 宁夏贺兰山农牧场日光温室。采集方法: 将农牧场日光温室按病害发生程度划分为重、中、轻和无病 4 个区。从每个区, 选取发病严重、中等、较轻的温棚进行采样, 每棚采取 3 点取样。采集带瘤状根结的根部和部分土样, 用塑料袋密封带回实验室及时分离, 未能及时分离的样本放入 -10℃低温保存。病根主要是黄瓜和西红柿。

1.2 培养基制备

采用玉米粉培养基^[4]: 玉米粉 20 g 加水, 置于 70℃水浴锅中保温 1 h, 用双层纱布过滤后加入琼脂 20 g 加热溶解琼脂, 加水定容至 1 000 mL, 分装, 121℃下灭菌 20 min。待培养基灭菌后凉至 50℃左右, 每 100 mL 培养基中加入 1 mL(5 mg/mL)青霉素溶液, 倒平板。

1.3 分离

在解剖镜下用解剖针将病根根瘤剥开, 直接从病组织中挑取雌成虫和卵。通过贝曼漏斗法用病土分离 2 龄幼虫。用 1.0%的次氯酸钠溶液或 0.1%升汞溶液处理雌虫和卵 3 min, 然后用无菌水冲洗 3 次, 在超净工作台上接入上述平板培养基上。将收集好的 2 龄幼虫放入灭菌的离心管内, 加 1.5 mL 1.0%的次氯酸钠溶液或 0.1%升汞溶液, 振荡 3 min, 3 000 rpm 离心, 弃上清, 加入灭菌水, 再离心 3 min, 重复 3 次, 在超净工作台上接入上述平板培养基上。每平板培养基上接 5~10 个虫体或卵, 30℃下培养 2 d, 镜检虫体上是否有真菌长出。

1.4 分离物的纯化与性状观察

将虫体上长出的真菌, 挑取少许, 接种与上述平板培养基上, 30℃下进行纯化培养, 对于纯化的分离物及时菌落性状和分生孢子梗、分生孢子、菌丝体等形

态观察记载。

1.5 真菌鉴定

依据分离物的菌落性状和分生孢子梗、分生孢子、菌丝体等菌体形态特征,参考魏景超编著的《真菌鉴定手册》^[3];李天飞等编著的《食线虫菌物分类学》^[4];张克勤编著的《食线虫菌物研究》^[5],进行初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 根结线虫生活史不同阶段天敌真菌的分离

从获得的根结线虫卵、二龄幼虫和雌成虫共 427 个样品上得到根结线虫天敌真菌分离物 83 株,其中从成虫样品上获得的分离物 46 株,卵和二龄幼虫样品上分离 28 和 9 株。由结果看出,从雌成虫样品上获得的分离物较多,卵次之,二龄幼虫最低(表 1)。由于雌成虫生活进入后期,其抵抗菌物入侵能力下降,并且因后期根部逐渐腐烂,接触土壤中的天敌菌物机会增多。而二龄幼虫因生命力强,代谢旺盛,又在不断地游动,菌物在其体壁上较难滋生。

表 1 根结线虫生活史不同阶段天敌真菌的分离情况

生活史阶段	样品数/个	分离物数/株	占总分离物的比例/%
雌成虫	204	46	55.4
卵	155	28	33.8
二龄幼虫	68	9	10.8
小计	427	83	

2.2 根结线虫天敌真菌的初步鉴定

对分离得到的 83 株真菌分离物进行初步鉴定,其中 13 株由于分类性状不明显没有鉴定外,其它 70 株分离物分属 9 个属(表 2),其中镰刀菌属 *Fusarium*,青霉属 *Penicillium* 的菌物分离数量较多,分别占总分离菌物数的 26.5%、20.5%。从真菌种类的初步鉴定结果来看,主要有 *Fusarium*、*Penicillium*、*Alternaria*、*Gliocladium*、*Monacrosporium* 等几个属,与祝明亮等^[6]、郑云峰等^[7]报道的基本一致,除 *Fusarium*、*Penicillium* 数量较多外,其它属的真菌数量较少,这与不同地区的土壤类型和土壤生态条件可能有关。

表 2 贺兰山农牧场根结线虫天敌真菌初步鉴定结果

真菌属名	种类	分离数	占总分离/%
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporium</i> <i>F. solani</i> ,	22	26.5
	<i>F. equiseti</i> , <i>F. sporotrichiodes</i>		
	<i>F. heterosporium</i>		
青霉属 <i>Penicillium</i>	<i>P. autochthonism</i> , <i>P. nigricans</i>	17	20.5
	<i>P. woolly</i>		
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	5	6.0
链格孢属 <i>Alternaria</i>		13	15.7
枝孢霉属 <i>Cladosporium</i>		2	2.4
单顶孢属 <i>Monacrosporium</i>		4	4.8
粘帚霉属 <i>Gliocladium</i>	<i>G. viscosity</i>	2	2.4
葡萄状穗霉属 <i>Stachybotrys</i>		3	3.6
节丛孢属 <i>Arthrobotrys</i>		2	2.4
未鉴定		13	15.7

2.3 不同病区根结线虫天敌真菌的分离

对贺兰山农牧场不同病区日光温室根结线虫天敌真菌的分离进行了统计(表 3),结果表明,重病区的样品上菌物分离率较高,轻病区的样品上菌物分离率较低。农牧场日光温室始于 20 世纪 90 年代后期,是分期分批建成投入生产。2000 年在早期生产温室发现根结线虫病并受到重视,2002 年做过调查,重病温室黄瓜几乎 100%发病,70%病株根系畸形严重,而温室生产之前没有此病的发生^[2],目前调查发现病害发生程度在逐渐减轻。出现上述现象,依据根结线虫天敌真菌的分离结果,初步分析认为,当重病区的根结线虫病逐年加重的同时,土壤中的生态环境也发生着变化,即随着根结线虫数量在土壤中的不断积累,相应的土壤真菌和细菌种群和数量也在逐步增多,使根结线虫感染率不断提高,导致数量慢慢减少,病害逐步减轻。

表 3 贺兰山农牧场不同病区根结线虫天敌真菌的分离统计

温室生产 开始年份	病害 程度	样品数				分离 菌物数	菌物分 离率/%	占总分 离物/%
		雌成虫	卵	二龄幼虫	合计			
1996 年	重病区	100	80	40	240	56	23.3	67.5
2000 年	中病区	74	60	20	160	23	14.3	27.7
2003 年	轻病区	30	15	8	53	4	7.4	4.8
2005 年	无病区	0	0	0				

3 小结与讨论

通过对贺兰山农牧场日光温室根结线虫天敌真菌的分离和初步鉴定,认为随着该地区根结线虫病发生时间的延长,土壤中逐步出现了根结线虫天敌真菌,目前该地区主要是镰刀菌属 *Fusarium* 的部分种类,这与祝明亮等^[6]、张小艳等^[7]的报道基本一致。目前没有分离到报道较多的淡紫拟青霉^[8] (*Paecilomyces lilacinus*)、轮枝孢属^[9] (*Verticillium* Nees)等对根结线虫作用强的种类,这与农牧场的发病时间和土壤环境条件是否有关需要深入研究。

在未鉴定的分离物中,有 2 株对根结线虫的作用表现较为突出,它们的一些生理特性和对根结线虫生活史的不同阶段的致病作用正在研究,是否具有开发利用潜力,需要进一步证实。

该研究从贺兰山农牧场日光温室根结线虫样品中分离得到一些天敌真菌,为以后根结线虫生防菌的筛选提供了物质基础,然而仅仅是一个农场地区,具有一定的局限性,宁夏其它地区土壤中的根结线虫天敌真菌如何,还需继续调查研究。

国内外有研究报道根结线虫在多年(3~5 a)连作条件下,由于受到自然界天敌拮抗菌的侵染,会出现种群数量下降的自然衰退现象^[9]。在贺兰山农牧场日光温室根结线虫病的研究过程中发现,发病早的重病区近年病害程度有所减轻,这是因为与种植者重视防治,特别

是采取以施用农药为主的各种防治措施,一定程度上减轻了病害的发生。另一方面从该病区样品中分离得到的根结线虫天敌真菌结果来看,天敌真菌对根结线虫的自然衰退肯定也有作用,哪方面起着主导作用有待继续探索。

参考文献

[1] 郑云峰,李建生,邱美强.根结线虫生防菌研究进展[J].中国农村小康科技 2006(11):62-65.
[2] 张靠稳,李建设,马军.宁夏贺兰山农牧场温棚黄瓜根结线虫病发生初报[J].农业科学研究,2006(4):23-26.
[3] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.

[4] 李天飞,张克勤,刘杏忠.食线虫菌物分类学[M].北京:中国科学技术出版社,2000.
[5] 张克勤.食线虫菌物的研究[M].昆明:云南大学出版社,2000:8-9.
[6] 祝明亮,奚家勤,张克勤,等.云南烟草根结线虫拮抗真菌分离鉴定初报[J].云南大学学报 2004,26(2):174-178.
[7] 张小艳,张荣,毛琦,等.陕西省蔬菜根结线虫拮抗真菌的分离与初步鉴定[J].干旱地区农业研究 2007,25(4):62-64.
[8] 肖顺,张绍升,刘国坤.淡紫拟青霉对根结线虫的防治作用[J].福建农林大学学报(自然科学版),2006,35(5):463-465.
[9] 孔祥义,陈绵才.根结线虫病防治研究进展[J].热带农业科学 2006,26(2):83-87.

The Abstract on the Separation and Identification of Root-knot Nematode Natural Enemy Fungus in Greenhouses in Helan Mountain Farm of Ningxia

ZHANG Kao-wen, JIN Sai

(College of Biological and Engineering, North for University Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: In this study, 427 samples of root-knot nematodes were obtained from ill rot and soil samples which were collected from Helan Mountain Farm of Ningxia, of which 204 adults, 68 larvae and 155 eggs. 83 fungal were obtained by dissection respectively from the root-knot nematode adults, larvae and eggs. The fungi saved were identified to 9 genera, including *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* etc. and 13 sterile fungi. *Fusarium* was the dominant population, and its isolation frequency took up 26.5% of all the isolates in this study.

Key words: Root-knot nematodes; Fungi; Isolating; Identification; Ningxia

花卉夏、秋、冬季施肥要领

科普知识

1 夏季

夏季温度较高,大部分花卉生长势较差。不耐高温的花卉如矮串红、矮牵牛、扶郎花、君子兰等在夏季气温较高时生长极其缓慢,对肥料要求也不高,此时应停止施肥,如降温条件好,花卉能正常生长时可施肥。由于夏季气温较高而处于半休眠状态的花卉如月季、仙客来等应停止施肥,待气温下降恢复生长后再开始施肥;对于一些耐高温的花卉如百日草、长春花、鸡冠花、唐菖蒲、向日葵等,夏季是它们生长开花的旺季,肥料应正常使用,但由于夏季白天气温较高,施肥应选择在清晨或傍晚,施肥的浓度也应控制,以防烧根。施肥完应立即用清水冲洗花卉叶面,防止溅至叶片上的肥液烧伤叶面;水生花卉如睡莲、碗莲夏季也可以正常施肥,可在根部土壤埋入腐熟的肥料,不存在烧根

烧叶的现象。

2 秋季

氮是花卉生长所必需的元素,施用氮肥能促进枝叶生长,但对于冬季休眠的花卉来说,秋季追施大量的氮肥,会诱发秋梢的发生。发生秋梢不但会消耗花卉体内贮藏的养分,第2年春季花卉的生长开花也会受到影响,而且由于发秋梢后花卉的休眠时间会向后推迟,遭遇低温时会出现冻害,故秋季应给冬季休眠的花卉施用磷钾肥,磷钾肥能促进花卉体内营养物质的积累,为第2年的生长和开花打下基础。但是并不是秋季就不能施用氮肥,冬季不休眠的花卉依然可以施用氮肥,尤其是观叶植物仍然应施用以氮肥为主的肥料。但在施用氮肥时应注意与磷钾肥配合。合理的磷钾肥施用可以提高花卉的抗寒性;冬季开花的植物如瓜叶菊、蒲包花、仙客来、

一品红、腊梅在早秋是营养生长期,应施以氮肥为主的肥料,晚秋大多是孕蕾期,在给此类花卉施肥时应以磷钾肥为主,氮肥为辅,氮肥过多不利于冬季开花。

3 冬季

冬季温度较低时不适合大部分花卉的生长。冬季不休眠的室内花卉,如常绿类花卉虎尾兰、鱼尾葵、棕竹、绿萝,室温在5℃左右时对肥料基本上无要求,故不需追肥。如气温较低时施肥容易出现根系腐烂的现象。主要原因是根系生长处于缓慢状态,所施肥料不能为根系所吸收,反而会妨碍根的正常吸收,严重时便会烂根。但有些花卉冬季气温低时也能生长良好,如花白菜、冷水花、海棠等,可以使用氮磷钾合理搭配氮肥为主的肥料,但用量应适当控制。