

蚯蚓洗涤液防治月季灰霉病的初步机理研究

闫钊岑 / 北京市第一零一中学

指导教师 / 马丽霞

◎ 引言

月季是蔷薇科蔷薇属多年生木本植物，是著名的四大切花之一，近年来已经成为花卉主栽品种。但是近年来，月季灰霉病已成为1种世界性的严重病害，在全国各地均有发生。危害月季的叶与花，严重影响了其产量和品质，给农业生产造成巨大的损失。目前采用的化学防治方法易产生抗药性、残留和环境污染等问题，探讨灰霉病的生物防治方法已迫在眉睫。

蚯蚓洗涤液来自蚯蚓的真体腔和背孔分泌的大量液体，是其他常见蚯蚓制品的副产品。我们采用平板滤纸片扩散法并结合大田实验，探究蚯蚓洗涤液对月季灰霉病的防治效果。该项目是在前期研究的基础上开展的第2期研究，寻找对灰霉菌起抑制作用的物质基础，初步探讨蚯蚓洗涤液防治植物灰霉病的机理。

◎ 实验材料与方法

◎ 实验材料

供试土壤：北京一零一中生态园

内土壤（土壤有机质、氮、磷、钾的平均含量为：1.04%、0.08%、0.11%、2.37%、pH值 7.08 ± 0.04 ）。

供试菌种：灰霉菌（农科院植物保护所提供）。

供试蚯蚓品种：赤子爱胜蚓（北京一零一中生态园内饲养）。

供试培养基：PDA培养基。

供试作物：培养3年的月季幼苗。

叶绿素测量仪：SPAD-502、冷冻机、超净工作台、天平、自制筛筒等。

◎ 实验方法

◆ 蚯蚓洗涤液抑菌性的测定实验

蚯蚓洗涤液的制备：取蚯蚓100g于40目纱布筛中，置于容器上，用1000mL无菌水反复冲洗10次，所收集的液体即为蚯蚓洗涤液，于4℃冷藏备用。

滤纸片扩散法：制备真菌培养基平板，将经37℃过夜培养的灰霉菌，经显微镜计数后，稀释成 10^5 CFU/mL，将直径1cm的滤纸片在 10^5 CFU/mL灰霉菌液中浸泡5min，用无菌镊子取出，平铺在平板中心处，每皿4个滤纸

片，其中3个处理，分别浸泡蚯蚓洗涤液原液（CT）、 10^{-1} 稀释液（CT₁）和 10^{-2} 稀释液（CT₂），同时以无菌水浸泡的滤纸片作为对照。这4个滤纸片都分别在皿的四周，与中心滤纸片等距1.5cm，30℃倒置培养，定期观察抑菌圈的形成情况，测量抑菌圈的大小并拍照，该实验进行6个重复。

◆ 蚯蚓洗涤液抑制灰霉菌的大田实验

在学校生态园实验田筑4个畦，畦长9米、宽1米，全部种植月季，每畦种植2行，每畦30株。其中3畦为实验组、1畦为对照组。对于3畦实验组分别喷施等量的蚯蚓洗涤液CT、CT₁、CT₂，对照组喷施等量的清水。喷施在生长期进行，从植株长出第1片真叶开始，每3天喷施1次，喷施在早晨8:00前或下午4:00后进行。共喷施约21次。

当月季生长4周后（花期过后），选取实验组和对照组每畦3株，每株从顶部选取第4片叶，各畦10片叶，接种灰霉菌孢子悬液，3天后观察记录感



图1 感染面积比较图



图2 开花情况比较图

染情况，叶片感染病斑的面积测定采用纸重比测定法。同时，注意观察记录花蕾数、花朵数、花朵大小、花瓣多少及花期，观察记录时随机取样，每畦3株，计算出平均值。

◆ 叶片感染病斑面积纸重比测定法

取透明的A4宣纸称重，并测其面积，后将此纸依次连续4次1/2对折，每次对折都裁开，依次称重，测其面积。以纵坐标为重量，横坐标为面积，作标准曲线，将叶片感染的不规则面积用透明宣纸按其大小描绘下来剪下，称其重量，在标准曲线上找其面积，该面积就是叶片感染的面积。

◆ 月季生长情况测定

在月季生长期，对其生长情况花蕾、花朵、花瓣及花期进行测量记录。

◆ 蚯蚓洗涤液成分的透析

将透析袋清理干净，用夹子把透析袋一端夹好，从另一端注入去离子水，检验是否漏水。检漏后，将蚯蚓洗涤液各30mL分别加入3个透析袋中，确保透析袋内无任何气泡后，将一端用夹子

夹好，将透析袋置于去离子水杯中（去离子水没过透析袋）12~24h，然后将去离子水杯放入冰盒中，并放置在磁力搅拌器上。之后，将去离子水杯置于冷冻机内冷冻抽提，将抽提出的干物质（即袋外的）分别加20mL无菌水予以溶解后待用。

◆ 蚯蚓洗涤液透析袋内、外物质抑菌性实验

取出透析袋内的溶液，同时用上述抽提的干物质制成的溶液，进行抑菌实验。

◎ 结果与分析

➤ 蚯蚓洗涤液抑菌性实验的测定结果

由滤纸片扩散法测定的蚯蚓洗涤液抑菌实验测定结果表明，培养24小时后，灰霉菌菌落距对照组边缘有0.4cm，48小时后距对照组边缘只有0.05cm，72小时后，距离为0，灰霉菌菌落已扩散到对照组。对照组没有任何抑菌性能。蚯蚓洗涤液原液CT，其边缘距灰霉菌菌落的距离，从24小时到72小时都保持在0.6cm，远远大于CT₁和CT₂距

灰霉菌菌落的距离。由此可见，蚯蚓洗涤液原液CT抑菌性能>CT₁>CT₂。

➤ 蚯蚓洗涤液抑制灰霉菌的大田实验结果

当月季生长4周后，花期过后，选取实验组、对照组各10片叶随机取样，接种灰霉菌孢子悬液，3天后观察感染情况（图1），用纸重比法测量其感染面积，结果表明，当幼苗期叶片接种灰霉菌孢子悬液后，实验组和对照组连续5天分别喷洒蚯蚓洗涤液和清水，对照组灰霉菌感染面积达到171.87cm²，而实验组叶片无一感染，其抑制率为100%。对花蕾期和开花期的月季喷洒蚯蚓洗涤液，对照组喷洒清水后，植株长势明显不同，前者生长旺盛、茁壮，后者生长较弱。植株的花蕾数和花朵大小也明显不同。见图2。

由9月25日的记录（图3）可以看出，实验组CT、CT₁、CT₂月季单株的花蕾数和花朵平均数分别为8.5、4.6、10.6、4.3、8.9、5.2，由成对t检验可知，各实验组与对照组（CK）之间均具有显著差异（P<0.01），花朵的直径和

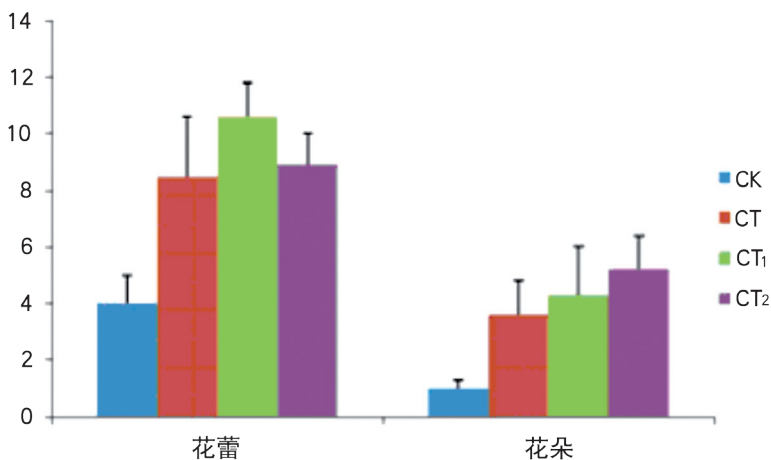


图3 9月25日单株开花数平均与方差统计图

花朵的瓣数也明显多于对照组，花期也由原来的1个多月延长到4个月。说明实验组CT、CT₁、CT₂的花蕾和花朵数显著多于对照组（CK）。这是因为蚯蚓洗涤液不但具有抑制灰霉菌病的性能，而且含有丰富的营养成分和多种微量元素，具有促进月季生长的作用。

⑤ 蚯蚓洗涤液透析后小分子物质的抑菌实验结果

蚯蚓洗涤液透析抽提后，收集的干物质加20mL无菌水溶解制得的溶液，是小分子物质溶液，经检测是抗菌肽物质。对该溶液进行如上文所述的滤纸片扩散法抑菌实验表明，抑菌效果非常好，抗菌肽是蚯蚓等多种动物免疫防御系统的一个重要组成部分，其杀菌机理主要是作用于细菌/真菌的细胞膜，破坏其完整性并发生穿孔现象，造成细胞内容物溢出胞外死亡。该结论与资料调研分析是一致的。

⑥ 蚯蚓洗涤液透析后透析袋内溶液抑菌性能结果

透析后留在透析袋内的液体，用滤纸片法进行72h抑菌性能检验，其结

果表明，72小时后，CK、CT、CT₁、CT₂几乎都和中心的灰霉菌丝连在一起，说明它们对灰霉菌都没有表现出明显的抑菌性能，这也表明，留在透析袋内的大分子物质抑菌作用不明显。

⑦ 大分子物质和小分子物质溶液抑制灰霉菌的大田实验

用透析袋内的大分子物质溶液和小分子物质制成的溶液进行防治月季灰霉病的大田实验，也发现只有小分子物质溶液表现出抑制月季灰霉病的功效，而大分子物质溶液抑菌效果不明显。

◎ 结论

实验室与大田实验结果表明，在月季叶片上喷施蚯蚓洗涤液能有效地抑制灰霉菌（真菌）的生长，防止植株受到灰霉菌的侵染，同时还能避免环境受到污染。透析研究表明：蚯蚓分泌液中具有明显抑制灰霉菌作用的是大量的抗菌肽等小分子物质，抑制率达100%。抗菌肽杀菌的机理是作用于细菌的细胞膜，破坏其完整性并产生穿孔现象，造成细胞内容物溢出细胞外而死亡。

月季喷施蚯蚓洗涤液，可以使其植株生长旺盛、茁壮，花期由原来的1个多月延长到4个多月，产量大幅增加。

该项目获得第26届全国青少年科技创新大赛创新成果竞赛项目中学组微生物学一等奖。

专家评语

该项目开展了蚯蚓洗涤液对月季灰霉病的防治实验，表明其具有良好的抑菌效果。实验设计科学合理，数据翔实可靠，结果和结论可信，创新性明显，有良好应用前景。■