

生物土壤添加剂减轻黄瓜连作障碍的微生物效应

郝永娟, 魏 军, 刘春艳, 王 勇, 王万立

(天津市植物保护研究所, 天津 300112)

摘要:为防治土传病害, 克服黄瓜连作障碍, 探讨了土壤生物添加剂不同添加量对土壤微生物种群结构的影响。结果表明, 土壤添加剂施用后不同时期, 土壤微生物总量增多, 土壤细菌和放线菌变化较大, 真菌变化不大。优势菌的种类和数量发生变化, 木霉、青霉等一些有益菌数量明显增加, 根际优势种的抑菌作用较强。施用添加剂后, 提高了土壤微生物多样性, 能够调节土壤微生物群落结构, 比应用化学农药更具有生态安全性。

关键词:生物土壤添加剂; 黄瓜; 连作障碍; 土壤微生物

中图分类号: S144.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)04-0231-04

Effects of Biological Soil Amendment Reducing on Replant Diseases of Cucumber

HAO Yong-juan, WEI Jun, LIU Chun-yan, WANG Yong, WANG Wan-li

(Tianjin Plant Protection Institute, Tianjin 300112, China)

Abstract: Soil biologic amendment (BSA) was applied to the cucumber continuous cropping to control soil-borne diseases and reduce replant diseases of cucumber. The changes of soil microorganism population structure were discussed by different agent. The result showed that total population of cucumber rhizosphere microbes increased remarkably after applying soil amendment. Number of bacteria and actinomycetes had a drastic variation. Number of fungi increased slightly. The species and amount of the dominant species were changing, beneficial microbes such as *Trichoderma* and *Penicillium* were more. Dominant species in rhizosphere antagonism were stronger along with controlling effect increasing. Applying BSA could increase soil microbial diversity and adjust community structure of soil microbial, and had better ecological stability than fungicide.

Key words: Biological soil amendment; Cucumber; Replant diseases; Rhizosphere microbes

连作是保护地蔬菜生产普遍采用的种植制度, 多年连作使土壤理化性状及生物学均发生了较大负面变化, 对蔬菜生产造成了严重危害。黄瓜属于不耐连作的蔬菜, 连作障碍明显, 植株抗病能力降低, 土传病害严重发生。连作障碍产生的原因很多, 但土壤微生物种群结构失衡是导致作物减产、土壤质量下降的主要原因之一。许多学者对黄瓜连作障碍进行过多方面的研究, 如朱林、吴凤芝等^[1]研究了黄瓜连作对土壤物理性状、生物化学性质的影响。袁飞等^[2]研究了不同有机物处理对防治苗期病害, 土壤微生物的影响; 吕卫光等^[3]研究了苯丙烯酸对连作黄瓜土壤微生物活性的影响, 这些研究都表明连作障碍与土壤微生物活性变化有关。国内外一些研究证明, 增施有机肥可以防治土传病害, 减缓连作障碍。但不同有机肥和添加物的防治效果存在一定差异。本研究利用菇渣木霉培养物与腐熟有机物一起合成生物土壤添加剂,

从改善土壤养分供应, 抑制土传病害、分解或转化自毒物质、诱导抗性物质等方面探讨生物土壤添加剂减轻黄瓜连作障碍的微生物效应, 为合理利用生物土壤添加剂防病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试生物土壤添加剂 生物土壤添加剂(Biologic soil amendmen, BSA)由天津市植保所研制, 生物土壤添加剂含木霉菌渣发酵物 60%以上, 其他为腐熟有机物。木霉菌剂(TF9801)的孢子数达 10^6 个/g, VA菌剂含孢子量 20 个/g。试验在天津市植保所日光温室进行, 黄瓜连作 8 年, 春秋两季种植, 土壤为粘壤土, pH 6.87; 供试黄瓜品种为津研 4 号。

1.1.2 供试病原菌 黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*), 天津植保所病害研究室保

收稿日期: 2009-03-20

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究(08JCYBJC04800); 天津市科技攻关培育项目(05YFGPCNC02900); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BSAD07B00)

作者简介: 郝永娟(1971-), 女, 天津人, 副研究员, 硕士, 主要从事蔬菜病害防治研究及杀菌剂应用技术研究。

存。将 *F. oxysporum* 用 PDA 液体培养基 25 培养 7 d 后,血球计数板镜检,将孢子悬浮液调整为 10^6 cfu/mL,备用。

1.2 试验设计

采用营养钵播种,每钵装干土 400 g。生物土壤添加剂的添加量分别为土壤质量的 1%,3%,5%,与连作土混匀装钵;化学药剂处理为 50%多菌灵 WP500 倍液喷洒连作土壤,混匀装钵,以不进行任何处理的连作土为对照。用枯萎病菌孢子悬浮液浸泡已催芽的黄瓜种子 30 s,播种在营养钵内。对照植株普遍发病后,调查各处理黄瓜的发病率及防病效果。播种后 7,14,21,28 d 调查黄瓜根际土壤微生物数量及区系。每处理 12 钵,24 株,重复 3 次。

1.3 分析方法

1.3.1 病情调查 黄瓜苗期枯萎病分级标准:0 级:无症状;1 级:叶片黄化或萎蔫面积不超过总叶面积的 50%;2 级:叶片黄化或萎蔫面积超过总叶面积的 50%;3 级:叶片萎蔫或枯死,仅生长点存活;4 级:病株枯死。

1.3.2 土壤微生物分离及计数 土壤微生物的分离采用稀释分离法^[4]。每处理分别取待测黄瓜根 3 株,取混合后的根际土 5 g,加入盛有 45 mL 无菌水的三角瓶中,150 r/min,振荡 30 min,制成 0.1 g/mL 土壤悬浮液。未沉淀前吸取 1 mL 加入盛有 9 mL 无菌水的灭菌三角瓶中摇匀,并依次稀释成不同浓度的土壤悬浮液。分离不同微生物采用的土壤悬浮液稀释度及培养基分别为:根际真菌的稀释浓度为 10^{-3} ,马丁氏培养基;细菌的稀释浓度为 10^{-6} ,牛肉膏蛋白胨培养基;放线菌的稀释浓度为 10^{-4} ,采用高氏一号培养基。每皿加入 1 mL 土壤稀释液和 9 mL 培养基,稀释分离后真菌、细菌、放线菌分别在 26,28,30 培养箱内培养 6,8,10 d,然后计数观察。每处理重复 4 皿,计算平均菌落数。将采用选择性培养基稀释分离的三种微生物及时进行转管保存,作进一步的鉴定和抑菌测定。采用烘干法测定 5 g 土壤干质

量,折算每克干土中土壤根际微生物的数量。

微生物数量 (cfu/g) = 平均每皿菌落数 × 稀释倍数 / 土样干质量

1.3.3 根际微生物鉴定及区系分析方法 根据菌落的培养性状和形态特征进行真菌种类及放线菌优势类群鉴定;根据细菌的培养性状、革兰氏染色、鞭毛染色及其他理化性质进行细菌优势类群的鉴定。根据各种微生物菌落在培养皿上出现的平均频率,将根际微生物分为三类:出现频率在 5% 以下,为稀有种(类群);出现频率在 5%~20% 之间,为常见种(类群);出现频率在 20% 以上,为优势种(类群)。

1.3.4 根际微生物对黄瓜枯萎病的抑菌效果测定

采用平板对峙培养法,将病菌菌片放于 PDA 平板中央,在 25 的培养箱中培养 1~2 d 后,在四周分别接上待测菌块,共同生长一段时间后,观察抑菌作用情况,记载抑菌效果,根据抑菌效果强弱,分为 5 个等级:“-”表示促进病菌生长;“0”对病菌生长无抑制作用或不明显;“+”有一定抑菌作用,抑菌带(圈)1~3 mm,“++”有明显的抑菌作用,抑菌带(圈)3~5 mm,“+++”有十分显著的抑菌作用,抑菌带(圈)5 mm 以上。

2 结果与分析

2.1 土壤生物添加剂防治黄瓜枯萎病的效果

土壤生物添加剂的盆栽试验结果见表 1,多年连作温室的表土施用生物土壤添加剂后,黄瓜出苗比多菌灵及空白对照早 1~2 d,且不同添加量处理均能促进黄瓜植株生长,株高较对照提高 37.79%~74.89%,且叶色浓绿,3%添加量的促长效果最明显,与多菌灵处理及对照间差异极显著。

土壤生物添加剂对黄瓜枯萎病的发生具有明显的抑制作用,对照的发病率达 64.59%,病情指数为 41.67,添加剂的处理发病较轻,病指在 9.38~14.06,且发病日期较对照推迟 5~7 d,3%添加量处理的防效略高于多菌灵,两者无显著差异。

表 1 土壤生物添加剂对连作黄瓜的影响

Tab.1 Effects of biological soil amendment on growth and disease of cucumber

处理 Treatments	株高/cm Plant height	发病率/% Incidence	病情指数 Disease index	防效/% Efficacy
BSA 1%	14.95 b	27.09 b	14.06 b	66.26 c
BSA 3%	19.05 a	18.06 d	10.63 c	73.75 b
BSA 5%	17.30 a	15.30 d	9.38 c	77.50 a
50%多菌灵 WP500 倍	11.20 c	20.22 c	11.81 c	71.66 b
CK	10.85 c	64.59 a	41.67 a	

2.2 土壤生物添加剂对土壤微生物数量的影响

黄瓜根际土壤微生物数量随时间的动态变化见

图 1~3。由图 1 可知,随着施入时间的延长,不同处理根际真菌呈现不同的变化趋势,添加剂的处理

施入初期,土壤真菌增加显著,主要与大量拮抗菌在根际的定殖有关;14 d后真菌数量呈下降趋势,21 d略有上升,28 d时较对照降低。分析原因可能与拮抗菌与土壤习居菌的相容性有关,添加剂中还含有丰富的有机物为一些腐生真菌提供了养分,使得菌群数量增加,28 d为移栽前期,此时真菌数量较少,有利于培育壮苗。化学药剂多菌灵处理初期杀灭了大量真菌,随着药效的减弱,真菌数量急骤增加。对照的根际真菌数量呈平稳上升趋势。

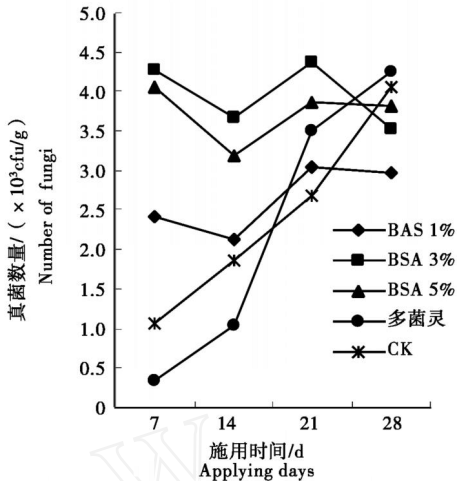


图1 土壤生物添加剂对黄瓜根际真菌的影响
Fig.1 Effect of BSA on number of fungi in cucumber rhizosphere

黄瓜根际细菌的变化见图2,添加剂处理后,在生长期至21 d,根际细菌一直呈上升趋势,以后数量逐渐减少。不同时期添加剂处理的细菌数量均显著高于多菌灵处理及对照。多菌灵处理初期与对照数量相当,14 d时略高于对照,以后的细菌数量均较对照减少。对照呈缓慢上升趋势。

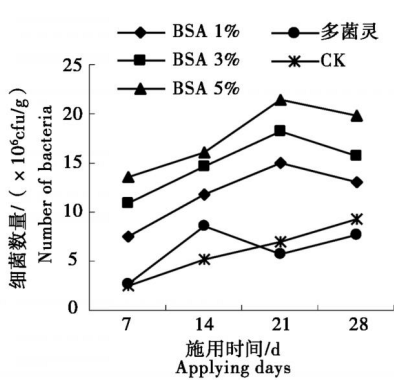


图2 土壤生物添加剂对黄瓜根际细菌的影响
Fig.2 Effect of BSA on number of bacteria in cucumber rhizosphere

黄瓜根际放线菌变化见图3,随着施用时间的推移,各处理放线菌的含量均呈上升趋势,添加剂的处理,放线菌增加显著。土壤生物添加剂中的有机物成分几丁质含量较高,有利于放线菌生长,分解有机物时土壤中放线菌比较活跃。

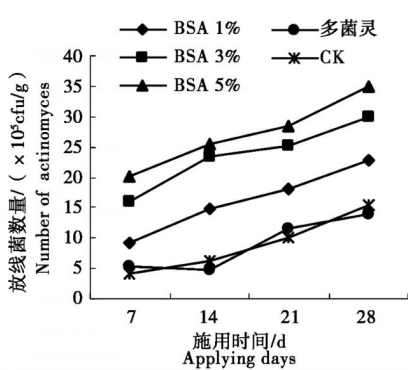


图3 生物土壤添加剂对黄瓜根际放线菌的影响
Fig.3 Effect of BSA on number of actinomycetes in cucumber rhizosphere

表2 土壤生物添加剂对黄瓜根际真菌、放线菌优势菌属的影响

Tab.2 Effects of biological soil amendment on dominant species in cucumber rhizosphere											%
处理 Treatment		真菌类型 Species of fungi					放线菌类型 Species of actinomyces				
		青霉 ¹	木霉 ²	镰刀菌 ³	根霉 ⁴	曲霉 ⁵	毛霉 ⁶	白袍类群 ⁷	黄袍类群 ⁸	粉袍类群 ⁹	灰褐类群 ¹⁰
BSA1 %	数量比例	20.81	48.21	5.26	9.25	0.00	6.98	20.53	57.39	6.55	15.53
	抑菌程度	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
BSA3 %	数量比例	23.08	61.52	0.00	0.00	7.29	6.67	10.85	62.17	6.29	15.44
	抑菌程度	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BSA5 %	数量比例	18.75	75.00	0.00	6.25	0.00	0.00	9.81	66.44	5.69	18.06
	抑菌程度	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
多菌灵	数量比例	12.50	0.00	0.00	16.78	0.00	0.00	23.60	50.12	8.57	10.92
	抑菌程度	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
CK	数量比例	16.84	15.79	6.67	10.53	0.00	0.00	26.34	46.75	7.67	12.70
	抑菌程度	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+

Note:1. *Penicillium* sp.;2. *Trichoderma* sp.;3. *Fusarium* sp.;4. *Rhizopus* sp.;5. *Aspergillus* sp.;6. *Mucor* sp.;7. *Albasporus*;8. *Flavus*;9. *Ruber*;10. *Inerogriseus*.

2.3 不同处理对土壤微生物优势菌属的影响

生物土壤添加剂对土壤真菌、放线菌优势菌的影响见表2,各处理土壤细菌的优势菌株主要为假单孢菌属和芽孢杆菌属的不同菌株,假单孢菌属数量比例高达58.33%,芽孢杆菌属为33.33%;对照分别为28.57%和25%。枯草芽孢杆菌、假单孢菌

可以拮抗黄瓜尖镰孢菌,减少土壤中的病原真菌。真菌主要为半知菌类,是土壤中常见的类群。不同处理产生的真菌类群主要为木霉菌,其次是青霉菌、毛霉属、根霉属、镰孢霉属及曲霉属,其他菌属所占比例较少。优势菌中的青霉、木霉和毛霉对黄瓜枯萎病菌有不同程度的抑菌作用。土壤放线菌主要为链霉菌,其中优势菌为黄孢类群、灰褐类群、白孢类群及粉孢类群,放线菌大多可以分泌抗生素抑制病原真菌,添加剂处理中黄孢类群、灰褐类群较对照增加,并且这两类菌株对黄瓜枯萎病镰刀菌有较强的抑制作用。

3 讨论

利用工农业废弃物结合拮抗菌配制的生物土壤添加剂对黄瓜连作障碍具有明显的缓解作用,育苗时施用可显著降低苗期病害的发生,并且具有促进植株生长的作用。黄瓜连作后根际土壤微生物种群失调,微生物活性降低,生物土壤添加剂富含有机质和养分,为微生物繁殖提供能源。并且本身含有大量有益拮抗菌。施用后土壤微生物总量增加,提高了连作土壤的活性,促进根系生长,增强了植株的抗性。

连作土壤应用生物土壤添加剂后,黄瓜根际优势菌的种类和数量发生变化,木霉、青霉等有益真菌数量明显增加,尤其是具有拮抗作用的菌属增多,使土传病害得到有效控制。同时施用添加剂后,改善了土壤微生物的营养条件,提高了土壤微生物多样性,从生态水平上缓解了连作的发生。对于生产上广泛使用的杀菌剂多菌灵在进行土壤消毒防治土传病害过程中,减少了土壤微生物数量,对土壤微生物种群结构的影响较大,在杀灭病原菌的同时,也杀灭了一些有益微生物。应用生物土壤添加剂比化学药剂更具有生态安全性。

土壤中的微生物在农业生态系统中不仅可以调节植物生长发育、抑制病原微生物的生长,而且在生态系统中的营养元素矿化、土壤肥力的保持和提高以及能量转化和物质循环等方面具有其他生物无法代替的作用^[5]。由于化学肥料的大量施用,土地复种指数的增加,导致土壤理化性质和微生物群落恶化,引起土传病害滋生。通过筛选有机物和有益微

生物,加工研制土壤添加物、合理施用、配合适当的农艺措施来改善、维护、培育土壤微生物群落,使之保持和谐、稳定的功能,从而提高土壤微生物多样性,进而实现土壤稳定、适度的生态肥力,可以从根本上抑制土传病害的发生,实现农业的可持续发展。

抑制植物土传病害在一定程度上是土壤微生物的群体作用,当土壤微生物群落结构越丰富,物种越均匀,多样性越高时,抑制病原菌的综合能力就越强,这也是往往单一或少数拮抗菌难以成功的原因。土壤条件复杂,许多病原菌可在土壤深处存活,化学杀菌剂、消毒剂的效果很难发挥到土壤深处,同时应用化学消毒剂时,也会杀掉许多有益微生物,破坏土壤生态系统平衡,使病害更加猖獗。应采取各种农业综合措施,调整和优化土壤微生态结构,使土壤中病原菌数目下降到不至于引发作物病害,并造成经济损失的程度。施用一般有机肥,对土壤微生物种类和数量会产生良好的影响^[6],对有机物进行特别加工处理以强化其对土壤微生物的影响并使之优化,是一种值得深入探讨的生态调控、抑制土传病害的可能途径。土壤微生物活性是反映土壤生态系统功能的重要指标,土壤微生物活性高,土壤生态系统稳定性和缓冲容量大,功能增强,因而,土壤对外来胁迫所引起的生态系统波动的恢复能力提高^[7]。研究黄瓜根际的微生物效应是生物土壤添加剂防病促长机理的主要因素。

参考文献:

- [1] 吴凤芝,王 伟,栗非时.土壤灭菌对大棚连作黄瓜生长发育影响[J].北方园艺,1999(5):49.
- [2] 袁 飞,彭 宇,张春兰,等.有机物料减轻设施连作黄瓜苗期病害的微生物效应[J].应用生态学报,2004,15(5):867-870.
- [3] 吕卫光,张春兰,彭 宇,等.外源苯丙烯酸抑制连作黄瓜生长的机制初探[J].中国蔬菜,2001(3):10-12.
- [4] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [5] 王 振,赵廷昌,刘学敏,等.转基因作物对土壤微生物多样性影响[J].植物保护,2007,33(4):15-19.
- [6] 廖宗文.工业废物的农用资源化:理论、技术和实践[M].北京:中国环境科学出版社,1996:169-174.
- [7] 蔡燕飞,廖宗文,董 春,等.番茄青枯病的土壤微生态防治研究[J].农业环境保护,2002,21(5):417-420.