

番茄青枯病的土壤微生态防治研究

蔡燕飞, 廖宗文, 董 春, 石木标

(华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 采用田间试验、微生物培养、BIOLOG GN 微平板培养分析, 研究了新开地、连作地施用生态有机肥前后土壤生物多样性与番茄青枯病的关系。结果表明, 新开地没有发生青枯病, 连作地番茄青枯病发病率为 100%, 连作地施用生态有机肥后, 青枯病发病率降低至 49.86%, 土壤真菌、放线菌的数量略微增加, 细菌的数量变化不大, 但平板中真菌、细菌、放线菌的不同形态菌落数明显增多。新开地、施用生态有机肥处理土壤微生物群落在 BIOLOG GN 微平板温育过程中的 AWCD 值、Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数、Alatalo 均匀度均显著高于连作地土壤, PIE 相遇几率则相反。新开地与施用生态有机肥土壤之间无显著差异。由此说明, 施生态有机肥能提高土壤微生物多样性, 从生态水平上抑制番茄青枯病的发生。

关键词: 番茄青枯病; 土壤微生物多样性; 生态有机肥; 生态肥力

中图分类号: S154.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0267(2002)05-0417-04

Soil Microbial Regulation for Controlling Bacterial Wilt of Toma

CAI Yan-fei, LIAO Zong-wen, DONG Chun, SHI Mu-biao

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Relationship between bacterial wilt of tomato with its soil biodiversity of freshly plowed soil, continuous cropping soil and continuous cropping soil receiving ecologically organic fertilizer (EOF) was studied by field experiment, plate counts and BIOLOG GN micro-plate culture. The results showed that tomato wilt did not occur in freshly plowed soil, while the ratio of tomato wilt was 100% in continuous cropping soil, and reduced to 49.86% when the soil receiving ecologically organic fertilizer (EOF), while the numbers of Fungi, Actinomycete increased, but a few change of bacteria was found, as the varieties of strains in vitro were increased obviously. The AWCD value, Simpson index, Shannon index, McIntosh index, Alatalo evenness of microbial community in BIOLOG GN micro-plate all increased greatly after adding the EOF, and almost were similar to those in freshly plowed soil. Those indicated that applying EOF could increase soil biodiversity, and exhibit beneficial to suppressing soil-borne pathogens on ecological level

Keywords: bacterial wilt of tomato; soil microbial diversity; ecological organic fertilizer (EOF); ecological regulation

植物细菌性青枯病 (*Ralstonia solanacearum*) 是一种严重的土传病害, 严重危害热带、亚热带、温带经济作物^[1,2], 目前尚无理想的化学防治方法。青枯病的发生与土壤环境关系密切, Yoshitaka Shiomi 等研究抑病与易感病土壤微生物群落结构, 发现病原菌很难在微生物多样性高的土壤中滋生^[3,4]。台湾的 S-H 土壤添加剂对青枯病有一定的防治效果^[5,6]。本研究通过筛选工农业有机废弃物, 研制成生态有机肥, 通过有机物和有益微生物的“基质-菌种”效应对土壤微生物群落进行调控, 从而控制番茄青枯病^[7]。

1 材料与方法

1.1 试验地点

番茄青枯病防治试验于 2001 年在校内试验地进行, 该地为番茄连作地, 多年种植番茄, 青枯病发生严重, 土壤为红壤, 土壤 pH 为 5.5, 有机质含量为 30.9 g · kg⁻¹ 土。新开地为校园内未耕作红壤, 植被为杂草和灌木, pH 为 6.0, 有机质含量为 30.6 g · kg⁻¹ 土, 于 2001 年春天开垦种植番茄。

1.2 试验材料

供试番茄品种为红宝石, 是青枯病感病品种。生态有机肥 (EOF) 由几种工农业废弃物资源加工改性制成。

1.3 试验设计

3 个处理,重复 3 次,共 9 个小区,每小区植番茄苗 20 株。处理 1:施生态有机肥,用量为 $0.65\text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$,在番茄移栽前一天撒施在土壤中,翻耕、淋水润湿土壤,4 月 1 日移栽番茄;处理 2 是连作地,处理 3 是新开地,处理 2、3 均没有施生态有机肥。所有处理用尿素、过磷酸钙、氯化钾作基肥,施用量每平方米分别为 10 gN 、 7.5 gP 、 5.5 gK ,相当于每公顷 100 kgN 、 75 kgP 、 55 kgK 的施用量。其他田间管理措施一致。

1.4 测定方法

1.4.1 土壤微生物细菌、真菌、放线菌总数测定

采用平板计数法。真菌培养基为 Martin 真菌培养基;细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基;放线菌培养基为高氏一号培养基。

1.4.2 土壤微生物多样性测定

参照 Garland、kelly 和姚永华等利用 BIOLOG 研究不同微生物群落对单一碳源底物的利用能力(Sole - Carbon - Source Utilization, SCSU) 的差异,从而获得土壤微生物群落结构和功能多样性方面的信息^[8-10]。具体步骤如下:

- (1)称去相当于 25 g 烘干土样的新鲜土壤。
- (2) 高压灭菌过的三角瓶中加 250 mL 无菌 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH7.0),加

- 入称好的土壤,封口。
- (3)摇床振荡 1 min,冰浴 1 min,共重复 3 次($1:10$ 提取液)。
- (4)静置 2 min;取上清液 5 mL 于灭过菌的 50 mL 的三角瓶中,加入 45 mL 无菌 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液,稍加振荡($1:100$ 提取液)。
- (5)重复步骤(4),直至稀释到每毫升稀释液大约为 $(3-4)\times 10^4$ 个微生物。将 BIOLOG 平板从冰箱内取出,预热到 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- (6)用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 移液器取稀释液加到平板中,每孔加 $150\text{ }\mu\text{L}$,重复 3 次。将加好样的平板进行 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育。
- (7)温育过程中,每隔一定时间,用 318MC 微平板读数器(microplate reader)在 578 nm 处读数。

1.5 数据处理方法

土壤微生物群落 BIOLOG GN 微平板在温育过程中的每孔颜色平均变化率(Average well color development, AWCD)计算方法如下式:

$$\text{AWCD 值} = [\sum (C - R)] / 95$$

式中: C 指各反应孔在 578 nm 下的吸光值, R 是对照孔 $A1$ 的吸光值。用于计算土壤微生物群落功能多样性的公式如表 1,采用反应 72 h 的数据计算。其中在计算 Simpson 指数时,数据扩大了 1 000 倍,以防

表 1 计算土壤微生物群落功能多样性指数的公式^[12-14]

Table 1 Formulas for calculations of functional diversity of soil microbial communities

多样性指数	特点和用途	公式	备注
Shannon 指数	基于信息论范畴的,预测从群落中随机排出一个一定个体的种的平均不定数	$H = -\sum Pi \ln Pi$	Pi 为第 i 个孔相对吸光值 $(C - R)$ 与整个平板相对吸光总值和的比率
Simpson 指数	基于概率论提出的,两个个体同属一个物种的概率,如果概率大,则多样性低,反则高	$D = N(N - 1) / \sum ni(ni - 1)$	ni 是第 I 孔的相对吸光值 $(C - R)$; N 是相对吸光值总和
McIntosh 指数	基于群落物种 S 维空间上的 Euclidian 距离的多样性指数	$U = \sqrt{\sum ni^2}$	S 为颜色变化的孔的数目
Alatalo 均匀度	指群落中不同物种分布的均匀程度	$E = [(\sum Pi^2)^{-1} - 1] / [\exp(-\sum Pi \log Pi) - 1]$	
PIE 相遇几率	表示不同种的个体在随机活动情况下相遇的概率	$PIE = \sum (ni / N) [(N - ni) / (N - 1)]$	

止出现负数。

2 结果与分析

2.1 番茄青枯病防治效果

图 1 显示,新开地番茄没有发生青枯病,连作地番茄于 5 月 19 日开始发病,于 7 月 3 日番茄青枯病发病率达 100%。施用生态有机肥后,连作地番茄青枯病推迟 5 d 发生,青枯病发病率降低至 49.86%。新开地土壤中没有青枯菌存在,因而没有发病,连作地长期种植番茄,土壤中潜伏了大量青枯菌,生态有机

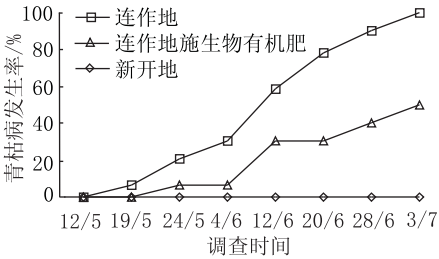


图 1 各处理番茄青枯病发生率的比较

Figure 1 Comparison of development of bacterial wilt on different treatments

肥为植株和土壤微生物提供了丰富的营养,提高了植物的抗病性,促进土壤微生物的腐生性,抑制病菌滋生。

2.2 各处理土壤微生物数量和种类的比较

各处理土壤微生物平板计数结果如表 2。从中发

现:新开地、连作地生态有机肥处理,土壤真菌、放线菌的数量略微增加,细菌的数量变化不大,但最高稀释度平板上分离到的真菌、细菌、放线菌的不同形态菌落数明显增多。

2.3 土壤微生物群落功能多样性测定

表 2 各处理土壤微生物数量的比较

Table 2 Comparison of soil microbial population between different treatments

处理	真菌		细菌		放线菌	
	数量/个·g ⁻¹ 土×10 ⁴	菌落数	数量/个·g ⁻¹ 土×10 ⁷	菌落数	数量/个·g ⁻¹ 土×10 ⁶	菌落数
连作地	2.4	2	1.9	2	2.4	1
施生态有机肥	4.8	4	1.8	5	3.6	2
新开地	4.5	3	2.0	4	3.2	1

注:菌落数是指最高稀释度平板上出现的形态不同的菌落种类。

2.3.1 BIOLOG GN 微平板颜色变化率 (Average Well Color Development, AWCD)

BIOLOG GN 微平板是 96 孔的反应平板,除对照孔 A1 只装有四氮叠茂和一些营养物质外,其余 95 孔还装有不同的单一碳底物,温育过程中,各孔微生物新陈代谢过程中三羧酸循环产生脱氢酶,它能降解四氮叠茂,从而使四氮叠茂变成紫色。在一定时期内颜色变化孔的数目和各孔颜色变化的程度与微生物群落结构和功能有密切的相关性,因此可用于微生物群落功能特性的研究。由于真菌、放线菌的代谢反应不能分解四氮叠茂,此方法只能检测微生物群落中细菌(主要是革兰氏阴性菌)的信息,存在一定的局限,不同的微生物对同一碳源的利用能力是有差异的,微生物对不同单一碳源的代谢指纹并不能简单地归纳为微生物群落的差异,因为土壤微生物在 BIOLOG 系统中生长时,由于环境的改变引起微生物对碳底物实际利用能力的改变,同时在温育过程中存在适应性问题如代谢补偿、代谢适应等^[15,16]。它最大的优点就是快速简便,可获得大量土壤微生物群落结构和功能多样性方面的信息。

各处理土壤微生物的 BIOLOG GN 微平板在温育过程中 AWCD 值变化结果如图 2 所示,土壤微生物群落的 AWCD 值在 BIOLOG GN 微平板温育过程中差异显著,连作地施用生态有机肥后,AWCD 值迅速增加。其土壤微生物利用碳底物的能力增强了。Garland 等(1991)认为土壤微生物群落 BIOLOG GN 微平板反应速度和最终能达到的程度与群落内能利用单一碳底物的微生物数目和种类相关^[8,9],因此从各处理土壤微生物利用碳底物的代谢差异可推测土壤微生物群落组成的差异。

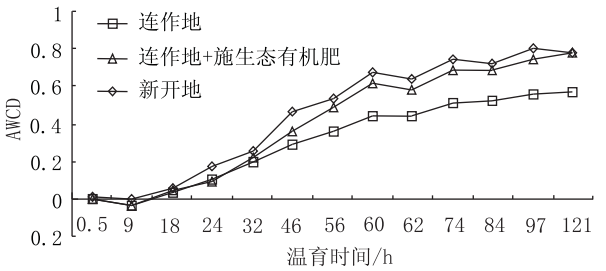


图 2 各处理土壤微生物群落温育过程中 AWCD 变化

Figure 2 AWCD changes during incubation of soil microbial community with different treatments

新开垦土壤原来是自然植被条件下长期自然选择的结果,形成了较和谐、平衡的微生态环境,微生物对不同单一碳底物的代谢能力较强,土壤微生物多样性比较高。连作地多年连作番茄,土壤中积累了大量危害同种作物的病原微生物,破坏土壤微生态平衡,微生物利用不同单一碳底物的种类减少,利用单一碳底物的能力降低,微生物种群结构趋于单一,对作物、环境变化的缓冲容量较小,当番茄种植时,以番茄为寄主的青枯菌容易大量生长,病害发生严重。施用生态有机肥后,改善土壤微生物的营养,尤其是土壤腐生菌的营养,提高了土壤微生物的代谢能力,从而提高了其在土壤中的竞争势,使土壤微生物群落对抗以作物为营养的病原菌的能力提高了,有助于对病害的抑制。

2.3.2 土壤微生物群落功能多样性的分析

由表 3 可知,连作地施用生态有机肥后,其土壤微生物群落的 Shannon 指数略微增加, Simpson 指数、McIntosh 指数、Alatalo 均匀度极显著升高, PIE 相遇几率下降,和新开地土壤差不多。由此看来,连作地施生态有机肥后,土壤微生物的物种多样性和均匀度大

表 3 土壤微生物群落功能多样性

Table 3 Diversity and evenness indices for soil microbial communities

处理	Shannon 指数	S	Simpson 指数	McIntosh 指数	Alatalo 均匀度	PIE 相遇几率
连作地	14. 42B	82B	74. 51B	5. 8C	2. 59B	1. 007
连作地施有机肥	14. 80A	93A	83. 64A	7. 16A	2. 64A	1. 003
新开地	14. 77A	91A	83. 32A	6. 70B	2. 65A	1. 004

大提高, 接近于新开土壤, 使得整个微生物群落趋于和谐、优化、平衡、稳定, 有助于抑制病害。土壤微生物群落在 BIOLOG GN 微平板温育 72 h 时颜色变化孔的数目, 施生态有机肥处理的土壤极显著高于对照。由此说明, 连作地施用生态有机肥后, 其土壤微生物群落中利用不同单一碳底物种类的能力提高, 也同样说明土壤微生物多样性提高。

3 小结

(1) 利用工农业废弃物资源, 根据“基质—菌种”效应配制的生态有机肥对青枯病具有明显的防治效果, 在连作地番茄青枯病发病率为 100% 的情况下, 施用生态有机肥后, 青枯病发病率降低至 49. 86%。

(2) 连作地施用生态有机肥后, 土壤真菌、放线菌的数量略微增加, 可培养的真菌、细菌、放线菌的菌落数明显增多, 土壤微生物群落在 BIOLOG GN 微平板温育过程中, 其 AWCD 值、Simpson 指数、McIntosh 指数、Alatalo 均匀度极显著升高, PIE 相遇几率下降。

由此说明, 施生态有机肥, 改善了土壤微生物的营养条件, 提高了土壤微生物多样性, 从生态水平上抑制了番茄青枯病的发生。

(3) 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的恶化, 引起土传病害滋生。通过加强筛选有机肥料和有益微生物, 加工研制肥料品种、合理施肥、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。

参考文献:

[1] Hartman G L, Elphinstone J G. Adance in the control of *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Bull Okayama Tob Exp Stn*, 1994, 42: 127 – 138.

[2] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65 – 87.

[3] Masaya Nishiyama, Yoshitaka Shiomi, Sea Suzuki. Suppression of growth

of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings cultivated in a suppressive soil[J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 1999, **45**(1): 79 – 87.

[4] Yoshitaka Shiomi, Masaya Nishiyama, Tomoko Onizuka. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(9): 3 996 – 4 001.

[5] Sun S K, Huang J W. Formulated soil amendment for controlling fusarium wilt and orther soilbrone disease[J]. *Plant Disease*, 1985, 69: 917 – 920.

[6] Hsu S T, et al. Effect of soil amendments on survival of *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Plant Prot, BULL*. 1989, 31: 21 – 33.

[7] Zhang Jiaen, Liao Zongwen. Discussion on soil ecological fertility and its cultivation[J]. *Soil and Environmental Sciences(Chinese)*, 2000, **9**(3): 253 – 256.

[8] Yang Yonghua, Yao Jian, Hua Xiaomei. Effect of microbial communities from pesticide – contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Microbiology*, 2000, **20**(2): 23 – 25.

[9] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities of on the basis of patterns of community – level sole – carbon – source utilization[J]. *Appli Environ Microbiol*, 1991, 57: 2 351 – 2 359.

[10] Kelly J J, Tate R L. Use BIOLOG for the analysis of microbial communities from Zinc – contaminated soil[J]. *J Environ Qual*, 1998, 27: 600 – 608.

[11] YAO Ge, ZHANG Fan, LI Zhou. Control of bacterial wilt with soil amendment[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1994, **10**(3): 106 – 109.

[12] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, N. J. 1998.

[13] Atlas R M. Diversity of microbial community[J]. *Adv Microb Ecol*, 1984, 7: 1 – 4.

[14] 骆世明, 彭少麟. 农业生态系统分析[M]. 广州: 广东科技出版社, 1996.

[15] Campbell C D, Grayston S J, Hirst D J. Use of rhizosphere carbon sources in sole – carbon – source tests to discriminate soil microbial communities[J]. *J Microbiol Methods*, 1997, 30, 33 – 41.

[16] Zak J, Willig M, Moorhead D, Wildman H. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach[J]. *Soil Biol Biochem*, 1994, 26, 1 101 – 1 108.

[17] Howard P J A. Analysis of inter – sample distances from BIOLOG plate data in Euclidean and simplex spaces[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1 323 – 1 330.