

稻秸秆覆盖对麦田细菌种群数量及小麦纹枯病发生的影响

曹启光^{1,2}, 陈怀谷^{2*}, 杨爱国³, 张银贵³, 林玲², 于汉寿^{1*}

(1 南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 3 江苏省姜堰市植保植检站, 江苏姜堰 225529)

摘要: 采用稀释平板计数法分析了秸秆覆盖麦田和未秸秆覆盖麦田的细菌数量变化, 并系统调查了小麦纹枯病的发生。结果表明, 秸秆覆盖麦田总细菌及荧光假单胞菌数量比未秸秆覆盖麦田有明显的提高; 稻秸秆覆盖有增加麦田总细菌和荧光假单胞菌的效应, 前期高于后期; 秸秆覆盖田块和未秸秆覆盖田块小麦根际拮抗菌所占比例无显著差异, 90% 以上的荧光假单胞菌对小麦纹枯病菌具拮抗能力; 秸秆覆盖田小麦纹枯病发生比未秸秆覆盖田有明显降低。

关键词: 秸秆覆盖; 荧光假单胞菌; 小麦纹枯病

中图分类号: S435.121.4

由禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 侵染所引起的小麦纹枯病是我国长江流域及黄淮平原麦区的重要病害。病菌以菌丝和菌核等在土壤中越冬和越冬, 从小麦苗期开始即可以侵染小麦茎基部叶鞘, 并可侵染茎秆。在叶鞘和茎秆上形成云纹状病斑, 影响植株营养和水分的输导, 严重的可形成枯孕穗和枯白穗, 导致小麦减产。和其他土传病害一样, 目前对小麦纹枯病还没有有效的控制方法。当前生产上应用的小麦品种都较易感染病害。由于小麦纹枯病为茎基部病害, 药剂防治技术要求高, 所需药量大, 加上病害早期症状不明显, 易被忽视, 往往使防治适期错过^[1]。

小麦纹枯病由上世纪 70 年代零星发生到现在的大面积发生, 可能与多种因素有关。小麦播期的提前, 增加了小麦冬前的发病基数, 使小麦纹枯病发生危害加重。耕作栽培制度的变化可能也是小麦纹枯病发生加重的重要因素。稻套麦、板茬麦等方式的采用, 使土壤湿度加大、植物根系发育不良, 从而使病害发生加重。近 20 年来, 小麦品种结构也发生了很大的变化。种植措施的变化势必会影响土壤的营养结构, 如从上世纪 80 年代以来, 土壤中的速效 K 含量逐年下降^[2]。土壤养分变化仅是耕作栽培措施带来的变化之一, 土壤的物理结构和微生物

群落也会发生相应的变化, 从而影响小麦纹枯病等土传病害的发生。

秸秆覆盖具有增加土壤养分含量、改善土壤结构等作用, 既可为作物生长提供养分来源, 又有利于土壤水分的保蓄^[3]。秸秆覆盖后土壤有机质含量的增加为土壤微生物提供了良好的生存环境, 使得土壤微生物的种类和数量有所增加, 提高了土壤微生物的活性^[4]。因此, 秸秆还田在江苏等地得到了较大面积的推广。在应用中, 刁春友等^[5]发现稻秸秆还田可以显著控制小麦纹枯病的发生, 初步分析后认为秸秆还田控病作用与土壤中的速效 K 有关。本研究对稻秸秆还田对小麦根际和非根际总细菌、荧光假单胞菌和小麦纹枯病菌拮抗菌数量的影响进行了调查, 旨在分析秸秆还田控制小麦纹枯病作用的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验地 试验在江苏省姜堰市姜堰镇三元村一农户田进行。试验田面积约 2000 m², 共 6 畦。前茬所栽作物为水稻。小麦品种扬麦 12, 于 2004 年 10 月 29 日播种, 采用撒播方式。试验田土壤为砂性土壤。土壤基本性状见表 1。

①基金项目: 国家攻关项目 (2001BA509B03) 资助。

* 通讯作者 (huaigu@jaas.ac.cn; yuhans@njau.edu.cn)

作者简介: 曹启光 (1980—), 男, 安徽人, 硕士研究生, 主要从事小麦根际微生物生态研究。

表 1 试验田土壤基本情况

Table 1 Basic properties of the tested soils

试验田	pH	N (g/kg)	有效 P (mg/kg)	有效 K (mg/kg)
覆盖秸秆田	7.3	1.45	22	76
未覆盖秸秆田	7.3	1.41	21	72

1.1.2 培养基 分离总细菌采用大豆蛋白胨琼脂培养基 (TSA) [6], 组成为胰化蛋白胨 7.5 g, 大豆蛋白胨 2.5 g, NaCl 2.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0~7.6; 分离荧光假单胞菌采用 Gould's S1 培养基 [7], 组成为蔗糖 10 g, 甘油 10 ml, 酸水解酪蛋白 5 g, NaHCO₃ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, K₂HPO₄ 2.3 g, 月桂酰肌氨酸钠 1.2 g, 甲氧苄氨嘧啶 20 mg, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.4~7.6, 甲氧苄氨嘧啶在培养基灭菌后、冷却至 50~60 时后加入。

1.2 方法

1.2.1 试验处理 在小麦播种后出苗前, 将切成 5~6 cm 长的稻草秸秆均匀地铺在农田土壤上 [8]。覆盖量为 2250 kg/hm²。试验田共分 2 块, 一半进行秸秆覆盖处理, 另一半不进行秸秆覆盖处理。

1.2.2 土样采集 用土铲挖出整株小麦植株 (带土), 用手轻抖小麦植株根系, 收集抖落的土壤 (非

根际土) 和粘附在根系上的土壤 (根际土)。

1.2.3 土样处理 将收集的土壤过 2 mm 筛去毛根, 室温下晾干。称取 5 g 土样, 放入盛有 50 ml 无菌水的三角瓶中, 振荡约 30 min。使土与水充分混合, 将菌分散。取 1 ml 土壤悬液注入盛有 9 ml 无菌水的试管中, 吹吸 3 次, 并振摇使之充分混匀。然后再用 9 ml 无菌水进行梯度稀释。将稀释后溶液 (总细菌稀释倍数 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶, 荧光假单胞菌稀释倍数 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵) 吸取 0.1 ml 放入 TSA 和 Gould's S1 培养基, 涂布均匀。在室温下培养 2~3 天。

1.2.4 细菌的拮抗实验 从每个处理样品的分离平板上随机挑选 100 个菌株, 在 PDA 培养基上, 与小麦纹枯病菌进行对峙培养 [9], 22 培养 5~7 天; 测量抑菌带宽度, 并计算拮抗菌株所占比例和抑菌带的平均宽度。

1.2.5 纹枯病发病情况调查 利用 4 级法调查小麦纹枯病的发生情况, 计算病株率、病情指数 [10]。

2 结果与分析

2.1 秸秆覆盖对小麦根际和非根际总细菌的影响

结果表明 (图 1), 在 4 个取样时间, 秸秆覆盖田的小麦根际和非根际总细菌数量比未秸秆覆盖田有明显的提高。秸秆覆盖田的小麦根际总细菌数量

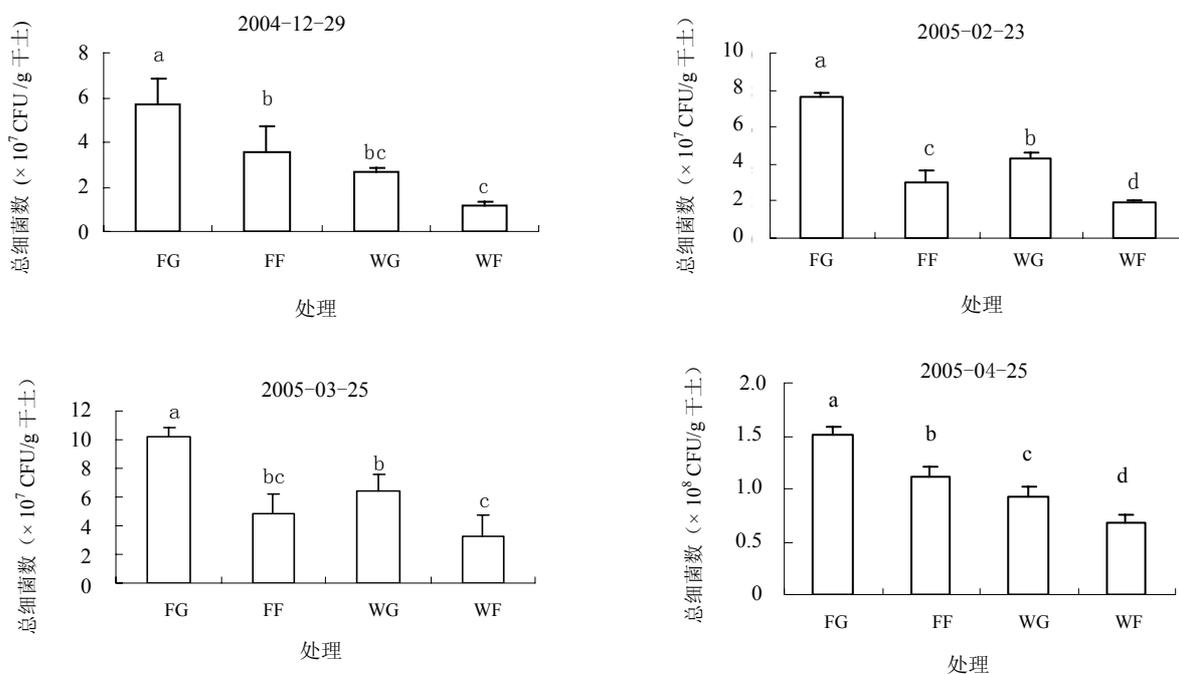


图 1 秸秆覆盖和未覆盖麦田土壤总细菌数量 (FG, 秸秆覆盖田根际土; FF, 秸秆覆盖田非根际土; WG, 未秸秆覆盖田根际土; WF, 未秸秆覆盖田非根际土; 下同)

Fig. 1 Total amount of bacteria in soils of straw mulched and not-mulched wheat fields

为 $5.7 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^8$ CFU/g 干土,而未秸秆覆盖田为 $2.7 \times 10^7 \sim 9.3 \times 10^7$ CFU/g 干土。秸秆覆盖田的小麦非根际总细菌数量为 $3.0 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$ CFU/g 干土,未秸秆覆盖田为 $1.2 \times 10^7 \sim 5.7 \times 10^7$ CFU/g 干土。秸秆覆盖后不同时期的效应有所不同。前期特别是冬前和冬后返青期秸秆覆盖增加细菌的效应强于后期。2004 年 12 月份,秸秆覆盖田小麦根际和非根际细菌总数量均为未秸秆覆盖田的 2 倍以上,秸秆覆盖效应高于根际效应,由于当时稻秸秆还未开始腐烂,这种作用可能是由于覆盖的秸秆起到增温保湿作用,从而增加了土壤中的细菌总量。2005 年 2 月与 3 月,由于覆盖的秸秆没有完全腐烂,不能给微生物补充充足的能源,因此未秸秆覆盖田小麦根际总细菌数量比秸秆覆盖田小麦非根际总细菌数量高。到 4 月份,覆盖的秸秆完全腐烂,增加了土壤的肥力,秸秆覆盖田小麦非根际总细菌数量显著高于未秸秆覆盖田小麦根际总细菌数量,秸秆覆盖效应比

较明显(图 1)。

2.2 秸秆覆盖对麦田荧光假单胞菌数量的影响

利用 Gould's S1 培养基,对秸秆覆盖后 4 个不同时间采集土样中的荧光假单胞菌进行了选择性分离。分离结果表明,秸秆覆盖田小麦根际和非根际荧光假单胞菌数量比未秸秆覆盖田都有明显的提高。秸秆覆盖田,小麦根际荧光假单胞菌数量为 $3.7 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ CFU/g 干土,未秸秆覆盖田为 $2.5 \times 10^6 \sim 7.2 \times 10^6$ CFU/g 干土,秸秆覆盖田小麦非根际荧光假单胞菌数量为 $1.6 \times 10^6 \sim 8.3 \times 10^6$ CFU/g 干土,而未秸秆覆盖田为 $9.0 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^6$ CFU/g 干土。小麦根际荧光假单胞菌数量显著高于非根际。秸秆覆盖后的不同时期的效应也有所不同,在 2004 年 12 月、2005 年 2 月,秸秆覆盖田小麦非根际荧光假单胞菌的数量约为未覆盖的 2 倍,而在 2005 年 3 月和 4 月,秸秆覆盖田根际荧光假单胞菌数量增幅大于非根际,显著高于非秸秆覆盖田(图 2)。

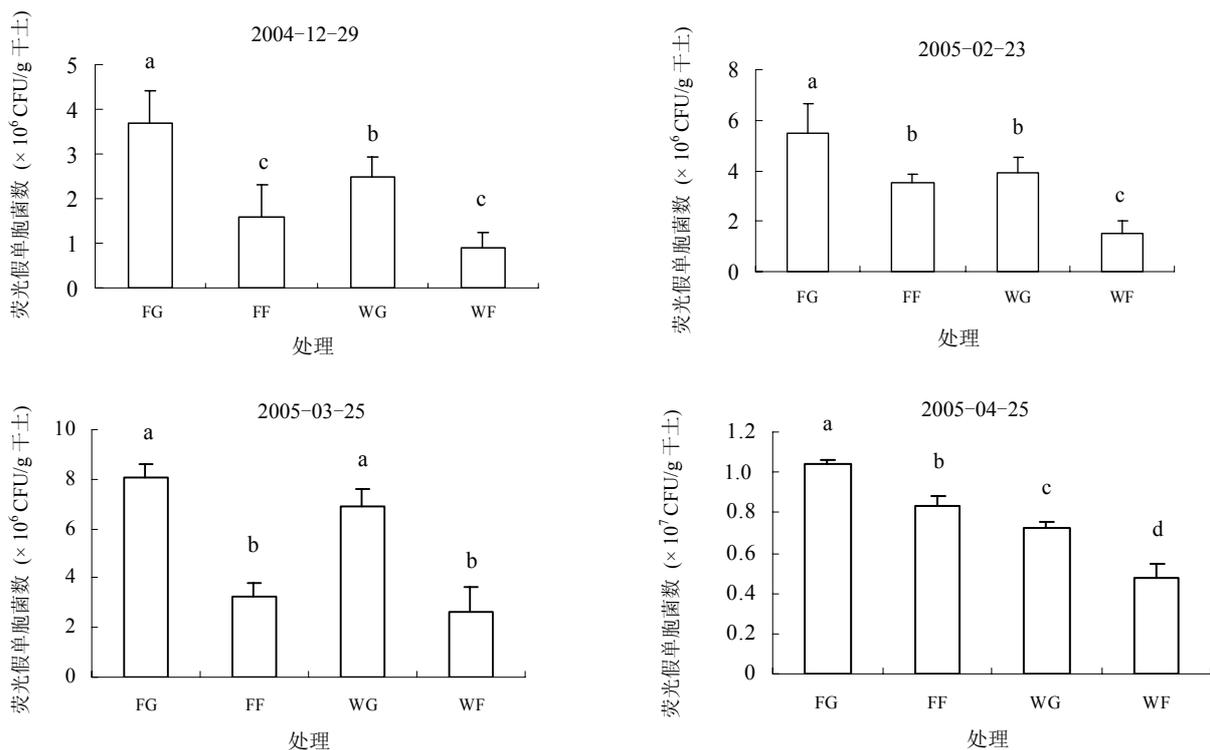


图 2 秸秆覆盖和未覆盖麦田土壤荧光假单胞菌数量

Fig. 2 Amount of *pseudomonas* in soils of straw mulched and not-mulched wheat fields

2.3 小麦根际细菌中的纹枯病菌拮抗菌

从秸秆覆盖田和未秸秆覆盖田中分离的总细菌和荧光假单胞菌中分别随机挑选 100 个菌株,通过

与小麦纹枯病菌进行对峙培养,计算拮抗菌所占的比例。从总细菌挑选的菌株中,秸秆覆盖田拮抗菌所占的比例略高于未秸秆覆盖田拮抗菌所占的比

例,但两者差异不显著。荧光假单胞菌菌株中,秸秆覆盖田拮抗菌所占的比例也略高于未秸秆覆盖田,两者差异也不显著。不管是秸秆覆盖田还是未秸秆覆盖田,小麦根际荧光假单胞菌中,拮抗菌所占的比例都在 90% 以上,显著高于总细菌中的比例。秸秆覆盖田小麦根际总细菌中拮抗菌的平均抑菌带大于未秸秆覆盖田根际总细菌中的拮抗菌,抑菌带宽度在 0.7 cm 以上;秸秆覆盖田小麦根际荧光假单胞菌中拮抗菌的平均抑菌带大于未秸秆覆盖田小麦根际荧光假单胞菌中的拮抗菌,抑菌带宽度在 0.9 cm 以上(表 2)。

2.4 秸秆覆盖对小麦纹枯病害发生的影响

在不同时期对秸秆覆盖田和未秸秆覆盖田小麦纹枯病的病情进行调查,结果表明(图 3),秸秆覆盖田小麦纹枯病发生率明显低于未秸秆覆盖田。2005 年 2 月秸秆覆盖田小麦纹枯病病株率为 1.6%,病情指数为 0.39;未秸秆覆盖田小麦纹枯病病株率为 5.4%,病情指数为 1.34。在小麦纹枯病病株率和病情指数最高的 4 月,秸秆覆盖田小麦纹枯病病株率为 22.1%,病情指数为 11.03;未秸秆覆盖田小麦纹枯病病株率为 38%,病情指数为 17.5。可见,秸秆覆盖控病作用明显。

表 2 小麦根际细菌对纹枯病菌的拮抗性

Table 2 Antagonism between wheat rhizosphere bacteria and *Rhizoctonia cerealis*

采样日期 (年-月-日)	指标	秸秆覆盖田		未秸秆覆盖田	
		总细菌	荧光假单胞菌	总细菌	荧光假单胞菌
2004-12-29	拮抗菌比例(%)	67	99	65	95
	平均抑菌带(cm)	0.75	0.92	0.68	0.89
2005-02-23	拮抗菌比例(%)	54	100	49	99
	平均抑菌带(cm)	0.78	0.93	0.7	0.91
2005-03-25	拮抗菌比例(%)	47	97	39	91
	平均抑菌带(cm)	0.77	0.95	0.69	0.9
2005-04-25	拮抗菌比例(%)	45	98	42	95
	平均抑菌带(cm)	0.74	0.94	0.72	0.87

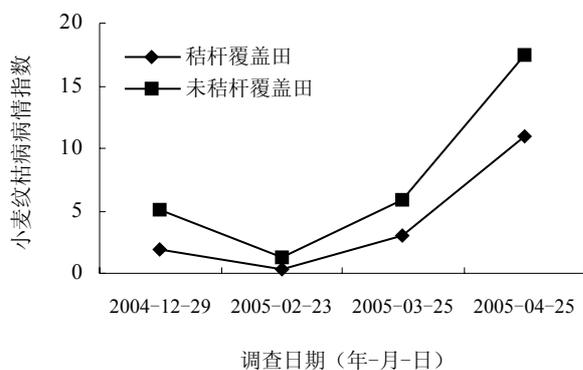


图 3 秸秆覆盖和未覆盖田小麦纹枯病病情指数调查

Fig. 3 Disease index of wheat sharp eye-spot in wheat fields straw mulched and not-mulched

3 讨论

目前,秸秆还田已在江苏等地得到了较大面积的推广。近年来,本实验室在前人调查分析的基础上,在江苏省姜堰市对稻秸秆还田控制小麦纹枯病的效果进行了较为系统的调查,进一步明确了稻秸

秆还田对小麦纹枯病的控制作用,并初步明确秸秆还田可以增加小麦根际的细菌总量。据此我们认为,稻秸秆还田对小麦纹枯病控制作用,除了可增加土壤中的速效 K 外,可能还与秸秆还田所带来的微生物变化有关。本研究在同一块农田中,分别进行了稻秸秆覆盖和未覆盖处理,对秸秆覆盖后小麦根际和非根际细菌数量及其纹枯病病害发生进行了系统调查,明确了稻秸秆还田可以控制小麦纹枯病的发生。在小麦 4 个生长期(苗期、分蘖期、拔节期、抽穗期),稻秸秆覆盖均能显著增加小麦根际、非根际总细菌的数量,其原因可能是覆盖的秸秆中含有一定量有机质,施入土壤后提高了土壤有机质含量^[11]。有机质是土壤微生物活动的主要能量来源,是微生物的“食物”。其次,秸秆覆盖具有增加土壤养分,改善土壤物理结构,如通气条件、保温等^[12],从而有利于微生物的生长繁殖。秸秆富含纤维素、半纤维素等物质,因此秸秆还田能够激发微生物活性,促进微生物的繁殖,增强呼吸作用以及氨化、硝化等作用,从而引起微生物群落组成的变化^[13]。

本研究利用稀释平板分离培养法证实了覆盖秸秆可显著增加小麦根际和非根际可培养的细菌数量, 至于覆盖秸秆对小麦根际和非根际细菌包括不可培养菌的群体结构的影响有待进一步的研究。

荧光假单胞菌是小麦根际的优势种群。在对小麦全蚀病衰退现象和抑病土壤的机制分析中, 研究发现荧光假单胞菌在许多抑菌土壤中起主要作用。荧光假单胞菌可以抑制棉花立枯病 (*Rhizoctonia solani*)^[14]、棉花猝倒病 (*Pythium ultimum*)^[15-16]、小麦根腐病 (*Pythium spp.*)^[17]、烟草黑胫病 (*Phytophthora parasitica var. nicotianae*)^[18] 以及水稻鞘腐病 (*Sarocladium oryzae*)^[19] 等的发生。其主要机制为荧光假单胞菌可产生 2, 4-二乙酰藤黄酚 (2, 4-DAPG)、吩嗪酸 (PCA) 等抗生素。本研究的结果也表明, 荧光假单胞菌为小麦根际的重要细菌种群, 90% 以上从小麦根际分离的荧光假单胞菌株都对小麦纹枯病菌有拮抗作用, 平均抑菌带的宽度在 0.9 cm 以上。秸秆覆盖能显著增加小麦根际和非根际荧光假单胞菌的数量。因此, 进一步分析秸秆覆盖对小麦根际荧光假单胞菌群落的影响, 有助于明确秸秆还田的抑病机理。

参考文献:

- [1] 刘朝晖, 张旭, 陆维忠. 小麦纹枯病的研究进展和对策. 江苏农业学报, 2000, 16 (3): 185-190
- [2] 刁春友, 李希平, 韩梅, 陆云梅. 江苏省麦类纹枯病发生情况回顾和影响因素探析. 植保技术与推广, 1999, (1): 11-14
- [3] 沈裕琥, 黄相国, 王海庆. 秸秆覆盖的农田效应. 干旱地区农业研究, 1998, 16 (1): 45-50
- [4] 高云超, 朱文珊, 陈文新. 秸秆覆盖免耕对土壤细菌群落区系的影响. 生态科学, 2000, 19 (3): 27-31
- [5] 刁春友, 缪荣蓉, 陆云梅. 江苏省小麦纹枯病发生区域分布原因探析. 江苏农业科学, 1998 (2): 38-40
- [6] Smit E, Leeftang P, Gommans S, Van Dan Broek J, Van Mil S, Wernars K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (5): 2284-2291
- [7] Gould WD. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent *Pseudomonas* from various habitats. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49 (1): 28-32
- [8] 缪荣蓉, 刁春友, 张银贵, 黄玉富, 杨爱国, 王生元. 浅析覆盖稻草及秸秆还田对小麦纹枯病的控制作用. 植保技术与推广, 1998, 1 (4): 10-12
- [9] 林玲, 陈怀谷, 刘磊, 张爱香, 王裕中, 史建荣. 小麦纹枯病菌拮抗细菌的筛选及生物活性测定. 江苏农业学报, 2003, 19 (3): 187-188
- [10] 王裕中. 纹枯病及其抗性研究 // 庄巧生, 杜振华主编. 中国小麦育种研究进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, 266-274
- [11] Bhatti AU, Khan Q, Gurmani AH, Khan MJ. Effect of organic manure and chemical amendments on soil properties and crop yield on a salt affected entisol. Pedosphere, 2005, 15 (1): 46-51
- [12] 吕彪, 秦嘉海, 赵芸晨. 麦秸覆盖对盐渍土肥力及作物产量的影响. 土壤, 2005, 37 (1): 52-55
- [13] 卜元卿, 黄为一. 稻秸对土壤细菌群落分子多态性的影响. 土壤学报, 2005, 42 (2): 271-277
- [14] Howell CR, Stipanovic RD. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology, 1979, 69: 480-482
- [15] Howell CR, Stipanovic RD. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology, 1980, 70 (8): 712-715
- [16] Loper JE. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. Phytopathology, 1987, 78: 165-172
- [17] Becker JO, Cook RJ. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased growth response of wheat by fluorescent *pseudomonads*. Phytopathology, 1988, 78: 778-589
- [18] Keel C, Voisard C, Berling CH, Kahr G, Defago G. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO under anotobotic conditions. Phytopathology, 1989, 79: 584-589
- [19] Sakthivel N, Gnanamanickam SS. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53 (9): 2056-2059

Effects of Straw Mulching on Population Number of Bacteria in Wheat Field and Incidence of Wheat Sharp Eye-Spot

CAO Qi-guang^{1,2}, CHEN Huai-gu², YANG Ai-guo³, ZHANG Yin-gui³, LIN Ling², YU Han-shou¹

(1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Agricultural Ministry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3 Plant Protection Station of Jiangyan City, Jiangsu Province, Jiangyan, Jiangsu 225529, China)

Abstract: In order to define the effect of straw-mulching on population number of bacteria in wheat fields and the relationship between straw-mulching and wheat sharp eye-spot, variation of population of bacteria was analysed with the dilution plate counting method and incidence of wheat sharp eye-spot investigated. Results showed that the total number of bacteria and *fluorescent pseudomonads* was much higher in straw-mulched plots than in not-mulched. The effect of straw-mulching on total number of bacteria and *fluorescent pseudomonads* was greater in the earlier stage than in the later stage. No significant difference was found in the proportion of antagonistic bacteria between straw-mulched and not-mulched fields. More than 90% of the *fluorescent pseudomonad* strains were antagonistic to *Rhizoctonia cerealis*. The incidence of wheat sharp eye-spot in straw-mulched fields was lower than in not-mulched.

Key words: Straw-mulching, *Fluorescent pseudomonads*, *Rhizoctonia cerealis*