

土壤微生物制剂防治草莓连作病害的研究

张丽萍, 黄亚丽, 程辉彩, 张根伟, 董超, 陈瑞勤

(河北省生物研究所, 石家庄 050051)

摘要: 木霉 T_{42} 与枯草芽孢杆菌 Bs-6 对引起草莓连作病害的主要病原菌尖孢镰刀菌和立枯丝核菌有明显的拮抗作用。应用实验表明, 由 T_{42} 与 Bs-6 组成的复合生物制剂能显著促进连作草莓的营养生长和生殖生长, 连作草莓的死苗率由 52.9% 降低到 8.2%, 产量增加 111%, 果实品质显著提高。

关键词: 草莓; 连作病害; 生物防治

中图分类号: S431.2

草莓, 重茬地发病率可达 89.2%, 由于耕地限制及设施栽培, 往往不能进行规范轮作, 连作病害成为草莓产业可持续发展的主要障碍。防治草莓连作障碍常采取的措施是采用溴甲烷熏蒸, 但易造成果农中毒、果实和环境污染等问题^[1]。当前利用拮抗微生物控制连作病害备受青睐^[2-4], 但单一生物菌剂田间应用效果往往不稳定; 这是由于土壤微生态环境复杂, 单一菌剂的使用难以改变土壤微生态失衡的状况。应用微生物理论, 使生物防治从单纯依靠拮抗微生物控制病害发展到借助多种因素创造有利寄主、不利病原菌的生物环境来防治植物病害是一个新的研究方向^[4-6]。本研究在对河北省草莓连作病原菌分离、获得高致病力尖孢镰刀菌、立枯丝核菌的基础上^[7], 研究草莓连作病害的生防菌类, 旨在探索防治草莓连作障碍切实、可行的方法, 并提出用复合生物制剂进行防治的措施。

1 材料与方法

1.1 材料

供试草莓品种: 丰香。

供试微生物: 木霉 T_{42} (*Trichoderma* sp.) 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*), 本实验室分离、保存; 枯草芽孢杆菌 Bs-6 (*Bacillus subtilis*), 俄罗斯科学院西伯利亚分院提供。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的制备 采用本研究室发酵工艺, 木霉 T_{42} 采用液固两相法制备, 枯草芽孢杆菌 Bs-6 由摇瓶或 20 L 发酵罐 28℃ 培养制备。

1.2.2 拮抗菌对病原菌菌丝的抑制试验 采用

双向培养法, 即用打孔器打直径 4 mm 的病原菌菌块放入 PDA 平板距中心 2 cm 处, 同样的方法取拮抗菌菌块放在与病原菌对称的位置。25℃ 培养, 定期测量生长半径。以病原菌纯培养为对照, 计算满皿时的抑制率。

抑制率 = (对照病原菌的半径 - 病原菌向生防菌生长的半径) / 对照病原菌的半径 × 100%

1.2.3 拮抗菌对病原菌孢子萌发的抑制试验^[8]

病原菌孢子置于不同浓度的拮抗菌液中, 振荡均匀, 滴加在琼脂波片上, 25℃ 培养 24 h 后镜检萌发情况, 以清水为对照。

1.2.4 生物制剂对草莓连作病害的防治试验

生物制剂以草炭吸附, 同时进行盆栽和田间实验, 设 3 个处理 (T), T_1 施入木霉 T_{42} 、 T_2 施入枯草芽孢杆菌 Bs-6、 T_3 施入木霉 T_{42} 与枯草芽孢杆菌 Bs-6 的复合制剂 (浓度分别为 T_1 和 T_2 的 50%)。用量盆栽为每盆 10 g, 田间应用为 10 kg/667m²。菌剂施入为底施, 以灭菌土 (盆栽实验) 或正茬土 (田间实验) 为阳性对照 (CK₂), 3 年连作土为阴性对照 (CK₁), 对照中都施入等重量的草炭; 每处理 3 次重复, 随机排列, 田间小区面积 20 m², 栽培管理相同。草莓生育期间测定不同生育时期的草莓株高、茎粗及生物量 (盆栽); 以及草莓果数及果重、植株死亡率, 采收后测定果实维生素 C 及糖、酸含量。其中可滴定酸含量用 NaOH 中和滴定法测定, Vc 含量用 2, 6-二氯酚靛酚滴定法测定^[9]; 总糖、还原糖采用斐林试剂法测定, 蔗糖采用旋光测定法测定^[10]。

基金项目: 河北省国际科技合作项目 (02295505D) 和河北省科技攻关项目 (02220127D) 资助。

作者简介: 张丽萍 (1969—), 女, 河北沽源人, 硕士, 副研究员, 主要从事农业微生物研究。E-mail: lizzle-69@163.com

2 结果与分析

2.1 拮抗菌对病原菌菌丝的抑制作用

实验结果见表 1，平板对峙培养时，木霉 T₄₂ 和枯草芽孢杆菌 B_S-6 对病原菌 *F. oxysporum* 和 *R. solani* 均有明显的抑制作用，两种拮抗菌都可以使病原菌生长速度减慢。其中木霉 T₄₂ 生长速度快，随着菌落的扩

展，病原菌逐渐被木霉覆盖，停止生长或死亡；对立枯丝核菌抑制率相对较低，为 55.0%，但满皿后经过 2 天的共存期，木霉不断在立枯丝核菌上生长，最终覆盖病原菌。枯草芽孢杆菌 B_S-6 可使病原菌的生长活力下降，在两菌落交界处，形成明显的抑菌带，这说明枯草芽孢杆菌 B_S-6 能产生某种抑菌物质。

表 1 拮抗菌对病原菌的抑菌作用

Table 1 Inhibiting effect of B_S-6 and T₄₂ on pathogenic fungus

		枯草芽孢杆菌 B _S -6		木霉 T ₄₂	
		立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌
菌生长半径	处理	40	38	27	14
(mm)	CK	60	60	60	60
抑制率 (%)		33.3	36.7	55.0	76.7

2.2 拮抗菌对病原菌孢子萌发的影响

由表 2 可以看出：二种拮抗菌对病原菌孢子萌发均有很强的抑制作用，随着菌液浓度的增加抑制作用

加强；浓度为 5×10^7 cfu/ml 时，抑制率均 > 70%。相同浓度下，复合菌剂处理的病原菌孢子萌发率明显低于单一菌剂，表现出增效作用。

表 2 不同浓度拮抗菌对病原菌孢子萌发的影响 (萌发率 %)

Table 2 Effect of B_S-6 and T₄₂ on spore germination of pathogenic fungus related to concentration

浓度 (cfu/ml)	木霉 T ₄₂		枯草芽孢杆菌 B _S -6		复合菌剂	
	尖孢镰刀菌	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	立枯丝核菌
5×10^6	75	78	63	72	58	66
1×10^7	52	56	41	47	32	42
5×10^7	38	42	24	29	14	25
CK	86	86	89	89	87	87

2.3 生防菌剂对草莓连作病害的防治效果

2.3.1 不同处理对草莓营养生长的影响 由图 1 ~ 3 可以看出，不同生物菌剂对草莓生长均有一定的促进作用，3 种处理草莓的株高、茎粗、生物量等指标均

优于连作对照。这表明微生物制剂在一定程度上改善了土壤的微生态环境，抑制了病原菌的生长，促进了连作草莓的生长发育，从而减轻了连作病害的病症，其中以处理 3 使用复合制剂的效果最好。

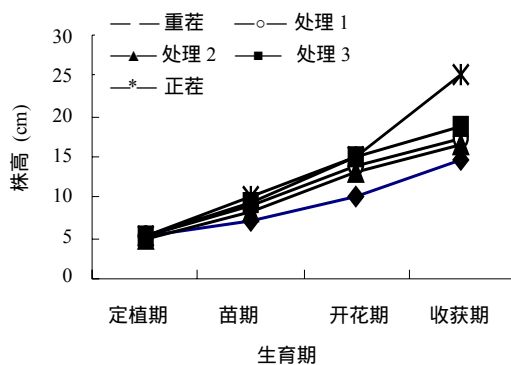


图 1 不同处理对草莓株高的影响

Fig. 1 Plant heights of strawberry in different treatments

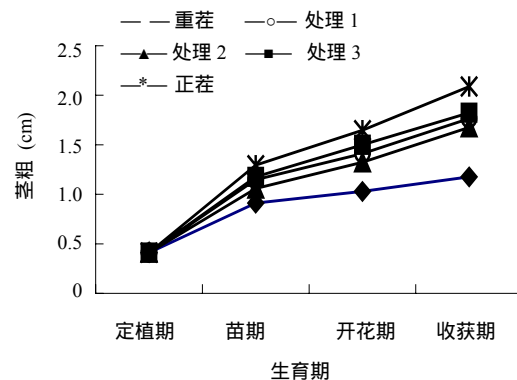


图 2 不同处理对草莓茎粗的影响

Fig. 2 Stem diameters of strawberry in different treatments

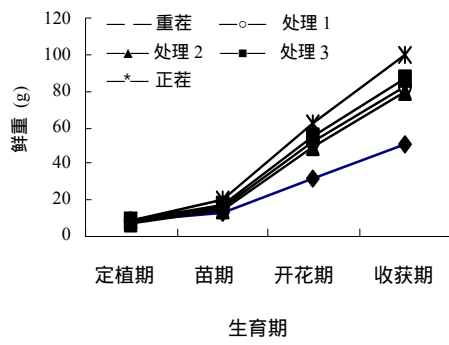


图 3 不同处理对草莓鲜重的影响

Fig. 3 Fresh weights of strawberry in different treatments

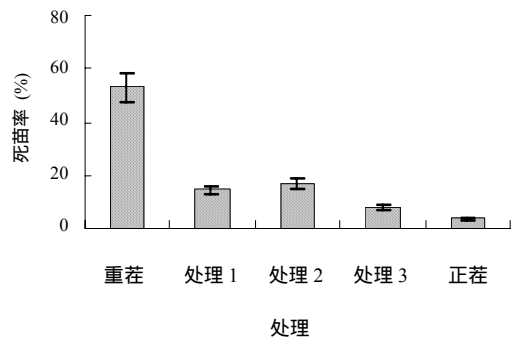


图 4 不同处理对草莓死苗率的影响

Fig. 4 Dead seedling rate of strawberry in different treatments

2.3.2 不同处理对草莓连作死苗率的影响 草莓连作导致死苗率增加, 实验结果见图 4, 可以看出各处理植株死亡率最高为 52.9%, 依次为处理 2 是 18.9%、处理 1 是都显著低于对照, 其中连作处理死苗 14.5%、处理 3 是 8.2%, 正茬对照死苗率最低为 3.5%。可见土壤中施入微生物制剂均可有效提高草莓抗连作障碍的能力, 施用复合生物制剂具有更好的防治效果。

2.3.3 不同处理对草莓生殖生长的影响 实验结果见表 3, 可以看出, 3 个处理都能使连作草莓的生育

期提前。其中处理 3 使草莓的开花期提前 6 天, 收获期提前 10 天; 处理 2 分别提前 6 天、9 天; 处理 1 分别提前 4 天、6 天。

表 4 实验结果可以看出, 不同处理不同采收时间收获的草莓量不同, 施入生物制剂使草莓产量增加。对总产量进行差异显著性分析表明, 3 处理的产量与连作对照存在显著差异; 使用复合制剂的处理 3 产量最高, 与处理 1 和处理 2 之间也表现出显著的差异。

表 3 不同处理对草莓生殖生长的影响

Table 3 Effects of treatments on reproductive growth of strawberry

生育期	CK ₁	T ₁	T ₂	T ₃	CK ₂
开花期 (月/日)	11/24	11/20	11/20	11/18	11/15
收获期 (月/日)	2/21	2/15	2/17	2/13	2/08

表 4 不同处理草莓不同时间的采收量 (kg/小区)

Table 4 Effect of treatments on yield of strawberry at different harvesting time

测定日期 (月/日)	CK ₁	T ₁	T ₂	T ₃	CK ₂
2/08	0.00 ± 0.00D	0.32 ± 0.05C	0.00 ± 0.00D	2.04 ± 0.07B	2.81 ± 0.16A
2/21	0.06 ± 0.01De	1.65 ± 0.06Bb	1.02 ± 0.08Cd	1.23 ± 0.05BCc	1.95 ± 0.09Aa
2/30	0.12 ± 0.02Cc	1.23 ± 0.04B	1.54 ± 0.10Aa	1.68 ± 0.04Aa	1.35 ± 0.08ABb
3/23	7.10 ± 0.32Bd	8.74 ± 0.41Bc	8.07 ± 0.29Bc	9.57 ± 0.41Ab	10.21 ± 0.38Aa
4/02	1.63 ± 0.08Cd	3.87 ± 0.12Bc	4.01 ± 0.11Bbc	4.21 ± 0.28Bb	5.22 ± 0.21Aa
合计	8.91 ± 0.45D	15.81 ± 0.56C	14.64 ± 0.37C	18.83 ± 0.63B	21.53 ± 0.49A
增量 (%)	-	77.4	64.3	111	-

注: 表中同行数据后不同大写字母表示在 P < 0.01 水平上差异显著, 小写字母表示在 P < 0.05 水平上差异显著 (下同)。

2.3.4 不同处理对草莓品质的影响 由表 5 可以看出, 与连作对照相比, 施用生物制剂可提高草莓果实维生素 C、蔗糖、总糖含量, 降低可滴定酸含量, 糖

酸比提高, 这表明使用生物制剂可提高草莓的品质。与连作对照相比, 处理 3 差异最显著; 处理 3 与正茬对照相比无显著差异。

表 5 不同处理对草莓品质的影响 (mg/kg)

Table 5 Effect of treatments on quality of strawberry

处理	维生素 C	蔗糖	还原糖	总糖	可滴定酸	糖/酸
CK ₁	438.5 ± 13.2C	15.1 ± 0.3Bc	37.8 ± 0.5Bb	53.1 ± 0.5Bc	8.22 ± 0.1Aa	6.46
T ₁	529.3 ± 15.6B	16.5 ± 0.2ABb	36.9 ± 0.6Bc	55.3 ± 0.4Aa	7.41 ± 0.2BCb	7.46
T ₂	507.9 ± 11.3B	15.6 ± 0.3Bc	37.2 ± 0.4Bb	54.5 ± 0.6Ab	7.66 ± 0.1Bb	7.11
T ₃	583.4 ± 14.6A	17.9 ± 0.4Aa	39.6 ± 0.4Aa	55.9 ± 0.2Aa	7.17 ± 0.3Cc	7.79
CK ₂	576.6 ± 12.7A	17.1 ± 0.1Ab	39.9 ± 0.3Aa	55.6 ± 0.4Aa	7.20 ± 0.2Cc	7.72

3 讨论

草莓连作病害主要由多种病原真菌单独或复合感染引起的土传根部病害，本课题组的研究也证明了这一点^[7]。有益微生物具有拮抗病原微生物的作用，其代谢产物还可以调节土壤微生态平衡、促进植物营养吸收，木霉和枯草芽孢杆菌均是对多种病原真菌有拮抗作用的微生物，采用单一菌剂防治植物病害的研究较多，然而作物根际的土壤微生态环境复杂，微生物种类丰富，连作病原真菌使土壤微生态环境失衡，因而利用复合微生物制剂从多方面调控土壤性状有利于控制土壤的连作病害。木霉 T₄₂ 和枯草芽孢杆菌 Bs-6 通过平板拮抗实验表明对草莓连作病原真菌有明显拮抗作用，用复合生物制剂处理土壤可显著提高连作草莓的营养生长与生殖生长，对草莓连作病害的田间防效良好，而且可以提高果实的品质。有关拮抗微生物在土壤中的定植及根际微生物在土壤中的动态变化还需进一步研究。

参考文献：

- [1] 甄文超, 李书生, 曹克强, 黄亚丽, 胡同乐, 陈梅. 连作草莓根病病原真菌的分离与鉴定. 华北农学报, 2003, 18: 35-37
- [2] Tamehiro N, Okamoto Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H, and Ochi K. Becilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 315-320
- [3] 张晓舟, 徐剑宏, 李顺鹏. 植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定. 土壤, 2005, 37 (1): 85-88
- [4] Kokalis-Burelle N, Kloepper JW, Reddy MS. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant mendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 2006, 31:91-100
- [5] 湛方栋, 陆引罡, 关国经, 唐远驹, 张永春, 黄建国. 干烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究. 土壤学报, 2005, 42 (3): 488-494
- [6] Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinor A. Combining bio-control agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*, 2001, 91: 621-627
- [7] 黄亚丽, 甄文超, 张丽萍, 张根伟, 田连生, 程辉彩, 史延茂, 李书生. 草莓重茬病菌的分离及其生物防治. 生物技术, 2005, 15 (6): 74-76
- [8] 朱红惠, 颜思齐. 玉米根系益菌的研究. 西南农业大学学报, 1999, 21 (2): 154-157
- [9] 鲍江峰, 夏仁学, 彭抒昂, 李国怀. 湖北省纽荷尔脐橙园土壤营养状况及其对果实品质的影响. 土壤, 2006, 38 (1): 75-80
- [10] 中山大学生物系. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1979: 22-27

Disease Control with Bio-Preparation in Continuous Cropping of Strawberry

ZHANG Li-ping, HUANG Ya-li, CHENG Hui-cai, ZHANG Gen-wei, DONG Chao, CHEN Rui-qin

(Institute of Biology of Hebei, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: T₄₂ *trichoderma* sp. and Bs-6 *Bacillus subtilis* significantly inhibit hyphal growth and spore germination of *Fusarium oxysporium* and *Rhizoctonia solani*, which are the main diseases strawberry suffers in continuous cropping. Pot and field experiments were carried out on effect of a complex T₄₂ and Bs-6 bio-preparation in controlling strawberry diseases. Results showed that it significantly enhanced the vegetative and reproductive growths of strawberry, reduced the dead seedling rate from 52.9% to 14.5%, increased the yield by 111%, and significantly improved quality of the fruit in comparison with that in the untreated control.

Key words: Strawberry, Replanting disease, Biological control