

三七设施栽培根际微生物菌群变化 及其与三七根腐病的相关性研究^①

官会林¹, 杨建忠², 陈煜君², 崔秀明², 王 勇², 张云峰^{3*}

(1 云南师范大学能源与环境科学学院, 昆明 650092; 2 云南文山三七研究院, 云南文山 663000;

3 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092)

摘 要: 本研究通过对三七免耕种植的定位研究, 探讨三七根腐病发病过程中的菌群变化及其与三七根腐病的相关性。结果表明: 设施栽培条件下三七根际土壤中各类微生物数量及种群结构均随着季节气温而变化, 其消涨变化规律与三七根腐病高发期吻合, 是诱发三七根腐病发生的根本原因。进一步的研究表明三七根腐病的发生, 与土壤中厌氧细菌、真菌及放线菌数量的增加及其种群数量比例变化有密切的关联性, 这三类菌群的数量及其比例变化是诱导三七根腐病害发生的主要原因; 土壤温度与根腐发病率没有直接的关联作用, 但是温度可改变土壤微生物种群变化并导致三七根腐病的发生发展; 根际土壤中好氧细菌数与厌氧细菌数比例及真菌与细菌总数比值可作为三七根腐发病及病害防治的预期参考指标。

关键词: 三七; 土壤微生物; 种群比例; 根腐病; 相关性

中图分类号: S154.1

三七 (*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen) 为五加科人参属植物, 是我国特有的名贵中药材, 主要种植于我国云南省文山州的部分地区。三七性喜温暖阴湿的多年生植物, 通常采用免耕阴蔽的栽培方式。随着设施种植年限的延长, 农药化肥施用量加大, 导致栽培土壤障碍因素日益突出, 根腐病害严重。因根腐病害的常年损失达 5% ~ 20%, 严重的达 70%, 所造成的损失占各种三七病害的 70% ~ 85%, 成为制约三七产业持续发展及农业生态环境建设的重要屏障^[1-2]。目前对三七根腐病的研究主要集中在病原菌分离、病害发生规律、栽培技术及其与生态因子的相关性研究^[2-5], 而针对三七发病土壤微生物菌群变化及其与三七根腐病害的相关性研究方面, 难以查阅到相关的文献报道。

以土壤为载体的根际微生物是根际微生态系统的重要组成部分, 参与土壤有机质分解、腐殖质形成、土壤养分转化和循环等一系列过程, 其种群结构及活性变化是衡量土壤质量、维持土壤肥力和药材产量的一个重要指标^[6-7]。因此, 土壤微生物群落的组成与活性在很大程度上决定了生物地球化学循环^[8-9], 被认为

是表征土壤质量变化最敏感最有潜力的指标^[10]。土传性病害的发生、发病的程度一般与病原菌、益微生物及其寄主宿主在土壤生态环境条件下相互竞争、相互联系、相互制约有密切的关系。有文献报道增加有机 P 农药施用量及改变耕作措施等都会使土壤微生物数量和种群发生较大变化^[11], 施用光合细菌可以改善土壤微生物区系^[12]。土壤中大量的细菌、放线菌、真菌等一方面通过土壤调节功能促进植物生长, 另一方面又通过生态位的竞争, 抑制和制约病原菌的生长而显著控制土传病害的发生与发展^[12-15]。因此, 通过对三七免耕种植定位研究, 探索根际土壤微生物群落组成变化与根腐病害的相关性, 为三七根腐病害的预测预报及其生物防治技术的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概括

试验于 2006 年 1 月—12 月在文山三七研究院砚山试验基地进行。试验点地处北回归线附近的低纬高原地带, 属亚热带大陆性季风气候区, 海拔 1255 m, 经纬度 104.199°N、23.392 2°E, 年均气温 16.5℃, 年

^①基金项目: 国家自然科学基金基金项目 (40861019, 30660075) 和云南省重点产业创新工程项目 (2008IF025-1) 资助。

* 通讯作者 (zhyunfeng001@yahoo.cn)

作者简介: 官会林 (1964—), 男, 学士, 教授, 主要从事农业环境工程研究。E-mail: GHL0871@yahoo.com.cn

均降雨量 900~1000 mm, 降雨日 150 天; 年平均日照 1934.9 h; 平均相对湿度 79%。种植模式采取人工建棚栽培, 棚顶为遮阳网覆盖, 雨水能自由渗漏, 已 3 年免耕种植, 地表覆盖物为松毛。试验选用同一个三七棚中 2 年生三七种植土壤为研究对象, 每个试验小区面积均为 15 m² (10 m×1.5 m), 并设 3 重复调查区, 每小区插入 3 支地温表测量土壤表层至 10 cm 深土壤温度。

1.2 样品采集

土壤采样均于每月下旬进行, 去除表层覆盖物, 每小区分别采用 S 形法进行采样, 采集 12 个样点, 混合后以四分法取舍, 装入新保鲜袋, 4℃ 冰箱保存备用, 取样土层 0~10 cm。

1.3 土壤微生物计数

采用稀释平板法进行土壤微生物测定^[16]: 其中细菌用 1% 葡萄糖的牛肉膏蛋白胨培养基平板计数, 30℃ 下培养, 培养基内部菌落计为厌氧生长, 基表菌落计为好氧生长数, 二者之和为可培养细菌总数; 酵母菌用培养基 (麦芽膏 1%、酵母膏 0.3%、MgSO₄ 0.1%、尿素 0.1%、KH₂PO₄ 0.02%、Na₂HPO₄ 0.2%、pH 7.0~7.2, 倒平板前加入青霉素、链霉素), 培养温度 30℃; 霉菌与放线菌方法相同, 霉菌以马丁氏 (Martin) 培养基, 放线菌用高氏 (Gause) 1 号培养基并加有青霉素、链霉素, 涂布平板法计数, 培养温度 25℃, 计数的稀释度为 100 倍。

1.4 数据分析

三七根腐病的大田鉴定, 根据缪作清等^[24]的方法, 试验中对根腐病的发病类型不进行分类, 只要出现相

关症状, 均确认为发病。发病率以发病植株占所调查植株的比例计。相对湿度、降雨量、日照及有效积温等气象资料由当地气象站提供。数据资料采用 SPSS 12.0 软件包及 Excel 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 气候因素与三七发病率的相关性分析

试验区域的降雨多集中在夏季的 6—8 月, 约占全年降雨量的 70% 左右, 是试验区中温度最高的季节及三七根腐病害高发期。因此, 对定位点的气候因素月变化与发病率进行了统计 (表 1) 及其相关性分析 (图 1)。结果发现除试验点有效积温与三七根腐病间存在明显的直线相关外, 平均地温、相对湿度、降雨量及日照与三七根腐病发病率间均不存在统计学意义上的直线相关性 ($p>0.05$)。说明三七发病与试验点气候间的关系相对复杂, 同时也暗示有效积温有可能影响到设施栽培三七根际微生物菌群的变化, 从而导致根腐病的发生。对试验点气候因素与三七发病率间进行曲线回归分析 (图 2), 结果表明在逻辑函数模型下平均地温、相对湿度、降雨量及平均日照与发病率间均存在显著的相关性, 其拟合度分别为 0.099、0.570、0.040、0.479。尽管其拟合度都不高, 但这种显著性相关性表明, 这些因素对三七根腐病的影响是通过某种种群变化而实现的, 而这种种群变化实际就是土壤中根腐病致病菌与其他非致病菌的消涨所造成, 或者是致病菌群大于某个临界点所引发的病害。因此, 气候因素特别是地温变化是通过影响土壤微生物种群变化, 进一步影响三七根腐发病率的发生发展。

表 1 试验区气候因素对发病率的影响 (2006 年)

Table 1 Effect of climate on frequency of root rot disease in *P. notoginseng*

测定时间 (月-日)	平均地温 (°C)	相对湿度 (%)	降雨量 (mm)	日照 (h)	发病率 (%)
1-25	9.16	77.37	13.46	153.21	1.437
2-24	12.31	74.59	18.27	169.42	2.693
3-25	15.16	69.39	29.57	209.37	1.77
4-28	21.32	70.31	121.37	213.42	3.42
5-26	23.76	73.53	135.64	193.52	5.15
6-25	23.15	78.52	206.86	146.25	2.333
7-27	22.41	82.48	185.38	147.53	7.933
8-26	21.43	82.37	119.62	148.32	4.877
9-26	20.08	81.52	66.54	142.35	9.24
10-25	14.75	80.12	46.39	136.54	12.69
11-27	12.32	79.36	12.51	143.27	11.49
12-26	10.78	77.36	84.32	163.31	7.643

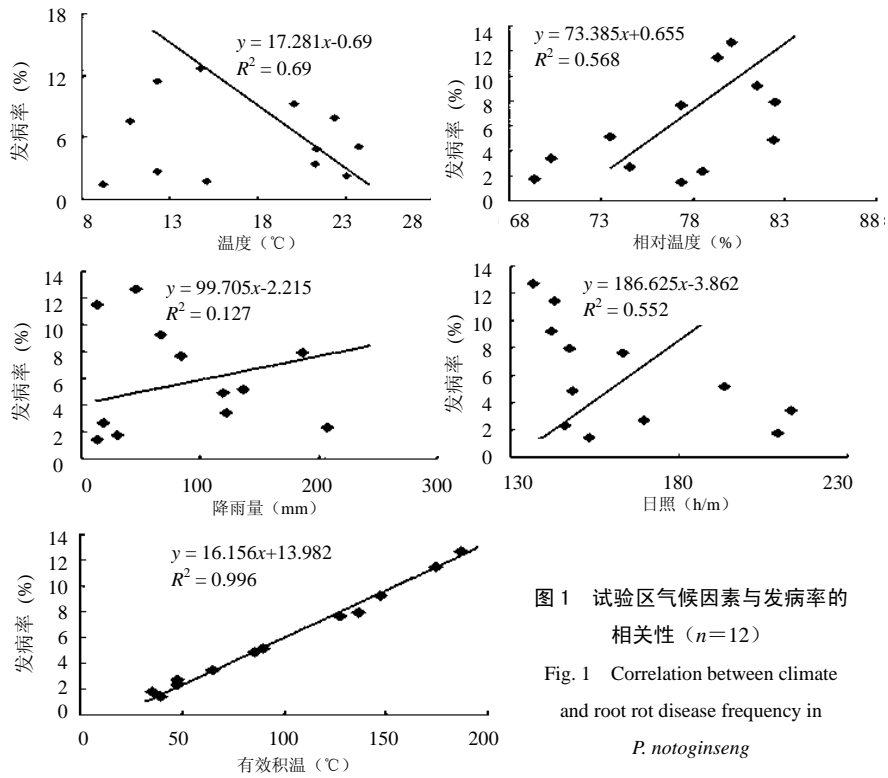


图 1 试验区气候因素与发病率的
相关性 ($n=12$)
Fig. 1 Correlation between climate
and root rot disease frequency in
P. notoginseng

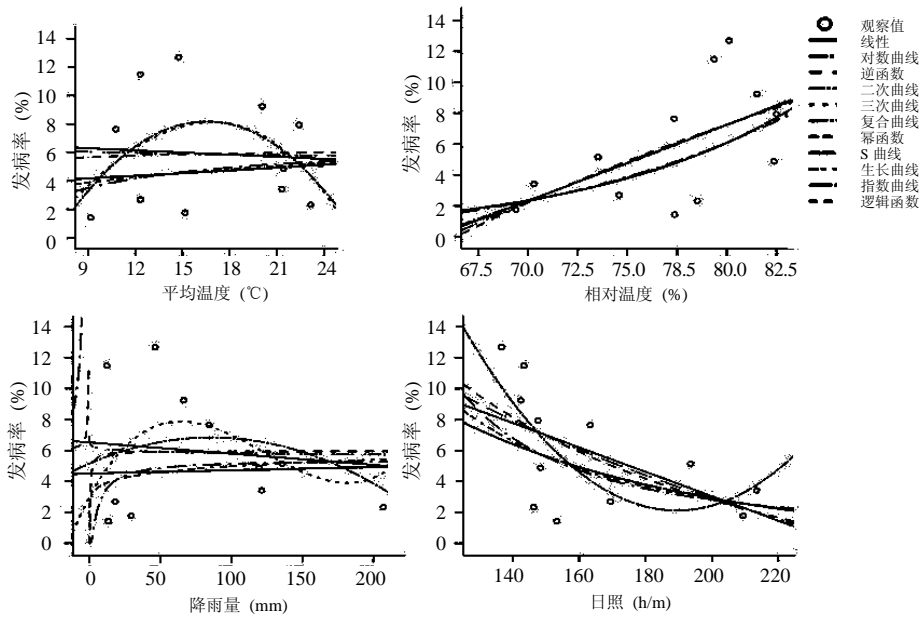


图 2 试验区气候因素与发病率的曲线相关性 ($n=12$)
Fig. 2 Curve regression between climate and root rot disease frequency in *P. notoginseng*

2.2 三七种植土壤微生物群落的月际动态变化特征

从图 3 看出土壤细菌(好氧菌和厌氧菌)、真菌数量随着地温的升高而增加,其中夏季 6—8 月菌群增幅最大,7 月和 8 月为全年高峰期,也是发病的高峰期,6—8 月期间根腐病发病率占全年发病率的 60% ~

75%,9 月份后随着地温的降低逐渐回落,根腐病发病率减少。而酵母菌受季节影响波动性较大,具有不稳定性,最小值出现在寒冷干燥的 1 月、2 月、3 月,分别为 1.32、1.69、2.08 ($\times 10^4$ cfu/g),在高温高湿的 6 月、7 月、8 月则为 4.41、5.68、5.69 ($\times 10^4$ cfu/g)。

放线菌数量最大值出现在 10 月份, 为 0.533×10^4 cfu/g, 最小值出现在 1 月份, 为 0.097×10^4 cfu/g。表明设施栽培条件下各类土壤微生物数量及种群结构均

随着季节气温的变化而变化, 并且土壤微生物种群数量的消涨变化与三七根腐病高发期基本吻合, 并可能是诱发三七根腐病发生的根本原因。

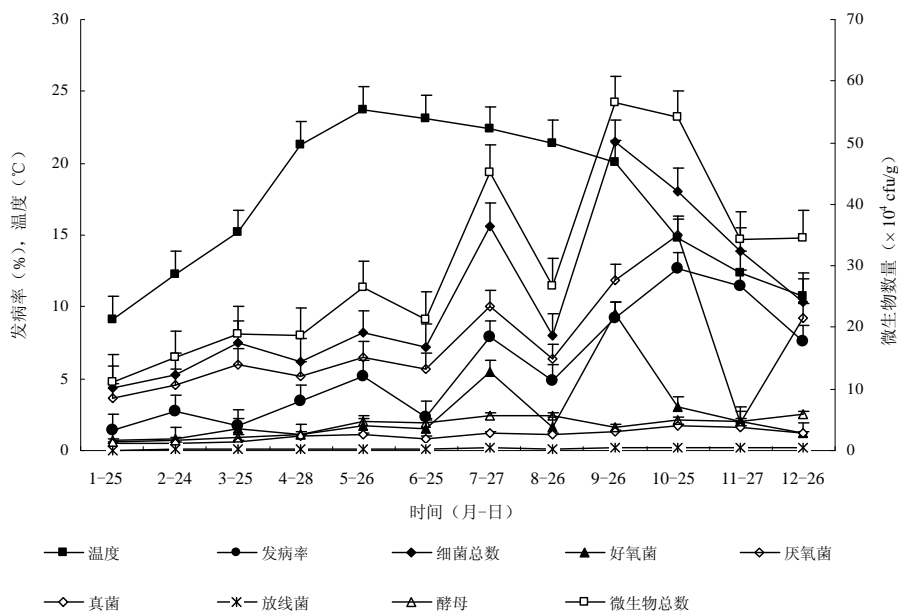


图3 定位点地温、三七发病率及微生物周年变化趋势

Fig. 3 Changes of temperature, root rot disease frequency and microbe at experiment plot

2.3 三七发病率与土壤微生物群落组分间的相关性分析

土壤微生物总菌群及细菌总菌群的曲线变化特征与三七发病变化特征曲线基本吻合(图3)。为此对各类微生物与发病率进行相关性分析(图4), 结果发现: 酵母菌、放线菌、真菌及厌氧菌与根腐病发病率之间具有显著的线性相关性 ($p < 0.05$), 微生物总数与根腐病发病率之间也有显著的正相关性 ($p < 0.05$)。酵母菌总数的最大值出现在 12 月份, 但是夏季(6—8月)平均总数最大, 为 5.258×10^4 cfu/g, 说明酵母菌群落数量易受到季节性气候的影响, 并且不完全由土壤温度支配, 而酵母菌与根腐病发病率之间具有显著的线性相关性, 或许是三七根腐病的发生也可能直接影响到酵母菌的数量。

在三七的免根栽培过程中, 土壤性质在试验过程中基本保持不变, 但三七根部一旦发生腐烂, 根际微环境的改变, 可能直接或者协同其他微生物导致酵母菌数量的变化。放线菌占总微生物数量的 1% ~ 3%,

受季节温度变化影响不大, 但 6—8 月的菌群数量增幅也为全年中变幅最大, 统计表明放线菌总数与三七根腐病发病率之间存在线性关系(图4)。文献报道三七根腐病是典型的土传性病害^[5], 且病原菌在土壤中可存活相当长一段时间, 这与放线菌是相对稳定的菌群结论相吻合, 或许放线菌中的一些种类可能是复合侵染的病原之一^[5,17]。

随着温度的升高, 试验地中的三七根腐病的发病率也随之升高。与此同时, 土壤中的各类微生物的菌群量也在增大, 特别是细菌总数及厌氧菌群的提高较为明显。表明土壤中的细菌总菌群, 特别是厌氧菌群的增加有可能是导致三七发生根腐病的主要原因。但从表 1 中也发现, 6 月、8 月的发病率较低, 此期间的真菌、放线菌的菌群较低, 说明三七根腐病的发生不仅与细菌有关, 而且与真菌、放线菌的菌群动态变化均有一定的关系。这与缪作清等^[3]、罗文富等^[17]从病原菌分离、感染的研究结论相一致, 表明三七根腐病是一种复合微生物侵染产生的病害。

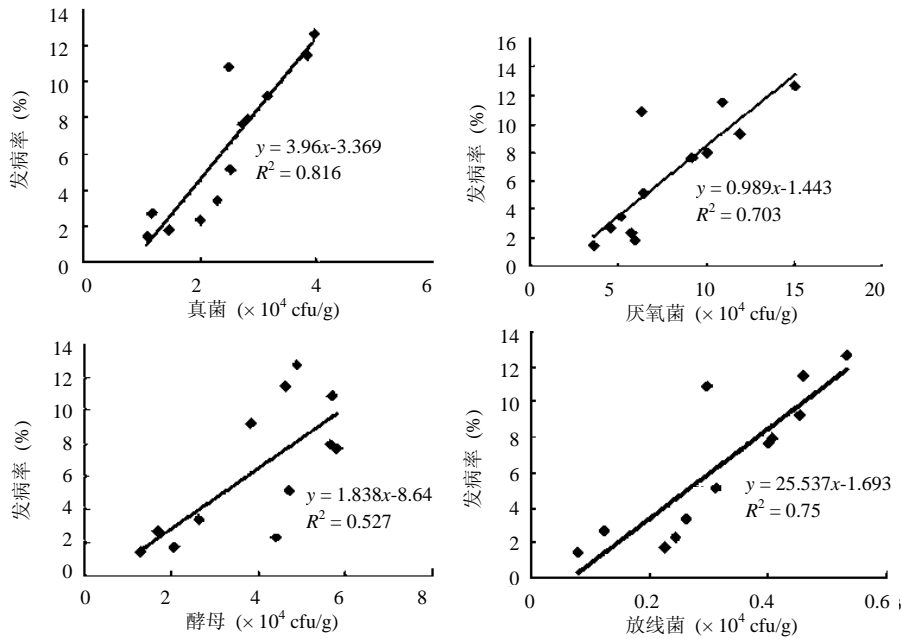


图 4 真菌、厌氧细菌、酵母菌、放线菌数量与根腐病发病率之间的线性相关关系 (n = 12)

Fig. 4 Linear correlations between root rot disease frequency and fungi, anaerobic bacteria, yeast, actionomyces in *P. notoginseng*

为进一步探讨各类微生物菌群对三七根腐病发病率的影响, 利用 SPSS 进行逐步直线回归 (stepwise), 以发病率为因变量, 地温及各类微生物菌群为自变量, 将各自变量逐步引入到回归分析, 表 2 为各自变量引入回归方程后复相关系数 (R) 的变化。从表 2 可以看出, 当地温度被引入回归方程时, 其复相关系数 R 为 0.837, 估计标准误差为 2.12。以此类推可以看出引入的自变量不同, 其复相关系数及估计标准误差也不同,

而且复相关系数越来越大, 估计标准误差越来越小。在逐步引入温度、细菌总数后, 复相关系数仅从 0.837 变为 0.896, 变化幅度仅为 0.065%。因而温度对三七根腐病发病的影响最大; 此外, 比较模型 5~7 可以看出, 复相关系数差异不大。从上述的分析中已证明地温不是影响三七根腐病的直接因素, 而是通过影响微生物种群结构变化而诱导根腐病的间接影响因素。因此, 影响三七根腐病发生的因素为厌氧菌及放线菌。

表 2 线性回归条件下各因子对三七根腐病发表率的累计影响

Table 2 Accumulative effects of various factors on root rot disease frequency under linear regression in *P. notoginseng*

模型	复相关系数 R	判定系数 R ²	调整后的判定系数	回归方程的估计标准误
1	0.837 ^a	0.701	0.692	2.12
2	0.896 ^b	0.803	0.785	1.77
3	0.943 ^c	0.889	0.874	1.35
4	0.945 ^d	0.893	0.876	1.35
5	0.959 ^e	0.920	0.904	1.19
6	0.958 ^f	0.918	0.905	1.18
7	0.957 ^g	0.915	0.904	1.18

注: a. 引入因子: 温度; b. 引入因子: 温度、细菌总数; c. 引入因子: 温度、细菌总数、厌氧菌; d. 引入因子: 温度、细菌总数、厌氧菌、真菌; e. 引入因子: 温度、细菌总数、厌氧菌、真菌、放线菌; f. 引入因子: 温度、细菌总数、厌氧菌、放线菌; g. 引入因子: 温度、厌氧菌、放线菌。

2.4 正常植株与发病植株根区土壤微生物特征

为进一步研究土壤微生物群落结构变化与三七根

腐病的关联性, 于 2006 年 4 月 28 日, 分别在 3 个重复调查区各取 5 株根腐病株和正常植株的根区土壤进

行对比研究, 利用SPSS软件对正常植株与发病植株的根区微生物各菌群进行非配对设计样本均数的差异显著性检验(表3), 结果表明: 在正常植株与发病植株的根区土壤微生物各菌群间均存在差异, 其中细菌总数差异达显著水平($p < 0.05$), 真菌、酵母菌、放线菌、好氧细菌及厌氧细菌间差异达到极显著水平($p < 0.01$)。并且发病植株根区土壤的细菌总数、厌氧细菌数、真菌及放线菌数均高于正常植株土壤, 分别提高9.70、80.66、2.42、0.80 ($\times 10^4$ cfu/g); 而好氧细菌数及酵母菌数则是正常植株土壤高于病植株土壤, 分别

提高7.26、0.76 ($\times 10^4$ cfu/g)。因此, 发病植株根区土壤细菌总数增加主要是厌氧细菌数增加引起。正常植株土壤中好氧细菌数与厌氧细菌数比例为1:3.83, 真菌约占微生物总数的1.22%; 而根腐病株土壤中好氧细菌数与厌氧细菌数比例为1:102.70, 真菌约占微生物总数的2.10%。由此看出, 土壤中厌氧细菌、真菌及放线菌数量的增加是导致三七根腐病害发生的主要因素, 特别是厌氧细菌和真菌与三七根腐病害的发生发展具有密切的关联性, 而放线菌与三七根腐病害的关联性低于真菌, 与上述定位监测研究结果相吻合。

表3 不同时间段三七健康植株与发病植株根际微生物菌群的配对检验

Table 3 Microbe colony paired test between health and root rot disease plants at various periods in *P. notoginseng*

配对因素	平均值	标准误	标准差均值	95% 可信限		T 值	自由度 df	双尾 P 值 Sig.
				低	高			
真菌 (正&病)	-2.42	2.73	0.41	-3.24	-1.60	-5.950	44	0.000
酵母菌 (正&病)	0.77	1.10	0.16	0.438	1.10	4.676	44	0.000
放线菌 (正&病)	-0.81	1.022	0.15	-1.12	-0.50	-5.243	43	0.000
细菌总数 (正&病)	-57.67	178.33	26.59	-111.25	-4.10	-2.169	44	0.035
好氧细菌 (正&病)	23.91	50.52	7.53	8.73	39.09	3.176	44	0.003
厌氧细菌 (正&病)	-80.08	155.94	23.25	-126.93	-33.23	-3.445	44	0.001

注: (正&病) 分别表示正常株和发病株根际土壤微生物。

真菌作为一种腐生性伴生菌群, 三七的腐烂必然会促进真菌的增殖。其次在高温高湿条件下, 一方面高温加速土壤氧气的溢出, 另一方面高湿度促进土壤中厌氧菌的繁殖, 从而改变了土壤微生物的整个菌群比例, 导致病原菌的繁殖。因此, 厌氧菌群的扩增是导致发病的主要因素, 这也是三七根腐病为何在高温、高湿条件下容易发病的根本原因。最近, 我们在三七栽培土壤中通过友好型好氧菌群(即非致病性好氧菌)的添加, 大大降低了三七根腐病的发生, 表明致病性厌氧菌群的变化是三七根腐病发生的主要原因。因此, 好氧菌群与厌氧菌群或厌氧菌与细菌总数的比例可作为三七发病及病害防治的预期指标。

3 结论

(1) 三七根腐病的病原菌, 除已报道的细菌中的假单胞杆菌^[17]及*C.destructans* 和 *C.didinum* 属真菌有关外^[3], 还与土壤中厌氧细菌、真菌及放线菌数量的增加及其种群数量比例变化有密切的关联性, 这3类菌群在不同季节存活量的高峰期与三七病害高发期相吻合。分析认为厌氧细菌、真菌和放线菌也是导致三七根腐病的主要病原菌。

(2) 气候因素变化, 特别是土壤温度变化可以影响三七根腐病的发病率和根际土壤微生物的数量变化, 但是土壤温度与根腐发病率没有直接的关联作用, 而是通过土壤温度影响土壤微生物种群变化导致三七根腐病的发生发展。

(3) 正常植株与发病植株的根区土壤微生物各菌群间均存在显著差异, 并且发病植株根区土壤的厌氧细菌数、真菌及放线菌数均高于正常植株土壤。正常植株土壤中好氧细菌数与厌氧细菌数比例为1:3.83, 真菌约占微生物总数的1.22%; 而根腐病株土壤中好氧细菌数与厌氧细菌数比例为1:102.70, 真菌约占微生物总数的2.10%。其指标可作为三七根腐发病及病害防治的预期参考指标。

(4) 针对三七根腐病害土壤生物修复措施, 应重点考虑控制土壤厌氧菌群数量及抑制土壤真菌数量的比例。

参考文献:

- [1] 董弗兆, 刘祖武, 乐丽涛. 云南三七. 昆明: 云南科技出版社, 1988: 102-103
- [2] 王朝梁, 崔秀明, 李忠义, 贺承福, 喻盛甫, 罗文富. 三七根腐

- 病发生与环境条件关系的研究. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 714-716
- [3] 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 陈昱君, 李云华, 王勇, 郭荣君, 夏振远, 张克勤. 三七根腐病病原研究. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1 371-1 378
- [4] 杨永建, 崔秀明, 杨涛, 萧凤回. 文山三七规范化种植及其发展对策. 云南农业大学学报, 2008, 23(3): 402-406
- [5] 陈昱君, 王勇, 冯光泉, 李忠义. 三七根腐病发生与生态因子的关系. 云南农业科技, 2001(6): 33-36
- [6] 江曙, 段金殿, 钱大玮, 严辉, 于光. 根际微生物对药材道地性的影响. 土壤, 2009, 41(3): 344-349
- [7] Mazzola M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 2004, 42: 35-59
- [8] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29: 11-29
- [9] 唐玉姝, 魏朝富, 颜廷梅, 杨林章, 慈恩. 土壤质量生物学指标研究进展. 土壤, 2007, 39(2): 157-163
- [10] 孙波, 赵其国, 张桃林, 俞慎. 土壤质量与持续环境. III: 土壤质量评价的生物学指标. 土壤, 1997, 29(5): 225-234
- [11] 曹慧, 崔中利, 周育, 滕齐辉, 王兴祥, 李顺鹏. 甲基对硫磷对红壤地区土壤微生物数量的影响. 土壤, 2004, 36(6): 654-657
- [12] 张信娣, 曹慧, 徐冬青, 金叶飞, 陈银科. 光合细菌和有机肥对土壤主要微生物类群和土壤酶活性的影响. 土壤, 2008, 40(3): 443-447
- [13] Moynihan JA, John P, Morrissey JP, Coppoolse ER, Stiekema WJ, O'Gara F, Boyd EF. Evolutionary history of the *phl* gene cluster in the plant-associated bacterium *pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 2 122-2 131
- [14] Benitez MS, McSpadden GBB. Linking sequence to function in soil bacteria: Sequence-directed isolation of novel bacteria contributing to soilborne plant disease suppression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 915-924
- [15] Thies JE. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. *Soil Sci.*, 2007, 71: 579-591
- [16] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 20-70
- [17] 罗文富, 喻盛甫, 贺承福, 李忠义, 王朝梁, 崔秀明. 三七根腐病病原及复合侵染的研究. 植物病理学报, 1997, 27(1): 85-91

Change of Rhizospheric Microbe Colony in Cultivated Soil and Its Correlation to Root Rot Disease in *Panax Notoginseng*

GUAN Hui-lin¹, YANG Jian-zhong², CHEN Yu-jun², CUI Xiu-ming², WANG Yong², ZHANG Yun-feng³

(1 College of Energy and Environment, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China;

2 Academy of Saqi Research, Wenshan, Yunnan 663000, China; 3 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China)

Abstract: Rhizospheric soils from health plants and disease plants at fixed spots were used to study the relation between the change of rhizospheric microflora colony and root rot in *Panax notoginseng*. The results showed that the quantity of various microbes and the structure of microbe population could change along with the season temperature, and their fluctuation characteristic was coherent with the happening time of root rot at cultivation condition, which implied that certain microbe quantity and rhizospheric microflora could be attributed to root rot. Further experiment revealed that the changes of the quantity of anaerobe, fungi and yeast and their population ratio had a high correlation with root rot at fixed spots in cultivation *Panax notoginseng*. The three kinds of microbe quantity and their ratios could be the direct factors of root rot. Although temperature could not result in the occurrence of root rot directly, it could influence the growth of anaerobe, fungi and yeast, further influence the occurrence of root rot in *Panax notoginseng*. By comparison microbe quantity, we concluded that the ratios of aerobic/anaerobe and fungi/total bacteria could be used as the consulting index for anticipating root rot in *Panax notoginseng* cultivation.

Key words: *Panax notoginseng*, Soil microorganism, Population ratio, Root rot disease, Relevance