

施肥模式对连作草莓枯萎病控制效果 及土壤微生物群落特征的影响^①

陈义群^{1,2,3}, 董元华^{1,3*}, 王辉^{1,3}, 黄冠焱¹, 霍恒志⁴

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 河海大学环境学院, 南京 210098;
3 中国科学院研究生院, 北京 100049; 4 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212400)

摘要: 通过营养调控防治连作病害是近年来的发展方向之一。本研究通过不同施肥处理的田间小区试验, 采用微生物培养方法和 Biolog 微生物自动分析系统分析了不同施肥模式下草莓抗病能力、连作土壤微生物群落特征。研究表明: 与当地习惯施肥相比, 优化施肥模式 I 和 II 可以促进草莓生长, 并有效地控制草莓枯萎病; 优化施肥模式 I 提高了草莓连作土壤细菌/真菌和放线菌/真菌比例; Biolog 结果显示在短期内不同施肥模式对土壤微生物群落碳源利用能力和 Shannon 指数、Simpson 指数、Mcintosh 指数的影响有限; PCA 分析表明, 优化施肥模式 I 的土壤微生物群落碳源利用特征与当地习惯施肥模式明显不同。综合考虑控病效果及施肥量, 优化施肥模式 I 是更为经济有效的施肥模式。

关键词: 草莓枯萎病; 施肥; 土壤微生物群落; Biolog

中图分类号: S316

我国由于耕地有限, 草莓连作现象很普遍。随着连作年限的延长, 连作病害尤其是经土壤传播的草莓枯萎病发生越来越严重, 成为限制草莓产业发展的重要因素。如何控制草莓枯萎病一直是研究热点, 目前研究多集中在利用生物拮抗菌、换地轮作、土壤日晒、化学消毒等方面^[1-2], 但均存在各种各样的缺陷。

引起草莓枯萎病的原因有土壤生物退化, 养分失衡等, 导致土壤微生态环境中诸多因子的平衡关系被破坏^[3-4]。因此通过优化施肥、调控养分供应以改善土壤微生物性状、促进作物生长是控制草莓枯萎病的重要途径之一。本文通过土壤微生物培养及 Biolog 微生物自动分析系统对不同施肥模式下连作草莓土壤微生物群落区系特点及功能多样性进行分析, 以期阐明不同施肥模式对草莓枯萎病的影响机理, 为草莓枯萎病防治提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 小区试验设计

1.1.1 供试材料 小区试验地位于江苏丘陵地区

镇江农业科学研究所草莓基地, 该基地已连续种植草莓近 30 年, 草莓枯萎病严重。基地具体位置为 31°57'N, 119°09'E, 海拔 15 m, 年均气温 15.2℃, 年降雨量 1 022 mm^[5]。土壤基本理化性状见表 1。供试草莓品种为明宝 (*Fragaria ananassa Duchesne.cv.Mingbao*), 是日本培育成功的大果型草莓优良品种。

1.1.2 小区试验设计 试验共设 4 种施肥处理, 见表 2, 每个处理重复 3 次, 共 12 个小区, 随机区组排列。每个小区长 6 m, 宽 3.8 m, 面积为 22.8 m²。每小区种植草莓 400 株, 株行距为 15 cm, 小区间留 30 cm 隔离带。小区管理措施一致, 即大棚常规管理。2008 年 8 月底开始施基肥, 9 月初移植草莓。

供试肥料肥料养分含量: 有机无机复混肥含 N 100 g/kg, 含 P₂O₅ 80 g/kg, 含 K₂O 70 g/kg; 尿素含 N 460 g/kg; 钙镁磷肥含 P₂O₅ 120 g/kg; 硫酸钾镁含 K₂O 220 g/kg; 叶面调理剂 I 含 N 75 g/kg, 含 P₂O₅ 78 g/kg, 含 K₂O 51 g/kg; 叶面调理剂 II 含 N 55 g/kg, 含 P₂O₅ 104 g/kg, 含 K₂O 68 g/kg; 高钾冲施肥含 N 60 g/kg, 含 P₂O₅ 30 g/kg, 含 K₂O 160 g/kg; 腐熟鸡粪含 N 7 g/kg,

①基金项目: 中国科学院知识创新工程方向项目 (KZCX2-YW-JC405, KSCX2-YW-N-51-02)、河海大学自然科学基金项目 (2008429811) 和中央高校基本科研业务费项目 (2010B05314) 资助。

* 通讯作者 (yhdong@issas.ac.cn)

作者简介: 陈义群 (1974—), 女, 湖南湘西人, 讲师, 博士研究生, 主要从事土壤生态学方面的研究。E-mail: cyqjoyce@tom.com

表 1 供试草莓地土壤基本理化性状

Table 1 Physical and chemical properties of soil in continuous cropping filed of strawberry

全氮 (g/kg)	全磷 (g/kg)	全钾 (g/kg)	有机碳 (g/kg)	pH	<0.002 mm 黏粒(g/kg)	0.05~0.002 mm 粉粒(g/kg)	2~0.05 mm 砂粒 (g/kg)	土壤 质地
0.6	1.4	12.8	12.1	6.3	309	650	41	粉砂黏土

表 2 小区试验施肥处理

Table 2 Fertilization treatments in field plot experiment

施肥模式	施肥量 (kg/hm ²)		施肥方法	
	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O		基肥	追肥
优化 I	总施肥量	346-301-562	有机无机复混肥(含氨基酸肥料) 1 080 kg/hm ² , 腐熟鸡粪 30 000 kg/hm ²	全生育期喷施叶面调理剂(含氨基酸肥料) 20 次, 每次用量 3 kg/hm ² , 稀释 300 倍, 其中 I 型 13 次, II 型 7 次。此外, 第一茬果收获后每隔 45 天施高钾肥 1 次, 共 2 次, 每次 300 kg/hm ²
	基肥量	306-278-463		
	追施量	40-23-99		
优化 II	总施肥量	362-305-634	尿素 270 kg/hm ² , 钙镁磷肥 750 kg/hm ² , 硫酸钾镁 675 kg/hm ² , 腐熟鸡粪 30 000 kg/hm ²	全生育期喷施叶面调理剂(含氨基酸肥料) 20 次, 每次用量 3 kg/hm ² , 稀释 300 倍, 其中 I 型 13 次, II 型 7 次。此外, 第一茬果收获后每隔 45 天施高钾肥 1 次, 共 2 次, 每次 300 kg/hm ²
	基肥量	322-282-535		
	追施量	40-23-99		
习惯	总施肥量	322-282-535	尿素 270 kg/hm ² , 钙镁磷肥 750 kg/hm ² , 硫酸钾镁 675 kg/hm ² , 腐熟鸡粪 30 000 kg/hm ²	清水喷施, 次数同上叶面施肥
	基肥量	322-282-535		
	追施量	0-0-0		
CK		0-0-0	无	清水喷施, 次数同上叶面施肥

含 P₂O₅ 6 g/kg, 含 K₂O 13 g/kg, 有机碳含量 99 g/kg。其中有有机无机复混肥, 叶面调理剂 I、II, 高钾冲施肥均由北京仲元生物技术有限公司提供; 尿素, 钙镁磷肥, 硫酸钾镁购于当地市场; 腐熟鸡粪由镇江农科所提供。

几种施肥模式说明: ①基肥量: 优化施肥模式 II 和传统施肥模式相同, 优化施肥模式 I 的基肥施入量中氮肥和钾肥分别比优化施肥模式 II 和传统施肥模式减少 5% 和 13%, 且施入的有机无机复混肥含植物易吸收的氨基酸肥料; ②追肥量: 优化施肥模式 I 和 II 追肥量相同, 当地习惯施肥无追肥; ③总施肥量: 优化施肥模式 I 和 II 与当地习惯施肥模式比, 通过追施钾肥其施入量约增加 5% 和 19% (表 2), 通过叶面追施氮肥, 其施入量约增加 7% 和 12%。

1.1.3 样品的采集与处理 2008 年在草莓枯萎病高发期统计草莓枯萎病发病率 (10 月底至 11 月底), 并进行土壤样品采集, 每个小区随机采取 0~15 cm 的表层土, 去除石子、植物根系等杂物后混匀, 带回实验室于冰箱中 4℃ 保存, 备用。12 月测定苗高和叶长等生长指标。

1.2 土壤中可培养细菌、真菌、放线菌及尖孢镰刀菌数量的测定

土壤中可培养细菌、真菌及放线菌的分离和数量测定采用稀释平板法, 培养基分别为牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马丁氏培养基、高氏 1 号培养基^[6]及尖孢镰刀菌的选择性培养基^[7], 25℃ 恒温培养、计数, 每个稀释度重复 3 次。

1.3 Biolog 分析

称取 10 g 新鲜土样置于装有 100 ml 无菌水的三角瓶中, 在约 180 r/min 下振荡 20 min。用无菌水分别稀释到 10⁻³ 倍后, 用 8 通道加样器向 Biolog Eco 微孔板 (Biolog, Hayward, CA, USA) 各孔分别添加 150 μl 稀释后的土壤悬液。每个微孔板上做 3 个重复。25℃ 恒温培养 7 天, 每隔 24 h 在 BIOLOG EmaxTM 自动读盘机 (Biolog, Hayward, CA, USA) 上利用 Microlog Rel. 4.2 软件读取 590 nm 波长下的吸光值^[8-9], 选取 84 h 的第 *i* 孔的相对吸光值与平均吸光度的比值进行主成分分析 (PCA)。

平均吸光度 (AWCD) 可以评判微生物群落对碳源利用的总能力, 指示土壤中微生物代谢活性。计算

公式见 (1)。式中 A_i 为第 i 孔的相对吸光度, A_{A1} 为 A_1 孔的相对吸光度。

$$AWCD = \frac{\sum(A_i - A_{A1})}{95} \quad (1)$$

Shannon 指数 H' 用于评估丰富度, 式中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

$$H' = -\sum P_i \cdot \ln(P_i) \quad (2)$$

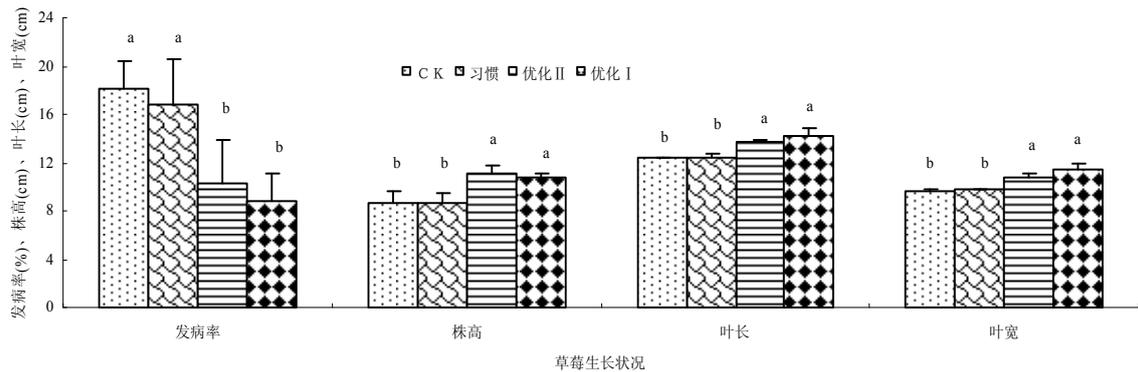
Simpson 指数, 用于评估优势度的指数, 常用其变型 Gini 指数来评价多样性, 式中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

$$D = 1 - \sum (P_i)^2 \quad (3)$$

Mcintosh 指数 U , 基于群落物种多维空间距离的多样性指数, 实际上是一致性的量度, 式中 n_i 是第 i 孔的相对吸光值^[10]。

$$U = \sqrt{\sum n_i^2} \quad (4)$$

1.4 数据统计分析



(图中不同字母表示各施肥模式在 $P < 0.05$ 水平差异显著)

图 1 不同施肥模式对草莓生长状况的影响

Fig. 1 Effects of fertilization treatments on growth of strawberry

2.2 不同施肥模式对草莓连作土壤微生物区系的影响

土壤中可培养细菌、真菌、放线菌是反映土壤微生物区系的常用指标。从表 3 可以看出优化施肥模式 I 的细菌/真菌显著地高于优化施肥 II、当地习惯施肥和不施肥模式, 几乎是其他 3 种模式的 2 倍。放线菌/真菌也是优化施肥模式 I 的最高, 其次是优化施肥模式 II, 优化施肥模式 I 与当地习惯施肥及不施肥模式的差异达显著水平, 说明优化施肥模式 I 可以促进连作草莓土壤中细菌和放线菌的增殖, 使其在土壤微生物中的比例显著提高。甄文超等^[13]研究发现草莓连作土壤和正茬土壤的微生物区系特点明显不同, 草莓连

用 SPSS13.0 统计软件进行主成分分析 (PCA) 及单因素方差分析 (ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 不同施肥模式对草莓枯萎病的抑制作用

由图 1 可以看出, 在草莓枯萎病高发期时, 优化施肥模式 I、II 的发病率显著低于当地习惯施肥模式和不施肥模式。从草莓的株高、叶长和叶宽来看, 优化施肥模式 I、II 也显著高于当地习惯施肥和不施肥模式, 说明优化施肥模式 I、II 可以明显地促进草莓的生长, 从而提高对病原菌的抵抗力, 枯萎病发病率较低。这可能是因为优化 I 施入的有机无机复混肥中含有易被植物吸收利用的氨基酸, 能促进草莓营养生长^[11-12], 使其叶面积增大, 光合作用增强, 从而提高抗病能力。另外, 优化施肥模式 I、II 在草莓返青后通过叶面调理剂 (含氨基酸) 补充必需的大量和微量元素, 对草莓营养生长也有明显的促进作用。

作会降低细菌在根际土壤微生物中的比例, 真菌种群相对数量上升, 而放线菌的增殖受到抑制。这说明优化施肥模式 I 可以使连作草莓土壤的微生物区系特点趋向于正茬土壤。另外, 根际土壤中的放线菌大多数属于 *Streptomyces*, 对病原微生物有一定的拮抗作用^[13]。说明优化施肥模式 I 下土壤微生物区系变化对降低草莓枯萎病发病率有重要作用。

从表 3 还可以发现引起草莓枯萎病的尖孢镰刀菌数量并没有随施肥模式的变化而发生显著改变。结合 2.1 结果, 说明草莓枯萎病的发生与多种因素有关, 除与致病菌有关外, 还与土壤微生物群落结构特征及草莓自身抗病能力有关。

表 3 不同施肥模式对土壤微生物区系的影响

Table 3 Effects of different fertilization treatments on soil microbial population

施肥模式	细菌/真菌 (B/F)	放线菌/真菌 (A/F)	细菌/放线菌 (B/A)	尖孢镰刀菌 ($\times 10^3$ cfu/g 干土)
CK	417 ± 199 b	32 ± 17 b	14 ± 8 a	3.588 ± 2.540 a
习惯	411 ± 117 b	46 ± 13 b	9 ± 1 a	1.365 ± 0.301 a
优化 II	534 ± 151 b	65 ± 16 ab	8 ± 2 a	2.409 ± 1.133 a
优化 I	982 ± 36 a	86 ± 22 a	12 ± 3 a	2.289 ± 1.905 a

注：同一列中不同字母表示不同施肥模式在 $P < 0.05$ 水平差异显著，下同。

2.3 不同施肥模式对草莓连作土壤微生物群落功能多样性的影响

AWCD 可以评判土壤中微生物群落的碳源利用能力，指示土壤中微生物的代谢活性。从表 4 可以看出，优化施肥模式 I 的 AWCD 最高，其次是优化施肥模式 II，二者均显著地高于不施肥模式，但是与当地习惯施肥模式间差异不显著。3 种施肥模式下的

Shannon 指数与不施肥模式比均无显著差异。优化施肥模式 I 的 Simpson 指数和 McIntosh 指数均显著高于不施肥施肥模式，但与习惯施肥模式比差异均不显著。说明在短期内不同施肥模式对土壤微生物碳源利用能力和群落多样性的影响是有限的，这可能是因为土壤微生物群落对不同施肥模式的响应需要一定的时间。

表 4 不同施肥模式对土壤微生物群落 AWCD 及功能多样性指数的影响

Table 4 Effects of different fertilization treatments on AWCD and functional diversity indexes of soil microbial communities

施肥模式	AWCD	Shannon 指数 H'	Simpson 指数 D	McIntosh 指数 U
CK	0.859 ± 0.039 b	3.101 ± 0.049 a	0.951 ± 0.003 b	5.320 ± 0.126 b
习惯	0.922 ± 0.019 ab	3.144 ± 0.019 a	0.954 ± 0.001 ab	5.544 ± 0.087 ab
优化 II	0.961 ± 0.018 a	3.138 ± 0.011 a	0.954 ± 0.001 ab	5.769 ± 0.070 a
优化 I	0.985 ± 0.081 a	3.147 ± 0.031 a	0.954 ± 0.001 a	5.896 ± 0.416 a

2.4 不同施肥模式对草莓连作土壤微生物碳源利用特征的影响

研究土壤微生物对不同碳源利用能力的差异有助于更全面地了解土壤微生物群落代谢功能特征。由图 2 可以看出，主成分分析中提取的 2 个主成分因子分

别可以解释所有变量方差的 25.16% 和 20.55%。优化施肥模式 I 主要分布在 PC1 的负值端，而习惯施肥模式及不施肥模式则主要分布在 PC1 的正值端或接近正值端。优化施肥模式 I 可以与当地习惯施肥模式和不施肥模式在 PC1 上明显地区分开，这说明优化施肥模式 I 与当地习惯施肥模式及不施肥模式的土壤微生物对单一碳源的利用能力不同，其群落代谢特征有差异。结合 2.1、2.2 结果，说明优化施肥模式 I 下草莓连作土壤微生物群落朝有利于抗病的方向演替，使草莓枯萎病发病率显著降低。

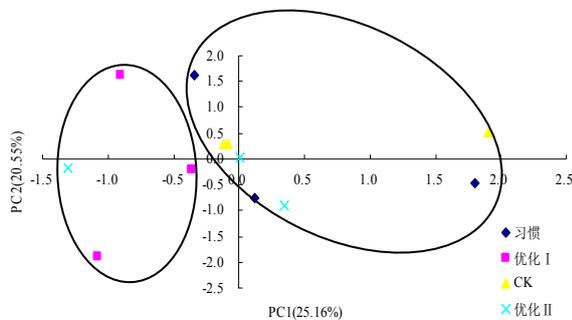


图 2 土壤微生物群落碳源利用特征的主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of carbon utilization of soil microbial communities

3 结论与讨论

从草莓枯萎病发病率来看，优化施肥模式 I、II 的发病率明显比当地习惯施肥模式和不施肥模式低，说明优化施肥模式对控制草莓枯萎病有显著的作用。优化施肥模式 I 的控病机理可能有如下两点：一是优化施肥模式通过施用含氨基酸的基肥和结合不同生育期

的需肥特点叶面喷施含氨基酸的调理剂来补充植物必需的养分,促进植株生长健壮,自身抵抗病原菌侵染能力增强;二是优化施肥模式 I 可以改善连作土壤微生态环境,使土壤中细菌、放线菌比例增加,土壤微生物区系特点趋向于正茬土壤,土壤微生物群落朝有利于抗病的方向演替。优化施肥模式 II 的控病机理主要是草莓返青后在不同生育期通过叶面喷施含氨基酸的调理剂来补充植物必需的养分,从而提高养分利用效率,促进草莓健壮生长,使草莓自身的抗病能力增强。

从两种优化施肥模式的控病效果及施肥量分析,可进一步筛选出更为经济有效的优化施肥模式。优化施肥模式 I 的基肥中氮肥和钾肥分别比优化施肥模式 II 和传统施肥模式减少 5% 和 13%。同时,从总施肥量来看,优化施肥模式 I、II 通过追肥增施 5%、19% 的钾肥,7%、12% 的氮肥,因此两种优化施肥模式总施肥量大于习惯施肥模式。但优化施肥模式 I 和 II 相比,施入的基肥量和总施肥量较少,其对草莓枯萎病的抑制作用却更明显,因此优化施肥模式 I 是草莓种植中更为经济有效的施肥模式。在该种模式下草莓连作土壤微生物群落结构特征、生态功能变化以及草莓自身抗病能力提高的生理生化机制,还需通过长期试验结合分子生物学方法进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Borrero C, Ordovás J, Trillas MI, Avilés M. Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biologs. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38: 1 631-1 637
- [2] Itoh K, Goto D, Sueyasu K, Suyama K, Yamamoto H. Effect of chloropicrin fumigation on microbial communities evaluated by community-level physiological profile and the resistance against Fusarium wilt. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2002, 48: 333-339
- [3] Hoestra H. General Remarks on Replant Disease. *Acta Horticulturae*, 1988, 233: 11-16
- [4] 甄文超, 代丽, 胡同乐, 曹克强, 孔俊英. 连作对草莓生长发育和根部病害发生的影响. *河北农业大学学报*, 2004, 27(5): 68-71
- [5] 郭兰萍, 黄璐琦, 阎洪阁, 吕冬梅, 蒋有绪. 基于地理信息系统的苍术道地药材气候生态特征研究. *中国中药杂志*, 2005, 30(8): 565-568
- [6] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985
- [7] Komada H. Development of a Selective Medium for Quantitative Isolation of *Fusarium oxysporum* from Natural Soil. *Review of Plant Protection Research*, 1975, 8: 114-125
- [8] Campbell CD, Grayston SJ, Hirst DJ. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30: 33-41
- [9] 申卫收, 林先贵, 张华勇, 尹睿, 段增强, 施卫明. 不同施肥处理下蔬菜塑料大棚土壤微生物活性及功能多样性. *生态学报*, 2008, 28(6): 2 682-2 689
- [10] Zak JC, Willig MR, Moorhead DL. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 1 101-1 108
- [11] Gunes A, Inal A, Aktas M. Reducing nitrate content of NET grown winter onion plants by partial replacement of NO_3^- with amino acid in nutrient solution. *Scientia Horticulturae*, 1996, 65: 203-208
- [12] Gunes A, Post WNK, Kirkby EA. Influence of partial replacement of nitrate by amino acid nitrogen or urea in the nutrient medium on nitrate accumulation in NET grown winter lettuce. *Journal of Plant Nutrition*, 1994, 17(11): 1929-1938
- [13] 甄文超, 代丽, 胡同乐, 曹克强. 连作草莓土壤微生物区系动态的研究. *河北农业大学学报*, 2005, 28(3): 70-72

Effects of Fertilization on Strawberry Fusarium Wilt and Soil Microbial Communities Under Continuous Mono-cropping

CHEN Yi-qun^{1,2,3}, DONG Yuan-hua^{1,3}, WANG Hui^{1,3}, HUANG Guan-yi¹, HUO Heng-zhi⁴

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences) , Nanjing 210008, China;

2 College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China; 3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4 Zhenjiang Institute of Agricultural Science of Hilly Regions in Jiangsu, Jurong, Jiangsu 212400, China)

Abstract: Soil nutrient management is recently an attractive method to control soil-borne plant disease. A field plot experiment with different fertilization treatments was carried out to evaluate the effects of fertilization on disease resistance of strawberry and soil microbial communities in continuous mono-cropping field of strawberry, by using microbial cultivation and Biolog analysis. The results showed that strawberry plant growth could be improved and strawberry fusarium wilt was controlled effectively under optimized fertilization treatments. In addition, the proportion of culturable bacterium and actinomycetes to fungus under optimized fertilization I were increased when compared with conventional fertilization treatment. The Biolog analyses indicated that optimized fertilization treatments had less affects on the carbon utilization ability and Shannon, Simpson, McIntosh indexes of soil microbial communities in a short term. PCA analyses suggested that carbon utilization of soil microbial communities under optimized fertilization I was obviously different from that of conventional fertilization treatment. Considering control of strawberry Fusarium wilt and dosage of fertilizer, optimized fertilization I was more effective and economical treatment than optimized fertilization II.

Key words: Strawberry fusarium wilt, Fertilization, Soil microbial community, Biolog