

# 土壤厌氧还原消毒对尖孢镰刀菌的抑制研究<sup>①</sup>

黄新琦<sup>1,2</sup>, 温 腾<sup>1</sup>, 孟 磊<sup>3</sup>, 张金波<sup>1</sup>, 朱同彬<sup>1</sup>, 蔡祖聪<sup>1,2\*</sup>

(1 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023; 2 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023; 3 海南大学农学院, 海口 570228)

**摘 要:** 试验采用土壤淹水同时添加有机物料的方法创造土壤厌氧还原环境, 抑制香蕉连作土壤中致病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*, FOC)的数量。结果表明: 土壤淹水同时添加玉米秸秆的处理显著增加了土壤 pH, 降低了土壤氧化还原电位和土壤中 NO<sub>3</sub>-N 的浓度; 土壤淹水同时添加玉米秸秆的处理过程中, 土壤可培养细菌数量显著增加, 土壤中可培养放线菌和真菌数量显著降低; 土壤淹水同时添加石灰或玉米秸秆均显著降低了土壤中 FOC 的数量, 其中每千克土添加 20 g 玉米秸秆的处理中 FOC 数量下降最多, 仅为对照处理 FOC 数量的 2.8%。田间试验结果表明: 土壤淹水同时每千克土添加 5 g 玉米秸秆可以有效降低香蕉枯萎病的发生, 防效为 69.5%。因此, 土壤淹水同时添加有机物料是一种可以防控香蕉枯萎病的高效和环保的方法。

**关键词:** 有机物料; 土壤厌氧消毒; 尖孢镰刀菌

中图分类号: S432.4

香蕉是世界上最重要的作物之一, 在许多发展中国家作为一种主要的食物和经济来源<sup>[1]</sup>。在全球香蕉产业快速发展的同时, 一些对香蕉具有毁灭性的病害在世界各地均有不同程度的发生, 严重制约着香蕉的生产<sup>[2]</sup>, 其中由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* (FOC) f. sp. *cubense* 引起的土传香蕉枯萎病最为严重<sup>[3]</sup>。与黑叶病等其他病害不同, 化学农药的施用并不能完全地防控香蕉枯萎病, 而且枯萎病致病菌 FOC 能够产生厚垣孢子, 即使在没有宿主存在的情况下也能在土壤里存活数年甚至数十年之久, 防治难度极大<sup>[3-4]</sup>。目前生产上主要通过化学防治、生物防治、培育抗病品种和一些农艺措施来减缓香蕉枯萎病的发生。但是由于环境污染、成本较高和防治效果差等原因, 这些方法并不能有效解决香蕉枯萎病的问题<sup>[5-6]</sup>。

先前的研究报道, 土壤中病原菌的浓度与植物的发病率呈显著正相关<sup>[7-8]</sup>, 因此能否有效地降低土壤中病原菌的数量是防控土传病害取得成功的关键因素。Shinmura<sup>[9]</sup>在 2000 年首次提出使用厌氧土壤消毒(anaerobic soil disinfestation, ASD)的方法抑制土壤中的病原菌, 随后此方法被证实可以抑制多种土传病原菌和线虫<sup>[10]</sup>。然而对于 ASD 过程中土壤性质变化

的研究还较少, 本试验采用 ASD 方法抑制香蕉连作土壤中病原菌 FOC, 研究 ASD 过程中土壤理化和生物学性质的变化, 同时研究 ASD 对香蕉枯萎病的实际防治效果, 此方法在国内属于首创。

## 1 材料与方法

### 1.1 土培试验

**1.1.1 材料** 供试土壤采自海南省澄迈县红湖, 是由玄武岩母质发育而成的砖红壤。供试有机物料: 玉米秸秆(C/N 45.7), 于当地获得, 充分晾干后打碎。放入 1.2 中。供试培养基: 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马丁氏培养基和高氏一号培养基, 配方参照文献<sup>[11]</sup>。

**1.1.2 试验处理** 将土壤与有机物料混匀后装入塑料盆钵中, 每盆装 500 g 土。试验分为 5 个处理: 不做任何处理(CK1)、淹水(CK2)、5 g/kg 玉米秸秆 + 淹水(LMS)、20 g/kg 玉米秸秆 + 淹水(HMS)和 3 g/kg 石灰 + 淹水(LI)。每个处理 3 个重复。处理周期为 25 天, 处理完成后排水, 土壤自然落干(约 15 天)。分别于处理前、处理第 5、10、15、25 天和落干后采集土样。盆钵置于温室中培养, 处理期间土壤温度为 25 ~ 35℃。

基金项目: 国家自然科学基金项目(41301335, 41222005)、高等学校博士学科点专项科研基金项目(20133207120018)和江苏高校优势学科建设工程项目资助。

\* 通讯作者(zccai@njnu.edu.cn)

作者简介: 黄新琦(1986—), 男, 江苏盐城人, 博士, 讲师, 主要从事土壤微生物及土传病害生物防控等方面研究。E-mail: xqhuang@njnu.edu.cn

### 1.1.3 土壤 pH、NO<sub>3</sub>-N 和氧化还原电位(Eh)的测定

将土壤分别与水和 2 mol/L KCl 溶液以 1:5 的比例混匀, 200 r/min 振荡 1 h 后过滤, 用 pH 计(Mettler S220K, Switzerland)测定土壤水提溶液的 pH; KCl 溶液用流动分析仪(Skalar San++, Holland)测定土壤中的 NO<sub>3</sub>-N 的浓度。土壤 Eh 采用便携式酸度计(QX6530, 中国科学院南京土壤所)原位测量。

**1.1.4 土壤中可培养微生物计数** 称取土壤样品 10 g, 加入到 90 ml 无菌水中, 170 r/min 振荡 20 min, 进行系列梯度稀释后分别于牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号培养基和马丁氏培养基上涂布, 30℃ 培养 2 天后计数土壤样品中可培养细菌数量, 4 天后计数放线菌和真菌的数量。同时测定土壤样品的含水量, 将微生物数量单位折算成每克干土的 lg CFU。

**1.1.5 土壤中 FOC 的 real-time PCR 测定** 土壤 DNA 的提取使用 Power Soil™ DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., USA), 具体方法参照文献[12]。Real-time PCR 反应采用 8 联管于 CFX-96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)上进行。扩增体系为 2 μl 土壤 DNA 模板, 10 μl SYBR Green premix EX Taq(2×, TaKaRa, 中国大连), 引物 ITS1-F: 5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3'和 AFP308: 5'-CGAATTAACGCGAGTCCCAAC-3'(10 μmol/L)各 0.4 μl, 7.2 μl 无菌去离子水。反应条件为 95℃ × 2 min; 95℃ × 10 s, 58℃ × 15 s, 72℃ × 20 s, 40 个循环。在每一循环的退火阶段采集荧光信号, 实时检测并且记录荧光信号的变化, 反应结束后制作扩增产物的熔解曲线(T<sub>m</sub> = 86℃ ± 0.5℃)。标准曲线的绘制参照文献[13], 得出的标准曲线为  $y = -3.2754x + 44.047$ ,  $R^2 = 0.997$ 。

### 1.2 田间试验

田间试验所用地块位于海南省乐东县万钟公司香蕉种植园内, 此地块土壤 pH 5.7, 有机碳 2.4 g/kg, 全氮 0.2 g/kg。供试香蕉苗为当地组培厂生产的枯萎病感性品种。供试有机物料同土培试验。田间试验分为 2 个处理: 原位土壤(CK)和 5 g/kg 玉米秸秆 + 淹水(ASD)。处理周期为 25 天, 处理完成后排水。土壤自然落干(约 10 天)后种植无菌的香蕉组培苗, 每个处理 3 个重复; 每个重复 12 棵香蕉苗, 每个重复占地约 60 m<sup>2</sup>。120 天后统计香蕉枯萎病的发病率。

### 1.3 数据处理

试验数据处理采用 Excel 2003、Origin 7.5 和 SPSS 13.0 统计分析软件, 并采用 Duncan 氏新复极差法检验差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

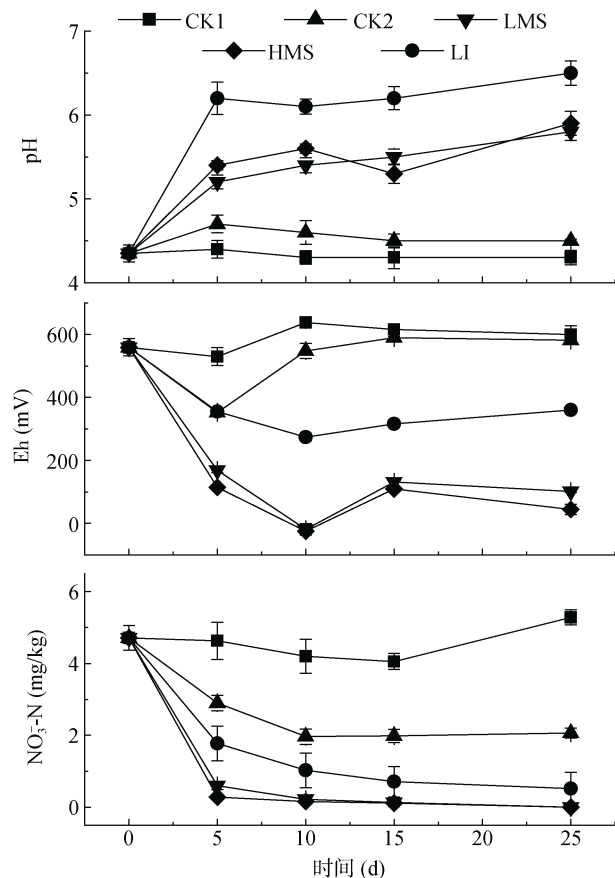
### 2.1 土壤 pH、Eh 和 NO<sub>3</sub>-N 浓度的变化

土培试验处理第 5 天, 在所有淹水的处理中

(CK2, LMS, HMS 和 LI), 土壤 pH 较 CK1 处理相比均有显著增高; 同时添加水稻秸秆处理土壤的 pH 显著高于 CK2 处理; LMS 和 HMS 处理土壤 pH 差异不显著; 添加石灰处理土壤的 pH 最高, 为 6.2。随着处理时间的增加, CK1 和 CK2 处理中土壤 pH 变化较小; 添加秸秆和石灰的处理 pH 呈缓慢上升趋势(图 1)。

土培试验处理第 5 天, 所有淹水处理土壤 Eh 较 CK1 处理相比均有显著下降; CK2 与 LI 处理土壤 Eh 无显著差异; 添加有机物料处理土壤 Eh 显著低于 CK2 和 LI 处理, 其中添加高量有机物料处理土壤 Eh 最低, 为 114.3。随着处理时间的增加, CK2 处理土壤 Eh 逐渐上升, 第 15 天与 CK1 处理相比无显著差异; LI、LMS 和 HMS 处理土壤 Eh 逐渐下降, 于第 10 天达到最低值, 分别为 274.2、-18.7 和 -25.2, 随后缓慢上升(图 1)。

随着处理时间的增加, 所有淹水处理土壤中的 NO<sub>3</sub>-N 浓度较 CK1 处理均有下降, 差异显著; LI 处理土壤 NO<sub>3</sub>-N 浓度显著低于 CK2 处理; LMS 和 HMS



(CK1: 不做任何处理; CK2: 淹水; LMS: 5 g/kg 玉米秸秆+淹水; HMS: 20 g/kg 玉米秸秆+淹水; LI: 3 g/kg 石灰+淹水)

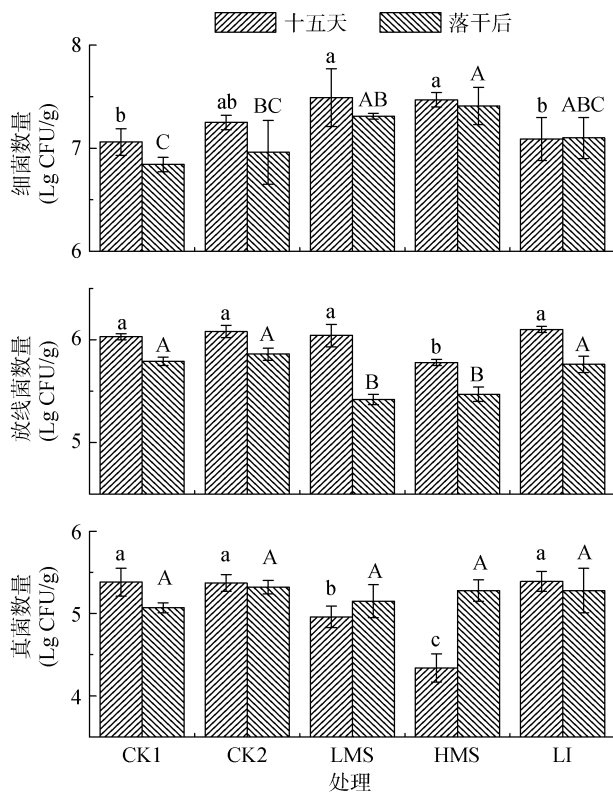
图 1 不同处理土壤中 pH、Eh 和 NO<sub>3</sub>-N 浓度的变化

Fig. 1 Variations of pH, Eh and concentration of NO<sub>3</sub>-N in soils under different treatments

处理土壤 NO<sub>3</sub>-N 浓度显著低于 LI 处理。处理第 10 天时, 添加有机物料处理的土壤中 NO<sub>3</sub>-N 的浓度接近 0(图 1)。

### 2.2 土壤可培养细菌、真菌和放线菌数量

土培试验处理第 15 天, LMS 和 HMS 处理土壤中可培养细菌数量较 CK1 处理显著增加, 分别是 CK1 处理的 3.1 和 2.6 倍; CK2 处理中土壤细菌数量较 CK1 处理有小幅增加, 但差异不显著。与第 15 天结果相似, 土壤落干后添加有机物料处理土壤细菌数量显著高于 CK1 处理, 其中 HMS 处理土壤中细菌数量最大, 为 2.7 × 10<sup>7</sup> CFU/g。处理第 15 天, HMS 处理土壤中可培养放线菌数量较其他处理相比显著下降, 仅为 CK1 处理的 56.4%; 其余处理差异不显著。土壤落干后, LMS 和 HMS 处理土壤放线菌数量显著低于其他处理, 分别为 CK1 处理的 42.9% 和 48.7%。处理第 15 天, 添加有机物料处理土壤可培养真菌数量显著低于其他处理; HMS 处理土壤真菌数量显著低于 LMS 处理, 仅为 CK1 处理的 9.2%; 其余处理差异不显著。随着处理时间的增加, LMS 和 HMS 处理土壤真菌数量逐渐上升, 土壤落干后较其他处理土壤中真菌数量相比无显著差异(图 2)。



(柱图上不同字母表示同一时间不同处理间经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著(P < 0.05); 下同)

图 2 不同处理土壤中细菌、放线菌和真菌的数量

Fig. 2 Populations of bacteria, actinomycetes and fungi in soils under different treatments

### 2.3 荧光定量 PCR 检测土壤 FOC

土培试验土壤落干后, 添加有机物料和石灰的土壤中 FOC 的数量较对照处理(CK1 和 CK2)均有显著下降; 其中添加高量玉米秸秆处理中 FOC 的数量最低, 仅为 CK1 处理的 2.8%; 添加低量有机物料处理次之, 为 CK1 处理的 12%; 添加石灰处理土壤 FOC 数量为 CK1 处理的 45.9%; CK2 与 CK1 处理差异不显著(图 3)。

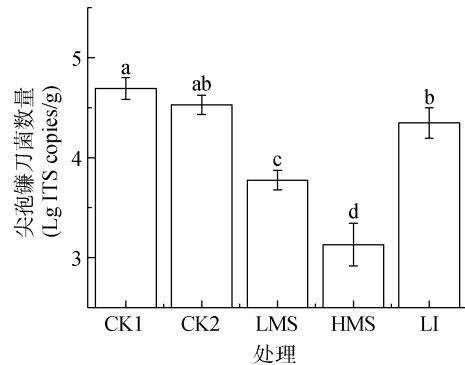


图 3 土壤落干后不同处理土壤中尖孢镰刀菌的数量

Fig. 3 Population of FOC in drained soils under different treatments

### 2.4 枯萎病防治效果

种植香蕉 120 天后对香蕉发病率进行调查, 结果表明: 对照处理香蕉枯萎病的发病率为 54.7%, 而 ASD 处理过后香蕉枯萎病的发病率仅为 16.7%, ASD 对于香蕉枯萎病的防效为 69.5%。

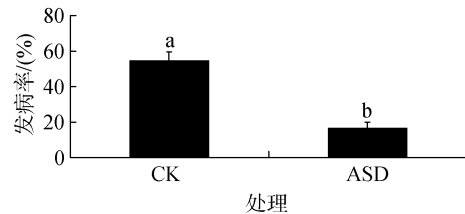


图 4 田间试验香蕉枯萎病发病率

Fig. 4 Disease incidences of banana Fusarium wilt in field experiment

## 3 讨论

人们早就提出采用土壤淹水的方法杀灭土壤中的土传病原菌, 土壤淹水杀灭土传病原菌的可能机理有: 形成土壤的厌氧环境<sup>[14]</sup>、CO<sub>2</sub> 浓度增高<sup>[15]</sup>和许多微生物在厌氧环境中产生的对病原菌具有毒害作用的代谢产物, 如氨、甲烷、有机酸和硫化氢等<sup>[16]</sup>。但是大量的研究表明, 为了达到理想的杀菌效果, 单纯的淹水处理需要 3~4 个月甚至更长时间, 并且当土壤中病原菌浓度较高或者存在对病原菌有利的未知因素时, 单纯的淹水处理并不能够有效抑制土壤中病原菌的数量<sup>[17-18]</sup>。本研究结果表明, 单纯淹水在

短期内对于 FOC 并无明显的抑制作用,然而在淹水处理的同时添加有机物料却能有效地降低土壤中 FOC 的数量,处理 25 天后,添加高量有机物料的处理土壤中 FOC 的数量仅为对照处理的 2.8%。其原因可能是单纯淹水处理时,由于缺乏营养,土壤中的厌氧微生物代谢活动较慢,并不能产生大量的抑菌物质,有机物料的添加显著增强了土壤中厌氧微生物的代谢活动<sup>[19]</sup>,使其在短期内产生大量的对病原菌具有毒害作用的代谢产物,如上述提到的氨、有机酸和硫化氢等。此外,在生产实践中,香蕉种植者常采用石灰对 FOC 侵染的土壤进行消毒,本研究结果表明,土壤淹水同时添加有机物料对于 FOC 的抑制作用要显著高于石灰处理。

土壤 Eh 的下降表明土壤中的氧气消耗和还原程度增强<sup>[20]</sup>,本试验中 ASD 处理过程中土壤 Eh 显著下降,说明 ASD 创造了土壤的厌氧还原条件。厌氧环境中土壤反硝化作用增强,因此 ASD 处理土壤中的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度迅速降低;同时土壤的还原环境使得土壤 pH 显著升高,说明 ASD 对于酸性土壤的改良具有很好的效果。此外,ASD 处理显著增加了土壤中的可培养细菌数量,推测可能是一些兼性厌氧型的细菌增加,报道指出多数土壤细菌对于植物的生长具有促进作用<sup>[21]</sup>,因此 ASD 还具有改善土壤微生物区系的作用。同时 ASD 还显著降低了土壤中真菌的数量,说明 ASD 对于真菌具有广谱性的抑制作用,与先前报道相似<sup>[22]</sup>。土壤落干后,ASD 处理真菌的数量上升到处理前的水平,然而 FOC 的数量仍然显著低于对照处理,说明 ASD 处理后,土壤真菌数量的增加并不包括或不仅是致病菌 FOC 的增加。

本研究采用的 ASD 方法由向土壤中添加微生物易分解的有机物料和通过淹水保持土壤厌氧状态组成,此方法已被证实对多种植物土传病原菌具有抑制效果,如尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*、茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum*<sup>[22]</sup>。本研究田间试验结果表明 ASD 处理不仅可以降低土壤中病原菌的数量,而且能够有效防控香蕉枯萎病,防效为 69.5%。先前研究报道指出超过 50% 的防控效果即是显著的,并可在田间条件下推广<sup>[23]</sup>。因此 ASD 处理是一种有效的防治土传病害的方法。此外,ASD 处理不仅能有效降低土壤中病原菌数量和枯萎病的发生,而且缓解了农业废弃物污染问题,还能降低农业生产中的化肥农药的投入<sup>[24]</sup>。由于具有上述优点,ASD 处理可以替代污染严重的化学杀菌剂,成为防控土传病害的有效措施之一。

## 参考文献:

- [1] Li WM, Qian CM, Mo YW, Hu YL, Xie JH. Tolerance of banana for fusarium wilt is associated with early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the roots[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(55): 11 378–11 387
- [2] Getha K, Vikineswary S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, 28: 303–310
- [3] Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, Souza MT, Kema GHJ. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen[J]. Plant Pathology, 2010, 59(2): 348–357
- [4] Stover RH. Fusarium wilt of banana: Some history and current status of the disease[M]. St Paul: American Phytopathological Society Press, 1990
- [5] Katan J. Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens[J]. Crop Protection, 2000, 19: 725–731
- [6] Corsten R, Roelofs T, de Veld P. Tackling *Verticillium* problems in chrysanthemum[J]. Vakbl Bloemisterij, 2002, 57(29): 42–43
- [7] Chinn SHF, Sallans BJ, Ledingham RJ. Spore populations of *Helminthosporium sativum* in soils in relation to the occurrence of common root rot of wheat[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1962, 4: 720–727
- [8] 何欣, 黄启为, 杨兴明, 冉炜, 徐阳春, 沈标, 沈其荣. 香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3 809–3 816
- [9] Shinmura A. Causal agent and control of root rot of welsh onion[C]. PSJ Soilborne Disease Workshop Report, 2000, 20: 133–143
- [10] Goud JKC, Termorshuizen AJ, Blok WJ, van Bruggen AHC. Long-term effect of biological soil disinfection on *Verticillium* wilt[J]. Plant Disease, 2004, 88(7): 688–694
- [11] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [12] Dineen SM, Aranda R, Anders DL, Robertson JM. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(6): 1 886–1 896
- [13] López-Mondéjar R, Antón A, Raidl S, Ros M, Pascual JA. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(8): 2 888–2 891
- [14] Blok WJ, Lamers JG, Termorshuizen AJ, Bollen GJ. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping[J]. Phytopathology, 2000, 90: 253–259
- [15] Bruehl GW. Soil-Borne Plant Pathogens[M]. New York: MacMillan, 1987
- [16] Runia WT, Molendijk LPG. Physical methods for soil disinfection in intensive agriculture: Old methods and new approaches[J]. Acta Horticulturae 2010, 883: 249–258

- [17] Stover RH. Fusarial wilt (Panama disease) of Bananas and Other Musa species[M]. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1962
- [18] Pullman GS, DeVay JE. Effect of soil flooding and paddy rice culture, on the survival of *Verticillium dahliae* and incidence of Verticillium wilt in cotton[J]. Phytopathology 1981, 71: 1 285–1 289
- [19] Oka Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—A review[J]. Applied Soil Ecology, 2010, 44(2): 101–115
- [20] Momma N. Biological soil disinfestation (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2008, 42(1): 7–12
- [21] Huang X, Zhang N, Yong X, Yang XM, Shen QR. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43[J]. Microbiological Research, 2011, 167: 135–143
- [22] Shinmura A. Principle and effect of soil sterilization method by reducing redox potential of soil[C]. PSJ Soilborne Disease Workshop Report, 2004, 22: 2–12
- [23] Minuto A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino LM. Control of soil borne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization[J]. Crop Protection, 2006, 15: 735–742
- [24] PiedraBuena A, García-Álvarez A, Díez-Rojo MÁ, Bello A. Use of crop residues for the control of *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions[J]. Pest Management Science, 2006, 62(10): 919–926

## Anaerobic Soil Disinfestation on *Fusarium oxysporum*

HUANG Xin-qi<sup>1,2</sup>, WEN Teng<sup>1</sup>, MENG Lei<sup>3</sup>, ZHANG Jin-bo<sup>1</sup>, ZHU Tong-bin<sup>1</sup>, CAI Zu-cong<sup>1,2\*</sup>

(1 School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, Nanjing 210023, China; 3 College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** The method of anaerobic soil disinfestations (ASD) involving incorporation of organic matters under flooding condition was used for creating soil anaerobic and reductive environment and controlling the pathogen *Fusarium oxysporum* (FOC) in banana continuous cropping soils. The results showed that ASD significantly increased soil pH, reduced soil Eh and the concentration of NO<sub>3</sub>-N in the soil. In ASD process, the population of cultural bacteria significantly increased, but the populations of antinomies and fungi were reduced. The population of FOC significantly decreased in the flooding soil incorporated with maize straw (20 g/kg soil) to 2.8% of untreated soil. Incorporation of lime decreased the population of FOC significantly as well, but less effectively than with maize straw did. ASD incorporated with maize straw (5 g/kg soil) could significantly decrease the disease incidence of banana, and a control efficiency of 69.5% was obtained in field experiment. These results indicated that ASD is an effective and environmentally friendly way to control banana *Fusarium* wilt disease.

**Key words:** Organic matters, Anaerobic soil disinfestation, *Fusarium oxysporum*