

棉隆熏蒸与微生物有机肥联用对西瓜枯萎病的防控研究^①

曹云¹, 宋修超¹, 郭德杰¹, 王秋君¹, 马艳^{1*}, 沈其荣²

(1 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 南京 210014; 2 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 通过田间试验评估了土壤熏蒸和微生物有机肥联用对西瓜枯萎病的防控效果及对西瓜产量与品质的影响。试验设置 3 个处理: 对照(CK)、棉隆熏蒸结合普通有机肥处理(OF)、棉隆熏蒸结合微生物有机肥处理(BOF)。结果发现: 与 CK 相比, BOF 处理和 OF 处理均显著降低西瓜枯萎病发生率, 病害防治效果分别为 65.8% 和 54.1%; BOF 处理还显著增加连作西瓜产量(增幅达 33.4%), 提高西瓜中心糖含量(增幅达 15.9%)和糖酸比(增幅达 13.4%)。棉隆熏蒸处理土壤细菌和真菌数量均显著低于 CK, 尖孢镰刀菌数量下降 3 个数量级; 土壤脲酶、蔗糖酶、荧光素二乙酸酯酶活性以及土壤微生物碳源利用多样性指数、均一性指数较 CK 均显著降低。棉隆熏蒸后施用有机肥可使土壤微生物数量、土壤酶活性及微生物碳源利用多样性逐步恢复, 其中 BOF 处理土壤微生物数量和酶活性恢复速度和强度更大、病原菌数量及病原菌与真菌数量比最低、微生物碳源利用多样性指数最高。结果表明, 利用棉隆对连作西瓜土壤熏蒸 20 d 能显著减少病原菌数量, 配合施用微生物有机肥, 能快速改善土壤微生物区系和恢复土壤酶活性, 降低枯萎病的发生, 并有效促进西瓜生长, 提高西瓜产量及品质。

关键词: 土壤熏蒸; 棉隆; 微生物有机肥; 连作; 西瓜

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A

中国是当前最大的西瓜生产国, 约占世界总种植面积的 55% 及总产量的 70% 以上^[1]。但由于西瓜连作各种土传病害发生逐年加重, 特别是枯萎病已经成为西瓜生产上发病最重、危害最大的病害之一, 严重制约了西瓜产业的健康发展^[2]。西瓜枯萎病属于世界性的土传真菌病害, 防治十分困难^[3]。西瓜枯萎病的发生和爆发程度除了受植株的健康状况以及外界环境条件等因素的影响外, 很大程度上取决于土壤中病原菌的数量和微生物群落结构^[4]。尖孢镰刀菌是典型的单循环病原菌, 通过各种方法降低土壤中初始尖孢镰刀菌的数量, 能有效防控枯萎病的发生^[5]。化学熏蒸是土壤处理的重要措施之一, 也是目前主要的防治方法之一^[6-7]。

棉隆作为一种广谱性土壤熏蒸剂, 已有很长的应用历史, 其施于土壤后, 遇水生成异硫氰酸甲酯, 该气体能杀死土壤中的病原菌。由于异硫氰酸甲酯在土壤中彻底分解后产物是 CO₂ 和 H₂O, 在土壤和作物上均无残留, 因而是联合国环境组织推荐用于替代甲基溴的绿色环保土壤熏蒸产品之一^[8]。近年来, 棉隆

熏蒸在田间对多种作物土传病原菌表现出了一定的防治效果^[6-7]。但土壤熏蒸剂的大量使用, 在直接杀灭连作土传病原菌的同时, 土壤中有益微生物类群同样受到破坏性的影响, 微生物群落结构显著改变, 消毒过的土壤也可能被病原菌二次侵染, 导致病害持续防控效果差^[9-10]。也有学者通过施用含有针对性的拮抗菌或其他有益菌的微生物有机肥来调节土壤微生物区系以克服连作障碍^[11], 但田间效果不稳定。前人的研究表明, 在病害不太严重的地块采用生物防治可以达到较好的效果, 但对发病严重的田块, 单独的生物防治效果甚微有时甚至没有防治效果^[10], 这主要与微生物有机肥的类型、土传病原菌的种类以及供试土壤的生态环境具有重要关系^[12]。

前期田间试验证实, 单独采用棉隆熏蒸, 尤其在黏土上反而加重辣椒疫病的发生率^[13]; 对西瓜枯萎病的防治效果也仅为 10%~20%。因为异硫氰酸甲酯在黏质土壤中对病原菌的毒杀效果弱于有机质相对贫瘠的砂质土^[14]。为寻求缓解或克服黏质连作土壤上西瓜枯萎病的有效方法, 在前人研究基础上, 提出

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2015CB150503)和江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(16)1002)资助。

* 通讯作者(myjaas@sina.com)

作者简介: 曹云(1981—), 女, 江苏丹阳人, 博士, 副研究员, 研究方向为农业废弃物资源化利用。E-mail: youngtsao66@126.com

棉隆熏蒸和施用微生物有机肥相结合的防控策略,即在移栽前通过土壤熏蒸来杀灭病原菌,在西瓜移栽后将含有特定拮抗菌的微生物有机肥穴施入西瓜根部,直接向西瓜根际土壤补充有益微生物。目前,对连作土壤进行预处理和微生物有机肥联用为防控马铃薯^[15]、香蕉^[16]、黄瓜^[17]等多种作物土传病害提供了新的技术,但这种方法对设施西瓜连作障碍的防控效果如何?国内外还未有系统而深入的研究。因此,本试验拟研究棉隆熏蒸和微生物有机肥联用对设施连作西瓜土传枯萎病的防控效果及对西瓜生长、产量、品质以及土壤微生物区系和酶活性等的影响,以期对设施西瓜土传病害的防治提供新技术与新方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用“棉隆”为土壤化学熏蒸剂,由江苏南通堃鑫有限公司生产。供试微生物有机肥“饕播王”由江阴联业生物科技有限公司提供,其基本理化性状为:有机质 442.0 g/kg、总氮 33.6 g/kg、总磷 35 g/kg、总钾 6.7 g/kg,水分 305 g/kg,总氨基酸含量 32 g/kg,含根际促生细菌和抗土传病害功能菌数量大于 10^8 cfu/g。供试普通有机肥由江苏省农业科学院六合动物科学基地堆肥场提供,发酵原料为稻草和猪粪,基本理化性状为:有机质 304.8 g/kg,总氮 28.2 g/kg,总磷 22.7 g/kg,总钾 4.8 g/kg,水分含量 287 g/kg。供试西瓜品种为苏蜜 8 号,由江蔬种苗科技有限公司提供。

1.2 试验设计

本试验于 2015 年在位于江苏省农业科学院六合动物科学基地的西瓜种植大棚进行。试验之前连续种植西瓜 4 茬,前茬西瓜枯萎病发病率 80% 左右。大棚土壤为马肝土,0~20 cm 土层基本理化性状:有机质 19.81 g/kg,全氮 0.66 g/kg,碱解氮 172.54 mg/kg,铵态氮 13.4 mg/kg,硝态氮 108.28 mg/kg,有效磷 122.4 mg/kg,速效钾 131.7 mg/kg。

试验设置 3 个处理:习惯施肥处理(CK),即施入普通有机肥和复合肥(15-15-15)作为底肥;棉隆熏蒸结合普通有机肥处理(OF),棉隆用量为 375 kg/hm^2 ,底肥施用同,但在西瓜移栽时每株穴施普通有机肥 100 g;棉隆熏蒸结合微生物有机肥处理(BOF),底肥施用及棉隆熏蒸处理同,但在西瓜移栽时每株穴施微生物有机肥 100 g。各处理等氮磷钾施入,其用量为 N 150 kg/hm^2 , P_2O_5 80 kg/hm^2 , K_2O 200 kg/hm^2 ,以氮磷钾用量最高的处理为基准,处理、处理中氮磷钾量不足的用尿素、过磷

酸钙和硫酸钾补足。

各处理将土壤旋耕 15~20 cm,处理、处理撒施棉隆,然后再将土壤旋耕 15~20 cm,使施入的棉隆与土壤混合均匀,浇水至土壤最大持水量的 70%,迅速覆盖 0.045 cm 厚的塑料薄膜,小区四周采用反理法将塑料薄膜压入土壤,确保密封良好。棉隆处理时间为 2015 年 3 月 3 日—3 月 23 日,处理结束将塑料薄膜揭开,自然透气 3 d 后所有处理施入底肥,并旋耕 15~20 cm。西瓜在 2015 年 2 月 15 日播种育苗,4 月 1 日移栽,栽培方式为畦栽,吊长,畦面宽 1.5 m,沟宽 0.5 m,每畦栽两行,行间距 1 m,株距 50 cm。每处理 3 个重复,每个小区面积 $18 \text{ m} \times 1.5 \text{ m} = 27 \text{ m}^2$ 。大棚长度 60 m,宽度为 8 m,棚内各处理随机排列,大棚两头空置 1 m,起垄作为缓冲带。

1.3 样品采集与分析

分别在西瓜移栽前(3 月 24 日,即土壤熏蒸完成后)、伸蔓期(5 月 5 日)、开花期(5 月 18 日)、成熟期(6 月 10 日)采集各小区土壤样品,于熏蒸结束后第 35、45、60、75 天调查发病率。西瓜移栽前每个土壤样品按照五点法采集。西瓜生长期土壤样品采集时,采取破坏性采样法,每次每小区采集植株 3 株,并采集西瓜根际土壤。采集时先将植株根系从土壤中整体挖出,采用抖土法抖掉与根系松散结合的土体土,抖落西瓜植株根系上的土壤后,将根称重,按每克根加 9 ml 无菌水的比例放入事先装有玻璃珠的试管中,再将试管放置在涡旋仪上涡旋 5 min,洗脱在无菌水中的土壤即为根际土壤。根际土壤用于总 DNA 的提取和 Biolog-ECO 板测定。土体土用于土壤酶活性测定。

在西瓜采收期(6 月 10 日开始,6 月 27 日完毕)摘下每小区所有西瓜,并逐个称重,记下总个数与总重。同时测定商品果(单果重 1.5 kg 以上)产量。在西瓜成熟时,西瓜收获时在每个小区随机采集健壮程度和长势一致的无病害西瓜植株 10 株,调查株高、叶片数等农艺性状,同时将植株整株挖出,分根、地上部两部分在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 下杀青 30 min, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘至恒重,称量干物质。记录试验小区西瓜实测产量,调查商品果(单果重 1 kg 以上)率。

1.3.1 土壤总 DNA 的提取与荧光定量 PCR 分析 将采集晾干的土样研碎并过筛(1 mm),装入聚乙烯袋保存在 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中用于 DNA 提取。土壤 DNA 的提取采用 FastDNA[®] Spin soil kit (MP Biomedicals, Solon, OH)试剂盒,提取方法参照试剂盒说明书。土壤中细菌 16s rDNA 上游引物 EUB338f (5'-GCTGCCTC

CCGTAGGAGT-3')、下游引物 907r (5'-CCGTCAA TTCMTTTRAGTT-3')；真菌 18srDNA 上游引物 EUK309f (5'-CCGGAGAGGGAGCCTG-3')、下游引物 EUK516r (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3')。土壤中西瓜尖孢镰刀菌 ITS 上游引物 Fon-1(CGATTAGCG AAGACATTCACAAGACT)、下游引物 Fon-2(AC GGTCAGAAGATGCAGGGTAAAGGT)。荧光定量 PCR 扩增体系为：1x SYBR® Premix Ex TaqTM (2×)(Takara 宝生物工程有限公司)混合液 10 μl，上、下游引物各 0.5 μl，DNA 模板 2 μl，ddH₂O 7 μl。反应程序：95 预变性 2 min，94 变性 30 s，60 退火延伸 34 s，40 个循环。每个样品设 3 个重复，以无菌水代替目标基因 DNA 为空白对照，定量 PCR 分析在 ABI 7500 Real-time PCR system 扩增仪上进行。

1.3.2 土壤酶活性分析 土壤酶包括荧光素二乙酸酯水解酶、蔗糖酶、脲酶，其活性的测定方法参考相关的实验工具书^[18]。

1.3.3 土壤微生物碳代谢多样性分析 微生物碳代谢多样性用 Biolog-ECO 板测定。取相当于 10 g 干土重的鲜土，加入 90 ml 灭过菌的 0.85% NaCl 溶液中，摇床上震荡 30 min，然后无菌水逐步稀释 10⁻³，取上清液(125 μl)接种到测试板的每个孔中，将接种好的测试板放至 25℃ 下培养，每隔 12 h 在波长为 590 nm 的 BIOLOG 读数器上读数，试验持续 7 d。Shannon 指数(H')用于评估微生物的多样性，即 $H' = -\sum(P_i \ln P_i)$ ，其中 P_i 为有第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比值，即 $P_i = (C_i - R) / \sum(C_i - R)$ ， C_i 、 R 分别为第 i 孔和对照孔的吸光度；Simpson 指数(D)用于评估优势度，即 $D = 1 - \sum(P_i)^2$ ，McIntosh 指数(U)用于评估基于群落物种多维空间距离的多样性指数， $U = \sqrt{\sum(C_i - R)^2}$ ^[19]。

1.3.4 果实品质测定 每个小区随机选取具有代表性的 10 个瓜带回实验室经蒸馏水洗涤后，迅速测定果实品质。使用手持式折光仪测定西瓜中心含糖量，有效酸度用 pH 计^[20]测定，果实糖酸比为中心糖含量与 pH 的比值^[20]。

1.4 数据处理

试验数据采用 IBM Statistics SPSS 13.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同处理对西瓜枯萎病发生的影响

如图 1 所示，在棉隆熏蒸结束后第 35 天，对照 (CK)、棉隆熏蒸结合微生物有机肥(BOF)和棉隆熏蒸

结合普通有机肥(OF)3 个处理的发病率分别为 3.5%、0.5% 和 18.3%，差异达显著水平，BOF 处理对病害的防控效果为 85.7%，OF 处理发病率反而比 CK 高出 35 倍；到第 60 天时，所有处理的发病率均有所增加，OF 处理的发病率仍然最高，BOF 处理的发病率仅为 1.3%；西瓜进入膨瓜期后，各处理发病率迅速上升，熏蒸结束后第 75 天，CK 的发病率最高(达 85.6%)，BOF 处理最低(仅为 29.6%)，OF、BOF 两种熏蒸处理对病害的防治效果分别为 54.1% 和 65.8%。表明棉隆熏蒸结合普通有机肥施用前期不利于防控枯萎病发生，但后期对西瓜枯萎病有一定防效；棉隆熏蒸与微生物有机肥配合施用防病效果更佳，但后期也出现发病率上升的趋势，说明单次施微生物有机肥对病害防控时效有限。

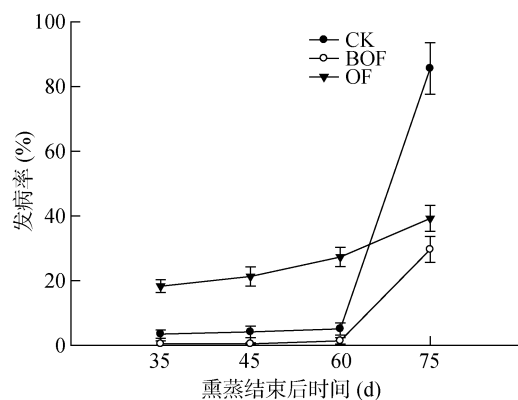


图 1 不同处理西瓜枯萎病的发病率
Fig.1 Incidences of *Fusarium* wilt disease under different treatments

2.2 不同处理对西瓜生长、产量和品质的影响

于膨瓜期(棉隆熏蒸处理后第 60 天)调查了西瓜的生长状况，结果见表 1。BOF 处理的叶片数、茎长、根干重和地上部干重较 CK 分别显著增加 17.7%、17.2%、55.1%、35.1%，表明棉隆熏蒸和微生物有机肥联用能增加连作西瓜的生物产量。OF 处理西瓜根干重比 CK 增加 53.0%，但叶片数、茎长、根和地上部生物量较 CK 仅增长了 3.9%、1.4%、5.5%，均未达到显著水平。

表 1 不同处理对西瓜生长的影响
Table 1 Effects of different treatments on watermelon growth parameters

处理	叶片数	茎长(cm)	根干重(g/株)	地上部干重(g/株)
CK	18.1 ± 0.3 b	170.6 ± 8.4 b	0.66 ± 0.1 c	23.6 ± 3.8 b
BOF	22.0 ± 2.5 a	206.2 ± 5.8 a	1.47 ± 0.09 a	36.4 ± 4.4 a
OF	18.8 ± 0.1 b	173.1 ± 4.3 b	1.01 ± 0.10 b	24.9 ± 3.8 b

注：表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差，同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

从表 2 可以看出,不同处理对西瓜产量和品质的影响存在显著差异。与 CK 相比,BOF 处理西瓜中心

糖含量、糖酸比分别提高 15.9%、13.4%,单果重、总产量、商品果产量分别增加 24.5%、33.4%、34.1%。

表 2 不同处理对西瓜产量与品质的影响
Table 2 Effects of different treatments on watermelon yields and qualities

处理	单果重(kg)	总重(kg/小区)	商品果重(kg/小区)	中心糖含量(g/kg)	酸度(pH)	糖酸比
CK	1.17 ± 0.11 c	63.72 ± 6.7 b	62.97 ± 7.1 b	89.8 ± 6.7 b	5.56 ± 0.05 b	1.61 ± 0.01 b
BOF	1.55 ± 0.08 a	96.41 ± 4.9 a	95.66 ± 4.5 a	106.8 ± 0.8 a	5.75 ± 0.19 a	1.86 ± 0.05 a
OF	1.32 ± 0.03 b	66.83 ± 0.49 b	66.21 ± 0.3 b	96.7 ± 2.2 b	5.76 ± 0.11 a	1.68 ± 0.01 b

2.3 不同处理对土壤微生物数量的影响

在棉隆熏蒸结束时,不同处理在微生物数量和组成上有显著差别,棉隆熏蒸对真菌的影响最大。熏蒸处理土壤真菌数量显著降低,由 9.82×10^7 拷贝数/g 干土平均减少到 3.75×10^5 拷贝数/g 干土;棉隆熏蒸对细菌拷贝数影响相对较小,仅下降了一个数量级(表 3)。熏蒸结束后第 25 天,两个熏蒸处理的真菌数量均增加,但比 CK 低 22.9% ~ 70.2%;细菌数量比 CK 略高,但无显著差异(表 3)。

从表 3 可以看出,棉隆熏蒸对土壤中尖孢镰刀菌的数量影响显著,棉隆熏蒸结束后第 1 天,CK 处

理病原菌数量最多,而棉隆熏蒸的 2 个处理尖孢镰刀菌数量比 CK 降低 3 个数量级。棉隆熏蒸结束后第 25 天,CK 病原菌数量变化不明显,棉隆熏蒸处理病原菌数量开始上升,其中 OF 处理病原菌数量上升较快,数量显著高于 BOF 处理,并与 CK 无显著差异,病原菌占真菌总数的比重也最大。BOF 处理病原菌数量比 CK 低 94.6%。棉隆熏蒸结束后第 75 天,2 种熏蒸处理的病原菌数量继续上升至与 CK 无显著差异水平,CK 和 BOF 处理的病原菌与真菌总数的比值增加,而 OF 处理病原菌与真菌总数的比值下降(表 3)。

表 3 不同时期各处理土壤不同微生物拷贝数
Table 3 Copy populations of soil microbes at different sampling time under different treatments

取样时间	处理	细菌($\times 10^{12}$ 拷贝数/g)	真菌($\times 10^6$ 拷贝数/g)	尖孢镰刀菌 ($\times 10^5$ 拷贝数/g)	尖孢镰刀菌/真菌
熏蒸后 1 d	CK	22.6 ± 0.35 a	98.2 ± 3.3 a	60.6 ± 1.4 a	0.062 ± 0.002 c
	BOF	1.1 ± 0.13 b	0.31 ± 0.2 c	0.02 ± 0.00 c	0.008 ± 0.006 d
	OF	2.8 ± 0.75 b	0.44 ± 0.3 c	0.03 ± 0.01 c	0.007 ± 0.002 d
熏蒸后 25 d	CK	16.9 ± 0.42 a	62.8 ± 7.8 ab	48.3 ± 5.4 a	0.077 ± 0.001 c
	BOF	23.8 ± 0.22 a	48.4 ± 1.5 b	2.6 ± 0.5 b	0.005 ± 0.001 d
	OF	22.9 ± 1.3 a	18.7 ± 4.3 b	40.6 ± 3.5 a	0.22 ± 0.03 a
熏蒸后 75 d	CK	22.4 ± 0.14 a	63.6 ± 9.5 ab	94.9 ± 4.5 a	0.15 ± 0.02 b
	BOF	22.9 ± 0.26 a	34.7 ± 1.3 b	34.5 ± 2.3 a	0.099 ± 0.003 c
	OF	24.3 ± 2.7 a	55.5 ± 3.9 ab	64.7 ± 7.45 a	0.12 ± 0.01 b

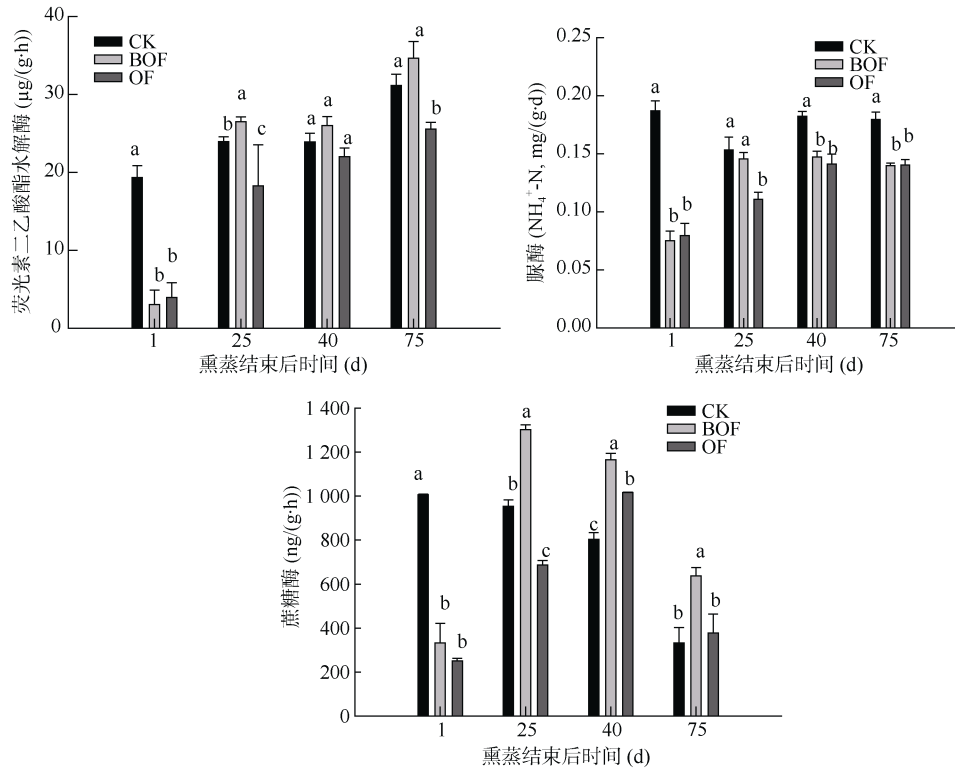
2.4 不同处理对西瓜不同生育期土壤酶活性的影响

棉隆熏蒸结束后第 1 天,土壤荧光素二乙酸酯水解酶(FDA)活性比 CK 下降了 82%;棉隆熏蒸处理结合肥料施用后的第 25 天,BOF 处理 FDA 水解酶活性最大,达到 23.9 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$,显著高于 CK 和 OF 处理;棉隆熏蒸处理后第 40 天,OF 处理的 FDA 水解酶活性恢复到 CK 水平。棉隆熏蒸显著降低了土壤脲酶活性,棉隆熏蒸结束第 1 天时两个熏蒸处理(BOF 和 OF)的脲酶活性仅为 CK 的 40.1%;随着时间的延长,棉隆熏蒸土壤脲酶活性有所上升,棉隆熏蒸结束后第 25 天,BOF 处理脲酶活性恢复到与 CK 无显著差异水平,但 OF 处理脲酶活性仍然比 CK 低 27.8%。棉

隆熏蒸结束第 1 天,土壤蔗糖酶活性较 CK 显著下降;棉隆熏蒸结束配合施肥后第 25 天,BOF 处理的蔗糖酶活性迅速恢复,比第 1 天分别提高了 2.9 倍,显著高于 CK;OF 处理蔗糖酶活性恢复速度较慢,棉隆熏蒸处理后第 40 天土壤蔗糖酶活性达到最大,此时及西瓜收获时 CK 蔗糖酶活性均最低。

2.5 不同处理对土壤微生物群落多样性的影响

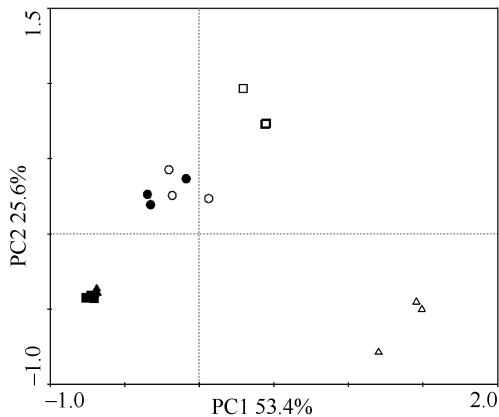
Biolog ECO 板中的 31 孔碳源为不同的反应底物,可表征为不同的指标,各孔 OD 值经主成分提取后可得主成分,主成分 1 与主成分 2 均对应于所代表的碳源,若公因子值较大,则该处理对公因子所代表碳源的利用程度高。由图 3 知,棉隆熏蒸(BOF



(柱图上方不同小写字母表示不同处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著)

图 2 土壤熏蒸和微生物有机肥施用对土壤酶活性的影响

Fig.2 Effects of soil fumigation with bio-organic fertilizer on soil enzyme activities



(图中 表示 CK-1d; 表示 CK-25d; 表示 BOF-1d; 表示 BOF-25d; 表示 OF-1d; 表示 OF-25d)

图 3 不同处理微生物碳源利用主成分分析所提取的主成分载荷图

Fig. 3 Ordination plot extracted by PCA of carbon resource utilization under different treatments

和 OF)后第 1 天的土壤与未熏蒸土壤(CK)相比,微生物群落对碳源的利用在主成分 2 上出现了明显分异, BOF 处理、OF 处理非常接近。在棉隆熏蒸结束后第 25 天, BOF 处理和 OF 处理分布在主成分 1 的正端, 与 CK 在 PC1 形成分异, PC2 则将 BOF 处理和 OF 处理及 CK 区分开。

棉隆熏蒸处理后第 1 天土壤微生物碳源利用多样性指数、均一性指数、Simpson 指数均显著低于 CK, 表明棉隆熏蒸对土壤微生物产生一定的毒害作用;棉隆熏蒸后配合施用有机肥和微生物有机肥第 25 天, 土壤微生物群落 Shannon 多样性指数、均一性指数、Simpson 指数均有不同程度的增大, 特别是 BOF 处理 3 种指数均最大, OF 处理微生物群落多样性指数也恢复到与 CK 无显著差异水平(表 4)。

表 4 棉隆熏蒸处理结束不同时间各处理土壤微生物群落多样性指数变化

Table 4 Changes of diversity indexes of soil microbial communities in different time after being influenced by dazomet fumigation

处理	熏蒸后 1 d			熏蒸后 25 d		
	Shannon 多样性指数	Shannon 均一性指数	Simpson 指数	Shannon 多样性指数	Shannon 均一性指数	Simpson 指数
CK	2.90 ± 0.17 a	0.84 ± 0.04 a	0.91 ± 0.03 a	2.63 ± 0.06 c	0.77 ± 0.01 c	0.91 ± 0.01 b
BOF	2.51 ± 0.15 b	0.73 ± 0.04 b	0.84 ± 0.03 b	3.16 ± 0.00 a	0.92 ± 0.00 a	0.96 ± 0.01 a
OF	2.47 ± 0.14 b	0.72 ± 0.04 b	0.83 ± 0.01 b	2.94 ± 0.08 b	0.85 ± 0.02 b	0.94 ± 0.01 b

3 讨论

3.1 棉隆熏蒸和微生物有机肥联用对连作西瓜枯萎病发病率和产量的影响

本研究中棉隆熏蒸显著减少了连作西瓜大棚土壤中尖孢镰刀菌的数量。与本试验结果类似,棉隆熏蒸能够抑制生姜根腐病菌、辣椒疫霉菌和南方根结线虫的活力^[6-8]。但单纯采用棉隆熏蒸对病害发生的控制效果不佳,还有可能加重病害^[13]。本试验中棉隆熏蒸结合普通有机肥处理前期西瓜枯萎病发病率比对照还高。但后期有机肥处理的发病率显著低于对照,这可能与有机肥促进西瓜根系生长,提高根系活力,增强根系对不良环境的抵抗力有关。张雪艳等^[21]研究表明,施入 8% 有机肥能增加基质黄瓜总根长、根体积、根表面积。吕卫光等^[22]研究表明,施用有机肥显著提高西瓜根系活性,西瓜总根长、根表面积增大,因而缓解了西瓜连作障碍。这与本试验结果一致。整体而言,棉隆熏蒸预处理配合微生物有机肥对西瓜枯萎病的防控效果显著优于棉隆熏蒸与普通有机肥联用。棉隆熏蒸结合微生物有机肥(BOF)处理对于西瓜植株地上部形态建成以及地下部根系生长比普通有机肥更具显著促进效果,能够有效提升植株光合作用,增强植株对土壤水分和养分的吸收利用。同时,由于连作西瓜的枯萎病发病率显著降低,导致西瓜产量增加,品质改善,表明对于土传病害严重的土壤,先进行土壤预处理,然后再施用微生物有机肥能有效抑制病害产生,克服连作障碍,这与前人报道一致。刘星等^[15]采用石灰加碳铵熏蒸配合微生物有机肥浇灌处理显著降低了连作马铃薯发病率,并提高了马铃薯块茎产量。钟书堂等^[16]用氨水熏蒸并补施微生物有机肥措施显著减少了高发枯萎病香蕉园土壤中尖孢镰刀菌数量,降低了香蕉枯萎病发病率。Li 等^[23]采用石灰加碳铵处理显著抑制了黄瓜、甜瓜枯萎病菌在土壤中增殖。但也有报道土壤熏蒸和堆肥联合应用并不能改善果树生长发育状况和提高果实产量,推测可能与病原菌的类型、堆肥的种类和性质、熏蒸剂的选择、用量以及熏蒸剂效用成分在不同质地土壤中的渗透效果等因素有关^[24]。

3.2 棉隆熏蒸和微生物有机肥联用对西瓜连作土壤微生物的影响

病原菌过度增殖、微生物种群结构失衡是导致连作土壤质量下降和作物减产的重要原因。本研究采用实时荧光定量 PCR 的方法对土壤中不同微生物

的拷贝数进行计量,表明棉隆熏蒸处理后真菌、细菌的数量显著低于对照,但真菌数量降幅更大,表明棉隆熏蒸对土壤不同微生物的毒力有差异,它对细菌的影响要小于真菌,这与马艳等^[12]研究结果一致。棉隆熏蒸配合施用微生物有机肥后,熏蒸过程中产生的异硫氰酸酯类杀生气体可以杀死或减少一部分微生物数量,而施用优质高氨基酸含量微生物有机肥后,会促进对杀生气体不敏感的微生物如木霉^[25]的生长繁殖。一些细菌在熏蒸时能够存活并且在熏蒸后能够快速增殖^[26]。与土壤微生物数量相对应,棉隆熏蒸后土壤 FDA 水解酶、脲酶、蔗糖酶活性显著降低,这与 Klos 和 Ajwa^[27]的研究结果一致,说明棉隆熏蒸不利于改善土壤生产力。但棉隆熏蒸与微生物有机肥联用 25 天后,土壤中多种酶活性恢复到对照甚至高于对照水平,普通有机肥处理恢复较慢,说明施用微生物有机肥较普通有机肥可以更快改善连作土壤碳、氮循环,加快土壤养分周转率,提高土壤微生物活性,这与刘星等^[15]、赵青云等^[28]、陈希等^[29]的研究结果一致。但西瓜进入膨瓜期(棉隆熏蒸结束 40 天)后,BOF 处理土壤酶活性逐渐下降,与之对应西瓜枯萎病发生率也随之上升,因此推测在西瓜花期追施一次微生物有机肥,可能进一步提高对西瓜枯萎病的防控效果。

Biolog 结果分析表明,棉隆熏蒸结合微生物有机肥能改变土壤微生物区系。马艳等^[10]采用 PCR-DGGE 研究了不同熏蒸方法对土壤微生物群落结构的影响,结果表明与对照相比,棉隆熏蒸对真菌群落结构影响最大,真菌条带数量明显少于对照^[12]。这是因为,土壤熏蒸后抑制或杀灭了土壤中一部分的微生物,含有大量功能微生物的微生物有机肥施入土壤后,能在短期内得到一个养分和空间的无限环境,在一定时期内会迅速繁殖,占据有利生态位点,有效利用根际营养和根系分泌物,减少了病原菌所必需的营养物质,因而能够持续地将镰刀菌数量维持在较低水平,并且改善微生物区系。而普通有机肥中因缺乏特定的拮抗微生物,在抑制病原菌上缺乏针对性,防控病害效果弱于微生物有机肥^[12]。Eo 和 Park^[25]采用 PLFA 比较了熏蒸后土壤微生物区系特征,结果表明,土壤熏蒸后细菌 PLFA 水平与熏蒸前差异不大,但随着时间推移真菌 PLFA 含量会逐渐增加,一些适应土壤环境的微生物会重新定殖。因此,如果没有拮抗微生物和有益微生物补充进土壤,土著镰刀菌会在近似于无限养分和空间条件下短期内大量重新生长繁殖,这也是仅棉隆熏蒸效果不好的原因之一。

4 结论

采用棉隆熏蒸配施微生物有机肥防控西瓜枯萎病是化学和生物双重作用的综合结果。棉隆熏蒸一方面杀灭了西瓜枯萎病菌,另一方面也降低了非靶标微生物数量和活性,并改变了微生物的群落结构及功能多样性。施用微生物有机肥能使土壤微生物数量和活性快速恢复,将病原菌控制在较低的水平,对防控或者延迟病原菌再次侵染发挥了重大作用。要持续防控西瓜枯萎病等土传病害,应该首先将土壤中病原菌数量降低到一定阈值,移栽后还必须要再在西瓜根际构建防御病原菌再次侵染的生物屏障,最终达到抑制病害的效果。

参考文献：

- [1] 凌宁,王秋君,杨兴明,等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1136-1141
- [2] 郑琦,毕扬,云小敏,等. 西瓜枯萎病的研究进展及其防治[J]. 中国植保导刊, 2007, 27(2): 11-13
- [3] Wu H S, Liu D Y, Ling N, et al. Influence of root exudates of watermelon on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Soil Science Society of American Journal, 2009, 73: 1150-1156.
- [4] 蔡祖聪,黄新琦. 土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究[J]. 土壤学报, 2016, 53(2): 305-310
- [5] 杨晓楠,高德良,韩君,等. 棉隆及氯化苦对几种生姜土传病原物的毒力[J]. 农药学学报, 2011, 13(3): 331-334
- [6] Yucel S, Ozarslandan A, Colak A. Effect of solarization and fumigant applications on soilborne pathogens and root-knot nematodes in greenhouse-grown tomato in Turkey[J]. Phytopathology, 2007, 35: 450-456
- [7] Yakabe LE, Parker SR, Kluepfel DA. Effect of pre-plant soil fumigants on *Agrobacterium tumefaciens*, *pythiaceus species*, and subsequent soil recolonization by *A. tumefaciens* [J]. Crop Protection, 2010, 29: 583-590
- [8] Slusarski C, Pietr SJ. Combined application of dazomet and *Trichoderma asperellum* as an efficient alternative to methyl bromide in controlling the soil-borne disease complex of bell pepper[J]. Crop Protection, 2009, 28: 668-674
- [9] Scopa A, Dumontet S. Soil solarization: effects on soil microbiological parameters[J]. Journal of Plant Nutrition, 2007, 30: 537-547
- [10] Everts K L, Himmelstein J C. *Fusarium* wilt of watermelon: Towards sustainable management of a re-emerging plant disease[J]. Crop Protection, 2015, 73: 93-99
- [11] 赵丽娅,李文庆,唐龙翔,等. 有机肥对黄瓜枯萎病的防治效果及防病机理研究[J]. 土壤学报, 2015, 52(6): 1383-1391
- [12] 马艳,胡安忆,杨豪,等. 菜粕生物熏蒸防控辣椒疫病[J]. 中国农业科学, 2013, 46(22): 4698-4706
- [13] Wang Q, Ma Y, Yang H. Effect of biofumigation and chemical fumigation on soil microbial community structure and control of pepper *Phytophthora* blight[J]. World Journal of Microbiological Biotechnology, 2014, 30(2): 507-518
- [14] Smolinska U, Morra M J, Knudsen G. R. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Disease, 2003, 87: 407-412
- [15] 刘星,张书乐,刘国锋,等. 土壤熏蒸-微生物有机肥联用对连作马铃薯生长和土壤生化性质的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(3): 122-133
- [16] 钟书堂,吕娜娜,孙逸飞,等. 连作香蕉园生态熏蒸剂的筛选及其对土壤微生物群落结构的影响[J]. 土壤, 2015, 47(6): 1092-1100
- [17] 刘亮亮,黄新琦,朱睿,等. 强还原土壤对尖孢镰刀菌的抑制及微生物区系的影响[J]. 土壤, 2016, 48(1): 88-94
- [18] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1986
- [19] Zhang Q, Haider SI, Xu DT. Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 57: 1-8
- [20] 杜少平,马忠明. 密度、氮肥互作对旱砂田西瓜产量、品质及氮肥利用率的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(1): 150-157
- [21] 张雪艳,田蕾,高艳明,等. 生物有机肥对黄瓜幼苗生长、基质环境以及幼苗根系特征的影响[J]. 农业工程学报, 2013, 29(1): 117-125
- [22] 吕卫光,杨广超,沈其荣,等. 有机肥对连作西瓜生长和土壤微生物区系的影响[J]. 上海农业学报, 2006, 22(4): 96-98
- [23] Li S, Song S, Lin F. Exploring a soil fumigation strategy based on ammonium bicarbonate to control *Fusarium* wilts of cucurbits[J]. Crop Protection, 2015, 70: 53-60
- [24] Merwin I A, Byard R, Robinson T L. Developing an integrated program for diagnosis and control of replant problems in New York apple orchards[J]. New York Fruit Quarterly, 2001, 9: 11-15
- [25] Eo S, Park K. Effects of dazomet on soil organisms and recolonisation of fumigated soil[J]. Pedobiologia, 2014, 57: 147-154
- [26] Xiao C L, Duniway J M. Bacterial population responses to soil fumigation and their effects on strawberry growth[J]. Phytopathology, 1998, 88 (9suppl.) : S100-S1000
- [27] Klose S, Ajwa H A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 1625-1635
- [28] 赵青云,赵秋芳,王辉,等. 施用不同有机肥对香草兰生长及土壤酶活性的影响[J]. 热带作物学报, 2014, 35(2): 256-260
- [29] 陈希,赵爽,姚建军,等. 微生物有机肥及杀菌剂对切花菊连作障碍的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(4): 1231-1236

Prevention and Control of Watermelon *Fusarium* Wilt by Dazomet Fumigation Combined with Bio-organic Fertilizer

CAO Yun¹, SONG Xiuchao¹, GUO Dejie¹, WANG Qiujun¹, MA Yan^{1*}, SHEN Qirong²

(1 *Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;*
2 *College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: *Fusarium* wilt disease, caused by formae speciales of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) is a serious problem for the watermelon production around the world. Among the managements for controlling *Fusarium* wilt disease, pre-planted fumigation of soil is one of the most effective and stable means for the disease inhibition. In this study, the possibility of applying the fumigation agent, dazomet, to watermelon planting field with a novel bio-organic fertilizer (BOF) was investigated as a strategy for controlling *Fusarium* wilt of watermelon and improving the bio-chemical properties of a continuously cropping soil. Three treatments including control (CK), dazomet fumigation plus organic fertilizer (OF) and dazomet fumigation plus the bio-organic fertilizer (BOF) were set in the field experiment. Compared with CK, BOF and OF treatments significantly reduced *Fusarium* wilt disease incidence by 65.8% and 54.1%, respectively. BOF treatment increased watermelon yield, sugar content and sugar/acid by 33.4%, 15.9% and 13.4%, respectively. Soil fumigation with dazomet for 20 days significantly decreased the numbers of soil microbial organisms compared with pre-fumigation and non-fumigated control (CK). Through the estimation by realtime PCR method, the copy number of FON was decreased by 3 log units, the activities of urease, invertase, fluorescein diacetate esterase were significantly reduced by dazomet fumigation. Principal analysis of the Biolog AWCD showed that fumigation altered the microbial community. The Shannon diversity index and evenness index were significantly reduced when compared with CK. The amendment of organic fertilizer or the bio-organic fertilizer after dazomet fumigation restored the number of microbial organism, the activity of soil enzymes and microbial functional diversity, and both the recovery speed and strength of soil microbial population and enzyme activities were maximal, the FON population and FON/fungi ratio were least, Shannon index was highest under BOF treatment during the whole growing season. These results suggest dazomet fumigation could significantly reduce the number of FON and could recover soil microbial flora faster and enhance enzyme activities if combined with bio-organic fertilizer. Thus, it could prevent watermelon plants from being re-infected by FON, reduce *Fusarium* wilt disease incidence significantly, and increase effectively the yield and quality of watermelon.

Key words: Soil fumigation; Dazomet; Bio-organic fertilizer; Continuous cropping; Watermelon