

连作土灭菌对黄瓜 (*Cucumis sativus*) 生长和土壤微生物区系的影响

张树生^{1,2} 杨兴明¹ 茆泽圣¹ 黄启为¹ 徐阳春¹ 沈其荣^{1,*}

(1. 南京农业大学资源与环境学院 南京 210095 ;2. 金华职业技术学院 浙江 金华 321007)

摘要 采用盆栽试验的方法 ,对黄瓜的生长状况、抗病相关酶及土壤微生物区系特征进行了测定。结果表明 连作土灭菌能在较大程度上改善黄瓜的生长 ,灭菌土上生长的黄瓜的叶绿素含量、株高、叶面积和鲜重均大于连作土 ,但随氨基酸肥料 (AAF)施用量的增加 ,灭菌土与连作土之间的差异变小。黄瓜叶片的 SOD 和 POD 活性在不施用 AAF 条件下灭菌土显著高于连作土 ,然而随着 AAF 施用量的增加 ,活性则相反。CAT 活性及可溶性蛋白含量灭菌土所有处理均极显著高于相对应的连作土 ,MDA 含量则显著低于相对应的连作土。灭菌土的细菌、真菌数量分别比连作土增加 1.89 ~ 3.03 倍和 6.96 ~ 2.43 倍 ,放线菌的增加幅度相对较小 ,真菌/细菌比值也显著提高。随 AAF 施用量的增加 ,连作土中的黄瓜枯萎病的致病菌 (尖孢镰刀菌)减少 ,而灭菌土的所有处理均未分离到。土壤细菌的 PCR-DGGE 图谱分析表明 ,灭菌土 DGGE 图谱带明显比连作土增加 ,土壤间带谱的相似性降低 ,土壤微生物多样性指数增加。灭菌土上的黄瓜未见枯萎病发生 ,而连作土的黄瓜发病率达 31.25% ~ 68.75%。

关键词 黄瓜 (*Cucumis sativus*) 灭菌土 连作障碍 土壤微生物区系 PCR-DGGE

文章编号 :1000-0933 (2007)05-1809-09 中图分类号 :Q785 Q938 Q948 文献标识码 :A

Effects of sterilization on growth of cucumber plants and soil microflora in a continuous mono-cropping soil

ZHANG Shu-Sheng^{1,2} , YANG Xing-Ming¹ , MAO Ze-Sheng¹ , HUANG Qi-Wei¹ , XU Yang-Chun¹ , SHEN Qi-Rong^{1,*}

1 College of Resources and Environmental Sciences , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China

2 Jinhua College of Profession and Technology , Jinhua Zhejiang 321007 , China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (5) 1809 ~ 1817.

Abstract : Pot experiments were carried out to investigate effect of sterilization and application of amino acid fertilizer on growth of cucumber plants and soil microflora in a continuous mono-cropping soil. The soil which had been planted with continuous mono-cropping cucumber for 4 seasonal crops and had a severe continuous obstacle , was used in the experiment. The experiments had 6 treatments with 8 replicates for each treatment , including CK (Non-sterilized soil with no application of amino acid fertilizer) , 0.5% AAF (Non-sterilized soil with the addition of 0.5% amino acid fertilizer based on soil dry weight) , 1.0% AAF (Non-sterilized soil with the addition of 1.0% amino acid fertilizer based on soil dry weight) , S-CK

基金项目 国家农业部农业产业结构调整重大专项资助项目 (06-07-04B) ; 国家农业部 948 重大资助项目 (2006-G62) ; 国家科技部 863 资助项目 (2006AA10Z416)

收稿日期 2006-10-31 ; 修订日期 2007-04-02

作者简介 张树生 (1963 ~) 男 浙江金华人 博士 副教授 主要从事有机肥料及土壤微生物研究. E-mail : sszhang62@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail : shenqirong@njau.edu.cn

Foundation item This work was financially supported by Project of Adjustment of Agricultural Industry from China Agriculture Ministry (No. 06-07-04B) ; Key Project (948) from China Agriculture Ministry (No. 2006-G62) ; Hi-tech Research and Development Program (863) of China (No. 2006AA10Z416)

Received date 2006-10-31 ; **Accepted date** 2007-04-02

Biography ZHANG Shu-Sheng , Ph. D. , Associate professor , mainly engaged in organic fertilizer and soil microorganism. E-mail : sszhang62@163.com

(Sterilized soil with no application of amino acid fertilizer), S-0.5% AAF (Sterilized soil with the addition of 0.5% amino acid fertilizer based on soil dry weight) and S-1.0% AAF (Sterilized soil with the addition of 1.0% amino acid fertilizer based on soil dry weight). Uniform cucumber seedlings with two cotyledons were transplanted to pots (0.5 L, 400 g soil) at March 7, 2006, and harvested at May 10, 2006. The results obtained are listed as follows. Soil sterilization could improve growth of cucumber plants to greater extent, and, for example, SPAD value, plant height, leaf area and fresh weight of cucumber plants grown in sterilized soil were significantly higher than those in non-sterilized soil. The differences of cucumber growth between the sterilized soil and non-sterilized soil decreased with increase of AAF application, showing that the application of AAF could solve some problems coming from continuous mono-cropping system. SOD and POD activities in the leaves of cucumber plants grown in sterilized soil were higher than CK, but their activities became lower with increase of AAF application. CAT activities and soluble protein contents of all treatments in sterilized soil were significantly higher than those in non-sterilized soil while MDAs were significantly lower. The number of bacteria and fungi in sterilized soil was increased by 1.89–3.03 folds and 6.96–2.43 folds, respectively, compared with those in non-sterilized soil and the ratio of fungi to bacteria was significantly increased. In addition, Actinomycetes were slightly enhanced. The analyses of PCR-DGGE profiles showed that the number of bands on the lanes of DGGE profiles in sterilized soil was more than those in non-sterilized soil, with low similarities of DGGE profiles, and the diversities of soil microorganism in sterilized soil were increased compared to those in non-sterilized soil. The incidence of Fusarium wilt of cucumber plants grown in non-sterilized soil was up to 31.2%–68.8%, but no incidence in sterilized soil.

Key Words: cucumber (*Cucumis sativus*); sterilized soil; obstacle of continuous mono-cropping; soil microflora; PCR-DGGE

在同一块土地上连续栽培同一种作物,即使在正常的管理条件下,也会发生作物生长不良的现象,这种现象被称为连作障碍^[1]。

蔬菜作物连作障碍的产生机理极为复杂,是蔬菜作物-土壤系统内部诸多因素综合作用的外在表现,按生态学原理可划分为两大类:即非生物因素和生物因素。非生物因素主要是连作造成土壤营养失衡、盐分积累、结构恶化以及作物本身分泌的化感物质而影响蔬菜作物的生长,而生物因素是指长期连作造成土壤微生物区系恶化,土壤有益微生物受抑制、有害微生物成为优势菌群,致使作物生长不良^[2,3]。虽然国内外学者对蔬菜的连作障碍进行了广泛而深入的研究,但其确切机理至今仍没有定论。

很多学者曾采用化学(溴甲烷)、物理(日晒和高温)等方法^[4-7]对连作土壤进行灭菌来消除土壤生物环境因素对植物生长的影响,从中探索连作障碍的产生机理及生产中应用的可能性。从生态健康和可持续农业理念出发,化学灭菌方法有带来环境风险的致命弱点,物理方法既能消除土壤有害生物,又不至于引起土壤污染,是生产中宜于采用的较为理想的土壤灭菌方法。也有很多学者从施用生态有机肥的角度,通过调节土壤微生态结构及微生物区系来研究连作障碍的产生机理及克服方法。

本文在高温灭菌和施用氨基酸肥料(Amino acid fertilizer, AAF)的条件下,系统探讨了连作土灭菌对黄瓜生长、抗病相关酶及土壤微生物区系的影响,以期进一步验证土壤生物因素在连作障碍产生过程中所起的作用及其机理,观察植物体内与抗病相关的抗氧化酶和土壤微生物群落结构的变化特征,以及 AAF 对连作土功能恢复的作用,为连作障碍的克服提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜连作土 连续种植黄瓜超过 4 茬的连作土壤,土壤的基本理化性状为:pH 6.8、土壤有机质含量 35.36 g/kg、全 N 2.12 g/kg、全 P 2.17 g/kg,物理性粘粒含量 34%、属中壤土。

灭菌土 将上述相同的黄瓜连作土用布袋分装,每袋 2 kg 左右,放入高压灭菌锅 121℃ 灭菌 1 h,冷却后

在室温下培养 48 h ,再按前述方法灭菌一次 ,冷却后备用。

供试的黄瓜品种 天津黄瓜研究所的津春 1 号。

供试 AAF 由本实验室自行研制 ,用菜粕为原料 ,接入本实验室自行筛选的高效蛋白酶分泌细菌 (菌种保藏号 :CGMCC NO. 1543) ,经发酵分解后形成含有丰富活性氨基酸的肥料。其养分含量为 :总氨基酸含量 8%、全 N 56.21 g/kg、全 P 11.32 g/kg、全 K 9.54 g/kg、有机质含量 435.2 g/kg、含水量 30%。全部养分含量以湿 AAF (含水量 30%)计算。

1.2 试验方法

试验采用盆栽方法 ,设 6 个处理 ,分别为 CK (对照 ,不施任何肥料)、0.5% AAF (施用土壤重量 0.5% 的 AAF)、1.0% AAF、S-CK (灭菌土对照 ,sterilized soil CK ,不施任何肥料)、S-0.5% AAF (灭菌土 ,施肥同 0.5% AAF)、S-1.0% AAF ,每个处理重复 8 次。

黄瓜种子 2006 年 2 月 27 日催芽后播入育苗盘中 ,3 月 7 日子叶刚展开时移栽。移栽方法 称相当于 400 g 干土 (因土壤的含水量约为 7% ,所以实际称土为 438 g)的土壤 ,放入盆钵中与按量称好的氨基酸肥料混合均匀 ,转入底部有透性孔的 0.5 L 小盆钵中 ,每盆移入两株黄瓜小苗 ,浇透水。在黄瓜生长过程中只浇水不施任何肥料。整个过程在温室中完成。

1.3 测定方法

叶绿素相对含量 (SPAD 值)用日本产 SPAD 仪测量 ,在每个处理中选植株第一张完全展开叶测定 5 株以上 ,叶面积测定采用复印称重法 ,在移栽后第 64 天 (5 月 10 日)采收时将每盆黄瓜的所有叶片用标准纸 (已测算了单位重量纸的面积 cm^2/g 的纸)复印下来称重计算。

黄瓜叶片的超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase , SOD)、过氧化物酶 (Peroxidase , POD)、过氧化氢酶 (Catalase , CAT)以及丙二醛 (Malondialdehyde , MDA)取第一片完全展开叶测定 ,参照陈建勋等^[8]方法。SOD 以抑制 NBT 光化还原 50% 定义为一个酶活性单位 (U) ;POD 采用愈创木酚氧化法 ,以在 470 nm 处 OD 每分钟增加 0.01 为一个酶活性单位 (U) ;CAT 以每分钟 OD 减少 0.01 为一个酶单位。蛋白质含量用考马斯亮蓝 G-250 法测定^[9]。

微生物计数用稀释平板法^[10] ,细菌采用牛肉膏蛋白胨琼脂平板表面涂布法 ,真菌采用马丁氏 (Martin) 培养基平板表面涂布法 ,放线菌采用改良高氏一号培养基平板表面涂布法 ,结果以每 g 鲜土所含微生物菌落形成单位数量 (Colony forming unit per gram fresh soil , cfu /g soil)表示。

尖孢镰刀菌计数所用选择性培养基参照 Komada H 的方法^[11] ,其具体配制方法为 :将 1 g K_2HPO_4 、0.5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g KCl、0.01 g Fe-Na-EDTA、2 g L-天门冬酰胺 (L-asparagine)、20 g D-半乳糖 (D-galactose)溶于约 300 ml 水中 ,定容至 1000 ml ,加入 20 g 琼脂装瓶灭菌。等培养基冷却至 60℃ 以下 ,迅速加入 1 g 五氯硝基苯 (每 1000 ml 培养基加入量 ,下同)、0.5 g 牛胆汁、1 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 g 硫酸链霉素 ,再用 10% 磷酸将 pH 调至 3.8~4.0 ,然后倒平板备用。

土壤 DNA 提取与聚合酶链反应 (PCR) :每个处理取相当于 5 g 干土的鲜土用于土壤微生物基因组 DNA 提取 ,重复 3 次 ,提取步骤参照张平究的方法^[12]。用于扩增的引物为对大多数细菌和古细菌的 16S rDNA 基因的特异性 V3 区的通用引物对 PRUN518R (Sequence :5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') 和 PRBA338 F-GC (Sequence :5' CGC CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3')^[13] ,扩增产物片段长约 220 bp。50 μl PCR 反应体系组成如下 :2 μl 的 DNA 模板、2 种引物各 1 μl 、2 μl dNTP、5 μl 的 10 \times PCR buffer、1 μl Taq DNA 聚合酶 ,最后用无菌超纯水加至 50 μl ;PCR 反应程序 :94℃ 预变性 5 min ,35 个循环为 94℃ 30 s ,55℃ 40 s 和 72℃ 1 min ,最后在 72℃ 下延伸 7 min。扩增后的 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) :电泳采用 D code DGGE 系统 (Bio-Rad) ,变性梯度从上到下是 35% 到 60% ,聚丙烯酰胺凝胶浓度是 8% ,首先在 200 V 电压下预电泳约 10 min ,随后在 85 V 的恒定电压下电泳

12 h。电泳完毕后,将凝胶在 EB 中染色 20~25 min,用自来水洗脱 10 min,用 Bio-Rad 的 GelDoc22000 凝胶影像分析系统成像,以 Quantity One 分析软件 (Bio-Rad) 分析 DGGE 带谱及其相似性。

1.4 统计分析

土壤微生物丰富度用数条带数量的方法,多样性指数 H (Shannon-Weaver 指数) 的计算方法采用 Eichner 等^[4]的方法,计算公式:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

式中 $P_i = n_i/N$, n_i 为 DGGE 泳道第 i 条泳带亮度峰值高度, N 为泳道中所有泳带亮度峰值高度的总和。本试验所有数据均运用 SAS 8.2 软件在 $p < 0.05$ 水平上进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜生长的影响

连作土上的黄瓜,在移栽后的第 3 天 (4 月 10 日) CK 的养分就显不足,叶色发黄;0.5% AAF 和 1.0% AAF 叶色均正常,并且没有表现差异。而灭菌土上的黄瓜的各个处理均出现僵苗现象,生长较差。

移栽 7d 后 0.5% AAF 处理的黄瓜的叶色开始逐渐退绿,但 1.0% AAF 处理的黄瓜的叶色仍能保持正常。而灭菌土上的黄瓜,无论是 S-CK 还是施用 AAF 的处理,叶色均开始逐渐转绿,生长加速。至移栽后第 64 天 (5 月 10 日) 试验结束,灭菌土上的黄瓜叶片的叶绿素含量 (SPAD 值) 比相同 AAF 施用量的连作土上的黄瓜叶片的叶绿素含量显著增加 (图 1A), 并且 S-CK 比 0.5% AAF 的黄瓜的叶绿素含量更高,差异达显著水平。从图 1A 还可以看出,无论是连作土还是灭菌土,随着 AAF 施用量的增加,黄瓜叶绿素含量均显著增加, AAF 作为黄瓜的氮素养分来源,在土壤微生物的作用下表现出了很好的供肥性能。

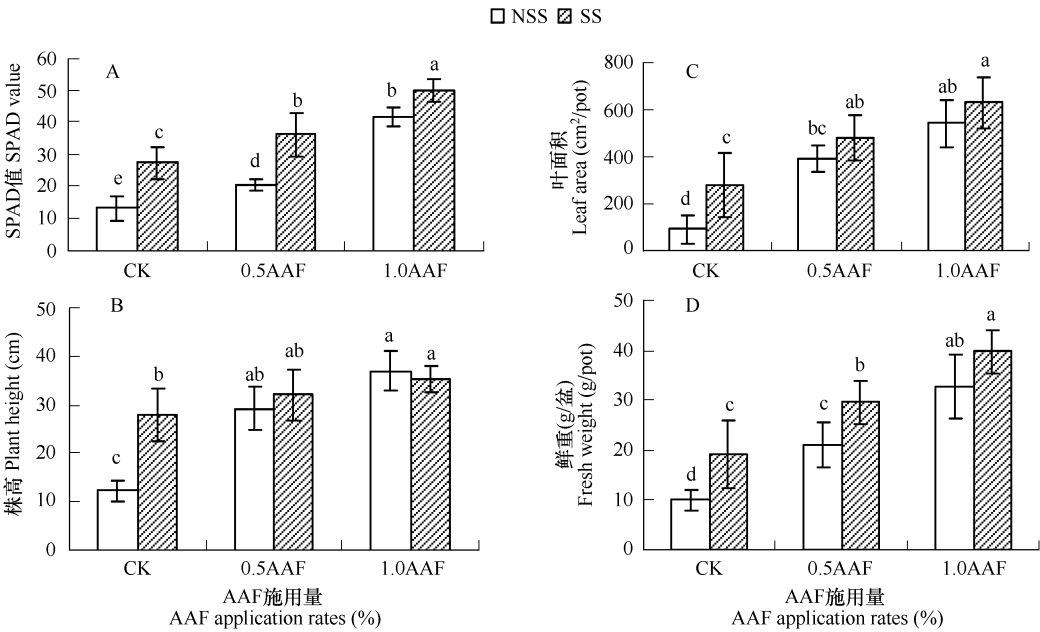


图 1 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜叶绿素含量 (SPAD 值) (A)、株高 (B)、叶面积 (C) 和植株鲜重 (D) 的影响
Fig. 1 Comparison of chlorophyll (SPAD value) content (A), plant height (B), leaf area (C) and plant fresh weight (D) of cucumber plants grown in non-sterilized soil (NSS) and sterilized soil (SS)

图中不同小写字母表示 LSR 检验差异达显著水平 ($p < 0.05$),下同 The different low-case letters above each bar indicate significant difference at $p < 0.05$ level according to the fisher's LSD test, The same in the following figures

图 1B 表明,同样为对照,连作土灭菌比连作土上的黄瓜株高增加 2.30 倍,但 0.5% AAF 与 S-0.5% AAF 之间和 1.0% AAF 与 S-1.0% AAF 之间则没有表现出差异。

连作土灭菌对黄瓜生长的改善作用还从黄瓜的叶面积 (图 1C)上得到体现。S-CK 较 CK 的叶面积显著增加 ,但 S-0.5% AAF 比 0.5% AAF 以及 S-1.0% AAF 比 1.0% AAF 增加的幅度则变小 ,黄瓜的鲜重也表现出同样趋势 (图 1D)。

2.2 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜叶片抗病相关酶活性的影响

图 2A 表明 随着 AAF 施用量的增大 ,黄瓜的 SOD 活性呈下降趋势。灭菌土与连作土相比 ,S-CK 比 CK 的 SOD 活性显著增强 ,S-0.5% AAF 与 0.5% AAF 之间没有差异 ,S-1.0% AAF 比 1.0% AAF 则显著降低。

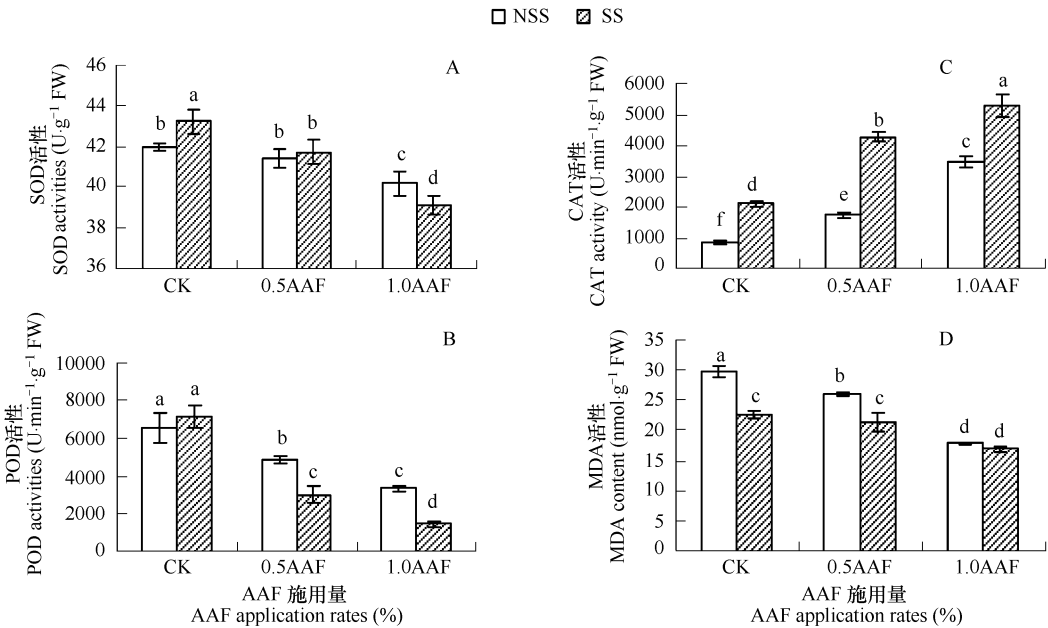


图 2 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜叶片超氧化物歧化酶 (SOD) (A)、过氧化物酶 (POD) (B)、过氧化氢酶 (CAT)活性 (C)和丙二醛 (MDA)含量 (D)的影响

Fig. 2 Comparison of SOD (A) ,POD (B) and CAT (C) activities and MDA content (D) in leaves of cucumber plants grown in NSS and SS

图 2B 表明 ,黄瓜叶片的 POD 在不施肥情况下活性最高 ,并随着施肥量的增加 ,活性显著降低。灭菌土与连作土比较 ,S-CK 与 CK 没有差异 ,S-0.5% AAF 比 0.5% AAF 下降 37.7% ,S-1.0% AAF 比 1.0% AAF 下降 56.8%。而黄瓜叶片的 CAT 则与 SOD、POD 趋势不同 (图 2C) ,不施肥的情况下 ,CAT 活性最小 ,随施肥量的增加 ,CAT 活性极显著增加。灭菌土的 CAT 活性均极显著高于相对应处理的连作土 ,S-CK 的 CAT 活性是 CK 的 2.47 倍 ,S-0.5% AAF 是 0.5% AAF 的 2.44 倍 ,S-1.0% AAF 则是 1.0% AAF 的 1.53 倍。

从图 2D 可以看出 ,随着施肥量的增加 ,植株生长状况改善 ,植株体内的 MDA 含量显著减少。灭菌土与连作土比较 ,S-CK 的 MDA 含量比 CK 降低 23.7% ,S-0.5% AAF 也比 0.5% AAF 下降了 17.8% ,均达显著水平 ,但 S-1.0% AAF 与 1.0% AAF 之间则没有差异。

不施肥的情况下 ,黄瓜生长较差 ,体内积累的可溶性蛋白质较少 (图 3)。随着施肥量的增加 ,可溶性蛋白质含量呈梯度显著增加。在同样 AAF 施用量下 ,灭菌土上生长的黄瓜叶片的可溶性蛋白质含量比连作土显著增加。其中 ,S-CK 比 CK 增加 44.7% ,S-0.5% AAF 比 0.5% AAF 增加 61.1% ,S-1.0% AAF 比 1.0% AAF 增加 28%。

2.3 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对土壤微生物区系的影响

表 1 表明 ,移栽后第 64 天 ,灭菌土的各个处理的细菌和真菌的数量均比连作土相应处理显著增加 ,其中 ,细菌增加 1.89 ~3.03 倍、真菌增加 6.96 ~2.43 倍 ,放线菌的增加幅度相对较小。无论是灭菌土还是连作土 ,随着 AAF 施用量的增加 ,细菌、放线菌和真菌的数量均呈增加趋势。从真菌/细菌比值看 ,灭菌土的 3 个处理的真菌/细菌比值均较大 ,与 1.0% AAF 的比值较接近 ,而连作土的 CK 的比值相对较小 ,但随 AAF 施用量的

增加 ,比值有显著升高趋势。

除此 ,连作土的各个处理均能分离到尖孢镰刀菌 (黄瓜枯萎病的致病菌) ,但其数量以及尖孢菌 /总真菌比值随 AAF 施用量的增加而减少 ;而灭菌土则未分离到尖孢镰刀菌。

图 4 是连作土与灭菌土的细菌 DGGE 图谱及其土壤细菌 DGGE 相似性分析的系统发生树。图谱上的泳带反映了土壤中的优势菌群 ,泳带数量、位置以及亮度的复杂性说明了菌群的多样性。由图 4 可以看出 ,不同处理的土壤间的 DGGE 图谱有一些相同泳带 ,但大多数优势带在位置、亮度及数量上差异明显。从土壤微生物丰富度看 ,连作土的 CK 有 14 条、0.5% AAF 18 条、1.0% AAF 20 条 ;而灭菌土的 S-CK 有 21 条泳带、S-0.5% AAF 有 22 条、S-1.0 % AAF 有 23 条。

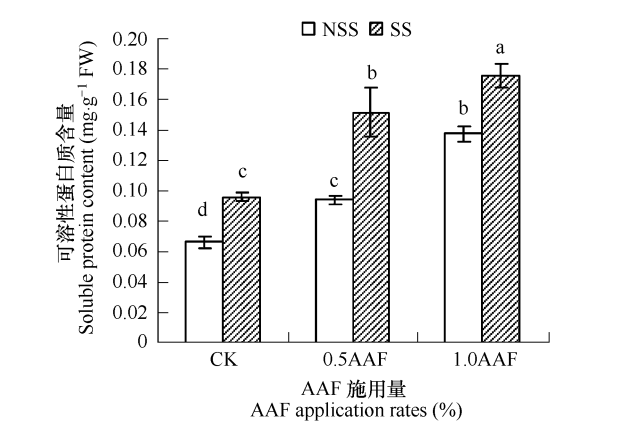


图 3 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜叶片可溶性蛋白质含量的影响
Fig. 3 Comparison of soluble protein content in leaves of cucumber plants grown in NSS and SS

表 1 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对土壤微生物区系的影响

Table 1 Effect of soil sterilization on soil microflora						
处理 Treatment	细菌 Bacteria (×10 ⁵ cfu g ⁻¹ soil)	放线菌 Actinomycetes (×10 ⁵ cfu g ⁻¹ soil)	真菌 Fungi (×10 ⁴ cfu g ⁻¹ soil)	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i> (×10 ² cfu g ⁻¹ soil)	真菌/细菌 Fungi/Bac. (×10 ⁻²)	尖孢/真菌 <i>F. /Fungi</i> (×10 ⁻²)
CK	7.98 ± 0.27 d	1.55 ± 0.24 d	1.43 ± 0.33 e	3.75 ± 0.95 a	1.79 ± 0.44 d	2.88 ± 1.50 a
0.5% AAF	8.65 ± 0.45 d	2.43 ± 0.25 c	3.18 ± 0.88 e	2.75 ± 0.96 ab	3.67 ± 0.90 c	0.99 ± 0.68 b
1.0% AAF	9.75 ± 0.50 d	3.38 ± 0.35 b	7.35 ± 0.75 d	2.00 ± 0.82 bc	7.54 ± 0.65 a	0.28 ± 0.12 b
S-CK	15.12 ± 1.49 c	1.65 ± 0.45 d	9.95 ± 0.97 c	0	6.58 ± 0.70 ab	0
S-0.5% AAF	22.62 ± 4.22 b	4.00 ± 0.55 a	12.82 ± 0.99 b	0	5.67 ± 1.42 b	0
S-1.0% AAF	29.50 ± 1.63 a	3.98 ± 0.39 a	17.87 ± 3.46 a	0	6.06 ± 1.18 ab	0

表中数据为 4 次重复的平均值 ± 标准差 Values in the table are means (4 replicates) ± SD

DGGE 带谱相似性分析发现 (图 4B) ,连作土灭菌与连作土之间的 DGGE 图谱的相似性相距很远 ,连作土之间比较 ,CK 与 0.5% AAF 的相似性较强 (61%) ,CK 与 1.0% AAF 的相似性减弱 ;灭菌土之间的相似性均较弱。相似性分析说明连作土灭菌或施用 AAF 都能促进土壤细菌特征性菌群的形成 ,改变土壤微生物群落结构特征。由于在土壤 DNA 的提取纯化、PCR 的扩增及 DGGE 电泳中的各种因素影响 ,DGGE 图谱的相似性会受到一些影响 ,但还是能够反映不同土壤间的关系。土壤微生物多样性指数 (图 5) 表明 ,灭菌土的土壤微生物多样性高于连作土 ,而连作土施用适量的 AAF 也能提高土壤微生物的多样性。

2.4 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜枯萎病发病率的影响

从表 2 可以看出 ,至试验结束 (5 月 10 日)止 ,灭菌土上生长的黄瓜没有枯萎病发生 ,而连作土则不一样 ,CK 在生长初期就开始发生黄瓜枯萎病 ,随后发病加重 ,0.5% AAF 和 1.0% AAF 则在 5 叶期后有较轻枯萎病发生。

3 讨论

连作土灭菌能在较大程度上改善黄瓜的生长 ,黄

表 2 连作土灭菌和施用氨基酸肥料对黄瓜枯萎病发病率的影响
Table 2 Effect of soil sterilization on incidence of Fusarium wilt of cucumber plants

处理 Treatment	活株数 Number of health plants	死株数 Number of dead plants	发病率 (%) Incidence of Fusarium wilt
CK	5	11	68.75
0.5 % AAF	10	6	37.5
1.0 % AAF	11	5	31.25
S-CK	16	0	0
S-0.5 % AAF	16	0	0
S-1.0 % AAF	16	0	0

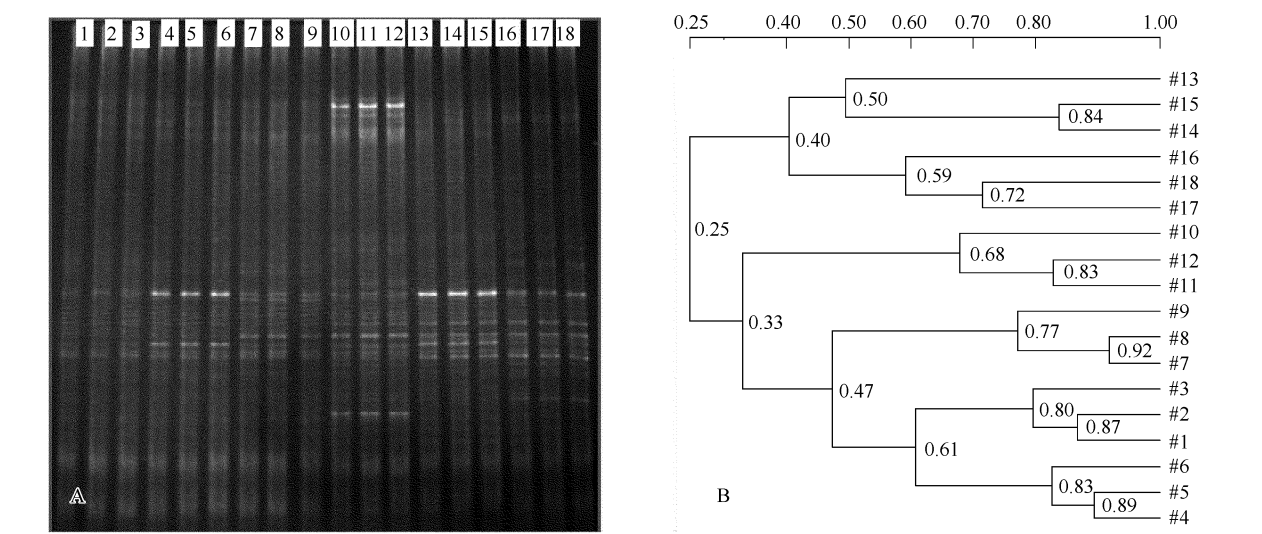


图4 灭菌土与连作土的 DGGE 图谱 (A)及其相似性分析 (B)

Fig. 4 Comparison of DGGE profile (A) between NSS and SS and lane similarities (phylogenetic tree of the lanes) (B)

1~3 泳道为 CK 4~6 为 0.5% AAF 7~9 为 1.0% AAF 10~12 为 S-CK 13~15 为 S-0.5% AAF 16~18 为 S-1.0% AAF The lanes of 1-3 for CK ;4-6 for 0.5% AAF ;7-9 for 1.0% AAF ;10-12 for S-CK ;13-15 for S-0.5% AAF ;16-18 for S-1.0% AAF

瓜的叶绿素含量、株高、叶面积和鲜重 S-CK 均显著大于 CK ,随着 AAF 施用量的增大 ,各项指标的差异缩小或不表现出差异 (图 1)。连作土灭菌 ,由于杀灭了土壤养分转化至关重要的微生物菌群 ,植物生长的前期往往会出现生长迟缓的现象 ,与阮维斌^[7]的报道一致。但土壤微生物群落及其功能在灭菌后会快速重新建立并显现养分转化的功能^[15] ,土壤灭菌还彻底消除了土壤中的不利生物因素 ,高温灭菌也会使土壤中的某些缓效养分得到释放^[16] ,因而使黄瓜的生长得到显著改善 ,并且这种作用在低肥力条件下表现得特别明显。由于 AAF 含有各种营养元素和氨基酸、多肽等生理活性物质 ,能改善作物根系微生态环境以及微生物群落的结构与功能 ,使土壤中的不利生物因素得到抑制 ,因此 ,连作土施用适量的 AAF 会使连作土的生长环境与灭菌土的生长环境趋于一致 ,连作土与灭菌土上的黄瓜的生长差异也会变小 ,甚至不表现出差异。

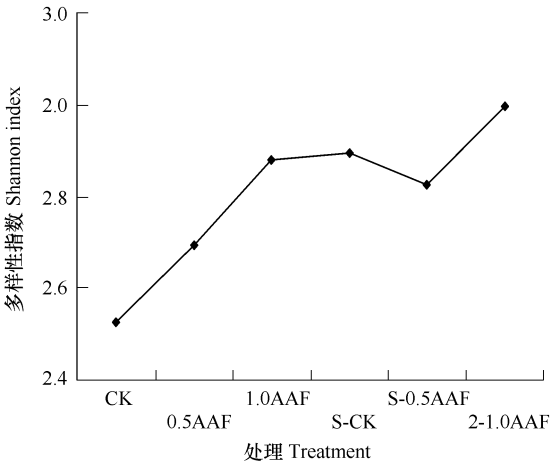


图5 不同处理对土壤微生物区系多样性指数的影响

Fig. 5 Effect of different treatments on Shannon-Weaver index

植物在逆境下会诱导植物体内活性氧 (Reactive oxygen species , ROS)的积累 ,激发植物的抗病反应^[17~19] ,但活性氧的积累可导致膜脂过氧化而使膜系统受损 ,引起植物体内发生一系列的生理生化反应 ,致使植物组织受到伤害。SOD、POD 作为植物逆境胁迫的诱导酶 ,在逆境情况下 (养分缺乏或不利生物因素)黄瓜的 SOD、POD 活性会应急升高 ,并且维持较高水平以消除体内的活性氧的伤害。当连作土灭菌或施用适量的 AAF 后 ,使逆境得到缓解 ,黄瓜体内的活性氧处于较低水平 ,因而黄瓜叶片的 SOD、POD 活性也相应处于较低的水平 ,与前人研究一致^[20~22]。

在本试验条件下 ,连作土灭菌和施用适量 AAF ,CAT 活性极显著提高。CAT 活性的增加 ,自然能迅速有效地清除黄瓜体内由活性氧转化来的过氧化氢 ,使黄瓜免受伤害。虽然大多数研究结果表明 ,CAT 在受到胁迫的情况下其活性增加^[20,21] ,但也有研究表明受到胁迫后其活性下降^[22] ,与本研究的结果一致。这也从另一个方面反映出黄瓜的抗氧化酶系统对养分和不利生物胁迫的反应机制是极为复杂的。

植物在逆境胁迫条件下,体内代谢失衡,活性氧增多,致使膜脂发生过氧化作用或脱脂作用而产生丙二醛(MDA)。丙二醛(MDA)作为膜脂过氧化作用的最终产物,它的含量是膜脂过氧化程度的一个重要标志^[23]。研究表明,连作土灭菌与施用适量的 AAF 都能缓解黄瓜逆境胁迫强度,减少膜脂过氧化风险。

Marschner 等^[15]的试验表明,土壤灭菌后在种植小麦的情况下,土壤微生物群落结构会在很短的时间内迅速得以恢复。其可能机理是土壤灭菌后消除了土壤中的所有生物,一旦外源微生物(对策生物)通过各种途径侵入土壤,就等于微生物进入到一个养分和空间的无限环境,在一定时期内会以指数形式迅速繁殖,其数量也会在短期内超过存在环境压力的自然土壤。本试验中,连作土灭菌后,土壤中的微生物也在很短的时间内得到恢复,并且细菌、真菌的数量极显著地高于连作土壤,其特点与其类似。

蔡燕飞^[24,25]、Doran^[26]和 Bekwe^[27]的研究表明,土壤中真菌数量以及真菌/细菌比值越高,土壤生态系统的稳定程度越高,土壤抑制病害能力越强^[28,29]。在本研究中,灭菌土的 3 个处理的真菌数量均显著高于连作土,并且真菌/细菌比值也都较大;同时,连作土的真菌/细菌比值在施用 AAF 后也得到显著提高(表 1),这充分说明了连作土灭菌或施用适量的 AAF 均能使连作土向着稳定健康的方向发展。既然真菌/细菌比值在一定程度上能反映土壤的稳定健康程度,如果能够得出一个合理的比值范围,对连作障碍的克服极有意义,值得进一步研究。

PCR-DGGE 是研究土壤微生物群落结构多样性的极为实用的方法之一,它能反映土壤细菌优势菌群的变化^[14]。连作土灭菌消除了土壤中的病原菌和有害微生物,建立了新的土壤微生物特征性群落,DGGE 带谱增多,与连作土的 DGGE 带谱的相似性下降,土壤微生物多样性增强。DGGE 图谱相似性分析以及 Shannon 指数还说明,施用适量的 AAF 也能在一定程度上增加连作土谱带,增加土壤微生物多样性,从而起到缓解黄瓜连作障碍作用。

总之,连作土灭菌能改善黄瓜的生长,增强黄瓜体内生理防御酶体系,改善土壤微生物多样性,对预防黄瓜枯萎病的发生有积极的作用。这也说明了黄瓜连作障碍的产生主要是由土壤的生物因素造成。采用更为经济有效的方法协调土壤微生态环境,改善土壤微生物群落结构和功能,增加土壤微生物的多样性,仍然是克服连作障碍今后研究的重点。同时,本试验在连作土上施用 AAF 发现,AAF 对连作土功能的恢复有明显的促进作用,也能使土壤中的尖孢镰刀菌的百分含量显著下降,起到了缓解黄瓜连作障碍发生的效果,特别是施用 AAF 比土壤灭菌有更强的可操作性,因此,对生产实际有重要的指导意义。

References :

[1] Xiao H, Mao Z Q, Yu M G, *et al.* Effects of successive cropping soil and successive cropping soil pasteurized on the growth and development of *Malus hupehensis* seedlings. *Journal of Fruit Science*, 2004, 21 (4): 370-372.

[2] Ma Y H, Wei M, Wang X F. Variation of microflora and enzyme activity in continuous cropping cucumber soil in solar greenhouse. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15 (6): 1005-1008.

[3] Hu Y S, Wu K, Liu N, *et al.* Studies on microbial population dynamics in the cucumber rhizospheres at different developmental stages. *Scientia Agricultural Sinica*, 2004, 37 (10): 1521-1526.

[4] Bollard E G. Effect of steam sterilized soil on growth of replant apple trees. *N Z J Sci. Technol.*, 1956, 38: 412-415.

[5] Covey R P, Benson N R Jr, Haglund W A. Effect of soil fumigation on the apple replant disease in Washington. *Phytopathology*, 1979, 69: 684-686.

[6] Jaffee B A, Abawi G S, Mai W F. Role of soil microflora and *pratylenchus* penetrans in an apple replant disease. *Phytopathology*, 1982, 72: 247-251.

[7] Ruan W B, Wang J G, Zhang F S, *et al.* Effect of sterilization with CH₃Br on root growth of soybean seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21 (5): 759-764.

[8] Chen J X, Wang X F. *Experimental direction for plant physiology*. Guangzhou: China-south Physico-industry University Press, 2002. 119-124.

[9] Li H S. *Experimental principle and technology for plant physiology and biochemistry*. Beijing: High Education Press, 2000. 182-185.

[10] Li F L, Yu Z N, He S J. *Experimental technique for agriculture microbiology*. Beijing: China Agriculture Press, 1996. 178-181.

[11] Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Protec. Res.*, 1975, 8: 114-125.

[12] Zhang P J, Li L Q, Pan G X, *et al.* Influence of long-term fertilizer management on topsoil microbial biomass and genetic diversity of a paddy soil from the Taihu Lake region, China. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (12): 2818-2824.

[13] Cindy H. Nakatsu ,Torsvik V , vre s L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil Sci. Soc. Am. J. ,2000 ,64 :1382 – 1388.

[14] Eichner C A ,Erb R W ,Timmis K N ,et al. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. Appl. Environ. Microbiol. ,1999 ,65 :102 ~ 109.

[15] Marschner P ,Rumberger A. Rapid changes in rhizosphere bacterial community structure during re-colonization of sterilized soil. Biol. Fert. Soils ,2004 ,40 :1 – 6.

[16] Troelstra S R ,Wagenaar R ,Smant W ,et al . Interpretation of bioassays in the study of interactions between soil organisms and plants :involvement of nutrient factors. New Phytol. ,2001 ,150 :697 – 706.

[17] Dat J ,Vandenabeele S ,Varanova E ,et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. CMLS Cellular Mol Life Sci ,2000 ,57 :779 – 95.

[18] Hancock J T ,Desikan R ,Clarke A ,et al. Cell signaling following plant-pathogen interaction involve the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. Plant Physiol. Biochem. ,2002 ,40 :611 – 617.

[19] Thoma I ,Loeffler C ,Sinha A K. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. The Plant Journal ,2003 ,34 (3) :363 – 368.

[20] Lechno S ,Zamski E ,Tel-or E. Salt stress-induced responses in cucumber plants. J. Plant Physiol. ,1997 ,150 :206 – 211.

[21] Posmyk M M ,Bailly C ,Szafrńska K ,et al. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine mas* L. Merr.) seedlings. J. Plant Physiology ,2005 ,162 :403 – 412.

[22] Zhu Z J ,Guo Q ,Li J ,et al. Silicon alleviates salt stress and increase antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Science ,2004 ,167 :527 – 533.

[23] Jouve L ,Engelmann F ,Noirot M ,et al. Evaluation of biochemical markers (sugar ,proline ,malondialdehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. Plant Science ,1993 ,991 :109 – 116.

[24] Cai Y F ,Liao Z W ,Zhang J E ,et al. Effect of ecological organic fertilizer on tomato bacterial wilt and soil microbial diversities. Chin. J. Appl. Ecol. ,2003 ,14 (3) :349 – 353.

[25] Cai Y F ,Liao Z W. Effect of fertilization on the control of tomato bacterial wilt and soil health restoration using FAME analysis. Scientia Agricultura Sinica ,2003 ,36 (8) :922 – 927.

[26] Doran J W ,Sarrantonio M ,Liebig M A. Soil health and sustainability. Advance Agronomy ,1996 ,56 :2 – 54.

[27] Bekwe A M ,Kennedy A C ,Frohne P S ,et al. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. FEMS Microbiology Ecology ,2002 ,39 :183 – 191.

[28] Outi P ,Susan J G ,Risto H T. Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soil under *Pinus sylvestris* ,*Picea abies* and *Betula pendula* at two forest sites. Biol. Fert. Soil ,2001 ,33 :17 – 24.

[29] Daniel L M ,Peter D S ,Jeffrey S B. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. Applied Soil Ecology ,2002 ,21 :251 – 259.

参考文献：

[1] 肖宏,毛志泉,于明革,等. 连作土与灭菌土对平邑甜茶幼苗生长发育的影响. 果树学报,2004 ,21 (4) :370 ~ 372.

[2] 马云华,魏珉,王秀峰. 日光温室连作黄瓜根区微生物区系及酶活性的变化. 应用生态学报,2004 ,15 (6) :1005 ~ 1008.

[3] 胡元森,吴坤,刘娜,等. 黄瓜不同生育期根际微生物区系变化研究. 中国农业科学,2004 ,37 (10) :1521 ~ 1526.

[7] 阮维斌,王敬国,张福锁,等. 溴甲烷灭菌对大豆苗期根系生长的影响. 生态学报,2001 ,21 (5) :759 ~ 764.

[8] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州:华南理工大学出版社,2002. 119 ~ 124.

[9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京:高等教育出版社,2000. 182 ~ 185.

[10] 李阜棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术. 北京:中国农业出版社,1996. 178 ~ 181

[12] 张平究,李恋卿,潘根兴,等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土微生物碳氮量及基因多样性变化. 生态学报,2004 ,24 (12) :2818 ~ 2824.

[24] 蔡燕飞,廖宗文,章家恩,等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响. 应用生态学报,2003 ,14 (3) :349 ~ 353.

[25] 蔡燕飞,廖宗文. FAME 法分析施肥对番茄青枯病抑制和土壤健康恢复的效果. 中国农业科学,2003 ,36 (8) :922 ~ 927.