

施用根腐病生防颗粒剂对大豆田土壤微生物区系的影响

许艳丽^{1,2,3}, 张红骥^{2,3}, 张匀华², 李春杰³

(1. 东北林业大学博士后工作站, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086; 3. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150081)

摘要 采用田间小区试验, 以木霉菌等多种生防菌结合的生防颗粒剂为材料, 探讨施于大豆田后对土壤微生物的影响。调查结果显示, 土壤中施入生防颗粒剂后未明显引起微生物区系变化, 也没有使某些微生物明显地上升或下降。在大豆生育期间多数生防颗粒剂组合的真菌数量低于种衣剂拌种处理区; 在大豆生育期间生防颗粒剂组合的放线菌数量都高于种衣剂拌种, 在分枝期1号和4号生防颗粒剂处理的细菌数量高于种衣剂处理区和空白对照, 开花期(R1)到成熟期(R8)多数生防颗粒剂处理的细菌数量也高于种衣剂处理和对照。生防颗粒剂在分枝期和开花期使土壤中木霉菌数量增加, 生防颗粒剂组合、种衣剂处理区和空白对照在分枝期镰孢菌数量较低, 除生防颗粒剂组合1号外葡萄孢菌数量在出苗期、结荚盛期都低于空白对照。除结荚期外, 其它时期生防颗粒剂处理较空白对照区青霉菌多。

关键词 木霉; 生防颗粒剂; 大豆; 根腐病; 土壤微生物

中图分类号 S151.94 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0198-06

THE EFFECT OF BIOCONTROL AGENTS OF TRICHODERMA AGAINST SOYBEAN ROOT ROT ON SOIL MICROORGANISM

XU Yan-li^{1,2,3}, ZHANG Hong-ji^{2,3}, ZHANG Yun-hua¹, LI Chun-jie²

(1. *Postdoctoral Working Station of Northeast Forestry University, Harbin 150040*; 2. *Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086*; 3. *Northeast Institute of Geography and Agricultural ecology, CAS, Harbin 150081*)

Abstract The test was conducted on plots of soybean fields, the aim is to discuss the effects of agent by *Trichoderma* spp. and several biocontrol combinations on soil microorganism community, after they were used in soybean fields. The results indicated that the biocontrol granules agent neither changed the soil microorganism system nor made distinct fluctuation of some soil microorganism. The populations of fungi in soil with most of biocontrol granule combinations were lower than that of seed coat during soybean growth, however, the populations of actinomyces in soil with combination biocontrol granule agents were higher than that of seed coat, the populations of bacteria in soil with combination biocontrol granule No.

收稿日期: 2007-03-14

基金项目: 黑龙江省博士后基金; 黑龙江省“十一五”科技攻关重点项目(GB0613105); 国家“十一五”科技支撑项目(GA0613101)

作者简介: 许艳丽(1958-), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物病害生物控制和土壤微生态研究。E-mail: xyll@neigaehrb.ac.cn

1 and No. 4 were higher than those of seed coat and CK in V1, the same results were found to bacteria of soils with most of biocontrol granules from R1 to R8. The populations of *Trichoderma* spp. increased due to biocontrol granules in V1 and R1. The populations of *Fusarium* spp. were low in soil with biocontrol granules, seed coat and CK in V1, the populations of *Botrytis* spp. of soil with biocontrol granules were lower than that of CK but biocontrol granule combination No. 1 in VE and R4. The populations of *Penicillium* spp. in soil with biocontrol granules were higher than that of CK excluding R4.

Key words *Trichoderma*; Biocontrol granule agent; Soybean; Soybean root rot; Soil microorganism

大豆根腐病是一种广泛发生、危害严重、防治困难的世界性病害^[1]。在我国主要分布于东北和黄淮地区,仅黑龙江垦区的发病率即达 75% ~ 90%, 每年给国家造成数亿元的经济损失^[2]。大豆根腐病是由多种土壤习居菌复合侵染引起的,主要为尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、燕麦镰孢菌(*F. avenaceum*)、茄腐镰孢菌(*F. solani*)、半裸镰孢菌(*F. semitectum*)、终极腐霉菌(*Pythium ultimum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[3]。目前我国在生产上主要是采用种衣剂拌种来控制大豆根腐病,由于化学药剂污染环境人们在不断地探讨生物防治技术,生防细菌和木霉是应用较多的有益微生物。郭荣君等从大豆根际分离筛选出的芽孢杆菌 BH1 防治由尖孢镰孢菌引起大豆根腐病,在温室防效可达 56.1%^[4]。全赞华等报道 AS818 和 AS929 菌株在室内抑菌活性测定及温室苗期试验中,均显示出对大豆根腐病较好的防治效果,并对大豆有较强的促生作用^[5],李春杰、温广月也报道了生防细菌对大豆根腐病菌有较好的抑制作用和对大豆的促生作用^[6,7]。具有生防能力的真菌对土传根腐病也有很好防效,1931 年 Sanfors 和 Broadfoot 首次报道可以直接利用腐生真菌防治植物土传病害。迄今为止,已经开发为生防农药的真菌有:青霉菌(*Penicillium*)、小盾壳霉(*Conithyrium minitans*)、毛壳菌(*Chaetomium*)、粘帚霉属(*Glododium*)、木霉属(*Trichoderma*)、链霉属(*Streptomyces* spp)、无致病力尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)^[8,9]。在应用真菌防治土传病害的研究中,研究和应用最广泛的真菌杀菌剂是木霉菌(*Trichoderma*),它对多种病原物都有抑制作用,使用方便及发酵生产工艺简单是一类理想的防治土传病害的生防菌^[10,11]。以色列已开发出一种商品名为(*Trichoderma*)的哈茨木霉制剂。美国的 Topshield (T-22) 在 1999 年销售额超过 3 百万美元,是北美第一个比较成功的生防药剂,在世界范围内推广应用^[12]。以往对土传病害的生

物防治主要用单一的生防因子进行,防治病害单一,防病效果欠佳,需菌量大,环境依赖性强且产品保藏期短和菌种易退化。大豆根腐病病原菌复杂,且具有较高的变异性;目前国内外对其生物防治和产品开发逐步转向使用多菌混合,利用不同微生物的抗病机制,延长有效期并提高防治病害的广谱性。

Matre 等主张使用拮抗单一病原菌的生防菌株,认为要扩大防治范围、提高并稳定防效,可将拮抗对象不同的 2 个生防菌株混合使用,提高防效。2001 年 Gustafson 将降解淀粉枯草芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌制成混合生防药剂,称为 BioYield。国内也有利用毛壳菌和木霉菌复配防治山杨根腐病^[13]。陈捷等利用具有抗生作用的几个细菌菌株和具有重寄生作用的一个绿色木霉菌株复配的生防制剂,可抑制腐霉菌和镰孢菌,具有稳定的防治茎腐病和增产效果。因此,生防因子的混合应用也是防治土传病害的一种可行的生物防治发展趋势。生防因子的混合应用将能更接近自然的情况,也可能拓宽生防因子的作用范围,加强生防因子的可靠性,使生防因子的作用机制更加多样化。但生防因子混合应用的一个重要的前提就是,混合应用的生防因子之间没有拮抗作用^[14]。

虽然单一菌和混合菌制剂已有应用,但生防菌剂施入后对土壤微环境影响如何? 是否引起土壤中微生物区系改变? 还很少有报道。为了评价生防菌剂对土壤微环境的影响,本研究以木霉菌为主与多种生防菌结合的生防颗粒剂为材料,探讨施于大豆田后对土壤微生物的影响,此生防颗粒剂对大豆根腐病防治效果 52.1% ~ 82.3%。以为生防菌剂应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 生防颗粒剂及其制备 将麦麸培养基培养的多种木霉菌、其它真菌和 NA 培养基培养的生防细菌 B7 按一定比例组合,并加入适量的载体、水及助剂制成不同的颗粒剂,分别为 MT1、MT2、MT3、MT4、MT5 和 MT6。供试的木霉菌、其它真菌和生防细菌 B7 均由中国科学院东北地理与农业生态研究所作物生理生态实验室分离和保存。

1.1.2 试验品种 试验区大豆品种是合丰 25。

1.2 试验设计与土样采集

1.2.1 试验设计 试验采用田间小区方法进行,试验田设在中国科学院海伦农业生态试验站连作 14 年大豆田。试验站为典型黑土,播种时间 5 月 6 日,采用随机区组设计,每个小区 5 条垄,每垄 5m 长,67cm 宽,小区面积 16.75 m²,每个处理 3 次重复。播种方法为垄上双行,人工点播,播种密度是 30 万株/hm²。颗粒剂使用量是 3 kg/667m²,设天津种衣剂拌种做化学药剂对照,以不施任何药剂为空白对照。

1.2.2 土样采集 在播种期(Seeding)、大豆出苗期(VE)、分枝期(V1)、开花期(R1)、盛荚期(R4)和成熟期(R8)分别取大豆根际土样 6 次。每次在小区内多点随机拔取大豆 20 株,去掉根上大土块后抖下根际土,装入塑料袋中,封口,做好标签,带回实验室备用。

1.2.3 土壤悬浮液制备 将土样利用四分法充分混匀,称取 10 g 迅速倒入内装 100 mL 带玻璃珠的无菌水瓶中(玻璃珠充满瓶底),振荡 20min,使土粒充分打散,即成为 10⁻¹ 的土壤悬浮液。用无菌的移液器吸取 1 mL,加入到 9 mL 无菌水中即为 10⁻² 稀释液,如此重复,可依次制成 10⁻³ ~ 10⁻⁷ 的稀释液。

1.2.4 土壤微生物分离、培养和菌落计数 采用混菌法培养微生物。接种好的细菌、放线菌、霉菌平板倒置,于 28 ℃ 恒温培养箱中培养,待长出菌落后,观察并记数。制备土壤悬浮液同时用烘干法进行土壤含水量测定,最后计算菌落数,计算公式为:

菌落数(CFU)/g 干土 = 每个皿菌落平均值 × 稀释倍数/干土%

2 结果与分析

2.1 生防颗粒剂对土壤微生物区系的影响

2.1.1 土壤中真菌的动态变化 生防颗粒剂施入到土壤中对大豆根际土壤真菌产生影响,在大豆生育期间,1~6 号生防颗粒剂真菌变化的总体趋势与空白对照基本一致(图 1)。播种期到盛荚期(R4),土壤中真菌的数量在逐渐增加,到开花期(R1)和盛荚期(R4)达到高峰,盛荚期(R4)到成熟期(R8)真菌的数量急剧下降。在大豆生育期间土壤中真菌数量不断地增加可能是由于播种后土壤的温度有所升高使真菌繁殖加速。在大豆生育期间种衣剂拌种处理区土壤中真菌数量逐渐升高,且高于多数生防颗粒剂组合。生防颗粒剂除了 1 号组合外,其它 5 个组合在大豆生育期间几乎都低于种衣剂拌种处理区。

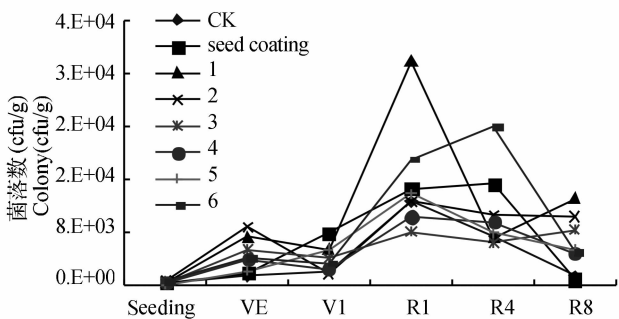


图 1 土壤中真菌的动态变化

Fig.1 The dynamic changes of the fungus in the rhizosphere soil

2.1.2 土壤中放线菌的动态变化 放线菌最突出的特征是能产生大量的种类繁多的抗生素,使土壤具有很强的拮抗能力,一般情况下每克土壤中的放线菌的孢子数可达 10⁷ 个^[15],肥沃土壤较瘠薄土壤多。土壤中放线菌测定结果表明(图 2),在大豆生育前期 6 个生防颗粒剂组合、种衣剂拌种和空白对照土壤中放线菌数量差别不大。大豆开花以后土壤中放线菌数量急剧上升,除了 1 号组合外其它 5 个生防颗粒剂组合的放线菌数量都高于种衣剂拌种和空白对照。在大豆生育期间生防颗粒剂组合的放线菌数量都高于种衣剂拌种,种衣剂拌种处理区土壤中放线菌数量始终不太高,即使在盛荚期也不高,并且几乎在所有处理中最低,说明种衣剂拌种对土壤中放线菌数量影响很大。

2.1.3 土壤中细菌的动态变化 土壤中的细菌具

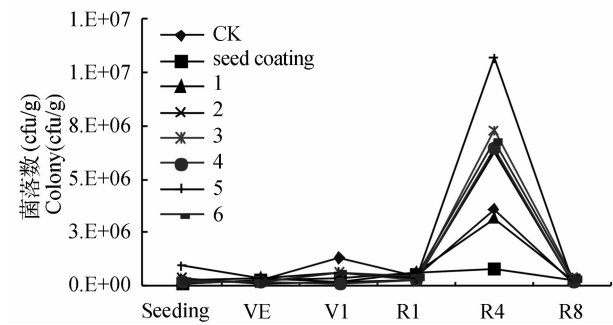


图2 土壤中放线菌的动态变化

Fig. 2 The dynamic changes of the actinomycetes in the rhizosphere soil

有提高土壤肥力、改善作物营养、防治植物病害和降解有毒物质的作用,通常情况下土壤中的细菌含量在 $10^8 \sim 10^{10}$ 。土壤中施入生防颗粒剂后对细菌测定结果显示,各处理在大豆整个生育时期土壤中细菌的含量保持较低的水平(图2),可能是由于连作大豆12年的土壤所致。所有生防颗粒剂组合、种衣剂处理和对照区土壤中细菌的数量在大豆全生育期间趋势相似,均在出苗期达到第一次高峰,并且是全生育期间最高峰,在分枝期达到全生育期的最低谷,以后到大豆成熟期细菌的数量有所上升。各处理间比较结果是,在分枝期1号和4号生防颗粒剂处理的细菌数量高于种衣剂处理区和空白对照,开花期(R1)到成熟期(R8)多数生防颗粒剂处理的细菌数量也高于种衣剂处理和对照。由此可见,生防颗粒剂未影响土壤中的细菌,有时还高于空白对照,说明生防颗粒剂使用后增加了土壤中细菌的数量,这将有利于提高土壤的肥力,促进大豆的生长发育和提高防御能力。

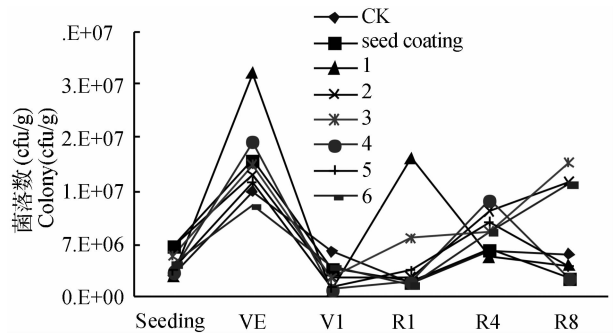


图3 土壤中细菌的动态变化

Fig. 3 The dynamic changes of the bacteria in the rhizosphere soil

2.2 生防颗粒剂对土壤中优势真菌的影响

对土壤中的真菌测定发现优势菌主要有木霉菌(*Tiechoderma* spp.)、镰孢菌(*Fusarium* spp.)、葡萄

孢菌(*Botrytis* spp.)和青霉菌(*Penicillium* spp.)。土壤中木霉菌数量在出苗期以后逐渐增多(图4),到分枝期达到高峰,之后又开始下降,所有生防颗粒剂组合、种衣剂处理区和空白对照趋势基本相似,但种衣剂处理区在大豆根腐病发生的分枝期较低,到开花期达到低谷,而生防颗粒剂的诸多组合在分枝期和开花期则均高于种衣剂处理区,说明生防颗粒剂没有抑制土壤中木霉菌数量。木霉菌的数量增加就意味着土壤中生防作用因素多,对大豆根腐病防治效果会好。

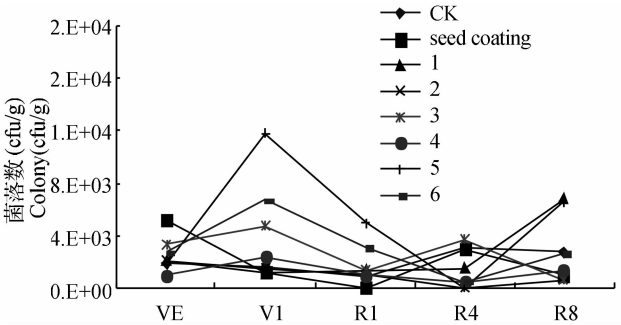


图4 木霉菌(*Tiechoderma* spp.)的动态变化

Fig. 4 The dynamic changes of the *Tricaderma* spp. in the rhizosphere soil

镰孢菌(*Fusarium* spp.)是一个庞大的属,广泛存在于土壤中,该属中有较多种是植物病原菌,如引起大豆根腐病的主要种有*Fusarium oxysporum*、*F. oxysporum* var. *redolens*、*F. oxysporu* f. sp. *glycines*、*F. solani*、*F. solani* f. sp. *glycines*、*F. equieti*、*F. graninea-rum*、*F. aveneum*等(马汇泉等1988),也有一些是非致病菌^[16]。调查发现,土壤中镰孢菌和木霉菌的数量变化趋势相反(图5),除生防颗粒剂组合1外,其它生防颗粒剂组合、种衣剂处理区和空白对照在分枝期镰孢菌数量较低,可能是被生防颗粒剂和种衣

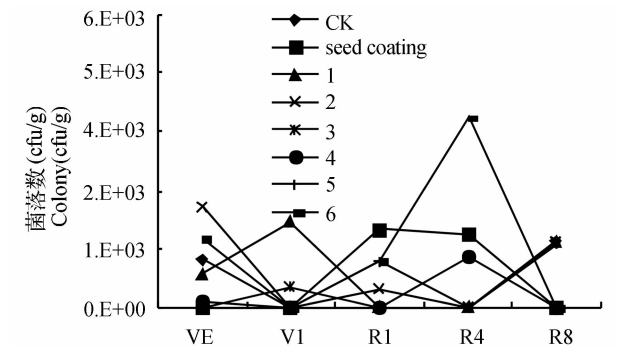


图5 土壤中镰孢菌(*Fusarium* spp.)的动态变化

Fig. 5 The dynamic changes of the *Fusarium* spp. in the rhizosphere soil

剂抑制所致。在开花期以后除生防颗粒剂组合 6 外,土壤中镰孢菌数量均一直不高,生防颗粒剂区都低于种衣剂处理,看来生防颗粒剂在大豆全生育期均能有效地抑制土壤中镰孢菌数量。

葡萄孢菌 (*Botrytis* spp.) 也是引起植物病害的重要病原菌,在大豆全生育期土壤中的葡萄孢数量变化趋势与镰孢菌 (*Fusarium* spp.) 差别不大(图 6),除生防颗粒剂组合 1 号外葡萄孢菌 (*Botrytis* spp.) 数量在出苗期、结荚盛期都低于空白对照,多数生防颗粒剂组合也低于种衣剂拌种。

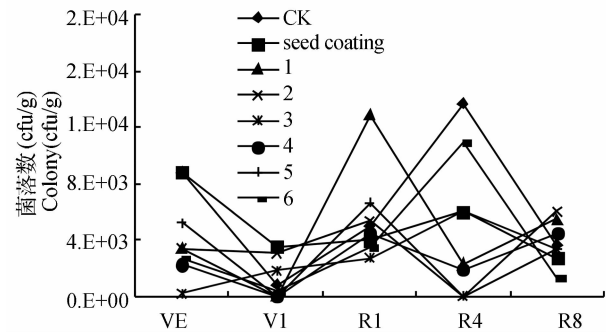


图 6 葡萄孢菌的动态变化
Fig. 6 The dynamic changes of the *Botrytis* spp. in the rhizosphere soil

青霉菌 (*Penicillium* spp.) 可以产生抗生素增强土壤的拮抗能力,土壤含量也较高。青霉菌 (*Penicillium* spp.) 测定结果显示(图 7),在大豆全生育期间种衣剂拌种明显高于生防颗粒剂所有组合和空白对照。在结荚期多数处理达到最高峰,之后下降,成熟期达到最低值。除结荚期外,其它时期生防颗粒剂处理较空白对照区青霉菌多。

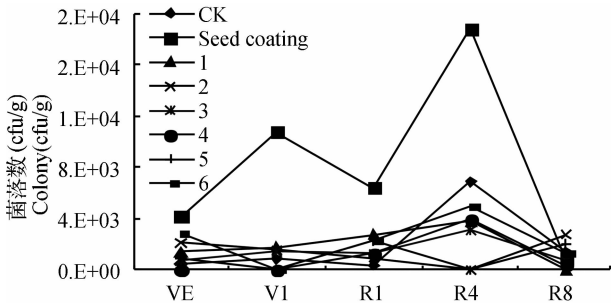


图 7 土壤中青霉菌 (*Penicillium* spp.) 的动态变化
Fig. 7 The dynamic changes of the *Penicillium* in the Rhizosphere soil

3 结论与讨论

在大豆全生育期间,使用生物制剂的处理土壤中细菌、真菌、放线菌的数量变化趋势与空白对照基本一致,对微生物总体数量影响不大,而化学药剂抑菌效果明显,影响土壤微生物的数量,需慎用。在大豆生育期间多数生防颗粒剂组合的真菌数量低于种衣剂拌种处理区;在大豆生育期间生防颗粒剂组合的放线菌数量都高于种衣剂拌种,在分枝期 1 号和 4 号生防颗粒剂处理的细菌数量高于种衣剂处理区和空白对照,开花期(R1)到成熟期(R8)多数生防颗粒剂处理的细菌数量也高于种衣剂处理和对照。生物颗粒剂对土壤中优势真菌影响较大。生防颗粒剂的诸多组合在分枝期和开花期木霉菌均高于种衣剂处理区和对照。分枝期各处理镰孢菌数量也较低。

利用生防制剂来防治大豆根腐病是人为引入有益的土壤微生物,来恢复原有的微生物群落或增加某些功能土壤微生物,从而抑制作物土传病菌、提高土壤微生物多样性,有助于土壤生态肥力的提高。但在自然条件下,由于土著微生物的竞争或其它不良环境因子的影响,阻碍了生防菌的生长,致使很多试验表现不出效果。因此,为了生防制剂在生产中稳定、有效地发挥其作用,必须深入了解植物生防菌的作用机理及各种环境因子的影响,并通过各种技术措施调控外界环境,满足其要求或刺激接种菌的繁殖,或者找出控制快速繁殖菌的遗传因子改良接种菌,才能使这类有益的生防菌持续有效地在生产中发挥作用。

在本试验中,种衣剂处理使青霉菌数量增加,且高于生防颗粒剂,还有待进一步研究。化学药剂对其它三种优势真菌均有抑制作用,但同时也破坏了土壤微生态环境和微生物区系的动态平衡。

参 考 文 献

[1] 马汇泉,靳学惠,孙伟萍,等. 大豆根腐病生态学研究Ⅱ不同土壤条件对大豆根腐病的影响[J]. 中国油料,1995,17(1): 47-48.

[2] 李长松,赵玖华,杨崇良,等. 我国大豆根腐病研究概况及存在的问题[J]. 中国油料,1997,19(3): 82-84.

[3] 马汇泉,辛惠普. 大豆根腐病病原菌种类鉴定及其生态学研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,1998,2:115-121.

- [4] 郭荣君,刘杏忠,杨怀文,等. 芽孢杆菌 BHI 防治大豆根腐病的效果及机制[J]. 中国生物防治,2003,19(4):180-184.
- [5] 全赞华,王学士. 大豆根腐病拮抗菌的室内筛选及温室测定[J]. 中国生物防治,1997,14(1):25-27.
- [6] 李春杰,许艳丽,李兆林,等. 大豆根腐病菌拮抗菌筛选及抗生作用[J]. 大豆科学,2004,23(3):174-177.
- [7] 温广月,许艳丽,李春杰,等. 6 株生防细菌对大豆根腐病防治效果初步评价[J]. 大豆科学,2005,24(2):121-125.
- [8] Rattink H. Biological control of *Fusarium* wilt disease of carnation by nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum* [J]. cta Horti, 1992,307:37-42.
- [9] Kasem Soyong. Application of a new broad spectrum biological fungicidal for environmental plant protection [A]. Advanced Study on Plant Pest Biological Control edited [C]. Heilongjiang Science and Technology Press,2000,8-22.
- [10] 葛红莲,赵红六,郭坚华. 植物土传病害微生物农药的研究开发进展[J]. 安徽农业科学,2004,32(1):153-155.
- [11] 邵红涛,许艳丽,李春杰,等. 筛选用于防治大豆尖孢镰刀菌根腐病的木霉菌株[J]. 中国油料作物学报,2004,26(4):74-77.
- [12] Elad Y, Chet I., Henis Y.. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry fields by *Trichoderma harzianum* [J]. Plant Soil, 1971,60:245-254.
- [13] 张海堂,薛煜,项存悌. 毛壳菌和木霉菌防治山杨根腐病的试验[J]. 森林病虫害通讯,1999,(1):2-3.
- [14] Siddiqui I. A., Shaukat S. S. Resistance against the damping-off fungus *rhizoctonia solani* systemically induced by the plant-growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (IE-6S+) and *P. fluorescens* (CHA0) [J]. Phytopathology, 2002, 150:500-506.
- [15] 黄秀梨. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2001,5.
- [16] 刘喜梅,何晨阳,许艳丽. 非致病性尖孢镰刀菌及其在生物防治中的应用[J]. 植物保护,2006,32(5):5-8.

欢迎订阅 2007 年《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性学术期刊,是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊、“中国期刊方阵”期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊。本刊坚持以高新实效为原则,以服务科研、服务生产为宗旨,主要报道最新的农业科研成果、先进技术、发展趋势以及新产品、新品种等,能够全面反映黑龙江省特色、内容丰富、栏目新颖、信息量大、可读性强。设有作物育种、耕作栽培、土壤肥料、植物保护、园艺、质量安全、畜牧兽医、农业经济、综述、实用技术、信息等栏目以及各类广告业务宣传,如:新品种、新产品、重点实验室、研究所、企业简介等。本刊发行面广,读者群大:农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广部门的科技人员、管理干部和广大农民群众等。

刊为国际大十六开本,彩色四封,80 页,双月刊,刊号:ISSN1002—2767,CN23—1204/S,邮发代号 14 61,广告经营许可证号:2301004010072,单月 10 日出版,每期定价 8.00 元,全年 48.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订。

地 址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号 《黑龙江农业科学》编辑部

电 话:0451-86668373

E-mail:nykx13579@sina.com

邮 编:150086