

# 连作黄瓜枯萎病株、健株根域土壤微生物生态研究

段春梅<sup>a</sup>, 薛泉宏<sup>a</sup>, 呼世斌<sup>b</sup>, 赵娟<sup>c</sup>, 魏祥<sup>a</sup>, 王玲娜<sup>c</sup>, 申光辉<sup>c</sup>, 陈秦<sup>a</sup>

(西北农林科技大学 a 资源环境学院, b 污染控制研究中心, c 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】对黄瓜病株与健株根区土的理化性质及根区土和根表土中的微生物区系特征进行比较,探索连作黄瓜枯萎病发生的微生态机制。【方法】采用常规方法测定土壤养分含量,稀释平板涂法测定黄瓜根区土、根表土、根外土中细菌(B)、真菌(F)和放线菌(A)的数量并计算其比值(B/F、A/F、B/A),同时对优势细菌、真菌和放线菌进行了分子生物学鉴定,研究连作黄瓜枯萎病株、健株根域土壤微生物生态的变化。【结果】①病株根区土中的速效 P、速效 K 含量分别较健株降低了 16.3% 和 16.8%,病株、健株根区土中速效 N、有机质、水溶性盐分含量及 pH 无差异,说明土壤速效 P、速效 K 含量与黄瓜枯萎病发生有一定关系。②连作黄瓜根区土中的细菌数量大幅度下降,真菌数量大幅度增加;与健株相比,病株的细菌数量减少了 16.9%,真菌数量增加了 56.1%;病株根区土中的优势病原真菌茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)及尖孢枝孢菌(*Cladosporium oxysporum*)数量分别较健株增加了 366.15% 和 2 201.85%;病株 B/F、A/F 值较健株分别降低了 46.8% 和 36.8%。③黄瓜根系染病溃烂导致黄瓜根表土中的细菌、真菌和放线菌数量急剧增加,病株根表土中的细菌、真菌及放线菌数量分别是健株的 57.3、8.9 及 3.7 倍。【结论】根区土和根表土中的微生物区系异常是黄瓜枯萎病发生的主要原因。

**【关键词】** 微生物区系;拮抗;连作障碍;黄瓜枯萎病;放线菌

**【中图分类号】** S154.36;S436.421.1<sup>+</sup>3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2010)04-0143-08

## Microbial ecology of *Fusarium wilt* infected and healthy cucumber plant in root zone of continuous cropping soil

DUAN Chun-mei<sup>a</sup>, XUE Quan-hong<sup>a</sup>, HU Shi-bin<sup>b</sup>, ZHAO Juan<sup>c</sup>, WEI Yang<sup>a</sup>,  
WANG Ling-na<sup>c</sup>, SHEN Guang-hui<sup>c</sup>, CHEN Qin<sup>a</sup>

(a College of Resources and Environment, b Research Center of Pollution Control,  
c College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 This research studied the microbial ecology mechanism of *Fusarium wilt* infected and healthy cucumber by exploring soil nutrition and the variation of soil microorganisms in different types of plants and rooting zones. 【Method】 Normal method was used to measure the content of soil nutrition, the amount of bacteria, actionmycete, fungi and the ratio of B/F, A/F, B/A in the rhizosphere, surface and external soil by dilution, and semar technique was used to do the molecular biology identification of the dominant microbes and to study the microbial ecology mechanism of *Fusarium wilt* infected and healthy cucumber in root zone of continuous cropping soil. 【Result】 ① The content of available P and K in rhizosphere of infected cucumber plants decreased by 16.3%, 16.8% compared with the healthy cucumber. There was no significant difference between healthy and infected cucumber on the value of available N, organic matter, soluble salt and pH. It indicated that the content of available P and K had relationship with incident of cucumber fusarium wilt. ② The number of bacteria decreased and the number of fungi increased.

\* [收稿日期] 2009-11-02

[基金项目] 国家环保示范项目(财建 2006-859)

[作者简介] 段春梅(1983-),女,陕西凤翔人,在读硕士,主要从事微生物资源研究。

[通信作者] 薛泉宏(1957-),男,陕西白水人,教授,博士生导师,主要从事微生物资源研究。E-mail: xuequanhong@163.com

The number of bacteria decreased by 16.9% while fungi increased by 56.1%, compared with healthy cucumber plants, of which *Fusarium solani* and *Cladosporium oxysporum* increased by 366.15% and 2 201.85% in infected cucumber plants. The B/F, A/F value of the healthy cucumber decreased by 46.8%, 36.8% compared with the infected. ③ The microorganism quantities in root surface increased for the ulceration of cucumber root in infected cucumber plants, the number of bacteria, fungi and actinomycetes were 57.3 times, 8.9 times and 3.7 times respectively as many as the number of healthy cucumber plants. 【Conclusion】 The main reason causing the *Fusarium wilt* of cucumber is the abnormal microflora of the soil in the root zone and surface.

**Key words:** microflora; antagonism; continuous cropping obstacle; cucumber *Fusarium wilt*; actinomycete

黄瓜连作常导致病虫害加重,产量及经济效益下降。枯萎病就是危害连作黄瓜最严重的土传病害之一。引起黄瓜连作障碍的原因很多,但土壤中微生物种群结构失衡是主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。苗则彦等<sup>[3]</sup>研究了健康与罹病黄瓜根际微生物数量及真菌区系状况,结果表明,健康与罹病黄瓜植株根际微生物数量存在明显差异。刘亚锋等<sup>[4]</sup>研究连作黄瓜土壤微生物区系时发现,连作导致细菌数量减少,少数真菌类群富集,种群呈现单一化趋势。马云华等<sup>[2]</sup>研究发现,随着连作年限的增加,土壤细菌、放线菌数量均呈倒“马鞍”形变化,真菌数量则呈线性增长,微生物区系由“细菌型”向“真菌型”过渡。上述研究表明,黄瓜连作障碍与土壤细菌数量减少、真菌数量增加有关,但未探明减少的细菌和增加的真菌在分类上属于何种类型,因而不能从微生物生态机理上揭示黄瓜连作枯萎病发生的准确原因。

本试验对连作黄瓜枯萎病病株与健株根系密集分布区(根区)、根系表面土中微生物的数量、优势种类及土壤养分进行了研究,旨在探明黄瓜枯萎病发生的微生态机制,为黄瓜连作枯萎病微生物修复提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 土壤样品 供试土壤类型为土垫早耕人为土。于 2008-09-23 在陕西省杨凌区杨村乡南庄村连作第 3 年的日光温室内,选取具有典型黄瓜枯萎病症状的植株(简称“病株”)及长势良好的植株(简称“健株”),分别采集其根区土及根表土,并以离黄瓜根系较远、受根系影响不大的垄沟内的土壤(简称“根外土”)作为对照土样,带回实验室置于 4 ℃ 冰箱中保存并及时分离。

1.1.2 拮抗试验靶标菌 黄瓜枯萎病病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),棉花黄萎病致病菌

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*),草莓枯萎病病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯病病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),枯萎病病原菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum f. sp. niveum*),均由西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室提供;泡木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*,简称 H),分离自黄瓜枯萎病植株。

1.1.3 培养基 培养基包括牛肉膏蛋白胨琼脂(BPA)、马铃薯蔗糖琼脂(PDA)、高氏 1 号(GA)<sup>[5]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 土壤样品采集与制备 按照周永强等<sup>[6]</sup>的方法采集根区土、根表土,并制备菌悬液。根区土:将附着在西瓜根系上的土抖落,称取 10.0 g,置于装有少量石英砂和 90 mL 无菌水的三角瓶中,在摇床上振荡 30 min 后备用。根表土:指根系上附着的大量土抖落后根表面仍粘附的少量土壤。将根剪下,称质量(W1)后置于装有少量石英砂和 90 mL 无菌水的三角瓶中,手摇振荡 1~2 min,待根表面粘附的土壤洗下即可,取出根,用吸水纸将根表面水吸干后称质量(W2),W1-W2 即为根表土质量。

1.2.2 微生物分离计数 细菌、真菌及放线菌数量均用稀释平板涂抹法分离测定,所用培养基分别为 BPA、PDA 及 GA,28 ℃ 培养,计数后挑取优势菌落,纯化、保藏、备用<sup>[5-6]</sup>。

1.2.3 拮抗菌对供试病原菌的皿内拮抗作用 采用琼脂块法<sup>[7]</sup>,将分离到的放线菌接种在 GA 琼脂平板上,28 ℃ 培养 8 d,用打孔器打取直径 7 mm 的小菌饼,移放到预先均匀涂抹接种靶标病原菌的 PDA 平板上,25 ℃ 培养 5 d,测量菌饼抑菌圈直径,观察透明程度。

1.2.4 黄瓜根区土壤理化性质测定<sup>[8]</sup> 土壤速效 K 含量用火焰光度法测定,速效 P 含量用钼锑抗比色法测定,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量用流动分析仪测定(两者相加即为速效 N 含量),有机质含量用重铬酸钾

氧化-外加热法测定,pH用DELTA 320 pH计测定,土壤可溶性盐分含量用残渣烘干-质量法测定。

1.2.5 优势菌种鉴定 细菌、放线菌总DNA提取按徐丽华等<sup>[9]</sup>的方法进行。PCR扩增使用以下引物:Primer A:(5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3');Primer B:(5'-AGGAGGTGATCCAGC-CGCA-3')。PCR反应体系:10×Buffer 5.0 μL,dNTPs 4.0 μL,Primer A 1.0 μL,Primer B 1.0 μL,Taq酶 0.25 μL,ddH<sub>2</sub>O 37.7 μL,提取的总DNA 1.0 μL,总体积为50 μL。反应条件:94℃预变性4 min;94℃变性1 min,57℃退火55 s,72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物检测以及序列分析依照Cui等<sup>[10]</sup>的方法进行。

真菌总DNA提取采用CTAB法<sup>[11-13]</sup>,PCR扩增引物为真核生物rDNA-ITS1的通用引物:ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR反应体系:10×Buffer 2.5 μL,dNTPs 2.0 μL,ITS 11.0 μL,ITS4 1.0 μL,Taq酶 0.2 μL,Mg<sup>2+</sup> 2.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 14.3 μL,提取的总DNA 2.0 μL,总体

积为25 μL。反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物检测以及序列分析同放线菌。

1.2.6 黄瓜枯萎病病情分级标准 参照黄窈军等<sup>[14]</sup>的方法对黄瓜枯萎病病情进行分级。

1.2.7 数据处理

$$\text{菌数增率}(\Delta) = \frac{\text{病株菌数} - \text{健株菌数}}{\text{健株菌数}} \times 100\%$$

数据用“平均值±标准差( $\bar{X} \pm S$ )”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜病株、健株的生物学性状

由表1可以看出,黄瓜病株与健株在生物量、瓜蔓长度及根系质量上都存在明显差异。病株、健株的生物量平均值分别为282.50,531.25 g/株,健株较病株增加了46.8%;主蔓长度平均值分别为6.74,7.95 m,健株高于病株15.2%;根系质量平均值分别为11.54,16.02 g/株,健株高于病株28.0%。

表1 黄瓜病株与健株的生物学性状

Table 1 Biological characteristics between infected and healthy cucumber plants

种类 Type	植株编号 Number	生物量/(g·株 <sup>-1</sup> ) Biomass	主蔓长度/m Length of main vine	根系质量/(g·株 <sup>-1</sup> ) Root weight	病情等级 Grade
病株 Infected plant	1	245.00	7.20	20.08	1
	2	350.00	7.76	6.59	3
	3	260.00	6.40	6.69	4
	4	275.00	5.60	12.78	2
	$\bar{X} \pm S$	282.50±46.64	6.74±0.94	11.54±6.39	—
健株 Healthy plant	1	555.00	9.56	16.27	0
	2	510.00	7.80	18.46	0
	3	560.00	7.32	15.87	0
	4	500.00	7.12	13.46	0
	$\bar{X} \pm S$	531.25±30.65	7.95±1.11	16.02±2.05	—
	Δ/%	-46.8	-15.2	-28.0	—

### 2.2 黄瓜病株、健株根区土的理化性质

由表2可以看出,在连作第3年的日光温室内,黄瓜病株、健株根区土及根外土的可溶性盐分含量分别为0.40,0.39,0.38 g/kg,土壤pH分别为8.01,8.07,8.03,土壤有机质含量分别为21.01,20.01,19.50 g/kg,病株与健株根区土上述3项指标之间无明显差异,且与根外土差异较小。黄瓜病株、健株根区土的速效N含量分别为78.38,77.55 mg/kg,二者无明显差异,但其N含量分别较根外土(67.40 mg/kg)提高了16.3%,15.1%。值得注意的是,黄瓜病株、健株根区土的速效P及速效K含量差异明显,其速效P含量分别为132.28,

158.13 mg/kg,病株较健株降低16.3%;其速效K含量分别为480.45,577.13 mg/kg,病株较健株降低16.8%,且黄瓜健株根区土的速效P、速效K含量分别较根外土提高28.7%,60.8%。以上结果表明,较高的速效P及速效K含量对减少黄瓜枯萎病发生有一定效果,故增施磷钾肥对提高黄瓜的抗病性有益,但该推论有待于进一步研究证实。

### 2.3 黄瓜病株、健株根区土和根表土的微生物区系

微生物区系通常指细菌、真菌及放线菌的数量与比例。B/F、A/F及B/A分别表示细菌与真菌、放线菌与真菌及细菌与放线菌数量的比值。B/F与A/F愈小,表示土壤中真菌数量愈多、所占比例愈

大,土壤微生物区系异常,作物易感病。

表 2 黄瓜病株与健株根区土的理化性质

Table 2 Soil nutrition and chemical properties between healthy and infected cucumber plant

土 样 Soil sample	植株编号 Number	速效 K/ (mg · kg <sup>-1</sup> ) Available K	速效 P/ (mg · kg <sup>-1</sup> ) Available P	速效 N/ (mg · kg <sup>-1</sup> ) Available N	有机质/ (g · kg <sup>-1</sup> ) Organic matter	pH	可溶性盐 /(g · kg <sup>-1</sup> ) Soluble salt
病株根区土 Soil of infected plant	1	448.20	115.40	59.60	16.28	8.01	0.38
	2	512.70	143.50	86.90	22.65	7.97	0.42
	3	522.60	128.40	96.00	21.17	8.01	0.40
	4	438.30	141.80	71.00	23.92	8.04	0.39
	$\bar{X} \pm S$	480.45 ± 43.33	132.28 ± 13.12	78.38 ± 16.23	21.01 ± 3.34	8.01 ± 0.03	0.40 ± 0.02
健株根区土 Soil of healthy plant	1	433.40	135.70	42.30	21.12	8.14	0.36
	2	661.40	165.60	99.70	22.19	7.99	0.41
	3	577.10	161.60	68.50	17.14	8.12	0.40
	4	636.60	169.60	99.70	19.58	8.03	0.39
	$\bar{X} \pm S$	577.13 ± 102.14	158.13 ± 15.30	77.55 ± 27.72	20.01 ± 2.19	8.07 ± 0.07	0.39 ± 0.02
根外土 External soil		359.0	122.90	67.40	19.50	8.03	0.38

2.3.1 根区土 根区土中的微生物受根系分泌物和根系生理生化活动的影响较大,且其对根系的反作用大于远离根系的根外土中的微生物。有研究表明<sup>[15-18]</sup>,连作后土壤中的细菌、真菌数量发生显著变化,而放线菌数量变化较小。由表 3、表 4 可知,黄瓜病株根区土中的细菌数量较健株减少 16.9%,真菌数量增加 56.1%,放线菌数量差异不大。病株、健株根区土及根外土的 B/F 值分别为 5 020,9 440 及 7 630,病株根区土的 B/F 较健株降

低 46.8%,较根外土降低 34.2%;A/F 值分别为 120,190 及 116,病株根区土较健株降低 36.8%,但与根外土基本相同;B/A 值分别为 42.0,49.6 及 65.8,病株根区土较健株降低 15.3%,较根外土降低 36.2%。由此可知,与健株相比,黄瓜病株根区土中的细菌数量下降、真菌数量增加,B/F、A/F 及 B/A 值均下降,表明土壤微生物区系异常既是连作黄瓜枯萎病发生的重要原因之一,也是土壤微生物区系由细菌型向真菌型转化的结果。

表 3 黄瓜病株、健株根区土和根表土中的微生物数量

Table 3 Quantities of soil microorganisms between infected and healthy cucumber plants

土壤种类 Soil type	细菌(×10 <sup>6</sup> ) Bacterium	真菌(×10 <sup>2</sup> ) Fungus	放线菌(×10 <sup>4</sup> ) Actinomycete	
根区土 Rhizosphere soil	病株 Infected plant	16.68 ± 6.82	33.21 ± 8.36	39.73 ± 9.11
	健株 Healthy plant	20.08 ± 3.74	21.28 ± 10.34	40.46 ± 4.76
	Δ/%	-16.9	56.1	-1.8
根表土 Root surface soil	病株 Infected plant	1 886.30 ± 200.03	136.80 ± 14.73	189.06 ± 32.06
	健株 Healthy plant	32.94 ± 11.43	15.44 ± 4.73	50.99 ± 1.54
	Δ/%	5 626.5	786.0	270.8
根外土 External soil	27.16 ± 1.89	35.62 ± 1.78	41.26 ± 6.06	

表 4 黄瓜病株、健株根区土和根表土中微生物 3 大类群的组成比例

Table 4 Ratio of the three major groups between infected and healthy cucumber plants

土壤种类 Soil type	B/F	A/F	B/A	
根区土 Rhizosphere soil	病株 Infected plant	5 020	120	42.0
	健株 Healthy plant	9 440	190	49.6
	Δ/%	-46.8	-36.8	-15.3
根表土 Root surface soil	病株 Infected plant	137 890	138	997.8
	健株 Healthy plant	21 340	330	64.6
	Δ/%	546.0	-58.2	1 444.6
根外土 External soil	7 630	116	65.8	

2.3.2 根表土 根表土指粘附在根系表面、受根系分泌物和代谢产物影响较大的一部分特殊土壤,其中的微生物与根系之间的相互作用更为强烈。由表 3、表 4 可知,黄瓜病株、健株根表土中的细菌、真菌数量的分布趋势与根区土相比有差异。黄瓜病株根

表土中的 3 大类微生物数量大幅度增加,病株根表土的细菌、真菌、放线菌数量分别是健株的 56.3,7.9,2.7 倍。黄瓜病株、健株根表土的 B/F 值分别为 137 890,21 340,病株较健株增加 546.0%;A/F 值分别为 138,330,病株较健株降低 58.2%;B/A 值

分别为 997.8,64.6,病株较健株增加 1 444.6%。由此可知,与健株相比,黄瓜病株根表土中的细菌、真菌、放线菌数量及 B/F、B/A 值均明显增加,可以推断根表土中的微生物区系异常是黄瓜枯萎病发生的重要原因之一。

由表 3、表 4 可知,与根外土相比,因根区土受根系生理代谢活动的影响较大,故根区土中的微生物数量与种类受根系的影响较大,而根区土微生物对根系的生长发育也产生了明显影响;与根区土相比,根表土微生物受根系的影响及对根系的反作用明显增强。这是因为当根系受到病原微生物感染发生病变时,根表组织溃烂,分泌物增多,根表土中的

营养条件发生急剧改变,导致根表土中的细菌、真菌及放线菌数量与比例发生明显变化,导致植物生长缓慢或死亡。故根表土中微生物数量的剧增及组成的改变,是根系发生病变的反映。

#### 2.4 黄瓜病株、健株根区土和根表土中优势微生物的鉴定

采用 16S rRNA 序列和 ITS 序列分析技术,分别对黄瓜根区土、根表土中的优势细菌、放线菌和真菌种类进行分子鉴定,结果(表 5)表明,病株、健株根区土和根表土中的优势微生物数量(N)及其占总菌数的比例(R)存在明显差异,且均不同于根外土。

表 5 黄瓜病株与健株根系不同部位土壤中的优势微生物

Table 5 Predominate microbial population between infected and healthy cucumber plants in different rooting zones

种类 Type	优势菌 Predominate microbial population	根区土 Rhizosphere soil				Δ/%	根外土 External soil	
		病株 Infected plant		健株 Healthy plant			N/(CFU · g <sup>-1</sup> )	R
		N/(CFU · g <sup>-1</sup> )	R	N/(CFU · g <sup>-1</sup> )	R			
细菌 Bacterium	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	18.19 × 10 <sup>5</sup>	10.91	35.96 × 10 <sup>5</sup>	17.91	-49.42	567.02 × 10 <sup>5</sup>	9.85
	绿针假单胞菌 <i>P. chlororaphis</i>	24.26 × 10 <sup>5</sup>	13.45	0.00	0.00	—	17.81 × 10 <sup>5</sup>	0.31
真菌 Fungus	茄病镰刀菌 <i>F. solani</i>	3.03 × 10 <sup>2</sup>	9.12	0.65 × 10 <sup>2</sup>	3.05	366.15	5.75 × 10 <sup>2</sup>	16.14
	毛壳属菌 <i>Chaetomium</i>	2.43 × 10 <sup>2</sup>	7.32	0.98 × 10 <sup>2</sup>	4.61	147.96	10.07 × 10 <sup>2</sup>	28.27
	尖孢枝孢菌 <i>C. oxysporum</i>	12.43 × 10 <sup>2</sup>	37.43	0.54 × 10 <sup>2</sup>	2.54	2 201.85	16.90 × 10 <sup>2</sup>	47.45
放线菌 Actinomycete	绿色产色链霉菌 <i>S. viridochromogenes</i>	6.06 × 10 <sup>3</sup>	1.53	0.00	—	—	2.97 × 10 <sup>3</sup>	0.72
	多产色链霉菌 <i>S. polychromogenes</i>	36.39 × 10 <sup>3</sup>	9.16	35.96 × 10 <sup>3</sup>	8.89	1.20	17.81 × 10 <sup>3</sup>	4.32
	加德那链霉菌 <i>S. gardneri</i>	18.19 × 10 <sup>3</sup>	4.58	29.97 × 10 <sup>3</sup>	7.41	-39.31	23.75 × 10 <sup>3</sup>	5.75
	高加索山链霉菌 <i>S. ciscaucasica</i>	39.42 × 10 <sup>3</sup>	9.92	35.96 × 10 <sup>3</sup>	8.89	9.62	26.69 × 10 <sup>3</sup>	7.19
种类 Type	优势菌 Predominate microbial population	根表土 Root surface soil				Δ/%		
		病株 Infected plant		健株 Healthy plant			N/(CFU · g <sup>-1</sup> )	R
		N/(CFU · g <sup>-1</sup> )	R	N/(CFU · g <sup>-1</sup> )	R			
细菌 Bacterium	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	2 761.50 × 10 <sup>5</sup>	14.64	72.84 × 10 <sup>5</sup>	22.11	—	3 691.19	—
	绿针假单胞菌 <i>P. chlororaphis</i>	42.48 × 10 <sup>5</sup>	0.23	7.61 × 10 <sup>5</sup>	2.31	—	458.21	—
真菌 Fungus	茄病镰刀菌 <i>F. solani</i>	9.77 × 10 <sup>2</sup>	7.14	2.08 × 10 <sup>2</sup>	13.47	—	369.71	—
	毛壳属菌 <i>Chaetomium</i>	5.95 × 10 <sup>2</sup>	4.35	1.46 × 10 <sup>2</sup>	9.46	—	307.53	—
	尖孢枝孢菌 <i>C. oxysporum</i>	22.73 × 10 <sup>2</sup>	16.62	2.08 × 10 <sup>2</sup>	13.47	—	992.79	—
放线菌 Actinomycete	绿色产色链霉菌 <i>S. viridochromogenes</i>	33.99 × 10 <sup>3</sup>	1.80	13.05 × 10 <sup>3</sup>	2.56	—	160.46	—
	多产色链霉菌 <i>S. polychromogenes</i>	25.49 × 10 <sup>3</sup>	1.35	9.78 × 10 <sup>3</sup>	1.92	—	160.63	—
	加德那链霉菌 <i>S. gardneri</i>	38.24 × 10 <sup>3</sup>	2.02	16.31 × 10 <sup>3</sup>	3.20	—	134.46	—
	高加索山链霉菌 <i>S. ciscaucasica</i>	67.98 × 10 <sup>3</sup>	3.60	19.57 × 10 <sup>3</sup>	3.84	—	247.37	—

从黄瓜根区土、根表土中分离出的 2 株优势细

菌分别为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)

和绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*);3 株优势真菌分别为茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、毛壳属菌(*Chaetomium*)及尖孢枝孢菌(*Cladosporium oxysporum*);4 株优势放线菌分别为绿色产色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、多产色链霉菌(*S. polychromogenes*)、加德那链霉菌(*S. gardneri*)及高加索山链霉菌(*S. ciscaucasica*)。

2.4.1 根区土 从表 5 可以看出,黄瓜病株、健株根区土中的优势细菌数量有显著差异。在黄瓜病株、健株根区土中,荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)的数量分别为  $18.19 \times 10^5$ ,  $35.96 \times 10^5$  CFU/g,病株较健株降低了 49.42%,仅为根外土的 3.2%;病株根区土中绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)的数量为  $24.26 \times 10^5$  CFU/g,健株中未测出,较根外土提高了 36.2%。荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)为根圈促生细菌,健株根区土中该菌数量明显多于病株,可能是健株发育良好的原因之一。

申卫收等<sup>[19]</sup>、陈志杰等<sup>[20]</sup>认为,黄瓜再植病害主要是由病原真菌引起的。从表 5 可以看出,黄瓜病株根区土中优势真菌数量大幅度增加。黄瓜病株根区土中茄病镰刀菌(*F. solani*)、毛壳属菌(*Chaetomium*)、尖孢枝孢菌(*C. oxysporum*)的数量分别较健株提高了 366.15%,147.96%,2 201.85%。由此可知,根区土中病原真菌数量大幅度增加是黄瓜枯萎病发生的重要原因之一。

从表 5 还可以看出,黄瓜病株、健株根区土中的优势放线菌数量不同。在黄瓜病株与健株根区土中,多产色链霉菌(*S. polychromogenes*)、高加索山链霉菌(*S. ciscaucasica*)数量差异不大,但均较根外土有明显提高;绿色产色链霉菌(*S. viridochromogenes*)在健株根区土中未检出,但该菌在病株根区土中的数量约为根外土的 2 倍;病株根区土中的加

德那链霉菌(*S. gardneri*)较健株根区土和根外土分别减少 39.31%,23.4%。

2.4.2 根表土 从表 5 可以看出,在黄瓜病株根表土中,优势细菌数量大幅度增加,其中荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)的数量为健株根表土的 37.9 倍、根外土的 4.9 倍;绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)的数量为健株根表土的 5.6 倍、根外土的 2.4 倍。在黄瓜根表土中,病株根表中的真菌数量大幅度增加,其中毛壳菌属(*Chaetomium*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)及尖孢枝孢菌(*C. oxysporum*)的数量分别为健株的 4.1,4.7,10.9 倍,是根外土的 0.6,1.7,1.3 倍。由此可知,根表土中病原真菌数量的大幅度增加是黄瓜枯萎病发生的重要原因之一。

从表 5 还可以看出,黄瓜病株根表土中的放线菌数量也大幅增加,其绿色产色链霉菌(*S. viridochromogenes*)、多产色链霉菌(*S. polychromogenes*)、加德那链霉菌(*S. gardneri*)及高加索山链霉菌(*S. ciscaucasica*)的数量分别为健株根表土的 2.6,2.6,2.3,3.5 倍,分别为根外土的 11.4,1.4,1.6,2.5 倍。这些特定优势放线菌数量的增加可能与黄瓜枯萎病株根系溃烂有关。

## 2.5 黄瓜根系土壤中优势细菌、真菌和放线菌的拮抗性

黄瓜根区土和根表土中,优势微生物与病原菌的相互作用对枯萎病等土传病害的发生影响很大。从表 6 可以看出,从黄瓜根区土和根表土中分离得到的 2 株优势细菌对所有病原菌均无拮抗作用;3 株优势真菌中,茄病镰刀菌对大丽轮枝菌的拮抗作用明显;4 株优势放线菌中,多产色链霉菌对所有病原菌均有拮抗作用,拮抗圈直径为 9~20 mm,具有广谱性。

表 6 黄瓜根系土壤中不同优势微生物对 6 种植物病原菌的拮抗圈直径

Table 6 Diameter of inhibitory zones of dominant bacteria, fungi and actinomycetes to six test pathogenetic fungi mm

种类 Type	优势菌 Predominate microbial population	尖孢镰刀菌 (黄瓜) <i>F. oxysporum</i>	泡木贼 镰刀菌 <i>F. equiseti</i>	大丽轮 枝菌 <i>V. dahliae</i>	尖孢镰刀菌 (草莓) <i>F. oxysporum</i>	立枯丝 核菌 <i>R. solani</i>	枯萎病病原菌 西瓜专化型 <i>F. oxysporum</i> <i>f. sp. niveum</i>
细菌 Bacterium	荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	0	0	0	0	0	0
	绿针假单胞菌 <i>P. chlororaphis</i>	0	0	0	0	0	0
真菌 Fungus	茄病镰刀菌 <i>F. solani</i>	0	0	26	0	0	0
	毛壳属菌 <i>Chaetomium</i>	0	0	0	0	0	0
	尖孢枝孢菌 <i>C. oxysporum</i>	0	0	0	0	0	0
放线菌 Actinomycete	绿色产色链霉 <i>S. viridochromogenes</i>	0	10	0	0	0	0
	多产色链霉菌 <i>S. polychromogenes</i>	9	15	20	12	16	11
	加德那链霉菌 <i>S. gardneri</i>	0	0	0	0	0	0
	高加索山链霉菌 <i>S. ciscaucasica</i>	0	0	0	0	0	0

### 3 结论与讨论

连作障碍的主要原因是土壤中微生物区系异常和养分平衡失调,表现为病原微生物数量大幅增加,有益微生物数量下降,土壤原有的微生物生态系统遭到破坏<sup>[21]</sup>。

本研究得到的主要结果为:①黄瓜病株根区土中的速效 P、速效 K 含量明显低于健株根区土和根外土,表明增施磷钾元素可能对降低黄瓜枯萎病发病率有一定效果。②病株根区土中的细菌数量较健株大幅度下降,其中病株根区土中具有促生作用的荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)数量较健株下降 49.4%,说明有益细菌数量大幅度下降与植株生长状况密切相关。本研究发现,染病黄瓜根区土中的真菌数量大幅度增加,其中优势真菌茄病镰刀菌(*F. solani*)及尖孢枝孢菌(*C. oxysporum*)增幅分别为 366.2%,2 201.9%,即这 2 种病原真菌在根际土壤中的大量积累,是黄瓜枯萎病发生的重要条件<sup>[22]</sup>。③病株根表土中的细菌、真菌和放线菌数量较健株根表土大幅度增加,这是根系染病腐烂导致腐生性微生物大量繁殖的结果。由于根区土、根表土中的微生物与作物的关系密切,因此本研究结果对于揭示黄瓜枯萎病发生的微生态机制具有重要意义。

本研究结果表明,细菌和真菌数量及其比例在根表土和根区土中变化较大,表明连作造成的微生物群落变化主要发生在根表和根区部位,即连作障碍的微生物修复重点应放在作物根区土和根表土上。从本研究结果还可以看出,在黄瓜根区土、根表土的优势微生物中,对黄瓜枯萎病病原菌尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)及其他 5 种常见作物土传病害病原真菌有拮抗性的菌株很少,对多种常见土传病害病原菌有广谱拮抗性的仅有多产色链霉菌(*S. polychromogenes*) 1 株,即根区土、根表土中缺乏对病原真菌有拮抗性的放线菌,这也可能是黄瓜连作时枯萎病等根部病害较为严重的原因之一。

尽管有许多学者已对连作黄瓜土壤微生物区系进行了研究<sup>[4, 17, 22]</sup>,但他们在采集土壤样品时均未考虑根区土与根表土中微生物因受根系生理生化影响不同而产生的差异,所采集的样品为耕层土壤或根区土,缺乏根表土的研究资料。因此,所得结果不能准确地反映作物根区土壤微环境中微生物数量和种类的真实状况,因而难以揭示黄瓜枯萎病株与健株根系中微生物生态系统的差异,也因此无法探明黄瓜

枯萎病发生的微生态机制。本试验从样品采集及分析方法上对根区土与根表土分别进行研究,有助于从更精确的微观分析中发现作物根部病害与微生物生态的关系。

### [参考文献]

- [1] 吴凤芝,王 伟,栾非时. 土壤灭菌对大棚连作黄瓜生长发育影响 [J]. 北方园艺,1999(4):300.  
Wu F Z, Wang W, Luan F S. Effect of sterilized soil on the growth of continuous cropping cucumber in greenhouse [J]. Northern Horticulture, 1999(4):300. (in Chinese)
- [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 [J]. 应用生态学报,2004,15(6):1005-1008.  
Ma Y H, Wei M, Wang X F. Variation of microflora and enzyme activity in continuous cropping cucumber soil in solar greenhouse [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(6):1005-1008. (in Chinese)
- [3] 苗则彦,赵奎华,刘长远,等. 健康与罹病黄瓜根际微生物数量及真菌区系研究 [J]. 中国生态农业学报,2004,12(3):156-157.  
Miao Z Y, Zhao K H, Liu C Y, et al. Rhizosphere microorganism quantity and fungal flora of healthy and infected cucumber plants by *F. oxysporum* [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2004, 12(3):156-157. (in Chinese)
- [4] 刘亚锋,孙富林,周 毅,等. 黄瓜连作对土壤微生物区系的影响 I:基于可培养微生物种群的数量分析 [J]. 中国蔬菜,2006(7):4-7.  
Liu Y F, Sun F L, Zhou Y, et al. The effects of continuous cucumber cropping on microbial communities structure I: Based on quantitative analysis of culturable microbial population [J]. China Vegetables, 2006(7):4-7. (in Chinese)
- [5] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术 [M]. 西安:世界图书出版公司,2000:80-83,104-105.  
Cheng L J, Xue Q H. Experimental techniques of microbiology [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000:80-83, 104-105. (in Chinese)
- [6] 周永强,薛泉宏,杨 斌,等. 生防放线菌对西瓜根域微生态的调整效应 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(4):143-150.  
Zhou Y Q, Xue Q H, Yang B, et al. Adjusted effect of inoculating with biocontrol actinomycetes on microbial flora of watermelon rooting zone [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2008, 36(4):143-150. (in Chinese)
- [7] 牛晓磊,薛泉宏,涂 璇,等. 6 株生防放线菌对辣椒疫霉的皿内拮抗研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(1):55-58.  
Niu X L, Xue Q H, Tu X, et al. Study on the antagonistic activity of 6 strains of actinomycetes against phytophthora capsici in plate [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2005, 33(1):55-58. (in Chinese)
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 北京:中国农业出版社,2000.

- Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000. (in Chinese)
- [9] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学-原理方法及实践 [M]. 北京:科学出版社, 2007.  
Xu L H, Li W J, Liu Z H, et al. Actinomycete systematic-principle, methods and practice [M]. Beijing: Science Press, 2007. (in Chinese)
- [10] Cui X L, Mao P, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 357-363.
- [11] Saghai M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(24): 8014-8018.
- [12] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.  
Yi R H, Zhu X R, Zhou E X. A simplified CTAB method for extracting rapid and small DNA from filamentous fungi [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2003, 23(6): 72-73. (in Chinese)
- [13] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362-365.  
Liu S H, Lu J P, Zhu R L, et al. A rapid and simple extraction method for plant pathogenic fungi [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(4): 362-365. (in Chinese)
- [14] 黄筠军,周晓华,李永丽. 几种药剂防治西瓜枯萎病的效果 [J]. 湖北学报, 1998(4): 18-19.  
Huang Y J, Zhou X H, Li Y L. The effect of several chemical pesticide on the control of watermelon *Fusarium wilt* [J]. Hubei Plant Protection, 1998(4): 18-19. (in Chinese)
- [15] 吴凤芝,赵凤艳,谷思玉. 保护地黄瓜连作对土壤生物化学性质的影响 [J]. 农业系统科学与综合研究, 2002, 18(1): 20-22.  
Wu F Z, Zhao F Y, Gu S Y. Effect of the continuous cultivating cucumber on the bio-chemical properties of soil in the plastic greenhouse [J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2002, 18(1): 20-22. (in Chinese)
- [16] Ellis R J, Morgan P, Weightman A J, et al. Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 3223-3230.
- [17] 胡元森,刘亚峰,吴 坤,等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究 [J]. 土壤通报, 2006, 37(1): 126-129.  
Hu Y S, Liu Y F, Wu K, et al. Variation of microbial community structure in relation to successive cucumber cropping soil [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2006, 37(1): 126-129. (in Chinese)
- [18] 吕卫光,余廷园,诸海涛,等. 黄瓜连作对土壤理化性状及生物活性的影响研究 [J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(2): 119-121.  
Lü W G, Yu T Y, Zhu H T, et al. Effects of cucumber continuous cropping on the soil physico-chemical characters and biological activities [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2006, 14(2): 119-121. (in Chinese)
- [19] 申卫收,林先贵,张华勇,等. 不同栽培条件下蔬菜塑料大棚土壤尖孢镰刀菌数量的变化 [J]. 土壤学报, 2008, 45(1): 137-142.  
Shen W S, Lin X G, Zhang H Y, et al. Numbers of *Fusarium oxysporum* in different greenhouse vegetable soils [J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(1): 137-142. (in Chinese)
- [20] 陈志杰,梁银丽,张 锋,等. 温室土壤连作对黄瓜主要病害的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(1): 71-74.  
Chen Z J, Liang Y L, Zhang F, et al. Effect of different crop successions on main disease development in cucumber under sunlit greenhouse [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2008, 16(1): 71-74. (in Chinese)
- [21] 薛泉宏,同延安. 土壤生物退化及其修复技术研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(4): 28-35.  
Xue Q H, Tong Y A. Research progress on soil biological degradation and its remediation technology [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008, 10(4): 28-35. (in Chinese)
- [22] 葛红莲,胡 春. 日光温室连作黄瓜根际微生物区系的变化 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 248-249.  
Ge H L, Hu C. Variation of microflora in cucumber rhizosphere of continuous cropping in greenhouse [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2009, 37(1): 248-249. (in Chinese)