

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.02055

马铃薯连作地健康株与病株根区土壤微生态特性比较

陈杰¹ 郭天文² 谭雪莲² 朱渭兵³ 魏晓丽¹ 王东胜¹ 薛泉宏^{1,*}

¹西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100; ²甘肃省农业科学院旱地农业研究所, 甘肃兰州 730070; ³杨凌金薯种业科技有限公司, 陕西杨凌 71210

摘要: 为探索甘肃省连作马铃薯健康生长的微生态机制, 采用常规养分分析法测定了健康株与病株根区土壤中速效氮磷钾含量, 稀释平皿涂抹法测定土壤放线菌数量, 琼脂块法筛选拮抗放线菌; 16S rRNA 序列分析法鉴定优势放线菌, 发酵液抑菌试验检测优势放线菌灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)对马铃薯病原真菌的抑菌作用。结果表明, 在连作 4 年的田中: 马铃薯病株根区土壤的速效 P、K 含量分别较健株低 29.9%、12.5%, 铵态氮含量较健株高 24.1%。在高氏 1 号培养基上, 病株根区土壤中放线菌总数、小单孢菌及未鉴定放线菌数量较健株分别减少 51.1%、83.0%及 53.9%; 腐植酸琼脂培养基上, 病株根区土壤中放线菌总数、链霉菌数量较健株分别减少 46.0%、46.7%。在病、健株根区土壤中, 对 4 株靶标真菌的拮抗潜势 SAAP 值病株均小于健株。健株根区土壤中的优势放线菌为灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*), 该菌对 4 株马铃薯常见土传病原真菌立枯丝核菌(*R. solani*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)、硫色镰刀菌(*F. sulphureum*)和大丽轮枝菌(*V. dahliae*)均有抑制作用; 病株根区土壤中的优势放线菌为加利利链霉菌(*S. galilaeus*), 该菌为马铃薯疮痂病致病菌。由此可知, 保持连作马铃薯健康生长的根区土壤微生态特征是, 高量磷钾及低量氮的速效养分组合, 较多放线菌且拮抗放线菌的拮抗潜势较大, 优势放线菌为有益菌。

关键词: 马铃薯; 连作; 土壤养分; 放线菌; 微生态机制

Comparison of Microecological Characterization in Rhizosphere Soil between Healthy and Diseased Plants in Continuous Cropping Potato Fields

CHEN Jie¹, GUO Tian-Wen², TAN Xue-Lian², ZHU Wei-Bing³, WEI Xiao-Li¹, WANG Dong-Sheng¹, and XUE Quan-Hong^{1,*}

¹College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ²Dryland Agriculture Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China; ³Yangling Jinshu Seed Technology Co. Ltd., Yangling 712100, China

Abstract: To explore the microecological mechanism of healthy plant growth in continuous potato fields in Gansu Province, China, we measured contents of available soil nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$), phosphorus (P), and potassium (K) using conventional soil nutrient analytic methods, abundance of soil actinomycetes using serial dilution and plating techniques, and screened antagonistic actinomycetes from obtained actinomycete isolates using the agar block method. The selected dominant actinomycetes were identified by 16S rRNA sequence analysis, and the inhibitory effect of one dominant actinomycete, *Streptomyces gancidicus*, was tested using culture filtrate. Results showed that in the four-year continuous potato field, available soil P and K contents in the rhizosphere of diseased plants were respectively 29.9% and 12.5% lower than those of healthy plants, whereas soil $\text{NH}_4^+\text{-N}$ content in the rhizosphere of diseased plant was 24.1% higher than that of healthy plant. Compared with those from the rhizosphere of healthy plants, the number of soil actinomycetes, *Micromonospora*, and unidentified actinomycetes from the rhizosphere of diseased plants cultured with the Gause1 medium decreased by 51.1%, 83.0%, and 53.9%, respectively, whereas the number of soil actinomycetes and *Streptomyces* from the rhizosphere of diseased plants cultured with the Humic Acid medium decreased by 46.0% and 46.7%, respectively. The soil actinomycetes antagonistic potentiality (SAAP) of actinomycetes with antagonistic effects on the four pathogenic fungi of potato were lower in the rhizosphere of diseased plants than in the rhizosphere of healthy plants. *S. gancidicus* and *S. galilaeus* were found dominant in the rhizosphere of healthy and diseased plants, respectively. In con-

本研究由甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2009-20)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 薛泉宏, E-mail: xuequanhong@163.com, Tel: 13474173220

第一作者联系方式: E-mail: Chenjie03306@163.com, Tel: 15129364258

Received(收稿日期): 2013-01-14; Accepted(接受日期): 2013-06-09; Published online(网络出版日期): 2013-08-12.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130812.1749.008.html>

clusion, the microecology of rhizosphere soil that supports healthy plant growth in the continuous potato field is mainly characterized by: available nutrient combination of abundant P and K with relatively poor N contents; and a larger number of soil actinomycetes than those of diseased plants, with the numerically dominant actinomycetes showing beneficial antagonistic effect on several common soil-borne pathogenic fungi.

Keywords: Potato; Continuous cropping; Soil nutrient; Actinomycetes; Microecological mechanism

由于连作障碍加重的土传病害已经严重影响马铃薯产量^[1-3]。但在同一连作田块中,在土壤类型、施肥管理及种植品种等相同的条件下,健康植株与发病植株同时存在的现象十分普遍。目前对该现象的发生原因了解很少,除流行病学因素外,有无其他原因尚不清楚,亦无相关报道。植物根系与根系分布区内的土壤关系密切,土壤化学性质及微生物区系等正常与否决定着根系健康生长或发生病害。白霜等^[4]研究发现,棉花黄萎病株与健株根区土壤盐分含量存在差异;段春梅等^[5]发现,黄瓜根区土壤中的速效磷钾含量有健株高于病株的现象。申光辉等^[6]发现,草莓根腐病株与健株根区微生物区系不同。由此推知,在相同的连作栽培条件下,健株与病株同时存在的现象之后必有其必然的原因。研究连作土壤中马铃薯健康生长的微生态机制,对于防治马铃薯连作障碍具有重要指导意义。本文比较了土壤养分含量、土壤放线菌数量及其拮抗性对马铃薯健株与病株的根域微生态特性,旨在探索连作田块中马铃薯植株保持健康生长的微生态机制,为马铃薯连作障碍预防及修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤样品 2010年7月20日于马铃薯淀粉形成期-成熟期从甘肃省农业科学院定西试验站连作2年、4年的马铃薯地分别采集健株、病株根区土和根外土。马铃薯品种为新大坪,一级种薯。病株为立枯丝核菌感染植株,兼有轻度晚疫病症状。

1.1.2 供试靶标菌 共4株,其中马铃薯干腐病病原菌2株,即茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)及硫色镰刀菌(*Fusarium sulphureum*);马铃薯黑痣病病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)1株,由甘肃农业科学院旱地农业研究所提供,马铃薯黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)1株,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。

1.1.3 培养基 放线菌分离采用高氏1号培养基

(GA)^[7]和腐植酸琼脂培养基(HA)^[8],倒皿前分别加入重铬酸钾使培养基中 $K_2Cr_2O_7$ 的浓度达到 $80\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 。放线菌保存及拮抗放线菌筛选琼脂块制备均采用高氏1号培养基。立枯丝核菌培养、保存及拮抗放线菌筛选用改良PDA培养基($120\ \text{g L}^{-1}$ 马铃薯打成匀浆,蔗糖 $20\ \text{g L}^{-1}$ 、琼脂粉 $10\ \text{g L}^{-1}$ 煮沸, 121°C 灭菌30 min)。其余病原真菌培养、保存及拮抗放线菌的筛选均采用普通PDA培养基^[7]。

1.2 土样采集

根区土指与根系结合较紧密、受根系影响较大的土壤。用采样铲分别将马铃薯健株和病株整个根系完整挖出,用轻敲根系,使与根系结合较松的土壤自然落下后弃去,将与根系紧密结合的土壤连同根系放入自封式采样袋,用手轻轻揉搓根系,使与根系结合较紧密的土壤落入采样袋中,所采样品即为健株根区土和病株根区土^[9]。

根外土指取自马铃薯行间受马铃薯根系影响较小的土壤。用采样铲刮除马铃薯植株行间地表约1 cm土层后,采集距健株16 cm处深度0~20 cm的耕层土壤,即健株根外土;采集距病株16 cm处深度0~20 cm的耕层土壤,即病株根外土。

1.3 土壤养分测定

参照鲍士旦^[10]的方法测定养分。采用重铬酸钾容量法测定有机质含量;采用pH计法(土:水=1:1)测定pH;采用 $0.5\ \text{mol L}^{-1}\ \text{NaHCO}_3$ 溶液浸提,钼锑抗比色法测定速效磷含量;采用 $1\ \text{mol L}^{-1}$ 中性 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液浸提,火焰光度法测定速效钾含量;采用 $2\ \text{mol L}^{-1}\ \text{KCl}$ 浸提,AA3型连续流动化学分析仪测定铵态氮含量。

1.4 放线菌分离计数

采用稀释平皿涂布法^[7]。 28°C 培养10 d后选择稀释度合适的平皿统计放线菌总数、链霉菌、小单孢菌数量,并将形态不同的放线菌接入高氏1号斜面,纯化后保存。

1.5 拮抗性放线菌筛选

采用琼脂块法^[11]。用竹签挑取少量1.4中保存至斜面的放线菌于已滴加0.1 mL无菌水的高氏1号

平皿上, 涂布均匀, 28℃培养 7 d, 用 7 mm 打孔器制成放线菌琼脂块备用。向已培养 4 d 的病原真菌斜面(*R. solani* 培养 7 d)加 4 mL 无菌水, 用灭菌竹签将菌丝刮下、磨碎, 搅匀制成菌悬液备用。用 1 mL 无菌吸管吸取 0.1 mL 病原菌悬液于 PDA 或改良 PDA 平皿上涂布均匀, 将已制备好的放线菌琼脂块接于其上, 菌面向上。28℃培养 4 d, 待病原菌均匀长满整个平皿后(*R. solani* 需培养 7 d)采用十字交叉法测量抑菌圈直径 d 。拮抗性、中、弱及无的分级标准分别为 $d \geq 14$ mm、 $14 \text{ mm} > d \geq 10$ mm、 $10 \text{ mm} > d > 7$ mm 及 $d \leq 7$ mm。

1.6 优势放线菌分子鉴定

采用酶解法^[12]提取放线菌总 DNA, 采用细菌 16S rRNA 通用引物(PA: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGC TCAG-3'; PB: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行 PCR 扩增, 得到长度为 1400~1500 bp 的片段, 送南京金斯特生物科技有限公司测序。将所获得序列校对后, 采用 Blast 方法从 GenBank 数据库中调取相关序列, ClustalX 2.0 软件进行同源性分析, Mega 3.0 软件中的 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。

1.7 优势放线菌灭癌素链霉菌(*Streptomyces gancidicus*)发酵滤液抑菌试验

该菌是从供试健康株土壤中分离、鉴定的优势放线菌。将灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)于斜面培养 7 d, 加无菌水 4 mL, 用竹签将孢子刮下、搅匀, 制成孢子悬液。用 1 mL 无菌吸管吸取孢子悬液 1 mL 至装有 60 mL 高氏 1 号液体培养基的 250 mL 玻璃瓶中, 以 4 层棉布封口, 重复 3 瓶。28℃、每分 160 转的摇床振荡培养 8 d 后用滤纸过滤、0.45 μm 微孔滤膜真空抽滤、0.45 μm 灭菌微孔滤膜过滤除菌得发酵滤液。向已培养 4 d 的茄病镰刀菌(*F. solani*)、硫色镰刀菌(*F. sulphureum*)、大丽轮枝菌(*V. dahliae*)斜面(*R. solani* 培养 7 d)中加入无菌水 4 mL, 用竹签将菌丝刮下、搅匀。用 1 mL 无菌吸管吸取 0.1 mL 菌悬液于 PDA(*R. solani* 菌悬液于改良 PDA)平皿上, 用刮铲涂匀。28℃培养 4 d (*R. solani* 培养 7 d)后, 用打孔器制成 7 mm 圆形菌饼, 备用。放线菌发酵滤液与冷却至 50℃左右的 PDA(或改良 PDA)培养基按体积比 1:4 混匀后倒平板, 以无菌水代替放线菌发酵滤液为对照。用灭菌竹签挑取病原菌琼脂块置上述平板中央, 菌面向下, 每处理 3 次重复。28℃培养 40 h, 用十字交叉法测量菌落直径并计算抑菌率。

1.8 计算公式

分别按公式(1)、(2)、(3)及(4)计算病株较健康株各指标增率 $\Delta D\%$ 、土壤中某种放线菌占放线菌总数的比例 $P\%$ 、土壤放线菌拮抗潜势(soil actinomycetes antagonistic potentiality, SAAP)^[11]及发酵滤液抑菌率^[13]。

$$\Delta D = [(病株值 - 健康株值) / 健康株值] \times 100\% \quad (1)$$

$$P = \text{某种放线菌数量} / \text{放线菌总数} \times 100\% \quad (2)$$

$$SAAP\% = \frac{\sum_{i=1}^n A_n}{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n A_n} \times 100 \quad (3)$$

抑菌率% = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 7)] × 100 (4)

(3)式中: A_n 为某株拮抗性放线菌能够拮抗靶标菌的株次; m 、 n 分别为供试土壤数和拮抗菌株数。拮抗菌株次指每株拮抗性放线菌能够拮抗的靶标菌的株数。如 1 株拮抗性放线菌对 1 个靶标菌有拮抗性, 称为 1 个株次; 1 株放线菌同时对 10 个靶标菌有拮抗性, 称为 10 株次。

1.9 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 处理数据, SAS(8.0)进行单因子方差分析及 Duncan's 多重检验。

2 结果与分析

2.1 马铃薯健康株、病株根区土壤养分

从表 1 看出, 在连作 4 年的田块, 病株根区土壤中的速效 P、K 含量分别较健康株低 29.9%、12.5%, 差异均达极显著水平($P < 0.01$); 病株根外土壤速效 P 和速效 K 含量亦较健康株分别减少 2.5% 和 15.5% ($P < 0.01$), 与根区土壤速效 P、K 含量的分布趋势一致。连作 2 年的田块, 根外土中速效 P、速效 K 的含量同样表现为病株低于健康株的趋势, 病株速效 P、K 分别较健康株低 54.1% 和 34.9%, 差异均达极显著水平($P < 0.01$); 但在根区土壤中, 速效 P、K 含量呈相反趋势, 表现为病株高于健康株, 该差异可能与病株根系吸收功能差、残留的养分含量多有关。

在连作 2 年和 4 年的田块, 病株根区土壤的铵态氮含量分别较健康株高 31.4% ($P < 0.01$)、24.1% ($P < 0.01$); 在连作 4 年的田块, 病株根外土壤中铵态氮含量较健康株高 86.6% ($P < 0.01$), 表明根区土壤中氮素含量较高可能会降低植株的抗病性, 但在连作 2 年的田块, 病、健康株根外土中铵态氮分布却呈相反

趋势, 反映出氮素养分影响的复杂性。

以上结果表明, 健株根区及根外土壤中速效 P、速效 K 含量较高, 铵态氮含量较低可能是导致马铃薯抗病性较强的养分因素。

此外, 从表 1 可知, 连作 4 年的根区土和连作 2

年的根外土壤中, 土壤 pH 在病、健株间的差异亦达极显著水平($P<0.01$), 呈病株大于健株的趋势; 连作 2 年根区土壤有机质呈病株大于健株的趋势, 且差异达极显著水平($P<0.01$)。土壤 pH 及有机质是否是影响马铃薯健康生长的主要因素尚不清楚。

表 1 连作马铃薯根区、根外土壤养分含量
Table 1 Content of nutrients in rhizosphere and out-rhizosphere soil in continuous cropping potato fields

植株/连作年限 Plant /Continuous cropping time	有机质 Organic matter		pH		速效 P Available P		速效 K Available K		铵态氮 Ammonium N	
	含量 Content (g·kg ⁻¹)	增率 ΔD (%)	测值 Measured value	增率 ΔD (%)	含量 Content (mg kg ⁻¹)	增率 ΔD (%)	含量 Content (mg kg ⁻¹)	增率 ΔD (%)	含量 Content (mg kg ⁻¹)	增率 ΔD (%)
根区土 Rhizosphere soil										
健株/2 年 HP/2 year	16.25±0.28	—	8.33±0.05	—	2.58±0.35	—	176.33±6.39	—	4.04±0.17	—
病株/2 年 DP/2 year	18.46±0.43	13.6**	8.24±0.03	-1.0	4.61±0.05	78.6**	265.59±0.45	50.6**	5.30±0.08	31.4**
健株/4 年 HP/4 year	13.18±0.76	—	7.91±0.03	—	8.64±0.25	—	158.31±0.03	—	3.61±0.17	—
病株/4 年 DP/4 year	12.95±0.52	-1.7	8.15±0.04	3.1**	6.06±0.20	-29.9**	138.55±0.35	-12.5**	4.48±0.04	24.1**
根外土 Out-rhizosphere soil										
健株/2 年 HP/2 year	16.47±0.26	—	7.46±0.01	—	9.18±0.05	—	276.69±0.03	—	4.41±0.54	—
病株/2 年 DP/2 year	16.67±0.38	1.2	7.83±0.09	5.0**	4.21±0.05	-54.1**	180.10±1.97	-34.9**	3.41±0.05	-22.7*
健株/4 年 HP/4 year	13.79±0.83	—	8.30±0.06	—	4.46±0.10	—	166.53±0.13	—	2.50±0.09	—
病株/4 年 DP/4 year	13.36±0.29	-3.2	8.10±0.01	-2.4**	4.34±0.10	-2.5	140.67±1.81	-15.5**	4.67±0.79	86.6**

表中数据为平均值±标准差; *和**分别指在根区土壤或根外土壤中病株与健株各测值间差异达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。ΔD: 病株较健株增率; HP: 健株; DP: 病株。

The data in the table are described as mean±SD; * and ** represent the differences in values between healthy and diseased plants are $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively. ΔD: increasing rate of diseased plant compared with healthy plant; HP: healthy plant; DP: diseased plant.

2.2 马铃薯健、病株根区土壤放线菌数量

根区土与根系结合紧密, 根区土中放线菌的数量及比例可以反映根系生长部位放线菌的分布状况。从表 2 中高氏 1 号培养基的分离结果看出, 在连作 4 年的田块, 病株根区土中放线菌总数、小单孢菌数量及未鉴定放线菌数量较健株分别减少 51.1% ($P<0.01$)、83.0% ($P<0.05$)及 53.9% ($P<0.01$); 病株根区土壤的链霉菌数量较健株减少 18.7%, 但其差异未达到显著水平。在连作 2 年的田块中, 病株根区土壤中的链霉菌、小单孢菌数量较健株分别高出 260.5%、75.9%, 与连作 4 年的田块呈相反趋势。

腐植酸琼脂培养基是链霉菌的选择性培养基。从该培养基上分离到的主要是能以腐植酸为碳源和

能源的放线菌, 一些在高氏 1 号培养基上不能生长的链霉菌也可以在腐植酸琼脂培养基上生长。从表 2 中腐植酸琼脂培养基的分离结果可知, 在连作 4 年的田块, 病株根区土壤中放线菌总数、链霉菌数量较健株分别减少 46.0%、46.7%, 病、健株差异均达显著水平($P<0.05$), 与高氏 1 号上的结果一致。在连作 2 年的田块, 病株根外土壤中放线菌总数和链霉菌数量分别较健株减少 53.5%、55.3%, 但在根区土壤中, 放线菌总数及链霉菌的数量却呈病株显著低于健株的趋势($P<0.05$)。

从总体来看, 在连作 4 年的田块, 土壤中放线菌数量表现病株少于健株的趋势, 说明健株根部土壤中放线菌数量较多可能是植株保持健康的原因之一。同时, 在连作 2 年的田块也存在一些呈相反趋

表 2 连作马铃薯根区、根外土壤放线菌组成及数量

Table 2 Composition and quantity of actinomycetes in rhizosphere and out-rhizosphere soil in continuous cropping potato fields

土壤样品 Soil sample	植株/连作年限 Plant /continuous cropping time	放线菌总数		链霉菌属		小单孢菌属		未鉴定放线菌属	
		Total No. of actinomycetes		<i>Streptomyce</i>		<i>Micromonospora</i>		Unidentified actinomycetes	
		数量 Quantity (10 ⁶ CFU g ⁻¹)	增率 ΔD (%)	数量 Quantity (10 ⁵ CFU g ⁻¹)	增率 ΔD (%)	数量 Quantity (10 ⁵ CFU g ⁻¹)	增率 ΔD (%)	数量 Quantity (10 ⁵ CFU g ⁻¹)	增率 ΔD (%)
高氏 1 号培养基 Gause 1 medium									
根区土 RS	健株/2 年 HP/2 year	1.43±0.49	—	2.53±0.50	—	2.20±0.20	—	9.60±4.91	—
	病株/2 年 DP/2 year	2.09±0.34	45.6	9.13±3.79	260.5*	3.87±0.42	75.9**	7.87±3.00	-18.1
根外土 ORS	健株/2 年 HP/2 year	1.79±0.59	—	3.53±2.69	—	1.87±0.70	—	12.53±5.26	—
	病株/2 年 DP/2 year	1.31±0.04	-26.8	3.47±0.42	-1.9	2.93±0.61	56.7	6.73±0.58	-46.3
根区土 RS	健株/4 年 HP/4 year	4.95±0.59	—	7.13±0.61	—	3.93±1.30	—	38.47±6.00	—
	病株/4 年 DP/4 year	2.42±0.30	-51.1**	5.80±2.09	-18.7	0.67±0.50	-83.0*	17.73±2.86	-53.9**
根外土 ORS	健株/4 年 HP/4 year	2.64±0.33	—	8.53±3.06	—	0.33±0.42	—	17.53±2.21	—
	病株/4 年 DP/4 year	2.79±0.36	5.7	8.73±3.51	2.3	0.60±0.00	81.8	18.53±0.12	5.7
腐植酸琼脂培养基 Humic acid medium									
根区土 RS	健株/2 年 HP/2 year	0.60±0.20	—	6.00±2.00	—	0	—	0	—
	病株/2 年 DP/2 year	1.80±0.72	200.0*	17.33±6.11	188.3*	0	—	0.67±1.15	—
根外土 ORS	健株/2 年 HP/2 year	2.73±0.61	—	25.33±7.02	—	0	—	2.00±2.00	—
	病株/2 年 DP/2 year	1.27±0.12	-53.5*	11.33±3.06	-55.3*	0	—	1.33±2.31	-33.5
根区土 RS	健株/4 年 HP/4 year	4.20±0.53	—	41.33±6.43	—	0	—	0.67±1.15	—
	病株/4 年 DP/4 year	2.27±0.42	-46.0**	22.00±4.00	-46.7*	0	—	0.67±1.15	0.0
根外土 ORS	健株/4 年 HP/4 year	2.33±0.70	—	22.67±8.08	—	0	—	0.67±1.15	—
	病株/4 年 DP/4 year	2.73±1.10	17.2	27.33±11.02	20.3	0	—	0	-100.0

表中数据为平均值±标准差,*和**分别指在根区土壤或根外土壤中病株与健株各测值间差异达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。 ΔD : 病株较健株增率; HP: 健株; DP: 病株; RS: 根区土; ORS: 根外土。

The data in the table are described as mean±SD; * and ** represent the differences in values between healthy and diseased plants are $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively. ΔD : increasing rate of diseased plant compared with healthy plant; HP: healthy plant; DP: diseased plant; RS: rhizosphere soil; ORS: out-rhizosphere soil.

势的现象,表明连作田块中,马铃薯病株、健株同时存在的原因复杂,放线菌数量仅是其中的原因之一,同时,也可能由于连作年限较短,微生物区系随连作年限延长发生的演替处于不同阶段,导致连作 2 年田块中土壤放线菌在健株、病株之间的分布呈现与连作 4 年不同的趋势。

2.3 连作马铃薯根区土壤放线菌拮抗潜势

从连作 2 年和 4 年马铃薯健、病株根区及根外土中共分离到放线菌 210 株,从中共筛选到对供试 4 株马铃薯土传病原真菌有拮抗作用的放线菌 61 株,占供试放线菌总株数的 29.1%。其中拮抗大丽轮枝菌、硫色镰刀菌的放线菌分别占放线菌总株数的 18.6%、

17.1%; 拮抗茄病镰刀菌和马铃薯立枯丝核菌的放线菌分别占放线菌总株数的13.8%和11.9% (详细结果另文报道)。

由表 3 可以看出, 在连作 4 年的田块, 病、健株根区土中对 4 株靶标菌呈强拮抗强度放线菌的拮抗潜势(SAAP)值分别为 13.3%、26.7%, 中等拮抗强度放线菌的 SAAP 分别为 14.7%、26.5%, 均表现健株大于病株的趋势; 在连作 4 年的根外土壤中, 也表现相同的趋势。连作 4 年的病、健株根区土的 SAAP

值表明, 根部土壤放线菌拮抗潜势与植株健康生长有关, 健株根部放线菌拮抗潜势大于病株是连作田块健株健康生长的重要原因之一。但在连作 2 年的田块, 马铃薯根区、根外土壤中对 4 株靶标菌呈强、中拮抗强度的放线菌拮抗潜势均呈相反趋势, 反映出拮抗潜势与植株抗病性关系的复杂性, 即土壤放线菌拮抗潜势也不是决定植株发病与否的唯一因素, 在连作时间较短的田块, 影响植株健康生长的主要因素不是 SAAP。

表 3 马铃薯健与病株根区、根外土壤拮抗放线菌的拮抗潜势

Table 3 Soil actinomycetes antagonistic potentiality (SAAP) in rhizosphere soil of healthy or diseased plants in potato fields

土壤样品 Soil sample	植株/连作年限 Plant /continuous cropping time	拮抗强度 Intensity of Antimicrobial actions					
		强 Strong		中 Middle		弱 Weak	
		A_n	SAAP (%)	A_n	SAAP (%)	A_n	SAAP (%)
根区土	健株/2 年 HP/2 year	2	11.8	9	20.5	6	60.0
RS	病株/2 年 DP/2 year	13	76.5	12	27.3	0	0
根外土	健株/2 年 HP/2 year	0	0	9	20.5	2	20.0
ORS	病株/2 年 DP/2 year	2	11.8	14	31.8	2	20.0
	总和 Total	17	100.0	44	100.0	10	100.0
根区土	健株/4 年 HP/4 year	4	26.7	9	26.5	1	3.9
RS	病株/4 年 DP/4 year	2	13.3	5	14.7	11	42.3
根外土	健株/4 年 HP/4 year	8	53.3	13	38.2	3	11.5
ORS	病株/4 年 DP/4 year	1	6.7	7	20.6	11	42.3
	总和 Total	15	100.0	34	100.0	26	100.0

A_n : 某株拮抗性放线菌能够拮抗靶标菌的株次; SAAP: 土壤放线菌拮抗潜势; HP: 健株; DP: 病株; RS: 根区土; ORS: 根外土。

A_n : strain number of one antagonistic actinomycetes antagonized test pathogenic fungi; SAAP: soil actinomycetes antagonistic potentiality; HP: health plant; DP: disease plant; RS: rhizosphere soil; ORS: out-rhizosphere soil.

2.4 马铃薯健、病株根区土壤优势放线菌

优势放线菌指土壤中数量较多的放线菌。即在用稀释平皿涂抹法分离放线菌时, 皿内数量较多的菌株。本试验共分离到 2 株优势放线菌 G70 和 G170。通过 16S rRNA 序列分析并构建系统发育进化树(图 1)可知, 放线菌 G70 与菌株 *Streptomyces rubiginosus* 和菌株 *Streptomyces gancidicus* 的相似度分别为 98.71%和 99.23%, 故将 G70 鉴定为灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*); 放线菌 G170 与菌株 *Streptomyces galilaeus* 的相似度为 99.01%, 故将 G170 定为加利利链霉菌(*S. galilaeus*)。

从表 4 可知, 在连作 4 年的马铃薯根区土壤中, 灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)在病株根区的数量较健株减少 59.5%, 差异达极显著水平($P < 0.01$); 在连作 2 年的根外土中, 该菌的数量也表现出相同趋势, 病株较健株减少 69.2% ($P < 0.05$)。病、健株的比较结果表明, 灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)可能具有拮抗马铃薯土传病害病原菌的能力, 其数量增多有利于提

高植株抗病性; 连作田块马铃薯能保持健康生长与植株根区土壤中该菌数量较多有关。表 5 结果支持了该推论。

但也有例外, 在连作 2 年的田块, 病株根区土壤的灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)的数量多于健株, 但其差异未达到显著水平。且由于在连作 2 年健株和病株根区土壤中, 该菌的数量很少, 仅分别是连作 4 年田块的 1/18.7 和 1/3.8, 故该菌对病原真菌的抗性有限, 对植株的健康生长贡献很小, 即在连作 2 年的田块, 保持植株健康生长的主要因素是该菌以外的其他原因。

由表 4 还可以看出, 连作 2 年和 4 年土壤中, 灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)与加利利链霉菌(*S. galilaeus*)的数量不同。在连作 4 年的田块中, 灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)的数量远高于连作 2 年的田块。其在连作 4 年健株和病株根区土壤中的数量分别是 2 年的 18.7 倍和 3.8 倍, 连作 4 年健株和病株根外土壤中的数量分别是 2 年的 3.0 倍和 8.3 倍, 即

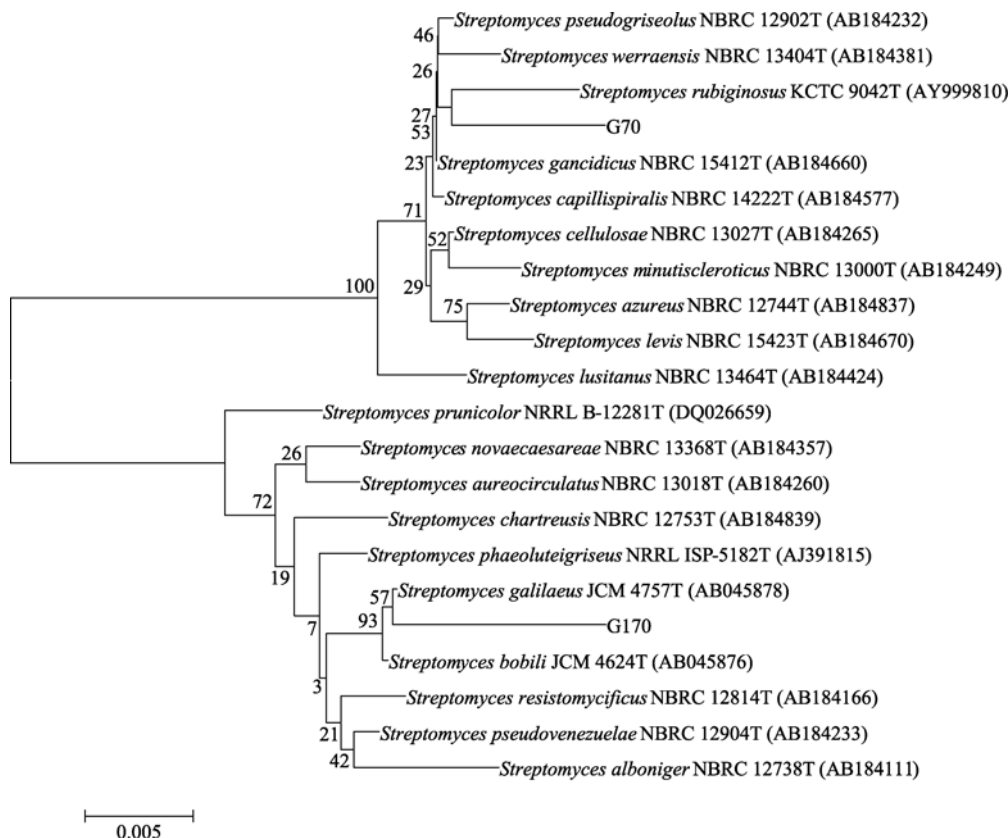


图 1 优势放线菌 G70 和 G170 的系统发育进化树
 Fig. 1 Phylogenetic tree of dominant actinomycetes strains G70 and G170

表 4 供试土壤优势放线菌数量及比例
 Table 4 Quantity and proportion of dominant actinomycetes in different soil samples

土壤样品 Soil sample	植株/连作年限 Plant/continuous cropping time	灭癌素链霉菌 <i>S. gancidicus</i>		加利利链霉菌 <i>S. galilaeus</i>		灭癌素链霉菌与加利利链霉菌数量之比 Quantity ratio between <i>S. gancidicus</i> and <i>S. galilaeus</i>
		数量 Quantity (10^5 CFU g^{-1})	比例 Percentage (%)	数量 Quantity (10^5 CFU g^{-1})	比例 Percentage (%)	
根区土 RS	健康/2 年 HP/2 year	0.3 ± 0.3	1.9	1.3 ± 0.6	8.8	0.2
	病株/2 年 DP/2 year	0.6 ± 0.2	3.4	2.9 ± 0.4	16.4	0.2
	ΔD (%)	125.0	—	131.6*	—	—
根外土 ORS	健康/2 年 HP/2 year	0.9 ± 0.1	4.2	0.7 ± 0.6	3.2	1.3
	病株/2 年 DP/2 year	0.3 ± 0.3	2.0	1.7 ± 0.1	12.7	0.2
	ΔD (%)	-69.2*	—	150.0*	—	—
根区土 RS	健康/4 年 HP/4 year	5.6 ± 0.2	11.3	0.9 ± 0.3	1.8	6.4
	病株/4 年 DP/4 year	2.3 ± 0.8	8.6	0.6 ± 0.2	2.3	3.8
	ΔD (%)	-59.5**	—	-30.8	—	—
根外土 ORS	健康/4 年 HP/4 year	2.7 ± 2.0	11.3	0.5 ± 0.3	2.2	5.2
	病株/4 年 DP/4 year	2.5 ± 0.9	8.9	0.7 ± 0.6	2.4	3.7
	ΔD (%)	-9.8	—	25.0	—	—

表中数据为平均值 ± 标准差; *和**分别指在根区土壤或根外土壤中病株与健康株各测值间差异达 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。ΔD: 病株较健康株增长率; HP: 健康株; DP: 病株; RS: 根区土; ORS: 根外土。

The data in the table are described as mean ± SD; * and ** represent the differences in values between healthy and diseased plants are $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. ΔD: increasing rate of diseased plant compared with healthy plant; HP: health plant; DP: disease plant; RS: rhizosphere soil; ORS: out-rhizosphere soil.

连作促进了灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)的数量增加。相反,加利利链霉菌(*S. galilaeus*)在连作 2 年田块中的数量均高于连作 4 年的田块,其中连作 2 年健株和病株根区土壤的数量分别是 4 年的 1.4 倍和 4.8 倍;连作 2 年健株和病株根外土壤的数量分别是 4 年的 1.4 倍和 2.4 倍,即连作会导致加利利链霉菌(*S. galilaeus*)数量减少。此外,在连作 2 年的田块,病株根区和根外土中加利利链霉菌(*S. galilaeus*)的数量较健株分别增加 131.6%和 150.0%,差异均达显著水平($P < 0.05$),表明加利利链霉菌(*S. galilaeus*)可能为有害放线菌,其数量增多会导致马铃薯植株发病。

由表 4 还可以看出,在连作 4 年的田块,健、病株根区土中灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)与加利利链霉菌的数量之比分别为 6.4/1、3.8/1,根外土为 5.2/1、

3.7/1,均呈相同趋势。在连作 2 年根区土中,健株、病株灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)与加利利链霉菌数量之比相同,而根外土壤则与连作 4 年的田块呈相同趋势。由此可见,健株土壤中灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)数量多于病株与植株保持健康有关,表 5 结果支持了该推论。

从表 5 可以看出,优势放线菌灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)无菌发酵滤液培养 40 h 对引起马铃薯土传病害的立枯丝核菌(*R. solani*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)、硫色镰刀菌(*F. sulphureum*)和大丽轮枝菌(*V. dahliae*) 4 株病原真菌均有抑制作用,抑菌率分别为 24.9%、26.9%、9.3%和 28.6%。灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)的琼脂块对上述 4 株马铃薯病原真菌亦均有抑菌效果,抑菌圈直径分别为 9.8、7.7、7.8 和 7.3 mm,其中对立枯丝核菌的抑菌效果最好(图 2)。

表 5 灭癌素链霉菌琼脂块及发酵液滤对 4 株马铃薯病原真菌抑菌效果
Table 5 Inhibition effect of agar block and culture filtrate of *S. gancidicus* to four potato pathogenic fungi

抑菌效果指标 Indicators of inhibition effect	病原真菌 Pathogenic fungi			
	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	硫色镰刀菌 <i>Fusarium sulphureum</i>	大丽轮枝菌 <i>Verticillium dahliae</i>
拮抗圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)	9.8/+++	7.7/++	7.8/+	7.3/++
抑菌率 Inhibition rate (%)	24.9±3.9	26.9±3.1	9.3±2.0	28.6±7.1

表中+++、++和+分别表示拮抗圈完全透明、比较透明和稍透明。

+++、++ and + represent high transparency, semi transparency and slight transparency of inhibition zone, respectively.

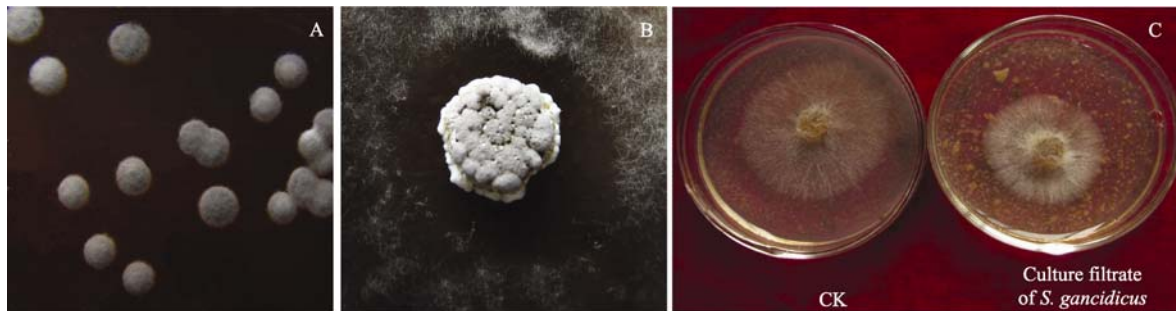


图 2 灭癌素链霉菌菌落形态及其琼脂块和发酵滤液对立枯丝核菌抑菌效果

Fig. 2 Colony characteristic of *S. gancidicus* and Inhibition effect of its agar block and culture filtrate to *R. solani*

A: 灭癌素链霉菌菌落形态; B~C: 分别为灭癌素链霉菌琼脂块、发酵滤液对马铃薯立枯丝核菌抑菌作用。

A: colony characteristic of *S. gancidicus*; B~C: inhibition effect of *S. gancidicus*'s agar block and culture filtrate to *R. solani*, respectively.

3 讨论

关于马铃薯不同连作年限耕层土壤养分之间的差异已有报道^[14-15]。甘肃定西地区的测定结果表明,随着连作年限增加,耕层土壤速效钾含量降低^[14]。但目前尚无不同连作年限马铃薯病、健株根区土壤速效养分差异研究。

本研究表明,在连作 4 年的田块,病株根区土壤中速效 P、K 含量均低于健株,这与段春梅等^[5]对温室连作黄瓜健、病株土壤速效 P、K 的研究结果一致;在连作 2 年和 4 年田块中,铵态氮在健株根区土中含量均低于病株。由此推知,速效 P、K 含量较高有利于提高马铃薯植株的抗病性,而速效氮过多可能会降低作物抗病性。即马铃薯健株根区土壤中速

效 P、K 含量高及速效氮含量低的养分组合可能是连作田块维持部分马铃薯健康生长的原因之一。

放线菌是抗生素的主要产生菌, 土壤中放线菌的生长繁殖对调整土壤微生物生态平衡起着至关重要的作用^[16]。本研究表明, 在连作 4 年的田块, 根区土中放线菌总数、链霉菌数量均呈健株高于病株的趋势, 即健株根区土壤中放线菌数量较高可能是植株在连作土壤中仍能健康生长的原因之一。

在不同土壤中, 不仅拮抗性放线菌的数量、种类不同, 且每株拮抗放线菌的抗菌谱也不同, 即能拮抗的病原菌的数量与种类不同。土壤放线菌拮抗潜势(SAAP)是反映拮抗菌数量与抗菌谱的综合指标, 可定量评价不同土壤中拮抗性放线菌的蕴藏潜力^[11]。SAAP 值愈大, 表示土壤中拮抗放线菌资源愈丰富。根区土壤中对供试病原真菌拮抗放线菌的拮抗潜势愈大, 表明该土壤对土传马铃薯真菌病害的抗病性愈强。本研究结果表明, 在连作 4 年的田块, 马铃薯健株根区、根外土壤中呈强及中等强度的拮抗放线菌的拮抗潜势均大于病株; 同时, 健株根区土壤中优势拮抗放线菌灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)的数量也大于病株; 该菌对 4 株马铃薯土传病害病原真菌均有较强的拮抗性, 使得健株抵御土传真菌病害的能力高于病株。拮抗潜势大及优势放线菌对 4 株病原真菌均具有较强抗性可能是保持连作田块中仍有大量马铃薯健康生长的另一重要原因。

本研究分离到的另 1 株优势放线菌为加利利链霉菌(*S. galilaeus*), 其在连作 2 年病株根区土壤中的数量为健株的 2.2 倍。已有研究表明, 该菌为马铃薯疮痂病致病菌^[17]。本研究表明, 连作促进了有益菌灭癌素链霉菌(*S. gancidicus*)的数量增加, 同时会导致有害菌马铃薯疮痂病菌加利利链霉菌(*S. galilaeus*)数量减少。但这一初步结果尚待后续研究证实。

从以上马铃薯病、健株根区土壤放线菌数量、放线菌拮抗潜势及 2 种优势放线菌的比较分析可知, 当植株根部土壤中有益放线菌数量较多、土壤中放线菌的拮抗潜势较大及有益放线菌成为数量较多的优势菌时, 能够提高植株抵御土传真菌病害的能力, 保持植株健康生长; 否则, 植株发病。这就是在同一连作田块中, 在土壤类型、施肥管理及种植品种等相同的条件下, 健康植株与发病植株同时存在的原因。

由本研究得到的重要启示是, 在马铃薯的连作种植中, 可以通过增加磷、钾肥的施用量及同时适

当减少氮肥用量来提高马铃薯植株的抗病性, 减少土传病害的发生; 同时, 通过促进土壤中有益放线菌生长繁殖提高土壤抗病性; 也可以通过接种对马铃薯等作物常见土传真菌病害有专性拮抗放线菌剂来增加土壤中有益放线菌的数量, 提高植株抵御土传病害的能力, 减轻连作土传病害的发生。施用有机肥能减轻土传病害已在生产实践中得到证明, 有机肥对土传病害的减轻机制可能与土壤微生物区系改变有关, 其中包括拮抗放线菌的数量与种类变化, 但更确切的证据需要进一步研究, 即追踪施用有机肥后, 伴随连作障碍减轻时植株根区土壤中放线菌数量与种类的对应变化, 以验证上述推论的正确性。

连作障碍的发生与土壤中养分变化及微生物区系的异常之间虽然有密切关系, 但两者并非维持植株健康生长的全部原因。连作障碍的发生还受许多田间其他因素的影响。本研究在连作 2 年田块中所得结果仍有一些不符合上述趋势的现象, 这可能与连作时间较短, 土壤微生物区系随连作年限加长引起的演替处于不同阶段有关, 由此导致其中某些数据的变化趋势不同于连作 4 年的田块。在连作 4 年的田块中, 连作年限较长, 其数据更能反映作物连作引起土壤微生物变化的趋势, 揭示连作土壤中植株健康生长的微生态机制。

本研究对根区土壤养分及拮抗放线菌与马铃薯健康生长关系的探讨, 能从新角度获得一些新信息, 进而为揭示马铃薯连作障碍的发生机制及预防修复提出新思路。

4 结论

连作马铃薯田块中保持植株健康生长的原因很多, 其部分微生态机制包括根区土壤中高含量速效磷钾及低含量速效氮的养分组合及较多放线菌, 其中的优势放线菌是对马铃薯几种主要土传病害病原真菌有较强拮抗性的有益菌; 土壤中拮抗性放线菌的拮抗潜势较大。

References

- [1] Zhang J-D(张久东), Bao X-G(包兴国), Yang W-Y(杨文玉), Hu Z-Q(胡志桥), Wang T(王婷), Li Q-F(李全福). High-efficiency cultivation technique of potato by intercropping green manure plants. *Gansu Agric Sci Technol* (甘肃农业科技), 2011, (12): 52-53 (in Chinese)
- [2] Yu B(余斌), Shen B-Y(沈宝云), Wang W(王文), Qiu H-Z(邱慧珍), Liu X(刘鑫), Li C-Z(李朝周), Zhang J-L(张俊莲), Wang D(王蒂). Effects of different potato varieties on preventing con-

- tinuous cropping obstacle in the arid regions. *J Gansu Agric Univ* (甘肃农业大学学报), 2012, 47(4): 49–53 (in Chinese with English abstract)
- [3] Robert P L, Timothy S G. Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Protect*, 2007, 26: 1067–1077
- [4] Bai S(白霜), Xue Q-H(薛泉宏), Zhao Y-C(赵邑尘), Cao S-M(曹书苗), Tong Y-A(同延安), Wang X-H(王晓辉), Xu W-L(徐万里). Study on actinomycetic ecology between healthy and diseased plants & rhizosphere with different salt contents in Xinjiang. *J Northwest A&F Univ* (Nat Sci Edn)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2009, 37(7): 183–190 (in Chinese with English abstract)
- [5] Duan C-M(段春梅), Xue Q-H(薛泉宏), Hu S-B(呼世斌), Zhao J(赵娟), Wei Y(魏祥), Wang L-N(王玲娜), Shen G-H(申光辉), Chen Q(陈秦). Microbial ecology of fusarium wilt infected and healthy cucumber plant in root zone of continuous cropping soil. *J Northwest A&F Univ* (Nat Sci Edn)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2010, 38(4): 143–150 (in Chinese with English abstract)
- [6] Shen G-H(申光辉), Xue Q-H(薛泉宏), Zhang J(张晶), Duan J-L(段佳丽), Wang D-S(王东胜), Yang X-H(杨兴华). Screening, identification and biocontrol potential of antagonistic fungi against strawberry root rot and plant growth promotion. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2012, 45(22): 4612–4626 (in Chinese with English abstract)
- [7] Cheng L-J(程丽娟), Xue Q-H(薛泉宏). *Experimental Techniques of Microbiology* (微生物实验技术). Xi'an: World Publishing Corporation, 2000. pp 80–84, 383–384 (in Chinese)
- [8] Xu L-H(徐丽华), Jiang C-L(姜成林). *Studies of Microbial Resources* (微生物资源学). Beijing: Science Press, 1997 (in Chinese)
- [9] Sun J-Z(孙敬祖), Xue Q-H(薛泉宏), Tang M(唐明), Cao S-M(曹书苗), Xing S-L(邢胜利). Study on the effect of actinomycetes on microflora of replanted strawberry's root domain and the bio-control effectiveness. *J Northwest A&F Univ* (Nat Sci Edn)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2009, 37(12): 153–158 (in Chinese with English abstract)
- [10] Bao S-D(鲍士旦). *Soil and Agricultural Chemistry Analysis* (土壤农化分析). Beijing: China Agriculture Press, 2000. pp 30–34, 53–56, 81–83, 106–108, 165 (in Chinese)
- [11] Zhu W-J(朱文杰), Xue Q-H(薛泉宏), Cao Y-R(曹艳茹), Xue L(薛磊), Shen G-H(申光辉), Lai H-X(来航线). Distribution and characteristics of soil antagonistic actinomycetes on northern slope of Taibai Mountain, Qinling. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2011, 22(11): 3003–3010 (in Chinese with English abstract)
- [12] Xu L-H(徐丽华), Li W-J(李文均), Liu Z-H(刘志恒). *Actinomycetes Systematics: Principle, Method and Practice* (放线菌系统学:原理方法及实践). Beijing: Science Press, 2007. pp 40–45 (in Chinese)
- [13] Zhao J(赵娟), Xue Q-H(薛泉宏), Wang L-N(王玲娜), Duan C-M(段春梅), Xue L(薛磊), Mao N(毛宁). Antagonistic effect of multifunctional actinomycete strain Act12 on soil-borne pathogenic fungi and its identification. *Chin J Eco-Agric* (中国生态农业学报), 2011, 19(2): 394–398 (in Chinese with English abstract)
- [14] Hu Y(胡宇), Guo T-W(郭天文), Zhang X-C(张绪成). Effect of potato continuous cropping on soil nutrients in dry land. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2009, 37(12): 5436–5439, 5610 (in Chinese with English abstract)
- [15] Sun Q(孙权), Chen R(陈茹), Song N-P(宋乃平), Wang Q-F(王青凤), Wang R(王锐). Change trends of soil nutrients, enzyme activities, and microbial composition in continuous potato cropping system in semi-arid and cool hilly area of Ningxia. *J Soil Water Conserv* (水土保持学报), 2010, 24(6): 208–212 (in Chinese with English abstract)
- [16] Zhang H-Y(张鸿雁), Xue Q-H(薛泉宏), Tang M(唐明), Wang L-N(王玲娜), Duan C-M(段春梅). Study on actinomycetic ecology in soil with the different cultivating years of ginseng. *J Northwest A&F Univ* (Nat Sci Edn)(西北农林科技大学学报·自然科学版), 2010, 38(8): 151–159 (in Chinese with English abstract)
- [17] Zhang M(张萌), Zhao W-Q(赵伟全), Yu X-M(于秀梅), Yang W-X(杨文香), Zhang T(张汀), Liu D-Q(刘大群). Genetic diversity of potato scab pathogens in China based on 16S rDNA sequences. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2009, 42(2): 499–504 (in Chinese with English abstract)