

王秋君, 郭德杰, 马 艳. 不同养分元素对致病性尖孢镰刀菌在土壤团聚体中分布的影响[ J ]. 江苏农业学报, 2017, 33( 2 ) : 301-306.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.010

## 不同养分元素对致病性尖孢镰刀菌在土壤团聚体中分布的影响

王秋君<sup>1,2</sup>, 郭德杰<sup>1,2</sup>, 马 艳<sup>1,2</sup>

(1.江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014; 2.农业部江苏耕地保育科学观测实验站, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了解致病性尖孢镰刀菌在土壤团聚体中分布状况并从土壤养分方面弄清其分布机制, 本试验将土壤灭菌后接种致病性尖孢镰刀菌, 并分别添加不同养分元素(有机物、氮、钾、钠、钙、镁、铜、锌、铁、锰)培养 15 d 后, 通过干筛法将土壤筛分为 4 种粒径团聚体(>4.0 mm、2.1~4.0 mm、1.1~2.0 mm、≤1.0 mm), 测定土体土及团聚体中尖孢镰刀菌数量。结果表明, 添加有机物显著增加了土体土中尖孢镰刀菌数量, 而添加氮、钙、镁、铜、锌、铁、锰显著降低了土体土中尖孢镰刀菌数量。添加不同养分元素显著改变了尖孢镰刀菌在不同粒径团聚体中的分布。通过相关性分析发现, 土体土中尖孢镰刀菌数量与 1.1~4.0 mm 粒径团聚体中尖孢镰刀菌数量显著相关。据此推测, 不同养分元素主要是通过影响尖孢镰刀菌在 1.1~4.0 mm 粒径团聚体中定殖状况而最终影响土体土中尖孢镰刀菌的生长。

**关键词:** 致病性尖孢镰刀菌; 土壤团聚体; 养分元素

**中图分类号:** S152.4<sup>+</sup>81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0301-06

## Distribution of pathogenic *Fusarium oxysporum* in soil aggregates in response to nutrient elements addition

WANG Qiu-jun<sup>1,2</sup>, GUO De-jie<sup>1,2</sup>, MA Yan<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Agricultural Resources and Environments, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Scientific Observing and Experimental Station of Arable Land Conservation <Jiangsu>, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To make clear the distribution of pathogenic *Fusarium oxysporum* in soil aggregates, the sterilized soil was inoculated with pathogenic *F. oxysporum* and applied with different nutrient elements (organic matter, N, K, Na, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, and Mn). After 15-d incubation, the soil was screened into four sizes of aggregates (>4.0 mm, 2.1-4.0 mm, 1.1-2.0 mm, ≤1.0 mm) and the populations of *F. oxysporum* in bulk soil and soil aggregates were measured. The results showed that the addition of organic matter significantly increased the number of *F. oxysporum* in bulk soil which was decreased by the addition of N, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, and Mn. The distribution of *F. oxysporum* in different sizes of

aggregates was significantly changed by nutrient elements. The number of *F. oxysporum* in bulk soil was significantly correlated with that in the aggregates of 1.1-4.0 mm, indicating that nutrient elements influenced the growth of *F. oxysporum* in bulk soil by affecting its colonization in 1.1-4.0 mm aggregates.

收稿日期: 2016-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(41301268)

作者简介: 王秋君(1983-), 男, 山西运城人, 博士, 副研究员, 主要从事土壤连作障碍修复研究。(E-mail) wangqiu jun461@163.

com

通讯作者: 马 艳, (E-mail) myjaas@sina.com

**Key words:** pathogenic *Fusarium oxysporum*; soil aggregate; nutrient element

由致病性尖孢镰刀菌侵染引起的植物枯萎病是一种世界性的土传病害,可引起植物维管束萎蔫,造成植株枯死<sup>[1-3]</sup>。已经发病的土壤,如果继续种植同一种作物就会导致作物减产甚至绝产,给农民带来重大的经济损失。致病性尖孢镰刀菌寄主范围广泛,国内外已报道的土传枯萎病发生严重的作物有棉花、甜瓜、香蕉、西瓜、花生等<sup>[4-7]</sup>。

土壤团聚体是土壤结构的基本单位,也是土壤中微生物活动的主要场所,土壤物质和能量的循环转化也主要发生在土壤团聚体中<sup>[8]</sup>。土壤中不同粒径团聚体的物理结构和养分含量不同,所以土壤微生物在大小不同的团聚体中定殖能力也不相同<sup>[9-10]</sup>。有研究者发现,不同粒径土壤团聚体的形成机制不同,大团聚体是由微小团聚体经过根系分泌物或微生物代谢产物的胶结作用形成的,相比于小团聚体,大团聚体中含有更多的新鲜的有机物质<sup>[11]</sup>。此外,真菌菌丝在土壤大团聚体的形成过程中也起着重要作用,因此,大团聚体中真菌含量高于小团聚体中真菌含量<sup>[12-13]</sup>。研究表明,土壤团聚体结构对立枯丝核菌和尖孢镰刀菌等土传病原菌菌丝在土壤中的生长延伸速率和程度有很大的影响<sup>[14-15]</sup>。Otten等<sup>[14-16]</sup>研究结果表明,土壤孔隙结构对立枯丝核菌菌丝的生长及侵染作物根系有较大的影响。Toyota等<sup>[17]</sup>研究尖孢镰刀菌在4~6 mm粒径的大团聚体上的定殖能力,发现大团聚体上的微生物种类对尖孢镰刀菌的定殖能力有较大影响。Dominguez等<sup>[18]</sup>研究发现土壤团聚体稳定性与香蕉枯萎病的发生有一定的相关性,该作者认为土壤团聚体通过影响土壤中电导率和可溶性钠、铁的含量来影响尖孢镰刀菌的生长。

目前有关致病性尖孢镰刀菌在不同粒径团聚体中的分布状况及土壤团聚体对致病性尖孢镰刀菌生长影响机制的研究较少,而关于不同养分对致病性尖孢镰刀菌在团聚体中分布的影响的研究,国内尚属空白。鉴于此,本试验研究了不同养分对土壤中尖孢镰刀菌生长的影响,并从土壤团聚体方面探讨不同养分对尖孢镰刀菌生长的影响机制,从而为防控作物枯萎病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试土壤是采自江苏省淮安市西瓜大棚的耕层土,质地为砂土。土壤的有机质含量为83.2 g/kg,铵态氮含量为36.6 mg/kg,硝态氮含量为24.7 mg/kg,有效磷含量为65.9 mg/kg,有效钾含量为327.0 mg/kg,电导率为254.0  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , pH为7.9。供试病原菌为致病性尖孢镰刀菌FW0,由本实验室分离所得。

### 1.2 试验设计

试验以室内培养的方式进行。将制备好的尖孢镰刀菌孢子液喷洒加入灭菌土壤中,并拌匀,使得每1 g干土尖孢镰刀菌数量为 $10^5$ 个孢子。再将试验土壤设以下5个处理:(1)空白对照;(2)有机物:葡萄糖添加量为2%;(3)氮:添加尿素,氮添加量为0.10%;(4)钾:添加硫酸钾,钾添加量为0.10%;(5)钠:添加硫酸钠,钠添加量为0.10%;(6)钙:添加硫酸钙,钙添加量为0.10%;(7)镁:添加硫酸镁,镁添加量为0.10%;(8)铜:添加硫酸铜,铜添加量为0.01%;(9)锌:添加硫酸锌,锌添加量为0.01%;(10)铁:添加硫酸铁,铁添加量为0.01%;(11)锰:添加硫酸锰,锰添加量为0.01%。不同养分元素以水溶液形式按质量比加入土壤并拌匀。各处理土壤分装到圆口盆钵中,每盆300 g土。每个处理3盆。土壤水分含量保持一致。28  $^{\circ}\text{C}$ 培养15 d后利用干筛法将各处理土样筛分为4种粒径团聚体(>4.0 mm、2.1~4.0 mm、1.1~2.0 mm、 $\leq 1.0$  mm),对各粒径团聚体称质量后测定土体土和团聚体中尖孢镰刀菌数量。

### 1.3 测定项目与方法

土壤常规理化指标分析:土壤pH采用土水比(质量比)=1:10浸提,用pH计测定;电导率采用土水比=1:10浸提,用电导仪测定;有机质含量采用重铬酸钾氧化法测定;铵态氮含量采用氯化钾浸提-靛酚蓝比色法测定;速效钾含量采用乙酸铵浸提-火焰光度法测定;有效磷含量采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法测定;硝态氮含量采用紫外分光光度法测定。

尖孢镰刀菌数量:采用实时荧光定量PCR技术测定土壤尖孢镰刀菌数量。采用SYBR<sup>®</sup> Premix

*Ex Taq*™ (大连宝生物工程公司) 试剂盒于 ABI (Applied BIO systems) PRISM<sup>®</sup> 7500 Real-time PCR System 扩增仪上对 DNA 样品进行绝对定量 PCR 分析。Real-time PCR 扩增反应采用 96-well Fast Thermal Cycling plate, 反应体系 20.0 μl, 反应液包括 10.0 μl SYBR<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*™ (2×), 上下游引物各 0.4 μl, 0.4 μl ROX Reference Dye II (50×), 2.0 μl DNA 模板, 6.8 μl 灭菌双蒸水, 每个土壤 DNA 样品做 3 个重复。采用两步法 Real-time PCR 扩增标准程序: 预变性, 95 °C, 30 s; PCR 反应, 40 个循环, 95 °C, 5 s, 60 °C, 34 s, 得出扩增产物的 Ct 值和溶解曲线。引物序列为: AFP308R: 5'-CGAATTA-ACGCGAGTCCCAAC-3'; ITS1-F: 5'-CTTGTCATT-TAGAGGAAGTAA-3'<sup>[19]</sup>。

1.4 数据处理

测定数据经 Microsoft Excel 2010 软件整理后, 用 SPSS17.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 不同处理对土壤团聚体组成的影响

从图 1 可知, 与 CK 相比, 添加有机物对土壤团聚体组成的改变作用最大, 增加了 >4.0 mm 和 2.1~4.0 mm 团聚体相对含量, 增加幅度分别为 57.1%、34.2%, 降低了 ≤1.0 mm 团聚体相对含量, 降低幅度为 29.9%。

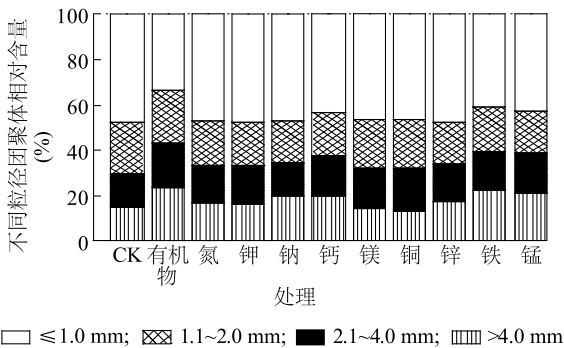
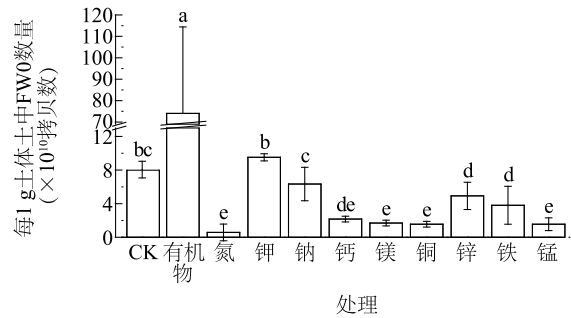


图 1 不同处理中不同粒径团聚体的相对含量  
Fig.1 The relative content of different sizes of aggregates in different treatments

2.2 不同处理对土体土中尖孢镰刀菌数量的影响

由图 2 可知, 添加不同养分对土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数量有显著的影响。与 CK 相比, 添加有机物处理显著增加了土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数

量, 而添加氮、钙、镁、铜、锌、铁、锰都显著降低了土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数量。



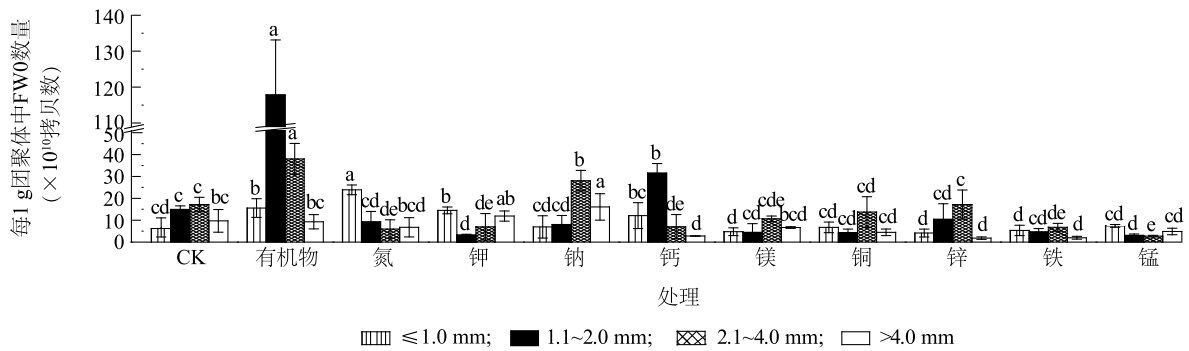
不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。  
图 2 不同处理对土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数量的影响  
Fig.2 The effect of nutrients additions on the population of FW0 in bulk soil

2.3 不同处理对土壤团聚体中尖孢镰刀菌数量的影响

由图 3 可看出, 不同粒径团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 的数量差异较大。不同处理中, 尖孢镰刀菌 FW0 在不同粒径团聚体中的分布也不同。在 ≤1.0 mm 粒径团聚体中, 与 CK 相比, 有机物、氮、钾处理显著增加了尖孢镰刀菌 FW0 数量; 在 1.1~2.0 mm 粒径团聚体中, 与 CK 相比, 有机物和钙处理显著增加了尖孢镰刀菌 FW0 数量, 而钾和锰处理显著降低了尖孢镰刀菌 FW0 数量; 在 2.1~4.0 mm 粒径团聚体中, 与 CK 相比, 有机物和钠处理显著增加了尖孢镰刀菌 FW0 数量, 而氮、钾、钙、铁、锰处理显著降低了尖孢镰刀菌 FW0 数量; 在 >4.0 mm 粒径团聚体中, 与 CK 相比, 钠处理显著增加了尖孢镰刀菌 FW0 数量, 而钙、锌、铁处理显著降低了尖孢镰刀菌 FW0 数量。

2.4 不同处理对尖孢镰刀菌在各粒径团聚体中分布的影响

由图 4 可知, 所有处理中, 不同粒径团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量占土体土中尖孢镰刀菌 FW0 总量的比例也不同。与 CK 相比, 不同处理对各粒径团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量占比的影响较大 (图 4)。在 CK 中, 2.1~4.0 mm 团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量占土体土中尖孢镰刀菌 FW0 总量比例最高 (34.7%); 在有机物和钙处理中, 1.1~2.0 mm 团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量占土体土中尖孢镰刀菌 FW0 总量比例最高 (66.5%、56.6%); 在氮、钾、铁、锰处理中, ≤1.0 mm 团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数



同一处理不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图3 不同处理对不同粒径团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量的影响

Fig.3 The effect of nutrients additions on the population of FW0 in different sizes of aggregates

量占土体土中尖孢镰刀菌 FW0 总量比例最高 (51.8%、39.7%、40.7%)；在钠、镁、铜、锌、铁处理中 2.1~4.0 mm 团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量占土体土中尖孢镰刀菌 FW0 总量比例最高 (47.2%、38.1%、46.1%、51.9%、35.9%)。

2.5 土体土中尖孢镰刀菌数量与团聚体中尖孢镰刀菌数量的相关性分析

由图 5 可看出,土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数量与不同粒径团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量的相关性不同。土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数量与 1.1~2.0 mm 团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ ), 与 2.1~4.0 mm 团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )。

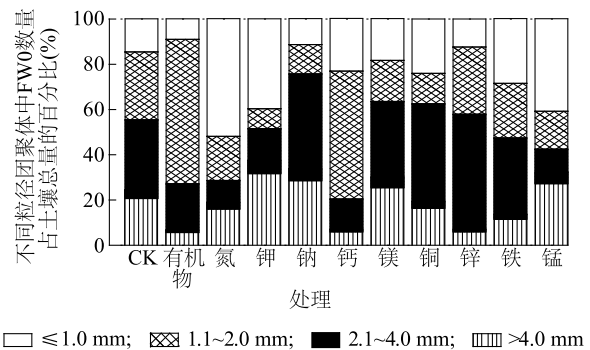


图4 不同处理对团聚体尖孢镰刀菌 FW0 数量占土体土中尖孢镰刀菌 FW0 总量比例的影响

Fig.4 The effect of nutrients additions on the proportion of FW0 population in aggregates

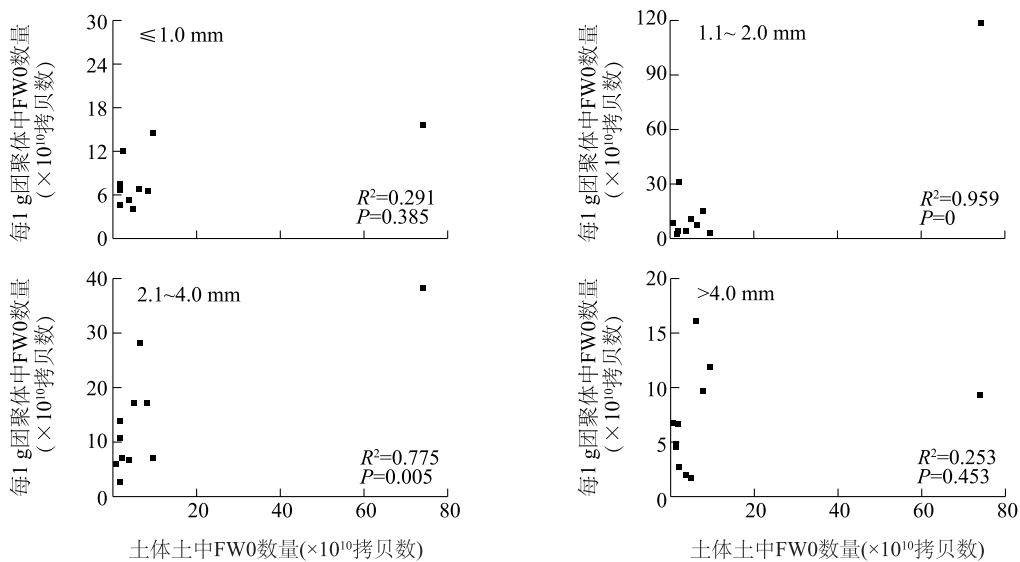


图5 不同粒径团聚体中尖孢镰刀菌 FW0 数量与土体土中尖孢镰刀菌 FW0 数量的相关性

Fig.5 The correlation between FW0 population in different sizes of aggregates and bulk soil

### 3 讨论

大量研究结果表明,土壤中有有机质对土壤团聚体的形成具有重要作用<sup>[20-21]</sup>。土壤中的微团聚体通过多糖等有机物的胶结作用形成大团聚体<sup>[11]</sup>。本研究中,在土壤中添加葡萄糖增加了土壤中 $>4.0$  mm 粒径团聚体的相对含量,降低了 $\leq 1.0$  mm 粒径团聚体的相对含量,可能是因为葡萄糖不仅通过自身的胶结作用将 $\leq 1.0$  mm 粒径团聚体形成 $>4.0$  mm 粒径团聚体,而且添加的葡萄糖可以为微生物提供能量和营养物质,促进微生物分泌出多糖类物质,进一步促进大团聚体的形成。

本研究结果表明,与添加其他养分相比,在土壤中添加葡萄糖显著增加了土壤中尖孢镰刀菌数量,这说明土壤中作为碳源的有机质对尖孢镰刀菌生长的影响作用是最大的。本研究中,在土壤中添加氮、钙、镁、铜、锌、铁和锰元素对尖孢镰刀菌生长具有显著的抑制作用,这与其他研究结果相似。张茂星等<sup>[22]</sup>通过室内平板培养试验,发现铵态氮能够抑制尖孢镰刀菌的生长,其中一部分原因是铵态氮浓度过高本身对尖孢镰刀菌的抑制作用,也可能是由于铵态氮在土壤中发生硝化作用后降低土壤中 pH 值导致的。刘付燕等<sup>[23]</sup>通过室内培养试验发现铁、锰、铜、锌在一定程度上可以抑制尖孢镰刀菌产孢。

关于致病性尖孢镰刀菌在土壤中不同粒径团聚体中的分布状况的研究,本研究在国内尚属首次。本研究结果表明,对照处理中尖孢镰刀菌在 2.1~4.0 mm 粒径的土壤团聚体中定殖能力最强,其次是 1.1~2.0 mm、 $>4.0$  mm,在 $\leq 1.0$  mm 粒径团聚体中定殖能力最弱,这可能是因为不同粒径团聚体的物理结构及养分含量不同。由于不同粒径团聚体的形成和稳定机制不同,导致不同粒径团聚体的物理结构及养分含量也不同<sup>[24]</sup>。本研究中,与对照处理相比,添加其他养分显著影响了尖孢镰刀菌在不同粒径团聚体中的分布,可能是因为各养分在不同粒径团聚体中的分布量不同引起的。不同养分在团聚体中的分布状况还需进一步研究。通过对各粒径团聚体中尖孢镰刀菌数量与土体土中尖孢镰刀菌数量进行相关性分析后,发现土体土中尖孢镰刀菌数量与 1.1~2.0 mm 和 2.1~4.0 mm 粒径团聚体中尖孢镰刀菌数量呈显著正相关,据此可以推论,添加不同养分主要是通过影响尖孢镰刀菌在 1.1~4.0 mm 粒径

团聚体中的定殖能力来影响土体土中尖孢镰刀菌的生长。

### 参考文献:

- [1] 王夏雯,余翔,乔俊卿,等. 西瓜茬后种植稻麦对土壤微生物数量和西瓜枯萎病发生的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1291-1295.
- [2] PALMERO D, RUBIO-MORAGA A, GALVEZ-PAT N L, et al. Pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from corms of *Crocus sativus* [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 61: 186-192.
- [3] 韦绍龙,黄素梅,韦莉萍,等. 香蕉抗(耐)枯萎病新品种桂蕉 9 号的选育及其高产栽培技术[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 530-536.
- [4] LING N, HUANG Q, GUO S, et al. *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 systemically affects root exudates of watermelon to decrease the conidial germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. *Plant and Soil*, 2011, 341(1/2): 485-493.
- [5] 周开胜. 厌氧还原土壤灭菌法抑制西瓜专化型尖孢镰刀菌[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1006-1011.
- [6] NEL B, STEINBERG C, LABUSCHAGNE N, et al. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants [J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(2): 207-216.
- [7] 刘贵友,邹瑶,顾杨霞,等. 内生真菌对连作花生土壤尖孢镰刀菌的拮抗作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12): 170-174.
- [8] VOGEL C, BABIN D, PRONK G J, et al. Establishment of macro-aggregates and organic matter turnover by microbial communities in long-term incubated artificial soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 79: 57-67.
- [9] KRAVCHENKO A, CHUN HC, MAZER M, et al. Relationships between intra-aggregate pore structures and distributions of *Escherichia coli* within soil macro-aggregates [J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 63: 134-142.
- [10] JIANG Y, SUN B, JIN C, et al. Soil aggregate stratification of nematodes and microbial communities affects the metabolic quotient in an acid soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 60(60): 1-9.
- [11] SIX J, BOSSUYT H, DEGRYZE S, et al. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics [J]. *Soil & Tillage Research*, 2004, 79: 7-31.
- [12] TISDALL J. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils [J]. *Plant and Soil*, 1994, 159(1): 115-121.
- [13] SIX J, ELLIOTT E T, PAUSTIAN K. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(14): 2099-2103.
- [14] OTTEN W, HARRIS K, YOUNG I M, et al. Preferential spread of the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* through structured soil

- [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(2): 203-210.
- [15] TOYOTA K, YOUNG I M, RITZ K. Effects of soil matric potential and bulk density on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(9): 1139-1145.
- [16] OTTEN W, GILLIGAN C A, WATTS C, et al. Continuity of air-filled pores and invasion thresholds for a soil-borne fungal plant pathogen, *Rhizoctonia solani* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(13): 1803-1810.
- [17] TOYOTA K, RITZ K, YOUNG I M. Microbiological factors affecting the colonisation of soil aggregates by *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(10): 1513-1521.
- [18] DOMINGUEZ J, NEGRŽN M, RODRIGUEZ C. Aggregate water-stability, particle-size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to *Fusarium* wilt of banana from Canary Islands (Spain) [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(4): 449-455.
- [19] LIEVENS B, CLAES L, VANACHTER A C, et al. Detecting single nucleotide polymorphisms using DNA arrays for plant pathogen diagnosis [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 255(1): 129-139.
- [20] CHIVENG P, VANLAUWE B, GENTILE R, et al. Organic resource quality influences short-term aggregate dynamics and soil organic carbon and nitrogen accumulation [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43(3): 657-666.
- [21] SODHI G P S, BERI V, BENBI D K. Soil aggregation and distribution of carbon and nitrogen in different fractions under long-term application of compost in rice/wheat system [J]. *Soil & Tillage Research*, 2009, 103: 412-418.
- [22] 张茂星, 陈鹏, 张明超, 等. 硝/铵营养对香蕉枯萎病尖孢镰刀菌生长的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(1): 232-238.
- [23] 刘付燕, 王兴祥, 李蕾, 等. 矿质元素对西瓜枯萎病病原菌尖孢镰刀菌产孢的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(10): 97-100.
- [24] REGELINK I C, STOOF C R, ROUSSEVA S, et al. Linkages between aggregate formation, porosity and soil chemical properties [J]. *Geoderma*, 2015(247/248): 24-37.

(责任编辑:陈海霞)