

棘孢木霉菌肥对黄瓜枯萎病的防治效果 及对连作黄瓜根际土壤微生物种群的影响

贺字典¹ 武春成¹ 沈江洁¹ 高玉峰¹ 常连生¹ 高增贵^{2*}

(1. 河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066004; 2. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161)

摘要: 为明确棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 菌肥在防治黄瓜枯萎病的同时对连作黄瓜根际土壤微生物种群的影响, 采用实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 和磷脂脂肪酸 (phospholipid fatty acid, PLFA) 分析方法分别测定了棘孢木霉菌肥对连作4年的黄瓜根际棘孢木霉菌和尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* DNA 拷贝数变化和黄瓜根际微生物种群的影响。结果表明: 棘孢木霉菌肥对黄瓜幼苗期和速长期黄瓜枯萎病的防治效果分别为70.24%和76.81%, 均与药剂对照的防效差异不显著。棘孢木霉菌的DNA拷贝数出现2个高峰期, 即黄瓜苗期和盛果期, 其DNA拷贝数分别为235 000.00 ng/μL和80 500.00 ng/μL。黄瓜速长期、盛果期、生长末期的尖孢镰孢菌DNA拷贝数分别为15.41、54.87和18.36 ng/μL, 且显著低于同一时期药剂对照和清水对照。黄瓜幼苗期、速长期、开花期和盛果期根际土壤微生物丰度分别为2.24、1.98、2.52和2.12, 均高于药剂对照。由此可见, 棘孢木霉菌肥在防治黄瓜枯萎病的同时, 还可以改善黄瓜连作土壤微生物种群结构。

关键词: 木霉菌肥; 根际土壤微生物; 磷脂脂肪酸分析; 种群动态变化

Effects of *Trichoderma asperellum* bio-fertilizer on cucumber *Fusarium* wilt and microbial population in continuous cucumber cropping rhizosphere soil

He Zidian¹ Wu Chuncheng¹ Shen Jiangjie¹ Gao Yufeng¹ Chang Liansheng¹ Gao Zenggui^{2*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066004, Hebei Province, China; 2. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning Province, China)

Abstract: DNA copies of *Trichoderma asperellum* and *Fusarium oxysporum* and microbial populations in continuous cucumber cropping rhizosphere soils for four years were detected by using real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and phospholipid fatty acid (PLFA), respectively, to explore the effects of *T. asperellum* bio-fertilizer on their control efficiency against cucumber wilt and calculate microbial dynamic variation. The results showed that the biocontrol effect of *T. asperellum* bio-fertilizer on cucumber wilt was 70.24% and 76.81% during the seedling period and rapid growth period, which was not significantly different from those of the fungicide control. The DNA copies of *T. asperellum* arrived at 235 000.00 ng/μL and 80 500.00 ng/μL, respectively, which reached the highest during seedling period and reached the second peak in full bearing period. Compared to the water control and fungicide control, the DNA copies of *F. oxysporum* decreased by 15.41, 54.87 and 18.36 ng/μL in rapid growth period, fruiting stage and late growth period of cucumber, respectively, when the *T. asperellum* bio-fer-

基金项目: 河北省重点研发农业关键共性技术攻关专项(17226914D), 河北省自然科学基金(C2016407101), 秦皇岛市科技支撑计划项目(201402B028)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zengguigao@sina.com

收稿日期: 2016-10-31

tilizer was applied. The microbial abundances in cucumber rhizosphere were 2.24, 1.98, 2.52 and 2.12 in four growth periods, from seedling to full bearing stages, respectively, higher than that of the fungicide control in the same period when *T. asperellum* bio-fertilizer was applied. Therefore, *T. asperellum* fertilizer could control cucumber *Fusarium* wilt and improve the soil microbial population in continuous cropping field.

Key words: *Trichoderma* bio-fertilizer; rhizosphere soil microorganism; phospholipid fatty acid (PLFA); microbial population dynamic variation

设施栽培中黄瓜连作非常普遍,段春梅等(2010)报道在黄瓜健株根区聚集着大量的荧光假单孢菌 *Pseudomonas fluorescens* 和加德那链霉菌 *Streptomyces gardneri*,而在病株根际聚集着较多的绿针假单孢菌 *P. chloeaephitis*、绿色产色链霉菌 *S. viridochromogene*、多产色链霉菌 *S. polychromogene* 及高加索山链霉菌 *S. ciscaucasicus*。黄瓜连作致使根际土壤中尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 等病原菌大量积累,进而引起黄瓜枯萎病等土传病害发生,致使健康植株与病株根际细菌、放线菌及其它真菌等微生物的种群结构发生变化。

黄瓜连作使健康黄瓜根系微生物群落逐渐转化为优势病原菌,优势病原菌的菌落数占总菌落数的88%以上,打破了土壤中微生物种群结构的平衡关系,引起黄瓜枯萎病发生并导致连作障碍日益严重(Urashima et al., 2012)。在明确了黄瓜枯萎病日益严重的主要原因后,学者们开始研究如何防治黄瓜枯萎病。哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum*、棘孢木霉菌 *T. asperellum*、荧光假单胞菌、非致病性尖孢镰孢菌、丛枝菌根菌 *Arbuscular mycorrhizas* 等生防菌对黄瓜枯萎病都有较好的防治效果(Alabouvette et al., 2009; Ferre & Santamarina, 2010; 贺字典等, 2011)。微生物菌肥是利用优质有机肥或营养基质作载体,将一种或几种生防菌发酵后生产的微生物制品,具有增加土壤肥力,增强作物抗病能力,改善连作土壤理化性状,优化连作土壤微生物菌群的作用。López-Mondéjar et al. (2010)、Sant et al. (2010)和贺字典等(2016a)将生防菌哈茨木霉菌、棘孢木霉菌发酵制成菌肥用于土传病害防治。de Caire et al. (2000)研究表明,生物菌肥在防治黄瓜枯萎病的同时还能改善土壤微生物区系。曹云(2011)研究表明,施用SQR9生物肥可使黄瓜枯萎病的病情指数降低15%~25%,并提高连作黄瓜根际土壤微生物数量。朱伟杰等(2010)研究表明,生防菌Th2和T4对甜瓜根际土壤细菌有明显的促生作用,对真菌和放线菌有明显的抑制作用。章初龙和徐同(2005)首次

在西藏自治区土壤中发现并鉴定出棘孢木霉菌;贺字典等(2010)和Sant et al. (2010)利用棘孢木霉菌防治黄瓜枯萎病、番茄枯萎病和水稻恶苗病等土传病害;Qi & Zhao(2013)研究表明,棘孢木霉菌还能提高植物的抗逆能力,而棘孢木霉菌肥施用后对连作黄瓜根际微生物种群的影响未见报道。

本研究将棘孢木霉菌研制成生物菌肥,并将其作为基肥施用到连作4年黄瓜土壤中。在测定棘孢木霉菌肥在黄瓜不同生育期对黄瓜枯萎病防效的同时,一方面采用实时荧光定量PCR技术测定黄瓜根际棘孢木霉菌和尖孢镰孢菌DNA拷贝数的变化,另一方面采用磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)分析方法研究黄瓜根际微生物种群变化,以期确定棘孢木霉菌肥在黄瓜连作生产上施用时期和施用次数等施用技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及菌株:黄瓜品种为中农6号,中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。尖孢镰孢菌黄瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*,本实验室分离鉴定和保存。

棘孢木霉菌肥:食用菌菌糠经堆肥发酵后,添加棘孢木霉菌分生孢子 10^7 CFU/g,经过2次发酵后,制成棘孢木霉菌肥,其有机质含量为487.39 g/kg,全氮、全磷和全钾含量分别为14.76%、3.14%和5.16%。采用稀释分离法测定菌肥中棘孢木霉菌分生孢子数量为 10^9 CFU/g。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g、蒸馏水1 000 mL;马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基:PDA培养基中不添加琼脂粉。

试剂及仪器:正己烷色谱纯、37种脂肪酸甲酯混标、26种细菌酸甲酯混标,美国Supelco公司;DNA产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公

司;感受态细胞、SYBRPremix ExTaq™、Premix(包含 Buffer、dNTP、Taq DNA 聚合酶)、DNA Ladder Marker, 宝生物工程(大连)有限公司;0% 甲基硫菌灵(thiophanate-methyl)可湿性粉剂,四川国光农化股份有限公司;其它试剂均为国产分析纯。Polaris Q Ion-Trap 气质联用仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SPE 硅胶柱、HP-5 MS 色谱柱,天津博纳艾杰尔科技有限公司;氮气吹干仪,美国 Organomation 公司;3K15 型高速离心机,德国 Sigma 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂;真空冷冻干燥机,美国 ThermoSavant 公司;ND-2000C 分光光度计,美国 NanoDrop 公司;iCycleriQ5 型荧光定量 PCR 仪、PTC-200 型 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 尖孢镰孢菌孢子悬浮液的制备

在 PDA 平板上将保存的尖孢镰孢菌黄瓜专化型菌种活化 3 d,用直径 5 mm 无菌打孔器打取菌饼,每 250 mL 三角瓶中装入 120 mL PD 液体培养基,每瓶接种 3 片尖孢镰孢菌黄瓜专化型菌片,120 r/min 振荡培养 7 d,用双层纱布过滤菌丝,以 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,取沉淀物加入适量无菌水,用血球计数板将其调至孢子浓度为 1×10^8 个/mL 的菌悬液,备用。

1.2.2 温室接种试验及试验处理

在河北科技师范学院实验站 45 m×9 m(长×宽)温室内进行接种试验,温室连续 4 年种植黄瓜。2014 年 4 月 30 日用 50℃ 温水将黄瓜种子浸泡 2 h,取出后置于铺有纱布的保温盒内 25℃ 过夜,催芽后播种于 50 穴育苗盘中,每穴 1 粒种子;6 月 8 日当黄瓜苗第 1 片真叶长成时移栽,共设 4 个处理:棘孢木霉菌肥,棘孢木霉菌肥按 750 g/m² 于黄瓜移栽时穴施;以 70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂 500 倍液灌根为药剂对照;清水对照;空白对照:田间土,不接菌。每个处理重复 3 次,共 12 个小区,小区随机分布,小区长 8 m、宽 1 m,每个小区移栽 50 株黄瓜苗。6 月 17 日当黄瓜苗长出 2~3 片真叶时,用无菌水将尖孢镰孢菌孢子浓度调至 10^7 个/mL 后,采用伤根灌根法将菌液接种,首先用小铲子围绕幼苗铲 1 圈,将根铲断,每株灌 3 mL 尖孢镰孢菌孢子悬浮液,然后覆盖原土。按照黄瓜生长需要进行吊蔓、整枝打叉等正常田间管理。

1.2.3 黄瓜枯萎病防治效果调查

当清水对照的黄瓜植株真叶出现轻微萎蔫后,于 7 月 6 日(幼苗期,7~8 叶期)挖出清水对照的黄瓜

根系,当观察到须根变褐时开始调查各处理黄瓜枯萎病发病情况。按 Z 字型在每个小区选取 5 株黄瓜苗,每个处理共取 15 株黄瓜苗。用铲子将黄瓜苗根系挖出,调查并记录黄瓜枯萎病发病情况,计算病情指数和防治效果。黄瓜枯萎病发病情况分级标准:0 级:地上、地下部均无症状;1 级:真叶轻微萎蔫,须根 10% 以下变褐;2 级:真叶萎蔫,主根变褐或须根 10%~50% 变褐;3 级:真叶萎蔫,主根 50% 变褐;4 级:超过 50% 主根变褐、地上部萎蔫或枯死。病情指数 = $\sum(\text{各级病叶/根数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数/根数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$;防治效果 = $(\text{清水对照病情指数} - \text{药剂处理病情指数}) / \text{清水对照病情指数} \times 100\%$ 。此后于 7 月 23 日(速长期,12~13 叶期)、8 月 6 日(开花期)、8 月 21 日(盛果期)、9 月 27 日(生长末期)分 4 次调查黄瓜枯萎病发病情况,黄瓜枯萎病发病情况调查、分级标准、病情指数和防治效果计算同上。

1.2.4 黄瓜根际土壤样品的采集

调查黄瓜枯萎病病情指数的同时采集黄瓜枯萎病罹病植株的根际土壤,每个处理取 5 株黄瓜根系的土壤,重复 3 次。取根际土壤时先抖去黄瓜根系附着力小的土壤,取紧密附着于黄瓜根系的土壤作为根际土壤。按四分法混匀后装入无菌密封袋内,立即进行抽真空冷冻干燥,加入液氮研磨,用于荧光定量 PCR 和磷脂脂肪酸分析。

1.2.5 黄瓜根际土壤中 2 种菌 DNA 拷贝数的检测

采用荧光定量 PCR 技术检测黄瓜根际土壤棘孢木霉菌与尖孢镰孢菌 DNA 拷贝数。参照 Power-Soil® DNA Isolation kit 试剂盒提取土壤 DNA。棘孢木霉菌扩增特异性引物为 ITS_S(5'-CCAACTC-TTTCTGTAGTCCCC-3')和 ITS_R(5'-GCATTTC-GCTGCGTTCTT-3')(贺字典等,2016b),尖孢镰孢菌扩增特异性引物为 FOF₁(5'-ACATACCACTT-GTTGCCTCG-3')和 FOR₁(5'-CGCCAATCAATTT-GAGGAA CG-3')(Nel et al., 2006)。RT-PCR 扩增体系:2×SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL、10 μmol/L 上下游引物各 1 μL、1 μL DNA 模板,用 ddH₂O 补足至 25 μL。扩增条件:95℃ 预变性 10 s;95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s,45 个循环;55℃ 延伸 10 s。待测样本浓度(ng/μL) = $OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$;样本分子量 = 碱基数 × 324;待测样本拷贝数(ng/μL) = $\text{待测样本浓度} / \text{样本分子量} \times 6 \times 10^{14}$ (Hietala et al., 2003)。

1.2.6 黄瓜根际土壤微生物种群变化的测定

采用磷脂脂肪酸分析法检测施用棘孢木霉菌肥

后土壤微生物种群的变化。准确称取 5 g 冻干土壤放入避光的三角瓶中, 分别加入 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 4.0 mL、氯仿 5.0 mL、甲醇提取液 10.0 mL。置于振荡器上 120 r/min 振荡 2 h, 在 2 500 r/min 速度下离心 10 min, 转移上清液。再向土壤中加入相同体积的提取液, 120 r/min 振荡 1 h, 离心, 合并 2 次上清液; 充分振荡, 放气; 将氯仿层取出, 氮气吹干。过硅胶柱后, 收集磷脂部分, 氮气吹干; 进样前, 加入 C19:0 脂肪酸甲酯作为内标定容, 分离得到脂肪酸甲酯, 利用气质联用仪获取其磷脂脂肪酸谱图。升温程序: 140℃ 保留 3 min, 以 4℃/min 速率升温到 190℃, 保留 1 min, 3℃/min 速率升温到 230℃, 保留 1 min, 以 2℃/min 速率升温 250℃, 保留 1 min, 以 10℃/min 速率升温 280℃, 保留 5 min。以 MS Scan 模式全扫描, 扫描范围 50~500, 离子源 EI⁺。采用 TSBA 6.0 数据库对磷脂脂肪酸进行鉴定。

每种菌群均有独特的 PLFA 特征谱图(包括 PLFA 总量、组成), 因此磷脂脂肪酸构成的变化能够说明土壤样品中微生物群落结构的变化, 可以对微生物群落进行识别和定量描述。根据 14:0、i15:0、a15:0、15:0、16:0、i16:0、i17:0、16:1 ω 7c、cyc17:0、a17:0、18:0、cyc19:0 和 20:0 的 PLFA 总含量计算细菌总量(Kong et al., 2008); 根据 i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、a17:0 的 PLFA 总含量计算革兰氏阳性细菌的

含量(Wang et al., 2008); 根据 16:1 ω 7c、cyc17:0、cyc19:0、16:1 ω 5c、16:1 ω 7t、18:1 ω 7c 的 PLFA 总含量计算革兰氏阴性细菌的含量(Kong et al., 2008); 根据 18:1 ω 9c、18:1 ω 9t、18:2 ω 6 的 PLFA 总含量计算真菌总量(Zhang et al., 2011); 其中, c 和 t 分别表示顺势和反势双键, i 和 a 分别表示有异构和反异构甲基支链, cyc 代表环丙基, ω 代表含有双键。选择细菌总量与真菌总量比、微生物群落相对丰度(Bardgett et al., 1996)及土壤微生物压力指数(Hammesfahr et al., 2008)这 3 个指标评价棘孢木霉菌肥对黄瓜连作土壤微生物群落的改善程度。微生物群落相对丰度=革兰氏阴性细菌含量/革兰氏阳性细菌含量、土壤微生物压力指数=(cyc17:0+cyc19:0)/(16:1 ω 7c+18:1 ω 7c)。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2003 和 SAS 9.1.3 软件对数据进行统计分析, 采用单因素方差分析、最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棘孢木霉菌肥对黄瓜枯萎病的防治效果

黄瓜幼苗期、速长期及开花期, 药剂对照对黄瓜枯萎病的防治效果分别为 79.82%、76.45% 和 64.28%(表 1)。

表 1 黄瓜根际土壤棘孢木霉菌和尖孢镰孢菌 DNA 拷贝数

Table 1 *Trichoderma asperellum* and *Fusarium oxysporum* DNA copies in cucumber rhizosphere soil

生育期 Growth period	处理方式 Treatment	DNA 拷贝数 DNA copies (ng/ μ L)		防治效果 (%) Control efficiency
		棘孢木霉菌 <i>T. asperellum</i>	尖孢镰孢菌 <i>F. oxysporum</i>	
幼苗期 Seedling period	空白对照 Blank control	2.36 $\pm$ 0.01 e	24.71 $\pm$ 1.23 ghijk	—
	药剂对照 Fungicide control	2.38 $\pm$ 0.21 e	50.82 $\pm$ 3.89 cdefg	79.82 $\pm$ 5.89 b
	清水对照 Water control	5.03 $\pm$ 0.22 e	21.28 $\pm$ 1.25 ijk	—
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	235 000.00 $\pm$ 10.31 a	68.36 $\pm$ 2.98 cd	70.24 $\pm$ 2.45 b
速长期 Rapid growth period	空白对照 Blank control	0.68 $\pm$ 0.01 e	22.42 $\pm$ 3.21 ijk	—
	药剂对照 Fungicide control	0.83 $\pm$ 0.02 e	62.42 $\pm$ 4.76 dce	76.45 $\pm$ 5.76 b
	清水对照 Water control	0.93 $\pm$ 0.02 e	720.75 $\pm$ 23.45 jk	—
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	59 300.00 $\pm$ 23.01 bcde	15.41 $\pm$ 1.45 jk	76.81 $\pm$ 3.02 b
开花期 Florescence	空白对照 Blank control	6.02 $\pm$ 0.12 e	46.82 $\pm$ 7.67 cdefgi	—
	药剂对照 Fungicide control	4.69 $\pm$ 0.32 e	21.55 $\pm$ 1.23 ijk	64.28 $\pm$ 4.14 c
	清水对照 Water control	1.37 $\pm$ 0.11 de	24.62 $\pm$ 3.56 ghijk	—
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	57 300.00 $\pm$ 9.87 bcde	29.16 $\pm$ 2.33 fgijk	64.29 $\pm$ 2.87 c
盛果期 Full bearing period	空白对照 Blank control	7.04 $\pm$ 0.32 e	28.40 $\pm$ 3.56 fhgijk	—
	药剂对照 Fungicide control	5.80 $\pm$ 0.32 bcde	69.93 $\pm$ 5.78 c	34.67 $\pm$ 3.65 e
	清水对照 Water control	4.46 $\pm$ 0.11 bcde	298.66 $\pm$ 12.67 a	—
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	80 500.00 $\pm$ 21.98 bcd	54.87 $\pm$ 9.78 b	50.00 $\pm$ 2.54 d
生长末期 Late growth period	空白对照 Blank control	9.16 $\pm$ 2.12 e	39.11 $\pm$ 1.22 efgijk	—
	药剂对照 Fungicide control	4.85 $\pm$ 1.00 e	25.60 $\pm$ 0.98 ghijk	35.78 $\pm$ 5.34 e
	清水对照 Water control	1.21 $\pm$ 0.04 e	24.33 $\pm$ 4.12 hijk	—
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	36 300.00 $\pm$ 12.05 cde	18.36 $\pm$ 2.33 jk	100.00 $\pm$ 0.00 a

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

黄瓜幼苗期、速长期及开花期,棘孢木霉菌肥对黄瓜枯萎病的防治效果分别为 70.24%、76.81% 和 64.29%;且同一个生育期,施用棘孢木霉菌肥与对照药剂的防治效果差异不显著。黄瓜盛果期和生长末期棘孢木霉菌肥对黄瓜枯萎病的防治效果分别为 50.00% 和 100.00%,显著高于对照药剂 ($P<0.05$, 表 1)。

2.2 对根际土壤中2种菌DNA拷贝数的影响

施用棘孢木霉菌肥后,黄瓜根际土壤中棘孢木霉菌的 DNA 拷贝数出现 2 个高峰期,即黄瓜幼苗期和黄瓜盛果期,其根际土壤中棘孢木霉菌的 DNA 拷贝数分别为 235 000.00 ng/ μ L 和 80 500.00 ng/ μ L,均显著高于其它生育期 ($P<0.05$, 表 1)。黄瓜速长期、盛果期、生长末期的根际土壤中尖孢镰孢菌 DNA 拷贝数分别为 15.41、54.87 和 18.36 ng/ μ L,同期药剂对照的尖孢镰孢菌 DNA 拷贝数分别为 62.42、69.93 和

25.60 ng/ μ L,同期清水对照的尖孢镰孢菌 DNA 拷贝数则为 720.75、298.66 和 24.33 ng/ μ L;同一生育期棘孢木霉菌肥处理的尖孢镰孢菌 DNA 拷贝数显著低于药剂对照和清水对照。

2.3 棘孢木霉菌肥对微生物种群结构的影响

施用棘孢木霉菌肥后,黄瓜幼苗期、速长期、开花期和生长末期的细菌/真菌的比值分别为 3.47、1.67、1.40 和 3.18,均低于药剂对照,但只有速长期和开花期的细菌/真菌比值与药剂对照间差异显著 ($P<0.05$)。施用棘孢木霉菌肥后,在黄瓜开花期和速长期的压力指数分别是 13.94 和 3.87,均显著高于药剂对照 ($P<0.05$);黄瓜幼苗期、速长期、开花期和盛果期根际微生物相对丰度分别为 2.24、1.98、2.52 和 2.12,均高于药剂对照,而且黄瓜幼苗期、速长期和开花期的微生物相对丰度与药剂对照差异显著 ($P<0.05$, 表 2)。

表 2 棘孢木霉菌肥对黄瓜根际土壤微生物种群的影响

Table 2 Effects of *Trichoderma asperellum* biocontrol fertilizer on microbial population in cucumber rhizosphere soil

生育期 Growth period	处理方式 Treatment	细菌/真菌 Ratio of bacteria and fungi	压力指数 Stress index	微生物群落相对丰度 Relative abundance of microbial community
幼苗期 Seedling period	空白对照 Blank control	3.38 $\pm$ 0.20 de	3.08 $\pm$ 0.04 fe	2.00 $\pm$ 0.01 de
	药剂对照 Fungicide control	3.52 $\pm$ 0.11 d	2.03 $\pm$ 0.01 g	1.71 $\pm$ 0.16 f
	清水对照 Water control	1.30 $\pm$ 0.01 i	3.69 $\pm$ 0.32 cd	1.34 $\pm$ 0.39 g
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	3.47 $\pm$ 0.01 d	3.05 $\pm$ 0.34 fe	2.24 $\pm$ 0.07 d
速长期 Rapid growth period	空白对照 Blank control	2.95 $\pm$ 0.17 ef	2.95 $\pm$ 0.39 f	2.50 $\pm$ 0.07 a
	药剂对照 Fungicide control	4.01 $\pm$ 0.14 c	3.54 $\pm$ 0.05 d	0.27 $\pm$ 0.16 h
	清水对照 Water control	3.35 $\pm$ 0.03 de	3.38 $\pm$ 0.20 ef	2.03 $\pm$ 0.07 de
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	1.67 $\pm$ 0.02 hi	3.87 $\pm$ 0.21 c	1.98 $\pm$ 0.01 def
开花期 Florescence	空白对照 Blank control	4.54 $\pm$ 0.10 b	4.31 $\pm$ 0.25 b	1.34 $\pm$ 0.39 h
	药剂对照 Fungicide control	3.19 $\pm$ 0.06 de	2.05 $\pm$ 0.07 h	2.03 $\pm$ 0.07 de
	清水对照 Water control	2.00 $\pm$ 0.02 g	3.34 $\pm$ 0.21 fe	1.68 $\pm$ 0.06 f
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	1.40 $\pm$ 0.04 i	13.94 $\pm$ 0.32 a	2.52 $\pm$ 0.10 a
盛果期 Full bearing period	空白对照 Blank control	7.79 $\pm$ 0.21 a	3.49 $\pm$ 0.05 de	2.05 $\pm$ 0.06 de
	药剂对照 Fungicide control	2.48 $\pm$ 0.01 fg	3.83 $\pm$ 0.34 c	2.08 $\pm$ 0.13 de
	清水对照 Water control	1.22 $\pm$ 0.11 i	3.74 $\pm$ 0.14 cd	1.75 $\pm$ 0.05 f
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	4.52 $\pm$ 0.12 b	3.30 $\pm$ 0.13 fe	2.12 $\pm$ 0.07cd
生长末期 Late growth period	空白对照 Blank control	3.12 $\pm$ 0.01 de	2.98 $\pm$ 0.23 f	2.24 $\pm$ 0.07 bc
	药剂对照 Fungicide control	3.36 $\pm$ 0.15 d	3.59 $\pm$ 0.11 de	2.36 $\pm$ 0.03 b
	清水对照 Water control	2.83 $\pm$ 0.03 ef	3.71 $\pm$ 0.21 cd	1.03 $\pm$ 0.04 g
	棘孢木霉菌肥 <i>T. asperellum</i> fertilizer	3.18 $\pm$ 0.21 de	2.02 $\pm$ 0.04 h	2.04 $\pm$ 0.45 de

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列不同字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

3 讨论

木霉是良好的生防真菌,已被广泛地应用于防控植物土传病害 (Vinale et al., 2008; Wu et al., 2009; 贺字典等, 2011)。木霉的防治效果不仅与木

霉菌种类有关,还与其施用方式有关,将其制成木霉菌肥或菌剂也会提高防治效果。陈凯(2011)筛选出的木霉菌 TM、TG 对黄瓜枯萎病的防治效果仅为 49.4% 和 54.9%;深绿木霉 *T. atroviride* 菌肥对油菜菌核病的相对防效为 63.24% (杨力帆, 2010);在西

瓜定植时增施微生物有机肥和使用微生物有机肥育苗+定植期增施微生物有机肥后,对枯萎病的防治效果高达83%以上(李双喜等,2012);棘孢木霉菌剂对黄瓜枯萎病的防治效果最高可达89.5%(孟洁等,2010)。防治效果还与木霉施用环境有很大关系。木霉菌对黄瓜枯萎病的防效试验多是在室内盆栽条件下进行的,虽然在室内防治效果很好,但真正应用到田间时,木霉菌的定殖能力差,与土著微生物的竞争力严重下降,致使防治效果很低。例如室内盆栽试验时木霉菌株M113和M135对茄子黄萎病的防效分别为70.53%和74.68%,均显著高于对照药剂,但田间小区试验时,2个菌株的防效则分别降低到33.71%和37.14%(赵丹等,2015)。本研究开发的棘孢木霉菌肥在连作4年的黄瓜温室中对黄瓜枯萎病的防效在黄瓜幼苗期为70.24%,在黄瓜速长期达到76.81%,而且与对照药剂防效差异不显著,这说明木霉菌肥可用于田间防治黄瓜枯萎病。

棘孢木霉菌对黄瓜枯萎病的防治效果还体现在棘孢木霉菌与尖孢镰孢菌二者的互作方面。棘孢木霉菌肥施用到田间后,快速定殖后并繁殖其孢子数量,使其抑制尖孢镰孢菌的繁殖。贺字典等(2016b)报道棘孢木霉菌施用到土壤后其DNA拷贝数从7 d的320 ng/μL迅速上升到56 d的 5.16×10^4 ng/μL,说明棘孢木霉菌能在土壤中快速繁殖。随着木霉数量增加,病原菌数量减少。第14、28天棘孢木霉菌DNA拷贝数迅速增加,分别为59 300、57 300 copies/μL,而茄病镰刀菌*F. solani* DNA拷贝数却呈下降趋势,分别为17.75 copies/μL和14.21 copies/μL(贺字典等,2016a)。本研究中黄瓜幼苗期棘孢木霉菌DNA拷贝数达到235 000 ng/μL,虽然同期尖孢镰孢菌的DNA拷贝数为68.36 ng/μL,高于清水对照和药剂对照,但速长期尖孢镰孢菌的DNA拷贝数则下降为15.41 ng/μL,显著低于同期清水对照和药剂对照的DNA拷贝数,说明棘孢木霉菌在黄瓜根际得到了快速繁殖,并且抑制了尖孢镰孢菌的繁殖。此外还发现黄瓜速长期与盛果期尖孢镰孢菌DNA拷贝数最多,这与黄瓜枯萎病田间发病高峰期相吻合(天津市农科所植保室,1974),因此,若要发挥棘孢木霉菌肥的防治效果,除了作为基肥使用外,还应在速长期和结果期多次施用,那样会取得更好的防治效果。

Zhou & Wu(2012)认为土壤微生物种群结构失衡是黄瓜连作障碍的主要原因,因此在连作生产条件下,通过改变根际土壤微生物种群结构,营造健康土壤微生物环境才是解决连作障碍的重要途径

(Szymańska et al., 2016)。连作西瓜经过连续3年休闲自然修复后,细菌、放线菌、其它真菌、镰孢菌的比例由休闲前的24 000:100:4:1变为57 000:100:3.5:1,根际土壤微生物区系逐渐得到恢复(吴洪生,2008)。王涛等(2011)研究表明木霉菌肥施于连作黄瓜土壤后,改善了黄瓜连作土壤的理化性状,同时提高了土壤酶活性、增加了细菌及放线菌数量并降低了真菌数量。康萍芝等(2013)施用哈茨木霉菌剂后,番茄根际细菌、真菌、放线菌及木霉菌数量显著增加。番茄定植后,生防菌B1619对番茄根际土壤中真菌和放线菌有促进作用,而对细菌则表现为先促进后抑制的作用(乔俊卿等,2013)。复合菌剂与有机无机肥配施显著提高了土壤总磷脂脂肪酸总含量、真菌/细菌比值、降低了G⁺/G⁻比值(张良,2014)。大豆田施用咪唑乙烟酸后,土壤中微生物的压力指数显著高于空白对照(张昌朋,2010)。李世贵(2010)将平板计数与DGGE、Biolog等方法相结合研究了长柄木霉*T. longbrachiatum*对黄瓜根际土壤微生物区系的影响,结果表明黄瓜根际土壤中细菌群落多样性降低,而放线菌和真菌群落多样性逐渐增加。与化学杀菌剂相比,棘孢木霉菌肥在抑制尖孢镰孢菌的同时,还能在速长期和开花期维持较高的细菌/真菌比值、压力指数和微生物相对丰度,与上述文献报道结果基本一致,从而说明棘孢木霉菌肥可以有效调节黄瓜根际细菌与真菌的比例关系,改善黄瓜根际微生物的群落结构,增加了微生物丰度,对于维持连作土壤微生物种群结构平衡具有重要作用。本研究只采用了RT-PCR和RFLP两种方法来研究棘孢木霉菌肥对细菌/真菌比值、压力指数和微生物丰度的影响,还需要进一步采用末端限制性片段长度多态性(terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)等技术以提高土壤微生物群落分析的精确度。

参 考 文 献 (References)

- Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184(3): 529–544
- Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegård Å. 1996. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*, 22(3): 261–264
- Cao Y. 2011. Control of *Fusarium* wilt disease of cucumber by application of bio-organic fertilizer and its working mechanism. Ph. D

- Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [曹云. 2011. SQR9微生物有机肥防治黄瓜土传枯萎病的效应与机制研究. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Chen K. 2011. Biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt disease by *Trichoderma* spp. Master Thesis. Luoyang: Henan University of Science and Technology (in Chinese) [陈凯. 2011. 生防木霉防治黄瓜枯萎病的研究. 硕士学位论文. 洛阳: 河南科技大学]
- de Caire GZ, de Cano MS, Palma RM, de Mulé CZ. 2000. Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13): 1985–1987
- Duan CM, Xue QH, Hu SB, Zhao J, Wei Y, Wang LN, Shen GH, Chen Q. 2010. Microbial ecology of *Fusarium* wilt infected and healthy cucumber plant in root zone of continuous cropping soil. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 38(4): 143–150 (in Chinese) [段春梅, 薛泉宏, 呼世斌, 赵娟, 魏样, 王玲娜, 申光辉, 陈秦. 2010. 连作黄瓜枯萎病株、健康根域土壤微生物生态研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(4): 143–150]
- Ferre FS, Santamarina MP. 2010. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Annals of Microbiology*, 60(2): 335–340
- Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, Smalla K, Thiele-Bruhn S. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7): 1583–1591
- He ZD, Gao YF, Wu HP, Gao ZG, Zhang Y. 2011. Effect factors to *Trichoderma* populations in greenhouse soil of vegetables. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 20(6): 147–154 (in Chinese) [贺字典, 高玉峰, 吴贺平, 高增贵, 张洋. 2011. 保护地蔬菜土壤中木霉菌种群影响因素. 西北农业学报, 20(6): 147–154]
- He ZD, Gao ZG, Gao YF, Zhao BX, Zhang XF. 2010. ITS sequence of *Trichoderma* species in soil planted vegetables in the greenhouse and UP-PCR analysis on genetic diversity. *Journal of Plant Protection*, 37(5): 459–465 (in Chinese) [贺字典, 高增贵, 高玉峰, 赵柏霞, 张小飞. 2010. 蔬菜保护地木霉菌 rDNA-ITS 序列和 UP-PCR 遗传多样性分析. 植物保护学报, 37(5): 459–465]
- He ZD, Song SQ, Gao YF, Shi YX, Li BJ. 2016b. Detection to *Trichoderma asperellum* colonization in soil by real-time fluorescent quantitative PCR. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 552–558 (in Chinese) [贺字典, 宋士清, 高玉峰, 石延霞, 李宝聚. 2016b. 棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 在土壤中定殖量的荧光定量 PCR 检测. 植物保护学报, 43(4): 552–558]
- He ZD, Wu SX, Song XF, Xie XY, Li SD. 2016a. Population dynamics of *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* and *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in cucumber rhizosphere. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(3): 357–364 (in Chinese) [贺字典, 吴素霞, 宋晓飞, 谢新宇, 李世东. 2016a. 生防菌与茄病镰刀菌在黄瓜根际动态变化研究. 中国生物防治学报, 32(3): 357–364]
- Hietala AM, Eikenes M, Kvaalen H, Solheim H, Fossdal CG. 2003. Multiplex real-time PCR for monitoring *Heterobasidion annosum* colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4413–4420
- Kang PZ, Zhang LR, Shen RQ, Du YN. 2013. Ecological effect of *Trichoderma harzianum* preparations on rhizosphere soil microbes in facilities continuous cropping tomato and their disease prevention. *Agrochemicals*, 52(2): 128–131 (in Chinese) [康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清, 杜玉宁. 2013. 哈茨木霉制剂对设施连作番茄根际土壤微生物的生态效应及防病作用. 农药, 52(2): 128–131]
- Kong CH, Wang P, Gu Y, Xu XH, Wang ML. 2008. Fate and impact on microorganisms of rice allelochemicals in paddy soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13): 5043–5049
- Li SG. 2010. Biocontrol action of two *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and the effects on soil microorganisms in the rhizosphere. Ph. D Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science (in Chinese) [李世贵. 2010. 两种木霉菌对黄瓜枯萎病菌生防作用及根际土壤微生物影响研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Li SX, Shen QR, Zheng XQ, Zhu YY, Yuan DW, Zhang JQ, Lü WG. 2012. Effect of organic microbe fertilizer application on watermelon growth and soil microorganisms under continuous monocropping. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 20(2): 169–174 (in Chinese) [李双喜, 沈其荣, 郑宪清, 朱毅勇, 袁大伟, 张娟琴, 吕卫光. 2012. 施用微生物有机肥对连作条件下西瓜的生物效应及土壤生物性状的影响. 中国生态农业学报, 20(2): 169–174]
- López-Mondéjar R, Antón A, Raidl S, Ros M, Pascual JA. 2010. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass. *Bioresour Technology*, 101(8): 2888–2891
- Meng J, Liu JB, Xu YL, Li CJ, Zhan LL. 2010. The effect of *Trichoderma* spp. agent on cucumber disease and growth. *System Science and Comprehensive Studies in Agriculture*, 26(2): 166–169 (in Chinese) [孟洁, 刘金波, 许艳丽, 李春杰, 战丽莉. 2010. 木霉粉剂对黄瓜病害防效和生长发育的影响. 农业系统科学与综合研究, 26(2): 166–169]
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne NA, Viljoen A. 2006. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants. *Plant Pathology*, 55(2): 207–216
- Plant Protection Laboratory of Tianjin Agricultural Science Institute. 1974. The occurrence and control of cucumber *Fusarium* wilt in the suburb of Tianjin. *Tianjin Agricultural Sciences*, (3): 42–46 (in Chinese) [天津市农科所植保室. 1974. 天津市郊区黄瓜枯萎病的发生与防治. 天津农业科学, (3): 42–46]
- Qi WZ, Zhao L. 2013. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4): 355–364
- Qiao JQ, Liu YZ, Xia YF, Mu SF, Chen ZY. 2013. Root colonization by *Bacillus myoliquefaciens* B1619 and its impact on the microbial community of tomato rhizosphere. *Journal of Plant Protection*

- tion, 40(6): 507–511 (in Chinese) [乔俊卿, 刘邮洲, 夏彦飞, 慕少锋, 陈志谊. 2013. 生防菌 B1619 在番茄根部的定殖及对根际微生态的影响. 植物保护学报, 40(6): 507–511]
- Sant D, Casanova E, Segarra G, Avilés M, Reis M, Trillas MI. 2010. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biological Control*, 53(3): 291–296
- Szymańska S, Płociniczak T, Piotrowska-Seget Z, Hryniewicz K. 2016. Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. community structure and metabolic potential. *Microbiological Research*, 192: 37–51
- Urashima Y, Sonoda T, Fujita Y, Uragami A. 2012. Application of PCR-denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE) method to examine microbial community structure in asparagus fields with growth inhibition due to continuous cropping. *Microbes and Environments*, 27(1): 43–48
- Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorigo M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1): 1–10
- Wang MC, Liu YH, Wang Q, Gong M, Hua XM, Pang YJ, Hu SJ, Yang YH. 2008. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3): 778–788
- Wang T, Qiao WH, Li YQ, Ao YS. 2011. Effects of rotation and microbial fertilizers on the properties of continuous cucumber cropping soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 43(3): 578–583 (in Chinese) [王涛, 乔卫花, 李玉奇, 奥岩松. 2011. 轮作和微生物菌肥对黄瓜连作土壤理化性状及生物活性的影响. 土壤通报, 43(3): 578–583]
- Wu HS. 2008. Microbial ecology mechanisms on *Fusarium* wilt of watermelon and its biological control in *Fusarium*-infested soil under long-term monoculture system. Ph. D Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [吴洪生. 2008. 西瓜连作土传枯萎病微生物生态学机理及其生物防治. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Wu HS, Yang XN, Fan JQ, Miao WG, Ling N, Xu YC, Huang QW, Shen QR. 2009. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by a bio-organic fertilizer containing combinations of antagonistic microorganisms. *BioControl*, 54: 287–300
- Yang LF. 2010. Preparation of compost and biocontrol of oilseed rape *Sclerotinia* stem rot and club root with *Trichoderma atroviride*. Master Thesis. Ya'an: Sichuan Agricultural University (in Chinese) [杨力帆. 2010. 深绿木霉 *Trichoderma atroviride* 生物菌肥的研制及对油菜菌核病、根肿病的生物防治. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学]
- Zhang CL, Xu T. 2005. Records of *Trichoderma* species from Hebei, Zhejiang, Yunnan and Tibet of China. *Mycosystema*, 24(2): 184–192 (in Chinese) [章初龙, 徐同. 2005. 我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述. 菌物学报, 24(2): 184–192]
- Zhang CP. 2010. Effect of herbicide imazathaphr on soil microbial diversity and environmental behavior. Ph. D Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [张昌朋. 2010. 除草剂咪唑乙烟酸对土壤微生物多样性影响及环境行为研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Zhang L. 2014. Effects of microorganism inoculants on growth and development of flue-cured tobacco and soil microbial properties. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [张良. 2014. 复合菌剂对烤烟生长发育及土壤微生物学特性的影响. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Zhang XL, Li X, Zhang CG, Li XY, Zhang HW. 2011. Ecological risk of long-term chlorimuron-ethyl application to soil microbial community: an *in situ* investigation in a continuously cropped soybean field in Northeast China. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(3): 407–415
- Zhao D, Qu HY, Wen L, Pan FJ, Lin M. 2015. Study on separation and screening of strain and control effect of *Verticillium* wilt. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, (1): 48–49 (in Chinese) [赵丹, 曲红云, 温玲, 潘凤娟, 林密. 2015. 木霉菌株分离筛选及对茄子黄萎病防治作用的研究. 黑龙江农业科学, (1): 48–49]
- Zhou XG, Wu FZ. 2012. Dynamics of the diversity of fungal and *Fusarium* communities during continuous cropping of cucumber in the greenhouse. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2): 469–478
- Zhu WJ, Wang N, Yu XP, Wang W. 2010. Effects of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on microbial community diversity in the melon rhizosphere. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(7): 1389–1396 (in Chinese) [朱伟杰, 王楠, 郁雪平, 王伟. 2010. 生防菌 *Pseudomonas fluorescens* 2P24 对甜瓜根围土壤微生物的影响. 中国农业科学, 43(7): 1389–1396]

(责任编辑: 张俊芳)