

微生物有机肥防治棉花黄萎病机制研究*

郎娇娇^{1,2} 王丽丽² 胡江^{1,2†} 沈其荣^{1,2}

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

(2 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室, 江苏宜兴 214200)

Mechanism of Bio-manure Controlling Cotton *Verticillium* Wilt

Lang Jiaojiao^{1,2} Wang Lili² Hu Jiang^{1,2†} Shen Qirong^{1,2}

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 Jiangsu Key Lab for Solid Organic Waste Utilization, Yixing, Jiangsu 214200, China)

关键词 棉花黄萎病; 生物防治; 微生物有机肥; PCR-DGGE; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S154.38 文献标识码 A

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 是一种世界范围内具有毁灭性危害的土传真菌, 它有着广泛的寄主, 包括多种树木、草本植物、蔬菜、粮食和经济作物^[1], 例如棉花和烟草^[2]。棉花黄萎病是由大丽轮枝菌引起的土传病害, 给棉花生产造成了严重的经济损失, 目前该病的控制措施主要关注于如何预防, 例如利用抗病品种和尝试生物防治来进行防治^[3]。

近十年来, 已经从土壤根际分离到的多种微生物菌株, 用于改善植物生长和健康^[4-6]。目前, 成功用于生物防治植物病害的非根际微生物包括芽孢杆菌 *Bacillus* spp.^[7-8], 假单胞菌 *Pseudomonas* spp.^[9]和木霉 *Trichoderma* spp.等等^[10]。然而, 大量的外源性生物防治剂的引入和单纯使用堆肥在不同程度上对病害防治产生不一致的效果^[11-13]。很多研究表明, 堆肥和根际微生物相结合进行进一步的培养和富集, 对病害防治有着更广阔的前景^[12-14]。

生防制剂与堆肥的结合应用, 能够影响植物根际和根系的微生物群落结构。土壤样品中施用不同生物制剂或者堆肥可以显著增加根系的细菌群落结构^[15-16]。然而, 这些处理对根际真菌群落结构的影响还没有详细报道。目前, 利用特异性引物和所扩增片段包含的遗传信息是揭示群落结构的关键性因素, 真菌 18S rRNA 包含的可变区域数目较细菌 16S rRNA 低一些^[17-18]。因此, 通过变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 对 18S rRNA 的基因片段来分析真菌群落就会十分有利^[18], 而且, 较多的病害信息也可被检测到。实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time PCR) 是一种方便、快速、准确的非细菌培养的定量方法, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 过程, 然后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的一种方法。随着分子生物学及其技术的不断发展, 实时荧光定量 PCR 技术已逐步应用于植物病害诊断, 包括不同病原菌的检测和定量分析。

本实验室使用枯草芽孢杆菌 HJ5 和 DF14 制成的微生物有机肥 (Bio-manure, BM) 用以防治棉花黄萎病^[19], 并持续连作了 5 季。本试验研究了第 5 季连作中, BM 微生物有机肥对棉花黄萎病发

* 农业部行业科技专项 (201103004) 和科技部 863 项目 (2010AA10Z401)

† 通讯作者, E-mail: hujiang@njau.edu.cn

作者简介: 郎娇娇 (1985—) 女, 河南沁阳人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物分子生物学和植物营养与病害研究。E-mail: jiaojiao501@126.com

收稿日期: 2010-12-13; 收到修改稿日期: 2011-04-12

病率的影响,并运用 PCR-DGGE 技术检测了不同生育期棉花根际土壤的真菌群落的多样性变化,并将 Real-time PCR 用于棉花黄萎病根际土壤中 *Verticillium dahliae* 的数量定量和快速检测。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

供试作物棉花品种为新陆早八号,由新疆石河子大学提供。

营养钵育苗土壤为未种植过棉花的健康土壤(水稻土,采自南京东郊);盆栽土壤为连续种植 4 季棉花的连作土壤(棉花土,取自江苏大丰)。

试验所用肥料为本实验研制的有机肥(Organic manure, OM)和微生物有机肥(BM)。其中有机肥(OM)为氨基酸有机肥料和猪粪堆肥按一定比例混合经二次发酵而成,微生物有机肥(BM)则是在有机肥(OM)的基础上加入 *Bacillus subtilis* 菌液经二次发酵而成。氨基酸有机肥是以菜粕为原料,经筛选的高效分泌蛋白酶的微生物分解而制成的氨基酸有机肥料,含有机质 442 g kg⁻¹、氨基酸 80 g kg⁻¹、N 44 g kg⁻¹、P₂O₅ 23 g kg⁻¹、K₂O 6.7 g kg⁻¹、水分 285 g kg⁻¹;猪粪堆肥含有机质 304 g kg⁻¹、N 20.1 g kg⁻¹、P₂O₅ 37 g kg⁻¹、K₂O 11 g kg⁻¹、水分 285 g kg⁻¹。

Bacillus subtilis 为本实验室筛选的两株高效 *Bacillus subtilis* 菌株: *Bacillus subtilis* HJ5(CGMCC No. 3301)和 *Bacillus subtilis* DF14(CGMCC No. 3302),两株皆为枯草芽孢杆菌。棉花黄萎病病原菌为 *Verticillium dahliae* (*Verticillium dahliae* Kleb.),来自南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术重点实验室。

1.2 试验设计

营养钵育苗试验分为 3 个处理:(1)对照(N_{CK})(未施用任何肥料);(2)有机肥(N_{OM})(施用有机肥,1%);(3)微生物有机肥(N_{BM})(施用微生物有机肥,1%)。即每个营养钵中加入 300 g 健康土壤,肥料与土壤充分混匀。各处理设 40 个重复,每个营养钵培养 1 株幼苗。营养钵苗期试验于 2009 年 7 月 28 日至 2009 年 8 月 21 日(共 25 d)在温室进行。

营养钵育苗试验和移栽大钵盆栽试验所设处理共组合成以下 5 个盆栽处理:(1)营养钵对照(N_{CK})+移栽大钵盆栽对照(连作土壤, T_{CK}),以(N_{CK}+T_{CK})表示;(2)营养钵施用有机肥(N_{OM})+移栽大钵盆栽对照(连作土壤, T_{CK}),以(N_{OM}+T_{CK})表示;(3)营养钵施用微生物有机肥(N_{BM})+移栽大钵盆栽对照(连作土壤, T_{CK}),以(N_{BM}+T_{CK})表示;(4)营养钵对照(N_{CK})+移栽大钵盆栽施用 0.5%微生物有机肥(连作土壤+0.5%微生物有机肥, T_{BM}),以(N_{CK}+T_{BM})表示;(5)营养钵施用微生物有机肥(N_{BM})+移栽大钵盆栽施用 0.5%微生物有机肥(连作土壤+0.5%微生物有机肥, T_{BM}),以(N_{BM}+T_{BM})表示。当营养钵中的棉花幼苗长出 3~4 片真叶时,将幼苗连同营养钵中土壤一起移栽至盆钵中,每个盆钵移植一株棉花幼苗。为强化土壤致病性,在每盆土中加入棉花黄萎病病原菌孢子悬液(1.8×10³个 g⁻¹土)并充分混匀。每盆装连作土壤 10 kg,每处理设 30 个重复。

盆栽试验于 2009 年 8 月 21 日至 2009 年 11 月 23 日(共 95 d)在温室进行,常规水肥管理。

1.3 病情调查

自移栽后一个月发现第一株发病植株后，每天记录病情状况，直至棉花吐絮期（100天左右），计算发病率和防治效果。

棉花黄萎病的发病率和防治效果按下式计算：发病率=发病植株数/调查植株总数×100%

防治效果=(对照发病率—处理发病率)/对照发病率×100%

1.4 土样采集

分别在棉花生长的4个时期采集土壤样品，即苗期、现蕾期、花铃期和吐絮期。每个处理随机选取生长一致的3个盆钵植株取样。采样时将整盆土壤倒出，轻轻敲碎，取出根部，采集棉花地表以下20 cm处富含棉花根系的土块（包括根部一起采集），分别装入无菌自封袋，带回实验室，轻轻抖动除去松散附在根上的土，剩下的附着于根部表层的5 mm以下的土壤即根际土，于-20℃保存直至后续的DNA提取和分析。

1.5 土壤总DNA的提取

采用试剂盒UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA)的方法提取土壤微生物总DNA，所得DNA于-20℃保存。

1.6 PCR-DGGE分析

1.6.1 PCR 扩增体系和条件 将提取的土壤微生物总DNA作为聚合酶链式反应（PCR）的模板，采用引物对EF390^[20]和FR1^[20]用于扩增真菌18S rDNA，反向引物FR1应在5'端加上一段富含“GC”的夹子^[20]。PCR反应体系：10×Buffer 2.5 μl，MgCl₂ (25 mmol L⁻¹) 1.5 μl，dNTP (2.5 mmol L⁻¹) 2 μl，引物 (10 mmol L⁻¹) 各 0.5 μl，DNA模板 1 μl，Taq酶 (5 U μl⁻¹) 0.3 μl，超纯水补足至 25 μl。PCR反应条件：95℃预变性 5 min，进入热循环：95℃变性 30 s，50℃退火 45 s，72℃延伸 2 min，共 30 个循环，72℃延伸 10 min。

1.6.2 DGGE 分析 土壤DNA经过PCR扩增后，采用D-Code突变检测系统（Bio-Rad）对所得PCR样品进行DGGE分析。所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为7.5%，变性梯度为45%~60%^[20]，50 V恒温58℃，1×TAE中电泳18 h，银染后扫描，采用Quantity One（Bio-Rad）分析结果。

1.7 实时荧光定量PCR（Real-time PCR）分析

优化后的扩增大丽轮枝菌的体系为：10×Buffer 2.5 μl，MgCl₂ (25 mmol L⁻¹) 1.5 μl，dNTP (2.5 mmol L⁻¹) 2 μl，引物 (10 mmol L⁻¹) 各 0.5 μl，DNA模板 1 μl，Taq酶 (5 U μl⁻¹) 0.3 μl，超纯水补足至 25 μl。采用大丽轮枝菌的特异性引物对ITS1-F^[21]和ST-VE1^[22]进行扩增。PCR反应条件：95℃预变性 5 min，进入热循环：95℃变性 30 s，50℃退火 30 s，72℃延伸 20 s，共 30 个循环，72℃延伸 5 min。扩增后的PCR产物按Axyprep™ DNA Gel Extraction Kit（中国浙江）纯化试剂盒说明书进行。

1.7.1 荧光定量PCR 扩增条件 荧光定量PCR扩增反应体系为20 μl：SYBR^R Premix Ex Taq™ (2×)10 μl，引物对各0.4 μl，ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μl，DNA模板 2 μl，超纯水 6.8 μl。反应

条件：95℃预变性 15 s，95℃预变性 5 s，60℃退火 34 s，40 个循环。在每一循环的退火阶段收集荧光，实时检测反应并且记录荧光信号的变化，得出扩增产物的熔解曲线。制备 10 个梯度的模板来检测反应的灵敏性。

1.7.2 荧光定量 PCR 标准曲线的绘制 大丽轮枝菌特异引物扩增后的 PCR 产物纯化后，连接到 PUC19T 载体上，转化到大肠杆菌，挑取单克隆提取质粒，测序确定插入片段是否正确。在合适的质粒浓度范围内选择 5 个模板梯度进行反应，确定阈值和基线，绘制出标准曲线。

1.8 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel™ 处理，采用 SPSS Base Ver.11.5 统计软件进行方差分析。采用 UPGMA 方法通过软件 Quantity One (Quantity One 4.6.3, Bio-Rad, $p < 0.05$) 对 DGGE 图谱进行相似性分析，并采用 Shannon-Wiener 指数^[23]来定量地表征不同处理土样的真菌群落的多样性。

Shannon-Wiener 多样性指数的计算公式为： $H = -\sum P_i \ln P_i = -\sum (N_i/N) \ln(N_i/N)$

H 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度，而条带的强度则通过条带的峰面积来表示。其中， N_i 为峰面积， N 为所有峰的总面积。

2 结果与分析

2.1 BM 对棉花黄萎病的生防效果

由表 1 可知，营养钵和盆钵中均施用 BM 的处理（处理 5， $N_{BM+T_{BM}}$ ）较其他两种施用方式效果更显著，发病率仅为 1.1%，而对照的发病率则达到 100%。长期的连作使得棉花黄萎病的发病率大大增加，而 BM 的施用在同样的连作条件下，可以大大降低黄萎病的发病率。其中， $N_{OM+T_{CK}}$ 的发病率为 88.9%，说明有机肥对于防治棉花黄萎病没有明显的效果。

从本试验中可以看出，只要在营养钵育苗时施用微生物有机肥的处理，移栽到盆钵土壤后，发病率均大大降低，防治效果在 60% 以上；而营养钵和盆钵土壤均施用一定量的微生物有机肥，棉花发病率仅为 1.1%，防治效果达到了 98.9%。营养钵育苗时未施用微生物有机肥的处理，移栽到盆钵土壤后，棉花黄萎病的发病率均达到了 50% 以上。因此，前期的接种和保护在微生物有机肥对棉花黄萎病的防治效果中，起着非常关键的作用。

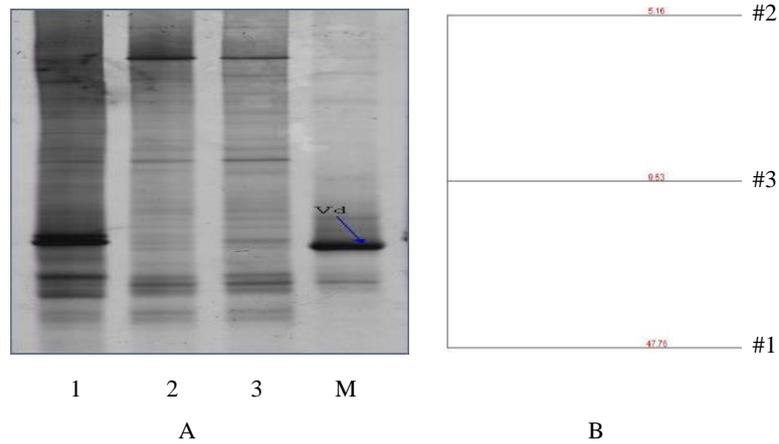
表 1 盆钵试验棉花黄萎病发病率及防治效果

处理代号	发病率(%)	防治效果(%)
$N_{CK+T_{CK}}$	100a	—
$N_{OM+T_{CK}}$	88.9±1.9b	11.1±1.9d
$N_{BM+T_{CK}}$	40.0±6.7d	60.0±6.7b
$N_{CK+T_{BM}}$	52.2±1.9c	47.8±1.9c
$N_{BM+T_{BM}}$	1.1±1.9e	98.9±1.9a

注：abc 表示邓肯检验 5% 显著水平；误差线表示 ±SE

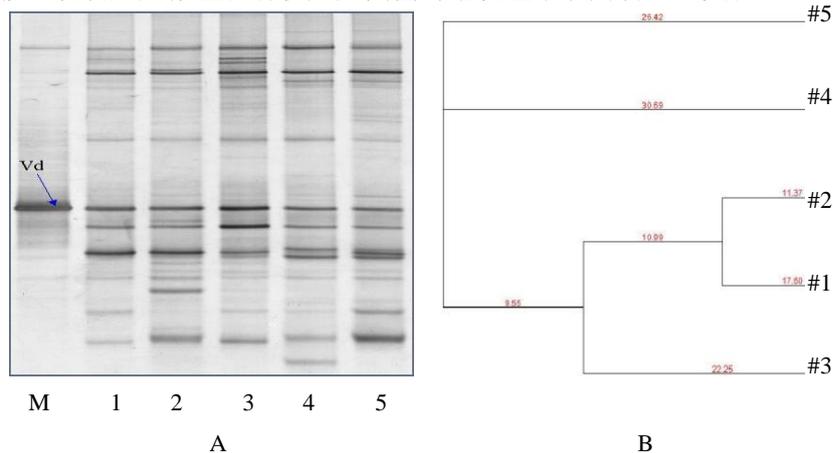
2.2 真菌群落多样性变化

2.2.1 苗期根际真菌群落多样性分析 对棉花苗期根际土壤中的真菌群落进行 DGGE 分析 (图 1A), 结果表明, 仅苗期的不同处理, 对根际的真菌群落结构就造成了较大的影响。对 DGGE 图谱进行相似性分析 (图 1B), 结果表明 3 个处理均为单独的族群。同时, 在苗期的 3 种土壤中, 均未检测到明显的大丽轮枝菌 *V. dahliae* 的条带 (图 1A)。



注: Vd 为病原菌大丽轮枝菌所得条带; 1: N_{CK} , 2: N_{OM} , 3: N_{BM} , M: 病原真菌 Vd
图 1 棉花苗期不同处理根际土壤真菌群落 DGGE 图谱 (A) 及相似性分析 (B)

2.2.2 现蕾期根际真菌群落多样性分析 对棉花现蕾期根际土壤中的真菌群落进行 DGGE 分析 (图 2A), 结果发现真菌群落在数量和种类上均发生了变化。对 DGGE 图谱进行相似性分析 (图 2B), 结果表明 5 个处理被分成了 3 个族群, 其中, 处理 $N_{BM}+T_{BM}$ 和 $N_{CK}+T_{BM}$ 分别单独成为一个族群, 处理 $N_{BM}+T_{CK}$ 和属于同一族群的两个处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 和 $N_{OM}+T_{CK}$ 共同组成了一个族群, 而 $N_{CK}+T_{CK}$ 和 $N_{OM}+T_{CK}$ 更为相似, 说明施用微生物有机肥后真菌群落发生了较为明显的变化。

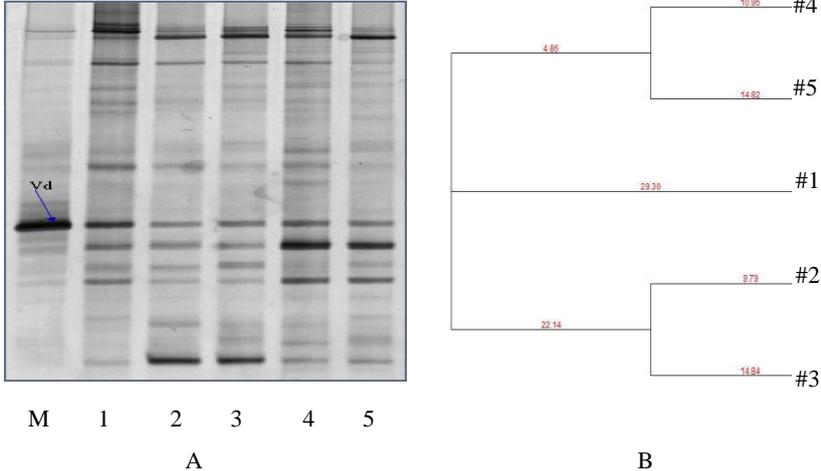


注: Vd 为病原菌大丽轮枝菌所得条带; M: 病原真菌 Vd, 1: $N_{CK}+T_{CK}$, 2: $N_{OM}+T_{CK}$, 3: $N_{BM}+T_{CK}$, 4: $N_{CK}+T_{BM}$, 5: $N_{BM}+T_{BM}$

图 2 棉花现蕾期不同处理根际土壤真菌群落 DGGE 图谱 (A) 及相似性分析 (B)

2.2.3 花铃期根际真菌群落多样性分析 对棉花花铃期根际土壤中的真菌群落进行 DGGE 分析 (图

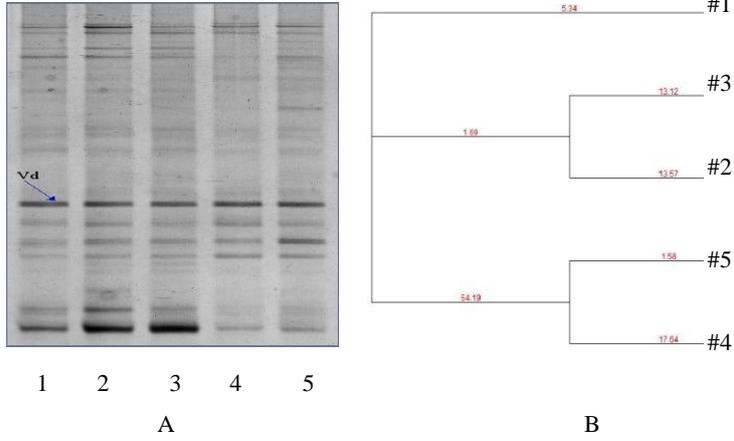
3A), 对 DGGE 图谱进行相似性分析, 结果见图 3B)。花铃期的 5 个处理被分成了 3 个族群, 其中, 处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 独立成为一个族群, 处理 $N_{OM}+T_{CK}$ 和 $N_{BM}+T_{CK}$ 属于同一族群, 处理 $N_{CK}+T_{BM}$ 和 $N_{BM}+T_{BM}$ 属于同一族群, 说明施用微生物有机肥后真菌群落发生了较为明显的变化。同时, 在花铃期的 5 个处理中, 均检测到了 *V. dahliae*, 从 DGGE 图谱上可以看出, 处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 的 *V. dahliae* 条带最亮。



注: Vd 为病原菌大丽轮枝菌所得条带; M: 病原真菌 Vd, 1: $N_{CK}+T_{CK}$, 2: $N_{OM}+T_{CK}$, 3: $N_{BM}+T_{CK}$, 4: $N_{CK}+T_{BM}$, 5: $N_{BM}+T_{BM}$

图 3 棉花花铃期不同处理根际土壤真菌群落 DGGE 图谱 (A) 及相似性分析 (B)

2.2.4 吐絮期根际真菌群落多样性分析 对棉花吐絮期根际土壤中的真菌群落进行 DGGE 分析, 所得图谱结果见图 4A。对 DGGE 图谱进行相似性分析, 结果见图 4B)。结果表明, 真菌群落变化较大, 5 个处理被分成了 3 个族群, 其中, 处理 $N_{BM}+T_{CK}$ 和 $N_{OM}+T_{CK}$ 属于同一族群, 处理 $N_{BM}+T_{BM}$ 和 $N_{CK}+T_{BM}$ 属于同一族群, 而处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 单独成为一个族群, 说明施用微生物有机肥后真菌群落的种类和数量发生了较为明显的变化。同时, 在吐絮期的 5 个处理中, 均检测到了 *V. dahliae*。但是处理间的发病率差异较为显著, 对照处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 的发病率达 100%, $N_{BM}+T_{BM}$ 仅为 1.1%。



注: Vd 为病原菌大丽轮枝菌所得条带; 1: $N_{CK}+T_{CK}$, 2: $N_{OM}+T_{CK}$, 3: $N_{BM}+T_{CK}$, 4: $N_{CK}+T_{BM}$, 5: $N_{BM}+T_{BM}$

图 4 棉花吐絮期不同处理根际土壤真菌群落 DGGE 图谱 (A) 及相似性分析 (B)

2.2.5 不同生育期不同处理棉花黄萎病土壤真菌类群的多样性指数 表 2 为棉花不同生育期不同处理的土壤真菌多样性指数, 从表中可见, 在苗期的 3 个处理中, 对照 (N_{CK}) 的真菌多样性指数最高, 为 1.039, 而微生物有机肥 (N_{BM}) 处理的真菌多样性指数仅为 0.924。说明施用微生物有机肥后真菌群落发生了较为明显的变化, 微生物有机肥改变了根际土壤中真菌群落的种类和数量。在现蕾期, $N_{OM}+T_{CK}$ 处理的真菌多样性指数最高, 为 1.175, $N_{CK}+T_{BM}$ 最低, 为 1.052, 说明有机肥对于降低真菌数量并没有显著效果。其余 3 个处理均无明显差异, 可能由于在现蕾期真菌对土壤微生物群落的影响还不太强烈。在花铃期, 处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 的真菌多样性指数为 1.239, 而施用了微生物有机肥的处理的真菌多样性指数均低于 $N_{CK}+T_{CK}$, 其中 $N_{BM}+T_{CK}$ 、 $N_{CK}+T_{BM}$ 和 $N_{BM}+T_{BM}$ 的真菌多样性指数分别为 1.131、1.182 和 1.087, 说明在棉花黄萎病的爆发期, 微生物有机肥有效地抑制了真菌的数量和活性, 导致了真菌数量和群落不断减少。在吐絮期, $N_{CK}+T_{CK}$ 的真菌多样性指数最高, 其发病率为 100%, 施用了微生物有机肥处理的真菌多样性指数较之 $N_{CK}+T_{CK}$ 均明显降低, 其中 $N_{BIO}+T_{CK}$ 处理的多样性指数为 1.161, 防治效果为 60%, $N_{CK}+T_{BM}$ 和 $N_{BM}+T_{BM}$ 真菌的多样性指数分别为 0.938 和 1.037, 相应的发病率分别为 52.2% 和 1.1%, 而防治效果则分别达到了 47.8% 和 98.9%, 说明在棉花生长后期, 微生物有机肥在降低真菌群落多样性的同时, 仍然能够有效地抑制棉花黄萎病的发生。

表 2 棉花不同生育期不同处理 DGGE 条带的 Shannon-Wiener 指数

生育期	处理代号							
	N_{CK}	N_{OM}	N_{BM}	$N_{CK}+T_{CK}$	$N_{OM}+T_{CK}$	$N_{BM}+T_{CK}$	$N_{CK}+T_{BM}$	$N_{BM}+T_{BM}$
苗期	1.039	0.913	0.924	—	—	—	—	—
现蕾期	—	—	—	1.098	1.175	1.151	1.052	1.109
花铃期	—	—	—	1.239	1.067	1.131	1.182	1.087
吐絮期	—	—	—	1.214	1.175	1.161	0.938	1.037

2.3 Real-Time PCR 对棉花黄萎病根际土壤中大丽轮枝菌的绝对定量

为了进一步了解大丽轮枝菌的数量变化, 我们用上述优化好的 Real-time PCR 扩增条件对本试验不同生育期 5 个处理的根际土壤中大丽轮枝菌数量进行定量, 结果如表 3: 在棉花黄萎病的发病初期, 即现蕾期时, 处理 $N_{OM}+T_{CK}$ 、 $N_{BM}+T_{CK}$ 和 $N_{CK}+T_{BM}$ 之间的病原菌数量没有显著差异, 均在 10^4 数量级上。而在棉花黄萎病的爆发期, 即花铃期时, 处理 $N_{BM}+T_{BM}$ 根际土壤中大丽轮枝菌的数量仅为 6.24×10^3 个 g^{-1} 土, 而处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 根际土壤中大丽轮枝菌的数量则显著高于处理 $N_{BM}+T_{BM}$, 达到 7.45×10^4 个 g^{-1} 土, 处理 $N_{OM}+T_{CK}$ 、 $N_{BM}+T_{CK}$ 和 $N_{CK}+T_{BM}$ 的根际病原菌数量没有显著差异, 分别为 3.79×10^4 、 1.85×10^4 和 4.37×10^4 个 g^{-1} 土; 在棉花吐絮期时, 处理 $N_{CK}+T_{CK}$ 根际土壤中大丽轮枝菌的数量为 3.32×10^4 个 g^{-1} 土, 处理 $N_{CK}+T_{BM}$ 和 $N_{BM}+T_{BM}$ 没有显著差异, 分别为 4.90×10^3 和 3.63×10^3 个 g^{-1} 土, 这一结果与发病率呈正相关, 根际土壤中大丽轮枝菌的数量越多, 发病率越高 (表 1)。

表 3 荧光定量 PCR 对棉花不同生育期 5 个处理的根际土壤中大丽轮枝菌数量 (cfu g^{-1}) 的计数结果

生育期	处理代号
-----	------

	N _{CK} +T _{CK}	N _{OM} +T _{CK}	N _{BM} +T _{CK}	N _{CK} +T _{BM}	N _{BM} +T _{BM}
现蕾期	4.57±0.00a	2.42±0.41b	1.35±0.48cd	1.95±0.06bc	0.69±0.04d
花铃期	7.45±1.24a	3.79±0.68ab	1.85±0.13b	4.37±2.86ab	0.62±0.01c
吐絮期	3.32±0.80a	1.88±0.16b	1.12±0.15bc	0.49±0.15d	0.36±0.03d

注：平均值±标准误，abc表示邓肯检验5%显著水平

3 讨 论

棉花黄萎病属于土传病害，是否发病以及发病的严重程度除受环境因素如温度、湿度、作物蒸腾速率影响外，主要还取决于根际土壤或土体土壤中的病原菌大丽轮枝菌的数量。微生物有机肥（BM）的施用可以显著降低棉花黄萎病的发病率，与罗佳^[19]和张慧^[24]等的研究结果一致。同时，微生物有机肥的施用对棉花黄萎病防治效果达到极显著水平（表 1），可能是由于施用微生物有机肥后微生物在土壤中增殖，改善了微生物区系，提高了颞颥微生物的活性，从而降低根际土壤中病原菌的数量，减轻病害的发生。本试验结果表明，发病率高的处理其根际土壤的大丽轮枝菌数量较高。在连作棉花植株生长过程中，当根际土壤中的大丽轮枝菌数量达到 10^4 cfu g⁻¹ 数量级时，棉花植株就会出现枯萎症状，甚至发病（处理 N_{CK}+T_{CK}、N_{OM}+T_{CK}、N_{BM}+T_{CK} 和 N_{CK}+T_{BM}）。如果根际土壤中大丽轮枝菌的数量为 10^3 cfu g⁻¹ 数量级，则棉花黄萎病的发病率为 1.1%（处理 N_{BM}+T_{BM}）。因此，在本试验条件下，连作棉花是否发生黄萎病以及发病率高高低，决定于根际土壤中大丽轮枝菌的数量。BM 究竟采取何种机制降低病原真菌的数量，从而达到抑制棉花黄萎病的发生，其具体机制尚不清楚，仍有待于进一步研究。

通过 DGGE 图谱表明，由菌株 *B. subtilis* HJ5 和 *B. subtilis* DF14 制成的微生物有机肥（BM）能够影响棉花黄萎病土壤根际真菌群落的多样性。这一结果说明，微生物有机肥对棉花黄萎病的抗性与根际真菌数量有关^[19]。枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 能够分泌多种抗菌物质^[25-27]，并且发现几种生防菌株能够破坏真菌的细胞壁^[28-30]。因此，由菌株 *B. subtilis* HJ5 和 *B. subtilis* DF14 制成的微生物有机肥可能影响了土壤根际真菌的活性，降低了真菌群落的多样性，与罗佳^[19]等的结果一致。同时发现，处理 N_{CK}+N_{CK} 根际真菌多样性指数在各个生育期呈先升高后降低的趋势（见表 2），这可能与棉花不同生育期植株代谢活动强弱，以及地温不同有关，这种现象在其他研究中也有相似报道^[31]。而 N_{BM}+T_{BM} 根际真菌群落多样性指数则随着生育期不断降低（见表 2），这说明微生物有机肥在棉花整个生育期均能够有效地抑制真菌的繁殖，同时降低了棉花黄萎病的发病率。土壤微生物区系保持平衡是克服连作障碍的主要措施之一，许多研究结果表明，根际微生物的数量和种类除受土壤环境条件影响外，最重要的是取决于根系分泌物。甚至根系分泌物的细小变化，均会导致根际微生物区系的极大差异。因此在施肥过程中，不仅要抑制病原真菌的数量，而且要提高有益细菌和放线菌的数量。对于微生物有机肥如何影响土壤根际真菌群落的结构和组成，目前尚不清楚，有待于进一步研究。

从上述结果可以看出，营养钵和大盆钵中均加入微生物有机肥料对土壤中大丽轮枝菌的繁殖有抑制作用，而且效果最好，能够显著地降低病原真菌的数量。凌宁^[32]和赵爽^[33]等研究结果表明，施用微生物有机肥能够显著降低西瓜根际尖孢镰刀菌的数量。据我们推测，这一现象很可能是由于施用含有颞颞微生物的有机肥料后，颞颞菌在装有健康土壤的营养钵中大量繁殖后，一旦移栽到加有微生物有机肥料的大盆钵时，颞颞微生物会形成所谓的“生物墙”来抵抗植株根际大丽轮枝菌的侵害的结果。但是“生物墙”具体是采用何种机理有效降低了大丽轮枝菌的数量，目前还不清楚，有待于进一步研究。值得关注的是，目前鲜见关于有益真菌对棉花黄萎病影响的相关报道。本试验只对病原真菌的数量进行了定量分析，并没有研究其他有益真菌的变化，因此，有益真菌对棉花黄萎病的影响并不清楚，需进一步研究。

参考文献

- [1] Pegg G F, Brady B L. *Verticillium wilts*. Wallingford, UK: CAB International, 2002
- [2] Zhu L, Zhang X, Tu L, et al. Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*) after infection by *Verticillium dahliae*. *Journal of Plant Pathology*, 2007, 89: 41-45
- [3] Tjamos E C. Problems and prospects in controlling verticillium wilt//Tjamos E C, Beckman C. *Vascular wilt diseases of plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1989: 441-478
- [4] Bent E. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF)//Tuzun S, Bent E. *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. USA: Springer, 2006: 225-258
- [5] Siddiqui Z A. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens//Siddiqui Z A. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. The Netherlands: Springer, 2006: 111-142
- [6] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 487-511
- [7] Jacobsen B J, Zidack N K, Larson B J. The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: *Plant Diseases. Phytopathology*, 2004, 94: 1 272-1 275
- [8] Schisler D A, Slininger P J, Behle R W, et al. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 2004, 94: 1 267-1 271
- [9] Weller D M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 2007, 97: 250-256
- [10] Samuels G J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 2006, 96: 195-206
- [11] Mazzola M. Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. *Journal of Nematology*, 2007, 39: 213-220
- [12] Noble R, Coventry E. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 2005, 15: 3-20
- [13] Postma J, Montanari M, Fvanden Boogert P H J. Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 39: 157-163
- [14] Suárez-Estrella F, Vargas-García C, López M J, et al. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection*, 2007, 26: 46-53
- [15] Filion M, Hamelin R C, Bernier L, et al. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with

- healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 3 541-3 551
- [16] Ofek M, Hadar Y, Minz D. Comparison of effects of compost amendment and of single-strain inoculation on root bacterial communities of young cucumber seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 6 441-6 450
- [17] Hugenholtz P, Pace N R. Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 1996, 14: 190-197
- [18] Anderson I C, Cairney J W G. Diversity and ecology of soil fungal communities: Increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 2004, 6: 769-779
- [19] Luo J, Ran W, Hu J, et al. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils. *Soil Science Society of America Journal*, 2010, 74(6): 2 039-2 048
- [20] Vainio E J, Hantula H. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res*, 2000, 104(8): 927-936
- [21] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 1993, 2: 113-118
- [22] Bart L, Margreet B, Alfons C R C, et al. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science*, 2006, 171: 155-165
- [23] Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20: 509-515
- [24] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应. *土壤学报*, 2008, 45(6): 1 095-1 101
- [25] Earl A M, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 2008, 16: 269-275
- [26] Nag órska K, Bikowski M, Obuchowski M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, 54: 495-508
- [27] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, 56: 845-857
- [28] Chaurasia B, Pandey A, Palni L M, et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research*, 2005, 160: 75-81
- [29] Manjula K, Podile A R. Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF1. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2005, 43: 892-896
- [30] Romero D, Vicente A D, Olmos J L, et al. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103: 969-976
- [31] 李洪连, 袁红霞, 王焯, 等. 根际微生物多样性与棉花品种对黄萎病抗性关系研究. *植物病理学报*, 1998, 28(4): 341-345
- [32] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(5): 1 136-1 141
- [33] 赵爽, 罗佳, 凌宁, 等. 基因宏阵列和荧光定量 PCR 方法对西瓜枯萎病害土壤中尖孢镰刀菌的快速检测和定量. *土壤学报*, 2010, 47(4): 703-708