

DOI: 10.11766/trxb201904180111

桂莎, 刘芳, 张立丹, 樊小林. 复合菌剂防控香蕉枯萎病的效果及其微生物学机制[J]. 土壤学报, 2020, 57 (4): 995–1007.

GUI Sha, LIU Fang, ZHANG Lidan, FAN Xiaolin. Effects of Complex Anti-Fungal Agents Biocontrolling Fusarium Wilt on Banana and Its Microbiological Mechanism[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 (4): 995–1007.

复合菌剂防控香蕉枯萎病的效果及其微生物学机制*

桂莎, 刘芳, 张立丹, 樊小林[†]

(广东高校环境友好型肥料工程技术研究中心, 华南农业大学资源与环境学院, 广州 510642)

摘要: 由病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc)) 侵染引起的香蕉枯萎病对全世界香蕉产业带来了毁灭性的影响, 且目前尚无广泛采用的防治方法。研究复合生防真菌制剂对香蕉枯萎病的防治效果, 以期为大田香蕉枯萎病的防治提供依据。设置 3 组不同的菌剂处理, 分别为对照组 CK、复合菌剂 NFP、复合菌剂 NFPT, 通过两季的盆栽试验, 研究复合菌剂对香蕉枯萎病的防治效果及其对土壤微生物多样性的影响; 利用 Illumina Miseq 高通量测序平台对细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 区域进行测序分析, 采用实时荧光 qPCR 定量分析各处理病原菌的数量。结果表明: (1) 复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 对香蕉枯萎病有较好的防治效果, 其防效分别为 43% 和 48%。(2) 施用复合菌剂增加了细菌和真菌群落丰富度和多样性。基于 Bray-curtis 距离矩阵的主坐标分析 (PCoA) 结果表明 NFP 和 NFPT 改变了细菌和真菌群落结构。NFP 和 NFPT 处理增加了潜在有益微生物中与香蕉枯萎病病情指数呈显著负相关的大理石雕菌属 *Marmoricola*、类诺卡氏菌属 *Nocardioides*、野野村式菌属 *Nonomuraea*、*norank_c_Acidobacteria*、*DS-100* 属和 *norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4* 属的相对丰度, 显著减少了病原菌尖孢镰刀菌的数量, 重塑了土壤微生物结构和功能, 增强其抗病性。

关键词: 复合真菌制剂; 香蕉枯萎病; Illumina Miseq 高通量测序; 土壤微生物多样性

中图分类号: S432.4⁺5 文献标志码: A

Effects of Complex Anti-Fungal Agents Biocontrolling Fusarium Wilt on Banana and Its Microbiological Mechanism

GUI Sha, LIU Fang, ZHANG Lidan, FAN Xiaolin[†]

(College of Natural Resource and Environment Science, South China Agricultural University, R & D Center of Environment Friendly Fertilizer Science and Technology of Guangdong Provincial University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: [Objective] Worldwidely, banana production is severely hindered by banana Fusarium wilt, a devastating soil-borne disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). With no widely adopted effective methods available to control or

* 国家重点研发计划项目 (2018YFD0201100), 广东省省级重大科研项目 (2016KZDXM029) 和国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-31-06) 资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFD0201100), the Major Scientific Research Projects of Guangdong Province in China (No.2016KZDXM029) and the Special Project for the Construction of China Agriculture Research System (No. CARS-31-06)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: crfxiaolin@126.com

作者简介: 桂莎 (1990—), 女, 湖南永州人, 博士研究生, 主要从事植物营养和肥料科学研究。E-mail: 932005243@qq.com

收稿日期: 2019-04-18; 收到修改稿日期: 2019-07-23; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-09-24

prevent the disease, it causes serious economic losses every year. In this study, complex biocontrol fungal agents were introduced and effects of their application preventing banana Fusarium wilt and potential mechanisms were explored, in an attempt to provide certain references for controlling disease on the large field scale. 【 Method 】 A pot experiment, lasting for 2 seasons were conducted and designed to have three groups of pots, namely, CK (no controlling agent applied), NFP (NFP for application of a complex anti-fungal agent prepared by combining non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp. and *Paecilomyces* sp. in 1 : 1 ratio), and NFPT (application of a complex anti-fungal agents prepared by combining non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp., *Paecilomyces* sp. and *Trichoderma* sp. in 9 : 9 : 4 ratio) for comparison between the pots for effects of the applications controlling banana Fusarium wilt and effects on soil microbial diversity. The Illumina Miseq high-throughput sequencing platform was used to analyze bacterial 16SrRNA gene and fungal ITS regions, the real-time fluorescence quantification PCR (RT-qPCR) was used to determine number of pathogens in the soil. 【 Result 】 Applications of the complex fungal agents (NFP and NFPT) have good effects of controlling banana Fusarium wilt disease, with control efficiency being 43% and 48%, respectively, and improve richness and diversity of bacteria and fungi. Principal coordinate analysis (PCoA) based on Bray-curtis distance matrix shows that significant differences in composition of the bacterial and fungal communities exist between the pots applied with the complex fungal agents and the pots in CK. The first principal component (PC1) explains 29.45% and 43.14% of the variability in the bacterial and fungal communities, respectively, and differs sharply between the treatment pots and the CK pots in composition of the overall bacterial and fungal communities. The microbes (non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp., *Paecilomyces* sp. and *Trichoderma* sp.) introduced into the soil are found quite limited in survivability in this study, and their abundance has only a marginal direct effect on the number of *F. oxysporum* and disease severity of the Fusarium wilt disease. However, they suppress the disease by altering composition of the soil microbiome. In particular, application of the complex fungal agents (NFP and NFPT) increases relative abundances of the beneficial indigenous microbial groups, such as *Marmoricola*, *Nocardioidea*, *Nonomuraea*, *norank_c_Acidobacteria*, *DS-100* and *norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4*. Their relative abundances are good indicators of the disease suppression effect and may play a keystone role in the process of the complex fungal agents suppressing banana Fusarium wilt disease. 【 Conclusion 】 In a word, application of the complex fungal agents (NFP and NFPT) significantly reduces the banana Fusarium wilt disease severity index. All the findings presented above show that relative abundance of the introduced non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp., *Paecilomyces* sp. and *Trichoderma* sp. has only a marginal effect on *F. oxysporum*. In contrast, the changes in abundance and community structures of the bacteria and fungi after application of the agents are the key factors suppressing the disease. Application of the agents stimulates the potential beneficial indigenous microbial groups that are significantly and negatively related to banana Fusarium wilt disease severity index. Thus, the effect of the complex fungal agents suppressing the disease seemed to be a joint one of the actual antagonism of the introduced microbes with the pathogens and their promoting growth of beneficial indigenous microbial groups.

Key words: Complex biocontrol fungal agents; Banana Fusarium wilt; Illumina Miseq High-throughput sequencing; Soil microbial diversity

香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) 侵染引起的一种土传病害, 给世界香蕉产业带来了巨大的经济损失^[1-2]。目前防治香蕉枯萎病的常用措施主要有土壤熏蒸^[3]、轮作^[4]和培育新品种^[5]等。然而土壤熏蒸会破坏土壤环境, 与农业可持续发展的理念相悖^[6]; 病原菌产生的厚垣孢子在无宿主的情况下可长期存活于土壤中^[2], 因此, 土壤一旦被 Foc 侵染, 在长达 30 年的时间易感病香蕉品种均难以成功种植^[4]; 抗

病新品种的培育周期长, 且品质难以保证^[7]。因此, 香蕉枯萎病的防治亟需新方法。

生物防治作为一种有前途且环境友好的病害防治方式, 正受到广泛的关注, 为香蕉枯萎病的防治提供了一种新的、有潜力的方式^[8]。在众多的生防微生物中, 生防真菌相比于生防细菌而言有更大的潜力在土壤中生长和繁殖^[9], 因此, 真菌更多地用于防治某些作物因尖孢镰刀菌引起的病害^[9], 目前已有许多生防真菌用于枯萎病的防治^[10-12]。尽管许

多不同的生防真菌对枯萎病的防治表现出了一定的防效,但是由于在生物防治过程中,生物和非生物因素相互作用的复杂性,对枯萎病防治的实际效果不尽相同^[13],为此可通过多种生防菌的结合应用解决该问题。多种拮抗菌结合施用较一种拮抗菌单独施用有更好的防病效果^[14],大量研究^[14-15]表明多种生防菌结合施用能有效地抑制枯萎病。本研究的前期工作证明香蕉施用多种生防真菌制成的复合菌剂,对香蕉枯萎病有明显的防治效果。已有研究^[16-17]报道了某些种类的生防真菌防病机理是直接对抗和间接对抗,但是多种生防真菌配合的防病机理尚不明确。本文假设复合真菌制剂防治香蕉枯萎病的机理可能在于,香蕉定植前在香蕉根区接种复合真菌制剂改变了香蕉根区土壤微生物结构,刺激了土著微生物中某些有益菌属相对丰度的增加。为研究复合真菌制剂防控香蕉枯萎病的效果,本研究开展了两次盆栽试验,通过细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 区域的高通量测序,系统研究了根区细菌和真菌群落结构对复合真菌制剂的响应,以期探讨复合真菌制剂防治香蕉枯萎病的机理,为以复合真菌制剂防治大田香蕉枯萎病的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

盆栽试验于华南农业大学温室进行。供试土壤为微碱性砂壤土,是滩涂填海造田的蕉园土壤,采自广东省中山市翠亨岛,土壤 pH 7.41,有机质含量 19.78 g·kg⁻¹,矿质态氮 11.12 mg·kg⁻¹,有效磷 8.53 mg·kg⁻¹,速效钾 141.0 mg·kg⁻¹。

供试香蕉为巴西蕉 (*Mimosa nana* Lour.) 无病组育苗的假植苗。香蕉假植苗长至 14 cm、7 片绿叶时,选取生长健壮、一致的幼苗进行试验。

复合真菌活菌制剂由西北农林科技大学植保学院植物病理研究室提供,复合真菌制剂 NFP 由非致病性尖孢镰刀菌 (*non-pathogenic Fusarium oxysporum* sp.) 和淡紫拟青霉菌 (*Paecilomyces* sp.) 按 1:1 比例复配而成,复合真菌制剂 NFPT 由非致病性尖孢镰刀菌 (*non-pathogenic Fusarium oxysporum* sp.)、淡紫拟青霉菌 (*Paecilomyces* sp.) 和木霉菌 (*Trichoderma* sp.) 按 9:9:4 的比例复配而成。有效活菌数均大于 5 × 10⁸ g⁻¹。

1.2 试验设计

分别于 2017 年 9 月 27 日至 2018 年 1 月 29 日和 2018 年 5 月 10 日至 2018 年 8 月 1 日开展了两次盆栽试验。两次试验结果的规律一致,本文以第二次盆栽试验的结果进行分析和讨论。两次盆栽试验方案相同,分别设置 CK (不接种生防菌剂)、复合菌剂 NFP、复合菌剂 NFPT 3 个处理,每个处理设 30 个重复,单株为 1 个重复,每盆移栽一株香蕉,共 90 盆香蕉,随机排列。所有处理的香蕉氮磷钾用量相等,N:P₂O₅:K₂O (质量比)均为 1:0.25:0.75。每个处理的施 N 量均为 0.2 g·kg⁻¹ 干土,在香蕉生长过程将各处理的总养分均分为 12 份,分别溶于水后,每周浇灌施肥 1 次。每盆的含水量用称重法保持在田间持水量的 70%。

1.3 试验方法

在香蕉苗假植期对其进行复合菌剂接种,具体方法是将三叶期的香蕉苗从沙培苗床中拔出,洗掉根上附着的河沙,假植于 7 cm × 10 cm 的黑色营养杯中,定植介质是无病椰糠+泥炭专用混合基质,假植苗移栽时,将 2 g 复合菌剂 NFP 和 NFPT 分别施于定植穴,使菌剂与香蕉根直接接触。假植期进行正常水肥管理,待香蕉苗长至 7 片叶时,选择生长一致的香蕉苗移栽于盆钵,开始香蕉盆栽试验。盆栽期按照上述方法进行水肥管理,参考大田管理措施进行香蕉枯萎病外的其他病虫害防治。

香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 (Foc4) 由华南农业大学农学院植物病理研究室提供。将 Foc4 接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上,在 25 °C 下黑暗活化培养 7 d,然后用直径 8 mm 打孔器从菌落边缘采取菌饼,接种于装有 500 mL 液体 PDA 培养基的锥形瓶中,在 28 °C、180 r·min⁻¹ 摇床培养 7 d。将得到的菌悬液用四层纱布过滤掉菌丝后,用无菌水稀释至 10⁶ CFU·mL⁻¹ 备用。

供试土壤分两层装盆,先装下层 4 cm (约 1.5 kg),顶层 7 cm (约 2.5 kg) 先不装土,移栽假植苗后再用土壤覆盖香蕉苗及其基质块。移栽前将选好的七叶一心健壮、一致的香蕉苗脱掉营养钵袋,移植于已装下层土壤的盆钵正中,然后将预留的顶层土壤覆盖于香蕉苗基质块周围,使基质块上仍能覆盖 1 cm 土壤。每盆移栽 1 株香蕉,浇水至田间持水量的 70% 进行缓苗。移栽的香蕉正常生长 1 个月后,采用伤根接种法接种病原菌。具体操作方法为用洁

净玻棒在香蕉假茎四周每个方位自上而下插入土壤中后拔出,分别在插入的四个方位中接种 10 mL 浓度为 10^6 CFU·mL⁻¹ 的 Foc4 菌悬液,接种量为 10^4 CFU·g⁻¹ (干土)。

1.4 样品采集与指标测定

接种病原菌后每隔 10 d 调查 1 次,连续调查 5 次并计算病情指数^[19]。香蕉枯萎病病情分为 6 级^[18],0 级:健株,无症状;1 级:病株有 20% 以下的叶片显病症;2 级:病株有 20%~40% 的叶片显病症;3 级:病株有 40%~80% 的叶片显病症;4 级:仅有顶部 1~2 片健康叶;5 级:整株枯死。

$$\text{病情指数}/\% = \sum \frac{\text{各级病株数} \times \text{该级级数值}}{\text{总株数} \times \text{最高级级数值}} \times 100$$

$$\text{防病效果}/\% = [(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100$$

香蕉枯萎病发病初期,每处理随机选取 12 盆香蕉,用土钻取土,每盆取 4 钻,每 4 盆的土壤混合均匀后得到 1 个混合样,每处理 3 个混合土样,即 3 个重复,3 个处理共 9 个土壤样品,用自封袋低湿带回实验室,去除植物根系并过 2 mm 筛后保存于 -80℃ 冰箱,用于 16S rRNA 和 ITS 测序分析。

采用土壤 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-tek, Norcross, GA, 美国) 提取土壤微生物总 DNA,用紫外可见分光光度计 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, 美国) 检测提取的 DNA 的浓度和纯度。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

样本总 DNA 提取后,设计基因特异性引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行 PCR 扩增;真菌特异性引物 ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) 和 ITS2R (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) 用来扩增真菌内部转录区 (ITS) 的 ITS1 区域。PCR 反应程序为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 细菌 16S rRNA 27 个循环,真菌 ITS 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。对扩增产物进行纯化、定量和均一化,形成测序文库,由上海美吉生物医药科技有限公司通过 Illumina MiSeq 平台进行测序。

土壤样本尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*) 的丰度用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法测定,上游引物 FOC1 (CAGGGGATGTATGAGGAGGCT) 和下游引物 FOC2 (GTGACAGCGTCGTCTAGTTCC)^[19] 用来扩增 rRNA 内部转录区 (ITS)。PCR 反应程序为 95℃ 变性 10 min, 95℃ 退火 15 s, 60℃ 延伸 1 min, 40 个循环。

1.5 数据统计与分析

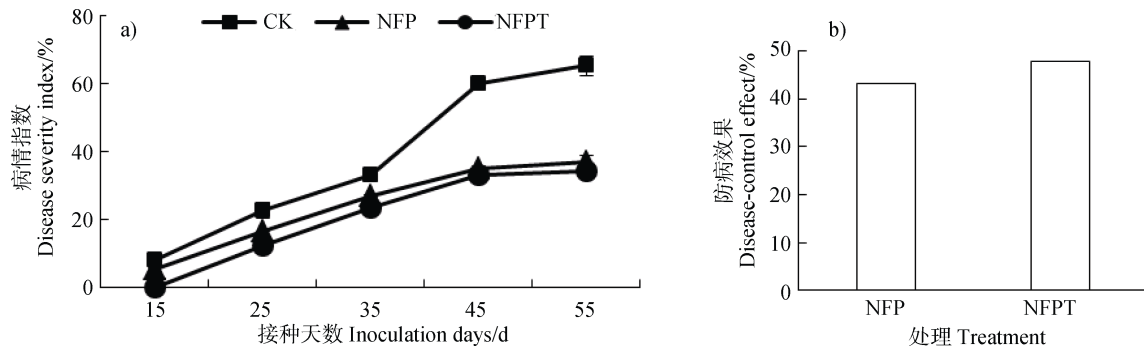
采用 SPSS 20.0 和 EXCEL 2007 软件进行数据处理。采用 Origin Pro 8.1 软件进行作图。对 Illumina Miseq 测序得到的原始细菌和真菌序列进行成对读长 (Paired-end reads, PE reads) 拼接、质控过滤和去除单序列、嵌合体;使用 UPARSE 软件对优化后的序列在 97% 的相似度水平下进行聚类得到分类操作单元 (OTU),采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并比对细菌 (Silva) 和真菌 (UNITE) 的分类学数据库对 OTU 进行分类学注释,统计各样本的群落组成。利用 MOTHUR (version v.1.30.1) 软件进行微生物阿尔法 (Alpha) 多样性指数的计算,包括 Sobs 指数、Chao1 指数、辛普森指数 (Simpson) 和覆盖度 Good's coverage 指数。利用 Qiime 软件计算 beta 多样性距离矩阵, R 语言进行主坐标分析 (PCoA) 分析和作图。利用 Qiime 软件进行 Mantel test 分析。利用 R (V2.15.3) pheatmap 工具包计算皮尔森 (Pearson) 相关系数。

2 结 果

2.1 复合菌剂对香蕉枯萎病防病效果和病原菌数量的影响

复合菌剂对香蕉枯萎病病情指数和防病效果的影响如图 1 所示。由图 1a) 可知,CK 处理病情指数在各个时期均最高。在接种病原菌后 15 d, CK 处理最先发病,其次是 NFP 处理。随着香蕉的生长,各处理病情指数均上升。接种 35 d 后,CK 处理病情指数迅速上升,至接种后 55 d, CK 处理病情指数高达 65%, 而 NFP 和 NFPT 处理病情指数增长缓慢且显著低于 CK 处理,较 CK 分别低 28% 和 31%。

将 CK 的防病效果指定为 0 时, NFP 和 NFPT 处理的防病效果分别为 43% 和 48% (图 1b))。



注：图中 CK 表示不施用生防菌剂，NFP 表示施用由非致病性尖孢镰刀菌和淡紫拟青霉菌按 1 : 1 比例复配而成的复合生防真菌制剂，NFPT 表示施用由非致病性尖孢镰刀菌、淡紫拟青霉菌和木霉菌按 9 : 9 : 4 的比例复配而成复合生防真菌制剂。下同。Note: CK stands for no application of biocontrol agent; NFP for application of a complex anti-fungal agent prepared by combining non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp. and *Purpureocillium* sp. in 1 : 1 ratio; and NFPT for application of a complex anti-fungal agents prepared by combining non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp., *Purpureocillium* sp. and *Trichoderma* sp. in 9 : 9 : 4 ratio. The same below.

图 1 复合菌剂对香蕉枯萎病病情指数和防病效果的影响

Fig. 1 Influences of the complex fungal agents on disease severity index of banana fusarium wilt disease and disease-control effects of the agents

由各处理病原菌 qPCR 分析结果可知 (图 2)，复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 病原菌数量显著低于 CK 处理 ($P < 0.05$)，其中复合菌剂 NFP 处理病原菌数量最低，较 CK 降低了 10.15%。以上结果表明，复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 香蕉枯萎病病情指数和病原菌数量均显著低于 CK 处理，对香蕉枯萎病的防效显著。

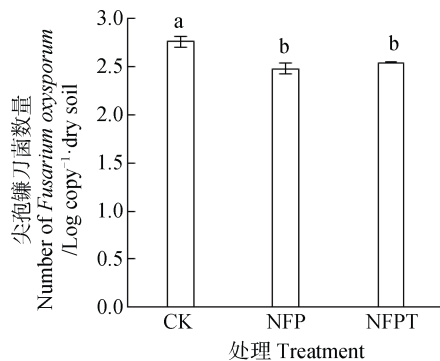


图 2 复合菌剂对病原菌尖孢镰刀菌 (Foc) 数量的影响

Fig. 2 Influences of the complex fungal agents on number of *Fusarium oxysporum* determined with qPCR relative to treatment

2.2 复合菌剂对土壤微生物多样性的影响

在去除短的、低质量的序列、单序列和嵌合体后，9 个样本共获得 244 105 条高质量 16S rRNA 序列和 556 075 条高质量 ITS 序列用于后续的群落分析。将每个样本的测序量按最小样本序列数 (细菌为 20 041 条序列、真菌为 41 942 条序列) 抽平至相同的测序深度后按照 97% 的相似性进行聚类，分别

得到 1 771 个细菌分类操作单元 (OTUs) 和 836 个真菌分类操作单元 (OTUs)。细菌和真菌的平均样本覆盖度 (Average Good's coverage) 分别为 98.5% 和 99.8%，并且细菌和真菌的稀释曲线渐趋平缓，这两者共同说明了对样本土壤微生物群落的测序数据达到饱和，能够覆盖样本中的绝大部分物种。

阿尔法多样性分析用来研究环境中微生物的多样性，通过单样本的阿尔法多样性分析反映微生物群落的丰富度和多样性。Sobs 和 Chao1 指数用来反映群落的丰富度，指数越大，表明物种总数越大。辛普森指数用来反映群落的多样性，辛普森值越大，说明群落多样性越低。由表 1 可以看出，与 CK 相比，NFPT 处理对土壤细菌丰度无显著性的影响，对真菌丰度提高有促进作用。复合菌剂 NFP 和 NFPT 处理后土壤真菌辛普森指数显著低于 CK 处理，说明施用复合菌剂可显著提高土壤中真菌群落多样性。

主坐标分析 (PCoA 分析，Principal co-ordinates analysis) 是一种非约束性的数据降维分析方法，可用 PCoA 分析来研究样本群落组成的相似性或差异性。基于 Bray-curtis 距离算法的主坐标分析结果表明，不同处理间土壤微生物群落结构差异明显 (图 3)。对细菌和真菌群落结构而言，不同处理间差异明显 (置换多元方差分析 PERMANOVA: 细菌, $R^2=0.256$, $P=0.001$; 真菌, $R^2=0.318$, $P=0.006$)。前两个主成分分别解释细菌和真菌群落总变异的 47.47% 和

表 1 不同处理土壤微生物群落的丰富度和多样性指数

Table 1 Richness and diversity index of the soil microbial community relative to treatment

处理 Treatment	细菌 Bacteria 16S			真菌 Fungus ITS		
	Sobs 指数	Chao1 指数	辛普森指数	Sobs 指数	Chao1 指数	辛普森指数
	Sobs index	Chao 1 index	Simpson index	Sobs index	Chao 1 index	Simpson index
CK	1 442±20a	1 647±30a	0.01±0a	370.0±4.0a	446.5±14.2a	0.15±0.00a
NFP	1 439±16a	1 651±5a	0.01±0a	404.3±57.0a	458.7±45.9a	0.08±0.02b
NFPT	1 453±3a	1 644±25a	0.01±0a	393.7±22.2a	455.85±20.0a	0.08±0.01b

注：表中数值均为均值±标准误，同列数值后小写字母不同表示处理间差异显著。Note: The values in the table were of mean± deviation. Different letters in the same column mean significant differences at the $P<0.05$ probability level according to ANOVA.

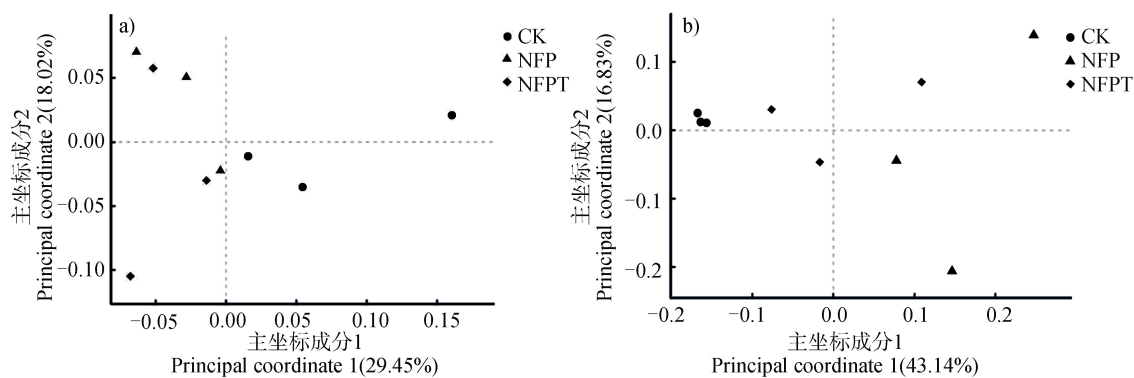


图 3 各处理基于 Bray-Curtis 距离的土壤微生物群落 (a) 细菌, b) 真菌) 相似性分析

Fig. 3 Similarity analysis of soil microbial communities (a) for Bacteria; and b) for Fungi) based on distance matrix calculated using the Bray-Curtis algorithm relative to treatment

59.97%。此外,第一主成分(PC1)是最重要的,且CK处理和复合菌剂处理(NFP和NFPT)细菌和真菌群落组成在第一主成分轴上(PC1)有显著差异,Bray-curtis距离矩阵在第一主成分轴上(PC1)对细菌和真菌群落组成差异的解释度分别为29.45%和43.14%。

各处理土壤细菌在门和属分类水平上相对丰度情况如图4a)和图4b)所示。由图4a)可知,各处理土壤细菌丰度前10优势菌门从高至低分别为变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteria、绿弯菌门 Chloroflexi、酸杆菌门 Acidobacteria、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、硝化螺旋菌门 Nitrospirae、拟杆菌门 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes、蓝细菌门 Cyanobacteria、Parcubacteria,大约占各处理土壤细菌总序列数的98%以上。由图4a)可以看出,与CK处理相比,施用复合菌剂处理(NFP和NFPT)对土壤细菌放线菌门 Actinobacteria、酸杆菌门 Acidobacteria、浮霉状菌门 Planctomycetes 丰度的提

高有促进作用。CK处理有较高的变形菌门 Proteobacteria、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、厚壁菌门 Firmicutes 相对丰度。由图4b)可以看出,各处理土壤细菌前5优势属分别为 *norank_c_Acidobacteria*、大理石雕菌属 *Marmoricola*、链霉菌属 *Streptomyces*、类诺卡氏菌属 *Nocardioides*、土微菌属 *Pedomicrobium*。与CK处理相比,施用复合菌剂处理(NFP和NFPT)有利于土壤细菌大理石雕菌属 *Marmoricola*、类诺卡氏菌属 *Nocardioides* 和德沃斯氏菌属 *Devosia* 相对丰度的提高。CK处理有较高的链霉菌属 *Streptomyces* 和土微菌属 *Pedomicrobium* 相对丰度。

各处理土壤真菌在门和属分类水平上相对丰度情况如图4c)和图4d)所示。由图4c)可以看出,各处理90%以上的土壤真菌序列属于子囊菌门 Ascomycota、接合菌门 Zygomycota、担子菌门 Basidiomycota。与CK处理相比,施用复合菌剂处理(NFP和NFPT)有利于增加土壤真菌接合菌门 Zygomycota、unclassified_k_Fungi、担子菌门

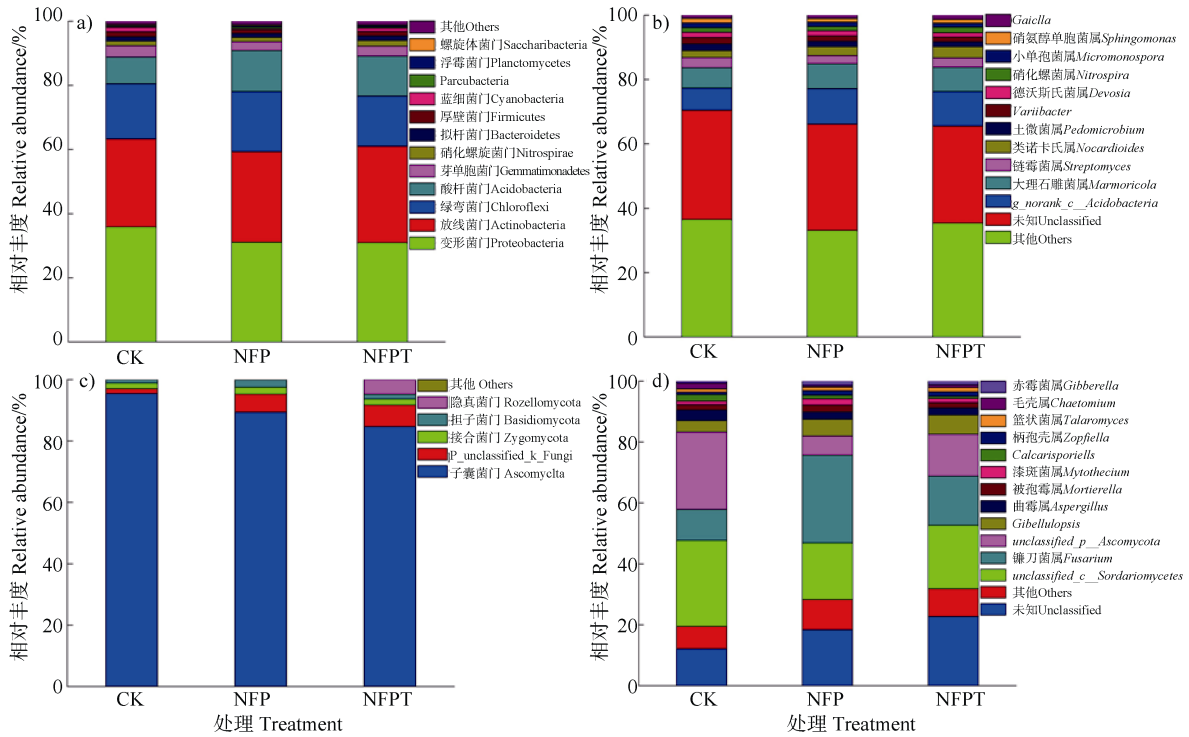


图 4 各处理土壤微生物 (a) 细菌门, b) 细菌属, c) 真菌门, d) 真菌属) 相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of soil microorganisms (a) for bacteria phylum, b) for bacteria genera, c) for fungi phylum and d) for fungi genera) relative to treatment

Basidiomycota 相对丰度, CK 处理有较高的子囊菌门 Ascomycota 相对丰度。由图 4d) 可以看出, 各处理土壤真菌前 5 优势属分别为 *unclassified_c_Sordariomycetes*、镰孢菌属 *Fusarium*、*unclassified_p_Ascomycota*、*Gibellulopsis* 属、曲霉属 *Aspergillus*。与 CK 处理相比, 施用复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 镰孢菌属 *Fusarium*、*Gibellulopsis* 属相对丰度明显升高, *unclassified_c_Sordariomycetes*、*unclassified_p_Ascomycota*、曲霉属 *Aspergillus*、

Calcarisporiella 属、毛壳菌属 *Chaetomium* 相对丰度明显下降。

由图 5a) 可知, 复合真菌制剂 NFP 处理拟青霉属 *Paecilomyces* 相对丰度在 3 个处理中最高, 但各处理间差异不显著; 复合真菌制剂 NFPT 处理木霉属 *Trichoderma* 相对丰度较 CK 处理高 (图 5b)), 但差异未达显著水平。此外, 由图 5c) 可以看出, 施用复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 镰孢菌属相对丰度高于 CK 处理, 但差异也未达到显著水平。

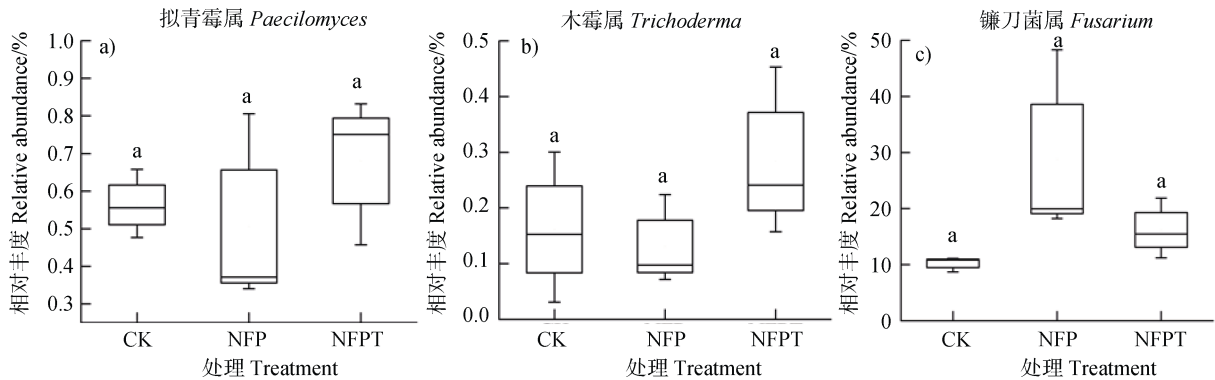


图 5 各处理中拟青霉属 *Paecilomyces* (a)、木霉属 *Trichoderma* (b) 和镰孢菌属 *Fusarium* (c) 相对丰度

Fig.5 Relative abundance of *Paecilomyces* (a) , *Trichoderma* (b) and *Fusarium* (c) genera relative to treatment

2.3 土壤微生物多样性与香蕉枯萎病的相关性

由 Mantel Test 分析可知, 土壤细菌和真菌群落组成与香蕉枯萎病病情指数显著相关 (细菌, $R=0.509$, $P=0.001$; 真菌, $R=0.370$, $P=0.035$)。由表 2 可知, 公认的与植物抑病相关的细菌门类相对丰度, 如拟杆菌门 Bacteroidetes 和放线菌门 Actinobacteria 与香蕉枯萎病病情指数呈负相关, 但

相关性不显著。包含多种丛枝菌根的球囊菌门 Glomeromycota 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数也无显著相关性。但是变形菌门 Proteobacteria、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、厚壁菌门 Firmicutes 和子囊菌门 Ascomycota 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著正相关, 酸杆菌门 Acidobacteria 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著负相关。

表 2 土壤细菌和真菌门相对丰度与香蕉枯萎病病情指数的皮尔森相关系数

Table 2 Pearson correlation coefficients between the abundances of selected phyla of bacteria and fungi and Fusarium wilt disease severity index

门 ^①	相对丰度 ^② /%	门 ^①	相关系数 ^③
变形菌门 Proteobacteria	32.60	变形菌门 Proteobacteria	0.854**
放线菌门 Actinobacteria	28.62	放线菌门 Actinobacteria	-0.379
绿弯菌门 Chloroflexi	17.23	绿弯菌门 Chloroflexi	0.039
酸杆菌门 Acidobacteria	11.20	酸杆菌门 Acidobacteria	-0.758*
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	3.111	芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	0.708*
硝化刺菌门 Nitrospirae	1.499	硝化刺菌门 Nitrospirae	-0.350
拟杆菌门 Bacteroidetes	1.383	拟杆菌门 Bacteroidetes	-0.131
厚壁菌门 Firmicutes	1.305	厚壁菌门 Firmicutes	0.703*
蓝细菌门 Cyanobacteria	0.961	蓝细菌门 Cyanobacteria	0.520
浮霉状菌门 Planctomycetes	0.369	浮霉状菌门 Planctomycetes	-0.605
子囊菌门 Ascomycota	89.85	子囊菌门 Ascomycota	0.664*
unclassified_k_Fungi	4.852	unclassified_k_Fungi	-0.633
结合菌门 Zygomycota	1.968	结合菌门 Zygomycota	-0.154
担子菌门 Basidiomycota	1.727	担子菌门 Basidiomycota	-0.372
球囊菌门 Glomeromycota	0.009	球囊菌门 Glomeromycota	-0.192

注: *表示相关性在 5% 水平差异显著; **表示相关性在 1% 水平差异显著。下同。Note: * indicates significant correlation at the 5% level; ** significant correlation at the 1% level. The same below. ①Phyla, ②Relative abundance, ③Correlation coefficient.

由表 3 可知, 细菌 *norank_f_Gemmatimonadaceae*、*Variibacter*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、芽孢杆菌属 *Bacillus* 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著正相关。真菌 *unclassified_c_Sordariomycetes*、曲霉菌属 *Aspergillus*、*Calcarisporiella*、*unclassified_p_Ascomycota*、毛壳菌属 *Chaetomium* 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著正相关。尽管公认的有益菌属如类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、木霉属 *Trichoderma* 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数相关性不显著, 一些潜在的生防属如 *norank_c_Acidobacteria*、大理石雕菌

属 *Marmoricola*、类诺卡氏菌属 *Nocardioides*、*norank_c_Gitt-GS-136*、*norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4*、*norank_f_Planctomycetaceae_DS-100* 属、野野村式菌属 *Nonomuraea*、*Gibellulopsis* 属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著负相关。有趣的是, 镰刀菌属 *Fusarium* 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数呈现负相关, 但相关性不显著。由图 5c) 可以看出, 复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 镰刀菌属相对丰度高于 CK 处理, 但差异未达到显著水平; 进一步的 qPCR 结果 (图 2) 显示复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 病原菌尖孢镰刀菌数量显著低于 CK 处理。

表 3 土壤细菌和真菌属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数的皮尔森相关系数

Table 3 Pearson correlation coefficients between the abundances of selected genera of bacteria and fungi and Fusarium wilt disease severity index

属 Genera	相对丰度 ^① /%	属 Genera	相关系数 ^②
<i>norank_c_Acidobacteria</i>	9.591	<i>norank_c_Acidobacteria</i>	-0.755*
大理石雕菌属 <i>Marmoricola</i>	7.187	大理石雕菌属 <i>Marmoricola</i>	-0.628*
类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	2.813	类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	-0.638*
<i>norank_f_Gemmatimonadaceae</i>	2.393	<i>norank_f_Gemmatimonadaceae</i>	0.784*
<i>Variibacter</i>	1.672	<i>Variibacter</i>	0.843**
鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	1.230	鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	0.749*
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.530	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	0.737*
<i>norank_c_Gitt-GS-136</i>	0.117	<i>norank_c_Gitt-GS-136</i>	-0.776*
<i>norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4</i>	0.216	<i>norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4</i>	-0.808**
<i>norank_f_Planctomycetaceae</i>	0.207	<i>norank_f_Planctomycetaceae</i>	-0.742*
<i>DS-100</i>	0.096	<i>DS-100</i>	-0.705*
野野村式菌属 <i>Nonomuraea</i>	0.057	野野村式菌属 <i>Nonomuraea</i>	-0.736*
类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	0.120	类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	0.279
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	2.830	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	0.407
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	18.42	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	-0.544
支顶孢属 <i>Acremonium</i>	0.157	支顶孢属 <i>Acremonium</i>	-0.308
链格孢属 <i>Alternaria</i>	0.031	链格孢属 <i>Alternaria</i>	-0.337
青霉菌属 <i>Penicillium</i>	0.619	青霉菌属 <i>Penicillium</i>	-0.261
<i>unclassified_c_Sordariomycetes</i>	22.52	<i>unclassified_c_Sordariomycetes</i>	0.749*
<i>unclassified_p_Ascomycota</i>	15.14	<i>unclassified_p_Ascomycota</i>	0.851**
<i>Gibellulopsis</i>	5.183	<i>Gibellulopsis</i>	-0.769*
<i>Calcarisporiella</i>	1.334	<i>Calcarisporiella</i>	0.752*
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	1.138	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	0.75*
曲霉菌属 <i>Aspergillus</i>	2.756	曲霉菌属 <i>Aspergillus</i>	0.737*
木霉属 <i>Trichoderma</i>	0.192	木霉属 <i>Trichoderma</i>	-0.287
拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	0.583	拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	-0.038

①Relative abundance, ②Correlation coefficient

3 讨 论

3.1 复合菌剂防治香蕉枯萎病的效果

香蕉枯萎病是香蕉生产过程中毁灭性的土传病害, 已引起世界各香蕉生产国的广泛关注, 生物防治是香蕉土传枯萎病防治的理想途径^[10]。本研究试图探究复合菌剂抑制香蕉枯萎病的可能机制。研究结果表明, 复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 香蕉

枯萎病病情指数显著低于 CK 处理 (图 1), 对香蕉枯萎病有较高的防效, 且病原菌 qPCR 结果显示, 复合菌剂 NFP 和 NFPT 处理病原菌数量显著低于 CK 处理 (图 2), 这与 Larkin 和 Fravel 等^[14]报道的多种拮抗菌混合施用能更好地防治番茄枯萎病的结果一致。

3.2 复合菌剂对根区土壤微生物多样性的影响

土壤微生物群落多样性是反映土壤健康的重要

指标, 土壤微生物群落是土壤生态系统持续发挥作用的重要媒介, 优化的土壤微生物结构对防治土传病害有积极的促进作用^[20]。本研究通过 Illumina MiSeq 平台进行细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 测序, 分析了土壤细菌和真菌群落多样性。采用绝对定量 PCR (qPCR) 分析了病原菌的数量。研究结果表明, 复合菌剂 NFP 和 NFPT 处理对土壤细菌和真菌群落丰富度的增加有促进作用, 且显著增加了真菌群落的多样性 (表 1), 且有研究^[21-22]表明更高的土壤微生物群落丰富度和多样性在提高土壤抗病性的过程中有重要的作用。本试验中施用复合菌剂 NFP 和 NFPT 后, 土壤微生物群落发生了显著的变化, 基于 Bray-curtis 距离矩阵的 PCoA 分析结果表明, 复合菌剂 NFP 和 NFPT 拥有结构上与 CK 处理明显不同的细菌和真菌群落 (图 3), 且 Mantel Test 分析结果表明土壤细菌和真菌群落组成与香蕉枯萎病病情指数显著相关 (细菌, $R=0.509$, $P=0.001$; 真菌, $R=0.370$, $P=0.035$; 表 2 和表 3), 说明土壤微生物群落结构差异可能是调控香蕉枯萎病发生的主要因子之一^[23]。综上所述, 在土壤中施入两种复合菌剂刺激了除功能菌外的某些相似的土壤微生物, 这些被刺激增长的土壤微生物可能会进一步影响土壤中微生物的相互作用且可能具有潜在的拮抗性, 从而帮助减少植物病害^[24]。

施用复合菌剂是塑造土壤微生物群落组成的主要因素。就细菌属水平上微生物组成的变化而言, 施用复合菌剂处理明显提高了放线菌门的大理石雕菌属 *Marmoricola*、类诺卡氏菌属 *Nocardioidea*、野野村式菌属 *Nonomuraea* 和酸杆菌门的 *norank_c_Acidobacteria*、*norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4*、*DS-100* 属相对丰度 (图 4), 且这些属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著负相关 (表 3), 表明这些属可能对香蕉枯萎病的抑制有重要作用。已有研究表明大理石雕菌属 *Marmoricola*、类诺卡氏菌属 *Nocardioidea*、野野村式菌属 *Nonomuraea* 能促进大豆、苜蓿等作物生物量的提高^[25], 提高作物抵抗病害的能力。本研究结果中酸杆菌门 *Acidobacteria* 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数呈显著负相关 (表 2), 这与 Sanguin 等^[26]研

究的抗病土壤有更高的酸杆菌门 *Acidobacteria* 丰度结果一致。本研究中酸杆菌门的 *norank_c_Acidobacteria*、*norank_f_Blastocatellaceae_Subgroup_4* 和 *DS-100* 属相对丰度与抗病性呈显著负相关 (表 3), 但是它们的抗病机制尚不清楚。已有研究表明, 芽孢杆菌属 *Bacillus* 能抑制某些作物的土传病害^[27], 但是在本研究中, *Bacillus* 相对丰度与香蕉枯萎病病情指数正相关 (表 3), 这可能是因为土壤酶活性、土壤物理化学性质等土壤性质的改变会影响微生物群落, 从而影响作物与有益微生物间的相互关系^[28]。施用复合菌剂也改变了真菌群落结构组成。本研究中, 子囊菌门 *Ascomycota* 和结合菌门 *Zygomycota* 在所有样本中相对丰度最高 (图 4c)。此外, 使用复合菌剂降低了子囊菌门 *Ascomycota* 相对丰度, 且子囊菌门相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著正相关 (表 3)。已有研究表明子囊菌门中包含一些致病菌^[29], 且香蕉根际子囊菌门相对丰度的降低与抑制香蕉枯萎病关系密切^[30]。在真菌属水平上, 施用复合菌剂显著提高了 *Gibellulopsis* 属相对丰度, 且 *Gibellulopsis* 属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著负相关 ($R=-0.769$) (表 3)。*Gibellulopsis* 是子囊菌门一个新提出的属^[31], 尚无其与枯萎病关系的相关报道。本研究中施用复合菌剂降低了毛壳菌属 *Chaetomium* 和曲霉属 *Aspergillus* 相对丰度, 且毛壳菌属和曲霉属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数显著正相关 (表 3)。据报道, 毛壳菌属与棉花黄萎病发生程度呈正相关^[32]。且研究表明西瓜连作后, 以曲霉属等为主的真菌数量大幅增加, 导致连作西瓜易发病^[33]。

3.3 复合菌剂防治香蕉枯萎病的可能机制

本文的研究结果表明, 复合菌剂 (NFP 和 NFPT) 中的功能菌 (non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp., *Paecilomyces* sp. 和 *Trichoderma* sp.) 在土壤中生存能力有限, 对香蕉枯萎病病原菌直接的抑制作用很小, 其抗病的机理可能为: 引入土壤中的功能菌可能是作为关键群落成员, 刺激了土著有益微生物中其他潜在的拮抗物种, 增加了土壤微生物多样性, 改变了土壤细菌和真菌群落结构, 这种生物防治相互作用的复杂关系说明疾病抑制通常是一个复杂的现象, 复杂的微生物群落可能对抑病有决定性作用^[34]。研究表明, 在抗病性土壤中, 因为非致病性尖孢镰刀菌和致病性尖孢镰刀菌的相互作用导致

了土壤的抗病性; 非致病性尖孢镰刀菌和致病性尖孢镰刀菌区别在于, 非致病性尖孢镰刀菌从根部侵入后并不会继续侵入维管系统导致植物发病^[8]。在接种病原菌前接种的非致病性尖孢镰刀菌 (non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp.) 可能会和病原菌抢占根表有限的侵染位点^[35]; 同时施入土壤中的木霉菌 (*Trichoderma* sp.) 因其强大的繁殖和养分吸收能力可能会使其与病原菌争夺有限的养分和空间^[16], 制约了病原菌的生长与繁殖; 施入土壤中的生防真菌淡紫拟青霉菌 (*Paecilomyces* sp.) 对植物寄生的根结线虫有一定的生防效果, 减少了根结线虫对植物根系的损伤^[36], 从而减少了病原菌的侵染。这些机制相互作用, 相互协同, 对提高复合菌剂的生防效果可能有积极的促进作用。

本文中另一个想探讨的问题是接入土壤中的功能菌 (non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp., *Paecilomyces* sp. 和 *Trichoderma* sp.) 是否会对香蕉枯萎病病原菌产生直接的抑制作用? 尽管复合真菌制剂 NFPT 处理木霉属 *Trichoderma* 相对丰度较 CK 处理高 (图 5b), 但是木霉属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数未达到显著的负相关 (表 3)。此外, 复合真菌制剂 NFP 处理拟青霉属 *Paecilomyces* 相对丰度在 3 个处理中最高 (图 5a), 但是 *Paecilomyces* 属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数也未达到显著的负相关 (表 3)。本研究中复合菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 镰刀菌属相对丰度高于 CK 处理, 但差异未达到显著水平 (图 5c), 镰刀菌属相对丰度与香蕉枯萎病病情指数呈负相关 (未达到显著水平), 且病原菌尖孢镰刀菌的 qPCR 分析结果表明复合真菌菌剂处理 (NFP 和 NFPT) 病原菌尖孢镰刀菌数量显著低于 CK 处理 (图 2), 但是由于 Illumina MiSeq 平台测序长度的限制, 测序结果不能在物种级别上进行详细的分类特征描述, 因此难以区分致病性尖孢镰刀菌和非致病性尖孢镰刀菌。综上所述, 本研究结果表明, 引入土壤中的微生物 (非致病性尖孢镰刀菌 Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* sp.、木霉菌 *Trichoderma* sp. 和淡紫拟青霉菌 *Paecilomyces* sp.) 在盆栽土壤中生存能力有限, 并且它们的丰度对 *F. oxysporum* 丰度和防治香蕉枯萎病的直接影响很小, 并不对病原菌产生直接的拮抗作用。

本试验通过两季的盆栽试验, 利用对细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 区域的高通量测序, 研究了

复合真菌制剂对香蕉枯萎病的防治效果及其机理。但是由于 16S rRNA 和 ITS 测序仅能开展在菌属层面的分析, 因此, 后续试验将通过宏基因组和转录组等分子生物学手段进一步探索影响香蕉枯萎病发生的关键菌种及其功能基因, 为防治香蕉枯萎病提供理论依据。本研究所得结果基于盆栽试验, 需要进一步在田间试验中验证, 然后再应用于生产。

4 结 论

基于盆栽研究结果表明, 施用复合真菌制剂显著降低了香蕉枯萎病的病情指数, 能有效防治香蕉枯萎病; 施用复合真菌制剂提高了细菌和真菌丰富度和多样性, 改变了细菌和真菌群落结构; 加入土壤中的生防真菌菌株在发挥其拮抗作用的同时刺激了土壤自身潜在的有益微生物种群, 与之协同作用, 提高了复合真菌制剂对香蕉枯萎病的防治效果。

参考文献 (References)

- [1] Ploetz R C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense[J]. Phytopathology, 2006, 96 (6): 653—656.
- [2] Dita M A, Waalwijk C, Buddenhagen I W, et al. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana Fusarium wilt pathogen[J]. Plant Pathology, 2010, 59 (2): 348—357.
- [3] Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, et al. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana[J]. Crop Protection, 2007, 26 (4): 697—705.
- [4] Stover R H. Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other Musa species[J]. Transactions British Mycological Society, 1962, 45 (4): 589—595.
- [5] Hwang S C, Ko W H. Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan[J]. Plant Disease, 2004, 88 (6): 580—588.
- [6] Blok W J, Lamers J G, Termorshuizen A J, et al. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping[J]. Phytopathology, 2000, 90 (3): 253—259.
- [7] Viljoen A. The status of fusarium wilt (Panama disease) of banana in South Africa[J]. South African Journal of Science, 2002, 98 (7/8): 341—344.
- [8] Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol[J]. New Phytologist, 2003, 157 (3): 493—502.

- [9] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52 (s1): 487—511.
- [10] Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, et al. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana[J]. *Plant Pathology*, 2006, 55 (2): 217—223.
- [11] Thangavelu R, Palaniswami A, Velazhahan R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2004, 103 (1): 259—263.
- [12] Lan X J, Zhang J, Zong Z F, et al. Evaluation of the biocontrol potential of *Purpureocillium lilacinum* QLP12 against *Verticillium dahliae* in eggplant[J]. *BioMed Research International*, 2017, Article 4101357.
- [13] Handelsman J, Stabb E V. Biocontrol of soilborne plant pathogens[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(10): 1855—1869.
- [14] Larkin R P, Fravel D R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato[J]. *Plant Disease*, 1998, 82 (9): 1022—1028.
- [15] Belgrove A, Steinberg C, Viljoen A. Evaluation of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and *Pseudomonas fluorescens* for Panama disease control[J]. *Plant Disease*, 2011, 95 (8): 951—959.
- [16] Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti E L, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (1): 1—10.
- [17] Benitez T, Rincon A M, Limon M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains[J]. *International Microbiology*, 2004, 7 (4): 249—260.
- [18] Carlier J. Global evaluation of *Musa germplasm* for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases nematodes[C]. Rome: Bioversity International, 2003.
- [19] Lin Y H, Chang J Y, Liu E T, et al. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 123 (3): 353—365.
- [20] Xue C, Huang Q W, Ling N, et al. Analysis, regulation and high-throughput sequencing of soil microflora in mono-cropping system[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48 (3): 612—618. [薛超, 黄启为, 凌宁, 等. 连作土壤微生物区系分析、调控及高通量研究方法[J]. *土壤学报*, 2011, 48 (3): 612—618.]
- [21] de Boer M, Bom P, Kindt F, et al. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms[J]. *Phytopathology*, 2003, 93 (5): 626—632.
- [22] Elsas V J D, Garbeva P, Salles J. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens[J]. *Biodegradation*, 2002, 13 (1): 29—40.
- [23] Zhu F Y, Tian C, Zhang Y, et al. Effects of different fertilization treatments on soil microbial community structure and the occurrence of watermelon wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2018, 34 (4): 589—597. [朱菲莹, 田程, 张屹, 等. 不同施肥处理对土壤微生物群落结构及西瓜枯萎病发生的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34 (4): 589—597.]
- [24] Akhtar M, Malik A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic *Nematodes*: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74 (1): 35—47.
- [25] Xiao X. The structure, variation and influence factors of leguminous plant rhizosphere and nodule endosphere microbiome[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2017. [肖潇. 豆科植物根际和根瘤内生细菌群落结构、变化规律及其影响因素研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.]
- [26] Sanguin H, Sarniguet A, Gazengel K, et al. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture[J]. *New Phytologist*, 2009, 184 (3): 694—707.
- [27] Wang B B, Shen Z Z, Zhang F G, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* strain W₁₉ can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions[J]. *Pedosphere*, 2016, 26 (5): 733—744.
- [28] Shi L, Du N S, Shu S, et al. *Paenibacillus polymyxa* NSY₅₀ suppresses *Fusarium* wilt in cucumbers by regulating the rhizospheric microbial community[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: Article 41234.
- [29] Sprague S J, Watt M, Kirkegaard J A, et al. Pathways of infection of *Brassica napus* roots by *Leptosphaeria maculans*[J]. *New Phytologist*, 2007, 176(1): 211—222.
- [30] Shen Z Z, Ruan Y Z, Chao X, et al. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51 (5): 553—562.
- [31] Zare R, Gams W, Starink-Willemse M, et al. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musicillum*, a new genus for *V. theobromae*[J]. *Nova Hedwigia*, 2007, 85 (3): 463—489.
- [32] Liu H Y. Diversity of the microbial communities in cotton field soil and roots infected by *Verticillium dahliae* in Xinjiang[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018. [刘海洋. 新疆棉花黄萎病田土壤与病株根部微生物群落多样性分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.]

- [33] Wang H. Effect of dazomet and sodium hypochlorite on soil microflora and growth and development of watermelon in continues growing plastic channel[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2014. [王缓. 棉隆和次氯酸钠土壤处理对设施连作西瓜生长发育及土壤微生物区系的影响[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2014.]
- [34] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 2011, 332 (6033): 1097—1100.
- [35] Mandeel Q. Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*[J]. *Phytopathology*, 1991, 81 (4): 462—469.
- [36] Patil J, Goel S R, Yadav S. Bio-management of cucumber wilt complex caused by root-knot nematode , *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in polyhouse under protected cultivation[J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2017, 11(4): 1909—1917.

(责任编辑: 陈荣府)