

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(8):842–851; 4 August 2013  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

# 施用拮抗菌饼肥发酵液和土壤消毒剂对香蕉枯萎病区土壤细菌群落的影响

周登博<sup>1,2</sup>, 井涛<sup>2</sup>, 谭昕<sup>2</sup>, 陈波<sup>2,3</sup>, 张锡炎<sup>1,2\*</sup>, 高祝芬<sup>2</sup>

<sup>1</sup>海南大学园艺园林学院, 海口 571737

<sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101

<sup>3</sup>海南大学资源与植物保护学院, 海口 571737

**摘要:**【目的】探明施用拮抗菌饼肥发酵液与土壤消毒剂对香蕉枯萎病的防控效果及对土壤微生物的影响。【方法】在大田栽培条件下, 采用 Biolog 和 T-RFLP 的方法研究了各处理在不同时期土壤微生物细菌的功能多样性及群落特征。【结果】结果表明, 施用拮抗菌饼肥发酵液和土壤消毒剂均显著降低了香蕉枯萎病的病情指数, 以两者配合施用防病效果最高, 达 60.82%。Biolog Eco 微平板研究发现, 施用拮抗菌饼肥发酵液可提高土壤微生物的 AWCD 及种群均匀度, 施用土壤消毒剂显著降低了土壤微生物种群的丰富度和均匀度; 主成分分析表明, 土壤微生物利用碳源的种类在香蕉整个生长季呈增加的趋势, 其前期主要利用碳源为氨基酸类、羧酸类、双亲化合物、糖类, 后期主要增加了羧酸类和双亲化合物类碳源。T-RFLP 分析土壤细菌多样性发现, 施用拮抗菌饼肥发酵液处理的细菌 TRFs 片段最高, 分析优势种群发现, 增加的种类主要有黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 等。【结论】拮抗菌饼肥发酵液配合土壤消毒剂施用, 可在降低土壤中病原菌的基础上, 增加土壤拮抗微生物的种类, 提高土壤微生物细菌的多样性, 改善土壤微生物生态结构, 最终达到提高香蕉枯萎病防病效果的目的。

**关键词:**香蕉枯萎病, 发酵液, 土壤消毒剂, 土壤微生物群落, Biolog, T-RFLP

**中图分类号:**X172      **文献标识码:**A      **文章编号:**0001-6209(2013)08-0842-10

香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*, FOC) 病原真菌引起的毁灭性土传病害<sup>[1]</sup>, 发病蕉园发病率一般在 30%–50%, 重病区可达 90% 以上, 是香蕉生产上的一个主要限制因子。生物防治是目前公认的比较安全和有效的防治措施<sup>[2]</sup>, 国内外关于香蕉枯萎病生物防治的研究刚起步, 主要集中于拮抗菌的筛选及室内盆栽试验<sup>[3]</sup>, 研究表明, 每种植物都有自

己独特的根际微生物区系, 增加有机碳源的多样性, 可促进土壤微生物多样性的恢复<sup>[4–6]</sup>, 有利于抑制病原菌种群数量的增长, 从而克服或缓解土传病害的危害<sup>[7–8]</sup>。研究表明, 将有机饼肥发酵制成液体肥料并应用于水果、蔬菜、花卉等经济作物, 具有显著的增产和防病作用<sup>[9–10]</sup>。国外有研究者将生防菌与印楝饼渣结合使用<sup>[11–13]</sup>, 但是应用复合拮抗菌的饼肥发酵液防控香蕉枯萎病的研究很少, 特别是

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-32)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-898-66986409; E-mail: zhangxiyan@itbb.org.cn

作者简介:周登博(1982–), 女, 山东德州人, 博士研究生, 主要从事病虫害综合防控技术与机理研究。E-mail: zhou dengbo-2001@163.com

收稿日期:2012-12-16; 修回日期:2013-05-05

大田土壤条件下,外源微生物或者栽培措施对土壤微生物群落影响研究至今未见报道。

Biolog 技术是一种研究微生物群落功能多样性较新的方法,它通过测定微生物对单一碳源的利用程度,来反映微生物群落的功能多样性<sup>[10]</sup>,进而有效地评价微生物群落结构<sup>[11]</sup>。T-RFLP 技术是将 RFLP 技术和荧光标记技术相结合后发展的一种较先进的分子生态学方法,由 Liu<sup>[14]</sup>等于 1997 年首次应用于微生物群落多样性的研究,目前该技术已成功的应用于多种微生物群落多样性研究中<sup>[1-16]</sup>。研究表明土壤微生物细菌功能多样性和防病效果有一定相关关系<sup>[17-18]</sup>,本文应用 Biolog 微平板和 T-RFLP 相结合的方法,通过对大田环境下,施用拈抗菌饼肥发酵液后植株根围土壤微生物进行连续的跟踪分析,以期从土壤微生物生态角度揭示拈抗菌饼肥发酵液对香蕉枯萎病的防控机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试香蕉:**巴西蕉 (*Musa acuminata* AAA Cavendish cv. Brazil),二级苗,购自中国热带农业科学院组培中心。

**1.1.2 拈抗菌:**4-L-16、A2、A3 均保存于本实验室,经鉴定分别为甲基营养型芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌。

**1.1.3 饼肥发酵液:**将饼肥和红糖混合并采用本实验室的方法发酵 7 d 后,加入以上 3 种拈抗菌(与饼肥发酵液的比列分别为 1:1:1:10),再发酵 14 d,得到所需的拈抗菌饼肥发酵液,经检测其拈抗菌的含量为  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL,全氮含量为 1.07 mg/mL。饼肥和红糖均购自海口市粮油综合批发市场。

**1.1.4 土壤消毒剂:**二氧化氯 ( $\text{ClO}_2$ ),购自天津某公司。

**1.1.5 供试土壤:**试验在海南省临高县南宝镇新营农场进行,该地块上 1 年香蕉枯萎病发病率为 65%,土壤质地为少砾质粉壤土,其理化性状为:pH5.35,有机质含量 13.7 g/kg,全氮 (N) 0.877 g/kg,碱解氮 (N) 含量为 88.9 mg/kg,有效磷 (P) 含量为 305.6 mg/kg,速效钾 (K) 含量为 117.5 mg/kg。

### 1.2 试验设计

试验时间为 2011 年 12 月至 2012 年 7 月,设 4

个处理:(1)CK,不进行土壤消毒,不施用发酵液;(2)FB,不进行土壤消毒,施用发酵菌液;(3)FB + SD,土壤消毒,施用发酵菌液;(4)SD,土壤消毒,不施用发酵菌液。各处理随机排列,重复 3 次。小区面积为 333 m<sup>2</sup>,种植密度为 136 株/亩,蕉苗移栽前翻耕试验地。发酵液施用方法,从幼苗期(7-8 片叶)起,每隔 15 d 灌根施入稀释 50 倍的拈抗菌饼肥发酵液,每株香蕉 1000 mL,直至收获;消毒剂的施用方法,分别于蕉苗移栽前 10 d、移栽后 30 d 和 60 d,喷灌 1000 倍的消毒剂稀释液对土壤消毒;FB + SD 处理于施入发酵液前 7 d 进行土壤消毒。其它栽培管理措施相同。

### 1.3 取样方法

蕉苗移栽前 12 月 10 日,各处理分别 5 点随机取样分析基础数据,在施入发酵液后,自 2012 年 1 月 10 日起,每隔 30 d 取样一次,生育期共连续取样 6 次。取土范围:0 cm-30 cm 根围土壤;取土方式:每小区 5 点随机取样,充分混合后将土样放于 -20℃ 保存,备测。

### 1.4 分析方法

**1.4.1 香蕉枯萎病发病情况统计:**最后一次取样时,调查各处理发病植株数,记录每株香蕉黄化叶片和正常叶片数并计算病情指数。香蕉病情指数及防病效果的计算参考张志宏<sup>[19]</sup>方法。

**1.4.2 土壤细菌 Biolog Eco 微平板分析:**Eco 板的接种液制备方法参考 Choi<sup>[20]</sup>方法,并于 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 时,用酶标仪在 590 nm 下测定光密度值。选取 72 h 的数据进行多样性指数的计算和主成分分析。多样性指数计算方法如下<sup>[20-22]</sup>:

平均颜色变化率 (average well color development, 简称 AWCD) 为利用碳源总能力的重要指标,  $AWCD = \sum (Ci - R)/n$ , 其中  $Ci$  为测定的第  $i$  个碳源的光密度值,  $R$  为对照孔光密度值,  $n$  为 31, 即培养基的碳源种类数目。Shannon 指数用于评估微生物种群丰富度,  $H' = - \sum Pi \cdot \ln(Pi)$ , 其中  $Pi$  为第  $i$  孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比值。Simpson 指数用于评估土壤微生物群落优势度,  $D = 1 - \sum (Pi)^2$ , 其中  $Pi$  为第  $i$  孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比值。Mc Intosh 指数用于评估土壤微生物群落的均匀度,

$U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$ , 其中  $n_i$  为第  $i$  孔的相对吸光值。

**1.4.3 土壤细菌 T-RFLP 分析:**土壤总 DNA 的提取采用 Biotech 试剂盒。用细菌 16S rRNA 序列保守引物扩增土壤细菌 16S rRNA,正向引物 8-27:f (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3')和反向引物 1507-1492r;(5'-ACGGT-TACCTTG TTACGACTT-3'),正向引物 5'端用 6-FAM 标记。PCR 反应体系和程序参照董萍的方法<sup>[23]</sup>并稍加改进,采用 50μL 反应体系:上下游引物各 1.5 μL,DNA 模板 1μL,2 × Taq PCR Master Mix25.0 μL。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 50 s,52℃ 50 s,72℃ 1 min 45 s,33 个循环。PCR 产物用 *MSPI* 37℃ 酶切,每 50 μL 酶切体系中,加入 PCR 产物 35 μL,限制性内切酶 1.2 μL、缓冲液 4 μL。酶切产物脱盐处理、基因扫描由上海生工基因公司完成。

**1.4.4 数据处理与统计分析:**采用末端限制性片段 (terminal restriction fragments, TRFs) 长度在 50 – 500 bp 范围内,荧光高度 ≥50 的峰数据进行分析,其结果由 Peak scanner software-v1.0 软件输出<sup>[24]</sup>,通过网站 (<http://trflp.limnology.wise.edu/index.jsp>)检索每个 TRF 片段可能代表的微生物类群,并计算各处理中每个片段的相对丰度,计算公式<sup>[25]</sup>为:  $A_i = n_i/N \times 100\%$ , 其中  $A_i$  表示片段  $i$  相对面积,  $n_i$  表示片段图谱面积,  $N$  表示  $i$  所在 T-RFLP 图谱总面积。

数据统计分析利用 SPSS19.0 和 Microsoft Excel 2003 完成。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同处理对香蕉枯萎病防病效果的影响

不同处理对香蕉枯萎病情指数和发病率的影响存在差异。由表 1 可以看出,CK 处理的发病率和病情指数最高,显著高于施用发酵液处理。其它 3 个处理间的发病率差异不显著,但 FB + SD 处理的病情指数显著低于 FB 和 SD 处理。FB + SD、FB 和 SD 处理的防病效果分别为 60.82%、44.69% 和 34.67%,可见,施用拮抗菌饼肥发酵液与使用消毒剂处理土壤对香蕉枯萎病均有一定的防病效果,但拮抗菌发酵液与消毒剂配合使用能有效提高防病效果。

表 1. 不同处理对香蕉枯萎病的防控效果

Table 1. Effect of different treatments on banana wilt disease

Treatment	Incidence of the disease/%	Disease index	Control effect/%
CK	33.57 ± 2.06 a	19.42 ± 1.54 a	
FB	28.23 ± 0.41 b	10.74 ± 1.11 b	44.69
FB + SD	26.97 ± 4.25 b	7.61 ± 1.76 c	60.82
SD	31.24 ± 1.18 ab	12.69 ± 0.83 b	34.67

Different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level.

### 2.2 不同处理对土壤微生物 AWCD 值的影响

平均颜色变化率 (average well color development, AWCD) 可以反映土壤微生物活群落对碳源利用的总能力和功能多样性,是微生物整体活性的一个重要指标<sup>[24]</sup>。由于大田中不同田块微生物结构往往差异较大,因此本文采用随机区组排列 3 次重复的设计,尽量避免和减少由田块微生物结构差异对结果造成的影响。由图 1 可以看出,随香蕉生育时期的延长,各处理的 AWCD 总体表现为先升高后降低的趋势;FB 和 FB + SD 处理的 AWCD 始终高于其它 2 个处理;SD 处理只在 1 月时的 AWCD 高于 CK 处理,其它时期均显著低于 CK 处理;FB + SD 与 CK 处理在 5 月和 6 月的 AWCD 值比较接近。由此可见,施用拮抗菌饼肥发酵液可以提高土壤微生物对碳源的利用能力,提高微生物的总体活性,而仅施用土壤消毒剂则降低了土壤微生物的总体活性。

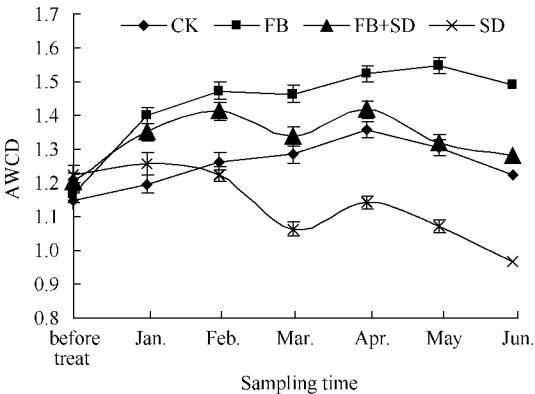


图 1. 不同处理随时间变化 AWCD 值的变化

Figure 1. AWCD changes with different sampling time in different treatments.

### 2.3 不同处理对土壤微生物细菌功能多样性的影响

土壤微生物群落功能可以用各种多样性指数表示。Shannon 指数反映土壤中微生物种群丰富度;

Simpson 指数反映土壤微生物群落优势度;McIntosh 指数则反映土壤微生物群落的均匀度。如表 2 Before treatment 部分所示,蕉苗移栽前各处理的多样性指数无明显差异,各处理之间的土壤微生物群落较一致;发酵液处理后 6 月份土壤微生物在培养 72 h 后的多样性指数见表 2 After treatment 部分。结果表明,4 个处理的 Simpson 指数无显著差异,即

4 个处理土壤微生物的种群优势度无显著差异;CK 和 FB 处理的 Shannon 指数显著高于 FB + SD 和 SD 处理,表明土壤消毒可显著降低土壤微生物种群丰富度;各处理的 McIntosh 指数差异显著,表现为 FB > FB + SD > CK > SD,可见施用饼肥发酵液可显著提高土壤微生物的均匀度,而进行土壤消毒会显著降低土壤微生物均匀度。

表 2. 不同处理的土壤微生物功能多样性指数  
Table 2. Microbial diversity index in different treatments

Treat	Before treatment			After treatment		
	Shannon	Simpson	Mcintosh	Shannon	Simpson	Mcintosh
	index	index	index	index	index	index
CK	3.267 ± 0.074a	0.961 ± 0.002a	8.1 ± 0.290a	3.328 ± 0.008a	0.959 ± 0.002a	7.412 ± 0.142c
FB	3.318 ± 0.006a	0.962 ± 0.001a	8.442 ± 0.162a	3.336 ± 0.007a	0.963 ± 0.004a	8.889 ± 0.171a
FB + SD	3.327 ± 0.009a	0.962 ± 0.001a	8.220 ± 0.160a	3.242 ± 0.052b	0.958 ± 0.010a	7.919 ± 0.143b
SD	3.324 ± 0.007a	0.963 ± 0.002a	8.049 ± 0.213a	3.209 ± 0.055b	0.954 ± 0.014a	6.241 ± 0.120d

Different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level.

2.4 不同处理土壤微生物群落碳源利用功能的主成分分析

利用培养 72h 后的 AWCD 值,采取降维法对 1 月和 6 月的土壤微生物群落功能进行主成分分析 (PCA)。由图 2 可知,1 月份的 4 个处理处于坐标轴的 4 个象限,其中 CK、SD、FB 和 FB + SD 处理分别处于第一、二、三、四象限;而 6 月份的 4 个处理同样处于坐标轴的 4 个象限,其中 FB、SD、CK 和 FB + SD 处理分别处于第一、二、三、四象限。由此可见,PC1、PC2 基本上能够区分各月份中不同处理间土壤微生物群落的代谢特征。

由 PCA 中提取的 1 月份和 6 月份与土壤微生物碳源利用功能多样性相关的 PC1、PC2 累计贡献率分别为 83.44% 和 87.92%,均可解释各自变异的绝大部分信息(图 2)。考察 PCA 的相关性矩阵可知,不同月份与 PC1 和 PC2 具有较高相关系数的碳源见表 3。在 1 月份时,对 PC1 贡献率大的碳源共有 11 种,分别属于胺类(2 种)、氨基酸类(4 种)、聚合物类(1 种)、双亲化合物(1 种)、糖类(3 种),对 PC2 贡献率大的碳源有 3 种,分别属于羧酸类(2 种)、聚合物类(1 种)、双亲化合物(1 种);而在 6 月份时,对 PC1 贡献率大的碳源共有 17 种,分别属于胺类(2 种)、氨基酸类(4 种)、羧酸类(5 种)、聚合物类(1 种)、双亲化合物(2 种)、糖类(3 种),对 PC2 贡献率大的碳源仅 1 种,为糖类。可见,随着时间的推移,香蕉土壤微生物利用碳源的种类呈增加

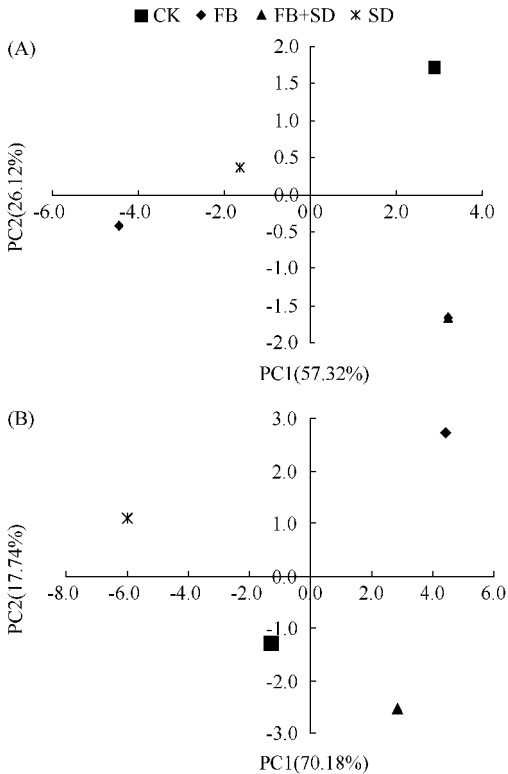


图 2. 不同处理随时间变化土壤微生物群落碳源利用的主成分分析  
Figure 2. Principal components analysis of carbon utilization of soil microbial communities under different treatments with different time period. A: January; B: June.

的趋势,主要体现在增加了羧酸类和双亲化合物类碳源。

表 3. 不同月份土壤中与 PC1 和 PC2 相关的主要碳源

Table 3. Main carbon resources of microbial utilization to PC1 and PC2 in different month

January				June			
PC1	r	PC2	r	PC1	r	PC2	r
Amine		Carboxylic acids		Amine		Saccharides	
Phenylethylamine	0.97	D-Galacturonic acid	-0.99	Phenylethylamine	0.87	β-Methyl-D-Glucoside	0.84
Putrescine	0.97	Itaconic acid	0.86	Putrescine	0.95		
Amino acids		Polymer		Amino acids			
L-Arginine	0.99	Tween 40	0.97	L-Arginine	0.95		
L-Serine	0.94	Amphiphilic compounds		L-Phenylalanine	0.91		
Carboxylic acids		Phosphoglycerol	-0.85	L-Serine	0.99		
4-hydroxybenzoic acid	0.95			Glycyl-L-Glutamic acid	0.98		
Polymer				Carboxylic acids			
Glycogen	0.98			4-Hydroxybenzoic acid	0.98		
Amphiphilic compounds				γ-Hydroxybutyric acid	0.93		
Methyl pyruvate	0.95			Itaconic acid	0.99		
Saccharides				α-ketobutyric acid	0.89		
i-Erythritol	0.92			D-Malic acid	0.94		
D-Mannitol	0.98			Polymer			
Lactose	0.94			Tween 40	0.95		
				Amphiphilic compounds			
				α-D-Glucose-1-Phosphoric acid	0.91		
				Methyl pyruvate	0.99		
				saccharides			
				i-Erythritol	0.90		
				D-Mannitol	0.94		
				D-Cellulobiose	0.95		

2.5 不同处理对土壤细菌 DNA 多样性的影响

*Msp*I 酶切后图谱上每个 TRFs 至少代表 1 种细菌,条带数量反映土壤细菌种类多寡,峰面积大小反映相对含量。发酵液处理前相对丰度大于 1% 的 TRFs 数量 CK 为 23 条,FB 为 24 条,FB + SD 为 24 条,SD 为 23 条,表明发酵液处理前各处理样品的细菌群落较一致,这与 Biolog 的多样性结果一致。发酵液处理后 6 月份各处理的土壤 DNA 数据表明,相对丰度大于 1% 的 TRFs 数量,CK 为 24 条,FB 为 31 条,FB + SD 为 28 条,SD 为 26 条,说明 FB 处理的细菌种类最多,FB + SD 次之,CK 最少;将不同片段按照相对丰度大小比较,如图 3 所示,处理前和处理后小于 250 bp 的 TRFs 相对丰度均最大,表明大部分土壤细菌的 TRFs 片段集中在此位置,结果与前人研究的结果类似<sup>[25,28]</sup>。发酵液处理前各处理不同片段的相对丰度基本一致,而发酵液处理后 FB 和 FB + SD 处理中 300 – 350 bp 和大于 500bp 的 TRFs 片段相对其它 2 个处理较多,可能与施入拮抗菌饼肥发酵液导致某些种类的微生物的生长和繁殖有关。

2.6 不同处理间土壤微生物优势种群比较

比较不同处理土壤的优势种群,如表 4 所示,处理前即蕉苗移栽前,各处理的优势种群种类比较一致主要集中在二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、海洋螺菌属(*Oceanospirillum*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)等几大类群。处理后,各处理的的优势种群均有不同程度的增加,其中以 FB 和 FB + SD 处理的优势种群最多,分别为 13 种和 11 种,增加的种类主要有黄杆菌属(*Flavobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)等,且增加的主要菌属中有些菌株有促进植株生长和对香蕉枯萎病具有拮抗作用。对各处理中所含有的芽胞杆菌和链霉菌种类的进一步分析中还发现 FB + SD 处理可能存在的芽胞杆菌和链霉菌种类最多为 25 种,FB 次之为 21 种,CK 和 SD 处理的种类最少均为 14 种,且未检测到链霉菌,说明施用拮抗菌饼肥发酵液可以提高土壤中芽胞杆菌的种类,同时可以刺激某些链霉菌的繁殖,这与表现的防病效果基本一致。

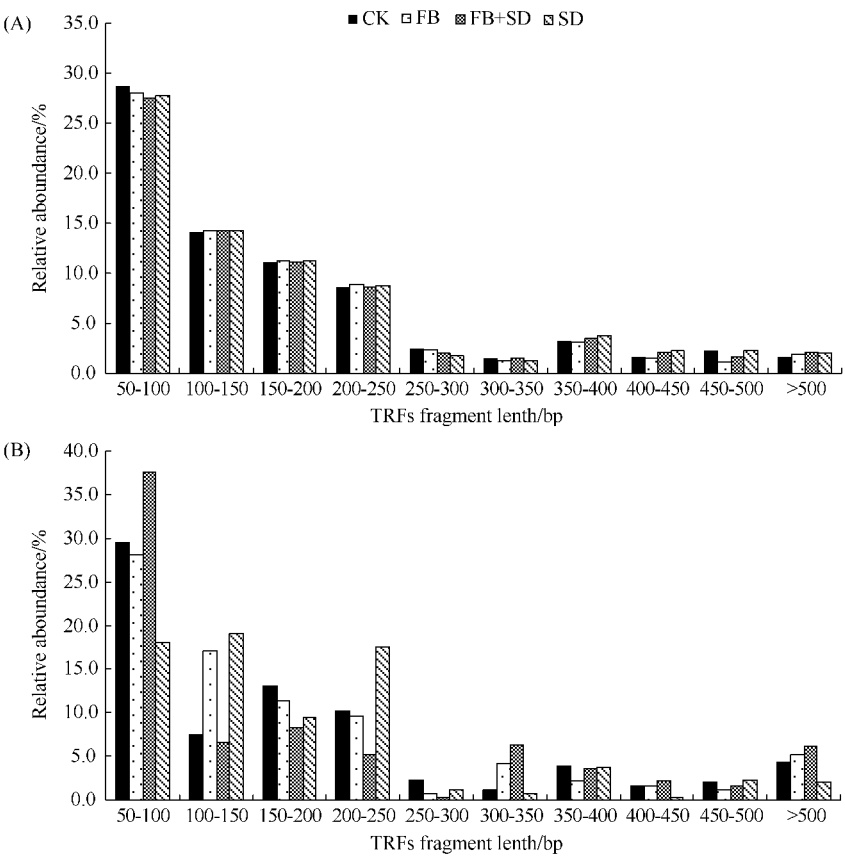


图 3. 不同处理 TRFs 片段相对丰度比较

Figure 3. Relative abundance analysis of TRFs in different treatments. A is relative abundance analysis of TRFs in different treatments before applying Fermentation Fluid; B is relative abundance analysis of TRFs in different treatments after applying Fermentation Fluid.

表 4. T-RFLP 分析不同处理土壤微生物的优势种群

Table 4. Dominant populations of microbial in soil under different treatments by T-RFLP

Dominant populations	CK		FB		FB + SD		SD	
	B	A	B	A	B	A	B	A
<i>Aeromonas</i>	—	—	—	—	—	—	+	+
<i>Bradyrhizobium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium</i>	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>Capnocytophaga</i>	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>Cylindrospermopsis</i>	—	+	—	+	—	—	—	+
<i>Cytophaga</i>	—	+	—	+	—	+	—	+
<i>Eubacterium</i>	—	+	—	—	—	—	+	—
<i>Flavobacterium</i>	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>Flexibacter</i>	+	+	+	—	+	—	—	+
<i>Fusobacterium</i>	+	+	—	+	—	—	+	+
<i>Lactobacillus</i>	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>Mycoplasma</i>	—	—	—	—	—	+	—	—
<i>Neisseria</i>	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>Oceanospirillum</i>	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>Polyangium</i>	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas</i>	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>Rhodobacter</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
<i>Rhodopseudomonas</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Spirochaeta</i>	—	—	+	+	—	+	—	—
<i>Streptococcus</i>	—	—	—	+	—	—	—	+

“+” means this genus exist in the sample; “—” means this genus do not exist in the sample; “B” is result before treatment; “A” is result after treatment.

### 3 讨论

二氧化氯消毒剂以其高效、光谱、安全的特性在我国农业中细菌、真菌性病害的防治方面日益受到重视,但在香蕉土传病害防治方面的应用仍属空白。本研究通过大田试验,将拮抗菌饼肥发酵液与二氧化氯消毒剂配合施用,应用于香蕉枯萎病的生物防治,结果表明,施用拮抗菌饼肥发酵液和施用土壤消毒剂均可降低香蕉枯萎病的病情指数,其中以土壤消毒剂与发酵液配合施用的效果最佳,防控效果可以达到 60.82%。

在香蕉的大田试验中,由于香蕉的种植周期长,试验结果容易受土壤、环境等因素的影响,鉴于此本文采用随机区组排列 3 次重复的试验设计,在一定程度上避免和降低田块本身差异对试验结果的影响。施用有机肥能够提高土壤微生物多样性,促进有益微生物的生长,改善土壤微生物生态环境<sup>[26-27]</sup>。但在应用 Biolog 方法进行研究时发现,某些真菌可以利用板上碳源底物并发生显色反应,FOC 可以利用 Eco 板上 31 种碳源底物中的 17 种<sup>[28]</sup>,可见香蕉土壤微生物的 AWCD 除了与土壤细菌多样性密切相关外,还会受病原菌的影响。本研究中,施用发酵液处理的 AWCD 显著高于未施用发酵液处理,而各处理间 Simpson 指数无显著差异;未施用消毒剂处理的 Shannon 指数显著高于施用消毒剂处理;各处理 McIntosh 指数差异显著,以单施发酵液处理的最高,单施消毒剂处理的最低。说明施用拮抗菌发酵液可以提高微生物的总体活性,提高土壤微生物丰富度性及均匀度,而施用土壤消毒剂则相反降低了这种趋势。但 CK 处理的 Shannon 指数与单施发酵液处理无显著差异,其主要原因可能是在发病后期,对照处理的病原菌含量较多,对 Biolog 数据产生了干扰作用的结果。本文利用 PCA 分析了一月份和六月份不同处理土壤微生物对碳源的利用情况,氨基酸类、羧酸类、双亲化合物、糖类是影响不同处理间微生物利用的主要碳源,该结果与赵娜<sup>[29]</sup>一致。随着时间推移,土壤微生物对碳源利用的能力呈增加趋势,主要原因可能是施用拮抗菌饼肥发酵液改变了土壤微生物的多样性及群落结构,也可能与病原菌数量的多少有关。

有研究表明,土壤中细菌和放线菌的生长得到

有效促进后,可显著抑制土壤真菌的增长,从而降低作物真菌性病害的发病率<sup>[30]</sup>。T-RFLP 此技术综合运用了 PCR 技术、DNA 限制性酶切技术、荧光标记技术和 DNA 序列自动分析技术分析微生物的群落结构<sup>[24]</sup>,与其它技术相比具有高通量、高灵敏度、定性定量均可的优点,且根据 TRFs 片段长度与数据库比对,有可能直接鉴定样品中的单个菌种,同时该技术操作简单、实验周期短,目前已被广泛用于分析各种环境中某类微生物的群落结构及动态<sup>[31-32]</sup>。本文采用 T-RFLP 的方法分析土壤微生物的多样性发现,土壤拮抗菌种类与防病效果之间具有一定的相关性:即防病效果最好的处理细菌的 TRFs 片段最多,同时施用发酵液的 2 个处理均增加了部分优势菌属如:链霉菌 (*Streptomyces*),黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 等,这些菌属中部分菌株是植株生长的有益菌和病原微生物拮抗菌。但是任何方法都有其局限性,T-RFLP 技术实验结果也易受 DNA 质量与纯度、限制性内切酶酶切位点差异等的影响,因此在今后的研究中将继续结合其它方法进一步研究发酵液对土壤微生物群落多样性的影响机理。

综上所述,拮抗菌饼肥发酵液配合土壤消毒剂施用,在降低土壤中病原菌的基础上,刺激某些拮抗菌的繁殖,从而增加土壤微生物的多样性,抑制病原真菌的生长,改善土壤微生物的群落结构,达到提高香蕉枯萎病防病效果的目的。

**致谢:**华南农业大学的李华平教授和周而勋教授在论文大田试验设计及论文写作中给予了很多帮助,特此致谢。

### 参考文献

- [1] Ouyang X, Ruan X, Wu C, Bai T, Li H. Main bacterial groups in banana soil under rotated and continuous cropping. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22 (6): 1573-1578. (in Chinese)  
欧阳娴,阮小蕾,吴超,白亭亭,李华平. 香蕉轮作和连作土壤细菌主要类群. *应用生态学报*, 2011, 22 (6): 1573-1578.
- [2] Thangacelu R, Palaniswami A, Doraiswamy S, Velazhahan R. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense on induction of defence enzymes and phenolics in banana. *Biologia*

- Plantarum, 2003, 46(1): 107-110.
- [3] Wang Z. Advances on banana fusarium wilt disease and control methods. *Plant Quarantine*, 2006, (3): 198-200. (in Chinese)  
王振中. 香蕉枯萎病及其防治研究进展. 植物检疫, 2006, (3): 198-200.
- [4] Wu M, Zhang H, Li X, Zhang Y, Su Z, Zhang C. Relationship between soil and fungistasis and bacterial community structure. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(7): 1574-1578. (in Chinese)  
吴敏娜, 张惠文, 李新宇, 张彦, 苏振成, 张成刚. 土壤抑菌真菌作用与细菌群落结构的关系. 应用生态学报, 2008, 19(7): 1574-1578.
- [5] Zhang J, Guo Y, Tian G, Zhang J, Yao J. Effects of three composts on growth and bacteria wilt of tomato. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2012, 18(5): 1185-1192. (in Chinese)  
张建华, 郭玉双, 田光明, 张君, 姚静华. 三种堆肥对番茄生长剂青枯病防治效果的影响. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(5): 1185-1192.
- [6] Chen Z, Zhang F, Cai X, He J, Peng Y. Effect of returning straws to field on microbes of degenerated soil in central tibet. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4): 696-699. (in Chinese)  
陈芝兰, 张涪平, 蔡晓布, 何建清, 彭岳林. 秸秆还田对西藏中部退化农田土壤微生物的影响. 土壤学报, 2005, 42(4): 696-699.
- [7] Yu Z, Song S. Effects of straw mixed with biopreparate on improvement of soil in greenhouse. *Transactions of the Chinese Society of Agriculture Engineering*, 2003, 19: 177-179. (in Chinese)  
于占东, 宋述尧. 稻草配施生物菌剂对大棚连作土壤的改良作用. 农业工程学报, 2003, 19: 177-179.
- [8] Yuan F, Peng Y, Zhang C, Shen Q. Effect of organic materials in controlling cucumber seedling diseases. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(5): 867-870. (in Chinese)  
袁飞, 彭宇, 张春兰, 沈其荣. 有机物料减轻设施连作黄瓜苗期病害的微生物效应. 应用生态学报, 2004, 15(5): 867-870.
- [9] Siddiqui Y, Meon S, Ismail MR, Alic A. *Trichoderma*-fortified compost extracts for the control of choanephora wet rot in okra production. *Crop Protection*, 2008, 27: 385-390.
- [10] Mattner SW, Porter IJ, Gounder RK, Shanks AL, Wren DJ, Allen D. Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry. *Crop Protection*, 2007, 27(8): 1165-1173.
- [11] Satheesh S, Venu DV. Effect of various amendments and *Trichoderma viride* on the fusarial wilt of banana. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 2004, 38: 546-550.
- [12] Saravanan T, Muthusamy M, Marimuthu T. Development of integrated approach to manage the fusarial wilt of banana. *Crop Protection*, 2003, 22: 1117-1123.
- [13] Garland JJ, Mills AL. Classification and characterization of samples of microbial communities using patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57: 2351-2359.
- [14] Liu WT, Marsh TL, Cheng H. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [15] Tillmann L, Michael F. Archaeal population dynamics during sequential reduction progress in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2732-2742.
- [16] Kaplan CW, Astaire JC, Sanders ME, Reddy BS, Kitts CL. 16S Ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1935-1939.
- [17] Li B, Xie G, Chen R, Huangpu W, Liu B. Effects of cropping system and cultivation pattern on bacterial population and anti-fusarium wilt bacteria in melon soil. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(10): 1937-1940. (in Chinese)  
李斌, 谢关林, 陈若霞, 皇甫伟国, 刘波. 耕作与栽培方式对瓜类土壤细菌数量及枯萎病拈抗菌分布的影响. 应用生态学报, 2006, 17(10): 1937-1940.
- [18] Li S, Gu L, Liu K. Effects of combined application of organic fertilizers on the control of soilborne diseases and the regulation of soil microbial diversity. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(4): 965-969. (in Chinese)  
李胜华, 谷丽萍, 刘可星. 有机肥配施对番茄土传病害的防治及土壤微生物多样性的调控. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(4): 965-969.
- [19] Zhang Z, Feng H, Xiao X, Li H. Influence of bio-fertilizers on control of banana wilt disease and soil microbial diversity. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(4): 575-579. (in Chinese)

- 张志红,冯宏,肖相政,李华兴.生物肥防治香蕉枯萎病及对土壤微生物多样性的影响.果树学报,2010,27(4):575-579.
- [20] Choi K, Dobbs FC. Comparion of two kinds of Biolog micro-plant(GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiology Methods*,1999,36(3):203-213.
- [21] Zhan X, Wu D, Zhang L, Zhang C, Zhou S, Yang Y. Respons of microbial community functional diversity in the rhizosphere of *Caragana microphylla* to environmental change. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (12):3087-3097. (in Chinese)
- 展小云,吴冬秀,张琳,张灿娟,周双喜,杨云霞.小叶锦鸡儿根际微生物群落功能多样性对环境变化的响应.生态学报,2010,30(12):3087-3097.
- [22] Shen W, Lin X, Zhang H, Yin R, Duan Z, Shi W. Microbial activity and functional diversity in soils used for the commercial production of cucumbers and tomatoes in pol ytnnel greenhouse , under different fertilization. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (6):2682-2689. (in Chinese)
- 申卫收,林先贵,张华勇,尹睿,段增强,施卫明.不同施肥处理下蔬菜塑料大棚土壤微生物活性及功能多样性.生态学报,2008,28(6):2682-2689.
- [23] Dong P, Sun Y, Wang H, Chen L, Zhang H. Study of micro-ecosystem of the Wenyu river by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *China Environmental Sciense*, 2011, 31 (4):631-636. (in Chinese)
- 董萍,孙寓姣,王红旗,陈利顶,张辉.利用 T-RFLP 技术对温榆河微生物群落结构研究.中国环境科学,2011,31(4):631-636.
- [24] Xu L, Ruan X, Li D, Li H. Endophytic bacterial diversity and communities of banana cultivars with different resistance to fusarium wilt disease. *Microbiology China*, 2012,39(9):1250-1259. (in Chinese)
- 许乐,阮小蕾,李冬丽,李华平.对枯萎病不同抗性的香蕉品种的内生细菌多样性及群落结构.微生物学通报,2012,39(9):1250-1259.
- [25] Li G, Liu H, Yun J, Li X, Chen J. Effect of pentachlorophenol (PCP) on bacterial community of an aerobic granular sludge estimated by T-RFLP. *Environmental Sciens*, 2006,27(4):794-799.
- 李光伟,刘和,云娇,李秀芬,陈坚.应用 T-RFLP 技术研究五氯酚对好氧颗粒污泥中细菌组成的影响.环境科学,2006,27(4):794-799.
- [26] Xu H, Xiao R, Zou D, Song T, Luo W, Li S. Effects of long-term fertilization on functional diversity of soilmicrobial community of the tea plantation. *Acta Ecologica Sinica*, 2007,27(8):3355-3361. (in Chinese)
- 徐华勤,肖润林,邹冬生,宋同清,罗文,李盛华.长期施肥对茶园土壤微生物群落功能多样性的影响.生态学报,2007,27(8):3355-3361.
- [27] Sammar K, Beatrix W. Utilization of carbon source by Pythium, Phytophthora and Fusarium Species as determined by Biolog microplate assay. *The Open Microbiology Journal*,2009,3:9-14.
- [28] Zhang Z, Peng G, Li H, Cai Y, Zhang X, Zhao L. Effects on controlling fusarium wilt by bio-fertilizer, chitosm, hymexazol and their combination. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(4):1149-1156. (in Chinese)
- 张志红,彭桂香,李华兴,蔡燕飞,张新明,赵兰凤.生物肥与甲壳素和恶霉灵配施对香蕉枯萎病的防治效果.生态学报,2011,31(4):1149-115.
- [29] Zhao N, Lin W, Cai K, Wang J. Impacts of livestock waste compost on tomato bacterial wilt,soil enzyme activity and soil microbial functional diversity. *Acta Ecologica Sinica*, 2010,30(19):5327-5337. (in Chinese)
- 赵娜,林威鹏,蔡昆争,王建军.家畜粪便堆肥对番茄青枯病、土壤酶活性剂土壤微生物功能多样性的影响.生态学报,2010,30(19):5327-5337.
- [30] Hoper H, Steinberg C, Alabouvette C. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to fusarium wilt of flax. *Soil Biology and Biochemistry*,1995,27(7):955-967.
- [31] Ren Y, Lu X, Wan F, Liu W. System error analysis for terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microbiology China*,2010,37(12):1820-1824. (in Chinese)
- 任玉晶,芦晓飞,万方浩,刘万学,末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术的系统误差分析.微生物学通报,2010,37(12):1820-1824.
- [32] Yuan S, Xue Y, Gao P, Wang W, Ma Y. Microbial diversity in Shengli petroleum reservoirs analyzed by T-RFLP. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007,47(2):290-294. (in Chinese)
- 袁三青,薛燕芬,高鹏,汪卫东,马延和.T-RFLP 技术分析油藏微生物多样性.微生物学报,2007,47(2):290-294.

# Effect of antagonistic bacteria and soil disinfectant on soil bacterium community in banana fusarium wilt disease area

Dengbo Zhou<sup>1,2</sup>, Tao Jing<sup>2</sup>, Xin Tan<sup>2</sup>, Bo Chen<sup>2,3</sup>, Xiyan Zhang<sup>1,2\*</sup>, Zhufen Gao<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Horticulture and Landscape of Hainan University, Haikou 571737, China

<sup>2</sup> Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China

<sup>3</sup> China College of Environment and Plant Protection of Hainan University, Haikou 571737, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The objective of the present study is to elucidate the effects of the application of cake fertilizer fermentation fluid with antagonistic bacteria and soil disinfectant chlorine dioxide on the occurrence of banana fusarium wilt disease and soil bacterium community. [ **Method** ] Under the field cultivation conditions, the Biolog and T - RFLP method was used to investigate the soil bacterium diversity and community features in different treatments at different periods. [ **Result** ] The results show that both cake fertilizer fermentation fluid with antagonistic bacteria and soil disinfectant could reduce disease index of banana fusarium wilt disease significantly, the highest control effect could reach 60.82% with the combined application of these two methods. The result of Biolog eco plate shows that the application of cake fertilizer fermentation fluid with antagonistic bacteria could improve soil microbial AWCD (average well color development) and population uniformity, the use of soil disinfectant significantly reduced the soil microbial population's abundance and the uniformity. Principal component analysis shows that the soil microbial population using carbon source had an increasing trend throughout the banana growing season, the main carbon sources in the early stage were amino acids, carboxylic acids, amphiphilic compounds and carbohydrates, and the increased main carbon sources in the later stage were carboxylic acids and amphiphilic compounds. Soil bacterial diversity analysis by T - RFLP shows that the treatments of cake fertilizer fermentation fluid with antagonistic bacteria had the highest bacterial TRFs (Terminal restriction fragment) fragments, which resulted from the increase of *Flavobacterium*, *Pseudomona* and *Lactobacillus* population in the soil. [ **Conclusion** ] The application of cake fertilizer fermentation fluid with antagonistic bacteria combining soil disinfectant could increase antagonistic microorganisms species, enhance soil microbial diversity, improve soil microbial ecological structure on the basis of reducing pathogen in soil, finally achieve the goal of improving the control effects of banana fusarium wilt disease. **Keywords:** banana fusarium wilt, fermentation fluid, soil disinfectant, soil microbial community, Biolog, T-RFLP

( 本文责编:王晋芳 )