

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2022.01.005

周云鹏, 周谈坛, 赵文慧, 等. 秸秆降解过程中拮抗链霉菌对禾谷镰刀菌消长动态的影响. 土壤, 2022, 54(1): 32–39.

秸秆降解过程中拮抗链霉菌对禾谷镰刀菌消长动态的影响^①

周云鹏^{1,2}, 周谈坛^{1,2}, 赵文慧¹, 李增强¹, 赵炳梓^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)引起的小麦赤霉病是导致小麦产量和品质降低的主要因素, 其在田间生长的基质主要为秸秆。基于各种拮抗菌的生物防治是控制小麦赤霉病的主要措施之一, 但秸秆降解过程中拮抗菌的拮抗效应是否与平板对峙获取的拮抗效应一致尚不清楚。本研究首先通过平板对峙试验, 筛选出对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 有潜在拮抗作用的 3 株菌: 吸水链霉菌 ACCC41648 (*Streptomyces hygroscopicus*)、吸水链霉菌井冈变种 ACCC40051 (*S. hygroscopicus* var. *jingganggensis*) 和娄彻氏链霉菌 ACCC41594 (*S. rochei*), 其抑菌带平均宽度依次为 2.67、1.67 和 1.12 mm。基于室内 70 d 培育试验, 发现秸秆降解 7、42 和 70 d 后, 吸水链霉菌 ACCC41648 及其井冈变种 ACCC40051 未表现抑制秸秆中禾谷镰刀菌生长的效应, 而娄彻氏链霉菌 ACCC41594 在秸秆降解 7 d 和 42 d 后显著降低禾谷镰刀菌丰度分别达 30.91% 和 69.28%。与对照相比, 娄彻氏链霉菌 ACCC41594 显著促进秸秆降解、提高秸秆 CO₂-C 累积释放量, 降低秸秆易矿化碳含量。进一步相关性分析发现, 残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度在培养 7 d 时与秸秆全钾含量极显著负相关($P < 0.01$), 42 d 时与秸秆易矿化碳含量显著正相关($P < 0.05$), 70 d 时与秸秆全氮含量极显著正相关, 与 C/N 极显著负相关($P < 0.01$)。上述结果表明, 通过平板对峙获取的拮抗菌在秸秆降解过程中其拮抗效应并不一定显现; 结果进一步暗示, 娄彻氏链霉菌 ACCC41594 在秸秆降解过程中抑制禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 生长的效应有可能通过其直接拮抗作用, 也有可能通过促进秸秆降解引起残留秸秆性质发生变化所致。

关键词: 禾谷镰刀菌; 秸秆降解; 链霉菌; 拮抗作用

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A

Dynamic Analysis on Antagonistic *Streptomyces* Against Growth and Decline of *Fusarium graminearum* during Straw Degradation

ZHOU Yunpeng^{1,2}, ZHOU Tantan^{1,2}, ZHAO Wenhui¹, LI Zengqiang¹, ZHAO Bingzi^{1*}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Fusarium* head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* which utilizes straw as main growth media in field is the main factor leading to reduction of wheat yield and quality. Biological control with various antagonistic organisms is one of the most effective methods to prevent and control FHB, however, it is not clear whether the antagonistic effect of antagonistic organisms in straw degradation process is in accordance with that in plate confrontation experiment. In this study, three kinds of strains with potential antagonistic effects on *F. graminearum* CGMCC3.4598 were primarily screened out through plate confrontation culture, they were *Streptomyces hygroscopicus* ACCC41648, *S. hygroscopicus* var. *jingganggensis* ACCC40051, and *S. rochei* ACCC41594, and the average width of their antifungal bands were 2.67, 1.67 and 1.12 mm, respectively. Next, based on indoor 70-day culture experiment, we found that after 7, 42 and 70 d of straw degradation, *S. hygroscopicus* ACCC41648 and its variant ACCC40051 did not show any antagonistic effect on the growth of *F. graminearum* in residual straw, while *S. rochei* ACCC41594 respectively reduced the abundance of *F. graminearum* in residual straw by 30.91% and 69.28% after 7 d and 42 d of straw degradation. Compared with the control (no antagonistic organisms were added), *S. rochei* ACCC41594 significantly promoted straw degradation, increased cumulative emission amount of CO₂-C, and reduced the size of easily mineralizable carbon in straw. Further correlation analysis found that the abundance of *F. graminearum* in residual straw had

①基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41977102)和财政部和农业农村部项目(CARS-03)资助。

* 通讯作者(bzhao@issas.ac.cn)

作者简介: 周云鹏(1996—), 男, 安徽涡阳人, 博士研究生, 主要从事小麦赤霉病菌在土壤环境中的去向研究。E-mail: zhouyunpeng@issas.ac.cn

significant negative correlation with total potassium content of straw at 7 d ($P < 0.01$), positive correlation with easily mineralizable carbon content of straw at 42 d ($P < 0.05$), and positive correlation with total nitrogen content of straw and negative correlation with C/N of straw at 70 d ($P < 0.01$). The above results indicated that the antagonistic strains screened from the plate confrontation may not always reappear their antagonistic effects during straw degradation. The results further indicated that the inhibition effect of *S. rochei* ACCC41594 on the growth of *F. graminearum* CGMCC3.4598 during straw degradation may be through its direct antagonism, or through its indirect effect that changing residual straw properties when it promoted straw degradation.

Key words: *Fusarium graminearum*; Straw degradation; *Streptomyces*; Antagonistic effect

以禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)为主要致病菌引发的小麦赤霉病是世界性的流行病害,多发生在温暖潮湿的区域,具有周期性流行的特点^[1-3]。中国的小麦赤霉病发病面积为全球最大,其在淮河以南及长江中下游麦区发生最为严重,华南和东北麦区经常流行成灾;随着秸秆还田普及、灌溉面积扩大及全球气候变暖,小麦赤霉病已逐渐向西北扩展至黄淮海冬麦区^[4-5]。赤霉病不仅会大幅度降低小麦的产量和品质,其病原菌代谢产生的真菌毒素也会对人畜健康造成严重威胁^[3, 6]。因此,有关小麦赤霉病的防治工作一直备受关注。

目前小麦赤霉病的防控措施主要包括抗病品种选育、化学药剂防治和生物防治^[3, 7-8]。选育抗赤霉病的小麦品种是最直接的赤霉病控制方式,但因赤霉病抗原较少且抗性机制较为复杂^[9],致使抗病且适宜大面积推广种植的小麦种质资源严重缺乏。化学药剂防治是减轻小麦赤霉病发生程度的关键,然而却容易导致病原菌产生抗药性并对环境造成污染^[7]。近年来,利用拮抗微生物及其代谢产物的生物防治措施因具有安全、低毒且对环境友好等优势,已成为赤霉病防控的研究焦点^[8, 10-11]。链霉菌(*Streptomyces* spp.)和芽胞杆菌(*Bacillus* spp.)作为防治赤霉病重要的两类生防菌,能分泌产生抗生素、环脂肽等多种具有抑菌作用的次级代谢产物,对禾谷镰刀菌的生长具有明显的抑制作用^[12-14]。然而,目前有关小麦赤霉病生物防治的研究多聚焦于生防菌的分离筛选和鉴定^[10, 12, 14],忽略了实际生产中秸秆的存在对小麦赤霉病爆发的影响。

秸秆还田是目前农业生产中秸秆资源利用的主要渠道,但其为各种病原生物的存活和增殖提供了有利环境条件,加剧了农田作物病虫害的发生。禾谷镰刀菌在田间的生长基质主要为秸秆,其是引起小麦赤霉病爆发的关键源头之一。Trail^[15]和 Leplat 等^[16]曾系统介绍了小麦赤霉病菌侵染循环过程,强调了病原菌通常以田间秸秆为基质进行越冬越夏,其在秸秆残

体上形成的子囊壳或分生孢子是下一季度赤霉病爆发的初侵染源。因此筛选秸秆降解生防菌加快田间秸秆降解,控制秸秆源头的病原菌数量对小麦赤霉病的防控具有重要意义。目前秸秆降解过程中拮抗菌对小麦赤霉病菌的拮抗效应是否与平板对峙获取的结果一致尚不清楚,有关赤霉病菌在秸秆中的生长规律也尚未见报道。本文以禾谷镰刀菌为研究对象,结合平板对峙试验和室内培育试验,探究秸秆降解过程中禾谷镰刀菌的动态消长规律及其如何受制于生防拮抗菌,以期小麦赤霉病的生物防治和生防产品开发提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试秸秆为玉米秸秆,于 2017 年 10 月采自中国科学院封丘农业生态试验站(114°24'E, 35°00'N)。将采集到的新鲜玉米秸秆洗净后于 65 °C 烘干至恒重,经粉碎机粉碎后过 60 目筛备用。秸秆基本理化性质为:全碳 489.19 g/kg、全氮 10.17 g/kg、全磷 1.24 g/kg、全钾 15.87 g/kg。

供试禾谷镰刀菌(*F. graminearum*, 菌株编号为 CGMCC3.4598)购自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)。所选禾谷镰刀菌拮抗菌株为蜡状芽胞杆菌(*B. cereus*, 菌株编号为 ACCC10263)、吸水链霉菌(*S. hygrosopicus*, 菌株编号为 ACCC41648)、吸水链霉菌井冈变种(*S. hygrosopicus* var. *jingganggensis*, 菌株编号为 ACCC40051)和娄氏链霉菌(*S. rochei*, 菌株编号为 ACCC41594),上述 4 种菌株购自中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)。

1.2 试验设计

1.2.1 平板对峙试验 采用对峙培养法初步检验 4 种拮抗菌对禾谷镰刀菌生长的抑制作用。先用接种环将活化后的 4 种拮抗菌在直径为 90 mm 的 PDA 培养基中央竖直划一条菌带,再用打孔器截取直径为 7

mm 的禾谷镰刀菌菌饼, 分别接种于拮抗菌菌带两侧, 要求两菌饼中心各距菌带中心 20 mm。以只接种禾谷镰刀菌的平板为对照, 每个处理重复 3 次。最后将平板置于 25 °C 恒温避光培养 7 d, 测量抑菌带宽度。抑菌带宽度为拮抗菌菌带边缘到禾谷镰刀菌菌落边缘的垂直距离。

1.2.2 室内培育试验 试验共设置 4 个处理, 即玉米秸秆+禾谷镰刀菌 (SF, 对照)、玉米秸秆+禾谷镰刀菌+吸水链霉菌 (SFX)、玉米秸秆+禾谷镰刀菌+吸水链霉菌井冈变种 (SFJ)、玉米秸秆+禾谷镰刀菌+娄彻氏链霉菌 (SFL), 每个处理重复 3 次。具体试验步骤: 称取过 60 目筛的烘干玉米秸秆样品 10.0 g 于 1 000 ml 无菌塑料瓶内, 加入无菌水至秸秆饱和吸

水。按照表 1 设计的菌剂接种量, 先加入禾谷镰刀菌分生孢子悬液至玉米秸秆, 25 °C 恒温避光培养 12 h 以促其孢子萌发成新的菌丝后, 再向秸秆中加入上述 3 种拮抗链霉菌菌液。随后将盛有 15 ml 1 mol/L NaOH 溶液的 25 ml 吸收杯小心悬挂于塑料瓶内, 加盖密封, 在 25 °C 条件下恒温避光培养 70 d, 同时设置空白对照, 培养期间及时补充无菌水以维持秸秆饱和吸水。分别在培养的第 7、42 和 70 天时进行破坏性采样, 以测定禾谷镰刀菌丰度和残留秸秆养分含量。玉米秸秆的碳矿化量则采用碱液吸收法测定, 分别在培养的第 1 ~ 14 天和第 19、24、29、34、39、42、51、59 和 70 天, 取出盛有碱液的吸收杯, 用浓度为 1 mol/L HCl 标准溶液进行滴定, 计算 CO₂-C 释放量。

表 1 供试玉米秸秆接种菌量
Table 1 Inoculation concentrations of different microbes in maize straws

处理	禾谷镰刀菌(cfu/g)	吸水链霉菌(cfu/g)	吸水链霉菌井冈变种(cfu/g)	娄彻氏链霉菌(cfu/g)
SF	2.3×10 ⁵	—	—	—
SFX	2.3×10 ⁵	9.2×10 ⁵	—	—
SFJ	2.3×10 ⁵	—	9.2×10 ⁵	—
SFL	2.3×10 ⁵	—	—	9.2×10 ⁵

注: SF、SFX、SFJ 和 SFL 处理分别为玉米秸秆+禾谷镰刀菌、玉米秸秆+禾谷镰刀菌+吸水链霉菌、玉米秸秆+禾谷镰刀菌+吸水链霉菌井冈变种、玉米秸秆+禾谷镰刀菌+娄彻氏链霉菌; cfu/g 表示每克烘干玉米秸秆接入的菌量, 下同。

1.3 测定方法与计算

1.3.1 秸秆性质测定 玉米秸秆理化性质测定采用常规土壤农化分析方法^[17]; 秸秆全碳含量采用重铬酸钾-外加加热法测定; 全量氮磷钾采用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮法, 用半微量凯氏定氮法测定全氮含量, 钼锑抗比色法测定全磷含量, 火焰光度法测定全钾含量。

1.3.2 禾谷镰刀菌丰度测定 残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度采用荧光染料 (SYBR Green) 渗入法进行实时荧光定量 PCR (qPCR)。所选用于定量禾谷镰刀菌的特异性引物为 Fg16F/Fg16R (Fg16F: 5'-CTCCGGATATGTTGCGTCAA-3', Fg16R: 5'-GGTAGGATCCGACATGGCAA-3')^[18]。采用宝生物工程(大连)有限公司提供的 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒, 用 CFX96 Real-Time PCR System 扩增仪 (Bio-Rad, 美国)分析, 每个样品平行 3 次。qPCR 反应体系 (25 μl) 包括 SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.3 μl, DNA 模板 2 μl, 灭菌双蒸水 9.9 μl。qPCR 扩增条件^[19]为 95 °C、2 min, 然后 95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 72 °C、45 s, 40 个循环, 于 72 °C 时测定荧光值。qPCR 标准曲线建立: 从纯培养的禾谷镰刀菌中提取菌丝 DNA 并测定其浓度 (ng/μl), 将菌丝 DNA 样品按 10 倍比稀释制作 7 个

浓度梯度 (10 ~ 10⁻⁵ ng/μl) 系列标准样品, 标准样品与待测样品在相同反应条件下进行实时荧光定量 PCR 扩增, 根据标准样品 C_i 值与浓度梯度构建标准曲线。最后将得到的待测样品 C_i 值代入标准曲线, 计算禾谷镰刀菌丰度。

1.3.3 数据计算与方程拟合

玉米秸秆 CO₂-C 释放量 (g/kg) =

$$\frac{(V_0 - V_1) \times C_{\text{HCl}}}{2} \times 44 \times \frac{12}{44} \times \frac{1}{m}$$

式中: C_{HCl} 为标准盐酸浓度 (mol/L); V₀ 为空白滴定消耗的盐酸体积 (ml); V₁ 为样品滴定消耗的盐酸体积 (ml); m 为烘干玉米秸秆质量 (g)。

玉米秸秆 CO₂-C 累积释放量 (g/kg) 指从培养开始到某一时间点秸秆 CO₂-C 的总释放量。本研究采用一级动力学方程^[20]对秸秆 CO₂-C 累积释放量进行拟合, 即 C_t = C₀ (1 - e^{-kt}) + C₁, 式中 C_t 为培养时间 t (d) 时的 CO₂-C 累积释放量 (g/kg), C₀ 和 k 分别表示秸秆潜在可矿化碳含量 (g/kg) 及其矿化速率常数 (d⁻¹), C₁ 表示秸秆易矿化碳含量 (g/kg)。

1.4 数据处理

试验数据采用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和邓肯 (Duncan) 显著性检验, 比较

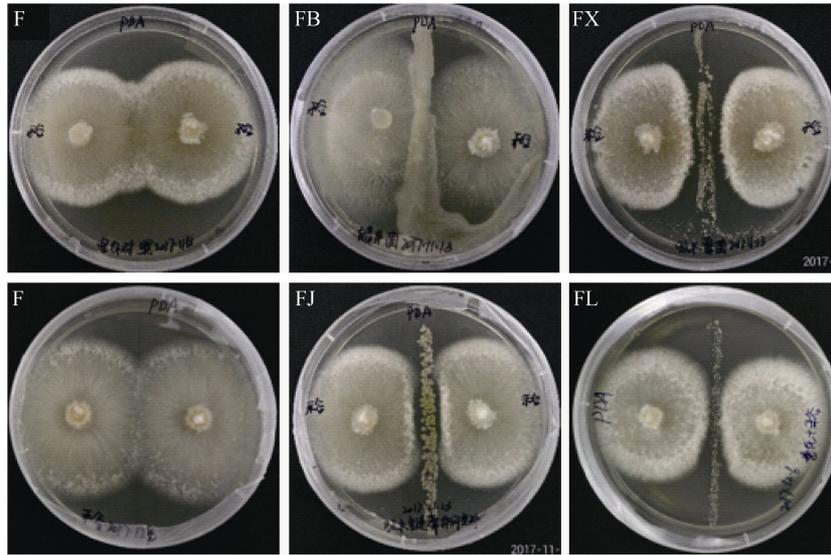
不同处理在 $P<0.05$ 水平的显著性差异。采用 Origin 9.0 作图, SigmaPlot 13.0 进行秸秆碳矿化动力学方程拟合和参数计算。

2 结果

2.1 平板对峙试验

由平板对峙结果(图 1)可知, 供试 4 种拮抗菌株对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 菌丝生长的抑制效果

不同。蜡状芽胞杆菌 ACCC10263 未对病原菌株 CGMCC3.4598 表现抑制作用, 而吸水链霉菌 ACCC41648、吸水链霉菌井冈变种 ACCC40051 和娄彻氏链霉菌 ACCC41594 对病原菌菌丝的生长均有不同程度的抑制作用, 经测量其抑菌带平均宽度依次为 2.67、1.67 和 1.12 mm, 初步表明供试的这 3 种链霉菌菌株为禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 的潜在拮抗菌。



(F: 禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598; FB、FX、FJ 和 FL 分别表示禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 与蜡状芽胞杆菌 ACCC10263、吸水链霉菌 ACCC41648、吸水链霉菌井冈变种 ACCC40051 和娄彻氏链霉菌 ACCC41594 的平板对峙)

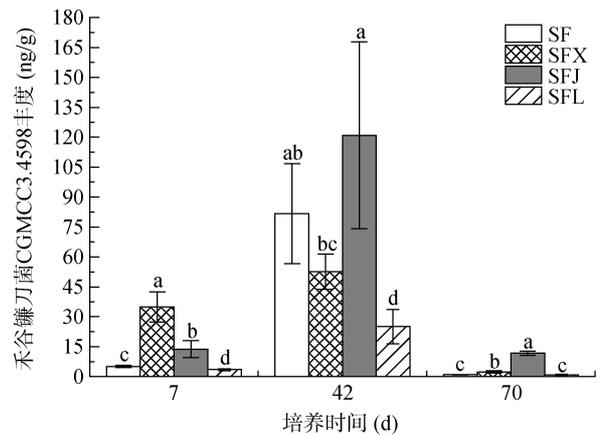
图 1 4 种拮抗菌株对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 的抑制作用

Fig. 1 Antifungal activities of four antagonistic strains against *F. graminearum* CGMCC3.4598

2.2 拮抗链霉菌对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 丰度的影响

在为期 70 d 的室内培育试验中, 残留秸秆中的禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 丰度随着培养时间的延长呈先增加后降低并趋于消亡的动态变化规律 (图 2)。各处理残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度在秸秆降解 42 d 时达到最大值, 为 25.08 ~ 120.92 ng/g, 而培养结束 (70 d) 时, 各处理残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度处于最低水平, 仅有 0.90 ~ 11.74 ng/g。

对比不同处理来看, 秸秆降解 7 d 时, 残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度顺序为 SFX>SFJ>SF>SFL, 其中 SFL 处理的禾谷镰刀菌丰度较 SF 处理显著降低 30.91%, 而 SFX 和 SFJ 处理的禾谷镰刀菌丰度则分别较 SF 处理显著提高 582.78% 和 168.69% ($P<0.05$)。秸秆降解 42 d 时, 残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度顺序为 SFJ \geq SF \geq SFX>SFL, 该时期 SFL 处理的禾谷镰刀菌丰度为 25.08 ng/g, 较 SF 处理显著降低 69.28%, 而 SFX 和 SFL 处理与 SF 相比无显著性



(图中小写字母不同表示同一培养期不同处理间的差异显著($P<0.05$), 下同)

图 2 残留玉米秸秆中的禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 丰度
Fig. 2 *F. graminearum* CGMCC3.4598 abundance in residual maize straws

差异。秸秆降解末期(70 d), SF 和 SFL 处理的残留秸秆中的禾谷镰刀菌均已近乎消亡(<1.00 ng/g), 两处理间无显著性差异, 而 SFX 和 SFJ 处理的禾谷镰刀菌

丰度较 SF 处理则分别提高约 1 倍和 10 倍($P<0.05$)。总结上述结果可知, 秸秆降解 7、42 和 70 d 后, 吸水链霉菌 ACCC41648 及其井冈变种 ACCC40051 均未能显著降低禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 在残留秸秆中的丰度, 而娄彻氏链霉菌 ACCC41594 在秸秆降解 7 d 和 42 d 后显著降低秸秆中的禾谷镰刀菌丰度分别达 30.91% 和 69.28%。

2.3 拮抗链霉菌对秸秆矿化特征的影响

不同处理玉米秸秆 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量的变化规律相同, 均呈前期 (0~14 d) 增速较快, 随着培养时间延长而增幅减缓并逐渐走向平稳的趋势(图 3)。秸秆降解的前 14 d, 各处理秸秆 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量在 22.54~24.77 g/kg, 占培养结束时 (70 d) 秸秆 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量的 50.98%~52.38%, 表明玉米秸秆在培养初期的矿化过程剧烈。对比不同处理来看, 秸秆降解 7、42 和 70 d 后, SFL 处理的秸秆 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量均达到最大, 分别较不添加任何拮抗链霉菌的对照(SF)显著提高 11.07%、11.58% 和 12.12% ($P<0.05$), 而 SFX 和 SFJ 处理的 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量与 SF 处理相比均无显著差异, 该结果表明娄彻氏链霉菌 ACCC41594 的添加对玉米秸秆的降解有显著促进作用。

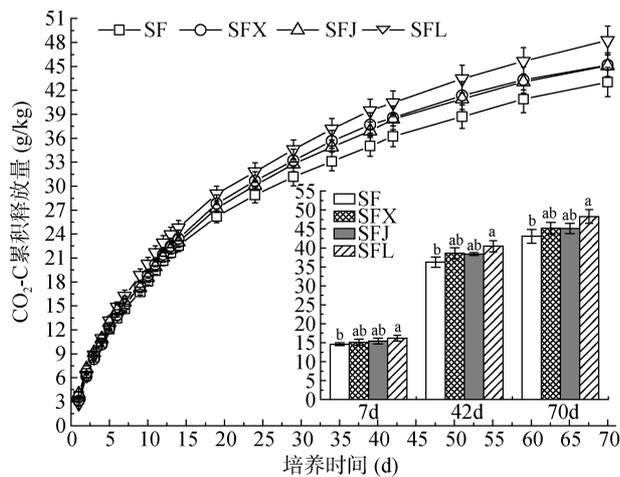


图 3 不同处理的 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量

Fig. 3 Cumulative emission amounts of $\text{CO}_2\text{-C}$ under different treatments

为了进一步研究玉米秸秆降解过程中碳组分含量的变化, 采用一级动力学方程($C_t = C_0(1 - e^{-kt}) + C_1$)^[20]对秸秆 $\text{CO}_2\text{-C}$ 累积释放量与培养天数之间的动态变化进行拟合, 并计算其矿化参数, 结果发现该方程能很好地描述秸秆矿化动态过程(拟合优度 $R^2 \geq 0.994$)。如表 2 所示, 各处理的秸秆潜在可矿化碳 (C_0) 含量(40.21 ~ 43.63 g/kg) 远高于易矿化碳 (C_1) 含量(2.83 ~ 4.33 g/kg), C_0 约为 C_1 的 9.74 倍 ~ 15.41

倍。对比不同处理来看, C_0 在各个处理之间没有显著性差异, 而 C_1 则呈现 $\text{SF} \approx \text{SFJ} > \text{SFX} \approx \text{SFL}$ 的变化规律, 其中 SFX 和 SFL 处理的 C_1 与 SF 处理相比分别显著降低 23.10% 和 25.72% ($P<0.05$)。对于矿化速率常数(k)而言, SFX、SFJ 和 SFL 处理与 SF 相比均无显著性差异。

表 2 根据一级动力学方程计算得到的秸秆碳矿化参数值

Table 2 Estimated parameters according to first order kinetic equation for mineralization of maize straw carbon

处理	C_0 (g/kg)	C_1 (g/kg)	k (d^{-1})	R^2
SF	40.21 ± 3.23 a	3.81 ± 0.19 a	0.043 ± 0.004 ab	0.995
SFX	43.63 ± 3.41 a	2.83 ± 0.40 b	0.045 ± 0.003 ab	0.997
SFJ	42.19 ± 1.78 a	4.33 ± 0.46 a	0.041 ± 0.003 b	0.996
SFL	42.97 ± 4.32 a	2.93 ± 0.39 b	0.050 ± 0.006 a	0.994

注: C_0 为玉米秸秆潜在可矿化碳含量, C_1 为玉米秸秆易矿化碳含量, k 为潜在可矿化碳的矿化速率常数, R^2 为一级动力学方程的拟合优度; 同列中小写字母不同表示处理间差异达 $P<0.05$ 显著水平, 下同。

2.4 拮抗链霉菌对残留秸秆养分性质的影响

表 3 结果显示, 秸秆降解 7 d 时, 添加拮抗链霉菌处理的残留秸秆全碳含量分别较不添加任何拮抗菌的对照 (SF) 显著降低 2.56%、3.69% 和 3.69%, 而秸秆全磷和 C/P 与对照相比无显著差异; 此外, 该时期 SFX 处理的秸秆全钾含量和 SFL 处理的全氮含量较 SF 处理分别显著降低 4.00% 和 7.97%, SFJ 处理的秸秆 C/N 和 C/K 则显著低于 SF 处理。秸秆降解 42 d 时, 残留秸秆的全碳、全钾、C/N 和 C/K 在不同处理之间均无显著性差异; 添加拮抗链霉菌处理的残留秸秆全磷含量均显著高于对照, C/P 则显著低于对照。秸秆降解 70 d 时, 不同处理之间残留秸秆的全碳、全磷和 C/P 无显著性差异; 就秸秆其他养分指标而言, SFJ 处理的残留秸秆全氮含量显著最高, C/N 显著最低, 而 SFL 处理的残留秸秆全氮含量和 C/N 的变化规律与 SFJ 处理相反。

从整个培养阶段来看, 秸秆降解 7、42 和 70 d 后, 各处理残留秸秆的全碳和全氮含量均呈先增加后降低的变化趋势, 而残留秸秆的其他养分指标随着培养时间延长尚无明显的变化规律。

2.5 禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 丰度与残留秸秆性质的相关性

由表 4 的相关性分析结果可知, 秸秆降解 7 d 时, 残留秸秆中的禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 丰度与秸秆全钾含量极显著负相关($P<0.01$); 降解 42 d 时, 残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度与秸秆易矿化碳 (C_1) 含量显著正相关($P<0.05$); 降解 70 d 时, 禾谷镰刀菌丰

表 3 残留玉米秸秆的养分性质
Table 3 Nutrient characteristics of residual maize straws

降解时间(d)	处理	全碳(g/kg)	全氮(g/kg)	全磷(g/kg)	全钾(g/kg)	C/N	C/P	C/K
7	SF	461.53 ± 0.77 a	11.04 ± 0.15 ab	1.67 ± 0.04 ab	17.73 ± 0.06 a	41.81 ± 0.60 a	275.96 ± 7.88 ab	26.03 ± 0.07 a
	SFX	449.71 ± 1.65 b	10.68 ± 0.41 bc	1.56 ± 0.05 b	17.02 ± 0.25 b	42.17 ± 1.76 a	288.49 ± 9.84 a	26.43 ± 0.44 a
	SFJ	444.52 ± 6.59 b	11.58 ± 0.30 a	1.69 ± 0.11 a	17.73 ± 0.32 a	38.41 ± 1.33 b	264.30 ± 18.22 b	25.08 ± 0.74 b
	SFL	444.50 ± 8.21 b	10.16 ± 0.51 c	1.55 ± 0.01 b	17.98 ± 0.17 a	43.80 ± 1.96 a	286.78 ± 5.62 a	24.73 ± 0.30 b
42	SF	471.34 ± 6.13 a	11.36 ± 1.04 b	1.27 ± 0.04 c	20.59 ± 0.36 a	41.74 ± 4.03 a	370.20 ± 8.30 a	22.90 ± 0.22 a
	SFX	465.82 ± 6.13 a	12.60 ± 0.26 a	1.45 ± 0.07 b	20.94 ± 0.43 a	36.99 ± 1.24 a	322.30 ± 13.53 b	22.25 ± 0.31 a
	SFJ	476.83 ± 15.96 a	12.12 ± 0.37 ab	1.60 ± 0.06 a	21.42 ± 0.25 a	39.39 ± 2.05 a	297.39 ± 5.49 c	22.27 ± 1.01 a
	SFL	470.43 ± 0.56 a	12.69 ± 0.49 a	1.64 ± 0.03 a	20.83 ± 0.70 a	37.12 ± 1.45 a	286.29 ± 5.45 c	22.60 ± 0.76 a
70	SF	459.93 ± 9.74 a	10.79 ± 0.52 b	1.46 ± 0.07 a	18.85 ± 0.89 b	42.71 ± 2.47 b	315.56 ± 13.91 a	24.44 ± 1.32 a
	SFX	448.86 ± 9.98 a	10.86 ± 0.22 b	1.30 ± 0.12 a	20.07 ± 0.90 ab	41.32 ± 0.81 b	345.60 ± 23.55 a	22.38 ± 0.57 b
	SFJ	442.60 ± 9.79 a	11.90 ± 0.00 a	1.40 ± 0.12 a	20.17 ± 0.30 a	37.20 ± 0.82 c	318.33 ± 30.46 a	21.95 ± 0.76 b
	SFL	449.19 ± 5.33 a	9.76 ± 0.20 c	1.40 ± 0.00 a	19.38 ± 0.14 ab	46.05 ± 0.69 a	319.77 ± 2.98 a	23.18 ± 0.42 ab

表 4 禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 丰度与残留秸秆性质的相关性 ($n = 12$)
Table 4 Correlation coefficients among *F. graminearum* CGMCC3.4598 abundance with properties of residual maize straws

降解时间(d)	全碳	全氮	全磷	全钾	C/N	C/P	C/K	C ₀	C ₁	k
7	ns	ns	ns	-0.753**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
42	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.648*	ns
70	ns	0.800**	ns	ns	-0.822**	ns	ns	ns	ns	ns

注：**表示相关性达 $P < 0.01$ 显著水平，* 表示相关性达 $P < 0.05$ 显著水平，ns 表示无显著相关。

度与秸秆全氮含量极显著正相关($P < 0.01$)，与 C/N 极显著负相关($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 不同拮抗菌株对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 的拮抗效果评估

通过平板对峙试验对 4 种生防菌株的拮抗效果进行初步检验(图 1)，确定了吸水链霉菌 ACCC41648 (*S. hygroscopicus*)、吸水链霉菌井冈变种 ACCC40051 (*S. hygroscopicus* var. *jinggangensis*)和娄彻氏链霉菌 ACCC41594(*S. rochei*)为禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 (*F. graminearum*)的潜在拮抗菌，这与前人^[21-22]的研究结果相似。有研究认为蜡状芽胞杆菌(*B. cereus*)作为生防芽胞杆菌的一种，能分泌抗菌肽等多种抑菌活性物质，对小麦赤霉病菌有明显的抑制作用^[23]。但从本研究的对峙结果来看，蜡状芽胞杆菌 ACCC 10263 对病原菌株 CGMCC3.4598 的生长未表现拮抗作用，其原因有待进一步研究。基于 70 d 的室内培育试验，我们发现秸秆降解 7、42 和 70 d 后(图 2)，吸水链霉菌 ACCC41648 及其井冈变种 ACCC40051 均未表现抑制残留秸秆中禾谷镰刀菌生长的效应，这与本文平板对峙呈现的结果不一致；而娄彻氏链霉菌

ACCC41594 在秸秆降解前 42 d 降低秸秆中的禾谷镰刀菌丰度达 30.91% ~ 69.28%，其拮抗效果较上述两种链霉菌株更为稳定。以上结果表明由平板对峙筛选得到的拮抗菌株在其他环境条件下不一定能很好地复现其拮抗作用。即便这些菌株在离体拮抗试验中对目标病原菌产生较强的拮抗作用，但在实际病害防治试验中可能没有防效^[24]，这在前人^[25-26]研究结果中得到了证实。然而也有不少研究表明，经平板对峙筛选获得的拮抗菌株在室内培养、盆栽试验和大田试验中均表现出相同的生防效果^[27-29]，其拮抗潜力依旧稳定存在。Weller^[30]研究认为拮抗菌在不同环境条件下对目标病原菌所表现的防效差异可能与其自身的生存能力、定殖能力以及抑菌物质的产生能力等密切相关。

3.2 拮抗链霉菌介导下的秸秆降解对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 消长的影响

根据室内培育试验结果(图 2)，我们发现无论拮抗链霉菌添加与否，秸秆降解 42 d 是禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 从旺盛生长转向衰亡的临界期；秸秆降解末期(70 d)，残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度已降至最低水平。引起这种变化的原因可能是在培养前期，秸秆含有的可溶性糖、氨基酸等营养物质相对充

足,禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 能利用这些养分迅速扩繁,随着秸秆不断降解,残留秸秆中的易利用养分逐渐被消耗殆尽,病原菌因有效养分供应不足而最终走向消亡^[31]。

本研究发现娄彻氏链霉菌 ACCC41594 对禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 的拮抗效果更稳定,其在秸秆降解 7 d 和 42 d 时降低的禾谷镰刀菌丰度分别达 30.91% 和 69.28%。尽管秸秆降解 70 d 时,添加娄彻氏链霉菌 ACCC41594 处理的禾谷镰刀菌丰度与对照(SF)相比无显著差异(图 2),但该时期对照组残留秸秆中的禾谷镰刀菌已近乎消亡,其丰度仅有 0.90 ng/g 左右,我们推测目标病原菌丰度过低很可能是导致该时期娄彻氏链霉菌 ACCC41594 拮抗效应不显现的原因之一。另外,从秸秆 CO₂-C 累积释放量的结果来看(图 3),添加娄彻氏链霉菌 ACCC41594 能显著促进玉米秸秆的降解(图 3),这与前人^[32-33]的研究结果一致,他们认为娄彻氏链霉菌是一种纤维素降解放线菌,其可产纤维素酶等胞外水解酶分解纤维素和木质素类物质,对农作物秸秆的腐解作用十分明显。进一步研究发现,该拮抗菌株较对照显著降低了秸秆易矿化碳(C_i)含量(表 3),上述结果暗示娄彻氏链霉菌 ACCC41594 很可能以消耗更多易矿化碳的形式促进了玉米秸秆的降解,其原因有待进一步研究。为了探明拮抗链霉菌添加后的秸秆性质变化与禾谷镰刀菌丰度之间的关系,本文发现秸秆降解 7 d 时,添加娄彻氏链霉菌 ACCC41594 较对照显著降低了秸秆的全碳、全氮和 C/K(表 4),但相关性分析结果(表 5)显示残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度与上述指标无显著相关,这暗示了该时期娄彻氏链霉菌 ACCC41594 抑制病原菌株 CGMCC3.4598 生长的效应有可能来自其直接拮抗作用。周淑霞^[33]和 Han 等^[34]研究表示娄彻氏链霉菌可产生多种具有抑菌作用的胞外次生代谢产物,能直接对禾谷镰刀菌菌丝的生长产生抑制作用。秸秆降解 42 d 时,残留秸秆中的禾谷镰刀菌丰度与秸秆易矿化碳含量显著正相关($P < 0.05$),易矿化碳是容易被微生物降解利用的碳组分^[35-36],其活性较高,当秸秆易矿化碳含量减少时,会引起赤霉菌生长所需的活性有机碳供应不足,进而限制了其生长繁殖。因此该时期娄彻氏链霉菌 ACCC41594 对残留秸秆中禾谷镰刀菌生长产生的抑制效应可能是通过竞争消耗了更多的秸秆易矿化碳,引起病原菌所需的易利用碳源减少所致。综合上述讨论可知,娄彻氏链霉菌 ACCC41594 在秸秆降解过程中抑制禾谷镰刀菌 CGMCC3.4598 生长的效应有可能通过其直接拮抗作

用,也有可能通过促进秸秆降解引起残留秸秆的性质发生变化所致,其机制仍有待进一步研究。

4 结论

本研究先通过平板对峙试验确定了吸水链霉菌 ACCC41648、吸水链霉菌井冈变种 ACCC40051 和娄彻氏链霉菌 ACCC41594 是禾谷镰刀菌 CGMCC 3.4598 的潜在拮抗菌。然后基于 70 d 的室内培育试验,发现秸秆降解 7、42 和 70 d 后,娄彻氏链霉菌 ACCC41594 的拮抗效果较上述两株拮抗链霉菌更为稳定,其能直接抑制禾谷镰刀菌的生长,也能在促进秸秆降解的过程中通过改变残留秸秆性质间接抑制禾谷镰刀菌的生长。本研究结果为小麦赤霉病的生物防治提供了一定的理论指导。

参考文献:

- [1] 陈云,王建强,杨荣明,等. 小麦赤霉病发生危害形势及防控对策[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 11-17.
- [2] 程顺和,张勇,别同德,等. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 938-942.
- [3] Dweba C C, Figlan S, Shimelis H A, et al. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies[J]. Crop Protection, 2017, 91: 114-122.
- [4] 张爱民,阳文龙,李欣,等. 小麦抗赤霉病研究现状与展望[J]. 遗传, 2018, 40(10): 858-873.
- [5] 黄冲,姜玉英,吴佳文,等. 2018 年我国小麦赤霉病重发特点及原因分析[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 160-163.
- [6] Bönninghausen J, Schauer N, Schäfer W, et al. Metabolic profiling of wheat *Rachis* node infection by *Fusarium graminearum* - decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility[J]. The New Phytologist, 2019, 221(1): 459-469.
- [7] 赵娜,杜秀明,李令蕊,等. 我国小麦赤霉病发生与控制研究进展[J]. 河北农业科学, 2020, 24(2): 54-58.
- [8] 陈文华,殷宪超,武德亮,等. 小麦赤霉病生物防治研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 12-18.
- [9] Anand A, Zhou T, Trick H N, et al. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384): 1101-1111.
- [10] Kemp N D, Vaughan M M, McCormick S P, et al. *Sarocladium Zeae* is a systemic endophyte of wheat and an effective biocontrol agent against *Fusarium* head blight[J]. Biological Control, 2020, 149: 104329.
- [11] 张洁,伊艳杰,王金水,等. 小麦赤霉病的防治技术研究进展[J]. 中国植保导刊, 2014, 34(1): 24-28,53.
- [12] Nourozian J, Etebarian H R and Khodakaramian G. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria[J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2006, 28(Suppl.1): 29-38.

- [13] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(8): 185–190.
- [14] Jamal Q, Cho J Y, Moon J H, et al. Purification and antifungal characterization of Cyclo (D-Pro-L- Val) from *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against *Fusarium graminearum* to control head blight in wheat[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 10: 141–147.
- [15] Trail F. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era[J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 103–110.
- [16] Leplat J, Friberg H, Abid M, et al. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2013, 33(1): 97–111.
- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [18] Dyer R B, Kendra D F, Brown D W. Real-time PCR assay to quantify *Fusarium graminearum* wild-type and recombinant mutant DNA in plant material[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(3): 534–542.
- [19] Li Z Q, Ma L, Zhang Y, et al. Effect of wheat cultivars with different resistance to *Fusarium* head blight on rhizosphere *Fusarium graminearum* abundance and microbial community composition[J]. Plant and Soil, 2020, 448(1/2): 383–397.
- [20] Jones C A. Estimation of an active fraction of soil nitrogen[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1984, 15(1): 23–32.
- [21] 宁楚涵, 李文彬, 张晨, 等. 定殖植物根内和根围放线菌的分离鉴定及其体外抑菌促生效应[J]. 微生物学报, 2019, 59(10): 2024–2037.
- [22] Li J, Duan Y B, Bian C H, et al. Effects of validamycin in controlling *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*: Inhibition of DON biosynthesis and induction of host resistance[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 153: 152–160.
- [23] 易龙, 张亚, 廖晓兰, 等. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. 农药, 2013, 52(3): 162–164, 170.
- [24] 喻会平, 罗定棋, 代园凤, 等. 烟草黑胫病拮抗细菌复合菌株的筛选与防治效果评价[J]. 中国农学通报, 2015, 31(8): 102–107.
- [25] Inam-Ul-ha M, Javed N, Ahmad R, et al. Evaluation of different strains of *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea[J]. Plant Pathology Journal, 2003, 2(1): 65–74.
- [26] Parnell J J, Berka R, Young H A, et al. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1110.
- [27] 陈思宇, 陈志谊, 张荣胜. 水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 植物保护学报, 2013, 40(3): 211–218.
- [28] Lu Z X, Tu G P, Zhang T, et al. Screening of antagonistic *Trichoderma* strains and their application for controlling stalk rot in maize[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(1): 145–152.
- [29] Xu W H, Wang K X, Wang H X, et al. Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Biological Control, 2020, 147: 104288.
- [30] Weller D M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26(1): 379–407.
- [31] 田胜营, 李慧敏, 陈金林, 等. 潮土中残留小麦和玉米秸秆养分含量差异及与微生物群落组成的关系[J]. 土壤, 2021, 53(1): 55–63.
- [32] Sun E H, Zhang Y, Yong C, et al. Biological fermentation pretreatment accelerated the depolymerization of straw fiber and its mechanical properties as raw material for mulch film[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 284: 124688.
- [33] 周淑霞. 一种含链霉菌的腐熟菌剂在麦秸还田中的初步应用研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2013.
- [34] Han D D, Wang L Y, Luo Y P. Isolation, identification, and the growth promoting effects of two antagonistic actinomycete strains from the rhizosphere of *Mikania micrantha* Kunth[J]. Microbiological Research, 2018, 208: 1–11.
- [35] Dai Z M, Enders A, Rodrigues J L M, et al. Soil fungal taxonomic and functional community composition as affected by biochar properties[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 126: 159–167.
- [36] 陈吉, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 长期施肥潮土在玉米季施肥初期的有机碳矿化过程研究[J]. 土壤, 2009, 41(5): 719–725.