

添加有机物料的微生物生防制剂对草莓灰霉病的防治

黄洁雪¹, 王晓琳¹, 邬 劼², 吉沐祥^{1*}

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 镇江 212400; 2. 镇江万山红遍农业园, 镇江 212400)

摘要: 为解决微生物生防制剂在实际应用过程中防效不稳定的问题, 本研究通过在不同微生物生防产品中添加有机物料, 分析了添加有机物料对草莓灰霉病防治和土壤微生物数目的影响。本试验共设 15 个处理。微生物生防制剂(BCA)包括枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*(Bs), 木霉菌 *Trichoderma* (Tr), EM 菌(effective microorganisms, EM), 半量枯草芽孢杆菌+木霉菌(1/2BT), 以及无菌剂对照(CK); 有机物料用量(米糠+豆粕粉, RB)设 3 个水平, 分别为不添加, 1/2RB (15 g/m² 米糠+60 g/m² 豆粕粉)和 RB (30 g/m² 米糠+120 g/m² 豆粕粉)。移栽 55 d 后将各处理组分均匀撒施至根周, 随后覆盖地膜并滴灌保湿。结果表明, 木霉菌和 EM 菌能够有效降低灰霉病发病率, 有机物添加量一致时, 微生物生防制剂的防效规律为 EM>Tr>Bs>1/2BT。木霉菌和 EM 菌单剂在发病较轻的试验地 1 中防效为 60.00%~68.00%, 发病严重的试验地 2 中防效为 16.39%~29.01%。各处理中 EM+RB 防效最高, 最高可达 90.00%。添加全量米糠和豆粕粉能够显著提高生防制剂的防效。生防制剂添加有机物料的防效规律为 BCA+RB>BCA+1/2RB>BCA, Tr+RB 防效比 Tr 单剂施用提高 0.17~1.1 倍, EM+RB 防效比 EM 单剂提高 0.32~1.84 倍。同时土壤微生物的数目随有机物料的添加而增加, 1/2RB 和 RB 可使数目分别增长 0.43~8.86 倍和 0.93~32.72 倍。以上结果表明, 实际生产中施用木霉菌或 EM 菌能够有效防治草莓灰霉病, 添加足量的有机物料可以增加土壤微生物丰度从而提高防治效果。

关键词: 草莓; 微生物生防制剂; 灰霉病; 米糠; 豆粕粉

中图分类号: S436.639 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)05-0802-09

Application of Microbial Biocontrol Agents Combined with Organic Material Addition for Combating Strawberry Gray Mold

HUANG Jiexue¹, WANG Xiaolin¹, WU Jie², JI Muxiang^{1*}

(1. Zhenjiang Agricultural Science Institute of Jiangsu Hilly Regions, Zhenjiang 212400, China; 2. Zhenjiang Wanshan Hongbian Agricultural Park, Zhenjiang 212400, China)

Abstract: To solve the unstable effect of microbial biological control agents (BCAs) on strawberry gray mold, field experiments were performed to determine the control effects of different microbial BCAs combined with organic material on strawberry gray mold and the number of soil microorganisms. There were 15 treatments in this experiment. Microbial BCAs included *Bacillus subtilis*, *Trichoderma*, effective microorganisms (EM), half-dose *Bacillus subtilis*+*Trichoderma* (1/2BT) and no BCA control (CK). Organic materials (rice bran and soybean meal powder, RB) included 3 levels: no add, 1/2RB (15 g/m² rice bran +60 g/m² soybean meal powder) and RB (30 g/m² rice bran +120 g/m² soybean meal powder). After 55 days of transplanting, the components of each treatment were evenly broadcasted around the root, and subsequently covered plastic film, moisture was kept with drip irrigation. The results showed that *Trichoderma* and EM could effectively reduce the incidence of gray mold. The order of the control effects of BCAs was EM>Tr>Bs>1/2BT with the same amount of organic

收稿日期: 2020-01-17

基金项目: 镇江市重点研发计划(NY2019002); 句容市农业科技支撑计划(NY2018504007)

作者简介: 黄洁雪, 博士研究生, 助理研究员, E-mail: huangjiexue-8612@163.com; *通信作者, 研究员, E-mail: jilvdun2800@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.05.018

material addition. The control effects of single *Trichoderma* and EM were 60.00%-68.00% in the mild disease test site 1 and 16.39%-29.01% in the serious disease test site 2. The treatment of EM+RB showed the highest prevention effect, which was up to 90.00%. The control effect of BCAs were significantly increased by adding the full amount of rice bran and soybean meal powder. The order of the control effects of BCAs with organic material addition was $BCA+RB > BCA+1/2RB > BCA$. The application of Tr+RB and EM+RB increased the control effects by 0.17-1.1 times and 0.32-1.84 times comparing to single BCAs, respectively. Meanwhile, the soil microbial population was positively regulated by application of organic materials. Application of 1/2RB and RB increased the microbial population by 0.43~8.86 times and 0.93~32.72 times, respectively. These results suggested that the application of *Trichoderma* or EM could effectively control strawberry gray mold in actual production, and the addition of sufficient organic materials could increase the soil microbial abundance, which might consequently improve the control effect.

Key words: strawberry; microbial biological control agents; gray mold; rice bran; soybean meal powder

草莓 *Fragaria×ananassa* Duch.是产量居于世界首位的小浆果,目前我国已成为世界草莓生产和消费的第一大国。在江苏地区,草莓以大棚种植为主,然而长期连作导致病虫害积累,其中灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* Pers.引起的灰霉病在低温潮湿的冬季容易大面积暴发,造成巨大经济损失。灰霉病果实的典型症状是茎端部有较大的灰褐色病变;果实在各个成熟期,尤其是花期易受感染,其中雄蕊是主要感染途径^[1]。目前针对田间灰霉病的防治以化学杀菌剂为主,生物防治为辅,但生物防治一般效果较差,且成本较高。在常规防治条件下,灰霉病快速传播的特性会导致草莓减产 10%~20%,严重时可达 50%^[2]。目前常用的化学杀菌剂由于病菌快速产生的抗药性常常效果不佳,或受到新的法律限制而不能使用。多地抗药性研究发现,嘧菌酯和苯菌灵在美国已经基本无效^[3],嘧菌酯和吡唑醚菌酯在江苏产生高水平抗药性^[4],啶酰菌胺、多菌灵、腐霉利和啉霉胺在江苏、湖南、四川等地也有 50%的菌株产生抗性^[5-7]。对多菌灵以及多种常用农药的残留检测表明,超量和不规范使用造成的农药残留风险阻碍了草莓产业的转型升级^[8-10]。

因此,不易产生抗性,安全性高的生物防治方法被提上议程。目前,灰霉病生防菌在葡萄上已经有枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、深绿木霉 *Trichoderma atroviride* 和出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* 的应用,当发病不重,适期防治并结合适当农艺措施时,防效可达 80%以上^[11]。生防菌与草莓灰葡萄孢的拮抗试验表明,在离体叶上有效的枯草芽胞杆菌单剂在整株上却无效,而深绿木霉单剂则均有效果^[12]。这表明,在室内的拮抗试验、离体局部的试验提供信息的前提下,大田中的完整生产性试验才真正体现生防菌效果。除了单一菌剂外,复合菌剂在生防中的应用也逐步展开。EM 菌 (effective microorganisms, EM) 是日本琉球大学研制的复合微生物制剂,其包括光合菌、乳酸菌、酵母菌、芽胞杆菌和放线菌等 10 个属 80 多种微生物,广泛应用于种植业、养殖业和环保领域。有研究表明,施用 EM 菌能够有效防治猕猴桃溃疡病^[13]和烟草根腐病^[14],有效减少采后草莓的腐烂率^[15],因此其广谱的生防效果值得在其他病害防治中进行研究。

然而实际农业生产中微生物生防制剂的效果往往难以控制,这是由于土壤养分和物理状态,土壤中原有微生物均会影响外来菌剂的定殖与功效。大量的研究表明,土壤中施入的有机物料的种类、质量和空间分布,因其提供了大量营养物质并改变了生存环境,会直接影响土壤微生物的群落分布,数量和活性^[16,17]。因此有机物料的施入成为提高生防菌防效的潜在办法。为防治辣椒枯萎病,将生防菌木霉 *Trichoderma* 与米糠按 1:12.5 比例混合后在辣椒移栽时沾根,相比单纯菌液灌根其防治效果显著提高,死株率降低 50%^[18]。将 5 种生防菌与 5 种有机物料混合后配置得到的“防疫 I 号”在青椒疫病防治中取得 80%的防效,其中有有机物料的添加能显著提高土壤中菌量^[19]。在黄瓜已感染立枯病、枯萎病的连作土壤上,接种病原菌菌丝,施入有机物料稻草后,木霉菌成为优势菌种,提高了抗病性^[20]。施入有机肥而非无机肥能够极显著提高生防放线菌 Act11 和 Act12 的数目,非灭菌条件和灭菌条件下可分别提高 3.62 倍和 15.44 倍^[21]。将生防菌密螺旋链霉菌剂与有机专用肥配合施用,可使得大田试验下魔芋软腐病始发期较 CK 和单用生防菌均推迟 37d,最终病株率下降 58.82%^[22]。

以上在大田作物和蔬菜作物中的大量研究均表明有机物料施入能够有效提高生防菌防效,而在草莓中的研究则大多侧重于生防菌强化的有机肥在病害防治中的作用,如拟茎点霉 B3 与有机肥配施防治叶枯病^[23],中药渣堆肥茶中添加生防菌的强化堆肥茶防治枯萎病^[24],将吸湿链霉菌 B04 进行固体发酵得到有机菌肥防治根腐病^[25],对提高已有商品生防菌生产实践效用的研究较少。因此,为解决草莓生产实践中生防菌效用不稳,防效低的难题,本研究在田间条件下,添加不同用量的米糠和豆粕粉为 4 组商品生防菌(枯草芽胞杆菌、木霉菌、EM 菌和 1/2 枯草芽胞杆菌+1/2 木霉菌组合)提供碳源和氮源,检测各处理对草莓灰霉病的防效以及土壤微生物数目变化,初步揭示有机物料对生防效果的影响及作用机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

生防菌剂(BCA)包括 1000 亿 CFU/g 枯草芽胞杆菌可湿性粉剂(商品名为青叶子,武汉科诺生物科技股份有限公司生产),2 亿 CFU/g 木霉菌可湿性粉剂(上海万力华生物科技有限公司生产),EM 菌 100% 原发酵液(中国独家代理株式会社 EM 研究机构南京代表处爱睦乐环保生物技术(南京)有限公司生产)米糠、豆粕粉为市售。供试草莓品种为“红颜”。

1.2 试验地点与土壤条件

试验位于江苏省镇江市句容市白兔镇的 2 个不同草莓大棚。试验地 1:连续 10 年连作草莓大棚,pH 5.40、有机质 1.78%、碱解氮 271.32 mg/kg、速效磷 245.82 mg/kg、速效钾 236.84 mg/kg。试验地 2:连续 2 年连作草莓大棚,pH 5.77、有机质 1.09%、碱解氮 75.69 mg/kg、速效磷 73.88 mg/kg、速效钾 166.57 mg/kg。

1.3 添加有机物料的微生物生防制剂对草莓灰霉病的防效测定

1.3.1 试验设计 试验共 15 个处理(表 1)。微生物生防制剂共 5 种处理,即施用枯草芽胞杆菌 375 mg/m² (Bs)、木霉菌 750 mg/m² (Tr)、EM 菌 1.2 mL/m² (EM)、枯草芽胞杆菌 187 mg/m²+木霉菌 375 mg/m² (1/2BT)和无菌剂对照(CK);有机物料米糠和豆粕粉(rice bran and bean meal powder,简写为 RB)共 3 个水平,即添加 15 g/m² 米糠+60 g/m² 豆粕粉(RB)、添加 30 g/m² 米糠+120 g/m² 豆粕粉(1/2 RB)、不添加米糠和豆粕粉。每小区 10 m²,100 株草莓,每处理 3 个重复,随机区组排列。

1.3.2 试验方案 2018 年 9 月 1 日移栽草莓。10 月 25 日,覆地膜前,准确称取或量取每小区所需菌剂并

表 1 试验设计
Table 1 Experimental design

| 处理编号 Treatment | 每小区(10 m ²)菌剂与有机物料种类及用量 The types and contents of various microbial BCAs and organic materials in each plot (10 m ²) |
|-------------------|---|
| Bs | 3.75 g 枯草芽胞杆菌 |
| Bs+1/2RB | 3.75 g 枯草芽胞杆菌+0.15 kg 米糠+0.60 kg 豆粕粉 |
| Bs+RB | 3.75 g 枯草芽胞杆菌+0.30 kg 米糠+1.20 kg 豆粕粉 |
| Tr | 7.50 g 木霉菌 |
| Tr+1/2RB | 7.50 g 木霉菌+0.15 kg 米糠+0.60 kg 豆粕粉 |
| Tr+RB | 7.50 g 木霉菌+0.30 kg 米糠+1.20 kg 豆粕粉 |
| EM | 12 mL EM 菌 |
| EM+1/2RB | 12 mL EM 菌+0.15 kg 米糠+0.60 kg 豆粕粉 |
| EM+RB | 12 mL EM 菌+0.30 kg 米糠+1.20 kg 豆粕粉 |
| 1/2BT | 1.87 g 枯草芽胞杆菌+3.75 g 木霉菌 |
| 1/2BT+1/2RB | 1.87 g 枯草芽胞杆菌+3.75 g 木霉菌+0.15 kg 米糠+0.60 kg 豆粕粉 |
| 1/2BT+RB | 1.87 g 枯草芽胞杆菌+3.75 g 木霉菌+0.30 kg 米糠+1.20 kg 豆粕粉 |
| CK | 空白对照 |
| CK+1/2RB | 0.15 kg 米糠+0.60 kg 豆粕粉 |
| CK+RB | 0.30 kg 米糠+1.20 kg 豆粕粉 |

用 H₂O 定容至 1 L 菌液, 喷至米糠和豆粕粉混合物上, 边喷边拌直至拌匀, 均匀撒到草莓根周土表, 覆盖地膜后用滴灌保湿。2018 年 12 月 18 日 (处理后 54 d) 调查各处理灰霉病发病初期发病率, 2019 年 1 月 18 日 (处理后 85 d) 调查各处理发病高峰期发病率。每小区随机调查 2 组发病率, 每组调查 50 个果, 果实萼片发红记为发病, 不加菌不加有机物料的处理为对照。发病率 (%) = (发病果数/调查总果数) × 100, 防效 (%) = (对照发病率—处理发病率)/对照发病率 × 100。

1.4 土壤微生物数目测定

2019 年 1 月 23 日 (处理后 90 d), 每处理取 3 土钻 (0~20 cm), 混匀后作为一个混合样, 除去植物残根、杂物, 保存于 4 °C 冰箱中, 用于土壤微生物的分离和计数。采用稀释平板计数法测定土壤中真菌、细菌和放线菌的数量。真菌用马丁氏培养基, 细菌用牛肉膏蛋白胨培养基, 放线菌用改良高氏 1 号培养基^[26]。

1.5 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 和 DPS 软件进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 EM 菌和木霉菌对草莓灰霉病的防效

两片试验地的两次调查结果表明, 包含 EM 菌和木霉菌的所有处理均能够显著降低草莓灰霉病的发病率, 而枯草芽胞杆菌和 1/2BT (半量枯草芽胞杆菌和木霉菌的处理组合) 处理只在发病率较低的试验地 1 的发病高峰期发病率显著下降 (表 2)。不添加有机物料仅施用生防菌时, 平均防效依次为 EM (44.37%) > Tr (40.51%) > Bs (14.87%) > 1/2BT (-8.25%); 添加 1/2RB 时, 平均防效依次为 EM+1/2RB (57.73%) > Tr+1/2RB (50.54%) > Bs+1/2RB (23.36%) > 1/2BT+1/2RB (16.02%) > CK+1/2RB (-14.08%); 添加 RB 时, 平均防效依次为 EM+RB (69.45%) > Tr+RB (57.72%) > Bs+RB (38.24%) > 1/2BT+RB (24.39%) > CK+RB (-15.17%), EM 菌和木霉菌防效最好。在发病不严重时, 发病率普遍不超过 25% 的试验地 1 中 (表 2), 发病初期 CK 发病率仅为 4.00%, 木霉菌和 EM 菌可将发病率降至 1.60% 以下, 发病高峰期 CK 发病率 20.00%, 木霉菌和 EM 菌可将发病率降至 7.60% 以下, EM 菌和木霉菌防效为 60.00%~68.00%。在发病严重, 无菌剂对照发病率均高于 48% 的试验地 2 (表 3)。虽然所有菌剂的防效均明显降低, 但木霉菌和 EM 菌的防效为 16.39%~29.01%, 仍然是相对最高的, 其发病率能够降低到 20.40%~40.80%。施用枯草芽胞杆菌可以降低灰霉病发病率, 但显然防效不佳, 其防效平均仅为 25.49%。半量枯草芽胞杆菌和木霉菌的处理组合 (1/2BT), 其防效低于单施枯草芽胞杆菌, 更远低于单施木霉菌, 在发病严重地块与 CK 发病率无显著差异 (表 3)。

2.2 添加全量米糠豆粕粉对草莓灰霉病的防效

结果表明, CK+1/2RB 和 CK+RB 处理的发病率与 CK 相比均无显著差异 (表 2, 3), 这表明试验处理中少量添加的有机物料本身不影响发病率, 其提供的养分不足以改变植株营养状况从而提高植株本身抗性。生防菌添加有机物料与单施生防菌相比, 呈现发病率下降的趋势 (表 2, 3), 平均防效表现为 BCA+RB > BCA+1/2RB > BCA。添加全量米糠豆粕粉 (RB) 能够显著提高生防菌的防效, Tr+RB 相比 Tr, 防效提高 0.17~1.1 倍, 其中试验地 1 发病高峰时, Tr+RB 防效 86.00% 显著高于 Tr 单剂 62.00%, Tr+1/2RB 防效 70.00% 略高于 Tr 单剂但差异不显著; EM+RB 相比 EM, 防效提高 0.32~1.84 倍, 其中试验地 1 发病高峰时, EM+RB 防效 90.00% 显著高于 EM 单剂 68.00%, EM+1/2RB 防效 70.00% 同样是略高于 EM 单剂但差异不显著 (表 2)。试验地 2 发病初期时, EM+RB 防效 49.62% 显著高于 EM 单剂 29.01%, 防效提高 70%, EM+1/2RB 防效 36.62% 同样是略高于 EM 单剂, 但差异不显著; 发病高峰时, EM+RB 防效 58.20% 显著高于 EM 单剂 20.49%, EM+1/2RB 防效 44.26% 也显著高于 EM 单剂, 防效分别提高 1.84 和 1.16 倍 (表 3)。这进一步表明, 添加一定用量的有机物料能够显著提高生防菌的防效, 而且防控压力越大, 提升效果越好。

2.3 添加有机物料增加土壤微生物数目

为了解木霉菌和 EM 菌在添加有机物料后防效提高的原因, 检测了土壤微生物数目的变化。相比单施菌剂, 添加有机物料使得土壤中的真菌、细菌、放线菌数目在两片试验地中均增加, 且与有机物料投放量

表 2 添加有机物料的微生物生防制剂对草莓灰霉病的防治效果（试验地 1）

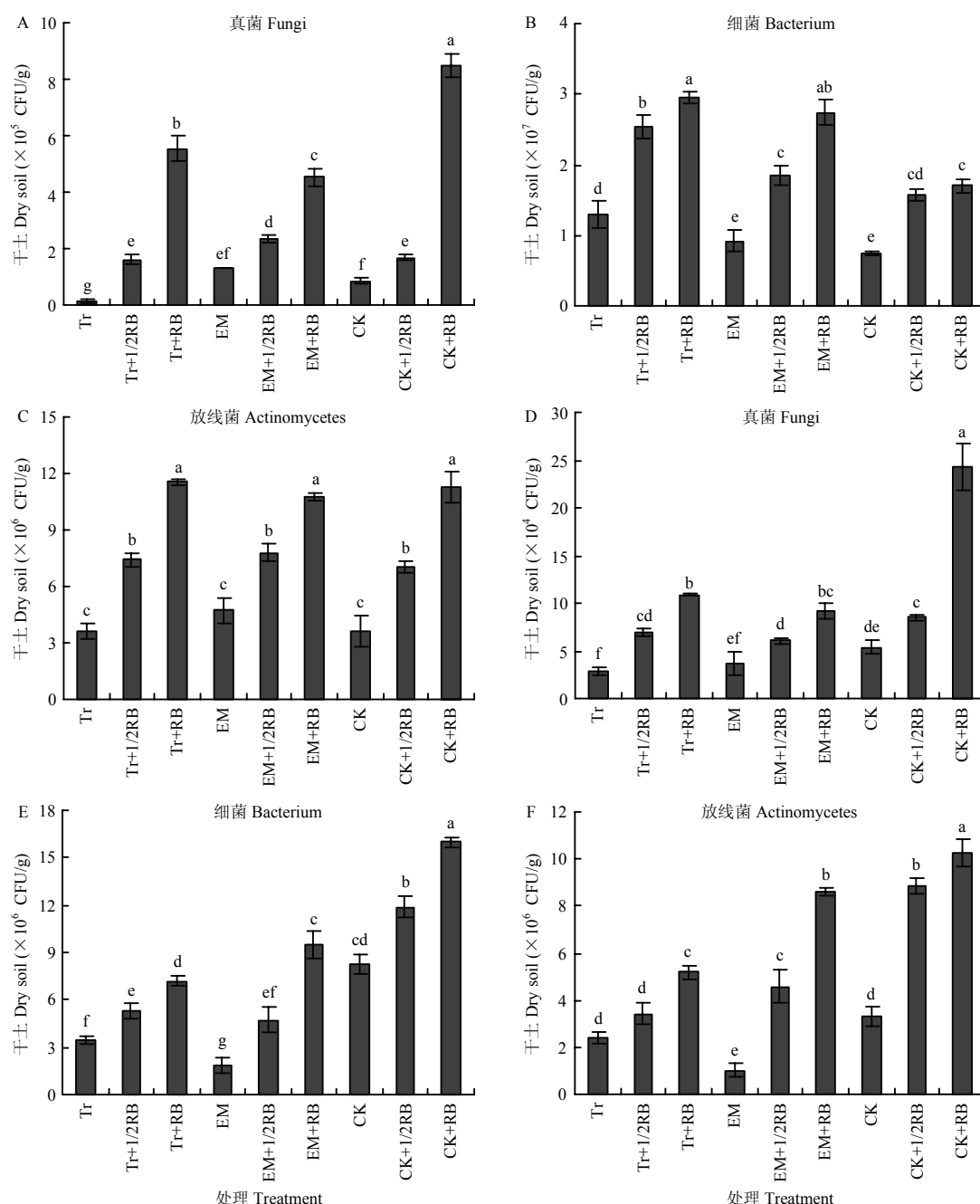
| Table 2 Control efficiency of microbial BCAs combined with organic material addition for combating strawberry gray mold (test site 1) | | | | |
|---|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 处理 Treatment | 发病初期 Early stage (54 d) | | 发病高峰期 Peak hours (85 d) | |
| | 发病率 Incidence (%) | 防效 Control efficiency (%) | 发病率 Incidence (%) | 防效 Control efficiency (%) |
| Bs | 2.40±0.84 bcd | 40.00±20.92 abc | 16.40±1.48 b | 18.00±7.42 f |
| Bs+1/2RB | 2.80±0.55 bc | 30.00±13.69 bc | 12.80±1.82 cd | 36.00±9.08 de |
| Bs+RB | 2.40±0.45 bcd | 40.00±11.18 abc | 7.60±1.10 ef | 62.00±5.48 bc |
| Tr | 1.60±0.84 cd | 60.00±20.92 ab | 7.60±1.30 ef | 62.00±6.52 bc |
| Tr+1/2RB | 1.20±0.89 cd | 70.00±22.36 ab | 6.00±1.58 f | 70.00±7.91 b |
| Tr+RB | 1.20±0.55 cd | 70.00±13.69 ab | 2.80±0.89 g | 86.00±4.47 a |
| EM | 1.60±0.45 cd | 60.00±11.18 ab | 6.40±1.10 f | 68.00±5.48 b |
| EM+1/2RB | 0.80±0.55 d | 80.00±13.69 a | 6.00±1.58 f | 70.00±7.91 b |
| EM+RB | 0.80±0.55 d | 80.00±13.69 a | 2.00±1.00 g | 90.00±5.00 a |
| 1/2BT | 4.80±0.55 a | -20.00±13.69 d | 14.00±0.71 bc | 30.00±3.54 ef |
| 1/2BT+1/2RB | 2.40±0.45 bcd | 40.00±11.18 abc | 14.40±0.84 bc | 28.00±4.18 ef |
| 1/2BT+RB | 2.40±0.45 bcd | 40.00±11.18 abc | 10.40±0.84 de | 48.00±4.18 cd |
| CK | 4.00±0.71 ab | — | 20.00±1.00 a | — |
| CK+1/2RB | 5.60±0.84 a | -40.00±20.96 d | 22.00±1.00 a | -10.00±5.00 g |
| CK+RB | 5.60±0.84 a | -40.00±20.96 d | 23.20±1.52 a | -16.00±7.58 g |

注：数据为平均值±标准误，不同小字母表示 0.05 水平上差异显著。下同。
Note: Data were presented as means±SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

表 3 添加有机物料的微生物生防制剂对草莓灰霉病的防治效果（试验地 2）

| Table 3 Control efficiency of microbial BCAs combined with organic material addition for combating strawberry gray mold (test site2) | | | | |
|--|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 处理 Treatment | 发病初期 Early stage (54 d) | | 发病高峰期 Peak hours (85 d) | |
| | 发病率 Incidence (%) | 防效 Control efficiency (%) | 发病率 Incidence (%) | 防效 Control efficiency (%) |
| Bs | 57.20±4.83 b | -9.16±9.21 f | 43.60±4.66 bcde | 10.66±9.55 defg |
| Bs+1/2RB | 43.60±3.11 cd | 16.79±5.94 de | 43.60±4.09 bcde | 10.66±8.37 defg |
| Bs+RB | 30.00±1.87 fg | 42.75±3.57 ab | 44.80±3.85 bcde | 8.20±7.88 defg |
| Tr | 40.00±3.08 de | 23.66±5.88 cd | 40.80±2.30 cdef | 16.39±4.72 cdef |
| Tr+1/2RB | 34.00±2.35 efg | 35.11±4.48 abc | 35.60±3.11 efg | 27.05±6.38 bcd |
| Tr+RB | 31.20±1.67 efg | 40.46±3.19 abc | 32.00±1.87 fg | 34.43±3.83 bc |
| EM | 37.20±2.61 def | 29.01±4.98 bcd | 38.80±3.36 def | 20.49±6.89 cde |
| EM+1/2RB | 33.20±1.34 efg | 36.64±2.56 abc | 27.20±1.67 gh | 44.26±3.43 ab |
| EM+RB | 26.40±2.28 g | 49.62±4.35 a | 20.40±1.92 h | 58.20±3.94 a |
| 1/2BT | 67.20±4.98 a | -28.24±9.50 g | 56.00±3.74 a | -14.75±7.67 h |
| 1/2BT+1/2RB | 53.60±4.60 b | -2.29±8.79 f | 49.60±2.17 abc | -1.64±4.44 fgh |
| 1/2BT+RB | 50.40±3.11 bc | 3.82±5.94 ef | 46.00±3.32 bcd | 5.74±6.80 efg |
| CK | 52.40±3.56 b | — | 48.80±3.58 abc | — |
| CK+1/2RB | 54.00±4.42 b | -3.05±8.43 f | 50.40±3.96 ab | -3.28±8.12 gh |
| CK+RB | 54.00±1.58 b | -3.05±3.02 f | 49.60±2.77 abc | -1.64±5.69 fgh |

呈正相关（图 1），1/2RB 可增加微生物数目 0.43~8.86 倍，RB 可增加 0.93~32.72 倍。即使试验地 1 与试验地 2 相比，其耕作时间更长，有机质含量和土壤中速效养分更高，导致其原始微生物丰度和构成具有明显差异，即土壤中可培养真菌和细菌数目比试验地 2 高出 1 个数量级，两者也具有相同的趋势，这表明有机物料增加土壤微生物数目的作用不受原始微生物丰度影响。在土壤中施用木霉菌，处理 Tr 和 Tr+RB 都会降低土壤中的真菌总数目（图 1A，D）。



注：通过稀释平板计数法测定各处理 0~20 cm 土壤中真菌、细菌和放线菌的数量。A-C：试验地 1；D-F：试验地 2。图中正负误差线表示标准误差大小，不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$, 邓肯法)。

Note: The number of fungi, bacterium and actinomycetes in 0~20 cm soil in each treatment was counted with dilute plate method. A-C: experimental field 1; D-E: experimental field 2. Values in the bar chart were mean \pm SE. Different lowercase letters indicated significant differences at 0.05 level by Duncan's test between different treatments.

图 1 添加有机物料和微生物生防制剂对土壤微生物数目的影响

Fig. 1 Effect of organic material addition and microbial BCAs on the number of soil microorganisms

3 讨论

草莓灰霉病是影响草莓经济利益的重要病害，为减少农药残留提高果品质量，使用生防菌进行生物防控是现代农业的发展趋势。选择合适的生防菌，适宜的配套施用方法是提高生防效果的关键。

木霉 *Trichoderma* 与多种病原真菌具备较强的拮抗作用，其主要生防机制包括竞争作用、重寄生作用、

抗生作用、诱导植物抗性作用,不同作用机制之间往往协同发挥作用^[27]。灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* Pers. 传播能力强,遗传变异快,易产生抗药性,但其营养需求高,木霉菌可以通过快速生长与之竞争营养和空间降低灰葡萄孢的种群数量。灰葡萄孢经常通过伤口穿透植物组织,利用衰老的宿主组织存活下来,并作为接种源感染浆果。因此,木霉菌在草莓衰老组织中定殖并与灰葡萄孢竞争,可以预防或减少草莓灰霉病的感染^[28]。长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* 的挥发性提取物对灰葡萄孢的抑菌率高达 91.9%,因此抗生作用也是木霉菌作为灰霉病生防菌的作用机制之一^[29]。棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 和哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 对番茄灰霉菌的室内抑制作用可分别高达 74.25%~96.915% 和 71.072%~95.889%^[30]。在草莓上施用解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42、哈茨木霉 T22、白僵菌 *Beauveria bassiana* ATCC 74040 防治灰霉病,这些生防菌的应用改变了细菌和真菌的群落组成和多样性,两种生防菌同时施用对微生物群落组成的影响大于单一施用,其中只有含有木霉菌的应用才能有效地减少含灰霉孢子的锤舌菌纲 *Leotiomycetes* 的相对丰度^[31]。本研究同样发现木霉菌可以改变土壤微生物数目并有效防治草莓灰霉病,这可能是通过营养竞争和分泌抗生物物质来降低灰葡萄孢种群数量。具体作用机制尚需要进一步研究,如检测土壤中的灰葡萄孢数量和木霉菌数量,以及植物的抗性变化。

来自西伯利亚的枯草芽胞杆菌 VKPM B 10641 在室内表现出良好的抑制草莓灰霉菌的效果,在相对湿度达到 80%,对照发病率高于 30% 的年份,其大田试验中生防效果可超过 60%^[32],其试验田发病强度类似于本试验的试验地 1,其结果也与本研究结果类似,然而,本研究中使用的枯草芽胞杆菌在发病严重的环境中防效不佳,这可能意味着该株系无法防治发病较重的灰霉病菌,可进一步选择其他株系的枯草芽胞杆菌来防御草莓灰霉病。对于单一生防菌作用方式单一或防效较弱的问题,生防菌联合使用或者复合菌剂的使用被认为是解决方案。有研究发现,在草莓上联合使用解淀粉芽胞杆菌、出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* 和白僵菌能够提高果实的灰霉病防控效果,然而单一菌剂则无效^[33]。此外,同时使用不相容的生防制剂有时会导致防效下降^[12]。枯草芽胞杆菌和哈茨木霉菌联合使用防治番茄枯萎病能够获得最高的防效 56%,高于枯草芽胞杆菌单剂的 44% 和哈茨木霉单剂的 40%^[34],然而本研究中使用的半量枯草芽胞杆菌和木霉菌的联合使用,其防效显著低于全量单剂,这可能意味着两者不相容,或是由于半量联合使得有效浓度不足。与单一的纯培养相比,混合培养的兼容微生物可能更有效地控制一系列土壤中传播的病原体,EM 菌 (effective microorganisms, EM) 就是一种商品化的兼容有益微生物混合发酵液。EM 可以减少生菜和卷心菜的软腐病,生菜菌核病,通过改善氮代谢提高对番茄疫霉菌的抗性^[35]。含有发酵有机质的 EM (EM-bokashi) 相比灭菌的 bokashi 能够减少立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 对胡萝卜的侵染,这种减少可能得益于真菌寄生机制^[36]。这表明混合的多种有益菌具有作为生防产品的可行性,以及其对不同真菌病害可能存在的广谱防效。此外,EM 菌还具有促生作用,如长期施用可提高小麦产量和营养^[37],还能有效地抑制盐诱导的植物渗透和离子损伤,提高大豆盐耐性^[38]。因此,在草莓土壤中施用 EM 菌,可能通过真菌寄生机制降低灰霉病种群数量,或通过改善营养代谢提高植物抗性减少发病率,可以为盐敏感植物-草莓提供多重保护。本研究发现木霉菌和 EM 菌在防治草莓灰霉病中具有重要的生产实践可行性。

通过改变土壤原有的土壤养分和物理状态,即在田间添加有机物料,可为微生物生防制剂提供适宜的定殖和繁衍环境。有研究表明,随着土壤中外源添加的有机质的增加,造成桉树枯梢病的肉桂疫霉败育率增加,其主要拮抗原因可能就是土壤养分和微生物种群数量增加^[39]。为防控黄瓜枯萎病施用微生物制剂的同时配套秸秆生物反应堆技术,可以调节土壤微生物群落结构,将易发病的真菌型转化为有利于黄瓜生长的细菌型^[40]。主成分为蚕豆粉和无机盐类等的有机添加物结合拮抗微生物,可以有效控制甜椒疫病、番茄立枯病和番茄苗期猝倒病,其作用机理被认为是可以抑制病原菌孢子的萌发、提高有益微生物种群密度并为之提供营养^[41]。本研究由于枯草芽胞杆菌和 1/2 枯草+1/2 木霉的处理均防效差,与不加菌对照无显著差异,因此没有检测其微生物数目;而为生防菌木霉或 EM 菌添加米糠和豆粕粉可显著增加土壤微生物数目,同时提高灰霉病防效,增效幅度超过 30%,这可能是因为有机物为生防菌提供了生长所需的碳源和氮源。

大棚草莓在定植后 40~55 d 后进入现蕾初期,此时需垄面覆盖黑色或银黑地膜以保持地温,并在地膜下铺设滴灌带便于水肥一体化操作。本研究选取这一特殊时期,是利用遮光地膜防止生防菌被太阳光中的

紫外线杀死, 且利用地膜下垄面较好的温湿条件, 利于功能菌的生存与持续大量增殖, 不深翻且用量不大的有机物料撒施可避免不腐熟有机物料易烧苗的问题。本研究采用的有机物料施用时间和施用方式有助于实现防效提升。

本研究发现, 米糠和豆粕粉的施用量与土壤微生物数量呈正相关, 更重要的是, 其用量需达到一定阈值才能显著提高微生物制剂的生防效果, 这表明量变引起质变的关键点仍需进一步研究。而施用木霉菌会降低土壤中的真菌总数目, 无论是单施木霉菌, 还是加全量米糠豆粕粉, 这可能与木霉对其他真菌的抑制/重寄生作用有关, 具体的种属变化还需进一步研究。此外, 许多研究表明有机物料的碳氮比对微生物的生长具有重要作用, 碳氮比为 15:1 时微生物生长与植物氮肥供应可以取得比较理想的平衡^[42]。因此, 与木霉菌和 EM 菌相匹配的有机物料配比仍需进一步优化。总之, 为获得绿色安全的草莓果品, 建议在使用木霉菌和 EM 菌防控草莓灰霉病时添加适当比例和用量的有机物料, 可取得更高的防控效果。

参 考 文 献

- [1] Mertely J C, MacKenzie S J, Legard D E. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit[J]. Plant Disease, 2002, 86: 1019-1024.
- [2] Cordova L G, Amiri A, Peres N A. Effectiveness of fungicide treatments following the strawberry advisory system for control of *Botrytis* fruit rot in Florida[J]. Crop Protection, 2017, 100: 163-167.
- [3] Petrasch S, Knapp S J, van Kan J A L, et al. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20: 877-892.
- [4] 肖婷, 许媛, 陈宏州, 等. 江苏丘陵地区草莓灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)对 QoIs 类杀菌剂的抗药性研究[J]. 果树学报, 2017, 34(5): 603-610.
- [5] 肖婷, 陈露, 张建华, 等. 江苏省句容市灰霉病菌对啮酰菌胺的抗药性[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 50-55.
- [6] 贡常委, 秦旖曼, 屈劲松, 等. 四川省草莓灰霉病菌对咯菌腈的抗性测定及其机制[J]. 中国农业科学, 2018, 51(22): 4277-4287.
- [7] 张亚, 王翀, 刘双清, 等. 湖南省草莓灰霉病菌对 4 种杀菌剂的抗药性检测[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 181-187.
- [8] 戎素云, 郭广辉. 食品安全事件的经济解读及其制度改进启示——对“草莓农药残留超标”事件的分析[J]. 河北经贸大学学报, 2017, 38(1): 79-84.
- [9] 刘敏, 张宏雨, 陈利平, 等. 2017 年昌平草莓质量安全调查分析报告[J]. 农学学报, 2018, 8(5): 15-20.
- [10] 崔新仪, 阮璐璐, 黄思达, 等. 温室草莓生产中超量使用多菌灵的风险评估[J]. 农药, 2018, 57(8): 582-584, 608.
- [11] Pertot I, Giovannini O, Benanchi M, et al. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine[J]. Crop Protection, 2017, 97: 85-93.
- [12] Robinson-Boyer L, Jeger M J, Xu X-M, et al. Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action[J]. Biocontrol Science and Technology, 2009, 19: 1051-1065.
- [13] 杨清平, 王立华, 胡楠. EM 菌对猕猴桃溃疡病的防治试验[J]. 福建林业科技, 2015, 42(1): 100-102, 114.
- [14] 李海江, 王正平, 宋学立, 等. 河南省平顶山烟区烟草根腐病发病情况调查及 EM 菌剂防治效果研究[J]. 农学学报, 2017, 7(2): 25-30.
- [15] 贾宇, 董晨阳, 周绪宝, 等. 品质因子和益生菌对草莓品质和贮藏的影响[J]. 农产品加工, 2019(13): 12-15.
- [16] 程存刚, 赵德英, 吕德国, 等. 植物源有机物料对果园土壤微生物群落多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(4): 913-922.
- [17] Grigera M S, Drijber R A, Eskridge K M, et al. Soil microbial biomass relationships with organic matter fractions in a nebraska corn field mapped using apparent electrical conductivity[J]. Soil Science Society of America Journal, 2006, 70(5): 1480-1488.
- [18] 燕嗣皇, 陆德清, 杨雨环. 木霉米糠菌剂沾根防治辣椒枯萎病[J]. 中国生物防治, 1999, 15(2): 50.
- [19] 朱宗源, 周新根, 宋荣浩, 等. 用生物制剂防治青椒疫病[J]. 上海农业学报, 1995, 11(1): 64-68.
- [20] 袁飞, 彭宇, 张春兰, 等. 有机物料减轻设施连作黄瓜苗期病害的微生物效应[J]. 应用生态学报, 2004, 15(5): 867-870.
- [21] 曹书苗, 薛泉宏, 邢胜利. 施用有机无机养分对生防放线菌数量的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(10): 210-215.
- [22] 崔鸣, 李建国, 陈和润, 等. 生防菌和有机专用肥对魔芋软腐病的防控效果及增产效应试验研究[J]. 陕西农业科学, 2014, 60(11): 28-29, 37.
- [23] 郝玉敏, 戴传超, 戴志东, 等. 拟茎点霉 B3 与有机肥配施对连作草莓生长的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(21): 6695-6704.
- [24] 马艳, 李艳霞, 常志州, 等. 强化拮抗菌有机肥在连作大棚草莓上的应用效果研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(6): 1459-1467.
- [25] Shen T, Wang C, Yang H, et al. Identification, solid-state fermentation and biocontrol effects of *Streptomyces hygroscopicus* B04 on strawberry root

- rot[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 103: 36-43.
- [26] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [27] Benítez T, Rincón A M, Limón M C, *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains[J]. *International Microbiology*, 2004, 7: 249-260.
- [28] Card S D, Walter M, Jaspers M V, *et al.* Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2009, 38: 183-192.
- [29] 吉海龙, 伊洪伟, 池玉杰. 长枝木霉菌株 T05 抑菌活性与拮抗机制[J]. *东北林业大学学报*, 2016, 44(1): 114-119.
- [30] Kuzmanovska B, Rusevski R, Jankulovska M, *et al.* Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates[J]. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2018, 78: 391-399.
- [31] Cruz A F, Barka G D, Sylla J, *et al.* Biocontrol of strawberry fruit infected by *Botrytis cinerea*: Effects on the microbial communities on fruit assessed by next-generation sequencing[J]. *Journal of Phytopathology*, 2018, 166: 403-411.
- [32] Shternshis M V, Belyaev A A, Shpatova T V, *et al.* Influence of *Bacillus* spp. on strawberry gray-mold causing agent and host plant resistance to disease[J]. *Contemporary Problems of Ecology*, 2015, 8: 390-396.
- [33] Sylla J, Alsanjani B W, Krüger E, *et al.* Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 143: 461-471.
- [34] Jangir M, Sharma S, Sharma S. Target and non-target effects of dual inoculation of biocontrol agents against Fusarium wilt in *Solanum lycopersicum*[J]. *Biological Control*, 2019, 138: 104069.
- [35] Olle M, Williams I H. Effective microorganisms and their influence on vegetable production – a review[J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2013, 88: 380-386.
- [36] Shin K, van Diepen G, Blok W, *et al.* Variability of effective micro-organisms (EM) in bokashi and soil and effects on soil-borne plant pathogens[J]. *Crop Protection*, 2017, 99: 168-176.
- [37] Hu C, Qi Y. Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China[J]. *European Journal of Agronomy*, 2013, 46: 63-67.
- [38] Talaat N B, Ghoniem A E, Abdelhamid M T, *et al.* Effective microorganisms improve growth performance, alter nutrients acquisition and induce compatible solutes accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants subjected to salinity stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2014, 75: 281-295.
- [39] Nesbitt H J, Malajczuk N, Glenn A R. Effect of organic matter on the survival of *Phytophthora cinnamomi* in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1979, 11: 133-136.
- [40] 马建华, 张丽荣, 康萍芝, 等. 秸秆生物反应堆技术的应用对设施黄瓜土壤微生物的影响[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(12): 161-165.
- [41] 周新根, 朱宗源, 汪树俊. 辅以拮抗微生物的有机添加物对蔬菜土传病原菌的生物防治作用[J]. *上海农业学报*, 1994, 10(4): 53-58.
- [42] 王利利, 董民, 张璐, 等. 不同碳氮比有机肥对有机农业土壤微生物生物量的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2013, 21(9): 1073-1077.