

魏艳丽,李红梅,扈进冬,等. 臭氧水与生防菌剂组合应用对番茄根结线虫及根际微生物群落的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(12):121-127.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.12.020

# 臭氧水与生防菌剂组合应用对番茄根结线虫及根际微生物群落的影响

魏艳丽<sup>1</sup>, 李红梅<sup>1</sup>, 扈进冬<sup>1</sup>, 隋丽娜<sup>2</sup>, 刘宝军<sup>1</sup>, 赵忠娟<sup>1</sup>, 李纪顺<sup>1</sup>

[1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)/山东省科学院生态研究所, 山东济南 250103;

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院, 山东济南 250353]

**摘要:**为了明确臭氧水与菌剂组合应用对番茄根结线虫的防治效果,采用定量接种法探究臭氧水与不同菌剂组合处理对沙培和土培番茄生长、南方根结线虫防治效果及根际土壤微生物群落的影响。结果表明,单独臭氧水处理对番茄生长无影响,8 mg/L 的臭氧水可显著减少番茄根系根结的形成,使盆栽番茄根际土中南方根结线虫群体密度降低 90.79%。臭氧水与哈茨木霉 T11-W 和伯克氏菌 B418 组合处理,番茄株高和鲜质量与对照相比分别增加 61.64%、90.90%,对根结线虫的相对防效为 69.95%。臭氧水与 B418 组合处理,番茄株高和鲜质量分别增加 59.10%、68.86%,对根结线虫的相对防效为 64.39%。臭氧水与哈茨木霉 T11-W 和伯克氏菌 B418 组合处理可降低细菌的丰富度,增加真菌群落多样性和丰富度,显著降低链格孢属(*Alternaria*)、镰刀菌属(*Fusarium*)等潜在植物病原真菌的相对丰度。该研究为臭氧水与菌剂组合防治番茄根结线虫病提供了理论依据。

**关键词:**臭氧水;番茄根结线虫;哈茨木霉;越南伯克霍尔德氏菌;微生物群落

**中图分类号:**S436.412;S154.3

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2022)12-0121-06

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是世界上分布最广、危害最重的植物病原线虫,每年对全世界作物造成严重的经济损失,它能侵染几乎所有的蔬菜作物,对保护地蔬菜的危害尤其严重<sup>[1-3]</sup>,已经成为我国设施蔬菜生产的最重要限制因子之一。

目前对根结线虫的防治主要是以化学药剂为主,分为熏蒸类和非熏蒸类两大类,杀线剂对人畜普遍呈现高毒性,用量大易产生抗药性,长期使用会带来非靶标生物毒害和环境污染等问题<sup>[4-5]</sup>,不少高毒性的杀线剂已被禁止使用。利用寄生或捕食性食线虫菌物、拮抗性根际微生物或致病性病原等进行生物防治是线虫病害防治研究的主流趋势,已报道的植物寄生线虫生防微生物资源有淡紫拟

青霉(*Purpureocillium lilacinum*)菌株 251<sup>[6]</sup>、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)菌株 I-1582<sup>[7]</sup>、厚垣孢普可尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)菌株 ZK7<sup>[8]</sup>、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)菌株 T6<sup>[9]</sup>、橘绿木霉(*T. citrinoviride*)菌株 Snf 1910<sup>[10]</sup>、越南伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia vietnamiensi*)菌株 B418<sup>[11]</sup>等,其中多株优良生防菌株已被开发为生物杀线剂产品。

臭氧是一种具有强氧化性的气体,在水中分解产生的二级氧化剂——氢氧自由基( $\cdot\text{OH}$ ),是一种非选择性的强氧化剂,可破坏微生物膜结构<sup>[12]</sup>,且极易分解,施用后 40 min 左右就会分解为氧气和水,不会对环境造成二次污染,是一种安全、高效、环保的杀虫灭菌剂<sup>[13]</sup>。Veronico 等研究发现,浇灌臭氧水可调控番茄的基本防御系统,降低线虫侵染率<sup>[14]</sup>;Guo 等研究发现,0.5 mg/L 的臭氧水可在体外抑制芸蓼属植物病原菌欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)的生长<sup>[15]</sup>;Kobayashi 等研究证实,臭氧可使尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)和果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)失去活性<sup>[16]</sup>。

越南伯克霍尔德氏菌 B418 和哈茨木霉(*T. harzianum*) T11-W 是笔者所在研究室保存的多功能生防菌株,其中哈茨木霉 T11-W 对南方根结线

收稿日期:2021-08-04

基金项目:2018 年山东省农业重大应用技术创新项目;齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合项目(编号:2020KJC-GH07);山东省科学院(校)地产学研协同创新基金(编号:2020-CXY11);山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(编号:2020CXGC010803)。

作者简介:魏艳丽(1978—),女,山东东阿人,硕士,研究员,主要从事植病生防和土壤微生物研究。E-mail:407978851@qq.com。

通信作者:李纪顺,研究员,主要从事植病生防和微生物肥料研发等工作。E-mail:yewu2@sdas.org。

虫分散卵具有寄生作用,是一种潜在的寄生植物线虫真菌资源<sup>[17]</sup>,越南伯克霍尔德氏菌 B418 对番茄和茄子根结线虫病的防治效果分别为 63.42%、75.6%<sup>[11]</sup>。在以往的试验中由于土壤中根结线虫含量较高,单独使用菌剂对线虫的防治效果还不甚理想。关于臭氧水与生防菌剂组合使用防治根结线虫是否会出现叠加或协同的效果尚未见报道。本研究在温室条件下,研究了沙培和土壤栽培模式下,臭氧水与哈茨木霉 T11-W 和越南伯克霍尔德氏菌 B418 菌剂联合应用对番茄植株生长的影响和对根结线虫的抑制作用,同时研究了联合应用对番茄根际土壤微生物菌落的影响,以期对根结线虫的防治提供安全有效的防控新技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试线虫和植物:南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 由笔者所在实验室自感病番茄根部分离并鉴定;供试番茄为金冠八号,购自济南伟丽种业有限公司。

供试微生物菌剂为哈茨木霉 T11-W 和越南伯克霍尔德氏菌 B418,为笔者所在实验室发酵制备的草炭制剂,有效活菌数均为  $2 \times 10^8$  CFU/g。

### 1.2 臭氧发生仪器

试验所用臭氧水发生器为山东泽恩农业科技股份有限公司生产的土壤消毒灭菌机,臭氧浓度检测仪为启立 DOZ-30 (广州启立环保设备有限公司)。

### 1.3 番茄南方根结线虫卵(虫)悬浮液的制备

从根结线虫发病严重地块挖取感病番茄植株,流动自来水冲洗干净根部,带回实验室。参考 Hussey 等的线虫悬浮液制备方法<sup>[18]</sup>,将洗净的番茄根用 5% NaClO 溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3 遍后用灭菌剪刀将根部剪成 0.5 cm 的小段,然后加入适量无菌水,充分搅拌均匀。将根及溶液依次倒入 200 目和 500 目的套筛上,收集 500 目筛上的卵及少量 2 龄幼虫,制成每毫升 500 个卵(幼虫)的悬浮液备用。

### 1.4 土壤中根结线虫 qPCR 定量检测

根据已发布的南方根结线虫 ITS 区的保守序列 (NCBI:KF418368.1、FJ534516.1) 设计特异性引物,预期扩增片段大小为 139 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列为 MIITS7-F

(5'-CCAATTTAATCGCAGTGGCTTG), MIITS127-R(5'-CGACAGCCGTTTCACAACAATA)。

qPCR 标准曲线中根结线虫 DNA 的提取参考 Gorny 等的方法<sup>[19]</sup>,于显微镜下挑取 1 000 条 2 龄幼虫,利用 MOBIO 的土壤 DNA 提取试剂盒 (Power Soil DNA Isolation Kit) 提取 DNA 作为标准品,以其梯度稀释液作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,每个标准品重复 3 次,得到各自循环阈值  $C_q$ ,通过  $C_q$  值与 2 龄幼虫的对数值之间的线性关系,建立标准曲线。

qPCR 反应参考 Zhao 等的方法<sup>[20]</sup>,使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (Perfect Real time) 和 Bio-Rad 公司的 iQ5 实时荧光定量 PCR 仪。25  $\mu$ L 体系如下: SYBR Green 预混液 12.5  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L 正向和反向引物各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 添加无菌水至终体积 25  $\mu$ L。qPCR 反应采用三步法:在 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 循环结束后,样品加热到 95  $^{\circ}$ C, 立刻降至 60  $^{\circ}$ C 保持 5 s, 然后每 5 s 提高 0.5  $^{\circ}$ C 递增至 95  $^{\circ}$ C。

### 1.5 番茄沙培试验设计

试验设无菌水对照和臭氧水浇灌 2 个处理,每个处理 20 个重复。将长有 4 张真叶且长势一致的供试番茄苗种植在装有灭菌河沙的 50 mL 塑料离心管中(底部有直径约 2 mm 的洞),每管种植 1 株苗。定植后,在距离番茄根周围 0.5 cm 处滴入 1 mL 的卵(幼虫)悬浮液,使每株番茄苗接种的卵(幼虫)数目为 2 000 个。接种 72 h 后,向管中加入过量的浓度为 8 mg/L 臭氧水(以底部刚刚有水流出为准)。根据番茄长势,每 3 d 浇 1 次 Hogland 溶液<sup>[21]</sup>,置于光照培养箱(光暗比 14 h—10 h, 25  $^{\circ}$ C)中培养 6 周后,小心取出整株根系,用自来水冲洗干净后,采用 EPSON 扫描仪记录根系形态,获取根系图像,分别测量植株根系及地上部干质量等指标。同时统计番茄根系上的根结数量,并计算根结减退率<sup>[9]</sup>。

根结减退率 = (对照根结数 - 处理根结数) / 对照根结数  $\times 100\%$ 。

### 1.6 番茄土壤盆栽试验

盆栽试验于 2020 年 9—11 月在山东省科学院生态研究所试验基地(117 $^{\circ}$ 15.87'E, 36 $^{\circ}$ 39.68'N)进行,盆栽土来自于基地连续种植番茄且根结线虫发病严重地块。除去表层土后,采集 0~20 cm 土样,多点采样混匀后过 50 目筛。土壤理化性质为:有机

质含量 22.14 g/kg、全氮含量 1.02 g/kg、速效磷含量 8.37 mg/kg、速效钾含量 219.16 mg/kg, pH 值 6.70, 参考刘维志的方法<sup>[22]</sup>测定根际土壤中根结线虫数量(以密度计, g/头)。

试验用盆为深 21 cm、直径 23 cm 的圆形花盆, 装土 2 kg/盆。所用臭氧水浓度为 8 mg/L。共设 5 个处理, 每个处理 6 个重复, 分别为 SO 臭氧处理组, 浇 2 L 臭氧水; SOB 处理组: 浇 2 L 臭氧水, 48 h 后加入 B418 菌剂 5 g/盆; SOT 处理组: 浇 2 L 臭氧水, 48 h 后加入 T11 - W 菌剂 5 g/盆; SOBT 处理组, 浇 2 L 臭氧水, 48 h 后加入 T11 - W 菌剂 5 g/盆和 B418 菌剂 5 g/盆; SCK 对照处理组浇等量蒸馏水。定植 5 株/盆具有 4 张真叶、长势一致的番茄苗。依据土壤干湿情况, 每间隔 3 ~ 4 d 浇水 1 次, 6 周后剪取植株地上部用于测量植株高度和地上部鲜质量。然后取出全部根系, 调查所有植株的根系根结数量。

### 1.7 番茄根际土壤微生物 DNA 提取及高通量测序

土壤盆栽番茄收获后, 将整株挖出, 轻轻抖落根系外围的大土块, 只收集附着在根系上的土壤作为根际土, 5 株/盆根际土混合作为 1 个样品。称取 0.5 g 土壤样品, 利用 DNeasy Power Soil DNA Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA) 试剂盒, 按照说明书提取土壤 DNA, 最终洗脱体积为 70  $\mu$ L, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度, 一部分用于根际土壤中根结线虫 qPCR 定量测定, 另一部分用于高通量测序。

土壤微生物 DNA 高通量测序方法<sup>[23]</sup>: 利用通用引物 341F(5' - CCTACGGGNGGCWGCAG) 和 805R(5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC) 对 DNA 中的细菌基因组 16S rRNA 的 V3 ~ V4 区域进行扩增, 利用通用引物 ITS3F(5' - GCATCGATGAAGAAC GCAGC) 和 ITS4R(5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC) 对真菌 ITS2 区进行扩增。30  $\mu$ L 扩增体系如下: Phusion Master Mix (2  $\times$ ) 15  $\mu$ L, 2  $\mu$ mol/L 引物 3  $\mu$ L, 1 ng/ $\mu$ L 模板 DNA 10  $\mu$ L, 超纯水 2  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 98  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。高通量测序采用 Illumina Miseq 平台, 由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.8 数据处理

番茄根结指数按照 0 ~ 5 级划分, 以根结数量和根受害程度为分级标准<sup>[4]</sup>, 具体如下: 0 级, 根系健

壮, 无根结; 1 级, 根系上只有极少数根结, 且直径大小在 2 mm 以内; 2 级, 25% 及以内的根系上有根结, 未连接成串, 且直径大小在 2 mm 以内; 3 级, 26% ~ 50% 根系有根结, 部分根结相连成直径大于 3 mm 的不规则根结; 4 级, 51% ~ 75% 的根系有根结, 多数相连成直径大于 3 mm 的不规则根结; 5 级, 76% 及以上的根系上有根结, 且相连直径大于 3 mm, 主、侧根呈畸形或腐烂。根结病情指数计算公式如下:

根结病情指数 =  $[\sum (\text{各级植株数量} \times \text{相应的级数}) / (\text{调查植株总株数} \times 5)] \times 100$ ;

相对防效 =  $[(\text{对照根结病情指数} - \text{处理根结病情指数}) / \text{对照根结病情指数}] \times 100\%$ ;

试验数据采用 Excel 2010 软件整理、SPSS 21.0 软件统计分析, 同一处理样品数据的差异显著性采用  $t$  检验分析。

高通量测序后对各样本优化序列提取非重复序列, 去冗余序列后按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 的代表序列。16S 扩增片段使用 RDP Classifier 比对 RDP 数据库; ITS 使用 Blast 比对 UNITE 数据库, 最终分别在域 (domain)、门 (phylum)、纲 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus)、种 (species) 等各个分类水平上统计各样本的群落组成, 应用 mothur 软件计算 Shannon、Chao 等多样性指数<sup>[24]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 根结线虫 qPCR 标准曲线的建立

利用引物 MIITS7 - F/MIITS127 - R 建立根结线虫的标准曲线,  $C_q$  值与根结线虫 2 龄幼虫量的对数值之间呈显著负相关性, 标准曲线方程为  $y = -3.529x + 30.297$ , 决定系数  $r^2 = 0.9838$ , 表明建立的实时荧光 PCR 标准曲线具有良好的线性关系。

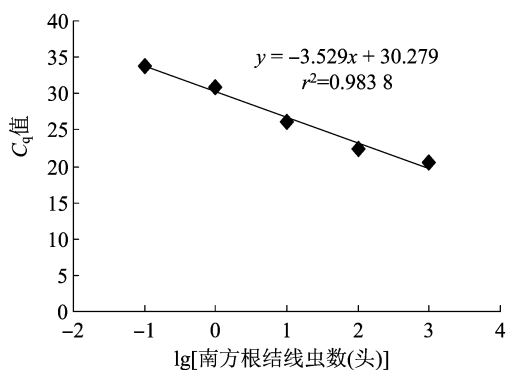


图1 南方根结线虫 2 龄幼虫的实时荧光 PCR 标准曲线

2.2 臭氧水对沙培番茄生长的影响及根结线虫的作用

番茄沙培 6 周后,各处理间植株的地上部和根系干质量并无显著性差异(表 1),但植株根系形态和根结发生现象差异明显(图 2),对照处理组须根

较少,在近主根的位置形成多个根结,且部分互连形成 5 mm 以上的大根结;而臭氧水处理的番茄植株须根较多,根结个体直径多在 2 mm 以内,主要分布在须根末端,且数量较少,平均根结减退率为 64.40%,与对照相比差异显著( $P < 0.05$ )。

表 1 不同处理对沙培番茄生长及根结形成的影响

处理	地上部干质量 (g)	根系干质量 (g)	根结数 (个)	根结减退率 (%)
对照	2.24 ± 0.17a	0.55 ± 0.09a	17.33 ± 3.61a	
臭氧水	2.18 ± 0.16a	0.58 ± 0.06a	6.17 ± 2.04b	64.40 ± 0.35

注:表中数据为“平均数 ± 标准差”。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著( $P < 0.05$ )。下表同。

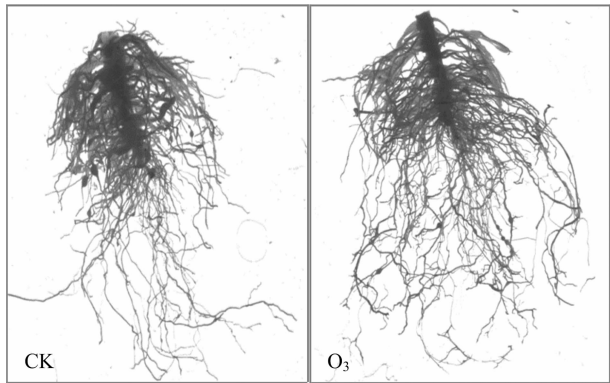


图2 臭氧水处理对沙培番茄根系形态和根结数量的影响

2.3 不同处理对土培番茄生长和根结线虫的防治效果

番茄土壤盆栽 6 周后,臭氧水单独处理组(SO)株高和单株鲜质量与对照相比无显著差异。臭氧水与菌剂组合的 2 个处理均可促进番茄株高和单株鲜质量增加(表 2),其中与 T11 - W 和 B418 组合处理组(SOBT)增加最显著( $P < 0.05$ ),对株高和鲜质量的增加率分别为 61.64%、90.90%;其次是臭氧水与 B418 组合处理组(SOB),对株高和鲜质量的增加率分别为 59.10%、68.86%。

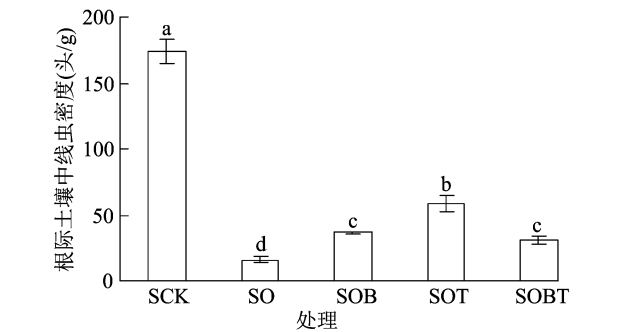
对照处理组番茄植株根结线虫病害发生严重,其根结病情指数达 79.2,而臭氧水单独或与菌剂组合处理都可抑制根结的产生,与对照相比根结病情指数显著降低( $P < 0.05$ )。SOBT 和 SOB 处理组对根结线虫病的相对防效分别为 69.95%、64.39%,二者之间无显著差异;SO 处理组相对防效为 55.06%。

2.4 不同处理对根际土壤根结线虫数量的影响

利用 qPCR 检测根际土壤中南方根结线虫虫口密度结果见图 3,各处理根际土壤中南方根结线虫密度存在着显著差异( $P < 0.05$ ),对照处理组(SCK)密

表 2 不同处理对土培番茄生长及根结线虫的防治作用

处理	株高 (cm)	单株鲜质量 (g)	根结 病情指数	相对防效 (%)
SCK	17.36 ± 1.10b	42.10 ± 3.66c	79.2a	
SO	18.25 ± 0.91b	39.71 ± 1.59c	35.6c	55.06b
SOB	27.62 ± 4.02a	71.09 ± 2.72b	28.2d	64.39a
SOT	25.91 ± 3.58a	69.24 ± 3.19b	47.5b	40.03c
SOBT	28.06 ± 2.33a	80.37 ± 2.87a	23.8d	69.95a



柱上不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著( $P < 0.05$ )  
图3 不同处理土培番茄根际土壤中南方线虫密度

度最大,为 174.41 头/g。臭氧水及其菌剂联合处理组检测出的南方根结线虫密度显著减少,其中单独臭氧处理组 SO 密度最小,为 16.07 头/g;臭氧 + B418 组合处理组 SOB 和臭氧 + B418 + T11 - W 组合处理组 SOBT 之间差异不显著,分别为 36.24、30.49 头/g。

2.5 不同处理对盆栽番茄根际微生物群落多样性和丰富度的影响

Chao 指数可反映群落物种丰富度,其值越大,表明样品中生物群落丰富度越高。由表 3 可以看出,单独臭氧水处理组 SO 与对照 SCK 相比细菌 Chao 指数降低,真菌 Chao 指数无显著变化;臭氧水与菌剂组合处理组与对照相比细菌 Chao 指数无显著差异,真菌 Chao 指数显著增加( $P < 0.05$ )。臭氧水

表 3 不同处理的番茄根际土壤细菌和真菌群落丰富度和多样性指数

处理	细菌				真菌			
	OTUs	Shannon 指数	Chao 指数	Simpson 指数	OTUs	Shannon 指数	Chao 指数	Simpson 指数
SCK	376.33 ± 16.56a	5.43 ± 0.07a	378.11 ± 14.00a	0.008 ± 0.002a	59.67 ± 9.07b	1.56 ± 0.05b	59.67 ± 9.07b	0.40 ± 0.02a
SO	344.67 ± 15.96a	5.38 ± 0.18a	345.19 ± 15.56b	0.007 ± 0.001a	60.00 ± 11.27b	2.00 ± 0.26a	60.00 ± 11.27b	0.28 ± 0.06b
SOB	390.67 ± 14.69a	5.45 ± 0.18a	391.50 ± 15.27a	0.007 ± 0.002a	79.33 ± 22.37a	2.20 ± 0.12a	79.33 ± 22.37a	0.24 ± 0.02b
SOT	395.33 ± 29.67a	5.45 ± 0.05a	397.75 ± 31.80a	0.008 ± 0.001a	89.33 ± 13.01a	2.53 ± 0.47a	89.33 ± 13.01a	0.20 ± 0.08b
SOBT	319.67 ± 23.35b	5.35 ± 0.06a	320.67 ± 13.12b	0.007 ± 0.000a	76.67 ± 5.51a	2.13 ± 0.09a	76.67 ± 5.51a	0.26 ± 0.02b

与 2 个菌剂联合处理组 SOBT 降低了细菌 Chao 指数,增加了真菌 Chao 指数。臭氧水与菌剂联合可以增加根际土壤中真菌的丰富度,降低细菌的丰富度。

Shannon 指数和 Simpson 指数反映了样品中微生物群落的多样性,Shannon 指数值越大说明群落多样性越高;Simpson 指数则相反,值越大说明群落多样性越低。由表 3 可知,所有处理间细菌的 Shannon 指数和 Simpson 指数没有显著变化。在真菌方面,臭氧水单独处理或与菌剂联合处理都可显著增加真菌的 Shannon 指数( $P < 0.05$ ),且臭氧水参与的 3 个处理之间没有显著差异。表明臭氧水或与菌剂联合处理不会影响细菌群落多样性,但可以增加真菌群落多样性。

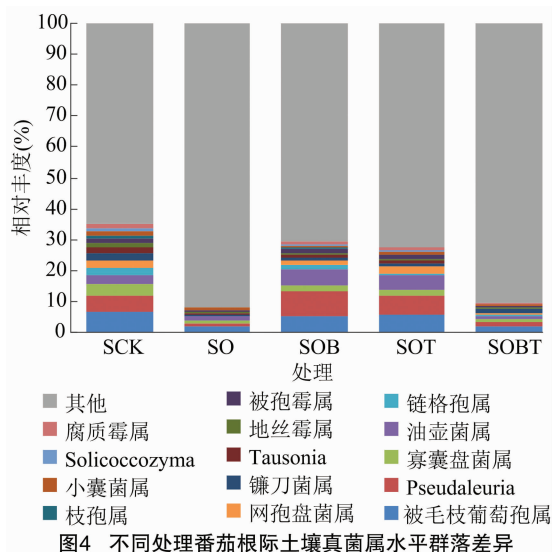
## 2.6 不同处理对盆栽番茄根际微生物群落结构的影响

在门分类水平上,各处理番茄根际土壤中鉴定得到的细菌归属于 23 个门,主要分布在变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)等。其中 Proteobacteria 为优势菌,占比 44.15% ~ 47.04%。不同处理之间没有显著差异。

各处理番茄根际土壤中鉴定得到的真菌主要来自 8 个门,其中子囊菌门(Ascomycota)、油壶菌门(Olpidiomycota)、担子菌门(Basidiomycota)为优势菌。各处理中根际土壤真菌群落结构构成相近,但臭氧水处理番茄根际土壤各真菌类群所占比例发生了明显的变化,如臭氧水与菌剂组合可显著增加子囊菌门和油壶菌门的相对丰度。

根据物种注释结果,选取每个样品在各分类属水平上最大丰度排名前 14 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图(图 4)。分析表明,臭氧水处理可使番茄根际土壤真菌群落组成发生显著改变,被毛枝葡萄孢属(*Botryotrichum*)、链格孢属(*Alternaria*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、被孢霉属(*Mortierella*)等相对丰

度减少。其中臭氧水与 T11 - W 和 B418 联合处理组 SOBT 的链格孢属相对丰度降低 97.61%,镰刀菌属相对丰度降低 42.27%。



## 3 讨论与结论

土壤中根结线虫群体密度与作物的受害程度关系密切<sup>[25]</sup>,准确检测和定量根结线虫群体密度对病害防治至关重要。实时荧光 PCR 技术已广泛应用于植物病原菌和线虫的定量检测中,本研究利用 SYBR Green I 染料,采用南方根结线虫特异性引物 MIITS7 - F/MIITS127 - R 和循环阈值( $C_q$ )( $r^2 = 0.9838$ ),建立了不同线虫数量的高质量标准曲线,可用于定量检测土壤样品中南方根结线虫的数量。

在根结线虫群体密度低的情况下,生防菌可通过产生代谢物或者提高植物抗逆性来实现根结线虫病的防治作用,但若群体密度过高,生防效果将大打折扣。本研究在定植前浇灌 8 mg/L 臭氧水,可降低根结线虫群体密度,再接种哈茨木霉、越南伯克霍尔德氏菌,植入大量的有益微生物,不仅可以竞争抑制根结线虫,同时还可诱导植物抗性,促进植物生长,呈现增效作用,对番茄株高和鲜质

量分别增加 61.64% 和 90.90%, 对根结线虫病的相对防效达到 69.95%。

臭氧极强的灭生性氧化作用, 不仅能抑制线虫的存活, 对土壤中有益微生物也会产生影响。在臭氧处理对土壤微生物群落结构的影响方面尚存在争议, 如王永强等研究认为, 臭氧水喷洒对设施植物根际微生物群落多样性影响不大<sup>[26]</sup>, 而陈展等的试验则表明, 高浓度臭氧水可抑制小麦土壤微生物总量, 降低微生物多样性指数<sup>[27]</sup>。本研究发现 8 mg/L 臭氧水浇灌处理 6 周后, 细菌和真菌的群落结构并未发生显著变化。但臭氧水与菌剂联合处理可降低细菌的丰富度, 增加真菌群落多样性和丰富度, 进一步分析发现, 臭氧水及菌剂组合可显著降低链格孢属、镰刀菌属等潜在植物病原真菌的相对丰度。扈进冬等研究发现, 哈茨木霉 LTR-2 拌种可以增加小麦根际真菌群落的丰富度<sup>[28]</sup>, 说明臭氧水与菌剂组合处理对番茄根际土壤微生物群落的影响主要是由于菌剂的作用引起的。

综上所述, 臭氧水与哈茨木霉 T11-W 和越南伯克霍尔德氏菌 B418 制剂联合, 具有协同增效作用, 能够有效防治番茄根结线虫病害, 增加植株鲜质量, 显示出较好的防病和增产效果, 二者联用可替代部分化学农药。臭氧水与菌剂联用还增加了根际土壤真菌群落多样性和丰富度, 降低镰刀菌等潜在植物病原真菌的相对丰度, 促进了植物根系发育和作物生长。

#### 参考文献:

- [1] 段玉玺, 吴刚. 植物线虫病害防治[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.
- [2] 彭德良. 蔬菜病虫害的综合治理(十): 蔬菜线虫病害的发生和防治[J]. 中国蔬菜, 1998(4): 57-58.
- [3] 王宏宝, 李茹, 付佑胜, 等. 保护地蔬菜根结线虫的发生规律及病害防治研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(1): 205-206.
- [4] Yang L L, Huang Y, Liu J, et al. *Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematocidal volatiles[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2012, 102(1): 53-59.
- [5] 胡安东, 梁晨, 于维霞, 等. 臭氧水对番茄根结线虫病的防治效果[J]. 蔬菜, 2019(11): 55-59.
- [6] Dahlin P, Eder R, Consoli E, et al. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251[J]. Crop Protection, 2019, 124: 104874.
- [7] Ghahremani Z, Escudero N, Beltrán - Anadón D, et al. *Bacillus firmus* strain I-1582, a nematode antagonist by itself and through the plant[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 796.
- [8] Manzanilla - López R H, Esteves I, Finetti - Sialer M M, et al. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo - parasitic *Nematodes*[J]. Journal of Nematology, 2013, 45(1): 1-7.
- [9] 李瑞, 李惠霞, 谢丙炎, 等. 长枝木霉菌株 TL16 防治南方根结线虫的作用机理[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 384-393.
- [10] Fan H Y, Yao M L, Wang H M, et al. Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Snf1910 for the biological control of root - knot nematode, *Meloidogyne incognita* [J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 299.
- [11] 李善梅, 李纪顺, 徐维生, 等. 生防菌剂 YKT41 及 B418 防治茄子根结线虫病的田间试验[J]. 山东科学, 2011, 24(5): 10-13.
- [12] 赵鑫, 董立新, 安立娜, 等. 臭氧对韭菜迟眼蕈蚊的室内毒力及其安全性评价[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 1001-1006.
- [13] 徐冬颖, 史君彦, 郑秋丽, 等. 臭氧处理对菠菜采后保鲜效果的影响[J]. 北方园艺, 2018(12): 125-130.
- [14] Veronico P, Paciolla C, Sasanelli N, et al. Ozonated water reduces susceptibility in tomato plants to *Meloidogyne incognita* by the modulation of the antioxidant system [J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(4): 529-539.
- [15] Guo Z H, Wang Q X. Efficacy of ozonated water against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. Ozone (Science & Engineering), 2017, 39(2): 127-136.
- [16] Kobayashi F, Ikeura H, Ohsato S, et al. Disinfection using ozone microbubbles to inactivate *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* [J]. Crop Protection, 2011, 30(11): 1514-1518.
- [17] 王贻莲, 李纪顺, 杨合同. 木霉菌株 T11-W 的鉴定及其对南方根结线虫卵的寄生性研究[J]. 山东科学, 2014, 27(6): 38-42.
- [18] Hussey R S, Barker K R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique[J]. Plant Disease Reporter, 1973, 57: 1025-1028.
- [19] Gorny A M, Wang X H, Hay F S, et al. Development of a species - specific PCR for detection and quantification of *Meloidogyne hapla* in soil using the 16D10 root - knot nematode effector gene[J]. Plant Disease, 2019, 103(8): 1902-1909.
- [20] Zhao Y L, Ruan W B, Yu L, et al. Combining maxRatio analysis with real - time PCR and its potential application for the prediction of *Meloidogyne incognita* in field samples[J]. Journal of Nematology, 2010, 42(2): 166-172.
- [21] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [22] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [23] Li J H, Philp J, Li J S, et al. *Trichoderma harzianum* inoculation reduces the incidence of clubroot disease in Chinese cabbage by regulating the rhizosphere microbial community [J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1325.
- [24] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. PNAS, 2011, 108(S1): 4516-4522.

陈绕生,薛林宝. 纳米硒、铜对干旱胁迫下番茄生长、光合特性及产量的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(12):127-134.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.12.021

# 纳米硒、铜对干旱胁迫下番茄生长、光合特性及产量的影响

陈绕生<sup>1</sup>, 薛林宝<sup>2</sup>

(1. 江苏联合职业技术学院植物工程系, 江苏淮安 223200; 2. 扬州大学园艺园林与植保学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:**随着农业技术的发展,越来越多的纳米技术已应用于农业生产中,然而纳米肥料对植物的影响尚不清楚。采用盆栽试验,研究干旱胁迫下施用纳米铜(Cu NPs)、纳米硒(Se NPs)对番茄生长、光合生理特性及产量的影响。结果表明,干旱胁迫(DS)条件下番茄干物质累积、根系形态、光合生理代谢及产量皆受到显著影响。DS条件下,与对照(CK)相比,施用Cu NPs(CU)、Se NPs(SE)及二者结合施用(CU+SE)处理均可有效增加番茄植株地上部、根系干物质累积量及根系性状指标,提高光合色素(叶绿素a、叶绿素b、类胡萝卜素)含量、光合特征参数、叶绿素荧光参数及上调表达光合作用基因(*PetE*、*Psb28*),处理间整体呈CK<CU<SE<CU+SE。正常水分(WW)条件下,与CK相比,施用Cu NPs、Se NPs可提高光合生理参数,但对植株生长参数及产量无明显影响。与WW条件下的CK相比,DS条件下纳米材料处理(CU、SE、CU+SE)植株生长及光合生理特征参数整体较低;产量变幅为-4.53%~-0.22%,且处理间差异不显著。可见干旱胁迫下施用Cu NPs、Se NPs可促进番茄植株生长发育、提高光合作用及维持产量,以二者结合施用处理效果较好。

**关键词:**纳米颗粒;番茄;干旱胁迫;荧光参数;基因表达水平;产量

**中图分类号:**S641.201

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2022)12-0127-08

随着温室效应带来的气候持续变暖,干旱性问题已成为全球植物生长和粮食安全生产面临的主要威胁之一<sup>[1]</sup>。目前,世界上有大面积耕地处于干旱或半干旱状态,干旱胁迫可对植物生长发育及生理代谢产生显著影响,包括水分利用效率、养分吸收、光合效率、总叶绿素含量以及激素水平等<sup>[2]</sup>,从而对农作物的生长发育、产量及品质等具有不利影响。目前针对缓解干旱环境下作物生长发育的相关技术已报道了微生物策略、保水剂研发及品种培育等<sup>[3-4]</sup>。为增加作物种子活力、抗逆性以及提高粮食品质,施用硅(Si)、铜(Cu)以及硒(Se)等有益

元素已成为农业生产中的必要措施<sup>[5]</sup>。随着农业技术的发展,越来越多的纳米农药、纳米肥料已应用于农业生产中,为提高作物生产力和作物保护提供了新思路。

最近的研究表明,由于纳米颗粒(<100 nm)类似于蛋白质等生物分子,能够穿过细胞膜<sup>[6]</sup>,其物理、化学性质与大颗粒的常规种类存在功能差异<sup>[7]</sup>。因此与养分有效态相比,纳米颗粒(NPs)形式的元素生物利用度和功能效率在植物生长和代谢方面效果更佳<sup>[7]</sup>。目前,在农业生产中以Se、Cu、锌(Zn)等为主的几种类型的纳米材料已逐渐得到运用<sup>[8]</sup>。且研究发现,纳米硒(Se NPs)具有潜在的抗氧化活性,在花生(*Arachis hypogaea* L.)的栽培中,Se NPs可增加花生植株的抗氧化酶和非酶抗氧化剂活性<sup>[9]</sup>;提高黄瓜作物中用于渗透保护的光合能力、脯氨酸和总可溶性碳水化合物的积累<sup>[10]</sup>。目前与植物相关的研究中,纳米铜(Cu NPs)是目前运

收稿日期:2021-11-28

基金项目:江苏省创新课题(编号:SN1703)。

作者简介:陈绕生(1973—),男,江苏淮安人,硕士,副教授,主要从事园艺生产研究。E-mail:1048483719@qq.com。

通信作者:薛林宝,博士,教授,主要从事园林、园艺研究。E-mail:xlbb@yzcn.net。

[25] 葛俊杰,王延红,刘长仲. 南方根结线虫初始接种量对番茄生长的影响及防治指标研究[J]. 甘肃农业大学学报,2016,51(5): 57-61.

[26] 王永强,李英东,郭正红,等. 臭氧水对土壤微生物群落的影响[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2018,47(6):688-696.

[27] 陈展,王效科,段晓男,等. 臭氧浓度升高对盆栽小麦根系和土壤微生物功能的影响[J]. 生态学报,2007,27(5):1803-1808.

[28] 扈进冬,吴远征,魏艳丽,等. 木霉拌种剂对小麦根际土壤真菌群落多样性的影响[J]. 山东科学,2019,32(1):46-51.