

复合微生物菌肥 KMM 减缓苹果再植病害机制

于松涛 张铭一 陈蕊 李波 曹克强 王树桐*

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071001)

摘要: 为揭示木美土里复合微生物菌肥(Kimidori microbial manure, KMM)促进再植苹果树的生长及减缓苹果再植病的作用机制,采用土壤常规农业化学分析法和 Illumina MiSeq 高通量测序技术比较分析 KMM 和常规有机肥(对照)处理后再植苹果树的生长指标、理化因子、根际土壤酶活性以及细菌群落结构和功能的变化。结果表明,施用 KMM 后,果树的株高增长率、干径增长率、叶绿素含量、分枝个数和分枝长度等生长指标均显著升高,有机质含量显著增加,中性磷酸酶、脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶活性均显著提高,同时增加了再植土壤细菌群落的丰富度和多样性。从采集土壤中分离得到 51 株细菌并进行盆栽试验,其中经 KMM-15、KMM-37 和 KMM-50 菌株处理后海棠苗叶绿素含量、株高、茎粗均显著提高,经鉴定这 3 株菌株为贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis*。表明春秋 2 次施用 KMM 提高了土壤有机质含量和酶活性,并重塑了根际土壤中细菌群落结构,进而缓解苹果再植病害发生程度,促进果树生长。

关键词: 苹果再植病害; 复合微生物菌肥; KMM; 生物防治; Illumina MiSeq 高通量测序; 细菌群落结构

The mechanism of compound microbial fertilizer KMM alleviating apple replant disease

Yu Songtao Zhang Mingyi Chen Rui Li Bo Cao Keqiang Wang Shutong*

(College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract: To reveal the mechanism of Kimidori microbial manure (KMM) promoting the growth of replanted apple trees and alleviating apple replant disease, the changes of growth indexes, physical and chemical factors, rhizosphere soil enzyme activities, structure and function of bacterial community in the rhizosphere of replanted apple trees treated with KMM and conventional organic fertilizer were compared and analyzed with soil conventional agricultural chemical analysis and Illumina MiSeq high-throughput sequencing. The results showed that the growth indexes such as plant height growth rate, stem diameter growth rate, chlorophyll content, branch number and branch length of fruit trees were significantly increased after the application of compound microbial fertilizer. The organic matter content was significantly increased, and the neutral phosphatase, urease, invertase and catalase were also significantly increased. At the same time, the richness and diversity of bacterial community in replanted soil were increased. Fifty-one bacterial strains were isolated from collected soil and subjected to pot experiments. The chlorophyll content, plant height, and stem diameter of potted begonia seedlings treated with strains KMM-15, KMM-37 and KMM-50 were significantly affected. The three strains were identified to belong to the bacterial species *Bacillus velezensis*. The application of KMM in spring and autumn increased soil organic matter content and enzyme activity, and reshaped the bacterial community structure

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-27), 河北省现代农业产业技术体系(HBCT2018100206, HBCT2021210204), 河北省重点研发计划(21326506D), 河北省引进留学人员资助项目(C20220362)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: bdstwang@163.com

收稿日期: 2023-01-18

in rhizosphere soil, thereby alleviating replanting disease and promoting growth of the apple trees.

Key words: apple replant disease; compound microbial fertilizer; KMM; biological control; Illumina MiSeq high-throughput sequencing; bacterial community structure

苹果具有良好的生态适应性, 种植范围广泛 (Xiang et al., 2021), 我国苹果种植受土地资源限制, 老龄果园的改造更新只能选择连作栽培 (Jiang et al., 2019), 导致再植苹果幼树根系发育异常、树体矮小、生长衰弱、抗性降低、寿命缩短, 甚至死亡, 这种现象称为苹果连作障碍, 又称苹果再植病害 (Mazzola & Manici, 2012)。苹果再植病害是长时间栽培累积形成的, 其病因复杂, 涉及生物因素和非生物因素。生物因素包括细菌、真菌、卵菌和线虫等, 非生物因素包括 pH、非生物胁迫、植物毒素、土壤肥力和重金属污染等, 而生物因素起主导作用 (Berendsen et al., 2012)。目前, 已经提出许多苹果再植病害的防控策略, 如更换土壤、土壤堆肥、轮作和熏蒸等 (Mazzola & Manici, 2012; Franke-Whittle et al., 2019); 应用生物制剂是减轻植物病害的一种环保和可持续的方法, 并在许多国家广泛应用 (Zalila et al., 2016)。

现有针对苹果再植病害病原的拮抗细菌多数为芽胞杆菌 *Bacillus* spp., 刘丽等 (2019) 发现枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 和漠海威芽胞杆菌 *B. mojavensis* 对苹果再植病害的病原菌有明显拮抗效果, 其菌剂对苹果再植病害有一定的防治作用; Duan et al. (2021) 研究结果显示芽胞杆菌 QSB-6 菌株的挥发物质能够抑制镰孢菌属 *Fusarium*、链格孢属 *Alternaria*、黄曲霉 *Aspergillus flavus* 和立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 等病原真菌生长, 具有很好的生防效果。拮抗细菌不仅能够抑制病原真菌生长繁殖, 往往还具有促进植物生长的功能。本课题组前期田间试验发现, 施用木美土里复合微生物菌肥 (Kimidori microbial manure, KMM) 后苹果再植病害的发生率显著降低, 证实 KMM 菌肥对苹果再植病害具有显著的防效 (赵璐, 2018), 但该菌肥的作用机理尚不清楚。

土壤微生物群落的丰度、组成和多样性在改善生态系统以保证土壤质量和作物健康方面发挥着重要作用 (Manici & Caputo, 2009)。Illumina Miseq 高通量测序作为当今应用最普遍的新一代测序技术, 可以解析复杂环境中微生物群落物种组成和相对丰度, 该技术已经在土壤微生物群落结构研究中广泛应用 (秦楠等, 2011; Rinke et al., 2013)。本试验采用土壤常规农业化学分析法和 Illumina MiSeq 高通量测序技术比较分析 KMM 和常规有机

肥处理后再植苹果树的生长指标、理化因子、根际土壤酶活性以及细菌群落结构和功能的变化, 并从 KMM 处理的根际土壤中筛选具有生防潜力的菌株, 以期明确复合微生物菌肥减缓苹果再植病害机制, 为防治苹果再植病害提供潜在生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* HS2 菌株, 由河北农业大学植物病害流行与综合防治实验室分离鉴定。

供试植物: 苹果品种为长富 2001, 乔木型, 以北海棠为砧木嫁接, 砧木购自河北怀来县好运八棱海棠苗木基地, 嫁接枝条采集自顺安绿生农业科技开发有限公司苹果种植基地。八棱海棠种子, 来自河北怀来县好运八棱海棠苗木基地。经 2 ℃ 低温沙藏 3 周, 25 ℃ 催芽 1 周, 待种子萌芽长度达种子直径的 1/2 时定植于盆栽基质中, 每盆定植 5 株, 待生长至 5 周 (6 叶期) 时供试。

供试培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基成分为马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 18 g、蒸馏水 1 000 mL; LB (Luria-Bertani) 液体培养基成分为胰蛋白胨 10 g、NaCl 10 g、酵母粉 5 g、蒸馏水 1 000 mL; 酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基成分为酵母提取物 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

肥料、试剂及仪器: KMM, 有效活菌数 ≥ 2.0 亿/g, 陕西枫丹百丽生物科技有限公司生产; 常规有机肥为当地养殖的羊粪腐熟烘干。土壤中性磷酸酶测试盒、土壤脲酶测试盒、土壤蔗糖酶测试盒、土壤过氧化氢酶测试盒, 苏州科铭生物技术有限公司; 革兰氏染色试剂盒, 北京奥博星生物技术有限责任公司; FastDNA SPIN Kit for Soil, 美国 Mp Biomedicals 公司; 其他试剂均为国产分析纯。JA1003 电子分析天平, 上海精密科学仪器有限公司; T-gradient Thermal Cycler PCR 扩增仪, 德国 Biometra 公司; DYY-4 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; RXZ 人工气候培养箱, 宁波江南仪器厂; NanoDrop 2000 分光光度计, 美国赛默飞世尔科技公司; 叶绿素测定仪, 日本

柯尼卡美能有限公司。

1.2 方法

1.2.1 施肥方案及土壤样本采集

于山东省烟台市海城市辛安镇前黄塘村果园(120°70'E, 37°17'N, 海拔178 m)进行试验。果园面积2.3 hm², 前茬为34年生乔纳金品种苹果树, 果树被砍伐后, 深耕果园, 清除残根, 2016年3月22日, 在原址再植苹果幼树, 品种为长富2001(乔木型, 以湖北海棠为砧木)。试验区属于暖温带东亚大陆性季风半湿润气候, 平均气温11.4℃, 年平均日照时数2 660 h, 年平均降水量640~846 mm。果园均匀划分为6个试验区, 每个试验区30株苹果树, 株行距为1 m×4 m, 试验小区间间隔8 m。试验共设2个处理, (1)KMM处理: 果树定植时施用KMM, 施肥量2 kg/株, 于2016年秋季再次施KMM, 施肥量3 kg/株; (2)对照处理: 定植时施用有机肥, 施肥量2 kg/株, 于2016年秋季再次施有机肥, 施肥量3 kg/株。其他农事操作2个处理完全一致。每个处理3次重复, 1个重复为1个小区。2017年3月22日, 用五点采样法采集各小区苹果树根际土样(Knight et al., 2018), 每个小区选取3株树定点采集土壤样本, 在距树干基部0.5 m处分别设置5个取样点, 用内径10 cm土钻挖取20~40 cm土壤采集根系, 抖落根系上附着的土壤。然后通过四分法将同一小区的土壤充分混合作为1个土样, 用于测定土壤理化因子以及分析土壤微生物群落结构。

1.2.2 苹果树长势测定

每个小区选择并标记3株树, 于2016年3月22日定植时对苹果幼树的株高和干径进行测量得到初始值, 2017年3月23日对标记苹果树进行再次测量作为最终值, 并测定叶片叶绿素含量、统计植株分枝个数和测量分枝长度。用卷尺测量株高, 株高为植株顶端生长点到地面的距离。用游标卡尺采用十字交叉法对树体干径进行测量即树体嫁接口以上20 cm位置的主干干径, 并用红色记号笔标记, 以便下次测量同一位置。对标记的每株植株分东、南、西、北4个方向各取5片叶, 共20片叶, 测定每个枝条顶端叶片6~7片以下的功能叶片的叶绿素含量, 将每株果树的所有测量数据取平均值作为该株叶片的叶绿素含量值。统计不同处理每株标记果树的主干分枝个数。不同处理中标记的每株植株在不同高度和方位选择5个枝条, 测量分枝着生处到分枝顶端生长点的长度, 取平均长度作为该株果树的分枝长度。

1.2.3 土壤理化因子及酶活性的测定

将1.2.1中获得的土壤样品风干及过筛后参照

鲁如坤(2000)试验方法, 制备pH待测液、电导率待测液、有机质待测液、碱解氮待测液、速效钾待测液和有效磷待测液, 进行常规土壤理化因子测定。

为研究不同处理土壤的活力, 分别取1 g土壤样品, 按照土壤中性磷酸酶、土壤脲酶、土壤蔗糖酶和土壤过氧化氢酶测试盒使用说明书测定中性磷酸酶、脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性, 每个处理3次重复。

1.2.4 土壤微生物总DNA提取和高通量测序分析

取1 g土壤样品, 采用Fast DNASPIN Kit for Soil试剂盒提取土壤微生物的总DNA, 采用Nano-Drop-ND2000分光光度计检测DNA浓度和提取质量。将合格的DNA样品送至上海派森诺生物科技有限公司, 利用Illumina MiSeq高通量测序技术进行测序。测序原始数据采用DADA2方法(Callahan et al., 2016)利用QIIME2软件进行质控, 首先调用qiimecutadapt-trim-paired程序切除序列的引物片段, 弃去未匹配的引物序列, 然后通过qiime dada2 denoise-paired程序调用DADA2进行质控、去噪、拼接、去嵌合体。质控后得到的序列以100%相似度聚类, 产生的每个去重复序列称为扩增子序列变体, 或称为特征序列, 对应于操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)代表序列, 而这些序列在样本中的丰度表称为特征表, 对应于OTU表。基于UNITE release 8.0数据库(<https://unite.ut.ee/>)分类学数据库, 对于每个扩增子序列变体的特征序列, 在QIIME2软件中使用Naive Bayes分类器进行物种注释(Bokulich et al., 2018)。利用QIIME2软件中R语言和ggplot2包对细菌物种丰富度进行alpha多样性分析, 本试验以Chao1指数和Observed species指数表征丰富度, 以Shannon指数和Simpson指数表征多样性, 以Faith's PD指数表征基于进化的多样性, 以Pielou指数表征均匀度, 以Goods coverage指数表征覆盖度。使用未抽平的ASV/OTU表, 调用“qiime diversity alpha-rarefaction”命令, 设置最小抽平深度为10, 全体样本中最低测序深度样本序列量为95%, 再在这一深度与最小深度之间均匀选取10个深度值, 每个深度值抽平10次, 选取最大抽平深度时的得分平均值作为alpha多样性指数。使用R语言和vegan包对获得的bray-curtis距离矩阵进行NMDS(non-metric multidimensional scaling)分析, 并通过二维排序图展示土壤中微生物群落的组成差异。

1.2.5 根际土壤中可培养细菌的分离和纯化

取10 g土壤于装有90 mL无菌水的250 mL三角瓶中, 于120 r/min摇床上振荡30 min, 即为10⁻¹稀

释液,取 1 mL 10^{-1} 稀释液加入盛有 9 mL 无菌水的试管中,即为 10^{-2} 稀释液,依此类推,用无菌水稀释成 10^{-3} ~ 10^{-7} 稀释液,各稀释度分别取 20 μ L 均匀涂布于 PDA 和 LB 培养基上,每个浓度重复 3 次,倒置于 30 $^{\circ}$ C 人工气候培养箱黑暗培养 5 d。分别挑取单菌落,根据形态、颜色、透明度等特征将纯化后的菌株编号为 KMM-X 格式保存。

1.2.6 分离菌株对海棠植株的生长促进作用

用 5 mm 的灭菌打孔器在 30 $^{\circ}$ C 黑暗培养 5 d 的 PDA 平板上打取尖孢镰孢菌和拮抗菌菌饼,分别接种于含有 50 mL YPD 液体培养基的锥形瓶中,在 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下黑暗培养 3 d,用灭菌滤布进行过滤收集滤液,通过血球计数板把尖孢镰孢菌和拮抗菌孢子悬浮液分别调节浓度为 1×10^6 CFU/mL 和 1×10^8 CFU/mL。挑选长势一致的 6 叶期盆栽海棠苗,测量其株高、茎粗及叶绿素含量的初始值,方法同 1.2.2。在其根区用灌根方式接种浓度为 1×10^6 CFU/mL 的尖孢镰孢菌孢子悬浮液,接种量为 5 mL/株,接种 2 周后,设 2 个处理,即分别用 3 kg/株的 KMM 菌肥和 1.2.5 中筛选的浓度为 1×10^8 CFU/mL 的拮抗菌孢子悬浮液进行处理,每株幼苗浇灌 30 mL 拮抗菌孢子悬浮液于 1 个花盆中,以浇灌等量清水处理作为对照,其余常规管理措施相同。2 个月后测量植株株高、茎粗及叶绿素含量的最终值,计算增长率。每个处理 3 次重复,每次重复 10 株苗。增长率=(最终值-初始值)/初始值 $\times$ 100%。

1.2.7 促生菌株的分子生物学鉴定

选取对海棠植株生长具有明显促进作用的菌株

KMM-15、KMM-37 和 KMM-50,参照 DNA 抽提试剂盒说明书提取各菌株的 DNA,利用引物 UP1F(5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNG -GNAARTTYGA-3')/UP2R (5'AGCAGGGTACGGA-TGTGCGAGCCRTCNCACRTCNGCRTCNGTCAT-3')对 *gyrB* 基因序列进行 PCR 扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μ L PCR 反应体系:10 $\times$ Reaction Buffer 2.5 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 0.5 μ L、*Taq* 酶 1 μ L、DNA 模板 1 μ L、灭菌水 19.5 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,2 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 8 min。将具有 *gyrB* 阳性克隆条带的 PCR 产物送北京华大基因科技有限公司测序。将测序所得序列与 GenBank 中所有已报道的相关序列进行 BLAST 比对分析,根据比对结果获得相似性高的菌株序列,用 MEGA 6 软件采用邻接法构建系统发育树,重复次数为 1 000 次,初步确定该菌株的种属类别。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析,用 LSD 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 KMM 处理对连作苹果植株长势的影响

KMM 处理后,植株的株高增长率、干径增长率、叶绿素含量、分枝个数和分枝长度分别提高了 27.09%、28.02%、12.72%、18.53% 和 24.10%(表 1),表明 KMM 对连作苹果幼树的生长有明显的促进作用。

表 1 复合微生物菌肥 KMM 对连作苹果植株生长的影响

Table 1 Effect of Kimidori microbial manure on the growth of continuous cropping apple

处理 Treatment	株高增长率 Plant height growth rate/%	干径增长率 Stem diameter growth rate/%	叶绿素含量 Chlorophyll content/ SPAD	分枝个数 Branch number	分枝长度 Branch length/cm
KMM	106.18 $\pm$ 3.82 a	51.22 $\pm$ 2.97 a	62.05 $\pm$ 0.39 a	11.64 $\pm$ 0.41 b	86.51 $\pm$ 3.15 a
对照 CK	83.55 $\pm$ 4.51 b	40.01 $\pm$ 3.16 b	55.05 $\pm$ 0.83 b	9.82 $\pm$ 0.38 b	69.71 $\pm$ 4.18 b

表中数据为平均数 $\pm$ 标准误。同列不同字母表示经 LSD 法检验差异显著 ($P < 0.05$)。Data in the table are mean $\pm$ SE. Different letters in the same column indicate significant difference by LSD test ($P < 0.05$).

2.2 KMM 处理对根际土壤理化因子的影响

KMM 处理后,土壤样品电导率由 0.061 ms/cm 升高为 0.074 ms/cm,土壤中碱解氮、速效钾和速效磷的含量均升高,但与对照之间均无显著差异;有机质含量由 9.51 g/kg 提高至 15.88 g/kg,两个处理间差异显著。KMM 处理和对照土壤样品的 pH 分别为 7.91 和 7.36,说明土壤样品均属于非盐化土壤,偏碱性(表 2)。

2.3 KMM 处理对根际土壤酶活性的影响

KMM 处理后,土壤中中性磷酸酶、脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶活性分别为 3 307.50 nmol $\cdot$ d $^{-1}$ $\cdot$ g $^{-1}$ 、207.88 μ g $\cdot$ d $^{-1}$ $\cdot$ g $^{-1}$ 、10.02 mg $\cdot$ d $^{-1}$ $\cdot$ g $^{-1}$ 和 10.46 μ mol $\cdot$ d $^{-1}$ $\cdot$ g $^{-1}$,均显著高于对照的相应酶活性(图 1)。

2.4 OTU 聚类与物种分类学注释

6 个细菌样品共测序获得 537 918 条序列,平均每个样品获得原始序列 89 653 条,有效序列 79 862 条,

共获得 7 491 个 OTU, 共同拥有的 OUT 为 2 053 个, OUT 为 3 050 个, 可划分为 44 门 109 纲 266 目 474 科
对照独有的 OUT 为 2 388 个, KMM 处理独有的 999 属 2 116 种。

表 2 复合微生物菌肥 KMM 对连作苹果根际土壤理化性质的影响

Table 2 Effect of Kimidori microbial manure on physicochemical properties of rhizosphere soil of continuous cropping apple

处理 Treatment	碱解氮 Nitrogen hydrolysis/(mg/kg)	速效钾 Available potassium/ (mg/kg)	速效磷 Available phosphorus/(mg/kg)	有机质 Organic matter/ (g/kg)	pH	电导率 Electric conductivity/ (ms/cm)
KMM	33.61±1.88 a	200.88±13.68 a	123.32±1.86 a	15.88±1.77 b	7.91±0.22 a	0.074±0.070 a
对照 CK	27.89±1.99 a	175.12±22.02 a	116.13±1.97 a	9.51±0.06 a	7.36±0.09 a	0.061±0.002 a

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经 LSD 法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data in the table are mean±SE. Different letters in the same column indicated significant difference by LSD test ($P<0.05$).

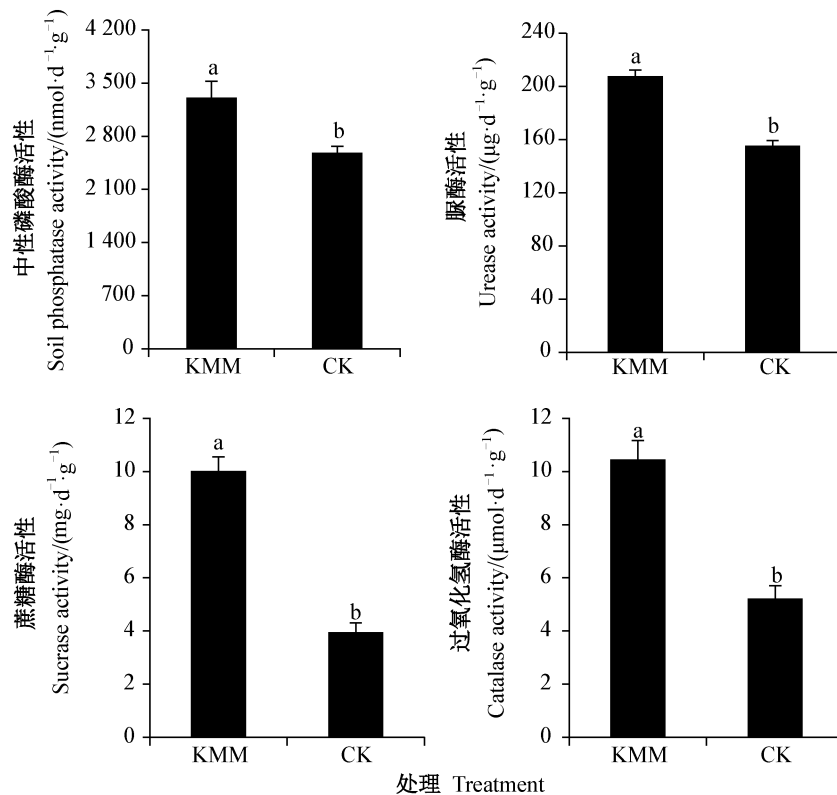


图 1 复合微生物菌肥 KMM 对连作苹果树根际土壤酶活性的影响

Fig. 1 Effect of Kimidori microbial manure on enzyme activity in rhizosphere soil of continuous cropping apple trees.

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经 LSD 法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicated significant difference by LSD test ($P<0.05$).

在门水平下, KMM 处理与对照土壤样品中相对丰度大于 1% 的细菌优势门有 10 个。KMM 处理后, 厚壁菌门、放线菌门、酸杆菌门和蓝藻菌门的相对丰度分别提高了 7.43、0.34、0.29 和 1.32 个百分点, 其中厚壁菌门的相对丰度上升最显著, 由 13.21% 上升至 20.64%; 变形菌门、芽单胞菌门、疣微菌门的相对丰度分别下降了 3.18、4.20 和 1.01 个百分点, 芽单胞菌门的相对丰度下降最显著, 由 8.87% 下降至 4.67% (图 2-A)。

在属水平上, KMM 处理和对照细菌前 20 位优势属的相对丰度分别占各组内的 48.73% 和 37.08%。KMM 处理后, 芽胞杆菌属 *Bacillus*、伯克氏菌属 *Burkholderia*、乳球菌属 *Lactococcus* 和罗丹

杆菌属 *Rhodanobacter* 的相对丰度分别提高了 4.07、5.48、2.91 和 1.28 个百分点, 其中伯克氏菌属的相对丰度上升最显著, 由 4.05% 上升至 9.53%; 芽单胞菌属 *Gemmatimonas*、Subgroup_6、马赛菌属 *Massilia*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 和假单胞菌属 *Pseudomonas* 的相对丰度分别下降了 0.87、0.87、0.97、0.30 和 1.15 个百分点 (图 2-B)。

2.5 细菌群落 α 多样性和 β 多样性分析

α 多样性分析结果显示, KMM 处理后土壤样品中细菌群落的 Chao1、Shannon、Faith's PD、Simpson、Pielou、Observed species 等指数均显著增加, 表明 KMM 处理后土壤细菌群落的丰富度显著提高。

样品点的排布代表了样本与样本之间的相似程度,样本间的距离越远,离散度越好。2个处理样本间

距离较远,离散度越好, β 多样性分析结果表明KMM处理与对照的细菌群落结构存在显著差异(图3)。

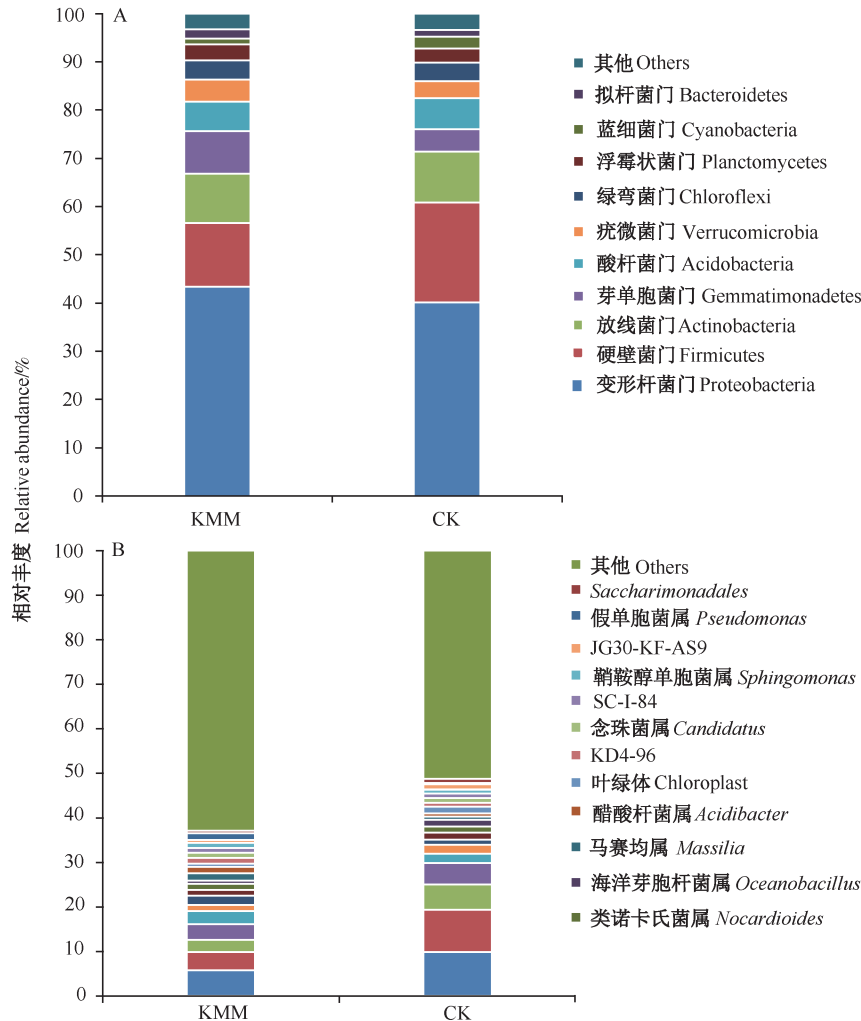


图2 复合微生物菌肥 KMM 对连作苹果树根际土壤细菌优势门(A)和优势属(B)分布的影响

Fig. 2 Effect of Kimidori microbial manure on bacterial dominant gate (A) and dominant genus (B) distribution in rhizosphere soil of continuous cropping apple trees

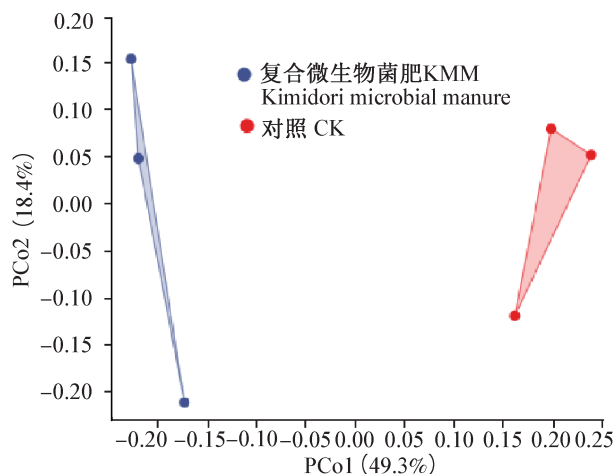


图3 再植苹果树根际土壤细菌群落的距离矩阵与PCoA分析
Fig. 3 Distance matrix and PCoA analysis of bacterial community in rhizosphere soil of replanted apple trees

2.6 拮抗菌株对海棠苗的促生作用

KMM 处理后植株的叶绿素、株高及茎粗的增长率分别为 10.67%、33.33% 和 25.67%, 显著高于对照的 6.86%、10.02% 和 5.42%。从土壤中共分离获得 51 菌株, 其中经菌株 KMM-15、KMM-37 及 KMM-50 处理后, 植株株高增长率分别为 52.33%、47.76% 和 50.19%, 茎粗增长率分别为 44.78%、35.24% 和 34.07%, 叶绿素增长率分别为 20.61%、8.47% 和 21.36%, 除了菌株 KMM-37 的叶绿素增长率与 KMM 处理差异不显著外, 其余指标皆显著高于 KMM 处理(图 4), 表明 KMM-15、KMM-37 及 KMM-50 菌株对海棠苗具有促生作用。

2.7 分子生物学鉴定结果

系统发育树显示, 菌株 KMM-15、KMM-37 和

KMM-50 的 *gyrB* 基因序列与贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* 位于 1 个分支上,相似度最高(图 5),最终将 KMM-15、KMM-37 和 KMM-50 菌株鉴定为贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*。

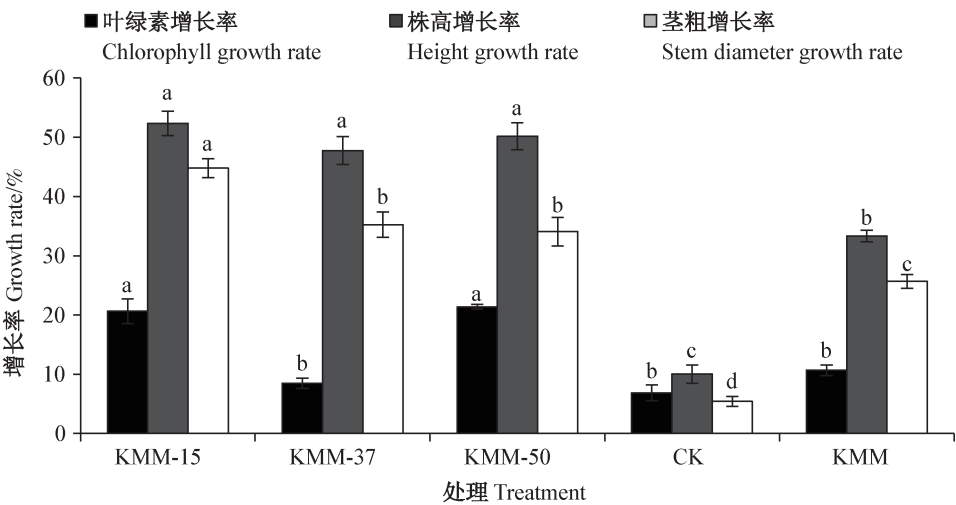


图 4 促生菌株对再植苹果幼树生长的影响

Fig. 4 Effects of plant growth promoting strains on the growth of replanted apple saplings

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经 LSD 法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data in the figure are mean±SE. Different letters indicate significant difference by LSD test ($P<0.05$).

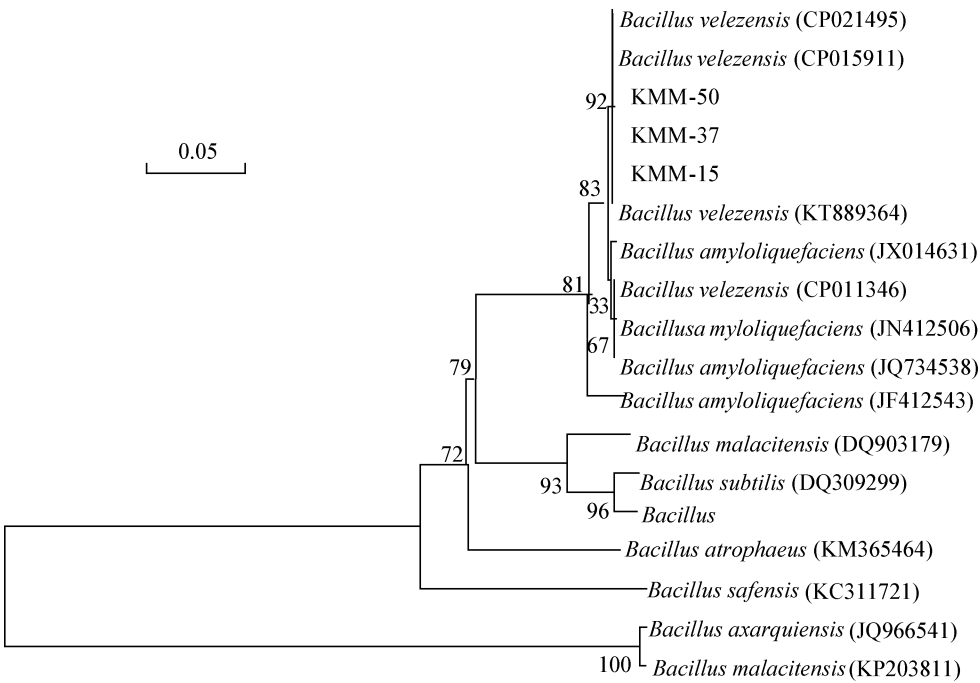


图 5 基于 *gyrB* 基因序列采用邻接法构建菌株 KMM-15、KMM-37 和 KMM-50 以及相似菌株的系统发育树

Fig. 5 The phylogenetic trees of strains KMM-15, KMM-37, KMM-50 and similar strains were constructed with neighbor-joining method based on *gyrB* gene sequence

3 讨论

本研究选择株高、茎粗、叶绿素含量、分枝个数和分枝长度等生长指标来反映果树的生长势,结果复合微生物菌肥对这些生长指标均有明显的促进作用,该结果与赵璐等(2019)研究发现复合微生物菌肥对海棠苗的生长指标具有促进作用的结

果相一致。

理化因子作为土壤的本质特征和基本属性,与植物的生长密切相关(Muoz-Rojas, 2018)。碱解氮、速效磷、速效钾是评价土壤近期供氮、供磷、供钾水平情况的重要指标(Hartemink, 2005),有机质是土

壤中各类营养元素的主要来源,能提供植株生长所需的大部分营养元素,使土壤具有保肥力和缓冲性(Karlen et al., 2019; Ondrasek et al., 2019)。本试验主要检测了土壤的有机质、碱解氮、速效磷、速效钾、pH、电导率等指标来评价土壤肥力。本研究中,复合微生物菌肥处理与对照的土壤样本中氮素供应整体水平偏低,钾、磷的供应水平都达到丰富的程度,但2个处理间均无显著差异。而对照根际土壤有机质含量处于缺乏状态,施用复合微生物菌肥后有机质含量显著提高,表明有机质含量的增加促进了苹果幼树植株生长。

土壤酶参与催化有机物代谢过程中发生的各种反应和代谢过程(郭辉和唐卫平, 2020)。脲酶的活性表示土壤氮素的供应状况;蔗糖酶的活性直接影响着土壤中碳的转化;磷酸酶的活性与有机磷的分解相关;过氧化氢酶能够促进土壤对生物和有害物质的过氧化氢分解(唐玉姝等, 2007)。蔗糖酶、脲酶、磷酸酶的活性从本质上反映了土壤中碳、氮、磷的转化强度(Nannipieri et al., 2012)。土壤酶能显著促进土壤微生物的代谢活动,故将土壤酶活性作为土壤生物功能多样性和微生物活性潜力的指标(Hu et al., 2010)。本试验施用复合微生物菌肥后,根际土壤中的中性磷酸酶、脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶活性相较于施用有机肥对照土壤中的相应酶活性均有显著提高,这与赵艳和张晓波(2011)研究发现施用菌肥有利于植物对土壤中氮、碳、磷等营养元素循环和微生物活动的结果一致。

本研究中,在属水平上,复合微生物菌肥处理相对于对照处理总属数显著增加,说明施用菌肥后根际土壤中细菌群落的多样性显著提升,且前20位属的相对丰度之和也显著高于对照,表明施用菌肥使细菌种群总数增加的同时,优势种群也更为突出,施用菌肥可以提高土壤细菌群落的多样性,调控土壤微生物群落结构(Jiang et al., 2019)。土壤中细菌群落的多样性显著提升,很可能引起根际微生物区系组成的定向改变和富集,即向高肥的“细菌主导型”转化(Liu et al., 2020)。施用复合微生物菌肥改变了连作土壤根际细菌群落结构,体现在类别和丰度2个方面(Li et al., 2018)。从属水平来说,前20位优势细菌属的相对丰度发生了显著变化,其中芽胞杆菌属、伯克氏菌属和乳球菌属的相对丰度显著上升。结合本研究室田间试验结果,即复合微生物菌肥显著缓解了苹果再植病害,表明施用复合微生物菌肥改变了连作苹果根际土壤细菌微生物的多样

性,有益的拮抗菌和固氮菌含量大幅提升。

本研究的盆栽试验证明,从处理土壤中分离的贝莱斯芽胞杆菌 KMM-15、KMM-37 和 KMM-50 在海棠幼树生长过程中能够有效促进其生长。

综上所述,施用复合微生物菌肥显著提高了根际土壤中有机质的含量和土壤酶的活性,同时提高了根际土壤细菌群落的多样性,尤其是有益微生物类群,使土壤微生物朝着促进植物生长的方向转化。施用复合微生物菌肥缓解了苹果再植病害,促进了果树生长。

参 考 文 献 (References)

- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8): 478–486
- Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Caporaso JG. 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1): 90
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581–583
- Duan YN, Chen R, Zhang R, Jiang WT, Chen XS, Yin CM, Mao ZQ. 2021. Isolation, identification, and antibacterial mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* QSB-6 and its effect on plant roots. *Frontiers in Microbiology*, 12: 746799
- Franke-Whittle I, Juárez MF, Insam H, Schweizer S, Naef A, Topp AR, Kelderer M, Rühmer T, Baab G, Henfrey J, et al. 2019. Performance evaluation of locally available composts to reduce replant disease in apple orchards of central Europe. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 34(6): 543–557
- Guo H, Tang WP. 2020. Enzyme activity and microbial community diversity in rhizosphere and non-rhizosphere soil of *Larix principis-rupprechtii*. *Ecology and Environmental Sciences*, 29(11): 2163–2170 (in Chinese) [郭辉, 唐卫平. 2020. 不同林龄华北落叶松根际与非根际土壤酶和土壤微生物研究. *生态环境学报*, 29(11): 2163–2170]
- Hartemink AE. 2005. Nutrient stocks, nutrient cycling, and soil changes in cocoa ecosystems: a review. *Advances in Agronomy*, 86: 227–253
- Hu K, Li HX, Lu WS, Liu YJ, Wang LB. 2010. Effect of microbial organic fertilizer application on soil microbial activity. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 18(2): 303–306
- Jiang SQ, Yu YN, Gao RW, Wang H, Zhang J, Li R, Long XH, Shen QR, Chen W, Cai F. 2019. High-throughput absolute quantification sequencing reveals the effect of different fertilizer applications on bacterial community in a tomato cultivated coastal saline soil. *Science of the Total Environment*, 687: 601–609
- Karlen DL, Veum KS, Sudduth KA, Obrycki JF, Nunes MR. 2019. Soil health assessment: past accomplishments, current activities, and

- future opportunities. *Soil and Tillage Research*, 195: 104365
- Knight R, Vrbanc A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciulek T, McCall LI, McDonald D, et al. 2018. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7): 410–422
- Li WH, Liu QZ, Chen P. 2018. Effect of long-term continuous cropping of strawberry on soil bacterial community structure and diversity. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(11): 2570–2582
- Liu LY, Xu C, Liu KX, Chi XL, Zhu H, Zhang X, Jin X, Liu WW, Sun ZT, Mao ZQ. 2019. Effects of two endophytic antagonistic bacteria on growth of pot experiment *Malus hupehensis* seedlings and the soil enzymes activity under continuous cropping conditions. *Acta Horticulturae Sinica*, 46(7): 1238–1248 (in Chinese) [刘丽英, 许超, 刘珂欣, 迟晓丽, 朱浩, 张潇, 金晓, 刘维维, 孙中涛, 毛志泉. 2019. 两株植物内生拮抗菌对连作土盆栽平邑甜茶幼苗生长及土壤酶活性的影响. 园艺学报, 46(7): 1238–1248]
- Liu Z, Guo Q, Feng ZY, Liu ZD, Li HY, Sun YF, Liu CS, Lai HX. 2020. Long-term organic fertilization improves the productivity of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) through increasing rhizosphere microbial diversity and network complexity. *Applied Soil Ecology*, 147: 103426
- Lu RK. 2000. Analytical methods of soil agrochemistry. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 18–99 (in Chinese) [鲁如坤. 2000. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, pp. 18–99]
- Manici LM, Caputo F. 2009. Fungal community diversity and soil health in intensive potato cropping systems of the East Po Valley, northern Italy. *Annals of Applied Biology*, 155(2): 245–258
- Mazzola M, Manici LM. 2012. Apple replant disease: role of microbial ecology in cause and control. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 45–65
- Muoz-Rojas M. 2018. Soil quality indicators: critical tools in ecosystem restoration. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 5: 47–52
- Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, Puglisi E, Ceccanti B, Masciandaro G, Fornasier F, Moscatelli MC, Marinari S. 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and Fertility of Soils*, 48(7): 743–762
- Ondrasek G, Bakić Begić H, Zovko M, Filipović L, Meriño-Gergichevich C, Savić R, Rengel Z. 2019. Biogeochemistry of soil organic matter in agroecosystems & environmental implications. *Science of the Total Environment*, 658: 1559–1573
- Qin N, Li DF, Yang RF. 2011. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology: a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 51(4): 445–457 (in Chinese) [秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 2011. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用. 微生物学报, 51(4): 445–457]
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, et al. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459): 431–437
- Tang YS, Wei CF, Yan TM, Yang LZ, Ci E. 2007. Biological indicator of soil quality: a review. *Soils*, 39(2): 157–163 (in Chinese) [唐玉姝, 魏朝富, 颜廷梅, 杨林章, 慈恩. 2007. 土壤质量生物学指标研究进展. 土壤, 39(2): 157–163]
- Xiang L, Wang M, Pan FB, Wang GS, Jiang WT, Wang YF, Chen XS, Yin CM, Mao ZQ. 2021. Transcriptome analysis *Malus domestica* ‘M9T337’ root molecular responses to *Fusarium solani* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113: 101567
- Zalila-Kolsi I, Ben MA, Ali H, Sellami S, Nasfi Z, Tounsi S, Jamoussi K. 2016. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Microbiological Research*, 192: 148–158
- Zhao L. 2018. Soil ecological effects research of KMM compound microbial fertilizer on apple replant disorder. Master thesis. Baoding: Hebei Agricultural University (in Chinese) [赵璐. 2018. 施用KMM复合微生物菌肥对苹果连作障碍的生态效应研究. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]
- Zhao L, Liu S, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. 2019. Zhao L, Liu S, Hutong L, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. 2019. Determination for control effect of microbial manure against apple replant disease and the identification of antagonistic strain against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Protection*, 46(1): 208–215 (in Chinese) [赵璐, 刘胜, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 2019. 复合微生物菌剂对苹果再植病害的生防效果测定及拮抗菌株鉴定. 植物保护学报, 46(1): 208–215]
- Zhao Y, Zhang XB. 2011. Effects of *Bacillus mucilaginosus* agents on the activities of urease, phosphatase and catalase in ryegrass rhizosphere soil. *Journal of Microbiology*, 31(6): 49–52 (in Chinese) [赵艳, 张晓波. 2011. 施用胶质芽胞杆菌菌剂对黑麦草根际土壤脲酶、磷酸酶及过氧化氢酶活性的影响. 微生物学杂志, 31(6): 49–52]

(责任编辑:王 璇)