

杨 威, 闫海霞, 张贝贝, 等. 施用微生物菌肥“宁盾”对辣椒根围细菌多样性及土壤酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 99–103. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.022

# 施用微生物菌肥“宁盾”对辣椒根围细菌多样性及土壤酶活性的影响

杨 威<sup>1</sup>, 闫海霞<sup>2</sup>, 张贝贝<sup>1</sup>, 张温馨<sup>1</sup>, 郭坚华<sup>3</sup>, 罗玉明<sup>1</sup>

(1. 淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300;

2. 江苏省淮安市农业技术推广中心, 江苏淮安 223300; 3. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095)

**摘要:**根据本地区设施种植特点, 选择红优 4 号、马六、好农 50、苏椒 5 号等 4 个辣椒品种, 检测微生物菌肥“宁盾”的使用对辣椒根围细菌多样性及根围土壤主要土壤酶活性和土壤养分的变化情况。发现“宁盾”中主要成分芽孢杆菌能够稳定定殖, 且随着生长期的延长, 处理组与对照组中根围细菌的多样性逐渐呈现差异化; 与对照组相比, 处理组在 3 个采样时间点, 土壤脲酶活性、磷酸酶活性、纤维素酶活性、过氧化氢酶活性均高于对照组; 水解性氮含量、速效磷含量、速效钾含量及有机质含量均高于对照组, 且随着生长期的延长几种主要养分含量的提高幅度基本呈上升趋势。土壤酶活性及土壤中养分含量变化在不同辣椒品种之间差异不明显。

**关键词:**微生物菌肥; “宁盾”; 根围细菌多样性; 土壤酶活性; 土壤养分; 营养指标测定

**中图分类号:** S154.3    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0099-05

淮安红椒产自我国地理南北分界线特定的江苏省淮安市辖区内, 已有近 30 年的发展历史, 先后荣获“国家地理标志证明商标”“江苏省名牌农产品”等殊荣。近年来, 淮安红椒生产呈现出快速发展的态势, 截至 2010 年, 淮安市大棚红椒种植面积达 1.4 万  $\text{hm}^2$ , 占全市设施蔬菜面积的 36.2%。全

市年产红椒 45 万 t 以上, 年销售收入超过 23 亿元<sup>[1-2]</sup>。在快速发展的同时, 淮安红椒在种植过程中也存在一系列问题。如规模经营比例较小、无公害标准化生产技术难以推广以及滥用农药现象较多, 产品质量存在安全隐患。其中, 特别是在病虫害的防治过程中, 化学农药的大量使用, 对食品安全, 品牌效应的提升等产生了严重的阻碍。其中, 在淮安红椒的生产过程中, 尤以疫病的发生最为严重。辣椒疫病是由辣椒疫霉(*Phytophthora capsici* Leon)引起的一种毁灭性病害, 一般田间发病率为 5%~65%, 平均发病率达 24.4%, 发病严重的可减产 40%~70%, 甚至绝收<sup>[3]</sup>。对辣椒疫病的防治方法主要包括种植抗病品种、农业防治、化学防治、生物防治。抗病品种使用较少, 最常使用的防治方法是化学防治, 主要药剂包括

收稿日期: 2016-12-03

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(编号: BE2015364)。

作者简介: 杨 威(1983—), 男, 河北承德人, 博士, 副教授, 主要从事生物防治研究。E-mail: yangw107@gmail.com。

通信作者: 罗玉明, 教授, 主要从事设施连作障碍研究。Tel: (0517) 83525128; E-mail: yumingluo@163.com。

[15] 廖 丽, 张 静, 吴东德, 等. 竹节草种质资源耐盐性初步评价[J]. 热带作物学报, 2014, 35(10): 1905–1911.

[16] 张 静, 廖 丽, 张欣怡, 等. 竹节草对铝胁迫响应及临界浓度筛选[J]. 草业科学, 2014, 31(8): 1498–1502.

[17] 廖 丽, 蒋仁娇, 刘建秀, 等. 竹节草种质资源抗寒性初步评价研究[J]. 热带作物学报, 2016, 37(2): 234–240.

[18] Smith A C. Flora vitiensis nova; a new flora of Fiji[M]. Hawaii: National Tropical Botanical Garden, 1979.

[19] 郑玉忠, 席嘉宾, 杨中艺. 中国竹节草野生种质资源调查及生物学特性研究[J]. 草业学报, 2005, 14(3): 117–122.

[20] 李合生. 植物生理生化实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 123–212.

[21] 周祖富, 黎兆安. 植物生理学实验指导[M]. 南宁: 广西大学, 2005: 102–117.

[22] Zhang F, Yu J, Johnston C R, et al. Seed priming with polyethylene glycol induces physiological changes in *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L. Moench) seedlings under suboptimal soil moisture environments[J]. PLoS One, 2015, 10(10): 1–15.

[23] Dan H F. Light-dependent herbicides: an overview[J]. Weed Science, 2000, 48(2): 160–170.

[24] Triantaphylides C, Havaux M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling[J]. Trends in Plant Science, 2009, 14(4): 219–228.

[25] Del B D, Ioli G, Nasini L, et al. A comparative study on the interference of two herbicides in wheat and Italian ryegrass and on their antioxidant activities and detoxification rates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(22): 12109–12115.

[26] Rubinstein A, Colantonio L, Bardach A, et al. Estimation of the burden of cardiovascular disease attributable to modifiable risk factors and cost-effectiveness analysis of preventative interventions to reduce this burden in Argentina[J]. BMC Public Health, 2010, 10(1): 627.

[27] Peixoto F P, Gomes-Laranjo J, Vicentet J A, et al. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli[J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(11): 1125–1133.

甲霜灵、代森锰锌、甲霜·锰锌、氧化亚铜可湿性粉剂等 (<http://www.chinapesticide.gov.cn>)。

对于辣椒疫病的生物防治在国内外均有较多的研究。Segarra 等比较了生防制剂棘孢木霉 T34 和土菌灵在辣椒疫病防治中的效果,发现 T34 菌株的防治效果达 71%,而土菌灵只有在与病原菌同时接种时才能起到防治作用<sup>[4]</sup>。Sopheareth 等在 2013 年报道,伯克霍尔德式菌(*Burkholderia cepacia*) MPC-7 制剂能够显著防治辣椒疫病,平均防效达 60%,同时该生防菌能够显著促进植物的生长及生物量的增加<sup>[5]</sup>。刘永亮等通过平板对峙法筛选得到 1 株金色毛壳菌 HTC,对辣椒疫病的防治效果高于 70%<sup>[6]</sup>。欧雄常等应用红树内生细菌解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) RS261 菌株在辣椒植株根部定殖防治辣椒疫病,6 d 时的防治效果高于 80%,并增强了植株的防御酶活性<sup>[7-8]</sup>。人们还发现,生防菌能够产生生物膜来阻挡辣椒疫霉的侵染。如约氏黄杆菌 GSE09 能够在植物体表面产生生物膜,同时产生一些吡啶类化合物、酵母促生物、表面活性剂等物质来防治辣椒疫霉<sup>[9]</sup>。这些生防菌生物膜和代谢产物在辣椒根围形成了一定的屏障,改变了根围微生态环境,但根围微生态改变的意义尚未引起足够的重视。

微生物菌肥“宁盾”是由笔者所在项目组前期与南京农业大学联合开发研制,于 2013 年取得生物肥料登记证[微生物肥(2013)准字(1096)号]。在前期工作中,“宁盾”在防治辣椒土传病害中取得了较好的效果<sup>[10-11]</sup>,在研究中发现“宁盾”的使用对田间病害的防治效果可以持续到下一茬作物,下一茬种植过程中即便不再施药,辣椒仍然生长良好,病害发生较轻。因此,本试验旨在检测“宁盾”在防治辣椒土传病害过程中,对辣椒根围细菌多样性及主要土壤酶活性和土壤养分的影响,以期为该微生物菌肥的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计及土壤样品采集

本研究地点设在江苏省淮安市农业技术推广中心蔬菜园区,在辣椒移栽时利用微生物菌剂“宁盾”进行灌根处理,并分别在移栽 1、2、3 个月 after 采集辣椒根围土壤进行检测。以未使用微生物菌剂的辣椒作为对照组,处理组 and 对照组试验小区随机分布,每个处理 3 次重复,每个小区面积为 3 m×2 m。处理组包含 4 个辣椒品种,分别为红优 4 号 (TH)、马六 (TM)、好农 50 (TA)、苏椒 5 号 (TS),对照组为红优 4 号 (CH)。

整个土壤采集过程采用 3 点取样法,每个小区选取 3 株间距 1 m 的辣椒植株,首先将植株拔出,轻轻抖动以去除黏附在根部的大量土壤,再利用毛刷轻轻刷下紧贴在辣椒根部的土壤,3 株辣椒土壤样品混合在一起,装入塑封袋放在冰盒中带回实验室。样品前期处理后研磨过 2 mm 筛,一部分进行土壤总 DNA 的提取、变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, 简称 PCR-DGGE) 分析;另一部分置于阴凉通风处自然干燥至恒质量,用作土壤理化性质及酶活性检测;剩余的则置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 土壤样品 DNA 提取及 DGGE 分析

本研究利用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒 (MP Bio, USA) 进行土壤样品总 DNA 的提取,提取方法参照试剂盒试验说明。以样品基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列,引物信息如表 1 所示。

表 1 土壤样品 16S rDNA 扩增引物信息

引物	引物序列
518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'
GC-338F	5'-CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCA-3'

PCR 扩增体系 (50 μL): 10×PCR buffer 5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 3.2 μL、rTaq (5 U/μL) 0.4 μL、GC-338F (20 μmol/L) 1 μL、518R (20 μmol/L) 1 μL、模板 DNA 50 ng、补充 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最终 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收。DGGE 梯度胶根据 Heuer 等的方法<sup>[12]</sup>制备。DGGE 在 DCode 突变检测系统 (Bio-Rad) 中完成。用 25 μL PCR 浓缩产物进行 DGGE, 采用变性梯度为 30%~60%、浓度为 8% 的丙烯酰胺凝胶 [100% 浓度定义为 7 mol/L 尿素和 40% 的去离子甲酰胺] 在 1×TAE 电泳缓冲液中、130 V 电压、60 ℃ 下电泳 7 h。电泳后用银染 10~15 min, 扫描并拍照。比对不同处理组 and 对照组之间差异性条带, 切胶回收、测序比对。测序结果采用 DNASTAR 和 Cluster 软件进行序列分析, 下载最相似的菌株序列作为系统发育树的参考序列。然后采用 MEGA 软件、Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 自展数为 1 000。主成分分析在 CANOCO 4.5 软件中进行。

细菌多样性指数是研究群落物种数和个体数以及均匀度的综合指标。根据电泳图谱中样品条带数目及每个条带的强度 (灰度), 对各样品中细菌香农指数、均匀度、丰富度等指标进行分析。DGGE 图谱采用 Quantity one 软件对每个样品的电泳条带数目、条带密度进行数字化分析。

1.3 土壤酶活性及理化性质测定

土壤酶活性测定包括脲酶、磷酸酶、蔗糖酶、过氧化氢酶等的测定, 具体操作参考关松荫的方法<sup>[13]</sup>。土壤理化性质测定包括速效氮、速效磷、速效钾、有机质等含量的测定, 具体操作参考鲁如坤的方法<sup>[14]</sup>。试验数据采用 Excel 处理后作图, 用 SPSS 16.0 对各处理之间的差异性进行分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒根围细菌 DGGE 指纹图谱分析

由表 2 可知, 微生物菌肥“宁盾”处理组相对于对照组, 辣椒根围微生物多样性呈现下降趋势, 从香农指数、丰富度的结果来看, 处理组除了 TM 组在第 2 个采样时间点高于对照组以外, 其他所有处理组在 3 个采样时间点均低于对照组。说明在施用微生物菌肥后能够降低辣椒根围土壤微生物的多样性, 使其中个别微生物成为优势种群。另外, 由于本次试验采用的是基质栽培, 因此, 辣椒根围微生物多样性总体偏低。

表 2 基于 DGGE 图谱的土壤样品微生物多样性分析

编号	香农指数	均匀度	丰富度
CH1	1.76	0.91	7
CH2	1.78	0.95	7
CH3	1.94	0.92	8
TH1	1.60	0.93	6
TH2	1.65	0.98	6
TH3	1.58	0.92	6
TM1	1.81	0.92	7
TM2	2.20	0.95	11
TM3	1.73	0.92	7
TA1	1.77	0.93	7
TA2	1.74	0.93	7
TA3	1.53	0.91	6
TS1	1.78	0.96	6
TS2	1.48	0.96	5
TS3	1.49	0.94	5

2.2 DGGE 图谱的主成分分析

为了使 DGGE 结果显现更加直观,本试验中将 DGGE 图谱进行量化,根据其灰度进行主成分分析。由图 1 可知,在施用微生物菌剂后短时间内,处理组 4 个品种和对照组辣椒根围土壤微生物多样性差异不明显,但随着种植时间的延长,处理组中 TM、TA 组与对照组之间逐渐开始显现差异性,而 TH、TS 组无明显变化,说明微生物菌剂的应用能够改变辣椒根围微生物的组成与密度。

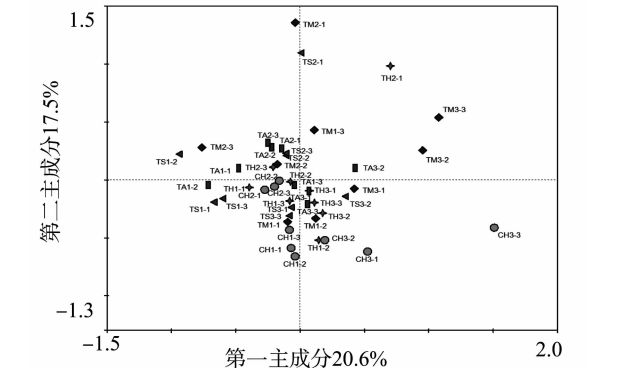


图1 基于 DGGE 图谱的土壤样品微生物多样性主成分分析

2.3 DGGE 测序条带的系统发育树构建

为明确施用微生物菌剂对辣椒根围微生物种类的影响,对 DGGE 指纹图谱中差异条带进行切胶测序比对。由图 2 可知,在处理组和对照组中有些微生物类群始终处于优势种群地位,如球形杆菌属 (band6, *Sphaerobacter* sp.)、*Dyella* 属 (band7, *Dyella* sp.)、链霉菌属 (band32, *Streptomyces* sp.) 等。另外,使用微生物菌剂后辣椒根围新出现的微生物类群主要包括类香味菌属 (band12, *Myroides* sp.)、芽孢杆菌属 (band 36, *Bacillus* sp.)、嗜冷芽孢杆菌属 (band27, *Psychrobacillus* sp.)、赤细菌属 (band28, *Erythrobacter* sp.) 等,其中出现最多的为芽孢杆菌属,芽孢杆菌为微生物菌肥“宁盾”的主要成分。

2.4 土壤酶活性测定结果

由图 3 可知,微生物菌肥处理后,在 3 个采样时间点,处理组的土壤酶活性相对对照组普遍升高。不同辣椒品种之间土壤酶活性变化差异不大。作为同一品种,红优 4 号经过微

生物菌肥处理后在 3 个采样时间点除蔗糖酶外所有土壤酶活性均明显高于对照组,其中脲酶活性分别提高 20%、12%、21%,磷酸酶活性分别提高 29%、31%、33%,纤维素酶活性分别提高 100%、180%、265%,过氧化氢酶活性分别提高 40%、66%、16%。说明微生物菌肥使用后能够在一定时期内提高辣椒根围土壤酶活性。

2.5 土壤主要营养指标测定结果

由图 4 可知,微生物菌肥处理组和对照组在 3 个采样时间点根围土壤中氮、磷、钾及有机质含量变化趋势基本一致,均呈先降后升的趋势。但微生物菌肥处理组在 3 个时间点的主要营养指标含量均高于对照组。不同辣椒品种之间,在微生物菌肥处理后 3 个时间点氮、磷、钾及有机质含量差异不大。在同一品种红优 4 号中,微生物菌肥处理组与对照组相比水解性氮含量分别提高 8%、29%、37%,速效磷含量分别提高 21%、48%、0,速效钾含量分别提高 19%、26%、36%,有机质含量分别提高 11%、23%、43%。除了处理 3 个月后的速效磷含量之外,其他营养指标在 3 个时间点的提高幅度均呈现上升趋势。说明在微生物菌肥处理后,能够在更长时间内为寄主植物提供充足营养。

3 讨论与结论

微生物菌肥由于含有能够协助寄主植物抗病促生的活性有益菌,在施用后能够在植物根围有效定殖,且在较长时期内通过提高土壤酶活性、加速土壤中养分循环、抑制病害发生等方面发挥有益作用<sup>[15-16]</sup>。但对于微生物菌肥的使用方式、对不同土壤条件的适应性以及在不同品种寄主植物上的作用差异等还须要更深入地研究。

本研究通过 PCR-DGGE 分析方法研究了微生物菌肥“宁盾”在不同辣椒品种上使用后对于寄主根围细菌多样性的变化,并测定了相关土壤酶活性以及土壤主要养分含量的变化情况。发现在“宁盾”使用以后,其中主要成分芽孢杆菌能够在寄主根围土壤中稳定定殖,且随着生长期的延长,处理组与对照组在根围细菌多样性上开始逐渐呈现差异化。同时,与根围微生物活性相关的几种土壤酶活性在处理组中均高于对照组,包括脲酶、过氧化氢酶、蔗糖酶、纤维素酶、磷酸酶等。另外,从辣椒根围土壤中主要养分指标测定结果来看,处理组均明显高于对照组,且随着辣椒生长期的延长,主要营养指标在 3 个时间点的提高幅度基本呈上升趋势。说明在微生物菌肥处理后,能够在更长时间内为寄主植物提供充足营养。从辣椒品种来看,微生物菌肥使用后在不同辣椒品种之间的影响差异不明显。

参考文献:

[1]王立华,王锡明,吴洪斌. 淮安红椒产业现状及发展对策[J]. 长江蔬菜,2012(18):95-97.  
[2]赵平. 多途径打造“淮安红椒”品牌[J]. 江苏农村经济,2012(7):31-31.  
[3]张政兵,郭海明. 辣椒疫病防治研究进展[J]. 农药研究与应用,2006,10(4):10-12.  
[4]Segarra G, Aviles M, Casanova E, et al. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum*

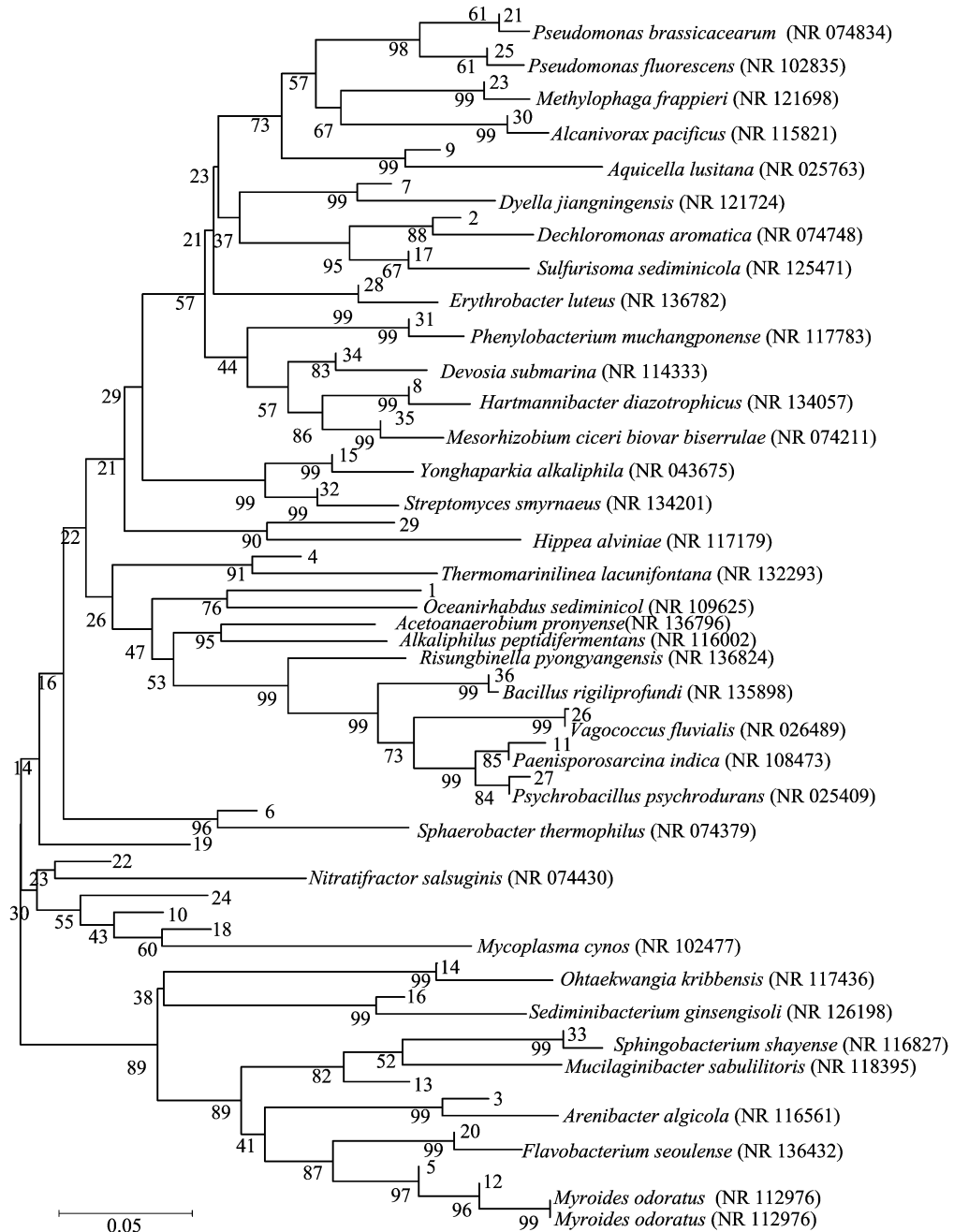


图2 基于 DGGE 图谱条带序列的系统进化树

strain T34[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2013, 52(1): 77 – 83.

[5] Sophaeareth M, Chan S, Naing K W, et al. Biocontrol of late blight (*Phytophthora capsici*) disease and growth promotion of pepper by *Burkholderia cepacia* MPC – 7[J]. The Plant Pathology Journal, 2013, 29(1): 67 – 76.

[6] 刘永亮, 尹成林, 田叶韩, 等. 拮抗真菌 HTC 的鉴定及其对辣椒疫病的生物防治潜力[J]. 植物保护学报, 2013, 40(5): 437 – 444.

[7] 欧雄常, 柳 凤, 詹儒林, 等. 拮抗辣椒疫病菌的红树内生细菌筛选及 RS261 菌株鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 175 – 180.

[8] 柳 凤, 欧雄常, 何 红, 等. 红树内生细菌 RS261 菌株防治辣椒疫病的初步研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 333 – 336.

[9] Sang M K, Kim K D. The volatile – producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(2): 383 – 398.

[10] Liu H X, Li S M, Luo Y M, et al. Biological control of *Ralstonia* wilt, *Phytophthora* blight, *Meloidogyne* root – knot on bell pepper by the combination of *Bacillus subtilis* AR12, *Bacillus subtilis* SM21 and *Chryseobacterium* sp. R89 [J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 139(1): 107 – 116.

[11] Zhou D M, Wang K P, Liu H X, et al. Field evaluation of different application methods of the mixture of *Bacillus cereus* strain AR156 and *Bacillus subtilis* strain SM21 on pepper growth and disease resistance[J]. Biocontrol Science and Technology, 2014, 24(12): 1451 – 1468.

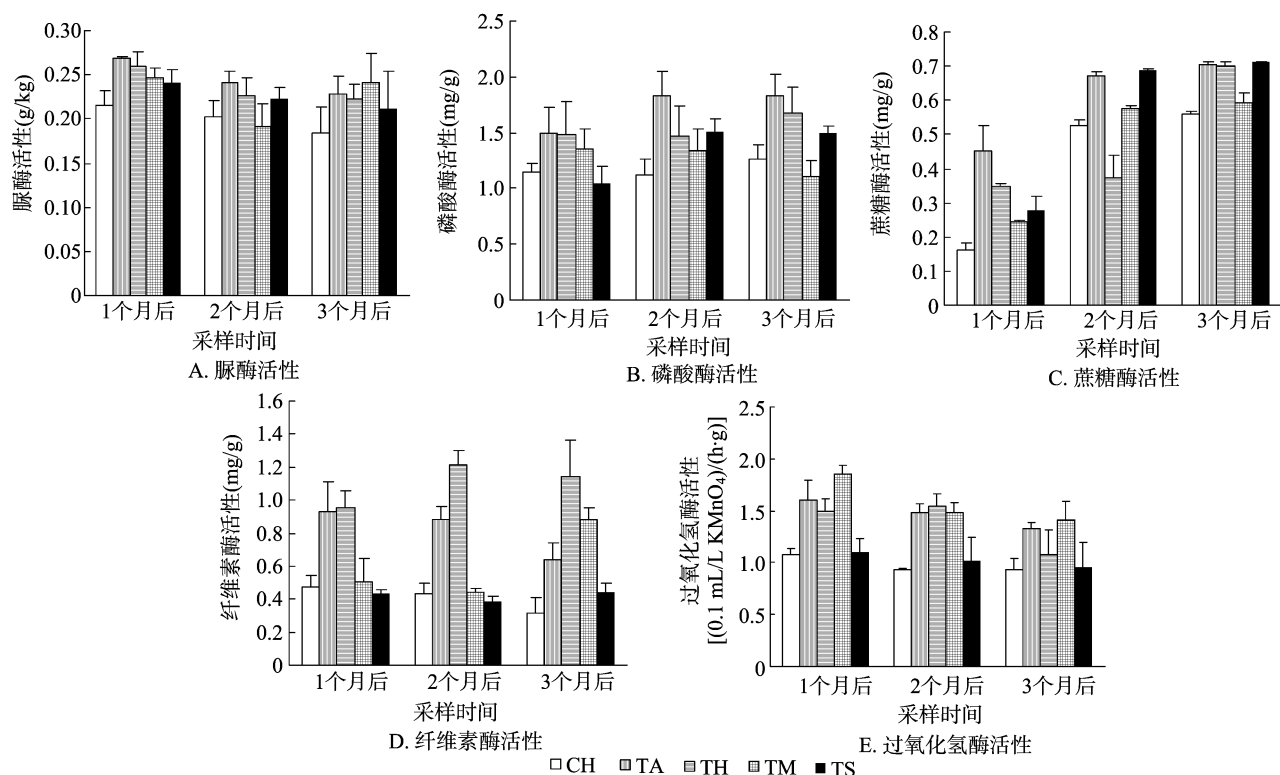


图3 不同处理组辣椒根围土壤样品酶活性测定结果

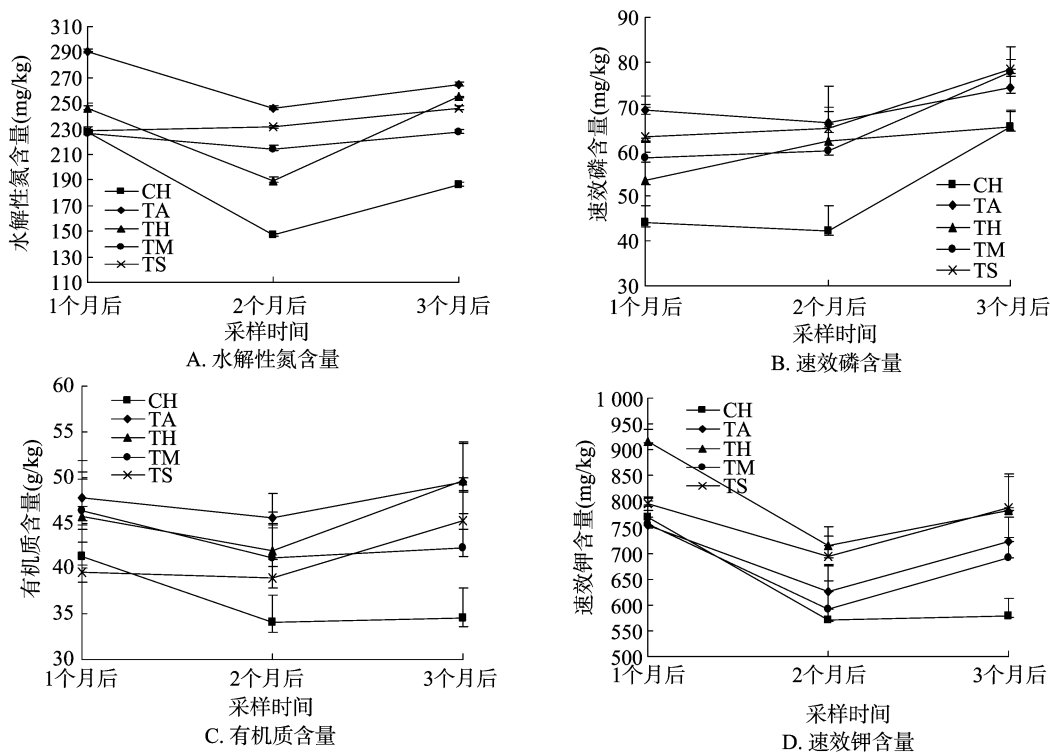


图4 不同处理组辣椒根围土壤样品营养指标测定结果

[12] Heuer H, Wieland G, Schönfeld J, et al. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis [J]. Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications, 2001, 9: 177-190.

[13] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.

[14] 鲁如坤. 土壤农化分析法 [M]. 北京: 农业科学出版社, 2000.

[15] 乔蓬蕾, 张艳云, 谢全喜, 等. 微生物菌肥修复作物连作障碍的机理 [J]. 农村经济与科技, 2015, 26(3): 8-9, 7.

[16] 胡可, 王琳, 秦俊梅, 等. 菌肥与有机无机肥配施对石灰性土壤生化作用强度和微生物数量的影响 [J]. 河南农业科学, 2015, 44(10): 76-80.