

微生物肥料对草莓根腐病防治效果及对根围土壤微生物群落多样性的影响

李丽艳^{1,2,3}, 朱瑞艳⁴, 杜迎辉¹, 肖艳^{1,2,3}

(1. 领先生物农业股份有限公司, 河北秦皇岛 066004; 2. 河北省农业生物技术工程技术研究中心, 河北秦皇岛 066004; 3. 河北省农业厅植物营养与海洋功能肥料重点实验室, 河北秦皇岛 066004; 4. 燕山大学环境与化学工程学院, 河北秦皇岛 066000)

摘要 [目的]探究微生物施肥技术对草莓根腐病的防治效果,为进一步合理应用微生物肥料防治草莓重茬病害提供理论依据。[方法]在草莓生长期施用微生物肥料,于膨果期调查草莓根腐病发病情况,并采集土样提取土壤基因组DNA,通过PCR扩增建立文库,利用Miseq平台Illumina第二代高通量测序技术并结合相关生物信息学分析土壤细菌16S rRNA基因V3+V4区域和真菌ITS1区域的丰富度和多样性指数以及群落结构。[结果]微生物肥料可使草莓根腐病发病率降低36.3%,平均防效达63.9%;显著降低镰孢菌属的相对丰度,较对照区降低了97.56%,明显提高了有益细菌芽孢菌属的相对丰度,较对照区提高了30.37%。[结论]微生物肥料可有效改善土壤微生物区系并提高作物产量、改善草莓品质。

关键词 草莓根腐病;微生物肥料;微生物群落多样性

中图分类号 S144 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)33-0111-03

Effect of Microbial Fertilizer on the Control of Strawberry Root Rot and the Diversity of Soil Microbial CommunitiesLI Li-yan^{1,2,3}, ZHU Rui-yan⁴, DU Ying-hui¹ et al (1. Leading Biological and Agricultural Limited Company, Qinhuangdao, Hebei 066004; 2. Agricultural Biotechnology Engineering Technology Research Center of Hebei Province, Qinhuangdao, Hebei 066004; 3. Key Laboratory of Plant Nutrition and Marine Functional Fertilizer, Hebei Provincial Department of Agriculture, Qinhuangdao, Hebei 066004; 4. College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004)

Abstract [Objective] To investigate the effect of microbial technology on the control of strawberry root rot, as well as to provide a theoretical basis for the further application of microbial technology to control strawberry stubble. [Method] The microbial fertilizer was applied during the growth of strawberry, and the occurrence of strawberry root rot was investigated in swelling period. The soil genomic DNA was extracted and the gene library was amplified by PCR. Miseq platform Illumina next generation sequencing and the bioinformatics were used to analyze the abundance and diversity indices of soil bacterial 16S rRNA gene V3 + V4 region and fungal ITS1 region as well as the community structure. [Result] The incidence of strawberry root rot decreased by 36.3%, the average control efficiency reached 63.9%, and the relative abundance of *Fusarium* spp. decreased by 97.56% compared with the control. The relative abundance of beneficial bacteria was increased by 30.37% compared with the control. [Conclusion] Microbial fertilizer could improve soil microbial flora and crop yield, and improve the quality of strawberry.

Key words Strawberry root rot; Microbial fertilizer; Microbial community diversity

近年来,由于草莓市场需求逐年扩大,种植草莓的连作重茬地面积逐年增加,从而造成草莓根部病害逐年加重,其中草莓根部重要病害之一是草莓根腐病(strawberry root rot)。草莓根腐病是一种较典型的根部土壤传播病害,防治困难,特别是种植在连作多年草莓地块的草莓更容易发生草莓根腐病。轻则造成草莓产量下降,重则造成草莓绝收^[1]。随着我国棚区草莓种植面积的逐年增加,草莓根腐病的发生也呈逐年上升趋势,已成为制约草莓产业正常发展的主要因素之一^[2-3]。

在防治该病方面,农药等化学药剂的作用巨大,也显而易见,但长期频繁使用化学药剂也在很大程度上增强了病原菌的抗药性,从而使得化学药剂的防治效果越来越差^[2],且长期、大量、频繁地使用农药等化学药剂容易破坏整体生态平衡,引起各种环境污染,危害人类健康^[1-2]。探寻一条新的途径来克服或缓解这些制约草莓生产的影响因素具有重要意义。为此,笔者以常规施肥为对照,选取有代表性的草莓根腐病发病地块,研究“富思德”微生物肥料对草莓根腐病的

防治效果以及对草莓根围土壤微生物群落多样性的影响,旨在为采用微生物肥料调节草莓的连作障碍防控技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 “富思德”荧光假单胞菌剂(领先生物农业股份有限公司):有效活菌数 ≥ 5 亿/mL;“富思德”生物有机肥(领先生物农业股份有限公司):有效活菌数 ≥ 0.2 亿/g,有机质 $\geq 40.0\%$ 。作物为连续种植6年棚的草莓,品种为红颜99。

1.2 试验设计 试验于2015年9月在秦皇岛昌黎左丰台草莓种植区进行。对照区为常规化学肥料,肥料用量(折合成纯养分)为N 330 kg/hm²、P₂O₅ 240 kg/hm²、K₂O 560 kg/hm²。采用大区对比试验,各处理面积为667 m²,不设重复。试验设2个处理:以常规施肥作为对照区(CMB01);微生物肥料(CMJ02)为处理区。定植前基施“富思德”生物有机肥2250 kg/hm²;分别在草莓定植期、缓苗期、开花期、膨果期、第一次摘果期、第二次摘果期冲施“富思德”荧光假单胞菌剂75 L/hm²。草莓对照区及处理区各时期施肥及管理措施均为当地种植人员常规管理模式。

1.3 试验方法

1.3.1 发病率调查。在草莓膨果期调查草莓根腐病发病情况,每个处理随机选取6行,每行10 m。发病率、病情指数和防效分别按照下列公式计算^[4-7]。

基金项目 河北省科技计划项目(17273201D);河北省产业创新创业团队项目(169A76114H)**作者简介** 李丽艳(1985—),女,河北唐山人,中级农艺师,硕士,从事微生物肥料研发、应用技术研究。朱瑞艳(1977—),女,山西文水人,讲师,从事微生物代谢产物研究。李丽艳和朱瑞艳为共同第一作者。**收稿日期** 2018-07-16; **修回日期** 2018-07-26

发病率=死苗棵数/调查区间种植总棵数×100%

病情指数=[Σ (病级株数×代表值)/(总株数×最高病级代表值)]×100

防效=(对照区病情指数-处理区病情指数)/对照区病情指数×100%

草莓根腐病发病程度参考[8-9]的方法分为6级。0级为根系未见发病;1级为根系发病率≤30%,叶片较为正常;2级为30%<根系发病率≤60%,叶片较为正常;3级为60%<根系发病率≤80%,叶片已开始变黄;4级为根系发病率80%以上,叶片已枯萎;5级为整株死亡,叶片整体干枯。

1.3.2 根际土壤微生物多样性分析

1.3.2.1 土壤微生物 DNA 提取。分别在盛果期取对照区及处理区草莓根际土样,采集时间为2016年4月,每个处理随机选取5个取样点,用螺旋取土钻采集0~10 cm表层新鲜土壤,除去杂物、根系,研磨并过2 mm筛后混合^[10]。针对每种新鲜土壤,分别称取0.5 g,3个重复。用FastDNA® Spin Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals)提取土壤微生物基因组总DNA^[10],将提取得到的土壤DNA溶解于50 μL TE缓冲液,详细操作步骤参考试剂盒说明书。采用0.8%琼脂糖凝胶电泳进行检测,DNA样品于-20℃冰箱保存待用。

1.3.2.2 试验流程。提取土壤样品总DNA后,根据文献^[11]

得到细菌V3+V4(F:5'-ARACTYCTACGGRAGGCWG-3';R:5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3')和真菌ITS1(F:5'-AACCTGCGGAAGGATCATT-3';R:5'-GARCCAAGAGATC-CRTTG-3')合成引物,PCR扩增并进行纯化、定量和均一化后建立测序文库,质检合格的文库用Illumina HiSeq PE250进行测序^[12],该测序工作由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

1.3.3 产量及品质调查。草莓盛果期分别调查对照区及处理区草莓产量(10 m)并测定草莓品质。品质测定按照下列方法^[13]:选取50个成熟度较为一致的草莓果实,充分研碎后过滤得到滤液,采用苯酚硫酸法测定滤液中的可溶性糖含量^[14];采用酸碱滴定法测定滤液中的可滴定酸含量;采用2,6-二氯酚酚滴定法测定滤液中的抗坏血酸含量^[15],重复3次。

2 结果与分析

2.1 微生物肥料对草莓根腐病防治效果的影响在盛果期调查对照及处理区草莓根腐病发病情况及病情指数,结果见表1。由表1可知,在草莓整个生长期施用微生物肥料,发病率降低了36.25%,平均防效达63.9%。说明在草莓整个生长期施用微生物肥料能够很好地预防并降低草莓根腐病引起的死苗现象。

表1 微生物肥料对草莓根腐病防治效果

Table 1 Control effect of microbial fertilizer on strawberry root rot

处理 Treatment	调查总棵数 Total number of trees//棵	发病数 Diseased trees 棵	发病率 Incidence rate//%	病情指数 Disease index	平均防效 The average control effect//%
对照 CMB01 Contrast CMB01	80	36	45.00	41.75	—
处理 CMJ02 Treatment CMJ02	80	7	8.75	4.25	89.80

2.2 微生物肥料对根际土壤真菌和细菌相对丰度的影响 Ace和Chao指数可反映群落物种丰富度,Shannon指数反映群落多样性。不同处理下土壤样品群落丰富度和多样性指数见表2。由表2可知,施用微生物肥料的处理区土壤中真菌Ace指数、Chao指数和Shannon指数均有所下降,分别降低了5.58%、7.68%、20.97%,处理区土壤中细菌Ace和Chao指数也均有所下降,分别降低了2.92%、3.77%、5.28%。说明施用微生物肥料后均在一定程度上降低了草莓根际细菌、真菌的群落丰富度和多样性,但下降幅度不显著。

由图1A可知,草莓对照及处理区根区土壤样品中的真菌中未确定种属的菌类占很大比例(对照区74.19%,处理区

90.27%)外,镰孢菌属(*Fusarium*)、腐质霉属(*Humicola*)、毛癣菌属(*Trichocladium*)的相对丰度最高,属于优势真菌。施用微生物肥料可显著降低镰孢菌属的相对丰度,较对照区降低了97.56%,从而可以有效地降低草莓根腐病的发生。

由图1B可知,草莓对照及处理区土壤样品中的优势细菌为*Gemmatimonadaceae_ uncultured*、芽孢菌属(*Bacillus*)、*OPB35 soil group_norank*、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、*RB41_norank*、*Nitrosomonadaceae_ uncultured*。施用微生物肥料后可明显提高有益细菌芽孢菌属的相对丰度,较对照区提高了30.37%。

表2 不同处理下土壤样品群落丰富度和多样性指数

Table 2 Richness and diversity index of soil samples under different treatments

处理 Treatment	真菌(ITS1区)Fungi				细菌(V3+V4区)Bacteria			
	Ace	Chao	Simpson	Shannon	Ace	Chao	Simpson	Shannon
对照 CMB01 Contrast CMB01	475.89	461.78	0.90	4.53	7 955.27	7 344.08	0.99	11.36
处理 CMJ02 Treatment CMJ02	450.74	428.84	0.79	3.58	7 729.32	7 077.27	0.99	10.79

2.3 微生物肥料对草莓产量及品质的影响由表3可知,微生物肥料的施用可显著提高草莓产量并改善草莓果实品质。微生物肥料可使草莓较对照增产25%,增产极显著($P <$

0.01);草莓果实可滴定酸含量下降10.8%,维生素C含量提高6.94%,变化显著($P <$ 0.05),而糖分含量增幅不显著($P >$ 0.05)。

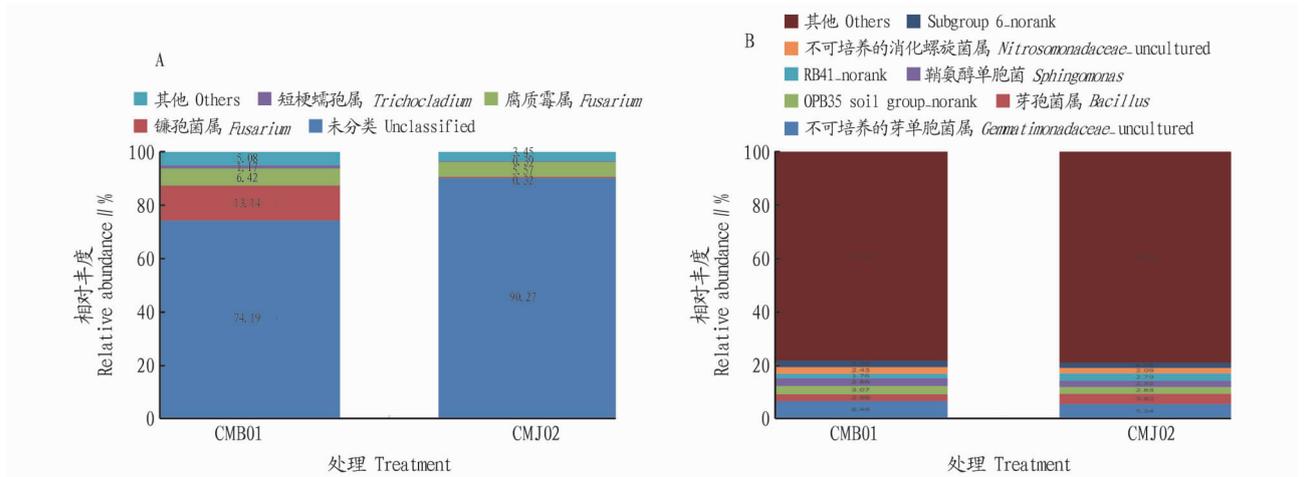


图1 土壤真菌属水平(A)和细菌属水平(B)相对丰度变化

Fig.1 The relative abundance of soil fungi (A) and bacteria (B)

表3 微生物肥料对草莓产量及品质的影响

Table 3 Effect of microbial fertilizer on yield and quality of the strawberry

处理 Treatment	产量 Yield/kg/m ²	糖分 Sugar/%	可滴定酸 Titratable acid/%	糖酸比 Sugar acid ratio	维生素 C 含量 Vitamin C content/mg/kg
对照 CMB01 Contrast CMB01	2.80 b	10.4 a	9.2 a	1.13 b	67.7 b
处理 CMJ02 Treatment CMJ02	3.50 a	10.8 a	8.3 b	1.30 a	72.4 a

注: 同列不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercases in the same column meant significant differences between different treatments at 0.05 level

3 结论与讨论

研究表明,阻碍草莓连作的最主要因素是草莓的各种病害发病率急剧上升,从而导致植株长势不良、根系新生根生长受到明显限制,最终导致草莓产量和品质受到极大影响^[16]。其根本原因是草莓根际土壤中的病原微生物数量急剧增加,从而导致有益微生物和病原微生物的比例严重失调,根系分泌出的自毒物质也出现大量累积^[13,17-18]。研究表明,利用有益微生物可明显降低草莓连作中各种障碍的影响^[19-20]。该试验利用微生物肥料可对草莓根腐病起到非常显著的防治效果,发病率降低 36.3%,平均防效达 63.9%;微生物肥料的施用显著降低了镰孢菌属的相对丰度,明显提高了有益细菌芽孢菌属的相对丰度,对草莓根际微生物区系起到明显的改善作用。

该研究表明,微生物肥料的施用可显著改善连作种植草莓地区草莓根际土壤微生物区系,促进草莓新生根系及植株健康生长,从而增强草莓自身抗病性,大大降低连作草莓根腐病发病率,提高草莓产量并改善果实品质,有效缓解了草莓连作障碍的影响。

参考文献

[1] 高菲,卜春亚,靳永胜,等. 草莓根腐病拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 广东农业科学,2012(3):4-8.
 [2] 杨述. 草莓根腐病的发生规律及防治技术[J]. 中国林副特产,2009(2):38-39.
 [3] 陈瑶,王树雪,魏艳敏,等. 草莓根腐病菌 C16-4 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 果树学报,2012,29(4):638-643.
 [4] 孙广宇,宗兆峰. 植物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,

2002.
 [5] 杨信东,高洁,马贵龙,等. 植物病害疫情控制效果计算公式的改进[J]. 吉林农业大学学报,1999,21(3):46-48.
 [6] 孙卓,杨利民. 人参锈腐病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 中国生物防治学报,2015,31(4):536-542.
 [7] 孙卓,杨利民,马秀杰,等. 人参黑斑病拮抗细菌的分离筛选和鉴定[J]. 吉林农业大学学报,2014,36(3):276-281.
 [8] VESTBERG M, KUKKONEN S, SAARI K, et al. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry[J]. Applied soil ecology, 2004, 27(3):243-258.
 [9] 申光辉,薛泉宏,张晶,等. 草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 中国农业科学,2012,45(22):4612-4626.
 [10] 夏围围,贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报,2014,54(12):1489-1499.
 [11] 曹辉,李燕歌,周春然,等. 炭化苹果枝对苹果根区土壤细菌和真菌多样性的影响[J]. 中国农业科学,2016,49(17):3413-3424.
 [12] 李莹. 复合菌系 LDC 的微生物多样性及木质素降解特性[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2016.
 [13] 申光辉,薛泉宏,陈素,等. 硅酸钾与密旋链霉菌 Act12 菌剂配施对连作草莓生长、果实产量及品质的影响[J]. 中国生态农业学报,2012,20(3):315-321.
 [14] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社,2002:95-97.
 [15] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:246-248.
 [16] 甄文超,代丽,胡同乐,等. 连作对草莓生长发育和根部病害发生的影响[J]. 河北农业大学学报,2004,27(5):68-71.
 [17] 薛泉宏,同延安. 土壤生物退化及其修复技术研究进展[J]. 中国农业科技导报,2008,10(4):28-35.
 [18] 解灵军,尹宝重,高峰,等. 草莓根系自毒物质降解菌的筛选及降解效果研究[J]. 河北农业大学学报,2009,32(4):76-78,87.
 [19] 李保会,李青云,李建军,等. 复合微生物菌肥对连作草莓产量和品质的影响[J]. 河北农业科学,2007,11(1):15-17.
 [20] 张丽萍,黄亚丽,程辉彩,等. 土壤微生物制剂防治草莓连作病害的研究[J]. 土壤,2007,39(4):604-607.