

胡英宏, 任泽广, 杨姝钰, 赵艳, 王蓓蓓, 张晓波, 阮云泽. 生物有机肥对菠萝心腐病发生和土壤细菌群落结构的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (6): 1444-1451

Hu YH, Ren ZG, Yang SY, Zhao Y, Wang BB, Zhang XB, Ruan YZ. Effects of bio-organic fertilizers on pineapple heart rot and bacterial community structure [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (6): 1444-1451

生物有机肥对菠萝心腐病发生和土壤细菌群落结构的影响

胡英宏¹ 任泽广¹ 杨姝钰¹ 赵艳¹✉ 王蓓蓓¹ 张晓波²✉ 阮云泽¹

¹海南大学热带作物学院 海口 570208

²海南大学旅游学院 海口 570208

摘要 菠萝心腐病是菠萝农业生产中常见的土传病害,为明确生物有机肥施用防控菠萝心腐病发生的机制,选择连作发病严重的菠萝园土壤,在盆栽条件下研究3种载体(菜籽饼、泥炭土、椰糠)和生防菌株(枯草芽孢杆菌HL2、链霉菌株HL3)与普通有机肥共同堆制成的生物有机肥(KC、KN、KY、LC、LN、LY)对连作菠萝心腐病发生及土壤细菌群落结构的影响。结果表明:相比三元复合肥处理和普通有机肥处理,生物有机肥(KC)处理心腐病发病率分别降低20%、13.3%,防控效果最好。生物有机肥KC、KN、KY、LC、LN、LY施入后土壤细菌群落丰富度和多样性均显著高于三元复合肥,但生物有机肥KC、KN、KY处理相比生物有机肥LC、LN、LY处理更高,形成了明显不同的群落结构。与三元复合肥相比,生物有机肥KC、KN、KY处理明显富集了土壤中芽孢杆菌属和偶氮水单孢菌属细菌及酸杆菌门细菌属(Gp4、Gp6),而生物有机肥LC、LN、LY处理土壤链霉菌属细菌相对丰度则显著增加。通过Spearman分析发现,这些细菌类群的相对丰度与心腐病发生率呈显著负相关关系。综上,施用生物有机肥能改变土壤细菌群落结构,激发土壤有益微生物,显著降低菠萝心腐病的发生,对恢复菠萝连作土壤微生态平衡具有重要意义。(图6表1参40)

关键词 菠萝心腐病; 生物有机肥; 细菌; 群落结构

Effects of bio-organic fertilizers on pineapple heart rot and bacterial community structure

HU Yinghong¹, REN Zeguang¹, YANG Shuyu¹, ZHAO Yan¹✉, WANG Beibei¹, ZHANG Xiaobo²✉ & RUAN Yunze¹

¹ College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570208, China

² School of Tourism, Hainan University, Haikou 570208, China

Abstract Heart rot is a common soil-borne disease in the pineapple industry, but the situation can be alleviated by the application of bio-fertilizers with beneficial microbiomes. Clarifying the controlling mechanism of bio-organic fertilizer on the high incidence of heart rot is critical in monocultural pineapple cropping patterns. In our study, the soil of continuous cropping pineapple orchards was collected. Three types of carriers (rapeseed cake, peat soil, and coconut bran), biocontrol strains (*Bacillus subtilis* HL2 and *Streptomyces* strain HL3), and organic fertilizer (YJ) were composted into different bio-fertilizers (KC, KN, KY, LC, LN, and LY), which were used in pot experiments. The controlling effect of the bio-fertilizer was determined based on the response of pineapple heart rot and bacterial communities to different fertilizing methods. Our results revealed that the incidence of heart rot in bio-fertilizer KC was the lowest, which decreased by 20% and 13.3%, respectively, compared to HF (chemical fertilizer, 16-16-16) and YJ (organic fertilizer). The richness and diversity of soil bacterial communities in all biofertilized treatments (KC, KN, KY, LC, LN, and LY) were significantly higher than those in HF. However, the α -diversity indices of the bio-fertilizers (KC, KN, and KY) were higher than those of LC, LN, and LY, and the bacterial community composition was significantly different. The bacteria GP4, GP6, *Bacillus*, and *Azohydromonas* were enriched in KC, KN, and KY, while the relative abundance of *Streptomyces* increased significantly in LC, LN, and LY. Furthermore, Spearman correlation analysis showed that the relative abundance of these bacterial groups was significantly negatively correlated with the incidence of pineapple heart rot. In summary, the application of bio-organic fertilizers can decrease the incidence of pineapple heart rot by altering the soil bacterial community structure and stimulating beneficial soil microorganisms, which is important for

收稿日期 Received: 2021-05-17 接受日期 Accepted: 2021-08-20

国家自然科学基金项目(31760605)和海南省自然科学基金项目(320RC475)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760605) and the Natural Science Foundation of Hainan, China (320RC475)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: yanbo315@126.com; angiaoo@126.com)

reconstructing the ecological balance in continuous pineapple orchards.

Keywords pineapple heart rot; bio-fertilizer; bacteria; community structure

菠萝 (*Ananas comosus*) 为凤梨科多年生草本植物, 是世界上仅次于香蕉和柑橘的第三大热带水果作物^[1-3]. 近年来, 由于连作模式以及施肥栽培管理模式不当, 菠萝病害发生严重, 其中最为严重的为菠萝心腐病 (pineapple heart rot disease, PHRD). 该病害是由疫霉属 (*Phytophthora*) 引起的危害最大的土传病害之一, 在我国广泛分布于海南、广东等菠萝产区, 严重制约着菠萝产业的可持续发展, 对农业生产造成了严重的经济损失^[4-6]. 菠萝心腐病的危害引发了国内外学者的关注, 施用化肥、喷洒农药、土壤改良等是目前应用较多的防控措施^[7-9], 但其防控效果都不理想. 因此, 寻找安全高效的防治措施是当前亟须解决的问题.

近年来, 随着人们环保意识的加强, 生物防控技术引起了人们的重视, 其主要是通过施用生防菌、有机肥或生物有机肥等措施调节和改善土壤微生物多样性及活性, 从而抑制土壤土传病害的发展^[10-12]. 国内外关于生物有机肥防控香蕉、茄子、黄瓜、西瓜、烟草等作物土传病害已有较多报道, 并取得了很好的防控效果^[13-17]. 然而国内外学者对菠萝心腐病的防控研究主要集中在选育抗性品种和生防菌资源的收集阶段, 应用于温室或田间试验的防控效果尚未见报道^[18-21]. 因此, 我们以菠萝 (MD-2, 金菠萝) 为材料, 利用前期筛选出的生防菌 (枯草芽孢杆菌HL2和链霉菌HL3)、载体 (椰糠, 菜籽饼, 泥炭土) 和普通有机肥进行二次发酵技术制成生物有机肥, 通过温室盆栽试验, 利用常规方法结合高通量测序技术, 研究不同生物有机肥对连作菠萝心腐病发生及土壤细菌群落结构的影响, 旨在探明土壤细菌群落结构调控与菠萝心腐病防控间的关系, 为菠萝心腐病的防控提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菠萝 供试菠萝品种为‘金菠萝 (MD-2)’, 由海南万钟实业有限公司提供.

供试土壤 采自海南省万钟实业有限公司菠萝连作3年地块, 土壤类型为海相沉积物发育的燥红土. 土壤基本理化性质: pH 5.31, 有机质0.73%, 土壤碱解氮73.01 mg/kg, 速效磷89.06 mg/kg, 速效钾21.55 mg/kg, 心腐病原菌数量为 5×10^3 CFU/g.

1.1.2 供试肥料 供试普通有机肥料为羊粪有机肥, 由内

蒙古锡林郭勒羊养殖专业合作社提供, 有机质 $\geq 45\%$, 总养分 ($N + P_2O_5 + K_2O$) $\geq 6\%$. 供试生物有机肥由本实验室自行堆制, 将对菠萝心腐病原菌 (烟草疫霉菌) 有显著拮抗作用的枯草芽孢杆菌HL2和链霉菌HL3 (由海南省乐东黎族自治县香蕉枯萎病防控研究所保存提供) 分别接种到腐熟普通有机肥与不同的载体 (椰糠, 菜籽饼, 泥炭土) 经二次固体堆制而成. 其中普通有机肥和椰糠、菜籽饼、泥炭土分别按照干重4:1的比例混合, 将液体菌剂按50 L/t的量接种到堆肥进行固体发酵. 其生物化学指标如下: 枯草芽孢杆菌HL2和链霉菌HL3有效活菌数 $\geq 10^9$ CFU/g, 有机质 $\geq 46.5\%$, 含N 2.63%、 P_2O_5 2.61%、 K_2O 1.91%、水分28.9%. 供试化肥 (三元复合肥) 养分: $N:P_2O_5:K_2O = 16:16:16$.

1.2 试验设计

温室盆栽试验在海南乐东黎族自治县香蕉枯萎病及热带经济作物土传病防控研究所温室内进行. 盆钵规格为 35 cm $\times$ 25 cm, 每盆装土5.0 kg. 试验设 8 个处理 (表1), 每个处理3个重复, 每个重复10盆. 每盆施入1%的有机肥或生物有机肥, 用三元复合肥补足差异养分. 装盆5 d后选择长势一致的菠萝苗移至盆钵中, 每盆定植1株, 所有处理随机区组排列.

1.3 项目测定与方法

1.3.1 菠萝心腐病发病率的测定 菠萝苗定植后, 观察盆栽各处理长势. 参考Shen等人的标准^[18], 统计菠萝发病植株数. 至发病率稳定后, 根据发病植株的数量和定植菠萝总株数计算发病率: 发病率=发病植株数/定植菠萝总株数 $\times 100\%$.

1.3.2 土壤样品的采集 菠萝生长140 d后, 采集菠萝植株, 各处理随机选取5盆收集菠萝根际土混合作为一个样品 (100 g), 去除植物根系和石块并过 2 mm筛, 保存于-80 $^{\circ}C$, 以备分析土壤微生物多样性.

1.3.3 土壤总DNA提取和PCR扩增 土壤总DNA提取, 使用Power Soil DNA分离试剂盒提取500 mg 土壤样本总DNA (MOBIO公司, 美国). 对细菌16S rRNA基因V4基因高变区进行PCR扩增, 引物序列为 (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 (5'-GGACTAC NVGGGTWTCTAAT-3'). 真菌ITS区基因扩增采用引物序列为 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 (5'-GCTGCG TTCTTCATCGATGC-3'). 初步样品质量筛选和成对文库制备由厦门承葛生物科技有限公司完成, 在Illumina MiSeq平台上测序.

表1 不同施肥处理
Table 1 Treatments using different fertilizing methods

试验处理 Test treatment	试验材料 Test materials
HF 三元复合肥 (16-16-16)	Chemical fertilizer (16-16-16)
YJ 普通有机肥	Organic fertilizer
KC 普通有机肥80%+菜籽饼20%+枯草芽孢杆菌 (HL2)	80% Organic fertilizer + 20% rapeseed cake + <i>Bacillus subtilis</i> HL2
KN 普通有机肥80%+泥炭土20%+枯草芽孢杆菌 (HL2)	80% Organic fertilizer + 20% peat soil + <i>Bacillus subtilis</i> HL2
KY 普通有机肥80%+椰糠20%+枯草芽孢杆菌 (HL2)	80% Organic fertilizer + 20% coconut bran + <i>Bacillus subtilis</i> HL2
LC 普通有机肥80%+菜籽饼20%+链霉菌 (HL3)	80% Organic fertilizer + 20% rapeseed cake + <i>Bacillus subtilis</i> HL3
LN 普通有机肥80%+泥炭土20%+链霉菌 (HL3)	80% Organic fertilizer + 20% peat soil + <i>Bacillus subtilis</i> HL3
LY 普通有机肥80%+椰糠20%+链霉菌 (HL3)	80% Organic fertilizer + 20% coconut bran + <i>Bacillus subtilis</i> HL3

1.3.4 细菌基因组高通量测序 利用QIIME软件对原始数据进行样品去接头和引物序列,使用USEARCH脚本读取原始测序数据,拼接正反向序列,并进行质量过滤,去除低质量碱基序列,包括去冗余和聚类,去除嵌合体和非细菌序列,生成代表性序列和OTU (operational taxonomic units) 表格(OTU的序列相似性为97%,最小覆盖范围为5个序列)。使用RDP classifier 16S rRNA数据库进行物种注释。

1.4 数据处理与分析

使用MOTHUR软件计算 α -多样性和 β -多样性,在R软件中完成细菌群落主坐标分析(PCoA),PERMANOVA和Spearman相关性分析,绘制OTU水平聚类分析热图。

2 结果与分析

2.1 生物有机肥对菠萝心腐病发病率的影响

由图1可见,不同处理菠萝心腐病发病率差异显著。其中,对照HF处理发病率最高为20%,其次是YJ处理,为13.3%,HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)发病率为0-3.3%,HL3生物有机肥处理(LC、LN、LY)发病率为3.3%-6.6%。KC处理相比对照HF处理和YJ处理,分别降低了20%和13.3%。以上结果表明接种生防菌的生物有机肥处理能够显著减少菠萝心腐病的发生,HL2生物有机肥处理较HL3生物有机肥处理防

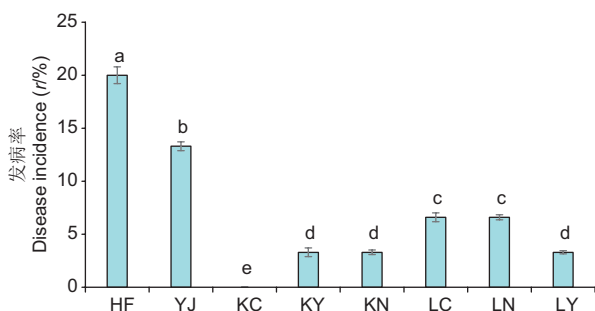


图1 不同施肥处理下的菠萝发病率。HF: 三元复合肥; YJ: 有机肥; KC、KN、KY: HL2生物有机肥; LC、LN、LY: HL3生物有机肥。不同字母代表不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 Disease incidence for pineapple using different cultivation methods. HF: Chemical fertilizer (16-16-16); YJ: Organic fertilizer; KC, KN, KY: Bio-organic fertilizers with *Bacillus* HL2; LC, LN, LY: Bio-organic fertilizers with *Streptomyces* HL3. Different letters represent significant differences among different treatments ($P < 0.05$).

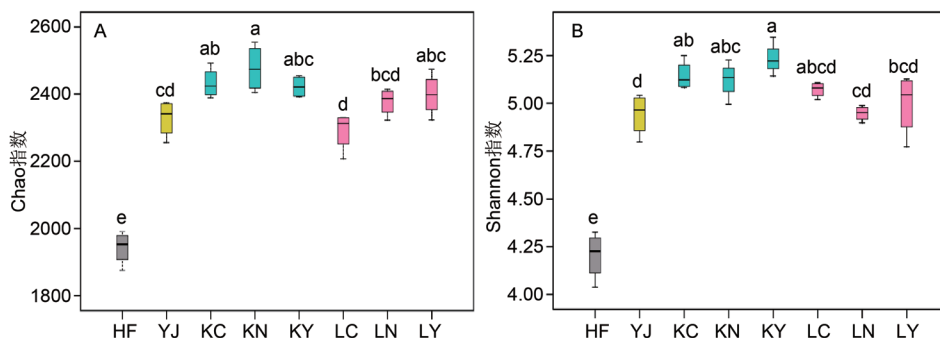


图2 不同处理下的土壤细菌多样性指数。HF: 三元复合肥; YJ: 有机肥; KC、KN、KY: HL2生物有机肥; LC、LN、LY: HL3生物有机肥。不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Bacterial alpha diversity in different samples. HF: Chemical fertilizer (16-16-16); YJ: Organic fertilizer; KC, KN, KY: Bio-organic fertilizers with *Bacillus* HL2; LC, LN, LY: Bio-organic fertilizers with *Streptomyces* HL3. Different letters indicate significant differences at the 0.05 level based on the analysis of variance.

控效果更好。

2.2 土壤样品测序有效性

对测序数据进行过滤之后,从32个样本序列中得到2 051 530条16S rRNA序列。基于97%的相似度,所有样本序列中鉴定到的细菌OTU数目为2 670。各组文库的覆盖率均达90%以上,表明所建的测序文库均可真实反映样本中细菌群落的多样性。

2.3 生物有机肥对土壤细菌 α 多样性的影响

微生物种群群落的丰富度用Chao指数表示,Shannon指数则解释存在物种的多样性,两者是衡量群落多样性的重要指标,指数越大,表明微生物群落的丰富度和多样性越高。由图2可以看出,与对照HF处理相比,所有生物有机肥处理(KC、KN、KY、LC、LN、LY)细菌丰富度和多样性显著增加。与YJ处理相比,KC处理和KN处理细菌丰度和多样性差异均显著,而LC处理和LY处理无明显差异。HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)和HL3生物有机肥处理(LC、LN、LY)相比,前者土壤细菌丰富度和多样性较后者更高,但差异不显著。

2.4 生物有机肥对土壤细菌 β 多样性的影响

为进一步了解不同生物有机肥处理对土壤细菌群落结构的影响,基于Bray-curits距离矩阵,对样品OTU进行主坐标分析(PCoA)和置换多元方差分析(PERMANOVA)。由图3可以看出,主坐标分析(PCoA)中,第1和第2坐标轴分别解释了总体变化的46.75%和14.97%。不同处理细菌群落结构差异显著,其中,生物有机肥处理和三元复合肥处理(HF)沿着第1坐标轴(PCoA 1)显著分离,HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)和HL3生物有机肥(LC、LN、LY)沿着第2坐标轴(PCoA 2)区分开来。值得注意的是,KN处理和LY处理距离较近,而与LC处理距离较远。置换多元方差分析(PERMANOVA, $P = 0.001$)进一步表明不同施肥处理之间土壤细菌群落结构有显著差异。

2.5 生物有机肥对细菌群落组成的影响

所有样本细菌16S rRNA序列涵盖了8个门(96%)。基于相对丰度(relative abundance)大于0.1%,所有样本中共有细菌优势门依次是变形菌门(Proteobacteria, 63.63%),拟杆菌门(Bacteroidetes, 11.21%),酸杆菌门(Acidobacteria, 6.82%),放线菌门(Actinobacteria, 4.25%),疣微菌门(Verrucomicrobia, 3.44%),蓝藻细菌门(Chloroplast, 2.58%),硬壁菌门(Firmicutes, 2.52%),芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 1.56%)。不同处理的细菌门

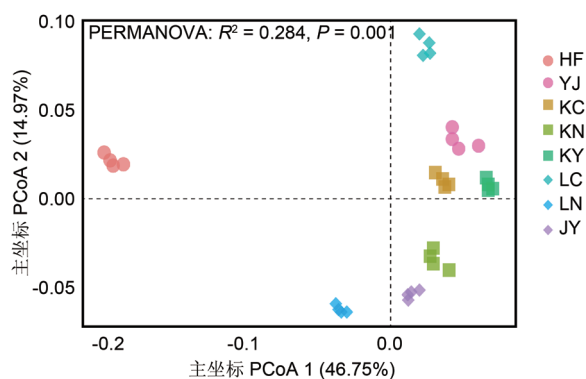


图3 基于Bray-Curtis距离的细菌群落主坐标分析(PCoA)和置换多元方差分析(PERMANOVA)。HF: 三元复合肥; YJ: 有机肥; KC、KN、KY: HL2生物有机肥; LC、LN、LY: HL3生物有机肥。

Fig. 3 Principal coordinate analysis (PCoA) of total soil microbial community and permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) based on the Bray-Curtis distance. HF: Chemical fertilizer (16-16-16); YJ: Organic fertilizer; KC, KN, KY: Bio-organic fertilizers with *Bacillus* HL2; LC, LN, LY: Bio-organic fertilizers with *Streptomyces* HL3.

丰度不同,与对照HF处理相比,所有生物有机肥处理(KC、KN、KY、LC、LN、LY)中酸杆菌门、放线菌门、蓝藻细菌门微生物减少,但放线菌门在LN处理和LY处理中仍有较高丰度。与HF处理相比,生物有机肥处理(KC、KN、KY、LY)拟杆菌门、疣微菌门丰度增加。硬壁菌门细菌在LC和LN处理丰度减少,在HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)有较高丰度。另外,芽单胞菌门细菌丰度在KC处理中最高。

如图4B所示,所有处理中丰度最高的10个细菌属为

罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*, 13.6%), *Trinickia* (5.22%), 偶氮水单孢菌属(*Azohydromonas*, 4.83%), 卡西列罗属(*Caballeronia*, 4.28%), 戴氏菌属(*Dyella*, 3.15%), 鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*, 3.02%), *Streptophyta* (2.43%), *GP3* (2.10%), *Hydrotalea* (1.98%) 和根瘤菌属(*Rhizobium*, 1.77%)。对相对丰度最高的15个细菌属分析(图4D)显示,相比于对照HF处理和YJ处理,HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)和HL3生物有机肥处理(LC、LN、LY)中,戴氏菌属、副伯克氏菌属(*Paraburkholderia*)、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)和嗜酸放线线束菌属(*Actinospica*)的相对丰度显著降低,而鞘氨醇单胞菌属和罗尔斯顿菌属相对丰度增加。副伯克氏菌属在KN处理中相对丰度更高,鼎湖山杆状菌属(*Edaphobacter*)在LN处理中相对丰度更高。

对细菌群落丰度前30的OTU作聚类分析(图5)发现,戴氏菌属、副伯克氏菌属、罗河杆菌属及*GP3*细菌属在HF处理富集, *Hydrotalea*属在KC、LY处理相对丰度更高,偶氮水单孢菌属在YJ、KY处理相对丰度更高。HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)相对富集了*GP4*、*GP6*细菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和鞘氨醇单胞菌属细菌。链霉菌属(*Streptomyces*)细菌LN处理和LY处理相对丰度更高,反之,LC处理链霉菌属细菌相对丰度较低。

2.6 土壤细菌群落中潜在的关键微生物

如图6所示,从不同施肥处理富集的细菌属水平上看,与心腐病发病率呈正相关的细菌菌群按相关系数大小依次是副伯克氏菌属、罗河杆菌属、鼎湖山杆状菌属、戴氏菌属、嗜酸放线线束菌属($P < 0.001$);与心腐病发病率呈负相关的细菌菌群按相关系数大小依次是*Hydrotalea*、*GP4*、*GP6*、罗尔

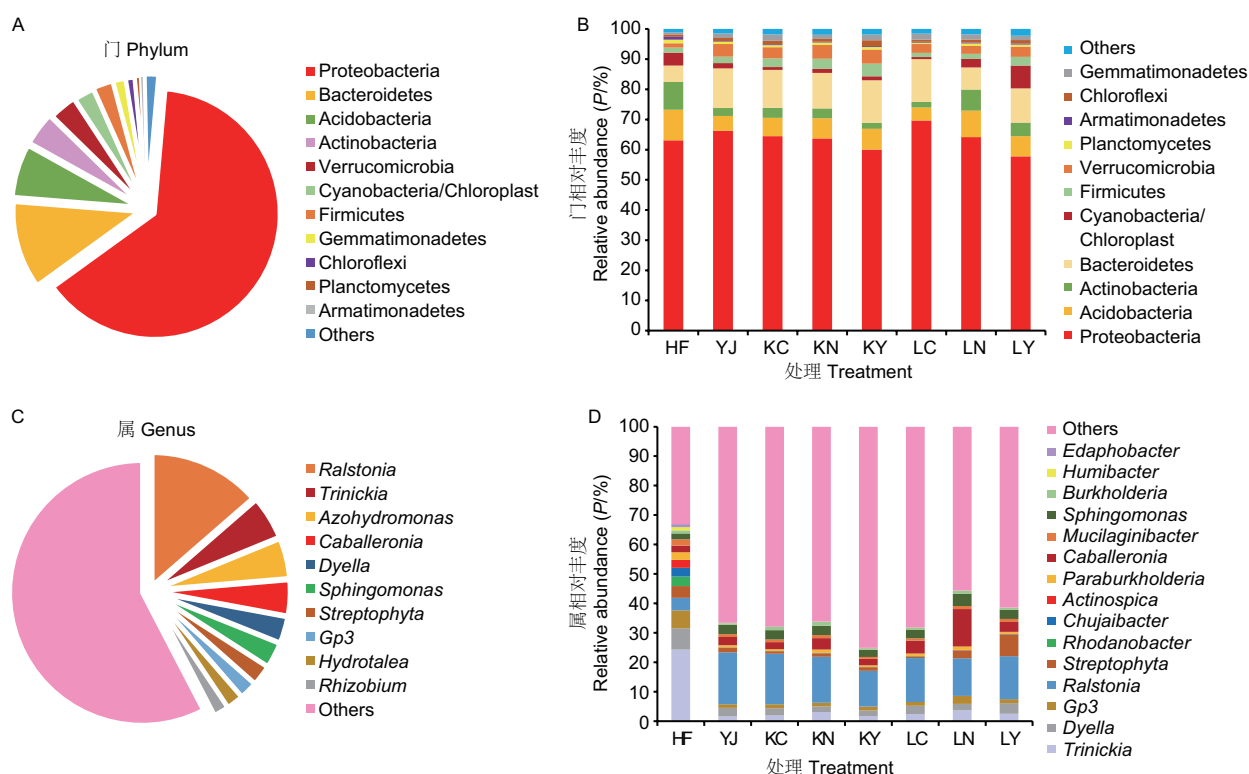


图4 土壤细菌门水平分布(A)和各处理门水平相对丰度(B)以及属水平分布(C)和各处理属水平相对丰度(D)。HF: 三元复合肥; YJ: 有机肥; KC、KN、KY: HL2生物有机肥; LC、LN、LY: HL3生物有机肥。

Fig. 4 Distribution of bacterial phyla (A) and their relative abundance in different treatments (B), and genus (C) and their relative abundance (D). HF: Chemical fertilizer (16-16-16); YJ: Organic fertilizer; KC, KN, KY: Bio-organic fertilizers with *Bacillus* HL2; LC, LN, LY: Bio-organic fertilizers with *Streptomyces* HL3.

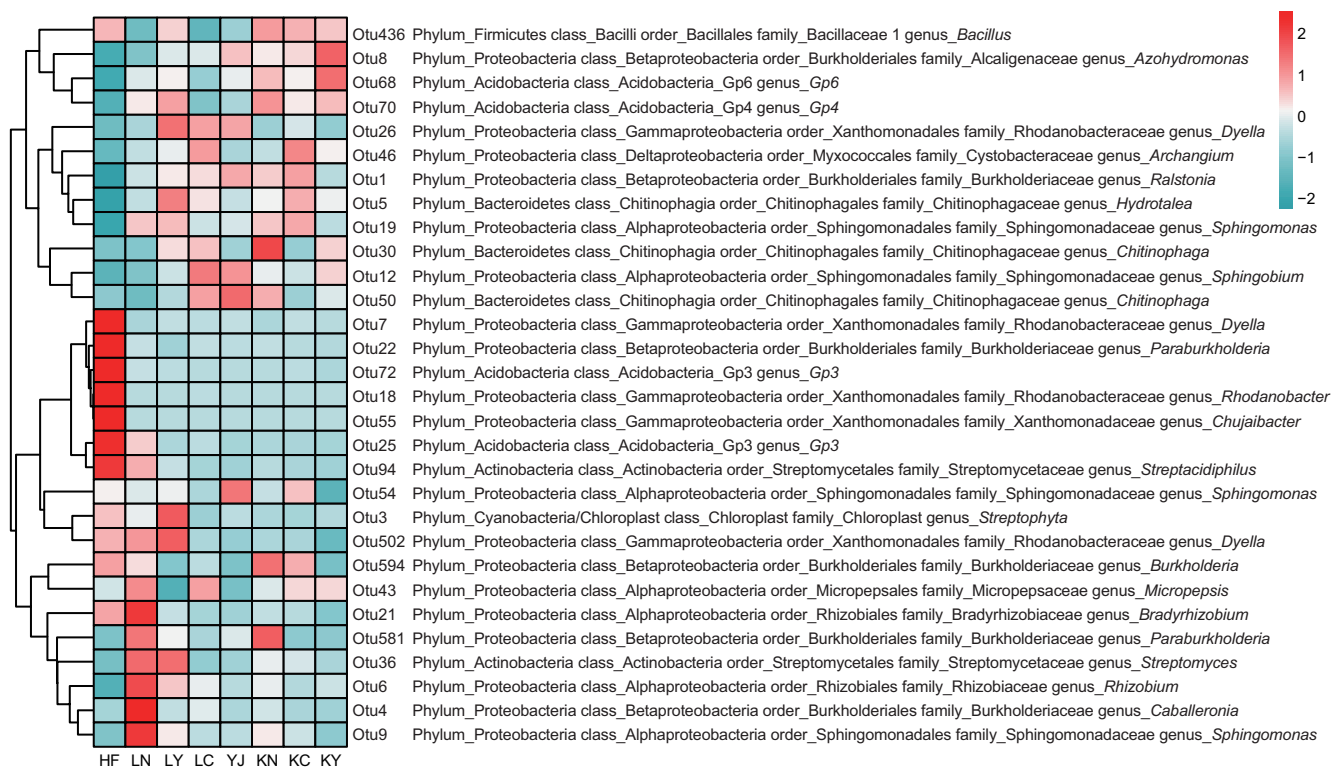


图5 细菌群落丰度前30的OTU聚类分析。HF: 三元复合肥; YJ: 有机肥; KC、KN、KY: HL2生物有机肥; LC、LN、LY: HL3生物有机肥。

Fig. 5 OTU cluster analysis of the first 30 bacteria abundance. HF: Chemical fertilizer (16-16-16); YJ: Organic fertilizer; KC, KN, KY: Bio-organic fertilizers with *Bacillus* HL2; LC, LN, LY: Bio-organic fertilizers with *Streptomyces* HL3.

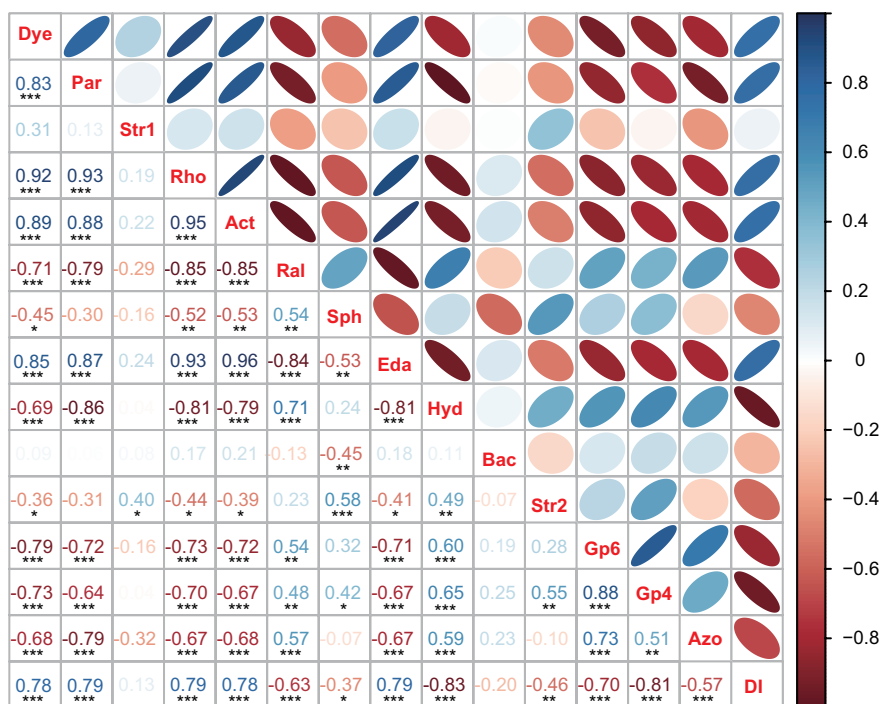


图6 土壤细菌特征类群与心腐病发病率Spearman相关性(不同颜色代表Spearman相关性)。Dye: 戴氏菌属; Par: 副伯克氏菌属; Str1: *Streptophyta*; Rho: 罗河杆菌属; Act: 嗜酸放线线束菌属; Ral: 罗尔斯顿菌属; Sph: 鞘氨醇单胞菌属; Eda: 鼎湖山杆状菌属; Hyd: *Hydrotalea*; Bac: 芽孢杆菌属; Str2: 链霉菌属; Azo: 偶氮水单胞菌属; DI: 发病率。* $P < 0.05$, 显著差异; ** $P < 0.01$, 极显著差异; *** $P < 0.001$, 极显著差异。

Fig. 6 Spearman's correlation coefficients between taxon (significant genera among different treatments) and PHRD incidence (colors representing Spearman's correlations). Dye: *Dyella*; Par: *Paraburkholderia*; Str1: *Streptophyta*; Rho: *Rhodanobacter*; Act: *Actinospica*; Ral: *Ralstonia*; Sph: *Sphingomonas*; Eda: *Edaphobacter*; Hyd: *Hydrotalea*; Bac: *Bacillus*; Str2: *Streptomyces*; Azo: *Azohydromonas*; DI: Disease incidence. * Significant difference at the 0.05 level; ** Significant difference at the 0.01 level; *** Significant difference at the 0.001 level.

斯顿菌属、偶氮水单胞菌属、链霉菌属、芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属。其中, 罗尔斯顿菌属、*Hydrotalea*、GP6、GP4和偶

氮水单胞菌属的相对丰度分别与副伯克氏菌属、罗河杆菌属、鼎湖山杆状菌属、戴氏菌、嗜酸放线线束菌属的相对丰度在

0.001水平显著负相关。以上结果或可提示防控菠萝心腐病的关键所在。

3 讨论与结论

本研究通过对不同施肥处理的菠萝心腐病发病率进行统计和对连作菠萝土壤中细菌进行高通量测序分析,结果表明施用生物有机肥相比三元复合肥能显著降低菠萝心腐病发病率。其中,对照HF处理发病率最高,为20%,其次是YJ处理,为13.3%,HL2生物有机肥处理(KC、KN、KY)发病率为0-3.3%,HL3生物有机肥处理(LC、LN、LY)发病率为3.3%-6.6%。可见,HL2生物有机肥处理较HL3生物有机肥处理、HF处理、YJ处理防控效果更好。这一结果可能是由于普通有机肥料与芽孢杆菌生防菌株相结合经过二次发酵后,芽孢杆菌可以更容易在土壤中定殖,并大量生长繁殖,改变土壤微生物的种群结构,从而可降低土壤病原菌数量^[22-23]。马田田等人研究得出,施用生物有机肥可以减少山药根茎腐病的发生^[24];Ye和袁先福等人研究表明,施用生物有机肥提高土壤肥力,减少连作模式下番茄和香蕉病害的发生^[25-26]。上述前人研究结果与本研究结果相符。因此,施用生物有机肥可作为防控菠萝心腐病的有效手段,特别是KC处理防控效果更明显。

本研究细菌的 α 多样性分析结果显示,与对照HF处理相比,所有生物有机肥处理(KC、KN、KY、LC、LN、LY)细菌丰富度和多样性显著增加。主坐标分析(PCoA)结果显示,不同处理间的土壤细菌群落结构明显不同,三元复合肥处理(HF)与HL2生物有机肥处理、HL3生物有机肥处理显著分开。以上结果可能是由于生物有机肥含有的大量生防菌发挥了重要的作用,施入土壤后,该微生物种群获得了空间,占据了土壤生态位,导致细菌群落组成和结构明显区别于三元复合肥处理和普通有机肥处理。已有研究表明,菜籽饼和椰糠作为有机肥材料,均含有丰富的有机质,可以起到增加土壤养分和改善土壤结构的作用,促进土壤微生物活动^[27-28],这或可解释主坐标分析(PCoA)中KC处理和KY处理相似的细菌群落结构。而LC处理与LN处理、LY处理的距离较远,根据周登博的研究^[29],推测采用菜籽饼作为生物有机肥材料的碳氮比不适于功能微生物链霉菌(HL3)的定殖。

土壤细菌群落组成结果表明,变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、放线菌门、疣微菌门、蓝藻细菌门、硬壁菌门和芽单胞菌门是相对丰度最高的8个门。施入生物有机肥,菠萝根际土壤拟杆菌门、疣微菌门、硬壁菌门和芽单胞菌门细菌相对丰度显著增加,而酸杆菌门和放线菌门丰度降低。其中,菠萝根际土壤中疣微菌门丰度增加,可能是由于施入生物有机肥后菠萝根系的分泌物直接或间接影响了微生物群落分布,与菠

萝根系建立起有益的植物-微生物相互作用,从而降低菠萝心腐病发生,这一结果在玉米根系的研究也有相关报道^[30];硬壁菌门是土壤中相对丰度较高的一类微生物,在香草、香蕉的枯萎病和甜菜的立枯病防控中具有重要的作用^[31-33];芽单胞菌门在KC处理显著富集,可能与防控菠萝心腐病发生密切相关,这一结果在之前对香蕉枯萎病的研究中也有相似表述^[34]。对不同处理微生物群落优势细菌属分析发现,施用生物有机肥后,戴氏菌属、副伯克氏菌属、罗河杆菌属、嗜酸放线菌束菌和鼎湖山杆状菌属相对丰度显著降低。反之,*Hydrotalea*属、GP4和GP6细菌属、偶氮水单孢菌属、芽孢杆菌属和链霉菌属细菌种群在生物有机肥处理中明显富集。另外,聚类分析进一步表明,不同施肥处理的细菌群落组成在OTU水平上存在显著差异,因此推测生物有机肥施入土壤后,细菌群落结构发生改变,对菠萝心腐病发生条件产生一定影响。

对土壤中潜在的关键微生物的分析表明,*Hydrotalea*、GP4、GP6、罗尔斯顿菌属、偶氮水单孢菌属和链霉菌属与心腐病发病率呈显著负相关关系。其中,Victor等人研究表明,*Hydrotalea*属对受真菌感染而导致的甜菜根腐病具有抑病作用^[35];目前对罗尔斯顿菌属的研究主要集中在由茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的作物青枯病方面,对其防治菠萝心腐病的机理尚不清楚^[36-37];酸杆菌门细菌属(Gp4、Gp6)和放线菌门链霉菌属增加可能与生防菌的加入有关,Mendes等人研究表明,酸杆菌门细菌属(Gp4、Gp6)在防控香蕉枯萎病方面发挥着重要作用^[33];链霉菌属在感病土壤中有很强的富集作用,并通过生产抗菌、抗真菌和杀线虫化合物来预防一些土传疾病,在土壤微生物受到剧烈干扰后有利于土壤养分循环和植物生长^[38-39];偶氮水单孢菌属丰度与心腐病的发生显著负相关,可成为防控菠萝心腐病的重要细菌菌群,在其他作物土传病研究中也有相关报道^[40];值得注意的是,芽孢杆菌属在生物有机肥处理中显著富集,但与心腐病发生未达到显著负相关水平,推测其可能为其他有益微生物提供了有效的生态位。以上结果表明,生物有机肥处理能促进有益微生物作用的发挥,降低菠萝心腐病的发生。

综上所述,在菠萝连作土壤中施入生物有机肥,可有效降低菠萝心腐病发生率,改变土壤微生物群落组成结构,使土壤土著有益细菌菌群丰度显著增加,重塑土壤细菌群落,恢复土壤微生态平衡,使其向着健康有利的方向发展,从而对连作菠萝心腐病的发生起到直接或间接的防控作用。本研究发现*Hydrotalea*属、酸杆菌门细菌属(GP4、GP6)、罗尔斯顿菌属、偶氮水单孢菌属和链霉菌属等细菌可能在抑病过程中发挥着重要作用,但是其发挥作用的具体机制尚不清楚,需要进一步研究。

参考文献 [References]

- 1 Bartholomew DP, Paull RE, Rohrbach KG. The Pineapple: Botany, Production and Uses [M]. Wallingford: CABI Publishing, 2003: 1-301
- 2 Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits [M]. UK: Elsevier Ltd, 2011: 104-212
- 3 Hassan RE, Domokos-Szabolcsy E, Abdalla NA, Taha HS, Fari M. Postharvest Management of Fruits and Vegetables Storage [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2015: 65-152
- 4 Ratti MF, Ascunce MS, Landivar JJ, Goss EM. Pineapple heart rot isolates from ecuador reveal a new genotype of *Phytophthora nicotianae* [J]. *Plant Pathol*, 2018, **67** (8): 1803-1813
- 5 罗建军, 刘琼光, 何衍彪, 李志斌, 魏楚丹. 广东菠萝心腐病原鉴定[J]. 广东农业科学, 2012, **39** (13): 90-92 [Luo JJ, Liu QG, He YB, Li ZB, Wei CD. Identification of the pathogen causing pineapple

- heart-rot disease [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2012, **39** (13): 90-92]
- 6 Shen HF, Lin BR, Zhan JX, Pu XM. First report of pineapple heart rot disease caused by *phytophthora nicotianae* in Hainan province, China [J]. *Plant Dis*, 2013, **560** (3): 974
- 7 Sidik S, Sapak Z. Evaluation of selected chemical pesticides for controlling bacterial heart rot disease in pineapples variety MD2 [J]. *Earth Environ Sci*, 2021, **757**: 012072
- 8 杨祁云, 沈会芳, 刘平平, 孙大元, 蒲小明, 张景欣, 林壁润. 我国菠萝使用农药登记现状及对策[J]. 中国南方果树, 2021, **50** (3): 172-179 [Yang QY, Sheng HF, Liu PP, Sun DY, Pu XM, Zhang JX, Lin BY. Current situation and countermeasures of Pineapple pesticide registration in China [J]. *S Chin Fruits*, 2021, **50** (3): 172-179]
- 9 谷会, 贾志伟, 侯晓婉, 张鲁斌. 氯化钙处理对菠萝黑腐病的防控效果及机制分析[J]. 热带作物学报, 2019, **40** (12): 2481-2488 [Gu H, Gia ZW, Hou XW, Zhang LB. Effects and mechanism of calcium chloride treatment on reducing pineapple black rot [J]. *Chin J Trop Crops*, 2019, **40** (12): 2481-2488]
- 10 刘珊珊, 胡夏茹, 王云舟, 李春雨, 陶成圆, 李荣, 沈其荣. 石灰碳铵熏蒸联合生物有机肥施用对香蕉土壤真菌群落的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2021, **27** (5): 1326-1333 [Liu SS, Hu XR, Wang YZ, Li CY, Tao CY, Shen QR. Effects of lime and ammonium carbonate fumigation coupled with bio-organic fertilizer application on banana fungal community [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2021, **27** (5): 1326-1333]
- 11 杜婵娟, 杨迪, 潘连富, 叶云峰, 张晋, 付岗. 香蕉枯萎病生防菌肥的优化及其防病促生效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2020, **36** (3): 396-404 [Du CJ, Yang D, Pan LF, Ye YF, Zhang J, Fu G. Bio-fertilizer optimization and its control effect on banana fusarium wilt [J]. *Chin J Biol Control*, 2020, **36** (3): 396-404]
- 12 王文丽, 李娟, 赵旭. 生物有机肥对连作当归根际土壤细菌群落结构和根腐病的影响[J]. 应用生态学报, 2019, **30** (8): 2813-2821 [Wang WL, Li J, Zhao X. Effects of biological organic fertilizer on rhizosphere soil bacteria community and root rot diseases of continuous cropping *Angelica sinensis* [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2019, **30** (8): 2813-2821]
- 13 刘珊珊, 夏萌, 胡夏茹, 王云舟, 李春雨, 陶成圆, 沈宗专, 张楠, 李荣, 沈其荣. 石灰碳铵熏蒸联合生物有机肥对香蕉枯萎病和细菌群落的影响[J]. 应用生态学报, 2020, **31** (12): 4189-4196 [Liu SS, Xia M, Hu XR, Wang YZ, Li CY, Tao CY, Shen ZZ, Zhang N, Li R, Shen QR. Effects of lime and ammonium carbonate fumigation coupled with bio-organic fertilizer application on banana fusarium wilt and bacterial community [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2020, **31** (12): 4189-4196]
- 14 丁传雨, 乔焕英, 沈其荣, 冉炜, 陈巍. 生物有机肥对茄子青枯病的防治及其机理探讨[J]. 中国农业科学, 2012, **45** (2): 239-245 [Ding CY, Qiao HY, Shen QR, Ran W, Chen W. Control effect and action mechanism research of bio-organic fertilizer on eggplant bacterial wilt [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, **45** (2): 239-245]
- 15 曲成闯, 陈效民, 张志龙, 王诺, 闫婧妍, 张俊, 黄春燕. 施用生物有机肥对黄瓜连作土壤有机碳库和酶活性的持续影响 [J]. 应用生态学报, 2019, **30** (9): 3147-3154 [Qu CC, Chen XM, Zhang ZL, Wang N, Lü JY, Zhang J, Huang CY. Long-term effects of bio-organic fertilizer application on soil organic carbon pool and enzyme activity of cucumber continuous cropping [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2019, **30** (9): 3147-3154]
- 16 Xue C, Shen Z, Hao Y, Yu S, Li Y, Huang W, Chong Y, Ran W, Li R, Shen QR. Fumigation coupled with bio-organic fertilizer for the suppression of watermelon Fusarium wilt disease re-shapes the soil microbiome [J]. *Appl Soil Ecol*, 2019, **140**: 49-56
- 17 娄俊鑫, 刘泓, 沈少君, 冯芷菡, 何冬冬, 吴树松, 陈炜, 江桂花, 常鹏飞, 彭国华. 不同农艺措施对烟田土壤真菌群落结构和功能的影响[J]. 中国烟草科学, 2020, **41** (1): 38-43+55 [Lou JX, Liu H, Shen SJ, Feng ZH, He DD, Wu SS, Chen W, Jiang GH, Chang PF, Peng GH. Effects of different agronomic measures on the structure and function of soil fungi community in tobacco fields [J]. *Chin Tobacco Sci*, 2020, **41** (1): 38-43+55]
- 18 Oculi J, Bua B, Ocwa A. Reactions of pineapple cultivars to pineapple heart rot disease in central Uganda [J]. *Crop Prot*, 2020, **135**: 105213
- 19 Kogeethavani R, Uyub AM, Latiffah Z. Molecular characterization and pathogenicity of *Erwinia* spp. associated with pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] and papaya [*Carica papaya* L.] [J]. *J Plant Prot Res*, 2015, **55** (4): 396-404
- 20 Brandi F, Heck DW, Ferreira TC, Bettiol W. Commercial formulations of *Bacillus* spp. for sugarcane pineapple disease control and growth promotion [J]. *Pesq Agrop Bras*, 2018, **53** (12): 1311-1319
- 21 吕诗锦, 黄华莲, 阮云泽, 赵艳, 王蓓蓓, 秦海利. 菠萝心腐病拮抗菌的分离、筛选及鉴定[J]. 中国南方果树, 2017, **46** (3): 83-87 [Lü SJ, Huang HL, Ruan YZ, Zhao Y, Wang BB, Qin HL. Isolation, screening and identification of antagonistic bacteria against pineapple heart rot [J]. *Sou Chin Fruits*, 2017, **46** (3): 83-87]
- 22 柳芳, 田伟, 李凌之, 杨兴明, 沈标, 沈其荣. 生防枯草芽孢杆菌 SQR9 固体发酵生产生物有机肥的工艺优化[J]. 应用与环境生物学报, 2013, **19** (1): 90-95 [Liu F, Tian W, Li LZ, Yang XM, Shen QR. Optimization of solid-state fermentation conditions for antagonistic *Bacillus subtilis* SQR9 producing bio-organic fertilizer [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19** (1): 90-95]
- 23 Lam VB, Meyer T, Arias AA, Ongena M, Oni FE, Höfte M. *Bacillus* cyclic lipopeptides iturin and fengycin control rice blast caused by *Pyricularia oryzae* in potting and acid sulfate soils by direct antagonism and induced systemic resistance [J]. *Microorganisms*, 2021, **9** (7): 1441-1441
- 24 马田田, 杨兴明, 沈其荣, 陈巍. 生物有机肥对防治山药根茎腐病和促进山药生长的研究[J]. 土壤, 2013, **45** (2): 1301-1305 [Ma TT, Yang XM, Shen QR, Chen W. Effects of bio-organic fertilizer on controlling root and stem rot and promoting growth of yam [J]. *Soils*, 2013, **45** (2): 1301-1305]
- 25 Ye L, Zhao X, Bao E, Li JS, Zou ZR, Cao K. Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality [J]. *Sci Rep*, 2020, **10** (1): 177
- 26 袁先福, 孙玉菡, 朱成之, 朱虹, 王帅, 沈宗专, 王蓓蓓, 李荣, 沈其荣, 阮云泽. 轮作联用生物有机肥促进香蕉生长[J]. 应用与环境生物学报, 2018, **24** (1): 60-67 [Yuan XF, Sun YH, Zhu CZ, Zhu H, Wang S, Shen ZZ, Wang BB, Li R, Shen QR, Ruan YZ. Rotation combined with bio-organic fertilizer application to promote banana growth [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (1): 60-67]
- 27 Xie S, Yang F, Feng H, Yu Z, Liu C, Wei C, Liang T. Organic fertilizer reduced carbon and nitrogen in runoff and buffered soil acidification in tea plantations: evidence in nutrient contents and isotope fractionations [J]. *Sci Total Environ*, 2021, **762**: 143059
- 28 Darmawan R, Hidayat F, Juliastuti SR, Hendrianie N, Gunawan S, Apamarta HW. Liquid organic fertilizer from waste of coconut porridge manufacturer and molasses using various microorganisms [J]. *IOP Conference Ser Mater Sci Eng*, 2019, **543** (1): 012099
- 29 周登博. 复合拮抗菌发酵液对香蕉枯萎病及土壤微生物区系的

- 影响[D]. 海口: 海南大学, 2013 [Zhou DB. Effect of compound antagonistic bacteria fermentation liquid on banana fusarium wilt and soil microflora [D]. Haikou: Hainan University, 2013]
- 30 Eneas AW, Jorge RE, Lori RS, Mayra T. Enrichment of verrucomicrobia, actinobacteria and burkholderiales drives selection of bacterial community from soil by maize roots in a traditional milpa agroecosystem [J]. *PLoS ONE*, 2018, **13** (12): e0208852
- 31 Shen ZZ, Ruan YZ, Chao X, Zhang J, Li R, Shen QR. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana Fusarium wilt disease suppression [J]. *Biol Fertil Soils*, 2015, **51** (5): 553-562
- 32 Wu X, Li R, Ren Y, Liu C, Zhao QY, Wu HS, Alexandre J, Shen QR. Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla Fusarium wilt disease [J]. *Soil Biol Biochem*, 2017, **107**: 198-207
- 33 Mendes R, Kruijt M, De Bruijn I, Dekkers E, van der VM, Schneider JH, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PA. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria [J]. *Sci*, 2011, **332** (6033):1097-1100.
- 34 Shen ZZ, Wang DS, Ruan YZ, Xue C, Zhang J, Li R, Shen QR. Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with banana Fusarium wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (5): e98420
- 35 Carrión VJ, Perez-Jaramillo J, Cordovez V, Tracanna V, Hollander M, Ruiz-Buck D, Mendes LW, Ijcken WFJ, Gomez-Expos R, Elsayed SS, Mohanraju P, Arifah A, Oost J, Paulson JN, Mendes R, Wezel GP, Medema MH, Raaijmakers JM. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome [J]. *Sci*, 2019, **366** (6465): 606-612
- 36 谭筱懿, 乔晋楠, 杨丹妮, 张义阳, 李文馨, 乔代蓉, 曹毅. 一株烈性青枯菌噬菌体 ϕ RSm2C的分离纯化及生物学特征 [J]. *应用与环境生物学报*, 2021, **27** (6): 1448-1455 [Tan XL, Qiao JN, Yang DN, Zhang DN, Zhang YY, Li WX, Qiao DR, Cao Y. Isolation, purification and biological characterization of a virulent *Ralstonia* phage ϕ RSm2C [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2021, **27** (6): 1448-1455]
- 37 Zhang ZG, Hu LW, Feng XH, Mou WJ, Wang LB, Zhang R. Detection and analysis of number of *Ralstonia solanacearum* in soil before winter tillage in Fuzhou tobacco-growing area, Jiangxi Province [J]. *Plant Dis Pests*, 2019, **10** (Z1): 1-3+10
- 38 Huang X, Liu L, Wen T, Zhu R, Zhang J, Cai Z. Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfestation [J]. *Microbiol Res*, 2015, **181**: 33-42
- 39 Yim BL, Winkelmann T, Ding GC, Smalla K. Different bacterial communities in heat and gamma irradiation treated replant disease soils revealed by 16S rRNA gene analysis—contribution to improved aboveground apple plant growth? [J]. *Front Microbiol*, 2015: 01224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01224>
- 40 Huang JF, Pang YW, Zhang FB, Huang QY, Zhang M, Tang SH, Fu HT, Li P. Suppression of fusarium wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6 [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2019, **154**: 585-596