植物营养与肥料学报 2015,21(2): 535 - 540
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer
doi: 10.11674/zwyf.2015.0230
http://www.plantnutrifert.org

根际促生菌 *Bacillus subtilis* Y - IVI 在香草兰上的应用效果研究

赵青云[1,3], 赵秋芳[1,2,3], 王 辉[1,3], 王 华[1,2], 庄辉发[1,2], 朱自慧[1,3]
(1 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533;
2 农业部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571737;
3 海南省热带香辛饮料遗传改良与品质调控重点实验室, 海南万宁 571533)

摘要:【目的】香草兰为多年生热带经济作物,随着种植年限的增加,植株长势弱,土壤有益微生物减少,土壤微生物区系失衡,严重制约了香草兰产业的可持续发展。枯草芽孢杆菌作为一种根际促生菌,被广泛应用于促进作物生长,改善土壤微生物环境。本文将枯草芽孢杆菌 Y - IVI 接种在有机肥上,生产了生物有机肥,并就该生物有机肥对香草兰生长的影响进行了研究。**【方法】**采用温室盆栽试验,调查施用根际促生菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Y - IVI 及其经固体发酵制得的微生物有机肥料(Y - IVI: 3×10^8 cfu/g)后,香草兰植株地上部及根系的生长状况,采用选择性培养基方法研究了 Y - IVI 在香草兰根际土壤中的定殖能力及对香草兰根茎腐病致病菌 - 尖孢镰刀菌数量的影响。**【结果】**施用 Y - IVI 及 BIO 4 个月后,香草兰根际土壤 Y - IVI 数量仍可达到 10^6 cfu/g 土,二者无显著差异,在处理 OF 和对照中未检测到菌株 Y - IVI。施用生物有机肥香草兰地上部干重和根系干重均显著高于对照,分别增加了 63.1% 和 59.4%,与不接种 Y - IVI 的有机肥处理(OF)相比,地上部干重显著提高了 43.2%,根系干重提高了 18%,差异不显著;施用 Y - IVI 菌液的处理植株地上部干重和根系干重均高于对照,但无显著性差异;处理 BIO 根系直径、根系表面积和总体积与对照相比分别增加了 41.9%、88.9% 和 80.4%,均显著高于对照,总根长与对照差异不显著;处理 BIO 根系表面积和总体积与有机肥处理 OF 相比分别显著增加了 41.9% 和 30.8%,根系直径与 OF 相比增加了 10.1%,差异不显著;处理 Y - IVI 根系直径与对照相比显著增加了 25.5%,但根系表面积和总体积与对照差异不显著;与对照相比,施用 BIO 及 Y - IVI 的处理根际土壤尖孢镰刀菌数量分别明显降低了 52.2% 和 41.8%,施用有机肥 OF 的处理降低了 10%,差异不显著。**【结论】**Y - IVI 可稳定定殖于香草兰根际土壤对其生长起有益作用,含促生菌 Y - IVI 的生物有机肥料比单独使用促生菌菌液可以更有效地减少根际土壤中尖孢镰刀菌数量,降低连作生物障碍。施用生物有机肥料比施用化肥和有机肥更有效地促进香草兰地上部及根系生长,因此,施用由根际促生菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Y - IVI 制得的生物有机肥是解决香草兰连作生物障碍和提高收益的有效手段。

关键词: 香草兰; 根际促生菌; 生物有机肥; 尖孢镰刀菌
中图分类号: S144; S573　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2015)02-0535-06

Beneficial effects of plant growth promoter rhizobacteria on vanilla (*Vanilla planifolia Ames.*) growth

ZHAO Qing-yun[1,3], ZHAO Qiu-fang[1,2,3], WANG Hui[1,3], WANG Hua[1,2], ZHUANG Hui-fa[1,2], ZHU Zi-hui[1,3]
(*1 Institute of Spice and Beverage, CATAS, Wanning, Hainan 571533, China; 2 Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture, Wanning, Hainan 571533, China; 3 Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning, Hainan 571533, China*)

Abstract:【Objectives】 *Vanilla* (*Vanilla planifolia Ames.*) is one of tropical perennial crop. The elongation of growth period often leads to weak plant, reduced population of soil beneficial microbes, increased harmful microbes and unbalance of the soil microbial community structure. We hope this can provide theoretical basis for solving the problems of weak vanilla plant growth and continuous cropping biological obstacles. The main objectives of this study were to study the effect of one of recognized root growth promoter, rhizobacteria *Bacillus subtilis* Y - IVI on ameliorate soil microbial community structure and the proper way of its application. **【Methods】** A solid fermented

收稿日期: 2014-02-09　　**接受日期:** 2014-09-23
基金项目: 国家自然科学青年基金项目(31201683);海南省自然科学基金项目(312032)资助。
作者简介: 赵青云(1983—),女,河南驻马店人,博士,助理研究员,主要从事土壤微生物与生物肥料研究。E-mail: qingyun_022@163.com

bioorganic fertilizer (BIO) was prepared by inoculating *Bacillus subtilis* Y-IVI into cattle manure and fermented 5 days inside greenhouse, the final active Y-IVI content is 3×10^8 cfu/g. A pot experiment in green house was carried out with chemical fertilizer as control, the effects of application of Y-IVI inocula, biofertilizer and cattle manure on the plant growth of both aboveground part and root were investigated Selective mediums method was used to study the colonization ability of Y-IVI in vanilla rhizosphere soil and their influence on the pathogen number of rhizome rot disease (*Fusarium* oxysporum). 【**Results**】The application of BIO could obviously increase vanilla plant above ground and root dry weight by 63.1% and 59.4% compared with control, and significantly increased the plant above ground dry weight by 43.2% compared with cattle manure. The single application of Y-IVI binocular does not have the significant effect on plant above ground and root dry weight. The application of BIO significantly increases the average root diameter, root surface area and total root volume by 41.9%, 88.9% and 80.4%, compared with control, but not the total root length; root surface area and total root volume of BIO treatment were obviously increased by 41.9% and 30.8% compared with manure, respectively, while average root diameter merely increased by 10.1%; average root diameter of Y-IVI treatment was significantly increased by 25.5% compared with control, but root surface area and total root volume had no significant difference. Application of BIO and Y-IVI significantly decreased population of *Fusarium oxysporum* in rhizosphere soil by 52.2% and 41.8%, compared with control, respectively, and organic fertilizer treatment merely decreased by 10%; population of Y-IVI remained about 10^6 cfu/g rhizosphere soil after application of BIO and Y-IVI 4 mouths. No Y-IVI was detected in organic fertilizer treatment and control. 【**Conclusions**】Inoculation of Y-IVI solid fermented bio-organic fertilizer BIO could promote vanilla plant above ground and root growth, significantly decrease *F. oxysporum* number in rhizosphere soil; Y-IVI can successfully colonize in rhizosphere soil to have sound effects on vanilla growth. The BIO can apply to vanilla culture to reduce chemical fertilizer and organic fertilizer application, the number of *F. oxysporum*, and decrease continuous cropping obstacles.

Key words: vanilla (*Vanilla planifolia Ames.*); plant growth promotion rhizobacteria; bio-organic fertilizer; *Fusarium oxysporum*

香草兰(*Vanilla planifolia Ames.*)是兰科香草兰属热带攀缘藤本香料植物,有“天然食品香料之王”的美誉。其鲜豆荚经过生香加工后含有250多种芳香成分,香气独特,被广泛用于调制各种高级香烟、名酒、茶叶,是各类高档食品和饮料的配香原料,在国际市场上供不应求[1]。另外香草兰还是用途广泛的天然药材,被列入美国、德国、英国的国家药典,有补肾、健胃、消胀、健脾之功效[2]。香草兰广泛分布于热带和亚热带地区,南北纬25°以内。在中国海南省及云南西双版纳地区均有栽培。

香草兰为多年生作物,在生产上以施用化肥和有机肥为主。随着种植年限的增加,植株长势变弱,土壤微生物区系失衡,土壤有益微生物数量减少,根茎腐病致病菌-尖孢镰刀菌数量增加,出现连作生物障碍问题[3],严重制约了香草兰产业的可持续发展。

近年来,根际促生菌成为国内外学者研究的热点之一,被广泛应用于促进作物生长,改善土壤微生物环境。Zaidi 等[4]盆栽试验研究显示,土壤接种 *Bacillus subtilis* SJ-101 可显著提高芥菜生物量,促进植物生长。Han 等[5]从中国南方水稻根际土中分离到的菌株 *Delftia tsuruhatensis* HR4 具有固氮能力,对植株生长有促生作用,并且可作为生防菌株防治水稻纹枯病等常见病害。Karlidag 等[6]在大田条件下研究了促生菌 M3、OSU-142、FS01 对苹果树生长的影响,结果表明,在移栽前用 10^9 cfu/mL 的菌悬液浸根可刺激苹果树生长。Niranjan Raj[7]通过温室盆栽及大田试验比较了5种不同的促生菌对御谷的促生作用,结果表明土壤接种促生菌的处理种子发芽率,株高,植株鲜、干重,叶片面积,千粒重,籽粒数等均显著高于对照;开花期与对照相比提前了4-5 d。Ling 等[8]通过大田和盆栽试验研究表明,施用由 *Paenibacillus polymyxa* SQR21 制得的微生物肥料可显著提高西瓜产量,有效降低根际土壤尖孢镰刀菌的数量。Wang 等[9]研究显示,施用由 *B. amyloliquefaciens* W19 制得的微生物肥料可显著提高香蕉植株干重,降低枯萎病发病率,改善土壤微生物环境。

促生菌在植物根际土壤中的成功定殖是其起促生作用的关键步骤[10-11]。Zhao 等[12]研究表明,土

壤接种 *B. subtilis* Y－IVI 可显著促进甜瓜生长。施用由 *B. subtilis* Y－IVI 制得的微生物肥料 BIO 可降低甜瓜根际土壤致病性真菌－尖孢镰刀菌的数量,提高植株干重,在施用 BIO 60 天后,Y－IVI 在根际土壤仍可达到 10^7 cfu/g 土[13]。本文采用的促生菌 *B. subtilis* Y－IVI 由南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室提供,旨在通过盆栽试验研究施用 Y－IVI 及其制得的微生物肥料 BIO 对香草兰生长是否有促进作用,并采用选择性培养基的方法研究 Y－IVI 在香草兰根际土壤中的定殖能力及对香草兰根茎腐病致病菌－尖孢镰刀菌数量的影响,为解决香草兰种植中出现的长势弱和连作生物障碍问题提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料与设计

供试土壤为沙壤土,养分含量为全氮 0.72 g/kg、速效磷 13.00 mg/kg、速效钾 93.00 mg/kg、有机质 12.67 g/kg。试验盆钵采用周转箱(内尺寸 600×420×165 mm),每盆装土 10 kg。选取长势一致的健康香草兰作为供试苗。

将绿色荧光蛋白分子标记后的枯草芽孢杆菌 Y－IVI 接种至 2000 mL 含 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 30℃,180 r/min 摇床培养 48 h,菌液 7000 × *g* 离心 15 min,倒掉上清液,菌体用无菌水悬浮,使菌体浓度为 10^9 cfu/mL。按照 10%(v/m)的比例接种至牛粪堆肥中,搅拌均匀,用水调节肥料含水量至 40%～45%,置于温室发酵 5 天,每天翻动肥料 1 次,发酵完成后用芽孢杆菌选择性培养基[14-15]测得肥料中 Y－IVI 浓度为 3 × 10^8 cfu/g,保存备用。

试验设 4 个处理:1)对照(CK,施用等量化肥);2)施用牛粪堆肥(OF,300 g/盆);3)施用标记菌株 Y－IVI 菌悬液(接种浓度 10^7cfu/g,土);4)施用微生物有机肥(BIO,300 g/盆)。该盆栽试验每盆栽种 2 株香草兰(1 株用于测定生物量及根系扫描,另外 1 株用于根际土壤微生物数量测定),每处理重复 4 次,3 次独立试验,共 48 盆。

1.2　测定项目及方法

1.2.1 植株生物量及根系形态　在香草兰移栽 4 个月后毁灭性采样,采用 EPSON 根系扫描仪扫描,WINRhizo 软件分析根系各生长参数。根系及茎叶分别装入牛皮纸袋中,置烘箱杀青并烘至恒重,称量。

1.2.2 根际土壤标记菌株 Y－IVI 数量及尖孢镰刀菌数量　植株根从盆钵中拔出,轻轻抖掉土体土,黏附在根上的土连同根作为根际样品[15-16],带回实验室保存于 4℃冰箱中保存。采用平板稀释涂布的方法,稀释至不同的浓度梯度,分别涂布在 *Fusarium oxysporum*[17],*Bacillus* spp.[14-15]选择性培养基上,计数。

1.3　数据分析

数据均采用 SPSS 软件(SPSS 16.0)进行 ANOVA 方差分析和多重比较(LSD, $P \leqslant 0.05$)。

2　结果与分析

2.1　不同处理对香草兰植株生物量的影响

由图 1A 可知,施用生物有机肥的处理(BIO)香草兰地上部干重显著高于其他处理,与对照(CK)相比,提高了 63.1%。施用牛粪有机肥的处理(OF)和接种促生菌 Y－IVI 的处理(Y－IVI)地上部干重分别比 CK 增加了 13.8% 和 14.6%,但三者之间无显著性差异。处理 BIO 香草兰根系干重显著高于 CK 及处理 Y－IVI,分别增加了 59.4% 和 37.2%。处理 BIO 与 OF 之间差异不显著(图 1B)。由此可见,施用促生菌 Y－IVI 及 BIO 均可促进香草兰地上部及根系生长,且 BIO 促生效果更好。

2.2　不同处理对香草兰根系生长的影响

从表 1 得出,CK 总根长高于其他处理,与处理 OF 及 BIO 无显著差异,但显著高于处理 Y－IVI。另外,处理 OF、Y－IVI 和 BIO 之间差异不显著。处理 BIO 根系表面积与其他处理差异显著,分别比 CK、OF 及 Y－IVI 增加了 88.9%、41.6% 和 71.9%,并且,处理 OF 根系表面积显著高于 CK 及处理 Y－IVI。处理 BIO 根系直径与 CK 及处理 Y－IVI 相比,分别显著提高了 41.9% 和 12.9%,与处理 OF 无显著性差异。处理 BIO 根系体积显著高于其他处理,但处理 OF 与 Y－IVI 之间差异不显著,分别比 CK 增加了 80.4% 和 31.1%。这说明施用促生菌 Y－IVI 或由其制得的 BIO 均可促进香草兰根系生长发育,且以施用 BIO 对培育香草兰发达的根系具有显著效果。

2.3　不同处理对香草兰根际土壤尖孢镰刀菌数量的影响

图 2 表明,处理 Y－IVI 和 BIO 根际土壤尖孢镰刀菌数量无显著性差异,但均显著低于 CK 和处理

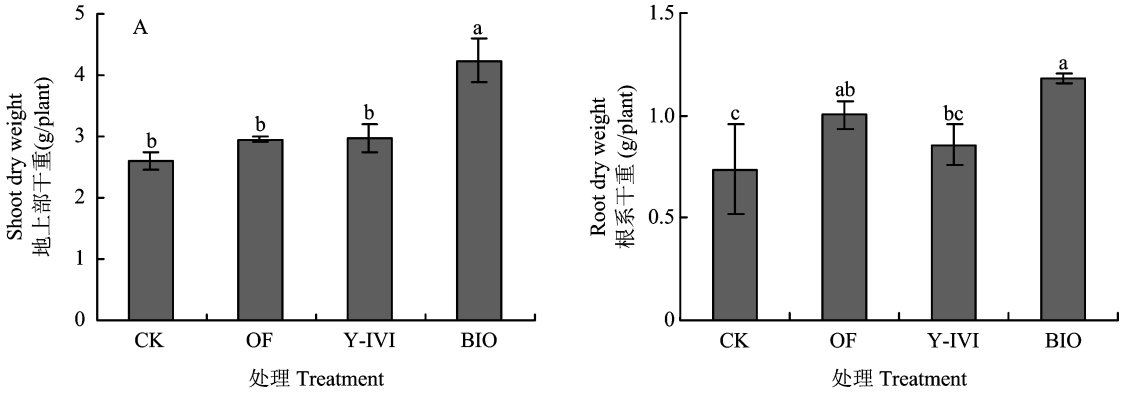

图1 不同处理对香草兰植株地上部及根系干重的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on vanilla shoot and root dry weight

[注(Note):CK—化肥 Chemical fertilizer;OF—有机肥 manure;Y-IVI—枯草芽孢杆菌 Y-IVI 菌液(接种浓度 10^7 cfu/g 土)Inocula of *Bacillus subtilis* Y-IVI (10^7 cfu/g, soil);BIO—接种 Y-IVI 菌液生物有机肥(Y-IVI, 3 × 10^8 cfu/g) Manure inoculated with Y-IVI (Y-IVI, 3 × 10^8 cfu/g). 图中柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)Bars with different letters indicate significant differences ($P<0.05$).]

表1 不同处理对香草兰根系生长参数的影响

Table 1 Effects of different treatments on vanilla root growth parameters

处理 Treatment	总根长 Total root length (m/plant)	根系直径 Average root diameter (mm)	根系表面积 Root surface area (cm^2/plant)	根系体积 Total root volume (cm^3/plant)
CK	4.82 ± 0.06 a	0.94 ± 0.08 c	115.41 ± 8.34 c	2.74 ± 0.58 c
OF	4.72 ± 0.12 ab	1.29 ± 0.14 ab	153.95 ± 8.49 b	4.94 ± 0.53 b
Y-IVI	4.55 ± 0.18 b	1.18 ± 0.09 b	126.84 ± 13.78 c	3.59 ± 0.58 bc
BIO	4.71 ± 0.10 ab	1.42 ± 0.10 a	218.49 ± 5.76 a	6.46 ± 0.42 a

注(Note):表中数据为3次独立试验的平均值 ± 标准偏差, Data were expressed as mean ± standard deviation ($n=3$);数值后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)Values followed by different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

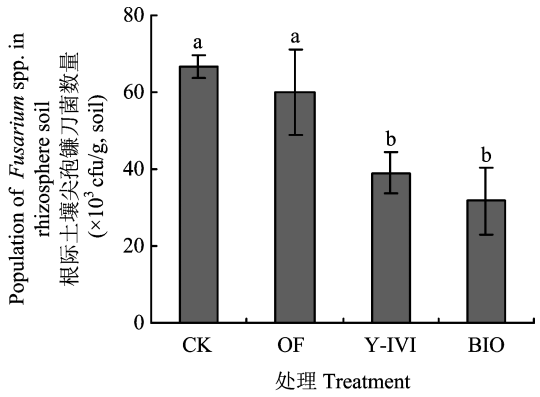

图2 不同处理对香草兰根际土壤尖孢镰刀菌数量的影响

Fig. 2 Effects of different treatments on *Fusarium* spp population in vanilla rhizosphere soil

[注(Note):CK—化肥 Chemical fertilizer;OF—有机肥 manure;Y-IVI—枯草芽孢杆菌 Y-IVI 菌液(接种浓度 10^7 cfu/g 土)Inocula of *Bacillus subtilis* Y-IVI (10^7 cfu/g, soil);BIO—接种 Y-IVI 菌液生物有机肥(Y-IVI, 3 × 10^8 cfu/g) Manure inoculated with Y-IVI (Y-IVI, 3 × 10^8 cfu/g). 图中柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)Bars with different letters indicate significant differences ($P<0.05$).]

OF。处理 BIO 与 CK、OF 及 Y-IVI 相比,尖孢镰刀菌数量分别降低了 52.6%、47.3% 和 19.0%。另外,处理 OF 与 CK 相比,土壤尖孢镰刀菌数量降低了 10.4%,但二者差异不显著。这说明,施用 Y-IVI 及 BIO 均可显著降低香草兰根际土壤尖孢镰刀菌的数量,但 OF 处理对降低尖孢镰刀菌数量不显著。

2.4 促生菌 Y-IVI 在香草兰根际土壤的定殖能力

图3显示,在土壤施用 Y-IVI 及 BIO 4个月后,处理 Y-IVI 和 BIO 根际土壤促生菌 Y-IVI 数量仍可达到 10^6 cfu/g 土,但在处理 CK 及 OF 根际土壤中并未检测到促生菌 Y-IVI。由此可见,Y-IVI 可稳定定殖于根际土壤对香草兰生长起促进作用,并可抑制土壤中有害真菌尖孢镰刀菌的数量。

3 讨论与结论

化肥的大量施用对提高作物产量起到了重要的

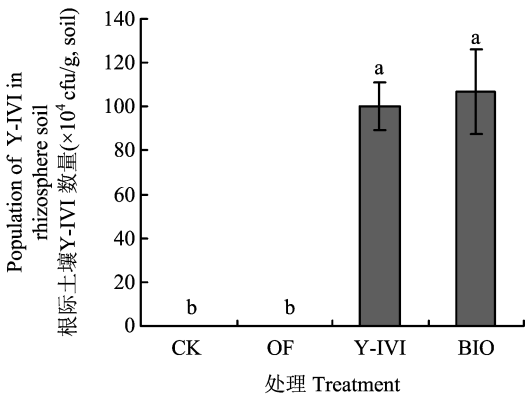

图 3　促生菌 Y－IVI 在香草兰根际土壤的定殖能力

Fig. 3　Colonization ability of plant growth promotion rhizobacteria Y－IVI in vanilla rhizosphere soil

[注(Note):CK—化肥 Chemical fertilizer;OF—有机肥 manure;Y－IVI—枯草芽孢杆菌 Y－IVI 菌液(接种浓度 10^7 cfu/g 土)Inocula of *Bacillus subtilis* Y－IVI (10^7cfu/g, soil);BIO—接种 Y－IVI 菌液生物有机肥(Y－IVI, 3 × 10^8 cfu/g) Manure inoculated with Y－IVI (Y－IVI, 3 × 10^8 cfu/g). 图中柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)Bars with different letters indicate significant differences ($P<0.05$).]

作用,但同时也带来了诸多问题,如化肥利用率降低,生态环境恶化,土壤微生物区系单一化等。根际促生菌在促进作物生长,防治植物病害,改善土壤微生物环境等方面具有重要的作用,在一定程度上可替代化肥、农药等应用于农业生产[12],减少有害成分对环境及人类健康造成危害,实现农业的可持续发展。另外,生物有机肥是由有益微生物菌群与有机肥结合形成的新型、高效、安全的生物有机肥料。它兼具了有机肥和微生物肥料的优点,可为微生物提供充足的养分,维持功能菌种活性,有效地提高肥料利用率,促进作物生长,改善土壤微生物环境[18-20]。促生菌及生物有机肥被广泛应用于瓜果蔬菜类经济作物以替代部分化肥及普通有机肥,在国内外促生菌及生物有机肥在香草兰上的应用研究鲜有报道。

本试验研究表明,施用促生菌 *B. subtilis* Y－IVI 及由其制得的微生物肥料 BIO 可提高香草兰植株干重,促进根系生长,以施用 BIO 促生效果最显著,这与 Zhao 等[13]研究结果一致,表明 *B. subtilis* Y－IVI 及其微生物肥料 BIO 可用于香草兰生产,以减少化肥施用量,改善香草兰生长状况。

芽孢杆菌是土壤微生态的优势种群之一,能形成具有较强抗逆能力的芽孢,有利于其在生物有机肥的生产及土壤环境中存活、定殖与繁殖[21]。微生物在根际成功定殖是其产生有益作用的先决条件[22]。Cao 等[23]将 *B. subtilis* SQR9 与有机肥经固体发酵制得微生物有机肥,结果表明施用该肥料可显著抑制尖孢镰刀菌在根际土壤中的数量,降低黄瓜枯萎病发病率,其原因是 *B. subtilis* SQR9 可在植株根系及根际土壤稳定定殖。Zhang 等[24]研究结果表明,施用由 *B. subtilis* N11 制得的微生物肥料可有效防治香蕉枯萎病,主要因为 *B. subtilis* N11 可在香蕉植株根系形成生物膜,稳定定殖于根系及根际土壤。Huang 等[25]研究表明,施用由 *B. pumilus* SQR－N43 制得的微生物肥料 20 天后,*B. pumilus* SQR－N43 在土壤中的数量并无显著下降,仍维持在 10^8 cfu/g 土,对黄瓜立枯病防治率达到 68%,显著高于施用普通有机肥的处理(9%)。Zhao 等[12]盆栽试验结果显示,土壤接种 *B. subtilis* Y－IVI 30 天后其在甜瓜根际土壤中的数量与接种时相比并未显著降低,仍可达到 10^8 cfu/g 土。本文结果显示,土壤接种 Y－IVI 及施用微生物有机肥 4 个月后 Y－IVI 在香草兰根际土壤中的数量为 10^6cfu/g 土,说明 Y－IVI 亦可稳定定殖在香草兰根际土壤对其生长起促进作用。

部分微生物兼具促生和生防的作用。Ren 等[26]研究指出,*Paenibacillus polymyxa* C5 可提高烟草植株干重,并可明显降低烟草黑胫病发病率。施用由 *B. amyloliquefaciens* 制得的生物有机肥可提高植株干重,有效防治番茄青枯病[27]。Wang 等[28]盆栽试验结果显示,施用由 *B. amyloliquefaciens* W19 制得的生物肥料可有效防治香蕉枯萎病,提高植株地上部及地下部干重。Zhao 等[29]盆栽及大田试验结果表明,施用由芽孢杆菌制得的微生物肥料后,甜瓜枯萎病发病率显著降低,植株生物量及甜瓜产量显著提高。本文结果表明,土壤接种 Y－IVI 及施用 BIO 的处理香草兰根际土壤尖孢镰刀菌数量显著低于对照及施用普通有机肥的处理,Y－IVI 及 BIO 对降低香草兰根茎腐病有一定的作用。Y－IVI 可产生脂肽类物质抑制有害真菌尖孢镰刀菌,改善土壤微生物环境,并可产生铁载体,吲哚乙酸等促生类物质促进甜瓜生长[12-13]。由此可见,*B. subtilis* Y－IVI 可作为广谱促生菌及生防菌应用于香草兰生产,以减少化肥施用量,促进香草兰生长,改善土壤微生物环境,缓解其种植中出现的植株长势弱,连作生物障碍问题。笔者拟从 Y－IVI 是否可在香草兰根际形成生物膜和分泌可调节植物生长的活性物质等方面进一步研究其作用机理。