植物营养与肥料学报 2014,20(5):1203-1211
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer doi: 10.11674/zwyf.2014.0517

抑制烟草青枯病型生物有机肥的田间防效研究

刘艳霞,李 想*,曹 毅,陆 宁,石俊雄
(贵州省烟草科学研究院,贵州贵阳 550000)

摘要:【目的】烟草青枯病是影响烟叶生产最主要的土传病害之一,生物防控烟草青枯病是近年来的研究热点。为验证抑制烟草青枯病型生物有机肥对生防青枯病的影响,进行2年田间试验研究其防效及其对土壤微生物的影响。**【方法】**本试验采用从烟草根际原位土壤分离得到的烟草青枯病拮抗菌株L-25和L-9,利用有机肥二次固体发酵技术,制成烟草青枯病拮抗生物有机肥。连续两年在安徽进行田间试验,分别在烟草移栽后50天和105天调查生物防控率,探求生物有机肥对青枯病的田间防效和对烟叶产量的影响;利用平板计数法、Biolog特征性碳源法和梯度变性凝胶电泳法摸索生物有机肥施用后根际土壤微生物数量、群落功能多样性和结构多样性的变化,揭示生物有机肥对青枯病的防控机理。**【结果】**1)第一年和第二年施用生物有机肥处理移栽50天后烟草青枯病的生物防控率分别为82.2%和96.2%,105天后烟草青枯病的生物防控率分别达到75.2%和95.4%;2)生物有机肥处理第一年和第二年烟叶产量分别为2212.5 kg/hm^2、1475.5 kg/hm^2,是对照的2.4和2.6倍;3)两年生物有机肥处理的根际土壤可培养细菌、放线菌数量均显著高于对照,真菌数量显著低于对照($P<0.05$),其中第一年生物有机肥处理50天和105天拮抗菌数量分别为对照的241.8倍和13.4倍,病原菌数量仅为对照的19.7%和56.6%,第二年生物有机肥处理50天和105天拮抗菌数量分别是对照的111.0倍和26.7倍,病原菌数量仅为对照的9.1%和31.4%;4)两年生物有机肥处理50天和105天根际土壤的微生物群落功能多样性,即Shannon指数、Simpson指数和Mclntosh指数均显著高于对照($P<0.05$);5)生物有机肥处理与对照土壤微生物群落结构也不相同,细菌和真菌梯度变性凝胶电泳图谱明显不同,分别属于不同的聚簇,生物有机肥处理的细菌种类较对照有所增加,同时真菌的种类有所减少。**【结论】**在烟草青枯病发病较为严重的烟田施用生物有机肥,可以显著降低青枯病发病率,增加烟草产量。生物有机肥可以显著提高拮抗菌数量,抑制根际土壤病原菌的数量,提高土壤微生物群落功能多样性,改善微生物种群和组成,丰富土壤微生物群落结构,使土壤保持健康的微生物生态平衡。

关键词: 烟草青枯病;生物有机肥;田间试验;土壤微生物群落结构多样性;微生物群落功能多样性
中图分类号: S144.1 **文献标识码:** A **文献编号:** 1008-505X(2014)05-1203-09

Field control efficiency of tobacco specific bio-organic fertilizer on tobacco bacterial wilt

LIU Yan-xia, LI Xiang*, CAO Yi, LU Ning, SHI Jun-xiong
(*Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang, Guizhou 550000, China*)

Abstract:【Objectives】 Tobacco bacterial wilt is one of the most serious soil-borne diseases for tobacco production. The biocontrol of tobacco bacterial wilt has become a hot topic recently. To investigate effect of specific bio-organic fertilizers on biocontrol of tobacco bacterial wilt, a two-year field experiment was conducted to investigate the biocontrol efficiency and soil microbial community.**【Methods】** In this experiment, two antagonistic strains (L-25 and L-9) with strong inhibitory effects on *Ralstonia solanacearum* in vitro were isolated from rhizosphere soil in a severely wilt-diseased field. Two solid bio-organic fertilizers (BOF) were secondly fermented by the two antagonists, strain L-25 and L-9. A two-year field experiment was conducted in Anhui Province. The biocontrol efficiency was investigated at 50 d and 105 d after tobacco transplanting. The effects of the bioorganic

收稿日期: 2013-11-13 **接受日期:** 2014-01-26
基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103004);中国烟草总公司重点项目(110201002019);贵州省烟草总公司重点项目(201018);贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2013]2197号,2018号)资助。
作者简介: 刘艳霞(1982—),女,河北张家口人,博士,助理研究员,主要从事植物营养、土壤微生物区系分析等研究。
E-mail: liuyanxia306@163.com。 * 通信作者 E-mail: newcool1361214@163.com

fertilizers on soil microbial community and tobacco yield were measured and analyzed. In order to reveal the biocontrol mechanism of the bioorganic fertilizers, the colony counting method, biolog phenotype analysis and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were used to analyze microbial population, functional and structural diversity of microorganisms, respectively in rhizosphere soil after the application of the bioorganic fertilizers. **【Results】**1) At 50 d after the transplanting, compared with the control, the control efficiencies of the BOF treatments reach to 82.2% and 96.2% for the first and second year, respectively, and to 75.2% for the first year and 95.4% for the second year at 105 d after the transplanting. 2) The tobacco yields are increased to 2212.5 kg/ha and 1475.5 kg/ha in the first and second year in the BOF treatments which are about 2.4 times and 2.6 times of control, respectively. 3) The populations of rhizosphere cultivated bacteria and actinomycetes of the BOF treatments are significantly higher than those of the control, while the counts of fungi of the BOF treatments are significantly lower than those of the control ($P < 0.05$). In the first year, the populations of antagonists are increased by 241.8 times and 13.4 times of the control in 50 d and 105 d after the transplanting in the BOF treatments, while the populations of pathogen are 19.7% and 56.6% of the control, respectively. In the second year, the counts of antagonists are increased by 111.0 times and 26.7 times of the control in 50 d and 105 d after the transplanting in the BOF treatments. However, the pathogen counts in the BOF treatments are 9.1% and 31.4% of the control. 4) The Shannon Index, Simpson Index and McIntosh Index of soil microbial community of the BOF treatments are significantly higher than those of the control in both 50 d and 105 d after the transplanting in the two years. 5) There are significant differences of soil microbial structural diversity between the BOF treatments and the control. The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) patterns of soil bacteria and fungi of the BOF treatments and the control treatment belong to two corresponding clusters, which suggests that bacterial species are increased and fungi species are decreased under the application of BOF. **【Conclusions】**The application of tobacco specific BOF in the severely wilt-diseased tobacco field can significantly reduce the wilt disease incidence and thus increase tobacco yield. Bioorganic fertilizer depresses the population of the pathogen and increases the counts of antagonists. Meanwhile, it can increase the functional diversity of the soil microbial community and improve the microbial structural diversity. Therefore, the soil micro-ecology keeps balanced.

Key words: tobacco bacterial wilt; bio-organic fertilizer; field experiment; structural diversity of soil microbial community; functional diversity of soil microbial community

烟草青枯病是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种以土壤传播为主的毁灭性细菌性烟草病害。在我国已经有14个省(区)爆发流行,在长江流域及其以南烟区普遍发生。烟草青枯病的发生、流行和危害是诸多因素综合作用的结果。以往对烟草青枯病的研究和防控主要集中在抗性品种选育、化学药剂防控、土壤添加剂防治及改善栽培管理等方面,防控方法效果都不理想,烟草青枯病至今仍得不到有效的控制。

近年来,随着科技进步和人们环保意识的加强,生物防控方法逐渐引起了人们的重视[1],其主要是通过施用拮抗菌、有机肥或生物有机肥等措施调节土壤微生态、改善土壤微生物多样性、抑制病原菌的生长或提高植物自身抗性,从而抑制土传病害的发生[2-3]。然而,大多数学者对青枯病病原菌的防控都停留在实验室内拮抗菌对病原菌的平板拮抗作用,应用于温室试验或田间试验的防控效果甚微。Anuratha等[4]将平板筛选得到的荧光假单胞杆菌直接用于田间试验,其对番茄青枯病的防控率仅为36%左右。肖相政等[5]研究表明,一株枯草芽孢杆菌对番茄青枯病的防病效果可达到30.6%~57.2%。拮抗菌单独施入土壤后不易定殖,将其配以一定的有机载体施入土壤中更利于拮抗菌生存,从而提高防控效果和稳定性。本试验以烟草青枯病拮抗菌发酵的生物有机肥BOF为生防材料,研究其在田间烟草连作土壤上防控烟草青枯病的生防效果,为功能性微生物有机肥料的研制和烟草青枯病的综合防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

烟草种子采用当地品种MS87,此品种烟叶品质

较好,但高感青枯病。

拮抗菌采用实验室前期自安徽省健康烟草根际土壤分离筛选到的 L-25(短短芽孢杆菌, *Brevibacillus brevis*)和 L-9(娄彻氏链霉菌, *Streptomyces rochei*),其中,L-25 经中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(CGMCC No. 3175)。

有机肥载体为菜粕酶解的氨基酸有机肥与牛粪以 1∶1(质量比)混合,含有机质 33.8%、氨基酸 4.3%、N 4.20%、P_2O_5 2.26%、K_2O 1.08%。肥料全部由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。

1.2 抑制烟草青枯病型生物有机肥的制备

将拮抗菌 L-25 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基,L-9 接种于高氏一号液体培养基,三角瓶装液量为 1/5,30℃、170 r/m 振荡 48 h。

将上述发酵液 6000 × *g* 离心 10 min,收集菌体按 5% 接种量接种于灭菌后的有机肥载体。调节有机肥含水量为 40%,发酵 5 ~ 6 d,定期翻抛。发酵结束后,通过稀释平板梯度计数[6]和荧光定量 PCR 测定 L-9 与 L-25 生物有机肥有效活菌数及拮抗菌数量(表 1)。L-25 与 L-9 分别二次发酵的生物有机肥以 1∶1(w∶w)混合后制成的生物有机肥称为 BOF。

表 1　拮抗菌二次发酵前后微生物数量(cfu/g)

Table 1　The counts of microbes before and after the secondary fermentation of antagonists

肥料处理 Fertilizer Treatment	细菌 Bacteria	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungi	拮抗菌 Antagonists
有机肥(二次发酵前) Organic Fertilizer (OF, before the secondary solid fermentation)	1.03×10^8	1.00×10^5	2.00×10^5	3.19×10^3
生物有机肥(二次发酵后) Bioorganic Fertilizer (BOF_9, after the secondary solid fermentation)	1.26×10^9	3.43×10^8	1.76×10^5	1.00×10^8
生物有机肥(二次发酵后) Bioorganic Fertilizer (BOF_{25}, after the secondary solid fermentation)	1.83×10^9	1.72×10^8	2.28×10^5	1.45×10^9

1.3　田间试验设计

在安徽省宣城市黄渡乡柏枧村分别于 2009 和 2010 年开展两年烟草连作定位田间试验。试验前青枯病发病率非常严重,当年已决定不再种植烟草。每年分别设置 2 个处理: 1)对照处理(CK) 只施用 975 kg/hm^2 的烟草专用复合肥料($N : P_2O_5 : K_2O$ = 10∶15∶25); 2)生物有机肥处理(BOF) 在施用 817.5 kg/hm^2 烟草专用复合肥料基础上加施 375 kg/hm^2 的 BOF,磷和钾不足的部分分别用过磷酸钙和硫酸钾补齐。供试土壤含有机质 24.2 g/kg、全氮 1.32 g/kg、碱解氮 143 mg/kg、速效磷 10.17 mg/kg、速效钾 95.2 mg/kg,土壤 pH 6.8。每处理 4 个重复区组,每区组 120 株烟株,加保护行等共占地 0.07 hm^2。田间管理及追肥的施用与当地其他烟田相同。

1.4　田间试验病害调查及相关性状测量

分别于烟草移栽后 50 和 105 d,观测烟草发病情况并测定根际土壤微生物数量及群落结构和功能多样性,烟叶采摘并烘烤后计算各处理产量。

1.4.1 发病率、病情指数与防控效果　分别于移栽后 50 和 105 d,对烟田进行发病率和发病程度的调查测定,以株为单位分组调查病害严重程度: 0 级—全株无病;1 级—茎部偶有褪绿斑,或病侧 1/2 以下叶片凋萎;3 级—茎部有黑色条斑,但不超过茎高 1/2,或病侧 1/2 至 2/3 叶片凋萎;5 级—茎部黑色条斑超过茎高 1/2,但未到达茎顶部,或病侧 2/3 以上叶片凋萎;7 级—茎部黑色条斑到达茎顶部,或病株叶片全部凋萎;9 级—病株基本枯死[7]。发病率、病情指数与防控效果的计算如下:

$$发病率 = (病株数 / 总株数) \times 100\%$$

$$病情指数 = \left[\frac{\sum(病情级数 \times 此级病株数)}{总级数 \times 总株数}\right] \times 100\%$$

$$防控效果 = \left(\frac{对照病情指数 - 处理病情指数}{对照病情指数}\right) \times 100\%$$

1.4.2　烟草产量测定　烟草移栽后 60 ~ 70 d,叶片开始自下而上逐渐成熟,根据烟叶成熟情况由下至上分次采收并放于烤房中烘烤,烘烤后计算其产量。

1.4.3　土壤微生物数量　可培养细菌计数采用牛肉膏蛋白胨固体培养基和 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 稀释度,可培

养放线菌计数采用高氏一号培养基和 10^{-3}～10^{-5} 的稀释度,可培养真菌计数采用马丁－孟加拉红培养基和 10^{-2}～10^{-4} 的稀释度[6],L-9 计数采用娄彻氏链霉菌选择性培养基。荧光定量 PCR 方法测定土壤中短短芽孢杆菌 L-25 和病原菌茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)数量。拮抗菌数量为 L-9 和 L-25 数量之和。

每年分别在烟草移栽后 50 和 105 d,采集根际土壤进行可培养微生物数量的测定。将烟草根系整体取出,轻轻抖动去除根圈土壤。将根及根表附着的土壤一起放入超声仪中进行超声处理,超声在水里的土壤即为根际土壤[8]。称取 1 g 根际土壤,加入到 9 mL 无菌水中,在摇床上以 170 r/m 震荡 30 min,使其充分混匀,静置 1 min 后吸取 0.5 mL 上清液于 4.5 mL 无菌水充分混匀得 10^{-1} cfu/mL 浓度,依次稀释至 10^{-1}～10^{-6} 浓度的土壤溶液待用。将吸取 100 μL 不同稀释度的土壤悬液涂布在不同平板上。

每克样品的菌数 = 同一稀释度几次重复的菌落平均数 × 10 × 稀释倍数

娄彻氏链霉菌选择性培养基:在高氏一号培养基的基础上加入 5 μg/mL 的苯唑西啉(oxacillin)、30 μg/mL 的头孢噻肟(cefotaxime sodium salt)、50 μg/mL 的氨曲南(aztreonam)、200 μg/mL 的诺氟沙星(norfloxacin)和 20 μg/mL 的哌拉西林(piperacillin),作为拮抗菌 L-9 选择性培养基。

土壤或肥料总 DNA 采用 Soil DNA Isolation Kit (Omega) 提取,以样品 DNA 作为扩增模板,分别用病原菌(*Ralstonia solanacearum*)与拮抗菌(*Brevibacillus brevis*)的特异性引物在荧光定量 PCR 仪(StepOne Plus Real-time PCR System, ABI)上进行扩增反应,反应结束后确认扩增曲线和融解曲线,记录每个样品的 Ct 值,并将 Ct 值代入标准曲线方程,计算出样品模板的初始基因拷贝数,最终换算出每克干土的茄科劳尔氏菌或短短芽孢杆菌的基因拷贝数。

茄科劳尔氏菌的正向引物 flicF: GAACGCCAACGGTGCGAACT; 反向引物 filcR: GGCGGCCTTCAGGGAGGTC[9]。短短芽孢杆菌 L-25 的正向引物 Bre-F: AGACCGGGATAACATAG GGAAACTTAT; 反向引物 Bre-R: GGCATGCTGA TCCGCG ATTACTA GC[10]。荧光定量 PCR 扩增反应体系(20 μL)含 SYBR® Premix Ex TaqTM (2 ×) (Takara) 10 μL、ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL、flicF 0.4 μL、filcR 0.4 μL、DNA 模板 2 μL, ddH_2O 6.8 μL。反应程序:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。溶解曲线步骤为 95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,反应结束后确认扩增曲线和融解曲线。

荧光定量 PCR 结果显示,茄科劳尔氏菌的扩增效率达到 91%,短短芽孢杆菌的扩增效率达到 100%,标准曲线 $R^2 > 0.99$。茄科劳尔氏菌标准曲线方程为 $C_{tR} = -3.564C_{0R} + 38.744$,短短芽孢杆菌标准曲线方程为 $C_{tB} = -3.322C_{0B} + 37.209$。

1.4.4 土壤微生物群落功能多样性指数 每年分别在烟草移栽后 50 和 105 d,采集根际土壤进行土壤微生物群落功能多样性指数的测定。采集田间试验每个处理中的 4 个重复根际土壤混匀,测量土壤含水量。准确称取 10 g 鲜土,加入到 90 mL 无菌生理盐水(0.85% NaCl)中稀释,在摇床里振摇 30 min,静止沉淀 3 ～5 min,然后进行 100 倍稀释,以每孔 150 μL 稀释液加入微孔板中,将制备好的菌悬液倒入无菌移液槽中,使用八孔移液器将其接种于 Ecoplate 的 96 孔中,放入 Biolog Omnilog 仪中 28℃ 恒温培养,每 15 min 自动测定波长为 590 nm 和 750 nm 的颜色与浊度。

计算土壤微生物群落功能多样性指数分别由 Shannon 多样性指数(H)、Simpson 优势度指数(D)和 McIntosh 均匀度指数(U)来表示[11]。

$$H = -\sum Pi\ln Pi$$

其中 Pi 为第 i 孔相对吸光度值与整个平板相对吸光度值总和的比率;

$$D = \sum \frac{ni(ni-1)}{N(N-1)}$$

$$U = \sqrt{\sum ni^2}$$

其中,ni 为第 i 孔的相对吸光值,N 为相对吸光度值总和。

1.4.5 根际土壤微生物群落结构变化 于第二年烟草移栽 105 d 后采集两处理根际土壤,土壤 DNA 提取方法同上。用细菌和真菌的带 GC 夹子的通用引物对 DNA 进行链式扩增反应。细菌正向引物为 5′-CCTGTGCTCCACGCTTGG-3′,反向引物为 5′-CGC CCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCAGGGTG GGGACTCCACGGGAGGCAGCAG-3′。真菌正向引物为 5′-GTAGTCATATGCTTGGTTC-3′,反向引物为 5′- CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCC

CCGCCCCATTCCCTTGTTACCCGTTG-3′。PCR 扩增反应体系: 10×缓冲液 2.5 μL、dNTP(25 mmol/L) 2 μL、上下游引物各 1 μL(25 pmol/μL)、Mg^{2+}(25 mmol/L)2 μL、模板 DNA 0.5 μL、Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、dd H_2O 15.5 μL、总体积 25 μL。反应条件: 94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,72℃保持 7 min,共循环 35 次,4℃保温。DGGE 电泳仪为 D-code Bio-Rad,所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,变性梯度为 40%～60%,80V 恒温 60℃,1×TAE 中电泳 16 h,银染后扫描,采用 Quantity One 4.4.0(Bio-Rad)分析结果。

1.5　数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2003 处理,显著性分析采用 SPSS Base Ver. 13.0 统计软件 (SPSS, IL, Chicago, USA)进行,用 LSD、Duncan 新复极差进行多重比较($P \leq 0.05$)。

2　结果与分析

2.1　青枯病的防控效果

大田中连续两年施入生物有机肥后,青枯病的发生情况显著减轻,BOF 处理中发病株数和发病程度都明显降低,青枯病初发期比对照延迟 13 天(表 2)。第一年和第二年 CK 处理移栽 50 d 后的发病率和病情指数无显著差异;而 BOF 处理的发病率和病情指数都存在显著差异,第二年 50 d 的防控效果比第一年高 14.0 个百分点,105 d 发病率降低了 94.1%,防控效果高达 95.4%。各处理 50 d 的发病率均显著低于 105 d,分别为 105 d 发病率的 43.1% (1-CK)、25.9% (1-BOF)、45.4% (2-CK) 和 32.2%(2-BOF)。BOF 处理 50 d 对烟草青枯病的防控效果高于 105 d,分别为 105 d 的 1.09(第一年)和 1.01 倍(第二年)。

表 2　大田试验田间小区防控效果

Table 2　Control efficiency in the field experiments

处理 Treatment	移栽后 50 d 50 days after the transplanting			移栽后 105 d 105 days after the transplanting		
	发病率(%) Incidence	病情指数(%) Disease index	防控效果(%) Control efficiency	发病率(%) Incidence	病情指数(%) Disease index	防控效果(%) Control efficiency
1-CK	26.1 ±2.8 a	17.4 ±0.8 a		60.6 ±1.2 a	54.9 ±6.0 a	
1-BOF	6.9 ±1.0 b	3.1 ±0.3 b	82.2	26.6 ±3.1 c	13.6 ±0.6 c	75.2
2-CK	23.9 ±0.6 a	18.2 ±0.4 a		52.7 ±2.0 b	45.5 ±6.6 b	
2-BOF	1.0 ±0.9 c	0.7 ±0.6 c	96.2	3.1 ±1.0 d	2.1 ±1.0 d	95.4

注(Note): 1-CK—第一年对照处理 Control treatment in the first year; 1-BOF—第一年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the first year; 2-CK—第二年对照处理 Control treatment in the second year; 2-BOF—第二年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the second year. 同列数据后字母不同代表处理间差异显著($P \leq 0.05$) Values in the same column followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

2.2　烟叶产量

两年田间试验结果都表明,施用生物有机肥可以显著增加烟叶产量(图 1)。与 CK 处理相比,BOF 处理第一年增产 2.4 倍,第二年增产 2.6 倍,CK 处理两年间产量无显著差异,BOF 处理第二年产量显著高于第一年,比第一年增加 11.9%。

2.3　烟草根际土壤微生物数量

移栽 50 d 后,BOF 处理根际的细菌、放线菌和拮抗菌的数量都比 CK 处理明显提高,而真菌和病原菌的数量却显著减少($P \leq 0.05$),病原菌数量由 CK 处理的 10^7 cfu/g,土下降到 10^6cfu/g, 土(表 3)。移栽 105 d 后,各种微生物数量也呈下降趋势,细菌数量与 50 d 相比下降一个数量级,BOF 处理的拮抗菌数量分别减少 23.2(第一年)和 14.8 倍(第二年);病原菌茄科劳尔氏菌的数量在两处理间没有显著差异,都在 1.0×10^6 cfu/g 土数量级上;放线菌数量在数量级上也无差异。

2.4　烟草根际土壤微生物群落功能多样性

土壤中施入生物有机肥的处理 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数均高于病土 CK 处理(表 4),表明生物有机肥可以有效改善土壤微生物的多样性,而长期施用化肥会降低土壤微生物的丰

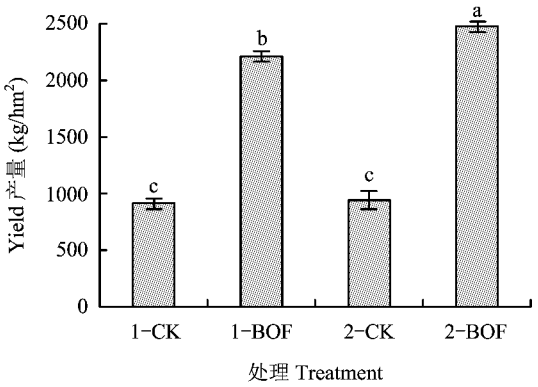

图1 施用生物有机肥对烟叶产量的影响

Fig. 1 Effect of the application of BOF on tobacco yield

[注(Note): 1-CK—第一年对照处理 Control treatment in the first year; 1-BOF—第一年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the first year; 2-CK—第二年对照处理 Control treatment in the second year; 2-BOF—第二年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the second year. 柱形图上字母不同代表处理间差异显著($P \leqslant 0.05$) Different letters above the bars indicate significant differences among different treatments ($P \leqslant 0.05$).]

富度和均匀度。两年的试验结果表明,第一年 BOF 处理 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数显著高于 CK 处理,50 d 增幅分别为 28.4%、76.9% 和 10.6%;第二年 BOF 处理土壤微生物群落功能多样性指数与 CK 处理相比差异明显,50 d 增幅分别为 36.2%、86.3% 和 19.1%,烟株移栽 105 d 后的根际土壤微生物群落功能多样性比 50 d 有所下降,但 BOF 处理仍显著高于 CK 处理。BOF 处理第二年根际土壤微生物群落 50 d Shannon 指数和 McIntosh 指数显著高于第一年,Simpson 指数无差异,105 d Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数均显著高于第一年。

2.5 烟草根际土壤微生物群落结构多样性

从图 2 可以看出,与 CK 处理相比,BOF 处理细菌的条带增加了,真菌条带减少了,即细菌种类增加的同时真菌的种类有所减少。通过 DGGE 图谱的相似性聚类分析发现,两年 BOF 处理的细菌和真菌群落结构具有相似性,CK 处理的细菌和真菌群落结构也具有相似性。

表3 烟草根际土壤可培养微生物数量(cfu/g, soil)

Table 3 Microbial counts of rhizosphere soil in field experiments

处理 Treatment	移栽后 50 d 50 days after the transplanting					移栽后 105 d 105 days after the transplanting				
	细菌 Bacteria ($\times 10^7$)	放线菌 Actinomyctes ($\times 10^5$)	真菌 Fungi ($\times 10^4$)	茄科劳尔氏菌 *R. solanacearum* ($\times 10^6$)	拮抗菌 Antagonist ($\times 10^3$)	细菌 Bacteria ($\times 10^7$)	放线菌 Actinomyctes ($\times 10^5$)	真菌 Fungi ($\times 10^4$)	茄科劳尔氏菌 *R. solanacearum* ($\times 10^6$)	拮抗菌 Antagonist ($\times 10^3$)
1-CK	1.4 b	1.8 b	67.4 a	12.7 a	4.7 b	5.1 b	1.7 a	32.1 a	7.6 a	3.5 b
1-BOF	33.1 a	10.4 a	8.4 b	2.5 b	1136.6 a	14.3 a	3.3 a	2.8 b	4.3 a	46.9 a
2-CK	2.0 b	2.8 b	23.3 a	11.0 a	9.5 b	7.6 b	1.8 a	31.5 a	3.5 a	2.5 b
2-BOF	15.9 a	20.9 a	9.6 b	1.0 b	1054.9 a	14.8 a	5.0 a	6.6 b	1.1 a	66.7 a

注(Note): 1-CK—第一年对照处理 Control treatment in the first year; 1-BOF—第一年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the first year; 2-CK—第二年对照处理 Control treatment in the second year; 2-BOF—第二年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the second year. 同列数据后字母不同代表处理间差异显著($P \leqslant 0.05$) Values followed by different letters in the same column are significantly different ($P \leqslant 0.05$).

3 讨论与结论

有机肥与功能微生物(生防菌、促生菌等)相结合制成微生物有机肥后施用,对各种土传病害的防控体现出很好的效果[12-13],目前国内报道的生物有机肥对香蕉枯萎病[14-15]、黄瓜枯萎病[16]、甜瓜枯萎病[17]、西瓜枯萎病[18]、棉花黄萎病[19]等具有较好的防控效果。本试验中,生物有机肥处理青枯病的发病率和病情指数较对照相比显著下降,防控效果分别达到 75.2%(第一年)和 95.4%(第二年)。此外,生物有机肥还能延缓青枯病的发病时间,初发期推迟 13 d,移栽后 50 d 的防控效果分别比 105 d 高 9.3%(第一年)和 1.2%(第二年)。这主要由于采用的拮抗微生物均从烟草根际土筛选获得,在烟草

表 4　烟草根际微生物群落多样性指数

Table 4　The diversity indices for rhizosphere microbial communities in the field experiments

处理 Treatment	移栽后 50 d 50 days after the transplanting			移栽后 105 d 105 days after the transplanting		
	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	McIntosh 指数 McIntosh index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	McIntosh 指数 McIntosh index
1-CK	1.83 c	27.7 b	11.3 c	1.79 c	27.3 c	11.0 c
1-BOF	2.35 b	48.5 a	12.5 b	2.30 b	46.8 b	12.3 b
2-CK	1.77 d	26.2 c	11.0 c	1.69 d	25.2 d	10.6 d
2-BOF	2.41 a	48.8 a	13.1 a	2.36 a	48.1 a	12.9 a

注(Note): 1-CK—第一年对照处理 Control treatment in the first year; 1-BOF—第一年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the first year; 2-CK—第二年对照处理 Control treatment in the second year; 2-BOF—第二年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the second year. 同列数据后字母不同代表处理间差异显著($P \leqslant 0.05$) Values followed by different letters in the same column are significantly different ($P \leqslant 0.05$).

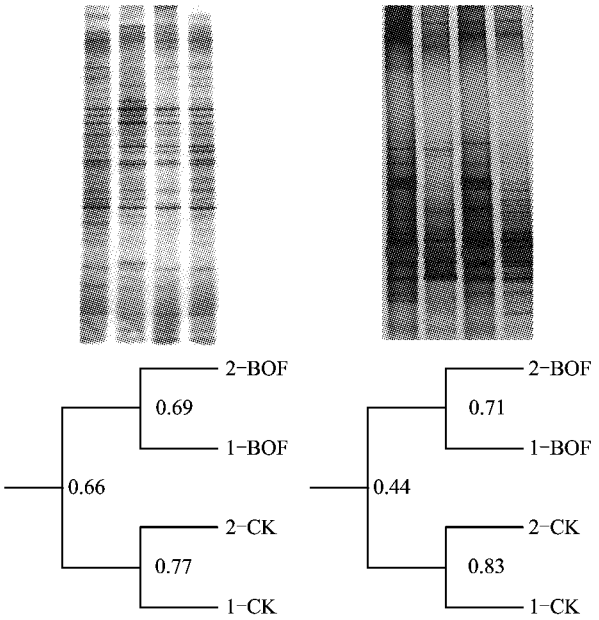

图 2　移栽 105 天烟草根际土壤的细菌(左)和真菌(右)DGGE 电泳图及聚类分析

Fig. 2　DGGE pattern and the phylogenetic tree of the bacterial community (left) and fugal community (right) of rhizosphere soil in different treatments in the pot experiment

[注(Note): 1-CK—第一年对照处理 Control treatment in the first year; 1-BOF—第一年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the first year; 2-CK—第二年对照处理 Control treatment in the second year; 2-BOF—第二年施用 BOF 处理 BOF applied treatment in the second year.]

根际上具有很强的定殖能力;同时拮抗菌以有机肥为载体,经过二次固体发酵后施入土壤中,在土壤中的定殖能力更强,对病原菌起到较好的抑制作用[20],进而推迟烟草植株发病时间和显著降低青枯病发病指数。

两年田间试验中对照 50 d 时病原菌数量维持在 10^7 cfu/g,土以上,发病指数显著高于生物有机肥处理,生物有机肥处理前期病原菌的数量低于 10^6 cfu/g,土。本试验研究结果表明,青枯劳尔氏菌浓度为 $10^6 \sim 10^7$cfu/g, soil 是青枯病发病与否的临界浓度,这与葛慈斌等在番茄组培苗上得到的试验结果相近[21]。Zhao 等[17]的研究也表明,施用拮抗菌二次发酵的生物有机肥后与对照相比,根表和根际土中的病原菌数量减少到发病浓度以下,进而达到防治病害的目的。移栽后 105 d 根际土壤中拮抗菌的数量比 50 d 分别减少了 95.8%(第一年)和 93.7%(第二年),究其原因可能是 105 天后烟草进入采摘后期,叶片数减少,光合作用减弱,进而导致烟草根系分泌物和次生代谢产物减少,拮抗菌数量也随之大幅减少[22]。

生物有机肥对土壤中青枯病病原菌有较好的抑制作用,主要是因为其有效改善土壤微生物平衡,恢复被破坏的土壤生态系统,从而建立起复杂而健康的土壤微生物体系[23]。拮抗菌在有机肥协助下形成"基质-菌群"生态系统,更有利于调节土壤微生态环境,可改变根际土壤微生物生态特征和物理化学特征,从而起到防病、抑病的作用[24]。本试验中生物有机肥处理根际土壤中的细菌和放线菌的数量较对照处理均显著增加,真菌的数量下降明显,土壤微生物由真菌主导型向细菌主导型转化, 土壤趋向健康方向发展[25]。生物有机肥在根际不但可以影响土壤的微生物数量,还可以调节微生物的群落多样性和功能多样性。本试验中通过 DGGE 方法分析发现,与对照相比,生物有机肥处理中细菌的条带

显著增多,真菌条带明显减少,从而说明,生物有机肥可以调节土壤微生物群落的结构多样性,这一结果与张慧[26]和 Lang 等[27]通过 DGGE 分析生物有机肥对棉花根际土壤真菌区系的影响类似。当土壤肥力水平提高、微生态环境得到改善、微生物活性增强时,土壤微生物群落功能多样性会提高[28-29]。本试验中,生物有机肥处理土壤的 Shannon 多样性指数、Simpson 优势度指数和 McIntosh 均匀度指数都显著高于对照,说明生物有机肥不但提高了土壤微生物整体代谢能力和数量[30],即增加土壤微生物功能多样性,而且微生物群落间无绝对优势种群,对土壤中各种碳源的利用更加均衡,从而达到改善土壤微生物区系的目的,使土壤健康、可持续发展。

综上所述,施用抑制烟草青枯病型生物有机肥可以有效降低青枯病发病率,增加烟叶产量,降低土壤中病原菌浓度进而减少病原菌对根系的侵染,有利于连作土壤的生态系统向健康可持续发展的方向转化,达到对烟草青枯病良好的防控效果。

参考文献:

[1] 王雅平, 刘伊强, 潘乃穗. 枯草芽孢杆菌 TG26 防病增产的研究[J]. 中国生物防治, 1993, 9(2): 63-68.
Wang Y P, Liu Y Q, Pan N S. Study on the biological control of plant diseases with Bacillus subtilis strain TG26 [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1993, 9(2): 63-68.

[2] Abawi G S, Widmer T L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops [J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 37-47.

[3] 李胜华, 谷丽萍, 刘可星, 等. 有机肥配施对番茄土传病害的防治及土壤微生物多样性的调控[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(4): 965-969.
Li S H, Gu L P, Liu K X *et al*. Effect of combined application of organic fertilizers on the control of soilborne diseases and the regulation of soil microbial diversity [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(4): 965-969.

[4] Anuratha C S, Gnanamanickam S S. Biological control of bacterial wilt caused by *pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria [J]. Plant and Soil, 1990, 124: 109-116.

[5] 刘琼光, 李忠, 唐孜. 拮抗细菌和土壤添加剂防治烟草青枯病[J]. 中国生物防治, 1999, 15(2): 94-95.
Liu Q G, Li Z, Tang Z. Biological control of tobacco bacterial wilt by soil amendments and antagonistic bacteria [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1999, 15(2): 94-95.

[6] 赵斌, 何绍江. 稀释平板测数法[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 69-72.
Zhao B, He S J. Dilution plate counting method [M]. Beijing: Science Press, 2002. 69-72.

[7] GB/T 23222-2008. 烟草病虫害分级及调查方法[S].
GB/T 23222-2008. Grade and investigation method of tobacco diseases and pests[S].

[8] Hervas A, Landa B, Datnoff L E *et al*. Effects of commercial and indigenous microorganisms on fusarium wilt development in Chickpea [J]. Biological Control, 1998, 13: 166-176.

[9] Schonfeld J, Heuer H, Van Elsas J D *et al*. Specific and sensitive detection of ralstonia solanacearum in soil on the basis of pcr amplification of flic fragments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7248-7256.

[10] Shida O, Takagi H, Kadowaki K *et al*. Proposal for two new genera, *brevibacillus* gen. Nov. and *aneurinibacillus* gen. Nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(4): 939-946.

[11] Staddon W J, Duchesne L C, Trevors J T. Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soils as determined by sole-carbon-source utilization patterns [J]. Microbial Ecology, 1997, 34: 125-130.

[12] Hoitink H A J, Boehm M J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon [J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37: 427-446.

[13] Trillas M I, Casanova E, Cotxarrera L. Composts from agricultural waste and the *trichoderma asperellum* strain t-34 suppress *rhizoctonia solani* in cucumber seedlings [J]. Biological Control, 2006, 39: 32-38.

[14] Zhang N, Wu K, He X *et al*. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *bacillus subtilis* n11 [J]. Plant and Soil, 2011, 344: 87-97.

[15] 何欣, 郝文雅., 杨兴明, 等. 生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防治的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16: 978-985.
He X, Hao W Y, Yang X M *et al*. Effects of bioorganic fertilizer on growth and controlling fusarium-wilt disease of banana [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16: 978-985.

[16] Zhang S, Raza W, Yang X *et al*. Control of fusarium wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer [J]. Biology and Fertility of Soils, 2008, 44: 1073-1080.

[17] Zhao Q, Dong C, Yang X *et al*. Biocontrol of *fusarium* wilt disease for *cucumis melo* melon using bio-organic fertilizer [J]. Applied Soil Ecology, 2011, 47: 67-75.

[18] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1136-1141.
Ling N, Wang Q J, Yang X M *et al*. Control of *Fusarium* wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(5): 1136-1141.

[19] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1095-1101.
Zhang H, Yang X M, Ran W *et al*. Screening of bacteria antagonistic against soil-borne cotton verticilllium wilt and their biological effects on the soil-cotton system [J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(6): 1095-1101.

[20] El-Abyad M S, El-Sayed M A, El-Shanshoury A R *et al.* Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *streptomyces* spp[J]. Plant and Soil, 1993, 149: 185-195.

[21] 葛慈斌，刘波，泉育菁. 青枯雷尔氏菌致病力的番茄组培苗鉴定方法研究[J]. 武夷科学，2004，20(20)：13-16.
Ge C B, Liu B, Quan Y Q. Study on the methods on identifying the virulence of *Ralstonia solanacearum* using tissue cultured tomatoes [J]. Wuyi Science, 2004, 20(20): 13-16.

[22] 殷博. 几种作物根系分泌物对土壤微生物的影响[D]. 哈尔滨：黑龙江大学硕士学位论文，2009.
Yin B. The effect of several root exudates on soil microorganisms [D]. Harbin: Master thesis, Heilongjiang University, 2009.

[23] Liu Y, Shi J, Feng Y *et al.* Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the applicaiton of antagonistic strains in combination with organic fertilizer [J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49(4):447-464.

[24] 张志红，李华兴，韦翔恩，等. 生物肥料对香蕉枯萎病及土壤微生物的影响[J]. 生态环境，2008，17 (6)：2421-2425.
Zhang Z H, Li H X, Wei X E *et al.* Influence of biological fertilizers on banana wilt disease and microorganisms in soil [J]. Ecological Environment, 2008, 17 (6): 2421-2425.

[25] Bottomley P J, Yarwood R R, Kageyama S A *et al.* Responses of soil bcterial and fungal communities to reciprocal transfers of soil between adjacent coniferous forest and meadow vegetation in the cascade mountains of Oregon [J]. Plant and Soil, 2006, 289: 35-45.

[26] 张慧. 防治棉花黄萎病微生物有机肥的研制及其生物效应[D]. 南京：南京农业大学硕士学位论文，2008.
Zhang H. Development of a bio-organic fertilizer against cotton *verticillium* wilt and its effect on the soil-cotton system [D]. Nanjing: MS thesis, Nanjing Agricultural University, 2008.

[27] Lang J, Hu J, Ran W *et al.* Control of cotton *verticillium* wilt and fungal diversity of rhizosphere soils by bio-organic fertilizer [J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48: 191-203.

[28] 张志明，许艳丽，韩晓增，等. 连续施肥对农田黑土微生物功能多样性的影响[J]. 生态学杂志，2012，31(3)：647-651.
Zhang Z M, Xu Y L, Han X Z *et al.* Effect of continuous fertilization on microbial functional diversity in black soil under cropland [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 647-651.

[29] 樊晓刚，金轲，李兆君，等. 不同施肥和耕作制度下土壤微生物多样性研究进展[J]. 植物营养与肥料学报，2010，16 (3)：744-751.
Fan X G, Jin K, Li Z J *et al.* Soil microbial diversity under different fertilization and tillage practices: A review [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16 (3): 744-751.

[30] 孙薇，钱勋，付青霞，等. 生物有机肥对秦巴山区核桃园土壤微生物群落和酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报，2013，19 (5)：1224-1233.
Sun W, Qian X, Fu Q X *et al.* Effects of bio-organic fertilizer on soil microbial community and enzymes activities in walnut orchards of the Qinling-Bashan Region [J]. Journla of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19 (5): 1224-1233.