

生物有机肥对田间蔬菜根际土壤中病原菌和功能菌组成的影响*

张 鹏 王小慧 李 蕊 冉 炜[†] 沈其荣

(南京农业大学农业部长江中下游植物营养与施肥重点实验室,江苏省固体有机废弃物资源化利用重点实验室,南京,210095)

摘 要 利用实时荧光定量 PCR 方法对田间条件下连作番茄和辣椒施用生物有机肥 (BOF) 和常规施肥 (CK) 的根际土壤微生物中青枯病原菌和功能菌群 (固氮菌和荧光假单胞菌) 的数量进行定量研究。结果表明:与 CK 相比,BOF 处理的番茄和辣椒产量分别提高了 26.0% 和 19.9%,青枯病发病率分别降低了 41.5% 和 44.7%,番茄和辣椒植株根际土壤固氮菌数量分别增加了 23.5% 和 25.8%、荧光假单胞菌数量分别增加了 29.5% 和 20.2%、病原菌数量分别减少了 73.2% 和 90.1%。生物有机肥能够调控根际微生物区系的组成,降低土传病害的发病率,促进作物健康生长;实时荧光定量 PCR 方法能够快速准确地检测根际土壤中功能微生物种群数量变化。

关键词 荧光定量 PCR;生物有机肥;根际土壤;青枯病;固氮菌;荧光假单胞菌

中图分类号 Q938.1

文献标识码 A

青枯病是由茄科劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的细菌性土传病害,茄科劳尔氏菌具有广泛的寄主,可侵染 50 多个科的 200 多种植物,其中马铃薯、番茄、烟草、辣椒等茄科作物受害最为严重^[1]。该病原菌可在土壤中存活多年并保持侵染能力,通过根部伤口侵染根并定殖于维管组织,引起木质部堵塞和叶萎蔫,直至整株死亡。连作容易诱发青枯病等土传病害。我国茄科作物集约化连作种植很普遍,由连作引起的土传病害问题已成为限制我国经济作物生产的主要因子^[2-3]。施用生物肥料,尤其是将有机肥与具有拮抗病原菌生长的功能微生物相结合制成生物有机肥,对青枯病等土传病害具较好的防治作用^[4-6],但田间条件下施用生物有机肥防治土传病害的机制尚待进一步研究。

根际土壤的功能微生物种群变化对土壤肥力、土壤物质转化和作物生长有重要的影响^[7]。根际土壤是位于受植物根系影响的根-土界面处的土壤,根际土壤微生物能够获得植物根系分泌的有机碳源和氮源,其中碳源可占植物光合产物的 40%^[8],影响根际土壤微生物群落结构和种群数量变化^[9]。未发病的或健康的植株与发病的或受胁迫的植株

产生的根系分泌物在种类和数量上有较大的差异^[10]。外源有机肥不仅提供了养分给植物使植物更加健康的生长,也提供养分和碳源给根际土壤微生物。施用生物有机肥对根际土壤功能微生物种群(包括土传病害微生物)的影响仍然不清楚。关于施用生物有机肥对连作障碍的根际土壤功能菌群微生物数量的影响方面报道较少。

利用 *nifH* 基因、*nosZ* 基因研究功能微生物菌群的报道很多^[11-15],但对功能菌群在土壤根际微生物区系中的数量进行绝对定量的报道较少。本文通过实时荧光定量 PCR 方法对根际土壤微生物中功能菌群(固氮菌和荧光假单胞菌)的数量进行定量检测,研究施用生物有机肥后对连作番茄和辣椒根际土壤青枯病原菌和功能菌群(固氮菌和荧光假单胞菌)的数量的影响,为生物有机肥防治土传病害的机理研究及利用生物有机肥修复连作障碍土壤提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 生物有机肥的制备

供试功能菌为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus*

* 江苏省科技支撑项目 (BE2009347)、国家基础研究发展规划“973”项目 (2011CB100503) 和广东省教育部产学研结合项目 (2010B090400431) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: ranwei@njau.edu.cn

作者简介:张 鹏(1986—),女,内蒙古人,硕士研究生,主要从事微主要事微生物肥料研究。E-mail: shangguanfeixuan@126.com

收稿日期:2012-03-02;收到修改稿日期:2012-07-02

amyloliquefaciens) QL-18,对青枯菌 QL-Rs1115 有较强的平板抑制作用^[4]。将 QL-18 菌株种子液按 1% 接种到 NA 液体培养基,30℃ 摇床振荡(170 r min⁻¹) 培养 24 h 后,菌液 5000 × g 离心 5 min,用无菌水重悬成 5 × 10⁹ cfu m⁻¹ 的菌液。供试有机肥为猪粪和菜粕有机肥,分别购自江苏田娘农业科技有限公司和江苏新天地肥料有限公司^[16]。将猪粪与菜粕有机肥按质量比 1:1 混后,按 20% (V/W) 的比例加入 QL-18 菌悬液进行固体发酵,发酵 5 ~ 7 d 后获得生物有机肥 BOF(拮抗菌含量达到 1 × 10⁹ 个 g⁻¹)。

1.2 田间实验设计

田间试验于 2010 年 7 月至 11 月在南京市麒麟镇后村蔬菜大棚进行,该地区种植番茄和辣椒等茄科作物,已有 10a 的青枯病发病史。试验以不施用生物有机肥的常规水肥管理为对照(CK),以施用生物有机肥(BOF)为单个处理,重复 3 次。每个小区面积为 100 m²,种植 250 棵苗。BOF 肥料采用穴施,施用量 25 g 穴⁻¹。供试番茄品种为合作 903,辣椒品种为苏椒 5 号。

1.3 供试样品

移栽后 45d 在每小区分别采集健康(healthy, H)和发病(Wilted, W)植株样品,即未施肥发病型(CK_w)、未施肥健康型(CK_h)、施肥发病型(BOF_w)和施肥健康型(BOF_h)。每个处理随机选取生长一致的 6 ~ 8 株植株毁灭性采样。将作物植株的地上部与地下部剪开,将挖取植株地下部根际周围 5 cm 范围的土壤(包括地下部)装入无菌自封袋,带回实验室。用手轻抖植物根系,抖下来的土壤为土体土,然后将根系(带土)放入离心管中,经超声波震荡,分离下来的土壤即为根际土。同一处理小区的健康和发病植株样品分别混合。用 DNA 提取试剂盒(MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA)提取根际土壤样品中总 DNA。

1.4 发病率和产量统计

作物移栽 25d 左右植株开始发病,移栽后 45 d 统计发病率,计算方法如下:

发病率 = 小区发病植株数 / 小区总植株数 × 100% ;

收获时分别计每小区产量,换算成 kg hm⁻²。

1.5 实时荧光定量 PCR

1.5.1 荧光定量 PCR 标准曲线的绘制 青枯菌的 Real-time qPCR 扩增所用引物为 Rsol-*fliC* primers (F:5'-GAA CGC CAA CGG TGC GAA CT-3'; R:5'-GGC GGC CTT CAG GGA GGT C-3'),扩增产物为

400bp^[17];用 CTAB 法^[18]提取青枯菌 QL-Rs1115 的总 DNA,用上述引物进行扩增并将基因片段纯化后与 TaKaRa PMD19-T Vector 连接试剂盒的 T 载体进行酶连,酶连产物用热激法转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5α 菌株中,用碱裂解法提取质粒^[18]。荧光假单胞菌的 Real-time qPCR 扩增所用引物为 *nosZ2F/nosZ2R*(5'-CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT-3';5'-CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA-3'),扩增产物为 267bp^[11];固氮菌的 Real-time qPCR 扩增所用引物为 *nifH-F/nifH-R*(5'-AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC-3';5'-TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC AT CAT-3'),扩增产物为 350bp^[12],荧光假单胞菌和固氮菌标准曲线绘制方法同青枯菌的一致,但是与 T 载体进行酶连的基因片段为上述的两对引物直接扩增土壤样品 DNA 所得。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测质粒浓度和纯度,将阳性质粒依次稀释 10 倍成 8 个浓度梯度,每个梯度 3 次重复,最后选取扩增效率高 5 ~ 6 个梯度用于标准曲线的制备。阴性对照以无菌超纯水代替。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 的反应条件 采用 TaKaRa 公司的实时荧光 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 在 ABI 7500[™] 实时荧光定量 PCR 检测仪上运行,扩增反应体系为 20 μl,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 ×) 10 μl,ROX Reference Dye(50 ×) 0.4 μl,上下游引物(10 mmol L⁻¹) 各 0.4 μl,DNA 模板 2 μl,双蒸水 6.8 μl。反应程序:95℃ 30s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。熔解曲线步骤为:95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。扩增效率(E)的计算根据公式 E = 10^{-1/斜率 - 1},扩增效率一般为 0.9 - 1.2,其越接近 1.0,越理想。

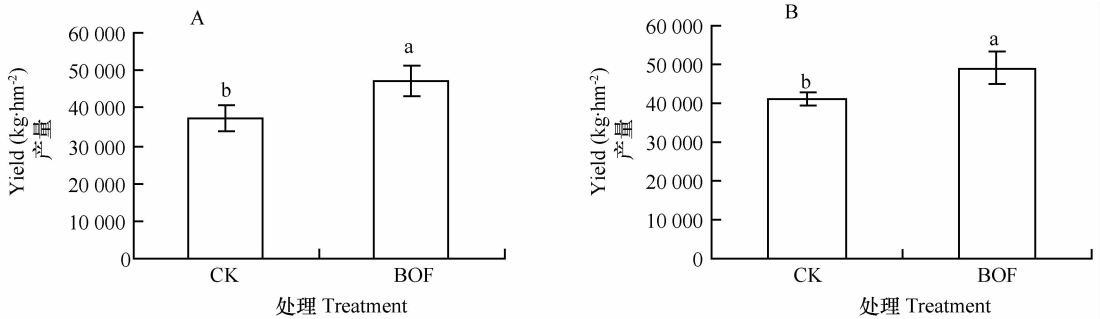
1.6 数据处理

数据统计分别使用 SPSS 13、7500 System Software 软件完成,采用邓肯氏新复极差法检验各处理间差异显著性。

2 结 果

2.1 不同处理的番茄和辣椒产量

由图 1 可知,施用生物有机肥能显著提高作物产量。BOF 的番茄产量是 CK 番茄产量的 1.26 倍,BOF 的辣椒产量是 CK 辣椒产量的 1.20 倍,处理 BOF 的番茄和辣椒产量与处理 CK 的产量存在显著差异($p < 0.05$)。



注:处理间不同字母表示显著差异($p < 0.05$),下同 Note: Different letters mean significant difference between treatments at 0.05 level. The same below

图1 施用生物有机肥 BOF 对番茄(A)和辣椒(B)产量的影响

Fig. 1 Effect of application of BOF on yields of tomato (A) and pepper (B)

2.2 不同处理的番茄和辣椒发病率

由图2可知,施用生物有机肥能显著降低连作

土壤青枯病的发病率。番茄处理 CK 的发病率达到 42.67%,为处理 BOF 的 1.71 倍;辣椒处理 CK 的发病率为 34.27%,为处理 BOF 的 1.81 倍。

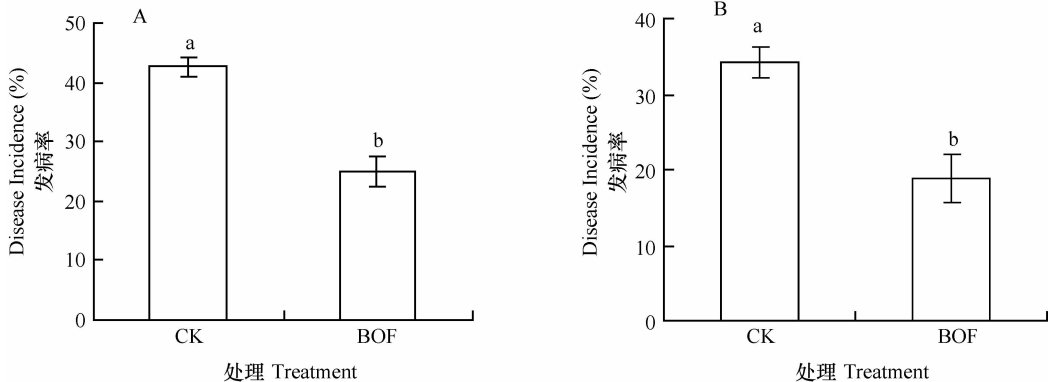


图2 施用生物有机肥 BOF 对番茄(A)和辣椒(B)青枯病发病率的影响

Fig. 2 Effect of application of BOF on incidence of bacterial wilt on tomato (A) and pepper (B)

2.3 番茄和辣椒根际土壤中青枯病原菌数量

从图3可知,番茄的处理 CK_w 的病原菌数量达到了 8.62×10^7 copies g⁻¹ soil,显著高于其他处理的病原菌数量,处理 BOF_b 的病原菌数量为 6.51×10^5 copies g⁻¹ soil,显著低于其他处理的病原菌数量,处理 CK_b、BOF_b 和处理 CK_w、BOF_w 分别比较可知,健康根际土病原菌的数量上低于发病根际土病原菌数量 1~2 个数量级,处理之间存在显著差异;施用 BOF 的番茄和辣椒的根际土壤病原菌数量减少了 73.2%~90.1%。荧光定量 PCR 茄科劳尔氏菌标准曲线方程为 $y = -3.294x + 44.925$, $R^2 = 0.999$,扩增效率(E)为 1.01。

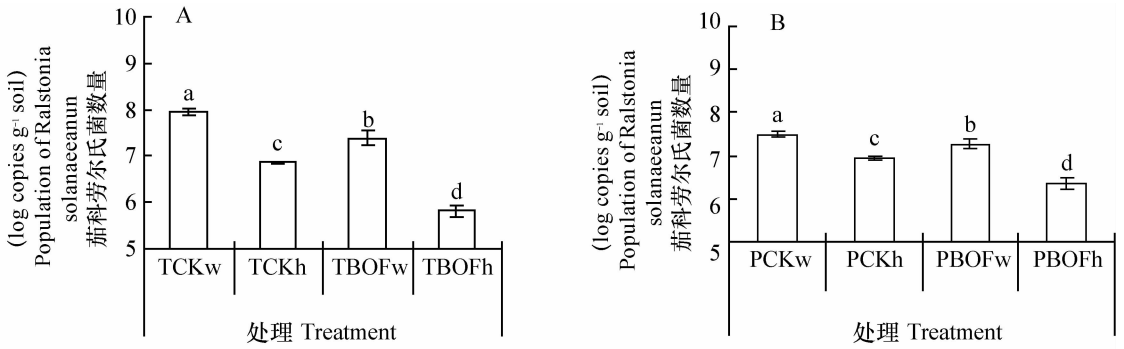
2.4 生物有机肥对番茄和辣椒根际功能菌数量的影响

2.4.1 番茄和辣椒根际土壤中固氮菌的数量

由图4可知,番茄和辣椒的处理 BOF_b 根际土壤中固

氮菌的数量为 1.42×10^5 copies g⁻¹ soil 和 1.01×10^5 copies g⁻¹ soil,分别是处理 CK_b 的 1.20 倍和 1.16 倍;处理 CK_b、CK_w 和处理 BOF_b、BOF_w 分别比较可知,健康根际土固氮菌的数量上高于发病根际土固氮菌数量 1~2 个数量级,处理之间存在显著差异;施用 BOF 的番茄和辣椒的根际土壤固氮菌数量分别增加了 23.5% 和 25.8%。荧光定量 PCR 固氮菌标准曲线方程为方程 $y = -3.043x + 38.531$, $R^2 = 0.996$,扩增效率(E)为 1.13。

2.4.2 番茄和辣椒根际土壤中荧光假单胞菌的数量 由图5可知,番茄和辣椒的处理 BOF_b 根际土壤中荧光假单胞菌的数量为 5.18×10^7 copies g⁻¹ soil 和 2.0×10^7 copies g⁻¹ soil,分别是处理 CK_b 的 1.06 倍和 1.12 倍,处理 CK_b、BOF_b 和处理 CK_w、BOF_w 分别比较可知,健康根际土荧光假单胞菌的



注Note:TCKw: 未施用生物有机肥的发病番茄型 Wilt-infected tomato without application of BOF; TCKh: 未施用生物有机肥的健康番茄型 Healthy tomato without application of BOF; TBOFw: 施用生物有机肥的发病番茄型 Wilt-infected tomato with application of BOF; TBOFh: 施用生物有机肥的健康番茄型 Healthy tomato with application of BOF. PCKw: 未施用生物有机肥的发病辣椒型 Wilt-infected pepper without application of BOF; PCKh: 未施用生物有机肥的健康辣椒型 Healthy pepper without application of BOF; PBOFw: 施用生物有机肥的发病辣椒型 Wilt-infected pepper without application of BOF; PBOFh: 施用生物有机肥的健康辣椒型 Healthy pepper without application of BOF. The same below

图 3 生物有机肥对番茄(A)和辣椒(B)根际土壤中青枯病原菌数量的影响

Fig. 3 Effect of application of BOF on population of *Ralstonia solanacearum* in the rhizospheric soils of tomato (A) and pepper (B)

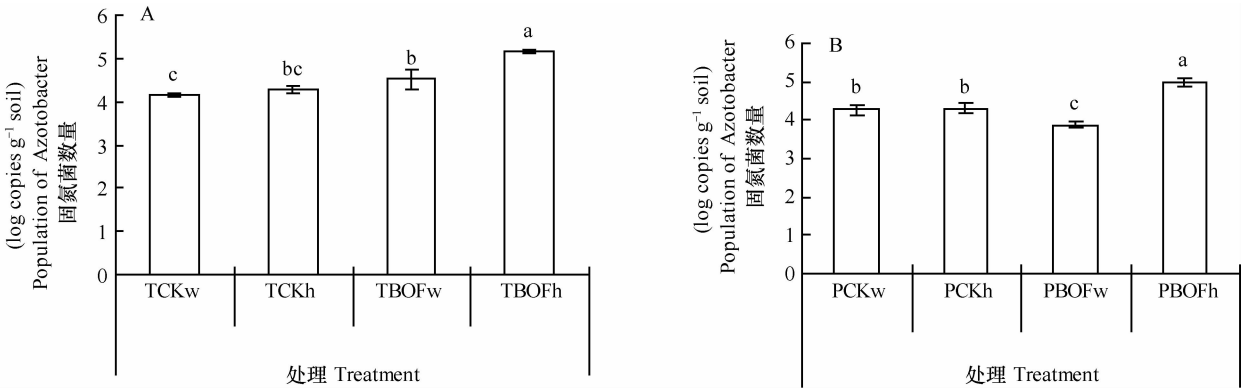


图 4 生物有机肥对番茄(A)和辣椒(B)根际土壤中固氮菌数量的影响

Fig. 4 Effect of application of BOF on population of *Azotobacter* in the rhizospheric soils of tomato (A) and pepper (B)

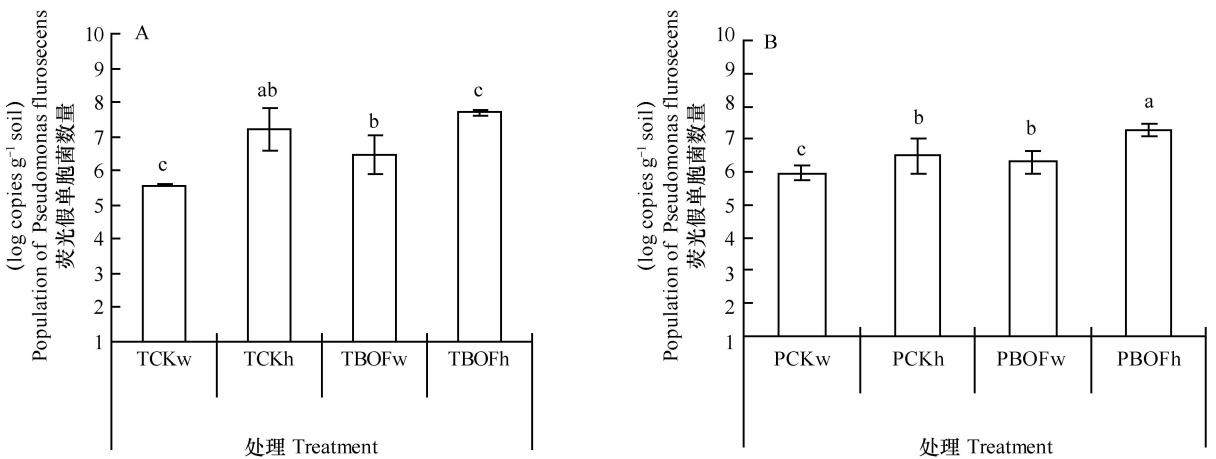


图 5 生物有机肥对番茄(A)和辣椒(B)根际土壤中荧光假单胞菌数量的影响

Fig. 5 Effect of application of BOF on population of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizospheric soils of tomato (A) and pepper (B)

数量上高于发病根际土病原菌数量 1 个数量级,处理之间存在显著差异;施用 BOF 的番茄和辣椒的根际土壤荧光假单胞菌数量分别增加了 29.5% 和 20.2%。荧光定量 PCR 荧光假单胞菌标准曲线方程为方程 $y = -3.530x + 50.640$, $R^2 = 0.999$, 扩增效率(E)为 0.92。

3 讨 论

实时荧光定量 PCR 具有灵敏度高,特异性强,自动化程度高和有效解决 PCR 污染问题等优点,该方法不必因模板不同而特别定制,试验设计简单,成本低廉,可用于多种目标基因的检测^[19]。实时荧光定量 PCR 技术应用于植物病原细菌的检测之后,有效地提高了检测速度和水平,检测的灵敏度也比一般的检测方法高出 100 倍左右,简化实验操作步骤,缩短检测时间^[20]。在根际土壤中的微生物菌群由于吸收基因表达量很低,很难进行精确定量,传统 PCR 在扩增反应结束之后通过凝胶电泳的方法或者通过对光密度扫描只能进行半定量分析,不能确保 PCR 产物信号与初始模板的拷贝数成比例,但是实时荧光定量 PCR 技术实现了对低拷贝基因表达量的快速、准确定量,使得检测根际土壤中的微生物菌群数量变化更加准确和便捷^[13-15]。

凌宁等^[21]对西瓜的研究也表明施用生物有机肥能显著降低西瓜发病率和促进西瓜植株的生长,增加其产量。施用 BOF 能够减少作物根际土壤中病原菌的数量,有效地防止青枯病的发生,减少根际病原菌的数量,保护植株免受病原菌侵染^[22-24]。杨合同等^[25]以荧光假单胞菌 P32 处理小麦种子,发现具有防病作用的菌株能在幼根表面形成一层均匀的保护层,说明荧光假单胞菌在根部定殖时保护了病原菌的侵染位点,降低侵染机会。

植物根际是一个很特殊的微生态区域,由于受根系生长及其分泌物的影响,根际微生态区域土壤微生物的数量和种群结构显著不同于非根际土壤^[26]。施用生物有机肥能够提高作物根际土壤中的固氮菌和荧光假单胞菌的数量,固氮菌为植物提供氮素,产生植物激素(如生长素、赤霉素、细胞分裂素等)促进植物生长,固氮菌能有效积累氮素,将固定的氮素直接提供给植物吸收同化,由于细菌的生命周期比植物短得多,细菌死亡崩解后释放的有机氮也能逐步为植物根系吸收^[27-28]。有些固氮菌还可以产生植物激素,影响宿主根的呼吸速率和代

谢并刺激侧根生长,从而在不同的环境和土壤条件下促进植物的生长^[29]。根际土壤中的荧光假单胞菌可以提高根系周围土壤中的物质降解,提高土壤肥力,促进根系生长,进而提高根系活力,使根系生长量显著增大^[30],而健壮根系又有利于根际土壤微生物数量的增加,改变根际微生物区系的组成,根际微生物反过来又通过对根围物质的转化和吸收作用影响根系的生长。由于植物地上部分和地下部分生长具有相关性,因而进一步影响植株地上部分的生长,它们之间是相互依存、相互获益的^[31]。

4 结 论

本文在田间条件下进行的施肥试验表明,从产量、病害发生率和根际病原菌和功能菌组成来看,施用生物有机肥显著优于常规施肥,因此,生物有机肥能够调控根际微生物区系的组成,降低土传病害的发病率,促进作物健康生长;实时荧光定量 PCR 方法对根际土壤中相关基因片段的扩增效率理想,检测到了不同植株根际土壤中功能菌群的显著差异,可用于快速准确检测土壤中功能微生物种群的动态变化。

参 考 文 献

- [1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65—87
- [2] He L Y, Sequeira L, Kelman A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*, 1983, 67(12): 1357—1361
- [3] Hoitink H A J, Boehm M J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 1999, 37: 427—446
- [4] Wei Z, Ran W, Xu Y, et al. Efficacy of *Bacillus-fortified* organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Appl Soil Ecol*, 2011, 48: 152—159
- [5] 江欢欢,程凯,沈其荣,等. 辣椒青枯病拮抗菌的筛选及其生物防治效应. *土壤学报*, 2010, 47(6): 1225—1231. Jiang H H, Cheng K, Shen Q R, et al. Isolation and biological effect of capsicum wilt antagonist (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(6): 1225—1231
- [6] 蔡燕飞,廖宗文,章家恩,等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响. *应用生态学报*, 2003, 14(3): 349—353. Cai Y F, Liao Z W, Zhang J E, et al. Effect of ecological or ganicfertilizer on tomato bacterial wilt and soil microbial diversities (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(3): 349—353
- [7] Bowen G D, Rovira A D. The rhizosphere and its management to

- improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 1999, 66:1—102
- [8] Lynch J M, Whipps J M. Substrate flow in the rhizosphere// Keister D L, Creagan P B. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991
- [9] Brimecombe M J, De Leij FA, Lynch J M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations//Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P. The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. New York: Marcel Dekker, 2001
- [10] Farrar J, Haes D, Jones D, et al. How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. *Ecology*, 2003, 84:827—837
- [11] Henry S, Bru D, Stres B, et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(8):5181—5189
- [12] Roßsch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(8):3818—3829
- [13] Wartiaainen I, Eriksson T, Zheng Wei W, et al. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*, 2008, 39(1):65—75
- [14] Skovhus T L, Ramsing N B, Holmstrom C, et al. Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. *Appl Environ Microb*, 2004, 70(4):2373—2382
- [15] Widmer F, Seidler R J, Gillevet P M, et al. A Highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) in environmental samples. *Appl Environ Microb*, 1998, 64(7):2545—2553
- [16] 朱震, 冉炜, 沈其荣, 等. 拮抗菌生物有机肥对番茄根结线虫的防治作用. *应用生态学报*, 2011, 22(4):1033—1038. Zhu Z, Ran W, Shen Q R, et al. Controlling effect of antagonist bioorganic fertilizer on tomato root-knot nematode (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4):1033—1038
- [17] Scholifeld J, Heuer H, Elsas J D, et al. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanaceae* in the soil on the basis of PCR amplification of *filC* fragments. *Appl Environ Microb*, 2003, 69(12):7248—7256
- [18] 萨姆布鲁克 J. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002. Sambrook J. Huang P T, et al. trans. *Molecular cloning: A laboratory manual* (In Chinese). Beijing: Science Press, 2002
- [19] 赵爽, 罗佳, 凌宁, 等. 基因宏阵列和荧光定量 PCR 方法对西瓜枯萎病土壤尖端镰刀菌的快速检测和定量. *土壤学报*, 2010, 47(7):704—708. Zhao S, Luo J, Ling N, et al. Quick check and quantification of in soil with macroarray and real-time PCR method (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(7):704—708
- [20] 徐小刚, 刘雅婷. 实时荧光定量 PCR 在植物病害中的应用. *中国农学通报*, 2009, 25(7):52—56. Xu X G, Liu Y T. Application of real-time fluorescence quantitative PCR in plant disease (In Chinese). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(7):52—56
- [21] 凌宁, 王秋君, 沈其荣, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(5):1136—1141. Ling N, Wang Q J, Shen Q R, et al. Control of *Fusarium* wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer (In Chinese). *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(5):1136—1141
- [22] Gabriele B, Christin Z, Jana L. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl Environ Microb*, 2005, 71:4203—4213
- [23] Garmendia I, Aguirreolea J, Goicoechea N. Defence-related enzymes in pepper roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and or *Verticillium dahliae*. *BioControl*, 2006, 51:293—310
- [24] Müller H, Berg G. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oil-seed rape. *BioControl*, 2008, 53:905—916
- [25] 杨合同, 王少杰, 许勃. 荧光假单胞菌与植物病害生物防治. *山东科学*, 1993, 6(9):50—56. Yang H T, Wang S J, Xu B. *Fluorescent pseudomonads* and biocontrol of plant diseases (In Chinese). *Shan Dong Science*, 1993, 6(9):50—56
- [26] 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. *土壤*, 2007, 39(4):604—607. Zhang L P, Huang Y L, Cheng H C, et al. Disease control with bio-preparation in continuous cropping of strawberry (In Chinese). *Soils*, 2007, 39(4):604—607
- [27] 王树凤, 陈益泰. 非豆科植物固氮菌-Frankia 的基因组研究进展. *土壤*, 2005, 37(4):382—387. Wang S F, Chen Y T. Advances in research on genomes of Frankia (In Chinese). *Soils*, 2005, 37(4):382—387
- [28] 卢秉林, 王文丽, 李娟, 等. 自生固氮菌的固氮能力及其对春小麦生长发育的影响. *中国生态农业学报*, 2009, 17(5):895—899. Lu B L, Wang W L, Li J, et al. Nitrogen fixation ability of azotobacter and its effect on growth of spring wheat (In Chinese). *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009, 17(5):895—899
- [29] 祁永青, 刁治民, 刘涛, 等. 联合固氮菌对植物促生作用的研究进展. *青海草业*, 2008, 17(12):22—28. Qi Y Q, Diao Z M, Liu T, et al. Review on studies of associated nitrogen fixing bacteria and growth promoting effect to plant (In Chinese). *Qing Hai Prataculture*, 2008, 17(12):22—28
- [30] 陈武, 何命军, 易建华, 等. 三株拮抗菌对烟草幼苗根系活力的影响. *湖南农业科学*, 2005(4):26—29. Chen W, He M J, Yi J H, et al. The impact of three anti-biotic bacteria strains on the root activity of tobacco seedling (In Chinese). *Hunan Agricultural Sciences*, 2005(4):26—29
- [31] 冯莉, 张玲华, 田兴山. 荧光假单胞菌对烟草根际微生物种群数量及根系活力的影响. *农业环境科学学报*, 2007, 26:537—539. Feng L, Zhang L H, Tian X S. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on rhizosphere microorganisms and root activity of tobacco (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26:537—539

EFFECT OF BIO-ORGANIC FERTILIZER ON PATHOGENIC AND FUNCTIONAL BACTERIA COMPOSITION IN RHIZOSPHERIC SOIL OF FIELD VEGETABLES

Zhang Peng Wang Xiaohui Li Rui Ran Wei[†] Shen Qirong

(Agricultural Ministry Key Lab of Plant Nutrition and Fertilization in Low-Middle Reaches of the Yangtze River; Jiangsu Key Lab and Engineering Center for Solid Organic Waste Utilization; Nanjing Agricultural University, 210095, China)

Abstract Populations of pathogenic *Ralstonia solanacearum* and functional bacteria groups in the rhizospheric soils of continuous cropping tomato and pepper applied with a kind of bio-organic fertilizer (BOF) and with conventional fertilizer (CK) were studied using the real-time quantitative PCR techniques. As compared with CK, BOF increased the yields of tomato and pepper by 26.0% and 19.9%, respectively, and decreased the incidence of bacterial wilt on tomato and pepper by 41.5% and 44.7%, respectively. BOF increased the population of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* by 23.5% and 29.5%, and by 25.8% and 20.2%, and decreased the population of *R. solanacearum* by 73.2% and by 90.1%, respectively, in the rhizospheric soil of healthy tomato and pepper. In conclusion, the bio-organic fertilizer is capable of regulating the composition of microflora in rhizosphere soil of crops, reducing the incidence of soil-borne plant disease, and promoting plant growth. Real time PCR techniques are quick and accurate in determination of the population of functional microbes in soil.

Key words Bio-organic fertilizer; Real-time qPCR; Rhizosphere soil; Bacterial wilt; *Azotobacter*; *Pseudomonas fluorescens*

(责任编辑:过 园)