

微生物有机肥结合土壤改良剂防治烟草青枯病*

王丽丽¹ 石俊雄² 袁赛飞¹ 吴凯¹ 蔡刘体² 刘艳霞²
杨兴明¹ 冯勇刚² 沈标^{1†} 沈其荣¹

(1 南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术重点实验室, 南京 210095)

(2 贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550081)

摘要 盆栽试验设置了五个处理: 对照 (T1)、施用普通有机肥 (T2)、施用 SQY-7 号微生物有机肥 (T3)、石灰处理土壤后施用 SQY-7 号微生物有机肥 (T4)、石灰和碳铵处理土壤后施用 SQY-7 号微生物有机肥 (T5), 用 DGGE 和平板计数法研究了根际土壤微生物群落的多样性, 旨在探讨微生物有机肥及微生物有机肥结合土壤改良剂对烟草青枯病的防治效果和对烟草根际土壤细菌群落多样性的影响。结果表明: 连作土壤中, 施用普通有机肥 (T2) 不仅不能防治烟草青枯病, 还提高了烟草青枯病的病情指数, 而施用微生物有机肥处理 (T3、T4 和 T5) 对烟草青枯病的防治效果分别达 66.7%~87.9%; 施用微生物有机肥可显著改变根际微生物区系结构; T2 处理的根际土壤细菌和放线菌数量较 T1 处理略有增加, 真菌数量则较 T1 处理增加了 1.1 倍; T3 和 T4 处理的根际土壤细菌分别较 T1 处理增加了 3.5 倍和 6.1 倍, 同时, 放线菌数量分别增加了 3.7 倍和 3.5 倍, 而真菌数量分别下降了 66.2% 和 70.1%; T5 处理的根际土壤细菌和放线菌数量较 T1 处理分别增加了 13.6 倍和 5.1 倍, 真菌数量下降了 75.0%; 各处理的细菌群落多样性均较 T1 处理增加。初步研究表明, 连作病害土壤用石灰和碳铵预处理后再施用 SQY-7 号微生物有机肥能有效防控烟草青枯病和减缓连作生物障碍, 其作用机制主要通过改变微生物区系和降低病原菌数量实现。

关键词 烟草青枯病; 微生物有机肥; 微生物区系分析; 连作土壤; 土壤改良剂

中图分类号 S154.38 **文献标识码** A

烟草属于双子叶植物纲 (Dicotyledoneae) 茄科 (Solanaceae) 植物, 具有很高的经济价值, 是烟区农民收入、地方财政和国家税收的重要来源之一^[1]。烟草青枯病是由茄科劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)^[2-3] 引起的维管束病害, 是一种毁灭性土传细菌病害^[4-6], 其分布广、危害重^[7], 严重影响烟草的产量与品质^[8]。

目前防治烟草青枯病的方法主要包括提高烟株的抗性、实施耕地控制和药剂防治等^[9]。提高烟株抗性是防治青枯病最经济有效的方法, 但烟株的抗性受很多因素影响, 例如我国的主栽品种 K326, 随着种植期延长, 病菌致病力发生变化, 其抗性正在丧失^[10]。化学药剂防治青枯病虽然能起到一定的作用, 但是长期大量施用化学药剂容易使细菌产生抗药性, 引起土壤质地的变化, 造成环境污染和烟草的药剂残留, 严重影响人体健康^[6]。生物防治

由于其对环境、生态和人畜的安全性而受到了国内外研究者的广泛关注^[11], 如丁传雨等^[12]报道的 BIO-36 有机肥和 BIO-23 有机肥防治效果分别达到 96% 和 91%, 李双喜等^[13]的研究表明土壤中施入微生物有机肥, 既能改善根际微生态环境, 增加微生物数量, 促进根系生长和对养分的吸收, 又能改变土壤微生物区系, 增强西瓜抗病性。研究表明, 若从病害的原位土壤中分离筛选出对病原菌具有拮抗效果的微生物制成微生物有机肥来防治土传病害, 在防病的同时还可以改善和修复土壤生态环境, 减少化肥和农药的使用, 实现烟草生产的可持续发展^[14]。此外, 土壤改良剂能对土壤理化性质产生改变, 影响土壤微生物, 降低病原菌数量^[15-16]。

本研究从烟草土传青枯病发病严重的大田健康植株根际土壤中筛选到一株拮抗烟草青枯病菌的细菌, 经鉴定为芽孢杆菌属, 将该拮抗菌制成微

* “十二五”公益性行业 (农业) 科研专项经费 (201103004)、中国烟草总公司重点项目 (11020100219) 和

† 通讯作者, 通讯作者, E-mail: shenbiao@njau.edu.cn

作者简介: 王丽丽 (1987—), 女, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物分子生物学和植物营养与病害研究。E-mail: wanglili531@163.com

收稿日期: 2011-12-21; 收到修改稿日期: 2012-03-27

生物有机肥,结合石灰、石灰和碳铵等土壤改良方法应用于烟草上,不仅可以很好地防治烟草土传青枯病害,还可以对连作障碍土壤进行生态修复。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验烟草为红花大金元,土壤改良剂为石灰和碳铵,均为贵州烟草科学研究所提供。

盆栽土壤为连续种植烟草的大田连作土壤(取自贵州省福泉市皂角井长期种植红花大金元且青枯病发病率高达 100% 的连作土壤)。

拮抗菌为本实验室筛选的一株高效拮抗细菌 SQY-7,经鉴定为 *Bacillus amyloliquefaciens*。本试验所用肥料为实验室研制的普通有机肥和微生物有机肥。普通有机肥为氨基酸有机肥料和猪粪堆肥按一定比例混合而成,微生物有机肥则是在有机肥的基础上加入拮抗菌 SQY-7 经二次固体发酵而成。普通有机肥含有 $\text{N} 0.417 \text{ g kg}^{-1}$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5 0.297 \text{ g kg}^{-1}$ 、 $\text{K}_2\text{O} 0.093 \text{ g kg}^{-1}$,微生物有机肥含有 $\text{N} 0.406 \text{ g kg}^{-1}$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5 0.286 \text{ g kg}^{-1}$ 、 $\text{K}_2\text{O} 0.086 \text{ g kg}^{-1}$,SQY-7 数量达到 $8 \times 10^8 \text{ cfu g}^{-1}$ 肥料。

1.2 试验设计

盆栽试验在贵州省烟草科学研究所温室进行(5月13日~8月21日),试验设置5个处理,10个重复,每盆装10kg烟草连作病土。5个处理分别为:1)T1:按常规施用当地烟草专用无机复合肥(50 g 株^{-1} ,N:P₂O₅:K₂O比例为8:10:22);2)T2:在T1的基础上加1.5%自行研制的普通有机肥;3)T3:在T1的基础上加1.5%自行研制的微生物有机肥;4)T4:在移栽前对土壤用石灰(100 g 盆^{-1})进行处理,用薄膜覆盖10d,揭膜使土壤透气3d,然后按T3处理;5)T5:在移栽前对土壤用石灰和碳铵(石灰 100 g 盆^{-1} +碳铵 50 g 盆^{-1})进行处理,用薄膜覆盖10d,揭膜使土壤透气3d,补足与T1相同的NPK肥(尿素 2.14 g 盆^{-1} ,磷酸二氢钾 9.48 g 盆^{-1} ,硫酸钾 14.31 g 盆^{-1}),再加1.5%微生物有机肥。

1.3 病情调查

自移栽后40d出现第一株发病植株起,每天记录病情状况,并每隔5d详细调查记录直至烟草成熟期。烟草青枯病的发病率、病情指数和防治效果按下式计算:发病率=处理发病植株/调查植株总数 $\times 100\%$,病情指数按照中华人民共和国烟草行业标准烟草病害分级及调查方法^[17]调查:0级:全病

无病;1级:茎部偶有退绿斑,或在有条斑一侧有少数叶片凋萎;2级:茎有黑色条斑,但尚未达到顶部,或病侧1/2以上叶片凋萎;3级:茎部黑色条斑到达株顶部,或病侧2/3以上叶片凋萎;4级:病株基本枯死。病情指数= $[\sum(\text{病情级数} \times \text{此级菌株数}) / (\text{最高级数} \times \text{总株数})] \times 100$,防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数 $\times 100\%$ 。

1.4 根际微生物区系数

试验结束后每个处理随机选取生长一致的3个盆钵植株,取其根际土混合,用稀释平板法对微生物区系进行计数。NA、高氏一号和马丁氏培养基^[18],分别用于根际土壤中的细菌、放线菌和真菌总数测定。

1.5 PCR-DGGE

1.5.1 土壤样品采集 分别在移栽后第7天(移栽后约7~10天为还苗期)、第25天(移栽后约10~30天为伸根期)、第50天(移栽后30~60天为旺长期)、第90天(移栽后60天以后为成熟期)采集土壤样品,每个处理随机选取3个重复,采其根际土。

1.5.2 PCR-DGGE 方法 PCR引物采用16S rRNA基因V3区引物GC-338F和518R^[19](GC-338F:5'-CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGGCGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3',518R:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。PCR体系包括2.5 μl 10 × PCR buffer(含有Mg²⁺),2 μl 2.5 mmol L⁻¹ dNTP mixture,0.3 μl的Ex Taq polymerase(5 U μl⁻¹,TaKaRa),引物各0.5 μl,模板1 μl,最后加入ddH₂O补足至25 μl。PCR反应程序:94℃预变性7 min,进入热循环,包括94℃变性30 s,61℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环,最后72℃延伸7 min。DGGE条件:DGGE电泳仪为D-code突变检测系统(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(Bio-Rad)分析结果。

1.6 数据处理

Shannon-Wiener多样性指数(H)^[20]的计算是基于DGGE条带的位置和条带的强度,而条带的强度则通过条带的峰面积来表示。计算公式为: $H = - \sum P_i \ln P_i = - \sum (N_i/N) \ln(N_i/N)$,式中,N_i为峰面积,N为所有峰的总面积。

试验数据采用SPSS13.0 statistic software进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同处理对烟草青枯病的防治效果

从表 1 可看出, T1 和 T2 处理的烟株发病率均为 100%, 说明施用烟草专用无机复合肥和普通有机肥在烟草青枯病发病率上没有差异, T2 处理的病情指数反而增加, 说明普通有机肥对防治烟草青枯病没有效果。与 T1 和 T2 处理相比,

T3 处理可以显著降低烟草青枯病的发病率, 其发病率为 50%, 防治效果为 66.7%, 说明施用微生物有机肥对防治烟草青枯病具有显著效果。而 T4 处理的烟草青枯病发病率仅 40%, 防治效果达到 81.8%。T5 处理烟草青枯病的发病率仅 20%, 防治效果达到 87.9%。表明对于土传病害严重的土壤, 先进行土壤预处理, 然后再施用微生物有机肥能有效控制连作土壤烟草青枯病的发生。

表 1 不同处理对烟草青枯病的防治效果

Table 1 Effects of different treatments controlling tobacco bacterial wilt

处理 Treatment	发病率 Incidence (%)	病情指数 Disease index (%)	防治效果 Control effect (%)
T1	100	82.5	—
T2	100	85.0	-2.9
T3	50	27.5	66.7
T4	40	15.0	81.8
T5	20	10.0	87.9

2.2 不同处理对烟草根际土壤微生物区系的影响

由表 2 可知, 与 T1 相比, T2、T3、T4 和 T5 处理的细菌和放线菌数量均有所增加, T2 处理的真菌数量较 T1 有所增加, 而 T3、T4 和 T5 的真菌数量均有所下降。T2 处理细菌和放线菌数量较 T1 略有增加, 真菌数量增加了 1.1 倍, 表明普通有机肥的使用也能在一定程度上促进根际微生物的生长; T3 和 T4 处理的根际土壤细菌分别较

T1 增加了 3.5 倍和 6.1 倍, 放线菌数量分别增加了 3.7 倍和 3.5 倍, 而真菌数量分别下降了 70.1% 和 66.2%, 表明施用微生物有机肥能很大程度上改变土壤微生物区系; T5 处理的根际土壤细菌和放线菌数量较 T1 分别增加了 13.6 倍和 5.1 倍, 真菌数量下降了 75.0%。表明用石灰和碳铵预处理土壤后, 再施用微生物有机肥能显著改变连作土壤区系。

表 2 不同处理对烟草根际土壤中微生物区系的影响

Table 2 Effects of different treatments on soil microbial population in tobacco rhizosphere

处理 Treatment	细菌 Bacteria ($\times 10^7$ cfu g^{-1} soil)	真菌 Fungi ($\times 10^4$ cfu g^{-1} soil)	放线菌 Actinomycetes ($\times 10^5$ cfu g^{-1} soil)
T1	4.7 \pm 4.2c	6.8 \pm 0.9ab	1.8 \pm 1.6b
T2	5.4 \pm 2.4c	14.3 \pm 9.3a	2.7 \pm 2.0b
T3	21.3 \pm 5.8bc	2.0 \pm 1.2b	8.5 \pm 6.4ab
T4	33.3 \pm 4.5b	2.3 \pm 1.6b	8.1 \pm 5.1ab
T5	68.7 \pm 20.1a	1.7 \pm 0.2b	10.9 \pm 1.0a

注: 平均值 \pm 标准差。同列数值后不同字母表示差异达 5% 差异水平
Note: Means \pm SE. Values followed by different letters in the same column mean significant difference at 5% level

2.3 不同生育期各处理烟草根际土壤细菌群落多样性变化

2.3.1 烟草还苗期根际土壤细菌群落多样性变化

对烟草还苗期根际土壤细菌群落进行了

DGGE 图谱分析(图 1A), 细菌群落在种类和数量上均发生了变化, 各处理中均有青枯菌的存在, 但是从丰度看各处理间无明显差异。对各处理的 DGGE 图谱进行相似性分析(图 2A), 结果表明, T1 和 T2

单独成为一个族群,T4与组成一个族群的T3和T5组成一个族群,表明在还苗期,使用微生物有机肥的处理其微生物群落结构和对照及使用普通有机肥的处理已经有显著不同。

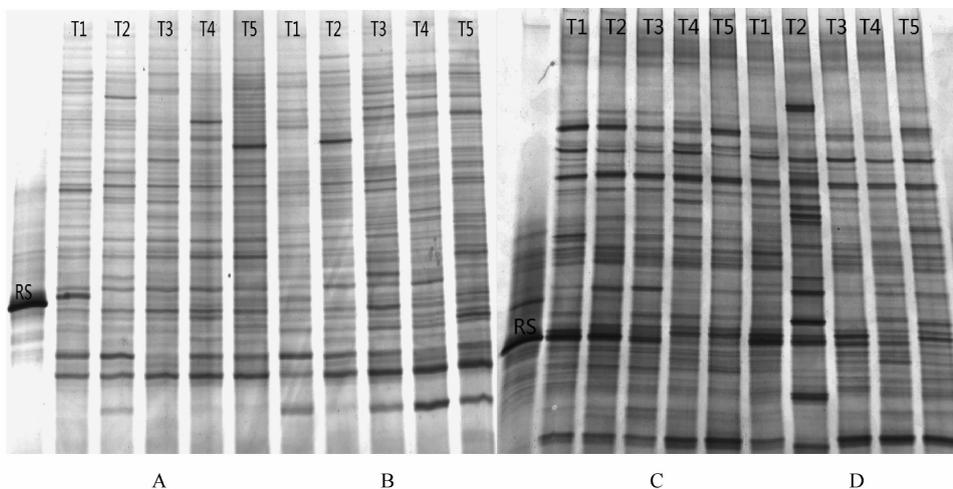
2.3.2 烟草伸根期根际土壤细菌群落多样性变化 在烟草伸根期对根际土壤细菌群落进行 DGGE 分析(图 1B),结果表明,5 个处理均检测到了青枯菌的存在,但是从丰度看各个处理间仍没有明显的差异。各处理的 DGGE 图谱相似性分析结果(图 2B)表明在伸根期 T1 单独为一个族群,与其他处理间差异巨大;T2 和 T3 两者组成一个族群;而 T4 和 T5 与其他处理之间的差异较大,表明用石灰或石灰-碳铵进行预处理对土壤细菌群落具有重要影响。

2.3.3 烟草旺长期根际土壤细菌群落多样性变化 对旺长期烟草根际土壤细菌群落进行 DGGE 分析(图 1C),结果表明,在 5 个处理中均有青枯菌的存在,但是各处理间青枯菌数量有较明显的差异,T1 和 T2 青枯菌条带较亮,T3 的青枯菌条带次之,而 T4 和 T5 的青枯菌条带较弱。说明 SQY-7 有效抑制了烟草旺长期青枯病原菌的生长与繁殖,若用石灰或者石灰-碳铵对其进行预处理,其抑制效果更加明显。对各处理的 DGGE 图谱进行相似性分析结果(图 2C)表明,T1 和 T2 的相似性较高,两者组成一个族群;T3 和 T4 两者组成一个族群;而 T5 为单独一个族群,表明 T5 的细菌多样性与其他 4 个处理的差异很大。

2.3.4 烟草成熟期根际土壤细菌群落多样性变化 在烟草成熟期,对烟草根际土壤细菌群落进

行 DGGE 分析(图 1D),对各处理的 DGGE 图谱进行相似性分析(图 2D),结果表明,T1 和 T2 组成一个族群,T3 和 T4 组成一个族群,T5 与组成一个族群的 T3 和 T4 组成一个族群,说明使用普通有机肥对微生物种群结构影响不大,而使用微生物有机肥显著影响了微生物种群结构。同时 5 个处理间均有青枯菌的存在,T1 和 T2 青枯菌条带最亮,T3 其次,T5 最暗。说明 SQY-7 有效抑制了烟草青枯病原菌的生长与繁殖,若用石灰或者石灰-碳铵对其进行预处理,其效果更加明显,其中石灰-碳铵-微生物有机肥处理抑制效果较石灰-微生物有机肥处理效果明显。

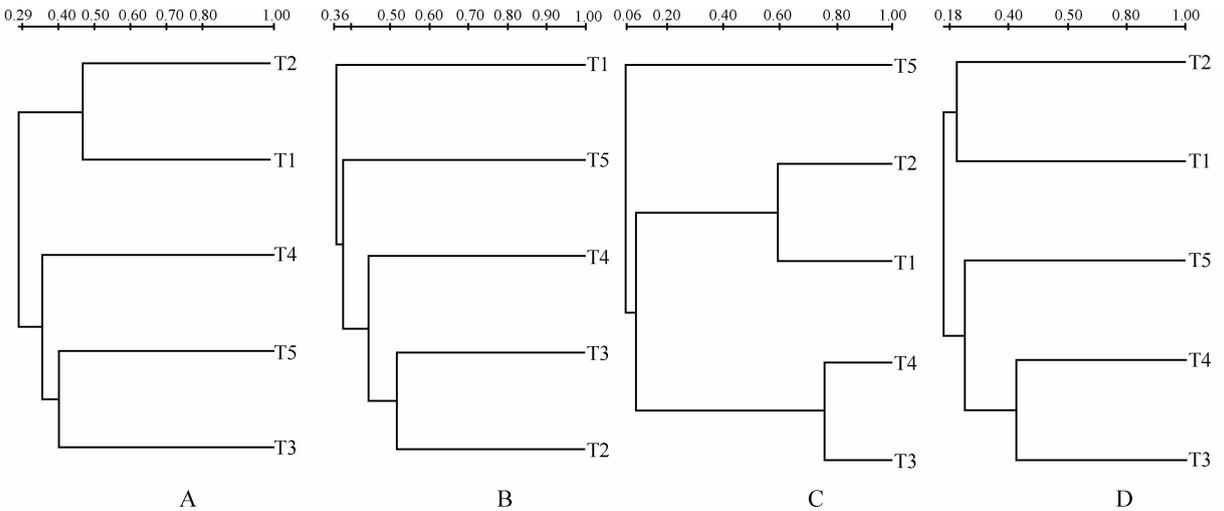
2.3.5 烟草不同生育期不同处理土壤细菌类群的多样性指数 表 3 数据表明:在烟草生长的 4 个生育期,5 个处理的细菌群落多样性指数最低的均为 T1,T2 的细菌群落多样性略高于 T1,表明使用有机肥可以促进细菌多样性的增加。T3 的细菌多样性指数又高于 T2,表明微生物有机肥对细菌多样性的促进作用较普通有机肥明显。由于石灰的消毒作用,T4 的细菌多样性指数在还苗期较 T3 略低,但在其他时期 T4 处理的细菌多样性指数均高于 T3,表明石灰对土壤的消毒作用是短暂的,随后在微生物有机肥的作用下土壤微生物区系得到了重建,而且多样性更加丰富。T5 的细菌群落多样性指数在各个时期均为最高,分别为 2.532、2.638、2.739 和 2.736,说明石灰和碳铵预处理土壤后再施用微生物有机肥可以显著改变连作烟草土壤的微生物群落结构,增加细菌多样性。



注: RS为病原菌茄科劳氏菌条带;A:烟草还苗期,B:伸根期,C:旺长期,D:成熟期 Note: RS stands for DGGE profile of *Ralstonia solanacearum*; A: Seeding reviving stage, B: Root spreading stage, C: Fast growing stage, D: Maturing stage

图 1 根际土壤细菌群落 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles of the bacterial community in tobacco rhizosphere soil



注：A:烟草还苗期,B:伸根期,C:旺长期,D:成熟期Note:A: Seeding reviving stage, B: Root spreading stage, C: Fast growing stage, D: Maturing stage

图2 根际土壤细菌群落 DGGE 图谱相似性分析

Fig. 2 DGGE similarity analysis of the bacterial community in tobacco rhizosphere soil

表3 烟草不同生育期不同处理根际土壤细菌多样性 (Shannon-Wiener 指数)

Table 3 Shannon-Wiener index of the bacterial in the rhizosphere in different treatments at different growth stages of the plants

生育期 Growth stage	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener Index				
	T1	T2	T3	T4	T5
还苗期 Seeding reviving stage	2.422	2.472	2.519	2.508	2.532
伸根期 Root spreading stage	2.492	2.586	2.590	2.596	2.638
旺长期 Fast growing stage	2.431	2.485	2.541	2.585	2.739
成熟期 Maturing stage	2.202	2.238	2.502	2.598	2.736

3 讨论与结论

众多研究表明,采用拮抗菌和有机肥发酵后施用的方法,有机肥为拮抗菌提供了足够的营养物质,使其容易在土壤中定殖,从而有效抑制病原菌的生长^[21-22]。本研究中微生物有机肥的施用可以显著降低烟草青枯病的发病率,与陈巧玲等^[23]的研究结果一致。

单独施用微生物有机肥虽然能显著降低烟草青枯病的发生,但是对于病害严重的长年连作土壤,其防治效果仍不能将病原菌控制在不发病或不会引起重大经济损失的阈值内。长期以来,国内外对土壤改良剂进行了大量深入的研究,施用土壤改良剂能够改善土壤的理化性质和对微生物群落产生巨大的影响,为作物的生长提供了良好的环境^[24],再通过微生物有机肥对病原菌的抑制作用,从而达到降低病害的发生。本研究将土壤改良剂和微生物有机肥结合起来,期望取得更好的防治效

果,结果表明施用土壤改良剂的处理防治效果较单独使用微生物有机肥的处理高,其中 T5 的防治效果最高,达到 87.9%。DGGE 图谱中病原菌丰度也表明,T5 处理病原菌数量较 T1 处理显著减少。

土壤微生物是土壤活的有机体,是最活跃的土壤,在土壤生态系统中占重要位置^[25],是土壤质量的重要组成部分^[26],连作障碍的形成与连作土壤细菌、放线菌等数量明显下降,病原菌数量明显上升,土壤微生态环境趋向恶劣有关^[27-28]。T3、T4、T5 处理显著增加了根际土壤中细菌的数量,其中 T5 对细菌数量的影响最大,T5 还显著增加了放线菌的数量;真菌数量的下降,可能与 SQY-7 有关,因为实验室条件下 SQY-7 亦能抑制赤星病、灰霉病等真菌,此外石灰处理改变了土壤的 pH,使其不适合真菌的生长^[24]。

研究表明,拮抗菌与有机肥共同施用不仅可以起到防病作用,而且可以使连作土壤微生物区系向着更为健康,更为合理的发展方向。DGGE 图谱及土壤细菌类群的多样性指数分析表明 T3、T4 和 T5

均能够降低烟草根际土壤中病原菌数量,增加细菌群落的多样性,其中以 T5 影响最大,其原因可能为:石灰及石灰和碳铵预处理,改变了土壤理化性质^[24],改变了连作土壤中病原菌的生存环境,对土壤起到了一定的还原作用,其中石灰-碳铵预处理效果较石灰好,加倍促进了微生物有机肥对根际细菌群落的修复,但具体的作用机制还需要进一步研究。

参考文献

[1] 朱贤朝,王彦亭,王智发. 中国烟草病害. 北京:中国农业出版社, 2002:152—162. Zhu X C, Wang Y T, Wang Z F. Tobacco diseases of China (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2002:152—162

[2] International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1996, 46(2):625—626

[3] Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. Microbiology and Immunology, 1995, 39(11):897—904

[4] 易有金,尹华群,罗宽,等. 烟草内生短链芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效. 植物病理学报, 2007, 37(1):301—306. Yi Y J, Yin H Q, Luo K, et al. Isolation and identification of endophytic *Brevibacillus brevis* and its biocontrol effect against tobacco bacterial wilt (In Chinese). Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(1):301—306

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

[6] Imazaki I, Nakaho K. Pyruvate-amended modified SMSA medium: Improved sensitivity for detection of *Ralstonia solanacearum*. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76:52—61

[7] 吕建林,刘二明,柏连阳,等. 烟草青枯病生防菌混合接种对其定殖及防效的影响. 中国生物防治, 2010, 26(2):200—205. Lv J L, Liu E M, Bai L Y, et al. Effects of the mixed inoculation of different bio-control strains on colonization in tobacco and control of tobacco bacterial wilt (In Chinese). Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2):200—205

[8] 段艳平,杨金广,杨继洪,等. 抗烟草青枯病菌的枯草芽孢杆菌 SH7 的筛选与鉴定. 吉林农业大学学报, 2012, 34(1):52—57. Duan Y P, Yang J G, Yang J H, et al. Screening and identification of *Bacillus subtilis* SH7 strain against *Ralstonia solanacearum* (In Chinese). Journal of Jilin Agricultural University, 2012, 34(1):52—57

[9] 霍沁波,张深,王若焱. 烟草青枯病研究进展. 中国农学通报, 2007, 23(9):364—368. Huo Q J, Zhang S, Wang R Y. Advance and control of tobacco bacterial wilt disease (In Chi-

nese). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(9):364—368

[10] 陈程,黎定军,陈武. 烟草青枯病生物防治研究进展. 作物研究, 2011, 25(6):639—642. Cheng C, Li D J, Chen W. Advance and control of tobacco bacterial wilt disease (In Chinese). Crop Research, 2011, 25(6):639—642

[11] 雷春霞,冯云利,奚家勤. 拮抗烟草青枯病菌的烟草内生细菌系统多样性及趋化性分析. 云南大学学报:自然科学版, 2012, 34(1):99—106. Lei C X, Feng Y L, Xi J Q. Phylogenetic diversity of the antagonistic endophytic bacteria of tobacco against *Ralstonia solanacearum* and their chemotaxis analysis (In Chinese). Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 2012, 34(1):99—106

[12] 丁传雨,乔焕英,沈其荣,等. 生物有机肥对茄子青枯病的防治及其机理探讨. 中国农业科学, 2012, 45(2):239—245. Ding C Y, Qiao H Y, Shen Q R, et al. Control effect and action mechanism research of bio-organic fertilizer on eggplant bacterial wilt (In Chinese). Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(2):239—245

[13] 李双喜,沈其荣,郑宪清,等. 施用微生物有机肥对连作条件下西瓜的生物效应及土壤生物性状的影响. 中国生态农业学报, 2012, 20(2):169—174. Li S X, Shen Q R, Zheng X Q, et al. Effect of organic microbe fertilizer application on watermelon growth and soil microorganisms under continuous monocropping (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(2):169—174

[14] 李红丽,郭夏丽,李清飞. 抑制烟草青枯病生物有机肥的研制及其生防效果研究. 土壤学报, 2010, 47(4):798—801. Li H L, Guo X L, Li Q F. Tobacco wilt suppressing bio-manure and its bio-control effect (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(4):798—801

[15] 杨钢,刘海胜,石根科,等. 3 种土壤改良剂对氮镉作用下土壤酶活性的影响. 武汉生物工程学院学报, 2010, 6(4):270—272. Yang G, Liu H S, Shi G K, et al. Effects of three soil amendment on soil enzyme activities in interaction of nitrogen application and cadmium contamination (In Chinese). Journal of Wuhan Bioengineering Institute, 2010, 6(4):270—272

[16] 王新平,赵春艳,加孜拉,等. 不同土壤改良剂对新疆盐碱土壤的改良效果研究. 灌溉排水学报, 2010, 29(4):133—135. Wang X P, Zhao C Y, Jia Z L, et al. Influence of different soil amendments on physico-chemical properties of saline-alkali soil in Xinjiang (In Chinese). Journal of Irrigation and Drainage, 2010, 29(4):133—135

[17] 全国烟草标准化技术委员会. YC/T 39—1996 中华人民共和国行业标准烟草病害药效试验方法. 北京:国家烟草专卖局, 1996. National Tobacco Standardization Technical Committee. YC / T 39—1996 People's Republic of China industry standard for tobacco disease efficacy trials (In Chinese). Beijing: State Tobacco Monopoly Bureau, 1996

[18] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 1999:353—387. Dong X Z, Cai M Y, et al. Manual of systematic and determinative bacteriology (In Chinese). Beijing: Science Press, 1999:353—387

- [19] Nakatsu C H, Torsvik V, øvreås L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, 64(4):1382—1388
- [20] Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20:509—515
- [21] Lang J J, Hu J, Ran W, et al. Control of cotton verticillium wilt and fungal diversity of rhizosphere soils by bio-organic fertilizer. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48:191—203
- [22] 江欢欢, 程凯, 杨兴明, 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):1 225—1 231. Jiang H H, Cheng K, Yang X M, et al. Isolation and biological effect of capsicum wilt antagonist (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(6):1 225—1 231
- [23] 陈巧玲, 胡江, 汪汉成, 等. 生物有机肥对盆栽烟草根际青枯病原菌和短芽孢杆菌数量的影响. *南京农业大学学报*, 2012, 35(1):75—79. Chen Q L, Hu J, Wang H C, et al. Effects of bio-organic fertilizer application on population of *Ralstonia solanacearum* and *Brevibacillus brevis* in tobacco rhizosphere (In Chinese). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 35(1):75—79
- [24] 姬红利. 土壤改良剂对植物-土壤磷吸收及流失的影响. 南京:南京林业大学森林资源与环境学院. 2011. Ji H L. Effect of soil amendments on phosphorus dynamics in the soil-plant system (In Chinese). Nanjing:College of Forest Resource and Environment, Nanjing Forestry University. 2011
- [25] 刘更另, 金维续. 中国有机肥料. 北京:农业出版社, 1991:238—248. Liu G L, Jin W X. *China Organic Fertilizer* (in Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1991:238—248
- [26] 雍太文, 杨文钰, 向达兵, 等. 不同种植模式对作物根系生长、产量及根际土壤微生物数量的影响. *应用生态学报*, 2012, 23(1):125—132. Yong T W, Yang W Y, Xiang D B, et al. Effects of different cropping modes on crop root growth, yield, and rhizosphere soil microbes' number (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(1):125—132
- [27] 郎娇娇, 王丽丽, 胡江, 等. 微生物有机肥防治棉花黄萎病机制研究. *土壤学报*, 2011, 48(6):1 298—1 305. Lang J J, Wang L L, Hu J, et al. Mechanism of bio-manure controlling cotton verticillium wilt (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(6):1 298—1 305
- [28] 刘素慧, 刘世琦, 张自坤, 等. 大蒜连作对其根际土壤微生物和酶活性的影响. *中国农业科学*, 2010, 43(5):1 000—1 006. Liu S H, Liu S Q, Zhang Z K, et al. Influence of garlic continuous cropping on rhizosphere soil microorganisms and enzyme activities (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(5):1 000—1 006

CONTROL OF TOBACCO BACTERIAL WILT WITH BIOMANURE PLUS SOIL AMENDMENTS

Wang Lili¹ Shi Junxiong² Yuan Saifei¹ Wu Kai¹ Cai Liuti² Liu Yanxia²
Yang Xingming¹ Feng Yonggang² Shen Biao^{1†} Shen Qirong¹

(1 Jiangsu Key Lab of Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang 550081, China)

Abstract A pot experiment, designed to have five treatments, was carried out in greenhouse to investigate effects of bio-organic fertilizer(BOF) and BOF plus soil amendments against on tobacco bacterial wilt and on microflora in rhizosphere soil. The five treatments were set as follows:T1, the control; T2, the plot was applied with common organic fertilizer; T3, the plot was applied with the BOF; T4, the plot was treated with lime before the application of the BOF; T5, the plot was treated with lime and bicarbonate before the application of the BOF. DGGE and plate counting were used to investigate microflora in the rhizosphere soils. Results show that T2 not only had no control effect against tobacco bacterial wilt, but also increased the disease index, while the control effects against tobacco bacterial wilt of T3, T4 and T5 varied in the range of 66.7%~87.9%. All the organic fertilizer treatments had some influence on microflora in the rhizosphere, increasing the number of bacteria by 3.5 and 6.1 times and the number of actinomycetes by 3.7 and 3.5 times, but decreasing the number of fungi by 66.2% and 70.1%, respectively in T3 and T4, and increasing the number of bacteria and actinomycetes by 13.6 times and 5.1 times, respectively, but decreasing the number of fungi by 75.0% in T5. The preliminary study found that a combined treatment of the soil with lime and bicarbonate before application of the BOF could control tobacco bacterial wilt effectively by altering composition of the microflora in tobacco rhizosphere, and decreasing the number of pathogens.

Key words Tobacco bacterial wilt; Bio-fertilizer; Microflora; Continuous monocropping; Soil amendments