

连续施用生物有机肥对烟草青枯病的防治效果^①

宋松¹, 孙莉¹, 石俊雄², 冯永刚², 杨兴明¹, 谭石勇¹, 李荣^{1*}, 沈其荣¹

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2 贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550003)

摘要: 分离获得一株对烟草青枯病病原菌茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 简称 RS)具有较强拮抗能力的拮抗菌(SQR11)并制成生物有机肥, 研究了连续施用该生物有机肥对烟草青枯病的防治效果。结合生理生化和 16S rDNA 技术鉴定, 菌株 SQR11 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。施用该生物有机肥后第一季烟草青枯病的生物防治率达到 47% 以上, 第二季为 69% 以上, 第三季达到 89% 以上。第三批盆栽实验表明, 当根际土中病原菌数量达到 2×10^5 cfu/g 干土时, 植株出现发病症状, 随着病原菌数量的增加, 发病症状加重。当根际土中拮抗菌活菌数量达到 2×10^7 cfu/g 干土时, 病原菌繁殖得到有效抑制, 可有效阻止植株染病; 若低于 10^7 cfu/g 干土, 则不能有效抑制病原菌增殖, 植株表现发病症状。植株各组织内拮抗菌数量检测发现, 未发病植株茎部拮抗细菌数量为 4×10^4 cfu/g (组织鲜重, 下同)左右, 而同处理中发病症状的植株茎部拮抗细菌数量仅为 6×10^3 cfu/g; 相对应的病原菌数量分别为 1.5×10^2 cfu/g (健康植株)和 3×10^3 cfu/g (发病植株)。SQR11 菌株制成的生物有机肥还具有较好的促生作用。总之, 利用拮抗菌 SQR11 菌株制成的生物有机肥对烟草青枯病具有显著的生物防治作用, 在根部进行大量定殖后可有效防止病原菌的侵入, 能够获得显著的生防效果。

关键词: 烟草青枯病; 生物防治; 生物有机肥; 芽孢杆菌; 定殖

中图分类号: S144.2

烟草青枯病是一种由茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* (简称 RS)引起的并可通过土壤进行传播的细菌性病害^[1]。一旦植株染病, 在自然条件适宜的情况下从发病到完全死亡只需要 3~5 天, 若大规模爆发则可能导致整个地区绝收^[2]。烟草青枯病属于维管束病害, 病原菌侵染的主要途径位于根部, 在移栽过程中, 根部、茎部受损会加重病害的发生。植株发病时, 最典型症状是叶片萎蔫。在田间, 青枯病常与黑胫病、线虫病等病害混合发生, 使烟草发病更加严重^[3-4]。在防治青枯病的危害方面, 生产上主要采用选育抗病品种和用药剂处理土壤等方法, 但效果时好时坏, 一旦条件适宜, 仍有大规模爆发的可能性^[5-6]。生物防治作为综合防治的措施之一, 对生态平衡和可持续农业的发展具有特别重要的意义。主要流程为: 筛选获得有较强拮抗某种土传病原菌能力的菌株, 将拮抗菌株接种到固体有机肥中, 通过二次固体发酵技术, 使拮抗菌株大量繁殖和定殖在有机肥环境中, 制成生物有机肥^[7]; 帮助拮抗菌在土体或根际土壤中有有效定植, 进行生物防治, 从根本上改善土壤环境, 通

过自然竞争抑制土传病原微生物的生长与繁殖, 达到较好防病效果^[8-10]。然而, 就目前文献报道的结果中, 施用生物有机肥的防病试验, 通常为一季或两季, 还没有发现连续三季以上连续施用生物有机肥进行防病的报道, 导致生物防治效果可能不稳定或不理想^[11-12]。

本试验采用浓度梯度稀释法从贵州烟草种植地青枯病发病土壤中分离获得了一株对 RS 具有显著拮抗作用的芽孢杆菌 SQR11, 并通过固体发酵制成生物有机肥。针对该菌生防能力的研究, 系统设计了 3 季连作盆栽试验, 客观真实地验证了拮抗菌株 SQR11 制成生物有机肥对烟草土传青枯病的生物防治效果, 以期为后继烟草青枯病的田间生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试烟草品种云烟 87 包衣种子, 由贵州烟草良种育苗基地提供; 烟草青枯病病原菌由贵州省烟草科学研究所提供; 分离拮抗菌所用土壤取自贵州福泉烟

基金项目: 国家自然科学基金项目(41101231)、江苏省科技成果转化专项(BA2008027)和江苏省科技支撑项目(BE2010351)资助。

* 通讯作者(lirong@njau.edu.cn)

作者简介: 宋松(1989—), 男, 江苏盱眙人, 硕士研究生, 主要研究方向为农业固体废弃物资源化利用。E-mail: 2010103148@njau.edu.cn

草种植地表层土壤。

1.2 培养基配方

RS 的保存与培养采用茄科劳尔氏菌专用培养基 (SMSA 培养基), 芽孢杆菌的分离、筛选采用芽孢杆菌专用培养基 (V8 培养基), 对峙培养采用 NA 改良型培养基^[13]。

1.3 试验方法

1.3.1 拮抗芽孢杆菌的筛选 按照 10 倍梯度稀释土壤悬液, 稀释至 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ cfu/ml, 采用平板涂布法, 分别取稀释液 0.1 ml, 均匀涂布于 NA 改良型培养基上, 30℃ 培养 96 h 后, 利用无菌喷雾器将 OD ($\lambda = 600$) 为 1 的病原菌稀释液均匀喷涂于平板上, 30℃ 对峙培养 24 h 后观察抑菌圈的有无及大小。选取菌落直径 (r) 较大 ($r = 3 \sim 10$ mm), 抑菌圈 (R) 比值较高 ($R/r = 3 \sim 10$) 的菌株^[14], 通过连续传代培养, 检测其拮抗能力遗传稳定性, 选取稳定性较好的芽孢杆菌留待进一步研究。

1.3.2 菌株 SQR11 的生理生化鉴定 生理生化鉴定方法参见文献^[15]。

1.3.3 菌株 SQR11 的 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增及系统发育树的构建 提取菌株基因组 DNA^[13], 利用 16S rDNA 的通用引物: 16S F: 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3', 16S R: 5'-GGTTACCTTGTTAC GACTT-3' 扩增 16S rDNA。50 μ l 的 PCR 反应体系: DNA 模板 1 μ l, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ l, 引物 (1 mmol/L) 各 1 μ l, 10 \times Buffer 5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l, Taq 酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l, 超纯水 34.5 μ l。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 进入热循环; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。采用 PCR 回收试剂盒回收 16S rDNA 的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小, T/A 克隆后进行测序, 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。测序结果在 GenBank 核酸数据库中进行搜索, 利用 ClustalX 1.8.1 进行分析, 通过 Njplot 软件分析生成系统发育树。

1.3.4 拮抗菌 SQR11 生物有机肥制备 生物有机肥制备参考文献^[16], 将腐熟猪粪 (江苏田娘农业科技有限公司提供) 与菜饼氨基酸有机肥 (江苏新天地生物肥料工程中心有限公司提供) 晒干处理后, 按 1:1 ($m:m$) 的比例混合均匀, 接种 5% ($v:m$) 拮抗菌 SQR11 发酵液, 发酵液含菌量为 10^9 cfu/ml。加入前将菌体离心, 除去培养液, 然后悬浮于无菌超纯水中。调节堆肥的含水量为 35% 左右即可进行发酵, 每 12 h 翻堆一次, 并每隔 24 h 利用芽孢杆菌专用培养基进

行拮抗菌数量检测, 同时监测堆肥温度等的变化, 一般在第 2~4 天温度较高, 约为 50℃~60℃, 随后开始降温。当肥料中拮抗菌数量达到 10^8 cfu/g (干重) 且温度下降至常温时, 堆肥处理完毕。整个过程一般持续 5~7 天, 不同菌种间或有差异。

1.3.5 生物有机肥盆栽试验 漂盘育苗处理: 将育苗基质及漂盘灭菌后, 按照 2% 比重加入生物有机肥, 与基质混匀后装入漂盘, 然后播种育苗。试验设计: 每季盆栽试验各设置 3 个处理, 分别为: 无机化肥处理 (CK)、有机肥处理 (OF)、生物有机肥处理 (BOF), 各处理 30 株重复。BOF 处理按 1% 肥/土加入生物有机肥, CK 处理施用无机化肥, OF 处理为施用普通有机肥, 按养分最高组补齐各处理营养成分。连续 3 季盆栽试验具体设计如下: 第一季高发病土壤试验: 烟苗生长 3 周后, 通过向健康土壤中注入病原菌法, 使得土壤中病原菌数量达到 10^7 以上, 导致烟苗处于高浓度病原菌环境, 其余为常规自然条件 (温度 25℃~35℃、湿度 60%~80% 等)。第二季高发病自然条件试验: 第一季盆栽结束后, 各处理盆栽土分开储存放置 10~15 天, 保持湿度, 维持正常病原菌数量, 约为 10^4 cfu/g 干土。移栽后, 烟苗生长环境为青枯病高发病条件 (此时气候处于 7 月下旬, 温度高, 平均气温为 32℃, 早中晚向地面喷洒大量清水, 保持高湿度, 强光照时遮光, 以达到烟草青枯病的高发条件: 多雨、高温、少日照。温度 30~40℃、湿度 80% 以上)。第三季烟草正常条件生长试验: 第二季盆栽结束后, 各处理盆栽土同样分开储存放置 10~15 天, 保持湿度, 维持正常病原菌数量, 重复拌肥, 烟苗生长环境气候处于 9 月下旬, 温度在 25℃~30℃, 湿度正常, 光照正常^[17-18] (随着时间推移, 气温、光照有所降低, 利用加热器增温、补光灯补光, 保证烟苗正常生长)。

病情调查: 观察烟苗生长状况, 从出现第一例病症起, 统计发病率, 至 CK 处理发病率达到 80% 时结束试验。检测各处理发病状况, 统计各处理发病指数与有机肥和生物有机肥处理生防指数。发病等级如下: 0 级: 植株体叶面无萎蔫症状; 1 级: 植株总体 1/5 以下的叶面表现萎蔫症状; 2 级: 植株总体 1/5~1/3 叶面表现萎蔫症状; 3 级: 植株总体 1/3 以上 2/3 以下叶面表现萎蔫症状; 4 级: 全株萎蔫死亡^[19]。

发病指数 = \sum (各级病株数 \times 各级代表值) / (调查总株数 \times 最高级代表值) \times 100%

生防指数 = (化肥处理发病指数 - 生物有机肥处理发病指数) / 化肥处理发病指数 \times 100%

1.3.6 病原菌及拮抗菌株的数量检测 对第三批盆栽各处理土体土及根际土进行随机采样, 1 g 土样加入 9 ml 无菌水振荡 30 min 充分混匀后, 10 倍浓度梯度稀释至 $10^{-2} \sim 10^{-4}$, 各吸取 100 μ l 用于平板涂布计数。同时随机采取植株样品, 植株充分冲洗干净后, 分别剪取根、茎、老叶、新叶各部分组织, 各称取 0.5 g, 加入 4.5 ml 无菌水, 置研钵中充分研磨, 再进行梯度稀释, 吸取 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 稀释液 100 μ l 用于平板涂布计数, 统计植株体内病原菌与拮抗菌的数量^[19]。

2 结果与分析

2.1 拮抗芽孢杆菌的筛选

采用平板稀释涂布法分离菌株, 利用喷雾法检测各菌株抑制效果, 初步筛选获得 5 株抑菌能力较强的芽孢杆菌, 分别标记为 SQR11、SQR33、SQR55、SQR99、SQR110。经第一次盆栽试验确定 SQR11 菌株生物防治效果最好, 因此, 选择该菌株进行进一步研究。SQR11 号菌株抑菌效果见图 1a; 菌落形态如图 1b。

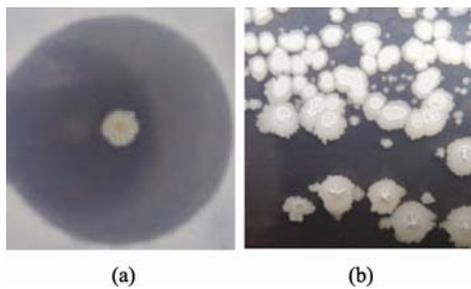


图 1 拮抗菌 SQR11 的抑菌圈(a)和菌落形态(b)
Fig. 1 Inhibition zone (a) and colony morphology (b) of antagonistic bacteria agent SQR11

2.2 拮抗菌 SQR11 的鉴定

菌株 SQR11 在 NA 改良型培养基上培养 24 h

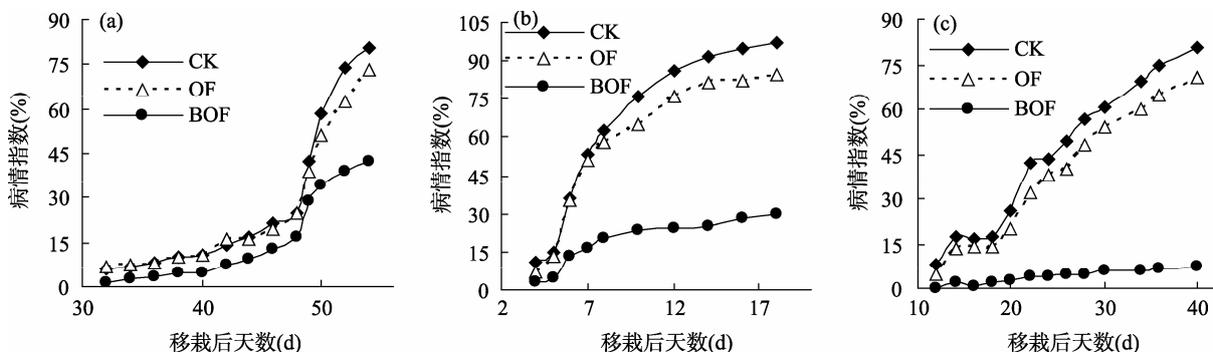
后, 菌落形态如图 1b 所示, 其菌落大小为 5 mm 左右, 中部有突起, 边缘不光滑, 无规则、不透明, 不产色素。菌株 SQR11 的生理生化性质: 6% 浓度 NaCl 生长, 温度生长范围 $20^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$, 石蕊牛奶分解试验产酸、还原和胨化, 硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、丙二酸盐利用、明胶液化、卵磷脂酶活性、淀粉水解、甲基红试验、吲哚试验、脲酶试验、甘油水解试验均呈阳性, 氧化酶、接触酶、荧光色素产生、V-P 试验均呈阴性, 葡萄糖和蔗糖发酵产酸产气。

菌株 SQR11 的 16S rDNA 序列构建的系统发育树上菌株位于芽孢杆菌分支, 与解淀粉芽孢杆菌相似性在 99% 以上, 结合生理生化试验将菌株 SQR11 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(发育树省略)。

2.3 抗烟草青枯病生物有机肥盆栽试验

盆栽试验于 2010—2011 年在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的温室内进行。育苗期间施用生物有机肥, 可利于拮抗菌株先期占据植株体内的有利生态位, 能够提高生物防治效果^[20], 因此本研究育苗时即在基质中加入生物有机肥。当烟苗生长 2 个月左右, 株高 10 cm 时选取长势一致的烟苗进行移栽。活苗后观察烟苗生长状况, 从发现首例发病植株起始, 每间隔 2~3 天记录一次, 各处理的发病率以及生防指数结果如图 2 和表 1 所示。

第一季盆栽, 移栽第 5 周左右出现病例。发病前期, 发病过程较为缓慢, BOF 处理的生防指数(与 CK 处理相比, 下同)最高达到 71.43%, 最低也大于 50%。第 7 周进入 6 月份, 达到发病高峰期, CK 处理发病率达到 80% 以上, 整个高峰期持续大约 10~15 天, BOF 处理的生防指数下降, 最低仅为 31.37%, 最高为 45.00%。发病后期, 发病速率有所下降, BOF 处理的生防指数有所回升, 达到 47% 左右。各处理发病率曲线趋势基本一致(图 2a, 表 1)。



(a: 第一季; b: 第二季; c: 第三季)

图 2 3 次盆栽试验各处理发病率

Fig. 2 The morbidity statistics of successive pot experiments

表 1 连续 3 季盆栽试验有机肥和生物有机肥处理生防指数 (%)
Table 1 Biological control rates of OF and BOF treatments during successive pot experiments (%)

第一季			第二季			第三季		
移栽时间(d)	OF	BOF	移栽时间(d)	OF	BOF	移栽时间(d)	OF	BOF
32	-0.14	71.43	4	38.41	69.23	12	39.98	100.00
34	-0.12	62.50	5	11.13	66.67	14	23.83	90.48
36	0.00	60.00	6	2.32	62.79	16	15.00	95.00
38	0.00	50.00	7	4.69	68.75	18	19.03	90.48
40	0.00	53.85	8	6.67	68.00	20	22.57	90.32
42	-0.12	47.06	10	14.28	69.23	22	24.00	90.00
44	0.05	45.00	12	11.65	71.85	24	11.54	90.38
46	0.12	42.31	14	10.91	72.72	26	18.65	89.83
48	0.00	33.33	16	13.16	70.18	28	14.72	91.18
49	0.08	31.37	18	13.16	69.23	30	10.95	90.41
50	0.13	41.43				34	13.26	91.57
52	0.02	47.19				36	13.33	91.11
54	0.09	47.42				40	12.37	90.72

第二季盆栽移栽前,各处理土样种植前病原菌数量分别为 CK : 3.76×10^4 cfu/g 干土, OF : 2.57×10^4 cfu/g 干土, BOF : 2.18×10^4 cfu/g 干土。以此作为连作土壤,进行第二季盆栽试验。由于发病条件适宜,植株迅速进入发病高峰期,各处理在活苗后第三天开始出现发病症状,且随着时间的推移,发病率迅速上升,整个过程持续 15 天左右。在第 16 天,CK 和 BOF 处理发病率达到 80% 以上,BOF 处理的生防指数前期较好(第 3 ~ 5 天),为 69.23%,发病速率快时(第 5 ~ 9 天),生防指数有所下降,最低为 62.79%,最高为 68.75%。随后随着发病速率的下降(第 10 ~ 18 天),生防指数也随着回升,最高值达到 72.72%,最低值为 69.23%。各处理发病率曲线趋势基本一致(图 2b,表 1)。

土壤休整后进行第三季盆栽,各处理土样种植前病原菌数量分别为 CK : 2.49×10^4 cfu/g 干土, OF : 1.82×10^4 cfu/g 干土, BOF : 1.37×10^4 cfu/g 干土。以此作为连作土壤,进行第三季盆栽试验。移栽第 12 天,CK、OF 处理出现发病症状,BOF 处理尚未出现发病植株。发病前期(第 12 ~ 18 天),BOF 处理的生防指数保持较高水平,最高达到 100.00%,最低为 90.48%。14 天时发病率上升,生防指数下降。20 ~ 24 天,发病速率较快,BOF 处理的生防指数略有下降,最低为 89.83%,随着发病率的上升,生防指数始终保持较高水平,平均值在 92% 左右。各处理发病率曲线趋势基本一致(图 2c,表 1)。

由表 1 数据可知,OF 处理较 CK 处理而言,没有明显的生物防治效果,在前期发病速率相对缓慢的情况下可能有较高的生防指数,但是并不能长期稳定维持。与 BOF 处理比较而言,其生防效果不明显。

连续 3 季盆栽试验结果表明,生防菌 SQR11 菌株研制成的生物有机肥具有显著的防治烟草青枯病的能力,连作土连续使用 3 季生物有机肥后,其生防效率达到 90% 以上。

2.4 第三季盆栽各处理土体土和根际土中病原菌及 BOF 处理拮抗菌株的数量变化

各处理土体土和根际土中病原菌 RS 及拮抗菌 SQR11 的平板梯度稀释检测结果表明:发病过程中,土壤中病原菌数量变化与各处理发病率间具有良好的一致性。在发病前期,发病症状比较轻微,土体土中病原菌数量相对稳定,根际土中数量略有上升;中期,发病速率较快,处于发病高峰期,土体土中病原菌数量明显上升,根际土中数量急剧上升,证实烟草发病程度与病原菌数量成正相关性;后期,发病速率下降,土体土及根际土中病原菌数量达到相对饱和,处于动态平衡,略有下降(图 3a、b)。此时,发病已接近尾声,CK 处理发病率达到 80% 左右。

为了研究 BOF 处理中病原菌变化趋势与拮抗菌之间的关系,对 BOF 处理的样品进行拮抗菌活菌数量检测。由图 4 可以得出,拮抗菌株 SQR11 能够在植株根部定殖,当数量达到 2.7×10^7 cfu/g 干土时,SQR11 菌体数量达到饱和,处于动态平衡状态。此时 SQR11 菌株已在植株根部形成绝对优势,病原菌数量得到有效抑制,只能维持在 3×10^4 cfu/g 干土左右(图 3b),有效抑制病原菌的增殖和侵染,从而达到防治植株发病的目的。同时由于土体土中大量存在拮抗菌,为植株根系生长营造了良好的生态环境,在一定程度上抑制了病原菌的增加。后期,可能由于营养物质的消耗等原因使得生存环境变得恶劣从而导致土体土中拮抗菌数量稍有减少。

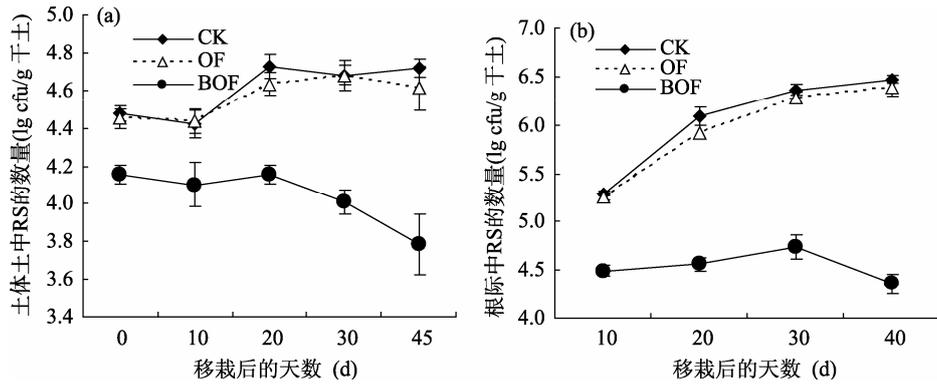


图 3 各处理土体土(a)及根际土(b)中病原菌 RS 数量变化曲线
 Fig. 3 Changes of pathogen RS numbers in bulk soil (a) and rhizosphere soil (b) of different treatments

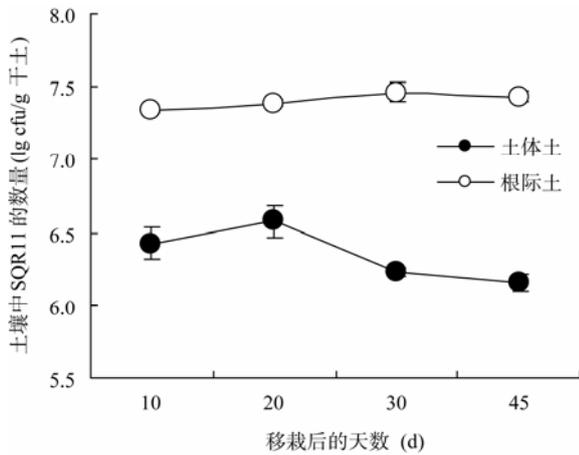


图 4 BOF 处理中土体土及根际土中拮抗菌 SQR11 的变化曲线

Fig. 4 Changes of antagonistic bacteria SQR11 numbers in bulk soil and rhizosphere soil of the BOF treatment

2.5 第三季盆栽 BOF 处理中发病植株土体土及根际土中病原菌及拮抗菌株数量的检测

上述试验虽得到了土壤环境中病原菌 RS 与拮抗菌 SQR11 之间的相互关系,却无法证明 SQR11 菌株在防治烟草青枯病中的决定性作用。本试验继续针对 BOF 处理中发病植株进行了采样分析,分析结果表

明:发病植株尽管在土体土中拮抗菌活菌数量能够稳定维持在 2×10^6 cfu/g 干土左右,且根际土中拮抗菌活菌数量随着时间逐渐上升,能够达到 4.13×10^6 cfu/g 干土,但仍低于 10^7 cfu/g 干土(图 5a),不能有效抑制病原菌的增殖,而病原菌的数量则缓慢上升到 4.1×10^5 cfu/g 干土,植株开始发病(图 5b)。

2.6 第三季盆栽 BOF 处理中发病/未发病植株体内拮抗菌和病原菌数量的检测

BOF 处理组中发病/未发病植株体内拮抗菌 SQR11 和病原菌 RS 数量检测结果见表 2。由结果发现,发病植株根内病原菌数量能够达到 2×10^4 cfu/g 组织鲜重左右,而健康植株仅为 3×10^2 cfu/g 组织鲜重。发病植株的茎部、叶片中仍能检测到较高数量的病原菌,而健康植株中则检测不到。拮抗菌 SQR11 的数量则与之相反,除根内以外发病植株体内各部位 SQR11 菌株数量均低于健康植株。

2.7 生物有机肥对烟草生物量的影响

SQR11 菌株防治烟草青枯病的同时,对烟草的生长也具有较好的促生作用,结果见表 3。试验结果表明施用猪粪:菜粕氨基酸 = 1:1 的有机肥处理 (OF) 及加入 SQR11 菌株二次发酵后制成的生物有

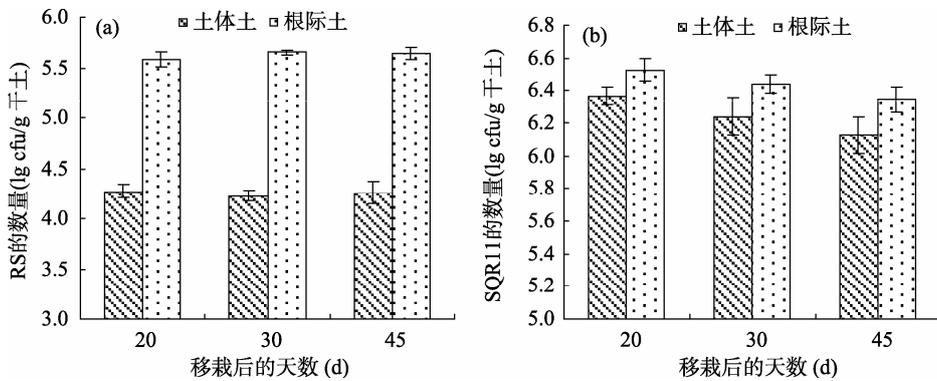


图 5 BOF 处理发病植株土体土和根际土中菌株 RS(a)和 SQR11(b)活菌数量

Fig. 5 Changes of strain RS(a)and SQR11(b) viable numbers in bulk soil and rhizosphere soil of the diseased plants in BOF treatment

表 2 BOF 处理中植株体内病原菌和拮抗菌数量(10^3 cfu/g 鲜重)
Table 2 Pathogen and antagonistic bacteria numbers in plants of the BOF treatment

项目		植株部位			
		根	茎	老叶	新叶
RS	发病植株	21.56 ± 2.64	3.32 ± 1.15	3.33 ± 1.52	2.16 ± 1.00
	健康植株	0.36 ± 0.15	0.14 ± 0.06	0	0
SQR11	发病植株	208.78 ± 10.51	6.33 ± 1.53	5.00 ± 0.58	0
	健康植株	226.53 ± 7.21	38.67 ± 7.57	21.00 ± 7.76	3.67 ± 0.58

表 3 各处理组烟草生长情况
Table 3 Effects of different treatments on tobacco growth

处理	株高		鲜重		干重	
	平均值(cm)	增长率(%)	平均值(g)	增长率(%)	平均值(g)	增长率(%)
CK	65.33 ± 3.22	-	128.33 ± 6.02	-	13.82 ± 0.53	-
OF	65.85 ± 3.29	0.46	130.33 ± 4.84	1.56	14.51 ± 0.69	4.99
BOF	77.63 ± 2.51	18.83	182.42 ± 9.23	42.15	19.89 ± 0.95	43.97

机肥处理(BOF)相对普通无机化肥(CK)而言均有一定的促生作用。但是 OF 处理促生作用不明显,烟草的平均株高基本没有增加,鲜重较 CK 处理只增长 1.56%,干重则增长了 4.99%;而 BOF 处理与 CK 处理相比促生效果明显,平均株高增长了 18.83%,鲜重增长了 42.15%,而干重增长了 43.97%。该研究结果表明 SQR11 菌株在苗期开始施用,对烟草的生长具有一定的促生作用。

3 讨论

由于芽孢杆菌的存活能力较强,常温放置数月,数量级不会减少,故可以放置较长时间^[21-22]。因此,利用芽孢杆菌类拮抗菌株研制生物有机肥控制连作障碍,成为生物防治的重要方式。本研究通过平板对峙试验、盆栽试验结合促生效果等证明了 SQR11 菌株制成的生物有机肥对烟草青枯病具有显著的防治效果,同时还具有较好的促生效果。结合本试验设计的 3 季连续施用生物有机肥的生防结果可以考虑在第一次施用生物有机肥时,加大肥料用量,可能会获得更好的防治效果^[23]。在施肥的同时还应考虑气候因素对烟草青枯病发病情况的影响,试验过程中,烟草发病速率与气候具有较大的相关性^[24],同时也会影响植株的生长从而间接地对拮抗菌在植株根部的定殖产生影响^[25]。

国内外有较多报道证实利用微生物之间的拮抗作用或竞争机制对于防治土传病害有着很大的应用前景^[26]。当这些有益拮抗菌在根际大量定殖时,在生防过程中既具拮抗作用还有一定的促生作用,目前许多研究结果已经证实,根围有益细菌能够直接或间

接地促进植物生长^[27]。连续 3 季盆栽试验证实了在病原土中连续施用生物有机肥其生物防治效果在 3 季以后比初始效果更加明显^[28]。就目前报道的生物防治试验结果分析,多数拮抗菌主要在植株的根系进行大量的定殖,阻断了病原菌侵染植株体的通道,从而达到抑制土传病害发生的目的,但不能形成稳定内寄生关系^[29]。而本试验中所使用的 SQR11 菌株不仅可以在植物根际大量富集,数量级高达 10^7 cfu/g 干土以上;更大的优势在于可以从植物根部进入植物体内,并在植株各个部位稳定存在,并形成一定的数量规模。一方面抑制了根际病原菌的侵入,另一方面更从内部杜绝可能侵入的病原菌在内部增殖感染植株的可能性。由此可以看出,SQR11 菌株与烟草植株可以形成良好、稳定的内生关系,在整体环境中保护了植株免于病原菌侵害。整个试验结果证实了 SQR11 菌株与病原菌株 RS 在土壤及植株体内的相互关系呈现此消彼长的趋势,说明 SQR11 菌株与 RS 菌株存在显著的拮抗机制。

综上所述,施用生物有机肥为预防土传病害提供了新的思路,通过筛选拮抗菌,利用自然存在的种间竞争机制可达到无污染、低成本、高效益的防治目的。从盆栽试验结果来看,SQR11 菌株制成的生物有机肥对烟草土传青枯病有较好的抑制作用。但烟草青枯病的爆发与天气有较大的关系,同时防治效果与拮抗菌数量有较大的相关性。如何在高峰、高发条件下仍能达到很好的抑制效果,或如何使得 SQR11 菌株在土壤环境和植株体内大量定殖与繁殖,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王静,赵廷昌,孔凡玉,何月秋,张成省,刘建华,刘伟

- 成. 拮抗细菌对烟草青枯病的温室防病及促生效果[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 103-105
- [2] 肖田, 姚廷山. 烟草青枯病的发生特点与综合防治技术[J]. 云南农业科技, 2008(1): 56-57
- [3] 何礼远, 华静月, 张长玲. 我国细菌性青枯病的发生与防治[J]. 植物保护, 1983, 9(3): 8-11
- [4] 陈瑞泰. 烟草病虫害防治[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1989: 61-68
- [5] Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biological Control, 2004, 29(1): 66-72
- [6] 匡传富, 罗宽. 烟草品种对青枯病抗病性及抗性机制的研究[J]. 湖南农业大学学报, 2002, 28(5): 395-399
- [7] 邓接楼, 涂晓虹, 王爱斌. 生物有机肥在烟草上的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9 289-9 290
- [8] Cook KJ, Baker KF. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens[M]. USA: APS Press, 1984
- [9] Che FI. Innovative Approaches to Plant Disease Control[M]. New York: Wiley, 1987: 372
- [10] Jatala P. Biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Annual Review Phytopathology, 1986, 24: 453-479
- [11] 张余莽, 周海军, 张景野, 刘淑霞, 吴海燕. 生物有机肥的研究进展[J]. 吉林农业科学, 2010, 35(3): 37-40
- [12] 阳文锐. 长期施用生物有机肥对土壤生物学特性的影响研究(硕士学位论文)[D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [13] 易有金, 刘如石, 尹华群, 罗宽, 刘二明, 刘学端. 烟草青枯病拮抗内生细菌的分离、鉴定及其田间防效[J]. 应用生态学报, 2007, 18(3): 554-558
- [14] 王金生, 田端华, 方中达, 张宏声, 张安全, 刘荆. 枯草杆菌 B-1 菌株对大白菜软腐病的生防作用[J]. 南京农业大学学报, 1989, 12(4): 59-62
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-398
- [16] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 徐阳春, 黄启为, 沈其荣. 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): 1 136-1 141
- [17] 周岗泉, 张建华, 陈泽鹏, 刘琼光. 烟草内生细菌及其对烟草青枯病的生物防治研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(2): 31-34
- [18] 李红丽, 郭夏丽, 李清飞, 王岩. 抑制烟草青枯病生物有机肥的研制及其生防效果研究[J]. 土壤学报, 2010, 47(4): 799-801
- [19] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 徐阳春, 沈其荣. 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): 1 095-1 011
- [20] Galal YGM. Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean[J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 24: 317-322
- [21] 李国学, 张福锁. 固体废物堆肥化与有机复混肥生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000
- [22] Brockwell J, Boyyomley PJ. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future[J]. Soil Biochemistry, 1995, 27(4): 683-697
- [23] 段大海, 孙顶国, 张培苹. 生物有机肥不同用量与方法对西瓜产量和品质的影响[J]. 当代生态农业, 2006, Z1: 106-108
- [24] 平新亮, 何念杰, 林媚, 王燕斌, 温明霞, 冯先桔, 蔡文. 烟草青枯病影响因素的研究及其防治探讨[J]. 江西植保, 2009, 32(1): 32-38
- [25] 王占武, 李晓芝, 葛建国, 张翠绵. 拮抗菌 B501 在草莓根际的定殖及对其他根际微生物的影响[J]. 河北农业科学, 2002, 6(3): 14-18
- [26] Whipps JM. Microbial interactions and bio-control in the rhizosphere[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 56: 487-451
- [27] 王雅平, 刘伊强, 潘乃和, 陈章良. 枯草芽孢杆菌 TG26 防病增产效应的研究[J]. 生物防治通报, 1993, 9(2): 63-68
- [28] 周莉华, 李维炯, 倪永珍. 长期施用 EM 生物有机肥对冬小麦生产的影响[J]. 农业工程学报, 2005, 21: 221-224
- [29] 郭刚, 曾会才, 刘兵团, 汪腾. 香蕉枯萎病生防微生物产品的功效限制因子[J]. 热带农业工程, 2010, 34(5): 5-9

Effects of Successive Application of Bioorganic Fertilizer on Controlling Tobacco Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*

SONG Song¹, SUN Li¹, SHI Jun-xiong², FENG Yong-gang², YANG Xing-ming¹, TAN Shi-yong¹,
LI Rong^{1*}, SHEN Qi-rong¹

(1 College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang 550003, China)

Abstract: An antagonistic bacterium named SQR11 which possessed strong ability to suppress tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (abbreviated as RS) was isolated, and the biological control effect of successive application of bioorganic fertilizer produced by this strain on controlling tobacco wilt was studied. Based on physiological and biochemical determination and the 16S rDNA sequence analysis, strain SQR11 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Biological control efficiency of the bioorganic fertilizer applied during the successive batches of pot experiments were 47%, 69% and 89%, respectively. Results from the third pot experiment indicated that plants showed symptoms when the number of pathogens in the rhizosphere soil reached 2×10^5 cfu/g dry soil, and the incidence of symptoms were accompanied with the increasing number of RS. The pathogens were effectively controlled when the number of antagonistic bacteria in the rhizosphere soil reached 2×10^7 cfu/g dry soil. The number of the antagonistic bacteria in the stems of the healthy tobacco was 4×10^4 cfu/g plant tissue, while the number of the pathogens in the same position was 1.5×10^2 cfu/g plant tissue; the number of the antagonistic bacteria in the stems of the diseased tobacco was only 6×10^3 cfu/g plant tissue, whereas the number of the pathogens in the same position reached 3×10^3 cfu/g plant tissue. The results also indicated that application of the bioorganic fertilizer could also promote tobacco growth. In conclusion, successive application of bioorganic fertilizer produced by strain SQR11 could significantly control the tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* by extensive colonization of SQR11 in the tobacco roots.

Key words: Tobacco bacterial wilt, Biological control, Bio-organic fertilizer, Bacillus, Colonization