

# 连续施用有机肥对连作花生根际微生物种群和酶活性的影响<sup>①</sup>

刘金光<sup>1,3</sup>, 李孝刚<sup>1</sup>, 王兴祥<sup>1,2\*</sup>

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049;

3 中国科学院红壤生态实验站, 江西鹰潭 335211)

**摘要:** 花生连作导致土传病害易发, 严重制约其产量和品质。为探讨持续施用有机肥缓解连作花生病害发生的防治机理, 大田条件下研究了连续 6 年施用化肥、普通有机肥和生物有机肥(接种内生菌拟茎点霉 B3)后对连作花生根腐病、根际土壤典型微生物种群和酶活的影响。结果表明: 与单施化肥相比, 持续施用普通有机肥和生物有机肥可有效控制连作花生土传病害发生, 荚果产量提高 23.8% 和 47.9%。连续施用普通有机肥和生物有机肥均显著提高根际过氧化氢酶、脱氢酶和酚氧化酶活性, 荧光定量 PCR 进一步测定出连续施用有机肥可显著增加连作花生根际细菌和真菌的数量, 说明连续施用有机肥后连作花生根际微生物活性显著提升。连续施用普通有机肥和生物有机肥显著增加了连作花生根际有益微生物种群的数量, 其中放线菌增加 0.9 倍和 1.6 倍, 假单胞菌增加 10.9 倍和 13.1 倍, 伯克氏菌增加 2.6 倍和 1.9 倍, 芽孢杆菌增加 1.1 倍和 2.1 倍; 然而连续施用有机肥对连作花生根际主要致病微生物种群(如镰刀菌属和青枯雷尔氏菌)无明显影响。表明通过持续施用有机肥可有效提高连作花生根际有益微生物种群的数量和土壤酶活性, 进而改善连作花生根际微生态环境, 增强连作土壤抑病能力, 以达到控制连作花生土传病害易发的目的。

**关键词:** 花生连作; 有机肥; 有益微生物; 土传病害

中图分类号: S144.2; S154.3 文献标识码: A

花生是我国重要的油料作物, 2014 年全国种植面积为 460.4 万  $\text{hm}^2$ , 占油料作物种植面积的 32.8%<sup>[1]</sup>。长期连作导致花生病虫害加剧、产量逐年降低。轮作是克服连作障碍最经济有效的措施, 可显著提高产量<sup>[2-6]</sup>。然而, 花生的经济效益较高, 加之农户种植习惯不易改变, 花生依然是红壤旱地春夏主栽作物之一<sup>[2]</sup>。

土传病害易发是限制连作花生持续高产的主要因素, 而花生根际微生物群落失衡可能是其土传病害易发的重要原因之一<sup>[7-8]</sup>。因而, 通过调控土壤微生物区系以提升连作土壤抑病能力, 是缓解连作下土传病害易发的有效途径。与长期施用化肥相比, 施用有机肥可提高土壤 pH、微生物多样性和活性<sup>[9]</sup>。利用拮抗性微生物与普通有机肥二次发酵得到的生物有机肥是目前研究的热点, 一方面增加拮抗微生物数量, 抑制致病微生物的生长; 另一方面普通有机肥提高根际微生物活性、改善根际微生态, 在防控土传病

害中取得良好效果, 而关于利用其他植物有益微生物制备生物有机肥的研究报道得较少<sup>[10-13]</sup>。广谱内生真菌拟茎点霉(*Phomopsis liquidambari*)B3 对致病微生物没有明显的拮抗作用, 但可提高花生根际细菌、放线菌数量和土壤酶活性, 改善植物生长环境<sup>[14-15]</sup>。因此, 本文通过分析连续施用化肥、普通有机肥和 B3 生物有机肥下连作花生根际微生物种群和土壤酶活性的效应, 探求连续施用有机肥缓解花生连作障碍的微生物机制, 为开发有效稳定的花生连作障碍控制措施提供理论依据和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地点

定位实验地位于江西省鹰潭市余江县刘家站 (28°13'N, 116°55'E), 属亚热带季风湿润气候, 1 月平均气温 5.9 °C, 7 月平均气温 30 °C, 年降水量 1 750 mm。供试土壤为第四纪红色黏土, 其基础理化性质为: pH

基金项目: 国家自然科学基金项目(41671306, 41371290)资助。

\* 通讯作者(xxwang@issas.ac.cn)

作者简介: 刘金光(1987—), 男, 河南周口人, 博士研究生, 主要从事土壤微生物生态方面研究。E-mail: ljg.1987@163.com

5.0, 有机质 15.4 g/kg, 全氮 0.9 g/kg, 全磷 0.7 g/kg, 全钾 8.9 g/kg, 有效磷 23 mg/kg, 速效钾 280 mg/kg。

1.2 有机肥制备

普通有机肥(OF)是经过充分腐熟的猪粪堆肥 ;生物有机肥(BOF)为内生真菌拟茎点霉(*Phomopsis liquidambari*)B3 固体发酵物与普通有机肥 1 : 10 比例充分混匀制备而成。

1.3 试验设计与方法

定位试验始于 2011 年, 试验布置之前该地已连续种植花生 5 a。设 3 个处理, 每个处理 4 个重复 : 常规施肥(CK), 尿素 300 kg/hm<sup>2</sup>、钙镁磷肥 750 kg/hm<sup>2</sup>, KCl 225 kg/hm<sup>2</sup>, 硼砂 15 kg/hm<sup>2</sup>; 处理 OF 和 BOF 分别施用普通有机肥 OF、生物有机肥 BOF, 施用量为 3 000 kg/hm<sup>2</sup>, 硼砂 15 kg/hm<sup>2</sup>, 然后通过测定有机肥内养分含量, 补加相应量的化肥, 以保持有机肥处理与 CK 等量的氮、磷、钾。每个小区 10 m × 5 m。花生品种为赣花 5 号, 每年 4 月播种 ,8 月中旬收获 , 常规田间管理, 秋冬休闲。

1.4 样品采集及测定项目

1.4.1 根际土采集和处理 2016 年花生收获前, 小心拔起花生并去除根部大颗粒土块 ,轻轻抖动根部收集根际土, 带回实验室分成 2 份, 分别 4 ℃ 和-25 ℃ 保存, 用于酶活性测定和微生物种群分析。

1.4.2 花生生长指标测定 每个小区采集 3 个 1 m ×

1 m 样方的花生植株 ,用于花生根瘤数和病情指数的测定, 小区荚果实收、晒干至恒重后测定, 折算成单位面积产量(kg/hm<sup>2</sup>)。根腐病是江西红壤连作花生主要病害, 其病情指数的评价分级标准如下 : 0 为无症状, 1 为主根发病面积占主根总面积的 25% 以下, 2 为主根发病面积占主根总面积的 25% ~ 50%, 3 为主根发病面积占主根总面积的 50% ~ 75%, 4 为整个主根完全发病<sup>[16]</sup>。

病情指数(%) = 
$$\frac{\sum(\text{每级发病株数} \times \text{病级代表值}) \times 100}{\text{调查总株数} \times \text{最高病级代表值}}$$

1.4.3 土壤酶活性测定 土壤脱氢酶活性用碘硝基四唑紫(iononitrotetrazolium chloride, INT)法测定<sup>[13]</sup>, OD<sub>464</sub> 变化 0.01 为一个酶活单位; 过氧化氢酶活性用高锰酸钾滴定法测定<sup>[14]</sup>, 以 20 min 内每克土壤分解过氧化氢的毫克数表示 ; 酚氧化酶活性测定参照文献<sup>[15]</sup>, OD<sub>534</sub> 变化 0.01 为一个酶活单位。

1.4.4 根际微生物数量测定 根际土壤微生物数量采用实时荧光定量 PCR 检测微生物特异性 DNA 片段的方法进行测定, 使用土壤 DNA 提取试剂盒(Fast DNA SPIN for Soil Kit ,MP ,美国)根际土壤总 DNA , 所用引物及定量 PCR 条件见表 1。将含有特异微生物 DNA 片段的重组质粒 10 倍梯度稀释后作为标准曲线, 稀释梯度 6 ~ 8 个。

表 1 实时定量 PCR 引物及 qPCR 条件  
Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR (qPCR) and qPCR conditions

目标微生物	引物	qPCR 条件	参考文献
细菌	338F/518R	95 ℃ 30 s ; 95 ℃ 5 s , 57.5 ℃ 30 s , 72 ℃ 30 s , 40 个循环	[20]
真菌	ITS1F/ITS4	95 ℃ 30 s ; 95 ℃ 5 s , 56 ℃ 30 s , 72 ℃ 30 s , 40 个循环	[20]
放线菌	S-P-Acti-1154-a-S-19/S-P-Acti-1339-a-A-18	95 ℃ 30 s ; 95 ℃ 5 s , 59 ℃ 30 s , 72 ℃ 20 s , 40 个循环	[21]
伯克氏菌	BKH812F/BKH1249R	95 ℃ 30 s ; 95 ℃ 5 s , 60 ℃ 60 s , 40 个循环	[22]
假单胞菌	Pse435F/Pse686R	95 ℃ 30 s ; 95 ℃ 5 s , 60 ℃ 60 s , 40 个循环	[23]
芽孢杆菌	B-K1-F/B-K1-R1	95 ℃ 30 s ; 94 ℃ 30 s , 63 ℃ 30 s , 72 ℃ 60 s , 40 个循环	[24]
镰刀菌	Fa/Ra	95 ℃ 30 s ; 95 ℃ 5 s , 57 ℃ 60 s , 72 ℃ 60 s , 40 个循环	[25]
青枯雷尔氏菌	R.sol1/R.sol2	94 ℃ 4 min ; 94 ℃ 30 s , 63 ℃ 30 s , 40 个循环	[26]

1.5 数据处理与统计分析

用 Microsoft Excel 2013 进行数据处理和作图, 并利用 SPSS 16.0 进行不同处理之间数据显著性分析。图中不同字母的处理表示 Duncan 检验差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2 结果

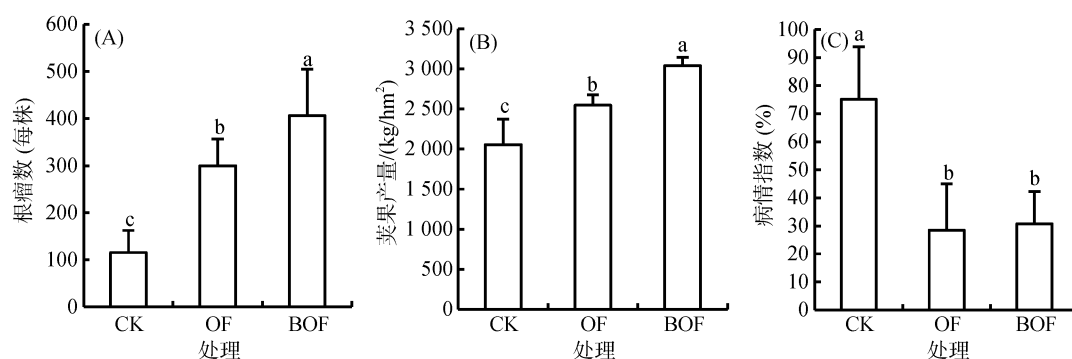
2.1 施用有机肥对连作花生根瘤数、荚果产量和根腐病病情指数的影响

常规单施化肥(CK)的花生植株矮小、根瘤少且

小、结果数少, 病情指数最高, 达到 75.2%(图 1)。与 CK 相比 ,连续施用普通有机肥和生物有机肥的花生根瘤数分别增加了 160.3% 和 252.9%, 荚果产量分别提高 23.8% 和 47.9%, 而根腐病病情指数显著降低。

2.2 施用有机肥对花生根际土壤酶活性的影响

与 CK 相比 ,施用普通有机肥和生物有机肥均显著提高了花生根际土壤过氧化氢酶、脱氢酶和酚氧化酶活性 ,施用普通有机肥和生物有机肥之间无显著性差异(图 2)。



(CK 为单施化肥处理 ;OF 和 BOF 分别为施用有机肥 OF 和 BOF ,并保持与 CK 等量氮、磷、钾。小写字母不同代表处理间差异达到  $P<0.05$  显著水平,下同)

图 1 施用有机肥对连作花生根瘤数(A)、荚果产量(B)和病情指数(C)的影响

Fig. 1 Effects of organic fertilizers on root nodules (A), pod yield (B) and disease index (C) of peanut under monoculture

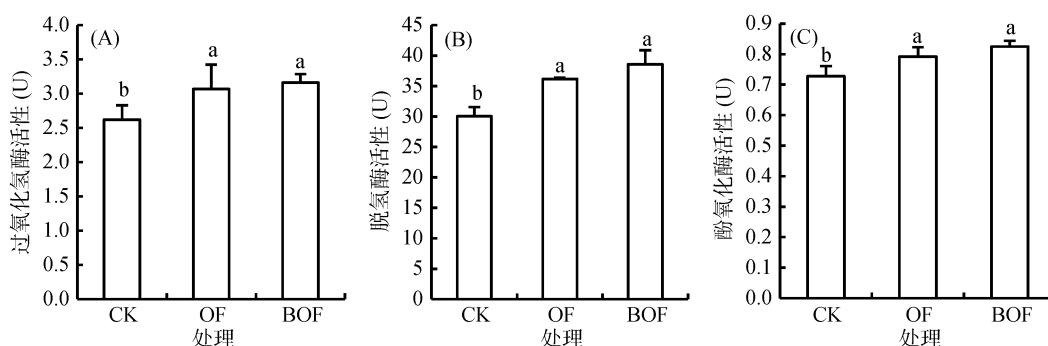


图 2 施用有机肥对连作花生根际土壤过氧化氢酶(A)、脱氢酶(B)和酚氧化酶(C)活性影响

Fig. 2 Effects of organic fertilizers on activities of dehydrogenase (A), catalase (B) and phenol oxidase (C) in peanut rhizosphere soil under monoculture

### 2.3 施用有机肥对花生根际土壤主要微生物种群数量的影响

采用 qPCR 的技术手段分析了不同施肥条件下花生根际土壤主要微生物种群的数量。与 CK 相比,普通有机肥和生物有机肥处理土壤细菌数量分别提高 74.2% 和 132.7%,真菌分别提高 44.4% 和 44.7%(图 3)。施用普通有机肥和生物有机肥的花生根际土壤有益菌如放线菌、假单胞菌、伯克氏菌和芽孢

杆菌的数量显著高于对照处理:放线菌增加 0.9 倍和 1.6 倍,假单胞菌增加 10.9 倍和 13.1 倍,伯克氏菌增加 2.6 倍和 1.9 倍,芽孢杆菌增加 1.1 倍和 2.1 倍(图 4)。花生根际土壤致病微生物镰刀菌和青枯雷尔氏菌的数量各处理之间无显著差异(图 5)。与施用普通有机肥相比,施用生物有机肥增加细菌数量的幅度更大,尤其根际有益微生物类群,如放线菌、假单胞菌和芽孢杆菌。

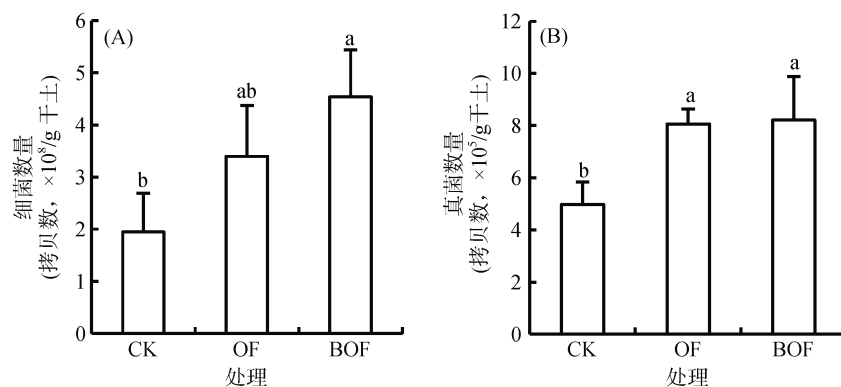


图 3 施用有机肥对连作花生根际细菌(A)和真菌(B)数量的影响

Fig. 3 Effects of organic fertilizers on abundances of bacterial (A) and fungal (B) in peanut rhizosphere soil under monoculture

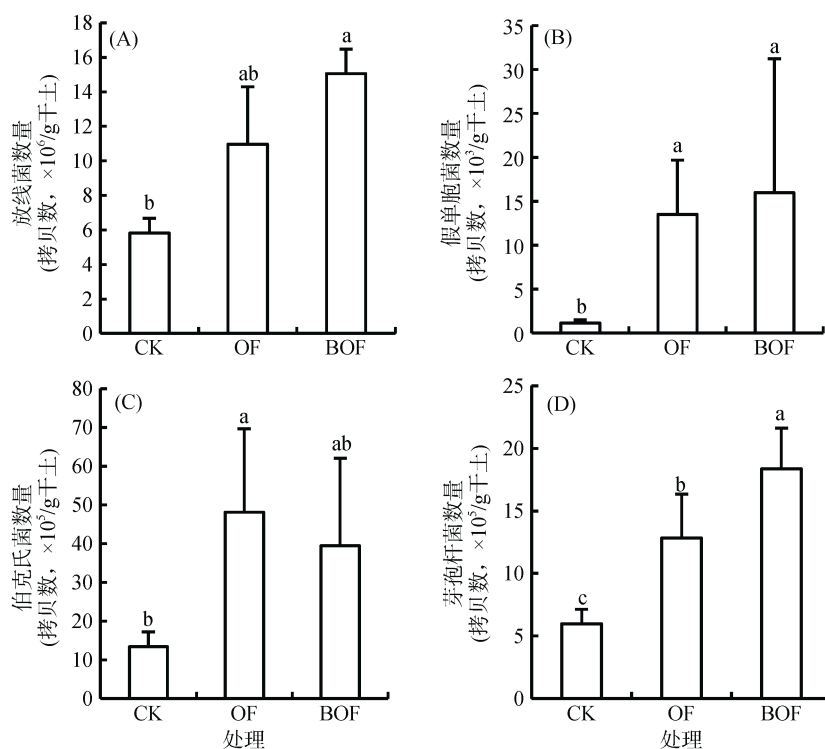


图 4 施用有机肥对连作花生根际土壤主要有益微生物数量的影响

Fig. 4 Effects of organic fertilizers on abundance of representative beneficial microorganisms in peanut rhizosphere soil under monoculture

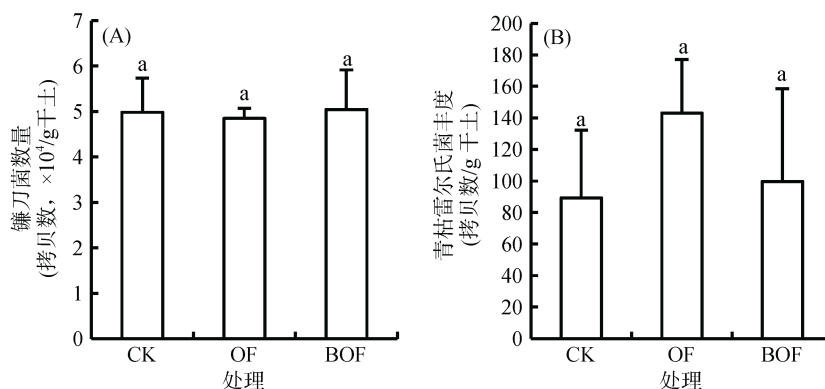


图 5 施用有机肥对连作花生根际土壤镰刀菌(A)和青枯雷尔氏菌(B)数量的影响

Fig. 5 Effects of organic fertilizers on abundance of *Fusarium* spp. (A) and *Ralstonia solanacearum* (B) in peanut rhizosphere soil under monoculture

### 3 讨论

化肥较有机肥肥效快,成为现代农业最为普遍应用的肥料。但近年来化肥用量不断增加,导致土壤养分比例失衡,花生根瘤减少,固氮能力减弱<sup>[2]</sup>;而土壤中有益微生物(如假单胞菌、伯克氏菌和根瘤菌)所占比例逐年降低,有害微生物(镰刀菌、青枯雷尔氏菌)逐年增加<sup>[8, 27-28]</sup>。有机肥比化肥肥效慢,但长期施用可提高土壤生物活性、改良土壤。张鹏等<sup>[13]</sup>在连作土壤中施用生物有机肥降低了番茄和辣椒青枯病的发病率,提高了产量。施用有机肥也可缓解连作条件下草莓、黄瓜和西瓜等枯萎病的发生<sup>[14, 29-31]</sup>。本研

究连续 6 a 施用有机肥较常规施化肥的花生病情指数显著降低,根瘤数量和荚果产量显著提高(增产 23.8%)。孔宏敏<sup>[32]</sup>连续施猪粪有机肥 13 a(1988—2001 年)处理的红壤旱地花生平均产量比单施化肥处理增产 18.2%;Liu 等<sup>[28]</sup>连续施用猪粪有机肥处理,第 5 年和第 7 年花生产量平均较长期施用化肥处理增产 34.8%(利用软件 Engauge Digitizer 6.0 从图表中提取数据),这表明施用猪粪有机肥可在一定程度上减轻花生连作障碍。本研究生物有机肥比普通猪粪有机肥增产效果更显著(增产 47.9%),表明利用内生菌 B3 制备的生物有机肥可进一步提高有机肥(腐熟猪粪)缓解花生连作障碍的效果。试验土壤及施肥条件

下,养分元素一般不会影响花生生产,土壤 pH 也无显著变化(数据未列),土壤微生物区系的变化可能是施用有机肥缓解连作障碍的作用机制。

土壤一般属于碳缺乏环境,而有机肥中含有大量的易分解碳和其他丰富的微生物生长所需的营养物质<sup>[33]</sup>,另外,有机肥中含有丰富的微生物类群,因此持续施用有机肥具有提高生物活性和培肥土壤的作用。本研究发现连续施用普通有机肥和生物有机肥显著提高了花生根际土壤脱氢酶和过氧化氢酶活性,表明土壤根际微生物活性提高<sup>[14,17]</sup>。qPCR 结果进一步证实施用有机肥可显著提高土壤细菌和真菌数量,尤其有益微生物的数量,如放线菌、假单胞菌、伯克氏菌和芽孢杆菌。与施用普通有机肥相比,施用生物有机肥对根际有益微生物的促进效果更好,这也与花生的产量结果相一致。根际微生物活性和生物量的提高,可增加与病原菌产生营养和空间资源的竞争,有利于阻止病原菌的侵入<sup>[12, 34]</sup>。因此,提高连作作物根际微生物活性可能是持续施用有机肥控制病害发生的重要作用机制。

根际有益微生物种群可提高植物获取营养物质的效率,促进植物生长,同时抑制土传病原微生物侵染。然而随着连作年限增加,土壤中有益微生物逐渐减少而致病微生物不断累积<sup>[8, 28, 35]</sup>。放线菌、伯克氏菌、假单胞菌和芽孢杆菌是农田土壤中的典型有益微生物种群,含有大量植物促生功能菌、病原拮抗菌等,在土壤抑病过程中扮演重要角色<sup>[11, 36-38]</sup>。大量研究表明施用普通有机肥和生物有机肥均可显著增加土壤中放线菌的数量,提高土壤抑病能力<sup>[13, 28-29]</sup>。此外,本研究中伯克氏菌、假单胞菌和芽孢杆菌的数量也显著高于单施化肥处理。伯克氏菌和假单胞菌是植物根际主要微生物,与植物生长关系密切<sup>[37]</sup>。随着连作年限的增加,二者在花生土壤中的所占比例逐渐降低<sup>[27]</sup>。芽孢杆菌对长期施用有机肥响应敏感,随着有机肥施用年限的增加,*Bacillus asahii* 逐渐成为优势种,并可能与长期施用有机肥作物的增产有关<sup>[39]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>利用含有 *Bacillus amyloliquefaciens* W19 的生物有机肥能够有效抑制香蕉镰刀萎蔫病的发病,并促进其生长。与长期施用化肥相比,长期施用有机肥的连作花生土壤具有更高水平的链霉菌、芽孢杆菌等有益微生物<sup>[28]</sup>。因此,持续施用有机肥下连作花生病情指数的降低和根瘤数量的增加与其根际有益微生物种群显著增加有关。对此,通过持续施用有机肥可有效诱导有益微生物种群在连作土壤中定殖,进而改善连作作物生长,提升连作花生对病害菌的抑病

能力。

根腐病和青枯病对花生生产造成严重损害,分别由镰刀菌和青枯雷尔氏菌侵染引起。随着连作年限的增加,镰刀菌和青枯雷尔氏菌在土壤中逐渐累积,是连作土壤土传病害高发的主要诱导因子<sup>[2, 8, 28]</sup>。酚酸是土壤中的主要化感物质,可直接对植物生长造成毒害,同时可促进尖孢镰刀菌的生长、萎蔫酸的生成及提高致病相关水解酶活性,其在土壤中累积被认为是导致土壤连作障碍的原因之一<sup>[20, 40-41]</sup>。酚氧化酶是土壤微生物转化酚类物质的重要酶,本研究中施用有机肥提高了花生根际土壤酚氧化酶活性,有利于酚酸类物质的及时转化。基于 Biolog 微平板法的微生物功能多样性研究发现,施用有机肥(腐熟猪粪)有利于以酚酸类物质为碳源的微生物生长<sup>[42]</sup>。本研究中,致病微生物在不同处理之间并无差异,但施用有机肥的花生病情指数显著低于对照。因此,酚氧化酶活性的增加可能归因于有机肥引起的伯克氏菌、假单胞菌和芽孢杆菌数量的增加,三者与镰刀菌竞争酚酸的利用<sup>[43-44]</sup>,降低酚酸对镰刀菌的刺激作用。作物发病是植物、致病微生物和其他微生物种群相互影响、综合作用的结果。因此,面对连作作物土传病害高发的问题,不能仅引入拮抗菌或者杀菌剂、强调抑制致病微生物,而应从生态学的角度,培育有益微生物种群、调节土壤微生物环境,整体提升土壤抑病能力。

综上所述,通过持续施用腐熟猪粪制成的有机肥可提高连作花生根际微生物活性,培育有益微生物种群在连作花生根际定殖,提升连作花生的根际抑病能力,以达到缓解连作花生土传病害发生的目的。有机肥持续施用后诱导的有益微生物种群和微生物活性的增加是有效降低连作花生病害发生的更为普遍、稳定的机制,所以持续施用有机肥是缓解连作障碍的长效稳定措施。

致谢:感谢南京师范大学生命科学学院戴传超教授提供拟茎点霉 B3 及其固体发酵物。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家统计局. 中国统计年鉴—2015[M]. 北京: 中国统计出版社, 2015
- [2] 王明珠, 陈学南. 低丘红壤区花生持续高产的障碍及对策[J]. 花生学报, 2005, 34(2): 17-22
- [3] Gil S V, Pedelini R, Oddino C, et al. The role of potential biocontrol agents in the management of peanut root rot in Argentina[J]. Journal of Plant Pathology, 2008, 90(1): 35-41

- [4] Wang B, Li R, Ruan Y, et al. Pineapple–banana rotation reduced the amount of *Fusarium oxysporum* more than maize–banana rotation mainly through modulating fungal communities[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 86: 77–86
- [5] McDaniel M, Grandy A, Tiemann L, et al. Crop rotation complexity regulates the decomposition of high and low quality residues[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 78: 243–254
- [6] Jordan D L, Bailey J E, Barnes J S, et al. Yield and economic return of ten peanut-based cropping systems[J]. *Agronomy Journal*, 2002, 94(6): 1289–1294
- [7] 滕应, 任文杰, 李振高, 等. 花生连作障碍发生机理研究进展[J]. *土壤*, 2015, 47(2): 259–265
- [8] Li X, Ding C, Zhang T, et al. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 72: 11–18
- [9] Ding J, Jiang X, Ma M, et al. Effect of 35 years inorganic fertilizer and manure amendment on structure of bacterial and archaeal communities in black soil of northeast China[J]. *Applied soil ecology*, 2016, 105: 187–195
- [10] 张瑞福, 沈其荣. 抑病型土壤的微生物区系特征及调控[J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(5): 125–132
- [11] Wang B, Yuan J, Zhang J, et al. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(4): 435–446
- [12] Fu L, Penton C R, Ruan Y, et al. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 104: 39–48
- [13] 张鹏, 韦中, 朱震, 等. 生物有机肥对连作番茄和辣椒根际土壤微生物区系及茄科雷尔氏菌的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(4): 77–82
- [14] 郝玉敏, 戴传超, 戴志东, 等. 拟茎点霉 B3 与有机肥配施对连作草莓生长的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(21): 6695–6704
- [15] 戴传超, 谢慧, 王兴祥, 等. 间作药材与接种内生真菌对连作花生土壤微生物区系及产量的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(8): 2105–2111
- [16] 李孝刚, 王兴祥, 戴传超, 等. 不同施肥措施对连作花生土传病害及产量的影响[J]. *土壤通报*, 2014(4): 930–933
- [17] Von Mersi W, Schinner F. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodinitrotetrazolium chloride[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1991, 11(3): 216–220
- [18] Kappen H. The catalytic effect of the soil[J]. *Fühlings Landw Ztg*, 1913, 62: 377–392
- [19] Perucci P, Casucci C, Dumontet S. An improved method to evaluate the *o*-diphenol oxidase activity of soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(13): 1927–1933
- [20] Zhou X, Wu F. *p*-Coumaric acid influenced cucumber rhizosphere soil microbial communities and the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen[J]. *PLoS one*, 2012, 7(10): e48288
- [21] Pfeiffer S, Pastar M, Mitter B, et al. Improved group specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(8): 2389–2407
- [22] Stopnisek N, Bodenhausen N, Frey B, et al. Genus wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1503–1512
- [23] Bergmark L, Poulsen P H B, Al-Soud W A, et al. Assessment of the specificity of *Burkholderia* and *Pseudomonas* qPCR assays for detection of these genera in soil using 454 pyrosequencing[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 333(1): 77–84
- [24] Wu X Y, Walker M J, Hornitzky M, et al. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 64(1): 107–119
- [25] Karlsson I, Edel-Hermann V, Gautheron N, et al. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(2): 491–501
- [26] Huang J, Wu J, Li C, et al. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(5): 1729–1739
- [27] Chen M, Li X, Yang Q, et al. Dynamic succession of soil bacterial community during continuous cropping of peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *PLoS one*, 2014, 9(7): e101355
- [28] Liu W, Wang Q, Wang B, et al. Changes in the abundance and structure of bacterial communities under long-term fertilization treatments in a peanut monocropping system[J]. *Plant and Soil*, 2015, 395(1/2): 415–427
- [29] 韦巧婕, 郑新艳, 邓开英, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防效[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(1): 40–46
- [30] 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
- [31] 顾小龙, 陈巍, 蔡枫, 等. 配施木霉微生物肥对连作黄瓜的影响[J]. *土壤学报*, 2016, 53(5): 1296–1305
- [32] 孔宏敏. 退化红壤旱地肥力重建的研究[D]. 南京: 中国科学院南京土壤研究所, 2003: 1–83
- [33] Demoling F, Figueroa D, Bååth E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(10): 2485–2495
- [34] Larkin R P. Soil health paradigms and implications for disease management[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2015, 53: 199–221
- [35] Chen M, Li X, Yang Q, et al. Soil eukaryotic microorganism succession as affected by continuous cropping of peanut-pathogenic and beneficial fungi were selected[J]. *PLoS one*, 2012, 7(7): e40659

- [36] Yu X, Ai C, Xin L, et al. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper[J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(2): 138–145
- [37] Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P, et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(11): 789–799
- [38] Liu X, Zhang S, Jiang Q, et al. Using community analysis to explore bacterial indicators for disease suppression of tobacco bacterial wilt[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36773
- [39] Feng Y, Chen R, Hu J, et al. *Bacillus asahii* comes to the fore in organic manure fertilized alkaline soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 81: 186–194
- [40] Wu H, Raza W, Fan J, et al. Cinnamic acid inhibits growth but stimulates production of pathogenesis factors by in vitro cultures of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1316–1321
- [41] Ye S F, Zhou Y H, Sun Y, et al. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of Fusarium wilt[J]. Environmental and Experimental Botany, 2006, 56(3): 255–262
- [42] 杨宇虹, 陈冬梅, 晋艳, 等. 不同肥料种类对连作烟草根际土壤微生物功能多样性的影响[J]. 作物学报, 2011, 37(1): 105–111
- [43] Pumphrey G M, Madsen E L. Field-based stable isotope probing reveals the identities of benzoic acid-metabolizing microorganisms and their *in situ* growth in agricultural soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 4111–4118
- [44] Zhang Y, Wang X, Chen S, et al. *Bacillus methylotrophicus* isolated from the cucumber rhizosphere degrades ferulic acid in soil and affects antioxidant and rhizosphere enzyme activities[J]. Plant and Soil, 2015, 392(1/2): 309–321

## Effects of Successive Application of Organic Fertilizers on Rhizosphere Microbial Populations and Enzyme Activities of Monoculture Peanut

LIU Jinguang<sup>1,3</sup>, LI Xiaogang<sup>1</sup>, WANG Xingxiang<sup>1,2\*</sup>

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 Experimental Station of Red Soil, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China)

**Abstract:** Continuous peanut planting leads to the prevalence of soilborne diseases, and constitutes a serious constraint to the yield and quality. To investigate the biocontrol effects of organic fertilizers on suppressing the soilborne diseases and possible mechanisms, a 6 year field experiment was conducted to study the effects of successive application of chemical fertilizer, organic fertilizer and bioorganic fertilizer (organic fertilizer inoculated with *Phomopsis liquidambari* B3) on the peanut root rot disease and on the abundance of group specific rhizosphere microbes and enzyme activities. Compared with the single application of chemical fertilizer, successive application of organic fertilizer and bioorganic fertilizer could effectively control the soilborne diseases, and increased the peanut pod yields by 23.8% and 47.9%, respectively. organic fertilizer and bioorganic fertilizer applications enhanced the activities of catalase, dehydrogenase and phenol oxidase in rhizosphere soil. The quantitative real-time PCR analysis further detected an increase of the bacterial and fungal abundance, indicating an increase in the soil microbial activities. organic fertilizer and bioorganic fertilizer applications also promoted the growth of the beneficial rhizosphere microorganisms, including *Actinobacteria* increased 0.9- and 1.6-fold, *Pseudomonas* increased 10.9- and 13.1-fold, *Burkholderia* increased 2.6- and 1.9-fold, and *Bacillus* increased 1.1- and 2.1-fold, respectively. However, no significant difference was observed on the abundance of major pathogenic microorganisms, such as *Fusarium* and *Ralstonia solanacearum*, two notorious pathogenic microorganisms of peanut between treatments. The above results indicated that successive application of organic fertilizers, especially bioorganic fertilizer, can control the prevalence of soilborne diseases by increasing the number of beneficial rhizosphere microorganisms and manipulating the soil microbiome to increase soil health.

**Key words:** Continuous peanut production; Organic fertilizer; Beneficial microorganism; Soilborne diseases