

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.01.004

不同土壤消毒方式对烟草青枯病 及根际微生物群落的影响

代玉豪¹, 杨亮¹, 肖庆驹¹, 高紫鹏¹,
张峰境¹, 陈少鹏², 丁伟¹

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715;

2. 中国烟草总公司 重庆市公司, 重庆 400023

摘要: 为明确不同土壤消毒方式对烟草青枯病的防治效果, 探讨不同消毒方式在生产上的应用价值, 解析不同消毒方式对土壤的微生物生态效应, 本研究通过田间小区试验探究了不同土壤消毒方式石灰氮(CC)、棉隆(DMTT)、氯溴异氰尿酸(CCA)和三氯异氰尿酸(TA)对烤烟青枯病发生及根际微生物的影响。结果表明, 整个调查期间 DMTT、TA 处理病情指数和发病率均明显低于空白对照, 发病高峰期调查结果显示相对防效分别为 44.76%, 37.06%。同时, CC、DMTT、TA 处理后均明显降低了烟草根际土壤青枯菌的含量。不同土壤消毒方式处理改变了土壤微生物的多样性, DMTT、CCA、TA 均在一定程度上降低了细菌、真菌群落多样性和丰富度, 与空白对照相比, 变形菌门(Proteobacteria)在各处理相对占比皆下降, 其中 DMTT 下降最多, 达 28.14%; 土壤消毒处理后根际土壤种厚壁菌门(Firmicutes)相对占比均上升。在烟草根际土壤中, 青枯菌的相对丰度与 *Solicozozya* 表现出正相关, 相关系数为 0.85 ($p < 0.001$); 4 种土壤消毒剂均降低了短杆菌属(*Solicozozya*)的相对丰度, 其中, DMTT 降低最多, 为 98.00%, TA 降低了 52.82%。综上所述, 棉隆、三氯异氰尿酸土壤消毒处理可以有效降低病原菌相关微生物的数量, 优化土壤微生态环境, 遏制烟草青枯病的发生, 值得在一定区域推广使用。

关键词: 土壤消毒; 烟草青枯病;

微生物 16S 测序

中图分类号: S432.4

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2024)01-0033-12

收稿日期: 2023-12-15

基金项目: 中国烟草总公司重庆市公司科技项目(B20221NY1312)。

作者简介: 代玉豪, 硕士研究生, 主要从事烟草青枯病防治方面的研究。

通信作者: 陈少鹏, 硕士, 农艺师。

共同通信: 丁伟, 教授。

Effects of Different Soil Disinfection Methods on Tobacco Bacterial Wilt and Rhizosphere Microbial Community

DAI Yuhao¹, YANG Liang¹, XIAO Qingju¹, GAO Zipeng¹,
ZHANG Fengjing¹, CHEN Shaopeng², DING Wei¹

1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Tobacco Company, Chongqing 400023, China

Abstract: In order to clarify the control effect of different soil disinfection methods on tobacco bacterial wilt, explore the application technology and value of different disinfection methods in production, and analyze the microecological effect of different disinfection methods on soil, in this paper, the effects of different soil disinfection methods on the occurrence of flue-cured tobacco bacterial wilt and rhizosphere microorganisms were investigated through field plot experiments. The results showed that the disease index and incidence of DMTT and TA treatments were significantly lower than that of control during the whole adjustment period. The results also showed that the relative prevention effectiveness was 47.76% and 37.06%. At the same time, CC, DMTT and TA treatments significantly reduced the content of solanacardia in tobacco rhizosphere soil. DMTT, CCA and TA all reduced the diversity and richness of bacterial and fungal communities to a certain extent. Compared with the control group, the relative proportion of Proteobacteria in each treatment decreased, with the most decreasing in DMTT, which reached 28.14%. Secondly, the relative proportion of Firmicutes in rhizosphere soil increased after soil disinfection. In the rhizosphere soil of tobacco, the relative abundance of solanacearia showed a very significant positive correlation with *Solicoccozya*, and the correlation coefficient was 0.85 ($p < 0.001$). All the four soil disinfectants reduced the relative abundance of *Solicoccozya*, among which, DMTT reduced the most (98.00%) and TA reduced 52.82%. In summary, the soil disinfection treatment with dazomet and trichloroisocyanuric acid can effectively reduce the number of pathogenic bacteria related microorganisms, optimize the soil micro-ecological environment, and curb the occurrence of tobacco bacterial wilt, which can be applied in production in some areas.

Key words: soil disinfectant; tobacco bacterial wilt; microbial 16S sequencing

烟草是我国重要的经济作物,我国烟草生产正向规模化、集约化方向发展,但受耕地、经济效益及生产栽培条件等因素制约^[1],烟草多集中种植,不可避免地导致连作^[2],而烟草长期连作容易引起土壤酸化、土壤营养失衡、土壤病原菌大量积累,甚至导致土传病害暴发,严重影响烟草的产量和质量.在长期连作模式下,烟草青枯病(Tobacco Bacterial Wilt)是最易暴发的土传病害之一.

青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)是引起烟草青枯病的致病菌,侵染烟株后最典型的症状为叶片枯萎,发病初期烟株下部叶片主脉一侧叶肉组织萎蔫、发黄,湿度大时呈水渍状褪绿斑.随着病害发展,烟株一侧叶片枯萎,呈“半边疯”状,发病后期茎秆上出现黑色条斑^[3-4].该病害已成为影响烟草健康生产最为严重的病害之一^[5],尤其在我国南方烟区、长江流域发病较为普遍,近些年有向北方蔓延的趋势^[6].带菌土壤是青枯菌的主要侵染源^[3],且土壤中青枯菌的数量与植物青枯病发病率呈显著正相关^[7-8],如能及时消除土壤中的病原菌,可以缓解细

菌性青枯病的发生. 化学防治一直是降低田间病原菌的初始侵染量的有效手段^[5, 9], 与其他防治方法相比, 化学防治具有简单、高效、成本低的优点^[10]. 应用杀菌剂是化学药剂防治土传细菌病害的最快速、最有效、最方便的防治手段. 将化学药剂用于土壤处理, 消除土壤中的有害生物以及不良因素的过程, 便称之为土壤化学消毒技术^[11-12]. 利用土壤消毒打破微生物障碍, 可有效预防青枯病等土传病害^[10, 13]. 土壤熏蒸消毒是指将熏蒸剂通过注射或混土的方式施入到土壤中, 采用专用塑料薄膜密封熏蒸 10~15 d, 使熏蒸剂气体扩散至不同深度土层, 达到杀虫防病的效果, 熏蒸剂防治谱广, 对土壤中的病原细菌、真菌、杂草和地下害虫均有较好的防效. 土壤熏蒸剂大多为小分子化合物, 在土壤中降解快, 在作物和果实中均无残留^[11]. 石灰氮、棉隆是生产中最常见的 2 种固体熏蒸剂^[12]. 两者都是通过与水反应产生活性物质从而杀灭土壤中的病原体, 但两者产生的活性物质有所不同, 石灰氮与水反应产生氰胺和双氰胺^[14], 棉隆在土壤中遇水会产生异硫氰酸甲酯(Methylisothiocyanate, MITC)等有毒气体^[11, 15], 这些气体能在土壤团粒间迅速扩散, 杀灭其中的各种病原菌、害虫和杂草种子. 此外, 土壤消毒过程中还可以通过直接将杀菌剂应用于土壤以达到灭菌目的, 氯溴异氰尿酸是烟草生产中常见的消毒剂^[16-19], 该药剂能缓慢释放 Cl 和 Br, 形成次氯酸(HOCl)和溴酸(HOBr), 因而具有强烈的杀菌作用^[19]. 三氯异氰尿酸为常见的消毒剂^[20], 但在烟草生产应用较少, 该消毒剂有效氯含量高, 可释放次氯酸^[21], 对细菌灭杀效果较好^[20, 22-23]. 以上 4 种药剂均为广谱性土壤消毒剂.

目前, 我国有关烟草青枯病土壤消毒剂技术的研究十分有限, 因此, 本研究探究了不同消毒方式下青枯雷尔氏菌的丰度变化, 分析土壤消毒后对烟草青枯病发生和土壤微生物群落变化差异的影响, 以为准确挖掘高效防治烟草青枯病的化学药剂及田间消毒技术提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验地点与小区处理

1) 试验地点. 试验地安排在重庆市酉阳县苍岭镇苍坝村烟草种植单元, 海拔 1 040~1 200 m, 酉阳县苍岭镇 28°99'N, 108°60'E. 试验所用烟苗采用漂浮育苗, 试验区均按相关技术标准进行统一大田管理, 中心花开放打顶, 用 12.5% 氟节胺 EC 控制腋芽. 烟草种植密度为行距 115 cm, 株距 55~60 cm, 每 667 m² 为 1 100 株左右. 试验品种选择“云烟 87”, 由重庆市烟草公司提供.

2) 试验小区处理. 试验共设 5 个处理, 3 次重复, 共 15 个小区, 小区面积约 66.67 m², 设置保护行, 试验地面积约为 1 333.33 m². 处理 1 为每 667 m² 使用 75% 石灰氮(CC) 10 kg, 处理 2 为每 667 m² 使用 95% 棉隆(DMTT) 10 kg, 处理 3 为每 667 m² 使用 42% 氯溴异氰尿酸(CCA) 180 g, 处理 4 为每 667 m² 使用 98% 三氯异氰尿酸(TA) 200 g, 处理 5 为空白对照(CK).

3) 施药方法. 石灰氮、棉隆施药前 3~7 d 灌水, 调整土壤相对湿度, 土壤含水量应达到田间持水量的 60% 以上(用手可压成各种形状而无湿痕), 起垄前先施药, 起垄后立即用常规塑料薄膜覆盖密闭土壤, 用垄间新土将薄膜四周压实, 保持密闭消毒 20 d 左右, 按照当地移栽技术规程, 打移栽孔透气 10 d 后做烟草发芽测试, 如无影响即可移栽烟苗. 三氯异氰尿酸、氯溴异氰尿酸于移栽前 10 d 每 667 m² 对水 100 kg 灌土处理.

1.2 烟草根际土壤采集时间及方法

于烟草移栽后 50 d 采集烟草根际土壤, 每个试验田取 4 个样方作为区内重复, 每个样方内随机选取 5 株烟, 使用灭菌铲采集 5~20 cm 的耕层土壤土样, 采集时去除表层 5 cm 的土壤, 利用土铲截断烟株根系, 将采集的各样点根系去除动植物残体、石块等杂物后迅速装入无菌自

封袋,放置于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰盒,3 h后抵达室内,轻轻抖落根系上附着的土壤,装入无菌管,放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,并用于土壤DNA提取。

1.3 烟草根际土壤青枯病菌含量检测

土壤样品DNA提取:每个重复土壤样品称取0.5 g新鲜土壤,按照MP公司的Fast DNA[®] Spin Kit for Soil土壤DNA快速提取试剂盒说明书提取土壤总DNA,提取结果用1%琼脂糖凝胶电泳检测.PCR扩增:以处理后的土壤样品DNA为模板,进行常规PCR扩增,PCR产物用1.5%的琼脂糖电泳,每个样品重复两次检测.土壤中青枯病菌RT-PCR检测:以处理后的土壤样品基因组DNA为模板,进行RT-qPCR扩增.RT-qPCR扩增体系见表1.反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s和72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s,40个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.用于青枯菌定量的引物体系见表2.通过土壤青枯病菌浓度的对数和RT-qPCR循环数线性方程 $y = -2.0241x + 35.952$ 计算土壤中青枯病菌的含量^[24-25].

表1 荧光定量PCR反应体系

反应成分名称	用量	μL
Pro Taq HS SYBR Green	10	
FlicF(10 μM)	1	
FlicR(10 μM)	1	
DNA	1	
ddH ₂ O	7	

表2 用于青枯菌定量的引物体系

引物名称	序列(5' to 3')	扩增基因	片段大小
FlicF	GAACGCCAACGGTGCGAACT	flic	400
FlicR	GGCGGCCTTCAGGGAGGTC		

1.4 不同土壤消毒方式处理后烟草根际土壤微生物多样性分析

采用土壤微生物DNA快速提取试剂盒(FastDNA Spin Kit, MP Biomedicals, United States)对土壤样品微生物总DNA进行提取,将提取的土壤微生物总DNA进行PCR扩增建立测序文库,用于土壤DNA扩增的引物体系见表3.针对细菌16S rRNA特异性V3~V4可变区进行扩增。

参照田明慧等^[26]的研究中的方法,进行PCR扩增,扩增结束后,使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(Axygen Biosciences, Union City, CA, USA)进行纯化,Tris-HCl洗脱,2%琼脂糖电泳检测.将纯化质量合格的PCR产物委托上海美吉医药生物有限公司进行文库构建及上机测序工作。

表3 用于土壤DNA扩增的引物体系

引物名称	序列(5' to 3')
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAA

1.5 病害调查与计算

烟草病害发生情况按照《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T 23222—2008)调查.结合当地

的病害发生特点对青枯病进行系统调查,调查每个小区的发病株数及发病级数并计算发病率.在发病初期开始调查,根据青枯病的发生情况,每隔 7 d 调查一次,连续调查 4 次以上.利用 Excel 2016 进行数据整理;使用 Graphpad Prism 9.0 绘图.

$$\text{病株率}(\%) = \frac{\text{发病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{发病株数} \times \text{该病级代表值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值}} \times 100 \quad (2)$$

1.6 数据处理与统计学分析

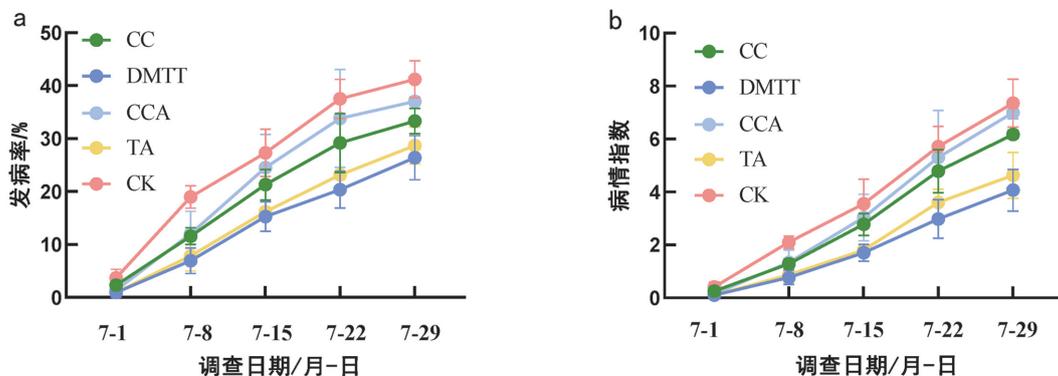
采用 Illumina MiSeq PE300 平台进行测序分析,通过 Fastp(v0.19.6),FLASH(v1.2.7)和 Qiime 2(v2022.2)对样本原始测序数据、拼接质控及序列降噪之后的数据信息进行统一管理.从原始测序数据获得样本真实序列信息 ASVs(Amplicon Sequence Variant),基于 ASVs 代表序列信息和丰度信息,进行后续物种分类学分析、群落多样性分析、物种组成分析.

利用 Excel 2016 进行数据整理;使用 Mothur-1.30 计算 Alpha 多样性指数,群落丰富度指数(Ace 指数、Chao 指数和 Sobs 指数)和群落多样性指数 Shannon 指数,基于 Kruskal-Wallis 秩和检验进行多组比较,基于 Kruskal-Wallis 秩和检验进行多组比较,基于 Bray-Curtis 距离进行主成分分析(Principalco-Ordinate Sanalysis, PCoA).应用 IBM SPSS 17.0 计算多重比较和独立样本 t 检验;VENN 分析采用在线网站制作(<https://ehbio.com/test/venn/#/>),采用 R studio “corrplot”包绘制自相关性矩阵.

2 结果与分析

2.1 不同土壤消毒方式对烟草青枯病的影响

由试验结果可知,施用不同土壤消毒剂后均在一定程度上减轻了烟草青枯病的发生,其中 DMTT 对青枯病的防治效果最好,其次为 TA.7 月 29 日,DMTT、TA 处理的病情指数分别为 4.06,4.63,明显低于空白对照的 7.36,DMTT、TA 处理的发病率亦明显低于空白对照,差异均具有统计学意义.DMTT、TA 处理防效分别为 44.76%,37.06%,CC、CCA 处理在青枯病发生前期有一定的防治效果,但随着时间推移防治效果不断减弱,病情指数与空白对照比较差异无统计学意义(图 1).

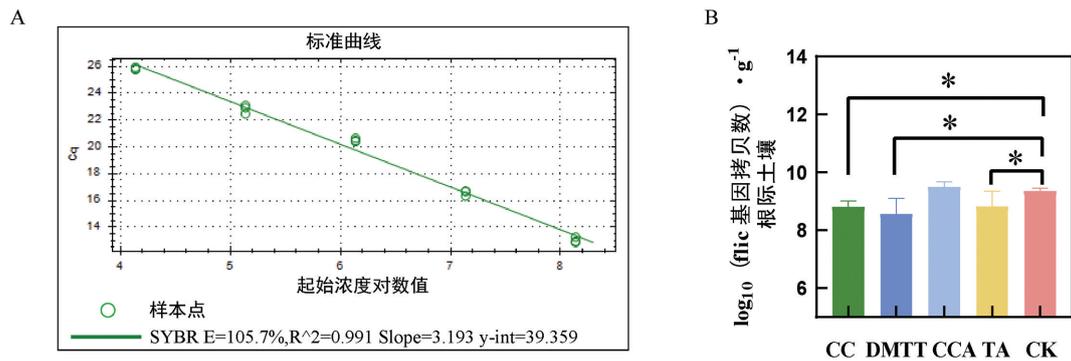


a 为烟草青枯病发病率, b 为烟草青枯病病情指数;其中, CC 为 75%石灰氮, DMTT 为 95%棉隆, CCA 为 42%氯溴异氰尿酸, TA 为 98%氯异氰尿酸, CK 为空白对照.

图 1 不同土壤消毒剂烟草青枯病发病情况

2.2 不同土壤消毒方式对烟草根际青枯菌丰度的影响

青枯菌鞭毛基因 *flic* PCR 扩增标准曲线见图 2a, 由图可知, 青枯菌 *flic* 基因扩增线性相关系数为 0.991, 符合扩增要求. 图 2b 展示了 50 d 不同消毒方式处理烟草根际土壤青枯菌含量, CCA 处理青枯菌丰度最高, 达到 3.25×10^9 CFU/g, 其次为空白对照, 青枯菌含量达到 2.31×10^9 CFU/g; DMTT、TA、CC 处理后烟草根际土壤青枯菌含量为 3.77×10^8 CFU/g、 6.79×10^8 CFU/g、 6.67×10^8 CFU/g, 均明显低于空白对照, 表明 DMTT、TA、CC 处理降低了烟草根际土壤青枯菌的含量.



a 为青枯菌 *flic* 基因定量 PCR 标准曲线, b 为不同土壤消毒剂处理 50 d 后烟草根际青枯菌丰度.

图 2 不同土壤消毒方式处理后烟草根际青枯菌丰度

2.3 不同土壤消毒方式对烟草根际土壤真菌和细菌 Alpha 多样性的影响

不同消毒方式处理后烟草根际土壤微生物群落 Alpha 多样性分析如表 1 所示, DMTT、CCA、TA 处理均在一定程度上降低了细菌群落的多样性和丰富度, 其中 DMTT 处理的 Ace 指数, Chao 指数和 Shannon 指数降低最明显, 组间数据比较差异无统计学意义. 真菌群落 Alpha 多样性数据表明, DMTT、CCA、TA 处理也在一定程度上降低了真菌群落的多样性和丰富度, 且 DMTT 处理后烟草根际土壤真菌群落在 Simpson 指数上明显高于其他处理, 这表明 DMTT 处理明显降低了烟草根际土壤真菌群落的丰富度, 而 CC 处理在一定程度上提高了真菌群落的多样性; 以上结果表明不同土壤消毒方式处理后, 对烟草根际土壤微生物多样性的影响不同, 其中 DMTT 处理对真菌群落的影响更明显.

表 1 不同土壤消毒剂方式土壤细菌、真菌群落 Alpha 多样性指数

μL

界	处理方法	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
细菌	CC	457.78a	450.66a	2.90a	0.150a
	DMTT	282.75a	280.33a	2.21a	0.319a
	CCA	330.05a	329.67a	2.76a	0.172a
	TA	298.92a	293.72a	2.97a	0.099a
	CK	394.86a	390.33a	3.09a	0.162a
真菌	CC	457.78a	450.66a	2.90a	0.150b
	DMTT	282.75a	280.33a	2.21a	0.319a
	CCA	330.05a	329.67a	2.76a	0.172b
	TA	298.92a	293.72a	2.97a	0.099b
	CK	394.86a	390.33a	3.09a	0.162b

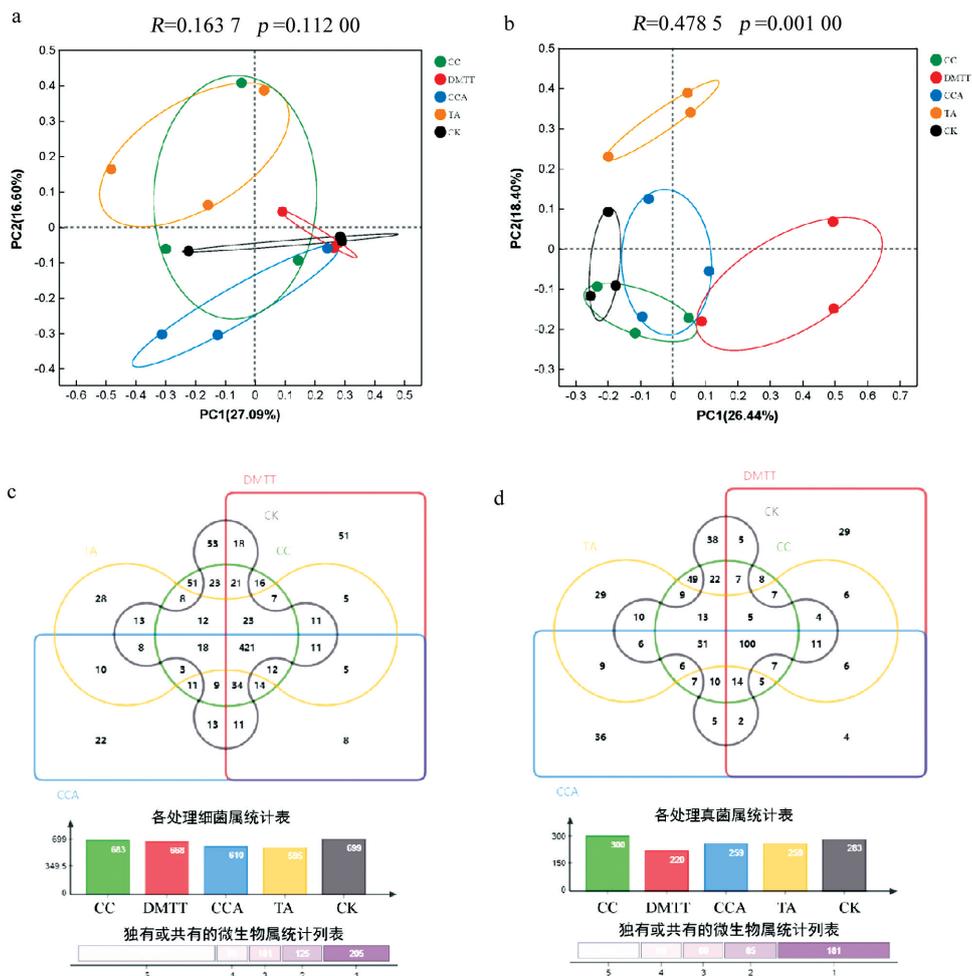
注: 小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义 ($p < 0.05$).

2.4 不同土壤消毒方式对土壤微生物 β 多样性影响

由图 3a 可见,在 OTU 水平上对不同消毒方式处理后 50 d 烟草根际土壤进行 PCoA 分析,细菌群落的 PCoA 分析结果表明,第一、二主坐标的贡献率分别为 27.09%和 16.60%。各处理在 PC2 轴上分离,其中 CC、TA 处理的样本点与 CK 距离较远,而 DMTT、CCA 处理与 CK 样本点距离较近,表明 CC、TA 处理根际土壤细菌群落结构与空白对照差异较大,而 DMTT、CCA 处理根际土壤细菌群落结构与空白对照相近。

由图 3b 可见,对真菌群落的 PCoA 分析结果表明,第一、二主坐标的贡献率分别为 26.44%和 18.40%,ANOSIM 组间差异检验的 R 值为 0.478 5, p 值为 0.001。同时,各处理在 PC1 轴上分离,其中 DMTT、TA 处理样本点与空白对照距离较远,表明 DMTT、TA 处理根际土壤真菌群落结构组成与空白对照相比差异较大。

通过物种维恩图分析统计了不同消毒剂处理后烟草根际土壤中固有和特有的微生物属数量,结果如图 3c、图 3d 所示,不同处理共有的细菌属 421 个、真菌属 100 个,CC、DMTT、CCA、TA 处理和空白对照特有的细菌属为 51, 51, 22, 28 和 53 个;CC、DMTT、CCA、TA 处理和空白对照特有的真菌属为 49, 29, 36, 29 和 38 个,表明 4 种土壤消毒剂处理后,都能影响烟草根际微生物群落的组成,且具有各自独特的微生物类群。



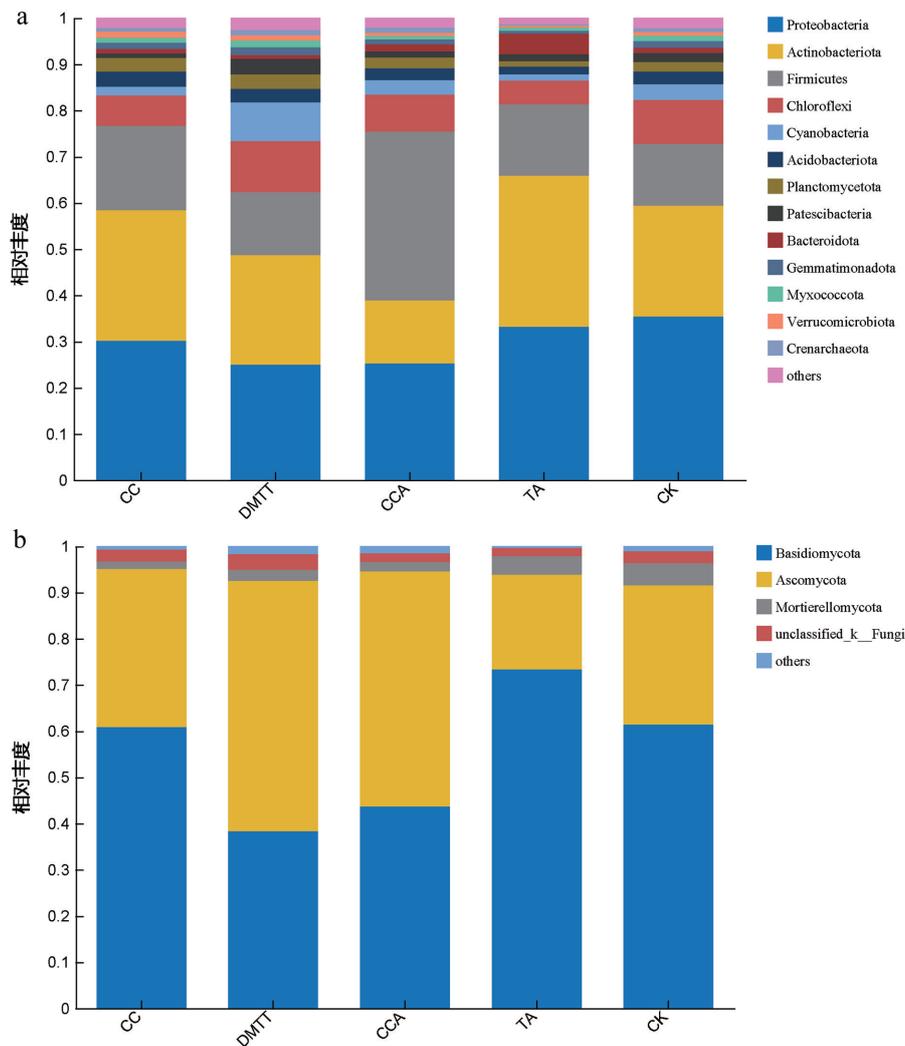
a, b 为不同消毒方式处理 ASV 水平下烟草根际细菌、真菌群落的 PCoA 分析,样本点的颜色代表不同的处理;
c, d 为细菌、真菌群落在属水平下的 VENN 分析结果,各颜色框内重合区域表示处理之间共有的微生物属。

图 3 不同土壤消毒方式对土壤微生物 Beta 多样性的影响度

2.5 不同消毒方式处理土壤微生物群落组成

不同消毒方式处理根际细菌共注释到 1 个域 (Domain)、1 个界 (Kingdom)、44 个门 (Phylum)、127 个纲 (Class)、293 个目 (Order)、465 个科 (Family)、950 个属 (Genus)，大多数序列属于变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和绿弧菌门 (Chloroflexi) 等，图 4a 显示出不同处理门水平下的细菌群落堆叠柱状图，不同土壤消毒方式处理后与空白对照组细菌门组成相同，丰度不同，4 种土壤消毒剂处理后烟草根际土壤变形菌门 (Proteobacteria) 相对占比皆下降，其中 DMTT 下降最多，相较于对照降低了 28.14%；4 种土壤消毒剂处理后根际土壤中厚壁菌门 (Firmicutes) 相对占比上升，其中 CCA 上升最多，相较于空白对照上升了 1.73 倍。

不同消毒剂处理根际真菌共注释到 1 个域 (Domain)、1 个界 (Kingdom)、13 个门 (Phylum)、46 个纲 (Class)、101 个目 (Order)、243 个科 (Family)、500 个属 (Genus)，大多数序列属于担子菌门 (Basidiomycota)、子囊菌门 (Ascomycota) 和被孢霉门 (Mortierellomycota) 等，如图 4a 所示，不同处理门水平下的真菌群落堆叠柱状图，除 TA 处理以外，其余处理均降低了担子菌门 (Basidiomycota) 相对丰度，其中 DMTT 下降最多，相较于对照下降了 37.5%；同时，子囊菌门 (Ascomycota) 丰度均上升，DMTT 处理上升最多，相较于对照上升了 80.0%。

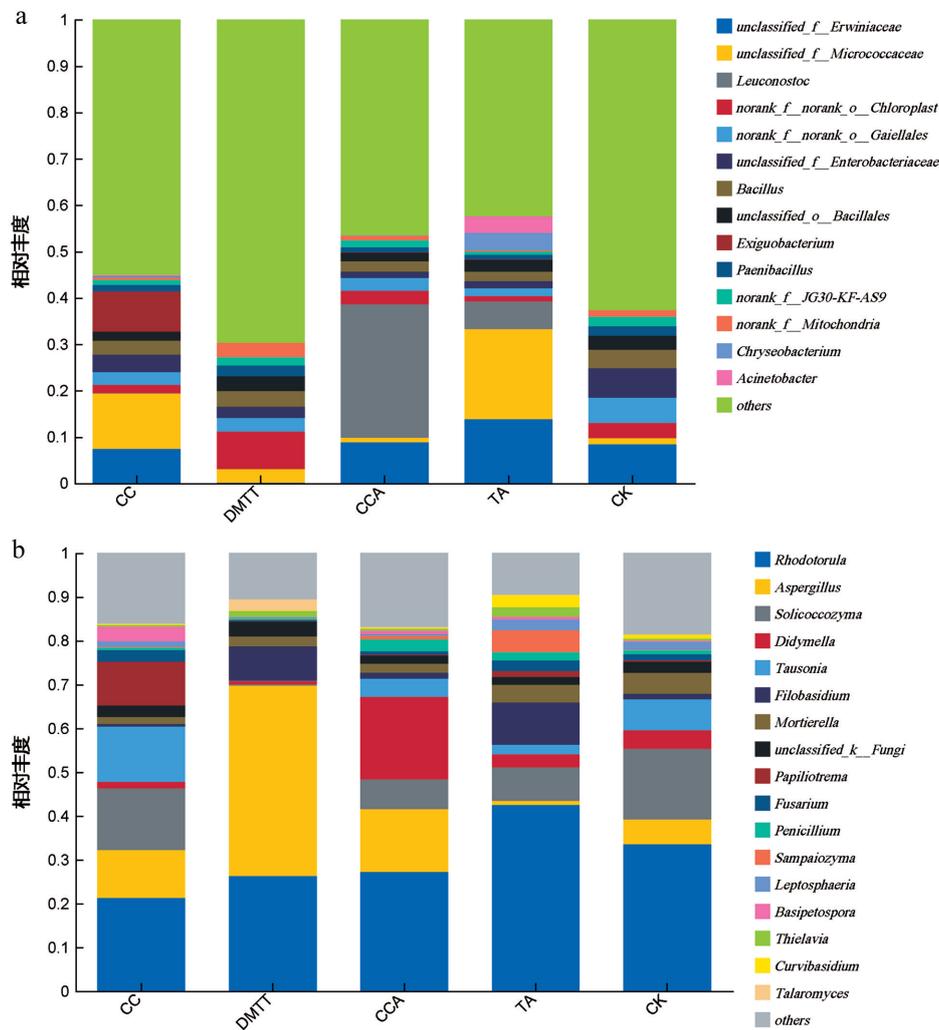


a 为细菌，b 为真菌。

图 4 土壤微生物群落基于门分类水平下在 Bray-Curtis 距离的群落组成

由图 5 可见前 14 个优势菌,其中 8 类未确定.分析已确定分类地位的细菌发现,与空白对照相比,CC 处理后类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度降低;DMTT 处理后芽孢杆菌属(*Bacillus*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)降低;CCA 处理后芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)降低;TA 处理后芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)相对丰度下降;但未达到显著水平.不同土壤消毒方式处理后均降低了产黄杆菌属(*Rhodanobacte*)、*Methylovirgula*、*norank_f__Chitinophagaceae*、*unclassified_f__Bacillaceae* 等差异细菌属的丰度.

真菌群落中,空白对照优势菌群第三大优势菌属为短柄菌属(*Solicoccozyma*),其相对丰度为 16.15%,DMTT 处理显著降低了短柄菌属(*Solicoccozyma*)的相对丰度,降低了 98.00%,CC、CCA 和 TA 处理分别降低了 12.88%、57.70%和 52.82%.对照处理中第五大优势菌属 *Tausonia* 属(7.12%),CCA、TA 处理后明显降低了 *Tausonia* 属.



a 为细菌, b 为真菌.

图 5 土壤微生物群落基于属分类水平下在 Bray-Curtis 距离的群落组成

2.6 青枯菌与根际差异菌属的相关性分析

利用自相关性矩阵检验 *Ralstonia* 与差异菌属的相关性,结果如图 6 所示,烟草根际土壤中 *Ralstonia* 的相对丰度与差异真菌属 *Solicoccozyma*、*Mucor* 表现出明显正相关,其相关性系数

与 p 值为 0.85 ($p < 0.001$), 0.60 ($p = 0.018$); *Ralstonia* 与细菌属 *Rhodanobacter*、*Methylovirgula*、*Unclassified_Streptomycetaceae* 表现出正相关, 相关系数与 p 值为 0.57 ($p = 0.027$), 0.55 ($p = 0.035$), 0.54 ($p = 0.037$); 以上结果表明, 不同消毒方式处理后, 对差异微生物的影响也在一定程度上间接影响了青枯雷尔氏杆菌在烟草根际土壤的相对丰度。

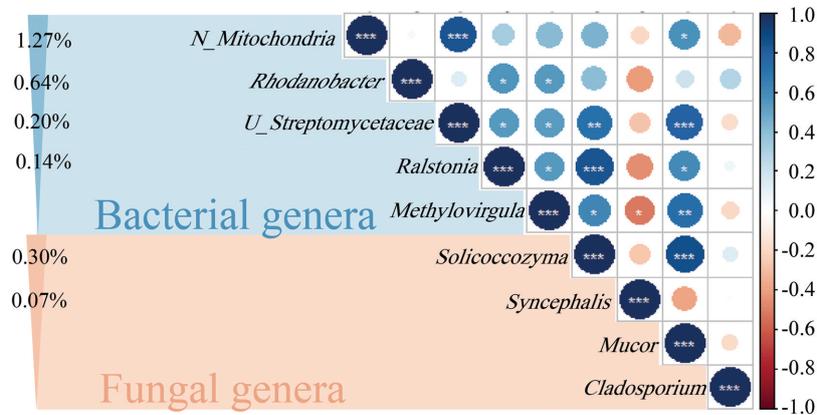


图6 烟草根际土壤劳尔氏菌属与差异微生物属的相关性

3 结论与讨论

3.1 不同土壤消毒方式对烟草青枯病发生的影响

本试验探究了4种土壤消毒剂对烤烟抗病性及其土壤微生物群落的影响, 由试验结果可知, 在大田条件下, 不同土壤消毒方式处理后均能在一定程度上减轻烟草青枯病的发生, 其中棉隆(DMTT)对青枯病的防治效果最好, 其次为三氯异氰尿酸(TA), 其病情指数与发病率均明显低于空白对照, 这表明利用 DMTT、TA 处理对土壤进行消毒, 可以有效控制烟草青枯病的发生. 在秦平伟等^[27]和黄石旺等^[28]的研究中, 棉隆对烟草青枯病的相对防效可以达到 70%, 89%. 本研究也发现棉隆对烟草青枯病具有良好的控病效果, 但由于土壤条件如温湿度、施药剂量、使用方法、土壤改良剂、施药季节等差异导致最终的防效略有差异。

3.2 不同土壤消毒方式对青枯菌丰度的影响

室内定量结果表明, CCA 处理青枯菌丰度最高, 其次为空白对照, 而 DMTT、TA、CC 处理后则明显降低了烟草根际土壤青枯菌含量, 均明显低于空白对照. 表明在 DMTT、TA、CC 处理后, 有利于缓解烟草根际受到胁迫. CC 处理与 TA 处理青枯菌丰度相近, 但在田间表型不同, 这可能是由于不同消毒方式对土壤中非靶生物的影响差异造成的, 在罗飞等^[18]的研究中, 室内条件下氯溴异氰尿酸的青枯菌 EC_{50} 为 273.99 mg/L, 与其他的土壤消毒剂相比, CCA 在烟草生产的应用较多, 本试验田的烟草配套技术措施中存在 CCA 用于叶面消毒的措施, 这也可能导致土壤中的青枯菌产生抗药性, 同时, 试验土壤采样时间位于烟株旺长期, 根际微生物群落已历经短期演变, 这也可能是导致 CCA 处理效果不佳的原因。

3.3 不同土壤消毒方式对烟草根际土壤微生物的影响

对不同土壤消毒剂处理后烟草根际土壤微生物的数据分析表明, 不同土壤消毒方式处理后改变了土壤微生物的多样性, DMTT、CCA、TA 均在一定程度上降低了细菌、真菌群落多样性和丰富度, 这与王红燕^[29]的结果较为一致. 石灰氮在一定程度上提高了土壤微生物群落的多样性, 也与刘晨祥^[30]、高正睿等^[31]的研究结果相符. 在属水平上, 利用 One-way ANOVA 检

验,筛选出隶属于变形菌门的差异细菌属——*norank-Mitochondria*;隶属于差异真菌属担子菌门——*Solicoccozya*、*Tausonia*,子囊菌门差异真菌属——*Cladosporium*;青枯雷尔氏杆菌(*Ralstonia*)与差异菌属的相关性分析结果表明,与差异真菌属 *Solicoccozya*、*Mucor* 可能存在拮抗关系,与差异细菌属——*Rhodanobacter*、*Methylovirgula*、*Unclassified_Streptomyetaceae* 可能存在协同作用;迄今为止,大多数根际微生物群落抵抗病原菌的研究都聚焦于根际微生物如何直接抑制土传病原菌的生长.但有研究表明,一些根际细菌能够促进病原菌的生长,成为土传病原菌在根际定殖增长的帮手^[32].本研究通过相关性分析发现5个与劳尔氏菌属显著相关的微生物属,这表明土壤消毒技术可能通过降低与青枯菌存在协同关系微生物属(例如 *Rhodanobacter*、*Solicoccozyma*)的相对丰度达到控病的效果,此外 DMTT、TA 对这些差异细菌属的影响大于 CC 和 CCA 处理,这可能是导致 DMTT 与 TA 处理在烟草青枯病发病高峰期的控病效果优于其他处理的原因.相比常规农药,消毒处理的毒性一般较高,使用要求也极为苛刻.本研究发现与空白对照相比,不同土壤消毒方式处理也降低了有益菌属芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)的丰度,鉴于消毒剂对益生菌群的影响,认为在土壤处理后及时补充有益微生物,如配施微生物菌肥非常必要^[6].

综上所述,本研究首次明确了石灰氮、棉隆、氯溴异氰尿酸和三氯异氰尿酸等不同土壤消毒方式对青枯菌和土壤微生物的影响,结果表明棉隆和三氯异氰尿酸消毒处理能明显减少田间烟草青枯病的发生,降低田间病原菌的初始侵染量,但土壤消毒技术在一定程度上降低了土壤微生物群落的多样性,建议使用土壤消毒技术后,补充相应的有益微生物,同时在连作障碍严重地块开展该技术.

参考文献:

- [1] 张继光, 申国明, 张久权, 等. 烟草连作障碍研究进展[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(3): 95-99.
- [2] 何洪令, 李钠钾, 孙成成, 等. 烟草青枯病的生物防治研究进展[J]. 植物医生, 2021, 34(2): 4-8.
- [3] 刘勇, 韦树谷, 叶鹏盛等. 烟草青枯病的发生流行及生防菌防控的根际微生物效应研究进展[J/OL]. 烟草科技, 1-16[2024-02-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1137.TS.20231201.1018.002.html>.
- [4] 李碧德. 两种生防菌(*Paenibacillus polymyxa* 与 *Pseudomonas fluorescens*) 防控烟草青枯病的特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [5] 王垚, 黄纯杨, 杨亮, 等. 烟草青枯病复配增效药剂筛选及田间防效[J]. 农药, 2022, 61(10): 776-780.
- [6] 丁伟, 刘颖, 李石力, 等. 烟草青枯病的病原特性及流行预警[J]. 植物医生, 2020, 33(2): 1-10.
- [7] JIANG G, WEI Z, XU J, et al. Bacterial Wilt in China: History, Current Status, and Future Perspectives[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1549.
- [8] SHE S, NIU J, ZHANG C, et al. Significant Relationship between Soil Bacterial Community Structure and Incidence of Bacterial Wilt Disease under Continuous Cropping System[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(2): 267-275.
- [9] 陈雅琼, 刘申艳, 谢永辉, 等. 烟草主要土传病害防控技术及登记用药分析[J]. 云南农业科技, 2023(4): 40-42.
- [10] 韩松庭, 丁伟. 烟草青枯病的化学防治研究进展[J]. 植物医生, 2019, 32(5): 20-25.
- [11] 王秋霞, 颜冬冬, 王献礼, 等. 土壤熏蒸剂研究进展[J]. 植物保护学报, 2017, 44(4): 529-543.
- [12] 朱诗君, 王丽丽, 金树权, 等. 不同土壤消毒方式对土壤真菌多样性和群落结构的影响[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(3): 639-646.
- [13] 何振宇, 戴良英, 陈武. 烟草连作障碍及其防治技术研究进展[J]. 农学学报, 2015, 5(10): 64-69.

- [14] SUZUKI K, KASHIWA N, NOMURA K, et al. Impacts of Application of Calcium Cyanamide and the Consequent Increase in Soil pH on N₂O Emissions and Soil Bacterial Community Compositions[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2021, 57(2): 269-279.
- [15] PRIDER J, WILLIAMS A. Using Dazomet to Reduce Broomrape Seed Banks in Soils with Low Moisture Content[J]. *Crop Protection*, 2014, 59: 43-50.
- [16] 陈金. 氯溴异氰尿酸在烟田中的残留降解及其对烟叶品质的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [17] 陈金, 龚道新, 彭祜, 等. 氯溴异氰尿酸对植烟土壤酶活性的影响[J]. *浙江农业科学*, 2012, 53(4): 477-479.
- [18] 罗飞, 穆青, 余知和, 等. 五种药剂对烟草青枯病菌的抑制活性及碳代谢的影响[J]. *农药学学报*, 2023, 25(4): 870-877.
- [19] 师红梅, 毛红彦, 刘雅, 等. 氯溴异氰尿酸防治几类主要病害药效研究[J]. *河南科技学院学报(自然科学版)*, 2005, 33(1): 63-65.
- [20] 季生栋. 谷子细菌性褐条病防治药剂筛选[J]. *湖北植保*, 2023(4): 34-36.
- [21] CLASEN T, EDMONDSON P. Sodium Dichloroisocyanurate (NaDCC) Tablets as an Alternative to Sodium Hypochlorite for the Routine Treatment of Drinking Water at the Household Level[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2006, 209(2): 173-181.
- [22] 张战利, 王家哲, 洪波, 等. 9种杀菌剂对枣树锈病的室内毒力及田间防效[J]. *陕西农业科学*, 2022, 68(9): 10-13.
- [23] 董扬. 糜子细菌性条斑病防治药剂筛选[J]. *湖北植保*, 2023(1): 15-18.
- [24] 孙成成. 多粘类芽孢杆菌在烟株内定殖特性及对烟草青枯病的防效研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [25] 江其朋. 烟草根际不同土层细菌种群多样性及其与青枯病发生的关系研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [26] 田明慧, 滕凯, 田峰, 等. 不同烟草青枯病抗感品种根际土壤细菌群落结构特征分析[J]. *植物医学*, 2022, 1(6): 42-49.
- [27] 秦平伟, 陈代明, 陈瑜欣, 等. 98%棉隆微粒剂对烟草生长和青枯病发生的影响[J]. *植物医生*, 2019, 32(6): 34-38.
- [28] 黄石旺, 王锡春, 周雨, 等. 土壤熏蒸对烟草土传病害的防控效果研究[J]. *湖南农业科学*, 2021(11): 59-61, 65.
- [29] 王红燕. 棉隆消毒对党参育苗质量和土壤生态因子的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2022.
- [30] 刘晨祥. 氰氨化钙对植烟土壤酶活性与微生物群落结构的影响 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- [31] 高正睿, 宿翠翠, 王玉红, 等. 不同消毒方式对特殊药材连作土壤理化性质、酶活性及微生物群落的影响[J/OL]. *山东农业科学*, 1-13[2024-02-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1148.S.20240204.1015.002.html>.
- [32] LI M, POMMIER T, YIN Y, et al. Indirect Reduction of *Ralstonia Solanacearum* via Pathogen Helper Inhibition[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(3): 868-875.

责任编辑 苏荣艳