

# 不同浓度棉隆熏蒸对老龄苹果园土壤微生物环境的动态影响

徐少卓, 王义坤, 王柯, 陈学森, 沈向, 尹承苗, 毛志泉

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 通过向 25 年老龄苹果园土壤中施入不同浓度(T1, 0.02‰; T2, 0.1‰; T3, 0.5‰)的棉隆, 利用微生物平板培养、实时荧光定量 PCR(qPCR)、微生物碳源利用(biolog-ECO)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、生物多样性指数 Biodap 等方法研究不同浓度棉隆熏蒸下土壤可培养微生物(细菌、真菌)数量、群落结构及其多样性指数随时间变化的演变趋势, 并进行平邑甜茶盆栽验证, 以为减轻苹果连作障碍筛选棉隆浓度提供理论依据。结果表明: 0.1‰的棉隆施用量对连作土壤再植平邑甜茶幼苗的生长促进作用最为显著。老龄苹果园土壤中微生物数量随棉隆施用量的增大而显著性降低, 30 天时, 各处理(T1、T2、T3)可培养细菌数量较 CK 分别降低了 57%, 81%, 87%, 可培养真菌数量(T1、T2、T3)较 CK 分别降低了 75%, 81%, 100%, 层出镰孢菌基因(*F. Proliferatum*)拷贝数较 CK 分别降低了 57%, 80%, 85%; 微生物单一碳源利用率(biolog-ECO)结果表明, 微生物活性(用平均每孔颜色变化率(AWCD)表示)在熏蒸后的土壤中随时间逐渐恢复, 但施加浓度越高, 恢复速度越慢, 30 天时, T1(0.02‰)的 AWCD 显著低于 CK; 60 天时, 该处理的 AWCD 已与 CK 无差异, 而 T3(0.5‰)AWCD 直到 90 天时仍显著低于 CK; 微生物 T-RFLP 主成分分析表明, 各处理均改变了老龄苹果园土壤微生物群落结构, 棉隆施用浓度越大, 群落改变越显著, 但高浓度熏蒸下的群落结构很不稳定, 随时间波动明显; 聚类分析显示, 随时间推移, T1(0.02‰), T2(0.1‰)与 CK 的群落结构相似度逐渐升高, 并逐渐向 CK 移动。而 T3(0.5‰)始终与 CK 保持低相似度; 在微生物多样性分析中, T3(0.5‰)对微生物多样性指数(Shannon index)与丰富度指数(Margalef index)降低程度最为显著。

**关键词:** 老龄苹果园土壤; 不同浓度棉隆; 土壤微生物; 土壤群落结构; 微生物多样性

中图分类号: S661.1; S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-2242(2018)02-0290-08

DOI: 10.13870/j.cnki.stbcbx.2018.02.043

## Dynamic Change Trend of Different Concentrations Dazomet Fumigation on the Microorganisms Environment in the Soil of Old Apple Orchard

XU Shaozhuo, WANG Yikun, WANG Ke, CHEN Xuesen,

SHEN Xiang, YIN Chengmiao, MAO Zhiqian

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018)

**Abstract:** In order to select the optimal concentration of dazomet for old apple orchard soil fumigation, a pot experiment was carried out. The pot experiment was designed to have 4 concentration treatments, i. e. Treatment CK(0, untreated old orchard soil), Treatment T1(0.02‰), Treatment T2(0.1‰), Treatment T3(0.5‰). All the pots in the experiment were filled up with the same soil from a 25 years old apple orchard. And the dynamic change of soil culturable microorganisms number(bacteria, fungi), community structure and diversity index under different concentrations dazomet fumigation was studied using microorganisms plate culture, a real-time quantitative PCR(qPCR), biolog-Eco and terminal restriction fragment length polymorphism(T-RFLP) methods. The results showed that the soil microorganism number significantly decreased with the increase of applying dazomet content. At 30th day, compared with the control, the (T1, T2, T3) bacteria number reduced by 57%, 81% and 87%, the fungi number reduced by 75%, 81%, 100%. The gene copy numbe of *Fusarium proliferatum* which analysed by Real-time PCR was reduced by 57%, 80%, 85%. Biolog-Eco showed microbial activity (using the average well development, AWCD) recovered gradually in the soil after fumigation, but the applied concentration was higher, the recovery speed was

收稿日期: 2017-10-31

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-28); 国家自然科学基金项目(31501720, 31672104); 国家重点研发计划项目(2016YFD0201114); 山东省水果创新团队项目(SDAIT-06-07)

第一作者: 徐少卓(1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事苹果连作障碍防控研究。E-mail: 892795417@qq.com

通信作者: 尹承苗(1986—), 女, 讲师, 主要从事苹果连作障碍防控研究。E-mail: yinchengmiao@163.com

毛志泉(1963—), 男, 教授, 主要从事苹果连作障碍防控研究。E-mail: mzhiqian@sda.u.edu.cn

slower. At 30th day, AWCD of T1(0.02‰) significantly lower than that of CK, the processing AWCD had no difference with CK when 60 days, but AWCD of T3(0.5‰) was still significantly lower than that of CK until 90 days. T-RFLP principal component analysis showed that all treatments changed the soil microbial community structure in old apple orchard. Dazomet concentration was greater, the more significant change of microbial community, but community structure was not very stable under high concentration of dazomet fumigation. Cluster analysis showed that the community structure of T1 and T2 became more and more similar to that of CK over time, while the community structure of T3(0.5‰) always kept low similarity with CK. Microbial diversity analysis showed that Shannon index and Margalef index of T3(0.5‰) significantly reduced, Simpson index improved. In conclusion, 0.5‰ dose of dazomet fumigation could significantly reduce microbial number and activity, change the microbial community and slow the recovery of microorganisms.

**Keywords:** old apple orchard soil; dazomet fumigation; microorganism; microorganism community; microbial diversity

苹果连作障碍又称苹果再植病,即在同一块土地上,苹果园刨除老树后又继续栽植新苹果树,新栽的幼树常表现出植株矮小、叶片变小、生长衰弱、根系分生能力差且抗性差、果实品质低劣等现象<sup>[1-2]</sup>。随着苹果新品种的不断更新以及矮化密植技术的持续推广,老果园更新势在必行,因此我国老果园更新面临着严峻的挑战<sup>[3]</sup>。造成苹果连作障碍发生的原因很多,普遍认为土壤微生物群落结构失衡是造成苹果连作障碍发生的主要原因<sup>[4]</sup>。因此,研究不同措施对微生物数量及群落结构的影响对于防控苹果连作障碍具有重要的现实意义。

土壤消毒是减轻苹果连作障碍的重要措施,目前仍以化学熏蒸为主,而效果较好的化学熏蒸剂溴甲烷因破坏臭氧层,导致紫外线增多,被《蒙特利尔议定书哥本哈根修正案》禁止使用,随之代替溴甲烷的化学熏蒸剂逐渐增多,如棉隆、威百亩、氯化苦等<sup>[5]</sup>。棉隆(dazomet),3,5-二甲基-1,3,5-噻二噻烷-2-硫酮,在潮湿的土壤中遇水易生成异硫氰酸甲酯,生成的异硫氰酸甲酯在细胞内可与细胞中的亲核部位(如氨基、羟基、巯基)发生氨基甲酰化反应,继而通过挥发产生毒性效应。研究发现棉隆作为广谱性土壤杀菌剂不仅可以减少土壤微生物数量,而且对微生物群落结构具有一定影响<sup>[6-7]</sup>,因此棉隆被广泛应用于防治农作物土传病害,如苹果再植病、生姜茎腐病、辣椒疫霉病、番茄根结线虫病以及黄瓜枯萎病等<sup>[8-12]</sup>。虽然棉隆现已成为优良的土壤杀菌剂,但棉隆的主要成分异硫氰酸甲酯在土壤中会随着时间逐渐消解<sup>[13-14]</sup>,其所发挥药效的持续性也会逐渐降低。

有研究认为只有适量的棉隆施用量才会最大程度地促进作物的生长<sup>[10-11]</sup>,但对于其中的原因未见报道。因此,本研究通过向老龄苹果园土壤中施用不同剂量的棉隆来研究土壤生物多样性以及群落结构随时间变化的动态趋势,并进行盆栽试验,试图从微生物群落结构及多样性变化的角度来为苹果连作障碍

的缓解筛选出合适的棉隆施用浓度。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验于 2016 年 10 月至 2017 年 9 月在山东农业大学园艺科学与工程学院作物生物学国家重点实验室进行,试验用土为山东省泰安市满庄镇小王庄村 25 年生老龄苹果园土,取自距树干 80 cm、去表层土后深 20—40 cm 的区域,多点随机取样,混匀备用。土壤为棕壤土,其理化性质为:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量 6.2 mg/kg, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 含量 4.5 mg/kg,速效钾含量 88.2 mg/kg,速效磷含量 10.1 mg/kg,有机质含量 5.0 g/kg。

98%微粒棉隆(dazomet)由江苏省南通施壮化工有限公司生产。

### 1.2 试验处理

2016 年 10 月 15 日开始进行熏蒸处理,根据前期研究结果,棉隆施用浓度共设 4 个处理,分别为 CK,0; T1,0.02‰; T2,0.1‰; T3,0.5‰(W:W)。每盆装土 3 kg。将棉隆与土混合均匀后浇水覆膜,每个处理设置 10 盆重复。15 天后揭膜并倒土晾晒,然后每 10 天表面洒水 1 次,并于 11 月 15 日、12 月 15 日、2017 年 1 月 15 日 3 次取样。取样时去除表层与盆周围土,每个处理随机选取 2 盆,混匀后过 2 mm 筛,分别装入 3 个封口袋分别保存,一份室温存放,测定微生物碳源利用率;一份于 4 ℃冰箱保存,测定土壤微生物数量;一份于 -80 ℃冰箱保存,提取土壤 DNA,后续进行 qPCR 和 T-RFLP 分析。

2017 年 3 月 22 日按照上述棉隆浓度进行熏蒸处理,2017 年 5 月 1 日,取长势基本一致的平邑甜茶幼苗(将平邑甜茶种子于 4 ℃层积 30 天,种子露白后,播种于育苗培养钵中)移栽至上部内径 25 cm、下部内径 17 cm、高 18 cm 的泥盆中,每盆定植 2 株幼苗,正常肥水管理。2017 年 7 月 15 日、8 月 15 日、9 月 15 日分 3 次取平邑甜茶植株,每个处理取平邑甜茶幼苗 3 株,洗净后测定生

物量指标。试验中以 8 月份数据为例进行分析。

### 1.3 试验方法

有机质、氮、磷、钾测定参照鲍士旦《土壤农化分析》第 3 版的方法。有机质含量采用重铬酸钾容量法(热稀释放法)测定;速效磷( $P_2O_5$ )含量采用钼锑抗比色法测定;速效钾( $K_2O$ )含量采用火焰光度法测定;铵态氮和硝态氮( $NH_4^+-N$  和  $NO_3^--N$ )含量采用  $CaCl_2$  浸提—流动注射分析法<sup>[15]</sup>测定。

土壤细菌、真菌采用平板稀释法<sup>[16]</sup>,最终结果换算为当量干重数据。细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,真菌采用 PDA 培养基。平邑甜茶幼苗株高、地径分别用米尺、游标卡尺(上海申工)测定;干、鲜质量用电子天平(上海舜宇恒平)测定。

#### 1.3.1 熏蒸土壤中微生物群落单一碳源利用的测定

土壤微生物群落碳源利用采用 Biolog(美国 Gen III Microstation 自动微生物鉴定系统)测试平板测定。具体步骤在 Classen 等<sup>[17]</sup>、Garland 等<sup>[18]</sup>等的研究基础上加以改进:将取样后的新鲜土壤室温下活化 24 h,后取 10 g(当量干重)鲜土加到含有 90 mL 0.85%生理盐水的 200 mL 锥形瓶中,220 r/min 振荡 30 min 后 4 ℃自然静置 30 min。取上清悬浮液 5 mL,梯度稀释 1 000 倍作为接种液。取 150  $\mu$ L 接种液置于 Biolog-ECO 微型板块孔中,28 ℃持续培养 168 h。每 24 h 读取 590 nm 和 750 nm 下的数值(0 h 读数记为 0),并计算平均每孔颜色变化率(average well-color development,AWCD)。

$$ACWD = \frac{\sum(C_i - R)}{31}$$

式中: $C_i$  为第  $i$  孔的吸光值; $R$  为对照孔的吸光值。当  $C_i - R \leq 0$  时记为 0。

1.3.2 土壤总 DNA 提取及荧光定量分析 土壤 DNA 的提取参考 E. Z. N. A™ 土壤 DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tek Omc. USA)说明书操作。实时荧光定量采用 CFX96™ Thermal Cycler (Bio-Rad)对土壤中层出镰孢菌(*F. proliferatum*)基因拷贝数进行绝对定量分析。实时荧光定量 PCR 体系依据 SYBR Premix Ex Taq™ Kit TaKaRa 试剂盒说明步骤完成。

25  $\mu$ L PCR 反应体系:DNA 模板 1.5  $\mu$ L;SYBR

Premix Ex Taq II 12.5  $\mu$ L;引物各 1  $\mu$ L;ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L。

层出镰孢菌 PCR 扩增反应程序:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s;60 ℃退火 30 s;共计 40 个循环。

1.3.3 T-RFLP 图谱分析<sup>[19]</sup> 用于细菌 16S 片段扩增的引物采用带 FAM 荧光标记的细菌通用引物 27F-FAM 和 1492R,由上海生工生物工程技术有限公司合成。27F-FAM:5'-FAM-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';1492R:5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3'。

用于真菌 ITS 片段扩增的引物采用带 FAM 荧光标记的真菌通用引物 ITS1-F-FAM 和 ITS4,由上海生工生物工程技术有限公司合成。ITS1-F-FAM:5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3';ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATAGC-3'。

50  $\mu$ L 真菌(细菌)反应体系:25  $\mu$ L Taq Master Mix;2  $\mu$ L DNA 模板;ITS1-F(27F-FAM)和 ITS4(1492R)各 3  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 1 min(30 S),51 ℃退火 1 min(90 S),72 ℃延伸 1 min,共 34 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。取 5  $\mu$ L ITS-PCR(27F-PCR)扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,然后用 EasyPure PCR 纯化试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)纯化。将纯化产物用限制性内切酶 Fast Digest Hha I 进行酶切。30  $\mu$ L 酶切反应体系:10  $\mu$ L ITS-PCR 纯化产物;2  $\mu$ L Hha I;2  $\mu$ L Buffer;16  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应体系于 37 ℃保温孵育 15 min,将酶切产物送至上海生工生物技术有限公司进行测序。

### 1.4 数据处理

采用 Excel 2003、Origin 8.5 进行数据整理,SPSS 19.0 进行方差分析,Duncan's 新复极差法进行差异显著性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对平邑甜茶幼苗生长的影响

由表 1 可以看出,0.1‰的棉隆浓度对平邑甜茶幼苗生长的促进效果最明显,在 0.1‰的棉隆熏蒸下,平邑甜茶幼苗的株高、地径、地下部干质量、地上部干质量、根冠比相对对照提高了 66.5%,74.0%,118.6%,60.0%,39.0%。

表 1 不同处理对平邑甜茶生物量的影响

处理	株高/cm	地径/mm	地下部干质量/g	地上部干质量/g	根冠比
CK	42.83±2.13c	5.20±0.18c	7.25±0.69d	9.64±0.88c	0.75±0.03c
T1	64.13±0.83b	8.01±0.12b	11.93±0.51b	13.61±0.34b	0.87±0.05b
T2	71.32±0.81a	9.05±0.06a	15.85±0.63a	15.39±0.25a	1.02±0.04a
T3	55.07±0.83d	7.26±0.06d	8.42±0.23c	10.78±0.84c	0.78±0.05c

注:表中数据为平均值±标准差;同列小写字母表示不同处理间差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

### 2.2 不同处理对土壤可培养微生物数量的影响

由表 2 可以看出,棉隆施用量越大,细菌数量减

少越明显。尤其以 0.5‰浓度处理细菌减少量最为显著,熏蒸后的土壤 30,60,90 天时,相比 CK 细菌

数量分别减少了 87.0%,87.0%,83.6%,而低浓度 0.02‰ 处理比 CK 细菌数量分别减少了 57.0%,31.3%,17.2%,0.1‰ 浓度处理的细菌数量比 CK 分别减少了 81.7%,77.1%,62.1%。

真菌的变化趋势与细菌相似,高浓度 0.5‰ 剂量

表 2 不同处理对土壤微生物数量的影响

处理 时间/d	细菌数量( $10^5$ CFU · g <sup>-1</sup> )				真菌数量( $10^3$ CFU · g <sup>-1</sup> )			
	CK	T1	T2	T3	CK	T1	T2	T3
30	115±3.48a	50±4.26b	21±2.03c	15±1.76c	87±4.37a	21±2.03b	16±1.76b	0±0.00c
60	131±1.73a	90±4.63b	30±4.48c	17±1.45d	88±4.06a	53±4.33b	32±2.60c	3±0.67d
90	116±4.81a	96±3.84b	44±3.61c	19±1.76d	106±2.96a	97±2.31b	42±1.73c	14±0.88d

### 2.3 不同处理对层出镰孢菌基因拷贝数的影响

徐文凤等<sup>[20]</sup>在我国环渤海苹果重茬园中分离出大量镰孢属真菌,分别为尖孢镰孢菌(*F. oxysporum*)、层出镰孢菌(*F. proliferatum*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)和串珠镰孢菌(*F. moniliforme*),致病性测定结果表明,层出镰孢菌和串珠镰孢菌致病性最强。本试验层出镰孢菌的基因拷贝数结果表明:30 天时,0.02‰,0.1‰,0.5‰ 棉隆浓度熏蒸下的层出镰孢菌基因拷贝数分别较 CK 降低了 57.1%,80.0%,85.7%;60 天时,0.02‰ 棉隆浓度熏蒸下的层出镰孢菌数量为 CK 的 74.2%,而 0.1‰,0.5‰ 棉隆浓度熏蒸下的基因拷贝数仍远低于 CK,分别为 CK 的 20.0%,15.2%;90 天时,0.02‰ 浓度与 CK 的基因拷贝数已无差异,0.1‰ 浓度下的层出镰孢菌基因拷贝数较 60 天时增长了 56.2%,而 0.5‰ 浓度下的层出镰孢菌基因拷贝数则无明显增长(图 1)。

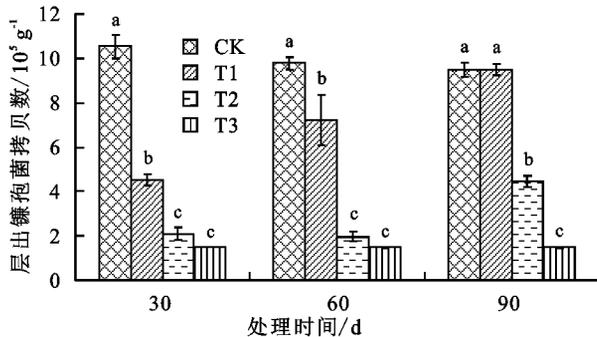


图 1 不同处理下层出镰孢菌的基因拷贝数分析

### 2.4 不同处理对土壤微生物利用碳源能力的影响

平均每孔颜色变化率(AWCD)是土壤微生物群落利用单一碳源的重要指标,能准确反映土壤中微生物种活性特征。由图 2 可以看出,处理 30 天后,0.1‰ 与 0.5‰ 浓度下的 AWCD 值较接近,且与 CK 差异显著,具体表现为 CK>0.02‰>0.1‰>0.5‰;处理 60 天后,0.02‰ 浓度下的 AWCD 与 CK 基本无明显差异,0.1‰ 浓度下的 AWCD 值较 30 天时有大幅度上升,但仍小于 CK,而 0.5‰ 浓度依然保持较低 AWCD 值;处理 90 天时的变化趋势同 60 天时相似,说明高

熏蒸后的土壤 30 天时无可培养真菌,60 天时,可培养真菌数量依旧较低,到 90 天时,可培养真菌才达到计数要求,但仅仅是 CK 的 13.2%。可见,对高浓度的棉隆熏蒸,真菌较细菌更为敏感。其他处理随时间延长,均有增长的趋势。

浓度的棉隆熏蒸能更长时间地抑制微生物的活性。

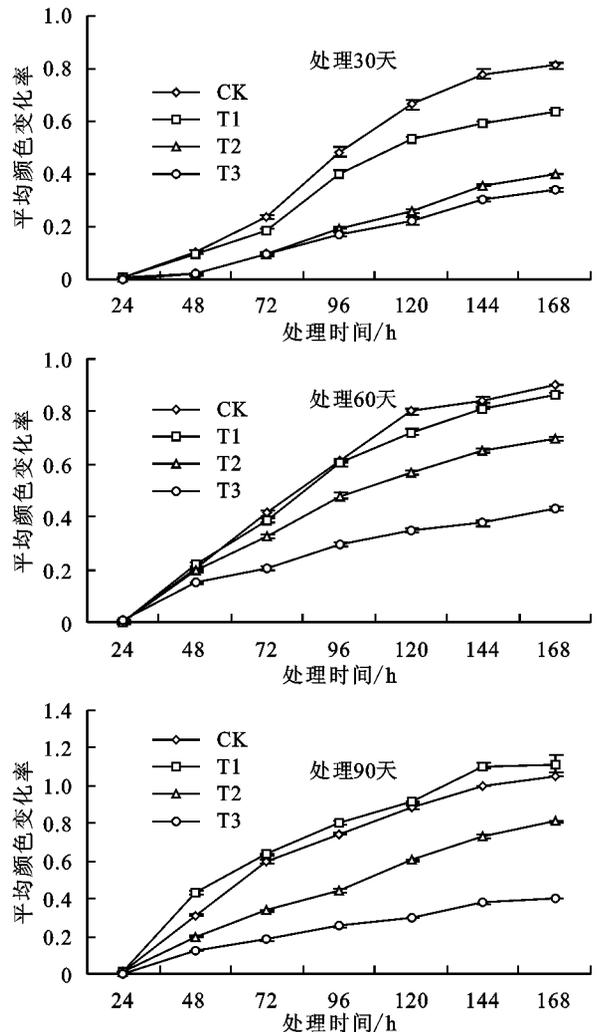
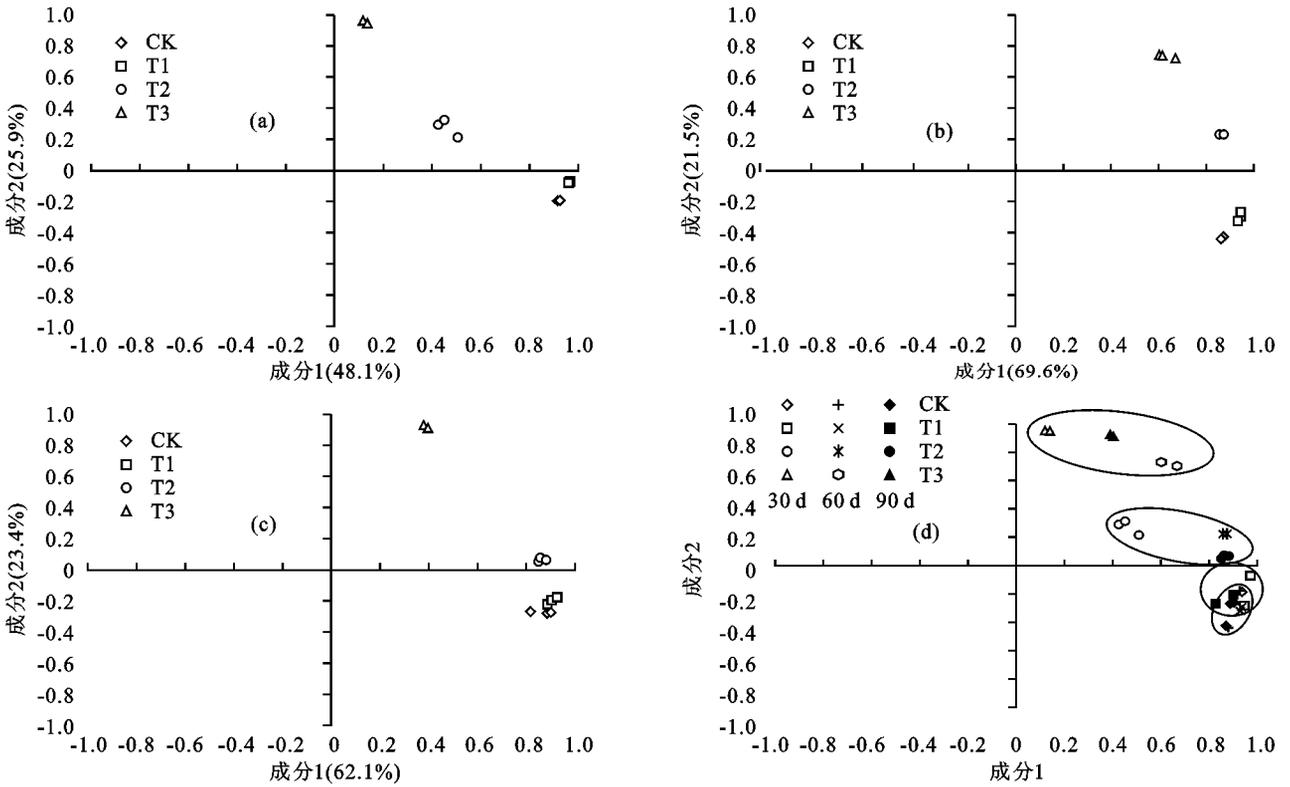


图 2 不同处理对平均每孔颜色变化率的影响

2.4.1 细菌 T-RFLP 图谱的主成分分析 从图 3 可以看出,在处理的 3 个时期中,0.1‰ 浓度与 0.5‰ 浓度处理下的微生物群落都处于 x 轴上方,0.02‰ 浓度与 CK 的微生物群落都比较接近 x 轴或处在 x 轴下方(图 3a,3b,3c)。将 3 个时期同时做主成分分析(图 3d)后发现,0.1‰ 浓度与 0.5‰ 浓度处理下的微生物群落在 3 个时期中波动明显,0.02‰ 浓度与 CK 的微生物群落在 3 个时期中波动较小,说明高浓度棉隆处理下的细菌群落并不稳定,处于一个动态变化的过程中。

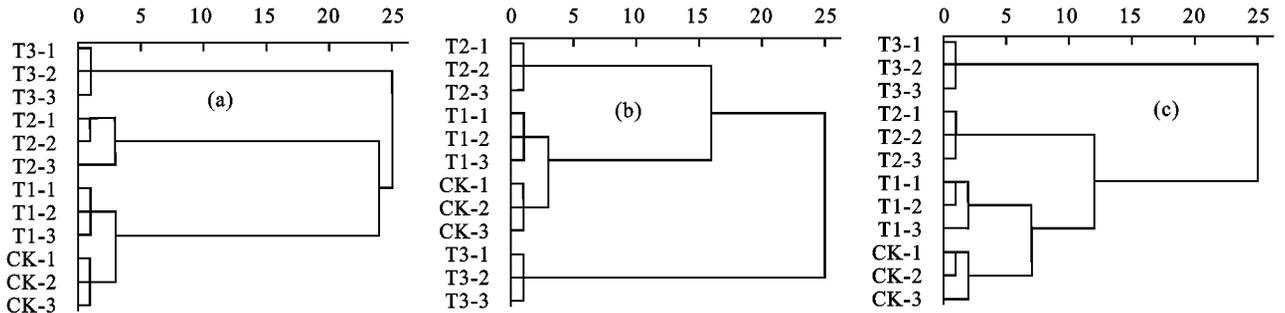


注:(a)为处理后 30 天;(b)为处理后 60 天;(c)为处理后 90 天;(d)为各处理的波动范围。

图 3 不同处理间细菌 T-RFLP 图谱主成分分析

2.4.2 细菌 T-RFLP 图谱的聚类分析 3 个时期的细菌群落聚类分析能直观地反映群落结构间的相似性,CK 与 0.02‰在 3 次取样分析中均具有相似的细菌群落结构,而 0.1‰剂量下的细菌群落在 30 天时

(图 4a)与 CK 的群落结构相似度较低,而在 60(图 4b),90 天(图 4c)时,0.1‰浓度下的细菌群落结构有向 CK 移动的趋势,而高浓度 0.5‰始终与 CK 相似度较低。



注:CK 为老龄苹果园土;T1 为 0.02‰;T2 为 0.1‰;T3 为 0.5‰;(a)为处理后 30 天;(b)B 为处理后 60 天;(c)为处理后 90 天。

图 4 不同处理间细菌 T-RFLP 图谱聚类分析

2.4.3 真菌 T-RFLP 图谱的主成分分析 从图 5 可以看出,3 个时期的主成分 1(PC1)均在 0.8~1.2 之间,成分 2(PC2)均在 -0.5~0.5。最低棉隆施用浓度 0.02‰的真菌群落在任何时期均与 CK 保持相同的象限,而最高棉隆施用浓度 0.5‰的真菌群落与 CK 在任一时期均位于不同象限;0.1‰的真菌群落在 30,60 天时与 0.5‰同处一象限,但在 90 后,已与 CK 同处第四象限。将 3 个时期同时比较时可以明显看出高剂量 0.5‰熏蒸下的真菌群落波动要远远大于其他 3 个处理。

离于其他所有处理;60 天时,CK 与 0.02‰具有较近相似度;90 天时 CK 与 0.02‰的真菌群落结构已经完全一致,此外,随着时间的变化,0.1‰浓度下的真菌群落结构与 CK 的群落结构相似度也逐渐升高,但 0.5‰浓度依然保持稳定。

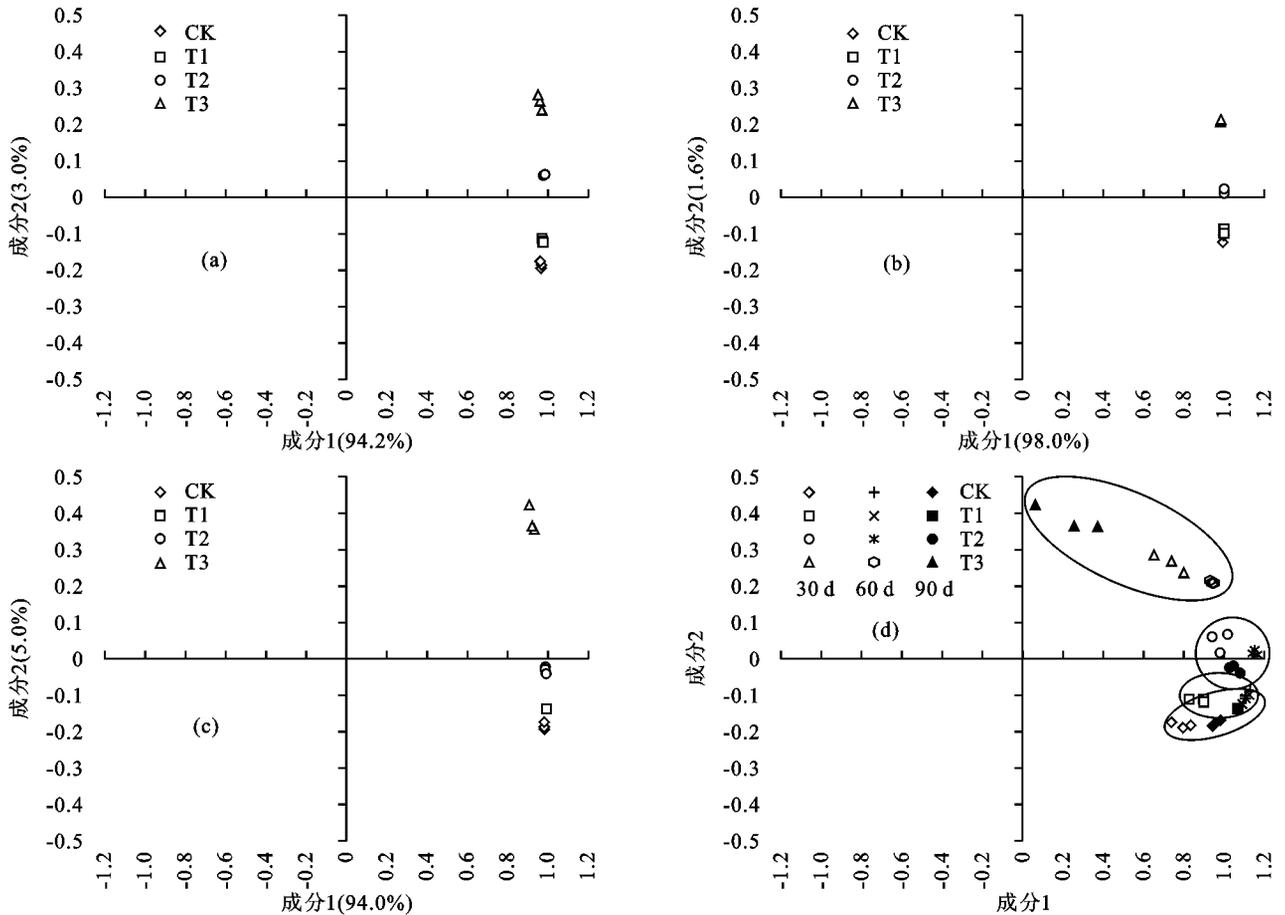
2.5 基于细菌 T-RFLP 的多样性分析

从表 3 可以看出,0.1‰与 0.5‰的棉隆施用浓度对细菌多样性指数和丰富度指数影响较大。在 3 次取样分析中,两者均显著小于 CK,且 0.5‰<0.1‰,低浓度处理 0.02‰的多样性指数与丰富度指数与 CK 无明显规律。优势度指数整体表现趋势与丰富度指数和多样性指数相反,0.1‰与 0.5‰显著高于 CK,且

2.4.4 真菌 T-RFLP 图谱的聚类分析 从图 6 可以看出,处理 30 天时,CK 的真菌群落结构要远远分

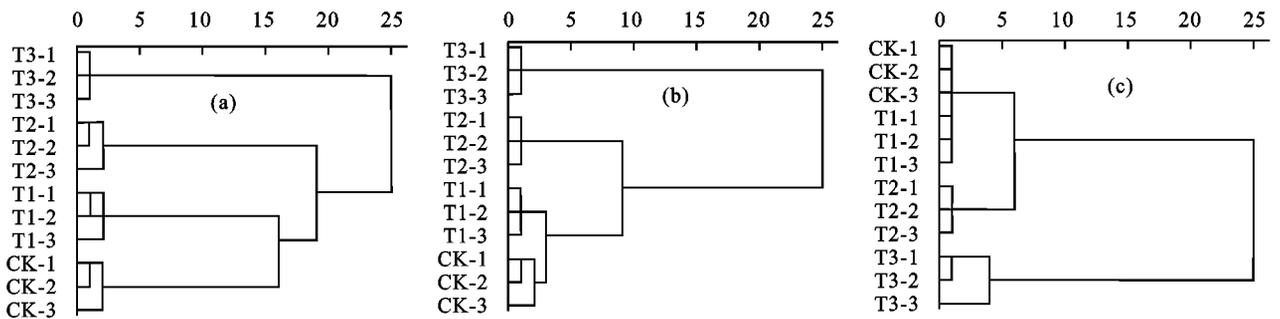
0.5‰>0.1‰;均匀度指数方面,0.5‰棉隆浓度熏蒸

下的土壤细菌具有最低的统一度指数。



注:(a)为处理 30 天;(b)处理 60 天;(c)处理 90 天;(d)为各处理的波动范围。

图 5 不同处理间真菌 T-RFLP 图谱主成分分析



注:CK 为老龄苹果园土;T1 为 0.02‰;T2 为 0.1‰;T3 为 0.5‰;(a)为处理 30 天;(b)为处理 60 天;(c)为处理 90 天。

图 6 不同处理间真菌 T-RFLP 图谱聚类分析

表 3 不同处理对土壤细菌多样性的影响

处理天数/d	处理	多样性指数	优势度指数	丰富度指数	均匀度指数
30	CK	2.37±0.015b	0.14±0.0020c	4.25±0.074a	0.81±0.0000b
	T1	2.55±0.024a	0.10±0.0040d	4.30±0.090a	0.87±0.0058a
	T2	1.35±0.009c	0.36±0.0062b	2.29±0.001c	0.56±0.0033d
	T3	1.28±0.030d	0.44±0.0038a	1.64±0.073d	0.60±0.0033c
60	CK	2.65±0.015a	0.08±0.0006c	4.57±0.049a	0.88±0.0000b
	T1	2.54±0.038b	0.09±0.0044bc	3.83±0.132b	0.90±0.0033a
	T2	2.40±0.033c	0.10±0.0044b	3.06±0.075c	0.89±0.0033a
	T3	1.18±0.024d	0.43±0.0054a	1.50±0.068d	0.58±0.0033c
90	CK	2.57±0.021a	0.09±0.0015c	4.33±0.146a	0.87±0.0033a
	T1	2.63±0.033a	0.09±0.0038c	4.41±0.143b	0.88±0.0033a
	T2	2.00±0.015b	0.20±0.0097b	3.30±0.062c	0.74±0.0033b
	T3	1.23±0.038c	0.42±0.0098a	1.65±0.075d	0.58±0.0058c

注:CK 为老龄苹果园土;T1 为 0.02‰;T2 为 0.1‰;T3 为 0.5‰;表中数字后不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。下同。

## 2.6 基于真菌 T-RFLP 的多样性分析

同细菌的多样性变化趋势相似,在 3 个时期中,0.5‰浓度的棉隆熏蒸下的土壤真菌具有最低多样性指数、丰富度指数,最高的优势度指数。

从表 4 可以看出,多样性、丰富度指数具体表现为  $0.02‰ > 0.1‰ > 0.5‰$ ,优势度指数表现为  $0.02‰ < 0.1‰ < 0.5‰$ 。0.02‰与 CK 的上述指数同样无明显规律。

表 4 不同处理对土壤真菌多样性的影响

处理天数/d	处理	多样性指数	优势度指数	丰富度指数	均匀度指数
30	CK	2.05±0.0000b	0.21±0.0005a	3.40±0.0040b	0.76±0.0000a
	T1	2.37±0.0058a	0.13±0.0021b	3.66±0.0013a	0.84±0.0033ab
	T2	2.11±0.0393b	0.16±0.0092c	2.98±0.0779c	0.83±0.0058b
	T3	1.61±0.0338c	0.22±0.0075a	1.64±0.0928d	0.85±0.0058a
60	CK	2.41±0.0033a	0.13±0.0015c	3.86±0.0029a	0.83±0.0033a
	T1	2.34±0.0033a	0.13±0.0015c	3.42±0.0029b	0.85±0.0033a
	T2	1.85±0.0418b	0.22±0.0107b	2.40±0.0782c	0.78±0.0067b
	T3	1.28±0.0067c	0.38±0.0025a	1.31±0.0007d	0.71±0.0033c
90	CK	2.41±0.0067a	0.15±0.0012c	4.12±0.0015a	0.82±0.0000b
	T1	2.43±0.0100a	0.14±0.0023d	4.10±0.0017a	0.83±0.0033b
	T2	2.15±0.0145b	0.16±0.0021b	2.99±0.0772b	0.82±0.0033b
	T3	1.68±0.0120c	0.21±0.0034a	1.43±0.0019c	0.86±0.0033a

## 3 结论与讨论

### 3.1 连作土壤中真菌相比于细菌对棉隆熏蒸更为敏感,棉隆熏蒸只能抑制连作土壤中微生物活性而不能彻底消灭土壤微生物,土壤微生物数量及活性随时间变化逐渐恢复

在老龄苹果园中,由于种植时间长,致病微生物相对富集,而新栽幼树抗逆性较弱,往往不能抵御致病菌的侵袭<sup>[21]</sup>。试验中利用微生物平板培养、实时荧光定量(qPCR)以及微生物单一碳源利用率(Biolog)等方法对施加不同浓度棉隆后老龄苹果园的土壤微生物数量及活性变化进行动态监测发现,不同浓度棉隆对细菌、真菌均有抑制效果,且浓度越高,对细菌和真菌的抑制作用越显著,符合棉隆作为广谱性杀菌剂的技术特点。高浓度 0.5‰剂量熏蒸后的土壤 30 天时无可培养真菌,可见真菌相比于细菌对高浓度棉隆熏蒸给为敏感。但随时间延长,0.02‰,0.1‰浓度处理的细菌、真菌数量均有所恢复,恢复程度表现为  $0.02‰ > 0.1‰$ ,这与乔康<sup>[22]</sup>在 1,3-D 上的研究结论一致。但 0.5‰浓度处理的微生物种群数量直到 90 天时也未增长,可能是因为棉隆熏蒸的有效成分异硫氰酸甲酯因棉隆施加浓度不同在土壤中消解时间不同,导致对微生物的抑制作用也有差异,也说明异硫氰酸甲酯同多菌灵、氯化苦等杀菌剂的抑菌机理相似只能减缓孢子或菌丝的萌发,而不能彻底杀死菌丝或孢子<sup>[23]</sup>。

### 3.2 棉隆熏蒸后土壤微生物群落结构并不稳定,棉隆施用浓度越大,群落结构波动越明显,但与 CK 的相似度随时间变化逐渐升高,即群落结构有随时间向 CK 移动的趋势

T-RFLP(末端限制性片段长度多态性技术)是限制性片段长度多态性技术(RFLP)的扩展,它集

RFLP、PCR 和核酸电泳技术于一体。T-RFLP 技术分析复杂的微生物群落结构具有更高的分辨率,更适用于对微生物群落多样性进行灵敏的分析评价以及快速研究、分析微生物群落的变化规律。试验对微生物 T-RFLP 图谱进行了主成分分析及聚类分析,细菌 T-RFLP 图谱主成分分析可看出各浓度处理的棉隆均改变了细菌群落结构,将 3 个时期的细菌群落结构主成分同时比较发现,0.1‰与 0.5‰的细菌群落结构很不稳定,变化较大,CK 与 0.02‰相对变化较小,可能是高浓度棉隆熏蒸虽然短时间降低了细菌数量,但同时也较大程度的改变了土壤的理化性质,破坏了土壤生态结构稳定性<sup>[24]</sup>,群落结构会向着更加稳定的方向发展。所以群落结构的波动更为明显。在聚类分析中,处理 30 天的细菌群落结构与 CK 相似度较高,而 30 天时的可培养细菌数量显著低于 CK,可见细菌数量并不是细菌群落结构变化的唯一因素。随着时间的延长,除 0.5‰浓度处理外,其余浓度的细菌群落结构,均有向 CK 发展的趋势。真菌群落结构的改变一般被认为是连作障碍发生的重要原因,真菌 T-RFLP 主成分分析发现,高浓度 0.5‰最大程度的改变了真菌群落结构,同样,此浓度的群落结构也不稳定,波动依旧较大。聚类分析中真菌的群落结构也有随时间向 CK 发展的趋势,尤其是 90 天时浓度 0.02‰的真菌群落结构,此处理的真菌群落结构 90 天时已与 CK 无任何差异。

### 3.3 连作土壤微生物多样性与丰富度指数随棉隆熏蒸浓度的增大而降低,但优势度指数变化趋势与之相反,表现为熏蒸浓度越大,优势度指数越高

通过土壤微生物多样性的研究不仅可以预测土壤养分和环境质量的变化,而且还可以认识和掌握在土壤微生物生态中起重要作用的微生物类群及其功

能角色<sup>[25]</sup>。T-RFLP结合Biodap技术已经被广泛地用来研究各种土壤中的微生物群落结构和多样性变化<sup>[26]</sup>。本试验中,细菌、真菌的多样性指数变化趋势相似,均表现为多样性与丰富度指数随棉隆熏蒸浓度的增大而降低,但优势度指数变化趋势与之相反,表现为熏蒸浓度越大,优势度指数越高,这与张超等<sup>[10]</sup>的研究结果一致,可能是由于棉隆属于灭生性土壤杀菌剂,施于土壤后杀死了土壤中大部分微生物,降低了土壤“土著”微生物种群数量,随之微生物多样性、丰富度指数便有所降低。虽然土壤中微生物基数有了较明显下降,但有些微生物增殖能力较强或抗逆性较强,不能被棉隆彻底消灭,在新的环境便成为土壤中的优势种群,增加了土壤微生物优势度指数。

### 3.4 0.1%浓度的棉隆施用量相较于0.5%浓度,不仅能有效促进连作土壤再植平邑甜茶幼苗的生长,而且能够降低生产成本

通过盆栽平邑甜茶幼苗试验可以看出,0.1%棉隆熏蒸浓度对平邑甜茶幼苗生长的促进效果最为显著,这与聂海珍等<sup>[11]</sup>的研究结果较为相似,张超等<sup>[10]</sup>研究认为600 kg/hm<sup>2</sup>的棉隆施用浓度对辣椒疫霉病的防效要优于450,750 kg/hm<sup>2</sup>,聂海珍等<sup>[11]</sup>也研究认为35 g/m<sup>2</sup>的棉隆施用浓度同比17.5,70 g/m<sup>2</sup>更能有效的防治番茄根结线虫病。通过以上数据分析可以推测,这可能与土壤中微生物活性及微生物多样性有关,土壤微生物之间存在着共生、互利、共存和竞争等各种复杂的关系,并且土壤微生物还参与了有机质分解、养分循环和能量流动等生态系统过程。因此,大剂量施用土壤消毒剂并不利于连作土壤微生物区系的修复和重建。此外,也有研究认为大剂量施用棉隆后,棉隆在土壤中的分散性较差,在土壤中的分布不均匀,即药剂有效成分异硫氰酸甲酯在土壤中的某一位点相对聚集,从而对植株造成药害,所以大剂量的棉隆熏蒸并不利于植株生长;同时,群落结构的不稳定性也可能对平邑甜茶幼苗的生长有影响。综上,0.1%浓度的棉隆施用相较于0.5%浓度不仅能有效促进连作土壤再植平邑甜茶幼苗的生长,而且能够降低生产成本,其具体的机理及应用效果仍需进一步探究。

#### 参考文献:

[1] Yao S, Merwin I A, Brown M G. Root dynamics of apple rootstocks in a replanted orchard[J]. HortScience, 2006,41(5):1149-1155.

[2] Laurent A S, Merwin I A, Thies J E. Long-term orchard ground management systems affect soil microbial communities and apple replant disease severity[J]. Plant and Soil, 2008,304(1/2):209-225.

[3] 陈学森,韩明玉,苏桂林,等. 当今世界苹果产业发展趋势及我国苹果产业优质高效发展意见[J]. 果树学报, 2010,27(4):598-604.

[4] Yim B, Smalla K, Winkelmann T. Evaluation of apple replant problems based on different soil disinfection treatments-links to soil microbial community structure [J]. Plant and Soil, 2013,366(1/2):617-631.

[7] Ślusarski C, Pietr S J. Combined application of dazomet and *Trichoderma asperellum* as an efficient alternative to methyl bromide in controlling the soil-borne disease complex of bell pepper [J]. Crop Protection, 2009, 28(8):668-674.

[5] Zasada I A, Halbrecht J M, Kokalis-Burelle N. Managing nematodes without methyl bromide[J]. Annual Review of Phytopathology, 2010,48(1):311-328.

[6] Eo J, Park K C. Effects of dazomet on soil organisms and recolonisation of fumigated soil [J]. Pedobiologia, 2014,57(3):147-154.

[7] 胡兰,杨威,徐婧,等. 棉隆与生化黄腐酸对设施土壤真菌多样性的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2014,45(2):217-220.

[8] 刘恩太,李园园,胡艳丽,等. 棉隆对苹果连作土壤微生物及平邑甜茶幼苗生长的影响[J]. 生态学报, 2014,34(4):847-852.

[9] 杨晓楠,高德良,韩君. 棉隆及氯化苦对几种生姜土传病原物的毒力[J]. 农药学报, 2011,13(3):331-334.

[10] 张超,卜东欣,张鑫,等. 棉隆对辣椒疫霉病的防效及对土壤微生物群落的影响[J]. 植物保护学报, 2015,42(5):834-840.

[11] 聂海珍,孙漫红,李世东,等. 棉隆与淡紫拟青霉联合防治番茄根结线虫病的效果评价[J]. 植物保护学报, 2016,43(4):689-696.

[12] 田甜,孙漫红,李世东. 棉隆与粉红螺旋聚孢67-1协同防治黄瓜枯萎病的研究[J]. 中国生物防治学报, 2014,30(4):503-510.

[13] 冯义志,潘金菊,刘伟. 棉隆在番茄和土壤中的残留降解动态及残留量[J]. 农药, 2015,54(8):588-590.

[14] 赵文,赵一杰,王惟萍,等. 实验室条件下威百亩及异硫氰酸甲酯在土壤中的降解特性[J]. 农药学报, 2013,15(5):567-573.

[15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2000.

[16] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:教育出版社, 2007.

[17] Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: Plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003,44(3):319-328.