

DOI: 10.5846/stxb201309082233

沈宗专, 钟书堂, 赵建树, 张建, 李荣, 阮云泽, 沈其荣. 氨水熏蒸对高发枯萎病蕉园土壤微生物区系及发病率的影响. 生态学报, 2015, 35(9): 2946-2953.

Shen Z Z, Zhong S T, Zhao J S, Zhang J, Li R, Ruan Y Z, Shen Q R. Effects of ammonia fumigation on soil microflora and banana production in an orchard with serious *Fusarium* wilt disease. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2946-2953.

氨水熏蒸对高发枯萎病蕉园土壤微生物区系及发病率的影响

沈宗专¹, 钟书堂¹, 赵建树¹, 张 建¹, 李 荣^{1,*}, 阮云泽², 沈其荣¹

¹ 南京农业大学资源与环境学院, 南京 210095

² 海南大学农学院, 海口 570228

摘要: 采用涂布计数及荧光定量 PCR 和 PCR-DGGE 技术, 研究了氨水熏蒸对土壤微生物区系的影响, 并研究氨水熏蒸对高发枯萎病香蕉园枯萎病的防控效果和对香蕉产量的影响。结果表明: 与熏蒸前相比, 高发枯萎病香蕉园土壤施用 130 L/667 m² 的氨水熏蒸后, 尖孢镰刀菌的数量下降了 1 个 log 单位; 与对照处理相比, 下降了 0.5 个 log 单位。氨水熏蒸后土壤可培养细菌数量与对照相比没有显著差异, 但显著低于熏蒸前; 可培养真菌的数量显著低于熏蒸前和对照; 可培养细菌真菌的比值与熏蒸前相比没有显著差异, 但显著高于对照。与对照及熏蒸前相比, 氨水熏蒸后土壤中总细菌及总真菌的数量显著下降; 熏蒸前后及对照处理总细菌真菌的比值没有明显差异。各土壤样品总细菌及真菌群落结构的 PCR-DGGE 分析结果表明, 氨水熏蒸后土壤微生物在聚类上和条带组成上均与熏蒸前及对照有显著性差异。与对照相比, 氨水熏蒸处理使香蕉枯萎病的发病率降低了 20%, 每 666.7m² 增产 1.25t。以上结果表明, 利用合适浓度的氨水对高发枯萎病香蕉园的土壤熏蒸, 能够有效改良土壤微生物区系和降低枯萎病的发生。

关键词: 香蕉枯萎病; 氨水熏蒸; 土壤微生物区系; 产量; 品质

Effects of ammonia fumigation on soil microflora and banana production in an orchard with serious *Fusarium* wilt disease

SHEN Zongzhuang¹, ZHONG Shutang¹, ZHAO Jianshu¹, ZHANG Jian¹, LI Rong^{1,*}, RUAN Yunze², SHEN Qirong¹

¹ College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

² College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: Banana *Fusarium* wilt disease, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, has been reported to be the most limiting factor in *Cavendish*-banana production worldwide since 1996. Furthermore, the *Cavendish*-banana production comprised about 90% of the banana growing areas in south China, and more than 200,000 ha banana orchards in this area have been attacked. Among the managements for controlling *Fusarium* wilt disease, pre-planted fumigation of soil is one of the effective and stable means for this disease prevention. However, methyl bromide, one widely used soil fumigant, will be banned internationally in 2015 due to the destruction of the ozone layer. In this study, ammonia, to our knowledge, has been first applied as soil fumigant to control this soil borne disease as a chemical alternative to methyl bromide in banana planting field. Traditional plate counting, Real-Time PCR and PCR-DGGE methods were used to

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41101231, 31372142); 中国博士后科学基金 (2011M501248, 2012T50479); 教育部博士点新教师基金 (20110097120001)

收稿日期: 2013-09-08; **网络出版日期:** 2014-08-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lirong@njau.edu.cn

determine the effects of ammonia fumigation on soil microflora, disease control efficiency and banana yield in a banana orchard with serious *Fusarium* wilt disease. Through the estimation by plate counting method, the number of *Fusarium* in the soil collected after fumigation with 130 L/667 m² of ammonia decreased 1 and 0.5 log unit, respectively, when compared with pre-fumigation (BF) and the non-fumigation control (CK). The numbers of soil culturable bacteria in the soils from fumigation treatment (AMO) and CK were significantly lower than that from BF treatment, while there was no significant difference could be detected among AMO and CK. CK and BF treatments showed significantly higher numbers of soil culturable fungi than AMO, while no significant difference could be detected among BF and CK treatments. The ratio of bacteria to fungi (B/F) in AMO was significantly higher than that in CK, but no significant difference was observed among pre-fumigating treatment (BF) and ammonia fumigating treatment (AMO). Through estimation by Real-Time PCR, the numbers of total bacteria and fungi in AMO were significantly lower than that in the BF and CK, while no significant difference of total B/F was found. Based on fungi PCR-DGGE fingerprints, the intensities of bands A1, A2 and A3 strengthened and bands of B1, B2 and B3 weakened in the AMO treatment whereas band F related to *Fusarium* sp. was obviously weakened in AMO treatment compared to BF and CK treatments. Soil bacteria PCR-DGGE fingerprints also revealed that the intensities of bands a1, a2 and a3 strengthened in AMO treatment and bands b1, b2, b3 and b4 weakened in the AMO treatment. However, in soil bacteria or fungi community, the three-replicate cluster of AMO treatment distinguished separately to the other clusters of BF and CK treatments while the clusters of BF and CK grouped together. Based on DGGE results, the soil bacterial and fungal structure for AMO treatment was obviously altered after fumigation compared to that of BF and CK. Field experiment showed that the *Fusarium* wilt disease incidence in AMO decreased about 20% compared to that in the CK and the banana yield per 667 m² for AMO increased 1.25 t due to the disease incidence decrease. In conclusion, all the results indicated that using ammonia fumigation could effectively improve soil microflora and control the banana *Fusarium* wilt disease.

Key Words: banana *Fusarium* wilt disease; ammonia fumigation; soil microflora; crop yield; fruit quality

香蕉枯萎病,又称巴拿马病、黄叶病,是由尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Snyder and Hansen race 4)侵染而引起香蕉维管束坏死的一种毁灭性土传病害,近年来严重危害了中国甚至世界香蕉种植业的发展^[1]。该病原菌侵染香蕉后,香蕉出现叶片黄化、下垂并堵塞维管束等症状,导致维管束坏死,养分和水分不能运输,香蕉不能正常生长,进而不能收获香蕉果实。据报导,广东和海南两省仅2010年就有超过20万hm²的香蕉园,因感染枯萎病而遭受重大经济损失^[2]。

香蕉为多年生作物,土传病害难以防治。目前防控香蕉枯萎病的措施包括选育抗性品种、轮作、生物防治和化学熏蒸等^[3-5]。与单独采用轮作、太阳能消毒或者生物防治相比,土壤前期熏蒸处理是效果较好和较稳定的措施^[6]。溴甲烷是一种广泛应用的土壤熏蒸化学药剂,但由于其危害臭氧层,发达国家已于2005年禁止使用,发展中国家也将在2015年完全禁用^[7]。目前关于可用于生产上有效防治香蕉枯萎病的杀菌剂的报道极少,因此筛选出防控香蕉枯萎病的高效、低毒土壤熏蒸消毒剂,对香蕉枯萎病的化学防治和香蕉产业的健康发展具有重要意义。

氨水具有良好的杀菌效果,在农业生产上,氨水能够释放氨的高氮无机物,很早就被用来作为土壤熏蒸剂,杀灭土壤中真菌性病原菌和线虫等。如陈培根和蒯元璋研究筛选了50余种新农药进行桑树紫纹羽病菌土壤消毒实验,发现氨水的杀菌效果最好,且60—70 d后土壤中无残留^[8]。Smiley等研究发现氨水能杀灭土壤中的一种能够引起小麦土传病害的病原菌——粉红镰刀菌(*Fusarium roseum*)^[9]。Schipper和Palm研究发现氨水能抑制土壤中腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)的孢子萌发和菌丝生长^[10]。

微生物在土壤功能中发挥着重要作用,维持土壤微生物群落结构和功能是维持土壤健康状况并抑制植物病害的发生重要保障。微生物多样性是健康土壤的重要组分,也是土壤抗病能力的主要驱动因子^[11]。据了

解,国内外还没有利用氨水处理高发香蕉枯萎病土壤,防控香蕉连作生物障碍的报道。本研究通过传统的涂布计数法结合现代分子生物学的实时荧光定量 PCR 法、变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 分析了氨水熏蒸对土壤微生物区系的影响,并研究了氨水熏蒸对高发枯萎病蕉园枯萎病的防控效果和对香蕉产量及品质的影响,为氨水作为土壤熏蒸剂提供科学依据,并为防控香蕉枯萎病的熏蒸修复技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤

供试土壤为由燥红土发育形成的沙壤,连作香蕉多年,土壤基本理化性质为:pH 5.63,土壤速效磷 88.75 mg/kg,速效钾 165.21 mg/kg,碱解氮 35.90 mg/kg,有机质 7.43 g/kg。

1.1.2 供试材料

供试熏蒸剂为农用氨水(氨含量 16%,氮含量 12%),供试香蕉品种为‘农科 1 号’(中感巴西蕉品种),由海南万钟实业有限公司提供。

1.2 试验设计

大田试验于 2010 年 6 月至 2011 年 6 月在海南万钟实业有限公司农场进行。实验共设 2 个处理:氨水熏蒸处理(AMO)和不熏蒸对照处理(CK)。选择枯萎病高发的香蕉园于 2010 年 6 月划分小区进行氨水熏蒸处理,具体操作简述如下:1)清理蕉园,深沟掩埋香蕉茎秆及老蕉头;2)起垄开沟,起 6 m 宽垄并开出排水沟;3)旋耕松土,旋松表层 0—30 cm 土壤;4)浸润土壤,铺设喷灌带并喷水至土壤饱和;5)喷洒氨水,均匀快速喷洒氨水并覆膜压实。氨水施用量为 130 L/667 m²,各小区面积约 667 m²,随机排列,3 次重复。不熏蒸处理(CK)除不喷洒氨水外,其他农事操作与氨水熏蒸一样。熏蒸 30 d 后揭膜晾晒 15 d 后种植香蕉。香蕉施肥及管理同农场常规模式,即每亩施入硝酸磷钾肥(22-9-9)30 kg、尿素 45 kg、复合肥(15-15-15)30 kg、过磷酸钙 15 kg、腐熟猪粪有机肥 320 kg,有机肥及过磷酸钙作为底肥一次性施入,硝酸磷钾及尿素底肥施入全量的 2/3,剩下的 1/3 作为追肥于苗期及花蕾期均分两次施入。

1.3 项目测定与方法

1.3.1 样品采集

试验共采集 3 土壤样品,即:熏蒸前、氨水熏蒸后及不熏蒸对照土壤。熏蒸前样品(BF)于 2010 年 6 月旋耕松土后采集,氨水熏蒸后样品(AMO)及对照样品(CK)于 2010 年 7 月揭膜后采取。样品一律用直径 5 cm 土钻采取 0—20 cm 的表土,各小区随机采取 10 点并混匀,4 ℃ 下保存备用。

1.3.2 土壤总 DNA 提取

称取 0.5 g 土壤样品,按照 MoBio 土壤提取试剂盒(MoBio Power Soil extraction kit, Carlsbad, CA, USA)操作说明书提取土壤样品总 DNA, -20 ℃ 保存备用。

1.3.3 土壤可培养细菌及真菌数量的测定

土壤可培养细菌及真菌的数量通过平板稀释涂布法测定。称取 10 g 土壤样品至 90 mL 无菌水中,30 ℃、170 r/min 震荡 30 min,将震荡后土壤悬液稀释至合适的梯度。吸取 100 μL 稀释液于不同培养基平板,均匀涂布。细菌采用 Luria-Bertani(LB)培养基,30 ℃ 培养 36 h;真菌采用马丁氏培养基,28 ℃ 培养 72 h。培养后计数平板上形成的菌落数,并转换成每克干土形成的菌落数(Colony Forming Unit, CFU),取对数值,以 log(CFU/g 干土)表示。各样品每克干土的细菌菌落数比上真菌的菌落数,即为可培养细菌与真菌的 B/F 值。

1.3.4 土壤总细菌及真菌数量的测定

土壤总细菌及真菌的数量利用实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR)测定^[12]。将含大肠杆菌(*Escherichia coli*)16 S 全长或酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)18 S 全长的质粒进行梯度稀释,采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,按照标准程序制成标准曲线。真菌定量扩增采用引物 5.8s/ITS1f(5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3'/5'-

TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),细菌定量扩增采用引物 Eub338/Eub518 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'/5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。扩增条件为:10 μ L SYBR® Premix Ex Taq,0.4 μ L 上游引物和下游引物,0.4 μ L ROX Reference Dye,2 μ L 模板 DNA 和 6.8 μ L 无菌水。采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪的标准程序扩增测定土壤样品微生物的总数量,PCR 扩增程序为:第一步,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;第二步,95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 34 s,循环 40 次。根据各样品 Ct 值计算每克土壤所含的拷贝数,并换算成每克干土形成的拷贝数,取对数值,以 $\log(\text{copies/g 干土})$ 表示。各样品每克干土的细菌拷贝数比上真菌的拷贝数,即为可培养总细菌与总真菌的 B/F 值。

1.3.5 土壤尖孢菌数量的测定

土壤尖孢菌的数量通过平板稀释涂布法进行测定。除培养基为 Komada 培养基外^[13],其他操作同 1.3.3 中可培养真菌的测定。

1.3.6 土壤微生物群落结构的测定

土壤微生物群落结构采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)进行测定。细菌 PCR 扩增采用 16 S rDNA 通用引物 Eub338/Eub518 (5'-GC clamp- ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'/5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[14];真菌 PCR 扩增采用 18 S rDNA 通用引物 NS1/Fungi (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'/5'-GC clamp- ATTCCCCGTTACCCGTTG-3')^[15],其中 GC clamp 为 5'-CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCC-3'。PCR 扩增反应体系:10 $\times$ PCR buffer(Mg^{2+} free)5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)4 μ L,dNTPs(各 2.5 mmol/L)4 μ L,引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.3 μ L,加入 ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 45 s(真菌退火温度为 57 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 45 s,循环 32 次;72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 D-Code 点突变检测系统(D Code Universal Mutation Detection System, BIO-RAD,USA)对 PCR 产物进行 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,细菌变性剂梯度为 40%—60%(100%的变性剂为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺的混合物),真菌变性剂梯度为 20%—40%。电泳条件:80 V 电压、60 $^{\circ}$ C 恒温电泳 16 h,电泳结束后银染胶片并扫描保存。

1.3.7 香蕉枯萎病发病率的测定

观察各处理香蕉长势,根据黄叶、维管束堵塞坏死及叶片下垂等枯萎病发病的典型症状判断香蕉植株发病与否,于香蕉枯萎病发病率稳定时,用发病株数与总株数的比例表示发病率。(处理发病率-对照发病率)/对照发病率的绝对值为防病效果。

1.3.8 香蕉产量及品质的测定

于 2011 年 6 月收获期对各小区随机标注 30 株健康香蕉果实,在采收时记录单株重量,取其均值作为各小区香蕉单株重(kg/株)。依据各小区单株重和能收获的健康香蕉株数估算各小区香蕉果实的总重量并换算为香蕉的单产量($\text{t}/667 \text{ m}^2$)。

1.4 数据分析

数据统计分析使用 Excel 和 SPSS13.0,通过 Duncan 新复极差法检验处理间差异的显著性水平。DGGE 电泳图谱分析采用 Quantity One 4.4.0 软件,通过非加权组平均法(UPGMA)获取聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 氨水熏蒸对土壤微生物区系的影响

氨水熏蒸前后土壤微生物数量的变化如图 1 所示。稀释涂布的结果表明:氨水熏蒸处理(AMO)与对照(CK)之间可培养细菌数量没有显著差异(图 1),但相比于熏蒸前(BF)显著降低;氨水熏蒸处理中

的可培养真菌数量显著低于熏蒸前及对照处理,可培养细菌与真菌的比值(B/F)虽与熏蒸前相比没有显著性差异,但显著高于对照。Real-Time PCR 的结果表明:氨水熏蒸后土壤总细菌的 16 S 和总真菌的 18 S 拷贝数显著低于熏蒸前及对照,而氨水熏蒸处理、对照及熏蒸前处理间细菌与真菌的比值(B/F)无显著性差异

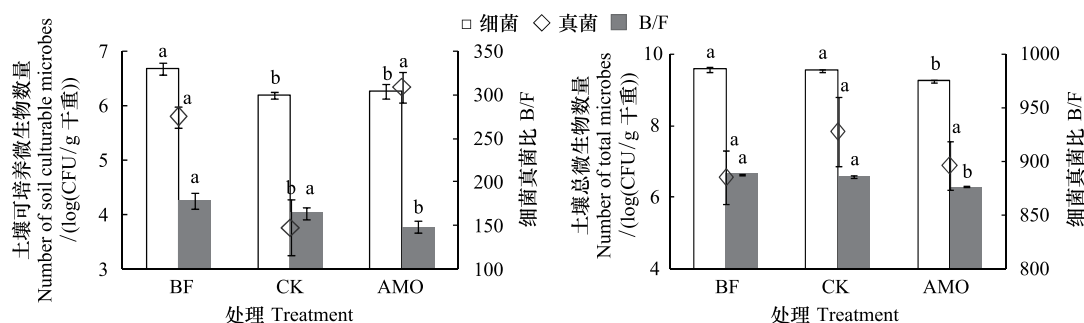


图1 可培养计数和实时荧光定量法测定的氨水熏蒸前后连作香蕉土壤微生物区系的数量

Fig.1 Population size of soil microflora for treatments of pre-fumigation (BF), control (CK) and ammonia fumigation (AMO) estimated by plate counting method and Real-time PCR

BF: Before Fumigation 熏蒸前处理, CK: Control 对照, AMO: Ammonia Fumigation 氨水熏蒸处理; □: Bacteria 细菌, ◇: Fungi 真菌, ◇: Bacteria/Fungi (B/F) 细菌真菌比; 同一柱形或菱形标注的不同字母表示在 0.05 水平上 Duncan 法多重比较有显著差异

(图 1)。

氨水熏蒸对土壤中尖孢镰刀菌数量的影响如图 2 所示。与消毒前 (BF) 相比, 对照 (CK) 及氨水熏蒸处理 (AMO) 的尖孢镰刀菌的数量均有显著下降。氨水熏蒸处理的尖孢镰刀菌数量与消毒前相比下降了约 1 个 log 单位, 与对照相比下降了约 0.5 个 log 单位。

氨水熏蒸对土壤微生物群落结构的影响如图 3 所示。无论是真菌 (图 3a) 还是细菌 (图 3b) 的 DGGE 图谱均表明氨水熏蒸对土壤微生物群落组成产生了一定影响, 表现为一些条带在氨水熏蒸后的消失与增加和一些共有条带的亮度差异, 表明氨水熏蒸前后土壤中微生物群落构成在 DNA 水平上发生了明显的变化。在真菌 DGGE 图谱 (图 3a) 中, 条带 B1、B2 及 B3 在熏蒸前 (BF) 及对照处理 (CK) 中亮度较大, 而在氨水熏蒸 (AMO) 后条带减弱甚至消失。B4 在熏蒸后和对照处理中均有所减弱。条带 A1、A2 及 A3 在氨水熏蒸后得到明显增强。条带 F 为香蕉枯萎病病原菌 (FOC) 的指示条带, 其在氨水熏蒸后的土壤中条带亮度明显低于对照及熏蒸前处理, 表明病原菌在氨水熏蒸后数量明显减少。在细菌 DGGE 图谱 (图 3b) 中, 条带 b1、b2、b3 及 b4 在熏蒸前 (BF) 及对照 (CK) 中亮度较大, 而在氨水熏蒸 (AMO) 后条带减弱甚至消失。条带 a1、a2 及 a3 在氨水熏蒸后得到明显增强。

氨水熏蒸前后土壤样品 DGGE 图谱的聚类分析结果如图 4 所示, 9 个样品明显聚成 3 类, 无论是真菌 (图 4a) 还是细菌 (图 4b), 氨水熏蒸处理 (AMO) 后的土壤样品明显区别于与熏蒸前 (BF) 和对照 (CK)。对照 (CK) 与熏蒸前 (BF) 的样品聚成一大类, 说明这两个处理的群落结构相似程度较高。聚类分析的结果表明氨水熏蒸明显改变了土壤真菌和细菌的群落结构。

2.2 氨水熏蒸对香蕉枯萎病发病率的影响

田间试验结果表明, 氨水熏蒸后 (AMO) 的小区香蕉枯萎病的发病率显著低于对照 (CK) 处理 (图 5)。对照处理枯萎病发病率高达 35%, 而氨水熏蒸后发病率只有 15%, 氨水熏蒸后发病率降低了 20%, 表现出 57.1% 的防病效果。

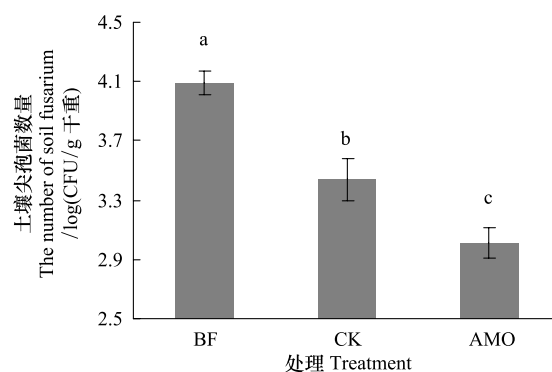


图2 氨水熏蒸前后连作香蕉土壤尖孢镰刀菌的数量

Fig.2 Population size of *Fusarium* sp. for treatments of pre-fumigation (BF), control (CK) and ammonia fumigation (AMO) estimated by plate counting method

BF: 熏蒸前处理, CK: 对照, AMO: 氨水熏蒸处理; 同一柱形标注的不同字母表示在 0.05 水平上 Duncan 法多重比较有显著差异

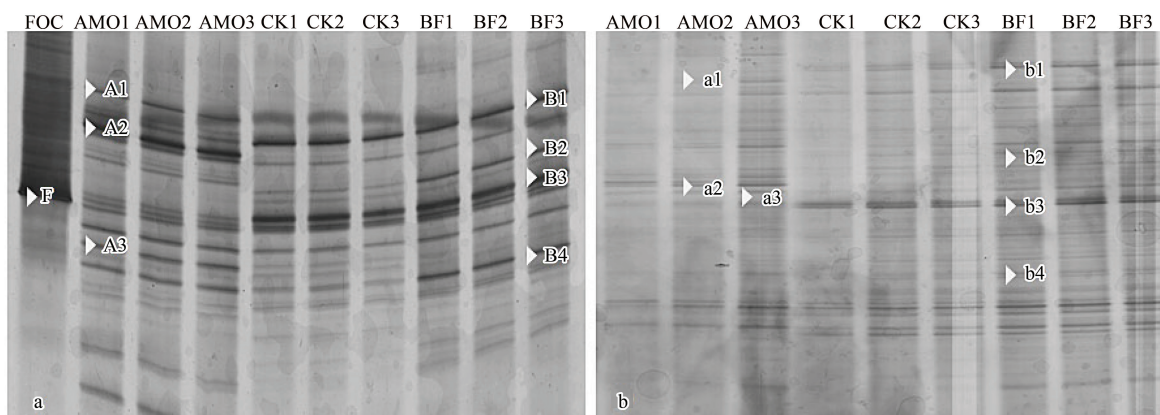


图3 氨水熏蒸对连作香蕉土壤总真菌(a)和总细菌(b)群落结构影响的 DGGE 图谱

Fig.3 The total fungi (a) and total bacteria (b) DGGE fingerprints for treatments of pre-fumigation (BF), control (CK) and ammonia fumigation (AMO)

泳道上方的编号 BF1-BF3 表示熏蒸前处理 BF 的 3 个重复,CK1—CK3 表示对照 CK 的 3 个重复,AMO1—AMO3 表示氨水熏蒸处理 AMO 的 3 个重复;图中编号 F—B4、a1—b4 等表示所对应的条带为 DGGE 检测到的特殊条带

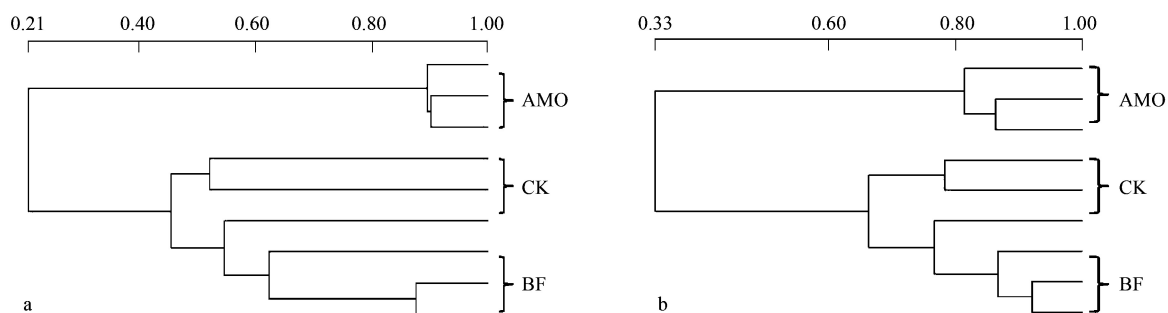


图4 氨水熏蒸前后连作香蕉土壤总真菌(a)及总细菌(b)的 DGGE 聚类分析图

Fig.4 Cluster diagram of total fungi (a) and total bacteria (b) DGGE fingerprints for treatments of pre-fumigation (BF), control (CK) and ammonia fumigation (AMO)

BF:熏蒸前处理,CK:对照,AMO:氨水熏蒸处理

2.3 氨水熏蒸对香蕉产量的影响

田间试验结果表明,氨水熏蒸处理(AMO)的香蕉亩产量显著高于对照(CK)处理(图6)。氨水熏蒸处理的亩产量达到 4.87 t,而对照处理的亩产量仅为 3.62 t。与对照相比,氨水熏蒸处理增产 1.25 t,表现出 34.5% 的增产效果。

3 讨论

香蕉枯萎病是一种严重危害香蕉产业的土传病害,多发生在多年连作的香蕉地中,其是否爆发很大程度上取决于病原菌的数量和香蕉根际环境中微生物区系的结构^[16]。连作条件下,土壤中致病真菌类微生物大量繁殖和微生物区系的变化是连作障碍的主要原因之一^[17]。香蕉枯萎病的病原菌是典型的单循环病原菌,可通过土壤熏蒸降低土壤中初始尖孢菌的数量进而有效防控枯萎病的发生。对于高发枯萎病的香蕉园,新种

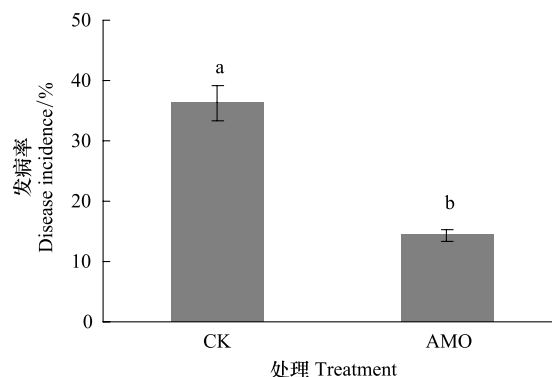


图5 对照及氨水熏蒸处理香蕉枯萎病的发病率

Fig.5 Banana *Fusarium* wilt disease incidence for treatments of control (CK) and ammonia fumigation (AMO)

CK:对照处理,AMO:氨水熏蒸处理;柱形图上标注的不同字母表示在 0.05 水平上 Duncan 法多重比较具有显著差异

香蕉前进行土壤熏蒸是防控枯萎病的必要措施。大量的研究表明土壤熏蒸能够有效的防控植物病害,溴甲烷、二氯丙烯结合三氯硝基甲烷、威百亩等均为有效的土壤熏蒸剂^[18],但由于该类原料的环境危害,均被先后禁止使用,寻找新的土壤熏蒸剂成为研究热点^[19]。本研究中氨水熏蒸措施显著减少了高发枯萎病香蕉园土壤中尖孢镰刀菌的数量,显著降低了香蕉枯萎病的发病率。与本实验结果类似,早在 1982 年, Rush 与 Lyda 即研究发现,氨能够杀灭棉根腐病菌 (*phymatotrichum omnivorum*) 的菌核和菌丝^[20]。氨同样被发现,能够杀灭黄萎病病原菌大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 的菌核^[21]、抑制腐霉菌 (*Pythium ultimum*) 和立枯丝核菌 (*rhizoctonia solani*) 的活力^[22]。

在本研究中平板稀释涂布法被用来计数可培养微生物的数量,氨水熏蒸后,可培养真菌的数量显著低于

对照,但可培养细菌的数量却没有显著性差异,表明尽管土壤熏蒸能够降低土壤中病原菌数量,但却不能完全杀灭土壤中所有微生物,尤其对细菌的影响要小于真菌。Xiao 和 Duniway 研究发现许多重要的细菌在熏蒸时能够存活并且假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 在熏蒸后能够快速重新恢复,有的甚至比熏蒸前的数量有所增加^[23]。由于传统微生物分离培养方法的选择性,人们更偏向于利用不依赖于培养技术的方法研究和揭示整个土壤微生物群落结构的变化^[24-25]。与传统的培养方法相比,这些不依赖于培养的分子生物学方法,能够更全面、更深入地认识土壤微生物区系的多样性和复杂性。在本研究中,Real-Time PCR 技术被用来测定土壤中总细菌和真菌的数量,无论是总细菌和真菌,其数量均有所下降,结合可培养真菌的结果,表明熏蒸后土壤微生物活性有所降低。结合分析可培养技术和 Real-Time PCR 技术的检测结果表明,可培养真菌与总真菌数量的变化趋势具有一致性,氨水熏蒸能够增加可培养 B/F,但对总 B/F 没有显著影响。

平板稀释涂布法和 Real-Time PCR 技术已经证实了氨水熏蒸能够降低病原菌数量,且对其他微生物数量也有影响,但其对土壤微生物群落结构的影响仍然未知。刘庆城和许玉兰应用平板计数法研究发现液氨处理前后真菌的数量和组成均有较大变化,而细菌类微生物对氨反应不如真菌敏感;氨水熏蒸 50 d 后,真菌数量回升,通过菌落形态观察发现其组成相对单一,种类减少^[26]。PCR-DGGE 技术自 Muyzer 首次应用于土壤微生物生态的研究后,一直被广泛应用于土壤微生物分子生态学的研究。目前国内外还没有有关 DGGE 切胶测序鉴定氨水熏蒸前后区系变化的报道。本研究首次利用 PCR-DGGE 研究氨水熏蒸前后土壤总细菌和真菌的群落结构变化,结果表明:氨水熏蒸后细菌和真菌 DGGE 图谱上一些条带明显增强或减弱,其中真菌 DGGE 图谱上表示病原菌的条带强度明显降低,也进一步证明了氨水熏蒸能够降低土壤中尖孢镰刀菌的数量;DGGE 的聚类分析图也表明了氨水熏蒸后土壤群落出现了明显差异。本文研究与 Yao 等人报道的相似,细菌和真菌群落结构组成受土壤熏蒸剂的影响^[27]。未涉及到条带的切胶测序是本研究的不足之处,未来需要进一步切胶测序或利用其它高通量测序的分析方法,系统研究氨水熏蒸前后土壤微生物区系的变化。Berry 报导液氨施用能够减少甘蔗线虫的发生,进而增加了甘蔗的亩产量^[28]。与其类似,本研究中因氨水熏蒸降低了香蕉枯萎病的发病率,使得处理中可收获的健康植株数量多于对照,从而显著增加了香蕉的亩产。

液氨本身是氮肥,施于有病地区,又具有杀菌除病作用,能使施肥与防病结合起来,具有工效高,成本低,省工、省时,一举两得等优点^[26]。但氨水熏蒸土壤时,不仅能杀病原菌,还能灭土壤中有益微生物,降低土壤微生物活性,如 Deng 等报导液氨施用后的土壤微生物和生物活性均有所降低^[29]。低微生物活性的土壤生态系统不稳定,易受其他微生物侵染。故在土壤熏蒸后,需及时补施生物菌肥,充分增加土壤中有益微生物的数

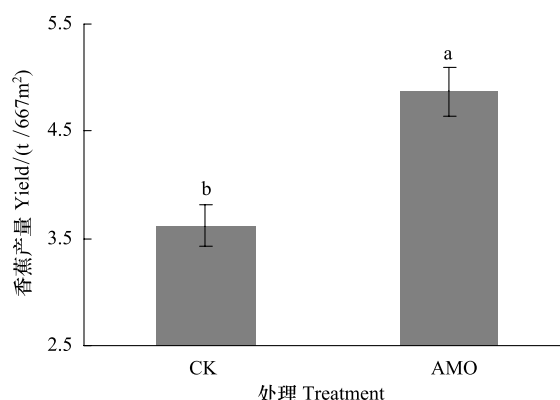


图 6 氨水熏蒸后对香蕉产量的影响

Fig. 6 Banana yield for treatments of control (CK) and ammonia fumigation (AMO)

CK: 对照处理, AMO: 氨水熏蒸处理; 柱形图上标注的不同字母表示在 0.05 水平上 Duncan 法多重比较具有显著差异

量及比例,预计能够更好的防控香蕉枯萎病的发生,该方面内容有待进一步研究。综上所述,在枯萎病严重的香蕉园中,氨水是一种良好的土壤熏蒸剂,能够显著降低土壤中尖孢镰刀菌的数量,改善土壤微生物区系,从而有效防控香蕉枯萎病的发生。

参考文献 (References):

- [1] Pegg K G, Moore N Y, Bentley S. Fusarium wilt of banana in Australia; a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1996, 47(5): 637-650.
- [2] Xu L B, Huang B Z, Wu Y L, Huang Y H, Dong T. The cost-benefit analysis for bananas diversity production in China Foc. zones. *American Journal of Plant Sciences*, 2011, 2(4): 561-568.
- [3] Sivamani E, Gnanamanickam S S. Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. cubense in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil*, 1988, 107(1): 3-9.
- [4] Raguchander T, Jayashree K, Samiyappan R. Management of Fusarium wilt of banana using antagonistic microorganisms. *Journal of Biological Control*, 1997, 11(1/2): 101-105.
- [5] Saravanan T, Muthusamy M, Marimuthu T. Development of integrated approach to manage the fusarial wilt of banana. *Crop Protection*, 2003, 22(9): 1117-1123.
- [6] 张卓, 彭德良, 黄文坤, 王高峰, 张超, 林雪, 张家娟, 孙建华. 土壤药剂处理结合阳光消毒防治番茄根结线虫技术评价. *植物保护*, 2011, 37(3): 161-164.
- [7] Anonymous. Assessment of alternatives to methyl bromide. Methyl Bromide Technical Options Committee, United Nations Environmental Programme Ozone Secretariat, Nairobi, Kenya, 1998.
- [8] 陈培根, 蒯元璋. 氨水对桑紫纹羽病菌污染土壤消毒效果及中试报告. *蚕业科学*, 1986, (4): 12: 236-238.
- [9] Smiley R W, Cook R J, Papendic R I. Anhydrous ammonia as a soil fungicide against Fusarium and fungicidal activity in the ammonia retention zone. *Phytopathology*, 1970, 60(8): 1227-1232.
- [10] Schippers B, Palm L C. Ammonia, a fungistatic volatile in chitin-amended soil. *European Journal of Plant Pathology*, 1973, 79(6): 279-281.
- [11] Garbeva P, van Veen J A., van Elsas J D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 243-270.
- [12] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, Jackson R B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 4117-4120.
- [13] Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of Fusarium oxysporum from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, 1975, 8: 114-124.
- [14] Nakatsu C H, Torsvik V, Ovreas L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(4): 1382-1388.
- [15] May L A, Smiley B, Schmidt M G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(9): 829-841.
- [16] 凌云, 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. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(5): 1136-1141.
- [17] 邹莉, 袁晓颖, 李玲, 王欣宇. 连作对大豆根部土壤微生物的影响研究. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 27-30.
- [18] Wang K H, McSorley R, Kokalis-Burelle N. Effects of cover cropping, solarization, and soil fumigation on nematode communities. *Plant and Soil*, 2006, 286(1/2): 229-243.
- [19] Stirling G R, Eden L M. The impact of organic amendments, mulching and tillage on plant nutrition, Pythium root rot, root-knot nematode and other pests and diseases of capsicum in a subtropical environment, and implications for the development of more sustainable vegetable farming systems. *Australasian Plant Pathology*, 2008, 37(2): 123-131.
- [20] Rush C M, Lyda S D. Effects of anhydrous ammonia on mycelium and sclerotia of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology*, 1982, 72: 1085-1089.
- [21] Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 2002, 92(3): 255-264.
- [22] Howell C R, Beier R C, Stipanovic R D. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology* 1988, 78: 1075-1078.
- [23] Xiao C L, Duniway J M. Bacterial population responses to soil fumigation and their effects on strawberry growth. *Phytopathology*, 1998, 88(9suppl.): S100-S1000.
- [24] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470-478.
- [25] Sørensen J, Nicolaisen M H, Ron E, Simonet P. Molecular tools in rhizosphere microbiology—from single-cell to whole-community analysis. *Plant and Soil*, 2009, 321(1/2): 483-512.
- [26] 刘庆城, 许玉兰. 液氨施肥防治作物土传病害的研究. *中国农业科学*, 1986, 19(1): 29-32.
- [27] Yao S R, Merwin I A, Abawi G S, Thies J E. Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(3): 587-599.
- [28] Berry S D. Effect of anhydrous ammonia on cane yield, nematodes and eldana. *Proceedings of the Annual Congress-South African Sugar Technologists Association*, 2011, 84: 226-235.
- [29] Deng S P, Parham J A, Hattey J A, Babu D. Animal manure and anhydrous ammonia amendment alter microbial carbon use efficiency, microbial biomass, and activities of dehydrogenase and amidohydrolases in semiarid agroecosystems. *Applied Soil Ecology*, 2006, 33(3): 258-268.