

## 连作香蕉园生态熏蒸剂的筛选及其对土壤微生物群落结构的影响<sup>①</sup>

钟书堂<sup>1</sup>, 吕娜娜<sup>1</sup>, 孙逸飞<sup>1</sup>, 沈宗专<sup>1</sup>, 李 荣<sup>1\*</sup>, 张 娟<sup>2</sup>, 沈其荣<sup>1</sup>

(1 国家有机类肥料工程技术研究中心, 江苏省有机废弃物资源化高技术研究重点实验室, 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2 山东省产品质量检验研究院, 济南 250100)

**摘 要:**通过对多年连作后香蕉枯萎病土壤进行熏蒸处理, 应用传统涂布计数法, 结合变性凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术, 较为全面地研究了不同熏蒸剂对病原菌的杀灭效果以及对土壤微生物区系的影响, 为连作蕉园的可持续栽培提供了理论依据。试验通过研究石灰、碳铵、石灰碳铵联用、二氧化氯、次氯酸钠、过氧化氢和氨水处理对水体病原菌孢子、土壤中尖孢镰刀菌的杀灭作用, 逐步筛选出适合连作蕉园灌溉水和土壤的熏蒸剂种类。结果表明: 上述熏蒸剂对水体或土壤中尖孢镰刀菌均具有杀灭作用, 土壤中氨水、石灰碳铵联用处理效果更加显著, 被选择为发病蕉园土壤熏蒸剂。不同用量氨水、石灰碳铵联用处理熏蒸土壤, 随着熏蒸剂施用量的增加, 土壤中尖孢镰刀菌数量下降幅度逐渐增大; 两种熏蒸剂对土壤中可培养总细菌和总真菌均有杀灭效果, 随着用量的增加, 总真菌数量下降幅度显著高于总细菌。DGGE 结果显示, 氨水、石灰碳铵联用处理对土壤中总真菌种类的影响也显著高于总细菌, 随着熏蒸剂用量的增加, 总细菌有少许条带的增加或减少, 总真菌条带丰富度急剧减少。与对照相比, 各熏蒸剂处理后总细菌物种多样性指数均有所降低, 随着用量的增加, 总体呈下降趋势, 在氨水、石灰碳铵联用用量分别为 2.67 ml/kg 和(3.33+1.67) g/kg 时各项指数最高。综上, 所有熏蒸剂均能作为水体病原菌杀灭剂, 其中氨水、石灰碳铵联用是良好的连作蕉园土壤熏蒸剂, 最适用量分别为 2.67 ml/kg、(3.33 + 1.67) g/kg。

**关键词:**尖孢镰刀菌; 熏蒸剂; 土壤微生物区系; 香蕉

**中图分类号:** S59

香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC)引起的一种常见土传真菌性病害, 对全球香蕉产业健康发展造成了严重障碍<sup>[1-2]</sup>。该病现广泛分布于亚洲、非洲、澳大利亚、南太平洋及热带美洲的香蕉产区, 我国广东、广西和台湾也为其适生区<sup>[3]</sup>, 其中以 4 号生理小种对我国香蕉种植产业造成的危害最大, 约有 90% 的香蕉品种受到威胁<sup>[4]</sup>。虽然香蕉枯萎病的危害早已引发国内外众多关注, 但其防治效果却不容乐观, 寻找有效的防治途径迫在眉睫。

自 20 世纪 40 年代以来, 土壤熏蒸一直是防治土传病害的重要手段, 其使用同时也能够减少作物生长期其他防治病害农药的应用, 减少了农药污染, 有利于提高作物的产量和品质<sup>[5]</sup>。溴甲烷是一种高效、

广谱的土壤熏蒸化学药剂, 但由于其对臭氧层的破坏, 已逐步被淘汰<sup>[6]</sup>。目前, 关于有效防治香蕉枯萎病的熏蒸剂的报道较少, 因此筛选出能够高效防控香蕉枯萎病并对环境友好的熏蒸剂, 对香蕉产业的健康发展具有重要意义。但由于熏蒸剂无选择性的杀死, 熏蒸过程中目标病原菌极大程度上被杀死的同时土壤中非目标微生物, 包括一些有益微生物的组成与活性也受到了影响<sup>[7-11]</sup>。土壤微生物是土壤生物的重要组成部分之一, 直接或间接地参与了几乎所有的土壤过程<sup>[12]</sup>。因此, 在比较不同新开发的土壤生态熏蒸剂应用效果的同时, 研究不同类型及不同浓度熏蒸剂对土壤中微生物的影响变得重要。

早期熏蒸剂对土壤中微生物影响的研究受手段及方法的限制, 多数只能采用涂布计数研究对数量的

①基金项目: 江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2012377)、海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014038)、国家自然科学基金项目(41101231)、淮安市科技支撑计划项目(SN201301)、国家大学生创业训练项目(201410307089)和南京农业大学 SRT 项目(1413C10)资助。

\* 通讯作者(lirong@njau.edu.cn)

作者简介: 钟书堂(1991—), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物生态与肥料。E-mail: 506018840@qq.com

影响。随着分子生物学的发展,从分子水平研究不同熏蒸剂对土壤微生物区系的变化成为可能,尤其是解析消毒前后微生物种类及群落结构的变化。本研究首先比较了不同生态熏蒸剂对水体及香蕉连作多年高发枯萎病土壤中病原菌的杀灭效果,选择出最有效熏蒸剂,然后通过应用涂布计数结合 DGGE 分子生物学手段,比较了该类熏蒸剂对可培养微生物区系的影响,以期土壤熏蒸防控香蕉土传枯萎病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 供试土壤** 供试土壤为连续种植香蕉 10 年以上、由燥红土发育而成的砂壤土,其可培养细菌、真菌和病原菌数量分别为  $3.2 \times 10^7$ 、 $3.0 \times 10^5$  和  $2.8 \times 10^4$  CFU/g, pH 6.28, TOC 5.40 g/kg, TON 0.69 g/kg, 速效磷 70.47 mg/kg, 速效钾 227.13 mg/kg。

**1.1.2 供试材料** 石灰,分析纯,购自西陇化工股份有限公司;碳铵,分析纯,纯度不小于 98%,购自上海久亿化学试剂有限公司;二氧化氯,分析纯,纯度 99%,购自成都西亚试剂有限公司;次氯酸钠,分析纯,活性氯含量不小于 5%,购自上海久亿化学试剂有限公司;过氧化氢,分析纯,含量不少于 30%,购自上海久亿化学试剂有限公司;氨水,分析纯,含量 25%~28%,购自无锡市亚盛化工有限公司。香蕉枯萎病病原菌为本实验室保存的尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种。

### 1.2 试验设计

**1.2.1 水体孢子消毒试验** 将病原菌接种于 K2 培养基,28℃ 黑暗培养 1 周,用无菌水洗脱并过滤除去菌丝,于显微镜下用血球计数板计数后,稀释成  $1.0 \times 10^4$  CFU/ml 孢子液待用。将不同固态熏蒸剂分别称取 5 g 溶于 50 ml 无菌水中,稀释成 5、2、1、0.5 g/L 的工作液,即液态熏蒸剂分别稀释至 200 倍(200×)、500 倍(500×)、1 000 倍(1 000×)和 2 000 倍(2 000×)。取各熏蒸剂 4 种浓度的工作液 10 ml 分别加入装有 90 ml 孢子液的三角瓶中,30℃ 静置培养 24 h 后,测定各处理尖孢镰刀菌数量,设定未添加熏蒸剂的处理为对照。

**1.2.2 土壤病原菌消毒试验** 将不同用量熏蒸剂分别加入装有 100 g 供试土壤的培养罐中,混匀,调节含水量一致(8.3%)。试验共设 7 个处理:①0.4 g 石灰处理(L);②0.2 g 碳铵处理(C);③0.4 g 石灰和 0.2 g 碳铵处理(LC);④0.4 g 二氧化氯处理( $\text{ClO}_2$ );⑤1 ml 过氧化氢处理( $\text{H}_2\text{O}_2$ );⑥1 ml 次氯酸钠处理

(NaClO);⑦0.5 ml 氨水处理(A);⑧对照(CK),不加入任何熏蒸剂。每处理 3 个重复。30℃ 培养 7 天,测定各处理尖孢镰刀菌数量。各处理病原菌相对杀灭率(Relative fumigation rate of FOC,以 RFF% 表示)=(CK 病原菌数量 - 各处理病原菌数量)/CK 病原菌数量 $\times 100$ 。

**1.2.3 不同用量氨水或石灰碳铵熏蒸试验** 每盆加入 3 kg 供试土壤,分别进行氨水熏蒸处理或石灰碳铵联用熏蒸处理。试验共设 11 个处理:①0.33 ml/kg 氨水处理(SA1);②0.67 ml/kg 氨水处理(SA2);③1.33 ml/kg 氨水处理(SA3);④2.67 ml/kg 氨水处理(SA4);⑤4 ml/kg 氨水处理(SA5);⑥(1.67 + 0.83) g/kg 石灰碳铵联用处理(SL1);⑦(3.33 + 1.67) g/kg 石灰碳铵联用处理(SL2);⑧(6.67 + 3.33) g/kg 石灰碳铵联用处理(SL3);⑨(13.33 + 6.67) g/kg 石灰碳铵联用处理(SL4);⑩(20 + 10) g/kg 石灰碳铵联用处理(SL5);⑪对照(SCK),不加入任何熏蒸剂。每处理 5 盆,3 次重复。用黑色塑料袋密封盆子,置于 30℃ 恒温环境中培养 30 天。

### 1.3 测定项目与方法

**1.3.1 熏蒸后水中及土壤中可培养微生物数量的测定** 采用稀释平板涂布计数法测定可培养微生物数量。总细菌采用 LB 培养基计数,真菌采用马丁氏培养基计数,放线菌采用高氏 1 号培养基计数<sup>[13]</sup>,病原菌(尖孢镰刀菌)采用 K2 培养基计数<sup>[14]</sup>。细菌于 30℃ 培养箱培养,真菌、放线菌及尖孢镰刀菌于 28℃ 培养箱培养。细菌培养 30 h 计数,真菌、尖孢镰刀菌培养 72 h 计数。

**1.3.2 土壤中微生物种类的测定** 熏蒸后土壤中微生物种类的变化采用变性梯度凝胶电泳法(DGGE)测定。用 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒(MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, USA)提取土壤总 DNA 后进行 PCR 扩增<sup>[15]</sup>,总细菌和总真菌引物分别为 338GC/518F<sup>[16]</sup>和 NS1/GCFungi<sup>[17]</sup>。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。总细菌变性胶浓度为 40%~60% 变性梯度(100% 胶为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),8% 的 PAGE。总真菌变性胶浓度为 20%~40% 变性梯度(100% 胶为 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺),6% 的 PAGE。将 20  $\mu\text{l}$  的 PCR 产物及 10  $\mu\text{l}$  缓冲液混合均匀后上样,电泳后银染胶片并扫描保存<sup>[18]</sup>。

**1.3.3 数据统计分析** 实验数据采用 SPSS 13.0 进行统计分析,DGGE 图片用 Quantity One 软件分析。

2 结果与分析

2.1 熏蒸剂对水体中病原菌孢子的杀灭作用

表 1 表明各熏蒸剂母液稀释不同倍数后,再取 10 ml 加入装有 90 ml 孢子液的三角瓶中,对水中病原菌的杀灭作用。各熏蒸剂母液稀释 200 倍或浓度为 5 g/L 时,对水中病原菌杀灭率均达 100%。石灰(L)和碳铵(C)处理母液浓度为 1 g/L 时,仍有杀菌作用,相较于 CK 处理,病原菌数目分别下降 28.57% 和 42.86%;石灰碳铵联用(LC)浓度为 0.5 g/L 时和氨水(A)处理母液稀释 2 000 倍时,对水中病原菌杀灭率均为 14.29%;二氧化氯(ClO<sub>2</sub>)浓度为 0.5 g/L 时、次氯酸钠(NaClO)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)母液稀释 2 000 倍时,对水中病原菌杀灭率几乎均为 100%。

表 1 不同熏蒸剂对水中病原菌的杀灭作用  
Table 1 Effects of different fumigants on FOCs in water

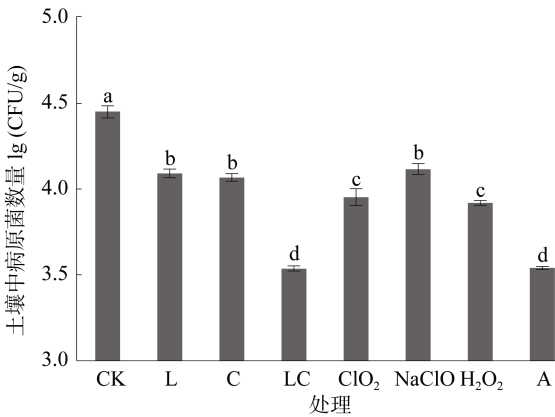
| 处理                            | 不同熏蒸剂的 RFF%      |                  |                   |                     |
|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|
|                               | 5 g/L<br>(2 00×) | 2 g/L<br>(5 00×) | 1 g/L<br>(1 000×) | 0.5 g/L<br>(2 000×) |
| L                             | 100              | 94.29            | 28.57             | 0                   |
| C                             | 100              | 100              | 42.86             | 0                   |
| LC                            | 100              | 100              | 54.29             | 14.29               |
| ClO <sub>2</sub>              | 100              | 100              | 100               | 100                 |
| NaClO                         | 100              | 100              | 100               | 100                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 100              | 100              | 100               | 99.14               |
| A                             | 100              | 94.29            | 82.86             | 14.29               |

注:CK:对照;L:石灰;C:碳铵;LC:石灰碳铵联用;ClO<sub>2</sub>:二氧化氯;NaClO:次氯酸钠;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:过氧化氢;A:氨水。

2.2 熏蒸剂对土壤中病原菌的杀灭作用

如图 1 所示,各熏蒸剂对土壤中病原菌均有杀灭作用。加入熏蒸剂一周后,与 CK 相比,各处理病原

菌数目均显著下降。L、C 和 NaClO 处理的病原菌数目下降约 30%,ClO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的病原菌数目下降至 CK 的 50% 左右,LC 和 A 处理对土壤中病原菌杀灭效果最为显著,下降约 1 个数量级。



(图中不同字母表示处理间差异显著(P<0.05),下同)

图 1 不同熏蒸剂对土壤中病原菌的杀灭作用

Fig. 1 Effects of different fumigants on FOC numbers in soils

2.3 不同用量氨水和石灰碳铵对土壤病原菌的杀灭作用

图 2 为不同用量氨水和石灰碳铵联用处理对土壤中尖孢镰刀菌数量的影响。图 2A 表明,相较于消毒前(SBD)和对照(SCK),施用不同用量氨水后,土壤病原菌数目均有降低,随着氨水施用量的增加,病原菌下降幅度加大,SA5 处理相比消毒前下降了约 2 个数量级;图 2B 显示,与 SBD 和 SCK 处理相比,石灰碳铵联用能显著降低土壤中的病原菌数量,随石灰碳铵联用量逐渐加大,土壤中尖孢镰刀菌数量呈梯度下降,当用量达到 SL5 处理时,土壤中尖孢镰刀菌数量相较于 SBD 处理下降达 3 个数量级。

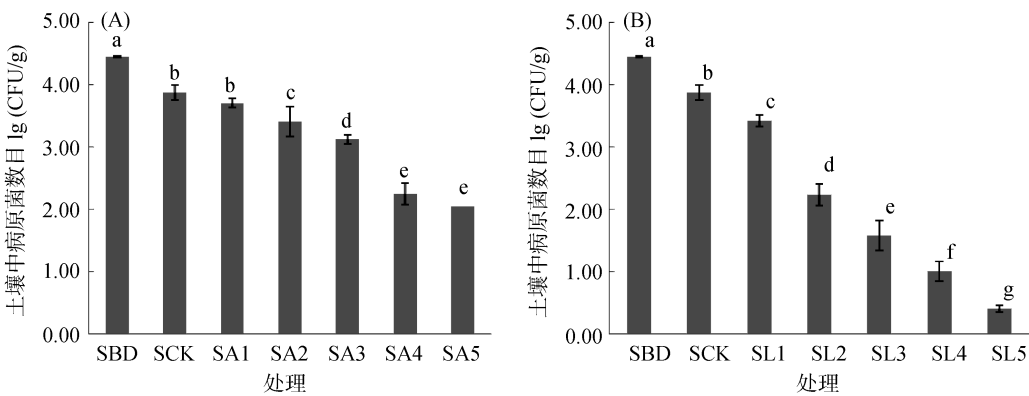


图 2 不同用量氨水(A)和石灰碳铵(B)对土壤中尖孢镰刀菌数量的影响

Fig. 2 Effects of fumigation with different dosages of ammonium hydroxide (A) and mixtures of lime and ammonia bicarbonate (B) on FOC numbers in soil

2.4 不同用量氨水和石灰碳铵对土壤可培养细菌和真菌数量的影响

图 3A 表明，随着氨水用量的增加，土壤中可培养细菌和真菌数量均呈现下降趋势。总细菌的数量总体变化幅度不大，SA5 处理与 SBD 处理相比下降仅下降 10 倍；总真菌数量下降幅度较大，SA5 处理下降程

度超出 100 倍。图 3B 显示，石灰碳铵联用处理土壤中可培养细菌和真菌数量均有下降，随着石灰碳铵联用用量的增加，可培养细菌数量下降的变化幅度不大，与 SBD 处理相比，最大下降程度不达 10 倍；总真菌数量随熏蒸剂用量的加大而迅速降低，SL5 处理数量比 SBD 处理减少近 10 000 倍，下降了 4 个数量级。

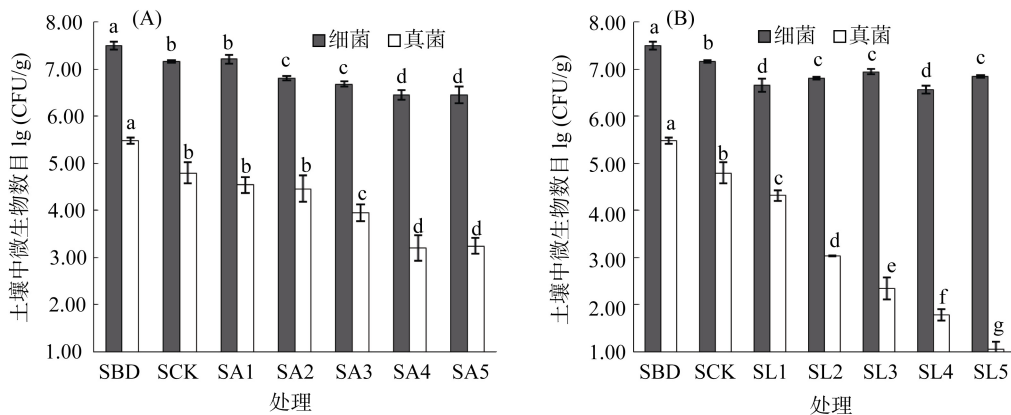


图 3 不同用量氨水(A)和石灰碳铵(B)对土壤中可培养细菌和真菌数量的影响

Fig. 3 Effects of fumigation with different dosages of ammonium hydroxide (A) and mixtures of lime and ammonia bicarbonate (B) on numbers of cultural bacteria and fungi in soil

2.5 不同用量氨水和石灰碳铵对土壤可培养细菌和真菌群落结构的影响

2.5.1 不同用量氨水的影响 图 4A 表明，不同用量氨水对土壤总细菌的种类影响不大，各处理的条带数目差异不显著。但熏蒸后不同处理与 SBD 样品相比，有一些特殊条带的增加与减少。如图中标示的条带 1、2、3、4 和 5 随着熏蒸剂用量的增加而逐步变暗甚至消失；条带 6、7、8 在 SCK 及 SBD 土壤样品

中未被检测到，而施用氨水后开始出现，并随着熏蒸剂的用量的加大而变亮。土壤总细菌物种丰富度和多样性指数分析(表 2)发现，与 SBD 和 SCK 处理相比，SA5 处理各项指标均降低，而熏蒸后其他处理物种丰富度、均匀度和多样性指数随氨水施用量的增加而逐渐增加，稳定性总体呈上升趋势。说明氨水熏蒸能够提高土壤微生物物种丰富度和多样性指数，增加其均匀度和稳定性。SA4 处理各项指标的值均高于其他处

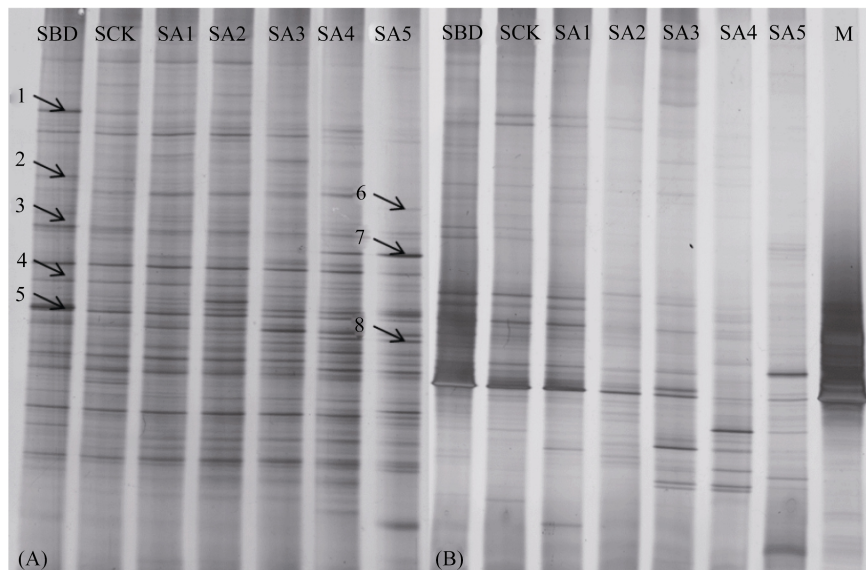


图 4 不同用量氨水对土壤总细菌(A)和总真菌(B)种类的影响

Fig. 4 DGGE images of soil total bacterial (A) and total fungal (B) communities amended with different dosages of ammonium hydroxide

表 2 氨水处理土壤总细菌的丰富度、均匀度、稳定性及多样性指数

Table 2 The indexes of richness, evenness, stability and diversity of total bacteria in soils amended with different dosages of ammonium hydroxide

| 处理  | 丰富度( <i>R</i> ) | 均匀度( <i>E</i> ) | 稳定性( <i>S</i> ) | 多样性( <i>H'</i> ) |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| SBD | 27              | 2.13            | 1.25            | 3.05             |
| SCK | 26              | 2.18            | 1.60            | 3.09             |
| SA1 | 29              | 2.18            | 1.91            | 3.19             |
| SA2 | 30              | 2.19            | 2.08            | 3.24             |
| SA3 | 30              | 2.20            | 1.76            | 3.24             |
| SA4 | 32              | 2.20            | 2.10            | 3.31             |
| SA5 | 23              | 2.16            | 0.98            | 2.94             |

理,表明向土壤中添加 2.67 ml/kg 用量氨水后,总细菌微生物区系状态最好。图 4B 中泳道 M 为尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种电泳条带。不同用量氨水对土壤总真菌的种类影响较大,随着熏蒸剂用量的增加,土壤总真菌的丰富度、多样性均呈现下降的趋势,尖孢镰刀菌的数量随着熏蒸剂用量的加大而减少。

2.5.2 不同用量石灰碳铵的影响 图 5A 表明,石灰碳铵联用后对土壤总细菌种类的影响较为显著,熏

蒸后各处理与 SBD 样品相比,有一些特殊条带的增多或减少。如图中所标示的条带 9、10、11、12、13 随着熏蒸剂用量的增加而逐步变暗甚至消失;条带 14、15、16 在 SBD 及 SCK 处理中并未检测到,但随着熏蒸剂的用量的增加而出现并变亮。土壤总细菌物种丰富度和多样性指数分析(表 3)发现,与 SCK 处理相比,熏蒸后各处理物种丰富度、均匀度、稳定性和多样性指数均有所降低,说明石灰碳铵联用处理降低了土壤微生物物种丰富度、多样性指数、均匀度和稳定性。SL1、SL3、SL4 和 SL5 处理随着石灰碳铵用量的增加各项指标逐渐降低,SL2 处理相较于其他熏蒸后处理土壤总细菌丰富度和多样性指数最高,均匀度和稳定性也最好。表明石灰碳铵施用量为(3.33 + 1.67) g/kg (SL2)时对土壤总细菌微生物区系影响较小。图 5B 中泳道 M 为尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种电泳条带。熏蒸剂对土壤总真菌的种类影响较大,随着熏蒸剂用量的增加,土壤总真菌的丰富度、多样性均呈现下降的趋势,石灰碳铵用量最大的处理 SL5 泳道上基本无清晰可见的条带。同时,尖孢镰刀菌的数量随着熏蒸剂用量的加大而逐步减少,SL5 处理几近消失。

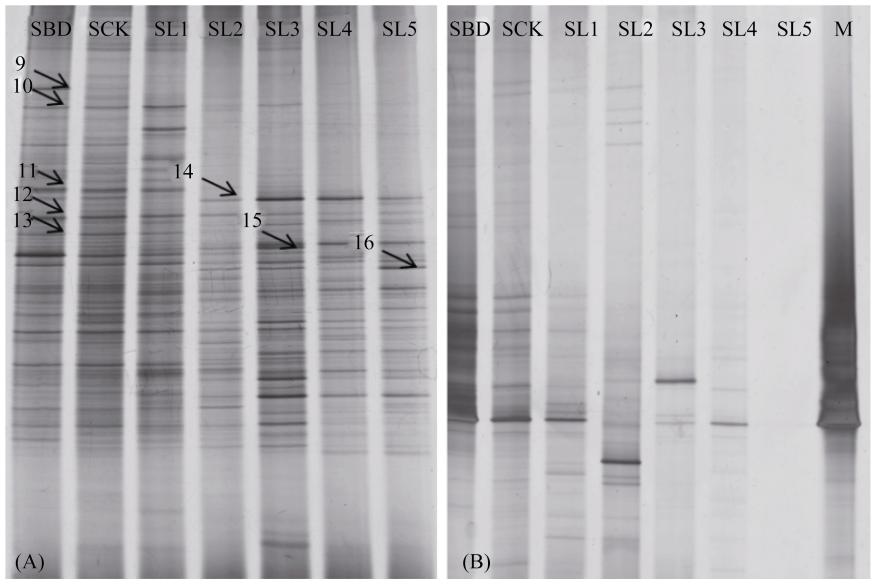


图 5 不同用量石灰碳铵对土壤总细菌(A)和总真菌(B)种类的影响

Fig. 5 DGGE images of soil total bacterial (A) and total fungal (B) communities amended with different dosages of the mixture of lime and ammonia bicarbonate

3 结论与讨论

香蕉枯萎病主要通过土壤、灌溉水流动和染病吸芽繁殖材料进行传播<sup>[19]</sup>。对香蕉灌溉水消毒能够从水源杀灭尖孢镰刀菌,减少香蕉枯萎病的发生率,但

目前关于对香蕉灌溉水源消毒还未有报道。石灰、碳铵、二氧化氯、次氯酸钠、过氧化氢和氨水均为环境友好型生态试剂<sup>[20-22]</sup>,但均没有灌溉水消毒的应用。本试验中 7 种供试熏蒸剂均能够有效杀灭水体中尖孢镰刀菌,高浓度时(0.5 g/L 或稀释 200 倍)杀灭率高



表 3 石灰碳铵联用处理土壤总细菌的丰富度、均匀度、稳定性及多样性指数  
Table 3 The indexes of richness, evenness, stability and diversity of total bacteria in soils amended with different dosages of lime and ammonia bicarbonate

| 处理  | 丰富度(R) | 均匀度(E) | 稳定性(S) | 多样性(H') |
|-----|--------|--------|--------|---------|
| SBD | 36     | 1.93   | 3.40   | 0.95    |
| SCK | 37     | 2.58   | 3.48   | 0.97    |
| SL1 | 33     | 1.89   | 3.32   | 0.95    |
| SL2 | 34     | 2.48   | 3.41   | 0.97    |
| SL3 | 33     | 1.69   | 3.35   | 0.96    |
| SL4 | 28     | 1.40   | 3.15   | 0.95    |
| SL5 | 26     | 1.38   | 3.07   | 0.94    |

达 100%。因此，在作为水体消毒剂时，这些消毒剂均可以被采用。

香蕉枯萎病作为一种典型的土传病害，上述生态熏蒸剂对香蕉发病土壤中尖孢镰刀菌是否有杀灭作用同样重要。目前国内外没有关于二氧化氯、次氯酸钠和过氧化氢用作土壤熏蒸剂的报道，而氨水因其可防治一些土传病害的发生，还能作为氮肥，已被作为较好的土壤熏蒸剂。Smiley 等人<sup>[23]</sup>研究发现氨能杀死沙土中真菌，Schippers 和 Palm<sup>[24]</sup>发现向土壤中加入能够产生氨气的几丁质，能够抑制 *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* 的孢子萌发及菌丝体的生长。同时，氨对棉根腐病菌(*phymatotrichum omnivorum*)、黄萎病原菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、霉菌(*Pythium ultimum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的菌核和菌丝有抑制作用<sup>[25-27]</sup>。碳铵能够减缓苹果斑点病的发生<sup>[28]</sup>，抑制山茶花枯萎病<sup>[29]</sup>、小麦叶锈病<sup>[30]</sup>、胡椒白粉病<sup>[31]</sup>和土豆银屑病<sup>[32]</sup>，也可作为一种安全杀菌剂使用。但是有关石灰和碳铵联用作为消毒剂的报道较少。本研究结果表明，7 种熏蒸剂对土壤病原菌均有较好的杀灭作用，其中氨水和石灰碳铵联用熏蒸效果最为显著，石灰碳铵联用效果显著高于石灰和碳铵单一施用。王丽丽等<sup>[33]</sup>研究与本研究结果类似，生物有机肥联合石灰碳铵对烟草青枯病的防治效果显著高于生物有机肥联合石灰。因此，本研究选择氨水和石灰碳铵为香蕉发病土壤熏蒸剂，并进一步研究其不同浓度的熏蒸效果。研究发现，不同用量氨水和石灰碳铵施用后对土壤尖孢镰刀菌数量均有显著杀灭作用，浓度越高，杀灭效果越好，与王芳艳等<sup>[34]</sup>结论一致。

对病原菌的杀灭效果不能作为选择熏蒸剂浓度的唯一标准。由于熏蒸剂的无选择性杀灭作用，在杀灭土壤中病原菌的同时，对非靶标微生物也有影

响<sup>[35]</sup>，目前只有少量关于熏蒸剂对土壤微生物影响的报道<sup>[36]</sup>，所以需要研究不同用量氨水和石灰碳铵施用后土壤中细菌和真菌群落的变化。涂布计数结果显示，氨水和石灰碳铵施用对土壤中可培养细菌和真菌数目均有影响，两种熏蒸剂施用后土壤中可培养真菌结果与病原菌类似，随熏蒸剂用量的增加而逐步减少；不同用量氨水处理细菌数量随熏蒸剂用量的增加依次降低，而不同用量石灰碳铵处理细菌数目略有起伏，SL2 和 SL4 处理细菌数量相较前一处理有略微回升。

平板计数的局限性仅能反映可培养微生物的变化，而无法涉及微生物种类的改变。PCR-DGGE 技术是比较不同样本微生物群落或单一微生物群落的最常用技术之一，已被广泛应用于土壤微生物分子生态学的研究<sup>[15,37]</sup>。本研究利用 DGGE 研究不同用量氨水和石灰碳铵分别处理后土壤总细菌和真菌的群落结构变化，结果表明，不同用量氨水对熏蒸后土壤中总细菌种类的影响不大，主要菌群的条带基本没有变化，个别条带的减少可能与 pH 的变化或者是 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 的积累有关<sup>[24]</sup>，一些随着熏蒸剂用量的添加而出现的条带，可能由于土壤中积累的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>诱导氨氧化古菌和氨氧化细菌的大量繁殖。细菌 DGGE 条带分析表明，土壤中细菌丰富度和多样性指数随氨水用量的加大逐步增加，SA4 处理达到最高。而施用氨水对土壤中总真菌种类的影响较大，Yao 等<sup>[38]</sup>的研究也发现，熏蒸后的土壤真菌群落改变远大于细菌群落。随熏蒸剂用量的增加，一些主要条带减弱甚至消失，尖孢镰刀菌条带也逐渐减弱，SA4 和 SA5 处理亮度相近。故 2.67 ml/kg 用量的氨水在高效杀灭土壤中病原菌的同时，能够使细菌群落多样性得到较大提高。石灰碳铵联用后结果与氨水类似，对真菌群落的影响更高于氨水，施用量最大的 SL5 处真菌条带已接近消失，而施用后细菌多样性均降低，在 SL2 处理时各项指数最为接近熏蒸前。马旭<sup>[39]</sup>的研究与本研究类似，向土壤中加入不同浓度的氯化钴，随着浓度的增加，土壤微生物物种均匀度和多样性呈降低趋势，但中高浓度略有波动。以上结果说明石灰碳铵联用用量为 (3.33 + 1.67) g/kg 时既能有效杀灭尖孢镰刀菌，又能够保持土壤细菌微生物群落的稳定性。

综上所述，氨水、石灰碳铵联用处理能够有效杀死香蕉枯萎病高发土壤病原菌，是良好的香蕉枯萎病土壤熏蒸剂。熏蒸剂用量的增加提高了对尖孢镰刀菌的杀灭率，但也破坏了土壤微生物区系的平衡。本研究熏蒸基于的土壤为连续种植香蕉 10 年以上的连

作土壤, 该土壤含有大量的病原菌, 同时微生物群落已遭受严重破坏, 种植香蕉后大面积发病, 在该土壤上已经很难获得正常的香蕉产量<sup>[13]</sup>, 因此, 熏蒸剂施用后打破了遭受连作破坏的土壤中微生物群落结构, 再加上本研究筛选的熏蒸剂为本身就是化学肥料的碳铵和氨水, 可以预见其施用不会对植物产生危害, 同时能够提高后期香蕉的生产力。本实验同时开展的碳铵熏蒸对防控连作黄瓜、西瓜和甜瓜枯萎病试验也表明了, 熏蒸能够促进后期植物的生长<sup>[40]</sup>。综上, 2.67 ml/kg 氨水用量和(3.33 + 1.67) g/kg 石灰碳铵联用既能有效杀灭尖孢镰刀菌, 又能够最大维持微生物区系稳定性, 为香蕉土壤熏蒸的最适用量。

### 参考文献:

- [1] Alves EJ, Shepherd K, Dantas JLL. Cultivation of bananas and plantain in Brazil and needs for Improvement // Perseley GJ, DeLanghe EA. Banana and Plantain Breeding Strategies[C]. Brisbane: Press Etching (Qld.) Pty. Ltd, 1987: 44-49
- [2] Ploetz RC, Herbert J, Sebasigari K, Hernandez JH, Pegg KG, Ventura JA, Mayato LS. Importance of Fusarium Wilt in different banana-growing regions // Ploetz RC. Fusarium Wilt of Banana[C]. Minnesota: American Phytopathological Society, 1990: 9-26
- [3] 林时迟, 张绍升, 周乐峰, 黄月英, 胡方平. 福建省香蕉枯萎病鉴定[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(4): 465-469
- [4] Li MH, Yang B, Leng Y, Chao CP, Liu JM, He ZF, Jiang ZD, Zhong S. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and 4 isolates from Taiwan and Southern China[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2011, 33(2): 168-178
- [5] 张鑫. 几种土壤熏蒸剂在蔬菜田的应用技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学植物保护学院, 2013
- [6] Smiley RW, Cook RJ, Papendic RI. Anhydrous ammonia as a soil fungicide against *Fusarium* and fungicidal activity in the ammonia retention zone[J]. Phytopathology, 1970, 60: 1 227-1 232
- [7] Stromberger ME, Klose S, Ajwa H, Trout T, Fennimore S. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives[J]. Soil Science Society of America Journal, 2005, 69(6): 1 987-1 999
- [8] Tanaka S, Kobayashi T, Iwasaki K, Yamane S, Maeda K, Sakurai K. Properties and metabolic diversity of microbial communities in soils treated with steam sterilization compared with methyl bromide and chloropicrin fumigations[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2003, 49(4): 603-610
- [9] Roux-michollet D, Czarnes S, Adam B, Berry D, Commeaux C, Guillaumaud N, Le Roux X, Clays-Josserand A. Effects of steam disinfestation on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(7): 1 836-1 845
- [10] Bending GD, Lincoln SD. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32 (8/9): 1261-1269
- [11] Ibekwe MA. Effects of fumigants on non-target organisms in soils[J]. Advances in Agronomy, 2004, 83: 1-35
- [12] 曹志平. 土壤生态学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [13] Shen ZZ, Zhong ST, Wang YG, Wang BB, Mei XL, Li R, Ruan YZ, Shen QR. Induced soil microbial suppression of banana fusarium wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality[J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 57: 1-8
- [14] Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil[J]. Review of Plant Protection Research, 1975, 8: 114-124
- [15] Muyzer G, De-Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700
- [16] Edenborn SL, Sextstone AJ. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(7): 1570-1579
- [17] 王丹, 李恋卿, 刘永卓, 潘根兴. 不同施肥处理对太湖地区水稻土团聚体粒组细菌和真菌组成和多样性的影响[J]. 土壤, 2012, 44 (2): 290-296
- [18] 付琳, 阮云泽, 沈宗专, 李荣, 杨兴明, 沈其荣. 生物有机肥对连作香蕉根际土壤可培养细菌区系的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(6): 82-88
- [19] Snyder WC, Hanson HN. The species concept in *Fusarium*[J]. American Journal of Botany, 1940, 27 (2): 64-67
- [20] 韦明肯, 赖洁玲, 詹萍. 二氧化氯杀菌机理研究进展[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 429-434
- [21] 李述茂, 吴德礼. 液氯和次氯酸钠对饮用水消毒效果的生产性试验研究[J]. 工业用水与废水, 2011, 42(2): 14-17
- [22] 石晶, 王金美, 孟一娟, 郭小佩. 食品级过氧化氢及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2009, 4: 62-64
- [23] Smiley RW, Cook RJ, Papendic RI. Anhydrous ammonia as a soil fungicide against *Fusarium* and fungicidal activity in the ammonia retention zone[J]. Phytopathology, 1970, 60: 1 227-1 232
- [24] Schippers B, Palm LC. Ammonia, a fungistatic volatile in chitin-amended soil[J]. European Journal of Plant Pathology, 1973, 79(6): 279-281
- [25] Rush CM, Lyda SD. Effects of anhydrous ammonia on mycelium and sclerotia of *phymatotrichum omnivorum*[J]. Phytopathology, 1982, 72: 1085-1089

- [26] Tenuta M, Lazarovits G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*[J]. Phytopathology, 2002, 92(3): 255–264
- [27] Howell CR, Beier RC, 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[J]. Phytopathology, 1988, 78: 1075–1078
- [28] Ilhan K, Arslan U, Karabulut OA. The effect of sodium bicarbonate alone or in combination with a reduced dose of tebuconazole on the control of apple scab[J]. Crop Protection, 2006, 25(9): 963–967
- [29] Van-Toor RF, Jaspers MV, Stewart A. Bicarbonate salts and calcium cyanamide suppress apothecial production by *Ciborinia camelliae*[J]. New Zealand Plant Protection, 2004, 57: 142–145
- [30] Karabulut OA, Arslan U, Ilhan K, Yagdi K. The effect of sodium bicarbonate alone or in combination with a reduced rate of mancozeb on the control of leaf rust [*Puccinia triticina*] in wheat[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2006, 28(3): 484–488
- [31] Fallik E, Ziv O, Grinberg S, Alkalai S, Klein JD. Bicarbonate solutions control powdery mildew (*Leveillula taurica*) on sweet red pepper and reduce the development of postharvest fruit rotting[J]. Phytoparasitica, 1997, 25: 41–43
- [32] Olivier C, MacNeil CR, Loria R. Application of organic and inorganic salts to field-grown potato tubers can suppress silver scurf during potato storage[J]. Plant Disease, 1999, 83(9): 814–818
- [33] 王丽丽, 石俊雄, 袁赛飞, 吴凯, 蔡刘体, 刘艳霞, 杨兴明, 冯勇刚, 沈标, 沈其荣. 微生物有机肥结合土壤改良剂防治烟草青枯病[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 150–156
- [34] 王方艳, 王秋霞, 颜冬冬, 毛连纲, 郭美霞, 燕平梅, 曹坳程. 二甲基二硫熏蒸对保护地连作土壤微生物群落的影响[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(4): 890–896
- [35] 谢红薇, 颜冬冬, 毛连纲, 吴篆芳, 郭美霞, 王秋霞, 李园, 曹坳程. 熏蒸剂对土传病原菌的防效和对土壤微生物群落的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 223–229
- [36] Klose S, Acosta-Martínez V, Ajwa HA. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(6): 1 243–1 254
- [37] 辜运富, 张小平, 涂仕华. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术在土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 土壤, 2008, 40(3): 344–350
- [38] Yao SR, Merwin IA, Abawi GS, Thies JE. Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(3): 587–599
- [39] 马旭. 熏蒸剂对土壤微生物群落多样性的影响及其方法学研究[D]. 成都: 成都理工大学材料与生物工程学院, 2010
- [40] Sun L, Song S, Fu L, Deng XH, Wang DS, Liang XL, Li R, Shen QR. Exploring a soil fumigation strategy based on ammonium bicarbonate to control *Fusarium* wilts of cucurbits [J]. Crop Protection, 2015, 70: 53–60



## Screening Eco-fumigants for Banana Orchards with Serious *Fusarium wilt* Disease and Their Influences on Soil Microflora

ZHONG Shu-tang<sup>1</sup>, LV Na-na<sup>1</sup>, SUN Yi-fei<sup>1</sup>, SHEN Zong-zhuan<sup>1</sup>,  
LI Rong<sup>1\*</sup>, ZHANG Juan<sup>2</sup>, SHEN Qi-rong<sup>1</sup>

(1 National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Jiangsu Key Laboratory of Solid Organic Waste Utilization, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Shandong Product Quality Inspection Research Institute, Jinan 250100, China)

**Abstract:** In order to screen ecological fumigants for ensuring banana sustainable cultivation in monoculture banana planting orchard, the effects of fumigation with different chemical compounds on the numbers of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (FOC) in water and banana orchard soil and on soil microflora were studied using the traditional plate-counting method combined with polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in this study. Fumigants included lime, ammonium bicarbonate, the mixture of lime and ammonium bicarbonate, chlorine dioxide, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and ammonia water. Results showed that all kinds of fumigants above can kill the spores of FOC in the water, while in soil, ammonia water and the mixture of lime and ammonium bicarbonate showed more effective antifungal effect than other fumigants. Thus, these two kinds of fumigants were selected for further study. Experiments of different dosages of ammonia water and the mixture of lime and ammonium bicarbonate in pot soil showed that the higher dosage of fumigants added, the better antifungal effect. Both the two kinds of fumigants decreased the culturable bacteria and fungi amounts, and the decline for bacteria was significantly lower than the fungi. As shown in DGGE, fungal bands were more influenced compared to the bacteria regardless of fumigation with ammonia water or the mixture of lime and ammonium bicarbonate, indicating the rapid decrease of abundance for fungi. While for bacteria, some bands appeared and some bands disappeared. Furthermore, compared with the control, the indexes of richness, evenness, stability and diversity of total bacteria amended with different dosages of fumigants were all decreased and the indexes were highest in sample treated with 2.67 ml/kg of ammonia water or 3.33 g/kg of lime mixed with 1.67 g/kg of ammonium bicarbonate among the two group treatments. In conclusion, all the results show all the chemical compounds could be used as fungicide in the water and confirm that not only ammonia water with the best additive amount of 2.67 ml/kg but also the mixture of lime and ammonia bicarbonate (3.33 g/kg and 1.67 g/kg, respectively) can be used as fumigants in soil.

**Key words:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; Fumigants; Microflora; Banana