

强还原土壤对尖孢镰刀菌的抑制及微生物区系的影响^①

刘亮亮¹, 黄新琦^{1,2,3}, 朱 睿¹, 张金波^{1,2,3}, 蔡祖聪^{1,2,3*}

(1 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023; 2 江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京 210023;

3 江苏省地理信息资源开发与利用协同创新中心, 南京 210023)

摘 要: 强还原土壤灭菌(reductive soil disinfestation, RSD)是一种抑制土传病原菌的高效和环保的方法。本试验通过荧光定量 PCR 和变性梯度凝胶电泳研究 RSD 对土壤尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)及微生物区系的影响。结果表明: 处理 15 天后, 较对照(CK)相比, 除添加氨水处理(NH₃)土壤 pH 上升外, 以苜蓿粉和乙醇为有机碳源的 RSD(AI-RSD 和 Et-RSD)处理土壤 pH 分别降低了 0.54 和 1.16; NH₃、AI-RSD 和 Et-RSD 处理将尖孢镰刀菌数量分别降低了 74%、98% 和 93%; AI-RSD 显著增加了细菌的数量和多样性, AI-RSD 和 Et-RSD 处理显著降低了土壤中真菌的数量, 但增加了真菌的多样性。结果表明 RSD 与氨气熏蒸相比对于土壤微生物区系的改善具有更好的作用。

关键词: 强还原土壤灭菌; 土传病害; 尖孢镰刀菌; 微生物区系

中图分类号: S154.3

香蕉是一种历史悠久的水果, 在世界上一度认为是继水稻、小麦和玉米之后需求最大的农作物^[1], 然而一场对香蕉具有毁灭性的土传病害给香蕉产业带来了极大的打击。香蕉枯萎病, 又称巴拿马病, 是一种由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, FOC)引起的、世界广泛分布的土传真菌病害^[2]。FOC 主要通过根部感染植株并寄生于根茎中, 引起植株维管束坏死, 导致香蕉树枯萎^[3]。该菌腐生能力强, 即使没有寄主, 也能产生厚垣孢子在土壤中中长期存活^[4–5]。它的传播途径分为自然因素和人为因素, 主要包括苗木、土壤、流水、耕作工具以及人等途径传播, 其感染力强、致病力强、死亡率大, 防治非常困难^[6]。

目前, 彻底防治香蕉枯萎病的方法仍未找到, 而现阶段采用较多的是物理防治、化学防治、培育抗病品种以及生物防治。物理防治如土壤暴晒法, 虽然有一定的效果, 但操作复杂, 气候条件限制性大; 某些化学杀菌剂, 如溴甲烷, 具有很强的杀菌效果, 但对食品 and 人类健康具有很大的安全隐患^[7]; 抗病品种在现阶段倍受青睐, 但在土传病害防治上仍未发挥应有的作用^[8], 且存在病原菌不断积累的风险; 由于具有

环保、有效等优点, 近年来生物防治土传病害的相关研究越来越多, 在国内外已有诸多学者采用生防菌抑制病原菌, 如哈茨木霉、枯草芽孢杆菌等^[9–10], 但外源添加的生防菌, 它既要克服土著微生物的排斥, 也要适应土壤以及周围的环境, 见效慢和效果不稳定^[11]。

2000 年, 日本 Shinmura^[12]和荷兰 Blok 等^[13]人相继采用强还原法(reductive soil disinfestation, RSD)杀灭土壤病原微生物, 此方法是由向土壤中添加易分解有机碳源并维持土壤厌氧状态组成, 可在 2~4 周内杀灭大量土传病原菌, 目前作为化学熏蒸剂替代品广泛用于农业生产中。国内黄新琦等^[14–15]采用淹水方式实施 RSD, 虽然杀菌效果很明显, 但是对于持水力较差的土壤采用淹水方式操作较为困难, 因此, 本试验采用添加有机物料后灌溉土壤至最大田间持水量并覆膜的方式实施 RSD。此外, 尽管 RSD 在日本和美国已取得一系列推广应用, 但已有的研究表明, RSD 对土壤微生物区系影响的相关研究较少^[16], 因此, 本试验研究了不同有机物料的 RSD 及氨气熏蒸对于连作土壤中 FOC、细菌和真菌数量及土壤微生物区系的影响。

基金项目: 国家自然科学基金项目(41301335)、中国博士后科学基金项目(2014M551622)和江苏高校优势学科建设工程项目资助。

* 通讯作者(zccai@njnu.edu.cn)

作者简介: 刘亮亮(1990—), 男, 江西永新人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物及土传病害生物防控等方面研究。E-mail: 15996230060@163.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤：试验地位于海南省乐东县(109.17°E、18.75°N)香蕉种植园内，由于较高的香蕉枯萎发病率，此地块已被撂荒一年。该土壤 pH 6.5，电导率 40.8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，有机碳和全氮含量分别为 9.46 g/kg 与 0.43 g/kg。供试有机物料：苜蓿粉和乙醇。供试氨水浓度为 25%。

1.2 试验处理

试验分为 4 个处理：原位土壤(CK)、土壤中添加 500 ml/m^2 氨水后灌溉至最大田间持水量并覆膜(NH_3)、土壤中添加 2 kg/m^2 苜蓿粉后灌溉至最大田间持水量并覆膜(AI-RSD)、土壤中添加 1 L/m^2 乙醇后灌溉至最大田间持水量并覆膜(Et-RSD)，每个处理 3 个重复，每个重复面积为 1 $\text{m} \times 1 \text{ m}$ 。处理期间温度 25 ~ 35℃，处理周期为 15 天，处理完成后揭膜，分别采取各处理 0 ~ 20 cm 和 20 ~ 40 cm 土层的土壤。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤 pH 的测定 将土壤与去离子水以 1 : 2.5 的比例混匀，然后以 200 r/min 在摇床中振荡 30 min 后用 pH 计(Mettler S220K, Switzerland)测定土壤 pH。

1.3.2 土壤 DNA 的提取 土壤 DNA 提取使用试剂盒 Power Soil™ DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories Inc., USA)。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 对真菌、细菌和 FOC 的定量 本试验通过实时荧光定量 PCR 和相应的特异性引物对真菌、细菌和 FOC 进行定量。定量 PCR 扩增采用 8 联管在 CFX96™ Real-Time System(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)上进行。每个 PCR 管的反应体系总量为 20 μl ^[17] 2 μl DNA 模板，10 μl SYBR Green premix EX Taq(2 $\times$)，正反引物各 1 μl (真菌特异性引物：ITS1-f 和 5.8 s；细菌特异性引物：Eub338 和 Eub518；FOC 特异性引物：ITS1-F 和 AFP308，表 1)，6 μl 无菌水。真菌和细菌的反应条件：95℃ $\times$ 2 min 预变性，95℃ $\times$ 10 s 高温解链，53℃ $\times$ 20 s 低温退火，72℃ $\times$ 30 s 延伸，40 个循环；FOC 反应条件：95℃ $\times$ 2 min 预变性，95℃ $\times$ 10 s 高温解链，58℃ $\times$ 15 s 低温退火，72℃ $\times$ 20 s 延伸，40 个循环；在每个循环的延伸阶段采集荧光信号，并在反应结束后绘制熔解曲线。标准品的构建参照文献[18]，得出的真菌、细菌及 FOC 标准曲线分别为： $y = -3.003 0x + 47.779$ ， $R^2 = 0.999$ ； $y = -3.368 0x + 49.903$ ， $R^2 = 0.996 1$ ； $y = -3.358 6x + 51.282$ ， $R^2 = 0.995 3$ 。

1.3.4 变性梯度凝胶电泳检测土壤微生物多样性 对土壤 DNA 进行 PCR 扩增所使用的细菌引物为 GC-

U968(GC 夹子 40 bp)和 L1401 真菌引物为 GC-Fungi 和 NS1(表 1)。PCR 反应体系总量为 25 μl ：1 μl DNA 模板，正反引物各 1 μl ，12.5 μl Mix Taq(2 $\times$)，9.5 μl 无菌水。细菌 PCR 反应条件为 94℃ $\times$ 5 min 预变性，94℃ $\times$ 10 s 高温解链，52℃ $\times$ 20 s 低温退火，72℃ $\times$ 30 s 延伸，32 个循环，72℃ $\times$ 10 min 再延伸；真菌 PCR 反应条件：95℃ $\times$ 5 min 预变性，94℃ $\times$ 20 s 高温解链，55℃ $\times$ 20 s 低温退火，72℃ $\times$ 30 s 延伸，32 个循环，72℃ $\times$ 7 min 再延伸。PCR 扩增后的产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 实时荧光定量 PCR 与 PCR-DGGE 引物列表

Table 1 The primers used in quantitative real-time PCR and PCR-DGGE

引物	序列(5'-3')	参考文献
ITS1-f(F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[19]
5.8s(R)	CGCTGCGTTCTTCATCG	[20]
338(F)	CCTACGGGAGGCAGCAG	[21]
518(R)	ATTACCGCGGCTGCTGG	[22]
ITS1-F(F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[19]
AFR308(R)	CGAATTAACGCGAGTCCCAAC	[23]
GC-U968(F)	GC-AACGCGAAGAACCTTAC	[24]
L1401(R)	GCGTGTGTACAAGACCC	[20]
GC(Bacteria)	CGCCCGGGGCGCGCCCGGG CGGGGCGGGGACGCGGGG	
GC-Fungi(F)	GC-ATTCCTCGTTACCCGTTG	[25]
NS1(R)	GTAATCATATGCTTGTCTC	[25]
GC(Fungi)	CGCCCGCCGCGCCCGCGCC CGGCGCGCGCCCGCGCC	

采用 D-Code System(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)，在 6%(w/v)的聚丙烯酰胺凝胶(40% acrylamide/bis-acrylamide，37.5 : 1，Bio-Rad)中加入等量浓度 PCR 产物，然后以 60℃、80 V 进行电泳，持续 16 h。细菌和真菌的变性梯度分别为 45% ~ 60% 和 25% ~ 40%，通过成像仪和 Quantity One 4.6.3 对电泳效果进行检测及分析。

1.4 数据处理与分析

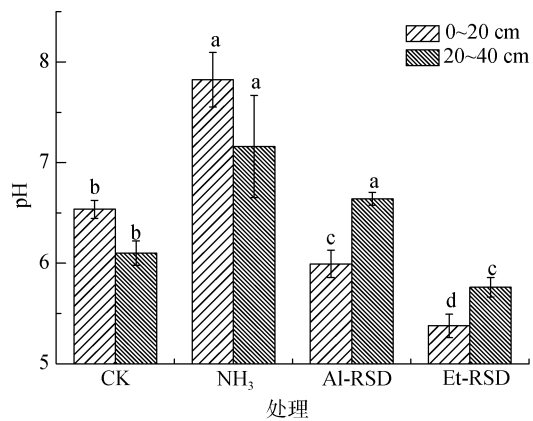
采用 Excel 2003、Origin 8.0 和 SPSS 19.0(SPSS Inc., Chicago, USA)统计分析软件对土壤 pH、微生物数量(细菌、真菌和 FOC)及微生物多样性数据进行处理与分析，并结合 LSD 多重比较法检验各处理间的差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 土壤 pH 的变化

处理 15 天揭膜后，0 ~ 20 和 20 ~ 40 cm 土层： NH_3 处理的 pH 较 CK 分别显著增加了 1.29 和 1.06；而 Et-RSD 处理的 pH 较 CK 分别显著降低了 1.3 和

0.34。Al-RSD 处理 0~20 cm pH 较 CK 降低了 0.54，但 20~40 cm 土层显著增加了 0.53(图 1)。



(图中小写字母不同表示同一土层不同处理间差异达到 $P<0.05$ 显著水平，下同)

图 1 处理结束后原位土壤(CK)、添加氨水(NH₃)、苜蓿 RSD 处理(Al-RSD)和乙醇 RSD 处理(Et-RSD)的土壤 pH
Fig. 1 Soil pH in untreated soil (CK), treated with NH₃, RSD with alfalfa (Al-RSD), and RSD with ethanol (Et-RSD) at the end of treatments

2.2 土壤真菌和细菌数量变化

处理结束后，0~20 cm 土层，NH₃ 处理的真菌数量较 CK 无显著差异，Al-RSD 和 Et-RSD 处理的真菌数量(1.26×10^8 、 7.05×10^7 copies/g)较 CK (4.29×10^8 copies/g)分别显著降低了 71% 和 84%(图 2)；20~40 cm 土层，除 Al-RSD 处理的真菌数量(3.16×10^8 copies/g)较 CK (1.59×10^8 copies/g)显著增加了 97%之外，NH₃ 和 Et-RSD 处理较 CK 都无显著变化。Al-RSD 处理 0~20 cm、20~40 cm 的细菌数量(4.21×10^{10} 、 2.48×10^{10} copies/g)较 CK (1.90×10^{10} 、 1.11×10^{10} copies/g)分别显著增加了 121.42% 和 123.42%，NH₃ 和 Et-RSD 处理的土壤细菌数量与 CK 比较差异均不显著(图 2)。

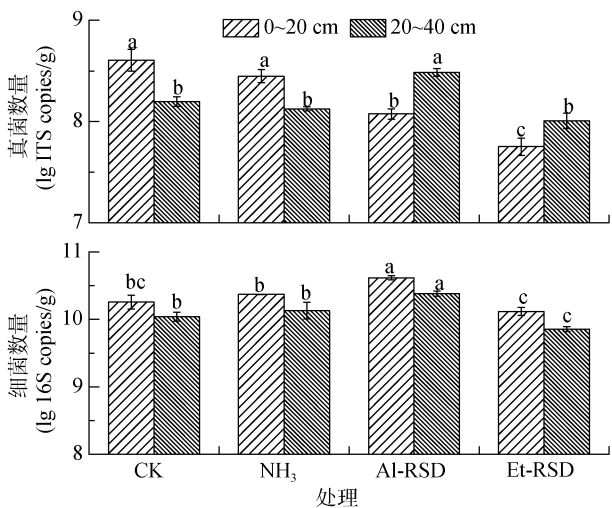


图 2 处理结束后土壤真菌和细菌数量
Fig. 2 Populations of bacteria in soils at end of treatments

2.3 尖孢镰刀菌(FOC)数量及其占真菌比重

处理结束后，0~20 cm 土层，NH₃、Al-RSD 和 Et-RSD 处理的 FOC 数量(3.32×10^6 、 2.63×10^5 、 8.63×10^5 copies/g)较 CK (1.28×10^7 copies/g)分别显著降低了 74%、98% 和 93%。NH₃ 处理 20~40 cm 土层 FOC 数量与 CK 相比差异不显著，但 Al-RSD 和 Et-RSD 处理较 CK 分别显著降低了 71% 和 61%(图 3)。

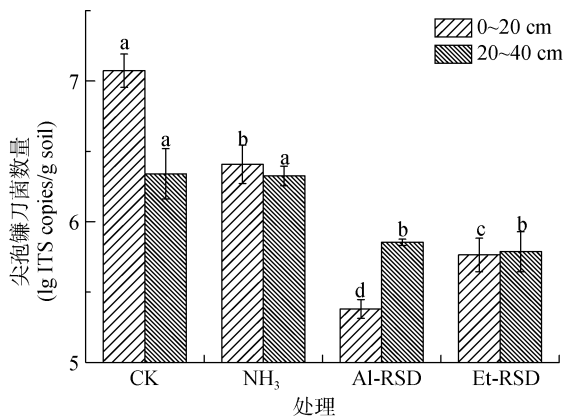


图 3 处理结束后土壤 FOC 数量
Fig. 3 Populations of FOC in soils at end of treatments

根据 FOC 与真菌的数量可知 FOC 在 4 个处理土壤中占真菌的比重。0~20 cm 土层，CK 处理 FOC 占真菌的比重最高，NH₃、Al-RSD 和 Et-RSD 处理 FOC 占真菌的比重较 CK 分别显著下降了 66%、92% 和 64%。20~40 cm 土层，NH₃ 处理 FOC 占真菌比重与 CK 相比差异不显著，Al-RSD 与 Et-RSD 处理分别显著下降了 83% 和 55%(表 2)。

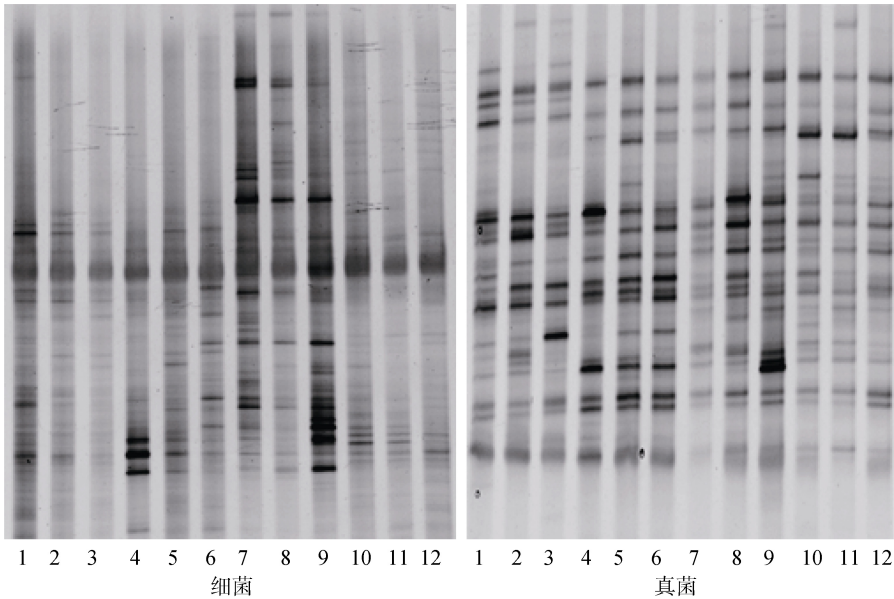
表 2 尖孢镰刀菌占真菌比重(%)
Table 2 Proportions of FOC in Fungi

处理	0~20 cm	20~40 cm
CK	2.98 ± 0.3 a	1.63 ± 0.5 a
NH ₃	1.02 ± 0.2 b	1.64 ± 0.1 a
Al-RSD	0.24 ± 0.04 c	0.24 ± 0.02 c
Et-RSD	1.07 ± 0.08 b	0.73 ± 0.1 b

注：表中同列数据小写字母不同表示处理间差异达到 $P<0.05$ 显著水平，下表同。

2.4 土壤微生物多样性的变化

采用 Quantity one 软件对 DGGE 图谱(图 4)进行分析后，选用 Shannon-Weaver 指数(H')、丰度(S)并结合聚类分析构建系统发育树分析各处理土壤微生物多样性^[26]。从图 4 可以看出 Al-RSD 处理土壤细菌条带数量和组成较 CK 处理相比发生了明显变化。从表 3 可知细菌的 H' 和 S 的大小排列依次为 Al-RSD、Et-RSD、NH₃ 和 CK，并且 Al-RSD 的 H' 和 S 与另 3



(图中数字分别表示为 CK : 1、2、3 ; NH₃ : 4、5、6 ; Al-RSD : 7、8、9 ; Et-RSD : 10、11、12 ; 下同)

图 4 处理结束后细菌和真菌 DGGE 图谱
Fig. 4 DGGE profiles of bacteria and fungi at end of treatments

表 3 各样品微生物多样性分析结果
Table 3 Microbial diversities of four treatments

处理	细菌		真菌	
	香浓指数 H'	丰度 S	香浓指数 H'	丰度 S
CK	2.01 ± 0.11 b	7.66 ± 0.88 b	2.64 ± 0.06 b	14.66 ± 0.88 b
NH ₃	2.05 ± 0.07 b	8.00 ± 0.57 b	2.72 ± 0.02 ab	15.66 ± 0.33 b
Al-RSD	2.96 ± 0.08 a	20.00 ± 1.73 a	2.87 ± 0.09 a	18.33 ± 1.85 a
Et-RSD	2.10 ± 0.03 b	8.33 ± 0.33 b	2.89 ± 0.01 a	18.66 ± 0.33 a

个处理差异相比均显著增加,表明 Al-RSD 处理细菌物种多样性最丰富;真菌的 H' 和 S 的大小排列依次为 Et-RSD、Al-RSD、NH₃ 和 CK,并且 Al-RSD 和 Et-RSD 的 H' 与 S 与 CK 相比均显著增加,表明 Al-RSD 和 Et-RSD 处理真菌的物种多样性最为丰富。从图 5 可知,NH₃ 和 Et-RSD 处理中的细菌群落具有较高的相似度;CK 与 NH₃、Al-RSD 与 Et-RSD 间的真菌群落也具有较高相似度。

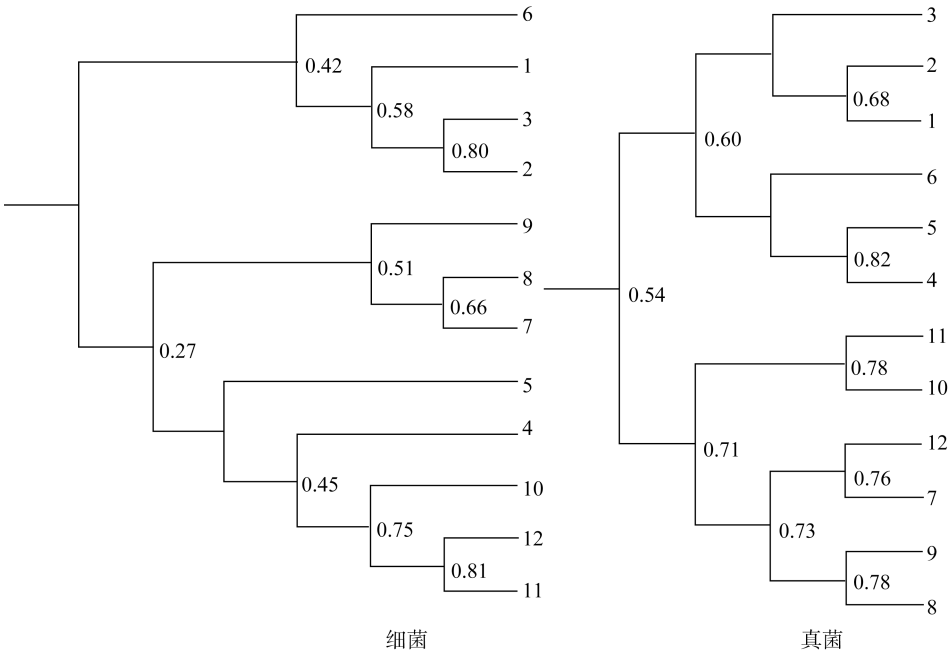


图 5 聚类分析系统发育树
Fig. 5 Clustering analysis of phylogenetic tree

3 讨论

Stover^[4]通过土壤淹水方式杀灭引起香蕉枯萎病的 FOC,但是耗时近 4 个月,且杀菌效果不好。黄新琦等^[14]研究结果也表明单独淹水在短时间内并不能很好地抑制病原菌,但是淹水同时添加有机物料使土壤呈现强烈还原状态显著地降低了土壤中 FOC 数量,本试验结果与此相似。然而,对于持水力较差的土壤采用淹水方式操作较为困难,且费时费水,所以本试验采用添加有机物料后灌溉土壤至最大田间持水量并覆膜的方式实施 RSD,结果表明此方法也能取得较好的杀菌效果。

已有的研究报道表明^[13, 27],RSD 的杀菌机理可能有:厌氧状态、抑菌物质(有毒有机酸和还原性产物)以及土壤微生物群落结构的改变。本试验中 AI-RSD 和 Et-RSD 处理 0~20 cm 的 pH 降低是由于在厌氧条件下,微生物分解有机物料产生有机酸所致,然而这些有机酸在土壤转为好氧状态后便会很快挥发或分解,并不会导致土壤酸化^[17]。研究表明,RSD 过程中产生的某些有机酸,如乙酸和丁酸对 FOC 具有很强的抑制作用^[17, 28],AI-RSD 和 Et-RSD 处理土壤中 FOC 数量急剧下降可能是 RSD 过程中产生的有毒有机酸所造成的。相关研究表明氨气对于土传病原菌具有较好的抑制效果^[29],本试验中 NH₃ 处理 0~20 cm FOC 显著下降可能是因为氨水熏蒸具有直接的杀菌作用。

土壤微生物区系对植物生长至关重要,它是衡量土壤微生物多样性和肥力的一个重要指标^[30]。而土壤微生物多样性也是土壤生态系统稳定性及土壤生产力一个重要组成部分^[31]。有研究表明植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)在防治土传病害和促进植物生长方面也具有重要的作用^[32]。本试验中 AI-RSD 处理的细菌数量较 CK 显著增加,而 Et-RSD 处理较 CK 相比无显著差异,可能是因为苜蓿粉中有机碳源比较丰富,从而促使能利用这些碳源的细菌增加;而 Et-RSD 处理中碳源单一,能利用乙醇的细菌较少。此外,尤为重要是 AI-RSD 处理显著地增加了土壤细菌多样性,改善了土壤微生物区系。Mowlick 等^[33]人研究指出在 RSD 过程中会产生许多厌氧细菌,其中以厚壁菌门梭菌属 *Clostridia* 和芽孢杆菌属 *Bacilli* 为主,其产生的孢子可以快速生长并繁殖为优势种,从而抑制病原菌的生存,本研究中 RSD 处理后所增加的新菌种可能与之相似。然而,Mowlick 等^[16]指出 RSD 处理后细菌多

样性与处理前相比显著降低,与本试验结果相反,原因可能是 DGGE 与克隆文库检测的灵敏度不一,或不同有机碳源的 RSD 对不同土壤微生物区系的影响不尽相同。就真菌而言,RSD 处理均显著减少了真菌数量,但显著增加了土壤真菌多样性,这对后续植物的健康生长至关重要。虽然利用氨水熏蒸对土壤病原微生物有一定的抑制效果,但其对土壤微生物区系的改善并无明显作用,同时还存在着许多问题,如处理后不能及时种植,否则会出现严重的烧苗现象^[29]。相比而言 RSD 处理不仅减少了土壤中病原菌的数量,而且显著增加了土壤微生物多样性,改善了土壤微生物区系。

虽然 Blok 等^[13]提到采用固体有机物料的 RSD 操作耗费劳动力的缺点,Momma 等^[34]人研究表明其杀菌效果不如乙醇,但是本研究采用固体有机物料的 RSD 对土壤微生物区系的改良效果要优于乙醇处理,此外还可以解决秸秆处理一直存在的困境从而变废为宝^[35]。因此,乙醇和作物秸秆相结合的 RSD 对于退化土壤的改良效果可能会更佳,这有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Akila R, Rajendran L, Harish S, et al. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana[J]. Biological Control, 2011, 57(3): 175-183
- [2] Thangavelu R, Palaniswami A, Velazhahan R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana[J]. Agriculture, ecosystems and environment, 2004, 103(1): 259-263
- [3] Viljoen A. The status of Fusarium wilt (Panama disease) of banana in South Africa: Review article[J]. South African Journal of Science, 2002, 98(8): 341-344
- [4] Stover R H. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other Musa species[M]. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1962
- [5] 彭双, 王一明, 叶旭红, 等. 土壤环境因素对致病性尖孢镰刀菌生长的影响[J]. 土壤, 2014, 46(5): 845-850
- [6] 肖彤斌, 谢圣华, 芮凯, 等. 香蕉枯萎病的发生及防控对策[J]. 热带农业科学, 2007, 26(6): 53-54
- [7] Gamliel A, Austerweil M, Kritzman G. Non-chemical approach to soilborne pest management—organic amendments[J]. Crop Protection, 2000, 19(8): 847-853
- [8] 李世东, 缪作清, 高卫东. 我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 433-440

- [9] 王洪梅, 吴云成, 沈标. 青枯病生防菌 N5 的特性及其生物学效应[J]. 土壤, 2013, 45(6): 1 082–1 090
- [10] 罗佳, 陈立华, 赵爽, 等. 棉花黄萎病生防菌脂肽类抑菌物质分离和鉴定[J]. 土壤学报, 2012, 49(3): 612–619
- [11] 殷晓敏, 陈弟, 郑服丛. 尖镰孢枯萎病生物防治研究进展[J]. 广西农业科学, 2008, 39(2): 172–178
- [12] Shinmura A. Causal agent and control of root rot of welsh onion[C]. PSJ Soilborne Disease Workshop Report, 2000, 20: 133–143
- [13] Blok W J, Lamers J G, Termorshuizen A J, et al. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping[J]. Phytopathology, 2000, 90(3): 253–259
- [14] 黄新琦, 温腾, 孟磊, 等. 土壤快速强烈还原对于尖孢镰刀菌的抑制作用[J]. 生态学报, 2014, 34(16): 4 526–4 534
- [15] 黄新琦, 温腾, 孟磊, 等. 土壤厌氧还原消毒对尖孢镰刀菌的抑制研究[J]. 土壤, 2014, 46(5): 851–855
- [16] Mowlick S, Inoue T, Takehara T, et al. Changes and recovery of soil bacterial communities influenced by biological soil disinfestation as compared with chloropicrin-treatment[J]. AMB Express, 2013, 3(1): 1–12
- [17] Huang X Q, Wen T, Zhang J B, et al. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. BioControl, 2014: 1–12
- [18] Lopez-Mondejar R, Anton A, Raidl S, et al. Quantification of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* with real-time TaqMan PCR and its potential extrapolation to the hyphal biomass[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(8): 2 888–2 891
- [19] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for *basidiomycetes*—application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2): 113–118
- [20] Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4 238–4 246
- [21] Dorsch M, Lane D, Stackebrandt E. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(1): 58–63
- [22] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. 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
- [23] Lievens B, Brouwer M, Vanachter A C R C, et al. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(11): 1 698–1 710
- [24] Zoetendal E G, Akkermans A D L, De Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3 854–3 859
- [25] Hoshino Y T, Morimoto S. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2008, 54(5): 701–710
- [26] 吴凤芝, 王学征. 设施黄瓜连作和轮作中土壤微生物群落多样性的变化及其与产量品质的关系[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2 274–2 280
- [27] Momma N, Kobara Y, Uematsu S, et al. Development of biological soil disinfestations in Japan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 3 801–3 809
- [28] Momma N, Yamamoto K, Simandi P, et al. Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD)[J]. Journal of General Plant Pathology, 2006, 72(4): 247–252
- [29] 刘庆城, 许玉兰. 液氮施肥防治作物土传病害的研究[J]. 中国农业科学, 1986(1): 29–32
- [30] 薛超, 黄启为, 凌宁, 等. 连作土壤微生物区系分析, 调控及高通量研究方法[J]. 土壤学报, 2011, 48(3): 612–618
- [31] 杨芳, 徐秋芳. 土壤微生物多样性研究进展[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(6): 39–41
- [32] 胡江春, 薛德林, 马成新, 等. 植物根际促生菌 (PGPR) 的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1 963–1 966
- [33] Mowlick S, Hiorta K, Takehara T, et al. Development of anaerobic bacterial community consisted of diverse *clostridial* species during biological soil disinfestation amended with plant biomass[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2012, 58(3): 273–287
- [34] Momma N, Momma M, Kobara Y. Biological soil disinfestation using ethanol: Effect on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and soil microorganisms[J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(5): 336–344
- [35] 鞠昌华. 我国农作物秸秆处理的困境与对策[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(6): 221–224

Influences of Reductive Soil Disinfestation on *Fusarium oxysporum* and Soil Microbiome

LIU Liangliang¹, HUANG Xinqi^{1,2,3}, ZHU Rui¹, ZHANG Jinbo^{1,2,3}, CAI Zucong^{1,2,3*}

(1 School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, Nanjing 210023, China; 3 Jiangsu Center for Collaborative Innovation in Geographical Information Resource Development and Application, Nanjing 210023, China)

Abstract: Reductive soil disinfestation (RSD) is an effective and environmentally-friendly method to suppress soil-borne pathogens. Real-time PCR and denaturing gradient gel electrophoresis were performed to investigate the influences of RSD on *Fusarium oxysporum* and soil microflora. Results showed that in 15 days after treatment, except for the NH₃ treatment, soil pH in AI-RSD and Et-RSD treatments decreased by 0.54 and 1.16 compared with that in the control treatment. NH₃, AI-RSD and Et-RSD significantly reduced the numbers of *Fusarium oxysporum* in soil by 76%, 98% and 94%, respectively. AI-RSD significantly increased the populations and diversities of bacteria. AI-RSD and Et-RSD significantly decreased the populations of fungi in the upper soil, but increased the fungal diversities. These results indicated that RSD has a better effect on the improvement of soil microflora compared with ammonia fumigation.

Key words: Reductive soil disinfestation; Soil-borne disease; *Fusarium oxysporum*; soil microflora