

西北黄土高原地区苹果连作障碍与土壤真菌群落结构的相关性分析

王晓宝, 王功帅, 刘宇松, 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: 采用构建真菌克隆文库和 T-RFLP 相结合的方法, 研究了甘肃、陕西和山西省 20 个地区再植苹果园土壤中的真菌群落结构特征, 同时还研究了平邑甜茶幼苗的生长与再植苹果园土壤中优势真菌属的相关性。结果表明, 在真菌分类门的水平上, 子囊菌门真菌是西北黄土高原地区苹果连作土壤中主要的真菌类型; 在属的水平上, 镰孢菌属、被孢霉属、毛壳菌属、隐球酵母菌属等是主要优势菌群。从果园地区分布来看, 甘肃省的 5 个地区土壤真菌具有相对较高的多样性指数、均匀度指数、丰富度指数和相对较低的优势度指数。陕西富平, 山西平陆, 山西盐湖区的苹果连作障碍较严重, 镰孢菌的丰度较高。从平邑甜茶幼苗生长受抑制量与土壤中优势真菌属的相关性来看, 镰孢菌的丰度与苹果连作障碍的严重程度呈极显著性正相关 ($r=0.585$, $P<0.01$), 而被孢霉属的丰度与其呈显著性负相关 ($r=-0.473$, $P<0.05$)。引起西北黄土高原地区苹果连作障碍的主要有害真菌类型是镰孢菌属。

关键词: 苹果; 连作障碍; 真菌克隆文库; T-RFLP; 镰孢菌; 真菌群落结构

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 05-0855-10

Correlation Analysis of Apple Replant Disease and Soil Fungal Community Structure in the Northwest Loess Plateau Area

WANG Xiaobao, WANG Gongshuai, LIU Yusong, CHEN Xuesen, SHEN Xiang, YIN Chengmiao*, and MAO Zhiquan*

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

Abstract: The aim of this study was to investigate the main reasons of apple replant disease (ARD) around Northwest Loess Plateau area. The characteristics of fungi in the soil of different replanted apple orchards were studied by combining the construction of fungi clone library and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). The correlation between the seedling growth of *Malus hupehensis* Rehd. and the dominant fungal species in the apple replanted soil was also studied. The results showed that *Ascomycetes* were the main fungi in the replanted apple orchards in Northwest Loess Plateau area at phyla level; *Fusarium*, *Mortierella*, *Chaetomium* and *Cryptococcus* were the dominant microflora

收稿日期: 2018-03-27; **修回日期:** 2018-05-15

基金项目: 山东省农业重大应用技术创新课题 (2014); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-28); 国家重点研发计划项目 (2016YFD0201114); 国家自然科学基金项目 (31501720; 31672104)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: mzhiquan@sdau.edu.cn; yinchengmiao@163.com)

at genus level. Among the 20 orchards, 5 belong to Gansu Province, which had a relatively high Shannon diversity index, Pielou index, Margalef index and low Simpson index. The soils from Shaanxi Fuping in Pinglu and Saline Lake area in Shanxi showed more serious ARD and higher abundance of *Fusarium*. The severity of ARD positively correlated with *Fusarium* ($r = 0.585$, $P < 0.01$), but negatively correlated with *Mortierella* ($r = -0.473$, $P < 0.05$). Overall, *Fusarium* in the apple replanted soil was the key factor for ARD around Northwest Loess Plateau area.

Keywords: apple; replant disease; fungal clone library; T-RFLP; *Fusarium*; fungal community structure

连作障碍是指同种作物或近缘作物在同一土壤上连续种植时,即使用正常的栽培管理措施也会发生产量降低、品质变劣、生育状况变差的现象(Mazzola, 1998; 陈晓红和邹志荣, 2002; 尹承苗等, 2014; Nicolaa et al., 2017)。中国西北黄土高原地区是苹果优势产区之一,连作障碍的发生具有普遍性,严重制约了果树生产的可持续发展(Narwal & Zeng, 2010)。能否有效缓解或克服连作障碍已成为苹果产业可持续发展的一项重要工作(Tewoldemedhin et al., 2011a)。苹果连作障碍原因复杂, Mazzola (1998) 将其分为非生物因素和生物因素两类。较多的研究表明生物因素是引起苹果连作障碍的主要因素(Braun, 1995; Mazzola, 1999; Rumberger et al., 2004)。近期研究结果显示,土壤有害真菌的积累是导致苹果连作障碍的主要原因(Mazzola & Manici, 2012)。

间型腐霉、立枯丝核菌、柱孢菌属和腐皮镰孢菌等约 75% 的根系定殖真菌,被美国(Mazzola, 1998)和加拿大(Braun, 1995)专家报道与再植苹果幼苗的根腐病复合症有关; Mai 等(1994)和 Traquair (1984) 的研究结果显示,在镰孢菌中,仅腐皮镰孢菌表现出低致病性,证实镰孢菌是引起苹果连作障碍的重要原因;在意大利,立枯丝核菌和腐霉菌被证明是引起苹果连作障碍的主要有害真菌,侵染植株根系从而引起根腐病(Manici et al., 2003);在南非,镰孢菌属、丝核属、疫霉属以及腐霉属被证明与苹果连作障碍相关(Schoor et al., 2009)。中国学者对环渤海湾地区重茬园取样分析得出了不同结果:徐文凤(2011)的研究结果表明镰孢菌是引起重茬园连作障碍的主要真菌; Sun 等(2017)对再植苹果园根际真菌群落的研究表明根霉属菌、棘壳孢菌、曲霉属是影响苹果连作障碍的主要真菌; Jiang 等(2017)的分析表明,苹果园连作土壤中单孢锈菌属,毛壳菌属,轮枝菌属等含量较高。邹庆甲等(2014)对河北省苹果园根际土壤中的有害真菌进行分离鉴定表明,镰孢菌是分离频率最高的真菌类群。可以发现,不同地区引起苹果连作障碍的主要致病真菌不同。

探究西北黄土高原地区连作苹果园土壤真菌群落结构,尤其是有害真菌的种类和数量,对进一步了解和防控苹果连作障碍具有重要意义。应用克隆文库技术和末端限制性片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)相结合的方法,对连作苹果园土壤真菌群落结构进行深入分析,以明确西北黄土高原地区的主要有害真菌类型和分布规律,为苹果连作障碍的防控技术研究提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验设计

供试土样采集于甘肃省 5 个地区(清水、秦州、静宁、庄浪、崆峒),陕西省 9 个地区(礼泉、乾县、彬县、旬邑、富平、白水、黄陵、洛川、富县)以及山西省 6 个地区(平陆、芮城、临猗、

万荣、盐湖区、吉县) 共 20 个连作苹果园。每个果园(更新换代果园, 2 ~ 3 年树龄) 随机选取 3 个取样点, 于再植苹果幼树周围半径 0.5 m 范围内, 5 ~ 30 cm 深度范围内取根际土约 50 kg, 充分混匀。参照《土壤农化分析》第 3 版(鲍士旦, 2000) 的方法, 对土壤氮磷钾和有机质进行测定。

将每份土样分为两个处理: 高温灭菌(121 °C 持续 30 min, 重复 2 次) 和连作对照, 用于栽植平邑甜茶 (*Malus hupehensis* Rehd.) 实生苗, 每个处理 6 个重复。

2017 年 1 月将平邑甜茶种子于 4 °C 层积 30 d 左右, 种子露白后, 于 2017 年 3 月播种于装有育苗基质的营养钵中进行育苗。待幼苗长至 6 片真叶时选取长势一致无病虫害植株, 于 4 月 26 日移栽至装有 4 kg 试验土壤的泥瓦盆中(上直径 17 cm、下直径为 15 cm、高 16 cm), 每盆定植 2 株幼苗, 统一田间管理。

2017 年 8 月 1 日取样测定平邑甜茶植株鲜样质量指标。通过两个处理间平均鲜样质量减少的比率来评估 20 个果园苹果连作障碍的严重程度。

1.2 土壤中真菌总 DNA 的提取

将取回的土样过筛编号, 于 -80 °C 保存样品。样品基因组总 DNA 的提取及纯化按照 E. Z. N. A. Soil DNA Kit 说明书进行操作, 提取后于 -20 °C 保存备用。

1.3 T-RFLP 分析

1.3.1 ITS-PCR 扩增

用于 ITS 片段扩增的引物采用带 FAM 荧光标记的真菌通用引物 ITS-F-FAM (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAGC-3'), 该引物由生工生物工程(上海) 股份有限公司合成。ITS 扩增反应体系为: 12.5 μL 2 × *Taq* MasterMix (Trans Gen Biotech Co, Ltd, Beijing, China), 1 μL 模板 DNA, ITS1-F 和 ITS4 (10 μmol · L⁻¹) 各 1.5 μL, 加 dd H₂O 至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL ITS-PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 按照 PCR 产物纯化试剂盒说明书进行 PCR 产物纯化, -20 °C 保存备用。

1.3.2 酶切

用限制性内切酶 *Hha* I (科尚生物技术有限公司, 青岛, 中国) 对上述 PCR 纯化产物进行酶切。酶切反应体系为 30 μL: 含 10 μL ITS-PCR 纯化产物、2 μL *Hha* I (10 U · μL⁻¹)、2 μL 10× Buffer, 加 ddH₂O 至 30 μL, 放入 37 °C 培养箱中 15 min。将酶切产物送至上海生工进行测序。

1.4 真菌克隆文库构建

用于真菌 ITS 片段扩增的引物为上引物 ITS1-F(5'-CTTGGTCATTTAGACGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 扩增体系包括 12.5 μL 的 2× *Easy Tap* PCR Super Mix (Trans Gen Biotech Co, Ltd, Beijing, China), 1.5 μL 的模板 DNA, ITS1-F 和 ITS 4 (10 μmol · L⁻¹) 各 1 μL 和 9 μL 的 ddH₂O。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 按照 PCR 产物纯化试剂盒 (Trans Gen Biotech Co, Ltd, Beijing, China) 说明书进行 PCR 产物纯化, 然后按照说明书将纯化后的产物克隆到 PMD18-T 载体 (Trans Gen Biotech Co, Ltd, Beijing, China) 上。质粒转化到大肠杆菌感受态细胞中 (DH5α, Trans Gen Biotech Co, Ltd, Beijing, China)。转化后转接于加过氨苄青霉素的 LB 平板培养基上培养并挑

选菌落, 检测 ITS 序列的存在是通过 PCR 扩增引物 M13F (5'-GGTGTTAGGAACGCCTTCC-3') 和 M13R (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') 实现的, 该引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5 计算方法与统计分析

对优化序列提取非重复序列, 去除没有重复的单序列, 按照 97%相似性对非重复序列进行聚类, 分成数量较少的分类单元 (OTU), 基于分类单元进行物种注释。在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 代表序列并将 $\geq 97\%$ 的代表序列通过软件平台 Uparse (vsesion 7.1 <http://drive5.com/uparse/>) 分配到相同的 OTU 中。用物种注释应用数据库 Unite Database (Release 6.0 <http://unite.ut.ee/index.php>) 进行真菌门、属的分类注释, 查询对比数据系统进行自动归类命名。

通过 T-RFLP 分析微生物群落的丰富度和多样性, 包括一系列统计学分析指数估计环境群落的物种丰度和多样性。计算菌群丰度指数 (Margalef index)、多样性指数 (Shannon index)、均匀度指数 (Pielou index) 和优势度指数 (Simpson index)。

平邑甜茶鲜质量差比率参考 Schoor (2009) 的方法加以改进, 将植株鲜质量差比率与优势真菌属 (丰度 $> 0.1\%$) 进行相关性分析。

试验数据为 3 次生物性重复试验的均值和标准误差 (SE)。统计计算采用 SPSS 软件 (version 19.0, SPSS Inc, Chicago, USA)。不同处理间平均差异比较采用方差分析 (ANOVA) 和邓肯氏新复极差法 (DMRT) 保持在 0.05 的概率水平下。

2 结果与分析

2.1 连作苹果园土壤样品的理化性质及苹果连作障碍的严重程度

表 1 列出了 20 个连作果园土壤 N、P、K 和有机质含量。4 种指标因管理、施肥和地域的不同而不同, 但各地区土壤有机质含量普遍较低。以灭菌土和未处理土壤中再植平邑甜茶幼苗的鲜质量差比率来计算各土壤中苹果连作障碍的严重程度, 可分为 3 种等级 (Tewoldemedhin et al., 2011b), 即严重 (富平、平陆、盐湖区, 3 个地区), 中 (清水、庄浪、崆峒、礼泉、乾县、白水和吉县, 7 个地区) 和低 (秦州、静宁、彬县、旬邑、黄陵、洛川、富县、芮城、临猗、万荣, 10 个地区)。试验结果显示, 土壤理化性质与连作障碍严重程度无相关性。

2.2 T-RFLP 法分析不同样品土壤真菌的多样性

根据 T-RFLP 图谱中 OTUs 的数量、种类及丰度, 分别计算了 20 个地区土壤样品中的真菌多样性指数 (表 2)。从 20 个地区所属省份来看, 甘肃省的 5 个地区具有相对较高的多样性指数、均匀度指数、丰富度指数和相对较低的优势度指数, 其中甘肃省 3 号地区 (静宁) 具有最高的多样性指数、均匀度指数、丰富度指数和最低的优势度指数; 陕西咸阳的 4 个地区和山西运城的 6 个地区的菌群多样性指数、均匀度指数、丰富度指数综合看来次于甘肃省的 5 个地区; 陕西省的 9 个地区多样性指数、均匀度指数、丰富度指数和优势度指数数值分布很不均匀, 其中 10 号地区 (富平) 具有最低的多样性指数、均匀度指数、丰富度指数和最高的优势度指数, 14 号地区 (富县) 具有仅次于 3 号地区 (静宁) 的多样性指数、均匀度指数、丰富度指数。

表 1 土壤性状及苹果连作障碍的严重程度
Table 1 Soil characteristics and severity degree of ARD

省份 Province	地区编号 Area number	果园 Orchard	N/ (mg · kg ⁻¹)	P/ (mg · kg ⁻¹)	K/ (mg · kg ⁻¹)	有机质/ (g · kg ⁻¹) Organic matter	鲜质量差比率/% Fresh quality difference ratio	连作障碍程度 ARD test result
甘肃 Gansu	1	清水 Qingshui	212.36	28.25	87.87	14.63	79	中 Medium
	2	秦州 Qinzhou	63.02	5.03	107.54	11.15	16	低 Low
	3	静宁 Jingning	67.13	100.01	173.11	15.14	20	低 Low
	4	庄浪 Zhuanglang	52.06	15.04	94.43	9.56	79	中 Medium
陕西 Shaanxi	5	崆峒 Kongtong	82.20	30.89	61.64	15.67	88	中 Medium
	6	礼泉 Liquan	34.94	9.69	48.52	7.90	54	中 Medium
	7	乾县 Qianxian	137.00	34.58	55.08	11.52	76	中 Medium
	8	彬县 Binxian	16.44	29.81	68.20	11.70	25	低 Low
	9	旬邑 Xunyi	89.74	30.56	114.10	12.08	8	低 Low
	10	富平 Fuping	50.01	25.34	71.48	13.59	160	严重 Serious
	11	白水 Baishui	52.75	6.31	74.75	15.67	71	中 Medium
	12	黄陵 Huangling	9.59	3.59	45.25	6.13	3	低 Low
	13	洛川 Luochuan	101.38	28.40	81.31	9.26	6	低 Low
	14	富县 Fuxian	28.77	21.81	45.25	10.69	25	低 Low
山西 Shanxi	15	平陆 Pinglu	26.03	13.67	61.64	17.92	107	严重 Serious
	16	芮城 Ruicheng	28.77	26.73	55.08	9.10	15	低 Low
	17	临猗 Linyi	6.85	41.16	97.70	10.72	47	低 Low
	18	万荣 Wanrong	24.66	62.20	74.75	10.36	11	低 Low
	19	盐湖 Yanhu	39.05	30.40	114.10	10.66	175	严重 Serious
	20	吉县 Jixian	189.07	6.37	61.64	12.08	64	中 Medium
<i>r</i>			0.107	- 0.155	- 0.09	0.402		

注: 鲜质量差比率 (%) = (熏蒸土壤的植株鲜质量 - 未熏蒸处理土壤的植株鲜质量) / 未熏蒸处理土壤的植株鲜质量 × 100。苹果连作障碍程度: 严重, 鲜质量差比率 > 100%; 中, 鲜质量差比率 99% ~ 50%; 低, 鲜质量差比率 < 50%。r: 与鲜质量差比率的相关性。

Note: Fresh quality difference ratio (%) = (fresh plant quality of fumigated soil - fresh plant quality of unfumigated soil) / fresh plant quality of unfumigated soil × 100. The degree of ARD: Serious, fresh quality difference ratio > 100%; Medium, fresh quality difference ratio 99% - 50%; Low, fresh quality difference ratio < 50%. r: Correlation with fresh quality difference ratio.

表 2 土壤真菌多样性分析
Table 2 Species diversity of soil fungi

省份 Province	地区编号 Area number	果园 Orchard	多样性指数 Shannon index	优势度指数 Simpson index	均匀度指数 Pielou index	丰富度指数 Margalef index
甘肃 Gansu	1	清水 Qingshui	2.88 ± 0.03 abc	0.06 ± 0.01 e	0.91 ± 0.01 a	5.38 ± 0.08 abc
	2	秦州 Qinzhou	2.99 ± 0.01 abc	0.05 ± 0 e	0.93 ± 0.00 a	5.70 ± 0.06 abc
	3	静宁 Jingning	3.11 ± 0.02 a	0.04 ± 0 e	0.94 ± 0.01 a	6.32 ± 0.09 a
	4	庄浪 Zhuanglang	2.89 ± 0.05 abc	0.06 ± 0.01 e	0.92 ± 0.01 a	5.09 ± 0.14 bcd
陕西 Shaanxi	5	崆峒 Kongtong	2.92 ± 0.05 abc	0.06 ± 0 e	0.91 ± 0.01 a	5.54 ± 0.22 abc
	6	礼泉 Liquan	2.25 ± 0.38 e	0.20 ± 0.08 bc	0.75 ± 0.09 d	4.05 ± 0.64 defg
	7	乾县 Qianxian	2.71 ± 0.03 abcd	0.09 ± 0 de	0.87 ± 0.01 ab	4.89 ± 0.08 cde
	8	彬县 Binxian	2.47 ± 0.03 de	0.11 ± 0 de	0.86 ± 0.01 abc	3.90 ± 0.12 efg
	9	旬邑 Xunyi	3.01 ± 0.03 abc	0.05 ± 0 e	0.93 ± 0.01 a	5.68 ± 0.24 abc
	10	富平 Fuping	0.71 ± 0.05 g	0.63 ± 0.02 a	0.51 ± 0.02 e	0.68 ± 0.14 i
	11	白水 Baishui	2.96 ± 0.12 abc	0.06 ± 0.01 e	0.91 ± 0.02 a	5.60 ± 0.44 abc
	12	黄陵 Huangling	1.86 ± 0.13 f	0.23 ± 0.04 b	0.73 ± 0.03 d	2.60 ± 0.19 h
	13	洛川 Luochuan	2.62 ± 0.14 cd	0.10 ± 0.01 de	0.86 ± 0.02 abc	4.68 ± 0.51 cde
	14	富县 Fuxian	3.05 ± 0.02 ab	0.05 ± 0 e	0.93 ± 0 a	6.06 ± 0.19 ab
山西 Shanxi	15	平陆 Pinglu	2.96 ± 0.06 abc	0.05 ± 0 e	0.92 ± 0.01 a	5.64 ± 0.35 abc
	16	芮城 Ruicheng	2.18 ± 0.08 ef	0.18 ± 0.01 bc	0.78 ± 0.01 cd	3.50 ± 0.21 fgh
	17	临猗 Linyi	2.84 ± 0.05 abcd	0.06 ± 0 e	0.92 ± 0.01 a	4.93 ± 0.18 cde
	18	万荣 Wanrong	2.66 ± 0.02 bcd	0.10 ± 0 de	0.87 ± 0.01 ab	4.64 ± 0.07 cde
	19	盐湖 Yanhu	2.63 ± 0.26 cd	0.09 ± 0.03 de	0.91 ± 0.04 a	4.20 ± 0.91 def
	20	吉县 Jixian	2.17 ± 0.07 ef	0.15 ± 0.01 cd	0.81 ± 0.01 bcd	3.09 ± 0.19 gh

注: 不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters stand for the significant difference at the 0.05 level.

2.3 克隆文库法分析真菌群落结构组成

2.3.1 真菌门水平丰度及多样本相似度分析

研究中发现,子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycotak)真菌在各样品中普遍存在且丰度较高。子囊菌门真菌占主导地位,存在于每个样品中且比例较高,1~20号地区分别为72.31%、67.90%、84.51%、57.14%、49.37%、80.43%、28.04%、82.19%、54.12%、94.44%、55.26%、30.97%、70.64%、50.62%、77.42%、80.36%、80.00%、9.09%、80.88%和76.74%,尤其是10号地区(富平)高达94.44%。担子菌门是第2大真菌门,存在于大部分样品中,18号(万荣)、2号(秦州)和5号(崆峒)地区分布较广,分别为54.55%、20.99%和26.58%。其他未知菌门丰度相对较低。另外土壤中不可培养的真菌占比较大,4号(庄浪)、7号(乾县)、11号(白水)和12号(黄陵)地区比例较高,其中7号(乾县)和12号(黄陵)地区以不可培养真菌为主,高达56.07%和66.37%。

真菌群落在 OTU 水平上的多样本相似度树状图(图 1)表明,3个省的20个地区间菌群分布的地域性不明显。除个别地区所属相同省份相似度较高外,其余地区不存在同一个省份或相邻地区间菌群分布一致的情况。

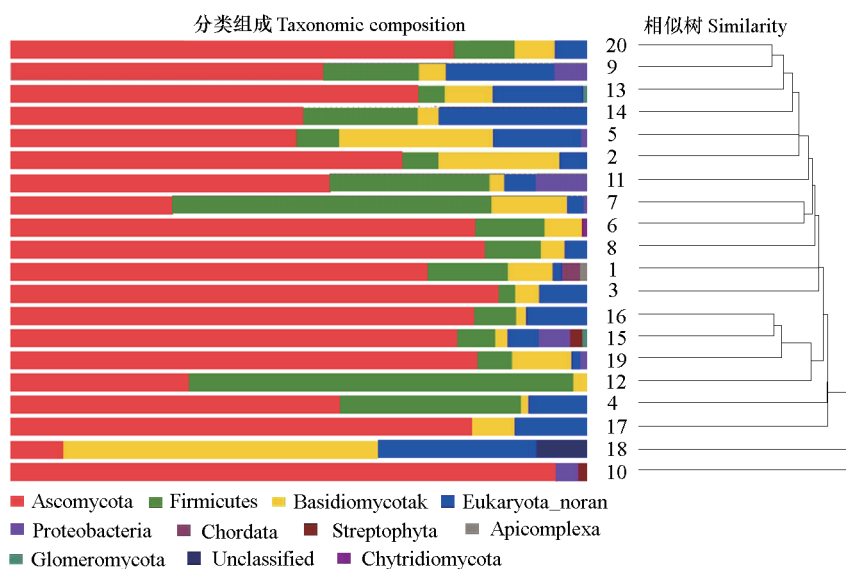


图 1 20 个地区在门的分类水平上真菌群落相对丰度柱形图及相似度分析

Fig. 1 The relative abundance column of fungal communities at the phylum in the 20 areas and similarity dendrogram

2.3.2 真菌属水平分析

在属的分类水平上,20个果园中共获得70个真菌属,不同地区获得的真菌种类和百分比存在差异。镰孢菌属、被孢霉属、毛壳菌属、隐球酵母菌属、单孢锈菌属、腐质霉属、梭孢壳属和酵母菌属是连作土壤中的优势菌属(图2)。镰孢菌几乎存在于每个地区且丰度较高,尤其是在2号(秦州)、6号(礼泉)、8号(彬县)、10号(富平)、15号(平陆)和16号(芮城)地区中相对丰度分别占到30.86%、53.26%、57.53%、90.74%、41.94%和50.00%。被孢霉属是第2大真菌属,存在于大部分地区,14号(富县)和18号(万荣)丰度较高,分别为25.93%和27.27%。毛壳菌属和隐球酵母菌属也大量存在于连作土壤中。单孢锈菌属、腐质霉属、梭孢壳属以及酵母菌属相对丰度较低。18号(万荣)地区是唯一不存在镰孢菌的地区,该地区中被孢霉属和隐球酵母菌是优势属,高达27.27%和54.55%;17号(临猗)地区中绿僵菌占到29.09%,该菌属在其他地区丰度很低或者几乎不存在。

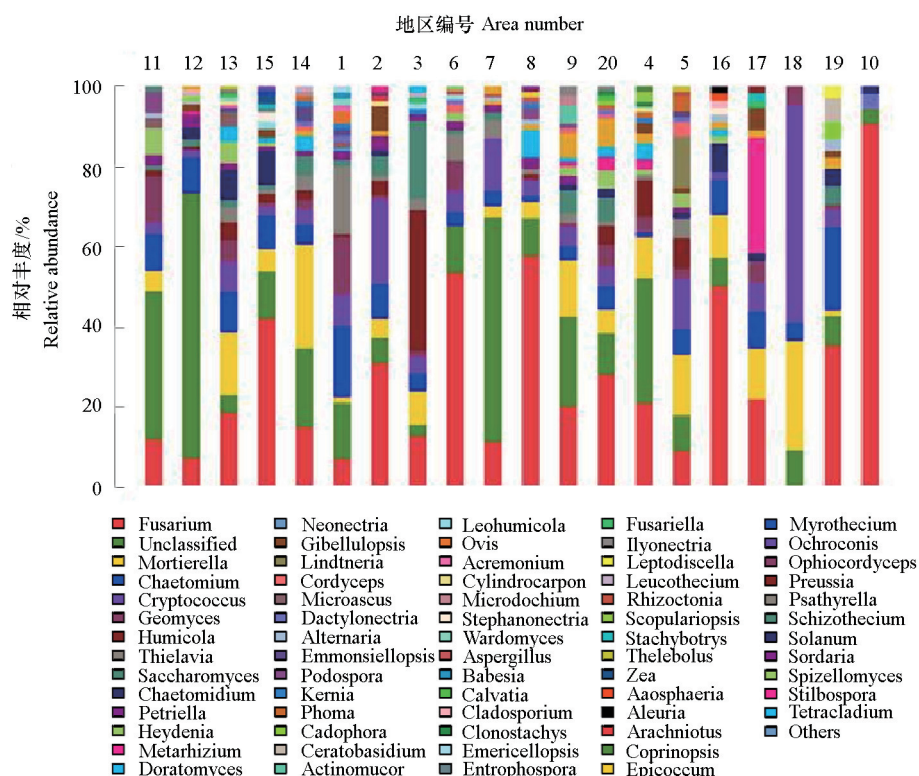


图 2 20 个地区在属的分类水平上真菌群落结构柱形图

Fig. 2 The relative abundance column of fungal communities at the genus in the 20 areas

2.4 幼苗生长与优势属间相关性

为了确定某些优势真菌属与苹果连作障碍严重程度相关性以及土壤的健康状况, 将土壤中优势菌属的丰度与植株鲜质量差比率进行相关性分析。

由表 4 可知, 优势菌属被孢霉属、隐球酵母、单孢锈菌属、腐质霉属、梭孢壳属和酵母菌属的丰度与植株鲜质量差比率的相关性系数为负。镰孢菌和毛壳菌属的丰度与植株鲜质量差比率的相关性系数为正。镰孢菌的丰度与苹果连作障碍的严重程度呈极显著性正相关 ($r = 0.585$, $P < 0.01$); 而被孢霉属的丰度与苹果连作障碍的严重程度呈显著性负相关 ($r = -0.473$, $P < 0.05$)。

表 3 优势菌属丰度与植株鲜质量差比率相关系数 (r)

Table 3 Correlation coefficients (r) between the abundance of fungal dominant fungal and difference of fresh weight

优势菌属 Dominant fungal	与植株鲜质量差比率相关系数 Correlation with fresh weight difference ratio
镰孢菌 <i>Fusarium</i>	0.585**
被孢霉属 <i>Mortierella</i>	-0.473*
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	0.227
隐球酵母 <i>Cryptococcus</i>	-0.296
单孢锈菌属 <i>Geomyces</i>	-0.900
腐质霉属 <i>Humicola</i>	-0.206
梭孢壳属 <i>Thielavia</i>	-0.038
酵母菌属 <i>Saccharomyces</i>	-0.206

注: ** 表示在 0.01 水平上显著相关, * 表示在 0.05 水平上显著相关。

Note: ** Significantly correlated at the 0.01 level; * Significantly correlated at the 0.05 level.

3 讨论

早期人们对苹果连作障碍的研究主要集中在养分问题上,然而,通过增加土壤中的速效养分和定期施肥的措施对消除连作障碍并没有明显效果 (Manici et al., 2003)。本试验研究结果显示,与未处理的连作土相比,灭菌土中再植平邑甜茶植株鲜样质量均有显著提高;植物可吸收利用的 N、P、K 和有机质等与苹果连作障碍的严重程度并无相关性。因此,土壤理化性质等非生物因素并不是导致苹果连作障碍的主要原因,微生物群落结构改变等生物因素才是苹果连作障碍的主要诱因,这与 Schoor 等 (2009) 的研究结果一致。

土壤微生物是决定土壤肥力和生产力的重要指标之一,也是评价土壤质量的潜在指标之一 (Wang et al., 2016),微生物群落多样性高的土壤更有可能抑制土传病害的发展 (Lazarovits, 2001)。本试验中 T-RFLP 的分析结果显示,甘肃省的 5 个地区菌群丰富度和多样性指数较高,优势度较低,该省的连作障碍严重程度偏低;山西省的 6 个地区有 2 个地区连作障碍程度严重,而该省的菌群丰富度和多样性指数普遍较低,优势度指数较高;陕西渭南地区的菌群优势度指数最高,丰富度指数和多样性指数偏低,连作障碍程度较为严重。长期连作会改变苹果根际周围的微生物群落结构,导致细菌数量下降,真菌数量增多。

镰孢菌与苹果连作障碍的严重程度呈极显著性正相关,而被孢霉属则呈显著性负相关。该结果与前人部分研究结果相一致:河北以及环渤海湾地区的重茬苹果园中分离得到大量镰孢菌;Laurent 等 (2008) 和 Schoor 等 (2009) 曾证明尖孢镰孢菌和茄腐镰孢菌是纽约和南非地区苹果连作障碍的病原菌。此外,镰孢菌能导致花生果腐病和根腐病 (滕应 等, 2015);腐皮镰孢菌和尖孢镰孢菌是引起西瓜连作障碍的主要病原菌 (张蕾 等, 2016);在枯萎病病原菌中,尖孢镰孢菌最为常见,主要危害葫芦科植物、香蕉、番茄和棉花等高经济价值作物 (高晓敏 等, 2014)。结合镰孢菌与再植病的相关性可知,镰孢菌是导致西北黄土高原地区苹果连作障碍的主要致病真菌。被孢霉属与苹果连作障碍的严重程度呈显著性负相关,对植株的生长起促进作用。有研究表明健康的三七植株根际土壤中被孢霉属的相对丰度显著高于发病植株根际土壤中的被孢霉属的相对丰度 (吴照祥 等, 2015),具体作用机制尚不清楚。有研究发现能够从被孢霉菌株中提炼一种微生物油脂,这类油脂具有较强的生理功能,对被孢霉属这种潜在的有益价值值得做进一步研究。本次试验中丝核菌属和柱孢菌属相对丰度很低且仅存于在个别地区,不能说明其是西北地区苹果连作障碍的主要有害真菌。有害真菌对苹果幼苗的作用机制目前还不清楚,接下来应加强对此机制的研究。土壤中的微生物群落结构相当复杂,不同地区间,相同地区间,微生物群落也会有很大差异,多样本相似度树状图也表明,虽然地区空间距离较大但菌群不存在明显的空间分布规律。各群落之间不仅相互影响,而且与周围环境相互作用,随着苹果的持续大规模栽培,土壤微生物群落可能从适合苹果树生长的生物系统转变为引起苹果连作障碍的生物系统 (Sun et al., 2017)。

4 结论

本研究结果表明,镰孢属真菌是引起西北黄土高原地区苹果连作障碍的主要有害真菌,与平邑甜茶再植病极显著正相关 ($r = 0.058$, $P < 0.01$),而被孢霉属 (*Mortierella*) 的丰度与苹果再植病的严重程度显著性相关 ($r = -0.473$, $P < 0.05$)。在徐文凤 (2011) 的研究中已初步分离到 4 种镰孢属真菌,分别是串珠镰孢菌、腐皮镰孢菌、层出镰孢菌和尖孢镰孢菌,果园连作条件下镰孢属真菌还

涉及哪些镰孢菌种群, 以及它们与苹果连作障碍的发病程度的相关性仍需进一步研究。

References

- Bao Shi-dan. 2000. Analysis of soil agricultural chemistry. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press: 34 - 35, 81 - 83, 106 - 107. (in Chinese)
- 鲍士旦. 2000. 土壤农化分析. 第3版. 北京: 中国农业出版社: 34 - 35, 81 - 83, 106 - 107.
- Braun P G. 1995. Effects of *Cylindrocarpon* and *Pythium* species on apple seedlings and potential role in apple replant disease. Canadian Journal of Plant Pathology, 17 (4): 336 - 341.
- Chen Xiao-hong, Zou Zhi-rong. 2002. Research status and control measures of continuous cropping obstacle in greenhouse vegetable cultivation. Shaanxi Agricultural Sciences, 12: 16 - 20. (in Chinese)
- 陈晓红, 邹志荣. 2002. 温室蔬菜栽培连作障碍研究现状及防治措施. 陕西农业科学, 12: 16 - 20.
- Gao Xiao-min, Wang Ju-gang, Ma Li-guo, Yun Xing-fu. 2014. Advances in pathogenic mechanism and allelopathy of *Fusarium oxysporum*. Microbiology, 41 (10): 2143 - 2148. (in Chinese)
- 高晓敏, 王锯钢, 马立国, 云兴福. 2014. 尖孢镰孢菌致病机理和化感作用研究进展. 微生物学通报, 41(10): 2143 - 2148.
- Jiang J H, Song Z, Yang X T, Mao Z Q, Nie X H, Guo H, Peng X W. 2017. Microbial community analysis of apple rhizosphere around Bohai Gulf. Scientific Reports, 7 (1): 8919.
- Laurent A S, Merwin I A, Thies J E. 2008. Long-term orchard groundcover management systems affect soil microbial communities and apple replant disease severity. Plant and Soil, 304 (1 - 2): 209 - 225.
- Lazarovits G. 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. Canadian Journal of Plant Pathology, 23 (1): 1 - 7.
- Manici L M, Ciavatta C, Kelderer M, Erschbaumer G. 2003. Replant problems in South Tyrol: role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic apple orchards. Plant and Soil, 256 (2): 315 - 324.
- Mai W F, Merwin I A, Abawi G S. 1994. Diagnosis, etiology and management of replant disorders in New York cherry and apple orchards. Horticulture Master, 363: 33 - 42.
- Mazzola M. 1998. Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. Phytopathology, 88 (9): 930 - 938.
- Mazzola M. 1999. Transformation of soil microbial community structure and rhizoctonia suppressive potential in response to apple roots. Phytopathology, 89 (10): 920 - 927.
- Mazzola M, Manici L M. 2012. Apple replant disease: role of microbial ecology in cause and control. Annual Review of Phytopathology, 50: 45 - 65.
- Narwal S S, Zeng R S. 2010. Allelopathy in ecological sustainable organic agriculture. Allelopathy Journal, 25 (1): 51 - 72.
- Nicolaa L, Turcoa E, Albanesea D, Donatia C, Thalheimerb M, Pindoia M, Insamc H, Cavalieria D, Pertot I. 2017. Fumigation with dazomet modifies soil microbiota in apple orchards affected by replant disease. Applied Soil Ecology, 113: 71 - 79.
- Rumberger A, Yao S, Merwin I A, Nelson E B, Thies J E. 2004. Rootstock genotype and orchard replant position rather than soil fumigation or compost amendment determine tree growth and rhizosphere bacterial community composition in an apple replant soil. Plant and Soil, 264 (1 - 2): 247 - 260.
- Schoor L V, Denman S, Cook N C. 2009. Characterisation of apple replant disease under South African conditions and potential biological management strategies. Scientia Horticulturae, 119 (2): 153 - 162.
- Sun J, Zhang Q, Li X L, Zhou B B, Wei Q P. 2017. Apple replant disorder of Pingyitiancha rootstock is closely associated with rhizosphere fungal community development. Journal of Phytopathology, 165 (3): 162 - 173.
- Teng Ying, Ren Wen-jie, Li Zhen-gao, Wang Xiao-bing, Liu Wu-xing, Luo Yong-ming. 2015. Research progress of peanut continuous cropping disorder. Soil, 47 (2): 259 - 265. (in Chinese)
- 滕 应, 任文杰, 李振高, 王小兵, 刘五星, 骆永明. 2015. 花生连作障碍发生机理研究进展. 土壤, 47 (2): 259 - 265.
- Tewoldemedhin Y T, Mazzola M, Botha W J, Spies C F J, McLeod A. 2011a. Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and

- oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 130 (2): 215 - 229.
- Tewoldemedhin Y T, Mazzola M, Labuschagne I, McLeod A. 2011b. A multi-phasic approach reveals that apple replant disease is caused by multiple biological agents with some agents acting synergistically. *Soil Biology and Biochemistry*, 43 (9): 1917 - 1927.
- Traquair J A. 1984. Etiology and control of orchard replant problems: a review. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 6 (1): 54 - 62.
- Wang Lei, Yang Fang, E Yao-yao, Yuan Jun, Raza Waseem, Huang Qi-wei, Shen Qi-rong. 2016. Long-term application of bioorganic fertilizers improved soil biochemical properties and microbial communities of an apple orchard soil. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1893.
- Wu Zhao-xiang, Hao Zhi-peng, Chen Yong-liang, Zeng Yan, Guo Lan-ping, Huang Lu-qi, Wang Yong, Chen Bao-dong. 2015. Seven root rot rhizosphere soil fungal community composition and carbon utilization characteristics. *Mycosystema*, 34 (1): 65 - 74. (in Chinese)
- 吴照祥, 郝志鹏, 陈永亮, 曾燕, 郭兰萍, 黄璐琦, 王勇, 陈保冬. 2015. 三七根腐病株根际土壤真菌群落组成与碳源利用特征研究. *菌物学报*, 34 (1): 65 - 74.
- Xu Weng-feng. 2011. Diversity analysis of soil fungi from Bohai Bay apple replanted orchard and the screening of the antagonistic fungi [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 徐文凤. 2011. 环渤海湾地区重茬苹果园土壤真菌群落多样性及生防真菌的筛选 [硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Yin Cheng-miao, Wang Gong-shuai, Li Yuan-yuan, Chen Xue-sen, Wu Shu-jing, Mao Zhi-quan. 2014. T-RFLP analysis of soil fungi in continuous apple orchard. *Acta Ecologica Sinica*, 34 (4): 837 - 846. (in Chinese)
- 尹承苗, 王功帅, 李园园, 陈学森, 吴树敬, 毛志泉. 2014. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析. *生态学报*, 34 (4): 837 - 846.
- Zhang Lei, Xu Hui-min, Zhu Bao-li. 2016. The relationship between rhizosphere microorganisms and plant replant disease. *Acta Microbiologica Sinica*, 56 (8): 1234 - 1241. (in Chinese)
- 张蕾, 徐慧敏, 朱宝利. 2016. 根际微生物与植物再植病的发生发展关系. *微生物学报*, 56 (8): 1234 - 1241.
- Zou Qing-jia, Wang Shu-tong, Liang Kui-jing, Wang Ya-nan, Hu Tong-le, Han Zhi-qi, Cao Ke-qiang. 2014. Species of suspected *Fusarium* species in rhizosphere soil of apple orchard in Hebei Province. *Mycosystema*, 33 (5): 976 - 983. (in Chinese)
- 邹庆甲, 王树桐, 梁魁景, 王亚南, 胡同乐, 韩之琪, 曹克强. 2014. 河北省苹果园根际土壤中疑似致病镰孢菌种类. *菌物学报*, 33 (5): 976 - 983.

征 稿

《Horticultural Plant Journal》

（《园艺学报》英文版）征稿

《园艺学报》英文版《Horticultural Plant Journal》由中国科学技术协会主管，中国园艺学会、中国农业科学院蔬菜花卉研究所和中国农业科学技术出版社共同主办，于 2015 年 7 月创刊，国内统一连续出版物编号 CN10-1305/S，国际标准连续出版物编号 ISSN 2095-9885，Online ISSN 2468-0141，双月刊，大 16 开，与国际出版商 Elsevier 合作，在 ScienceDirect 网络出版平台实现全文开放存取 (<http://www.sciencedirect.com/journal/horticultural-plant-journal>)。目前，《Horticultural Plant Journal》已经被 Directory of Open Access Journals (DOAJ)、英国国际农业与生物科学研究中心文摘 (CABI Abstracts)、英国食品科学与技术文摘 (Food Science and Technology Abstracts) 等国际数据库收录。

办刊宗旨：准确、全面、及时地报道园艺学科领域重大研究成果和科研进展，反映学科研究水平和发展动向，为学术交流服务，为促进学科发展作贡献。

刊载范围：有关园艺作物种质资源、遗传育种、栽培技术、生理生化、生态、基因组学、生物技术、植物保护、采后处理与利用等原创性研究论文、研究简报及综述等。

欢迎投稿：投稿网址 <https://www.journals.elsevier.com/horticultural-plant-journal/>。邮寄地址：北京中关村南大街 12 号，中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部（邮编 100081）。联系电话：010-62124615。