

不同药剂处理对番茄连作培养基质微生物群落的影响

闫思华, 王慧茹, 李建设*, 高艳明

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 为探讨连作基质微生物群落对不同消毒药剂的响应, 设置 6 个处理, 即施入枯草芽孢杆菌 + 地衣芽孢杆菌 (T1)、恶霉灵 + 氯溴异氰尿酸 (T2)、恶霉灵 + 乙酸铜 (T3)、2.2% 酒精 (T4)、甲醛 (T5) 5 种药剂消毒组合, 以清水处理为对照 (CK), 依托 Illumina MiSeq 高通量测序平台, 研究不同药剂处理对基质细菌和真菌群落组成及多样性的影响。结果表明: 不同药剂消毒后基质细菌和真菌群落多样性下降, 与 CK 相比, T4 处理显著降低了细菌 OTU 序列、丰富度指数 (Chao 1 和 Ace 指数) 和多样性指数 (Shannon 指数), T3 ~ T5 处理显著降低真菌 OTU 序列 (40.87% ~ 47.49%), Chao 1 指数 (40.58% ~ 46.58%) 和 Ace 指数 (41.16% ~ 46.51%)。不同药剂施入影响群落结构及组成, 其中绿弯菌门、厚壁菌门、放线菌门、变形菌门和子囊菌门相对丰度达到 10% 以上, 与 CK 相比, T5 处理后的厚壁菌门、放线菌门、子囊菌门相对丰度提高, 厚壁菌门中的耐受性细菌芽孢杆菌科相对丰度降幅较小, 子囊菌门中的曲霉科相对丰度提高 29.14%, 表现为 T4>T5>T3>T2>CK>T1。本研究表明, 不同药剂消毒改变了连作基质细菌和真菌群落组成, 降低菌群多样性, 且甲醛处理后最为明显。

关键词: 药剂消毒; 番茄土传病害; 基质微生物群落; 高通量测序

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是我国设施栽培面积最大的作物之一, 其营养丰富, 既可生食又可熟食, 还可用作加工原料, 是中国人民喜食的一种重要果菜^[1]。近年来, 随着蔬菜栽培技术发展, 基质无土栽培被广泛用于蔬菜生产, 其在设施栽培生产中面积不断扩大^[2-3], 但由于基质成本较高, 多重茬利用, 随着重茬利用年份累积及温室高温、高湿的环境作用, 栽培基质中的微生物环境发生变化, 群落结构不合理, 导致微生物活性降低, 病原微生物增多, 养分利用率也随之降低, 最终蔬菜产量降低、品质变劣, 进而大大降低了蔬菜的商品价值, 使得农民收入减少^[4-5]。基质消毒作为一项高效且快速的杀灭土传病害的技术^[6-7], 对无土栽培基质连作障碍的防治有明显的的作用, 近些年来随着农业科技交流的不断扩大, 消毒技术逐步被引入设施栽培中, 在消除设施栽培基质质量障碍方面发挥了重要作用。

已有研究表明, 基质消毒是解决连作障碍的有效途径, 其不仅可解决基质多年利用问题, 还可提高作物产量和质量^[8]。常用的消毒技术有物理消毒、药剂消毒以及生物熏蒸消毒^[9], 药剂消毒中, 主要以甲基溴、棉隆、高锰酸钾、甲醛等化学药剂为原料以及各种生物药剂, 通过各种方式与基质混匀, 覆膜 1 ~ 2 周进行消毒^[10]。Kobara 等^[11] Momma 等^[12] 通过实验发现, 在含有低浓度乙醇的土壤中, 线虫、枯萎病菌等得到有效抑制, 另外有学者研究发现, 氯氧消毒剂处理对土壤细菌、真菌灭菌效果较明显, 对放线菌灭菌效果不强, 能有效调节和改善土壤微生物群落结构^[13]。枯草芽孢杆菌用于 1,3- 二氯丙烯 (甲基溴替代物) 消毒土壤对番茄植株生长具有一定的促生作用, 显著地提高了番茄株高和产量^[14]。对于连作障碍造成的土传病害, 化学药剂和生物药剂是目前使用最广泛、最方便且最有效的方法, 但大多数研究停留在单独的药剂消毒处理对设施蔬菜产量、经济效益、基质理化性质等的影响方面, 对于不同药剂组合的施用, 在基质微生物群落的研究较少^[15-16], 细菌和真菌作为微生物群落的重要组成部分, 其结构组成及多样性影响基质养分循环, 可及时反映基质健康状况, 在基质发育、环境净化及维持生态平衡等方面

收稿日期: 2020-04-29; 录用日期: 2020-08-12

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2019BBF02008)。

作者简介: 闫思华 (1995-), 女, 宁夏吴忠人, 硕士研究生, 主要从事设施蔬菜栽培生理研究。E-mail: ysh513937@163.com。

通讯作者: 李建设, E-mail: 13709587801@163.com。

发挥着重要作用,且在农药降解和生物转化过程中发挥着核心作用^[17-20]。

因此,本试验选用化学药剂及生物药剂,从基质微生态角度出发,探讨不同药剂组合的施用对基质细菌和真菌群落结构组成及多样性的影响,选出对微生物群落改变较为有益的药剂组合,以期为解决基质栽培蔬菜土传病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验于2019年7~8月在宁夏贺兰园艺产业园2号日光温室进行。温室长65 m,宽7 m。该地区属于温带大陆性气候,主要气候特点是:热量资源比较丰富, $\geq 0^{\circ}\text{C}$ 的积温为3753.2 $^{\circ}\text{C}$, $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 的积温为2629.9 $^{\circ}\text{C}$,年平均气温8.5 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

1.2 基质处理情况

基质于2015年2月填装到栽培槽栽培蔬菜,栽培基质为宁夏中青农业科技有限公司生产的商品栽培基质,基质配比为东北草炭:珍珠岩:腐熟稻壳=9:9:1。基质容重为0.211 g·cm⁻³,EC值为1.211 mS·cm⁻¹,持水孔隙度为53.17%,通气孔隙度为36.42%,碱解氮为145.60 mg·kg⁻¹,有效磷为

188.67 mg·kg⁻¹,速效钾为231.01 mg·kg⁻¹。每年栽培2茬番茄,到2019年7月,共栽培9茬番茄。基质理化性质pH 6.05、EC值为2.653 mS·cm⁻¹,碱解氮为53.9 mg·kg⁻¹,有效磷为76.72 mg·kg⁻¹,速效钾为136.35 mg·kg⁻¹。

1.3 试验设计

试验采用单因素随机区组设计,共6个处理,施入枯草芽孢杆菌+地衣芽孢杆菌(T1)、恶霉灵+氯溴异氰尿酸(T2)、恶霉灵+乙酸铜(T3)、2.2%酒精(T4)、甲醛(T5),以清水处理为对照(CK)。不同处理供试药剂来源及处理方式见表1。

2019年7月20日,先将39个栽培槽(槽长5.5 m,槽宽0.5 m,深0.3 m)中的1/3基质取出,混匀,平均分成18个同等大小的小区,用于试验。处理时,选取3个小区浇清水,其它15个小区将不同药剂组合分别均匀施入,覆膜1周后,揭膜晾晒3 d,深翻基质耙平。8月4日采集处理后的基质样品,每个小区5点随机取样后混匀,去除样品中的植物根系、石粒,装入冰盒,运回实验室置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于土壤细菌和真菌群落组成及多样性的测定。

表1 供试药剂来源及处理方式

处理	药剂	生产厂家	剂型	施用方法	施用量
CK	清水	当地灌溉用水	—	—	浇透
T1	枯草芽孢杆菌+地衣芽孢杆菌	山东青州市农一农业发展有限公司+河南佳乐夫农业发展有限公司	干燥粉剂	混土、撒播	1.50 g·m ⁻² +0.37 g·m ⁻²
T2	恶霉灵+氯溴异氰尿酸	潍坊华诺生物科技有限公司+山东鑫星农药有限公司	99%原药+50%可湿性粉剂	按比例兑水浇施	3 g·m ⁻² (4000倍液)+0.09 g·m ⁻²
T3	恶霉灵+乙酸铜	潍坊华诺生物科技有限公司+山东省青岛瀚生生物科技股份有限公司	99%原药+20%可湿性粉剂	按比例兑水浇施	3 g·m ⁻² (4000倍液)+2.25 g·m ⁻² (400倍液)
T4	2.2%酒精	—	95%水剂	按比例兑水浇施	浇透
T5	甲醛	—	40%水剂	按比例兑水浇施	浇透(稀释50倍)

1.4 测定项目与方法

1.4.1 基质微生物DNA提取和PCR扩增

根据QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN N.V.,德国)说明书进行微生物群落总DNA抽提,提取后使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量,使用NanoDrop2000测定DNA浓度和纯度;细菌使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S

rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增,真菌使用ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对ITS基因ITS1可变区进行PCR扩增,扩增程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min,27(16S V3-V4)/35(ITS)个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s),然后72 $^{\circ}\text{C}$ 稳定延伸10 min,最后在4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行保存(PCR仪:ABI Gene Amp[®] 9700型)。PCR反应体系

为: $10\times$ 缓冲液 $2\ \mu\text{L}$ (16S V3-V4) / $5\times$ FastPfu 缓冲液 $4\ \mu\text{L}$ (ITS), $2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs $2\ \mu\text{L}$, 上游引物 ($5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.8\ \mu\text{L}$, 下游引物 ($5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.8\ \mu\text{L}$, rTaq DNA 聚合酶 $0.2\ \mu\text{L}$ (16S V3-V4) / FastPfu DNA 聚合酶 $0.4\ \mu\text{L}$ (ITS), 模板 DNA $10\ \text{ng}$, 补足至 $20\ \mu\text{L}$ 。每个样本 3 个重复。采用 Illumina Miseq PE300 测序平台对 PCR 扩增产物进行测序, 测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.4.2 高通量测序数据分析

在美吉生物云平台 (<http://www.i-sanger.com/>) 上进行高通量测序数据的质控, 拼接和去杂以及嵌合体去除。使用 FLASH 1.2.11 软件对原始数据进行拼接, 将拼接得到的序列用 Trimmomatic 0.33 软件进行质控。运用 UPARSE 软件, 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU (Operational Taxonomic Unit) 聚类并剔除嵌合体, 选择 OTUs 中具有代表性的序列, 比对 Silva 数据库, 利用 RDP classifier 贝叶斯算法对每条序列与已知序列进行比较, 得到物种分类注释。

1.5 数据处理

采用 Excel 2016、美吉生物云分析平台进行数据整理并作图, 用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析, 用 Duncan 法 ($\alpha=0.05$) 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 基质样品测序及合理性分析

随序列量的增加, 细菌和真菌 OTU 稀释曲线的变化逐渐趋于平坦; 测序量达到 30000 左右时, OTU 数基本达到饱和状态。这说明测序数量较合理, 能够真实地反映出这 18 个基质样本的细菌和真菌群落组成, 测序结果包含了本试验大多数细菌、真菌类群。尽管随测序量的增加, 仍可能会有少量未被发现的细菌、真菌种类出现, 但其对发现新 OTU 数的贡献率较小, 所以当前测序量是充分的。Shannon-Wiener 曲线是反映样品中微生物多样性的指数, 随着测序量的增加, Shannon-Wiener 曲线趋于平缓, 同样也可说明数据量足够大, 可以反映样品中绝大多数微生物信息 (图 1)。

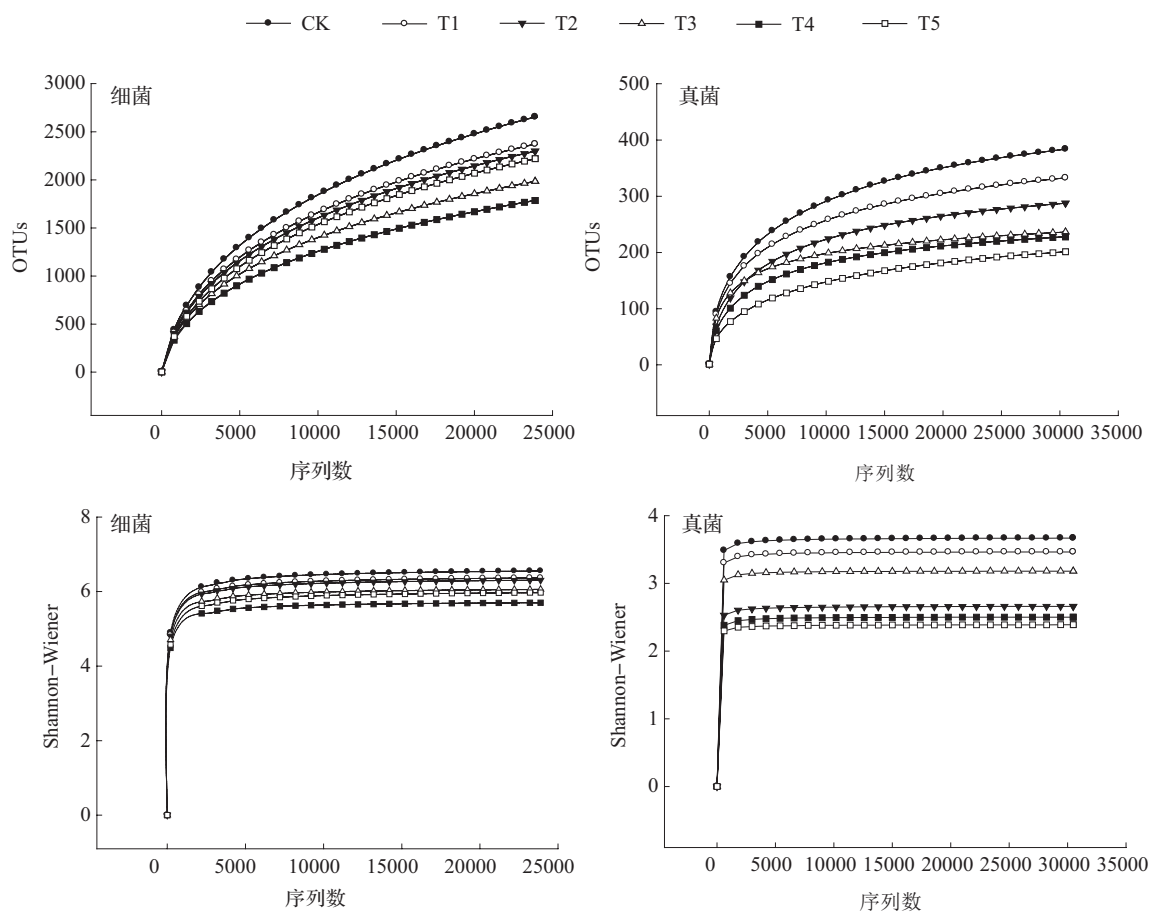


图 1 不同测序样品的稀释曲线与 Shannon-Wiener 曲线

2.2 基质细菌和真菌群落 α 多样性分析

对基质中细菌和真菌群落进行测序分析, 细菌 α 多样性指数总体上均高于真菌 (除 Simpson), 说明细菌在基质微生物中占主导地位。各处理中细菌和真菌测序覆盖率分别在 97% 和 99% 以上, 表明样品中的序列绝大多数被测出, 进一步证实, 测序结果能够较好反映基质细菌、真菌群落组成的真实情况。

在细菌群落 OTU 序列数、Chao 1 指数、Ace 指数、Shannon 指数中, CK 处理的各项指数均显著高于 T4 处理, 分别高 50.85%、44.84%、45.63% 和 15.01%, 说明施入不同药剂组合降低了细菌群落

物种多样性及丰富度, T4 处理对其降低最为明显。在 Simpson 指数中, 各处理与 CK 处理无显著性差异 (表 2)。

在真菌群落中, OTU 序列数、Chao 1 指数和 Ace 指数均表现为 CK>T1>T2>T4>T3>T5, 且 CK 处理下的 OTU 序列数、Chao 1 指数和 Ace 指数均显著高于 T3 ~ T5, 分别比 T3 ~ T5 高 69.11% ~ 90.43%、68.40% ~ 86.77%、69.94% ~ 86.95%, Simpson 指数与细菌一样, 各处理与对照 CK 之间无显著性差异。另外, 相较于其它处理, T1 处理对真菌群落物种多样性以及丰富度影响最小, 各指数与 CK 处理无显著差异 (表 2)。

表 2 不同处理基质细菌和真菌群落的 α 多样性指数

	处理	OTU 序列数	覆盖率 (%)	Chao 1 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
细菌	CK	3186 ± 189a	97.27	4382.63 ± 219.81a	4361.77 ± 212.91a	6.59 ± 0.10a	0.0046 ± 0.001a
	T1	2880 ± 426ab	97.72	3899.57 ± 543.27 ab	3902.04 ± 526.64ab	6.40 ± 0.29ab	0.0057 ± 0.002a
	T2	2842 ± 88ab	97.80	3933.89 ± 116.94ab	3937.41 ± 137.37ab	6.34 ± 0.12ab	0.0059 ± 0.001a
	T3	2389 ± 126ab	98.07	3290.68 ± 154.13b	3249.61 ± 116.21b	6.08 ± 0.02ab	0.0080 ± 0.002a
	T4	2112 ± 262b	98.00	3025.81 ± 350.80b	2995.13 ± 346.14b	5.73 ± 0.38b	0.0163 ± 0.007a
	T5	2784 ± 205ab	97.84	3855.00 ± 273.41ab	3853.08 ± 275.33ab	6.01 ± 0.29ab	0.0140 ± 0.007a
真菌	CK	438 ± 13a	99.91	483.69 ± 16.90a	476.02 ± 17.76a	3.67 ± 0.09a	0.0535 ± 0.006a
	T1	385 ± 29a	99.93	424.92 ± 30.27a	418.45 ± 33.63ab	3.47 ± 0.22ab	0.0872 ± 0.023a
	T2	327 ± 24ab	99.94	367.04 ± 26.36ab	352.65 ± 25.67bc	2.67 ± 0.41ab	0.2305 ± 0.098a
	T3	250 ± 49b	99.96	275.56 ± 57.04b	267.99 ± 50.14c	3.19 ± 0.35ab	0.1324 ± 0.061a
	T4	259 ± 45b	99.95	287.23 ± 44.71b	280.11 ± 43.16c	2.51 ± 0.65ab	0.2129 ± 0.085a
	T5	230 ± 35b	99.94	258.97 ± 41.77b	254.62 ± 41.25c	2.39 ± 0.27b	0.2071 ± 0.074a

注: 数据为平均值 ± 标准误。同列不同字母代表处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 基质细菌和真菌的物种 Venn 图分析

基质细菌和真菌 Venn 图可用于统计各处理所共有和独有的物种 (如 OTU) 数目, 可以比较直观地表现环境样本物种 (如 OTU) 组成相似性及重叠情况。

在细菌中, 6 个处理共产生 21866 个 OTU, 共有的 OTU 数为 1447 个, 占总 OTU 数的 6.62%, CK ~ T5 各处理所包含的 OTU 数分别为 4200、3934、3712、3381、3047 和 3592 个, 分别占总 OTU 数的 19.21%、17.99%、16.98%、15.46%、13.93% 和 16.43%, 且各处理特有的 OTU 数分别为 430、299、226、211、147 和 249 个。各处理中所包含 OTU 数及特有的 OTU 数均以 CK 处理最多, 其次是 T1 处理, T4 处理最小, 说明施入不同药剂组合

会对细菌产生一定抑制作用, T1 处理相较于其它处理 (除 CK), 抑制细菌产生的力度较小。此外, CK 与 T1 ~ T5 各处理共有的 OTU 数分别为 3001、2701、2411、2240 和 2606 个, 受施入消毒剂影响, 基质细菌共有种类都不同, 以 CK 与 T1 处理共有的种类最多 (图 2)。

在真菌中, 6 个处理共产生 3145 个 OTU, 共有的 OTU 数为 142 个, 占总 OTU 数的 4.52%, CK ~ T5 各处理所包含的 OTU 数分别为 681、617、546、475、453 和 373 个, 分别占总 OTU 数的 21.65%、19.62%、17.36%、15.10%、14.40% 和 11.86%, 且各处理特有的 OTU 数分别为 163、133、110、110、101 和 47 个。各处理中所包含 OTU 数及特有的 OTU 数均以 CK 处理最多, 其次是 T1 处理, T5 处

理最少,说明施入不同药剂组合会对真菌产生一定抑制作用,T1处理相较于其它处理(除CK处理),抑制真菌产生的力度较小。此外,CK与T1~T5各处理共有的OTU数分别为391、335、

270、278和259个,受施入消毒剂影响,基质真菌共有种类都不同,与细菌一致,以CK与T1处理共有的种类最多(图2)。

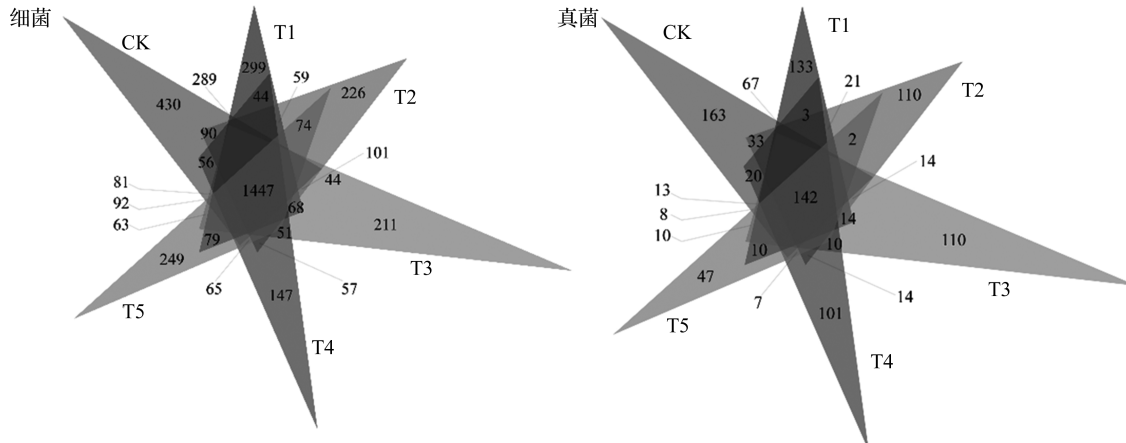


图2 基质细菌和真菌 OTU 分布的 Venn 图

2.4 不同处理对基质细菌和真菌群落组成及相对丰度的影响

不同处理下基质中细菌主要门类均有:变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、Patescibacteria门、浮霉菌门(Planctomycetes)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus),表明药剂消毒并没有改变基质主要微生物的门类。其中相对丰度大于10%的细菌门主要有变形菌门、放线菌门、厚壁菌门、绿弯菌门。与CK处理相比,T1处理的绿弯菌门和T5处理的厚壁菌门相对丰度最高,但与其无显著性差异。T5处理的放线菌门相对丰度最高(28.27%),与CK处理达到显著性差异,增长了49.02%,T3处理相对丰度最低,各处理表现为T5>T2>T1>CK>T4>T3,但其它处理与CK处理无显著性差异。与CK处理相比,变形菌门T1处理的相对丰度最高但与其无显著性差异,T4、T5处理最低且达到显著性差异,较CK处理分别降低了42.94%和32.22%,其它处理与CK处理无显著性差异。说明施入不同药剂,能显著改变优势种群的比例(图3)。

不同处理下真菌门类均有:子囊菌门(Ascomycota)、未分类的真菌、Opidiomycota门、担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)。其中子囊菌门是基质真菌优势菌门,CK~T5各

处理中相对丰度为75.67%~97.74%,表现为T5>T2>T4>CK>T3>T1。与CK处理相比,T1、T3处理相对丰度显著降低22.53%和16.26%,其它处理与CK处理无显著性差异。此外,不同处理下,未分类真菌中各处理相对丰度为1.20%~11.38%,表现为T3>T1>CK>T4>T2>T5,且与CK处理相比,T3处理显著增加了165.27%,T5处理显著降低。Opidiomycota门中T1处理显著高于其它处理以及CK处理,CK与T2、T3、T4和T5无显著性差异。担子菌门的相对丰度为0.03%~1.09%,表现为T3>CK>T1>T2>T5>T4,且T3处理显著高于其它处理及CK处理,T4处理的相对丰度与CK处理相比显著降低94.51%。与CK处理相比,被孢霉门T1处理的相对丰度显著增加了123.26%,同时T5和T4处理显著降低,分别降低95.83%和82.64%。与细菌一致,说明不同药剂组合对微生物优势物种的改变起着重要作用(图3)。

在基质细菌中,不同处理下相对丰度居前6位的科为芽孢杆菌科(Bacillaceae)、热单孢科(Thermomonosporaceae)、类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)、无科学名称(norank_o_norank_c_Gemmatimonadetes)、热放线菌科(Thermoactinomycetaceae)、芽单胞菌科(Gemmatimonadaceae)。其中,芽孢杆菌科是其优势菌科,CK处理下相对丰度最大,与CK处理相比,各处理芽孢杆菌科的相对丰度降低了0.14%~58.48%,说明药剂消毒情况下降低了其相对丰度,T4处理下相对丰度降幅最小(表3)。

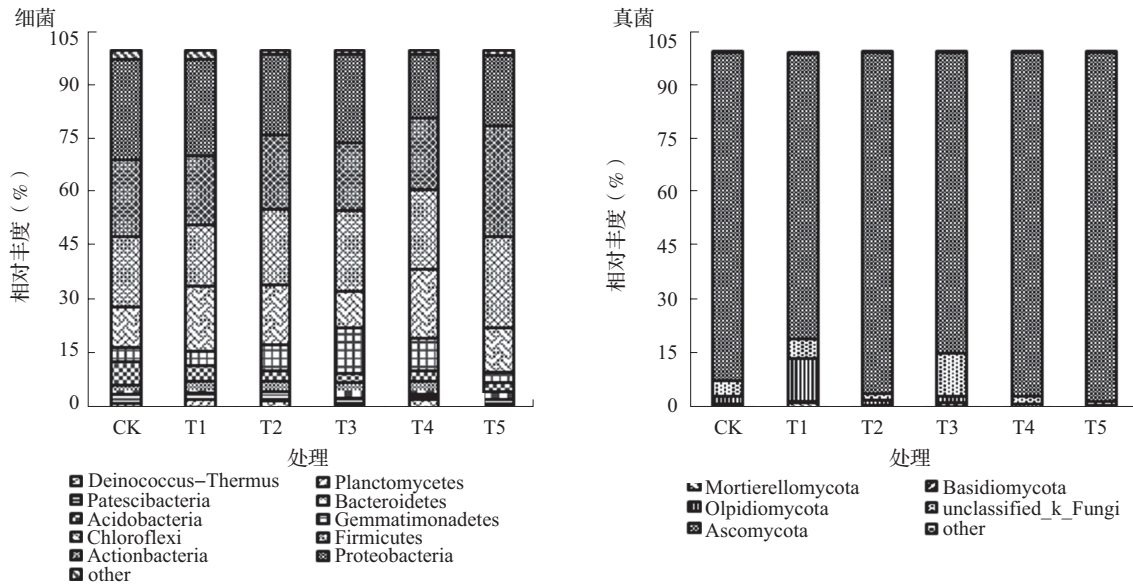


图3 不同处理基质细菌和真菌门水平分类学群落组成和相对丰度

在基质真菌中,不同处理下相对丰度居前6位的科为曲霉科(Aspergillaceae)、未分类的子囊菌门(norank_o_norank_c_Gemmatimonadetes)、毛壳菌科(Chaetomiaceae)、丛赤壳科(Nectriaceae)未分类的真菌(unclassified_k_Fungi)、毛霉菌科(Trichocomaceae)。其中,优势菌科为曲霉科,与

CK处理相比,其它处理(除T1处理)的曲霉科都有所增加,表现为T4>T5>T3>T2>CK>T1,T4处理较其他处理增加30.82%~152.35%,说明部分药剂消毒增加了真菌优势菌科的相对丰度,T4处理下相对丰度增幅最大(表3)。

表3 不同处理基质细菌和真菌科水平分类学群落组成和相对丰度 (%)

科		处理					
		CK	T1	T2	T3	T4	T5
细菌	芽孢杆菌科	13.80a	5.75c	8.23b	7.59bc	13.78a	8.92b
	热单孢科	1.87d	2.33d	4.61bc	3.24cd	6.13ab	7.66a
	类芽孢杆菌科	1.41c	1.30c	2.87b	4.22a	2.93b	3.34b
	无科学名	0.96c	1.00c	3.04b	3.58b	4.70a	0.94c
	热放线菌科	1.74b	1.13b	1.28b	1.23b	1.68b	7.06a
	芽单孢菌科	2.44b	2.52b	2.57b	3.99a	1.06c	1.36c
真菌	曲霉科	39.09c	26.17d	39.35c	45.71bc	66.04a	50.48b
	未分类的子囊菌门	10.90a	13.58a	6.37b	10.94a	7.68b	6.31b
	毛壳菌科	6.16c	6.54c	15.51a	1.37d	2.09d	13.18b
	丛赤壳科	10.31b	14.53a	1.04d	3.82c	8.76b	1.78cd
	未分类的真菌	4.53c	7.83b	5.14c	12.82a	5.08c	1.20d
	毛霉菌科	1.74c	1.27c	7.82b	1.61c	1.23c	19.81a

注:同行不同小写字母代表处理间差异显著($P<0.05$)。

2.5 不同处理下基质细菌和真菌主成分分析

在OTU水平下采用ANOSIM对样品间细菌和真菌进行主成分分析,以观察不同处理对微生物影响的相关性。在细菌群落中,经过PCA降维后,所提取

的PC1对总方差的解释率为28.67%,PC2的解释率为22.87%,两者共解释51.54%。其结果显示除了T4处理,其它处理与CK处理细菌群落组成较为相似。在真菌群落中,经过PCA降维后,前两轴分别解释

了37.28%和30.34%，两者总占比为67.62%。其结果说明T3~T5各处理与CK处理对基质真菌群落

组成影响差异显著。总体来看，T4、T5处理对连作基质细菌和真菌群落的影响更为明显（图4）。

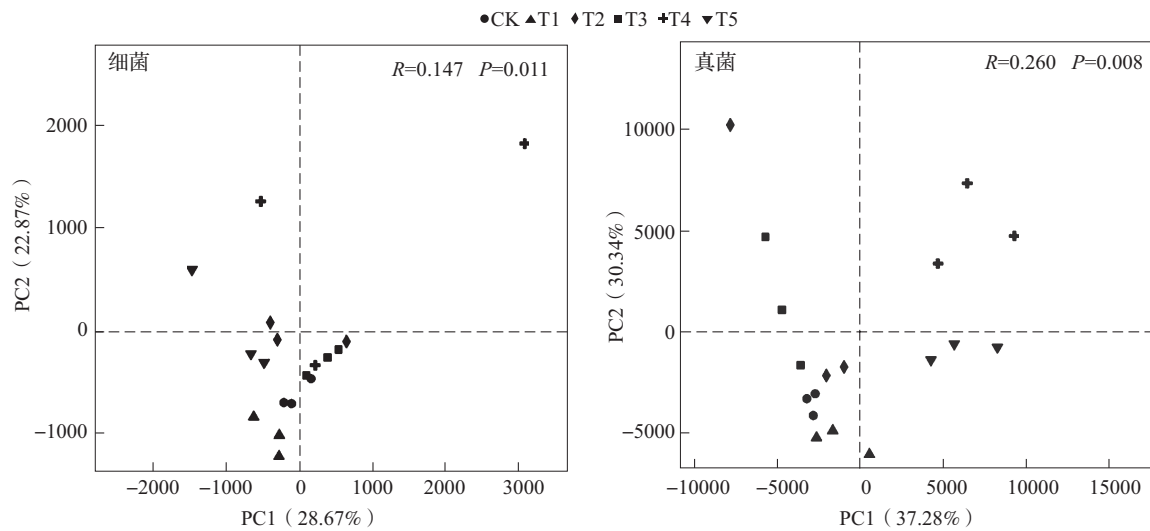


图4 不同处理基质细菌和真菌 PCA 分析

2.6 不同处理基质细菌和真菌群落结构间差异

采用UPGMA方法对样品进行聚类树分析，能可视化呈现不同处理基质细菌和真菌群落的相似性及差异性。不同处理下基质细菌群落组成为两大类，CK和T1、T2和T4、T3和T4处理的细菌群落组成在聚类关系上趋同性较强，表明这3组的细菌群落组成的亲缘关系较近。整体上，T1处理中T1-3重复与T1-1、T1-2两个重复样本之间细菌群落存在较大差异，这可能是源于设施内撒施药剂

下，基质空间异质性导致基质细菌群落组成改变的缘故（图5）。

不同处理下基质真菌群落同细菌组成一样也分为两大类，T2和T3、T4和T5处理的真菌群落组成在聚类关系上趋同性较强，表明这两组的真菌群落有较近的亲缘关系。另外，T2处理的3个重复之间聚类关系较远，T3处理的T3-3较T3-1、T3-2两个重复关系也较远，可能是由于耕作等原因造成的。整体上，其它处理各重复之间的亲缘关系较近（图5）。

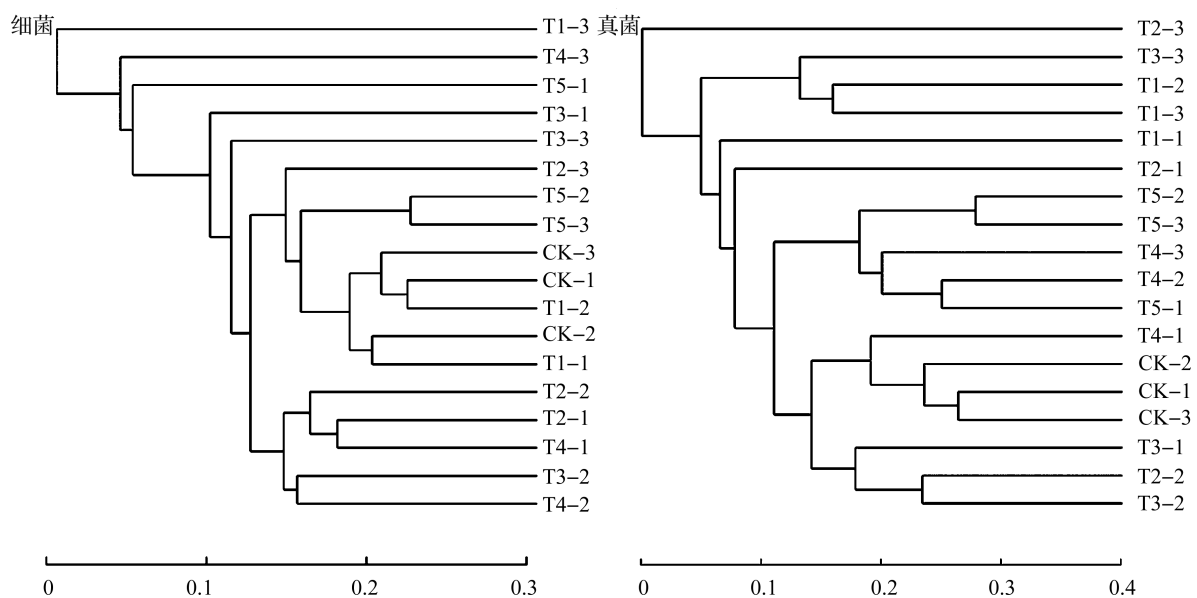


图5 不同处理基质细菌和真菌群落相似性聚类树

3 讨论

3.1 不同药剂组合对连作基质细菌和真菌多样性的影响

微生物参与养分循环和能量流动等关键基质生态过程,对基质质量状况有着重要作用,其群落多样性能够灵敏地反映环境和植物群落的变化^[21-22]。本研究中,施入不同药剂组合,与CK连作基质相比,细菌和真菌丰富度及多样性都有所下降,均表现为T1处理相对丰度及多样性降幅较小,T4处理和T5处理降幅较大,这与Tanaka等^[23]和曾祥国等^[24]研究结果一致,基质消毒后微生物群落多样性低于消毒前,其原因可能是施用不同药剂刺激了某些特定微生物的大量繁殖,抑制了其他微生物的生长^[25]。整体上,细菌多样性指数大于真菌,且施入药剂后,真菌的降幅大于细菌,这与燕平梅等^[26]研究结果不一致,可能是细菌包含多种代谢种类和营养类型,能够适应更多、更复杂的生态位^[27],药剂施入会带来基质理化环境的改变,真菌对不同药剂的敏感性大于细菌,使得某些真菌微生物无法生存,从而降低了真菌的物种丰度,致使真菌的丰富度和多样性降低的幅度大于细菌^[28]。

3.2 不同药剂组合对连作基质细菌和真菌群落组成及结构的影响

微生物群落组成与基质健康状况密切相关,药剂施入会引起基质微生物群落组成变化。本试验中,施入不同药剂组合,细菌类相对丰度大于10%的优势菌门有绿弯菌门、厚壁菌门、放线菌门和变形菌门,这与董先勤^[29]研究结果一致。T5处理的厚壁菌门及放线菌门相对丰度都最高,较CK处理分别高31.22%和49.02%,但T5处理的变形菌门又较CK处理显著降低,可能由于T5处理的药剂是强还原剂,具有防腐杀菌性能,能跟生物体(包括细菌)蛋白质上的氨基发生反应,且处理后用塑料薄膜覆盖,创造厌氧还原环境,达到抑制病原菌和土传病害的效果,致使其有益菌的相对丰度增高,变形菌门中的病原菌较多,所以其相对丰度随之减少^[30]。另外,在基质细菌科水平上,T4、T5处理的芽孢杆菌科属于厚壁菌门,其相对丰度较CK处理及其它处理降幅较小,此科能够产生氨、铁载体、过氧化氢酶、吡啶乙酸和抗土传病原真菌

的抗生素^[31],致使耐受型细菌生长,从而抑制病原菌等其他细菌群落生长,达到控制病害的效果^[32]。枯草、地衣芽孢杆菌具有孢子休眠期、生殖生长期两个生长时期,会在生长环境恶劣、营养物质缺乏等不适宜的环境下进入孢子休眠期,一些产品会表现出见效慢,持效期短^[33]。本研究T1处理芽孢杆菌科比CK处理的芽孢杆菌科丰度低,可能是因为T1处理所添加的枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌均为干燥粉剂,施入后覆膜一周导致该环境处于高温、缺水且缺氧状态,致使芽孢杆菌的孢子进入休眠状态,因此并没有直接提高芽孢杆菌的含量,反而使其降低。不同药剂组合施用下,在真菌门水平中,子囊菌门是所有处理的优势菌门,是一类容易受到植物种类和秸秆残茬强烈影响的基质腐生真菌,其功能是分解木质化植被碎屑^[34]。CK~T5处理中其相对丰度为75.67%~97.74%,T5处理下最高,T1、T3处理下相对丰度较CK处理显著降低,不同药剂的施入对其影响不同,可能T5处理为子囊菌门提供了适宜的基质环境,使其更好地利用可降解的作物残茬,促进了菌群的快速增长与繁殖^[35]。另外,在基质真菌科水平上,曲霉科属于子囊菌门,与CK处理相比,其它处理(除T1处理)的相对丰度增加,这与董先勤^[29]研究结果一致,厌氧消毒后可增加其相对丰度,T1处理相对丰度下降,可能是枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的施入,将曲霉科中的病原菌杀死,致使其相对丰度降低。不同处理下微生物群落结构的相似性和差异性也不同,CK与T1处理群落结构较为相似,与T4和T5处理差异较大,这可能是由于基质微生物对化学药剂较为敏感造成的。不同药剂组合,对于连作基质微生物群落的影响各有不同,群落组成及多样性的改变影响着基质的生态微环境。

4 结论

施入不同药剂,基质细菌和真菌多样性指数均降低,相较于CK处理,T4处理显著降低细菌多样性指数,T3、T4和T5处理显著降低真菌多样性指数,其它处理与CK处理无显著性差异。

不同药剂处理影响连作基质菌群的结构和组成,部分厌氧、耐性较强的细菌相对丰度增加。T5处理对基质中厚壁菌门、芽孢杆菌科、放线菌门、子囊菌门和曲霉科等菌群影响较大,能够有效提高

有益菌、减少病原菌相对丰度。研究表明,不同药剂处理可改变连作基质菌群多样性、结构和组成。甲醛添加在短期内对番茄连作基质微生物群落的影响较为明显。

参考文献:

- [1] 王敏, 李建设, 高艳明. 限根栽培对日光温室樱桃番茄植株生长和品质的影响[J]. 西北农业学报, 2014, 23(7): 131-137.
- [2] 邵兴华, 熊佳文, 季天委. 无土栽培常用营养液及应用综述[J]. 东北农业科学, 2018, 43(2): 40-43.
- [3] 徐烘爽, 赵芳, 王丽萍. 无土栽培在现代农业中的应用及发展[J]. 农业与技术, 2018, 38(10): 79.
- [4] 王小兵, 骆永明, 李振高, 等. 长期定位施肥对红壤地区连作花生生物学性状和土传病害发生率的影响[J]. 土壤学报, 2011, 48(4): 725-730.
- [5] 姚小东, 李孝刚, 丁昌峰, 等. 连作和轮作模式下花生土壤微生物群落不同微域分布特征[J]. 土壤学报, 2019, 56(4): 975-985.
- [6] 曹勘程, 郭美霞, 王秋霞. 土壤消毒技术[J]. 世界农药, 2010, 32(S1): 10-13.
- [7] 曹勘程, 刘晓曼, 郭美霞, 等. 作物土传病害的危害及防治技术[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 6-16.
- [8] 杨陆强, 赵玉清, 朱加繁, 等. 栽培基质物理消毒技术研究现状概述与评析[J]. 中国农机化学报, 2017, 38(2): 100-108.
- [9] 周雪青, 张晓文, 邹岚, 等. 设施农业土壤消毒方法比较[J]. 农业工程, 2016, 6(3): 108-112.
- [10] 李英梅, 田朝霞, 徐福利, 等. 不同土壤消毒方法对日光温室土壤温度和土壤养分的影响[J]. 西北农业学报, 2009, 18(6): 328-331.
- [11] Kobara Y, Uematsu S, Tanaka-Miwa C, et al. Possibility of the new soil fumigation technique with ethanol solution [C]. Proceedings of 2007 annual international research conference on methyl bromide alternatives and emissions reductions, 2007. 741-742.
- [12] Momma N, Momma M, Kobara Y. Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganism [J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(5): 336-344.
- [13] 秦邵龙, 祁桥伟, 刘杰, 等. 氯氧消毒剂对设施土壤生物学性质的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(7): 1-7.
- [14] 刘秀梅. 枯草芽孢杆菌用于 1,3-D 消毒土壤对番茄的促生作用及对土壤微生态的改良效应研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [15] Liu X M, Li Q, Liang W J, et al. Distribution of soil enzyme activities and microbial biomass along a latitudinal gradient in farmlands of songliao plain, Northeast China [J]. Pedosphere, 2008, 18(4): 431-440.
- [16] 李英梅, 曹红梅, 徐福利, 等. 土壤消毒措施对土壤物理特性及黄瓜生长发育的影响[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(6): 1189-1193.
- [17] Yang Q, Lei A P, Li F, et al. Structure and function of soil microbial community inartificially planted *Sonneratia apetala* and *S. caseolaris* forests at different stand ages in Shenzhen Bay, China [J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 85(2): 754-763.
- [18] Shi Y, Grogan P, Sun H B, et al. Multi-scale variability analysis reveals the importance of spatial distance in shaping Arctic soil microbial functional communities [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 86: 126-134.
- [19] Ye X L, Dong F, Lei X Y. Microbial resources and ecology-microbial degradation of pesticides [J]. Natural Resources Conservation and Research, 2018, 1(1): 22-28.
- [20] Becerra-Castro C, Lopes A R, Vaz-Moreira I, et al. Wastewater reuse in irrigation: a microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health [J]. Environment International, 2015, 75: 117-135.
- [21] Wall D H, Moore J C. Interactions underground: Soil biodiversity, mutualism, and ecosystem processes [J]. Bioscience, 1999, 49: 109-117.
- [22] 胡婵娟, 郭雷. 植被恢复的生态效应研究进展[J]. 生态环境学报, 2012, 21(9): 1640-1646.
- [23] Tanaka S, Kobayashi T, Iwasaki K, et al. 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.
- [24] 曾祥国, 韩永超, 张庆华, 等. 不同浓度棉隆熏蒸对草莓土壤微生物多样性的影响[J]. 2018, 57(2): 42-45.
- [25] 陈丹梅, 陈晓明, 梁永江, 等. 轮作对土壤养分、微生物活性及细菌群落结构的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(12): 56-65.
- [26] 燕平梅, 乔宏萍, 赵文婧, 等. 溴甲烷熏蒸对土壤反硝化作用及 *nosZ* 型反硝化微生物群落结构的影响[J]. 微生物学报, 2015, 55(1): 73-79.
- [27] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(11): 1437-1445.
- [28] 吕宁, 石磊, 刘海燕, 等. 生物药剂滴施对棉花黄萎病及根际土壤微生物数量和多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2019, 30(2): 602-614.
- [29] 董先勤. 日光温室厌氧土壤灭菌不同添加物对土壤性质及微生物群落的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [30] 檀兴燕. 强还原土壤灭菌法缓解番茄连作障碍的效果及其土壤微生物群落的响应机制[D]. 淮北: 淮北师范大学, 2019.
- [31] Joseph B, Patra R R, Lawrence R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. International Journal of Plant Production, 2019, 30(2): 602-614.

- 2007, 1 (2): 141–152.
- [32] 伍朝荣, 林威鹏, 黄飞, 等. 土壤厌氧消毒对青枯病的控制及土壤细菌群落结构的影响 [J]. 土壤学报, 2018, 55(4): 987–998.
- [33] 边羽芊. 浅析枯草芽孢杆菌研究进展与应用 [J]. 科学技术创新, 2017 (30): 33–34.
- [34] Boer W D, Folman L B, Summerbell R C, et al. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development [J]. Fems Microbiology Reviews, 2010, 29: 795–811.
- [35] Ma A, Zhuang X, Wu J, et al. Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in arable soil [J]. Plos One, 2013, 8 (6): e66146.

Effects of different pharmaceutical treatments on microbial community of tomato continuous culture matrix

YAN Si-hua, WANG Hui-ru, LI Jian-she*, GAO Yan-ming (College of Agriculture Ningxia University, Yinchuan Ningxia 750021)

Abstract: In order to investigate the response of continuous cropping matrix microbial community to different disinfection agents, six treatments were set up in this study, including the combination of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (T1), Hymexazol and Chlorobromoisocyanurate (T2), Hymexazol and Copper acetate (T3), 2.2% Alcohol (T4), Formaldehyde (T5), and control with water treatment (CK). Based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing platform, the effects of different treatments on the composition and diversity of matrix bacterial and fungal communities were studied. The results showed that the diversity of host bacterial and fungal communities decreased after disinfection with different agents. Compared with CK, T4 treatment significantly decreased bacterial OTU sequence, richness index (Chao 1 and Ace index) and diversity index (Shannon index), T3 ~ T5 treatment significantly decreased fungal OTU sequence (40.87% ~ 47.49%), Chao 1 index (40.58% ~ 46.58%) and Ace index (41.16% ~ 46.51%). The relative abundance of Chloroflexi, Firmicutes, Actinobacteri, Proteobacteria and Ascomycota reached more than 10%. Compared with CK, the relative abundance of Firmicutes, Actinobacteri and Ascomycota increased in T5 treatment, the relative abundance of tolerant bacteria Bacillaceae in the Firmicutes phylum decreased slightly, and the relative abundance of Aspergillaceae in the Ascomycota increased by 29.14%, showing as T4>T5>T3>T2>CK>T1. This study showed that different agents disinfection changed the composition of continuous substrate bacterial and fungal community, reduced the diversity of flora, with the most obvious changes in Formaldehyde treatment.

Key words: drug disinfection; tomato soil-borne diseases; matrix microbial community; high-throughput sequencing