



研究报告

不同处理对高山凤头姜姜瘟病的防效及土壤细菌群落结构和功能的影响

胡洪涛¹ 朱志刚¹ 杨靖钟^{*1} 曹坳程^{*2} 颜冬冬²

1 湖北省生物农药工程研究中心 湖北 武汉 430064

2 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193

摘要:【背景】凤头姜是湖北西部山区来凤县著名的国家地理标志产品，但由于姜瘟病的流行且无经济有效的防控方法，导致其播种面积和总产值急剧下滑，姜瘟病已成为制约凤头姜产业振兴的关键因子。【目的】研究高山凤头姜姜瘟病防控技术及其对高山土壤微生态的影响。【方法】通过田间试验评价了棉隆土壤消毒(T1)、生防菌 34107 灌根(T2)、棉隆土壤消毒联合生防菌 34107 灌根(T3)、中生菌素灌根(T4)、对照(T5)等5种处理对高山凤头姜姜瘟病的防控效果。同时，提取了上述处理土壤基因组 DNA，利用 Illumina MiSeq 平台对细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区进行了高通量测序。【结果】在所有处理中，以 T3 处理对凤头姜姜瘟病的防效最好(96.1%)，高于 T1 (86.5%)，且显著高于 T2 (75.2%)和 T4 (54.8%) ($P<0.05$)。产量和纯收入以 T3 为最高，其次为 T1、T2 和 T4，而 T5 产量和纯收入最低且纯收入为负值。高通量测序共获得 608 070 条高质量的 16S rRNA 基因序列，简并后得到 9 243 个分类单元(operational taxonomic unit, OTU); 各处理土壤细菌在门水平群落结构与对照非常相似，但部分分类单元丰度发生较大改变。土壤细菌 α 多样性分析结果显示，T1–T4 处理 Shannon 和 Simpson 指数均显著高于 T5 ($P<0.05$)，而除 T2 处理外，其余 3 个处理 Chao1 指数均显著高于 T5 ($P<0.05$)；ACE 指数以 T3 处理最高，高于 T1 和 T4 处理、显著高于 T2 和 T5 处理($P<0.05$)。相比 T5，总共 25 个门水平的 OTU 丰度发生显著改变($P<0.05$)，且大部分丰度有所增加；总共有 159 个属水平的 OTU 发生显著性改变($P<0.05$)，其中 50.9%在 4 个处理中均发生显著性改变，仅有少数 OTU 在单个处理中改变显著性。丰度前 10 的属中，植物病原菌所属的雷尔氏菌属(*Ralstonia*)和软腐菌属(*Pectobacterium*)丰度在 T1–T4 中均显著下调($P<0.05$)，而有益菌，如芽孢杆菌属(*Gemmatimonas*)、放线菌(*Jatrophihabitans*)等则有不同程度的增加。土壤细菌 OTU 共映射到 6 055 个 KEGG 功能通路，其中与亚硝酸盐还原酶相关的通路在 4 个处理中均显著下调($P<0.05$)，与氮固定相关的通路则不同程度上调，与一氧化二氮还原酶相关的通路在 T3 和 T4 处理中下调而在 T1 和 T2 处理中上调。KEGG 功能通路富集到 41 个代谢通路模块，其中与氨基酸和碳水化合物代谢的丰度最高，且大部分在 T3 处理中丰度最高。【结论】棉隆土壤消毒联合生防菌 34107 处理能有效控制高山凤头姜姜瘟病，同时

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201606); Agricultural Innovation Team Project of Hubei Province (2019-620-000-001-27)

***Corresponding authors:** YANG Jing-Zhong: Tel: 86-27-59101919; E-mail: 398261011@qq.com
CAO Ao-Cheng: Tel: 86-10-62894863; E-mail: caoac@vip.sina.com

Received: 15-09-2019; **Accepted:** 05-12-2019; **Published online:** 27-12-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201606); 湖北省农业创新团队项目(2019-620-000-001-27)

***通信作者:** 杨靖钟: Tel: 027-59101919; E-mail: 398261011@qq.com

曹坳程: Tel: 010-62894863; E-mail: caoac@vip.sina.com

收稿日期: 2019-09-15; **接受日期:** 2019-12-05; **网络首发日期:** 2019-12-27

能增加土壤细菌微生物多样性和有益菌丰度, 本研究为高山土壤微生物生态修复及重建技术和理论的发展奠定了基础。

关键词: 凤头姜, 姜瘟病, 棉隆, 土壤消毒, 生物防控, 微生物多样性, KEGG 功能通路

Effect of treatments on bacterial wilt of ginger at high mountain area and soil bacterial community

HU Hong-Tao¹ ZHU Zhi-Gang¹ YANG Jing-Zhong^{*1} CAO Ao-Cheng^{*2}
YAN Dong-Dong²

1 Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan, Hubei 430064, China

2 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: [Background] Fengtou ginger is the famous national geographic hallmark product in Laifeng county in Western mountain of Hubei. Its cultural area was up to 3 400 hm²; however, due to the prevalence of bacterial wilt of ginger and without effective control methods, the cultural area is falling to current 740 hm². The bacterial wilt of ginger has become the key factor restricting the industrial development of Fengtou ginger. **[Objective]** In order to study the control of bacterial wilt of Fengtou ginger at high mountain and the impacts on soil microbial ecology of high mountain. **[Methods]** Through field experiments, the control effects of five treatments on bacterial wilt of Fengtou ginger were evaluated, including soil disinfection with dazomet (T1), root drenching with bio-control microbial strain 34107 (T2), soil disinfection combined with bio-control (T3), and root drenching with Zhongshengmycin (T4), and control (T5). Meantime, the soil genomic DNA in above treatments were extracted for high-through-put sequencing of V3–V4 regions of bacterial 16S rRNA gene by Illumina MiSeq platform. **[Results]** Among these treatments, the control effect of T3 on bacterial wilt of Fengtou ginger was the best (96.1%), which was greater than T1 (86.5%) and significantly greater than T2 (75.2%) and T4 (54.8%). The yield and economic profit of T3 were the most notable, followed by T1, T2 and T4, whereas that of T5 were the lowest and its economic profit was negative. High-through-put sequencing obtained 608 070 high-quality sequences of 16S rRNA gene, which were assembled into 9 243 OTU; The bacterial community structures at phylum level in different treatments were quite similar, while the abundance of a part of OTUs had greater changes. Analysis of soil bacterial alpha diversity indexes demonstrated that Shannon and Simpson indexes in T1 to T4 were significantly greater than T5 ($P<0.05$), while except for T2, the Chao1 indexes in the rest were significantly greater than T5 ($P<0.05$); The ACE index of T3 was the greatest, greater than T1 and T4 and significantly greater than T2 and T5 ($P<0.05$). Compared to T5, the total 25 OTUs at phylum level were significantly changed ($P<0.05$), and most of them were increased in abundance; the total 159 OTUs at genus level were significantly changed ($P<0.05$), of which 50.9% were common in all four treatments and only a few were detected in single treatment. Among top 10 most abundant genera, the genera *Ralstonia* and *Pectobacterium* containing plant pathogens were significantly downregulated ($P<0.05$), while beneficial bacteria, such as *Gemmatimonas* and *Jatrophihabitans*, were upregulated at different scales. The OTUs of soil bacteria were mapped to 6 055 KEGG functional pathways, of which the functional pathways related to nitrite reductase were significantly downregulated ($P<0.05$), the pathways related to nitrogen fixation were upregulated at different scales, and the pathway related to nitrous oxide reductase were downregulated in T3 and T4 but upregulated in T1 and T2. The KEGG pathways were enriched into 41 metabolic pathway modules, of which the abundance of the modules related to amino acid and carbohydrate metabolism were the greatest, and most were the highest in T3. **[Conclusion]** Dazomet soil disinfection combined with bio-control using strain 34107 was able to effectively control bacterial wilt of Fengtou ginger at high mountain, and it also can increase the microbial

diversity of soil bacteria and was benefit to recovery and restoration of soil microbial ecology.

Keywords: Fengtong ginger, Bacterial wilt of ginger, Dazomet, Soil disinfection, Biological control, Microbial diversity, KEGG functional pathways

姜瘟病是生姜细菌性青枯病(bacterial wilt of ginger)的俗称^[1-2],其发病快死亡率高、经济损失大。细菌性青枯病由于缺乏经济有效的防控措施,也被称为植物的“癌症”。细菌性青枯病病原为青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 青枯菌)^[3],该菌在世界上广为分布,能侵染 50 多个科 300 多种植物,其许多寄主是重要的经济作物,包括番茄、辣椒、茄子、烟草、马铃薯等^[4-5],鉴于该菌的危害性和所致经济损失严重,而被列为世界十大植物病原细菌之一^[6]。同时,该菌在我国大部分地区均有发现^[7],且寄主种类多,已成为我国农业可持续发展的关键制约因子。青枯菌主要习居于土壤,在逆境或缺乏寄主时,能以所谓的非可培养活细胞状(viable but not culturable, VBNC)存活^[8-9],据报道该菌在土壤中可存活长达 10 年之久。土壤带菌是生姜青枯病主要初侵染源,因此,消灭土壤中病原菌是防治生姜青枯病的关键。众多研究表明土壤消毒控制土传性病害效果最好,土壤消毒又称土壤熏蒸,是采用化学、物理、生物等方法^[10-14]杀灭土壤中有害生物,从而达到控制土传病虫害发生、保障农业生产可持续发展的目的。在所有土壤消毒的措施中,尤以化学药剂溴甲烷消毒效果最好,但因其对臭氧层破坏而被全球禁用,研究和开发溴甲烷的替代品成为控制土传性病害的关键^[11]。研究较多的溴甲烷替代品有氯化苦、棉隆等,其中棉隆因其毒性低、操作便利、环境友好等特性而在许多地方推广。棉隆在土壤中遇水能迅速分解成甲胺基甲基二硫代氨基甲酸酯,并进一步生成异硫氰酸甲酯^[11],从而杀灭土壤中有害生物,包括线虫、真菌、细菌和杂草等。尽管土壤消毒防治土传性病害的效果突出,但因其对土壤中的生物均有杀灭作用,对微生物的结构和功能有一定影响^[12],其应用一直备受争议。

众多的报道指出棉隆土壤消毒技术能有效控

制土传性病害的发生,如黄瓜根结线虫^[13]、番茄茎基腐病^[14]、根肿病^[15]等,但是绝大多数研究仅限于线虫或真菌病害,而对细菌性病害的防控效果研究较少,尤其是对生姜姜瘟病防治效果的研究不多,更缺乏高山生姜姜瘟病的防控效果的研究。凤头姜是湖北恩施州来凤县著名国家地理标志产品,曾经播种面积高达 3 400 hm²,然而由于长期连作,导致姜瘟病流行且无经济有效的防控措施,致使凤头姜大面积死亡,播种面积萎缩 80%,目前只有 740 hm²左右,姜瘟病已经成为制约凤头姜产业发展的关键因子。为科技支撑贫困山区产业发展、实现凤头姜产业振兴,我们通过田间试验评价棉隆土壤消毒、生物防控、土壤消毒联合生物防控、化学防控等方法对凤头姜姜瘟病防控效果,同时采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术评价不同处理对土壤细菌微生物多样性及其群落结构和功能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地点

试验地点位于湖北恩施州来凤县绿水镇周家湾村,试验田连续种植了 3 年生姜,上季姜瘟病发生较为严重。

1.2 主要试剂和仪器

土壤基因组试剂盒 FastDNA Spin Kit for Soil, 北京索莱宝科技有限公司; Q5 高保真 DNA 聚合酶, NEB 公司; 5×反应缓冲液、5×高 GC 缓冲液、dNTPs, Thermo Fisher Scientific 公司; TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit, Illumina 公司。

电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop 2000 微量分光光度计, 赛默飞公司; Illumina MiSeq 双端高通量测序平台, Illumina 公司。

1.3 试验处理

试验共 5 个处理,分别是 98%棉隆微粒剂土壤

消毒(T1)、生防菌 34107 (0.2 亿/mL 孢子青霉菌剂)灌根(T2)、98%棉隆微粒剂土壤消毒并联合生防菌 34107 灌根(T3)、3%中生菌素灌根(T4)和空白对照(T5)。98%棉隆微粒剂为江苏南通施壮化工有限公司所生产含量,土壤消毒方法按照 NY/T3129《棉隆土壤消毒技术规范》要求进行,用量为 450 kg/hm²,土壤处理时间为 2018 年 3 月 10 日,揭膜时间为 3 月 25 日,4 月 5 日栽姜。生防菌 34107 为湖北省生物农药工程研究中心试验样品,按照 600 kg/hm²量进行灌根,整个生长季共灌根 3 次,每次用量为 200 kg/hm²,时间分别为 5 月 10 日、6 月 8 日和 7 月 15 日。3%中生菌素为福建凯立生物制品有限公司生产,按 63 kg/hm²用量分 3 次进行灌根,时间同 T2 处理。每个处理设 3 个重复,每小区面积为 150 m²,小区随机排列。

1.4 结果调查

在生姜收获时(2018 年 9 月 30 日),按照 NY/T1464.31《农药田间药效试验准则第 31 部分:杀菌剂防治生姜姜瘟病》的要求调查姜瘟病病情指数,同时采集生姜根茎附近土壤用于提取土壤微生物总 DNA。

1.5 土壤细菌 16S rRNA 基因高通量测序

土壤总基因组 DNA 提取后,经 0.8%凝胶电泳和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检验合格后,对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行 PCR 扩增,扩增上游引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCA-3'),下游引物为 806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3')。PCR 反应体系(25 μ L):Q5 高保真 DNA 聚合酶 0.25 μ L, 5 \times 反应缓冲液 5 μ L, 5 \times 高 GC 缓冲液 5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 8.75 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物采用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库,然后采用 Illumina MiSeq 双端高通量测序平台进行测序。

1.6 数据分析

Illumina MiSeq 原始双端测序数据为 FASTQ 格

式,首先采用窗口滑动法对序列进行质量过滤,以 10 bp (base pair, 碱基)为窗口、1 bp 为步长进行滑动,窗口内的碱基质量要求大于或等于 Q20,且质量过滤后的序列长度大于 150 bp。经质量过滤的序列,采用 FLASH 软件进行双端拼接,要求重叠区大于或等于 10 bp 且无错配,并采用 QIIME 软件^[16]检查并剔除含有模糊碱基或嵌合体的序列。然后,采用 QIIME 软件中的 UCLUST 序列比对工具,将过滤后的序列与 GreenGenes 数据库中的 16S rRNA 基因序列进行比对,以 97%的相似性作为阈值进行 OTU 划分。

1.7 土壤细菌多样性计算

细菌多样性指数、Simpson、Chao1、ACE 和 Shannon 指数计算方法,分别参照文献[17-20]。

1.8 土壤细菌功能预测

采用 PICRUST^[21]方法对测序所得的土壤微生物 OTU 与数据库进行比对,然后映射到 KEGG^[22]数据库,对基因功能进行预测和分析。

1.9 统计学检验

使用 Mothur^[23]软件,调用 MetaStats^[7]的统计学算法对不同处理的细菌各分类单元的序列量差异进行两两比较检验。

2 结果与分析

2.1 不同处理对生姜青枯病防效、产量及经济效益分析

不同处理对生姜青枯病防效、产量及经济效益分析详见表 1。由表 1 可见,同对照(T5)比较,无论是棉隆消毒(T1)还是棉隆消毒联合生物菌剂(T3)等处理,均能显著降低凤头姜姜瘟病病情指数($P<0.05$),其中以 T3 处理病情指数最低(1.4)而校正防效最高(96.1%),其次为 T1 (病情指数 4.9,校正防效 86.5%),随后为 T2 (病情指数 9.1,校正防效 75.2%)和 T4 (病情指数 16.6,校正防效 54.8%),T3 和 T1 校正防效无显著差异($P>0.05$),但这二处理校正防效显著高于 T2 和 T4 ($P<0.05$)。

测产结果表明,以 T3 处理生姜产量最高

表 1 不同处理对生姜青枯病防效及经济效益分析

Table 1 Control effects of different treatments on bacterial wilt of ginger and profit analysis

处理 Treatments	病情指数 Disease index	校正防效 Control efficacy (%)	产量 Yield (kg/hm ²)	产值 Total income (Yuan/hm ²)	药剂成本 Pesticide cost (Yuan/hm ²)	种姜、化肥、人工成本 Seed ginger, fertilizer and labor cost (Yuan/hm ²)	纯收入 Net income (Yuan/hm ²)
T1	4.9±1.0ab	86.5±1.9a	28 043±537.8b	157 040.8±3 011.9b	25 500	35 100	104 690.8±3 011.8b
T2	9.1±2.6bc	75.2±3.9b	21 383.5±1 388.1c	119 747.6±7 773.3c	4 860	43 350	79 787.6±7 773.3c
T3	1.4±0.3a	96.1±1.3a	32 427.5±750.7a	181 594±4 203.8a	30 360	35 100	116 134.0±4 203.8a
T4	16.6±4.9cd	54.8±8.2c	13 971±903.8d	78 237.6±5 061.2d	6 300	43 350	30 762.6±5 061.2d
T5	36.3±5.5e	/	3 204.5±498.9e	17 945.2±2 793.7e	/	43 350	-25 404.8±2 793.7e

注: T1 和 T3 处理由于无需人工除草, 扣除人工除草费用 8 250 Yuan/hm²; 不同小写字母表示各处理在 0.05 水平上表达差异显著。/: 无。
 Note: Because the treatments of T1 and T3 had no need to control weed by labor, the labor cost of 8 250 Yuan/hm² for weed control was deducted; the lowercase letters represented significant difference at 0.05 level. /: No data.

(32 427.5 kg/hm²), 显著高于其他 3 个处理($P<0.05$); 其次为 T1 处理(28 043 kg/hm²), 显著高于 T2 (21 383.5 kg/hm²)和 T4 处理(13 971 kg/hm²) ($P<0.05$)。以 T3 处理产值最高(181 594 Yuan/hm²), 显著高于其他 3 个处理; T1 处理产值次之(157 040.8 Yuan/hm²), 随后为 T2 处理(119 747.6 Yuan/hm²)、最低为 T5 处理(17 945.2 Yuan/hm²)。扣除药剂、种姜等成本, 以 T3 处理纯收入最高, 为 116 134.0 Yuan/hm², 显著高于 T1 (104 690.8 Yuan/hm²)、T2 (79 787.6 Yuan/hm²) 和 T4 处理(30 762.6 Yuan/hm²), 而 T5 处理产量最低而纯收入为-25 404.8 Yuan/hm²。

2.2 高通量测序与 OTU 划分与鉴定

Illumina MiSeq 测序数据经剔除低质量序列后, 共得到 608 070 条高质量细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 序列, 平均每个文库的序列量为 40 538±4 802 条, 99.8% 的序列长度在 400-450 bp 之间。通过序列比对和 OTU 划分, 共得到 9 243 个 OTU, 其中 543 (5.87%) OTU 为 5 个处理所共有, 592-1 238 个 OTU 仅在单个处理检出, 约占总量的 6.40%-13.39%。

不同处理土壤细菌在门水平的分类学组成见图 1。由图 1 可见, 不同处理的土壤细菌在门水平的组成非常类似, 均以变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)相对丰度为最高, 3 个门总相对丰度达到 56.6%-73.8%。相对于 T5, 各处理变形菌门的相对丰度较对照均大幅下降, 幅度为 41.8%-49.3%, 且

在 T2、T3 和 T4 处理中显著下降($P<0.05$); 而酸杆菌门在 T1-T4 处理中均显著增加($P<0.05$), 增幅为 178.6%-401.6%。除 T2 外, 放线菌门其余处理中的相对丰度均大幅增加, 增加幅度为 13.5%-46.8%, 但除 T3 外, 其余处理与 T5 比较差异不显著 ($P>0.05$)。

2.3 不同处理对土壤细菌 α 多样性的影响

不同处理对土壤细菌 α 多样性的影响见图 2。Simpson 指数以 T3 (0.997 7)和 T1 处理(0.997 2)为最高, 显著高于 T4 (0.995 7)、T2 (0.995 4)和 T5 处理(0.973 0)。Chao1 指数以 T3 (3 223)为最高, 与 T1 (2 950)

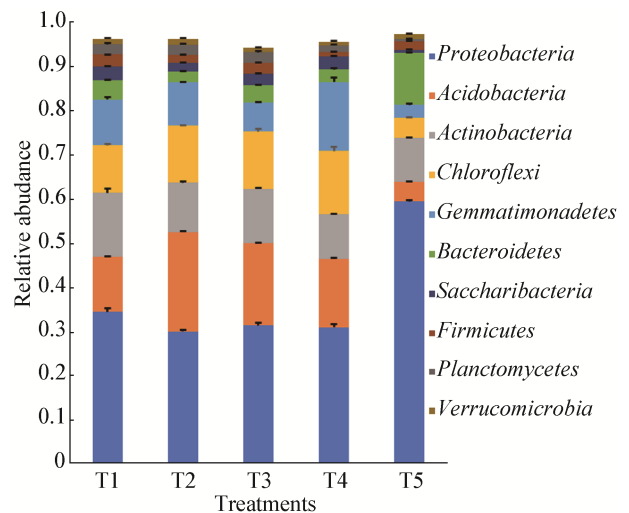


图 1 不同处理土壤细菌在门水平组成
 Figure 1 Composition of soil bacteria in different treatments

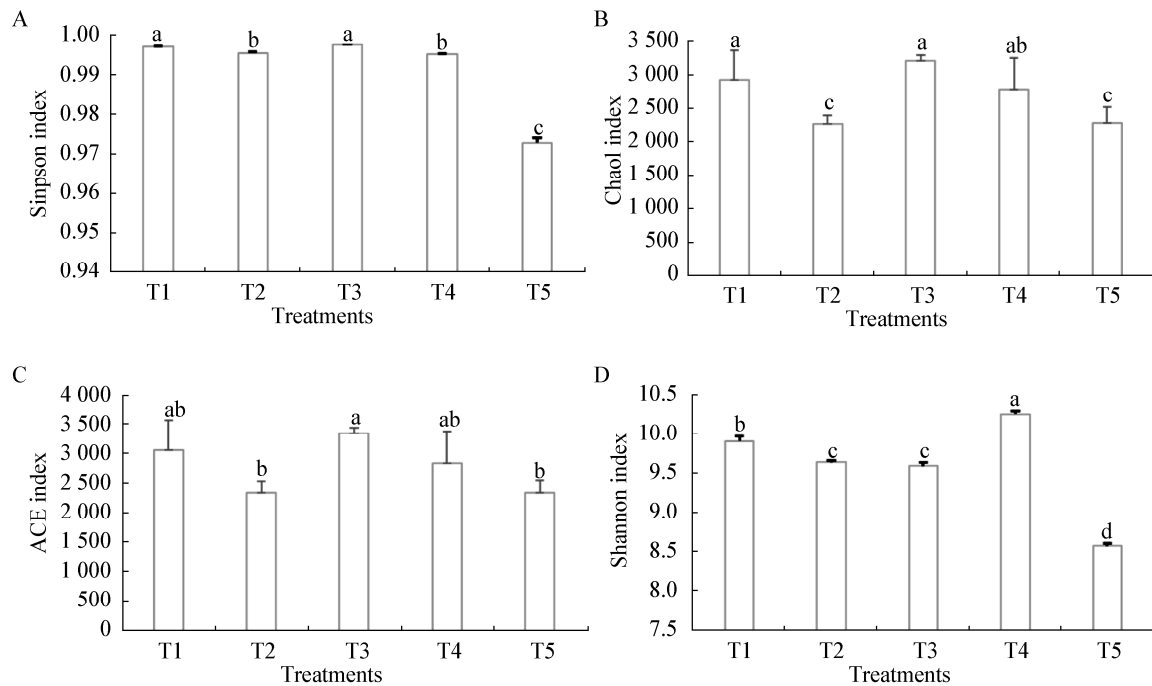


图2 不同处理土壤细菌 α 多样性

Figure 2 The alpha diversity of soil bacteria in the soils by different treatments

注: A、B、C 和 D 分别是 Simpson、Chao1、ACE 和 Shannon 指数; 图中相同字母代表在 0.05 水平无显著性差异, 而不同字母代表显著性差异。

Note: A, B, C and D represent Simpson, Chao1, ACE and Shannon indexes, respectively; The same letters in the figures represent no significant difference at 0.05 level, while different letters represent significant differences.

和 T4 处理(2 801)无显著性差异($P>0.05$), 但显著高于 T2 (2 284)和 T5 (2 299) ($P<0.05$)。ACE 指数也是 T3 处理(3 363.2)为最高, 其次为 T1 (3 069.4)、T4 (2 847.3)、T5 (2 354.6)和 T2 (2 351.4)。Shannon 指数以 T4 处理(10.26)为最高, 显著高于 T1 (9.91)、T2 (9.64)和 T3 (9.60)处理($P<0.05$), 且 T1-T4 处理 Shannon 指数均显著高于 T5 处理($P<0.05$)。

2.4 不同处理对土壤细菌群落结构和组成的影响

采用 MetaStats 方法, 对不同处理土壤中细菌丰度变化进行了两两比较, 不同处理对土壤细菌在门水平的影响详见图 3。同 T5 比较, 共有 25 个门水平的 OTU 发生显著性改变(图 3A), 根据其表达趋势, 可以分为 4 个不同的组(C1、C2、C3 和 C4)。C1 组包含 4 个门水平 OTU (*Chloroflexi*、*Gemmatimonadetes*、*Actinobacteria* 和 *Acidobacteria*),

均相对于 T5 丰度增加(图 3B); C2 组包含 4 个门水平 OTU (*Firmicutes*、*Planctomycetes*、*Nitrospirae*、*Saccharibacteria*), 其丰度相对 T5 也明显增加(图 3C); C3 组包含 13 个门水平 OTU (*Chlorobi*、*Elusimicrobia*、*Latescibacteria*、FCPU426、GAL15、*Chlamydiae*、TM6_(*Dependentiae*), WS2、BRC1、*Euryarchaeota*、*Lentisphaerae*、*Armatimonadetes*、*Parcubacteria*), 相对于 T5 丰度也明显增加(图 3D); C4 组包含 4 个门水平 OTU (*Fibrobacteres*、*Cyanobacteria*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*), 其丰度相对于 T5 明显下降(图 3E)。

MetaStats 分析两两比较结果发现, 总共 159 个属水平的 OTU 丰度发生显著改变($P<0.05$) (表 2)。各处理(T1-T4)相对与对照(T5), 分别有 125 (78.6%)、119 (74.8%)、120 (75.5%)、124 (78.0%)个属水平的 OTU 发生显著变化(表 2); 其中分别有 63 (39.6%)、

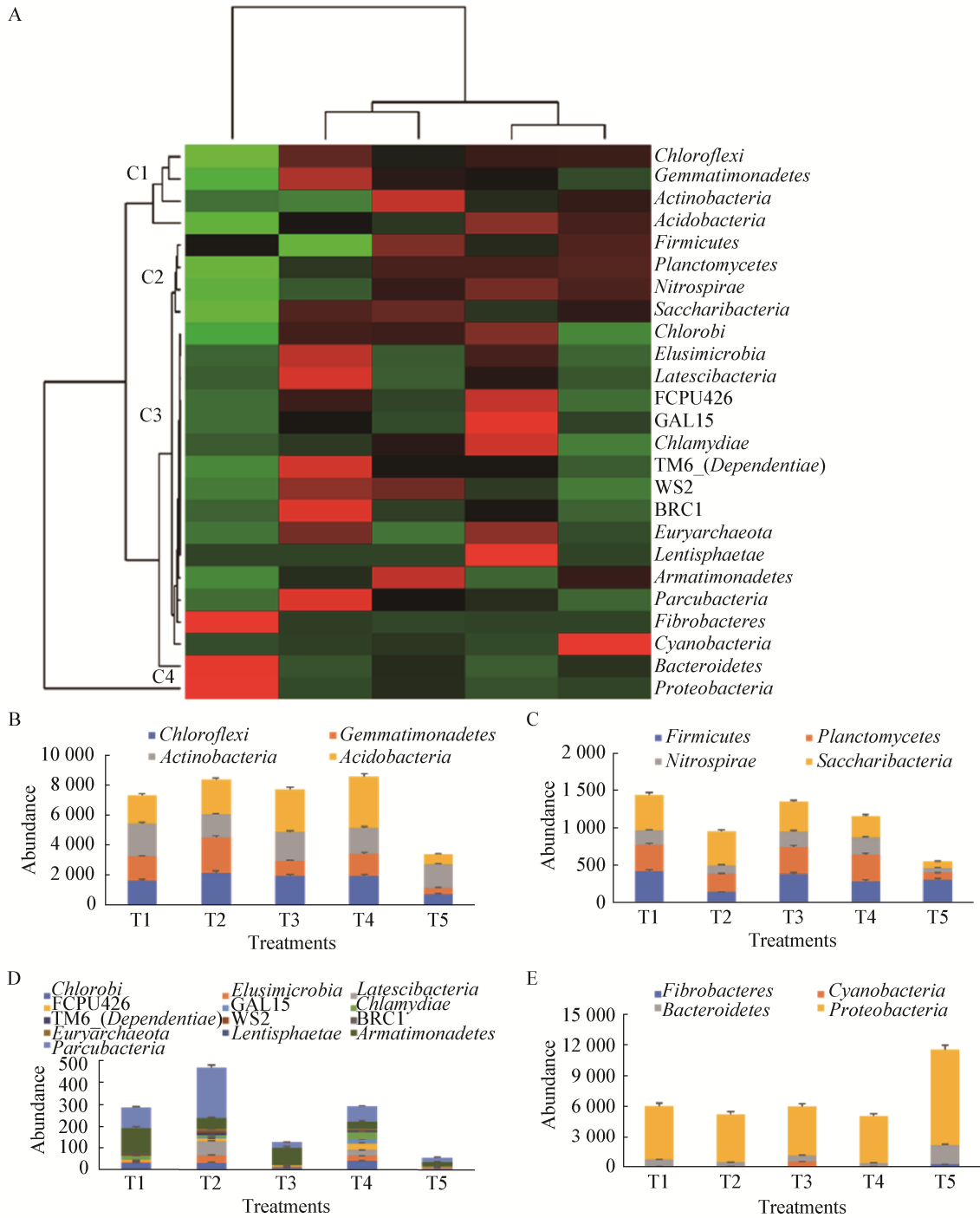


图 3 不同处理土壤细菌丰度发生显著性改变的在门水平 OTU

Figure 3 OTUs at phylum level of soil bacteria whose abundances were significantly changed in different treatments

注: A: 热图显示土壤细菌丰度发生显著改变的在门水平 OTUs; B-D: C1-C4 组中不同处理细菌门水平 OTU 丰度; 图中颜色代表 OTU 丰度, 红色丰度高、绿色丰度低。

Note: A: Heat map exhibiting OTUs of soil bacteria at phylum level that were significantly changed; B to D: The abundance of bacterial OTUs in different treatments in clades C1 to C4, respectively; The colors represent the OTU abundance: Red and green representing higher and lower abundances, respectively.

表 2 不同处理土壤细菌属水平 OTU 丰度发生显著改变的数量

Table 2 Numbers of OTUs at the genus level significantly changed in different treatments

两两比较	上调	下调	总数
Paired comparison	Upgraded	Down graded	Total
T1 vs T5	63	62	125
T2 vs T5	55	64	119
T3 vs T5	64	56	120
T4 vs T5	59	65	124
共同 Common			81

55 (34.6%)、64 (40.3%)、59 (37.1%)个 OTU 显著上调, 62 (39.0%)、64 (40.3%)、56 (35.2%)、65 (40.9%)个 OTU 显著下调。

发生显著改变属水平 OTU 交集详见图 4。在 T1-T4 处理中, 分别仅有 4 (2.5%)、3 (1.9%)、7 (4.4%) 和 5 (3.1%)个 OTU 其丰度仅在单个处理中显著性改变; 7 (4.4%)、7 (4.4%)、7 (4.4%)、6 (3.8%)、4 (2.5%)个 OTU 分别在 T1-T2、T1-T3、T1-T4、T2-T3、T3-T4 处理中同时发生显著性改变; 有 1 (0.6%)、12 (7.5%)、6 (3.8%)、8 (5.0%)分别同时在 T1-T2-T3、T1-T2-T4、T1-T3-T4、T2-T3-T4 中发生显著性改变; 而有 81 (50.9%)个 OTU 在 4 个处理中均发生显著改变(图 4)。

发生显著改变的属水平前 10 位 OTU 丰度详见图 5。在 T1-T4 等 4 个处理中, 6 个属水平 OTU (*Ralstonia*、*Pectobacterium*、*Cellvibrio*、*Flavobacterium*、*Arthrobacter*、*Arcobacter*)均显著下调($P < 0.05$), 其中 *Ralstonia*、*Pectobacterium* 和 *Arcobacter* 包含了青枯病、软腐病、动物菌血症病原菌, 而其余 4 个属 OTU (*Sphingomonas*、*Mizugakiibacter*、*Gemmatimonas*、*Jatrophihabitans*)相对于对照则有不同程度的增加。

2.5 不同处理对土壤细菌群落功能的影响

对土壤微生物基因功能进行分析, 细菌 OTU 共映射到 6 055 个 KEGG 通路, 其中与氮代谢相关基因和蛋白质的功能通路丰度详见图 6。同 T5 比

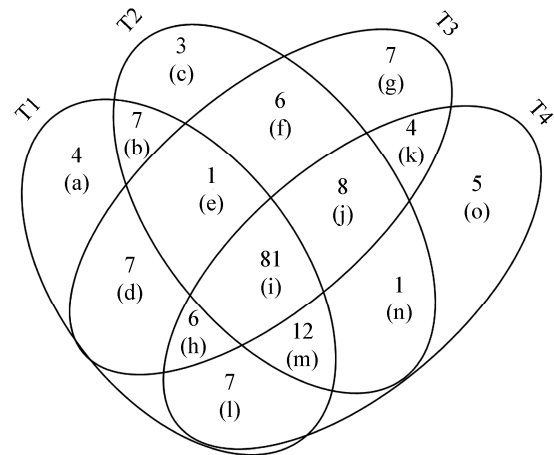


图 4 不同处理中属水平发生显著改变的 OTU 交集

Figure 4 The intersection of OTUs at the genus level that were significantly changed in different treatments

Note: The lowercase letters in the figure represented different intersections; The numbers represented the amount in corresponding intersections. a (T1): *Mesorhizobium*, *Pusillimonas*, *Sporocytophaga*, *Jeotgalicoccus*; b (T1∩T2): *Blastococcus*, *Rhodoplanes*, *Nakamurella*, *Massilia*, *Chryseobacterium*, *Aquamicrobium*, *Luedemannella*; c (T2): *Gaiella*, *Nocardioides*, *RB41*; d (T1∩T3): *Modestobacter*, *Aquincola*, *Undibacterium*, *Crenotalea*, *Conyzicola*, *Asticcacaulis*, *Devosia*; e (T1∩T2∩T3): *Sorangium*, *Actinospica*, *Micromonospora*, *Singulisphaera*, *Dyella*, *Granulicella*; f (T2∩T3): *Noviherbaspirillum*, *Phormidium*, *Arthronema*, *Rhizobium*, *Roseateles*, *Mucilagibacter*; g (T3): *Lysinimonas*, *Heliimonas*, *Minicystis*, *Spirosoma*, *Bryum_argenteum_var_argenteum*, *Streptomyces*, *Chthonobacter*; h (T1∩T3∩T4): *Sorangium*, *Actinospica*, *Micromonospora*, *Singulisphaera*, *Dyella*, *Granulicella*; i (T1∩T2∩T3∩T4): *Reyranelia*, *Anaerolinea*, *Brevundimonas*, *Burkholderia-Paraburkholderia*, *Haliangium*, *Flavitalea*, *Isosphaera*, *Pseudomonas*, *Hydrogenophaga*, *Sphingobacterium*, *Ralstonia*, *Opitutus Pedobacter*, *Acidobacterium*, *Leptospirillum*, *Acidothermus*, *Pseudorhodofera*, *Delftia*, *Microbacterium*, *Hamadaea*, *Gemmatirosa*, *Verrucosispora*, *Variibacter*, *Jatrophihabitans*, *Polycyclovorans*, *Terrabacter*, *Lachnoclostridium_5*, *Kaistia*, *Nitrolancea*, *Comamonas*, *Fluviicola*, *Arcobacter*, *Stenotrophomonas*, *Caulobacter*, *Citrobacter*, *Luteimonas*, *Conexibacter*, *Tahibacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Nannocystis*, *Azospirillum*, *Candidatus_Solibacter*, *Bdellovibrio*, *Pseudolabrys*, *Leucobacter*, *Bryobacter*, *Roseiarcus*, *Mizugakiibacter*, *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *H16*, *Acidovorax*, *Anaeromyxobacter*, *Siphonobacter*, *Cellvibrio*, *Geodermatophilus*, *Gemmatimonas*, *Rhizomicrobium*, *Nubsella*, *Pseudoclavibacter*, *Inhella*, *Hermiimonas*, *Aquicella*, *Bacteriovorax*, *Myroides*, *Lachnospiraceae_NC2004_group*, *Streptacidiphilus*, *Leadbetterella*, *Acidibacter*, *Aeromonas*, *Rhodanobacter*, *Escherichia-Shigella*, *Phenyllobacterium*, *Nitrobacter*, *Paenarthrobacter*, *Enterobacter*, *Sediminibacterium*, *Pectobacterium*, *Catenulispora*, *Acidicaldus*; j (T2∩T3∩T4): *Xanthomonas*, *Pseudohongiella*, *Candidatus_Koribacter*, *Enterococcus*, *agricultural_soil_bacterium_SC-I-84*, *CL500-29*, *Roseiflexus*, *Achromobacter*; k (T3∩T4): *Mycobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Lapillicoccus*, *Methylobacterium*; l (T1∩T4): *Ochrobactrum*, *Sphingobium*, *Ottowia*, *Pseudarthrobacter*, *Variovorax*, *Pantoea*, *Caenimonas*; m (T1∩T2∩T4): *SM1A02*, *Prosthecoabacter*, *Acinetobacter*, *Iamia*, *Parcubacteria_group_bacterium_GW2011_GW1_60_11*, *Duganella*, *Arenimonas*, *Bacillus*, *Bosea*, *Dongia*, *Dyadobacter*, *Paludibacterium*; n (T2∩T4): *Nitrospira*; o (T4): *Sphingopyxis*, *Cytophaga*, *Persicitalea*, *Holophaga*, *Ensifer*.

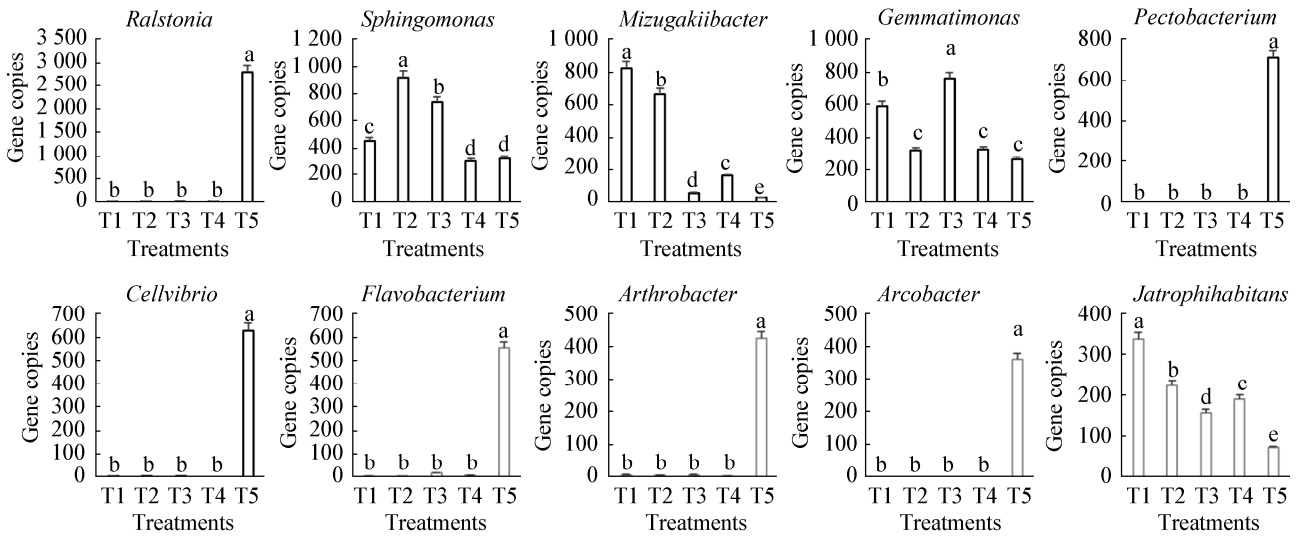


图 5 前 10 位丰度显著改变的属水平 OTU

Figure 5 Top 10 OTUs at genus level that were significantly changed

注: 图中相同字母代表在 0.05 水平无显著性差异, 而不同字母代表显著性差异。

Note: The same letters in the figures represent no significant difference at 0.05 level, while different letters represent significant difference.

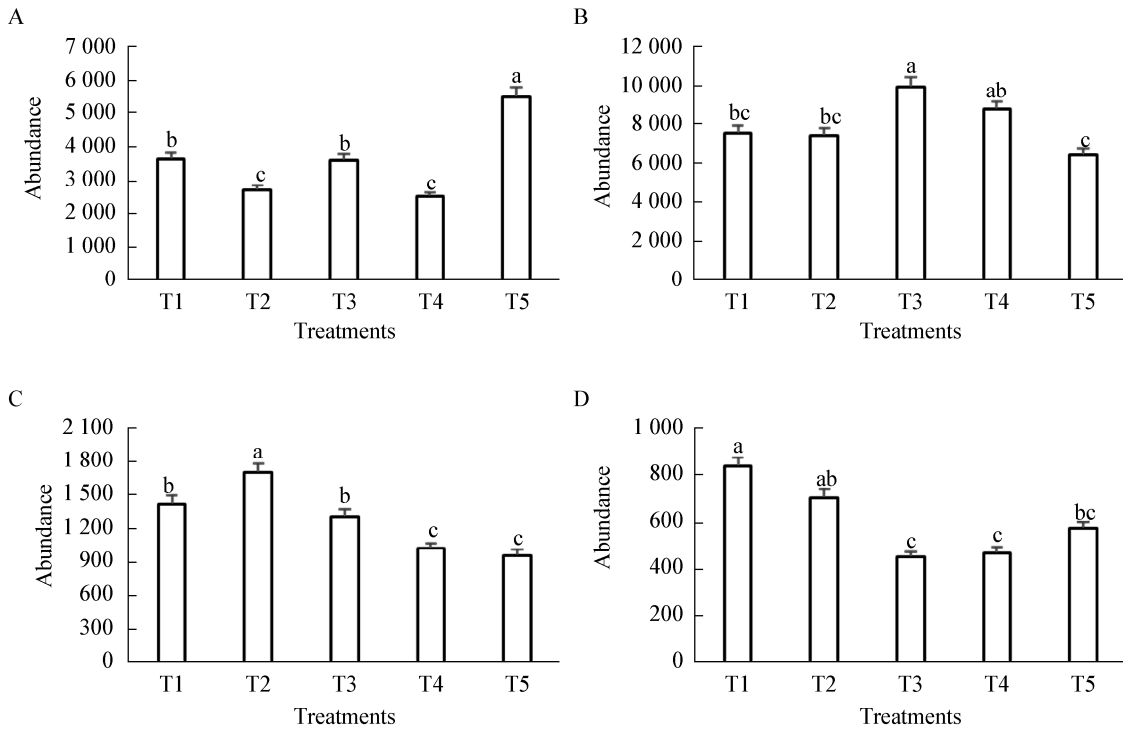


图 6 不同处理对土壤细菌氮代谢相关 KEGG 功能通路丰度

Figure 6 The abundance of KEGG pathways of soil bacteria related to nitrogen metabolism in different treatments

Note: A: Nitrite reductase; B: Nitrogen fixation protein; C: Nitrogenase; D: Nitrous oxide reductase.

较, T1-T4 处理能有效减少亚硝酸盐还原酶功能通路的丰度($P<0.05$), 以 T4 处理的丰度减少最多(54.2%), 其次为 T2 (50.6%)、T3 (34.1%)、T1 (33.4%)。固氮蛋白功能通路丰度在 4 个处理中均有不同程度增加, 以 T3 处理增加最多(53.7%), 其次为 T4 处理(35.3%)、T1 (16.7%)、T2 (15.2%)。固氮酶功能通路丰度在 T1-T3 处理中显著增加($P<0.05$), 以 T2 增幅最大(76.3%), 显著高于其他处理($P<0.05$), 而 T4 处理与 T5 无显著差异($P>0.05$)。一氧化二氮还原酶功能通路在 T3 和 T4 处理中减少, 而在 T1 和 T2 中有不同程度增加。

这些功能通路富集到 41 个 KEGG 代谢通路模

块(图 7), 分属于 7 类调控网络: 细胞的过程(cellular process)、环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、人类疾病(human diseases)、代谢(metabolism)、器官系统(organismal systems)、未分类(unclassified)。在 41 个代谢通路模块中, 以与氨基酸代谢(amino acid metabolism)和碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)丰度最高, 膜转运(membrane transport)次之, 而以细胞通讯(cell communication)和感应系统丰度最低(sensory system)。大部份代谢模块丰度在 T3 中最高、T1 次之, 而在其他几个处理中相对较低。

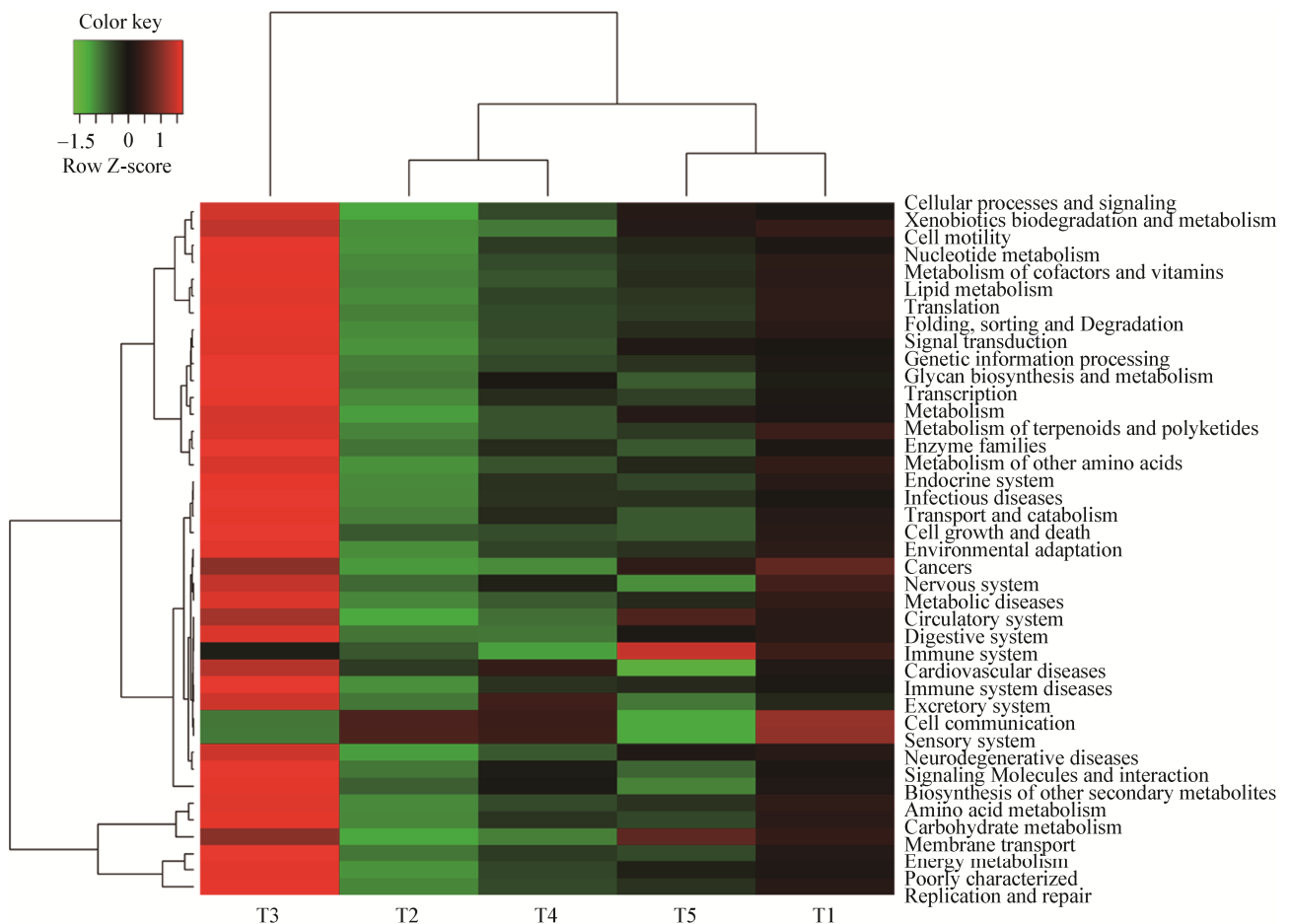


图 7 不同处理土壤细菌 KEGG 代谢通路模块丰度

Figure 7 The abundance of KEGG metabolic pathways of soil bacteria in different treatments

注: 图中颜色代表通路模块丰度, 红色丰度高、绿色丰度低。

Note: The colors represent the abundance of pathway modules; red and green representing higher and lower abundances, respectively.

3 讨论与结论

生姜是我国乃至东南亚地区广为种植的蔬菜品种之一,在我国南北均广泛种植,并在栽培过程中逐渐形成多个各具特色的名优地方品种。凤头姜作为湖北山区来凤县的名牌地理标志产品,栽培历史长达300多年,以其富硒多汁、无筋嫩脆、营养丰富而成为全国名产,产量曾高达 4.5×10^7 kg,是贫困山区的农业产业支柱。由于长时间连作,姜瘟病在产区流行,导致生姜大面积死亡,为抑制姜瘟病的发生,当地多采用水旱轮作模式,即种植一季水稻,来年种植一季生姜,从而规避姜瘟病的暴发。然而,种植水稻经济收入较低、拉低整体经济收入,且水旱轮作对姜瘟病抑制效果有限,导致凤头姜种植面积急剧下滑约80%,产业发展受到极大限制,解决姜瘟病防控难题已成为山区产业发展和乡村振兴的关键。

姜瘟病的防控方法通常可分为生物防控、化学防控、土壤消毒等,在我国正式登记的防治姜瘟病的药剂有5种,包括3种化学药剂(氢氧化铜、噻森铜、硫酸铜)和2种生物药剂(蜡质芽孢杆菌和多粘芽孢杆菌)^[24],但实践中应用并不多。也有报道称采用太阳能消毒辅以钙肥或地衣芽孢杆菌能有效降低土壤青枯菌种群数量,防治效果接近100%^[25]。凤头姜一般在春季4月5日前后种植,但此时且恰逢山区春季多雨季、阳光少,无法实施太阳能消毒。尽管土壤消毒在平原或设施蔬菜种植区域应用效果较好,但是山区具有与平原地区迥然不同的土壤性质和气候环境,土壤消毒能否在山区应用仍待实践检验。我们曾利用棉隆成功防治高山甘蓝根肿病的研究、证明了高山地区使用棉隆土壤消毒的可行性^[15]的基础上,继续尝试采用棉隆防治高山凤头姜姜瘟病。试验结果显示,采用棉隆土壤消毒结合生物防治,能有效地防治凤头姜姜瘟病,防治效果达到96.1%,高于棉隆防效、显著高于生物和化学防控防效,产量是中生菌素处理2倍多,同时经济效益相当显著,并且田间基本不用人工除草,节约大量劳动力投入。

化学药剂土壤消毒是一种灭生性的方法,对土壤生物靶标无选择性,这导致其一直饱受争议,实际应用也受到限制。为阐明土壤消毒对高山生姜土壤微生态的影响,我们采用Illumina MiSeq方法研究不同处理条件下土壤微生物群落结构和功能的变化。结果发现,无论是土壤消毒、还是生物防控或是化学防控,其土壤微生物群落结构非常相似(图1),其中有益菌数量如放线菌等,在土壤消毒处理中反而较单纯生物防控有大幅增加,说明无论是生物或化学方法,对高山生姜土壤细菌群落的影响相似,且土壤消毒有利于土壤有益菌的累积。 α 多样性是衡量土壤微生物多样性的关键指标,同对照比较,4种处理土壤中几乎所有4种 α 多样性指数均有不同程度增加(图2),其中棉隆消毒联合生物防控处理的Chao1和ACE指数最高,显示4种处理土壤微生物多样性均有不同程度改善,其中棉隆土壤消毒联合生物防控微生物群落丰富度最高,说明该处理最有利于土壤微生态恢复。相对于对照,有25个门水平OTU发生显著变化,其中多数丰度为显著增加(图3),提示4种处理均有利于土壤微生物种群的恢复。属水平OTU有159个发生显著改变,其中50.9%在4个处理中均显著上调或下调,尤其是青枯菌所属的雷尔氏菌属(*Ralstonia*)的丰度在各处理中显著下调,显示各处理能有效降低土壤青枯菌病原的数量(图5),而同时生姜姜瘟病的病情指数相对于对照也有显著降低(表1),说明土壤中的青枯菌的数量与病情指数之间存在着内在的联系,而降低土壤青枯菌数量对防控青枯病起到积极和关键的作用。除此之外,土传性软腐病原菌所属的软腐菌属(*Pectobacterium*)、动物菌血症所属的*Acrobacter*的丰度也显著下调(图5),说明这4个处理对环境中的病原菌有明显的抑制作用,提示这些方法有可能应用于防控其他土传性病害。另外,在对照土壤中,青枯菌与软腐菌的丰度都较高,提示这两种菌可能存在着相互作用,促进姜瘟病的发生与发展。相对于病原菌,土壤有益菌包括芽孢杆菌属(*Gemmatimonas*)、放线菌(*Jatrophihabitans*)等,则

丰度显著增加,说明各处理土壤微生态朝健康方向发展。所有处理土壤中亚硝酸还原酶功能通路丰度均显著降低;棉隆土壤消毒结合生物防控和中生菌素处理土壤固氮蛋白功能通路丰度均显著增加;除中生菌素处理外,固氮酶功能通路丰度均显著增加,而一氧化二氮还原酶在棉隆结合生物防控和中生菌素处理中显著下调、在棉隆和生物防控处理中上调。由于亚硝酸盐还原酶和一氧化二氮还原酶参与了氮的反硝化过程^[26],而固氮蛋白和固氮酶参与氮的固定,这显示不同处理潜在的影响着土壤氮的转化和利用,棉隆消毒联合生物防控生姜产量增加明显,有可能是抑制氮的反硝化作用,而增强固氮作用,从而提高氮的利用率,最终导致产量显著增加。

土壤微生物是土壤生态的有机组分,在物质循环、植物生长等过程中扮演着关键作用。然而长期连作会破坏土壤团粒结构,导致土壤理化性质恶化、植物自毒物质积累、土壤微生物多样性丧失、病原菌积累,从而导致连作障碍的发生^[27]。连作条件下,土壤微生物丰富度和均匀度均显著降低,通过人工干预改变土壤环境,如增施生物有机肥^[28]、施用有益菌^[29]等,能有效改善土壤微生态区系、减轻土传性病害的发生,在一定程度上抑制连作障碍。随着研究深入,研究者逐渐认识到土壤微生物组在控制土传性病害引起的作物连作障碍中的关键作用^[30],治理土传性病害引起的连作障碍必须恢复和重建土壤健康生态环境。尽管土壤消毒在短时间内造成土壤生物多样性的丧失,但大约在数周至数月内,土壤微生物区系自然恢复,同时土壤有害生物数量显著减少、有益菌显著增加,土壤微生物区系和群落结构并无显著改变^[14-15],显示土壤消毒有利于土壤微生物组的修复与重建。在土壤消毒同时,增施生物有机肥或有益菌或许能更快的促进微生物区系恢复与重建。因此,结合本研究结果,实行棉隆土壤消毒与生物防控相结合的方法,防控高山生姜姜瘟病的发生具有较好的经济可行性和环境生态效应。本研究首次采用棉隆土壤消毒结合生

物防控措施治理高山生姜姜瘟病连作障碍,防效和经济效益显著,同时发现,该措施有利于土壤微生态恢复和与重建,这为土壤微生态修复技术和理论发展提供了重要的支撑。

REFERENCES

- [1] Zhang GM, Fan GQ, Zhu HC, et al. Study on the pathogen of the ginger wilt disease in Shandong[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2001, 32(4): 418-422 (in Chinese)
张广民, 范国强, 朱汉城, 等. 山东姜瘟病原菌的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(4): 418-422
- [2] Zhu L, Gao SP, Zhang J, et al. The isolation and identification of ginger blast pathogen *Pseudomonas solanacearum*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(7): 1997-1999 (in Chinese)
朱丽, 高淑萍, 张杰, 等. 姜瘟致病菌青枯罗尔斯顿氏菌的分离鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(7): 1997-1999
- [3] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6790-6801
- [4] Zheng XF, Liu B, Zhu YJ, et al. Bacterial community diversity associated with the severity of bacterial wilt disease in tomato fields in southeast China[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, 65(7): 538-549
- [5] Zhou XJ, Wang J, Yang YW, et al. Advances in tobacco bacterial wilt disease[J]. Microbiology China, 2012, 39(10): 1479-1486 (in Chinese)
周训军, 王静, 杨玉文, 等. 烟草青枯病研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(10): 1479-1486
- [6] Yuliar, Nion YA, Toyota K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Microbes and Environments, 2015, 30(1): 1-11
- [7] Jiang GF, Wei Z, Xu J, et al. Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1549
- [8] Milling A, Meng FH, Denny TP, et al. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2[J]. The American Phytopathological Society, 2009, 99(10): 1127-1134
- [9] Yu XL, Xu J, Zhang H, et al. Rapid detection of viable but non-culturable (VBNC) *Ralstonia solanacearum* by PMA-PCR method[J]. Plant Protection, 2016, 42(1): 144-149 (in Chinese)
于小龙, 徐进, 张昊, 等. PMA-PCR 方法快速检测 VBNC 状态青枯菌[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 144-149
- [10] Wang QX, Yan DD, Wang XL, et al. Research advances in

- soil fumigants[J]. *Journal of Plant Protection*, 2017, 44(4): 529-543 (in Chinese)
王秋霞, 颜冬冬, 王献礼, 等. 土壤熏蒸剂研究进展[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(4): 529-543
- [11] Cao AC, Liu XM, Guo MX, et al. Incidences of soil-borne diseases and control measures[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(2): 6-16 (in Chinese)
曹焯程, 刘晓漫, 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
- [12] Li QJ, Fang WS, Yan DD, et al. Research progress on the effect of fumigants on soil microorganisms[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2019, 21(5/6): 780-786 (in Chinese)
李青杰, 方文生, 颜冬冬, 等. 熏蒸剂对土壤微生物的影响研究进展[J]. *农药学报*, 2019, 21(5/6): 780-786
- [13] Zhang J, Xia MC, Liu HY, et al. Efficacy of dazomet fumigation and bioorganic fertilizer in integrated control of cucumber root-knot nematode[J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46(4): 824-831 (in Chinese)
张洁, 夏明聪, 刘红彦, 等. 低剂量棉隆熏蒸联合生物菌肥防治黄瓜根结线虫病的应用效果[J]. *植物保护学报*, 2019, 46(4): 824-831
- [14] Wang GY, Guo WL, Chen BH, et al. Effects of combined application of dazomet and bio-bacterial fertilizer on growth, yield, diseases, pests and weeds of plastic house autumn tomato[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(2): 48-52 (in Chinese)
王广印, 郭卫丽, 陈碧华, 等. 棉隆及与生物菌肥配施对大棚秋番茄生长、产量及病虫害的影响[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(2): 48-52
- [15] Hu HT, Zhu ZG, Jiao ZJ, et al. Effects of soil disinfection by dazomet on control efficacy of cabbage clubroot disease and soil fungal communities in high mountain area[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(3): 25-31 (in Chinese)
胡洪涛, 朱志刚, 焦忠久, 等. 棉隆土壤消毒对高山甘蓝根肿病的防效及土壤真菌群落的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(3): 25-31
- [16] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [17] Simpson EH. Measurement of diversity[J]. *Nature*, 1949, 163(4148): 688
- [18] Chao AN. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, 11(4): 265-270
- [19] Chao AN, Ma MC, Yang MCK. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates[J]. *Biometrika*, 1993, 80(1): 193-201
- [20] Shannon CE. A mathematical theory of communication[J]. *The Bell System Technical Journal*, 1948, 27(3): 379-423
- [21] Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821
- [22] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1): 29-34
- [23] White JR, Nagarajan N, Pop M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. *PLoS Computational Biology*, 2009, 5(4): e1000352
- [24] Xue YR, Bu YQ, Liu CH, et al. Control effect and correct using methods of registered pesticides against ginger rot disease in China[J]. *China Vegetables*, 2019(4): 91-95 (in Chinese)
薛雅蓉, 卜元卿, 刘常宏, 等. 我国姜腐烂病登记农药的防病效果和正确使用的方法[J]. *中国蔬菜*, 2019(4): 91-95
- [25] Bhai RS, Prameela TP, Vincy K, et al. Soil solarization and amelioration with calcium chloride or *Bacillus licheniformis*—an effective integrated strategy for the management of bacterial wilt of ginger incited by *Ralstonia pseudosolanacearum*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 154(4): 903-917
- [26] Guo LY, Shi F, Yang LY. Advances in functional genes and molecular ecology in denitrifiers[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(4): 583-590 (in Chinese)
郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学进展[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(4): 583-590
- [27] Peng Y, Qi YJ, Jiang GC, et al. Advance in continuous cropping problems of melon[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2019, 25(12): 55-56 (in Chinese)
彭云, 齐英杰, 姜桂翠, 等. 甜瓜连作障碍研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2019, 25(12): 55-56
- [28] Qu CC, Chen XM, Zhang ZL, et al. Mechanism of bio-organic fertilizer on improving soil productivity for continuous cucumber in greenhouse[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25(5): 814-823 (in Chinese)
曲成闯, 陈效民, 张志龙, 等. 生物有机肥提高设施土壤生产力减缓黄瓜连作障碍的机制[J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25(5): 814-823
- [29] Zhao XS, Zhao XY, Tang YL, et al. Aurbuscular mycorrhizal (AM) fungi remediation mechanism of continuous cropping obstacle in greenhouse vegetables[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2018, 31(1): 1-4 (in Chinese)
赵秀山, 赵秀云, 唐艳领, 等. 丛枝菌根真菌修复设施蔬菜连作障碍机制[J]. *中国瓜菜*, 2018, 31(1): 1-4
- [30] Wolfgang A, Taffner J, Guimarães RA, et al. Novel strategies for soil-borne diseases: exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms toward controlling meloidogyne-based disease complexes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1296