

# 根皮苷和串珠镰孢菌加重苹果连作土壤环境及其对平邑甜茶生长的抑制

姜伟涛<sup>1,\*</sup>, 尹承苗<sup>1,2,\*</sup>, 段亚楠<sup>1</sup>, 相立<sup>1</sup>, 王玫<sup>1</sup>, 陈学森<sup>1</sup>, 沈向<sup>1</sup>,  
张民<sup>2,\*\*</sup>, 毛志泉<sup>1,\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 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; <sup>2</sup> 山东农业大学资源与环境学院/土肥资源高效利用国家工程实验室, 国家缓控释肥工程技术研究中心, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 以平邑甜茶幼苗 (*Malus hupehensis* Rehd.) 为试材, 在盆栽条件下研究了串珠镰孢菌和根皮苷对幼苗生长及连作土壤微生物的影响, 为阐明连作障碍的发生机理提供理论依据。结果表明: 8 月份串珠镰孢菌、根皮苷、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理均不同程度降低了连作条件下‘平邑甜茶’幼苗的生物量, 其中串珠镰孢菌 + 根皮苷处理的株高、地径、鲜质量、干质量降低最显著, 分别为连作土对照的 70.6%、77.4%、52.3%和 43.7%; 9 月份各处理的生长量趋势与 8 月份一致。在 8 月和 9 月, 不同处理对幼苗根系呼吸速率的抑制作用表现为: 串珠镰孢菌 + 根皮苷 > 串珠镰孢菌 > 根皮苷 > 连作土对照。3 个处理均不同程度地抑制了连作土壤中细菌的生长, 促进了真菌的生长, 改变了土壤真菌的群落结构。3 个处理均不同程度地降低了连作土壤中脲酶、中性磷酸酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性; 在 8 月, 根皮苷、串珠镰孢菌、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理后对土壤脲酶活性的抑制作用较显著, 分别比对照降低 14.8%、29.1%和 53.4%。综上, 串珠镰孢菌和根皮苷单独或组合处理均显著抑制了‘平邑甜茶’幼苗的生长, 其中串珠镰孢菌 + 根皮苷处理最为显著, 说明根皮苷和串珠镰孢菌共同作用加重了苹果连作障碍现象。

**关键词:** 苹果; 连作障碍; 根皮苷; 串珠镰孢菌

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 01-0021-09

## Phloridzin and *Fusarium moniliforme* Aggravated the Replanted Soil Environment and Inhibited the Growth of *Malus hupehensis* Seedlings

JIANG Weitao<sup>1,\*</sup>, YIN Chengmiao<sup>1,2,\*</sup>, DUAN Yanan<sup>1</sup>, XIANG Li<sup>1</sup>, WANG Mei<sup>1</sup>, CHEN Xuesen<sup>1</sup>,  
SHEN Xiang<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>2,\*\*</sup>, and MAO Zhiquan<sup>1,\*\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>2</sup> National Engineering Research Center for Slow/Controlled Release Fertilizers, National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** To provide a theoretical basis for clarifying the mechanism of apple replant disease, a pot experiment was conducted to study effects of phloridzin and *Fusarium moniliforme* on the growth of *Malus*

**收稿日期:** 2017-07-24; **修回日期:** 2018-01-02

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31501720, 31672104); 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); 山东省自然科学基金项目 (ZR2014CL024); 山东省水果创新团队项目 (SDAIT-06-07)

\* 并列第一作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: minzhang-2002@163.com; mzhiquan@sdaa.edu.cn)

*hupehensis* Rehd. seedlings and the replanted soil microorganisms. The determination results of the August showed that the biomass of *M. hupehensis* Rehd. seedlings was significantly reduced with the treatments of *Fusarium moniliforme*, phloridzin and *Fusarium moniliforme* + phloridzin. The plant height, ground diameter, fresh weight and dry weight of the *Fusarium moniliforme* + phloridzin were 70.6%, 77.4%, 52.3%, and 43.7% of the replanted soil control, respectively. The growth trend of the treatments in September was consistent with that in the year of August. Treatments that caused damage to the root respiration rate of *M. hupehensis* Rehd. seedlings in August and September were sorted as: *Fusarium moniliforme* + phloridzin > *Fusarium moniliforme* > phloridzin > replanted soil control. Three treatments inhibited the growth of bacteria in the replanted soil, promoted the growth of fungi and changed the community structure of soil fungi. The activities of soil catalase, soil urease, soil invertase, soil neutral phosphatase were significantly reduced with the three treatments; In August, soil urease was reduced by 14.8%, 29.1%, 53.4% compared with the replanted soil control. In conclusion, *Fusarium moniliforme* and phloridzin alone or in combination significantly inhibited the growth of *M. hupehensis* Rehd. seedlings, *Fusarium moniliforme* and phloridzin treatment was the most significant. These results suggested that the combination of phloridzin and *Fusarium moniliforme* could increase the phenomenon of apple replant disease.

**Keywords:** apple; replant disease; phloridzin; *Fusarium moniliforme*

老苹果园更新时普遍面临连作障碍问题 (Manici et al., 2003; 张江红, 2005; Bubna et al., 2011)。大量研究表明, 根系分泌的以及前茬残根腐解产生的酚酸类物质是引起连作障碍的重要原因之一 (白茹, 2009; Mazzola & Manici, 2012; Liu et al., 2014; 孙步蕾 等, 2015)。这些酚酸类物质主要包括根皮苷、苯甲酸、间苯三酚、根皮素、阿魏酸、对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、咖啡酸等 (尹承苗 等, 2013; Yin et al., 2016)。孙海兵等 (2011) 研究环渤海湾地区连作苹果园土壤中酚酸类物质的含量时发现, 根皮苷、焦性没食子酸和绿原酸可能是引起连作障碍的关键物质。有研究认为镰孢菌属 (*Fusarium* spp.) 真菌是引起苹果连作障碍的主要病原菌之一 (Kelderer et al., 2012; Ju et al., 2014)。van Schoor 等 (2009) 研究发现在南非所有连作苹果园土壤中镰孢属、柱孢属以及腐霉属真菌是引起苹果连作障碍的主要致病真菌属。

本课题组前期进行了碳化硅量子点标记串珠镰孢菌 (有害真菌) 的室内离体试验, 通过荧光显微镜观察发现, 根皮苷 (自毒物质) 可促进串珠镰孢菌数量的急剧增长, 并且促使其菌丝分裂速度加快 (Yin et al., 2017)。然而, 在连作土壤环境中根皮苷与串珠镰孢菌哪个对连作土壤微生态环境及平邑甜茶的影响较大, 以及根皮苷的加入是否因促使真菌数量的增加, 进而加重了连作障碍的症状, 尚没有明确结论。根据前人的试验, 本研究中将根皮苷与串珠镰孢菌单独或组合使用, 研究其对连作平邑甜茶幼苗生长以及土壤微生物数量的影响, 进一步阐明苹果连作障碍的发生机理, 为生产上综合防控苹果连作障碍提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料 with 处理

试验于 2016 年在山东农业大学园艺科学与工程学院、国家苹果工程技术研究中心及作物生物学国家重点实验室进行。试验用土取自山东省泰安市满庄镇小王庄村 25 年生老龄苹果园, 砧木为八棱

海棠。取 10 ~ 40 cm 区域的土壤, 多点随机取样, 均匀混合后装盆。土壤类型为棕壤土 ( $\text{NO}_3\text{-N}$   $5.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$   $3.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 速效钾  $90.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 速效磷  $9.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 有机质  $5.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。

供试材料为平邑甜茶 (*Malus hupehensis* Rehd., 苹果无融合生殖砧木) 幼苗。将平邑甜茶种子于  $4^\circ\text{C}$  层积 30 d 左右, 待种子露白后, 于 2016 年 3 月 20 日在育苗盘播种育苗。2016 年 5 月 1 日待幼苗长至 5 片真叶时, 取长势基本一致的幼苗移栽至不同处理的泥瓦盆 (上部内径 25 cm, 下部内径 17 cm, 高 18 cm) 中进行盆栽试验。

设置 4 个处理: 连作土对照、串珠镰孢菌处理、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理、根皮苷处理。根皮苷浓度参照 Yin 等 (2016) 的试验结果设定, 将根皮苷配制成浓度为  $15.94 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的溶液, 于 2016 年 5 月 30 日每盆加 100 mL。串珠镰孢菌从连作苹果园分离得到, 于 2016 年 5 月 30 日每盆加 100 mL 串珠镰孢菌孢子溶液 (用血球计数法计算孢子个数, 每 100 mL 含  $6 \times 10^4$  个孢子)。每个处理设置 30 盆重复, 每盆定植 2 株平邑甜茶幼苗, 统一肥水管理。

2016 年 8 月 25 日和 9 月 28 日取土样。每个处理随机选取 3 盆, 作为 3 个重复。取样时去除表层与盆周围土, 过 2 mm 筛后分装 3 个封口袋, 分别放入  $4^\circ\text{C}$  冰箱备用于测定土壤微生物, 放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱备用于提取土壤 DNA 进行 T-RFLP 分析, 放在通风向阳处风干备用于测定土壤酶活性。在取土样的同时, 每个处理取平邑甜茶幼苗 3 株, 洗净后及时带回实验室进行生物量指标测定, 并进行根系扫描以及根呼吸速率测定。

## 1.2 测定指标及方法

生物量的测定: 使用直尺和游标卡尺测定株高和地径。取完整植株地上部与根系, 清水洗净后用卫生纸擦拭干净, 使用天平测定鲜质量, 然后放入烘箱  $105^\circ\text{C}$  杀青 30 min, 之后  $80^\circ\text{C}$  烘干, 用天平测定干质量。

根系构型参数的测定: 将幼苗根系用清水洗净, 放入盛有水的硬塑料盒中, 在水中平铺展开, 使用专业版 WinRHIZO (2007 年版) 根系分析系统处理样品图像, 记录根长度、根系表面积和根体积。

根系呼吸速率的测定: 参照毛志泉等 (2004) 的方法, 采用 Oxy-Lab 氧电极自动测定系统测定。

土壤微生物的测定: 土壤细菌、真菌的测定均采用稀释平板计数法, 细菌采用土壤浸出液用牛肉膏蛋白胨培养基于  $37^\circ\text{C}$  条件下培养, 真菌采用土壤浸出液用 PDA 选择性培养基于  $28^\circ\text{C}$  条件下培养 (程丽娟和薛泉宏, 2000)。

土壤微生物群落结构的测定: 参照尹承苗等 (2014) 的方法, 提取土壤总 DNA 后, 用真菌 ITS 区通用片段引物 (ITS1-F 和 ITS4) 进行扩增, 用限制性内切酶 *Hha* I 对 PCR 产物酶切, 酶切产物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。扫描图谱用 Peak Scanner 输出, 选择介于 50 ~ 600 bp 的 T-RFS, 仅采用峰面积比重  $> 1\%$  的 T-RFS 进行分析。以图谱中每 1 个可统计的 T-RFS, 视为 1 个 OTU (Operational Taxonomic Unit)。根据图谱中 OTU 的数量及其丰度利用 BIO-DAP 程序计算样品的多样性指数、优势度指数、丰富度指数和均匀度指数。利用 SPSS 19.0 软件对测序结果进行聚类分析和主成分分析。

土壤酶活性的测定: 磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法; 脲酶采用比色法; 蔗糖酶采用比色法; 过氧化氢酶采用容量法测定 (关松荫, 1986)。

试验数据采用 Microsoft Excel 2003 进行计算和作图, 通过 SPSS19.0 软件进行方差分析, 采用邓肯氏新复极差法进行差异显著性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 根皮苷和串珠镰孢菌对平邑甜茶幼苗生物量的影响

由表 1 可以看出, 土壤中添加一定量的根皮苷、串珠镰孢菌可以明显抑制平邑甜茶幼苗的生长。抑制作用大小表现为: 串珠镰孢菌 + 根皮苷处理 > 串珠镰孢菌处理 > 根皮苷处理 > 连作土对照。8 月份串珠镰孢菌 + 根皮苷处理的平邑甜茶幼苗株高、地径、鲜质量、干质量分别为连作土对照的 70.6%、77.4%、52.3%、43.7%; 串珠镰孢菌处理的幼苗各指标分别为连作土对照的 83.3%、86.8%、56.6%、64.0%; 根皮苷处理的幼苗各指标分别为连作土对照的 90.9%、88.8%、75.4%、67.6%。9 月份各处理的生长量趋势与 8 月份一致。

表 1 不同处理对平邑甜茶幼苗生物量的影响  
Table 1 Effects of different treatments on plant biomass of *Malus hupehensis* seedling

日期 Date	处理 Treatment	株高/cm Plant height	地径/mm Ground diameter	鲜质量/g Fresh weight	干质量/g Dry weight
08-25	连作土对照 Replanted soil	54.40 ± 0.07 a	6.06 ± 0.17 a	38.60 ± 1.80 a	16.07 ± 0.25 a
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	45.33 ± 1.35 c	5.26 ± 0.07 b	21.85 ± 1.39 bc	10.28 ± 0.27 b
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	38.40 ± 1.21 d	4.69 ± 0.13 bc	20.18 ± 1.18 c	7.02 ± 0.24 b
	根皮苷 Phloridzin	49.43 ± 0.56 b	5.38 ± 0.26 b	29.11 ± 1.87 b	10.87 ± 0.81 b
09-28	连作土对照 Replanted soil	66.33 ± 1.12 a	8.21 ± 0.19 a	61.00 ± 4.00 a	29.70 ± 2.01 a
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	52.97 ± 0.38 c	7.33 ± 0.26 ab	47.20 ± 4.30 b	22.77 ± 1.40 bc
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	50.63 ± 0.50 c	6.72 ± 0.08 b	47.14 ± 2.14 b	19.99 ± 1.16 c
	根皮苷 Phloridzin	62.67 ± 1.10 b	7.40 ± 0.26 ab	58.60 ± 1.18 ab	26.48 ± 1.84 ab

注: 表中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different letters in the table stand for the significant difference at the 0.05 level. The same below.

### 2.2 根皮苷和串珠镰孢菌对平邑甜茶根系生长和呼吸速率的影响

由表 2 可以看出, 在 8 月和 9 月份, 根皮苷、串珠镰孢菌、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理的幼苗根系指标大多低于连作土对照, 其中串珠镰孢菌 + 根皮苷处理最为显著, 9 月份根长、根表面积和根体积与连作土对照相比分别降低了 43.4%、30.7%和 48.6%; 其次为串珠镰孢菌处理, 分别降低了 24.9%、17.4%和 23.8%; 根皮苷处理伤害较小, 分别降低了 15.9%、8.9%和 19.8%。由此表明, 根皮苷和串珠镰孢菌处理均对平邑甜茶幼苗根系的正常生长有抑制作用。

根皮苷、串珠镰孢菌、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理均抑制了平邑甜茶幼苗的根系呼吸速率, 8 月份分别降低了 17.3%、22.6%和 39.3%; 9 月份降低了 13.3%、18.4%和 44.4%。

表 2 不同处理对平邑甜茶幼苗根系生长的影响  
Table 2 Effects of different treatments on root growth of *Malus hupehensis* seedling

日期 Date	处理 Treatment	根长/cm Root length	根表面积/cm <sup>2</sup> Root surface	根体积/cm <sup>3</sup> Root volume	根呼吸速率/ (nmol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> FW) Root respiration rate
08-25	连作土对照 Replanted soil	1 590.57 ± 69.04 a	1 077.53 ± 38.70 a	52.02 ± 3.52 a	666.51 ± 25.53 a
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	1 324.92 ± 72.02 b	696.28 ± 14.51 b	24.33 ± 1.66 bc	515.69 ± 39.11 b
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	1 079.34 ± 145.29 c	456.44 ± 45.01 c	16.71 ± 1.67 c	404.27 ± 23.93 c
	根皮苷 Phloridzin	1 482.50 ± 34.43 b	798.79 ± 63.91 b	32.72 ± 1.67 b	551.43 ± 39.23 b
09-28	连作土对照 Replanted soil	2 638.02 ± 115.32 a	1 328.73 ± 52.94 a	83.70 ± 4.61 a	914.93 ± 46.52 a
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	1 981.91 ± 104.62 b	1 098.15 ± 68.21 ab	63.79 ± 4.76 a	746.65 ± 46.79 b
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	1 491.95 ± 158.13 c	920.45 ± 42.46 c	42.98 ± 6.08 b	508.93 ± 52.57 c
	根皮苷 Phloridzin	2 218.06 ± 110.92 b	1 210.84 ± 54.64 a	67.13 ± 4.71 a	793.67 ± 31.04 ab

2.3 根皮苷和串珠镰孢菌对土壤微生物和土壤酶活性的影响

2.3.1 土壤微生物

由表 3 可知, 8 月和 9 月, 根皮苷、串珠镰孢菌、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理均抑制土壤中细菌的生长, 促进土壤中真菌的生长。其中 9 月份根皮苷、串珠镰孢菌、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理的土壤细菌数量与对照相比分别减少了 29.6%、44.4%和 62.9%, 真菌数量分别增加了 23.2%、40.2%和 81.7%。8 月份细菌、真菌的数量变化趋势与 9 月份一致。

表 3 不同处理对土壤微生物数量的影响  
Table 3 Effects of different treatments on the number of microorganism

日期 Date	处理 Treatment	细菌数量/ ( $\times 10^5$ CFU $\cdot$ g $^{-1}$ ) The number of soil bacteria	真菌数量/ ( $\times 10^3$ CFU $\cdot$ g $^{-1}$ ) The number of fungi
08 - 25	连作土对照 Replanted soil	24.00 $\pm$ 2.08 a	23.33 $\pm$ 2.02 c
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	14.00 $\pm$ 2.96 bc	43.66 $\pm$ 2.96 b
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	11.33 $\pm$ 1.85 c	55.66 $\pm$ 4.33 a
	根皮苷 Phloridzin	17.33 $\pm$ 1.76 b	29.00 $\pm$ 2.08 c
09 - 28	连作土对照 Replanted soil	27.33 $\pm$ 1.76 a	27.33 $\pm$ 2.60 c
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	15.33 $\pm$ 1.85 bc	38.33 $\pm$ 3.17 b
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	10.33 $\pm$ 1.20 c	49.66 $\pm$ 1.76 a
	根皮苷 Phloridzin	19.66 $\pm$ 2.18 b	33.66 $\pm$ 2.91bc

根据 T-RFLP 图谱中 OTU 的数量、种类及丰度, 分别计算了各处理的真菌多样性 (表 4)。8 月份的结果显示, 各处理的真菌多样性无显著性规律。9 月份的结果显示, 根皮苷处理有较高的优势度指数与较低的多性、丰富度、均匀度指数; 串珠镰孢菌处理、串珠镰孢菌 + 根皮苷处理的优 势度、多样性、丰富度、均匀度指数差异不显著, 但与连作土对照、根皮苷处理的差异显著。

表 4 不同处理对土壤真菌多样性的影响  
Table 4 Effects of different treatments on the soil fungal diversity

日期 Date	处理 Treatment	多样性指数 Shannon index	优势度指数 Simpson index	丰富度指数 Margalef index	均匀度指数 Pielou index
08 - 25	连作土对照 Replanted soil	2.82 $\pm$ 0.003 b	0.07 $\pm$ 0.001 b	6.23 $\pm$ 0.019 a	0.84 $\pm$ 0.003 bc
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	2.84 $\pm$ 0.006 ab	0.08 $\pm$ 0.001 a	6.20 $\pm$ 0.002 a	0.84 $\pm$ 0.003 bc
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	2.86 $\pm$ 0.007 a	0.07 $\pm$ 0.001 b	5.81 $\pm$ 0.002 c	0.87 $\pm$ 0 a
	根皮苷 Phloridzin	2.85 $\pm$ 0.012 a	0.07 $\pm$ 0 b	6.02 $\pm$ 0.126 ab	0.85 $\pm$ 0.003 b
09 - 28	连作土对照 Replanted soil	3.03 $\pm$ 0.012 a	0.06 $\pm$ 0.001 c	6.83 $\pm$ 0.072 a	0.88 $\pm$ 0 a
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	2.81 $\pm$ 0.009 b	0.07 $\pm$ 0.001 b	6.02 $\pm$ 0.126 b	0.84 $\pm$ 0.007 bc
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	2.84 $\pm$ 0 b	0.07 $\pm$ 0 b	5.99 $\pm$ 0.008 b	0.85 $\pm$ 0 b
	根皮苷 Phloridzin	2.73 $\pm$ 0.006 c	0.08 $\pm$ 0 a	5.55 $\pm$ 0.008 c	0.84 $\pm$ 0.003 c

由主成分分析 (图 1) 可以看出, 添加根皮苷、串珠镰孢菌对苹果连作土真菌群落结构的影响不同。结果显示, 8 月、9 月第一主成分方差贡献率分别为 84.4%和 83.9%, 第二主成分方差贡献率分别为 8.5%和 9.5%, 两者贡献和分别为 92.9%和 93.4%, 可以代表整个土壤系统状况。9 月份结果显示, 根皮苷与串珠镰孢菌组合处理 (T2) 的真菌群落结构与连作土对照 (CK) 有明显差异, 其中串珠镰孢菌处理 (T1) 与根皮苷处理 (T3) 的真菌群落结构相近, 而二者组合处理 (T2) 则是形成一个独立的真菌群落。

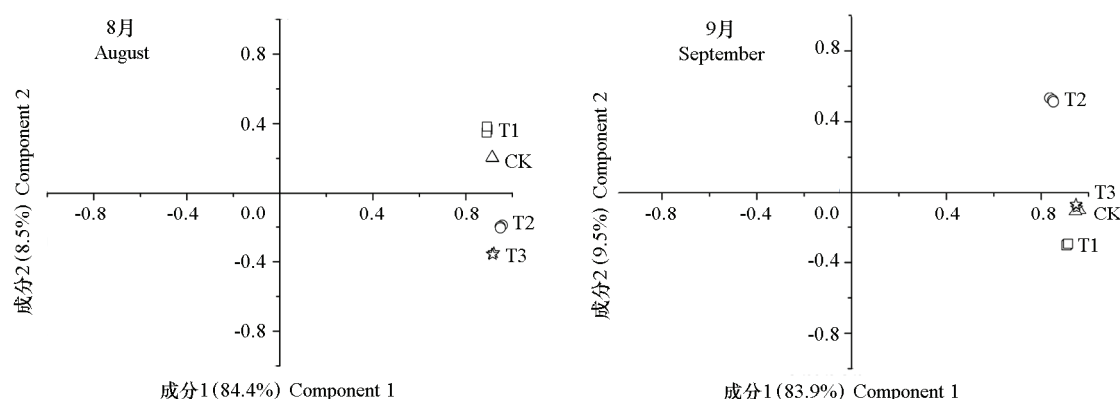


图1 不同处理间真菌 T-RFLP 图谱主成分分析

CK: 连作土对照; T1: 串珠镰孢菌; T2: 串珠镰孢菌 + 根皮苷; T3: 根皮苷。

Fig. 1 PCA for different treatments of fungi

CK: Replanted soil; T1: *Fusarium moniliforme*; T2: *Fusarium moniliforme* + Phloridzin; T3: Phloridzin.

### 2.3.2 土壤酶活性

由表 5 可以看出, 根皮苷、串珠镰孢菌、串珠镰孢菌 + 根皮苷对土壤酶的活性均有显著的抑制作用。8 月份, 土壤脲酶活性分别比对照降低 14.8%、29.1%和 53.4%, 中性磷酸酶活性分别降低 8.0%、15.1%和 21.6%, 蔗糖酶活性分别降低 14.6%、23.7%和 30.7%, 过氧化氢酶活性分别降低 18.9%、26.7%和 37.8%。9 月份的趋势与 8 月份一致。

表 5 不同处理对土壤酶活性的影响

Table 5 Effects of different treatments on soil enzyme

日期 Date	处理 Treatment	中性磷酸酶/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) Neutral phosphatase	脲酶/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) Urease	蔗糖酶/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) Sucrase	过氧化氢酶/ ( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ) Catalase
08 - 25	连作土对照 Replanted soil	$4.64 \pm 0.05 \text{ a}$	$6.35 \pm 0.03 \text{ a}$	$10.43 \pm 0.27 \text{ a}$	$0.90 \pm 0.01 \text{ a}$
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	$3.94 \pm 0.10 \text{ c}$	$4.50 \pm 0.06 \text{ c}$	$7.96 \pm 0.12 \text{ c}$	$0.66 \pm 0.01 \text{ b}$
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	$3.64 \pm 0.05 \text{ d}$	$2.96 \pm 0.11 \text{ d}$	$7.23 \pm 0.06 \text{ d}$	$0.56 \pm 0.02 \text{ c}$
	根皮苷 Phloridzin	$4.27 \pm 0.03 \text{ b}$	$5.41 \pm 0.10 \text{ b}$	$8.91 \pm 0.07 \text{ b}$	$0.73 \pm 0.03 \text{ b}$
09 - 28	连作土对照 Replanted soil	$5.11 \pm 0.08 \text{ a}$	$12.00 \pm 0.28 \text{ a}$	$8.13 \pm 0.21 \text{ a}$	$0.48 \pm 0.02 \text{ a}$
	串珠镰孢菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	$4.04 \pm 0.05 \text{ c}$	$5.61 \pm 0.15 \text{ c}$	$6.31 \pm 0.24 \text{ b}$	$0.33 \pm 0.01 \text{ c}$
	串珠镰孢菌 + 根皮苷 <i>Fusarium moniliforme</i> + Phloridzin	$3.74 \pm 0.05 \text{ d}$	$4.58 \pm 0.10 \text{ d}$	$5.33 \pm 0.12 \text{ c}$	$0.29 \pm 0.01 \text{ c}$
	根皮苷 Phloridzin	$4.37 \pm 0.08 \text{ b}$	$7.85 \pm 0.34 \text{ b}$	$6.91 \pm 0.23 \text{ b}$	$0.38 \pm 0.01 \text{ b}$

## 3 讨论

前人研究认为植物根系分泌和前茬腐解产生的毒素是引起连作障碍的主要原因之一, 且酚酸类化合物是主要的毒性物质(孔垂华和胡飞, 2001; Ye et al., 2004; 张江红, 2005; Bai et al., 2009)。王艳芳等(2015a, 2015b)研究表明连作土壤中实际浓度的根皮苷、根皮素、肉桂酸、对羟基苯甲酸和间苯三酚均使平邑甜茶幼苗生长受到抑制, 以根皮苷处理抑制效果最显著, 间苯三酚处理抑制效果最小。同时也有研究认为土壤微生物的变化也是连作障碍的主要因子(刘建国 等, 2009; 张重义 等, 2010)。刘志(2013)研究认为, 造成中国环渤海湾地区苹果再植病的主要病原菌是镰孢菌, 并对分离鉴定的 4 种镰孢菌进行了致病性试验, 结果显示串珠镰孢菌对平邑甜茶的致病作用最强,

其次是层出镰孢菌, 然后是尖孢镰孢菌, 而腐皮镰孢菌的致病作用相对较弱。本试验研究发现, 根皮苷、串珠镰孢菌均抑制了连作条件下平邑甜茶幼苗的生长发育, 导致连作土壤中细菌数量减少、真菌数量增加、土壤酶活性下降, 且串珠镰孢菌的抑制作用更强。综上, 认为与根皮苷处理相比, 串珠镰孢菌处理对连作土壤环境及平邑甜茶幼苗的生长发育影响较大。

胡元森等(2007)研究认为连作障碍的发生与土壤酚酸类物质的累积及土壤病原微生物的增加有密切关系。然而, 连作导致有害真菌的增加绝不是偶然现象, 而是与连作产生的酚酸类物质密切相关(Zhou et al., 2012; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2015; 尹承苗等, 2016)。刘金波等(2009)研究认为连作后根系分泌物的增多会诱导土壤真菌数量的增加。蔺姗姗等(2009)研究发现高浓度( $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的香草醛、肉桂酸抑制了细菌和放线菌的生长, 促进了真菌数量的增加。本试验结果表明, 根皮苷和串珠镰孢菌组合处理后对平邑甜茶幼苗的生物量、根系呼吸速率及根构型参数的抑制作用最大, 导致连作土壤中的细菌数量减少最多、真菌数量增加最多、土壤酶活性下降最显著, 说明根皮苷和串珠镰孢菌共同作用加重了苹果连作障碍。从 T-RFLP 结果表明, 根皮苷和串珠镰孢菌组合处理后显著改变了连作土壤中真菌的群落结构, 形成一个独立的群落结构, 可能是根皮苷和串珠镰孢菌组合处理后促使了某一种菌的大量繁殖, 导致其群落结构发生巨大变化。

酚酸类物质对土壤有害真菌影响的原因可能是多种多样的。Zhao 等(2015)利用 qPCR 和 HPLC 手段研究发现, 太子参根系分泌的酚酸类物质随着根际土壤中微生物的变化而增加, 这个结果证明植物—微生物存在互作关系。Yin 等(2017)进行了碳化硅量子点标记串珠镰孢菌的室内离体试验, 研究发现根皮苷可显著促进串珠镰孢菌数量的急剧增长, 并且促使其菌丝分裂速度加快, 这个结果证明酚酸—微生物也存在互作关系。在连作土壤环境中, 植物—酚酸—微生物的互作机理是怎样的, 还需进一步研究。

## 4 结论

串珠镰孢菌和根皮苷单独或组合处理均显著降低了连作平邑甜茶幼苗的生物量、根系呼吸速率, 抑制了连作土壤中细菌的生长, 促进了真菌的生长, 降低了连作土壤中脲酶、中性磷酸酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性, 其中串珠镰孢菌 + 根皮苷处理抑制作用最为显著, 说明根皮苷和串珠镰孢菌共同作用加重了苹果连作障碍。

## References

- Bai Ru. 2009. Autointoxication in apple replant disease [Ph. D. Dissertion]. YangLing: North West Agriculture and Forestry University. (in Chinese)  
白茹. 2009. 苹果连作障碍中自毒作用的研究 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Bai R, Ma F W, Liang D, Zhao X. 2009. Phthalic acid induces oxidative stress and alters the activity of some antioxidant enzymes in roots of *Malus prunifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 488 - 494.
- Bubna G A, Lima R B, Zanardo D Y L, Dos Santos W D, Ferrarese M D L L, Ferrarese-Filho O. 2011. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, 168 (14 - 15): 1627 - 1633.
- Cheng Li-juan, Xue Quan-hong. 2000. Microbiology laboratory technology. Xi'an: World Publishing Corporation. (in Chinese)  
程丽娟, 薛泉宏. 2000. 微生物学实验技术. 西安: 世界图书出版公司.
- Guan Song-yin. 1986. Soil enzymes and its research methods. Beijing: Agricultural Press: 274 - 340. (in Chinese)  
关松荫. 1986. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社: 274 - 340.
- Hu Yuan-sen, Wu Kun, Li Cui-xiang, Sun Fu-lin, Jia Xin-cheng. 2007. Effects of phenolic compounds on the growth of *Cucumis sativus* seedlings

- and *Fusarium oxysporum* hypha. *Chinese Journal of Ecology*, 26 (11): 1738 - 1742. (in Chinese)
- 胡元森, 吴 坤, 李翠香, 孙富林, 贾新成. 2007. 酚酸物质对黄瓜幼苗及枯萎病菌菌丝生长的影响. *生态学杂志*, 26 (11): 1738 - 1742.
- Ju R, Zhao Y, Li J, Jiang H, Liu P, Yang T, Bao Z, Zhou B, Zhou X, Liu X. 2014. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology*, (64): 377 - 383.
- Kelderer M, Manici L M, Caputo F, Thalheimer M. 2012. Planting in the 'inter-row' to overcome replant disease in apple orchards: a study on the effectiveness of the practice based on microbial indicators. *Plant and Soil*, 357: 381 - 393.
- Kong Chui-hua, Hu Fei. 2001. Allelopathic allelopathy and its application. Beijing: China Agriculture Press: 30 - 42. (in Chinese)
- 孔垂华, 胡 飞. 2001. 植物化感相生相克作用及其应用. 北京: 中国农业出版社: 30 - 42.
- Lin Shan-shan, Zhou Bao-li, Chen Shao-li, Li Xia, Ding Yu-wen, Ye Xue-ling. 2009. Effects of grafting on soil microbe amounts and enzyme activities of eggplants under vanillin and cinnamic acid stress. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 18 (3): 222 - 226, 248. (in Chinese)
- 蔺姗姗, 周宝利, 陈绍莉, 李 夏, 丁昱文, 叶雪凌. 2009. 香草醛、肉桂酸胁迫下嫁接对茄子根际土壤微生物数量和土壤酶活性的影响. *西北农业学报*, 18 (3): 222 - 226, 248.
- Liu E T, Wang G S, Li Y Y, Shen X, Chen X S, Song F H, Wu S J, Chen Q, Mao Z Q. 2014. Replanting affects the tree growth and fruit quality of Gala apple. *Journal of Integrative Agriculture*, 13 (8): 1699 - 1706.
- Liu Jian-guo, Zhang Wei, Li Yan-bin, Sun Yan-yan, Bian Xin-min. 2009. Effects of long-term continuous cropping system of cotton on soil physical-chemical properties and activities of soil enzyme in oasis in Xinjiang. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (2) : 725 - 733. (in Chinese)
- 刘建国, 张 伟, 李彦斌, 孙艳艳, 卞新民. 2009. 新疆绿洲棉花长期连作对土壤理化性状与土壤酶活性的影响. *中国农业科学*, 42 (2): 725 - 733.
- Liu Jin-bo, Xu Yan-li, Lv Guo-zhong, Li Chun-jie, Zhao Zhi-hui, Wei Wei. 2009. Black soil region *Fusarium* population structure and quantity in soybean rhizosphere of different rotation system. *Soybean Science*, 28 (1): 97 - 102. (in Chinese)
- 刘金波, 许艳丽, 吕国忠, 李春杰, 赵志慧, 魏 巍. 2009. 黑土区不同轮作系统大豆根际镰孢菌种群结构和数量. *大豆科学*, 28 (1): 97 - 102.
- Liu Zhi. 2013. The isolation and identification of fungi pathogen from apple replant disease in Bohai Bay region and the screening of the antagonistic *Trichoderma* strains [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 刘 志. 2013. 环渤海湾地区苹果再植病原真菌分离鉴定及生防木霉菌株的筛选 [硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- 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.
- Mao Zhi-quan, Wang Li-qin, Shen Xiang, Shu Huan-rui, Zou Yan-mei. 2004. Effect of organic materials on respiration intensity of annual *Malus hupehensis* Rehd. root system. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 10 (2): 171 - 175. (in Chinese)
- 毛志泉, 王丽琴, 沈 向, 束怀瑞, 邹岩梅. 2004. 有机物料对平邑甜茶实生苗根系呼吸强度的影响. *植物营养与肥料学报*, 10 (2): 171 - 175.
- Mazzola M, Manici L M. 2012. Apple replant disease: role of microbial ecology in cause and control. *Annual Review of Phytopathology*, 50: 45 - 65.
- Sun Bu-lei, Wang Yan-fang, Zhang Xian-fu, Shen Xiang, Chen Xue-sen, Mao Zhi-quan. 2015. Effect of residual roots on the biomass of *Malus hupehensis* seedlings, phenolic acids and microbiology in the soil of continuous cropping. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (1): 131 - 139. (in Chinese)
- 孙步蕾, 王艳芳, 张先富, 沈 向, 陈学森, 毛志泉. 2015. 连作土壤中残根对平邑甜茶幼苗生物量及土壤酚酸类物质和微生物的影响. *园艺学报*, 42 (1): 131 - 139.
- Sun Hai-bing, Mao Zhi-quan, Zhu Shu-hua. 2011. Changes of phenolic acids in the soil of replanted apple orchards surrounding Bohai Gulf. *Acta Ecologica Sinica*, 31 (1): 90 - 97. (in Chinese)
- 孙海兵, 毛志泉, 朱树华. 2011. 环渤海湾地区连作苹果园土壤中酚酸类物质变化. *生态学报*, 31 (1): 90 - 97.
- van Schoor L, 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.
- Wang Yan-fang, Pan Feng-bing, Zhan Xing, Wang Gong-shuai, Zhang Guo-dong, Hu Yan-li, Chen Xue-sen, Mao Zhi-quan. 2015a. Effects of five kinds of phenolic acid on the function of mitochondria and antioxidant systems in roots of *Malus hupehensis* Rehd. seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 35 (19): 6566 - 6573. (in Chinese)
- 王艳芳, 潘凤兵, 展星, 王功帅, 张国栋, 胡艳丽, 陈学森, 毛志泉. 2015a. 连作苹果土壤酚酸对平邑甜茶幼苗的影响. *生态学报*, 35 (19): 6566 - 6573.
- Wang Yan-fang, Pan Feng-bing, Zhang Xian-fu, Wang Peng, Chen Xue-sen, Shen Xiang, Mao Zhi-quan. 2015b. Effects of phenolic acids on growth and photosynthetic characteristics of seedlings of *Malus hupehensis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 51(2): 52 - 59. (in Chinese)
- 王艳芳, 潘凤兵, 张先富, 王鹏, 陈学森, 沈向, 毛志泉. 2015b. 土壤中不同酚酸类物质对平邑甜茶幼苗光合及生理特性的影响. *林业科学*, 51 (2): 52 - 59.
- Ye S, Yu J, Peng Y, Zheng J, Zou L. 2004. Incidence of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil*, 263: 143 - 150.
- Yin Cheng-miao, Wang Gong-shuai, Li Yuan-yuan, Che Jin-shui, Shen Xiang, Chen Xue-sen, Mao Zhi-quan, Wu Shu-jing. 2013. A new method for analysis of phenolic acids in the soil-soil from replanted apple orchards was investigated. *Scientia Agricultura Sinica*, 46 (21): 4612 - 4619. (in Chinese)
- 尹承苗, 王功帅, 李园园, 车金水, 沈向, 陈学森, 毛志泉, 吴树敬. 2013. 一种分析土壤中酚酸类物质含量的新方法——以连作苹果园土壤为试材. *中国农业科学*, 46 (21): 4612 - 4619.
- Yin Cheng-miao, Wang Gong-shuai, Li Yuan-yuan, Chen Xuan-shen, Wu Shu-jing, Mao Zhi-quan. 2014. Assessment of fungal diversity in apple replanted orchard soils by T-RFLP analysis. *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.
- Yin Cheng-miao, Xiang Li, Sun Chuan-xiang, Shen Xiang, Chen Xue-sen, Zhou Hui, Mao Zhi-quan. 2016. Effects of different apple rootstocks on the soil microbial quantity and enzyme activity of apple replanted orchard soil. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (12): 2423 - 2430. (in Chinese)
- 尹承苗, 相立, 孙传香, 沈向, 陈学森, 周慧, 毛志泉. 2016. 不同苹果砧木对连作土壤微生物及酶活性的影响. *园艺学报*, 43 (12): 2423 - 2430.
- Yin C M, Xiang L, Wang G S, Wang Y F, Shen X, Chen X S, Mao Z Q. 2016. How to plant apple trees to reduce replant disease in apple orchard: a study on the phenolic acid of the replanted apple orchard. *PLoS ONE*, 11 (12): e0167347. doi:10.1371/journal.pone.0167347.
- Yin C M, Xiang L, Wang G S, Wang Y F, Shen X, Chen X S, Mao Z Q. 2017. Phloridzin promotes the growth of *Fusarium moniliforme* (*Fusarium verticillioides*). *Scientia Horticulturae*, (214): 187 - 194.
- Zhang F G, Zhu Z, Yang X M, Ran W, Shen Q R. 2013. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. *Applied Soil Ecology*, 72: 41 - 48.
- Zhang Jiang-hong. 2005. Allelopathic effect of phenolics and its role on apple replant disease mechanism [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 张江红. 2005. 酚类物质对苹果的化感作用及重茬障碍影响机理的研究 [博士学位论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Zhao Y, Wu L, Chu L, Yang Y, Li Z, Azeem S, Zhang Z, Fang C, Lin W. 2015. Interaction of *Pseudostellaria heterophylla* with *Fusarium oxysporum* f. sp. *heterophylla* mediated by its root exudates in a consecutive mono-culture system. *Scientific Reports*, 5: 8197; DOI:10.1038/srep08197.
- Zhang Zhong-yi, Chen Hui, Yang Yan-hui, Chen Ting, Lin Rui-yu, Chen Xin-jian, Lin Wen-xiong. 2010. Effects of continuous cropping on bacterial community diversity in rhizosphere soil of *Rehmannia glutinosa*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21 (11): 2843 - 2848. (in Chinese)
- 张重义, 陈慧, 杨艳会, 陈婷, 林瑞余, 陈新建, 林文雄. 2010. 连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响. *应用生态学报*, 21 (11): 2843 - 2848.
- Zhou X, Yu G, Wu F. 2012. Soil phenolics in a continuously monocropped cucumber (*Cucumis sativus* L.) system and their effects on cucumber seedling growth and soil microbial communities. *European Journal of Soil Science*, 63: 332 - 340.