氯化苦熏蒸对土壤反硝化作用及 *nirS* 型反硝化细菌群落结构的影响

燕平梅[1,2]， 魏爱丽[1,2]， 赵文婧[1,2]， 李 娜[1,2]， 李 博[1,2]， 曹坳程[3*]

（1. 太原师范学院生物系，太原 030619；2. 土壤消毒活化绿色产业技术创新战略联盟，太原 030619；3. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘要 探究氯化苦熏蒸对土壤反硝化作用的影响及机制。采用理化分析和 DGGE 方法分析了氯化苦熏蒸后土壤反硝化及 *nirS* 型反硝化细菌群落结构。不同浓度氯化苦熏蒸对土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落均匀度无影响，而对 *nirS* 型反硝化细菌多样性和丰富度指数的影响为高浓度＞中浓度＞低浓度＞对照。对土壤反硝化作用的影响表现为，经500 mg/kg氯化苦熏蒸的土壤在培养初期(0 d)反硝化率比对照降低 10.55%，土壤反硝化作用被显著抑制。2 周后 3 种浓度氯化苦均抑制土壤反硝化作用，4 周后土壤的反硝化作用缓慢恢复。500 mg/kg 浓度氯化苦对土壤反硝化强度的影响与 *nirS* 型反硝化细菌群落结构变化不同，说明土壤反硝化作用的强弱并非完全决定于土壤 *nirS* 型反硝化细菌。

关键词 氯化苦； 土壤熏蒸剂； *nirS*； 反硝化作用； DGGE

中图分类号： S 482.6 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2018491

Effects of chloropicrin fumigation on soil denitrification and the community structure of *nirS*-denitrifying bacteria

YAN Pingmei[1,2]， WEI Aili[1,2]， ZHAO Wenjing[1,2]， LI Na[1,2]， LI Bo[1,2]， CAO Aocheng[3]

(1. *Department of Biology*, *Taiyuan Normal University*, *Taiyuan* 030619, *China*; 2. *Strategic Alliance of Green Industry Technology Innovation for Soil Disinfestation and Activation*, *Taiyuan* 030619, *China*; 3. *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*)

Abstract The effects of chloropicrin fumigation on edaphic denitrification and the mechanisms were studied by using DGGE and physical and chemical analysis of soil denitrification and the community structure of *nirS*-denitrifying bacteria. Different concentrations of chloropicrin fumigation had no effect on the evenness of soil *nirS*-denitrifying bacterial community, but their effects on the diversity and abundance indexes of *nirS*-denitrifying bacteria were as followed: high concentration ＞ medium concentration＞ low concentration ＞ the control. The soil denitrification experiments showed that after treated by 500 mg/kg chloropicrin, at the initial stage of culture (0 d) the denitrification rate decreased by 10.55% compared with the control, denitrification were significantly inhibited in soil. After two weeks, all of the three concentrations of chloropicrin inhibited denitrification in soil, but the denitrification in soil naturally recovered after four weeks. The effect of 500 mg/kg chloropicrin on soil denitrification intensity was different from the change in the community structure of *nirS*-denitrifying bacteria, explaining why the strength of denitrification in soil was not completely determined by *nirS*-denitrifying bacteria.

Key words chloropicrin； soil fumigant； *nirS*； denitrification； DGGE

土壤熏蒸技术主要用于防治土传性病害，可有效控制农业生产中的病虫草害。用于土传病虫草害防治的高效、广谱土壤熏蒸剂——溴甲烷，由于其对臭氧层产生很大的破坏作用，危害地球表面的生态环境，被《蒙特利尔议定书》列为受控物质，全世界在2015 年全部淘汰(必要用途豁免除外)该药剂，因此

收稿日期： 2018－11－28 **修订日期：** 2019－02－10
基金项目： 现代农业产业技术体系北京市创新团队；国家自然科学基金(40871131；31240009)
* 通信作者 E-mail：caoac@vip.sina.com

需要寻找溴甲烷的替代品或替代技术。氯化苦等溴甲烷的替代品作为防治土传病害的土壤消毒剂已有大量研究和商业化应用[1-4]。有关溴甲烷替代品的研究主要是针对其对病虫害及杂草的防治效果及对环境的影响等[5-7]。熏蒸处理后，土壤中病原微生物被抑制，但其他非目标微生物，如反硝化细菌的生长也受到抑制[8-9]，导致反硝化活性显著低于对照土壤[10]。但也有报道[11]认为，氯化苦和棉隆熏蒸显著促进土壤反硝化作用。熏蒸剂对土壤反硝化作用影响有不同的报道，目前从反硝化细菌的群落结构变化探究氯化苦熏蒸与土壤反硝化作用关系及机制的研究还未见报道。反硝化细菌不是分类学特定类群，采用细菌 16S rDNA 研究反硝化细菌群落有明显缺陷[12]。而反硝化过程中的关键功能基因可用于分析反硝化细菌群落结构。*nirS* 基因编码的亚硝酸还原酶基因被用于不同生境下反硝化细菌群落结构分析[13-15]。本试验从氯化苦熏蒸土壤中提取病原微生物的总 DNA，采用 *nirS*-PCR-DGGE 方法研究了氯化苦熏蒸对土壤中 *nirS* 型反硝化细菌群落结构影响及其与反硝化活性变化的关系。

1　材料和方法

1.1　土壤样品及土壤处理

土壤样品来自通州区黄瓜大棚土壤。土壤理化性质为：铵态氮 73.01 mg/kg，硝态氮 249.46 mg/kg，有机质 33.55 g/kg，速效钾 443.45 mg/kg，有效磷 657.66 mg/kg，pH 6.86。土壤熏蒸剂是 90%氯化苦液剂。

供试药剂与土壤处理：将土壤湿度调节到 15%，取 1 kg 土壤置于 1.5 L 干燥器中。将氯化苦液剂按 20、100、500 mg/kg 加到干燥器中的土壤中，25℃密闭熏蒸 7 d 后敞气恒温避光培养。每处理重复 3 次，以不熏蒸的土样为对照(CK)，分别于培养 0、14、28、56、84 d 取样测定。

1.2　反硝化活性的测定和计算

土壤中加入一定量的硝酸盐，经厌氧培养后，测定土壤硝酸根的消灭率，用以表示土壤的反硝化活性的强度[16]。

1.3　土壤指标的测定

采用连续流动分析仪法(INTEGRAL Futura ALLIANCE INSTRUMENTS)测定滤液中 NH_4-N 和 NO_3-N 含量[17]。

1.4　硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性测定

硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性采用比色法[8,17]测定。

1.5　PCR-DGGE 方法

1.5.1　土壤微生物基因组 DNA 的提取与检测

按照 MO BIO 公司土壤 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取，以 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2　PCR 扩增 *nirS* 基因

以 Cd3aF-GC F 5′-GT(C/G) AAC GT(C/G) AAG GA(A/G) AC(C/G) GG-3′ 和 R3cd 5′-GA (C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TTGA-3′ 为引物扩增 *nirS* 基因[13,18]。PCR 扩增体系为：10× PCR 缓冲溶液[500 mmol/L tris-HCl (pH 8.0)，0.5 μmol/L引物，25 mmol/L $MgCl_2$]，0.25 mmol/L dNTPs，1.25 U *Taq*DNA 聚合酶。PCR 反应条件为：95℃预变性 4 min；95℃变性 50 s，52℃退火 30 s，72℃延伸 50 s，35 次循环；72℃延伸8 min。PCR 扩增产物为 706 bp。

1.5.3　变性梯度凝胶电泳(DGGE)

变性剂梯度范围为 30%～50%，聚丙烯酰胺凝胶浓度为 7%(变性剂为尿素 7 mol/L 和 40%的去离子甲酰胺)。200 V 60℃下电泳 5 h。采用 SYBR Green 对凝胶进行染色。

1.5.4　DGGE 指纹图谱分析、群落结构计算和系统学分析

采用凝胶成像系统分析 DGGE 指纹图谱。计算丰富度指数(Margalef) $R=S-1/\ln N$，S 为某一泳道的总带数；Shannon 多样性指数：$H=-\Sigma(n_i/N)\ln(n_i/N)$，$n_i$ 表示单一条带的峰面积，N 为所有峰的面积；均匀度指数(Eveness)：$E=H/H_{max}$(其中 $H_{max}=\ln S$)[19]，并据此分析反硝化细菌群落结构。

1.5.5　*nirS* 基因序列的鉴别和系统发育分析

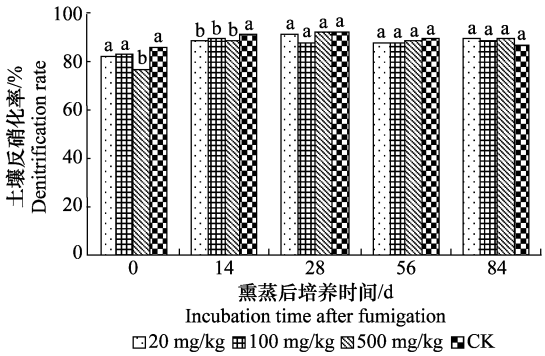
将所测阳性转化克隆菌 *nirS* 基因序列用 DNAMAN (Version 4.0)软件去除两端的载体序列；用 CHECK CHEMERA 程序检测人工嵌合序列并剔除，得到 *nirS* 序列。用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索相似序列，用 DNAMAN (Version 5.0)进行比对和系统发育分析。

2　结果与分析

2.1　氯化苦熏蒸土壤的反硝化作用

以 20 mg/kg(低浓度)、100 mg/kg(中浓度)、

500 mg/kg(高浓度)90%氯化苦液剂处理土壤，于处理后的 0 d 及培养 14、28、56、84 d 测定土壤反硝化率，结果见图 1。熏蒸剂处理不同时间对土壤反硝化作用的影响不同，处理后 0 d 高浓度(500 mg/kg)处理反硝化率为 77.57%，显著低于低、中浓度处理土样及对照(86.72%)($P<0.05$)，比对照减低了 10.55%。低、中浓度氯化苦处理土样之间及与对照土样无显著差异($P>0.05$)。熏蒸后培养 14 d，低、中、高浓度处理均显著低于对照土样($P<0.05$)，而 3 种浓度处理之间无显著差异。熏蒸培养 28、56、84 d，3 种浓度氯化苦(低、中、高)熏蒸的土样的反硝化率无显著差异($P>0.05$)；其与对照(未熏蒸土样)土样无显著差异($P>0.05$)。试验结果说明土壤反硝化作用对氯化苦熏蒸敏感，刚熏蒸后就表现出高浓度氯化苦抑制土壤反硝化作用；2 周后三种浓度氯化苦均抑制土壤反硝化作用；4 周后土壤的反硝化作用自然恢复。



同一组中不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著，下同。
Different letlers on the bar in same group indicate significant difference at 0.05 level. The same below

图 1 不同浓度氯化苦熏蒸土壤反硝化作用的变化

Fig. 1 Changes of soil denitrification with different concentrations of chloropicrin fumigation

2.2 氯化苦熏蒸土壤硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性的变化

氯化苦熏蒸土壤硝酸还原酶活性的变化如图 2 所示，培养不同时间土壤硝酸还原酶活性不同，熏蒸后 0 d 与 14、28、56 d 低、中、高浓度氯化苦熏蒸的土样之间无显著差异($P>0.05$)；其与对照(未熏蒸土样)土样无显著差异($P>0.05$)。熏蒸培养 84 d 高、中、低浓度氯化苦处理土样硝酸还原酶活性显著低于对照土样($P<0.05$)；而低、中、高浓度氯化苦处理土样之间无显著差异($P>0.05$)。说明氯化苦熏蒸后在土样培养的后期(84 d)抑制土样硝酸还原酶活性，且不同浓度之间无显著差异。

不同浓度氯化苦熏蒸对土壤亚硝酸还原酶活性的影响见图 3，处理后 0 d，高浓度(500 mg/kg)处理显著低于对照土样($P<0.05$)，高、中、低浓度氯化苦处理土样之间无显著差异($P>0.05$)，中、低浓度氯化苦处理与对照土样无显著差异($P>0.05$)。熏蒸后培养 14 d，低、中浓度处理土壤亚硝酸还原酶活性均显著低于对照土样($P<0.05$)，而高浓度处理与对照之间无显著差异($P>0.05$)。熏蒸培养28 d，低浓度处理显著低于对照土样($P<0.05$)，而中、高浓度处理与对照之间无显著差异($P>0.05$)。56 d、84 d，三种浓度氯化苦(低、中、高)熏蒸的土样土壤亚硝酸还原酶活性无显著差异($P>0.05$)；其与对照土样无显著差异($P>0.05$)。试验结果表明，高浓度氯化苦熏蒸后，土壤亚硝酸还原酶活性被抑制；而 8 周后土壤的亚硝酸还原酶活性恢复。

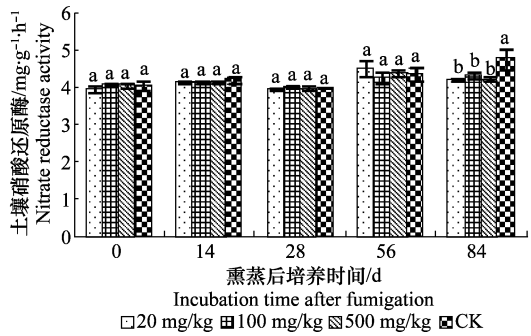


图 2 不同浓度氯化苦熏蒸对土壤硝酸还原酶活性的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of chloropicrin fumigation on the activity of nitrate reductase in soil

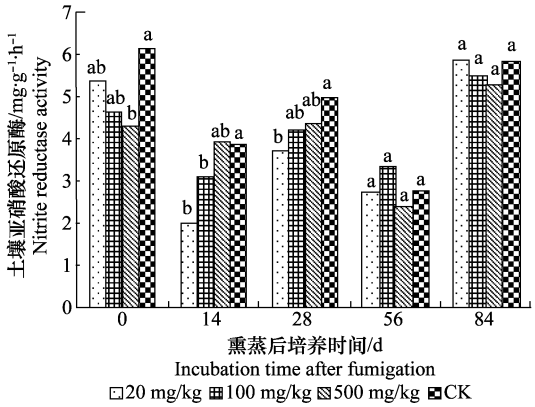


图 3 不同浓度氯化苦熏蒸对土壤亚硝酸还原酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of chloropicrin fumigation on the activity of nitrite reductase in soil

2.3 氯化苦熏蒸土壤 NH_4-N、NO_3-N 含量的变化

不同浓度氯化苦熏蒸对土壤 NH_4-N 含量的影

响见图 4。熏蒸后,培养 0 d 和 14 d,低、中、高浓度氯化苦处理土样之间及与对照土样 NH_4-N 含量无显著差异($P>0.05$)。培养 28 d,低浓度氯化苦熏蒸处理 NH_4-N 含量显著低于中、高浓度氯化苦熏蒸处理和对照土样($P<0.05$)。培养 56 d,中浓度处理 NH_4-N 含量显著低于对照($P<0.05$),而高、低浓度处理土样与对照无显著差异($P>0.05$)。培养 84 d,低,中、高浓度处理 NH_4-N 含量显著低于对照($P<0.05$),低浓度处理显著低于中、高浓度处理($P<0.05$),而中、高浓度处理无显著差异($P>0.05$)。试验结果说明氯化苦熏蒸对土壤 NH_4-N 含量的影响发生在培养的后期(28 d后),且不同浓度的影响不同。

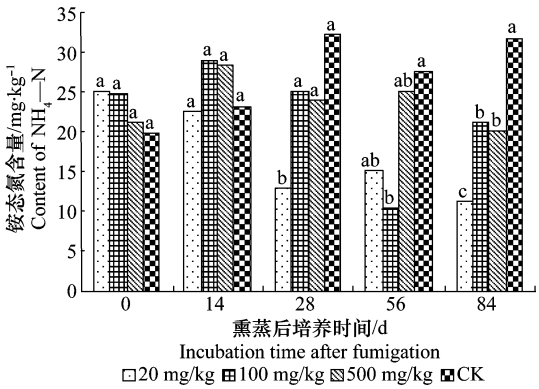


图 4　不同浓度氯化苦熏蒸土壤 NH_4-N 含量的变化

Fig. 4　Change of NH_4-N content in soil treated by different concentrations of chloropicrin fumigation

氯化苦熏蒸对土壤 NO_3-N 含量的影响如图 5,熏蒸后 0 d 及培养 14、28 d,低、中、高浓度氯化苦熏蒸的土样无显著差异($P>0.05$);其与对照(未熏蒸土样)土样也无显著差异($P>0.05$)。熏蒸后培养 56 d,中浓度处理 NO_3-N 含量显著低于对照及高、低浓度处理($P<0.05$),而高、低浓度处理与对照无显著差异($P>0.05$)。培养 84 d,低浓度氯化苦熏蒸处理与对照无显著差异($P>0.05$),高、中浓度氯化苦熏蒸处理显著高于对照($P<0.05$),低浓度氯化苦熏蒸处理显著低于高、中浓度处理($P<0.05$)。说明高、中浓度氯化苦熏蒸对土壤 NO_3-N 含量有影响。

2.4　PCR-DGGE 方法分析氯化苦熏蒸土样 *nirS* 型反硝化细菌群落结构

2.4.1　氯化苦熏蒸土壤样品 *nirS* 型反硝化型细菌的 DGGE 指纹分析

不同浓度氯化苦熏蒸土样培养不同时间后,土样 *nirS* 型反硝化基因的 DGGE 图谱结果见图 6。不同泳道上有一些共同的 DNA 条带,且其中有一条泳带在不同样品中迁移率一致,说明不同浓度氯化苦熏蒸处理间以及和对照土壤间存在相同的反硝化细菌类群, DNA 条带信号强度不同说明不同浓度氯化苦熏蒸对土样反硝化细菌丰富性影响不同。各个土样的扩增产物经 DGGE 电泳区分条带数目、迁移率差别很小,说明土样反硝化细菌类群相似。回收图 6 中 1、2、3 号电泳条带,经测序鉴定为均 Uncultured denitrifying bacterium (表 1),系统发育关系结果见图 7,1 号和 3 号条带回收产物的同源关系较近,和 2 号条带同源关系较远。

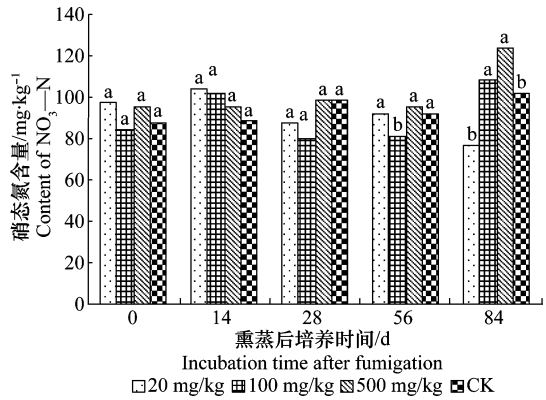


图 5　不同浓度氯化苦熏蒸后土壤 NO_3-N 含量的变化

Fig. 5　Change of NO_3-N content in soil treated by different concentrations of chloropicrin fumigation

表 1　*nirS*-PCR-DGGE 片段测序分析结果

Table 1　Sequencing analysis of *nirS*-PCR-DGGE bands

电泳条带 Bands	GenBank 登录号 GenBank accession no.	测序菌种与 NCBI 序列同源性高的菌种 The strain or clone with the highest identity with that from NCBI
1	HQ882586.1	Uncultured denitrifying bacterium clone S1-69
2	HQ882552.1	Uncultured denitrifying bacterium clone S1-61
3	HQ882586.1	Uncultured denitrifying bacterium clone S1-69

2.4.2　氯化苦熏蒸剂处理土壤 *nirS* 型反硝化细菌群落结构分析

物种多样性指数是应用数学的方法来度量组成群落的物种种类数、个体总数以及各种群均匀程度等 3 个方面的数量指标,从而表明群落的组织结构水平及其生态学特征[19]。多样性指数(H),均匀度(E)和丰富度(R)分别从不同角度反映群落结构特征,它们可以反映群落类型的不同,群落结构的差异,群落演替的动态变化。

90%氯化苦液剂 3 种浓度熏蒸土样的多样性指数(H)随熏蒸后培养时间不同表现不同(表 2)。熏蒸后 0 d 和 14 d,H 表现为 500 mg/kg>20 mg/kg>CK>100 mg/kg;熏蒸后 28 d,H 表现为 20 mg/kg>500 mg/kg>100 mg/kg>CK;熏蒸后 56 d 和 84 d,H 表现为 500 mg/kg>100 mg/kg>20 mg/kg>CK。

90%氯化苦液剂 3 种浓度熏蒸后的土样和对照土样的均匀度指数(E)相近(表 2),表明氯化苦熏蒸不会影响 *nirS* 型反硝化细菌群落的均匀度。

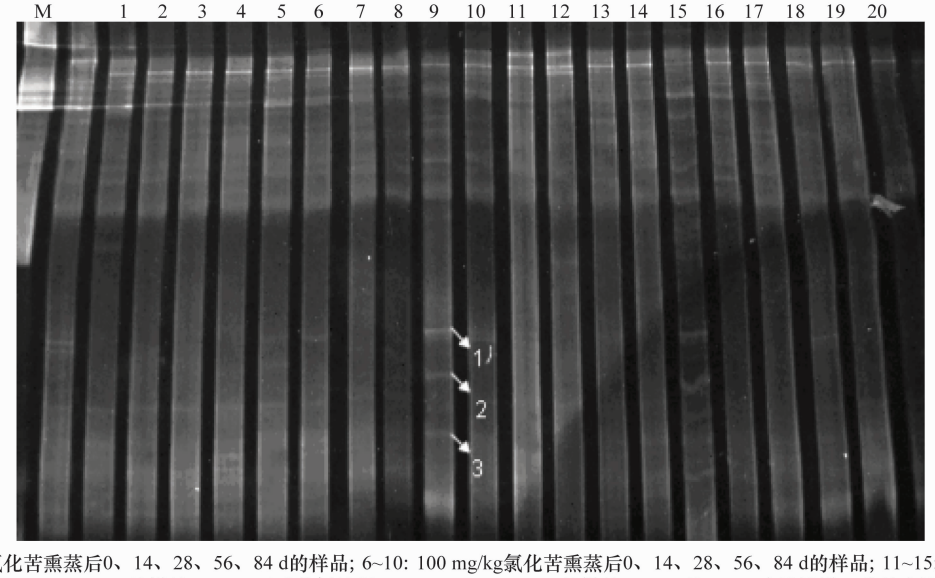
90%氯化苦液剂 3 种浓度熏蒸后土样的丰富度指数(R)随熏蒸后培养时间不同表现不同(表 2)。熏蒸后 0 d,R 表现为 500 mg/kg>CK>20 mg/kg>100 mg/kg;熏蒸后 14 d,R 表现为 500 mg/kg>20 mg/kg>CK>100 mg/kg;熏蒸后 28 d,R 表现为 20 mg/kg>500 mg/kg>100 mg/kg>CK;熏蒸后 56 d,R 表现为 100 mg/kg>20 mg/kg>500 mg/kg>CK;熏蒸后 84 d,R 表现为 100 mg/kg=500 mg/kg>20 mg/kg>CK。熏蒸后 28~84 d,经氯化苦熏蒸土壤丰富度指数(R)均大于对照(CK),说明说明20 mg/kg、100 mg/kg 和 500 mg/kg 氯化苦可诱导新类型 *nirS* 型反硝化细菌的大量产生。

表 2 氯化苦反硝化细菌生态指数[1)]

Table 2 Ecological index of *nirS* type of denitrifying bacteria in the soil fumigated with chloropicrin

熏蒸后培养时间/d Time after fumigation	氯化苦熏蒸浓度/mg·kg^{-1} Concentration of chloropicrin	多样性指数(H) Shannon index	均匀度(E) Eveness index	丰富度(R) Margalef index
0	20	1.387 b	0.959 a	27.804 c
	100	1.204 d	0.959 a	17.788 d
	500	1.409 a	0.936 a	31.809 a
	CK	1.340 c	0.916 a	28.803 b
14	20	1.301 b	0.943 a	23.796 b
	100	0.729 d	0.764 a	8.782 d
	500	1.360 a	0.961 a	25.803 a
	CK	1.165 c	0.947 a	16.804 c
28	20	1.310 a	0.950 a	23.797 a
	100	1.151 c	0.900 a	18.800 c
	500	1.219 b	0.895 a	22.804 b
	CK	1.087 d	0.903 a	15.798 d
56	20	1.342 c	0.949 a	25.798 b
	100	1.363 b	0.952 a	26.805 a
	500	1.376 a	0.955 a	16.791 c
	CK	0.943 d	0.943 a	9.788 d
84	20	1.183 c	0.925 a	18.802 b
	100	1.328 b	0.962 a	23.799 a
	500	1.391 a	0.935 a	23.798 a
	CK	0.927 d	0.971 a	8.786 c

1) 表中数据为平均值,数据后不同字母表示同一时间不同氯化苦浓度处理差异显著($P<0.05$)。
Data in the table are the mean value. Different small letter in same incubation time indicate significant difference among different concentration treatment of chloropicrin ($P<0.05$).



1~5: 20 mg/kg氯化苦熏蒸后0、14、28、56、84 d的样品; 6~10: 100 mg/kg氯化苦熏蒸后0、14、28、56、84 d的样品; 11~15: 500 mg/kg氯化苦熏蒸后0、14、28、56、84 d的样品; 16~20:无熏蒸剂处理0、14、28、56、84 d的样品。1~3: 从DGGE电泳泳道回收的电泳带
1-5: 0, 14, 28, 56 and 84 d after fumigation with 20 mg/kg chloropicrin; 6-10: 0, 14, 28, 56, 84 d after fumigation with 100 mg/kg chloropicrin; 11-15: 0, 14, 28, 56, 84 d after fumigation with 500 mg/kg chloropicrin; 16-20: 0, 14, 28, 56, 84 d after treatment with no fumigant. Electrophoretic bands 1-3 are recovered from DGGE

图 6 氯化苦熏蒸土壤 *nirS* 型反硝化细菌的 DGGE 结果

Fig. 6 Results of DGGE analysis of *nirS*-denitrifying bacteria in soil after chloropicrin fumigation

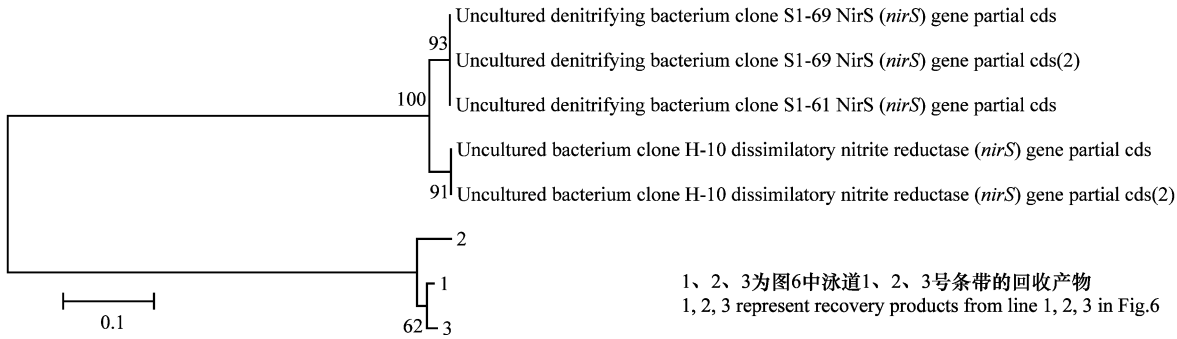


图 7　氯化苦熏蒸土壤 *nirS* 基因序列与其他已知 *nirS* 序列的系统发育树

Fig. 7　Phylogenetic tree based on the *nirS* sequences originated from the soil fumigated with chloropicrin and other known *nirS* sequences

3　讨论

参与土壤生物反硝化的主要生物酶有硝酸盐还原酶（基因：*narG*）、亚硝酸盐还原酶（基因：*nirS*、*nirK*）。本研究中硝酸还原酶在熏蒸后 12 周受到抑制，2 周后 20、100、500 mg/kg 浓度氯化苦均抑制土壤反硝化作用。氯化苦抑制硝酸还原酶与抑制反硝化作用时间不一致，表明反硝化过程中硝酸还原酶的催化作用不起主要作用，而亚硝酸还原酶是反硝化作用的关键酶。编码反硝化细菌的亚硝酸还原酶基因有 *nirS* 和 *nirK*[20]，且广泛存在于土壤反硝化细菌中[21-22]。从本试验结果可知高浓度氯化苦熏蒸增加了 *nirS* 型反硝化细菌的种类和丰富性，由此推断氯化苦应促进反硝化作用，但是本试验结果表明高浓度氯化苦抑制土壤反硝化作用，说明了 *nirS* 型反硝化细菌在土壤反硝化作用中不起主要作用，有可能是 *nirK* 型反硝化细菌在土壤反硝化作用中起主要作用。该推断尚有待于进一步的研究。

参考文献

[1] BEN-YEPHET Y, MELERO-VERA J M, Devay J E. Interaction of soil solarization and metharn-sodium in the destruction of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfecmm* [J]. Crop Protection, 1988,7(5): 327 - 331.

[2] GILREATH J P, MOILS T N, SANTOS B M, et al. Influence of supplementary in-bed chloropicrin application on soilborne pest control in tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Crop Protection, 2005,24(9): 779 - 784.

[3] HUTCHINSON C M, MCGIFEN M E, OHR H D, et al. Efficacy of methyl iodide and synergy with chloropicrin for control of fungi [J]. Pest Management Science, 2000,56: 413 - 418.

[4] MINUTO A, GULLINO M L, LAMBERTI F, et al. Application of an emulsifiable mixture of 1, 3-dichloropropene and chloropicrin against root knot nematodes and soilborne fungi for greenhouse tomatoes in Italy [J]. Crop Protection, 2006, 25(12): 1244 - 1252.

[5] GILREATH J, SANTOS B M. Herbicide dose and incorporation depth in combination with 1,3-dichloropropene plus chloropicrin for *Cyperus rotundus* control in tomato and pepper [J]. Crop Protection, 2004,23(3): 205 - 210.

[6] HANSON B D, GAO S, GERIK J S, et al. Effects of emission reduction surface seal treatments on pest control with shank-injected 1,3-dichloropropene and chloropicrin [J]. Crop Protection, 2011,30(2): 203 - 207.

[7] KLOSE S, AJWA H A, FENNIMORE S A. Dose response of weed seeds and soilborne pathogens to 1,3-D and chloropicrin [J]. Crop Protection, 2007,26(4): 535 - 542.

[8] 孙军德，赵春燕，曲宝成，等. 氯化苦熏蒸土壤对微生物种群数量的影响[J]. 土壤通报，2005，12(2)：51 - 53.

[9] 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.

[10] ROUX-MICHOLLET D, CZARNES S, ADAM B, et al. Effects of steam disinfestation on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil [J]. Soil Biology & Biochemistry,2008, 40: 1836 - 1845.

[11] 颜冬冬. 熏蒸对设施栽培土壤中可溶性氮素、氧化亚氮的影响及其微生物学机制[D]. 北京：中国农业科学院，2013.

[12] MOUNIER E, HALLET S, CHENEBY D. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community [J]. Environmental Microbiology,2004,6(3):301 - 312.

[13] 莫旭华，麻威，史荣久，等. 氮肥对小麦田土壤型反硝化细菌多样性的影响[J]. 微生物学报，2009，49(9)：1203 - 1208.

（下转 228 页）

[18] LI Xiaoqiong, GUO Wenfeng, SIEMANN E, et al. Plant genotypes affect aboveground and belowground herbivore interactions by changing chemical defense [J]. Oecologia, 2016, 182(4):1107-1115.

[19] 刘亚珍，覃志伟，项瑶，等. 天敌互作对乌桕生长及生物量的影响[J]. 西南林业大学学报(自然科学)，2018，38(1):196-201.

[20] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社，2000.

[21] 叶子飘，于强. 光合作用光响应模型的比较[J]. 植物生态学报，2008，32(6):1356-1361.

[22] KAPLAN I, SARDANELLI S, DENNO R F. Field evidence for indirect interactions between foliar-feeding insect and root-feeding nematode communities on *Nicotiana tabacum* [J]. Ecological Entomology, 2010, 34(2):262-270.

[23] MARON J L, SIMMS E L. Rodent-limited establishment of bush lupine: field experiments on the cumulative effect of granivory [J]. Journal of Ecology, 2010, 89(4):578-588.

[24] HUANG Wei, DING Jianqing. Effects of generalist herbivory on resistance and resource allocation by the invasive plant, *Phytolacca americana* [J]. Insect Science, 2016, 23(2):191-199.

[25] WURST S, VAN DAM N M, MONROY F, et al. Intraspecific variation in plant defense alters effects of root herbivores on leaf chemistry and aboveground herbivore damage [J]. Journal of Chemical Ecology, 2008, 34(10):1360-1367.

[26] STRAUSS S Y, AGRAWAL A A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1999, 14(5):179-185.

[27] KAPLAN I, HALITSCHKE R, KESSLER A, et al. Physiological integration of roots and shoots in plant defense strategies links above-and belowground herbivory [J]. Ecology Letters, 2008, 11(8):841-851.

[28] HUANG Wei, SIEMANN E, GREGROYS S, et al. Resource allocation to defence and growth are driven by different responses to generalist and specialist herbivory in an invasive plant [J]. Journal of Ecology, 2010, 98(5):1157-1167.

[29] 王毅. 外来入侵植物防御昆虫能力的进化——以乌桕为例[D]. 北京：中国科学院研究生院，2012.

[30] PATTISON R R, GOLDSTEIN G, ARES A. Growth, biomass allocation and photosynthesis of invasive and native Hawaiian rainforest species [J]. Oecologia, 1998, 117(4):449-459.

[31] TOG T, KJF V, JANSEN J J, et al. Correction: plants know where it hurts: root and shoot Jasmonic acid induction elicit differential responses in *Brassica oleracea* [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(6):e65502.

[32] 赵德斌，刘桂华，唐燕平，等. 方翅网蝽对两种类型悬铃木光合作用的影响[J]. 林业工程学报，2011，25(3):36-40.

[33] 梁军生，陈晓鸣，王健敏，等. 受小蠹虫不同阶段为害的云南松光合生理反应分析[J]. 林业科学研究，2009，22(3):407-412.

[34] ELLSWORTH D S, TYREE M T, PARKER B L, et al. Photosynthesis and water-use efficiency of sugar maple (*Acer saccharum*) in relation to pear thrips defoliation [J]. Tree Physiology, 1994, 14(6):619.

[35] EYLES A, PINKARD E A, O'GRADY A P, et al. Role of corticular photosynthesis following defoliation in *Eucalyptus globulus* [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 32(8):1004-1014.

[36] 郭素民. 入侵植物喜旱莲子草对天敌的响应及机制研究[D]. 临汾:山西师范大学，2014.

[37] BUENO A D F, BUENO R C O D F, NABITY P D, et al. Photosynthetic response of soybean to twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) injury [J]. Brazilian Archives of Biology & Technology, 2009, 52(4):825-834.

[38] DALLAGNOL L J, RODRIGUES F A, CAVATTE P C, et al. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae* [J]. Australasian Plant Pathology, 2011, 40(4):360-365.

(责任编辑：杨明丽)

(上接 213 页)

[14] BRAKER G, FESEFELDT A, WITZE K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3769-3775.

[15] BRAKER G, ZHOU Jizhong, WU Liyou. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2096-2104.

[16] 李阜棣，喻子牛，何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社，1996:21-34.

[17] 李振高，骆永明，滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京:科学出版社，2008:56-68.

[18] 陈哲，陈春兰，秦红灵，等. 化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响[J]. 生态学报，2009，29(11):6142-6147.

[19] 李晔，孙丽娜，杨继松，等. 基于 PCR-DGGE 的重金属污染土壤微生物种群指纹分析[J]. 生态环境学报，2010，19(9):2204-2208.

[20] PETER M, MARK A, BOHLKE J K, et al. Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem [J]. Ecological Applications, 2006, 16(6): 2091-2122.

[21] PRIEME A, BRAKER G, TIEDJE M. Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1893-1900.

[22] THROBACK IN, ENWALL K, JARVIS A, et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 49: 401-417.

(责任编辑：杨明丽)