

# Effects of Fumigation with Chloropicrin on Soil Fungal Composition and Diversity after Continuous Cropping of *Panax notoginseng*

Yi Lv<sup>1\*</sup>, Ya Zhao<sup>1\*</sup>, Xudong Mao<sup>1\*</sup>, Yang Liu<sup>1</sup>, Yao Xiao<sup>1</sup>, Ting Luo<sup>1</sup>, Xiuming Cui<sup>1,2</sup>, Lianbing Lin<sup>1</sup>, Feng Wang<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan

<sup>2</sup>Key Laboratory of *Panax notoginseng* in Yunnan Province, Kunming Yunnan

Email: #wangfeng076@126.com

Received: Aug. 22<sup>nd</sup>, 2019; accepted: Sep. 4<sup>th</sup>, 2019; published: Sep. 11<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

*Panax notoginseng* is one of the most valuable traditional Chinese medicine, which usually grows under warm and humid environment and thus has high mortality in root rot caused by continuous cropping. Currently, soil fumigation with chloropicrin (CP) is an effective way to avoid this. In this study, ITS sequencing based on Illumina MiSeq platform was employed to analyze the structure and diversity of fungal community in the soil samples with or without CP fumigation. We found that fumigation with CP had a remarkable effect on the composition of soil fungal community. Especially, the relative abundance of harmful genera, for example, *Fusarium*, was significantly decreased from 7.42% to 1.97%, while the abundance of friendly genera, for example, *Trichoderma*, was remarkably increased from 14.70% to 23.45%. Our results provide new insights for CP fumigation in promoting self-reparation of soil microecosystem and controlling root rot in *Panax notoginseng* caused by disordered fungal community.

## Keywords

*Panax notoginseng*, Rhizosphere Soil, Fungal Community, ITS Sequencing, Continuous Cropping Obstacle

# 氯化苦土壤消毒对三七种植后真菌群落组成及多样性的影响

吕艺<sup>1\*</sup>, 赵娅<sup>1\*</sup>, 毛煦东<sup>1\*</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 肖瑶<sup>1</sup>, 罗婷<sup>1</sup>, 崔秀明<sup>1,2</sup>, 林连兵<sup>1</sup>, 王峰<sup>1#</sup>

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 吕艺, 赵娅, 毛煦东, 刘洋, 肖瑶, 罗婷, 崔秀明, 林连兵, 王峰. 氯化苦土壤消毒对三七种植后真菌群落组成及多样性的影响[J]. 微生物前沿, 2019, 8(3): 121-129. DOI: 10.12677/amb.2019.83015

<sup>1</sup>昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明

<sup>2</sup>云南省三七种植重点实验室, 云南 昆明

Email: \*wangfeng076@126.com

收稿日期: 2019年8月22日; 录用日期: 2019年9月4日; 发布日期: 2019年9月11日

## 摘要

三七是我国特有的名贵中药材, 喜温暖而阴湿的环境, 这种环境极易诱发其根腐病形成, 导致连作障碍的发生。氯化苦是一种具有挥发性的土壤熏蒸剂, 目前, 采用其进行土壤消毒是防治三七土传病害的有效措施。本研究中, 我们采用基于Illumina MiSeq平台的ITS高通量测序技术研究氯化苦消毒后三七种植地中土壤真菌群落组成、多样性的变化。结果表明, 氯化苦消毒后的三七根际土壤与未消毒的根际土壤相比真菌群落组成、多样性存在明显差异, 并且经氯化苦消毒后, 常见的主要三七致病真菌镰刀菌属(*Fusarium*)占比出现极大下降, 从消毒前的7.42%下降到消毒后的1.97%, 而对三七生长有益的木霉属(*Trichoderma*)真菌占比则出现相对升高(从消毒前的14.70%增加到消毒后的23.45%)。这些结果表明氯化苦消毒在三七连作障碍的防治中可以影响真菌群落的结构和组成, 导致病原菌和有益菌占比发生变化, 这种变化对于三七种植地土壤环境的改善、菌群结构的平衡以及土壤微生态的自我修复具有重要意义。

## 关键词

三七, 根际土壤, 真菌群落, ITS测序, 连作障碍

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

三七(*Panax notoginseng*)是一种传统的名贵中药材, 主产于云南文山, 具有“止血、散瘀、定痛”等功效[1] [2]。要想获得高质量、高品质的三七, 必须连续种植三年或三年以上。然而, 长时间的连续种植使三七极易受到土传病害的攻击, 如根腐病、灰霉病、黑斑病、疫霉病、锈腐病、白粉病和圆斑病等, 其中根腐病是三七最常见病害之一[3] [4]。当前, 已报道的三七根腐病病原菌主要有腐皮镰孢菌、细链格孢菌、坏损柱孢菌和黄腐病菌等[5] [6], 由此导致的损失常年在5%~20%左右, 最高可达70% [7] [8]。三七的连作障碍问题严重制约其种植周期和产量, 极大的降低了土地的利用率, 其中根际微生物的动态变化是三七连作障碍的重要因子之一, 也是目前的研究热点。

氯化苦的化学名称是三氯硝基甲烷, 其分子式为 $\text{CCl}_3\text{NO}_2$ , 可用于粮食熏蒸, 土壤、植物种子消毒等[9] [10]。氯化苦土壤熏蒸消毒可有效杀灭各种土壤病原微生物, 研究表明, 其对有害细菌、真菌的杀灭率均在85%以上, 可以极大的降低相关土传病害的侵染率, 而且由于氯化苦具有很强的挥发性, 其在土壤中残留量极低, 目前, 美国、日本、以色列、我国山东等地已有较大面积的应用[10] [11], 但是其在三七种植以及连作障碍防治中的应用报道较少, 特别是氯化苦施用后对三七土壤中真菌群落的影响尚未见报道。

随着基因组学测序技术的迅猛发展, 基于真菌 ITS 序列的免培养高通量测序方法已成为研究土壤样品中真菌群落结构和组成的重要工具[12]。基于此, 本研究采用 Illumina MiSeq 测序平台, 通过构建小片段 DNA 文库进行双末端(paired-end)宏基因组学测序获得土壤样品中真菌的物种组成及其丰度信息, 并通过  $\alpha$  多样性分析、 $\beta$  多样性分析对氯化苦消毒前后的三七种植地中真菌群落组成和多样性的变化做一系统的分析。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 研究区概况

试验于 2016~2017 年在云南文山州七麟三七科技有限公司三七种植基地试验田进行, 试验地处于云南省东南部低纬度高原地区(东经 103°43'~104°27', 北纬 23°06'~23°44'), 试验区属中亚热带季风气候, 平均相对湿度 75%, 年均降雨量 1187.8 mm。试验场地实行统一化、科学化和规范化管理, 采用人工建棚(统一遮阳网覆盖)方式进行三七栽培。

### 2.2. 土壤样品采集

试验采用田间小区型实验设计, 设无熏蒸消毒和熏蒸消毒两个处理。无熏蒸消毒处理为对照, 即土壤不做任何处理; 熏蒸消毒处理为用氯化苦消毒土壤, 具体操作方法为用耕地机将土翻开 20 公分, 按照 30 公斤每亩用量喷洒氯化苦消毒剂, 消毒剂喷撒后用薄膜将其罩住进行熏蒸消毒 20 天, 之后揭去薄膜, 再自然晾晒半个月进行轮作种植。因氯化苦是易挥发化学物质, 且有剧毒, 必须在通风环境内, 佩戴防毒面具操作。其它大田管理和三七农事操作等均按照常规管理进行。土壤采样方法为 5 点法(即: 每块地分五个不同地点采样, 设置三个重复)。样品采集深度为地下 10~20 cm, 土样采集后, 先用 4 mm 土筛进行筛选, 然后装入低温冰盒中进行储存, 带回实验室放入 -80℃ 超低温冰箱, 用于宏基因组学测序。

### 2.3. 土壤真菌基因组总 DNA 的提取

按照 SPIN Kit for Soil 试剂盒(Mpbio 公司, 美国)说明书提供的操作步骤, 从土壤样品中提取真菌宏基因组 DNA 并进行电泳检测后, 于 -20℃ 冰箱中冷冻保存 DNA 样品。

### 2.4. PCR 扩增与测序

将提取并纯化后的土壤总 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 采用 ITS 序列的通用引物进行 PCR 扩增, 引物序列为 ITS-F: GCATCGATGAACGCAGC, ITS-R: TCCTCCGCTTATTGATATGC [13]。PCR 扩增的实验条件为: 95℃ 预变性 2 min, 退火温度为 55℃, 时间为 30 s, 链延伸温度为 72℃, 时间为 30 s, 共计进行 30 次循环, 最终 72℃ 延伸 5 min。扩增完成以后, 取 10  $\mu$ L 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并进行上机测序。所有样品测序均在美因健康科技(北京)有限公司进行, 主要方法为采用 Illumina MiSeq 高通量二代基因测序系统, 通过构建小片段文库进行双末端(paired-end)测序, reads 读长为 250 bp。

### 2.5. 数据分析

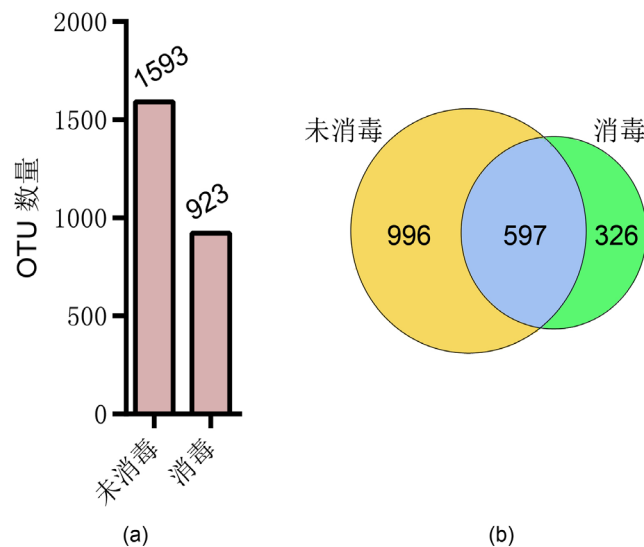
测序数据分析的主要流程为首先对原始数据(Raw reads)进行拼接、过滤, 得到 Clean Tags, Clean Tags 经过嵌合体的去除得到有效数据(Effective Tags), 然后基于质控合格的有效数据进行后续生物信息分析, 根据特定的阈值(默认选取 97%)进行 OTU (Operational Taxonomic Units)聚类, 结合目前的微生物学权威数据库 Unite [14]进行物种注释和分类。具体包括以下流程: 1) 去除 Reads 两端的 Barcode 和 Primer 序列; 2) 使用 Qiime [15]提供的脚本利用 Read1 和 Read2 之间的重叠区进行拼接, 拼接后的序列为 Raw Tags。

拼接采用 fastq-join 方法, 拼接过程要求重叠区的最小长度为 10 bp, 最大错配率为 10%; 3) 对 Raw Tags 进行质控, 截断掉含 5 个以上连续 N 或低质量碱基的 Tags, 并进一步过滤掉连续高质量碱基长度小于 Tags 长度 75% 的 Tags, 从而获得 Clean Tags; 4) 去除 Clean Tags 中的嵌合体, 嵌合体即 PCR 扩增过程中产生的错误序列。嵌合体的检定采用 UCHIME 算法[14], 与 Unite 数据库比对, 嵌合体序列去除后即获得作为后续数据分析的 Effective Tags; 5) 最后按照 97% 的序列一致性将每个样本测序产生的所有 Effective Tags 聚类为 OTU, 并将 OTU 代表性序列与物种注释进行比对分析, 统计各个样品在各个分类水平菌群组成和分布情况, 并采用 Chao1 指数、Shannon 指数等对测序数据进行菌群丰富度和多样性等指标的分析[16][17][18]。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. OTU 分析

为了研究样品的真菌群落组成及其多样性信息, 我们按照 97% 的序列相似性标准将 Effective Tags 聚类成 OTU (Operational Taxonomic Units, 即分类操作单元, 是指在系统发生学研究或群体遗传学研究中, 为了便于进行分析, 人为给某一个分类单元设置的同一标志)。各样品的 OTU 数量统计结果如图 1(a)所示。为了更直观的展示不同样品之间特有和共有的 OTU, 根据分析结果进一步绘制 Venn 图(图 1(b)), 结果表明, 经过氯化苦消毒后真菌的 OTU 数量总体下降了 42.06%, 其中消毒后样品中约有 64.70% 的 OTU 与未消毒样品相同, 并新增加了 326 个 OTU。



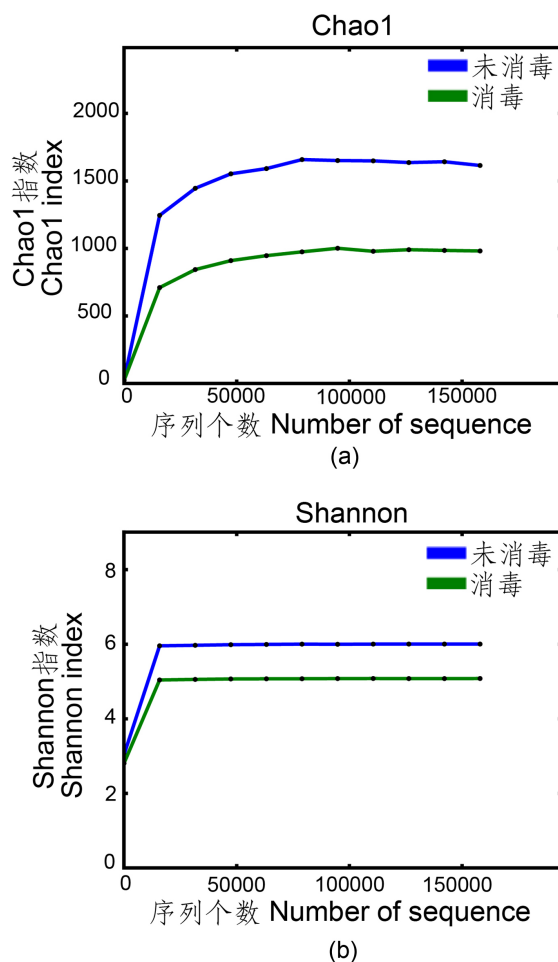
**Figure 1.** OTU number counting (a) and Venn diagram analysis (b) of soil samples without or with chloropicrin fumigation

**图 1.** 未消毒对照及氯化苦消毒处理后土壤样品 OTU 数量统计 (a) 及 Venn 图分析 (b)

#### 3.2. 氯化苦消毒对土壤真菌群落多样性的影响

如图 2 所示, 三七种植后土地经氯化苦消毒后, 真菌菌群丰富度指数(Chao1)和多样性指数(Shannon)均有所减少, 该结果与上述 OTU 分析结果一致。其中, Chao1 指数主要是计算群落丰度(Community Richness), 用于估计群落样品中包含的物种总数, Chao1 指数越大, 微生物群落丰富度越高。Shannon 指数主要用于计算群落多样性(Community Diversity), 该指数受群落中物种丰富度和均匀度(Community

Evenness)的共同影响, Shannon 指数越大, 微生物群落多样性越大。在如图 2(b)所示的未消毒和消毒样品中, Shannon 指数均达到 5 以上, 表明氯化苦消毒后真菌群落多样性实际上仍处于较高水平。



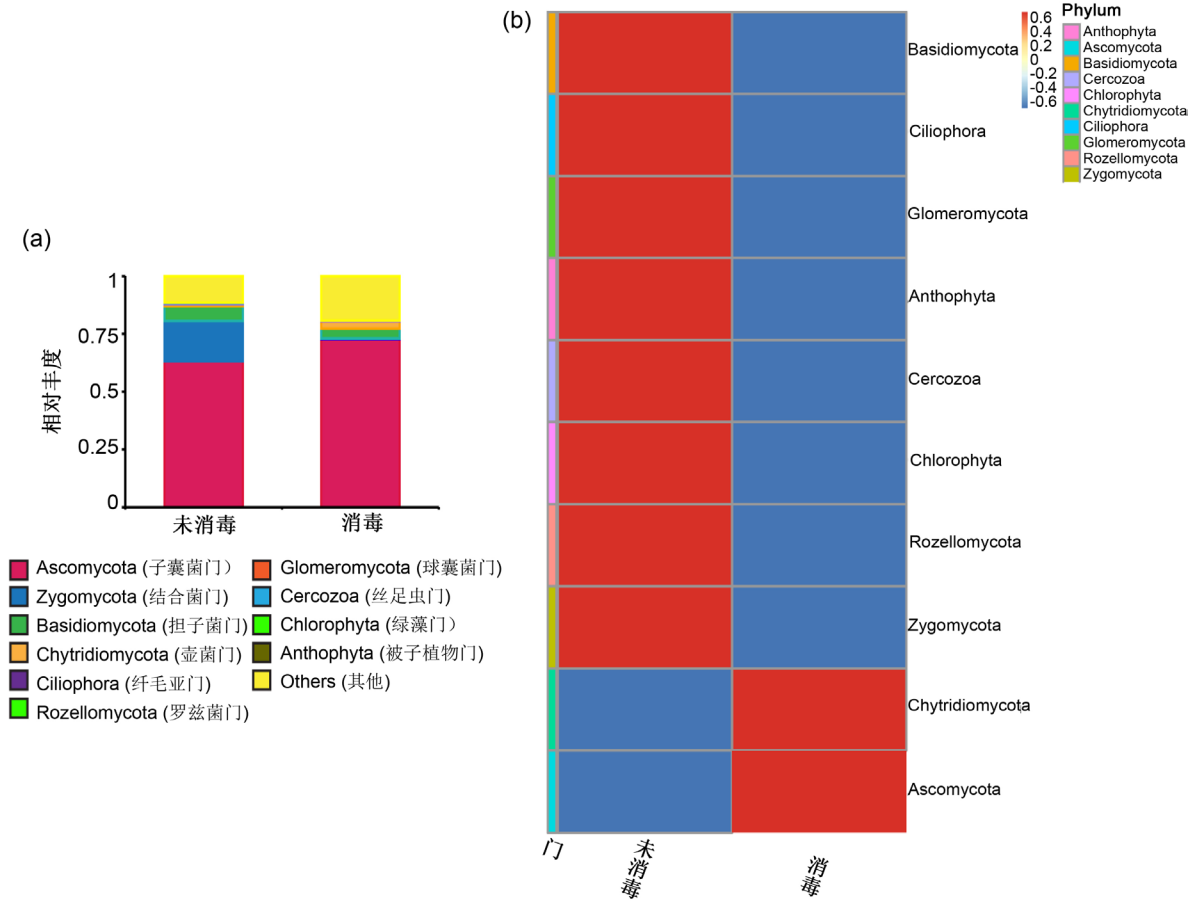
**Figure 2.** Rarefaction curves generated for fungal ITS from soil samples without or with chloropicrin fumigation ((a) Chao1 index; (b) Shannon index)

**图 2.** 未消毒对照及氯化苦消毒处理后土壤真菌 ITS 多样性稀释度曲线((a) Chao1 指数; (b) Shannon 指数)

### 3.3. 氯化苦消毒对土壤真菌群落门水平的影响

由图 3(a)所示的物种相对丰度分布柱形图可知, 氯化苦未消毒及消毒样品中平均丰度最高的 10 个门, 分别为子囊菌门(*Ascomycota*)、结合菌门(*Zygomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、壶菌门(*Chytridiomycota*)、纤毛亚门(*Ciliophora*)、罗兹菌门(*Rozellomycota*)、球囊菌门(*Glomeromycota*)、丝足虫门(*Cercozoa*)、绿藻门(*Chlorophyta*)和被子植物门(*Anthophyta*)。其中, 子囊菌门、结合菌门、担子菌门为未消毒土壤样品中的优势菌群, 它们分别占土样真菌总数的 63.25%, 17.40%和 6.40%; 子囊菌门、担子菌门和壶菌门为氯化苦土壤消毒样品中的优势菌群, 它们分别占土样真菌总数的 72.73%, 4.26%和 3.17%。由图 3(b)所示的物种丰度聚类热图可知, 担子菌门(*Basidiomycota*)、纤毛亚门(*Ciliophora*)、球囊菌门(*Glomeromycota*)、被子植物门(*Anthophyta*)、丝足虫门(*Cercozoa*)、绿藻门(*Chlorophyta*)、罗兹菌门(*Rozellomycota*)、结合菌门(*Zygomycota*)真菌在消毒后数量明显减少; 壶菌门(*Chytridiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)真菌在消毒

后数量出现明显增加。

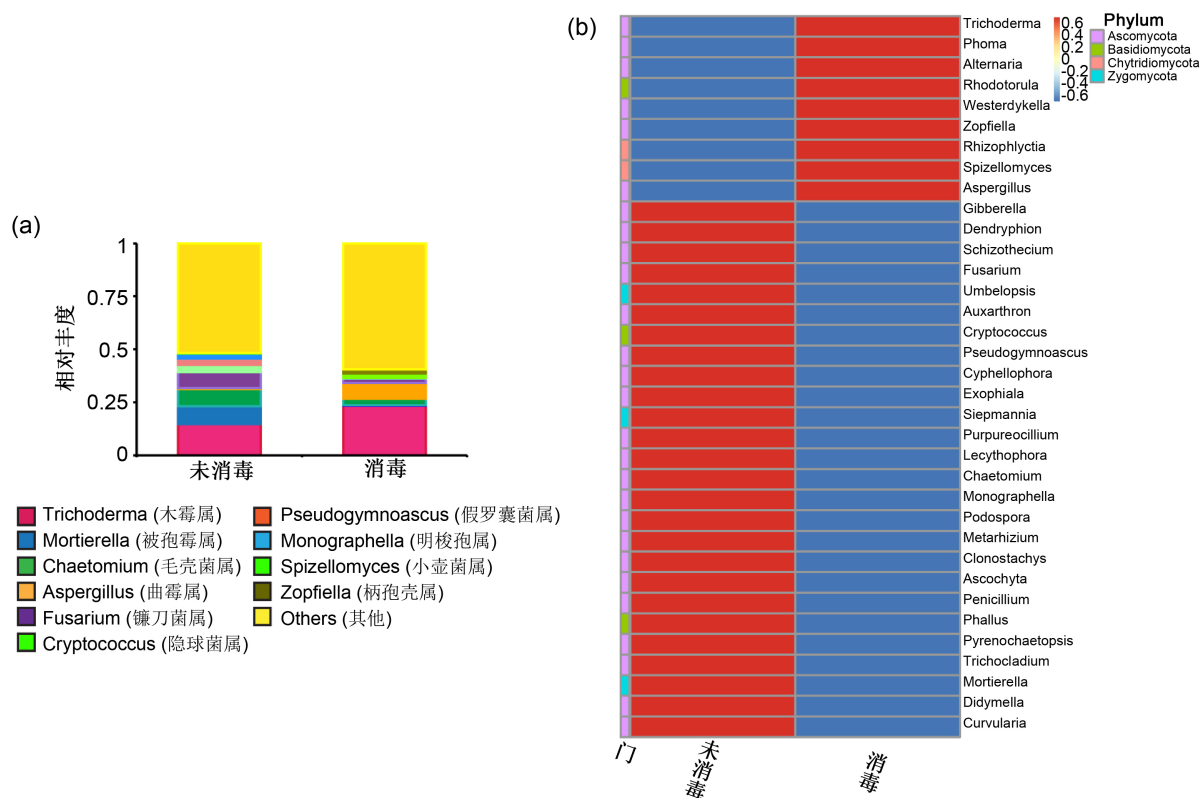


**Figure 3.** The relative abundance of species (a) and their heatmap (b) on the level of fungal community in the horizontal of the phylum without or with chloropicrin fumigation

**图 3.** 未消毒对照及氯化苦消毒处理后土壤真菌主要门水平分布柱形图(a)及丰度聚类热图(b)

### 3.4. 氯化苦消毒对土壤真菌群落属水平的影响

由图 4(a)所示的物种相对丰度分布柱形图可知,氯化苦未消毒及消毒样品中平均丰度最高的 10 个属,分别为木霉属(*Trichoderma*)、被孢霉属(*Mortierella*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)、明梭孢属(*Monographella*)、孢子菌属(*Spizellomyces*)和柄孢壳属(*Zopfiella*)。其中,木霉属、被孢霉属、毛壳菌属为未消毒土壤样品中的优势菌群,它们分别占土样真菌总数的 14.70%, 8.44%和 8.11%;木霉属、曲霉属和毛壳菌属为氯化苦土壤消毒样品中的优势菌群,它们分别占土样真菌总数的 23.45%, 7.51%和 3.00%。由图 4(b)所示的物种丰度聚类热图可知,赤霉属(*Gibberella*)、裂壳菌属(*Schizothecium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、伞状霉属(*Umbelopsis*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)、明梭孢属(*Monographella*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)等真菌在消毒后数量减少;木霉属(*Trichoderma*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、海洋真菌属(*Westerdykella*)、柄孢壳属(*Zopfiella*)、根瘤菌属(*Rhizophlyctis*)、孢子菌属(*Spizellomyces*)和曲霉属(*Aspergillus*)等真菌在消毒后数量出现增加。这些结果从属的角度表明氯化苦消毒前后土壤中真菌群落组成与结构具有明显的不同。

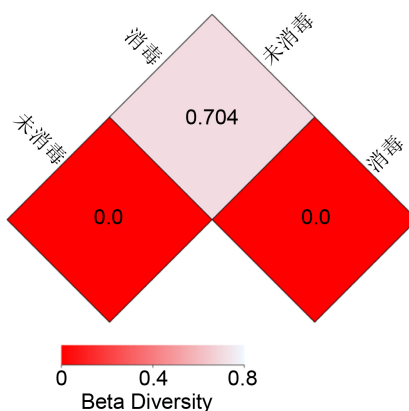


**Figure 4.** The relative abundance of species (a) and their heatmap (b) on the level of fungal community in the horizontal of the genus without or with chloropicrin fumigation

**图 4.** 未消毒对照及氯化苦消毒处理后土壤真菌主要属水平分布柱形图(a)及丰度聚类热图(b)

### 3.5. Beta 多样性分析

Beta 多样性分析主要是对不同组样本之间的微生物群落构成及其差异进行研究。在 Beta 多样性分析中，常选用 Bray-Curtis 距离来衡量两个样品间的相异系数，其值越大，表示这两个样品在微生物组成、物种丰度和多样性方面存在的差异越大。所有样本的 Bray-Curtis 距离 heatmap 热图如图 5 所示，该结果表明两个样本之间的相似性较低，即氯化苦消毒前后土壤真菌群落结构不同。



**Figure 5.** Heatmap of beta diversity index based on Bray-Curtis distance

**图 5.** 基于 Bray-Curtis 距离的 Beta 多样性指数热图

## 4. 讨论与结论

由于三七生长适宜范围狭窄, 种植周期在三年以上, 其连作障碍问题非常突出, 研究发现, 在三年生三七土地中, 继续移栽种植三七苗, 一年后, 所移栽植株几乎全部发生根腐病害[19]。在这样的条件下, 适宜种植三七的土地不断减少, 病原微生物数量增多, 自毒效应明显, 严重影响三七产业的发展。三七连作障碍实际上是土壤生态系统中各种因素综合作用的结果, 这些因素主要包括土壤理化性质、微生物群落、土壤酶活性、土壤自毒物质的积累以及农作物因素等, 其中土壤根际微生物群落结构的改变是最重要的影响因素之一[20] [21] [22]。近期一项与草莓种植相关的研究表明, 氯化苦消毒可以提高土壤的理化性质, 调整细菌和真菌的菌群结构, 进而增加草莓产量[23], 并且, 通过和二甲基二硫醚联合使用, 氯化苦还可以很好的控制轮虫和镰刀菌枯萎病的发生[24]。因此, 要防止三七连作障碍, 可以先利用氯化苦实施土壤熏蒸、消毒处理等措施, 尽量减少土壤中有害病原菌数量, 提高三七连作后有益菌占比, 促进土壤微生物的动态演替和菌群结构平衡[25] [26] [27]。

长期以来, 通过实验室培养等传统方法能测到的微生物数量只占其总数的 0.1%至 10% [28], 这使得土壤微生物组成及其结构不能得到整体全面的研究。近年来, 由于 Illumina 高通量测序技术的迅猛发展, 基于宏基因组学高通量测序技术的相关研究大大提高了我们对土壤微生物多样性的认识并促进了对许多未知微生物的探索[29]。本研究中, 我们通过对氯化苦消毒前后三七根际土壤真菌 ITS 测序及宏基因组学分析发现, 氯化苦消毒后的三七种植地中土壤真菌群落及其多样性与未消毒土壤相比存在明显差异, 但是无论是未消毒对照还是氯化苦消毒土壤样品, 子囊菌门(*Ascomycota*)均是真菌群落中的第一大类群, 占比 60%以上。当前对于土壤致病真菌的研究表明, 镰刀菌属(*Fusarium*)是诱发三七根腐病的常见致病菌[30], 本研究发现经氯化苦消毒后, 镰刀菌属真菌占比出现极大下降, 它们从消毒前的 7.42%下降到消毒后的 1.97%; 与之相对应, 木霉菌属(*Trichoderma*)是常见的对三七生长有益的真菌, 经氯化苦消毒后, 它们的占比出现相对升高, 从消毒前的 14.70%增加到消毒后的 23.45%。这些结果在一定程度上表明氯化苦消毒会导致三七根际土壤中的菌群, 特别是病原菌和有益菌占比发生改变, 我们认为这种优势菌群的变化对于根际土壤微生态的自我修复、三七种植地土壤环境的改善以及后续轮作作物的生长具有重要意义。

## 基金项目

云南省科技厅重大科技项目(No. 2017ZF001); 云南省 2018 年大学生创新创业训练计划项目(No. 201810674019)。

## 参考文献

- [1] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [2] 何科. 三七的药理作用研究进展[J]. 中国医药指南, 2011, 11(13): 21-23.
- [3] 蒋妮, 覃柳燕, 叶云峰. 三七病害研究进展[J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1070-1074.
- [4] 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 等. 三七根腐病病原研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378.
- [5] 汪静, 梁宗锁, 康冰, 等. 文山三七根腐病病原真菌的鉴定与药剂防治[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(1): 158-163.
- [6] 罗文富, 喻盛甫, 贺承福, 等. 三七根腐病病原及复合侵染的研究[J]. 植物病理学报, 1997(1): 85-91.
- [7] 毛忠顺, 龙月娟, 朱书生, 等. 三七根腐病研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(12): 2051-2054.
- [8] 刘莉, 刘大会, 金航, 等. 三七连作障碍的研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(1): 70-75.
- [9] 侯西涛, 文政强. 浅谈氯化苦的熏蒸使用技术[J]. 四川粮油科技, 1994(2): 17-18.
- [10] 王海涛, 陈玉国, 王省伟, 等. 氯化苦土壤熏蒸防治烟田杂草及土传病害效果研究[J]. 中国农学通报, 2010,



- 26(4): 244-248.
- [11] 欧小宏, 刘迪秋, 王麟猛, 等. 土壤熏蒸处理对连作三七生长发育及土壤理化性状的影响[J]. 中国现代中药, 2018, 20(7): 74-81.
- [12] Metzker, M.L. (2010) Sequencing Technologies—The Next Generation. *Nature Reviews Genetics*, **11**, 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- [13] Lafontaine, D.L.J. and Tollervy, D. (2001) The Function and Synthesis of Ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 514-520. <https://doi.org/10.1038/35080045>
- [14] Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C. and Knight, R. (2011) Uchime Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection. *Bioinformatics*, **27**, 2194-2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- [15] Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., et al. (2010) QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nature Methods*, **7**, 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- [16] Shannon, C.E. (1997) The Mathematical Theory of Communication. *M.D. Computing: Computers in Medical Practice*, **14**, 306-317.
- [17] Chao, A. (1984) Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, **11**, 265-270.
- [18] Li, B., Zhang, X., Guo, F., Wu, W.M. and Zhang, T. (2013) Characterization of Tetracycline Resistant Bacterial Community in Saline Activated Sludge Using Batch Stress Incubation with High-Throughput Sequencing Analysis. *Water Research*, **47**, 4207-4216. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.021>
- [19] 孙雪婷, 李磊, 龙光强, 等. 三七连作障碍研究进展[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 885-893.
- [20] Huang, B., Yan, D., Wang, X., et al. (2019) Soil Fumigation Alters Adsorption and Degradation Behavior of Pesticides in Soil. *Environmental Pollution*, **246**, 264-273.
- [21] 付丽娜, 汪娅婷, 王星, 等. 三七连作根际微生物多样性研究[J]. 云南农业大学学报, 2018, 33(2): 198-207.
- [22] Fang, W., Yan, D., Wang, X., et al. (2018) Evidences of N<sub>2</sub>O Emissions in Chloropicrin-Fumigated Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*, **66**, 11580-11591. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04351>
- [23] Zhang, D., Yan, D., Fang, W., et al. (2019) Chloropicrin Alternated with Biofumigation Increases Crop Yield and Modifies Soil Bacterial and Fungal Communities in Strawberry Production. *Science of the Total Environment*, **675**, 615-622. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.222>
- [24] Yu, J., Land, C.J., Vallad, G.E. and Boyd, N.S. (2019) Tomato Tolerance and Pest Control Following Fumigation with Different Ratios of Dimethyl Disulfide and Chloropicrin. *Pest Management Science*, **75**, 1416-1424. <https://doi.org/10.1002/ps.5262>
- [25] 陆晓菊. 三七连作障碍土壤微生物多样性研究[D]: [硕士学位论文]. 昆明: 云南师范大学, 2015.
- [26] 谭勇, 崔尹瞻, 季秀玲, 等. 三七种植前后土壤细菌群落结构与多样性分析[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2016, 41(6): 92-99.
- [27] Ma, Y., Chen, C., Li, Q., Xu, F.-R., Cheng, Y.-X. and Dong, X. (2019) Monitoring Antifungal Agents of *Artemisia annua* against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, Associated with *Panax notoginseng* Root-Rot Disease. *Molecules*, **24**, 213. <https://doi.org/10.3390/molecules24010213>
- [28] Felber, R., Leifeld, J., Horák, J. and Neftel, A. (2014) Nitrous Oxide Emission Reduction with Greenwaste Biochar: Comparison of Laboratory and Field Experiments. *European Journal of Soil Science*, **65**, 128-138. <https://doi.org/10.1111/ejss.12093>
- [29] Wilson, M.C. and Piel, J. (2013) Metagenomic Approaches for Exploiting Uncultivated Bacteria as a Resource for Novel Biosynthetic Enzymology. *Chemistry & Biology*, **20**, 636-647. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.011>
- [30] 董鲜, 马晓惠, 陈传娇, 等. 三七根腐病尖孢镰刀菌分离鉴定及致病作用研究[J]. 中药材, 2018, 41(1): 13-17.