

## 不同地黄品种根际土壤真菌群落结构研究

吴廷娟, 杜权, 谢小龙\* (河南中医药大学, 河南郑州 450046)

**摘要** [目的]通过研究不同地黄品种根际土壤真菌的群落结构,以明确不同地黄品种的根际土壤中真菌的群落结构和组成是否具有差异,为优选抗病性地黄品种提供数据支撑。[方法]通过采用传统的平板培养和分离方法,将吨王、北京3号、沁怀、金九、金状元、狮子头6个地黄品种土壤中的真菌先进行纯培养分离、鉴定和计数,然后提取初步分离得到的真菌菌株的DNA,采用基于ITS序列的一代测序技术,通过ITS序列扩增、测序比对,进一步鉴定真菌的种类,并进行聚类分析,分析真菌的群落结构及多样性。[结果]从6个地黄品种的根际土壤中共分离出34株真菌,分别通过形态、显微鉴定以及序列分析,最终归属于13属27种,主要属于青霉属、毛霉属、曲霉属、根霉属、酵母属、枝孢属、链格孢属等。其中沁怀中分离出来的真菌属于4属,狮子头3属,金九3属,金状元4属,吨王和北京3号均为5属。[结论]不同地黄品种根际土壤中真菌的群落结构具有一定差异,地黄根系对其根际土壤中的真菌数量、组成和种类具有一定的塑造性。

**关键词** 群落结构;真菌;地黄;根际土壤;土壤微生物

中图分类号 S154.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)11-0159-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.11.044

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Study on Fungal Community Structure of Rhizosphere Soil of Different *Rehmannia glutinosa* Species

WU Ting-juan, DU Quan, XIE Xiao-long (Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046)

**Abstract** [Objective] To study the differences in community structure and diversity of rhizosphere soil fungi in different *Rehmannia glutinosa* cultivars, and to determine whether there was a difference in the community structure and composition of fungi in different rhizosphere soils, and to provide a theoretical basis for revealing the formation mechanism of *Rehmannia glutinosa* continuous cropping obstacles. [Method] By adopting traditional plate culture and isolation methods, the fungi in the soils of six *Rehmannia glutinosa* cultivars of Dunwang, Beijing No. 3, Qinhuai, Jinjiu, Jinzhuangyuan and Shizitou were firstly purely cultured and separated by colony morphology. The observation and microscopic identification techniques were used for preliminary classification and enumeration; then the DNA of the initially isolated fungal strains was extracted, and the ITS sequence-based sequencing technology was used to further identify the fungal species by ITS sequence amplification and sequencing alignment. And carry out cluster analysis to analyze the community structure and diversity of fungi. [Result] A total of 34 fungi were isolated from the rhizosphere soil of 6 rehmannia cultivars. The morphological, microscopic identification and sequencing results were finally attributed to 27 genera and 13 species, mainly *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* and *Root*. *Mildew*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Alternaria* and the like. Among them, the fungi isolated from Qinhuai belonged to 4 genera, 3 heads of *Shizitou*, 3 genera of *Jinjiu*, 4 genera of *Jinzhuangyuan*, and 5 genera of *Dunwang* and *Beijing No. 3*. [Conclusion] The community structure of fungi in the rhizosphere soil of different *Rehmannia glutinosa* varieties has certain differences, and the root system of *Rehmannia glutinosa* has a certain shaping of the number, composition and types of fungi in the rhizosphere soil.

**Key words** Community structure; Fungal; *Rehmannia glutinosa*; Rhizosphere soil; Soil microbe

根际土壤微生物是植物和土壤之间联系的关键媒介,其对植物的生长发育起着关键的作用。植物根系通过向土壤中分泌一些物质来改变土壤理化环境,进而决定根际微生物的种类、数量和组成,从而导致土壤微生物群落发生改变。相反,根际微生物的群落结构、数量及其变化又会反馈影响植物的生长发育,会使植物的抗病能力下降,进一步加剧土传病害的发生<sup>[1-2]</sup>。

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科地黄属多年生草本植物,在我国具有多年的栽培历史,在各地都有种植。其中河南的产量大、质量佳,为传统的道地药材。地黄的连作障碍一直是限制地黄产量和品质的主要问题。研究表明,根际土壤微生物群落结构的改变导致土传病害的增加是地黄产生连作障碍的主要原因之一<sup>[1]</sup>。王明道等<sup>[3]</sup>研究发现地黄连作后土壤中真菌的种类和数量发生显著的变化。土壤真菌群落发生变化是导致地黄种植后引起重茬土壤中的

真菌病害随连作年限增长而增加的主要原因<sup>[3-4]</sup>。地黄种植过程中常见的真菌病害主要为枯萎病和根腐病,主要的致病菌为尖镰刀菌<sup>[5]</sup>。研究表明,不同植物及同一植物不同品种间土壤微生物的群落结构有不同。在实际生产中,地黄栽培品种繁多,良莠不齐。因此,比较分析不同地黄品种间根际土壤微生物的群落结构的差异,可为评价不同地黄品种的抗病性和抗连作障碍性以及优选抗逆性强的品种提供数据支撑。

#### 1 材料与方法

**1.1 土壤样品的采集** 此次试验的土壤样品采自河南省焦作市温县地黄种植基地。土壤样品于2018年11月24日采集,共选择北京3号、金状元、金九、沁怀、狮子头、吨王6个地黄品种的根际土壤。于每个地黄品种的根周围20 cm范围内用土钻(直径5 cm,高20 cm)采集0~20 cm的土层。每个品种随机采集土壤样品3份,共18份土样。采集后土壤装入无菌自封袋中,带回实验室并放于4℃冰箱中保存、备用。

**1.2 土壤真菌群落结构的观察** 首先,采用稀释涂布平板法来培养不同地黄品种根际土壤的真菌。称取6个地黄品种的新鲜土壤样品各5.0 g,加入已灭过菌的含有45 mL无

**基金项目** 国家重点研发计划项目(2017YFC1702800);河南省重大科技专项(171100310500)。

**作者简介** 吴廷娟(1981—),女,河南新乡人,讲师,博士,从事药用植物栽培和病虫害防治研究。\*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事中药材规范化种植技术研究。

**收稿日期** 2020-10-30

菌水的三角瓶中。在4℃下200 r/min 振荡20 min,制成 $10^{-1}$ 的土壤稀释液。静置1 min后,吸取1.0 mL 移入含有9.0 mL 已灭菌的无菌水试管中,依次制成 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 一系列浓度梯度。然后吸取0.1 mL 的悬浮液分别涂抹于马铃薯葡萄糖琼脂培养基上进行接种,每一稀释浓度重复3次。将培养基倒置在28℃下培养3~5 d,挑取菌落反复纯化。待长出单个菌落后计数,并通过形态观察进行初步鉴定,随后将菌转移到PDA斜面试管中保存。

在真菌培养过程中观察真菌的菌落形状、大小、生长速度、颜色和菌落表面的纹饰,以及菌落质地、菌落高度、菌落边缘形状、有无渗出物等。将分离得到的菌株接种到PDA培养基上,在靠近菌0.5 min处插入在121℃灭菌20 min的载玻片,在28℃下培养3~5 d,待菌落长满载玻片,随后取下载玻片放置显微镜下观察,对照《真菌鉴定手册》和《中国真菌志》对菌株的形态特征进行初步鉴定。

其次,对分离到的单株采用新型植物基因组DNA提取试剂盒(NuClean Plant Genomic DNA Kit)来提取真菌菌株基因组DNA,具体操作按照其说明书进行。然后进行PCR扩增及测序。

**1.3 数据统计分析** 原始数据用Excel 2007 进行整理分析。用SPSS 16.0 对不同品种间的真菌菌落数量进行单因素方差统计分析,对不同稀释倍数条件下的菌落数进行单因素方差分析。用MEGA 6.0 软件将获得的菌株与获取的同源性序列最高的菌株构建系统发育树。

## 2 结果与分析

**2.1 不同地黄品种根际土壤的菌落数** 从表1可以看出,金九、吨王、沁怀、北京3号、金状元、狮子头在 $10^{-2}$  稀释度中的菌落数显著高于 $10^{-3}$  稀释度中的菌落数多( $F=122.18$ ,  $P<0.001$ )。在 $10^{-2}$  稀释度条件下,6个地黄品种间的真菌菌落数量差异显著( $F=5.46$ ,  $P<0.01$ );吨王的菌落数显著高于金状元、沁怀和狮子头,而狮子头和沁怀的菌落数低于其他品种;不同地黄品种根际土壤真菌的菌落数量平均值从大到小依次为吨王>北京3号>金九>金状元>沁怀>狮子头。在 $10^{-3}$  稀释度条件下,北京3号的真菌菌落数显著高于其他品种,而其他品种间差异不显著。

表1 不同地黄品种在不同稀释倍数下根际土壤的真菌菌落数量

Table 1 The number of fungal colonies in the rhizosphere soil of different *Rehmannia glutinosa glutinosa* varieties under different dilution multiples 个

序号 No.	地黄品种 <i>Rehmannia glutinosa</i> varieties	稀释 $10^{-2}$ 倍 Dilute $10^{-2}$ times	稀释 $10^{-3}$ 倍 Dilute $10^{-3}$ times
1	金九	37.67±5.26 ab	10.33±1.53 b
2	吨王	43.00±5.13 a	5.33±0.88 b
3	沁怀	23.67±2.03 c	6.33±3.53 b
4	金状元	29.33±3.48 bc	5.00±1.00 b
5	狮子头	18.33±3.53 c	4.00±1.73 b
6	北京3号	38.67±2.33 ab	28.00±4.62 a

注:同列后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters after the same column indicate significant differences( $P<0.05$ )

**2.2 不同地黄品种根际真菌的群落特征分析** 通过对6个地黄品种根际土壤的真菌形态特征和显微特征进行观察,共分离出34株真菌,主要分属于13属27种。其中沁怀中分离出来的真菌属于4属,狮子头3属,金九3属,金状元4属,吨王和北京3号均为5属。主要菌的特征如下:

(1)青霉菌。菌落为圆形,生长速度较快,表面为墨绿色,背面为黑色,周围为白色表面平展或者具有皱纹,菌落为粉末状,边缘全缘,分生孢子为扫帚状,孢子为圆形(图1a)。

(2)黄曲霉菌。菌落为圆形,生长速度较快,表面为白色,有些中心为黄绿色,表面纹理疏松,菌落为绒毛状,孢子为圆形,菌丝有隔(图1b)。

(3)枝孢菌。菌落不规则,生长速度较慢,背面为黑色,表面皱缩,菌落为粉末状,边缘全缘,中间突起,孢子为纺锤形,菌丝隔状(图1c)。

(4)链格孢菌。菌落圆形,表面为灰黑色,背面为黑色,周围有一圈乳黄色,菌落毡状,表面平展,边缘全缘,孢子纺锤形,棕色,孢子中有隔,30 μm左右(图1d)。

(5)红酵母菌。菌落小,圆形,生长速度慢,表面红色,黏液状,平展,边缘全缘,孢子圆形,5 μm左右,无菌丝(图1e)。

(6)米根霉菌。菌落圆形,生长速度较快,早期为白色,之后变成灰白色,菌丝无色,孢子梗直立,孢子为椭圆形或者圆形,大小不一(图1f)。

(7)高山被孢霉菌。菌落圆形,中间为白色绒毛,边缘一圈为半透明,表面疏松,没有渗出物,孢子梗不分枝,孢子囊多孢属,孢子小,8 μm左右,长形(图1g)。

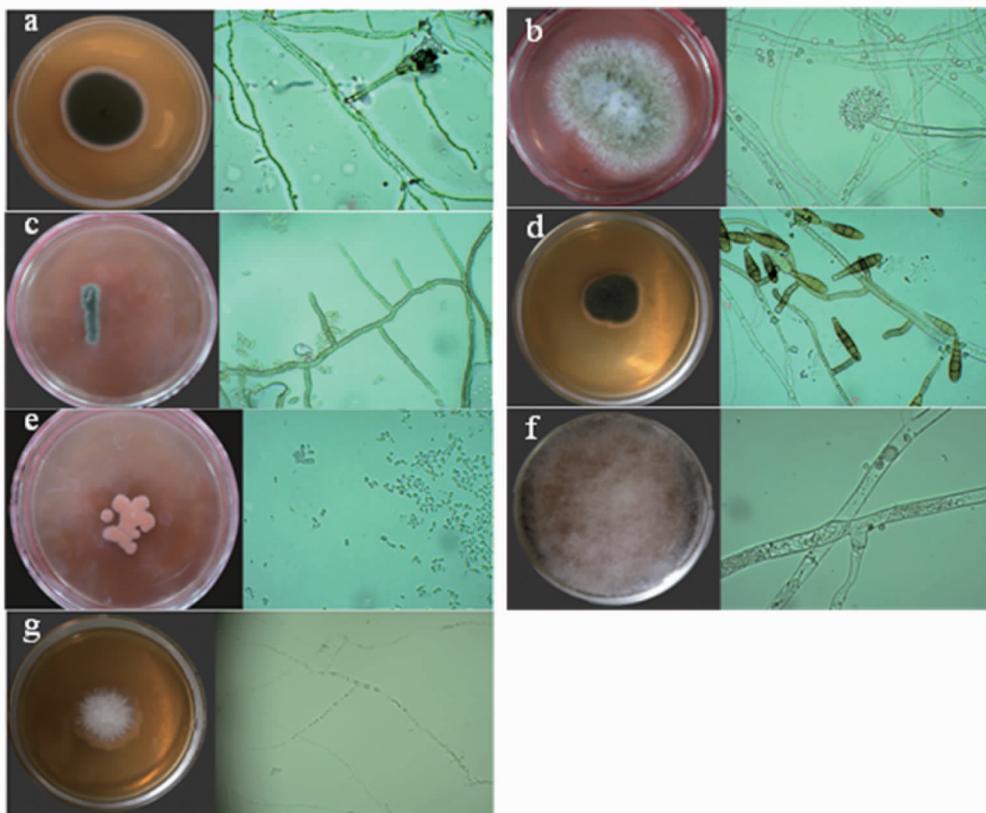
**2.3 ITS序列的测序结果与分析** 从真菌菌株DNA提取的琼脂糖凝胶电泳结果(图2)可以看出,不同地黄品种土壤中检测到的条带亮度和大小不同,可能是由于该试验所用的提取方法对不同地黄品种根际土壤真菌的DNA提取量产生影响,也可能是因为菌株本身的差异性所造成的。另外,有一部分条带出现拖尾现象,是因为在提取过程中部分DNA片段被降解造成的。

将提取的菌株DNA进行PCR扩增,扩增的DNA片段在500 bp左右。结果表明部分条带没有明显的亮度,可能是因为提取的DNA量少(图3)。

**2.4 基于ITS基因序列的系统发育分析** 将提取的34株真菌的ITS序列数据在NCBI上通过Blast进行核酸序列比对,再通过MEGA 6.0软件将获得的单个菌株与获取的同源性序列最高的菌株构建系统发育树。结果发现各菌株间相似性较高,其中1-4、1-6、3-3、4-1与2-3、5-6、2-4分属于2支,相似性达到100%,通过构建系统发育树这些菌株都属于青霉属(*Penicillium*)的不同菌株。根据以往的研究,青霉属的物种特别多,迄今为止该属包含354个物种,其中很多的物种在ITS基因序列上差异极小,相似性都为99%以上<sup>[6]</sup>。也就证实了1-4、1-6、3-3、4-1与2-3、5-6、2-4相似性达到100%,却还分为2支。如3-6和已知菌株*Penicillium aurantiogriseum* KY552626相似性都为99%,1-4和*Penicillium oxalicum* MH282514.1相似性为94%。3-7、3-2、4-4的相似性

为 100%, 而 3-7 和已知菌株 *Alternaria* sp. JX418364 的相似性为 99%, 可是他们又分为 2 支, 应该是枝孢属 (*Alternaria*) 的 2 个不同物种, 有待进一步确定。3-1、5-7 相似性也为 100%。根据图 4 可发现各菌株间相似性很高, 所以与序列比

对得到的菌株很难聚类, 因此最终将相似性最高的几株菌 1-6、2-3、2-4、3-3、5-6 去除, 其余菌株和比对得到的同源性较高的序列构建系统发育树。

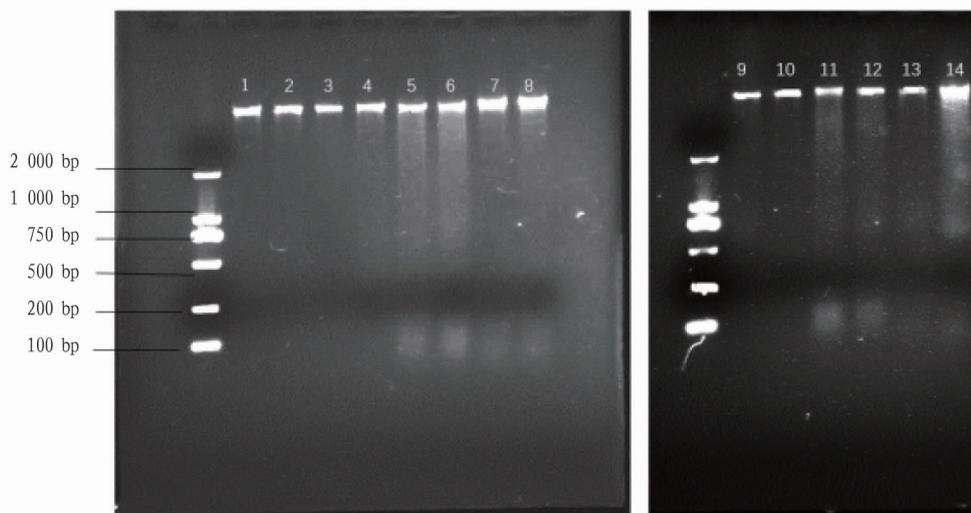


注: a. 青霉菌; b. 黄曲霉菌; c. 枝孢菌; d. 链格孢菌; e. 红酵母菌; f. 米根霉菌; g. 高山被孢霉菌

Note: a. *Penicillium*; b. *Aspergillus*; c. *Cladosporium*; d. *Alternaria*; e. Red yeast; f. *Rhizopus oryzae*; g. *Mortierella alpina*

图 1 主要真菌菌落特征

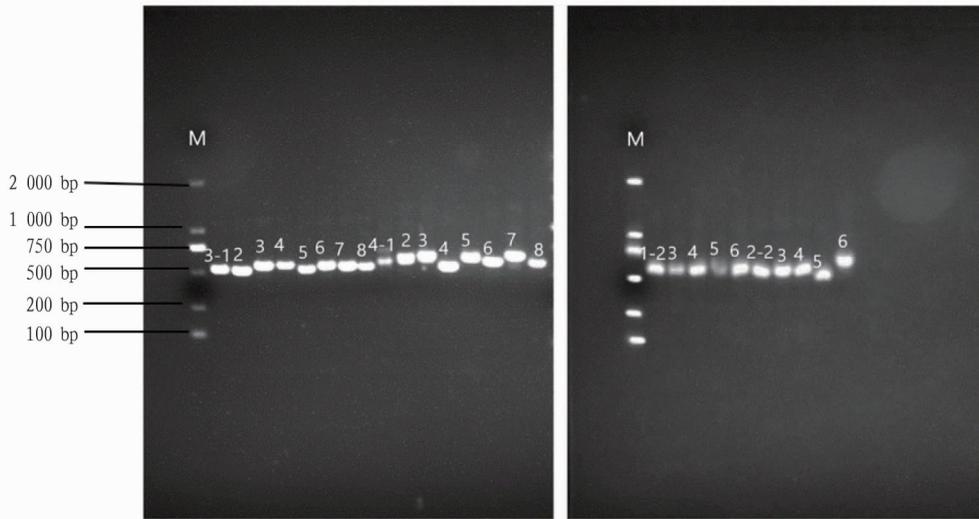
Fig. 1 Features of main fungal colonies



注: 1, 2 为沁怀 1 号在  $10^{-2}$  稀释度中的 3 号菌, 3, 4 为北京 3 号在  $10^{-3}$  稀释度中 1 号菌, 5, 6 为金九在  $10^{-2}$  稀释度中的 1 号菌, 7, 8 为吨王在  $10^{-2}$  稀释度 4 号菌, 9, 10 为北京 3 号在  $10^{-2}$  稀释度中的 4 号菌, 11, 12 为北京 3 号在  $10^{-2}$  稀释度的 5 号菌, 13, 14 为狮子头在  $10^{-2}$  稀释度的 2 号菌

图 2 真菌菌株 DNA 提取的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of fungal strain DNA extraction



注:3-1,3-2,3-3 分别为吨王在  $10^{-2}$  稀释度下 1,3 和 4 号菌;3-4,3-5 为吨王在  $10^{-3}$  稀释度下 2,3 号菌;3-6 为金九  $10^{-3}$  稀释度下 1 号菌;3-7 为金九  $10^{-2}$  稀释度下 1 号菌;3-8 为沁怀  $10^{-2}$  稀释度下 1 号菌;4-1,4-2,4-3 为狮子头  $10^{-2}$  稀释度下 1,2,4 号菌;4-4,4-7 为金状元  $10^{-3}$  稀释度下 3,1 号菌;4-5 为金状元  $10^{-2}$  稀释度下 1 号菌;4-6,4-8 为狮子头  $10^{-3}$  稀释度下 2,1 号菌;1-2,1-3,1-4,1-5 为北京 3 号  $10^{-2}$  稀释度下 1,3,4,5 号菌;1-6 为北京  $10^{-3}$  稀释度下 1 号菌;2-2,2-3,2-4,2-5,2-6 分别为沁怀  $10^{-2}$  稀释度下 2,3,4,5,6 号菌

图 3 菌株 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis diagram of PCR amplification products of strains

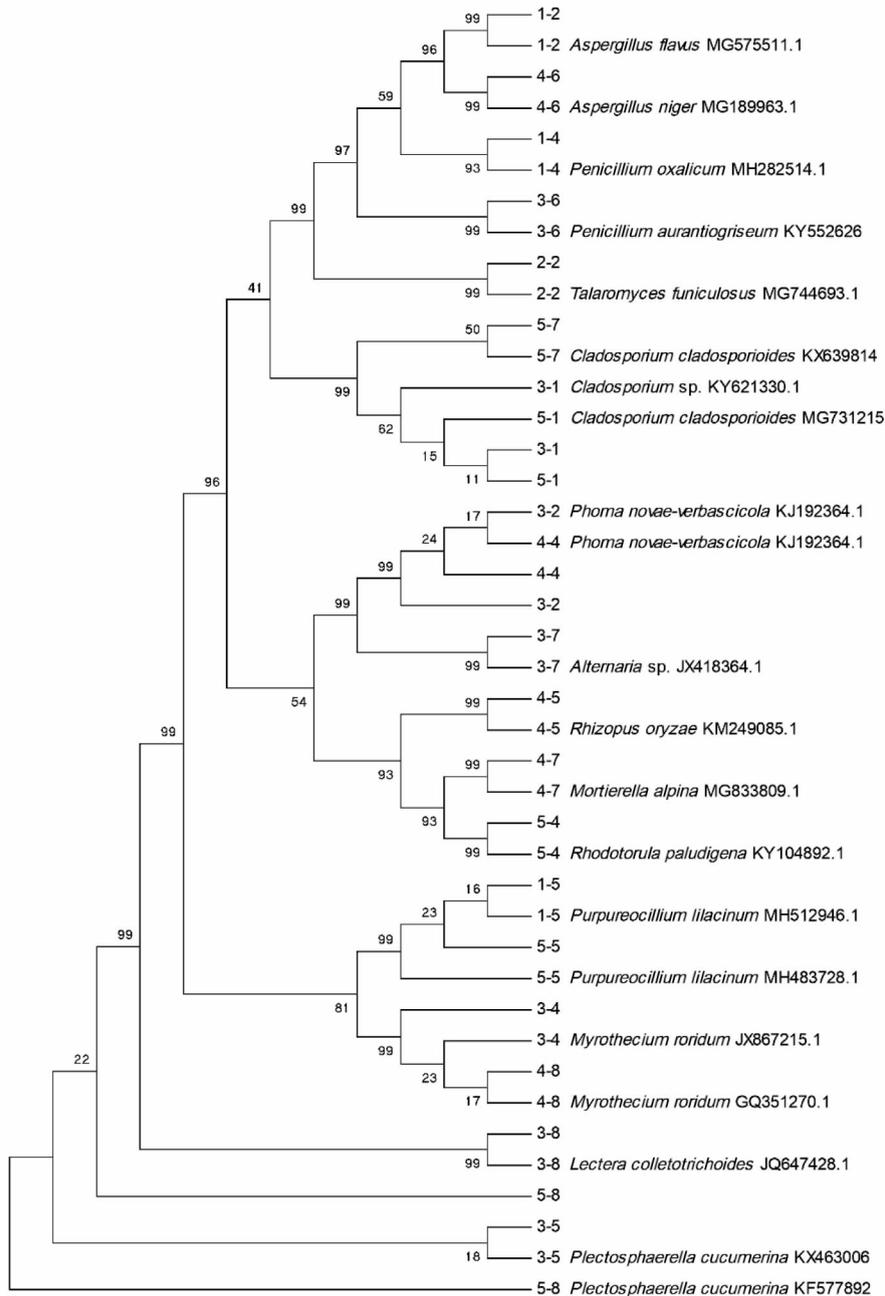
从图 4 可以看出,有 9 种菌株和已知菌株的同源性达到 99%,分别为 1-2 和 *Aspergillus flavus* MG575511. 1 (黄曲霉菌)、4-6 和 *Aspergillus niger* MG189963 (黑曲霉菌)、3-6 和 *Penicillium aurantiogriseum* KY552626 (青霉菌)、2-2 和 *Talaromyces funiculosus* MG744693. 1、3-7 和 *Alternaria* sp. JX418364. 1 (链格孢菌)、4-5 和 *Rhizopus oryzae* KM249085. 1 (米根霉菌)、4-7 和 *Mortierella alpina* MG833809 (高山被毛菌)、5-4 和 *Rhodotorula paludigena* KY104892 (红酵母菌)、3-8 和 *Lectera colletotrichoides* JQ647428。另外,3-1、5-1 未确定分类菌种,有待进一步研究。1-4 和 *Penicillium oxalicum* MH282514. 1 的 ITS 序列相似性为 93%,为 *Penicillium* (青霉属) 的一个潜在物种。3-8 和 4-4 相似性为 99%,而 4-8 与已知菌株 *Myrothecium roridum* GQ351270. 1 (露湿漆斑菌) 的相似性为 17%,但需要进一步确认。上述结果说明地黄根际土壤中大多数菌株和系统发育亲缘关系最密切的相关物种间存在很大差异,也说明纯培养的真菌具有丰富的多样性。

采用一代测序对挑选的 34 株菌进行测序分析,最终通过构建系统发育树得到 13 属 27 种真菌。其中北京 3 号土壤中主要有青霉菌、红酵母菌、黄曲霉菌、露湿漆斑菌、淡紫紫孢菌 (*Purpureocillium lilacinum*) 共 5 种菌;金九土壤中主要有青霉菌、链格孢菌、淡紫紫孢菌共 3 种菌;沁怀土壤中主要为青霉菌、枝孢霉菌、篮状菌属 (*Talaromyces funiculosus*)、*Lectera colletotrichoides* 共 4 种菌;吨王土壤中主要为青霉菌、枝孢菌、*Phoma novae-verbascicola*、露湿漆斑菌、黄瓜萎蔫病菌 (*Plectosphaerella cucumerina*) 共 5 种菌;金状元土壤中主要有高山被毛霉菌 (*Mortierella alpina*)、米根霉菌 (*Rhizopus oryzae*)、*Phoma novae-verbascicola*、黄瓜萎蔫病菌共 4 种菌;狮子头土壤

中主要有黑曲霉菌、枝孢霉菌、露湿漆斑菌共 3 种菌。与纯培养试验结果一致,北京 3 号、吨王、沁怀根际土壤中的真菌群落较丰富。在这 6 个地黄品种的根际土壤中,青霉属分布在北京 3 号、沁怀、金九、吨王 4 个品种中;并且青霉属的数量最多,共有 7 个种,属于优势种,与纯培养的结果一致。另外,通过分子鉴定发现 *Phoma novae-verbascicola*、*Myrothecium*、*Cladosporium*、*Plectosphaerella*、*Purpureocillium*、*Lectera* 6 个属的物种,通过显微和菌落形态不能鉴定出来。在传统平板培养过程中,毛霉属虽然只分离到高山被毛霉菌一种菌,但是毛霉属也是土壤微生物中的优势物种<sup>[4]</sup>,与分子鉴定的结果一致。该试验中分离到的黄曲霉菌、黑曲霉菌、黄瓜萎蔫病菌、露湿漆斑菌等是一些常见的真菌病原菌,其数量的变化可能是导致土壤中土传病害发生的原因。

### 3 讨论与结论

真菌是土壤微生物的重要组成部分,其群落结构的多样性可评价其在土壤中生态功能的稳定性。该试验通过传统培养方法和基于 ITS 序列的一代测序,对 6 种不同地黄品种的根际土壤中的真菌群落结构进行分析,结果发现  $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  稀释度为最适土壤稀释浓度, $10^{-2}$  稀释度中不仅分离的菌落数目多,而且具有丰富的物种多样性。其中菌落数量均值从大到小依次为吨王>北京 3 号>金九>沁怀>金状元>狮子头。狮子头的根际土壤中真菌菌落数相对较少,而金九、吨王、北京 3 号的根际土壤中真菌群落结构较丰富。仅从该试验结果来看,同一植物的不同品种对土壤真菌的群落组成具有一定的塑造性。研究表明,种植不同棉花<sup>[7]</sup>、香蕉<sup>[8]</sup> 品种造成土壤中真菌菌落的数量、丰度和多样性均发生显著变化。种植不同苕麻品种后土壤中细菌群落的结构和多样性也发生显著变化<sup>[6]</sup>。因此,不同地黄品种的根际土壤中真菌



注:3-1,3-2 分别为吨王在  $10^{-2}$  稀释度下 1,3 号菌;3-4,3-5 为吨王在  $10^{-3}$  稀释度下 2,3 号菌;3-6 为金九  $10^{-3}$  稀释度下 1 号菌;3-7 为金九  $10^{-2}$  稀释度下 1 号菌;3-8 为沁怀  $10^{-2}$  稀释度下 1 号菌;4-4,4-7 为金状元  $10^{-3}$  稀释度下 3,1 号菌,4-5 为金状元  $10^{-2}$  稀释度下 1 号菌;4-6,4-8 为狮子头  $10^{-3}$  稀释度下 2,1 号菌;1-2,1-4,1-5 为北京 3 号  $10^{-2}$  稀释度下 1,4,5 号菌

图 4 菌株的 ITS 基因序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the ITS gene sequence of the strain

群落结构存在一定差异,将会影响土壤真菌病害的发生,进而对地黄的生长产生不同的反馈影响。根据不同地黄品种根际土壤真菌的致病性及群落结构多样性的差异,可为优选抗性强的地黄品种提供数据支撑。另外,种植地黄后造成的土壤微生物群落结构组成的改变是造成地黄连作障碍产生的原因之一<sup>[9-10]</sup>,该试验结果可为探究不同地黄品种在抗连作障碍方面提供数据参考。

#### 参考文献

[1] 李明杰,冯法节,张宝,等. 多元组学背景下地黄连作障碍形成的分子

- 机制研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(3):413-419.
- [2] 付丽娜,魏兰芳,王震铄,等. 三七根际微生物群落组成及多样性研究[J]. 生物技术进展,2017,7(3):211-216.
- [3] 王明道,吴宗伟,原增艳,等. 怀地黄连作对土壤微生物区系的影响[J]. 河南农业大学学报,2008,42(5):532-538.
- [4] 吴林坤,黄伟民,王娟英,等. 不同连作年限野生地黄根际土壤微生物群落多样性分析[J]. 作物学报,2015,41(2):308-317.
- [5] 刘伟,周冰谦,王晓,等. 基于 ITS 序列的丹参连作根际土壤真菌群落组成及多样性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):130-135.
- [6] 汤涤洛,涂修亮,潘国雄,等. 不同苎麻品种根际土壤细菌多样性[J]. 西南农业学报,2018,31(3):538-543.

(下转第 177 页)

续表 4

序号 No.	农药 Pesticide	番茄基质 Tomato sample						苹果基质 Apple sample					
		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
15	甲萘威	113.0	3.1	119.0	2.6	97.2	2.1	115.0	2.2	97.0	7.0	113.0	1.2
16	烯酰吗啉	116.0	5.7	105.0	7.9	96.0	6.0	113.0	3.4	101.0	2.0	99.5	1.4
17	乙酰甲胺磷	86.7	4.6	83.2	4.4	88.6	4.3	87.5	4.3	80.6	1.1	85.2	2.4
18	咪鲜胺	117.0	4.1	109.0	9.6	104.0	5.2	100.0	3.7	89.1	3.1	102.0	5.1
19	辛硫磷	113.0	5.9	127.0	7.9	121.0	3.4	113.0	2.9	104.0	4.2	118.0	4.1
20	阿维菌素	95.2	5.2	115.0	6.7	119.0	4.7	97.6	5.8	87.2	3.4	116.0	2.8
21	哒螨灵	109.0	5.4	119.0	5.7	108.0	5.2	105.0	6.2	81.4	2.7	95.3	6.3
22	甲维盐	106.0	3.6	117.0	12.2	113.0	3.7	114.0	4.4	89.0	5.5	108.0	3.6
23	除虫脲	125.0	4.6	109.0	11.5	116.0	4.7	109.0	3.6	107.0	1.1	116.0	2.2
24	灭幼脲	122.0	5.4	112.0	2.2	103.0	5.5	95.7	5.5	94.2	5.3	83.0	1.5
25	氟虫脲	121.0	3.1	116.0	8.3	121.0	4.2	119.0	3.2	96.7	2.2	87.3	3.7
26	氟甲脲	115.0	5.2	118.0	7.3	102.0	3.4	106.0	2.1	102.0	4.0	92.7	2.1
27	氟虫脲硫醚	118.0	3.8	103.0	8.4	115.0	6.7	98.2	3.7	113.0	1.7	109.0	2.4
28	氟虫脲砒	124.0	3.2	117.0	7.7	106.0	5.3	117.0	3.6	87.1	1.6	86.5	1.7
29	灭多威	117.0	4.2	106.0	4.5	114.0	4.4	109.0	5.5	83.6	3.5	89.3	5.4
30	氟啶脲	105.0	3.3	109.0	4.6	98.0	5.0	91.2	3.6	92.1	4.7	81.7	4.7

**2.5.3 实际样品的检测及方法比较。**用该试验建立的方法与 GB/T 20769—2008<sup>[18]</sup> 同时对市场采购的番茄、芹菜、茄子、苹果、黄瓜、青椒进行检测。结果发现(表 5),分别在番茄、茄子、黄瓜中检出多菌灵、烯酰吗啉、啶虫脲、阿维菌素 4 种农药,2 种方法检测结果数值相近。

表 5 2 种方法检测结果比较

样品 Sample	农药 Pesticide	该试验建 立的方法 This method	GB/T 20769 —2008
番茄 Tomato	多菌灵	0.016	0.013
番茄 Tomato	啶虫脲	0.028	0.032
茄子 Eggplant	多菌灵	0.034	0.029
黄瓜 Cucumber	多菌灵	0.618	0.631
黄瓜 Cucumber	烯酰吗啉	0.042	0.050
黄瓜 Cucumber	阿维菌素	0.014	0.019

### 3 结论

该研究以乙腈-2 mmol/L 乙酸铵水(含 0.05%, V/V)为流动相,乙腈作为提取溶剂,经过优化的 QuEChERS 方法提取净化,建立了果蔬中 30 种农药残留的液相色谱串联质谱检测方法。该方法前处理简单、分析时间短、稳定性好,回收率、精密度和定量限均满足农药残留分析的要求,适用于果蔬中农药残留的检测。

### 参考文献

- [1] 郑妹宁,李凌云,林桓,等.超快速液相色谱-串联质谱法快速筛查蔬菜中 176 种农药的残留量[J].色谱,2013,31(1):71-78.
- [2] 蔡红梅,汪孟丽,田子玉.蔬菜中农药残留检测前处理方法概述[J].现代

农业科技,2019(3):93-94.

- [3] 赵金利,王成龙,刘佳,等.基于 QuEChERS-液质联用法测定蔬菜中农药多残留的基质效应[J].农药,2018,57(10):742-746.
- [4] 张海霞.浅析蔬菜农药残留原因及检测方法[J].农业与技术,2020,40(14):43-44.
- [5] 李映梅,熊彩云,白铭松,等.GC-ECD 法测定苕菇中 15 种有机氯类农药和拟除虫菊酯类农药的残留量[J].安徽农业科学,2019,47(20):213-216.
- [6] 林泽鹏,许少美,林晨,等.气相色谱法对果蔬中氧乐果测定及结果分析[J].食品工业,2018,39(10):310-312.
- [7] 范力欣,李红艳,钱训.气相色谱法快速测定农药产品中 7 种高毒有机磷类农药[J].现代农药,2017,16(3):21-23,26.
- [8] 王敏,李广益,宋丰江,等.高效液相色谱法测定蔬菜中氨基甲酸酯类农药[J].食品研究与开发,2018,39(1):122-125.
- [9] 孙大江,武亭亭,张东,等.液相色谱柱后衍生法测定蔬菜、水果中氨基甲酸酯类农药[J].食品安全质量检测学报,2019,10(20):7015-7023.
- [10] 房宁,李倩,王海云,等.气相色谱-串联质谱法测定植物性食品中 50 种农药残留[J].食品安全质量检测学报,2019,10(13):4394-4400.
- [11] 罗欣阳,郑悦珊,熊含鸿,等.QuEChERS 结合气相色谱-质谱联用法检测蔬菜中 10 种农药残留[J].食品安全质量检测学报,2020,11(16):5461-5469.
- [12] 方丽,林晨,王李平,等.气质联用法测定叶菜类蔬菜中的氟虫脲及其代谢物残留量[J].安徽农业科学,2020,48(17):206-209.
- [13] 郭保宝,石志格,刘胜男,等.QuEChERS/HPLC-MS/MS 法同时测定果蔬中 17 种农药残留[J].安徽农业科学,2017,45(26):87-92,115.
- [14] 李淑娟,于杰,高玉生,等.HPLC-MS/MS 测定果蔬中有机磷类农药的基质效应[J].食品工业科技,2017,38(6):49-53.
- [15] 徐春奎,李艳,侯莉莉,等.破壁处理与改进 QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 快速检测蔬菜中 52 种农药残留[J].安徽农业科学,2019,47(22):200-205,260.
- [16] 张帆,黄志强,张莹,等.高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 20 种氨基甲酸酯类农药残留[J].色谱,2010,28(4):348-355.
- [17] 黄景辉,罗科丽,黄兵.HILIC-MS/MS 模式测定甘蓝中 11 种强极性、亲水性农药残留[J].农产品质量与安全,2019(4):26-30.
- [18] 庞国芳,李岩,范春林,等.水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 20769—2008[S].北京:中国标准出版社,2009.

(上接第 163 页)

- [7] 雒珺瑜,崔金杰,李树红,等.不同棉花品种对土壤微生物的影响[J].中国棉花,2005,32(9):10.
- [8] 邓大豪,邓涛,周游,等.不同品种香蕉种植地土壤微生物多样性及其

对土壤理化性质的响应[J].热带作物学报,2019,40(9):1858-1864.

- [9] 李明杰,冯法节,张宝,等.多元组学背景下地黄连作障碍形成的分子机制研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(3):413-419.
- [10] 李振方,杨燕秋,谢冬凤,等.连作条件下地黄药用品质及土壤微生态特性分析[J].中国生态农业学报,2012,20(2):217-224.