

徐筋燕, 何晓兰, 邵明灿, 等. 不同连作年限栝楼根际土壤微生物群落多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(5): 1140-1150.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.05.006

不同连作年限栝楼根际土壤微生物群落多样性分析

徐筋燕¹, 何晓兰¹, 邵明灿¹, 万云龙², 刁亚梅³, 杨中海⁴, 郭书巧¹

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 3. 江苏农林职业技术学院农学院, 江苏 句容 212400; 4. 涟水雨果农业发展有限公司, 江苏 淮安 223411)

摘要: 为明确连作对栝楼根际土壤微生物群落的影响和栝楼连作障碍产生的原因, 以连作 2 年和连作 4 年的栝楼根际土壤为研究对象, 进行土壤理化性质测定以及土壤细菌 16S 和真菌 ITS 高通量测序。土壤理化性质测定结果表明, 与连作 2 年的栝楼根际土壤样本相比, 连作 4 年的栝楼根际土壤样本中有机碳含量下降; 与对照土壤样本和连作 2 年的栝楼根际土壤样本相比, 连作 4 年的栝楼根际土壤样本阳离子交换量 (CEC) 下降, 说明土壤保肥能力已下降。细菌群落 α 多样性分析结果显示, 栝楼连作对细菌群落的影响相对较小。细菌群落结构分析结果表明, 与对照土壤样本相比, 栝楼连作根际土壤中一些具有重要功能的细菌门相对丰度下降。与对照土壤样本相比, 连作 2 年和连作 4 年的栝楼根际土壤样本中真菌群落群落结构和组成发生明显变化, 一些有害真菌属如 *Stagonosporopsis*、*Rhizoctonia* 和 *Colletotrichum* 的相对丰度大幅增加。典型相关分析结果表明, 硝态氮含量、全磷含量和速效磷含量是栝楼根际土壤微生物群落多样性的主要影响因素; pH 值、阳离子交换量是 CK 土壤微生物群落多样性的主要影响因素。

关键词: 栝楼; 连作; 根际土壤; 微生物群落; 土壤理化性质; 高通量测序

中图分类号: S567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)05-1140-11

Analysis of microbial community diversity in rhizosphere soil of continuous cropping *Trichosanthes kirilowii*

XU Jin-yan¹, HE Xiao-lan¹, SHAO Ming-can¹, WAN Yun-long², DIAO Ya-mei³, YANG Zhong-hai⁴, GUO Shu-qiao¹

(1. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. School of Agronomy and Horticulture, Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China; 4. Lianshui Yuguo Agricultural Development Co., Ltd., Huai'an 223411, China)

Abstract: To clarify the effects of continuous cropping on the rhizosphere soil microbial community of *Trichosanthes kirilowii* and the causes of continuous cropping obstacles, rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii* after continuous cropping for two and four years were used for analyzing in this study. The physicochemical properties of the soil samples were determined, and the bacterial 16S library and fungal ITS library were constructed and sequenced by high-throughput sequencing technology. The results of physicochemical properties showed that compared with the rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii* after continuous cropping for two years, the organic carbon content in the rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii* after continuous cropping for four years decreased. Compared with the control soil samples and the rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii* after continuous cropping for two years, the cation exchange capacity (CEC) of soil samples began to decrease after four years of continuous cropping, indicating that the soil fertility retention capacity began to decrease. The results of α -diversity of bacterial communities showed that the continuous cropping of *Trichosanthes kirilowii*

收稿日期: 2022-09-19

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31901559); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(21)3167]; 江苏省苏北科技专项 (SZ-HA2021034)

作者简介: 徐筋燕 (1985-), 女, 江苏昆山人, 助理研究员, 主要从事栝楼遗传育种研究。 (Tel) 025-84390290; (E-mail) xujin-yan0610@126.com

通讯作者: 郭书巧, (E-mail) sg2015@jaas.ac.cn

continuous cropping for four years decreased. Compared with the control soil samples and the rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii* after continuous cropping for two years, the cation exchange capacity (CEC) of soil samples began to decrease after four years of continuous cropping, indicating that the soil fertility retention capacity began to decrease. The results of α -diversity of bacterial communities showed that the continuous cropping of *Trichosanthes kirilowii*

had a relatively small effect on bacterial community. However, the relative abundance of some functional bacteria in the rhizosphere soil samples of continuous cropping *Trichosanthes kirilowii* decreased compared with that in the control soil samples. Compared with the control soil samples, the structure and composition of fungal communities in the rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii* after continuous cropping for two years and four years changed significantly, and the relative abundance of some harmful fungi such as *Stagonosporopsis*, *Rhizoctonia* and *Colletotrichum* increased significantly. The results of canonical correlation analysis showed that nitrate nitrogen content, total phosphorus content and available phosphorus content were the main influencing factors of microbial community diversity in rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii*, and pH and CEC were the main influencing factors of soil microbial community diversity in CK.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*; continuous cropping; rhizosphere soil; microbial community; physicochemical properties of the soil; high-throughput sequencing

栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)又名瓜蒌,属于葫芦科栝楼属,是中国传统的中药材,具有非常高的药用价值。栝楼的根、茎、叶均可入药,栝楼根即天花粉,是中国临床常用中药材,具有降血糖、抗肿瘤和抗病毒等多种疗效^[1-3]。栝楼果实在临床上分为3种,即全瓜蒌(栝楼果实)、瓜蒌皮和瓜蒌籽,可用于治疗肺病、肺热咳嗽和大便秘结等,此外,它在呼吸系统、心血管系统、血液系统疾病治疗方面以及抗菌、抗肿瘤等方面均具有一定的作用^[4-7]。瓜蒌籽营养丰富,富含蛋白质、氨基酸和多种人体所需微量元素,近年来已逐渐成为一种广受大众喜爱的休闲食品。栝楼等传统中药材在治疗新型冠状病毒感染中发挥了重要的作用^[8-10],因此,近年来对于栝楼的需求也逐渐呈现供不应求的状态。

栝楼属于多年生宿根类作物,种植以后可以连续收获4~6年。但随着连作时间的增加,会发生明显的连作障碍,主要表现为暴发严重的病虫害(炭疽病、蔓枯病等),产量、品质下降。据统计,在2018~2020年,江苏省苏北地区栝楼主栽区连作3年以上的栝楼减产30%~80%,部分严重地块甚至绝产,给江苏省栝楼产业造成了巨大的打击,直接经济损失达上亿元。解决栝楼连作障碍问题已经刻不容缓。连作障碍是指在同一地块上连续种植同种或同科作物,即使在正常的管理条件下,作物仍然表现出生长发育迟缓、抗逆性降低、病虫害严重和产量下降等现象。很多作物受连作障碍影响,导致产量、品质下降和高死亡率等问题,而宿根类中药材因其特殊的栽培条件,受到连作障碍的影响更大,约70%的宿根类药材都存在不同程度的连作障碍问题^[11-14]。有研究结果表明,增加连作时间会导致土壤肥力下降、养分失衡、土壤酶活性降低、植物病虫害发生率增加、根际有毒物质积累量增加^[15-16],这些变化均会对植物根际微生物群落产生较大影响,并进一

步影响植物的生长发育。

土壤微生物群落能够影响植物的生理性状和生长发育,与植物密切相关^[17]。植物根际微生物特别是细菌能够参与一些重要的生物进程,包括土壤有机质分解、土壤养分的转化和循环等^[18],对植物的生长发育具有非常重要的作用。而大多数土壤真菌包含很多致病菌,并不利于植物生长。通常情况下,植物和根际微生物群落之间存在着一定的平衡关系,土壤中以细菌为主,真菌数量较少。连作会导致土壤中细菌与真菌的比例失衡,细菌数量、种类减少,真菌种类、数量增加,从而导致土壤肥力下降,植物病虫害发生率增加^[15,19]。对连作的花生根际土壤进行研究,发现连作会导致土壤中一些有益真菌[如丛枝菌根真菌(AMF)和木霉属(*Trichoderma*)真菌]相对丰度减少,部分有害真菌[如镰刀菌属(*Fusarium*)真菌]相对丰度增加,从而导致花生产量下降^[19];连续种植黑胡椒会导致土壤pH值、有机质含量和土壤细菌丰度下降,土壤微生物群落结构改变,导致黑胡椒生长不良^[20]。关于栝楼连作障碍的研究起步较晚,栝楼根际土壤微生物群落多样性及其对栝楼连作影响方面的研究较少。

本研究拟以非栝楼根际土壤为对照,以连作2年和连作4年的栝楼根际土壤样本为研究对象,检测不同土壤样本理化性质的变化,并利用16S和ITS高通量测序技术对栝楼根际土壤微生物群落多样性和群落结构进行系统分析,探讨连作对栝楼根际土壤微生物群落组成和多样性的影响,挖掘影响栝楼连作的微生物类群,以期揭示栝楼连作障碍的成因及找到缓解方式提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

土壤采集地点位于江苏省淮安市高沟镇(34°

01°N, 119°20'E), 采集时间为 2020 年 10 月。选取江苏省栝楼主栽品种皖菱 9 号、皖菱 17 号根际土壤作为研究对象, 分别选择连作 2 年和连作 4 年的栝楼根际土壤进行取样, 对照土壤样本为取样地块周边未耕作自然土壤。

1.2 土壤样本采集

每个地块随机选取 5 个采样点, 每个采样点选取 3 株植株, 收集位于块根四周 10~20 cm 处的根系土壤以及附着在植株根系附近的土壤, 随后将 5 个采样点的样本充分混合。每个栝楼品种选取 2 个地块进行取样, 即每个连作时间采集 4 份土壤样本, 共获得土壤样本 12 份, 其中对照组 (CK) 4 份, 连作 2 年组 (CC2) 4 份, 连作 4 年组 (CC4) 4 份。将每份土壤样本分成 2 份, 分别用于土壤微生物测定和理化性质测定。

1.3 土壤理化性质测定

土壤样本全氮含量利用凯氏定氮法测定, 硝态氮含量利用双波长比色法测定, 全磷、速效磷含量利用钼锑抗比色法测定, 全钾、速效钾含量利用 ICP-aes 法测定, 有机碳含量利用重铬酸钾容量法测定。利用电位测定法测定土壤 pH 值, 利用比色法测定土壤阳离子交换量 (CEC)。

1.4 土壤细菌 16S 和真菌 ITS 高通量测序

土壤细菌 16S 和真菌 ITS 高通量测序由上海翰宇生物科技有限公司完成。对土壤样本进行基因组 DNA 抽提并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验抽提 DNA 的质量和纯度。利用 Dual-barcode 技术和 Illumina PE250 测序平台对样本进行文库构建和高通量测序。

1.5 数据处理与分析

首先, 根据条形码 (Barcode) 得到所有样本的有效序列, 过滤 read 尾部质量值为 20 以下的碱基; 其次, 根据双末端测序 (PE) reads 之间的叠连关系, 将成对的 read 拼接成一条序列, 最小叠连长度为 10 bp, 拼接序列的叠连区允许的最大错配比为 0.2; 最后, 根据首尾两端的条形码和引物区分样本, 并调整

序列方向, 条形码允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2。在此过程中, 利用 Usearch 软件和 Gold 数据库, 采用无参和有参结合的方式去除嵌合体。

将序列根据 97% 的相似性进行分类操作单元 (OTU) 划分, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析。16S 细菌比对数据库为 Silva (Release138.1, <http://www.arb-silva.de>), ITS 真菌比对数据库为 Unite (Release 8.2, <http://unite.ut.ee/index.php>)。使用 97% 相似度的 OTU, 利用 Mothur 软件做稀释性曲线分析; 利用 Bray-curtis 算法进行样本间基于群落组成的层次聚类分析; 利用 R 语言进行主成分分析 (PCA), 用 Vegan 软件包进行典型相关分析 (CCA), 利用 ggplot2 软件包作图。

2 结果与分析

2.1 连作对栝楼根际土壤理化性质的影响

对不同连作时间栝楼根际土壤样本理化性质进行测定, 测定内容包括土壤全氮、全磷、全钾、速效磷、速效钾、硝态氮含量以及土壤 pH 值和 CEC。结果 (表 1) 表明, 连作 2 年组和连作 4 年组的栝楼根际土壤样本中速效钾、硝态氮含量显著高于对照, 连作 4 年组的栝楼根际土壤样本中速效磷含量显著高于对照, 但是不同连作时间栝楼根际土壤样本中的全氮、全钾之间没有显著差异。土壤有机碳是通过微生物作用形成的腐殖质、动植物残体和微生物体的合称, 其含量大小具有指示土壤肥力的作用。统计结果显示, CC4 有机碳含量显著低于 CC2, 说明随着连作时间的增加, 土壤肥力已经开始下降。CEC 可作为评价土壤保肥能力的正向指标。表 1 显示, 土壤阳离子交换量随着连作时间的增加呈下降趋势, CC4 栝楼根际土壤样本中的 CEC 较 CK 下降了 7.51%。结合有机碳含量测定结果, 说明随着连作时间的延长, 栝楼根际土壤保肥能力逐渐下降。

表 1 不同连作年限栝楼根际土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of rhizosphere soil of continuous cropping *Trichosanthes kirilowii*

样本	全氮含量 (g/kg)	全磷含量 (g/kg)	全钾含量 (g/kg)	有机碳含量 (g/kg)	速效磷含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)	硝态氮含量 (mg/kg)	阳离子交换量 (cmol/kg)	pH 值
CK	1.54a	1.00a	20.29a	15.22a	34.51a	370.00a	3.81a	25.02a	8.38a
CC2	1.90a	1.00a	20.30a	18.38b	43.55a	495.63c	15.34c	23.29a	8.06a
CC4	1.70a	1.23b	20.06a	16.07a	95.10b	415.00b	12.21b	23.14a	8.18a

CK: 取样地块周边未耕作自然土壤; CC2: 连作 2 年栝楼根际土壤; CC4: 连作 4 年栝楼根际土壤。同列数据后不同小写字母表示不同样本间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 栝楼根际土壤微生物测序结果和多样性分析

2.2.1 测序结果分析 对不同连作时间栝楼根际土壤样本进行细菌 16S 和真菌 ITS 高通量测序,所有样本中共得到 727 613 个细菌有效序列,平均长度 446.54 bp,覆盖度 96.3%~98.9%;获得 734 546 个真菌有效序列,平均长度 289.52 bp,覆盖度 99.6%~99.9%(表 2)。采用对序列进行随机抽样的方法,使用 97%相似度的 OTU 进行稀释曲线分析。图 1 显示,土壤样本序列的稀释曲线逐渐趋于平缓,说明测序数据基本合理,测序深度包含了样本中绝大多数细菌和真菌类型,能够反应土壤中细菌和真菌的群落组成。

表 2 栝楼根际土壤测序信息

Table 2 Sequencing information of rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii*

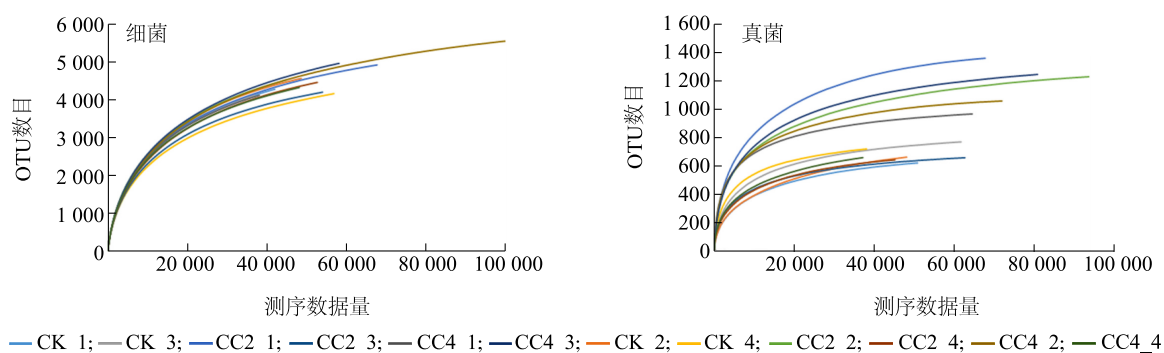
微生物类群	样本	有效序列数	碱基数	覆盖度 (%)	平均长度 (bp)
细菌	CK_1	47 335	33 718 067	97.1	448.78
	CK_2	79 991	22 224 744	98.4	447.37
	CK_3	41 091	18 793 137	96.8	448.38
	CK_4	45 965	49 677 518	96.3	448.33
	CC2_1	75 409	26 652 273	98.3	447.14
	CC2_2	49 711	26 621 194	97.1	447.08
	CC2_3	59 467	27 339 605	98.1	448.19
	CC2_4	59 502	23 727 554	97.8	447.40
	CC4_1	41 928	21 242 916	96.8	448.22
	CC4_2	111 040	35 785 529	98.9	447.38
	CC4_3	63 037	18 424 259	97.7	433.71
	CC4_4	53 137	20 607 316	97.6	446.54
真菌	CK_1	51 328	21 661 339	99.8	263.93
	CK_2	48 792	29 739 643	99.7	263.28
	CK_3	62 934	19 853 599	99.8	278.09
	CK_4	38 951	22 522 775	99.7	286.84
	CC2_1	70 037	17 792 766	99.8	309.28
	CC2_2	95 041	12 799 671	99.8	312.91
	CC2_3	63 118	25 238 832	99.9	281.90
	CC2_4	45 703	10 577 546	99.7	280.06
	CC4_1	65 408	13 547 208	99.8	303.53
	CC4_2	73 138	12 845 734	99.9	307.95
	CC4_3	82 285	17 501 110	99.8	306.72
	CC4_4	37 811	11 172 803	99.6	279.75

CK_1~CK_4:取样地块周边未耕作自然土壤的 4 次重复;CC2_1~CC2_4:连作 2 年栝楼根际土壤的 4 次重复;CC4_1~CC4_4:连作 4 年栝楼根际土壤的 4 次重复。

利用韦恩图对不同样本的 OTU 进行可视化分析,结果(图 2)表明,CK、CC2、CC4 的土壤样本中细菌 OTU 分别有 7 278 个、6 839 个和 7 212 个,其中所有土壤样本共有的细菌 OTU 有 4 285 个,CK、CC2、CC4 的土壤样本独有的细菌 OTU 分别为 1 450 个、980 个和 1 422 个;CK、CC2、CC4 的土壤样本中真菌 OTU 分别有 1 355 个、2 137 个和 2 045 个,其中共有的真菌 OTU 有 525 个,CK、CC2、CC4 的土壤样本独有的真菌 OTU 分别为 528 个、711 个和 653 个。表明栝楼根际和连作时间对土壤微生物群落结构具有较大影响。

2.2.2 α 多样性分析 比较微生物群落 α 多样性,利用 Chao1 指数指示菌群丰度,利用 Shannon 指数和 Simpson 指数指示菌群多样性,分析栝楼根际和连作时间对土壤微生物群落丰度和多样性的影响。细菌群落多样性分析结果(图 3)表明,CK、CC2、CC4 土壤样本细菌群落的 Chao1 指数值分别为 5 666.7、5 402.6 和 5 713.5,Shannon 指数分别为 7.32、7.19 和 7.25,Simpson 指数分别为 0.001 67、0.001 93 和 0.001 73,样本间无明显差异。对真菌群落多样性进行分析,图 3 显示,Chao1 指数最高为 CC4,最低为 CK;Shannon 指数最高为 CC4,最低为 CK;Simpson 指数最低的为 CC4,最高为 CK,说明连作 4 年的栝楼根际土壤真菌丰度和多样性最高,其次为连作 2 年栝楼根际土壤样本。以上结果表明栝楼连作会导致根际土壤真菌丰度和多样性大幅提高,但是对细菌群落的影响相对较小。

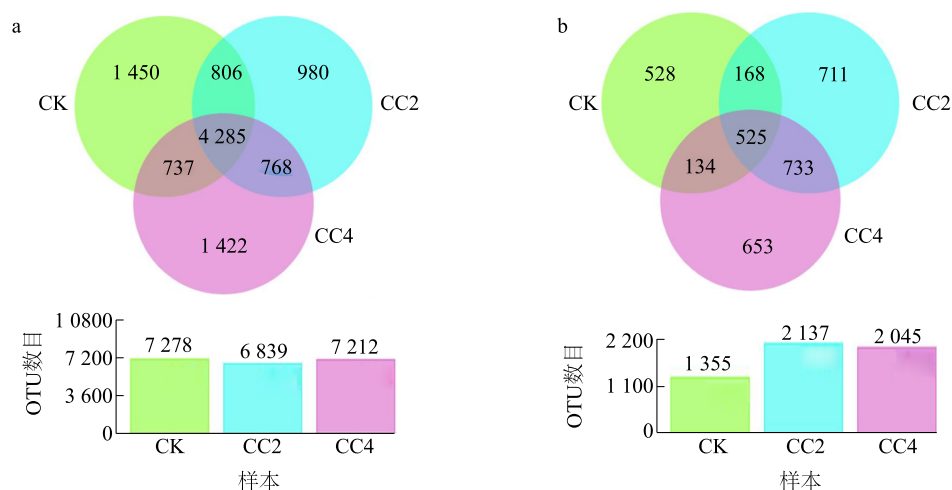
2.2.3 β 多样性分析 图 4 显示,细菌群落主成分分析(PCA)中 PC1 和 PC2 这 2 个主成分的贡献率分别为 19.6% 和 14.5%。CK 土壤样本细菌群落组成结构与 CC2、CC4 存在明显差异,CC2 和 CC4 的栝楼根际土壤样本细菌群落组成结构存在交集,说明栝楼根际会影响栝楼根际土壤细菌群落组成结构,但是连作时间对细菌群落组成结构影响相对较小。所有土壤样本中真菌群落 PCA 结果表明,PC1 和 PC2 这 2 个主成分分析的贡献率分别为 13.4% 和 12.1%,CK 土壤样本真菌群落组成结构与 CC2 存在明显差异。与 CK 和 CC2 相比,CC4 的 4 个样本之间的距离较大,说明群落结构差异较大。以上结果说明栝楼根际和连作时间会对栝楼根际土壤中真菌群落组成结构造成较大影响。



CK_1~CK_4: 取样地块周边未耕作自然土壤的 4 次重复; CC2_1~CC2_4: 连作 2 年栝楼根际土壤的 4 次重复; CC4_1~CC4_4: 连作 4 年栝楼根际土壤的 4 次重复; OTU: 分类操作单元。

图 1 基于 OTU 丰度的土壤样本微生物群落稀释曲线

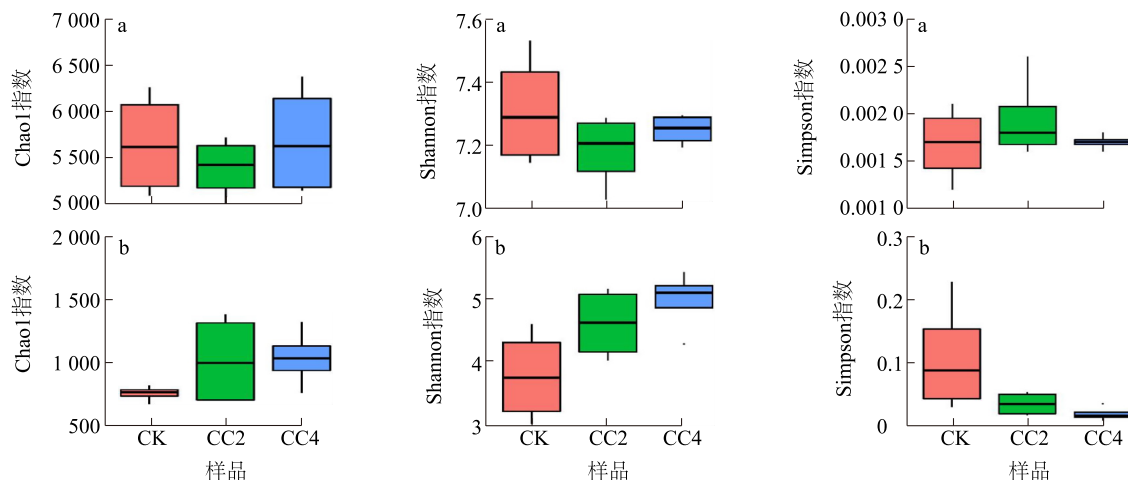
Fig.1 Rarefaction curves of soil microbial communities based on OTU richness



a: 细菌 OTU 分布韦恩图; b: 真菌 OTU 分布韦恩图。CK: 取样地块周边未耕作自然土壤; CC2: 连作 2 年栝楼根际土壤; CC4: 连作 4 年栝楼根际土壤。

图 2 不同栝楼根际土壤样本中 OTU 数量韦恩图

Fig.2 Venn diagram of OTU number in different rhizosphere soil samples of *Trichosanthes kirilowii*



a: 细菌 α 多样性图; b: 真菌 α 多样性图。CK: 取样地块周边未耕作自然土壤; CC2: 连作 2 年栝楼根际土壤; CC4: 连作 4 年栝楼根际土壤。

图 3 栝楼根际土壤微生物群落 α 多样性

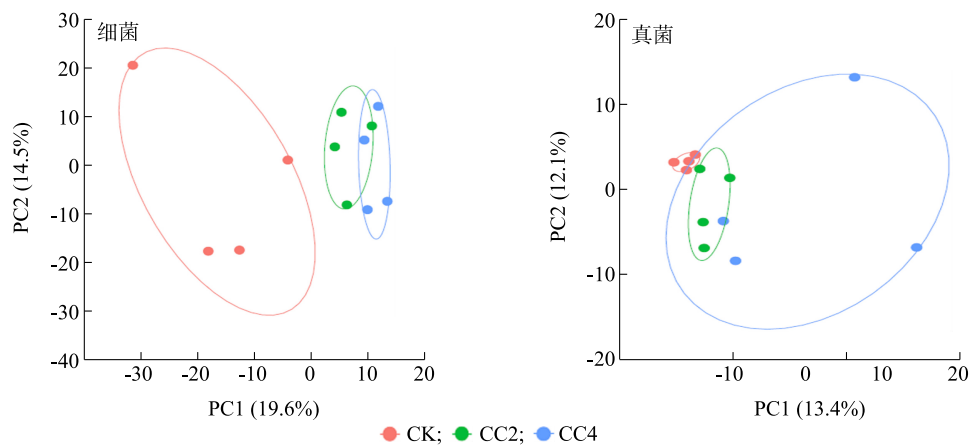
Fig.3 The α -diversity of microbial communities in rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii*

2.3 栝楼根际土壤微生物群落结构分析

3种土壤样本中的细菌被归类为47个门、124个纲、301个目、495个科、1 025个属和1 693个种;真菌被归类为8个门、30个纲、80个目、164个科、321个属和605个种。

2.3.1 不同土壤样本微生物门水平群落结构分析 图5a显示,在所有样本细菌群落组成的47个门中,相对丰度达到5.0%以上的优势菌门依次为 Proteobacteria (30.8%~34.1%)、Actinobacteriota (13.9%~22.8%)、Gemmatimonadota (10.0%~12.9%)、Bacteroidota (6.9%~

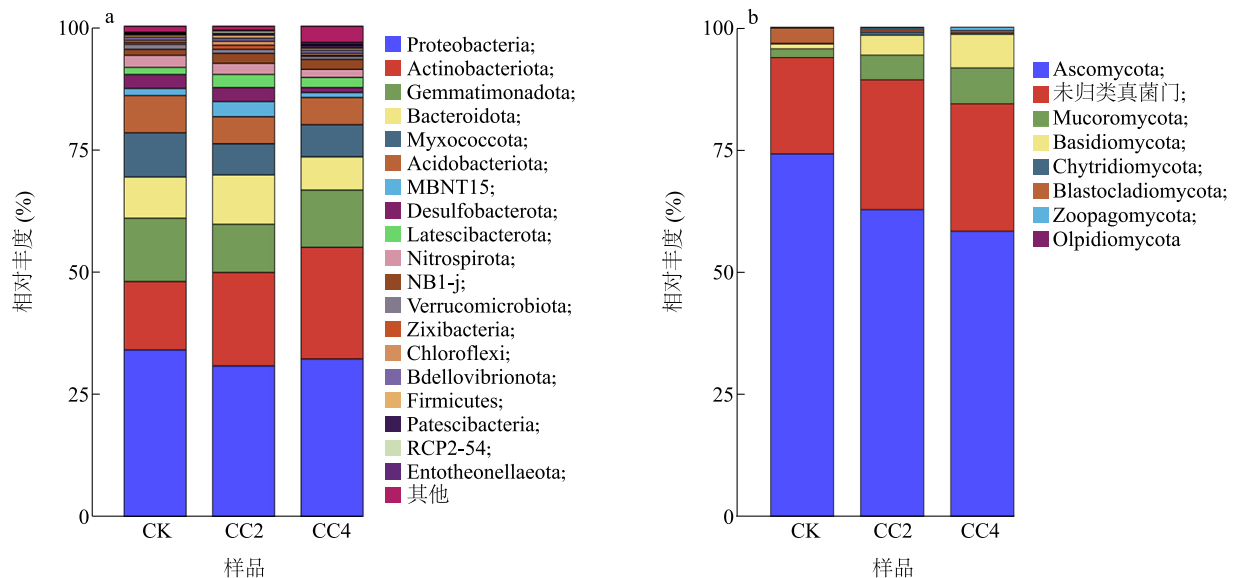
9.9%)、Myxococcota (6.5%~8.9%) 和 Acidobacteriota (5.4%~7.7%)。与CK相比,CC2和CC4的栝楼根际土壤样本中 Proteobacteria、Gemmatimonadota、Myxococcota 和 Acidobacteriota 的相对丰度均下降,而 Actinobacteriota 的相对丰度逐渐增大。除了优势菌门,一些具有重要功能的细菌门,如 Nitrospirota 在CC2和CC4中的相对丰度与CK相比分别降低了3.5%和34.7%;CC4中 Bacteroidota 相对丰度与CK相比降低了17.9%,Chloroflexi 相对丰度与CK相比降低了18.1%。



CK: 取样地块周边未耕作自然土壤; CC2: 连作2年栝楼根际土壤; CC4: 连作4年栝楼根际土壤。

图4 栝楼根际土壤微生物群落主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of microbial communities in rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii*



a: 细菌门水平群落结构图; b: 真菌门水平群落结构图。CK: 取样地块周边未耕作自然土壤; CC2: 连作2年栝楼根际土壤; CC4: 连作4年栝楼根际土壤。

图5 栝楼根际土壤微生物门水平群落组成

Fig.5 Microbial community composition at phylum rank in rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii*

在所有样本真菌群落组成的 8 个门中, Ascomycota 和未归类真菌门的相对丰度最高, 其次是 Mucoromycota、Basidiomycota、Chytridiomycota、Blastocladiomycota、Zoopagomycota 和 Olpidiomycota (图 5b)。与 CK 相比, CC2 和 CC4 的栝楼根际土壤样本中 Ascomycota 相对丰度分别减少了 15.3% 和 21.2%, Blastocladiomycota 相对丰度下降了 83.8% 和 79.7%, 其余真菌门相对丰度均明显增加, Mucoromycota 相对丰度分别增加了 1.88 倍和 3.08 倍, Basidiomycota 相对丰度分别增加了 3.29 倍和 6.36 倍, Chytridiomycota 相对丰度分别增加了 1.81 倍和 18.6%, Zoopagomycota 相对丰度分别增加了 2.12 倍和 4.51 倍。此外, 与 CK 相比, CC2 和 CC4 的栝楼根际土壤样本中未归类真菌门的相对丰度也大幅增加, 分别增加了 34.5% 和 32.1%。以上结果表明, 栝楼根际和连作使得栝楼根际微生物群落结构和组成发生了明显的变化, 特别是对真菌群落的结构和组成影响更为明显。

2.3.2 不同土壤样本微生物属水平群落结构分析

所有样本共包含 1 025 个细菌属和 321 个真菌属。图 6a 显示, 在 1 025 个细菌属中, 相对丰度最高的 10 个细菌属分别为 *Gemmatimonadaceae*、*MND1*、*MB-A2-108_norank*、*Haliangium*、*MBNT15_norank*、*S0134 terrestrial group*、*NB1-j_norank*、*Ellin6067*、*Gaiella* 和 *67-14_norank*。与 CK 相比, CC2、CC4 栝楼根际土壤样本中 *Gemmatimonadaceae*、*Haliangium*、*S0134 terrestrial group* 细菌属相对丰度均下降; *MB-A2-108_norank*、*NB1-j_norank*、*Gaiella* 和 *67-14_norank* 细菌属相对丰度均增加; *MBNT15_norank* 相对丰度先增加后下降。对相对丰度最高的 10 个细菌属进行分析, 与 CC2 相比, CC4 栝楼根际土壤样本中除了 *MBNT15_norank* 和 *Ellin6067* 相对丰度下降, 其余 8 个细菌属相对丰度均增加。此外, 与 CK 相比, CC2 和 CC4 非优势细菌属中有益细菌属 *Bryobacter* 的相对丰度分别下降了 67.2% 和 57.4%; *Steroidobacteraceae* 相对丰度分别下降了 46.5% 和 48.7%; *Nitrospira* 相对丰度分别降低了 11.7% 和 15.1%。

图 6b 显示, 在所有 321 个真菌属中, 除去相对丰度最高的未归类真菌属, 在 CK 土壤样本中相对丰度大于 5% 的优势真菌属依次为 *Zopfiella*、*Cercophora*、*Schizothecium* 和 *Podospora*, 而在 CC2

栝楼根际土壤样本中相对丰度大于 5% 的优势菌属依次为 *Lophotrichus*、*Stagonosporopsis*、*Mortierella*、*Dendrostilbella* 和 *Schizothecium*, CC4 栝楼根际土壤样本中相对丰度大于 5% 的优势菌属为 *Mortierella* 和 *Fusarium*。与 CK 相比, CC2、CC4 栝楼根际土壤样本的真菌群落结构已经发生了巨大变化, 一些有害真菌属的相对丰度大幅增加, 例如 *Stagonosporopsis* 的相对丰度分别增加了 85.10 倍和 25.60 倍, *Rhizoctonia* 相对丰度分别增加了 54.80 倍和 13.70 倍, *Colletotrichum* 相对丰度分别增加了 4.82 倍和 6.00 倍, *Plectosphaerella* 相对丰度分别增加了 21.00 倍和 11.50 倍。以上结果表明, 栝楼根际和连作明显影响根际土壤中细菌和真菌的丰度和结构, 使得部分有益细菌属的相对丰度降低, 而部分引起严重病害的真菌属相对丰度则大幅增加。

2.4 土壤理化性质与土壤微生物群落结构和组成的关系

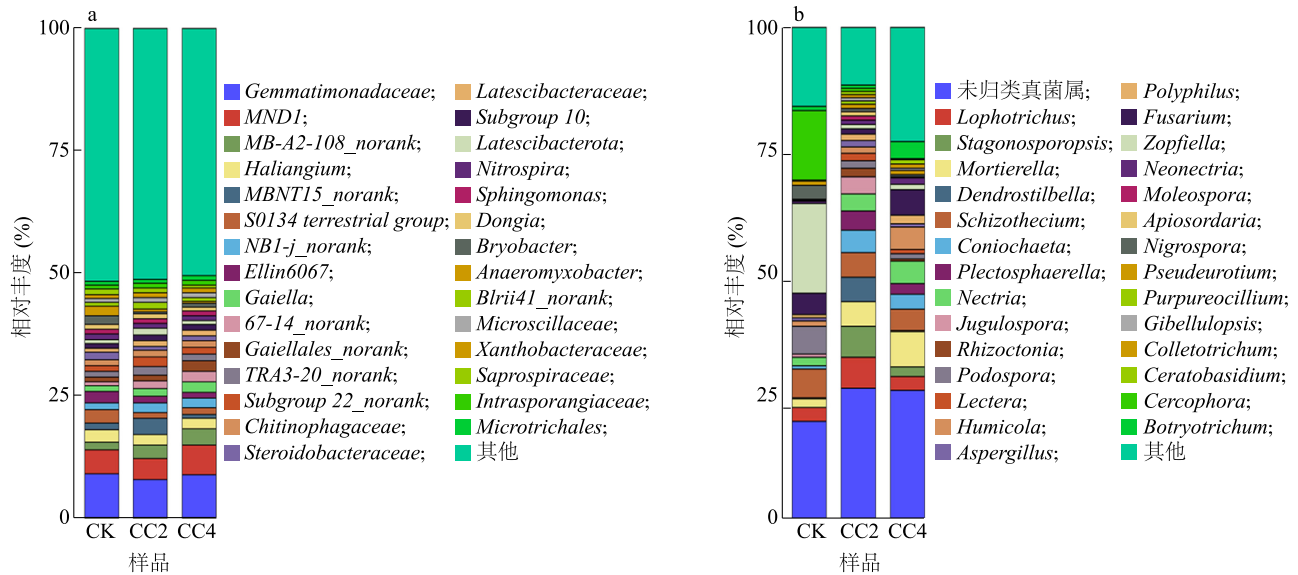
对各个样本不同细菌属、真菌属与土壤理化性质进行典型相关分析 (CCA), 首先进行细菌属与土壤理化性质的典型相关分析, 对 CCA 结果进行置换检验 (置换次数为 999), $P=0.011$, 表明环境因子显著影响细菌物种分布。对每个环境因子进行检验, 发现硝态氮含量 ($P=0.003$)、pH 值 ($P=0.026$)、全磷含量 ($P=0.050$) 和速效磷含量 ($P=0.020$) 4 个因素对栝楼根际土壤细菌分布具有显著影响。对真菌属与土壤理化性质进行典型相关分析, 对 CCA 结果进行置换检验 (置换次数为 999), $P=0.007$, 说明环境因子显著影响真菌物种分布。对每个环境因子进行检验, 发现硝态氮含量 ($P=0.035$)、速效磷含量 ($P=0.042$) 和 CEC ($P=0.001$) 3 个因素对栝楼根际土壤真菌分布具有显著影响。图 7 显示, 硝态氮含量、全磷含量和速效磷含量是栝楼根际土壤微生物群落多样性的主要影响因素; pH 值、CEC 是 CK 土壤微生物群落多样性的主要影响因素。

3 讨论

许多与植物相关的微生物会对植物生长发育、营养吸收、病害以及产量产生深远的影响, 这些微生物甚至被称为植物微生物组或者植物的另一个基因组^[17]。同时, 植物根系会对根际土壤的生物、理化

性质产生影响^[21],这种影响会反馈于土壤微生物,从而影响他们的结构和活性^[17]。连作会对土壤微生物群落产生巨大影响,包括影响微生物群落结构

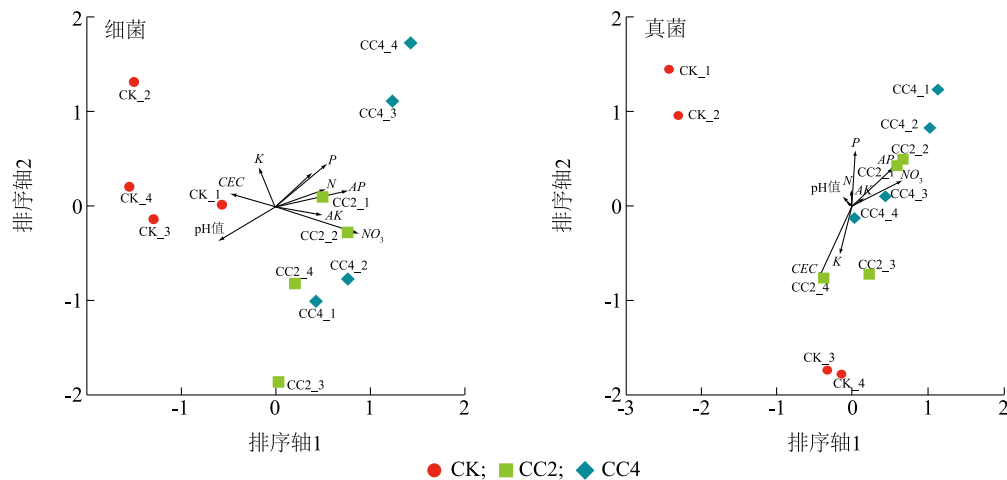
等,这种改变可能会导致土壤肥力下降,甚至导致严重的植物病虫害^[15-16]。



a:细菌属水平群落结构图;b:真菌属水平群落结构图。CK:取样地块周边未耕作自然土壤;CC2:连作2年栝楼根际土壤;CC4:连作4年栝楼根际土壤。

图6 栝楼根际土壤微生物属水平群落组成

Fig.6 Microbial community composition at genus rank in rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii*



CK₁~CK₄:取样地块周边未耕作自然土壤的4次重复;CC2₁~CC2₄:连作2年栝楼根际土壤的4次重复;CC4₁~CC4₄:连作4年栝楼根际土壤的4次重复。 NO_3^- :硝态氮含量;N:全氮含量;P:全磷含量;K:全钾含量;AP:速效磷含量;AK:速效钾含量;CEC:阳离子交换量。

图7 基于典型相关分析的栝楼根际土壤理化性质与细菌属、真菌属的关系

Fig.7 Relationship between physiochemical properties of rhizosphere soil of *Trichosanthes kirilowii* and genera of bacteria and fungus based on canonical correlation analysis

本研究发现,栝楼连作障碍的产生与栝楼根际土壤真菌和细菌比例失衡、真菌结构发生巨大变化

以及有害真菌相对丰度大幅增加紧密相关。与对照土壤样本相比,连作2年和连作4年的栝楼根际土

壤样本中真菌 OTU 数目增加,而细菌 OTU 数量稍有下降。目前的研究结果表明,很多土壤细菌在植物生长过程中起重要的作用^[17],如变形菌门在土壤碳、氮、硫循环中均起着关键的作用^[22],放线菌具有分解纤维素和木质素的功能,同时还具有固氮和解磷作用^[23-31];大多数土壤真菌对于植物的生长是不利的^[19-20]。因此,栝楼连作土壤样本中真菌丰度和多样性的提高,说明随着连作时间的增加,栝楼生存环境正在逐渐恶化。

在本研究中,连作的栝楼根际土壤微生物结构发生了变化,其中变化最为明显的是真菌群落结构。真菌群落结构变化包括一些有害真菌属相对丰度的大幅上升。相比对照土壤样本,连作 2 年和连作 4 年的栝楼根际土壤样本中 *Stagonosporopsis* 的相对丰度分别增加了 85.10 倍和 25.60 倍,该真菌属与葫芦科植物蔓枯病和菊科植物的射线枯萎病有关^[32-33]; *Rhizoctonia* 相对丰度增加了 54.80 倍和 13.70 倍,该菌属与烟草叶斑病和根腐病关联紧密^[34]; *Colletotrichum* 相对丰度分别增加了 4.82 倍和 6.00 倍,该菌属会引起植物炭疽病和枯萎病^[35]; *Plectosphaerella* 相对丰度分别增加了 21.00 倍和 11.50 倍,该菌属与作物根腐病紧密相关^[36]。本研究结果表明,栝楼连作对栝楼根际土壤中真菌结构和多样性的影响非常明显,会导致栝楼根际土壤中真菌结构失衡,大量有害真菌相对丰度大幅提升,从而导致栝楼发生严重的病虫害。

除了有害真菌相对丰度的增加,一些有益菌相对丰度的下降,也与栝楼连作障碍具有一定的相关性。CC4 中 Bacteroidota 和 Chloroflexi 等具有代谢营养物质和通过光合作用产能等功能的细菌门类^[37-39],相对丰度与对照相比也有不同程度的降低,说明栝楼连作土壤的代谢功能、产能等可能均受到了影响。硝化菌门的 *Nitrospira* 和 *Nitrosospora* 在土壤微生物的氮代谢中起着主导作用,也是响应缺氮胁迫的土壤微生物标志物^[40-41]。在本研究中,连作 2 年和连作 4 年的栝楼根际土壤样本中 *Nitrospira* 相对丰度较对照土壤分别降低了 11.7% 和 15.1%。该研究结果与土壤样本中氮含量的变化相反,说明栝楼可能面临着缺氮胁迫,而这种胁迫并不是土壤氮含量导致的,而是土壤中微生物氮素分解和利用能力降低所导致的。今后应将提高栝楼栽培土壤氮素分解和利用能力作为栝楼连作障碍缓解和土壤改

良的目标之一。

栝楼根际土壤微生物群落组成和结构与土壤理化性质具有紧密的相关性。CCA 结果表明,细菌群落组成和结构与硝态氮含量、全磷含量、速效磷含量和 pH 值紧密相关;真菌群落组成和结构与硝态氮含量、速效磷含量和 CEC 紧密相关。氮和磷在植物生长发育中具有非常重要的作用,同时也对土壤微生物群落多样性和群落结构具有深远的影响^[42-43]。本研究结果表明,硝态氮含量、全磷含量和速效磷含量是栝楼根际土壤微生物群落多样性的主要影响因素;pH 值、CEC 是 CK 土壤微生物群落多样性的主要影响因素。本研究还发现,土壤 pH 值对细菌群落多样性影响明显高于真菌群落多样性,而 CEC 对真菌群落多样性影响高于细菌群落多样性。土壤 pH 值对土壤酶活性、土壤养分的释放和转运等均有影响,对植物的生长发育具有重要作用。由于适宜真菌生长的 pH 值范围较大(3.0~8.0),而适宜细菌生长的 pH 值范围则相对较小,因此 pH 值的改变对真菌群落多样性影响较小^[44]。由于真菌的菌丝具有高结合阳离子能力,不同种类的真菌对阳离子吸附能力存在着较大的差异并且对作物和环境存在一定的依赖,因此土壤 CEC 的变化对于真菌群落的影响较大^[45]。

在本研究中,连作 2 年和连作 4 年的栝楼根际土壤样本中真菌的组成和结构也存在着较大的差异,除了受到栝楼根际和连作时间的影响外,人为操作也是该现象产生的原因之一。由于栝楼连作 3 年以上就会出现病害严重和产量下降的现象,因此农民在栽培过程中会通过增施有机肥和增加农药施用量等措施来保证连作 3 年以上栝楼产量,从而导致本研究中土壤样本之间的较大差异。该现象说明栝楼根际土壤微生物菌落多样性是可以通过采取不同措施进行改变的。下一步将研究不同栽培措施、土壤养分、添加剂对土壤细菌和有害真菌丰度、多样性的影响,以期通过降低栝楼根际土壤有害微生物的相对丰度,提高有益微生物的相对丰度,从而缓解栝楼连作障碍。

4 结 论

栝楼连作会造成其根际土壤养分和理化性质发生变化。同时,根际微生物群落的多样性和结构也会发生巨大的变化,表现为一些有害真菌属(如

Stagonosporopsis、*Rhizoctonia* 和 *Colletotrichum*) 的相对丰度成倍增长,一些有益细菌门(如 *Bacteroidota*、*Chloroflexi* 和 *Nitrospirota* 等)的相对丰度下降,这可能是造成枯萎连作障碍和病虫害频发的原因之一。典型相关分析结果表明,硝态氮含量、全磷含量和速效磷含量是枯萎根际土壤微生物群落多样性的主要影响因素;pH 值、CEC 是 CK 土壤微生物群落多样性主要影响因素。本研究结果揭示了枯萎连作障碍的产生可能是根际土壤微生物群落组成和丰度失衡,有害真菌大量积累导致的,可以为下一步缓解枯萎连作障碍提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 宋宁,王新苗,樊俐慧,等. 天花粉的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(3): 433-435.
- [2] 王静,蒋杰,李新朋,等. 天花粉治疗糖尿病物质基础及作用机制研究进展[J]. 药学研究, 2021, 40(10): 684-686, 697.
- [3] 司红梅,于旭东,商建伟,等. 基于网络药理学探讨威灵仙-天花粉药对抗癌的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5): 182-190.
- [4] 刘岱琳,曲戈霞,王乃利,等. 瓜蒌的抗血小板聚集活性成分研究[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1334-1336.
- [5] 郭琳,苗明三. 瓜蒌化学、药理及临床应用探讨[J]. 中医学报, 2014, 29(6): 865-868.
- [6] 闫爱国,刘建勋,李欣志,等. 瓜蒌薤白半夏汤合血府逐瘀汤组方对小型猪痰瘀互结证冠心病模型心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2174-2179.
- [7] 何湛湛,杨桢,元玉婕,等. 枳实薤白桂枝汤现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(6): 254-259.
- [8] 何玲玲,赵玲. 瓜蒌薤白半夏汤防治新型冠状病毒肺炎潜在应用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(5): 1024-1027.
- [9] 董陈颖,杨鸿. 基于网络药理学探讨宣白承气汤对新冠肺炎的抗炎作用机制[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(19): 1446-1454.
- [10] 孟小勤,鲁奇亮,刘珊,等. 田和炳宣透汤用于新冠肺炎痊愈后防复验案 4 则[J]. 四川中医, 2021, 39(3): 16-19.
- [11] 阮维斌,王敬国,张福锁. 连作障碍因素对大豆养分吸收和固氮作用的影响[J]. 生态学报, 2003, 23(1): 22-29.
- [12] 杨凡,王建宏,蔡毓新,等. 设施黄瓜连作障碍灾变机制及酵素菌应用研究进展[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(7): 6-12.
- [13] 王梓,李勇,丁万隆. 人参化感自毒作用与连作障碍机制研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(7): 1040-1044.
- [14] 李丽,蒋景龙. 西洋参化感自毒作用与连作障碍研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(13): 4436-4443.
- [15] LIU Z X, LIU J J, YUA Z H, et al. Long-term continuous cropping of soybean is comparable to crop rotation in mediating microbial abundance, diversity and community composition [J]. Soil & Tillage Research, 2020, 197: 104503.
- [16] CHEN S, QI G F, LUO T, et al. Continuous-cropping tobacco caused variance of chemical properties and structure of bacterial network in soils [J]. Land Degradation & Development, 2018, 29: 4106-4120.
- [17] MENDES R, GARBEVA P, RAAIJMAKERS J M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 634-663.
- [18] RICHARD J, MANUELA P, ANTONELLA S, et al. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition-current knowledge and future directions [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1617.
- [19] LI X G, DING C F, ZHANG T L, et al. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2014, 72: 11-18.
- [20] XIONG W, LI Z G, LIU H J, et al. The effect of long-term continuous cropping of black pepper on soil bacterial communities as determined by 454 pyrosequencing [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136946.
- [21] PATERSON E. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity [J]. European Journal of Soil Science, 2003, 54: 741-750.
- [22] WANG Y Z, XU X M, LIU T M, et al. Analysis of bacterial and fungal communities in continuous-cropping ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) fields in different areas in China [J]. Scientific Reports, 2020, 10: 3264.
- [23] 涂勇,杨文钰,刘卫国,等. 大豆与烤烟不同套作年限对根际土壤微生物数量的影响[J]. 作物学报, 2015, 41(5): 733-742.
- [24] CUI J, LI Y, WANG C, et al. Characteristics of the rhizosphere bacterial community across different cultivation years in saline-alkaline paddy soils of Songnen Plain of China [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64: 925-936.
- [25] 赖家豪,熊桂红,刘冰,等. 放线菌活性物质的挖掘与分离技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(13): 82-89.
- [26] 银江林,李蜜,易湘茜,等. 广西涠洲岛 3 种海参共附生细菌多样性及其延缓衰老活性分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(10): 2904-2912.
- [27] 纠敏,李晶晶,李伟山,等. 大豆疫霉病菌生防放线菌的筛选、鉴定及生防效果[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(5): 1137-1142.
- [28] 范江龙,李欣蕊,席雪冬. 小麦赤霉病生物防治研究进展[J]. 生物加工过程, 2021, 19(4): 420-431.
- [29] 程欢,张东华,张俊忠,等. 苹果砧木 T337 不同组织内生菌群落及其功能预测[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(14): 144-154.
- [30] 李朝生,田丹丹,覃柳燕,等. 香蕉套种黑皮冬瓜对香蕉枯萎病的防控效果及土壤微生物群落的影响[J]. 南方农业学报, 2021, 52(5): 1238-1245.

- [31] 彭玉娇,崔学宇,邵元元,等. 不同树龄沙田柚果园土壤肥力、叶片养分和土壤细菌群落的特征[J].江苏农业学报,2021,37(2):348-354.
- [32] MAHAPATRA S, RAO E S, SANDEEPKUMAR G M, et al. *Stagonosporopsis cucurbitacearum* the causal agent of gummy stem blight of watermelon in India [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2020, 15. DOI:10.1007/s13314-020-0376-z.
- [33] VAGHEFI N, PETHYBRIDGE S J, FORD R, et al. *Stagonosporopsis* spp. associated with ray blight disease of Asteraceae [J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41(6): 675-686.
- [34] GONZALEZ M, PUJOL M, METRAUX J P, et al. Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn [J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(3): 209-216.
- [35] DEAN R, VAN KAN J A L, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 414-430.
- [36] CARLUCCI A, RAIMONDO M L, SANTOS J, et al. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy [J]. Persoonia, 2012, 28: 34-48.
- [37] HILL V R, KAHLER A M, JOTHIKUMAR N, et al. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water sample [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 4218-4225.
- [38] YU H, SI P, SHAO W, et al. Response of enzyme activities and microbial communities to soil amendment with sugar alcohols [J]. Microbiologyopen, 2016, 5: 604-615.
- [39] KRAGELUND C, LEVANTESI C, BORGER A. Identity abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59: 671-682.
- [40] DYTCHAK M A, LONDRY K L, OLESZKIEWICZ J A. Nitrifying genera in activated sludge may influence nitrification rates [J]. Water Environment Research, 2008, 80(5): 388-396.
- [41] 熊艺,郑璐,沈仁芳,等. 缺氮胁迫对小麦根际土壤微生物群落结构特征的影响[J].土壤学报,2022, 59(1):218-230.
- [42] LI Y L, TREMBLAY J, BAINARD L D, et al. Long-term effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil microbial community structure and function under continuous wheat production [J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(3):1066-1088.
- [43] KAVAMURA V N, HAYAT R, CLARK I M, et al. Inorganic nitrogen application affects both taxonomical and predicted functional structure of wheat rhizosphere bacterial communities [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1074.
- [44] WHEELER K A, HURDMAN B F, PITT J I. Influence of pH on the growth of some toxigenic 470 species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* [J]. International Journal of Food Microbiology, 1991, 12(2/3): 141-149.
- [45] MARSCHNER P, JENTSCHKE G, GODBOLD D L. Cation exchange capacity and lead sorption in ectomycorrhizal fungi [J]. Plant and Soil, 1998, 205: 93-98.

(责任编辑:王妮)