

白茂军, 高正锋, 张力元, 等. 烟草青枯病发病程度与土壤环境间的响应关系[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(6): 1294-1302.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.06.004

烟草青枯病发病程度与土壤环境间的响应关系

白茂军¹, 高正锋², 张力元³, 范成平¹, 潘首慧¹, 董延鑫¹, 杨 索¹, 王 莹¹,
陈 汶¹, 杨小龙¹, 岑 浩¹, 田玉琴¹, 咎建朋¹, 吴 海¹

(1. 贵州省烟草公司安顺市公司, 贵州 安顺 561000; 2. 云南农业大学, 云南 昆明 650201; 3. 贵州中烟工业有限责任公司, 贵州 贵阳 550009)

摘要: 为探究烟草青枯病发生与土壤生态环境因子间的关系, 明确与青枯病发病程度相关的因素, 通过田间调查收集青枯病不同发病程度的根际土壤, 测定土壤理化指标和酶活性并用 16S DNA、内转录间隔区 (Internally transcribed spacer, ITS) 基因测序技术分析烟株发病与未发病植株根际土壤细菌、真菌群落结构的差异。结果表明, 在烟株发生青枯病的根际土壤中, 随着烟株发病程度的加重, 土壤 pH 值、有机质含量、总氮含量降低, 硝态氮 (NO_3^- -N) 含量升高; 发病烟株根际土壤真菌群落中镰刀菌属 (*Fusarium*)、毛霉属 (*Mucor*)、*Pseudaleuria* 与细菌群落中肠杆菌属 (*Enterobacter*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 的相对丰度高于正常烟株根际土壤; 通过 LEfSe 及相关性分析发现, 柱孢霉属 (*Cylindrocarpus*)、毛霉属 (*Mucor*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 可能是不同青枯病发病程度烟株根际土壤中微生物在属水平产生差异的主要物种; 冗余分析 (RDA) 结果表明, 总氮含量、有机质含量可能是影响烟草青枯病发生的关键土壤因子。综上所述, 土壤总氮含量、有机质含量与鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、毛霉属 (*Mucor*) 微生物相对丰度的降低以及柱孢霉属微生物相对丰度的增加是引起烟草青枯病严重发生的关键因素。

关键词: 烟草青枯病; 土壤理化性状; 酶活性; 细菌; 真菌

中图分类号: S435.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)06-1294-09

The relationship between the incidence of bacterial wilt disease and soil environment in tobacco

BAI Mao-jun¹, GAO Zheng-feng², ZHANG Li-yuan³, FAN Cheng-ping¹, PAN Shou-hui¹, DONG Yan-xin¹,
YANG Suo¹, WANG Ying¹, CHEN Wen¹, YANG Xiao-long¹, CEN Hao¹, TIAN Yu-qin¹, ZAN Jian-peng¹,
WU Hai¹

(1. Anshun Branch of Guizhou Tobacco Company, Anshun 561000, China; 2. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. China Tobacco Guizhou Industrial Co., Ltd., Guiyang 550009, China)

Abstract: In order to explore the relationship between the occurrence of tobacco wilt and soil ecological and environmental factors, and to clarify the factors related to the incidence of wilt, rhizosphere soil with different degrees of wilt was collected through field investigation, soil physicochemical indices and enzyme activities were measured, and the differences of bacterial and fungal community structure in rhizosphere soil of pathogenic and non-diseased tobacco plants were analyzed by 16S DNA and internally transcribed spacer (ITS) gene sequencing technology. The results

showed that in the rhizosphere soil of tobacco plants with bacterial wilt, with the aggravation of the degree of disease, the soil pH value, organic matter content and total nitrogen content decreased, and the content of nitrate nitrogen (NO_3^- -N) increased. The relative abundance of *Fusarium*, *Mucor* and *Pseu-*

收稿日期: 2022-08-23

基金项目: 贵州省烟草公司重点研发项目 (2021XM15); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2022Y250)

作者简介: 白茂军 (1983-), 男, 重庆人, 助理农艺师, 农业推广硕士, 从事烤烟种植与收购工作。 (E-mail) 772390297@ qq.com

通讯作者: 张力元, (E-mail) 760061799@ qq.com

daleuria in the fungal community and *Enterobacter* and *Sphingomonas* in the bacterial community in the rhizosphere soil of diseased tobacco plants was higher than that in the rhizosphere soil of normal tobacco plants. Through LEFse and correlation analysis, it was found that *Cylindrocarpon*, *Mucor*, and *Sphingomonas* may be the main different species of microorganisms in the rhizosphere soil of tobacco plants with different degrees of wilt at the genus level. The results of redundancy analysis (RDA) showed that total nitrogen content and organic matter content may be the key soil factors affecting the occurrence of wilt. In summary, the decrease of soil total nitrogen content, organic matter content and relative abundance of *Sphingomonas* and *Mucor*, and the increase of relative abundance of *Cylindrocarpon* were the key factors causing the serious occurrence of wilt.

Key words: tobacco bacterial wilt; soil physical and chemical properties; enzyme activity; bacteria; fungi

烟草是中国重要的经济作物,由于耕地土壤养分失衡,加上中国烟草难以实现轮作与休耕,导致土传病害频发^[1-2]。其中,青枯病是烟草主要的细菌性土传病害之一,病原菌入侵植株后,会破坏维管束组织,从而造成烟草枯萎,因此青枯病是烟草生产上的一大毁灭性病害,造成的损失较大^[2-3]。目前,种植抗性品种^[4]、化学防治^[5-6]、生物防治^[7]、烟田轮作^[8-9]等是防治烟草青枯病的主要方式,但在病害发生时,化学防治可能会导致病原菌抗药性增强并造成环境污染,而生物防治效果不稳定,在复种指数高的烟田上只依靠农业防治措施的效果也十分有限。因此,通过探究发病程度与土壤微环境间的关系来筛选预防青枯病的原生微生物用于防治青枯病是必不可少的。有研究发现,土壤理化性质等对烟草青枯病发生的影响较大^[10-12]。还有研究发现,提高土壤 pH 值及增加土壤有机质、钾含量等可提高烟株对青枯病的抗性^[13]。此外,植株根际中土壤微生物数量及群落结构的变化也会影响病害的发生。如樊俊等^[14]研究发现,根瘤菌属、鞘氨醇单胞菌属细菌的操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)数量是导致烟草青枯病发生的重要因素。同时,在青枯病发生过程中,健康烟株根际中土壤细菌拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)细菌的相对丰度均大于发病烟株根际中土壤相应微生物的相对丰度,而在根际土壤真菌中,发病程度较轻的烟株根际土壤真菌群落的 α 多样性更高^[15]。在青枯病发病过程中,致病微生物[雷尔氏菌属(*Ralstonia*)细菌等]和有益微生物[芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌等]的相对丰度明显升高^[16]。然而,根际不仅是病原菌侵染的场所,也是有益微生物和病原菌相互作用的场所^[17]。但是,目前通过发病程度与土壤微环境间的关系来筛选防治青枯病原生微生物的报道较少,因此本研究拟通过田间调查,收集烟草青枯病不同发病程度的根际

土壤,测定根际土壤酶活性及理化性质,分析细菌、真菌的群落结构,以期探究根际土壤环境因子与发病程度间的关系,并筛选出致病微生物及关键土壤因子。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

土壤取样地位于贵州省安顺市紫云县大田坝村,地理坐标 106° 18' 19" E, 25° 34' 40" N,海拔 1 044 m。取样区域为同一地块且肥力均匀、地块平整,土壤质地为沙质土,种植的烟草品种为云烟 87。

试验地的基础理化性质:pH 值 5.21,有机质含量 24.28 g/kg,全氮含量 1.42 g/kg,碱解氮含量 162.74 mg/kg,硝态氮含量 19.18 mg/kg,铵态氮含量 9.74 mg/kg,全磷含量 0.03%,速效磷含量 3.33 mg/kg,全钾含量 0.15%,速效钾含量 54.08 mg/kg。

1.2 青枯病的分级处理

参照 GB/T 23222-2008《烟草病虫害分级及调查方法》中病虫害的分级及调查方法^[18],以株为单位调查各烟株青枯病的发病等级。0级:全株无病,烟株正常生长,记为 0;1级:茎部偶有褪绿斑,或在有条斑一侧有少数叶片凋萎,记为 1;5级:茎部黑色条斑到达顶部,或病侧 2/3 以上叶片凋萎,记为 5;7级:病株基本枯死,记为 7。

1.3 样品的采集与制备

通过系统调查并确定青枯病发病地块后,于烟株旺长期在田间对不同青枯病发病等级的烟株根际土壤进行取样,按照青枯病发病等级,相同病级取 3 株以上烟草,采用抖根法收集根系周围 0~2 mm 根际土壤,充分混匀后装袋,一部分放于-80℃冰箱中保存,用于提取土壤 DNA,另一部分储存在 4℃冰箱中,用于测定土壤酶活性、土壤养分含量。

1.4 土壤理化性状、酶活性的测定

采用电位法测定 pH 值;土壤碱解氮(AN)、硝态氮

(NO_3^- -N)、铵态氮(NH_4^+ -N)、全磷(TP)、速效磷(AP)、全钾(TK)、速效钾(AK)、有机质(SOM)、全氮(TN)含量分别用碱解扩散法、紫外分光光度法、可见分光光度法、NaOH 熔融-光度计法、碳酸氢钠-钼锑抗比色法、NaOH 熔融-火焰光度计法、 NH_4OAc 浸提-火焰光度计测定法、重铬酸钾容量法-稀释热法、半微量凯氏法测定。用苏州格锐思生物科技有限公司提供的试剂盒分别测定土壤酸性磷酸酶、脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶活性。

1.5 土壤微生物的测定

用 HiPure Soil DNA Kits 提取土壤中的 DNA; 通过 NanoDrop 微量分光光度计、琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性, 将纯化的 PCR 产物进行文库构建。经过 Qubit 和 Q-PCR 验证文库合格后, 使用 NovaSeq6000 对 DNA 文库进行测序。测序数据通过 Qiime V1.9.1 去除平均质量分数低($Q < 20$)和长度短(< 100 bp)的低质量序列, 得到最终的有效数据(Effective tags)。使用 Usearch 软件进行聚类,

表 1 不同发病程度烟株根际土壤理化性状

Table 1 Physical and chemical properties of rhizosphere soil of tobacco plants with different disease degrees

病级	pH 值	有机质含量 (g/kg)	总氮含量 (g/kg)	碱解氮含量 (mg/kg)	硝态氮含量 (mg/kg)	铵态氮含量 (mg/kg)	全磷含量 (%)	速效磷含量 (mg/kg)	全钾含量 (%)	速效钾含量 (mg/kg)
0	5.96±0.08a	26.14±1.24d	1.57±0.03c	181.30±20.44b	15.12±0.64d	39.48±2.61a	0.05±0.01a	154.73±38.16c	0.30±0.05a	127.49±27.47b
1	5.97±0.16a	38.95±1.14a	2.32±0.12a	325.97±41.96a	36.13±0.09c	37.59±6.09a	0.07±0.02a	237.33±24.76b	0.40±0.02a	392.02±64.26a
5	5.76±0.04a	33.43±1.65b	1.88±0.05b	349.30±58.07a	38.75±0b	37.59±12.80a	0.07±0.05a	399.44±67.57a	0.30±0.13a	434.95±71.60a
7	5.46±0.22b	28.82±0.07c	1.64±0.06c	336.70±4.59a	54.06±0.09a	28.84±3.00a	0.05±0.01a	165.93±8.53bc	0.32±0.06a	219.70±93.09b

同列数据后标有不同小写字母代表在 0.05 水平差异显著。

2.2 烟株根际土壤酶活性

病害的发生会影响根际土壤酶活性, 具体表现为根际土壤中蔗糖酶、过氧化氢酶活性随发病程度的加重呈下降趋势。由图 1 可以看出, 青枯病 5 级烟株根际土壤的蔗糖酶活性显著低于不发病、青枯病 1 级烟株根际土壤, 过氧化氢酶活性以青枯病 1 级烟株根际土壤最高, 但是各等级病害间的差异未达到显著水平。以上结果表明, 病害的严重程度与土壤酶活性有关, 且与蔗糖酶活性间的关系较密切。

2.3 青枯病不同发病程度根际土壤微生物群落多样性

2.3.1 微生物 α 多样性变化 由表 2 可以看出, 各处理的覆盖度均大于 97%。土壤中细菌与真菌多样性对病害发生的响应不同。在真菌中, 随着发病程度的加重, Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数和 Ace

去除聚类过程中检测到的嵌合体, 获得 OTU 的丰度和 OTU 代表序列。基于 OTU 的序列、丰度数据, 开展物种注释、物种组成分析、Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析、相关性分析等。

1.6 数据处理

用 Excel 2010 进行数据处理, 用 SPSS 25.0 进行方差分析和多重比较(Duncan's 新复极差法), 显著性水平为 0.05, 用 R 语言进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 烟株根际土壤理化性状

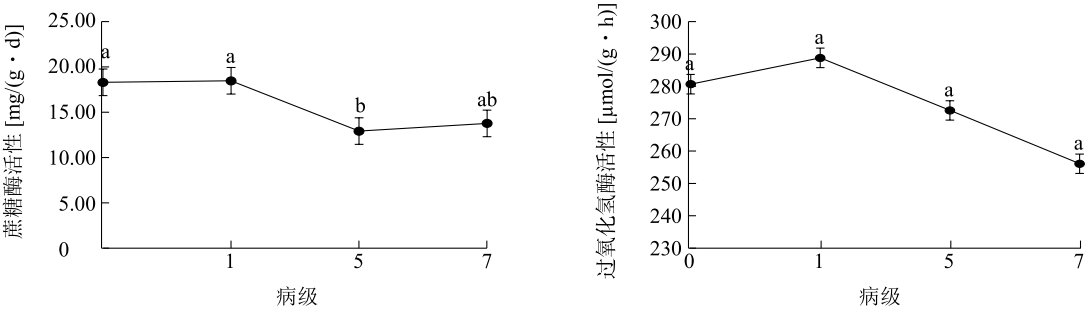
由表 1 可以看出, 不同青枯病发病程度的烟株根际土壤理化性状存在显著差异。青枯病发病烟株根际土壤的有机质、总氮、碱解氮、硝态氮、速效磷和速效钾含量均高于未发病烟株根际土壤。在发病烟株根际土壤中, 随着烟株发病程度的加重(病级由 1 级升至 7 级), pH 值、有机质含量、总氮含量、铵态氮含量降低, 硝态氮含量升高。

指数均在青枯病 1 级时最高, 且只有 Chao1 指数、Ace 指数显著高于其他病级, 其余均未达到显著差异(t -test 检验和 wilcox 秩和检验)。在细菌中, 各指数也是青枯病 1 级时最高, 但各病级间的差异均未达到显著水平。

2.3.2 不同发病程度对土壤微生物 β 多样性的影响 由图 2 可以看出, 在不同发病程度下, 土壤真菌及细菌群落 β 多样性有一定差异。主坐标分析(Principal co-ordinates analysis, PCoA)图给出了基于 Anosim 相似性分析计算出的 r 值, r 值越接近 1, 说明组间差异越大于组内差异。真菌和细菌中 PCoA 的结果均有显著差异($P < 0.05$)。在 PCo1 轴上, 随发病程度的增加, 真菌群落逐渐分离, 但正常土壤与青枯病 7 级烟株根际土壤有部分重合(图 2A), 表明青枯病 7 级烟株根际土壤真菌群落与正

常土壤相似。在 PCo1 轴上,正常土壤细菌群落与发病土壤能显著分开,而青枯病 5 级烟株根际土壤和青枯病 7 级烟株根际土壤未能明显分开(图 2B),

表明正常土壤与发病土壤间存在差异,青枯病 5 级、7 级烟株根际土壤细菌群落结构较为相似。



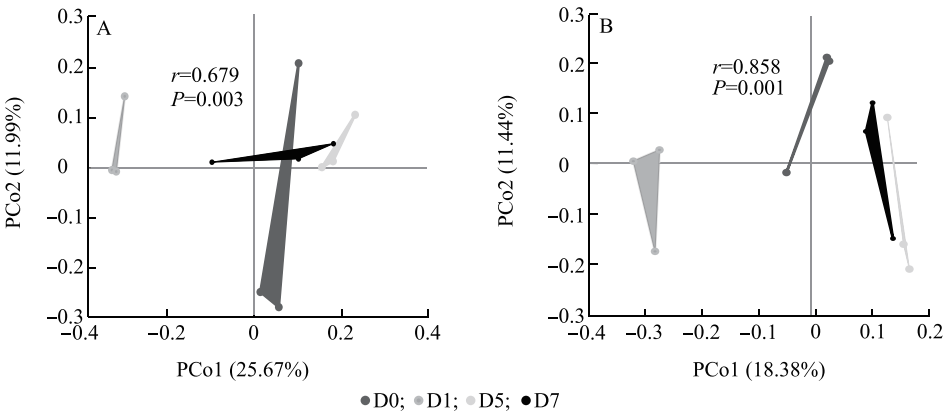
不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
图 1 不同病级烟株根际土壤的酶活性

Fig.1 Enzyme activities in the rhizosphere soil of tobacco plants with different disease grades

表 2 青枯病不同发病程度下根际土壤真菌、细菌群落 α 多样性的变化
Table 2 Changes of α diversity of soil fungal and bacterial communities under different incidence of bacterial wilt

微生物	病级	覆盖度 (%)	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	Ace 指数
真菌	0	99	4.44a	0.87a	641.04b	641.23b
	1	99	4.56a	0.88a	798.71a	795.97a
	5	99	4.26a	0.88a	582.64b	591.62b
	7	99	4.26a	0.86a	664.97b	655.80b
细菌	0	99	8.05a	0.97a	3 208.20a	3 419.59a
	1	98	8.26a	0.98a	3 208.35a	3 445.81a
	5	99	6.93a	0.93a	2 883.31a	3 086.05a
	7	99	7.27a	0.96a	2 897.16a	3 087.01a

表中数据为平均值,对于同类微生物而言,同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。



A:不同发病程度对真菌群落 β 多样性的影响;B:不同发病程度对细菌群落 β 多样性的影响。D0:全株无病;D1:青枯病 1 级;D5:青枯病 5 级;D7:青枯病 7 级;PCo1:第一主成分;PCo2:第二主成分。

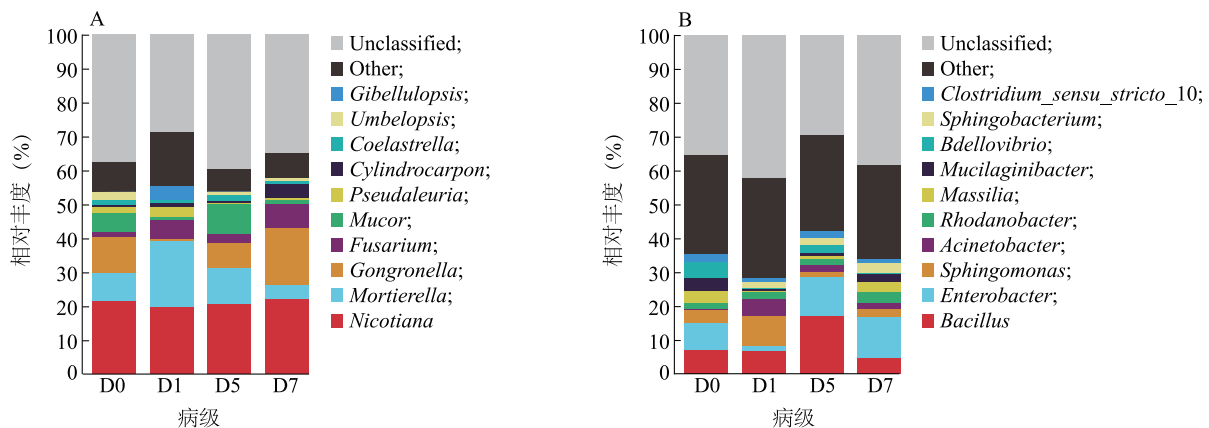
图 2 不同发病程度对根际土壤微生物 β 多样性的影响
Fig.2 Effects of different disease degrees on soil microbial β diversity

2.3.3 不同发病程度青枯病烟株根际土壤微生物属水平的差异 发病程度对根际土壤微生物群落相对丰度有一定影响(图 3)。随着烟株发病程度的增加,真菌群落中被孢霉菌 (*Mortierella*)、球托霉属 (*Gongronella*) 菌的相对丰度呈此消彼长的态势,与正常土壤相比,发病烟株根际土壤中镰刀菌属 (*Fu-*

sarium) 菌、柱孢霉菌属 (*Cylindrocarpon*) 菌的相对丰度提高,毛霉属 (*Mucor*) 菌相对丰度有降低趋势。随着烟株发病程度的加重,肠杆菌属 (*Enterobacter*) 菌在青枯病 5 级、7 级烟株根际土壤中的相对丰度高于正常土壤,鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 菌相对丰度在青枯病 1 级烟株根际土壤中较高,不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 菌只出现在发病烟株根际土壤中,产黄杆菌属 (*Rhodanobacter*) 菌相对丰度随着

烟株发病程度加重而逐渐增加。

对相对丰度排名前 7 的细菌、真菌属进行差异性分析 (Duncan's 新复极差法), 详见表 3。真菌群落中被孢霉菌 (*Mortierella*)、球托霉属 (*Gongronella*) 菌、毛霉属 (*Mucor*) 菌, 细菌群落中鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 菌相对丰度的变化达到显著水平。结合指示物种分析, 推测出与青枯病发病相关的差异物种, 结果见图 4。



A: 属水平的真菌群落相对丰度; B: 属水平的细菌群落相对丰度。D0: 全株无病; D1: 青枯病 1 级; D5: 青枯病 5 级; D7: 青枯病 7 级。图 A 中, Unclassified: 未经分类的; Other: 其他; Gibellulopsis (未中文命名); Umbelopsis: 伞状霉属; Coelastrella: 星空藻属; Cylindrocarpon: 柱孢霉菌属; Pseudaleuria (未中文命名); Mucor: 毛霉属; Fusarium: 镰刀菌属; Gongronella: 球托霉属; Mortierella: 被孢霉属; Nicotiana: 烟草属。图 B 中, Unclassified: 未经分类的; Other: 其他; Clostridium_sensu_stricto_10 (未中文命名); Sphingobacterium: 鞘氨醇杆菌属; Bdellovibrio: 蛭弧菌属; Mucilaginibacter: 黏液杆菌属; Massilia: 马赛菌属; Rhodanobacter: 产黄杆菌属; Acinetobacter: 不动杆菌属; Sphingomonas: 鞘氨醇单胞菌属; Enterobacter: 肠杆菌属; Bacillus: 芽孢杆菌属。

图 3 烟草青枯病不同发病程度下根际土壤微生物群落组成

Fig.3 Composition of rhizosphere soil microbial communities at the genus level under different incidence of bacterial wilt

表 3 不同烟草发病程度对烟株根际土壤微生物相对丰度的影响

Table 3 Effects of different incidence degrees on the relative abundance of microorganisms in rhizosphere soil of tobacco plants

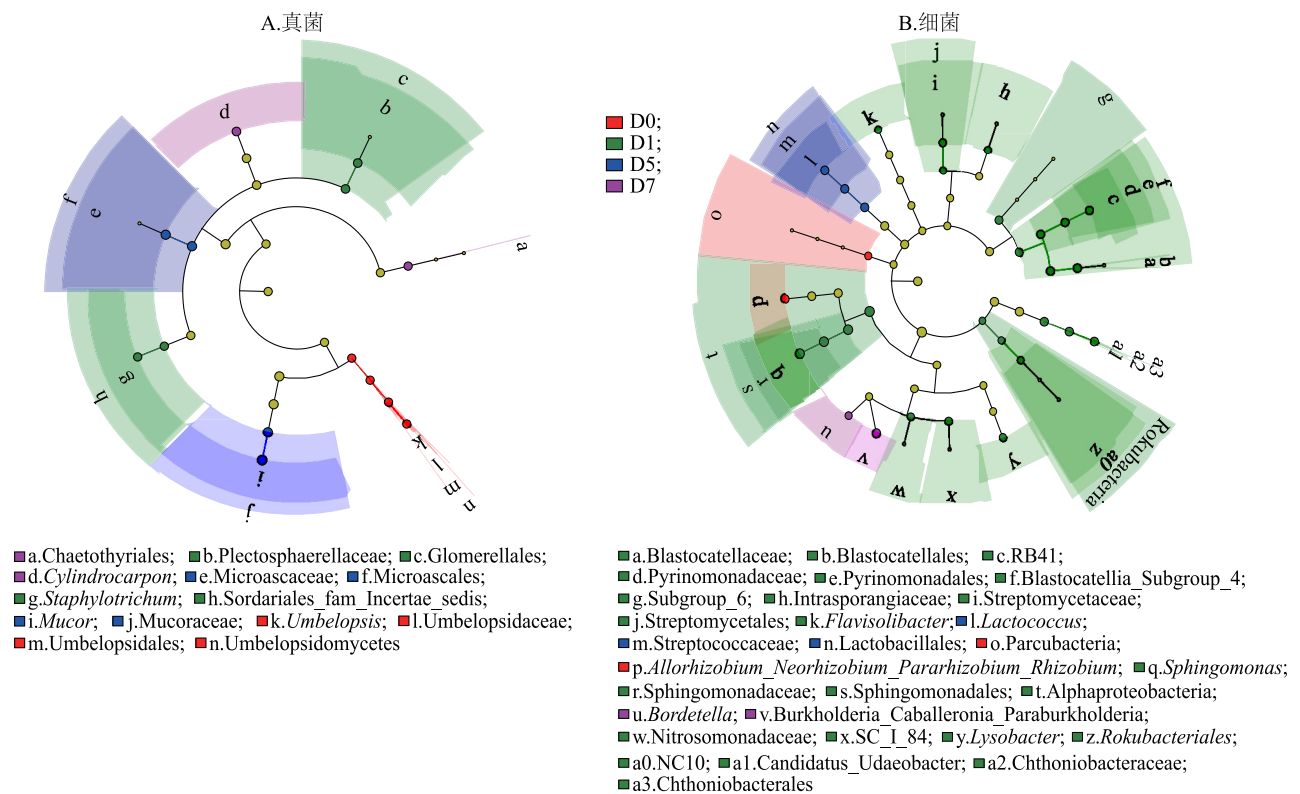
类别	拉丁名	相对丰度			
		D0	D1	D5	D7
真菌	Nicotiana (烟草属)	19.03±8.82a	17.61±7.73a	18.75±1.72a	19.92±13.70a
	Mortierella (被孢霉属)	7.71±5.25ab	16.08±10.63a	3.76±4.26ab	1.50±1.02b
	Gongronella (球托霉属)	10.68±7.90ab	0.49±0.28b	7.16±2.94ab	16.97±13.45a
	Fusarium (镰刀菌属)	1.35±0.29a	4.54±3.16a	2.43±1.45a	5.55±4.94a
	Mucor (毛霉属)	4.30±3.13a	0.48±0.34b	1.99±0.72ab	0.93±0.79b
	Pseudaleuria	1.95±2.51a	3.11±2.86a	0.34±0.27a	0.58±0.60a
	Cylindrocarpon (柱孢霉菌属)	0.44±0.23a	0.72±0.22a	0.32±0.13a	3.82±4.62a
细菌	Bacillus (芽孢杆菌属)	6.00±8.62a	6.34±6.69a	15.33±11.77a	4.00±5.41a
	Enterobacter (肠杆菌属)	8.05±6.89a	1.36±1.90a	11.37±9.57a	12.00±10.29a
	Sphingomonas (鞘氨醇单胞菌属)	2.00±0.27b	6.11±2.23a	1.18±0.31b	1.64±0.80b
	Acinetobacter (不动杆菌属)	1.30±0.86a	0.72±0.58a	0.71±0.95a	2.93±2.78a
	Rhodanobacter (产黄杆菌属)	0.02±0.01a	0.70±1.19a	1.37±1.26a	1.23±2.09a
	Massilia (马赛菌属)	1.81±1.52a	0.15±0.02a	0.23±0.30a	0.95±0.86a
	Mucilaginibacter (黏液杆菌属)	0.80±0.77a	0.10±0.09a	0.13±0.13a	1.48±1.29a

D0: 全株无病; D1: 青枯病 1 级; D2: 青枯病 5 级; D7: 青枯病 7 级。同行数据后标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3.4 不同发病程度烟株根际土壤中差异物种

为了获得不同发病程度烟株根际土壤细菌、真菌群落的主要差异物种,用 LEFse 软件进行 lefse 分析 (LDA effect size),对 OTU 数据进行统计意义和生物差异分析。如图 4 所示,在属水平上,对于不同青枯病发病程度烟株根际土壤的真菌而言,伞状霉属 (*Umbelopsis*) 的 LDA 值较大,为正常土壤中的差异物种,青枯病 1 级烟株根际土壤中的圆孢霉属

(*Staphylotrichum*) 为差异物种,青枯病 5 级烟株根际土壤中的毛霉属 (*Mucor*) 为优势种群,青枯病 7 级烟株根际土壤中的柱孢霉菌属 (*Cylindrocarpum*) 为优势种群。图 3A 结果表明,发病烟株根际土壤中毛霉属 (*Mucor*) 菌的相对丰度高于正常土壤,说明毛霉属 (*Mucor*) 可能是不同青枯病发病程度烟株根际土壤真菌群落在属水平产生差异的主要物种。



D0: 全株无病; D1: 青枯病 1 级; D5: 青枯病 5 级; D7: 青枯病 7 级。图 A 中, Chaetothyriales: 刺盾负目; Plectosphaerellaceae: 小不整球壳科; Glomerellales: 小丛壳目; *Cylindrocarpum*: 柱孢霉菌属; Microascaceae: 小囊菌科; Microascales: 小子囊菌目; *Staphylotrichum*: 圆孢霉属; Sordariales_fam_Incertae_sedis: 未中文命名; *Mucor*: 毛霉属; Mucoraceae: 毛霉科; *Umbelopsis*: 伞状霉属; Umbelopsidaceae: 伞枝孢囊霉科; Umbelopsidales: 伞形霉目; Umbelopsidomycetes: 伞形霉纲。图 B 中, Blastocatellaceae: 酸杆菌科; Blastocatellales: 酸杆菌目; RB41: 未中文命名; Pyrinomonadaceae: 未中文命名; Pyrinomonadales: 未中文命名; Blastocatellia_Subgroup_4: 未中文命名; Subgroup_6: 未中文命名; Intrasporengiaceae: 间孢囊菌科; Streptomycetaceae: 链霉菌科; Streptomycetales: 链霉菌目; *Flavisolibacter*: 未中文命名; *Lactococcus*: 乳球菌属; Streptococcaceae: 链球菌科; Lactobacillales: 乳杆菌目; Parcubacteria: 未中文命名; *Allorhizobium_Neorhizobium_Pararhizobium_Rhizobium*: 未中文命名; *Sphingomonas*: 鞘氨醇单胞菌属; Sphingomonadaceae: 鞘氨醇单胞菌科; Sphingomonadales: 鞘氨醇单胞菌目; Alphaproteobacteria: α -变形菌纲; *Bordetella*: 波氏杆菌属; *Burkholderia_Caballeronia_Paraburkholderia*: 未中文命名; Nitrosomonadaceae: 亚硝化单胞菌科; SC_I_84: 未中文命名; *Lysobacter*: 溶杆菌属; *Rokubacteriales*: 罗库菌属; NC10: 未中文命名; *Candidatus_Udaeobacter*: 未中文命名; Chthoniobacteraceae: 未中文命名; Chthoniobacterales: 未中文命名。

图 4 不同发病程度烟株根际土壤中差异物种的分析结果

Fig.4 Analysis results of different species in rhizosphere soil of tobacco plants with different disease degrees

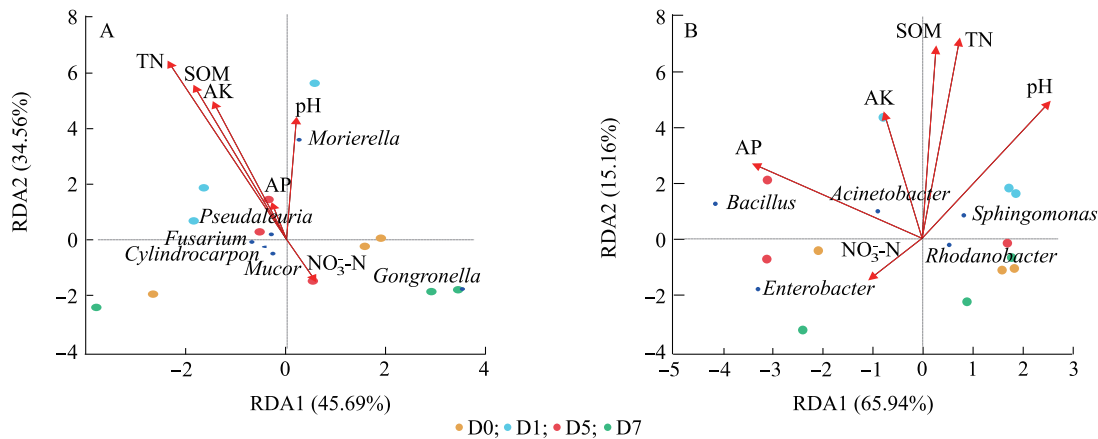
细菌中,与发病烟株根际土壤相比,*Allorhizobium_Neorhizobium_pararh* 属的 LDA 值高,为正常土壤

中的差异物种,且随发病程度的加重,溶杆菌属 (*Lysobacter*)、RB41、*Flavisolibacter* 和鞘氨醇单胞菌属

(*Sphingomonas*) (来自青枯病 1 级烟株根际土壤), 乳球菌属 (*Lactococcus*) (来自青枯病 5 级烟株根际土壤), 波氏杆菌属 (*Bordetella*) (来自青枯病 7 级烟株根际土壤) 逐渐成为特异种群。由图 3B 可以看出, 肠杆菌属 (*Enterobacter*) 菌在青枯病 5 级、7 级烟株根际土壤中的相对丰度高于正常土壤; 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 菌在青枯病 1 级烟株根际土壤中的相对丰度较高, 而后随着发病程度的加重逐渐下降, 表明鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 可能是青枯病不同发病程度烟株根际土壤细菌群落在属水平产生差异的主要物种。

2.3.5 微生物群落组成与土壤环境因子间的相关性 选择差异较大的 6 个理化指标 (pH 值、SOM 含量、TN 含量、 NO_3^- -N 含量、AP 含量、AK 含量), 结合

OTU 数据矩阵进行冗余分析 (RDA)。由图 5A 可以看出, 2 个排序轴共解释了 80.25% 的真菌群落变化, 其中毛霉属 (*Mucor*) 在 TN 含量、SOM 含量、AK 含量、AP 含量和 pH 值箭头上的投影均在反向延长线上, 呈负相关, 而在 NO_3^- -N 含量箭头上的投影在正向延长线上, 呈正相关; 柱孢霉菌属 (*Cylindrocarpus*) 与 NO_3^- -N 含量呈负相关, 与其余理化因子呈正相关。由图 5B 可以看出, 2 个排序轴共解释了 81.1% 的细菌群落变化, 其中, 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 与 pH 值、TN 含量、SOM 含量、AK 含量呈正相关, 与 AP 含量、 NO_3^- -N 含量呈负相关。从箭头长度可以看出, TN 含量、SOM 含量对微生物群落结构的影响较大。



A: 属水平真菌群落组成与土壤因子的冗余分析; B: 属水平细菌群落组成与土壤因子的冗余分析。RDA1: 排序轴 1; RDA2: 排序轴 2; D0: 全株无病; D1: 青枯病 1 级; D5: 青枯病 5 级; D7: 青枯病 7 级; SOM: 有机质; AK: 速效钾; TN: 总氮; AP: 速效磷; NO_3^- -N: 硝态氮; *Mortierella*: 被孢霉属; *Gongronella*: 球托霉属; *Fusarium*: 镰刀菌属; *Mucor*: 毛霉属; *Cylindrocarpus*: 柱孢霉菌属; *Bacillus*: 芽孢杆菌属; *Acinetobacter*: 不动杆菌属; *Sphingomonas*: 鞘氨醇单胞菌属; *Rhodanobacter*: 产黄杆菌属; *Enterobacter*: 肠杆菌属。

图 5 微生物群落组成与土壤因子的冗余分析结果

Fig.5 Redundancy analysis of microbial community composition and soil factors

3 讨论

烟草青枯病的发生跟土壤养分供应水平、酸碱状况、酶活性和微生物等的相关性较大^[19-20]。本研究结果表明, 在烟株发生青枯病的根际土壤中, 随着发病程度的加重, 土壤 pH 值、有机质含量、总氮含量降低, 硝态氮含量升高, 原因可能是 pH 值的下降可促进土壤青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 相对丰度的提高^[21], 从而导致病害加重, 而部分养分可通过增强烟株的抗逆性从而减少病害的发

生^[22]。何万泽^[23]研究发现, 加入有机肥可以提高植株抗病性, 当有机氮施用量占施氮量的 20% ~ 30% 时, 烟草的抗病性最高。赵芳等^[24]研究发现, 适量的氮素水平可以提高烟株的抗性, 进而使其抵御病害发生, 这与本研究结果类似, 发病土壤的有机质、总氮含量高于健康土壤, 且随发病程度增加呈下降趋势, RDA 结果还显示, 有机质、氮是影响根际土壤微生物群落结构的关键因子。不同形态的氮素可以影响作物生长发育和根系形态结构, 从而影响作物的抗病性^[25], 而硝态氮可以减少香蕉枯萎病^[26]

和大白菜斑点病的发生^[27]。本研究结果显示,随着青枯病的发生,土壤中硝态氮含量逐步升高,但是RDA结果显示,硝态氮含量对随根际环境变化较大的微生物影响不大。本试验结果表明,随着青枯病发病程度的加重,蔗糖酶、过氧化氢酶活性先增后减,这与一些研究者如史普西等^[28-30]对不同作物的研究结果类似,表明这2种酶对土传病害的相应规律具有普遍性。在烟株发病初期,酶活性出现小幅上升的原因可能是烟株为了抵抗逆境,通过改变根系分泌物等方式促使酶活性短暂升高。因此,土壤养分含量、酶活性与青枯病的发生密切相关。

土壤微生物在作物根际土壤微生态环境中发挥着重要作用,是影响植株发病的重要因素^[31-32]。本研究发现,在发病土壤中,真菌群落镰刀菌属(*Fusarium*)、柱孢霉菌属(*Cylindrocarpon*)的相对丰度高于正常土壤,且随发病程度的加重,其相对丰度呈增加趋势,毛霉属(*Mucor*)、被孢霉菌(*Mortierella*)、球托霉属(*Gongronella*)相对丰度的变化达到显著差异,说明以上真菌可能与烟草青枯病发生有关。目前已有研究发现,镰刀菌属(*Fusarium*)、柱孢霉菌属(*Cylindrocarpon*)是潜在的致病性真菌群落^[31-32],镰刀菌属(*Fusarium*)真菌是一类重要的寄生性植物病原真菌,可侵染大多数植物并引起毁灭性病害^[33],柱孢霉菌属(*Cylindrocarpon*)是一类能引发多种植物(包括人参、三七等)根腐病的常见土壤真菌^[34-35],并且在发病土壤中检测出的柱孢霉菌属(*Cylindrocarpon*)为优势菌属,与关键土壤因子pH值、全氮含量、有机质含量等呈负相关。因此推测,柱孢霉菌属菌丰度的增加可能是造成烟株发病的原因之一,而毛霉属(*Mucor*)是土壤中常见的有益真菌类群^[36],在本研究中属于发病土壤中的优势菌群,可能是致病菌、寄主及环境的差异,导致其发挥不同作用。球托霉属(*Gongronella*)、被孢菌属(*Mortierella*)菌为有益菌^[37-38],球托霉属(*Gongronella*)、被孢菌属(*Mortierella*)虽然不是特异物种,但是随着青枯病的发生,球托霉属(*Gongronella*)、被孢菌属(*Mortierella*)菌的相对丰度变化差异达到显著水平,这或许与青枯病发生有关。在细菌群落中,肠杆菌属(*Enterobacter*)在青枯病5级、7级烟株根际土壤中的相对丰度高于正常土壤,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)在青枯病1级烟株根际土壤中的相对丰度较高,而后随着发病程度的增加逐渐下降,鞘

氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)菌是土壤中的有益微生物,它的减少可能导致致病微生物增加^[39]。特异性物种分析结果表明,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为特异物种,且与pH值、全氮含量、有机质含量、速效钾含量呈正相关,与速效磷含量、硝态氮含量呈负相关。因此推测,土壤中鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)相对丰度的降低或许是青枯病发生的关键因素,具体影响机制还有待进一步探究。

4 结 论

青枯病的发生降低了细菌、真菌的多样性,微生物群落中的柱孢霉菌属(*Cylindrocarpon*)的相对丰度增加,毛霉属(*Mucor*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的相对丰度降低是影响烟草青枯病严重发生的关键菌属。提高土壤全氮含量、有机质含量能有效降低烟草青枯病的发病程度。

参考文献:

- [1] 吴永铭,钟小丽,谢凤标. 土壤调理剂对植烟土壤理化性状及烤烟产质量的影响[J]. 现代农业科技, 2021(20):6-9.
- [2] 章文水,张 瀛,王雪仁,等. 不同土壤改良措施对植烟土壤理化性状及烟草青枯病的影响[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(2):16-22.
- [3] 王 焱,韩松庭,杨 亮,等. 生物有机肥对烟草青枯病防控的研究进展[J]. 植物医生, 2020, 33(6):18-23.
- [4] 刘 勇,秦西云,李文正,等. 抗青枯病烟草种质资源在云南省的评价[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1):10-16.
- [5] 单晓鹏. 烟草青枯病的防治研究进展[J]. 现代农业科技, 2021(11):111-113.
- [6] 叶建如,顾 钢,张 瀛. 几种药剂防治烟草青枯病的药效评价[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(1):72-76.
- [7] 刘艳霞,李 想,曹 毅,等. 抑制烟草青枯病型生物有机肥的田间防效研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(5):1203-1211.
- [8] 张永春,黄 镇,关国经,等. 不同农业生态调控措施对烟草青枯病的影响[J]. 中国烟草科学, 2007(4):49-52.
- [9] 方树民,唐莉娜,陈顺辉,等. 作物轮作对土壤中烟草青枯菌数量及发病的影响[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2):377-382.
- [10] 孙 思,王 军. 青枯病发病率与土壤条件关系的研究进展[J]. 江西植保, 2005(1):17-20.
- [11] 倪纪恒. 不同土壤类型与调控措施对烟草根系生长与分布的影响[D]. 郑州:河南农业大学, 2002.
- [12] 匡传富,何志明,汤若云,等. 烟草青枯病土壤微生物数量及生理群的测定[J]. 中国烟草科学, 2003(1):43-45.
- [13] 章文水,张 瀛,王雪仁,等. 不同土壤改良措施对植烟土壤理

- 化性状及烟草青枯病的影响[J].中国烟草科学,2019,40(2):16-22.
- [14] 樊俊,谭军,王瑞,等.烟草青枯病发病程度的影响因素分析[J].烟草科技,2021,54(10):20-28.
- [15] 吴晓宗.烟草青枯病发病对植烟根际土壤微生态的影响[D].郑州:郑州大学,2020.
- [16] 黎妍妍,王林,彭五星,等.烟草青枯病不同发病阶段根际土壤微生物群落变化趋势分析[J].中国烟草科学,2020,41(5):73-78.
- [17] 高游慧,郑泽慧,张越,等.根际微生态防治作物土传真菌病害的机制研究进展[J].中国农业大学学报,2021,26(6):100-113.
- [18] 国家烟草专卖局.烟草病虫害分级及调查方法:GB/T 23222-2008[S].北京:中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会,2008.
- [19] 番华彩,唐嘉义,秦小萍.烟草青枯病防治研究进展[J].云南大学学报(自然科学版),2008,30(增刊1):31-35.
- [20] 李红丽,李清飞,郭夏丽,等.调节土壤微生态防治烟草青枯病[J].河南农业科学,2006(2):57-60.
- [21] 汪汉成,余婧,蔡刘体,等.温度、湿度、接菌量及pH对烟草青枯病菌致病力的影响[J].中国烟草科学,2017,38(5):8-12.
- [22] BUDAKOV D, NAGL N, STOJŠIN V, et al. Sensitivity of *Cercospora beticola* isolates from Serbia to carbendazim and flutriafol[J]. Crop Protection, 2014, 66: 120-126.
- [23] 何万泽.烟草不同氮源水平对赤星病的抗性研究[J].烟草科技,2001(3):45-46.
- [24] 赵芳,赵正雄,徐发华,等.施氮量对烟株接种黑胫病前、后体内生理物质及黑胫病发生的影响[J].植物营养与肥料学报,2011,17(3):737-743.
- [25] 谭军,周冀衡,李强,等.氮素形态对烟草黑胫病发生的影响[J].中国烟草科学,2017,38(4):80-85.
- [26] 董鲜,郑青松,王敏,等.铵态氮和硝态氮对香蕉枯萎病发生的比较研究[J].植物病理学报,2015,45(1):73-79.
- [27] 郭莹,杨晓云,司朝光,等.不同形态氮素营养对大白菜芝麻状斑点病发生的影响[J].园艺学报,2011,38(8):1489-1497.
- [28] 史普西,杨成翠,贾孟,等.不同黑胫病发病程度下植烟根际土壤酶活性及细菌群落结构差异比较[J].中国土壤与肥料,2020(1):179-187.
- [29] 寻路路,赵宏光,梁宗锁,等.三七根腐病病株和健株根域土壤微生态研究[J].西北农业学报,2013,22(11):146-151.
- [30] 廖梓良,孙世中,刘建香,等.设施栽培香石竹根际土壤酶活与土传病害相关性研究[J].云南师范大学学报(自然科学版),2009,29(3):59-63.
- [31] 宋帅,赵艳艳,刘亦哈,等.轮作大蒜对番茄植株根际土壤微生态的影响[J].北方园艺,2022(23):98-105.
- [32] LI Y L, DAI S Y, WANG B Y, et al. Autotoxic ginsenoside disrupts soil fungal microbiomes by stimulating potentially pathogenic microbes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(9):e00130-20.
- [33] 高芬,岳换弟,秦雪梅,等.植物致病镰刀菌细胞壁降解酶的研究进展[J].江苏农业学报,2018,34(4):955-960.
- [34] 张天宇,李恭民,陈伟群,等.西洋参锈腐病病原研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),1991(1):43-48.
- [35] HILDEBRAND A A. Root rot of ginseng in Ontario caused by member of the genus *Rumularia* [J]. Canadian Journal of Research, 2011, 12(1):82-114.
- [36] 刘雨艳,保丽美,魏云林,等.连作三七根际土壤自毒物质与微生物互作研究进展[J].中药材,2022,45(1):242-247.
- [37] LEE S M, KONG H G, SONG G C, et al. Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease[J]. The ISME Journal, 2021, 15(1):330-347.
- [38] 黄芳芳.农药对三七根际土壤被孢霉的影响及其田间定殖能力[D].昆明:云南大学,2017.
- [39] 黎妍妍,王林,彭五星,等.烟草青枯病不同发病阶段根际土壤微生物群落变化趋势分析[J].中国烟草科学,2020,41(5):73-78.

(责任编辑:徐艳)