

王兴松, 李恩星, 杨诗瀚, 等. 根结线虫病对烟草植株根际土壤微生物群落及其功能的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(6): 993-1003.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.06.005

# 根结线虫病对烟草植株根际土壤微生物群落及其功能的影响

王兴松<sup>1</sup>, 李恩星<sup>1</sup>, 杨诗瀚<sup>2</sup>, 杨媛<sup>2</sup>, 陈江政<sup>2</sup>, 李晗梅<sup>2</sup>, 王戈<sup>1</sup>, 王娜<sup>1</sup>,  
白羽祥<sup>1</sup>, 周鹏<sup>1</sup>, 杜宇<sup>1</sup>, 李杰<sup>2</sup>

(1. 云南农业大学烟草学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省烟草公司昆明市公司, 云南 昆明 650051)

**摘要:** 为明确烟草植株根际土壤微生物对烟株根结线虫病的响应特征, 采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术测定健康烟株(FH-H)、发病烟株(FH-D)根际土壤细菌 16S rDNA 和真菌内转录间隔区(ITS)序列, 测定其根际土壤理化性质和酶活性, 并借助 PICRUSt2 软件和 FUNGuild 数据库进行分析。结果表明, 与健康烟株相比, 发病烟株根际土壤 pH、硝态氮含量、碱解氮含量、过氧化氢酶活性和微生物群落  $\alpha$  多样性显著降低; 发病烟株根际土壤微生物种类和相对丰度发生改变, 细菌群落中放线菌门、厚壁菌门、芽孢杆菌属和 Unclassified\_Ktedonobacteraceae 属相对丰度均显著升高, 真菌群落中子囊菌门、担子菌门、青霉属、粗糙链孢菌属相对丰度均显著升高。发病烟株根际土壤细菌群落在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素代谢等功能丰度上显著高于健康烟株根际土壤, 功能真菌类型的相对丰度明显区别于健康烟株根际土壤, 其中腐生营养型功能真菌相对丰度显著高于健康烟株根际土壤。方差分解分析结果表明, 土壤有效磷含量对烟株根际土壤细菌相对丰度影响最大, 烟株根际土壤真菌相对丰度主要与土壤脲酶活性、土壤硝态氮含量和土壤酸碱度有显著相关性。本研究结果为根结线虫病的绿色防控和土壤保育提供了理论依据。

**关键词:** 根结线虫; 烟草; 根际土壤; 微生物群落; 微生物功能

中图分类号: S572.04 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)06-0993-11

## Effects of root-knot nematode disease on microbial community and function in rhizosphere soil of tobacco plants

WANG Xingsong<sup>1</sup>, LI Enxing<sup>1</sup>, YANG Shihan<sup>2</sup>, YANG Yuan<sup>2</sup>, CHEN Jiangzheng<sup>2</sup>, LI Hanmei<sup>2</sup>,  
WANG Ge<sup>1</sup>, WANG Na<sup>1</sup>, BAI Yuxiang<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>1</sup>, DU Yu<sup>1</sup>, LI Jie<sup>2</sup>

(1. College of Tobacco, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Tobacco Company Kunming Branch, Kunming 650051, China)

**Abstract:** In order to clarify the response characteristics of rhizosphere soil microorganisms of tobacco plants to its root-knot nematode disease, Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology was used to determine the bacterial 16S rDNA and fungal internal transcribed spacer (ITS) sequences in the rhizosphere soil of healthy tobacco plants (FH-H) and diseased tobacco plants (FH-D). The physicochemical properties and enzyme activities of the rhizosphere soil were determined, and PICRUSt2 software and FUNGuild database analysis were performed. The results showed that compared with healthy tobacco plants, the pH, nitrate nitrogen content, alkali-hydrolyzable nitrogen content, catalase activity and microbial community  $\alpha$  diversity of rhizosphere

收稿日期: 2023-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160517); 云南省烟草公司昆明市公司科技计划项目[昆烟科(2022)12号 KMYC202207]

作者简介: 王兴松(1997-), 男, 云南曲靖人, 硕士研究生, 研究方向为烟草栽培与植烟土壤保育。(E-mail) 2962435088@qq.com

通讯作者: 李杰, (E-mail) lijie1245@163.com

The results showed that compared with healthy tobacco plants, the pH, nitrate nitrogen content, alkali-hydrolyzable nitrogen content, catalase activity and microbial community  $\alpha$  diversity of rhizosphere

soil of diseased tobacco plants decreased significantly. The microbial species and relative abundance changed. The relative abundances of Actinobacteria, Firmicutes, *Bacillus* and Unclassified\_Ktedonobacteraceae in the bacterial community increased significantly, and the relative abundances of Ascomycota, Basidiomycota, *Penicillium* and *Trechispora* in the fungal community increased significantly. The abundances of carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, cofactors and vitamin metabolism of the bacterial community in the rhizosphere soil of diseased tobacco plants were significantly higher than those in the rhizosphere soil of healthy tobacco plants. The relative abundance of functional fungal types in the rhizosphere soil of diseased tobacco plants was obviously different from that of healthy tobacco plants. The relative abundance of saprophytic functional fungi in the rhizosphere soil of diseased tobacco plants was significantly higher than that of healthy tobacco plants. The results of variance decomposition analysis showed that the soil available phosphorus content had the greatest influence on the bacterial relative abundance in the rhizosphere soil of tobacco plants. The fungal relative abundance in the rhizosphere soil of tobacco plants was mainly correlated with soil urease activity, soil nitrate nitrogen content and soil pH. The results of this study provide a theoretical basis for the green prevention and control of root-knot nematode disease and soil conservation.

**Key words:** root-knot nematodes; tobacco; rhizosphere soil; microbial community; microbial function

烟草根结线虫病是一种以根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 为病原物的典型土壤病害,它在烟草生长的不同阶段感染烟株根系,严重影响了烟叶的质量<sup>[1]</sup>。根结线虫侵染烟草根系会导致其受到机械损伤,利于其他病原微生物侵入烟草,从而形成复合侵染类型的病害<sup>[2]</sup>,这会进一步影响烟叶的正常生长过程,并降低其产量和质量<sup>[3]</sup>。

烟株根际是根结线虫的主要活动空间,也是根系与土壤相互作用的重要场所<sup>[4]</sup>。根际土壤微生物的变化与根结线虫的生存及活动密切相关<sup>[5]</sup>。土壤微生物对土壤生态系统的平衡具有重要意义,其群落组成结构和多样性与植物病害的发生息息相关<sup>[6]</sup>。前人研究表明,患病植株根际土壤微生态环境会发生一定改变<sup>[7-8]</sup>,根结线虫侵染后土壤微生物的丰富度和多样性显著降低<sup>[9]</sup>,感染根结线虫病后土壤脲酶活性和碱解氮含量降低。常海娜<sup>[10]</sup>发现番茄根系感染根结线虫后,土壤 pH 值、硝态氮含量会受到显著影响,植物根际土壤微生物与环境因子共同作用,影响病害的发生与流行<sup>[11]</sup>。因此,本研究拟通过探究感病土壤与健康土壤微生物生态特征及其土壤理化性质的差异,系统解析土壤理化性质、土壤酶活性、微生物生态特征与烟草根结线虫病发生的相关性,探究植烟土壤微生态环境对根结线虫病的响应特征,为烟草根结线虫病的精准防控与植烟土壤可持续利用提供一定理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验地概况

试验地位于昆明市寻甸县凤合镇(N25°51'2.88,

E103°4'0.48),海拔2 072 m,烤烟种植年限为 10 年。

### 1.2 土壤样品采集

土壤样品采集时间为 2022 年 9 月 12 日,在试验地寻找 3 株感染烟草根结线虫病的感病烟株(发病等级范围为 5~9 级)(标记为 FH-D)和 3 株未感染烟草根结线虫病的健康烟株(标记为 FH-H),采取抖根法<sup>[12]</sup>收集根际土,先去除烟株表土杂草,缓缓拔出烟株,将附着于根系的大块颗粒土轻轻抖落,再将附着于根系的根际土收集于自封袋中,充分混匀后,一部分置于液氮中保存,带回实验室于超低温(-80 ℃)保存,用于提取土壤基因组 DNA 和对土壤微生物群落进行分析;一部分用于二龄幼虫的分离;其余土样置于室温自然风干,去除杂质并研磨过 40 目筛,用于土壤化学性质和酶活性的测定。

### 1.3 土壤二龄线虫的分离与计数

采用贝曼漏斗法<sup>[13]</sup>各称取发病和未发病土壤 100 g 进行土壤中线虫的分离和计数。

### 1.4 土壤化学性质的测定

参照《土壤农化分析》<sup>[14]</sup>进行土壤 pH 值、有机质含量、硝态氮含量、铵态氮含量、速效钾含量、碱解氮含量、有效磷含量的测定。

### 1.5 土壤酶活性的测定

参照《土壤酶学》<sup>[15]</sup>中的方法进行土壤酶活性的测定,采用高锰酸钾滴定法进行过氧化氢酶活性测定,采用苯酚钠-次氯酸钠比色法进行脲酶活性测定,采用磷酸苯二钠比色法进行酸性磷酸酶活性测定,蔗糖酶活性测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色法。

### 1.6 土壤微生物的测定与分析

采用 PowerSoil DNA 提取试剂盒提取土壤

DNA。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度及含量。将 DNA 冷冻于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  用于后续 PCR 扩增。利用引物 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3') 扩增根际土壤细菌 16S 基因, 利用引物 ITS3\_KYO2 (5'-GAT-GAAGAACGYAGYRAA-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3') 扩增根际土壤真菌内转录间隔区 (ITS) 基因。经过实时荧光定量 PCR 仪验证文库合格后, 使用 NovaSeq 6000 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 ( $< 100\text{ bp}$ ) 的低质量序列, 得到最终的有效数据。使用 Usearch 软件进行聚类, 去除聚类过程中检测到的嵌合体, 获得操作分类单元 (OTU) 的相对丰度和序列。

### 1.7 数据处理与分析

采用 Microsoft Excel 2019 和 GraphPad Prism 8.0.2 进行数据统计分析和作图; 基于 QIIME 2 平台进行  $\alpha$  多样性分析, 基于 SIMCA 软件进行  $\beta$  多样性分析; 用 OmicShare 平台 R 包进行线性判别分析 (LEfSe), 即 LEfSe 丰度差异分析; 通过计算样本间的 Bray-Curtis 距离进行 PCA (主成分分析) 计算及作图; 基于 R 语言 Random Forest 包计算物种对分组差异的贡献度, 采用 PICRUST2 软件进行细菌功能预测, 基于 FUNGuild (真菌功能类群) 数据库对真菌进行功能预测。

表 1 健康烟株与发病烟株根际土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants

处理	pH 值	铵态氮含量 (mg/kg)	硝态氮含量 (mg/kg)	碱解氮含量 (mg/kg)	有机质含量 (g/kg)	有效磷含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)
FH-H	5.82±0.32a	13.12±1.42a	117.70±9.66a	236.20±19.34a	33.97±5.36a	41.38±6.78a	641.76±149.92a
FH-D	5.01±0.26b	15.27±0.82a	61.11±8.20b	187.80±11.95b	39.56±3.74a	50.05±11.74a	623.01±67.43a

FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 健康烟株与发病烟株根际土壤酶活性测定结果

烟株感染根结线虫病后土壤过氧化氢酶活性、

表 2 健康烟株与发病烟株根际土壤酶活性

Table 2 Enzyme activities in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants

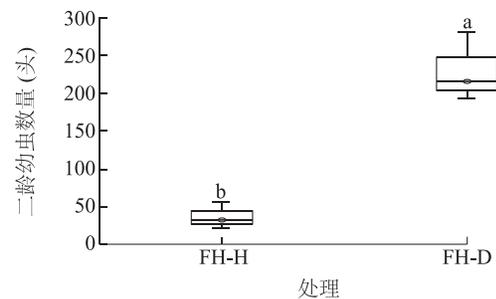
处理	过氧化氢酶活性 [ $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g})$ ]	酸性磷酸酶活性 [ $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{g})$ ]	蔗糖酶活性 [ $\text{mg}/(\text{d} \cdot \text{g})$ ]	脲酶活性 [ $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot \text{g})$ ]
FH-H	493.57±69.03a	858.74±56.84a	17.71±3.32a	642.09±79.31a
FH-D	288.95±14.97b	644.28±77.37a	16.19±3.04a	564.85±42.82a

FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 健康烟株与发病烟株根际土壤根结线虫数量

健康烟株与发病烟株土壤根结线虫二龄幼虫数量见图 1, 发病烟株根际土壤根结线虫数量显著高于健康土壤, 为健康土壤的 526.36%。



FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。不同小写字母表示健康烟株与发病烟株间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 1 健康烟株与发病烟株根际土壤根结线虫二龄幼虫数量

Fig.1 Number of second-instar root-knot nematode larvae in rhizosphere soil of healthy and diseased tobacco plants

### 2.2 健康烟株与发病烟株根际土壤理化性质测定结果

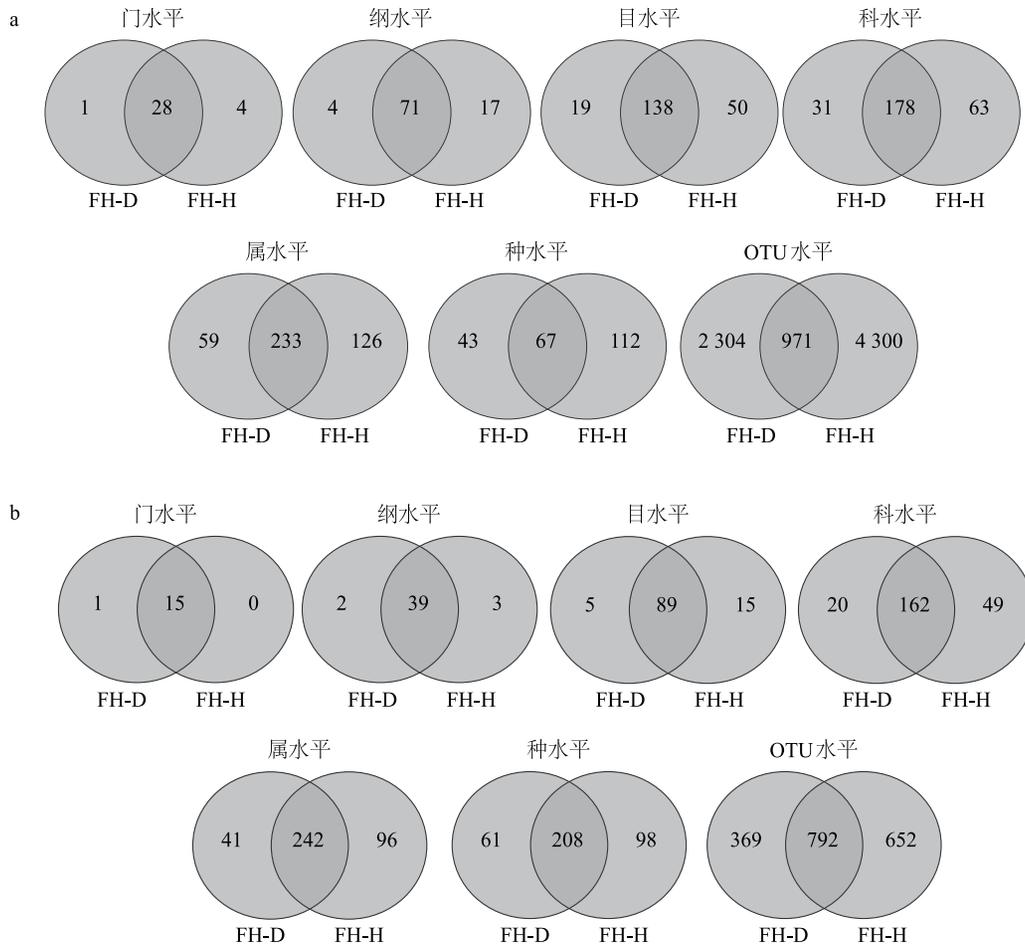
由表 1 可知, 与健康烟株土壤相比, 发病烟株土壤 pH 值、硝态氮含量、碱解氮含量显著降低, 降低幅度分别为 13.92%、48.08%、20.49%。铵态氮含量、有机质含量和有效磷含量无显著差异。

酸性磷酸酶活性、蔗糖酶活性、脲酶活性均降低 (表 2), 其中, 过氧化氢酶活性显著降低, 而土壤酸性磷酸酶活性、蔗糖酶活性、脲酶活性无显著变化。

## 2.4 健康烟株与发病烟株根际土壤 OTU 聚类结果

高通量测序结果(图 2)表明,在各分类水平上,与健康烟株土壤相比,感病烟株土壤细菌特有菌群数量均有所减少。其中,门分类水平上减少 3 个,纲分类水平上减少 13 个,目分类水平上减少 31 个,科分类水平上减少 32 个,属分类水平上减少 67 个,种分

类水平上减少 69 个,OTU 减少 1 996 个。与健康烟株土壤相比,在发病烟株土壤中,真菌特有菌群数量除在门水平增加外,其余分类水平均表现为减少,具体表现为:纲分类水平上减少 1 个,目分类水平上减少 10 个,科分类水平上减少 29 个,属分类水平上减少 55 个,种分类水平上减少 37 个,OTU 减少 283 个。



a: 细菌维恩图; b: 真菌维恩图。FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。OTU: 操作分类单元。图中数据为各分类水平的数量(个)。

图 2 健康烟株与发病烟株根际土壤细菌和真菌维恩图

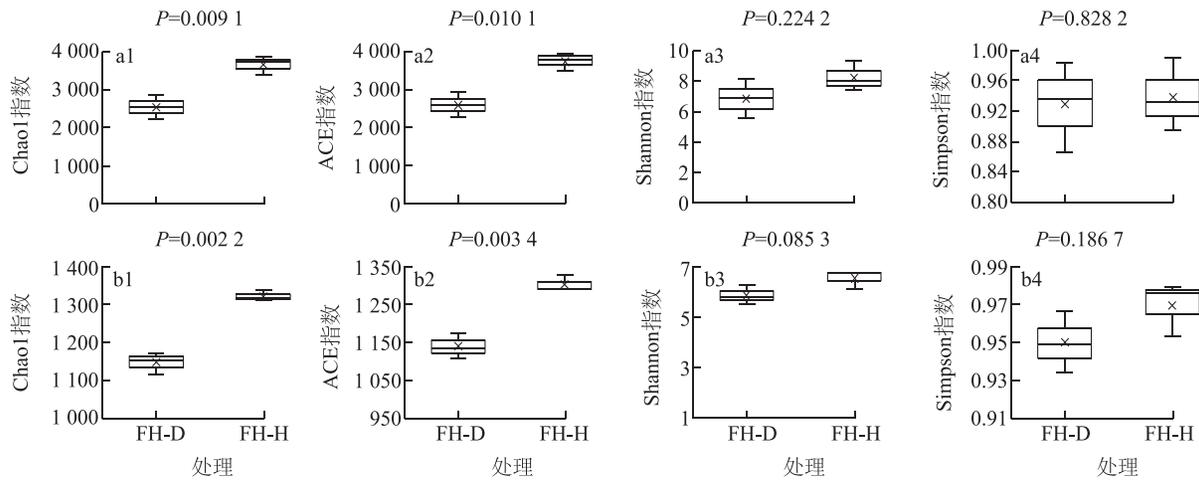
Fig.2 Venn diagram of bacteria and fungi in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants

## 2.5 健康烟株与发病烟株根际土壤微生物多样性指数

与健康烟株根际土壤相比,发病烟株根际土壤细菌多样性指数及真菌多样性指数均降低(图 3)。其中,发病烟株土壤细菌和真菌 Chao 1 指数( $P=0.009 1, P=0.002 2$ )、ACE 指数(基于丰度的覆盖估计值)( $P=0.010 1, P=0.003 4$ )显著降低,其余指数同样表现为降低趋势,但与健康烟株土壤微生物多样性指数相比未达到显著水平( $P>0.05$ )。

## 2.6 健康烟株与发病烟株根际土壤微生物 PCA 分析

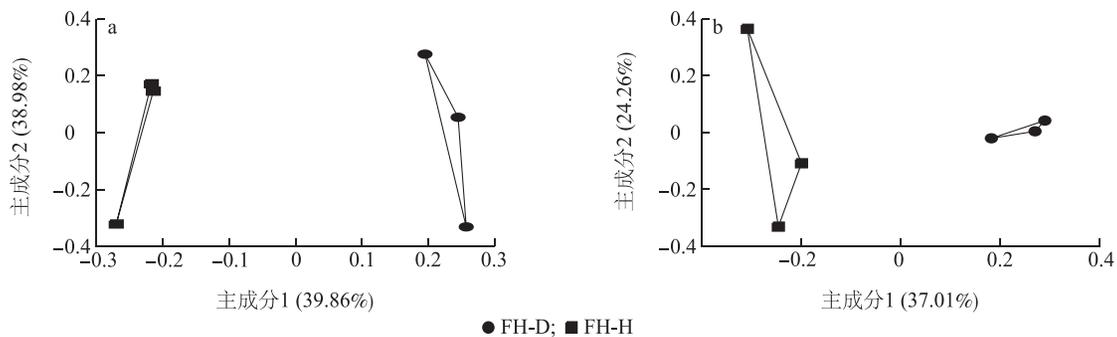
健康烟株与发病烟株根际土壤细菌和真菌群落组成显著分散。在土壤细菌群落中,第一坐标轴和第二坐标轴分别解释了 39.86% 和 38.98% 的原有变量,累积解释度为 78.84%(图 4);在土壤真菌群落中,第一坐标轴和第二坐标轴分别解释了 37.01% 和 24.26% 的原有变量,累积解释度为 61.27%(图 4)。



a1~a4:细菌 $\alpha$ 多样性图;b1~b4:真菌 $\alpha$ 多样性图。FH-D:发病烟株;FH-H:健康烟株。

图3 健康烟株与发病烟株根际土壤微生物 $\alpha$ 多样性指数

Fig.3 Alpha diversity index of microorganisms in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants



a:细菌主成分分析图,b:真菌主成分分析图。FH-D:发病烟株;FH-H:健康烟株。

图4 健康烟株与发病烟株根际土壤微生物主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of microorganisms in rhizosphere soils of healthy tobacco plants and diseased tobacco plants

## 2.7 烟草根结线虫病发病烟株根际土壤微生物群落组成分析

2.7.1 细菌群落组成分析 由图5可知,门分类水平下,发病烟株根际土壤放线菌门、酸杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门、厚壁菌门细菌群落的相对丰度分别比健康烟株根际土壤高5.49个百分点、0.48个百分点、1.62个百分点、1.90个百分点和6.90个百分点。属分类水平下,发病烟株根际土壤细菌群落的相对丰度前5的细菌属为链霉菌属(25.73%)、芽孢杆菌属(5.50%)、鞘氨醇单胞菌属(4.10%)、布氏杆菌属(2.48%)和Unclassified\_Ktedonobacteraceae(1.33%),发病烟株根际土壤的芽孢杆菌属、Unclassified\_Ktedonobacteraceae相对丰度分别为健康烟株根际土壤的6.10倍、10.66倍。

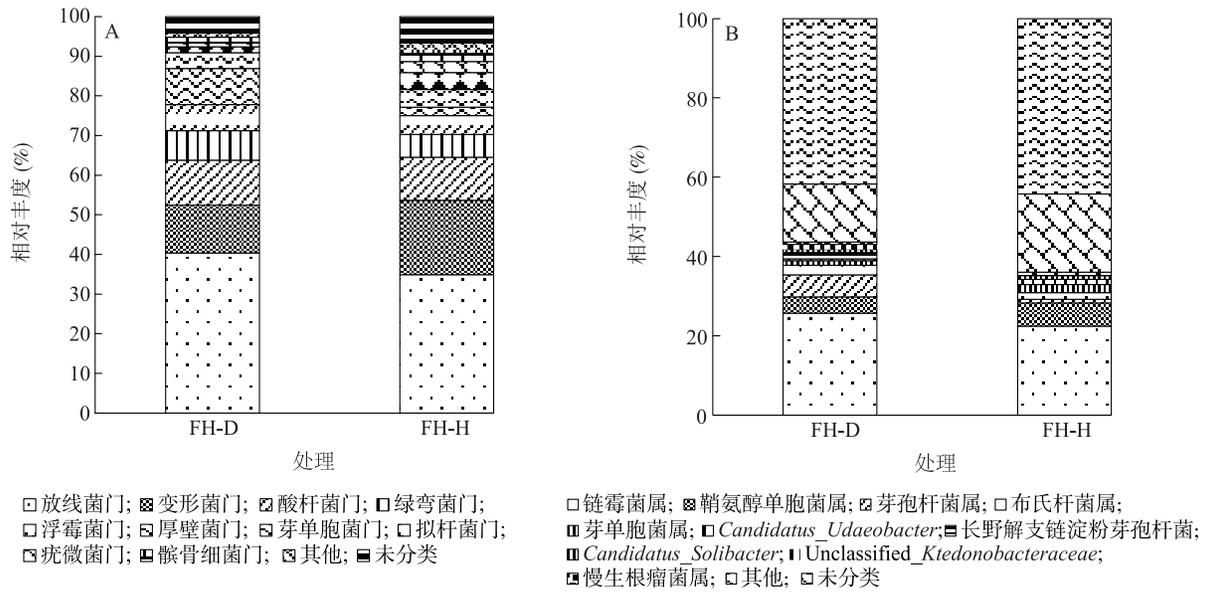
2.7.2 真菌群落组成分析 由图6可知,门分类水

平下,发病烟株根际土壤真菌群落的子囊菌门、担子菌门、毛囊菌门相对丰度分别比健康烟株根际土壤高5.17%、4.80%、4.61%。

属分类水平下,发病烟株根际土壤真菌群落相对丰度排名前5的真菌属为镰刀菌属(10.05%)、青霉属(6.22%)、粗糙孔菌属(6.18%)、Setophoma(4.93%)和Saitozyma(4.03%),发病烟株根际土壤的青霉属、粗糙孔菌属相对丰度分别为健康烟株根际土壤的14.22倍、16.34倍。

## 2.8 烟草根结线虫病发病烟株根际土壤微生物属水平LEfSe物种差异分析

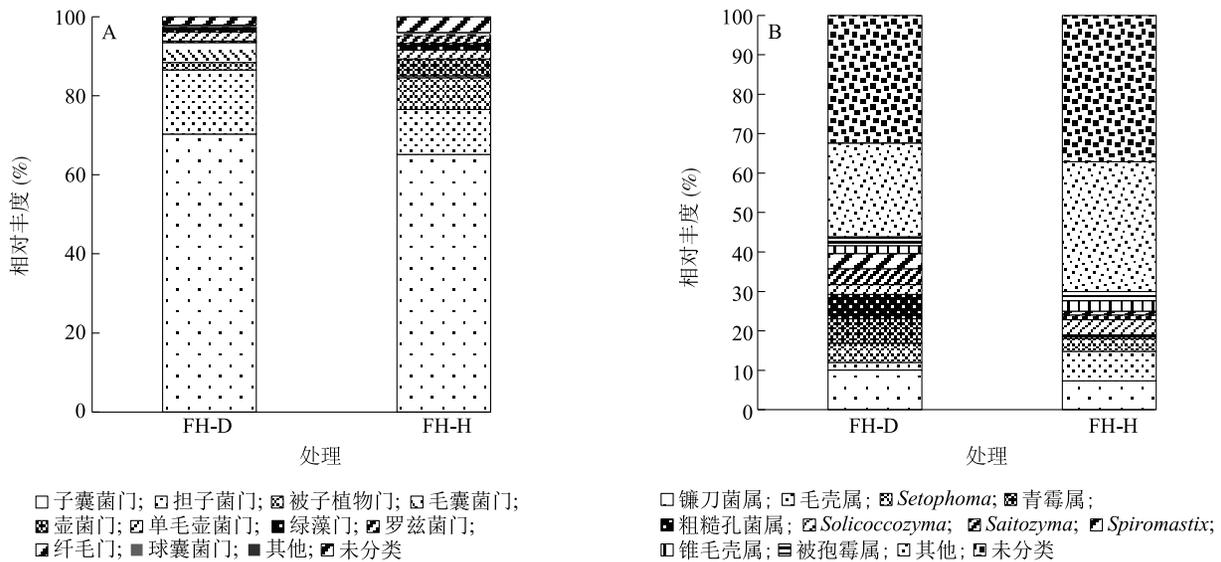
土壤细菌群落的线性判别分析( $LDA>4.00$ ,  $P<0.05$ )结果(表3)表明,纲水平的纤维杆菌纲、目水平的纤维杆菌目、科水平的纤维杆菌科与JG30\_KF\_AS9在发病烟株根际土壤富集。



A: 门水平; B: 属水平。FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。

图 5 健康烟株与发病烟株根际土壤细菌群落门水平和属水平相对丰度

Fig.5 Relative abundance of bacterial community at phylum and genus levels in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants



A: 门水平; B: 属水平。FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。

图 6 健康烟株与发病烟株根际土壤真菌群落门水平和属水平相对丰度

Fig.6 Relative abundance of fungal community at phylum and genus levels in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants

土壤真菌群落的线性判别分析 ( $LDA > 4.00, P < 0.05$ ) 结果 (表 4) 显示, 门水平的毛霉门, 纲水平的蓝藻纲, 目水平的爪甲团囊菌目、糙孢孔目、毛霉目, 科水平的 *Onygenales\_fam\_Incertae\_sedis*、线虫草科、刺孢菌科, 属水平的 *Spiromastix*、粗糙孔菌属在发病烟株根际土壤富集。

### 2.9 烟草根结线虫病发病烟株根际土壤微生物功能预测分析

2.9.1 细菌功能预测分析 为了进一步确定感染烟草根结线虫对根际土壤细菌群落功能的影响, 采用 Welch's *T* 检验功能丰度差异。通过 PICRUS2 软件注释出 16 个二级功能 (图 7), 其中, 与健康烟

株根际土壤相比,发病烟株根际土壤共有 11 个功能丰度显著提高,包括碳水化合物代谢,氨基酸代谢,辅助因子和维生素的代谢,能量代谢,其他氨基酸的代谢,核苷酸代谢,复制与修复,折叠、分类和降解,细胞运动,跨膜运输,信号转导。

表 3 健康烟株与发病烟株根际土壤细菌线性判别分析

Table 3 Linear discriminant analysis of bacteria in rhizosphere soils of healthy tobacco plants and diseased tobacco plants

处理	分类水平	物种	线性判别分值
FH-D	目	纤线杆菌目	4.45
	科	纤线杆菌科	4.11
	科	JG30_KF_AS9	4.15
	纲	纤线杆菌纲	4.45
FH-H	科	Blastocatellaceae	4.04
	纲	拟杆菌纲	4.09
	目	微球菌目	4.29
	科	微球菌科	4.18
	纲	Blastocatellia	4.24
	目	Blastocatellales	4.02
	门	拟杆菌门	4.11

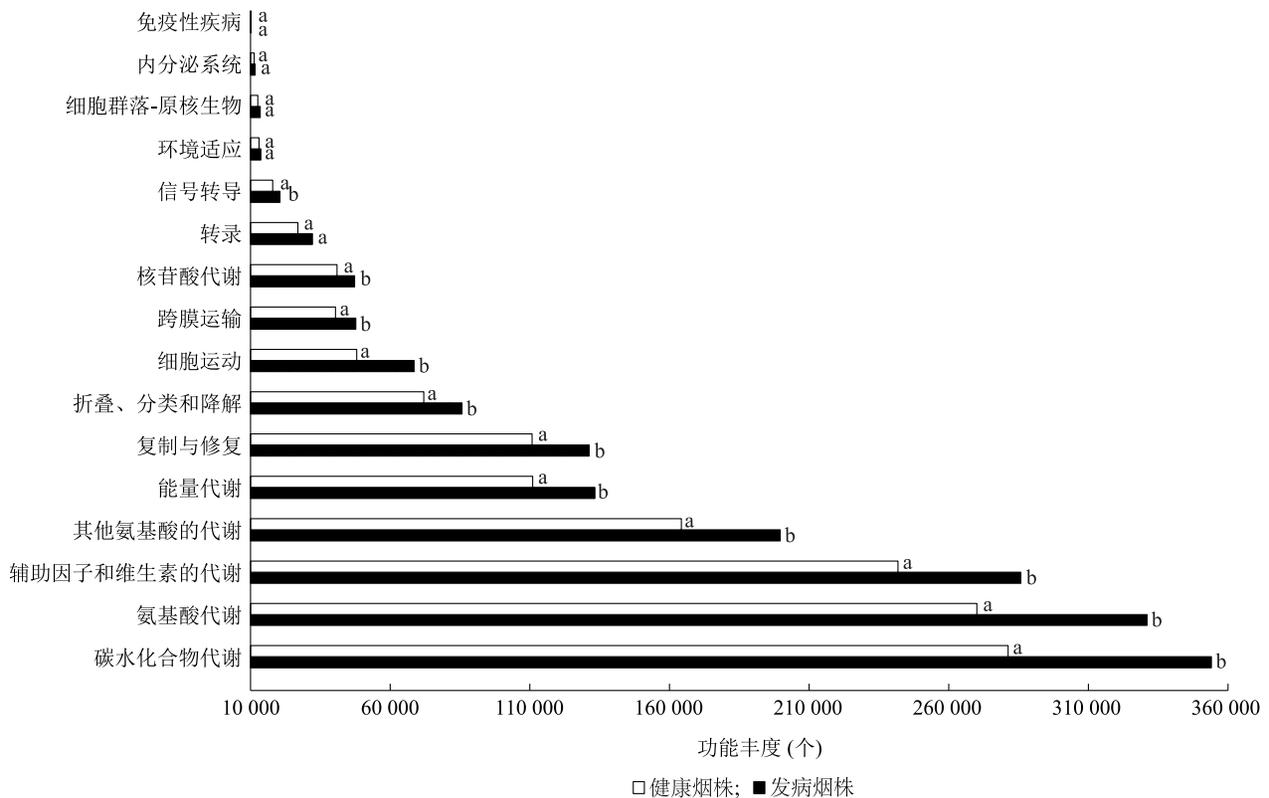
FH-D:发病烟株;FH-H:健康烟株。

表 4 健康烟株与发病烟株根际土壤真菌线性判别分析

Table 4 Linear discriminant analysis of fungi in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco roots

处理	分类水平	物种	线性判别分值
FH-D	纲	蓝藻纲	4.04
	科	Onygenales_fam_Incertae_sedis	4.20
	科	线虫草科	4.02
	科	刺孢菌科	4.45
	目	爪甲团囊菌目	4.20
	门	毛霉门	4.41
	目	糙孢孔目	4.51
	属	<i>Spiromastix</i>	4.19
	属	粗糙孔菌属	4.47
	目	毛霉目	4.06
FH-H	纲	小壶菌纲	4.21
	门	壶菌门	4.30
	目	小壶菌目	4.28
	科	小壶菌科	4.25

FH-D:发病烟株;FH-H:健康烟株。



同一功能柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

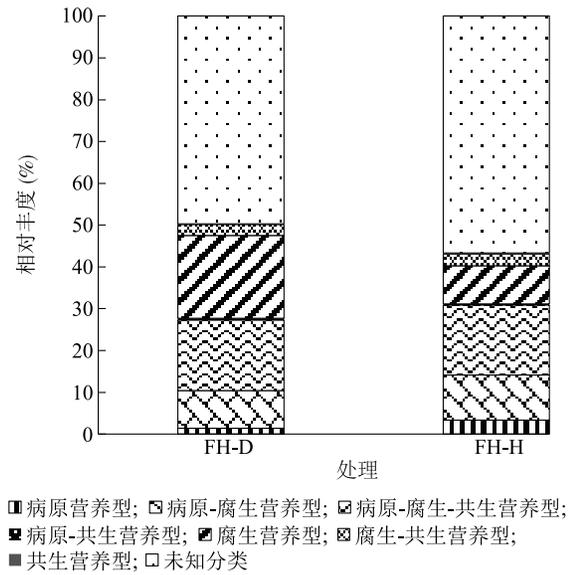
图 7 烟株根际土壤细菌群落的功能预测

Fig.7 Functional prediction of bacterial community in tobacco rhizosphere soil

2.9.2 真菌功能预测分析 采用 FUNGuild 数据库预测健康烟株与感病烟株根际土壤真菌功能。结果(图 8)表明,真菌营养型可分为病原营养型、病原-腐生营养型、病原-腐生-共生营养型、病原-共生营养型、腐生营养型、腐生-共生营养型和共生营养型 7 种,从营养类型来看,病原-腐生-共生营养型为主要营养型。发病烟株根际土壤的腐生营养型相对丰度高于健康烟株根际土壤。

2.10 微生物群落与土壤理化因子相关性分析

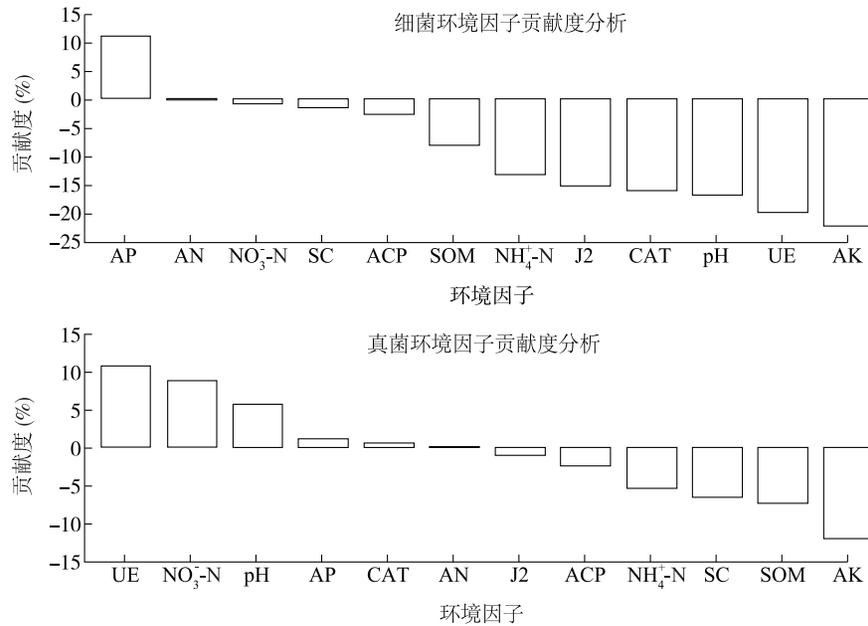
在方差分解分析(VPA)中,贡献度数值越大表示环境因子对物种分布的影响越大,数值为负表示该环境因子对物种分布无影响。土壤理化因子对根际土壤细菌门水平丰度的贡献度分析结果(图 9)表明,土壤有效磷含量对土壤细菌丰度贡献度最高;土壤环境因子对土壤真菌门水平丰度贡献度由高到低排序为土壤脲酶活性、硝态氮含量、pH 值、有效磷含量等。



FH-D: 发病烟株; FH-H: 健康烟株。

图 8 健康烟株与发病烟株根际土壤真菌群落的功能预测

Fig.8 Function prediction of fungal community in rhizosphere soils of healthy and diseased tobacco plants



UE 为土壤脲酶活性; CAT 为土壤过氧化氢酶活性; SC 为土壤蔗糖酶活性; ACP 为土壤酸性磷酸酶活性; NO<sub>3</sub>-N 为土壤硝态氮含量; NH<sub>4</sub>-N 为铵态氮含量; AP 为土壤有效磷含量; AN 为碱解氮含量; SOM 为土壤有机质含量; AK 为土壤速效钾含量; J2 为土壤根结线虫二龄幼虫数量。

图 9 土壤理化因子对土壤细菌和真菌群落丰度的贡献度分析

Fig.9 Contribution of soil physical and chemical factors to abundances of soil bacterial and fungal communities

3 讨论

根际是根系与土壤相互作用的空间,是物质循环与养分转化的窗口<sup>[16]</sup>,也是根结线虫的主要活动

空间<sup>[17]</sup>。当土壤病原体入侵植株根系时,由烟株、土壤微环境组成的微生态环境将发生改变<sup>[18]</sup>,而根结线虫的侵染势必会打破土壤环境的平衡<sup>[19]</sup>。本研究发现,发病烟株根际土壤 pH 显著低于健康烟

株根际土壤。究其原因,一方面,烟株根系分泌物中存在多种有机酸,土壤酸碱度能直接影响土壤中的线虫群落组成<sup>[20]</sup>,另一方面,土壤中的有机酸与土壤 pH 呈显著负相关,而水杨酸作为土壤中普遍存在的化感物质,由其合成的水杨酸甲酯有助于二龄幼虫对宿主的识别行为,促进了根结线虫感染<sup>[21]</sup>。前人研究结果表明,长期连作导致土壤理化性质变差,进而加剧烟草根结线虫病的发生<sup>[22]</sup>。本研究也发现,感病烟株根际土壤硝态氮含量、碱解氮含量均显著低于健康烟株根际土壤, Lu 等<sup>[8]</sup>的研究结果也表明,硝态氮能有效抑制线虫的发育,且抑制作用随着浓度的增加而增大。

土壤酶在土壤物质循环和能量转化中起到十分重要的作用<sup>[23-24]</sup>。本试验发现,发病烟株根际土壤过氧化氢酶活性显著低于健康烟株根际土壤,可能是烟株根系遭受侵染后,影响其抗氧化系统,使植株体内过氧化氢酶释放水平下降所致。研究结果表明,根结线虫数量的增多会导致微生物活性降低,从而使发病土壤酶活性降低<sup>[25]</sup>;另一方面根结线虫的感染会导致烟株根系受损,使烟株难以通过分泌根系分泌物来提高土壤酶活性,此消彼长之下,便使得感病土壤中土壤酶活性下降,对其他作物的研究结果也表明,感染土传病害会降低土壤酶活性<sup>[26-27]</sup>。

根际微生物是连接植株与土壤的重要介质<sup>[28]</sup>,根系是植株塑造根际微生物群落的重要器官,当植株根系被根结线虫感染后,其微生物群落也将受到影响<sup>[29-30]</sup>。在本研究中,发病烟株根际土壤细菌和真菌群落丰富度和多样性都显著低于健康烟株根际土壤。通过主成分分析发现,患病烟株根际土壤和健康烟株根际土壤细菌和真菌分布存在显著差异,表明为响应根结线虫感染,烟株根系土壤的微生物群落发生了显著改变。与健康烟株根系土壤相比,发病烟株根系土壤细菌群落的放线菌门、酸杆菌门、芽孢杆菌属具有明显优势。放线菌次生代谢产物能抑制病原微生物生长<sup>[31]</sup>,酸杆菌门的次生代谢产物也起到抗菌效果<sup>[32]</sup>。

在本研究中,发病烟株根际土壤真菌群落中子囊菌门、担子菌门的相对丰度较高,而子囊菌多为寄生菌或腐生菌,能增强土壤抵抗侵蚀的能力<sup>[33]</sup>,随着根结线虫种群密度的增大,土壤真菌种类更加丰富,子囊菌门的相对丰度有所增加<sup>[34]</sup>,担子菌作为土壤中的重要分解者,对于土壤碳循环具有重要作

用。镰刀菌属、青霉属、粗糙孔菌属在发病烟株根际土壤中占优势地位;镰刀菌属是一类植物病原菌<sup>[35]</sup>,前人研究结果也表明,镰刀菌属病原菌可能与烟草根结线虫的发生有关。青霉属、粗糙孔菌属病原菌均具有腐生菌功能,对纤维素具有明显降解作用<sup>[36]</sup>。

利用 PICRUST2 对感病烟株与健康烟株根际土壤细菌功能进行预测,细菌群落中新陈代谢(碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素的代谢、能量代谢、其他氨基酸的代谢、核苷酸代谢)丰度显著升高,新陈代谢作为细菌群落的核心功能,在促进植物土壤物质循环、促进植物生长中发挥重要作用<sup>[37]</sup>。发病烟株根际土壤新陈代谢功能的丰度显著高于健康烟株根际土壤,这可能是土壤细菌群落中有益菌拮抗线虫侵染和某些细菌通过降解植物组织帮助线虫在根系形成根结的共同结果<sup>[38]</sup>。采用 FUNGuild 预测不同地块发病烟株与健康烟株根际土壤不同功能真菌的相对丰度变化,发病烟株根际土壤腐生营养型真菌相对丰度显著高于健康烟株根际土壤,研究结果表明,一些真菌可以通过改变营养类型来适应环境变化,同时,具有竞争性腐生能力的真菌能通过植物病原体竞争营养物质和寄生空间(如植物根部)来抑制病原菌的生长<sup>[7]</sup>。

病原体作为生物多样性-生态系统功能关系的重要驱动因素,积极影响了包括有益微生物和病原体在内的关键微生物群落相对丰度;另外,微生物和环境因素也会积极响应根结线虫的侵染,减少或促进病害的发生<sup>[39]</sup>。在本研究中,烟株根际土壤细菌和真菌微生物群落对土壤指标的反应不一致,土壤细菌群落主要与土壤有效磷含量相关,而真菌群落主要与土壤脲酶活性、硝态氮含量、pH 值相关。表明土壤理化性质的改变影响着土壤微生物群落的构建,可能导致土壤微生物功能的改变,进而响应根结线虫的侵染。

## 4 结论

土壤有效磷含量对细菌群落分布的影响最明显,而土壤脲酶活性、土壤硝态氮含量以及土壤酸碱度对真菌群落的影响最为明显。与健康烟株根际土壤相比,在发病烟株根际土壤细菌群落中,放线菌门、厚壁菌门、芽孢杆菌属以及 *Unclassified\_Ktedonobacteraceae* 属的相对丰度显著提高;而在真菌群

落中,与健康烟株根际土壤相比,子囊菌门、担子菌门、毛囊菌门、青霉属以及粗糙孔菌属的相对丰度也显著提高;与健康土壤相比,发病烟株根际土壤细菌群落代谢功能有明显增强,而真菌群落的腐生营养型功能相对丰度则显著高于健康土壤。

### 参考文献:

- [1] JONES T, HAEGEMAN A, DANCHIN E G J, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(9): 946-961.
- [2] CHINHEYA C C, YOBO K S, LAING M D. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus isolates*, on soybean[J]. *Biological Control*, 2017, 109: 37-41.
- [3] 邱雪柏. 烟草根结线虫生物防治研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(7): 121-124.
- [4] 王从丽, 李春杰, 胡岩峰. 利用 Pluronic 三维胶系统研究植物寄生线虫的趋化性[J]. *土壤与作物*, 2016, 5(1): 1-13.
- [5] YI C, XIAO Z Y, MEI D Y, et al. Tobacco root microbial community composition significantly associated with root-knot nematode infections; dynamic changes in microbiota and growth stage[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 807057.
- [6] 杨珍, 戴传超, 王兴祥, 等. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展[J]. *土壤学报*, 2019, 56(1): 12-22.
- [7] 雷少楠. 根结线虫侵染对植物根际和根内生细菌群落结构、演替和功能的影响[D]. 福州: 福建师范大学, 2018: 94.
- [8] LU P, SHI H L, TAO J M, et al. Metagenomic insights into the changes in the rhizosphere microbial community caused by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tobacco[J]. *Environmental Research*, 2023, 216: 114848.
- [9] 曾青, 熊超, 尹梅, 等. 植物微生物组生态功能与群落构建过程研究进展[J]. *生物多样性*, 2023, 31(4): 186-202.
- [10] 常海娜. 连作年限和施肥措施对番茄生长及根结线虫危害的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [11] HUANG F Y, DENG X P, GAO L L, et al. Effect of marigold (*Tagetes erecta* L.) on soil microbial communities in continuously cropped tobacco fields[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 19632.
- [12] 张雅蓉, 刘彦伶, 黄兴成, 等. 不同有机肥施用模式下黄壤稻田根际和非根际土壤有机碳的矿化特征[J]. *植物营养与肥料学报*, 2023, 29(3): 449-458.
- [13] MAHFOUZ M M, ABD E, TARIQUE H A. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies[J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2018, 28(1): 1-24.
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2013: 72-75.
- [15] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [16] 江其朋, 江连强, 龚杰, 等. 影响四川凉山地区烟草根结线虫病发生的关键因子分析[J]. *中国烟草学报* 2021, 27(6): 89-98.
- [17] 王志江, 叶贤文, 詹筱国, 等. 中草药提取物对烟草根结线虫病及根际土壤理化性状的影响[J]. *湖南农业科学*, 2020(6): 66-69.
- [18] BATES S T, BERG L D, CAPORASO J G, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(5): 908-917.
- [19] SPIEGEL Y, COHN E, KAFKAFI U. The influence of ammonium and nitrate nutrition of tomato plants on parasitism by the root-knot nematode[J]. *Phytoparasitica*, 1982, 10(1): 33-40.
- [20] HUANG K, JIANG Q P, LIU L H, et al. Exploring the key microbial changes in the rhizosphere that affect the occurrence of tobacco root-knot nematodes[J]. *Amb Express*, 2020, 10: 1-11.
- [21] JIA X Q, WANG L, ZHAO H Y, et al. The origin and evolution of salicylic acid signaling and biosynthesis in plants[J]. *Molecular plant*, 2022, 16(1): 245-259.
- [22] 左梅, 谭军, 向必坤, 等. 根际土壤性状对烟田烟草根结线虫病发病等级的影响[J]. *土壤通报*, 2020, 51(4): 885-890.
- [23] 王启宇, 吕怡颖, 杨敏, 等. 烤烟根结线虫病发生与土壤酶活性的相关性研究[J]. *湖南农业科学*, 2021(8): 32-35.
- [24] 张文婕, 杨莉莉, 王金凤, 等. 三种抗生素与铜复合污染对土壤过氧化氢酶活性的影响[J]. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(1): 135-143.
- [25] ZHAO X Y, LIN C H, TAN J, et al. Changes of rhizosphere microbiome and metabolites in *Meloidogyne incognita* infested soil[J]. *Plant and Soil*, 2022, 483(1/2): 331-353.
- [26] 赵娜, 林威鹏, 蔡昆争, 等. 家畜粪便堆肥对番茄青枯病、土壤酶活性及土壤微生物功能多样性的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(19): 5327-5337.
- [27] 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.
- [28] 周远锋, 冯瑞, 汤利. 根系分泌物介导的间作防控土传病害作用机制研究进展[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2023, 38(2): 353-360.
- [29] 范雅琦, 王亚南, 霍瑞轩, 等. 轮作模式下土壤微生物与线虫群落的互作研究现状[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(25): 108-113.
- [30] 李春霞, 吴兴彪, 靳亚忠. 根系代谢物介导的植物-微生物互作的研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(9): 3318-3328.
- [31] PANG Z Q, CHEN J, WANG T H, et al. Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 621276.
- [32] KALAM S, BASU A, AHAMD I, et al. Recent understanding of soil acidobacteria and their ecological significance: a critical review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 580024.
- [33] 张铁, 于存, 戚玉娇. 喀斯特森林常见树种倒木分解对土壤真菌群落组成及分布规律的影响[J]. *生态学报*, 2022, 42(7): 2774-2783.

- [34] 张俊. 根结线虫土壤微生物多样性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.
- [35] 蔡文涌, 方香玲. 植物病原尖孢镰刀菌致病因子研究进展[J/OL]. 分子植物育种, 2023(3): 1-13 [2023-07-31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20220309.1705.010.html>.
- [36] 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.
- [37] MORENO L F, MAYER V, VOGLMAYR H, et al. Genomic analysis of ant domatia-associated melanized fungi (Chaetothyriales, Ascomycota) [J]. Mycol Progress, 2019, 18: 541-552.
- [38] 刘坤和, 薛玉琴, 竹兰萍, 等. 嘉陵江滨岸带不同土地利用类型对土壤细菌群落多样性的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(3): 1620-1629.
- [39] KING K M, WEST J S. Detection of the Phoma pathogens *Plenodomus biglobosus* subclades 'brassicae' and 'canadensis' on wasabi, and 'canadensis' in Europe [J]. European Journal of Plant Pathology, 2022, 162(3): 751-756.

(责任编辑: 陈海霞)