



番茄连作青枯病不同发病时期的非根际土壤细菌群落变化特征

侯金凤^{1,2}, 申民翀¹, 孙菲菲³, 王夏⁴, 党柯柯^{1,2}, 刘洪^{1,2}, 彭俊伟^{1,2}, 刘金平⁴,
李建刚^{1,2*}, 董元华^{1,2}

1 中国科学院南京土壤研究所, 土壤环境与污染修复重点实验室, 江苏 南京 210008

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 南京市农业技术推广站, 江苏 南京 210036

4 南京市蔬菜科学研究所, 江苏 南京 210042

侯金凤, 申民翀, 孙菲菲, 王夏, 党柯柯, 刘洪, 彭俊伟, 刘金平, 李建刚, 董元华. 番茄连作青枯病不同发病时期的非根际土壤细菌群落变化特征. 微生物学报, 2022, 62(9): 3464–3477.

Hou Jinfeng, Shen Minchong, Sun Feifei, Wang Xia, Dang Keke, Liu Hong, Peng Junwei, Liu Jinping, Li Jianguang, Dong Yuanhua. Characteristics of bacterial community in bulk soil at different stages of tomato bacterial wilt under continuous monoculture system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3464–3477.

摘要: 【目的】研究连作条件下番茄青枯病不同发病时期的非根际土壤微生物群落差异, 明确土壤微生物对青枯病发病时期的响应机制。【方法】本研究对 16S rRNA V4–V5 区进行实时荧光定量 PCR 和高通量测序, 综合分析了连续种植第 1、3、5 和 7 季的发病高峰期和发病末期的番茄非根际土壤的病原菌数量、细菌群落多样性、群落组成、标志细菌类群和群落构建机制。

【结果】发病高峰期的青枯菌数量(1.28×10^7 copies/g)要高于发病末期(1.77×10^6 copies/g)。随着连作时间的增加, 发病时期对细菌群落多样性的影响逐渐增加。第 3 季和第 5 季不同发病时期之间的细菌群落 alpha 和 beta 多样性存在显著差异。LEfSe 分析发现, 番茄青枯病发病高峰期和发病末期的非根际土壤样品有其各自不同的标志细菌类群。此外, 随连作时间的延长协助青枯菌致病的细菌逐渐累积。发病高峰期是微杆菌属(*Microbacterium*)和亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)协助青枯菌致病, 而在发病末期, 则由鞘脂菌属(*Sphingobium*)、norank_f_norank_o_SBR1031 和 norank_f_Rhodothermaceae 协助青枯菌致病。群落构建过程分析发现不同发病时期细菌群落均以

基金项目: 国家自然科学基金(41977055); 江苏省碳达峰碳中和科技创新专项资金(BE2021407)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41977055) and by the Jiangsu Province Carbon Peaking Carbon Neutrality Science and Technology Innovation Special Fund Project (BE2021407)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86881370; Fax: +86-25-86881000; E-mail: jgli@issas.ac.cn

Received: 10 January 2022; Revised: 14 February 2022; Published online: 26 May 2022

随机过程的扩散限制为主, 但细菌群落在发病高峰期比发病末期的同质化作用更强。【结论】本研究发现青枯病发病高峰期和发病末期的番茄非根际土壤的细菌群落多样性、组成和结构在第3季和第5季时存在显著差异。此外, 细菌群落会随着连作时间发生动态变化, 而这些变化可能与细菌群落构建机制相关联。研究结果加深了对连作条件下的番茄青枯病发展过程的认识, 可为防治青枯病提供参考依据。

关键词: 番茄青枯病; 连作; 发病时期; 细菌群落

Characteristics of bacterial community in bulk soil at different stages of tomato bacterial wilt under continuous monoculture system

HOU Jinfeng^{1,2}, SHEN Minchong¹, SUN Feifei³, WANG Xia⁴, DANG Keke^{1,2}, LIU Hong^{1,2}, PENG Junwei^{1,2}, LIU Jinping⁴, LI Jiangan^{1,2*}, DONG Yuanhua^{1,2}

1 CAS Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Nanjing Agricultural Technique Popularizing Station, Nanjing 210036, Jiangsu, China

4 Nanjing Institute of Vegetable and Flower Sciences, Nanjing 210042, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] The study aimed to explore the dynamic changes of bacterial community in bulk soil at different stages of tomato bacterial wilt under a continuous monoculture system and clarify the response mechanisms of bulk soil bacteria to disease stages. **[Methods]** For all the bulk soil samples in the 1st, 3rd, 5th, and 7th crops, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to measure the number of *Ralstonia solanacearum* at different disease stages, and high-throughput sequencing of 16S rRNA V4–V5 region was used to study the diversity, composition, biomarkers and assembly processes of bacterial community. **[Results]** The number of *R. solanacearum* at the peak stage of disease (1.28×10^7 copies/g) was higher than that at the final stage of disease (1.77×10^6 copies/g). In addition, the influence of disease stages on the diversity of bacterial community was enhanced with increasing continuous monoculture time. Alpha and beta diversities of bacterial community between different stages in the 3rd and 5th crops were significantly different. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis showed that samples from the final and peak stages of disease during continuous monoculture comprised distinct biomarkers. Additionally, microorganisms that assisted *R. solanacearum* in inducing diseases gradually accumulated with the increasing continuous monoculture time. *Microbacterium* and *Nitrosospora* were observed with positive effect for tomato bacterial wilt at the peak stage of disease, while they were *Sphingobium*, norank_f_norank_o_SBR1031, and norank_f_Rhodothermaceae at the final stage of disease. The analysis of community assembly process revealed that bacterial community at the two stages of disease were both dominated by stochastic processes, especially the dispersal limitation, but the bacterial community at the peak stage of disease was more homogeneous than that at the final stage of disease.

[Conclusion] The bacterial communities at the final and peak stages of tomato bacterial wilt were significantly different in diversity, composition and structure in 3rd and 5th crops, and these changes might be related to different community assembly mechanisms. This study facilitated the understanding of the development of tomato bacterial wilt during continuous monoculture system and provided guidance for the control of bacterial wilt.

Keywords: tomato bacterial wilt; continuous monoculture; disease stage; bacterial community

番茄是我国主要的经济作物之一，生产规模大。随着集约化生产的加剧和设施农业的发展，土传病害严重等连作障碍问题日益突出，致使大面积减产、质量降低，严重制约着番茄的可持续生产^[1]。土传青枯病是连作番茄的一种典型的细菌性维管束病害，其病原菌为茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)，可侵染200多种植物，其中番茄、马铃薯、烟草等作物受害最为严重^[2]。

在实际生产中，植物在不同发病时期的病情不同，所处的生育期也不同。比如番茄盛果期是青枯病的发病高峰期，发病植株大部分枝叶呈萎蔫状态，而在收获期，植株整株枯黄，甚至枯死，病情更为严重。植物生长状态的不同会导致根系分泌物的组成不同，植物的免疫反应不同^[3]，土壤中微生物群落的组成也不同。例如，刘婷等^[4]发现健康番茄和青枯病发病番茄的根际代谢物的组分和含量存在显著差异。丁亚茹等^[5]发现黑胫病发病率不同的烟田其根际微生物组成差异主要体现在类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)和假霉样真菌属(*Pseudallescheria*)等细菌、真菌属的差异。Zhou等^[6]发现枯萎病发病番茄的土壤和根内生微生物多样性均显著低于健康番茄，健康番茄的土壤和根内显著富集一些生防菌，比如芽孢杆菌属(*Bacillus*)，假单胞菌属(*Pseudomonas*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)等。徐欣韵等^[7]从番茄青枯病抑病型土壤中分离出多株青枯菌的拮抗

促生细菌，多为芽孢杆菌属。此外，由于连作会改变土壤微生物群落组成^[8]，发病时期引起的微生物群落组成的差异很可能会随着连作时间的增加而发生变化。因此，开展连作条件下青枯病不同发病时期的土壤微生物群落差异研究，对深入认识土传青枯病发病机理具有积极作用。

已有研究发现根际微生物在土传病害的发生与控制中起到很重要的作用，植物可以通过根系分泌物在根际召集有益微生物，通过有益微生物的拮抗、竞争和诱导系统抗性 etc 来提升病害抵御能力^[9]。但是作为根际微生物的源，非根际微生物在土传病害中的作用并没有受到重视。基于此，本研究欲探究不同发病时期植物生长生理状态的改变是否会影响离根际较远的非根际微生物，非根际微生物群落结构改变是否与青枯病发病有关？本研究以连作番茄为研究对象，探究青枯病不同发病时期的非根际土壤细菌群落差异，及其随连作时间的变化趋势，以期为生物防治番茄土传青枯病提供参考和技术指导。

1 材料与方法

1.1 田间试验设计和样品采集

为了连续监测青枯病的发展过程，在一个塑料大棚中开展番茄连续种植试验。试验前土壤的基本理化性质如下：pH 7.01，全氮为 0.9 g/kg，全磷为 1.42 g/kg，全钾为 12 g/kg，有效磷为

147 mg/kg, 有效钾为 260 mg/kg。试验周期为 2016–2019 年, 试验地点位于南京市蔬菜科学研究所(31°73' N, 118°78' E)。每年种植两季番茄(品种为“合作 908”), 春茬为 3 月底至 7 月中旬, 秋茬为 8 月中旬至 11 月中旬。试验采用随机区组设计, 共设置 4 个生物学重复, 即 4 个试验小区, 每个试验小区面积为 7 m², 分别种植 28 株番茄。每一季施用尿素 776 kg/hm² (46.4% N)、过磷酸钙 1 276 kg/hm² (12% P₂O₅) 和硫酸钾 360 kg/hm² (50% K₂O), 每一季的施肥量保持一致。其他农艺措施基本一致, 试验期间不使用农药。

每季盛果期(春茬为 6 月上旬, 秋茬为 10 月中旬)和收获期于远离植物根系区域采集土样, 分别用于代表发病高峰期和发病末期的非根际土壤样品。土壤采样方法为六点混合法, 共采集 32 个非根际土壤样品, 采样深度为 0–15 cm。去除土壤中的植物根和碎石后过 2 mm 筛, 过筛后的土壤保存于–80 °C 冰箱用于提取 DNA。鉴于春茬和秋茬的气候差异可能会影响研究结果的稳定性, 因此只选用易发病的春茬番茄用于连作条件下青枯病发病率和不同发病时期的细菌群落变化研究。春茬番茄每一季的两次不同发病时期土壤样品的采集时间间隔大约为 30 d。

1.2 植株发病率统计

在每一季的盛果期统计番茄青枯病发病植株数, 计算发病率。发病率(%)=每区发病植株数/小区总株数×100。

1.3 土壤 DNA 提取与高通量测序

称取 0.25 g 非根际土壤, 使用土壤 DNA 提取试剂盒(DNeasy PowerSoil Kit, QIAGEN)提取非根际土基因组 DNA。使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。DNA 样品送往上海美吉生物医药科技有限公司, 使用特异性引物对 515F-907R^[10]对 16S rRNA V4–V5

区进行扩增子高通量测序。使用 Illumina MiSeq PE300 测序平台对扩增产物进行双端测序。原始序列经过质控和拼接^[11–12]后使用 UPARSE (v7.1)在 97%相似水平上进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)聚类, 之后使用 SILVA v138 数据库(<https://www.arb-silva.de/download/archive/>)进行物种分类注释。将基于所有样本的序列数和小于 10 的 OTU 及被鉴定为植物叶绿体和线粒体的 OTU 去除, 之后根据最小样本数对 OTU 丰度数据进行均一化处理, 获得 OTU 终表。本研究所用样本的原始序列已上传到 NCBI (National Center for Biotechnology Information)数据库, SRA 号(Sequence Read Archive) 为 SRR17518584–SRR17518569, SRR16523032–SRR16523035, SRR16523044–SRR16523047, SRR16523056–SRR16523059 和 SRR16523061–SRR16523064。

1.4 土壤中青枯菌浓度定量检测

非根际土壤中青枯菌的浓度采用实时荧光定量 PCR 的方法, 利用引物 Rsol_ *fliC*^[13](正向引物: 5'-GAACGCCAACGGTGCGAACT-3', 反向引物: 5'-GGCGGCCTTCAGGGAGGTC-3')对青枯菌致病基因 *fliC* 进行检测。分析采用 Applied Biosystems 公司的 7500 Real-Time PCR 系统, 使用 SYBR Green I 荧光染料。反应体系包括 10 μL SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa Bio Inc.), 1 μL 模板 DNA 和正反引物各 0.8 μL, 最后用无菌双蒸水加至 20 μL。PCR 扩增程序如下: 95 °C 1 min, 40 个循环的 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 30 s, 接着是 95 °C 5s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s 的熔解阶段。用 10 倍梯度稀释的含目的基因的质粒绘制标准曲线, 标准曲线 *r*² 为 0.998, 引物的扩增效率为 93.6%。

1.5 数据处理

使用 R 语言“vegan”包进行基于 Bray-Curtis

距离的主坐标(principal coordinate analysis, PCoA)分析、置换多元方差分析(PERMANOVA)和群落差异度分析。韦恩(Venn)分析和线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 在上海美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com/page/tools/>)完成。群落构建过程在 R 语言中使用“picante”包完成分析。 β NTI (β -nearest taxon index, 最近物种指数)的值在 $[-2, 2]$ 之间表示随机性过程, 而 β NTI 的值大于 2 表示确定性过程的异质选择作用, β NTI 的值小于-2 表示确定性过程的同质选择作用。利用基于零模型的随机值与表征 Bray-Curtis 距离观测值之间差异的 Bray-Curtis-based Raup-Crick (RC_{bray})来计算基于扩散影响的微生物群落构建过程^[14-16]。根据 RC_{bray} 值将随机性过程分为同质扩散 ($|\beta NTI| < 2$, $RC_{bray} < -0.95$) 和扩散限制 ($|\beta NTI| < 2$, $RC_{bray} > 0.95$), 以及由未知因素控制的群落构建过程 ($|\beta NTI| < 2$, $|RC_{bray}| < 0.95$)。方差分析(ANOVA, 多重比较采用 Student-Newman-Keuls 检验)和 t 检验使用 SPSS 21.0, 显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。使用到的作图软件有 Origin2021 和 R(v3.3.1)。

2 结果与分析

2.1 连作番茄青枯病发病率

连作番茄青枯病发病率呈先增加后降低的趋势, 第 5 季是青枯病的一个暴发期, 随后病情减缓(图 1)。第 1 季番茄青枯病的发病率为 0, 表明试验前的土壤并没有病害的发生。第 3 季的平均发病率为 28.9%。第 5 季平均发病率为 52.1%, 最高发病率为 100%。第 7 季的发病率有所降低, 平均发病率为 29.5%。另外, 由青枯病的发病特征可知, 发病末期的植物长势和健康程度要远低于发病高峰期。

2.2 连作番茄非根际土壤中青枯菌的数量

对发病高峰期和发病末期的土壤中青枯菌的数量采用定量 PCR 的方法进行测定, 双因素方差分析结果表明, 连作时间和发病时期对青枯菌的数量没有显著影响($P > 0.05$)。发病高峰期的青枯菌 *fliC* 基因拷贝数高于发病末期, 发病高峰期每克土壤的平均青枯菌 *fliC* 基因拷贝数为 1.28×10^7 , 发病末期则为 1.77×10^6 (图 2)。另外, 发病高峰期的青枯菌数量与发病率没有显著相关关系, 而发病末期的青枯菌数量与发病率显著正相关(相关系数 $r = 0.548$, $P < 0.05$)。



图 1 不同连作时间番茄青枯病发病情况

Figure 1 The information for tomato bacterial wilt under different monocropping time. “IR” indicates the incidence rate of bacterial wilt. “C1”, “C3”, “C5” and “C7” refer to the first, third, fifth and seventh consecutive growth crop of continuous tomato cultivation, respectively.

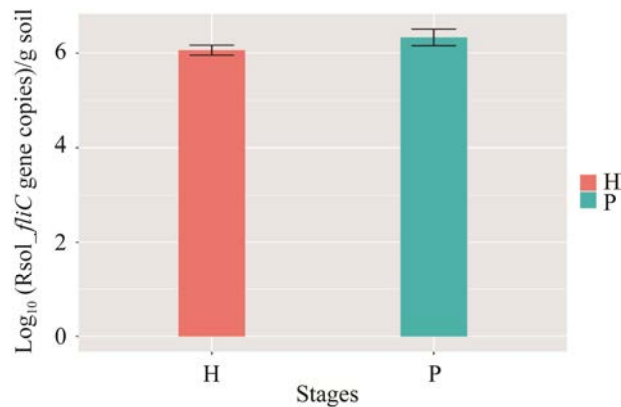


图 2 连作条件下发病末期和发病高峰期的番茄非根际土壤青枯菌数量

Figure 2 Quantity of *Ralstonia solanacearum* in the bulk soils at final stage and peak stage of bacterial wilt during tomato monoculture. “H” indicates the final stage of disease and “P” indicates the peak stage of disease. The error bar represent standard error ($n=16$).

2.3 不同发病时期番茄非根际土壤细菌群落差异性

2.3.1 细菌群落多样性

本研究共获得 1 882 322 条高质量细菌序列, 按最小样本数将序列抽平到每样本 24 142 条序列, 共获得 6 271 个 OTUs。

本研究利用香农指数(Shannon diversity)和物种丰富度(Observed OTUs)指数表征细菌群落的 alpha 多样性。结果表明, 两发病时期土壤细菌的香农指数(图 3A)和物种丰富度指数(图 3B)在试验开始(第 1 季)和试验结束(第 7 季)时均没有显著差异(t 检验, $P>0.05$)。除第 3 季外, 其他季都是发病末期的 alpha 多样性低于发病高峰期。发病末期的香农指数和物种丰富度指数随连作时间增加呈现先增加后降低的趋势(t 检验, $P<0.05$)。前 3 季的香农指数和物种丰富度指数在发病高峰期时无显著变化(t 检验, $P>0.05$), 在第 7 季时显著降低($P<0.05$)。主坐

标分析(PCoA)和置换多元方差分析(PERMANOVA)结果显示, 第 3 季和第 5 季的两个发病时期之间的细菌群落结构都存在显著差异($P<0.05$), 在第 5 季时发病时期对群落结构的差异解释度最高(37.3%), 但第 1 季和第 7 季时两发病时期的细菌群落无显著差异($P>0.05$) (图 3C)。通过基于距离矩阵的群落差异度分析(Bray-Curtis 距离), 发现两不同发病时期细菌群落的差异度在第 1 季为 25.7%, 第 3 季为 30.0%, 第 5 季为 36.4%, 第 7 季为 40.4%, 且每两季之间均有显著差异(ANOVA, $P<0.05$)。研究结果表明, 发病越严重的年份, 发病时期对细菌群落结构和多样性的影响越大。然而在病害大暴发后, 虽然不同发病时期的细菌群落差异继续增大, 但是发病时期对群落结构和多样性的影响程度变小且不显著。

2.3.2 细菌群落组成

由 Venn 分析可知, 各组(不同季和不同发病时期)样品共有 1 583 个相同的 OTU, 平均占各样本 OTU 总数的 41%。与其他季相比, 虽然第 7 季的发病高峰期和发病末期的样品 OTU 总数小, 但拥有最多的独有 OTU, 分别为 73 和 91 (图 4A)。比较同一季的不同发病时期的样品, 发现第 1 季的发病末期样品(C1_H)有 583 个独有 OTU, 占总数的 15.1%, 发病高峰期(C1_P)有 772 个独有 OTU, 占总数的 19.0%; 第 3 季的分别为 904 (C3_H)和 717 (C3_P), 占各自总数的 21.1%和 17.5%; 第 5 季的分别为 684 (C5_H)和 1 066 (C5_P), 占各自总数的 18.1%和 25.7%; 第 7 季的分别为 810 (C7_H)和 816 (C7_P), 占各自总数的 24.0%和 24.2% (图 4B)。结果表明发病末期和发病高峰期独有 OTU 的数量平均大概占到各自样本 OTU 总数的 20%左右。

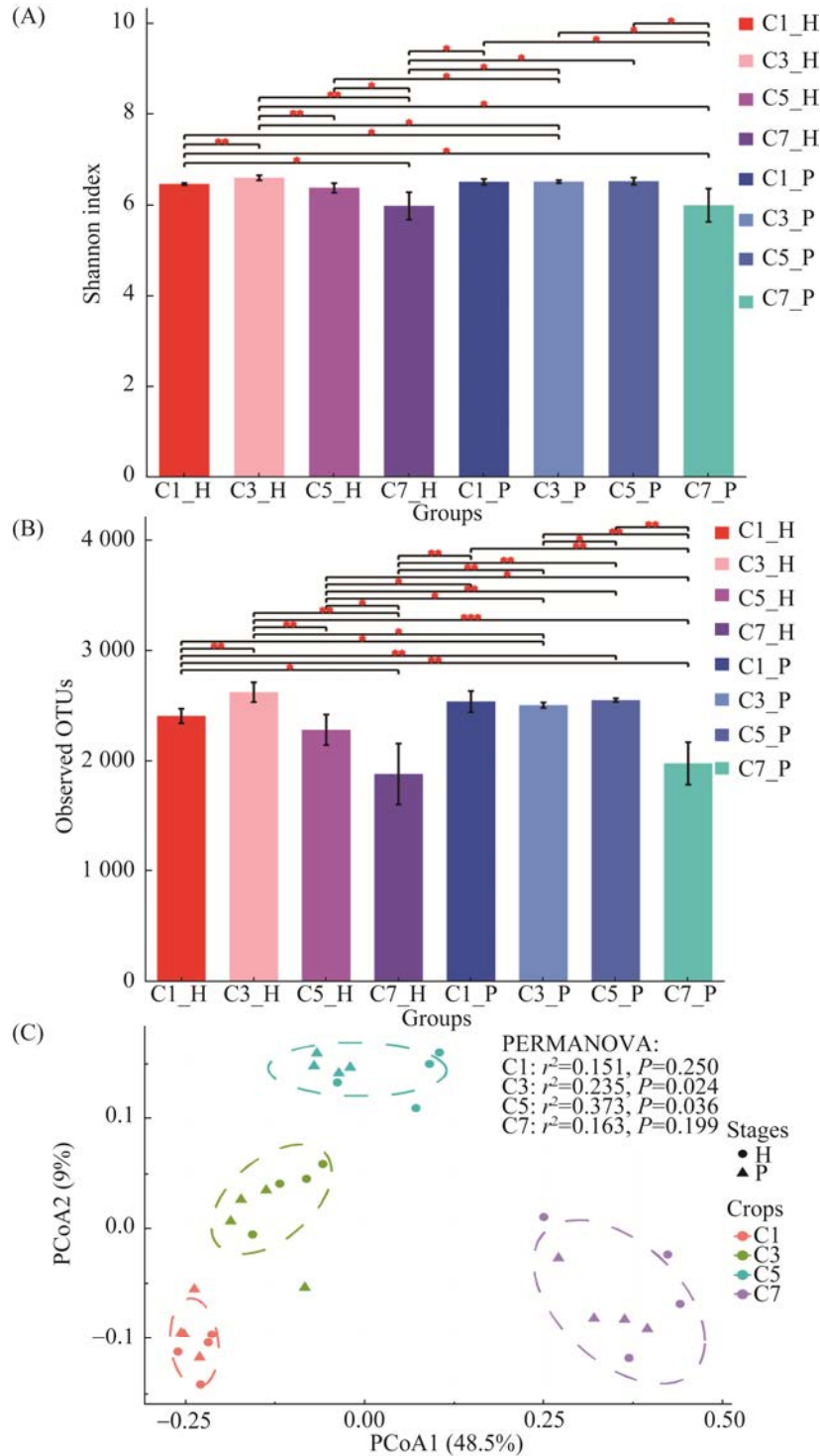


图3 非根际土壤细菌群落香农指数(A)、物种丰富度指数(B)和主坐标分析(C)

Figure 3 Shannon index (A), Observed OTUs (B), and PCoA analysis (C) of bacterial communities in bulk soil. *t*-test was used for paired comparison. “*”, “**”, “***” indicate significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively. “H” indicates the final stage of disease and “P” indicates the peak stage of disease. “C1”, “C3”, “C5” and “C7” indicate the first, third, fifth and seventh consecutive growth crop of continuous tomato cultivation, respectively.

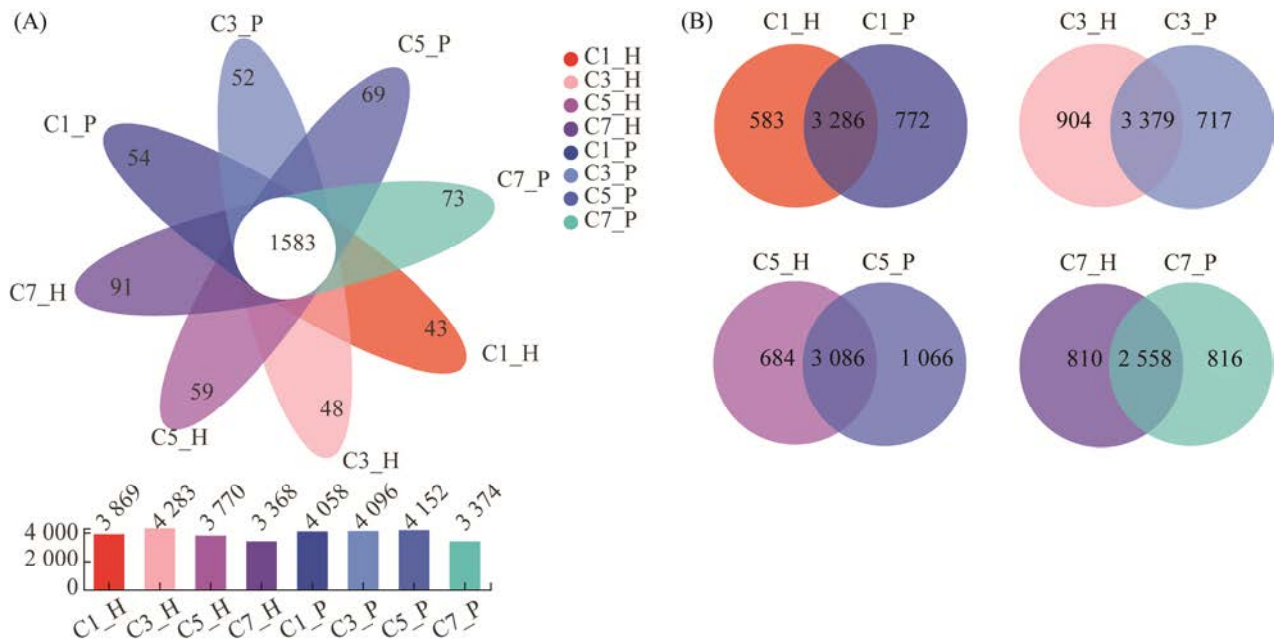


图 4 不同连作时间的不同发病时期样品(A)和同一连作时间下不同发病时期样品(B)在 OTU 水平的 Venn 分析

Figure 4 Venn analysis of samples at different stages of disease and different continuous cropping time (A) and samples at different stages of disease at the same cropping time (B) at OTU level. “H” indicates the final stage of disease and “P” indicates the peak stage of disease. “C1”, “C3”, “C5” and “C7” indicate the first, third, fifth and seventh consecutive growth crop of continuous tomato cultivation, respectively.

在门水平, 细菌群落主要由放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和厚壁菌门(Firmicutes)组成, 共占各样本序列数的 82%。从属水平组成上可以看出, 无论是发病高峰期还是发病末期, 不同连作时间的土壤样品细菌属的相对丰度差异较大, 尤其是第 7 季的样品, 与其他季的差别比较明显(图 5)。例如, 相较于其他季, 第 7 季番茄在发病末期其非根际土壤链霉菌属 (*Streptomyces*)、朱氏杆菌属 (*Chujaibacter*)和 *norank_f__Chitinophagaceae* 的相对丰度明显增加, 而 *norank_o__Vicinamibacterales*、*norank_f__Vicinamibacteraceae* 和 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 明显减少; 在发病高峰期时, 芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、朱

氏杆菌属 (*Chujaibacter*)、*norank_f__Chitinophagaceae* 和劳尔氏菌属(*Ralstonia*)明显增加, 而 *norank_o__Vicinamibacterales*、*norank_f__Vicinamibacteraceae*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 明显降低。此外, 同一连作时间不同发病时期的细菌属组成也存在明显差异。

2.3.3 标志细菌类群

通过 LEfSe 分析发现不同连作时间的发病高峰期和发病末期的样品均有其各自不同的标志细菌类群(图 6)。随连作时间增加, 发病高峰期和发病末期样品间显著差异的细菌类群数目明显增加, 表明发病时期对细菌群落的影响随着连作时间的增加而增加, 这与 PERMANOVA 分析结果一致, 但第 7 季时又有所减少。在属水平, C1_H

显著富集溶杆菌属 (*Lysobacter*) 和 unclassified_f_Rhodanobacteraceae; C1_P 无显著富集属; C3_H 显著富集链霉菌属 (*Streptomyces*) 和芽单胞菌属 (*Gemmatimonas*) 在内的 7 个细菌属; C3_P 显著富集类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 和 *Gaiella* 等在内的 5 个细菌属; C5_H 显著富集微杆菌属 (*Microbacterium*)、鞘脂菌属 (*Sphingobium*) 和新鞘脂菌属 (*Novosphingobium*) 等在内的 16 种细菌属; C5_P 显著富集芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 和膨胀芽孢杆菌属 (*Tumebacillus*) 等在内的 16 个细菌属; C7_H 显著富集亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、短状杆菌属 (*Brachybacillus*)、马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*) 和类诺卡氏菌

属 (*Nocardioides*); C7_P 显著富集 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*、芽单胞菌属 (*Gemmatimonas*) 和 norank_f_Gemmatimonadaceae。将这 45 个属与青枯病发病率做相关性分析, 发现发病高峰期时微杆菌属 (*Microbacterium*) ($r=0.682$, $P=0.004$) 和亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*) ($r=0.514$, $P=0.042$) 的相对丰度与发病率显著正相关。发病末期时 norank_f_norank_o_SBR1031 ($r=0.570$, $P=0.021$)、norank_f_Rhodothermaceae ($r=0.578$, $P=0.019$) 和鞘脂菌属 (*Sphingobium*) ($r=0.569$, $P=0.024$) 与发病率显著正相关。但这 5 个属都是发病末期的相对丰度高于发病高峰期 (图 7), 说明不同发病时期由不同的微生物协助青枯菌使植物发病, 并且这些细菌在土壤中逐渐累积。

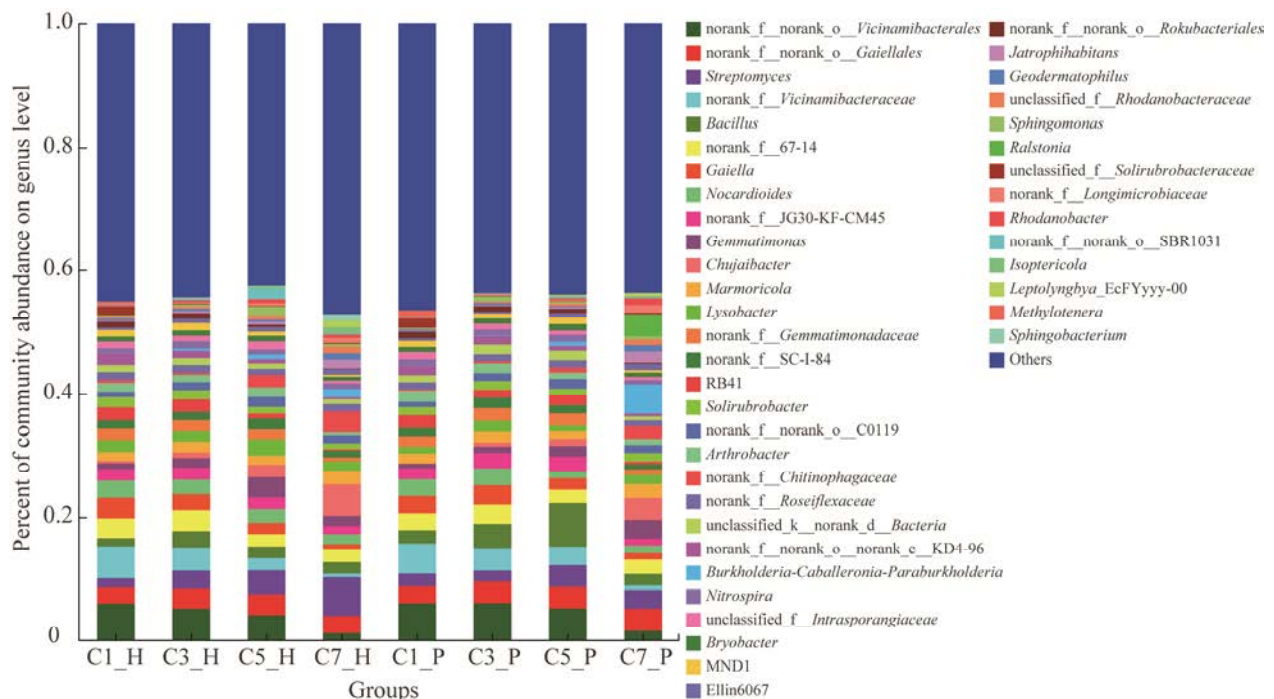


图 5 非根际土壤细菌群落在属水平的组成

Figure 5 Composition of soil bacterial communities in bulk soil at genus level. “H” indicates the final stage of disease and “P” indicates the peak stage of disease. “C1”, “C3”, “C5” and “C7” indicate the first, third, fifth and seventh consecutive growth crop of continuous tomato cultivation, respectively.

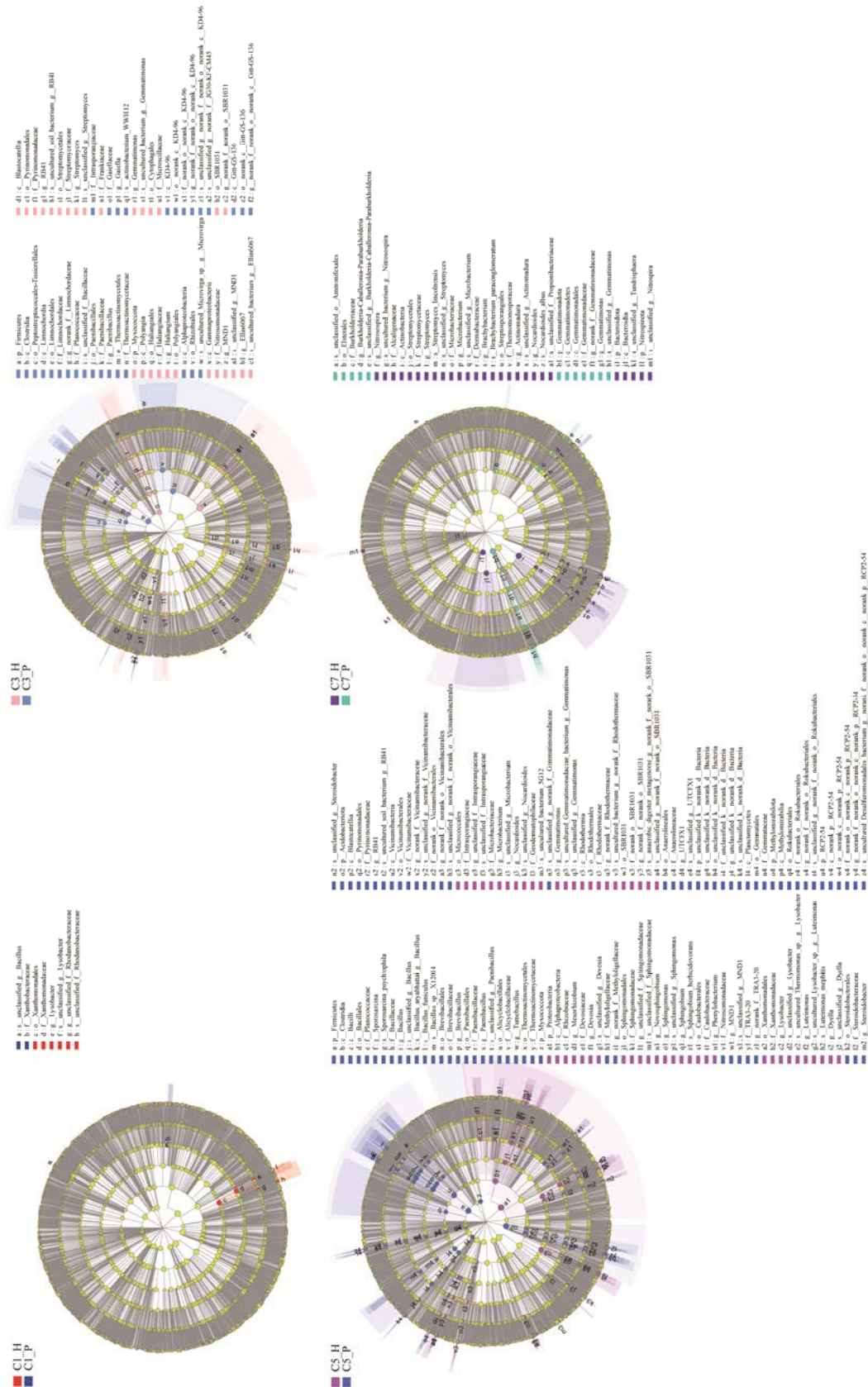


图6 同一连作时间下不同发病时期样品细菌群落的线性判别分析

Figure 6 LEfSe analysis of bacterial communities at different stages of disease at the same cropping time. “H” indicates the final stage of disease and “P” indicates the peak stage of disease. “C1”, “C3”, “C5” and “C7” indicate the first, third, fifth and seventh consecutive growth crop of continuous tomato cultivation, respectively.

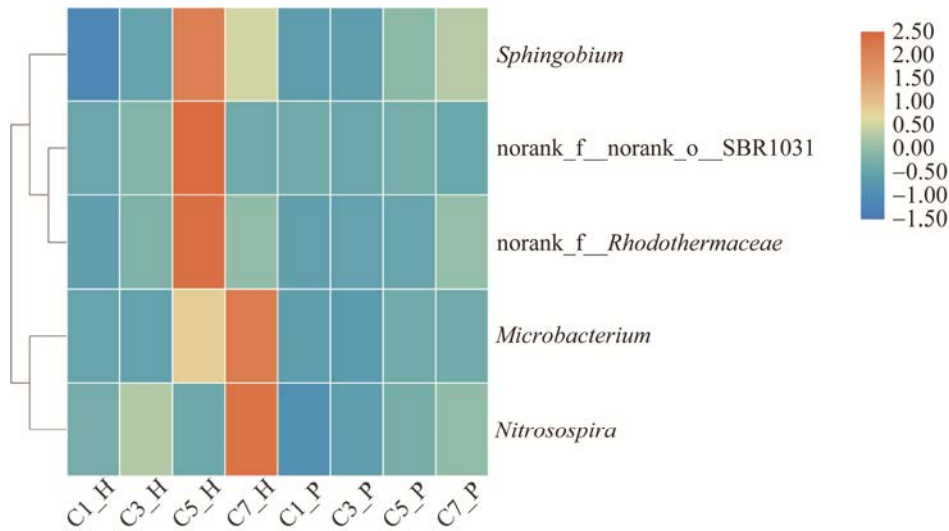


图 7 与青枯病发病率显著相关的不同发病时期的显著差异细菌属的热图

Figure 7 Heatmap of bacterial genera with significant difference at different stages of disease that were significantly associated with bacterial wilt incidence. “H” indicates the final stage of disease and “P” indicates the peak stage of disease. “C1”, “C3”, “C5” and “C7” indicate the first, third, fifth and seventh consecutive growth crop of continuous tomato cultivation, respectively.

2.4 细菌群落构建过程

对细菌的群落构建过程进行分析, 结果表明不同发病时期的土壤细菌群落构建均以随机过程为主(图 8, $|\beta\text{NTI}| < 2$), 发病末期样品的确

定性过程所占比例(H vs. H, 22.5%)小于发病高峰期(P vs. P, 26.7%)。进一步分析发现随机过程中的扩散限制在所有细菌群落间均占主导地位, 占比 40%左右(表 1)。异质化过程包括异质

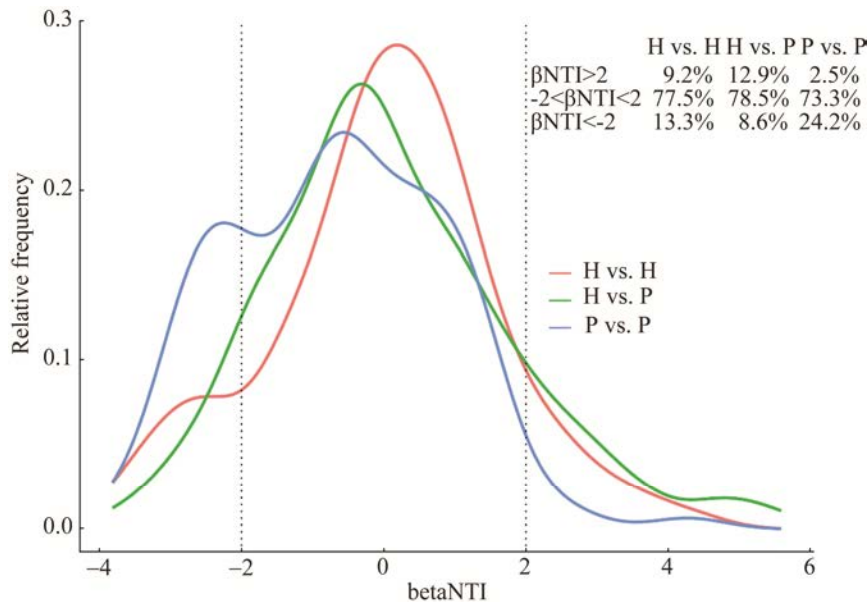


图 8 连作条件下不同发病时期的细菌群落间 βNTI 分布图

Figure 8 βNTI distribution of bacterial communities at different stages of disease under tomato monoculture system. “H vs. H” indicates βNTI values of any two samples from the final stage of disease of the four crops. “P vs. P” indicates βNTI values of any two samples from the peak stage of disease of the four crops. “H vs. P” indicates βNTI values between the samples from the final stage and the peak stage of disease of the four crops.

表 1 连作条件下不同发病时期的细菌群落构建过程解析

Table 1 The community assembly process analysis of bacterial communities at different stages of disease under tomato monoculture system

Groups	VS/%	DL/%	Heterogenization/%	HS/%	HD/%	Homogenization/%	UD/%
H vs. H	9.2	43.3	52.5	13.3	10.0	23.3	24.2
H vs. P	12.9	47.3	60.2	8.6	13.3	21.9	18.0
P vs. P	2.5	38.3	40.8	24.2	19.2	43.3	15.9

VS: variable selection, also called heterogeneous selection; DL: dispersal limitation; HS: homogeneous selection; HD: homogenizing dispersal. UD: undominated processes. "H vs. H" indicates values of any two samples from the final stage of disease of the four crops. "P vs. P" indicates values of any two samples from the peak stage of disease of the four crops. "H vs. P" indicates values between the samples from the final stage and the peak stage of disease of the four crops.

选择(heterogeneous selection, also called variable selection)和扩散限制(dispersal limitation), 同质化过程包括同质选择(homogeneous selection)和同质扩散(homogenizing dispersal)。从表 1 可以看出, 发病高峰期的异质化过程占比为 40.8%、同质化过程占比为 43.3%, 发病末期的异质化过程占比为 52.5%、同质化过程占比为 23.3%, 因此, 发病高峰期的群落比发病末期的群落更同质化。Pearson 相关性分析结果显示, 细菌群落的差异度与群落的 β NTI 值有显著相关性($r=-0.406$, $P<0.001$), 与群落的 RC_{bray} 值也有显著相关性($r=0.716$, $P<0.001$), 因此, 不同发病时期的细菌群落差异可能与群落构建机制的不同有关。

3 讨论

非根际微生物是对土传病害控制起重要作用的根际微生物的源, 探究连作条件下不同发病时期非根际微生物群落的差异对防治土传病害的意义重大。本研究基于连作大棚试验, 分析了番茄青枯病发病高峰期和发病末期的非根际细菌群落的差异, 及其随连作时间增加的变化特征。试验结果表明, 随着连作时间的增加, 番茄青枯病病情逐渐加重, 在第 5 季病害大暴发, 但第 7 季病情又有所减缓, 预示随种植年限的增加有形成抑病土的可能。已有研究表明

连作会加剧土传病害的发生, 但是长时间的连作导致病害大暴发后又形成抑病土^[17], 比如小麦全蚀病^[18]。其次, 通过定量检测土壤中病原菌的数量, 发现发病高峰期的病原菌数量较发病末期的高, 这可能是因为发病高峰期植物生长旺盛, 根系分泌化合物的能力高于发病末期, 利于病原菌的繁殖。发病高峰期青枯菌数量与发病率没有显著相关关系, 而发病末期的则有显著正相关关系。产生这种特征的原因可能是非根际土壤离作物根系较远, 并不能直接影响植物发病, 而收获期是一季作物结束的时候, 病原菌数量不再受植物生长影响而储存在土壤中, 这种连作条件下病原菌的累积效应通过其他方式进而引起病害加重, 比如影响根际有益菌或根际病原菌数量, 尤其是被报道在土传病害发生与防控中起着重要作用的根际有益菌^[19-20]。

对细菌群落多样性和群落组成分析的结果表明, 在抑病土形成前, 发病时期对细菌群落的影响随连作时间增加而增加, 但在病情减缓后, 发病时期的影响呈减弱趋势。不同连作时间的发病高峰期和发病末期样品均有其各自不同的标志细菌类群。另外, 本研究发现非根际土壤中会逐渐累积帮助青枯菌发病的细菌。青枯病发病率与细菌相对丰度的相关性分析结果表明在发病高峰期由微杆菌属(*Microbacterium*)

和亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)帮助青枯菌,在发病末期由鞘脂菌属(*Sphingobium*)、norank_f_norank_o_SBR1031 和 norank_f_Rhodothermaceae 帮助青枯菌致使植物发病。微杆菌属被报道在青枯菌入侵植物过程中起积极作用^[21],这与本研究的结果一致。亚硝化螺菌属的细菌参与硝化作用为植物生长提供氮,有研究发现连作黄瓜土壤中亚硝化螺菌属相对丰度降低^[22],未见其与病原菌关系的报道。鞘脂菌属被报道在青枯病发病土壤中的相对丰度显著低于健康土壤中的相对丰度,暗示其对于抗病的积极作用^[20],而与本研究结果不同的原因,可能是因为土壤中起作用的鞘脂菌属的种类不同。

微生物群落构建过程包括确定性过程和随机性过程,确定性过程包括环境过滤和生物相互作用,随机性过程包括随机扩散、随机的物种形成与灭亡、生态漂变。研究微生物群落构建机制对于明确塑造微生物群落的因素具有重要意义^[16]。本研究发现发病高峰期和发病末期的细菌群落构建过程均以随机性过程为主导,尤其是扩散限制对群落结构的影响最大,但是发病高峰期的群落比发病末期的群落更同质化,说明发病高峰期的细菌群落同质化作用增强,其可能是发病高峰期青枯菌数量更多的一个原因。此外,细菌群落差异性与群落构建过程显著相关,表明了微生物群落构建过程对细菌群落结构具有调控作用。

4 结论

本研究通过对连作条件下不同青枯病发病时期的非根际土壤细菌群落进行动态监测,发现发病高峰期的青枯菌数量要高于发病末期,且发病率与发病末期的青枯菌数量显著相关。另外,在抑病土形成前,发病时期对细菌群落的影响随连作时间增加而增加,但在病情减缓

后,发病时期的影响呈弱化趋势。在不同发病时期由不同的细菌帮助青枯菌致病,并且这些细菌在土壤中逐渐累积。不同发病时期的细菌群落差异可能是受其不同的群落构建过程驱动。本研究结果加深了对连作条件下的番茄青枯病发展过程的认识,可为防治青枯病提供参考依据。

参考文献

- [1] 卢维宏,张乃明,包立,张丽,秦太峰.我国设施栽培连作障碍特征与成因及防治措施的研究进展.土壤,2020,52(4):651-658.
Lu WH, Zhang NM, Bao L, Zhang L, Qin TF. Study advances on characteristics, causes and control measures of continuous cropping obstacles of facility cultivation in China. *Soils*, 2020, 52(4): 651-658. (in Chinese)
- [2] 张鹏,韦中,朱震,高雪莲,邓开英,冉炜,沈其荣.生物有机肥对连作番茄和辣椒根际土壤微生物区系及茄科雷尔氏菌的影响.南京农业大学学报,2013,36(4):77-82.
Zhang P, Wei Z, Zhu Z, Gao XL, Deng KY, Ran W, Shen QR. Effect of a bio-organic fertilizer on microbial flora and *Ralstonia solanacearum* population in rhizosphere soils of continuous cropping tomato and pepper. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, 36(4): 77-82. (in Chinese)
- [3] Xiong C, Singh BK, He JZ, Han YL, Li PP, Wan LH, Meng GZ, Liu SY, Wang JT, Wu CF, Ge AH, Zhang LM. Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome. *Microbiome*, 2021, 9(1): 171.
- [4] 刘婷,文涛,赵梦丽,张媛,张超,袁军,沈其荣.番茄根际代谢物抵御茄科劳尔氏菌入侵机制研究.南京农业大学学报,2020,43(3):460-467.
Liu T, Wen T, Zhao ML, Zhang Y, Zhang C, Yuan J, Shen QR. The mechanisms of tomato rhizosphere metabolites resistance to *Ralstonia solanacearum* invasion. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(3): 460-467. (in Chinese)
- [5] 丁亚茹,陈玉蓝,林正全,拓阳阳,李斌,李红丽,王岩.不同发病率烟田根际土壤微生物群落组成研究.中国烟草科学,2020,41(1):67-73.
Ding YR, Chen YL, Lin ZQ, Tuo YY, Li B, Li HL, Wang Y. Study on microbial community composition in

- rhizosphere soil of tobacco fields with different disease incidence rates. *Chinese Tobacco Science*, 2020, 41(1): 67–73. (in Chinese)
- [6] Zhou X, Wang JT, Wang WH, Tsui CK, Cai L. Changes in bacterial and fungal microbiomes associated with tomatoes of healthy and infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Microbial Ecology*, 2021, 81(4): 1004–1017.
- [7] 徐欣韵, 王宁, 丁佳, 陈妍, 田光明. 番茄青枯病拮抗菌的定向筛选及其抗病促生机制研究. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3276–3290.
Xu XY, Wang N, Ding J, Chen Y, Tian GM. Isolation and identification of antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt and the mechanisms in disease prevention and plant growth promotion. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3276–3290. (in Chinese)
- [8] Li XG, Panke-Buisse K, Yao XD, Coleman-Derr D, Ding CF, Wang XX, Ruan HH. Peanut plant growth was altered by monocropping-associated microbial enrichment of rhizosphere microbiome. *Plant and Soil*, 2020, 446(1/2): 655–669.
- [9] 韦中, 沈宗专, 杨天杰, 王孝芳, 李荣, 徐阳春, 沈其荣. 从抑病土壤到根际免疫: 概念提出与发展思考. *土壤学报*, 2021, 58(4): 814–824.
Wei Z, Shen ZZ, Yang TJ, Wang XF, Li R, Xu YC, Shen QR. From suppressive soil to rhizosphere immunity: towards an ecosystem thinking for soil-borne pathogen control. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(4): 814–824. (in Chinese)
- [10] Biddle JF, Fitz-Gibbon S, Schuster SC, Brenchley JE, House CH. Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(30): 10583–10588.
- [11] Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2018, 34(17): i884–i890.
- [12] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [13] Schönfeld J, Heuer H, Van Elsas JD, Smalla K. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7248–7256.
- [14] Stegen JC, Lin XJ, Konopka AE, Fredrickson JK. Stochastic and deterministic assembly processes in subsurface microbial communities. *The ISME Journal*, 2012, 6(9): 1653–1664.
- [15] Stegen JC, Lin XJ, Fredrickson JK, et al. Quantifying community assembly processes and identifying features that impose them. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2013, 7(11): 2069–2079.
- [16] Zhou JZ, Ning DL. Stochastic community assembly: does it matter in microbial ecology? *American Society for Microbiology*, 2017, 81(4): e00002-17.
- [17] Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40: 309–348.
- [18] Cook RJ. The influence of rotation crops on take-all decline phenomenon. *Phytopathology*, 1981, 71(2): 189–192.
- [19] 宫超, 黎振兴, 麦培婷, 孙保娟, 李植良, 李涛. 番茄青枯病抗性相关根际微生物的研究进展. *广东农业科学*, 2021, 48(9): 51–61.
Gong C, Li ZX, Mai PT, Sun BJ, Li ZL, Li T. Research progress of rhizosphere microorganisms related to tomato bacterial wilt resistance. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2021, 48(9): 51–61. (in Chinese)
- [20] Mendes R, Kruijt M, De Bruijn I, Dekkers E, Van Der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, Raaijmakers JM. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 2011, 332(6033): 1097–1100.
- [21] Hu QL, Tan L, Gu SS, Xiao YS, Xiong XY, Zeng WA, Feng K, Wei Z, Deng Y. Network analysis infers the wilt pathogen invasion associated with non-detrimental bacteria. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6(1): 8.
- [22] Liu X, Zhang Y, Ren XJ, Chen BH, Shen CW, Wang F. Long-term greenhouse vegetable cultivation alters the community structures of soil ammonia oxidizers. *Journal of Soils and Sediments*, 2019, 19(2): 883–902.