

不同连作年限西红花种植土壤微生物多样性及网络特征的差异

李孟芝¹, 封锐², 高丽¹, 梁鹏¹, 谢锐¹, 申皓天¹, 黄显章^{1*}

(1. 南阳理工学院河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室, 河南南阳 473000; 2. 南阳理工学院, 河南南阳 473000)

摘要 [目的]探究不同连作年限西红花种植土壤中细菌和真菌群落多样性以及网络结构特征。[方法]采用高通量测序技术分析不同连作年限西红花种植土壤微生物群落的多样性、组成以及网络特征差异。[结果]不同连作年限西红花种植土壤细菌和真菌的多样性发生明显变化,尤其是真菌的 OTUs、Shannon、Simpson、Chao 和 ACE 指数,随着连作年限增加呈现明显增加的趋势。主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS)结果表明,不同连作年限西红花种植土壤中细菌和真菌群落组成均有明显差异。放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和浮霉菌门(Planctomycetes)为4个不同连作年限西红花种植土壤中丰度前5位的细菌门。子囊菌门(Ascomycota)在4个连作年限中均为第一大真菌门(相对丰度>55%)。种植4年的土壤中放线菌门(Actinobacteria)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的丰度低于种植1年、2年和3年。产油菌属(*Solicoccozyma*)在连作4年西红花土壤中丰度显著高于其他年限($P<0.05$)。细菌和真菌的共发生网络分析表明,不同连作年限西红花种植土壤细菌和真菌呈现不同的连接模式。[结论]该研究描绘了不同连作年限西红花种植土壤微生物多样性、组成以及网络结构的差异,从微生物角度探讨西红花连作障碍机制,为解决西红花的连作障碍提供参考。

关键词 西红花;连作年限;土壤微生物;多样性;网络特征

中图分类号 R282.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2024)24-0137-08

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2024.24.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Differences of Microbial Diversity and Network Characteristics in *Crocus sativus*-Planting Soil of Different Continuous Cropping YearsLI Meng-zhi¹, FENG Mao², GAO Li¹ et al (1. Henan Key Laboratory of Zhang Zhongjing Formulae and Herbs for Immunoregulation, Nanyang Institute of Technology, Nanyang, Henan 473000; 2. Nanyang Institute of Technology, Nanyang, Henan 473000)

Abstract [Objective] To explore the diversity and network structure of bacterial and fungal communities in soil microorganism of *Crocus sativus* in different years of continuous cropping. [Method] High-throughput sequencing was carried out to determine the diversity, composition and network structure of bacterial and fungal communities in soil microorganism of *C. sativus*. [Result] The diversity of bacteria and fungi in soil of *C. sativus* had significant changes, especially the OTUs, Shannon, Simpson, Chao and ACE indices of fungi, which showed a significant increase trend with the increase of continuous cropping years. The results of PCoA and NMDS showed that there were significant differences in the composition of bacteria and fungi in soil of *C. sativus* in different years of continuous cropping. At the bacterial phylum level, Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi and Planctomycetes were the top five phyla. At the fungal phylum level, Ascomycota (55%) was the most abundant phylum. The relative abundance of Actinobacteria and Gemmatimonadetes were lower in soils of continuous cropping 4 year than continuous cropping 1, 2 and 3 year. The relative abundance of *Solicoccozyma* was significantly higher in soils of continuous cropping 4 year than continuous cropping 1, 2 and 3 year ($P<0.05$). There were different connectivity patterns of bacteria and fungi in *C. sativus*-planting soil of different continuous cropping years. [Conclusion] The study describes the differences of microbial diversity, composition and network structure in *C. sativus*-planting soil of different continuous cropping years, and explores the mechanism of *C. sativus* continuous cropping obstacles from a microbial perspective, providing reference for solving the obstacles of continuous cropping in *C. sativus*.

Key words *Crocus sativus*; Continuous cropping years; Soil microorganism; Diversity; Network characteristic

西红花为鸢尾科植物番红花(*Crocus sativus* L.)的干燥柱头^[1]。西红花主要在伊朗、西班牙、摩洛哥、土耳其、印度、希腊、意大利等地种植,目前在我国主要产地为上海、浙江、安徽和河南等省(市)^[2-3]。相关的研究表明,西红花的柱头具有较多的药理作用,例如抗氧化、抗炎、抗抑郁、保护神经、保肝等,这些疗效主要来源于藏红花素、藏红花苷和藏红花醛3个主要活性成分^[4]。由于西红花的化学成分具有重要的药理作用,导致西红花的重要性和需求显著增加^[5]。然而,由于各种因素的影响,近几十年来世界范围内西红花的生产和种植呈下降趋势^[6]。西红花的产量可能受到低温、干旱、水涝以及病原菌的影响^[2]。

西红花为多年生药用植物,连续种植使病虫害加重,导

致西红花的产量和品质下降,连作障碍明显^[2]。土壤微生物在土壤功能中扮演重要角色,尤其是在调节植物生长、产量、品质等方面^[7]。土壤中微生物的数量、种类、多样性以及群落结构对于维持土壤系统稳定和调节土壤生态系统功能至关重要^[8]。前人很多的研究结果证实,连作打破了土壤中微生物的群落结构,作为药用植物三七(*Panax notoginseng*)^[9]、人参(*Panax ginseng*)^[10]、地黄(*Rehmannia glutinosa*)^[11]等产生连作障碍的一个重要原因。连作改变土壤微生物多样性和组成,对土壤生产力和作物产量产生负面影响^[12]。然而,由于西红花在我国种植历史不长,目前鲜见西红花不同连作年限土壤微生物多样性、群落组成的研究。因此,全面解析不同连作年限西红花土壤微生物多样性、群落组成,对于解析西红花连作障碍发生机制及预防其发生具有重要意义。该研究通过高通量测序获得不同连作年限西红花土壤微生物群落多样性和组成,阐明不同连作年限西红花种植土壤微生物的多样性、组成以及网络结构的差异,以期为解决西红花连作障碍提供依据。

基金项目 河南省重大科技专项(221100310400);2022年度南阳理工学院交叉科学研究项目(S20095);2022年度南阳市科学技术攻关项目(KJGG030)。

作者简介 李孟芝(1990—),女,河南禹州人,讲师,博士,从事药用植物与微生物互作研究。*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事中药资源及品质评价研究。

收稿日期 2024-02-20

1 材料与方 法

1.1 样品采集 2021年10月20日(西红花花期)在河南省南阳市卧龙区蒲山镇马营村西红花种植基地采集土壤样本。分别采集连续种植西红花1年、2年、3年和4年的耕作层土壤,分别标记为CC1Y、CC2Y、CC3Y、CC4Y,每个种植年限选取3个种植小区,小区面积为 $4.0\text{ m}\times 1.5\text{ m}=6\text{ m}^2$ 。采取五点取样法用土钻采集深度为0~20 cm的耕层土壤放入无菌袋中,将5个点的土壤样品混在一起,作为一个生物学重复,共获得12个土壤样本。将土壤样本置于冰上运送到实验室,-80℃保存备用。

1.2 DNA提取与PCR扩增 取0.5 g土壤样品,按照试剂盒(Fast DNA TM Spin kit for soil)操作流程进行,获得土壤总DNA,用Nanodrop 2000对DNA样本的浓度和纯度进行检测;使用1%的琼脂糖凝胶对DNA质量进行检测,检测合格的DNA用于后续的PCR扩增。细菌16S的V3~V4区进行扩增,引物序列为341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3')^[13];真菌ITS的ITS2区进行扩增,引物序列为ITS3_KYO2(5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3')^[14]。将上述引物分别合成带有barcode标签的特异性引物,进行PCR扩增,PCR扩增条件参考文献[15]进行。将纯化后的扩增产物(扩增子)连接测序接头,构建测序文库,在广州基迪奥生物科技有限公司的illumina HiSeq TM2500平台上机测序。

1.3 生物信息学分析 测序得到Raw reads,运用FASTP(version 0.18.0)过滤低质量的reads,利用FLSAH(version 1.2.11)将双端reads拼接为tag。为了获得高质量的clean tags,通过过滤条件将raw tags中的噪声序列过滤,然后运用UPARSE(version 9.2.64)系统将相似度 $\geq 97\%$ 的clean tags聚类成OTUs^[16]。运用UCHIME算法将所有嵌合体的tags去除^[17]。16S和ITS的代表性序列集合使用RDP Classifier的Naïve Bayesian assignment算法分别依据SILVA和ITS2数据库进行物种注释(设置置信度的阈值为0.8)^[18-19]。多样性指数通过QIIME软件(<http://qiime.org/index.html>)计算。基于Bray-unifrac距离的主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)和基于Weighted-unifrac距离的非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling ordination, NMDS),通过R语言作图。运用Linear discriminant analysis effect size(LEfSe, v1.9.0)筛选西红花不同种植年限土壤中差异的微生物菌群^[20]。“共发生”分析通过Python中的“SparCC”模块实现,网络图的可视化和属性测量利用交互平台Gephi进行。

1.4 统计分析 不同连作年限西红花种植土壤微生物细菌和真菌测序结果、多样性指数、群落组成(门和属水平)显著性差异用SPSS 21.0分析软件进行单因素方差分析,不同种植年限差异显著性采用Duncan法计算($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同连作年限对西红花种植土壤微生物多样性的影响 对于细菌,CC1Y、CC2Y、CC3Y、CC4Y分别获得2 665、

2 929、3 168、3 040个OTUs;对于真菌,CC1Y、CC2Y、CC3Y、CC4Y分别获得311、378、470、482个OTUs(表1);随着连作年限的延长,耕作土壤中细菌和真菌的OTUs数量总体呈现增加的趋势,说明连作使土壤中细菌和真菌的种类增加。对4个不同连作年限土壤细菌和真菌的alpha多样性进行统计分析,结果发现(表2),连续种植2、3、4年的西红花土壤Chao指数、ACE指数和Shannon指数均显著高于种植1年西红花土壤($P<0.05$),连续种植2、3、4年的西红花土壤Simpson指数高于种植1年西红花土壤。基于Bray-curtis距离的细菌和真菌PCoA分析结果(图1a)表明,不同连作年限西红花土壤微生物群落组成有显著差异(细菌 $R^2=0.77$, $P=0.001$,真菌 $R^2=0.56$, $P=0.002$)。同样基于Weighted-unifrac距离的NMDS分析结果(图1b)显示,连作显著驱动了西红花种植土壤中细菌和真菌微生物群落的变化(细菌 $R^2=0.73$, $P=0.001$,真菌 $R^2=0.60$, $P=0.002$)。

表1 不同连作年限西红花种植土壤细菌和真菌测序结果

Table 1 Sequencing results for bacteria and fungi in *C. sativus*-planting soil of different continuous cropping years

种类 Species	样本 Sample	Total tags	Singleton tags	OTUs
细菌 Bacteria	CC1Y	55 927±1 491 a	7 534±407 a	2 665±16 b
	CC2Y	57 005±878 a	8 572±1 585 a	2 929±108 a
	CC3Y	59 153±886 a	5 809±734 a	3 168±57 a
	CC4Y	58 894±1 459 a	5 931±565 a	3 040±71 a
真菌 Fungi	CC1Y	58 865±1 470 a	5 594±2 404 a	311±28 c
	CC2Y	53 209±1 847 bc	2 133±405 a	378±10 b
	CC3Y	51 219±916 c	4 749±2 477 a	470±10 a
	CC4Y	56 277±682 ab	2 593±493 a	482±24 a

注:同列不同小写字母表示同一种类不同样本之间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between samples of the same type ($P<0.05$).

2.2 不同连作年限西红花种植土壤微生物群落组成分析 细菌门水平上的丰度分析(图2a₁)表明,不同连作年限土壤中前5位的优势菌门相同,分别为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和浮霉菌门(Planctomycetes)。不同连作年限细菌丰度门水平的差异分析(表3)表明,种植4年的土壤中放线菌门(Actinobacteria)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的丰度低于种植1年、2年和3年;厚壁菌门(Firmicutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)在种植2年、3年和4年的土壤中高于种植1年的土壤。细菌属水平的丰度分析(图2b₁和表3)发现,*Gaiella*在种植4年的土壤中丰度显著低于种植1年、2年和3年($P<0.05$);芽生球菌属(*Blastococcus*)和土壤红色杆形菌属(*Solirubrobacter*)的丰度随着连作年限的增加呈现降低的趋势。

真菌群落门水平上的丰度分析(图2a₂)发现,子囊菌门(Ascomycota)在4个连作年限中均为第一大菌门(相对丰度 $>55\%$);4个连作年限真菌门水平上的丰度差异分析(表4)表明,土壤中毛霉菌门(Mucoromycota)的丰度随着西红花连作年限的增加而降低;担子菌门(Basidiomycota)在连作4年

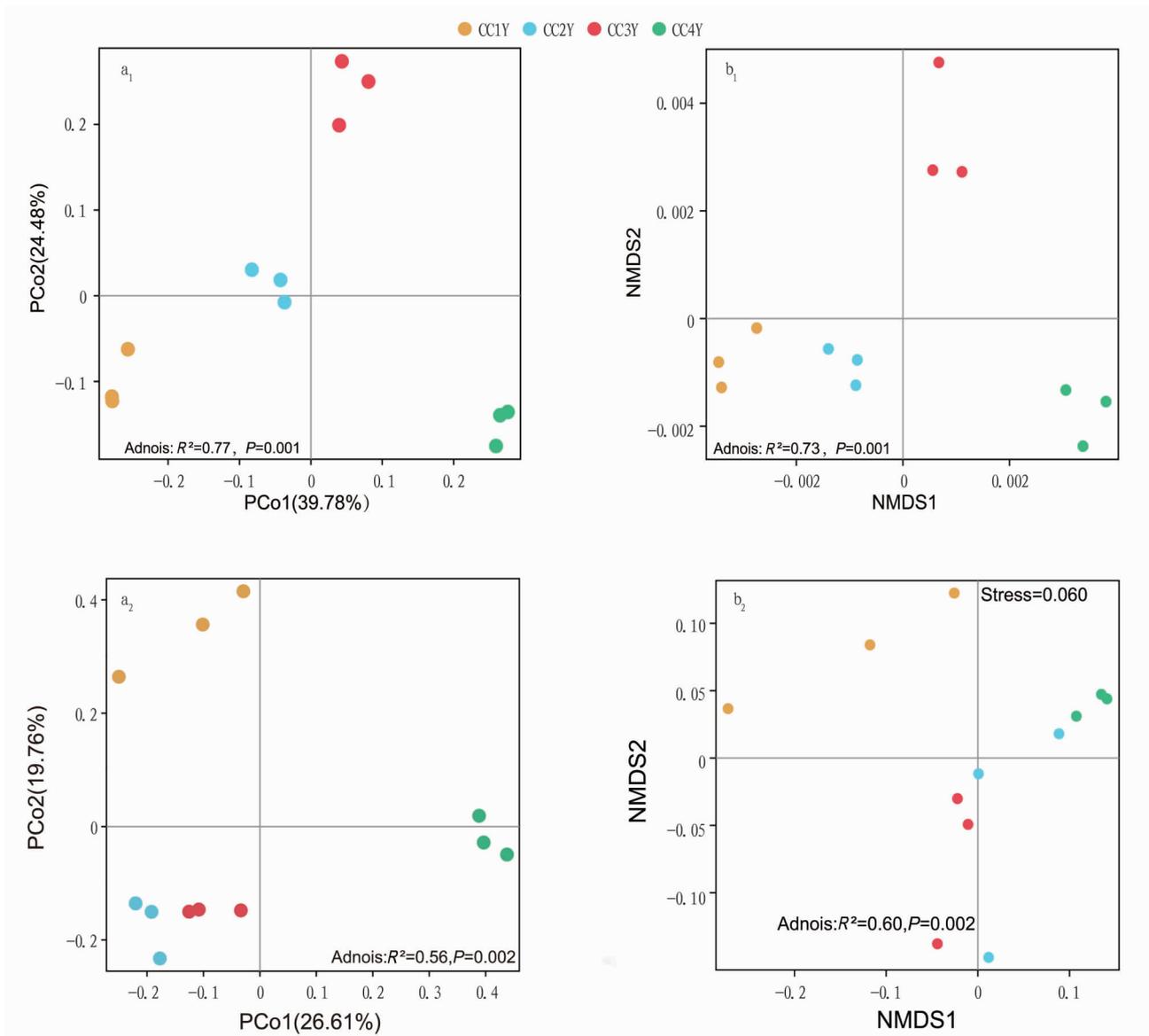
表 2 不同连作年限西红花种植土壤细菌和真菌多样性指数

Table 2 Diversity index of bacteria and fungi in *C.sativus*-planting soil of different continuous cropping years

种类 Species	样本 Sample	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Chao 指数 Chao index	ACE 指数 ACE index
细菌 Bacteria	CC1Y	9.480 0±0.046 2 c	0.995 8±0.000 3 b	2 927.294 3±34.625 6 b	2 919.468 6±29.231 8 b
	CC2Y	9.647 1±0.054 3 b	0.996 6±0.000 3 a	3 326.706 8±74.866 9 a	3 320.932 9±83.384 6 a
	CC3Y	9.776 3±0.058 1 ab	0.996 4±0.000 0 ab	3 473.053 1±94.950 2 a	3 467.092 2±81.360 1 a
	CC4Y	9.813 1±0.015 4 a	0.997 1±0.000 1 a	3 303.998 8±69.519 6 a	3 314.069 1±63.160 3 a
真菌 Fungi	CC1Y	5.513 6±0.229 3 c	0.930 6±0.018 7 b	320.701 2±25.238 2 c	320.759 3±26.162 8 c
	CC2Y	6.081 0±0.106 5 b	0.957 9±0.004 4 ab	391.407 0±13.726 7 b	388.773 0±11.490 0 b
	CC3Y	6.676 9±0.093 0 a	0.974 7±0.002 0 a	482.091 4±12.768 6 a	481.722 0±11.908 2 a
	CC4Y	6.439 7±0.067 7 ab	0.961 6±0.003 2 ab	493.060 2±23.286 9 a	490.232 6±23.931 0 a

注: 同列不同小写字母表示同一种类不同样本之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) between samples of the same type.

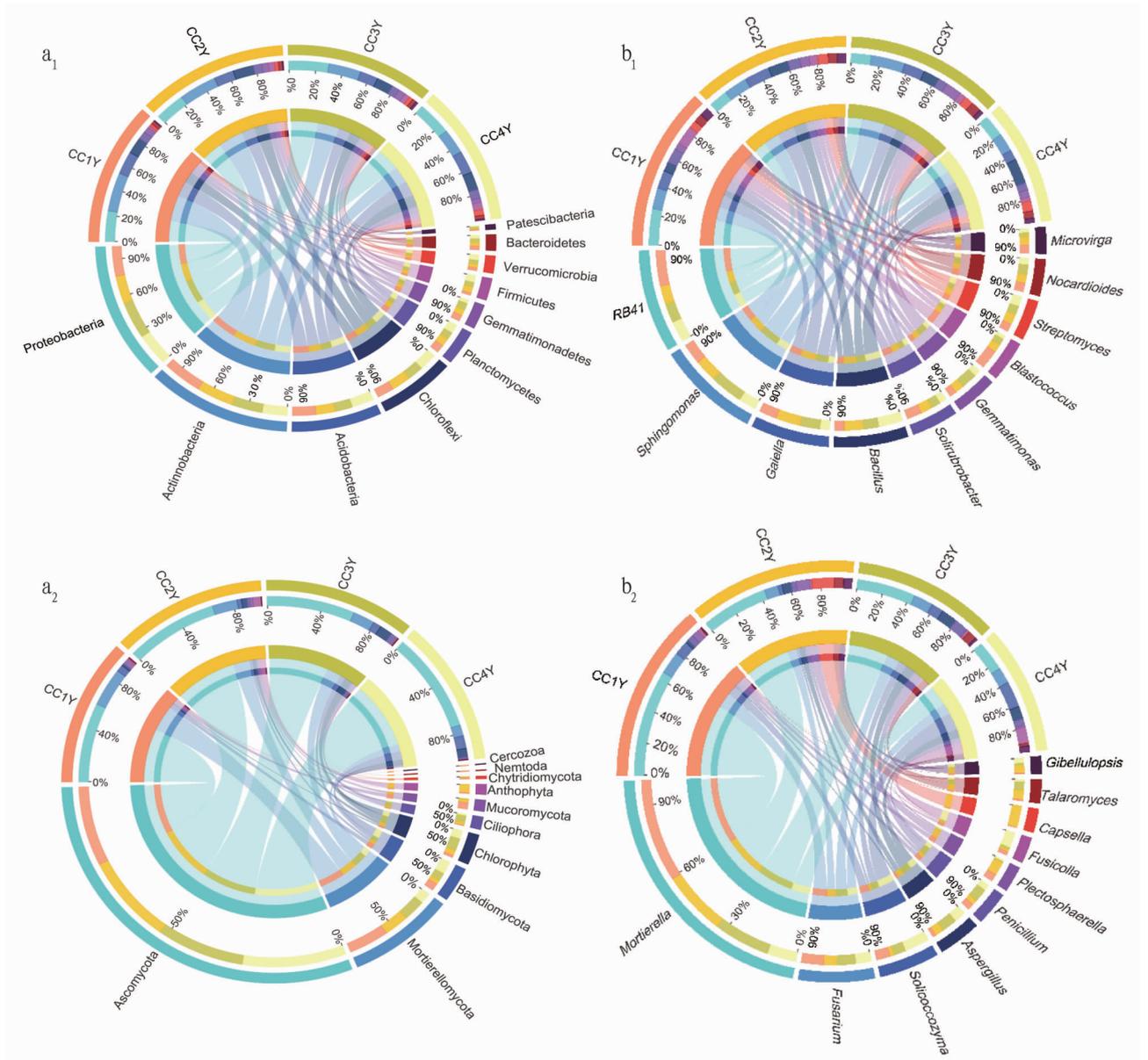


注: a₁、b₁ 为细菌; a₂、b₂ 为真菌。

Note: a₁ and b₁ are bacteria; a₂ and b₂ are fungi.

图 1 不同连作年限土壤微生物多样性基于 Bray-curtis 距离的 PCoA 分析 (a) 和基于 Weighted-unifrac 距离的 NMDS 分析 (b)

Fig.1 PCoA analysis of soil microorganisms diversity based on Bray curtis distance for different continuous cropping years (a) and NMDS analysis based on Weighted-unifrac distance (b)



注: a₁、b₁ 为细菌; a₂、b₂ 为真菌。

Note: a₁ and b₁ are bacteria; a₂ and b₂ are fungi.

图2 不同连作年限土壤中细菌和真菌在门(a)和属(b)水平上的丰度分析

Fig.2 Abundance analysis of bacteria and fungi in soil with non continuous cropping years at the phylum(a) and genus (b) levels

土壤中的丰度显著高于其他年限($P < 0.05$)。在属水平上,被孢霉属(*Mortierella*)为4个连作年限土壤中真菌的优势菌属(图2b₂);产油菌属(*Solicoccozyma*)在连作4年西红柿土壤中的丰度显著高于其他年限($P < 0.05$)(表4)。以上结果说明,随着西红柿种植年限的增加驱动了土壤中微生物群落组成的变化。

2.3 不同连作年限西红柿种植土壤细菌群落的 LEfSe 分析 对西红柿不同种植年限土壤微生物群落进行 LEfSe 分析,进一步筛选不同种植年限土壤中的生物标记物。通过细菌 LEfSe 分析共获得 63 个差异群落,其中连作 1 年、2 年、3 年、4 年分别为 11、13、14 和 25 个差异群落(图 3)。其中,放线菌门(Actinobacteria)、红色杆菌纲(Rubrobacteria)、红色杆菌目(Rubrobacterales)、弗兰克氏菌目(Frankiales)、红色杆菌

科(Rubrobacteriaceae)、黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、红色杆菌属(*Rubrobacter*)、芽球菌属(*Blastococcus*)等群落在连作 1 年的土壤中富集。酸微菌纲(Acidimicrobia)、绿弯菌纲(Chloroflexia)、梭状芽胞杆菌纲(Clostridia)、甲基球菌目(Methylococcales)、梭菌目(Clostridiales)、微球菌目(Micrococcales)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、间孢囊菌科(Intrasporangiaceae)、壤霉菌属(*Agromyces*)等群落在连作 2 年的土壤中富集。变形菌门(Proteobacteria)、索力氏菌纲(Solibacterales)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、红环菌科(Rhodocyclaceae)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、褚氏杆菌属(*Chujaiibacter*)、芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)等群落在连作 3 年的土壤中富集。疣微菌门(Verrucomicrobia)、厚壁菌门(Firmicutes)、棒状杆菌目

(Rokubacteria)、疣微菌纲 (Verrucomicrobiae)、浮霉菌纲 (Planctomycetacia)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、纤线杆菌纲 (Ktedonobacteria)、酸杆菌目 (Acidobacteriales)、纤线杆菌目 (Ktedonobacteriales)、芽孢杆菌目 (Bacillales)、芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 等群落在连作 4 年的土壤中富集。

2.4 不同连作年限西红柿种植土壤真菌群落的 LEfSe 分析 通过真菌 LEfSe 分析共获得 42 个生物标记物,其中连作 1 年、2 年、3 年、4 年分别为 12、7、12 和 11 个生物标记物(图 4)。毛霉门 (Mucoromycota)、被孢霉门 (Mortierellomycota)、毛霉纲 (Mucoromycetes)、被孢霉纲 (Mortierellomycetes)、被孢霉目 (Mortierellales)、毛霉菌目 (Mucorales)、根霉科 (Rhizopodaceae)、被孢霉科 (Mortierellaceae)、根霉属 (*Rhizopus*)、被

孢霉属 (*Mortierella*) 在连作 1 年的土壤中富集。锥毛壳目 (Coniochaetales)、锥毛壳科 (Coniochaetaceae) 等群落在连作 2 年的土壤中富集。纤毛亚门 (Ciliophora)、旋毛纲 (Spirotrichea)、酵母菌纲 (Saccharomycetes)、座囊菌纲 (Dothideomycetes)、格孢腔菌目 (Pleosporales)、散毛目 (Sporadotrichida)、双足囊菌科 (Dipodasaceae)、地霉属 (*Geotrichum*) 等群落在连作 3 年的土壤中富集。担子菌门 (Basidiomycota)、盘菌纲 (Pezizomycetes)、银耳纲 (Tremellomycetes)、丝黑粉菌目 (Fiolbasidiales)、盘菌目 (Pezizales)、微囊菌目 (Microascales)、小囊菌科 (Microascaceae)、粪壳菌科 (Sordariaceae)、产油菌属 (*Solicoccozyma*) 等群落在连作 4 年的土壤中富集。

表 3 不同连作年限土壤细菌门和属水平具有显著差异的群落

Table 3 Bacterial communities with significant differences at phyla and genera level in *C.sativus*-planting soil of different continuous cropping years

样本 Sample	门 Phylum						
	Actinobacteria	Proteobacteria	Chloroflexi	Gemmatimonadetes	Firmicutes	Verrucomicrobia	Patescibacteria
CC1Y	28.37±0.55 a	22.35±1.09 b	11.86±0.41 b	4.40±0.29 a	1.62±0.31 b	1.98±0.11 c	0.47±0.16 b
CC2Y	26.46±2.40 ab	21.22±0.30 b	14.13±0.17 a	4.48±0.34 a	4.43±0.61 a	2.76±0.24 b	0.51±0.07 b
CC3Y	22.51±1.91 bc	27.96±2.30 a	11.53±0.76 b	5.20±0.64 a	3.66±0.40 ab	2.86±0.19 b	1.42±0.05 a
CC4Y	18.15±0.60 c	24.46±1.03 ab	13.03±0.75 ab	2.88±0.10 b	5.42±1.20 a	4.25±0.22 a	0.77±0.11 b
P 值 P value	0.008	0.037	0.047	0.019	0.030	0.000	0.001
样本 Sample	属 Genus						
	<i>Sphingomonas</i>	<i>RB41</i>	<i>Gaiella</i>	<i>Gemmatimonas</i>	<i>Solirubrobacter</i>	<i>Blastococcus</i>	<i>Ellin6067</i>
CC1Y	2.48±0.14 b	4.33±0.40 a	2.12±0.20 a	0.78±0.09 b	1.76±0.05 a	2.30±0.25 a	0.51±0.06 b
CC2Y	2.77±0.21 b	2.24±0.59 b	2.97±0.25 a	1.13±0.06 b	1.43±0.21 ab	1.01±0.16 b	0.50±0.22 b
CC3Y	4.00±0.38 a	2.35±0.40 b	2.43±0.50 a	1.89±0.32 a	1.11±0.11 bc	0.79±0.08 b	0.84±0.14 a
CC4Y	2.17±0.11 b	2.59±0.15 b	1.19±0.01 b	0.83±0.06 b	0.89±0.02 c	0.48±0.01 b	0.52±0.06 b
P 值 P value	0.003	0.024	0.012	0.007	0.005	0.000	0.041

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

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

表 4 不同连作年限土壤真菌门和属水平具有显著差异的群落

Table 4 Fungal communities with significant differences at phyla and genera level in *C.sativus*-planting soil of different continuous cropping years

样本 Sample	门 Phylum				属 Genus	
	Basidiomycota	Chlorophyta	Ciliophora	Mucoromycota	<i>Solicoccozyma</i>	<i>Gibellulopsis</i>
CC1Y	4.88±0.48 b	1.47±0.49 c	0.20±0.16 b	4.47±1.48 a	3.63±0.22 b	0.12±0.10 b
CC2Y	3.05±0.44 b	3.66±0.21 c	1.80±0.11 b	2.14±0.43 ab	1.03±0.08 c	2.04±0.29 a
CC3Y	5.61±0.50 b	8.75±1.25 a	4.88±1.22 a	0.42±0.19 b	3.14±0.48 b	0.54±0.18 b
CC4Y	12.09±1.51 a	6.29±0.11 b	1.22±0.55 b	0.17±0.05 b	6.70±1.16 a	1.47±0.32 a
P 值 P value	0.006	0.000	0.006	0.016	0.002	0.002

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

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

2.5 不同连作年限西红柿种植土壤细菌和真菌群落的网络结构分析 细菌共发生网络分析(图 5A 和表 5)表明,细菌共发生网络中的网络直径、平均路径长度、中间中心性和度中心性拓扑特征指数在连续种植 4 年的西红柿土壤中高于种植 1 年、连续种植 2 年和连续种植 3 年的西红柿土壤;细菌共发生网络中的群落数量随着连续种植年限的增加呈现持续递减的趋势;细菌共发生网络中的节点数目、边条数目和正相关条数目在连续种植 4 年的西红柿土壤中均低于种植 1 年、连续种植 2 年和连续种植 3 年的西红柿土壤。真菌共发生网络分析(图 5B 和表 5)表明,连续种植 4 年的西红柿土壤中的网络节点数目高于种植 1 年、连续种植 2 年和连

续种植 3 年的西红柿土壤;真菌共发生网络中正相关条数目,在第 1 年种植西红柿的土壤中远高于连续种植 2 年、3 年和 4 年的西红柿土壤;真菌共发生网络中的网络直径和平均路径长度在第 1 年种植西红柿的土壤中低于连续种植 2 年、3 年和 4 年的西红柿土壤。以上结果表明,西红柿不同连作年限的土壤中细菌和真菌群落呈现不同的连接模式。

3 结论与讨论

土壤微生物多样性在保持土壤健康和品质中起关键作用,同时可作为土壤健康的一个重要的生物学指标^[21]。在该研究中连续种植 3 年和 4 年的西红柿种植土壤中真菌多样性指数 Shannon、Simpson、Chao 和 ACE 指数高于连续种植

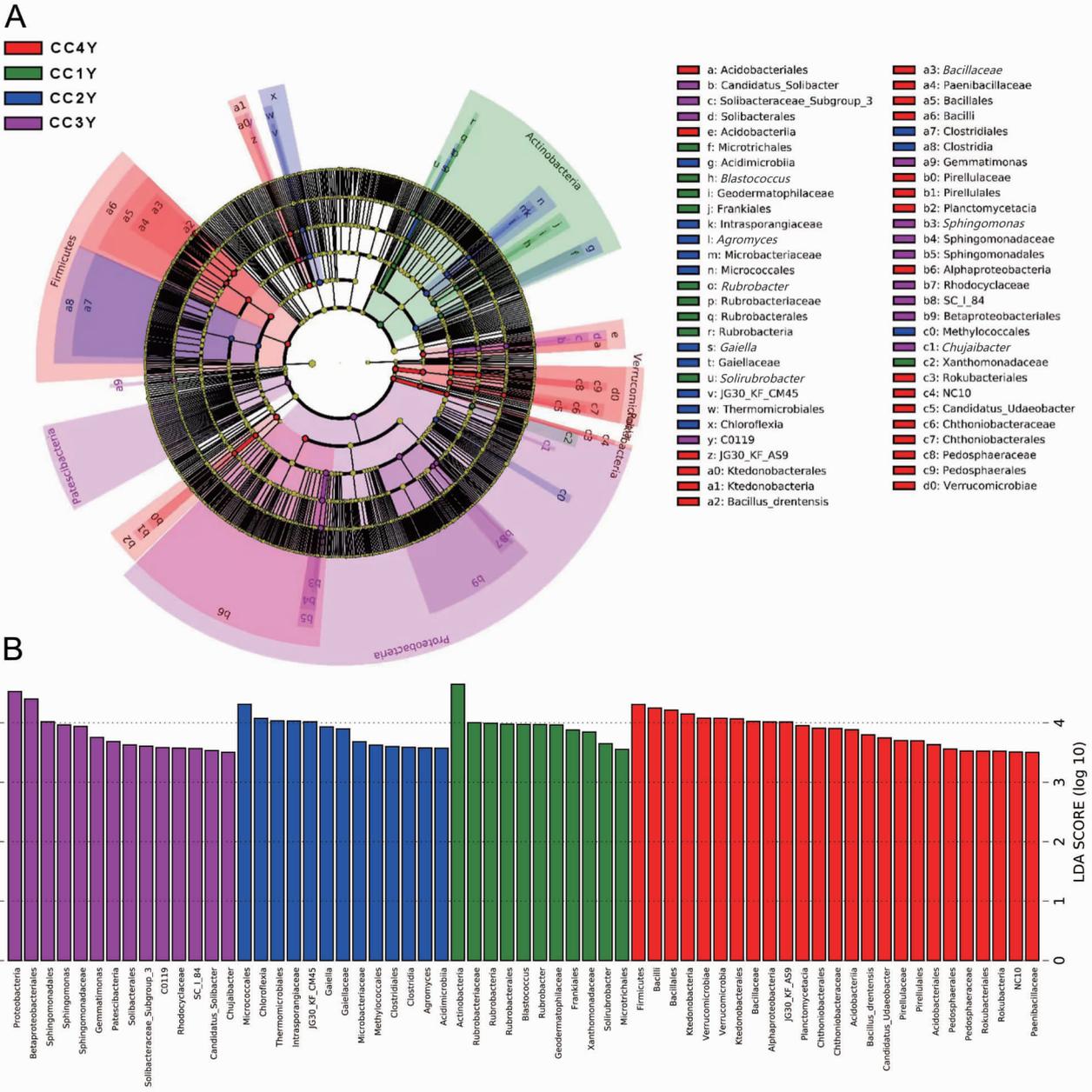


图3 西红花不同种植年限细菌群落的 LefSe 多级物种层级树图(A)和 LDA 判别柱状图(B) (LDA 值 > 3.5 且 $P < 0.05$)

Fig.3 LefSe multilevel species hierarchical tree diagram(A) and LDA discriminant bar chart of bacterial communities in *C. sativus*-planting soil of different continuous cropping year

1年和2年的土壤;随着连作年限的增加土壤中真菌 OTUs 的数据呈现增加的趋势。Dong 等^[22]研究表明,药用植物西洋参随着连作年限的增加,耕作土壤中的真菌多样性呈现增加的趋势。另外, Dong 等^[23]研究表明,在三七的连作体系中,土壤微生物中真菌多样性与三七死苗率密切相关。该研究土壤中真菌多样性随着西红花连作年限的增加呈现增加的趋势,说明西红花连作改变了土壤的微生态环境,与西红花连作障碍的发生有一定的关联。

连作体系改变了土壤微生物群落的组成,从而影响土壤的健康和质量^[24]。该研究中不同连作年限西红花种植土壤细菌群落组成具有明显差异。放线菌门(Actinobacteria)的丰度随着种植年限的增加呈现降低的趋势。芽单胞菌门

(Gemmatimonadetes)的丰度在连作4年的土壤中显著低于连作1年、2年和3年。该研究中随着连作年限的增加,有益菌放线菌门和芽单胞菌门的丰度呈降低趋势,推测有益菌丰度的降低,使得土壤抵抗性降低,土壤中病原菌数量增加,从而造成西红花连作障碍。

该研究中通过网络分析探究不同连作年限西红花种植土壤中微生物群落的互作模式。细菌网络的某些拓扑性质,例如节点数目、边条数目、正相关条数目、群落数量等,随着连作年限增加呈现降低的趋势。真菌网络中的正相关条数目在连作2、3、4年的土壤中少于连作1年的土壤,网络直径和平均路径长度在连作2、3、4年的土壤中大于连作1年的土壤。Lax 等^[25]研究表明,土壤微生物中高度的网络连接可

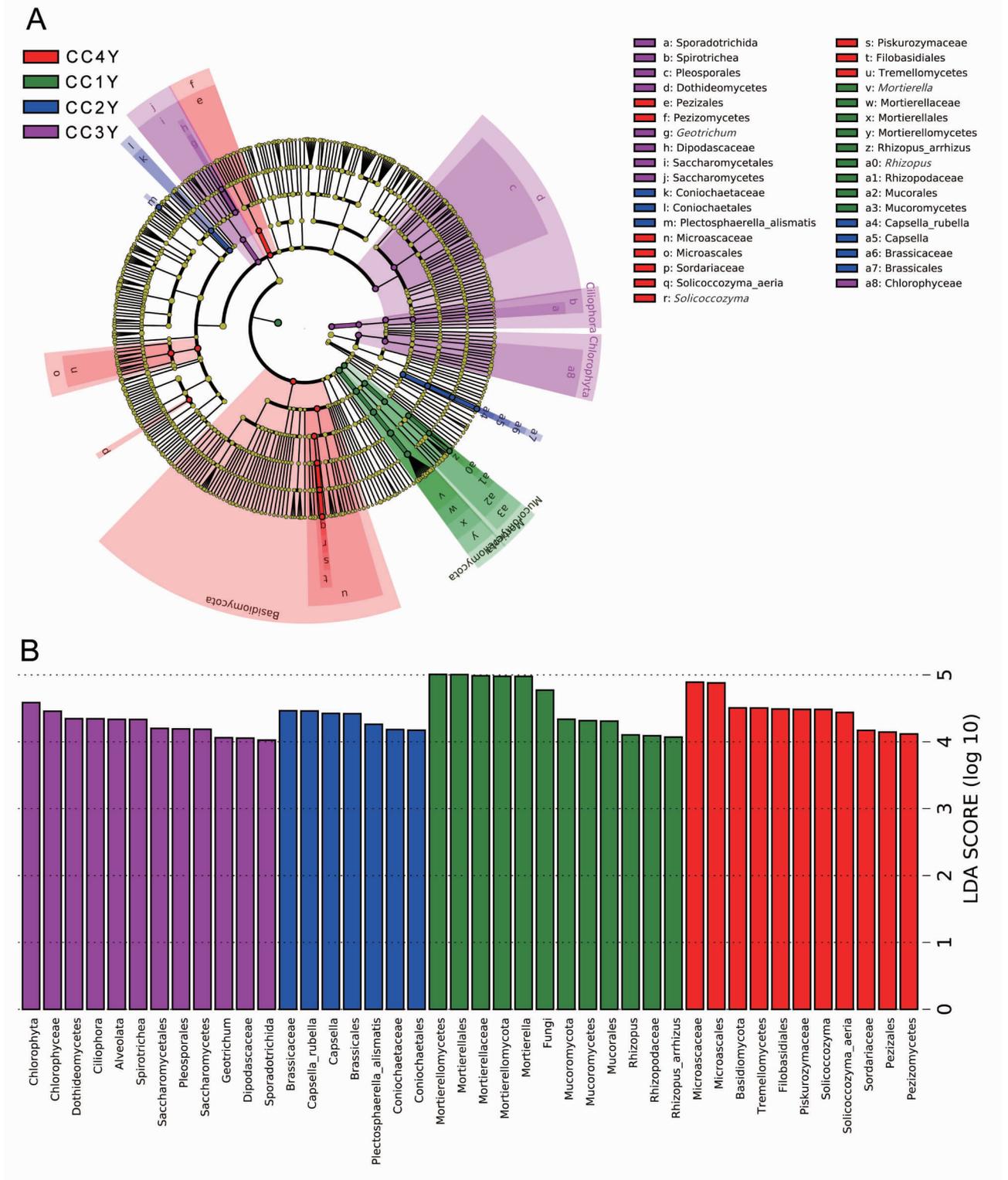
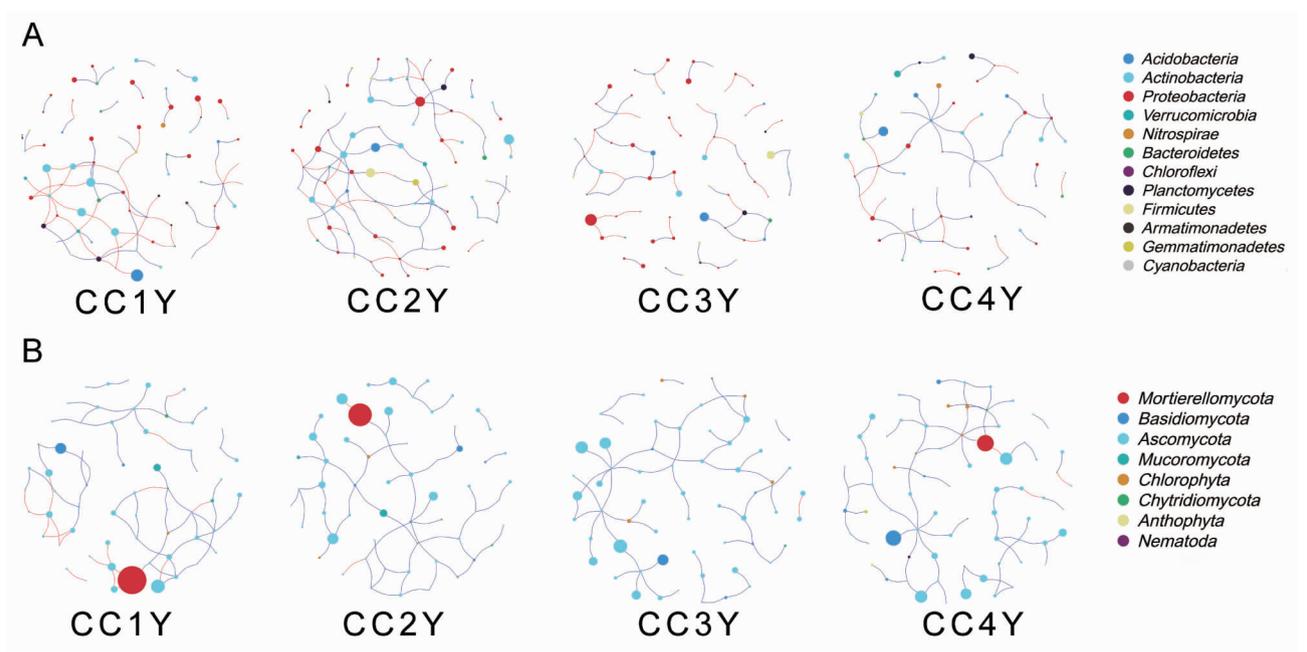


图4 西红柿不同种植年限真菌群落的 LEfSe 多级物种层级树图(A)和 LDA 判别柱状图(B) (LDA 值> 4.0 且 $P < 0.05$)

Fig.4 LEfSe multilevel species hierarchical tree diagram (A) and LDA discriminant bar chart of fungal communities in *C. sativus*-planting soil of different continuous cropping year

以启动植物免疫系统,加速激活抵御病原菌。该研究中随着连作年限的增加,土壤中细菌和真菌的网络连接呈现降低的趋势,推测随着西红柿连作年限的增加,土壤中微生物群落间的连接度降低,导致抵抗病原菌的能力降低,从而造成连作障碍的原因之一。

该研究运用高通量测序技术分析西红柿不同连作年限土壤中细菌和真菌微生物群落的多样性、组成以及网络结构的差异,从土壤微生物的角度,为西红柿连作障碍的机制及问题的解决提供理论依据。



注:链接线表示较强的相关性(SparCC, $|\rho| > 0.7, P < 0.05$)。红色线代表正相关,蓝色线代表负相关。每一个点代表一个属,点的大小与属的丰度成正比。不同颜色的节点代表不同的门。

Note:A connection indicates a strong correlation(SparCC, $|\rho| > 0.7, P < 0.05$).Red edges represent positive correlation,while blue edges represent negative correlation.Nodes are colored at phylum level,and the size of node is proportional to the relative abundance of each genus.

图 5 不同连作年限西红花种植土壤细菌属(A)和真菌属(B)群落共发生网络分析

Fig.5 Co-occurrence network analysis of bacterial genus(A) and fungal genus(B) communities in *C.sativus*-planting soil of different continuous cropping years

表 5 不同连作年限西红花种植土壤细菌和真菌共发生网络分析的拓扑特性

Table 5 Topological properties of co-occurring bacterial and fungal networks in *C.sativus*-planting soil of different continuous cropping years

细菌 Bacteria												
样本 Sample	节点数目 Number of nodes	边条数目 Number of edges	正相关条数目 Positive edges	负相关条数目 Negative edges	模块性 Modularity	群落数量 Number of communities	网络直径 Network diameter	平均路径长度 Average path length	平均度 Average degree	密度 Density	中间中心性 Betweenness centrality	度中心性 Degree centrality
CC1Y	80	77	38	39	0.72	21	7	3.40	1.93	0.02	0.04	0.06
CC2Y	88	92	21	71	0.69	19	8	3.92	2.09	0.02	0.05	0.03
CC3Y	71	59	22	37	0.86	16	9	3.06	1.66	0.02	0.03	0.03
CC4Y	61	56	13	43	0.77	12	14	5.95	1.84	0.03	0.26	0.09
真菌 Fungi												
样本 Sample	节点数目 Number of nodes	边条数目 Number of edges	正相关条数目 Positive edges	负相关条数目 Negative edges	模块性 Modularity	群落数量 Number of communities	网络直径 Network diameter	平均路径长度 Average path length	平均度 Average degree	密度 Density	中间中心性 Betweenness centrality	度中心性 Degree centrality
CC1Y	67	73	18	55	0.73	13	8	3.41	2.18	0.03	0.04	0.04
CC2Y	58	58	2	56	0.68	13	15	6.18	2.00	0.04	0.29	0.05
CC3Y	63	59	1	58	0.75	10	11	4.55	1.87	0.03	0.21	0.08
CC4Y	72	72	3	69	0.74	10	14	5.72	2.00	0.03	0.24	0.07

参考文献

[1] 张家豪,陆洁淼,丁钰婷,等.西红花根际可培养细菌菌群结构、多样性及分布规律[J].中草药,2022,53(8):2499-2505.

[2] 刘兵兵,董艳,姚冲,等.中国西红花的资源开发研究概况[J].中国现代应用药学,2022,39(13):1783-1788.

[3] 秦小钢,魏鸿雁,徐静,等.产地及采收期对西红花有效成分含量的影响研究[J].时珍国医国药,2022,33(12):3022-3025.

[4] SIDDIQUI M J,SALEH M S M,BASHARUDDIN S N B B, et al.Saffron (*Crocus sativus* L.): As an antidepressant [J].Journal of pharmacy & bioallied sciences,2018,10(4):173-180.

[5] BUKHARI S I,MANZOOR M,DHAR M K.A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids [J].Biomedicine & pharmacotherapy,2018,98:733-745.

[6] MENIA M,IQBAL S,ZAHIDA R, et al.Production technology of Saffron for enhancing productivity[J].Journal of pharmacognos and phytochem,2018,7(1):1033-1039.

[7] ANDREOTE F D,DE CÁSSIA PEREIRA E SILVA M.Microbial communities associated with plants: Learning from nature to apply it in agriculture [J].Current opinion in microbiology,2017,37:29-34.

机酸含量偏高而糖类化合物含量偏低,同时外观质量指标得分与化学成分含量间存在较强相关性,可根据实际需求进行共性或个性化的化学成分调节,以提高非优质烟叶内在品质。

参考文献

- [1] 陈斌,徐玮杰,王超,等.商业烟叶收购等级质量与工业认可度比较研究[J].中国烟草学报,2022,28(1):108-114.
- [2] 黄浩,谢晋,苏绍,等.二次分选对云南烟叶等级质量和均质化复烤加工的影响[J].安徽农业科学,2022,50(6):157-160.
- [3] 王树林,李志伟,兰刚,等.基于均质化加工需求的原烟精选研究与应用[J].安徽农学通报,2023,29(5):125-128,171.
- [4] 卫盼盼,吴晓梅,安银立,等.精细化分选对打叶复烤均质化加工的影响[J].江西农业学报,2023,35(7):14-19.
- [5] 郝捷,季婧,李力群,等.生物酶和微生物技术改善烟叶香气的研究进展[J].生物技术进展,2022,12(6):817-824.
- [6] 张莉,纪铭阳,胡宗玉,等.基于随机森林和逻辑回归分类模型的烟叶精选品控指标筛选[J].江苏农业科学,2020,48(3):214-217.
- [7] 张书伟,张子颖,过伟民,等.“黄金叶”品牌河南烟叶工业分选方法建立与应用[J].烟草科技,2022,55(7):73-82.
- [8] 卫盼盼,马建勋,安银立,等.基于烤烟分级因素的工业分选因素创建及应用[J].中南农业科学,2023,44(6):135-139.
- [9] 陈健,蔡宪杰,郭文,等.西南部清甜香型产区烤烟外观特征及其与常规化学成分和感官质量的关系分析[J].烟草科技,2020,53(8):7-14.
- [10] 蔡宪杰,左伟标,郭文,等.黄淮部分焦甜焦香型产区烤烟外观特征及其与常规化学成分和感官质量的关系[J].烟草科技,2020,53(11):23-29.
- [11] 郭文,左伟标,蔡宪杰,等.武陵秦巴部分醇甜香型产区烤烟外观特征及其与常规化学成分和感官品质的关系[J].烟草科技,2021,54(6):30-36.
- [12] 袁文彬,陈楨禄,严锦申,等.清甜香型产区上部烟叶主要化学成分与外观质量的关系研究[J].江西农业学报,2023,35(1):28-35.
- [13] 闫克玉,张家荣,周小忠,等.河南烤烟(40级)氮组分含量及规律性研究[J].烟草科技,1998,31(5):4-6.
- [14] 闫克玉,李兴波,李成刚,等.河南烤烟(40级)挥发碱含量及其规律性研究[J].郑州轻工业学院学报,1997,12(2):81-85.
- [15] 闫克玉,李兴波,屈剑波,等.河南烤烟(40级)水溶性总糖和还原糖含量及其相关性研究[J].郑州轻工业学院学报,1997,12(4):42-47.
- [16] 闫克玉,李兴波,李成刚,等.烤烟国家标准(40级)河南烟叶水浸液pH值、总酸度和总挥发酸含量的研究[J].烟草科技,1997,30(4):16-18.
- [17] 闫克玉,李兴波,侯雅珍,等.河南烤烟(40级)石油醚提取物含量的研究[J].郑州轻工业学院学报,1995,10(1):71-75.
- [18] 冯丽婷,徐杰,闫克玉,等.河南烤烟(40级)酚类物质含量及规律性研究[J].烟草科技,1999,32(1):22-24.
- [19] 董惠忠,毕艳玖,赵晓华,等.基于致香成分的上部烟叶和中部烟叶分类判别[J].上海大学学报(自然科学版),2019,25(2):309-316.
- [20] 于洁,蔡振波,高扬,等.烟叶中糖类物质含量及产地特性[J].济南大学学报(自然科学版),2022,36(1):108-114.
- [21] 张恒,徐文韬,张子颖,等.不同生态区影响烤烟上部烟叶感官品质的关键外观指标[J].烟草科技,2023,56(1):24-32.
- [22] 刘峰峰,董世良,王波,等.烤烟油分与烟叶内在质量的关系的研究[J].武汉理工大学学报,2019,41(12):45-50.
- [23] 徐兴阳,尹平,李跃平,等.三类烤坏烟叶主要化学成分及其协调性的变化趋势[J].山地农业生物学报,2012,31(2):99-102.
- [24] 肖振杰,周艳宾,徐增汉,等.黔南烤坏烟与正常烟叶主要化学成分含量差异[J].中国烟草科学,2014,35(3):74-78.
- [25] 孟霖,杨秀军,管仕栓,等.翠碧一号不同外观特征烟叶内在质量分析[J].中国烟草科学,2023,44(1):85-91.
- [26] 季舜华,苏明亮,张焱,等.不同叶片结构烤烟化学成分的差异[J].烟草科技,2022,55(9):57-64.
- [27] 韦克苏,涂永高,宋泽民,等.贵州不同油分烟叶化学成分的差异[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2013,39(5):453-457.
- [8] GARBEVA P, VAN VEEN J A, VAN ELSAS J D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness [J]. Annual review of phytopathology, 2004, 42: 243-270.
- [9] LI M Z, CHEN Z J, QIAN J, et al. Composition and function of rhizosphere microbiome of *Panax notoginseng* with discrepant yields [J]. Chinese medicine, 2020, 15(1): 1-12.
- [10] DONG L L, XU J, ZHANG L J, et al. Rhizospheric microbial communities are driven by *Panax ginseng* at different growth stages and biocontrol bacteria alleviates replanting mortality [J]. Acta pharmaceutica sinica B, 2018, 8(2): 272-282.
- [11] WU L K, WANG J Y, HUANG W M, et al. Plant-microbe rhizosphere interactions mediated by *Rehmannia glutinosa* root exudates under consecutive monoculture [J]. Scientific reports, 2015, 5: 1-12.
- [12] JIANG J H, SONG Z, YANG X T, et al. Microbial community analysis of apple rhizosphere around Bohai Gulf [J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 1-9.
- [13] GUO M J, WU F H, HAO G G, et al. *Bacillus subtilis* improves immunity and disease resistance in rabbits [J]. Frontiers in immunology, 2017, 8: 1-13.
- [14] YIN Y N, WANG J L. Predictive functional profiling of microbial communities in fermentative hydrogen production system using PICRUSt [J]. International journal of hydrogen energy, 2021, 46(5): 3716-3725.
- [15] SHI Y, YANG Q Y, ZHAO Q H, et al. *Aureobasidium pullulans* S-2 reduced the disease incidence of tomato by influencing the postharvest microbiome during storage [J]. Postharvest biology and technology, 2022, 185: 1-8.
- [16] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [17] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [18] ANKENBRAND M J, KELLER A, WOLF M, et al. ITS2 database V: Twice as much [J]. Molecular biology and evolution, 2015, 32(11): 3030-3032.
- [19] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic acids research, 2013, 41: D590-D596.
- [20] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome biology, 2011, 12(6): 1-18.
- [21] HE J Z, ZHENG Y, CHEN C R, et al. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches [J]. Journal of soils and sediment, 2008, 8(5): 349-358.
- [22] DONG L L, XU J, ZHANG L J, et al. High-throughput sequencing technology reveals that continuous cropping of *American ginseng* results in changes in the microbial community in arable soil [J]. Chinese medicine, 2017, 12: 1-11.
- [23] DONG L L, XU J, FENG G Q, et al. Soil bacterial and fungal community dynamics in relation to *Panax notoginseng* death rate in a continuous cropping system [J]. Scientific reports, 2016, 6(1): 1-11.
- [24] 张英英,魏玉杰,杨宪忠,等.药用植物连作障碍形成机理研究进展[J].现代农业科技,2023(3):87-91.
- [25] LAX S, SMITH D P, HAMPTON-MARCELL J, et al. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment [J]. Science, 2014, 345(6200): 1048-1052.

(上接第144页)