

烤烟连作对根际土壤微生物群落多样性及网络结构的影响^①

沈嘉¹, 周初跃², 汪季涛², 邹先常³, 李兰周³, 尹浩³, 朱一帆², 夏浩¹, 姜超强¹,
祖朝龙¹, 马文广^{3*}

(1 安徽省农业科学院经济作物研究所, 合肥 230031; 2 安徽中烟工业有限责任公司, 合肥 230000; 3 云南省烟草公司丽江市公司, 云南丽江 674100)

摘要: 为探明烤烟连作对土壤理化性质、微生物群落多样性的影响, 明确导致连作障碍的主要因子, 在云南省丽江烟区采集连作和非连作烟田根际土, 测定土壤养分、酶活性和微生物多样性, 比较分析其细菌和真菌群落多样性和网络结构的差异, 通过偏最小二乘法(PLS)分析土壤理化性质、微生物群落与烟株生长的关系。结果表明: 与非连作相比, 连作烤烟烟株株高和地上部鲜物质量降低 50.27% 和 71.09%($P<0.01$); 土壤 pH 降低 0.45 个单位($P<0.05$), 有效磷、速效钾和电导率分别增加 129.66%($P<0.05$)、40.90%($P<0.05$)和 132.74%($P<0.01$); 土壤脲酶活性升高($P<0.05$), 酸性磷酸酶活性降低($P<0.05$); 土壤细菌群落 Shannon 指数和系统发育多样性(PD)指数降低($P<0.05$), 真菌群落 ACE 指数、Shannon 指数和 PD 指数升高($P<0.05$); 马红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌(*Streptomyces*)、纤维弧菌(*Cellvibrio*)等细菌和 *Cyphelophora*、赤霉菌(*Gibberella*)、*Ceratostidaceae*、韦特菌(*Waitea*)等真菌呈现富集趋势。共现网络分析表明, 与非连作烤烟相比, 连作烤烟根际土壤微生物网络更复杂, 有更高的模块化和更紧密的连接, 细菌之间的竞争作用增强, 真菌之间的竞争作用减弱。PLS 分析表明, 土壤有效磷对微生物群落有显著的正向影响, 电导率对微生物群落有显著的负向影响, 微生物群落变化是烟田土壤连作障碍产生的主要原因。

关键词: 烤烟; 连作障碍; 土壤理化性质; 微生物多样性; 网络分析

中图分类号: S154.1 文献标志码: A

Effects of Flue-cured Tobacco Continuous Cropping on Microbial Community Diversity and Co-occurrence Network in Rhizosphere Soil

SHEN Jia¹, ZHOU Chuyue², WANG Jitao², TAI Xianchang³, LI Lanzhou³, YIN Hao³, ZHU Yifan², XIA Hao¹, JIANG Chaoqiang¹, ZU Chaolong¹, MA Wenguang^{3*}

(1 Industrial Crop Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2 Anhui China Tobacco Industry Corporation, Hefei 230000, China; 3 Yunnan Tobacco Company Lijiang Company, Lijiang, Yunan 674100, China)

Abstract: To explore the effects of continuous planting of flue-cured tobacco on soil physicochemical properties and microbial community diversity, and to identify the main factors leading to continuous cropping obstacles, rhizosphere soils of continuous cropping (CCO) and non-continuous cropping tobacco fields (NOR) in Lijiang of Yunnan Province were collected. Soil nutrients, enzyme activities and microbial diversity were measured, and the differences in bacterial and fungal community diversities and network structures between CCO and NOR soils were analyzed. The relationship between soil physicochemical properties, microbial communities and tobacco plant growth was analyzed by partial least squares (PLS) model. The results showed that the plant height and fresh weight of CCO was significantly reduced by 50.27% and 71.09% compared with NOR. The available phosphorus, potassium and conductivity of CCO soil increased by 129.66%, 40.90% and 132.74%, respectively, and soil urease activity increased significantly, but soil pH decreased by 0.45 units, and acid phosphatase activity decreased significantly. The bacterial community showed a significant decrease in Shannon and phylogenetic diversity (PD) indexes, whereas fungal community displayed significant increases in ACE, Shannon, and PD indexes. Bacteria and fungi such as *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Cellvibrio*, *Cyphelophora*, *Gibberella*, *Ceratostidaceae*, and *Waitea* were enriched. Co-occurrence network

①基金项目: 安徽中烟工业有限责任公司科技项目(2022136)和安徽中烟基地技术服务项目(2023340000340030)资助。

* 通信作者(2570315899@qq.com)

作者简介: 沈嘉(1982—), 男, 安徽马鞍山人, 博士, 副研究员, 主要从事烟草栽培生理研究。E-mail: shenjia0000@126.com

analysis indicated that CCO soil microbial network had higher modularity and tighter connection, and the competition between bacteria was enhanced, while the competition between fungi was weakened. PLS analysis showed that soil available phosphorus had a significant positive effect on microbial community, while soil conductivity had a significant negative effect. The change of microbial community was the main reason for the obstacle of continuous cropping in tobacco field.

Key words: Flue-cured tobacco; Continuous cropping obstacles; Soil physicochemical properties; Microbial diversity; Network analysis

连作障碍是指在同一地块连续多茬种植同种或同科作物后，植物病虫害加重、长势变弱、产量和质量下降的现象^[1]。连作障碍由两个因素驱动：①生物因素，包括土壤病原菌积累和微生物群落组成变化；②非生物因素，包括土壤养分失衡和植物根系分泌物的自身毒性等^[2-3]。土壤微生物对许多过程至关重要，包括有机质周转、矿物营养循环、土壤结构维护和毒素降解^[4]，并且能提高植物抗逆性和(或)抑制病原体，被称为植物的第二基因组^[5]，因此土壤健康取决于微生物群落及其功能的多样性^[6]。植物长期连作为有害微生物提供了适宜的生长繁殖环境，造成了有害微生物的快速生长，阻碍了本土有益微生物群落的生存发展，打破了微生物群落间的动态平衡，进而影响作物生长^[7-8]。

烟草是我国重要的经济作物，在全国范围内广泛种植。在云南、贵州、四川等以山地烟田为主的产区，由于种植区域集中、土地资源紧张，烟草重茬连作情况较为普遍，土壤得不到有效轮作或休养，产生连作障碍^[9]。据报道，连作会导致烟草产量降低 20% ~ 100%，给地域经济和农民效益带来巨大影响^[10]。烤烟长期连作会改变烟田微生物群落多样性和组成结构，导致病原菌积累，增加土传病害发生风险；同时，土壤 pH、全氮、硝态氮、有效磷等也会发生改变^[11-12]。Li 等^[4]报道，连续种植 8~30 年烤烟，土壤速效氮、有效磷、速效钾和有机质明显富集。Yan 等^[13]和 Wang 等^[8]研究表明，随着连作年限的增加，烟田土壤细菌群落多样性降低，而真菌群落的丰度和多样性增加。Yu 等^[6]研究表明，土壤中变形菌门、拟杆菌门和芽孢杆菌门的相对丰度随着连作年限的增加而降低，生物多样性指数随连作年限增加而下降。刘艳霞等^[14]研究表明，连作烟草根系分泌的酚酸类化学物质会导致病原菌数量显著提高，土壤根际微生物多样性和结构平衡性降低，拮抗菌、固氮菌、无机磷细菌、硅酸盐细菌等的数量显著减少。Jia 等^[15]开展不同酚酸对烤烟化感作用的研究，发现外源香豆酸显著降低土壤 pH，并使土壤微生物群落从以细菌为主转变为以真菌为主，表现出最强的直接化感作用。

微生物在土壤中存在复杂的相互作用，并参与形成生态网络^[16]。基于高通量测序技术，利用网络分析可揭示这种复杂的相互关系，能够为群落结构研究提供新的见解^[17]。尽管大量研究表明烤烟连作会影响土壤理化性质、微生物群落结构，但对土壤理化性质、酶活性与微生物群落的网络拓扑特征关联性研究较少。本研究以云南丽江烟区连作和非连作烟田为研究对象，分析两类烟田在土壤化学性质、酶活性、根际土壤微生物群落结构等方面差异，并通过共现性网络、偏最小二乘法(PLS)等方法分析根际微生物群落结构、土壤化学指标等与烟草连作障碍的关系，为探索消减烟草连作障碍的有效方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2021 年在丽江市古城区七河镇木光灿村开展。选取非连作障碍烟田和连作障碍烟田各 9 块。非连作障碍烟田选取标准为：①首次种植烤烟，传统种植玉米、油菜、大麦等当地主要作物，施肥、管理和收获均按当地传统方式进行；②烟株长势正常，整齐度好，无明显病虫害。连作障碍烟田选取标准为：①连续种植烤烟 8 年以上；②烟株移栽后生长缓慢，植株明显矮小，生物量低，无明显病虫害。两类田块在相对集中区域内随机选取，土壤类型均为当地典型红壤，烤烟品种为云烟 87，肥料用量均按照当地烤烟生产推荐量，具体为：N 85.50 kg/hm², P₂O₅ 102.60 kg/hm², K₂O 299.25 kg/hm²。其他农艺措施、田间管理技术均按当地标准生产技术进行。

1.2 采样方法

在烤烟圆顶期进行样品采集。每块田随机选取 5 株烟，参照 YC/T 142—2010《烟草农艺性状调查测量方法》^[18]测定烟株农艺性状，随后将烟株和根系整株挖出，采用抖根法采集根际土^[19]。每块田中 5 株烟的根际土混合为 1 个样品。每个土壤样本挑出细根后分为 2 份，一份立即放入干冰保存，用于高通量测序；另一份 4 ℃保存，用于测定土壤理化指标和土壤酶活性。

1.3 土壤理化指标和酶活性测定

土壤理化性质测定参照《土壤农化分析》^[20], 其中, pH(土水质量比1:5)采用pH计测定, 电导率(土水质量比1:5)采用电导率仪测定, 有机质采用重铬酸钾容量法测定, 碱解氮采用扩散吸收法测定, 有效磷采用钼锑抗比色法测定, 速效钾采用火焰光度法测定。

土壤蔗糖酶采用3, 5-二硝基水杨酸比色法测定^[21], 脲酶采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定, 过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法测定, 磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法测定^[22]。

1.4 土壤微生物总DNA提取与文库构建

土壤微生物的提取与文库构建均在上海美吉生物科技有限公司进行。对细菌16S V3~V4特异性可变区进行扩增, 上游引物为338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 下游引物为806R: 5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3'。对真菌ITS1~ITS2区域进行扩增, 上游引物为ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', 下游引物为ITS2R: 5'-GCT GCGTTCTTCATCGATGC-3'。测序仪为Illumina PE300。

1.5 高通量测序数据分析

数据分析在美吉生物云上完成。通过fastp(v0.19.6)软件对原始数据进行质控, 使用FLASH(v1.2.7)进行拼接。后续使用QIIME2(Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2)软件^[23]进行分析(使用DATA2降噪), 得到扩增序列变体(amplicon sequence variants, ASV)。使用Naive Bayes分类器, 并分别基于SILVA和UNITE数据库, 对细菌和真

菌的代表序列进行物种注释。利用mothur-1.30和R软件对AVS表格进行群落 α 多样性和 β 多样性分析。数据分析主要涉及的R程序包有: stat、vegan、devtools、phyloseq、ade4、dplyr、magrittr、indicspecies; 图形输出主要涉及程序包为ggplot2。使用ggClusterNet包进行网络分析, 去除一些低丰度ASV(ASV至少出现在6个样本中, 并且具有至少10个序列), 采用spearman相关系数, 筛选有效边的标准为: $|r|>0.6$ 且 $P<0.05$, 计算网络图的 Z_i 和 P_i 值(模块化算法为Cluster fast greedy^[24]), 并将节点划分为4类(外围节点(peripherals, $Z_i \leq 2.5$, $P_i \leq 0.62$)、连接节点(connectors, $Z_i \leq 2.5$, $P_i > 0.62$)、模块核心节点(module hubs, $Z_i > 2.5$, $P_i \leq 0.62$)和网络核心节点(network hubs, $Z_i > 2.5$, $P_i > 0.62$)。

1.6 数据处理

使用SPSS 23.0进行t检验, 采用GraphPad Prism 8作图。利用SmartPLS 3将土壤理化指标、烤烟株高和LEfSe分析中筛选出的种水平的生物标志物(biomarker)进行PCA降维后的PC1指标(代表微生物群落)进行偏最小二乘法(PLS)建模, 建模的所有数据均经过log转换。采用自助法计算参数, 以SRMR<0.8为模型接受标准。

2 结果与分析

2.1 烤烟农艺性状

如表1所示, 连作烤烟株高、地上部鲜物质量和最大叶长比非连作烤烟显著降低50.27%($P<0.01$)、71.09%($P<0.01$)和11.78%($P<0.05$), 叶片数、茎围和最大叶宽没有显著差异。

表1 烤烟农艺性状
Table 1 Agronomic traits of flue-cured tobacco

烟田	株高(cm)	叶片数	茎围(cm)	最大叶长(cm)	最大叶宽(cm)	地上部鲜物质量(kg)
非连作	128.03 ± 8.89	18.07 ± 0.21	9.65 ± 1.48	78.70 ± 0.52	26.07 ± 4.28	2.11 ± 0.23
连作	63.67 ± 8.02 ^{**}	19.07 ± 0.61	8.67 ± 0.45	69.43 ± 4.93 [*]	24.73 ± 6.04	0.61 ± 0.65 ^{**}

注: *、**分别表示经t检验差异达 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 显著水平, 下同。

2.2 根际土壤理化性质和酶活性

根际土壤理化性质如表2所示。与非连作相比, 连作烤烟根际土壤pH显著降低7.34%($P<0.05$), 有效磷、速效钾含量及电导率显著提高129.66%、40.90%($P<0.05$)和132.74%($P<0.01$), 速效氮和有机质含量无显著差异。土壤酶活性如图1所示, 连作烤烟根际土壤脲酶活性显著高于非连作烤烟根际土壤($P<0.05$), 酸性磷酸酶活性则显著降低($P<0.05$), 过

氧化氢酶和蔗糖酶活性与非连作烤烟根际土壤无显著差异。

2.3 根际土壤微生物群落结构

通过高通量测序对两种烤烟根际土细菌群落结构进行描述, 非连作烤烟根际土有5 053条细菌ASVs, 连作烤烟根际土有5 346条细菌ASVs。共鉴定出34个门、762个属, 其中放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)、Acidobacteriota菌门、绿弯菌

门(*Chloroflexi*)和*Gemmatimonadota* 菌门在两种根际土壤中是排名前 5 的细菌优势类群(图 2A)。维恩图结果

(图 2C)显示,两种烤烟根际土共有 2 747 条相同的细菌 ASVs, 非连作烤烟根际土特有 2 306 条细菌 ASVs。

表 2 根际土壤理化性质
Table 2 Physicochemical properties of rhizosphere soils

烟田	pH	有机质(g/kg)	碱解氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)	电导率(μS/cm)
非连作	6.13 ± 0.12	45.20 ± 1.60	116.00 ± 10.61	32.43 ± 4.58	1 251.47 ± 103.12	279.33 ± 53.02
连作	5.68 ± 0.13*	43.50 ± 0.20	105.03 ± 8.87	74.48 ± 2.31*	1 763.37 ± 169.82*	650.11 ± 71.04**

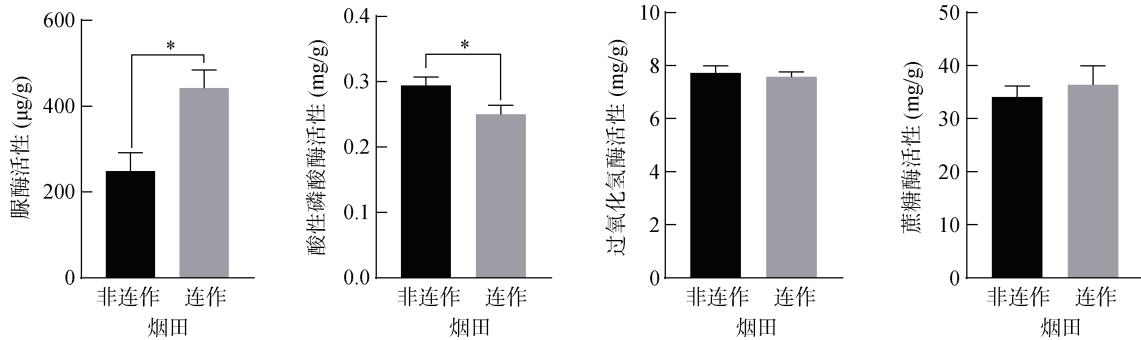
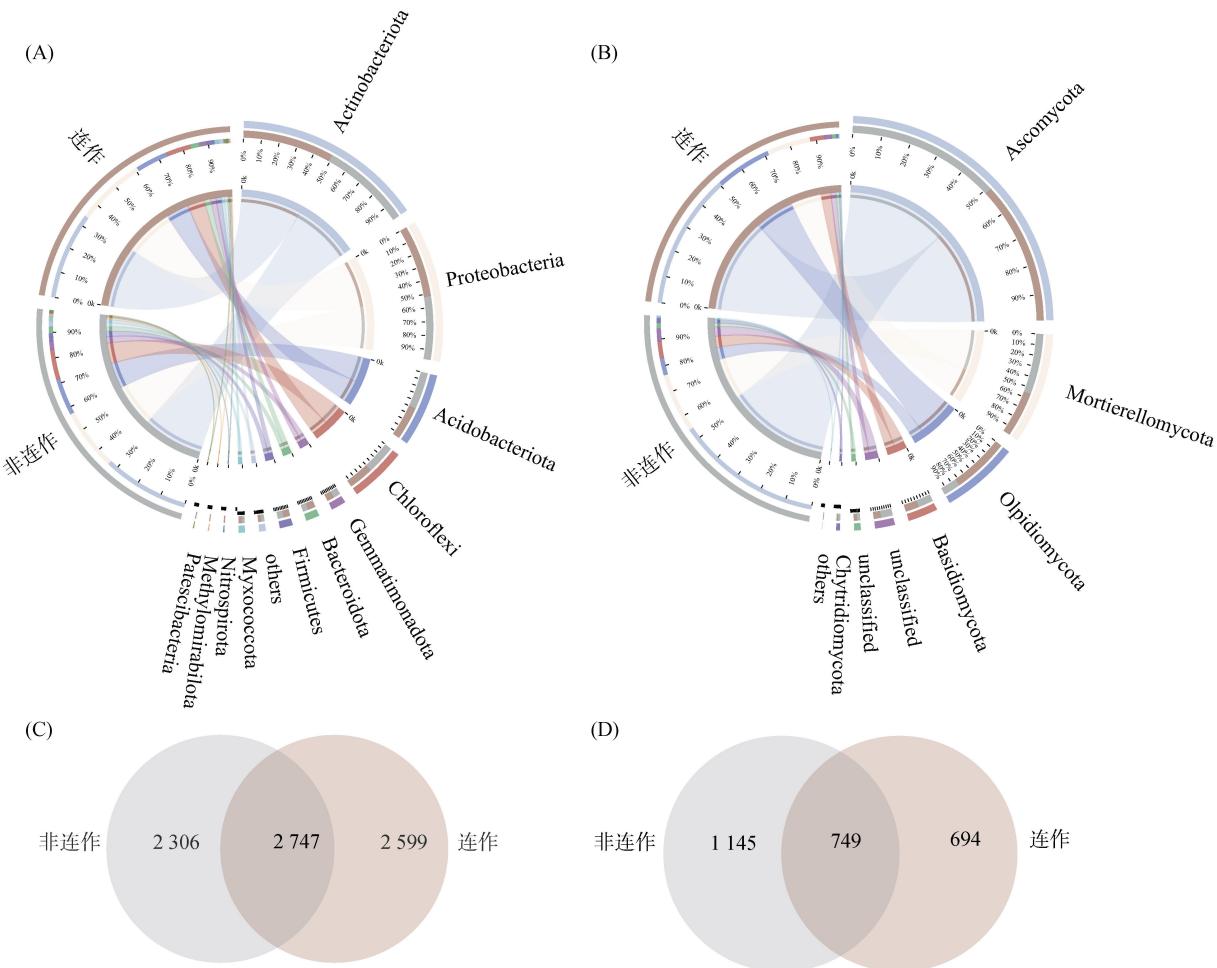


图 1 根际土壤酶活性
Fig. 1 Enzyme activities of rhizosphere soils



(A: 细菌门水平群落结构; B: 真菌门水平群落结构; C: 细菌 ASVs 水平维恩图; D: 真菌 ASVs 水平维恩图)

图 2 根际土壤微生物群落结构与共(独)有物种数目

Fig. 2 Microbial community structures and numbers of common (unique) species of rhizosphere soils

两种烤烟根际土壤真菌群落分别有1 894条真菌ASVs(非连作烤烟)和1 443条真菌ASVs(连作烤烟)。真菌共鉴定出14个门、505个属,其中子囊菌门(Ascomycota)、毛霉菌门(Mortierellomycota)、壶菌门(Olpidiomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和未鉴定出的真菌门,是排名前5的真菌优势类群(图2B)。维恩图结果(图2D)表明,两种烤烟根际土共有749条相同的真菌ASVs,非连作烤烟根际土特有1 145条真菌ASVs,连作烤烟根际土特有694条真菌ASVs。

2.4 根际土壤微生物多样性

与非连作烤烟相比,连作烤烟根际土壤细菌群落Shannon指数和PD指数显著降低($P<0.05$,表3)。Shannon指数降低表明细菌群落多样性、丰富度和均匀度降低,PD指数降低表明细菌物种间的进化历史更简单,进化距离更短。真菌群落ACE、Shannon指数和PD指数显著升高,表明真菌物种多样性、丰富度、均匀度升高,物种间进化历史更加丰富,进化距离更大。基于Bray-Curtis距离的非限制性主坐标轴分析(PCoA)表明两种烤烟根际土壤样本在第一主

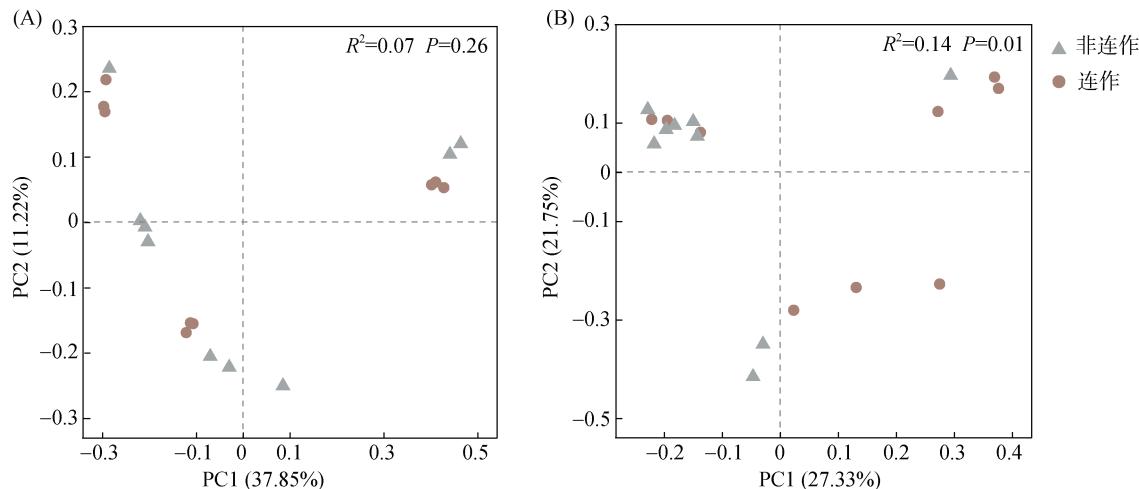
轴显著分离($P<0.05$,图3)。

2.5 根际土壤微生物LEfSe分析

为了提供更多根际土壤微生物群落信息,使用LEfSe(Linear discriminant analysis Effect Size)分析来识别非连作根际土和连作根际土中从门到属水平差异丰度分类群(图4)。分析结果显示,非连作根际土中有40个细菌分类学支系和27个真菌分类学支系表现出更大相对丰度,连作根际土中有81个细菌分类学支系和29个真菌分类学支系表现出更大相对丰度。在科水平上,非连作根际土中有诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、拜叶林克氏菌科(Beijerinckiaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)和细胞弧菌科(Cellvibrionaceae)等细菌和长喙霉科(Ceratocystidaceae)、黄丝菌科(Cephalothecaceae)和油壶菌科(Olpidiaceae)等真菌富集。在属水平上,马红球菌属(Rhodococcus)、链霉菌(Streptomyces)、纤维弧菌(Cellvibrio)等细菌和Cyphellophora、赤霉菌(Gibberella)、Ceratocystidaceae、韦特菌(Waitea)等真菌在连作根际土中富集。

表3 根际土壤微生物多样性指数
Table 3 Microbial diversity indexes of rhizosphere soils

微生物	烟田	ACE	Shannon	Shannon even	PD
细菌(16S)	非连作	1 285.04 ± 94.85	6.74 ± 0.09	0.942 4 ± 0.006 0	105.01 ± 5.24
	连作	1 189.81 ± 81.47	6.64 ± 0.06*	0.938 7 ± 0.004 4	98.10 ± 3.94*
真菌(ITS)	非连作	413.27 ± 28.09	3.99 ± 0.31	0.662 4 ± 0.048 4	102.32 ± 3.99
	连作	465.76 ± 44.89*	4.31 ± 0.23*	0.702 2 ± 0.033 9	115.8 ± 12.65*



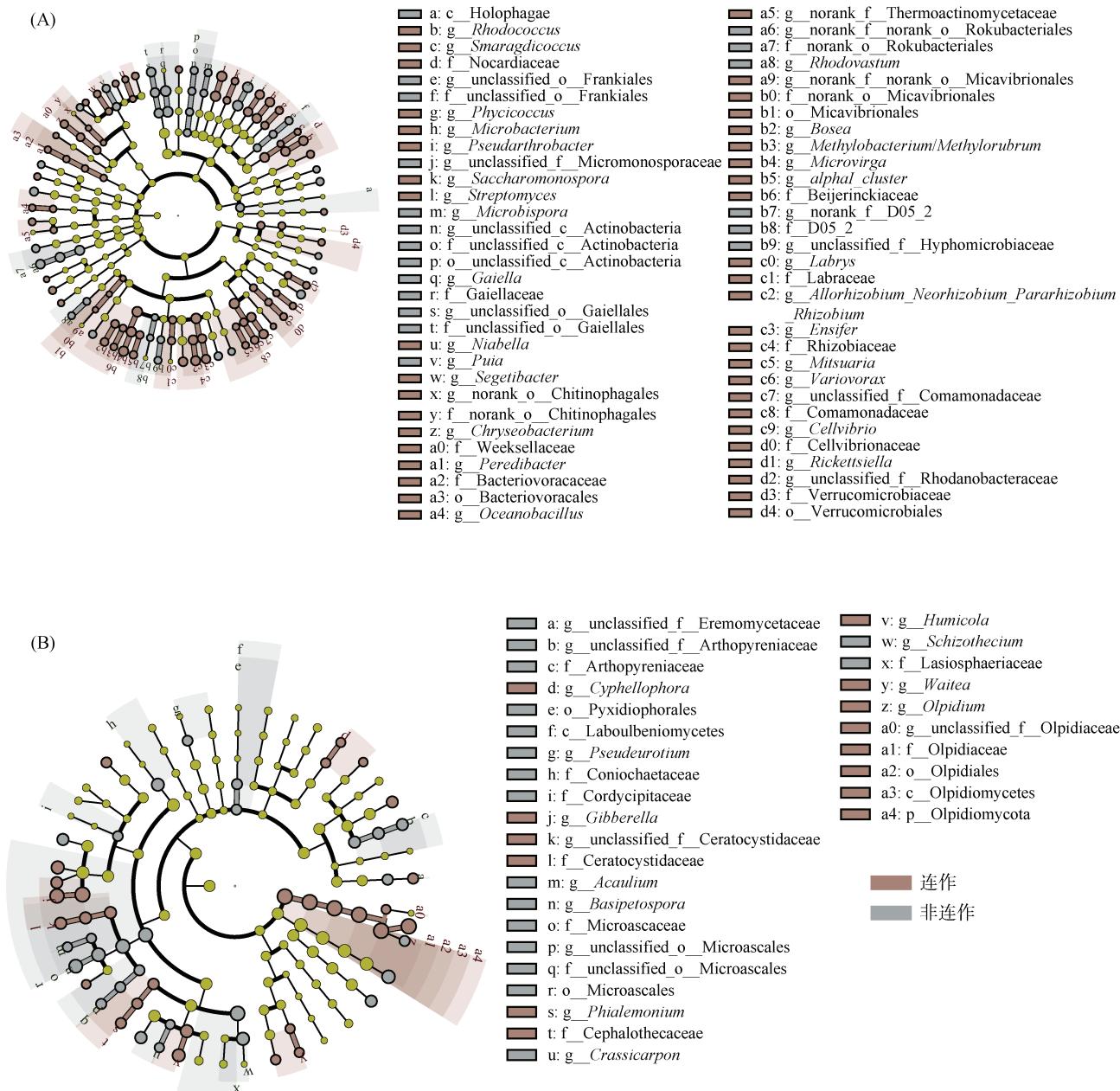
(A: 细菌 β 多样性; B: 真菌 β 多样性。PERMANOVA采用Adonis函数置换检验,置换999次)

图3 根际土壤微生物多样性PCoA分析
Fig. 3 PCoA analysis of rhizosphere soil microbial diversities

2.6 土壤微生物的共现性网络分析

构建共现性网络比较两种烤烟根际土壤细菌和真菌群落的差异(图5A、5B)。对于细菌网络,连作

烤烟和非连作烤烟的边数分别为9 231和1 429,节点数分别为380和322(表4)。连作烤烟有64个节点归于连接节点(图5C),而非连作烤烟仅有14个节点



(A: 细菌; B: 真菌。差异物种进化分支图, 由内至外辐射的圆圈代表了由界至种的分类级别。在不同分类级别的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类, 小圆圈直径大小与相对丰度大小成正比。无显著差异的物种统一着色为黄色, 差异物种跟随组进行着色, 灰节点表示在非连作障碍根际土组别中起到重要作用的微生物类群, 红节点表示在连作障碍根际土组别中起到重要作用的微生物类群)

图 4 根际土壤微生物的 LEfSe 分析
Fig. 4 LEfSe analysis of rhizosphere soil microorganisms

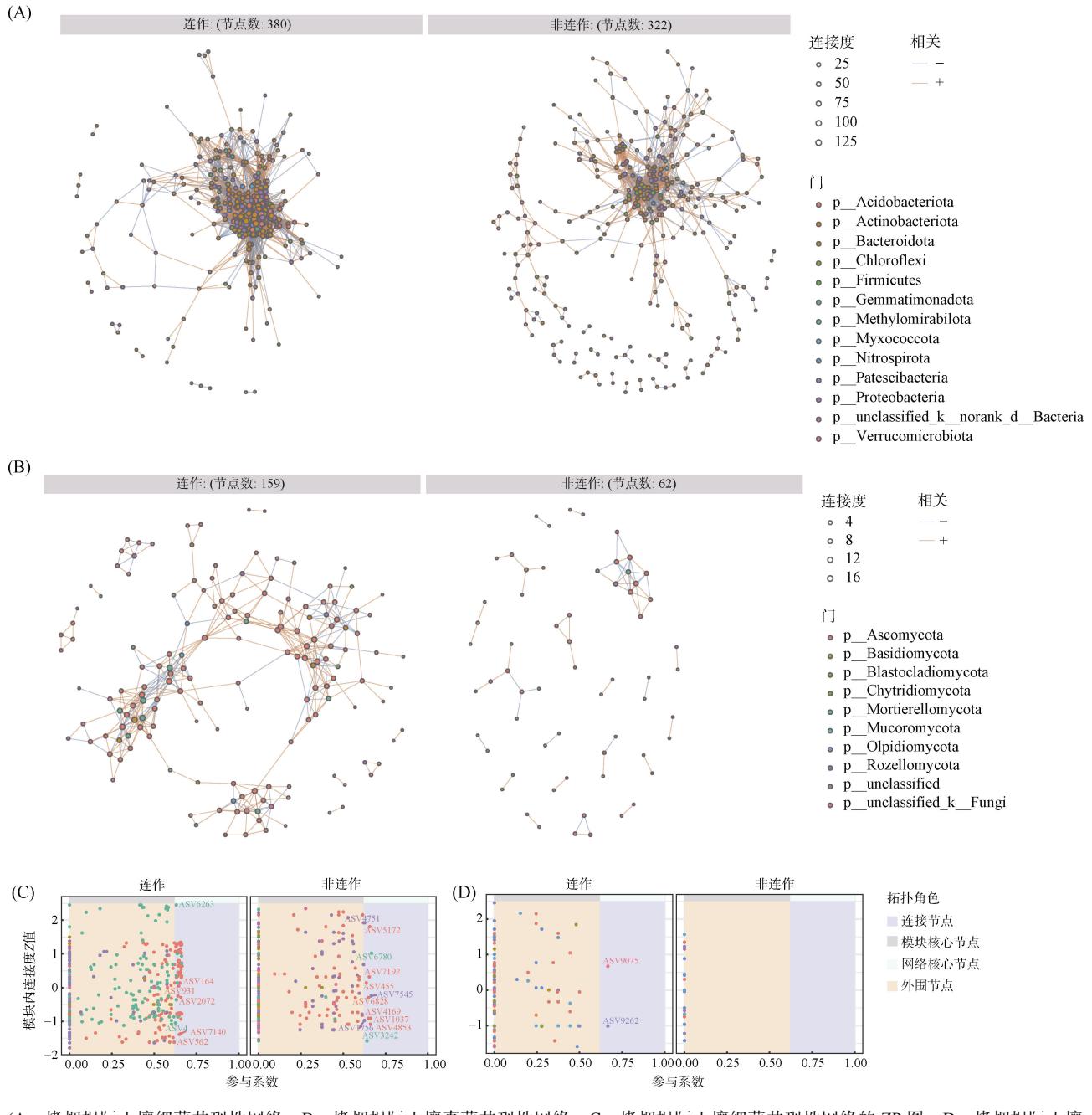
归属为连接节点。与非连作烤烟相比, 连作烤烟的负边比例、连通度、平均邻居数、聚类系数和相对模块性分别提高 23.68%、333.33%、447.07%、20.83% 和 163.64%, 网络直径降低 8.92。

对于真菌网络, 连作烤烟和非连作烤烟的边数分别为 436 和 62, 节点数分别为 159 和 62(表 4)。连作烤烟有 2 个节点归于连接节点(图 5D), 而非连作烤烟中归属为连接节点的节点数为 0。与非连作烤烟相

比, 连作烤烟的平均邻居数、网络直径和相对模块性分别提高 174%、142.97% 和 405.88%, 负边比例降低 25.64%。

2.7 偏最小二乘模型(PLS)分析

以 LEfSe 分析中筛选出的种水平的生物标志物进行 PCA 降维后的 PC1 指标代表微生物群落, 将 PC1 指标与土壤化学指标、烤烟株高进行偏最小二乘法(PLS)建模, 进一步分析土壤理化指标、微生物与连



(A: 烤烟根际土壤细菌共现性网络; B: 烤烟根际土壤真菌共现性网络; C: 烤烟根际土壤细菌共现性网络的 ZP 图; D: 烤烟根际土壤真菌共现性网络的 ZP 图。C 和 D 中的节点依据 Z_i 和 P_i 值分为 4 类: 外围节点 ($Z_i \leq 2.5$, $P_i \leq 0.62$)、连接节点 ($Z_i \leq 2.5$, $P_i > 0.62$)、模块核心节点 ($Z_i > 2.5$, $P_i \leq 0.62$) 和网络核心节点 ($Z_i > 2.5$, $P_i > 0.62$))

图 5 根际土壤微生物的共现性网络
Fig. 5 Co-occurrence networks of rhizosphere soil microorganisms

作障碍之间的关系(图 6)。结果表明, 土壤有效磷对微生物群落有显著的正向影响, 影响路径系数为 0.489, T 值为 1.756; 土壤电导率对微生物群落有显著的负向影响, 影响路径系数为 -0.501, T 值为 1.971。土壤微生物群落对烤烟株高有显著正向影响, 影响路径系数为 0.557, T 值为 5.015。

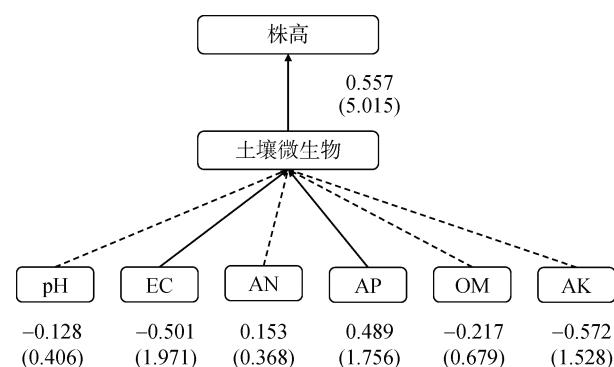
3 讨论

3.1 连作对烟田土壤理化指标和酶活性的影响

烟草是不耐连作的作物。晋艳等^[25]研究表明, 连作的烟株在旺长期和现蕾期的株高、田间叶面积系数均低于轮作烟草, 圆顶期的株高、茎围、节距、叶

表 4 共现性网络拓扑性质
Table 4 Properties of co-occurrence network topology

拓扑性质	细菌		真菌	
	连作	非连作	连作	非连作
边数	9 231	1 429	436	62
负边比例	0.47	0.38	0.29	0.39
节点数	380	322	159	62
连通度	0.13	0.03	0.03	0.03
平均邻居数	48.58	8.88	5.48	2.00
平均路径长度	2.36	4.94	4.42	1.52
网络直径	8.60	17.52	9.16	3.77
聚类系数	0.58	0.48	0.51	0.52
相对模块性	1.16	0.44	0.86	0.17



(EC: 电导率; AN: 碱解氮; AP: 有效磷; AK: 速效钾; OM: 有机质。实线表示 $P < 0.05$; 虚线表示 $P > 0.05$; 数字为路径系数, 括号内数字为 T 值)

图 6 土壤理化指标对土壤微生物群落和烤烟株高影响的 PLS 模型

Fig. 6 PLS model of effects of soil physiochemical properties on soil microbial community and flue-cured tobacco plant height

面积系数等较轮作都有不同程度的下降。本试验选择的两类烟田烟株长势差异明显, 烤烟连作田块在圆顶期株高、地上部鲜物质量和叶片大小显著低于非连作烤烟(表 1), 表明在丽江烟区, 连续种植烟草会产生连作障碍, 导致烟叶产量、烟农效益降低, 与晋艳等^[25]研究结果基本一致。

烟草长期连作后土壤养分失衡和理化性状恶化是影响植株生长的原因之一^[26]。有研究认为, 连作障碍土壤 pH、全氮、有机质、有效磷、速效钾和速效氮下降^[8, 27-28]。但李序进等^[29]研究表明, 百合连作土壤中的有机质、全氮、全磷、速效氮、有效磷含量随连作时间增加呈增加趋势, 可见不同作物连作对土壤理化性质影响不同。本研究发现, 在丽江烟区, 连作烟田烟株根际土的有效磷、速效钾含量分别增加 129.66% 和 40.90%, 土壤电导率升高, pH 下降。张科等^[30]研究同样发现, 连作 6 年后, 烟田土壤有效磷和速效钾含量分别从 13.33 mg/kg 和 233.09 mg/kg

增至 17.54 mg/kg 和 285.19 mg/kg。据调查, 丽江烟区种植烟草时, K_2O 和 P_2O_5 用量一般为 $255 \text{ kg}/\text{hm}^2$ 和 $105 \text{ kg}/\text{hm}^2$, 高于玉米(P_2O_5 60~90 kg/hm^2 、 K_2O 70~80 kg/hm^2)和大麦(只施用氮肥, 几乎不施用磷钾肥)等作物。因此, 连作烟田长期施用大量磷、钾肥可能是土壤有效磷、速效钾含量增加的主要原因。

随着连作年限的增加, 土壤中残留的肥料和根系分泌物可能导致盐分积累, 引起土壤电导率上升。同时, 这些盐类的解离可能会产生 H^+ , 并导致土壤 pH 降低。土壤电导率升高和 pH 下降表明土壤有盐渍化和酸化迹象^[31]。Ling 等^[2]、Lithourgidis 等^[32]认为, 作物连作后土壤容重增大、黏性增强、通气孔隙减少、土壤交换性盐基总量及盐基饱和度降低, 是导致土壤酸化及盐渍化现象加重的原因。

土壤酶活性与土壤健康及土壤养分转化等有很大关系, 是近年来土壤质量评估中重要的指标。连作对土壤酶活性有极大影响, 本研究中烤烟连作障碍土壤中脲酶活性升高, 酸性磷酸酶活性降低(图 1)。王胜男^[33]、姜永雷等^[34]也发现, 连作烟田土壤酸性磷酸酶活性下降, 而脲酶活性与连作年限正相关。连作使烟田土壤脲酶活性增强, 连作 3 年时活性为 13.02 mg/(kg·h), 连作 20 年时增加至 33.75 mg/(kg·h)^[35]。土壤酶是土壤中各种生物化学过程的催化剂, 如无机化合物的氧化还原、腐殖质的分解与合成、动植物残体和微生物残体的分解及其合成有机化合物的水解与转化等^[9]。脲酶可以催化尿素水解成氨和二氧化碳, 酸性磷酸酶可促进有机磷的水解。胡加云等^[36]认为, 土壤酶活性的高低直接影响烟田土壤生态系统的物质转化、能量流动及土壤肥力的形成, 直接影响烤烟的生长发育, 是导致烤烟连作障碍的重要原因之一。

3.2 连作对烟田土壤微生物群落结构和网络结构的影响

根际微生物的细菌优势类群主要为放线菌门(Actinobacteriota)和变形菌门(Proteobacteria), 真菌的优势类群主要为子囊菌门(Ascomycota)、毛霉菌门(Mortierellomycota), 这与饶德安^[37]研究结果基本一致。连作障碍根际土特有的 ASVs 数量较多, 表明连作障碍的发生伴随着大量根际微生物的更替(图 2C, 2D)。从微生物 α 多样性指数来看, 连作土壤细菌群落 Shannon 指数和 PD 指数显著降低; 真菌群落 ACE 指数、Shannon 指数和 PD 指数显著升高, 表明细菌群落多样性降低, 真菌群落的多样性和丰富度增加, Yu 等^[38]和 Wang 等^[8]的研究也得到了类似结果。细菌和真菌的 α 多样性变化表明, 连作障碍伴随细菌和真

菌产生不同的变化。细菌群落的多样性降低可能是化感类物质积累的结果。而真菌群落的多样性增加则可能是因为真菌在新的环境条件下更具竞争优势,能够利用更广泛的资源,或是某些抑制细菌的真菌物种在新环境中变得更为活跃^[39]。有研究指出,长期的连作导致细菌微生物群落 α 多样性降低和真菌 α 多样性升高,被称为土壤“真菌化”,是土壤质量下降的表现^[40-41]。LEfSe分析表明(图4),1个真菌门(Olpidiomycota)筛选为生物标志物,该门在连作障碍根际土中丰度更高。魏光钰等^[42]在消减连作障碍后的烟草根际土中观察到了该真菌门的丰度下降。在属水平连作烤烟的生物标志物中有许多有害微生物(图4),如马红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌(*Streptomyces*)、纤维弧菌(*Cellvibrio*)等细菌和*Cyphellophora*、赤霉菌(*Gibberella*)、*Ceratostidaceae*、韦特菌(*Waitea*)等真菌。这些微生物能够抑制植物生长发育,甚至本身就是病原微生物。因此,大量病原微生物的积累可能是导致连作障碍的原因。

连作通过改变微生物群落结构,影响共现性网络(包括网络拓扑特征和网络组成)^[43]。通过共现性网络分析发现,与非连作相比,连作烤烟根际土壤的细菌和真菌共现性网络均拥有更多的节点和边,表明烤烟连作增加了细菌与真菌网络的复杂性,这与李孟芝^[44]的研究结果一致。连作烤烟根际土壤细菌网络的负边比例高于非连作烤烟,但真菌网络的负边比例低于非连作烤烟,这意味着连作增强了细菌之间的竞争作用,但降低了真菌之间的竞争作用^[45]。连作烤烟根际土壤的细菌网络相比于非连作烤烟更为紧凑(网络直径更短),具有更高的模块性和更短的平均路径长度。这可能是因为连作导致了根际微环境变化,细菌为了适应这种变化,分化出更多的生态位,形成独立的功能模块。对于真菌网络,连作烤烟真菌网络较为密集,但表现出较低的信息传递效率(平均路径长度更长),它们之间的联系可能更加疏松(网络直径更长)。此外,连作烤烟真菌网络显示出较高的模块性。总之,细菌网络的复杂性和连通性增强,竞争关系增加,但信息传递效率更高;真菌网络的模块化程度和连通性增强,但信息传递路径变长,竞争关系减弱。这些变化会影响土壤的健康状况和植物的生长发育,从而导致连作障碍的发生。

3.3 土壤理化性质、微生物群落与烤烟连作障碍的关系

通过PLS模型揭示了土壤理化性质、微生物群落和烤烟生长之间的复杂关系。本研究发现,土壤有

效磷对微生物群落有显著的正向影响,这与李琼香等^[46]研究结果一致;而电导率对微生物群落有显著的负向影响(图6)。电导率显著影响微生物群落的结构和功能。在连作障碍发生过程中,电导率升高加剧土壤的盐渍化进程,进而影响微生物群落结构^[47]。连作土壤中有效磷含量增加,这种变化改变了微生物之间的竞争关系,导致特定微生物类群的相对丰度发生变化,适应高磷环境的微生物可能获得了竞争优势,而其他微生物则可能被排挤出生态系统^[48]。土壤有效磷和电导率通过影响土壤微生物群落,进而影响烟株生长。健康的微生物群落不仅可以通过固氮、解磷、解钾等过程为植物提供必要的营养元素,还可以产生植物激素,如吲哚乙酸(IAA),以促进植物根系发育,增强植物的抗逆性^[49]。连作导致土壤理化性质改变,引起微生物群落结构变化,土壤细菌多样性下降,真菌多样性和丰富度上升,有害微生物富集,这些微生物的变化将会对烤烟的生长产生不利影响。未来研究应关注这些生态变化的长期效应,以及如何通过生态手段恢复和维护健康的土壤微生物群落,比如种植填闲绿肥^[50]或有机无机肥配施^[51],以此改善烤烟的生长环境,提升作物产量和质量,实现可持续农业发展。

4 结论

丽江烟区连作障碍烟田土壤与非连作烟田土壤相比,磷、钾富集,电导率升高, pH降低;土壤细菌多样性下降,真菌多样性和丰富度上升,有害微生物富集;微生物网络有更高的模块化和更紧密的连接,细菌之间的竞争作用增强,而真菌之间的竞争作用减弱。土壤有效磷对微生物群落有显著的正向影响,电导率对微生物群落有显著的负向影响,土壤微生物群落对株高有显著正向影响。土壤有效磷和电导率通过影响土壤微生物群落,进而影响烟株生长。

参考文献:

- [1] 张子龙,王文全.植物连作障碍的形成机制及其调控技术研究进展[J].生物学杂志,2010,27(5): 69-72.
- [2] Ling N, Deng K Y, Song Y, et al. Variation of rhizosphere bacterial community in watermelon continuous mono-cropping soil by long-term application of a novel bioorganic fertilizer[J]. Microbiological Research, 2014, 169(7/8): 570-578.
- [3] Xia H, Jiang C Q, Riaz M, et al. Impacts of continuous cropping on soil fertility, microbial communities, and crop growth under different tobacco varieties in a field study[J]. Environmental Sciences Europe, 2025, 37(1): 5.

- [4] Li G T, Gong P F, Zhou J, et al. The succession of rhizosphere microbial community in the continuous cropping soil of tobacco[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2024, 11: 1251938.
- [5] Beckers B, Op De Beeck M, Weyens N, et al. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 25.
- [6] Yu S K, Gu H Z, He J X, et al. Impact of continuous cropping on tobacco growth, stress resistance, and soil microecological structure[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2024, 38(1): 2290343.
- [7] Ma Z Z, Zhang X C, Zheng B Y, et al. Effects of plastic and straw mulching on soil microbial P limitations in maize fields: Dependency on soil organic carbon demonstrated by ecoenzymatic stoichiometry[J]. *Geoderma*, 2021, 388: 114928.
- [8] Wang R Q, Xiao Y P, Lv F J, et al. Bacterial community structure and functional potential of rhizosphere soils as influenced by nitrogen addition and bacterial wilt disease under continuous sesame cropping[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 125: 117–127.
- [9] 张继光, 申国明, 张久权, 等. 烟草连作障碍研究进展[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(3): 95–99.
- [10] Li A B, Jin K K, Zhang Y Z, et al. Root exudates and rhizosphere microbiota in responding to long-term continuous cropping of tobacco[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14: 11274.
- [11] 汤宏, 王建伟, 曾掌权, 等. 连作烤烟土壤特征及连作障碍防控技术研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2024(8): 109–117.
- [12] Bai Y X, Wang G, Cheng Y D, et al. Soil acidification in continuously cropped tobacco alters bacterial community structure and diversity via the accumulation of phenolic acids[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 12499.
- [13] Yan L, Zhang W Y, Duan W J, et al. Temporal bacterial community diversity in the *Nicotiana tabacum* rhizosphere over years of continuous monocropping[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 641643.
- [14] 刘艳霞, 李雨, 李想, 等. 烤烟根际土壤微生物对根系酚酸类物质的响应[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(8): 1373–1382.
- [15] Jia M, Wang X S, Zhu X Q, et al. Accumulation of coumaric acid is a key factor in tobacco continuous cropping obstacles[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1477324.
- [16] Freilich S, Kreimer A, Meilijson I, et al. The large-scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(12): 3857–3868.
- [17] 李桂龙, 李朋发, 吴萌, 等. 化肥配施有机肥对花生根际细菌群落结构及共存网络的影响[J]. 土壤, 2022, 54(3): 498–507.
- [18] 国家烟草专卖局. 烟草农艺性状调查测量方法: YC/T 142—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [19] Lavecchia A, Curci M, Jangid K, et al. Microbial 16S gene-based composition of a sorghum cropped rhizosphere soil under different fertilization managements[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(6): 661–672.
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [21] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [22] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [23] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 852–857.
- [24] Newman M E J. Finding community structure in networks using the eigenvectors of matrices[J]. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 2006, 74(3 Pt 2): 036104.
- [25] 晋艳, 杨宇虹, 段玉琪, 等. 烤烟轮作、连作对烟叶产量质量的影响[J]. 西南农业学报, 2004, 17(S1): 267–271.
- [26] 汤宏, 刘文祥, 曾掌权, 等. 烤烟连作障碍产生的原因及消减措施研究进展[J]. 湖南农业科学, 2022(10): 107–110.
- [27] Lisuma J, Mbega E, Ndakidemi P. Influence of tobacco plant on macronutrient levels in sandy soils[J]. *Agronomy*, 2020, 10(3): 418.
- [28] 孙雪婷, 龙光强, 张广辉, 等. 基于三七连作障碍的土壤理化性状及酶活性研究[J]. 生态环境学报, 2015, 24(3): 409–417.
- [29] 李序进, 蔡立群, 李海亮. 兰州百合连作土壤碳氮磷化学计量特征及酶活性研究[J]. 中国农学通报, 2021, 37(6): 82–88.
- [30] 张科, 袁玲, 施娴, 等. 不同植烟模式对烤烟产质量、土壤养分和酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(1): 124–128.
- [31] Hu H, Tang C, Rengel Z. Influence of phenolic acids on phosphorus mobilisation in acidic and calcareous soils[J]. *Plant and Soil*, 2005, 268(1): 173–180.
- [32] Lithourgidis A S, Damalas C A, Gagianas A A. Long-term yield patterns for continuous winter wheat cropping in northern Greece[J]. *European Journal of Agronomy*, 2006, 25(3): 208–214.
- [33] 王胜男. 西南山区烤烟连作对土壤微生物多样性的影响及机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [34] 姜永雷, 肖雨, 邓小鹏, 等. 微生物菌剂对烟草连作土壤理化性质及土壤胞外酶活性的影响[J]. 中国烟草学报, 2022, 28(4): 59–66.
- [35] 蔡秋燕, 阳显斌, 孟祥, 等. 不同连作年限对植烟土壤性状的影响[J]. 江西农业学报, 2020, 32(10): 93–98.
- [36] 胡加云, 朱艳梅, 徐天养, 等. 云南省文山州烟田土壤主要肥力指标多年度动态变化[J]. 土壤, 2022, 54(1): 95–102.
- [37] 饶德安. 烤烟连作土壤的修复技术及其应用效果研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [38] Yu F, Yan Y F, Dong Q, et al. The changes in rhizosphere metabolome and microbiota are the main direct obstacles to

- continuous cropping in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. *Agronomy*, 2023, 13(4): 964.
- [39] Zhang Y, Dong S K, Gao Q Z, et al. Soil bacterial and fungal diversity differently correlated with soil biochemistry in alpine grassland ecosystems in response to environmental changes[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43077.
- [40] 白羽祥, 杨成翠, 史普酉, 等. 连作植烟土壤酚酸类物质变化特征及其与主要环境因子的 Mantel Test 分析[J]. *中国生态农业学报(中英文)*, 2019, 27(3): 369–379.
- [41] Xiong W, Zhao Q Y, Zhao J, et al. Different continuous cropping spans significantly affect microbial community membership and structure in a *Vanilla*-grown soil as revealed by deep pyrosequencing[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 209–218.
- [42] 魏光钰, 胡勇, 吴永琴, 等. 土壤强还原处理对植烟土壤真菌群落结构及烤烟产质量的影响[J]. *湖南农业科学*, 2021(3): 34–39.
- [43] Chen S, Qi G F, Luo T, et al. Continuous-cropping tobacco caused variance of chemical properties and structure of bacterial network in soils[J]. *Land Degradation & Development*, 2018, 29(11): 4106–4120.
- [44] 李孟芝. 三七不同生育期根际土壤微生物组研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [45] Yao J, Wu C Y, Fan L J, et al. Effects of the long-term continuous cropping of Yongfeng yam on the bacterial community and function in the rhizospheric soil[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 274.
- [46] 李琼香, 李志宏, 张云贵, 等. 土壤微生物对不同种植方式的响应[J/OL]. *中国烟草学报*, 2025: 1–13. (2025–01–10). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2985.TS.20250110.0958.002.html>.
- [47] Kim J M, Roh A S, Choi S C, et al. Soil pH and electrical conductivity are key edaphic factors shaping bacterial communities of greenhouse soils in Korea[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 54(12): 838–845.
- [48] Ben Keane J, Hartley I P, Taylor C R, et al. Grassland responses to elevated CO₂ determined by plant-microbe competition for phosphorus[J]. *Nature Geoscience*, 2023, 16(8): 704–709.
- [49] 勾宇春, 王宗抗, 张志鹏, 等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2023, 29(2): 495–506.
- [50] 李桂龙, 王于娟, 冷珂, 等. 绿肥填闲种植下土壤细菌群落特性对土壤多功能性的调控[J]. *土壤*, 2024, 56(6): 1253–1261.
- [51] 温煊琳, 马宜林, 周俊学, 等. 腐熟羊粪有机肥配施无机肥对植烟土壤微生物群落结构和多样性的影响[J]. *土壤*, 2023, 55(4): 804–811.