

DOI: 10.11766/trxb201904300132

常海娜, 王春兰, 朱晨, 王东升, 李荣, 周星, 龚鑫, 陈小云, 胡锋, 刘满强. 不同连作年限番茄根系淀积物的变化及其与根结线虫的关系[J]. 土壤学报, 2020, 57(3): 750–759.

CHANG Haina, WANG Chunlan, ZHU Chen, WANG Dongsheng, LI Rong, ZHOU Xing, GONG Xin, CHEN Xiaoyun, HU Feng, LIU Manqiang. Variation of Rhizodeposits under Monocropping of Tomato and Its Relationship with Root-knot Nematode [J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(3): 750–759.

## 不同连作年限番茄根系淀积物的变化及其与根结线虫的关系\*

常海娜<sup>1, 2</sup>, 王春兰<sup>1, 2</sup>, 朱晨<sup>1, 2</sup>, 王东升<sup>1, 3</sup>, 李荣<sup>1, 2</sup>, 周星<sup>1, 2</sup>,  
龚鑫<sup>1, 2</sup>, 陈小云<sup>1, 2</sup>, 胡锋<sup>1, 2</sup>, 刘满强<sup>1, 2†</sup>

(1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2. 江苏省有机固体废物资源化协同创新中心, 南京 210095; 3. 南京市蔬菜科学研究所, 南京 210042)

**摘 要:** 了解蔬菜连作与土传病虫害的关系有助于发展绿色农业。基于根系淀积物在植物-土壤之间功能反馈中的重要地位, 选择野外定位试验中番茄第 2、第 6 和第 8 茬的不同连作年限处理, 研究根结线虫的变化及其与土壤性质特别是根系淀积物组成的关系。结果显示: 与第 2 茬相比, 连作茬数增加导致土壤 pH 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而土壤有机碳和硝态氮含量显著升高; 同时, 根系淀积物的组分类别及其相对含量也有显著变化, 其主要组分中有机酸类物质的数量和相对含量随连作茬数的增加而增加。土壤化学性质、根系淀积物和根结指数三者的网络结构分析表明, 根结指数与网络中其他节点之间的联系伴随连作年限而增强。在第 8 茬中, 根结指数与月桂酸含量呈负相关, 与土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量以及颠茄碱、麦角甾醇的含量呈正相关, 说明连作番茄根结线虫病害加重与土壤化学性质尤其是根系淀积物的变化有密切联系。

**关键词:** 连作障碍; 生态农业; 土壤健康; 根系淀积; 根结线虫; 差异化合物

中图分类号: S154.1 文献标志码: A

## Variation of Rhizodeposits under Monocropping of Tomato and Its Relationship with Root-knot Nematode

CHANG Haina<sup>1, 2</sup>, WANG Chunlan<sup>1, 2</sup>, ZHU Chen<sup>1, 2</sup>, WANG Dongsheng<sup>1, 3</sup>, LI Rong<sup>1, 2</sup>, ZHOU Xing<sup>1, 2</sup>, GONG Xin<sup>1, 2</sup>, CHEN Xiaoyun<sup>1, 2</sup>, HU Feng<sup>1, 2</sup>, LIU Manqiang<sup>1, 2†</sup>

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210095, China; 3. Nanjing Institute of Vegetable Science, Nanjing 210042, China)

\* 国家重点研发计划项目 (2016YFD0200305)、国家自然科学基金项目 (41771287) 和中央高校基本科研业务费 (KYYJ201702) 资助  
Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200305), the National Natural Science Foundation of China (No. 41771287), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. KYYJ201702)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liumq@njau.edu.cn

作者简介: 常海娜 (1993—), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事土壤生态学方面的研究。E-mail: haina0924@163.com

收稿日期: 2019-04-30; 收到修改稿日期: 2019-08-13; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-09-24

**Abstract:** 【Objective】 This paper aimed at understanding the relationship between continuous monocropping of vegetable and soil-borne diseases, which will contribute a lot to development of green ecological agriculture. 【Method】 Based on the important role of rhizodeposition in plant-soil functional feedbacks, a field experiment was carried out to study incidence variation of root knot nematode diseases and explore its relationships with rhizospheric soil properties, especially composition of rhizodeposits in tomato fields under monocropping for 2, 6 and 8 seasons and the same cultivation management. 【Result】 Results show that compared with the plot of 2 season, the plots of 6 and 8 seasons were significantly lower in soil pH ( $P < 0.05$ ), and significantly higher in concentration of soil total organic carbon and nitrate nitrogen. Root knot index of the tomato and incidence of the root knot nematode disease increased with the monocropping going on. A total of 150 kinds of rhizodeposits were identified with the gas chromatography/time of flight mass spectrometry (GC/TOF-MS) metabolomics, including alcohols, organic acids, amino acids, carbohydrate, terpenes, alkaloids and steroids compounds. Meanwhile, with the monocropping going on, composition and relative contents of the components of the rhizodeposits varied significantly, and the amount and relative abundance of organic acids, such as 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid, salicylic acid, thymol, succinic acid, lauric acid, as main components of the rhizodeposits increased, too. The network architecture analysis of soil chemical properties, rhizodeposits and root knot index shows that the network was reducing in complexity, but intensifying in modularization after continuous tomato monocropping. The compounds in the rhizosphere were quite closely related to soil chemical properties and root knot index of the tomato. Among them, 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid, salicylic acid and succinic acid were negatively related to soil pH, and 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid, salicylic acid and atropine were positively to concentration of soil  $\text{NO}_3^- \text{-N}$ . The relationships between root knot index and other nodes were strengthened with the monocropping going on. 【Conclusion】 In the plot of 8 season, the root knot index was negatively related to content of lauric acid but positively to concentration of soil  $\text{NO}_3^- \text{-N}$ , atropine and ergosterol. The findings shows that the monocropping of tomato aggravates root knot nematode disease, which is closely related to soil chemical properties, especially variation of the rhizodeposits. Therefore, more efforts should be made in future studies, based on screening of key differential compounds, to specify, through simulation of the composition of the rhizodeposits, functions of specific compounds in the rhizosphere and their synergic effects with biological and abiotic factors on incidence of root knot nematode diseases.

**Key words:** Monocropping obstacle; Ecological agriculture; Soil health; Rhizodeposition; Root knot nematodes; Differential compounds

设施蔬菜栽培具有土地利用率高、生产周期短、受季节影响较小等优点，已成为我国公民蔬菜消费和农民收入的重要来源<sup>[1]</sup>。然而，由于设施蔬菜作物的连续单一种植、肥料投入量大以及设施环境相对封闭，造成与土壤相关的障碍问题日益突出，如土壤酸化和盐渍化、土壤养分失衡、土传病害频发等<sup>[2-3]</sup>。尤其是根部病虫害的发生直接影响了蔬菜的正常生长发育，其中，根结线虫作为设施内普遍发生且危害严重的植物土传病害之一，已成为限制设施蔬菜生产与可持续发展的重要障碍因子<sup>[4]</sup>。由于根际是植物和土壤的桥梁，能够灵敏地反馈植物和土壤的健康状况，并同时影响土壤和植物的健康。因此，聚焦根际过程中与根系直接相关的病原物，了解土壤健康尤其是土壤生物群落与植物健康的关系，逐渐受到越来越多的土壤学家的关注<sup>[5]</sup>。有关

这方面的知识也会在减少农业化学品施用、保障食品安全及保护农业生态环境等绿色发展中发挥越来越重要的作用<sup>[6]</sup>。

根结线虫是一类在蔬菜生产中普遍存在的植物寄生性线虫，其寄主范围广，对茄科作物危害严重<sup>[7]</sup>。其二龄幼虫仅感染根系，受害部位形成瘤状根结，消耗植物的光合产物和养分，导致植株对其他病害的抵抗力下降，最终造成巨大的经济损失<sup>[8]</sup>。当前，连作过程中过量施用化肥进一步恶化了土壤环境<sup>[9]</sup>，同时也降低了作物对病虫害的抗性，促进了根结线虫病害的发生<sup>[10]</sup>。此外，根际释放的有机物质影响着植物的根际环境，进一步反馈给根结线虫并诱导其发生<sup>[11]</sup>。已有的研究表明，包括根结线虫在内的地下食根动物对寄主的识别和感染依赖于一些根际信号物质，如酚酸类、黄酮类、糖类和生物

碱类化合物等<sup>[12-13]</sup>。而根系淀积 (rhizodeposition) 作为植物向土壤生态系统输入有机物的的重要途径之一, 其根系淀积物伴随连作年限的不断延长也会诱发某些病原体的定殖和感染<sup>[14]</sup>, 如连作条件下根系淀积物与根结线虫的关系 (图 1)。然而, 由于传统上不同学科的研究相对孤立, 现有连作影响病虫害的研究通常未整合根系淀积物等与根结线虫的关系, 限制了对连作条件下根结线虫病害发生规律和机制的认识。

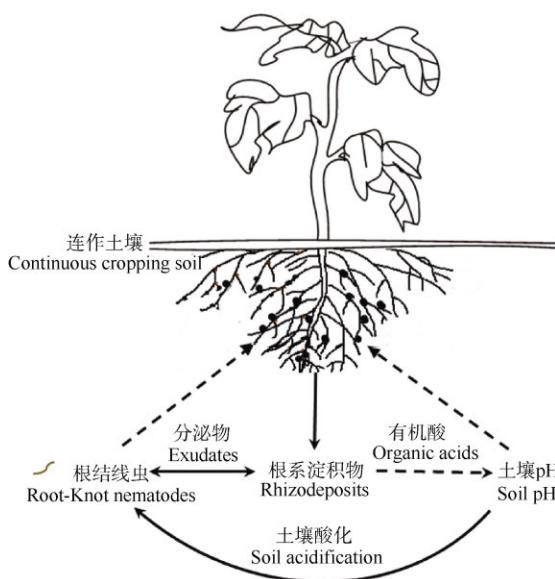


图 1 连作条件下根系淀积物与根结线虫关系的概念思路框架 (实线箭头代表正面影响, 虚线箭头代表负面影响)

Fig. 1 Conceptual framework showing the relationship between rhizodeposits and root-knot nematodes under continuous monocropping systems (Solid arrow represents positive impact and dotted arrow represents negative impact)

本研究基于番茄不同连作茬数的田间定位实验, 分析根结线虫危害和根系淀积物组成的差异, 探讨土壤化学性质尤其是根系淀积物与根结线虫的关系。研究结果可进一步加深对连作障碍条件下根结线虫病的认识, 为深入了解蔬菜连作中根结线虫发生的微生态机制及研发蔬菜连作障碍修复措施和防控策略提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和预处理

不同连作茬数番茄的根系和土壤采自南京市蔬菜花卉科学研究所内的田间定位实验田

(118°46'36.87" E, 31°43'11.50" N)。选择具有同样种植历史 (辣椒-番茄-菠菜轮作) 的相邻大棚 (具有同样的土壤基础性质), 分别从 2013 年、2014 年和 2016 年开始采用番茄连续单一种植制度, 一年分春茬 (3—7 月) 和秋茬 (8—12 月) 番茄, 在 2016 年秋茬番茄 (分别为第 2、6、8 茬) 收获前统一采样。各棚内的施肥和灌溉措施保持一致。土壤类型为淋溶土, 质地为黏壤土 (黏粒 229 g·kg<sup>-1</sup>, 粉粒 365 g·kg<sup>-1</sup>, 砂粒 406 g·kg<sup>-1</sup>)。土壤 pH 7.21 (水), 有机碳 18.2 g·kg<sup>-1</sup>, 全氮 3.27 g·kg<sup>-1</sup>, 全磷 3.58 g·kg<sup>-1</sup>, 全钾 19.2 g·kg<sup>-1</sup>, 矿质氮 (铵态氮和硝态氮之和) 140.5 mg·kg<sup>-1</sup>, 有效磷 31.5 mg·kg<sup>-1</sup>, 速效钾 719 mg·kg<sup>-1</sup>。

供试作物为番茄 (世纪红冠), 在番茄定植前两天将有机肥 (腐熟的鸡粪 75 t·hm<sup>-2</sup>) 作为基肥一次性均匀翻施入耕层土壤中。于 2016 年 10 月 21 日分别从第 2、6、8 茬番茄棚中选择有机肥处理的小区, 每处理 3 个小区, 小区面积约为 8 m<sup>2</sup>, 每个小区随机选取 3 株番茄挖掘根系, 共 27 株。采用抖根法并用毛刷采集植株根际土壤, 同一小区的土壤样品均匀混合。植株用水洗净后观察其形态。部分土壤样品置于液氮中快速冷冻并储存于 -80 °C 冰箱待进行化合物提取和气相色谱-飞行时间质谱 (GC/TOF-MS) 分析, 其余土壤预处理后用于土壤化学性质的测定。

### 1.2 根际土壤化合物的提取

通过改进 Yang 等<sup>[15]</sup>研究中样品的提取方法, 分别对不同连作茬数番茄根际土壤中的化学物质进行萃取和衍生化。化合物萃取: 称取 1.0 g 根际土壤样品置于离心管中, 加入甲醇/氯仿 (3 : 1 v : v) 提取液和乙酸乙酯进行涡旋; 再加入瓷珠, 研磨并超声 (冰水浴), 重复 5 次; 然后将样本离心后小心移取上清液于离心管中。化合物衍生化: 先于真空浓缩器中干燥提取物; 再加入甲氧胺盐试剂并轻轻混匀后放入烘箱中 80 °C 培养 30 min; 然后向每个样品中加入双 (三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA), 将混合物于 70 °C 下培养 1.5 h。冷却至室温, 样品采用气相色谱仪 (Agilent 7890, 安捷伦科技有限公司) 随机顺序上机检测。

### 1.3 分析方法

土壤有机质采用外加热重铬酸钾氧化—容量法测定; 铵态氮和硝态氮采用 2 mol·L<sup>-1</sup> 氯化钾浸提后用流动分析仪 (SKALAR San++, 荷兰) 测定; 可溶性有机碳采用超纯水浸提后用总有机碳 (TOC) 分析

仪 (Elementar Vario EL III, 德国) 测定; 土壤有效磷采用  $\text{NaHCO}_3$  浸提, 钼锑抗比色法测定<sup>[16]</sup>; 土壤速效钾采用  $\text{NH}_4\text{OAc}$  浸提, 火焰光度法测定; 土壤 pH 和电导率 (EC) 测定时水土比为 5 : 1。

番茄根结线虫病情评估: 根结指数 =  $\sum$  (各级病株数  $\times$  各级代表值)  $\times 100 /$  (调查总株数  $\times$  最高严重度代表值)<sup>[17]</sup>。

气相色谱-飞行时间质谱联用仪 (Agilent 7890, 安捷伦科技有限公司) 配有 Agilent Rxi-5MS 毛细管柱 (30 m  $\times$  250  $\mu\text{m}$   $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ , 美国)。GC/TOF-MS 分析条件如下: 进样量为 1  $\mu\text{L}$ , 分流比 10 : 1, 载气为氦气, 前进样口吹扫流速为 3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱流速为 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 程序升温 (50  $^\circ\text{C}$  保持 0.5 min, 以 15  $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  的速率上升至 320  $^\circ\text{C}$ , 并保持 10 min), 前进样口温度为 280  $^\circ\text{C}$ , 传输线温度为 320  $^\circ\text{C}$ ; 离子源温度为 230  $^\circ\text{C}$ , 电离电压为 -70 eV, 质量范围为 50~500  $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ , 扫描速率为 10  $\text{s}^{-1}$ , 溶剂延迟时间为 4 min。

#### 1.4 数据分析

使用 MS-DIAL 软件对质谱原始数据进行峰提取、基线矫正、解卷积、峰积分和峰对齐等分析<sup>[18]</sup>; 使用 Fiehn Binbase 数据库对物质定性<sup>[19]</sup>, 选用匹配度大于 700、保留时间偏差 (RI) 小于 5% 的化合物<sup>[20]</sup>。将化合物的原始数据上传至 MetaboAnalyst 4.0 进行标准化: 中值归一化、对数转换和自动数据缩放<sup>[21]</sup>。在软件 R 3.3.2 中对已鉴定化合物进行非度量多维尺度分析 (NMDS), 可以直观地体现不同连作茬数

番茄之间化合物的差异; 然后进行偏最小二乘法判别分析和  $t$  检验, 根据变量投影重要性值 (阈值大于 1.2) 和  $t$  检验的  $P$  值 ( $P < 0.05$ ) 来确定差异性表达的化合物<sup>[22]</sup>。用 Statistics 7.1 统计软件对数据进行分析, 采用单因素方差分析并用最小显著差异 (LSD) 法进行处理之间的差异显著性检验 ( $P < 0.05$ )。使用 R 软件对化合物组成及根结指数进行斯皮尔曼 (Spearman) 相关性分析, 并用 Gephi 0.9.2 软件和 Fruchterman Reingold 算法分别对不同连作茬数番茄的根系淀积物组分与土壤化学性质和根结指数的相关性结果进行网络可视化。

## 2 结果

### 2.1 连作茬数对根际土壤化学性质的影响

连作茬数显著影响了根际土壤养分含量。与连作 2 茬相比, 连作 8 茬后土壤铵态氮 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) 和溶解性有机碳 (DOC) 含量分别下降了 4.31% 和 15.07%, 差异显著; 随着连作茬数的增加, 土壤有机碳 (SOC) 含量显著升高, 硝态氮 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) 含量先升高后降低。此外, 土壤 pH 随着连作茬数的增加而降低 (表 1)。

### 2.2 连作茬数对番茄根系形态的影响

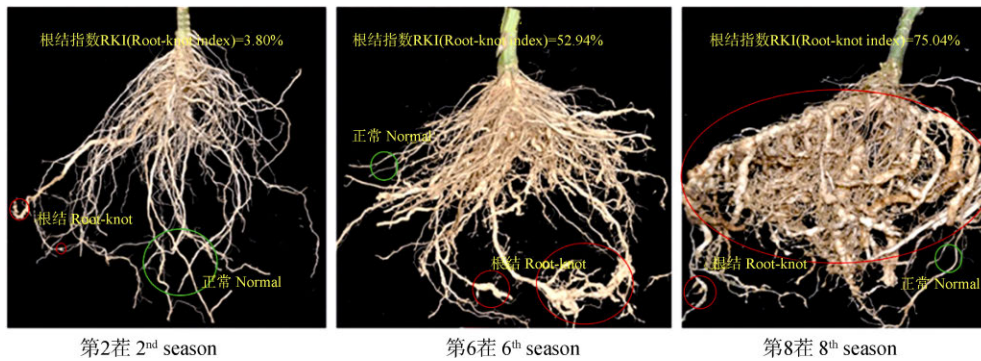
随着连作茬数的增加, 侧根和须根上的根结数越来越多, 并连接成串珠状, 造成根系肿胀、畸形, 在连作 8 茬番茄中表现最为严重; 相应地, 番茄的根结指数随着连作茬数的增加而增大 (图 2)。

表 1 不同连作茬数番茄根际土壤化学性质

Table 1 Chemical properties of the rhizosphere of monocropping tomato relative to history of monocropping

连作茬数 History of monocropping	SOC/ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ / ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ / ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	DOC/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	AP/ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	pH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	EC/ ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
第 2 茬 <sup>①</sup>	14.1 $\pm$ 0.16c	3.71 $\pm$ 0.04a	153.5 $\pm$ 1.0b	7.3 $\pm$ 0.1a	90.8 $\pm$ 3.9a	7.21 $\pm$ 0.03a	0.75 $\pm$ 0.04c
第 6 茬 <sup>②</sup>	15.7 $\pm$ 0.12b	3.59 $\pm$ 0.03b	162.3 $\pm$ 1.9a	6.6 $\pm$ 0.0b	36.5 $\pm$ 2.8b	6.91 $\pm$ 0.02b	2.50 $\pm$ 0.12a
第 8 茬 <sup>③</sup>	16.8 $\pm$ 0.15a	3.55 $\pm$ 0.03b	160.2 $\pm$ 1.0a	6.2 $\pm$ 0.1c	37.7 $\pm$ 3.2b	6.88 $\pm$ 0.04b	1.49 $\pm$ 0.15b

注: SOC: 土壤有机碳;  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ : 铵态氮;  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ : 硝态氮; DOC: 溶解性有机碳; AP: 有效磷; pH: 酸碱度; EC: 电导率。表中数据为平均值  $\pm$  标准误 ( $n = 3$ ), 同列不同字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。Note: SOC: soil organic carbon;  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ : ammonium nitrogen;  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ : nitrate nitrogen; DOC: dissolved organic carbon; AP: available phosphorus; pH: potential of hydrogen; EC: electrical conductivity. Data are means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ), different letters in the same column represent significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ). The same below. ①2<sup>nd</sup> season, ②6<sup>th</sup> season, ③8<sup>th</sup> season



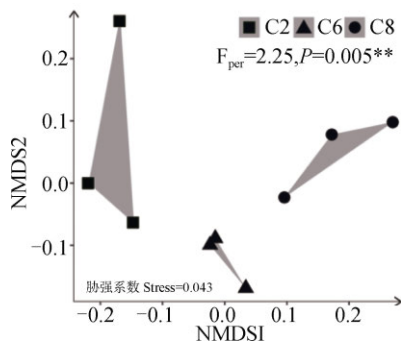
注: 红色圆圈区域表示根结部位, 绿色圆圈区域表示根系的正常部位。Note: The red circle indicates the part where root-knots from, and the green circle indicates the part of normal roots.

图 2 不同连作茬数下的番茄根系形态

Fig. 2 Morphology of tomato roots relative to history of monocropping

### 2.3 连作茬数对番茄根系沉积物的影响

从番茄根际土壤中共鉴定出 150 种化合物, 连作茬数对这些化合物的组分及相对含量有显著影响, 且差异随着连作茬数的增加而增大 (图 3)。根系沉积物主要包括醇类、有机酸类、氨基酸类、糖类、萜类、生物碱和甾族化合物等。其中有机酸类化合物的数量最多、相对含量最高, 且在第 6 茬和第 8 茬中有有机酸种类 (51 种和 52 种) 显著多于第 2 茬 (46 种); 在第 2 茬处理中未检测到生物碱类物质, 但其相对含量在第 6 茬和第 8 茬中较高, 分别为 8.96% 和 9.33% (表 2)。



注: Per (PerMANOVA): 非参数多元方差分析; □ C2 代表第 2 茬番茄; △ C6 代表第 6 茬番茄; ○ C8 代表第 8 茬番茄。下同。Note: Per (PerMANOVA): Permutational Multivariate Analysis of Variance; □ C2, 2nd season of tomato; △ C6, 6th season of tomato; ○ C8, 8th season of tomato. The same below.

图 3 不同连作茬数番茄根际土壤中化合物的非度量多维尺度分析 (NMDS)

Fig. 3 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot of the compounds in the rhizosphere of the tomato relative to history of monocropping

### 2.4 不同连作茬数番茄根际差异化合物种类的变化

在偏最小二乘法判别分析中, 变量投影重要性值大于 1.2 的候选差异化合物有 25 种, 结合  $t$  检验确定了在不同连作茬数间具有显著差异 ( $P < 0.05$ ) 的 11 种化合物。其中, D-半乳糖、L-苹果酸和草酸等化合物在第 2 茬中有较高水平, 而间羟基苯丙酸、百里香酚、月桂酸、水杨酸、琥珀酸和颠茄碱等在第 6 茬和第 8 茬中的水平显著高于第 2 茬 (图 4)。

### 2.5 不同连作茬数番茄根系沉积物、土壤化学性质和根结指数的共网络结构

第 2 茬的网络连接度最高 (平均度为 9.484), 平均路径长度 (5.744) 和网络直径 (18) 最小, 随着连作茬数的增加, 网络连通度降低, 表明连作降低了网络的复杂性; 与第 2 茬相比, 第 6 和第 8 茬网络中的节点数增加, 化合物种类增多; 各网络均达到了模块化程度 (模块化指数大于 0.44), 连作增加了网络的模块化系数, 表明网络的内部形成不同模块的可能性增加 (表 3, 图 5a)。其中, 差异化合物与土壤化学性质和根结指数的关系比较密切, 与土壤 pH 呈负相关的是间羟基苯丙酸、水杨酸和琥珀酸; 与  $\text{NO}_3^-$ -N 含量呈正相关的是间羟基苯丙酸、水杨酸和颠茄碱; 与 AP 含量呈负相关的是麦角甾醇。此外, 代表根结指数的节点随着连作茬数的增加其与其他化合物的相关性明显增大, 在第 2 和第 6 茬中与月桂酸含量呈正相关; 在第 8 茬中与月桂酸含量呈负相关, 与土壤  $\text{NO}_3^-$ -N 含量以及颠茄碱和麦角甾醇的含量呈正相关 (图 5b)。

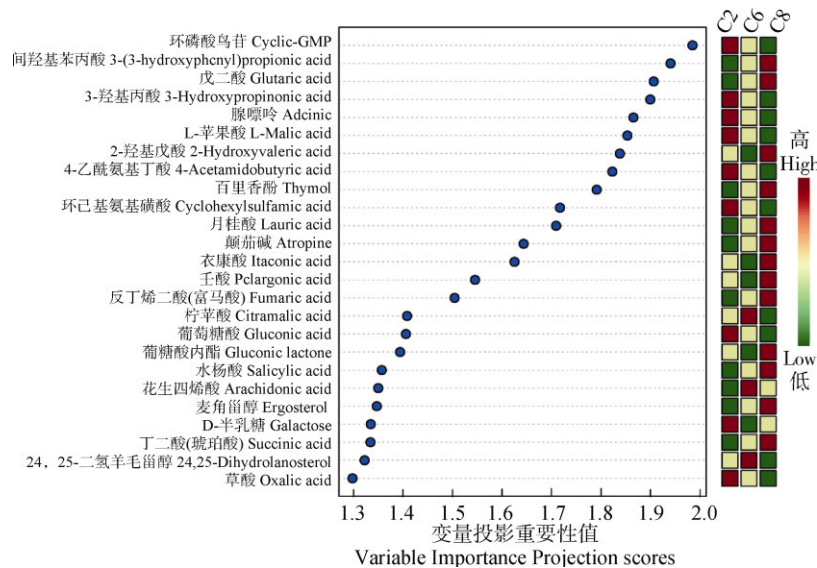


表 2 不同连作茬数下根系淀积物的组分及相对含量

Table 2 Composition and relative contents of its components in the rhizodeposits relative to history of monocropping

类别 Categories	数量 Number			相对含量 Relative contents/%		
	C2	C6	C8	C2	C6	C8
醇类 Alcohols	9	9	10	19.33±0.52a	14.12±0.73b	12.55±0.39b
有机酸 Organic acids	46	51	52	51.25±0.45a	53.62±1.43a	54.36±1.76a
氨基酸 Amino acids	16	17	16	5.23±0.15a	4.88±0.26a	5.07±0.16a
糖类 Carbohydrate	14	12	14	4.89±0.40a	2.56±0.13b	2.22±0.10b
萜类 Terpene	5	5	5	2.77±0.57a	2.23±0.15a	2.79±0.05a
生物碱 Alkaloids	0	1	1	0	8.96±0.34a	9.33±1.25a
甾类 Steroids	14	14	12	6.23±0.46ab	4.93±0.11b	7.55±1.03a
其他 Others	31	32	32	10.30±0.33a	8.7±0.46b	6.13±0.18c

注：用色谱峰面积归一化法测定各组分的相对含量，并将相对含量小于 0.5% 的化合物归类到其他类别中。Note: Relative contents of the components determined with the photospectral peak area normalization and compounds<0.5% in proportion sorted into other categories.



注：图右侧的彩色方框表示每个处理中对应化合物的相对含量。Note: The colored square boxes on the right of figure indicate relative content of the corresponding compounds, relative to treatment.

图 4 不同连作茬数番茄根际差异化合物的变量投影重要性预测值分布

Fig. 4 Distribution of predictions of importance of variable projections of differential compounds in the tomato rhizosphere relative to history of monocropping

### 3 讨论

#### 3.1 连作对土壤理化性质、根系淀积物和根结线虫病情的影响

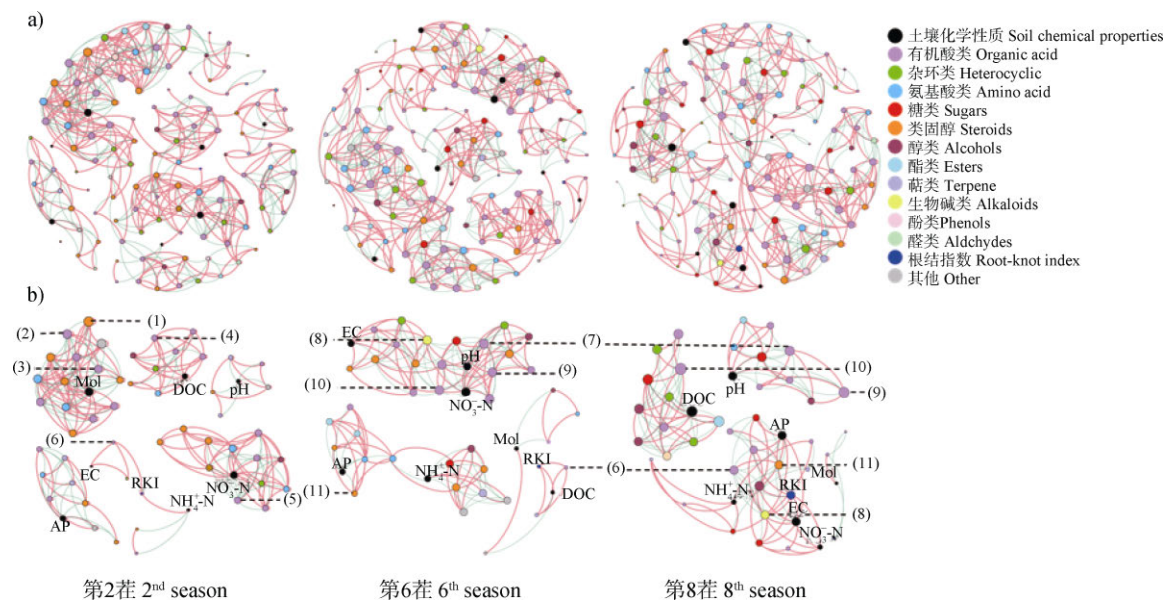
番茄连作种植后土壤 pH 下降，而硝态氮含量升高，一方面因为长期高强度单作从土壤中选择性地吸收较多的碱基元素和中微量元素，导致土壤向酸化方向发展<sup>[23]</sup>；另一方面，棚内施肥量和蒸发量

较大，导致土壤中硝酸盐累积及土壤表层的次生盐渍化<sup>[24]</sup>。连作对番茄根系淀积物的组分及其相对含量有显著影响，其中，有机酸类物质的数量和相对含量伴随连作茬数的增加而增加（表 2），而多数有机酸类物质被认为是化感物质或自毒物质，当其积累到一定水平，能直接影响自身或周围植株的生长，这是导致作物发生连作障碍的重要原因之一<sup>[25]</sup>。此外，连作茬数的增加导致番茄根结指数增大，这表明根结线

表 3 不同连作茬数番茄网络拓扑结构指标

Table 3 Network topology structure indices of the tomato relative to history of monocropping

图的度量 Graph metric	连作茬数 History of monocropping		
	C2	C6	C8
节点数 Number of nodes	128	140	137
边数 Number of edges	607	653	624
平均度 Average degree	9.484	9.329	9.109
平均路径长度 Average path length	5.744	8.947	9.686
模块化指数 Modularity index	2.071	3.029	2.977
网络直径 Diameter	18	30	31
正相关 Positive correlation	69.85%	66.62%	67.47%
负相关 Negative correlation	30.15%	33.38%	32.53%



注：连线代表相关系数大于 0.6（正相关-红线）或小于-0.6（负相关-绿线）和统计学显著性（ $P < 0.05$ ）。不同颜色的节点表示不同的化合物、土壤化学性质和根结指数，并且节点的大小与连接数（度）成正比。差异化合物包括：（1）D-半乳糖；（2）L-苹果酸；（3）草酸；（4）葡萄糖酸；（5）3-羟基丙酸；（6）月桂酸；（7）间羟基苯丙酸；（8）颠茄碱；（9）水杨酸；（10）琥珀酸；（11）麦角甾醇。Moi：土壤湿度；RKI：根结指数。Note: Continuous lines stand for correlation coefficient  $>0.6$  (positive correlation - red line) or  $<-0.6$  (negative correlation - green line) and statistical significance ( $P < 0.05$ ). Nodes different in color indicate different compounds, soil chemical properties and root-knot index, and size of the node is proportional to degree of the connection (degree). Differential compounds include (1) Galactose, (2) L-Malic acid, (3) Oxalic acid, (4) Gluconic acid, (5) 3-Hydroxypropionic acid, (6) Lauric acid, (7) 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid, (8) Atropine, (9) Salicylic acid, (10) Succinic acid, and (11) Ergosterol. Moi: soil moisture; and RKI: root-knot index.

图 5 不同连作茬数番茄的根系淀积物、土壤化学性质和根结指数的共现网络 a) 根系淀积物中的所有化合物，b) 根系淀积物中的差异化合物

Fig. 5 Network co-occurrence analysis of rhizodeposits, soil chemical properties and root-knot index relative to history of monocropping a) All compounds in rhizodeposits, and b) Differential compounds in rhizodeposits

虫病情随着连作时间的延长而不断加剧<sup>[26]</sup>。主要是因为是在设施栽培条件下,连茬种植不仅导致根系淀积物中自毒物质的积累,而且伴随着根际土壤生物群落结构和多样性的破坏,如土壤中有益生物减少而有害病原物增多,抑制植株生长并降低其抗性,促使根结线虫等土传病害发生<sup>[27]</sup>。同时,连茬种植改变了根际土壤的线虫群落结构,使根结线虫成为优势种群,且土壤中病虫基数不断增大,致使根结线虫病害持续流行并逐年加重<sup>[28]</sup>。此外,由于连茬种植同种作物,根系向根际反复释放相似的组分,不仅改变了根际土壤环境,还可能诱发根结线虫的发生<sup>[29]</sup>。

### 3.2 连作茬数影响下根系淀积物与根结线虫的关系

根际是根结线虫的主要活动空间,根际土壤环境的变化特别是根系淀积物中化合物组分及含量的变化密切联系着根结线虫的生存及活动<sup>[11]</sup>。本研究发现番茄根系淀积物中的有机酸类物质,如间羟基苯丙酸、水杨酸、百里香酚、琥珀酸、月桂酸等的相对含量随着连作茬数的增加而不断升高(图4)。其中,间羟基苯丙酸和水杨酸等酚酸类化合物被认为是土壤和植物根系分泌物中普遍存在的化感物质<sup>[30]</sup>,琥珀酸对番茄青枯病有正趋化作用<sup>[31]</sup>,这些物质在根际中随着连作茬数的增加而不断积累,间接降低了植株抵抗病虫害的能力,从而有利于根结线虫的成功侵染。有研究表明,水杨酸能合成水杨酸甲酯,这种物质有助于根结线虫二龄幼虫(J2)对宿主的识别行为<sup>[32]</sup>。此外,有研究证明根际中的月桂酸在低浓度( $0.5\sim 2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时能吸引根结线虫并使其致死,高浓度( $4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时能直接趋避根结线虫<sup>[33]</sup>;百里香酚作为一种天然杀菌剂对根结线虫的二龄幼虫也有致死作用<sup>[34]</sup>。根际中这些抗性物质的相对含量随着连作茬数的增加而增加,说明植株根系受到根结线虫侵染后会分泌一些特异性物质来启动自身的防御机制<sup>[35]</sup>,而这些化合物对今后开发根结线虫的新型控制策略具有潜在的利用价值。

研究结果发现连作茬数增加后,根系淀积物中化合物的种类增多,但由土壤化学性质、根系淀积物和根结指数构成的网络结构图的整体复杂程度略有降低,模块化程度增加(图5),说明连作导致了根际土壤中化合物的不均衡累积。随着连作茬数的增加,与土壤化学性质和根结指数间关系密切的化

合物组分相应改变,表现为网络中节点的连接度越大,与其相连组分间的关系越强<sup>[36]</sup>。网络中与根结指数关系较强的节点随着连作茬数的增加而增多。其中,月桂酸在低茬番茄中与根结指数呈正相关,在连作8茬时与根结指数呈负相关,而月桂酸含量随着连作茬数的增加而升高,符合前人报道的月桂酸对根结线虫调控的浓度效应<sup>[33]</sup>。在连作8茬中,根结指数还与根系淀积物中颠茄碱和麦角甾醇的含量呈正相关,说明连茬种植后根际中颠茄碱和麦角甾醇含量的增加可能对根结线虫有正趋化作用,然而这些物质与根结线虫的功能关系尚未见报道。今后进一步的研究可通过分离纯化或合成等途径以揭示特定的化合物在根结线虫-宿主关系中的作用。

此外,连作条件下番茄根系淀积物的变化与土壤化学性质之间的联系也可影响根结线虫的发生。本研究发现间羟基苯丙酸、水杨酸等有机酸类物质的相对含量与土壤pH呈负相关,与 $\text{NO}_3^-$ -N含量呈正相关(图5b))。以往的研究主要关注土壤pH的总体变化,较少地考虑根系淀积物丰富的有机酸类化合物如对羟基苯甲酸、肉桂酸、苯甲酸等的积累是作物连茬种植后土壤pH下降的重要原因<sup>[37]</sup>。同时,土壤酸化又是促进根结线虫发生的重要因素<sup>[38]</sup>。因此,深入揭示连作对作物病害的影响机制需要同时考虑多种因素的ss综合作用,今后需要结合多种技术和研究途径才能系统地理解和揭示连作障碍的成因和对策。

## 4 结 论

伴随着连作年限的增加,番茄根结线虫病情加剧,根际土壤趋于酸化;且根系淀积物中的化合物种类及含量也相应地改变,如间羟基苯丙酸、百里香酚、月桂酸、水杨酸、颠茄碱和麦角甾醇等差异化合物不断累积,并与土壤化学性质、根结指数之间存在密切联系。连作条件下作物根系淀积物的累积与土壤非生物因素的共同作用加重了根结线虫病害的发生。今后应在筛选关键差异化合物的基础上,通过成分模拟明确根际特殊化合物的功能作用及与生物和非生物因素综合作用对根结线虫发生的影响机制。

**致 谢** 感谢南京农业大学植物保护学院李红梅教授在实验上的指导,资源与环境科学学院周阳和张宇同学的帮助。



## 参考文献 (References)

- [ 1 ] Cai Z C. Scientific and technological issues of nutrient management under greenhouse cultivation in China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 ( 1 ): 36—43. [蔡祖聪. 我国设施栽培养分管理中待解的科学和技术问题[J]. 土壤学报, 2019, 56 ( 1 ): 36—43.]
- [ 2 ] Han J P, Shi J C, Zeng L Z, et al. Effects of nitrogen fertilization on the acidity and salinity of greenhouse soils[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22 ( 4 ): 2976—2986.
- [ 3 ] Cai Z C, Huang X Q. Soil-borne pathogens should not be ignored by soil science[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 ( 2 ): 305—310. [蔡祖聪, 黄新琦. 土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究[J]. 土壤学报, 2016, 53 ( 2 ): 305—310.]
- [ 4 ] Chen T, Lin S, Wu L K, et al. Soil sickness: Current status and future perspectives[J]. *Allelopathy Journal*, 2015, 36 ( 2 ): 167—196.
- [ 5 ] Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P, et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11 ( 11 ): 789—799.
- [ 6 ] Sun B, Lu Y H, Zhang X D, et al. Research progress on impact mechanisms of cultivated land fertility on nutrient use of chemical fertilizers and their regulation[J]. *Soils*, 2017, 49 ( 2 ): 209—216. [孙波, 陆雅海, 张旭东, 等. 耕地地力对化肥养分利用的影响机制及其调控研究进展[J]. 土壤, 2017, 49 ( 2 ): 209—216.]
- [ 7 ] Seid A, Fininsa C, Mekete T, et al. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot *Nematodes* (*Meloidogyne* spp.)—A century-old battle[J]. *Nematology*, 2015, 17 ( 9 ): 995—1009.
- [ 8 ] Kepenekci I, Hazir S, Oksal E, et al. Application methods of *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii* and *Purpureocillium lilacinum* to control root-knot nematodes in greenhouse tomato systems[J]. *Crop Protection*, 2018, 108: 31—38.
- [ 9 ] Gao X H, Zhang Y P, Liu Z H, et al. Effects of cultivating years on soil ecological environment in greenhouse of Shouguang City, Shandong Province[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35 ( 5 ): 1452—1459. [高新昊, 张英鹏, 刘兆辉, 等. 种植年限对寿光设施大棚土壤生态环境的影响[J]. 生态学报, 2015, 35 ( 5 ): 1452—1459.]
- [ 10 ] Wang X B, Luo Y M, Li Z G, et al. Effects of long-term stationary fertilization experiment on incidence of soil-borne diseases and biological characteristics of peanut in continuous monocropping system in red soil area[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48 ( 4 ): 725—730. [王小兵, 骆永明, 李振高, 等. 长期定位施肥对红壤地区连作花生生物学性状和土传病害发生率的影响[J]. 土壤学报, 2011, 48 ( 4 ): 725—730.]
- [ 11 ] Čepulytė R, Danquah W B, Bruening G, et al. Potent attractant for root-knot *Nematodes* in exudates from seedling root tips of two host species[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: Article number 10847.
- [ 12 ] Johnson S N, Rasmann S. Root-feeding insects and their interactions with organisms in the rhizosphere[J]. *Annual Review of Entomology*, 2015, 60 ( 1 ): 517—535.
- [ 13 ] van Dam N M, Bouwmeester H J. Metabolomics in the rhizosphere: Tapping into belowground chemical communication[J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21 ( 3 ): 256—265.
- [ 14 ] Ai C, Sun J W, Wang X B, et al. Advances in the study of the relationship between plant rhizodeposition and soil microorganism[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21 ( 5 ): 1343—1351. [艾超, 孙静文, 王秀斌, 等. 植物根际沉积与土壤微生物关系研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21 ( 5 ): 1343—1351.]
- [ 15 ] Yang X, Feng L, Zhao L, et al. Effect of *Glycine* nitrogen on lettuce growth under soilless culture: A metabolomics approach to identify the main changes occurred in plant primary and secondary metabolism[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98 ( 2 ): 467—477.
- [ 16 ] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.]
- [ 17 ] Jiang C H, Xie P, Li K, et al. Evaluation of root-knot nematode disease control and plant growth promotion potential of biofertilizer Ning shield on *Trichosanthes kirilowii* in the field[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49 ( 2 ): 232—239.
- [ 18 ] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, et al. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis[J]. *Nature Methods*, 2015, 12 ( 6 ): 523—526.
- [ 19 ] Kind T, Wohlgemuth G, Lee D Y, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 ( 24 ): 10038—10048.
- [ 20 ] Yang X, Wei S W, Liu B, et al. A novel integrated non-targeted metabolomic analysis reveals significant metabolite variations between different lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties[J]. *Horticulture Research*, 2018, 5: Article number 33.
- [ 21 ] Chong J, Soufan O, Li C, et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46 ( W1 ): W486—W494.
- [ 22 ] Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for

- identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80 ( 1 ): 115—122.
- [ 23 ] Han J P, Luo Y H, Yang L P, et al. Acidification and salinization of soils with different initial pH under greenhouse vegetable cultivation[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, 14 ( 10 ): 1683—1692.
- [ 24 ] Sun H W, Wei C, Xu W S, et al. Characteristics of salt contents in soils under greenhouse conditions in China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26 ( 4 ): 3882—3892.
- [ 25 ] Liu P, Zhao H J, Zhong Z W, et al. The effects of three root exudated fatty acids on peanut ( *Arachis hypogaea* L. ) growth and soil enzymes activities[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33 ( 11 ): 3332—3339. [刘苹, 赵海军, 仲子文, 等. 三种根系分泌脂肪酸对花生生长和土壤酶活性的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33 ( 11 ): 3332—3339.]
- [ 26 ] Li X Y, Lewis E E, Liu Q Z, et al. Effects of long-term continuous cropping on soil nematode community and soil condition associated with replant problem in strawberry habitat[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: Article number 30466.
- [ 27 ] Li X G, Ding C F, Zhang T L, et al. Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 72: 11—18.
- [ 28 ] Ma Y Y, Li Y L, Lai H X, et al. Effect of sick rhizosphere soil under tomato continuous cropping on soil *Nematodes*, microbes and tomato growth[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2017, 25 ( 5 ): 730—739. [马媛媛, 李玉龙, 来航线, 等. 连作番茄根区病土对番茄生长及土壤线虫与微生物的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2017, 25 ( 5 ): 730—739.]
- [ 29 ] Dutta T K, Powers S J, Gaur H S, et al. Effect of small lipophilic molecules in tomato and rice root exudates on the behaviour of *Meloidogyne incognita* and *M. Graminicola*[J]. *Nematology*, 2012, 14 ( 3 ): 309—320.
- [ 30 ] van de Voorde T F J, Ruijten M, van der Putten W H, et al. Can the negative plant-soil feedback of *Jacobaea vulgaris* be explained by autotoxicity?[J]. *Basic and Applied Ecology*, 2012, 13 ( 6 ): 533—541.
- [ 31 ] Fang Z Y. The effects and mechanisms of *Bacillus amyloliquefacien* strain SQY<sub>162</sub> on biological control of bacterial wilt of tomato[D]. Nanjing : Nanjing Agricultural University, 2016. [房志颖. 解淀粉芽孢杆菌 SQY<sub>162</sub> 防控土传番茄青枯病效果及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.]
- [ 32 ] Kihika R, Murungi L K, Coyne D, et al. Parasitic nematode *Meloidogyne incognita* interactions with different *Capsicum annum* cultivars reveal the chemical constituents modulating root herbivory[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: Article number 2903.
- [ 33 ] Dong L L, Li X L, Huang L, et al. Lauric acid in crown daisy root exudate potently regulates root-knot nematode chemotaxis and disrupts Mi-flp-18 expression to block infection[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65 ( 1 ): 131—141.
- [ 34 ] Nahar K, Kyndt T, de Vleeschauwer D, et al. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot *Nematodes* in rice[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157 ( 1 ): 305—316.
- [ 35 ] Manosalva P, Manohar M, von Reuss S H, et al. Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: Article number 7795.
- [ 36 ] Hu C Y, Shi J X, Quan S, et al. Metabolic variation between japonica and indica rice cultivars as revealed by non-targeted metabolomics[J]. *Scientific Reports*, 2015, 4: Article number 5067.
- [ 37 ] Zhao K, Zhou B H, Ma W Z, et al. The influence of different environmental stresses on root-exuded organic acids: A review[J]. *Soils*, 2016, 48 ( 2 ): 235—240. [赵宽, 周葆华, 马万征, 等. 不同环境胁迫对根系分泌有机酸的影响研究进展[J]. *土壤*, 2016, 48 ( 2 ): 235—240.]
- [ 38 ] Wang C L, Lower S, Williamson V M. Application of pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour[J]. *Nematology*, 2009, 11 ( 3 ): 453—464.

(责任编辑: 陈荣府)