

DOI: 10.11766/trxb202107140361

任翔宇, 刘满意, 孙铭泽, 杨劲明, 王蓓蓓, 李荣. 香蕉根际土壤原生动物群落特征及与枯萎病病原菌的关系[J]. 土壤学报, 2023, 60 (2): 558–567.

REN Xiangyu, LIU Manyi, SUN Mingze, YANG Jinming, WANG Beibei, LI Rong. Characteristics of Protist Community in Banana Rhizosphere Soil and Interactions between Protists and Pathogens of *Fusarium* Wilt Disease[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (2): 558–567.

## 香蕉根际土壤原生动物群落特征及与枯萎病病原菌的关系\*

任翔宇<sup>1</sup>, 刘满意<sup>1</sup>, 孙铭泽<sup>1</sup>, 杨劲明<sup>1</sup>, 王蓓蓓<sup>1†</sup>, 李 荣<sup>2</sup>

(1. 海南大学热带作物学院, 海口 570228; 2. 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室, 江苏省有机固体废弃物协同创新中心, 教育部资源节约型肥料工程技术研究中心, 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

**摘要:** 香蕉枯萎病由病原真菌尖孢镰刀菌 4 号生理小种引起, 其根际微生物组是抵御病原菌入侵的关键屏障。根际原生动物群落在根际微生物群落调控以及植物健康方面有不可忽视的作用。利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析连作蕉园中植株发病前后根际土壤原生动物群落特征变化以及其与病原菌的相互关系。结果表明: 相较于可培养细菌与真菌, 原生动物的数量对病原菌的种群数量变化的影响更大; 根际原生动物的群落多样性与丰富度都随植株生长而降低, 且在发病植株中更低; 抽蕾前后的健康与发病植株中根际原生动物群落结构存在显著差异; 总体而言, 吞噬型原生动物的相对丰度显著高于其他功能类型的原生动物, 且在健康与发病植株中差异显著; 吞噬型原生动物中与病原菌具有显著相关性的多为丝足虫门; 在抽蕾期的健康植株中, 丝足虫门的高丰度属中 *Group-Te* 与 *Cercomonas* 属与病原菌呈显著负相关; 在抽蕾期的患病植株中, 相对丰度较高的植物致病型原生动物 *Pythium* 属与病原菌呈显著正相关。综上所述, 根际土壤中原生动物对病原菌的影响较大, 在植株生长过程中, 原生动物的群落特征发生改变, 且在发病与健康植株中存在差异。与病原菌具有显著负相关的吞噬型原生动物, 尤其是丝足虫门的部分高丰度属, 可能会在防控香蕉枯萎病上产生一定潜力。

**关键词:** 香蕉土传枯萎病病原菌; 根际; 土壤原生动物; 吞噬型原生动物; 土传病害防治

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

## Characteristics of Protist Community in Banana Rhizosphere Soil and Interactions between Protists and Pathogens of *Fusarium* Wilt Disease

REN Xiangyu<sup>1</sup>, LIU Manyi<sup>1</sup>, SUN Mingze<sup>1</sup>, YANG Jinming<sup>1</sup>, WANG Beibei<sup>1†</sup>, LI Rong<sup>2</sup>

(1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Solid Organic Waste Utilization, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Solid Organic Wastes, Ministry of Education Engineering Center of Resource-Saving Fertilizers, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] As a serious banana disease and a significant limiting factor in banana production worldwide, banana

\* 海南省自然科学基金项目(320RC483)和国家自然科学基金项目(41867006)资助 Supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 320RC483) and the National Natural Science Foundation of China (No. 41867006)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: Wangbbhaida@163.com

作者简介: 任翔宇(1996—), 女, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: 513997654@qq.com

收稿日期: 2021-07-14; 收到修改稿日期: 2022-01-15; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-03-16

*Fusarium* wilt disease is caused by the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4(FOC). The rhizosphere microbiome of plants is a key barrier that defends plant roots from an invasion of soil-borne pathogens. Most studies of the rhizosphere microbiome have focused on bacterial and fungal communities. However, as an important component of the rhizosphere microbiome, the rhizosphere protist community has been neglected in the regulation of microbiome and plant health. This study was conducted to explore the characteristics of the soil protist community in healthy and diseased plants and the interactions between protists and pathogens through field experiments of continuous cropping of bananas. 【 Method 】 In this paper, high-throughput Illumina MiSeq sequencing was applied to analyze the differences of soil protist community structure and composition among different treatments in field experiments. 【 Result 】 Results show that the relative importance of protists in predicting pathogenic *Fusarium* number was 47.19%, suggesting that protists might be the best predictor for pathogen number than culturable bacteria and fungi. The diversity and richness of the rhizosphere protist community decreased during plant growth and was lower in diseased plants. The composition and community structure of protists differed between healthy and diseased plants in rhizosphere soil. Also, the relative abundance of phagotrophic protists was highest compared to other functional groups in all soil samples, showing an increasing trend throughout plant development and enriched in diseased plants. Before the heading stage, the relative abundance of *Bacillariophyta\_X\_unclassified*, a phototrophic protist, was highest in healthy plants but decreased at a later stage. In healthy plants, the relative abundances of *Group-Te* and *Cercomonas*, phagotrophic protists, were higher at the heading stage. It was also observed that diseased plants showed a higher relative abundance of *Pythium* while phagotrophic protists, particularly *Cercozoa* protists, had significant correlations with *Fusarium* than other protistan communities. *Group-Te* and *Cercomonas*, two *Cercozoa* taxa, were negatively linked with the pathogen. In contrast, pathogens in diseased plants were positively linked with *Pythium*, which was a plant pathogenic protist. 【 Conclusion 】 Protists in the rhizosphere soil demonstrated a greater impact on pathogens. The community characteristics of protists in rhizosphere soil changed in the process of plant growth and differed between healthy and diseased plants. Particularly *Group-Te* and *Cercomonas* were negatively linked with the pathogen, which might have potential in the prevention and control of banana wilt disease. Future research should focus on (i) the isolation and purification of phagotrophic protists negatively related to pathogens, (ii) exploring the mechanism of phagotrophic protists and pathogens, and (iii) investigating the internal connection with other beneficial microorganisms in rhizosphere soil to improve the efficiency of controlling banana wilt.

**Key words:** Pathogen of *Fusarium* wilt disease; Rhizosphere; Soil protists; Phagotrophic protists; Controlling of soil-borne disease

香蕉枯萎病是由真菌尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 侵染引起的<sup>[1]</sup>, 又称为巴拿马病或黄叶病, 于 1904 年在美国夏威夷首次被发现<sup>[2]</sup>, 是病虫害中对香蕉危害最为严重的一种。尖孢镰刀菌会破坏植株的维管束结构, 使其木质部导管堵塞, 从而导致植株假茎开裂、叶片发黄, 随后植株枯萎死亡<sup>[3]</sup>。

根际微生物组是抵御香蕉枯萎病病原菌 (致病性尖孢镰刀菌) 入侵并保护植物健康的关键屏障, 其对病原菌的拮抗作用使得植物能够免受其侵染<sup>[4]</sup>。然而, 根际微生物群落在土传病害防治上的研究多集中于细菌和真菌<sup>[5-6]</sup>, 原生动物作为根际微生物组中另一个重要的微生物群体, 受到的关注较少<sup>[7-8]</sup>。原生动物在根际具有多种功能: 部分原生动物可以直接对细菌及真菌进行捕食, 扮演着根

际土壤食物网中消费者的角色; 部分原生动物寄生于植物; 也有部分原生动物参与了分解有机质的过程, 在碳氮循环和养分转化过程中发挥着重要作用等等<sup>[9-11]</sup>。

研究表明, 原生动物对于土壤环境变化的响应比细菌与真菌更强烈, 患病植株中, 根际原生动物的群落结构对病原菌种群数量的解释力度高于细菌与真菌<sup>[12]</sup>, 原生动物对植株的健康起到了预测作用<sup>[13-14]</sup>。Foissner<sup>[15]</sup>证实当土壤原生动物存在时, 即使加入病原菌也不会影响作物的正常生长, 而不接种原生动物的对照组则在几天之内发病枯萎。最新的研究结果表明吞噬型原生动物可能能够通过直接捕食作用来抑制病原青枯菌的数量, 推动了对番茄青枯病的防治进展<sup>[12]</sup>。而原生动物在香蕉

土传枯萎病的防治上鲜有报道。因此,本研究通过采用近年来在探索微生物群落中使用较为广泛的高通量测序方法<sup>[16]</sup>来探究连作蕉园中植株发病前后根际土壤原生动植物群落特征以及其与病原菌的关系,以探明根际原生动植物在香蕉枯萎病防控中的潜力。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

试验于2018年10月至2019年8月在海南省澄迈县桥头镇(19°23'N, 109°35'E)进行。该地区属热带季风气候,年平均气温 23.8 °C,降水量 1 786 mm,且热雨同季,台风影响较弱。试验田土壤为砖红壤,土壤 pH 5.53、有机质 16.84 g·kg<sup>-1</sup>、碱解氮 93.47 mg·kg<sup>-1</sup>、铵态氮 14.19 mg·kg<sup>-1</sup>、硝态氮 10.81 mg·kg<sup>-1</sup>、有效磷 96.57 mg·kg<sup>-1</sup>、速效钾 372 mg·kg<sup>-1</sup>。

试验田所种香蕉品种为巴西蕉(*Mimosa nana* Lour.),苗龄 2 个月,由海南大学儋州校区中国热带农业科学院试验研究基地提供。

### 1.2 试验方法

2018年10月12日定植香蕉苗,香蕉行距 2 m、株距 2 m。2018年11月在蕉园中选取香蕉苗长势均匀相邻的两列,每列香蕉植株 60 棵作为样品采集对象,两列周边香蕉行设为保护行。水分管理:抽蕾前使田间持水量保持在 85%左右,抽蕾后使田间持水量保持在 75%左右。施肥管理:底肥每株施腐熟的羊粪有机肥 5 kg,同时添加磷肥 0.2 kg,均匀拌入施肥穴;前期(前 3 个月)每 10~15 天追施一次肥,第一个月每株每次淋施 400 倍尿素水溶液约 4 kg,后两个月每株每次淋施 200 倍硫酸钾复合肥(15-15-15)水溶液约 4 kg;中期每 15~20 天追施一次肥,每株每次淋施 66 g 尿素、60 g 硫酸钾复合肥和 166 g 硫酸钾;后期每 25~30 天追施一次肥,每株每次淋施 50 g 尿素、80 g 硫酸钾复合肥和 110 g 硫酸钾。

### 1.3 样品采集与分析

分别在抽蕾期前与抽蕾期采集土壤样品。1)抽蕾期前随机选取 3 棵健康香蕉植株,组成一个混合香蕉根际土。共采集 15 棵健康香蕉植株,组成 5 个混合重复样品,记为 BH(Healthy plants before

heading stage)。2)抽蕾期香蕉大量发病后选取发病率较高的一列,随机采集 3 棵发病香蕉植株,组成一个混合香蕉根际土。共采集 15 棵发病香蕉植株,组成 5 个混合重复样品,记为 AD(Diseased plants at heading stage)。3)采集 AD 样品中每棵患病植株相邻的健康香蕉植株的根际土,同样三棵组成一个混合重复,共采集相邻健康香蕉植株 15 棵,组成 5 个混合样品,记为 AH(Healthy plants at heading stage)。

根际土样放入冰盒内带回实验室,抖落根系表层土壤,抖落的根围土壤过 2 mm 筛后风干,用于土壤理化性质的测定;然后用无菌剪刀将根系剪成 5 cm 左右小段,装入到含有 500 mL 无菌水的组培瓶内,然后以 170 r·min<sup>-1</sup>的速度振荡 30 min。振荡完成后,用纱布过滤到灭菌后的锥形瓶内,然后将瓶内悬浊液转移到 50 ml 离心管内,配平后用冷冻离心机 4 °C, 10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 3 min,弃去上清液后底部土壤即为根际土<sup>[17]</sup>,取约 100 g 放置到 -80 °C 冰箱,用于提取 DNA,随后进行高通量测序。

土壤理化性质分析:pH 采用电位法测量,水土比为 5:1;通过油浴法测定土壤有机质;0.03 mol·L<sup>-1</sup>氟化铵和 0.025 mol·L<sup>-1</sup>盐酸浸提—钼锑抗比色法测定土壤有效磷;1 mol·L<sup>-1</sup>中性乙酸铵溶液浸提—火焰光度计法测定土壤速效钾;2 mol·L<sup>-1</sup>氯化钾溶液浸提—紫外分光光度计法测硝态氮;2 mol·L<sup>-1</sup>氯化钾溶液浸提—靛酚蓝比色法测铵态氮;具体方法详见《土壤农化分析》<sup>[18]</sup>。

### 1.4 土壤可培养微生物数量的测定

土壤可培养病原菌尖孢镰刀菌、细菌、真菌的数量均通过稀释涂布计数法测定<sup>[19]</sup>,可培养尖孢镰刀菌计数使用 K2 培养基,28 °C 培养 72 h;细菌采用 LB 培养基,30 °C 培养 24 h;真菌采用马丁氏培养基,28 °C 培养 72 h。将培养后计数平板上形成的菌落数转换成每克干土形成的菌落数(Colony forming unit, CFU),以 CFU·g<sup>-1</sup>干土表示;原生动植物数量采用改进的“3 级 10 倍”环式稀释法计数分析<sup>[20]</sup>,称取 2 g 风干土样后加入 198 mL 蒸馏水,充分震荡 1 h,得到稀释度为 10<sup>2</sup>的土壤悬浮液;吸取 2 mL 悬浮液,加入 18 mL 无菌水,充分摇匀,此时稀释度为 10<sup>3</sup>;按此方法配制稀释度为 10<sup>4</sup>的土壤悬浮液;每级各取 1 mL 接种于各自的培养环内,每级

稀释液接种 2 个培养皿 10 个环,将培养皿置于 25 °C 光照培养箱中培养,分别在第 4、7、11 天于显微镜下镜检,并依据“3 级 10 倍”环式稀释法原生动物流密度换算表计算每克烘干土壤中原生动物流的数量。

取 0.80 g 混合土壤样品,用土壤 DNA 提取试剂盒 (PowerSoil DNA Isolation Kit) 按照说明书上的要求提取每个混合土壤样品的 DNA 提取。提取好的 DNA 用核酸定量仪 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA) 测定其核酸浓度,然后存于 -20 °C 冰箱备用。每个重复分别吸取 20 μL 样品送至美格基因公司进行测序,以基因组 DNA 为模板,根据测序区域的选择,使用带 barcode 的特异引物及 TaKaRa Premix Taq<sup>®</sup> Version 2.0 (TaKaRa Biotechnology Co., Dalian, China) 进行 PCR 扩增。原生动物流 18SV4 区域采用引物 528F (5'-GCGGTAA TTCCAGCTCCAA-3') 和 706R (5'-AATCCRAGAAT TTCACCTCT-3')<sup>[21]</sup>;真菌测序 ITS1 区域采用引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')<sup>[22]</sup>。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 2 min, 进入热循环: 98 °C 变性 15 s, 55 °C, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。每个样本进行 3 个重复,并将同一样本的 PCR 产物进行混合。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段长度和浓度。按照 NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II DNA Library Prep Kit for Illumina<sup>®</sup> (New England Biolabs, USA) 标准流程进行建库操作。使用 Illumina Nova 6000 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。原始数据上传至 NCBI Sequence Read Archive (SRA) 中,序列号为: PRJNA762227。

### 1.5 数据处理

根据每个样品所特有的 barcode 信息,利用 QIIME 软件将序列分开形成各自的 fastaq 文件。利用 FLASH V1.2.7 软件将分开的 fastaq 文件合并,再利用 QIIME 软件将低质量的序列(质量分数小于 0.5 或长度低于 200bp 或单序列)滤掉<sup>[23]</sup>。用 USEARCH 软件按照 UPARSE pipeline 分析优质序列,以 97% 的相似度标注生成 OTU (Operational taxonomic units) 并筛选出代表序列<sup>[24]</sup>。利用 RDP classifier (<https://pyro.cme.msu.edu>) 对 OTU 代表序列进行比对,病原菌使用 UNITE Fungal ITS 数据库<sup>[25]</sup>,原

生动物利用 PR2 数据库 (Protist Ribosomal Reference database) 进行比对<sup>[26]</sup>,删去红藻门 (Rhodophyta)、链藻门 (Streptophyta)、后生动物门 (Metazoa)、真菌门 (Fungi) 和未分类的后角藻门序列 (unclassified Opisthokonta sequences),以生成一个原生动物流的 OTU 分类学综合信息表,用于之后的分析<sup>[11]</sup>。根据原生动物流行使的功能将其分为:吞噬型 (Phagotrophic),光养型 (Phototropic),植物致病型 (Plant pathogenic),寄生型 (Parasitic),腐生型 (Saprophytic) 和兼养型 (Mixotrophic)<sup>[27-29]</sup>。

通过 R 语言的 relaimpo 包进行可培养微生物与原生动物流数量对病原菌种群数量的相对重要性分析,采用 IBM SPSS Statistics 20 统计分析软件,通过独立样本 *t* 检验进行数据比较,检验处理间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。将 USEARCH 程序中生成的 OTU 表格格式进行转化后,用 Mothur 对转化后的文件进行 Alpha 多样性的分析,包括 Shannon 指数,Chao1 指数<sup>[30]</sup>。基于贝叶斯距离 (Bray-distance) 进行各处理间的主坐标分析 (Principal Coordinates Analysis, PCoA)。相似性分析 (ANOSIM, Analysis of similarity) 与置换多元方差分析 (PERMANOVA, Permutational multivariate analysis of variance) 用于判断差异是否到达显著水平 ( $P < 0.05$ ),通过 R 语言的 vegan 包完成。原生动物流各个功能类型在不同生长期不同处理的相对丰度采用 Microsoft Excel 2017 软件进行数据处理与作图。不同处理根际土壤中相对丰度前 50 的原生动物流 OTU 热图通过 R 语言的 gplots 包完成。采用 R 语言中 ggcorrplot 和 corrplot 包进行 Spearman 相关性分析<sup>[31]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 香蕉根际土壤中可培养微生物与原生动物流对病原菌的影响

表 1 为抽蕾前后可培养细菌、真菌和原生动物流数量及其对病原菌种群数量的影响力。抽蕾前可培养细菌、真菌的数量均低于抽蕾后,病原菌在发病植株中的数量显著高于健康植株 ( $P < 0.05$ ),抽蕾后原生动物流在发病植株中的数量也高于健康植株。对比可培养细菌与真菌,原生动物流的数量对病原菌的种群数量变化的影响力更大。

表 1 土壤可培养微生物数量及对病原菌种群数量的影响力

Table 1 Number of culturable soil microbes and the relative importance for pathogenic *Fusarium* number

可培养微生物 Culturable microbes	细菌 Bacteria/ (log (CFU·g <sup>-1</sup> dry soil))	真菌 Fungi/ (log (CFU·g <sup>-1</sup> dry soil))	原生动物 Protist/ (log (ind·g <sup>-1</sup> dry soil))	病原菌 <i>Fusarium</i> / (log (CFU·g <sup>-1</sup> dry soil))
BH	7.59±4.73b	5.34±3.52c	4.60±3.55a	3.93±2.49b
AD	7.81±5.35a	5.81±3.94a	4.64±3.94a	4.20±2.01a
AH	7.81±5.38a	5.80±3.91b	4.32±3.67b	3.93±2.03b
相对重要性 Relative importance	20.45%	21.56%	47.19%	—

注: BH: 抽蕾前健康植株; AD: 抽蕾后发病植株; AH: 抽蕾后健康植株。不同字母表示不同处理间差异显著 ( $P<0.05$ )。下同。Note: BH: Healthy plants before heading stage; AD: Diseased plants at heading stage; AH: Healthy plants at heading stage. Different letters indicated significant differences between treatments ( $P<0.05$ ). The same below.

## 2.2 香蕉根围土壤化学性质

表 2 可以看出, 抽蕾后香蕉植株根围土壤的 pH 显著高于抽蕾前 ( $P<0.05$ ), 抽蕾后铵态氮、硝态氮、速效钾均显著低于抽蕾前 ( $P<0.05$ ), 抽蕾后的健康植株根围土中 pH、硝态氮、有效磷、有机质显著高于发病植株 ( $P<0.05$ ), 抽蕾后发病植株的铵态氮、速效钾都显著高于发病植株 ( $P<0.05$ )。

## 2.3 不同香蕉根际原生动物群落多样性

不同样品中香蕉根际土壤的原生动物 Alpha 多样性指数如图 1 所示。抽蕾前的健康香蕉根际中原生动物的香农指数和 Chao1 指数均显著高于抽蕾期 ( $P<0.05$ )。抽蕾期患病植株香农指数显著低于临近的健康植株 ( $P<0.05$ ), 而 Chao1 指数值与健康植株无显著差异。

## 2.4 不同香蕉根际样品中土壤原生动物群落结构

图 2 主坐标分析表明, 不同样品之间原生动物群落结构存在显著差异 ( $P<0.05$ )。抽蕾前的健康植

株与抽蕾后根际原生动物的群落结构在第一主成分上显著分离 ( $P<0.05$ ), 在抽蕾期发病与健康植株的原生动物群落结构在第二主成分上显著分离 ( $P<0.05$ )。第一主成分和第二主成分分别占总贡献率的 50.02% 和 30.86%。

## 2.5 不同香蕉根际样品中土壤原生动物群落组成的差异

不同样品土壤原生动物各个功能类型相对丰度如图 3 所示。无论是在抽蕾前后、发病与健康植株中吞噬型原生动物 (Phagotrophic protist) 相对丰度均显著高于其他功能类型的原生动物。吞噬型原生动物在抽蕾后相对丰度显著升高 ( $P<0.05$ ), 且在发病植株中最高 (59.47%)。光氧型原生动物 (Phototropic protist) 在抽蕾前相对丰度较高, 在抽蕾后相对丰度显著降低 ( $P<0.05$ )。植物致病型原生动物 (Plant pathogenic protist) 在抽蕾后的相对丰度显著升高 ( $P<0.05$ ), 且在发病植株中达到最高 (14.97%)。

表 2 香蕉根围土壤的化学性质

Table 2 Soil chemical properties of banana in soil

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter/ (g·kg <sup>-1</sup> )	铵态氮 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	有效磷 Available phosphorus/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	速效钾 Available potassium/ (mg·kg <sup>-1</sup> )
BH	6.40±0.02c	14.52±0.99b	15.54±0.33a	12.52±0.63a	114.75±1.79b	80.53±0.77a
AD	6.51±0.02b	14.41±0.82b	14.66±0.23b	5.45±0.31c	99.13±2.83c	77.19±1.02b
AH	6.74±0.02a	16.47±0.38a	13.56±0.20c	7.92±0.43b	128.33±2.30a	68.97±1.39c

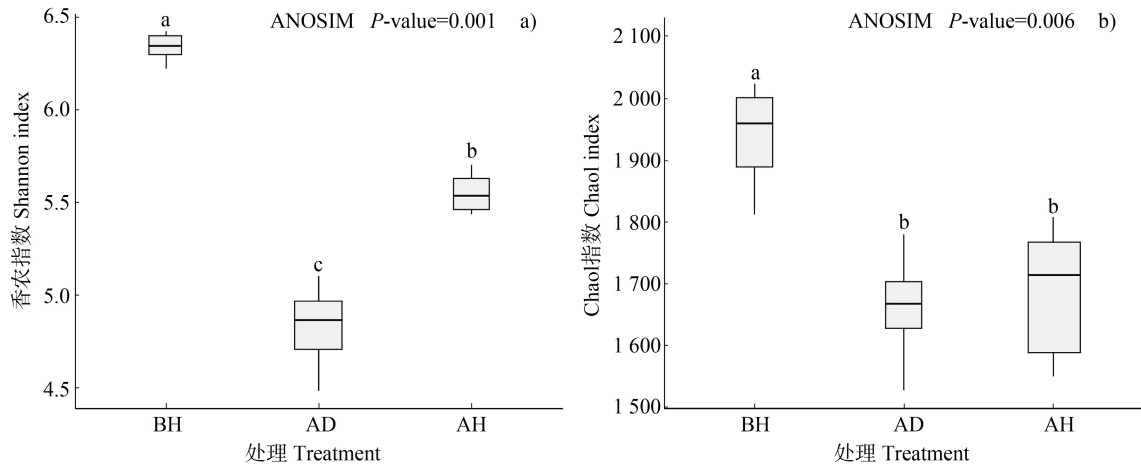


图 1 原生动物的 Alpha 多样性指数：a) 香农指数；b) Chao1 指数

Fig. 1 Alpha Diversity Indexes of protists in different treatments: a) Shannon index; b) Chao1 index

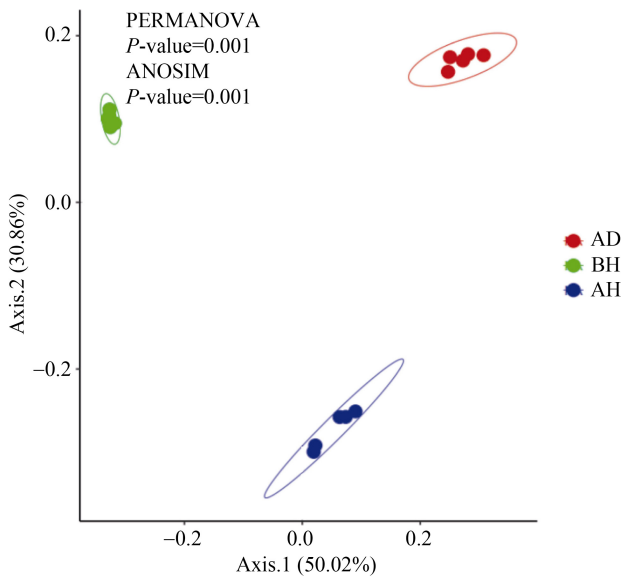
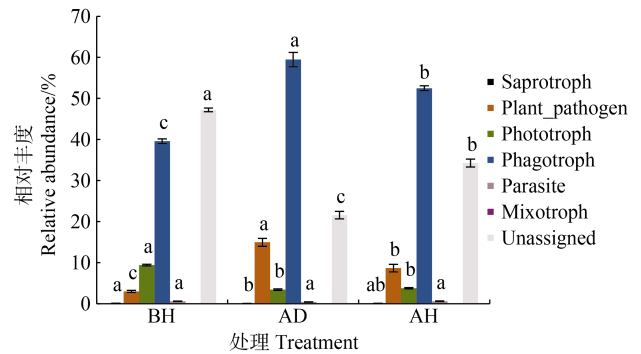


图 2 不同处理间原生动物群落主坐标分析

Fig. 2 Principal coordinate analysis of protist communities between treatments

在抽蕾前后、发病与健康植株之间原生动物群落组成差异显著(图 4)。所有样品中,吞噬型原生动物的相对丰度都较高,且多属于丝足虫(*Cercozoa*),其次为光氧型原生动物。抽蕾前健康植株中,相对丰度最高的为光氧型原生动物 OTU18(*Ochrophyta*, *Bacillariophyta\_X\_unclassified*),到抽蕾期,无论是健康或是发病植株,OTU18 的相对丰度都降低。抽蕾期的发病植株中,相对丰度最高的为一种植物致病型原生动物 OTU5 (*Pseudofungi*, *Pythium*),而抽蕾期健康植株中,相对丰度最高的为吞噬型原生动物 OTU16(*Cercozoa*, *Group-Te*),且 OTU16(*Cercozoa*,



注：不同字母代表同一功能类型的原生动物在不同处理之间的差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Different letters indicated significant differences between treatments of the same functional taxonomic protist ( $P < 0.05$ ) .

图 3 各个功能类型在不同生长期不同处理的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of different functional taxonomic protist rhizosphere soil different treatments with different growth periods

*Group-Te*) 在健康植株中相对丰度显著高于发病植株 ( $P < 0.05$ )。

不同时期病原菌的相对丰度具有显著差异 ( $P < 0.05$ ),抽蕾前病原菌的相对丰度较高;抽蕾后病原菌在发病植株中的相对丰度高于健康植株,差异具有显著性 ( $P < 0.05$ , 图 5a)。

相对丰度前 20 个原生动物 OTU 与病原菌的相关性分析显示,与病原菌呈显著的负相关关系的 OTU 有 9 个 ( $P < 0.05$ ),其中吞噬型原生动物有 7 个,2 个属于纤毛虫(*Ciliophora*),1 个属于变形虫(*Lobosa*),4 个属于丝足虫门(*Cercozoa*),包含了 *Group-Te*、*Cercomonas* 和 *Filosa-Sarcomonadea* 属。

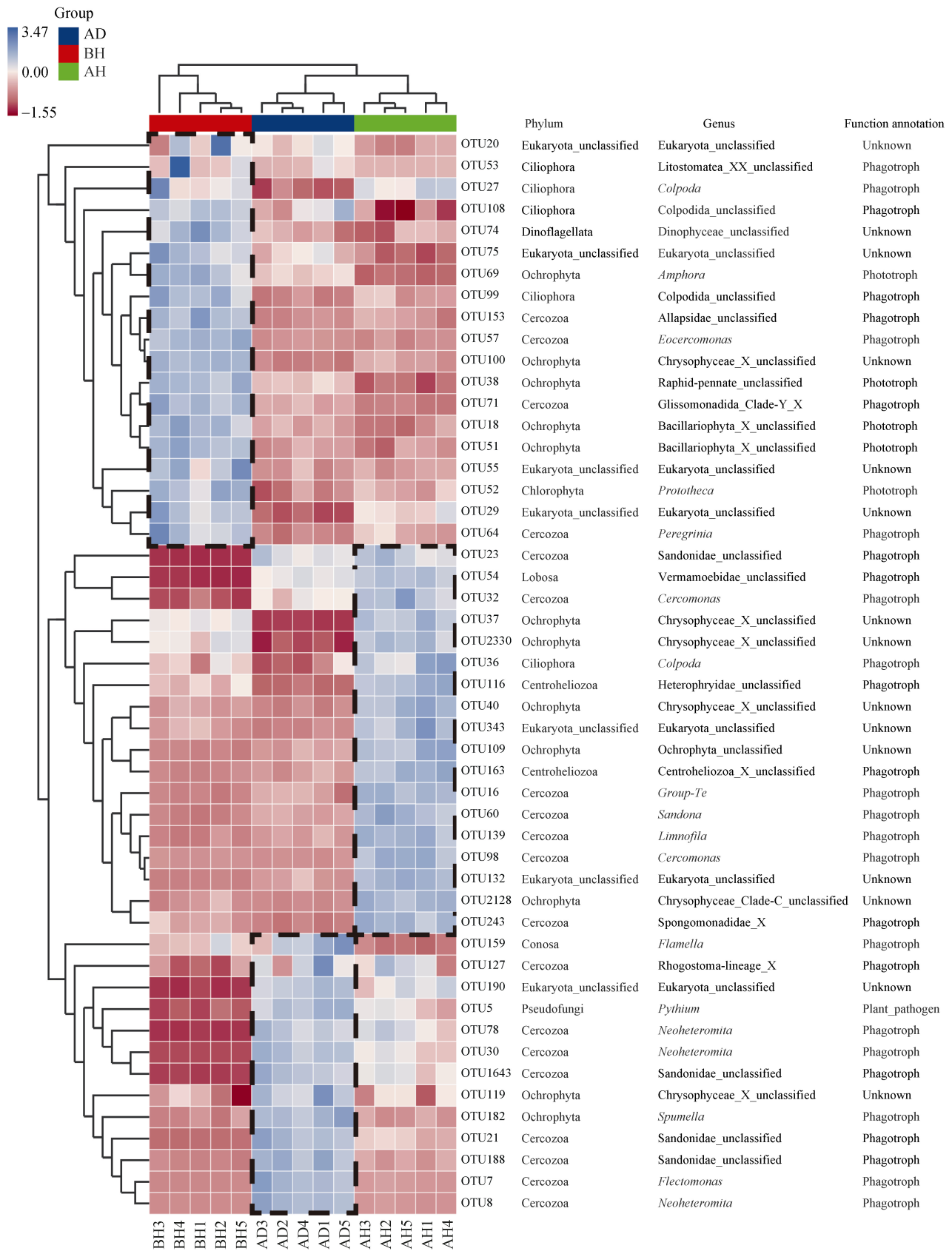


图 4 不同处理根际土壤中相对丰度前 50 的原生动物 OTU 热图

Fig. 4 Heat map of the top 50 protist OTUs in the rhizosphere soil samples collected from different treatments



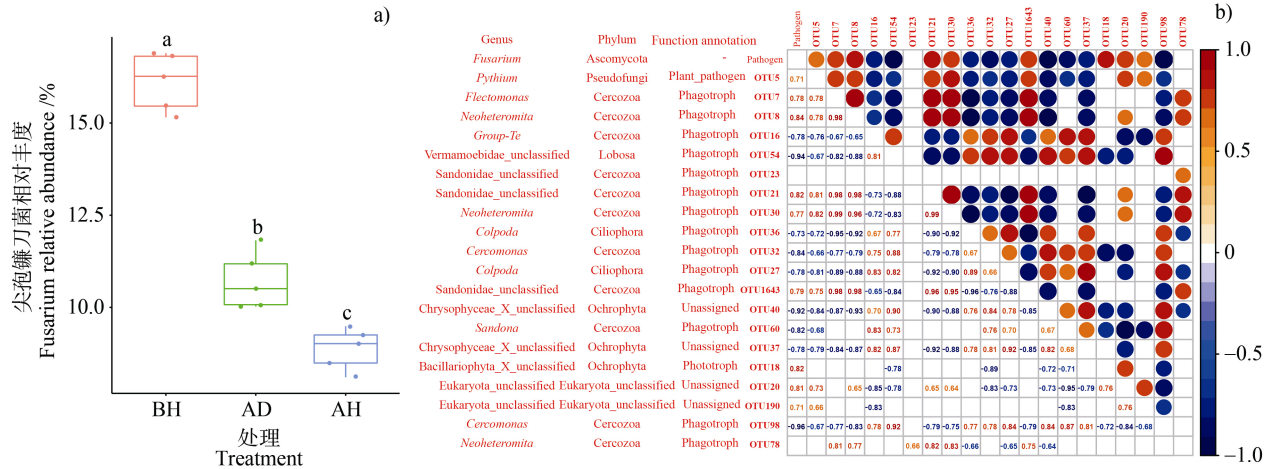


图 5 不同处理下病原菌的相对丰度 (a) 及相对丰度前 20 个原生动物 OTU 与病原菌的 Spearman 相关性 (b)

Fig. 5 The relative abundance of *Fusarium* in different treatments (a) and the Spearman correlations between the relative abundance of top 20 indicator protistan taxa (OTUs) and *Fusarium* (b)

与病原菌呈显著的正相关关系的 OTU 同样有 9 个 ( $P < 0.05$ ), 其中有 5 个吞噬型原生动物, 均属于丝足虫门 (Cercozoa), 包含了 *Flectomonas*、*Neoheteromita* 和 *Sandonidae\_unclassified* 属。

### 3 讨论

长期连续种植同一作物与不合理的施肥方式是香蕉枯萎病发生的重要原因, 同时, 土壤环境的问题例如土壤板结、土壤容重下降与土壤微生物群落逐渐失衡, 这些均会导致土传病原菌的加速繁殖, 而根际土壤的微生物群落对作物的生长和健康有重要的影响。为解决这些问题, 改善连作蕉园根际土壤微生物群落成为至关重要的一步。原生动物作为土壤微生物群落的重要组成部分, 关于其在土壤功能方面的研究一直较少。本研究中, 土壤可培养微生物和原生动物对病原菌影响的相对重要性分析结果表明, 对比可培养细菌与真菌, 原生动物的数量对病原菌种群数量变化的解释率更高, 与之前的研究一致<sup>[32]</sup>。因此找到某种与病原菌有着负相关关系甚至是抑制作用的原生动物可能会成为一种防治土传病害的有效手段。

之前的研究发现健康与发病的番茄植株中原生动物的群落结构有显著分离<sup>[12]</sup>, 这与本研究结果一致。本研究中, 在根际土壤中原生动物不仅在不同时期的群落结构显著分离, 在同一时期, 健康与发病植株中原生动物的群落结构也同样差异显著。随

着香蕉植株的生长, 根际土壤中原生动物的多样性与丰度均呈下降趋势, 健康植株中原生动物群落的多样性较发病植株中的更高, 这与 Ceja-Navarro 等<sup>[33]</sup>的研究结果相似, 他们发现健康柳枝稷根际土壤中的原生动物多样性与丰富度随植物生长而降低。这可能是由于香蕉到达抽蕾期, 根际土壤环境如细菌和真菌群落结构等发生改变, 原生动物群落内部对细菌真菌等食物的竞争加剧, 而某些原生动物的竞争力可能大于其他类群的原生动物, 成为优势种, 甚至有可能直接捕食其他类群的原生动物<sup>[34]</sup>。

本研究中, 香蕉抽蕾前后, 根际原生动物群落组成发生明显变化, 并且抽蕾期发病植株和健康植株根际原生动物群落组成差异明显。无论是在健康还是发病植株中, 吞噬型原生动物的相对丰度均显著高于其他功能类群的原生动物。相比于健康植株, 发病植株中吞噬型原生动物相对丰度较高。同时, 与病原菌具有显著相关关系的原生动物功能类型大部分为吞噬型原生动物, 且主要属于丝足虫门, 这与 Guo 等<sup>[35]</sup>的研究一致, 他们认为丝足虫可能是土壤原生动物群落中最重要的组成。同时 Guo 等<sup>[35]</sup>还指出, 原生动物可能是通过与根际中某些微生物群落的互动从而对植物生长起到积极的作用。因此在本研究中, 吞噬型原生动物尤其是丝足虫门在健康和发病植株之间的差异, 可能与发病植株中的病原菌数量的变化相关<sup>[36]</sup>。此外, Xiong 等<sup>[12]</sup>发现在患病植株中, 植物致病型原生动物 *Pythium* 属与番茄青枯病原菌呈显著正相关, 与本研究结果相似,



说明患病植株可能感染了不同的病原菌,在其中形成了致病型微生物群落,从而使植株更易患病。

本研究中,丝足虫门的部分高丰度原生动物属与病原菌呈现显著的相关关系。丝足虫门中,*Group-Te*属与病原菌呈显著负相关,在抽蕾期的健康植株中相对丰度最高,显著高于发病植株,*Cercomonas*属与病原菌也呈显著负相关,且在健康植株中的相对丰度较高,与最新的研究结果相似<sup>[35]</sup>。由此可见,丝足虫门部分高丰度属的变化可能会对病原菌的数量产生负面的影响,从而促进植物健康,可能会在防控香蕉枯萎病上产生一定潜力。随后的研究中,有必要将重点放在分离与纯化和病原菌呈负相关的吞噬型原生动上,有针对性地探索吞噬型原生动物与病原菌的作用机理,以及明确是否需要搭配其他生防菌,才能更好地提高防治香蕉枯萎病的效率。

## 4 结 论

香蕉根际土壤中原生动物的群落结构和组成在抽蕾前后、发病与健康植株中差异显著。香蕉抽蕾后根际土壤中原生动物群落多样性与丰富度均降低,且发病植株低于健康植株。吞噬型原生动物尤其是丝足虫门在健康和发病植株之间的差异,可能与发病植株中的病原菌数量的变化相关。与病原菌相关的吞噬型原生动物可能在防控香蕉枯萎病上具有一定潜力。

## 参考文献 (References)

- [ 1 ] Wu K L, Chen W Z, Yang S, et al. Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Fujian Province, China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18 ( 8 ): 1905—1913.
- [ 2 ] Ploetz R C. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4[J]. *Crop Protection*, 2015, 73: 7—15.
- [ 3 ] Liu M Y, Wang Y T, Sun M Z, et al. Effect of intercropping of banana with white clover on banana *Fusarium* wilt and soil microbial community[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2021 ( 2 ): 219—227. [刘满意, 王禹童, 孙铭泽, 等. 套作白三叶草对香蕉枯萎病发病率及土壤微生物群落的影响[J]. *热带生物学报*, 2021(2): 219—227.]
- [ 4 ] Carrión V J, Perez-Jaramillo J, Cordovez V, et al. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome[J]. *Science*, 2019, 366 ( 6465 ): 606—612.
- [ 5 ] Cha J Y, Han S, Hong H J, et al. Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10 ( 1 ): 119—129.
- [ 6 ] Klein E, Katan J, Gamliel A. Soil suppressiveness to *Fusarium* disease following organic amendments and solarization[J]. *Plant Disease*, 2011, 95( 9 ): 1116—1123.
- [ 7 ] Geisen S, Mitchell E A D, Adl S, et al. Soil protists: A fertile frontier in soil biology research[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42 ( 3 ): 293—323.
- [ 8 ] Jousset A, Rochat L, Scheu S, et al. Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 ( 15 ): 5263—5268.
- [ 9 ] Wei Z, Song Y Q, Xiong W, et al. Soil protozoa: Research methods and roles in the biocontrol of soil-borne diseases[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58( 1 ): 14—22. [韦中, 宋宇琦, 熊武, 等. 土壤原生动物——研究方法及其在土传病害防控中的作用[J]. *土壤学报*, 2021, 58 ( 1 ): 14—22.]
- [ 10 ] Bates S T, Clemente J C, Flores G E, et al. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7 ( 3 ): 652—659.
- [ 11 ] Dupont A Ö C, Griffiths R I, Bell T, et al. Differences in soil micro-eukaryotic communities over soil pH gradients are strongly driven by parasites and saprotrophs[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18( 6 ): 2010—2024.
- [ 12 ] Xiong W, Song Y Q, Yang K M, et al. Rhizosphere protists are key determinants of plant health[J]. *Microbiome*, 2020, 8 ( 1 ): 27.
- [ 13 ] Gao Z L, Karlsson I, Geisen S, et al. Protists: Puppet masters of the rhizosphere microbiome[J]. *Trends Plant Science*, 2019, 24 ( 2 ): 165—176.
- [ 14 ] Bahroun A, Jousset A, Mrabet M, et al. Protists modulate *Fusarium* root rot suppression by beneficial bacteria[J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 168: 104158.
- [ 15 ] Foissner W. Soil protozoa: Fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators, and guide to the literature[J]. *Progress in Protistology*, 1987, 2: 69—212.
- [ 16 ] Dai Y T, Yan Z J, Xie J H, et al. Soil bacteria diversity in rhizosphere under two types of vegetation restoration based on high throughput sequencing[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54 ( 3 ): 735—748. [戴雅婷, 闫志坚, 解继红, 等. 基于高通量测序的两种植被恢复类型根际土壤细菌多样性研究[J]. *土壤学报*, 2017, 54 ( 3 ): 735—748.]
- [ 17 ] Lu T, Ke M J, Lavoie M, et al. Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering[J]. *Microbiome*, 2018, 6 ( 1 ): 231.

- [ 18 ] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [ 19 ] Shen Z Z. Characterization and management of microbial community in banana suppressive soils to soil-borne Fusarium wilt disease[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. [沈宗专. 抑制香蕉土传枯萎病土壤的微生物区系特征及调控[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.]
- [ 20 ] Li L J, Xiong Q L, Pan K W, et al. The responses of soil protozoan communities to *Quercus aquifolioides*: Recovery after cutting and growing season dynamics[J]. Biodiversity Science, 2015, 23 ( 6 ): 793—801. [李玲娟, 熊勤犁, 潘开文, 等. 土壤原生动物对川滇高山栎恢复时间的响应及生长季动态[J]. 生物多样性, 2015, 23 ( 6 ): 793—801.]
- [ 21 ] Brown M W, Kolisko M, Silberman J D, et al. Aggregative multicellularity evolved independently in the eukaryotic supergroup rhizaria[J]. Current Biology, 2012, 22 ( 12 ): 1123—1127.
- [ 22 ] Cardenas E, Wu W M, Leigh M B, et al. Significant association between sulfate-reducing bacteria and uranium-reducing microbial communities as revealed by a combined massively parallel sequencing-indicator species approach[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 ( 20 ): 6778—6786.
- [ 23 ] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics: Oxford, England, 2011, 27 ( 21 ): 2957—2963.
- [ 24 ] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10 ( 10 ): 996—998.
- [ 25 ] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 ( 16 ): 5261—5267.
- [ 26 ] Guillou L, Bachar D, Audic S, et al. The Protist Ribosomal Reference database ( PR2 ): A catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 41 ( D1 ): D597-D604.
- [ 27 ] Singer D, Seppey C V W, Lentendu G, et al. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems[J]. Environment International, 2021, 146: 106262.
- [ 28 ] Dumack K, Fiore-Donno A M, Bass D, et al. Making sense of environmental sequencing data: Ecologically important functional traits of the protistan groups Cercozoa and Endomyxa ( Rhizaria ) [J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20 ( 2 ): 398—403.
- [ 29 ] Adl S M, Simpson A G B, Lane C E, et al. The revised classification of eukaryotes[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2012, 59 ( 5 ): 429—493.
- [ 30 ] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75 ( 23 ): 7537—7541.
- [ 31 ] Liu L L, Huang X Q, Zhang J B, et al. Deciphering the relative importance of soil and plant traits on the development of rhizosphere microbial communities[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2020, 148: 107909.
- [ 32 ] Porter K G, Sherr E B, Sherr B F, et al. Protozoa in planktonic food Webs[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1985, 32 ( 3 ): 409—415.
- [ 33 ] Ceja-Navarro J A, Wang Y, Ning D L, et al. Protist diversity and community complexity in the rhizosphere of switchgrass are dynamic as plants develop[J]. Microbiome, 2021, 9 ( 1 ): 96.
- [ 34 ] Guo S, Xiong W, Xu H, et al. Continuous application of different fertilizers induces distinct bulk and rhizosphere soil protist communities[J]. European Journal of Soil Biology, 2018, 88: 8—14.
- [ 35 ] Guo S, Xiong W, Hang X N, et al. Protists as main indicators and determinants of plant performance[J]. Microbiome, 2021, 9 ( 1 ): 64.
- [ 36 ] Sleigh M A. Protozoa and other protists.- Arnold holder[J]. Protozoa & Other Protists, 1989.

( 责任编辑: 卢 萍 )