

DOI: 10.11766/trxb202111050447

魏世平, 吴萌, 李朋发, 刘佳, 李桂龙, 刘凯, 刘明, 李忠佩. 腐殖酸对花生连作地土壤真菌群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60 (3): 846–856.

WEI Shiping, WU Meng, LI Pengfa, LIU Jia, LI Guilong, LIU Kai, LIU Ming, LI Zhongpei. Effects of Humic Acid on Fungal Community Structure in a Peanut-continuous Cropping Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (3): 846–856.

## 腐殖酸对花生连作地土壤真菌群落结构的影响\*

魏世平<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 吴萌<sup>1, 2</sup>, 李朋发<sup>1, 2</sup>, 刘佳<sup>5</sup>, 李桂龙<sup>1, 2</sup>, 刘凯<sup>1, 2</sup>, 刘明<sup>1, 2</sup>, 李忠佩<sup>1, 2†</sup>

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 江苏农林职业技术学院, 江苏镇江 212400; 4. 江苏现代园艺工程技术中心, 江苏镇江 212400; 5. 江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所/国家红壤改良工程技术研究中心, 南昌 330200)

**摘要:** 土传病害的绿色防控是当前农业、生态和环境领域中为建立资源节约型、环境友好型病虫害可持续治理技术体系的重要组成部分。将来自藜类泥炭和风化煤的腐殖酸添加至两个花生种植年限的土壤中(1年和6年), 进行室内恒温培养。对土壤真菌进行内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)测序, 运用非参数多因素方差分析(PerMANOVA)、相关性分析等方法阐释腐殖酸对土壤真菌群落的影响。结果表明: 腐殖酸的添加显著影响了培养94 d以后的土壤真菌群落结构, 而添加量对4个培养时间点的土壤真菌群落结构均可产生显著影响; 同时腐殖酸显著改变了部分真菌属的相对丰度。腐殖酸对土壤真菌功能的影响, 主要表现为显著改变了土壤中真菌功能营养型的组成。其中, 随着腐殖酸添加量的增加, 土壤植物病原菌的相对丰度均显著降低; 相关性分析表明腐殖酸添加量与致病菌镰刀属(*Fusarium* spp.)和丝核菌属(*Rhizoctonia* spp.)的相对丰度呈显著负相关, 而与拮抗菌青霉属(*Penicillium* spp.)的相对丰度呈显著正相关。本研究表明, 特定腐殖酸在适当添加量下可显著改变花生地的土壤真菌群落结构和功能营养型组成, 尤其是降低了土壤中植物病原菌的相对丰度, 但影响程度因花生种植年限的长短而异。本研究结果为腐殖酸生态功能应用拓展提供了理论依据, 为土传病害绿色防控技术的研发提供新的视角。

**关键词:** 腐殖酸; 土壤真菌群落; Illumina 测序; 植物病原菌; 种植年限

中图分类号: S154.1 文献标志码: A

## Effects of Humic Acid on Fungal Community Structure in a Peanut-continuous Cropping Soil

WEI Shiping<sup>1, 2, 3, 4</sup>, WU Meng<sup>1, 2</sup>, LI Pengfa<sup>1, 2</sup>, LIU Jia<sup>5</sup>, LI Guilong<sup>1, 2</sup>, LIU Kai<sup>1, 2</sup>, LIU Ming<sup>1, 2</sup>, LI Zhongpei<sup>1, 2†</sup>

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang, Jiangsu 212400, China; 4. Jiangsu Engineering and Technology Center for Modern Horticulture, Zhenjiang, Jiangsu 212400, China; 5. Soil

\* 国家自然科学基金项目(32071642, 41771298)和江苏省自然科学基金项目(BK20191511)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 32071642, 41771298), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20191511)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhpli@issas.ac.cn

作者简介: 魏世平(1986—), 女, 安徽滁州人, 博士研究生, 主要从事土壤有机改良研究。E-mail: weishiping@jsafc.edu.cn

收稿日期: 2021-11-05; 收到修改稿日期: 2022-02-14; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-05-10

and Fertilizer & Resources and Environment Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, National Engineering & Technology Research Center for Red Soil Improvement, Nanchang 330200, China)

**Abstract:** 【Objective】 The negative impact of soil-borne diseases on peanut is enhanced for continuous planting. Thus, green prevention and control practices on soil-borne diseases are always an important part when establishing a resource-saving and environment-friendly sustainable control technology system. As a natural stimulant, humic acid has been shown to suppress the activity of soil-borne pathogenic fungi, and the inhibitory effect has a wide range and diverse manifestations. However, valid information is still lacking about the effects of humic acid on the microbial community. The objective of this work was to investigate the response of soil fungal communities under continuous peanut planting to humic acid from different origins, and to provide a theoretical basis for researching and developing a green-effective prevention and control method on soil-borne diseases in the continuous planting soil. 【Method】 Different concentrations of humic acids from mossy peat and weathered coal were respectively added to two peanut planting soils (including 1 year and 6 years continuous planting), and soils were cultured with indoor thermostatic incubation. The soil fungi community was sequenced by Illumina MiSeq PE300. PerMANOVA, correlation analysis, and other methods were used to explain the effect of humic acid on the soil fungi community. 【Result】 The results showed that the addition of humic acid had a significant effect on the fungal community structure of six years planting soil, while it had no significant effect on one-year planting soil. The concentration of humic acid both had a significant effect on the fungi community structure of the two planting soils. Effects of humic acid on soil fungi community structure at each culture time were as follows: humic acids significantly changed the fungi community structures of one-year planting soil at 94 d and 193 d, and of six years planting soil at 193 d. Also, the concentration of humic acids had significant effects on the fungi community structure of the two planting soils during the whole culture process. Humic acid also significantly changed the relative abundance of some fungi at the genus level. The effect of humic acid on soil fungal function can be mainly attributed to its significant alteration of the compositions of fungal functional trophic types in the two planting soils. It was also observed that the relative abundance of plant pathogens in soil decreased significantly with an increase in the concentration of humic acid. Spearman correlation analysis further detected that the relative abundances of *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia* spp. were significantly negatively correlated with the concentration of humic acid, while the relative abundance of *Penicillium* spp. was significantly positively correlated. The correlation coefficients were  $-0.270$ ,  $-0.138$ , and  $0.172$ , respectively. 【Conclusion】 The appropriate concentration of specific humic acid could significantly change the soil fungi community structure and functional trophic composition in peanut soils, especially in reducing the relative abundance of plant pathogens. Results of this study could provide a direct theoretical basis for expanding the application of the ecological function of humic acid, and provide a new perspective for researching and developing efficient green prevention and control technology of soil-borne diseases.

**Key words:** Humic acid; Soil fungi community; Illumina sequencing; Plant pathogen; Continuous planting age

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是我国南方红壤区主要的油料作物和经济作物, 以江西省为例, 每年播种面积约  $1.6 \times 10^5 \text{ hm}^2$ , 年均产量约  $4.5 \times 10^8 \text{ kg}$ , 年产值近 30 亿元<sup>[1]</sup>。由于花生种植效益相对较高及受土地利用传统所限, 常常多年连片、大规模地种植, 有的甚至已连续种植 10~20 年。随之而来的连作障碍问题日益突出, 已成为农业可持续发展的重大问题之一。花生连作导致土传病原真菌增加, 控制土传病原真菌是解决连作障碍问题的必要前提<sup>[2-3]</sup>。

研究表明, 腐殖酸通过增加土壤含水量和调节 C/N 比来改善土壤细菌群落结构的多样性<sup>[4]</sup>; 腐殖酸能够增加烟株生长前期和中期根际土壤和非根际土壤中细菌和放线菌的数量<sup>[5]</sup>, 腐殖酸肥料能够显著增加番茄种植土壤中微生物的数量<sup>[6]</sup>, 富含腐殖酸的蚯蚓粪 (与化肥比较), 显著增加豌豆种植土壤中细菌和真菌的物种多样性以及丰富度<sup>[7]</sup>; 进一步, 腐殖酸对花生连作土壤中细菌常见种和稀有种的物种演替以及功能演替的影响存在差异<sup>[8]</sup>。即腐殖酸作为土壤改良剂, 能够增加土壤中细菌、放线菌、

真菌的数量以及多样性等。同时也有研究表明,腐殖酸能够提高连作花生的产量和抗逆性,有益于缓解花生连作障碍问题<sup>[9]</sup>。然而,针对连续种植模式下土壤真菌群落结构以及病原真菌组成受腐殖酸影响的研究尚欠缺。

因此,本研究选择不同花生种植年限的土壤,对其进行腐殖酸添加的培养实验,在不同培养时间段进行采样并进行土壤真菌内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)测序,以观察腐殖酸及其添加量对土壤真菌群落结构的影响;同时对土壤真菌测序结果进行 FUNGuild 功能注释,深入研究腐殖酸对土壤真菌功能和植物病原菌相对丰度的影响,以此评价腐殖酸对花生连续种植土壤的生物调节功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 培养试验设计

供试土壤采自江西抚州市东乡县境内,江西省农业科学院赣东北红壤综合试验区(28°10'N, 116°35'E),发育于第四纪红黏土母质。采集土样分为花生种植1年土壤和花生种植6年土壤(以下简称1年土壤和6年土壤),田间施肥比例为N:P:K=135:35:112,每公顷施N 135 kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 81 kg, K<sub>2</sub>O 135 kg。于花生收获后进行采样,用土钻采集0~20 cm 土样,去除植物残体及杂质,过筛(<2 mm),4℃保存备用。培养试验所添加的腐殖酸原料分别是来自藓类泥炭(Pindstrup, 丹麦)以及风化煤(山西吕梁)。腐殖酸的提取纯化过程参考 Wei 等<sup>[10]</sup>。腐殖酸添加量为0、10、50、500、5 000 mg·kg<sup>-1</sup>;同时设置腐殖酸原料添加处理,添

加浓度为6 072 mg·kg<sup>-1</sup>,该浓度原料含碳量等同于相应腐殖酸最高添加量(5 000 mg·kg<sup>-1</sup>)时的含碳量。腐殖酸以及原料均过0.42 mm 筛,试验共设22个处理,各处理3个平行,各平行含有50 g 本底干土。培养条件为:25℃,黑暗培养。在培养的第7、32、94和193天进行取样,样品于-40℃进行保存,用于提取土壤DNA。供试土壤的基本理化性质详见表1。

### 1.2 土壤DNA的提取和高通量测序

称取不同培养时间土壤样品0.5 g,采用试剂盒(FastDNA SPIN kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, 加拿大))进行DNA提取。提取的DNA利用NanoDrop2000(Thermo Fisher Scientific, 美国)进行纯度和浓度的检测,并利用琼脂糖凝胶电泳进行DNA完整性检测。然后进行真菌ITS的PCR扩增,所用ITS引物序列分别为:5'-CTTGGTCATTTAGAG GAAGTAA-3'(ITS1F)和5'-GCTGCGTTCTTCATC GATGC-3'(ITS2R)。PCR采用TakaRa rTaq DNA Polymerase的20 L反应体系:10×缓冲液2 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>脱氧核苷三磷酸(dNTPs)2 μL, 5 μmol·L<sup>-1</sup>上下游引物各0.8 μL, rTaq聚合酶(Polymerase)0.2 μL,牛血清白蛋白(BSA, Bovine Serum Albumin)0.2 μL,模板DNA 10 ng,补足超纯水(ddH<sub>2</sub>O)至20 μL。PCR扩增条件:95℃预变性3 min, 35个循环(95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s),最后72℃延伸10 min。循环数与退火温度可适当调整。所用PCR仪为ABI GeneAMP@9700。高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)是基于Illumina高通量测序Miseq PE300平台(CA, 美国)进行,由上海美吉生物医药科技有限公司承担完成。

表1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Physicochemical properties of selected soil

种植年限 <sup>①</sup>	pH	TOC /(g·kg <sup>-1</sup> )	TN /(g·kg <sup>-1</sup> )	TP /(g·kg <sup>-1</sup> )	TK /(g·kg <sup>-1</sup> )	AN /(mg·kg <sup>-1</sup> )	AP /(mg·kg <sup>-1</sup> )	AK /(mg·kg <sup>-1</sup> )	CEC /(cmol·kg <sup>-1</sup> )
1年 <sup>②</sup>	6.30±0.04	9.67±0.37	0.98±0.01	0.59±0.01	10.11±0.03	91.88±3.68	25.73±0.87	312.5±12.50	11.67±0.45
6年 <sup>③</sup>	5.41±0.13	8.90±0.32	0.97±0.02	0.54±0.01	11.46±0.68	84.53±3.68	17.50±1.81	208.3±3.82	13.03±0.21

注: TOC-有机碳, TN-全氮, TP-全磷, TK-全钾, AN-碱解氮, AP-有效磷, AK-速效钾, CEC-阳离子交换量。Note: TOC-Total Organic Carbon, TN- Total Nitrogen, TP- Total Phosphorus, TK-Total Potassium, AN-Alkali-hydro Nitrogen, AP-Available Phosphorus, AK-Available Potassium, CEC-Cation Exchange Capacity. ①Continuous planting age, ②1 year, ③6 years.

### 1.3 数据统计分析

高通量测序原始数据经拆分、优化、拼接等提取出用于分析的有效数据。后续有效数据分析使用微生物生态学定量研究平台 QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) 软件<sup>[11]</sup>。在 QIIME 分析过程中,使用 usearch 方法进行去冗余、生成代表序列以及聚类可操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU),再对 OTU 表格按最小序列数进行抽平;对 OTU 代表序列的物种注释使用的是 unite 数据库,按照 97%相似度利用序列相似性快速搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool, Blast) 方法进行比对,以得到物种注释信息。随后,进行  $\alpha$  多样性 (observed\_otu 和香农指数) 和  $\beta$  多样性 (布雷柯蒂斯距离 bray-curtis distance 等) 的计算。利用 R\*64-3.5 (The R Foundation for Statistical Computing, Austria) 中的“vegan”、“ape”数据包进行主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA),主要用于分析处理间的真菌群落结构差异;同时进行基于布雷柯蒂斯距离的非参数多因素方差分析 (permutational multivariate analysis of variance, PerMANOVA),用于分析腐殖酸及其添加量对土壤真菌群落结构的影响。采用真菌功能分组 FUNGuild 数据库进行真菌功能注释,并进一步细分为包括植物病原菌在内的 12 个小类 (guilds)<sup>[12]</sup>。在 SPSS25.0 中进行不同处理之间真菌门、属水平上相对丰度的显著性差异检验,并用图基法 (Tukey's B) 进行多重比较 ( $P<0.05$ )。此外,不同腐殖酸添加浓度与真菌属水平相对丰度的相关性分析,使用的方法是 R 语言中“psych”数据包中“cor”方法计算得出变量之间的斯皮尔曼 (Spearman) 相关系数,同时利用“corr.test”对各变量相关性进行显著性检验。Origin9.0 用于图片的绘制。

## 2 结 果

### 2.1 土壤真菌群落和功能营养型组成

土壤真菌 ITS 测序结果显示,264 个样品共产生 15 920 715 条有效序列,最终聚成 5 187 个 OTU (97%的相似水平)。在门水平上,OTU 在 UNITE 数据库上的注释比例为 99.63%;筛选出相对丰度大于 1%的真菌种类 5 个,且群落组成主要集中在子囊

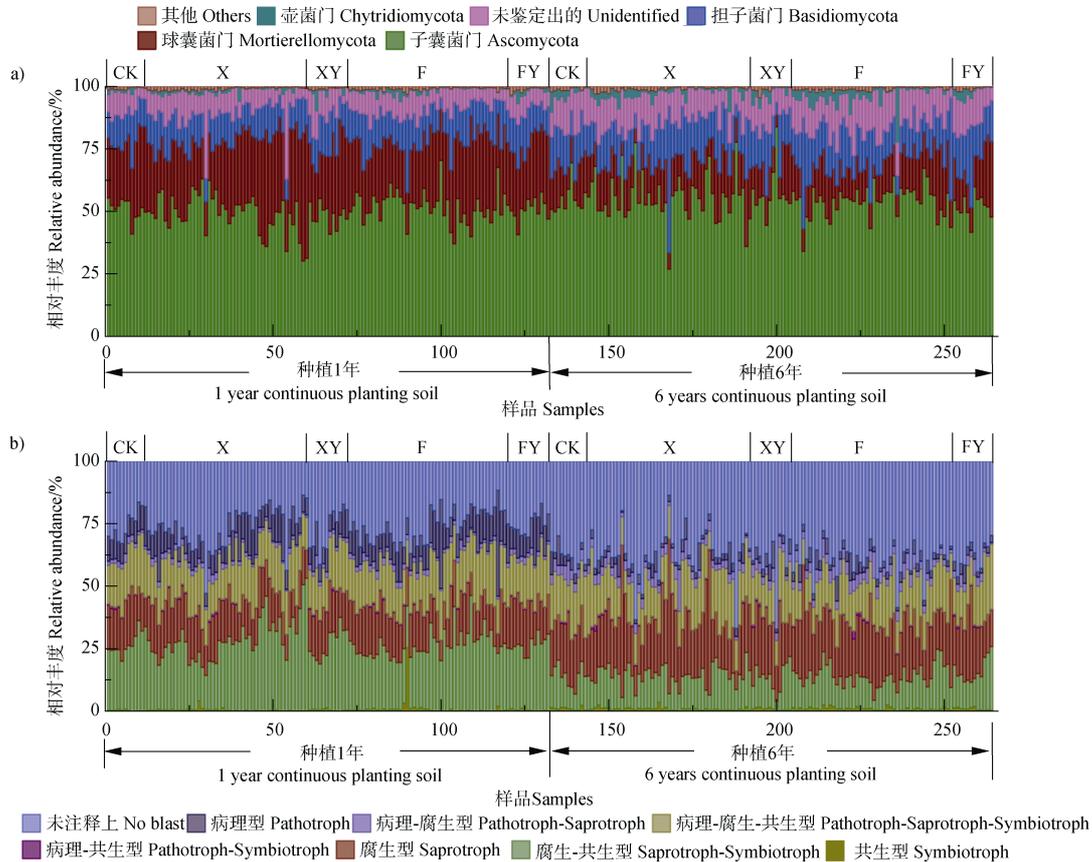
菌门 Ascomycota (平均约占 52.74%)、球囊菌门 Mortierellomycota (平均约占 21.00%) 以及担子菌门 Basidiomycota (平均约占 13.66%), 剩余相对丰度小于 1%的真菌种类归于其他,详见图 1a。图 1b 为 FUNGuild 功能注释结果,OTU 注释比例为 48.39%,注释上的真菌分为 7 大营养型,即:病理型 (Pathotroph)、腐生型 (Saprotroph)、共生型 (Symbiotroph)、病理-腐生型 (Pathotroph-Saprotroph)、病理-共生型 (Pathotroph-Symbiotroph)、腐生-共生型 (Saprotroph-Symbiotroph) 以及病理-腐生-共生型 (Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph), 平均相对丰度分别为:7.03%、19.55%、0.76%、2.91%、0.34%、20.25%和 17.06% (未注释上营养类型的真菌平均相对丰度为 32.09%)。

### 2.2 腐殖酸对土壤真菌群落结构的影响

利用 PerMANOVA 方法进行处理间真菌群落分异的显著性分析。表 2 中显示:总体上,腐殖酸添加与否对 1 年土壤真菌群落结构无显著影响,而对 6 年土壤真菌群落结构存在显著影响;腐殖酸添加量对 2 种年限土壤真菌群落结构均存在显著影响。依据培养时间不同,腐殖酸的添加显著改变了 1 年土壤在培养后期 (94 d 和 193 d) 以及 6 年土壤在培养末期 (193 d) 的真菌群落结构 ( $P<0.05$ );且腐殖酸添加量显著改变了 1 年土壤在 4 个培养时间点、6 年土壤在 3 个培养时间点 (7 d、94 d 和 193 d) 的真菌群落结构 ( $P<0.05$ )。

为明确各处理对土壤真菌群落结构的具体影响,进行 PCoA 分析。结果 (图 2) 表明:(1) 藓类泥炭腐殖酸 5 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  添加量影响了 1 年土壤在 4 个培养时间点、6 年土壤在 3 个培养时间点 (7 d、94 d、193 d) 的真菌群落结构,(2) 风化煤腐殖酸 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  添加量影响了 6 年土壤在培养前期 (7 d 和 32 d) 的真菌群落结构;藓类泥炭原料对 6 年土壤在培养 94 d 时的真菌群落结构有影响,而风化煤原料影响了 6 年土壤在培养 193 d 时的真菌群落结构。结合上述 PerMANOVA 分析结果表明,花生连作地的土壤真菌群落结构受腐殖酸种类及其添加量的显著影响,且不同培养时间点存在差异。

进一步分析腐殖酸的添加对 6 年土壤、腐殖酸添加量对 2 种年限土壤真菌相对丰度 (属水平) 的显著性影响。表 3 中,腐殖酸的添加致使 6 年土壤



注：CK—对照，X—藓类泥炭腐殖酸处理，XY—藓类泥炭原料处理，F—风化煤腐殖酸处理，FY—风化煤原料处理。下同。  
 Note: CK-Control, X-Humic acid from moss peat added, XY-Moss peat added, F-Humic acid from weathered coal added, FY-Weathered coal added. The same below.

图 1 样品门水平上物种相对丰度 (a) 以及 FUNGuild 功能注释营养型相对丰度 (b)

Fig. 1 Relative abundances at phylum level of samples (a) and relative abundances of samples' trophic mode obtained through FUNGuild functional annotation (b)

表 2 不同处理土壤真菌群落结构的两因素 PerMANOVA 分析

Table 2 Two-way PerMANOVA of soil fungal community variations among different treatments

种植年限 Continuous planting age	取样时间 Sample time	处理 Treatment	R <sup>2</sup>	P	种植年限 Continuous planting age	取样时间 Sample time	处理 Treatment	R <sup>2</sup>	P
1 年 1 year	_7d	A	0.124	0.311	6 年 6 years	_7d	A	0.123	0.266
		B	0.135	0.002**			B	0.116	0.019*
	_32d	A	0.120	0.287		_32d	A	0.114	0.573
		B	0.144	0.001***			B	0.114	0.067
	_94d	A	0.156	0.013*		_94d	A	0.108	0.288
		B	0.122	0.019*			B	0.152	0.001***
	_193d	A	0.153	0.024*		_193d	A	0.163	0.02*
		B	0.160	0.001***			B	0.132	0.006**
	总体 All	A	0.028	0.077		总体 All	A	0.117	0.001***
		B	0.025	0.031*			B	0.118	0.001***

注：A 代表腐殖酸添加与否，B 代表腐殖酸添加量；数值后\*表示差异显著性检验，\*表示 0.05 水平上，\*\*表示 0.01 水平上，\*\*\*表示 0.001 水平上。下同。Note: A stands for humic acid added or not, B for Humic acid addition amount; \*after the value represents the results of a significant test. \*is at 0.05 level, \*\*is at 0.01 level, \*\*\*is at 0.001 level. The same below.

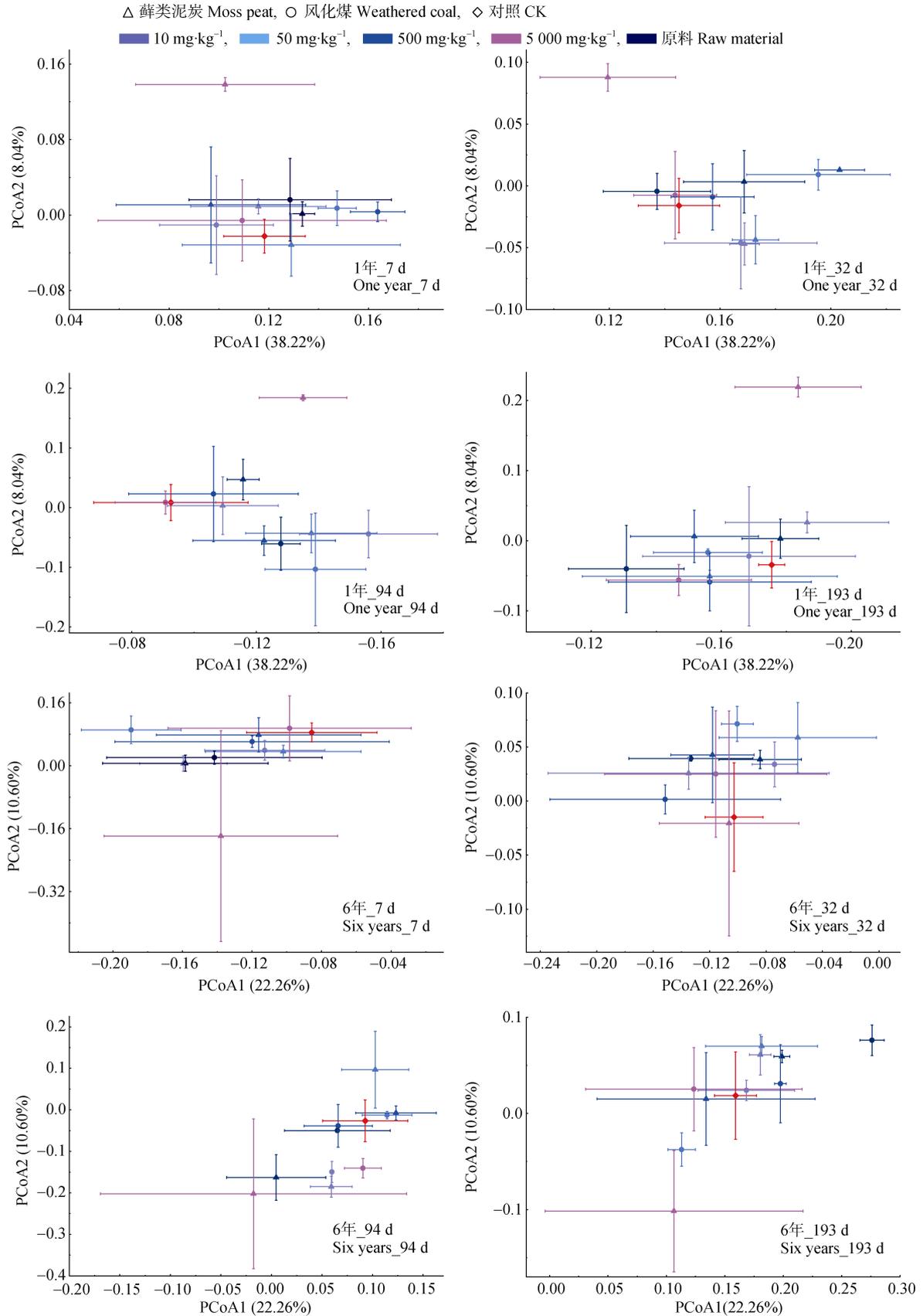


图 2 培养过程中腐殖酸对土壤真菌群落结构影响的主坐标分析 (PCoA)

Fig. 2 Principal coordinate analysis (PCoA) of the effect of humic acid on soil fungi community structure during culture

真菌群落中 15 个属相对丰度发生显著改变; 腐殖酸添加量致使 1 年土壤真菌群落中 8 个属 (门水平上, Ascomycota 和 Mortierellomycota 两个门的相对丰度也检测到显著差异, 未列出)、6 年土壤真菌群落中 7 个属的相对丰度发生了显著变化。但是, 腐殖酸及其添加量对土壤真菌群落的  $\alpha$  多样性均未检测到显著差异。故腐殖酸显著改变了花生连作地的土壤中部分真菌属的相对丰度, 而对土壤真菌群落多样性无显著影响。

将腐殖酸添加量与所有样品土壤真菌相对丰度

(属水平) 进行 Spearman 相关性分析。表 4 中镰刀属 (*Fusarium* spp.)、梭孢壳属 (*Thielavia* spp.)、小棒孢囊壳属 (*Corynascella* spp.)、杯梗孢属 (*Cyphellophora* spp.)、丝核菌属 (*Rhizoctonia* spp.) 等与腐殖酸添加量呈显著负相关, 而与青霉菌属 (*Penicillium* spp.) 呈显著正相关; 其中, *Fusarium* spp. 和 *Thielavia* spp. 相对丰度与腐殖酸添加量的负相关系数最大, 而 *Penicillium* spp. 相对丰度与腐殖酸添加量的正相关系数最大。

表 3 腐殖酸及其添加量对土壤真菌属水平相对丰度的影响显著性

Table 3 Significant differences of soil fungal relative abundance at the genus levels affected by humic type and amount

腐殖酸添加与否 Humic acid added or not			腐殖酸添加量 Humic acid addition amount		
种植年限 Continuous planting age	真菌 (属) Fungi (Genus)	P	种植年限 Continuous planting age	真菌 (属) Fungi (Genus)	P
6 年 6 years	<i>Plenodomus</i>	0.008**	1 年 1 year	<i>Fusarium</i>	0.018*
	<i>Thielavia</i>	0.023*		<i>Geminibasidium</i>	0.025*
	<i>Clitopilus</i>	0.023*		<i>Penicillium</i>	0.000***
	<i>Cookeina</i>	0.000***		<i>Clonostachys</i>	0.043*
	<i>Didymella</i>	0.038*		<i>Acremonium</i>	0.026*
	<i>Leucocoprinus</i>	0.037*		<i>Colletotrichum</i>	0.001**
	<i>Rufoplaca</i>	0.038*		<i>Serendipita</i>	0.017*
	<i>Zopfiella</i>	0.041*		<i>Harpophora</i>	0.022*
	<i>Pseudeurotium</i>	0.006**	6 年 6 years	<i>Metarhizium</i>	0.023*
	<i>Arizonaphlyctis</i>	0.000***		<i>Penicillium</i>	0.000***
	<i>Candida</i>	0.044*		<i>Clonostachys</i>	0.022*
	<i>Stachybotrys</i>	0.000***		<i>Thielavia</i>	0.030*
	<i>Cora</i>	0.008**		<i>Cladosporium</i>	0.049*
	<i>Engyodontium</i>	0.047*		<i>Cora</i>	0.013*
	<i>Chrysosporium</i>	0.001***		<i>Engyodontium</i>	0.001**

注: 表中的属为平均相对丰度大于 0.01% 的真菌属。Note: Genus with >0.01% average relative abundance are listed here.

表 4 腐殖酸添加量与土壤真菌属水平相对丰度的斯皮尔曼 (Spearman) 显著相关系数

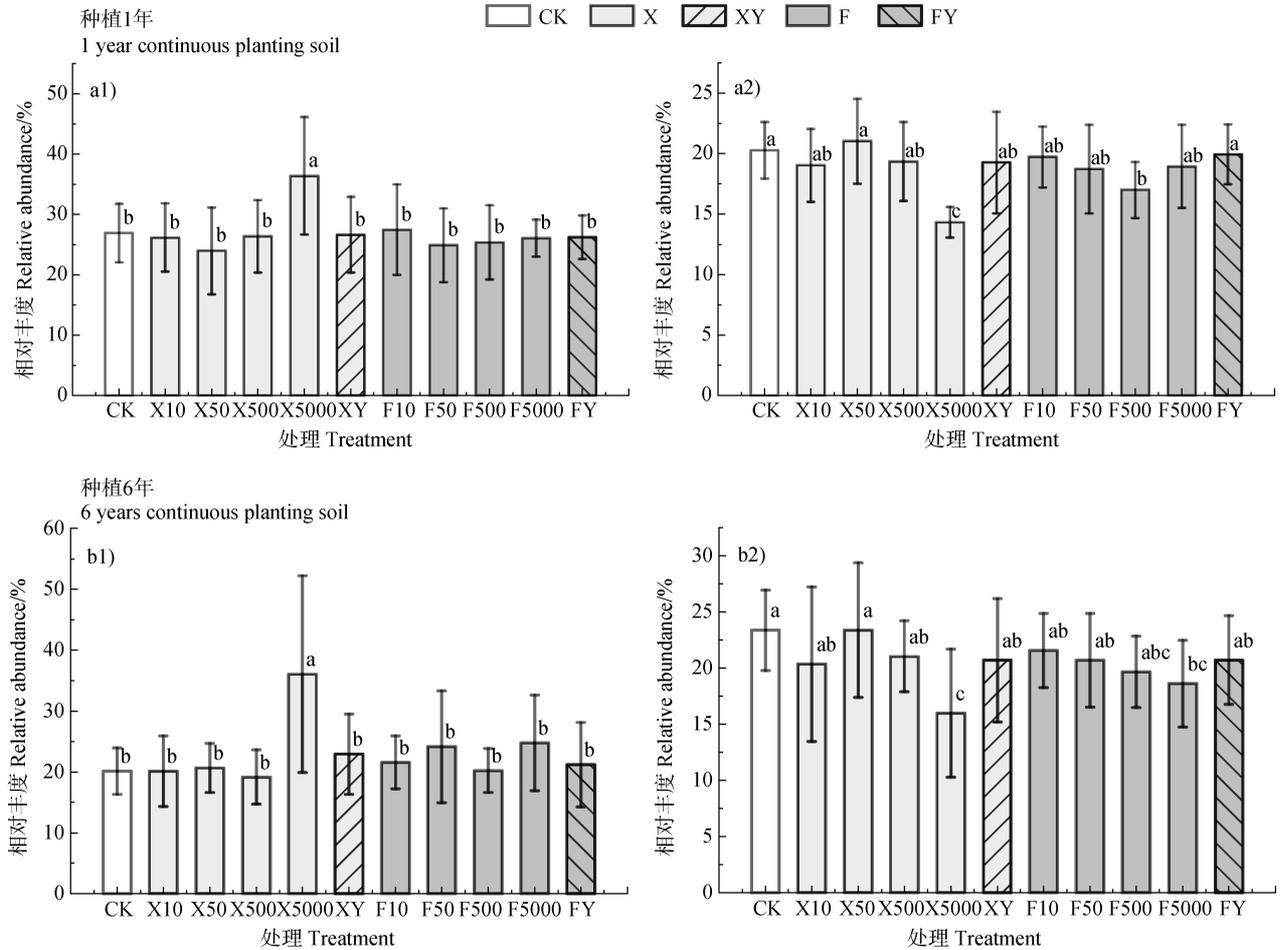
Table 4 Spearman coefficient between humic acid concentration and soil fungal relative abundance at the genus levels

真菌 (属) Fungi (Genus)	相关系数 Correlation coefficient	P	真菌 (属) Fungi (Genus)	相关系数 Correlation coefficient	P
<i>Fusarium</i> spp.	-0.270	0.000***	<i>Corynascella</i> spp.	-0.150	0.028*
<i>Penicillium</i> spp.	0.172	0.012*	<i>Hypochnicium</i> spp.	-0.149	0.029*
<i>Acremonium</i> spp.	-0.137	0.044*	<i>Rhizoctonia</i> spp.	-0.138	0.043*
<i>Thielavia</i> spp.	-0.274	0.000***	<i>Bifiguratus</i> spp.	-0.134	0.049*

### 2.3 腐殖酸对土壤真菌群落功能的影响

土壤真菌 FUNGuild 功能注释结果显示腐殖酸的添加显著改变了部分功能营养型真菌的相对丰度 (图 3)。藓类泥炭腐殖酸  $5\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  添加量显著提高了 1 年土壤中腐生-共生型真菌、6 年土壤中腐生型真菌的相对丰度；且显著降低了 2 种年限土壤中植物病原菌的相对丰度。风化煤腐

殖酸  $500\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $5\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的添加量分别显著降低了 1 年和 6 年土壤中植物病原菌的相对丰度。藓类泥炭和风化煤原料的添加未显著改变土壤中功能营养型真菌的组成。综上，腐殖酸的添加改变了 2 种植年限土壤中真菌功能营养型的组成，且腐殖酸原料本身不能显著改变土壤中真菌功能营养型的组成。



注：X10、X50、X500、X5000 分别代表藓类泥炭腐殖酸的添加量为 10、50、500、5 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，F10、F50、F500、F5000 分别代表风化煤腐殖酸的添加量为 10、50、500、5 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。Note: X10, X50, X500 and X5000 are represented 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and 5 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  addition of humic acids from moss peat, F10, F50, F500, and F5000 are represented 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and 5 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  addition of humic acids from weathered coal.

图 3 不同花生种植年限下存在显著差异的部分 FUNGuild 功能营养型和植物病原菌的相对丰度 (a1-种植 1 年\_腐生-共生型, a2-种植 1 年\_植物病原菌, b1-种植 6 年\_腐生型, b2-种植 6 年\_植物病原菌)

Fig. 3 Relative abundance of trophic modes and plant pathogen from FUNGuild functional annotation with significant differences under different peanut planting ages (a1-1 year continuous planting soil\_Saprotrop-Symbiotroph, a2-1 year continuous planting soil\_Plant pathogen, b1-6 years continuous planting soil\_Saprotrop, b2-6 years continuous planting soil\_Plant pathogen)

分析腐殖酸不同添加量对应的植物病原菌相对丰度的差异显著性, 结果见图 3a2 和图 3b2。图中显示, 藓类泥炭腐殖酸添加量为  $5\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,

在 2 种植年限土壤中植物病原菌的相对丰度最低, 且显著低于对照; 风化煤腐殖酸添加量为  $500\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 在 1 年花生种植土壤中植物病原菌相对丰度最

低, 显著低于对照; 风化煤腐殖酸添加量为 5 000 mg·kg<sup>-1</sup> 时, 在 6 年花生种植土壤中植物病原菌相对丰度最低。综上, 随着腐殖酸添加量的增加, 2 种年限土壤中植物病原菌的相对丰度总体呈现显著降低的趋势, 且添加量为 500 mg·kg<sup>-1</sup> 和 5 000 mg·kg<sup>-1</sup> 时, 花生种植土壤中植物病原菌相对丰度对腐殖酸的响应最敏感。

### 3 讨 论

花生连续种植过程中, 土壤微生物区系平衡被破坏, 由细菌型土壤向真菌型土壤转变<sup>[13]</sup>, 导致不同花生种植年份土壤真菌群落结构存在显著差异, 故本研究中腐殖酸对 2 种土壤真菌群落结构的影响不同, 且在不同培养时间下表现不同。Maji 等<sup>[7]</sup>研究发现, 富含腐殖酸的蚯蚓粪肥较化肥显著提高了豌豆种植土壤中真菌的物种多样性指数(香农指数, Shannon diversity index) 以及丰富度指数(马哥列夫指数, Margalef abundance index), 且在添加后不同时间下多样性指数不同。本研究则发现腐殖酸添加未显著影响花生土壤真菌多样性指数, 但是腐殖酸可显著改善土壤真菌群落结构(图 1 和表 1)。腐殖酸积极的生物学作用来源于其化学组分(特别是官能团), 如碳水化合物、类糖物质、低木质素、低酚酸和脂肪酸的含量、高含量的其他非木质素芳香族化合物以及腐殖成分的疏水性和其灵活的构象结构<sup>[14]</sup>。故腐殖酸对土壤真菌群落结构的改善主要来自其特殊化学结构所发挥的生物活性作用。此外, 腐殖酸的化学结构在不同原料、不同有机处理及处理阶段、不同形成环境及气候条件等因素影响下, 均表现出一定差异性<sup>[10, 15-17]</sup>。因此, 本研究中藓类泥炭腐殖酸和风化煤腐殖酸在相同添加量背景下对土壤真菌群落结构及功能菌群的影响不同, 这与两种腐殖酸各自化学结构组成相关。藓类泥炭腐殖酸属于脂族性, 其烷基碳含量最高; 而风化煤腐殖酸属于芳香性, 其芳香碳含量最高; 且两种腐殖酸在其他碳组成上也存在显著差异<sup>[10]</sup>。

大量田间试验数据显示, 腐殖酸的施入与土壤中植物病原菌存在关联。例如, Liu 等<sup>[18]</sup>发现土壤中腐殖酸含量与辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*) 引起的辣椒疫霉病发病率呈现显著负相关; 与腐殖酸含量较低的土壤相比, 高腐殖酸含量土壤中草莓

根腐病<sup>[19]</sup>、哈密瓜霜霉病<sup>[20]</sup>的发病率分别降低 77% 以上和 30% 以上。结合现代分子生物学技术可进一步检测土壤真菌群落中致病菌的组成, Li 等<sup>[8]</sup>将腐殖酸施入花生种植土壤中, 结果表明对植物生长有利的担子菌门(Basidiomycota) 和球囊菌门(Mortierellomycota) 的相对丰度分别增加了 81.95% 和 3.16 倍, 而子囊菌门(Ascomycota) 的相对丰度降低了 13.07%, 其中子囊菌门中大多数是与植物病原菌相关的种属。本研究深入分析了土壤真菌功能群落中植物病原菌与腐殖酸添加量之间的关系, 发现随着腐殖酸添加量的增加, 植物病原菌相对丰度显著下降(图 3)。

土壤中植物病原菌相对丰度不仅与有害微生物相对丰度有关, 还与有益微生物相对丰度有关<sup>[21]</sup>。有害微生物可通过分泌细胞降解酶、致使导管堵塞或分泌毒素等危害寄主植物; 有益微生物能够促进植物生长、参与营养转化、抑制病害发生等<sup>[22]</sup>。腐殖酸添加量与土壤真菌相对丰度(属水平) 斯皮尔曼相关性分析(表 4) 表明镰刀属 *Fusarium* spp.、梭孢壳属 *Thielavia* spp. 和青霉属 *Penicillium* spp. 的相对丰度受到腐殖酸添加量的影响最大。镰刀属是花生连续种植土壤中花生根腐病的主要致病菌属, 已有研究证实: 随着花生种植年限的增加, 镰刀属的相对丰度显著增加<sup>[23]</sup>。而青霉属能产生多种具有生物活性的次级代谢物, 包括抗真菌活性代谢物如青霉素等<sup>[24-25]</sup>, 从而能够不同程度地抑制尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、串珠镰刀菌 *F. moniliforme*、层出镰刀菌 *F. proliferatum* 和腐皮镰刀菌 *F. solani* 的菌丝生长<sup>[26]</sup>。Li 等<sup>[23]</sup>利用对抗实验检测出, 在共培养时桔青霉 *Penicillium citrinum* 对尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌和腐皮镰刀菌的生长均产生抑制作用。此外, 丝核菌属是花生立枯病的主要致病属, 前期研究结果显示腐殖酸可调节立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 自身解毒机制中谷胱甘肽的体内代谢途径, 从而抑制其生长<sup>[27]</sup>。综上, 腐殖酸的添加之所以导致花生种植土壤中植物病原菌的相对丰度显著降低, 主要原因是通过降低土壤连续种植过程中主要致病菌属(以镰刀属和丝核菌属为代表) 的相对丰度, 同时增加具有抑制多种病原菌生长功能的青霉属相对丰度来实现, 这些与腐殖酸的化学结构及其生物调节功能密切相关。生理机制上, 几丁质酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶是与植物防御相关的酶<sup>[28]</sup>, 是后续研究须关注的主要

方向，以便结合生理机制详细阐释腐殖酸引起花生种植土壤植物病原菌下降的分子机理。

## 4 结 论

添加腐殖酸能够显著改变花生地的土壤真菌群落组成和功能营养型组成，但影响程度因花生种植年限的长短、腐殖酸来源而异。腐殖酸的添加（藜类泥炭腐殖酸和风化煤腐殖酸）显著改变了土壤真菌群落在培养后期（94 d 以后）的结构组成；而腐殖酸添加量对土壤真菌群落结构的显著改变在整个培养时期均有发生。随着腐殖酸添加量的增加，不同花生种植年限的土壤中植物病原菌的相对丰度均显著降低，这与镰刀属、丝核菌属等致病菌属相对丰度的降低和青霉属相对丰度的增加有极大的相关性。

## 参考文献 (References)

- [ 1 ] Ren W F, Wei X J, Zeng Z C, et al. Present situation and prospect of peanut industry in Jiangxi Province[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42 ( 5 ): 920-926. [任伟芳, 魏雪娇, 曾昭聪, 等. 江西省花生产业发展现状及展望[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42 ( 5 ): 920—926.]
- [ 2 ] 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 & Biochemistry, 2014, 72: 11—18.
- [ 3 ] Liu J G, Li X G, Wang X X. Effects of successive application of organic fertilizers on rhizosphere microbial populations and enzyme activities of monoculture peanut[J]. Soils, 2018, 50 ( 2 ): 305—311.[刘金光, 李孝刚, 王兴祥. 连续施用有机肥对连作花生根际微生物种群和酶活性的影响[J]. 土壤, 2018, 50 ( 2 ): 305—311.]
- [ 4 ] Tian X M, Wang K Y, Liu Y H, et al. Effects of polymer materials on soil physicochemical properties and bacterial community structure under drip irrigation[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 150: 103456.
- [ 5 ] Peng Z L, Huang Y J, Liu G S, et al. Effects of different organic fertilizer on soil microbe and hence quality and yield of tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2009, 15 ( 2 ): 41—45. [彭智良, 黄元炯, 刘国顺, 等. 不同有机肥对烟田土壤微生物以及烟叶品质和产量的影响[J]. 中国烟草学报, 2009, 15 ( 2 ): 41—45.]
- [ 6 ] Li X Y, Zhao Q F, Shang Y C, et al. Effects of humic acid fertilizer on soil microbial population, yield, and quality of tomato in greenhouse[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2016, 50 ( 2 ): 203—208. [李小玉, 赵群法, 尚玉臣, 等. 腐殖酸肥对温室番茄土壤微生物及产量品质的影响[J]. 河南农业大学学报, 2016, 50 ( 2 ): 203—208.]
- [ 7 ] Maji D, Misra P, Singh S, et al. Humic acid rich vermicompost promotes plant growth by improving microbial community structure of soil as well as root nodulation and mycorrhizal colonization in the roots of *Pisum sativum*[J]. Applied Soil Ecology, 2017, 110: 97—108.
- [ 8 ] Li P F, Liu J, Jiang C Y, et al. Distinct successions of common and rare bacteria in soil under humic acid amendment - A microcosm study[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2271.
- [ 9 ] Li Y, Fang F, Wei J L, et al. Physiological effects of humic acid in peanut growing in continuous cropping soil[J]. Agronomy Journal, 2021, 113 ( 1 ): 550—559.
- [ 10 ] Wei S P, Wu M, Li G L, et al. Fungistatic activity of multiorigin humic acids in relation to their chemical structure[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66 ( 28 ): 7514—7521.
- [ 11 ] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7 ( 5 ): 335—336.
- [ 12 ] Nguyen N H, Song Z W, Bates S T, et al. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild[J]. Fungal Ecology, 2016, 20: 241—248.
- [ 13 ] Teng Y, Ren W J, Li Z G, et al. Advance in mechanism of peanut continuous cropping obstacle[J]. Soils, 2015, 47 ( 2 ): 259—265. [滕应, 任文杰, 李振高, 等. 花生连作障碍发生机理研究进展[J]. 土壤, 2015, 47 ( 2 ): 259—265.]
- [ 14 ] Muscolo A, Sidari M, Nardi S. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings[J]. Journal of Geochemical Exploration, 2013, 129: 57—63.
- [ 15 ] Spaccini R, Piccolo A. Molecular characteristics of humic acids extracted from compost at increasing maturity stages[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41 ( 6 ): 1164—1172.
- [ 16 ] Esteves V I, Otero M, Duarte A C. Comparative characterization of humic substances from the open ocean[J]. Organic Geochemistry, 2009, 40: 942—950.
- [ 17 ] Qualls R G, Bridgham S D. Mineralization rate of  $^{14}\text{C}$ -labelled dissolved organic matter from leaf litter in soils of a weathering chronosequence[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37 ( 5 ): 905—916.
- [ 18 ] Liu B, Gumpertz M L, Hu S J, et al. Effect of prior tillage and soil fertility amendments on dispersal of *Phytophthora capsici* and infection of pepper[J].

- European Journal of Plant Pathology, 2008, 120 (3): 273—287.
- [ 19 ] Khafagi E Y, El-Abeid S E, Soliman M S, et al. Role of arbuscular mycorrhizae fungi and humic acid in controlling root and crown rot of strawberry[J]. Plant Pathology Journal, 2018, 17: 65—74.
- [ 20 ] El-Hai KMA, El-Khateeb AY, Ghoniem AA, et al. Comparative response of cantaloupe features to amino acids, humic acid and plant oils towards downy mildew disease[J]. Journal of Biological Sciences, 2019, 19: 122—130.
- [ 21 ] Yao X D, Li X G, Ding C F, et al. Microzone distribution characteristics of soil microbial community with peanut cropping system, monocropping or rotation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56 (4): 975—985. [姚小东, 李孝刚, 丁昌峰, 等. 连作和轮作模式下花生土壤微生物群落不同微域分布特征[J]. 土壤学报, 2019, 56(4): 975—985.]
- [ 22 ] Yang Z, Dai C C, Wang X X, et al. Advance in research on rhizosphere microbial mechanisms of crop soil-borne fungal diseases[J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56(1): 12—22. [杨珍, 戴传超, 王兴祥, 等. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展[J]. 土壤学报, 2019, 56(1): 12—22.]
- [ 23 ] Li P F, Liu J, Jiang C Y, et al. Trade-off between potential phytopathogenic and non-phytopathogenic fungi in the peanut monoculture cultivation system[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 148: 103508.
- [ 24 ] Nicoletti R, Lopez-Gresa M P, Manzo E, et al. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*[J]. Mycopathologia, 2007, 163 (5): 295—301.
- [ 25 ] Zhelifonova V P, Antipova T V, Kozlovsky A G. Secondary metabolites in taxonomy of the *Penicillium* fungi[J]. Microbiology, 2010, 79 (3): 277—286.
- [ 26 ] Zhang X F, Xiang L, Wang Y F, et al. Identification of *Penicillium oxalicum* A1 strain and antagonistic effects on four species of *Fusarium* pathogen of apple[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43 (5): 841—852. [张先富, 相立, 王艳芳, 等. 草酸青霉 A1 菌株的鉴定及对苹果 4 种镰孢病菌的拮抗作用[J]. 园艺学报, 2016, 43(5): 841—852.]
- [ 27 ] Wei S P, Li G L, Li P F, et al. Molecular level changes during suppression of *Rhizoctonia solani* growth by humic substances and relationships with chemical structure[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111749.
- [ 28 ] Sun K, Xie X G, Lu F, et al. Peanut preinoculation with a root endophyte induces plant resistance to soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* via activation of salicylic acid-dependent signaling[J]. Plant and Soil, 2021, 460 (1/2): 297—312.

(责任编辑: 陈荣府)