土 壤 学 报
Acta Pedologica Sinica

DOI: 10.11766/trxb202408290347 **CSTR: 32215.14.trxb202408290347**

彭俊伟，刘勤，董元华，李建刚.青枯菌入侵对番茄根际细菌与真菌群落互作的影响[J].土壤学报，2025，

PENG Junwei, LIU Qin, DONG Yuanhua, LI Jiangang. Impact of Ralstonia solanacearum Invasion on the Interaction Between Bacterial and Fungal Communities in Tomato Rhizosphere[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025,

青枯菌入侵对番茄根际细菌与真菌群落互作的影响*

彭俊伟 [1, 2, 3]，**刘 勤** [1, 3]，**董元华** [1, 3]，**李建刚** [1, 2, 3†]

（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 211135；2. 中国科学院大学，北京 100049；3.中国科学院大学南京学院，南京 211135）

摘 要：青枯菌（*Ralstonia solanacearum*）作为一种极具危害性的植物病原细菌，会寄生番茄等作物引起青枯病的发生，造成宿主死亡与作物减产，严重危害农业经济。根际作为微生物—植物交互的重要场所，决定了病原菌入侵结果与植物健康状况。然而，病原菌入侵下的细菌与真菌互作过程尚不明确，限制了对青枯病害发生的理解。通过荧光定量 PCR（qPCR）量化微生物丰度，并通过高通量扩增子测序技术调查罹病和健康番茄植株的根际土壤中细菌和真菌群落，以探究青枯菌入侵对根际细菌和真菌组成结构及互作关联的影响。结果表明，罹病和健康植株根际的细菌群落存在显著差异，罹病根际中含有更高数量的青枯菌，而健康植株的根际则显著富集了放线菌门（Actinobacteria）和厚壁菌门（Firmicutes），这些类群包含了更多具有生物防治潜力的有益细菌。此外，病原菌的入侵压缩了真菌在根际的生存空间，显著降低了根际中真菌的 qPCR 数量和生态位宽度。共现网络分析表明，罹病根际的细菌—真菌网络更为复杂，真菌节点占比（46.7%）显著增加（健康根际为 31.0%），其中子囊菌门（Ascomycota）物种成为关键网络节点，反映出病原菌入侵增强了细菌与真菌（尤其是 Ascomycota 物种）之间的密切关联。在细菌与真菌的直接关联中，罹病根际的负相关占比（46.3%）明显高于健康根际（35.4%），表明病原菌引导的细菌—真菌互作关系更多呈现负向性。并且，Ascomycota 和 Actinobacteria 是其中关键的真菌和细菌类群，分别是罹病和健康状态下的根际指示微生物，与病原菌数量呈现显著正相关（R^2 = 0.393，P = 0.002）和负相关关系（R^2 = 0.523，P = 0.000 2）。本研究阐明了青枯菌对根际微生物群落的扰动作用，尤其是对细菌—真菌生态关联的影响结果，从根际微生物生态的角度阐释了番茄青枯病发生下的根际微生物结构特征变化，为青枯病防控策略提供了理论依据。

关键词：青枯菌；番茄青枯病；根际微生物群落；细菌—真菌互作；微生物生态网络

中图分类号：S436.412.1+5 **文献标志码：**A

Impact of *Ralstonia solanacearum* Invasion on the Interaction Between Bacterial and Fungal Communities in Tomato Rhizosphere

*国家自然科学基金项目（42377129）、国家重点研发计划项目（2023YFD1900305）和江苏省碳达峰碳中和科技创新专项（BE2022301）资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42377129), the National Key Research and Development Program of China (No. 2023YFD1900305) and the Special Technology Innovation Fund of Carbon Peak and Carbon Neutrality of Jiangsu Province, China (No. BE2022301)

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

作者简介：彭俊伟（1996—），男，安徽合肥人，博士研究生，主要从事青枯病发生机制与防控研究。 E-mail：pengjw@issas.ac.cn

收稿日期：2024-08-29；收到修改稿日期：2024-11-08；网络首发日期（www.cnki.net）：

PENG Junwei[1, 2, 3], LIU Qin[1, 3], DONG Yuanhua[1, 3], LI Jiangang[1, 2, 3†]

(1. *State Key Laboratory of Soil & Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing* 211135, *China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*; 3. *University of Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Nanjing* 211135, *China*)

Abstract:【Objective】*Ralstonia solanacearum*, a highly virulent plant pathogenic bacterium, causes bacterial wilt in tomatoes and other crops. This causes host death and significant yield losses, posing a serious threat to agricultural economies. The rhizosphere, as a critical environment for plant-microbe interactions, plays a decisive role in determining the outcome of pathogen invasion and plant health. However, the interactions between bacteria and fungi in the rhizosphere under pathogen invasion remain unclear, thus, limiting the understanding of the microbial changes associated with bacterial wilt disease.【Method】This study investigated the impact of *R. solanacearum* invasion on the composition and interaction networks of bacterial and fungal communities in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants. Quantitative real-time PCR (qPCR) was employed to quantify microbial abundances, while high-throughput amplicon sequencing was used to characterize the diversity and structure of bacterial and fungal communities. By comparing the microbial co-occurrence network in rhizosphere soils of diseased and healthy tomato plants, the study aimed to elucidate how pathogen invasion affects the microbial community structure and their ecological interactions.【Result】The results showed significant differences in the bacterial communities between the rhizospheres of diseased and healthy plants. The rhizosphere of diseased plants was invaded by a higher abundance of *R. solanacearum*, while the rhizosphere of healthy plants was significantly enriched with bacteria from the phyla Actinobacteria and Firmicutes, which include a greater number of beneficial bacteria with potential for biological control. Moreover, pathogen invasion reduced the ecological niche breadth and qPCR counts of fungi in the rhizosphere. Co-occurrence network analysis revealed that the bacterial-fungal network in diseased rhizospheres was more complex, with a significantly higher proportion of fungal nodes (46.7% compared to 31.0% in healthy rhizospheres). Among them, Ascomycota species emerged as key network nodes, indicating that pathogen invasion enhanced the close associations between bacteria and fungi (particularly Ascomycota species). In the direct bacterial-fungal interactions, the proportion of negative correlations in diseased rhizospheres (46.3%) was notably higher than in healthy rhizospheres (35.4%), suggesting that pathogen-induced interactions were predominantly antagonistic. Additionally, in the bacteria-fungi networks, Ascomycota and Actinobacteria were identified as key fungal and bacterial taxa, serving as biological indicators in diseased and healthy rhizospheres, with significant positive (R^2 = 0.393, P = 0.002) and negative (R^2 = 0.523, P = 0.000 2) correlations with pathogen abundance, respectively.【Conclusion】These results elucidate the disruptive effects of *R. solanacearum* on rhizosphere microbial communities, particularly the bacterial-fungal ecological interactions, and highlight the changes in rhizosphere microbial structures under bacterial wilt. This study provides a theoretical foundation for developing future strategies to control bacterial wilt in tomatoes.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; Tomato bacterial wilt; Rhizosphere microbial communities; Bacteria-fungi interactions; Microbial ecological network

青枯病是由青枯劳尔氏菌（*Ralstonia solanacearum*）引起的一种全球性的细菌性土传病害，发生于 50 多个科的 200 多种植物中，对农业经济发展具有不可忽视的危害性[1]。在众多寄主作物中，青枯菌对番茄作物的侵染尤为普遍[2]。当青枯菌从地下成功入侵番茄植株后，会造成番茄维管束组织的堵塞和损伤，使其无法有效从地下吸收水分和养分，从而引起叶片萎蔫和植株死亡，导致果实的减产甚至绝收[3]。由于番茄青枯病的发生隐匿于地下且发展迅速，给稳定高效的防病技术开发带来了巨大挑战。因此，深入研究青枯菌与寄主植物的互作

过程，对于推进病害防控具有重要意义。

根际环境作为青枯菌入侵番茄作物的第一道屏障，很大程度上决定了病原菌的入侵过程与结果。根际是土壤与植物根系交界的微域，孕育了多样化的微生物体，包括细菌、真菌、原生动物和线虫等，大量的研究表明它们对病原菌存活和植物生长具有重要影响[4-5]。细菌群落中，存在着诸多有益微生物，如链霉菌（*Streptomyces*）、芽孢杆菌（*Bacillus*）和假单胞菌（*Pseudomonas*）等，能够通过产生抗生素、抢夺生态位、竞争养分和诱导植物抗性等方式抑制病原菌生长和病害发生[6-7]。真菌中的木霉菌（*Trichoderma*）和根霉菌（*Gliocladium*）、青霉菌（*Penicillium*）、黄曲霉菌（*Aspergillus*）也被报道对青枯病害有抑制效果[8-9]。此外，捕食性原生动物也会影响植物的健康状态[10]，例如肾形虫（*Colpoda*）能够捕食青枯菌，抑制病害的发生[11]。

上述不同界的微生物在根际并不是相互独立的，它们之间存在着千丝万缕的联系，共同组成了根际复杂的微生物共生网络，与病原菌的入侵过程和植物健康状态紧密相关[12]。荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）通过与真菌互作可促进有益微生物的增殖，从而增强植物对根腐病的抵抗力[13]。丛枝菌根真菌（*Arbuscular mycorrhizae*）与假单胞菌和芽孢杆菌的联合应用能够协同促进植物的系统抗逆性，增强对病害的防效[14]。诸多研究表明，细菌和真菌群落的组成和功能在维持根际生态稳定和植物健康方面起到了重要的作用[5, 15]。然而，关于青枯菌入侵下的根际细菌与真菌的互作研究相对较少，对病原菌入侵引起的根际跨界微生物生态变化需要更多的关注和研究。针对此，微生物共现网络分析（Co-occurrence network analysis）是合适的研究工具，其基于物种丰度计算相关性，构建微生物共生网络。通过节点的生物学分类和边的正负属性，能够有效阐释群落物种间的互作模式，帮助破译微生物群落的内部成员关联特性和整体结构特征。

为此，本研究通过采集番茄连作大棚中罹患青枯病与健康植株的根际土壤，利用荧光定量 PCR（qPCR）和高通量扩增子测序技术检测根际土壤中细菌和真菌群落丰度和组成，并通过微生物网络关联技术分析细菌与真菌的生态互作关系，从而揭示病原菌入侵下的根际细菌与真菌群落的组成及其互作关联的变异，为番茄根系微生物的病害防控策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的收集

实验地位于江苏省南京市横溪街道南京蔬菜花卉研究所（31°43′N，118°46′E）中的番茄设施大棚。自 2016 年以来，该设施大棚长期进行单一的番茄栽培，一年两季。本研究于 2021 年 7 月收获期采集罹病和健康番茄植株的根际土壤样品。选择了 10 株出现严重枯萎症状（75%~100%的叶片枯萎或死亡）的番茄植株，以及 10 株毗邻患病植株而无病害症状的健康植株。将这些罹病和健康植株完整挖出，抖落根围的松散土壤后，小心收集贴附于根际的土壤，并通过 2 mm 筛网去除植物组织和碎屑。将收集到的根际土壤样品使用 Fast DNA Spin 试剂盒（MP Biomedicals， 上海）进行 DNA 的提取，随后储存于-80℃冰箱，用于后续的扩增子测序和基因定量分析。

1.2 病原菌 *Ralstonia solanacearum*、细菌和真菌的拷贝数定量检测

病原菌 *R. solanacearum*、细菌和真菌的数量通过实时荧光定量 PCR 技术检测。针对 *R. solanacearum* 的特异性扩增引物使用 *fliC*-F（5'-GAACGCCAACGGTGCGAACT-3'）和 *fliC*-R（5'-GGCGGCCTTCAGGGAGGTC-3'）[16]；细菌的特异性引物为 338F（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'）和 518R（5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'）[17]；真菌的特异性引物为 1737F（5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'）和 2043R

（5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'）[18]。DNA 样品的扩增采用 20 μL 的反应体系，包含 2 μL 的引物、7 μL 的 ddH_2O 和 10 μL 的 SYBR Green I 核酸凝胶染料（Sigma， 上海）。扩增反应条件为：95 ℃ 1 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 30 s，循环 40 次；随后 95 ℃ 5 s，60 ℃ 1 min；最后升温至 95 ℃，持续 15 s。在扩增周期结束时检测 SYBR 荧光信号。每个样品的检测包括三个技术重复。

1.3 细菌与真菌群落的扩增子测序

提取的根际土壤 DNA 分别用于靶向细菌 16S V3~V4 区域和真菌 ITS1 区域进行基因扩增子测序。细菌 16S rRNA 基因的 V3~V4 区使用引物 338F（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'）和 806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）进行扩增[17]；真菌 ITS1 区使用引物 1737F（5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'）和 2043R（5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'）进行扩增[18]。文库的构建包括纯化、定量和标准化，以及后续的上机测序在上海派森诺生物科技股份有限公司的 Illumina MiSeq 平台上进行。下机的原始数据使用 QIIME2 软件进行分析，利用 DADA2 插件对数据进行过滤、去噪、聚类和去除嵌合体[19]。随后，从剩余序列中整合扩增子序列变体（ASVs），并使用 SILVA 数据库（版本 138.1）进行序列比对获得各 ASV 的分类信息，生成的 ASV 丰度表供后续的微生物多样性分析[20]。

1.4 数据分析

根据测序得到的细菌和真菌 ASV 数据，进行微生物多样性分析。主坐标分析（PCoA）用于展示样本群落组成的差异性，置换多因素方差分析（PERMANOVA）以及相似性分析（ANOSIM）用以检验组间群落差异的显著性，均通过 R 语言（版本 4.0.2）的 Vegan 包执行。堆叠图、箱线图、线性拟合的分析和绘图在 R 语言中利用 ggplot2 包实现。线性判别效应量分析（Linear discriminant analysis effect size，LEfSe）用于鉴定群落间的关键差异物种，其核心指标线性判别分析分数（Linear discriminant analysis score， LDA score）用以量化物种在不同组间差异中的重要性，阈值设置为 3.5，在 R 语言中利用 microeco 包执行。使用 Cytoscape（版本 3.8.2）进行物种网络维恩图的分析和可视化，用以呈现不同微生物组的独特 ASV。

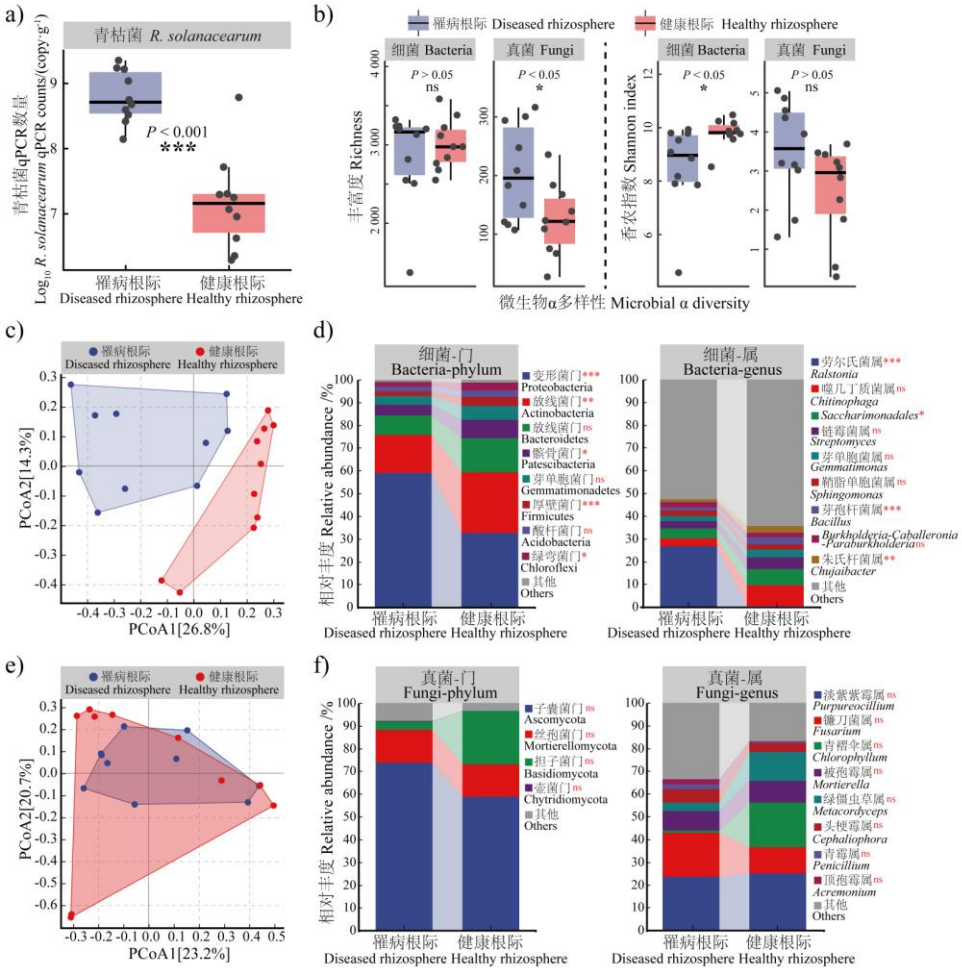
微生物的共现网络分析在 Cytoscape 软件中使用 CoNet 插件运行。将抽平后的细菌和真菌 ASV 数据表合并，保留相对丰度大于 0.05%的 ASV 进行相关性分析。相关性计算方法选择斯皮尔曼（Spearman），相关性 r 阈值设置为 0.7，显著性 P 阈值为 0.05，矫正方法采用 Benjamini-Hochberg 方法。计算得到的总共现网络中，选择其中细菌与真菌节点的连线保留，得到细菌—真菌互作的共现子网络。得到的网络数据利用 Gephi（版本 0.9.2）软件进行可视化。节点的拓扑属性在 R 语言中利用 psych 和 rnetcarto 包通过计算模块内连通度（Zi）和模块间连通度（Pi）进行评估，节点属性分为 4 类：网络中心点（Zi > 2.5 且 Pi > 0.62），模块中心点（Zi > 2.5 且 Pi < 0.62），连接节点（Zi < 2.5 且 Pi > 0.62）和外围节点（Zi < 2.5 且 Pi < 0.62）。

2 结 果

2.1 番茄健康状态影响根际细菌和真菌群落的结构与组成

qPCR 结果表明，罹病和健康番茄根际中存在的病原菌 *Ralstonia solanacearum* 数量存在显著差异（Student’s t-test，$P < 0.001$，图 1a）。罹病状态下，每克根际土壤中存在 10^8 至 10^9 的青枯菌拷贝数，而健康状态下的每克根际土壤中仅存有约 10^7 数量的青枯菌。群落分析的物种多样性结果（图 1b）表明，细菌香农指数（Shannon index）在健康番茄根际中显著高

于其在罹病番茄根际中（$P < 0.05$），而真菌物种丰富度（Richness）则在罹病番茄根际中显著更高（$P < 0.05$）。PERMANOVA 和 ANOSIM 分析以及基于 Bray-curtis 距离的细菌群落 PCoA 结果（表 1，图 1c）表明，罹病番茄与健康番茄的根际细菌群落存在显著差异（PERMANOVA 检验统计值 F. model = 3.779，$P = 0.001$；ANOSIM 检验统计值 $R = 0.458$，$P = 0.002$），样品在第一柱坐标成分（PCoA1，解释度：26.8%）上得到了明显的区分。细菌门水平组成上，罹病番茄根际中的变形菌门（Proteobacteria）相对丰度显著高于健康根际，而健康根际中的放线菌门（Actinobacteria）、髌骨菌门（Patescibacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）和绿湾菌门（Chloroflexi）的相对丰度水平则显著更高（$P < 0.05$，图 1d）。在属水平上，病原菌劳尔氏菌属 *Ralstonia* 在罹病根际占绝对优势，而健康根际中的 *Saccharimonadales*、芽孢杆菌属（*Bacillus*）和朱氏杆菌属（*Chujaibacter*）的相对丰度则显著更高（$P < 0.05$）。然而，对于真菌群落，罹病和健康的番茄根际群落间无显著差异（F. model = 1.389，$P = 0.195$；$R = 0.054$，$P = 0.172$），样品不能在 PCoA 图中得到明显的区分（图 1e）。在真菌群落组成上，门水平上以子囊菌门（Ascomycota）为主，属水平上则以淡紫紫霉属（*Purpureocillium*）和镰刀菌属（*Fusarium*）为主，但样品变异较大，在罹病和健康根际中无显著差异（$P > 0.05$，图 1f）。上述结果表明，番茄青枯病发生情况对根际细菌群落的物种多样性和组成具有显著影响，而对真菌的影响较小，仅体现在物种多样性的影响上。



注：“*”、“**”、“***”分别表示差异检验（Student’s t-test）的显著性 P 值小于 0.05、0.01、0.001；“ns”表示差异不显著，P 值大于 0.05。下同。Note: “*”, “**”, and “***” indicate that the significance P-value of Student’s t-test is less than 0.05, 0.01, and 0.001, respectively; “ns” indicates a non-significant difference with a P-value greater than 0.05. The same as below.

图 1 罹病与健康番茄根际的细菌和真菌群落的结构与组成差异（a. 罹病和健康番茄根际中的 *R. solanacearum* 数量；b. 罹病和健康番茄根际中细菌和真菌的 α 多样性（丰富度和香农多样性指数）；罹病和健康番茄根际中细菌（c）和真菌（e）群落主坐标分析（PCoA）；罹病和健康番茄根际中细菌（d）和真菌（f）群落的门及属水平组成）

Fig. 1 Differences in the structure and composition of bacterial and fungal communities in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants (a. The qPCR amounts of *R. solanacearum* in the rhizosphere of diseased and healthy tomatoes; b. The α diversity (richness and Shannon diversity index) of bacterial and fungal communities in the rhizosphere soils of diseased and healthy tomatoes; Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial (c) and fungal (e) communities in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; Bacterial (d) and fungal (f) community composition in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants at the phylum or genus level)

表 1 罹病和健康番茄根际细菌和真菌群落的显著性差异检验

Table 1 The significance test of the differences between bacterial and fungal communities in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants

	PERMANOVA		ANOSIM	
	F. model	*P*	*R*	*P*
细菌 Bacteria	3.779	0.001	0.458	0.002
真菌 Fungi	1.389	0.195	0.054	0.172

注：“PERMANOVA”和“ANOSIM”分别表示置换多元方差分析和相似性分析。*F*. model 和 *R* 是用于衡量组间差异相对于组内差异显著性的检验统计值。Note: “PERMANOVA” and “ANOSIM” indicate the permutational multivariate analysis of variance and analysis of similarities, respectively. The test statistics *F*. model and *R* are employed to evaluate the significance of between-group differences relative to within-group variation.

对于细菌群落进一步分析，通过网络维恩图（图 2a）发现，罹病根际相对于健康根际存在更多特异 Proteobacteria 门的 ASV，数量达到 327 个，而健康根际中 Proteobacteria 门下的特异 ASV 仅有 152 个；相反，Actinobacteria 中特异的 ASV 则在健康根际中更多，存在 191 个，高于其在罹病根际中的 52 个。LEfSe 分析有类似的结果（图 2b），罹病根际中富集了 Proteobacteria 门及其下属的物种，而健康根际中富集的细菌则以 Actinobacteria 和 Firmicutes 为主。

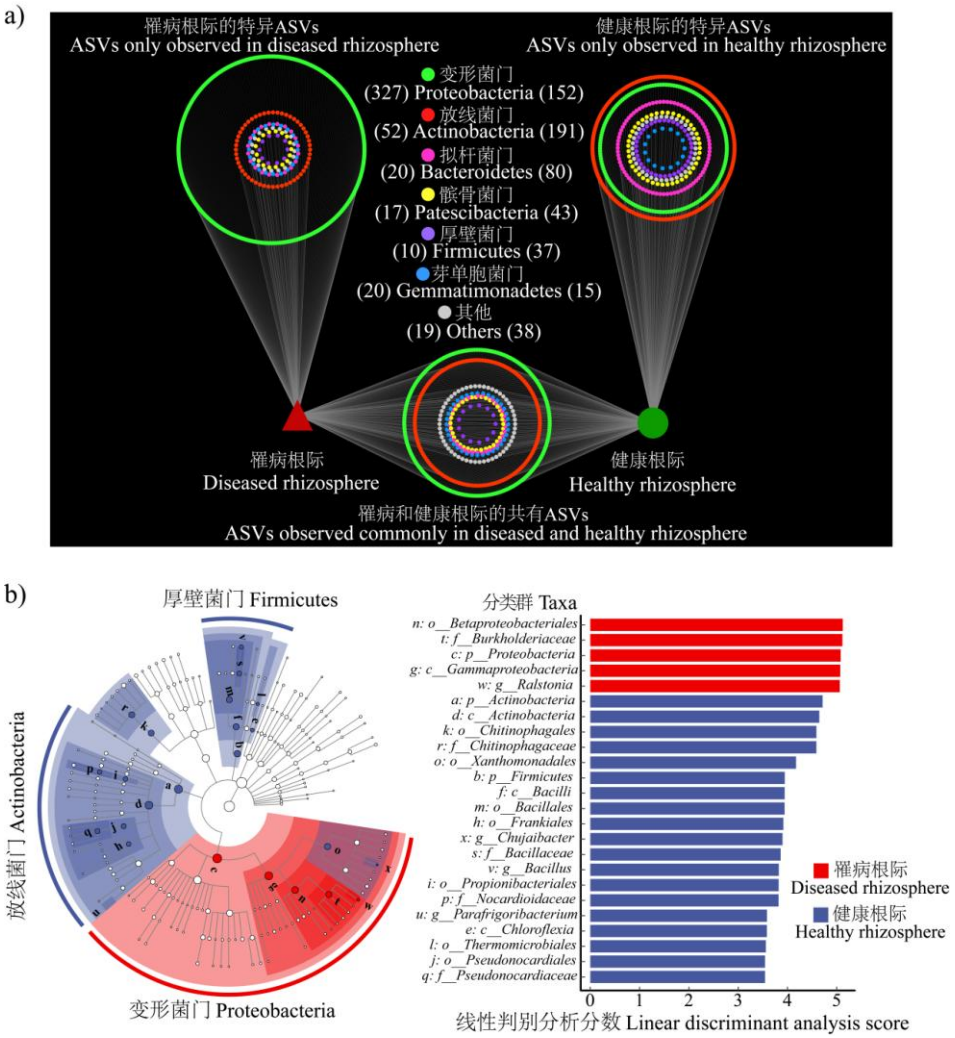


图 2 罹病与健康番茄根际细菌的特异物种及富集物种差异（a. 网络韦恩图展示罹病和健康番茄根际中的特异细菌物种;b. 线性判别效应分析（LEfSe）展示罹病和健康番茄根际中的富集细菌）

Fig. 2 Differences in specific and enriched bacterial species in the rhizosphere of diseased and healthy tomatoes (a. Venn network diagram showing specific bacterial species in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; b. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) showing enriched bacterial species in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants)

2.2 病原菌入侵降低根际中真菌的丰度和生态位

荧光定量（qPCR）检测结果表明，罹病番茄根际中的细菌总数量与健康番茄根际相比无显著差异（Student’s t-test，$P > 0.05$，图 3a）。与细菌相反，真菌在罹病番茄根际中的数量要显著低于其在健康番茄根际中的数量（$P < 0.05$）。此外，真菌的物种生态位（$P < 0.05$）和群落生境生态位（$P < 0.01$）在罹病番茄根际中也处于更低的水平，显著低于健康番茄根际（图 3b）。上述结果表明，在番茄患病状态下，根际环境中真菌的生存空间受到了一定程度的限制。进一步分析真菌总数量和生境生态位与病原菌的关联（图 3c），发现它们均与青枯菌数量呈显著的负相关关系，拟合 R^2 值分别为 0.379（$P < 0.01$）和 0.523（$P < 0.001$），这表明青枯菌的入侵是真菌生存空间降低的重要原因。

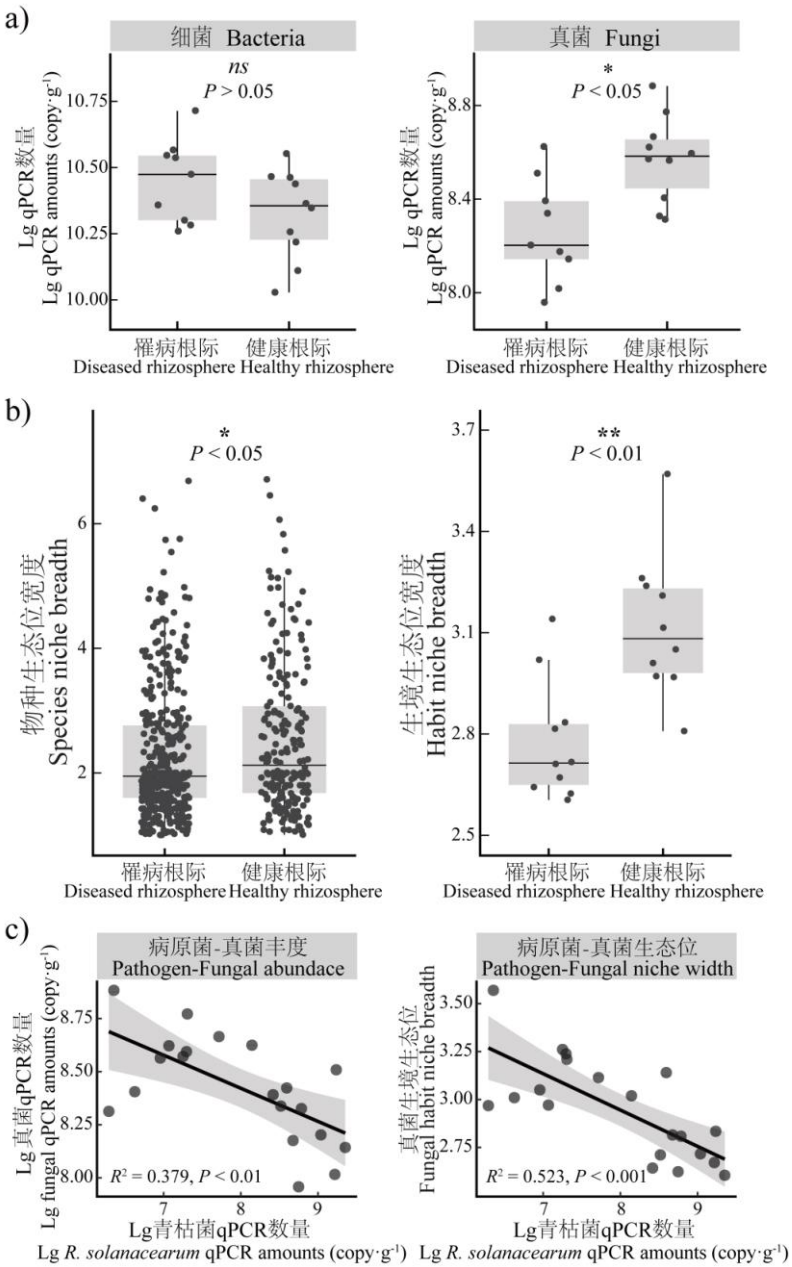


图 3 罹病与健康番茄根际的微生物丰度与生态位差异(a. 罹病和健康番茄根际中细菌和真菌的 qPCR 数量；b. 罹病和健康番茄根际中真菌的物种生态位宽度和群落生境生态位宽度；c. 病原菌 qPCR 数量与真菌 qPCR 数量和生境生态位宽度的相关性)

Fig. 3 The difference in microbial abundance and niche width in the rhizosphere of diseased and healthy tomatoes (a. The qPCR amounts of bacteria and fungi in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; b. Species niche breadth and habitat niche breadth of fungi in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; c. Correlation fitting analysis between pathogen qPCR amounts and fungal qPCR amounts and habitat niche breadth)

2.3 病原菌入侵影响细菌—真菌关联网络的结构

对番茄根际的细菌和真菌群落进行网络整合分析，得到罹病和健康状态下两种不同的网络（图 4a）。罹病的根际网络具有 168 个节点、725 条边，健康根际网络具有 156 个节点和 517 条边。在节点分布上，罹病状态下的网络中，真菌节点的数量占总网络节点的 48.2%；而在健康状态下，真菌节点数量的占比明显减小，仅占 25.6%（图 4b）。对于网络连接，罹

病和健康状态下的网络均以正相关连接为主导，占比分别达到 70.2%和 65.6%。Zi-Pi 结果（图 4c）表明，健康根际网络中含有 15 个连接节点（Connector），其中 4 个属于 Proteobacteria 门，3 个属于 Patescibacteria 门，2 个属于 Ascomycota 门；而罹病根际网络中的关键节点则主要为 Ascomycota 门下物种，含有 1 个模块中心点（Connector hub）和 4 个连接节点。进一步关注网络连线（图 4d），发现细菌内部连线（细菌—细菌）、真菌内部连线（真菌—真菌）和细菌—真菌间连线在罹病和健康状态的网络中占不同比例。相较于健康状态，罹病状态下的根际网络中真菌—真菌和细菌—真菌的网络连接占比明显提升。对细菌与真菌子网络（细菌—真菌）深入分析（图 4e），发现罹病状态下子网络具有 137 个节点，其中 46.7%为真菌节点，而健康状态下仅有 100 个节点，且仅有 31%的真菌节点。在细菌—真菌子网络的关联性上（图 4f），罹病状态下的边有 281 条，高于健康状态下的 164 条，并且罹病子网络的负相关连接占比达 46.3%，要高于其在健康状态下的 35.4%，说明病原菌的成功入侵使细菌和真菌的关联性更加复杂，且向负向关系发展。

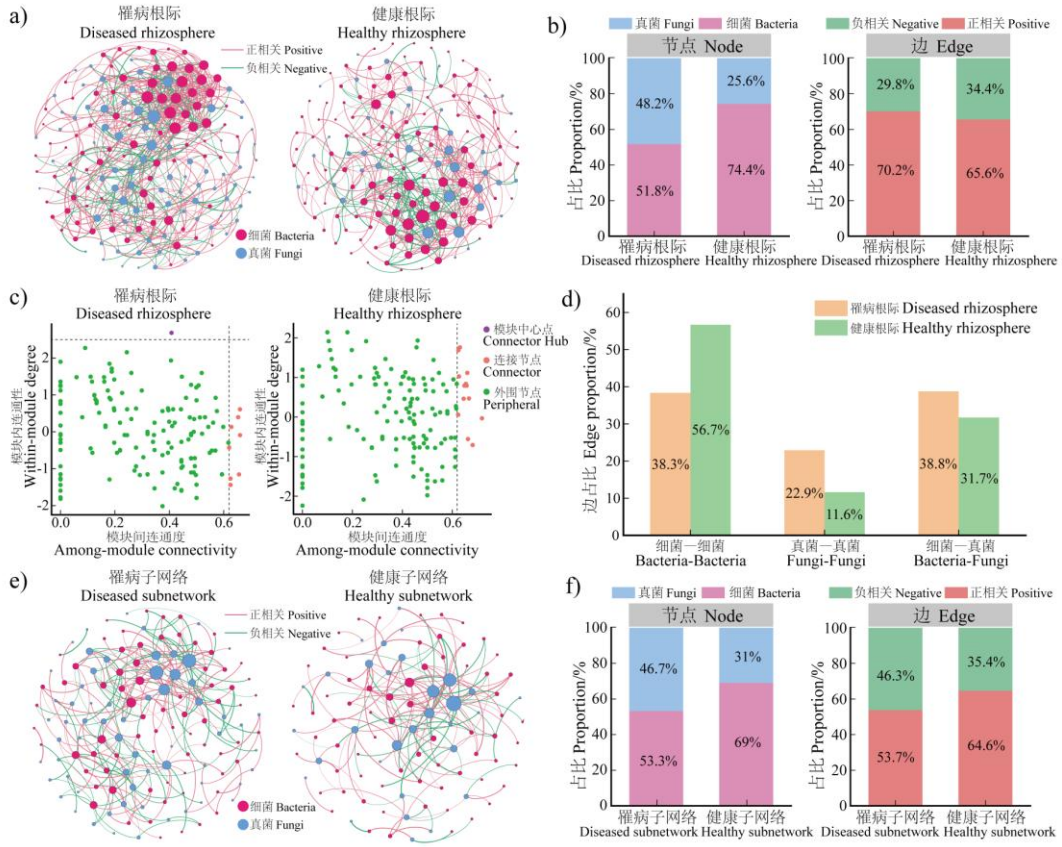


图 4 罹病和健康番茄根际的微生物网络分析（a. 罹病和健康番茄根际中的细菌—真菌的整体微生物网络；b. 罹病和健康根际中整体微生物网络中的节点与边的属性占比；c. 罹病和健康根际微生物网络节点的模块内与模块间的连通度（Zi-Pi）图；d. 罹病和健康根际中不同连接方式（细菌—细菌、真菌—真菌、细菌—真菌）在整体微生物网络中的占比；e. 罹病和健康番茄根际中的细菌与真菌互作的子网络；f. 罹病和健康根际中细菌—真菌互作子网络中的节点与边的属性占比)

Fig. 4 Network analysis of rhizosphere microbial communities in the diseased and healthy tomato plants (a. Overall bacteria-fungi networks in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; b. Distribution of node and edge attributes in the microbial networks in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; c. Within-module degree and among-module connectivity (Zi-Pi) plots of nodes in the diseased and healthy rhizosphere microbial networks; d. Proportions of different

connection types (bacteria-bacteria, fungi-fungi, bacteria-fungi) in the overall microbial networks in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; e. Sub-networks of bacteria-fungi interactions in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants; f. Distribution of node and edge attributes in the bacteria-fungi interaction sub-networks in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants)

2.4 病原菌入侵影响细菌—真菌互作网络中的关键类群

堆叠图表明，罹病和健康状态下的细菌—真菌子网络的节点分类组成上有明显差异（图 5a）。对于细菌节点，罹病状态下 Proteobacteria、Actinobacteria 和拟杆菌门（Bacteroidetes）的节点数量分别为 31、19 和 12 个，而健康状态下 Actinobacteria 的节点数量最多，存在 22 个。真菌节点的差异主要体现在子囊菌门（Ascomycota）上，罹病的细菌—真菌子网络存在 41 个 Ascomycota 节点，相对应其在健康状态下仅有 15 个。进一步的节点丰度分析（图 5b）显示，健康状态子网络中的放线菌节点在健康根际群落中有更高的丰度水平（Student's t-test，$P < 0.01$）。而对于真菌节点（图 5c），罹病状态子网络中的 Ascomycota 节点在罹病根际群落中表现出显著更高的丰度（$P < 0.001$）。上述结果表明，Ascomycota 和 Actinobacteria 分别是罹病和健康状态下细菌—真菌子网络中的关键类群，它们在对应植株状态下的富集驱动了细菌和真菌的关联互作。

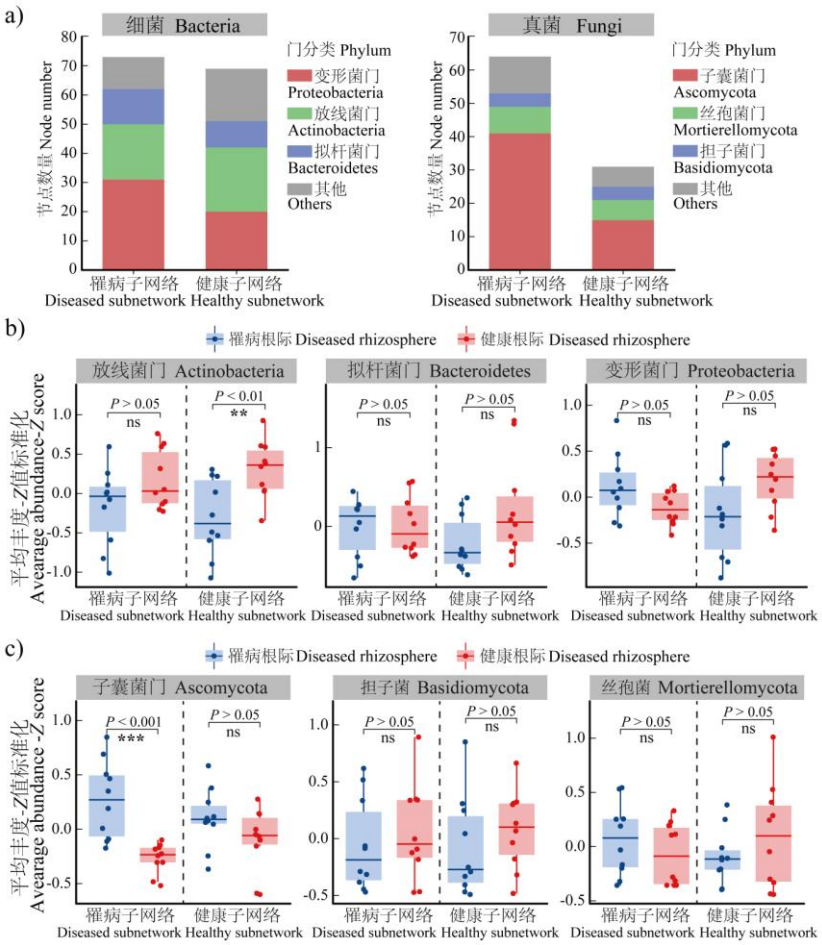


图 5 细菌—真菌互作子网络中的节点分类及丰度变化（a. 罹病和健康根际中细菌—真菌互作子网络中细菌和真菌节点的分类学组成；罹病和健康根际中细菌—真菌互作子网络中的不同细菌（b）和真菌（c）门水平节点在不同健康状态下的丰度变化)

Fig. 5 Classification and abundance changes of nodes in the bacteria-fungi interaction sub-network (a. Taxonomic composition of bacterial and fungal nodes in the bacteria-fungi interaction sub-network in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants;

Changes in the abundance (Z-score) of nodes attributed to different bacterial (b) and fungal (c) phylum in the bacteria-fungi interaction sub-networks in the rhizosphere of diseased and healthy tomato plants)

进一步的拟合分析以验证子网络中不同门的节点对病原菌入侵的响应。结果（图 6）表明，在罹病根际的细菌—真菌子网络中（图 6a），Ascomycota 的节点是对青枯菌入侵响应最强的真菌节点（R^2 = 0.393，P < 0.01），且与病原菌数量呈正相关关系，表明病原菌入侵促进了细菌—真菌互作中 Ascomycota 相关物种的生存优势。而在健康根际的细菌—真菌子网络中（图 6b），Actinobacteria 节点与青枯菌关联性最强，与病原菌数量呈现显著的负相关关系（R^2 = 0.523，P < 0.001）。上述结果进一步表明，Actinobacteria 和 Ascomycota 分别是病原菌入侵下的根际细菌—真菌互作中的关键细菌和真菌类群，且它们可作为病原菌入侵及植物健康状态的重要指示生物。

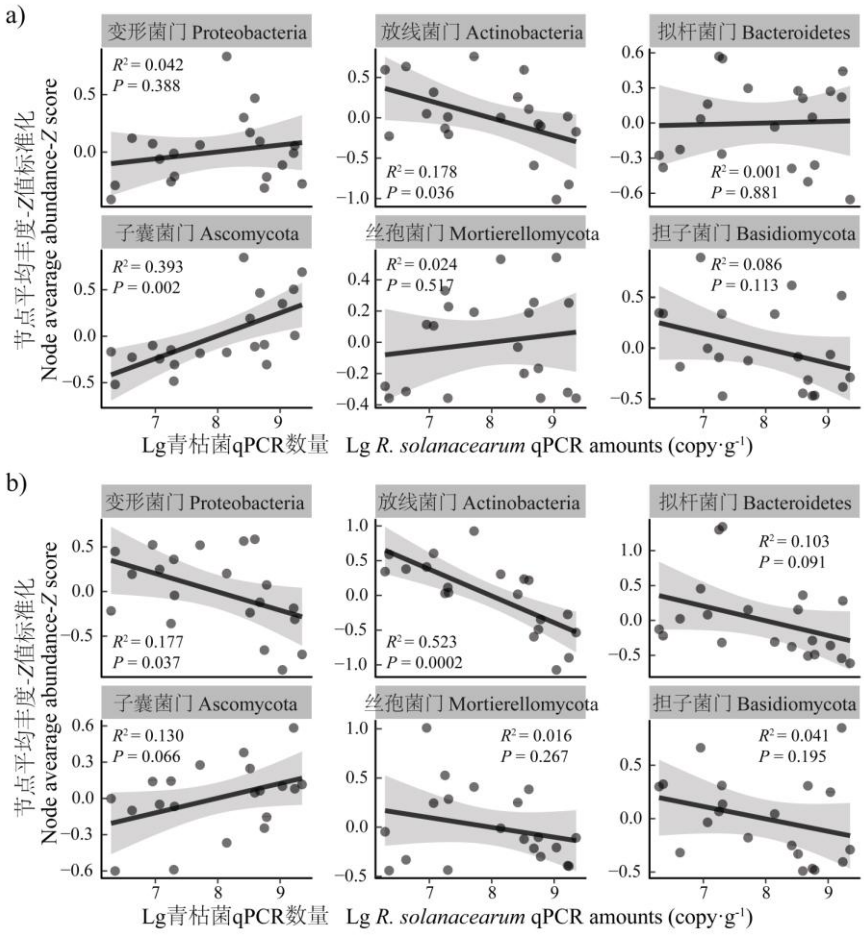


图 6 罹病（a）和健康（b）根际细菌—真菌互作子网络中的不同门类节点丰度与病原菌的相关性拟合

Fig. 6 Correlation fitting analysis between the abundance (*Z*-score) of bacterial and fungal nodes at different phylum levels in the bacteria-fungi interaction sub-network and pathogen qPCR amounts in the rhizosphere of diseased (a) and healthy (b) tomato plants

3 讨 论

3.1 病原菌入侵影响细菌群落组成与真菌群落生态空间

青枯菌（*R. solanacearum*）作为病原细菌，对植株的成功入侵势必引起根际细菌群落的相应变化。本研究中发现，罹病番茄根际中检测到了更多的 *R. solanacearum* 数量，且健康番茄根际的细菌多样性更高（图 1a，图 1b），这可能是由于 *R. solanacearum* 的大量侵入引

起了根际细菌群落的失衡。罹病和健康番茄根际细菌群落的结构与组成也具有显著差异，表明病原菌入侵对根际细菌群落的构成具有重要影响[21-22]。在罹病番茄根际细菌群落中，富集了更多的 Proteobacteria 的物种，而健康番茄根际中则富集了更多的 Actinobacteria 和 Firmicutes 物种（图 2）。Lee 等[23]发现 Actinobacteria 和 Firmicutes 在根际中的存在是番茄抵御病原菌入侵和维持健康状态的关键。并且，诸多 Actinobacteria 和 Firmicutes 门中的物种如 *Streptomyces* 和 *Bacillus* 均被广泛报道能产生多种具有抗生性的次级代谢产物，常用于农业病害的防控研究与实践中[24-25]。它们的富集可能代表了根际微生物群落的抑病潜力，决定了病原菌是否能够成功侵染番茄寄主。

而真菌群落组成上，尽管罹病和健康番茄根际间无显著性差异（图 1e，图 1f），但在真菌多样性、数量和生态位上表现出了显著差异（图 3），表明 *R. solanacearum* 的入侵对真菌群落的整体发展上有较强的干扰。这可能是因为细菌和真菌会共同竞争土壤碳和能量资源[15]，而细菌群落整体在内部 *R. solanacearum* 大量扩繁的情况下，向外作出资源与空间的侵略和掠夺，从而压缩了真菌在根际环境中的生存空间。

3.2 Actinobacteria **和** Ascomycota **分别是细菌—真菌互作网络中的关键细菌与真菌类群**

网络分析表明，罹病状态下的细菌—真菌网络结构较健康状态更为复杂，节点数量和连线数量均有所增加（图 4），这可能是由于罹病情况下番茄植株会采用呼叫策略（Cry for help）调节根系分泌物的组成和数量，使得根际环境资源更为复杂，进而增强了微生物的种间互作[26-27]。此外，病原菌入侵压缩了真菌的生态空间，使得真菌相关的竞争作用加剧，这可能解释了网络中真菌节点数量增加，以及真菌相关连线（细菌—真菌，真菌—真菌）占比提高的现象（图 4d）。同时，细菌—真菌子网络中更高比例的负相关连线（图 4f）也表明病原菌的入侵加强了细菌与真菌间的负向竞争作用。

在罹病和健康状态下 Ascomycota 和 Actinobacteria 分别是真菌和细菌共现网络中的关键类群（图 5），它们的丰度变化可能是驱动群落结构变化以及影响细菌—真菌互作的主要因素。有研究表明，在植物组织的分解过程中，Ascomycota 对植株组织的特异性响应较高，是负责细菌与真菌相互关联的主要物种[28]。而 Actinobacteria 门的物种则被报道对多种真菌物种具有拮抗能力[26, 29]。这些功能特性可能是它们主导网络结构变化的重要原因。进一步的拟合分析（图 6）证明，这种网络变化的驱动力来源于病原菌的入侵。*R. solanacearum* 的入侵使得 Ascomycota 物种在真菌内部的生态位竞争中占据优势，类似的研究也报道了 Ascomycota 门下镰刀菌（*Fusarium* spp.）在罹病植株根际的富集[30]。相反，健康根际子网络的 Actinobacteria 节点与病原菌呈负相关，说明其可能是抵御病原菌入侵的重要保障。上述结果表明，*R. solanacearum* 不仅通过直接侵染导致病害，还可能通过扰动根际细菌与真菌群落的关键类群与互作结构，间接影响病害的发生。

然而，本研究展现的细菌—真菌网络共现模式虽然从生态学角度上解释了病原菌入侵对根际微生物跨界互作的影响，但其中涉及的具体物种互作机制仍然难以明确，无法通过简单的相关性数值体现。这些种间互作关乎根际微生物群落的功能与稳定，对抵御病原菌的入侵和维持植物健康均起到了尤为重要的作用[5, 31]。因此，针对这方面的不足尚需更深入的室内机理研究，从而为病害的防控与技术发展提供更全面的理论基础。

4 结 论

本研究通过分析罹病和健康番茄根际细菌与真菌群落组成及关联网络结构，揭示了病原菌 *R. solanacearum* 入侵对根际微生物群落的复杂影响。结果表明，病原菌入侵会压缩真菌在根际的生存空间，于此同时，病原菌会通过影响 Actinobacteria 门和 Ascomycota 门中的关键物种，进而改变细菌和真菌的关联网络。该发现对理解植物病害与根际微生物群落之间的

关系具有重要意义，尤其是在揭示病原菌如何通过影响关键微生物节点来改变根际跨界微生物群落方面。未来研究应进一步探讨不同作物系统和环境条件下病原菌入侵对根际微生物群落结构和功能的影响，并探索如何通过调控关键类群微生物来增强植物的抗病性。

参考文献（References）

[1] Guo J H, Qi H Y, Guo Y H, et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biological Control, 2004, 29(1): 66-72.

[2] Wang J, Long S F, Wang Z W, et al. Research progress in controlling tomato bacterial wilt[J]. China Vegetables，2020(1)：22-30. [王杰，龙世芳，王正文，等. 番茄青枯病防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2020(1): 22-30.]

[3] Kwak M J, Kong H G, Choi K, et al. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato[J]. Nature Biotechnology, 2018, DOI: 10.1038/nbt.4232.

[4] Boro M, Sannyasi S, Chettri D, et al. Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: A review[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(11): 666.

[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] Singh H B. Management of plant pathogens with microorganisms[J]. Proceedings of the Indian National Science Academy，2014, 80(2): 443-454.

[7] Ma C, Yang X R, Jiang G F, et al. Research progresses on key factors affecting survival of *Ralstonia solanacearum* in soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(6): 1359-1367. [马超，杨欣润，江高飞，等. 病原青枯菌土壤存活的影响因素研究进展[J]. 土壤学报, 2021, 58(6): 1359-1367.]

[8] Konappa N，Krishnamurthy S，Siddaiah C N，et al. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2018, 28(1): Article number 63.

[9] Gafur A. Development of biocontrol agents to manage major diseases of tropical plantation forests in Indonesia: A review[J]. Environmental Sciences Proceedings, 2021, 3(1): 11. https://doi.org/10.3390/IECF2020-07907

[10] Wei Z，SongY 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.]

[11] Guo S, Jiao Z, Yan Z, et al. Predatory protists reduce bacteria wilt disease incidence in tomato plants[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 829.

[12] Deveau A, Bonito G, Uehling J, et al. Bacterial–fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2018, 42(3): 335-352.

[13] Saravanakumar D，Lavanya N，Muthumeena B，et al. *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leaffolder pest[J]. Journal of Applied Entomology, 2008, 132(6): 469-479.

[14] Li F X，Duan T Y. Research progress in the control of plant diseases by the combination of fungi and beneficial microorganisms[J]. Chinese Journal of Grassland, 2021, 43(8): 93-105. [李法喜，段廷玉. 真菌和有益微生物联合防治植物病害研究进展[J]. 中国草地学报, 2021, 43(8): 93-105.]

[15] Wang C Q, Kuzyakov Y. Mechanisms and implications of bacterial–fungal competition for soil resources[J]. The ISME Journal, 2024, 18(1): wrae073.

[16] Schönfeld J, Heuer H, Van Elsas J D, et al. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of fliC fragments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7248-7256.

[17] Mori H, Maruyama F, Kato H, et al. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes[J]. DNA Research, 2014, 21(2): 217-227.

[18] Degnan P H, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity[J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 183-194.

[19] Hall M，Beiko R G. 16S rRNA gene analysis with QIIME2[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1849: 113-129.

[20] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.

[21] Kuang L, Li T, Wang B, et al. Diseased-induced multifaceted variations in community assembly and functions of plant-associated microbiomes[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1141585.

[22] Liu H, Dong Y H, Shen M C, et al. Characteristics of rhizosphere microbial communities in a disease- suppressive soil of tomato bacterial wilt and its disease-suppressive transmission mechanism[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(4): 1125-1135. [刘洪，董元华，申民翀，等. 番茄青枯病抑病土壤根际微生物群落特征及其抑制性传递机制[J]. 土壤学报, 2022, 59(4): 1125-1135.]

[23] Lee S M, Kong H G, Song G C, et al. Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease[J]. The ISME Journal, 2021, 15(1): 330-347.

[24] Barka E A, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(1): 1-43.

[25] Palaniyandi S A, Yang S H, Zhang L, et al. Effects of Actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(22): 9621-9636.

[26] Huang X Q, Liu S Z, Liu X, et al. Plant pathological condition is associated with fungal community succession triggered by root exudates in the plant-soil system[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 151: 108046.

[27] You C, Yang T J, Zhou X G, et al. Research advances on mechanisms and preventions of soil-borne diseases exacerbated by root exudates in continuous cropping systems[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(5): 1201-1211. [游川，杨天杰，周新刚，等. 连作根系分泌物加剧土传病害的机制和缓解措施研究进展[J]. 土壤学报, 2024, 61(5): 1201-1211.]

[28] Zhao B, Xing P, Wu Q L. Interactions between bacteria and fungi in macrophyte leaf litter decomposition[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(2): 1130-1144.

[29] Sharma P, Aswini K, Prasad J S, et al. Characterization of Actinobacteria from wheat seeds for plant growth promoting traits and protection against fungal pathogens[J]. Journal of Basic Microbiology, 2023, 63(3/4): 439-453.

[30] Li T T, Deng X H, Li R C, et al. Effects of *Ralstonia solanacearum* infection on soil fungal community diversity[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(10): 195-203. [李婷婷，邓旭辉，李若尘，等. 番茄青枯病发生对土壤真菌群落多样性的影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 195-203.]

[31] Jambon I, Thijs S, Weyens N, et al. Harnessing plant-bacteria-fungi interactions to improve plant growth and degradation of organic pollutants[J]. Journal of Plant Interactions, 2018, 13(1): 119-130.

（责任编辑：陈荣府）