

DOI: 10.11766/trxb202211050608

郭俏, 肖莉, 李进, 孙晨瑜, 符慧晶, 舒小龙, 薛泉宏, 来航线. 绿肥介导的土壤代谢物-微生物变化缓解草莓自毒并增产提质[J]. 土壤学报, 2023,

GUO Qiao, XIAO Li, LI Jin, SUN Chenyu, FU Huijing, SHU Xiaolong, XUE Quanhong, LAI Hangxian. Green Manuring-induced Changes in Soil Metabolome and Microbiome Alleviate Strawberry Autotoxicity While Improving Fruit Yield and Quality[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023,

绿肥介导的土壤代谢物-微生物变化缓解草莓自毒并增产提质*

郭俏, 肖莉, 李进, 孙晨瑜, 符慧晶, 舒小龙, 薛泉宏, 来航线[†]

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为探讨禾本科绿肥对设施大棚草莓产量和品质的影响及机制, 于 2017—2021 年选取玉米、高粱和高丹草绿肥进行还田试验, 设置休闲农田-草莓、玉米-草莓、高粱-草莓和高丹草-草莓 4 个处理, 测定草莓盛果期的植株生长及生理指标、果实产量及品质、土壤化学特征、细菌群落结构及代谢组。结果表明, 不同绿肥处理均促进后茬草莓生长、产量形成及品质提高。其中, 玉米绿肥的效果最为明显, 该处理下草莓植株干重、根表面积、根长、根平均直径、根尖数、根系活力和叶片叶绿素含量分别较休闲对照显著增加 53.4%、34.4%、40.0%、21.0%、94.7%、36.0% 和 7.8%。同时, 玉米绿肥处理下果实单株产量、总糖含量、维生素 C 含量和可溶性固形物含量分别显著增加 44.6%、13.9%、14.4% 和 12.8%。此外, 玉米绿肥处理下土壤 pH、阳离子交换量、有机质含量、碱解氮含量、有效磷含量、速效钾含量、蔗糖酶活性、磷酸酶活性和脲酶活性均显著增加。绿肥介导了草莓根际土壤细菌群落多样性及丰富度增加, 有益细菌如黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、贪噬菌属 (*Variovorax*) 和鞘氨醇杆菌属 (*Pedobacter*) 显著富集。绿肥对有益细菌的招募可能与之介导的土壤中糖类代谢物 (如山梨糖、甘露糖和果糖) 相对丰度显著增加有关, 而脂类代谢物 (如棕榈酸、硬脂酸和油酸) 相对丰度的显著降低缓解了草莓自毒作用。因此, 禾本科绿肥引起土壤特定代谢物变化通过招募有益菌并缓解自毒作用提高草莓产量和品质, 以玉米为主的禾本科绿肥适用于设施大棚草莓生产。

关键词: 草莓; 禾本科绿肥; 细菌群落结构; 代谢组

中图分类号: S154

文献标志码: A

Green Manuring-induced Changes in Soil Metabolome and Microbiome Alleviate Strawberry Autotoxicity While Improving Fruit Yield and Quality

GUO Qiao, XIAO Li, LI Jin, SUN Chenyu, FU Huijing, SHU Xiaolong, XUE Quanhong, LAI Hangxian[†]

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

* 秦创原科技创新基金项目 (2021ZDZX-NY-0005)、陕西省自然科学基金项目 (2021JQ-151)、鄂尔多斯市科技重大专项 (2022EEDSKJZDZX019) 和内蒙古自治区科技计划项目 (2022YFHH0114) 资助 Supported by the Qinchuangyuan Scientific and Technological Innovation Funds of China (No. 2021ZDZX-NY-0005), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (No. 2021JQ-151), the Science and Technology Major Project of Ordos (No. 2022EEDSKJZDZX019), and the Science and Technology Planning Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2022YFHH0114)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: laihnafuedu@163.com

作者简介: 郭俏 (1985—), 女, 西安人, 博士, 主要研究方向为根际微生态与植物免疫。E-mail: shuiyiwei83@163.com

收稿日期: 2022-11-05; 收到修改稿日期: 2023-02-13; 网络首发日期 (www.cnki.net):

Abstract: 【Objective】 Green manuring is considered to be an effective strategy to achieve sustainable development in agriculture. It plays key roles in ameliorating soil fertility, improving fruit quality, and enhancing resource use efficiency. China is the world's largest strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) producer, with strawberry cultivation taking place mainly in greenhouses. However, many field management practices, such as long-term monoculture and irrational chemical fertilization, reduce the fruit yield and quality of strawberries. Therefore, it is important to investigate the effects and mechanisms of green manuring on strawberry yield and quality in greenhouses. 【Method】 Three gramineous green manures, i.e., maize (*Zea mays* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], and sorghum-sudangrass (*Sorghum × sudangrass*), were selected to carry out a field experiment from 2017 to 2021. There were four treatments: fallow farmland-strawberry (control), maize-strawberry, sorghum-strawberry, and sorghum-sudangrass-strawberry. Samples were collected in the full fruit stage of strawberries to determine plant growth and physiological parameters, in addition to fruit yield and quality attributes. Rhizosphere soil chemical properties, bacterial community structure, and metabolome were also analyzed. 【Result】 The different green manure treatments promoted plant growth and yield formation, and improved the fruit quality of subsequent strawberry crops. The most prominent effects were observed for the corn green manure treatment, which increased strawberry plant dry weight, root growth, and leaf chlorophyll content (SPAD value) by 53.4%, 21.0% - 94.7%, and 7.8%, respectively, compared with the control treatment. Also, fruit yield per plant was markedly improved by 44.6% in the corn green manure treatment, along with the increase of nutrient contents (total sugar: by 13.9%; vitamin C: by 14.4%; and soluble solids: by 12.8%). Soil pH, cation exchange capacity, organic matter content, and nutrient availability (N, P and K) were also strongly increased under the corn green manure treatment, while sucrase, phosphatase, and urease activities were enhanced simultaneously. Green manuring mediated an increase in the diversity and abundance of rhizosphere soil bacterial communities, coupled with a distinct enrichment of potentially beneficial bacteria, such as *Flavobacterium*, *Variovorax*, and *Pedobacter*. The increase in the abundance of potentially beneficial bacteria might be related to a considerable increase in the relative abundance of carbohydrate metabolites (e.g., sorbose, mannose, and fructose) associated with green manuring. A remarkable decrease in the relative abundance of lipid metabolites (e.g., palmitic acid, stearic acid, and oleic acid) alleviated the autotoxicity of strawberries. 【Conclusion】 Gramineous green manure-mediated shifts in specific metabolites in the rhizosphere soil improved strawberry yield and quality by recruiting potentially beneficial bacteria and alleviating allelopathic autotoxicity. Maize green manure is a better option compared to sorghum and sorghum-sudangrass green manures for greenhouse strawberry production.

Key words: Strawberry; Gramineous green manure; Bacterial community structure; Metabolome

草莓果实的营养价值丰富, 富含膳食纤维和多种维生素^[1]。目前我国已经成为世界上最大的草莓生产国, 种植方式主要以设施大棚为主^[2]。然而, 长期单一种植草莓和不合理施用化肥, 导致土壤理化性质恶化、微生物区系劣变、化感物质累积。例如, 草莓连作下的土壤板结、酸化和盐渍化, 抑制植物根系对养分的吸收; 对植物有益的微生物放线菌数量减少, 而有害的镰刀菌数量增加; 阻碍植物生长的自毒化感物质(如脂类化合物棕榈酸、硬脂酸和油酸)大量积累^[3-6]。土壤环境的恶化不仅抑制植株的正常生长, 还降低果实的产量和品质, 给草莓产业带来巨大的经济损失^[7-8]。

绿肥在增加土壤肥力、改善土壤质量、提高资源利用率等方面有重要价值, 其应用被视为建立可持续性发展农业的重要策略^[9]。以豆科植物作为绿肥介导作物增产和提质效应是当前研究的热点。例如, 夏闲期种植并翻压豆科绿肥(如绿豆)增加土壤有机质和有效养分的含量、降低后茬草莓枯萎病的发病率, 进而促进草莓植株生长并提高果实产量^[10]。草木樨绿肥提高多种土壤酶(如蔗糖酶、脲酶、磷酸酶)的活性, 从而促进土壤中的养分循环和物质转化, 对作物生长和产量形成正效应^[11]。此外, 紫云英绿肥通过动态调节稻田土壤中氨氧化细菌、古菌的丰度, 降低土壤硝态氮淋失的风险, 进而提高水稻产量^[12]。然而, 禾本科绿肥对草莓植株生长、果实产量和品质的影响及作用机制在很大程度上未知。

土壤代谢物是植物-微生物互作的重要介质,具有双重作用。一方面,一些糖类代谢物可以为微生物提供碳源,如果糖、山梨糖和甘露糖,且这几种糖类物质可以诱导有益微生物(如植物根际促生菌)的趋化作用和生物膜形成,从而在植物根际定殖,促进植物生长并维持健康^[13-15]。另一方面,化感物质(如脂类代谢物)的积累会抑制植物的生长^[5-6]。然而,研究表明多种微生物(如芽孢杆菌和根瘤菌)可以降解/利用化感物质^[16]。目前少有研究报道绿肥介导下的代谢物-微生物协同变化模式,及该模式对植物的作用效应。

本研究通过长期定位田间试验,评估三种禾本科绿肥(玉米、高粱和高丹草)处理对后茬草莓植株生长和生理特性、果实产量和品质、土壤化学特征、微生物组和代谢组的影响,旨在揭示绿肥介导的草莓增产和提质机制,从而丰富设施大棚草莓种植技术和理论的科学基础。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于陕西省西安市鄠邑区(34°6'N, 108°31'E),海拔 430 m,地势平坦。该地区属暖温带大陆性季风气候区,年均气温 13.5 °C,年均降水量 627 mm,多集中于夏秋季节,雨热同季。供试土壤为塿土,试验前耕层土壤(0~20 cm) pH 6.4,有机质含量 15.3 g·kg⁻¹,阳离子交换量 10.3 cmol·kg⁻¹,全氮含量 1.2 g·kg⁻¹,全磷含量 0.9 g·kg⁻¹,全钾含量 18.4 g·kg⁻¹,碱解氮含量 42.3 mg·kg⁻¹,有效磷含量 151.1 mg·kg⁻¹,速效钾含量 113.7 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计

设置 4 个处理:CK,休闲农田-草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.);MA,玉米(*Zea mays* L.)-草莓;SO,高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]-草莓;SS,高丹草(*Sorghum × sudangrass*)-草莓。采用完全随机区组试验设计,每个小区面积 60 m² (4 m × 15 m),每个处理 3 次重复。

2017 年 6 月起,在设施大棚内开展长期定位试验,一年一季。于每年 6 月初播种不同绿肥作物,高丹草和高粱籽粒播种量均为每小区 0.24 kg,玉米籽粒播种量为每小区 0.96 kg。绿肥种植期间不施肥。每年 7 月中旬收获并将绿肥切碎翻压于土壤中,翻压深度 20 cm,每个小区翻压量均约 60 kg(以干重计)。玉米、高粱和高丹草翻压时的鲜草氮含量分别为 29、25 和 23 g·kg⁻¹,磷含量分别为 2.6、2.3 和 2.2 g·kg⁻¹,钾含量分别为 26、20 和 24 g·kg⁻¹。翻压后的绿肥腐解至 8 月初,起垄,8 月中旬移栽草莓。所有处理每季草莓施肥量一致,N、P₂O₅ 和 K₂O 的施用量分别为 135 kg·hm⁻²、80 kg·hm⁻² 和 150 kg·hm⁻²,以 1:1 的比例分基肥和追肥施用,追肥从草莓花期开始施用,每半月施用一次,平均分为 12 次施用完毕。

1.3 样品采集

于 2021 年 1 月草莓盛果期采集果实,每处理随机选取 6 株,称重后 4 °C 冷藏用于果实品质的测定。同时,测定叶片的叶绿素含量,再将整株草莓挖出,抖落根系土壤,用无菌刷收集草莓根际土壤,混匀,一部分风干、过筛并测定土壤化学特征参数,一部分液氮速冻后-80 °C 保存用于土壤代谢组的测定及细菌群落高通量测序。整株草莓用无菌水冲洗三次后沥干,测定根系形态、活力及植株生物量。

1.4 测定指标及方法

采用便携式叶绿素仪(SPAD-502)测定草莓叶片叶绿素含量。用根系扫描仪(i800 plus)扫描草莓根系,使用 WinRHIZO 软件(Regent Instruments, Canada)测定根系形态(根表面积、根长、平均根直径和根尖数)。根系活力采用氯化苯基四氮唑法测定^[17]。草莓植株 70 °C 烘干至恒重,称量干重。

称重法测定草莓单株的果实产量。草莓果实的维生素 C(V_C)含量采用碘量法测定,可溶性总

糖含量采用蒽酮比色法测定, 总酸含量采用酸碱滴定法测定^[18]。草莓果实的可溶性固形物含量采用手持数字测糖仪 (TD-45) 测定。

采用电位法测定土壤 pH, 一次平衡法测定土壤阳离子交换量 (CEC), $K_2Cr_2O_7$ -外加加热法测定土壤有机质 (SOM) 含量, 碱解扩散法测定土壤碱解氮 (AN) 含量, 钼锑抗比色法测定土壤有效磷 (AP) 含量, 火焰光度法测定土壤速效钾 (AK) 含量^[19]。用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定土壤蔗糖酶 (SSC) 活性, 磷酸苯二钠比色法测定土壤磷酸酶 (SACP) 活性, 苯酚钠-次氯酸钠比色法测定土壤脲酶 (SUE) 活性^[20]。

取 0.5 g 土壤样品, 用于细菌群落的高通量测序。用 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals, USA) 提取土壤总 DNA, 并通过微孔板分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, USA) 测定所提取 DNA 的质量和浓度。细菌 16S rRNA 引物序列为 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3', PCR 扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区^[21], 再经回收定量, 利用 Illumina 高通量测序平台 Miseq PE300 进行测序。去除测序得到的原始数据中可能存在的 PCR 扩增与测序错误, 得到优化序列, 按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行聚类并去除嵌合体, 将所有优化序列映射至操作分类单元 (OTU) 代表序列, 得到 OTU。用 R 4.1.0 软件 (R Foundation for Statistical Computing, Austria), 基于 Bray-Curtis 距离算法进行非度量多维尺度分析 (NMDS), ANOSIM 检验用于评估不同处理间的群落结构是否存在显著差异。用 Mothur 软件计算细菌群落的 α -多样性指数 (Shannon 和 Chao1)。根据线性判别分析效应大小 (LEfSe) 方法, 基于 Kruskal-Wallis 和配对 Wilcoxon 检验, 区分不同处理下的特定细菌类群, 线性判别分析 (LDA) 得分 (经 $\log_{10}$ 转换) >2 被认为是数量显著增加的菌属。

另取 0.5 g 土壤样品, 用于测定代谢组。土壤样品加入 1 mL 甲醇-异丙醇-水 (3:3:2 V/V/V) 提取液, 室温震荡 3 min 后置于冰水浴下超声 20 min, 再于 4 °C 下 12 000 $g \cdot min^{-1}$ 离心 3 min。上清液转移到样品瓶, 加入 0.02 mL 内标 (10 $\mu g \cdot mL^{-1}$), 氮吹仪吹干, 置于冻干机冷干。加入 0.1 mL 甲氧胺盐吡啶 (0.015 $g \cdot mL^{-1}$), 于 37 °C 下脲化 2 h, 加入 0.1 mL BSTFA (含 1% TMCS), 37 °C 反应 30 min 得到衍生化溶液。将衍生化溶液稀释至 1 mL, 0.22 μm 有机相针式过滤器过滤, 用于 GC-MS 检测。采用 Agilent 8890 气相色谱仪与 5977B 质谱仪耦合 (Agilent Technologies, USA), 对待测液进行 GC-MS 检测。使用 DB-5MS 色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm , J&W Scientific, USA); 进样量 1 μL ; 分流模式 5:1; 载气为氦气; 柱流速为 1.2 mL $\cdot min^{-1}$; 柱箱程序升温, 40 °C 下 1 min, 20 °C $\cdot min^{-1}$ 升温至 100 °C, 15 °C $\cdot min^{-1}$ 升温至 300 °C 并保持 5 min; 传输线、离子源和四级杆温度分别为 280 °C、230 °C 和 150 °C; 电离电压 70 eV; 在扫描模式下分析所有样品。采用 MWDB 自建库 (迈特维尔生物科技公司, 武汉) 质谱检索数据库, 对代谢物进行定性定量分析。对样品进行的主成分分析 (PCA) 用 R 4.1.0 软件实现。根据显著性 ($P < 0.05$) 和单变量分析差异倍数 (FC, $FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67) 来筛选差异代谢物。使用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), 基于 Fisher 精确检验, 对差异代谢物进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。土壤差异代谢物与细菌属水平的共现性网络通过 Cytoscape 3.7.1 软件 (<https://www.cytoscape.org/>) 实现。用 R 4.1.0 软件, 基于欧氏距离矩阵, 通过曼特尔检验 (Mantel's test) 评估土壤化学特征、微生物群落组成、代谢物组成与草莓生长、产量、品质指标之间的相关性 (999 次置换)。

1.5 数据处理

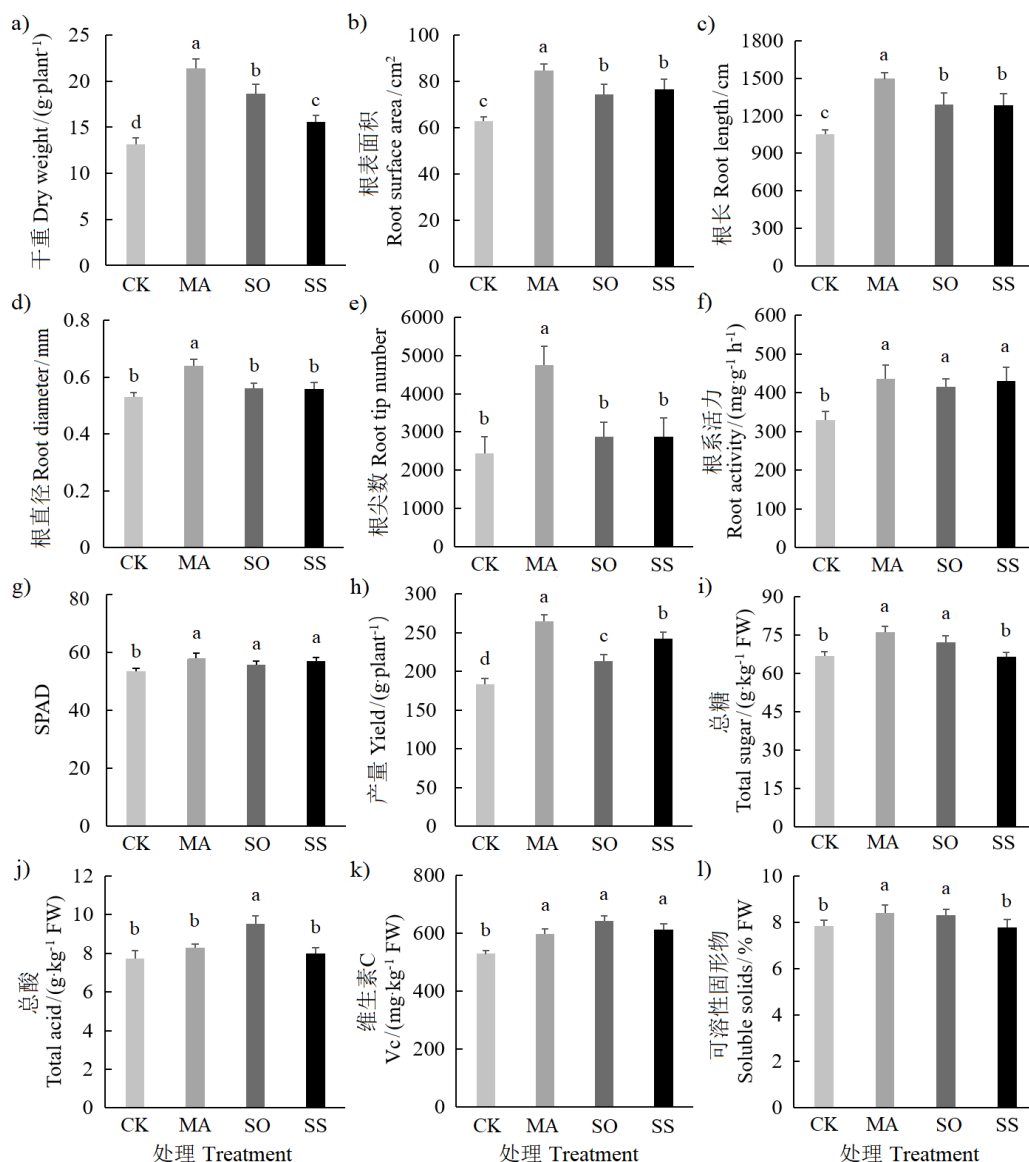
数据统计分析使用 R 4.1.0 软件, 采用单因素方差分析和 LSD 法进行方差分析 (ANOVA) 和多重比较 ($P < 0.05$ 被认为差异显著)。用 R 4.1.0 和 Origin 2021 软件 (OriginLab Corp., USA) 作图。

2 结果

2.1 禾本科绿肥介导的草莓促生、增产和提质效应

与 CK 相比, 三种绿肥处理均显著提高草莓植株干重; 其中, MA 处理下的草莓植株干重最大 (21.5 g), 增幅为 53.4% ($P < 0.05$, 图 1a)。三种绿肥处理对草莓根系形态具有改善作用, MA 处理下的根表面积、根长、根平均直径和根尖数分别较 CK 显著增加 34.4%、40.0%、21.0%和 94.7%; SO 处理下根表面积和根长分别较 CK 显著提高 21.6%和 23.1%; SS 处理下根表面积和根长分别较 CK 显著增加 24.9%和 22.8% (图 1b-图 1e)。此外, 与 CK 相比, MA、SO 和 SS 处理下的根系活力分别显著提高 36.0%、27.3%和 30.4%; 叶片叶绿素含量分别显著提高 7.8%、4.1%和 6.6% (图 1f-图 1g)。

MA、SO 和 SS 处理下的草莓果实单株产量分别较 CK 显著提高 44.6%、16.2%和 32.4% (图 1h)。对于草莓果实品质特征, 与 CK 相比, MA 和 SO 处理下果实总糖含量分别显著增加 13.9%和 8.4%; SO 处理下果实总酸含量显著增加 23.5%; MA、SO 和 SS 处理下果实 Vc 含量分别显著增加 14.4%、16.6%和 15.2%; MA 和 SO 处理下果实可溶性固形物含量分别显著增加 12.8%和 11.6% (图 1i-图 1l)。



注: CK 为休闲农田-草莓, MA 为玉米-草莓, SO 为高粱-草莓, SS 为高丹草-草莓; 柱状图的误差线为标准误 ($n=6$); 不同小写字母代表处理之间的差异达到了显著水平 ($P<0.05$), 下同。Note: CK, fallow farmland-strawberry; MA, maize-strawberry; SO, sorghum-strawberry; SS, sorghum-sudangrass-strawberry. Error bars indicate the standard error of the mean ($n=6$). Different lowercase letters above the error bars indicate significant difference among the treatments ($P<0.05$). The same as below.

图 1 不同绿肥处理下的草莓生长、产量及品质参数

Fig. 1 Growth, yield, and quality parameters of strawberries treated with different green manures

2.2 禾本科绿肥改善草莓根际土壤化学特征

与 CK 相比, MA、SO 和 SS 处理下的土壤 pH 分别显著增加 11.1%、4.1%和 5.1%; CEC 分别显著增加 19.1%、14.2%和 18.2%; SOM 分别显著增加 16.7%、15.1%和 13.4% (图 2a-图 2c)。MA、SO 和 SS 处理下的土壤 AN 分别较 CK 显著增加 20.8%、13.2%和 12.3%; MA 处理下的土壤 AP 较 CK 显著增加 23.4%; MA 和 SS 处理下的土壤 AK 分别较 CK 显著增加 18.4%和 16.1%(图 2d-图 2f)。

此外, MA、SO 和 SS 处理下的土壤 SSC 分别较 CK 显著增加 43.9%、27.1%和 12.8%; MA 处理下的土壤 SACP 较 CK 显著增加 18.8%; MA、SO 和 SS 处理下的土壤 SUE 分别较 CK 显著增加 210.8%、55.4%和 48.3% (图 2g-图 2i)。

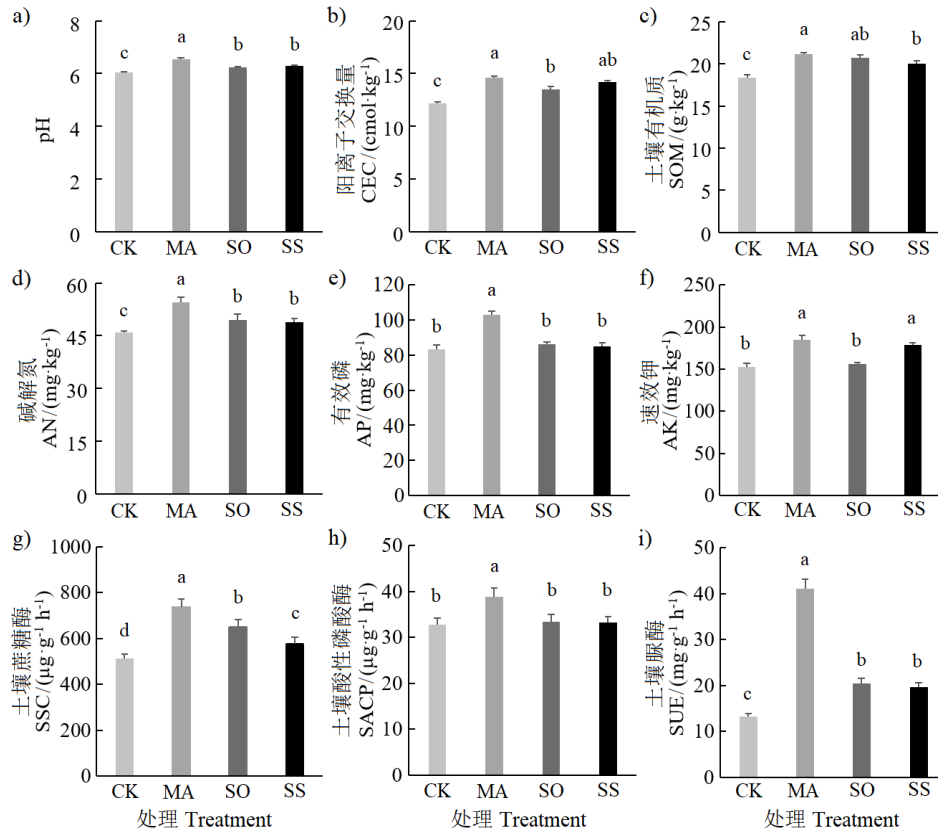


图 2 不同绿肥处理下的土壤化学特征

Fig. 2 Soil chemical characteristics under different green manure treatments

2.3 禾本科绿肥重塑草莓根际土壤细菌群落结构

本研究总共鉴定出 4 321 个 OTU, 其中, CK、MA、SO 和 SS 处理下根际土壤特有的 OTU 数分别为 394、247、158 和 257, 所有处理共有的 OTU 数为 1 971 (图 3a)。基于 NMDS 的第一和第二维度, 不同处理下的样本能实现有效分离, 表明不同绿肥处理能够改变土壤细菌群落结构 (ANOSIM $P=0.001$, 图 3b)。与 CK 相比, MA 和 SO 处理下细菌群落的 Shannon 和 Chao1 指数显著增加; SS 处理下 Shannon 和 Chao1 指数增加, 但不显著 (图 3c-图 3d)。

细菌群落中优势菌属以鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) (11.9% ~ 13.1%)、新鞘氨醇单胞菌

(*Novosphingobium*) (5.9% ~ 6.3%) 和黄杆菌属 (*Flavobacterium*) (0.8% ~ 7.5%) 为主 (图 3e)。绿肥处理改变了细菌群落结构组成, LEfSe 分析直观地展示了菌属在不同处理间存在明显的差异 (图 3f)。例如: 与 CK 相比, 三种绿肥处理均显著增加了黄杆菌属、贪噬菌属 (*Variovorax*) 和鞘氨醇杆菌属 (*Pedobacter*) 的相对丰度, MA 处理的效果最明显, 三种菌的相对丰度分别增加 7.5 倍、1.8 倍和 5.0 倍。此外, MA 处理下亚栖热菌属 (*Meiothermus*)、假黄色单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas*)、甲基菌属 (*Methylobacillus*) 和异根瘤菌属 (*Allorhizobium*) 被显著富集; SO 处理下假黄色单胞菌属、亚栖热菌属、赭黄嗜盐囊菌属 (*Haliangium*) 和 *Dongia* 被显著富集; SS 处理下鞘氨醇盒菌 (*Sphingopyxis*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和异根瘤菌属被显著富集。

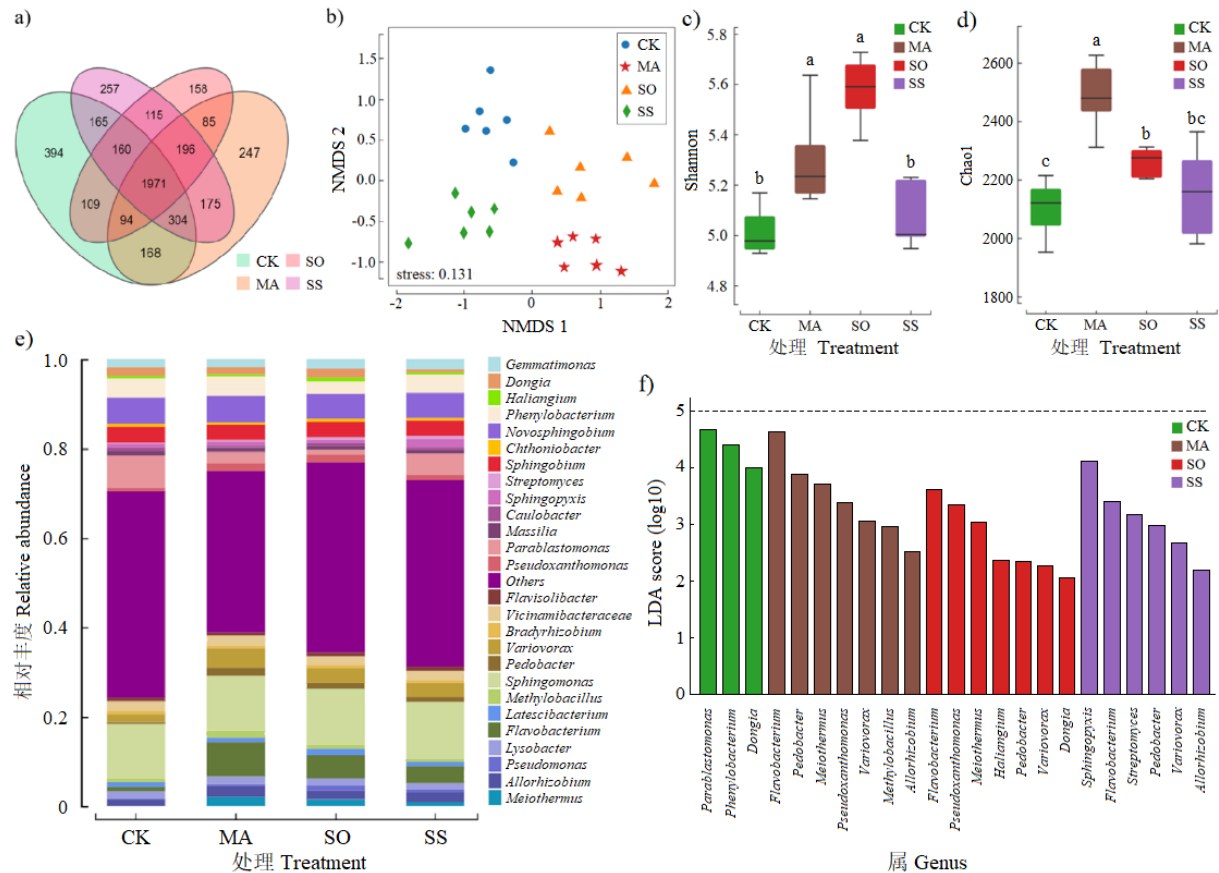


图 3 不同绿肥处理下根际土壤细菌群落特征

Fig. 3 Characteristics of rhizosphere soil bacterial communities in response to different green manure treatments

2.4 禾本科绿肥重塑草莓根际土壤代谢组

本研究共鉴定出 96 种土壤差异代谢物, 包括脂类、碳水化合物、有机酸等 (图 4a)。基于 PCA 的第一和第二维度, 不同处理下的样本可以有效分离, 表明不同绿肥处理能够改变土壤的代谢物组成 (图 4b)。三种绿肥处理下的差异代谢物均以脂类和碳水化合物为主: 脂类 15 ~ 20 种, 其中 1 ~ 2 种上调 (如吡啶-3-乙酸-5-甲氧基甲酯), 14 ~ 18 种下调 (如棕榈酸、油酸、13-二十二碳烯酸和丙酸-2-羟基丙酯); 碳水化合物 5 ~ 12 种, 其中 3 ~ 8 种上调 (如果糖、山梨糖和甘露糖), 2 ~ 4 种下调 (如 4-羟基蒽醌-2-羧酸) (图 4c)。MA 处理下的差异代谢物数量最多, 为 57 种, 其中 14 种显著上调, 43 种显著下调; SO 处理下的差异代谢物有 35 种, 其中 3 种显著上调, 32 种显著下调; SS 处理下的差异代谢物有 38 种, 其中 14 种显著上调, 24 种显著下调 (图 4d)。

KEGG 富集分析表明, 不同绿肥处理下, 土壤的果糖和甘露糖代谢、不饱和脂肪酸的生物合成通路均被显著富集 ($P < 0.05$, 图 4e): 果糖和甘露糖代谢通路中, 三种绿肥处理均显著增加山梨糖

(51.5%~89.4%)、甘露糖(52.4%~71.9%)和果糖(99.6%~129.5%)的相对丰度(图4f); 不饱和脂肪酸生物合成通路中, 三种绿肥处理均显著降低棕榈酸(37.1%~71.5%)、油酸(70.1%~78.2%)和13-二十二碳烯酸(77.9%~85.2%)的相对丰度, MA处理下硬脂酸的相对丰度也显著降低44.2%(图4g)。糖类和脂类代谢物的改变均以玉米绿肥的效果最为明显。共现性网络分析表明, 土壤代谢物与微生物属形成了复杂的互作网络(图5a)。其中, 果糖(TMWN0424)、山梨糖(TMWN0643)、甘露糖(TMWN0547)均与黄杆菌属、鞘氨醇杆菌属和贪噬菌属呈显著正相关; 棕榈酸(TMWN0580)、油酸(TMWN0325)、13-二十二碳烯酸(TMWN0639)、硬脂酸(TMWN0228)均与这三种菌属呈显著负相关。

曼特尔夫检验的结果表明, 土壤化学特征、微生物群落组成、代谢物组成与草莓生长、产量、品质指标之间均呈显著正相关关系($P < 0.05$, 图5b)。

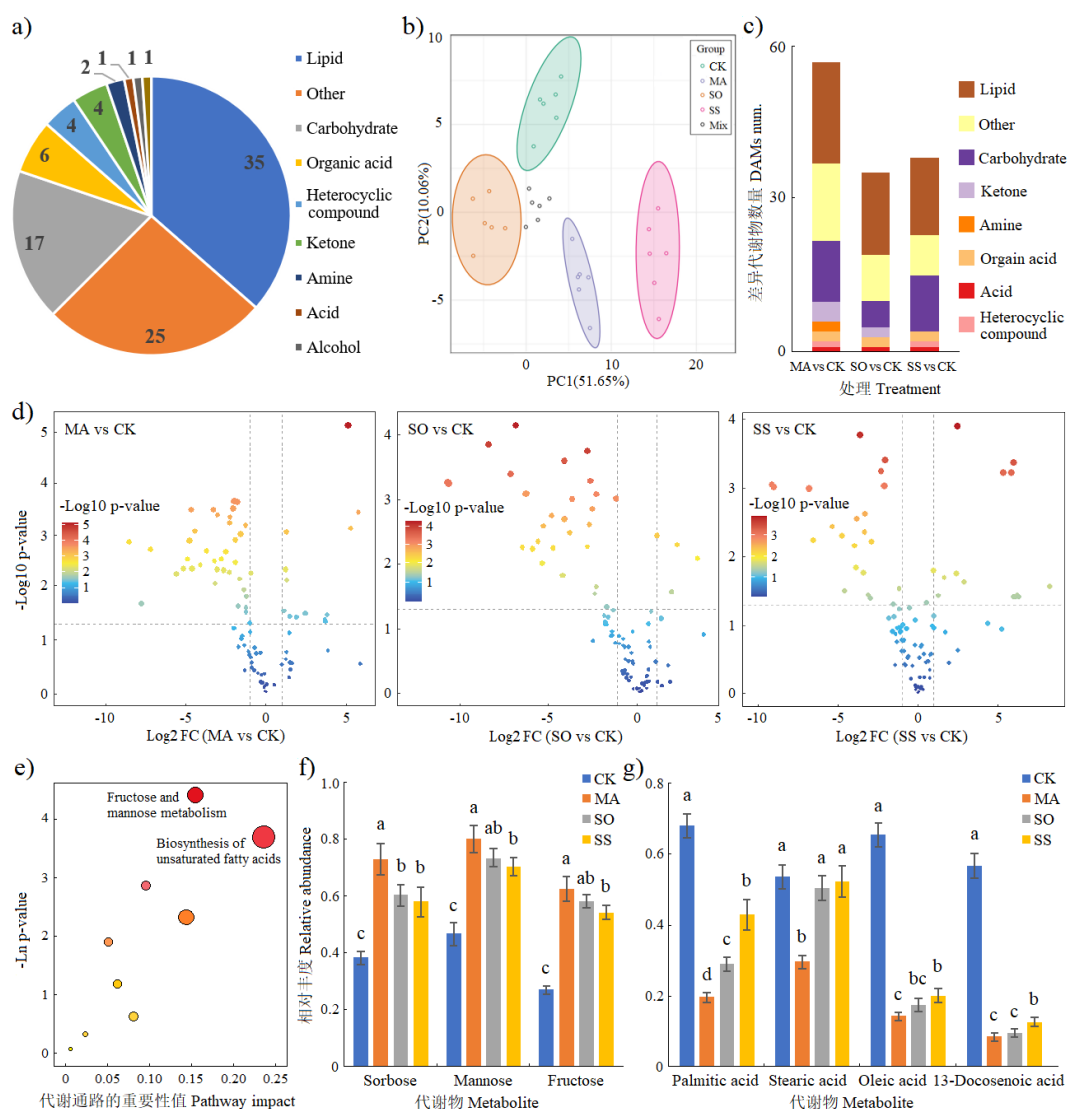
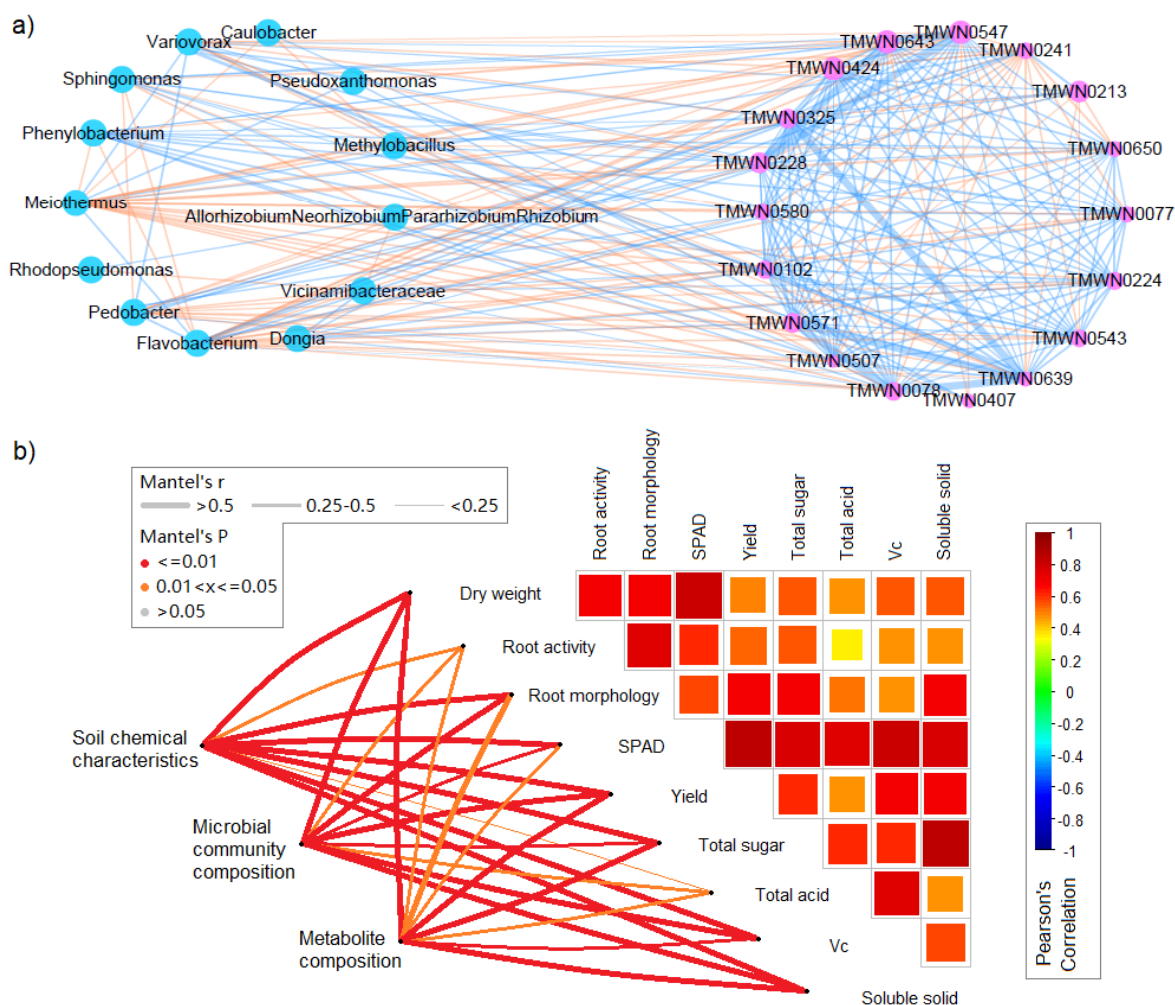


图4 不同绿肥处理下根际土壤代谢组

Fig. 4 Rhizosphere soil metabolome affected by different green manure treatments



注: 黄色或蓝色线条分别代表代谢物/细菌属之间呈显著正或负相关 ($P < 0.01$), 蓝色或紫色圆圈分别代表细菌属或代谢物。Note: Yellow or blue lines represent significant positive or negative correlations between metabolites/bacterial genera ($P < 0.01$), respectively; blue or purple circles represent bacterial genera or metabolites, respectively.

图5 草莓根际土壤差异代谢物与细菌属的共现性网络 (a) 和土壤化学特征、微生物群落组成、代谢物组成与草莓生长、产量、品质指标的曼特检验 (b)

Fig. 5 Cooccurrence network of differentially accumulated metabolites and bacterial genera in the rhizosphere soil of strawberry (a) and Mantel's tests between soil chemical characteristics, microbial community composition, metabolite composition/strawberry growth, yield, fruit quality indices (b)

3 讨论

本研究发现, 禾本科绿肥处理介导后茬草莓的促生、增产和提质效应。禾本科绿肥处理下, 草莓植株的干重增加, 根系形态改善、活力提高, 叶片叶绿素含量增加, 果实产量提高、品质改善。这与以往的研究^[22-24]发现豆科绿肥翻压对后茬作物 (如小麦、玉米) 的生长和产量效应一致。三种绿肥处理的作用效果存在差异, 其中玉米绿肥的效果最为明显。基于土壤代谢组和微生物组学分析, 揭示了以玉米为主的禾本科绿肥介导草莓产量形成和品质改善的机制。

土壤代谢物是植物-微生物互作的重要介质。然而, 目前尚无研究报道绿肥介导下的土壤代谢物

-微生物协同变化模式, 及该模式对植物的作用效应, 本研究则弥补了这一空白。本研究中, 禾本科绿肥处理主要上调了土壤特定糖类代谢物(果糖、山梨糖和甘露糖)的相对丰度, 但下调了脂类代谢物(如棕榈酸、硬脂酸、油酸)的相对丰度, 其中玉米绿肥的效果最为明显。前人研究表明, 果糖、山梨糖和甘露糖不仅能作为碳源被根际微生物利用, 还可以诱导植物根际促生菌等有益细菌的趋化作用及生物膜形成, 进而对植物起到促生、抗病等效应^[13-14]。

多数研究表明, 绿肥处理增加大田土壤细菌群落的多样性和丰度。例如, 豆科绿肥增加湘西烟田土壤细菌群落多样性^[25]和湖南水稻土细菌群落丰度与多样性^[26]。本研究同样观察到禾本科绿肥处理提高草莓根际细菌群落的多样性(基于 Shannon 及 Chao1 指数的增加)。此外, 绿肥的施用重塑了细菌群落结构的组成。例如, 三种绿肥处理均增加了黄杆菌属、贪噬菌属和鞘氨醇杆菌属的相对丰度, 且以玉米绿肥的增幅最大。研究表明, 黄杆菌通过活化土壤中的氮素促进植物对氮的吸收, 产生植物生长激素促进小麦生长, 通过拮抗病原菌(立枯丝核菌)提高小麦的立枯病抗性^[27-28]。鞘氨醇杆菌增强油菜的重金属耐受性, 同时改善油菜的根系形态^[29]。贪噬菌可以通过产生铁载体和 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶的方式促进白菜和青椒生长^[30]。共现性网络分析的结果表明, 果糖、山梨糖和甘露糖均与有益根际微生物(如黄杆菌、鞘氨醇杆菌和贪噬菌)呈显著正相关。这说明绿肥处理可能通过上调土壤中特定糖类代谢物的相对丰度, 进而招募根际有益细菌。此外, 相较于高粱和高丹草绿肥, 玉米绿肥处理下的土壤糖类代谢物(果糖、山梨糖和甘露糖)相对丰度增幅最高, 因而能够招募更多的有益微生物。

脂类代谢物(如棕榈酸、硬脂酸、油酸)作为土壤中存在的主要化感物质已被报道会抑制作物生长及产量形成^[5-6]。然而, 芽孢杆菌和根瘤菌等多种微生物可以降解或利用化感物质^[16]。本研究中, 绿肥处理降低了连作草莓根际土壤中脂类化感物质棕榈酸、硬脂酸和油酸的相对丰度。共现性网络分析表明, 这些脂类代谢物与有益菌(黄杆菌、鞘氨醇杆菌和贪噬菌)呈显著负相关。可以推测, 禾本科绿肥通过富集有益微生物来降解草莓连作土壤中的脂类化感物质。与高粱和高丹草绿肥相比, 玉米绿肥富集的有益微生物最多, 因而脂类化感物质的含量最少。这与刘贤文和郭华春^[31]发现玉米-马铃薯间作富集黄杆菌, 同时降解脂类化感物质的研究结果相一致。迄今尚未见研究报道鞘氨醇杆菌和贪噬菌能够缓解作物化感作用, 但根据本研究结果推测这两株菌具有降解脂类化感物质的潜在作用。曼特尔检验的结果表明, 土壤微生物群落组成、代谢物组成均与草莓生长、产量、品质指标之间呈显著正相关关系。基于此, 本研究揭示了一种绿肥介导下的土壤代谢物-微生物协同变化模式: 绿肥引起土壤特定糖类代谢物积累, 进而招募有益微生物降解脂类化感物质, 这一模式对草莓生长和产量形成了正效应。

此外, 本研究中, 禾本科绿肥处理提高了设施大棚土壤 SOM、CEC、AN、AP 和 AK 含量, 且以玉米绿肥效果最佳。前人研究发现, 种植并翻压豆科绿肥通过提高土壤 SOM 含量、离子交换吸附能力, 以及氮、磷和钾素供应, 从而提高土壤肥力, 保证后茬作物的产量与品质^[32-33]。由此可见, 禾本科绿肥在改善土壤化学特征方面与豆科绿肥具有相似的效果。土壤酶活性是土壤质量和肥力的重要指标, 与土壤养分循环密切相关^[34]。例如, SSC、SACP 和 SUE 分别参与土壤中碳、磷和氮素的转化^[35]。本研究表明, 不同禾本科绿肥处理对土壤酶活性的影响有所差异。其中, 玉米绿肥翻压对土壤酶活性提升的效果最为明显, 从而大幅度地提高了土壤肥力。有益微生物黄杆菌、鞘氨醇杆菌和贪噬菌也具有活化土壤氮磷钾养分的作用^[27, 36], 玉米绿肥介导土壤代谢物-微生物协同变化模式富集的更多有益微生物提高了土壤养分的有效性。此外, 禾本科绿肥翻压提高了酸性土壤的 pH。酸性土壤的改良也有利于提高土壤养分的有效性并对作物生长和产量形成正效应^[37]。

4 结 论

长期禾本科绿肥翻压能促进设施大棚草莓植株生长, 提高果实产量, 并改善果实品质。此外, 绿肥处理改善了土壤化学特性, 通过重塑根际土壤代谢组来富集有益细菌、缓解草莓化感自毒作用。玉米、高粱和高丹草三种禾本科绿肥中, 玉米绿肥对后茬草莓的作用效果最为明显。因此, 种植和翻压以玉米为主的禾本科绿肥轮作措施是设施大棚草莓增产和提质的有效措施。

参考文献 (References)

- [1] Nowicka A, Kucharska A Z, Sokół-Lętowska A, et al. Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria × ananassa* Duch[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 32-46.
- [2] Chen X Y, Dai D J, Zhao S F, et al. Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. causing strawberry anthracnose in Zhejiang, China[J]. Plant Disease, 2020, 104(5): 1351-1357.
- [3] She S Y, Niu J J, Zhang C, et al. Significant relationship between soil bacterial community structure and incidence of bacterial wilt disease under continuous cropping system[J]. Archives of Microbiology, 2017, 199(2): 267-275.
- [4] Yu Y C, Yang J Y, Zeng S C, et al. Soil pH, organic matter, and nutrient content change with the continuous cropping of *Cunninghamia lanceolata* plantations in South China[J]. Journal of Soils and Sediments, 2017, 17(9): 2230-2238.
- [5] Lyu F J, Zhang Z H, Wang R Q, et al. Response of sesame root exudates at different growing stages to continuous cropping and its autotoxicity[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(6): 1087-1098. [吕丰娟, 张志华, 汪瑞清, 等. 不同生育期芝麻根系分泌物对连作障碍的响应及其自毒作用[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(6): 1087-1098.]
- [6] Zhao H M, Yang S Y, Guo H R, et al. Allelopathy of *Artemisia annua* on 4 receptor plants[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2007, 27(11): 2292-2297. [赵红梅, 杨顺义, 郭鸿儒, 等. 黄花蒿对 4 种受体植物的化感作用研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(11): 2292-2297.]
- [7] Li W H, Liu Q Z. Changes in fungal community and diversity in strawberry rhizosphere soil after 12 years in the greenhouse[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(3): 677-687.
- [8] 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(1): 30466.
- [9] Cao W D, Bao X G, Xu C X, et al. Reviews and prospects on science and technology of green manure in China[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(6): 1450-1461. [曹卫东, 包兴国, 徐昌旭, 等. 中国绿肥科研 60 年回顾与未来展望[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(6): 1450-1461.]
- [10] Zhou Y J. Effects of leguminous green manure inoculated with rhizobia on crop growth, weight loss and drug reduction in field in intercropping with tea trees and strawberry rotation[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020. [周雨佳. 豆科绿肥接种根瘤菌在与茶树间作、草莓轮作中对作物生长及田间减肥减药效果的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.]
- [11] Wang P P, Chang C L, Yang X Y, et al. Effects of phosphorus contortion and application of chemical fertilizer on soil enzyme activities in flue-cured tobacco[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2018, 33(S1): 222-229. [王盼盼, 常春丽, 杨新宇, 等. 草木犀翻压配施化肥对烤烟土壤酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2018, 33(S1): 222-229.]
- [12] Gao S J, Zhou G P, Cao W D. Impacts of plantation of winter green manure crops on soil nitrification in paddy soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(1): 263-273. [高嵩涓, 周国朋, 曹卫东. 冬种绿肥对水稻土硝化作用的影响[J]. 土壤学报, 2022, 59(1): 263-273.]
- [13] Jin Y Q, Zhu H F, Luo S, et al. Role of maize root exudates in promotion of colonization of *Bacillus velezensis* strain S3-1 in rhizosphere soil and root tissue[J]. Current Microbiology, 2019, 76(7): 855-862.
- [14] Ordal G W, Villani D P, Rosendahl M S. Chemotaxis towards sugars by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of General Microbiology, 1979, 115(1): 167-172.
- [15] Yuan Y Y, Xian H Q, Hong Y C, et al. Identification of peanut root exudates and the analysis of its allelopathy effect[J]. Journal of Peanut Science, 2011, 40(3): 24-29. [袁云云, 咸洪泉, 洪永聪, 等. 花生根系分泌物的鉴定及其化感效应分析[J]. 花生学报, 2011, 40(3): 24-29.]

- [16] Cheng F, Cheng Z H. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1020.
- [17] Gao J F. Experimental guidance for plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006. [高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.]
- [18] Cao S C. Vegetables[M]. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House, 1987. [曹寿椿. 蔬菜[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1987.]
- [19] 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.]
- [20] Guan S Y. Soil enzyme and its research methods[M]. Beijing: Agriculture Press, 1986. [关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.]
- [21] Yu P, He X M, Baer M, et al. Plant flavones enrich rhizosphere Oxalobacteraceae to improve maize performance under nitrogen deprivation[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(4): 481-499.
- [22] Zhao N, Zhao H B, Yu C W, et al. Effect of green manure in summer fallow period and nitrogen rate on winter wheat growth[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2010, 19(12): 41-47. [赵娜, 赵护兵, 鱼昌为, 等. 夏闲期种植翻压绿肥和施氮量对冬小麦生长的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(12): 41-47.]
- [23] Zhang S H, Wang J, Ghimire R, et al. Effect of green manure on soil water and crop yield in the Loess Plateau of China: A Meta-analysis[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(11): 1879-1892. [张少宏, 王俊, Ghimire R, 等. 黄土高原绿肥填闲种植的水分与产量效应: Meta 分析[J]. 中国生态农业学报, 2021, 29(11): 1879-1892.]
- [24] Zhang D B, Yao P W, Li J, et al. Effects of two years' incorporation of leguminous green manure on soil properties of a wheat field in dryland conditions[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(7): 2272-2281. [张达斌, 姚鹏伟, 李婧, 等. 豆科绿肥及施氮量对旱地麦田土壤主要肥力性状的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(7): 2272-2281.]
- [25] Zhang C, Zhu S R, Tian F, et al. Effects of different green manure on bacterial community structure and diversity in tobacco-planting field in Xiangxi[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2016, 44(5): 43-46. [张超, 朱三荣, 田峰, 等. 不同绿肥对湘西烟田土壤细菌群落结构与多样性的影响[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(5): 43-46.]
- [26] Wang Z, Liang Y, Yao P W, et al. Effects of fertilization before sowing of leguminous green manure and its incorporation methods on soil moisture and nutrient regime of wheat field in Weibei Dryland[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2014, 32(3): 119-126. [王峥, 梁颖, 姚鹏伟, 等. 绿肥播前施肥和翻压方式对旱地麦田土壤水肥性状的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2014, 32(3): 119-126.]
- [27] Chen Q Q, Wang J P, Zhang H F, et al. Microbial community and function in nitrogen transformation of ectopic fermentation bed system for pig manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124155.
- [28] Yin C T, Casa Vargas J M, Schlatter D C, et al. Rhizosphere community selection reveals bacteria associated with reduced root disease[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 86.
- [29] Montalbán B, Croes S, Weyens N, et al. Characterization of bacterial communities associated with *Brassica napus* L. growing on a Zn-contaminated soil and their effects on root growth[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2016, 18(10): 985-993.
- [30] Natsagdorj O, Sakamoto H, Santiago D M O, et al. *Variovorax* sp. has an optimum cell density to fully function as a plant growth promoter[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(3): 82.
- [31] Liu X W, Guo H C. Effects of potato and maize compound planting on soil allelochemicals and soil bacterial community structure[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2020, 28(6): 794-802. [刘贤文, 郭华春. 马铃薯与玉米复合种植对土壤化感物质及土壤细菌群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2020, 28(6): 794-802.]
- [32] Hsieh C C, Hsiao K C, Yu T J. Significance of green manures in improving soil fertility in central China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1961, 9(3/4): 117-128. [谢建昌, 肖克谦, 于天仁. 华中地区主要绿肥在提高土壤肥力上的作用[J]. 土壤学报, 1961, 9(3/4): 117-128.]
- [33] Zhao Q, Zhang X J, Ning X G. Study on green manure crops nutrient accumulation and effect on soil nutrients before returning in North China[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2022(5): 61-67. [赵秋, 张新建, 宁晓光. 华北冬绿肥作物养分累积特征及对翻压前土壤养分的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2022(5): 61-67.]

- [34] Dai X L, Zhou W, Liu G R, et al. Soil C/N and pH together as a comprehensive indicator for evaluating the effects of organic substitution management in subtropical paddy fields after application of high-quality amendments[J]. *Geoderma*, 2019, 337: 1116-1125.
- [35] Jiang Y, Yi X T, Liu M Y, et al. Dynamic responses of soil enzymes at key growth stages in rice after the *in situ* remediation of paddy soil contaminated with cadmium and arsenic[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 830: 154633.
- [36] Suh J, Noh H. Impact of amendments on microbial biomass, enzyme activity and bacterial diversity of soils in long-term rice field experiment[J]. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 2009, 42(4): 257-265.
- [37] Wang X Y, Zhang M, Liu Y J, et al. Effects of soil amelioration material mix on pH of acid soils, growth and material accumulation of flue-cured tobacco[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(11): 2626-2633. [王新月, 张敏, 刘勇军, 等. 改土物料混用对酸性土壤 pH 和烤烟生长及物质积累的影响[J]. *核农学报*, 2021, 35(11): 2626-2633.]

(责任编辑: 卢 萍)