DOI: 10.5846/stxb201801270212

刘株秀,刘俊杰,徐艳霞,张武,米刚,姚钦,王光华.不同大豆连作年限对黑土细菌群落结构的影响.生态学报,2019,39(12): - . Liu Z X, Liu J J, Xu Y X, Zhang W, Mi G, Yao Q, Wang G H.Effects of continuous cropping years of soybean on the bacterial community structure in black soil.Acta Ecologica Sinica,2019,39(12): - .

不同大豆连作年限对黑土细菌群落结构的影响

刘株秀1,2,刘俊杰1,*,徐艳霞3,张 武4,米 刚4,姚 钦1,王光华1

- 1 中国科学院东北地理与农业生态研究所 黑土农业生态重点实验室, 哈尔滨 150081
- 2 中国科学院大学, 北京 100049
- 3 黑龙江省畜牧研究所, 齐齐哈尔 161005
- 4 黑龙江省农业科学院黑河分院, 黑河 164300

摘要:大豆连作导致作物产量下降、病原微生物富集和土壤退化等问题日趋严重。然而,目前关于大豆连作对土壤细菌群落结构组成及多样性分布的影响及发生机制尚不清楚。采用高通量测序技术,对大豆连作(不同年限)和大豆-玉米轮作下的黑土细菌 16S rRNA 基因进行测序分析。结果表明:轮作 5 年(CR5)和 13 年长期连作(CC13)处理显著增加了土壤 pH、全氮(TN)、全磷(TP)和速效养分(AN、AP和 AK)含量。与短期连作相比,CR5和 CC13处理均提高了细菌群落的 OTUs数量、PD值、Chaol指数和 Shannon指数。聚类分析图谱结果显示细菌群落结构组成受到轮作和连作年限的双重影响,而土壤 pH、TN、TP、AN、AP和 AK是细菌群落结构发生变化的主要驱动因子(P<0.05)。此外、VPA分析发现上述土壤因子中,土壤 pH 对细菌群落结构变化的贡献度最大。本研究证明大豆长期连作提高了土壤养分含量和细菌群落的丰富度和多样性指数,从分子生物学的角度证实大豆长期连作在一定程度上改善了土壤环境,为大豆连作障碍的研究提供了理论依据。

关键词:高通量测序;大豆连作;轮作;细菌群落;多样性

Effects of continuous cropping years of soybean on the bacterial community structure in black soil

LIU Zhuxiu^{1,2}, LIU Junjie^{1,*}, XU Yanxia³, ZHANG Wu⁴, MI Gang⁴, YAO Qin¹, WANG Guanghua¹

- 1 Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China
- 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
- 3 Heilongjiang Animal science Institute, Qiqihaer 161005, China
- 4 Heihe Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China

Abstract: Soybean [Glycine max (L.) Merill.] continuous cropping may lead to yield decline, enriched pathogenic microbes, and soil degradation. Although the problems can become serious, the mechanisms of how the bacterial community is affected and possible links between these effects and cropping systems remain unclear. Therefore, we comparatively investigated the bacterial diversity and structure of the soil samples collected from soybean continuous cropping with different years (CC-) and cropping rotation with maize (CR) using Illumina Miseq sequencing methods. The results showed that soil pH, total N, total P, and available nutrient content were significantly higher in CR5 and CC13 treatments. Compared with short-term continuous cropping, CR5 and CC13 treatments increased the number of OTUs (operational taxonomic units), value of PD (phylogenetic diversity), Chao1 index, and Shannon index of bacterial communities. The cluster analysis revealed that the bacterial community compositions were affected both by the cropping system and cropping years,

基金项目:国家科技部重点研发项目(2017YFD0200604);黑龙江省青年基金项目(QC2015027,D2018009)

收稿日期:2018-01-27; 网络出版日期:2018-00-00

^{*}通讯作者 Corresponding author. E-mail: liujunjie@iga.ac.cn

and soil pH, TN (total N), TP (total P), AN (available N), AP (available P), and AK (available K) were the main factors in driving bacterial community structure (P < 0.05). In addition, a variance partitioning analysis (VPA) revealed that the effect of soil pH was a primary factor in determining bacterial community composition. In this study, the results showed that soil nutrient content and richness and diversity index of the bacterial community increased under CC13 treatments, which indicated that long-term soybean continuous cropping improved the soil environment to some extent. This study provides scientific data for studying the ecology of soybean continuous cropping.

Key Words: high-throughput sequencing; soybean continuous cropping; cropping rotation; bacterial community; bacterial diversity

东北黑土是我国重要的土壤资源,在保障国家粮食安全和生态安全上具有重要地位。受耕地面积、经济效益和气候特征等因素影响,大豆连作在黑龙江省北部地区普遍存在。Liu 等[1]对东北地区大豆连作产量统计分析表明,大豆连作4年后不仅导致产量降低40%,而且土壤的生物活性显著退化。已有研究证明,大豆连作会导致土壤理化性质改变、土壤微生物群落结构变化、土壤酶活性降低和根系分泌物的化感自毒作用加剧^[2-5]。在这些限制因子中,生物因素被普遍认为是导致连作障碍发生的主要影响因子^[6]。

土壤微生物是土壤的重要组成部分,在调节土壤生态系统功能,如养分循环、有机质分解、土壤结构维持、温室气体产生和环境污染物净化起着重要作用^[7-9]。已有研究证实,土壤微生物的数量、种类和多样性是维持土壤健康和质量的重要因素^[10]。因此,研究不同种植制度下土壤微生物群落结构的演替规律,对选择合理种植措施和改善土壤生态功能具有重要意义。

目前关于不同种植措施下,微生物群落结构组成及多样性变化关系研究结果存在差异。如 Tang 等[11] 采用克隆文库方法,对大豆连作和轮作细菌群落结构研究表明,大豆轮作下土壤放线菌数量和多样性指数显著提高,而其他细菌门类则呈现下降趋势。Li 等[12] 研究发现,在非根际土壤中大豆连作没有改变细菌群落结构,而在根际土中细菌群落结构受连作和轮作影响显著。利用高通量测序技术,Xuan 等[13] 研究表明在水稻-玉米和水稻-绿豆的轮作体系中,细菌数量和丰富度显著高于水稻连作处理。然而,一些研究结果显示轮作条件下,细菌群落结构和多样性指数并没有发生显著变化[14-15]。他们认为不同的研究方法(DNA 指纹图谱和高通量测序)、不同的轮作体系和种植年限是导致结果不同的主要原因。

针对黑土区大豆种植面积不断增加所导致连作障碍的问题,以往关于连作下微生物群落结构演替的研究主要是采用分离培养、变性梯度凝胶电泳(DGGE)或磷脂脂肪酸(PLFA)等较低通量的研究手段,在一定程度上限制了对连作障碍下微生物群落结构变化的深入理解^[16-17]。基于此,本研究采用 Illumina 高通量测序对黑龙江省北部黑河地区大豆不同连作年限(3、5 和 13 年)和大豆-玉米轮作体系下土壤细菌群落结构组成和多样性分布特征进行研究,旨在揭示连作年限和轮作方式下细菌群落结构组成及多样性的异同关系。同时采用典范对应分析(Canonical Correspondence Analysis, CCA)和方差分解分析(Variance Partitioning Analysis, VPA)方法,阐明大豆连作细菌群落结构发生变化的主要环境驱动因子。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

本试验地位于黑龙江省农科院黑河分院(50°15′12″N,127°27′40″E),试验地点属中温带大陆性季风气候,年平均气温-1.5℃,年平均降雨量为 450—600 mm,3 个连作小区面积分别为 0.5 hm²,大豆-玉米轮作的试验区面积为 1 hm²,土壤类型为黑土。供试样地长期土壤施肥和管理方式一致(每公顷化肥用量为:磷酸二胺100 kg、尿素 4 kg 和磷酸二氢钾 83 kg)。

1.2 试验设计

本研究选取大豆连作3年处理(CC3)、大豆连作5年处理(CC5)、大豆连作13年处理(CC13)和大豆-玉

米轮作 5 年处理(CR5)为供试土壤。于 2015 年 7 月 7 日在大豆开花期采集大豆非根际土壤。在试验区内采用随机采样方法,采集 0—20 cm 耕层土壤,每个样点随机采集 10 个土壤样品作为一个重复,每个处理 4 次重复。土壤样品去除枯枝、树根及石块等杂物后过 2 mm 筛,放入带冰袋的保温箱中,带回实验室 4℃保存,其中部分样品保存至-80℃冰箱中用于提取土壤微生物总 DNA。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤 pH 值采用 pH 计测定振荡 30 min 后的土壤水悬浮液(1:2.5 w/v)。土壤全碳(TC)和全氮(TN)用元素分析仪(VarioELIII, Germany)测定。土壤全磷(TP)、速效磷(AP)利用连续流动分析系统(SKALAR SAN⁺⁺, Netherlands)进行测定^[18]。土壤全钾(TK)和速效钾(AK)利用火焰光度计(ICPS-7500, Shimadzu, Japan)进行测定。此外,利用碱性水解扩散法测定土壤速效氮(AN)^[19]。

1.3.2 DNA 提取

采用 Fast DNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA),按照说明书进行土壤微生物总 DNA 的提取。提取后的 DNA 用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解,并用 NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, USA)测定 DNA 含量及质量,土壤 DNA 最后保存于−20℃冰箱中备用。

1.3.3 高通量测序

以提取的土壤微生物总 DNA 为模板,利用通用引物 515F 和 907R^[20] 对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。25 μL 的 PCR 体系中含有 2.5 μL 10 × PCR buffer,2 μL 2.5 mmol/L dNTPs,0.25 μL Taq 酶(5 U/μL) (TaKaRa, Dalian, China),0.5 μL 正向和反向引物,2 μL 样品 DNA 为模板,用灭菌超纯水补足至 25 μL 体系。PCR 反应条件为:初变性 95℃ 5 min;然后变性 95℃ 1 min,复性 63℃ 1 min 和延伸 72℃ 1 min,共 30 个循环;最后是延伸 72℃ 5 min。每个样品做 3 次重复,混合后利用 Agarose Gel DNA purification kit(TaKaRa, Dalian, China)进行纯化。PCR 纯化后的产物送到上海美吉生物公司(Shanghai, China)利用 Illumina-MiSeq 平台进行双端测序分析。

1.3.4 高通量序列分析

基于 Illumina PE 300 测序,首先将获得细菌的 FASTQ 原始序列文件,通过 QIIME Pipeline Version 1.8.0 (http://qiime.org/tutorials/tutorial.html) [21] 进行序列拆分和质量控制。利用 FLASH(fast length adjustment of short reads) 软件,对质控序列进行双端拼接,并去除序列长度小于 200 bp,平均质量得分小于 20 的序列信息 [18]。质控后通过 Uchime algorithm [22] 软件去除嵌合体序列信息。此后,通过 RDP (ribosomal database project) (http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp)对有效的序列信息进行分类信息注释。通过 CD-HIT 方法 [23],基于 97%的相似度水平进行 OTUs 分类单元划分。利用 PyNAST (Python Nearest Alignment Space Termination tool) [24] 软件对每个分类单元的代表性序列进行聚类分析,同时利用 FastTree 软件构建系统进化树 [25]。

1.3.5 统计分析

本研究基于获得最小序列的 CC3 处理,将所有处理的序列数随机抽平至 3.0 万条,进行 α 和 β 多样性分析。其中 Chao1 指数^[26]和基于系统进化距离的 PD 值^[27],用来分析不同种植制度下细菌多样性指数的变化关系。基于 SPSS(18.0 版本)软件,利用 One-way ANOVA,对不同处理的土壤理化性状、细菌门分类水平的相对丰度和 α 多样性指数进行单因素方差分析。同时,利用 R(v.3.3.1)软件(R Development CoreTeam, 2006)进行聚类分析(Cluster analysis)、典范对应分析(CCA)和方差分解分析(VPA),以解析不同种植制度下,细菌群落结构组成的变化特征和主要驱动因子。

2 结果与分析

2.1 不同处理土壤的理化性质

不同处理的土壤理化性质如表 1 所示。与连作处理相比,除全碳(TC)和全钾(TK)含量外,大豆-玉米轮

作处理(CR5)显著提高了土壤 pH、全氮(TN)、全磷(TP)含量和速效养分(AP、AK 和 AN)含量。此外,对比不同连作年限大豆的土壤理化性状发现,除速效磷(AP)含量在连作3年处理(CC3)达到最高值外,大豆连作13年处理(CC13)的TC、TN和速效养分AN、AK含量均显著高于连作3年(CC3)和5年(CC5)处理。

表 1	不同外理对土壤理化性状的影响	

Table 1	Effect of	different	treatments	on soil	physicochemical	properties
---------	-----------	-----------	------------	---------	-----------------	------------

处理 Treatment	рН	全碳 Total C/ (g/kg)	全氮 Total N/ (g/kg)	全磷 Total P/ (g/kg)	全钾 Total K/ (g/kg)	速效氮 Available N/ (mg/kg)	速效磷 Available P/ (mg/kg)	速效钾 Available K/ (mg/kg)
CC3	4.61±0.00d	15.75±0.21c	1.08±0.02d	0.68±0.01d	18.93±0.19a	155.68±2.99d	19.95±0.63b	122.77±6.95c
CC5	$4.69 \pm 0.01 c$	$18.78 \pm 0.11 \mathrm{b}$	$1.24{\pm}0.00\mathrm{c}$	$0.71{\pm}0.00\mathrm{c}$	18.93±0.02a	$172.15\!\pm\!0.60c$	$16.27\!\pm\!0.10{\rm c}$	$122.57 \pm 0.19 \mathrm{e}$
CC13	$4.77 \pm 0.07 \mathrm{b}$	22.75±0.60a	$1.51{\pm}0.02\mathrm{b}$	$0.75 \pm 0.01 \mathrm{b}$	18.77±0.04a	$179.98 \pm 7.36 \mathrm{b}$	$16.47 \pm 0.84 \mathrm{c}$	$209.28 \pm 16.77 \mathrm{b}$
CR5	5.01±0.01a	$18.59 \pm 0.09 \mathrm{b}$	$1.58 \pm 0.02 a$	$0.79 \pm 0.01a$	18.88±0.01a	206.89±2.27a	23.43±0.04a	249.20±2.75a

(1) CC3: 连作 3 年, continuous cropping 3 years; CC5: 连作 5 年, continuous cropping 5 years; CC13:连作 13 年, continuous cropping 13 years; CR5:轮作 5 年, cropping rotation 5 years; (2) 用 Duncan 法统计(n=4),同行数据后不同字母表示差异显著(P<0.05)

2.2 细菌门水平相对丰度

本研究共获得细菌序列 618029 条(30087—44615),以 97%的相似水平进行 OTU 聚类,共获得 2696 个 OTU,分布在 37 个细菌门(图 1),其中酸杆菌门(Acidobacteria)(20.13%)、放线菌门(Actinobacteria)(17.15%)、α-变形菌门(Alphaproteobacteria)(13.55%)、β-变形菌门(Betaproteobacteria)(11.74%)、绿弯菌门(Chloroflexi)(8.69%)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)(7.61%)为土壤中的优势菌门(相对丰度均大于5%),占获得总细菌序列量的 78.87%。

对比处理间细菌门水平相对丰度关系发现,上述优势菌门中酸杆菌门和放线菌门各处理间差异不显著; α-变形菌门在 CC13 处理中的相对丰度显著高于处理 CC5 和 CR5, 而 β-变形菌门在 CC13 处理中含量最低,

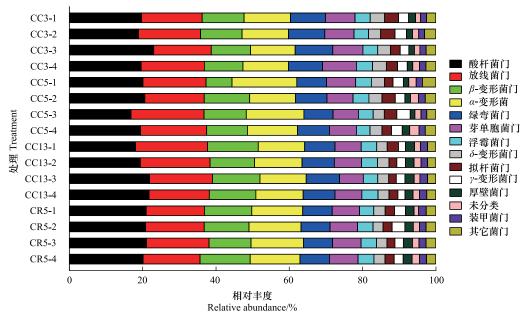


图 1 不同种植制度下土壤细菌门水平下群落结构组成

Fig.1 Composition of soil bacterial community at phylum level with different cropping systems

CC3: 连作3年,continuous cropping 3 years, CC3-1, CC3-2, CC3-3, CC3-4为4个重复;CC5: 连作5年,continuous cropping 5 years, CC5-1, CC5-2, CC5-3, CC5-4为4个重复; CC13:连作13年,continuous cropping 13 years, CC13-1, CC3-2, CC13-3, CC13-4为4个重复; CR5:轮作5年,cropping rotation 5 years, CR5-1, CR5-2, CR5-3, CR5-4为4个重复

与 CC3、CC5 和 CR5 对比,分别降低 16.24%、18.45%和 4.36%。此外,绿弯菌门和芽单胞菌门在轮作 CR5 处理中的丰度显著高于其他连作处理。

不同处理中检测到丰度较低的一些细菌门类,如浮霉菌门(Planctomycetes)、 δ -变形菌门(Deltaproteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、 γ -变形菌门(Gammaproteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和装甲菌门(Armatimonadetes),其相对丰度变化范围在 1%-5%之间。其中拟杆菌门和 δ -变形菌门在轮作处理 CR5中,相对丰度显著高于连作处理;厚壁菌门和装甲菌门的相对丰度在 CC3 和 CC5 处理中显著高于 CC13 和 CR5 处理;而浮霉菌门在 4 个耕作处理中分布较稳定,处理间差异不显著。此外,本研究检测到包括蓝细菌(Cyanobacteria)在内的,24 个丰度很低的痕量菌门以及未分类的细菌门。

此外,研究共检测到 552 个不同细菌属,其中 43. 25%的序列注释经 RDP 注释后没有明确的分类信息 (unclassified)。共有 49 和 140 个细菌属的相对丰度分别大于 0.5%和 0.1%,其中 Subgroup_1 的相对丰度最高,达到 6.84±0.78,其次为 Gemmatimonas、Gaiellales、Solibacter 和 SC-I-84 相对丰度分别为 3.88±0.30、3.66±0.52、3.56±0.08 和 3.42±0.11。对比处理间细菌属水平相对丰度关系发现,上述优势菌属中 Solibacter 和 SC-I-84 各处理间差异不显著; CR5 处理显著降低了 Subgroup_1 和 Gaiellales 的相对丰度,而显著增加了 Gemmatimonas 的相对丰度。此外,研究发现连作处理 CC13 和轮作处理 CR5 分别显著增加了 Spingomonas (丰度>1.5%)和 Nitrospira (丰度>0.5%)的相对丰度(图 2)。

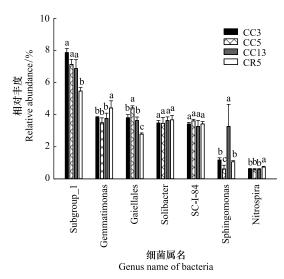


图 2 不同种植制度下部分细菌属水平下群落结构组成

Fig.2 Composition of partial bacterial community at genus level with different cropping systems

2.3 Alpha 多样性分析

不同耕作处理的 Alpha 多样性指数变化关系如表 2

所示。各处理的覆盖率均大于 98%,说明本研究获得的细菌序列覆盖度较好,其测序深度可以满足细菌群落结构组成及多样性分析。本研究将各处理间序列随机抽平到 3.0 万条,用以比较分析不同处理 Alpha 多样性大小。总体可以看出,处理 CC13 和 CR5 的 Alpha 多样性指数,包括获得的 OTUs 数量、PD 值、Chao1 指数和 Shannon 指数均显著高于处理 CC3 和 CC5,而长期连作处理 CC13 与轮作处理 CR5 间差异不显著。该结果表明,短期大豆连作处理降低了土壤细菌多样性指数,但长期大豆连作土壤的 Alpha 多样性指数有恢复的趋势。

表 2 不同处理对土壤中微生物群落多样性的影响

处理 Treatment	OTU 数 Number of OTUs	PD 值 Phylogenetic diversity	Chao 1 指数 Chao 1 index	Shannon 指数 Shannon index	覆盖率 Coverage/%
CC3	1756.8±42.15b	122.64±1.64b	2283.2±74.35b	6.20±0.03c	98.47±0.00
CC5	$1799.6 \pm 39.74 \mathrm{b}$	124.46±3.14ab	$2395.8\!\pm\!101.81\mathrm{ab}$	$6.23{\pm}0.03\mathrm{bc}$	98.38±0.00
CC13	1870.1±41.72a	128.55±3.12a	2429.8±57.48a	$6.26 \pm 0.04 \mathrm{ab}$	98.34±0.00
CR5	1884 7+24 730	127 75±1 660	2450 4+60 450	6.30±0.020	08 44±0 00

Table 2 Effects of different treatments on the diversity of bacterial communities

2.4 细菌群落结构分析

基于 Bray-curtis 距离细菌群落结构变化的聚类分析图谱如图 3 所示。细菌群落结构主要划分为轮作处理(I 群)和连作处理(II 群)两大集群,说明连作与轮作处理间细菌群落结构差异显著。此外,在连作处理的

⁽¹⁾ OTU: 可操作分类单元, operational taxonomic units; PD: 系统发育多样性, phylogenetic diversity; (2) 用 Duncan 法统计(n=4), 同行数据后不同字母表示差异显著(P<0.05)

分布集群中,区别于 CC13 处理(亚类 II),短期连作的 CC3 和 CC5 处理独立分布于另一个亚类中(亚类 I),说 明随着连作年限的进一步延长,土壤细菌群落结构的分异度增加。

利用典范对应分析发现,土壤 pH、TN、TP、AN、AP和 AK 是细菌群落结构发生变化的主要驱动因子(P<0.05),且所有相关因子均与大豆-玉米轮作处理呈正相关分布关系,其中土壤 pH 对细菌群落结构的分异贡献度最大(图 4)。此外,方差分解分析(图 4)发现上述土壤因子对不同种植制度引起细菌群落分异的贡献率为77.76%,其中 pH 对土壤微生物群落变化的贡献率最大,为8.49%,而土壤理化因子 TN、TP 和速效养分含量对细菌群落分异的共同解释率为32.06%。

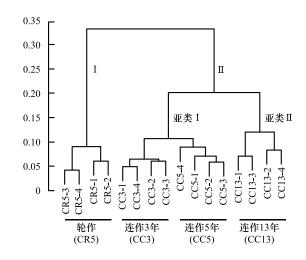


图 3 不同种植制度下大豆土壤细菌群落的聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of soybean soil bacterial community under different cropping systems

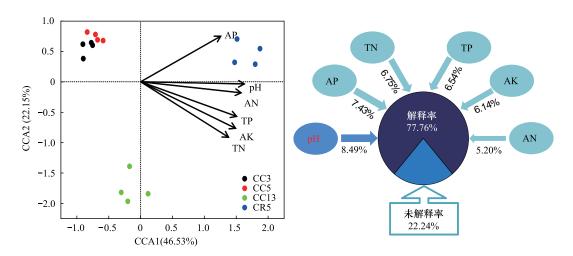


图 4 不同种植制度下土壤细菌群落结构与环境因子间的典范对应分析和方差分解分析

Fig.4 Canonical correspondence analysis and variance partitioning analysis between soil bacterial community structure and environmental factors under different cropping systems

CCA:典范对应分析, canonical correspondence analysis; TN:全氮, total N; TP:全磷, total P; AN:速效氮, available N; AP:速效磷, available P; AK:速效钾, available K

3 讨论

连作导致土壤理化性质恶化,养分失调和作物产量降低被广泛报道^[28-30]。本研究对比轮作和连作大豆土壤理化性质发现,轮作大豆的土壤 pH、TN、TP 和速效养分含量(AP、AN 和 AK)均显著高于连作大豆。这与傅慧兰等^[31]和李玉洁等^[32]的研究结果相一致。轮作大豆土壤速效养分高于连作大豆,可能与轮作体系中种植玉米有关,玉米种植施肥量大,玉米茬口的残余肥料可导致后茬大豆土壤速效养分增加。与不同连作年限大豆茬口相比,轮作处理下土壤 TC 含量没有显著变化,该结果与 Martens^[33]报道的 TC 含量在轮作处理中高于连作处理的结果相悖。导致这种差异的原因可能是由于本研究中大豆-玉米的轮作体系只有 5 年,其中玉米茬口 2 年,尽管玉米生物量大,玉米残茬还田量大于大豆茬,但短短 2 年的玉米残茬还田不足以导致土壤TC 产生显著的变化^[34-35]。此外,对比不同连作年限处理间的土壤理化性状变化发现,CC13 的土壤 pH、TC、

TN、TP 和速效养分 AN 和 AK 含量均显著高于 CC3 和 CC5 处理,说明大豆长期连作在一定程度上改善了土壤环境,提高了土壤养分含量。王娟英等^[36]对怀牛膝连作的研究发现,随连作年限的不断延长,土壤中革兰氏阳性与阴性细菌比值的降低和一些参与土壤物质循环和木质素降解的微生物类群数量的提高是导致长期连作土壤养分有效化增强和含量提高的主要原因。

土壤微生物多样性指数被认为是评价土壤生态功能的重要指标^[37]。有研究证明轮作体系通过增加作物的种类和生物量的方式增加了土壤微生物的食物来源,进而导致土壤微生物的多样性升高^[38]。然而,目前基于不同轮作方式下微生物多样性变化的研究结果不尽相同^[39-40]。最近,Venter等^[41]对不同种植方式下土壤微生物多样性指数变化研究的文章进行综合分析发现,轮作体系中仅有 15.1%和 3.4%的微生物群落丰富度和多样性指数呈增加的趋势。本研究发现,大豆-玉米轮作体系下,细菌群落 alpha 多样性指数显著高于短期连作处理 CC3 和 CC5,而与长期连作处理 CC13 差异不显著。此外,本研究发现细菌群落的多样性指数与土壤 pH、TP、AK、AP和 AN 呈显著正相关关系(P<0.001)。然而目前基于不同种植制度下,微生物群落多样性指数与环境因子间的相关性研究较少^[42],Zak等^[43]研究证实轮作下细菌多样性指数的增加不仅是由于作为微生物外源植物残体种类数量的增加,而土壤养分尤其是速效养分的升高是微生物多样性增加的另一主要因素。朱琳等^[44]对不同大豆连作年限的研究发现,大豆长期连作(10年以上)处理增加了土壤微生物群落的丰富度和多样性。此外,本研究基于大豆长期连作 CC13 处理下,土壤养分含量和多样性指数的升高,间接佐证了关于土壤养分的提高导致微生物多样性升高的研究结果。

近年来,土壤 pH 在细菌群落结构形成中的重要作用得到了充分的论证^[45-51]。如在细菌的大尺度空间分布研究^[45-46]、不同海拔梯度研究^[47-48]和一些定点长期野外试验研究^[49-50]中土壤 pH 均被揭示出是决定细菌群落结构发生演替的主导因子。本研究发现,尽管不同耕作方式引起土壤 pH 的最大变异只有 0.4 个 pH 单位,基于 CCA 和 VPA 的分析结果均表明土壤 pH 与土壤细菌群落的相关性最高,且对细菌群落结构变化的单独贡献率高于其他任一个土壤理化因子,说明种植制度改变后土壤 pH 的变化是引起细菌群落结构发生分异的主要驱动因子。Degrune等^[52]对不同种植制度下细菌群落结构研究也证实,虽然土壤 pH 只有 0.3 个单位的变化,但是土壤 pH 与细菌群落组成及多样性指数存在显著的相关性(P<0.01)。此外,CCA 结果显示 TN、TP 和速效养分 AN、AP 和 AK 与细菌群落结构存在相关关系(P<0.01),且 VPA 结果得出养分含量对细菌群落结构变化的另一主要贡献因子。

Yin 等^[40]研究显示,与连作相比,轮作体系显著改变微生物的群落结构。然而,Jiang 等^[15]和 Venter 等^[41]发现轮作条件下微生物群落并不发生改变,且不同的研究手段和轮作方式、种植年限等因素会导致研究结果产生差异。本研究基于高通量测序技术的研究结果显示,轮作和连作处理下的细菌群落结构在聚类分析图谱中分为二大类,而短期连作 CC3、CC5 和长期连作 CC13 处理聚为一个独立的亚类,说明大豆-玉米轮作和连作不同年限对细菌群落结构均有显著影响。此外,本研究发现一些细菌在门水平上的相对丰度发生了显著变化。如被普遍报道的富营养菌门中的拟杆菌门在长期连作和轮作处理中丰度最高,而寡营养菌门中的厚壁菌门在短期连作中丰度最高,说明上述菌门受种植制度影响后的丰度变化与其营养型关系保持一致。然而,其他富营养型菌门如放线菌门、β-变形菌门和 γ-变形菌门的丰度没有发生显著变化,说明不同的种植制度在一定程度上改变了上述菌门的 r 型生长策略^[34,53]。此外,研究发现具有土壤污染物降解功能的芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)^[54]和将土壤中的亚硝酸氧化成硝酸盐的硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)在轮作处理中的相对丰度显著高于其他处理,说明轮作方式有助于降解土壤污染和提高土壤的氮肥力^[55]。另外,对比三个连作处理发现,α-变形菌门中能利用苯甲酸、水杨酸等物质作为唯一碳源^[56]的鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的相对丰度在连作 13 年处理中相对丰度最高,鞘氨醇单胞菌属能够降解土壤有毒物质,并且有助于植物抵抗病原菌^[57]。Wei^[58]等对连作大豆根部微生物群落结构数量变化关系研究发现,长期连作显著增加了哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、厚垣普可尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)和拟青霉菌(*Paecilomyces lilacinus*)的数

量,导致长期连作土壤对大豆根部真菌病原菌和线虫产生了抑制作用。上述研究结果证明,长期大豆连作改变了土壤微生物群落结构,有助于促使抑病土的产生。此外,近年来的研究结果也发现,长期连作大豆的株高、生物量和产量均显著高于短期大豆连作[12]。

综上所述,本研究发现区别于连作处理,大豆-玉米轮作体系下的细菌群落结构在聚类图谱中被划分为独立的集团,说明轮作后细菌群落结构组成发生了明显的分异。一些细菌的相对丰度受种植制度影响发生了显著变化,其中富营养型的拟杆菌门和寡营养型的厚壁菌门相对丰度的变化与其营养型分布关系一致,而富营养型放线菌门、β-变形菌门和 γ-变形菌门没有因轮作处理提高养分含量的情况下,而显著增加其相对丰度。此外,与连作处理相比,CR5 处理显著提高了细菌群落的丰富度和多样性指数,说明轮作处理有助于改善土壤环境。有趣的是,本研究发现长期连作 CC13 处理显著提高了土壤养分含量和细菌群落的丰富度和多样性指数,说明长期大豆连作在一定程度上改善了土壤环境,提高了土壤的保肥能力,为土壤微生物提供了营养和能源物质。本研究利用高通量测序技术,提供了长期连作后细菌群落多样性升高的实例,然而关于土壤-作物微生物三者如何介导连作退化土壤环境改善的内在机制尚需要进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Liu X B, Jin J, Wang G H, Herbert S J. Soybean yield physiology and development of high-yielding practices in Northeast China. Field Crops Research, 2008, 105(3): 157-171.
- [2] 阮维斌, 王敬国, 张福锁. 连作障碍因素对大豆养分吸收和固氮作用的影响. 生态学报, 2003, 23(1): 22-29.
- [3] 傅慧兰, 邹永久, 韩丽梅, 闫飞, 刘金萍. 大豆连作土壤障碍因素研究——Ⅱ.连作土壤酶活性与肥力因素间的相关性分析. 大豆科学, 1996, 15(4): 332-339.
- [4] 刘金波, 许艳丽. 我国连作大豆土壤微生物研究现状. 中国油料作物学报, 2008, 30(1): 132-136.
- [5] 陈雪丽,李伟群,王英,王玉峰,王晓军.黑土区连作大豆根际土壤氨氧化古菌群落结构特征及其驱动因子分析.大豆科学,2016,35(4):620-625.
- [6] Dias T, Dukes A, Antunes P M. Accounting for soil biotic effects on soil health and crop productivity in the design of crop rotations. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(3): 447-454.
- [7] Bell T, Newman J A, Silverman B W, Turner S L, Lilley A K. The contribution of species richness and composition to bacterial services. Nature, 2005, 436(7054): 1157-1160.
- [8] Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. Science, 2008, 320(5879): 1034-1039.
- [9] 于镇华, 王艳红, 燕楠, 李彦生, 谢志煌, 金剑. CO₂浓度升高对不同大豆品种根际微生物丰度的影响. 土壤与作物, 2017, 6(1): 9-16.
- [10] Kong A Y Y, Scow K M, Córdova-Kreylos A L, Holmes W E, Six J. Microbial community composition and carbon cycling within soil microenvironments of conventional, low-input, and organic cropping systems. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(1): 20-30.
- [11] Tang H, Xiao C H, Ma J Z, Yu M, Li Y M, Wang G L, Zhang L P. Prokaryotic diversity in continuous cropping and rotational cropping soybean soil. FEMS Microbiology Letters, 2009, 298(2): 267-273.
- [12] Li C G, Li X M, Kong W D, Wu Y, Wang J G. Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China. Plant and Soil, 2010, 330(1/2): 423-433.
- [13] Xuan D T, Guong V T, Rosling A, Alström S, Chai B, Högberg N. Different crop rotation systems as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(2): 217-225.
- [14] Jangid K, Williams MA, Franzluebbers AJ, Schmidt TM, Coleman DC, Whitman WB. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(10): 2184-2193.
- [15] Jiang X, Wright A L, Wang X, Liang F. Tillage-induced changes in fungal and bacterial biomass associated with soil aggregates: a long-term field study in a subtropical rice soil in China. Applied Soil Ecology, 2011, 48(2): 168-173.
- [16] Zhu Y B, Shi F Y, Tian J Q, Liu J B, Chen S Y, Xiang M C, Liu X Z. Effect of soybean monoculture on the bacterial communities associated with cysts of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, 2013, 45(3): 228-235.
- [17] 谷岩,邱强,王振民,陈喜凤,吴春胜. 连作大豆根际微生物群落结构及土壤酶活性. 中国农业科学, 2012, 45(19): 3955-3964.
- [18] Miranda K M, Espey M G, Wink D A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide, 2001, 5(1): 62-71.
- [19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.

- [20] Biddle J F, Fitz-Gibbon S, Schuster S C, Brenchley J E, House C H. Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(30): 10583-10588.
- [21] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [22] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 2011, 27 (16): 2194-2200.
- [23] Li W Z, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics, 2006, 22 (13): 1658-1659.
- [24] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Keller K, Brodie E L, Larsen N, Piceno Y M, Phan R, Andersen G L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. Nucleic Acids Research, 2006, 34(S2): W394-W399.
- [25] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(7): 1641-1650.
- [26] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11(4): 265-270.
- [27] Faith D P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. Biological Conservation, 1992, 61(1): 1-10.
- [28] 刘晓冰,于广武,许艳丽,周玉新,周绍钧,颜华.大豆连作效应分析.农业系统科学与综合研究,1990,(3):40-44.
- [29] 陈宗泽,殷勤燕,王旭明,邹永久. 大豆连作土壤微生物区系动态研究初报. 中国农业科学, 1997, 30(4): 96-96.
- [30] Huang L F, Song L X, Xia X J, Mao W H, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q. Plant-soil feedbacks and soil sickness: from mechanisms to application in agriculture. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39(2): 232-242.
- [31] 傅慧兰,杨振明,邹永久,王树起,韩丽梅. 大豆连作对土壤酶活性的影响. 植物营养与肥料学报,1996,2(4):374-377.
- [32] 李玉洁,王慧,赵建宁,皇甫超河,杨殿林.耕作方式对农田土壤理化因子和生物学特性的影响.应用生态学报,2015,26(3):939-948.
- [33] Martens D A. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(3): 361-369.
- [34] Liu J J, Yu Z H, Yao Q, Hu X J, Zhang W, Mi G, Chen X L, Wang G H. Distinct soil bacterial communities in response to the cropping system in a Mollisol of northeast China. Applied Soil Ecology, 2017, 119: 407-416.
- [35] Spargo J T, Alley M M, Follett R F, Wallace J V. Soil carbon sequestration with continuous no-till management of grain cropping systems in the Virginia coastal plain. Soil and Tillage Research, 2008, 100(1/2): 133-140.
- [36] 王娟英,许佳慧,吴林坤,吴红淼,朱铨,孔露霏,林文雄.不同连作年限怀牛膝根际土壤理化性质及微生物多样性.生态学报,2017,37(17):5621-5629.
- [37] Bender S F, Wagg C, van der Heijden M G A. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. Trends in Ecology & Evolution, 2016, 31(6): 440-452.
- [38] van der Heijden M G A, Bardgett R D, van Straalen N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters, 2008, 11(3): 296-310.
- [39] Navarro-Noya Y E, Gómez-Acata S, Montoya-Ciriaco N, Rojas-Valdez A, Suúrez-Arriaga M C, Valenzuela-Encinas C, Jiménez-Bueno N, Verhulst N, Govaerts B, Dendooven L. Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 65: 86-95.
- [40] Yin C T, Jones K L, Peterson D E, Garrett K A, Hulbert S H, Paulitz T C. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(12); 2111-2118.
- [41] Venter Z S, Jacobs K, Hawkins H J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: a meta-analysis. Pedobiologia, 2016, 59(4): 215-223.
- [42] Eisenhauer N. Plant diversity effects on soil microorganisms: spatial and temporal heterogeneity of plant inputs increase soil biodiversity. Pedobiologia, 2016, 59(4): 175-177.
- [43] Zak D R, Holmes W E, White D C, Peacock A D, Tilman D. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function; are there any links? Ecology, 2003, 84(8): 2042-2050.
- [44] 朱琳,曾椿淋,李雨青,俞冰倩,高凤,魏巍,许艳丽.基于高通量测序的大豆连作土壤细菌群落多样性分析.大豆科学,2017,36(3):419-424.
- [45] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(3); 626-631.

- [46] Lauber C L, Hamady M, Knight R, Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5111-5120.
- [47] Shen C C, Ni Y Y, Liang W J, Wang J J, Chu H Y. Distinct soil bacterial communities along a small-scale elevational gradient in alpine tundra. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 582.
- [48] Zhang B, Liang C, He H B, Zhang X D. Variations in soil microbial communities and residues along an altitude gradient on the northern slope of changbai mountain, China. PLoS One, 2013, 8(6): e66184.
- [49] Jenkins S N, Waite I S, Blackburn A, Husband R, Rushton S P, Manning D C, O'Donnell A G. Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, 95(4): 319-334.
- [50] Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, Fierer N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(9): 2407-2415.
- [51] 田磊,石少华,张建峰,高强,田春杰.长期化肥施用与秸秆还田对玉米根部相关 AMF 和细菌的群落结构多样性的影响.土壤与作物, 2017,6(4):291-297.
- [52] Degrune F, Dufrêne M, Colinet G, Massart S, Taminiau B, Bodson B, Hiel M P, Daube G, Nezer C, Vandenbol M. A novel sub-phylum method discriminates better the impact of crop management on soil microbial community. Agronomy for Sustainable Development, 2015, 35 (3): 1157-1166.
- [53] Li X Z, Rui J P, Mao Y J, Yannarell A, Mackie R. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 68: 392-401.
- [54] 丁传雨, 郑远, 任学敏, 陈兆进. 能源植物修复土壤镉污染过程中细菌群落分析. 环境科学学报, 2016, 36(8): 3009-3016.
- [55] Watson S W, Bock E, Valois F W, Waterbury J B, Schlosser U. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.; a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. Archives of Microbiology, 1986, 144(1): 1-7.
- [56] Story S P, Kline E L, Hughes T A, Riley M B, Hayasaka S S. Degradation of aromatic hydrocarbons by Sphingomonas paucimobilis strain EPA505. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 47(2): 168-176.
- [57] 胡杰,何晓红,李大平,刘强. 鞘氨醇单胞菌研究进展. 应用与环境生物学报,2007,13(3):431-437.
- [58] Wei W, Xu Y L, Li S X, Zhu L, Song J. Developing suppressive soil for root diseases of soybean with continuous long-term cropping of soybean in black soil of Northeast China. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil and Plant Science, 2015, 65(3); 279-285.