DOI: 10.5846/stxb201805151071

王悦,杨贝贝,王浩,杨程,张菊,朱濛,杨如意.不同种植模式下丹参根际土壤微生物群落结构的变化.生态学报,2019,39(13): - . Wang Y, Yang B B, Wang H, Yang C, Zhang J, Zhu M, Yang R Y.Variation in microbial community structure in the rhizosphere soil of *Salvia miltiorrhiza* Bunge under three cropping modes. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(13): - .

不同种植模式下丹参根际土壤微生物群落结构的变化

王 悦^{1,2},杨贝贝^{1,2},王 浩^{1,2},杨 程^{1,2},张 菊^{1,2},朱 濛^{1,2},杨如意^{1,2,*}

1 安徽师范大学环境科学与工程学院, 芜湖 241002

2 安徽省水土污染治理与修复工程实验室, 芜湖 241002

摘要:采用 MiSeq 高通量测序技术对连作、轮作、套作 3 种种植模式下丹参根际土壤中细菌的 16S rDNA 基因 V3—V4 区片段和 真菌 18S rDNA 基因 V4 区片段进行了测序,研究了细菌和真菌群落结构的变化,并分析了其与土壤因子的关系,从根际微生态 系统的变化阐释了丹参连作障碍的发生机理。总体上,细菌和真菌群落的大部分 Alpha 多样性指数在 3 种种植模式之间没有 显著差异,但呈现轮作>套作>连作的趋势。与连作相比,轮作显著提高了细菌群落的香农-威纳指数和丛枝菌根真菌的侵染 率。从细菌群落的组成上看,轮作模式下芽单胞菌门的相对丰度显著低于连作和套作。相反,轮作和套作时浮霉菌门和拟杆菌 门的相对丰度则高于连作。轮作和套作模式下,真菌群落中的接合菌门、壶菌门和子囊菌门的相对丰度显著高于连作。另外, 不同种植模式下微生物之间的相互作用关系也有明显差异,轮作甚至会造成真菌之间的相互关系发生逆转。连作模式下检出 了丹参枯萎病的病原菌镰刀菌,而有益菌枯草杆菌属的数量却呈下降趋势,这可能是引起丹参病害加剧的原因之一。主坐标成 分分析表明,微生物群落在 3 种种植模式之间没有发生显著的分化,前两个主坐标成分的总解释能力均小于 30%,表明没有显 著的圭导因子。轮作和套作可以提高土壤 pH 和部分矿质营养,降低 ORP。但是,土壤性质的变化仅影响细菌群落,对真菌群 落的影响不明显。套作模式下,总钾和有效钾会提高细菌和真菌群落的多样性;轮作和连作模式下的真菌群落则刚好相反,它 们更适应低钾和高 ORP 的环境。研究结果表明,轮作和套作可以在一定程度上改善土壤质量,提高根际细菌群落多样性,改变 微生物群落组成,以及微生物-微生物、微生物-丹参之间的相互关系,这些可能是缓解丹参连作障碍的重要原因。 关键词:高通量测序;细菌群落;真菌群落;种植模式

Variation in microbial community structure in the rhizosphere soil of *Salvia miltiorrhiza* Bunge under three cropping modes

WANG Yue^{1, 2}, YANG Beibei^{1, 2}, WANG Hao^{1, 2}, YANG Cheng^{1, 2}, ZHANG Ju^{1, 2}, ZHU Meng^{1, 2}, YANG Ruvi^{1, 2, *}

1 College of Environmental Science and Engineering, Anhui Normal University, Wuhu 241002, China

2 Anhui Provincial Engineering Laboratory of Water and Soil Pollution Control and Remediation, Wuhu 241002, China

Abstract: Salvia miltiorrhiza Bunge, a staple in Chinese herbal medicine, is widely used for the treatment of cardiovascular diseases. However, the yield and quality of *S. miltiorrhiza* have decreased dramatically because of severe continuous cropping obstacles stemming from inadequate wild resources and limited genuine production areas. The rhizosphere soil samples of *S. miltiorrhiza* under three cropping modes—rotation cropping monoculture (RCMO), continuous cropping monoculture (CCMO), and intercropping mix-culture (ICMI)—were collected from the city of Bozhou in the Anhui province. The MiSeq high-throughput sequencing technique, targeting the V3-V4 region of the bacterial 16S rDNA gene and

基金项目:2016年高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016025);国家自然科学基金项目(41001368, 41771355);安徽省自然科学基金 项目(1508085SMC211)

收稿日期:2018-05-15; 网络出版日期:2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: yangruyi@ mail.ahnu.edu.cn

http://www.ecologica.cn

the V4 region of the fungi 18S rDNA gene, was used to investigate the bacterial and fungi community structure and analyze the links between the microbial community structure and soil environmental parameters. The goal of this study was to illuminate the mechanism of continuous cropping obstacles that occur in S. miltiorrhiza from the perspective of a rhizospheric micro-ecological environment. Overall, most Alpha diversity indexes of microbial communities followed the order of RCMO> ICMI>CCMO, but significant differences were not observed between the three cropping modes. The Shannon-Wiener index of bacterial community and the mycorrhizal colonization of S. miltiorrhiza under RCMO were higher than those under CCMO. The relative abundance of the top 10 dominant bacterial phyla accounted for 94%, and all of the 10 dominant phyla were the same across all cropping modes; these were Proteobacteria, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Unclassified, Firmicutes, and Chloroflexi phyla. In terms of bacterial community composition, the relative abundance of Gemmatimonadetes phylum under RCMO was lower than that under CCMO and ICMI. In contrast, the dominance of Planctomycetes and Bacteroidetes phyla under RCMO and ICMI were higher than that under CCMO. In total, only nine fungi phyla were found in this study, most of them unclassified fungi. The relative abundance of Zygomycota, Chytridiomycota, and Ascomycota phyla under RCMO and ICMI increased compared to CCMO. Furthermore, the relationship between the microbes differed significantly across the three cropping modes. The rotation of S. miltiorrhiza even reversed the relationship between fungi, from negative undehttp://toutiao.7junshi.com/? qid=minitopr CCMO to positive. The ratio of beneficial Bacillus genus decreased but pathogenic Fusarium genus increased under CCMO, which might change the relationship between the microbial community and dramatically exacerbate the diseases of S. miltiorrhiza. Differentiations between the microbial communities were not evident between the three cropping modes according to principal coordinates analysis (PCoA). The variation in microbial communities was controlled by eight principal coordinates, among which the first two principal coordinates explained less than 30% of the total variance. This indicates that there was no dominant factor that shaped the microbial community. The results showed that soil pH, ORP, and partial mineral nutrients were improved under RCMO and ICMI modes compared to CCMO. A Monte Carlo permutation test revealed that soil environmental parameters were closely related to the differences in the bacterial community but not the fungi community. Total and available K were positively correlated to bacterial and fungi communities under ICMI, respectively. In contrast, fungi communities under RCMO and CCMO were better adapted to low available K and high ORP in soil environments. Our study indicated that RCMO and ICMI can, to some extent, improve the physicochemical properties of soil, increase the diversity of microbial community in the rhizosphere soil of S. miltiorrhiza, and change the microbemicrobe and microbe-plant relationships in comparison with CCMO, thus alleviating the continuous cropping obstacles.

Key Words: high-throughput sequencing, bacterial community, fungi community, cropping mode

丹参(Salvia miltiorrhiza Bunge)是唇形科(Lamiaceae)鼠尾草属的一种多年生草本植物,以干燥的根和根状茎入药(Danshen)。丹参是一味常用的传统中药材,对冠心病、心胶痛、心肌梗死和高血压等心血管系统疾病具有显著疗效^[1],其植株浸提液还具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤和抗炎症等功能^[2-5]。丹参属大宗中药材,市场需求量大,但野生资源稀缺,适宜人工栽培的道地产区也非常有限,导致其栽培地重茬连作现象十分普遍。长期连作造成丹参枯萎病、根腐病、根结线虫病加剧,生长势减弱,黄苗、死苗、裂根等现象严重,有效成分含量和商品率逐年下降,产生连作障碍(continuous cropping obstacles)^[6]。连作障碍在人参(Panax ginseng C. A. Meyer)、地黄(Rehmannia glutinosa (Gaetn.) Libosch. ex Fisch. et Mey.)、三七(Panax notoginseng (Burk.) F.H. Chen)、黄芩(Scutellaria baicalensis Georgi)、当归(Angelica sinensis (Oliv.) Diels)等其他中药材栽培过程中也普遍存在,且影响非常严重。因此,研究连作障碍的发生机理对于提出合理有效的消减措施,保障中药材生产的可持续发展和药材资源供应的安全性具有重要的理论和现实意义。

丹参连作障碍的发生机理十分复杂,包括化感自毒作用、根际理化环境失衡,以及微生物区系的变化[7-8]

等。近年来,从植物-土壤-微生物组成的根际微生态系统探讨连作障碍的成因和消减措施已成为一个新的研究思路和重要的发展趋势^[9-11]。丹参根际次生代谢物的产生与释放,以及在环境介质中的迁移、转化、降解等过程与根际微生物之间存在密切的相互作用。研究发现,蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、丛枝菌根真菌(*Glonus mosseae*)和内生菌等不仅能够促进丹参根系的生长,而且会诱导其产生更多丹参酮和丹酚酸 B^[12-14]。但是,连作条件下大量次生代谢物的积累将改变土壤中微生物的群落结构,使根际微生态系统失衡,从而对植物产生负反馈^[15]。已有研究证实,丹参酮和丹酚酸 B 等均具有很强的抑菌作用^[2,16],会导致根际放线菌和真菌群落结构发生明显变化^[8],有益微生物数量减少,致病菌增加,使丹参更易受病原菌侵染,抗逆性降低^[9,17]。在农林生产实践中,轮作、间作、套作可以有效缓解连作障碍,这与植物根系之间的地下化学作用有关^[18],但相关的微生态机理尚不清楚。

安徽省亳州市是国家科技部批准建立的中药特色产业基地,具有多年从事丹参栽培和加工的历史。本课题组于 2016 年 6 月调研发现,连作两年以上丹参即出现黄苗和枯萎现象(枯苗率 10%—20%),产量和品质严重下降,与玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)、桔梗(*Platycodonis radix*)等其他根类药材实行轮作方可缓解(枯苗率 <5%)。本研究通过高通量测序对比分析了轮作、连作、套作 3 种栽种模式下丹参根际微生物群落的变化,尝试从微生态系统的变化阐明丹参连作障碍的发生机理,为缓解这一重大生产难题,加快建立道地中药材生产质量管理规范化(Good Agricultural Practice, GAP)基地提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 采样点概况和样品采集

本研究采样点位于安徽省亳州市谯城区十八里镇的一处中药材种植基地(33°52'48"N, 115°46'12"E)。 该地位于皖豫交界处,地势平坦,属于暖温半湿润季风性气候,雨热同季,年均降水量约 821.3 mm,年均气温 约 14.9℃,年均日照约 2184 h。土壤质地属沙质或沙淤两合土质,种植有丹参、白芍(*Paeonia lactiflora* Pall.)、 桑(*Morus alba* L.)、桔梗、亳菊(*Chrysanthemum morifolium* cv. Boju)等中药材,种植历史悠久。

本研究采集的丹参包括 3 种种植模式:即与桔梗轮作 1 年(rotation cropping monoculture, RCMO),连作 2 年(continuous cropping monoculture, CCMO)和与白芍连续套作 2 年(intercropping mix-culture, ICMI)。轮作或 连作丹参的密度约为 112500—120000 株/hm²,套作丹参的密度约为 60000 株/hm²,白芍密度约为 45000 株/hm²。白芍种植时间为 10 月,次年 3—4 月套作丹参。

每种种植模式随机选取 3 个面积为 2 m×2 m 的样方,将样方内的丹参整株取出,采用抖根法收集根际土 壤,同一样方内的土样混合均匀作为一个混合样,所有土壤样品立即带回实验室,4℃冰箱保存。混匀的土样 一部分风干保存,测定土壤理化性质,另一部分新鲜土壤用于提取微生物总 DNA 进行高通量测序。

1.2 实验方法

1.2.1 土壤理化性质测定

称取过 1 mm 筛孔的风干土 10 g,加入 1 mol/L 的 KCl 溶液 25 mL(土水比为 1:2.5),摇匀 30 min 后用 pH 计测定土壤 pH。土壤氧化还原电位(oxidation reduction potential, ORP)采用铂电极法测定。土壤有机质采用 K₂Cr₂O₇-H₂SO₄稀释热法测定^[19]。土壤全磷和速效磷浓度分别采用 H₂SO₄-HClO₄消解和 HCl-H₂SO₄浸提,钼 铵蓝比色法进行测定^[19]。同时,称量 100 g 新鲜土壤在 105℃烘箱干燥 8 小时计算土壤含水率。

1.2.2 细菌宏基因组 16S rDNA 测序

利用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A[™] Mag-Bind Soil DNA Kit, OMEGA)提取细菌总 DNA。总 DNA 用琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性,然后用于 PCR 扩增。利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量,以确定 PCR 反应加入的 DNA 量。PCR 所用的引物已经融合了 Miseq 测序平台的 V3—V4 通用引物(341F/805R)。

PCR 体系包括 2×Taq master Mix 15 µL、Bar-PCR primer F (10 µM) 1 µL、primer R (10 µM) 1 µL、 Genomic DNA 10—20 ng,补充无菌水至 30 µL。PCR 扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,45℃退火 20 s、65℃延伸 30 s,共 5 个循环;94℃变性 20 s,55℃退火 30 s、72℃延伸 30 s,共 20 个循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 结束后,引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物进行第二轮扩增。PCR 体系包括 2×Taq master Mix 15 µL、primer F (10 µM) 1 µL、primer R (10 µM) 1 µL、Genomic DNA 20 ng,补充无菌水至 30 µL。PCR 扩增条件 为:95℃预变性 30 s;95℃变性 15 s,55℃退火 15 s,72℃延伸 30 s,共 5 个循环;最后 72 度延伸 5 min。PCR 结束 后对扩增产物进行琼脂糖电泳,并对 DNA 进行回收。回收产物用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒定量,根据测得的 DNA 浓度,将所有样品按照 1:1 的比例进行混合,混合后充分震荡均匀。等量混合时,每个样品 DNA 量取 10 ng, 最终测序浓度为 20 pmol。该混合样品由上海生工生物工程有限公司进行后续的样品建库与宏基因测序。 **1.2.3** 真菌宏基因组 18S rDNA 测序

真菌总 DNA 提取、检测方法与细菌相同,18S V4 区通用引物为 V43NDF/Euk_V4_R。

PCR 体系包括 10×PCR buffer 5 µL、dNTP (10 mM each) 0.5 µL、Genomic DNA10 ng、Bar-PCR primer F (50 µM) 0.5 µL、primer R (50 µM) 0.5 µL、Plantium Taq (5U/µL) 0.5µL,补充无菌水至 50 µL。PCR 扩增条 件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,45℃退火 20 s、65℃延伸 30 s,共5 个循环;94℃变性 20 s,55℃退火 30 s、72℃延伸 30 s,共20 个循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 结束后,引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物进行第二 轮扩增。PCR 体系包括 10×PCR buffer 5 µL、dNTP (10 mM each) 0.5 µL、DNA 20 ng、primer F (50 µM) 0.5 µL、plantium Taq (5U/µL) 0.5 µL,补充无菌水至 50 µL。PCR 扩增条件为:95℃预 变性 30 s;95℃变性 15 s,55℃退火 15 s,72℃延伸 30 s,共5 个循环;最后 72℃延伸 5 min。真菌 PCR 扩增产物的后续检测、回收、混合、建库、测序等处理与细菌的方法相同。

1.2.4 丛枝菌根真菌侵染率测定

将新鲜丹参的须根剪下,用自来水将根部土壤冲洗干净,然后放置在 FAA 固定液(甲醛:醋酸:50%酒精= 5:5:90)中固定,洗净固定液,加入 10%的 KOH 溶液,90℃下水浴加热 10 min,之后在 10%的盐酸中酸化 15 min,最后用酸性品红染色过夜。将须根剪成约 2 cm 的小段,用十字交叉法计算侵染率^[20]。

1.3 分析方法

1.3.1 数据分析

使用 SPSS 17.0 对土壤理化性质数据进行统计分析(SPSS, Inc., Chicago, IL),先进行正态分布和方差齐 性检验(Normal distribution and homogeneity of variance test),然后做单因素方差分析(One way ANOVA)。不同 处理的均值在 5%的显著性水平下做 LSD(Least significant difference)多重比较。

1.3.2 微生物多样性、网络及相互作用分析

将多条序列按其序列间的距离进行聚类,根据序列之间的相似性作为域值分成操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU),序列相似性域值设为0.97。采用uclust软件(v1.1.579)对OTU进行聚类, uclust首先筛选出序列中最长的 reads 作为种子序列,找出所有与该序列的相似度在阈值范围内的序列,并归 为一个类,而后依次执行此步骤,直到所有序列均完成聚类,每一个类作为一个 OTU。

微生物 Alpha 多样性指标包括 ACE 指数、Chao1 指数、香农-威纳指数(Shannon-Wiener index)、丰富度指数(richness)、均匀度和覆盖度,各指数的计算方法参见邵宗圆等人的方法^[21]。

细菌群落 Beta 多样性可以用来比较多组样本之间的差别,本研究利用 Fast UniFrac 软件进行主坐标分析 (Principal co-ordinates analysis, PCoA)。

选取丰富度高于 1%或丰富度排序在前 100 位的物种,利用 QIIME(v1.8.0)和 SparCC 软件(v1.0.0)分别 进行网络(network)分析和微生物之间相互作用关系分析。

1.3.3 基于 Canoco 软件的冗余分析(RDA)

利用 Canoco(v 4.5, Centre for Biometry, Wageningen, The Netherlands)软件分析土壤理化因子和细菌群

落之间的关系。首先,对丹参根际土壤细菌群落做降趋势对应分析(Detrended correspondence analysis, DCA)。结果显示,细菌的第一排序轴长度为0.594,真菌的第一排序轴长度为0.783,均小于3,因此本研究选择基于线性模型的冗余分析(Reundancy analysis, RDA)进行排序^[22]。

蒙特卡罗置换检验(Monte Carlo permutation)用以检验限制性排序模型的显著性,置换次数选择默认值 499 次。预筛选(Forward selections)可以检验哪种环境因子对微生物群落组成有显著性的影响。根据预筛选的结果,通过偏冗余分析(partial RDA)的 variation partitioning 能够确定具有显著性影响的各因子的贡献率^[22]。

2 结果

2.1 土壤理化性质

土壤理化性质见表 1。结果显示,所有土壤均属于酸性土,不同样点的酸度有显著差异(P<0.05),其中连 作两年的土壤 pH 最低,而轮作土壤 pH 最高。土壤呈氧化状态,轮作和连作土壤的 ORP 无显著差异,但套作 土壤的 ORP 明显低于其他两种种植模式。土壤有机质在 12.92—21.51 g/kg 之间,含量较高,且呈现轮作<连 作<套作的规律。连作两年的丹参根际土壤总磷和总钾均最低,但有效磷和有效钾的变化趋势与总磷和总钾 有所不同。3 种种植模式下,丹参根际土壤微生物量(以 DNA 含量计)没有明显差异,但呈现连作<套作<轮 作的趋势。

Table 1 Soil physicochemical properties					
	—————————————————————————————————————				
Soil properties	轮作一年 RCMO	轮作一年 RCMO 连作两年 CCMO			
pH	6.38±0.01a	6.14±0.02c	6.24±0.01b		
氧化还原电位 Oxidation reduction potential, ORP/(mv)	43.33±0.58a	44.00±1.00a	$18.00{\pm}0.00{\rm b}$		
有机质 Organic matter/(g/kg)	$12.92 \pm 0.20c$	$18.72 \pm 0.19 \mathrm{b}$	21.51±0.16a		
总磷 Total phosphorus/(g/kg)	$0.82 \pm 0.00a$	$0.66 \pm 0.00c$	$0.70 \pm 0.01 \mathrm{b}$		
有效磷 Available phosphorus/(mg/kg)	48.83±0.18a	$19.71{\pm}0.00{\rm b}$	$6.68 \pm 0.00c$		
总钾 Total potassium/(g/kg)	$0.21 \pm 0.01 \mathrm{b}$	$0.18 \pm 0.00c$	0.24±0.01a		
有效钾 Available potassium/(mg/kg)	0.13±0.01c	$0.36 \pm 0.03 \mathrm{b}$	0.60 ± 0.04 a		
总氮 Total nitrogen/(g/kg)	11.53 ± 0.36 b	13.11±0.45a	$12.27 \pm 0.26 b$		
微生物 DNA 含量 Microbial DNA content/(ng/µL)	37.77±10.70a	31.40±8.34a	33.53±12.61a		

表 1 土壤理化性质 ble 1 Soil physicochemical properties

表中数据为平均值±标准偏差,不同字母标记的数值表示在5%的显著性水平下有显著性差异;RCMO:轮作,Rotation cropping monoculture; CCMO:连作,Continuous cropping monoculture;ICMI:套作,Intercropping mix-culture

2.2 丹参根部 AMF 真菌的侵染率

本研究未单独分析丹参根际 AMF 的群落变化, 仅测定了其侵染率。从表 2 可以看出, 3 种种植模式下丹 参根部 AMF 真菌的侵染率有明显差异(P<0.05), 其中连作两年的丹参根部 AMF 侵染率最低, 仅为 23.57%, 而轮作丹参的侵染率最高, 达 44.67%。

%
'

Table 2	Mycorrhizal	colonization	of Salvia	miltiorrhiza	Bunge under	three cropping	modes

	种植模式 Cropping modes	
轮作一年 RCMO	连作两年 CCMO	套作两年 ICMI
44.67±7.51a	23.57±1.78b	31.26±0.95b

2.3 丹参根际细菌群落结构变化

2.3.1 细菌群落 Alpha 多样性

3 种种植模式下测序文库的覆盖度均达到 97%以上,说明绝大部分细菌的序列可以被测出,测序结果有较好的代表性。细菌丰富度指数通过 OTU 的个数来计算,可以衡量细菌的物种数,数量均在 5000 条以上,表

明细菌丰富度非常高。轮作条件下,丹参根际细菌群落的香农-威纳指数显著高于连作和套作(P<0.05,表3),其他 Alpha 多样性指数在 3 种种植模式之间均无显著差异,但均呈现轮作>套作>连作的变化趋势。虽然都是种植两年,但套作丹参根际的细菌多样性明显好于连作。

Table 5 Alpha diversity indexes of son bacterial communities						
多样性指标		种植模式 Cropping modes				
Alpha diversity indexes	轮作一年 RCMO	连作两年 CCMO	套作两年 CCMI			
覆盖度 Coverage	$0.97 \pm 0.01a$	$0.97 \pm 0.01 a$	0.97 ± 0.01a			
丰富度(S) Richness	$5969.00 \pm 619.95 a$	$5097.33 \pm 285.48a$	$5252.67 \pm 462.41a$			
香农-威纳指数(H)Shannon-Wiener index	$7.15 \pm 0.08a$	$6.86\pm0.05\mathrm{b}$	$6.84\pm0.13\mathrm{b}$			
均匀度 (E_H) Evenness	$0.82 \pm 0.01a$	0.80 ± 0.01 a	$0.80 \pm 0.02a$			
ACE 指数 ACE index	$7997.49 \pm 499.62a$	$7155.36 \pm 224.15a$	$7252.50 \pm 515.98a$			
Chaol 指数 Chaol index	$7781.30 \pm 543.49a$	$6985.39 \pm 192.17a$	$7104.68 \pm 473.14a$			
辛普生指数 Simpson index	$0.0051 \pm 0.0027a$	$0.0047 \pm 0.009a$	$0.0049 \pm 0.0011a$			

表 3 土壤细菌 Alpha 多样性指标

2.3.2 细菌主要类群及分布

3 种种植模式下,相对丰富度排名前 10 的优势细菌所占比例均达到 94%以上,尽管排序有所差异,但前 10 个优势细菌门在 3 种种植模式中是相同的(图 1),包括 Proteobacteria(变形菌门)、Acidobacteria(酸杆菌 门)、Gemmatimonadetes(芽单胞菌门)、Planctomycetes(浮霉菌门)、Actinobacteria(放线菌门)、Bacteroidetes(拟 杆菌门)、Verrucomicrobia(疣微菌门)、Unclassified(未分类门)、Firmicutes(厚壁菌门)和 Chloroflexi(绿弯菌 门)。芽单胞菌门在轮作模式下占比仅为 5.01%,与连作和套作相比明显下降(P<0.05)。其他细菌门在 3 种种植模式之间无明显差异,但是浮霉菌门和拟杆菌门在连作模式下的相对丰富度均低于其他两种模式。

2.3.3 细菌群落 PCoA 分析

由图 2 可见,3 种种植模式中 3 个重复并不聚类于同一象限,表明组内变异较大,3 种种植模式之间细菌 群落没有发生明显的分化。PCoA 分析结果表明,细菌群落结构的变异受 8 个主坐标成分的控制(累积解释 的总方差达 100%),主坐标成分的特征值均大于 0.769,其中前两个主坐标成分影响最大,分别能够解释 15. 08%和 13.97%的变异,累积解释能力达 29.05%。但是,所有主坐标成分的特征值相差不大,说明本研究中影 响土壤细菌群落结构的主导因子并不明显。

2.4 丹参根际真菌群落结构变化

2.4.1 真菌群落 Alpha 多样性

真菌群落的丰富度均在 600 条以上,数量显著低于细菌。由于数量相对较少,3 种种植模式下测序文库的覆盖度均达到 100%,表明测序结果有较好的代表性。真菌群落的所有 Alpha 多样性指数在 3 种种植模式 之间均无明显差异(P>0.05,表4),但是除了覆盖度和辛普生指数以外,均呈现轮作>套作>连作的变化趋势。

Table 4 Alpha diversity indexes of soil fungi communities					
多样性指标		种植模式 Cropping modes			
Alpha diversity indexes	轮作一年 RCMO	连作两年 CCMO	套作两年 ICMI		
覆盖度 Coverage	$1.00 \pm 0.00a$	1.00±0.00a	1.00±0.00a		
丰富度(S) Richness	$765.00 \pm 124.59a$	603.67±97.90a	725.33±87.67a		
香农-威纳指数(H)Shannon-Wiener index	$4.98 \pm 0.28a$	3.27±1.79a	4.33±0.84a		
均匀度 (E_H) Evenness	$0.75 \pm 0.04a$	0.51±0.27a	0.66±0.12a		
ACE 指数 ACE index	815.19±137.50a	712.22±30.30a	802.70±91.90a		
Chao1 指数 Chao1 index	814.13±122.10a	699.68±61.76a	790.76±87.29a		
辛普生指数 Simpson index	$0.02 \pm 0.02a$	0.26±0.37a	0.07±0.09a		

表 4 土壤真菌 Alpha 多样性指标



图1 3种种植模式下主要细菌类群相对丰度

Fig.1 Relative abundance of the major bacterial phylogenetic groups under three cropping modes

RCMO: 轮作, Rotation cropping monoculture; CCMO: 连作, Continuous cropping monoculture; ICMI: 套作, Intercropping mix-culture

2.4.2 真菌的主要类群及分布

共发现9个真菌门,其中未分类门相对丰富度最高,除此之外其他所有真菌门的相对丰富度在31. 96%—51.48%,说明土壤中已知真菌类群较少,尤其是 连作模式(图3)。已知真菌主要包括Ascomycota(子囊 菌门)、Basidiomycota(担子菌门)、Zygomycota(接合菌 门)、Chytridiomycota(壶菌门)、Neocallimastigomycota (新丽鞭毛菌门)、Glomeromycota(球囊菌门)、Fungi_ Incertae_Sedis(未知菌门)和Blastocladiomycota(芽枝霉 菌门)等。除未分类门以外,子囊菌门在所有种植模式 中的相对丰富度最高,但是套作(15.22%)显著高于连 作(9.31%)。同样,轮作模式下接合菌门和壶菌门的相 对丰富度也显著高于连作模式(P<0.05)。

2.4.3 真菌群落 PCoA 分析

与细菌群落类似,3种种植模式中真菌群落的3个 重复也较分散,种植模式之间没有明显分化。PCoA分 析结果表明,真菌群落组成的变异受8个主坐标成分的





控制,主坐标成分的特征值均大于 0.890,其中前两个主坐标成分影响最大,分别能够解释 14.12% 和 13.63% 的变异,累积解释能力达 27.75%(图 4)。但是,所有主坐标成分的特征值相差不大,说明本研究中影响土壤



生 态

学 报



Fig.3 Relative abundance of the major fungi phylogenetic groups under three cropping modes

真菌群落结构的主导因子并不明显。

2.5 土壤微生物群落网络分析和相互作用关系

网络分析表明,优势细菌门在 3 种种植模式之间变 化不大,只有芽单胞菌门在轮作模式下的丰富度显著低 于连作和套作(P<0.05);而非优势细菌门的变化较大, 尤其是热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria),但其变化 趋势与芽单胞菌门刚好相反(P<0.01)。连作模式下 Ignavibacteriae 门和 Deinococcus-Thermus 门之间存在显 著的负相互作用(P<0.05),而套作和轮作模式下只有 正相互作用,如变形菌门、酸杆菌门和硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)(套作, P<0.05),衣原体门(Chlamydiae) 和蓝藻门(Cyanobacteria/Chloroplast)(轮作, P<0.01)。 但是,未发现细菌门之间的相互作用关系在不同种植模 式下发生明显转变的情况。

套作模式下球囊菌门和子囊菌门的优势度较高,而 轮作模式下新丽鞭毛菌门、壶菌门和接合菌门占优势, 但连作模式下未发现优势真菌门。虽然真菌门数量很 少,它们之间的相互作用却更加复杂。连作模式下球囊





菌门与子囊菌门、未知菌门均有负相互作用,但在轮作模式下球囊菌门与子囊菌门之间转变为正相互作用(P

<0.01);套作模式下未知菌门与接合菌门、新丽鞭毛菌门有负相互作用,但在轮作模式下均转变为正相互作用(P<0.01)。

2.6 土壤细菌群落与环境因子之间的关系

蒙特卡罗置换检验结果显示,第一典范轴 P 值为 0.087(F=0.487),所有典范轴的 P 值为 0.027(F= 1.458),表明该排序模型的解释变量(即土壤环境因子)可以很好地解释响应变量(即土壤细菌群落结构)的 变化,但第一典范轴的影响不显著。丹参根际土壤细菌群落与根际土壤环境因子的冗余分析结果见表 5,其中 RDA 前两个排序轴的特征值分别为 0.328 和 0.133,分别解释了 32.8%和 13.3%的细菌群落变化。本文所 选的 8 个土壤环境因子共解释了 86.2%的总特征值,说明对丹参根际土壤细菌群落有显著影响。

表 5 土壤细菌群洛冗余分析							
	Table 5 Redundancy analysis of bacterial communities						
排序轴 Axes	特征值 Eigen value	物种-环境 相关系数 Species-environment correlation	物种累积 百分比变化率 Cumulative percentage variance of species data	物种-环境累积 百分比变化率 Cumulative percentage variance of species- environment relation	典范特征值总和 Sum of all eigenvalues		
排序轴 1 Axis1	0.328	1.000	32.8	36.0	0.862		
排序轴 2 Axis2	0.133	0.997	46.0	50.6			
排序轴 3 Axis3	0.108	1.000	56.8	62.4			
排序轴 4 Axis4	0.090	1.000	65.8	72.3			

为了研究影响丹参根际细菌群落结构的主导因素, 对 8 个土壤理化因子进行预筛选。结果表明,只有土壤 总钾(TK, P=0.034, F=2.24)对细菌群落的构建有显 著性影响(P<0.05)。RDA 双序图(图 5)显示,TK 对套 作模式下丹参根际细菌群落有正向影响,相反对连作模 式下的细菌群落不利。

2.7 土壤真菌群落与环境因子之间的关系

蒙特卡罗置换检验结果显示,第一典范轴 P 值为 0.332(F=0.961),所有典范轴的 P 值为 0.604(F= 0.979),表明该排序模型的解释变量(即土壤环境因 子)与响应变量(即土壤真菌群落结构)的变化关系不 大。丹参根际土壤真菌群落与土壤环境因子的冗余分 析结果见表 6,其中 RDA 前两个排序轴的特征值分别 为 0.490 和 0.239,分别解释了 49.0%和 23.9%的真菌物 种变化。本文所选的 8 个土壤环境因子共解释了 87. 3%的总特征值,对丹参根际土壤真菌群落有显著影响。

偏冗余分析的结果表明,8个土壤因子中只有有效 钾(AK)和 ORP 对真菌群落的构建有显著性影响(表



图5 3种种植模式下细菌群落和土壤理化因子间的 RDA 双序图 Fig.5 The RDA biplots generated from bacterial communities under three cropping modes and soil physicochemical properties 图中黑线和实心箭头表示显著性因子,黑线和空心箭头表示非显 著性因子; OM: 有机质, Organic matter; TP: 总磷, Total phosphorus; AP: 有效磷, Available phosphorus; TN: 总氮, Total nitrogen; TK: 总钾, Total potassium; AK: 有效钾, Available potassium; ORP: 氧化还原电位, Oxidation reduction potential

7, P<0.05),分别可以解释 19.7%和 4.40%的真菌群落变化。从双序图中可以看出,影响真菌群落结构的关键土壤因子在不同种植模式下有明显差异,套作丹参根际真菌群落主要受 AK 影响,而轮作和连作主要受 ORP 影响(图 6)。

Table 6 Redundancy analysis of fungi communities					
排序轴 Axes	特征值 Eigen value	物种-环境 相关系数 Species-environment correlation	物种累积 百分比变化率 Cumulative percentage variance of species data	物种-环境累积 百分比变化率 Cumulative percentage variance of species- environment relation	典范特征值总和 Sum of all eigenvalues
排序轴 1 Axis1	0.490	0.993	49.0	56.2	0.873
排序轴 2 Axis2	0.239	0.909	72.9	83.5	
排序轴 3 Axis3	0.084	0.991	81.3	93.2	
排序轴 4 Axis4	0.023	0.836	83.6	95.8	

表 6 土壤真菌群落冗余分析结果

表 7	土壤环	竟因子	偏冗余分	・析(pRD	As)
-----	-----	-----	------	--------	-----

Table 7 Partial RDAs testing the influence of the significant parameters on the composition of fungi community

模型参数 Parameters included in the model	特征值 Eigen value	解释能力/% Variation explains solely	F值	<i>P</i> 值
有效钾 Available potassium (AK)	0.197	19.7%	2.295	0.042
氧化还原电位 Oxidation reduction potential, ORP	0.044	4.40%	0.518	0.046
所有参数 All parameters	0.485	48.5%	2.823	0.028

3 讨论

根际土壤微生物对植物的生长繁殖、营养物质的吸收运输和残体分解等方面具有重要影响,它们与植物之间存在着十分紧密的相互作用,也是环境土壤学研究的 热点问题之一。植物在连作后其根系分泌物、残根和凋 落物的质与量会发生显著变化,从而对根际土壤微生物 产生明显的影响^[23-24]。

3.1 不同种植模式下丹参根际微生物群落的变化

本研究利用高通量测序法对丹参根际土壤中的微 生物群落进行了测序和分析。从种植时间上来看,细菌 的丰富度、香农-威纳指数、ACE 指数、Chao1 指数和 Simpson 指数随丹参种植年限增加而降低,其中香农-威



图 6 3 种种植模式下真菌群落和土壤理化因子间的 RDA 双序图 Fig.6 The RDA biplots generated from fungi communities under three cropping modes and soil physicochemical properties

纳指数显著降低。但是,真菌的 Alpha 多样性指数均无显著变化,变化规律与细菌相似。真菌 Simpson 指数 虽然随种植年限增加呈上升趋势,但变异主要来自组内。从种植模式而言,套作在一定程度上能够提高土壤 微生物群落多样性,因为大多数 Alpha 多样性指标都高于连作。由于亳州地区丹参连作障碍非常严重,因此 很少连作两年以上,这可能是多数微生物群落多样性指标没有发生显著变化的原因之一。相比而言,新疆的 棉花连作时间可长达 30 年,根际细菌群落多样性的变化要明显的多^[23]。除连作时间的影响以外,土壤性质 和丹参品种也可能导致土壤微生物群落多样性的变化有所差异。Tang 等发现,四川中江县的丹参连作 1—3 年,其根际真菌群落的丰富度和香农-威纳指数与未耕作地相比均显著降低^[8]。

从根际微生物聚类分析的结果来看,无论细菌还是真菌群落在3种种植模式之间均没有发生显著分化。 但是,出现这种现象可能与各种种植模式组内差异较大有关,微生物群落组成的细微差别,以及由此造成的根 际微生物与丹参相互作用关系的变化仍然值得关注。由于微生物,尤其是细菌的种类较多,本研究从门这一 较高的分类单元进行了统计和分析。芽单胞菌门在轮作模式下的相对丰富度显著低于连作和套作,表明该门 的细菌对连作环境的耐受性较强,有可能成为连作模式下的优势菌。与此相反,轮作和套作时浮霉菌门和拟 杆菌门的相对丰富度则高于连作,说明这两个门的细菌对连作环境较为敏感,保持根际微环境的多样性对它 们有利。真菌的数量远小于细菌,套作模式下占优势的子囊菌门的相对丰富度显著高于连作。与此类似,轮 作模式下接合菌门和壶菌门的相对丰富度也显著高于连作模式。

AMF 是一种普遍存在的专性内共生真菌,可以通过侵染植物根系和植物形成共生体系。AMF 需要依靠 宿主获得 C 源,同时能够增强植物获取 P 等矿质营养的能力,从而实现互利共生。被 AMF 真菌侵染可以提 高植物的抗逆性、抗病虫害等能力,促进植物的生长,提高作物的质量和产量^[25]。研究发现,AMF 不仅可以 改善连作丹参的生长,而且能够增加丹酚酸 B、丹参酮的产量和对铁、锰等微量元素的积累^[13, 26]。本研究表 明,随着种植年限的增加,无论是连作还是套作,AMF 真菌对丹参根部的侵染率均显著下降。另外,与套作相 比,连作丹参的 AMF 真菌侵染率降低,但未达到显著水平。

3.2 丹参根际微生物群落变化的原因及与连作障碍的关系

大量研究结果表明,陆地生态系统中地上的植物多样性,以及土地利用方式或耕作方式的变化是驱动地 下微生物群落多样性、代谢类型多样性变化的重要因素^[18, 23, 27-28]。丹参连作会导致土壤酸化,团聚体结构破 坏,土壤营养失衡等现象^[6]。本研究结果表明,轮作和套作不仅提高了土壤 pH,降低了 ORP,改善了部分土 壤矿质营养,而且能够在一定程度上影响丹参根际的微生物群落组成,从而可能对缓解连作障碍起到积极作 用。微生物群落结构受 8 个主坐标成分的影响,但前两个主坐标成分的综合解释能力均小于 30%,表明没有 显著的主导因子。本研究将 8 个土壤环境因子通过冗余分析投影成 4 个典范轴。结果表明,土壤性质的变化 对细菌群落的影响较大,但对真菌群落的影响不明显。因此,真菌群落变化的主导因素并非土壤理化性质。 研究表明,植物根际分泌物可以直接或间接影响微生物群落^[8, 23-24],但由于丹参根际分泌物组成复杂本研究 未将此因子纳入冗余分析。总钾和有效钾可以提高套作模式下细菌和真菌群落的多样性,说明丹参和白芍套 作形成的根际微环境更适合喜钾微生物的生长。而轮作和连作模式下的真菌群落与此刚好相反,它们更适应 低钾和高 ORP 的环境。

研究表明,在低 P 环境下 AMF 对宿主的侵染率较高^[29-30]。但本研究发现,连作条件下丹参根际土壤的 总磷和有效磷均低于轮作。因此,土壤营养条件的变化可能不是导致 AMF 侵染率下降的主要原因。由于丹 参是根类药材,根际分泌物将随着种植时间的增加在土壤中发生积累,并引起土壤微生物群落结构的显著变 化^[8, 23-24],这可能是导致 AMF 侵染率下降的潜在原因之一,但具体机制还要进一步的研究来证实。AMF 侵 染率的下降可能会造成连作丹参的品质和产量降低^[13, 26],抗病能力下降,进一步加剧连作障碍。镰刀菌属 (*Fusarium genus*)是丹参枯萎病和根腐病的主要病原菌。虽然该属在真菌中的相对丰富度很低(0.01%),但 间作和套作两种模式下均未发现该菌,仅在连作模式下有检出。另外,有研究发现枯草杆菌属(*Bacillus* genus)和 AMF 可以有效控制枯萎病的发生^[31-32],属有益菌。但本研究发现,连作模式下枯草杆菌属的相对丰 富度(0.18%)低于套作(0.22%)和轮作(0.26%),AMF 的侵染率也同样显著下降。微生物组成和功能群的变 化会影响根际有机质的代谢和循环,改变根际微环境,以及微生物与植物之间的关系,这也可能是导致连作障 碍的重要原因之一^[33]。此外,本研究表明,不同的丹参种植模式下微生物之间的相互关系有明显差异。细菌 在轮作和套作模式下均表现为正相互作用,但在连作模式下存在负相互作用,而轮作甚至还会造成真菌之间 的相互关系发生逆转。这种现象与丹参连作障碍是否有关值得进一步深入研究

本研究的结果仅基于一次性取样,只能表征一个时间断面上的变化。未来应开展不同种植模式下丹参根 际微生态环境的动态监测,这对于揭示连作障碍发生机理和探索应对策略具有重要意义。

参考文献(References):

- [1] Chen W, Chen G X. Danshen (Salvia miltiorrhiza Bunge): a prospective healing sage for cardiovascular diseases. Current Pharmaceutical Design, 2017, 23(34): 5125-5135.
- [2] Kong W J, Zhang S S, Zhao Y L, Wu M Q, Chen P, Wu X R, Ma X P, Guo W Y, Yang M H. Combination of chemical fingerprint and bioactivity evaluation to explore the antibacterial components of Salvia miltiorrhizae. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8112-8112.
- [3] Zhou X L, Chan S W, Tseng H L, Deng Y, Hoi P M, Choi P S, Or P M Y, Yang J M, Lam F F Y, Lee S M Y, Leung G P H, Kong S K, Ho

H P, Kwan Y W, Yeung J H K. Danshensu is the major marker for the antioxidant and vasorelaxation effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) water-extracts produced by different heat water-extractions. Phytomedicine, 2012, 19(14): 1263-1269.

- [4] Yang C Y, Hsieh C C, Lin C K, Lin C S, Peng B, Lin G J, Sytwu H K, Chang W L, Chen Y W. Danshen extract circumvents drug resistance and represses cell growth in human oral cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17: 555-555.
- [5] Stumpf C, Fan Q, Hintermann C, Raaz D, KurfürstI, Losert S, Pflederer W, Achenbach S, Daniel W G, Garlichs C D.Anti-inflammatory effects of Danshen on human vascular endothelial cells in culture. The American Journal of Chinese Medicine, 2013, 41(5): 1065-1077.
- [6] 张辰露,孙群,叶青. 连作对丹参生长的障碍效应. 西北植物学报, 2005, 25(5): 1029-1034.
- [7] Liu H Y, Wan P, Mu M, Liu Q, Zhang Y Q, Zhang Z Y. Autotoxins screening from aqueous extracts of Salvia miltiorrhiza Bge. Based on spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and autotoxicity. Pakistan Journal of Botany, 2016, 48(4): 1467-1471.
- [8] Tang J, Xue Z Q, Daroch M, Ma J. Impact of continuous Salvia miltiorrhiza cropping on rhizosphere actinomycetes and fungi communities. Annals of Microbiology, 2015, 65(3): 1267-1275.
- [9] 段佳丽, 舒志明, 魏良柱, 付亮亮, 薛泉宏. 丹参红叶病发生的微生态机制. 应用生态学报, 2013, 24(7): 1991-1999.
- [10] Wu Z X, Hao Z P, Sun Y Q, Guo L P, Huang L Q, Zeng Y, Wang Y, Yang L, Chen B D. Comparison on the structure and function of the rhizosphere microbial community between healthy and root-rot *Panax notoginseng*. Applied Soil Ecology, 2016, 107: 99-107.
- [11] Zhao J, Zhou X, Jiang A Q, Fan J Z, Lan T, Zhang J B, Cai Z C. Distinct impacts of reductive soil disinfestation and chemical soil disinfestation on soil fungal communities and memberships. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(17): 7623-7634.
- [12] Zhao J L, Zhou L G, Wu J Y. Promotion of Salvia milliorrhiza hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide-protein fractions of plant growth-promoting rhizobacterium Bacillus cereus. Process Biochemistry, 2010, 45(9): 1517-1522.
- [13] Chen M L, Yang G, Liu D H, Li M H, Qiu H Y, Guo L P, Huang L Q, Chao Z. Inoculation with Glomus mosseae improves the growth and Salvianolic acid B accumulation of continuously cropped Salvia miltiorrhiza. Applied Sciences, 2017, 7(7): 692-692.
- [14] Zhai X, Luo D, Li X Q, Han T, Jia M, Kong Z Y, Ji J C, Rahman K, Qin L P, Zheng C J. Endophyte *Chaetomium globosum* D38 promotes bioactive constituents accumulation and root production in *Salvia miltiorrhiza*. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2694-2964.
- [15] 沈仁芳,赵学强.土壤微生物在植物获得养分中的作用.生态学报,2015,35(20):6584-6591.
- [16] Wang D D, Zhang W X, Wang T T, Li N, Mu H B, Zhang J W, Duan J Y. Unveiling the mode of action of two antibacterial tanshinone derivatives. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(8): 17668-17681.
- [17] 陈章,王强锋,杨红,郎伯涛,杨季声,李洁,刘燕,张俊,陈翠平,陈强.四川中江丹参根际和非根际土壤真菌种群多样性 PCR-DGGE 分析.西南农业学报,2014,27(5):2040-2044.
- [18] Xia Z C, Kong C H, Chen L C, Wang P, Wang S L. A broadleaf species enhances an autotoxic conifers growth through belowground chemical interactions. Ecology, 2016, 97(9): 2283-2292.
- [19] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版). 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [20] Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 1980, 84 (3): 489-500.
- [21] 邵宗圆, 王悦, 张菊, 杨程, 周刚, 杨如意. 耐铜植物茵陈蒿根际细菌群落结构及影响因素. 生态学报, 2017, 37(22): 7679-7688.
- [22] Lepš J, Šmilauer P. Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO. New York: Cambridge University Press, 2003: 43-75.
- [23] Wei Z, Yu D. Analysis of the succession of structure of the bacteria community in soil from long-term continuous cotton cropping in Xinjiang using high-throughput sequencing. Archives of Microbiology, 2018, 200(4): 653-662.
- [24] Huang Y, Xiao X, Huang H Y, Jing J Q, Zhao H J, Wang L, Long X E. Contrasting beneficial and pathogenic microbial communities across consecutive cropping fields of greenhouse strawberry. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(13): 5717-5729.
- [25] van der Heijden M G A, Klironomos J N, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders I R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, 1998, 396(6706):69-72.
- [26] Yang Y, Ou X H, Yang G, Xia Y S, Chen M L, Guo L P, Liu D H. Arbuscular mycorrhizal fungi regulate the growth and phyto-active compound of Salvia milliorrhiza seedlings. Applied Sciences, 2017, 7(1): 68-68.
- [27] He X Y, Wang K L, Zhang W, Chen Z H, Zhu Y G, Chen H S. Positive correlation between soil bacterial metabolic and plant species diversity and bacterial and fungal diversity in a vegetation succession on Karst. Plant and Soil, 2008, 307(1/2): 123-134.
- [28] Zhou X G, Gao D M, Liu J, Qiao P L, Zhou X L, Lu H B, Wu X, Liu D, Jin X, Wu F Z. Changes in rhizosphere soil microbial communities in a continuously monocropped cucumber (*Cucumissativus* L.) system. European Journal of Soil Biology, 2014, 60: 1-8.
- [29] Yoneyama K, Xie X N, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. Planta, 2007, 227(1): 125-132.
- [30] 徐丽娇,姜雪莲,郝志鹏,李涛,吴照祥,陈保冬.丛枝菌根通过调节碳磷代谢相关基因的表达增强植物对低磷胁迫的适应性.植物生态 学报,2017,41(8):815-825.
- [31] Ren L X, Lou Y S, Sakamoto K, Inubushi K, Amemiya Y, Shen Q R, Xu G H. Effects of arbuscular mycorrhizal colonization on microbial community in rhizosphere soil and *Fusarium* wilt disease in Tomato. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2010, 41 (11): 1399-1410.
- [32] Moradi H, Bahramnejad B, Amini J, Siosemardeh A, Haji-Allahverdipoor K. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Fusarium Wilt by *Bacillus subtillis* and *Trichoderma harzianum*. Plant Omics Journal, 2012, 5(2): 68-74.
- [33] Bainard L D, Koch A M, Gordon A M, Klironomos J N. Growth response of crops to soil microbial communities from conventional monocropping and tree-based intercropping systems. Plant and Soil, 2013, 363(1/2): 345-356.