

DOI: 10.5846/stxb201902250348

周柳婷, 李建鹃, 赵艳琳, 罗扬, 白莹, 陈军, 吴则焰, 林文雄. 基于高通量测序的连栽木麻黄根际土壤细菌群落变化研究. 生态学报, 2020, 40(8):

Zhou L T, Li J J, Zhao Y L, Luo Y, Bai Y, Chen J, Wu Z Y, Lin W X. Variation of bacterial communities in the rhizosphere soils of successive rotations *Casuarina equisetifolia* plantations based on high-throughput sequencing analysis. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(8):

基于高通量测序的连栽木麻黄根际土壤细菌群落变化研究

周柳婷¹, 李建鹃², 刘书影¹, 罗 扬¹, 白 莹¹, 陈 军¹, 吴则焰^{1,3,4,*}, 林文雄¹

1 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

2 福建农林大学林学院, 福州 350002

3 作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室, 福州 350002

4 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福州 350002

摘要:选取 3 个不同连栽代数(第一代 First rotation plantation, FCP; 第二代 Second rotation plantation, SCP; 第三代 Third rotation plantation, TCP)木麻黄林地根际土壤为研究对象,通过 IonS5™ XL 二代测序系统,从根际土壤微生物角度探究木麻黄连栽障碍形成机制。结果显示:从 3 个不同连栽代数木麻黄根际土壤中总共得到 338560 条有效序列,将其注释为 17627 个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)。α 多样性指数表明,木麻黄根际土壤细菌群落的 Simpson、Chao1、ACE 指数随着连栽代数增加而下降,Observed species、Shannon 指数呈现先增加后减少的趋势。β 多样性指数表明,根际土壤中 FCP 与 SCP 之间的细菌群落多样性差异相对较大。UPGMA 聚类分析结果阐明,木麻黄根际土壤 FCP 与 SCP、TCP 存在较大差异。优势细菌在属水平的热图分析结果表明,不同连栽代数木麻黄根际土壤细菌群落结构存在一定差异。随着木麻黄连栽代数增加,根际土壤中慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的相对丰度呈上升趋势;与之相反,热酸菌属(*Acidothermus*)、根微菌属(*Rhizomicrobium*)、酸杆菌属(*Acidibacter*)、布氏杆菌属(*Bryobacter*)随连栽代数增加而下降;其中,与营养循环相关的有益菌属 *Rhizomicrobium* 的相对丰度随连栽代数增加而降低约 311.49%、282.16%,而酸杆菌属(*Acidibacter*)的相对丰度随之降低约 176.07%、284.54%。因此,木麻黄连栽障碍问题可能是由于根际土壤微生物群落结构失衡导致的,从而降低了森林的生态效益,使平均木生物量、林分生物量及林分净生产力下降。研究结果对揭示木麻黄连栽障碍形成的原因具有一定参考价值。

关键词:木麻黄;连栽障碍;高通量测序;细菌群落

Variation of bacterial communities in the rhizosphere soils of successive rotations *Casuarina equisetifolia* plantations based on high-throughput sequencing analysis

ZHOU Liuting¹, LI Jianjuan², ZHAO Yanlin¹, LUO Yang¹, BAI Ying¹, CHEN Jun¹, WU Zeyan^{1,3,4,*}, LIN Wenxiong¹

1 Life Sciences College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2 Forestry College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3 Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

4 Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Based on the IonS5™ XL next-generation sequencing system, the rhizosphere soils sampled from three different

基金项目:国家自然科学基金(31500443);福建省自然科学基金(2018J01617);福建农林大学杰青项目(XJQ201718)

收稿日期:2019-02-25; **网络出版日期:**2019-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wuzeyan0977@126.com

plantations (including FCP, SCP, TCP) were used to explore the causes and mechanisms during successive rotations of *Casuarina equisetifolia* plantations. The results indicated that a total of 338,560 effective bacterial 16S rRNA gene (V4) sequences were obtained from 3 rhizosphere soil samples, which were assigned to 17,627 OTUs. Alpha diversity indices (Simpson, Chao1 and ACE) revealed that the bacterial communities in the rhizosphere soils decreased with the aggravation of successive rotations. The observed species and Shannon indices increased first and decreased afterwards. Beta diversity indices showed that the bacterial community of FCP was significantly different from that of SCP. UPGMA cluster analysis displayed that there were significant differences between FCP, SCP and TCP. Based on the heat map analysis of the dominant bacteria at the genus level, there were some differences among the structure of the bacterial communities under the successive rotations of *C. equisetifolia*. The relative abundance of *Bradyrhizobium* in rhizosphere soil increased with the increase of successive rotations. In contrast, *Acidothermus*, *Rhizomicrobium*, *Acidibacter*, and *Bryobacter* decreased with the increasing years of successive rotations. Among them, the relative abundance of *Rhizomicrobium*, which was related to nutrient cycling, decreased by 311.49% and 282.16%, and the *Acidibacter* decreased by 176.07% and 284.54%. We concluded that the consecutive monoculture problem of *C. equisetifolia* might be caused by the imbalance of the microbial community structure in the rhizosphere soil, thereby reducing the forest ecological benefits, and decreasing the biomass and net productivity. The results have certain significance to illustrate the reasons of consecutive monoculture problem of *C. equisetifolia*.

Key Words: *Casuarina equisetifolia*; consecutive monoculture problem; high-throughput sequencing; bacterial community

木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* Forst.) 是木麻黄属常绿乔木, 20 世纪 50 年代作为庭院绿化树种引入我国^[1-2], 因其良好的适应性及抗风、耐贫瘠、耐盐碱等生理特点, 在维持海岸带生态系统稳定、缓解沿海沙地盐碱危害、防潮汐侵蚀等方面都起到极其重要的作用^[3]。目前滨海沙地的适生树种较少, 木麻黄作为重要的防护林树种, 长期受到严重的连栽障碍问题困扰^[4], 具体表现为木麻黄平均木生物量、林分生物量及林分净生产力均呈现逐代下降趋势, 植株生长缓慢, 病虫害严重, 造成产量、品质下降^[5-6]。如何缓解或消减木麻黄连栽障碍, 成为国内外同行研究的前沿热点。

前人研究认为, 植物连栽障碍是地力衰退^[7]、化感物质自毒作用^[8-9]、土壤微生态环境失衡等诸多方面综合作用的结果。在地力衰退研究方面, 有学者指出长期连栽条件下植物对土壤矿质营养元素的片面吸收, 使连栽土壤养分不均衡, 进而导致林分生产力下降、森林防护效益降低。更有甚者试图通过增施肥料的措施来缓解连栽障碍但收效甚微, 反而加剧了环境污染^[10]。在化感物质自毒作用研究方面, 李键^[11]、邓兰桂^[12]等人从木麻黄小枝提取物中分离鉴定出了黄酮类、鞣花酸类化感物质, 认为自毒作用是引起木麻黄连栽障碍的原因。随着研究的深入, 国内外同行逐渐认识到化感物质释放到土壤后势必受到微生物的加工、分解、转化等^[10, 13], 其存在只是诱因而不是导致植物连栽障碍形成的直接因素^[14], 因此土壤微生态成为连栽障碍研究的关注焦点。深入研究“植物-土壤-微生物”三者在根际的互作过程, 对于探索土壤微生物与植物生长发育之间的相互调控关系、揭示植物连栽障碍机制至关重要^[15]。例如: Zhao 等^[16]研究表明, 桉树多代连栽后根际土壤中真菌多样性增加; Wu 等^[17]发现连栽杉木使根际土壤中真菌/细菌比例显著增加, 且微生物群落多样性和代谢活性显著降低, 从而打破了土壤微生态平衡; 叶功富等^[18]研究发现, 连栽木麻黄林地中细菌、放线菌、固氮菌与纤维素分解菌数量分别比一代林地减少 22.46%、12.25%、32.66% 和 29.61%, 真菌数量增加 22.39%, 微生物总量减少 21.07%。目前, 虽然已有少量关于连栽木麻黄土壤微生物数量变化的研究, 但由于传统微生物培养方法的局限性, 未能充分揭示连栽条件下土壤微生物群落结构及多样性的变化规律^[19]。本研究利用空间代替时间的方法, 采用高通量测序技术扩增细菌的 16S rRNA 基因高变区, 并对物种进行注释及相对丰度分析, 探索连栽木麻黄根际土壤细菌群落变化规律, 为揭示木麻黄连栽障碍机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验样地选址于福建惠安赤湖国有防护林场(118°55'E, 24°35'N), 该林场占地面积约 433 hm², 地处中国南亚热带气候区。该地区夏季多台风和暴雨, 秋冬季盛行东北风。年均温 19.8℃, 极端低温 1℃, 极端高温 35℃, 年降雨量 1029 mm, 年蒸发量 2000 mm^[20]。该林场栽植有 3 个不同代数的木麻黄人工林, 其中第一代木麻黄林(First rotation plantation, FCP)栽植于 1987 年, 第二代(Second rotation plantation, SCP)栽植于 2011 年, 第三代(Third rotation plantation, TCP)栽植于 2014 年。不同样地的伴生树种和林下植被基本一致, 伴生树种均为少量的台湾栎树(*Koelreuteria elegans*)和潺槁木姜子(*Litsea glutinosa* (Lour.) C. B. Rob.), 林下植被均为霍香蓟(*Ageratum conyzoides* L.)和鬼针草(*Bidens pilosa* L.)。土壤质地均为风积黄砂土。

1.2 土壤样品的采集

2018 年 7 月, 于福建惠安赤湖境内的国有防护林场内设置样地: 在 FCP、SCP 和 TCP 设立 3 个林地概况相近的 20 m×20 m 实验样地, 每个样地设 3 个重复样方, 共 9 个样方。采集木麻黄根际土壤方法参考王圳等^[21]的“抖落法”: 沿“S”形路径在每个样方内选择 20 株平均胸径、树高相近的木麻黄, 去除其落叶层后逐层挖去上层覆土, 剪下细根分枝并轻轻抖动, 仍粘在细根上的即为根际土壤, 用小毛刷收集至自封袋中保存备用。将每个样方内取得的 20 份根际土壤混匀为 1 份土样, 共获得 9 份土壤样品。土样通过 2 mm 筛选后其中一部分保存于-80℃冰箱, 另一部分土样 4℃冰箱保存用于测定土壤中微生物多样性。

1.3 根际土壤 DNA 提取及 PCR 扩增

利用试剂盒 BioFast Soil Genomic DNA Extraction Kit(BioFlux 公司, 中国)提取木麻黄根际土壤微生物基因组总 DNA。DNA 浓度通过 Nanodrop 进行测定, 并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。再将基因组总 DNA 用无菌水稀释至 1 ng/μL。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 采用 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶(New England Biolabs 公司, 美国)对细菌 16S rRNA 基因的 V4 区域进行扩增。扩增引物为 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[22]。采用 50 μL PCR 扩增体系, 反应程序为: 98℃ 预变性 1 min; 30 个循环包括(98℃, 10 sec; 50℃, 30 sec; 72℃, 30 sec); 72℃, 5 min。扩增后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的质量。将 PCR 产物送至北京诺禾至源科技有限公司进行高通量测序。

1.4 数据分析

测序所得的原始数据经 Fast QC 软件进行质控后, 利用 Cutadapt (V1.9.1) 软件去除短序列(<200 bp)及低质量序列($q < 25$)^[23]。通过 Mothur 方法与 SILVA 数据库对 97% 相似度的有效序列分配操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)^[24]。依据物种分类信息绘制物种分类条形图和物种丰度热图^[25]。再通过 QI-IME 软件计算样品的覆盖度和多样性指标^[26-28]。运用 PICRUST 软件对菌群的功能和代谢途径进行预测分析^[29]。

2 结果与分析

2.1 连栽木麻黄根际土壤细菌群落 OTU 组成及结构

通过 IonS5™ XL 测序平台, 从 3 个林地概况相近的不同连栽代数木麻黄根际土壤中总共得到 338560 条有效序列, 平均每个样品的有效序列为 37618 条。以 97% 的序列相似性阈值将有效序列聚类为 17627 个 OTU。其中 FCP 均值为 1905 个 OTU, SCP 均值为 2046 个 OTU, TCP 均值为 1924 个 OTU。平均而言, 约 98.6% 的有效序列可聚类为门级, 但仅有 38.68% 以上的有效序列可聚类为属级。稀释曲线可直接反映所抽取的优化序列深度是否合理, 并间接反映样品中的物种丰富度^[30]。由图 1 可知, 抽取的序列条数达到 25000 条以上, 曲线趋于平坦, 表明不同处理土壤所测的序列库容都能够较好地反映细菌群落种类数量, 测序数据量基

本合理。

Venn 图可以直观地体现不同代数木麻黄根际土壤细菌群落 OTU 组成的差异性 & 重叠情况(图 2)。维恩分析结果表明,在 OTU 水平上,FCP 中特异性细菌 OTU 占总 OTU 序列数的 9.86%(341),SCP 中特异性细菌 OTU 占 14.68%(508),TCP 中特异性细菌 OTU 占 9.62%(333)。此外,FCP 与 SCP 共有的 OTU 数量为 292(8.44%),SCP 与 TCP 共有的 OTU 数量为 345(9.97%),FCP 与 TCP 共有的 OTU 数量为 177(5.12%)。FCP、SCP、TCP 根际土壤中共有的细菌 OTU 数量为 1464(42.31%)。

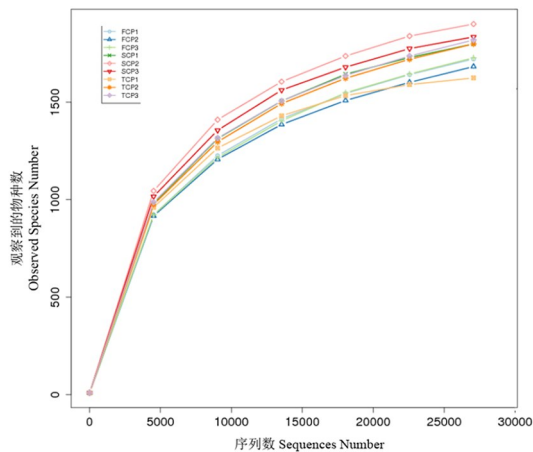


图 1 木麻黄根际土壤样本微生物群落的稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of microbial communities in rhizosphere soils samples of *C. equisetifolia*

FCP:第一代 First rotation plantation;SCP:第二代 Second rotation plantation;TCP:第三代 Third rotation plantation

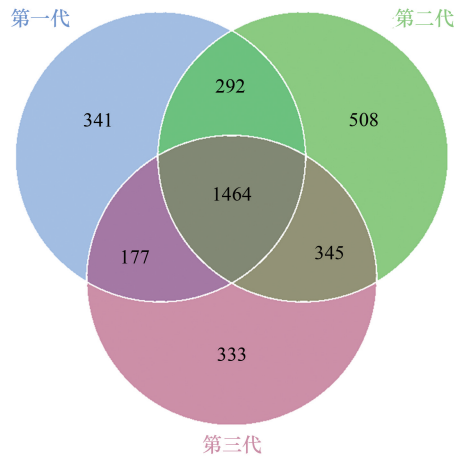


图 2 基于 OTU 丰度的不同代数木麻黄根际土壤细菌群落维恩图

Fig.2 Venn diagram of bacterial communities in rhizosphere soil of different rotations of *C. equisetifolia* based on OTUs abundance

2.2 连栽木麻黄根际土壤细菌群落结构

2.2.1 连栽木麻黄根际土壤细菌群落多样性分析

通过土壤样品中细菌群落多样性分析指数,对连栽木麻黄根际土壤细菌群落物种丰富度和均匀度进行评估(cutoff=27075)。由表 1 可知,随着连栽代数增加,Chao1 指数、ACE 指数均逐代下降,而 Observed species、Shannon 指数则呈现先上升后降低的趋势,但差异均不显著($P>0.05$),Simpson 指数几乎没有发生变化。Shannon 指数分析显示,木麻黄根际土壤 SCP(8.874)中细菌多样性相对较高,FCP(8.780)最低。从 Chao1 指数分析来看,FCP 物种丰富度最高(2086.012),SCP 次之(2005.244),TCP 最低(2002.447)。

表 1 连栽木麻黄根际土壤细菌群落丰富度和多样性指数

Table 1 Richness and diversity indices of bacterial communities in rhizosphere soils of continuous rotations of <i>C. equisetifolia</i>					
	观察到的物种 Observed species	香农指数 Shannonindex	辛普森指数 Simpsonindex	Chao1 指数 Chao1index	ACE 指数 ACEindex
第一代 First rotation plantation (FCP)	1710±24a	8.780±0.037a	0.994±0.000a	2086.012±17.612a	2067.843±47.749a
第二代 Second rotation plantation (SCP)	1844±51a	8.874±0.106a	0.993±0.000ab	2005.244±50.941a	2040.062±44.004a
第三代 Third rotation plantation (TCP)	1746±106a	8.800±0.017a	0.993±0.000b	2002.447±300.693a	1976.025±247.083a

每列不同字母表示差异达显著水平 ($P\leq0.05, n=3$)

通过 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离来比较两个样品间物种多样性的相异程度。FCP

和 SCP 之间的 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离分别为 0.181 和 0.416, FCP 和 TCP 之间分别为 0.174 和 0.405, SCP 和 TCP 之间分别为 0.123 和 0.391。

2.2.2 连栽木麻黄根际土壤细菌群落 PCoA 分析与 UPGMA 聚类分析

基于 OTU 的木麻黄根际土壤细菌群落主坐标分析 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA) 结果见图 4, 主成分 1 (PC1) 与主成分 2 (PC2) 分别解释变量方差的 30.32%、22.93%, 两者累计贡献率达 53.25%。PC1 将 FCP 中的细菌群落与 SCP、TCP 明显区分开, PC2 将 SCP 中的细菌群落与 FCP、TCP 明显区分开。UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean) 聚类分析结果见图 5, SCP 和 TCP 的细菌群落结构聚集为一个群体, 再与 FCP 聚集在一起形成系统发生树, 说明 FCP 与 SCP、TCP 二者存在较大差异。

2.2.3 连栽木麻黄根际土壤细菌群落组成及结构变化

在木麻黄根际土壤细菌群落中共检测到 10 个门, 优势类群依次是变形菌门 (*Proteobacteria*) (30.27%—34.42%)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*) (28.10%—32.21%)、放线菌门 (*Actinobacteria*) (14.86%—18.84%)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) (3.79%—8.09%) (图 6)。由表 2 可知, 在属水平上, 热酸菌属 (*Acidothermus*)、*Candidatus Solibacter*、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、根微菌属 (*Rhizomicrobium*)、酸杆菌属 (*Acidibacter*)、变杆菌属 (*Variibacter*)、布氏杆菌属 (*Bryobacter*) 是根际土壤细菌群落的优势属 (丰度 > 1%), 其中 FCP 中最高丰度属是热酸菌属 (*Acidothermus*), 而 SCP、TCP 根际土壤中 *Candidatus Solibacter* 相对丰度最高。随着木麻黄连栽代数增加, 根际土壤中热酸菌属 (*Acidothermus*)、根微菌属 (*Rhizomicrobium*)、酸杆菌属 (*Acidibacter*)、布氏杆菌属 (*Bryobacter*) 的相对丰度大体呈下降趋势, 其中酸杆菌属 (*Acidibacter*) 的相对丰度在 FCP、SCP、TCP 之间的

下降趋势达显著水平 ($P < 0.05$)。与之相反, 慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 的相对丰度随连栽代数的增加而增加。此外, 从木麻黄根际土壤中前 35 个优势细菌在属水平的群落热图分析也可以看出, 木麻黄连栽后土壤细菌群落组成结构发生了显著变化 (图 7)。

3 结论与讨论

植物根系与根际微生物形成的植物-微生物群落综合体, 是“植物-土壤-微生物”三者进行根际互作过程的重要场所^[31]。根际微生物是土壤生态系统能量流动、物质循环和信息传递最主要的驱动者, 对维持土壤生产力至关重要^[32]。本研究通过高通量测序技术对连栽木麻黄根际土壤细菌群落变化进行探究。结果表明连

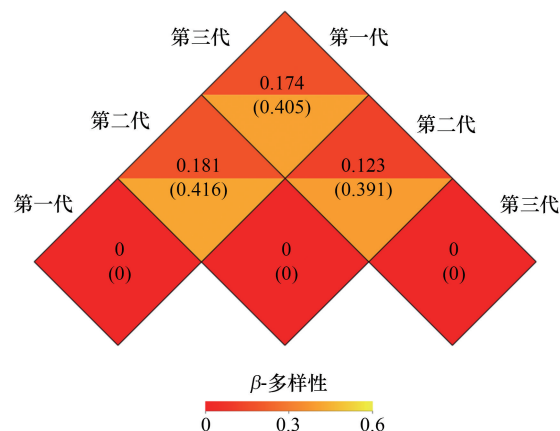


图 3 不同代数木麻黄根际土壤样本间的 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 距离

Fig. 3 Weighted and unweighted Unifrac distances between rhizosphere soils samples of different rotations of *C. equisetifolia*

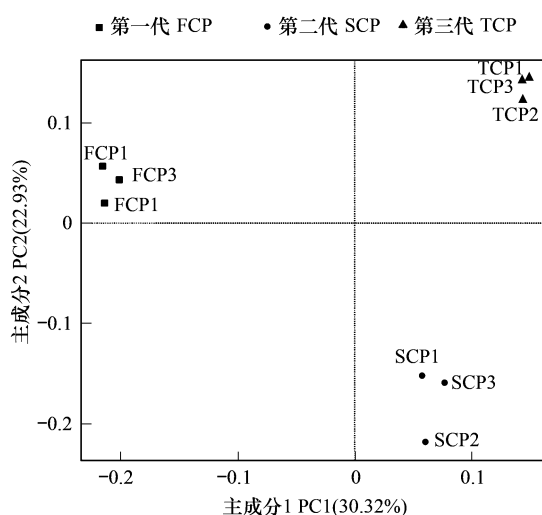
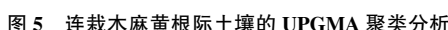


图 4 连栽木麻黄根际土壤细菌群落 PcoA 分析

Fig. 4 PcoA analysis of bacterial communities from rhizosphere soils of continuous rotations of *C. equisetifolia*



栽后根际土壤细菌群落的组成与结构发生了显著变化。由多样性分析可知,木麻黄根际土壤细菌群落的 Simpson、Chao1、ACE 指数随着连栽代数的增加而下降, Observed species、Shannon 指数呈现先增加后减少的趋势,变化趋势不一致的原因可能是由于土壤理化性质不完全一致、林龄差异、森林凋落物等因素导致。这与韩亚飞^[33]研究杨树土壤细菌群落多样性所提出的观点相似,但与李延茂等^[34]通过 DGGE 分析法研究杉木根际土壤细菌群落的结果不一致。推测可能是由于技术方法不同、树种差异、地域差别、土壤异质性等因素造成研究结果不一致。

Stacked bar chart showing the relative abundance of bacterial phyla across three groups: 第一代 (First Generation), 第二代 (Second Generation), and 第三代 (Third Generation). The y-axis represents '相对丰度 Relative abundance' from 0 to 1.00. The legend includes: 其他 (Other), 厚壁菌门 (Firmicutes), 放线菌门 (Actinobacteria), 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 浮霉菌门 (Mycetozoa), 酸杆菌门 (Acidobacteria), 芽单胞菌门 (Chloroflexi), 绿弯菌门 (Chloroflexi), 奇古菌门 (Candidatus), and 疣微菌门 (Candidatus). The chart shows that the composition of bacterial phyla remains relatively stable across the three generations, with Firmicutes and Actinobacteria being the most abundant in all groups.

Fig.6 The relative abundance of predominant bacteriain rhizospheric soil samples of continuous rotations of *C. equisetifolia* at the phylum level

铵(NH_4^+)^[37]。木麻黄是重要的结瘤共生固氮树。在本研究中,随着连栽代数的增加,慢生根瘤菌属且 FCP、SCP 两者与 TCP 的差异达显著水平($P<$ 的结论一致。与之相反,根际土壤中的热酸菌属(*thermobacter*)、布氏杆菌(*Bryobacter*)的相对丰度呈下降趋势。解磷过程以及降解有机物过程中发挥重要作用的菌属(*Rhizomicrobium*)的相对丰度随之降低约50%($P<0.05$)。酸杆菌门下的酸杆菌属(*Acidibacter*)



图 7 连栽木麻黄根际土壤优势细菌在属水平的群落热图分析

Fig.7 Heat map analysis of the main bacteria in rhizospheric soil of continuous rotations of *C. equisetifolia* at the genus level

表 2 连栽木麻黄根际土壤在属水平的细菌群落信息

属 Genus	相对丰度 Relative abundance/%		
	FCP	SCP	TCP
热酸菌属 <i>Acidothermus</i>	5.2841a	2.498b	3.5629b
<i>Candidatus Solibacter</i>	3.7661a	3.7932a	3.9471a
慢生根瘤菌属 <i>Bradyrhizobium</i>	1.6103b	2.1348b	3.9421a
根微菌属 <i>Rhizomicrobium</i>	3.4669a	1.1130b	1.2287b
酸杆菌属 <i>Acidibacter</i>	3.6959a	2.0991b	1.2989c
变杆菌属 <i>Variibacter</i>	3.6171a	2.2727b	3.4595ab

续表

属 Genus	相对丰度 Relative abundance/%		
	FCP	SCP	TCP
布氏杆菌属 <i>Bryobacter</i>	2.5793a	1.5328b	1.6707b
伯克氏菌属 <i>Burkholderia</i>	0.8815b	1.3777a	1.7593a
H16	1.2533a	0.7842b	0.7707b
<i>Terracidiphilus</i>	0.7436b	0.9037b	1.2213a
放线菌属 <i>Actinospica</i>	0.1404b	0.4481b	0.8593a
克洛氏菌属 <i>Crossiella</i>	0.2425c	0.4087b	0.9701a
地杆菌属 <i>Geobacter</i>	0.2622b	0.5134ab	0.8199a
分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	0.4986b	0.5368b	0.8384a
假罗布里斯属 <i>Pseudolabrys</i>	0.3804ab	0.5405a	0.3053b
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	0.2278c	0.474b	0.6316a
埃达布特属 <i>Edaphobacter</i>	0.4666a	0.0246b	0.0320b
乳杆菌属 <i>Acidobacterium</i>	0.5392a	0.0813b	0.1305b
苯基杆菌属 <i>Phenyllobacterium</i>	0.4555a	0.1108b	0.0874b
酸双酯属 <i>Acidicardus</i>	0.4925a	0.3533b	0.2979b
梭菌属 <i>Clostridium sensu stricto</i> 1	0.3029b	0.4112a	0.3977ab
<i>Mizugakiibacter</i>	0.3817a	0.0111b	0.0037b

每列不同字母表示差异达显著水平 ($P \leq 0.05, n = 3$)

是具有分解蛋白质和摄取环境周围酸性物质的有益菌属^[41]。在本研究中,随着连栽代数的增加,酸杆菌属 (*Acidibacter*) 的相对丰度随之降低约 176.07%、284.54%,且 FCP、SCP 与 TCP 三者之间的差异达显著水平 ($P < 0.05$)。由此可见,木麻黄连栽后根际土壤微生物群落结构发生了改变。这种现象可能是由于根系化感物质所产生的间接生态效应引起的,从而导致根际微生物发生恶化偏移。化感物质可以直接或间接影响根际微生物的代谢和生长发育,进而对根际微生物的种类、数量和分布产生影响^[42]。如田给林等^[43]研究发现,外源添加阿魏酸能显著促进草莓专化型尖孢镰刀菌的生长及孢子萌发,从而间接侵染草莓植物,造成连作障碍的发生。刘金光等^[44]研究发现,低浓度的苯甲酸对曲霉菌属和镰刀菌属有显著促进作用,造成根际土壤微生物群落结构失衡。

本研究证实了木麻黄长期单一化栽植后,根际土壤细菌群落结构发生了显著变化,导致土壤微生态失衡,间接造成木麻黄连栽障碍问题。然而,连栽障碍形成及加重的原因不是单一孤立的,是众多因素彼此影响、相互制约的结果。唯有建立在充分了解“土壤-微生物-根际”相互关系的基础上,才能系统地认识连栽木麻黄的根际生态效应。因此,对于木麻黄根际土壤化感物质如何介导土壤微生物区系定向演变? 以及关键的特异微生物如何在木麻黄连栽障碍形成的根际生态学中扮演重要角色,仍需设计进一步的实验进行验证讨论。

参考文献 (References):

- [1] 李钦禄, 莫其锋, 王法明, 李应文, 徐馨, 邹碧, 李晓波, 陈瑶, 李志安. 华南热带沿海不同林龄木麻黄人工林养分利用特征. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 139-146.
- [2] Goel V L, Behl H M. Growth and productivity assessment of *Casuarina glauca* Sieb. ex. Spreng on sodic soil sites. Bioresource Technology, 2005, 96(12): 1399-1404.
- [3] Vijayabhama M, Jaisankar R, Raj S V, Baranidharan K. Spatial-temporal variation of casuarinaspread in Cauvery delta and north eastern zone of Tamil Nadu, India: a spatial autoregressive model. Journal of Applied Statistics, 2018, 45(1): 1-7.
- [4] 谭芳林, 李志真, 叶功富, 林捷, 高美玲. 木麻黄连栽对沿海沙地土壤养分含量及酶活性的影响. 林业科学, 2003, 39(S1): 32-37.
- [5] Long F, Xie B B, Liang A J, Liu Y, Lin Y M, Chen C, Hong T, Hong W, Wu C Z, Li J. Replant problem in *Casuarina equisetifolia* L.: Isolation and identification of allelochemicals from its roots. Allelopathy Journal, 2018, 43(1): 73-82.
- [6] 林武星. 木麻黄 (*Casuarina equisetifolia*) 自身他感作用响应规律的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [7] Asadu C L A, Dixon A G O. Soil nutrient and cassava yield variations under continuous cultivation of three crop mixtures in south-eastern Nigeria.

- Tropical Agriculture, 2005, 82(1): 1-7.
- [8] Vikane J H, Vandvik V, Vetaas O R. Invasion of *Calluna* heath by native and non-native conifers: the role of succession, disturbance and allelopathy. *Plant Ecology*, 2013, 214(7): 975-985.
- [9] Weston L A, Alsaadawi I S, Baerson S R. Sorghum allelopathy-from ecosystem to molecule. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39(2): 142-153.
- [10] Jie W G, Liu X R, Cai B Y. Diversity of rhizosphere soil arbuscular mycorrhizal fungi in various soybean cultivars under different continuous cropping regimes. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72898.
- [11] 李健. 木麻黄化感物质对其幼苗生理特征和蛋白质组差异表达的影响研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [12] 邓兰桂, 孔垂华, 骆世明. 木麻黄小枝提取物的分离鉴定及其对幼苗的化感作用. *应用生态学报*, 1996, 7(2): 145-149.
- [13] Ye S F, Yu J Q, Peng Y H, Zheng J H, Zou L Y. Incidence of Fusarium wilt in *Cucumis sativus* L. is promoted by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates. *Plant and Soil*, 2004, 263(1): 143-150.
- [14] Kaur H, Kaur R, Kaur S, Baldwin I T, Inderjit. Taking ecological function seriously: soil microbial communities can obviate allelopathic effects of released metabolites. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4700.
- [15] Li X G, Ding C F, Hua K, Zhang T L, Zhang Y N, Zhao L, Yang Y R, Liu J G, Wang X X. Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 78: 149-159.
- [16] Zhao J, Wan S Z, Zhang C L, Liu Z F, Zhou L X, Fu S L. Contributions of understory and/or overstory vegetations to soil microbial PLFA and nematode diversities in Eucalyptus monocultures. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85513.
- [17] Wu Z Y, Li J J, Zheng J, Liu J F, Liu S Y, Lin W X, Wu C Z. Soil microbial community structure and catabolic activity are significantly degenerated in successive rotations of Chinese fir plantations. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6691.
- [18] 叶功富, 徐俊森, 林武星, 隆学武, 潘惠忠, 陈胜, 李思敬. 木麻黄连栽林地土壤肥力动态与地力维持. *防护林科技*, 1996, (S1): 49-53, 89-89.
- [19] 张洪勋, 王晓谊, 齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展. *生态学报*, 2003, 23(5): 988-995.
- [20] 郭清明. 滨海沙地三种相思生长防护效果及改土能力研究. *海峡科学*, 2008, (3): 71-72, 83-83.
- [21] 王圳, 张金池, 崔晓晓, 王如岩, 王定胜, 黄建庭. VA 菌根对喀斯特草本群落植物根际养分影响研究. *生态环境学报*, 2010, 19(7): 1574-1577.
- [22] Degnan P H, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal*, 2012, 6(1): 183-194.
- [23] 马玉颖, 张焕朝, 项兴佳, 王道中, 郭熙盛, 郭志彬, 孙瑞波, 褚海燕. 长期施肥对砂姜黑土丛枝菌根真菌群落的影响. *应用生态学报*, 2018, 29(10): 3398-3406.
- [24] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole J R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [25] 李岩, 何学敏, 杨晓东, 张雪妮, 吕光辉. 不同生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性. *生态学报*, 2018, 38(17): 5983-5995.
- [26] 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.
- [27] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 161-177.
- [28] Lu L, Xing D F, Ren N Q. Pyrosequencing reveals highly diverse microbial communities in microbial electrolysis cells involved in enhanced H₂ production from waste activated sludge. *Water Research*, 2012, 46(7): 2425-2434.
- [29] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, McDonald D, Knights D, Reyes J A, Clemente J C, Burkepile D E, Thurber R L V, Knight R, Beiko R G, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [30] 曹荣, 张井, 孟辉辉, 赵玲, 刘淇. 高通量测序与传统纯培养方法在牡蛎微生物群落分析中的应用对比. *食品科学*, 2016, 37(24): 137-141.
- [31] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能. *土壤学报*, 2008, 45(5): 892-900.
- [32] 万盼, 胡艳波, 张弓乔, 王宏翔, 李录林, 王鹏, 惠刚盈. 甘肃小陇山油松与柴胡栽培土壤细菌群落特征. *生态学报*, 2018, 38(17): 6016-6024.
- [33] 韩亚飞. 连作对杨树人工林土壤细菌群落结构和多样性的影响研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [34] 李延茂, 胡江春, 张晶, 汪思龙, 王书锦. 杉木连栽土壤微生物多样性的比较研究. *应用生态学报*, 2005, 16(7): 1275-1278.

- [35] Bazylnski D A, Williams T J, Lefèvre C T, Berg R J, Zhang C L, Bowser S S, Dean A J, Beveridge T J. *Magnetococcus marinus* gen. nov., sp. nov., a marine, magnetotactic bacterium that represents a novel lineage (*Magnetococcaceae* fam. nov., *Magnetococcales* ord. nov.) at the base of the *Alphaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(3): 801-808.
- [36] Kalita M, Malek W. *Genistatinctoria* microsymbionts from Poland are new members of *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(5): 252-259.
- [37] VanInsberghe D, Maas K R, Cardenas E, Strachan C R, Hallam S J, Mohn W W. Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *The ISME Journal*, 2015, 9(11): 2435-2441.
- [38] 康丽华, 江业根, 陆俊锬, 马海宾, 王胜坤. 华南地区主要造林树种共生微生物资源研究与利用//第三届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会论文集. 兰州: 中国微生物学会, 2011.
- [39] 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.
- [40] 唐婧, 徐小蓉, 商传禹, 牛晓娟, 张习敏, 乙引. 南明河城区河段细菌多样性与环境因子的关系. *微生物学报*, 2015, 55(8): 1050-1059.
- [41] 陈松. 动静模式下水葫芦净化生活污水研究[D]. 安庆: 安庆师范大学, 2018.
- [42] Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2011, 15(2): 327-337.
- [43] 田给林. 连作草莓土壤酚酸类物质的化感作用及其生物调控研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [44] 刘金光, 李孝刚, 王兴祥. 苯甲酸对土壤微生物群落结构影响及与花生连作障碍关系//第八次全国土壤生物与生物化学学术研讨会暨第三次全国土壤健康学术研讨会论文摘要集. 河源: 中国土壤学会土壤生物与生物化学专业委员会, 中国土壤学会土壤生态专业委员会, 广东盆地一号生物产业有限公司, 香港生巴达有机农业集团, 2015.