



黑土区连作大豆根际微生物群落结构的动态变化

陈雪丽^{1,2}, 王玉峰¹, 李伟群¹, 王爽¹, 王晓军¹, 张磊¹, 王英¹

(1. 黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所/黑龙江省土壤环境与植物营养重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为探明长期连作对大豆根际土壤微生物群落结构的影响, 基于环境因子相同的黑土区大豆连作长期定位试验, 采用实时定量聚合酶链式反应(Quantity-PCR, qPCR)和PCR-DGGE技术, 解析大豆根际微生物群落丰度和结构组成在不同连作年限间的动态变化过程。结果表明, 连作7年以上处理的细菌群落结构组成和多样性明显低于轮作和连作4年以下处理, 由此可以看出, 大豆连续种植导致土壤中细菌群落组成的演替, 是根际作物-土壤-微生物相互作用缓慢累积的过程, 直到连作7年才足以被检测出来。连作大豆根际真菌群落结构多样性分析结果表明, 连作2年和连作4年根际真菌群落组成丰富, 多样性较高。而连作7年以上和轮作处理的大豆根际真菌群落多样性指数为3.067 7~3.071 5, 低于连作2年和连作4年处理, 同时连作7年处理真菌群落组成与轮作处理相似性较高, 由此可以看出大豆连作土壤被称作抑制性土壤的机制所在。

关键词:黑土; 大豆连作; 根际; 微生物群落; 多样性

Dynamic Evolution of Microbial Community in the Rhizosphere of Continuous Cropping of Soybean in Black Soil

CHEN Xue-li^{1,2}, WANG Yu-feng¹, LI Wei-qun¹, WANG Shuang¹, WANG Xiao-jun¹, ZHANG Lei¹, WANG Ying¹

(1. Institute of Soil Fertilizer and Environment Resources, Key Laboratory of Soil Environment and Plant Nutrition of Heilongjiang Province, Fertilizer Engineering Technology Research Centre of Heilongjiang Province, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Postdoc station of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to explore the effects of long-term continuous cropping on the microbial community structures of soybean rhizosphere soil. Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) method was used to analysis the dynamic process of soil microbial community based on long-term soybean continuous cropping experiment with the same environment factors. The results showed that soil bacteria community composition changed with continuous cropping years, where the diversity of bacteria community in soybean continuous cropping over seven years treatments were lower than that of rotation and continuous cropping less than four years, indicating that soil bacteria community was changed with soybean continuous cropping, but it is a slowly process. The results of fungi community structure analysis showed that the community composition of SC2 and SC4 trend to more abundant and diverse. Then the diversities of fungi community for more than 7 years and the rotation treatment were from 3.067 7 to 3.071 5, lower than that of SC2 and SC4, while the community composition of SC7 showed similar to rotation, which was the typical property of suppressive soil.

Keywords: Black soil; Soybean continuous cropping; Rhizosphere; Microbial community; Diversity of soil microbial

土壤微生物群落的结构和功能多样性受到各种生物和非生物因素的影响, 例如气候和季节、土壤类型和结构、土壤处理或管理方式以及植被种类和植被生长时期等^[1-6]。在农田生态系统中, 土壤类型、作物种类和种植方式是决定土壤微生物群落组成的关键因素^[2,7-8]。另一方面, 尽管土壤生产力和土壤肥力的可持续性是由物理、化学和生物因素共同决定的, 由于微生物群落特征对环境变化的快速反应, 而被认为是土壤状况和农田管理的生物指示因子^[9-10]。微生物群落的演替是评价微生物、土

壤和作物相互作用的环境变化敏感指标^[9-11], 而且土壤微生物群落的人为管理, 例如种群的调控、改善土壤条件、抑制土传病害均是提高作物产量可行的方法^[12-13]。

单一作物长期连续种植被称为“连作”, 在农田生态系统中, 作物的耐连作程度大不相同, 有些作物对连作不敏感, 连续种植对这些作物产量和品质影响不明显, 如玉米和水稻; 有些作物不耐连作, 大豆是典型的对连作敏感的作物。连作不仅会导致大豆产量降低、品质变差, 生长发育受阻, 病虫害的

收稿日期: 2017-08-07

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2016YFD0300303); 国家科技重大专项(2015ZX07201-008); 中央引导地方科技发展专项(ZY18A04); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z17198)。

第一作者简介: 陈雪丽(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事土壤微生物生态研究。E-mail: xuelichen99@163.com。

通讯作者: 王玉峰(1967-), 女, 硕士, 研究员, 主要从事农业环境保护研究。E-mail: wangyf2011@163.com。

严重发生,同时根系分泌物的累积对大豆生长还具有自毒作用^[14-15]。

大豆连作障碍中土壤生物障碍被认为是最为重要的因素,也因此,大豆连作土壤被认为是抑制性土壤^[16-17]。关于大豆连作障碍的研究已有大量的报道,针对大豆连作根际真菌群落组成的研究集中在短期连作即大豆连作 3~5 年,结果表明连作导致大豆根部病害的严重发生,如大豆根腐病、大豆胞囊线虫、大豆菌核病等^[18-20]。土壤中细菌群落结构组成是相对稳定的,烟草根际优势细菌种群在连作过程中仍然处于优势地位^[21];连作大豆根际土壤中细菌优势菌群组成变化不大,但是连作降低了细菌群落多样性和功能多样性,改变了细菌菌群结构^[22-27],然而以往的研究基于大豆短期连作(3~5 年)或者仅局限于长期连作(20 年)后与轮作处理的对照研究。微生物群落结构是动态变化过程,因此,本研究选择黑土区相同施肥处理、相同环境因素条件下不同连作年限的大豆根际土壤作为研究对象,通过了解土壤微生物群落结构和丰度动态变化过程,不仅是对土壤肥力的评价过程,更重要的是为明确连作大豆土壤物质循环机制提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

大豆长期连作定位试验位于黑龙江省哈尔滨市民主乡的黑龙省农业科学院现代化农业创新园区(N45°49',E126°50')。开始于 1995 年,土壤为典型黑土,目前有包括轮作、连作 2 年到连作 24 年共 25 个处理。肥料的年施入量为纯 N 45 kg·hm⁻²、P₂O₅ 90 kg·hm⁻²、K₂O 45 kg·hm⁻²,所有肥料作底肥一次施入,所用肥料为尿素(N,46%),磷肥为二铵(P₂O₅,18%),钾肥为氯化钾(K₂O,60%)。试验小

区的田间管理同一般大田。

1.2 试验设计

本研究于大豆收获期(2011 年 9 月),采用抖根法采集连作 2 年(SC2)、连作 4 年(SC4)、连作 7 年(SC7)、连作 11 年(SC11)、连作 17(SC17)和轮作(MS)大豆根际土壤,每个处理 3 次重复。每个重复小区中分别采集 5 个点大豆根际土壤,混匀。用冰盒保存带回实验室,保存在-80℃冰箱以备提取土壤总 DNA。

1.3 方法

1.3.1 土壤总 DNA 提取 土壤总 DNA 提取:采用 Fast DNA SPIN Kit for soil(Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA)试剂盒并按其说明书操作方法提取土壤总 DNA。

1.3.2 细菌 16S 和真菌 ITS 基因定量分析 以纯化后的土壤总 DNA 为模板通过 SYBR green I 染料法,采用引物 GC-357f/517r 和 ITS1f/ITS4(表 1),对土壤中细菌 16S 和真菌 ITS 基因进行定量扩增 PCR 扩增仪为 Lightcycler 480II(Roche)。反应体系,反应程序及数据收集见 Liu 等^[28-32]。

1.3.3 变性梯度凝胶电泳(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)以纯化后的 DNA 为模板进行巢式 PCR,本文所用引物及引物基因序列见表 1。对于细菌群落,先用引物 27f/1492r 对微生物 16S rRNA 基因扩增,然后再以 PCR 产物为模板,用引物 GC-357f/517r 进行扩增。对于真菌群落,先用引物 ITS1f/ITS4 对真菌 ITS 区段进行扩增,然后再以 PCR 产物做为模板,用引物 GC-ITSf/ITS2r 进行 PCR 扩增。得到产物在 1% 凝胶检测,再进行变性梯度凝胶电泳。观察各个土壤样品的 PCR 产物经变性梯度凝胶电泳分离后的电泳图谱照片,采用 QuantityOne 分析软件(Bio-Rad)进行分析。

表 1 用于细菌和真菌微生物群落 PCR 扩增的引物及其序列

Table 1 Primers and its sequencing for PCR amplification bacteria and fungi community

目的菌	引物 Primers		扩增片段长度	文献
Target	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	Products length/bp	References
细菌 Bacteria	27f	5′ – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3′	1400	[29-30]
	1492r	5′ – GGCTACCTTGTACGACTT – 3′		
	GC – 357f	5′ – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3′	230	
	517r	5′ – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3′		
真菌 Fungus	ITS1f	5′ – TCCGTAGGTGAACCTGCG G – 3′	700	[31-32]
	ITS4	5′ – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3′		
	GC – ITS1f	5′ – AICCATTCAATCGGTAIT – 3′	300	
	ITS2r	5′ – GCTGCGTTCCTCATCGATGC – 3′		

GC;GC-Clamp,5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGG-3'

PCR 体系 (50 μL):10 × ExTaq Buffer 5.0 μL, dNTP Mixture 5.0 μL, 每种引物 0.5 μL, 模板 1.5 μL, TaKaRa ExTaq(5U μL⁻¹)1 μL,dH₂O 36.5 μL。

细菌 PCR 扩增反应条件:94℃,3 min;(94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1.5 min)30 个循环;72℃,10 min;真菌 PCR 扩增反应条件:94℃,3 min;(94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s)35 个循环;72℃,10 min。

将 PCR 产物加到 Bio-Rad 变性剂梯度凝胶电泳仪上进行电泳,聚丙烯酰胺浓度为 8%(V/V),细菌变性剂浓度从 30%~70%,真菌变性剂浓度从 20%~55%,其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。待胶完全凝固后,将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中,加热到 60℃,洗胶,然后在每个加样孔加入 PCR 样品 8 μL 和 3 μL 的 Loading Buffer,加样完成后,在 80 V 的电压下,60℃,电泳 16 h。电泳完毕后,将凝胶用 GelRed 避光染色 20 min。将染色后的凝胶成像系统(Bio-Rad)观察每个样品的电泳条带并拍照,采用 QuantityOne 分析软件(Bio-Rad)进行分析。

1.4 数据分析

微生物群落结构多样性指数可采用 Shannon 指数(Shannon-index)来表示^[33]。Shannon 指数由下式计算:

$$H = - \sum P_i \ln P_i = - \sum (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

公式中:H 为 Shannon 指数,H 最小值为 0,最大值为 lnS;*P_i* 为第 *i* 个 DGGE 条带出现概率;*N_i* 为第 *i* 个 DGGE 条带的扩增量;

N 为土壤微生物群落 DNA 的 DGGE 条带扩增总量(*N* = ∑*N_i*)。

主成分分析和相关性分析应用 SPSS (Version 10.0 for Windows) 软件^[34]。聚类分析应用 Quantity One 软件中程序进行。采用 Sigma-Plot 10.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 连作大豆根际土壤细菌 16S 和真菌 ITS 基因丰度分析

通过对轮作和连作大豆根际土壤中细菌和真菌群落定量分析,以期明确细菌和真菌群落丰度在大豆连作年限之间的动态变化规律。结果表明,连作 11 年以上细菌群落丰度低于轮作和短期连作处理,但没有达到显著水平;真菌群落丰度的变化趋势为连作 2 年和 4 年处理的真菌群落丰度高于轮作和连作 7 年到 11 年,而连作 17 年真菌丰度又有升高的趋势,但均未达到显著水平(表 2)。

表 2 连作大豆根际土壤细菌和真菌群落丰度
Table 2 Bacterial and fungal abundance for continuous cropping of soybean soil

样品 Sample	16S rRNA /(× 10 ⁸ · g ⁻¹)	ITS /(× 10 ⁵ · g ⁻¹)
MS	7.10	4.64
SC2	6.73	6.49
SC4	7.61	5.83
SC7	7.31	4.54
SC11	6.00	4.48
SC17	6.40	6.83

MS:轮作;SC2:连作 2 年;SC4:连作 4 年;SC7:连作 7 年;SC11:连作 11 年;SC17:连作 17 年。下同。

MS:Rotation;SC2:Continuous cropping for 2years;SC4:Continuous cropping for 4 years;SC7:Continuous cropping for 7 years;SC11:Continuous cropping for 11 years;SC17:Continuous cropping for 17 years. The same below.

2.2 连作大豆根际土壤微生物总 DNA 检测

本文采用通用土壤总 DNA 提取试剂盒进行提取,将提取液经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳,获得了清晰条带。进行细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS rRNA 基因 PCR 扩增,分别得到片断长度约为 230 bp 和 300 bp 的 PCR 产物,与目标片断长度一致(结果未展示)。

2.3 连作大豆根际细菌群落结构分析

2.3.1 细菌群落组成分析 对轮作和 5 个不同连作年限的大豆根际土壤细菌 16S rRNA 基因的指纹图谱分析结果表明,各处理之间细菌群落组成相对稳定,处理间优势种群和共有类群相似性较高。随着大豆连作年限的增加,大豆根际细菌类群出现演替的现象,如大豆连作导致新的类群出现,条带 b 只出现在大豆连作处理中,而轮作处理中未检出;条带 a 出现在轮作处理、连作 2 年和 4 年处理中,而在其它连作处理中未检出。

2.3.2 细菌群落多样性分析 将不同连作年限大豆根际土壤细菌多样性进行比较分析,结果发现,轮作处理、连作 2 年和连作 7 年处理的条带数和多样性指数相似,其中轮作处理 DGGE 条带数和香农指数(H)均最高,分别为 25 条和 3.182 9(表 3)。连作 7 年以后的 3 个处理 DGGE 图谱条带数和多样性指数随着连作年限的延长呈现逐渐降低的趋势,连作 17 年处理的条带数和多样性指数最低,分别为 20 条和 2.952 3。

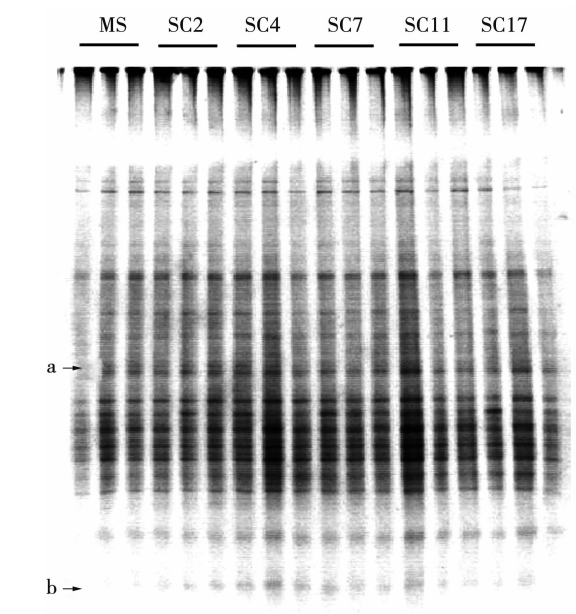


图1 连作大豆根际细菌群落 16S rRNA 基因片段 DGGE 电泳图谱

Fig. 1 16S rDNA gene of soil bacterial community in rhizosphere of continuous cropping of soybean on DGGE

表3 不同处理细菌群落 DGGE 条带数和香农指数
Table 3 DGGE band number and Shannon index of soil bacterial community in rhizosphere of continuous cropping soybean

处理 Treatment	条带数 Band number	<i>H</i>
MS	25 ± 2. 5	3. 1829 ± 0. 0429
SC2	24 ± 1. 5	3. 1506 ± 0. 0643
SC4	24 ± 1. 5	3. 1387 ± 0. 0675
SC7	22 ± 0. 6	3. 0554 ± 0. 0294
SC11	22 ± 1. 0	3. 0669 ± 0. 0474
SC17	20 ± 1. 2	2. 9523 ± 0. 0583

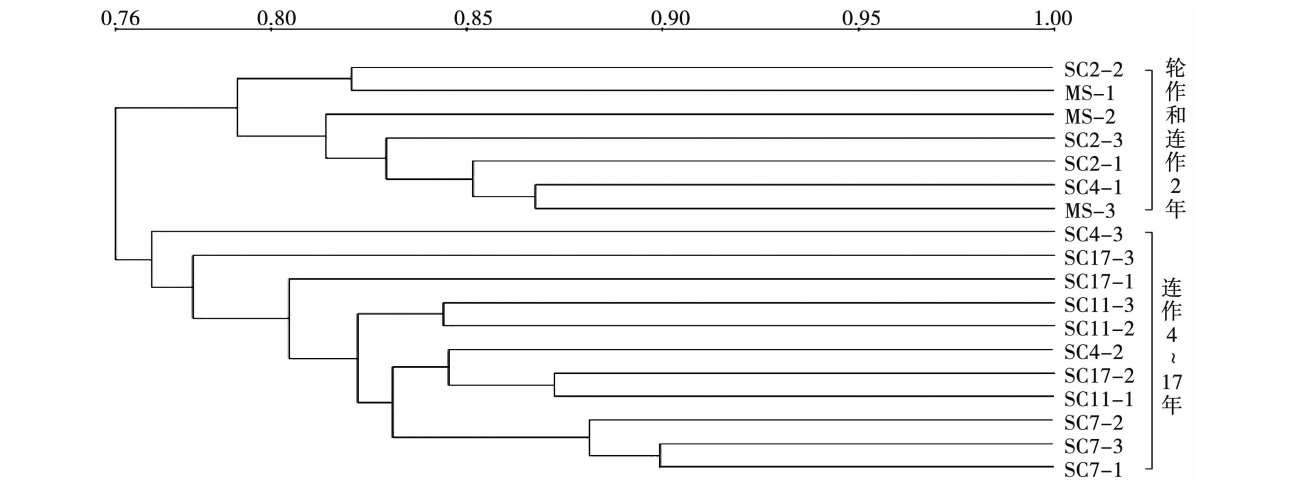


图3 细菌 DGGE 图谱的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis of bacterial community DGGE fingerprinting

2. 3. 3 细菌群落结构主成分分析(PCA) 通过细菌 DGGE 指纹图谱中条带赋值,进而对不同处理细菌群落结构组成进行主成分分析(图 2)。结果表明,主成分 1 和主成分 2 的贡献率分别为 25. 82% 和 17. 96%。轮作处理和连作 2 年的细菌群落聚为一类,群落组成相似性较高;连作 4 年到连作 11 年处理的细菌群落聚在一起,处理之间的差异不明显;而连作 17 年处理的细菌群落结构组成与其它处理差异较大。由此可以看出,大豆连作改变了根际土壤细菌群落结构,并随着连作年限的增加群落组成差异明显。

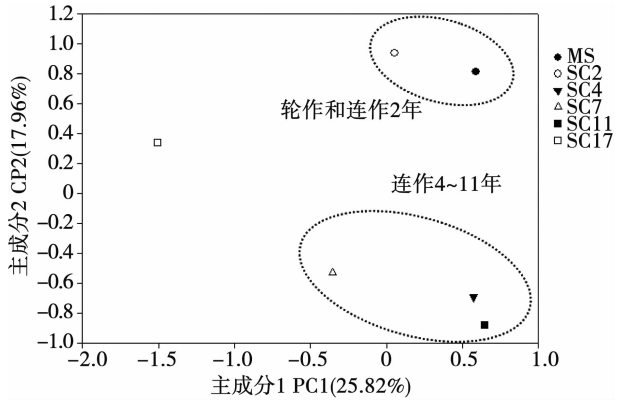


图2 连作大豆根际细菌群落 DGGE 条带主成分分析
Fig. 2 Principal component analysis on change of bacterial diversity in rhizosphere of continuous cropping of soybean

2. 3. 4 细菌群落结构聚类分析 对细菌 DGGE 指纹图谱进行聚类分析(图 3),与主成分分析结果一致,即轮作处理和连作 2 年处理聚为一类。连作 4 年以上的连作处理聚在一起。可以看出短期连作(2 年)与轮作处理大豆根际细菌群落结构相似性较高。随着连作年限的增加根际细菌群落结构发生趋向性变化。

2.4 连作大豆根际真菌群落结构分析

2.4.1 真菌群落组成分析 连作大豆根际土壤真菌群落变化较大,与细菌群落结构特征明显不同,而且片段长度集中在中部(图4)。从 DGGE 图谱可以看出,轮作与连作处理土壤真菌群落结构组成之间有明显的不同,既有优势种群的增加也有种群的逐渐减少趋势。如条带 a 是各处理的共有群落,也是优势种群,但在各处理之间浓度具有明显差异,轮作处理相对丰度较高,而连作 17 年,该群落的丰度较低。而条带 b 代表的群落随着连作年限的增加丰度逐渐降低,到连作 11 年以上消失。条带 c 为轮作特有群落。条带 d 代表的群落在轮作和连作 11 年处理中丰度较低,而在其它连作处理中为优势种群。

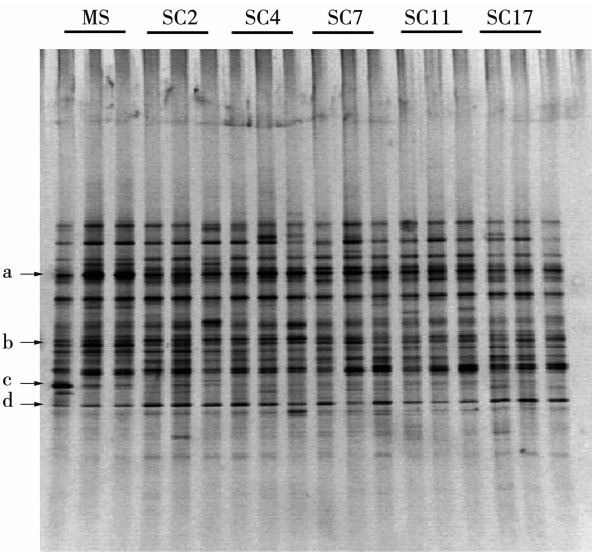


图4 连作大豆根际真菌群落 ITS rDNA 基因片段 DGGE 电泳图谱

Fig. 4 16S rDNA gene of soil fungi community in rhizosphere of continuous cropping of soybean on DGGE

2.4.2 真菌群落多样性分析 对比分析不同处理大豆根际土壤真菌群落多样性,结果表明,连作 2 年和连作 4 年大豆根际真菌群落的 DGGE 条带数和多样性指数高于轮作和其它连作处理(表4),其中连作 4 年的大豆根际真菌群落多样性指数最高,为 3.197 3,其它处理之间差异不明显。

表4 连作大豆根际真菌群落 DGGE 条带数和香农指数
Table 4 DGGE band number and Shannon index of soil fungal community in rhizosphere of continuous cropping of soybean

处理 Treatment	条带数 Band number	H
MS	22 ± 0.6	3.0686 ± 0.0268
SC2	24 ± 1.0	3.1324 ± 0.0475
SC4	26 ± 2.0	3.1973 ± 0.0744
SC7	23 ± 1.0	3.0715 ± 0.0375
SC11	22 ± 1.0	3.0677 ± 0.0533
SC17	22 ± 1.0	3.0679 ± 0.0580

2.4.3 真菌群落结构主成分分析(PCA) 对连作大豆根际土壤真菌 ITS rRNA 基因的 DGGE 条带进行主成分分析(图5)。结果表明,连作 2 年和连作 4 年处理、轮作和连作 7 年处理以及连作 11 年和连作 17 年处理的真菌群落结构分别分布在第一、第二和第三象限,群落组成差异显著。由此认为,大豆连作对根际土壤真菌群落结构组成具有显著影响,连作 7 年与轮作处理的真菌群落结构组成相似性较高。

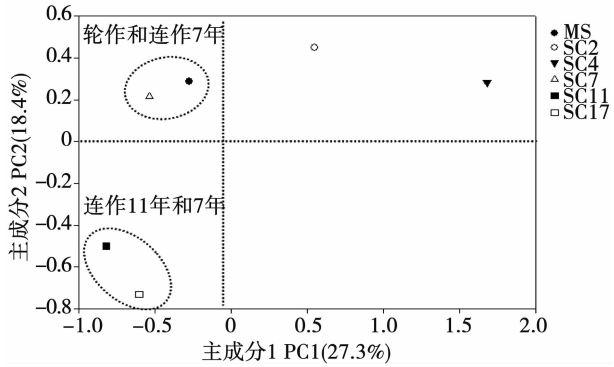


图5 连作大豆根际真菌群落 DGGE 条带主成分分析
Fig. 5 Principal component analysis on change of fungi diversity in rhizosphere of continuous cropping of soybean

2.4.4 真菌群落结构聚类分析 对连作大豆根际土壤中真菌群落组成进行聚类分析(图6),与细菌群落相同的是连作年限仍然是决定真菌群落结构的重要因素。不同的是轮作处理单独聚为一类。连作 2 年和连作 4 年处理真菌群落结构组成的相似程度较高,而连作 7 年以上处理的真菌群落组成的相似程度较高。

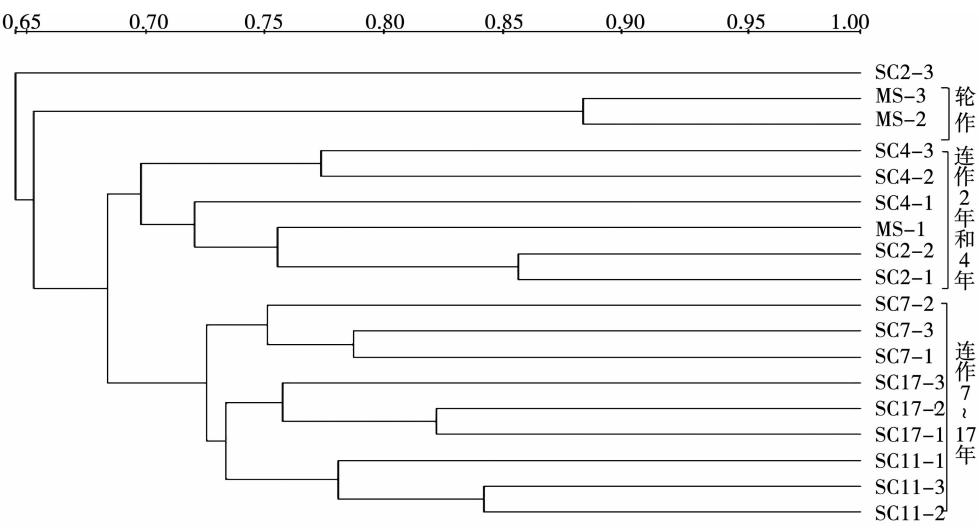


图 6 真菌 DGGE 图谱的聚类分析

Fig. 6 Clustering analysis of fungi community DGGE fingerprinting

3 讨 论

3.1 连作年限是影响大豆根际细菌群落结构组成的关键因素

真菌和细菌是土壤微生物的两大主要类群,在物质转化、有机质分解过程中起到重要的作用。本文在大豆长期连作土壤理化指标变化不明显的基础上^[35],采用 PCR-DGGE 技术解析连作对大豆根际真菌和细菌群落结构的影响。从细菌群落的 DGGE 指纹图谱可以看出,各处理之间细菌群落结构的优势种群组成相似,同时存在处理的特异种群(图 1)。应用 QuantityOne 分析软件进一步将 DGGE 条带赋值,统计条带数和计算多样性指数,连作 17 年处理的多样性指数和条带数最低,但未达到显著差异水平(表 3)。聚类分析和主成分分析结果表明,短期连作 2 年和轮作处理的群落组成相似性较高,与其它连作处理的细菌群落结构组成差异显著(图 3)。以往的研究表明,大豆连作导致根际土壤中真菌和细菌群落多样性变化,取样时期也是影响细菌群落结构的重要因素之一,如成熟期取样研究结果表明正茬处理的细菌群落结构多样性和功能多样性高于连作^[25-27]。朱英波等^[36]对大豆连作 5 年的土壤与常规轮作处理相比较,结果发现大豆轮作土壤细菌多样性更为丰富,并以变形菌为优势细菌类群;而大豆连作土壤细菌多样性有所减少,以酸杆菌为优势细菌类群。同样,Zhou 等^[37]研究表明,黄瓜连作改变了根际细菌群落结构组成,随着连作年限的增加,细菌群落结构发生显著性变化。因此,连作是导致根际土壤环境变化,进而诱导根际细菌种群变化的重要因素。

3.2 连作导致大豆根际真菌群落变化

以往的研究表明,大豆长期连作导致大豆产量

和植株生物量降低、大豆叶片光合速率下降^[38]、根际微生态环境发生变化,如 pH 降低等^[39],土壤从高肥的“细菌型”转向低肥的“真菌型”^[27]。本研究结果发现,与轮作处理比,大豆连作增加了土壤中真菌群落种类和多样性,尤其连作 2 年和连作 4 年处理(图 4)。有研究表明,随着连作年限(轮作、迎茬、连作 1 ~ 5 年)的增加,土壤 pH 值显著降低^[40-41],而土壤偏酸有利于大豆根腐病的发生^[42]。由此可以看出,大豆连作 2 年和连作 4 根际真菌群落组成变化最大的年限。该结果与王进闯^[43]的试验结果相一致,研究认为,在连作期间,真菌属水平上的群落组成发生了明显变化。*Geomyces* 和 *Bionectria* 自始至终都是最优势的属。*Geomyces* 的相对丰度在连作 1 到连作 3 年之间较高,但是之后明显减少,而 *Bionectria* 是随着连作年限的增加而增加。本研究结果表明,连作 2 年和 4 年处理的大豆根际真菌群落结构组成与其他处理存在明显差异,连作 7 年以上处理之间结构组成差异不显著(图 5)。这可能是由于大豆连续种植导致根际土壤微环境的变化,真菌群落组成重新组建重新达到一个新的平衡过程^[44]。

4 结 论

综上所述,在相同的肥料种类和肥料施入量水平条件下,大豆连作 2 ~ 4 年是微生物群落动态变化较为强烈的阶段,无论是真菌群落还是细菌群落的群落组成和多样性指数都显著不同于轮作处理和更长的连作处理。

参考文献

[1] Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape

the structure and function of microbial communities in the rhizosphere[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2010, 68(1):1-13.

[2] Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 243-270.

[3] Rasche F, Velvis H, Zachow C, et al. Impact of transgenic potatoes expressing antibacterial agents on bacterial endophytes is comparable to effects of soil, wildtype potatoes, vegetation stage and pathogen exposure[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2006, 43(3): 555-566.

[4] Jangid K, Williams M A, Franzluebbers A J, et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2843-2853.

[5] Caesar T, Lenssen A W, Caesar A J, et al. Effects of tillage on microbial populations associated to soil aggregation in dryland spring wheat system[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2010, 46(2): 119-127.

[6] Guan X, Wang J, Zhao H, et al. Soil bacterial communities shaped by geochemical factors and land use in a less-explored area, Tibetan Plateau[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 820.

[7] Sudini H, Liles M R, Arias C R, et al. Exploring soil bacterial communities in different peanut-cropping sequences using multiple molecular approaches[J]. *Phytopathology*, 2011, 101(7): 819-827.

[8] Wieland G, Neumann R, Backhaus H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5849-5854.

[9] Avidano L, Gamalero E, Cossa G P, et al. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators[J]. *Applied Soil Ecology*, 2005, 30(1): 21-33.

[10] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, et al. Microbial diversity and soil functions[J]. *European Journal of Soil Sciences*, 2010, 54(4): 655-670.

[11] Welbaum G E, Sturz A V, Dong Z, et al. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems[J]. *Critical Review in Plant Sciences*, 2004, 23(2): 175-193.

[12] Glick B R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation[J]. *Biotechnology Advance*, 2010, 28(3): 367-374.

[13] Hayat R, Ali S, Amara U, et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review[J]. *Annual Microbiology*, 2010, 60(4): 579-598.

[14] Liu X, Zhang J, Gu T, et al. Microbial community diversities and taxa abundances in soils along a seven-year gradient of potato monoculture using high throughput pyrosequencing approach[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e86610.

[15] She S, Niu 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):1-9.

[16] 陈宗泽, 殷勤艳, 王旭明, 等. 土壤病原菌对连作大豆的致病性初探[J]. *吉林农业大学学报*, 1999, 21(1): 29-32. (Chen Z Z, Yin Q Y, Wang X M, et al. Preliminary research on the pathogenicity of soil pathogens to continuous cropping soybean [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 1999, 21(1): 29-32.)

[17] Baker K F, Cook R J. Biological control of plant pathogens[M]. San Francisco: American phytopathological society, 1974, 71(4): 1632.

[18] 蔡柏岩, 王丽阳, 胡维, 等. 连作大豆苗期根际土壤根腐病原真菌菌群秸秆分析[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(32): 92-98. (Cai B Y, Wang L Y, Hu W, et al. Analysis of community structure of root rot pathogenic fungi in seedling stage of soybean continuous cropping[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(32): 92-98.)

[19] 韩晓增, 许艳丽. 大豆连作减产主要障碍因素的研究. I. 连作大豆根系腐解物的障碍效应[J]. *大豆科学*, 1998, 17(3): 207-211. (Han X Z, Xu Y L. A study of main factors causing yield decrease of continuous cropping soybean [J]. *Soybean Science*, 1998, 17(3): 207-211.)

[20] 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文. 大豆根际细菌 I 拮抗大豆根腐病菌研究[J]. *大豆科学*, 1998, 17(1): 53-58. (Guo R J, Liu X Z, Yang H W. Antagonistic effect of soybean rhizosphere bacteria I against soybean root rot [J]. *Soybean Science*, 1998, 17(1): 53-58.)

[21] Chen M N, Li X, Yang Q L, et al. Dynamic succession of soil bacterial community during continuous cropping of peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101355.

[22] 朱琳, 曾椿淋, 李雨青, 等. 基于高通量测序的大豆连作土壤细菌群落多样性分析[J]. *大豆科学*, 2017, 36(3): 419-424. (Zhu L, Zeneg C L, Li Y Q, et al. The characteristic of bacterial community diversity in soybean field with continuous cropping based on the high-throughout sequencing[J]. *Soybean Science*, 2017, 36(3): 419-424.)

[23] 殷继忠, 李亮, 接伟光, 等. 连作对大豆根际土壤细菌菌群结构的影响[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(1): 230-238. (Yin J Z, Li L, Jie W G, et al. Effects of continuous cropping on bacterial flora structure in soybean rhizosphere soil [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(1): 230-238.)

[24] 高圣超, 关大伟, 马鸣超, 等. 大豆连作条件下施肥对东北黑土细菌群落的影响[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(7): 1271-1281. (Gao S C, Guan D W, Ma M C, et al. Effects of fertilization on bacterial community under the condition of continuous soybean monoculture in black soil in northeast China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(7): 1271-1281.)

[25] 谷岩, 邱强, 王振民, 等. 连作大豆根际微生物群落结构及土壤酶活性[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(19): 3955-3964. (Gu Y, Qin Q, Wang Z M, et al. Effects of soybean continuous cropping on microbial and soil enzymes in soybean rhizosphere [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(19): 3955-3964.)

[26] 李春格, 李晓鸣, 王敬国. 大豆连作对土体和根际微生物群落功能的影响[J]. *生态学报*, 2006, 26(4): 1144-1150. (Li C G, Li X M, Wang J G. Effect of soybean continuous cropping on bulk and rhizosphere soil microbial community function [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(4): 1144-1150.)

[27] 邹莉, 袁晓颖, 李玲, 等. 连作对大豆根部土壤微生物的影响研究[J]. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 27-30. (Zou L, Yuan X Y, Li L, et al. Effects continuous cropping on soil microbes on

soybean roots[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(2): 27-30.)

[28] Liu J J, Yu Z H, Yao Q, et al. Distinct soil bacterial communities in response to the cropping system in a mollisol of Northeast China [J]. Applied Soil Ecology, 2017, 119: 407-416.

[29] Muyzer G, de Waal E D, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.

[30] Zhang C L, Huang Z Y, Cantu J, et al. Lipid biomarkers and carbon isotope signatures of a microbial (beggiatoa) mat associated with gas hydrates in the gulf of mexico[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2106-2112.

[31] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhiza and rusts [J]. Molecular Ecology, 1993, 2(2): 113-118.

[32] White T J, Buns T D, Lee S, et al. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[J]. Per Protocols A Guide to Methods & Applicati, 1990: 315-322.

[33] Yang C, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 345-351.

[34] Tscherko D, Hammesfahr U, Marx M C, et al. Shifts in rhizosphere microbial communities and enzyme activity of *Poa alpina* across an alpine chronosequence [J]. Soil Biological and Biochemistry, 2004, 36(10): 1685-1698.

[35] 陈雪丽,李伟群,王英,等. 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[J]. 大豆科学, 2016, 35(4): 622-627. (Chen X L, Li W Q, Wang Y, et al. Characterization of ammonia oxidizing archaea community structure in the rhizosphere of continuous cropping soybean in black soil [J]. Soybean Science, 2016, 35(4): 622-627.)

[36] 朱英波,史凤玉,张瑞敬,等. 黑龙江大豆轮作和连作土壤细菌群落多样性比较[J]. 植物保护学报, 2014, 41(4): 403-409. (Zhu Y B, Shi F Y, Zhang R J, et al. Comparison of bacterial diversity in rotational and continuous soybean cropping soils in Heilongjiang[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2014, 41(4): 403-409.)

[37] Zhou X G, Gao D M, Liu J, et al. Changes in rhizosphere soil microbial communities in a continuously monocropped cucumber (*Cucumis sativus* L.) system[J]. European Journal of Soil Biology, 2014, 60(1): 1-8.

[38] Liu X B, Li Y S, Han B J, et al. Yield response of continuous soybean to one-season crop disturbance in a previous continuous soybean field in Northeast China [J]. Field Crops Research, 2012, 138(138): 52-54.

[39] 王光华,金剑,潘相文,等. 不同茬口大豆根圈土壤 pH 值和氮营养分布的变化[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(1): 55-59. (Wang G H, Jin J, Pan X W, et al. Effect of different rotation systems on soil pH and N nutrition distribution across soybean rhizosphere [J]. Chinese journal of oil crop sciences [J]. 2004, 26(1): 55-59.)

[40] 马汇泉,郑桂萍,赵九洲,等. 大豆连作障碍及产生机理[J]. 土壤, 1997, 1: 46-48. (Ma H Q, Zheng G P, Zhao J Z, et al. Soybean continuous cropping obstacles and production mechanism [J]. Soil, 1997, 1: 46-48.)

[41] 乔云发,苗淑杰,韩晓增,等. 不同土地利用方式对黑土农田酸化的影响[J]. 农业系统科学与综合研究, 2007, 23(4): 468-470, 476. (Qiao Y F, Miao S J, Han X Z, et al. The effects of different land-use types on farm black soil acidification [J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2007, 23(4): 468-470, 476.)

[42] 马汇泉,靳学慧,孙伟萍,等. 大豆根腐病生态学研究 II. 不同土壤条件对大豆根腐病的影响[J]. 中国油料, 1995, 17(1): 47-48. (Ma H Q, Jin X H, Sun W P, et al. Soybean root rot ecology research II: Effects of different soil conditions on soybean root rot [J]. Chinese oil, 1995, 17(1): 47-48.)

[43] 王进闯. 大豆连作对根际土壤微生物群落的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2014. (Wang J C. The impact of continuous soybean monoculture on soil communities in the rhizosphere [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.)

[44] Schreiner K, Hagn A, Kyselkova M, et al. Comparison of barley succession and take-all disease as environmental factors shaping the rhizobacterial community during take-all decline[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4703-4712.