



正茬与迎茬对大豆根际土壤微生物群落组成的影响

接伟光, 杨冬莹, 姚延轩, 林厚泽

(黑龙江东方学院 食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150066)

摘要:为探索正茬与迎茬种植方式对大豆根际土壤微生物群落组成的影响, 分析导致大豆迎茬障碍形成的主要病原微生物, 研究大豆迎茬障碍的形成机制, 进而为其生物防治提供一定的理论基础, 本研究采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术分析正茬与迎茬大豆根际土壤微生物群落组成。结果表明: 大豆迎茬种植在一定程度上降低了土壤细菌群落丰度和多样性, 而增加了土壤真菌群落丰度和多样性。正茬与迎茬大豆根际土壤微生物群落组成和主要优势菌群所占比例均存在较大差异。酸杆菌门 (Acidobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 分别为正茬和迎茬大豆根际土壤细菌群落中最具优势的细菌门。镰孢霉属 (*Fusarium*) 和粗糙链孢菌属 (*Subulicystidium*) 分别为正茬和迎茬大豆根际土壤真菌群落中最具优势的属。

关键词: 正茬; 迎茬; 大豆; 根际土壤; 微生物群落组成; 高通量测序

Effects of Rotational Cropping and Alternate Cropping on Microbial Communities Composition in the Rhizosphere Soil of Soybean

JIE Wei-guang, YANG Dong-ying, YAO Yan-xuan, LIN Hou-ze

(School of Food Engineering, Heilongjiang East University, Harbin 150066, China)

Abstract: In order to explore the effects of planting methods on the composition of microbial communities in the rhizosphere soil of soybean, we analyzed the main pathogenic microorganisms leading to the formation of soybean alternate cropping obstacle, and explore the formation mechanism of soybean alternate cropping obstacle, so as to provide a theoretical basis for its biological control. We used Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing technology to analyze the effects of rotational cropping and alternate cropping on the composition of microbial communities in the rhizosphere soil of soybean. The results showed that the abundance and diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of alternate cropping soybean were decreased, but the abundance and diversity of fungal communities were increased. There were significant differences in the composition of microbial communities and the proportion of dominant microflora in the rhizosphere soil of rotational cropping and alternate cropping soybean. Acidobacteria and actinobacteria were the most dominant bacterial phylum in the rhizosphere soil of rotational cropping and alternate cropping soybean, respectively. *Fusarium* and *Subulicystidium* were the most dominant fungal genera in the rhizosphere soil of rotational cropping and alternate cropping soybean, respectively.

Keywords: rotational cropping; alternate cropping; soybean; rhizosphere soil; composition of microbial communities; high-throughput sequencing

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是全球第四大粮食作物, 也是我国重要的油料作物^[1-2]。大豆具有较高的营养价值, 蛋白质、脂肪含量丰富, 还含有异黄酮、皂脂及低聚糖等有益于人体健康的活性物质^[3], 是我国人民摄入蛋白的重要来源, 同时又是畜牧、纺织及其他轻工业的重要原料^[4]。黑龙江地区是我国大豆主产区, 大豆种植面积以及产量在我国大豆产业中均占重要地位^[5]。近年来, 耕地面积逐年减少, 大豆迎茬种植现象日益严重。大豆正茬种植即在同一块耕地上种植其它作物 2 年以上, 再种植大豆的种植方式。大豆迎茬种植即在同一块耕地上第一年种植大豆, 第二年种植其它作物, 第三年再种植大豆的种植方式^[6]。大豆迎茬种植会导致土壤理化性质恶化、土壤肥力失衡、微生物群

落组成发生变化、土传病害加重等问题, 致使大豆产量降低、品质变劣^[7]。在农业生产中, 迎茬条件下农民主要通过施用化肥来提高大豆产量, 但长期施用化肥会破坏土壤结构、导致土壤养分失衡、自毒物质积累, 使大豆根腐病病情加重^[8]。

土壤中微生物群落组成在维持土壤生态系统多样性方面具有重要的作用^[9]。作物迎茬种植会影响土壤微生物群落组成, 抑制有益微生物生长, 而有利于病原微生物生长, 从而导致作物严重减产^[10-11]。土壤类型、作物种植方式以及种植作物种类等均对土壤酶活性、微生物群落组成和土壤养分产生影响^[12]。我国每年因大豆迎茬障碍引起的大豆减产问题已越来越受到重视^[13]。大豆迎茬种植会导致其根际土壤微生物生态环境发生变化, 土壤

pH下降,土壤类型由高肥的“细菌型”向低肥的“真菌型”转化,病原真菌数量显著增加,大豆产量降低^[14]。近年来,研究者们主要采用 T-RFLP、PCR-DGGE、高通量测序等技术分析了大豆田土壤细菌群落组成^[15-17]。然而,有关正茬与迎茬大豆田土壤细菌与真菌群落组成的相关研究仍鲜有报道。本研究采用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术分析正茬与迎茬大豆根际土壤微生物群落组成,旨在探索正茬与迎茬种植方式对大豆根际土壤微生物群落组成的影响,为揭示大豆迎茬障碍的形成机制提供科学依据,并为大豆迎茬障碍的生物防治提供必要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试玉米抗倒伏高产品种为龙高 L2,粗蛋白含量为 10.37% ~ 11.01%、粗脂肪含量为 4.28% ~ 5.22%、淀粉含量为 68.73% ~ 70.14%、赖氨酸含量为 0.41%。供试大豆为病害敏感型高蛋白品种

黑农 48,蛋白质平均含量 45.23%,脂肪平均含量 19.50%。

1.2 试验设计

试验地设在黑龙江东方学院试验站(45°39'N, 126°36'E)。研究站地处中国东北平原东北部地区,黑龙江省南部,哈尔滨市境内。该区域属于中温带大陆性季风气候,土壤类型为黑土。试验小区设置为正茬(大豆-玉米-玉米-大豆,即 2015 年 5 月中旬第一次播种大豆,2016 年 5 月中旬第一次播种玉米,2017 年 5 月中旬第二次播种玉米,2018 年 5 月中旬第二次播种大豆);迎茬(玉米-大豆-玉米-大豆,即 2015 年 5 月中旬第一次播种玉米,2016 年 5 月中旬第一次播种大豆,2017 年 5 月中旬第二次播种玉米,2018 年 5 月中旬第二次播种大豆)。两个试验处理,每个试验处理各 0.2 hm²,土壤生理生化指标如表 1 所示。采用人工播种,定期除草灌溉,全生产期周期均不施肥,每年作物种植完毕后去除土壤中残留的作物根系。

表 1 土壤生理生化指标
Table 1 The physiological and biochemical indices of soil

土壤类型 Soil type	铵态氮 Ammonium nitrogen/ (mg·kg ⁻¹)	速效钾 Rapidly available potassium/ (mg·kg ⁻¹)	速效磷 Rapidly available phosphorus/ (mg·kg ⁻¹)	有机质 Organic matter/ (g·kg ⁻¹)	硝态氮 Nitrate nitrogen/ (mg·kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus /%	总氮 Total nitrogen /%	pH
正茬 Rotational cropping	20.92 ± 0.79	27.35 ± 0.72	25.96 ± 0.51	20.59 ± 0.63	17.02 ± 0.30	0.99 ± 0.13	0.30 ± 0.09	7.15 ± 0.05
迎茬 Alternate cropping	22.88 ± 0.85	25.02 ± 0.57	22.79 ± 0.63	17.87 ± 0.38	15.19 ± 0.21	0.93 ± 0.20	0.19 ± 0.07	6.79 ± 0.04

1.3 方法

1.3.1 样本采集 2019 年 5 月 10 日采用棋盘式取样法分别采集上述正茬及迎茬大豆根际土壤样本。在各试验处理区随机选取 10 点,去表层土后收集 15 ~ 20 cm 深土层土壤样本,过筛后混合均匀,-80 ℃ 保存。每个土壤样本 3 个生物学重复。

1.3.2 DNA 提取 分别从上述混合均匀的土壤样本中取 1.0 g 土壤,使用土壤总微生物 DNA 提取试剂盒 (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO Laboratories Inc., USA) 提取微生物基因组 DNA。使用 DNA 纯化试剂盒 (PowerClean DNA Clean-up Kit, MOBIO Laboratories Inc., USA) 对提取的土壤微生物基因组 DNA 进行纯化,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Scientific, USA) 测定土壤微生物基因组 DNA 浓度。-80 ℃ 保存备用。

1.3.3 PCR 扩增及高通量测序 以细菌通用引物

335F(5'-CADACTCCTACGGGAGGC-3')和 769R(5'-ATCCTGTTTGMTMCCCVCRC-3')对细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V4 区域进行 PCR 扩增^[18]。以真菌通用引物 ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGG-AAGTAA-3')和 ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCG-ATGC-3')对真菌 ITS1 区域进行 PCR 扩增^[19]。PCR 反应体系均为:5 μmol·L⁻¹引物各 0.8 μL,2.5 mmol·L⁻¹dNTP 2.0 μL, FastPfu Buffer 4.0 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL,模板 DNA 10 ng,加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件均为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。采用 PCR 产物纯化试剂盒 (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, USA) 对 PCR 扩增产物纯化后,将其送至百迈客生物科技有限公司,在 Illumina HiSeq 2500 测序平台上进行高通量测序,每个土壤样本 3 个生物学重复。

1.4 数据分析

为了获得更高质量、精准的生物信息,对 Illumina HiSeq 2500 高通量测序原始数据进行质量控制。采用 QIIME v1.8.0 软件对原始 DNA 序列进行处理^[20],利用 FLASH v1.2.7 软件进行序列拼接^[21]。将小于 200 bp 且平均碱基质量分数小于 20 的低质量序列或含有模糊碱基的序列在进一步分析前去除。嵌合体通过 UCHIME 检测并消除^[22]。相似性 $\geq 97\%$ 的优质序列聚为一个操作分类单元 (OTU)^[23]。通过 GenBank 内基于 BLAST 算法的搜索对 OTU 进行分类和识别。土壤微生物群落的丰富度、多样性和测序深度采用 Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和 Coverage 指数进行评价。分别绘制不同样本在门水平和属水平上的微生物群落分布柱状图,对根际土壤样本的微生物群落组成进行分析与比较。绘制 Heatmaps 以显示不同根际土壤样本 OTU 丰度的相对差异。

2 结果与分析

2.1 根际土壤细菌菌群组成分析

2.1.1 根际土壤细菌多样性分析 通过对正茬与迎茬大豆田土壤细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V4 区域进

行 Illumina HiSeq 2500 高通量测序,共获得原始序列 480 143 条,经去除低质量序列、Barcode 序列和引物序列后,共产生 453 486 条有效序列,每个样本至少产生 74 789 条有效序列,平均产生 75 581 条有效序列。使用 Usearch 软件对有效序列在 97% 的相似度水平下进行聚类并获得 OTU,经过 Silva 分类学数据库的注释以及 OUT 分析后,共获得 1 882 个细菌 OTU。细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V4 区测序的 OTU 覆盖率 Coverage 数值均为 0.998 0 以上(表 2),表明此测序深度可以准确地反映出样本中的 OTU 数量。由表 2 可知,迎茬大豆土壤细菌群落 OTU 数量、Ace 和 Chao1 指数均低于正茬大豆土壤,表明迎茬大豆土壤细菌群落丰富度相对较低,即细菌物种数量相对较低。对正茬与迎茬大豆土壤细菌群落 Simpson 指数和 Shannon 指数的分析同样表明,迎茬大豆土壤细菌群落多样性均低于正茬大豆土壤。由此可知,正茬大豆土壤细菌群落组成更为丰富和多样,这可能与不同种植方式下土壤中作物根系分泌物不同导致土壤理化性质发生变化,进而影响土壤细菌群落组成有关,表现为迎茬大豆土壤细菌群落丰富度和多样性显著降低。

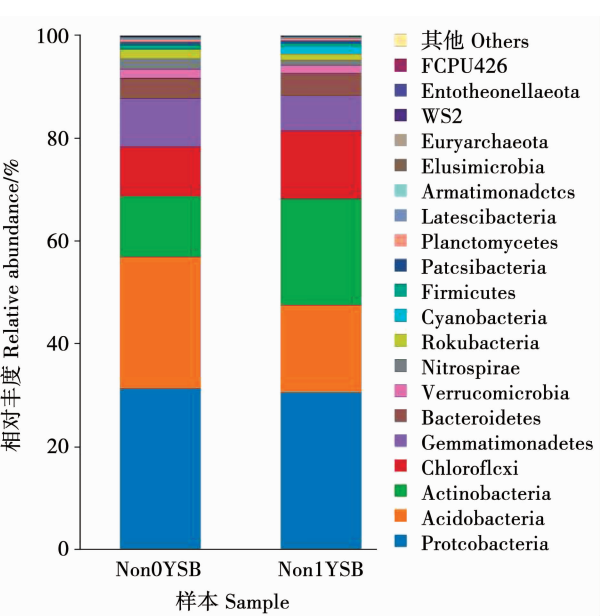
表 2 土壤样本中细菌多样性指数
Table 2 The diversity indices of bacteria in different rhizosphere soil samples

样品编号 Sample ID	OTU	Ace	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
Non0YSB1	1877	1905.011	1920.46	0.0036	6.5627	0.9986
Non0YSB2	1886	1910.678	1929.50	0.0034	6.5990	0.9983
Non0YSB3	1893	1914.579	1924.29	0.0036	6.5732	0.9984
Non1YSB1	1874	1900.731	1914.25	0.0047	6.4628	0.9982
Non1YSB2	1862	1888.958	1890.56	0.0048	6.4589	0.9983
Non1YSB3	1875	1903.438	1905.79	0.0050	6.4264	0.9982

注:Non0YSB 和 Non1YSB 分别表示正茬与迎茬大豆根际土壤细菌;末位不同数字代表 3 个生物学重复。下同。
Note:Non0YSB and Non1YSB represent the bacterial communities in the rhizosphere soil of soybean under rotational cropping and alternate cropping, respectively. Different numbers at the end represent three biological repeats. The same below.

2.1.2 根际土壤细菌群落组成分析 正茬与迎茬大豆土壤细菌群落在门分类水平上的分布情况如图 1 所示。两个土壤样本中各细菌类群所占比例存在差异,优势细菌群落主要分布于 20 个门。变形菌门(Proteobacteria)为正茬与迎茬大豆土壤细菌群落中最具优势的细菌门,所占比例分别为 31.27% 和 30.55%,而其他优势细菌门在正茬与迎茬大豆土壤细菌群落中存在较大差异。酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌

门(Chloroflexi)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)依次为正茬大豆土壤细菌群落中其他最具优势细菌门,所占比例分别为 25.59%、11.84%、9.67% 和 9.35%。然而,在迎茬大豆土壤细菌群落中其他最具优势细菌门依次为 Actinobacteria、Acidobacteria、Chloroflexi 和 Gemmatimonadetes,占比分别为 20.74%、16.93%、13.28% 和 6.81%。结果表明作物种植方式对土壤细菌群落组成影响较大,迎茬大豆根际土壤中有益细菌丰度显著降低,不利于作物生长。



注:Non0YSB 和 Non1YSB 分别表示正茬与迎茬大豆根际土壤细菌。下同。

Note: Non0YSB and Non1YSB represent the bacterial communities in the rhizosphere soil of soybean under rotational cropping and alternate cropping, respectively. The same below.

图1 正茬与迎茬大豆土壤细菌群落在门分类水平上的分布情况

Fig.1 The composition of bacterial communities at the phylum level in the rhizosphere soil of the rotational cropping and alternate cropping soybean

正茬与迎茬大豆土壤细菌群落在属分类水平上的分布情况如图2所示。与门分类水平上的分布情况相似,两个土壤样本中各细菌群落组成和主要优势属所占比例存在较大差异。其中,两个样本中20个优势细菌菌属分别占正茬与迎茬大豆土壤细

菌 OTU总数的 54.47%和 44.45%。其中,uncultured_bacterium_c_Subgroup_6 菌属为正茬与迎茬大豆土壤细菌群落中最具优势细菌门,所占比例分别为 11.61% 和 8.40%,而其他优势细菌属在正茬与迎茬大豆土壤细菌群落中存在较大差异。如 RB41 为正茬大豆土壤细菌群落中第二优势细菌属,所占比例为 6.28%。然而,在迎茬大豆土壤细菌群落中第二优势细菌属为鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*),所占比例为 4.53%。结果表明,大豆种植方式影响土壤细菌群落组成和主要优势属所占比例。这一结果与土壤细菌群落在门分类水平上的分析结果相似,迎茬大豆根际土壤中部分有益细菌丰度出现降低的趋势,土壤细菌群落组成发生变化,这可能会对作物生长产生不利影响。

在细菌属水平上对两个土壤样本(每个土壤样本 3 个生物学重复)所含细菌菌属进行聚类分析,根据聚类后各土壤样本中不同 OTU 数目对应所含序列的丰度作 Heatmap 图的结果如图 3 所示,依据颜色梯度的变化,可以在细菌属水平上反映出正茬与迎茬大豆土壤细菌群落结构的差异性。正茬与迎茬大豆土壤样本中细菌优势属及其相对丰度受大豆种植方式的影响较大,两个样本中优势细菌属及其相对丰度具有显著差异,迎茬种植会降低根际土壤中有益细菌丰度的占比,抑制促生菌生长。这可能与不同种植方式导致土壤理化性质发生变化,进而影响正茬与迎茬大豆根际土壤细菌群落组成密切相关,此结果与上述正茬和迎茬大豆土壤细菌群落在门及属分类水平上的分布情况分析结果相似。

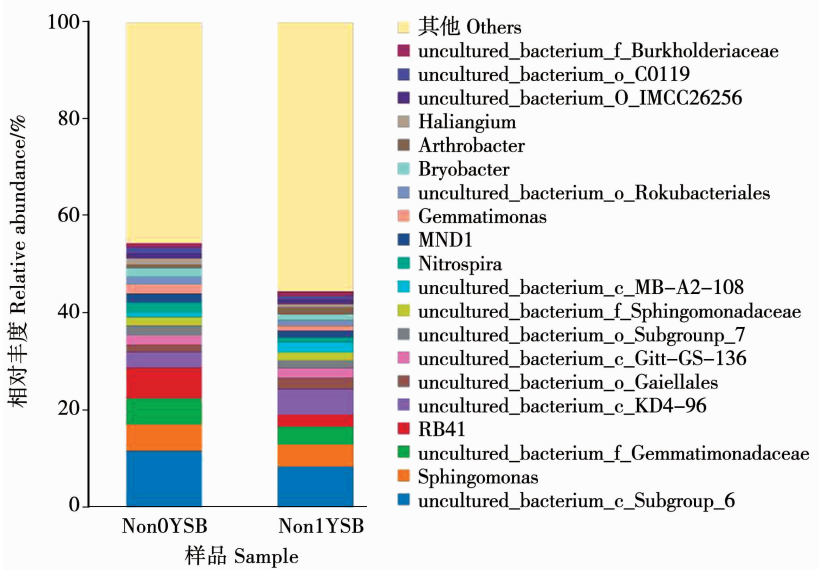
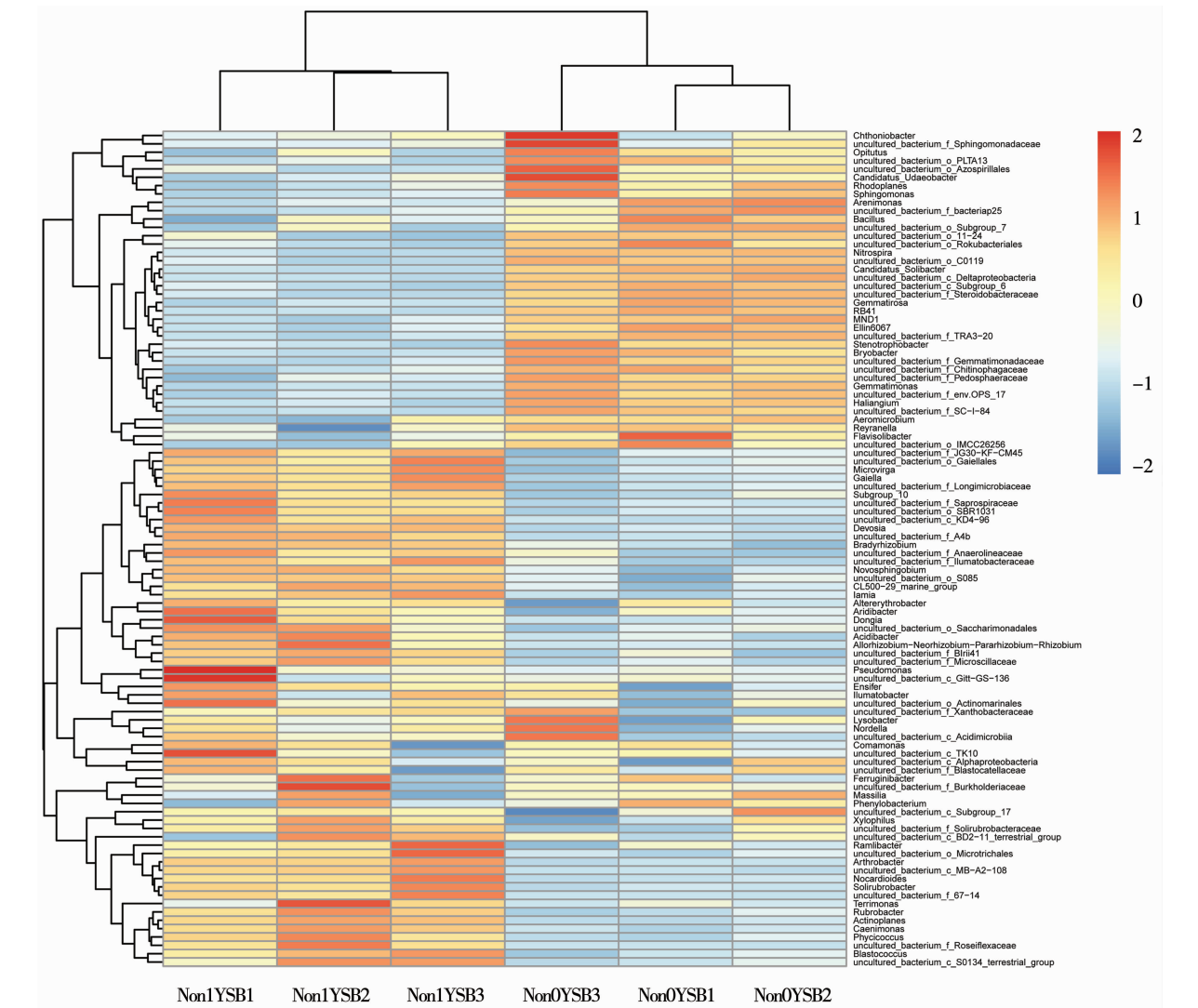


图2 正茬与迎茬大豆土壤细菌群落在属分类水平上的分布情况

Fig.2 The composition of bacterial communities at the genus level in the rhizosphere soil of the rotational cropping and alternate cropping soybean



注:Non0YSB 和 Non1YSB 分别表示正茬与迎茬大豆根际土壤细菌;末位不同数字代表 3 个生物学重复。下同。
Note:Non0YSB and Non1YSB represent the bacterial communities in the rhizosphere soil of soybean under rotational cropping and alternate cropping, respectively. Different numbers at the end represent three biological repeats. The same below.

图 3 不同样本中最丰富的 100 个细菌属的热图
Fig. 3 The heatmap of the 100 most abundant bacterial genera in the different samples

2.2 根际土壤真菌菌群组成分析

2.2.1 根际土壤真菌多样性分析 通过对正茬与迎茬大豆田土壤真菌 ITS1 区进行 Illumina HiSeq 2500高通量测序后,将原始序列中低质量序列、Barcode 序列和引物序列去除后,共产生 435 094 条有效序列,平均产生 72 516 条有效序列。使用 Usearch 软件对有效序列在 97%的相似度水平下进行聚类并获得 OTU,经过 UNITE 分类学数据库的注释以及 OUT 分析后共获得 149 个真菌 OTU。真菌 ITS1 区测序的 OTU 覆盖率 Coverage 指数均为 0.999 0 以上(表 3),表明测序文库已经达到饱和。由表 3 可知,根际土壤真菌多样性与细菌多样性分

析结果相反。迎茬大豆土壤真菌群落 OTU 数量、Ace 和 Chao1 指数均高于正茬大豆土壤,表明迎茬大豆土壤真菌群落丰富度相对较高。Simpson 和 Shannon 指数分析表明,迎茬大豆土壤真菌群落多样性均高于正茬大豆土壤。迎茬大豆土壤真菌群落组成更为丰富和多样,这一研究结果与根际土壤细菌多样性分析结果相对应,不同种植方式下土壤中作物根系分泌物不同,导致土壤理化性质发生变化。与细菌多样性分析结果相反,大豆迎茬种植方式下作物产生的根系分泌物更有利于土壤真菌生长,进而影响土壤真菌群落组成,表现为迎茬大豆土壤真菌群落丰富度和多样性显著升高。

表 3 土壤样本中真菌多样性指数
Table 3 The diversity indices of fungi in different rhizosphere soil samples

样品编号 Sample ID	OTU	Ace	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
Non0YSF1	140	187.3705	189.5	0.2102	2.2464	0.9991
Non0YSF2	128	176.8719	176.0	0.2023	2.1988	0.9990
Non0YSF3	145	185.3602	182.6	0.2160	2.2585	0.9991
Non1YSF1	154	193.2312	193.0	0.1408	2.3474	0.9990
Non1YSF2	173	215.5717	208.8	0.1735	2.6450	0.9992
Non1YSF3	157	199.5933	197.3	0.1987	2.5357	0.9994

2.2.2 根际土壤真菌群落组成分析 由图 4 可知,正茬与迎茬大豆土壤真菌群落中各真菌类群所占比例存在较大差异,优势真菌群落主要分布于 4 个门。子囊菌门(Ascomycota)在正茬与迎茬大豆土壤中均占主要优势,所占比例相近,分别为 51.52% 和 52.21%。在正茬与迎茬大豆土壤中其他优势真菌类群依次为担子菌门(Basidiomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和球囊菌门(Glomeromycota),但两个土壤样本中各真菌类群所占比例存在较大差异。在正茬大豆土壤中 Basidiomycota、Mortierellomycota 和 Glomeromycota 所占比例分别为 3.64%、0.26% 和 0.01%。然而,在迎茬大豆土壤中 Basidiomycota、Mortierellomycota 和 Glomeromycota 所占比例分别为 12.29%、0.006% 和 0.004%。此结果进一步表明,作物种植方式对土壤真菌群落组成影响较大,这可能与迎茬大豆植株根系分泌物对土壤理化性质影响较大,更有利于根际土壤中病原真菌的生长密切相关。

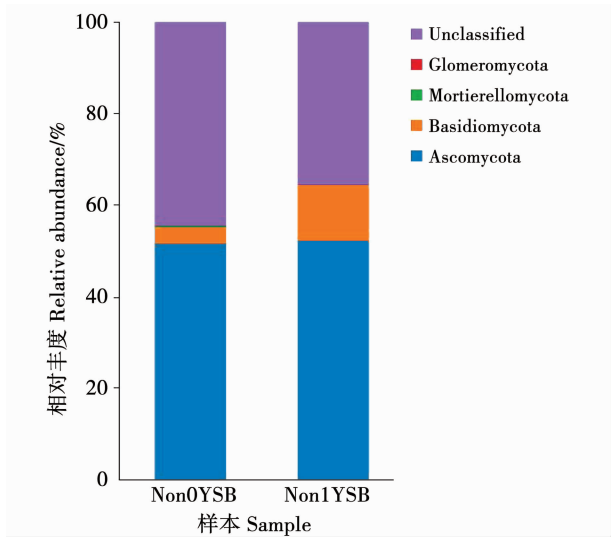


图 4 正茬与迎茬大豆土壤真菌群落在门分类水平上的分布情况
Fig. 4 The composition of fungal communities at the phylum level in the rhizosphere soil of the rotational cropping and alternate cropping soybean

正茬与迎茬大豆土壤真菌群落在属分类水平上的分布情况如图 5 所示。与门分类水平上的分布

情况相似,两个土壤样本中各真菌群落组成和主要优势属所占比例同样存在较大差异。镰孢霉属(*Fusarium*)、土赤壳属(*Ilyonectria*)、光黑壳属(*Preussia*)、拟棘壳孢属(*Setophoma*)和拟鬼伞菌属(*Coprinopsis*)依次为正茬大豆土壤真菌群落中最具优势的前 5 个属,所占比例分别为 15.67%、6.48%、5.42%、2.21% 和 1.78%。但在迎茬大豆土壤真菌群落中最具优势的前 5 个属则分别为粗糙孔菌属(*Subulicystidium*)、镰孢菌属(*Fusarium*)、柄孢壳属(*Podospora*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)和癣囊腔菌属(*Plectosphaerella*),所占比例分别为 10.29%、8.40%、3.47%、2.46% 和 2.18%。与土壤真菌群落在门分类水平上的分析结果相似,迎茬大豆根际土壤中部分病原真菌丰富度显著升高,土壤真菌群落组成发生显著变化,这可能与迎茬大豆根际土壤理化性质发生变化密切相关。与正茬大豆根际土壤相比,迎茬大豆根际土壤 pH 降低,更有利于土壤真菌生长,因此迎茬大豆根际土壤真菌表现出多样性增加、病原真菌丰富度升高,这可能是导致迎茬作物产量降低的主要原因之一。

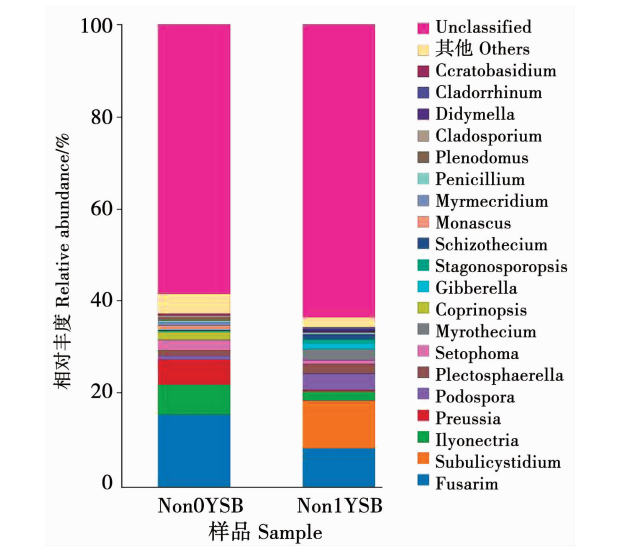


图 5 正茬与迎茬大豆土壤真菌群落在属分类水平上的分布情况
Fig. 5 The composition of fungal communities at the genus level in the rhizosphere soil of the rotational cropping and alternate cropping soybean

真菌属水平上的 Heatmap 图如图 6 所示,正茬与迎茬大豆土壤样本中真菌优势属及其相对丰度同样受大豆种植方式影响较大,其优势真菌属及其相对丰度具有显著差异。大豆迎茬种植增加了根际土壤中病原真菌的丰富度,抑制促生菌生长。此结果与上述正茬和迎茬大豆根际土壤真菌群落在

门及属分类水平上的分布情况分析结果相似,这可能与不同种植方式导致作物根际土壤理化性质发生变化,进而使正茬与迎茬大豆根际土壤真菌群落组成密切相关,迎茬大豆根际土壤理化性质的变化加速了土传病害的传播。

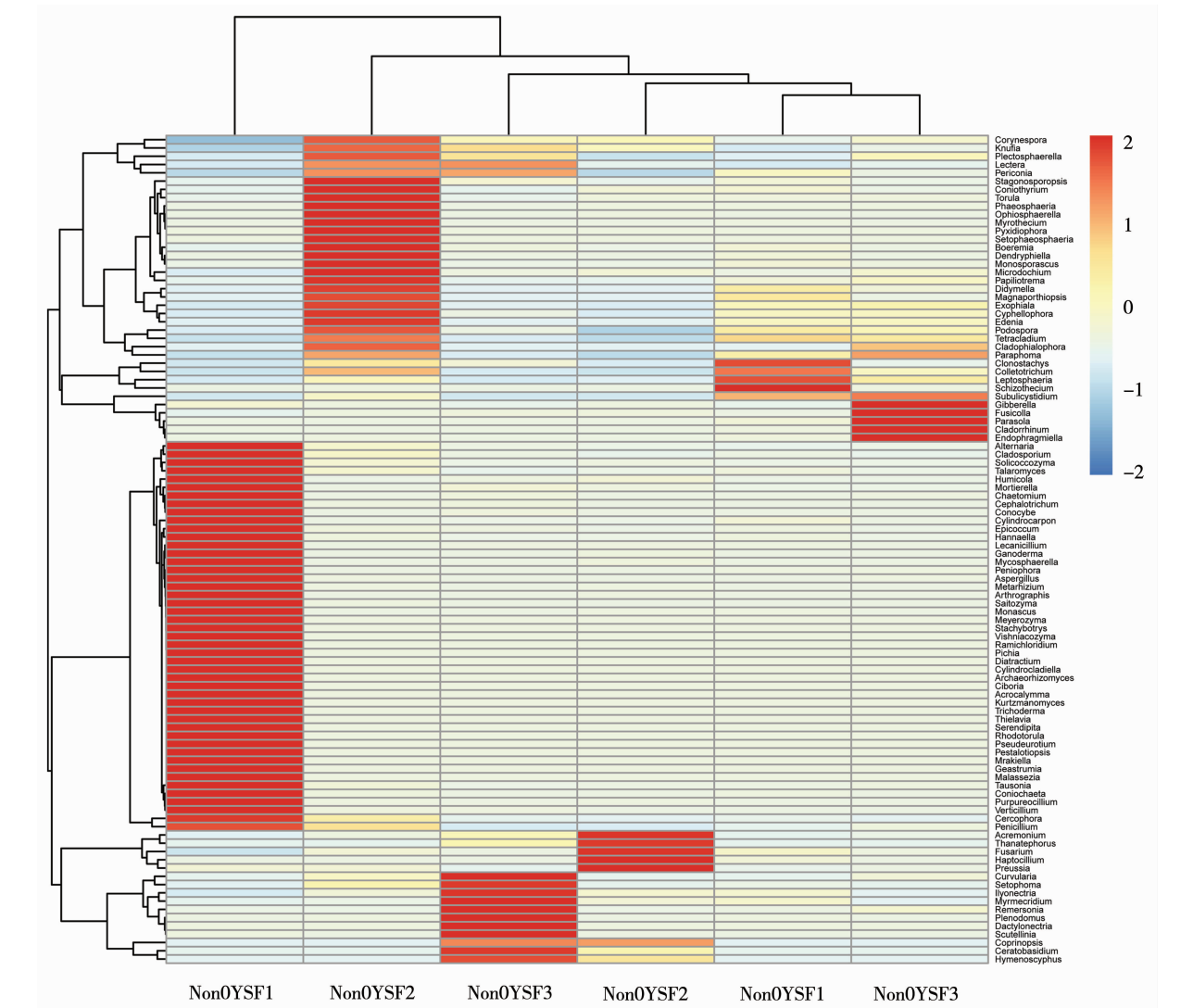


图 6 不同样本中最丰富的 100 个真菌属的热图

Fig. 6 The heatmap of the 100 most abundant fungal genera in the different samples

3 讨论

Alpha 多样性能够反映出单个样本中物种的丰度和多样性,可通过 Ace、Chao1、Simpson 和 Shannon 指数来衡量。Ace 与 Chao1 指数能够衡量物种丰度,即物种数量的多少。Simpson 与 Shannon 指数能够衡量物种的多样性,但受物种丰度与均匀度的影响。在相同物种丰度下,其均匀度越低,群落多样性越低,Simpson 指数值越大,Shannon 指数值越小,表明样本的物种多样性越低^[24]。本研究对正茬及迎茬大豆根际土壤细菌和真菌群落进行 Alpha 多样性分析的结果表明,大豆迎茬种植在一定程度上降

低了土壤细菌群落丰度和多样性,而增加了土壤真菌群落丰度和多样性,说明迎茬种植可能抑制了部分有益细菌的生命活动,而有利于部分病原真菌的生长,进而影响土壤中氮素、磷素等营养元素的循环,最终影响作物的正常生长。这与朱琳等^[25]的研究结果相似,在相同的农田土壤环境中,健康土壤中有益微生物的多样性往往高于病害土壤中有益微生物的多样性,迎茬土壤具有更高的病害发病潜力。作物迎茬种植会破坏土壤细菌群落组成,从而降低土壤细菌丰度及多样性^[26]。

本研究对正茬及迎茬大豆根际土壤细菌群落组成的分析可知,两个样本中细菌群落组成差异较

大,迎茬土壤中有益细菌丰度降低,大豆种植方式影响土壤细菌群落组成。如 *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Chloroflexi* 和 *Gemmatimonadetes* 为正茬大豆土壤细菌群落中优势细菌门,所占比例依次为 25.59%、11.84%、9.67% 和 9.35%。然而,在迎茬大豆土壤细菌群落中优势细菌门为 *Actinobacteria*、*Acidobacteria*、*Chloroflexi* 和 *Gemmatimonadetes*,所占比例依次为 20.74%、16.93%、13.28% 和 6.81%。同样的研究结果已在太子参、烟草及黄花蒿等不同作物中得到证实^[27-29]。同时,大豆迎茬种植会影响土壤细菌群落组成,降低有益细菌的丰度,如参与土壤中营养元素循环的细菌丰度也会受迎茬种植的影响。作物迎茬种植不仅能够抑制土壤中细菌的相对丰度,而且会削弱细菌间的相互作用,从而影响土壤中氮素、磷素等营养元素的循环,最终影响其生长^[30]。土壤中的可培养细菌是土壤生态系统的重要组成部分,但它们更易受到土壤生态系统变化的影响^[31]。土壤微生物几乎参与了土壤中的所有生化反应,包括土壤中主要营养元素的循环与利用,土壤微生物的数量及活性与土壤生态系统的维持与改善密切相关^[32]。

对正茬及迎茬大豆根际土壤真菌群落组成分析可知,两个样本中真菌群落组成差异亦较大,正茬大豆土壤真菌群落中最具优势的前 5 个属依次为 *Fusarium*、*Ilyonectria*、*Preussia*、*Setophoma* 和 *Coprinopsis*,所占比例分别为 15.67%、6.48%、5.42%、2.21% 和 1.78%。然而,迎茬大豆土壤真菌群落中最具优势的前 5 个属则分别为 *Subulicystidium*、*Fusarium*、*Podospora*、*Myrothecium* 和 *Plectosphaerella*,所占比例分别为 10.29%、8.40%、3.47%、2.46% 和 2.18%。部分病原真菌,如 *Subulicystidium*,在正茬土壤中丰度较低,而在迎茬土壤中的丰度较高,不利于迎茬土壤中作物的生长。大豆种植方式不同,两个土壤样本中优势真菌群落组成差异明显,大豆迎茬土壤中有害真菌的丰度相对较高。大豆根腐病主要是由镰孢菌、腐霉菌、疫霉菌和丝核菌等真菌引起的^[33]。本研究表明,在正茬与迎茬土壤中均检测到 *Fusarium*,且均为优势真菌属,说明 *Fusarium* 为本研究样地中的大豆根腐病主要致病菌。有研究表明大豆迎茬种植其根际土壤真菌群落组成发生改变,如半裸镰孢菌、粉红粘帚霉、立枯丝核菌、大豆疫霉菌和腐霉菌等土传病原菌丰度增加^[34]。本研究结果再次证明了这一结论,研究发现迎茬土壤中根腐病病原菌 *Plectosphaerella* 的丰度明显高于正茬土壤中 *Plectosphaerella* 的丰度,*Plectosphaerella* 为本研究样地中诱发迎茬大豆根腐病加剧的主要致病菌之一。相似的研究结果在对马铃薯连作土壤的研究中也

得到证实,马铃薯连作土壤中立枯丝核菌与尖孢镰刀菌等丰度显著升高,土传病害加重,土壤中有益细菌如固氮菌被抑制,土壤微生物类型从细菌型向真菌型转变,土壤肥力逐年降低^[35]。由本研究结果可知,大豆迎茬障碍的主要影响因素之一是土壤中有益细菌丰度降低,而有害真菌丰度升高,这与 Heatmap 图中有益细菌与有害真菌丰度变化趋势一致。因此,对正茬及迎茬大豆根际土壤真菌群落进行解析有助于明确导致大豆迎茬障碍形成的致病真菌,为其生物防治提供必要的理论依据。

通过高通量测序技术解析正茬及迎茬大豆根际土壤微生物群落组成的结果表明,大豆迎茬种植对土壤微生物群落组成影响较大,细菌群落的丰富及多样性均较正茬土壤稍有增加,而真菌群落的情况则成相反的趋势。迎茬土壤中有益微生物在优势微生物中所占比例较低,而根腐病病原菌所占比例则较高,这将不利于大豆养分吸收和生长。而正茬土壤中这一结果与迎茬土壤结果相反,因此,正茬土壤中的有益微生物可能通过间接作用抑制土壤中大豆根腐病病原菌的生长,进而有利于大豆植株生长并提高产量。正茬及迎茬大豆根际土壤中各优势微生物群落亦具有显著差异,因此,后续研究有必要分析大豆长期连作条件下的土壤微生物群落组成,为揭示大豆迎茬及连作障碍的形成机制提供科学依据。

4 结论

大豆迎茬种植在一定程度上降低了土壤细菌群落丰度和多样性,而增加了土壤真菌群落丰度和多样性。大豆种植方式对其根际土壤微生物群落组成和主要优势属所占比例影响较大。正茬与迎茬大豆土壤细菌群落中优势细菌属分别为 *RB41* 和 *Sphingomonas*。正茬大豆土壤真菌群落中最具优势的前 5 个属依次为 *Fusarium*、*Ilyonectria*、*Preussia*、*Setophoma* 和 *Coprinopsis*,迎茬大豆土壤真菌群落中最具优势的前 5 个属则分别为 *Subulicystidium*、*Fusarium*、*Podospora*、*Myrothecium* 和 *Plectosphaerella*。大豆迎茬种植降低了土壤中有益细菌和真菌的丰度,而提高了有害真菌的丰度。解析正茬及迎茬大豆根际土壤微生物群落有助于明确导致大豆迎茬障碍形成的机制,为其生物防治提供必要的理论基础。

参考文献

[1] LIU X Q, HE J B, WANG Y F, et al. Geographic differentiation and phylogeographic relationships among world soybean populations [J]. The Crop Journal, 2020, 8(2): 260-272.
[2] COLEMAN K, WHITMORE A P, HASSALL K L, et al. The po-

tential for soybean to diversify the production of plant-based protein in the UK [J]. Science of the Total Environment, 2021, 767: 144903.

[3] JIE W G, LIN J X, GUO N, et al. Community composition of rhizosphere fungi as affected by *Funneliformis mosseae* in soybean continuous cropping soil during seedling period [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2019, 79(3): 356-365.

[4] 李为喜, 朱志华, 刘三才, 等. 中国大豆(*Glycine max*)品种及种质资源主要品质状况法分析[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 2(1): 185-192. (LI W X, ZHU Z H, LIU S C, et al. Analysis of main quality status of soybean (*Glycine max*) varieties and germplasm resources in China [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2004, 2(1): 185-192.)

[5] ZHANG W W, FENG Z Z, WANG X K, et al. Quantification of ozone exposure- and stomatal uptake-yield response relationships for soybean in northeast China [J]. Science of the Total Environment, 2017, 599-600: 710-720.

[6] 李森, 姚钦, 刘俊杰, 等. 大豆重迎茬研究进展[J]. 大豆科学, 2020, 39(2): 317-324. (LI S, YAO Q, LIU J J, et al. Research progress of soybean continuous cropping [J]. Soybean Science, 2020, 39(2): 317-324.)

[7] WANG Y, XU X, LIU T, et al. Analysis of bacterial and fungal communities in continuous-cropping ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) fields in different areas in China [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 3564-3569.

[8] 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 community structure in soybean rhizosphere soil [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(1): 230-238.)

[9] PAULO P J, MOREIRA B C, MARLIANE S, et al. Agroecological coffee management increases arbuscular mycorrhizal fungi diversity [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0209093.

[10] KLEIN E, KATAN J, GAMLIEL A. Soil suppressiveness to *Fusarium* disease following organic amendments and solarization [J]. Plant Disease, 2011, 95: 1116-1123.

[11] DONG L, JIANG X, FENG G, et al. Soil bacterial and fungal community dynamics in relation to *Panax notoginseng* death rate in a continuous cropping system [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31802.

[12] YANG R, MO Y, LIU C, et al. The effects of cattle manure and garlic rotation on soil under continuous cropping of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0156515.

[13] 许艳丽, 刘晓冰, 韩晓增, 等. 大豆连作对生长发育动态及产量的影响[J]. 中国农业科学, 1999, 32: 64-68. (XU Y L, LIU X B, HAN X Z, et al. Effects of continuous cropping on growth and yield of soybean [J]. Agricultural Science in China, 1999, 32: 64-68.)

[14] 许艳丽, 王光华, 韩晓增. 连、轮作大豆土壤微生物生物分布特征与大豆根部病害关系的研究[J]. 农业系统科学与综合研究, 1995, 11(4): 311-314. (XU Y L, WANG G H, HAN X Z. Study on the relationship between soil microbial biodistribution and soybean root diseases in continuous and rotation soybean [J]. Agricultural System Science and Comprehensive Research, 1995, 11(4): 311-314.)

[15] WEI W, XU Y, LI S, et al. Analysis of *Fusarium* populations in a soybean field under different fertilization management by Real-time quantitative PCR and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Journal of Plant Pathogenicity, 2012, 94(1): 119-126.

[16] 魏巍, 许艳丽, 刘金波, 等. 土壤镰孢菌 Real-Time qPCR 定量方法的建立及应用[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 655-658, 662. (WEI W, XU Y L, LIU J B, et al. Establishment and application of real time qPCR quantitative method for soil *Fusarium* [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 655-658, 662.)

[17] 魏巍, 许艳丽, 朱琳, 等. 长期连作对大豆根际土壤镰孢菌种群的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(2): 497-504. (WEI W, XU Y L, ZHU L, et al. Effects of long-term continuous cropping on *Fusarium* population in soybean rhizosphere soil [J]. Journal of Applied Ecology, 2014, 25(2): 497-504.)

[18] DORN-IN S, BASSITTA R, SCHWAIGER K, et al. Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 113: 50-56.

[19] SMITH D P, PEAY K G. Sequence depth, not PCR replication, improves ecological inference from next generation DNA sequencing [J]. PLoS One, 2014, 9: e90234.

[20] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336.

[21] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.

[22] EDGAR R C, HAAS B J, QUINCE C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2020, 27: 2194-2200.

[23] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.

[24] GRICE E A, KONG H H, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192.

[25] 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, ZENG C L, LI Y Q, et al. Diversity analysis of soil bacterial community in soybean continuous cropping system based on high-throughput sequencing [J]. Soybean Science, 2017, 36(3): 419-424.)

[26] 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: 267-275.

- [27] 林茂兹, 王海斌, 林辉锋. 太子参连作对根际土壤微生物的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(1): 106-111. (LIN M Z, WANG H B, LIN H F. Effects of continuous cropping of *Pseudostellaria heterophylla* on rhizosphere soil microorganisms [J]. Journal of Ecology, 2012, 31(1): 106-111.)
- [28] 刘晔, 姜瑛, 王国文. 不同连作年限对植烟土壤理化性状及微生物区系的影响[J]. 中国农学通报, 2016, 32(13): 136-140. (LIU Y, JIANG Y, WANG G W. Effects of different continuous cropping years on physicochemical properties and microflora of tobacco growing soil [J]. Chinese Agronomy Bulletin, 2016, 32(13): 136-140.)
- [29] 李倩, 袁玲, 杨水平, 等. 连作对黄花蒿生长及土壤细菌群落结构的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1803-1810. (LI Q, YUAN L, YANG S P, et al. Influence of continuous cropping on growth of *Artemisia annua* and soil bacterial communities in soil [J]. Chinese Journal of Chinese Material Medicine, 2016, 41(10): 1803-1810.)
- [30] 崔晓莹, 白莉, 郭娜, 等. 摩西管柄囊霉 (*Funneliformis mosseae*) 对连作大豆根际土壤细菌菌群的影响[J]. 大豆科学, 2020, 2: 277-287. (CUI X Y, BAI L, GUO N, et al. Effects of *Funneliformis mosseae* on bacterial flora of soybean rhizosphere soil under continuous cropping [J]. Soybean Science, 2020, 2: 277-287.)
- [31] ELLIS R J, MORGAN P, WEIGHTMAN J, et al. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3223-3230.
- [32] 许光辉, 郑洪元, 张德生, 等. 长白山北坡自然保护区森林土壤微生物生态分布及其生化特性的研究[J]. 生态学报, 1984, 4(3): 207-222. (XU G H, ZHENG H Y, ZHANG D S, et al. Study on ecological distribution and biochemical properties of forest soil microorganisms on the northern slope of the Changbaishan Mountain Natural Reserve [J]. Journal of Ecology, 1984, 4(3): 207-222.)
- [33] LIU J B, XU Y L, LI C J, et al. Effect of long term soybean monoculture on soybean root rot and soybean growth and development in pot experiment [J]. Soybean Science, 2008, 27: 806-810.
- [34] ZHANG L, KHABBAX S E, WANG A, et al. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium crown* and root rot disease of tomato [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(3): 685-703.
- [35] XIONG W, ZHAO Q, XUE C, et al. Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 117.

欢迎订阅 2022 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管、主办的大豆专业性学术期刊,被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及广大农民。

《大豆科学》为双月刊,16开本,国内外公开发行。国内每期定价:40.00元,全年240.00元,邮发代号:14-95。国外每期定价:40.00美元(含邮资),全年240.00美元,国外邮发代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

地址:哈尔滨市松北区创新三路800号国际农业科技创新中心1321室

邮编:150028

电话:0451-51522862

网址:<http://ddkx.haasep.cn>

E-mail:soybeanscience@vip.163.com

