



# 基于 rDNA 测序的连作大豆土壤微生物群落变化规律研究

曲晓华<sup>1,2</sup>, 戴艳婷<sup>1</sup>, 赵晓燕<sup>1</sup>

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生态研究所/山东省应用微生物重点实验室, 山东 济南 250103; 2. 威海市城市管理综合服务中心, 山东威海 264200)

**摘要:**为寻找连作障碍与土壤微生物群落之间的联系,从土壤微生物群落生态的角度研究大豆连作障碍的机理,以大豆正茬、连作4,6,8和10年的大豆盛花期土体和根际土壤为研究对象,采用16S/18S rDNA PCR-DGGE方法,对比连作不同年份土壤中细菌和真菌种群结构的变化规律,并对差异性电泳条带进行测序比对。结果显示:聚类分析表明,连作不同年份的土体土聚在一簇,根际土聚在另一簇,土体土细菌和真菌群落结构明显不同于根际土壤;16S rDNA的DGGE图谱表明,土体细菌群落没有发现明显的条带变化,根际细菌种群出现了明显的变化,变化较大的细菌种群经序列比对表明多为 *Proteobacterium*, 是一种固氮菌;18S rDNA的DGGE图谱表明,各处理间真菌结构存在一定差异和变化,不同处理间一些条带出现或消失,变化较大的真菌种群经序列比对表明多为 *Trichosporon pullulans*、*Temellomycete*、*Phoma sp.*、*Cladosporium cladosporioides*、*Trichosporon pullulans* 和 *Cyathus striatus*。结果说明细菌和真菌的根际效应很明显,连作大豆细菌种群变化不大,对真菌种群结构影响较大,研究结果可为大豆连作障碍机理研究提供科学依据。

**关键词:**大豆;连作;土壤微生物;细菌;真菌;种群结构;rDNA

## Changes of Soil Microbial Community of Continuous Cropping Soybean Based on rDNA Sequencing

QU Xiaohua<sup>1,2</sup>, DAI Yanting<sup>1</sup>, ZHAO Xiaoyan<sup>1</sup>

(1. Ecology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences)/Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Jinan 250103, China; 2. Weihai City Management Integrated Service Center, Weihai 264200, China)

**Abstract:** In order to find out the relationship between continuous cropping barriers and soil microbial communities, this research studied the mechanism of soybean continuous cropping obstacles from the ecological view of soil microbial community, the soil and rhizosphere soil of soybean in full flowering period of soybean stubble and continuous cropping for 4, 6, 8 and 10 years were taken as the research objects, the 16S/18S rDNA PCR-DGGE method was used to study the characteristics of soil and rhizosphere in full flowering stage of soybean, the population structure of bacteria and fungi in different years of continuous cropping soil were compared, and the differential electrophoresis bands were sequenced and compared. The results show: cluster analysis shows soil is clustered in one cluster and rhizosphere soil in another cluster, the community structure of bacteria and fungi is obviously different from that of rhizosphere soil. The DGGE map of 16S rDNA showed that there was no obvious change in the soil bacterial community, but there was obvious change in the rhizosphere bacterial population. The sequence alignments showed that most of them were *Proteobacterium*, which was a kind of nitrogen-fixing bacteria. The DGGE map of 18S rDNA showed that there were some differences and changes in the fungal structure among the treatments, and some bands appeared or disappeared in different treatments, the sequence alignments showed that most of the fungi with great variation were *Trichosporon pullulans*, *Temellomycete*, *Phoma sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichosporon pullulans* and *Cyathus striatus*. Results showed that the rhizosphere effect of bacteria and fungi was obvious, and the change of bacterial population in soybean soil was not obvious, and it had great effect on the structure of fungal population. The results can provide scientific basis for the mechanism of soybean continuous cropping obstacle.

**Keywords:** soybean; continuous cropping obstacle; soil microbe; bacteria; fungi; community structure; rDNA

大豆连作导致产量下降,通常减产幅度在10%~35%<sup>[1-2]</sup>。大豆连作障碍的原因一直是研究的热点问题,其中以大豆根际和土壤之间的微生态学研究较多,主要表现为连作土壤养分缺乏<sup>[3]</sup>、根部病虫害加重<sup>[4]</sup>、作物根系分泌及残根腐解的有害化感物质累积<sup>[5]</sup>和土壤微生物群落结构改变等<sup>[6]</sup>。大

量研究发现,土壤微生物各菌种的比例关系失衡<sup>[7-8]</sup>及种群数量变化较大是大豆连作障碍的主要原因之一<sup>[9]</sup>,其中以大豆根际的变化尤为显著<sup>[10]</sup>。

很多学者对大豆根际土壤微生物数量做了大量的研究,基本认为连作后,土壤细菌数量减少,真菌总量增加。其中有益真菌数量减少,有害真菌数

收稿日期:2024-01-31

基金项目:山东省重点研发项目(2019GSF109012);青岛市科技惠民示范专项(23-2-8-xdny-5-nsh)。

第一作者:曲晓华(1980—),女,博士,副研究员,主要从事植物营养学研究。E-mail:45900251@qq.com。

通讯作者:赵晓燕(1978—),女,硕士,副研究员,主要从事生物防治和面源污染修复研究。E-mail:28468805@qq.com。

量如青霉菌和镰刀菌等增加,同时,大豆胞囊线虫、根腐病等病虫害发生严重<sup>[11-12]</sup>。关于大豆连作的微生物群落研究报道很多,然而传统培养方法的瓶颈问题限制了研究的深入进行,现对大豆连作土壤微生物区系特别是未培养微生物的连续变化趋势跟踪研究尚不充分,也未探明连作条件下根部微生物区系的演替规律。

DGGE 电泳条带的多少可以直观地反映样品细菌群落的遗传多样性,多样性指数是研究群落物种数及其个体数和分布均匀度的综合指标<sup>[13-14]</sup>。本研究从土壤微生物群落生态的角度研究连作障碍的机理,利用 16S/18S rDNA PCR-DGGE(变性凝胶电泳)方法,进一步探明连作土壤中微生物种群结构和功能的变化规律,以期找出连作障碍与土壤微生物群落之间的联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试大豆 采用绥农 10 号作为供试大豆品种。

1.1.2 供试土壤 试验地位于黑龙江省农业科学院大豆连作长期试验站,于 2020 年 7 月大豆盛花期初取样,将正茬、连作 2,4,6,8,10 年土体土壤和正茬、连作 2,4,6,8,10 年根际土壤,分别编号为 1~12。按五点取样法选取大豆植株,先去掉 0~5 cm 的表土,轻轻抖掉根系外围土作为土体土,用毛刷刷轻轻刷粘附在根表面的土壤作为根际土,用无菌的封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验,研磨过 1 mm 筛后储于 -20 °C 冰箱中做 DNA 分析。

1.1.3 主要试剂 土壤 DNA 提取试剂盒购自美国 Q-BIOgene 公司,PCR 扩增采用的酶是 TaKaRa(大连宝生物工程公司) LA *Taq* 酶,PCR 引物由 Takara 公司合成,琼脂糖胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司,丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(37.5:1)、Tris 等为上海生工公司产品。去离子甲酰胺、尿素、过硫酸胺、TEMED(四甲基乙二胺)等试剂是美国 Amresco 公司产品,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳染色剂是购自 Sigma 公司的 SYBR Green I nucleic acid gel stain (10 000 ×)。其余常规药品均为进口或国产分析纯级,测序在上海生工公司进行。

常用溶液:EB 储备液(10 mg·mL<sup>-1</sup>)、0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA(pH8.0)、10 × Tris EDTA、50 × TAE、6 × DNA Loading Buffer、10% APS。

DGGE 专用缓冲液:3.854 g 醋酸铵、0.214 g 四水合醋酸镁、0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH8.0), Diffusion buffer 定容至 100 mL,121 °C 灭菌 15 min 后加入

0.5 mL 20% SDS。

DGGE dye:称取 6 g 蔗糖溶于 2 mL 去离子水中,定容至 10 mL,121 °C 灭菌 15 min,配置为 60% 蔗糖;在 15 mL 离心管中加入 2.5% 溴酚蓝 200 μL,0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA 2 mL,20% SDS 250 μL,混匀后加入 6.66 mL 60% 蔗糖,定容至 10 mL,配置为 2 × DNA Loading Buffer。

1.1.4 主要仪器 FastPrep<sup>®</sup>核酸快速提取仪(BIO 101<sup>®</sup>Systems 公司);MJ-PCR 仪(MJ 公司,英国);高速冷冻离心机为美国科俊仪器公司生产;超低温冰箱和制冰机为 SANYO 型,Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统(DCode Universal Detection System Instrument,美国);凝胶成像分析系统为安莱生命科技有限公司产品 AlphaImager2200。

### 1.2 方法

1.2.1 土壤微生物基因组 DNA 的提取 采用 BIO 101<sup>®</sup>Systems 公司生产的 FastPrep<sup>®</sup>核酸快速提取仪,再与相应的 FastPrep<sup>®</sup> soil DNA Kit 试剂盒联用,提取和纯化土壤样品的原始 DNA。

1.2.2 土壤基因组 DNA 的 PCR 扩增 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增:采用对大多数细菌和古细菌 16S rRNA 基因 V3 区的特异性引物 F357GC (5'-cgcccgccgcgcgcggcgggcgggcgggggcaccgggggacctacggaggcagcag-3') 和 R518 (5'-attaccgcggttctgg-3') (Muyzer,1993),退火温度 55 °C,扩增产物片断长约 230 bp。

真菌 18S rRNA 基因的 PCR 扩增:采用 FUNGGC 和 NS1 两套通用引物<sup>[15]</sup>,分别对真菌 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增。引物对 NS1 和 FUNGGC 的序列分别为 NS1 (5'-gtagtcatatgcttctctc-3') 和 FUNGGC: (5'-cgcccgccgcgccccgcgccccggccccgcgccccgcgccattccccgttaccggtg-3')。退火温度 57 °C,扩增产物片断长约 390 bp。

PCR 反应体系:50 μL 扩增反应体系含 5 μL 10 × 缓冲液(含 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>),2 μL dNTP (25 mmol·L<sup>-1</sup>),2 μL 引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>),模板 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U,双蒸水 ddH<sub>2</sub>O 补加到 50 μL。

PCR 反应程序:95 °C 预变性 6 min,95 °C 变性 30 s,55 °C(真菌使用 57 °C)退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,35 个循环,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保温。

PCR 反应产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,AlphaImager2200 成像系统拍照。

1.2.3 PCR 反应产物 DGGE 分析 变性胶的制备:配制浓度为 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶,按照要求的变性梯度加入一定比例的 40% 丙烯酰胺、50 × TAE、

去离子甲酰胺和尿素,加入催化剂过硫酸胺 ASP (160  $\mu\text{L}$ )和四甲基乙二胺 TEMED(30  $\mu\text{L}$ ),加双蒸水定容至 100 mL,使用梯度胶混合器进行灌胶。细

菌和真菌 PCR 反应产物检测的变性胶梯度浓度分别为 30% ~ 55% 和 15% ~ 35%,其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增,室温聚合至少 2 h。

表 1 不同浓度变性胶的制备

Table 1 Preparation of denature gel of different concentration

试剂 Reagent	胶浓度 Gel concentration			
	15%	30%	35%	55%
40% 丙烯酰胺 Acrylamide-Bis/mL	20	20	20	20
50 $\times$ TAE/mL	2	2	2	2
去离子甲酰胺 Deionized Formamide/mL	6	12	14	22
尿素 Urea/g	6.3	12.6	14.7	23.1
过硫酸胺 ASP/ $\mu\text{L}$	160	160	160	160
四甲基乙二胺 TEMED/ $\mu\text{L}$	30	30	30	30
双蒸水 ddH <sub>2</sub> O	定容至 100 mL			

PCR 样品的加样:待胶完全凝固后,将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中,将 20 ~ 30  $\mu\text{L}$  PCR 样品与 8  $\mu\text{L}$  2  $\times$  Loading Buffer 混匀,然后加入点样孔中。

电泳及染色:电泳缓冲液为 1  $\times$  TAE,预热到 60  $^{\circ}\text{C}$ 。点样后首先 20 V 电压 60  $^{\circ}\text{C}$  电泳 10 min,然后 80 V 电压 60  $^{\circ}\text{C}$  电泳 16 h。电泳完毕后,将凝胶在 SYBR Green I 中浸泡染色 20 ~ 30 min。

DGGE 分离后的遗传多样性分析:使用凝胶用凝胶影像分析仪 AlphaImager 2200 观察样品的电泳条带并拍照,采用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)对各样品电泳条带的多少及密度来进行定量分析,以作为多样性统计指标的初步数据,同时计算各样品间的相似性系数,并自动生成聚类树(UPGMA)。多样性指数(H),丰度(S)和均匀度(E)等指标被用来比较各个样品的细菌多样性。计算公式为: $H = -\sum(P_i)(\ln P_i)$ ;

$E = H/H_{\max} = H/\ln S$ ;  $S_{xy} = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 。其中, $P_i$  是某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率, $S$  是某个样品中所有条带数目总和, $N_x$  代表在样品  $x$  中某一产物扩增的条带数, $N_y$  代表在样品  $y$  中某一产物扩增的条带数, $N_{xy}$  代表在  $x$  和  $y$  中扩增出片段长度相同的条带数。

#### 1.2.4 变性聚丙烯酰胺凝胶中条带的回收和测序

将 DGGE 图谱中主要条带或消失或出现的条带切胶回收。回收方法为加入 400  $\mu\text{L}$  100% 乙醇,10 ~ 15 min 后,胶变为白色。真空吸走上清液后在离心管中加入 200  $\mu\text{L}$  Diffusion buffer。胶从白色变为透明色后 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。用酒精沉淀法<sup>[16]</sup>回收 DNA。

测序前将回收的 DGGE 条带重新 PCR(参照上文方法)后再做 DGGE 分离,直至在 DGGE 中出现单一条带后,重新按照前面的引物(去掉 GC 夹)进行 PCR 扩增,用于测序的 PCR 程序与 PCR-DGGE 的程序基本相同,但循环数少于 25 个。PCR 的模板为 1  $\mu\text{L}$ ,按 50  $\mu\text{L}$  体系,每个样品扩增 2 管,然后把 2 个 PCR 产物合并为 100  $\mu\text{L}$  混合物。经琼脂糖凝胶 TaKaRa 公司回收试剂盒去掉引物后,送上海生工公司测序。

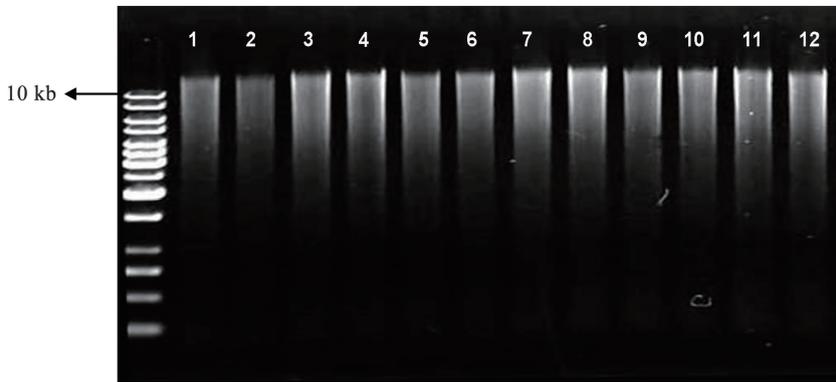
1.2.5 数据统计 土壤微生物群落 DNA 的 PCR-DGGE 图谱采用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件分析;试验数据用 SPSS 26.0 统计软件处理。

采用 DNAMAN 软件对测序结果进行序列有效性验证剔除无效序列,将剩余序列合并比对后在 NCBI 的 Blast 功能搜索 GenBank、DDBJ 和 PDB 上的所有序列,获取公开的相近菌株的 16S/18S rRNA 基因序列。同时,利用 Bioedit 软件的 Clustal W 方法和 Mega 软件的 NJ 方法建立系统发育树,遗传距离用 Tamura-Neighbor 公式<sup>[17]</sup>计算,枝长代表了分歧程度,各枝上的数字是 10 000 次 bootstrap 重抽样分析的支持百分比,然后将序列递交给 Genebank,即可获得 Acession Number 和 Genebank 的检索结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生物基因组 DNA 的提取及特异性扩增

2.1.1 基因组 DNA 质量检测 将提取的土体和根际微生物基因组 DNA 进行电泳的结果如图 1 所示,可以获得较为完整的基因组 DNA,可用于下一步 PCR 扩增。



注:编号为 1~12 泳道分别为正茬、连作 2,4,6,8 和 10 年土体土壤和正茬、连作 2,4,6,8 和 10 年根际土壤。下同。

Note: Lanes 1-12 were no-replanting, replanting for 2, 4, 6, 8 and 10 years of soil mass, and no-replanting, replanting for 2, 4, 6, 8 and 10 years of rhizosphere soil. The same below.

图 1 土壤基因组 DNA 检测图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of soil microbial community genome

2.1.2 引物对 F357GC/R518 扩增 16S rDNA 部分片断的产物 如图 2 所示,采用大多数细菌和古细菌引物(F357GC 和 R518)对细菌基因组 DNA 进行特异性扩增,均可以获得长度约为 230 bp 的 16S rDNA 片段的 PCR 产物。

2.1.3 引物对 NS1/FUNGGC 扩增 18S rDNA 部分片断的产物 如图 3 所示,采用真菌通用引物 NS1/FUNGGC 对真菌基因组 DNA 进行特异性扩增,均可以获得长度约为 390 bp 的 18S rRNA 片段的 PCR 产物。

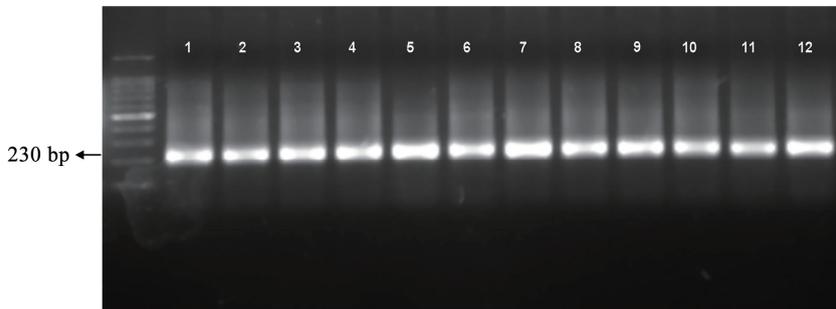


图 2 引物对 F357GC/R518 扩增产物检测图谱

Fig. 2 PCR products of bacterial 16S rDNA amplified by primer pair F357GC-R518

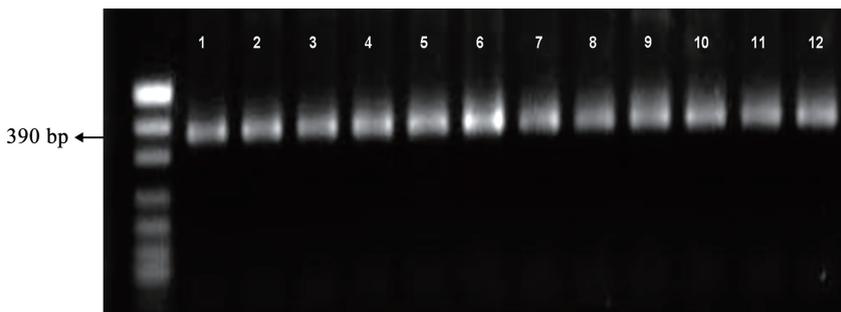


图 3 引物 NS1 和 FUNGGC 扩增产物检测图谱

Fig. 3 PCR products of fungal 18S rDNA fragment amplified by primer pair NS1-FUNGGC

## 2.2 不同连作年份土体土和根际土细菌群落结构分析

2.2.1 细菌 16S rDNA 的 DGGE 图谱分析 从图 4 可以看出,正茬、连作 2、4、6、8 和 10 年大豆在盛花期的土体细菌群落没有明显的变化,而根际细菌群落部分条带出现变异,将根际中出现变异的条带回收测序。将 X1 和 X2 测序结果与 NCBI 中核酸数据

库序列比对结果如表 2 所示。其中,条带 X1 在正茬根际和连作 4 年出现富集,条带 X2 出现在正茬根际,X1 和 X2 比对结果与 *Proteobacterium*(NCBI 登录号为 EF020277)相似性均为 98%,是一种固氮菌。可以看出,正茬花期根际出现并富集了 *Proteobacterium*,而随着大豆连作年限的增加,这两种固氮菌数量逐渐减少。

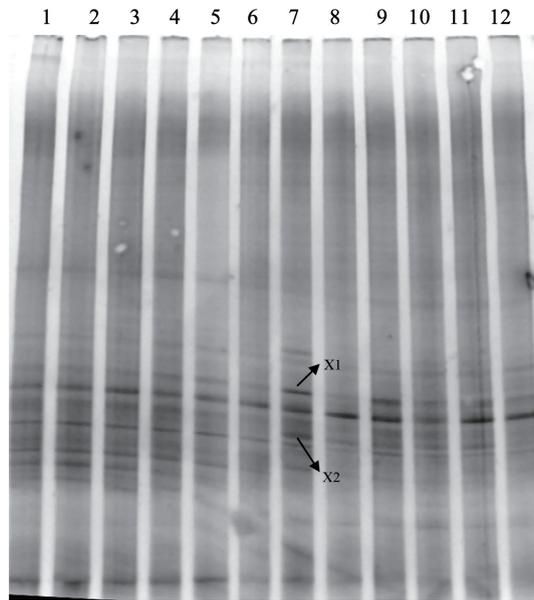


图4 供试土壤细菌 16S rDNA 扩增的 DGGE 图谱

Fig.4 DGGE gel of partial 16S rDNA fragments amplified using primer pair F357GC-R518

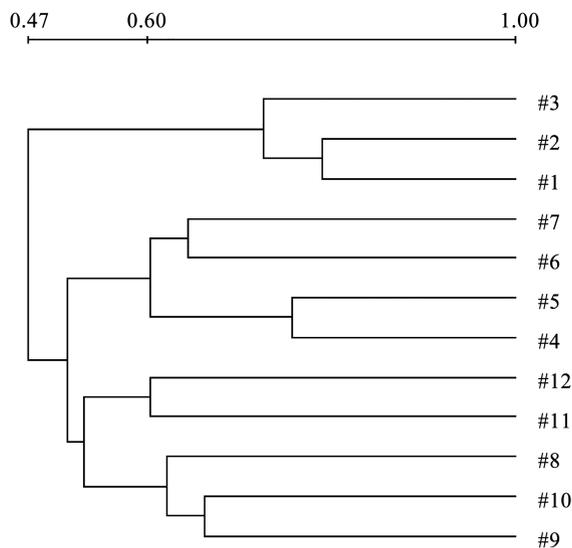
表2 供试土壤样品细菌 16S rDNA DGGE 扩增产物图谱中部分条带测序鉴定

Table 2 Species of fungal and bacterial sequences in the NCBI database most similar to the clones of tested soil samples

条带 DGGE band	长度 Sequence length/bp	最相似种类 Closest relative	相似值 Identity/%	登陆号 Accession No.
X1	202	Proteobacterium	98	EF020277
X2	196	Proteobacterium	98	EF075770

2.2.2 细菌群落系统发育分析 根据细菌群落 DGGE 图谱构建发育树结果如图 5 所示,土体和根际土壤细菌群落分别聚为两大类,正茬、连作 2,4,

6,8 和 10 年土体土壤细菌群落聚在一起,连作 2,4,6,8 和 10 年根际土壤细菌群落聚在另外一簇,与从 DGGE 图谱中直接观察的结果一致。



注:编号#1~12 分别为正茬、连作 2,4,6,8 和 10 年土体土壤和正茬、连作 2,4,6,8 和 10 年根际土壤。下同。

Note: Code #1-12 were no-replanting, replanting for 2, 4, 6, 8 and 10 years of soil mass, and no-replanting, replanting for 2, 4, 6, 8 and 10 years of rhizosphere soil. The same below.

图5 基于 UPGAMA 方法的 DGGE 图谱发育树

Fig.5 Dendrogram of DGGE profiles of bacterial community based on UPGAMA

## 2.3 不同连作年份土体土和根际土真菌群落结构分析

2.3.1 真菌 18S rDNA 的 DGGE 图谱分析 如图 6 所示,各处理间真菌群落结构存在一定差异,不同处理间引物对 NS1/FUNGGC 扩增的一些条带出现或者消失。例如,在一些处理中出现了一些特异条带,条带 L6 和 L9 在连作 6 年土体含量高,而其它处理含量低或没有;条带 L11 和 L12 在正茬土体和根

际土中不明显出现或没有,而在连作各年限的土体和根际土中均出现,并在有些连作年限中表现为优势种群,L11 在连作 2 和 4 年表现为优势种群,在连作 6 和 8 年消失或含量低,而在连作 10 年含量又有所回升,L12 在连作 10 年表现为优势种群;条带 L1 和 L2 在连作 2 年根际土含量高,而在其他处理表现含量低或没有。将这些特异条带切胶测序和鉴定(表 2)。

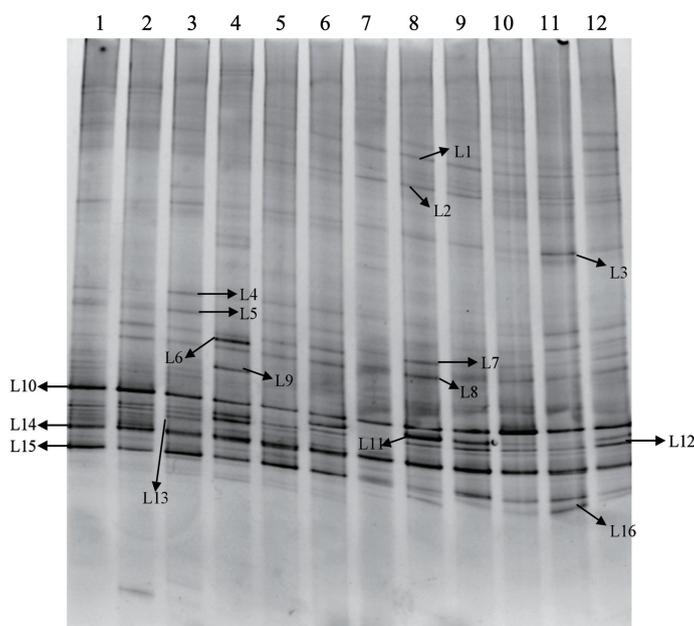


图 6 引物对 NS1-FUNGGC 扩增真菌 18S rDNA 的 DGGE 图谱

Fig. 6 DGGE gel of partial 18S rDNA fragments amplified using primer pair NS1-FUNGGC

2.3.2 真菌群落系统发育分析 根据真菌群落 DGGE 图谱构建发育树如图 7 所示,土体和根际真菌群落分别聚为两类,正茬、连作 2,4,6,8 和 10 年

土体土壤真菌群落聚在一起,正茬、连作 2,4,6,8 和 10 年根际土壤真菌群落聚在另外一簇,与从 DGGE 图谱中直接观察的结果一致。

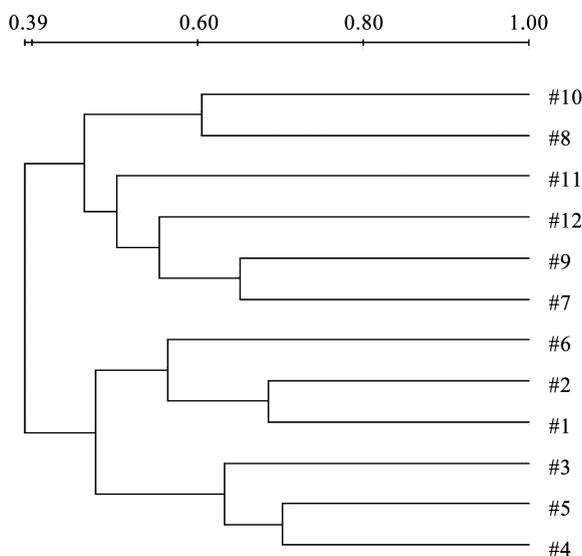


图 7 基于 UPGAMA 方法的真菌 DGGE 图谱发育树

Fig. 7 Dendrogram of DGGE profiles of fungal community based on UPGAME

## 2.4 微生物群落结构多样性和均匀度分析

依据 DGGE 电泳图谱中每个条带的强度,对样品中的细菌多样性指数(H)和均匀度(E)等指标进行分析的结果如表3所示。细菌多样性和均匀度比较发现,土体各连作年限的土壤的多样性均高于正茬土壤,随着连作年限的增加,细菌多样性呈现先增加后减少的趋势,在大豆连作6年处理达到最高,到了大豆连作8和10年又逐渐减少,差异达到显著水平;而根际细菌多样性的结果正好与土体相

反,差异达到显著水平;均匀度与多样性的结果基本一致,差异达到显著水平。真菌多样性和均匀度比较发现,土体真菌多样性和均匀度差异不大,均未达到显著水平;而对于根际土而言,土体各连作年限的土壤的多样性均低于正茬土壤,随着连作年限的增加,真菌多样性呈现先减少后增加的趋势,在大豆连作6年处理达到最低,到了大豆连作8和10年又逐渐增加,差异达到显著水平;均匀度与多样性的结果基本一致,差异达到显著水平。

表3 盛花期不同处理土体、根际细菌和真菌 DGGE 多样性指数(H)和均匀度(E)

Table 3 Shannon-Weaver (H) and Evenness (E) of bacteria and fungal for bulk and rhizosphere soil samples estimated by the DGGE bands patterns at flowering stage

处理 Treatment	细菌 Bacteria		真菌 Fungal		
	多样性指数 H	均匀度 E	多样性指数 H	均匀度 E	
土体 Bulk	正茬	2.81 ± 0.10 c	0.83 ± 0.02 c	3.29 ± 0.10 a	0.93 ± 0.01 a
Bulk	连作2年	2.99 ± 0.04 b	0.85 ± 0.02 bc	3.35 ± 0.03 a	0.95 ± 0.01 a
	连作4年	3.17 ± 0.06 a	0.90 ± 0.01 a	3.21 ± 0.02 a	0.91 ± 0.03 a
	连作6年	3.21 ± 0.04 a	0.90 ± 0.01 a	3.26 ± 0.08 a	0.91 ± 0.04 a
	连作8年	3.06 ± 0.07 b	0.90 ± 0.02 a	3.22 ± 0.14 a	0.91 ± 0.04 a
	连作10年	3.02 ± 0.06 b	0.87 ± 0.01 ab	3.30 ± 0.07 a	0.92 ± 0.02 a
根际 Rhizosphere	正茬	2.99 ± 0.05 c	0.86 ± 0.02 bc	3.47 ± 0.05 a	0.94 ± 0.03 a
Rhizosphere	连作2年	3.17 ± 0.03 b	0.88 ± 0.01 abc	3.35 ± 0.11 ab	0.92 ± 0.01 a
	连作4年	3.12 ± 0.07 b	0.88 ± 0.02 abc	3.28 ± 0.06 abc	0.92 ± 0.04 ab
	连作6年	3.05 ± 0.10 c	0.85 ± 0.02 c	3.12 ± 0.09 c	0.88 ± 0.04 b
	连作8年	3.35 ± 0.05 a	0.91 ± 0.04 a	3.25 ± 0.11 bc	0.91 ± 0.04 ab
	连作10年	3.17 ± 0.02 b	0.89 ± 0.01 ab	3.34 ± 0.02 ab	0.93 ± 0.02 a

## 2.5 目的条带的测序

选择16个相对较亮的真菌18S rDNA的DGGE电泳条带(图6)进行PCR扩增并纯化测序,将测序结果与NCBI中核酸数据库序列比对结果如表4所示。各处理间真菌结构存在一定差异和

变化,变化较大的真菌种群L1、L2、L6、L9、L11和L12,经序列比对表明为*Trichosporon pullulans*、*Temellomycete*、*Phoma* sp.、*Cladosporium cladosporioides*、*Trichosporon pullulans*、*Pullulans cladosporioides*和*Cyathus striatus*。

表4 土壤样品18S rDNA扩增产物DGGE图谱中部分条带的测序鉴定

Table 4 Sequencing identification of some bands in the DGGE profile of 18S rDNA amplification products in soil samples

条带 Band	片段长度 Sequence length/bp	最相似种类 Closest relative	相似率 Identity/%	登陆号 Accession No.
L1	353	<i>Trichosporon pullulans</i>	99	AB001766
L2	354	<i>Temellomycete</i>	100	AY379102
L3	384	<i>Ascomycete</i>	99	DQ837573
L4	353	<i>Kirschsteiniothelia elaterascus</i>	97	AF053728
L5	357	<i>Pulchromyces fimicola</i>	99	DQ412120
L6	356	<i>Phoma</i> sp.	98	EF532930
L7	358	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99	DQ678004
L8	427	<i>Uncultured eukaryote</i>	94	AY082990
L9	632	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99	DQ678004

表 4(续)

条带 Band	片段长度 Sequence length/bp	最相似种类 Closest relative	相似率 Identity/%	登陆号 Accession No.
L10	350	<i>Dothideomycete</i> sp.	100	AY275186
L11	431	<i>Trichosporon pullulans</i>	100	AB001766
L12	352	<i>Cyathus striatus</i>	99	AF026617
L13	354	<i>Geomyces pannorum</i>	100	AY129548
L14	356	<i>Dothideomycete</i> sp.	98	AY275186
L15	361	<i>Guehomyces pullulans</i>	100	AB001766
L16	354	<i>Cryptococcus terreus</i>	100	AB032649

### 3 讨论

细菌的 16S rDNA 的 DGGE 图谱表明,土体细菌群落扩增条带没有明显差异,根际细菌种群条带出现了明显的差异。序列比对表明,差异较大的细菌种群多为 *Proteobacterium*,是一种固氮菌。存在许多在不同处理间亮度及位置基本不发生变化的条带,推测是一些对农田微生态环境的构成及稳定起重要作用的土居微生物群体,它们在土壤微生物中占有很大比重。

真菌的 18S rDNA 的 DGGE 图谱表明,不同处理间一些条带出现或消失,在一些处理中出现了一些特异条带,说明各处理间真菌结构存在一定差异。序列比对表明,*Phoma* sp.、*Cladosporium cladosporioides* 在连作 6 年土体中含量较高,而在其它处理中的含量较低或没有;*Trichosporon pullulans* 和 *Cyathus striatus* 在正茬土体和根际土中不明显或没有,而在各连作年限的土体和根际土中均出现,并在有些连作年限中表现为优势种群;*Trichosporon pullulans* 和 *Temellomycete* 在连作 2 年根际土中含量高,而在其他处理含量低或没有。由此可见,大豆连作对真菌群落结构影响较大。对 DGGE 图谱进行数字化统计处理及聚类分析表明,土体土聚在一簇,根际土聚在另一簇,土体土的细菌和真菌群落结构明显不同于根际土壤,说明细菌和真菌各自有很明显的根际效应。

本研究发现,在连作 6 年以前,随着连作年限增加,大豆的生长状况越来越差,而连作 6 年以上大豆的生长状况又有所改善,连作 8 年处理的生长状况明显好于连作 4 年的大豆。该现象与多样性指数结果相对应,即在连作 6 年前后,细菌和真菌的种群结构变化规律不同,土壤微生物种群变化与大豆的生长状况存在一定的相关性,因此推测,土壤微生物群落受大豆根系影响而表现出一定的变化,根际的这种种群变化反映了微生物群落的一种自我调节,

短年限连作大豆根际微生态失衡,进而影响大豆生长,随着连作年限的增长,微生物群落自我调节适应了环境变化,从而维持根际微生态平衡,进而使植株抵御有害微生物袭击而不会引发病害发展。连作大豆土体/根际土壤的微生物群落结构与大豆连作障碍之间是相互作用的,既是连作障碍的主要影响因子,也是连作障碍的环境指示剂。

连作多样性指数被认为是表征微生物群落一个相对稳定的参数<sup>[18-19]</sup>,在本研究中,细菌和真菌的 DGGE 图谱数据分析结果与田间试验观察的试验结果一致。在连作 6 年前后,细菌和真菌的种群结构变化规律不同,土壤微生物种群变化与大豆的生长状况存在一定的相关性<sup>[20-21]</sup>。因此推测,土壤微生物群落受大豆根系影响而表现出一定的变化,根际土壤微生物的种群变化反映了微生物群落的一种自我调节<sup>[22]</sup>,短年限连作大豆根际微生态失衡,影响大豆生长。随着连作年限的增长,微生物群落通过自我调节适应了环境变化<sup>[23]</sup>,进而维持根际微生态平衡,从而使植株抵御有害微生物袭击而抑制病害发展。

### 4 结论

本研究采用 16S/18S rDNA 核酸技术系统地对田间试验条件下不同连作年限大豆土壤微生物群落进行跟踪研究。结果表明连作大豆对细菌种群影响不大,对真菌种群结构影响较大。16S rDNA 的 DGGE 图谱表明,土体细菌群落的扩增条带没有发生明显变化,根际细菌种群出现了明显变化,经序列比对表明,变化较大的细菌种群多为 *Proteobacterium*,是一种固氮菌。18S rDNA 的 DGGE 图谱表明,各处理间真菌结构存在一定差异,一些条带在不同处理间有或无。将 DGGE 图谱进行数字化统计及聚类分析显示,土体土聚在一簇,根际土聚在另一簇,土体土的细菌和真菌群落结构明显不同于根际土壤,说明细菌和真菌的根际效应很明

显。对差异较大的真菌种群序列进行比对显示其多为 *Trichosporon pullulans*、*Temellomycete*、*Phoma* sp.、*Cladosporium cladosporioides*、*Trichosporon pullulans* 和 *Cyathus striatus*。研究结果可为大豆连作障碍机理研究提供科学依据。

## 参考文献

- [1] 薛庆喜. 中国及东北三省 30 年大豆种植面积、总产、单产变化分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(35): 102-106. (XUE Q X. Analysis on the change of 30 year's soybean areas, production and yield in China and Northeast China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(35): 102-106.)
- [2] 张怀骞. 黑龙江省大豆重迎茬现状及综合栽培技术[J]. 农业工程技术, 2017, 37(26): 56. (ZHANG H Q. Current situation and comprehensive cultivation techniques of soybean in Heilongjiang Province[J]. Agricultural Engineering Technology, 2017, 37(26): 56.)
- [3] YU Y, YANG J, ZENG S, et al. Soil pH, organic matter, and nutrient content change with the continuous cropping of *Cunninghamia lanceolata* plantations in South China[J]. Journal of Soils and Sediments, 2017, 17(9): 2230-2238.
- [4] ZENG J, LIU J, LU C, et al. Intercropping with turmeric or ginger reduce the continuous cropping obstacles that affect *Pogostemon cablin* (patchouli) [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 579719.
- [5] 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 on continuous and alternate cropping of soybean [J]. Soybean Science, 2020, 39(2): 317-324.)
- [6] ZHANG H, WANG R, CHEN S, et al. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 39911.
- [7] ZHANG Y, ZHENG Y, XIA P, et al. Impact of continuous *Panax notoginseng* plantation on soil microbial and biochemical properties[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 13205.
- [8] LIU S, WANG Z, NIU J, et al. Changes in physicochemical properties, enzymatic activities, and the microbial community of soil significantly influence the continuous cropping of *Panax quinquefolius* L. (American ginseng)[J]. Plant and Soil, 2021, 463(1): 427-446.
- [9] MAIER S, TAMM A, WU D, et al. Photoautotrophic organisms control microbial abundance, diversity, and physiology in different types of biological soil crusts[J]. The ISME Journal, 2018, 12(4): 1032-1046.
- [10] MACIK M, GRZYTA A, FRAC M. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms [M]//Advances in Agronomy. Amsterdam: Elsevier, 2020: 31-87.
- [11] 刘星, 邱慧珍, 王蒂, 等. 甘肃省中部沿黄灌区轮作和连作马铃薯根际土壤真菌群落的结构性差异评估[J]. 生态学报, 2015, 35(12): 3938-3948. (LIU X, QIU H Z, WANG D, et al. Evaluation on fungal community structure of rhizosphere soils of potato under rotation and continuous cropping systems in Yellow River Irrigation Areas of Middle Gansu Province [J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(12): 3938-3948.)
- [12] 李春格. 大豆连作对土壤微生物群落功能和结构的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2007. (LI C G. Effects of soybean continuous cropping on the function and structure of soil microbial community[D]. Beijing: China Agricultural University, 2007.)
- [13] HAMID M I, HUSSAIN M, WU Y, et al. Successive soybean-monoculture cropping assembles rhizosphere microbial communities for the soil suppression of soybean cyst nematode [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2017, 93(1): 10. 1093/femsec/fiw222.
- [14] 马军伟, 孙万春, 胡庆发, 等. 氰胺类肥料对连作土壤微生物种群结构的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2013, 39(3): 281-290. (MA J W, MA J W, HU Q F, et al. Effects of cyanamide fertilizer on microbial community structure of continuous cropping soil [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2013, 39(3): 281-290.)
- [15] HE J, XU Z, HUGHES J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(1): 91-100.
- [16] MALUSÀ E, RUSSO M A, MOZZETTI C, et al. Modification of secondary metabolism and flavonoid biosynthesis under phosphate deficiency in bean roots[J]. Journal of Plant Nutrition, 2006, 29(2): 245-258.
- [17] MARSCHNER P. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(3): 453-461.
- [18] HERMANS S M, BUCKLEY H L, CASE B S, et al. Bacteria as emerging indicators of soil condition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(1): e02826-e02816.
- [19] CHEN Y, DU J, LI Y, et al. Evolutions and managements of soil microbial community structure drove by continuous cropping[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 839494.
- [20] LIU J, YU Z, 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.
- [21] LIU J, YAO Q, LI Y, et al. Continuous cropping of soybean alters the bulk and rhizospheric soil fungal communities in a Mollisol of Northeast PR China [J]. Land Degradation & Development, 2019, 30(14): 1725-1738.
- [22] 陈雪丽, 王玉峰, 李伟群, 等. 黑土区连作大豆根际微生物群落结构的动态变化[J]. 大豆科学, 2018, 37(5): 748-755. (CHEN X L, WANG Y F, LI W Q, et al. Dynamic evolution of microbial community in the rhizosphere of continuous cropping of soybean in black soil [J]. Soybean Science, 2018, 37(5): 748-755.)
- [23] 杨雪贞, 罗同阳, 赵雪萍, 等. 山药田土壤微生物群落分布特征及间作豆科植物的改良效果[J]. 中国土壤与肥料, 2023(4): 54-60. (YANG X Z, LUO T Y, ZHAO X P, et al. Distribution characteristics of soil microbial community in yam field and improvement effect of intercropping legumes [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2023(4): 54-60.)