

基于高通量测序的大豆连作土壤细菌群落多样性分析

朱琳¹, 曾椿淋¹, 李雨青¹, 俞冰倩², 高凤¹, 魏巍², 许艳丽³

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏大学农业装备工程学院, 江苏镇江 212013; 3. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 黑龙江哈尔滨 150081)

摘要: 研究应用基于 Illumina 公司的 Miseq 高通量测序平台, 深度解析东北黑土大豆短期连作和长期连作土壤细菌群落结构多样性。通过对细菌 16S rRNA 序列 V4 区的高通量测序, 短期(3 年)和长期连作(20 年)大豆田土壤分别得到 180 980 和 221 424 条有效序列, 注释为 1 254 和 1 432 个细菌可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 且长期连作土壤细菌群落丰富度和多样性均高于短期连作土壤。在细菌门分类水平上, 短期和长期连作土壤中细菌优势菌群构成成为相同的 8 个细菌菌门(所占比例 > 1%), 依次包括变形菌门、酸杆菌门、疣微菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门和硝化螺菌门, 其所占总比例之和分别达到细菌菌门总数的 85.5% 和 86.3%。在细菌属分类水平上, 短期和长期连作土壤中细菌 TOP10 优势菌群构成相同, 包括疣微菌门的 *Spartobacteria* 属、酸杆菌门的 *Gp1*、*Gp4*、*Gp3* 和 *Gp6* 属、芽单胞菌门的 *Gemmatimonas* 属、硝化螺菌门的 *Nitrospira* 属、变形菌门的 *Sphingomonas* 属和 *Bradyrhizobium* 属以及厚壁菌门的 *Bacillus* 属, 且 10 个细菌菌属所占比例之和分别达到细菌菌门总数的 71.3% 和 69.0%。结果表明: 东北黑土区大豆经过长期连作后土壤细菌优势菌群结构变化较小, 但群落丰富度和多样性较短期连作略有增加, 且对大豆养分吸收和生长有促进作用的根瘤菌 *Bradyrhizobium* 属和硝化细菌 *Nitrospira* 属所占比例增加。研究结果对解释大豆长期连作根病抑制性土壤形成机制具有一定价值。

关键词: 大豆; 长期连作; Miseq; 细菌群落; 结构多样性

中图分类号: S565.1; S154.36 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0419

The Characteristic of Bacterial Community Diversity in Soybean Field with Continuous Cropping Based on the High-Throughput Sequencing

ZHU Lin¹, ZENG Chun-lin¹, LI Yu-qing¹, YU Bing-qian², GAO Feng¹, WEI Wei², XU Yan-li³

(1. School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Zhenjiang 212013, China; 3. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China)

Abstract: Based on the Miseq platform of Illumina company, we explored the effect of short-term and long-term cropping continuous with soybean on the composition diversity of the bacterial community. According to the sequencing of the V4 region of bacterial 16S rRNA gene, we obtained 180 980 and 221 424 efficient sequences, respectively, and confirmed them as 1 254 and 1 432 OTUs. The richness and diversity of bacterial community form the soybean field with long-term continuous cropping was higher than those in soybean field with short-term continuous cropping. At the phylum level, there were 8 bacterial phylum as the dominant group in both fields (the ratio to total above 1%), including Proteobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Gemmatimonadetes and Nitrospira. All of which were 85.5% and 86.3% of the total community in short and long-term continuous cropping fields, respectively. At the genus level, the top 10 groups were the same bacterial genera between the both treatments, including Spartobacteria in Verrucomicrobia, Gp1, Gp4, Gp3 and Gp6 in Acidobacteria, Gemmatimonas in Gemmatimonadetes, Nitrospira in Nitrospira, Sphingomonas and Bradyrhizobium in Proteobacteria, and Bacillus in Firmicutes. All of these genera were 71.3% and 69.0% of the total community in each field, respectively. The results of this study indicated that the richness and diversity of bacterial community in soybean field was increased after long-term continuous cropping, although there was just a little change in bacterial community composition, especially those of dominant groups. It is of great significance to explain the mechanism of the formation of suppressive soil for soybean root disease by long-term continuous cropping.

Keywords: Soybean; Long-term continuous cropping; Miseq; Bacteria community; Composition diversity

大豆连作可以使大豆病虫害加重, 从而使其产量降低、品质变劣, 因此大豆连作障碍已经成为大豆高产和稳产的重要限制因子^[1-2]。我国每年因连作障碍引起的减产幅度高达 11% ~ 35%, 关于大豆

收稿日期: 2016-12-20
基金项目: 国家自然科学基金(41571253); 江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJB180002); 镇江市重点研发计划-现代农业(NY2015023)。
第一作者简介: 朱琳(1982-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品微生物生态学研究。E-mail: zhulin19820402@ujs.edu.cn。
通讯作者: 魏巍(1984-), 男, 博士, 副教授, 主要从事土壤微生物多样性研究。E-mail: weiwei7096@ujs.edu.cn;
许艳丽(1958-), 女, 博士, 教授, 主要从事大豆病害防治方面研究。E-mail: xyll@iga.ac.cn。

连作障碍的研究已经得到广泛重视^[2-3]。微生物是土壤环境质量的主要指标之一,土壤微生物在大豆障碍中的作用越来越引起重视^[4]。王光华等^[5]研究认为大豆连作障碍很可能归因于大豆根圈土壤微生物生态环境的改变。连作后的土壤环境可能会由高肥的“细菌型”土壤向低肥的“真菌型”土壤转化^[6]。周德庆等^[7]研究认为,大豆连作土壤 pH 的变化使其从细菌喜好的偏中性环境转化成真菌适宜的偏酸性环境,从而刺激病原真菌的生长发育。然而,近年来陆续有报道指出,当大豆连作时间超过一定年限时,大豆连作障碍得以减缓和抑制^[8]。Wei 等^[9]报道指出,大豆长期连作形成的大豆根部病害抑制性土壤成因主要来源于生物因素,且微生物群落的变化可能发挥了重要的作用。Song 等^[10]研究利用土壤微生态模拟体系,进一步确定了细菌和真菌群落对大豆长期连作抑制性土壤的贡献比为真菌高于细菌群落。由此可见,当大豆进行了长期连作时,大豆根际土壤微生物群落结构势必发生了变化,很可能发生土壤病原抑制性微生物取代病原微生物成为优势微生物类群。然而,关于长期连作大豆田土壤微生物群落结构相关研究仍鲜见报道。因此,对长期和短期连作大豆田土壤微生物类群的解析,有助于解析拮抗微生物类群,从而为大豆连作障碍的控制提供材料和指导。

近年来,研究者采用 T-RFLP、PCR-DGGE 和 16S rRNA 克隆文库等传统方法分析了大豆田土壤细菌群落^[11-13],然而这些方法的研究结果仍难以确定微生物群落全貌,无法全面地揭示微生物群落的多样性。新一代基于 Illumina 公司 Miseq 测序平台的高通量测序技术的出现,可以更更全面更准确地描述大豆田土壤细菌群落信息。通过对样品的微生物群落结构进行大规模分析,能更精确地测定生境中各类微生物的相对丰度,为解析大豆短期和长期连作土壤细菌群落这个“黑匣子”提供了有效手段。因此,从中国科学院海伦农业生态实验站长期连作定位试验区分别采集大豆短期连作(3 年)和长期连作(20 年)土壤样品,通过 Miseq 测序平台的高通量测序技术对其土壤细菌群落多样性进行了深度测序解析,旨在探索长期连作对大豆田土壤细菌群落结构多样性的影响,为揭示大豆长期连作形成连作障碍抑制性土壤的机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 轮作系统定位区设置

试验样地设在中国科学院海伦农业生态试验站(N47°26',E126°38')长期定位试验区^[14]。土壤

类型为黑土,属于温带大陆性季风气候区。长期定位试验区设于 1991 年,为固定场圃,本研究试验小区设置为大豆 3 年连作(玉米-大豆-大豆-大豆)和大豆 20 年连作两个试验处理。小区长 10 m,宽 7.7 m,面积 77 m²。大豆品种为黑农 35。田间管理采用常规方法,即人工播种,三铲三趟。大豆施肥量:磷酸二铵 150 kg·hm⁻²;玉米施肥量:磷酸二铵 150 kg·hm⁻²,尿素 225 kg·hm⁻²(50%基肥,50%追肥)。

1.2 土壤样品的采集

于 2011 年 5 月 20 日(大豆苗期)采集大豆田土壤样品。土壤采用棋盘式取样法,在各区选取 8~10 点,去表土后使用土钻取大豆苗间的土壤样品(0~15 cm)。采集后的土壤充分混合后,置于冰盒中,带回实验室进行土壤 DNA 的提取^[13]。

1.3 样品采集和 DNA 提取

分别从混合充分的样品中取 1 g 土壤提取微生物基因组 DNA。应用日本和光公司的 DNA 提取试剂盒 Isoil beads beating,按照操作说明进行微生物基因组总 DNA 的提取。提取后的 DNA 应用 Nano-drop one 进行浓度的测定。大豆 3 年连作和 20 年连作两样品的 DNA 浓度分别为 140.4 和 145.7 ng·μL⁻¹。

1.4 PCR 扩增及高通量测序

本试验采用细菌 16S rRNA 的 V4 区域作为目标 DNA 序列进行 PCR 扩增。以通用引物 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R(5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rRNA 的 V4 区域进行扩增^[15]。PCR 反应条件均为 95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,25 个循环;72℃延伸 10 min^[15]。扩增结束后,PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖进行凝胶电泳,检查扩增效果。将样品的 PCR 产物,送至北京诺禾至源科技有限公司在 Illumina-MiSeq 平台上进行高通量测序。

1.5 数据分析

对高通量测序初始数据进行质量控制,以获得更为精准、高质量的 DNA 序列信息,采用 Mothur 软件将得到的 16S rDNA 基因序列在 RDP(ribosomal database project)数据库中进行嵌合体检验,充分去除嵌合体序列。为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息,采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的操作分类单元(OTU)代表序列进行分类学分析,用 Mothur 软件构建稀释性曲线^[16]。利用 QI-ME 软件计算样品 Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数^[17-18]。其中群落丰富度用 Chao1 指数

描述,其值越高表明群落物种的丰富度越高;Shannon 和 Simpson 指数可以反映样品的多样性程度,其值越大表明样品群落多样性越高。

2 结果与分析

2.1 大豆短期和长期连作土壤细菌群落高通量文库评价

通过对短期和长期连作大豆田土壤细菌 16S rRNA 的 V4 区测序,分别得到原始序列196 771和 221 424条,经去除低质量序列、Barcode 序列和引物序列后,2 个样品分别得到180 980和202 978条有效序列,经过 RDP 数据库的注释以及 OTU 分析后,分别获得1 254和1 432个细菌 OTU (表 1)。短期和长

期连作大豆田土壤中细菌 16S rRNA 测序的文库覆盖率分别为 99.3%和 99.6%(表 1),说明更深的测序几乎不会产生更多的 OTU,该两个连作土壤的测序文库已经达到饱和。从表 1 中也可以看出大豆长期连作土壤细菌群落 OTU 数量和 Chao1 指数均高于短期连作土壤,说明长期连作土壤细菌群落具有更高的丰富度,即土壤中细菌物种数量高于短期连作土壤。此外,通过比较短期和长期连作土壤细菌群落的 Simpson 指数和 Shannon 指数同样可以发现,长期连作土壤细菌群落多样性均高于短期连作土壤(表 1)。因此,该结果表明土壤经过大豆长期的连作过程之后,其细菌群落构成变得更为丰富和多样。

表 1 大豆短期和长期连作土壤细菌群落高通量测序文库质量汇总

Table1 The information of high-throughput DNA sequencing library of soybean field with short and long-term continuous cropping							
处理 Treatment	原始序列数 Raw sequences	有效序列数 Clean sequences	OTU 数量(97%) OTU number	Chaol 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index	文库覆盖率 Coverage/%
短期连作 Short-term continuous cropping	196771	180980	1254	944.59	0.836	4.264	99.3
长期连作 Long-term continuous cropping	221424	202978	1432	996.13	0.893	4.993	99.6

2.2 大豆短期和长期连作土壤细菌群落结构多样性分析

大豆短期和长期连作土壤中细菌群落在门分类水平上的分布比例见图 1。两个样品中细菌群落结构构成相近,各细菌类群所占比例较为一致,其中优势群落主要隶属于 8 门(比例大于总测序量的 1%)。细菌变形菌门(Proteobacteria)在短期和长期连作大豆田土壤中占主要优势,所占比例分别为

27.0%和 29.9%。随后是酸杆菌门(Acidobacteria, 20.4%和 18.9%)、疣微菌门(Verrucomicrobia, 11.3%和 9.8%)、厚壁菌门(Firmicutes, 8.3%和 8.5%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 7.0%和 8.6%)、放线菌门(Actinobacteria, 6.5%和 6.2%)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 3.3%和 3.3%)、硝化螺菌属(Nitrospira, 1.6%和 1.0%)。

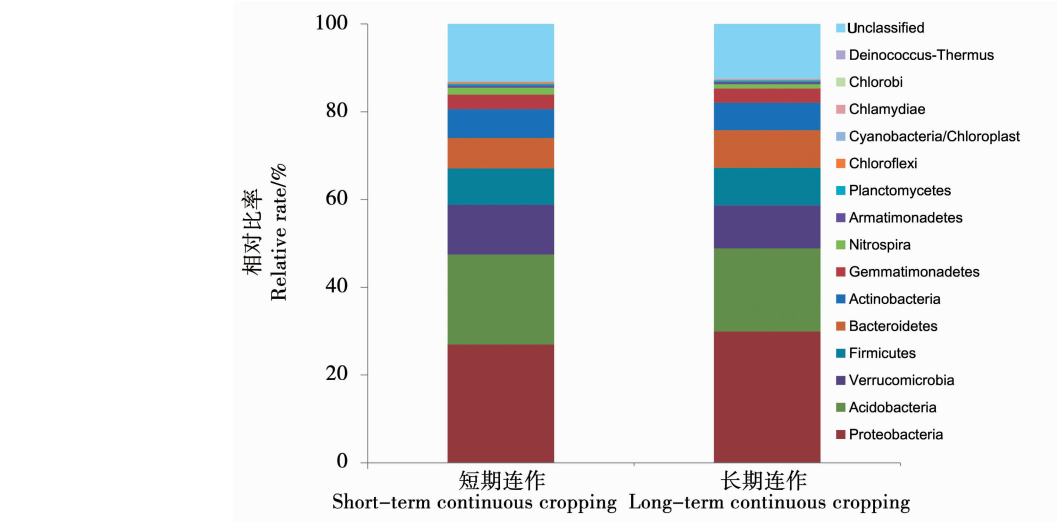


图 1 大豆短期和长期连作土壤细菌在门分类水平群落结构

Fig. 1 Bacterial community composition at phylum level insoybean field with short and long-term continuous cropping

大豆短期和长期连作土壤细菌群落在属分类水平的分布情况见图2。两个样品中细菌群落结构组成和主要优势属(TOP10)所占比例均较为一致。其中,隶属于10个属的细菌菌属占据了短期和长期连作土壤细菌 OTU 总数的 71.3%和 69.0%。按照所占比例由多至少为 *Spartobacteria* (19.8% 和

17.9%)、*Gp1* (11.1% 和 14.5%)、*Gp4* (11.2% 和 7.6%)、*Gp3* (7.6% 和 9.1%)、*Gemmatimonas* (6.7% 和 7.1%)、*Gp6* (6.3% 和 4.5%)、*Nitrospira* (2.4% 和 2.9%)、*Sphingomonas* (2.6% 和 2.7%)、*Bradyrhizobium* (1.6% 和 2.1%) 和 *Bacillus* (1.4% 和 1.4%)。

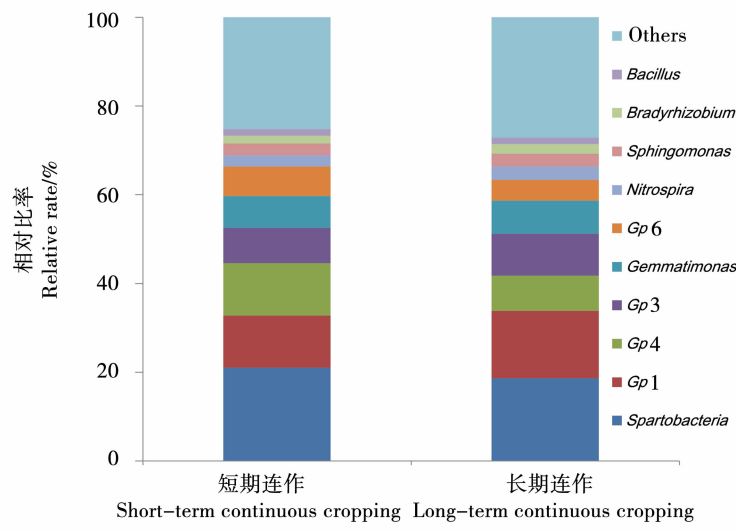


图2 大豆短期和长期连作土壤细菌在属分类水平的群落结构
Fig. 2 Bacterial community composition at genus level in soybean field with short and long-term continuous cropping

2.3 大豆短期和长期连作土壤细菌群落 OTU 特异性

维恩图可以直观地表现大豆短期和长期连作土壤细菌群落的 OTU 数目组成相似性、重叠情况以及特异性(图3)。大豆短期和长期连作土壤之间存在共有细菌 OTU 数量为 1 128, 其中 981 个 OTU

(87%) 分布在大豆短期和长期连作土壤细菌群落 Top10 的优势细菌群落中。同时,大豆长期连作土壤中特异性的细菌 OTU 数量为 304, 是短期连作土壤特异性细菌 OTU 数量的 2.4 倍, 且均集中在仅占 OTU 总数量 7% 的细菌非优势类群中, 说明长期连作土壤较短期连作有更多的特异性细菌类群存在。

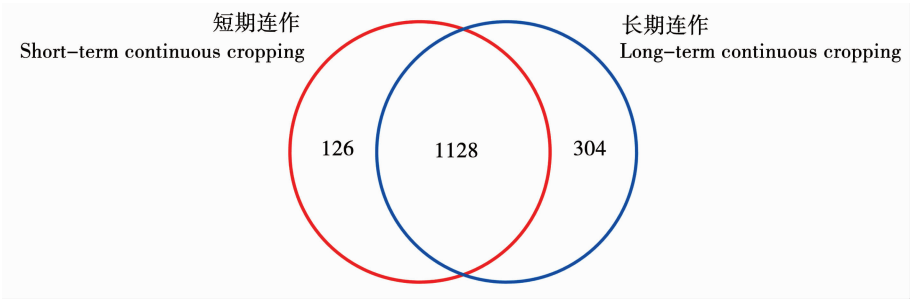


图3 大豆短期和长期连作土壤细菌群落 OTU 维恩图
Fig. 3 Venn diagram of bacterial OTUs in soybean field with short and long-term continuous cropping

3 结论与讨论

通过对东北黑土大豆短期 3 年连作和长期 20 年连作土壤中细菌群落进行 Miseq 高通量测序, 我们可以发现大豆的长期连作在一定程度上增加了土壤细菌群落的丰富度指数和多样性指数。多样性指数是有效评价不同土壤微生物群落多样性的

指标, 多样性指数高表明微生物群落多样性高^[17], 而较高的多样性代表该微生物群落内部菌群分布更为均匀。在相同的农田土壤环境中, 健康的土壤一般较病害发生的土壤具有更高的微生物菌群多样性。因此, 大豆长期连作土壤较高的微生物群落丰富度和多样性指数很可能说明其较短期连作土壤具有较小的微生物病害发病潜力。已有报道表

明已知的大豆根部病害主要是由真菌引起的(如大豆根腐病原的镰孢菌 *Fusarium* spp.、腐霉菌 *Pythium* spp.、疫霉菌 *Phytophthora* spp. 和丝核菌 *Rhizoctonia* spp. 等^[24]),而已有关于这些病原真菌的抑制性微生物均属于真菌类群,如木霉菌 *Trichoderma* spp.、淡紫拟青霉菌 *Paecilomyces lilacinus* 以及厚垣轮枝菌 *Verticillium chlamydosporium* 等^[24, 9-10]。因此,大豆长期连作形成的大豆根部病害抑制性土壤机制很可能与大豆长期连作土壤细菌群落构成没有直接的关系。我们的结果也表明大豆田土壤在经过 20 年的长期连作后,无论是在门分类水平,还是在属的分类水平上,细菌尤其是其优势菌群的构成均保持一致。这说明大豆的长期连作并不会明显地影响土壤细菌群落的结构构成,也可以间接表明大豆长期连作形成的抑制性土壤的微生物作用可能并不来源于细菌群落,而是主要来源于真菌类群。正如 Wei 等^[9] 和 Song 等^[10] 研究结果所表明,真菌群落中的 *Trichoderma* spp.、*Paecilomyces lilacinus* 以及 *Verticillium chlamydosporium* 等类群可能在大豆长期连作抑制性土壤的形成过程中发挥主要作用。因此,进一步对大豆短期和长期连作土壤真菌群落进行解析,有助于明确大豆长期连作形成的抑制性土壤中关键微生物的作用。

在不同的连作年限下,细菌群落结构在属水平分类单元下主要以酸杆菌门的 *Gp1*、*Gp4*、*Gp3* 和 *Gp6* 菌属为主,均占短期和长期连作土壤总细菌比例的 36%。Liu 等^[19] 研究结果表明东北黑土土壤细菌群落以酸杆菌门为主。导致这一现象的原因可能是多年连作导致土壤 pH 下降,弱酸性土壤环境有利于某些酸杆菌的生长。酸杆菌是一类最近 10 年报道的细菌类群,目前对这类细菌的研究还比较少,多数的酸杆菌是不可培养的微生物,其在遗传和代谢上具有较高的多样性,在陆地、海洋沉积物和活性淤泥等环境中具有重要作用^[20]。然而,目前还没有报道证明该菌门细菌与大豆根部病害或大豆病害抑制作用相关。本研究中短期和长期连作土壤中所占比例相同也可能证明其在大豆长期连作土壤形成过程中没有发挥决定性的作用。根据图 1 所示,在不同连作年限大豆田土壤中,细菌群落结构在门分类水平上最为优势的类群是变形菌门细菌。然而在属分类水平上,该细菌门仅有 *Sphingomonas* 属和 *Bradyrhizobium* 属成为两种土壤中的优势细菌属,且仅占短期和长期连作土壤总细菌比例的 3.7% 和 3.8%。这说明隶属于变形菌门的绝大部分细菌类群在大豆连作土壤中不是优势菌群,而是作为非优势菌大量的分布于大豆田土壤中。 α 变形

菌纲属于变形菌门的一个纲,是陆地土壤中的优势菌群^[21]。本研究结果也表明,作为主要优势属的 *Bradyrhizobium* 是属于 α 变形菌纲的一种根瘤菌^[22]。根瘤菌具有固氮作用,是大豆生长的有益菌。本研究中大豆的长期连作使土壤中 *Bradyrhizobium* 根瘤菌的比例明显增加,该结果表明大豆长期连作过程可能形成更富有根瘤菌的土壤,从而促进大豆的生长。同时,另一个重要的大豆田土壤细菌类群硝化螺旋菌,在经过大豆的长期连作过程后,所占比例亦较短期连作土壤明显增加。硝化螺旋菌属可以将硝化菌氧化土壤氨生成的亚硝酸继续氧化成硝酸盐,而硝酸盐是土壤中作物易吸收的氮源形式,因此土壤中硝化螺旋菌的增加可以间接地增加土壤氮肥力^[23]。由此可见,作为大豆长期连作土壤中主要优势菌属的根瘤菌 *Bradyrhizobium* 和硝化菌 *Nitrospira* 可能有效促进了大豆的生长。这也表明,除了大豆根部病害抑制性微生物之外,大豆长期连作土壤造成的上述能促进大豆生长的细菌相应类群丰度的增加,也可能是长期连作土壤抑制大豆根部病害(如根腐病,大豆胞囊线虫病等)的另一个可能原因。

综上所述,东北黑土地地区大豆在经过长期连作过程后,大豆田土壤细菌群落的丰富度和多样性均较短期连作田略有增加,但是细菌群落结构、尤其是优势菌菌群结构变化较小。其中,大豆长期连作土壤中根瘤菌 *Bradyrhizobium* 属和硝化细菌 *Nitrospira* 属所占比例较短期连作田有所增加,其可能对长期连作田大豆养分吸收和生长有促进作用。因此,大豆长期连作田土壤中的细菌群落可能通过间接作用促进大豆长期连作田形成大豆根部病害抑制性土壤。

参考文献

- [1] 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, Liu X, Han X, et al. Effect of continuous-cropping on yield and growth development of soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32: 64-68.)
- [2] 许艳丽,王光华,韩晓增. 连作大豆生物障碍研究[J]. 中国油料, 1997, 19(3): 46-49. (Xu Y L, Wang G H, Han X Z, et al. Study on biological barrier in continuous soybean [J]. Oil Crops of China, 1997, 19(3): 46-49.)
- [3] 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.
- [4] 刘金波,许艳丽. 我国连作大豆土壤微生物研究现状[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(1): 132-136. (Liu J B, Xu Y L. Current research of soil microbial of successive soybean cropping in

China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(1): 132-136.)

[5] 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, 2004, 26(1): 55-59.)

[6] 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, et al. Relationship between soil microbial ecological distribution characteristics and soybean root disease in soybean monocropping and rotation[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 1995, 11(4): 311-314.)

[7] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. (Zhou D Q. Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002.)

[8] 文景芝, 张明厚. 重迎茬大豆根腐病的发生与防治[J]. 大豆通报, 1996, 3: 5-6. (Wen J, Zhang M. Prevention and control of root rot in continuous and partrition rotation soybean[J]. Soybean Bulletin, 1996, 3: 5-6.)

[9] Wei W, Xu Y, Li S, et al. Developing suppressive soil for root diseases of soybean with continuous long-term cropping of soybean [J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 2015, 65(3): 279-285.

[10] Song J, Li S, Xu Y, et al. Diversity of parasitic fungi from soybean cyst nematode associated with long-term continuous cropping of soybean in black soil[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 2016, 66(5): 432-442.

[11] 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.

[12] 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. (Wei W, Xu Y L, Liu J B, et al. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for detection of *Fusarium* spp. in soil [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 655-658.)

[13] 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. Impact of long-term continuous cropping on the *Fusarium* population in soybean rhizosphere[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(2): 497-504.)

[14] 刘金波, 许艳丽, 李春杰, 等. 长期连作对大豆根际真菌主要类群的影响[J]. 农业系统科学与综合研究, 2009, 25(1): 105-108. (Liu J B, Xu Y L, Li C J, et al. Effect of soybean long term continual cropping on main groups of rhizosphere fungi[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2009, 25(1): 105-108.)

[15] Degnan P H, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity [J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 183-194.

[16] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.

[17] Caporaso J G, Gregory J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.

[18] Youssef N, Sheik C S, Krumholz L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227-5236.

[19] Liu J, Sui Y, Yu Z, et al. Diversity and distribution patterns of Acidobacterial communities in the black soil zone of northeast China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 95: 212-222.

[20] Janssen P H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72: 1719-1728.

[21] Bazyliński D A, Williams T J, Lefèvre C T, et al. *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* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 63(3): 801-808.

[22] Kalita M, Małek W. *Genista tinctoria* microsymbionts from Poland are new members of *Bradyrhizobium japonicum* bv. *Genistearum* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33(5): 252-259.

[23] Watson S W, Bock E, Valois F W, et al. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: A chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium [J]. Archives Microbiology, 1986, 144(1): 1-7.