

不同连作年限马铃薯根际土壤 细菌群落特征研究

徐沛国¹, 谢奎忠², 胡新元^{1,2}, 王维¹, 谭雪莲³

(1. 甘肃农业大学资源与环境学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070;

3. 甘肃省农业科学院旱地农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要:采用长期定位试验, 设马铃薯连作1~7 a (CP1~CP7) 和轮作(RT)8个处理, 通过高通量测序探究不同连作年限对马铃薯根际土壤细菌群落多样性的影响。结果表明: 供试土壤中, 放线菌门、变形菌门、厚壁菌门为主要的优势菌门。随连作年限的增加, 土壤细菌数量表现出波动变化趋势, 连作年限影响细菌群落结构。RT、CP1、CP2、CP3处理土壤细菌相似度较高, CP4、CP5、CP6、CP7处理土壤细菌相似度较高。马铃薯连作7 a土壤中的放线菌门相对丰度降幅最大, 较RT降低10.47%; 厚壁菌门相对丰度在连作6 a土壤中显著降低, 较RT减少22.07%; 类诺卡氏属相对丰度在连作7 a显著减少, 较RT减少2.34%; 芽孢杆菌属相对丰度在连作6 a时最低, 较RT减少9.18%; 连作7 a较RT减少5.14%; 芽单胞菌属相对丰度在连作7 a土壤中达到最高(16.54%), 较RT增加5.26%。长期连作改变了马铃薯土壤细菌群落结构, 连作4 a土壤细菌群落种类开始变化, 土壤细菌群落结构也随之改变。土壤中预防病害的菌类减少, 增加了马铃薯染病风险。

关键词: 马铃薯; 连作年限; 根际土壤; 细菌群落; 群落多样性

中图分类号: S154.3; S532 **文献标志码:** A

Effects of different continuous cropping years on diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of potatoes

XU Peiguo¹, XIE Kuizhong², HU Xinyuan^{1,2}, WANG Wei¹, TAN Xuelian³

(1. School of Resources and Environment, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Potato Research Institute of Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. Gansu Academy of Agricultural Sciences Dryland Agriculture Research Institute, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Utilizing long-term positioning trials, eight treatments were established, involving potato continuous cropping for 1 to 7 years (CP1~CP7) and crop rotation (RT). High-throughput sequencing was used to explore the effects of different continuous cropping years on the diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of potatoes. The results showed that in the tested soils, Actinobacteria, Proteobacteria, and Firmicutes were the dominant bacterial phyla. As the duration of continuous cropping increased, the number of soil bacteria exhibited a fluctuating trend, and the continuous cropping years influenced the structure of the bacterial community. The RT, CP1, CP2 and CP3 treatments had higher soil bacterial similarity, as did the CP4, CP5, CP6, and CP7 treatments. In the soil after 7 years of continuous potato cropping, the relative abundance of Actinobacteria decreased the most, by 10.47% compared to RT. The relative abundance of Firmicutes significantly dropped in the soil after 6 years of continuous cropping, by 22.07% compared to RT. *Nocardioide*s relative abundance significantly decreased after 7 years of continuous cropping, by 2.34% compared to RT. The relative abundance of *Bacillus* was the lowest after 6 years of continuous cropping, by 9.18% compared to RT, and decreased by 5.14% after 7 years. The rela-

收稿日期:2023-09-06

修回日期:2024-01-17

基金项目:国家自然科学基金项目(31860354,32260550);甘肃省农业科学院重点研发计划项目(2022GAAS36,2023GAAS20);国家重点研发计划“绿色宜居村镇技术创新”重点专项(2022YFD1100503)

作者简介:徐沛国(1999-),男,甘肃武威人,硕士研究生,研究方向为马铃薯栽培。E-mail:1185251140@qq.com

通信作者:胡新元(1973-),男,甘肃泾川人,研究员,主要从事土壤与植物营养研究。E-mail:844374905@qq.com

tive abundance of *Gemmatimonadaceae_uncultured* reached its peak in the soil after 7 years of continuous cropping (16.54%), increasing by 5.26% compared to RT. Long-term continuous cropping has changed the structure of soil bacterial communities in potatoes, with changes in the types of soil bacterial communities starting after 4 years of continuous cropping, and the community structure altering as a result. The decrease in disease-preventing bacteria in the soil has increased the risk of potato diseases.

Keywords: potato; continuous cropping years; rhizosphere soil; bacterial community; community diversity

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是我国第四大粮食作物, 种植经济效益高, 在西北旱区种植业生产中占重要地位^[1]。马铃薯耐寒、耐旱、耐瘠薄、适应性强, 在我国各个生态区域都广泛种植, 其种植面积逐年扩大^[2-4], 与其他作物争地的问题日渐突出, 且受订单农业、集约化、规模化等因素的影响, 马铃薯连作现象也日益严重^[5]。

连作使土壤环境因子被过度消耗, 导致土壤微生态环境恶化, 植物病原体富集, 无法给作物提供充足的养分, 最终使作物生长受阻^[6]。植物根际微生物特别是细菌能够参与一些重要的生物进程, 包括土壤有机质分解、土壤养分的转化和循环等, 对植物的生长发育具有非常重要的作用^[7]。连作会破坏根际土壤微生物群落结构, 不但抑制有益菌的存活, 还会使病原菌的生长速度增快, 加剧土传病害的发生, 对作物的生长发育造成影响^[8]。有研究表明, 番茄、胡麻及谷子的土壤细菌群落结构与连作障碍关系密切, 且受连作年限的影响较大^[9-11]。刘素等^[12]研究表明, 随连作年限增加, 芹菜土壤中益生菌比例缓慢下降, 致病病原菌比例呈先下降后急剧增长趋势, 微生物群落结构的变化导致芹菜生长发育受阻。徐文修等^[13]研究表明, 棉花长期连作改变了土壤微生物数量和菌群结构, 随连作年限增加微生物总量减少, 细菌型土壤向真菌型土壤不断转变, 连作年限的长短对土壤微生物区系的影响很大。谭雪莲等^[14]研究表明, 马铃薯连作和轮作土壤细菌和真菌群落组成无较大区别, 但其群落结构和相对丰度差异较大, 尤其是连作 3 a 后, 土壤细菌和真菌的群落结构发生了较大变化。孙小花等^[15]研究表明, 马铃薯长期连作显著降低土壤微生物数量, 微生物群落结构随连作年限明显改变。马玲等^[16]采用 T-RFLP 技术研究了马铃薯不同连作年限根际土微生物群落动态变化, 发现随连作年限增加, 根际土壤细菌 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和 Sorenson 指数均有所下降。

目前, 关于不同连作年限对马铃薯土壤根际细菌群落结构及功能影响的研究较为匮乏。因此, 本研究基于马铃薯长期连作定位试验, 采用高通量测

序技术, 系统分析马铃薯根际土壤中细菌多样性的变化, 以期为解决马铃薯连作障碍提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验于 2010—2023 年在甘肃省定西市安定区宁远镇红土村 (35°26'N, 104°50'E) 布设。该地区属于中温带偏旱区, 平均海拔 1 977 m, 日照时数 2 476.6 h, 年均气温 6.4℃, $\geq 0^\circ\text{C}$ 积温 2 933.5℃, $\geq 10^\circ\text{C}$ 积温 2 239.1℃, 无霜期 140 d, 多年平均降水 390.9 mm, 年蒸发量 1 531 mm, 为典型的黄土高原半干旱雨养农业区。试验地土壤为黄绵土, 土质绵软、深厚, 质地均匀, 贮水性能良好, 土壤养分含量如表 1 所示。

表 1 试验区土壤基本理化特性

Table 1 Basic physical and chemical properties of soil in the experimental area

指标 Indicator	值 Value
全氮 Total N/(g · kg ⁻¹)	1.00
全磷 Total P/(g · kg ⁻¹)	0.71
全钾 Total K/(g · kg ⁻¹)	18.15
速效氮 Available N/(mg · kg ⁻¹)	65.00
有效磷 Available P/(mg · kg ⁻¹)	14.72
速效钾 Available K/(mg · kg ⁻¹)	438.00
有机质 Organic matter/(g · kg ⁻¹)	13.00
有效锌 Available Zn/(mg · kg ⁻¹)	1.47
有效铁 Available Fe/(mg · kg ⁻¹)	2.10
有效铜 Available Cu/(mg · kg ⁻¹)	0.56
有效锰 Available Mn/(mg · kg ⁻¹)	2.07
有效硼 Available B/(mg · kg ⁻¹)	0.94
水溶性钙 Solution calcium/%	0.012
有效硫 Available S/(mg · kg ⁻¹)	45.15

1.2 试验设计

2010 年 4 月开始进行定位试验, 选取长期定位试验中 8 个处理为研究对象, 分别为: (1) 对照 (RT): 2022 年第一年种植马铃薯; (2) 马铃薯连作 1 a (CP1): 2021—2022 年连续 2 a 种植马铃薯; (3) 马铃薯连作 2 a (CP2): 2020—2022 年连续 3 a 种植马铃薯; (4) 马铃薯连作 3 a (CP3): 2019—2022 年连续种植 4a 马铃薯; (5) 马铃薯连作 4 a (CP4): 2018—2022 年连续 5a 种植马铃薯; (6) 马铃薯连作

5 a (CP5):2017—2022 年连续 6 a 种植马铃薯;(7) 马铃薯连作 6 a (CP6):2016—2022 年连续 7 a 种植马铃薯;(8) 马铃薯连作 7 a (CP7):2015—2022 年连续 8 a 种植马铃薯。各处理前茬均为小麦,每个处理 3 次重复,小区面积为 71.48 m² (17.02 m × 4.20 m)。

供试马铃薯品种为‘陇薯 7 号’,于每年 4 月下旬播种,种植行距 60 cm,株距 37 cm,播种密度为 45 022 株 · hm⁻²。基础施肥量为 P₂O₅ 108 kg · hm⁻²,N 135 kg · hm⁻²,农家肥 30 000 kg · hm⁻²,肥料种类为尿素和磷酸二铵。出苗后用 10% 的啉虫脲防治蚜虫,58% 的甲霜灵锰锌防治晚疫病,每 7 d 喷施一次,连续喷施 3 次;马铃薯生育期人工除草,其他田间管理方式同当地。马铃薯收获期为 10 月上旬。每年马铃薯品种、播种方式、施肥量以及田间管理均一致。

1.3 样品采集

2022 年马铃薯收获前 1 周,各小区采用对角线三点采样法随机采集 5 株马铃薯植株,使用抖土法,先轻轻抖落大块不含根系的非根际土壤,再用力将根系表面附着的土壤抖落在筛子上(不易掉落的部分将根系在筛沿轻撞至根系土脱落),用镊子剔除土样中的碎石、根系等杂物,混匀立即过 2 mm 孔径筛。将土样装入灭菌袋后置于含有冰袋的保温箱运回实验室,保存于 -80℃ 冰箱,用于土壤微生物测定。

1.4 土壤微生物高通量测序

提取全基因组 DNA 后,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。选择 16s rDNA 的通用引物,以 515 F (5′-GTGCCAGCMGCCGCGG-3′) 作为上端引物,用 907 R (5′-CCGTCAATTC-MTTTRAGTTT-3′) 作为后端引物。PCR 采用 TransStartFastpfu DNA Polymerase (ABI GeneAmp[®] 9700),进行 20 μL 反应体系:4 μL FastPfu Buffer (5×),2 μL (2.5 mm) dNTPs,0.8 μL (5 μm) 的正向和反向引物,0.4 μL FastPfu 聚合酶,10 ng DNA 模板和 20 μL ddH₂O;所需反应参数:(1) 1 × (5 min 95℃), (2) cycles × (30 s 95℃, 30 s Tm℃, 45 s 72℃), (3) 10 min 72℃, 10℃ 直至结束;步骤如下:测试前先设 3 个重复,将相同样本及其 PCR 产物混合,用 2% 的琼脂糖电泳测定混合后的样本。恢复试剂盒 (AXYGEN) 的切胶恢复 PCR 产物时用 AxyPrepDNA 凝胶,并用 TrisHCl 洗脱;用 2% 琼脂糖进行电泳。依照电泳全部样本按照正式试验条件

进行,每个样本 3 个重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物,Tris_HCl 洗脱;2% 琼脂糖电泳检测。然后进行荧光定量,参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 进行检测定量,按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。最后采用 Illumina PE250 平台进行文库构建和测序。

1.5 数据处理

土壤微生物群落组成及其多样性分析借助上海凌恩生物有限公司 Illumina PE250 平台进行。首先根据 barcode 得到所有样品的有效序列;然后对 reads 的质量进行质控过滤;接着根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对的 reads 拼接 (merge) 成一条序列;最后按照 barcode 和引物序列拆分得到每个样本的优质序列,并在过程中根据正反 barcode 和引物方向校正序列方向以及去除嵌合体。使用 Usearch (V10) 软件,按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到 OTU 的代表序列。使用 RDP 分类器 (V2.13) 对照细菌 Silva 数据库 (V138) 对每个 OTU 代表性序列进行物种分类注释和分析,设置置信阈值为 0.7。基于 OTU 丰度表及 OTU 分类表进行后续分析。使用 SPSS 22.0、Excel 2007、origin 2019 软件进行数据处理和绘图,并采用 AI (AdobeIllustrator 2022) 软件进行图表修饰。多样性分析各指数算法如下:

Chao:用 chao1 算法估计样本中所含 OTU 数目的指数,chao1 在生态学中常用来估计物种总数,计算公式如下:

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1 + (n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (1)$$

式中, S_{chao1} 为估计的 OTU 数; S_{obs} 为实际观测到的 OTU 数; n_1 为只含有一条序列的 OTU 数目; n_2 为只含有两条序列的 OTU 数目。

Shannon:估算样本中微生物多样性指数之一,常用于反映 alpha 多样性指数。Shannon 值越大,说明群落多样性越高。

$$H_{\text{shannon}} = \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (2)$$

式中, H_{shannon} 为估算样本中微生物多样性指数; S_{obs} 为实际观测到的 OTU 数; n_i 为第 i 个 OTU 所含的序列数; N 为全部序列数。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌丰度与多样性指数分析

马铃薯土壤细菌群落的多样性 (Alpha 多样性) 可以反映微生物群落的丰度和多样性。如表 2 所示,用于指数评估的 OTU 相似性水平为 97%。Chao 指数越大表明土壤中细菌物种丰富度越大,各年限处理土壤细菌 Chao 指数均较 RT 有所上升,CP6 处理最高,CP1 处理最低,但处理间差异均不显著。与细菌 Chao 指数表现相同,Shannon 指数随着连作年限的增长也呈现相同的变化趋势。

2.2 土壤细菌群落组成

利用 Bray-Curtis 运算法则,对各个样本之间土壤细菌群落样本的物种或功能丰度分布的差别进行定量分析。由图 1 可知,CP6 与 RT、CP1、CP2、CP3、CP5 处理间差异系数小,表明物种多样性差异小。CP4 与 RT、CP1、CP2、CP3、CP5 和 CP6 处理间差异系数较大,CP7 与其他各处理间差异系数极大,说明 CP4 与 RT、CP1、CP2、CP3、CP5 和 CP6 处理间细菌群落的物种多样性差异较大,而 CP7 与其他处

表 2 不同连作年限土壤的细菌多样性和丰度的比较分析

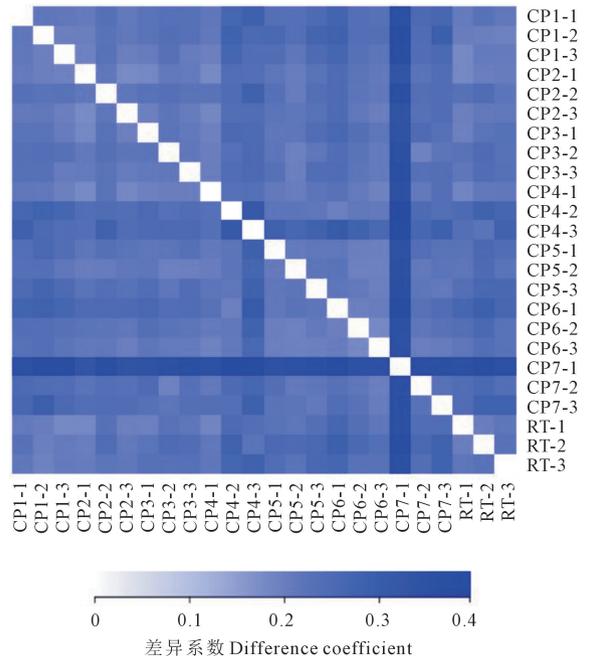
Table 2 Comparative analysis of bacterial diversity and abundance in soils with different continuous cropping years

处理 Treatment	相似性水平 Label/%	Chao 指数 Chao index	Shannon 指数 Shannon index
RT	97.0	3771a	6.41a
CP1	97.0	3884a	6.47a
CP2	97.0	4044a	6.60a
CP3	97.0	4007a	6.59a
CP4	97.0	3980a	6.48a
CP5	97.0	3975a	6.68a
CP6	97.0	4093a	6.70a
CP7	97.0	3905a	6.57a

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

理间细菌群落的物种多样性差异极大。通过对比同一数轴上所有处理数据的箱形图并行排列发现,CP7 与其他各处理的组间距离极大,CP4 与其他处理组间距离较大(图 2)。综上可知,马铃薯连作 4 a 和连作 7 a 时土壤中细菌群落的物种可能发生了改变,土壤细菌群落结构开始变迁,导致这两个连作年限处理的土壤细菌群落种类不同于其他年限。



注:不同颜色表示的值是样品两两之间的差异系数,差异系数越小,两个样品物种多样性的差异越小。CP1-1、CP1-2、CP1-3 分别表示 CP1 处理的 3 个重复,其他处理同理。下同。

Note: The values represented by different colors in the heatmap in the figure are the difference coefficients between two samples. The smaller the difference coefficient, the smaller the difference in species diversity between the two samples. CP1-1, CP1-2, and CP1-3 respectively represent three repeated experiments of CP1, and other treatments are the same. The same as following.

图 1 不同连作年限下土壤细菌群落样本间距离热图

Fig.1 Heatmap of distance between soil bacterial community samples under different continuous cropping years

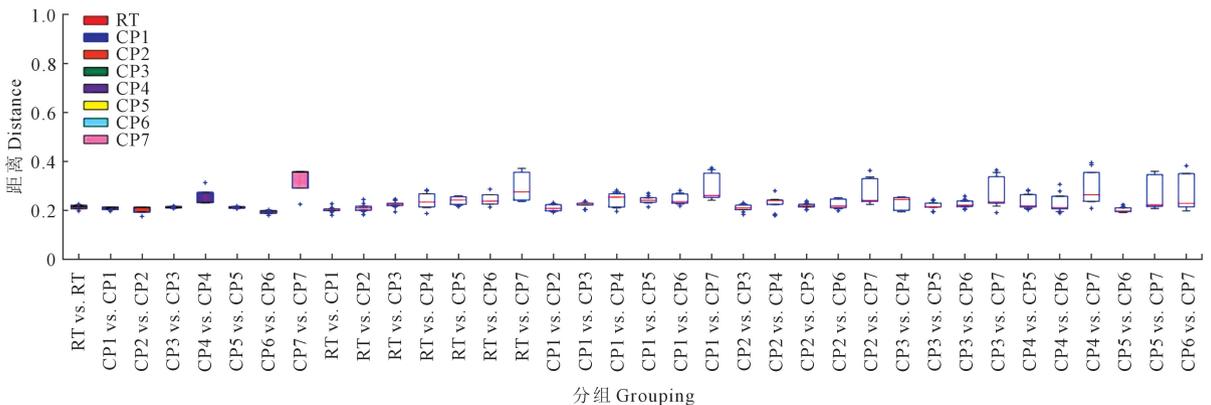


图 2 不同年限下土壤细菌群落组间组内距离箱式图

Fig.2 Box plot of distance between groups and within groups of soil bacterial communities under different years

2.3 土壤细菌群落多样本相似度聚类树对比分析

通过对不同连作年限马铃薯土壤样品细菌群落结构相似度进行聚类分析可知(图 3),按土壤细菌组成相似度可将处理分为两大类,第一类包含 RT、CP1(1 a)、CP2(2 a)、CP3(3 a),第二类包含 CP4(4 a)、CP5(5 a)、CP6(6 a)、CP7(7 a),说明马铃薯连作 3 a 及以下的土壤细菌群落结构区别于 4 a 及以上连作年限的土壤细菌群落结构。表明连作导致土壤健康状况恶化,土壤细菌群落结构在马铃薯连作 3~4 a 之间发生了很大改变,连作 4 a 时土壤中的原生菌落开始死亡,适应性强的的细菌大量繁殖,产生不同的细菌群落,导致连作 3 a 内与连作 4 a 以上的土壤细菌群落结构产生差异。

2.4 土壤门水平的细菌群落组成

对土壤细菌群落在门水平上的分类进行分析,如图 4 所示,共检测出包括放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、变形菌门(Proteobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、装甲菌门(Armatimonadetes)、广古菌门(Euryarchaeota)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)等在内的 40 个细菌门。长期连作的 CP7 处理相对丰度与其他处理存在较大差异,RT、CP1、CP2、CP3、CP4、CP5 和 CP6 处理间相对丰度差异较小,说明马铃薯连作年限不同会引起土壤细菌群落发生变化。由图 5 可知,不同处理土壤细菌群落门水平相对丰度可知,放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)为主要优势菌门,其中放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度随着连作年限的增长呈现起伏趋势。放线菌门(Actinobacteria)相对丰度在连作 1 a 时最高(73.00%),在连作 7 a 时最低(58.34%)且较 RT 降低 10.47%;变形菌门(Proteobacteria)相对丰度在连作 7 a 时最高(65.66%),在连作 4 a 时最低(61.77%),RT 均低于连作处理;厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度在连作 1 a 时最高(54.55%),在连作 6 a 时最低(36.37%),RT 均高于连作处理;酸杆菌门(Acidobacteria)相对丰度在连作 1~5 a 时随着年限增长而增长,增长到 29.92%,在连作 6 a 时较 5 a 减少 0.16%,连作 7 a 时达到最

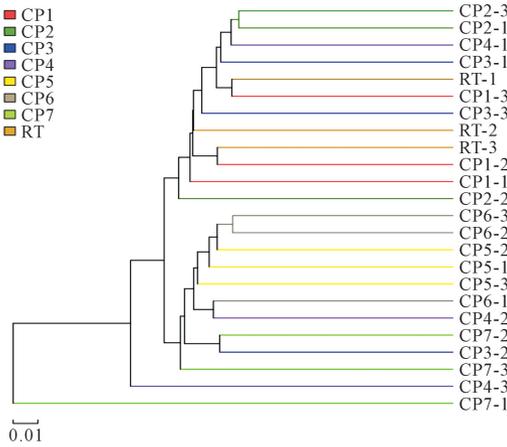
高(30.39%)。

2.5 土壤细菌属水平的细菌群落组成

如图 6 所示,对土壤细菌群落在属水平上的分类进行分析,共检测出 754 个细菌属,相对丰富较高的前 10 个细菌属分别为:乳球菌属(*Lactococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Subgroup6 norank*、*Gemmatimonadaceae uncultured*、*Acidimicrobialesnorank*、类诺卡氏属(*Nocardioiodes*)、*Tepidisphaeraceae norank*、*Nitrosomonadaceae uncultured*、*Pseudarthrobacter*、*Gaiellalesnorank*。CP4 处理菌属相对丰度与其他组间存在一定差异,CP7 处理菌属相对丰度与其他处理差异显著,其中 *Subgroup6 norank*、*Nitrosomonadaceae uncultured*、*Acidimicrobialesnorank*、类诺卡氏属(*Nocardioiodes*)、*Anaerolineaceae uncultured*、土壤红杆菌属(*Solirubrobacter*)、*TakashiAC-B11 norank*、*Planctomycetaceae uncultured*、*Elev-16S-1332 norank*、*Marine Group II norank*、*BD2-11 terrestrial group norank*、*FF-CH11085 norank*、*0319-6A21 norank* 这 15 个细菌属的相对丰度在不同处理土壤中差异显著。乳球菌属(*Lactococcus*)的相对丰度在连作 1 a 时最高(23.92%),在连作 6 a 时最低(15.67%),RT 均高于连作处理。*Subgroup6 norank* 的相对丰度随连作年限的增长呈现持续上升趋势,在连作 3 a 时高于 RT。有益菌芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度在连作 1 a 时到达最高(23.32%),连作 6 a 时达到最低(15.49%),且 RT 均高于连作处理。类诺卡氏属(*Nocardioiodes*)相对丰度在连作 1 a 时达到最高(6.35%),较 RT 增长 0.38%;连作 7 a 时大幅降低,较 RT 减少 2.34%。连作处理后有益菌芽孢杆菌属(*Bacillus*)和类诺卡氏属(*Nocardioiodes*)的相对丰度均有所减少,土壤中有益菌的减少导致马铃薯感染病害风险增加。

2.6 土壤细菌群落主成分分析

对不同年限马铃薯连作土壤细菌群落组成结构进行 PCA 分析,可反映菌群的差异和距离;对不同样品 OTU 构成分析(97%相似度)能够反映出样品之间的差别和距离。如图 7 所示,PC1 轴可信度为 79.61%,解释了所有变量的大多数差异,各处理在 PC1 轴上分布距离较大,说明处理间的细菌群落组成有差异;PC2 轴的可信度为 4.57%,土壤细菌群落分布差异不明显。在 PC1 轴上,以 0 为分界,高于 0 的多为 CP4~CP7 的样本,低于 0 的多为 RT~CP3 的样本,与相似性聚类分析结果相同,说明马铃薯连作年限的增长显著影响土壤细菌群落的结构组成。



注: 树枝长表示样品之间的距离, 样品可以按预先设定好的组别, 并且用不同的颜色进行区分, 末端竖线表示样本相似度较高。

Note: The length of the branches indicates the distance between the samples, the samples can be divided by pre-set groups and different colors, and the vertical line at the end indicates that the samples are clustered together with high similarity

图 3 土壤细菌群落结构相似性聚类分析图

Fig.3 Cluster analysis of soil bacterial structural similarity

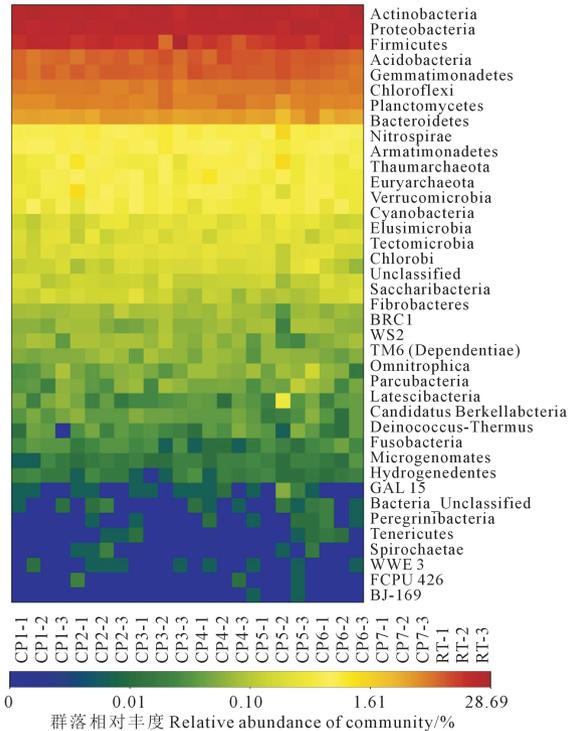


图 4 土壤细菌群落门水平 heatmap

Fig.4 Heatmap of soil bacterial communities at the phylum level

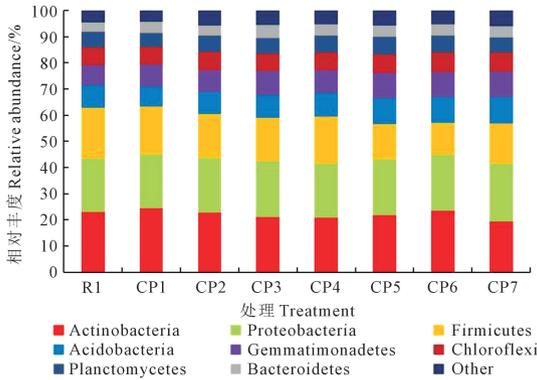


图 5 土壤细菌群落门水平相对丰度

Fig.5 Relative abundance of soil bacterial communities at the phylum level

对不同年限马铃薯连作土壤细菌群落结构进行 PCOA 分析, 并选取贡献率最大的主坐标组合作图, 可反映土壤细菌群落结构之间的差异, 样本的距离越接近, 表示样本之间的细菌物种组成结构越相似。如图 8 所示, PC1 轴和 PC2 轴分别解释细菌群落总变异的 32.16% 和 16.29%, 共解释了原信息量的 48.45%。CP1 ~ CP3 处理细菌群落结构与 RT 相似度较高, CP4 ~ CP7 距离 RT 较远, 相似度低。说明与对照相比, 马铃薯连作 4 a 后土壤细菌群落结构发生了显著改变。

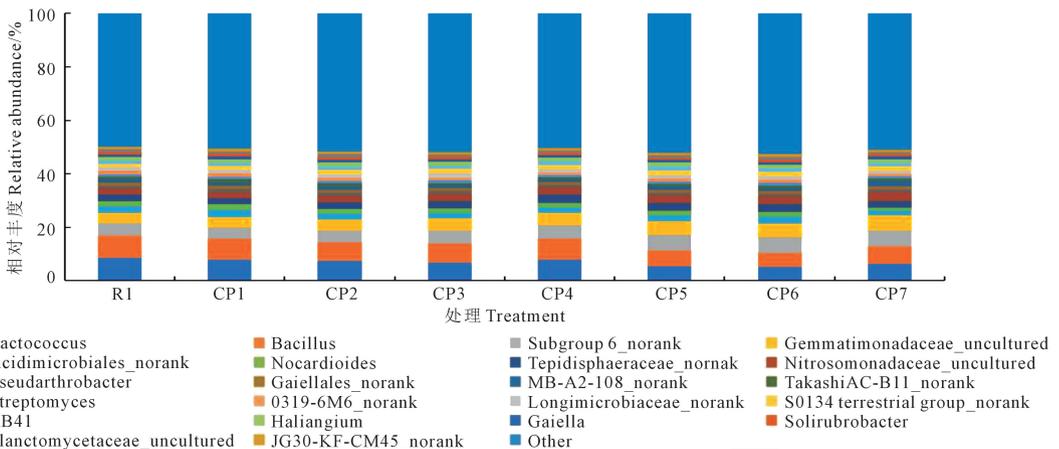


图 6 土壤细菌群落属水平相对丰度

Fig.6 Relative abundance of soil bacterial communities at the genus level

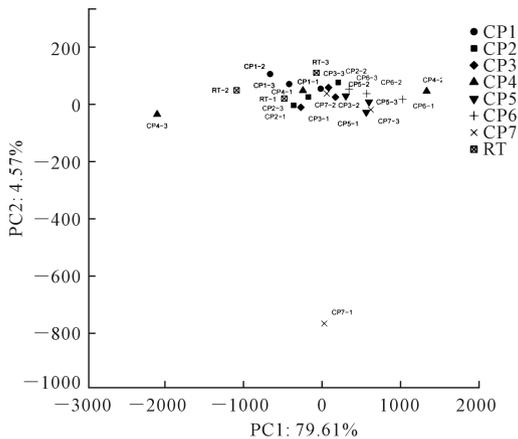


图 7 不同连作年限对马铃薯土壤样本主成分分析图

Fig.7 Analysis of principal components of potato soil samples with different years of continuous cropping

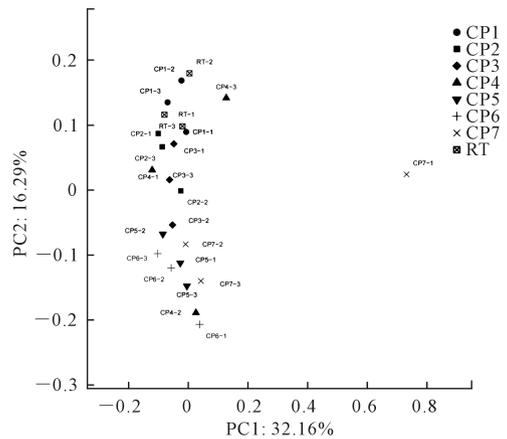


图 8 不同连作年限对马铃薯土壤样本 PCOA 分析图

Fig.8 Plot of soil PCOA analysis for different continuous cropping years

3 讨论

土壤微生物的种类和数量与连作障碍的发生关系密切^[17]。研究表明,土壤微生物总量和细菌的数量与土壤肥沃程度呈正相关关系^[18],可见细菌丰富度和多样性不仅影响土壤的健康情况,也决定着马铃薯能否健康生长。土壤中真菌与细菌的比值越低,土壤生态系统越稳定,土壤抑制病害能力越强^[19],细菌数量的增加也可以减少土传病害的发生。韩翠莲等^[20]研究表明,土壤中细菌和放线菌数量随马铃薯连作年限的增加呈先增加后降低趋势。谭雪莲等^[21]研究表明,马铃薯连作后土壤中的可培养细菌数量明显减少。土壤细菌的数量随着连作年限的增长不断发生改变,不同年限对土壤细菌数量的影响程度不同。郭晗玥等^[22]研究发现,西瓜根际细菌数量随连作茬次的延长呈先下降后上升趋势,且在连作 6 茬时最高。本研究发现,不同连作年限处理土壤细菌数量均高于 RT,随马铃薯连作年限的增加,细菌数量表现为波动变化趋势,CP6 处理达到最高,较 RT 增加 8.5%。可能是随着马铃薯长期种植土壤中的养分积累以及肥料的不断施入和植物的残体遗留,土壤中细菌可获得更多的养分和有机物,促使土壤中的细菌数量开始增长。

连作后土壤中的细菌群落结构发生改变,有益菌使得土壤养分充足,可满足马铃薯植株生长需求,致病菌则会严重影响马铃薯植株的正常生长。研究表明,根部土壤中的酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)等细菌门的情况是植株健康与否的重要标志^[23],厚

壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)在抑制土壤病害中起着非常重要的作用。本研究中,与 RT 相比,马铃薯连作土壤中的放线菌(Actinobacteria)相对丰度均有所减少,且 CP7 处理降幅最大(10.47%);厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度也降低,CP6 处理最少(22.07%)。这两种菌数量减少说明土壤的健康状况变差,马铃薯植株更容易被病原菌侵入。

研究证实,大多数芽孢杆菌成员可以抑制土壤中致病微生物的繁殖,减少土传病害的发生^[8]。芽孢杆菌属(*Bacillus*)对枯萎病有防治作用,因其繁殖快、适应性广、易培养,被越来越多的研究者认可并应用^[24]。本研究通过对土壤细菌群落在属水平上的分类进行分析发现,芽孢杆菌属(*Bacillus*)属于优势菌种,其相对丰度在连作 6 a 时达到最低,连作 5~7 a 均低于其他连作年限处理,说明连作 5 a 后马铃薯植株感染土传病害尤其是枯萎病的风险可能会大幅增加。类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*)为放线菌门的有益菌,可促进植物生长,并且有修复土壤环境的能力^[25]。本研究发现,土壤类诺卡氏菌属相对丰度在连作 1~3 a 降低,4~6 a 有所增加,在连作 7 a 时大幅降低。有研究证实,杀虫剂和抗菌剂在土壤中的降解会影响类诺卡氏菌属^[26],本研究中 CP7 处理细菌数骤降可能与长期连作过程中使用的杀虫剂等化学药品积累有关,说明长期连作对土壤状况有不良影响。田美等^[27]研究发现芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)是生物除磷过程中的重要菌属。袁源等^[28]在研究灵芝连作覆土细菌群落的变化时发现,覆土中芽单胞菌属的细菌类群

数量在长期连作后也呈现大幅降低趋势。而本研究发现,芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)数量随着连作年限的增加不断增多。芽单胞菌属也是净化环境常见的有益菌,可以维持土壤的健康状况,有利于植物的生长发育。本研究中连作土壤芽单胞菌属相对丰度的增加说明连作年限增长可能会促进部分有益菌的生长,具体机理及变化方向仍需进行更深入的研究。

4 结 论

马铃薯长期连作导致土壤细菌群落相似度发生变化,按土壤细菌组成相似度可分为 RT、CP1(1 a)、CP2(2 a)、CP3(3 a)和 CP4(4 a)、CP5(5 a)、CP6(6 a)、CP7(7 a)两类,说明土壤细菌群落结构在马铃薯连作 3~4 a 间发生了很大改变。随连作年限增加,不良影响加重,造成土壤原生菌死亡,适应性强的细菌大量繁殖。

马铃薯长期连作导致土壤细菌群落结构发生变化,放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度在连作 7 a 时最低(58.34%),较马铃薯种植 1 a 处理减少 10.47%;变形菌门(*Proteobacteria*)的相对丰度在连作 7 a 时达到最高(65.66%);厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对丰度在连作 6 a 时处于最低(36.37%);酸杆菌门(*Acidobacteria*)的相对丰度随连作年限的增长而增长,在连作 5 a 时达到 29.92%,连作 7 a 时达到最高 30.39%。厚壁菌门和放线菌门的减少预示着土壤状况向不良的方向发展,会影响马铃薯的正常生长发育,间接增加植株感染病害的几率。具有防治枯萎病效果的芽孢杆菌属(*Bacillus*)相对丰度在连作 6 a 时最低(15.49%),在 7 a 时略有上升(4.04%);有益菌类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*)相对丰度在连作 7 a 时较 RT 降低(2.34%);有利于植物生长的芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)相对丰度随连作年限的增加有所增加。

参 考 文 献:

[1] 丁凯鑫,王立春,单莹,等. 马铃薯连作障碍及其防控的研究进展[J]. 中国马铃薯, 2022, 36(1): 71-77.
DING K X, WANG L C, SHAN Y, et al. Research progress in potato continuous cropping obstacles and their prevention and control [J]. Chinese Potato Journal, 2022, 36(1): 71-77.

[2] 徐建飞,金黎平. 马铃薯遗传育种研究:现状与展望[J]. 中国农业科学, 2017, 50(6): 990-1015.
XU J F, JIN L P. Advances and perspectives in research of potato genetics and breeding [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(6):

990-1015.

[3] 杨雅伦,郭燕枝,孙君茂. 我国马铃薯产业发展现状及未来展望[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(1): 29-36.
YANG Y L, GUO Y Z, SUN J M. Present status and future prospect for potato industry in China [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2017, 19(1): 29-36.

[4] 钟鑫,蒋和平,张忠明. 我国马铃薯主产区比较优势及发展趋势研究[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(2): 1-8.
ZHONG X, JIANG H P, ZHANG Z M. Studies on comparative advantage and developing tendency of major potato producing areas in China [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(2): 1-8.

[5] 崔勇. 马铃薯连作造成的影响及连作障碍防控技术[J]. 作物杂志, 2018, (2): 87-92.
CUI Y. Influence of continuous cropping and controlling measures on continuous cropping potato [J]. Crops, 2018, (2): 87-92.

[6] 胡新元,谭雪莲,孙小花,等. 马铃薯长期连作对土壤真菌群落特征的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(4): 185-191.
HU X Y, TAN X L, SUN X H, et al. Effects of potato continuous cropping on soil fungal community characteristics [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2022, 40(4): 185-191.

[7] 徐筋燕,何晓兰,邵明灿,等. 不同连作年限根际土壤微生物群落多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(5): 1140-1150.
XU J Y, HE X L, SHAO M C, et al. Analysis of microbial community diversity in rhizosphere soil of continuous cropping *Trichosanthes kirilowii* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2023, 39(5): 1140-1150.

[8] DONG L L, XU J, FENG G Q, 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.

[9] 侯金凤,申民翀,孙菲菲,等. 番茄连作青枯病不同发病时期的非根际土壤细菌群落变化特征[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3464-3477.
HOU J F, SHEN M C, SUN F F, et al. Characteristics of bacterial community in bulk soil at different stages of tomato bacterial wilt under continuous monoculture system [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3464-3477.

[10] 王立光,叶春雷,陈军,等. 胡麻连作对土壤细菌群落的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(1): 70-75.
WANG L G, YE C L, CHEN J, et al. Effects of continuous cropping on bacteria community in oil flax soil [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2022, 40(1): 70-75.

[11] 郝晓芬,王根全,郭二虎,等. 连作、轮作对谷子根际细菌群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(3): 585-596.
HAO X F, WANG G Q, GUO E H, et al. Effects of continuous cropping and rotation on rhizosphere bacterial community structure of millet [J]. Journal of Agro-environment Science, 2022, 41(3): 585-596.

[12] 刘素,吴宏亮,陈倬,等. 连作年限影响芹菜根际土壤微生物群落结构及功能类群[J]. 中国农业气象, 2023, 44(5): 372-385.
LIU S, WU H L, CHEN Z, et al. Continuous cropping years affect the rhizosphere soil microbial community structure and functional taxa

- of celery [J]. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 2023, 44 (5): 372-385.
- [13] 徐文修, 罗明, 李大平, 等. 不同连作年限棉田土壤理化性质及微生物区系变化规律研究[J]. *干旱地区农业研究*, 2014, 32(3): 134-138.
- XU W X, LUO M, LI D P, et al. Changes in soil physicochemical properties and microflorae under long-term cotton continuous cropping [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2014, 32(3): 134-138.
- [14] 谭雪莲, 郭天文, 胡新元, 等. 黄土高原旱作区马铃薯连作根际土壤微生物群落变化特征[J]. *作物学报*, 2022, 48(3): 682-694.
- TAN X L, GUO T W, HU X Y, et al. Changes in soil physicochemical properties and microflorae under long-term cotton continuous cropping [J]. *Crops*, 2022, 48(3): 682-694.
- [15] 孙小花, 胡新元, 陆立银, 等. 黄土高原马铃薯不同连作年限土壤理化性质及微生物特性[J]. *干旱地区农业研究*, 2019, 37(4): 184-192.
- SUN X H, HU X Y, LU L Y, et al. Soil physical and chemical properties and microbial characteristics of potato in different continuous cropping years on the Loess Plateau [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2019, 37(4): 184-192.
- [16] 马玲, 马琨, 杨桂丽, 等. 马铃薯连作栽培对土壤微生物多样性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2015, (5): 589-596.
- MA L, MA K, YANG G L, et al. Effects of continuous potato cropping on the diversity of soil microorganisms [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, (5): 589-596.
- [17] 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.
- [18] HE J Z, ZHENG Y, CHEN C R, et al. Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(5): 349-358.
- [19] 侯乾, 王万兴, 李广存, 等. 马铃薯连作障碍研究进展[J]. *作物杂志*, 2019, (6): 1-7.
- HOU Q, WANG W X, LI G C, et al. Advances in the research on potato continuous cropping obstacles [J]. *Crops*, 2019, (6): 1-7.
- [20] 韩翠莲, 霍轶珍, 田志强. 不同连作年限对马铃薯土壤环境及产量的影响[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(10): 83-85.
- HAN C L, HUO Y Z, TIAN Z Q. The effect of different continuous cropping years on the soil environment and yield of potatoes [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(10): 83-85.
- [21] 谭雪莲, 郭晓冬, 马明生, 等. 连作对马铃薯土壤微生物区系和产量的影响[J]. *核农学报*, 2012, 26(9): 1322-1325, 1321.
- TAN X L, GUO X D, MA M S, et al. Effects of continuous cropping on soil microflora and yield of potato [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2012, 26(9): 1322-1325, 1321.
- [22] 郭晗玥, 王东升, 阮杨, 等. 西瓜连作根际土壤微生物群落演替特征[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(21): 4245-4258.
- GUO H Y, WANG D S, RUAN Y, et al. Characteristics and succession of rhizosphere soil microbial communities in continuous cropping watermelon [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56 (21): 4245-4258.
- [23] QIN S, YEBOAH S, CAO L, et al. Breaking continuous potato cropping with legumes improves soil microbial communities, enzyme activities and tuber yield [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175934.
- [24] 朱菲莹, 张屹, 肖姬玲, 等. 生物有机肥对土壤微生物群落结构变化及西瓜枯萎病的调控[J]. *微生物学报*, 2019, 59(12): 2323-2333.
- ZHU F Y, ZHANG Q, XIAO J L, et al. Regulation of soil microbial community structures and watermelon Fusarium wilt by using bio organic fertilizer [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59 (12): 2323-2333.
- [25] ZHOU X G, LIU J, WU F Z. Soil microbial communities in cucumber monoculture and rotation systems and their feedback effects on cucumber seedling growth [J]. *Plant and Soil*, 2017, 415 (1): 507-520.
- [26] 张思慧. 青藏高原植物中殷大奎藤黄单胞菌和董小平类诺卡氏菌两个细菌新种的发现和生物学分析 [D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- ZHANG S H. Taxonomic and biological analyses of *Luteimonas Yindakui* Sp. nov. and *Nocardioides Dongxiaoping* Sp. nov. isolated from plants on Qinghai-Tibetan plateau [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2020.
- [27] 田美, 刘汉湖, 申欣, 等. 百乐克(BIOLAK)活性污泥宏基因组的生物多样性及功能分析[J]. *环境科学*, 2015, (5): 1739-1748.
- TIAN M, LIU H H, SHEN X, et al. Biodiversity and function analyses of BIOLAK activated sludge metagenome [J]. *Environmental Science*, 2015, (5): 1739-1748.
- [28] 袁源, 李琳, 黄海辰, 等. 基于16S rDNA扩增子测序分析灵芝连作覆土细菌群落的变化[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(24): 116-123.
- YUAN Y, LI L, HUANG H C, et al. Analysis of bacterial community in ganoderma Lingzhi continuous cropping soil based on 16S rDNA amplicon sequencing [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(24): 116-123.