

研究报告

不同连作年限草莓根际细菌和真菌多样性变化

赵帆¹ 赵密珍^{2*} 王钰¹ 庞夫花²

(1. 安徽大学资源与环境工程学院 安徽 合肥 230601)

(2. 江苏省农业科学院果树研究所 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室 江苏 南京 210014)

摘要:【目的】以不同连作年限草莓根际土壤为材料,探讨不同连作年限土壤细菌、真菌多样性的变化,以期对草莓连作障碍调控提供理论依据。【方法】将没有连作(CK)、连作1年(1Y)、连作8年(8Y)的土壤分别与珍珠岩以3:1的体积充分混匀装盆,“宁玉”草莓苗于2016年9月10日定植于盆栽土壤中,定植后50d时(开花前)进行土壤取样,提取基因组DNA,通过PCR扩增建立文库,利用MiSeq平台Illumina第二代高通量测序技术并结合相关生物信息学方法,分析土壤细菌16S rRNA基因V4+V5区域和真菌ITS1+ITS2区域的丰富度和多样性指数以及群落结构。【结果】从9个草莓根际土壤样本中获得3192个细菌分类操作单元OTU和762个真菌OTU,其中,变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和蓝藻门为草莓根际土壤的优势菌种,在CK、1Y、8Y草莓根际土壤中分别占细菌总数的87.86%、64.83%和61.79%;子囊菌门和担子菌门为优势真菌,在CK、1Y、8Y草莓根际土壤中分别占真菌群落的69.17%、69.06%和76.18%。从门的分类水平看,酸杆菌门、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、蓝菌门、浮霉菌门、芽单胞菌门、变形菌门以及真菌担子菌门、接合菌门、壶菌门的比例在不同连作年限的草莓根际土壤中显著改变($P < 0.05$)。属水平的分析也表明,共有29个细菌属和19个真菌属的比例发生改变($P < 0.05$)。【结论】随连作年限的延长,草莓根际土壤生态系统中细菌和真菌群落各门类组成的比例会发生显著变化。

关键词: 草莓, 根际土壤, Illumina 高通量测序, 土壤细菌, 土壤真菌

Biodiversity of bacteria and fungi in rhizosphere of strawberry with different continuous cropping years

ZHAO Fan¹ ZHAO Mi-Zhen^{2*} WANG Yu¹ PANG Fu-Hua²

(1. School of Resources and Environment Engineering, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China)

(2. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Institute of Pomology, Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to explore the changes of soil bacteria and fungal

Foundation item: Modern Agriculture Research and Development Demonstration Project of Jiangsu Province (No. BE2016369)

*Corresponding author: E-mail: njzhaomz@163.com

Received: March 01, 2017; Accepted: March 21, 2017; Published online (www.cnki.net): March 24, 2017

基金项目: 江苏省现代农业研究开发示范类项目(No. BE2016369)

*通讯作者: E-mail: njzhaomz@163.com

收稿日期: 2017-03-01; 接受日期: 2017-03-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-03-24

diversity with strawberry rhizosphere soil of different continuous cropping years, to provide theoretical basis for the control of strawberry continuous cropping obstacles. **[Methods]** The soils without continuous cropping (CK), continuous cropping for 1 year (1Y) and continuous cropping for 8 years (8Y) were separately mixed with perlite in a ratio of 3:1. 'Ningyu' strawberry plants were transplanted in the potted soil on 10th of September in 2016; soil samples were collected 50 d after transplanting (before flowering); genomic DNA was extracted, and PCR was amplified to establish libraries. The 16S rRNA genes V4+V5 regions of soil bacteria and fungal ITS1+ITS2 regions were sequenced by Illumina high-throughput sequencing technology on MiSeq platform, and related biological analysis was conducted to explore the changes of soil bacterial and fungal abundances, diversities and structures. **[Results]** A total of 3 192 bacterial operational taxonomic units (OTUs) and 762 fungal OTUs were obtained from 9 strawberry rhizosphere soil samples. Among them, Proteobacteria, Fimicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes and Cyanobacteria were the dominant bacteria, which abundances of total bacteria were 87.86%, 64.83% and 61.79% respectively in strawberry rhizosphere soil of CK, 1Y, 8Y. Ascomycota and Basidiomycota were dominant fungi, which abundances of fungal community were 69.17%, 69.06% and 76.18% respectively in strawberry rhizosphere soil of CK, 1Y, 8Y. At phylum level, the ratios of Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fimicutes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Planctomyces, Gemmatimonadetes, Proteobacteria, Ascomycota, Zygomycota and Chytridiomycota were significantly changed in different cropping years ($P<0.05$), The analysis at the genera level also showed that the ratios of 29 genera of bacteria and 19 genera of fungi were significantly changed in different cropping years ($P<0.05$). **[Conclusion]** With the extension of continuous cropping years, ratios of various kinds of bacterial and fungi in ecosystem of strawberry rhizosphere soil will be changed significantly.

Keywords: Strawberry, Rhizosphere soil, Illumina high-throughput sequencing, Soil bacteria, Soil fungi

草莓 (*Fragaria ananassa* Duch) 属蔷薇科 (Rosaceae) 草莓属植物, 是一种营养价值和经济价值较高的水果, 因其色、香、味俱佳, 深受消费者青睐。草莓的主要栽培模式为一年一栽, 主产区草莓连作障碍现象不仅在我国普遍存在, 全世界栽培草莓地区连作障碍同样广泛存在。草莓在同一地块上连续种植 2 年以上, 地下病虫害逐年严重, 草莓长势逐年变弱, 表现为植株发育受阻, 甚至植株死亡, 果品质量逐年变劣, 产量逐年下降。草莓连作障碍已成为草莓栽培者及研究者广泛关注的焦点。目前, 我国已经成为世界第一大草莓生产国^[1], 草莓连作障碍已严重制约了草莓产业的发展, 亟待解决。土壤微生物影响着土壤养分的吸收和转化, 微生物种群结构失衡是导致土壤质量下降、作物减产的主要原因^[2]。傅佳等^[3]、周陈等^[4]研究表明, 土壤微生物数量变化直接或间接影响土壤中养分的转

化。作物连作年限过长, 养分消耗单一, 肥力水平下降, 不利于养分的平衡供给, 土壤微生物活性降低, 影响了养分的利用效率, 土壤微生物种群结构不合理, 有害微生物数量逐渐占优势^[5]。传统的土壤微生物研究方法如微生物平板培养法、Biolog 鉴定系统法、生物标记法等^[6]往往会过低估计土壤微生物的群落结构组成, 无法详细描述出土壤微生物的群落结构组成方面的信息, 也无法描绘出不同群体的生理差异。第二代测序 Illumina MiSeq 方法有效地避免了通量低、操作复杂和准确率低等缺陷^[6-7], 具有操作简单、成本较低的优势, 并且采用边合成边测序原理, 结果可信度高。MiSeq 高通量测序平台, 不仅可实现对多样品的多个可变区同时测序, 而且在测序速度和测序通量上都有进一步提升。目前此平台已在微生物多样性群落结构研究方面得到广泛应用^[8-9]。一些研究发现随草莓连作时间逐年

增加, 根际土壤中细菌数量逐渐降低, 真菌数量逐渐升高, 细菌和真菌的比值逐渐降低, 土壤微生物由“细菌型”向“真菌型”转变, 说明土壤真菌与草莓连作关系密切, 其中病原真菌是草莓连作障碍因子之一, 主要包括镰刀菌属、丝核菌属、轮枝菌属、疫霉属、腐霉属、拟盘多毛孢属和炭疽菌属等致病真菌。国内以镰刀菌和丝核菌为主^[10]。不同连作年限草莓根际土壤细菌、真菌群落多样性变化目前还不清楚, 本研究以不同连作年限草莓根际土壤为材料, 采用高通量测序技术, 探讨不同连作年限土壤细菌、真菌多样性的变化, 以期对草莓连作障碍调控提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2016 年 9–11 月在江苏省农业科学院草莓温室大棚进行。

1.1 试验材料

试材为生长整齐一致的三叶一心期“宁玉”草莓苗; 盆栽土壤分别采集于江苏省农业科学院白马植物基地里 3 个相邻的农田耕作层, 其中一个农田已经荒废多年没有开垦(CK), 一个农田连作 1 年(1Y)草莓且之前一直荒废多年, 另一个农田连作 8 年(8Y)草莓。土壤基本理化性质见表 1。

1.2 试验设计

将每种不同连作年限的土壤与珍珠岩以 3:1 的体积充分混匀装盆。塑料盆直径 15 cm, 深 18 cm, 每盆装土 1 500 g, 每盆栽草莓一株。草莓苗于 2016 年 9 月 10 日定植, 定植后早晚各浇一次水并且适当遮阴 7 d, 之后正常水肥光照管理, 温度维

持在 20–25 °C 之间, 光周期约 12 h(昼)/12 h(夜)。定植后 50 d 时(开花前)进行土壤取样及测定分析。各个土壤处理选取长势相似的 3 盆草莓, 采用抖土法获取粘附在根系表面上的根际土壤并充分混匀, 重复 3 次。取得的根际土壤一份于–20 °C 冷冻保存用于土壤微生物分析, 一份 4 °C 保存备测。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤微生物基因组 DNA 的提取: 提取试剂盒为 Omega 土壤微生物 DNA 提取试剂盒, 称取 0.5 g –20 °C 保存的土壤样品, 按试剂盒的试验步骤进行土壤微生物总 DNA 的提取, DNA 样品于–20 °C 保存待用。

1.3.2 试验流程: 提取样品总 DNA 后, 根据设计得到细菌 V4+V5 (F : 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3', R : 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') 和真菌 ITS1+ITS2 (F : 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', R : 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 合成的引物, 合并引物接头, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 含 15 mmol/L MgCl₂ 的 10×Buffer 10.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 10 μmol/L 引物各 5.0 μL, 5 U/μL *Taq* 酶 1.0 μL, DNA 模板 4.0 μL, 灭菌去离子水 73.0 μL, 总体积 100 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。然后对其产物进行纯化、定量和均一化形成测序文库, 建好的文库先进行文库质检, 质检合格的文库用 Illumina HiSeq PE250 进行测序, 由南京集思慧远生物科技有限公司完成测序。

表 1 供试土壤基本理化性质

Table 1 The basic physical and chemical properties of the tested soil

处理 Treatments	pH	有机质 OM (g/kg)	全氮 Total N (g/kg)	全钾 Total K (mg/g)	全磷 Total P (g/kg)	碱解氮 Alkalyzable N (mg/kg)	速效磷 Available P (mg/kg)	速效钾 Readily available K (mg/kg)
CK	7.31	21.49	0.85	10.68	1.02	65.28	42.38	229.30
1Y	6.80	38.40	2.35	12.61	2.01	142.53	97.49	389.53
8Y	6.79	32.22	2.38	12.34	2.12	153.67	110.02	491.99

1.4 生物信息分析方法

1.4.1 数据过滤及质量评估: 数据过滤主要步骤如下: (1) 去除平均质量值低于 20 的长 Reads; (2) 去除 Reads 含 N 的碱基数超过 3 个的长 Reads; (3) Reads 长度范围为 220–500 nt。

1.4.2 序列优化: 利用 Mothur 软件(version 1.34.4, <http://www.mothur.org/>)进行序列优化, 主要步骤^[11]如下: (1) 对序列进行筛选, 去除模糊碱基数大于 0、单碱基高重复区大于 8、重叠区错配数大于 0 及长度大于 97.5% 的序列(细菌)、重叠区长小于 20 bp 的序列(真菌); (2) 进行去冗余处理。

1.4.3 OTU 聚类分析: 为便于下游物种多样性分析, 将 Tags 聚类为 OTU (Operational taxonomic units)。首先把拼接的 Tags 中的 Singletons (对应 Reads 只有一条的序列)过滤掉, 因为 Singletons 可能由于测序错误造成, 因此将这部分序列去除, 不加入聚类分析, 利用 Usearch 在 0.97 相似度下进行聚类, 对聚类后的序列进行嵌合体过滤后, 得到用于物种分类的 OTU, 每个 OTU 被认为可代表一个物种。

1.5 数据分析

随机选取相似度在 97% 条件下的 OTU 生成稀释曲线, 并利用软件 Mothur 计算丰富度指数 Chao 和 ACE 多样性指数 Simpson 和 Shannon。基于 RDP 和 UNITE 分类学数据库对 OTU 进行物种注释, 并用 Excel 和 SPSS 进行数据处理, 利用 Excel 和 R 语言工具对样品物种组成及相对丰度统计结果绘制柱状图和 Venn 图。

2 结果与分析

2.1 土壤样品测序深度评估

9 个细菌样品测序, 过滤后共获得 124.7 Mb 数据量, 双端 Reads 拼接后共产生 331 079 条 Raw Tags, 序列优化后共得到 300 784 条 Clean Tags, 聚类一共获得 3 192 个 OTU; 9 个真菌样品测序, 过滤后共获得 82.7 Mb 数据量, 双端 Reads 拼接后共产生 344 316 条 Raw Tags, 序列优化后共得到 340 298 条 Clean Tags, 聚类一共获得 762 个

OTU。参照文献[12]随机抽取测序序列, 将抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建曲线, 在 97% 相似性水平下聚类 OTU 并制作各样品的稀释曲线图(图 1), 由图 1 可知, 细菌和真菌曲线逐渐趋向平坦, 说明测序数量合理。

2.2 不同连作年限草莓根际土壤细菌和真菌群落丰富度和多样性变化

Observed species 指数和 Chao 指数可反映群落物种丰富度, 由表 2 可知 1Y 草莓根际土壤细菌 Observed species 指数和 Chao 指数相较于 CK 分别增加了 37.89% 和 22.66%, 8Y 草莓根际土壤细菌 Observed species 指数和 Chao 指数相较于 CK 分别增加了 27.91% 和 12.71%, 但是相较于

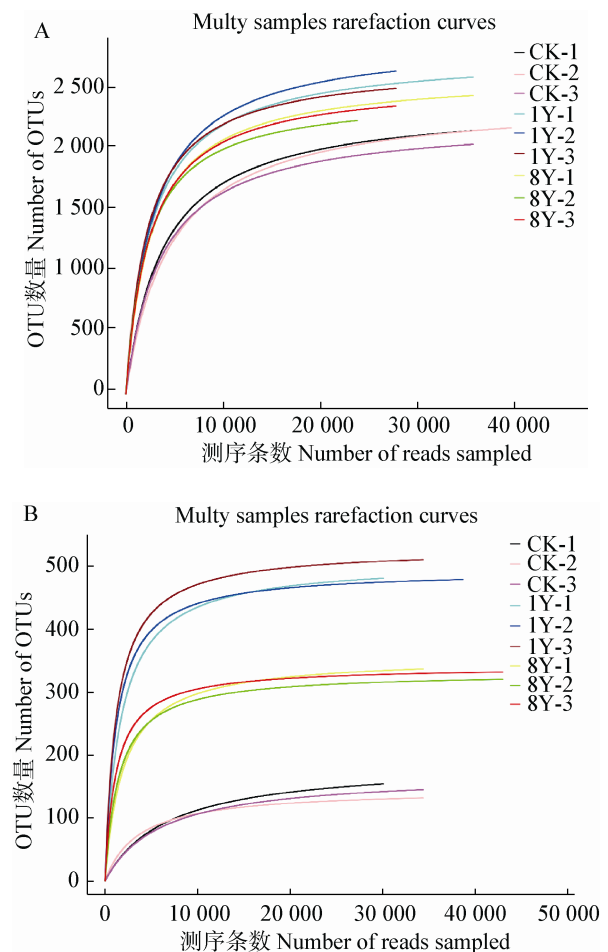


图 1 土壤样品细菌(A)、真菌(B)多样品稀释曲线
Figure 1 Bacterial (A) and fungal (B) rarefaction curves of different soil samples

表 2 不同连作年限草莓根际土壤细菌和真菌群落丰富度和多样性指数
Table 2 OTUs' abundance and diversity of strawberry rhizosphere bacteria and fungi of different continuous cropping years

处理 Treatments	细菌(V4+V5 区) Bacterial (V4+V5)				真菌(ITS1+ITS2 区) Fungal (ITS1+ITS2)			
	Observed species 指数	Chao 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	Observed species 指数	Chao 指数	Simpson 指数	Shannon 指数
CK	1 533.33	2 069.88	0.97	6.98	106.33	154.31	0.84	3.09
1Y	2 114.33	2 538.94	1.00	9.15	456.00	484.72	0.97	6.26
8Y	1 961.33	2 332.86	1.00	9.09	300.00	326.14	0.93	5.05

1Y 分别减少了 7.24%和 8.12%。1Y 草莓根际土壤真菌 Observed species 指数和 Chao 指数相较于 CK 分别增加了 3.3 倍和 2.1 倍, 8Y 草莓根际土壤真菌 Observed species 指数和 Chao 指数相较于 CK 分别增加了 1.1 倍和 1.1 倍, 但是相较于连作 1 年分别减少了 34.21%和 32.64%。显示土壤细菌和真菌群落物种丰富度的变化因连作年限的不同而有较大差异, 草莓连作 1 年可增加土壤细菌和真菌群落物种丰富度, 连作 8 年却会减少土壤细菌和真菌群落物种丰富度。

Simpson 指数和 Shannon 指数可反映群落物种多样性。由表 2 可知, 1Y 草莓根际土壤细菌 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于 CK 分别增加了 3.09%和 31.09%, 8Y 草莓根际土壤细菌 Simpson 指数相较于 1Y 没有变化, Shannon 指数相较于 1Y 减少了 0.66%。1Y 草莓根际土壤真菌 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于 CK 分别增加了 15.48%和 1 倍, 8Y 草莓根际土壤真菌 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于 1Y 减少了 4.12%和 19.33%。可见土壤细菌和真菌群落物种多样性的变化因连作年限的不同而有较大差异, 草莓连作 1 年可增加土壤细菌和真菌群落物种多样性, 连作 8 年却会减少土壤细菌和真菌群落物种多样性。

2.3 不同连作年限草莓根际土壤微生物群落门类组成

从门的分类水平看, 草莓根际土壤样本中主要检测出细菌 10 个门, 分属变形菌门(Proteobacteria)、

厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)。其中, 变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和蓝藻门为草莓根际土壤的优势菌种(表 3) 这些菌在 CK、1Y、8Y 草莓根际土壤中分别占细菌总数的 87.86%、64.83%和 61.79%。对各门细菌所占比例分析发现, 不同连作年限草莓根际土壤中细菌群落组成发生明显变化(表 3)。芽单胞菌门、疣微菌门和绿弯菌门的比例随连作年限的增加而逐渐增加; 蓝藻门的比例则逐渐减小。在 1Y 的草莓根际土壤生态系统中, 变形菌门、酸杆菌门的比例较 CK 和 8Y 显著增加, 厚壁菌门的比例较 CK 和 8Y 显著减小。

测序结果表明, 从草莓根际土壤中鉴定得到的真菌主要来自 5 个门, 包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和新美鞭菌门(Neocallimastigomycota)(表 3)。其中, 优势菌群为子囊菌门和担子菌门, 这两种真菌在 CK、1Y、8Y 草莓根际土壤中分别占真菌群落的 69.17%、69.06%和 76.18%。接合菌门的比例随连作年限的增加而逐渐增加, 在 1Y 的草莓根际土壤生态系统中, 担子菌门、接合菌门和壶菌门的比例较 CK 显著增加, 分类地位尚不明确或尚未鉴定的真菌比例随连作年限的增加而显著减少。以上结果显示, 随连作

表3 草莓根际土壤微生物在门和属水平上的丰度变化
Table 3 Changes in relative abundance of the microorganisms at the phyla and genera level in the rhizosphere soil of strawberry

分类水平 Taxonomy		比例 Ratios (%)		
门 Phyla	属 Genera	CK	1Y	8Y
细菌 Bacteria	变形菌门	26.10±0.26c	38.95±0.76a	32.33±0.87b
	伯克氏菌属	0.09±0.02b	2.28±0.35a	0.16±0.01b
	<i>Haliangium</i>	0.39±0.03c	1.15±0.08a	0.70±0.02b
	盐单胞菌	4.43±0.30a	0.01±0.01b	0.01±0.01b
	密斯氏菌属	0.24±0.02c	1.04±0.05a	0.93±0.01b
	厚壁菌门	13.88±0.51a	2.89±0.27c	4.93±0.33b
	葡萄球菌	5.42±0.16a	0.04±0.02b	0.01±0.01b
	芽孢杆菌属	0.26±0.02c	0.72±0.03b	1.23±0.08a
	喜盐芽孢杆菌属	4.11±0.16a	0.01±0.01b	0.00±0.00b
	动性球菌属	0.99±0.07a	0.34±0.04b	0.35±0.03b
	盐水球菌属	1.28±0.13a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	放线菌门	29.98±0.29a	13.25±1.48b	16.30±1.11b
	<i>Gaiella</i>	0.29±0.05c	1.17±0.24a	0.75±0.18b
	微杆菌属	1.80±0.11a	0.05±0.02c	0.07±0.03b
	涅斯捷连科氏菌属	7.57±0.15a	0.09±0.03b	0.06±0.01b
	类诺卡氏属	0.61±0.06c	1.97±0.23b	2.84±0.20a
	链霉菌属	1.17±0.05b	2.95±0.28c	5.61±0.36a
	短杆菌属	3.64±0.20a	0.00±0.00b	0.02±0.01b
	拟杆菌门	8.71±0.11a	5.04±0.42b	5.76±0.40b
	黄杆菌属	2.81±0.24a	0.59±0.07b	0.33±0.02c
	<i>Olivibacter</i>	3.36±0.04a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
	<i>Niastella</i>	0.20±0.04a	0.29±0.05a	0.22±0.02a
	<i>Flavisolibacter</i>	0.06±0.04a	0.13±0.01a	0.35±0.12a
	芽单胞菌门	1.62±0.10b	5.31±0.25a	5.89±0.23a
	芽单胞菌属	0.37±0.02c	1.69±0.13a	0.92±0.09b
	疣微菌门	0.83±0.08a	1.49±0.30a	2.17±0.31a
	丰佑菌属	0.75±0.10a	1.34±0.28a	1.94±0.22a
	交替球菌属	0.02±0.01b	0.08±0.02a	0.09±0.02a
	<i>Luteolibacter</i>	0.00±0.00a	0.01±0.01a	0.01±0.00a
	绿弯菌门	3.14±0.09c	9.06±0.22b	11.27±0.39a
	玫瑰弯菌属	0.26±0.02b	0.54±0.05a	0.41±0.01a
	厌氧蝇菌属	0.01±0.01b	0.04±0.02b	0.57±0.04a
<i>Nitrolancea</i>	0.05±0.02a	0.10±0.01a	0.06±0.02a	
酸杆菌门	3.13±0.15c	10.62±0.45a	8.79±0.34b	
<i>Blastocatella</i>	0.18±0.03b	0.42±0.06a	0.32±0.02a	
<i>Bryobacter</i>	0.09±0.02b	0.20±0.01a	0.24±0.07a	
<i>Candidatus Solibacter</i>	0.06±0.00b	0.16±0.03a	0.07±0.02b	
蓝藻门	9.19±0.22a	4.70±0.68b	2.47±0.08b	
<i>Microcoleus</i>	0.27±0.02a	0.28±0.05a	0.11±0.02b	

(待续)

(续表)					
		<i>Persicaria minor</i>	0.12±0.03a	0.19±0.05a	0.04±0.02a
		席藻属	0.26±0.01a	0.03±0.01b	0.00±0.00b
	浮霉菌门		1.59±0.03b	4.58±0.51a	4.53±0.57a
		浮霉状菌属	0.31±0.01b	1.11±0.14a	0.86±0.13b
		小梨形菌属	0.20±0.05b	0.49±0.04a	0.72±0.09a
		<i>Gemmata</i>	0.19±0.01b	0.49±0.05a	0.58±0.01a
	其它		1.80±0.09c	4.21±0.29b	5.55±0.20a
真菌 Fungi	子囊菌门		68.91±0.56a	52.40±0.73a	60.43±3.39a
		链格孢属	0.42±0.04a	0.36±0.02b	0.06±0.01c
		节丛孢属	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.80±0.25a
		曲霉属真菌	0.09±0.02c	1.97±0.18b	5.99±0.06a
		镰刀菌属	0.00±0.00b	0.31±0.11a	0.34±0.09a
		油瓶霉属	0.01±0.01b	0.43±0.08a	0.00±0.00b
		绿僵菌属	0.00±0.00b	0.77±0.06a	0.01±0.01b
		<i>Mycothermus</i>	0.01±0.00b	1.79±0.15a	2.02±0.21a
		漆斑菌属	0.00±0.01b	0.30±0.03a	0.39±0.12a
		<i>Parascedosporium</i>	0.00±0.00b	0.03±0.00b	0.94±0.08a
		青霉菌属	0.02±0.01c	0.98±0.08b	2.30±0.20a
		<i>Remersonia</i>	0.00±0.00c	0.21±0.05b	1.84±0.16a
		葡萄穗霉属	0.00±0.00c	0.14±0.06b	0.25±0.03a
		踝节菌属	0.01±0.01b	1.29±0.19a	1.42±0.10a
		<i>Westerdykella</i>	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.67±0.07a
	担子菌门		0.26±0.03b	16.66±0.86a	15.75±0.14a
		<i>Phylloporus</i>	0.01±0.01b	0.80±0.23a	0.85±0.13a
		<i>Pseudozyma</i>	0.00±0.00c	0.15±0.02b	0.27±0.10a
		粉褶蕈属	0.03±0.02b	0.28±0.08a	0.00±0.00b
	接合菌门		0.02±0.00b	7.28±0.16a	15.87±2.79a
		被孢霉属	0.02±0.00a	7.28±0.16b	15.15±2.80c
	壶菌门		0.04±0.01c	5.49±0.21a	1.51±0.13b
		<i>Rhizophlyctis</i>	0.00±0.00b	1.42±0.10a	0.00±0.01b
		<i>Pateramyces</i>	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.05±0.02a
		<i>Rhizophydium</i>	0.01±0.01a	0.01±0.00a	0.00±0.00a
	新美鞭菌门		0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.02±0.01a
		<i>Anaeromyces</i>	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.02±0.01a
	其它		30.77±0.54a	18.17±0.05b	6.44±0.54c

注: 每个给定菌群的相对丰度按照测得该菌序列 Reads 数/总测序 Reads 数计算。数据为 $\bar{x} \pm s$ ($n=3$)。不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。表中仅列出确定的属。

Note: The relative abundance of each given group of bacterial was calculated based on percentage of the reading of sequences of the given group to the reading of the total sequences measured. Data shown were $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). Different letters mean significant difference ($P<0.05$). Only established genera were listed here.

年限的延长,草莓根际土壤生态系统中细菌和真菌群落各门类组成的比例会发生显著变化。

进一步从属的角度分析发现,不同连作年限草莓根际土壤中的细菌和真菌群落的组成比例同样发生明显改变(表 3)。对不同年限间的比较发现,CK 草莓根际土壤中丰度显著增加的细菌群落主要为盐单胞菌(*Halomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、*Halobacillus*、动球菌属(*Planococcus*)、盐水球菌属(*Salinicoccus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、涅斯捷连科氏菌属(*Genus Nesterenkonia*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、*Olivibacter*、席藻属(*Phormidium*)。1Y 草莓根际土壤中丰度显著增加的细菌群落主要为伯克氏菌属(*Burkholderia*)、*Haliangium*、密斯氏菌属(*Smithella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Gaiella*、类诺卡氏属(*Nocardioideis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、玫瑰弯菌属(*Roseiflexus*)、*Blastocatella*、*Bryobacter*、*Candidatus Solibacter*、浮霉状菌属(*Planctomyces*)、*Pirellula*、*Gemmata*。8Y 草莓根际土壤中丰度显著增加的细菌群落主要为 *Haliangium*、密斯氏菌属(*Smithella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Gaiella*、类诺卡氏属(*Nocardioideis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、*Alterococcus*、玫瑰弯菌属(*Roseiflexus*)、厌氧绳菌属(*Anaerolinea*)、*Blastocatella*、*Bryobacter*、*Pirellula*、*Gemmata*。

对已确定分类地位至属的真菌分析表明,不同连作年限草莓真菌群落组成也发生显著改变(表 3)。CK 草莓根际土壤中丰度显著增加的真菌群落主要为链格孢属,1Y 草莓根际土壤中丰度显著增加的真菌群落主要为曲霉属真菌(*Aspergillus*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、油瓶霉属(*Lecythophora*)、绿僵菌属(*Metarhizium*)、*Mycothermus*、漆斑菌属(*Myrothecium*)、青霉菌属(*Penicillium*)、*Remersonia*、葡萄穗霉属(*Stachybotrys*)、踝节菌属(*Talaromyces*)、*Phylloporus*、*Pseudozyma*、粉褶蕈属(*Entoloma*)、被孢霉属(*Mortierella*)、*Rhizophlyctis*。8Y 草莓根际土壤中

丰度显著增加的真菌群落主要为节丛孢属(*Arthrotrichy*)、曲霉属真菌(*Aspergillus*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、*Mycothermus*、漆斑菌属(*Myrothecium*)、*Parascedosporium*、青霉菌属(*Penicillium*)、*Remersonia*、葡萄穗霉属(*Stachybotrys*)、踝节菌属(*Talaromyces*)、*Westerdykella*、*Phylloporus*、*Pseudozyma*、被孢霉属(*Mortierella*)、*Pateramyces*、根生壶菌属(*Rhizophyidium*)和厌氧鞭菌属(*Anaeromyces*)所占比例均未发生显著变化。

2.4 不同连作年限草莓根际土壤细菌、真菌类群分析

在 97%的相似性下,得到了每个样品的 OTU 个数,如表 4 所示,CK、1Y、8Y 分别获得 2 089、2 639 和 2 420 个细菌 OTU,以及 153、592 和 417 个真菌 OTU。Venn 图能够反映组间或样品之间共有和特有 OTU 的数目,直观地表现出组间或样品间 OTU 的重叠情况^[13]。结合 OTU 所代表的物种,可以找出不同环境中的核心微生物。从图 2A 中可以看出,不同处理之间共有的细菌 OTU 数目为 1 486 个,代表的物种分别属于放线菌纲(*Actinobacteria*)、暖绳菌纲(*Caldilineae*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteri*)、全噬菌纲(*Holophagae*)和丰佑菌纲(*Opiritutae*)等。各个处理之间也存在差异,CK 与 1Y 之间共有 984 个各自独有 OTU;CK 与 8Y 之间共有 1 311 个各自独有 OTU;1Y 与 8Y 之间共有 1 117 个各自独有 OTU。

从图 2B 中可以看出,各处理之间共有的真菌 OTU 数目为 86 个,主要共有物种分别属于粪壳菌

表 4 不同连作年限草莓根际土壤样本测序获得的细菌、真菌 OTU 序列读数

Table 4 Reads of observed soil bacterial and fungal OTUs		
处理 Treatments	细菌(V4+V5 区)	真菌(ITS1+ITS2 区)
	OTU 个数 Bacterial (V4+V5) OTU numbers	OTU 个数 Fungal (ITS1+ITS2) OTU numbers
CK	2 089	153
1Y	2 639	592
8Y	2 420	417

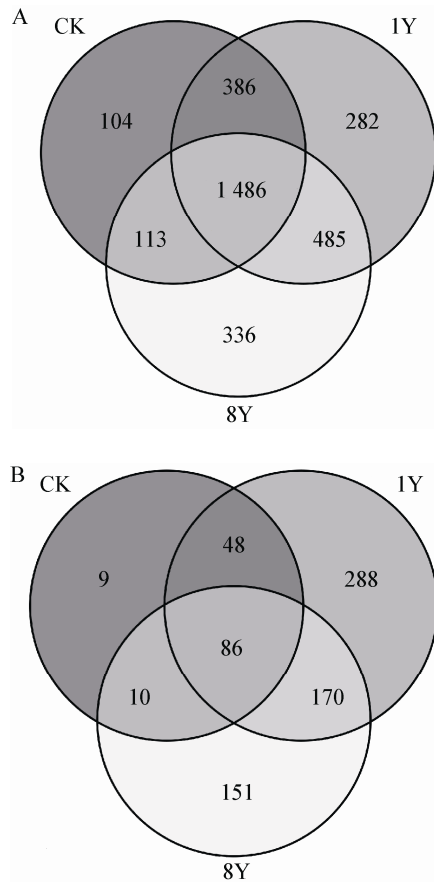


图 2 不同连作年限草莓根际土壤细菌(A)、真菌(B) Venn 图

Figure 2 Venn diagrams of soil bacterial (A) and fungal (B) community with strawberry rhizosphere of different continuous cropping years

纲(Sordariomycetes)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、伞菌纲(Agaricomycetes)和座囊菌纲(Dothideomycetes)等。各个处理之间也存在差异,CK 与 1Y 之间共有 477 个各自独有 OTU;CK 与 8Y 之间共有 377 个各自独有 OTU;1Y 与 8Y 之间共有 497 个各自独有 OTU。

3 结论与讨论

连作障碍,也称再植病或土壤病,是一种特殊的植物化感现象,是指同一地块连续多年种植相同作物造成作物生长状况变差、产量和品质降低、病虫害发生加剧的现象。前人研究表明,造成作物连作障碍的原因可能是多方面的,比如土壤营养失

衡、土壤理化性质恶化、自毒物质积累等^[14]。越来越多的研究者认为,植物产生的化感自毒物质是作物连作障碍的重要原因,这些物质存在于土壤中,会抑制下一茬同类植物的生长。相关研究表明,草莓的根系分泌物含有乳酸、苯甲酸、琥珀酸、己二酸和对羟基苯甲酸,其中苯甲酸明显抑制根重,对草莓生长抑制作用最强^[15]。化感物质可单独对草莓植株造成危害,也可与其他病原复合作用危害草莓,同时促进连作土壤中病原菌菌丝生长、孢子萌发及侵染,加重连作草莓土传根部病害,最终导致再植病害的发生^[16]。但是,近年来越来越多的学者认为,根系分泌物生态效应的间接作用及土壤微生物区系紊乱是导致植物连作障碍形成的主要因素^[17]。这可能是由于在根系分泌物特定组分的介导下,某些类群的微生物(如土传病原菌)大量繁殖,同时抑制其他有益微生物(如假单胞菌等拮抗菌)的生长,进而改变了植物根系分泌物的组分和数量,为趋化性病原微生物提供更多的碳源、能源,形成恶性循环,造成植物生长发育不良。

本实验中,变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和蓝藻门为草莓根际土壤细菌的优势菌种。芽单胞菌门、疣微菌门和绿弯菌门的比例随连作年限的增加而逐渐增加;蓝藻门的比例则逐渐减小。在 1Y 的草莓根际土壤生态系统中,变形菌门、酸杆菌门的比例较 CK 和 8Y 显著增加,厚壁菌门的比例较 CK 和 8Y 显著减小。真菌优势菌群为子囊菌门和担子菌门。接合菌门的比例随连作年限的增加而逐渐增加,在 1Y 的草莓根际土壤生态系统中,担子菌门、接合菌门和壶菌门的比例较 CK 显著增加,分类地位尚不明确或尚未鉴定的真菌比例随连作年限的增加而显著减少。以上结果显示,随连作年限的延长,草莓根际土壤生态系统中细菌和真菌群落各门类组成的比例会发生显著变化。前人研究发现,长期施肥能够影响作物根际微生物的群落组成^[18],虽然本研究在采集草莓 8 年土壤时尽量避开施肥区域,但在长期种植过程中,施肥对草莓根际微生物多样性的影响仍不可避免。因此,可能

是根系分泌物介导下的土壤微生物群落结构与功能多样性变化对草莓的生长发育产生重要的影响。

从属的角度分析发现, 1Y 和 8Y 草莓根际土壤中丰度显著增加的真菌群落有镰刀菌属(*Fusarium*)。镰刀菌属(*Fusarium*)为真菌中较大的一个属, 它广泛分布于自然界中, 兼寄生或腐生生活。它是人类发现的最重要的植物病原菌之一。它可侵染多种植物(粮食作物、油料作物、经济作物、药用植物及观赏植物)造成植物萎焉、根腐、穗腐等各种类型的腐烂病, 导致严重的减产, 从而造成重大的经济损失^[19]。我国报道的草莓根腐病主要为草莓黑根腐病和红中柱根腐病, 已分离鉴定的病原真菌中就有尖孢镰刀菌^[20]。

序列分析中有部分属于 Norank 序列, 即在与现有数据库中已知序列进行比对时, 无法获得该序列的分类学信息。因此, 推断这些序列可能是一些新发现的土壤微生物类群, 还需采用其他分析手段进一步鉴定。

参 考 文 献

- [1] Tan CH, Dai HP, Lei JJ. Status quo and development trend of world strawberry production and trade[J]. World Agriculture, 2003(5): 10-12,40 (in Chinese)
谭昌华, 代汉萍, 雷家军. 世界草莓生产与贸易现状及发展趋势(上)[J]. 世界农业, 2003(5): 10-12,40
- [2] Ma K, Zhang L, Du Q, et al. Effect of potato continuous cropping on soil microorganism community structure and function[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2010, 24(4): 229-233 (in Chinese)
马琨, 张丽, 杜茜, 等. 马铃薯连作栽培对土壤微生物群落的影响[J]. 水土保持学报, 2010, 24(4): 229-233
- [3] Fu J, Li XS, Fu JF. The effects of continuous cropping American Ginseng on soil microbes and soil physicochemical properties[J]. Journal of Microbiology, 2009, 29(2): 63-66 (in Chinese)
傅佳, 李先思, 傅俊范. 重茬种植西洋参对其根区土壤微生物与土壤理化性质影响[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(2): 63-66
- [4] Zhou C, Li X, Yang MK, et al. Dynamic change of soil microorganisms and soil nutrition at different growing stage of winter wheat[J]. Acta Agriculture Boreali-Occidentalis Sinica, 2008, 17(3): 113-116 (in Chinese)
周陈, 李许, 杨明开, 等. 冬小麦不同生育期土壤微生物及养分动态变化[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 113-116
- [5] Hu RX, Zhao SY, Tan ZJ, et al. The effect of continuous tobacco cropping on the microbes and enzyme activities in rice soil[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2007, 21(5): 494-497 (in Chinese)
胡汝晓, 赵松义, 谭周进, 等. 烟草连作对稻田土壤微生物及酶的影响[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 494-497
- [6] Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, et al. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(6): e37
- [7] Williams ST, Foster PG, Littlewood DTJ. The complete mitochondrial genome of a turbinid vetigastropod from MiSeq Illumina sequencing of genomic DNA and steps towards a resolved gastropod phylogeny[J]. Gene, 2014, 533(1): 38-47
- [8] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(32): 12115-12120
- [9] Konstantinidis KT, Tiedje JM. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(7): 2567-2572
- [10] Elad Y, Chet I, Henis Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry fields by *Trichoderma harzianum*[J]. Plant and Soil, 1981, 60(2): 245-254
- [11] Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(17): 5112-5120
- [12] Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, et al. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. The ISME Journal, 2013, 7(7): 1344-1353
- [13] Chen H, Boutros PC. Venn Diagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 35
- [14] Zhang CY, Lin WX. Continuous cropping obstacle and allelopathic autotoxicity of medicinal plants[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(1): 189-196 (in Chinese)
张重义, 林文雄. 药用植物的化感自毒作用与连作障碍[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 189-196
- [15] Kitazawa H, Asao T, Ban T, et al. Autotoxicity of root exudates from strawberry in hydroponic culture[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2005, 80(6): 677-680
- [16] Dai L, Zhao HM, Zhen WC. Study on allelopathy in strawberry replanting disease[J]. Science & Technology Review, 2006, 24(6): 52-54 (in Chinese)
代丽, 赵红梅, 甄文超. 草莓再植病害中的化感作用研究[J]. 科技导报, 2006, 24(6): 52-54
- [17] Qi JJ, Yao HY, Ma XJ, et al. Soil microbial community composition and diversity in the rhizosphere of a Chinese medicinal plant[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2009, 40(9/10): 1462-1482
- [18] Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome[J]. Nature, 2012, 488(7409): 86-90
- [19] Zhang XM. History and current research on taxonomy of the genus *Fusarium*[J]. Journal of Fungal Research, 2005, 3(2): 59-62 (in Chinese)
张向民. 镰刀菌属分类学研究历史与现状[J]. 菌物研究, 2005, 3(2): 59-62
- [20] Zeng FC, Huang Y, Zhao YQ, et al. Biological characteristics of strawberry fusarium wilt[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2006, 24(2): 157-160 (in Chinese)
曾富春, 黄云, 赵艳琴, 等. 草莓枯萎病菌的生物学特性[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(2): 157-160