中国生态农业学报 2015 年 2 月 第 23 卷 第 2 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Feb. 2015, 23(2): 225−232

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.140755

马铃薯连作栽培对土壤微生物多样性的影响*

秦 越 马 琨 刘 萍**

(宁夏大学农学院 银川 750021)

摘 要 马铃薯是宁夏回族自治区南部山区重要的粮菜兼用作物，随栽培面积持续扩大，轮作倒茬困难，由此带来的连作障碍问题日渐突出。为探明马铃薯连作障碍机制，分别采集马铃薯正茬、连作 1 年、6 年和 10 年的根际土壤样本，利用末端标记限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术研究连作栽培对根际土壤微生物多样性的影响，以期揭示马铃薯根际土壤主要菌群动态变化规律及连作障碍的可能原因。结果表明：连作栽培后马铃薯土壤细菌和真菌 DNA 仍具有较高的 T-RFLP 多态性，但不同连作年限根际土壤中优势 T-RFs 片段发生变化，多年连作使某些 T-RFs 消失；随连作年限增加，根际土细菌 Shannon-Wienen 指数、Simpson 指数和 Sorenson 指数下降，而真菌 Shannon-Wienen 指数和 Simpson 指数上升。菌群分析发现，土壤细菌中以厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌纲(Bacilli)和梭菌纲(Clostridia)所占比例最大。连作使细菌和真菌菌群发生变化，芽孢杆菌纲、鞘氨醇纲(Sphingobacteria)等比例下降甚至消失，β-变形菌纲(Beta proteobacteria)和异常球菌纲(Deinococci)比例上升；土壤真菌中座囊菌纲(Dothideomycetes)煤炱目(Capnodiales)随连作年限增加比例下降，粪壳菌纲(Sordariomycetes)肉座菌目(Hypocreales)随连作年限增加比例上升。马铃薯连作使根际土壤中芽孢杆菌属(*Bacillus*)等有益菌属的细菌减少，罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)等致病菌属的细菌增加。连作导致马铃薯根际土壤细菌多样性水平降低，真菌多样性水平升高，根际土壤微生物多样性存在明显差异，连作破坏了根际土壤微生物群落的平衡，使其根际土壤微生态环境恶化。连作障碍可能是多因素综合互作用的结果，持续的研究有利于做出较合理的解释。

关键词 马铃薯 连作栽培 根际土壤 T-RFLP 遗传多样性 微生物群落 细菌 真菌

中图分类号: S154.36; Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2015)02-0225-08

Effect of potato continuous cropping on genetic diversity of soil microorganisms

QIN Yue, MA Kun, LIU Ping

(College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract Because of its high nutritive value and extensive use, potato has become a critical crop in the southern mountain areas of Ningxia, China. However, the expansion of cultivated land areas under potato has made not only crop rotation difficult, but as has also worsened the obstacles of potato continuous cropping in recent years. In order to alleviate and eventually resolve the obstacles of potato continuous cropping, rhizosphere soils were sampled under the following potato treatments after 2 years, 7 years and 11 years of continuous cropping in the southern mountain areas of Ningxia, China. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was used to study the genetic diversity of soil microorganisms, to explore the dynamics of main soil microbial groups in rhizosphere soils and to find the possible reasons for the obstacles of potato continuous cropping in the region. The results showed that some specific T-RFs fragments changed or disappeared in rhizosphere soil samples under different periods of continuous cropping, though higher polymorphism of T-RFLP of bacteria and fungi in rhizosphere soils of continuously cropped potato was observed. While the Shannon-Wienen, Simpson and Sorenson indexes of bacterial dropped, those of fungus increased with increasing years of continuous cropping. Analysis of soil microorganism biota revealed that Firmicute, Bacilli and Clostridia were the highest proportion of total bacteria communities in potato rhizosphere soils. Continuous cropping significantly changed structures of soil

* 国家自然科学基金项目(31160104)资助

** 通讯作者：刘萍，主要从事种质资源遗传多样性研究。E-mail: liupnxdx@126.com
秦越，主要从事遗传多样性研究。E-mail: qy890521@126.com

收稿日期: 2014−06−24 接受日期: 2014−11−27

bacteria and fungi communities. While the proportions of *Bacilli* and Sphingobacteria decreased or even disappeared with increasing cropping years, β-proteobacteria and Deinococci proportions increased. The proportion of Dothideomycete and Capnodiales of fungi community in rhizosphere soils dropped whereas that of Sordariomycete and Hypocreales grew. The results suggested that potato continuous cropping limited the population of beneficial microbes such as *Bacillus*, while boosting that of pathogenic bacteria such as *Ralstonia* in the rhizosphere soils. In conclusion, soil microbial diversity in rhizosphere soils under different periods of continuous cropping was obviously influenced. The fall of the diversity of bacteria community gave way to the rise of fungi community under continuous cropping, causing imbalance in microbial community and soil micro-ecological/environmental deterioration. The obstacle of continuous cropping possibly resulted from complex interaction of multiple soil factors in rhizosphere soils. There was therefore the need for continuous field research to help comprehensively determine the mechanism of continuous cropping obstacle.

Keywords Potato; Continuous cropping; Rhizosphere soil; T-RFLP; Genetic diversity; Microorganism community; Bacteria; Fungi

(Received Jun. 24, 2014; accepted Nov. 27, 2014)

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是茄科茄属一年生草本植物，是世界上仅次于水稻、小麦、玉米的第 4 大粮食作物，同时又是重要的蔬菜作物之一[1]。近年来，马铃薯已成为宁夏回族自治区(以下简称宁夏)第 1 大粮菜兼用作物，播种面积达到 27 万 hm^2，占全国马铃薯种植面积的 5%，约占宁夏粮食作物播种面积的 25%，马铃薯生产对稳定宁夏南部山区乃至宁夏粮食安全有着举足轻重的作用。然而由于土地资源的限制，宁夏马铃薯连作栽培现象非常普遍。与番茄(*Lycopersicon esculentum*)、枸杞(*Lycium barbarum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)等茄科植物一样，连作会造成马铃薯病虫害增多，产量与品质下降[2−4]，并产生严重的连作障碍。

连作障碍是根际土壤系统内部诸多因素综合作用的外在表现，导致其发生的因素包括土壤理化性状劣变、土壤传染性病害和根际分泌物引起的自毒作用等[5−6]。一些学者认为，根系分泌物对土壤微生物，特别是病原微生物的选择性促进及由此导致土壤微生态系统失衡，是引发连作障碍的主要因素。陈冬梅等[7]研究发现白肋烟连作使根际鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和链霉菌属(*Streptomyces*)等益生菌属数量减少，蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等潜在致病菌增加，破坏了烟草根际土壤微生物群落的平衡，使其微生态环境恶化；沈宝云等[8]和李金花等[9]发现连作栽培促使土壤中出现了诱发马铃薯枯萎病和黑痣病的病原菌；Rowe 等[10]发现马铃薯连作栽培易引起早疫病；Emmond 等[11]研究发现马铃薯轮作与连作相比，枯萎病的发生率降低。还有一些学者认为，连作致使土壤微生物区系发生变化，土壤从细菌型向真菌型转化。孟品品等[12]研究发现马铃薯连作使根际土壤中真菌优势种群的个体数明显增多，真菌多样性水平升高，根际土壤土传病害病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)的数量明显增加。马琨等[13]研究发现马铃薯连作后土壤细菌/真菌的比例与对照土壤相比有不同程度的减少。可见，对于连作障碍形成原因不同学者有着不同的观点。宁夏南部山区隶属于黄土丘陵区，连续多年的马铃薯大量种植，势必会改变当地的农田生态系统，加速土壤肥力的消耗，马铃薯块茎的主要生长环境是土壤，土壤微生态环境的变化与马铃薯的生长关系密切。然而，马铃薯连作对根际土壤微生物多样性变化的影响仍少见系统报道。为此，本文从根际微生物微生态角度出发，采用 T-RFLP 技术研究马铃薯不同连作年限根际土壤微生物群落动态变化，揭示马铃薯连作障碍可能的发生机理，为其综合防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况和供试土样

土壤样品采自宁夏固原市张易镇马场村，该区域位于东经 106.5°~106.6°，北纬 35.54°~35.55°，海拔 2 133~2 276 m，是宁夏南部山区黄土高原和六盘山阴湿区的过渡区域。土壤为黄土母质上形成的典型地带性土壤，以黑垆土为主。土壤有机质 29.01~45.92 $g·kg^{-1}$，全氮 1.31~1.94 $g·kg^{-1}$，全磷 0.72~1.12 $g·kg^{-1}$，速效钾 170.60~735.37 $mg·kg^{-1}$，速效磷 16.02~94.86 $mg·kg^{-1}$，pH 8.19~8.61。

试验选择马铃薯正茬(A，连作 5 年的冬小麦地)，连作 1 年(B)、6 年(C)、10 年(D)马铃薯栽培地，分别采集马铃薯播种前(1)和成熟期(2)2 个时期的根际土壤。播种前按对角线五点法采集土样，每个样点取 15~20 cm 土层，分别将各点土样按四分法混匀；成熟期土样采样时随机将 5 个样点的马铃薯连根取出，抖掉根周围松散的土壤，剩下黏附在根表面的土壤即为根际土，充分混匀后装入灭菌的样品袋。所有土样均冰盒保存带回实验室，过 2 mm 筛后贴

好标签, 存于−70 ℃冰箱中备用。

1.2　土壤微生物总 DNA 提取

土壤微生物总 DNA 采用土壤 DNA 提取试剂盒(OMEGA 公司)提取, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3　细菌 16S rDNA 的扩增和酶切

用带 FAM 荧光标记的细菌通用引物 8F-FAM (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 926R (5′-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3′)扩增土壤细菌 16S rDNA 片段[14]。反应体系(20 μL)为: 10×buffer 2.0 μL, Mg^{2+}(50 mmol·L^{-1})1.2 μL, 引物(10 μmol·L^{-1})1.6 μL, 模板(10 ng·μL^{-1})1.0 μL, Taq 酶(5 U·μL^{-1})0.2 μL, dNTPs(10 mmol·L^{-1})0.2 μL, ddH_2O 补足 20 μL。扩增程序为: 92 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 1 min, 58 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 共 30 个循环, 72 ℃延伸 8 min。

取 5 μL 扩增产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 其余产物电泳后经 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒割胶纯化, 纯化后的 PCR 产物用 HaeⅢ和 MspⅠ分别酶切。酶切体系 10 μL 包括: 酶 1 μL, 酶缓冲液 1 μL, ddH_2O 2 μL, PCR 产物 6 μL; 37 ℃温浴 5 h 后, 4 ℃避光保存备用。

1.4　真菌 ITS 区的扩增和酶切

用带 HEX 荧光标记的真菌通用引物 ITS1-HEX (5′-CTTGGTCATTTAGAAGAAGTAA-3′)和 ITS4(5′-TCCTC CGCTTATTGATATGC-3′)扩增土壤真菌 ITS 区约 750 bp 的目的片段[15]。反应体系为: 10×buffer 2 μL, Mg^{2+}(50 mmol·L^{-1})1.0 μL, 引物(10 μmol·L^{-1}) 1.1 μL, 模板(10 ng·μL^{-1})1.0 μL, Taq 酶(5 U·μL^{-1}) 0.2 μL, dNTPs(10 mmol·L^{-1})0.2 μL, ddH_2O 补足 20 μL。扩增程序为: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 45 s, 55 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min; 共 35 个循环, 72 ℃延伸 10 min。

扩增产物纯化后分别用 HaeⅢ和 MspⅠ酶切。酶切产物 4 ℃避光保存备用。

1.5　毛细管电泳

酶切产物避光低温下送生工生物工程(上海)股份有限公司, 在 ABI 自动测序分析仪上进行毛细管电泳。

1.6　数据分析

原始数据首先计算出每个 T-RF 的丰度百分比(Ap); 用 BIO-DAP 软件[16]计算 Shannon-Wienen 指数、Simpson 指数和 Sorenson 相似性指数[17]。同时将原始数据导入 MiCA3 网站(http://mica.ibest.uidaho.edu/runpat.php), 选择在线分析中 T-RFLP Analysis 程序, 把土壤细菌 2 个酶切产生的 T-RFs 片段与 RDP 16S Bacterial rRNA 核糖体数据库进行序列比对, 土壤真菌 2 个酶切产生的 T-RFs 片段与 SILVA SSU Parc 核糖体数据库进行序列比对, 分别找出各酶切片段对应菌属。所有数值均为 2 个内切酶的平均值。

$$丰度百分比(Ap)= n_i/N\times100\% \quad (1)$$

式中: n_i 是 T-RFLP 图谱中第 i 个峰峰面积, N 是 T-RFLP 图谱中峰的总面积。

2　结果与分析

2.1　马铃薯不同连作年限土壤细菌和真菌 T-RFLP 多态性分析

采用 T-RFLP 技术对 4 个连作年限成熟期根际土样细菌和真菌 DNA 的 HaeⅢ和 MspⅠ图谱进行分析, 土壤细菌分别检测到 35~618 bp、63~541 bp 的峰 99 个和 103 个, 土壤真菌分别检测到 73~704 bp、48~688 bp 的峰 76 个和 79 个。将 4 份土样 DNA 酶切图谱中丰度百分比(Ap)大于 2%的视为优势 T-RFs 片段。由图 1 可知, 4 份土样 DNA 细菌优势 T-RFs 片段共有 19 个, 其中连作 1 年的优势 T-RFs 片段 12 个, 正茬和连作 10 年的优势 T-RFs 片段均为 15 个, 连作 6 年的优势 T-RFs 片段 14 个; 与正茬相比, 连作 1 年、6 年及 10 年均出现 T-RF410, 而 T-RF35 消失(图 1A)。4 份土样 DNA 真菌优势 T-RFs 片段共有 20 个, 具体为: 正茬 10 个, 连作 1 年 8 个, 连作 6 年 11 个, 连作 10 年 12 个; 与正茬相比, 连作 1 年、6 年及 10 年均出现 T-RF133, 而 T-RF161 和 T-RF683 却消失了, 在连作 10 年的土样 DNA 中出现了 T-RF129、T-RF653 和 T-RF688 的特有片段(图 1B)。

2.2　马铃薯不同连作年限土壤微生物的多样性变化

由表 1 可知, 随连作年限的增加, 土壤细菌的 Shannon-Wienen 指数和 Simpson 指数在播种前与成熟期 2 个生育时期均呈下降趋势, 土壤真菌的 Shannon-Wienen 指数和 Simpson 指数在这 2 个生育时期表现为上升。表明马铃薯连作栽培致使土壤细菌多样性水平下降, 土壤真菌多样性水平升高, 土壤微生物从细菌型向真菌型转化。同一连作年限, 成熟期与播种前相比, 细菌和真菌多样性水平都有一定程度的降低。

研究表明, 连作可使土壤细菌和真菌的菌群逐渐发生变化, 8 份土样中细菌 Sorenson 相似指数范围为 0.476~0.623, 真菌的 Sorenson 相似指数为 0.279~0.517, 连作使土壤细菌 Sorenson 相似指数逐年下降, 其中以成熟期正茬和连作 10 年之间土壤细菌的相似指数最小; 不同连作年限土壤真菌 Sorenson 相似指数随连作年限的改变而变化, 但无规律可循。

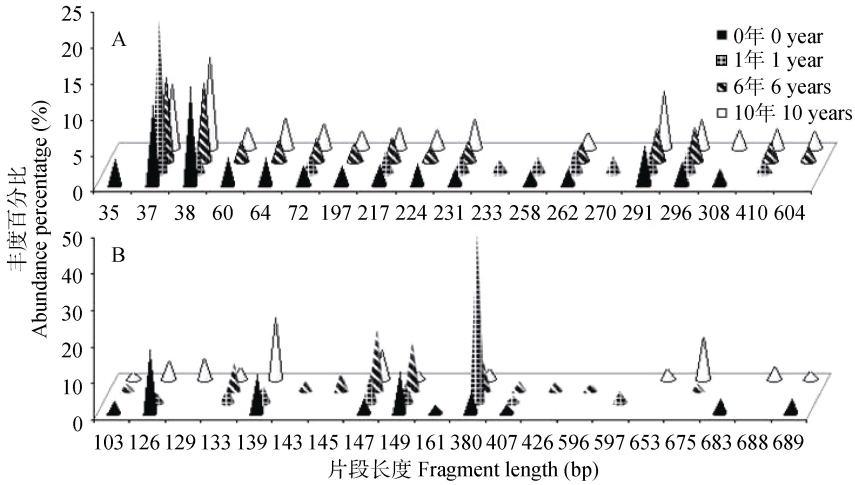

图 1 不同连作年限马铃薯成熟期根际土细菌(A)和真菌(B)群落 HaeⅢ酶切的 T-RFLP 多态性分析

Fig. 1 T-RFLP analysis of rhizosphere soil bacteria (A) and fungi (B) at mature period of potato continuously planted for different years

图中仅显示丰度百分比大于 2%的 T-RF 片段。Only the T-RF fragments with the abundance percentage more than 2% were shown in the figure.

表 1 马铃薯不同连作年限土壤微生物多样性比较

Table 1 Diversity of soil microorganism under different continuous cropping years of potato

取样时期 Sampling time	连作年限 Continuous cropping years (a)	细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
		Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon-Wiener 指数 Shannon-Wiener index	Simpson 指数 Simpson index
播种前 Before sowing	0	4.00	32.79	3.39	21.74
	1	3.69	25.00	3.42	21.88
	6	3.59	18.18	3.59	26.32
	10	3.43	21.28	3.66	24.39
成熟期 Mature period	0	3.69	28.99	3.13	14.93
	1	3.52	25.00	3.27	15.15
	6	3.57	27.26	3.51	18.18
	10	3.50	25.00	3.39	16.12

2.3 马铃薯不同连作年限土壤微生物菌群分析

对马铃薯 4 个连作年限 2 个生育时期根际土细菌 T-RFLP 数据进行细菌菌群分析表明: 8 份根际土样中共检测到 13 个门, 19 个纲的细菌(表 2), 以厚壁菌门芽孢杆菌纲所占比例最大。连作年限不同, 各纲细菌所占比例有较大变化, 芽孢杆菌纲和鞘氨醇菌纲的比例随马铃薯连作年限增加逐渐下降, β-变形菌纲比例上升, 说明细菌菌群发生改变。不同连作年限土样中出现了特有的细菌菌群, 具体表现如下: 播种前连作 1 年土样中出现了螺旋体纲和绿菌纲 2 个特有纲的细菌, 成熟期连作 1 年、6 年和 10 年土样中出现了 δ-变形菌纲和异常球菌纲的细菌, 丝状杆菌纲的细菌只出现在对照正茬的土样中, 鞘氨醇菌纲的细菌在成熟期连作 10 年的土样中消失。

分析 8 份土样的真菌菌群发现: 4 个连作年限 2 个生育时期的根际土样中共检测到真菌的 4 个门, 7 个纲, 11 个目; 以座囊菌纲(Dothideomycetes)煤炱目(Capnodiales)所占比例最大, 且随连作年限增加其比例下降; 其次是肉座菌目(Hypocreales), 其比例随连作年限增加表现上升; 同时马铃薯连作后根际土壤中还检测到酵母目(Saccharomycetales)、担孢酵母目(Erythrobasidiales)和接合菌纲(Zygomycetes)的真菌。

2.4 马铃薯正茬和连作 10 年的土壤细菌 T-RFs 片段定性分析

鉴于马铃薯正茬和连作 10 年成熟期根际土壤细菌 Sorenson 相似性指数最小, 对这 2 份根际土样进行 T-RFs 片段的定性分析。2 份土样中相同的 T-RFs 片段有 27 个, 分属于 6 个门的 9 个纲(表 3), 芽孢杆菌纲细菌丰度百分比从正茬的 9.11%降低到连作 10 年的 5.79%, 以长度为 232 bp、233 bp 和 270 bp 的 T-RFs 片段下降幅度最大; 梭菌纲细菌的丰度百分比从正茬的 4.75%上升到连作 10 年的 5.04%, 以长度为 258 bp 和 301 bp 的 T-RF 片段上升幅度最大; 放线菌亚纲细菌丰度百分比从正茬的 6.06%上升到连作 10 年的 12.77%, 以长度为 64 bp 和 410 bp 的 T-RFs 片段上升幅度最大。

表 2　马铃薯不同连作年限播种前和成熟期土壤细菌菌群分析

Table 2　Analysis of soil bacterial flora before sowing and at mature period of potato continuously cropped for different years　%

门 Phylum	纲 Class	比例 Proportion (%)							
		播种前 Before sowing				成熟期 Mature period			
		A1	B1	C1	D1	A2	B2	C2	D2
变形菌门 Proteobacteri	α-变形菌纲 α-proteobacteria	14.3	13.9	16.9	18.0	17.9	16.5	17.3	17.2
	β-变形菌纲 β- proteobacteria	2.2	7.4	4.2	4.9	6.0	6.3	7.4	11.5
	γ-变形菌纲 γ-proteobacteria	2.2	4.6	4.2	3.3	1.2	3.8	1.2	3.5
	δ-变形菌纲 δ-proteobacteria	2.2	0.9	1.4	1.6	0	1.3	1.2	3.5
厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	25.3	19.4	25.4	19.7	26.2	26.6	23.5	19.5
	梭菌纲 Clostridia	19.8	18.5	16.9	18.0	16.7	13.9	16.1	18.4
放线菌门 Actinobacteria	放线菌亚纲 Actinobacteridae	14.3	19.4	14.1	14.8	13.1	15.2	11.1	11.5
	红蝽菌亚纲 Coriobacteridae	2.2	1.9	0	1.6	2.4	1.3	0	2.3
拟杆菌门 Bacteroidetes	黄杆菌纲 Flavobacteria	5.5	2.8	7.0	8.2	3.6	5.1	7.4	3.5
	鞘氨醇菌纲 Sphingobacteria	2.2	1.9	0	1.6	2.4	1.3	2.5	0
蓝细菌门 Cyanobacteria	蓝细菌纲 Cyanobacteria	4.4	2.8	2.8	1.6	2.4	2.5	2.5	3.5
螺旋体门 Spirochaetes	螺旋体纲 Spirochaetes	0	0.9	0	0	0	1.3	1.4	0
绿菌门 Chlorobi	绿菌纲 Chlorobia	0	0.9	0	0	0	1.3	1.2	0
绿屈挠菌门 Chloroflexi	绿屈挠菌纲 Chloroflexi	1.1	0.9	0	1.6	1.2	1.3	1.2	1.2
柔膜菌门 Tenericutes	柔膜菌纲 Mollicutes	1.1	1.9	1.4	0	2.4	0	3.7	2.3
丝状杆菌门 Fibrobacteres	丝状杆菌纲 Fibrobacteres	1.1	0	0	0	1.2	0	0	0
梭杆菌门 Fusobacteria	梭杆菌纲 Fusobacteria	0	0	0	0	1.2	0	1.2	0
泉古生菌门 Crenarchaeota	热变形菌纲 Thermoprotei	1.1	0.9	2.8	1.6	2.4	1.3	0	0
异常栖热菌门 DeinococcusThermus	异常球菌纲 Deinococci	1.1	0.9	2.8	3.3	0	1.3	1.2	2.3
	总纲数 Total class number	16	17	12	14	15	16	16	13

A: 正茬; B: 连作 1 a; C: 连作 6 a; D: 连作 10 a; 1: 播种前; 2: 成熟期; 下同。A: first-planting treatment; B: continuous cropping for 1 year; C: continuous cropping for 6 years; D: continuous cropping for 10 years; 1: before sowing; 2: mature period. The same below.

表 3　马铃薯正茬和连作 10 年成熟期根际土细菌的共有 T-RFs 片段

Table 3　T-RFs fragments co-existing in rhizosphere soils of potato first-planted and continuously cropped for 10 years

片段长度 Fragment length (bp)	丰度百分比 Abundance percentage (%)		对应分类 Classification		
	A2	D2	门 Phylum	纲 Class	属 Genus
61	1.23	2.35	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	鲁杰氏菌属 *Ruegeria*
291	7.68	8.66	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	中慢生根瘤菌属 *Mesorhizobium*
296	4.20	4.43	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	巴尔通氏体属 *Bartonella*
217	3.16	4.27	变形菌门 Proteobacteria	β-变形菌纲 β-proteobacteria	硫单胞菌属 *Thiomonas*
37	11.41	12.78	变形菌门 Proteobacteria	γ-变形菌纲 γ-proteobacteria	寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*
194	0.62	0.46	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	指环酸芽孢杆菌属 *Alicyclobacillus*
209	0.69	0.66	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	泥土芽孢杆菌属 *Geobacillus*
219	0.63	0.59	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	短小芽孢杆菌属 *Brevibacillus*
232	1.28	0.38	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	利斯塔氏菌属 *Listeria*
233	2.11	1.11	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌属 *Bacillus*
270	1.41	0.53	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	链球菌属 *Streptococcus*
279	0.71	0.47	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	乳酸杆菌属 *Lactobacillus*
308	0.49	0.59	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌属 *Bacillus*
323	0.52	0.58	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	乳酸杆菌属 *Lactobacillus*
365	0.65	0.42	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	芽孢杆菌属 *Bacillus*
146	1.12	0.73	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	*Symbiobacterium*
258	1.23	1.76	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	梭菌属 *Clostridium*
301	1.34	1.39	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	梭菌属 *Clostridium*
316	0.51	0.52	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	*Anaerococcus*
329	0.55	0.64	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	脱亚硫酸菌属 *Desulfitobacterium*
64	1.16	4.51	放线菌门 Actinobacteria	放线菌亚纲 Actinobacteridae	粗食杆菌属 *Modestobacter*
197	0.54	1.18	放线菌门 Actinobacteria	放线菌亚纲 Actinobacteridae	诺卡氏菌属 *Nocardioides*
224	3.19	2.83	放线菌门 Actinobacteria	放线菌亚纲 Actinobacteridae	链霉菌属 *Streptomyces*
410	1.17	4.25	放线菌门 Actinobacteria	放线菌亚纲 Actinobacteridae	动弯杆菌属 *Mobiluncus*
138	0.67	0.74	蓝细菌门 Cyanobacteria	蓝细菌纲 Cyanobacteria	聚球藻属 *Synechococcus*
201	0.52	0.71	绿屈挠菌门 Chloroflexi	绿屈挠菌纲 Chloroflexi	绿弯菌属 *Chloroflexus*
38	2.44	2.13	拟杆菌门 Bacteroidetes	黄杆菌纲 Flavobacteria	黄褐二氧化碳嗜纤维菌属 *Capnocytophaga*

表 4 为马铃薯正茬与连作 10 年成熟期根际土细菌群落中特有 T-RFs 片段。连作 10 年马铃薯的成熟期根际土特有细菌包括 4 个门 7 个纲，分别为变形菌门(α-变形菌纲、β-变形菌纲、δ-变形菌纲)、厚壁菌门(芽孢杆菌纲、梭菌纲)、蓝细菌门(蓝细菌纲)和异常球菌–栖热菌门(异常球菌纲)。土样中虽含有与碳元素循环有关的聚球藻属(T-RFs 长度为 128 bp)[18]，但同时存在大量潜在的致病菌包括奈瑟菌属(T-RFs 长度 206 bp)、梭菌属(T-RFs 长度为 214 bp)、罗尔斯通菌属[19](T-RFs 长度为 200 bp)等。

表 4 连作 10 年马铃薯根际土细菌特有的 T-RFs 片段(与正茬对比)

Table 4 Special T-RFs fragments in rhizosphere soil of potato continuously cropped for 10 years compared with that of first planted potato

片段长度 Fragment length (bp)	对应分类 Classification		
	门 Phylum	纲 Class	属 Genus
73	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	醋杆菌属 *Granulibacter*
128	蓝细菌门 Cyanobacteria	蓝细菌纲 Cyanobacteria	聚球藻属 *Synechococcus*
132	异常栖热菌门 DeinococcusThermus	异常球菌纲 Deinococci	异常球菌属 *Deinococcus*
178	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	动性球菌属 *Planococcus*
193	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	副球菌属 *Paracoccus*
200	变形菌门 Proteobacteria	β-变形菌纲 β-proteobacteria	罗尔斯通菌属 *Ralstonia*
203	变形菌门 Proteobacteria	δ-变形菌纲 δ-proteobacteria	粘球菌属 *Myxococcus*
205	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	月形单胞菌属 *Selenomonas*
206	变形菌门 Proteobacteria	β-变形菌纲 β-proteobacteria	奈瑟菌属 *Neisseria*
208	异常栖热菌门 DeinococcusThermus	异常球菌纲 Deinococci	稍热菌属 *Meiothermus*
214	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	梭菌属 *Clostridium*
216	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	真杆菌属 *Eubacterium*
236	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	热厌氧杆菌属 *Thermoanaerobacter*
295	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	巴尔通氏体属 *Bartonella*
307	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	链球菌属 *Streptococcus*
327	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌纲 Bacilli	乳酸杆菌属 *Lactobacillus*
368	厚壁菌门 Firmicutes	梭菌纲 Clostridia	*Pelotomaculum*
376	蓝细菌门 Cyanobacteria	蓝细菌纲 Cyanobacteria	*Geitlerinema*
399	变形菌门 Proteobacteria	α-变形菌纲 α-proteobacteria	埃立克体属 *Ehrlichia*

3 讨论与结论

3.1 马铃薯连作对土壤微生物菌群的影响

不同连作年限马铃薯播种前和成熟期根际土壤微生物多样性存在明显差异，连作导致马铃薯根际土壤细菌多样性水平降低，真菌多样性水平升高，这与吴凤芝等[20]对黄瓜连作和李春格等[21]对大豆连作的研究结果相一致。同一连作年限中，成熟期马铃薯根际土壤中细菌和真菌多样性水平都比播种前有一定程度的降低，可能原因是马铃薯植株生长过程中，根系产生的分泌物改变了土壤微生态环境，不利于某些微生物的生长，致使多样性水平下降。

马铃薯连作后土壤细菌各纲所占比例发生较大的变化，芽孢杆菌纲中的有益菌群逐渐减少，此纲中枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)能降解酚酸类化合物，类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)能降解多芳香族碳氢化合物，铫子短小芽孢杆菌(*Brevibacillus invocatus*)可以分解酚，解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)能分解淀粉，侧孢短芽孢杆菌(*B. laterosporu*)能抵抗有害真菌，球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)和某些枯草芽孢杆菌还具有固氮作用等[18]。β-变形菌纲比例升高，此纲中奈瑟菌属和罗尔斯通菌是马铃薯潜在的致病菌群。此外，马铃薯正茬和连作 10 年的土壤细菌 T-RFs 片段定性分析发现放线菌纲中链霉菌属[22]细菌丰度百分比下降，而潜在的致病菌梭菌纲中梭菌属丰度百分比上升，表明根际土壤细菌菌群中益生菌在减少、潜在的病原菌在增加，马铃薯根际细菌菌群的功能受到破坏。

本研究中未捡出有关马铃薯致病的真菌，可能与 MiCA3 网站中真菌 T-RFLP 数据库不够完善，反馈出的结果太少有关。因此，在今后的研究中应该选择更能反映真菌遗传多样性的方法。

3.2　马铃薯连作障碍的成因

马铃薯连作障碍产生的原因主要与土壤肥力、自毒作用及土壤微环境的恶化有着密切的关系[2−4]。研究试验地位于宁夏南部山区，试验地土壤肥力较高，加之农民适宜的培肥措施，因此尽管连续多年种植马铃薯，土壤肥力未受到明显影响[13]。本研究中马铃薯正茬和连作土壤均具有较高的土壤有机质和全氮，且该研究区域气候冷凉，有机质的矿化过程缓慢，连作栽培下土壤肥力的衰退很可能是一个缓慢渐变的过程，高的肥力水平保证了马铃薯正常生长发育的需要。

本研究发现连作栽培可导致马铃薯土壤微生物群落发生改变，土壤中有益菌群比例下降乃至逐渐消失，一些潜在的致病菌群在连作栽培后的土壤中出现，导致马铃薯生长的微环境恶化。但田间试验表明，连作 1 年、6 年和 10 年的马铃薯生长状况并未表现出和正茬马铃薯的明显差异。按照现在连作障碍理论，连作可增大作物对土壤微生物的选择压力，降低土壤微生物多样性，长期连作可导致作物生长状况越来越差，然而这一理论并不能解释本试验的结果。

马铃薯长期连作栽培后根际土壤中虽然出现了一些潜在的致病菌群，但马铃薯病害的发生却一直较轻，比较李春格等[21]的研究结果，分析认为马铃薯连作障碍可能是土壤–微生物–植物–气候综合相互作用的结果，单一因素的研究很难对田间试验情况作出较合理的解释。

参考文献

[1] 张永成，田丰. 马铃薯试验研究方法[M]. 北京：中国农业科学技术出版社, 2007: 4
Zhang Y C, Tian F. The Potato Experimental Method[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2007: 4

[2] 李继平，李敏权，惠娜娜，等. 马铃薯连作田土壤中主要病原真菌的种群动态变化规律[J]. 草业学报，2013，22(4): 147–152
Li J P, Li M Q, Hui N N, et al. Population dynamics of main fungal pathogens in soil of continuously cropped potato[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(4): 147−152

[3] 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
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

[4] 谢奎忠，陆立银，罗爱花. 不同栽培措施对连作马铃薯土壤真菌、真菌性病害和产量的影响[J]. 中国蔬菜，2013(2): 70−75
Xie K Z, Lu L Y, Luo A H. Effects of different cultivation measures on soil fungus, fungal diseases and yield of continuous cropping potato[J]. China Vegetables, 2013(2): 70−75

[5] 林文雄，熊君，周军建，等. 化感植物根际生物学特性研究现状与展望[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(4): 1−8
Lin W X, Xiong J, Zhou J J, et al. Research status and its perspective on the properties of rhizosphere biology mediated by allelopathic plants[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(4): 1−8

[6] 苗淑杰，乔云发，韩晓增，等. 大豆根系特征与磷素吸收利用的关系[J]. 大豆科学, 2007, 26(1): 16−20
Miao S J, Qiao Y F, Han X Z, et al. Relationship between root characters and phosphorus absorption in soybean[J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 16−20

[7] 陈冬梅，柯文辉，陈兰兰，等. 连作对白肋烟根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. 应用生态学报，2010，21(7): 1751−1758
Chen D M, Ke W H, Chen L L, et al. Diversity of bacterial community in rhizosphere soils under effects of continuously planting burley tobacco[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(7): 1751−1758

[8] 沈宝云，刘星，王蒂，等. 甘肃省中部沿黄灌区连作对马铃薯植株生理生态特性的影响[J]. 中国生态农业学报，2013，21(6): 689−699
Shen B Y, Liu X, Wang D, et al. Effects of continuous cropping on potato eco-physiological characteristics in the Yellow River irrigation area of the central Gansu Province[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(6): 689−699

[9] 李金花，王蒂，柴兆祥，等. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456−463
Li J H, Wang D, Chai Z X, et al. Isolation and identification of the dominant pathogens causing potato Fusarium dry rot in Gansu Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(5): 456−463

[10] Rowe R C, Powelson M L. Potato early dying: Management challenges in a changing production environment[J]. Plant Disease, 2002, 86(11): 1184−1193

[11] Emmond G S, Ledingham R J. Effects of crop rotation on some soil-borne pathogens of potato[J]. Canadian Journal of Plant Science, 1972, 52(4): 605−611

[12] 孟品品，刘星，邱慧珍，等. 连作马铃薯根际土壤真菌种群结构及其生物效应[J]. 应用生态学报，2012，23(11): 3079−3086
Meng P P, Liu X, Qiu H Z, et al. Fungal population structure and its biological effect in rhizosphere soil of continuously cropped potato[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(11): 3079−3086

[13] 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
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

[14] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1995: 11–13

[15] Luo J, Ran W, Hu J, et al. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils[J]. Soil Science Society of America Journal, 2010, 74(6): 2039–2048

[16] Thomas G, Clay D. Ecological Diversity and Its Measurement Computer Software[M]. New Brunswick, Canada: Parks Canada (PHQ) & Fundy National Park, 1989

[17] Horswell J, Cordiner S J, Maas E W, et al. Forensic comparison of soils by bacterial community DNA profiling[J]. Journal of Forensic Science, 2002, 47(2): 350−353

[18] 陈冬梅, 吴文祥, 王海斌, 等. 植烟土壤提取物质对烟株生长及根际土壤细菌多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(12): 1614−1620
Chen D M, Wu W X, Wang H B, et al. Effects of tobacco-cultivated soil extracts on tobacco growth and bacterial community diversity in rhizosphere soils[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(12): 1614−1620

[19] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65−87

[20] 吴凤芝, 王学征. 设施黄瓜连作和轮作中土壤微生物群落多样性的变化及其与产量品质的关系[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2274−2280
Wu F Z, Wang X Z. Effect of monocropping and rotation on soil microbial community diversity and cucumber yield, quality under protected cultivation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(10): 2274−2280

[21] 李春格, 李晓鸣, 王敬国. 大豆连作对土体和根际微生物群落功能的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(4): 1144−1150
Li C G, Li X M, Wang J G. Effect of soybean continuous cropping on bulk and rhizosphere soil microbial community function[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(4): 1144−1150

[22] Ryan A D, Kinkel L L, Schottel J L. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control[J]. Biocontrol Science and Technology, 2004, 14(3): 301−311