

DOI: 10.11766/trxb201807020355

# 再植枸杞根际真菌群落对长期连作的响应研究\*

马少兰 马彩霞 徐鹏鑫 郑国琦 纳小凡<sup>†</sup>

(宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

**摘要** 受枸杞自身种植特点和道地产区土地资源限制, 连作障碍已成为制约宁夏枸杞产业可持续发展的主要因素之一, 导致严重的经济损失和生态问题。前期研究表明, 连作能够显著影响再植枸杞根际土壤细菌的群落结构和多样性, 但就连作对真菌群落结构和功能的影响目前仍不清楚。本文利用实时荧光定量 PCR 和高通量测序技术, 研究连作对再植枸杞根际真菌群落丰度及多样性的影响。实时荧光定量 PCR 分析表明, 与对照样地相比, 连作显著促进再植枸杞根际及非根际土壤中细菌和真菌的丰度。但连作对真菌的促进作用明显高于细菌, 导致细菌/真菌比例失衡, 使再植枸杞根际及非根际土壤微生物环境偏向于真菌型。对测序结果的分析发现, 所测定样地中枸杞根际及非根际土壤中的优势真菌门分别为子囊菌门、担子菌门、接合菌门、壶菌门及球囊菌门, 其中连作地再植枸杞根际子囊菌门的相对丰度较对照样地显著降低, 而接合菌门的相对丰度则显著增加 ( $P < 0.05$ )。FUNGuild 真菌功能预测也证实连作显著抑制再植枸杞根际土壤丛枝菌根真菌的相对丰度 ( $P < 0.05$ )。基于距离的冗余分析 (db-RDA) 结果表明, 土壤 pH、电导率、硝态氮和有效磷含量是影响枸杞根际土壤真菌群落变化的主要因子 ( $P < 0.05$ ), 而土壤硝态氮和有效磷含量则是解释非根际土壤真菌群落变化的主要因子 ( $P < 0.05$ )。这些结果说明长期施用化肥可能是改变连作地再植枸杞根际土壤真菌群落结构及枸杞-真菌互作关系的主要因素之一。这一研究结果为理解枸杞连作障碍的形成机制提供理论基础。

**关键词** 枸杞; 连作; 根际; 真菌群落; ITS2

**中图分类号** S154.36 **文献标识码** A

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 是茄科枸杞属多年生落叶灌木, 广泛分布于中国、韩国、日本、欧洲、北美和地中海等地区的干旱和半干旱区域<sup>[1]</sup>。由于近期研究证实宁夏枸杞果实 (枸杞子) 具有抗衰老、保护神经、消炎、促进代谢、控制血糖、免疫调节及抗肿瘤等多种生物学活性<sup>[1-2]</sup>, 枸杞子已作为食品和营养保健品在亚洲及欧美等多国零售市场中销售<sup>[3-5]</sup>。受国际市场追捧, 枸杞种植业已成为我国西北省份, 尤其是宁夏出口创汇的优势富民产业之一, 为地区经济发展做出巨大贡献<sup>[6]</sup>。

然而, 受枸杞自身生长特点及传统种植模式影

响, 枸杞连作障碍现象已成为限制枸杞产业可持续发展的主要因素之一, 严重影响了枸杞园土地生产力和枸杞生产效益, 导致农民收入下降。通过多年的田间调查和实验, 纳小凡等<sup>[6]</sup>研究发现种植超过十年的枸杞园开始出现枸杞子产量和品质降低、病虫害加重等现象。对连作地再植枸杞生长的分析也表明, 连作能够显著抑制再植枸杞生长, 证实了枸杞连作障碍现象的存在<sup>[7]</sup>。张俊华和郑国琦<sup>[8]</sup>对不同种植年限枸杞园土壤线虫群落的分析发现, 树龄超过 9 年后枸杞园土壤线虫群落的多样性下降, 且植物寄生性线虫的相对比例明显增加。通过对连作地

\* 宁夏自然科学基金项目 (2018AAC03015) 资助 Supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Province of China (No. 2018AAC03015)

<sup>†</sup> 通讯作者 Corresponding author, E-mail: nxf-0324@163.com

作者简介: 马少兰 (1994—), 女, 硕士, 主要从事植物生理生态研究

收稿日期: 2018-07-02; 收到修改稿日期: 2018-10-18; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2019-01-08

再植枸杞根际土壤细菌群落分析也表明,连作显著抑制再植枸杞根际土壤细菌群落多样性并导致细菌群落结构发生显著变化<sup>[7]</sup>。这些研究均表明长期传统种植模式下,枸杞园土壤理化性质及土壤生物环境的变化可能是导致枸杞连作障碍的主要原因,但其作用机制目前仍不清楚。

作为土壤微生物区系的重要成员,土壤真菌与其他微生物一起参与土壤生态系统中物质循环和能量流动<sup>[9-10]</sup>。研究发现,真菌群落能够通过互惠共生、病害及营养物质吸收和循环等方式影响陆生植物群落的多样性和组成<sup>[11]</sup>。除此以外,土壤真菌还能够通过固氮、植物激素分泌、病原菌防护和提高植物抗旱等生物学过程影响植物生理状况<sup>[12-14]</sup>。因此研究土壤真菌群落多样性及其演替规律,对于探索土壤可持续利用措施及保持土壤健康至关重要<sup>[14-15]</sup>。本研究基于前期对连作地再植枸杞根际土壤细菌群落的研究,进一步利用实时荧光定量 PCR 和高通量测序技术,分析连作对再植枸杞根际/非根际土壤真菌群落丰度及多样性的影响,为深入理解枸杞连作障碍机制提供新的理论信息。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究区概况

试验地位于银川市北郊 20 km 的南梁农场,该地区主要气候类型为中温带干旱气候,年均气温在 7.9~8.6℃之间,昼夜温差大,年均降雨量约为 145.5 mm,无霜期在 129~177 d 之间。样地土壤类型为砂壤土。

### 1.2 试验设计

在实验区域内选取连续种植 10 年的枸杞田和无枸杞种植史的设施农业用地,分别将其设置为连作及对试样地。连作及对试样地土壤基础理化性质如下: pH 分别为 5.2 和 6.4;电导率 199.7 和 1006  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;有机碳 9.7 和 12.9  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;全氮 0.9 和 0.8  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;碱解氮 46.7 和 30.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;铵态氮 13.9 和 13.7  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;硝态氮 30.3 和 20.6  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;全磷 0.9 和 0.8  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;有效磷 48.9 和 12.3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;速效钾 260.7 和 309.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

挖去连作样地枸杞,连作及对试样地经整理后于 2012 年 4 月种植一年生枸杞苗(宁杞 1 号),行

距 3 m、株距 1 m,样方面积 666  $\text{m}^2$ ,枸杞田间管理与前期研究一致<sup>[6]</sup>。2016 年 8 月采集宁夏枸杞根际、非根际土壤样本(最后一茬枸杞果实采摘后)。实验田内随机设置 3 个样方(10 m×10 m),每个样方内随机选取 10 株枸杞,利用土钻在距离枸杞茎 20 cm 处采集 0~20 cm 深度土壤;同时挖取枸杞根(直径小于 2 mm),抖去浮土后放入无菌离心管。合并同一样方内的根际土及非根际土,置于冰盒保存。非根际土过 2 mm 筛去杂物并充分混匀,留取 1 g 鲜土于 -20℃ 保存用于提取 DNA;剩余土样经风干后用于土壤理化性质分析<sup>[6]</sup>。根际土壤采用纳小凡等<sup>[6]</sup>的方法获得。土壤 DNA 按照 Power Soil™ DNA 提取试剂盒说明提取。所提 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测合格后分为三份,一份用于前序研究对 16S rDNA V4 区段的测序<sup>[6]</sup>,一份用于本研究中真菌 ITS2 区段的测序,一份保留至 -20℃ 用于 qRT-PCR 测定 16S rDNA 和 18S rDNA 基因丰度。

### 1.3 真菌 ITS2 区段高通量测序及数据分析

采用两步扩增法对真菌的 ITS2 区段进行扩增,第一步扩增法引物序列分别为 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3' 和 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。扩增产物经稀释后用于第二步扩增反应的模板,引物序列分别为 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' 和 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。扩增条件为:98℃,预变性 1 min;98℃,变性 10 s;50℃,退火 30 s;72℃,延伸 1 min;30 个循环。72℃,延伸 5 min。PCR 扩增完成后,应用 Illumina HiSeq 2500 基因组分析平台对真菌基因 ITS2 区段进行测序。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

所提土壤基因组 DNA 中 16S rDNA(细菌)和 18S rDNA(真菌)基因丰度利用 QuantStudio™5 实时定量荧光 PCR 系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行。所用细菌引物为 Eub338(ACTCCTACGGGAGGCAG CAG)和 Eub518(ATTACCGCGGCTGG),真菌引物为 Fu18s1(GGAAACTCAGGTCCAGA)和 Nu-SSU-1536(ATTGCAATGCYCTATCCC CA)。PCR 反应体系体积为 20  $\mu\text{L}$ ,其中包括 SYBR Premix Ex Taq(Takara,大连,中国)10  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 、ROX 0.4  $\mu\text{L}$ 、无菌去离子水 5.6  $\mu\text{L}$ 。细菌用两步法进行扩增,扩增程序为:95℃预变性 30 s,在 95℃变性 5 s,

60℃退火和延伸 34 s。真菌用三步法进行扩增, 扩增程序如下: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 循环 40 次。细菌和真菌溶解曲线按照 QuantStudio 5 实时荧光定量检测系统默认程序分析: 95℃变性 15 s, 60℃复性 60 s, 95℃复性 15 s。将含 16S rDNA 和 18S rDNA 基因片段的重组质粒 DNA 梯度稀释, 并分别以此为模板制备 16S rDNA 和 18S rDNA 基因扩增标准曲线, 计算土壤 DNA 样本中相应基因的绝对含量。

### 1.5 统计分析

不同样品间数据的显著性分析由 SPSS (22.0) 中的单因素方差分析完成 (Turkey test,  $n=3$ )。真菌营养型预测利用 FUNGuild 数据库进行对比检索<sup>[16]</sup>。土壤理化因子与土壤真菌群落结构变化的关系利用 Canoco (5.0) 中基于距离的冗余分析 (db-RDA)

完成。作图使用 Origin 9.0 软件。

## 2 结果

### 2.1 宁夏枸杞根际/非根际细菌和真菌丰度对连作的响应

实时荧光定量 PCR 结果表明, 连作样地根际及非根际土壤细菌和真菌丰度分别显著高于对照样地根际及非根际土壤 ( $P<0.05$ , 表 1)。其中, 连作样地再植枸杞根际细菌和真菌丰度分别为对照样地再植枸杞根际的 4.8 倍和 7.3 倍, 而非根际土壤则分别为对照的 2.1 倍和 5.9 倍 (表 1)。进一步分析发现, 对照样地根际及非根际土壤的细菌/真菌比均高于连作样地, 其比例分别为对照样地的 1.5 倍 ( $P>0.05$ ) 和 2.7 倍 ( $P<0.05$ , 表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 法分析枸杞根际/非根际细菌和真菌丰度变化

Table 1 Abundances of soil bacteria and fungi in the bulk soil and rhizosphere of *L. barbarum* detected by real-time PCR

处理 Treatment	细菌 Bacteria / ( $\times 10^8 \text{ g}^{-1}$ )	真菌 Fungi / ( $\times 10^7 \text{ g}^{-1}$ )	细菌/真菌 Bacteria/Fungi	
根际 Rhizosphere	对照 RC	7.0 ± 3.6b	3.6 ± 1.6b	19.0 ± 1.8b
	连作 RM	33.7 ± 13.2a	26.5 ± 0.9a	12.6 ± 4.6b
非根际 Bulk soil	对照 BC	2.9 ± 0.3c	0.5 ± 0.2c	67.5 ± 22.0a
	连作 BM	6.3 ± 0.9b	2.7 ± 1.1b	25.0 ± 7.6b

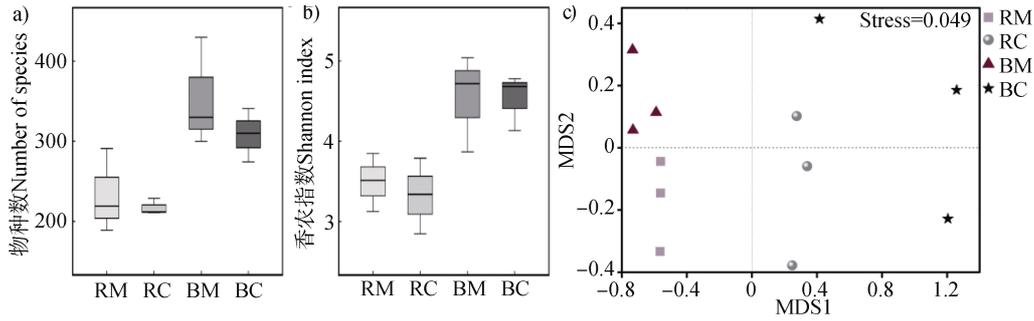
注: 平均值±标准偏差 ( $n=3$ )。同列数据中不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。RC, 净作样地枸杞根际土壤; RM, 连作枸杞根际土壤; BC, 净作样地枸杞非根际土壤; BM, 连作枸杞非根际土壤。下同 Note: Means ± SD ( $n=3$ ). Different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level. RC, rhizosphere of *L. barbarum* in the control field; RM, rhizosphere of *L. barbarum* in the monocropped field; BC, bulk soil of the control field; BM, bulk soil of the monocropped field. The same below

### 2.2 长期连作对再植宁夏枸杞根际真菌群落 $\alpha$ 多样性及群落结构的影响

对真菌 ITS2 区段的高通量测序结果表明, 虽然非根际土壤真菌群落的丰度和均一度指数均高于枸杞根际土壤, 但与对照样地相比, 连作并不影响再植枸杞根际及非根际土壤真菌群落的  $\alpha$  多样性指数 ( $P>0.05$ , 图 1a、图 1b)。多维尺度分析 (NMDS) 表明, 连作样地与对照样地再植宁夏枸杞根际及非根际土壤的真菌群落均存在明显差异。但与对照样地相比, 连作样地再植宁夏枸杞根际真菌群落结构与非根际土壤间的差异明显降低 (图 1c)。

### 2.3 长期连作对再植枸杞根际/非根际优势真菌丰度的影响

测序结果表明, 所测定土壤样品中的优势真菌门分别为子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、接合菌门 (Zygomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota)、球囊菌门 (Glomeromycota), 这些真菌占各样品总序列数的 99.1%~99.9% (表 2)。统计分析发现, 接合菌门在连作地枸杞根际土壤中的相对丰度较对照样地显著增加 ( $P<0.05$ , 表 2), 但球囊菌门的相对丰度则显著降低 ( $P<0.05$ , 表 2)。



a) 真菌群落物种数 OTU number, b) 香农指数 Shannon index of fungal community, c) 枸杞根际真菌群落结构的三维尺度分析 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of composition of the fungal community

图 1 再植枸杞根际/非根际土壤真菌群落多样性分析

Fig. 1 Diversity of the soil fungal communities in the bulk soil and rhizosphere of replanted *L. barbarum*

表 2 再植枸杞根际/非根际优势真菌群落相对丰度变化

Table 2 Relative abundances of the dominant fungal phyla in bulk soils and rhizosphere of replanted *L. barbarum*

分类 Taxonomy	根际 Rhizosphere		非根际 Bulk soil	
	对照 RC	连作 RM	对照 BC	连作 BM
子囊菌门 Ascomycota	94.75 ± 3.12a	86.72 ± 5.70a	88.97 ± 5.45a	89.73 ± 5.18a
担子菌门 Basidiomycota	4.21 ± 3.11a	2.73 ± 1.64a	4.16 ± 0.94a	7.51 ± 4.15a
接合菌门 Zygomycota	0.18 ± 0.08b	10.39 ± 4.21a	0.80 ± 0.66b	1.41 ± 0.59b
壶菌门 Chytridiomycota	0.09 ± 0.08a	0.05 ± 0.02a	5.01 ± 5.05a	0.36 ± 0.40a
球囊菌门 Glomeromycota	0.07 ± 0.03a	0.01 ± 0.02b	0.36 ± 0.28a	0.08 ± 0.07a
其他 Other	0.01 ± 0.01a	0.09 ± 0.01a	0.68 ± 0.33a	0.90 ± 1.16a

进一步对相对丰度排名前 30 的真菌属分析发现, 连作显著促进了再植枸杞根际土壤中毛霉属和 *Gibellulopsis* 的相对丰度 ( $P < 0.05$ , 表 3)。此外,

连作样地再植枸杞根际和/或非根际土壤中镰刀菌属、葡柄霉属和粉红螺旋聚孢霉属的相对丰度均高于对对照样地, 但结果不显著 ( $P > 0.05$ , 表 3)。

表 3 再植枸杞根际/非根际优势真菌属丰度变化

Table 3 Relative abundance of dominant fungal genera in the bulk and rhizosphere of replanted *L. barbarum*

分类 Taxonomy	根际 Rhizosphere		非根际 Bulk soil	
	对照 RC	连作 RM	对照 BC	连作 BM
链孢菌属 <i>Alternaria</i>	33.36 ± 16.38a	27.64 ± 10.80a	18.76 ± 6.30a	13.98 ± 12.16a
赤霉菌属 <i>Gibberella</i>	20.69 ± 19.44a	1.96 ± 0.89a	16.50 ± 18.95a	10.09 ± 5.38a
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	4.35 ± 4.41a	15.60 ± 8.00a	7.26 ± 10.41a	12.89 ± 6.39a
绿僵菌属 <i>Metarhizium</i>	2.61 ± 4.48a	0.02 ± 0.01a	0.02 ± 0.01a	0.04 ± 0.01a
微囊菌属 <i>Microascus</i>	0.02 ± 0.00a	0.06 ± 0.04a	0.03 ± 0.02a	2.70 ± 4.40a
拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>	0.01 ± 0.00a	0.08 ± 0.10a	0.01 ± 0.01a	2.46 ± 4.17a
丝孢菌属 <i>Scedosporium</i>	0.07 ± 0.05a	0.13 ± 0.13a	1.65 ± 2.04a	0.09 ± 0.03a
柄孢壳属 <i>Zopfiella</i>	0.77 ± 0.58ab	0.04 ± 0.01b	2.39 ± 1.35a	0.06 ± 0.02b
优雅波边革菌 <i>Cymatoderma</i>	1.16 ± 1.96a	0.01 ± 0.01a	0.03 ± 0.03a	0.02 ± 0.00a
葡柄霉属 <i>Stemphylium</i>	0.09 ± 0.02a	1.79 ± 1.37a	0.02 ± 0.00a	0.12 ± 0.11a

续表

分类 Taxonomy	根际 Rhizosphere		非根际 Bulk soil	
	对照 RC	连作 RM	对照 BC	连作 BM
毛壳属菌 <i>Chaetomium</i>	0.78 ± 0.50a	0.61 ± 0.86a	1.09 ± 0.17a	1.13 ± 1.18a
假裸囊菌属 <i>Pseudogymnoascus</i>	0.28 ± 0.36a	0.20 ± 0.15a	0.88 ± 1.36a	0.28 ± 0.23a
帚霉属 <i>Scopulariopsis</i>	0.22 ± 0.35a	0.05 ± 0.02a	0.32 ± 0.42a	0.81 ± 1.21a
粉红螺旋聚孢霉属 <i>Clonostachys</i>	0.02 ± 0.01a	0.89 ± 1.15a	0.23 ± 0.38a	0.21 ± 0.31a
闭小囊菌属 <i>Kernia</i>	0.03 ± 0.04a	0.02 ± 0.01a	0.01 ± 0.00a	0.70 ± 1.07a
细基格孢属 <i>Ulocladium</i>	0.55 ± 0.69a	0.08 ± 0.03a	0.04 ± 0.04a	0.01 ± 0.01a
翅孢壳属 <i>Emericellopsis</i>	0.01 ± 0.00a	0.12 ± 0.05a	0.01 ± 0.00a	0.64 ± 0.57a
毛霉属 <i>Mucor</i>	0.11 ± 0.08b	0.74 ± 0.22a	0.02 ± 0.02b	0.05 ± 0.06b
青霉菌属 <i>Penicillium</i>	0.02 ± 0.02a	0.00 ± 0.00a	0.38 ± 0.49a	0.01 ± 0.01a
支顶孢属 <i>Acremonium</i>	0.11 ± 0.06a	0.08 ± 0.03a	0.22 ± 0.14a	0.50 ± 0.41a
蜡蚧菌 <i>Lecanicillium</i>	0.21 ± 0.22a	0.09 ± 0.08a	0.40 ± 0.42a	0.08 ± 0.07a
刺毛霉属 <i>Actinomucor</i>	0.00 ± 0.00a	0.07 ± 0.08a	0.30 ± 0.27a	0.10 ± 0.17a
黑色霉菌属 <i>Ochroconis</i>	0.01 ± 0.01a	0.03 ± 0.03a	0.19 ± 0.32a	0.09 ± 0.08a
<i>Thelonectria</i>	0.00 ± 0.00a	0.04 ± 0.03a	0.00 ± 0.00a	0.45 ± 0.47a
<i>Bahusakala</i>	0.01 ± 0.01a	0.01 ± 0.01a	1.03 ± 1.78a	0.01 ± 0.00a
<i>Geosmithia</i>	0.23 ± 0.36a	0.01 ± 0.00a	0.65 ± 0.98a	0.02 ± 0.00a
<i>Gibellulopsis</i>	0.03 ± 0.03b	0.40 ± 0.13a	0.01 ± 0.00b	0.30 ± 0.08a

## 2.4 连作对再植枸杞根际不同功能真菌相对丰度的影响

将测序结果与 FUNGuild 的真菌数据库进行比对，在测定的所有土壤样本中主要发现六种功能真

菌（表 4）。统计分析表明，连作地再植枸杞根际土壤中丛枝菌根真菌的丰度较对照样地再植枸杞根际土壤显著降低（ $P < 0.05$ ），其他五种功能真菌的相对丰度则无显著变化（表 4）。

表 4 连作及对照条件下再植枸杞根际/非根际不同功能真菌的相对丰度变化

Table 4 Relative abundances of soil fungi in the bulk soils and rhizosphere of replanted *L. barbarum* relative to functional group and treatment

真菌功能组 Functional group	根际 Rhizosphere		非根际 Bulk soil	
	对照 RC	连作 RM	对照 BC	连作 BM
植物病原菌 Plant pathogens	29.86 ± 20.01a	20.99 ± 0.20a	24.75 ± 17.82a	24.11 ± 3.70a
动物寄生真菌 Animal parasites	37.93 ± 19.56a	28.75 ± 9.94a	22.30 ± 6.85a	16.58 ± 11.65a
腐生真菌 Saprotrophic fungi	4.80 ± 4.23a	14.94 ± 2.58a	10.62 ± 5.61a	16.31 ± 6.69a
丛枝菌根真菌 AM fungi	0.07 ± 0.03a	0.01 ± 0.02b	0.31 ± 0.34a	0.08 ± 0.07a
菌寄生真菌 Mycoparasites	0.12 ± 0.14a	0.13 ± 0.08a	0.39 ± 0.51a	0.11 ± 0.04a
外生菌根真菌 EcM fungi	0.00 ± 0.00a	0.01 ± 0.01a	0.21 ± 0.33a	0.02 ± 0.01a
其他 Other	15.27 ± 6.20a	25.22 ± 9.87a	6.06 ± 2.35b	2.14 ± 1.39b
功能未知 Unmatched	11.95 ± 7.41b	9.95 ± 6.11b	35.36 ± 10.98a	40.65 ± 10.84a

## 2.5 连作样地土壤理化性质对枸杞根际/非根际土壤真菌群落的影响

相关性分析表明,枸杞根际土壤中接合菌门的相对丰度与土壤电导率和硝态氮显著负相关,而与有效磷含量显著正相关;壶菌门的相对丰度与土壤全磷含量显著负相关;球囊菌门的相对丰度与硝态氮含量显著正相关,而与有效磷含量显著负相关( $P<0.05$ ,表5)。非根际土壤中优势真菌门的相对丰度与土壤因子间均无显著相关关系( $P>0.05$ ,表5)。从真菌功能分类看,枸杞根际土壤中植物病原菌的相对丰度与土壤全磷含量显著负相关;腐生真菌的相对丰度与土壤电导率及硝态氮含量显著负相关;丛枝菌根真菌的相对丰度与硝态氮含量显著正相关,而与有效磷含量显著负相关。而在非根际土壤中,植物病原菌的相对丰度与土壤有机碳含量显著正相关( $P<0.05$ ,表5)。

进一步利用基于距离的冗余分析(db-RDA)发现,土壤有效磷含量、电导率、速效氮含量及pH分别解释了宁夏枸杞根际土壤真菌群落变化的33.7%、30.0%、27.1%和26.7%( $P<0.05$ ,表6)。土壤有效磷和硝态氮含量分别解释了宁夏枸杞非根际土壤真菌群落变化的34.1%和29.3%( $P<0.05$ ),其他土壤因子均无显著影响(表6)。

## 3 讨 论

### 3.1 连作扰乱再植枸杞根际和非根际土壤细菌群落与真菌群落间的平衡关系

实时荧光定量PCR的结果证实,连作地再植枸杞根际和非根际土壤中细菌和真菌的丰度均显著高于对照样地(表1),这一结果说明传统模式下长期种植枸杞能够显著促进土壤微生物种群的繁殖。导致这一结果的原因可能有三点:首先,长期施用肥料及枸杞落叶返还土壤能够通过提供营养和碳源、调整土壤C/N比及改变土壤微环境等方式促进土壤微生物群落的生长和繁殖<sup>[17]</sup>。其次,Bouskill等<sup>[18]</sup>研究发现,前期预处理能够增强土壤微生物群落对后期相同类型环境胁迫的耐受性。经过长期的定向选择,枸杞连作地土壤微生物已适应枸杞根际环境,进而在再植枸杞根际土壤大量定植。此外,连作地土壤可能通过影响再植枸杞生长及其生理状态<sup>[6]</sup>,调整枸杞根系与土壤微生物间的互作关系,

导致枸杞根系对根际土壤微生物的控制力降低而使根际微生物过度繁殖。对再植枸杞根际/非根际真菌群落结构的分析发现,连作地再植枸杞根际真菌群落与非根际真菌群落结构较为相似(图1C),证实连作可能弱化了再植枸杞根系对土壤真菌的选择作用。然而就连作如何影响枸杞与土壤微生物间的相互作用仍需深入研究。

由于土壤细菌和真菌群落在底物利用、功能等方面的差异,决定了这两种微生物群落在应对环境变化时表现出不同的响应机制<sup>[19]</sup>。本研究结果也表明,连作对再植枸杞根际/非根际土壤真菌群落的促进作用高于细菌,导致连作地再植枸杞根际和非根际土壤中细菌/真菌的比例均明显低于对照样地(表1),使再植枸杞根际土壤微生物环境偏向于真菌型。近期,Grosso等<sup>[20]</sup>研究发现土壤pH和植物凋落物的C/N是影响土壤细菌和真菌群落平衡的主要因素。其中,低pH和高C/N均有利于真菌生长。因此,长期施用氮肥导致的土壤pH降低<sup>[6]</sup>,可能是连作影响再植枸杞根际和非根际土壤细菌/真菌比例平衡的主要原因之一。

### 3.2 连作抑制再植枸杞根际土壤丛枝菌根真菌(球囊菌门)的相对丰度

丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是土壤中分布极其广泛的一类真菌,它能够与约75%的陆生植物形成互利共生的联合体<sup>[21]</sup>,因其具有帮助植物吸收氮、磷等元素、提高植物对土传病害和干旱等生物及非生物胁迫的耐受性等功能而受到广泛关注<sup>[22-23]</sup>。目前研究发现,丛枝菌根真菌主要以球囊菌门为主,因此有研究直接将球囊菌门视为丛枝菌根真菌<sup>[21,24]</sup>。本研究的测序及真菌功能预测结果表明,球囊菌门和丛枝菌根真菌的相对丰度在不同土壤样本中均保持一致(表2和表4)。进一步分析发现,连作地再植枸杞根际土壤中丛枝菌根真菌的相对丰度较对照样地显著降低(表4),且其丰度与硝态氮含量显著正相关,而与有效磷含量则显著负相关(表5)。这些结果说明,长期施肥可能影响了丛枝菌根真菌与再植枸杞根系间的共生关系。由此推测,丛枝菌根真菌丰度的减少可能进一步影响了再植枸杞对生物及非生物胁迫的抗性,从而导致再植枸杞生长减缓。

### 3.3 连作对再植枸杞根际土壤植物病原菌丰度的影响

前期对不同种植年限枸杞根际土壤微生物群落

表 5 土壤理化因子与枸杞根际非根际优势真菌及其功能丰度的相关分析

Table 5 Pearson's correlation coefficients of soil properties with abundance of dominate fungal phyla and the associated function in the bulk soil and rhizosphere of <i>L. barbarum</i>		土壤因子 Factors									
系统发育	根际	pH	电导率 EC	有机碳 TOC	全氮 TN	碱解氮 AN	铵态氮 $H_4^+$ -N	硝态氮 $NO_3^-$ -N	全磷 TP	有效磷 AP	速效钾 AK
Phylogeny	子囊菌门 Ascomycota	0.41	0.79	0.37	-0.54	-0.78	0.27	0.63	-0.55	-0.60	0.49
	接合菌门 Zygomycota	-0.61	-0.84*	-0.36	0.32	0.79	-0.28	-0.86*	0.24	0.84*	-0.30
	壶菌门 Chytridiomycota	0.49	0.66	0.58	-0.38	-0.67	-0.55	0.24	-0.87*	-0.23	0.73
	担子菌门 Basidiomycota	0.42	0.08	0.19	0.58	0.09	0.13	0.55	0.67	-0.53	-0.61
	球囊菌门 Glomeromycota	0.76	0.58	0.55	0.14	-0.39	-0.06	0.88*	0.29	-0.84*	-0.16
Bulk soil	子囊菌门 Ascomycota	-0.12	-0.07	0.30	0.50	0.18	0.58	0.14	-0.16	-0.02	-0.59
	接合菌门 Zygomycota	-0.78	-0.70	-0.19	-0.13	0.78	0.71	-0.31	0.59	0.48	-0.69
	壶菌门 Chytridiomycota	0.59	0.58	-0.31	-0.25	-0.73	-0.41	0.33	-0.05	-0.56	0.72
	担子菌门 Basidiomycota	-0.50	-0.47	0.04	-0.47	0.48	-0.29	-0.56	0.04	0.67	0.09
	球囊菌门 Glomeromycota	0.61	0.47	-0.32	-0.07	-0.55	-0.30	0.45	0.32	-0.65	0.41
Function guild	植物病原菌 Plant Pathogens	0.22	0.60	0.35	-0.49	-0.67	-0.08	0.17	-0.96**	-0.16	0.69
	动物寄生真菌 Animal parasites	0.01	0.02	-0.17	-0.11	0.05	0.58	0.42	0.68	-0.39	-0.36
	腐生真菌 Saprotrophic fungi	-0.67	-0.90*	-0.70	0.29	0.79	-0.16	-0.89*	0.47	0.81	-0.28
	丛枝菌根真菌 AM fungi	0.76	0.61	0.53	0.11	-0.42	-0.01	0.91*	0.29	-0.86*	-0.15
	菌寄生真菌 Mycoparasites	0.15	-0.18	-0.76	0.27	0.01	-0.58	-0.30	0.46	0.02	0.26
非根际	外生菌根真菌 EcM fungi	0.03	-0.27	0.13	0.09	0.31	-0.70	-0.31	0.16	0.31	0.02
	植物病原菌 Plant Pathogens	0.10	0.26	0.85*	-0.18	-0.12	-0.10	0.16	-0.64	0.04	0.05
	动物寄生真菌 Animal parasites	0.49	0.21	-0.03	-0.10	-0.19	-0.60	0.26	0.46	-0.36	0.24
	腐生真菌 Saprotrophic fungi	-0.67	-0.29	-0.25	-0.43	0.15	0.28	-0.60	-0.53	0.64	0.25
	丛枝菌根真菌 AM fungi	0.45	0.26	-0.43	0.03	-0.33	-0.19	0.35	0.54	-0.54	0.20
Bulk soil	菌寄生真菌 Mycoparasites	0.32	0.23	-0.54	-0.11	-0.34	-0.14	0.23	0.44	-0.43	0.32
	外生菌根真菌 EcM fungi	0.37	0.27	-0.55	-0.09	-0.40	-0.20	0.22	0.37	-0.45	0.38

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

表 6 土壤理化因子对宁夏枸杞根际/非根际真菌群落结构的影响

Table 6 Effects of soil properties on composition of the soil fungal communities in the bulk soil and rhizosphere of *L. barbarum*

因子 Factor	根际 Rhizosphere		非根际 Bulk soil	
	解释度 %	P 值	解释度 %	P 值
	variance explained	P-value	variance explained	P-value
pH	26.7	0.036	21.2	0.072
电导率 EC	30	0.032	20.6	0.08
速效氮 AN	27.3	0.014	15.5	0.12
硝态氮 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	27.1	0.084	29.3	0.018
有效磷 AP	33.7	0.038	34.1	0.002

注：本表仅列出具有显著影响的土壤因子 Note: Only the soil properties that have significant effects are listed in the table

的分析发现，镰刀菌属、李维菌属及枝孢属等已知植物病原菌的相对丰度在不同树龄枸杞间均发生显著变化<sup>[7]</sup>。在本研究中，FUNGuild 数据库检索结果显示植物致病菌的总体相对丰度在不同样品中无显著差异（表 4）。然而，就单一植物病原菌而言，连作地再植枸杞根际土壤中已知植物病原菌镰刀菌属、拟青霉属、葡柄霉属和粉红螺旋聚孢霉属的相对丰度均高于对对照样地（表 3）。虽然目前就这些植物病原菌是否导致枸杞产生病害尚不清楚，但这些病原真菌相对丰度的增加说明连作地再植枸杞根际土壤微生物环境较对照样地更差。此外，这一结果也间接证明连作可能干扰了再植枸杞根系对植物病原菌的抑制作用。

### 3.4 长期施肥是驱动再植枸杞根际土壤真菌群落演替的主要因子

前人研究表明长期施用化肥所导致的土壤酸化、土壤次生盐碱化等效应均能够直接或间接影响土壤微生物群落的结构和组成<sup>[21, 25]</sup>。前序基于相同条件下对细菌群落的研究发现，土壤 pH 和有效磷含量是驱动枸杞非根际细菌群落结构变化的主要因素<sup>[6]</sup>。本研究进一步表明，土壤 pH、电导率、硝态氮和有效磷含量是解释再植枸杞根际真菌群落的主要因素，其中硝态氮和有效磷含量也是驱动非根际土壤真菌群落的主要土壤因子（表 6）。这些结果与前人研究结果一致<sup>[21]</sup>。在实际生产中，长期施用氮肥是导致枸杞园土壤酸化的主要原因，并且氮肥和磷肥的长期使用又能够导致氮、磷元素过量。因

此在传统种植模式下，大量、长期使用化肥所导致的土壤理化性质改变是驱动枸杞园土壤细菌/真菌群落及再植枸杞根际真菌群落结构演替的主要因子。鉴于土壤细菌和真菌群落在多数土壤生态过程中具有重要作用，由此可以推测，长期使用化肥对土壤微生物群落的影响可能是导致枸杞连作障碍产生的主要原因之一。

此外，在长期种植过程中枸杞凋落物及根系分泌物的不断输入也可能导致枸杞园土壤微生物群落结构发生改变。本研究也观察到 TOC 含量与植物病原真菌的相对丰度存在显著正相关关系（表 5），但对枸杞凋落物如何驱动枸杞园土壤微生物群落演替以及长期施肥如何影响土壤微生物群落对枸杞凋落物的利用和降解等重要过程仍不清楚。探索这些土壤生物学过程对于理解枸杞连作障碍形成机制及改进枸杞种植技术具有重要理论价值。

## 4 结 论

长期连作显著促进再植枸杞根际及非根际土壤细菌和真菌的群落丰度；且连作对真菌的促进作用强于细菌，导致枸杞根际及非根际土壤微生物环境偏向于真菌型。测序结果表明，再植枸杞根际土壤的优势真菌分别为子囊菌门、担子菌门、接合菌门、壶菌门和球囊菌门，其中连作地再植枸杞根际土壤中球囊菌门（丛枝菌根真菌）的相对丰度较对照样

地显著降低, 而接合菌门的相对丰度则显著增加。db-RDA 分析发现, 土壤 pH、电导率、硝态氮和有效磷是驱动再植枸杞根际土壤真菌群落结构变化的主要因素, 而硝态氮和有效磷含量是影响非根际土壤真菌群落结构变化的主要因子。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Amagase H, Farnsworth N R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji) . Food Research International, 2011, 44( 7 ): 1702—1717
- [ 2 ] Bryan J K, Costa D, Giese N, et al. Goji ( *Lycium* spp. ) in natural standard monograph. 2008. Natural Standard Inc. www.naturalstandard.com
- [ 3 ] Karp D. Goji taunts North American farmers - The berry, cultivated in China and said to convey health benefits, is eagerly sought in the West. Growers here are trying but are discovering they have much to learn. Los Angeles Times. 2009[2018-07-02]. <http://articles.latimes.com/2009/aug/05/food/fo-goji5>
- [ 4 ] Seeram N P. Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56( 3 ): 627—629
- [ 5 ] Dutch Authorities. Recommendation by centre for substances and integrated risk assessment of national institute of public health and environment in the netherlands dated October 6. 2004[2018-07-02]. <http://www.rivm.nl/en/>
- [ 6 ] 纳小凡, 郑国琦, 邢正操, 等. 连作对再植枸杞根际细菌群落多样性和群落结构的影响. 土壤学报, 2017, 54( 5 ): 1280—1292  
Na X F, Zheng G Q, Xing Z C, et al. Effects of monocropping on diversity and structure of the bacterial community in rhizosphere of replanted *Lycium barbarum* L. ( In Chinese ) . Acta Pedologica Sinica, 2017, 54( 5 ): 1280—1292
- [ 7 ] 纳小凡, 郑国琦, 彭励, 等. 不同种植年限宁夏枸杞根际微生物多样性变化. 土壤学报, 2016, 53( 1 ): 241—252  
Na X F, Zheng G Q, Peng L, et al. Microbial biodiversity in rhizosphere of *Lycium bararum* L. relative to cultivation history( In Chinese ) . Acta Pedologica Sinica, 2016, 53( 1 ): 241—252
- [ 8 ] 张俊华, 郑国琦. 宁夏枸杞根际土壤线虫群落特征. 应用生态学报, 2016, 27( 5 ): 1647—1656  
Zhang J H, Zheng G Q. Soil nematode community structure in the rhizosphere of *Lycium barbarum* ( In Chinese ) . Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27( 5 ): 1647—1656
- [ 9 ] 李欢, 李晓林, 张俊伶, 等. 蚯蚓与丛枝菌根真菌的相互作用及其对植物的影响. 土壤学报, 2011, 48( 4 ): 847—855
- Li H, Li X L, Zhang J L, et al. Interaction between earthworms and mycorrhizal fungi and their effects on plants ( In Chinese ) . Acta Pedologica Sinica, 2011, 48( 4 ): 847—855
- [ 10 ] Bagyaraj D J, Ashwin R. Soil biodiversity: Role in sustainable horticulture//Biodiversity in Horticultural Crops. New Delhi: Daya Publishing House, 2017: 1—18
- [ 11 ] Hannula S E, Morriën E, de Hollander M, et al. Shifts in rhizosphere fungal community during secondary succession following abandonment from agriculture. ISME Journal, 2017, 11( 10 ): 2294—2304
- [ 12 ] 冯固, 张福锁, 李晓林, 等. 丛枝菌根真菌在农业生产中的作用与调控. 土壤学报, 2010, 47( 5 ): 995—1004  
Feng G, Zhang F S, Li X L, et al. Role and regulation of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural production ( In Chinese ) . Acta Pedologica Sinica, 2010, 47( 5 ): 995—1004
- [ 13 ] Ferris H, Tuomisto H. Unearthing the role of biological diversity in soil health. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 85: 101—109
- [ 14 ] Fraç M, Hannula S E, Belka M, et al. Fungal biodiversity and their role in soil health. Frontiers in Microbiology, 2018, DOI: 10.3389/fmicb.2018.00707
- [ 15 ] 牛利敏, 秦华, 徐秋芳, 等. 长期种植毛竹林土壤丛枝菌根真菌群落演变趋势. 土壤学报, 2017, 54( 3 ): 722—734  
Niu L M, Qin H, Xu Q F, et al. The evolutionary trend of arbuscular mycorrhizal community in soil of long-term moso bamboo plantation ( In Chinese ) . Acta Pedologica Sinica, 2017, 54( 3 ): 722—734
- [ 16 ] Nguyen N H, Song Z, Bates S T, et al. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal Ecology, 2016, 20( 1 ): 241—248
- [ 17 ] Zhang B, Gao Q, Xu S, et al. Long-term effect of residue return and fertilization on microbial biomass and community composition of a clay loam soil. Journal of Agricultural Science, 2016, 154( 6 ): 1051—1061
- [ 18 ] Bouskill N J, Lim H C, Borglin S, et al. Pre-exposure to drought increases the resistance of tropical forest soil bacterial communities to extended drought. ISME Journal, 2013, 7( 2 ): 384—394
- [ 19 ] Rousk J, Bååth E. Growth of saprotrophic fungi and bacteria in soil. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 78( 1 ): 17—30
- [ 20 ] Grosso F, Bååth E, Nicola F D. Bacterial and fungal growth on different plant litter in Mediterranean soils: Effects of C/N ratio and soil pH. Applied Soil Ecology, 2016, 108: 1—7
- [ 21 ] Liu Y, Johnson N C, Lin M, et al. Phylogenetic structure of arbuscular mycorrhizal community shifts in response

- to increasing soil fertility. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 89: 196—205
- [ 22 ] Smith S E, Read D J. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. London: Academic Press, 2008
- [ 23 ] Hodge A, Helgason T, Fitter A H. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, 2001, 3: 267—273
- [ 24 ] Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, et al. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 2014, 346( 6213 ): 1—11
- [ 25 ] Zhou J, Guan D, Zhou B, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 90: 42—51

## Effects of Long-term Monocropping of *Lycium barbarum* L. on Function and Composition of Fungal Community in Rhizosphere of Replanted *Lycium barbarum* L.

MA Shaolan MA Caixia XU Pengxin ZHENG Guoqi NA Xiaofan<sup>†</sup>

(School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract** 【Objective】 Owing to the growth characteristics of wolfberry (*Lycium barbarum* L.) per se and the limitation of soil resources in the traditional wolfberry plantation regions, long-term monocropping of the plants has become one of the main factors hindering sustainable development of the industry of wolfberry production and causing serious economic loss and potential eco-problems. Previous studies found that monocropping could significantly affect diversity and composition of the bacterial communities in the rhizosphere of replanted *L. barbarum*, however, they did not deal much with responses of the fungal communities therein to the long-term monocropping. 【Method】 Soil samples were collected from the topsoil layer (0~20 cm) near the plants in the long-term monocropping wolfberry fields and randomly in the control (no wolfberry cultivation history) with a soil auger ( $n = 3$ ). In order to have enough rhizosphere soils, root segments from at least ten individual plants were collected. Rhizosphere soil adhered to the roots were collected by washing with  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl solution and centrifuging. The genomic DNA was extracted from 0.1 g wet rhizosphere and bulk soil sample using the PowerSoil DNA isolation Kit, separately. The ITS2 region was amplified and sequenced with the Illumina HiSeq technique. Then metrics of  $\alpha$  diversity (Shannon index and OTU richness) and weighted and unweighted UniFrac distances were calculated with the aid of QIIME. And real time PCR was used to quantify abundance of the bacterial and fungal populations in each DNA samples. 【Result】 Real time PCR found that monocropping significantly increased abundances of the bacterial and fungal communities in both bulk soil and rhizosphere of *L. barbarum* as compared with what was found in the control fields ( $P < 0.05$ ). However, the effect was much higher on fungi than on bacteria, and hence disturbed the balance between bacteria and fungi in ratio, thus making the microbial environments in the rhizosphere and bulk soil tend to be fungal dominant. Sequencing analysis discovered that Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota, and Glomeromycota were the dominant phyla in all the samples, and that the relative abundance of Zygomycota in the rhizosphere of replanted wolfberry was significantly lower than that in the control, whereas an opposite trend was found with Glomeromycota ( $P < 0.05$ ). And FUNGuild predication of fungal functions demonstrated that the relative of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the rhizosphere of replanted wolfberry in the monocropping fields decreased significantly relative to what in the control fields ( $P < 0.05$ ). Non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) revealed that the fungal communities in bulk soil and rhizosphere of replanted wolfberry were quite similar to each other in the monocropping fields, but not so in the control, although they did not very much in diversity from those in the control. Furthermore, distance based redundancy analysis indicated that soil pH, electrical conductivity, and contents of nitrate nitrogen and readily

available phosphorous were the main factors affecting soil fungal communities in the rhizosphere of wolfberry, while contents of nitrate nitrogen and readily available phosphorous were the ones explaining changes in soil fungal communities in the bulk soils ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】 All the findings in this study suggest that long-term fertilization in the monocropping wolfberry fields might be one of the major causes driving the succession of soil fungal communities in the rhizosphere of replanted wolfberry and altering the interaction between wolfberry and soil fungal community. Therefore, the study may shed some new light on mechanism of the forming of the hazard of long-term monocropping of wolfberry to sustainable development of the industry of wolfberry production.

**Key words** *Lycium barbarum* L. (wolfberry); Monocropping; Rhizosphere; Fungal community; ITS2

(责任编辑：卢 萍)