

不同种植年限宁夏枸杞根际微生物多样性变化^{*}

纳小凡^{1, 2} 郑国琦^{1, 2} 彭 励^{1, 2†} 雷川怡¹ 杨红艳¹ 马 玉¹
赵 强¹ 石硕硕¹

(1 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

(2 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘 要 为了解长期人工种植枸杞根际土壤微生物的种群结构变化特征, 利用Illumina MiSeq测序平台分别对种植5、10和15 a宁夏枸杞根际土壤微生物基因组总DNA中16S和18S rDNA基因的部分区域进行测序, 经UPARSE pipeline和RDP classifier软件进行聚类分析和物种注释。结果表明, 长期种植宁夏枸杞不会改变其根际土壤pH, 但会导致根际土壤全磷、有效磷、全盐含量和电导率升高。测序结果表明, 不同种植年限枸杞根际土壤细菌群落 α 多样性无显著变化, 但真菌群落多样性在种植10 a枸杞中较种植5 a时显著降低($p < 0.05$), 表明根际细菌群落多样性受种植年限影响较小。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、泉古菌门、蓝菌门、芽单胞菌门、变形菌门以及真菌子囊菌门、担子菌门、接合菌门的比例在不同种植年限的枸杞根际土壤中显著改变($p < 0.05$)。属水平的分析也表明, 共有27个细菌属和16个真菌属的比例发生改变($p < 0.05$), 这些结果表明枸杞根际土壤微生物群落组成受种植年限的影响更大。相关性分析结果表明, 种植年限、土壤全磷及有效磷含量是影响枸杞根际微生物群落结构的主要因子。

关键词 宁夏枸杞; 微生物多样性; 根际土壤

中图分类号 S154.36 **文献标识码** A

生物多样性与生态系统功能间的关系是当今生命科学领域的研究热点问题之一。其中, 土壤是陆生植物所依赖的复杂生态系统, 土壤微生物则是土壤生态系统中极其重要的部分, 在土壤养分转化循环、系统稳定性、抗干扰能力以及可持续利用中占据主导地位。从农业生产的角度考虑, 探索土壤微生物多样性、群落结构、种类组成及其时空分布特征, 有助于阐明生物多样性与生态系统功能之间的关系, 进而阐释土壤生态系统的功能与稳定性即土壤回复力和抗性之间的关系^[1], 这对于保障土壤质量和健康以及生态系统的可持续发展具有重要的理论和实践意义。长期以来, 土壤生态系统的复杂性、土壤生物的多样性和技术手段的不足等因素严

重制约着人们对土壤微生物多样性的研究。随着测序等分子生物学技术的发展及其与传统方法相结合的应用, 对自然生态系统中土壤微生物多样性及其功能之间关系的研究日益增多。近期的研究表明, 土壤微生物不仅能促进植物对矿质元素的吸收^[2]及激素的合成^[3], 还具有增强植物抵抗生物和非生物胁迫能力等作用^[4-6], 逐步证实了土壤中微生物与植物间存在紧密的联系和互作。

枸杞(*Lycium chinense* L.), 茄科, 枸杞属, 多年生落叶灌木。枸杞根系发达, 具备较强的抗旱、耐盐碱等生物学特性, 是一种典型的生态和经济兼备的树种。在我国, 枸杞主要分布在宁夏、内蒙古、青海、新疆、山西、陕西及河北等地。其

^{*} 宁夏自然科学基金项目(NZ12115)资助Supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Province of China (No. NZ12115)

[†] 通讯作者Corresponding author, E-mail: pengli1124@163.com

作者简介: 纳小凡(1983—), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物生理生化相关研究。E-mail: nxf-0324@163.com

收稿日期: 2015-03-03; 收到修改稿日期: 2015-08-02

中,在宁夏具有悠久栽培历史的宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)逐渐形成了特有的品质和地道产区,在国内外享有盛誉,已成为区域优势显著的特色产业。在长期的种植规程中,科研人员在新品种选育、规范化种植技术和新产品开发方面开展了大量的工作,取得一系列的成果,为支撑产业的发展奠定了重要的基础。但是,随着种植规模的扩大和种植年限的增加,枸杞果实产量和品质均出现不同程度的降低,严重影响了产业的可持续发展。一些研究表明枸杞与其根际微生物的相互作用对枸杞产量^[7]和枸杞耐逆性有一定影响^[8-9]。例如,通过施加NutriSmart生态型微肥料可以提高枸杞产量^[7]。接种枸杞根际丛枝菌根真菌(AMF)^[8]和深色有隔内生真菌(DSE)^[9]能够有效促进枸杞幼苗根系发育,提高幼苗生物量以及叶片气孔导度和净光合速率,增强枸杞对非生物胁迫的耐受能力。然而从土壤生态系统角度看,土壤微生物群落结构的变化与枸杞种植年限、根系发育、枸杞产量/品质及病虫害之间的关系仍不清楚。因此,本文旨在通过对不同种植年限枸杞根际微生物的分布、组成等进行研究,拟从土壤微生物层面探讨枸杞生长发育与根际微生物间的关系,为进一步指导生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于宁夏银川市南梁农场,为宁夏枸杞代表性种植区域,具有30多年的种植历史,当前主栽品种为宁杞1号。该区域海拔1 107~1 117 m,年均降雨量145.5 mm,年均蒸发量1 747 mm,年均温9.1℃,日照充足,昼夜温差大。区域内土壤结构以灰钙土、半固定沙丘、白疆土和盐土为主,农田引黄自流灌溉。

1.2 试验方法

选取已种植5、10、15 a的枸杞地作为采集地(样点间直线距离至少2 km)。样地内枸杞管理一律按照枸杞栽培技术规程(GB/T19116-2003),施肥量为有机肥30 000 kg hm⁻², N 900 kg hm⁻²、P₂O₅ 600 kg hm⁻²、K₂O 450 kg hm⁻²,氮肥基、追比例为40%、60%,两次追肥各占30%;磷、钾肥基追各占50%,按25%比例追施2次。基肥施用时间为4月中旬,追肥分别在6月和7月进行,有机肥

在10月进行。施肥方法采用半环施方法,沟槽宽15~20 cm,距根茎30~40 cm处,深30 cm,肥料施于沟内,与土混匀后覆土。

在2014年6月16日(第一期)、6月25日(第二期)、7月4日(第三期)、7月12日(第四期)于南梁农场,分别取现收获的种植5、10和15 a枸杞鲜果,随机选取100粒现场测定枸杞鲜果百粒重,重复5次。

在枸杞盛果期(6月下旬),采用抖根法,每个样地设9个点取样,按照“田”字型分布,样点间横向及纵向间隔均为10 m(采样点均避开施肥位置至少50 cm),采集土壤深度为10~20 cm,将枸杞根际土壤抖至50 ml无菌离心管中,迅速置于冰盒中储存、备用,重复3次。

1.3 土壤环境化学指标测定

将采集的土样风干、过1 mm口径筛孔后,参照戴万宏等^[10]的方法测定土壤pH。土壤离子含量测定参照李立平等^[11]的方法。土壤有机质含量测定采用重铬酸钾容量法,全氮采用凯氏定氮法,碱解氮采用碱解扩散法,全磷采用钼钒黄比色法,有效磷采用0.5 mol L⁻¹NaHCO₃浸—钼锑抗比色法,全钾采用ICP法,速效钾采用火焰光度计,土壤全盐含量采用重量法^[12]。

1.4 土壤微生物基因组总DNA提取及浓度测定

准确称取0.1 g土样,按照MoBio强力土壤微生物DNA提取试剂盒(Power Soil™ DNA Isolation Kit, MoBio, USA)说明书步骤,分别提取不同样地的9个重复土样总DNA。经1%琼脂糖凝胶电泳测定DNA完整性、Mini Dorp测定DNA纯度和浓度。每个样地的9份DNA样品随机取3份等量混匀,分别制成3个平行样本,于-20℃保存、备用。

1.5 PCR扩增及测序

细菌和真菌核糖体编码基因相应区段的扩增及测序服务由诺禾致源生物信息公司完成。细菌多样性的测定参考Caporaso等^[4]的方法,扩增细菌16S rDNA V4区段,引物为515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。真菌多样性采用两步扩增法对18S rDNA的ITS2区段进行测序分析。第一次扩增反应引物序列分别为5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'和5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。扩增产物经稀释后,作为第二次扩增的模板继续反应,引物序列

分别为5’ -GCATCGATGAAGAACGCAGC-3’ 和 5’ -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’。DNA扩增参照前人研究方法^[13]，扩增条件为98 ℃预变性1 min，98 ℃变性10 s，50 ℃退火30 s，72 ℃延伸60 s，30个循环，72 ℃延伸5 min。测序采用Illumina MiSeq平台。

1.6 DNA数据分析

所测得原始序列截去Barcode序列和引物序列后，经FLASH（V1.2.7，参数设置ITS为-m 10 -f 300 -x 0.2 -p 33 -r 219 -M 213，16S rDNA为-m 10 -f 300 -x 0.1 -p 33 -r 180 -M 135）拼接获得原始 Tags数据。原始Tags经QIIME（V1.7.0，质控参数为QIIME默认值，参照http://qiime.org/scripts/split_libraries.html）过滤处理获得高质量Tags数据（Clean Tags），并与数据库（Gold database，http://drive5.com/uchime/uchime_download.html）进行比对（UCHIME Algorithm，http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html）检测嵌合体序列，最终获得有效数据（Effective Tags）。测序深度为每个文库原始reads数不少于4万条。后以97%相似性为依据，利用UPARSE pipeline软件（v7.0.1001）将各序列聚类成为OTUs。为获得土壤样品中微生物物种的多样

性信息，使用uclust软件对所得序列进行聚类，并利用RDP classifier（v2.2）^[14]软件与GreenGene数据库（<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>）进行物种注释，统计每个样品在各分类水平上的构成。

利用QIIME（V1.7.0）计算香农指数表示土壤样本微生物群落α多样性。相关性分析采用SPSS16.0软件处理，图片利用OriginPro 8制作。

2 结 果

2.1 种植年限对枸杞根际土壤性质的影响

对宁夏银川市南梁农场已种植5、10、15 a的宁夏枸杞根际土壤的pH和电导率分析结果表明：枸杞长期种植对土壤酸碱度没有明显影响，所测土样均显微酸性；但随种植年限增长，枸杞根际土壤电导率逐渐增高（表1）。

进一步对枸杞地土壤样本的主要化学指标分析表明：土壤有机质、全氮及全钾含量无显著差异，全磷及有效磷含量在10 a和15 a枸杞地中含量较高（表1）。此外，种植15 a枸杞根际土壤中全盐含量较5 a和10 a显著增高（表1），这与土壤电导率增高的结果一致。

表1 不同种植年限宁夏枸杞根际土壤理化性状

Table 1 Physico-chemical properties of rhizosphere soil of Lycium bararum L. relative to cultivation history of the plants										
种植年限	pH	电导率	全盐	有机质	全氮	全磷	全钾	碱解氮	有效磷	速效钾
Cultivation		Electrical	Total salt	OM	Total N	Total P	Total K	Alkalyzable	Available P	Readily
Year		Conductivity	Total salt	OM	Total N	Total P	Total K	N	(mg	available K
(a)		($\mu\text{S cm}^{-1}$)	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(g kg^{-1})	(mg kg^{-1})	kg^{-1})	(mg kg^{-1})
5	5.5 ± 0.23a	108.4 ± 3.2a	2.1 ± 0.14a	21.9 ± 1.7a	1.2 ± 0.1a	0.9 ± 0.1a	23.1 ± 1.8a	136.5 ± 3.6a	10.3 ± 0.5a	293.3 ± 11.5a
10	5.8 ± 0.01a	154.9 ± 11.3b	2.2 ± 0.19a	18.8 ± 1.0a	1.4 ± 0.2a	1.6 ± 0.2b	22.3 ± 1.1a	145.2 ± 5.6a	73.7 ± 4.3b	280.0 ± 10.0a
15	5.5 ± 0.23a	164.4 ± 6.9b	3.4 ± 0.26b	18.5 ± 1.2a	1.5 ± 0.2a	1.8 ± 0.2b	22.3 ± 2.1a	140.0 ± 6.2a	46.4 ± 0.7c	246.7 ± 11.5b

注：平均值 ± 标准差（n=3）。同列数据后小写字母不同表示差异达显著（p<0.05）。下同 Note: Means ± SD（n = 3）. Different lowercase letters in the same column represent significant difference at p<0.05

2.2 不同种植年限枸杞鲜果百粒重变化

对枸杞种植年限与所产枸杞鲜果百粒重进行分析，结果表明，种植10 a的枸杞果实在前三期均较大，能够保持较长的大果采摘期（表2）。种植15 a的枸杞其第一期和第二期与种植10 a枸杞相比并无显著差异，但第三期鲜果显著较10 a生枸杞小（p<0.05）（表2）。说明随着种植年

限达到15 a，枸杞的大果产期缩短，果实发育可能受到影响。而第三期枸杞仍处于枸杞盛果期，此时鲜果品质下降会影响枸杞全年产值。通常枸杞干果的市场价值直接受其果实大小的影响，果实越大价值越高，因此可以推测种植年限到达15 a时，单位重量枸杞干果的收益要低于种植10 a枸杞。

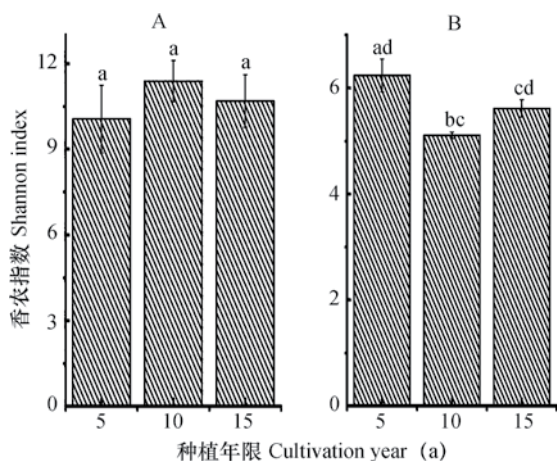
表2 不同种植年限枸杞鲜果百粒重变化

Table 2 Hundred-grain weight of fresh fruits harvested at four stages relative to cultivation history of <i>Lycium bararum</i> L.				
种植年限 Cultivation year (a)	第一期 The 1st harvest (g)	第二期 The 2nd harvest (g)	第三期 The 3rd harvest (g)	第四期 The 4th harvest (g)
5	67.3 ± 3.4a	59.2 ± 6.3a	70.8 ± 3.2a	55.4 ± 1.8a
10	68.5 ± 2.8a	75.2 ± 4.7a	70.9 ± 2.5a	57.7 ± 3.1a
15	68.9 ± 3.2a	68.5 ± 1.5a	59.7 ± 2.3b	53.7 ± 2.9a

注：平均值 ± SD ($n=5$)。同列数据后不同小写字母表示差异达显著 ($p < 0.05$) Note: Means ± SD ($n=5$). Different lowercase letters in the same column represent significant difference at $p < 0.05$

2.3 枸杞种植对根际土壤微生物种群多样性的影响

基于16S rDNA和18S rDNA的高通量测序结果显示，种植5 a和10 a枸杞根际细菌群落的香农指数未发生变化，15 a则略有降低；而10 a和15 a枸杞根际土壤真菌群落的香农指数则低于5 a枸杞（6.00），分别为5.14和5.62（图1）。这一结果表明，随种植时间增加，枸杞根际土壤细菌群落多样性的变化较小，但真菌群落的多样性有所降低。



注：图中误差为标准偏差 ($n=3$)。不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$) Note: Error bar showed the Standard Deviation ($n=3$). Different letters mean significant difference ($p < 0.05$)

图1 宁夏枸杞根际土壤中细菌 (A) 及真菌 (B) 群落的香农指数

Fig. 1 Shannon index of bacteria (A) and fungi (B) in the rhizosphere soil of *Lycium bararum* L.

2.4 枸杞根际土壤微生物群落门类组成

从门的分类水平看，枸杞根际土壤样本中共检测出细菌11个门，分属酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌门

(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、泉古菌门 (*Crenarchaeota*)、蓝藻门 (*Cyanobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、变形细菌门 (*Proteobacteria*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)。其中，酸杆菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、泉古菌门、变形细菌门为枸杞根际土壤的优势菌种 (表3)，这些菌在5 a、10 a、15 a中分别占细菌总数的77.91%、70.46%和85.34%。对各门细菌所占比例分析发现，不同种植年限宁夏枸杞根际土壤中细菌群落组成发生明显变化 (表3)。厚壁菌门、芽单胞菌门和变形细菌门的比例随种植年限增加而逐渐增长；放线菌门、拟杆菌门和泉古菌门的比例则逐渐减少。在种植10 a的枸杞根际土壤生态系统中，酸杆菌门的比例较5 a和15 a显著降低，而绿弯菌门的比例则显著增加。

测序结果表明，从枸杞根际土壤中鉴定得到的真菌主要来自4个门，包括子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、球囊菌门 (*Glomeromycota*) 和接合菌门 (*Zygomycota*) (表3)。其中，优势菌群为子囊菌门和担子菌门，这两种真菌在5 a、10 a、15 a枸杞根际土壤中分别占真菌群落的65.85%、22.48%和35.22%。随枸杞种植年限增长，子囊菌门和担子菌门的比例显著降低 (表3)，而分类地位尚不明确或尚未鉴定的真菌比例显著增加。以上结果显示，随种植时间的延长，枸杞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，不同种植年限宁夏枸杞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

表3 宁夏枸杞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 Lycium bararum L.

分类水平Taxonomy			比例Abundance (%)			
门Phyla	属Genera ^①	5 a	10 a	15 a		
细菌Bacteria	酸杆菌门	<i>Candidatus Solibacter</i>	14.72 ± 1.12a	7.16 ± 0.45b	15.22 ± 0.93a	
			0.58 ± 0.03a	0.41 ± 0.02a	0.77 ± 0.03a	
	放线菌门		5.37 ± 0.39a	4.73 ± 0.28b	3.96 ± 0.42b	
		Iamia	0.17 ± 0.01a	0.30 ± 0.02b	0.17 ± 0.01a	
		节杆菌属	0.00 ± 0.00a	0.01 ± 0.00a	0.11 ± 0.01b	
		链霉菌属	0.22 ± 0.01a	0.17 ± 0.01a	0.10 ± 0.01b	
	拟杆菌门		16.24 ± 1.17a	12.25 ± 1.03b	13.07 ± 0.84b	
		A4	8.58 ± 0.45a	6.15 ± 0.38b	6.16 ± 0.44b	
		<i>Arenibacter</i>	0.14 ± 0.01a	0.01 ± 0.00b	0.02 ± 0.00b	
		<i>Chitinophaga</i>	2.84 ± 0.15a	3.07 ± 0.26a	2.47 ± 0.13a	
		<i>Flavisolibacter</i>	0.35 ± 0.02a	0.31 ± 0.01a	0.13 ± 0.01b	
		类香味菌属	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.22 ± 0.01b	
		上地杆菌属	0.15 ± 0.01a	0.03 ± 0.00b	0.09 ± 0.01a	
		鞘氨醇杆菌属	0.04 ± 0.00a	0.03 ± 0.00a	1.45 ± 0.09b	
		绿弯菌门		9.37 ± 0.47a	14.75 ± 1.14b	6.69 ± 0.52a
		泉古菌门		19.24 ± 1.67a	14.03 ± 1.03b	12.16 ± 0.83b
			<i>Candidatus Nitrososphaera</i>	17.83 ± 1.72a	9.39 ± 0.77b	7.08 ± 0.56b
		亚硝化休儒菌属	1.26 ± 0.09a	3.95 ± 0.21b	2.70 ± 0.14c	
	蓝藻门		1.13 ± 0.11a	0.46 ± 0.03b	0.94 ± 0.04a	
	厚壁菌门		0.65 ± 0.02a	1.54 ± 0.12b	2.53 ± 0.17c	
		喜氨菌属	0.06 ± 0.00a	0.13 ± 0.01b	0.18 ± 0.02b	
		梭菌属	0.02 ± 0.00a	0.14 ± 0.00b	0.07 ± 0.01a	
		芽孢八叠球菌属	0.07 ± 0.00a	0.06 ± 0.00a	0.56 ± 0.02b	
	芽单胞菌门		2.87 ± 0.15a	6.22 ± 0.32b	5.34 ± 0.46b	
	浮霉菌门		4.24 ± 0.31a	3.75 ± 0.47a	3.96 ± 0.21a	
		<i>Planctomyces</i>	0.67 ± 0.02a	0.75 ± 0.01a	0.55 ± 0.03a	
		<i>Pirellula</i>	1.25 ± 0.10a	1.48 ± 0.09a	1.27 ± 0.06a	
		变形菌门		18.34 ± 2.25a	22.27 ± 1.58a	26.08 ± 1.98b
	<i>Aquicella</i>		0.20 ± 0.01a	0.17 ± 0.01a	0.20 ± 0.01a	
	<i>Azoarcus</i>		0.22 ± 0.00a	0.25 ± 0.00a	0.22 ± 0.01a	
	<i>Candidatus Enttheonella</i>		0.21 ± 0.01a	0.06 ± 0.00b	0.17 ± 0.00a	
	<i>Ramlibacter</i>		0.25 ± 0.01a	0.11 ± 0.00b	0.26 ± 0.01a	
	<i>Skermanella</i>		0.18 ± 0.01a	0.05 ± 0.00b	0.09 ± 0.02b	
	<i>Syntrophobacter</i>		1.25 ± 0.09a	1.49 ± 0.08a	1.28 ± 0.09a	
	芽孢杆菌属		0.21 ± 0.01a	0.36 ± 0.04b	0.43 ± 0.02b	
	纤维弧菌属		0.08 ± 0.00a	0.04 ± 0.00b	0.12 ± 0.00a	
	氢噬胞菌属		0.02 ± 0.00a	0.07 ± 0.00a	0.62 ± 0.02b	

续表

分类水平Taxonomy		比例Abundance (%)		
门Phyla	属Genera ^①	5 a	10 a	15 a
细菌Bacteria	溶杆菌属	0.20 ± 0.00a	0.16 ± 0.00a	0.43 ± 0.01b
	藤黄单孢菌属	0.15 ± 0.00a	0.31 ± 0.02b	0.42 ± 0.01b
	蛭弧菌属	0.05 ± 0.00a	0.15 ± 0.00b	0.16 ± 0.01b
	类固醇杆菌属	1.02 ± 0.13a	0.76 ± 0.02a	0.36 ± 0.01b
	热单胞菌属	0.14 ± 0.01a	0.07 ± 0.00b	0.15 ± 0.01a
真菌Fungi	疣微菌门	2.23 ± 0.13a	2.15 ± 0.13a	1.51 ± 0.23a
	<i>Opitutus</i>	0.20 ± 0.01a	0.20 ± 0.01a	0.13 ± 0.01a
	子囊菌门	44.13 ± 4.52a	17.55 ± 1.25b	26.74 ± 2.03b
	<i>Dokmaia</i>	2.90 ± 0.15a	0.42 ± 0.00b	0.43 ± 0.02b
	<i>Gibberella</i>	0.04 ± 0.00a	0.07 ± 0.00a	0.03 ± 0.00a
	<i>Ilyonectria</i>	0.35 ± 0.01a	0.25 ± 0.02a	0.33 ± 0.02a
	<i>Ochroconis</i>	0.05 ± 0.01a	0.01 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	<i>Preussia</i>	0.08 ± 0.00b	0.02 ± 0.00b	0.03 ± 0.00b
	<i>Setosphaeria</i>	0.01 ± 0.00a	0.03 ± 0.00a	0.03 ± 0.00a
	枝孢属	0.14 ± 0.01a	0.05 ± 0.00b	0.06 ± 0.00b
	尾孢属	0.04 ± 0.00a	0.01 ± 0.00a	0.08 ± 0.01b
	链格孢属	0.61 ± 0.03a	0.29 ± 0.01b	1.53 ± 0.11c
	镰刀菌属	0.53 ± 0.02a	0.77 ± 0.02a	1.25 ± 0.07b
	地丝霉属	3.23 ± 0.16a	3.39 ± 0.47a	1.81 ± 0.08b
	腐质霉属	0.16 ± 0.00a	1.87 ± 0.09b	0.13 ± 0.01a
	闭小囊菌属	0.00 ± 0.00a	0.01 ± 0.00a	0.10 ± 0.00b
	李维菌属	0.04 ± 0.00a	0.03 ± 0.00a	0.27 ± 0.01b
	小球腔菌属	0.10 ± 0.01a	0.01 ± 0.00b	0.01 ± 0.00b
	茎点霉属	10.19 ± 1.26a	0.90 ± 0.04b	0.86 ± 0.05b
	柔膜菌属	0.02 ± 0.00a	0.20 ± 0.00b	0.01 ± 0.00a
	根串珠霉属	3.62 ± 0.26a	0.61 ± 0.03b	0.68 ± 0.02b
	担子菌门	21.72 ± 3.14a	4.93 ± 0.37b	8.48 ± 0.52b
	<i>Cryptococcus</i>	0.02 ± 0.00a	0.06 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a
	<i>Psathyrella</i>	0.07 ± 0.00a	0.05 ± 0.00a	0.06 ± 0.00a
	鬼伞属	0.18 ± 0.01a	0.13 ± 0.00a	3.35 ± 0.25b
	丝核菌属	0.11 ± 0.01b	0.01 ± 0.00a	0.01 ± 0.00a
	球囊菌门	0.15 ± 0.00a	0.17 ± 0.00a	0.16 ± 0.01a
	<i>Glomus</i>	0.03 ± 0.00a	0.06 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a
	<i>Rhizophagus</i>	0.10 ± 0.00a	0.09 ± 0.00a	0.10 ± 0.01a
	接合菌门	0.42 ± 0.01a	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
	根霉属	0.28 ± 0.01a	0.01 ± 0.00b	0.03 ± 0.00b
	其他Other	32.52 ± 4.38a	76.63 ± 5.44b	64.14 ± 4.21b

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。数据为均值 ± SD ($n=3$)。不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。①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 the means ± SD ($n=3$). Different letters mean significant difference ($p < 0.05$). ①Only established genera were listed here

同年限间的比较发现, 种植5 a枸杞根际土壤中丰度显著增加的细菌群落主要为链霉菌属 (*Streptomyces*)、*A4*、*Arenibacter*、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、*Flavisolibacter*、上地杆菌属 (*Pedobacter*)、*Candidatus Nitrososphaera*、*Candidatus Entotheonella*、纤维弧菌属 (*Cellvibrio*)、*Ramlibacter*、*Skermanella*、类固醇杆菌属 (*Steroidobacter*) 和热单胞菌属 (*Thermomonas*)。10 a枸杞根际为*Iamia*、链霉菌属、*Flavisolibacter*、喜氮菌属 (*Ammoniphilus*)、梭菌属 (*Clostridium*)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)、藤黄单胞菌属 (*Luteimonas*)、类固醇杆菌属、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和亚硝化侏儒菌属 (*Nitrosopumilus*)。15 a为节杆菌属 (*Arthrobacter*)、碳酸噬胞菌属 (*Aequorivita*)、黄杆菌属、类香味菌属 (*Myroides*)、上地杆菌属、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*)、喜氮菌属、芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina*)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)、*Candidatus Entotheonella*、纤维弧菌属 (*Cellvibrio*)、氢噬胞菌属 (*Hydrogenophaga*)、溶杆菌属 (*Lysobacter*)、藤黄单胞菌属 (*Luteimonas*)、芽孢杆菌属、热单胞菌属和 *Ramlibacter*。

对已确定分类地位至属的真菌分析表明, 不同种植年限枸杞真菌群落组成也发生显著改变 (表3)。显著性分析显示, 5 a生枸杞根际土壤微生态中的枝孢属 (*Cladosporium*)、*Dokmaia*、地丝霉属 (*Geomyces*)、小球腔菌属 (*Leptosphaeria*)、茎点霉属 (*Phoma*)、根串珠霉属 (*Thielaviopsis*)、丝核菌属 (*Rhizoctonia*) 和根霉属 (*Rhizopus*) 真菌的较高。10 a生枸杞根际为地丝霉属、腐质霉属 (*Humicola*)、柔膜菌属 (*Rhizoscyphus*)、15 a则为鬼伞属 (*Coprinellus*)、李维菌属 (*Lewia*)、尾孢属 (*Cercospora*)、闭小囊菌属 (*Kernia*)、镰刀菌属 (*Fusarium*) 和链格孢属 (*Alternaria*)。在不同种植年限的枸杞根际土壤中, 丛枝菌根真菌 (AFM) 球囊霉属和 *Rhizophagus* 所占比例均未发生显著变化。此外, 分类地位尚未确定或尚未鉴定的真菌比例在种植10 a和15 a后显著增加 (表3)。

2.5 土壤理化性质与枸杞根际微生物群落结构的关系

相关性分析表明, 厚壁菌门、变形菌门与种

植年限、全盐含量、全氮含量、全磷含量显著正相关, 疣微菌门与种植年限、全盐含量成显著负相关, 而与有机质、全钾成显著负相关; 担子菌门与种植年限、全磷及有效磷含量成显著负相关, 与有机质含量成显著正相关; 接合菌门与种植年限、全磷及有效磷含量显著负相关; 酸杆菌门、子囊菌门与有效磷含量显著负相关; 芽单胞菌门与全磷及有效磷含量显著正相关 (表4)。此外, 第三期枸杞鲜果百粒重与绿弯菌门 ($p < 0.05$) 和疣微菌门 ($p < 0.01$) 的丰度成显著正相关 (表4)。其他因子间的相关性均未达显著水平 ($p > 0.05$)。

3 讨 论

3.1 长期人工种植枸杞根际微生物群落变化

本试验中选择的4个样点均位于南梁农场约1 000 hm²富硒枸杞地, 属同一气候区域。加之采用标准机械化作业模式, 因此4个样点的气候、土壤类型、田间管理均无差异。因此, 本研究对枸杞根际微生物群落多样性的分析主要反映长期人工种植枸杞所产生的效应。对拟南芥的研究发现, 拟南芥不同发育时期根系分泌物的差异决定了根际微生物组成的变化^[15]。据此推测枸杞根际分泌物在根际土壤中的长期积累可能是导致根际微生物群落发生变化的主要因素之一。在对枸杞根, 尤其是枸杞根皮 (俗称地骨皮) 的化学成分分析发现, 地骨皮中含多种生物活性物质^[16]。随着种植年限增加, 枸杞叶、茎和根中的有机物可能通过长期雨水淋溶和灌溉而进入根际微环境, 这些物质可能作为能量、胁迫等因素导致根际微生物群落结构发生变化。前人研究发现, 长期施肥能够显著影响作物根际微生物的群落组成^[17]。虽然本研究在采样时尽量避开施肥区域, 但在长期种植过程中, 施肥对枸杞根际微生物多样性的影响仍不可避免。因此, 导致枸杞根际微生物群落组成差异两个主要因素是长期施肥和根际分泌物积累。

3.2 根际微生物群落结构与土壤元素代谢

对土壤理化性质的分析发现, 全磷及有效磷含量随种植年限增长显著增加, 这可能与长期施加磷肥及植物对磷的利用率较低有关。同时, 长期种植枸杞导致根际土壤中全盐含量显著升高, 这可能与长期施肥、灌溉方式 (漫灌)、长期种植枸杞无法深翻以及微生物群落机构变化影响元素代谢等因

表4 枸杞根际微生物群落结构与土壤理化性质、果实百粒重及种植年限的相关系数

Table 4 Correlation analysis of rhizospheric soil microbe community structure with physico-chemical soil properties, hundred-grain weight and cultivation history of *Lycium barbarum* L.

项目Item	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
Y1	0.17	-0.27	-0.13	0.95**	0.57	0.93**	-0.64	-0.87**	-0.74*	-0.86**
Y2	0.55	-0.54	0.37	0.90*	0.25	0.92**	-0.16	-0.75*	-0.485	-0.55
Y3	0.06	0.23	0.41	-0.39	-0.24	-0.29	0.63	0.73**	0.67*	-0.60
Y4	0.02	0.16	0.04	0.79**	0.65	0.84**	-0.33	-0.21	-0.39	-0.48
Y5	-0.04	0.10	0.39	-0.18	-0.23	-0.15	0.49	0.55	0.51	0.55
Y6	-0.09	0.09	-0.20	0.95**	0.81**	0.94**	-0.66	-0.54	-0.73*	-0.88**
Y7	-0.67*	0.61	-0.82	0.52	0.94**	0.49	-0.97**	-0.24	-0.95**	-0.82**
Y8	-0.32	0.47	-0.01	-0.79**	-0.27	-0.79*	0.40	0.84**	0.51	0.60
Y9	-0.49	0.57	-0.53	0.31	0.62	0.38	-0.56	0.10	-0.53	-0.47
Y10	-0.51	0.71*	-0.14	-0.63	-0.003	-0.58	0.26	0.95**	0.38	0.50

注: X_1 : 酸杆菌门; X_2 : 绿弯菌门; X_3 : 蓝藻门; X_4 : 厚壁菌门; X_5 : 芽单胞菌门; X_6 : 变形细菌门; X_7 : 子囊菌门; X_8 : 疣菌门; X_9 : 担子菌门; X_{10} : 接合菌门。Y₁: 种植年限; Y₂: 全盐含量; Y₃: 有机质; Y₄: 全氮含量; Y₅: 全钾含量; Y₆: 全磷含量; Y₇: 有效磷; Y₈: 速效钾; Y₉: 碱解氮; Y₁₀: 第三期枸杞鲜果百粒重。**表示差异极显著 ($p < 0.01$), *表示差异显著 ($p < 0.05$)

Note: X_1 : Acidobacteria; X_2 : Chloroflexi; X_3 : Cyanobacteria; X_4 : Firmicutes; X_5 : Gemmatimonadetes; X_6 : Proteobacteria; X_7 : Ascomycota; X_8 : Verrucomicrobia; X_9 : Basidiomycota; X_{10} : Zygomycota; Y₁: Cultivation history; Y₂: Total salt content; Y₃: SOM; Y₄: Total N; Y₅: Total K; Y₆: Total P; Y₇: Available P; Y₈: Readily available K; Y₉: Alkalyzable N; Y₁₀: Hundred-grain weight of the third-time harvest. **Correlation is significant at the 0.01 level, *Correlation is significant at the 0.05 level

素有关。分析还表明枸杞根际土壤中有机碳、氮、磷及钾的含量(表1)远高于枸杞所需。有机碳、氮、磷及钾不仅满足枸杞生长,同时对其根际微生物生态环境产生作用。例如在细菌多样性的分析中发现,枸杞根际富集着大量变形细菌。目前已在拟南芥^[18]和玉米^[19]根际中发现变形细菌的富集分布,表明变性细菌具备适应多种植物根际微环境的特征。而枸杞根际土壤中丰富的有机碳则为这种能够利用可降解碳源且生长迅速的细菌提供了充足的能量物质。

磷是植物所必须的大量营养元素之一。我国土壤普遍缺磷,土壤中大约95%以上磷元素不能被植物直接利用,这主要是因为施入的磷肥常与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Al^{3+} 结合而失去有效性^[20]。目前的研究发现,土壤中存在大量解磷微生物能够辅助植物吸收磷元素^[20]。例如Rodríguez和Fraga^[21]发现假单胞杆菌、芽孢杆菌和根瘤菌的许多菌株均具有强大的解磷功能。尹瑞玲^[22]从土壤中分离出的巨大芽孢杆菌、节细菌、黄杆菌、欧文氏菌及假单胞菌均具有较强的溶磷能力。测序结果表明,枸杞根际土壤中的解磷菌主要为黄杆菌属、根霉属、链

霉菌属、芽孢杆菌属、节杆菌属以及AMF菌根真菌球囊霉属和Rhizophagus。其中,种植5 a枸杞根际中参与解磷的微生物主要为黄杆菌属、根霉属和链霉菌属,10 a为芽孢杆菌属和链霉菌属,而15 a则为节杆菌属、黄杆菌属、镰刀菌属和芽孢杆菌属。有研究表明,与气象因子相比,土壤因子中的全磷含量是影响枸杞多糖含量的最主要因子^[23]。枸杞多糖含量随果熟期土壤中全磷和有效磷含量的增加而递减^[23]。这不仅说明土壤全磷含量对枸杞药材品质的影响,也表明枸杞根际土壤中磷的代谢水平可能对枸杞果实的发育产生作用。相关性分析也发现,全磷及有效磷含量与酸杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、芽单胞菌门、子囊菌门、担子菌门和结合菌门的比例变化显著相关,表明土壤中磷含量升高能够对微生物群落结构产生较大影响。然而,全磷及有效磷含量变化与根际微生物群落组成以及枸杞果实发育间的关系仍有待进一步验证。

3.3 植物病原菌对枸杞长期种植响应

刘建利^[24]从枸杞茎、叶和果组织中共分离出青霉属、黑葱花霉属、链格孢属、镰孢霉属、曲霉属、茎点霉属以及根霉属共7个属真菌,其中链格

孢属为优势菌群。我们在枸杞根际土壤中也检测到了根霉属、茎点霉属和链格孢属（表3），表明这三类真菌在枸杞根、茎、叶和果实均有寄生。研究表明，链格孢属95%以上的种类兼性寄生于植物上，引起多种植物病害^[25]。测序结果发现，链格孢属真菌所占比例在不同种植年限枸杞根际中出现先降低后升高的现象，即10 a枸杞根际最低，5 a次之，15 a最高（表3）。另一种含多种致病真菌的茎点霉属在5 a枸杞根际土壤中的比例高达10.19%，在10 a和15 a中则分别降至0.90%和0.86%（表3）。而根霉属真菌则主要分布于5 a枸杞根际土壤中。

除这三个属外，在不同种植年限枸杞根际土壤中还检测到其他可能的植物病原菌。例如，种植5 a枸杞根际土壤中的枝孢属、小球腔菌属、根串珠霉属以及15 a枸杞根际的镰刀菌属和李维菌属（表3）。进一步分析发现，随种植时间延长，枸杞根际可能的致病菌丰度变化表现为抛物线式：5 a、10 a、15 a分别占15.25%、2.86%和4.67%。因此，从植物病原菌角度分析，种植10 a枸杞根际微生物的种群分布更加合理，可能更有利于枸杞的生长和发育，进而产出大果的时期更久（表2）。当种植年限逐渐增长，枸杞树木老化、抗逆性降低，加之根际病原菌比例增多，进一步对枸杞果实的生长发育产生影响（表2）。由于目前尚无有关枸杞根微生物病害的研究，且在采样过程中也未发现明显病变的根部样本，因此探索长期人工种植条件下枸杞根部病害及主要致病菌分布情况，对促进枸杞产业可持续发展至关重要。

3.4 菌根真菌多样性与枸杞耐逆性

土壤微生物除在生态系统中物质循环起重要作用外，在植物生长、耐逆性等方面也发挥着重要作用^[26]。土壤微生物和菌根真菌群落的变异影响着植物群落及整个陆地生态系统格局的变化。在对枸杞菌根真菌的研究中，Zhang等^[8]通过接种3株DSE真菌，发现接种后可改变枸杞幼苗根际土壤细菌数量、提高枸杞根际土壤细菌代谢活性、增强代谢、功能及遗传多样性，并能提高枸杞幼苗生物量。该研究中分离的3株DSE真菌一株属于茎点霉属，另外两株属于枝孢属。本研究发现，这两个属真菌群落在5 a枸杞根际土壤中分别占10.19%和0.14%，显著高于10 a（0.90%和0.05%）和15 a（0.05%和0.06%）枸杞。同时，具有提高

植物抗逆功能的丛枝菌根真菌（AMF）球囊霉属和Rhizophagus的比例不随种植年限增加而变化（表3）。这说明DSE真菌可能在枸杞生长的早期产生作用，而AMF不随枸杞种植年限发生变化。

4 结 论

长期人工种植宁夏枸杞导致根际土壤电导率、全盐含量及全磷含量增加，表明枸杞种植可以加重土壤盐碱化。测序结果表明，宁夏枸杞根际细菌群落 α 多样性不受种植时间影响，而真菌多样性在种植10 a时显著降低（与种植5 a枸杞相比）。对微生物群落结构分析发现，共有12个门、43个属的微生物丰度在不同种植年限枸杞根际土壤中发生显著改变。相关性分析表明，种植年限、全磷及有效磷含量等因素是影响枸杞根际土壤微生物群落结构变化的主要因子。

参 考 文 献

- [1] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, et al. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 2003, 54 (4): 655—670
- [2] Kuczynski J, Lauber C L, Walters W A. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13 (1): 47—58
- [3] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27 (16): 2194—2200
- [4] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, et al. PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 2010, 26 (2): 266—267
- [5] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7: 335—336
- [6] McDonald D, Price M N, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 2012, 6 (3): 610—618
- [7] 罗青, 李晓莺, 何军, 等. NutriSmart生态型肥料对枸杞产量与品质的影响. *北方园艺*, 2007 (9): 39—40
Luo Q, Li X Y, He J, et al. Preliminary study on effect of the eco-fertilizer NutriSmart on the yield and quality of *Lycium barbarum* L. (In Chinese). *Northern Horticulture*, 2007 (9): 39—40
- [8] Zhang H H, Tang M, Chen H, et al. Effects of a dark-

- septate endophytic isolate LBF-2 on the medicinal plant *Lycium barbarum* L. *Journal of Microbiology*, 2012, 50 (1): 91—96
- [9] Zhang H H, Tang M, Chen H, et al. Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes colonization status in medicinal plant *Lycium barbarum* L. in arid Northwestern China. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4 (18): 1914—1920
- [10] 戴万宏, 黄耀, 武丽, 等. 中国地带性土壤有机质含量与酸碱度的关系. *土壤学报*, 2009, 46 (5): 851—860
- Dai W H, Huang Y, Wu L, et al. Relationships between soil organic matter content (SOM) and pH in topsoil of zonal soils in China (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46 (5): 851—860
- [11] 李立平, 张佳宝, 朱安宁, 等. 土壤养分有效性测定及其方法. *土壤通报*, 2004, 35 (1): 84—90
- Li L P, Zhang J B, Zhu A N, et al. Soil nutrition availability and testing methods (In Chinese). *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35 (1): 84—90
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000: 212—279
- Bao S D. Soil and agrochemical analysis (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2000: 212—279
- [13] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27 (21): 2957—2963
- [14] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108: 4516—4522
- [15] Chaparro J M, Badri D V, Vivanco J M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal*, 2014, 8 (4): 790—803
- [16] 周兴旺, 徐国钧, 王强. 地骨皮化学成分的研究. *中国中药杂志*, 1996, 21 (11): 675—676
- Zhou X W, Xu G J, Wang Q. Studies on the chemical constituents in roots of *Lycium chinense* Mill. (In Chinese). *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1996, 21 (11): 675—676
- [17] Lundberg D S, Lebeis S L, Paredes S H, et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 2012, 488 (7409): 86—90
- [18] Fierer N, Bradford M A, Jackson R B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88 (6): 1354—1364
- [19] Peiffer J A, Spor A, Koren O, et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (16): 6548—6553
- [20] 金术超, 杜春梅, 平文祥, 等. 解磷微生物的研究进展. *微生物学报*, 2006, 26 (2): 73—78
- Jin S C, Du C M, Ping W X, et al. Advance in phosphorus dissolving microbes (In Chinese). *Journal of Microbiology*, 2006, 26 (2): 73—78
- [21] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 1999, 17 (4): 319—339
- [22] 尹瑞玲. 我国旱地土壤的溶磷微生物. *土壤*, 1988, 20 (5): 243—246
- Yin R L. The phosphate-solubilizing microorganisms in arid soil of China (In Chinese). *Soils*, 1988, 20 (5): 243—246
- [23] 张晓煜, 刘静, 袁海燕, 等. 枸杞多糖与土壤养分、气象条件的量化关系研究. *干旱地区农业研究*, 2003, 21 (3): 43—47
- Zhang X Y, Liu J, Yuan H Y, et al. A study on quantified relationship between the polysaccharides content of *Lycium barbarum* L. and soil nutrient and meteorological condition (In Chinese). *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2003, 21 (3): 43—47
- [24] 刘建利. 宁夏枸杞内生真菌的分离及抗氧化活性的测定. *时珍国医国药*, 2011, 22 (4): 857—860
- Liu J L. Isolation and determination of antioxidant activity of endophytic fungi from *Lycium barbarum* L. (In Chinese). *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2011, 22 (4): 857—860
- [25] 高芬, 吴元华. 链格孢属 (*Alternaria*) 真菌病害的生物防治研究进展. *植物保护*, 2008, 34 (3): 1—6
- Gao F, Wu Y H. Progresses in the biocontrol of plant diseases caused by *Alternaria* (In Chinese). *Plant Protection*, 2008, 34 (3): 1—6
- [26] Martínez-García L B, Armas C, Miranda J D, et al. Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43 (3): 682—689

Microbial biodiversity in rhizosphere of *Lycium bararum* L. relative to cultivation history

NA Xiaofan^{1, 2} ZHENG Guoqi^{1, 2} PENG Li^{1, 2†} LEI Chuanyi¹ YANG Hongyan¹

MA Yu¹ ZHAO Qiang¹ SHI Shuofan¹

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

(2 Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Yinchuan 750021, China)

Abstract The rhizosphere is a critical interface where exchange of substance takes place between plants roots and their surrounding soil. In the rhizosphere, interactions between the plant and soil microbes, though affected by a series of factors, such as physic-chemical properties of the rhizospheric soil, genotype of their host plant, can be beneficial to growth of the plant, the microbes or both. However, it is still not very clear how long-term cultivation of *Lycium bararum* L. would affect soil microbial community structure in the rhizosphere of the plant. Therefore, rhizospheric soil samples were collected from *Lycium bararum* L. fields different in cultivation history (5 a, 10 a and 15 a) in a farm of Nanliang, Ningxia, China, for analysis of physic-chemical properties, such as pH, electrical conductivity, SOM, total salt, total and readily available N, P and K, etc. Results showed that pH remained unchanged in all the fields, while total salt content, total and readily available phosphorus and electrical conductivity in the soil increased significantly with the age of cultivation. Total genomic DNA was isolated from the rhizosphere soil using a Power Soil DNA Isolation Kit for sequence analysis of V4 sections of 16S rDNA as indicator of bacterial diversity and ITS2 sections of 18S rDNA gene as indicator of fungal diversity, with the aid of the Illumina MiSeq system. Results of the sequencing were assembled and clustered with the FLASH, QIIME, and UPARSE pipeline software packages. In the end, it was found that the α diversity of the rhizosphere bacteria community did not vary much between the fields different in cultivation history, but fungal diversity did, and decreased with the cultivation going on from 5 a to 10 a ($p < 0.05$). For analysis of changes in microbial community structure at the phyla and genus levels, the software of RDA Classifier to denote each OUT by species. It was found that *Proteobacteria* (22.2%), *Crenarchaeota* (15.1%), *Bacteroidetes* (13.9%), *Acidobacteria* (12.4%), *Chloroflexi* (10.3%), *Gemmatimonadetes* (4.8%), *Actinobacteria* (4.7%), *Planctomycetes* (4.0%) and *Verrucomicrobia* (2.0%) were the dominate bacterial groups and *Ascomycota* (29.5%) and *Basidiomycota* (11.7%) were the dominant fungal group in the rhizosphere of the plant. However, about 55.8% of the fungi found in the rhizosphere were still unknown in the taxonomy. Besides, the sequencing further demonstrated that soil microbial community structure in the rhizosphere varied sharply between the fields different in cultivation history and stood out uniquely in each field from the others. The variation between fields different in cultivation history was particularly significant in terms of the ratio of *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fimicutes*, *Chloroflexi*, *Crenarchaeota*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Zygomycota* in the rhizospheric microbial community ($p < 0.05$). The proportion of unknown fungal groups in taxonomy was much higher in the 10 a (76.6%) and 15 a (61.4%) *Lycium bararum* L. fields than in the 5 a (32.5%) fields ($p < 0.05$). The analysis at the genera level also shows that the ratios of 27 genera of bacteria and 16 genera of fungi changed with the cultivation going on ($p < 0.05$). In order to further analyze relationships

of soil community, with soil physic-chemical properties, hundred-grain weight and cultivation history, SPSS 16.0 software was used to work out pearson' s correlation coefficients between the data, which show that cultural history is significantly related to richness of *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Basidiomycota* and *Zygomycota* ($p < 0.05$), content of total phosphorus in the rhizosphere soil is to richness of *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* ($p < 0.05$) and content of readily available phosphorus is to richness of *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Ascomycot*, *Basidiomycota* and *Zygomycota* ($p < 0.05$). The findings further demonstrated that the three factors, cultural year, total phosphorus and readily available phosphorus, are the key factors affecting soil microbial composition in the rhizosphere of *Lycium bararum* L. To sum up, cultivation history affects soil microbial community structure more than soil microbial diversity in the rhizosphere soil of *Lycium bararum* L., which may be related to soil phosphorus metabolism in the rhizosphere.

Key words *Lycium bararum* L.; Microbial diversity; Rhizosphere soil

(责任编辑：卢 萍)