植物营养与肥料学报 2015,21(4):1022-1031 doi: 10.11674/zwyf.2015.0422
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer http://www.plantnutrifert.org

大豆连作土壤线虫群落结构的影响

王进闯[1,2], 王敬国[1*]
(1 中国农业大学资源与环境学院,农业部植物营养学重点实验室,北京 100193;
2 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所,海南海口 571101)

摘要:【目的】由根系活动引起的根际微生态系统的改变,特别是病原生物数量的增加是导致作物产生连作障碍的主要因素。其中,植生性病原线虫的危害是大豆连作障碍产生的重要原因之一。由于植生性病原线虫的存在往往受到其它营养类型线虫的影响,因而从线虫群落结构进行分析,不仅可以更好地反映不同营养类型的线虫之间的相互关系,而且能全面了解土壤的健康状况。本文利用末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)和实时荧光定量 PCR(qPCR)等分子生物学的方法,比较短期连作和长期连作线虫群落的差异,揭示长期连作大豆土壤线虫群落的变化规律,理解线虫群落与植物健康的关系,阐明线虫群落的变化在大豆连作障碍中的作用。**【方法】**首先,基于 16srDNA 的 T-RFLP 指纹图谱,分析土壤中线虫的物种丰富度和不同大小的末端限制性片段(T-RF)的相对丰度。然后,通过构建克隆文库和系统发育树,鉴定 T-RF 片段对应的线虫种类。最后,利用 qPCR,采用绝对定量的方法确定线虫群落的大小。**【结果】**线虫的物种丰富度随着连作年限的增加呈逐渐降低的趋势。第 1 年物种丰富度最高,第 3 年的丰富度显著低于第 1 年,之后逐渐降低,9 年之后保持不变。大豆根际土中共检测到 16 个 T-RF,且大多数 T-RF 能从克隆文库中鉴定。其中,食细菌线虫(*Acrobeloides*)是最为丰富的线虫种类。在连作 2～3 年后,植物寄生线虫相对丰度增加,而在连作后期,植物寄生线虫相对丰度减少。非度量多维尺度分析(NMDS)示,第 1 年线虫群落与其余年限分开,而第 2 和第 3 年聚集较近,而连作 9、11 和 13 年后聚集较近。另外,线虫群落结构与 pH、土壤有机质(SOM)、速效磷(AP)、细菌数量和真菌数量相关。线虫群落总丰度呈先增后降的趋势,最高值出现在第 6 年。线虫的基因拷贝数与土壤 NH_4^+ 和染料木因浓度呈显著正相关,而与 NO_3^- 和细菌的基因拷贝数呈显著负相关。**【结论】**大豆根际土壤中,线虫群落丰度在连作第 2～3 年下降最为明显,到第 6～9 年有一定的恢复,但不能完全修复。大豆种植为第一,基线虫属(556 bp)丰度最高。土壤功能正常,连作第 2～3 年后,摄食性线虫(555 bp、558 bp、560 bp 等)丰度增加,线虫浸染机会增加。

关键词: 连作; 大豆; 线虫群落; T-RFLP; 定量 PCR
中图分类号: S344.4; S432.4+5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2015)04-1022-10

Effects of continuous soybean monoculture on soil nematode community

WANG Jin-chuang[1,2], WANG Jing-guo[1*]
(*1 College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University/MOA Key Laboratory of Plant Nutrition, Beijing 100193, China; 2 Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, Hainan 571101, China*)

Abstract:【Objectives】Soybean yield decrease and soil sinckness in the northeast China have been attributed to continuous monoculture. Continuous soybean monoculture may provide preferential food resources for specific plant-parasitic nematodes namely cyst nematode (*Heterodera glycines*), resulting in the increase in competitive advantage of disease-causing plant-parasitic nematodes over beneficial free-living forms, with resulting economic losses. Thus, understanding dynamics of nematode communities in continuous monoculture is an important aspect of soil sickness of soybean. We used terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and Quantitative PCR (qPCR) assays to estimate soil nematode community in soils taken from a long-term field experiment with

收稿日期: 2014-03-17 **接受日期:** 2014-05-27 **网络出版日期:** 2015-05-06
基金项目: 国家自然科学基金(40871121)资助。
作者简介: 王进闯(1976—),男,河北邯郸人,博士,主要从事微生物生态学研究。E-mail:jinchuangwang@yahoo.com
* 通信作者 Tel: 010-62732198, E-mail: wangjg@cau.edu.cn

continuous soybean monoculture up to 13 years. The objective of this study was to investigate whether the dynamic processes in free-living nematodes and plant-parasitic nematodes with increasing durations of continuous soybean monoculture are linked to soil sickness.【**Methods**】T - RFLP assays were used to estimate structure of soil nematode community in rhizosphere soils. According to T - RFLP analysis, the species richness and relative abundances of different sizes of T - RF were determined. In order to assign phylogenetic affiliation to specific T - RF, a clone library was constructed using the pMD 19 - T Vector. Phylogenetic tree was constructed using the MEGA software with the Kimura two-parameter method for distance matrix calculations and the neighbor-joining method for the tree design. Finally, quantitative PCR was used to assess nematode community sizes in rhizosphere soils.【**Results**】The species richness of nematode communities is decreased rapidly to the lowest value in the ninth year and then remains a constant from the ninth year to the thirteenth year. The T - RFLP analysis of nematode gene shows that the nematode communities in soybean rhizosphere soil of the northeast China are dominated by *Acrobeloides*. The relative abundances of plant-parasitic nematode in the second year and third year of monoculture are higher than those from the sixth year to 13th year. The free-living nematodes are more abundance in the first year and less abundance in the second year and third year, and are more abundance from the sixth year onwards. No omnivores-predators are identified. The nonmetric multi-dimensional scaling (NMDS) indicates that the nematode communities in rhizosphere soil collected from the 9th, 11th, and 13th years closely cluster together, outside of the first three years. This result suggests that the differences of nematode communities measured by pairwise Bray-Curtis dissimilarities have less change in the first three years. However, the nematode communities are highly differed between subsequent years and initial years. Furthermore, the nematode community composition is affected by available P, soil organic matter (SOM), pH, bacterial and fungal abundance. The abundance of nematode community is increased from the first year to sixth year, and then decreased from the nineth year to 13th year. In addition, the abundance of nematode community is positively correlated to NH_4^+ and genisten, and is negatively correlated to NO_3^- and bacterial abundance.【**Conclusions**】The species richness and relative abundance of nematode is decreased significantly in the second and the third year of soybean monoculture, and revived form the 6th to the 9th year to some extent, but not completely. In the first year of soybean culture, the abundance of *Acrebeloides* is the highest, representing healthy and normal soil function. In the following 2 and 3 years, the abundance of plant-parasitic nematode is increased, indicating the high risk of disease infection. The lower ratio of free-living nematodes to plant-parasitic nematode in the second year and third year could respond to the potential severity of the disease.

Key words: continuous monoculture; soybean; nematode community; T - RFLP; qPCR

土壤健康是农产品产量和品质的重要保证,而土壤生物的群落结构决定了土壤的健康状况,土壤生物群落结构的变化可作为土壤变化的早期预警生态指标[1]。线虫群落包括不同营养类群:植物寄生线虫、食细菌线虫、食真菌线虫、捕食性和杂食性线虫,是土壤动物中数量最多、功能最丰富的一类[2]。线虫影响着土壤有机质分解和养分循环以及病害的发生,被认为是土壤健康状况的敏感性指示生物[3]。

研究认为,植物寄生线虫中孢囊线虫(Heterodera)属的大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines*)是引起大豆连作障碍的重要原因之一,与植物根系释放的化感物质对植物寄生线虫卵的孵化具有刺激作用有关[4-5]。短期连作(<5～6 年)可引起大豆胞囊线虫种群迅速增加,导致作物的发病率升高,使大豆减产[6]。然而,土壤生态系统具有一定的自我修复能力,长期连作的土壤中出现了抑制孢囊线虫的因素[7]。如随着大豆连作年限的增加(>5～6 年),大豆胞囊线虫种群密度减少[8]。虽然长期连作使非抑制线虫土壤转变成抑制线虫土壤的机理仍然不清楚,但普遍认为连作过程中环境变化可能起到驱动作用。连作在改变土壤条件的同时,也改变了土壤线虫的生存环境,导致线虫种群和群落结构的变化。如 Castro 等发现钾(K^+)、铵态氮(NH_4^+)和硝态氮(NO_3^-)等无机离子能抑制南方根接线虫(*Meloidogyne incognita*)二龄虫的生长[9]。另

外,连作土壤引起的土壤微生物群落的变化也是关键的因素。与短期连作相比,长期连作导致微生物寄生到大豆胞囊线虫的数量更多[10]。在一些土壤中,食线虫菌物被毛孢(*Hirsutella spp.*)属的真菌寄生被认为是主要原因,这些真菌更多地寄生在二龄线虫上,抑制了土壤线虫病害的发生[11]。也有人认为,几种根瘤菌和未培养的变形细菌能抑制孢囊线虫[12]。近年的研究表明,健康土壤大豆根际微生物具有控制胞囊线虫数量的作用[10,13]。目前,关于长期连作影响线虫的研究,大多局限于对特定植物寄生线虫种群如大豆胞囊线虫的影响,而从线虫群落的角度去理解大豆连作的研究鲜见报道。在土壤生态系统中,单个生物群体的存在是多种生物之间和生物与非生物的环境因子之间相互作用的结果,因而利用群落结构作为指标比用单个属或科更全面、更可靠[14],因为这样能够更好地反映土壤生物间的相互关系,更全面地了解土壤健康状况。

通常研究土壤线虫群落结构的方法是形态分类,这需要具有分类经验的专业技术人员,而且在鉴定上费时费工,很难在短期内获得结果[15]。同时,鉴定的结果往往是在属、科和营养类群的水平,使生态分析往往比较模糊或表面化[16]。形态分类的另一个缺点是只能鉴定成虫标本,而成虫仅是全部线虫群落的很小的一部分[17],不能全面反映土壤的线虫状况。利用分子生物学方法的一个优点是不必分离和培养线虫,仅通过设计引物就可以鉴定一个土壤系统中的线虫群落。末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)已被证实是研究不同生境中线虫群落的有效方法[18-21]。

本文利用T-RFLP和qPCR技术,研究了长期大豆连作根际土壤中线虫群落的结构和丰度的变化,特别是比较短期连作和长期连作线虫群落的差异。另外,通过相关性分析,确定引起土壤线虫群落变化的主要驱动因子,有助于理解长期连作大豆土壤线虫群落的变化规律。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

供试土壤样品采自于黑龙江省农科院土肥所长期连作试验小区,该试验建于1996年,有1～13年的大豆连作小区。年平均降水550 mm,80%的降水集中于6～9月份,气温波动从-18℃(一月份)到23℃(六月份),年霜冻持续160天。

1.2 大豆品种

供试大豆材料为合丰25号。选用的品种适应性强,且茎秆坚韧、节间短小、结荚密实,因而它有适应性强、高产和早熟等优良特性。目前,合丰25号是黑龙江省主要的种植品种。2009年4月,开始种植大豆,播种密度为每平方米30颗种子,每个样地包括10行(长×宽为15 m×0.67 m),按当地推荐的施肥量施用底肥(N 50 kg/hm^2、P 45 kg/hm^{2}和K 50 kg/hm^2)。

1.3 土壤样品采集与制备

在试验田采用"Z"形设点,于2009年9月12日大豆成熟期取样,选取种植大豆1、2、3、6、9、11和13年的试验小区,收获30株大豆,连根拔起植株。用抖根法采集根际土,即抖动植株至土壤不再下落,粘在根系的即为根际土壤。土壤样品含水量为(16±3)%。根际土壤过2 mm筛,去除植物组织和土壤杂质。采集的样品放于冰盒中运回实验室,-20℃保存。

测定土壤样品中的总氮(N)、有机质(SOM)、铵态氮(NH_4^+)、硝态氮(NO_3^-)、交换性钾(EK)、有效磷(AP)和pH[22],类黄酮总量、大豆苷元和染料木素测定用超高效液相色谱(UPLC)[23-24],土壤理化性质及类黄酮总量、大豆苷元和染料木素含量见表1。

1.4 土壤总DNA的提取和PCR扩增

1.4.1 土壤总DNA的提取　本实验的土壤DNA提取采用FastDNA SPIN Kit for Soil试剂盒(Bio 101, Carlsbad, CA, USA)。提取出来的土壤基因组DNA在-20℃冰箱中保存、备用。DNA通过1%的琼脂糖凝胶电泳后,用DNA green染色,成像系统拍照。

1.4.2 PCR扩增和纯化　线虫扩增引物对为NEMF1(5′-CGC AAA TTACCC ACT CTC-3′)和S3(5′-AGT CAA ATT AAG CCG CAG-3′)[18]。进行T-RFLP分析时,引物NEMF1 5端用6-羧基荧光素(FAM)标记。

PCR反应体系(50 μL)含DNA模板1 μL, EasyTaq缓冲液5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)4 μL, NEMF1(10 mmol/L)0.6 μL, S3(10 mmol/L) 0.6 μL, Easy taq聚合酶(5 units/μL)(全氏金)0.6 μL, 双蒸水(ddH_2O)38.2 μL。

PCR扩增条件为94℃预变性5 min,35个循环:94℃变性1 min,53℃引物退火45 s,72℃延伸1 min。最后72℃末端延伸10 min。PCR产物3 μL用1%琼脂糖凝胶电泳检测,使用凝胶回收型试剂

盒(天根生化科技(北京)有限公司)对 PCR 产物纯化, -20℃保存。

1.5　T-RFLP 分析

在 3 μL PCR 产物中,加入 0.6 μL *Taq* Ⅰ限制性内切酶(Takara),2 μL 缓冲液,最后用 ddH_2O 补足到反应总体积 10 μL。65℃,遮光酶切 3 h。酶切产物用乙醇沉淀法纯化,纯化产物用锡箔纸包裹,在 -20℃下保存。在 1 μL 酶切纯化产物中加入 8.8 μL 甲酰胺,0.2 μL Rox 1000 内标(Bioventures Int., 美国),共 10 μL 混合液,然后加到 96 孔板,要避免产生气泡,否则可能损坏遗传分析仪。在 95℃变性 3 min,然后迅速移到冰上冷却 3 min。在 ABI 3130 自动测序仪上检测时,电压为 2500 V,电流 40 Ma,功率 27 W。末端带荧光标记的片段能被自动检测到,而其它没有带荧光标记的片断检测不到。用 Peak Scanner Software v1.0 分析 T-RFLP 图谱,然后将末端限制性片段(T-RF) > 50 bp 的峰高计算不同片段的相对丰度。

表 1　大豆连作根际土壤性质、类黄酮、大豆苷元和染料木素含量

Table 1　Soil properties and concentrations of isoflavones, daidzein and genistein in the rhizosphere soil over years of mono-cropping

连作年限 Cropping years	铵态氮 NH_4^+-N (μg/g)	硝态氮 NO_3^--N (μg/g)	有机质 Organic matter (g/kg)	总氮 Total N (g/kg)	交换性钾 Exchangeable K (mg/kg)
1	7.7 ± 3.0 c	39.8 ± 6.6 a	27.5 ± 1.4 bc	1.4 ± 0.01 a	165.3 ± 4.0 b
2	10.3 ± 0.5 bc	14.5 ± 1.6 b	25.0 ± 0.6 d	1.3 ± 0.02 b	181.7 ± 6.9 a
3	9.1 ± 1.5 bc	13.0 ± 1.2 b	25.8 ± 1.3 cd	1.2 ± 0.01 c	167.3 ± 5.9 b
6	13.7 ± 1.0 ab	6.5 ± 0.5 c	29.2 ± 0.4 ab	1.4 ± 0.08 a	187.7 ± 16.8 a
9	17.9 ± 1.0 a	13.8 ± 1.4 b	28.4 ± 1.2 b	1.3 ± 0.09 b	173.8 ± 18.3 ab
11	14.7 ± 1.1 bc	14.4 ± 0.3 b	30.3 ± 0.5 a	1.4 ± 0.04 a	156.1 ± 4.1 c
13	6.7 ± 0.7 c	15.8 ± 1.4 b	29.0 ± 0.7 ab	1.4 ± 0.02 a	159..4 ± 5.2 bc

连作年限 Cropping years	可利用性磷 Available P (mg/kg)	pH	类黄酮 Isoflavones (μg/g)	大豆苷元 Daidzein (μg/g)	染料木因 Genistein (μg/g)
1	76.5 ± 12.2 ab	5.27 ± 0.06 bc	261.3 ± 24.2 b	0.41 ± 0.1 c	0.46 ± 0.1 d
2	88.7 ± 16.2 a	5.25 ± 0.11 c	193.8 ± 8.2 d	0.56 ± 0.1 b	0.41 ± 0.0 e
3	74.0 ± 11.5 ab	5.32 ± 0.10 bc	200.3 ± 19.3 c	0.28 ± 0.1 f	0.44 ± 0.1 d
6	59.2 ± 6.4 b	5.46 ± 0.08 ab	337.0 ± 4.8 a	0.69 ± 0.0 a	1.18 ± 0.1 a
9	62.0 ± 5.0 b	5.29 ± 0.06 bc	276.2 ± 39.2 b	0.39 ± 0.1 d	0.61 ± 0.0 c
11	76.6 ± 3.6 ab	5.54 ± 0.09 a	339.7 ± 18.7 a	0.43 ± 0.0 c	0.67 ± 0.2 b
13	59.5 ± 3.6 b	5.54 ± 0.17 a	281.5 ± 17.3 b	0.33 ± 0.0 e	0.62 ± 0.1 c

注(Note): 同列数据是平均值加标准误 Date are means ± SD ($n = 3$). 不同的字母表示在 $P < 0.05$ 水平上年份间存在显著差异 Different letters mean significant difference among different years at $P < 0.05$ level. 数据来源于 Guo 等[22] 和 Wang 等[23] Data are adapted from Guo *et al.*[22] and Wang *et al.*[23].

1.6　克隆及测序分析

用与 T-RFLP 序列相同但不带荧光标记的引物进行 PCR 扩增,扩增条件也与 T-RFLP 的相同。以 PCR 产物进行切胶回收纯化。纯化产物采用 pMD 19-T Vector (Takara)试剂盒连接到载体上,转化感受态细胞(Takara),涂布到含有氨苄青霉素(Ampicillin)、X-Gal 和 IPTG 的 LB(Luria-Bertani)培养基上,37℃过夜培养,约 12h,形成单菌落。随机选取 170 个白色克隆子,采用菌体直接扩增,检测到的阳性克隆送往测序公司进行测序,测序引物为 M13-47。先用 Clustal X 软件对所得序列去除载体序列[25],然后利用 RDP Ⅱ在线数据库(http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/cgis/chimera.cgi? su = SSU)去除 PCR 扩增过程中产生的嵌合体。然后用 Clustal X 和 Mega5.0 软件分析比对,采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。

1.7 实时荧光定量 PCR

利用实时荧光定量 PCR,采用绝对定量的方法确定线虫群落的大小。用阳性克隆质粒绘制线虫基因的定量 PCR 标准曲线。引物为 NEMF1/NEM896r (5′-TCC AAG AAT TTC ACC TCT MAC G-3′)。实验采用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(ABI),在 7500 Real Time PCR system(ABI)仪器上进行。实时荧光定量 PCR 25 μL 反应体系为:12.5 μL SYBR Green;引物各 1 μL(10 μmol/L),5 μL ddH_2O,0.5 μL BSA(0.1%),模板 DNA 5 μL。反应程序为:50℃ 2 min,启动 dUTP 防止非特异性扩增;95℃ 10 min,激活热启动酶;然后 45 个循环的 PCR 反应:94℃变性 1 min,53℃引物退火 45 s,72℃延伸 1 min,72℃收集荧光信号,最后做溶解曲线。根据标准曲线,用 7500 system SDS Software(ABI)分析定量结果。

1.8 数据处理

利用 Mental test 确定环境因子对线虫群落的影响。布雷柯蒂斯(Bray-Curtis)距离用来进行非度量多维尺度分析(NMDS),分析群落的变化。Mental test 和 NMDS 均在 R 软件 vegan 软件包中进行。方差分析和相关性分析在 SPSS 17 软件中进行。

2 结果与分析

2.1 线虫群落结构

线虫的物种丰富度随着连作年限的增加呈逐渐降低的趋势。第 1 年物种丰富度最高,为 12,第 3 年的丰富度显著低于第 1 年($P<0.05$),之后逐渐降低,连作 9 年后达到最小值,为 5(图 1)。

T-RFLP 图谱显示,线虫群落结构在连作期间发生了变化(图 2)。大豆根际土中共检测到 16 个末端限制性片段(T-RF),包括:62 bp、73bp、74 bp、75 bp、416 bp、418 bp、522 bp、549 bp、553 bp、555 bp、556 bp、557 bp、558 bp、559 bp、560 bp、562 bp。其中 74 bp、75 bp、555 bp、556 bp、557 bp、558 bp、559 bp、560 bp、562 bp 为主要片断,其余片断相对丰度均小于 5%,且加和小于 11%(图 2)。线虫群落在不同连作年限中相对丰度最高的 T-RF 均为 556 bp,且随连作年限增加呈波动性变化。T-RF 556 bp 第 1 年的相对丰度为 86%,然后分别下降到第 2 年和第 3 年的 49% 和 41%,在第 6、9、11、13 年,T-RF 556 相对丰度又分别增加到 61%、90%、75% 和 78%。T-RF 555 在第 1 年没有检测到,但在第 2 年和第 3 年的相对丰度分别高达 15% 和 19%,然后下降到第 6 年的 7% 和第 9 年的 2%,后两年维持在 6% 和 5%。T-RF 557 第 1 年的相对丰度为 3%,在第 2 和第 3 年分别增加到 7% 和 11%,之后,维持在 3%~4%。T-RF 74 从第 1 年的 0.6% 分别增加到第 2、3 和 6 年的 2%、8% 和 12%,然后分别降到第 9、11 和 13 年的 1%、8% 和 10%。T-RF 562 和 558 只有前两年能检测到,并且第 2 年的相对丰度都比第 1 年的高。T-RF 559 先从第 1 年的 2% 增加到第 2 年的 5% 和第 3 年的 9%,然后在第 6 年下降到 3%,之后没有检测出。T-RF 560 从第 1 年的 2% 增加到第 2 年的 8%,在从第 6 年到第 13 年期间只有第 11 年检测到 3% 的相对丰度(图 2)。

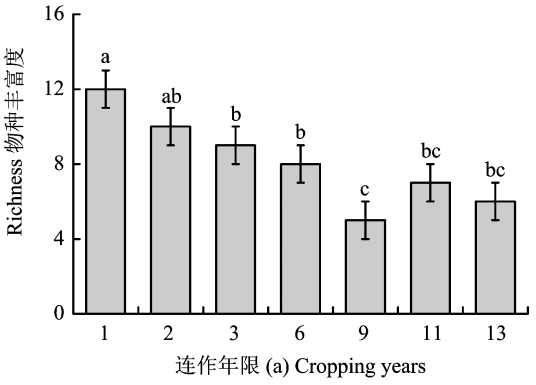

图 1 长期连作大豆根际土壤线虫群落的物种丰富度变化

Fig. 1 Changes of species richness of nematode communities in long-term continuous soybean monoculture

[注(Note):数据是平均值加标准误 Date are means ± SD ($n=3$). 方柱上不同字母表示在 $P<0.05$ 水平存在显著差异 Different letters above bars are significantly different at $P<0.05$ level (according to Duncan's new multiple range tests).]

2.2 线虫群落组成与环境的关系

T-RFLP 分析中的大多 T-RF 能从克隆文库中鉴定(图 3)。在大豆根际土中,线虫群落由茎线虫属(*Ditylenchus* 对应 416 bp 和 556 bp)、真滑刃属(*Aphelenchus* 对应 553 bp)、拟丽突属(*Acrobeloides* 对应 62 bp、74 bp、556 bp 和 557 bp)、针属(*Paratylenchus* 对应 418 bp、549 bp、555 bp 和 558 bp)、盘旋属(*Rotylenchus* 对应 562 bp)、孢囊属(*Heterodera* 对应 559 bp 和 560 bp)、中小杆属(*Mesorhabditis* 对应 73 bp、75 bp 和 522 bp)组成。线虫群落主要分成植食性线虫、食细菌线虫和食真菌线虫,没有检测到杂食性线虫(图 3)。

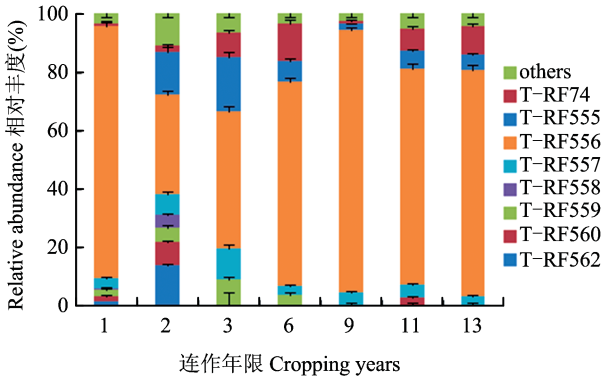

图 2　长期大豆连作线虫群落的结构和组成（基于线虫基因的 T－RFLP 分析）

Fig. 2　Compositions and structures of nematode communities in the long-term continuous soybean monoculture as determined by the T－RFLP analysis

NMDS 分析显示，第 1 年线虫群落与其余年限分开，而第 2 和第 3 年聚集较近，后面第 9、11 和 13 年聚集较近（图 4）。说明短期连作导致了群落的明显变化，随着连作年限的增加，线虫群落进一步分化，暗示了连作时间对线虫群落结构并没有恢复。Mantel test 分析显示环境与线虫群落之间存在显著的关系（相关系数 $r = 0.368$，$P < 0.001$），暗示了环境条件对于群落的变化起到了部分的作用。线虫群落结构与 pH、土壤有机质（SOM）、速效磷（AP）、细菌数量和真菌数量相关（图 4）。

2.3　定量分析

随着连作年限的增加，线虫丰度逐渐增加，在第 6 年达到最高值，然后又开始下降（图 5）。线虫的基因拷贝数与土壤 NH_4^+ 和染料木因（genistein）浓度呈显著正相关，而与 NO_3^- 和细菌的基因拷贝数呈显著负相关（图 6）。

3　讨论

在长期连作情况下，会出现由致病土壤向抑病土壤的转化。例如，许多地方的研究表明持续连作使土壤出现自然抑制病原线虫的现象[5]。欧洲的

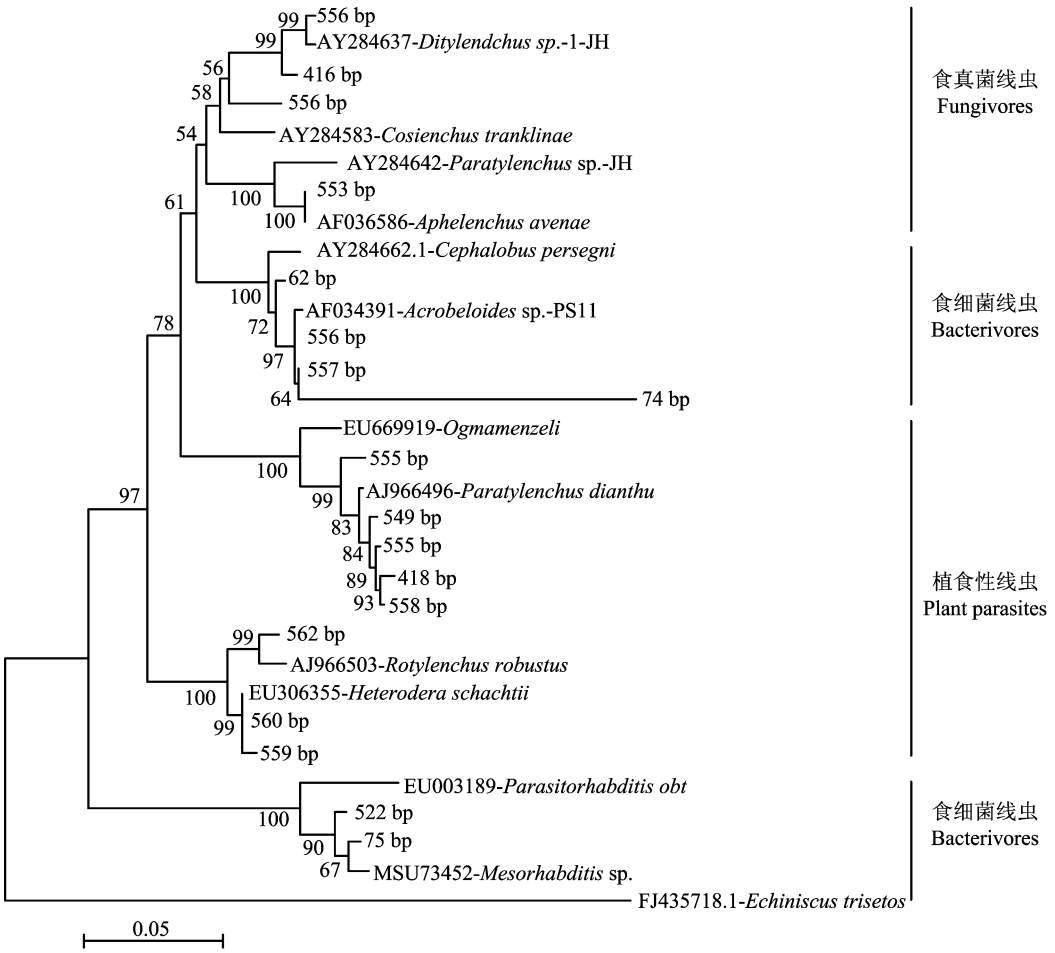

图 3　线虫克隆文库系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic relationship of representative nematode clone sequences

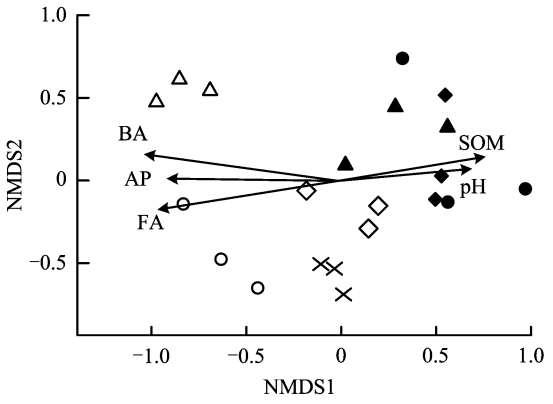

图4 NMDS分析长期大豆连作的线虫群落结构与环境的关系

Fig. 4 Nonmetric multi-dimensional scaling (NMDS) plots showing similarity between nematode community structures from the continuous soybean monoculture system

[注(Note): BA—细菌丰度;FA—真菌丰度;AP—速效磷;SOM—土壤有机质.]

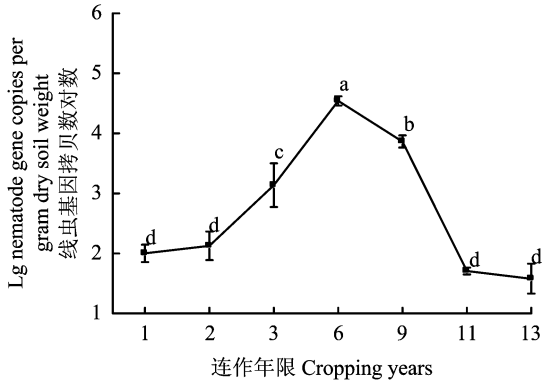

图5 长期大豆连作线虫的基因拷贝数变化

Fig. 5 Gene copies of soil nematode in the long-term continuous soybean monoculture

[注(Note): 数据是平均值加标准误 Date are means ± SD ($n = 3$). 不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平年份间存在显著差异 Different letters mean significant difference among different years at $P < 0.05$ level (according to Duncan's new multiple range tests).]

荞麦连作减少了胞囊线虫(*Heterodera avenae*)种群的密度[26]。在我国东北地区,大豆连作前5年,胞囊线虫数量每250 g土增加到351个,之后开始下降,并在连作14年后降到260个[6]。

本研究结果表明,不同连作年限大豆土壤线虫种类数量和群落结构都发生了不同程度的变化。在种植大豆第1年,556 bp为优势营养类群,其对应着自由生活线虫类群(图2和3)。说明了在大豆第1年自由生活线虫参与的土壤功能能够正常发挥,促进有机质分解和养分周转速率,有利于增加养分的释放并提高植物对土壤养分的利用[27]。在连作2年后,556 bp相对丰度减少,555 bp、558 bp、559 bp、560 bp和562 bp的相对丰度增加,这些T-RF片段对应着孢囊线虫(*Heterodera*)、盘旋线虫(*Rotylenchus*)和针属线虫(*Paratylenchus*)等植食性线虫(图3),说明在2年连作后,植食性线虫增加,大豆易于受到线虫的危害。而且在大豆自毒作用等其他因素的影响下,连作大豆会出现发育不良,致使线虫侵染机会增加[28]。寄生线虫对植株同化物、氮素和其它养分的大量消耗,使植物根系受到伤害,生长受阻[28]。此外,大豆幼苗的生长不良更容易引起病原微生物的侵染及植食线虫的侵染[28]。值得注意的是,第3年连作后,线虫的物种丰富度减少,560 bp和562 bp对应的植食性线虫没有检测到,而555 bp和559 bp对应的植食性线虫相对丰度增加,植食性线虫仍然保持着高的相对丰度。可能说明线虫群落内存在种间竞争,而且不同生物间的相互作用,使得一些物种数量降低或者在微生物的作用下减少了线虫的种类[29]。大豆短期连作减少了土壤食物网中捕食微生物线虫的数量,引起了根际土壤微生态系统破坏的这种现象,也发生在香蕉和苹果连作上[1,30]。然而,随着连作年限的增加,物种的丰富度进一步减少,556 bp对应的捕微生物线虫、557 bp和74 bp对应的拟丽突属(*Acrobeloides*)的食细菌线虫增加,而植食性线虫相对丰度减少(图1~图3)。说明在连作超过6年后,线虫以捕微生物线虫为主,可能使病害减轻,但是群落种类数量减少,线虫群落趋于简化。这可能主要是因为在连作6年后,有益微生物对包括植物寄生线虫在内的病原生物产生抑制作用,从而有利于植物根系和植株生长转好[31]。根系的良好发育,可能为细菌的生长创造了条件,一些机会主义的食细菌线虫(*Acrobeloides* 和 *Mesorhabditis*)数量增多,与植食性线虫竞争,减少了植食性线虫的数量[32]。

土壤线虫群落的变化并不是偶然的,其消长通常受土壤理化性质和微生物的影响[33]。本研究发现,线虫群落结构受有机质、有效磷和pH值的影响,而且细菌和真菌的数量也影响着线虫结构(图4)。土壤有机质是影响土壤线虫分布的重要因素[34]。土壤有机质为土壤微生物提供了能源,因此增加了微生物的活性和生物量。一些食细菌线虫的增加可能是由于微生物生物量增加引起[35]。另外,土壤pH降低通常减少了细菌生物量而有利于真菌

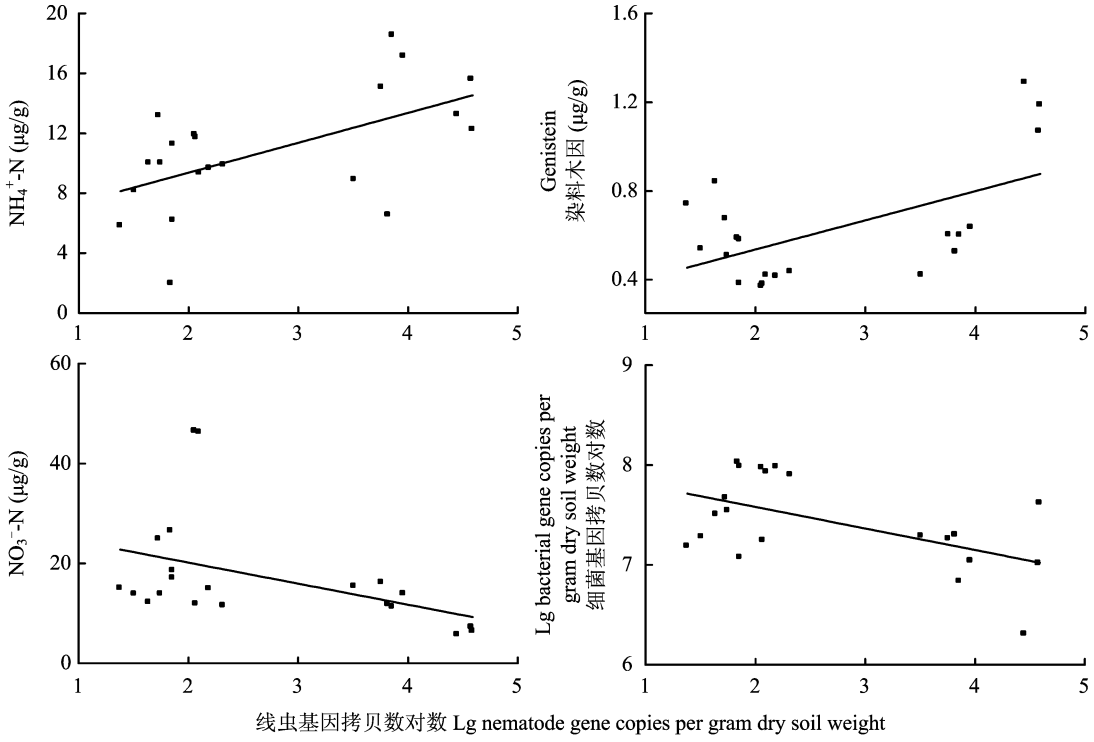

图 6　长期大豆连作土壤中线虫群落基因拷贝数和环境因子的关系

Fig. 6　Nematode community gene copies association with environmental factors in the long-term soybean monoculture

生物量,这样的变化能够反映在捕食微生物的线虫群落变化上[36-37]。番茄连作过程中,pH 值与垫刃科(*Tylenchidae*)线虫数量呈正相关,还有一些滑刃线虫(*Aphelenchoides* spp)对 pH 值具有较强的忍耐性[32],说明不同的线虫种类对 pH 值的响应存在差异,可能引起群落变化。土壤磷含量高能增加线虫的丰度,特别是食细菌线虫数量,改变了食真菌和食细菌线虫数量[37]。王邵军等[38]发现,柳杉根际的速效磷与垫刃线虫(*Tylenchusplatycephalus*)及居尾滑刃线虫(*Aphelenchoides composticola*)数量正相关,而与厄萨拉斯螺旋线虫(*Helicotvlenchus xallus*)和双宫螺旋线虫(*Helicotylenchus dihystera*)无关。这些结果说明连作引起的土壤性质的改变引起了土壤线虫群落的分化。另外,细菌和真菌是捕食微生物的食物来源,微生物的数量对线虫群落结构的调节也十分明显[33]。

随着连作年限的增加,线虫群落基因拷贝数逐渐增加,并在第 6 年达到最高值,然后逐渐减少(图 5)。第 2 ～3 年线虫数量的增加可能与植食性线虫的数量增加有关。陈宏宇发现,在连作 5 ～6 年内大豆胞囊线虫数量呈逐年增加的趋势[6]。我们的研究发现在第 6 年,细菌和真菌的数量都很少[39],但线虫群落基因拷贝数达到了最大值。这可能是由于食微生物线虫对土壤微生物量响应的滞后性引起。有研究发现,线虫数量往往是在土壤中细菌减少几个月后才减少[40]。在连作 9 ～13 年期间,线虫数量减少,一方面可能由于减少了植食性线虫数量[6],另一方面可能是细菌和真菌的数量处在一个较低的水平,不能提供充分的食物。

线虫丰度的变化与 NH_4^+、NO_3^-、根系分泌的染料木因和细菌丰度有关(图 6)。线虫丰度与 NH_4^+ 呈正相关。Sanchez-Moreno 等也发现,在不同的耕作模式下,中小杆线虫属(*Mesorhabditis*)和拟丽突属(*Acrobeloides*)与 NH_4^+ 呈正相关,可能增加了 N 的矿化[33]。细菌丰度和线虫丰度的负相关说明捕食压力可能影响着总的细菌群落。染料木因与线虫丰度呈正相关。陈宏宇发现,盆栽的敏感大豆品种增加了根际大豆胞囊线虫数量。这说明根际活动刺激了线虫的生长和繁殖[6]。因此,植物的生理状况对线虫的数量也产生影响。线虫丰度与 NO_3^- 呈负相关。已有研究表明,食真菌线虫滑刃线虫属(*Aphelenchoides*)与 NO_3^- 具有相关性,NO_3^- 能通过影响食真菌线虫数量影响线虫的总数量[33]。

本研究中并没有检测到捕食/杂食线虫(Omnivores-predators)。这可能是由于研究方法的差异。本研究主要研究根际土,而且 DNA 是从

0.5 g土壤中提取,不能全面地估计线虫分布。因此,为了更全面研究线虫群落结构,需要经典分类和分子技术相结合[42]或从更多质量的土壤中提取DNA,再用高通量的测序方法进行群落结构鉴定[43]。

4 结论

总之,大豆连作改变了线虫群落的结构和数量。在连作早期,植物寄生线虫增加,可能是导致短期连作大豆减产的重要原因,而在连作后期,植物寄生线虫减少,减轻了对大豆的危害,但由于种群趋向单一,产量不稳。线虫群落结构的变化主要受到土壤有机质、pH值、速效磷、细菌和真菌数量影响。随着连作年限增加,线虫基因拷贝数呈先增后降的趋势,最高值出现在第6年。线虫的丰度与 NH_4^+ 和染料木因呈正相关,与细菌的数量和 NO_3^- 呈负相关。本研究有利于深入理解大豆连作障碍和长期连作后形成植物寄生线虫的抑病土壤的机制。

参 考 文 献:

[1] 杨树泉,沈向,毛志泉,等. 环渤海湾苹果产区老果园与连作果园土壤线虫群落特征[J]. 生态学报, 2010, 30 (16): 4445-4451.
Yang S Q, Shen X, Mao Z Q *et al*. Characterization of nematode communities in the soil of long-standing versusreplanted apple orchards surrounding Bohai Gulf [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30 (16): 4445-4451.

[2] 邵元虎,傅声雷. 试论土壤线虫多样性在生态系中的作用[J]. 生物多样性, 2007, 15(2): 116-123.
Shao Y H, Fu S L. The diversity and functions of soil nematodes [J]. Biodiversity Science, 2007, 15(2): 116-123.

[3] Freckman D W. Bacterivorous nematodes and organic-matter decomposition [J]. Agriculture, Ecosystem and Environment, 1998, 24(1-3): 195-217.

[4] Maramune T, Anetai M, Takasugi M *et al*. Isolation of a natural hatching stimulus, glycinoeclepin[J]. Nature, 1982, 297: 495-496.

[5] Halbrendt J M. Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes[J]. Journal of Nematology, 1996, 28(1): 8-14.

[6] 陈宏宇. 不同品种和不同茬口大豆根面及根际的微生物群落结构分析[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2005.
Chen H Y. Microbial communities in the rhizoplane and rhizosphere as affected by soybean cultivar and cropping system [D]. Beijing: PhD Dissertation, China Agricultural University, 2005.

[7] Chen S, Dickson D W. Biological control of plantparasitic nematodes [J]. Manzanilla-Lopez R H, Marban-Mendoza N. Practical plant nematology [C]. Guadalajara, Jalisco, Mexico: Colegio de Postgraduados and Mundi-Prensa, Biblioteca Basica de Agricultura, 2012. 761-811

[8] Zhu Y B, Shi F Y, Tian J Q *et al*. Effect of soybean monoculture on the bacterial communities associated with cysts of *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 2013, 45(3): 228-235.

[9] Castro C E, Belser N O, Mckinney H E. Strong repellency of the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* by specific inorganic ions[J]. Journal of Chemical Ecology, 1990, 16 (4): 1199-1205.

[10] Sun M H, Liu X Z. Suppressive soils of soybean cyst nematode in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2000, 30: 353-356.

[11] Xiang M C, Xiang P A, Jiang X Z *et al*. Detection and quantification of the nematophagous fungus *Hirsutella minnesotensis* in soil with real-time PCR [J]. Applied Soil Ecology, 2010, 44: 170-175.

[12] Yin B, Valinsky L, Gao X B *et al*. Bacterial rRNA genes associated with soil suppressiveness against the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 1573-1580.

[13] Chen S Y. Suppression of *Heterodera glycines* in soils from fields with long-term soybean monoculture [J]. Biocontrol Science Technology, 2007, 17: 125-134.

[14] Neher D A, Campbell C L. Nematode communities and microbial biomass in soils with annual and perennial crops[J]. Applied Soil Ecology, 1994, 1: 17-28.

[15] Lawton J H, Bignell D E, Bolton B *et al*. Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest[J]. Nature, 1998, 391: 72-76.

[16] Yeates G W, Bongers T. Nematode diversity in agroecosystems [J]. Agriculture, Ecosystem and Environment, 1999, 74: 113-135.

[17] Griffiths B S, Bengough A G, Neilson R *et al*. The extent to which nematode communities are affected by soil factors - a pot experiment[J]. Nematology, 2002, 4: 943-952.

[18] Waite I S, O'Donnell A G, Harrison A *et al*. Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35: 1165-1173.

[19] Donn S, Griffiths B S, Neilson R *et al*. DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 38: 20-26.

[20] Edel-Hermann V, Gautheron N, Alabouvette C *et al*. Fingerprinting methods to approach multitrophic interactions among microflora and microfauna communities in soil [J]. Biology and Fertility Soils, 2008, 44: 975-984.

[21] Palomares-Rius J E, Castillo P, Montes-Borrego M *et al*. Nematode community populations in the rhizosphere of cultivated olive differs according to the plant genotype[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 45: 168-171.

[22] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
Lu R K. Analysis methods for soil chemistry of agriculture[M].

Beijing: China Agricultural Scientech Press, 2000.

[23] Guo Z, Kong C, Wang J *et al*. Rhizosphere isoflavones (daidzein and genistein) levels and their relation to the microbial community structure of mono-cropped soybean soil in field and controlled conditions[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43: 2257-2264.

[24] Wang J, Li X, Zhang J *et al*. Effect of root exudates on beneficial microorganisms-evidence from a continuous soybean monoculture[J]. Plant Ecology, 2012, 213: 1883-1892.

[25] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23: 2947-2948.

[26] Kerry B R, Crump D H. The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four soils under intensive cereal production [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1998. 21: 617-625.

[27] Ferris H. Form and function: Metabolic footprints of nematodes in the soil food web[J]. European Journal of Soil Biology, 2010, 46(2): 97-104.

[28] 阮维斌. 大豆连作障碍机理及其调控措施的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2000.
Ruan W B. The mechanism and regulation of soybean (*Glycine max* (L.)) replanting problem [D]. Beijing: PhD Dissertation, China Agricultural University, 2000.

[29] Latala P. Biological control of plant-parasitic nematodes [J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, Z4: 453-489.

[30] 钟爽, 何应对, 韩丽娜, 等. 连作年限对香蕉园土壤线虫群落结构及多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(5): 604-611.
Zhong S, He Y D, Han L N *et al*. Effect of continuous cropping of banana on soil nematod ecommunity structure and diversity [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture., 2012, 20(5): 604-611.

[31] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health [J]. Trends in Plant Science, 2012, 17: 478-496.

[32] Widmer T L, Mitkowski N A, Abawi G S. Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes[J]. Nematology, 2002, 34(4): 289-295.

[33] Sanchez-Moreno S, Minoshima H, Ferris H *et al*. Linking soil properties and nematode community composition: effects of soil management on soil food webs[J]. Journal of Nematology, 2006, 8(5): 703-715.

[34] Briar S S, Grewal P S, Somasekhar N *et al*. Soil nematode community, organic matter, microbial biomass and nitrogen dynamics in field plots transitioning from conventional to organic management[J]. Applied Soil Ecology, 2007, 37: 256-266.

[35] Ruess L, Funke W. Effects of experimental acidification on nematode populations in soil cultures[J]. Pedobiologia, 1992, 36: 231-239.

[36] de Goede R G M, Dekker H H. Effects of liming and fertilization on nematode communities in coniferous forest soils [J]. Pedobiologia, 1993, 37: 193-209.

[37] Chen X Y. Nematode response to nitrogen and phosphorus in grasslands, assessed by microscopy and molecular methods [D]. Ireland: PhD Dissertation, National University of Ireland - Galway, 2012.

[38] 王邵军, 蔡秋锦, 阮宏华. 不同生境柳杉根际线虫群落的生态特征[J]. 生态学杂志,2008, 27(4): 583-590.
Wang S J, Cai Q J, Ruan H H. Ecological characteristics of nematode communities in rhizophere soil at different habitats of *Cryptomeria fortune* [J]. Chinese Journal of Ecology, 2008, 27(4): 583-590.

[39] 王进闯. 大豆连作对根际土壤生物的影响[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2014.
Wang J C. The impact of continuous soybean monoculture on soil communities in the rhizosphere [D]. Beijing: PhD Dissertation, China Agricultural University, 2014.

[40] Papatheodorou E M, Argyropoulou M D, Stamou G P. The effects of large and small-scale differences in soil temperature and moisture on bacterial functional diversity and the community of bacterivorous nematodes[J]. Applied Soil Ecology, 2004, 25: 37-49..

[41] Wardle D A, Williamson W M, Yeates G W *et al*. Trickle-down effects of aboveground trophic cascades on the soil food web[J]. Oikos, 2005, 111: 348-358.

[42] Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*. EGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2731-2739.

[43] Floyd R, Abebe E, Papert A *et al*. Molecular barcodes for soil nematode identification[J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 839-850.