



茄子连作与轮作土壤养分、酶活性及微生物群落结构差异分析

李戌清^{1*}, 张雅^{1*}, 田忠玲², 吴根良¹

(1. 杭州市农业科学研究院, 杭州 310024; 2. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058)

摘要 研究茄子连作与轮作土壤养分、酶活性及微生物群落结构的变化,为阐明连作障碍和轮作减轻病害的机制提供理论依据。结果表明:与轮作相比,连作(茄子-茄子-茄子-茄子)土壤有效磷、钙、镁含量显著降低;多酚氧化酶、脲酶、碱性蛋白酶活性降低;细菌分类单元数量减少,真菌增多,两者的多样性指数降低,优势度指数升高。不同作物轮作方式间也存在差异,水旱轮作(茄子-水稻-水稻-茄子)与旱地轮作[茄子-四季豆(上半年)+长瓜(下半年)-四季豆(上半年)+长瓜(下半年)-茄子]相比,水旱轮作土壤酸碱度、总磷、有效磷、交换性钙、镁、锰含量显著增加,而盐度和有效硼含量显著降低;过氧化物酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶活性显著降低,而过氧化氢酶、脲酶、碱性蛋白酶活性显著升高;细菌分类单元数量增加,真菌减少,多样性指数升高,优势度指数降低。综上表明,轮作较连作更有利于保持或提高土壤肥力和土地生产力,尤其以水旱轮作较佳,是山地茄子栽培中值得推广的一种种植方式。

关键词 茄子; 连作; 轮作; 土壤养分; 酶活性; 微生物群落结构

中图分类号 S 436.41; S 314 **文献标志码** A

Difference analysis of soil nutrients, enzymatic activities and microbial community structure between eggplant continuous cropping and rotation. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2017, 43(5):561-569

LI Xuqing^{1*}, ZHANG Ya^{1*}, TIAN Zhongling², WU Genliang¹ (1. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Summary Eggplant (*Solanum melongena* L.) is one of nutritious vegetables welcomed by consumers. However, the diseases occurred on eggplants, particularly soil-borne diseases became increasingly severe, which hampered sustainable development of eggplant production. Based on our investigation, eggplant rotation is able to reduce the occurrence of diseases significantly, but its mechanism has not been explained clearly.

In this study, we collected soil samples from different fields cultivated by eggplant continuous cropping and rotation to analyze their nutrients, enzymatic activities and microbial community structure using high throughput sequencing technique.

The results showed that the contents of available P, Ca, Mg and Mn decreased significantly, and the activities of polyphenol oxidase (PPO), urease (UE), alkaline protease (ALPT) decreased; the number of bacterial operational taxonomic units (OTUs) reduced but fungal OTUs increased, and the bacterial and fungal diversity indexes decreased and the dominance index increased in fields with four-year continuous cropping (eggplant-eggplant-eggplant-eggplant, EEEE), as compared with different eggplant rotation fields. However, there were significant differences in the nutrients, enzymatic

基金项目:浙江省科技厅重点研发项目(2015C02023);浙江省育种团队项目(2016C02051-2-2);杭州市农业科学研究院重点推广项目(2016HNKT-08)。

*通信作者(Corresponding authors):李戌清(<http://orcid.org/0000-0001-7420-4709>), E-mail: xq_li@126.com; 张雅(<http://orcid.org/0000-0002-5121-4987>), E-mail: zhangya2636@163.com

收稿日期(Received):2017-02-22;接受日期(Accepted):2017-06-20

activities and microbial community structure from different soil samples between the four-year eggplant rotation fields [eggplant–rice–rice–eggplant, ERRE or eggplant–green bean (the early half of the year)+bottle gourd (the latter half of the year)–green bean (the early half of the year)+bottle gourd (the latter half of the year)–eggplant, EGBE] as well. Compared with the EGBE, the pH and the contents of total P, available P, exchangeable Ca, Mg and Mn increased significantly, but the salinity and available boron (B) reduced significantly; the activities of peroxidase, acid protease, neutral protease decreased significantly but the catalase, UE and ALPT increased significantly; the number of bacterial OTUs increased significantly but fungal OTUs decreased; the bacterial and fungal diversity indexes increased and the dominance indexes decreased in ERRE.

In sum, ERRE is a good and worthy way for rotation by comprehensively considering soil pH, salinity, nutrients, enzymatic activities and microbial community structure in this study. The above results lay a theoretical foundation for choosing suitable cultivation system of eggplants in mountain regions.

Key words eggplant; continuous cropping; rotation cropping; soil nutrient; enzymatic activity; microbial community structure

茄子(*Solanum melongena* L.)营养丰富,是广大消费者最喜爱食用的蔬菜品种之一。然而,随着茄子的产业化和规模化发展,病害发生亦日趋严重,其中土传性病害发生尤为普遍,在浙江的一般田块发病率为20%~40%,严重时达70%~80%,严重阻碍了当地茄子产业的可持续发展。我们在调查田间茄子病害时发现,茄子轮作田块病害发生率明显比连作田块低,但病害减轻的具体机制还不清晰。

一些研究表明,作物连作后,即使在正常的栽培管理条件下,也会出现长势变弱、病虫害严重、产量降低、品质下降的现象,即为连作障碍^[1-2]。目前,连作障碍已成为制约蔬菜生产可持续发展的重要因子之一。研究显示:在番茄连作土壤中,微生物多样性下降,有益菌数量显著降低,病原菌数量显著增加,病害频发^[3];且在设施栽培番茄土壤中,连作年限越长,pH值越低,细菌数量越少^[4]。相比较而言,合理轮作不仅有利于调节土壤肥力,改变土壤理化性状,提高作物的产量和品质,而且还能控制作物病害的发生^[5-6]。杨祥田等^[7]发现,经草莓–闷棚(即草莓采收后不揭棚膜,灌水,利用夏日高温进行高温闷棚)、草莓–水稻4年轮作(即草莓采收结束后,揭掉棚膜,翻耕,在田间直播水稻),土壤pH值升高,盐分积累减少,黄萎病发生率降低,草莓产量及效益明显提高。于高波等^[8]在东北实施小麦–黄瓜和毛苕子–黄瓜(当年秋季,黄瓜常规种植,轮作作物小麦和毛苕子条播于2垄搭架黄瓜垄台的外侧,上冻前结合秋翻将小麦和毛苕子翻入土壤中,第2年春季黄瓜常规种植)轮作时发现,相较于黄瓜连作,轮作使根际细菌种类显著增加,真菌群落明

显减少,土壤微生态环境显著改善,黄瓜产量明显提高。张黎杰等^[9]发现,相对于西瓜2年连作,西瓜–草菇–辣椒(在同一田块,3月至5月种植西瓜,7月至8月种植草菇,8月至12月种植辣椒)2年轮作更有利于防止土壤酸化和次生盐渍化,提高有机质含量,增加细菌和放线菌数量,降低有害病原真菌数量,从而显著提高经济效益。然而,不同方式的茄子轮作,尤其是水旱轮作对土壤养分、酶活性及微生物群落结构等影响的相关研究尚未见报道。

测定土壤养分含量可了解土壤中养分的分布情况,测定土壤酶活性可了解土壤中各营养物质的转化速度、土壤肥力及自净能力,分析微生物群落结构可了解土壤中细菌和真菌的构成比例以及微生物多样性和优势度状况。而不同的栽培制度会影响土壤的养分、酶活性及微生物群落结构变化,也会影响土壤中病原菌的存活。为此,本文通过测定茄子轮作与连作土壤养分、酶活性以及用微生物高通量测序技术(细菌16S区、真菌ITS区)分析土壤微生物群落结构,揭示不同栽培制度的土壤样品间存在的差异,为阐明连作障碍和轮作减轻病害的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

所采集的土壤样品分别来自浙江省杭州市临安区龙岗镇林坑村的连作和轮作田块。连作的栽培方式为:茄子–茄子–茄子–茄子(EEEE)连作,即连续4年种植“杭茄2010”品种(每年4月20日左右

定植茄苗至田间,7月15日左右剪枝,11月初采收结束,其余时间田闲置)。轮作的栽培方式如下。1)水旱轮作:茄子-水稻-水稻-茄子(ERRE)轮作,即第1年种植“杭茄2010”品种,第2年种植水稻(5月1日直播水稻于田间,11月水稻采收结束,其余时间田闲置),第3年种植水稻(同第2年),第4年种植“杭茄2010”品种;2)旱地轮作:茄子-四季豆(上半年)+长瓜(下半年)-四季豆(上半年)+长瓜(下半年)-茄子(EGBE)轮作,即第1年种植“杭茄2010”品种,第2年种植四季豆和长瓜(4月20日左右种植四季豆,夏季采收结束后种植长瓜,待长瓜采收结束后,其余时间田闲置),第3年种植四季豆和长瓜(同第2年),第4年种植“杭茄2010”品种。

1.2 土壤样品采集与处理

采用五点取样法采集土壤样品。每点采集0~20 cm耕作层土壤,挑去杂物,混匀,保留约2.5 kg土壤,置于样品采集袋中,并贴上标签。其中:每点取约2 kg土壤,自然风干,混匀,用于土壤养分、酶活性等常规测定;每点另取约20 g土壤,立即用液氮冷冻,用于细菌和真菌高通量测序。

1.3 样品测定

1.3.1 土壤养分和酶活性测定

土壤养分测定方法如下。土壤pH测定:称取10 g过1 mm筛孔的土样于25 mL烧杯中,加蒸馏水10 mL混匀,静置30 min,用IQ150 pH仪(IQ公司,美国)测定土壤浸出液的pH值。土壤盐度测定:称取20 g过2 mm筛孔的土样于250 mL干燥三角瓶中,加100 mL蒸馏水,振荡3 min,过滤至另一干燥的三角瓶中,得到清亮的土壤浸出液,用EL30k电导率仪(Mettler-Toledo公司,瑞士)测定土壤浸出液盐度。土壤总有机质测定:称取0.5 g过0.25 mm筛孔的土样于试管中,采用重铬酸钾氧化法^[10]测定。总氮测定:取充分混匀土样,按照四分法缩减至100 g,粉碎,过2 mm筛孔,用KJELTEC2300全自动定氮仪(FOSS公司,瑞典)测定。总磷测定:称取1 g过0.25 mm筛孔的土样于50 mL三角瓶中,采用浓硫酸-高氯酸消煮法、钼锑抗比色法测定^[11]。有效磷测定:称取2.5 g土样于干燥的150 mL具塞锥形瓶中,采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗分光光度法^[12]测定。全铁测定:取1 mL土样溶液置于50 mL干净容量瓶中,采用邻菲罗啉分光光度法^[13]测定。总钾、速效钾、钙、交换性钙、镁、硼、有效硼及锰测定:参照《土壤农化分析》中的方法^[14]测定。

酶活性测定方法如下。土壤过氧化氢酶活性测定:取0.1 g土样,采用高锰酸钾滴定法测定,以24 h后1 g土壤催化降解过氧化氢的μmol数表示^[15]。土壤过氧化物酶和多酚氧化酶活性测定:取0.05 g土样(多酚氧化酶活性测定时土样需过30~50目筛),采用邻苯三酚比色法测定,以24 h后1 g土壤中产生的紫色没食子素(pyrogallol)的mg数表示^[15]。土壤脲酶活性测定:取0.25 g土样,采用苯酚-次氯酸钠比色法测定,以24 h后1 g土壤中产生NH₃-N的μg数表示^[15]。土壤碱/酸/中性蛋白酶活性测定:取0.02 g土样,采用茚三酮比色法测定,以24 h后1 g土壤中产生的酪氨酸(tyrosine)的mg数表示^[15]。

实验数据用Excel 2007进行基本计算,用SPSS 16.0软件进行统计分析,差异显著性水平为P<0.05。

1.3.2 土壤真菌和细菌的高通量测序

土壤样品送至杭州谷禾信息技术有限公司进行细菌和真菌高通量测序。

土壤细菌的高通量测序:用强力土壤DNA提取试剂盒(PowerSoil DNA Isolation Kit, MO BIO公司,美国)提取土壤中的基因组DNA,进行PCR扩增,经电泳检测,磁珠回收,浓度检测,割胶纯化后,在MiSeq高通量测序仪(Illumina公司,美国)上进行双向测序,所得序列长度约为480 bp。其中PCR扩增所用引物为细菌V3-V4区通用引物对(正向引物:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3',反向引物:5'-GGACTTACHVGGGTWTCTAAT-3'^[16])。通过聚类分析形成细菌分类单元(operational taxonomic units, OTUs),用BLAST程序比对GenBank(<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)中的已知序列,再根据97%的相似性确定各16S rDNA序列所代表的细菌种类。

土壤真菌的高通量测序:PCR扩增所用引物为真菌ITS2区通用引物对(正向引物:5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3',反向引物:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'^[17]),所得序列长度约为380 bp。DNA提取、PCR扩增、上机测序、真菌分类单元(OTUs)的获得、ITS rDNA序列所代表真菌种类的确定方法等均与细菌的一致。

利用土壤细菌OTUs和16S rDNA序列数计算土壤细菌的种群结构特征值,利用真菌OTUs和ITS rDNA序列数计算土壤真菌的种群结构特征值,包括细菌和真菌的多样性指数和优势度指数^[18-19]。

某细菌丰富度=(某细菌16S rDNA序列数/细菌16S rDNA序列总数)×100%;某真菌丰富度=(某真菌ITS rDNA序列数/真菌ITS rDNA序列总数)×100%^[20-21]。

2 结果

2.1 土壤理化性质分析结果

在不同种植方式的土壤中,土壤pH、盐度、有机质和养分含量均有不同程度的变化(表1)。与茄子连作方式相比:ERRE水旱轮作能显著提高土壤pH,从pH 4.73提高到6.50,但EGBE旱地轮作土壤pH无显著提高;ERRE水旱轮作能显著降低土壤盐度,从259.17 mg/kg降低为164.87 mg/kg,但EGBE旱地轮作较EEE连作盐度略有升高,为280.77 mg/kg;ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作对土壤有机质、总氮(N)、总钾(K)、速效K、总铁(Fe)的影响均不明显;ERRE水旱轮作的总磷(P)含量较EEE连作有显著提高,从861.76 mg/kg提高到926.84 mg/kg,但

EGBE旱地轮作与EEE连作无明显差异;EEE连作、EGBE旱地轮作和ERRE水旱轮作的有效P含量分别为64.15、84.96和112.02 mg/kg,三者间差异显著;钙(Ca)含量在ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作中均有显著提高,从310.87 mg/kg分别提高到403.38和392.44 mg/kg,而交换性Ca在ERRE水旱轮作中的质量分数为162.80 mg/kg,显著高于EEE连作的143.70 mg/kg,而EGBE旱地轮作为145.92 mg/kg,与EEE连作无明显差异;EEE连作、EGBE旱地轮作和ERRE水旱轮作的镁(Mg)含量分别为748.97、906.04和1 022.35 mg/kg,三者间差异显著;ERRE水旱轮作的硼(B)含量显著高于EEE连作,从256.73 mg/kg提高到292.29 mg/kg,而EGBE旱地轮作为265.00 mg/kg,与EEE连作间差异不显著;EEE连作、EGBE旱地轮作和ERRE水旱轮作的有效B质量分数分别为0.90、0.97和0.82 mg/kg,三者间差异显著;锰(Mn)在ERRE水旱轮作中质量分数最高,为774.42 mg/kg,在EGBE旱地轮作中最低,为659.55 mg/kg,两者间差异显著。

表1 不同种植方式对土壤pH、有机质和无机养分等的影响

Table 1 Influence of different cropping patterns on soil pH, organic matter, inorganic nutrients

种植方式 Cropping patterns	pH	盐度 Salinity/(mg/kg)	有机质 TOM/(g/kg)	总N Total N/ (mg/kg)	总P Total P/ (mg/kg)	总K Total K/ (g/kg)	有效P Available P/(mg/kg)	速效K Available K/(mg/kg)
连作 Continuous cropping	EEE ERRE EGBE	4.73b 6.50a 4.84b	259.17a 164.87b 280.77a	45.81a 44.82a 43.97a	659.57a 659.80a 630.69a	861.76b 926.84a 867.97b	16.58a 16.82a 18.57a	64.15c 112.02a 84.96b
种植方式 Cropping patterns	钙 Ca/(mg/kg)	交换性Ca Exchangeable Ca/(mg/kg)	镁 Mg/(mg/kg)	硼 B/(mg/kg)	有效B Available B/ (mg/kg)	总Fe Total Fe/ (g/kg)	锰 Mn/(mg/kg)	
连作 Continuous cropping	EEE ERRE EGBE	310.87b 403.38a 392.44a	143.70b 162.80a 145.92b	748.97c 1 022.35a 906.04b	256.73b 292.29a 265.00ab	0.90b 0.82c 0.97a	25.77a 25.02a 25.60a	726.54b 774.42a 659.55b

EEE:茄子-茄子-茄子-茄子;ERRE:茄子-水稻-水稻-茄子;EGBE:茄子-四季豆(上半年)+长瓜(下半年)-四季豆(上半年)+长瓜(下半年)-茄子。同列数据后的不同小写字母表示在P<0.05水平差异有统计学意义。

EEE: Eggplant-eggplant-eggplant-eggplant; ERRE: Eggplant-rice-rice-eggplant; EGBE: Eggplant-green bean (the early half of the year)+bottle gourd (the latter half of the year)-green bean (the early half of the year)+bottle gourd (the latter half of the year)-eggplant. The values within the same column followed by different lowercase letters show statistically significant differences at the 0.05 probability level.

2.2 土壤酶活性分析结果

土壤酶活性因种植方式不同而异(表2)。在ERRE水旱轮作处理的土壤中:过氧化氢酶、多酚氧化酶、脲酶和碱性蛋白酶活性最高,分别为 $0.47\text{ }\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 、 $16.51\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 、 $276.51\text{ }\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 和 $92.63\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$;过氧化物酶、酸性蛋白酶和中性蛋白酶活性最低,分别为 $38.08\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 、 $1.53\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 和 $1.23\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 。在

EGBE旱地轮作处理的土壤中:过氧化物酶、酸性蛋白酶和中性蛋白酶活性最高,分别为 $72.36\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 、 $1.87\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 和 $1.53\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$;过氧化氢酶活性最低,为 $0.38\text{ }\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{d})$;多酚氧化酶、脲酶和碱性蛋白酶活性介于EEEE连作和ERRE水旱轮作之间,分别为 $16.16\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 、 $87.14\text{ }\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 和 $82.55\text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{d})$ 。

表2 不同种植方式对土壤酶活性的影响

Table 2 Influence of different cropping patterns on soil enzymatic activities

种植方式 ^{a)} Cropping patterns ^{a)}	过氧化氢酶 CAT/(\mu mol/ (g·d))	过氧化物酶 POD/(mg/ (g·d))	多酚氧化酶 PPO/(mg/ (g·d))	脲酶 UE/(\mu g/ (g·d))	碱性蛋白酶 ALPT/(mg/ (g·d))	酸性蛋白酶 ACPT/(mg/ (g·d))	中性蛋白酶 NPT/(mg/ (g·d))
连作 Continuous cropping	EEEE	0.42ab	56.72b	15.46b	74.03b	79.89b	1.66b
轮作 Crop rotation	ERRE	0.47a	38.08c	16.51a	276.51a	92.63a	1.53c
	EGBE	0.38b	72.36a	16.16ab	87.14b	82.55b	1.87a

a)见表1注。同列数据后的不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异有统计学意义。

a) Please see the footnote of Table 1. CAT: Catalase activity; POD: Peroxidase; PPO: Polyphenol oxidase activity; UE: Urease activity; ALPT: Alkaline protease; ACPT: Acid protease; NPT: Neutral protease activity. The values within the same column followed by different lowercase letters show statistically significant differences at the 0.05 probability level.

2.3 土壤微生物群落结构分析结果

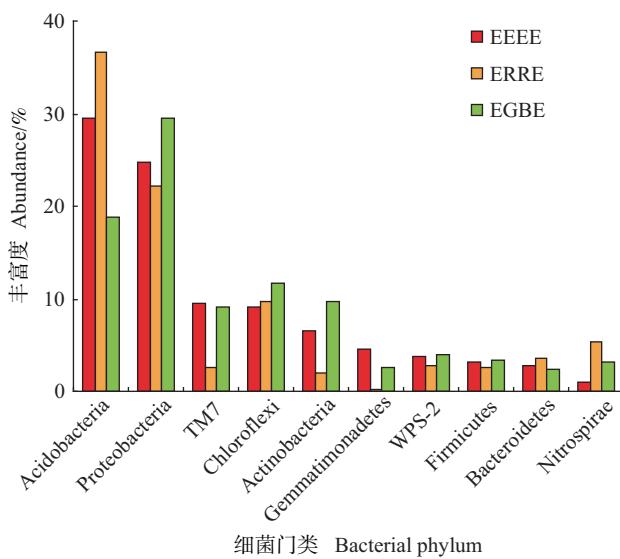
2.3.1 细菌群落结构特征

在EEEE连作、ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作土壤中,细菌16S rDNA个数(reads)依次为26 890、24 633和23 204,分别代表1 552、2 401和1 804种细菌OTUs,归属于酸杆菌(Acidobacteria)、变形菌(Proteobacteria)、绿弯菌(Chloroflexi)、放线菌(Actinobacteria)、芽单胞菌(Gemmatimonadetes)、厚壁菌(Firmicutes)、拟杆菌(Bacteroidetes)及硝化螺旋菌(Nitrospirae)等50个门,约有1%的细菌尚待确定所归属的门类(图1)。其中,酸杆菌门的丰富度最高,占总量的18.90%~36.67%,平均为28.00%。此外,在各种植方式的土壤中,前10种门类的细菌丰富度随种植方式不同而异。其中:在EEEE连作土壤中,前10种门类的细菌分别为酸杆菌门、变形菌门、TM7、绿弯菌门、放线菌门、WPS-2、芽单胞菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和硝化螺旋菌门,其丰富度分别为29.53%、24.76%、9.42%、9.12%、6.60%、4.64%、3.84%、3.11%、2.86%和1.05%;在ERRE水旱轮作土壤中,分别为酸杆菌门、变形菌门、绿弯菌门、硝化螺旋菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、TM7、厚壁菌门、放

线菌门和WPS-2,其丰富度分别为36.67%、22.26%、9.61%、5.35%、3.56%、2.75%、2.56%、2.48%、1.97%和0.21%;在EGBE旱地轮作土壤中,分别为变形菌门、酸杆菌门、绿弯菌门、放线菌门、TM7、芽单胞菌门、厚壁菌门、硝化螺旋菌门、WPS-2和拟杆菌门,其丰富度分别为29.55%、18.88%、11.61%、9.76%、9.01%、3.97%、3.33%、3.11%、2.62%和2.36%。

2.3.2 真菌群落结构特征

在EEEE连作、ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作土壤中,真菌ITS rDNA个数(reads)依次为270 590、301 895和208 613,分别代表588、528和529种真菌OTUs,归属于子囊菌(Ascomycota)、担子菌(Basidiomycota)、接合菌(Zygomycota)、球囊菌(Glomeromycota)及壶菌(Chytridiomycota)等5个门,约有20%~30%的真菌尚待确定所归属的门类(图2)。其中,子囊菌门的丰富度最高,占总量的53.54%~67.80%,平均为60.59%。在各种植方式的土壤中,该5种门类的真菌丰富度随种植方式不同而异。其中:在EEEE连作土壤中,丰富度从高到低依次为子囊菌门(67.80%)、担子菌门(2.70%)、接合菌门(0.40%)、球囊菌门(0.30%)和壶菌门(0.00%);在



EEEE、ERRE、EGBE表示的含义详见表1注。Acidobacteria:酸杆菌门; Proteobacteria:变形菌门; TM7:未知菌; Chloroflexi:绿弯菌门; Actinobacteria:放线菌门; WPS-2:未知菌; Gemmatimonadetes:芽单胞菌门; Firmicutes:厚壁菌门; Bacteroidetes:拟杆菌门; Nitrospirae:硝化螺旋菌门。

Please see the footnote of Table 1 for the details of EEEE, ERRE, EGBE.

图1 不同种植方式土壤中前10个细菌门类的丰富度

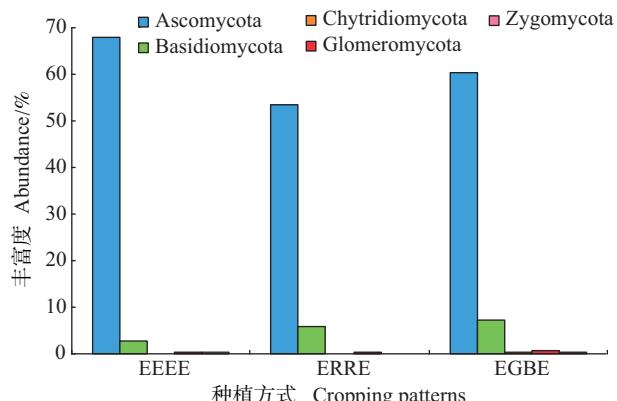
Fig. 1 Abundance of the top ten bacterial phyla in soil under different cropping patterns

ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作土壤中,丰富度从高到低均依次为子囊菌门(53.54%,60.44%)、担子菌门(5.99%,7.40%)、球囊菌门(0.25%,0.71%)、接合菌门(0.01%,0.51%)和壶菌门(0.01%,0.38%)。

2.3.3 微生物群落多样性特征

在不同的种植方式中,土壤微生物OTUs总数、细菌OTUs数量和真菌OTUs数量存在差异(表3)。在ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作土壤中微生物OTUs总数高于EEE连作,且前两者的细菌OTUs所占比例分别高达82.6%和77.7%,均高于连作的73.0%,而真菌OTUs所占比例分别为17.4%和22.3%,均低于连作的27.0%。

ERRE水旱轮作和EGBE旱地轮作土壤的细菌多样性指数均高于EEE连作,而优势度指数均低于EEE连作(表4)。其中:ERRE水旱轮作土壤的细菌多样性指数最高,达9.433,优势度指数最低,为0.984;EEE连作土壤的细菌多样性指数最低,为8.210,优势度指数最高,为0.994;EGBE旱地轮作土壤的细菌多样性指数和优势度指数分别为8.701和0.989,均介于ERRE水旱轮作和EEE连作



EEEE、ERRE、EGBE表示的含义详见表1注。Ascomycota:子囊菌门; Basidiomycota:担子菌门; Chytridiomycota:壶菌门; Glomeromycota:球囊菌门; Zygomycota:接合菌门。

Please see the footnote of Table 1 for the details of EEEE, ERRE, EGBE.

图2 不同种植方式土壤中5个真菌门类的丰富度

Fig. 2 Abundance of five fungal phyla in soil under different cropping patterns

之间。在不同种植方式下,土壤的真菌多样性指数、优势度指数的变化趋势均与细菌一致。其中:ERRE水旱轮作土壤的真菌多样性指数最高,达6.292,优势度指数最低,为0.908;EEE连作土壤的真菌多样性指数最低,为5.060,优势度指数最高,为0.970;EGBE旱地轮作土壤的真菌多样性指数和优势度指数分别为6.173和0.956,均介于ERRE水旱轮作和EEE连作之间。

3 讨论

本研究结果表明,茄子与水稻轮作种植或与四季豆(上半年)+长瓜(下半年)轮作种植,其土壤有机质和养分(除有效B外)均得到提高或无显著变化。说明在这2种轮作方式下,辅以当年11月至次年4月的冬季田闲置,可保持或提高土壤肥力和土地生产力。其中,茄子与水稻轮作田块的土壤pH从4.73显著提高为6.50,盐度从259.17 mg/kg显著降低为164.87 mg/kg,说明茄子与水稻轮作可明显改善茄子连作田中土壤酸化和盐渍化严重的状况,进而提供适宜茄子生长而抑制病虫害的环境条件。此外,在旱地轮作和水旱轮作土壤中,有效P分别高达84.96和112.02 mg/kg,是茄子连作田块的1.32倍和1.75倍,因此可以适量减施磷肥;Mg含量分别高达906.04和1 022.35 mg/kg,是茄子连作田块的1.21倍和1.37

表3 不同种植方式对土壤微生物群落结构的影响

Table 3 Influence of different cropping patterns on microbial community structure in soil

种植方式 ^{a)} Cropping patterns ^{a)}	OTUs数量 OTUs No.		OTUs占比 OTUs percent/%	
	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	真菌 Fungi
连作 Continuous cropping	EEEE	1 589.8b	587.6a	73.0b 27.0a
轮作 Crop rotation	ERRE	2 502.8a	528.2b	82.6a 17.4b
	EGBE	1 849.8b	529.4b	77.7ab 22.3ab

a)见表1注。细菌和真菌OTUs数量均测自0.5 g土壤。同列数据后的不同小写字母表示在P<0.05水平差异有统计学意义。

a) Please see the footnote of Table 1. The OTUs numbers of bacteria and fungi were both measured from 0.5 g soil. The values within the same column followed by different lowercase letters show statistically significant differences at the 0.05 probability level.

表4 不同种植方式土壤细菌和真菌群落特征值

Table 4 Characteristic values of bacterial and fungal communities in soil under different cropping patterns

种植方式 ^{a)} Cropping patterns ^{a)}	细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
	多样性指数 Shannon index	优势度指数 Simpson index	多样性指数 Shannon index	优势度指数 Simpson index
连作 Continuous cropping	EEEE	8.210b	0.994a	5.060b 0.970a
轮作 Crop rotation	ERRE	9.433a	0.984a	6.292a 0.908b
	EGBE	8.701ab	0.989a	6.173a 0.956a

a)见表1注。同列数据后的不同小写字母表示在P<0.05水平差异有统计学意义。

a) Please see the footnote of Table 1. The values within the same column followed by different lowercase letters show statistically significant differences at the 0.05 probability level.

倍,因此也可以适量减施镁肥。这一结论与陈丹梅等^[22]的研究结果相类似,即轮作土壤的有效P是原始土壤的2.13~4.67倍,因而可适当减施磷肥,且在高强度轮作种植条件下,辅以秸秆还田或冬季休闲可保持或提高土壤肥力和生产力。

土壤酶作为土壤的重要组成部分,参与土壤物质转化和能量代谢,在生态系统中起着重要的作用,其活性大小是评价土壤肥力高低、生态环境质量优劣的重要生物指标^[7]。过氧化物酶由各种氧化酶组成,其在氧化各种底物的同时,将氧还原为过氧化氢,从而对生物体产生毒害作用,即土壤中过氧化物酶活性愈高,土壤健康状况愈差。在本研究中土壤过氧化物酶活性在ERRE水旱轮作土壤中最低,为38.08 mg/(g·d),显著低于EEEE连作的56.72 mg/(g·d)和EGBE旱地轮作的72.36 mg/(g·d)。这一结果与周宝利等^[23]的研究结果不一致,他认为随着连作年限的增加,茄子根际土壤的过氧化物酶活性呈降低趋势。过氧化氢酶和多酚氧化酶广泛存

在于土壤中和生物体内,主要通过酶促氧化还原反应抑制过氧化氢、酚类物质对生物体的毒害作用;脲酶广泛存在于土壤中,其酶促产物氨是植物氮源之一,还与尿素氮肥水解密切相关;蛋白酶参与土壤中蛋白质以及其他含氮有机化合物的转化反应,其水解产物也是植物氮源之一。以上说明土壤中这几类酶的活性与土壤健康状况呈正相关。在本研究中土壤过氧化氢酶和多酚氧化酶活性在ERRE水旱轮作土壤中最高,分别为0.47 μmol/(g·d)和16.51 mg/(g·d),分别是EEEE连作和EGBE旱地轮作的1.12~1.24倍和1.02~1.07倍;脲酶活性在ERRE水旱轮作土壤中最高,为276.51 μg/(g·d),显著高于EGBE旱地轮作的87.14 μg/(g·d)和EEEE连作的74.03 μg/(g·d);碱性蛋白酶活性在ERRE水旱土壤中最高,为92.63 mg/(g·d),显著高于EEEE连作和EGBE旱地轮作土壤;酸性蛋白酶和中性蛋白酶活性在ERRE水旱轮作中最低,在EEEE连作中次之,在EGBE旱地轮作中最高。这与周宝利

等^[23]的研究结果相一致,即随着连作年限的增加,茄子根际土壤过氧化氢酶、多酚氧化酶、蛋白酶的活性呈降低趋势。

目前普遍认为土壤微生物是引起蔬菜连作障碍的因子之一。而土壤微生物中细菌和真菌的种类和数量最多,它们的群落结构变化通常能在一定程度上反映土壤质量,在土壤营养元素循环、有机物的形成和分解、土壤肥力的保持和提高、生态环境的改善、植物的生长发育和作物病虫害防治等方面均起着极其重要的作用,因此是克服连作障碍及其他土壤障碍因子的关键所在^[24~25]。一般认为:多样性指数越高,则样本的物种多样性越高;优势度指数越大,则样本的奇异度越高,优势种群突出^[26];生物多样性指数越高,优势度指数越低,则生态环境越健康稳定^[22]。本文采用 MiSeq 高通量测序方法,揭示了连作和轮作土壤中真菌和细菌群落结构组成。结果表明:在 ERRE 水旱轮作土壤中,细菌的优势度指数虽与 EEEE 连作、EGBE 旱地轮作无显著变化,但其多样性指数显著提高;真菌的优势度指数显著降低,多样性指数显著升高。这表明在 ERRE 水旱轮作方式下土壤生态环境较其余 2 种更健康稳定。在 ERRE 水旱轮作和 EGBC 旱地轮作土壤中,细菌与真菌数量比均较 EEEE 连作有显著提高,表明在 ERRE 水旱轮作和 EGBC 旱地轮作土壤中细菌生长繁殖增多,种群密度增大,而真菌数量显著降低。而在 EEEE 连作土壤中细菌和真菌比显著降低,说明茄子连作使土壤微生物群落结构发生了显著变化,使土壤由细菌型向真菌型转变。这与许多前人的研究结果一致,如:周宝利等^[23]研究了不同连作年限的土壤对茄子根际土壤微生物数量的影响,结果显示,随着连作年限的增加,茄子根际土壤细菌数量和放线菌数量呈下降趋势,真菌数量呈增加趋势;杨尚东等^[3]研究认为,番茄连作导致土壤可培养细菌和放线菌数量显著降低,而真菌数量显著增加,微生物群落由细菌型向真菌型转变;李振方等^[27]对连作条件下地黄土壤微生态特性进行了分析,认为与正茬土壤相比,连作造成根际土壤细菌数量减少,真菌和放线菌数量增多,土壤微生物类型由细菌型向真菌型过渡。此外,本研究通过 MiSeq 高通量测序方法获得了 1 552~2 401 个细菌 OTUs 和 528~588 个真菌 OTUs,远远超过了目前常规培养、聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE)、磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析等所能达到

的水平^[3,28],因此能更深入地研究土壤细菌和真菌的组成及群落结构。

综上所述,ERRE 水旱轮作和 EGBC 旱地轮作均较连作更有益于保持或提高土壤肥力和土地生产力。从土壤 pH、盐度、养分、酶活性、微生物群落结构等方面综合看,ERRE 水旱轮作较佳,是一种值得推广的种植方式。

参考文献(References):

- [1] 吴凤芝,赵凤艳,刘元英.设施蔬菜连作障碍原因综合分析与防治措施.东北农业大学学报,2000,31(3):241~247.
WU F Z, ZHAO F Y, LIU Y Y. On the reasons of continuous cropping obstacles in vegetable facility gardening. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2000,31(3):241~247. (in Chinese with English abstract)
- [2] 张重义,林文雄.药用植物的化感自毒作用与连作障碍.中国生态农业学报,2009,17(1):189~196.
ZHANG Z Y, LIN W X. Continuous cropping obstacle and allelopathic autotoxicity of medicinal plants. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009,17(1):189~196. (in Chinese with English abstract)
- [3] 杨尚东,李荣坦,吴俊,等.番茄连作与轮作土壤生物学特性及细菌群落结构的比较.生态环境学报,2016,25(1):76~83.
YANG S D, LI R T, WU J, et al. Comparison of soil microbial properties and bacterial community structure in continuous cropping and rotation fields of tomatoes. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016,25(1):76~83. (in Chinese with English abstract)
- [4] 葛晓颖,孙志刚,李涛,等.设施番茄连作障碍与土壤芽孢杆菌和假单胞菌及微生物群落的关系分析.农业环境科学学报,2016,35(3):514~523.
GE X Y, SUN Z G, LI T, et al. Soil *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., and microbial communities under tomato continuous cropping in greenhouse production. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016,35(3):514~523. (in Chinese with English abstract)
- [5] 沈崇尧,彭有良,康振生,等.植物病理学.5 版.北京:中国农业出版社,2009:282.
- [6] 王玉琴.关于轮作的探讨.现代农业科技,2010(2):108.
- [7] WANG Y Q. Discussion on rotation. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2010(2):108. (in Chinese)
- [8] 杨祥田,周翠,李建辉,等.不同轮作方式下大棚草莓产量及土壤生物学特性.中国生态农业学报,2010,18(2):312~315.
YANG X T, ZHOU C, LI J H, et al. Effect of cropping system on yield of strawberry and soil biological property under plastic greenhouse condition. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2010, 18(2):312~315. (in Chinese with English abstract)
- [9] 于高波,吴凤芝,周新刚.小麦、毛苕子与黄瓜轮作对土壤微生态环境及产量的影响.土壤学报,2011,48(1):175~184.

- YU G B, WU F Z, ZHOU X G. Effects of rotations of cucumber with wheat and hairy vetch on soil micro-ecological environment and its yield. *Acta Pedologica Sinica*, 2011,48(1):175–184. (in Chinese with English abstract)
- [9] 张黎杰,周玲玲,姜若勇,等.大棚西瓜-草菇-辣椒轮作对解除设施西瓜连作障碍的效果.江西农业学报,2016,28(4):11–14.
- ZHANG L J, ZHOU L L, JIANG R Y, et al. Effect of watermelon-straw mushroom-pepper rotation on relieving continuous cropping obstacle of watermelon in greenhouse. *Acta Agriculture Jiangxi*, 2016, 28(4):11–14. (in Chinese with English abstract)
- [10] 杨树筠.用重铬酸钾氧化法简便快速测定土壤有机质含量.现代农业,1997(4):23.
- YANG S Y. A simple and rapid determination of soil organic matter content by potassium dichromate oxidation. *Modern Agriculture*, 1997(4):23. (in Chinese)
- [11] 魏丽红.土壤全磷测定中样品分解与比色方法的比较研究.辽宁职业技术学院学报,2009,11(2):1–3.
- WEI L H. Comparison of decomposition and colorimetry methods in determination of soil total phosphorus. *Journal of Liaoning Agricultural College*, 2009,11(2):1–3. (in Chinese with English abstract)
- [12] 沈志群,张琪,刘琳娟,等.碳酸氢钠浸提-钼锑抗分光光度法测定土壤中的有效磷.环境监测与预警,2011,3(5):12–15.
- SHEN Z Q, ZHANG Q, LIU L J, et al. Determination of available phosphorus in soil by sodium bicarbonate extraction Mo-Sb anti-spectrophotometry method. *Environmental Monitoring and Forewarning*, 2011,3(5):12–15. (in Chinese with English abstract)
- [13] 巴哈尔古丽·别克吐尔逊,叶尔江·拜克吐尔汉,马哈亚·艾斯江.邻菲罗啉比色法分析原始森林土壤中铁的含量.光谱实验室,2013,30(5):2314–2318.
- BIEKETUERXUN B, BIEKETUERHAN Y, AISIJIANG M. Phenanthroline colorimetric analysis of the content of iron in virgin forest soil. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2013,30(5):2314–2318. (in Chinese with English abstract)
- [14] 鲍士旦.土壤农化分析.3版.北京:中国农业出版社,2000:100–191.
- BAO S D. *Soil and Agricultural Chemistry Analysis*. 3rd ed. Beijing: Agricultural Press of China, 2000:100–191. (in Chinese)
- [15] 严褪升.土壤肥力研究法.北京:农业出版社,1988:277–279.
- YAN C S. *Soil Fertilizer Research Ways*. Beijing: Agricultural Press, 1988:277–279. (in Chinese)
- [16] FADROSH D W, MA B, GAJER P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumine MiSeq platform. *Microbiome*, 2014,2:6.
- [17] HSIAO C, CHATTERTON N J, ASAY K H, et al. Phylogenetic relationships of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome*, 1994,37(1):112–120.
- [18] KREBS C J. *Ecological Methodology*. New York, USA: Harper Collins Publish, 1989:1–654.
- [19] SCHLOSS P D, GEVERS D, WESTCOTT S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rDNA-based studies. *PLoS One*, 2011,6(12):e27310.
- [20] ROESCH L F W, FULTHORPE R R, RIVA A, et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 2007,1(4):283–290.
- [21] LIM Y W, KIM B K, KIM C M, et al. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *The Journal of Microbiology*, 2010,48(3):284–289.
- [22] 陈丹梅,陈晓明,梁永江,等.轮作对土壤养分、微生物活性及细菌群落结构的影响.草业学报,2015,24(12):56–65.
- CHEN D M, CHEN X M, LIANG Y J, et al. Influence of crop rotation on soil nutrients, microbial activities and bacterial community structures. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015,24(12):56–65. (in Chinese with English abstract)
- [23] 周宝利,徐研,尹玉玲,等.不同连作年限土壤对茄子土壤生物学活性的影响及其嫁接调节.生态学杂志,2010,29(2):290–294.
- ZHOU B L, XU Y, YIN Y L, et al. Effects of different years continuous cropping and grafting on the biological activities of eggplant soil. *Chinese Journal of Ecology*, 2010,29(2):290–294. (in Chinese with English abstract)
- [24] 吴凤芝,包静,刘淑芹.盐胁迫对黄瓜根际土壤细菌群落结构和生长发育的影响.园艺学报,2010,37(5):741–748.
- WU F Z, BAO J, LIU S Q. Effect of salt stress on rhizospheric soil bacterial community structure and cucumber yield. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010,37(5):741–748. (in Chinese with English abstract)
- [25] 贾志红,易建华,苏以荣,等.烟区轮作与连作土壤细菌群落多样性比较.生态环境学报,2010,19(7):1578–1585.
- JIA Z H, YI J H, SU Y R, et al. Diversity comparison of soil bacteria communities in rotation and continuous flue-cured tobacco cropping. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010,19(7):1578–1585. (in Chinese with English abstract)
- [26] HUNTER P R, GASTON M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988,26(11):2465–2466.
- [27] 李振方,杨燕秋,谢冬凤,等.连作条件下地黄药用品质及土壤微生态特性分析.中国生态农业学报,2012,20(2):217–224.
- LI Z F, YANG Y Q, XIE D F, et al. Effects of continuous cropping on the quality of *Rehmannia glutinosa* L. and soil micro-ecology. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012,20(2):217–224. (in Chinese with English abstract)
- [28] 徐幼平,蔡新忠,祝小祥.水旱作物轮作田块土壤中微生物群落结构的PLFA法比较分析.浙江农业学报,2013,25(5):1056–1061.
- XU Y P, CAI X Z, ZHU X X. Comparative analysis of microbial community structures in soils from rice-upland crop rotation fields by PLFA profile technique. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2013, 25(5):1056–1061. (in Chinese with English abstract)