



辣椒连作对土壤细菌群落的影响

李莹¹, 刘兰英¹, 姜宇杰², 何肖云¹, 邱胤辉³, 任丽花¹, 傅建炜^{1*}

1 福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/福建省农产品质量安全重点实验室, 福建 福州 350003

2 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002

3 福建三明市农业科学研究院, 福建 三明 365000

李莹, 刘兰英, 姜宇杰, 何肖云, 邱胤辉, 任丽花, 傅建炜. 辣椒连作对土壤细菌群落的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 297-318.

LI Ying, LIU Lanying, JIANG Yujie, HE Xiaoyun, QIU Yinhuai, REN Lihua, FU Jianwei. Effect of continuous cropping of hot pepper on soil bacterial community[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 297-318.

摘要:【目的】土壤微生物对农业生态系统的长期可持续性至关重要。为探讨不同连作年限对辣椒土壤细菌群落结构和潜在功能的影响。【方法】采用 16S rRNA 基因高通量测序 PICRUSt 功能预测相结合的研究方法, 对不同连作年限下(1Y、3Y、5Y 和 10Y)的辣椒土壤细菌微生物群落结构和功能进行分析。【结果】微生物多样性指数和共生网络复杂度随连作年限的延长而降低, 同时, 连作年限变化对细菌群落组成有显著影响。不同的土壤细菌种群对连作措施的响应程度不一, 长期连作增加了变形菌门和拟杆菌门的相对丰度, 但降低了绿弯菌门、酸杆菌门、厚壁菌门和髌骨细菌门的相对丰度。PICRUSt 功能预测结果表明, 延长连作年限改变了土壤细菌整体的氮、磷代谢能力, 导致细菌群预测功能基因发生了变化, 能量代谢、氨基酸代谢和碳水化合物代谢等重要代谢功能基因减少, 而折叠、分类和降解、复制和修复、膜转运、细胞生长与死亡等功能基因丰度明显增加。冗余分析表明, 土壤有机质和有效磷是影响细菌群落迁移和功能变化的关键土壤理化因子。【结论】延长辣椒连作年限后, 细菌群落结构改变和多样性下降导致土壤微生物群落功能失调可能是造成辣椒连作障碍的原因之一。

资助项目: 福建省农业科学院自由探索科技创新项目(ZYTS2021011); 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2021R1022004); 福建省农业科学院科技创新团队(CXTD2021011-1); 福建省“5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021020)

This work was supported by the Freely Explore Scientific and Technology Innovation Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (ZYTS2021011), the Special Project of Public Welfare Research Institute of Fujian Province (2021R1022004), the Innovation Team Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (CXTD2021011-1), and the Fujian Province “5511” Collaborative Innovation Project in Fujian (XTCXGC2021020).

*Corresponding author. Tel: +86-591-87869476, Fax: +86-591-87869422, E-mail: 20291349@126.com

Received: 2022-04-26; Accepted: 2022-07-26; Published online: 2022-08-03

关键词：辣椒；连作；细菌群落结构；功能预测

Effect of continuous cropping of hot pepper on soil bacterial community

LI Ying¹, LIU Lanying¹, JIANG Yujie², HE Xiaoyun¹, QIU Yinhu³, REN Lihua¹, FU Jianwei^{1*}

1 Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Key Laboratory of Agro-Products Quality and Safety, Fuzhou 350003, Fujian, China

2 Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Sanming Academy of Agricultural Sciences, Sanming 365000, Fujian, China

Abstract: [Objective] Soil microorganisms are essential for the long-term sustainability of agricultural ecosystems. This study aims to explore the effects of continuous cropping of hot pepper on the structure and function of soil bacterial community. [Methods] We employed high-throughput sequencing of 16S rRNA and PICRUSt-based functional prediction to investigate the bacterial abundance, diversity, community composition, and potential functional component in the soils with continuous cropping of hot pepper for 1, 3, 5, and 10 years (1Y, 3Y, 5Y, and 10Y, respectively). [Results] The Shannon index and co-occurrence network complexity of soil bacteria decreased with the extension of continuous cropping years. The bacterial community structure was markedly affected by the years of continuous cropping, and different bacterial populations had varied responses to continuous cropping. Long-term continuous cropping increased the relative abundance of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, while decreasing that of *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, and *Patescibacteria*. Furthermore, PICRUSt-based functional prediction showed that the continuous cropping changed the overall nitrogen and phosphorus metabolism of soil bacteria. After long-term continuous cropping, the functional genes in energy metabolism, amino acid metabolism, and carbohydrate metabolism showed reduced relative abundance, while those involved in folding, classification and degradation, replication and repair, membrane transport, and cell growth and death had increased relative abundance. The results of redundancy analysis indicated that soil organic matter and available phosphorus were the key factors associated with the migration and functional changes of soil bacteria. [Conclusion] After long-term continuous cropping of hot pepper, the change of community structure and the decline of diversity to the dysfunction of soil microbial community, which may be one of the reasons for the continuous cropping obstacles of hot pepper.

Keywords: hot pepper; continuous cropping; bacterial community structure; function prediction

辣椒(*Capsicum annuum* L.)因含有丰富的营养和具有独特的风味而广受大众青睐，已成

为世界上仅次于豆类、番茄的第三大蔬菜作物。近年来，福建的大棚辣椒因品质好、反季产量

大而走俏全国。但由于市场需求较大, 导致栽培过程中连作现象极其普遍, 连作面积不断增加。诸多研究证实^[1-3], 连作会影响植物生长, 加剧土壤环境恶化, 加重土壤传播疾病, 降低蔬菜的产量和质量。我们的田间试验也证实延长连作年限对辣椒产量和品质有明显的负面影响。目前, 连作障碍已经成为辣椒栽培过程中普遍存在的问题。许多农民试图通过施用更多的肥料和杀虫剂减缓连作障碍, 但这不仅增加了生产成本, 还容易导致蔬菜中农药残留超标^[4]。目前, 除了迫不得已的休耕之外, 合理的轮作仍是应对连作障碍最安全有效的方法^[2]。但对于设施农业, 轮作不但剥夺了农户潜在的获利空间, 还增加了投资的成本与风险。

土壤作为农作物生长的载体, 其健康状况直接影响植物长势和抗病害的能力。土壤微生物作为土壤生态系统的重要组成部分^[5], 对环境变化十分敏感, 在一定程度上能够衡量土壤质量和健康程度^[6-7]。近年来, 随着高通量测序技术的发展, 土壤微生物与连作实践间的相互作用成为是科研热点。而细菌作为微生物中含量最多、丰度最高的类群, 在物质转化、有机质降解、能量流动和信息传递发挥着重要功能^[8], 在植物获取水分和养分、拮抗土传植物病虫害和病原菌以及诱导植物对病原菌的防御反应等方面起着至关重要的作用^[9], 因此常被认为是土壤生态系统质量变化的早期指标。研究表明, 长期连作过程中, 植物根系分泌物、根际微生物以及相同的管理方式创造特定的土壤微环境^[10], 导致连作后土壤细菌群落结构发生改变^[11], 这种变化甚至成为连作障碍的直接原因^[12]。目前, 基于设施条件下连作黄瓜^[11]和草莓^[13]后土壤细菌微生物变化的研究已被陆续报道, 但研究的重点多放在土壤细菌群落结构变化方面, 对细菌功能的探索尚少见报道, 土

壤细菌功能对连作的响应机制尚不明晰。事实上, 微生物群落功能发挥与群落组成特征密不可分, 微生物群落变化可能进一步影响微生物的功能发挥。因此, 只有加深对土壤微生物群落结构、功能的了解, 才能够更好地阐明连作对土壤环境的影响机制。近年来, PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states) 以其方便快捷, 成本低廉, 结果准确, 已成为预测细菌和古菌的代谢功能谱重要工具^[9], 这为我们进一步研究土壤微生物群落结构与功能提供了新途径。

迄今为止, 关于辣椒长期连作对土壤的理化性质、微生物多样性及其功能的研究甚少。辣椒长期连作体系下土壤细菌群落动态尚不清楚, 尤其是在长期仅施用有机肥的情况下。本研究以三明农科院蔬菜所辣椒育种基地为研究对象, 采用 16S rRNA 基因 MiSeq 高通量测序技术, 研究不同连作年限对土壤细菌群落组成的影响, 同时结合 PICRUSt 分析连作土壤细菌功能, 阐明土壤细菌多样性、群落组成和功能潜势随连作年限增加的变化特征, 以期揭示土壤细菌群落结构和功能潜势对连作的响应, 并解析其环境驱动因子, 为未来进一步完善管理策略, 改良管理措施, 克服辣椒连作障碍和建立科学栽培制度提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 试验区域概况和试验设计

本试验于三明农业科学院蔬菜所辣椒种植基地(26°15'N, 117°41'E)进行。该区属亚热带季风性湿润气候, 气温日际变化大, 昼夜温差悬殊, 冷暖不定, 一年四季明显, 雨水充沛, 干湿明显, 年均降雨日 174 d, 年日照时数 1 878 h, 无霜期 303 d, 年平均降水量 1 754 mm。

本试验选择不同连作年限的辣椒大棚作

为样地，辣椒品种为“明椒系列”，本研究共设置 4 个处理：分别为连作 1 年(1Y)、连作 3 年(3Y)、连作 5 年(5Y)和连作 10 年(10Y)。四个处理分属 4 个不同大棚，且大棚之间的直线距离均在 500 m 以内。

辣椒为一年两季，种植茬口分别为春提早和秋延后。辣椒种植前先进行翻土并沟施基肥，通常开沟约 20–30 cm 深，基肥选择由猪粪、鸡粪、蘑菇渣、木耳渣及辅料烟末等为原料，加入生物菌堆沤混合发酵腐熟后制成的有机肥(由三明市森耕农业科技发展有限公司提供，有机质含量 $\geq 45\%$ ，水含量 $\leq 30\%$ ， $N+P_2O_5+K_2O \geq 5.0\%$)；一般每年每茬施用有机肥 50 t/hm²。待辣椒进入旺盛生长期后，平均每两周喷施一次 N:P:K 为 15:15:15 的叶面肥。所有的辣椒大棚都遵循一致的管理模式，且这些大棚建成后没有其他作物的种植历史。

1.2 土壤样品采集

于 2021 年 11 月 13 日辣椒盛花期进行土壤样品采集。每个连作年限的辣椒基地中分别设置 3 个重复，按“S”形在每个重复地块收集 5 个完整土样混合后作为 1 个土壤样品，取样点距辣椒根系 5–8 cm，取样深度为 0–20 cm，共收集 12 个土壤样品。将土壤样品装入无菌袋中，放入冰盒后迅速转移到实验室。去除大型土壤动物、石子以及植物残体并混合均匀，将每个土壤样品分为两份，一份储存 80 °C 冰箱中以进行土壤微生物分析，另一份自然风干后进行土壤理化性质分析。

1.3 土壤理化性质测定

土壤理化性质分析参照鲍士旦的方法进行。土壤 pH 值采用电位法测定；电导率(electrical conductivity, EC)采用电导率仪法测定；土壤总碳(total carbon, TC)、总氮(total nitrogen, TN)含量利用元素分析仪(Elementar

Vario Macro Cubelementar)测定；土壤有机质(soil organic matter, SOM)采用重铬酸钾容量稀释法测定；速效磷(available phosphorus, AP)采用碳酸氢钠-钼锑抗比色法测定；速效钾(available potassium, AK)采用 NH₄OAc 浸提-火焰光度法测定；铵态氮(ammonium nitrogen, NH₄⁺-N)和硝态氮(nitrate nitrogen, NO₃⁻-N)含量用 2 mol/L KCl 浸提后，采用 AA3 连续流动分析仪(AA3 SEAL Analytical, 荷兰)测定；可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)和可溶性总氮(dissolved total nitrogen, DTN)采用 TOC 测定仪(SHIMADZUTOC-VCPH/CPNAnalyzer 公司)进行测定；可溶性有机氮(dissolved organic nitrogen, DON)由可溶性总氮差减溶解性无机氮(NH₄⁺+NO₃⁻)获得；阳离子交换量(cation exchange capacity, CEC)通过乙酸铵交换法-铵态氮比色法测定。

1.4 土壤 DNA 提取和 PCR 扩增

土壤细菌利用 Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台测序，测序委托北京奥维森生物科技有限公司完成。称取 0.5 g 的土壤，利用试剂盒(Mobio PowerSoil DNA Isolation Kit (100))提取 DNA，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的 DNA 质量，Nanodrop 检测样品质量，取 30 ng 进行 PCR 扩增。采用引物(5'-ACTCCTACGG GAGGCAGCAG-3', 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rRNA 基因 V3–V4 区进行测序；PCR 反应体系 25 μ L，包括 DNA 2 μ L，上下游引物各 1 μ L，BSA 3 μ L，2 \times Taq Plus Master Mix 12.5 μ L，ddH₂O 5.5 μ L。PCR 反应程序为：94 °C 5 min；94 °C 30 s，50 °C 30 s，72 °C 60 s，28 个循环；72 °C 7 min，4 °C 保存，设置 3 次生物学重复。使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物，Tris HCl 洗脱，2%琼脂糖电泳检测。而后进行

MiSeq 文库构建, 上机测序。

1.5 数据处理和分析

MiSeq 测序得到双端序列数据, 经过质控、拼接与去除嵌合体、短序列后得到优质序列(clean tags)^[14]。利用 Uparse 软件在 97%相似度下对优化序列进行聚类, 得到操作分类单元(operational taxonomic units, OTU), 采用 RDP classifier 算法对 OTU 代表序列进行比对分析, 得到每个 OTU 对应的物种分类信息; 采用 Mothur 软件对全部有效序列进行 OTU 聚类统计, 绘制韦恩图^[15]; 使用 Qiime 软件计算样品的 Chao1 指数、Shannon 指数等 A 多样性值^[16]; 采用 PICRUST 软件对 OTU 丰度表进行标准化后进行功能基因预测分析, 将 OTU 信息与 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库进行比对^[17], 获得各功能基因的丰度, 参考 KEGG 的一级和二级代谢通路的功能基因类别划分归类, 获得功能基因组成^[16]。

采用 Excel 2010 和 IBM SPSS Statistics 22.0 进行数据处理和分析, 土壤理化性质、微生物

群落结构相对丰度等差异显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA), Duncan 进行比较 ($P<0.05$); 利用 Pearson 等级相关系数进行相关性分析; 使用 Bray-Curtis 法进行细菌群落聚类分析^[16]; 采用 Origin 9.0 绘制土壤细菌群落组成与功能热图; 对每个样本的土壤细菌 OTUs 为样本源, 采用 Spearman 秩进行共发生网络分析, 以相关性(Spearman's $\rho>|0.8|$)和显著相关性 ($P<0.05$)为依据探讨共发生模式, 于 Gephi (version 9.2)中绘制土壤细菌共现网络图。使用冗余分析(distance-based redundancy analysis, db-RDA)分析影响土壤细菌群落物种和功能基因组成的关键环境因子, 采用 Canoco 4.5 进行土壤细菌 RDA 分析。

2 结果与分析

2.1 不同连作年限土壤理化性质分析

方差分析表明(表 1), 连作年限变化对所除 CEC 外的其余测定土壤参数均有极显著影响 ($P<0.01$)。连作 3Y 时的土壤 pH 最高, 但 1Y、5Y 和 10Y 的土壤 pH 间无显著性差异。而 5Y

表 1 各处理土壤理化性状

Table 1 Soil physicochemical properties of the different samples

Soil factor	1Y	3Y	5Y	10Y	One-way ANOVA
pH	5.96±0.34a	6.45±0.11b	5.84±0.01a	5.6±0.03a	$F=10.07, P=0.004$
EC ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	571.33±48.21a	570.33±22.37a	756±7.11b	2 005.6±76.42c	$F=661.65, P=0.000$
SOM (g/kg)	22.85±0.07a	36.10±0.15b	50.01±0.18c	54.78±0.32d	$F=15 693.06, P=0.000$
C/N	7.50±0.17a	8.79±0.42bc	9.34±0.17c	8.62±0.06b	$F=29.86, P=0.000$
CEC (cmol/kg)	26.38±3.9a	21.62±2.50a	20.89±1.71a	22.07±1.64a	$F=0.59, P=0.639$
NH_4^+-N (mg/kg)	22.58±1.06b	13.15±0.23a	17.77±2.62a	33.89±2.44c	$F=67.82, P=0.000$
NO_3^--N (mg/kg)	34.27±1.17a	56.88±0.44b	107.18±1.06c	369.83±5.65d	$F=8 342.83, P=0.000$
DOC (mg/kg)	204.03±29.84a	555.55±68.85c	481.59±77.33c	330.08±77.53b	$F=25.14, P=0.000$
DON (mg/kg)	29.42±1.76b	33.87±4.94c	17.58±0.68a	12.78±1.69a	$F=68.89, P=0.000$
AP (mg/kg)	95.21±0.34a	311.15±32.11b	317.04±46.63c	353.07±54.64c	$F=26.13, P=0.000$
AK (mg/kg)	46.59±1.75a	128.19±1.68b	139.12±3.14b	235.7±10.94c	$F=531.34, P=0.000$

1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years. The value is mean±standard error ($n=3$), different lowercase letters in the same line indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

和 10Y 处理下的土壤 EC 急剧增加, 分别是 1Y 处理的 1.32 和 3.51 倍($P<0.05$); 但不同连作年限下的土壤阳离子交换量无显著性差异。同时, 土壤 SOM、AP、AK 和 NO_3^- -N 含量呈现出随连作年限延长而逐渐增加的变化趋势, 10Y 后的 SOM、AP、AK 和 NO_3^- -N 含量分别是 1Y 处理的 2.40、3.71、5.06 和 10.79 倍($P<0.05$)。不同的是, NH_4^+ -N 在短期连作时(3Y 和 5Y 处理)显著降低($P<0.05$), 但 10Y 后急剧攀升, 较 1Y 处理增加了 50.09% ($P<0.05$)。另外, 连作也显著增加了土壤 DOC 含量($P<0.05$), 且 3Y 和 5Y 处理下的 DOC 含量显著高于 10Y 处理($P<0.05$), 但在连作 5Y 后, DON 含量显著降低($P<0.05$)。

2.2 不同连作年限土壤细菌多样性分析

通过对不同连作年限土壤样本进行高通量测定, 共获得 1 232 588 条序列, 最小抽样深度序列数为 50 325, 分别属于细菌的 46 门 128 纲 294 目 393 科 730 属 768 种, 7 460 OTUs。

2.2.1 土壤细菌群落 α 多样性

测序结果基于种分类水平的各样本文库覆盖率均在 97%以上, 且稀释曲线随着序列数量的增加而均趋于平缓, 说明结果具有良好的置信度, 已覆盖绝大多数的样本信息, 能够较好地反映土壤样品细菌群落组成的真实情况。

不同处理 α 多样性结果表明(表 2), 连作年限变化对细菌 Chao1 指数和 Shannon 指数均有

极显著影响($P<0.001$)。其中, 3Y 处理的 Chao1 指数显著高于其余处理($P<0.05$), 随后 Chao1 指数逐渐降低, 但 5Y 和 10Y 处理的 Chao1 指数仍较 1Y 处理显著增加了 3.39%和 4.84% ($P<0.05$)。Chao1 指数代表着样本内的物种数量(丰富度), 其值越大, 表明群落丰富度越高; 这表明, 连作在一定程度上有利于细菌群落丰富度的增加。而 Shannon 指数用于表示微生物群落的多样性, Shannon 指数随着连作年限的增加呈明显降低趋势, 表明, 延长连作年限导致土壤细菌群落多样性降低。

4 个处理土壤样品的细菌 OTUs 数在 4 854–5 155 个之间, 且 1Y、5Y、10Y 和 3Y 的土壤 OTUs 依次显著递增。韦恩图能够直观反映不同处理间土壤细菌群落 OTUs 组成的差异性及重叠关系。本研究采用 97%的序列相似度作为 OTUs 划分阈值(图 1)。结果显示, 4 个处理所共有的 OTUs 有 2 443 个, 分别占 1Y、3Y、5Y 和 10Y 处理的 50.33%、47.39%、49.44%和 48.38%, 此外, 1Y 特有的 OTUs 547 个, 占 OTUs 总数的 11.27%; 3Y 特有的 OTUs 326 个, 占 OTUs 总数的 6.32%; 5Y 特有的 OTUs 249 个, 占 OTUs 总数的 5.04%; 10Y 特有的 OTUs 430 个, 占 OTUs 总数的 8.51%。这些数据表明, 不同连作年限土壤的 OTUs 组成存在差异, 且连作会促进特有细菌物种的生成, 但随着连作年限的增加, 这一比例有所降低。

表 2 不同处理下土壤细菌测序数据和 α 多样性指数

Table 2 Alpha diversity indexes and OTU species of bacteria under different treatments

Treatments	OTU species	Chao1 index	Shannon index	Coverage index
1Y	4 854±61a	4 603.52±66.22a	10.07±0.05c	0.98±0.001a
3Y	5 155±39d	5 050.79±36.00c	9.90±0.03b	0.97±0.001a
5Y	4 941±56b	4 759.22±54.78b	9.82±0.04b	0.98±0.001a
10Y	5 054±14c	4 825.82±58.56b	9.59±0.08a	0.98±0.001a
One-way ANOVA	$F=26.84, P=0.00$	$F=4.17, P=0.00$	$F=44.74, P=0.00$	$F=0.64, P=0.70$

1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years. The value is mean±standard error ($n=3$), and different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

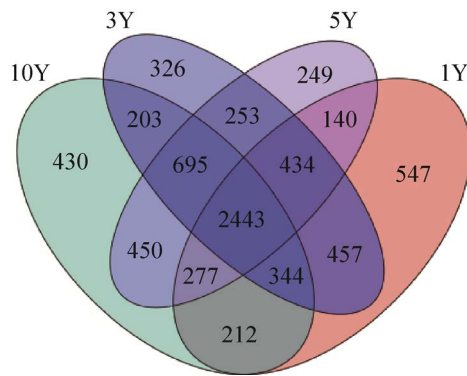


图 1 不同处理土壤细菌 OTUs 韦恩图

Figure 1 OTUs venn of soil bacteria under different treatments. 1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years.

2.2.2 土壤细菌 β 多样性

细菌群落的 UPGMA 聚类分析(OTUs)水平结果如图 2 所示, 在 0.12 的相似性水平上, 所有土壤样品可聚为 2 大类, 其中, 1Y 处理单独为 1 簇, 其他三个处理细菌群落聚为 1 簇, 在 0.06 的相似性水平上, 3Y 与 5Y 处理、10Y 处理又聚为两个独立的亚类。表明, 连作过程明显的

改变了土壤细菌群落结构, 且连作处理与 1Y 处理的群落结构相似度随连作年限的延长而降低。

2.3 不同连作年限土壤细菌共生网络分析

为进一步了解微生物群落的相似性, 利用 OTUs 数据构建四个处理土壤细菌网络(图 3), 并计算相关的拓扑性质(表 3)。四个处理中, 变形菌门和放线菌门在共现网络所占比重最大(数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000152)。细菌群落总链接数以 1Y 处理最高, 且随着连作年限的延长逐渐降低。而平均度也表现出一致的变化趋势, 通常, 平均度越高, 表明节点的连通度越高^[18]。同时, 1Y、3Y 和 5Y 处理中, 正链接数的数量是多于负链接数的数量, 相反的, 10Y 处理中下的正负链接数比小于 1, 且随连作年限的延长, 正链接数与负链接数的比例而逐渐降低。这些结果表明, 4 个连作处理中, 1Y 处理下的细菌网络复杂性更高, 而 10Y 处理的复杂性最低。同时, 4 个处理的模块度指数均为 >0.4 ^[18], 而 1Y 处理的菌群模块化程度最高, 且模块化指数随着连作年限增加而下降。

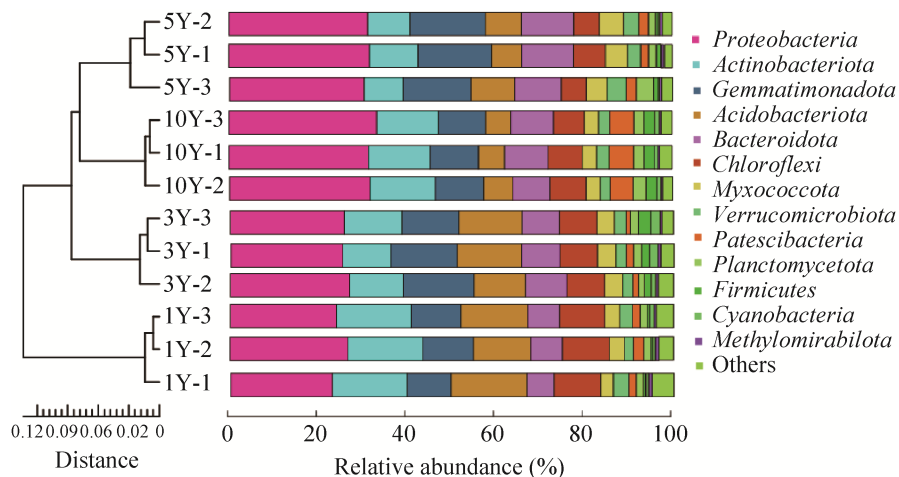


图 2 不同连作年限的土壤细菌群落 UPGMA 聚类分析

Figure 2 UPGMA cluster analysis of bacterial community in soil sample from different continuous cropping years. 1Y-1, 1Y-2 and 1Y-3: Soil from continuous cropping for 1 year. 3Y-1, 3Y-2 and 3Y-3: Soil from continuous cropping for 3 years. 5Y-1, 5Y-2 and 5Y-3: Soil from continuous cropping for 5 years. 10Y-1, 10Y-2 and 10Y-3: Soil from continuous cropping for 10 years.

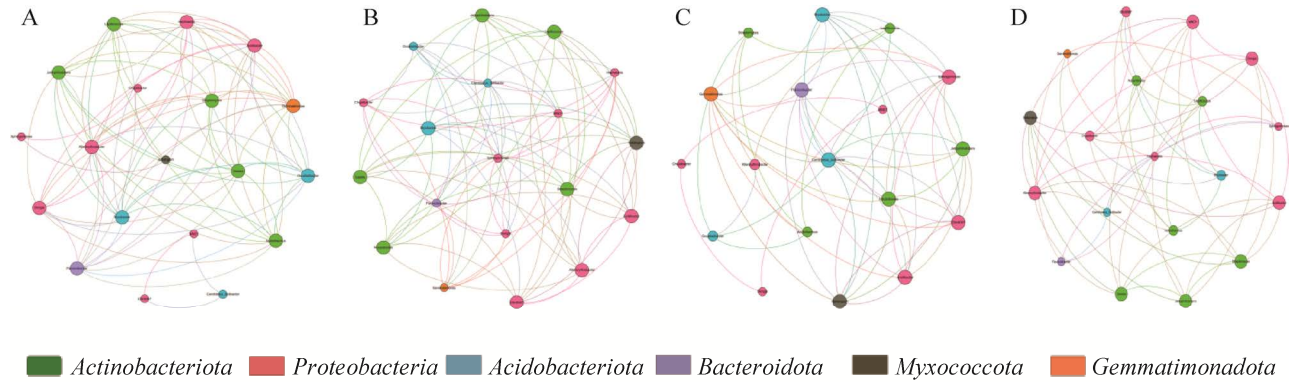


图3 不同连作年限土壤细菌共生网络图

Figure 3 The co-occurrence network of bacteria in soil sample from different continuous cropping years. A: Soil from continuous cropping for 1 year. B: Soil from continuous cropping for 3 years. C: Soil from continuous cropping for 5 years. D: Soil from continuous cropping for 10 years. The connections stands for a strong (Spearman's $\rho > |0.8|$) and significant ($P < 0.05$) correlations. The node of each network is colored according to microbial phylum and sized according to the degree, the node sizes reflect their degree of connection (edge numbers assigned to the node).

表3 不同连作处理细菌群落共生网络主要拓扑性质

Table 3 Major topological properties of soil bacteria under different treatments

Network properties	1Y	3Y	5Y	10Y
Average degree	8.84	8.53	6.444	5.58
Modularity index	1	0.97	0.889	0.84
Total nodes	19	19	18	19
Total edges	84	81	58	53
Positive edges	68 (80.95%)	59 (72.84%)	42 (72.41%)	24 (45.28%)
Negative edges	16 (19.05%)	22 (27.16%)	16 (28.59%)	29 (54.72%)

1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years.

2.4 不同连作年限土壤细菌群落结构分析

4个处理的土壤中总共检测出13个细菌门和27个细菌属(包括未鉴定类群和其他),将平均相对丰度大于1%的细菌门划分为优势细菌门,共有13个细菌门,占比达90%以上。其中,变形菌门(*Proteobacteria*)在4个处理的比例均最高,占比为24.50%–32.16%,其他优势菌门有放线菌门(*Actinobacteriota*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadota*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、粘球菌门(*Myxococcota*)、

疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、髌骨细菌门(*Patescibacteria*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。方差分析结果表明,除浮霉菌门和疣微菌门外,其余9个优势菌门均在0.01水平有显著差异(表4)。其中,变形菌门相对丰度随连作年限的延长而逐渐增加;而芽单胞菌门、粘球菌门和疣微菌门在3Y和/或5Y处理下显著增加($P < 0.05$),然10Y处理下相对丰度下降,但均与1Y处理无显著差异;相反的,放线菌门相对丰度在3Y和5Y处理下显著降低,10Y时显著增加,但仍较1Y降低了

表 4 不同处理土壤细菌群落优势门水平上物种相对丰度分布

Table 4 The most relative abundance of soil bacterial community at phylum levels under different treatments (%)

Dominant bacteria phylum	1Y	3Y	5Y	10Y
<i>Proteobacteria</i>	24.50±1.89a	25.93±0.88a	31.14±0.70b	32.16±1.03b
<i>Actinobacteriota</i>	16.87±0.02d	12.04±1.07b	9.76±1.11a	14.18±0.48c
<i>Acidobacteria</i>	15.08±2.11b	13.47±1.59b	8.25±1.57a	6.03±0.44a
<i>Bacteroidetes</i>	6.80±0.62a	8.81±0.48b	11.34±0.7c	9.27±0.77b
<i>Gemmatimonadota</i>	10.84±0.82a	14.57±1.59b	16.31±0.90b	10.85±0.17a
<i>Myxococcota</i>	3.20±0.20a	4.04±0.11b	5.05±0.40b	3.21±0.06a
<i>Chloroflexi</i>	10.46±0.21c	8.51±0.03b	6.22±0.87a	7.64±0.66b
<i>Verrucomicrobia</i>	2.78±0.75ab	2.41±0.20a	3.60±0.66b	2.53±0.28a
<i>Patescibacteria</i>	1.32±0.37a	1.94±0.32b	2.08±0.28b	5.37±0.19c
<i>Firmicutes</i>	0.45±0.43a	0.86±0.25a	1.99±0.67b	2.39±0.61b
<i>Planctomycetes</i>	1.64±0.54a	1.67±0.31a	2.39±0.32a	2.53±0.37a

1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years. The value is mean±standard error ($n=3$), and different lowercase letters in the same line indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

28%; 同时, 短期连作(3Y 和 5Y)也促进了拟杆菌门的增加, 但随年限延长, 拟杆菌门相对丰度显著下降; 另外, 绿弯菌门、酸杆菌门、厚壁菌门和鞭毛细菌门随连作年限的延长呈递减趋势。

在属水平上, 未知菌群(Unidentified)的相对丰度最高, 为 29.07%–34.24%。优势属群中(相

对丰度大于 1%), 芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、MND1 属、黄色土源菌(*Flavisolibacter*)、*Haliangium* 属和苔藓杆菌属(*Bryobacter*)是 4 个处理的共有优势属群(表 5); 其余包括链霉菌属(*Streptomyces*)、Ellin6067 属、不动杆菌属(*Acidibacter*)、*Dongia* 属、苔藓杆菌属(*Bryobacter*)、类诺卡氏菌属

表 5 不同处理土壤细菌群落优势属水平上物种相对丰度分布

Table 5 The most relative abundance of soil bacterial community at genus levels under different treatments (%)

Dominant bacteria genus	1Y	3Y	5Y	10Y
MND1	1.26±0.10a	1.51±0.21a	3.82±0.10c	2.92±0.12b
Ellin6067	1.65±0.22c	1.26±0.11b	1.04±0.01b	0.33±0.04a
<i>Acidibacter</i>	1.53±0.41c	0.58±0.03ab	0.85±0.08b	0.40±0.03a
<i>Dongia</i>	0.69±0.06b	0.54±0.06a	1.03±0.12c	0.70±0.02b
<i>Rhodanobacter</i>	0.33±0.06a	0.22±0.002a	0.25±0.04a	2.72±0.43b
<i>Chujaibacter</i>	0.70±0.09ab	0.54±0.14a	1.78±0.15c	0.83±0.10b
<i>Streptomyces</i>	1.02±0.12b	0.63±0.08a	0.74±0.15a	1.79±0.04c
<i>Nocardioides</i>	0.58±0.07a	0.88±0.16b	1.05±0.05b	2.23±0.22c
<i>Sphingomonas</i>	2.33±0.25a	4.11±0.38c	3.29±0.09b	4.03±0.14c
<i>Bryobacter</i>	1.14±0.19c	0.83±0.58b	0.48±0.10a	0.42±0.06a
<i>Flavisolibacter</i>	1.48±0.24b	2.11±0.37c	1.65±0.14b	1.00±0.09a
<i>Gemmatimonas</i>	5.08±0.87b	6.99±0.59c	4.82±0.42b	2.04±0.68a
<i>Haliangium</i>	1.08±0.13a	1.42±0.21a	2.34±0.27b	1.17±0.27a

1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years. The value is mean±standard error ($n=3$), different lowercase letters in the same line indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

(*Nocardioides*)、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)和竹杆菌属(*Chujaibacter*)为其中一个或两个处理的优势菌属。同时,连作年限变化对除 *Dongia* 属外的 12 个细菌优势属群均有极显著影响 ($P<0.01$)。随连作年限的增加,苔藓杆菌属、Ellin6067 属、不动杆菌属的相对丰度呈递减趋势,而类诺卡氏菌属则呈现出递增的趋势;同时,芽单胞菌属、黄色土源菌属、*Haliangium* 属和 MND1 属均呈现出在连作 3Y 或 5Y 内持续增加,随后又显著降低的变化趋势;但相反的,链霉菌属则呈现出连作 5Y 内显著降低 ($P<0.05$),随后又显著增加的变化趋势;而罗河杆菌属在连作 5Y 内相对丰度无显著变化,但 10Y 时急剧增加,是 1Y 处理的 7.2 倍 ($P<0.05$)。

2.5 环境因子与微生物群落结构及多样性之间的相关性

Pearson 相关性分析结果表明(表 6), Chao1 指数与 DOC 呈极显著正相关性 ($r=0.775$, $P<0.01$), 而 Shannon 指数则与 C/N 比 ($r=-0.853$, $P<0.01$)、SOM ($r=-0.787$, $P<0.01$)和 AP ($r=-0.781$, $P<0.01$)均呈极显著负相关。

利用 Canoco 4.5 软件对细菌 OTUs 水平群落丰度进行除趋势对应分析方法(Detrended correspondence analysis, DCA)分析。结果显示, 4 个轴中的特征值最大为 0.588 (该值小于 3.0), 故选择线性模型中冗余分析(RDA)用于后续分析。从图 4 看出, 所有被选择的土壤环境因子共解释了土壤细菌群落变化的 83.3%, RDA 的

表 6 土壤细菌群落多样性指数与被选择的土壤理化性质相关性

Table 6 Pearson's rank correlation coefficients between soil bacterial diversity indices and selected soil physicochemical properties

Alpha diversity index	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	C/N	SOM	pH	EC	CEC	DOC	DON	AK	AP
Chao 1 index	-0.354	0.082	0.537	0.281	0.556	0.035	-0.275	0.775**	0.245	0.405	0.301
Shannon index	0.071	-0.268	-0.853**	-0.787**	0.206	-0.178	0.267	-0.555	0.574	-0.503	-0.781**
Simpon index	0.129	0.076	-0.252	-0.218	0.104	0.110	-0.012	-0.158	0.218	-0.003	-0.291

*: Significant correlation ($P<0.05$); **: Extremely significant correlation ($P<0.01$).

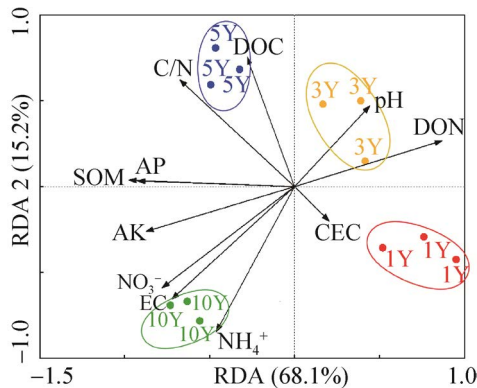


图 4 基于 OTU 水平细菌群落与被选择土壤理化因子 RDA 分析

Figure 4 RDA analysis of bacterial community species and selected soil physicochemical properties at the OTU level. 1Y: Soil from continuous cropping for 1 year; 3Y: Soil from continuous cropping for 3 years; 5Y: Soil from continuous cropping for 5 years; 10Y: Soil from continuous cropping for 10 years.

前两个轴分别解释总变异的 68.1% (RDA1)和 15.2% (RDA2)。不同连作年限土壤样本分别分布在四个不同的象限,其中, 1Y 与 3Y 位于 X 轴的正侧, 而 5Y 和 10Y 位于 X 轴的负侧, 同时, 1Y 和 10Y 与 3Y 和 5Y 在 Y 轴上分开。结合蒙特卡洛置换检验, 进一步揭示影响细菌微生物群落结构的关键理化因子, 与第 1 排序轴相关性高的理化性质依次为: SOM ($r=0.973$, $P=0.001$)、AP ($r=-0.922$, $P=0.001$)、DON ($r=0.868$, $P=0.002$)、AK ($r=-0.872$, $P=0.002$), 其中 SOM 和 AP 对细菌组成影响更大。1Y 和 3Y 与 SOM、AP 和 AK 呈负相关, 与 DON 呈正相关, 相反, 5Y 和 10Y 与 SOM、AP 和 AK 呈正相关, 与 DON 呈负相关。这些环境因子与

细菌群落组成具有显著的相关性, 是影响细菌群落组成的重要因素。

Pearson 相关性分析显示(图 5), SOM、EC、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、AK、AP 与罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、MND1 属呈显著正相关, 与芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、Ellin6067 属、苔藓杆菌属(*Bryobacter*)、黄色土源菌属(*Flavisolibacter*)、不动杆菌属(*Acidibacter*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)呈负相关; 而 DON 与芽单胞菌属、黄色土源菌属、Ellin6067 属和苔藓杆菌属呈正相关, 与 *Dongia* 属、罗河杆菌属、链霉菌属、类诺卡氏菌属、MND1 属呈负相关, 除此之外, pH 也显著影响了芽单胞菌属和黄色土源菌属的

菌群丰度。由上述结果可以看出, 长期连作下土壤理化性质的变化是导致微生物群落结构发生改变的重要原因。

2.6 细菌 PICRUSt 功能预测分析

通过 KEGG 数据库中的 KO (KEGG orthology)数据库进行对比, 得到所有样品细菌群落的基因功能分类。其中, 一级功能层共获得细胞过程(cellular processes)、环境信息处理(environmental information processing)、人类疾病(human diseases)、代谢(metabolism)、有机系统(organismal systems)和遗传信息处理(genetic information processing) 6 类生物代谢通路功能。其中, 代谢、遗传信息处理和环境信息处理为主要一级功能, 占比分别为 80.49%–81.28%、11.83%–12.13%和 1.96%–2.02%。

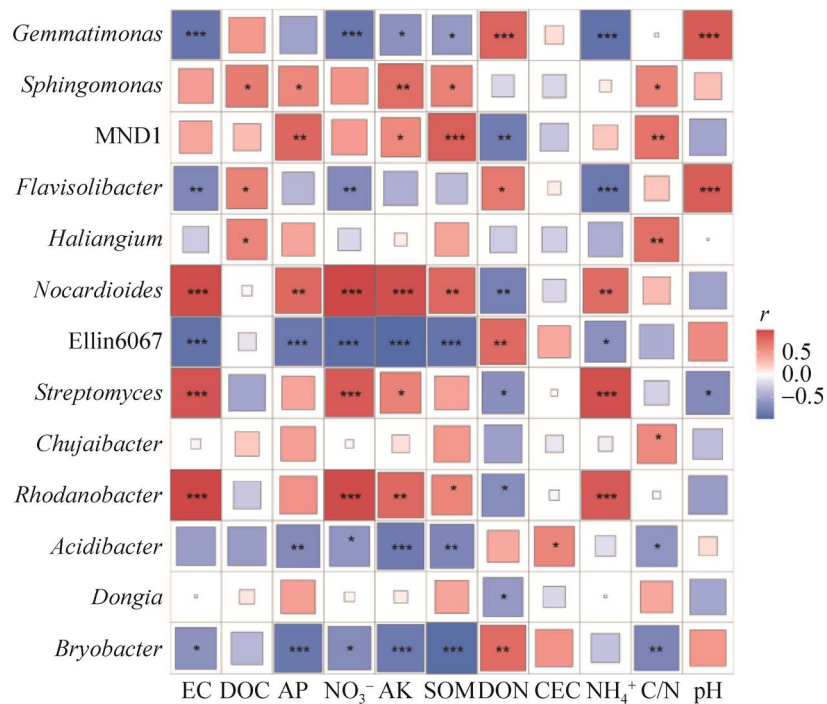


图 5 细菌优势属水平菌群与被选择土壤理化性质相关性分析

Figure 5 Pearson correlation analysis between relative abundance of bacteria and selected soil physicochemical properties. *: $P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

对预测基因二级功能层进行分析,发现其由34个子功能组成。其中,共有17个二级功能层相对丰度大于1%(图6),除A₂、A₆和B₁外的其余14类基因的相对丰度对连作年限变化均有显著响应($P < 0.05$)。对于属于同一级代谢通路的二级代谢通路基因,随连作年限的延长,其变化趋势也并不一致。其中,氨基酸代谢(A₆)或碳水化合物代谢(A₁)占主导地位,其次为辅助因子和维生素代谢(A₃),其他功能相对丰度均低于10%。碳水化合物代谢(A₁)、能量代谢(A₄)、萜类化合物和聚酮化合物的代谢(A₇)、其他次生代谢产物的生物合成(A₈)和外源物质生物降解和代谢(A₉)五类功能基因的相对丰度表现出随连作年限的增加而逐渐降低的变化特征,相反的,辅助因子和维生素代谢(A₃)、核苷酸代谢(A₅)、折叠、分类和降解(B₂)、复制和修复(B₄)、膜转运(C₁)、细胞生长与死亡(D₁)六类功能基因的相对丰度随连作年限的增加而增加;而其他包括氨基酸代谢(A₁₀)、聚糖生

物合成和代谢(A₁₁)和细胞运动(D₂)三类功能基因的相对丰度随连作年限延长呈倒“U”型变化趋势。

采用RDA(全部土壤样品细菌二级功能基因类群的DCA1=0.168<3)分析影响4类土壤细菌二级功能变异的主要土壤理化因子(图7)。结果表明,全部土壤理化性质参数解释了不同土壤样品细菌功能差异的87.9%(RDA1:68.8%;RDA2:18.1%);连作1Y的土壤样品的细菌功能基因类群位于RDA1的正侧,而5Y和10Y处理位于RDA1负侧。土壤C/N、SOM、AP和AK与RDA1呈显著正相关,而pH与RDA2呈显著负相关。表征土壤SOM、AP、C/N和AK是导致连作土壤细菌功能显著差异的主要土壤因子。

利用PICRUS_t预测部分氮(N)、磷(P)循环关键基因的相对丰度(图8),共检测到45个与N代谢相关的直系同源基因(KEGG orthology, KO)具有数值,P代谢共检测到36个。N代谢

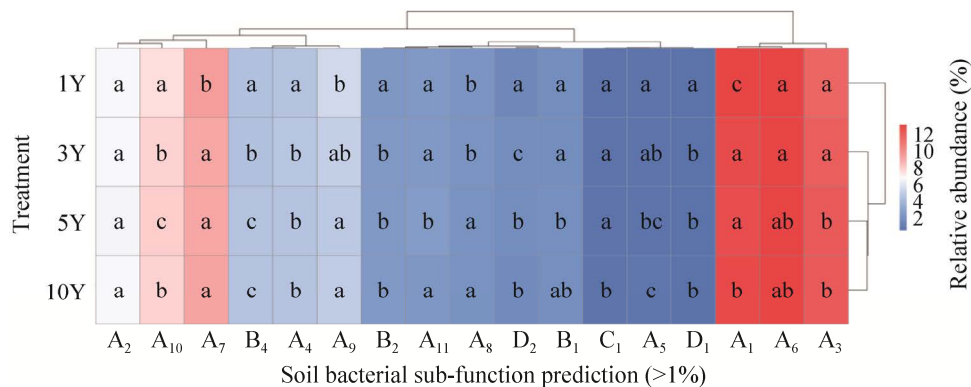


图6 KEGG二级代谢通路基因相对丰度随连作年限的变化

Figure 6 Variations in the relative abundance of KEGG pathway (level II) genes with cropping years. A₁: Carbohydrate metabolism; A₂: Lipid metabolism; A₃: Metabolism of cofactors and vitamins; A₄: Energy metabolism; A₅: Nucleotide metabolism; A₆: Amino acid metabolism; A₇: Metabolism of terpenoids and polyketides; A₈: Biosynthesis of other secondary metabolites; A₉: Xenobiotics biodegradation and metabolism; A₁₀: Metabolism of other amino acids; A₁₁: Glycan biosynthesis and metabolism; B₁: Translation; B₂: Folding, sorting and degradation; B₄: Replication and repair; C₁: Membrane transport; D₁: Cell growth and death; D₂: Cell motility. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

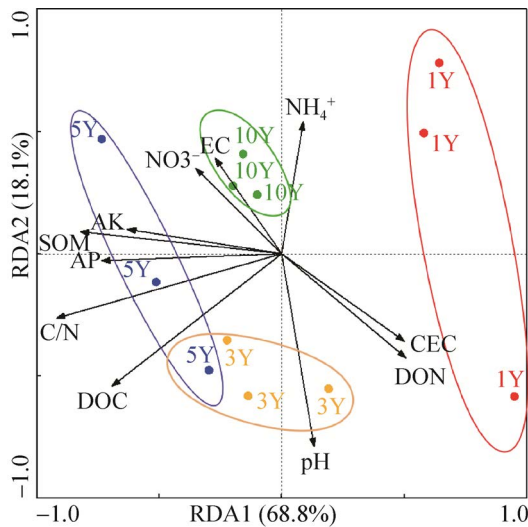


图 7 土壤细菌群落二级功能基因与被选择土壤理化性质的 RDA 分析

Figure 7 RDA analysis of selected soil physicochemical properties and secondary functional genes for soil bacterial community.

主要包括固氮作用(*narG*、*narH*、*narI*、*napA*和*napB*)、反硝化作用(*narG*、*nirK*、*nirS*等)和氮同化还原及异化还原作用(*narA*、*narB*、*nirA*和*nasB*等)。P 循环相关功能基因主要参考 LeBrun 和 Kang 的文献^[19]。从 N(图 8A)、P 循环(图 8B)基因拷贝数聚类分析结果可知,连作改变了土壤细菌 N 和 P 代谢能力,且长期连作(10Y)和短期连作(1Y 和 3Y)之间的细菌 N 和 P 代谢能力也存在显著差异。

3 讨论

3.1 辣椒连作降低了土壤细菌群落多样性和网络复杂性

诸多研究表明,土壤微生物群落在土壤功能和生态系统可持续性中起着重要作用。因此,揭示连作制度下土壤微生物群落的变化规律,有助于理解发生辣椒连作障碍的原因。其中,微生物群落的多样性和丰富度被认为是土壤生态系统完整性、功能和长期可持续性的关键^[20]。

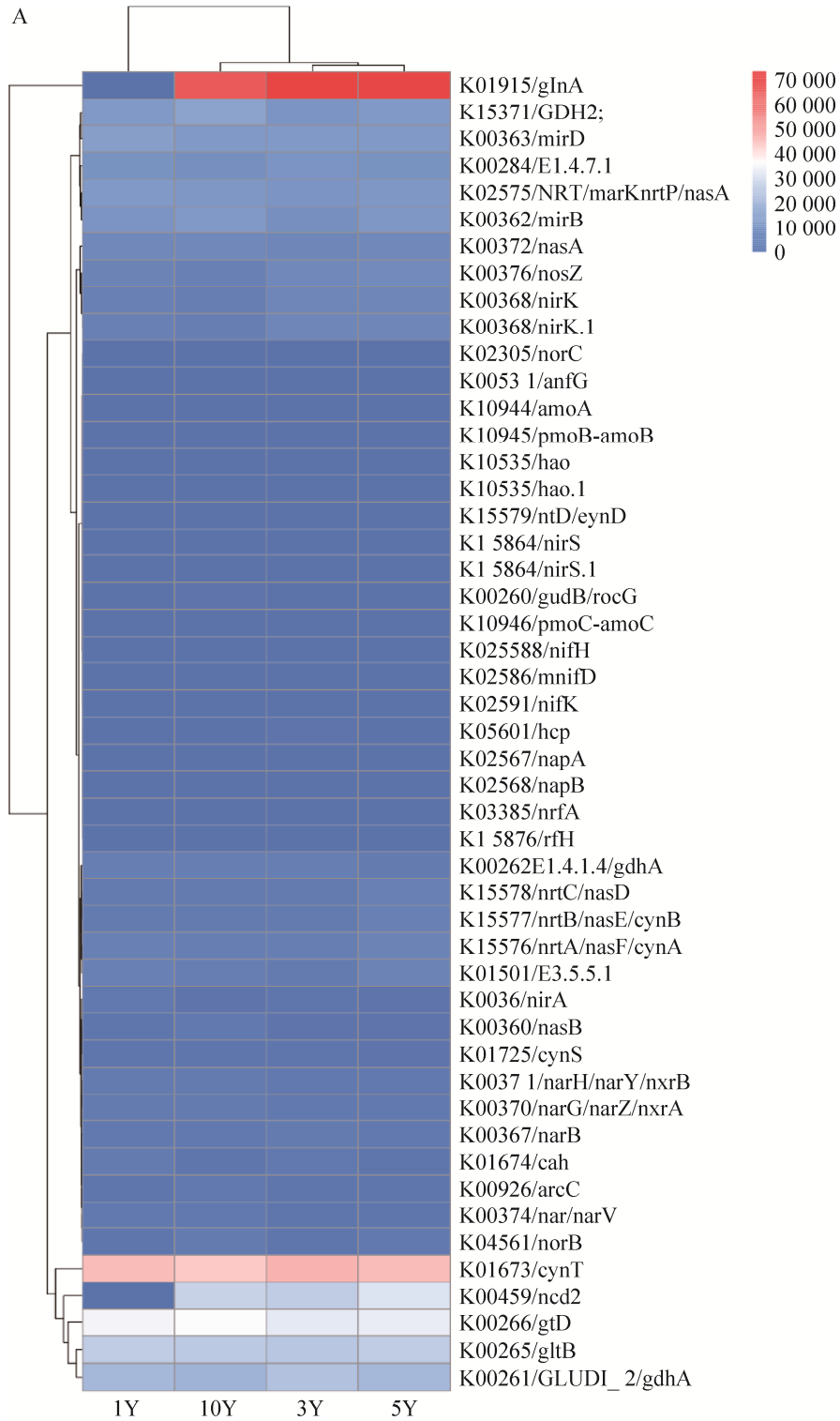
本研究发现,尽管连作后的土壤有更多可被微生物利用的养分和有机物质,但细菌群落多样性随着连作年限的延长而降低,这与部分前人的研究结果相一致^[2,21-22],但细菌丰富度的变化与前期研究结果有所差异^[7,23]。本研究中,细菌丰富度随连作年限延长呈现出先增加后降低的趋势,转折点在连作 3Y 附近,但尽管如此,5Y 和 10Y 处理的细菌丰富度仍显著高于 1Y 处理。表明,连作过程提高了土壤细菌丰富度。细菌适合生长在养分丰富的土壤环境中,较高的土壤肥力能够刺激细菌的生长,有利于土壤中细菌总体的丰富度的提高。但在连作系统中,相同的田间管理模式、植物化感物质的长期累积以及同类型根系分泌物长期释放的生态效应,导致土壤中的微生物区系发生改变,微生物群落结构的失衡,可能是微生物多样性下降的重要原因^[24-25]。同时,种植过程中农药和杀虫剂的使用也可能降低土壤细菌群落多样性。此外,有学者曾提出^[26],向土壤添加营养物质后,土壤中的部分物种对过量的营养物质反应迅速,进而通过快速繁殖占领寡营养微生物的生态位,导致微生物多样性立即下降,一般来说土壤微生物多样性越丰富则微生物群落的稳定性越好,而土壤细菌多样性的丧失被认为是生态系统功能的主要威胁,可能对与生物量生产、养分循环和分解有关的生态系统功能产生明显的负面影响^[27]。另外,我们还发现,随着连作年限延长,细菌网络的复杂性和菌群模块化程度逐渐降低。此前有研究表明,具有复杂网络结构的细菌群落比简单网络更能抵抗环境干扰^[28]。因此,延长连作年限导致土壤细菌对环境变化的抵抗力减弱^[29],不利于土壤可持续发展。

3.2 辣椒连作影响了土壤细菌的组成和功能

辣椒连作显著影响土壤细菌微生物群落。本研究显示,连作后的细菌群落结构组成发生

明显的分异，并且随着连作年限的延长，细菌结构变化越明显。这与 Liu 等^[2,21]的研究结果相

近，他们发现，大豆和葡萄长期和短期连作体系中土壤细菌群落均存在显著差异。



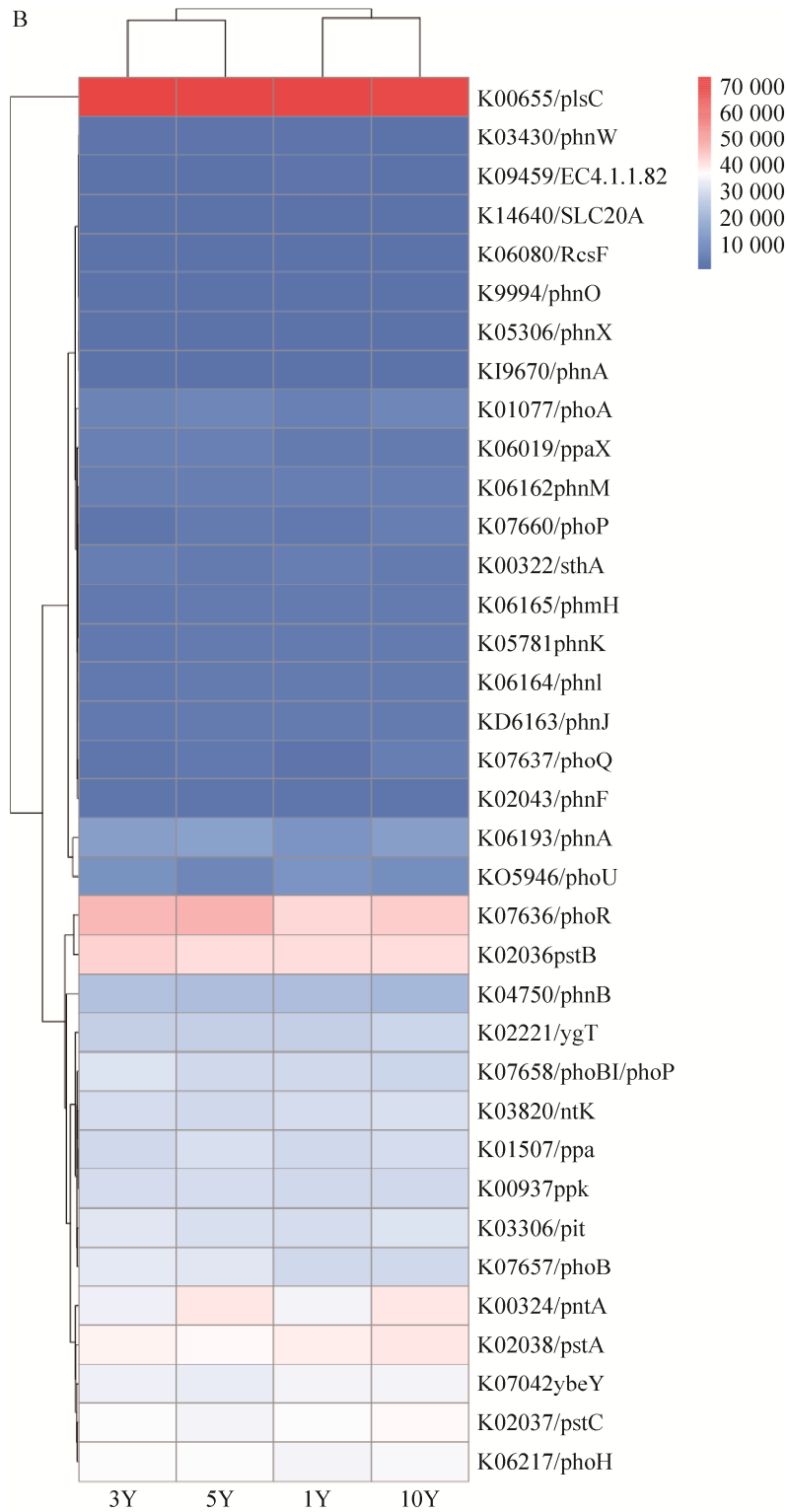


图 8 氮、磷代谢相关 KO 预测基因拷贝数相对丰度热图

Figure 8 Heatmap of nitrogen and phosphorus metabolism related KO based on predicted genes copy number. A: Nitrogen metabolism. B: Phosphorus metabolism.

细菌的相对丰度受连作年限的影响发生了显著变化, 本研究中, 4 个连作土壤的细菌优势门为变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门、酸杆菌门和拟杆菌门。变形菌门是 4 个处理中占绝对优势的细菌门类群。变形菌门和拟杆菌门为富营养菌门, 二者相对丰度在连作后养分含量和土壤有机质显著增加的情况下随连作年限的延长呈增长趋势; 而酸杆菌门通常在土壤中被鉴定为一种寡养(或 k 选择)细菌群^[30], 其相对丰度也随土壤养分的累积而降低。表明, 三者在对连作措施的响应与其营养性关系基本保持一致。而其他富营养型菌门如放线菌门相对丰度在连作后明显降低, 但寡营养菌门中的厚壁菌门相对丰度随连作年限延长而增加, 表明连作过程在一定程度上改变了这些菌群的生长策略。前期有研究发现^[31], 放线菌门是形成土壤有机质的关键生物, 能够促进土壤有机质的分解, 且具有解磷作用。但高有机质的环境不利于其生长繁殖^[23], 这与本研究放线菌门与 SOM、DOC、C/N 和 AP 的相关性结果一致。而厚壁菌门可以产生芽孢抵御外界有害因子, 具有极强的抗逆性, 本研究中厚壁菌门丰度随着连作年限的增加而在一定程度上增加土壤抗病害风险的能力。有文献发现^[32], 粪肥中富含丰富的厚壁菌门和拟杆菌门, 因此, 有机粪肥的施用可能有利于以上菌门的富集。相反的, 绿弯菌门能够降解纤维素并维持土壤中碳含量的水平稳定, 芽单胞菌属(芽单胞菌门)与土壤氮代谢、磷酸盐与次磷酸盐代谢密切相关^[33], *Bryobacter* 属(酸杆菌门)可以降解包括纤维素和木聚糖在内的各种多糖为自身碳源^[31]。以上菌群相对丰度随连作年限延长均显著降低, 说明连作(尤其是长期连作)改变了细菌微生物的代谢方式, 不利于土壤有机质的降解和物质循环。

此前有研究证实, 类诺卡氏菌属(放线菌门)和鞘氨醇单胞菌属(放线菌门)与杀虫剂和抗菌剂的降解密切相关^[27]。本研究中, 以上两个属群的相对丰度在连作 10Y 时最高, 这可能是由于连作过程中长期采用化学杀虫剂进行有害生物管理, 导致土壤有机物污染严重, 促进了降解大分子有机污染物的微生物的繁殖。同时, 鞘氨醇单胞菌属丰度显著增加, 也有利于促进辣椒次生代谢产物的降解^[34]。链霉菌属(放线菌门)和罗河杆菌属(变形菌门)为生防菌, 链霉菌属可通过产生抗真菌、抗菌活性和抗病毒毒素来预防部分土传疾病^[31]。而罗河杆菌属具有氧化酶和过氧化氢酶活性, 对根腐病病原菌有明显的拮抗效应^[35]。本研究中, 链霉菌属和罗河杆菌属相对丰度随连作年限延长呈现出不对称的“U”型, 在 3Y 和 5Y 时降低, 说明连作 3Y 年后土壤对病原菌的抗性下降, 在 10Y 处理中显著增加, 在此考虑在连作 5 年至 10 年期间有土传病害爆发促进了拮抗生防菌的繁殖。值得注意的是, 本研究中, 芽孢杆菌属(厚壁菌门)相对丰度在长期连作后显著增加, 但最高占比仍然低于 1% (数据未列出), 研究证实, 大多数芽孢杆菌成员可以抑制土壤中致病微生物的繁殖, 减少植物的土传疾病。因此, 芽孢杆菌的增加可能是对连作措施下土壤理化性质、微生物群落结构和组成变化的微弱响应。

利用 PICRUS_t 对不同连作处理下土壤细菌进行功能预测, 结果显示, 以碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素代谢、萜类化合物和聚酮化合物的代谢四种功能丰度最高, 表明土壤细菌群落积极参与了基本的代谢过程。其中, 碳水化合物的代谢过程与固氮、溶磷等作用密切相关, 且其中间产物可以为许多物质的合成提供原料^[36]; 脂类作为维持生物体正常生命活动基本物质, 其合成代谢对能量存

储和物质运输都至关重要;微生物的能量代谢,特别是矿质养分代谢,对植物生长至关重要。同时,细菌能够通过合成次生生物活性代谢物来抑制土壤中病原性疾病的传播,从而保持宿主健康。本研究中,碳水化合物代谢(A₁)、脂质代谢(A₂)、能量代谢(A₄)、萜类化合物和聚酮化合物的代谢(A₇)以及其他次生代谢产物(A₈)的相关微生物功能基因相对丰度随连作年限延长而降低,结合 RDA 结果说明,延长连作年限后 SOM 和养分累积不利于土壤细菌对碳源的利用、物质循环与转化及生物体代谢调控^[37],这与前面我们对微生物菌群变化的分析结论一致。同时,萜类化合物、聚酮类化合物代谢被证实在抗生素及抗逆性的增强方面具有重要意义^[38]。氨基酸是脂类、碳水化合物、核酸和信号分子合成的前体^[39],同时,氨基酸代谢主要参与脱氨作用和转氨作用,与植株氮素的循环息息相关^[40],连作 5Y 后,土壤细菌氨基酸代谢相对丰度显著降低预示着土壤环境逐渐不利于细菌物质合成和繁衍,且土壤氮循环可能受到抑制^[41]。我们推测,长期连作下,重要代谢功能基因相对丰度显著降低是形成连作障碍的原因之一。此外,土壤辅助因子和维生素代谢相对丰度在 5Y 后显著提高,有利于细菌适应不良环境,这可能由于该功能基因与土壤 AP 含量密切相关^[41];细胞生长与死亡(D₁)和复制和修复(B₄)功能基因相对丰度的变化说明连作年限的延长改变了细菌细胞的生长和死亡周期,有助于提高土壤细菌对因连作引起的土壤环境变化的适应能力,加快细菌群落演替。而膜转运(C₁)的功能基因丰富有利于促进土壤中铁和小分子物质的溶解,保证细菌快速成活^[42]。但目前,由于 PICRUS_t 功能预测存在局限性,后续仍需结合宏基因组测序等技术进一步进行分析验证。

3.3 土壤细菌微生物群落的环境驱动因素

据报道,长期连作导致土壤化学性质恶化,土壤养分含量失衡,最终导致植物产量和品质下降^[3]。本研究发现,连作环境下,长期施用有机肥促进了土壤 SOM 和有效养分(有效氮、有效磷和速效钾)的大量累积,提高了土壤肥力,这与前人^[20,43]的研究结果一致。同时,刘来等^[44]研究发现,辣椒连作 9 年后土壤 pH 显著降低,但本研究中,连作 10 年后的 pH 下降不明显,而连作 5 年时的 pH 甚至有所增加,这可能是由于有机肥呈碱性,常年定期施用减缓土壤酸化。另外,10Y 的土壤 EC 值是 1Y 处理的 3.5 倍,说明,长期连作导致土壤盐渍化严重,而次生盐渍化加剧是设施大棚土壤质量退化的一个重要特征^[45]。

任何环境因子的变化都可能在一定程度上改变土壤微生物群落结构^[46-47]。连作中长年施用有机肥,土壤有机质及速效养分改变较大,这些土壤特性的变化可能驱动着细菌群落结构的变化。本研究中,C/N 比、SOM 和 AP 与细菌群落多样性极显著负相关关系,而 DOC 则是影响细菌丰富度的重要因子。SOM 对土壤生态至关重要,可为植物和微生物提供养分^[48]。连作过程中,有机肥为土壤提供大量有机质,有机质分解过程中形成不同类型的碳源,直接增加了土壤中 DOC 含量,从而促进微生物的生长和繁殖^[46];另一方面,这些碳源在进入土壤后增加了土壤的 C/N 比,对细菌群落结构也具有调控作用^[37]。冗余分析中解释变量的前向选择结果表明土壤 SOM 和 AP 的变化能最大程度上解释土壤细菌群落的改变,且二者与大部分的细菌优势属群有显著相关性。这与前人的研究相似^[19,33]。前期,Zhang 等^[49]发现,随着连作年限的增加,土壤有机质积累导致微生境中氧的扩散减少,从而影响微生物群落组成。Li 等^[11]也

发现,在设施连作黄瓜系统中,AN和AP含量的增加诱导土壤微生物群由细菌向真菌转变。因此,土壤养分变化对土壤微生物群落组成和结构的影响可能比以往认为的更为重要^[30]。

土壤中有有效磷是土壤细菌的重要营养来源^[50]。前期,唐宏亮等^[51]研究发现,土壤磷的生化过程与碳氮循环紧密耦合,土壤有效磷含量的增加能够改变微生物的碳源利用方式,并有助于加快微生物代谢,这与本研究中对细菌功能潜势的预测结果存在一致性。除此之外,本研究中,C/N也是影响细菌群落功能的重要因素^[52]。前期证实,提高C/N比会引起微生物对N源的争夺利用,不利于微生物的分解和氮的转化^[37]。同时,陆地长期施肥后土壤中有有效氮含量的提升不利于自生固氮菌的生长和繁殖,导致土壤固氮的基本过程受到抑制^[53],这也可能是本研究中长期连作后N矿化增加的重要原因。这里对细菌N代谢能力的预测也证实长期连作改变了细菌整体N代谢能力。前期,有诸多证实连作过程中土壤pH值在调控细菌种群生长和代谢过程中的关键作用^[54],但本研究中,pH并不是影响细菌群落结构演替的主导因子,这可能与此处pH变化范围较窄有关。但随着连作持续,土壤中硝态氮含量的不断累积会加速土壤酸化^[44],pH的影响性也可能逐渐凸显。

除此之外,根系分泌物被认为是影响土壤微生物的重要因素之一,并且在植物不同生长阶段驱动微生物群落变化。此前,江山等^[55]发现,辣椒根系分泌物中的邻苯二甲酸、邻苯二甲酸酯类衍生物及雪松醇等物质均具有自毒作用,甚至分析认为分泌物影响下导致的微生物群落结构失衡可能是辣椒连作障碍的重要成因^[56]。但针对这一结论目前仍缺乏最直接性证据。因此,研究根系分泌物-微生物相互作用

及其相关机制,探寻根系分泌物-土壤微生物-连作障碍的关系方面是我们未来重点关注的方向。同时,为了解土壤因子和微生物群落结构的变化,也有必要对辣椒不同生育期连作障碍的影响进行跟踪分析。

4 结论

综上所述,本研究发现,辣椒连作显著影响细菌微生物群落结构,且不同连作年限间细菌群落结构也存在显著差异。延长连作年限导致土壤中细菌多样性显著降低,群落网络的复杂性减少,导致细菌群落稳定性和对环境变化的抵抗力减弱。同时,连作也改变了部分优势菌群的生长策略,导致与有机质分解密切相关的放线菌门、绿弯菌门和酸杆菌门,与土壤氮代谢、磷酸盐与次磷酸盐代谢密切相关的芽单胞菌门相对丰度随连作年限的延长而降低,而链霉菌属和罗河杆菌属等生防菌在长期连作后(10Y)增加则在反映出土壤细菌对环境的适应能力。此外,细菌群落功能发生显著变化,包括碳水化合物的代谢、脂类代谢和氨基酸代谢等重要微生物代谢功能基因相对丰度在长期连作后降低,说明,连作(尤其是长期连作)降低了细菌微生物的物质调控能力。冗余分析结果证实,土壤SOM和AP的累积与细菌微生物群落和功能变化密切相关。未来,设施条件下有必要根据土壤实际情况进行肥料定制或搭配微生物菌肥以求进一步优化土壤环境,缓解连作障碍,提高辣椒产量。

参考文献

- [1] CHEN W, TENG Y, LI ZG, LIU WX, REN WJ, LUO YM, CHRISTIE P. Mechanisms by which organic fertilizer and effective microbes mitigate peanut continuous cropping yield constraints in a red soil of South China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 128:

- 23-34.
- [2] LIU ZX, LIU JJ, YU ZH, YAO Q, LI YS, LING AZ, ZHANG W, MI G, JIN J, LIU XB, WANG GH. Long-term continuous cropping of soybean is comparable to crop rotation in mediating microbial abundance, diversity and community composition[J]. *Soil and Tillage Research*, 2020, 197: 104503.
- [3] MAGUIRE VG, BORDENAVE CD, NIEVA AS, LLAMES ME, COLAVOLPE MB, GÁRRIZ A, RUIZ OA. Soil bacterial and fungal community structure of a rice monoculture and rice-pasture rotation systems[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 151: 103535.
- [4] PHILIPPE V, NEVEEN A, MARWA A, AHMAD BASEL AY. Occurrence of pesticide residues in fruits and vegetables for the Eastern Mediterranean Region and potential impact on public health[J]. *Food Control*, 2021, 119: 107457.
- [5] FIERER N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(10): 579-590.
- [6] 戴雅婷, 闫志坚, 解继红, 吴洪新, 徐林波, 侯向阳, 高丽, 崔艳伟. 基于高通量测序的两种植被恢复类型根际土壤细菌多样性研究[J]. *土壤学报*, 2017, 54(3): 735-748.
DAI YT, YAN ZJ, XIE JH, WU HX, XU LB, HOU XY, GAO L, CUI YW. Soil bacteria diversity in rhizosphere under two types of vegetation restoration based on high throughput sequencing[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(3): 735-748 (in Chinese).
- [7] 曾维爱, 杨昭玥, 黄洋, 谷亚冰, 陶界锰, 刘勇军, 谢鹏飞, 蔡海林, 尹华群. 长期连作农田土壤细菌群落结构和共现网络拓扑性质对土壤理化性质的响应[J]. *微生物学报*, 2022, 62(6): 2403-2416.
ZENG WA, YANG ZY, HUANG Y, GU YB, TAO JM, LIU YJ, XIE PF, CAI HL, YIN HQ. Response of soil bacterial community structure and co-occurrence network topology properties to soil physicochemical properties in long-term continuous cropping farmland[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2403-2416 (in Chinese).
- [8] PANKE-BUISSSE K, POOLE AC, GOODRICH JK, LEY RE, KAO-KNIFFIN J. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(4): 980-989.
- [9] 靳晓拓, 周彦妤, 夏杨荣畅, 陈丽君, 李涛, 赵洪伟. 多效唑对芒果园土壤细菌多样性的影响及 PICRUSt 基因功能预测分析[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(4): 807-814.
JIN XT, ZHOU YY, XIA Y, CHEN LJ, LI T, ZHAO HW. Effects of paclobutrazol on soil bacterial diversity in mango orchard and PICRUSt-based predicted metagenomic analysis[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(4): 807-814 (in Chinese).
- [10] DEMARCO J, MACK MC, BRET-HARTE MS. The effects of snow, soil microenvironment, and soil organic matter quality on N availability in three Alaskan Arctic plant communities[J]. *Ecosystems*, 2011, 14(5): 804-817.
- [11] LI Y, CHI JL, AO J, GAO XM, LIU XH, SUN YL, ZHU WW. Effects of different continuous cropping years on bacterial community and diversity of cucumber rhizosphere soil in solar-greenhouse[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(6): 2380-2390.
- [12] HUANG Y, XIAO X, HUANG HY, JING JQ, ZHAO HJ, WANG L, LONG XE. Contrasting beneficial and pathogenic microbial communities across consecutive cropping fields of greenhouse strawberry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(13): 5717-5729.
- [13] CHEN MN, LI X, YANG QL, CHI XY, PAN LJ, CHEN N, YANG Z, WANG T, WANG M, YU SL. Soil eukaryotic microorganism succession as affected by continuous cropping of peanut: pathogenic and beneficial fungi were selected[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40659.
- [14] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, MCDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, SEVINSKY JR, TURNBAUGH PJ, WALTERS WA, WIDMANN J, YATSUNENKO T, ZANEVELD J, KNIGHT R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [15] 苏迪, 鲍恩侯, 王进. 适钙植物报春苣苔根际土壤微生物群落结构[J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(10): 149-156.
SU D, BAO EY, WANG J. Microbiome composition in rhizosphere and bulk soil of calciphilous plant *Primulina tabacum*[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2020, 22(10): 149-156 (in Chinese).
- [16] 张瑞海, 宋振, 付卫东, 郗玲玲, 高金会, 王然, 王忠辉, 张国良. 植被恢复对刺萼龙葵根际土壤细菌群落结构与功能的影响[J]. *环境科学*, 2021, 42(1): 433-442.
ZHANG RH, SONG Z, FU WD, YUN LL, GAO JH,

- WANG R, WANG ZH, ZHANG GL. Effects of vegetation restoration on the structure and function of the rhizosphere soil bacterial community of *Solanum rostratum*[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(1): 433-442 (in Chinese).
- [17] LANGILLE MGI, ZANEVELD J, CAPORASO JG, MCDONALD D, KNIGHTS D, REYES JA, CLEMENTE JC, BURKEPILE DE, VEGA THURBER RL, KNIGHT R, BEIKO RG, HUTTENHOWER C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [18] 钟菊新, 唐红琴, 李忠义, 董文斌, 韦彩会, 李强, 何铁光. 绿肥配施化肥对岩溶区水稻土壤细菌群落结构的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(10): 1746-1756.
- ZHONG JX, TANG HQ, LI ZY, DONG WB, WEI CH, LI Q, HE TG. Effects of combining green manure with chemical fertilizer on the bacterial community structure in Karst paddy soil[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(10): 1746-1756 (in Chinese).
- [19] LEBRUN ES, KANG S. A comparison of computationally predicted functional metagenomes and microarray analysis for microbial P cycle genes in a unique basalt-soil forest[J]. *F1000Research*, 2018, 7: 179.
- [20] SHANG LR, WAN LQ, ZHOU XX, LI S, LI XL. Effects of organic fertilizer on soil nutrient status, enzyme activity, and bacterial community diversity in *Leymus chinensis* steppe in Inner Mongolia, China[J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0240559.
- [21] LIU QW, WANG SX, LI K, QIAO J, GUO YS, LIU ZD, GUO XW. Responses of soil bacterial and fungal communities to the long-term monoculture of grapevine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(18): 7035-7050.
- [22] GAO ZY, HAN MK, HU YY, LI ZQ, LIU CF, WANG X, TIAN Q, JIAO WJ, HU JM, LIU LF, GUAN ZJ, MA ZM. Effects of continuous cropping of sweet potato on the fungal community structure in rhizospheric soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2269.
- [23] 李晶晶, 续勇波. 连作年限对设施百合土壤微生物多样性的影响[J]. *土壤通报*, 2020, 51(2): 343-351.
- LI JJ, XU YB. Effects of continuous cropping years of lily on soil microbial diversities under greenhouse cultivation[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2020, 51(2): 343-351 (in Chinese).
- [24] LI XG, DING CF, HUA K, ZHANG TL, ZHANG YN, ZHAO L, YANG YR, LIU JG, WANG XX. Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 78: 149-159.
- [25] LI XG, JOUSSET A, de BOER W, CARRIÓN VJ, ZHANG TL, WANG XX, KURAMAE EE. Legacy of land use history determines reprogramming of plant physiology by soil microbiome[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(3): 738-751.
- [26] van BRUGGEN AHC, SEMENOV AM. In search of biological indicators for soil health and disease suppression[J]. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15(1): 13-24.
- [27] ZHOU XG, LIU J, WU FZ. Soil microbial communities in cucumber monoculture and rotation systems and their feedback effects on cucumber seedling growth[J]. *Plant and Soil*, 2017, 415(1): 507-520.
- [28] SANTOLINI M, BARABÁSI AL. Predicting perturbation patterns from the topology of biological networks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(27): E6375-E6383.
- [29] BAI R, WANG JT, DENG Y, HE JZ, FENG K, ZHANG LM. Microbial community and functional structure significantly varied among distinct types of paddy soils but responded differently along gradients of soil depth layers[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 945.
- [30] FIERER N, BRADFORD MA, JACKSON RB. Toward an ecological classification of soil bacteria[J]. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [31] ZHAO YN, MAO XX, ZHANG MS, YANG W, DI HJ, MA L, LIU WJ, LI BW. Response of soil microbial communities to continuously mono-cropped cucumber under greenhouse conditions in a calcareous soil of North China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20(5): 2446-2459.
- [32] 练金山, 王慧颖, 徐明岗, 魏文良, 段英华, 刘树堂. 长期施用有机肥潮土细菌的多样性及功能预测[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(12): 2073-2082.
- LIAN JS, WANG HY, XU MG, WEI WL, DUAN YH, LIU ST. Diversity and function prediction of bacteria community in fluvo-aquic soils as affected by long-term organic fertilization[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(12): 2073-2082 (in

- Chinese).
- [33] 张仲富, 喻庆国, 王行, 刘会会, 赵亚川, 谢雪杨, 张萌, 耿玮. 植物群落和土壤理化性质对碧塔海湿地土壤细菌群落的影响[J]. 应用生态学报, 2021, 32(6): 2199-2208.
ZHANG ZF, YU QG, WANG H, LIU HH, ZHAO YC, XIE XY, ZHANG M, GENG W. Effects of plant community and soil properties on soil bacterial community in Bitahai Wetland, Southwest China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2021, 32(6): 2199-2208 (in Chinese).
- [34] 杜思瑶, 于森, 刘芳华, 肖雷雷, 张洪霞, 陶军, 顾卫, 顾京晏, 陈茜. 设施种植模式对土壤细菌多样性及群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(11): 1615-1625.
DU SY, YU M, LIU FH, XIAO LL, ZHANG HX, TAO J, GU W, GU JY, CHEN X. Effect of facility management regimes on soil bacterial diversity and community structure[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25(11): 1615-1625 (in Chinese).
- [35] 田程, 邱婷, 朱菲莹, 肖姬玲, 魏林, 梁志怀. 氧化钙对西瓜枯萎病及根际细菌群落的调控[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2018, 44(6): 620-624.
TIAN C, QIU T, ZHU FY, XIAO JL, WEI L, LIANG ZH. Calcium oxide regulation of *Fusarium* wilt and rhizosphere bacterial community[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2018, 44(6): 620-624 (in Chinese).
- [36] 徐伟, 葛阳阳, 陈翠婷, 马婷婷. 基于宏基因组技术分析传统红茶菌中菌群组成及其主要代谢通路[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 119-123, 129.
XU W, GE YY, CHEN CT, MA TT. Microorganism composition and main metabolic pathways analysis of traditional Kombucha by metagenomic technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(5): 119-123, 129 (in Chinese).
- [37] 梁艳, 明安刚, 何友均, 罗应华, 谭玲, 覃林. 南亚热带马尾松-红椎混交林及其纯林土壤细菌群落结构与功能[J]. 应用生态学报, 2021, 32(3): 878-886.
LIANG Y, MING AG, HE YJ, LUO YH, TAN L, QIN L. Structure and function of soil bacterial communities in the monoculture and mixed plantation of *Pinus massoniana* and *Castanopsis hystrix* in southern subtropical China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2021, 32(3): 878-886 (in Chinese).
- [38] 陈末, 朱新萍, 蒋靖佰伦, 买迪努尔·阿不来孜, 孙涛, 贾宏涛. 冻融期巴音布鲁克高寒湿地土壤细菌群落变化及其响应机制[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(1): 134-142.
CHEN M, ZHU XP, JIANG JBL, ABULAIZI M, SUN T, JIA HT. Shifts in soil bacterial community and their response mechanism during freeze-thaw period in Bayinbuluk alpine wetland[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(1): 134-142 (in Chinese).
- [39] 胡居吾, 朱仁果, 王慧宾, 邓朝阳, 张蕾. 松针中游离氨基酸代谢对环境氮的响应[J]. 生物化工, 2017, 3(3): 5-8.
HU JW, ZHU RG, WANG HB, DENG ZY, ZHANG L. Free amino acids in pine needles response to environment nitrogen[J]. Biological Chemical Engineering, 2017, 3(3): 5-8 (in Chinese).
- [40] 丁钰珮, 杜宇佳, 高广磊, 张英, 曹红雨, 朱宾宾, 杨思远, 张敬醒, 邱业, 刘惠林. 呼伦贝尔沙地樟子松人工林土壤细菌群落结构与功能预测[J]. 生态学报, 2021, 41(10): 4131-4139.
DING YP, DU YJ, GAO GL, ZHANG Y, CAO HY, ZHU BB, YANG SY, ZHANG JX, QIU Y, LIU HL. Soil bacterial community structure and functional prediction of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantations in the Hulun Buir Sandy Land[J]. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(10): 4131-4139 (in Chinese).
- [41] 杨盼, 翟亚萍, 赵祥, 王绍明, 刘红玲, 张霞. 丛枝菌根真菌和根瘤菌互作对苜蓿根际土壤细菌群落结构的影响及 PICRUSt 功能预测分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3868-3879.
YANG P, ZHAI YP, ZHAO X, WANG SM, LIU HL, ZHANG X. Effect of interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* on *Medicago sativa* rhizosphere soil bacterial community structure and PICRUSt functional prediction[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3868-3879 (in Chinese).
- [42] 杜宇佳, 高广磊, 陈丽华, 丁国栋, 张英, 曹红雨. 呼伦贝尔沙区土壤细菌群落结构与功能预测[J]. 中国环境科学, 2019, 39(11): 4840-4848.
DU YJ, GAO GL, CHEN LH, DING GD, ZHANG Y, CAO HY. Soil bacteria community structure and function prediction in the Hulun Buir Sandy Area[J]. China Environmental Science, 2019, 39(11): 4840-4848 (in Chinese).
- [43] HONG YC, DAI YJ, XIN W. Effects of continuous monoculture of *Achyranthes bidentata* on diversity of soil bacterial community [J]. Allelopathy Journal, 2015, 36 (2): 213-224.
- [44] 刘来. 连作土壤酸化及改良对土壤性状和辣椒生理代谢的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文,

- 2013.
- LIU L. Effect of continuous cropping on properties of soil and growth, physiological metabolism of pepper[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- [45] 文方芳. 种植年限对设施大棚土壤次生盐渍化与酸化的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2016(4): 49-53.
- WEN FF. Effect of planting years on soil secondary salinity and soil acidification in greenhouse[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2016(4): 49-53 (in Chinese).
- [46] 李慧敏, 田胜营, 李丹丹, 李增强, 谭钧, 赵炳梓. 有机物料施用对潮土活性有机碳及微生物群落组成的影响[J]. 土壤学报, 2021, 58(3): 777-787.
- LI HM, TIAN SY, LI DD, LI ZQ, TAN J, ZHAO BZ. Effect of application of organic materials on content of labile organic carbon and composition of microbial community in fluvio-aquatic soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(3): 777-787 (in Chinese).
- [47] ZHENG Q, HU YT, ZHANG SS, NOLL L, BÖCKLE T, DIETRICH M, HERBOLD CW, EICHORST SA, WOEBKEN D, RICHTER A, WANKE W. Soil multifunctionality is affected by the soil environment and by microbial community composition and diversity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 136: 107521.
- [48] FAN MS, LAL R, CAO J, QIAO L, SU YS, JIANG RF, ZHANG FS. Plant-based assessment of inherent soil productivity and contributions to China's cereal crop yield increase since 1980[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74617.
- [49] ZHANG HJ, DING WX, YU HY, HE XH. Linking organic carbon accumulation to microbial community dynamics in a sandy loam soil: result of 20 years compost and inorganic fertilizers repeated application experiment[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(2): 137-150.
- [50] 安然, 马风云, 崔浩然, 秦光华, 黄雅丽, 田琪. 黄河三角洲刺槐臭椿混交林与纯林土壤细菌群落结构和多样性特征分析[J]. 生态学报, 2019, 39(21): 7960-7967.
- AN R, MA FY, CUI HR, QIN GH, HUANG YL, TIAN Q. Analysis of bacterial community structure and diversity characteristics of mixed forest of *Robinia pseudoacacia* and *Ailanthus altissima* and there pure forest in the Yellow River Delta[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(21): 7960-7967 (in Chinese).
- [51] 唐宏亮, 郭秋换, 张春潮, 段霄霄. 磷供应对玉米根际微生物碳源利用和功能多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(10): 1312-1319.
- TANG HL, GUO QH, ZHANG CC, DUAN XX. Effects of phosphorus supply on microbial carbon source utilization and functional diversity of maize rhizosphere[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(10): 1312-1319 (in Chinese).
- [52] 杨璐, 曾闹华, 白金顺, 周兴, 周国朋, 高嵩涓, 聂军, 曹卫东. 紫云英季土壤固氮微生物对外源碳氮投入的响应[J]. 中国农业科学, 2020, 53(1): 105-116.
- YANG L, ZENG NH, BAI JS, ZHOU X, ZHOU GP, GAO SJ, NIE J, CAO WD. Responses of soil diazotroph community to rice straw, glucose and nitrogen addition during Chinese milk vetch growth[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(1): 105-116 (in Chinese).
- [53] FAN KK, DELGADO-BAQUERIZO M, GUO XS, WANG DZ, WU YY, ZHU M, YU W, YAO HY, ZHU YG, CHU HY. Suppressed N fixation and diazotrophs after four decades of fertilization[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 143.
- [54] 高毓晗. 连作和有机改良对设施黄瓜番茄土壤性质和根际微生物种群结构的影响[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2019.
- GAO YH. Monoculture and organic amendment change soil properties and rhizosphere microflora in cucumber and tomato greenhouses[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [55] 江山, 赵尊练, 臧纱纱, 谢振华, 史联联, 郭建伟. 线辣椒根系分泌物中几种化感物质对其种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 西北农业学报, 2013, 22(12): 137-143.
- JIANG S, ZHAO ZL, ZANG SS, XIE ZH, SHI LL, GUO JW. Influence of several allelochemicals from root exudates on own seed germination and seedling growth in chilli pepper[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2013, 22(12): 137-143 (in Chinese).
- [56] 李晓雪. 辣椒对土壤连作障碍的响应及其成因研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2021.
- LI XX. The mechanisms of continuous cropping obstacle formation of chilli pepper and the response of chilli pepper to continuously mono-cropped system[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2021 (in Chinese)