

韦月平,丛培东,曲贵伟,等. 生物有机肥稻田不同生长时期根际土壤细菌群落动态变化[J]. 江苏农业科学,2022,50(6):181-185.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.06.030

生物有机肥稻田不同生长时期根际土壤 细菌群落动态变化

韦月平,丛培东,曲贵伟,王 鹏,宋 宇

(辽东学院,辽宁丹东 118003)

摘要:为探讨生物有机肥稻田水稻不同生长时期根际土壤细菌群落动态变化及其和环境因子的相关性,利用高通量测序技术对生物有机肥稻田水稻分蘖期、拔节期、抽穗期和成熟期 4 个时期的根际土壤细菌进行高通量测序及分析。结果显示,测序共获得 404 183 个有效序列,可分为 55 个门,171 个纲,385 个目,603 个科,1 010 个属,2 139 个种。 α 多样性分析显示,ACE 多样性指数在生长时期呈现先下降后上升的趋势,分蘖期和拔节期的香农多样性指数均与成熟期差异显著。4 个生长时期的优势菌门相似,优势菌门(相对丰度 $> 10\%$)有放线菌门(Actinobacteriota)、绿弯菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteriota)。 β 多样性分析显示,4 个生长时期的细菌群落结构具有一定的差异性,成熟期和其余 3 个时期的群落结构差异显著。冗余分析(RDA)表明,pH 值是影响细菌群落的第 1 因子,主要菌门都与 pH 值呈正相关,其中绿弯菌门受 pH 值影响最大。相对丰度值最高的放线菌门则受含量影响最大。在生物有机肥稻田中,随着水稻的生长发育,根际土壤的细菌群落结构会随着土壤理化因子发生一定变化,说明土壤理化因子是影响细菌群落的主要因素。

关键词:生物有机肥稻田;土壤细菌;高通量测序技术;群落结构;生长时期;多样性;环境因子

中图分类号:S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)06-0181-05

植物根系可与土壤中的微生物相互合作,植物通过根系吸收水分、无机养分,并分泌有机分泌物供根际微生物生长^[1]。据估计,每克植物根际土壤都含有数 10 亿种微生物,包括数万个物种;因此,土壤被认为是一个高度复杂和动态的生态系统^[2-4]。根际微生物可以通过溶磷、固氮作用或激素合成、降解作用促进植物从环境中吸取营养及调控植物的生长和环境适应性并可通过与致病菌的作用或诱导植物抗性来调控免疫反应^[5-9]。水稻是我国最重要的粮食作物,其种植面积约占世界水稻种植面积的 1/4,占我国耕地面积的 25% 左右^[10]。在水稻与土壤系统中,土壤微生物在维系此系统健康与稳定方面发挥着重要作用。现代农业生产中通过使用化肥农药来减少病虫害和增加粮食产量。但研究发现,长期使用化肥、农药会导致土壤酸化板结、温室气体排放量增加、水体富氧化等一系列生态环

境问题^[11-13]。为缓解此类问题的发生,通过施加有机肥料与功能性微生物相结合的生物有机肥可改善农田生态环境又可获得绿色安全的稻米。目前,国内外对水稻根际微生物群落的研究集中于以下几个方面:水稻常见疾病发生时根际微生物群落的变化、不同地区不同水稻栽培类型的水稻全生长期根际微生物群落的变化、转基因水稻对根际微生物群落的影响、不同施肥模式对水稻根际微生物的影响、喷施农药对水稻根际微生物的影响等^[14-18];而鲜见对生物有机肥稻田水稻不同生长时期根际细菌群落结构的变化及土壤理化因子相关性分析的报道。土壤微生物群落结构研究现已由只能培养土壤约 0.3% 的微生物的传统分离方法^[19],发展到如今的低成本、高灵敏度快速获取土壤微生物信息的高通量测序法。随着高通量测序技术的发展,常规种植的水稻根际微生物群落相关研究有所进展^[20]。本研究拟通过高通量测序对生物有机肥稻田越光大米不同生长时期根际土壤细菌群落的动态变化进行分析,探讨生物有机肥稻田越光大米不同生长时期根际土壤细菌群落结构变化及其与环境因子的相关性,以期生物有机肥稻田不同生长时期的根际土壤环境提供数据支持,为针对不同

收稿日期:2021-05-08

基金项目:辽宁省 2020 年教育厅科研项目(编号:LNSJYT20200)。

作者简介:韦月平(1972—),女,广西来宾人,硕士,副教授,主要从事生物多样性研究。E-mail:95759605@qq.com。

通信作者:宋 宇,高级实验师,主要从事环境微生物研究。

E-mail:763869365@qq.com。

生长时期的专用有机菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集和处理

本研究选取只施生物有机肥而不用化肥、农药的越光大米稻田为试验材料,试验地点为辽宁省东港市北井子镇盖家坝农场,生物有机肥是日照益康有机农业科技发展有限公司生产的海藻生物有机肥,其分别在 2020 年 3 月和 7 月按 20 kg/666.67 m² 施用。该试验田占地面积约 700 m²,连续 3 年施用生物有机肥,水稻于 2020 年 5 月 10 日进行移栽,株间距为 30 cm × 15 cm,分别在越光大米的分蘖期(2020 年 6 月 29 日,YJT FN)、拔节期(2020 年 7 月 31 日,YJTBJ)、抽穗期(2020 年 9 月 2 日,YJTCHS)、成熟期(2020 年 10 月 15 日,YJTCS)在稻田上随机选取 5 个点采用破坏性取样法将水稻整株挖出,勿伤害根系,抖落大块土壤后用无菌刷刷取根际区域约 1 mm 紧密黏附在根表面的土壤,每 5 株为 1 个重复,每个时期 3 次重复。混合后的样品分成 2 份,1 份装入 50 mL 离心管中,于 -80 ℃ 冷冻保存,用于微生物多样性分析;另一份装入密封袋,带回风干处理,用于土壤理化指标分析。

1.2 土壤理化因子的测定

有机质含量测定采用重铬酸钾氧化-分光光度法,土壤 pH 值采用酸度计测定,速效磷含量测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法,速效钾含量测定采用氯化钙浸提-火焰光度计法,全氮含量测定采用凯氏定氮法^[21]。

1.3 样品总 DNA 提取与高通量测序

称取 0.5 g 在 -80 ℃ 冰箱中保存的样品,利用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(FastDNA® Spin Kit for Soil)进行基因组 DNA 提取,提取的 DNA 经适当稀释后于 -20 ℃ 条件下保存用于后续聚合酶链式反应(PCR)扩增。用通用引物 338F:ACTCCTACGG GAGGCAGCAG 和 806R:GGACTACHVGGGTWTCTA

AT,扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区并利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台,委托上海美吉生物医药科技有限公司对 PCR 扩增产物进行双端测序。

1.4 数据的质控与分析

高通量测序所得到的原始双端序列数据经 Trimmomatic 软件去杂、Flash 软件拼接后通过 Qiime 软件进行质控并利用 usearch 软件去除嵌合体序列即得到优质序列。利用 UPARSE 按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行操作分类单元(OTU)聚类并去除嵌合体,得到 OTU 的代表序列。基于 Silva 细菌分类学数据库利用 RDP Classifier(version 2.1.1)软件对 OTU 进行分类学注释,得到每个 OTU 对应的物种分类信息以统计各水平下各样品的群落组成^[22]。利用 mothur(1.30.2) 软件计算 α 多样性指数,利用 R 语言 vegan 包中冗余分析(RDA)进行环境因子关联分析。利用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 生物有机肥稻田不同生长时期根际土壤基本理化性质

如表 1 所示,速效磷和速效钾含量会随着水稻的生长发育而呈递减趋势。速效磷含量在各个生长时期无显著差异。随着水稻的生长,pH 值先降低后升高,拔节期最低,成熟期最高,但不同生长时期差异不显著。有机质和全氮含量则是拔节期 > 成熟期 > 分蘖期 > 抽穗期,且拔节期与成熟期、分蘖期、抽穗期都有显著差异。抽穗期和成熟期的速效钾含量均显著低于分蘖期和拔节期。

2.2 生物有机肥稻田不同生长时期土壤细菌群落高通量文库及 α 多样性指数分析

通过对土壤细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区进行高通量测序,该研究中水稻 4 个生长时期的 12 个样本共获得 404 183 个有效序列,其中部分序列

表 1 生物有机肥稻田不同生长时期根际土壤理化因子

生长时期	pH 值	有机质含量 (g/kg)	全氮含量 (g/kg)	速效磷含量 (mg/kg)	速效钾含量 (mg/kg)
分蘖期	5.67 ± 0.08a	25.68 ± 0.87b	1.44 ± 0.05b	19.43 ± 1.74a	153.80 ± 32.27a
拔节期	5.58 ± 0.14a	34.32 ± 1.54a	1.73 ± 0.24a	17.05 ± 3.14a	100.56 ± 23.23a
抽穗期	5.78 ± 0.28a	24.30 ± 0.39b	1.36 ± 0.02b	16.77 ± 1.71a	73.46 ± 7.09b
成熟期	5.94 ± 0.15a	26.61 ± 2.55b	1.49 ± 0.01b	14.41 ± 1.20a	71.52 ± 3.87b

注:同列数据后不同英文字母表示差异显著(P < 0.05)。下表同。

重复,分析时已去除。各时期获得 3 184 ~ 4 031 个 OTU,从分蘖期到成熟期 OTU 数呈递增趋势;其中,分蘖期、拔节期、抽穗期 OTU 数与成熟期差异显著。所有样品的覆盖度都大于 0.96,接近于 1,说明测序

深度已经基本覆盖样品中的所有物种。ACE、香农 (Shannon) 等 2 种 α 多样性指数分析显示,分蘖期和拔节期与成熟期之间的 Shannon 指数差异显著 (表 2)。

表 2 生物有机肥稻田不同生长时期土壤细菌群落高通量文库及多样性指数分析

生长时期	序列数(个)	OTU 数(个)	ACE 指数	Shannon 指数	覆盖度
分蘖期	30 309 ± 4 757	3 184 ± 226b	4 619.55 ± 181.71a	6.68 ± 0.06b	0.96
拔节期	28 774 ± 4 525	3 197 ± 265b	4 510.43 ± 311.12a	6.68 ± 0.02b	0.96
抽穗期	33 033 ± 3 064	3 403 ± 255b	4 699.07 ± 304.37a	6.79 ± 0.08b	0.96
成熟期	42 612 ± 5 283	4 031 ± 192a	5 226.47 ± 143.47a	7.00 ± 0.05a	0.97

2.3 生物有机肥稻田不同生长时期土壤细菌群落结构动态分析

本研究获得的微生物序列可分为 55 个门,171 个纲,385 个目,603 个科,1 010 个属,2 139 个种。将各样品中相对丰度 <1% 的归为其他,则所有样品中放线菌门 (Actinobacteriota, 13.5% ~ 25.53%)、绿弯菌门 (Chloroflexi, 17.62% ~ 20.35%)、变形菌门 (Proteobacteria, 16.47% ~ 17.95%) 和酸杆菌门 (Acidobacteriota, 9.25% ~ 11.26%) 的相对丰度均 >10%,在不同生长时期占比最大 (图 1)。此外,样品中还有脱硫杆菌门 (Desulfobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidete)、厚壁菌门 (Firmicutes)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、黏球菌门 (Myxococcota)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、骸骨菌门 (Patescibacteria)、MBNT15 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 等 (图 2)。在优势菌群中,放线菌门在各个生育期的相对丰度

有明显差异,其中拔节期相对丰度最高而成熟期则最低。其余优势菌群在各个生长时期的相对丰度差异不明显。变形菌门、绿弯菌门相对丰度随着生长时期的增加呈现先下降后升高的趋势。脱硫杆菌门、厚壁菌门、黏球菌门相对丰度随着生长时期的增加先逐步升高后在成熟期有所下降。

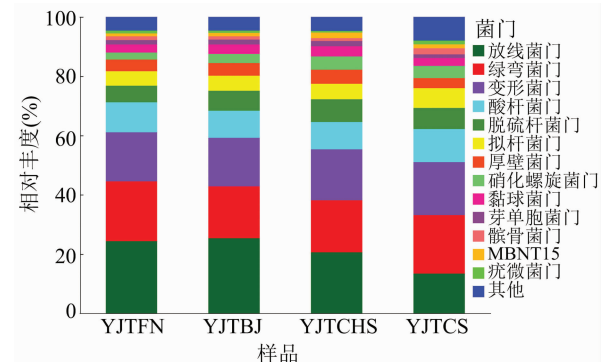


图1 生物有机肥稻田不同生育期门水平上土壤细菌群落组成

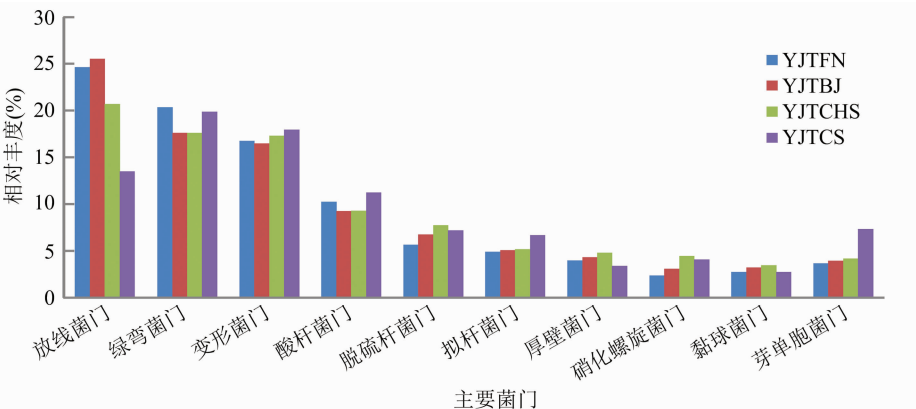


图2 不同生长时期门水平各优势细菌群落丰度变化

2.4 生物有机肥稻田不同生长时期根际土壤细菌群落的 β 多样性分析

β 多样性分析是通过对不同生境或微生物群落间的物种多样性进行组间比较分析来探索不同组分样本间群落组成的相似性或差异性。主分量分

析 (PCA) 也是一种 β 多样性分析方法。如图 3 所示,生物有机肥稻田 4 个生长时期均有一定距离,说明细菌群落结构具有一定差异性,成熟期和其余 3 个时期距离较远,说明成熟期细菌群落结构和另外 3 个时期有明显差异。

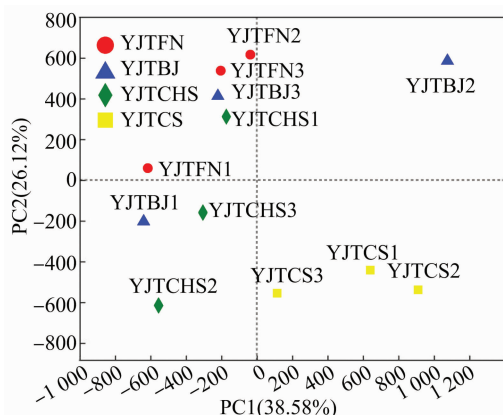
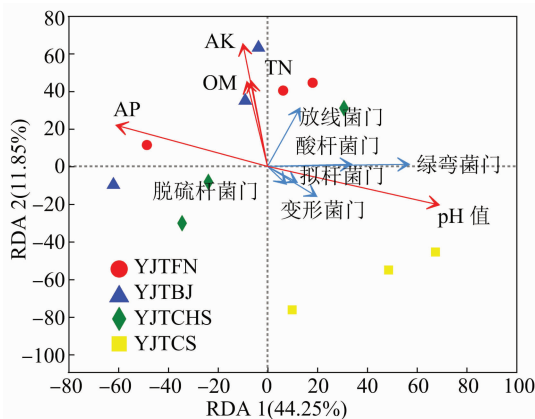


图3 不同生长时期根际土壤细菌群落 PCA 分析

2.5 不同生长时期土壤细菌群落与环境因子的 RDA 分析

通过 RDA 分析对生物有机肥稻田不同生长时期土壤理化因子与根际土壤细菌群落门水平上的关系进行分析。如图 4 所示,2 个排序轴的菌门与环境因子的累积百分比为 56.10%,其中第 1 排序轴贡献了 44.25%,第 2 排序轴贡献了 11.85%。第 1 排序轴主要与速效磷(AP)含量和 pH 值相关,相关系数分别为 -0.994 7 和 0.998 6;第 2 排序轴主要与速效钾(AK)、有机质(OM)、全氮(TN)含量相关,相关系数分别为 0.999 7、0.999 9 和 0.999 3。pH 值是影响菌门的第 1 因子,其次是速效磷和速效钾含量。丰度排名前六的菌门均与 pH 值呈正相关且除放线菌门外与速效磷、速效钾、有机质和全氮含量呈负相关,其中绿弯菌门受 pH 值影响最大。放线菌门和速效钾、有机质和全氮含量呈正相关,其中受全氮含量的影响最大。



图中箭头越长表示影响越大

图4 不同生育期土壤细菌群落与环境因子的 RDA 分析

3 讨论与结论

高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中

已得到广泛应用^[23]。本研究利用此技术通过对 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区的测序分析,成功获得了生物有机肥稻田不同生长时期土壤菌群结构的多样性的菌群信息。测序共获得 404 183 个有效序列,可分为 55 个门,171 个纲,385 个目,603 个科,1 010 个属,2 139 个种。成熟期的 OTU 数最多,分蘖期和拔节期的 OTU 数均与成熟期有显著差异。在门分类水平上,4 个生长时期的优势菌门相近,其中具有抑菌和防治土传病害功效的放线菌门相对丰度最高,这可能和稻田施入生物有机肥有关,研究证实施用有机肥料与功能性微生物相结合的生物有机肥在预防土传病害方面的应用更为有效^[24-25]。Tian 等研究表明,不同类型土壤放线菌数量变化不同,连续施用生物有机肥后,放线菌数量呈上升趋势^[26]。

张振兴等研究发现,土壤理化因子影响水稻根际的生理代谢,水稻根际的生长代谢活动又可改变土壤理化性状,二者相互作用共同影响微生物的群落组成及多样性^[27]。本研究 4 个生长时期中分蘖期和拔节期的 Shannon 指数均与成熟期差异显著。 β 多样性分析可以看出随着水稻的生长发育,各个时期的群落结构会发生变化,成熟期和其余 3 个时期的群落结构有明显差异。

RDA 对不同生长时期稻田根际土壤细菌群落影响因素分析表明,细菌群落组成的影响因子排序是 pH 值 > AP 含量 > AK 含量 > OM 含量 > TN 含量,已有研究证实土壤微生物群落组成与土壤 pH 值密切相关^[28-29],丰度排名前六菌门的相对丰度均与 pH 值呈正相关,其中绿弯菌门受 pH 值影响最大。丰度值最大的放线菌门的相对丰度和速效钾、有机质、全氮含量、pH 值呈正相关,与速效磷含量呈负相关,其中受全氮含量的影响最大。

生物有机肥稻田中随着水稻的生长发育,根际土壤理化因子的变化,细菌群落结构会随之变化, α 多样性指数分析显示分蘖期和拔节期的 Shannon 指数均与成熟期差异显著。 β 多样性分析显示成熟期的群落结构和其余时期有明显差异,RDA 分析显示 pH 值是影响细菌群落的首要因子,其次是速效磷、速效钾、有机质和全氮含量。全氮含量是放线菌门的首要控制因子,pH 值是绿弯菌门的首要控制因子。本研究为生物有机肥稻田不同生长时期的根际土壤环境提供了数据支持并为针对不同生长时期的专用有机菌剂的开发提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Hacquard S, Garrido - Oter R, González A, et al. Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(5): 603 - 616.
- [2] Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 807 - 838.
- [3] Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers J M, et al. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 634 - 663.
- [4] Philippot L, Raaijmakers J M, Lemanceau P, et al. Going back to the roots; the microbial ecology of the rhizosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11: 789 - 799.
- [5] Oldroyd G E D, Murray J D, Poole P S, et al. The rules of engagement in the legume - rhizobial symbiosis[J]. Annual Review of Genetics, 2011, 45(1): 119 - 144.
- [6] Mbodj D, Effa - Effa B, Kane A, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice; establishment environmental control and impact on plant growth and resistance to abiotic stresses[J]. Rhizosphere, 2018, 8: 12 - 26.
- [7] Duan L, Liu H B, Li X H, et al. Multiple phytohormones and phytoalexins are involved in disease resistance to *Magnaporthe oryzae* invaded from roots in rice[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 152(3): 486 - 500.
- [8] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root - inhabiting bacterial microbiota[J]. Nature, 2012, 488: 91 - 95.
- [9] Santhanam R, Luu V T, Weinhold A, et al. Native root - associated bacteria rescue a plant from a sudden - wilt disease that emerged during continuous cropping[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(36): E5013 - E5020.
- [10] 龚子同, 张效朴. 我国水稻土资源特点及低产水稻土的增产潜力[J]. 农业现代化研究, 1988(8): 33 - 36.
- [11] Zhou J, Guan D, Zhou B K, et al. Influence of 34 - years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 90: 42 - 51.
- [12] 宋亚娜, 林 艳, 陈子强. 氮肥水平对稻田细菌群落及 N_2O 排放的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(9): 1266 - 1275.
- [13] Ju X T, Xing G X, Chen X P, et al. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3041 - 3046.
- [14] 杨 俊, 王 星, 付丽娜, 等. 水稻条斑病抗感品种根际微生物群落结构和功能分析[J]. 生态科学, 2019, 38(1): 17 - 25.
- [15] Zhang J Y, Zhang N, Liu Y X, et al. Root microbiota shift in rice correlates with resident time in the field and development stage[J]. Science China(Life Science), 2018, 61(6): 613 - 621.
- [16] 陈 敏, 应文荷. 转 *Bt* 水稻与常规水稻根际土壤细菌类群的比较研究[J]. 杭州师范学院学报(自然科学版), 2005, 4(4): 290 - 292.
- [17] 倪国荣. 不同土壤肥力及施肥制度下的双季稻田土壤微生物特征[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- [18] 李鑫鑫. 抗虫和抗除草剂转基因水稻对根际土壤微生物的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [19] 陈子熙, 陈 磊, 张卫文. 单细胞尺度下的微生物学研究: 意义与方法[J]. 微生物学报, 2017, 57(6): 920 - 931.
- [20] Edwards J, Johnson C, Santos - Medellin C, et al. Structure, variation and assembly of the root - associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): E911 - E920.
- [21] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 11 - 17.
- [22] Quast C, Priesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web - based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590 - D596.
- [23] 楼 骏, 柳 勇, 李 延. 高通量测序技术在土壤微生物多样性研究中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(15): 256 - 260.
- [24] Chen C, Bauske E M, Musson G, et al. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria[J]. Biological Control, 1995, 5(1): 83 - 91.
- [25] Hoitink H A J, Boehm M J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate - dependent phenomenon[J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37(1): 427 - 446.
- [26] Tian X J, Zhang F H, Li J H, et al. Effects of bio - organic fertilizer on soil microbiome against *Verticillium dahliae*[J]. International Journal of Agriculture Biology, 2016, 18(5): 923 - 933.
- [27] 张振兴, 张文钊, 杨会翠, 等. 水稻分蘖期根系对根际细菌丰度和群落结构的影响[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(12): 2045 - 2052.
- [28] Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M H, et al. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long - term fertilizer experiment[J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4215 - 4224.
- [29] Campos S B, Lisboa B B, Camargo F A O, et al. Soil suppressiveness and its relations with the microbial community in a Brazilian subtropical agroecosystem under different management systems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2016, 96: 191 - 197.