

不同种植模式草莓根际细菌和真菌群落结构的变化

陈泽斌¹, 陈 敏¹, 阮亚男¹, 徐胜光¹, 刘小林^{2*}

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214;

2. 宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 为研究限根种植和非限根种植对草莓根际细菌和真菌群落结构的变化, 测序草莓根际土壤 DNA 中 16S rDNA 的 V4-5 区及 ITS1 区. 结果表明, 限根种植后根际细菌和真菌的 OTU 丰度、Ace 指数、香农指数及 Chao1 指数均增加, 而辛普森指数不变, 说明限根种植提高了细菌和真菌的多样性, 而对物种分布的均匀度没有影响. 限根种植后放线菌门、变形菌门、拟杆菌门、子囊菌门丰度分别增加 1.75%, 7.60%, 0.53% 和 19.07%, 绿弯菌门、酸杆菌门和结合菌门丰度分别下降 3.06%, 4.72% 和 10.77%. 从分子水平上揭示了限根种植后草莓根际细菌和真菌群落的多样性变化.

关键词: 限根种植; 草莓; 根际土壤; 微生物; 多样性

中图分类号: S432.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2019) 06 - 0052 - 05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2019.06.010

Changes of Bacterial and Fungal Community Structure in Strawberry Rhizosphere under Different Planting Patterns

CHEN Zebin¹, CHEN Min¹, RUAN Yanan¹, XU Shengguang¹, LIU Xiaolin^{2*}

(1. College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. College of Life Science and Resources Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi, China 336000)

Abstract: In order to study the changes of bacterial and fungal community structure in strawberry rhizosphere under limited and unrestricted root cultivation, V4-5 and ITS1 regions of 16S rDNA in strawberry rhizosphere soil were sequenced. The results showed that OTU abundance, Ace index, Shannon index and Chao1 index of rhizosphere bacteria and fungi increased after root-limiting cultivation, while Simpson index remained unchanged, indicating that root-limiting cultivation improved the diversity of bacteria and fungi, but had no effect on the evenness of species distribution. With root-limiting cultivation, the abundance of Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes and Ascomycota increased by 1.75%, 7.60%, 0.53% and 19.07% respectively, while the abundance of Chloroflexi, Acidobacteria and Zygomycota decreased by 3.06%, 4.72% and 10.77% respectively. From the molecular level the diversity of bacterial and fungal communities in strawberry rhizosphere was revealed.

Key words: root limit cultivation; strawberry; rhizosphere soil; microorganism; diversity

限根种植是采用物理或生态方法将植物根部限制在特定介质中生长, 人为控制其体积和数量的种植方法. 根系限制种植可以改善土壤肥力特性, 促进植物生长发育, 提高作物产量. 目前, 限根种植主要有垄作法、箱式法、坑式法和槽式法 4 种^[1].

限根种植在调节植物枝条数量、提高矿质养分吸收、改善果实品质方面均有应用^[2]. 武衍等^[3]用无纺布对西瓜限根种植后发现, 其对单果质量的提高并不显著, 但配合合理密植便能提高果实的风味以及功能方面的品质; 樊怀福等^[4]以及 Lmai S

收稿日期: 2019 - 07 - 05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31660603); 云南省地方本科高校基础研究联合专项资助项目 (2017FH001-041).

作者简介: 陈泽斌 (1985—), 男, 云南昆明人, 副教授, 博士, 主要从事农业微生物学研究.

* 通讯作者: 刘小林 (1966—), 男, 江西高安人, 教授, 博士, 主要从事生物化学和分子生物学研究, E-mail: 13507058860@163.com.

等^[5]的研究结果均表明, 限根容器越小其果实的综合品质提高就越明显; 舒海波等^[6]的研究结果表明, 限根种植后大白菜的增产高于非限根种植. 除上述报道外, 限根种植技术还分别在桃^[7]、番茄^[8]、枸杞^[9]、苹果^[10]等多种园艺作物上有所应用. 目前, 关于限根种植对植物根域温度、光合特性、生物量积累以及营养品质等方面的影响已有很多报道^[11], 但是有关限根种植对草莓根际微生物多样性的影响未见报道, 其影响机理尚待阐明. 因此, 本研究从分子水平, 探讨限根种植条件下草莓根系与土壤微生物的分子生态学关系, 以期对草莓的生长管理、品质提高提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试草莓品种为“明晶”. 温室育苗后, 于2018年5月在云南省宣威市罗水镇健康试验地进行田间种植.

1.2 试验设计

试验设置了两种处理方法, 其中 I2 处理为非限根种植, I2X 处理为限根种植. 根据武衍等^[2]方法, 进行了限根和非限根栽培. 在成熟期, 各处理随机选择 30 棵健康草莓挖掘根系, 采用摇根法^[3]获得根际土壤样品.

1.3 土壤 DNA 的提取

用 DNA 试剂盒提取土壤 DNA.

1.4 16S rDNA 的 V4-5 区和 ITS1 区的 PCR 扩增及回收

使用引物 515F/926R 和 ITS1F/ITS2R^[12] 对 16S rDNA 的 V4-5 及 ITS1 区进行了扩增, 通过凝胶切割回收目标片段, 并由上海微基生物有限公司进行测序.

1.5 测序数据的生物信息学分析

进行序列质量控制、过滤和组合, 以获得有效的序列^[13]. 对有效序列进行了 OTU 聚类分析、物种分类分析、多样性指数分析和序列深度检测^[14], 并分析了各分类层级的群落结构.

2 结果与分析

2.1 细菌和真菌的 OTU 丰度和 α 多样性指数

根际土壤样品 16S rDNA 的 V4-5 及 ITS1 区的 OTU 丰度、覆盖率、辛普森指数、有效序列数、

Chao1 指数和香农指数见表 1 和表 2. 结果表明, 文库覆盖了土壤样品中 99.83% 以上的细菌和真菌类群. OTU 丰度稀释曲线的斜率随着测序数量的增加而逐渐减小 (图 1 和图 2), 表明测序量足以反映样品中的物种组成, 但依然存在少量低丰度类群没有被覆盖. 非限根种植与限根种植根际细菌的 OTU 丰度分别为 639 和 665 (表 1), 非限根种植与限根种植根际真菌的 OTU 丰度分别为 280 和 360 (表 2), 表明限根种植提高了草莓根际细菌和真菌的 OTU 丰度. 限根种植后根际细菌的 Ace 指数、Chao1 指数分别增加 25.08 和 27.00 (表 1), 根际真菌的 Ace 指数、Chao1 指数分别增加 80.58 和 80.91 (表 2), 表明限根种植后细菌和真菌的群落丰富度都有所增加; 限根种植后根际细菌和真菌的香农指数分别增加了 0.14 和 0.09, 而辛普森指数没有变化, 说明限根种植提高了根际细菌和真菌类群的多样性, 而对物种分布的均匀度没有影响.

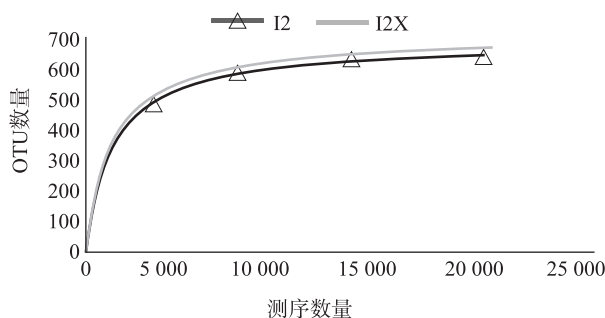


图1 限根和非限根种植根际细菌稀释曲线

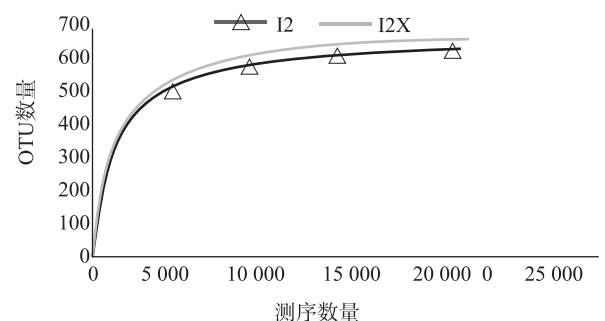


图2 限根和非限根种植根际真菌稀释曲线

2.2 细菌群落种类组成及丰度

限根种植后, 在门水平 (表 3), 丰度 > 10.00% 的优势类群中, 放线菌门 (Actinobacteria) 丰度增加 1.75%, 变形菌门 (Proteobacteria) 丰度增加 7.61%, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 丰度增加 0.53%, 绿弯菌门 (Chloroflexi) 和酸杆菌门

(Acidobacteria) 丰度分别下降 3.06% 和 4.72%。

限根种植后，在纲水平（表 4），丰度 >5% 的优势类群中，尚未分类的类群（Unclassified）和厌氧绳菌纲（Anaerolineae）丰度分别减少 3.18% 和 4.60%， α -变形菌纲（Alphaproteobacteria）、 γ -变形菌纲（Gammaproteobacteria）、 β -变形菌纲（Betaproteobacteria）、鞘氨醇杆菌纲（Sphingobacteriia）丰度分别增加 4.15%，2.87%，1.55% 和 1.00%。

限根种植后，在属水平方面（表 5），丰度 >

1.00% 的优势类群中，尚未分类的类群（Unclassified）、黄杆菌属（*Flavobacterium*）、*Gaiella* 属丰度分别降低 14.30%，0.72% 和 0.03%，蔷薇属（*Roseiflexus*）和硝化螺旋菌属（*Nitrospira*）丰度分别增加 0.63% 和 0.31%。

2.3 真菌群落种类组成及丰度

限根种植后，在门水平（表 6），丰度 >10% 的优势类群中，子囊菌门（Ascomycota）丰度增加 19.07%，结合菌门（Zygomycota）丰度下降 10.77%。

表 1 细菌 OTU 丰度和 α 多样性

样品名	优化序列数	OTU 丰度	覆盖率/%	香农指数	Chao1 指数	Ace 指数	辛普森指数
I2	19 293	639	99.83	5.41	651	650.14	0.01
I2X	19 745	665	99.84	5.55	678	675.22	0.01

表 2 真菌 OTU 丰度和 α 多样性

样品名	优化序列数	OTU 丰度	覆盖率/%	香农指数	Chao1 指数	Ace 指数	辛普森指数
I2	41 422	280	100.00	4.07	280.20	280.50	0.04
I2X	36 400	360	99.99	4.16	361.11	361.08	0.04

表 3 门水平上细菌相对丰度

门	I2/%	I2X/%
Proteobacteria	27.10	34.71
Chloroflexi	19.77	16.71
Acidobacteria	17.42	12.70
Bacteroidetes	10.85	11.38
Actinobacteria	10.51	12.26
Others（丰度 <10.00%）	14.35	12.24

表 4 纲水平上的细菌相对丰度

纲	I2/%	I2X/%
Unclassified	16.46	13.28
Anaerolineae	12.34	7.74
Betaproteobacteria	9.43	10.98
Alphaproteobacteria	8.45	12.60
Gammaproteobacteria	5.56	8.43
Sphingobacteriia	5.00	6.00
Others（丰度 <5.00%）	42.76	40.97

表 5 属水平上细菌相对丰度

属	I2/%	I2X/%
Unclassified	68.16	53.86
<i>Flavobacterium</i>	4.00	3.28
<i>Roseiflexus</i>	1.69	2.32

续表 5

属	I2/%	I2X/%
<i>Nitrospira</i>	1.40	1.71
<i>Gaiella</i>	1.28	1.25
Others（丰度 <1.00%）	23.47	37.58

表 6 门水平上真菌相对丰度

门	I2/%	I2X/%
Ascomycota	46.34	65.41
Zygomycota	31.67	20.90
Others（丰度 <10.00%）	21.99	13.69

限根种植后，在纲水平（表 7），丰度 >5% 的优势类群中，粪壳菌纲（Sordariomycetes）、座囊菌纲（Dothideomycetes）、尚未分类的类群（Unclassified）丰度分别增加 10.40%，2.64% 和 1.42%，Mortierellomycotina 纲丰度减少 10.66%。

限根种植后，在属水平（表 8），丰度 >1% 的优势类群中，被孢霉属（*Mortierella*）、隐球菌属（*Cryptococcus*）、根串珠霉属（*Thielaviopsis*）、油壶菌属（*Olpidium*）、柱孢属（*Cylindrocarpon*）丰度分别降低 10.66%，2.16%，3.18%，0.66% 和

0.23%, 尚未分类的类群 (Unclassified)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*)、小画线壳属 (*Monographella*) 丰度分别增加 2.16%, 8.98%, 0.50% 和 2.00%。

表 7 纲水平上的真菌相对丰度

纲	I2/%	I2X/%
Mortierellomycotina	31.51	20.85
Sordariomycetes	30.70	41.10
Unclassified	14.63	16.05
Dothideomycetes	5.62	8.26
Others (丰度 <5.00%)	17.54	13.74

表 8 属水平上的真菌相对丰度

属	I2/%	I2X/%
<i>Mortierella</i>	31.51	20.85
Unclassified	23.77	25.93
<i>Cryptococcus</i>	5.84	3.68
<i>Fusarium</i>	5.70	14.68
<i>Chaetomium</i>	4.29	4.79
<i>Thielaviopsis</i>	4.22	1.04
<i>Monographella</i>	3.44	5.44
<i>Olpidium</i>	1.73	1.07
<i>Cylindrocarpon</i>	1.43	1.20
Others (丰度 <5.00%)	18.07	21.32

3 结论与讨论

从门水平来看, 草莓限根与非限根种植土壤中共有优势细菌为变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、放线菌门。罗影等^[15]对胡麻、宋宇等^[16]对草莓、汪娅婷等^[17]对玉米、程立君等^[18]对叶珙桐、徐雪雪^[19]对马铃薯、方敏等^[20]对马缨杜鹃根际土壤优势菌群的研究也得到了相似的结果。但本研究的优势菌群与王娟等^[21]对草莓、于翠等^[22]对大青叶樱桃土壤细菌多样性的研究结果不一致, 推测原因可能是因为传统的培养法, 只能培养出不足自然界微生物总量 1% 的微生物类群, 导致不能更全面地检测所致^[23]。变形菌门在多种植物的根际土壤中都为高丰度类群, 可能是由于其是细菌中最大的一个门, 另外, 变形菌门细菌繁殖能力强, 因此在数量上占优势。变形菌门丰度在限根种植后增加 7.60%, 酸杆菌

门丰度下降 4.72%, 原因可能是酸杆菌门细菌的生长速度较慢, 当土壤养分或结构发生变化时, 快速生长的变形菌门细菌取代了缺乏营养的酸杆菌, 使其丰度降低。从纲和属水平来看, 未分类的类群为最优势类群, 限根种植后丰度下降, 这与陈泽斌等^[12]的研究结果基本一致。限根种植后, α -变形菌纲为优势类群, 这与赵爱花等^[24]的研究基本一致。已有研究^[25]表明, α -变形菌纲在形态、生理、代谢和细胞分裂机制方面呈现出极其丰富的多样性特征, 与真核生物密切相关, 在工业、农业和医学领域都极为重要。为什么在限根以后其增加显著, 这有待于进一步的研究。本研究发现, 共有优势真菌门为子囊菌门和结合菌门, 这与李越鲲等^[26]对枸杞的研究结果相同, 但与汤涤洛等^[27]的研究结果不一致, 可能与草莓限根种植后根系分泌物的改变密切相关。从纲来看, *Mortierellomycotina* 纲是共有的最优势纲, 限根种植后其丰度下降 10.66%, 使得粪壳菌纲成为最优势纲, 这证实了程立君等^[18]的研究结果。在属水平, 被孢霉属为共有的最优类群, 且限根种植后丰度下降 10.66%, 其次为尚未分类的类群, 限根后丰度增加 2.16%。以往的研究^[28-29]表明, 根系分泌物的数量和种类也会随着种植方式的不同而变化, 并可能导致根际土壤微生物群落结构的变化。Wang 等^[30]发现多样性的土壤真菌有助于形成土壤团聚体, 可以有效地保护土壤结构。本研究表明, 限根种植有利于增加土壤真菌多样性, 这与大多数同类研究的结果吻合^[31], 原因可能是限根种植可以增加土壤蓄水量, 改善土壤理化性质, 以及促进土壤微生物繁殖^[19]。吴杨焕等^[32]研究表明, 限根种植能明显提高果实的品质和产量, 推测与限根后根际微生物的变化有密切关系。

[参考文献]

[1] THOLOZAN J L, CAPPELIER J M, TISSIER J P, et al. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65 (3): 1110 – 1116.

[2] 彭醒醒. 限根种植对蓝莓生长发育的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.

[3] 武衍, 陈佩, 王灿磊, 等. 无纺布限根种植对西瓜果实发育及其营养品质的影响 [J]. *中国农业大学学*

- 报, 2013, 18 (2): 45-49.
- [4] 樊怀福, 杜长霞, 朱祝军. 不同容积盆栽对樱桃番茄果实品质和叶片氮代谢影响 [J]. 中国农学通报, 2012, 28 (16): 150-154.
- [5] LMAI S, FUJIWARA T, TANAKA S, et al. Effect of soil moisture on vine growth and fruit production of kyoho grapes growing on restricted rooting volume [J]. Environment Control in Biology, 2010, 29 (3): 133-140.
- [6] 舒海波, 贺超兴, 张志斌, 等. 富有机质土壤栽培方式对大白菜产量及品质的影响 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (20): 196-200.
- [7] 高清华, 章镇, 叶正文, 等. 设施栽培中限根对油桃幼树生长和结果的影响 [J]. 上海农业学报, 2004, 20 (3): 37-41.
- [8] 王敏. 不同体积限根对番茄生长发育及品质的影响 [D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- [9] 何昕孺, 戴国礼, 焦恩宁, 等. 限根种植对枸杞根域温度、生物量积累及营养元素吸收的影响 [J]. 西北农业学报, 2017, 26 (2): 281-286.
- [10] 吴海芹. 限根种植对苹果幼树生长发育及相关生理机制影响的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [11] 舒海波, 贺超兴, 王怀松, 等. 园艺作物限根种植技术研究进展 [J]. 农业科技通讯, 2009 (4): 85-88.
- [12] 陈泽斌, 高熹, 王定斌, 等. 生物炭不同施用量对烟草根际土壤微生物多样性的影响 [J]. 华北农学报, 2018, 33 (1): 224-232.
- [13] CAPORASO J, GREGORY L C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108: 4516-4522.
- [14] HESS M, SCZYRBA A, EGAN R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. Science, 2011, 331: 463-467.
- [15] 罗影. 不同种植模式对胡麻田土壤酶活性和土壤微生物群落结构及多样性的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [16] 宋宇. 草莓不同生长时期土壤微生物群落结构变化 [J]. 贵州农业科学, 2018, 46 (8): 59-62.
- [17] 汪娅婷, 付丽娜, 姬广海, 等. 基于高通量测序技术研究云南玉米根际微生物群落多样性 [EB/OL]. [2019-04-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/36.1028.S.20190320.1500.032.html>.
- [18] 程立君, 王磊, 吴银梅, 等. 高通量测序技术分析光叶珙桐根际土壤微生物多样性 [J]. 广东农业科学, 2019, 46 (1): 43-49.
- [19] 徐雪雪. 基于高通量测序的马铃薯沟垄覆膜连作土壤微生物多样性分析 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [20] 方敏, 徐小蓉, 唐明, 等. 马缨杜鹃根系微生物群落结构及其变化 [EB/OL]. [2019-04-10]. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wxb.20180449>.
- [21] 王娟. 不同耕作方式对草莓土壤细菌数量和多样性的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [22] 于翠, 吕德国, 秦嗣军, 等. 大青叶樱桃根际微生物种群结构及其变化动态 [J]. 果树学报, 2007, 24 (3): 298-302.
- [23] HART M. Methods of studying soil microbial diversity [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58 (2): 169-188.
- [24] 赵爱花, 杜晓军, 臧婧, 等. 宝天曼落叶阔叶林土壤细菌多样性 [J]. 生物多样性, 2015, 23 (5): 649-657.
- [25] 吕志堂, 王静, 周燕霞, 等. α -变形菌纲新的保守特征性插入缺失 [J]. 微生物学杂志, 2016, 36 (2): 1-7.
- [26] 李越鲲, 孙燕飞, 雷勇辉, 等. 枸杞根际土壤真菌群落多样性的高通量测序 [J]. 微生物学报, 2017, 57 (7): 1049-1059.
- [27] 汤涤洛, 涂修亮, 付聪, 等. 基于高通量测序的苧麻根际土壤真菌群落结构 [J]. 西南农业学报, 2018, 31 (10): 173-177.
- [28] MARSCHNER P, NEUMANN G, KANIA A, et al. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) [J]. Plant & Soil, 2002, 246 (2): 167-174.
- [29] YANG C H, CROWLEY D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (1): 345-351.
- [30] WANG Y, XU J, SHEN J, et al. Tillage, residue burning and crop rotation alter soil fungal community and water-stable aggregation in arable fields [J]. Soil & Tillage Research, 2010, 107 (2): 71-79.
- [31] NYANKANGA R O, WIEN H C, OLANYA O M. Effects of mulch and potato hilling on development of foliar blight (*Phytophthora infestans*) and the control of tuber blight infection [J]. Potato Research, 2008, 51 (2): 101-111.
- [32] 吴杨焕, 周进, 王静静, 等. 限根对设施无土栽培精品西瓜品质及产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46 (16): 113-115.