昆明学院学报　2020，42（3）：60～63　ISSN 1674－5639　CN 53－1211/G4
Journal of Kunming University

限根栽培对万寿菊根际微生物区系的影响

陈泽斌，李希杨，阮亚男，徐胜光*
（昆明学院 农学与生命科学学院，云南 昆明 650214）

摘要：为探讨限根栽培对万寿菊根际土壤微生物种类和丰度的影响．采用二代测序技术测定万寿菊根际土壤 DNA 中 16S rDNA 的 V4-5 和 ITS1 区．结果表明，限根栽培条件下根际土壤细菌类群的辛普森指数、香农指数、OTU 丰度略低于非限根栽培，表明限根栽培略降低了细菌 OTU 的丰富度．而真菌类群的辛普森指数、香农指数和 OTU 丰度均高于非限根栽培，说明限根栽培提高了真菌类群 OTU 的丰富度．

关键词：限根栽培；土壤；细菌；真菌；多样性
中图分类号：S682.1　**文献标识码**：A　**文章编号**：1674－5639（2020）03－0060－04
DOI：10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.03.013

Effects of Root-limited Cultivation on Microbial Flora of Marigold Rhizosphere Soil

CHEN Zebin，LI Xiyang，RUAN Yanan，XU Shengguang*
（College of Agriculture and Life Sciences，Kunming University，Kunming，Yunnan，China　650214）

Abstract：In order to study the effects of root-limited cultivation on microbial species and abundance in marigold rhizosphere soil，the V4-5 and ITS1 regions of 16S rDNA in marigold rhizosphere soil were determined by second-generation sequencing. The results showed that the Simpson index，Shannon index and OTU abundance of bacteria in rhizosphere soil were slightly lower than those in non-rhizosphere cultivation，indicating that root-limited cultivation slightly reduced the bacterial OTU richness，but Simpson index，Shannon index and OTU abundance of fungi were higher than those of non-root-limited cultivation，indicating that root-limited cultivation improved the OTU abundance of fungi.

Key words：root-limited cultivation；soil；bacteria；fungi；diversity

植物根系具有许多重要的生理功能，如吸收、合成、分泌、感知等[1]．而限根栽培是指利用一定的物理或生态方法，通过控制根系生长来控制根系的体积，以及调节地上、地下部分、营养生长和生殖生长过程的一种栽培方法[2]．目前，限根栽培技术已应用于多种果树[3]．常见的限根栽培模式有垄式、箱框式和坑式 3 种[4]．近年来，在美国、澳大利亚等国家推广的根域干燥和气控根系技术，也属于限根栽培模式[5]．限根栽培可以控制植物生长，促进开花，同时还可减少土壤耕作中因肥料渗漏对地下水的污染[6]．目前，关于限根栽培对植物根系温度、光合特性、生物量积累和营养品质影响的报道较多．然而有关限根栽培对植物根际土壤微生物区系的影响鲜见报道，特别是其对植物根际土壤微生物多样性的影响机理尚待阐明．因此，本研究拟在比较两种栽培方式下，探讨万寿菊根际微生物群落组成和分布，旨在为限根栽培技术增产的产量生理基础提供理论依据．

1　材料与方法

1.1　试验材料与试验地概况

供试万寿菊种子由云南省农业科学院花卉所提

收稿日期：2019－06－23
基金项目：国家自然科学基金资助项目（41361056）；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：徐胜光（1973—），男，云南兰坪人，研究员，博士，主要从事污染生态的修复研究，E-mail：sgxu2011@126.com.

供. 在温室内穴盘基质育苗后，于 2018 年 5 月在云南省宣威市落水镇健康试验田进行大田定植，2018 年 9 月进行土壤样品采集及 DNA 的提取.

1.2　试验设计

试验设置 I_1A 处理（CK）为非限根栽培，I_1A_X 处理为限根栽培. 非限根栽培及限根栽培参照武衍等[7]的方法进行. 在采摘期，随机选择 30 株健康的万寿菊，挖掘出根系，采用抖根法[8]采集根际表面附着的土壤，混合后获得根际土壤样品.

1.3　土壤 DNA 的提取

采用 DNA 提取试剂盒提取.

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

分别用引物 515F/926R[9]和 ITS1F/ITS2R[10]扩增 16S rDNA 的 V4-5 区和 ITS1 区. 切胶回收目标片段，委托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

对序列进行质控、过滤和拼接，得到有效序列[11]. 对有效序列进行 OTU 聚类分析、物种分类学分析、多样性指数分析和测序深度检测[12]，然后对各分类水平上的群落结构进行统计分析.

2　结果与分析

2.1　细菌和真菌的 OTU 丰度和 α 多样性

根际土壤样品 16S rDNA 的 V4-5 及 ITS1 区的 Chao1 指数、辛普森指数、有效序列数、OTU 丰度、香农指数和覆盖率见表 1 和表 2. 结果表明，文库覆盖了土壤样品中 99.74% 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. 限根栽培后根际土壤细菌类群的辛普森指数与非限根栽培相同，香农指数和 OTU 丰度略低于非限根栽培，说明限根栽培对细菌类群 OTU 分布的均匀度无影响，且略降低了细菌 OTU 的丰富度. 限根栽培后根际土壤真菌类群的辛普森指数、香农指数和 OTU 丰度均高于非限根栽培，说明限根栽培提高了真菌类群 OTU 分布的均匀度和丰富度.

表 1　细菌 OTU 丰度和 α 多样性

样品名	Chao1 指数	辛普森指数	有效序列数	OTU 数	香农指数	覆盖率/%
I_1A	780.50	0.01	33 637.00	755.00	5.70	99.74
I_1A_X	764.57	0.01	36 673.00	754.00	5.61	99.85

表 2　真菌 OTU 丰度和 α 多样性

样品名	Chao1 指数	辛普森指数	有效序列数	OTU 数	香农指数	覆盖率/%
I_1A	497.59	0.02	44 726.00	493.00	4.44	99.97
I_1A_X	529.08	0.05	46 751.00	524.00	4.80	99.97

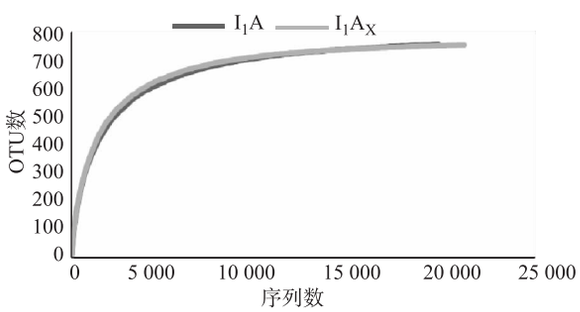

图1　细菌OTU丰度稀释曲线

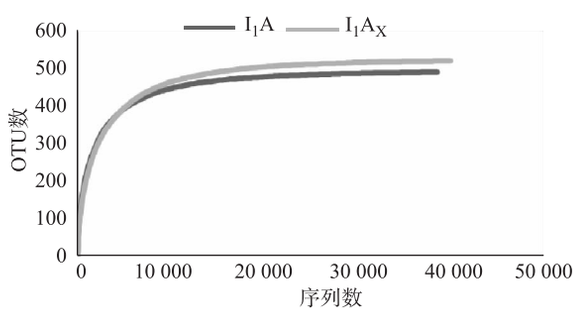

图2　真菌OTU丰度稀释曲线

2.2　细菌类群组成及丰度

从表 3 可以看出，在门水平方面，变形菌门（Proteobacteria）、绿弯菌门（Chloroflexi）、酸杆菌门（Acidobacteria）、放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）是 2 个处理共有的优势门，丰度均大于 10%. 然而限根栽培后，变形菌门丰度降低 2.65%，绿弯菌门丰度降低 0.50%，但酸杆菌门丰度增加 3.65%，放线菌门丰度降低 2.62%，拟杆菌门丰度增加 0.17%.

表 3 门水平的细菌相对丰度

门	非限根栽培/%	限根栽培/%
Chloroflexi	20.61	20.11
Proteobacteria	26.70	24.05
Acidobacteria	13.99	17.64
Bacteroidetes	11.63	11.80
Nitrospirae	1.35	1.50
Actinobacteria	13.42	10.80
Cyanobacteria	1.31	0.07
Gemmatimonadetes	4.63	5.82
Armatimonadetes	1.71	1.97
Planctomycetes	1.64	3.31
Others（丰度 <1% 的类群）	3.01	2.93

在属水平方面（表4），尚未分类的类群（Unclassified）、黄杆菌属（*Flavobacterium*）、玫瑰弯菌属（*Roseiflexus*）、类诺卡氏属（*Nocardioides*）、*Gaiella* 属、硝化螺菌属（*Nitrospira*）是2 个处理共有的优势类群，丰度均大于 1%. 限根栽培后，尚未分类类群丰度增加 5.66%，黄杆菌属丰度增加 1.73%，玫瑰弯菌属丰度降低 0.12%，类诺卡氏属丰度降低 0.71%，*Gaiella* 属丰度降低 0.24%，硝化螺菌属丰度增加 0.07%.

表 4 属水平的细菌相对丰度

属	非限根栽培/%	限根栽培/%
Unclassified	62.32	67.98
Roseiflexus	2.52	2.40
Flavobacterium	2.50	4.23
Nocardioides	1.83	1.12
Gaiella	1.48	1.24
Opitutus	1.40	0.99
Nitrospira	1.18	1.25
Solirubrobacter	1.00	0.70
Others（丰度 <1% 的类群）	25.77	20.09

2.3 真菌类群组成及丰度

在门水平方面（表5），子囊菌门（Ascomycota）、担子菌门（Basidiomycota）、尚未分类的类群（Unclassified）、接合菌门（Zygomycota）是 2 个处理共有的优势类群，丰度均大于 5%. 限根栽培后，子囊菌门（Ascomycota）丰度增加 3.81%，担子菌门（Basidiomycota）丰度降低 4.22%，尚未分类的类群（Unclassified）丰度下降 0.35%，接合菌门（Zygomycota）丰度增加 1.93%.

在属水平方面（表6），尚未分类的类群（Unclassified）、*Boeremia* 属、赤霉菌属（*Gibberella*）、被孢霉属（*Mortierella*）、毛壳菌属（*Chaetomium*）、镰刀菌属（*Fusarium*）、隐球菌属（*Cryptococcus*）在两种栽培方式中的丰度均大于 1%，是 2 个处理共同的优势类群. 限根栽培后，尚未分类的类群丰度降低 4.83%，*Boeremia* 属丰度增加 15.29%，赤霉菌属丰度降低 4.19%，被孢霉属丰度增加 1.95%，毛壳菌属丰度增加 5.60%，镰刀菌属丰度降低 0.43%，隐球菌属丰度增加 3.37%.

表 5 门水平的真菌相对丰度

门	非限根栽培/%	限根栽培/%
Ascomycota	71.17	74.98
Basidiomycota	13.20	8.98
Zygomycota	5.66	7.59
Chytridiomycota	1.19	0.47
Blastocladiomycota	0.00	0.10
Glomeromycota	0.38	0.34
Unclassified	5.60	5.25
Others（丰度 <1% 的类群）	2.80	2.29

表 6 属水平的真菌相对丰度

属	非限根栽培/%	限根栽培/%
Unclassified	27.64	22.81
Gibberella	10.36	6.17
Mortierella	5.64	7.59
Fusarium	4.60	4.17
Boeremia	2.76	18.05
Cryptococcus	2.61	5.98
Chaetomium	2.42	8.02
Others（丰度 <1% 的类群）	43.97	27.21

3 结论与讨论

采用高通量测序手段，比较万寿菊限根栽培和非限根栽培方式下根际微生物群落组成，发现限根栽培提高了真菌 OTU 分布的均匀度和丰富度，降低了细菌类群 OTU 的丰富度，但对细菌的均匀度无影响. 限根栽培后，土壤细菌群落的丰富度和多样性指数高于真菌，这与李岩等[13]的研究成果一致，并与土壤中微生物以细菌为主有关[14]. 两个处理根际土壤中共有的优势细菌类群与袁鑫等[15]的研究结果一致，该 5 个细菌门在根际微生物中占有重要地位. 限根栽培降低了细菌类群 OTU 丰富度，这可能是由于限根栽培后，土壤氮含量升高，土壤酸化，从而使得根际土壤细菌群落丰度下降[16]. 限根栽培后，酸杆菌门、拟杆菌门的相对丰度增加，而变形菌门、绿弯菌门的相对丰度降低，这与乔清华等[17]的研究结果一致. 限根栽培后担子菌门真菌比例减少，子囊菌门真菌比例增加，这可能是由于限根栽培后根系分泌物大量富集造成了土壤中有机酸含量升高，从而导致土壤 pH 下降，使得真菌群落的丰度下

降[18]．在细菌和真菌的各分类水平方面，都检测到丰度不等的尚未分类的微生物类群（Unclassified），推测是根际土壤中的新微生物种类，这部分序列在数据库中找不到相应的分类信息，可能是受到测序技术的限制．目前，对该类微生物研究较少，且还未对其进行分类．限根栽培后，芽单胞菌的丰度增加了 1.24%，芽单胞菌是典型的植物促生菌，通过与植物互作，进行生物固氮，诱导植物激素分泌，促进植物生长[19]．扈进冬等[20]的研究结果表明，链格孢属、赤霉菌属、镰刀菌属中的某些种常常会引起作物真菌性病害．而本研究表明，限根栽培后，赤霉菌属和镰刀菌属的丰度均降低，推测限根栽培降低了病原真菌在根际土壤中的丰度，减少了病原真菌积累．子囊菌门和担子菌门是限根栽培后根际土壤中丰度最高的两个门，也是土壤中最丰富的真菌类群．李发虎等[21]发现这两类真菌能促进根系生长．本研究发现的其他菌群是否与植物健康有关尚不清楚，还需进一步通过试验来验证．根际土壤微生物群落复杂，其群落特征是微生物种群协同作用的结果，根际土壤微生物对植物的影响不能根据单个或几个种群的变化来解释，在后续研究中还需要进行长期的试验和多方面的观察，并结合其他研究者的研究才能进一步揭示其对植物生长的影响．

［参考文献］

［1］吕志明，吕德国．限根栽培对果树生长发育的影响及应用［J］．北方果树，2004（z1）：59－60.

［2］张丽娟，曲继松，颜秀娟，等．根域容积限制对矮生观赏番茄生长发育的影响［J］．北方园艺，2016（10）：24－27.

［3］王杰，宋士任，董能利，等．根域容积对柑桔果实品质及土壤养分、微生物和酶的影响［J］．中国南方果树，2016，45（1）：1－7.

［4］张先勋．根域限制栽培方式在果树上应用研究进展［J］．东南园艺，2016，4（4）：61－64.

［5］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.

［6］舒海波，贺超兴，张志斌，等．不同有机土栽培方式对温室番茄植株生长及产量和品质的影响［J］．西北农业学报，2010，19（6）：120－125.

［7］武衍，陈佩，王灿磊，等．无纺布限根栽培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.

［8］吴瑕，吴凤芝，周新刚．分蘖洋葱伴生对番茄矿质养分吸收及灰霉病发生的影响［J］．植物营养与肥料学报，2015，21（3）：734－742.

［9］WALTERS W，HYDE E R，BERG-LYONS D，et al. Improved bacterial 16S rRNA gene（V4 and V4-5）and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys［J］. Msystems，2016，1（1）：9－15.

［10］BISSETT A，FITZGERALD A，MEINTJES T，et al. Introducing BASE：the biomes of Australian soil environments soil microbial diversity database［J］. Giga Science，2016，5（1）：1－11.

［11］魏玉洁，邹弯，马文瑞，等．应用高通量测序技术研究新疆产区葡萄果实、叶片及果园土壤微生物多样性［J］．食品科学，2018，39（6）：162－170.

［12］张艺洁，邵惠芳，张珂，等．基于高通量测序研究施肥对连作植烟土壤环境及微生物的影响［J］．中国农业科技导报，2018，20（5）：16－25.

［13］李岩，何学敏，杨晓东，等．不同生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性［J］．生态学报，2018，38（17）：5983－5995.

［14］KOWALCHUK G A，BUMA D S，BOER W D，et al. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms［J］. International Journal of General and Molecular Microbiology，2002，81（1/4）：509－520.

［15］袁鑫，王梦亮，王俊红．一种生物刺激素对大豆根际土壤微生物群落的影响［J］．大豆科学，2017，36（5）：751－760.

［16］王继玥，刘燕，刘勇，等．基于高通量测序检测 Pb 污染对三叶草根际土壤细菌多样性的影响［J］．环境科学研究，2018，31（1）：102－110.

［17］乔清华，张传云，袁哲诚，等．多年连作土壤中棉花根际细菌群落结构及其动态［J］．棉花学报，2018，30（2）：128－135.

［18］张庆华，曾祥国，韩永超，等．土壤熏蒸剂棉隆和生物菌肥对草莓连作土壤真菌多样性的影响［J］．微生物学通报，2018，45（5）：1048－1060.

［19］李昱龙，韩正敏．嗜麦芽窄食单胞菌在环保和农业生产上的应用［J］．生物技术通报，2015，31（8）：35－43.

［20］扈进冬，吴远征，魏艳丽，等．木霉拌种剂对小麦根际土壤真菌群落多样性的影响［J］．山东科学，2019（1）：46－51.

［21］李发虎，李明，刘金泉，等．生物炭对温室黄瓜根际土壤真菌丰度和根系生长的影响［J］．农业机械学报，2017，48（4）：265－270，341.