

doi:10.11937/bfyy.20173642

## 土壤改良施肥对白菜根际微生物群落结构的影响

陈 诚<sup>1</sup>, 张小川<sup>2</sup>, 蔡小扬<sup>2</sup>, 王 剑<sup>1</sup>, 伏荣桃<sup>1</sup>, 卢代华<sup>1</sup>

(1. 四川省农业科学院 植物保护研究所, 四川 成都 610066; 2. 成都天杰有机农业发展有限公司, 四川 成都 610091)

**摘 要:** 为了了解改良施肥方式对土壤微生物群落结构的影响, 以白菜为试材, 采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 对常规施用化肥和改良施肥(化肥减量、增施有机肥、增施土壤调理剂)条件下白菜根际真菌和细菌群落结构进行了研究。结果表明: 改良施肥后增加了白菜产量, 缓解了土壤酸化的情况, 土壤养分增加, 改良施肥方式白菜根际真菌和细菌丰度和多样性大于常规施肥处理, 2 种施肥方式微生物群落组成和优势类群有较大差异。改良施肥后白菜根际微生物种类增多, 优势类群发生了较大变化。

**关键词:** 白菜; 改良施肥; MiSeq 高通量测序; 微生物群落

**中图分类号:** S 634.106<sup>+</sup>.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2018)13-0108-06

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 在土壤营养元素循环、土壤肥力形成和发展、生态环境改善、植物生长和土传病害防治等方面起着极其重要的作用<sup>[1]</sup>。土壤微生物对耕作、施肥等变化反映敏感, 可作为指示土壤质量的重要生物指标<sup>[2]</sup>。根际是植物生态系统和土壤生态系统交叉形成的特殊区域<sup>[3]</sup>, 根际微生物包括有益微生物和有害微生物, 在土壤生态循环中扮演中重要的角色, 与作物的生长和健康密切相关<sup>[4]</sup>。因此, 研究植物根际微生物群落结构, 可为评价土壤质量和作物生长情况提供重要的参考依据。

蔬菜是人们日常饮食中必不可少的食物之一, 富含人体所必需的多种维生素、矿物质、碳水化合物及其它营养物质, 是我国农业的重要组成部分<sup>[5]</sup>。蔬菜栽培面积呈逐年递增的趋势, 但在

利益的驱使下, 农民常以牺牲土壤质量为代价, 单一和过度施用化学肥料, 造成土壤酸化、养分失调、理化性质恶化, 微生物区系改变等问题<sup>[6-7]</sup>, 使蔬菜产业可持续发展受到严重阻碍。在这种形势下, 增施有机肥、化肥减量、施用土壤改良剂成为解决上述问题的有效办法。有研究表明, 有机无机肥配施能显著增加土壤微生物量, 化肥适度减量和配施有机肥能改善土壤微生物状况, 提高土壤肥力<sup>[8]</sup>。施用土壤改良剂能提高土壤 pH, 降低酸性土壤交换性铝含量, 增加土壤交换性钙和交换性镁含量, 有效增加土壤中细菌、真菌、放线菌和拮抗菌数量, 能改善作物生长状况, 提高作物的品质和产量<sup>[9-10]</sup>。

由于微生物对于土壤和作物的重要作用, 微生物肥料研究日益增多, 其作用有提供植物养分供应能力、刺激植物生长、拮抗某些病原微生物及降解有害污染物等<sup>[11]</sup>。因此, 研究特定环境下的微生物群落结构, 挖掘优良微生物资源, 对于新型优质微生物肥料研发具有重要的意义。该研究以减量增效, 改良土壤为前提, 首次采用高通量 Illumina 测序技术研究不同施肥下白菜根际真菌和细菌群落结构, 系统了解土壤改良施肥方式对

**第一作者简介:** 陈诚(1991-), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向为作物病害防控。E-mail: 598506100@qq.com.

**责任作者:** 卢代华(1970-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为水稻病害。E-mail: 453831354@qq.com.

**基金项目:** 成都市产业升级牵引工程资助项目(2015-NY01-00119-NC)。

**收稿日期:** 2018-02-28

白菜根际微生物的影响,为功能微生物资源的挖掘奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

复合肥(N-P-K:16-16-16)、碳铵(N:17)、磷酸一铵(N-P:11-44)、氯化钾(K:60)、冲施肥(N-P-K:20-20-20)、有机肥(N-P-K-有机质:2-1-2-45)、中微量元素(Ca+Mg+Si-B+Zn+Fe+Mo+Mn:10-21)、土壤调理剂(K:4)、根宝(N-P-K-有机质:8-6-9-3.1)。其中复合肥、碳铵、磷酸一铵、氯化钾和冲施肥均为市售,有机肥、中微量元素、土壤调理剂和根宝由成都天杰有机农业发展有限公司生产。

### 1.2 试验方法

田间试验在四川省成都市崇州市进行,试验设计2个处理,分别为常规施用化肥和改良施肥方式,每处理3次重复,每小区25 m<sup>2</sup>,共6个小区,随机排列。常规施肥以复合肥为底肥,667 m<sup>2</sup>用量为50 kg,移栽后15 d第一次追肥,667 m<sup>2</sup>施碳铵、磷酸一铵、氯化钾、冲施肥各5 kg;移栽后30 d第二次追肥,667 m<sup>2</sup>施碳铵、磷酸一铵、氯化钾、冲施肥各7.5 kg。改良施肥方式,667 m<sup>2</sup>底肥复合肥减量为30 kg,增施有机肥250 kg、中微量元素1 kg、土壤调理剂40 kg;667 m<sup>2</sup>第一次追施碳铵、磷酸一铵、氯化钾、冲施肥分别减量为3、2、1、3 kg,增施根宝3 kg;667 m<sup>2</sup>第二次追施碳铵、磷酸一铵、氯化钾、冲施肥分别减量为5、3、5、1、5 kg,增施根宝5 kg。

随机选择每个试验小区白菜3株,按CUI等<sup>[12]</sup>的方法采集白菜根际土,将3株白菜根际土混合样为试验样品,常规施肥3个小区的样品编号分别为T1-1、T1-2、T1-3,土壤改良施肥方式3个小区样品编号为T2-1、T2-2、T2-3。将采集的样品放入无菌EP管,迅速带回实验室-20℃冷冻保存备用。

### 1.3 项目测定

DNA提取采用E. Z. N. A. ® soil DNA Kit 50试剂盒,按操作说明进行。DNA检测合格后进行PCR扩增,对真菌标准ITS1区进行扩增,前引物序列为F1: GGAAGTAAAAGTCGTAA-

CAAGG,后引物序列为R1: GCTGCGTTCT-TCATCGATGC;对细菌标准V3-V4区进行扩增,前引物序列F2: ACTCCTACGGGAGGCAG-CA,后引物序列R2: GGACTACHVGGGT-WTCTAAT。扩增产物经1%琼脂糖凝胶检测合格后,送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行高通量测序。

### 1.4 数据分析

首先对原始数据进行质量筛查,然后对碱基进行配对,剔除疑问序列和嵌合体序列,使用QI-ME软件,调用UCLUST这一序列比对工具<sup>[13]</sup>,将97%相似度的序列进行归并和OTU划分,并选取每个OTU中丰度最高的序列作为该OTU的代表序列,根据每个OTU在每个样本中所包含的序列数,构建OTU在各样本中丰度的矩阵文件。将丰度值低于全体样本测序总量0.001%的OTU去除后<sup>[14]</sup>,计算样品的Alpha多样性指数<sup>[15]</sup>。根际OTU划分和分类鉴定结果,采用Excel 2007软件构建微生物在门和属水平上的组成图。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤改良施肥方式对白菜产量和土壤理化性质的影响

常规施肥试验小区的白菜产量为(253.64±6.04)kg,折合667 m<sup>2</sup>产量为(6 764.25±160.97)kg;改良施肥方式试验小区白菜产量为(315.07±11.44)kg,折合667 m<sup>2</sup>产量为(8 405.97±305.10)kg。可见,改良施肥后白菜产量有了较大幅度地提升。改良施肥后,土壤理化性质见表1,可以看出改良施肥提高了土壤pH,缓解了土壤酸化的情况,且较大幅度提高了土壤有机质、全氮、有效磷和有效钾含量,改善了土壤营养状况。

### 2.2 施肥对白菜根际微生物的影响

#### 2.2.1 测序结果及微生物多样性分析

对常规施用化肥(样品编号T1)和土壤改良施肥方式(样品编号T2)的2组共6个样品进行真菌ITS1区和细菌V3-V4区进行高通量测序,真菌获得有效序列312 438条,细菌获得有效序列184 573条。将获得的序列按97%的序列相似度进行归并和OTU划分后,计算样本微生物群

表1 不同施肥方式土壤理化性质

Table 1 Basic physical qualities of tested soil samples

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter /(g · kg <sup>-1</sup> )	全氮 Total nitrogen /(g · kg <sup>-1</sup> )	碱解氮 Alkaline nitrogen /(mg · kg <sup>-1</sup> )	有效磷 Available phosphorus /(mg · kg <sup>-1</sup> )	有效钾 Available potassium /(mg · kg <sup>-1</sup> )
T1	4.94	32.20	1.95	193.80	89.52	53.05
T2	6.40	53.51	2.46	185.11	110.66	176.92

落的多样性(表2)。可知,T2样本真菌和细菌OTU数均高于T1样本,可见改良施肥后,白菜根际微生物种类有所增加。从微生物丰富度指数(Chao、ACE),多样性指数(Simpson、Shannon)结果可看出,除细菌Simpson指数与T1相当外,T2所有样本指数值均高于T1,可见改良施肥后,白菜根际真菌和细菌群落和多样性均增加。

表2 样品OTU数及微生物多样性指数

Table 2 OTUs and microbial diversity index of samples

项目 Item		样品编号 Sample No.	
		T1	T2
分类单元	真菌(Fungus)	361.67±1.33	374.67±170.05
OTUs	细菌(Bacteria)	1 494.33±114.38	1 611.00±121.51
Chao指数	真菌(Fungus)	384.45±10.91	403.90±15.54
Chao	细菌(Bacteria)	1 634.13±253.31	1 850.44±306.40
ACE指数	真菌(Fungus)	392.31±13.09	404.37±16.77
ACE	细菌(Bacteria)	1 686.95±304.55	1 907.25±329.19
辛普森指数	真菌(Fungus)	0.853±0.032	0.867±0.043
Simpson	细菌(Bacteria)	0.997±0.003	0.997±0.003
香农指数	真菌(Fungus)	4.31±0.26	4.55±0.49
Shannon	细菌(Bacteria)	9.16±0.13	9.22±0.15

## 2.2.2 真菌分类及样品差异分析

根据门水平上真菌的注释结果,计算每种分类单元占有所有真菌门的比例,然后按从大到小的顺序进行排列,绘制柱状图。由图1可知,白菜根际真菌包括6个真菌门,常规施用化肥的白菜根际土中子囊菌门最多,占比为82.53%,其次是担子菌门的真菌;其子囊菌门和担子菌门所占的比例高达94.36%。改良施肥方式后,白菜根际子囊菌所占比例急剧降低,其比例仅为59.68%,担子菌门真菌所占的比例略微增多,壶菌门真菌所占的比例急剧增加,从0.51%增加到了20.03%。可见,改良施肥方式后,白菜根际优势真菌类群发生了较大变化。

通过计算各样本在属水平的真菌群落组成,选择至少在一组样品中含量大于1%的真菌分类单元为代表类群,其余部分合并为Others(其它),绘制属水平上真菌群落组成图。

由图2可知,常规施用化肥后,白菜根际最主要的类群是毛壳属 *Chaetomium* 和青霉属 *Penicillium*,其所占的比例分别为23.45%和23.23%,其余真菌所占比例均较低,占比均在6%以下,超过1%的属有 *Humicola*、*Redeckera*、*Bullera*、*Cryptococcus*、*Mortierella*、*Staphylotrichum*、*Dendroclathra*、*Verticillium* 和 *Monographella*。改良施肥方式后,白菜根际最主要的真菌类群是毛壳属 *Chaetomium* 和 *Olpidiaster*,其占比分别为21.15%和19.91%,其余真菌占比均在5%以下,超过1%的属有 *Humicola*、*Redeckera*、*Bullera*、*Cryptococcus*、*Mortierella*、*Staphylotrichum*、*Dendroclathra*、*Acremonium* 和 *Conocybe*。从群落结果还可以看出,*Olpidiaster* 和 *Conocybe* 在改良施肥方式后白菜根际中属于优势种群,在常规施用化肥的白菜根际中却未被检测到,可见,改良施肥方式促进了一些优势真菌类群在白菜根际繁殖。

## 2.2.3 细菌分类及样品差异分析

从门水平上细菌分类结果(图3)可看出,白菜根际细菌主要分为25个菌门,整体看来,2组样品中优势细菌种类比较相似,变形菌门是最主要的类群,其它占比超过10%的细菌门有放线菌门 Actinobacteria、绿弯菌门 Chloroflexi 以及酸杆菌门 Acidobacteria,占比在1%~10%的菌门均是芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、拟杆菌门 Bacteroidetes、厚壁菌门 Firmicutes、硝化螺旋菌门 Nitrospirae、疣微菌门 Verrucomicrobia、Saccharibacteria 及浮黴菌门 Planctomycetes。相比于常规施用化肥的根际土,改良施肥方式后,优势细菌门(占比超过1%)所占比例增加的有放线菌门(2.15%)、绿弯菌门(27.55%)、芽单胞菌门(13.83%)和拟杆菌门(60.22%);优势细菌门所占比例降低的有变形菌门(17.37%)、酸杆菌门(17.65%)、厚壁菌门(19.24%)、硝化螺旋菌门

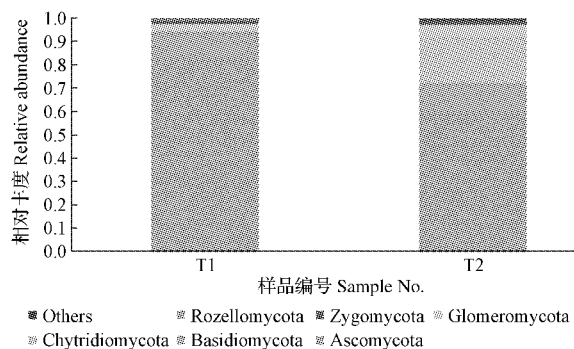


图 1 门水平上真菌群落组成

Fig. 1 Distribution of fungi displaying in phylum level

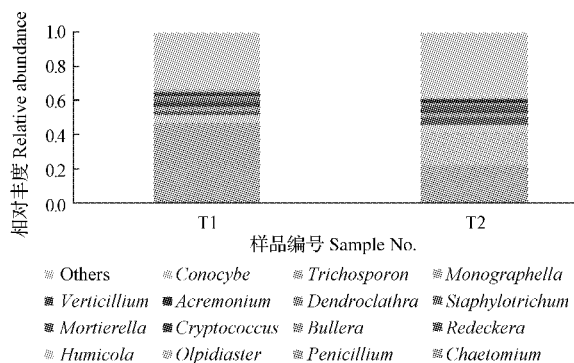


图 2 属水平上真菌群落组成

Fig. 2 Distribution of fungi displaying in genus level

(4.54%)、疣微菌门(29.80%)、Saccharibacteria(124.96%)和浮霉菌门(11.26%)。

按至少在一组样品中含量大于1%的细菌分类单元为代表类群,其余部分合并为 Others,绘制属水平上细菌群落组成图。从图 4 可知,所有细菌分类单元占比均在 6% 以下,在施用化肥根际土中占比超过 3% 的细菌类群有 Gemmatimonadaceae、Acidobacteriaceae、*Sphingomonas*、*Rhodanobacter* 和 *Candidatus Solibacter*;在改良施肥根际土中占比超过 3% 的细菌类群有 Gemmatimonadaceae、Acidobacteriaceae、*Sphingomonas*和 *Anaerolineaceae*。改良施肥方式后,所占比例增加 50% 以上的细菌类群 *Anaerolineaceae* (69.48%) 和 *Chryseolinea* (99.28%);所占比例降低 50% 以上的类群有 *Rhodanobacter* (115.04%)、*Rhizomicrobium* (116.63%)、*Ktedonobacteria* (57.69%)、*Saccharibacteria* (121.22%)、*Gaiellales* (55.56%) 及

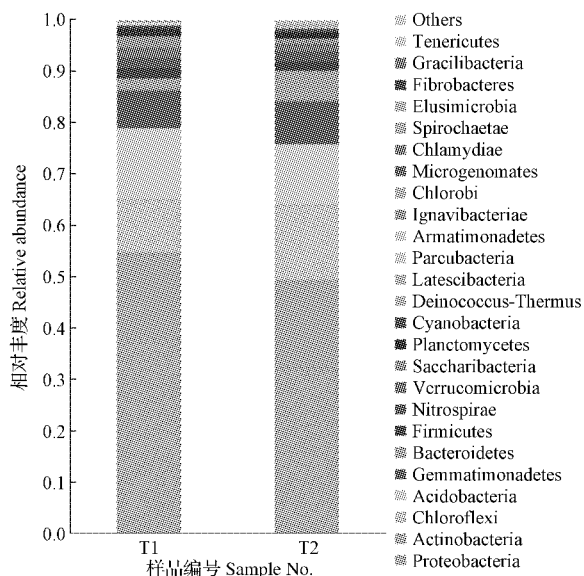


图 3 门水平上细菌群落组成

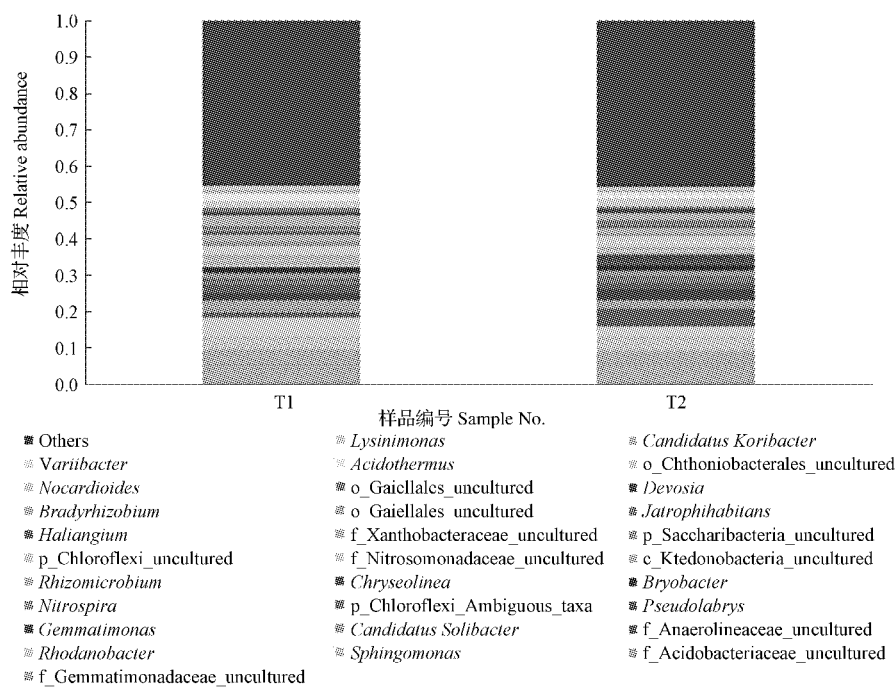
Fig. 3 Distribution of bacteria displaying in phylum level

*Lysinimonas* (60.67%)。

### 3 讨论与结论

Illumina Miseq 测序技术能够克服传统检测方法的缺陷,具有通量高、错误率低、成本低、流程自动化、速度快等优势<sup>[16]</sup>,已被广泛用于微生物群落结构研究<sup>[17-19]</sup>。该研究采用高通量 Illumina Miseq 测序技术对白菜根际微生物进行系统分析,能真实全面地了解根际微生物的组成情况。该研究通过增施有机肥、化肥减量及施用土壤改良剂的施肥方式,显著提高了土壤 pH,增加了土壤有效磷和钾含量,改善了土壤状况,增加了白菜产量。从土壤微生物多样性结果可看出,土壤改良施肥增加了真菌和细菌的多样性,这与以往研究结果一致<sup>[20-21]</sup>,表明改良施肥有利于维持土壤微生物平衡,有利于农业可持续发展。

从真菌组成结果可看出,常规施用化肥子囊菌门所占的比例高达 82.53%,改良施肥后子囊菌门的比例降低,担子菌门、壶菌门、球囊菌门及结合菌门所占的比例均有一定程度地增加。多种土壤微生物平衡共存可互相抑制,防止某些微生物尤其是病原微生物过度繁殖<sup>[22]</sup>,可见改良施肥对土壤微生物环境有积极的影响。常规施用化肥



注:不同颜色代表不同细菌属,若在属水平上未被注释则以上一级分类单元表示,以此类推。

Note: Different colors represent different genus. Sequences could not be classified into genus were given names of the upper level and so on.

图4 属水平上细菌群落组成

Fig. 4 Distribution of bacteria displaying in genus level

青霉属的比例较高,改良施肥后根际青霉属的量显著降低,青霉属包括果蔬病原菌类群<sup>[23]</sup>,可能改良施肥增强了白菜抗性,降低了根际病原菌的积累。从细菌组成结果可看出,改良施肥方式后,真菌和细菌群落结构发生较大变化,芽单胞菌门所占比例增加,酸杆菌门所占的比例降低,荀卫兵<sup>[24]</sup>通过研究增施有机肥与单施化肥土壤细菌群落结构的差异,结果也表明芽单胞菌门比例增加,酸杆菌门比例降低,可能这2个类群的细菌在特定生态系统中有重要的作用。改良施肥方式后,厌氧绳菌科 Anaerolineaceae 所占比例显著增加,这与陆海飞等<sup>[25]</sup>的研究结果一致,可能该类群的细菌包括优良的微生物资源,具体还需进一步研究。

总体来说,该研究通过化肥减量、增施有机肥和土壤改良剂的方式,改善了土壤酸化的情况,增加了土壤养分和白菜产量。从微生物群落结构可看出,改良施肥方式白菜根际微生物多样性增加,2种施肥方式的微生物群落组成和优势类群有较

大差异。这为进一步挖掘优良微生物资源,从而开发微生物肥料奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 徐万里,唐光木,葛春辉,等.长期施肥对新疆灰漠土土壤微生物群落结构与功能多样性的影响[J].生态学报,2015,32(2):468-447.
- [2] 孙瑞波,郭熙盛,王道中,等.长期施用化肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响[J].微生物学通报,2015,42(10):2049-2057.
- [3] JONES D L, HINSINGER P. EDITORIAL: The rhizosphere:Complex by design[J]. Plant and Soil, 2008, 312(1-2): 1-6.
- [4] 周文杰,吕德国,秦嗣军.植物与根际微生物相互作用关系研究进展[J].吉林农业大学学报,2016,38(3):253-260.
- [5] 赵恒栋,葛茂悦,王怀栋,等.我国三种主要蔬菜氮肥的利用现状分析[J].北方园艺,2017(5):151-155.
- [6] SHEN W S, LIN X G, SHI W M, et al. Higher rates of nitrogen fertilization decrease soil enzyme activities, microbial functional diversity and nitrification capacity in a Chinese polytunnel greenhouse vegetable land[J]. Plant and Soil, 2010, 337(1-2): 137-150.

- [7] 王瑞雪, 汤利, 徐智, 等. 影响晋宁设施蔬菜产量的主要土壤因子分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2017, 32(1): 140-145.
- [8] 王庆, 海江波, 岳忠娜, 等. 化肥减量对麦田土壤微生物量及微生物区系的影响[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(3): 484-487.
- [9] 杜玉凤, 吕乐福, 何振全, 等. 矿物土壤改良剂对酸性红壤改良的影响[J]. 水土保持学报, 2016, 30(3): 351-354.
- [10] 刘中良, 郑建利, 孙哲, 等. 土壤改良剂对设施番茄土壤微生物群落、品质及产量的影响[J]. 华北农学报, 2016, 31(增刊): 394-398.
- [11] 许景钢, 孙涛, 李嵩. 我国微生物肥料的研发及其在农业生产中的应用[J]. 作物杂志, 2016(1): 1-6.
- [12] CUI H Y, YANG X Y, LU D X. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere and bulk soil of *Stellera chamaejasme* L. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2015, 61(3): 171-181.
- [13] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [14] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.
- [15] 陈诚, 李强, 黄文丽, 等. 羊肚菌白霉病的发生对土壤真菌群落结构的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2652-2659.
- [16] LOMAN N J, MISRA R V, DALLMAN T J, et al. Corrigendum: Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 434-439.
- [17] 陆美青, 牛晓君, 林晓忠, 等. 用 Illumina MiSeq 高通量测序方法探讨四环素对厌氧消化系统微生物群落结构的影响[J]. 环境工程学报, 2017, 11(5): 2797-2803.
- [18] HONG C, SI Y, XING Y, et al. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(14): 10788-10799.
- [19] ZHANG X, QU Y, MA Q, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals diverse microbial communities of activated sludge systems stimulated by different aromatics for indigo biosynthesis from indole[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125732.
- [20] 沈建平, 芦阿虔, 李小龙, 等. 土壤调理剂对植烟土壤微生物群落的影响[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(1): 39-42, 88.
- [21] HARTMANN M, FREY B, MAYER J, et al. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming[J]. Isme Journal, 2015, 9(5): 1177-1194.
- [22] 陈丹梅, 袁玲, 黄建国, 等. 长期施肥对南方典型水稻土养分含量及真菌群落的影响[J]. 作物学报, 2017, 43(2): 286-295.
- [23] 赖童飞, 刘毅, 任梦, 等. 外源一氧化氮对果蔬采后病害 *Penicillium expansum* 发育的影响[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(3): 253-262.
- [24] 荀卫兵. 长期不同施肥下旱地红壤细菌群落结构特征及驱动因子的探究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [25] 陆海飞, 郑金伟, 余喜初, 等. 长期无机有机肥配施对红壤性水稻土微生物群落多样性及酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3): 632-643.

## Effects of Modified Fertilization on Rhizosphere Microbial Community Structure of Chinese Cabbage

CHEN Cheng<sup>1</sup>, ZHANG Xiaochuan<sup>2</sup>, CAI Xiaoyang<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, FU Rongtao<sup>1</sup>, LU Daihua<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066; 2. Chengdu Tianjie Organic Agriculture Development Co. Ltd., Chengdu, Sichuan 610091)

**Abstract:** In order to understand the effect of the modified fertilization mode on soil microbiome community structure, Chinese cabbage was collected as the research object, and Illumina MiSeq high throughput sequencing technology was used to analyze the rhizospheric fungal and bacterial community structure of Chinese cabbage under the condition of conventional fertilization and modified fertilization (fertilizer reduction, increasing organic fertilizer and soil conditioner). The results showed that the improved fertilization increased the yield of cabbage, alleviated soil acidification, and soil nutrient increased. There were significant differences between the microbial community and dominant groups of the two kinds of fertilization methods. The modified fertilization method led the abundance of rhizosphere microbiome increased, the community structure changed, and the dominant fungi groups varied.

**Keywords:** Chinese cabbage; modified fertilization; MiSeq high-throughput sequencing; microbial community