

DOI: 10.5846/stxb201711082002

李岩, 何学敏, 杨晓东, 张雪妮, 吕光辉. 不同生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性. 生态学报, 2018, 38(21): - .

Li Y, He X M, Yang X D, Zhang X N, Lü G H. The microbial community diversity of the rhizosphere and bulk soils of *Lycium ruthenicum* in different habitats. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(21): - .

不同生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性

李 岩^{1, 2}, 何学敏^{1, 2}, 杨晓东^{2, 3}, 张雪妮^{1, 2}, 吕光辉^{1, 2, *}

1 新疆大学干旱生态环境研究所, 乌鲁木齐 830046

2 新疆大学绿洲生态教育部重点实验室, 乌鲁木齐 830046

3 新疆大学资源与环境科学学院, 乌鲁木齐 830046

摘要: 研究典型生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性及其与土壤理化性质间的关系, 为进一步研究黑果枸杞抗逆性提供理论数据。采集新疆精河县艾比湖地区(EB)盐碱地、乌苏市(WS)路旁荒地、五家渠市(WQ)人工林带的黑果枸杞根际与非根际土壤, 利用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术分析细菌和真菌群落组成和多样性。结果表明, 根际土壤细菌多样性高于非根际土壤(WQ 除外), 而根际真菌多样性低于非根际土壤。WQ 非根际土壤细菌和真菌多样性均高于 EB 和 WS; 根际细菌多样性排序为 EB>WS>WQ, 根际真菌多样性排序为 WS>EB>WQ。根际土壤优势细菌门依次是变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、酸杆菌门, 真菌优势门为子囊菌门、担子菌门。根际土壤细菌变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门的相对丰度高于非根际土壤, 而厚壁菌在根际土壤中的丰度显著降低, 真菌优势门丰度在根际土和非根际土中的变化趋势因地区而异; *Haliea*、*Gp10*、*Pelagibius*、*Microbulbifer*、假单胞菌属、*Thiopfundum*、*Deferrisoma* 是根际土壤细菌优势属; 多孢子菌属、支顶孢属、*Corollospora*、*Cochlonema* 是根际真菌优势属。细菌、真菌优势类群(门、属)的组成以及丰富度存在地区间差异, 厚壁菌门在 EB 地区的丰富度显著高于含盐量较低的 WS、WQ; 盐碱生境 EB 中根际土壤嗜盐细菌的丰度高于非盐碱生境(WQ、WS), 如盐单胞菌属、动性球菌属、*Geminicoccus*、*Pelagibius*、*Gracilimonas*、*Salinimicrobium* 等。小囊菌属是 EB 根际真菌的最优势属, *Melanoleuca* 是 WQ 和 WS 的最优势属, 地孔菌属、*Xenobotrytis*、*Brachyconidiellopsis*、多孢子菌属等在 EB 根际土壤中的丰度显著高于 WQ 和 WS。非盐碱生境(WS 和 WQ)的微生物群落之间的相似性较高, 并且高于与盐碱环境(EB)之间的相似性, 表明土壤含盐量对微生物群落组成丰度具有重要的影响。

关键词: 黑果枸杞; 高通量测序; 根际微生物; 多样性; 群落结构

The microbial community diversity of the rhizosphere and bulk soils of *Lycium ruthenicum* in different habitats

LI Yan^{1, 2}, HE Xuemin^{1, 2}, YANG Xiaodong^{2, 3}, ZHANG Xueni^{1, 2}, LÜ Guanghui^{1, 2, *}

1 Institute of Arid Ecology and Environment, Xinjiang University, Urumqi, 830046, China

2 Key Laboratory of Oasis Ecology, (Xinjiang University) Education Ministry, Urumqi 830046, China

3 College of Resource and Environment Sciences, Urumqi 830046, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the microbial (bacterial and fungal) community structure and the relationship between community structure and soil chemical properties in the rhizosphere soil of the halophyte *Lycium ruthenicum* from different geographical locations (habitats), to provide a theoretical basis for further studies on the relationship between rhizosphere microbiomes and the salt tolerance capacity of *Lycium ruthenicum*. The rhizosphere and

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2016M5928666); 国家自然科学基金项目(31560131, 31760168, 31700354)

收稿日期: 2017-11-08; **网络出版日期:** 2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ler@xju.edu.cn

bulk soils were collected from the Ebinur Lake wetland of Jinghe county (EB), Wusu city (WS), and Wujiaqu city (WQ). The bacterial 16S rDNA and fungal 18S rDNA were sequenced with Illumina MiSeq high-throughput sequencing, and we analyzed their diversity and community structure. Results showed that the rhizosphere bacterial diversities were higher than those of bulk soils (except for WQ), whereas rhizosphere fungal diversities were lower than those of bulk soils. The bacterial and fungal diversities in bulk soils of WQ were higher than those of EB and WS. The rhizosphere bacterial diversity order was EB > WS > WQ, whereas the rhizosphere fungal diversity was WS > EB > WQ. The most abundant bacterial phyla in rhizosphere soils were Proteobacteria, Bacteroides, Actinomycetes, and Acidobacteria. Ascomycetes and Basidiomycota were the most abundant phyla in the rhizosphere fungal communities. The relative abundances of Proteobacteria, Bacteroidetes, and Acidobacteria in rhizosphere soils were higher than those in bulk soils, whereas that of Firmicutes was the opposite. The differences in relative abundances of dominant fungal phyla between rhizosphere and bulk soils varied among regions. The most abundant rhizosphere bacterial genera were *Haliea*, *Pelagibius*, *Microbulbifer*, *Thiopfundum*, and *Deferisoma*, and genera *Melanoleuca*, *Cochlonema*, and *Pleospora* dominated the rhizosphere fungal communities. The composition and relative abundances of the most-abundant groups (phyla and genera) differed among regions. The relative abundance of Firmicutes in EB was much higher than those in WS and WQ. Most of the halophilic bacteria, such as *Halomonas*, *Geminicoccus*, *Pelagibius*, *Gracilimonas*, *Salinimicrobium*, and *Planococcus*, had much higher abundances in saline-alkali habitat (EB) than in non-saline-alkali habitat (WQ and WS). *Microascus* was the most abundant genus in the rhizosphere fungal community of EB, while genus *Melanoleuca* dominated in the rhizosphere fungal communities of WQ and WS. Additionally, the abundances of *Geopora*, *Xenobotrytis*, *Brachyconidiellopsis*, and *Pleospora* in the rhizosphere soil of EB were much higher than those of WQ and WS. The rhizosphere microbial communities were distinctly separated from the non-rhizosphere communities. The rhizosphere soil microbial communities in all three regions had high similarity to one another, and the same was true for non-rhizosphere communities. The similarity of the microbial communities of non-saline-alkali habitats (WS and WQ) was higher than that of non-saline-alkali and saline-alkali habitats (EB), indicating that soil electrical conductivity had important influences on microbial community composition and abundance.

Key Words: *Lycium ruthenicum*; high-throughput sequencing; rhizosphere microbiome; diversity; community structure

根际土壤是直接受植物根系和分泌物影响的土壤区域,是土壤微生物与植物相互作用的重要场所。根际土壤微生物与根系之间存在适应性协同进化关系^[1],并形成植物-微生物之间的互惠关系^[2]。植物通过根系活动改变根际土壤的养分含量及其他土壤理化性质,改变根际微生物群落的组成,使得根际与非根际土壤微生物群落组成和多样性上具有明显的差异^[3]。根际微生物对植物生长具有重要的作用,促植物生长细菌(PGPR)通过自身代谢活动将土壤营养物质分解、转化为植物可吸收利用的形态,促进植物生长,部分细菌分泌的激素等物质可提高植物的适应性,如干旱、盐碱等胁迫条件^[4-5]。

根际土壤微生物的群落结构受植物影响,如植物种类^[6]、生长阶段^[7]、健康状况^[8],另外,土壤理化性质对微生物群落也具有重要的作用,如土壤营养状况^[9]、水分和 pH^[10-11]、温度^[12]。土壤盐渍化作为一种重要的环境胁迫因子,不仅影响植物的生长、植被群落结构,而且对土壤微生物群落多样性和组成具有重要的影响^[13-14]。我国西北干旱区,特别是新疆地区,拥有大面积的盐渍化土壤,含盐量高,不利于作物耕种,却孕育了许多盐生植物,如盐角草(*Salicornia europaea*)、盐穗木(*Halostachys caspica*)、盐节木(*Halocnemum strobilaceum*)、碱蓬(*Suaeda glauca*)、盐爪爪(*Kalidium foliatum*)等。深入开展盐生植物根际土壤微生物群落结构对于揭示植物对盐碱环境的适应机理具有重要意义^[15]。然而,目前对盐生植物根际土壤微生物的群落结构的了解还比较少^[16]。

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)是一种分布于我国西北干旱区的耐盐植物。国内学者主要从生理生态方

面对它们的耐盐碱机理开展过研究^[17-18],但是根际土壤微生物对黑果枸杞耐盐碱性的作用尚未揭示。研究表明,植物根际微生物群落的组成和丰富度在不同生境间具有差异^[19-20],黑果枸杞作为一种耐盐植物,可生长于多种生境中,如盐化沙地、干河床、荒漠河岸林中、河湖沿岸,然而,黑果枸杞根际微生物群落多样性和组成在盐碱化生境与非盐碱化生境之间的差异性还不清楚。本研究在前期对艾比湖地区黑果枸杞根际土壤细菌群落结构分析的基础上,进一步分析不同地区(盐化与非盐化生境)中黑果枸杞根际土壤细菌和真菌的群落组成,揭示根际微生物群落与非根际微生物群落组成之间,以及不同生境间微生物群落结构的差异,为研究根际土壤微生物与黑果枸杞耐盐性之间的关系提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品于2016年5月11—13日取自精河县艾比湖湿地国家级自然保护区、乌苏市、五家渠市,生境分别为盐碱地、路旁荒地、人工林带旁。分别在每个黑果枸杞居群中选择生长状况相近的健康个体,每个地点采集3—4个重复,每个重复之间距离大约20—50 m。将植株根系挖出,抖去根部附着比较疏松的土壤,留下与根系结合比较紧密的土壤(厚度约1 mm),装入50 mL无菌离心管中。采集距离根系30—40、0—30 cm深度土层的土壤,装于无菌袋中,作为非根际土壤。土壤采集完后立即在冷藏条件下(冰上)带回实验室。向盛有根系的离心管中加入适量(30 mL左右)无菌PBS溶液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8.5 mmol/L Na₂HPO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.3),漩涡震荡10 min,弃去根系,土壤溶液即为根际土壤溶液,暂存于4℃,备土壤微生物基因组DNA提取。

1.2 方法

1.2.1 土壤理化性质分析

土壤pH值采用pH计测定;土壤有机碳(TOC)采用重铬酸钾容量法进行测定;全氮(TON)采用重铬酸钾-硫酸消化法进行测定;电导率(EC)采用电导率仪测定,由于EC与土壤含盐量具有正相关关系,因此以EC近似表示含盐量。

1.2.2 土壤微生物基因组DNA的提取

基因组DNA提取方法参考Edwards^[21]。吸取1 mL根际土壤溶液至2 mL无菌离心管中,于4℃、10000 g离心30 s,弃上清,所得沉淀用于根际土壤微生物基因组DNA提取;对非根际土,用无菌药匙取大约0.2 g土壤(湿重),加入2 mL无菌离心管中,用于提取基因组DNA。利用OMEGA试剂盒E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit试剂盒(OMEGA)提取基因组DNA,利用1%琼脂糖凝胶检测DNA的长度和完整性,利用NanoDrop检测DNA的浓度和纯度。

1.2.3 DNA扩增及测序

采用两轮法对细菌16S rDNA V3—V4区进行扩增,第一轮扩增利用融合了barcode序列的通用引物进行,上游引物341F: ccctacacgacgctcttccgactcg (barcode) cctacggnggcwgcag,下游引物805R: gactggagttccttggcaccgcgagaattccagactachvgggtatctaattcc;真菌18S rDNA扩增,第一轮扩增利用融合了barcode序列的通用引物进行,上下游引物序列: NS1: cctacacgacgctcttccgactcg (barcode) gtagtcatatgcttcttc, Fung: gactggagttccttggcaccgcgagaattccaaattcccggtaccggt g。反应体系30 μL,包含15 μL 2×Taq master Mix(Thermo),引物(10 μmol/L)各1 μL,模板DNA 20 ng。扩增条件:94℃ 3 min,94℃ 30 s,45℃ 20 s,65℃ 30 s,扩增5个循环;94℃ 20 s,55℃ 20 s,72℃ 30 s,扩增20个循环,72℃延伸5 min。第二轮扩增使用Illumina桥式PCR兼容引物,以第一轮的PCR产物为模板。反应体系同上。扩增条件:95℃ 30 s,95℃ 15 s,55℃ 15 s,72℃ 30 s,扩增5个循环,72℃延伸5 min。PCR产物经磁珠法回收并定量。将每个重复个体的PCR产物等量混合,每份混合样品包含相应的全部重复个体,将6份混合样品送至生工(上海)生物工程有限公司,利用Illumina-MiSeq平台进行高通量测序。

1.2.4 数据分析

测序原始数据去除引物接头序列、去除各低质量碱基 (Phred Quality Score = 20) 后进行拼接, 舍弃长度短于 200 bp 的序列, 去除非特异性扩增序列及嵌合体后, 得到每个样本的有效序列数据。以 97% 为划定阈值, 对 16S 和 18S 序列划分操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。采用 RDP classifier 2.12 对 97% 相似度水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 得到每个 OTU 对应的物种分类信息, 并在界、门、纲、目、科、属水平上统计各个样品的细菌群落组成。基于物种分类分析, 绘制物种分类条形图和物种丰度热图。16S 和 18S 序列经重取样 (resampling) 统一测序深度 (16S 为 60000 条, 18S 为 27000 条) 后, 计算 alpha 多样性指数 (Chao1、Shannon、Simpson 指数以及覆盖度)。以 OTUs 丰富度对序列数作图, 进行稀释分析并制作稀释曲线图 (Rarefaction curve)。根据样本 OTUs 组成之间的 weighted unifracs 距离矩阵进行主坐标分析 (PCoA) 分析微生物群落之间的相似性; 用配对 t 检验比较根际和非根际、细菌和真菌群落多样性的差异性; 利用 CCA 分析检测细菌、真菌群落组成与土壤理化因子的关系。OTU 划分、alpha 多样性指数计算以及稀释分析用 Mothur 软件完成; 配对 t 检验及作图用 Graphpad 6 完成; PCoA 和 CCA 分析采用 R 的 *vegan* 软件包进行。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

根际土壤有机碳 (TOC)、总氮 (TON) 含量高于非根际土, 电导率 (EC) 和 pH 低于非根际土; 非根际土壤的 TOC、TON 含量和 pH 在 3 个地区间无显著差异 ($P > 0.05$), EC 显著高于乌苏地区 (WS) 和五家渠地区 (WQ) ($P < 0.01$) (表 1), 表明艾比湖地区 (EB) 土壤为盐渍化土壤, 其含盐量显著高于非盐渍化的 WQ 和 WS 地区。

表 1 根际土壤与非根际土壤的理化性质

Table 1 Chemical properties of rhizosphere and bulk soils

编号 Sample ID	地点 (缩写) Region (abbrev.)	土壤类型 Soil type	有机碳 TOC Total organic carbon/(g/kg)	总氮 TON Total nitrogen/(g/kg)	pH	电导率 EC Electrical conductivity/(mS/cm)	取样数 n Sample number
EB_R*	艾比湖湿地 (EB)	根际	12.71	0.849	8.23	5.66	4
WS_R*	乌苏 (WS)	根际	10.17	0.628	8.1	1.33	3
WQ_R*	五家渠 (WQ)	根际	14.12	1.491	8.42	0.54	4
EB_B	艾比湖湿地 (EB)	非根际	6.46±1.05a	0.216±0.16a	8.78±0.26a	7.13±1.06a	4
WS_B	乌苏 (WS)	非根际	5.72±0.83a	0.172±0.04a	8.57±0.15a	2.21±0.09b	3
WQ_B	五家渠 (WQ)	非根际	7.66±1.23a	0.146±0.04a	8.73±0.26a	1.03±0.18c	4

不同小写字母表示不同地区间差异显著性 ($P < 0.01$); *, 每个重复个体的根际土样质量很低, 无法满足测试需求, 因此我们将每个地区的所有重复个体的根际土混合后测定, 故每个参数只有 1 个数值, 没有误差, 也无法检验根际土壤之间理化性质的差异显著性

2.2 微生物多样性及群落结构

2.2.1 测序数据预处理结果

土壤样品序列的稀释曲线逐渐趋于平缓 (图 1), 同时测序覆盖度 0.91—0.99 之间 (表 2), 说明测序数据量合理, 基本能真实反应土壤微生物的群落组成。

2.2.2 微生物群落多样性

配对 t 检验表明, 根际土壤细菌群落的多样性和丰富度高于非根际土壤 ($P > 0.05$), 然而 WQ 非根际细菌的多样性和丰富度高于根际土 (表 2); 根际真菌多样性低于非根际土壤 ($P < 0.05$) (图 2), 而丰富度无显著差异 (图 2)。细菌群落的丰富度和多样性指数显著高于真菌 ($P < 0.05$, 图 2)。不同地区间, 细菌和真菌群落的多样性和丰富度具有差异, WQ 非根际土壤细菌和真菌多样性均高于 EB 和 WS; 根际细菌多样性排序为 EB > WS > WQ, 根际真菌多样性排序为 WS > EB > WQ (表 2)。

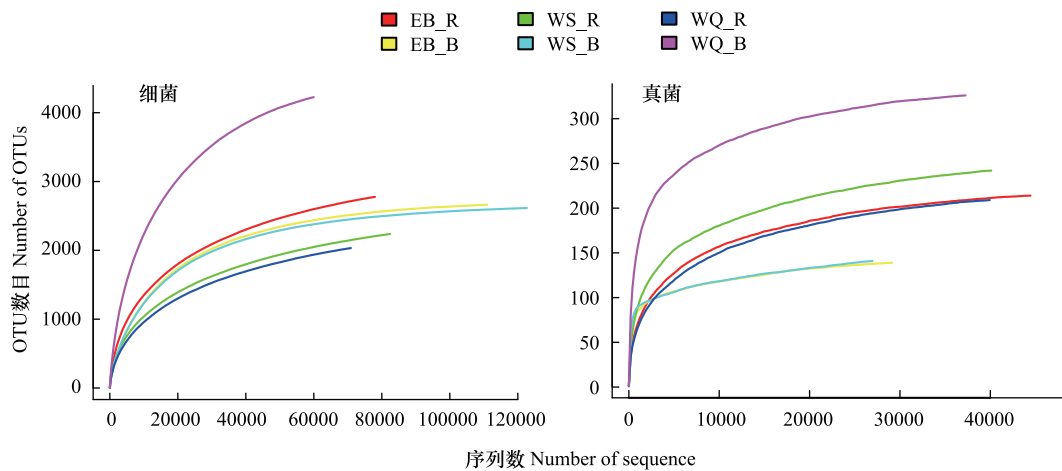


图 1 基于 OTU 丰度的土壤样品微生物群落的稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curves of soil microbial communities based on OTU richness

EB_R: 艾比湖地区黑果枸杞根际土壤, Rhizosphere soils of *Lycium ruthenicum* in Ebinur Lake wetland; EB_B: 艾比湖地区非根际土壤, Bulk soils in Ebinur Lake wetland; WS_R: 乌苏地区黑果枸杞根际土壤, Rhizosphere soils of *Lycium ruthenicum* in Wusu; WS_B: 艾比湖地区非根际土壤, Bulk soils in Wusu; WQ_R: 五家渠地区黑果枸杞根际土壤, Rhizosphere soils of *Lycium ruthenicum* in Wujiaqu; WQ_B: 五家渠地区非根际土壤, Bulk soils in Wujiaqu

表 2 土壤样品测序数据统计及 alpha 多样性

Table 2 Sequence statistics and alpha diversity of soil samples

微生物类群 Microbial group	样品编号 Sample ID	OTU 数目 OTU number	Chao 1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	覆盖度 Coverage
细菌 Bacteria	EB_B	4633	13923	5.23	0.95
	WS_B	4390	13104	5.19	0.95
	WQ_B	6518	23847	6.17	0.91
	EB_R	5462	20752	6.25	0.94
	WS_R	4580	19619	5.80	0.96
	WQ_R	4351	18297	5.38	0.95
真菌 Fungi	EB_B	309	1531	3.71	0.99
	WS_B	319	1959	3.98	0.99
	WQ_B	478	1441	4.41	0.99
	EB_R	390	1452	2.85	0.99
	WS_R	433	1581	3.48	0.99
	WQ_R	380	1814	2.45	0.99

2.2.3 土壤微生物群落组成

非根际细菌群落中, 优势类群依次是变形菌门 (Proteobacteria) (42.34%—45.58%)、厚壁菌门 (Firmicutes) (23.12%—33.06%)、放线菌门 (Actinobacteria) (9.67%—17.15%)、酸杆菌门 (Acidobacteria) (2.41%—5.95%); 根际土壤细菌群落中, 优势类群依次是变形菌门 (55.9%—65.13%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) (12.04%—15.37%)、放线菌门 (6.38%—8.64%)、酸杆菌门 (6.22%—7.89%) (图 3)。真菌群落中, 子囊菌门 (Ascomycota)、担子菌门 (Basidiomycota) 丰度最高, 其中子囊菌门在非根际土中的丰度为 50.86%—67.37%, 根际土中的丰度为 17.92%—75.12%; 担子菌门在非根际土中的丰度为 21.27%—24.98%, 根际土中的丰度为 3.89%—60.48% (图 3)。

属水平上, 微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是非根际细菌群落的优势属 (丰度 > 1%) (图 4), 微小杆菌属丰度

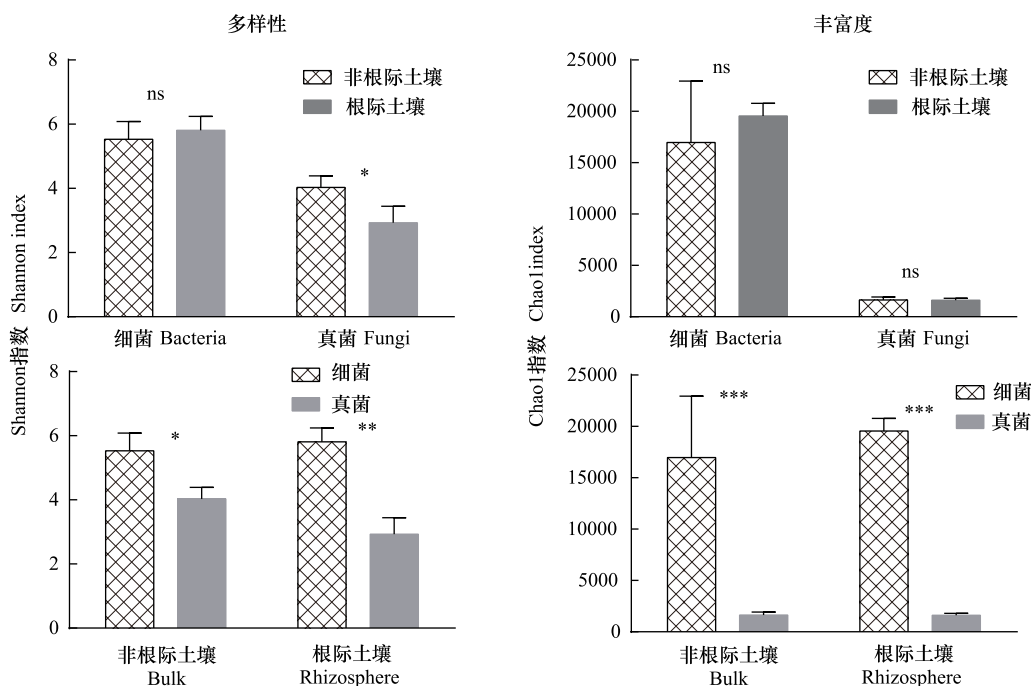


图2 根际和非根际土壤细菌和真菌群落的多样性和丰富度比较

Fig.2 Comparison of the diversity and richness of bacterial and fungal communities in rhizosphere and bulk soils

差异显著性: ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

最高(19.8%—28.86%)。曲霉属(*Aspergillus*)、*Penidiella*、*Craterocola*、*Phaeosphaeria*、青霉属(*Penicillium*)、*Meyerozyma*、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、犁头霉属(*Absidia*)、*Hygrocybe*、毛壳菌属(*Chaetomium*)是非根际真菌群落的优势属(丰度>1%)(图4)。*Haliea*、*Gp10*、*Pelagibius*、*Microbulbifer*、假单胞菌属、*Thiopfundum*、*Deferrisoma*是3个地区黑果枸杞根际土壤细菌群落的优势属(图4),其中*Haliea*的丰度最高(3.86%—11.93%)。多孢子菌属(*Pleospora*)、支顶孢属(*Acremonium*)、*Corollospora*、*Cochlonema*是3个地区根际土壤的真菌优势属(图4)。

2.3 土壤微生物群落差异性分析

2.3.1 根际与非根际土壤微生物群落的差异性

相似性分析(ANOSIM)表明根际土壤与非根际土壤微生物群落之间具有很大的差异(细菌 $R = 1$, $P = 0.1$; 真菌 $R = 0.667$, $P = 0.1$)。基于OTU的微生物群落主坐标分析(PCoA)表明,非根际群落之间具有较高的相似性,根际群落之间具有较高的相似性,非根际样本与根际样本在第一轴上能明显的区分开(图5)。

根际细菌的变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门的相对丰度高于非根际土壤,而厚壁菌门、放线菌门的相对丰度则降低,尤其是厚壁菌门的丰度显著降低($P < 0.05$)(图3)。Gamma变形菌的丰度在根际土和非根际土中无显著差异,而alpha变形菌在根际土中的丰度显著高于非根际土($P < 0.05$)(表3)。真菌优势门丰度在根际土和非根际土中的差异因地区而异;子囊菌门在WQ和WS根际土中的丰度低于非根际土,担子菌门在WQ和WS根际土中的丰度升高,然而在EB则相反。属水平上,根际细菌的优势属数量多于非根际土壤,非根际群落优势属,如微小杆菌属、柠檬酸杆菌属、不动杆菌属在根际土壤中的丰度显著降低,而低丰度的属,如*Haliea*、*Pelagibius*、*Microbulbifer*、*Thiopfundum*、*Deferrisoma*在根际土壤中富集成为优势属,此外,*Gp10*、盐单胞菌属(*Halomonas*)等属在根际土壤的丰度也显著升高(图6)。真菌根际真菌群落的优势属数量低于非根际土,非根际土壤的优势属,如曲霉属、犁头霉属、被孢霉属、青霉属、丝膜菌属、*Penidiella*、*Phaeosphaeria*等在根际土壤中的丰度显著降低甚至消失,而一些丰度较低的属,如被孢霉属、多孢子菌属、*Cochlonema*、*Corollospora*在根际土壤中富集成为优势属(图6)。

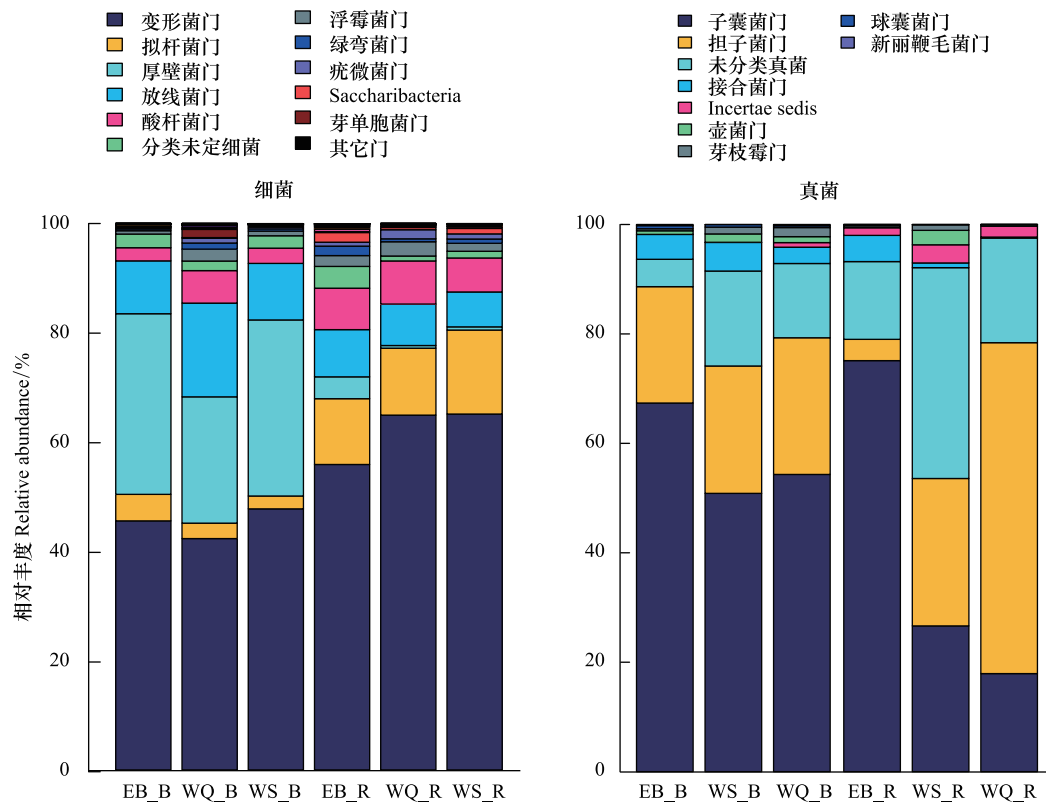


图3 黑果枸杞根际和非根际土壤微生物门水平群落组成

Fig.3 Microbial community composition at phylum rank in rhizosphere and bulk soils of *Lycium ruthenicum*

表3 变形菌门中各纲的丰度/%

Table 3 Relative abundance of each class in the phylum Proteobacteria

纲 Class	EB_B	WQ_B	WS_B	EB_R	WQ_R	WS_R
alpha 变形菌 Alphaproteobacteria	2.86	10.1	4.37	15.62	24.97	22.25
Beta 变形菌 Betaproteobacteria	0.27	1.88	0.38	0.1	1.33	0.4
Gamma 变形菌 Gammaproteobacteria	35.93	28.5	40.19	30.8	35.37	38.48
Delta 变形菌 Deltaproteobacteria	5.03	1.75	2.57	8.3	3.07	3.68
Epsilon 变形菌 Epsilonproteobacteria	0	0	0.01	0	0	0

2.3.2 盐化生境与非盐化生境间群落结构差异

PCoA 表明无论根际还是非根际土壤,非盐化生境 WS 和 WQ 微生物群落间的相似性高于与盐化生境 EB 之间的相似性(图 5)。门水平上,细菌 delta 变形菌和真菌子囊菌门在 EB 非根际土中的丰度显著高于 WS 和 WQ(表 3)。根际土壤细菌 alpha 变形菌以及真菌在 EB 中的丰度低于 WQ 和 WS,细菌 delta 变形菌、拟杆菌门、厚壁菌门,以及真菌子囊菌门和接合菌门担子菌门在 EB 的丰度高于 WQ 和 WS,然而它们的相对丰度在 WQ 和 WS 之间无明显差异。

属水平上,根际土壤细菌中的假单胞菌属、*Haliea*、盐单胞菌属、*Geminicoccus*、*Salinimicrobium*、动性球菌属、*Albidovulum* 等属,以及非根际土壤细菌中的 *Deferrisoma*、*Gp10*、*Gillisia*、*Salinimicrobium*、*Salisaeta*、盐单胞菌属在 3 个地区之间具有差异。另外,盐化生境(EB)中根际土壤嗜盐细菌的丰度明显高于非盐化生境(WQ、WS),如盐单胞菌属、动性球菌属(*Planococcus*)、*Geminicoccus*、*Pelagibius*、*Gracilimonas*、*Salinimicrobium*、*Rubriwriga*、*Methylohalomonas*、*Thiohalobacter* 等(图 6)。对于真菌,EB 非根际土壤中多孢子菌属的丰度很低,而在 WQ 和 WS 为优势属,且在 WQ 和 WS 的丰度基本相同;而青霉属、曲霉属、*Meyerozyma* 等属则相反。根际土壤中,小

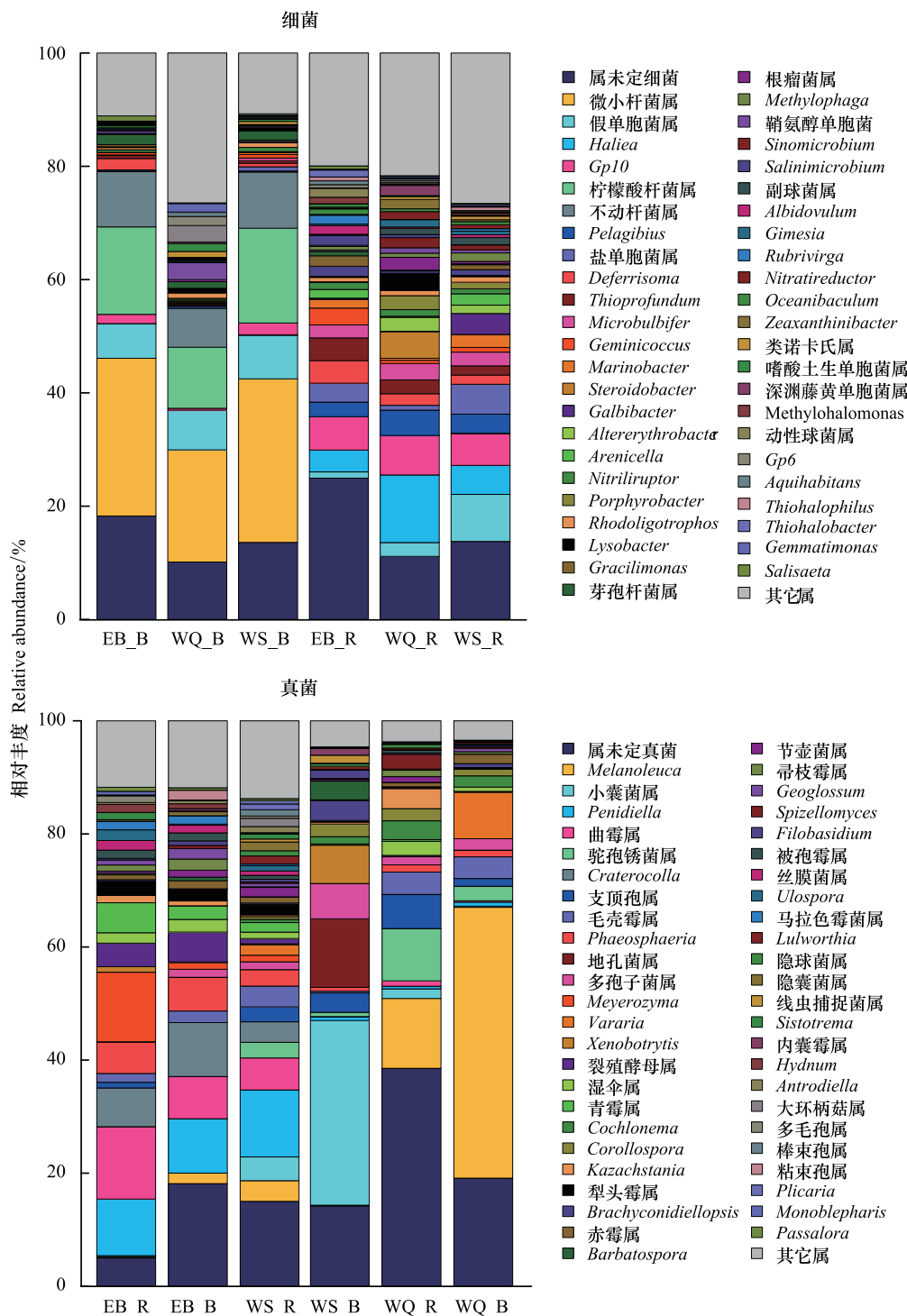


图4 黑果枸杞根际和非根际土壤微生物属水平群落组成

Fig.4 Microbial community composition at genus rank in rhizosphere and bulk soils of *Lycium ruthenicum*

囊菌属是EB的最优势属,而WQ和WS的最优势属为 *Melanoleuca*;此外,地孔菌属(*Geopora*)、*Xenobotrytis*、*Brachyconidiellopsis*、多孢子菌属等属在EB的丰度显著高于WQ和WS,这5个属的总丰度占EB真菌总丰度的61.33%,而在WQ和WS的丰度为3.09%和3.26%,与之相反, *Chaetomium*、*Phaeosphaeria*在EB丰度显著低于WS和WQ,而且在后两者中的丰度相近(图6)。

2.4 微生物群落与土壤理化因子的关系

相关性分析表明土壤TOC与TON显著正相关($P < 0.01$),pH与EC正相关($P > 0.05$);细菌群落多样性与

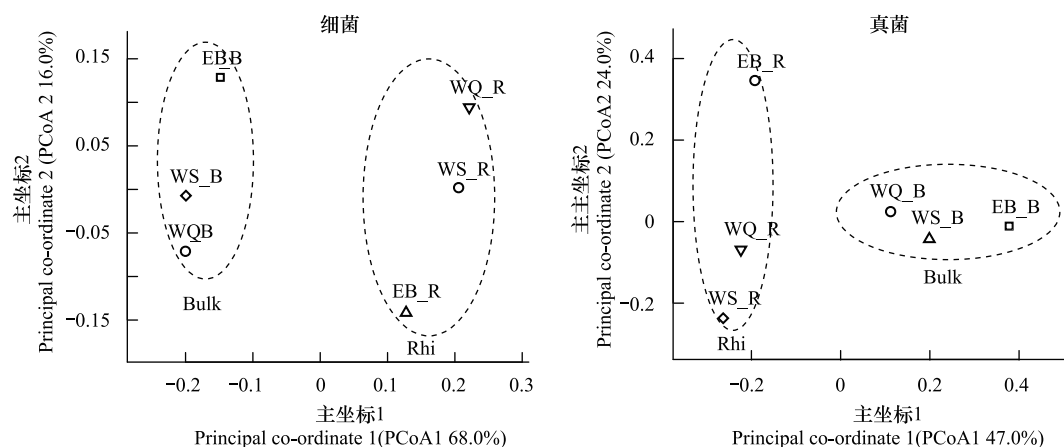


图5 基于 weighted unifrac 距离的土壤微生物群落的主坐标分析

Fig.5 Principal co-ordinates analysis (PCoA) of microbial communities based on weighted unifrac distance

Bulk; 非根际土壤, bulk soils; Rhi; 根际土壤, rhizosphere soils

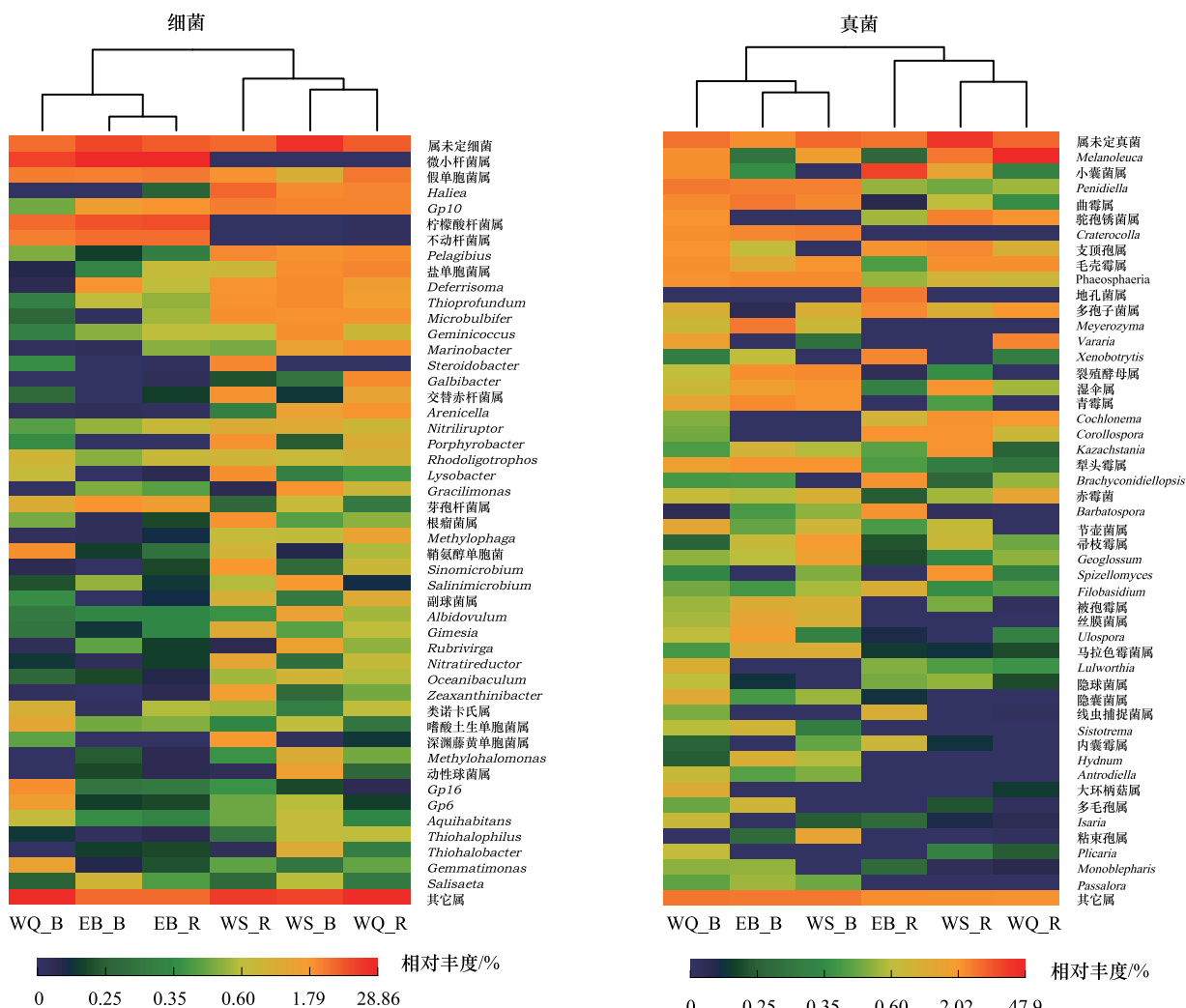


图6 以不同地区间具有丰度差异属构建的热度图和聚类关系图

Fig.6 Heatmap and cluster relationship of genera with abundance differed among different regions

土壤 TOC、TON 正相关,与 pH、EC 负相关;真菌群落多样性与 TOC、TON 显著负相关($P<0.05$),与 EC 和 pH 分别呈负相关和正相关(表 4)。CCA 结果表明 TOC、TON 是根际微生物群落的主要影响因子,EC、pH 是非根际微生物群落的主要影响因子;EC 对 EB 根际群落也具有重要的影响(图 7)。

表 4 细菌、真菌群落多样性与土壤理化性质的相关性

相关系数及显著性 Correlation coefficient and significance	pH	电导率 EC	总氮 TON	细菌香农指数 Bacterial shannon index	真菌香农指数 Fungal shannon index
有机碳 TOC	-0.47	-0.13	0.93***	0.67	-0.88*
pH	—	0.22	-0.55	-0.73*	0.59
电导率 EC		—	-0.27	-0.21	-0.06
总氮 TON			—	0.53	-0.93***

* :显著性水平 significance level; * $P<0.05$; *** $P<0.01$

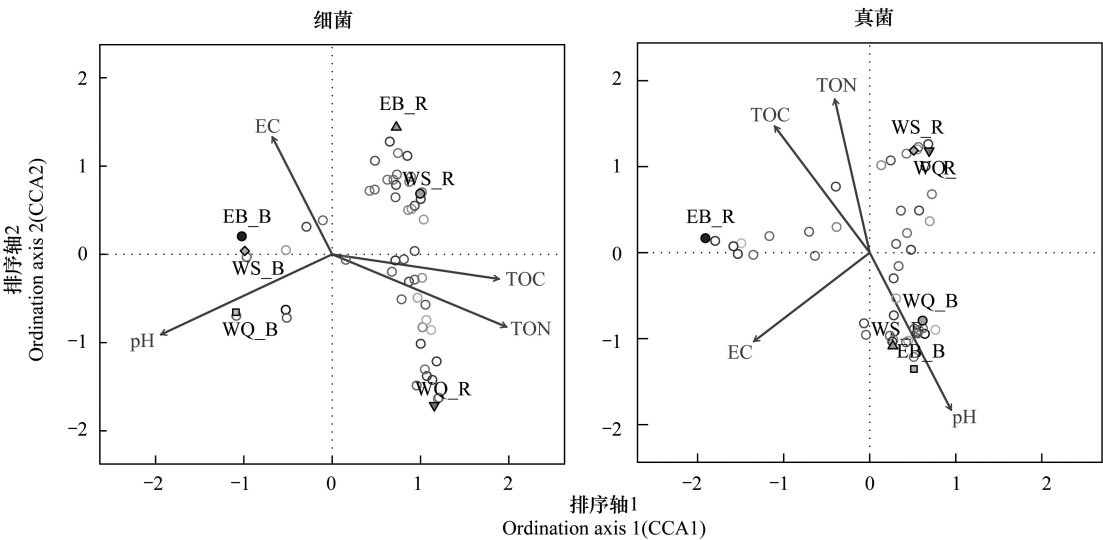


图 7 微生物群落组成与土壤理化性质的典范对应分析

Fig.7 Canonical correspondence analysis (CCA) between microbial community composition and soil chemical properties

TOC:总碳,total organic carbon;TON:总氮,total nitrogen;pH:pH 值;EC:电导率,electrical conductivity

3 讨论

非根际和根际土壤中细菌丰富度高,而真菌数量相对较少,这与土壤中微生物以细菌为主一致^[21]。根际细菌多样性高于非根际细菌,而根际真菌多样性却低于非根际土壤。根际土壤中营养物质高于非根际土壤,有利于细菌的繁殖从而丰富度和多样性升高,相关性分析也表明细菌多样性和组成与 TOC、TON 正相关,与以往研究相一致^[22-23];而土壤真菌多为病原菌^[24],不利于植物生长,可能被植物根系主动过滤,导致根际真菌多样性低于非根际。

根际细菌、真菌群落组成与非根际土壤存在明显的差异,PCoA 结果也表明非根际土壤与根际微生物群落分离明显,非根际土壤群落之间,以及根际土壤群落之间各具有较高的相似性。门水平上,根际土壤中细菌的变形菌门(alpha 变形菌)、拟杆菌门、酸杆菌门的相对丰度高于非根际土壤,而厚壁菌门、放线菌门的相对丰度则降低,尤其是厚壁菌门的丰度显著降低。真菌子囊菌门在 WQ 和 WS 根际土中的丰富度低于非根际土,担子菌门在 WQ 和 WS 根际土中的丰度升高,然而在 EB 则呈相反的趋势。属水平上,根际细菌的优势属的组成比非根际土壤的均匀度高,根际细菌的优势属数量多于非根际土壤,且单个优势属的丰度比非根际土

的低;非根际土壤的优势属,如微小杆菌属、柠檬酸杆菌属、不动杆菌属在根际土壤中的丰度显著降低,而 *Haliae*、*Pelagibius*、*Microbulbifer*、*Thiopfundum*、*Defferisoma* 在根际土壤中显著富集成为优势属。

根际与非根际菌群的差异,一方面是因为根际土壤 TOC、TON 的含量高于非根际土,EC 低于非根际土,利于某些特定类群的增殖和丰度的提高。CCA 结果表明根际细菌和真菌群落结构与土壤 TOC 和 TON 呈正相关关系,而非根际细菌和真菌群落结构与土壤 EC 和 pH 呈正相关关系。总体上,根际土壤细菌群落多样性高于非根际,例外的是 WQ 非根际细菌多样性和丰富度均高于根际,可能与该采样点位于人工林带内,非根际土壤的水分和养分含量高,利于微生物繁殖。另一方面,是植物从自身代谢和健康出发,由根系主动选择形成的^[25],gamma 变形菌包含许多促植物生长细菌(PGPR),如具有固氮作用的芽孢杆菌属、固氮菌属(*Azotobacter*),在生产和释放植物激素^[26-27]和土壤源植物病原菌(如真菌)的生物防治^[28]中有重要作用。alpha 变形菌包含许多植物共生固氮菌,如 *Rhizobium*、*Rickettsia*;delta 变形菌的一些物种,如 *Desulfovibrio*、*Geobacter*、*Bdellovibrio* 等,对土壤硫循环具有重要作用,对植物生长有重要作用,因此在根际土壤中的丰富度明显高于非根际土壤;alpha 和 delta 变形菌的丰度升高是在根际土壤中变形菌门的丰度显著高于非根际土的主要原因。另外,一些嗜盐或嗜盐碱细菌也对植物生长有促进作用,如盐单胞菌属、芽孢杆菌属^[5]、*Microbulbifer*^[29]、动性球菌属^[30],因此在根际土中的丰度高于非根际土。

子囊菌门和担子菌门黑果枸杞根际土壤丰度最高的两个门,也是土壤中最丰富的真菌类群。李越鲲等^[20]对青海、新疆、宁夏地区栽培的宁夏枸杞(*L. barbarum*)根际真菌群落的研究发现,总体上,子囊菌门和接合菌门是丰度最高的门,然而,青海格尔木地区的根际真菌丰度最高的仍为子囊菌门和担子菌门。球囊菌门能够侵染大多数陆生植物根系形成菌根,增强植物吸收水分、养分、以及抵御环境胁迫的能力,本研究发现球囊菌门在真菌群落中的相对丰度较低,与宁夏枸杞中的结果相似。我们还发现,真菌根际真菌群落的优势属数量低于非根际土,非根际土壤的优势属,如曲霉属、犁头霉属、被孢霉属、青霉属、丝膜菌属、*Penidiella*、*Phaeosphaeria* 等在根际土壤中的丰度显著降低甚至消失,而被孢霉属、多孢子菌属、*Cochlonema*、*Corollospora* 等属在根际土壤中显著富集成为优势属。

微生物群落多样性和组成在不同生境之间的差异与土壤理化性质密切相关,生境不同,根际微生物群落不同^[19]。我们也发现微生物群落的优势类群(门、属)的组成以及丰富度存在地区间差异,特别是盐碱生境(EB)与非盐碱生境(WQ、WS)。厚壁菌门在 EB 根际土中的丰度高于 WQ 和 WS;在属水平上,一些嗜盐和嗜碱细菌,如盐单胞菌属^[31]、*Geminicoccus*^[32]、*Pelagibius*^[33]、*Gracilimonas*^[34]、*Salinimicrobium*^[35]、动性球菌属^[30]、*Rubrivirga*^[36]、*Methylohalomonas*、*Nitriliruptor*^[37]、*Thiohalobacter*^[38]、*Aliifodinibius*^[39] 等,在盐碱生境中根际土壤嗜盐细菌的丰度高于非盐碱生境;另外,这些嗜盐细菌在根际土壤的丰度高于非根际土壤,表明 EB 地区根际土壤的相对高的含盐量与营养成分促进了它们的繁殖和丰度的提高,CCA 分析也表明它们与 TOC、TON 正相关。

PCoA 结果表明含盐量低的 WQ 和 WS 的根际土壤微生物群落的相似度高于与 EB 之间的相似度,CCA 结果也表明 EB 根际细菌群落与 EC 也具有正相关关系,说明含盐量对土壤微生物群落结构具有重要的影响。但是也有研究表明盐胁迫能显著降低根际土壤细菌群落的丰富度,例如,盐敏感黄瓜品种根际细菌的丰富度在低盐处理下较高,而耐盐黄瓜品种根际细菌的丰富度在高盐胁迫下较高^[40],说明盐分是植物根际微生物群落的重要影响因子,然其作用效果也受植物根际效应的制约^[13]。另外,气候条件,特别是水分和温度,对植物生理、光合作用,根系活动具有重要的调控作用,进而影响根际微生物群落的组成^[12, 41],可是,本研究未对水分、温度因子进行测量,它们对群落结构的影响有待于进一步的研究。

参考文献(References):

- [1] Shi S J, Nuccio E, Herman D J, Rijkers R, Estera K, Li J B, da Rocha U N, He Z L, Pett-Ridge J, Brodie E L, Zhou J Z, Firestone M. Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. MBio, 2015, 6(4): e00746.
- [2] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty N K, Bhatnagar S, Eisen J A, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly

- of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): E911-E920.
- [3] Knelman J E, Legg T M, O'Neill S P, Washenberger C L, González A, Cleveland C C, Nemergut D R. Bacterial community structure and function change in association with colonizer plants during early primary succession in a glacier forefield. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 172-180.
- [4] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350.
- [5] Bharti N, Barnawal D, Maji D, Kalra A. Halotolerant PGPRs prevent major shifts in indigenous microbial community structure under salinity stress. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 196-208.
- [6] Rodríguez-Blanco A, Sicardi M, Frioni L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 2015, 51(3): 391-402.
- [7] Bevivino A, Paganin P, Bacci G, Florio A, Pellicer M S, Papaleo M C, Mengoni A, Ledda L, Fani R, Benedetti A, Dalmasi C. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105515.
- [8] Luan F G, Zhang L L, Lou Y Y, Wang L, Liu Y N, Zhang H Y. Analysis of microbial diversity and niche in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton at the flowering stage in southern Xinjiang. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1602-1611.
- [9] Ramirez K S, Craine J M, Fierer N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology*, 2012, 18(6): 1918-1927.
- [10] Brockett B F T, Prescott C E, Grayston S J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 44(1): 9-20.
- [11] 刘方春, 邢尚军, 马海林, 陈波, 丁延芹, 杜秉海. 持续干旱对樱桃根际土壤细菌数量及结构多样性影响. *生态学报*, 2014, 34(3): 642-649.
- [12] Mateos-Rivera A, Yde J C, Wilson B, Finster K W, Reigstad L J, Øvreås L. The effect of temperature change on the microbial diversity and community structure along the chronosequence of the sub-arctic glacier forefield of Styggealsbreen (Norway). *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(4): fnw038.
- [13] Borruso L, Bacci G, Mengoni A, de Philippis R, Brusetti L. Rhizosphere effect and salinity competing to shape microbial communities in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex-Steud. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 359(2): 193-200.
- [14] Yang J, Ma L A, Jiang H C, Wu G, Dong H L. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25078.
- [15] da Silveira Lúcio W, de Lacerda C F, Filho P F M, Hernandez F F F, Neves A L R, Gomes-Filho E. Growth and physiological responses of melon plants inoculated with mycorrhizal fungi under salt stress. *Semina: Ciências Agrárias*, 2013, 34(4): 1587-1602.
- [16] Yang H, Hu J X, Long X H, Liu Z P, Rengel Z. Salinity altered root distribution and increased diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil of Jerusalem artichoke. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20687.
- [17] 王龙强. 盐生药用植物黑果枸杞耐盐生理生态机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011.
- [18] 韩多红, 李善家, 王恩军, 孟红梅, 陈叶, 张勇. 外源钙对盐胁迫下黑果枸杞种子萌发和幼苗生理特性的影响. *中国中药杂志*, 2014, 39(1): 34-39.
- [19] 王雪, 接伟光, 蔡柏岩. 不同生境黄蘗 AM 真菌菌群结构分析. *林业科学*, 2012, 48(9): 99-107.
- [20] 李越鲲, 孙燕飞, 雷勇辉, 周旋, 尹跃, 秦垦. 枸杞根际土壤真菌群落多样性的高通量测序. *微生物学报*, 2017, 57(7): 1049-1059.
- [21] Yang S, Xing S, Liu C, Du Z, Wang H, Xu Y. Effects of root pruning on the vegetative growth and fruit quality of Zhanhuadongzao trees. *Horticultural Science*, 2010, 37(1): 14-21.
- [22] Zhao C C, Miao Y, Yu C D, Zhu L L, Wang F, Jiang L, Hui D F, Wan S Q. Soil microbial community composition and respiration along an experimental precipitation gradient in a semiarid steppe. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24317.
- [23] Musyoki M K, Cadisch G, Zimmermann J, Wainwright H, Beed F, Rasche F. Soil properties, seasonality and crop growth stage exert a stronger effect on rhizosphere prokaryotes than the fungal biocontrol agent *Fusarium oxysporum* f.sp. strigae. *Applied Soil Ecology*, 2016, 105: 126-136.
- [24] 刘方春, 邢尚军, 马海林, 杜振宇, 马丙尧, 陈波, 杜秉海. PGPR 生物肥对甜樱桃 (*Cerasus pseudocerasus*) 根际土壤生物学特征的影响. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(5): 722-727.
- [25] Kowalchuk G A, Buma D S, de Boer W, Klinkhamer P G L, van Veen J A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1/4): 509-520.
- [26] Kamilova F, Kravchenko L V, Shaposhnikov A I, Makarova N, Lugtenberg B. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate.

- Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(10): 1121-1126.
- [27] Palaniyandi S A, Damodharan K, Yang S H, Suh J W. *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(3): 766-773.
- [28] Jošić D, Ćirić A, Soković M, Stanojković-Sebić A, Pivić R, Lepšanić Z, Glamočlija J. Antifungal activities of indigenous plant growth promoting *Pseudomonas* spp. from alfalfa and clover rhizosphere. Frontiers in Life Science, 2015, 8(2): 131-138.
- [29] Imran M, Pant P, Shanbhag Y P, Sawant S V, Ghadi S C. Genome sequence of *Microbulbifer mangrovi* DD-13^T reveals Its versatility to degrade multiple polysaccharides. Marine Biotechnology, 2017, 19(1): 116-124.
- [30] See-Too W S, Convey P, Pearce D A, Lim Y L, Ee R, Yin W F, Chan K G. Complete genome of *Planococcus rifietoensis* M8^T, a halotolerant and potentially plant growth promoting bacterium. Journal of Biotechnology, 2016, 221: 114-115.
- [31] Wang Y H, Song N, Yang L N, Abdel-Motaal H, Zhang R, Zhang Z L, Meng F K, Jiang J Q. A novel NhaD-type Na⁺/H⁺ antiporter from the moderate halophile and alkaliphile *Halomonas alkaliphila*. Canadian Journal of Microbiology, 2017, 63(7): 596-607.
- [32] Foesel B U, Gößner A S, Drake H L, Schramm A. *Geminicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., an aerobic phototrophic *Alphaproteobacterium* isolated from a marine aquaculture biofilter. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(8): 581-586.
- [33] Choi D H, Hwang C Y, Cho B C. *Pelagibius litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family Rhodospirillaceae isolated from coastal seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 818-823.
- [34] Wang Y X, Li Y P, Liu J H, Xiao W, Lai Y H, Li Z Y, Ding Z G, Wen M L, Cui X L. *Gracilimonas mengyeensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt mine in Yunnan, south-western China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(11): 3989-3993.
- [35] Nedashkovskaya O I, Vancanneyt M, Kim S B, Han J, Zhukova N V, Shevchenko L S. *Salinimicrobium marinum* sp. nov., a halophilic bacterium of the family Flavobacteriaceae, and emended descriptions of the genus *Salinimicrobium* and *Salinimicrobium catena*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(10): 2303-2306.
- [36] Song J, Joung Y, Park S, Cho J C, Kogure K. *Rubrivirga profundus* sp. nov., isolated from deep-sea water, and emended description of the genus *Rubrivirga*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(9): 3253-3257.
- [37] Sorokin D Y, van Pelt S, Tourova T P, Evtushenko L I. *Nitriliruptor alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a deep-lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of *Nitriliruptoraceae* fam. nov. and *Nitriliruptorales* ord. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(2): 248-253.
- [38] Sorokin D Y, Kovaleva O L, Tourova T P, Muyzer G. *Thiohalobacter thiocyanaticus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from hypersaline lakes, that utilizes thiocyanate. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(2): 444-450.
- [39] Cho G Y, Lee J C, Whang K S. *Aliifodinibius salicampi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a grey saltern. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(8): 2598-2603. [40] 张立英, 吴凤芝, 周新刚, 杨平. 盐胁迫下黄瓜根系分泌物对土壤养分及土壤酶活性的影响. 中国蔬菜, 2009(14): 6-11.
- [41] Deepika S, Kothamasi D. Soil moisture-a regulator of arbuscular mycorrhizal fungal community assembly and symbiotic phosphorus uptake. Mycorrhiza, 2015, 25(1): 67-75.