

磷浓度处理对大豆根际土壤微生物群落结构的影响

刘俊杰^{1,2}, 王光华², 金 剑², 刘居东², 张秋英², 刘晓冰²

(¹东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨, 150030; ²中国科学院东北地理与农业生态研究所黑土重点实验室, 黑龙江 哈尔滨, 150081)

摘 要:根际土壤微生物是根际土壤生态系统的重要组成部分,与根际养分有效性、植物生长发育等关系密切。土壤磷素营养的差异可引起植物根系分泌物和根形态的变化,但对植物根际微生物的作用还少有报道。在盆栽条件下,研究了3种磷浓度处理对生长在黑土土壤上3个采样时期(V3、R1和R3期)的大豆根际微生物群落结构的影响。采用PCR-DGGE技术对细菌16S rDNA和真菌ITS片段进行解析,对DGGE图谱主成分分析(PCA)。结果表明:大豆根际土壤细菌和真菌群落结构均随生育期而迁移,说明生育时期较磷浓度处理而言是影响根际微生物群落结构产生变化的主要因素;大豆根际真菌群落结构受不同磷浓度处理产生分异体现在V3期,细菌结构产生分异体现在V3和R1期,说明磷浓度处理对大豆根际微生物的影响主要表现在大豆生育的早期,随着生育时期的推进,这种差异弱化至不明显。

关键词:PCR-DGGE;磷浓度;黑土;细菌群落;真菌群落

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)05-0801-05

Effect of Different Phosphorus Concentrations on Microbial Communities in Soybean Rhizosphere

LIU Jun-jie^{1,2}, WANG Guang-hua², JIN Jian², LIU Ju-dong², ZHANG Qiu-ying², LIU Xiao-bing²

(¹Northeast Agricultural University, Resources and Environmental Sciences College, Harbin 150030; ²Key Lab of Black Soil Ecology, Northeast Institute of Geography and Agro-ecology, Chinese Academy of Science, Harbin 150081, Heilongjiang, China)

Abstract: Microbial community in the rhizosphere play an important role in soil nutrient availability and plant growth. Different concentrations of phosphorus availability change the root exudates and root architecture; however, the effect on microbial community in the rhizosphere is unclear. In this study, a pot experiment was conducted to investigate the effects of three phosphorus concentrations on soybean rhizosphere microbial communities at three sampling times (V3, R1 and R3). The bacterial and fungal communities were analyzed by PCR-DGGE (polymerase chain reaction-degenerate gradient gel electrophoresis) targeting a partial 16S rDNA and the internal transcribed space (ITS) region, respectively. DGGE banding patterns were used for principal component analysis (PCA). Results showed that both bacterial and fungal communities shifted with growth stages, suggesting that the growth stage play a more important role in determination of soybean rhizosphere microbial community than different phosphorus concentration treatments. Furthermore, the impact of different phosphorus treatments on microbial community change was only detected at soybean early growth stages, i. e., for fungal community at stage V3 and for bacterial community at stages V3 and R1. No significant difference of microbial community among phosphorus treatments was observed at growth stage R3.

Key words: Bacterial community; Black soil; Fungal community; PCR-DGGE; Phosphorus

土壤磷素缺乏是限制植株生长和作物产量提高的重要影响因素^[1]。目前施用磷肥是满足作物生长所需磷的唯一手段,大量的施用磷肥不仅耗尽了有限的磷矿资源,而且易引起环境污染问题^[2]。由

于土壤对磷素固定现象的普遍存在,尽管每年向农田中施入很多的磷肥,导致大多数农田土壤潜在的磷库很大,而提供作物生长发育的磷流却很小^[3]。因此如何提高土壤中磷素利用效率是备受关注的

收稿日期:2008-06-05

基金项目:国家自然科学基金专项基金资助项目(40541004)。

作者简介:刘俊杰(1984-),男,硕士,主要从事根际土壤微生物多样性研究。E-mail:liujunjie0451@hotmail.com。

通讯作者:王光华,博士,研究员。E-mail:guanghuawang@hotmail.com。

课题。

提高土壤磷素利用效率的生物措施主要有两方面,一是植物的改良,通过培育耐低磷的作物品种或改变根系形态等^[4-5];二是采用微生物的措施,如利用菌根菌或溶磷菌等^[6]。大豆是对磷肥敏感的作物,土壤磷素亏缺,严重地影响着大豆的产量和品质^[7]。有研究表明在低磷胁迫条件下,大豆根系分泌物和根系形态产生了变化^[8-9]。鉴于根系分泌物是根际微生物生长的营养源,不同的根系分泌物可导致根际微生物群落结构产生变化^[10],推测不同浓度的磷处理也可能导致大豆根际土壤微生物群落结构的改变,但相关研究还未见报道。采用分子生物学 PCR-DGGE 技术,对大豆根际细菌和真菌的群落结构进行解析,旨在了解不同磷浓度处理条件下,大豆根际土壤微生物群落结构变化情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试大豆品种为绥农 14(磷素敏感)。供试土壤为典型中层黑土,取自海伦市胜利村,土壤有机质为 $47.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,土壤全氮、全氮和全钾分别为 $2.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.872 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $19.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,土壤碱解氮、速效磷和速效钾分别为 $175.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $39.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 值 7.01。

1.2 试验设计

试验于 2006 年在中国科学院东北地理与农业生态研究所哈尔滨园区盆栽试验场进行。采用沙土盆栽法,以降低土壤中的磷浓度。水洗细砂和供试土壤按 4:1 的比例与添加的基础养分充分混合,装入盆栽盆,每盆装基质 15 kg。添加的基础养分用量为($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$):Ca(NO_3)₂ 1200;K₂SO₄ 200;MgSO₄ 250;Fe(EDTA) 15;ZnSO₄ 10;CuSO₄ 8。设 3 个施磷浓度处理,即 P₀(0 mg P·kg⁻¹土)、P₁(15 mg P·kg⁻¹土)和 P₂(40 mg P·kg⁻¹土),磷源为磷酸二氢钾,每处理 3 次重复。大豆出苗真叶展开后,去掉子叶,以减少籽粒磷对低磷胁迫的影响。在大豆生长的 V3、R1 和 R3 期时,扣盆取根际土壤。

1.2.1 根际土壤微生物总 DNA 的提取与纯化 微生物 DNA 提取参考 Zhou 等^[11]和 Watanabe 等^[12]的方法。粗提 DNA 溶于 100 μL 的 TE buffer 中,利用 Sephadax G-200 柱层析法纯化。

1.2.2 PCR 扩增 细菌群落研究,采用引物 GC357f 和 517r 对细菌 16S rDNA 的 V3 区进行 PCR

扩增。PCR 反应条件参照前文报道^[13]。真菌群落研究,采用巢式 PCR 对真菌 ITS 区段进行扩增,第一步和第二步扩增的引物分别为 ITS1f 和 ITS4,及 GC-ITS1f 和 ITS2^[14],PCR 反应按 Bastias 等的报道^[15]。

1.2.3 DGGE 采用 DCode 突变检测系统对 PCR 产物进行 DGGE 分析。细菌和真菌群落结构分析所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度均为 8%,电泳液为 1 × TAE 溶液。细菌凝胶的变性梯度为 30% ~ 70%(100% 的变性剂为 7 mol·L⁻¹尿素,40% 甲酰胺),电泳条件为电压 100 V、温度 60 ℃、电泳时间 14 h。真菌凝胶的变性梯度为 20% ~ 55%,电泳条件为电压 75 V、温度 60 ℃、电泳时间 16 h。电泳结束后,取下凝胶置于稀释至 3 300 倍的 Gel Red 核酸染料中染色 20 min,UVI 成像系统拍照。

1.2.4 数据分析 采用 QuantityOne-1-D 软件(Version 4.5)对 DGGE 条带进行数字化分析。由于 DGGE 条带 DNA 含量与其灰度(范围 0 ~ 255,0:灰度最小,255:灰度最大)呈比例关系^[16],用每个条带的灰度值对该列所有条带平均灰度值的比值 p_i (该方法可以降低不同样品之间因注入 DNA 量不平衡产生的差异),计算土壤微生物群落结构多样性指数(H)和均匀度指数(E)。其中 $H = -\sum p_i \ln p_i$; $E = H/\ln S$, S 为样品的条带数。再利用 p_i 值进行主成分分析(Principal component analysis;PCA)。

2 结果与分析

2.1 细菌 DGGE 指纹图谱分析

图 1 表征的是不同磷浓度处理和不同采样时期的大豆根际土壤细菌群落结构的 DGGE 图谱。由图可知,条带间具有很高的相似性,许多条带是共有的。如条带 1、4、7、8、10、11 和 12 等,表明这些条带代表的微生物不受低磷胁迫和采样时期的影响。而有些条带所代表的细菌则受到磷浓度和采样时期的共同作用而表现出复杂的变化,如条带 3 主要出现在 R3 期的 P₀ 和 P₁ 处理,说明在此时期,低磷处理诱导了特定的微生物在大豆根际定植;而条带 14、15、16、17 和 18 的亮度在 R3 期大于 V3 和 R1 期,表明大豆根际细菌群落结构受生育期影响发生变化,某些细菌从采样初期非优势微生物随采样期的推进变为优势微生物。

2.2 细菌 DGGE 图谱的主成分分析(PCA)

对大豆根际细菌群落 DGGE 图谱主成分分析

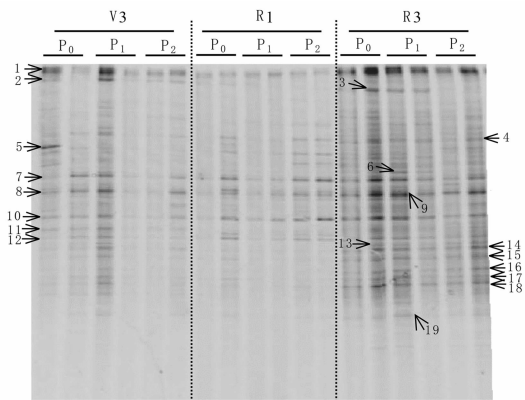


图1 磷浓度处理对大豆根际细菌群落结构影响的 DGGE 图谱

Fig.1 Effect of different phosphorus concentrations on bacterial communities in soybean rhizospheres estimated by DGGE profiles

结果表明,主成分 1(生育期)的变异率为 51.3%,远大于主成分 2(磷浓度)的变异率 15.6%,所以样品间细菌群落结构的差异主要有主成分 1 轴来决定(图 2)。PCA 图可将大豆根际细菌群落划分为 3 个集团,分别隶属于大豆的 3 个采样时期。鉴于 PC1 远远大于 PC2,说明 V3 和 R1 期采集的样品根际细菌群落结构相似度要高于第 R3 期样品,大豆根际细菌群落结构变化主要受到生育时期的影响,不同磷浓度处理处于次要地位。对比同一采样时期根际微生物群落变化结果表明,V3 和 R1 期细菌群落受磷浓度影响产生一定程度的分异,待大豆生长到 R3 期磷作用效果几乎消失。不同大豆生育时期根际细菌群落结构演替方向如图中箭头所示。

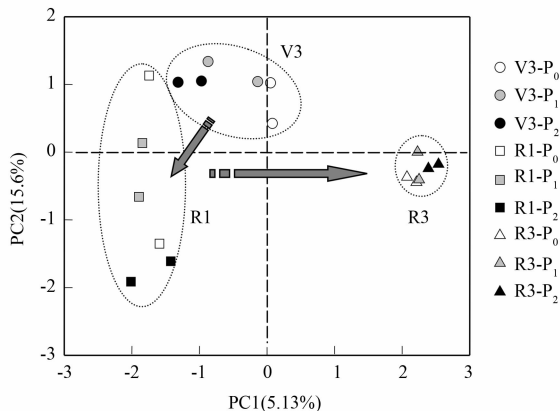


图2 不同磷浓度处理对大豆根际细菌群落结构影响的主成分分析

Fig.2 Principal component analysis of bacterial communities in soybean rhizospheres as influenced by different phosphorus concentrations

2.3 真菌 DGGE 指纹图谱分析

图 3 为磷浓度处理对根际真菌群落结构影响的 DGGE 图谱。与细菌图谱相似,不同磷浓度处理和不同采样时期的大豆根际土壤细菌群落的 DGGE 图谱条带也具有很高的相似性,一些条带是共有的,如条带 b、f、k、r 和 s 等,表明这些微生物不受磷浓度和生育期的影响。而有些条带所代表的真菌则受到磷浓度和采样时期的共同作用而表现出复杂的变化,如条带 a 主要出现在 V3 期的 P₀ 处理;条带 n 只出现在 R1 期的 P₁ 处理。图中条带的有无及亮度可以代表某种细菌存在与否及数量的相对多少。条带 d、q 所代表的真菌亮度的增强说明磷浓度处理改变了特定微生物的群落密度。由图可知磷浓度变化诱导了大量特异性条带出现或缺失,如条带 a、c、h、i、l、n、o、p 等,说明真菌群落结构受磷浓度影响产生了变化。

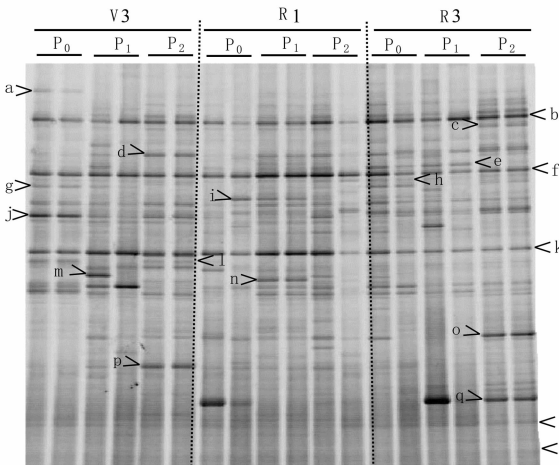


图3 磷浓度处理对大豆根际真菌群落结构影响的 DGGE 图谱

Fig.3 Effect of different phosphorus concentrations on fungal communities in soybean rhizospheres estimated by DGGE profiles

2.4 真菌 DGGE 图谱的主成分分析 (PCA)

对大豆根际真菌群落结构 DGGE 图谱进行主成分分析(见图 4),结果表明,除去在大豆生育期 R1 和 R3 的 P₀ 处理各一个样品外,PCA 图可将大豆根际真菌群落按生育期划分为 R1 和 R3 期两个集团;而在集团内不同磷浓度处理间未表现显著差异。与上两个时期不同,在大豆生长的 V3 期,真菌群落结构按磷浓度处理 P₀、P₁ 和 P₃ 可划分为各自的集团,说明大豆根际真菌群落结构受磷浓度影响差异显著。

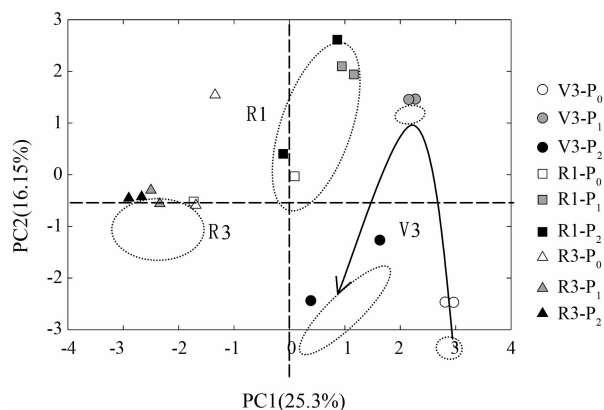


图4 不同磷浓度处理对大豆根际真菌群落结构影响的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of fungal communities in soybean rhizospheres as influenced by different phosphorus concentrations

3 讨论

作物在缺磷胁迫条件下,磷高效植物会通过增加分泌有机酸和酸性磷酸酶等活化土壤中的难溶磷来满足作物生长^[17-18]。植物自身的这种调控机制改变了根系分泌物的成分组成,从而影响到根际微生物的群落结构^[10]。研究结果显示不同磷浓度处理对根际微生物群落结构有一定影响,但这种作用只体现在大豆生长的早期,对细菌群落结构而言是在大豆生长的V3和R1期;对真菌群落结构而言是在V3期。随着生育时期的推进,这种作用体现得不明显。这一结果与大豆磷高效基因型筛选时期相吻合^[19],一般而言,在大豆磷高效基因型筛选上重点侧重于大豆生长的早期,出苗后45 d左右,随着生育期的推进,不同基因型间的差异被弱化。根据这一结论和研究结果,推测大豆根际微生物群落结构受磷浓度影响体现在早期可能与根系分泌物的差异有关,这一推测有待进一步的验证。

不同的发育阶段根际土壤微生物群落结构存在较大的差异^[20]。Picard等^[21]指出产生DAPG的荧光假单胞杆菌在玉米根际的数量受植物生长期的影响很大,在玉米生长前期DAPG产生的菌数很低,以后便逐渐增多。Duineveld等^[22]用菊花做试验材料也得到同样的结论:DGGE图谱表明幼龄植株与成熟植株间根际土壤微生物群落结构差异很大。他们将这种原因归结为作物在不同生育期根系分泌物不同有关。研究也发现微生物群落随生育期变化显著,同一生育期的样品在PCA图谱中明显聚为一类,表明生育期是引起微生物群落发生变化的主要

因素,而磷浓度处于次要地位。从而进一步暗示大豆生育时期较土壤磷素浓度差异对根际分泌物的影响要强。

参考文献

- [1] Wissuwa M. How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Small causes with big effects[J]. Plant Physiology, 2003, 133(4):1947-1958.
- [2] Zhang L M, He L Y, Li J S, et al. Phosphorus nutrient characteristics of different maize (*Zea mays*) inbreds for tolerance to low-P stress[J]. Agricultural Sciences in China, 2005, 4(4):281-287.
- [3] 潘相文,唐才贤,王光华,等.作物耐低磷适应机制研究进展[J].吉林农业大学学报,2005,27(4):434-441. (Pan X W, Tang C X, Wang G H, et al. Progress of study on adaptation mechanism of crop tolerance to low phosphorus[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2005, 27(4):434-441.)
- [4] 林海建,张志明,高世斌,等.玉米耐低磷研究现状及磷高效育种策略的探讨[J].中国农学通报,2008,24(1):181-185. (Lai H J, Zhang Z M, Gao S F, et al. The research actuality of maize (*Zea mays* L.) tolerance to low phosphorus and the strategy of high phosphorus efficiency breeding[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(1):181-185.)
- [5] 严小龙,廖红,戈振扬,等.植物根构型特性与磷吸收效率[J].植物学通报,2000,17(6):511-519. (Yan X L, Liao H, Ge Z Y, et al. Root architectural characteristics and phosphorus acquisition efficiency in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000, 17(6):511-519.)
- [6] Asea P E A, Kucey R M N, Stewart J W B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1988, 20:459-464.
- [7] 丁洪,郭庆元,李志玉.磷对大豆品种产量和品质的影响[J].中国油料作物学报,1998,20(2):67-70. (Ding H, Guo Q Y, Li Z Y, et al. Effect of phosphorus on grain yield and quality in soybean cultivars[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2):67-70.)
- [8] 王美丽,严小龙.大豆根形态和根系分泌物特性与磷效率[J].华南农业大学学报,2001,22(3):1-4. (Wang M L, Yan X L. Characteristics on root morphology and root exudation of soybean in relation on phosphorus efficiency[J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(3):1-4.)
- [9] 金剑,王光华,刘晓冰,等.不同施磷量对大豆苗期根系形态性状的影响[J].大豆科学,2006,25(4):360-364. (Jin J, Wang G H, Liu X B, et al. Effect of different phosphorus regimes on root morphological characteristics of soybean seedling[J]. Soybean Science, 2006, 25(4):360-364.)
- [10] 朱丽霞,章家恩,刘文高.根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述[J].生态环境,2003,12(1):102-105. (Zhu L X, Zhang J E, Liu W G. Review of studies on interactions between root exudates and rhizospheric microorganisms[J]. Ecology and Environment, 2003, 12(1):102-105.)

- [11] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:316-312.
- [12] Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, et al. DGGE method for analyzing 16SrDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 23 (2): 153-163.
- [13] 王光华, 刘俊杰, 齐晓宁, 等. Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析施肥对德惠黑土细菌群落结构和功能的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(1): 220-226. (Wang G H, Liu J J, Qi X N et al. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(1): 220-226.)
- [14] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2: 113-118.
- [15] Bastias B A, Xu Z H, Cairney J W G. Influence of long-term repeated prescribed burning on mycelial communities of ectomycorrhizal fungi [J]. *New Phytologist*, 2006, 172: 149-158.
- [16] Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutrition status [J]. *Applied and Microbiology*, 2000, 66: 345-351.
- [17] 田中民, 李春俭, 王晨, 等. 缺磷白羽扇豆排根与非排根区根尖分泌有机酸的比较[J]. *植物生理学报*, 2000, 26(4): 317-322. (Tian Z M, Li C J, Wang C, et al. Comparative studies on organic acid exudation by tips of proteoid and non proteoid roots of phosphorus deficient white lupin [J]. *Acta Photophy Siologica Sinica*, 2000, 26(4): 317-322.)
- [18] 吴平, 印莉萍, 张力平, 等. 植物营养分子生理学[M], 北京: 科学出版社, 2001, 103-106. (Wu P, Yin L P, Zhang L P, et al. *Molecular physiology of plant nutrition* [M]. Beijing: Science Press, 2001, 103-106.)
- [19] 王聪, 刘玉平, 李秀辉, 等. 磷胁迫下不同基因型大豆苗期根系形态及生物量的差异[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(2): 155-159. (Wang C, Liu Y P, Li X H, et al. Study on variation in characteristics of phosphorus efficiency among different soybean genotypes at seedling stage under phosphorus stress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(2): 155-159.)
- [20] 王光华, 金剑, 徐美娜, 等. 植物、土壤及土壤管理对土壤微生物群落结构的影响[J]. *生态学杂志*, 2006, 25(5): 550-556. (Wang G H, Jin J, Xu M N, et al. Effect of plant, soil and soil management on soil microbial community diversity [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, 25(5): 550-556.)
- [21] Picard C, De Cello F, Venture M, et al. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth [J], *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 948-955.
- [22] Duineveld B M, Kowalchuk G A, Keijzer A, et al. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 172-178.

About Crop Science Online

Crop Science, published bimonthly, is the official publication of the Crop Science Society of America. The publication is prepared by an editorial board consisting of an editor and editor-in-chief, technical editors, associate editors, publications director and managing editor, and the executive vice president.

Crop Science publishes original research in crop breeding and genetics; crop physiology and metabolism; crop ecology, production, and management; seed physiology, production, and technology; turfgrass science; crop ecology, management, and quality; genomics, molecular genetics, and biotechnology; plant genetics resources; and pest management. Cultivar, germplasm, parental line, and genetic stock, and mapping population registration manuscripts are also published. Manuscripts should be submitted to Crop Science through the Crop Science online submission program at <http://mc.manuscriptcentral.com/crop/>. Detailed instructions can be found at the site.

Instructions to authors of research manuscripts as well as crop registration manuscripts can be found at http://www.asa-cssa-sssa.org/publications/forms_resources.html. All papers, whether invited or volunteered, are subject to review. Additional details on requirements for articles are available on the web site. Appeals of decision by the editorial board are handled by the editor.