

一种生物刺激素对大豆根际土壤微生物群落的影响

袁鑫,王梦亮,王俊红

(山西大学 应用化学研究所,山西 太原 030006)

**摘要:**为研究生物刺激素(二苯基脲磺酸钙)对大豆根际土壤微生物群落的影响,采用中华费氏根瘤菌或不同浓度的生物刺激素对汾豆 78 进行浸种,田间条件下播种后在大豆花期时采集大豆根际土壤,并通过对比改良 SDS 法、TSAI 法、生工试剂盒法和 Mobile 试剂盒法,选取效果最佳的 Mobile 试剂盒法进行土壤细菌 DNA 提取,对目的片段 16S V3 区进行特异性扩增,扩增产物用于后续高通量测序分析。结果表明:5 个试验组与 CK 组相比,试验组 Shannon 数值下降。处理 S2、S3、S4 和 S5 与 CK 相比,变形菌门、放线菌门和拟杆菌门相对含量增加;酸杆菌门和硬壁菌门相对含量减少。试验还发现在属的水平上,一些对大豆生长有益和促进固氮的功能菌种有增加趋势。生物刺激素使大豆根际土壤微生物多样性下降;可以促进根瘤菌的生长,增加根际土壤微生物中根瘤菌的含量;同时生物刺激素还可以促进根际土壤微生物中功能菌属的数量,不仅促进大豆固氮,还促进大豆生长发育。

**关键词:**生物刺激素;大豆;根际微生物;DNA 提取;高通量测序

**中图分类号:**S565. 1;S154. 3      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 05. 0751

Effect of A Kind of Biological Stimulant on Microbial Community in Rhizosphere Soil of Soybean

YUAN Xin, WANG Meng-liang, WANG Jun-hong

(Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 03006, China)

**Abstract:** In this paper, field experiments were carried out to study the influence of biostimulant (*Diphenylurea Sulfonic Calcium*), developed by Shanxi University to the rhizosphere soil microbial community. Test set up five experimental groups, group S1 to S5, and one blank control group CK, then spray Chinese fisher Rhizobium or different concentrations of biostimulant to soybean seeds. Collected soybean rhizosphere soil during the flowering period, and compared the modified SDS method, TSAI method, Sangon magnetic bead kit and Mobile kit method, and selected the best Mobile Kit Method for soil bacterial DNA extraction. Amplified the fragment of 16S V3 region specifically, amplification products used for subsequent high-throughput sequencing analysis. The result showed that compared with the CK group, the Shannon values of the 5 experimental groups decreased. Compared with CK, S2, S3, S4 and S5 were found that the relative content of Proteobacteria, Actinomycetes and Bacteroides were increased in the main phylum, and the relative contents of the phylum and the hard wall were reduced. At the genus level, it was also found that there was an increasing trend of functional bacteria in soybean growth and nitrogen fixation. Biostimulins made the diversity of soybean rhizosphere soil microorganism decreased, and could promote the growth of rhizobia, increase the content of rhizobia in rhizosphere soil microorganisms, at the same time, it could promote the number of functional bacteria in rhizosphere soil microbes, not only promote the soybean nitrogen fixation, but also promote the growth of soybean.

**Keywords:** Biostimulant; Soybean; Soil rhizosphere microbial; DNA extraction; Pyrosequencing

大豆是世界上最重要的油料作物,也是中国进口量较大的农产品之一。近年来,我国国内大豆产业整体形势日益严峻,本土生产产量下滑、需求持续快速增长、进口依存度过高。据数据显示,2015 – 2016 年度中国大豆进口量达到8 249 万 t,比上年度增加了 414 万 t,增幅达到了 5. 3%。为了满足国内日益增长的大豆需求,减缓大豆进口数量,提高大豆产量成为目前急需解决的问题<sup>[1]</sup>。而传统增产方式如施用化肥,长期导致土壤板结,土壤肥力下降,破坏生态环境和危害人体健康。因此优化共生固氮环境,完全依靠土壤中共生固氮菌群的自然生态属性的科学思想开始出现,而生物刺激素正是在

收稿日期:2017-05-17  
基金项目:林业公益性行业科研(201304326)。  
第一作者简介:袁鑫(1992 – ),男,硕士,主要从事微生物研究。E-mail:673143868@ qq. com。  
通讯作者:王梦亮(1966 – ),男,博士,教授,主要从事生物催化与转化研究。E-mail:mlwang@ sxu. edu. cn。

这种背景下兴起的一个概念,由 EBIC (生物刺激素联盟)在 2012 年 7 月提出。

生物刺激素是一种有机源物质或生物体或特殊无机物(氨基酸、小分子肽、低聚糖、腐殖酸、功能微生物等),当其施用于植物或者植物根际时,其功效对植物的自然进程起到刺激作用,包括有益于营养吸收、非生物胁迫抗力及作物品质<sup>[2]</sup>。有关于生物刺激素的研究表明,生物刺激素可以改善土壤空隙结构,促进根系生长,增进光合速率,提高作物抗逆性和果实产量,改善作物品质<sup>[3]</sup>。

本试验以山西大学应用化学研究所开发的一种可增加豆类作物根瘤的根瘤促生剂(二苯基脲磺酸钙)作为生物刺激素,此前研究已证明根瘤促生剂可以使中华费氏根瘤菌的对数期提前,稳定期延长;同时可以诱导根瘤菌产生结瘤因子;此外根瘤促生剂对大豆植株干重、根系活力、根瘤菌数量、豆血红蛋白含量和固氮酶活性具有显著影响<sup>[4]</sup>,目前生物刺激素对于土壤根际微生物种群多样性的影响鲜有研究,因此,本文将根瘤促生剂施用于大豆,采用高通量测序的方法研究施用生物刺激素后对大豆根际微生物种群的影响,为生物刺激素在大豆增产上的合理使用提供理论依据。

由于土壤成分复杂,常规提取总 DNA 的方法难以去除腐殖酸,而微量的腐殖酸即可抑制 PCR 扩增中的 *Taq* DNA 聚合酶以及酶切反应的限制型内切酶活性。此外,由于土壤质地和成分的差异,不同的土壤类型也会影响土壤微生物 DNA 的提取效果。因此,国内外研究者对不同的土壤 DNA 提取和纯化方法进行了比较研究<sup>[5-7]</sup>。本研究采用 4 种提取方法对土壤的微生物总 DNA 进行了提取,比较这些方法的提取效率和 DNA 纯度。采用通用的靶标细菌 16S V3 可变区的引物进行 PCR 扩增并进行琼脂糖凝胶电泳验证,以评价这几种不同提取方法对土壤微生物多态性的反应效果。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 大豆品种 汾豆 78,由山西省农业科学院经济作物所选育。
- 1.1.2 供试菌种 中华费氏根瘤菌 (*Sinorhizobium*) 为本实验室保存。
- 1.1.3 生物刺激素 山西大学应化所开发的一种可增加豆类作物根瘤的根瘤促生剂。
- 1.1.4 供试地点及土壤理化性质 试验在山西省

汾阳市经济作物研究所大豆田中进行,试验地位于 E111°76′~112°00′22″,N37°19′44″~37°27′10″。土壤有机质 15.62 mg·kg<sup>-1</sup>、全氮 0.78 mg·kg<sup>-1</sup>、有效磷 17.97 mg·kg<sup>-1</sup>、速效钾 152.4 mg·kg<sup>-1</sup>、缓效钾 392 mg·kg<sup>-1</sup>。

1.2 试验所需试剂成分

磷酸缓冲液 pH8.0,含 2% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。

DNA 提取缓冲液:100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,100 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,100 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钠,1.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,2% CTAB。

混合物抽提液配比:苯酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1 (V/V)。

TSAI 法溶液 I:0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,0.1 mol·L<sup>-1</sup> EDTA。TSAI 法溶液 II:0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA,10% SDS。

PBS 溶液:0.12 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸钠缓冲液,pH8.0。

1.3 试验设计

试验采用农田耕种,共设 5 个试验组,1 个空白对照 CK 组,将生物刺激素溶液和根瘤菌液按试验设计(表 1)加入到各个试验组中,且每个试验组加 8 mL 蒸馏水进行拌种,静置 2 h 播种,每组种 5 行,留苗 700 株,3 次重复。于 2016 年 5 月 5 日进行大豆播种,2016 年 7 月 8 日进行土壤采集。

表 1 汾阳田间试验分组

Table 1 Experimental design for a field trial in Fenyang city of China

序号 Number	试验处理 Experimental treatment	小区用量 Residential consumption
S1	中华费氏根瘤菌	4.4 mL
S2	生物刺激素 40 g·L <sup>-1</sup>	3.6 mL
S3	生物刺激素 80 g·L <sup>-1</sup>	3.6 mL
S4	中华费氏根瘤菌 + 生物刺激素 40 g·L <sup>-1</sup>	4.4 mL + 3.6 mL
S5	中华费氏根瘤菌 + 生物刺激素 80 g·L <sup>-1</sup>	4.4 mL + 3.6 mL
CK	空白	水,8 mL

1.4 方法

- 1.4.1 根瘤菌接种液制备 活化根瘤菌菌株,接种至 YMA 液体培养基中,120 r·min<sup>-1</sup> 培养 48 h,根瘤菌液浓度为 2.86 × 10<sup>9</sup> 个·mL<sup>-1</sup>。
- 1.4.2 生物刺激素溶液制备 分别称取 40 和 80 g 的固体颗粒生物刺激素(二苯基脲磺酸钙)溶于 1 L 蒸馏水中,备用。

1.4.3 土壤样品采集 采用 5 点法采集不同处理的大豆根际土壤,挖取 0 ~ 20 cm 土层大豆完整根系,并除去根围附近较大的土壤团块,轻轻抖下大豆根系表面的土壤作为根际土壤。将 5 点法采集的土样混匀后作为该条件处理的 1 个土壤样品。将样品混匀后分为 2 份,1 份鲜样于 -20℃ 条件保存,另外 1 份用于高通量测序分析。

1.4.4 土壤 DNA 提取方法 分别采用以下 4 种方法提取土壤样品的总 DNA,每种方法 3 次重复。

(1)改良 SDS 法(方法 1):在张瑞福等<sup>[8]</sup>方法基础上进行优化,①土壤预洗:在 10 mL 2% 磷酸缓冲液中加入 0.5 g 土壤样品,混合液搅拌 15 min,离心 5 min (1 000 r·min<sup>-1</sup>)取沉淀,重复上述步骤 2 次。将沉淀转移至 1.5 mL 离心管中,并于 -20℃ 冰箱保存备用;②DNA 提取:于 1.5 mL DNA 提取缓冲液中加入 0.5 g 根际土壤及 10 μL 蛋白酶 K,37℃ 水浴 30 min 并每间隔 10 min 振荡 1 次,加入 150 μL 20% SDS,65℃ 水浴 3 h 并间隔 15 ~ 20 min 摇晃 1 次,于室温离心 10 min (8 000 r·min<sup>-1</sup>),收集上清并转移到 2 mL 离心管中。用等体积的混合物抽提液抽提。离心后将水相转移至已灭菌的 2 mL 离心管中,用 1/3 体积的 PEG 8000 于 -20℃ 沉淀 2 h,4℃ 离心 20 min (12 000 r·min<sup>-1</sup>),收集核酸沉淀,沉淀用 4℃ 70% 乙醇洗涤并重悬于灭菌的去离子水中,最终体积为 100 μL。

(2)TSAI 法(方法 2):取 1 g 土壤,研碎,加入 2 mL PBS 溶液,置于摇床振荡 30 min (37℃,225 r·min<sup>-1</sup>)。离心取沉淀(12 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min)。加入 1.5 mL 溶液 I,0.5 mL 溶菌酶,37℃ 水浴 2 h 后加入 2 mL 溶液 II,先于 -20℃ 进行冰浴,之后水浴(65℃)循环 3 次,离心(6 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min)取上清,加入等体积的混合物抽提液抽提 2 次,乙醇沉淀(12 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),用 100 μL 无菌水溶解<sup>[9]</sup>。

(3)试剂盒提取方法:分别采用生物工程(上海)有限公司的磁珠法微量基因组 DNA 抽提试剂盒(方法 3)和 Mobile 公司的 BIO-101 DNA extraction Kit 试剂盒(方法 4)。

1.4.5 DNA 的质量与纯度检测 提取的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,180 V 电泳 20 min,Bio 凝胶成像系统中观察结果并拍照。DNA 纯度采用 Thermo 公司的 Nanodrop 测定 OD 值,并以 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 和 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值评价 DNA 纯度。

1.4.6 PCR 扩增反应条件 第 1 次 PCR:普通

PCR,扩增细菌 16S rDNA 的通用引物 F27 和 R1495 作为引物。

第 2 次 PCR:第 1 次 PCR 产物进行 10 倍稀释后作为模板扩增,细菌通用引物 F341 和 R518 为引物扩增 16S rDNA V3 高变区,F341 序列 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3',R518 序列为 5'-AT-TACCGCGGCTGCTGG-3',在 F341 的 5'末端连一段序列为 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCG-GGGGCACGGGGG-3'的 GC 夹。

PCR 体系:PCR Easy SuperMix(生工)25 μL,上下游引物各 2 μL,引物浓度 10 mmol·L<sup>-1</sup>,土壤粗提 DNA 1 μL,最后加灭菌双蒸水至 50 μL。为减少扩增过程中的非特异性产物,采用 Touch-down PCR 程序:95℃,预变性 6 min,前 5 个循环为 94℃ 30 s,65 ~ 55℃ 45 s(每个循环降低 0.5℃),72℃ 45 s,后 20 个循环为:94℃ 20 s,55℃ 20 s 和 72℃ 30 s,最后 72℃ 10 min。于 4℃ 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.7 高通测序分析

(1)胶回收测序:使用琼脂糖电泳对 PCR 产物进行测定,采用上海生工琼脂糖凝胶回收试剂盒对 DNA 进行回收。使用 Qubit® 2.0 荧光剂对回收产物进行定量处理并将所有样品根据测得的 DNA 浓度按 1:1 充分混匀。使用罗氏公司 454 测序仪(Roch GS FLX sequencer)对混合产物进行测序<sup>[10]</sup>。

(2)数据处理:将测序所得序列与 RDP 数据库进行比对,使用 Mothur 软件归类同种可操作分类单元(OTU)<sup>[11]</sup>。进行多样性分析,计算香农指数(Shannon)、菌群丰富度指数(Chao1)、辛普森指数(Simpson)和覆盖率(Coverage)并对细菌分类<sup>[12]</sup>。

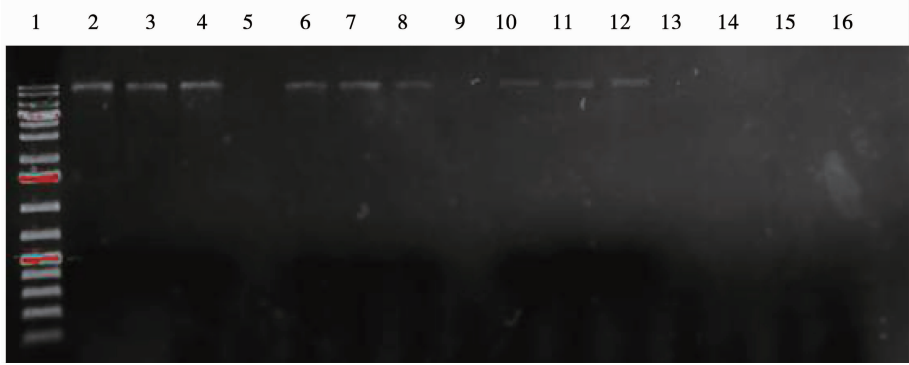
## 2 结果与分析

### 2.1 4 种粗提土壤 DNA 方法的比较

土壤 DNA 的提取结果表明,4 种方法所提取的土壤 DNA 片断长度差异不大,均在 21 kb 左右,这与国内其它研究文献基本一致。但条带信号存在明显差异,其中 Mobile 试剂盒法提取 DNA 条带信号强,生工试剂盒条带信号弱,而 TSAI 法条带信号模糊,改良 SDS 法条带信号缺失(图 1)。纯 DNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8,低于 1.8 则表明 DNA 中有蛋白质污染<sup>[13]</sup>。DNA 纯度检测结果表明(表 2),4 种方法中,两种试剂盒法所提取的 DNA 纯度高,A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 平均值为 1.7,其 DNA 中的杂质主要是提取过程中的吸附颗粒。两种手提法提取的 DNA 纯度低,

$A_{260}/A_{280}$  平均值为 1.32, 污染物主要是蛋白质和腐殖酸。从所提取的土壤 DNA 颜色即可见, 试剂盒法

所提土壤 DNA 中的腐殖酸含量少, 而改良 SDS 法所得粗提产物颜色深, 含有大量的腐殖酸<sup>[14]</sup>。



1: 20000 marker; 2~4: Mobile 试剂盒法; 6~8: 生工磁珠试剂盒法; 10~12: TSAI 法; 14~16: 改良 SDS 法。

1: 20000 marker; 2-4: Mobile kit method; 6-8: Sangon magnetic bead kit method; 10-12: TSAI method; 14-16: Modified SDS method

图 1 土壤根际微生物宏基因组琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Metagenomic agarose gel electrophoresis of soil rhizosphere microorganisms

表 2 粗提 DNA OD 值

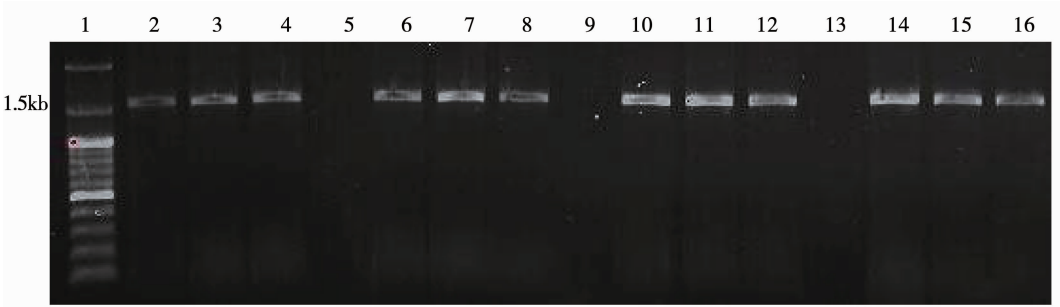
Table 2 Coarse extraction DNA OD value

OD 值 OD value	Mobile 试剂盒 Mobile kit	生工磁珠试剂盒 Sangon magnetic bead kit	TSAI 法 TSAI method	改良 SDS 高盐法 Modified SDS high salt method
$A_{260}/A_{280}$	1.80 ± 0.01	1.65 ± 0.03	1.36 ± 0.01	1.19 ± 0.01
$A_{260}/A_{230}$	1.92 ± 0.02	1.59 ± 0.01	0.58 ± 0.04	0.52 ± 0.05

2.2 PCR 扩增结果

用 4 种提取方法所获得的粗提 DNA 为模板分别进行 PCR 扩增, 上述方法所获得的 DNA 片段均不需要经过纯化便可直接进行扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测, 第一次均获得了长度约 1.5 kb 的片段

(图 2), 第二次获得 230 bp 左右的片段(图 3), 条带信号和重复性存在差异, 方法 4 条带信号强, 重复性好, 方法 1 条带信号弱, 重复性差, 基本符合粗提 DNA 的 OD 值数据, 因此选择方法 4 作为试验中粗提根际土壤 DNA 的方法, 并进行后续试验。

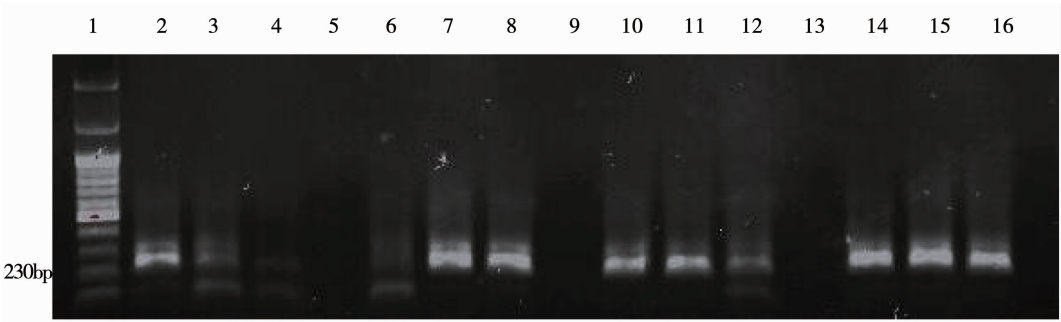


1: 3000 marker; 2~4: 改良 SDS 法; 6~8: TSAI 法; 10~12: 生工磁珠试剂盒法; 14~16: Mobile 试剂盒法。

1: 3000 marker; 2-4: Modified SDS method; 6-8: TSAI method; 10-12: Sangon magnetic bead kit method; 14-16: Mobile kit method.

图 2 土壤根际微生物 16S 全长琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis of 16S rDNA of soil rhizosphere microorganisms



1: 3000 marker; 2~4: 改良 SDS 法; 6~8:TSAI 法;10~12: 生工磁珠试剂盒法;14~16:Mobile 试剂盒法。  
1;3000 marker; 2-4: Modified SDS method; 6-8: TSAI method; 10-12: Sangon magnetic bead kit method; 14-16: Mobile kit method.

图 3  土壤根际微生物 16S V3 区琼脂糖凝胶电泳图  
Fig. 3  The agarose gel electrophoresis of rhizosphere soil microorganism 16S in V3 area

2.3  高通量测序结果分析

高通量测序建库过程中的 PCR 扩增会产生嵌合体序列 (chimera sequence), 对有效序列进行过滤和去除嵌合体处理并得到最终用于后续分析的优

质序列<sup>[15]</sup>才可保证分析结果的准确性。  
样品测序统计结果表明, 优质序列在全部测序有效序列中所占比例均大于 88% (表 3)。说明本次宏基因组测序所得到的结果有极高的可靠性。

表 3  样品序列统计  
Table 3  The statistics of sample sequence

样品 Sample	有效序列 Effective sequence/bp	优质序列 Quality sequence/bp	比例 Proportion/%
S1	50514	44889	88. 86
S2	46560	42740	91. 80
S3	44576	41206	92. 42
S4	48955	43648	89. 10
S5	45532	41235	90. 56
CK	53161	46862	88. 15

本次测序得到大量优质序列, 其长度绝大多数分布在 230 bp 左右 (图 4), 符合 16S DNA V3 区长度, 认为本次测序适合进行下一步分析。  
为了检测测序是否充分, 测序的数据量是否合理, 对序列进行随机抽取, 统计序列所代表的 OTU 数, 以随机抽取的序列数为横坐标, OTU 数为纵坐标, 构建稀释曲线 (图 5)。当曲线斜率减小, 曲线趋向平坦时, 说明本次测序数据量趋于饱和。如图 5 所示, 6 个根际土样在 3 500 个 OTU 处, 曲线趋向平坦, 说明本次测序数据量趋于饱和, 加大数据量对新 OTU 发现的可能贡献不大, 从测序量来看本次测序数据合理。

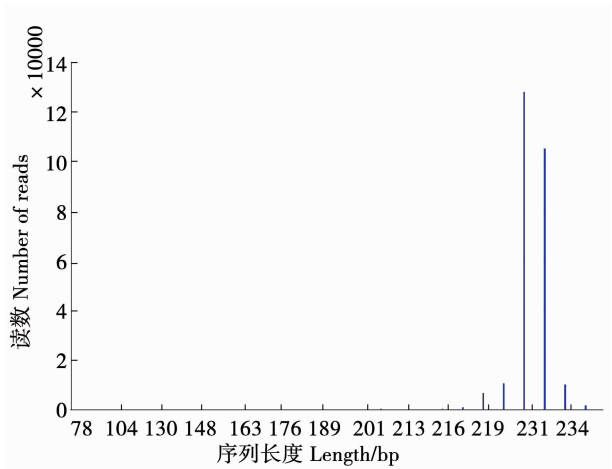


图 4  优质序列长度分布  
Fig. 4  The distribution of quality sequence length

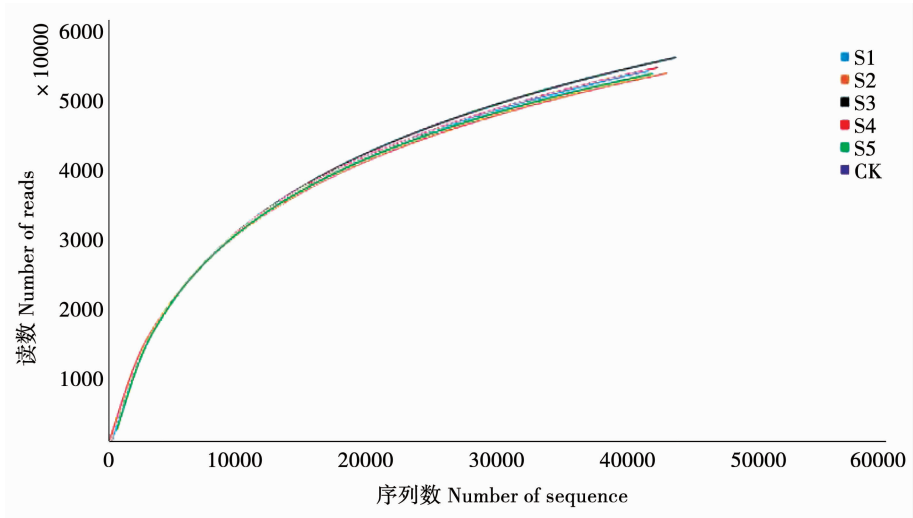


图5 稀释曲线

Fig. 5 Dilution curve

2.4 根际土壤微生物群落多样性分析

本研究共测得260 580条有效序列,平均每个样品的测序深度为43 430条有效序列。测序所得的一些多样性指数,可以从不同方面反映出样本的微生物多样性。从表4可以得出,试验组与空白对照

组所获得的 OTU 数相近,覆盖率都在 95% 以上,其中 CK 组的 Shannon 值高于 5 个试验组,Simpson 值则与 Shannon 值表现相反,多样性比较结果为 CK > S2 > S3 > S1 > S4 > S5。

表4 多样性指数统计

Table 4 The statistics of diversity index

样品 Sample	分类单元 OTU	香农指数 Shannon	菌种丰富度指数 Chao1	覆盖率 Coverage	辛普森指数 Simpson
S1	5474	6. 862521	6440. 585	0. 980401	0. 006476
S2	5132	6. 953577	6514. 705	0. 968811	0. 005221
S3	5273	6. 920187	6201. 458	0. 959674	0. 004585
S4	5067	6. 806353	6508. 349	0. 961186	0. 007043
S5	4989	6. 781724	6520. 095	0. 955714	0. 007970
CK	5349	7. 286942	6851. 287	0. 964850	0. 003228

2.5 根际土壤微生物群落的 Shannon-Wiener 曲线分析

将表4计算所得的 Shannon 指数进行作图,得

到 Shannon-Wiener 曲线(图6)。在不同试验条件处理下,每一条曲线趋向平坦,说明测序数据量足够大,可以反映样本中绝大多数的微生物信息。

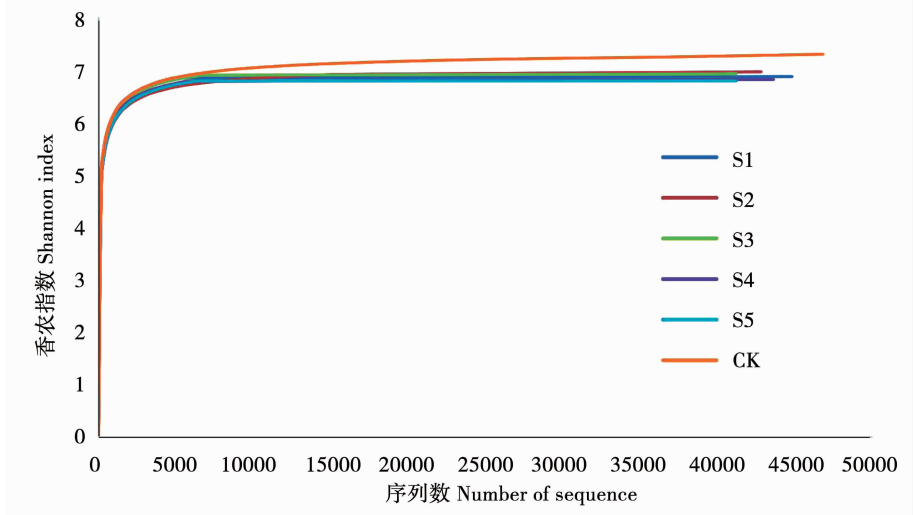


图6 Alpha 指数稀释曲线图

Fig. 6 Alpha exponential dilution curve

2.6 根际土壤微生物群落结构分析

表5列出了各样本在 Phylum 分类水平下的序列数目。根际土壤中的优势细菌主要来自变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、硬壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽孢杆菌门(Gemmatimonadetes)和硝化螺

旋菌门(Nitrospirae)。该10类菌门占已知总菌量的62%以上,其中变形菌门在各样本中所占比例为15%~41%,酸杆菌门为9%~14%,放线菌门为13%~21%,其余门类所占比均低于8%。由此可见,变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)在大豆根际微生物中占有重要的地位。

表5 Phylum 分类序列数目  
Table 5 Phylum classification sequence number

分类 Phylum	S1	S2	S3	S4	S5	CK
变形菌门 Proteobacteria	12547	9619	10027	14037	14474	6181
酸杆菌门 Acidobacteria	6325	4238	4566	4362	3910	5901
放线菌门 Actinobacteria	3497	6239	6657	6420	6378	2102
拟杆菌门 Bacteroidetes	3232	5450	5675	5532	5639	2272
浮霉菌门 Planctomycetes	2802	1844	2585	1846	1862	1618
疣微菌门 Verrucmoicrobia	2112	2626	1536	1974	1662	2596
硬壁菌门 Firmicutes	1712	1393	1211	1010	1235	2969
绿弯菌门 Chloroflexi	1458	1064	1106	1083	1147	1290
芽单胞菌门 Gemmatimonadetes	1677	1385	1127	1002	1018	1382
硝化螺旋菌门 Nitrospirae	456	326	444	379	305	418

图7表示6个样本的细菌群落结构图,每种颜色的区域面积代表该颜色所对应物种在本样品中的相对含量。5个试验组与CK组相比,变形菌门(Proteobacteria)相对含量显著增加,其中处理S4和S5提升最为明显,分别达到了32%和35%;处理S2和S3增长略低于S1。处理S2、S3、S4和S5与CK组相比,放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的相对含量明显增加,处理S1与CK组基本持平。而酸杆菌门(Acidobacteria)和硬壁菌门(Firmicutes)试验组相对含量低于CK组,其中硬壁菌门(Firmicutes)减少至2%~3%。

2.7 聚类分析

施用中华费氏根瘤菌和生物刺激素会影响各细菌菌群的丰度。同时热图(图8)也对各样本进行了聚类分析,颜色块代表距离值,颜色越红表示样本间距离越近,相似度越高,颜色越蓝则距离越远。通过聚类树亦可看出样本间的距离关系。处理S2与S3最先聚集于一起,处理S4与S5聚集于一起,最后再与处理S1聚集于一起。说明S2与S3细菌菌群相似,S4与S5细菌菌群相似,处理S1与S2、S3、S4和S5细菌菌群相似性低,5个试验组与CK组存在显著差异。

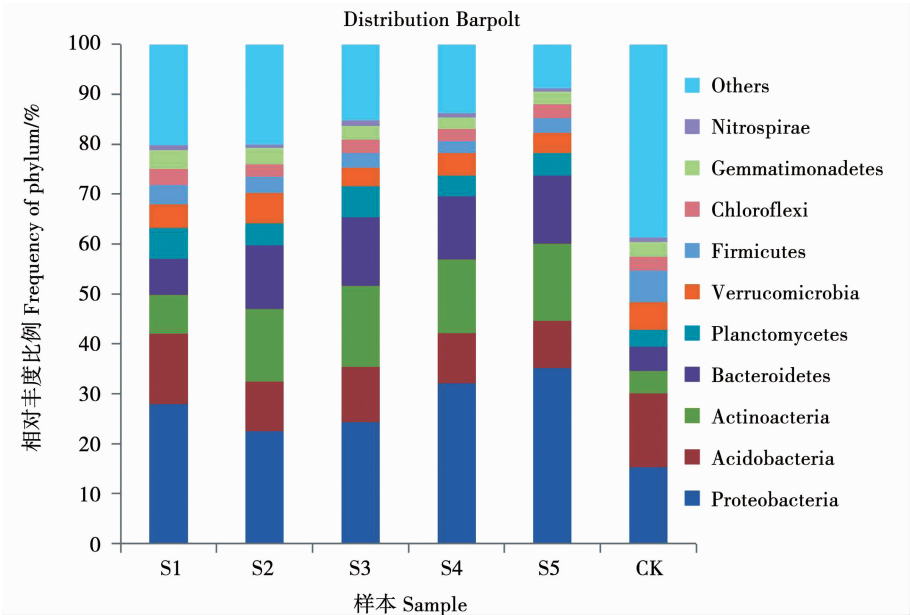


图 7 Phylum 水平群落结构分布图

Fig. 7 Phylum horizontal community structure

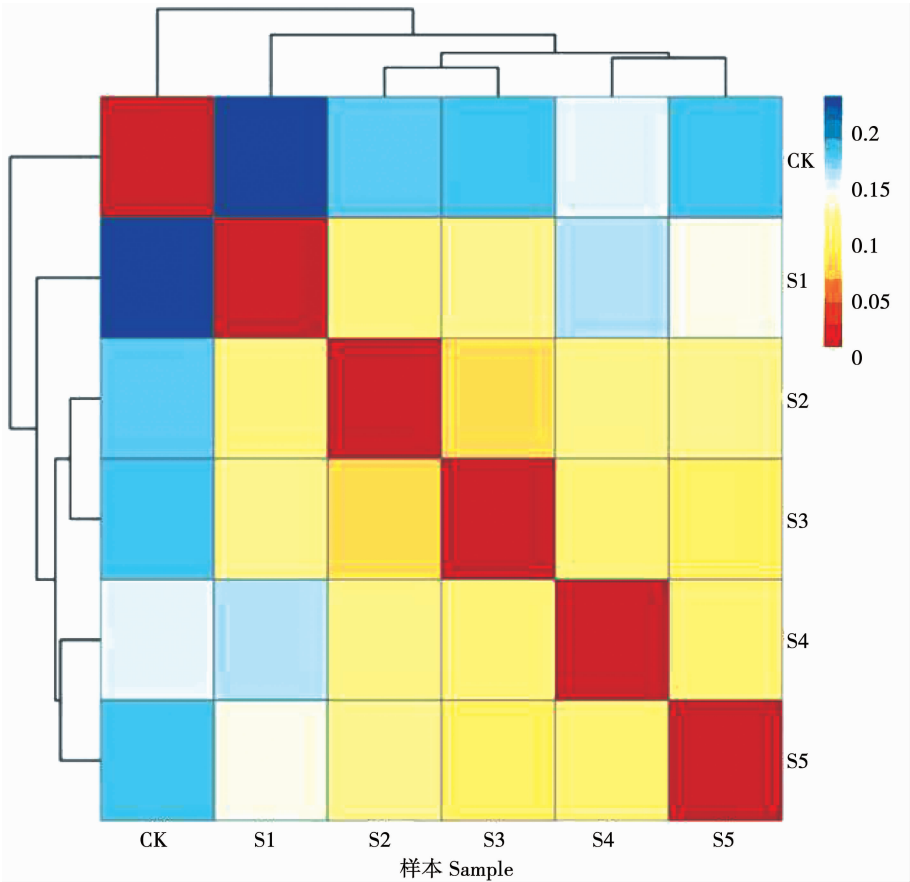


图 8 样本距离热图

Fig. 8 Samples distance from infraredimages

2.8 部分菌在 genus 水平的结构分析

表 6 列出了各样本在 genus 分类水平下的部分序列数目,是已报道的一些有益菌株,有些菌株被认为含有促进大豆生长的解磷解钾菌、固氮菌以及一些通过不同方式对植物生长产生有益作用的菌

株<sup>[16-19]</sup>。总体来看,处理 S1 与 CK 组差异不明显,只有根瘤菌属 (*Rhizobium*) 相对含量增加;处理 S2、S3、S4 和 S5 与 CK 组相比相对含量都有增加,其中促进大豆固氮功能的菌属增长较为明显,尤其是根瘤菌属 (*Rhizobium*),处理 S4 和 S5 整体强于 S2 和



S3,其中 S5 的平均增幅达到了 8%;促进大豆生长和解磷解钾功能的菌属中,处理 S2、S3、S4 和 S5 与 CK 组相比之下,欧文氏菌属 (*Erwinia*) 的数量基本持平,而链霉菌属 (*Streptomyces*) 数量甚至在试验组中出现下降;除此之外处理 S2 和 S3 整体与 S4 和 S5 持平,都有略微增长。

表 6 genus 分类部分序列数目  
Table 6 Sequence number of genus classification

属 Genus	功能 Function	S1	S2	S3	S4	S5	CK
伯克氏菌属 <i>Burkholderia</i>	促进固氮	152	221	286	296	312	245
无色杆菌属 <i>Achromobacter</i>	Promote nitrogen fixation	282	709	686	654	710	364
根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>		3628	2460	2915	4820	5150	1658
中慢生根瘤菌属 <i>Mesorhizobium</i>		529	725	664	827	744	469
慢生根瘤菌属 <i>Bradyrhizobium</i>		299	456	519	506	522	320
欧文氏菌属 <i>Erwinia</i>	促进解磷解钾	419	412	386	395	489	433
土杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	Promote the solution of	656	735	889	810	846	623
硫杆菌属 <i>Thiobacillus</i>	phosphorus and potassium	174	268	321	306	341	221
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>		329	409	457	367	491	575
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>		186	152	611	391	589	252
埃希氏菌属/志贺氏菌属 <i>Escherichia/Shigella</i>		211	256	313	244	337	156
固氮螺菌属 <i>Azospirillum</i>		188	424	493	486	532	146
产黄杆菌属 <i>Rhodanobacter</i>	促进生长发育 Promote growth and development	328	656	775	724	848	429

3 结论与讨论

土壤是一个复杂生态环境体系,而土壤微生物是土壤的重要组成部分,并可能通过根际微域的介导与植物形成一定的互利共生关系。微生物大量聚集在根系周围,将有机物转变为无机物,为植物提供有效的养料<sup>[20]</sup>;同时,微生物还能分泌维生素、生长刺激素等,促进植物生长<sup>[21]</sup>。高通量测序被认为是较好的研究土壤微生物多样性的方法,其利用新一代高通量测序可以对土壤微生物群落的 DNA 特异区段进行高质量测序,进一步探究生物刺激素对大豆根际微生物产生的影响<sup>[22]</sup>。

通过对高通量测序试验数据分析,首先我们可以得出:与 CK 组相比,处理 S1 加入了中华费氏根瘤菌,使得土壤微生物多样性下降,变形菌门相对含量增加,且根瘤菌属数量增多;处理 S2 和 S3 与 CK 组相比,只加入了生物刺激素,表现为土壤多样性略微下降,变形菌门、放线菌门和拟杆菌门相对含量增加,且有益于大豆固氮和解磷解钾等作用的功能菌属数量都有不同程度增加,说明与处理 S1 相比,加入生物刺激素比直接加入根瘤菌对土壤微生物的多样性影响小,生物刺激素可以促进根瘤菌的生长,增加根际土壤微生物中根瘤菌含量,达到与

直接加入根瘤菌一样的作用,同时生物刺激素还可以促进根际土壤微生物中功能菌属的数量,不仅促进大豆固氮,还促进大豆生长发育,这是处理 S1 没有的效果;并且分析处理 S4 和 S5 可以得出相同的结论,区别在于整体的作用效果明显强于 S2 和 S3,说明当生物刺激素与中华费氏根瘤菌共同播种于土壤后,更有益于变形菌门、放线菌门和拟杆菌门相对含量的增加和功能菌属的增长;但是土壤微生物多样性下降至最低,其原因可能是添加了根瘤菌并有选择性地增加了功能菌属的数量,破坏了土壤微生物的平衡性,导致某些含量较低的土壤微生物消失,或者可以推测为生物刺激素抑制了土壤微生物中致病菌的生长。另外,通过对比 S2、S3 和 S4、S5 发现,适当增加生物刺激素浓度有益于功能菌属的增长。

此前的研究证明了生物刺激素对中华费氏根瘤菌分生速率,稳定期提前,促进其分生生长;并检测在大豆不同生长时期各试验组的植株干重、根瘤个数、根系活力、固氮酶活性和豆血红蛋白含量等指标均有显著提高。而本文通过研究生物刺激素对大豆根际微生物群落的影响也从侧面验证了适宜浓度的生物刺激素对大豆植株的结瘤固氮和生长发育具有积极意义。

参考文献

[1] 殷瑞锋. 2016/17 年度中国大豆进口增长空间进一步缩小 [J]. 农产品市场周刊, 2016 (33): 46-47. (Yin R F. 2016/17 China's soybean import growth has narrowed further[J]. Agricultural Products Market Weekly, 2016 (33): 46-47. )

[2] 郑宏敏. 生物刺激素的发展动向与其在设施农业中的应用 [J]. 营销界(农资与市场), 2015(7):97-98. (Zheng H Q. The development trend of bio stimulant and its application in facility agriculture [J]. Marketing Edition (Agriculture and Market), 2015 (7):97-98. )

[3] 柳红, 李江. 浅议生物刺激素在农业中的作用[J]. 青海农技推广, 2015(2): 55-56. (Liu H, Li J. Discussion on the role of biological stimulant in agriculture [J]. Qinghai Agricultural Technology Extension, 2015 (2): 55-56. )

[4] 王梦亮, 张蕊, 王俊宏, 等. 根瘤促生剂对大豆促生结瘤的研究[J]. 大豆科学, 2011,30(4):264-266. (Wang M L, Zhang R, Wang J H, et al. Study on promoting nodulation of soybean by Rhizobium growth promoting agent [J]. Soybean Science, 2011, 30 (4): 264-266. )

[5] 徐晓宇, 闵航, 刘和, 等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 农业生物技术报, 2005, 13(3): 377-381. (Xu X Y, Min H, Liu H, et al. Soil microbial total DNA extraction method of [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2005, 13 (3): 377-381. )

[6] 张于光, 李迪强, 王慧敏, 等. 用于分子生态学研究的土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 应用生态学报,2005(5): 956-960. (Zhang Y G, Li D Q, Wang H M, et al. Extraction method of soil microbial DNA for molecular ecology research [J]. Journal of Applied Ecology, 2005 (5): 956-960. )

[7] Martin F, Philpot L, Hallet S, et al. DNA extraction from soils old bias for new microbial diversity analysis methods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2354-2359.

[8] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 276-282. (Zhang R F, Cao H, Cui Z L, et al. Extraction and purification of total DNA from soil microorganism [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43 (2): 276-282. )

[9] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction[J]. Applied and Environmental Microbiolgy, 1992;58: 2292-2295.

[10] Uroz S, Oger P, Morin E, et al. Distinct ectomycorrhizospheres share similar bacterial communities as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(2): 3020-3024.

[11] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent community-supported software

for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.

[12] Guimarães A A, Jaramillo P M D, Nóbrega R S A, et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (4): 6726-6733.

[13] Yeates C, Gillingsm R, Davisona D, et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. Biological Procedures Online, 1998, 1(1): 40-47.

[14] Mark B, Jenna M, Tom C, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London(Series B, Biological Sciences)2005, 360(1462): 1935-1943.

[15] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001(3): 7-11. (Zhao X R, Lin Q M. Research progress of microbial phosphorus[J]. Soil and Fertilizer, 2001(3): 7-11. )

[16] Clercq D D, Trappen S V, Cleenwerck I, et al. Rhodmurchacterspathiphylli sp. nov. a gammaproteobacterium isolated from the roots of *Spathiphyllum* plants grown in a compost-amended potting mix[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006(56): 1755-1759.

[17] 刘训理, 王超, 吴凡, 等. 烟草根际微生物研究[J]. 生态学报,2006(5): 552-557. (Liu X L, Wang C, Wu F, et al. Study on rhizosphere microorganisms of tobacco [J]. Acta Ecologica Sinica, 2006 (5): 552-557. )

[18] 吴鹏飞, 张冬明, 郝丽虹, 等. 解磷微生物研究现状及展望 [J]. 中国农业科技导报,2008(3): 40-46. (Wu P F, Zhang D M, Hao L H, et al. Research status and prospect of microbial phosphorus solution [J]. Chinese Agricultural Science and Technology Review, 2008 (3): 40-46. )

[19] 邓振山, 李军, 苏水杰. 植物根际促生菌作用机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011(10): 5844-5846. (Deng Z S, Li J, Su S J. Plant growth promoting rhizosphere bacteria research progress mechanism [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2011 (10): 5844-5846. )

[20] Islam M R, Sultana T, Melvin J M, et al. Comparisons of direct extraction methods of micrbial DNA from different paddy soils[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2012, 19(3): 337-342.

[21] 陆雅海, 张福锁. 根际微生物研究进展[J]. 土壤学报, 2006, 38(2): 113-121. (Lu Y H, Zhang F S. Research progress of rhizosphere microorganisms [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2006(2): 113-121. )

[22] Mustafa Y, Canbolat, Serdar B, et al. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora[J]. Biology and Fertilizer of Soils, 2005, 42(4): 350-357.