



侵蚀黑土玉米和大豆根部伴生细菌群落结构分析

喻江^{1,2}, 范国权³, IKENAGA Makoto⁴, SAKAI Masao⁴, 王光华¹, 刘晓冰¹, 于镇华¹

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/黑土区农业生态重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150028; 3. 黑龙江省农业科学院 马铃薯研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 日本鹿儿岛大学 农学院, 日本 鹿儿岛 890 - 0065)

摘要:为分析东北侵蚀黑土中大豆和玉米根部伴生细菌群落结构多样性,促进土壤侵蚀过程中其根部伴生细菌群落结构响应规律的研究,本研究结合 LNA-PCR 技术和高通量测序方法,模拟东北黑土侵蚀土壤,分析玉米播种期和抽穗期、大豆开花期根部细菌群落结构多样性和差异。结果表明:土壤表层剥离后大豆根部细菌群落多样性降低,而玉米根部细菌群落多样性变化不显著。变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为大豆和玉米根部伴生细菌共有的优势菌门。属水平上,*Acinetobacter*、*Rhodanobacter*、*Steroidobacter* 和 *Dyella* 主要在玉米根部获得,而 *Bacillus*、*Arenimonas*、*Variovorax*、*Propionibacterium*、g__norank_p__和 Candidate_division_TM7 主要在大豆根部发现。本研究首次发现 Candidate division TM7 也是植物伴生细菌的成员,其序列主要划分为 α 、 β 和 γ 3 个簇,有 97.5% 的序列属于 α 簇。研究证实了植物根部伴生细菌群落结构不仅具有宿主特异性,且易受土壤侵蚀影响。

关键词:LNA-PCR;高通量测序;土壤侵蚀;根部伴生细菌;群落结构

Communities Structure of Corn and Soybean Root-associated Bacteria in Eroded Black Soil

YU Jiang^{1,2}, FAN Guo-quan³, IKENAGA Makoto⁴, SAKAI Masao⁴, WANG Guang-hua¹, LIU Xiao-bing¹, YU Zhen-hua¹

(1. Northeast Institute of Geography and Agroecology/Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; 2. Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China; 3. Research Institute of Potatoes, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 4. Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890 - 0065, Japan)

Abstract: In order to analyze the response of root-associated bacterial diversity to soil erosion, the diversity and differences of bacterial community structure in the simulated eroded black soil in northeast China during the sowing and heading periods of maize and the flowering periods of soybean were investigated. Locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping and high-throughput sequencing were used. The results showed that the diversity indices of soybean root-associated bacterial communities declined with soil erosion, while those of corn root-associated bacterial communities did not change. The dominant root-associated bacterial phyla were Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes both in soybean and corn samples. On the genus level, *Acinetobacter*, *Rhodanobacter*, *Steroidobacter* and *Dyella* were mainly found in corn roots, whereas *Bacillus*, *Arenimonas*, *Variovorax*, *Propionibacterium* and g__norank_p__Candidate_division_TM7 were mainly detected in soybean roots. Among them, Candidate Division TM7 was found to be a member of root-associated bacteria for the first time in this study and all sequences were grouped into three major clusters (α , β and γ). Approximately 97.5% of Candidate Division TM7 sequences obtained in this study divided into cluster α . Taken together, root-associated bacterial communities were host specific and sensitive to soil erosion.

Keywords: LNA-PCR; High-throughput sequencing; Soil erosion; Root-associated bacteria; Communities structure

在植物根部微生态系统中存在着大量对植物生长具有重要作用的伴生细菌 (root-associated bacteria),包括根际细菌 (rhizobacteria)、根表细菌 (epiphytes) 和根内生细菌 (endophytes) 等^[1-2]。它们普遍存在于植物根部周围或生活在植物根内,具有分泌植物激素、固氮、产生铁载体、拮抗真菌病原菌等促生功能^[3-7]。植物根部伴生细菌群落结构受到多种生物因素和非生物因素影响,如植物宿主种类、环境因素和农业管理方式等^[8-9]。大豆和玉米为黑龙江省主要栽培作物,其根系分泌物明显不

同,释放至土壤中,可影响作物根部伴生细菌群落结构^[10],前期研究发现大豆和玉米苗期根部伴生细菌群落结构存在差异,且根部伴生菌中蕴含着大量的促生菌^[11],深入探究其它生长期植株根部伴生细菌多样性和群落结构对进一步研究根部伴生细菌功能以及发现新型植物健康菌株具有重要意义。

土壤侵蚀问题已成为全球重大环境问题之一,中国东北黑土区由土壤侵蚀造成的土壤退化问题越发严重,影响农业可持续发展。目前国内外学者开展的土壤侵蚀对土壤性状和作物影响的研究较

收稿日期:2020-10-22

基金项目:黑龙江省自然科学基金 (D2018008); 中国科学院青年创新促进会项目 (2019233); 哈尔滨商业大学博士科研启动项目 (2019DS103)。

第一作者:喻江 (1983—),女,博士,讲师,主要从事微生物生态学研究。E-mail:yuj0000@126.com。

通讯作者:于镇华 (1984—),女,博士,副研究员,硕导,主要从事土壤微生物生态研究。E-mail:yuzhenhua@iga.ac.cn。

多^[12-15],当 30 cm 表层土壤耕层剥离即黑土层消失时,大豆产量可降低 59.2%,而玉米产量降低则高达 95.4%^[10],但在土壤侵蚀过程中,根部伴生细菌群落结构的响应机制目前鲜见报道。

本课题组前期利用 LNA-PCR (Locked Nucleic Acid oligonucleotide-PCR clamping) 技术和高通量技术对植物根部伴生细菌进行研究,表明该方法不仅可以有效抑制 DNA 扩增过程中来自植物细胞器 SSU rRNA 基因的干扰,且相比传统克隆方法可以获得更多的细菌 OTUs (Operational Taxonomic Units)^[11],因而,可以更加全面地揭示作物根部细菌群落结构特征。因此,本研究采用 LNA-PCR 和高通量测序方法,比较黑土区 30 cm 土壤剥离条件下大豆和玉米根部伴生细菌群落结构差异,试图挖掘特异性响应细菌。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种东生 1 号由中国科学院东北地理

与农业生态研究所选育;玉米品种新垦 5 号为市售。

1.2 试验设计

试验地位于黑龙江省海伦市前进乡光荣村 (47°21'N,126°49'E),属于北温带大陆性季风区,冬季寒冷干燥,夏季炎热多雨。冬季最低温度 -37℃,夏季最高温度 32℃,年平均气温 1.5℃。2006—2015 年年平均降水量 548 mm,作物生长季节(5—9 月)的平均温度 18.1℃,平均降雨量为 474 mm。土壤为典型东北黑土。试验田始建于 2004 年,基于土壤侵蚀一般发生在耕作层深度的 40%,黑土区一般小于 30 cm,因此,对表层 30 cm 土壤进行剥离模拟土壤侵蚀,未剥离土壤(0 cm)为对照,地上作物为东生 1 号大豆和新垦 5 号玉米轮作,根据附近农田施肥量施入化肥。本研究大豆和玉米样品采自单施化肥试验区,2016 年分别于在玉米播种期、抽穗期以及大豆开花期采集根部样品,共 6 个处理(表 1)。每个处理随机采集 3 株植物根部样品作为 3 次重复,放入冰盒带回实验室,-4℃冰箱保存。

表 1 试验处理设置
Table 1 The setup of test treatments

处理 Treatment	作物 Crop	生育时期 Growth stage	采样时间(月-日) Sampling time(month-day)	表层土壤剥离深度 Removal depth of topsoil/cm
CS0	玉米 Corn	播种期 Sowing	6-22	0
CS30	玉米 Corn	播种期 Sowing	6-22	30
CT0	玉米 Corn	抽穗期 Heading	7-10	0
CT30	玉米 Corn	抽穗期 Heading	7-10	30
ST0	大豆 Soybean	开花期 Flowering	7-10	0
ST30	大豆 Soybean	开花期 Flowering	7-10	30

1.3 方法

1.3.1 植物根部伴生细菌 DNA 提取 用自来水清洗植物根部样品表面土壤,转至 50 mL 离心管中并加入 0.05% 无菌 SDS 溶液,手动振荡约 10 min 后弃去 SDS 溶液,用灭菌水冲洗样品,直至 SDS 溶液无残留^[16]。用灭菌剪刀将根剪碎至约 2 mm 长度,充分研磨后称取 0.5 g,使用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals, Solon, OH, USA)提取植物根部伴生细菌 DNA。DNA 提取液 -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增和高通量测序 参照 Ikenaga 等^[16]方法对玉米和大豆根部伴生细菌进行巢式 PCR 扩增。LNA-PCR 扩增引物、高通量测序引物及扩增过程详见 Yu 等^[11]。将每个样品的 PCR 产物等量混合后委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 454 高通量测序。

1.3.3 序列分析 使用 QIIME(vsesion 1.17 [http://](http://qiime.org/)

qiime.org/) 软件去除模糊序列,包括模糊碱基(ambiguous)数>0、单碱基高重复区(homologous)>6、长度<200 bp 的序列,以及 barcode 引物。为了进一步分析细菌多样性,利用 UPARSE (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>)将同源性≥97% 的序列归为相同的 OTU,并根据所有样品中最小序列数目,随机抽取约 7 700 条序列进一步分析 α 和 β 多样性。利用 MOTHUR 软件分析稀释性曲线(rarefaction curves)和群落结构多样性,同时计算多样性指数,包括 ACE、Chao、Shannon 和 Simpson^[17]。采用软件 MEGA 4.0 构建系统进化树。

将获得的所有 DNA 序列提交 NCBI (National Center for Biotechnology Information),并采用最大邻位连接法对根部伴生细菌与 NCBI 数据库相似序列构建系统发育树,bootstrap 参数设置为 1 000 次,大于 50% 在进化树上显示,0.02 表示两个核苷遗传距离。

2 结果与分析

2.1 高通量测序结果及根部伴生细菌多样性指数

采用 LNA-PCR 和高通量测序方法获得大豆和玉米根部伴生细菌 16s rRNA 基因序列,其中,线粒体和叶绿体序列的数量仅占总序列的 0~0.21%,证明该结果可有效用于植物伴生细菌研究。基于 97% 相似度水平,不同样品获得的 OTU 数目为 198~874,覆盖率>97%,证明本研究测序深度可以用来表征根部伴生细菌群落的结构特征。

在抽穗期玉米根部伴生细菌多样性指数 ACE、Chao1 和 Shannon 大于播种期。比较不同剥离层根

部伴生细菌多样性,玉米和大豆未剥离土壤样品 OTU 数量、ACE 和 Chao1 均大于模拟剥离土壤样品,但是玉米样品在两个生长时期的差异均较小,与大豆样品相比差异较大。玉米和大豆之间 Simpson 和 Shannon 指标存在差异。玉米播种期未剥离土壤样品 Simpson 大于模拟剥离土壤样品,抽穗期两个土壤样品 Simpson 相同,而大豆开花期末剥离土壤样品 Simpson 小于模拟剥离土壤样品。玉米播种期未剥离土壤样品 Shannon 小于模拟剥离土壤样品,抽穗期两个处理土壤样品 Shannon 基本相同,而大豆开花期末剥离土壤样品 Simpson 大于模拟剥离土壤样品(表 2)。

表 2 不同剥离土壤处理玉米和大豆根部伴生细菌多样性指数

Table 2 Root-associated bacterial diversity indices for corn and soybean in different soil removal treatments								
处理 Treatment	来自植物叶绿体和 线粒体的序列比例 Proportion of chloroplast and mitochondria in total sequences/%	获得有效 序列数目 Number of valid sequences	OTU 数目 Number of OTU	多样性指数 Diversity indices				覆盖率 Coverage /%
				ACE	Chao1	Simpson	Shannon	
CS0	0.04	14 660	524	649	640	0.07	5.49	99
CS30	0.08	7 733	474	563	546	0.03	6.66	99
CT0	0.00	9 530	874	1073	1000	0.03	7.14	97
CT30	0.00	8 155	834	1041	986	0.03	7.15	97
ST0	0.00	12 283	679	833	791	0.02	6.93	99
ST30	0.21	11 195	198	223	216	0.18	4.13	99

2.2 根部伴生细菌群落结构组成分析

2.2.1 相对丰度门水平组成分析 大豆和玉米根部伴生细菌优势菌门(相对丰度超过 1% 的门)如表 3 所示,不同样品中优势菌门分布比例显著不同。玉米根部样品(CS0、CS30、CT0 和 CT30)的优势菌门分别为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes),占总序列的比例为 81%~98%。其中,Proteobacteria 最丰富,在未剥离土壤的玉米样品 CS0 和 CT0 中分别占 27% 和 29%,而在 30 cm 剥离土壤玉米样品 CS30 和 CT30 中占比分别增至 38% 和 51%。在 CS0 中 Bacteroidetes 所占比例达到 36%,显著高于其它玉米样品,但是 Firmicutes 仅占 2%,显著低于其它样品。Acidobacteria 仅在玉米播种期根样品中发现。而在大豆样品中,未剥离土壤和 30 cm 剥离土壤大豆根部伴生细菌优势菌门存在差异显著,未剥离土壤大豆中优势菌门包括 Proteobacteria、Bacteroidetes 和 Actinobacteria,占比分

别为 63%、19% 和 11%,而在 30 cm 剥离土壤中大豆根部优势菌门包括 Firmicutes、Actinobacteria 和 Candidate division TM7,分别占 54%、4% 和 8%。

将本研究中获得的所有 DNA 序列提交至 NCBI 数据库,登录号为 SRP066641。仅在大豆根部检测出 Candidate division TM7,而在玉米根部伴生细菌成员中未发现。ST0 和 ST30 处理中,分别发现 15 和 14 个 OTU 属于 Candidate division TM7,其中,OTU1432、OTU1763、OTU1765 和 OTU2693 为优势 OTU,占该门所有序列的 86.7%。通过 BLAST 比对发现,这些 OTU 与 NCBI 网站上已公布的序列同源性为 92%~99%(表 4),其在 Candidate division TM7 中的系统发育地位和最相似序列详见图 1。基于系统进化树的整体结构,Candidate division TM7 序列主要划分为 α 、 β 和 γ 3 个簇,其中本研究获得的 Candidate division TM7 序列有 97.5% 的序列属于 α 簇。此外,本研究还发现部分序列属于 α 簇中的一些亚簇或者分支。

表 3 各处理各门水平序列占总序列数目比例

Table 3 Ratio of Phylum sequence to total sequence of each treatment (%)

门 Phylum	处理 Treatment					
	CS0	CS30	CT0	CT30	ST0	ST30
Acidobacteria	0.3	0.8	2.7	1.9	0.3	1.3
Actinobacteria	34.5	34.9	41.6	21.6	10.8	24.5
Bacteroidetes	36.5	1.8	6.4	13.9	19.2	0.9
Candidate division TM7	0.0	0.1	0.3	0.9	5.2	9.8
Firmicutes	1.7	10.1	18.1	21.1	0.8	54.2
Proteobacteria	26.7	51.3	29.4	38.3	63.3	8.8
其它 Other	0.3	1.0	1.5	2.3	0.4	0.5

表 4 大豆样品中 Candidate division TM7 序列与 NCBI 已公布序列的相似性比对

Table 4 Closest relatives of sequenced Candidate division TM7 from soybean samples and the reference sequences from NCBI

OTU 编号 ID	处理 Treatment		序列号 Accession No.	分类 Organism	来源 Isolate source	相似度 Similarity/%	序列比对 Alignment
	ST0	ST30					
OTU46	0	2	HM215448	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	human tooth surface scrapings	99	519/523
OTU442	4	2	GU480933	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	hydrogen-treated soil	95	511/539
OTU472	10	0	GU180006	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	oil well	92	473/513
OTU479	0	6	FN811207	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	soil	92	477/518
OTU637	7	0	FR749763	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	soil	97	518/535
OTU713	1	0	GU480932	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	hydrogen-treated soil	96	474/494
OTU723	5	4	DQ508328	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	agricultural silt loam ultisol	94	481/512
OTU860	0	1	JX114502	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	rhizosphere soil	97	440/454
OTU972	1	0	JF987317	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	paddy rice cropland soils	95	471/494
OTU1423	75	31	GU480933	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	hydrogen-treated soil	99	537/537
OTU1479	4	0	AF445701	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	travertine	97	521/539
OTU1532	1	0	GU480933	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	hydrogen-treated soil	97	523/540
OTU1696	0	1	FJ542866	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	low ergovaline treatment gut	97	487/500
OTU1763	37	137	GU214151	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	slime samples at paper mill	97	518/530
OTU1765	65	278	JX114502	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	rhizosphere soil	99	529/531

续表 4

OTU 编号 ID	处理 Treatment		序列号 Accession No.	分类 Organism	来源 Isolate source	相似度 Similarity/%	序列比对 Alignment
	ST0	ST30					
OTU1794	3	0	FR749822	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	soil	96	492/512
OTU1969	0	1	JX114502	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	rhizosphere soil	97	426/438
OTU2060	0	22	HQ595194	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	surface ice of Austre Lovenbreen glacier	98	444/455
OTU2467	4	2	GU480932	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	hydrogen-treated soil	97	464/477
OTU2518	15	0	GU214151	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	slime samples at paper mill	98	519/531
OTU2670	0	10	HQ595194	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	surface ice of Austre Lovenbreen glacier	99	529/537
OTU2693	47	22	GU480933	uncultured Candidatus Saccharibacteria bacterium	hydrogen-treated soil	99	496/501

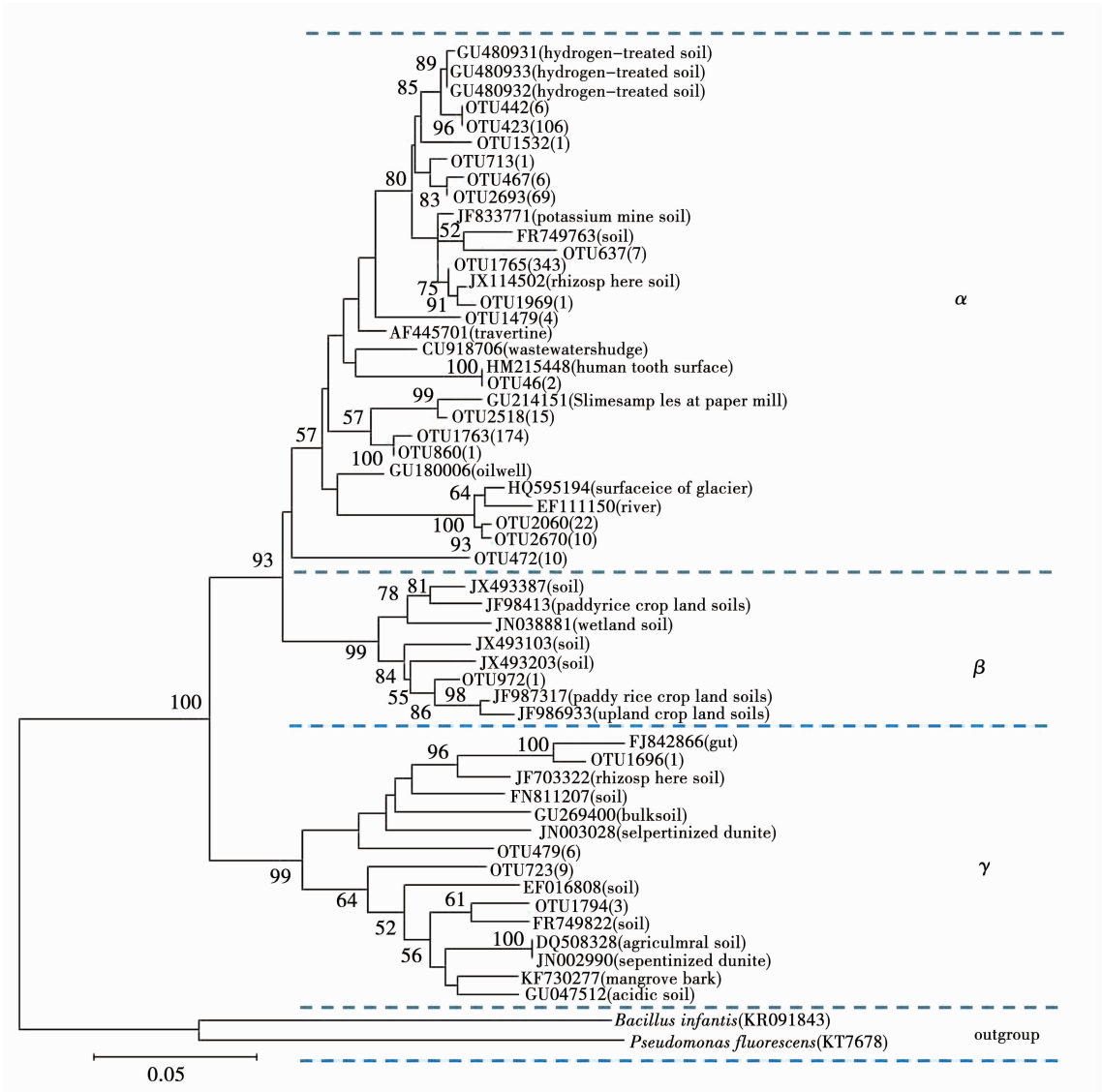


图 1 Candidate division TM7 序列与 NCBI 数据库相似序列系统进化分析

Fig. 1 Neighbor-joining tree of Candidate division TM7 and reference sequences from NCBI

2.2.2 相对丰度属水平组成分析 在样品 CS0、CS30、CT0、CT30、ST0 和 ST30 中分别发现了 133, 126,197,225,165 和 49 个属,表 5 为优势属(序列所占比例>1%)的详细信息。*Bacillus*、*Arenimonas*、*Variovorax*、*Propionibacterium*、g _ _ norank _ p _ _ 和 *Candidate_division_TM7* 主要在大豆根部发现,而 *Acinetobacter*、*Rhodanobacter*、*Steroidobacter* 和 *Dyella* 主要在玉米根部获得。一些优势属在 2 种作物根部的相对丰度也不同,如玉米根部样品中属于 Alphaproteobacteria 的所有属丰度均<1%或未被发现,而在大豆样品中属于 Alphaproteobacteria 的一些

属相对丰度较高,如 *Novosphingobium*、*Rhizobium* 分别占 6.3%和 5.0%。在玉米从播种期至抽穗期的生长过程中,在不同剥层条件下一些属的相对丰度表现显著降低,如 *Pseudomonas* 在未剥离土壤中丰度由 8.2%降至 0,在 30 cm 剥层土壤中丰度由 10.1%降至 5.4%。*Massilia* 在未剥离土壤中丰度由 6.4%降至 1.1%,在 30 cm 剥层土壤中丰度由 1.5%降至 0。在大豆样品中,一些属的相对丰度也表现出与土壤剥离相关,如在 30 cm 土壤剥离中 *Pseudomonas*、*Novosphingobium*、*Rhizobium* 和 *Flavobacterium* 丰度降低,而 *Arthrobacter* 和 *Bacillus* 丰度显著增加。

表 5 不同样品在属水平的序列数目占总序列数目的百分比
Table 5 Percentage of the quantitative contribution of the sequences affiliated with different genus to the total number of sequences in each sample (%)

门 Phylum	纲 Class	属 Genus	处理 Treatment					
			CS0	CS30	CT0	CT30	ST0	ST30
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	—	—	—	16.2	—	-
		<i>Arenimonas</i>	-	-	-	-	2.5	—
		<i>Luteimonas</i>	—	-	1.7	-	-	-
		<i>Lysobacter</i>	-	1.1	8.7	1.5	2.0	-
		<i>Thermomonas</i>	-	-	2.8	-	-	—
		<i>Pseudomonas</i>	8.2	10.1	-	5.4	12.5	-
		<i>Rhodanobacter</i>	3.5	22.2	1.4	—	-	—
		<i>Stenotrophomonas</i>	1.1	3.6	-	-	1.4	—
		<i>Steroidobacter</i>	—	-	1.2	-	-	—
		<i>Dyella</i>	-	1.2	—	—	—	—
	Alphaproteobacteria	<i>Bosea</i>	—	—	—	—	1.1	—
		<i>Bradyrhizobium</i>	-	-	—	—	1.8	-
		<i>Hyphomicrobium</i>	—	—	—	—	1.2	1.7
		<i>Mesorhizobium</i>	-	—	-	—	1.1	—
		<i>Novosphingobium</i>	—	—	—	—	6.3	-
		<i>Rhizobium</i>	-	—	-	-	5.0	-
		<i>Shinella</i>	—	—	—	-	1.9	—
		<i>Devosia</i>	-	—	-	-	4.4	-
	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia</i>	2.1	-	-	-	—	—
		<i>Massilia</i>	6.4	1.5	1.1	-	1.4	—
		<i>Polaromonas</i>	—	—	-	-	1.6	-
		<i>Rhizobacter</i>	1.3	1.4	-	2.5	-	—
		<i>Variovorax</i>	-	—	-	-	1.1	—

续表 5

门 Phylum	纲 Class	属 Genus	处理 Treatment					
			CS0	CS30	CT0	CT30	ST0	ST30
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	23.5	9.1	5.0	3.8	1.4	19.9
		<i>Lechevalieria</i>	—	—	3.0	3.2	—	—
		<i>Leifsonia</i>	—	3.4	—	—	—	—
		<i>Microbacterium</i>	1.3	4.5	—	—	1.9	—
		<i>Glycomyces</i>	—	—	1.5	—	—	—
		<i>Streptomyces</i>	3.7	3.8	22.6	8.7	2.0	—
		<i>Propionibacterium</i>	—	—	—	—	—	2.4
		<i>Nocardioides</i>	—	1.2	—	—	—	—
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	<i>Chitinophaga</i>	1.7	—	—	—	1.4	—
		<i>Niastella</i>	—	—	1.8	—	—	—
		<i>Pedobacter</i>	2.2	—	—	—	—	—
	Flavobacteria	<i>Flavobacterium</i>	29.9	—	—	8.7	14.2	—
Firmicutes	Clostridia	<i>Incertae_Sedis</i>	—	—	2.1	4.4	—	—
	Bacilli	<i>Paenibacillus</i>	—	—	4.4	1.0	—	—
		<i>Paenisporosarcina</i>	—	—	1.3	1.3	—	—
		<i>Sporosarcina</i>	—	1.0	1.1	1.1	—	—
		<i>Bacillus</i>	—	4.2	3.7	5.0	—	53.5
Acidobacteria	Acidobacteria	<i>Subgroup_6</i>	—	—	2.1	1.3	—	—
Candidate division TM7	c_norank_p_Candidate_division_TM7	g_norank_p_Candidate_division_TM7	—	—	—	—	5.2	9.8
others	others	uncultured	—	1.2	4.9	3.8	2.6	—
		uncultured_norank	—	—	1.7	1.7	1.3	—
		Others	9.3	21.7	23.1	23.2	20.1	7.8

—: 序列数量 < 1% ; —: 未检测到
—: Number of sequences < 1% ; —: Not detected

3 讨 论

植物根部伴生细菌与宿主植物种类、植物生长时期、土壤环境等多种因素密切相关^[18-21]。本研究在东北黑土区模拟不同土壤侵蚀条件,选择大豆和玉米生长过程中根部伴生细菌已充分定殖的6月和7月采集植物根部样品进行根部伴生细菌群落结构研究。研究结果证实,玉米根部伴生细菌多样性高于相同种植条件和相同生长期下的大豆根部伴生细菌多样性。前期关于证实 LNA-PCR 技术在研究内生细菌优越性的研究中,也发现相同种植条件下苗期玉米 OTU 及多样性指数 ACE、Chao1 和 Shannon 均高于大豆^[10],这可能与玉米和大豆根际微环境不同有关。由于植物基因型、生理状态、根形态和表面结构、根系分泌物成分或植物内部细胞大小等因素交互影响着植物根部微生物的定殖^[22-23],因而会形成特异的植物根部伴生细菌群落。同时,本研究还比较了玉米根部发育和植物生

长重要的两个时期(播种期和抽穗期)根部伴生细菌群落结构,结果表明,随着玉米生育期的推进,播种期至抽穗期玉米根部细菌多样性增加,Bacteroidetes 和 Actinobacteria 为播种期主要菌门,而抽穗期 Bacteroidetes 菌门数量相对减少。在属水平, *Flavobacterium* 和 *Arthrobacter* 为玉米播种期主要菌属, *Streptomyces* 为抽穗期主要菌属,不同生育时期细菌优势菌属的变化可能与植物生长阶段根系环境的变化有关^[24]。

土壤侵蚀是威胁我国土壤生产力的潜在因素之一。研究表明,即使受短期土壤侵蚀影响,表层黑土被剥离不同深度后,土壤细菌群落结构也会发生显著改变^[25]。本研究中,土壤侵蚀导致大豆根部伴生细菌群落多样性下降,而玉米根部细菌变化不明显。根部细菌群落随土壤侵蚀的变化可能与两种机制有关。一种机制是侵蚀过程中土壤养分、粘土含量、土壤容重和水稳性团聚体等土壤环境发生变化,引起微生物生活的微环境发生改变,进而影

响微生物群落结构。在本研究中,只有大豆根部伴生细菌群落结构对土壤侵蚀的响应敏感,而玉米不敏感,表明尚有未知因素影响玉米根部伴生细菌群落结构。另一种机制也可能归因于宿主本身。推测在土壤侵蚀条件下,玉米根系比大豆根系生物量大,抗外界干扰能力相对较强,能够维持相对稳定的玉米根部细菌群落结构,但这一推测需要后续研究进一步证实。

本研究结合 LNA-PCR 技术和高通量测序方法获得的大豆和玉米根部优势伴生细菌主要包括 Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes 和 Firmicutes,除此还包括一些在大豆和玉米中未被前人报道的根部伴生细菌菌属^[26-28]以及稀有菌群(rare phyloypes)。其中,稀有菌属是指序列数目占总序列数目的比值小于 1% 的菌属,本研究中每个样品约有 7.8%~23.2% 的稀有菌属。因此,稀有菌属可能在作物生长或是其他方面发挥着重要作用,如 *Paenibacillus* 或 *Rhizobium* 作为植物促生细菌(Plant Growth Promote Bacteria, PGPB)已被广泛报道^[29]。根部优势菌属和稀有菌属的相互作用共同维持着植物根系内部的生态平衡^[28]。

Candidate division TM7 是一个在环境中普遍存在的不可培养菌门,自 2001 年首次被报道后,相继在土壤、沉积物、淡水、废水污泥、皮肤和牙齿等不同环境中或是人体部位中被发现^[1,30]。本研究首次在植物根部伴生细菌中发现 Candidate division TM7,从系统进化树中可以看出,这些序列大部分与来自不同土壤的 Candidate division TM7 紧密聚集,包括根际土壤、废弃土壤和农业土壤。Winsley 等^[31]研究证实,Candidate division TM7 数量与环境因素有关,如适当的 pH、湿度或是其他因素均有可能利于 Candidate division TM7 的生长。本研究中 Candidate division TM7 主要定殖于大豆根部,表明它们具有附着于植物根上并可从植物根部获得养分和空间的能力,且对附着植物具有一定的选择性,但是对土壤侵蚀的响应不明显。

植物根部是一个特定的区域,包括根际、根表和根内。研究发现根部细菌与土壤细菌群落结构显著不同,如 Acidobacteria 约占农田黑土细菌群落的 23.9%±4.0%^[32],但在本研究中,Acidobacteria 数量不足 3%,这一结果表明,根表和根内为细菌的生长提供了独特的生态位。

4 结 论

研究采用 LNA-PCR 技术和高通量测序方法评价土壤 30 cm 侵蚀条件下玉米和大豆根部伴生细菌

群落结构差异,结果表明根部伴生细菌群落多样性在玉米抽穗期明显高于苗期和大豆花期;30 cm 模拟土壤侵蚀条件下,大豆根部伴生细菌群落多样性明显下降,而玉米根部伴生细菌群落多样性变化不明显;大豆和玉米根部伴生细菌群落以变形菌门(Proteobacteria),放线菌门(Actinobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)为主,但是在不同作物和不同土壤剥条件下,比例存在差异。Candidate division TM7 主要在大豆根部伴生细菌中被发现。同时,研究还发现大豆和玉米根部有一些稀有菌属的存在。

参考文献

[1] Hugenholtz P, Tyson G W, Webb R I, et al. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (1): 411-419.

[2] Li Y H, Liu Q F, Liu Y, et al. Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China) [J]. Research in Microbiology, 2011, 162: 124-131.

[3] Bashan Y, Holguin G, de-Bashan L E. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(8): 521-577.

[4] Sessitsch A, Reiter B, Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant growth-promoting and antagonistic abilities [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(4): 239-249.

[5] Germaine K J, Liu X, Cabellos G G, et al. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 57(2): 302-310.

[6] Mendes R, Pizzirani-Kleiner A A, Araujo W L, et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (22): 7259-7267.

[7] Remans R, Beebe S, Blair M, et al. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Plant and Soil, 2008, 302(S1-2): 149-161.

[8] Tan Z, Hurek T, Reinhold-Hurek B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5 (10): 1009-1015.

[9] Wang P, Marsh E L, Ainsworth E A, et al. Shifts in microbial communities in soil, rhizosphere and roots of two major crop systems under elevated CO₂ and O₃ [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15019.

- [10] 刘晓冰, 周克琴, 苗淑杰, 等. 土壤侵蚀影响作物产量及其因素分析[J]. 土壤与作物, 2012, 1(4): 205-211. (Liu X B, Zhou K Q, Miao S J, et al. Crop yield and relevant factors as affected by soil erosion[J]. Soil and Plant, 2012, 1(4): 205-211)
- [11] Yu Z H, Yu J, Ikenaga M, et al. Characterization of root-associated bacterial community structures in soybean and corn using locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping and 454 pyrosequencing[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15:1883-1991.
- [12] Yan B X, Tang J. Study on black soil erosion rate and the transformation of soil quality influenced by erosion [J]. Geographic Research, 2005, 24: 499-506.
- [13] Liu X B, Zhang X Y, Wang Y X, et al. Soil degradation: A problem threatening the sustainable development of agriculture in northeast China [J]. Plant, Soil and Environment, 2010, 56(2): 87-97.
- [14] Sui Y Y, Liu X B, Jin J, et al. Differentiating the early impacts of topsoil removal and soil amendments on crop performance/productivity of corn and soybean in eroded farmland of Chinese Mollisols[J]. Field Crops Research, 2009, 111(3): 276-283.
- [15] Duan X W, Xie Y, Ou T H, et al. Effects of soil erosion on long-term soil productivity in the black soil region of northeastern China [J]. Catena, 2011, 87(2): 268-275.
- [16] Ikenaga M, Sakai M. Application of locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide-PCR clamping technique to selectively PCR amplify the SSU rRNA genes of bacteria in investigating the plant-associated community structures[J]. Microbes and Environments, 2014, 29(3): 286-29.
- [17] 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.
- [18] Hardoim P R, Andreote F D, Reinhold-Hurek B, et al. Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(1): 154-164.
- [19] Kolton M, Harel Y M, Pasternak Z, et al. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(14): 4924-4930.
- [20] Dean S L, Farrer E C, Porras-Alfaro A, et al. Assembly of root-associated bacteria communities: Interactions between abiotic and biotic factors[J]. Environmental Microbiology Reports, 2015, 7(1): 102-110.
- [21] Lundberg D S, Lebeis S L, Paredes S H, et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome [J]. Nature, 2012, 488(7409): 86-90.
- [22] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914.
- [23] Aleklett K, Leff J W, Fierer N, et al. Wild plant species growing closely connected in a subalpine meadow host distinct root-associated bacterial communities [J]. The Journal of Life and Environment Sciences, 2015, 3(8): e804.
- [24] Andreote F D, da Rocha U N, Araújo W L, et al. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 97(4): 389-399.
- [25] Yu Z H, Jin J, Li Y S, et al. Distinct effects of short-term reconstructed topsoil on soybean and corn rhizosphere bacterial abundance and communities in Chinese Mollisol [J]. Royal Society Open Science, 2019, 6(1): 181054.
- [26] Bouasria A, Mustafa T, de Bello F, et al. Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance [J]. European Journal of Soil Biology, 2012, 52: 59-66.
- [27] Li X Z, Rui J P, Mao Y J, et al. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 68(1): 392-401.
- [28] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2015, 112(8): e911-e920.
- [29] Yanni Y G, Rizk R, Corich V, et al. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth [J]. Plant Soil, 1997, 194(1): 99-114.
- [30] Dinis J M, Barton D E, Ghadiri J, et al. In search of an uncultured human-associated TM7 bacterium in the environment [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21280.
- [31] Winsley T J, Snape I, McKinlay J, et al. The ecological controls on the prevalence of Candidate division TM7 in polar regions [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 345.
- [32] Liu J J, Sui Y Y, Yu Z H, et al. High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 70: 113-122.