

# 土壤质地和砧木对苹果根际微生物功能多样性及其碳源利用的影响

徐龙晓, 荀 咪, 宋建飞, 田孝志, 殷方鹏, 黄伟男, 张玮玮, 杨洪强\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 以分别栽培于砂壤土、壤土和黏壤土, 砧木为八棱海棠 (*Malus robusta* Rehd.) 和平邑甜茶 (*Malus hupehensis* Rehd.) 的 2 年生盆栽 ‘红富士’ 苹果 (*Malus × domestica* Borkh. ‘Red Fuji’) 幼树根际土为试材, 分析根际和未栽植果树的非根际土壤细菌 *16S rRNA* 基因拷贝数、细菌根际效应、微生物群落代谢活性、功能多样性及其碳源利用类型等。结果表明, 根际和非根际土壤细菌的拷贝数、微生物群落代谢活性以及功能多样性指数均是黏壤土 > 壤土 > 砂壤土、平邑甜茶根际土 > 八棱海棠根际土、根际土 > 非根际土。两种砧木的细菌根际效应均是在砂壤土最大, 黏壤土最小; 砂壤土中的细菌丰度受砧木的影响最大。根际和非根际微生物群落碳源利用能力均是黏壤土 > 壤土 > 砂壤土; 根际微生物群落对酚酸和羧酸类碳源的利用能力显著高于非根际; 八棱海棠根际微生物群落对羧酸类碳源的利用能力在砂壤土中最高、在黏壤土中最低, 平邑甜茶根际微生物群落正相反。根际微生物群落碳源利用类型因土壤质地而异, 在砂壤土中主要利用氨基酸类, 其次是碳水化合物和羧酸类; 在壤土中主要利用碳水化合物, 其次是多聚物类和氨基酸类; 在黏壤土中主要利用多聚物类, 其次是氨基酸类和碳水化合物。主成分分析显示土壤质地使根际微生物群落类型分离, 而两种砧木的根际微生物群落在同一质地土壤下聚集在一起, 即苹果根际微生物群落碳源利用类型更易受到土壤质地影响, 而砧木差异所带来的影响较小。

**关键词:** 土壤质地; 苹果; 砧木; 根际微生物; 功能多样性; 根际效应

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 08-1530-11

## Effect of Soil Textures and Rootstock on Rhizosphere Microorganism and Carbon Source Utilization of Apple Roots

XU Longxiao, XUN Mi, SONG Jianfei, TIAN Xiaozhi, YIN Fangpeng, HUANG Weinan, ZHANG Weiwei, and YANG Hongqiang\*

(State Key Laboratory of Crop Biology, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** Bacterial *16S rRNA* gene copy number, bacterial rhizosphere effect, microbial community metabolic activity, functional diversity and carbon source utilization types in rhizosphere and non-rhizosphere soils were analyzed in two-year old potted apple trees (*Malus × domestica* Borkh. ‘Red Fuji’)

**收稿日期:** 2020-02-12; **修回日期:** 2020-07-10

**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2019YFD1000103); 国家自然科学基金项目 (31772251); 山东省重大科技创新工程项目 (2018CXGC0207); 山东省自然科学基金重大基础研究项目 (ZR2018ZC08N3)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hqyang@sdaa.edu.cn)

with *Malus robusta* Rehd. and *Malus hupehensis* Rehd. as rootstock) planted in sandy loam, loam and clay loam respectively. Results showed that among all parameters that were tested, three of them including the bacterial copy number, microbial community metabolic activity and functional diversity index displayed the exact same trend. Clay loam had the highest numbers followed by loam and sandy loam. Numbers in *M. hupehensis* were higher than those in *M. robusta*. Rhizosphere soil had higher numbers than non-rhizosphere soil. Rhizosphere effects in the 2 rootstocks were the largest in sandy loam and the smallest in clay loam, and the bacterial abundance in sandy loam soil was most affected by rootstocks. The utilization capacity of carbon sources of rhizosphere and non-rhizosphere microbial community in clay loam were the highest followed by loam and sandy loam. The utilization capacity of phenolic acids and carboxylic acids in rhizosphere microbial community was significantly higher than that in non-rhizosphere microbial community. Rhizosphere microbial community of *M. robusta* had the highest utilization capacity of carboxylic acids in sandy loam and the lowest in clay loam whereas *M. hupehensis* showed the opposite trends. Types of carbon sources used by rhizosphere microbial community varied with soil texture. In sandy loam, amino acids were mainly used, followed by carbohydrates and carboxylic acids; in loam, carbohydrates were mainly used, followed by polymers and amino acids; and in clay loam polymers were mainly used, followed by amino acids and carbohydrates. The principal component analysis showed that the rhizosphere microbial community types of the two rootstocks were separated by different soil texture types and they were gathered in the same soil texture, which indicated that the type of carbon source utilization of apple rhizosphere microbial community was more susceptible to soil texture, while the difference between the two rootstocks had less impacts.

**Keywords:** soil texture; apple; rootstock; rhizosphere microorganism; functional diversity; rhizosphere effect

土壤是地球上微生物最丰富的生态系统之一 (Tringe et al., 2005), 根系是植物与土壤直接相连的器官, 在根系和土壤交界面存在特异的微生物群落生态位变化 (Poudel et al., 2019); 该交界面 (即根际) 是根系与土壤相互影响最直接、最强烈的区域。根际土壤微生物数量和活性显著高于根外土壤, 呈现特异的根际效应, 该效应在根际土壤微生物群落构建中起关键作用, 并影响土壤中的物质转化、养分循环和能量流动 (Li et al., 2019)。

土壤质地是土壤基本的物理性状, 不同质地土壤通过其颗粒大小和组成而影响土壤孔隙度和容重, 进而影响土壤通透性和水、肥、气、热以及生物状况的改变, 并通过影响植物根系分泌的代谢物而引起根际土壤微生物群落结构和碳源利用模式的转变 (Mahoney et al., 2017), 从而呈现不同的根际效应。中国苹果种植区域广泛, 土壤质地多样; 土壤质地明显影响苹果根系生长发育和根系构型 (杨洪强和束怀瑞, 2007); 不同根系和根系构型必然会产生不同的根际效应, 从而形成多样化的根际微生物群落。

栽培果树的根系来自其砧木, 砧木对根际微生物群落有更重要的影响 (Marasco et al., 2018)。八棱海棠和平邑甜茶是苹果常用砧木, 但目前对不同土壤质地下八棱海棠和平邑甜茶根际微生物群落特征知之尚少。本研究中主要探讨 3 种质地土壤两种苹果砧木根际和非根际土壤的细菌丰度、细菌根际效应、微生物功能多样性和碳源利用特征, 明确苹果砧木根际微生物在不同质地土壤中的表现, 为改善苹果根际微生态环境及改进果园土壤管理提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与处理

试验于 2019 年 3 月—11 月在山东农业大学南校区果树试验站和山东省高校果树生物学重点实验室进行; 3 种质地的土壤由黏性褐土、河沙与有机肥按不同比例配置。

由于土壤质地取决于其矿物颗粒(砂粒、粉粒、黏粒)组合, 不同矿物颗粒的矿质养分含量和组成本身即存在差异, 这种差异是由土壤质地本身所导致的, 是其质地属性的组成部分(土壤质地和其矿质含量分不开), 但为尽量减少不同质地土壤养分和有机质尤其是有机质含量的差异, 设置的 3 种质地的土壤均加入等比例(体积比都是 1/4)的有机肥, 即砂壤土按照褐土: 河沙: 有机肥 = 1: 2: 1(掺入 50% 的河沙)配制; 壤土按照褐土: 河沙: 有机肥 = 2: 1: 1(掺入 25% 的河沙)配制; 黏壤土按照褐土: 有机肥 = 3: 1(未掺入河沙)的配比配制。配好后混匀, 装入内径 28 cm、高 25 cm 的盆中, 每盆装土 10 kg。各盆土基本理化性质见表 1。

表 1 3 种质地土壤的基本特性  
Table 1 Basic characteristics of 3 types texture soils

土壤质地 Soil texture	容重/ (g · cm <sup>-3</sup> ) Soil bulk density	孔隙度/% Total porosity	pH	砂粒/% Sand	粉粒/% Powder	黏粒/% Clay	有机质/ (g · kg <sup>-1</sup> ) Organic matter	全氮/ (g · kg <sup>-1</sup> ) Total nitrogen	全磷/ (g · kg <sup>-1</sup> ) Total phosphorus	全钾/ (g · kg <sup>-1</sup> ) Total potassium
砂壤土 Sandy loam	1.42	45.11	7.31	66	21	13	9.97	0.95	1.37	12.23
壤土 Loam	1.37	49.21	6.86	50	29	21	10.05	1.04	1.24	14.94
黏壤土 Clay loam	1.35	50.05	6.54	40	31	29	10.10	1.19	1.20	18.92

春季定植时将砧木为八棱海棠(*Malus robusta* Rehd.)和平邑甜茶(*Malus hupehensis* Rehd.)的 2 年生‘红富士’苹果分别移栽到不同盆中, 形成 6 种处理组合(砂壤土—平邑甜茶、壤土—平邑甜茶、黏壤土—平邑甜茶、砂壤土—八棱海棠、壤土—八棱海棠和黏壤土—八棱海棠), 每个处理组合重复 3 次; 同时, 3 种质地的土壤各保留 3 盆不移栽苹果树, 使其保持不受根系影响状态而用于非根际土壤的分析。处理期间, 各盆在相同环境中进行同样管理, 130 d 后取土分析。

### 1.2 土壤取样方法

根际土壤采用“抖根法”取样(Riley & Barber, 1970), 将根系连同附近土壤一起取出, 抖掉较大土块, 将附着在根系上的土壤用无菌毛刷刷入无菌自封袋中, 放入冰盒带回实验室, 在 - 4 ℃ 冰箱保存, 并在 24 h 内提取土壤中总 DNA。非根际土壤取自未移栽苹果的盆中, 将顶部 0.5 ~ 2.0 cm 的表土去除后, 从盆中心取出。

### 1.3 测定和分析方法

#### 1.3.1 根际细菌丰度及细菌的根际效应

称取新鲜土壤, 利用 E.Z.N.A.® Soil DNA kit (Omega, 美国)试剂盒提取土壤微生物总 DNA, 根据细菌 16S rRNA 基因中的 V4 高变区特异性引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系为 20 μL, 其中包括 DNA 模板 1 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, SYBR® Premix Ex Taq™ (2×) 10 μL 和重蒸水 8.2 μL; 反应条件为: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火、延伸 30 s, 50 个循环。利用质粒

DNA 在同样反应体系和条件下的 PCR 结果绘制标准曲线, 根据曲线计算土壤样品 *16S rRNA* 基因拷贝数, 根据 *16S rRNA* 基因拷贝数分析细菌丰度和计算细菌的根际效应 (Rhizosphere effect, RE)。RE = (R - NR) / NR。式中 R 和 NR 分别表示根际和非根际土壤的细菌 *16S rRNA* 基因拷贝数 (黄娜 等, 2019)。

1.3.2 土壤微生物群落代谢活性、碳源利用及功能多样性分析

取 3 g 新鲜土壤装入含有 27 mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 在  $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下振荡 30 min; 静置 15 min 后, 取上清液稀释后接种至 Biolog-ECO 微平板中, 在 28 °C 恒温培养 10 d。每隔 24 h 读取 590 nm (颜色 + 浊度) 和 750 nm (浊度) 下的吸光度值, 用两者的差值表征各孔去除了浊度影响的吸光度值 (田雅楠和王红旗, 2011; 姚琦 等, 2017), 并用于以下指标的计算和分析。

(1) 微生物群落代谢活性: 用微平板中各孔的平均颜色变化率 (Average well color development, AWCD) 反映, 计算公式  $\text{AWCD} = \sum (C_i - R) / 31$ 。式中  $C_i$  为每反应孔碳源的吸光度值; R 为对照孔 (A1) 的值, 31 为 Biolog-ECO 微平板中的碳源总数 (具体见表 2)。

(2) 微生物群落碳源利用特征: 将土壤微生物在含有 31 种碳源 (表 2) 的 Biolog-ECO 微平板中培养 168 h, 用此时的吸光度值表示碳源利用特征, 并用该吸光度值对碳源利用进行主成分分析。

(3) 土壤微生物群落多样性: 用 Shannon - Wiener 多样性指数 ( $H'$ ) 表示 (姚琦 等, 2017),  $H' = -\sum (P_i \times \ln P_i)$ 。式中  $P_i$  表示每个非对照孔和对照孔 A1 的吸光度值差与整板 31 孔吸光度值差值总和的比值, 即  $P_i = (C_i - R) / \sum (C - R)$ ,  $C_i$  为第  $i$  个碳源孔的吸光值, R 为对照孔的吸光值。

(4) 土壤微生物群落优势度: 用 Simpson 优势度指数 ( $D$ ) 表示 (华建峰 等, 2013),  $D = 1 - \sum P_i^2$ 。

(5) 土壤微生物群落均匀度: 用 Pielou 均匀度指数 ( $E$ ) 表示 (Benizri & Amiaud, 2005),  $E = H' / \ln S$ 。式中  $S$  为微生物利用的碳源总数。

表 2 Biolog-ECO 板中的 31 种碳源  
Table 2 The 31 carbon sources in Biolog-ECO plates

类别 Carbon source type	底物 Substrate	类别 Carbon source type	底物 Substrate
碳水化合物 Carbohydrate	<i>D</i> - 半乳糖酸 - $\gamma$ - 内脂 <i>D</i> -Galactonic acid- $\gamma$ -lactone	羧酸类 Carboxylic acid	$\gamma$ - 羟基丁酸 $\gamma$ -Hydroxybutyric acid
	$\beta$ - 甲基 - <i>D</i> - 葡萄糖苷 $\beta$ -Methyl- <i>D</i> -glucoside		丙酮酸甲酯 Pyruvic acid methyl ester
	<i>D</i> - 纤维二糖 <i>D</i> -Cellobiose		<i>D</i> - 苹果酸 <i>D</i> -Malic acid
	葡萄糖 - 1 - 磷酸盐 Glucose-1-phosphate		$\alpha$ - 丁酮酸 $\alpha$ -Ketobutyric acid
	<i>D</i> - 甘露醇 <i>D</i> -Mannitol	多聚物类 Polymers	衣康酸 Itaconic acid
	<i>D</i> - 木糖 <i>D</i> -Xylose		吐温 40 Tween 40
	<i>N</i> - 乙酰 - <i>D</i> - 葡萄糖胺 <i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -glucosamine		肝糖 Glycogen
	$\alpha$ - <i>D</i> - 乳糖 $\alpha$ - <i>D</i> -Lactose		吐温 80 Tween 80
	<i>i</i> - 赤藻糖醇 <i>i</i> -Erythritol	酚酸类 Phenolic acid	$\alpha$ - 环式糊精 $\alpha$ -Cyclodextrin
	<i>D, L</i> - $\alpha$ - 磷酸甘油 <i>D, L</i> - $\alpha$ -Glycerol phosphate		2 - 羟基苯甲酸
	<i>D</i> - 半乳糖醛酸 <i>D</i> -Galacturonic acid	胺类 Amine	2-Hydroxy benzoic acid
	<i>D</i> - 葡萄糖胺酸 <i>D</i> -Glucosaminic acid		4 - 羟基苯甲酸
	<i>L</i> - 天门冬酰胺 <i>L</i> -Asparagine		4-Hydroxy benzoic acid
	<i>L</i> - 苯基丙氨酸 <i>L</i> -Phenylalanine		苯乙胺 Phenylethyl-Amine
氨基酸类 Amino acid	<i>L</i> - 丝氨酸 <i>L</i> -Serine		腐胺 Putrescine
	<i>L</i> - 精氨酸 <i>L</i> -Arginine		
	<i>L</i> - 苏氨酸 <i>L</i> -Threonine		
	甘氨酸 - <i>L</i> - 谷氨酸 Glycyl- <i>L</i> -glutamic acid		

1.4 数据处理与分析

采用 Excel 2007 软件进行数据处理并作图; 采用 SPSS 19.0 统计软件进行主成分分析 (PCA) 和方差分析, Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同质地土壤中苹果砧木根际细菌 *16S rRNA* 基因丰度及其根际效应

如图 1 所示, 不论根际还是非根际土壤, 细菌丰度都以黏壤土最高、砂壤土最低。在非根际土中, 黏壤土细菌 *16S rRNA* 基因拷贝数最多, 其次为壤土, 砂壤土最少, 拷贝数分别为  $9.31 \times 10^{10}$ 、 $3.22 \times 10^{10}$  和  $7.86 \times 10^9$  copies · g<sup>-1</sup>。在八棱海棠根际土中, 细菌丰度呈现黏壤土 > 壤土 > 砂壤土的趋势, 拷贝数分别为  $9.65 \times 10^{10}$ 、 $8.07 \times 10^{10}$  和  $5.50 \times 10^{10}$  copies · g<sup>-1</sup>; 在平邑甜茶根际土中的变化趋势与八棱海棠一致, 但其拷贝数均高于八棱海棠, 分别为  $1.15 \times 10^{11}$ 、 $9.14 \times 10^{10}$  和  $6.01 \times 10^{10}$  copies · g<sup>-1</sup>, 两种砧木根际细菌丰度均表现出壤土和黏壤土显著大于砂壤土。此外, 在相同质地土壤中, 八棱海棠和平邑甜茶的根际细菌丰度差异并不显著。

在砂壤土和壤土中, 两种砧木根际细菌丰度均显著大于非根际, 其根际效应分别达到了 6.00、6.86 和 1.66、1.82 (表 3); 而在黏壤土中, 两种砧木根际土壤的细菌丰度与非根际之间差异并不显著, 根际效应为 0.21 和 0.23。表明苹果砧木根系对黏壤土中的细菌丰度影响不大, 但显著增加砂壤土和壤土中的细菌丰度。

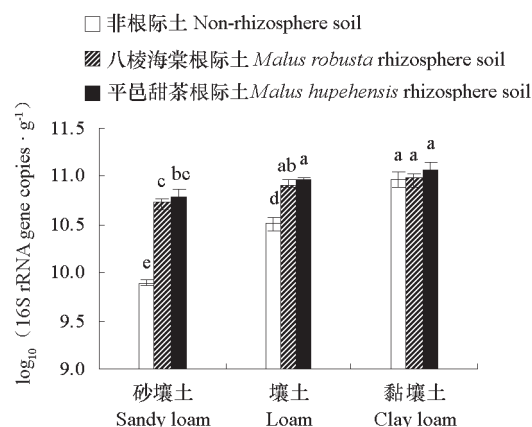


图 1 不同质地土壤苹果砧木根际细菌 *16S rRNA* 基因拷贝数  
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Fig. 1 Copy number of *16S rRNA* gene of rhizosphere bacteria in apple rootstock with different soil textures  
Different lowercase letters stand for the significant difference at the 0.05 level. The same below.

表 3 不同质地土壤苹果砧木细菌根际效应

Table 3 Rhizosphere effect of bacteria on apple rootstock in different soil textures

砧木 Rootstock	土壤质地 Soil texture	根际效应 Rhizosphere effect
八棱海棠 <i>Malus robusta</i>	砂壤土 Sandy loam	$6.00 \pm 0.26$ a
	壤土 Loam	$1.66 \pm 0.98$ b
	黏壤土 Clay loam	$0.21 \pm 0.09$ c
平邑甜茶 <i>Malus hupehensis</i>	砂壤土 Sandy loam	$6.86 \pm 1.38$ a
	壤土 Loam	$1.82 \pm 0.01$ b
	黏壤土 Clay loam	$0.23 \pm 0.12$ c

注: 数据为平均值 ± 标准差; 同一列中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Data are means ± SD; in the same column, different lowercase letters stand for the significant difference at the 0.05 level. The same below.

### 2.2 不同质地土壤中苹果砧木根际微生物群落代谢活性分析

由图 2 可知, 根际和非根际土壤微生物群落代谢活性 (AWCD) 变化动态一致, 均随着培养时间的延长, AWCD 值逐渐增加。0~24 h 之内 AWCD 值无明显变化; 24 h 之后迅速升高, 微生物群落活性增强, 大幅度利用碳源; 168 h 之后变化趋于平稳。

在非根际土微生物群落中，黏壤土 AWCD 值始终最大，其次壤土，砂壤土最小。在八棱海棠根际土微生物群落中，AWCD 值 0 ~ 96 h 时呈现出砂壤土 > 黏壤土 > 壤土的趋势，但在 120 h 后则表现为黏壤土 > 壤土 > 砂壤土，并均高于非根际土；在平邑甜茶根际土微生物群落中，黏壤土的 AWCD 值始终最高，壤土 AWCD 值在 120 h 以后大于砂壤土，并均高于非根际土（图 2）。

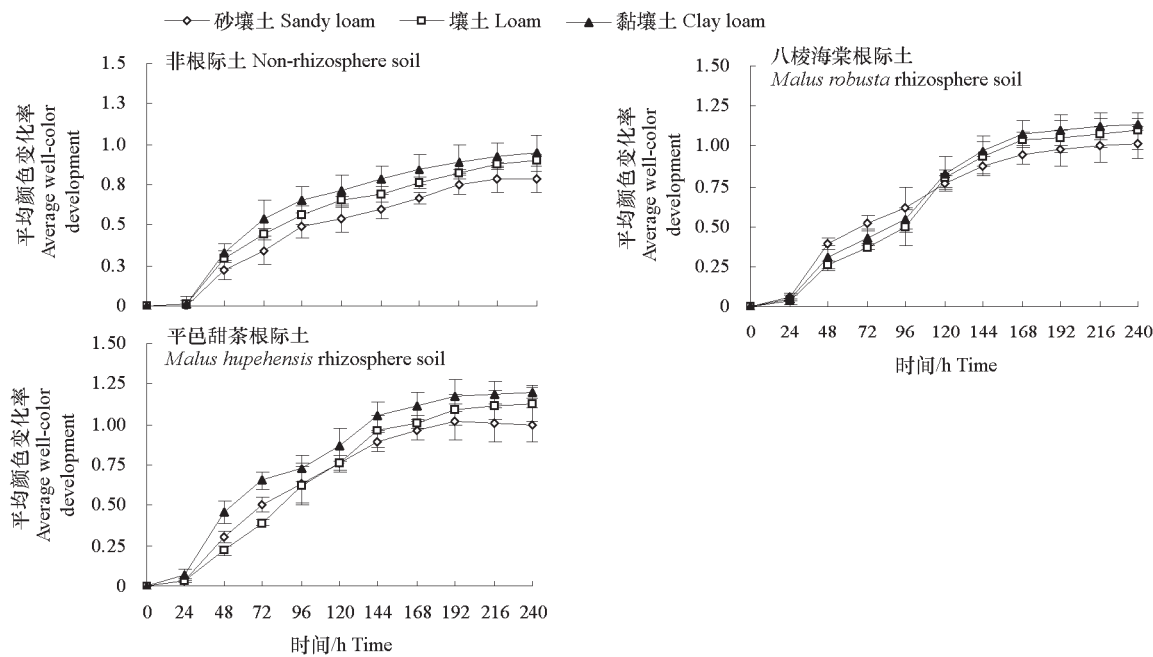


图 2 不同质地土壤苹果砧木根际微生物群落代谢活性（AWCD）  
Fig. 2 Metabolic activity of rhizosphere microbial community of apple rootstock in different textures soil

2.3 不同质地土壤中苹果砧木根际微生物群落功能多样性

如表 4 所示，无论在非根际土还是在根际土微生物群落中，Simpson 优势度指数 ( $D$ ) 变化不大，而代谢活性 (AWCD)、Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ ) 和 Pielou 均匀度指数 ( $E$ ) 都以黏壤土最高，砂壤土最低，并且同一质地下的根际土微生物群落都显著高于非根际土。在八棱海棠根际土壤

表 4 不同质地土壤苹果砧木根际微生物群落功能多样性指数  
Table 4 Functional diversity index of rhizosphere microbial community of apple rootstock in different soil textures

处理 Treatment	土壤质地 Soil texture	$H'$ Shannon-Wiener 指数 Shannon index	$D$ Simpson 指数 Simpson index	$E$ Pielou 指数 Pielou index	AWCD
非根际土 Non-rhizosphere soil	砂壤土 Sandy loam	3.11 ± 0.10 e	0.948 ± 0.01 b	0.956 ± 0.02 f	0.69 ± 0.06 i
	壤土 Loam	3.14 ± 0.07 de	0.947 ± 0.00 b	0.961 ± 0.03 e	0.77 ± 0.02 h
	黏壤土 Clay loam	3.16 ± 0.06 d	0.948 ± 0.00 b	0.970 ± 0.01 cd	0.85 ± 0.09 g
八棱海棠砧 <i>Malus robusta</i>	砂壤土 Sandy loam	3.24 ± 0.02 c	0.963 ± 0.00 a	0.968 ± 0.03 d	0.95 ± 0.05 f
	壤土 Loam	3.31 ± 0.03 b	0.960 ± 0.00 a	0.974 ± 0.05 bc	1.04 ± 0.10 c
	黏壤土 Clay loam	3.32 ± 0.03 ab	0.961 ± 0.00 a	0.978 ± 0.03 ab	1.08 ± 0.07 b
平邑甜茶砧 <i>Malus hupehensis</i>	砂壤土 Sandy loam	3.25 ± 0.03 c	0.963 ± 0.01 a	0.967 ± 0.01 de	0.96 ± 0.02 e
	壤土 Loam	3.31 ± 0.03 ab	0.962 ± 0.00 a	0.977 ± 0.02 ab	1.02 ± 0.03 d
	黏壤土 Clay loam	3.34 ± 0.01 a	0.963 ± 0.00 a	0.980 ± 0.00 a	1.11 ± 0.05 a

中, 砂壤土、壤土和黏壤土的  $H'$  分别为 3.24、3.31 和 3.32,  $E$  分别为 0.968、0.974 和 0.978, 黏壤土和壤土均显著高于砂壤土; 平邑甜茶的根际土与八棱海棠趋势相同, 但其值略高于八棱海棠。而 Simpson 优势度指数 ( $D$ ) 在八棱海棠和平邑甜茶的根际土中无差异。

## 2.4 不同质地土壤中苹果砧木根际微生物群落碳源利用特征

由表 5 可以看出, 根际和非根际微生物群落在利用碳水化合物、氨基酸类、酚酸类和多聚物类碳源的能力上, 大部分表现出黏壤土 > 壤土 > 砂壤土的趋势。在羧酸类碳源中, 两种砧木根际微生物群落利用能力在 3 种质地土壤中呈现出相反的趋势; 在胺类碳源中, 八棱海棠在壤土中利用能力最高, 而平邑甜茶在黏壤土中利用能力最高。根际微生物群落碳源利用能力高于非根际, 其中提升最大的为酚酸类碳源, 两种砧木根际微生物群落在砂壤土、壤土和黏壤土中平均提高了 1 044.38%、531.19%和 395.33%。另外, 在砂壤土中, 根际微生物群落羧酸类碳源利用能力较非根际显著提升, 八棱海棠和平邑甜茶分别提高 276.62%和 244.09%。可见, 苹果根系提高了根际微生物群落的碳源利用能力, 黏壤土总体表现出了较高的碳源利用能力, 砂壤土最低。

3 种质地土壤下, 非根际微生物群落以利用氨基酸类、碳水化合物和多聚物类碳源为主。在砂壤土中, 根际微生物群落的主要碳源利用类型为氨基酸类、碳水化合物和羧酸类; 在壤土中, 根际微生物群落的主要碳源利用类型为碳水化合物、多聚物类和氨基酸类; 在黏壤土中, 根际微生物群落的主要碳源利用类型为多聚物类、氨基酸类和碳水化合物 (表 5)。

表 5 不同质地土壤苹果砧木根际微生物群落对 6 类碳源的总体利用状况

Table 5 Total utilization of 6 carbon sources by rhizosphere microbial communities of apple rootstocks in different soil textures

处理 Treatment	土壤质地 Soil texture	碳水化合物 Carbohydrate	氨基酸类 Amino acid	羧酸类 Carboxylic acid	多聚物类 Polymers	酚酸类 Phenolic acid	胺类 Amine
非根际土 Non-rhizosphere soil	砂壤土 Sandy loam	0.80 ± 0.02 f	0.86 ± 0.03 f	0.39 ± 0.01 f	0.67 ± 0.01 f	0.04 ± 0.00 g	0.63 ± 0.03 c
	壤土 Loam	0.90 ± 0.01 e	0.99 ± 0.05 e	0.75 ± 0.02 d	0.70 ± 0.02 e	0.11 ± 0.00 f	0.41 ± 0.02 e
	黏壤土 Clay loam	1.18 ± 0.03 cd	1.08 ± 0.06 de	0.66 ± 0.03 e	0.79 ± 0.01 e	0.15 ± 0.00 e	0.34 ± 0.01 f
八棱海棠砧 <i>Malus robusta</i>	砂壤土 Sandy loam	0.96 ± 0.03 e	1.22 ± 0.02 bc	1.08 ± 0.05 a	1.03 ± 0.03 c	0.43 ± 0.01 d	0.52 ± 0.01 d
	壤土 Loam	1.21 ± 0.02 bc	1.18 ± 0.04 c	0.94 ± 0.05 bc	1.19 ± 0.04 b	0.53 ± 0.02 bc	1.11 ± 0.06 a
	黏壤土 Clay loam	1.27 ± 0.05 ab	1.42 ± 0.07 a	0.84 ± 0.03 cd	1.33 ± 0.03 a	0.55 ± 0.02 bc	0.76 ± 0.03 b
平邑甜茶砧 <i>Malus hupehensis</i>	砂壤土 Sandy loam	1.14 ± 0.01 d	1.02 ± 0.02 e	0.95 ± 0.02 bc	0.90 ± 0.02 d	0.50 ± 0.00 c	0.75 ± 0.02 b
	壤土 Loam	1.30 ± 0.06 a	1.15 ± 0.03 cd	0.99 ± 0.03 b	1.31 ± 0.04 a	0.57 ± 0.01 b	0.69 ± 0.02 bc
	黏壤土 Clay loam	1.20 ± 0.04 cd	1.29 ± 0.03 b	1.07 ± 0.06 a	1.39 ± 0.07 a	0.64 ± 0.03 a	1.11 ± 0.04 a

## 2.5 不同质地土壤中苹果砧木根际微生物群落代谢功能主成分分析

将试验所有处理的根际、非根际土壤的微生物在含有 31 种碳源 (表 2) 的 Biolog-ECO 微平板中培养 168 h 时, 利用此时的吸光度值进行主成分分析。当把 31 个碳源因子降维到 8 个主成分时, 它们的累计方差贡献率达到 100%, 其中第一主成分 (PC1) 方差贡献率为 31.77%, 第二主成分 (PC2) 方差贡献率为 23.34%, 两者方差累计贡献率达到 55.11%, 能够反映微生物群落对大部分碳源的利用特征 (其中对 PC1 贡献较大的碳源有 14 种, 对 PC2 贡献较大的碳源有 8 种, 主要是碳水化合物和氨基酸类, 表 6), 而其余 6 个主成分方差贡献率较低, 因此选取 PC1 和 PC2 主成分作图 (图 3)。



表 6 在 PC1 和 PC2 上载荷值较高 ( $|r| > 0.6$ ) 的碳源  
Table 6 Carbon source with higher factor load ( $|r| > 0.6$ ) on PC1 and PC2

碳源类别 Carbon source type	底物 Substrate	主成分 1 PC1	主成分 2 PC2
碳水化合物 Carbohydrate	葡萄糖-1-磷酸盐 Glucose-1-phosphate	0.921	
	D-甘露醇 D-Mannitol	0.852	
	D-木糖 D-Xylose	0.713	
	N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-glucosamine	0.680	0.663
	D-半乳糖酸- $\gamma$ -内脂 D-Galactonic acid- $\gamma$ -lactone	0.619	
	$\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷 $\beta$ -Methyl-D-glucoside	0.640	
	$\alpha$ -D-乳糖 $\alpha$ -D-Lactose		0.689
	i-赤藻糖醇 i-Erythritol	-0.671	
	L-丝氨酸 L-Serine	0.805	
	L-天门冬酰胺 L-Asparagine	0.762	
氨基酸类 Amino acid	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid	0.719	
	L-精氨酸 L-Arginine	-0.631	0.690
羧酸类 Carboxylic acid	$\alpha$ -丁酮酸 $\alpha$ -Ketobutyric acid	0.615	
	$\gamma$ -羟基丁酸 $\gamma$ -Hydroxybutyric acid		0.760
多聚物类 Polymers	肝糖 Glycogen		0.810
	吐温 80 Tween 80	0.691	
	$\alpha$ -环式糊精 $\alpha$ -Cyclodextrin		0.804
酚酸类 Phenolic acid	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy benzoic acid		0.825
胺类 Amine	苯乙胺 Phenylethyl-amine	-0.608	0.748

图 3 中各点的距离表示微生物群落的相似程度，距离越近相似程度越高。相同质地土壤下，两种砧木根际微生物群落聚集在一起，而土壤质地不同则出现了明显的分化。其中，壤土中八棱海棠根际和平邑甜茶根际分布在第一、二象限，位于 PC2 正端；黏壤土中八棱海棠根际和平邑甜茶根际分布在第二象限，位于 PC1 负端和 PC2 正端；砂壤土中八棱海棠根际和平邑甜茶根际分布在第三象限，位于 PC1 负端和 PC2 负端；而非根际的 3 种质地土壤聚集在第三、四象限，位于 PC2 负端。可见，根际微生物群落的代谢功能受到了土壤质地类型的影响，而两种砧木的差异所产生的影响较小，质地的作用更大。

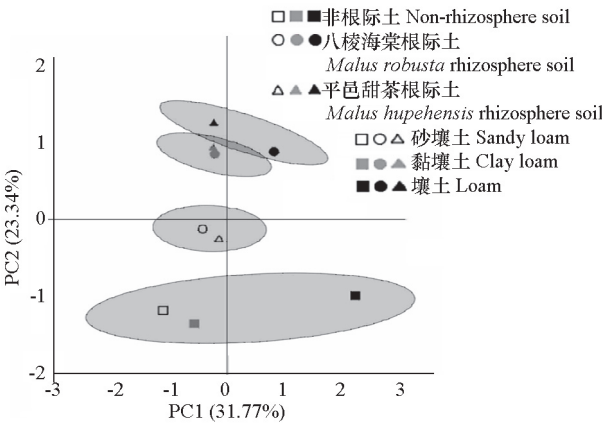


图 3 不同土壤样品中微生物群落代谢功能的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of metabolic function of microbial communities in different soil samples

3 讨论

土壤是植物赖以生存的基础，也是根际微生物的“蓄水池”，土壤性状对植物营养和健康至关重要 (Raaijmakers et al., 2009)。土壤质地是土壤矿物颗粒组合状况的反映，对微生物群落多样性有显著影响。有研究指出，黏粒具有较强的保水性，更有利于养分保持和微生物繁衍，因此微生物数量和活性与土壤黏粒含量正相关 (Franzluebbers et al., 1996; 王清奎 等, 2005)。本研究中发现不论在根际还是在非根际，土壤细菌基因拷贝数、土壤微生物群落代谢活性、碳源利用能力和功能多样性均呈现黏壤土 > 壤土 > 砂壤土，这应当与黏粒含量有关，即土壤黏粒越多，其微生物群落组成越复杂、多样性越丰富 (Marschner et al., 2001; Sessitsch et al., 2001)。此外，土壤孔隙可通



过土体微空间特征和气液物质供给影响微生物的繁衍、移动和相互作用,进而影响微生物群落的组成和多样性;一般土壤孔隙越多,微生物活性越大,多样性越丰富(张维俊等,2019)。而黏壤土不仅比砂壤土黏粒多,总孔隙度也大,这也使得微生物活性和多样性等呈现黏壤土 > 壤土 > 砂壤土的特征。

植物根系活动使根际圈形成了一个独特的微域,根际土壤微生物比非根际微生物更容易从根系分泌物中获得碳源等营养物质,其生物量和活性更强,使土壤理化性质和微生物群落结构趋向根际改变,从而形成了根际效应(Hartmann et al., 2008)。本研究中发现,不论黏壤土、壤土还是砂壤土,在同一土壤质地下,根际土壤的细菌丰度、微生物功能多样性指数和碳源利用能力均大于非根际土壤,微生物碳源利用类型由非根际向根际土壤也发生了转变,这是根系驱使土壤微生物群落从非根际到根际重新组装的结果,也是植物根系活动对微生物趋向性的共性影响,因为在生态脆弱地区9种植物的根际和非根际土壤的微生物功能多样性也存在这一特征(安韶山等,2011)。

除了不同质地土壤根际微生物的共性特征外,本研究中发现砂壤土具有最高的细菌根际效应,而黏壤土的最低,这应与不同质地土壤物质转运能力以及初生微生物群落有关。黏壤土含水量较高,水分不易流失,可溶性养分在根际和非根际土壤之间转运容易,能很快达到动态平衡,从而使根际和非根际土壤微生物活跃度差异较小;而砂壤土保水性和毛管作用较弱,根系分泌物滞留在根际,从而导致根际微生物相对活跃,根际效应增强(王晓婷等,2019)。此外,在非根际土壤中,砂壤土初始微生物数量少、活性低,而壤土和黏壤土的较高,再加上砂壤土因其根系分泌物的增多,刺激了微生物的繁殖和活性,造成了较高的根际效应。Miller等(2019)就曾发现在砂土中高粱根际有较多的根系分泌物,而在黏土中较少。因此,在果园土壤管理中,向黏壤土掺沙,将有助于增强细菌根际效应,促进土壤养分转化。

土壤微生物碳源利用类型是微生物群落代谢特征的重要反映(Kennedy & Smith, 1995),它会因植物种类的不同而存在差异,草本植物会如此(曲同宝等,2015),木本植物也会这样。本研究中发现八棱海棠和平邑甜茶的根际微生物对羧酸类碳源的利用能力明显不同,前者在砂壤土中最高、在黏壤土中最低,后者正相反。这既有同一砧木在不同质地土壤中的差异,也有不同砧木在相同土壤质地下的差异。植物种类因其根系构型或根系分泌物数量和种类差异,导致根际土壤理化性质的变化,进而会重塑土壤微生物功能活性及其组成结构(Vieira et al., 2020)。在果树生产中,可以针对土壤质地和砧木类型,施用碳源物质而人为调控和培育根际微生物群落,比如,在砧木为八棱海棠的砂壤土苹果园,或者在砧木为平邑甜茶的黏壤土苹果园,施入羧酸类碳源能更好地满足根际微生物的需求,提高根际微生物的活跃程度;反之,则可能不利。

根系分泌物极易受立地条件影响。土壤质地不同会导致土壤孔隙度的差异,孔隙度对土壤保水保肥能力和气体状况都有明显影响,它会通过水肥气影响根系分泌和根际微生物。因此,即使同种砧木,其根际微生物在不同土壤中的数量、种类和对碳源的利用能力等,都会因土壤总孔隙度的差异而不同。本研究结果显示,黏壤土总孔隙度大,其微生物多样性和丰富度较高,碳源利用能力也普遍较强;而砂壤土总孔隙度少,其微生物多样性、丰富度和碳源利用能力均较小。同时,沙粒和黏粒对根尖的摩擦和刺激不同,会导致根系分泌物的数量和种类不同。在砂壤土中,沙粒含量高,根系为减轻沙粒的摩擦会分泌更多黏性物质、有机酸和氨基酸等,这些物质会吸引特定微生物释放有机酸螯合剂,提高养分溶解性和利用效率(Bais et al., 2006)。因此,在黏壤土中掺入适量沙粒或砂土,使黏壤趋向砂壤,将会促进以氨基酸等为碳源的微生物繁衍,诱导根系分泌更多有机酸等,因而将会有利于土壤养分的溶解和利用。

不同砧木的根际微生物碳源利用情况对土壤质地反应不同。本研究中发现八棱海棠根际微生物对羧酸类碳源的利用能力在砂壤土中最高, 平邑甜茶则相反。因此, 在黏壤土中掺沙所产生的效果会因砧木而异, 而这与砧木的适应习性有关。比如, 平邑甜茶耐涝性比八棱海棠强, 黏壤土比砂壤土更容易积涝, 平邑甜茶因其耐涝性强而对黏重土壤有较强的适应能力, 因而, 黏壤土掺沙对平邑甜茶产生的影响会小于八棱海棠, 即黏壤土掺沙改善苹果根际微生物的作用, 以八棱海棠为砧木时会大于以平邑甜茶为砧木。另外, 八棱海棠耐旱性比平邑甜茶强, 砂壤土保水力弱、易干旱, 八棱海棠因其耐旱性强而更适应于砂壤土, 因此, 掺沙使黏壤土趋向于砂壤土, 从这方面看, 黏壤土掺沙对八棱海棠根际微生物的改善作用也会比平邑甜茶砧木更突出。

主成分分析结果显示, 不论是平邑甜茶还是八棱海棠的根际土壤, 土壤质地均使根际微生物群落类型分离, 而在同一质地土壤下, 两种砧木的根际微生物群落均聚集一起, 说明苹果根际微生物群落更易受土壤质地影响, 而两种砧木的差异对微生物造成的影响并不明显。Edwards 等 (2015) 也发现土壤类型是水稻根际微生物群落变化的主要变异源, Girvan 等 (2003) 的研究则表明土壤质地显著影响了 3 个农田的土壤微生物群落结构, 而植物种类对微生物群落的影响较小。因此, 为改善根际微生物群落, 采取改善土壤质地的措施会有更好的效果。

## References

- An Shao-shan, Li Guo-hui, Chen Li-ding. 2011. Soil microbial functional diversity between rhizosphere and non- rhizosphere of typical plants in the hilly area of southern Nixia. *Acta Ecologica Sinica*, 31 (18): 5225 – 5234. (in Chinese)
- 安韶山, 李国辉, 陈利顶. 2011. 宁南山区典型植物根际与非根际土壤微生物功能多样性. *生态学报*, 31 (18): 5225 – 5234.
- Bais H P, Weir T L, Perry L G, Gilroy S, Vivanco J M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233 – 266.
- Benizri E, Amiaud B. 2005. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology & Biochemistry*, 37 (11): 2055 – 2064.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellin C, Lurie E, Podishetty N K, Bhatnagar S, Eisen J A, Sundaresan V. 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (8): 911 – 920.
- Franzluebbers A J, Haney R L, Hons F M, Zuberer D A. 1996. Active fractions of organic matter in soils with different texture. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1367 – 1372.
- Girvan M S, Bullimore J, Pretty J N, Osborn A M, Ball A S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1800 – 1809.
- Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312: 7 – 14.
- Hua Jian-feng, Lin Xian-gui, Jiang Qian, Zhang Hua-yong, Chen Qian, Yin Yun-long. 2013. Diversity of carbon source metabolism of microbial community in farmland soils in an arsenic mining area. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 24 (2): 473 – 480. (in Chinese)
- 华建峰, 林先贵, 蒋 倩, 张华勇, 陈 茜, 殷云龙. 2013. 砷矿区农田土壤微生物群落碳源代谢多样性. *应用生态学报*, 24 (2): 473 – 480.
- Huang Na, Zhou Yi, Wu Xiao-ni, Fu Deng-gao, Zhao Luo-qi. 2019. Effects of dominant species on soil enzyme activity in the phosphorus-enriched degraded mountain area in the lake Dianchi watershed of southwestern China. *Research of Soil and Water Conservation*, 26 (4): 171 – 176. (in Chinese)
- 黄 娜, 周 苡, 吴晓妮, 付登高, 赵洛琪. 2019. 滇池流域富磷退化山区主要优势植物对土壤酶活性的影响. *水土保持研究*, 26 (4): 171 – 176.
- Kennedy A C, Smith K L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170 (1): 75 – 86.
- Li H, Su J Q, Yang X R, Zhu Y G. 2019. Distinct rhizosphere effect on active and total bacterial communities in paddy soils. *Sci Total Environ*, 649: 422 – 430.

- Mahoney A K, Chuntao Y, Hulbert S H. 2017. Community structure, species variation, and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8: 132.
- Marasco R, Rolli E, Fusi M, Michoud G, Daffonchio D. 2018. Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*, 6 (1): 3 - 17.
- Marschner P, Yang C H, Lieberei R, Crowley D E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (11): 1437 - 1445.
- Miller S B, Heuberger A L, Broeckling C D, Jahn C E. 2019. Non-targeted metabolomics reveals sorghum rhizosphere-associated exudates are influenced by the belowground interaction of substrate and sorghum genotype. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2): 431.
- Poudel R, Jumpponen A, Kennelly M M, Rivard C L, Gomez-Montano L, Garrett K A. 2019. Rootstocks shape the rhizobiome: rhizosphere and endosphere bacterial communities in the grafted tomato system. *Appl Environ Microbiol*, 85 (2): 1 - 16.
- Qu Tong-bao, Wang Cheng-yu, Pang Si-na, Zhang Jian-feng. 2015. Utilization of carbon sources by soil microbial communities of four plant functional groups in Songnen Steppe. *Acta Ecologica Sinica*, 35 (17): 5695 - 5702. (in Chinese)
- 曲同宝, 王呈玉, 庞思娜, 张建峰. 2015. 松嫩草地 4 种植物功能群土壤微生物碳源利用的差异. *生态学报*, 35 (17): 5695 - 5702.
- Raaijmakers J M, Paulitz T C, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant & Soil*, 321 (1 - 2): 341 - 361.
- Riley D, Barber S A. 1970. Salt accumulation at the soybean [*Glycine max* (L.) merr.] root-soil interface. *Soil Science Society of America Journal*, 34 (1): 154 - 155.
- Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M H, Kirchmann H, Kandeler E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl Environ Microbiol*, 67 (9): 4215 - 4224.
- Tian Ya-nan, Wang Hong-qi. 2011. Application of biolog to study of environmental microbial function diversity. *Environmental Science & Technology*, 34 (3): 50 - 57. (in Chinese)
- 田雅楠, 王红旗. 2011. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用. *环境科学与技术*, 34 (3): 50 - 57.
- Tringe S G, Mering C V, Kobayashi A, Salamov A A, Chen K, Chang H W, Podar M, Short J M, Mathur E J, Detter J C, Bork P, Hugenholtz P, Rubin E M. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308 (5721): 554 - 557.
- Vieira S, Sikorski J, Dietz S, Herz K, Schrumpf M, Bruelheide H, Scheel D, Friedrich M W, Overmann J. 2020. Drivers of the composition of active rhizosphere bacterial communities in temperate grasslands. *ISME journal*, 14: 463 - 475.
- Wang Qing-kui, Wang Si-long, Feng Zong-wei, Huang Yu. 2005. Active soil organic matter and its relationship with soil quality. *Acta Ecologica Sinica*, 25 (3): 513 - 519. (in Chinese)
- 王清奎, 汪思龙, 冯宗伟, 黄宇. 2005. 土壤活性有机质及其与土壤质量的关系. *生态学报*, 25 (3): 513 - 519.
- Wang Xiao-ting, Chen Rui-rui, Jing Zhong-wang, Feng You-zhi, Yao Tong-yan, Lin Xian-gui. 2019. Comparative study on rhizosphere effects and bacterial communities in the rhizospheres of rice and wheat. *Acta Pedologica Sinica*, 56 (2): 443 - 453. (in Chinese)
- 王晓婷, 陈瑞蕊, 井忠旺, 冯有智, 姚童言, 林先贵. 2019. 水稻和小麦根际效应及细菌群落特征的比较研究. *土壤学报*, 56 (2): 443 - 453.
- Yang Hong-qiang, Shu Huai-rui. 2007. Studies on apple roots. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 杨洪强, 束怀瑞. 2007. 苹果根系研究. 北京: 科学出版社.
- Yao Qi, You Qing, Li Yuan-hong, Zhang Qi-chang, Yin Hao-neng, Wu Hong-ping, Wang Rui-ping. 2017. Functional diversity of soil microorganisms in the soil in Dongzhaigang mangrove wetlands in Hainan. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 23 (5): 857 - 861. (in Chinese)
- 姚琦, 尤青, 李媛宏, 张起畅, 殷浩能, 吴红萍, 王锐萍. 2017. 海南东寨港红树林土壤微生物功能多样性. *应用与环境生物学报*, 23 (5): 857 - 861.
- Zhang Wei-jun, Li Shuang-yi, Xu Ying-de, Liu Xu, An Ting-ting, Zhu Ping, Peng Chang, Wang Jing-kuan. 2019. Advances in research on relationships between soil pore structure and soil microenvironment and organic carbon turnover. *Journal of Soil and Water Conservation*, 33 (4): 1 - 9. (in Chinese)
- 张维俊, 李双异, 徐英德, 刘旭, 安婷婷, 朱平, 彭畅, 汪景宽. 2019. 土壤孔隙结构与土壤微环境和有机碳周转关系的研究进展. *水土保持学报*, 33 (4): 1 - 9.