植物保护学报 Journal of Plant Protection，2020，47(6)：1261-1269 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2019203

秸秆还田对水稻根际微生物多样性和水稻纹枯病发生的影响

胡 蓉 郑 露 刘 浩 黄俊斌*

（华中农业大学植物科学技术学院，武汉 430070）

摘要：为探究稻麦轮作模式下秸秆还田对水稻根际微生物多样性与水稻纹枯病发生的影响，本研究采用Illumina测序技术结合生物信息学比较分析了秸秆还田与不还田处理的水稻根际微生物群落多样性差异，并采用实时荧光定量PCR（real-time fluorescent quantitative PCR，RT-qPCR）对这2种稻田土壤中水稻纹枯病菌*Rhizoctonia solani*含量进行测定，并采用随机五点取样法调查稻田中水稻纹枯病发病率和病情指数。结果表明，秸秆还田后水稻根际细菌群落Chao1丰富度指数和Shannon多样性指数均有所增加，分别增加14.42%和4.39%，其中前者增幅显著；根际真菌群落Chao1丰富度指数降低29.60%，而Shannon多样性指数略有增加，增加5.96%；在门水平上，秸秆还田和不还田处理的水稻根际土壤优势细菌门均为变形菌门、放线菌门、绿弯菌门和酸杆菌门，优势真菌门均为子囊菌门、接合菌门和担子菌门；在属水平上，秸秆还田处理的硝化螺旋菌属和芽胞杆菌属相对丰度分别比不还田处理的显著增加96.11%和106.19%；在水稻孕穗期秸秆还田土壤中水稻纹枯病菌含量比不还田处理的显著增加120.20%；秸秆还田后水稻纹枯病发生加重，病情指数比不还田处理的增加18.10%~45.41%。

关键词：水稻；秸秆还田；微生物多样性；立枯丝核菌；水稻纹枯病

Effects of straw returning on microbial diversity in rice rhizosphere and occurrence of rice sheath blight

HU Rong ZHENG Lu LIU Hao HUANG Junbin*

（College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China）

Abstract: To explore the effects of straw returning on microbial diversity in rice rhizosphere and occurrence of rice sheath blight, Illumina high-through sequencing technology combined with related bioinformatics analysis were used to analyze the difference in the rice rhizosphere community diversity between straw returning paddy field (SRPF) and none-straw returning paddy field (NSRPF), and real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to investigate the *Rhizoctonia solani* content in paddy fields under a rice-wheat cropping system. The incidence rate and disease index of rice sheath blight in paddy fields were investigated via random five-point sampling. As a result, the Chao1 richness index and Shannon diversity index of bacterial community in rhizosphere of SRPF were higher than those of NSRPF, which increased by 14.42% and 4.39%, respectively, and the increase of richness was significant. The diversity of fungal community in rhizosphere soil of SRPF decreased by 29.60% compared to that of NSRPF, whereas the diversity was slightly increased by 5.96%. At the phylum level, Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi and Acidobacteria were found to be the dominant bacterial

基金项目：国家重点研发计划（2017YFD0301403）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：junbinhuang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期：2019-12-03

phyla in rhizosphere soils of both treatments, while Ascomycota, Zygomycota and Basidiomycota were the dominant fungi phyla. At genus level, the relative abundance of *Nitrospira* and *Bacillus* increased significantly by 96.11% and 106.19%, respectively, in SRPF, compared to of NSRPF. In comparison to NSRPF, the *R. solani* content increased in SRPF significantly by 120.20% during booting stage. In SRPF, the disease index of rice sheath blight increased by 18.10%−45.41%.

Key words: rice; straw returning; microbial diversity; *Rhizoctonia solani*; rice sheath blight

长江中下游平原是我国重要的农业集约化地区，稻麦轮作是当地的主要耕作模式之一（Shi et al.，2012）。作物收获后秸秆产出量大，轮作间隔时间短，秸秆还田是当地秸秆处理的主要措施（Zhang et al.，2016）。麦秆和稻秆中含有大量的有机物以及丰富的氮、磷、钾等营养元素（王兰等，2018），秸秆还田有利于提高稻田中速效养分的含量。

土壤根际微生物作为土壤中最活跃的组成成分，其组成和丰度对作物生长所需营养的循环利用以及土传病害发生具有重要影响。目前，在稻麦轮作模式下仅有秸秆还田对水稻非根际土壤微生物影响的相关报道，如郭梨锦等（2013）采用磷脂脂肪酸（phospholipid fatty acid，PLFA）法发现麦秆还田可显著提高稻田0~5 cm表层土壤微生物生物量和微生物多样性；Chen et al.（2017）采用PLFA法发现稻秆和麦秆均还田后，0~20 cm耕层土壤中总磷脂脂肪酸、细菌生物量和放线菌*Actinomycetes*的生物量分别增加52%、75%和56%；Yang et al.（2016）将两季秸秆埋至20 cm和40 cm深度，发现2个处理中特有分类操作单元（operational taxonomic unit，OTU）数目不同，而门水平微生物群落组成相似；Guo et al.（2016）发现麦秆还田显著提高了稻田细菌总生物量，而革兰氏阳性菌G^+和革兰氏阴性菌G^-的比率显著降低。由于土壤中大部分微生物难以分离培养，PLFA标记等传统土壤微生物研究方法可提供的分类学信息非常有限（贺字典等，2018），不利于进一步明确秸秆还田后细菌和真菌属水平上的土壤微生物组成及丰度的变化。近年来，高通量测序技术被应用于土壤微生物多样性分析中，如Navarro-Noya et al.（2013）采用454焦磷酸测序发现长期将玉米秸秆和小麦秸秆还田可显著影响土壤细菌的丰度，其中拟杆菌门Bacteroidetes丰度显著增高，而放线菌门Actinobacteria、绿弯菌门Chloroflexi、蓝细菌门Cyanobacteria及芽单胞菌门Gemmatimonadetes丰度显著降低；Amoo et al.（2020）利用Illumina Miseq 16S rRNA基因扩增子测序对森林土壤样本中细菌进行了高通量测序，发现门水平上的细菌以酸杆菌门Acidobacteria、放线菌门和疣微菌门Verrucomicrobia为主。国内外学者还综合采用2种或2种以上高通量测序方法研究土壤微生物，如Su et al.（2019）采用高通量测序技术结合PLFA法发现在小麦−玉米轮作定点试验中，两季作物秸秆还田后细菌和真菌的相对丰度分别增加1.9%和7.7%，与土壤硝化相关的细菌相对丰度增加，而真菌属中链格孢属*Alternaria*等的相对丰度降低。植物病原真菌通常附着在作物秸秆上，随着秸秆还田土壤中越冬菌源基数大大增加，进而可能加重植物病害。赵永强等（2017）将麦秆和稻秆全量还田1年后发现小麦纹枯病病情指数有所降低，但随着还田年限增长，秸秆还田小区的小麦纹枯病呈增加趋势，而秸秆还田对水稻根际微生物和水稻病害发生影响的鲜有报道。

为了明确秸秆还田对水稻纹枯病发生的影响，采用Illumina测序技术结合生物信息学比较分析秸秆还田与不还田处理下水稻根际微生物群落多样性差异，通过采用实时荧光定量PCR（real-time fluorescent quantitative PCR，RT-qPCR）对稻田土壤中纹枯病菌含量进行测定，以期为稻麦轮作模式下水稻纹枯病的可持续控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌和植物：水稻纹枯病菌*Rhizoctonia solani*由华中农业大学植物真菌病害研究室提供。水稻品种为甬优4949，由宁波市种子有限公司和武汉佳禾生物科技有限责任公司用甬粳49A作母本、F9249作父本配组育成的三系籼粳杂交中稻品种；小麦品种为郑麦9023，河南省农业科学院小麦研究所选育的强筋优质小麦新品种。

马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）培养基：马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L。

药剂、试剂及仪器：25%多菌灵（carbendazim）可湿性粉剂，上海农乐生物制品股份有限公司。E. Z. N. A® soil试剂盒，美国Omega Bio-tek公司；

TransStart Tip Green qPCR SuperMix试剂盒，北京全式金生物技术有限公司；AxyPrep DNA Gel Extraction Kit试剂盒，上海普飞生物技术有限公司；其它试剂均为国产分析纯。Hettich ROTINA 380R高速大量冷冻离心机，上海凌仪生物科技有限公司；CFX-96实时定量PCR仪、PowerPac系列Bio-Rad电泳仪，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；GeneAmp® 9700型PCR仪，美国ABI公司；Quanti Fluor® dsDNA System，美国赛默飞世尔科技。

1.2 方法

1.2.1 秸秆还田试验

于2017年6月—2018年10月在湖北省襄阳市枣阳市吴店镇肖湾村进行田间试验，采用稻麦轮作的种植模式，水稻品种为甬优4949，小麦品种为郑麦9023。水稻于2017年6月中旬采用插秧机移栽，株行距为13 cm×20 cm，于10月中上旬收获；小麦于2017年11月中旬采用机械条播，株距约15~16 cm，2018年5月底至6月初收获。试验设秸秆还田和秸秆不还田2个处理，种植小区面积为14 m×15 m，每个处理3个重复，共6个小区。2017年10月水稻收获后将其秸秆全量粉碎并旋耕还田，2017年6月和2018年6月将小麦秸秆全量粉碎并旋耕还田。水稻整个生育期不施用杀菌剂，小麦生育期采用25%多菌灵可湿性粉剂400倍液喷雾防治小麦赤霉病、黑穗病等麦类病害，并采用人工除草方式除草。水稻N、P_2O_5和K_2O施肥量分别为270、135和270 kg/hm^2；而小麦N、P_2O_5和K_2O的施肥量分别为180、90和180 kg/hm^2，采用常规田间管理。

1.2.2 根际土壤DNA提取与PCR扩增

2018年水稻分蘖期（6月28日）自试验小区采集土壤，每个小区随机选择5点取样，每点采集水稻根际土壤约10 g，将5个样点的土混合为1份样品，6个小区共采集6份样品，秸秆还田样品编号分别为SR1、SR2和SR3，秸秆不还田样品编号分别为NS1、NS2和NS3。将从田间采集的土壤样品装入自封袋中，置于冰盒中带回实验室，液氮速冻后于−80℃冰箱中保存，用于微生物多样性测序。

采用E. Z. N. A® soil试剂盒提取秸秆还田和不还田小区水稻根际土壤样品的DNA。分别采用细菌引物338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）/806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′）和真菌引物ITS1F（5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′）/ITS2R（5′-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′）分别对V3~V4可变区和ITS1区进行PCR扩增。所有引物均委托上海美吉生物医药科技有限公司合成。20 μL扩增体系：5×FastPfu缓冲液4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、5 μmol/L引物各0.8 μL、FastPfu聚合酶0.4 μL、10 ng/μL DNA模板1 μL，加ddH_20补足20 μL。PCR扩增程序：95℃预变性3 min；95℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸30 s，27个循环；72℃再延伸10 min。使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物，利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit试剂盒进行纯化，Tris-HCl洗脱，2%琼脂糖电泳检测。PCR产物利用Quanti Fluor® dsDNA System进行检测定量后，根据Illumina Miseq标准操作规程利用纯化后的扩增片段构建PE2*300的文库，委托上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。测序原始数据上传至NCBI，细菌序列号分别为SRR11002244、SRR11002478、SRR11002245、SRR11002480、SRR11002481和SRR11002483，真菌序列号分别为SRR10999309~SRR10999314。

1.2.3 Illumina Miseq测序数据处理及比对

原始测序序列使用Trimmomatic软件进行质量控制，使用Flash 1.2.11软件（https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml）拼接，去除无法拼接的序列。使用Uparse 7.0.1090软件（http://www.drive5.com/uparse/），根据97%相似度对序列进行OTU聚类，使用Uchime软件剔除嵌合体。采用RDP classifier 2.2软件（http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/）对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学分析。分别以Silva 128数据库（http://www.arb-silva.de）和Unite 7.0（http://unite.ut.ee/index.php）为细菌和真菌比对数据库，在门、属分类水平上统计各土壤样品中微生物群落组成，比对阈值设置为70%。

1.2.4 微生物多样性分析

从样品中随机抽取一定测序量的数据，统计它们所代表物种数目，即OTU数目，使用R 2.15.3软件以抽取的测序数据量与对应的OTU数目来构建稀释曲线。稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性，当曲线趋向平坦时，说明测序数据量渐近合理。

根据OTU物种丰度信息，选择97%相似度的OTU，利用mothur软件分析水稻土壤微生物群落Shannon多样性指数和Chao1丰富度指数。Shannon多样性指数用来估算样本中微生物多样性的指数之一。Shannon多样性指数越大，说明群落多样性越高。Shannon多样性指数$= -\sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$，式中$S_{obs}$为实际观测到的OTU数目，$n_i$为第$i$个OTU所含的序

列数；N为所有序列数。Chao1丰富度指数是用Chao1算法估计样本中所含OTU数目的指数，Chao1丰富度指数在生态学中常用来估计物种总数，数值越大代表样本中所含物种越多。Chao1丰富度指数$= S_{obs} + \frac{n_1(n_1-1)}{2(n_2+1)}$，式中$n_1$为只含有1条序列的OTU数目；$n_2$只含有2条序列的OTU数目。

基于门水平的各物种所占比例大小，利用R 2.15.3软件绘制各样本中各微生物的相对丰度图并分析微生物相对丰度在秸秆还田处理和秸秆不还田处理之间的差异。基于属水平的各物种所占比例大小，利用R 2.15.3软件绘制各样本中各微生物的相对丰度图并分析微生物相对丰度在秸秆还田处理和秸秆不还田处理之间的差异。

1.2.5 秸秆还田后稻田土壤水稻纹枯病菌的测定

于2018年分蘖期(6月28日)和孕穗期(8月15日)采集秸秆还田和不还田处理小区土壤，用于稻田土壤水稻纹枯病菌的测定。每个生育期每个小区随机采取5点，每点采集0~10 cm耕层土壤约10 g，将5个样点的土混合为1份土壤样品，6个小区共采集6份土壤样品。采用实时荧光定量PCR（real-time fluorescent quantitative PCR，RT-qPCR）测定不同生育期秸秆还田和不还田稻田土壤中水稻纹枯病菌的含量，测定方法参考Sayler & Yang(2007)并略作改进。按照E. Z. N. A® soil试剂盒说明书提取PDA培养基上培养7 d的水稻纹枯病菌DNA，分别将其稀释为1×10^5、1×10^4、1×10^3、1×10^2、10和1 ng/μL浓度，并以各浓度的水稻纹枯病菌DNA为模板，采用水稻纹枯病菌基因组保守序列特异性引物Rs-F（5′-GCCTTTTCTACCTTAATTTGGCAG-3′）/Rs-R（5′-GTGTGTAAATTAAGTAGACAGCAAATG-3′）进行RT-qPCR检测。20 μL RT-qPCR检测体系：DNA模板1 μL、10 μmol/L引物各0.4 μL、2×TranStart® Tip Green qPCR SuperMix 10 μL，加ddH_2O至20 μL。RT-qPCR反应程序：95℃预变性3 min；95℃变性30 s，58℃退火30 s，72℃延伸30 s，40个循环；72℃再延伸10 min。经RT-qPCR检测获得不同浓度下的C_t值，根据水稻纹枯病菌DNA含量与C_t值的标准曲线得到各土壤样品中水稻纹枯病菌DNA含量。

1.2.6 秸秆还田后稻田水稻纹枯病的病情调查

为进一步了解秸秆还田对水稻纹枯病发生的影响，于2018年水稻分蘖期(6月28日)、拔节期(7月21日)、孕穗期(8月15日)和黄熟期(9月6日)对秸秆还田和不还田稻田小区水稻纹枯病发生情况进行调查。每个小区随机选择5个点，每点调查70~80株水稻。根据水稻纹枯病分级标准划分病害等级，计算发病率和病情指数。水稻纹枯病分级标准：0级，未发现纹枯病病斑；1级，以剑叶为第1片叶，第4片叶及其以下各叶鞘和叶片均发病；3级，第3片叶及其以下叶鞘和叶片均发病；5级，第2片叶及其以下各叶鞘和叶片均发病；7级，第1片叶及其以下各叶鞘和叶片均发病；9级，全株发病甚至枯死。发病率=发病率株数/调查总株数×100%；病情指数=Σ(病级株数×代表级株数)/(调查总株数×最高病级值)×100。

1.3 数据分析

采用Excel 2013和DPS 9.50软件对试验数据进行统计分析，应用t检验法对土壤微生物相对丰度进行差异显著性检验，其它均应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 秸秆还田对水稻根际微生物多样性的影响

2.1.1 水稻根际土壤样品测序质量评估

秸秆还田和不还田处理的土壤细菌群落总序列数分别为64 351条和47 404条，平均片段长度为437 bp，按照97%相似度对非重复序列进行聚类后共获得4 293个OTU；稻麦秸秆还田和不还田处理的土壤真菌群落总序列数分别为72 794条和73 305条，平均片段长度为253 bp，聚类后共获得609个OTU。土壤细菌及真菌稀释曲线显示，在97%相似度的OTU分类水平下，细菌和真菌的稀释曲线逐渐趋向平坦，说明测序数据量足够，可反映土壤细菌及真菌群落绝大多数序列信息(图1)。

2.1.2 水稻根际土壤微生物群落多样性分析

秸秆还田后水稻根际土壤细菌Chao1丰富度指数和Shannon多样性指数均有所增高，而根际真菌Chao1丰富度指数降低，Shannon多样性指数略有增高。秸秆还田后根际土壤细菌Chao1丰富度指数为3 640.89，比秸秆不还田显著增加14.42%($P<0.05$)，根际土壤细菌Shannon多样性指数为6.89，比秸秆不还田处理的增加4.39%，但差异不显著；秸秆还田后根际土壤真菌Chao1丰富度指数和Shannon多样性指数分别为315.27和3.91，前者比秸秆不还田处理的减少29.60%，后者比秸秆不还田处理的增加5.96%，但均无显著差异(表1)。

2.1.3 土壤微生物群落主要门组成及相对丰度

秸秆还田与不还田水稻根际土壤的微生物在门

水平上组成一致，但各优势细菌门和真菌门的相对丰度之间存在一定差异（图2）。秸秆还田与不还田水稻根际土壤的微生物优势细菌门均为变形菌门、放线菌门、绿弯菌门和酸杆菌门，其中变形菌门的相对丰度均最高，在秸秆还田和不还田处理中的相对丰度分别为24.65%~36.08%和27.91%~31.63%；秸秆还田与不还田水稻根际土壤的微生物优势真菌门均为子囊菌门、接合菌门和担子菌门，其中子囊菌门的相对丰度均最高，在秸秆还田和不还田处理中的相对丰度分别为37.49%~53.34%和59.91%~73.64%。

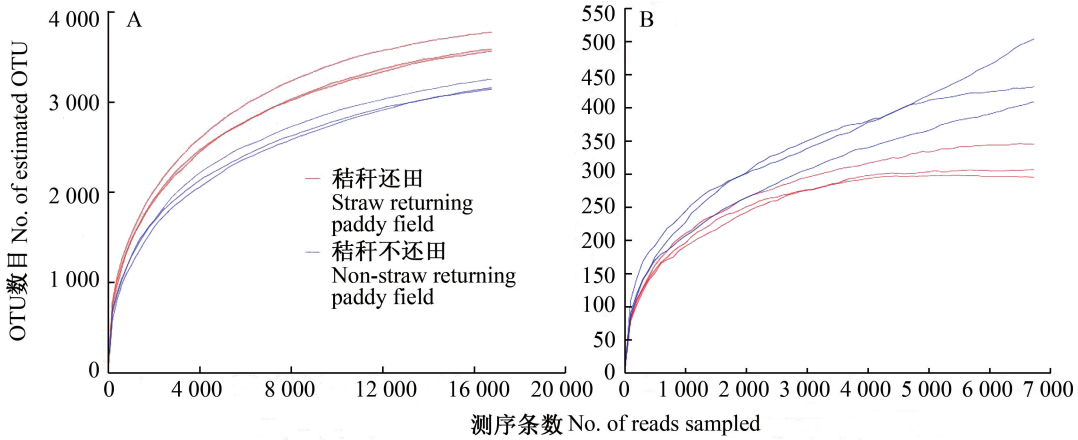

图1　水稻根际土壤样品细菌（A）和真菌（B）的稀释曲线

Fig. 1　Bacterial (A) and fungal (B) rarefaction curves in rice rhizosphere

表1　秸秆还田对水稻根际土壤细菌和真菌的Chao1丰富度指数及Shannon多样性指数的影响

Table1　Effects of straw returning in paddy fields on the richness and diversity index of bacteria and fungi in rice rhizosphere

处理 Treatment	Chao1丰富度指数 Chao1 richness index		Shannon多样性指数 Shannon diversity index	
	细菌 Bacterium	真菌 Fungus	细菌 Bacterium	真菌 Fungus
秸秆还田 Straw returning paddy field	3 640.89±114.51 a	315.27±26.44 a	6.89±0.08 a	3.91±0.05 a
秸秆不还田 Non-straw returning paddy field	3 181.97±60.60 b	447.85±49.64 a	6.60±0.10 a	3.69±0.21 a

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经LSD法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

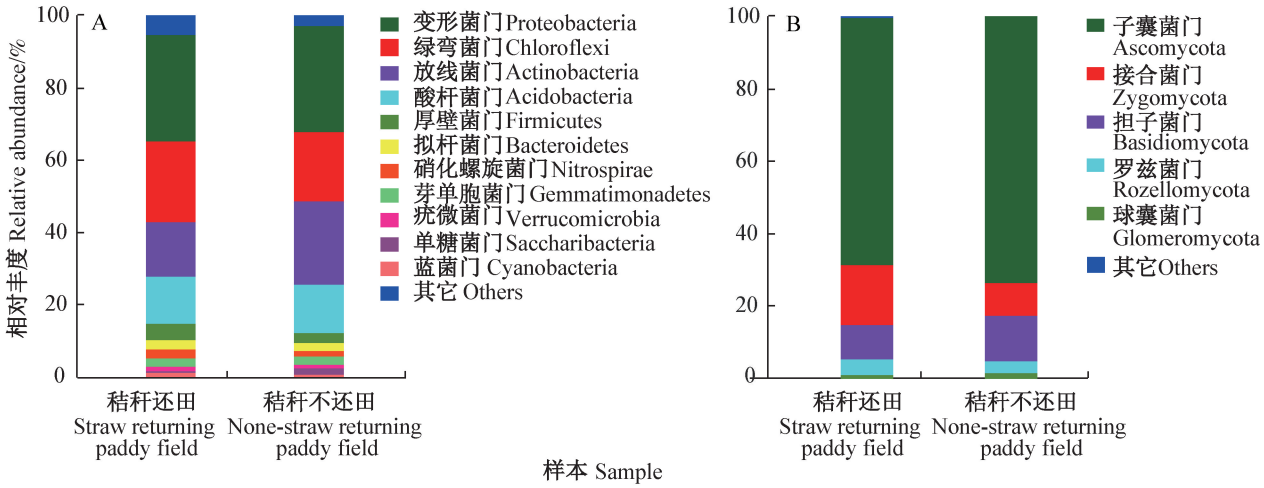

图2　秸秆还田对水稻根际土壤细菌（A）和真菌（B）主要门相对丰度的影响

Fig. 2　Effects of straw returning paddy field on relative abundance of major phyla of bacteria (A) and fungi (B) in rice rhizosphere

2.1.4　*土壤微生物群落主要属组成及相对丰度*

秸秆还田与不还田水稻根际土壤的微生物的相对丰度排列前15位的细菌属和真菌属均一致，但各优势细菌属和真菌属的相对丰度之间存在一定差异

(图3)。秸秆还田与不还田水稻根际土壤的微生物优势细菌属的相对丰度分别为0.73%~8.62%和1.45%~7.72%,其中秸秆还田水稻根际土壤的硝化螺旋菌属和芽胞杆菌属的相对丰度分别比秸秆不还田处理的相对丰度显著高96.11%和106.19%($P<0.05$),鞘氨醇单胞菌属、norank_o__Acidimicrobiales、假节杆菌和unclassified_f__Intrasporangiaceae的相对丰度均比秸秆不还田处理的相对丰度显著低32.13%、25.59%、77.47%和46.58%($P<0.05$,图3-A)。秸秆还田和不还田水稻根际土壤的真菌属的相对丰度分别为0.14%~14.99%和0.34%~19.94%,其中秸秆还田水稻根际土壤的unclassified_p__Ascomycota、链格孢属、*Pyrenochaetopsis*和unclassified_c__Dothideomycetes的相对丰度分别为1.15%、1.59%、1.40%和0.37%,显著低于秸秆不还田处理的相对丰度($P<0.05$,图3-B)。

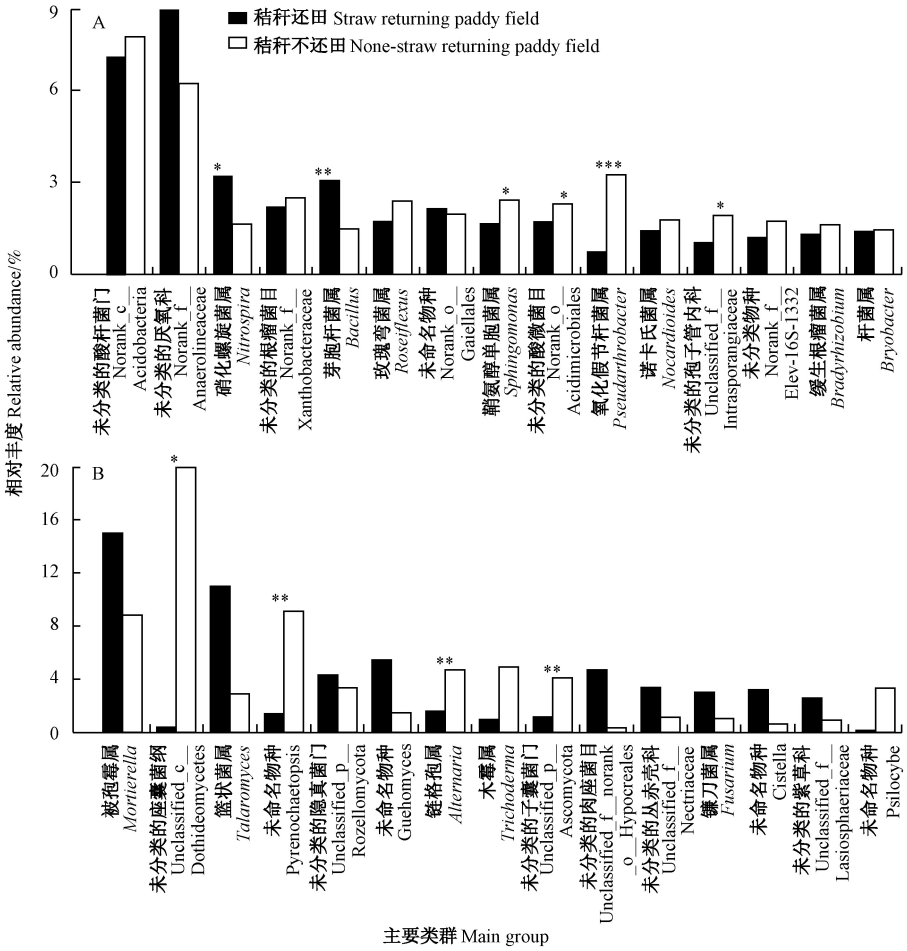

图3 秸秆还田对水稻根际土壤中细菌(A)和真菌(B)主要属相对丰度的影响

Fig. 3 Effects of straw returning paddy field on relative abundance of major bacterial (A) and fungal (B) genera in rice rhizosphere

*、**和***分别表示经t检验法检验在$P<0.05$、$P<0.01$和$P<0.001$水平差异显著。*, **, *** indicate significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$ level by t test.

2.2 秸秆还田对土壤中水稻纹枯病菌含量的影响

水稻分蘖期和孕穗期秸秆还田小区每克土壤中纹枯病菌DNA含量分别为0.113 ng和0.123 ng,分别比秸秆不还田处理的显著增加115.93%和120.20%($P<0.05$,图4)。

2.3 秸秆还田对稻田中水稻纹枯病发生的影响

秸秆还田和不还田处理后,稻田中水稻纹枯病的发病率和病情指数均随着水稻的生长逐渐增加;与秸秆不还田处理相比,秸秆还田处理后稻田中水稻纹枯病明显加重。在水稻孕穗期和黄熟期,秸秆还田稻田中水稻纹枯病发病率分别为75.72%和76.31%,显著高于秸秆不还田处理的发病率($P<0.05$)。在水稻孕穗期,秸秆还田稻田中水稻纹枯病病情指数为24.56,比秸秆不还田的病情指数显著增加45.41%($P<0.05$);在其它3个生育期,秸秆还田稻田中水稻纹枯病病情指数介于2.74~26.45之间,比

同期秸秆不还田稻田中的病情指数增加18.10%~45.41%，但差异不显著（表2）。

3 讨论

植物根系、土壤及土壤根际微生物所形成的根际微生态系统往往维持着动态平衡（Chaparro et al.，2012）。一般来说，生态系统的稳定性取决于生态系统中微生物的多样性，即微生物多样性指数越高，生态系统的稳定性也越好（贺纪正等，2013）。本研究结果显示，稻麦秸秆还田后水稻根际土壤细菌群落物种Chao1丰富度指数和Shannon多样性指数均有所增加。郭梨锦等（2013）和Guo et al.（2016）研究也发现，在稻麦轮作模式下，秸秆还田2年后，0~5 cm表层土壤细菌群落的丰富度和多样性均提高。因此推测秸秆还田可以改善土壤营养状况，提高稻田土壤有机碳含量，而有机碳为细菌生长提供养分，从而使还田土壤中细菌的丰富度和多样性增加。王妍（2016）和王宁等（2017）研究结果表明麦秆粉碎直接还田可降低土壤真菌丰富度指数和多样性指数，而将麦秆焚烧后再还田对真菌丰富度指数和多样性指数均无显著影响。本研究结果发现，秸秆还田后水稻根际土壤真菌群落物种多样性指数增加，而丰富度指数有一定降低，但差异不显著，与前人研究结果存在一定差异，分析原因可能是本研究均为稻秆和麦秆粉碎后直接全量还田，未经过焚烧等处理，2种作物秸秆还田过程中可能引入了新物种，从而使稻田真菌群落多样性指数增加；稻秆还田后，小麦季的土壤湿度加大，孔隙度增大，有利于土壤真菌生长；而水稻季的土壤处于淹水状态，通气性差，此时土壤中的真菌很可能以兼性厌氧微生物或厌氧微生物为主，从而导致真菌群落丰富度发生变化；真菌生长较慢，在土壤中的大量定殖受到限制，从而导致不同处理下土壤真菌群落丰富度无显著差异。

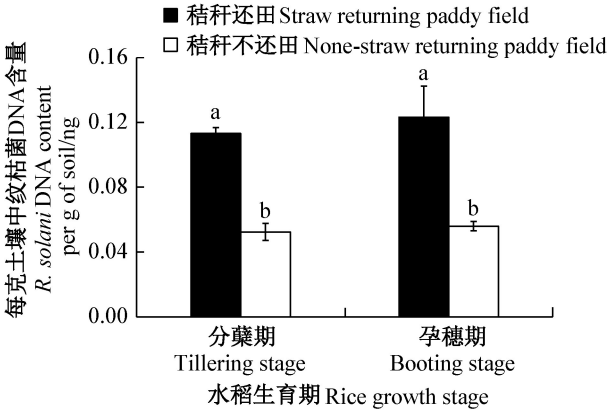

图4　秸秆还田后水稻分蘖期和孕穗期稻田土壤中水稻纹枯病菌含量

Fig. 4　*Rhizoctonia solani* content in paddy fields at tillering stage and booting stage after straw returning

图中数据为平均数±标准误。同系列不同字母表示经LSD法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same series indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

表2　秸秆还田对水稻纹枯病发病率和病情指数的影响

Table 2　Effects of straw returning on the incidence rate and disease index of rice sheath blight occurrence

处理 Treatment	发病率 Incidence rate/%			
	分蘖期 Tillering stage	拔节期 Jointing stage	孕穗期 Booting stage	黄熟期 Yellow maturity stage
秸秆还田 Straw returning paddy field	18.57±2.13 a	50.65±6.08 a	75.72±9.24 a	76.31±3.06 a
秸秆不还田 Non-straw returning paddy field	18.75±8.64 a	45.96±2.31 a	58.52±15.85 b	66.05±7.36 b
处理 Treatment	**病情指数 Disease index**			
	分蘖期 Tillering stage	拔节期 Jointing stage	孕穗期 Booting stage	黄熟期 Yellow maturity stage
秸秆还田 Straw returning paddy field	2.74±0.29 a	15.61±0.88 a	24.56±2.26 a	26.45±0.66 a
秸秆不还田 Non-straw returning paddy field	2.32±0.52 a	12.95±0.09 a	16.89±3.05 b	21.33±2.45 a

图中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示LSD法检验在$P<0.05$水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

本研究结果表明秸秆还田与不还田处理水稻根际土壤微生物在门水平的组成基本相似，变形菌门、放线菌门、绿弯菌门及酸杆菌门均为2个处理下根际土壤优势细菌菌门，子囊菌门、接合菌门及担子菌门均为优势真菌菌门。Tardy et al.（2015）研究发现麦秆还田后土壤中的优势细菌门为变形菌门和酸杆

菌门，优势真菌门为子囊菌门；王妍（2016）研究发现在小麦-玉米轮作模式下，麦秆还田后土壤中的真菌优势菌门为子囊菌门、接合菌门及担子菌门；Wang et al.（2018）发现芝麻连作田优势细菌门为变形菌门、酸杆菌门及放线菌门，均与本研究结果一致。究其原因可能是这些田块的生态幅较宽，而物种分布又与生态幅呈正相关（袁秀等，2011），从而变形菌门、酸杆菌门等成为多数微生态环境中的优势菌门。在稻麦轮作模式下，已有关于稻田微生物组成及丰度差异的分析仅局限于门水平（Guo et al.，2016；Yang et al.，2016；Chen et al.，2017）。本研究结果发现秸秆还田与秸秆不还田根际土壤微生物组成在属水平上存在较大差异，秸秆还田水稻根际土壤中的芽胞杆菌属和硝化螺旋菌属相对丰度显著增加。芽胞杆菌属是促进植物生长的根际细菌之一，其可增强植物对非生物胁迫和植物病害的抵抗力（Chaparro et al.，2012）。芽胞杆菌属中的枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* 和地衣芽胞杆菌 *B. lincheniformis* 可以抑制植物致病真菌灰霉菌 *Botrytis cinerea* 的发育，并对植物生长和发育有一定的促进作用（Shternshis et al.，2015）。本研究从水稻根际土壤中成功分离到巨大芽胞杆菌 *B. megaterium*、解淀粉芽胞杆菌、蜡质芽胞杆菌 *B. cereus*、枯草芽胞杆菌及苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*，这5种芽胞杆菌能否抑制水稻纹枯病菌菌核的萌发或菌丝的生长还有待进一步探讨。秸秆中含有一定量的有机质，旋耕后进入土壤，提高了稻田土壤的有机质含量，有机质是土壤微生物活动的主要能量来源，可以促进微生物氨化和硝化作用（卜元卿和黄为一，2015）；硝化螺旋菌属参与土壤硝化反应，促进土壤氮循环（Camejo et al.，2017），因此秸秆还田可能会增加硝化螺旋菌属丰度。

本研究结果显示，秸秆还田后水稻根际土壤的水稻纹枯病菌含量显著增加，水稻纹枯病病情指数显著高于秸秆不还田处理的。刘凤艳等（2010）和李洪林等（2012）研究结果发现，在水稻连模式下稻秆还田通常导致水稻纹枯病加重；而在稻麦轮作模式下，秸秆还田后水稻纹枯病既有加重的，也有减轻的，结论不一致，如赵永强等（2017）研究结果发现秸秆还田后土壤中水稻纹枯病菌含量增加，小麦纹枯病随秸秆还田年限增长呈逐年加重趋势，而曹启光等（2006）从水稻秸秆覆盖处理的麦田土壤中分离到对小麦纹枯病菌有拮抗作用的荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*，水稻秸秆覆盖2年后小麦纹枯病的发病率明显降低。本研究种植的水稻品种为甬优4949，该品种易感染水稻纹枯病，2017年稻秆还田，水稻纹枯病菌菌核和菌丝体也随着大量病残体进入土壤，增加了次年初侵染的数量。因此，推测稻田土壤中芽胞杆菌含量虽然增高，但不足以抑制纹枯病的发生，随着秸秆还田年限增加病害可能逐年加重；若当地种植水稻抗病品种，秸秆中带菌量不会显著增加，秸秆还田后土壤中显著增加芽胞杆菌有望抑制水稻纹枯病的发生。

本研究采用Illumina高通量测序技术对稻麦轮作模式下秸秆还田与不还田处理田块的水稻根际土壤样品进行了测序分析，在属水平上的差异分析中发现秸秆还田显著提高了芽胞杆菌属的相对丰度，但土壤理化性质等环境因子对微生物群落结构的影响以及根际土壤中分离获得的芽胞杆菌对水稻纹枯病菌的防治效果有待进一步研究。

参 考 文 献（References）

AMOO AE, ENAGBONMA BJ, BABALOLA OO. 2020. High-throughput sequencing data of soil bacterial communities from Tweefontein indigenous and commercial forests, South Africa. Data in Brief, 28: 104916

CAMEJO PY, SANTO DOMINGO J, MCMAHON KD, NOGUERA DR. 2017. Genome-enabled insights into the ecophysiology of the comammox bacterium "*Candidatus Nitrospira nitrosa*". mSystems, 2(5): e0005917

CAO QG, CHEN HG, YANG AG, ZHANG YG, LIN L, YU HS. 2006. Effects of straw mulching on population number of bacteria in wheat field and incidence of wheat sharp eye-spot. Soils, 38(4): 459−464 (in Chinese) [曹启光, 陈怀谷, 杨爱国, 张银贵, 林玲, 于汉寿. 2006. 稻秸秆覆盖对麦田细菌种群数量及小麦纹枯病发生的影响. 土壤, 38(4): 459−464]

CHAPARRO JM, SHEFLIN AM, MANTER DK, VIVANCO JM. 2012. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. Biology and Fertility of Soils, 48(5): 489−499

CHEN ZM, WANG HY, LIU XW, ZHAO XL, LU DJ, ZHOU JM, LI CZ. 2017. Changes in soil microbial community and organic carbon fractions under short-term straw return in a rice-wheat cropping system. Soil and Tillage Research, 165: 121−127

GUO LJ, CAO CG, ZHANG ZS, LIU TQ, LI CF. 2013. Short-term effects of tillage practices and wheat-straw returned to rice fields on topsoil microbial community structure and microbial diversity in central China. Journal of Agro-Environment Science, 32(8): 1577−1584 (in Chinese) [郭梨锦, 曹凑贵, 张枝盛, 刘天奇, 李成芳. 2013. 耕作方式和秸秆还田对稻田表层土壤微生物群落的短期影响. 农业环境科学学报, 32(8): 1577−1584]

GUO LJ, ZHENG SX, CAO CG, LI CF. 2016. Tillage practices and straw-returning methods affect topsoil bacterial community and

organic C under a rice-wheat cropping system in central China. Scientific Reports, 6: 33155

HE JZ, LI J, ZHENG YM. 2013. Thoughts on the microbial diversity-stability relationship in soil ecosystems. Biodiversity Science, 21 (4): 411−420 (in Chinese) [贺纪正, 李晶, 郑袁明. 2013. 土壤生态系统微生物多样性−稳定性关系的思考. 生物多样性, 21 (4): 411−420]

HE ZD, WU CC, SHEN JJ, GAO YF, CHANG LS, GAO ZG. 2018. Effects of *Trichoderma asperellum* bio-fertilizer on cucumber *Fusarium* wilt and microbial population in continuous cucumber cropping rhizosphere soil. Journal of Plant Protection, 45(3): 528−535 (in Chinese) [贺字典, 武春成, 沈江洁, 高玉峰, 常连生, 高增贵. 2018. 棘孢木霉菌肥对黄瓜枯萎病的防治效果及对连作黄瓜根际土壤微生物种群的影响. 植物保护学报, 45 (3): 528−535]

LI HL, LIU FY, GONG ZP, JIN XH, HUANG SW. 2012. Effect of straw return back to paddy field on occurrence of rice major diseases. Crop Research, 26(1): 7−10 (in Chinese) [李洪林, 刘凤艳, 龚振平, 靳学慧, 黄世文. 2012. 稻秆还田对水稻主要病害发生的影响. 作物研究, 26(1): 7−10]

LIU FY, GONG ZP, MA XS, JIA NJ. 2010. Effect of rice stalks back to field on the occurrence of disease. Heilongjiang Agricultural Sciences, (8): 75−78 (in Chinese) [刘凤艳, 龚振平, 马先树, 贾乃九. 2010. 秸秆还田对水稻病虫害发生的影响. 黑龙江农业科学, (8): 75−78]

NAVARRO-NOYA YE, GÓMEZ-ACATA S, MONTOYA-CIRIACO N, ROJAS-VALDEZ A, SUÁREZ-ARRIAGA MC, VALENZUELA-ENCINAS C, JIMÉNEZ-BUENO N, VERHULST N, GOVAERTS B, DENDOOVEN L. 2013. Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 65: 86−95

PU YQ, HUANG WY. 2005. Effect of rice straw on molecular phylogenetic diversify of soil bacterial communities. Acta Pedologica Sinica, 42(2): 271−277 (in Chinese) [卜元卿, 黄为一. 2005. 稻秸对土壤细菌群落分子多态性的影响. 土壤学报, 42(2): 271−277]

SAYLER RJ, YANG YN. 2007. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. Plant Disease, 91(12): 1663−1668

SHI ZL, JING Q, CAI J, JIANG D, CAO WX, DAI TB. 2012. The fates of ^{15}N fertilizer in relation to root distributions of winter wheat under different N splits. European Journal of Agronomy, 40: 86−93

SHTERNSHIS MV, BELYAEV AA, SHPATOVA TV, LELYAK AA. 2015. Influence of *Bacillus* spp. on strawberry gray-mold causing agent and host plant resistance to disease. Contemporary Problems of Ecology, 8(3): 390−396

SU Y, LÜ JL, YU M, MA ZH, XI H, KOU CL, HE ZC, SHEN AL. 2019. Long-term decomposed straw return positively affects the soil microbial community. Journal of Applied Microbiology, 128 (1): 138−150

TARDY V, CHABBI A, CHARRIER X, BERRANGER CD, REIGNIER T, DEQUIEDT S, FAIVRE-PRIMOT C, TERRAT S, RANJARD L, MARON PA. 2015. Land use history shifts *in situ* fungal and bacterial successions following wheat straw input into the soil. PLoS ONE, 10(6): e0130672

WANG L, HUANG GQ, SUN DP, WANG SB. 2018. Crop yield and soil nutrients under paddy-upland multiple cropping rotation systems. Chinese Journal of Ecology, 37(11): 3284−3290 (in Chinese) [王兰, 黄国勤, 孙丹平, 王淑彬. 2018. 稻田水旱复种轮作对作物产量及土壤养分的影响. 生态学杂志, 37(11): 3284−3290]

WANG N, YU JG, CHANG ZZ, HUANG HY, GU KJ, ZHANG ZH. 2017. Responses of fungal community diversity and composition in paddy soils to straw return. Soils, 49(6): 1115−1120 (in Chinese) [王宁, 于建光, 常志州, 黄红英, 顾克军, 张振华. 2017. 稻田土壤真菌群落多样性和组成对麦秸还田的响应. 土壤, 49(6): 1115−1120]

WANG RQ, XIAO YP, LÜ FJ, HU LY, WEI LG, YUAN ZQ, LIN HX. 2018. Bacterial community structure and functional potential of rhizosphere soils as influenced by nitrogen addition and bacterial wilt disease under continuous sesame cropping. Applied Soil Ecology, 125: 117−127

WANG Y. 2016. The effects of straw residue incorporation on fungal communities in lime concretion black soil. Mater Thesis. Hefei: Anhui Agricultural University (in Chinese) [王妍. 2016. 不同秸秆还田方式对砂姜黑土真菌群落的影响. 硕士学位论文. 合肥: 安徽农业大学]

YANG HS, FENG JX, ZHAI SL, DAI YJ, XU MM, WU JS, SHEN MX, BIAN XM, KOIDE RT, LIU J. 2016. Long-term ditch-buried straw return alters soil water potential, temperature, and microbial communities in a rice-wheat rotation system. Soil and Tillage Research, 163: 21−31

YUAN X, MA KM, WANG D. 2011. Explaining the abundance-distribution relationship of plant species with niche breadth and position in the Yellow River Delta. Acta Ecologica Sinica, 31(7): 1955−1961 (in Chinese) [袁秀, 马克明, 王德. 2011. 黄河三角洲植物生态位和生态幅对物种分布−多度关系的解释. 生态学报, 31(7): 1955−1961]

ZHANG L, XU HM, ZHU BL. 2016. Association of rhizosphere soil microbiome with the occurrence and development of replant disease: a review. Acta Microbiologica Sinica, 56(8): 1234−1241

ZHAO YQ, XU Z, ZHANG CL, YANG DJ, SUN HJ, XIE YP. 2017. Effects of total wheat and rice straw return on occurrence of wheat sharp eyespot. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 30(5): 1063−1067 (in Chinese) [赵永强, 徐振, 张成玲, 杨冬静, 孙厚俊, 谢逸萍. 2017. 稻麦秸秆全量还田对小麦纹枯病发生的影响. 西南农业学报, 30(5): 1063−1067]

（责任编辑：张俊芳）