

文章编号: 1000-0615(2018)05-0720-13

DOI: 10.11964/jfc.20170310730

养殖鳖的引入对稻田土壤细菌群落结构的影响

罗衡¹, 赵良杰², 李丰¹, 郭海松¹, 沈竑³, 刘其根^{1*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 信阳农林学院河南省渔业生物工程技術研究中心, 河南 信阳 464000;

3. 上海市沐雨生态农庄, 上海 202150)

摘要: 农业—水产复合生产体系(integrated agri-aquaculture system, IAAS)因其具有良好的生态环境效应及能生产满足市场对食品安全需求的绿色稻米而成为了农业可持续发展的主要方向之一。了解这种农水复合系统中土壤细菌群落结构特征对于种养工艺的改进和生态调控的实现具有重要意义。实验采用高通量测序技术比较稻鳖共作(R-T)和稻田单作(R-M)2种模式下稻田表层和根系土壤微生物的群落结构,旨在为稻鳖种养生态学积累资料和为稻鳖综合种养的生产技术优化提供理论依据。高通量测序结果显示,两种模式下稻田表层及根系土壤中主要细菌门类为变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、硝化螺旋菌门和绿弯菌门。与R-M相比,R-T表层土壤中绿弯菌门、硝化螺旋菌门和酸杆菌门的相对丰度增加,变形菌门和拟杆菌门的相对丰度减少;而其根系土壤硝化螺旋菌门、拟杆菌门和变形菌门的相对丰度增加,绿弯菌门和酸杆菌门的相对丰度减少。主要优势菌属为酸杆菌属、亚硝化单胞菌属、硝化螺旋菌属、地杆菌属、芽单胞菌属、黄单胞菌属6类。其中亚硝化单胞菌属、硝化螺旋菌属、芽单胞菌属和酸杆菌属在两种模式的表层土壤中的相对丰度存在显著差异;硝化螺旋菌属和地杆菌属在根系土壤中的相对丰度存在显著差异。引入养殖鳖(R-T)后,稻田根系和表层土壤的细菌Chao指数及Shannon指数均增加。PCA以及聚类分析结果显示,养殖鳖引入后,稻田表层土壤的细菌群落结构产生明显变化,同时也在一定程度上对水稻根系的菌群产生了影响。研究初步揭示了稻鳖共作复合生态系统优于稻田单作系统的微生物生态基础。

关键词: 稻鳖共作; 稻田土壤; 群落结构; 16S rDNA; 高通量测序

中图分类号: S 966.5

文献标志码: A

土壤微生物是土壤中的重要组成部分,其对于土壤的养分循环、有机质分解、土壤结构变化起着重要的作用^[1]。土壤微生物群落结构以及数量也受到包括土壤理化性质、土壤类型以及田间管理方式等的影响^[2-3]。土壤微生物数量庞大、种类繁多。传统的培养法仅能培养不足1%的土壤微生物^[4],难以反映土壤微生物群落的丰度及其作用机制。近年来,随着分子生物学技术,尤其是高通量测序技术在环境微生物领域研究中的不断应用与发展,为研究揭示环

境样品中微生物种群结构和组分分析提供了一种高效可靠的技术^[5-6]。同时由于细菌16S rDNA具有多个保守片段,因而可被广泛应用于土壤以及环境样品的细菌多样性研究中^[7]。

在现代农业生产中化肥和农药是两个最重要的投入品。长期的农药和化肥使用,不仅增加了农业生产的成本,同时还引起土壤肥力下降、药残及环境污染等一系列问题^[8-9],从而危及农业的可持续发展。21世纪以来,由于稻田种养复合生态系统的良好生态环境效应及市场对

收稿日期: 2017-03-02 修回日期: 2017-04-23

资助项目: 公益性行业(农业)专项(201203083); 上海市高校知识服务平台项目(ZF1206)

通信作者: 刘其根, E-mail: qgliu@shou.edu.cn

绿色安全稻米的需求, 其应用范围不断扩大。国内外研究也表明, 稻田种养模式将是促进农业持续发展、保证粮食安全的有效途径^[10]。当前对稻田养殖模式的生态学机理和环境效益研究, 主要集中在病、虫、草害的控制、土壤理化性质及温室气体的排放等方面^[11-12]。然而有关稻田养殖系统中的土壤微生物数量及多样性、对稻田土壤中细菌功能基因的多样性及其功能的研究还较少, 仅见甘德欣等^[13]对稻田养鸭后土壤微生物数量的研究。该研究发现, 稻田养鸭之后土壤微生物的数量增加。

在稻渔复合生态系统中, 养殖生物引入后, 由于其爬行扰动、摄食和排泄等活动, 稻田表层生态系统的物质循环和能量流动产生相应的影响^[14], 这种影响可能会轻而易举地体现在表层土壤的菌群上; 同时由于稻田是一个完整的生态系统, 养殖动物在表层土壤的活动和生存, 会从食物网、能量流动和物质循环等多方面对根系土壤的生态系统结构和功能产生影响, 因此也可能间接影响到根系土壤的菌群, 而根系土壤菌群与水稻的生长关系可能更密切。然而目前国内针对稻渔共生系统中养殖生物对微生物影响的研究鲜见。本实验拟采用高通量测序技术对稻鳖共作(R-T)与稻田单作(R-M)两种模式下表层以及根系土壤细菌(16S rDNA)多样性特征进行比较, 探讨不同种养模式对水稻表层和根系土壤微生物群落结构以及组成的影响, 以期揭示土壤微生物群落结构、多样性特征与稻田种养之间的内在联系。

1 材料与方法

1.1 实验设计以及地点

养殖场位于上海崇明岛(31°27'00"~31°51'15" N, 121°09'30"~121°54'00"E), 地处长江口, 属于典型的亚热带季风气候区, 日照时数 2104 h, 年平均气温 15.2 °C, 年平均降雨量 1030 mm, 年平均降雨 118 d, 主要集中在 4—9 月。实验前土壤 pH 为 8.11~8.22, 有机质为 17.57~20.48 g/kg, 全 N 为 2.14~2.72 g/kg, 速效 P 为 7.07~8.87 mg/kg, 速效 K 为 80.40~88.31 mg/kg。

实验采用随机大田块设计, 设置稻鳖共作组(R-T)和稻田单作组(R-M)共 2 个处理, 每个处理各 3 个重复, 共 6 块稻田, 每块稻田总面积为

1000 m², 且田块之间田埂有围隔, 围隔高 0.5 m 且深入土壤 30.0 cm。其中稻鳖共作组(R-T)的种植面积为 773 m², 养殖环沟的面积为 267 m², 外围养殖环沟宽 2.0 m, 中间种水稻, 环沟上宽 2.0 m, 底宽 1.5 m, 深 0.5 m, 除种植水稻外, 每块稻田还在水稻移栽后 20 d 投入 150 只 500 g 左右的中华鳖(*Trionyx sinensis*)。整个水稻生长期间不施用农药且灌溉水位始终保持在 5.0~10.0 cm。

水稻于 6 月 9 日进行移植, 栽培水稻品种为‘南粳 46’, 株间距为 30 cm×20 cm, 株距为南北走向, 10 月 25 日进行水稻收割。实验所施肥料为复合肥(N:P:K=24%:8%:10%), 施用量为 487.5 kg/ha, 各稻田施肥均分 2 次完成, 第一次为水稻种植前, 施用量为 412.5 g/ha 作为基肥; 第二次为水稻移栽后 39 d 的分蘖期施用 75 g/ha。稻田单作组(R-M)田块施用化肥为 48.75 kg; 稻鳖共作(R-T)田块除施用 35.75 kg 复合肥外, 还每天按鳖重的 5%~8% 进行饵料投喂, 各养殖田块共投喂冷冻野杂鱼 200 kg。

1.2 土壤样品采集与处理

2015—2016 年进行 2 年的定位实验, 每年水稻收获后稻茬翻入土中, 养殖沟渠进行清塘处理, 且下一年按前一年小区排列进行种植。土壤样品的采集于 2016 年 9 月 2 日进行(水稻抽穗期)。每块稻田随机 5 个点各取 1 株水稻, 整株挖起后, 取深度为 10.0~20.0 cm 的根系周围土壤(根系土壤), 5 株水稻根系取得的土壤混合为 1 个样品, 样品编号分别为 RRT1、RRT2、RRT3、RRM1、RRM2 和 RRM3, 其中 RRT 为稻鳖共作模式的根系土壤, 而 RRM 为稻田单作模式的根系土壤样品; 同时于每块稻田随机选 5 个点采集土层深度约为 0~5.0 cm 的土壤(表层土壤), 将 5 点采集的土壤混合为 1 个样品, 样品编号分别为 RT1、RT2、RT3、RM1、RM2、RM3, 其中 RT 为稻鳖共作模式的表层土壤, 而 RM 为稻田单作模式的表层土壤。鲜土于实验室内去除动植物残体、杂草和石块杂质后混匀装入 50 mL 离心管后 -20 °C 冷冻保存, 用于微生物多样性分析。同时采用 5 点取样法(专用的稻田土采样器)取 0~15.0 cm 土壤并混匀, 进行土壤理化性状测定。

1.3 土壤理化性质测定

土壤理化性质的测定采用 Bao^[15]的方法。土

壤pH值测定采用酸碱度玻璃电极法(土水比1:2.5),有机质测定方法为重铬酸钾容量法,速效磷测定采用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法,速效钾测定采用乙酸铵—火焰光度法,土壤全氮采用重铬酸钾—硫酸消化法,土壤 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N含量用2 mol/L KCl浸提土壤分析仪测定。

1.4 土壤总DNA提取

称取0.5 g于-20 °C保存的土壤样品,采用OMEGA公司生产的E.Z.N.A Soil DNA试剂盒进行土壤微生物总DNA的提取并用1%琼脂糖凝胶电泳检测后,于-20 °C冰箱保存待用。

1.5 PCR扩增及高通量测序

运用通用引物对515F (5'-GTGCCAGCMGC-CGCGG-3')和907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRA GTTT-3')对16S *rRNA*基因高变区V3~V4进行扩增^[7],每个样品3次重复,之后使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产物,Tris_HCl洗脱;2%琼脂糖电泳检测。参照电泳初步定量结果,将PCR产物用QuantiFluor™_ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量,之后对各样品浓度进行标准化,混合后进行测序。文库构建使用Illumina公司TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit (FC-121-3001/3002),测序平

台为Illumina公司MiSeq PE300平台。

1.6 数据分析

焦磷酸高通量测序后,运用软件Trimomatic和FLASH对reads的质量进行质控过滤,在去除低质量碱基及接头污染序列等操作过程后完成数据过滤,得到可供后续分析的高质量目标序列。后续的生物信息学操作使用Usearch和mothur软件完成^[16],比对数据来源为Silva^[17]的细菌和古菌核糖体数据库,数据统计和作图使用R^[18]完成。2种模式下稻田土壤理化性质数据、微生物多样性指标数据及主要菌属的相对丰度的差异运用SPSS 16.0软件进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 2种模式下稻田土壤理化性质

对两种模式下稻田土壤的理化性质进行了测定,比较发现,不同种养模式下稻田土壤理化性质变化较大(表1)。与水稻单作组相比,稻鳖共作组土壤的有机质、速效磷和速效钾含量都有一定的提高,pH值下降,但两组差异不显著($P > 0.05$),而稻鳖共作组土壤中的全氮、硝态

表1 2种模式下稻田土壤理化性质

Tab. 1 The soil properties of paddy field in two models

| 处理组 treatment | pH | 有机质/(g/kg) soil organic carbon | 全氮(g/kg) total nitrogen | 速效P/(mg/kg) available P | 速效K/(mg/kg) available K | 氨态氮/(mg/kg) NH_4^+ -N | 硝态氮/(mg/kg) NO_3^- -N |
|------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| R-T | 7.87±0.05 ^a | 19.10±1.44 ^a | 2.67±0.05 ^a | 10.11±1.79 ^a | 94.44±12.53 ^a | 30.79±1.92 ^a | 0.73±0.06 ^a |
| R-M | 8.09±0.03 ^a | 18.53±0.48 ^a | 2.57±0.05 ^b | 8.31±0.54 ^a | 89.67±1.18 ^a | 26.94±1.92 ^b | 0.83±0.05 ^b |

注:相同字母代表处理间不存在显著差异($P > 0.05$),不同字母代表处理间存在显著差异($P < 0.05$)

Notes: The same letters mean no significant differences ($P > 0.05$), while different letters mean that there are statistically significant differences ($P < 0.05$) between groups

氮和氨态氮含量均显著升高($P < 0.05$)。

2.2 高通量测序情况概述以及多样性分析

稻鳖共作的根系(RRT)及表层(RT)和稻田单作的根系(RRM)及表层(RM)高通量测序所获得的平均总序列数分别为70 384.33±1848.63、70 167.67±4432.42、61 342.33±2636.83、68 536.67±3990.81,序列长度在417.74~420.63(表2)。去除引物、模糊碱基和带有嵌合体的序列后,将序列长度控制在401~450,最终得到的总有效序列数是716 922条,平均片段长度420 bp。在97%相似度的

OTU划分水平下,其测序覆盖度达到了97%左右,反映出本次测序结果是足够代表了样本中微生物的真实情况。同时为保证所用样品的测序深度相同,我们从每个样品中选出51 792个(即所有样品中有效序列数最少的一个)有效序列进行标准化处理,用于下一步数据分析。

2种种养模式下的水稻根系和表层土壤生物多样性分析结果显示,稻鳖共作的表层土壤组(RT)的微生物Chao指数及Shannon指数均为最高,其次为稻田单作的表层土壤组(RM),然后

表 2 2种模式下稻田根系及表层土壤高通量测序结果概述

| 处理组 treatments | 总序列数 total reads | 高质量序列数 high quality reads | 覆盖率/% coverage | 序列长度/bp reads average size |
|-------------------|---------------------|------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| RRT | 70 384.33±1848.63 | 62 976.67±2186.45 | 98.02±0.08 | 419.22±1.40 |
| RRM | 70 167.67±4432.42 | 61 894.00±4461.07 | 98.13±0.31 | 420.24±0.46 |
| RM | 61 342.33±2636.83 | 53 310.00±1887.93 | 97.52±0.13 | 420.43±0.17 |
| RT | 68 536.67±3990.81 | 60 793.33±3566.24 | 97.75±0.21 | 419.18±0.71 |

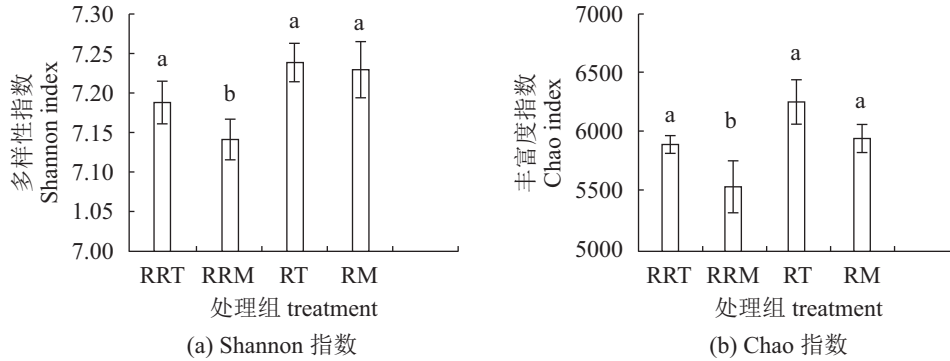


图 1 2种模式下表层及根系土壤的微生物多样性

图中不同字母代表着处理组间存在显著差异(P<0.05)。RRT. 稻蟹共生根系土壤组; RRM. 稻田单作根系土壤组; RT. 稻蟹共生表层土壤组; RM. 稻田单作表层土壤组

Fig. 1 Diversity index of rhizosphere and surface soils in paddy field in two models

The different letters in the figure represent significant differences between treatment groups (P<0.05). RRT. rhizosphere soils of R-T group; RRM. rhizosphere soils of R-M group; RT. surface soils of R-T group; RM. surface soils of R-M group

为稻蟹共作的根系土壤组(RRT), 而稻田单作的根系土壤组(RRM)为最低; 无论是Chao指数还是Shannon指数, 稻田单作模式的根系土壤组(RRM)均显著(P<0.05)低于其他3个处理组(图2), 说明养殖蟹的引入能增加稻田土壤微生物的多样性与丰富度, 且对根系土壤的影响更加明显。

在97%的相似性下得到的 8247 个OTU中有 3682 个OTU为4个处理组共用OTU, 占总OTU的 44.6%, 说明微生物种类的分布在各处理之间较集中(图2)。两两共享的OTU中, 稻蟹共生模式中的根系(RRT)与表层(RT)土壤共享数量最多, 有1506个占总OTU的18.2%, 最低的为稻田单作的表层(RM)与根系(RRM)土壤, 只有651个占总OTU的7.9%。这说明, 引入养殖蟹后, 能加强稻田表层及根系土壤之间的菌群交流。

2.3 不同种养模式的根系和表层土壤的细菌群落结构分析

在本次测序中, 得到的所有序列均为细菌序列, 其中只有6.78%的序列在门(Phyla)分类级别上没有被归类。在微生物组成上, 2种模式下

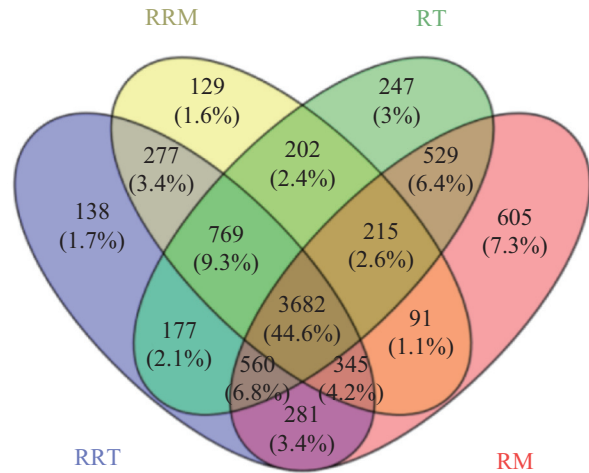


图 2 2种模式下水稻根系和表层土壤OTU Venn图

RRT. 稻蟹共生根系土壤组; RRM. 稻田单作根系土壤组; RT. 稻蟹共生表层土壤组; RM. 稻田单作表层土壤组

Fig. 2 The statistical result of OTU of samples RRT, RRM, RT and RM

RRT. rhizosphere soils of R-T group; RRM. rhizosphere soils of R-M group; RT. surface soils of R-T group; RM. surface soils of R-M group

水稻根系及表层土壤所含的优势门(相对丰度大于5%)是相似的, 它们分别是变形菌门(Proteo-

bacteria), 酸杆菌门(Acidobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 硝化螺旋菌门(Nitrospirae), 绿弯菌门(Chloroflexi), 其共占总序列数的71.07%~76.72%(图3)。变形菌门(Proteobacteria)为所有样品中相对丰度最高的门, 其具有2416个OTU, 平均相对丰度为41.74%[最高达到了42.86%±5.32%(RT), 最低为40.87%±3.78%(RRM)]和以前的研究相比, 本研究中使用高通量测序在水稻土壤当中得到的变形菌门(Proteobacteria)相对丰度更高^[19-21]。

对样品中的5个主要菌门的16S rRNA的序列相对丰度进行对比可以看到, 各类群在不同样品中的相对丰度存在较大差异。引入养殖蟹后, 稻田表层土壤的绿弯菌门(Chloroflexi)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)和酸杆菌门(Acidobacteria)的相对丰度都得到提升, 尤其是酸杆菌门(Acidobacteria)其相对丰度显著($P<0.05$)高于未放蟹组, 同时变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的相对丰度则减少了; 从根系土壤上看, 引入养殖蟹后硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)

的相对丰度得到了提升, 其中硝化螺旋菌门(Nitrospirae)的相对丰度显著($P<0.05$)高于未放蟹组, 而绿弯菌门(Chloroflexi)和酸杆菌门(Acidobacteria)的相对丰度则减少, 其中绿弯菌门(Chloroflexi)显著($P<0.05$)低于未放蟹组。

2.4 优势属分析

在属的分类级别上, 样品中有很一部分的序列没有被归类(40.89%~43.78%), 同时与其他的高通量测序结果一样, 本次测序当中出现了很多特殊的菌属(比如菌属后面带有uncultured), Albertsen等^[22]推测这一类无法人工培养的菌属可能包含有土壤当中对土壤的理化性状以及水稻生长过程具有重大作用的细菌。在属水平上得到的587个分类单元的细菌当中, 有541个分类单元共存于4个处理组当中, 它们所包含的序列占有整个序列的比例为97.97%, 仅仅只有很小一部分的序列(0.01%)为单独某一处理组中所有(表3)。对每一类样品中含量占前55的微生物种群进行含量排序(图4)。

酸杆菌属(*Acidobacteria bacterium_uncultured*)

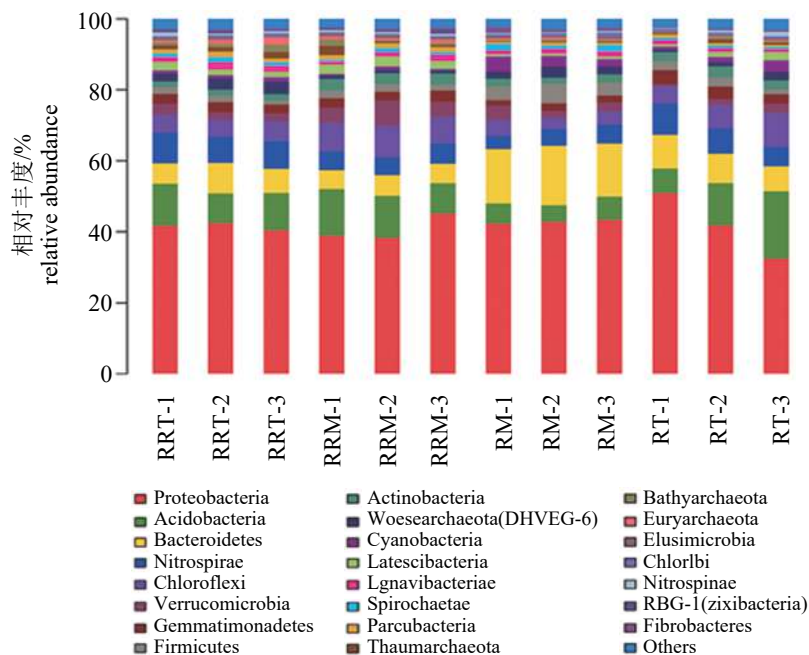


图3 2种模式下稻田根系和表层土壤门水平的微生物组成丰度图

分析过程中将相对丰度低于1%的归于“其他”组内。RRT. 稻蟹共生根系土壤组; RRM. 稻田单作根系土壤组; RT. 稻蟹共作表层土壤组; RM. 稻田单作表层土壤组

Fig. 3 Percentages of the major phyla of rhizosphere and surface soils in paddy field in two models

Sequences whose relative abundance was lower than 1% were assigned as “others”. RRT. rhizosphere soils of R-T group; RRM. rhizosphere soils of R-M group; RT. surface soils of R-T group; RM. surface soils of R-M group

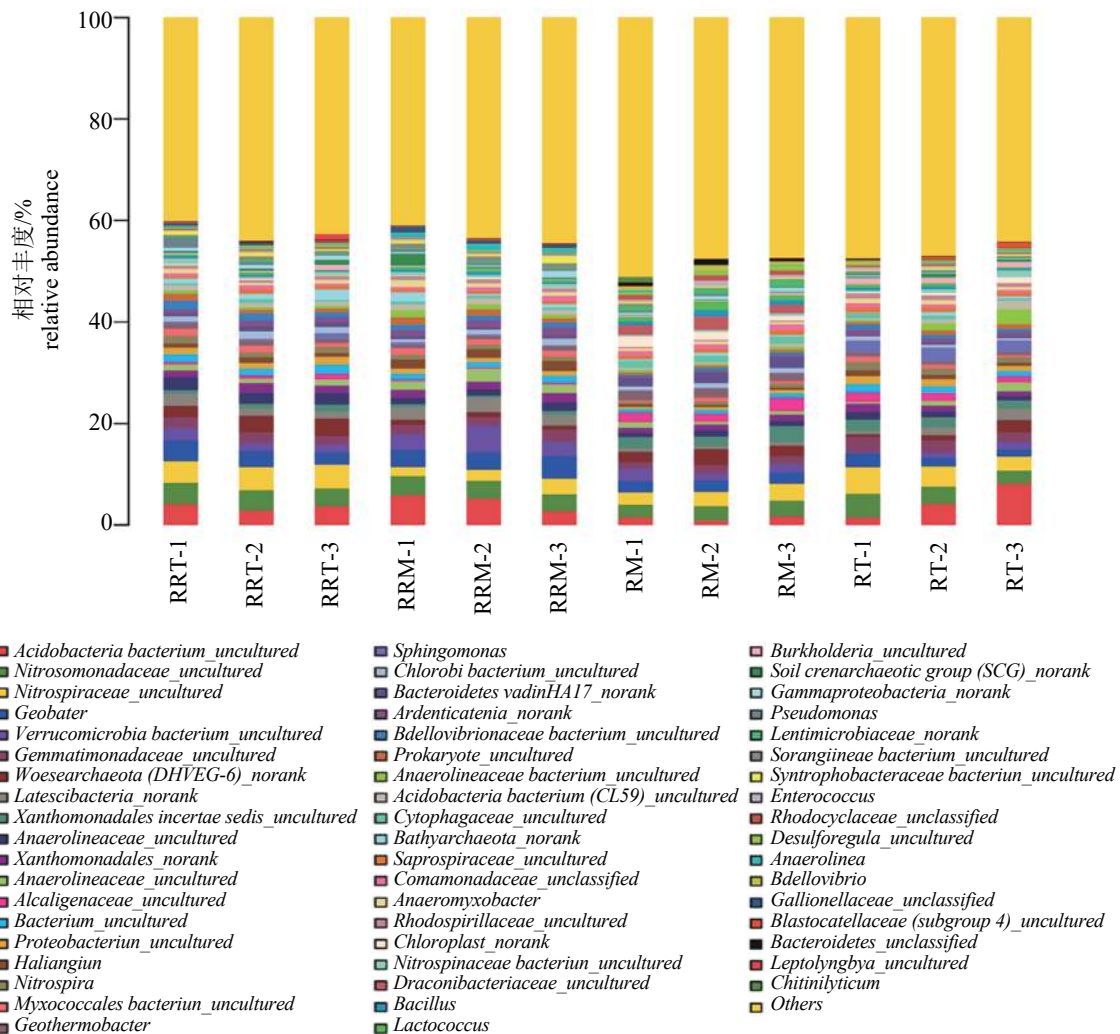
表 3 2种模式下水稻根系及表层土壤微生物共有属和它们所对应的序列的百分比

Tab. 3 The percentages of rhizosphere and surface soils common genera and their corresponding sequences in two models

| 处理 treatments | 属数量 numbers of genera | 共有属百分比/% percentage in genera | 共有属所占序列百分比/% percentage in sequences |
|---------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| RRT | 550 | 93.7 | 99.98 |
| RRM | 541 | 92.2 | 99.97 |
| RT | 587 | 100 | 100 |
| RM | 573 | 97.6 | 99.99 |

为土壤当中平均相对丰度最高的属, 在OTU分类当中, 共有541个OTU被归于该属, 其在RRT、RRM、RT和RM组的相对丰度分别为3.54%±0.64%、4.54%±1.65%、4.56%±2.21%和1.34%±0.41%。可以看到引入养殖鳖后, 该菌在稻鳖共作组的表层土壤(RT)的相对丰度显著高于未养殖组(RM)($P < 0.05$), 而在根系土壤当中相对丰度则相差不大。

亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonadaceae uncultured*)与硝化螺旋菌属(*Nitrospiraceae uncultured*)为土壤当中常见硝化菌群^[23], 同样的在本研究中, 这两类菌群同样也是所有样品当中具有较高



相对丰度的菌属，其平均相对丰度分别达到了 $3.46\% \pm 0.65\%$ 和 $3.44\% \pm 1.09\%$ 。与不养鳖组相比，无论在表层还是根系土壤中，稻鳖共作模式中这2类菌的丰度都高于前者，且硝化螺旋菌属(*Nitrospiraceae_uncultured*)和亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonadaceae_uncultured*)在表层土壤当中差异显著($P < 0.05$)，而硝化螺旋菌属(*Nitrospiraceae_uncultured*)则在根系土壤当中差异显著($P < 0.05$)。

地杆菌属(*Geobacter*)为4组处理当中另一类优势种属，是一类具有将S元素以及硫酸盐氧化成硫酸的兼性厌氧性微生物^[24]。在本次研究中，共有23个OTU被检索为该属，与不养鳖组相比，稻鳖共作组无论在表层还是根系土壤中的相对丰度都少于稻田单作组，同时根系土壤当中稻鳖共作组的相对丰度显著($P < 0.05$)的低于稻田单作组。同时该属在两种模式下的根系土壤的相对丰度均显著($P < 0.05$)高于表层土壤。

除了上述4类外，芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)和黄单胞菌属(*Xanthomonadales_norank*)在稻田土壤当中也都具有较高的相对丰度(在4个处理组中的平均相对丰度均大于1%)。从表层土壤看，稻鳖共作模式土壤当中的芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)和黄单胞菌属(*Xanthomonadales_norank*)高于稻田单作模式，且芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)在2种模式之间存在显著差异($P < 0.05$)。从根系土壤上看，与不养鳖稻田组相比，稻鳖共作组根系土壤当中芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)的平均相对丰度较高于稻田单作组，而黄单胞菌属(*Xanthomonadales_norank*)的平均相对丰度则低于后者。

为了解这6类主要菌属与稻田当中土壤理化性质的变化的关系，运用典范对应分析(CCA)对这6类主要菌属与土壤环境因子进行分析，结果表明前2个排序轴的特征值分别为0.016和0.008。AP(0.466)、pH(-0.273)、TN(0.462)、 NH_4^+-N (0.480)主要贡献于第一排序轴，OM(-0.269)和 NO_3^--N (0.479)主要贡献于第二排序轴，前2轴中物种与环境关系的累积百分比为23.80%(图5)。图中亚硝化单胞菌属(S2)、地杆菌属(S4)与黄单胞菌属(S6)与 NH_4^+-N 、N、AK、AP和OM呈负相关，与 NO_3^--N 呈正相关；硝化螺旋菌属(S3)与 NO_3^--N 负相关、与OM正相关；芽单胞菌属(S5)与pH呈正相关；酸杆菌属(S1)与pH呈负相关。

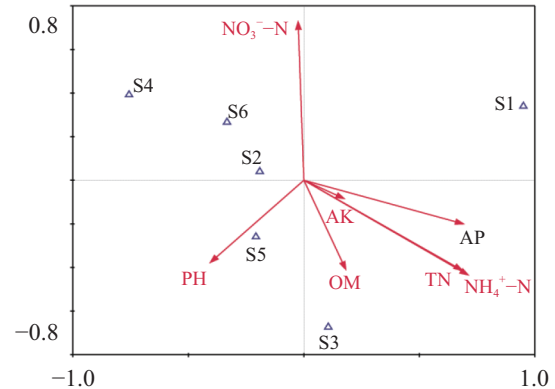


图5 6种主要菌属与土壤环境因子的CCA排序图

S1. 酸杆菌属; S2. 亚硝化单胞菌属; S3. 硝化螺旋菌属; S4. 地杆菌属; S5. 芽单胞菌属; S6. 黄单胞菌属

Fig. 5 CCA ordination biplot of six major genera and soil environmental factors

S1. *Acidobacteria bacterium_uncultured*; S2. *Nitrosomonadaceae_uncultured*; S3. *Nitrospiraceae_uncultured*; S4. *Geobacter*; S5. *Gemmatimonadaceae_uncultured*; S6. *Xanthomonadales_uncultured*

2.5 基于细菌群落的相似性分析

对2种模式下的表层和根系土壤的微生物群落进行聚类分析可看出相同处理下的3个重复组的样品菌群聚集在一起，表明样品具有很好的重复性(图6-a)。同时稻鳖共作模式根系土壤(RRT)以及稻田单作模式中的根系土壤(RRM)菌群群落聚集在一个分支，而2种模式下的表层土壤则较根系土壤相距较远。对4组处理下样品的细菌群落结构进行PCA分析，2种模式的根系土壤菌群群落聚集在一起，而表层土壤的菌群群落则相隔较远的(图6-b)。结合聚类结果，表明稻田引入养殖鳖后，相对于稻田根系土壤菌群，稻田的表层土壤的菌群结构和组成的差异更加的明显。

3 讨论

稻渔综合种养依据的最重要生态学原理之一是稻—渔之间的共生性。在稻—渔共生关系中，最引人关注的自然是水产动物为水稻除虫、除草等直接作用，相比之下，水产动物引入后对稻渔共生系统中微生物群落的影响等间接作用，尚未引起足够的重视。本研究表明，在稻鳖共生系统中，由于鳖的残饵和粪便及鳖的排泄作用，使得稻鳖共作稻田中土壤的TN、

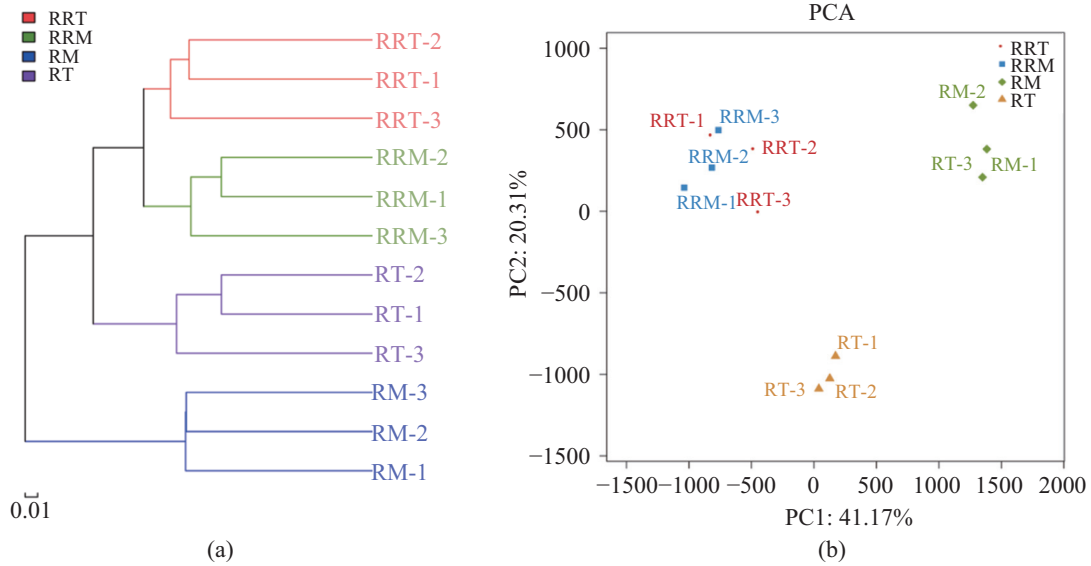


图 6 基于OTU水平下12个不同土壤细菌群落的聚类分析树(a)以及主成分(PCA)分析图(b)

RRT. 稻鳖共生根系土壤组; RRM. 稻田单作根系土壤组; RT. 稻鳖共生表层土壤组; RM. 稻田单作表层土壤组

Fig. 6 Hierarchical Clustering (a) and Principal Component Analysis (b) of the 12 different soil bacterial community at OTU level.

RRT. rhizosphere soils of R-T group; RRM. rhizosphere soils of R-M group; RT. surface soils of R-T group; RM. surface soils of R-M group

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 均出现了显著升高, 养分的增加必然为其中微生物的生长提供了充足的养料; 同时微生物生长又与碳氮比有关, 尽管本研究没有测定其中的TN或总有机碳, 但可以肯定的是, 由于氮含量的增加, 必然会使其碳氮比下降, 从而对微生物群落组成产生影响。此外, 鳖的活动也会对土壤产生扰动, 可以改变土壤的透气性, 从而有利于改善次表层土壤的氧气条件, 这些也可能对稻鳖共生系统土壤微生物组成产生影响。

为了更好地了解稻鳖共作可能对稻田系统微生物群落组成的上述影响, 本研究采用了高通量测序技术来开展相关研究。从现有结果来看, 稻田土壤的微生物种类丰富, 在4个处理组97%的相似性下共得到8247个OTU, 在门和属的微生物分类水平, 共检测到66门1044属的微生物种群。在门的分类水平上, 各样品中均以变形菌门(Proteobacteria), 酸杆菌门(Acidobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 硝化螺旋菌门(Nitrospirae), 绿弯菌门(Chloroflexi)这5个门为主要种类。此外, 无论是在表层土壤还是根系土壤都以变形菌门(Proteobacteria)占主导地位, 这与Jangid^[25]等的研究一致。与传统的PCR-DGGE技术仅仅局限于分析相对丰度大于1%的

优势类群相比^[26], 本研究中采用的高通量测序技术能检测出土壤大量丰度较低的细菌类群^[27], 因此能相对全面地反映细菌群落组成。

稻田土壤微生物作为稻田土壤生态系统的重要组成部分, 其对外界环境的作用(养殖鳖引入)具有敏感而快速的响应^[28]。本研究发现, 种养模式的不同不仅引起了稻田土壤理化性质变化, 而且也对稻田表层和根系土壤微生物产生了明显影响。对于稻田表层土壤微生物而言, 由于水产养殖动物的引入及其摄食、排泄等活动, 有效地改善土壤物理性结构及土壤细菌的营养条件, 进而提高了土壤微生物类群的活性及土壤微生物的多样性^[29]; 根系土壤虽然与地上养殖动物等其他因素没有直接接触, 但甘欣德等^[30]对稻田养鸭的土壤理化性质研究表明, 养殖动物的引入对深层土壤的理化性质也具有相关的影响, 因而养殖动物的引入对根系土壤微生物群落也具有一定的影响。此外, 2种模式下各自的根系土壤微生物与表层土壤微生物之间也出现明显差异。这可能是由于根际效应的存在, 根系对根系周围土壤的微生物具有选择性^[31], 同时根系土壤的pH、组成结构、有机物和营养水平与非根系土壤也有差异^[32]。因此, 其微生物的组成和结构与非根系土壤微生物之间差异显

著^[33], 这与江其同等^[34]对杨树根系与非根系细菌群落的研究一致。

在主要的优势种属中, 比较2种模式下的表层土壤微生物, 具有显著差异的有4类, 分别为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonadaceae_uncultured*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospiraceae_uncultured*)、芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)和酸杆菌属(*Acidobacteria bacterium_uncultured*), 且稻鳖共作组中的相对丰度均高于稻田单作组; 在根系土壤上, 硝化螺旋菌属(*Nitrospiraceae_uncultured*)在稻鳖共作组中显著($P<0.05$)高于稻田单作组, 而地杆菌属(*Geobacter*)则在稻田单作组中的相对丰度显著高于稻鳖共作组。Martiny等^[35]认为亚硝化单胞菌和硝化螺旋菌在硝化过程中发挥重要作用, 这2类细菌较高的相对丰度表明养殖鳖的引入使稻田土壤富集了具有高效除氨功能的菌群, 有效促进了稻鳖种养过程中的氮循环, 因而在稻鳖共作组土壤中三态氮含量显著($P<0.05$)高于稻田单作组, 结合CCA分析也可以看出来这两类菌属生长受限于土壤当中的 NH_4^+-N 与 NO_3^--N 含量; 酸杆菌属(*Acidobacteria bacterium_uncultured*)在2种模式下的根系与表层土壤中都具有较高的丰度, 其在CCA分析中与pH呈负相关, 表明pH值的降低是导致该类菌生长的重要因素^[36]。引入养殖动物后, 养殖动物在田间的活动、摄食及粪便排泄, 在一定程度上起到了不间断施肥效果^[37], 使土壤有机质和氮磷钾等养分含量得到提高及pH值下降, 为酸杆菌提供了适宜的生长环境, 从而增加了其相对丰度; 芽单胞菌属(*Gemmatimonadaceae_uncultured*)是芽单胞菌门唯一正式命名的菌属, 在土壤当中的富集还鲜见研究, 并且对其功能尚未明确; 地杆菌属(*Geobacter*)是典型的异化铁还原菌, 其在缺氧或无氧条件下, 能够利用乙酸盐作为唯一碳源, 以Fe(III)作为电子受体进行厌氧呼吸^[38], 在CCA分析中, 其相对丰度与 NH_4^+-N 含量呈负相关, 与 NO_3^--N 含量呈正相关, 这可能是由于铵根离子对于乙酸根离子具有良好的结合性减少了乙酸以离子存在的形式, 而硝酸根离子能增加土壤当中乙酸离子的存在进而增加地杆菌属的碳源。

生物多样性是评价群落结构特征和稳定度的重要因素, 较高的生物多样性更能保证生态

系统的功能冗余, 从而维持生态系统的稳定^[39]。本研究结果显示, 无论是在根系土壤还是表层土壤, 稻鳖共作模式的微生物多样性均高于稻田单作模式(图1), 可推测出土壤微生物群落结构在稻鳖共作模式中较稻田单作模式稳定, 使稻鳖共作组具有更强的抗冲击能力。此外, 多样性指数在表层土壤微生物之间的差值低于根系土壤微生物间。这可能是由于表层微生物的种类多, 根系土壤的微生物种类数量较少^[40], 因此根系土壤的微生物多样性指数在数值上差异较大。

综上所述, 通过高通量测序技术可以很好地探究稻田土壤中细菌组成和群落结构状况。同时2种种养模式下稻田的表层土壤细菌群落均比根系土壤细菌群落组成更为复杂, 表层土壤细菌的种群多样性指数也高于根系土壤; 稻田引入养殖鳖后对表层土壤的细菌群落结构以及组成产生的变化更加明显, 同时稻田的表层以及根系土壤微生物的Chao指数及Shannon指数均得到提升。由于稻鳖共作组土壤中有有机物降解菌和硝化亚硝化菌丰度的提高, 促进了土壤氮循环效率, 从而保证了土壤中的有机物及无机氮污染负荷在可控范围内。本研究从微生物角度来揭示稻田引入养殖动物后, 其共作复合生态系统的土壤供肥能力和理化性状所产生的变化机制, 但这一机制缺乏长期的土壤理化性质检测指标验证。因此, 仍需进一步深入地对稻渔复合系统中土壤微生物群落进行研究, 尤其是增加长期的稻田种养模式下的土壤相关指标的变化。同时, 在野外大田块试验, 稻田表层的细菌除受到本实验设计的相关变量的影响外, 也易受到外界环境(如天气、温度等自然状况)及相关人为采样定点的随机性的影响, 因而需开展相关室内实验, 从而更好地控制误差的影响。

参考文献:

- [1] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, *et al.* Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(8): E911-E920.
- [2] 夏北成, Zhou J Z, Tiedje J M. 植被对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 1998, 9(3): 296-300.

- Xia B C, Zhou J Z, Tiedje J M. Effect of vegetation on structure of soil microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1998, 9(3): 296-300(in Chinese).
- [3] 张彩霞. 新一代高通量测序技术研究土壤微生物群落结构对环境条件的响应[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- Zhang C X. The research of microorganism composition responses to environment conditions with the next generation high throughput DNA sequencing technology[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012(in Chinese).
- [4] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(5): 899-904.
- Zhong W H, Cai Z C. Methods for studying soil microbial diversity[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(5): 899-904(in Chinese).
- [5] 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和DGGE分析土壤微生物群落的技术评价[J]. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489-1499.
- Xia W W, Jia Z J. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(12): 1489-1499(in Chinese).
- [6] 蔡艳, 郝明德, 张丽琼, 等. 应用454测序技术分析种植制度对黑垆土微生物多样性的影响[J]. *作物学报*, 2015, 41(2): 339-346.
- Cai Y, Hao M D, Zhang L Q, *et al.* Effect of cropping systems on microbial diversity in black loessial soil tested by 454 sequencing technology[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(2): 339-346(in Chinese).
- [7] Bates S T, Berg-Lyons D, Caporaso J G, *et al.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(5): 908-917.
- [8] Tilman D, Cassman K G, Matson P A, *et al.* Agricultural sustainability and intensive production practices[J]. *Nature*, 2002, 418(6898): 671-677.
- [9] Bromley D W. Food security: Beyond technology[J]. *Science*, 2010, 328(5975): 169.
- [10] Pretty J. Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008, 363(1491): 447-465.
- [11] Frei M, Razzak M A, Hossain M M, *et al.* Methane emissions and related physicochemical soil and water parameters in rice-fish systems in Bangladesh[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2007, 120(2-4): 391-398.
- [12] Frei M, Becker K. A greenhouse experiment on growth and yield effects in integrated rice-fish culture[J]. *Aquaculture*, 2005, 244(1-4): 119-128.
- [13] 甘德欣, 黄璜, 蒋廷杰. 免耕稻鸭复合系统生态学特性研究 II. 土壤生物学特性[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 31(1): 35-38.
- Gan D X, Huang H, Jiang T J. The ecological characteristics of no-tillage rice-duck complex system II. The microbe amounts and microbe biomass of soil[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2005, 31(1): 35-38(in Chinese).
- [14] 王思潮, 曹凑贵, 李成芳, 等. 耕作模式对冷浸田水稻产量和土壤特性的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(10): 1165-1173.
- Wang S C, Cao C G, Li C F, *et al.* Effects of cultivation patterns on rice yield and soil properties in cold waterlogged paddy fields[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2014, 22(10): 1165-1173(in Chinese).
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- Bao S D. *Soil and Agricultural Chemistry Analysis*[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000(in Chinese).
- [16] 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.
- [17] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [18] R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing[M]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011.
- [19] 袁红朝, 吴昊, 葛体达, 等. 长期施肥对稻田土壤细菌、古菌多样性和群落结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(6): 1807-1813.
- Yuan H Z, Wu H, Ge T D, *et al.* Effects of long-term fertilization on bacterial and archaeal diversity and community structure within subtropical red paddy soils[J].

- Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(6): 1807-1813(in Chinese).
- [20] 陈哲, 陈春兰, 秦红灵, 等. 化肥对稻田土壤细菌多样性及硝化、反硝化功能菌组成的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(11): 6142-6147.
- Chen Z, Chen C L, Qin H L, *et al.* Effect of fertilization on bacterial community, genetic diversity of *amoA* and *nosZ* genes in paddy soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(11): 6142-6147(in Chinese).
- [21] Ge Y, Zhang J B, Zhang L M, *et al.* Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(1): 43-50.
- [22] Albertsen M, Hansen L B S, Saunders A M, *et al.* A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1094-1106.
- [23] 段亮, 夏四清, 宋永会, 等. 高密度微阵列基因芯片技术在微生物分子生态学中的运用[J]. 环境科学, 2009, 30(12): 3691-3697.
- Duan L, Xia S Q, Song Y H, *et al.* Using high-density universal 16S rRNA microarray in microbial molecular ecology research[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3691-3697(in Chinese).
- [24] Ma Q, Qu Y Y, Shen W L, *et al.* Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 436-443.
- [25] Jangid K, Williams M A, Franzluebbers A J, *et al.* Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(11): 2843-2853.
- [26] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [27] Kirchman D L, Cottrell M T, Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(5): 1132-1143.
- [28] 赵翔刚, 罗衡, 刘其根, 等. 稻田养殖沙塘鳢对稻田水体及底泥微生物群落结构及多样性的影响[J]. 淡水渔业, 2017, 47(4): 8-14.
- Zhao X G, Luo H, Liu Q G, *et al.* Influence of the cultured *Odontobutis obscurus* to the microbial community structure and diversity in rice-fish system[J]. , 2017, 47(4): 8-14(in Chinese).
- [29] Wietz M, Hall M R, Høj L. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(4): 266-277.
- [30] 甘德欣, 黄璜, 黄梅, 等. 免耕稻鸭复合系统生态学特性研究 I. 土壤物理性状及养分动态变化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, 30(1): 24-28.
- Gan D X, Huang H, Huang M, *et al.* The ecological characteristics of no-tillage rice-duck complex system I. the soil physical and chemical characteristic[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2004, 30(1): 24-28(in Chinese).
- [31] Singh B K, Millard P, Whiteley A S, *et al.* Unravelling rhizosphere-microbial interactions: Opportunities and limitations[J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(8): 386-393.
- [32] Hartmann A, Schmid M, Van Tuinen D, *et al.* Plant-driven selection of microbes[J]. *Plant and Soil*, 2009, 321(1-2): 235-257.
- [33] 展茗, 曹凑贵, 汪金平, 等. 稻鸭、稻鱼复合生态系统土壤微生物多样性特征分析[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1179-1183.
- Zhan M, Cao C G, Wang J P, *et al.* Analysis of diversity of soil microbial community of the wetland rice-duck and rice-fish complex ecosystem[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(6): 1179-1183(in Chinese).
- [34] 汪其同, 朱婉芮, 刘梦玲, 等. 基于高通量测序的杨树人工林根际和非根际细菌群落结构比较[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(5): 967-973.
- Wang Q T, Zhu W R, Liu M L, *et al.* Comparison on bacterial community of rhizosphere and bulk soil of popular plantation based on pyrosequencing[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(5): 967-973(in Chinese).
- [35] Martiny A C, Albrechtsen H J, Arvin E, *et al.* Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: Detection of a large nitrite-oxidizing population as-

- sociated with *Nitrospira*. spp[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8611-8617.
- [36] Nemergut D R, Costello E K, Hamady M, *et al*. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(1): 135-144.
- [37] 王昂, 王武, 马旭洲, 等. 养蟹稻田水环境部分因子变化研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(17): 3514-3519.
Wang A, Wang W, Ma X Z, *et al*. Study on the changes of water environmental factors in rice-crab culture system[J]. Hubei Agricultural Science, 2011, 50(17): 3514-3519(in Chinese).
- [38] 由焦化, 夏淑红, 王保莉, 等. 淹水时间对水稻土中地杆菌科群落结构及丰度的影响[J]. 微生物学报, 2011, 51(6): 796-804.
You J H, Xia S H, Wang B L, *et al*. Effect of flooding time on community structure and abundance of *Geobacteraceae* in paddy soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(6): 796-804(in Chinese).
- [39] Yachi S, Loreau M. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4): 1463-1468.
- [40] Duineveld B M, Rosado A S, Van Elsas J D, *et al*. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(12): 4950-4957.

Effects of the introduction of cultured turtle on soil bacterial community structure in paddy field

LUO Heng¹, ZHAO Liangjie², LI Feng¹, GUO Haisong¹, SHEN Hong³, LIU Qigen^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resource and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Fishery Biological Engineering Technology Research Center, Henan Province, Xinyang 464000, China;

3. Shanghai Mooyuu Farm, Shanghai 202150, China)

Abstract: The integrated agri-aquaculture system (IAAS) has become one of the main directions for the sustainable development of agriculture because of its good ecological environmental effect and the ability to produce enough green rice to meet the market demand for high quality food. It is important to understand the structural characteristics of soil bacterial community in this compound system for the improvement of planting and breeding and the realization of ecological regulation. In this study, Illumina high-throughput sequencing was used to compare the surface soil and rhizosphere soil bacterial community structure among rice-turtle co-culture (R-T) and rice monoculture (R-M), and provide the theoretical basis for the accumulation of data of rice-turtle co-culture ecology and the optimization of production technology for comprehensive cultivation of rice turtle co-culture. The results showed that Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae and Chloroflexi were the main phyla in all paddy soil. Compared with R-M, the relative abundance of Chloroflexi, Nitrospirae and Acidobacteria increased and the relative abundance of Proteobacteria and Bacteroidetes was reduced in the surface soil of the R-T. In rhizosphere soil, compared with R-M, the relative abundance of Nitrospirae, Bacteroidetes and Proteobacter increased, and the relative abundance of Chloroflexi and Acidobacteria reduced in R-T treatments. The main genera were Acidobacteria bacterium_uncultured, Nitrosomonadaceae_uncultured, Nitrospiraceae_uncultured, Geobacter, Gemmatimonadaceae_uncultured and Xanthomonadales_norank. In the two models, the relative abundance of Nitrospiraceae_uncultured and Geobacter in rhizosphere soil was significantly different ($P < 0.05$), and the relative abundance of *Nitrosomonadaceae_uncultured*, *Nitrospiraceae_uncultured*, *Gemmatimonadaceae_uncultured* and *Acidobacteria bacterium_uncultured* in the surface soils was significantly different ($P < 0.05$). PCA and cluster analysis showed that R-T treatments exerted a significant effect on the bacterial community structure of surface soils, and also affected the rhizosphere soil bacterial community structure to a certain extent. Overall, this study provides microbial ecological evidences for the advantages of rice – turtle integrated system over rice monoculture.

Key words: rice-turtle co-culture; paddy field; community structure; 16S rDNA; illumina high-throughput sequencing

Corresponding author: LIU Qigen. E-mail: qgliu@shou.edu.cn

Funding projects: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest(201203083); Shanghai University Knowledge Service Platform Project (ZF1206)