



稻虾共生模式对水稻结实期根系分泌物及微生物的影响

陶先法¹, 李冰², 喻召雄³, 侯谄然², 王龙¹, 朱健^{1,2,3*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了探明稻虾共生模式中虾对水稻生长的促进作用, 实验以红螯螯虾为养殖对象, 比较了稻虾共生和水稻单作 2 种模式下结实期水稻根系分泌物(有机酸、氨基酸和酚酸)和微生物群落结构的差异。结果显示, 稻虾共生模式显著增加了结实期水稻根系苹果酸、酒石酸、马来酸、异亮氨酸、丝氨酸以及总有机酸和总氨基酸的分泌量, 分别较对照组提高了 29.07%、61.84%、10.8%、136.11%、218.54%、21.50% 和 12.69%; 对羟基苯甲酸、香豆酸及酚酸总量降低了 20.38%、25.5% 和 9.48%。在结实后期, 稻虾共生模式在门水平上显著增加了 *Methylomirabilota* 和 *Latescibacterota* 的丰度, 分别提高了 101.11% 和 48.86%; 在属的水平上, 稻虾共生模式显著提高了 *Vicinamibacterales-norank* 和 *Latescibacterota-norank* 的丰度, 分别较对照组提高了 22.96% 和 48.23%。相关性分析表明, 根系分泌的有机酸和酚酸总量皆与绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和放线菌门 (*Actinobacteriota*) 呈显著负相关, 酒石酸、异亮氨酸、丝氨酸及总有机酸与放线菌门也呈显著负相关, 酒石酸和丝氨酸与 *Vicinamibacterales-norank* 呈显著正相关。研究表明, 稻虾共生模式可以显著提高水稻根系有机酸和氨基酸的分泌量, 为 *Methylomirabilota*、*Latescibacterota*、*Latescibacterota-norank* 和 *Vicinamibacterales-norank* 微生物提供碳源, 促使其在水稻根际聚集, 加速土壤有效养分的释放, 进而提高水稻根系对养分的吸收速率, 促进水稻的高产。

关键词: 红螯螯虾; 稻虾共生; 根系分泌物; 根际微生物; 结实期

中图分类号: S 966.12

文献标志码: A

稻虾共生模式是一种将水稻与淡水虾养殖相结合的农业生产模式, 其能够有效利用养殖对象与水稻互利共生的生态优势, 减少农药、化肥的使用量, 有效降低农业点、面源污染^{[1][2]}。红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 属于节肢动物门 (*Arthropoda*) 甲壳纲 (*Crustacea*) 光壳虾属 (*Cherax*), 原产于澳大利亚北部, 1992 年才由我国湖北水产研究所引进, 目前已在广东、江苏、湖南等 23 个

省(区)形成了一定的养殖规模^[3]。何俊等^[4]研究发现, 稻田中养殖红螯螯虾可以获得更高的养殖效益。目前, 稻虾共生模式的研究主要集中在生产技术、经济效益和温室气体排放等方面^[5], 有关稻虾共生模式对水稻根系分泌物和微生物之间的相互影响关系尚缺乏深入研究。

植物根系分泌物不仅能为根际土壤微生物提供营养, 更重要的是它还能促进植物对营养元素

收稿日期: 2021-06-07 修回日期: 2021-08-09

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项课题 (2019YFD0900305); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-45)

第一作者: 陶先法 (照片), 从事稻渔综合种养的研究, E-mail: 2248824719@qq.com;
李冰, 从事健康生态养殖的相关研究, E-mail: lib@ffrc.cn

通信作者: 朱健, 从事稻渔综合种养及生态养殖的研究, E-mail: zhuj@ffrc.cn



的吸收, 以及通过改变根系分泌物的组成和含量来帮助植物更好的度过逆境^[6]。而土壤微生物是土壤最活跃的土壤肥力因子之一, 在营养元素循环、土壤肥力的形成和保持、生态环境改善等方面起着重要作用, 是衡量土壤环境质量重要的指标^[7]。植物通过光合作用固定的碳可通过根系分泌物释放到土壤中, 为土壤微生物提供丰富的营养, 而土壤微生物则可借助趋化感应, 游向富含根系分泌物的根际及根表面进行定殖与繁殖^[8]。根系分泌物的含量和种类变化可直接导致根际微生物类群数量与种类的变化, 进而对植物的生长发育产生直接影响。水稻结实期(自抽穗至成熟期)根系生理活性加强, 需吸收较多的养分与水分来满足籽粒的灌浆, 其根系代谢强弱与产量形成及养分高效利用有着密切关系。常二华等^[9]研究表明, 水培条件下, 水稻结实前中期氮胁迫降低了水稻根系有机酸及氨基酸总分泌量, 且氮累积量与根系分泌物中的有机酸和氨基酸含量呈显著正相, 由此提示根系分泌的有机酸和氨基酸含量与水稻养分吸收利用均有密切关系。

实验通过水培的方法获取水稻根系分泌物, 采取气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)和 Illumina MiSeq 高通量测序技术来研究稻虾共生模式下结实期水稻根系分泌物的含量变化和微生物群落多样性变化及其之间相互作用关系和影响途径, 以此来探究稻虾共生模式中虾扰动对水稻的生长发育产生的影响, 为优化稻虾共生养殖模式以及提升稻虾产量提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验场地概况

实验于 2020 年 5—11 月在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心靖江科研试验基地(32°08'N, 120°19'E)进行。此区域属亚热带季风气候, 全年平均气温 16~20 °C, 平均降雨量 1 078 mm。实验土壤背景值为总氮(TN) 1 340 mg/kg、总磷(TP) 71.82 mg/kg、硝态氮(NO₃⁻-N) 0.78 mg/kg、氨态氮(NH₄⁺-N) 4.78 mg/kg、亚硝态氮(NO₂⁻-N) 0.067 mg/kg。

1.2 实验材料与设计

实验水稻为本地常种品种南粳 5055, 养殖对象为红螯螯虾。本次实验共 2 块稻田, 一块为放养红螯螯虾的试验田(RSC)、另一块为水稻单作对照田(RMC)。每块稻田总面积为 5 400 m², 其

中包括在稻田的四周开挖深 1.5 m、宽 4 m 总面积约为 1 600 m² 的环沟(图 1)。水稻的移植为人工移植, 每穴种植 4~6 株, 间距为 30×40 cm。水稻在 7 月 12 日开始移植, 9 月 1 日(水稻刚进入抽穗期)向 RSC 中放入 250 kg 红螯螯虾, 规格为每尾 40~45 g。水稻移植前施加一次复合肥作为土地基肥, N、P₂O₅、K₂O 施肥量分别为 165、75 和 135 kg/hm²。在移植后的 20 和 40 d 各追加一次施肥, N、P₂O₅、K₂O 施肥量均为 66、30 和 54 kg/hm²。田间管理为常规管理, 饲料以总体质量 1% 的比例进行投喂。饲料中各物质含量: 粗蛋白≥30%、粗脂肪≥3%、粗灰分≤18%、总磷≥1%、钙 1%~3.5%、粗纤维≤8%、水分≤11%。

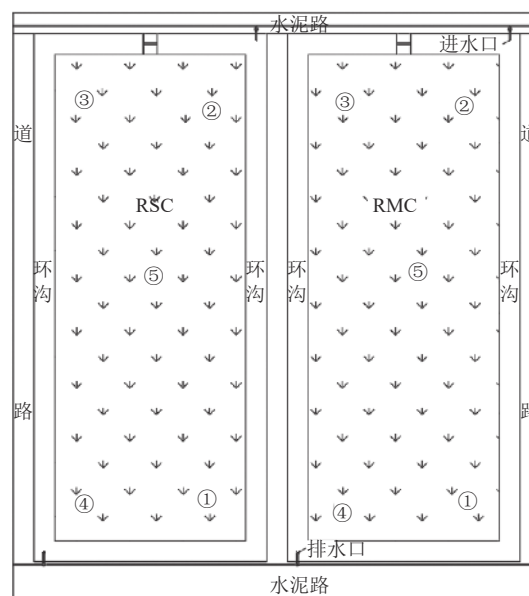


图 1 试验场地平面示意图

①、②、③、④、⑤分别代表五个依据五点采样法确定的不同采样点

Fig. 1 Plan sketch of the experiment site

①, ②, ③, ④, and ⑤ indicated five different sampling points determined according to the five-point sampling method

1.3 实验方法

水稻根际土壤的采集与微生物测定 在水稻的结实前后(9月10日和10月19日), 采用 5 点取样的方法, 每点挑选一穴长势及有效穗数相同的水稻, 连同根部土壤一块取出, 采用抖土和淋洗的方法获得根际土壤。每个采样点将水稻根际土壤分为 5 组重复, 采用 Soil Genomic DNA Extraction Kit 土壤总 DNA 提取试剂盒提取, 然后采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对土壤 DNA 进行基因测序。

根系分泌物的收集与测定 采取水培的方式收集水稻的根系分泌物。将取完根际土壤后的水稻根部清理干净,每4株为1份,放入 *Espino* 水稻营养液中通氧复性3 d。根系避光处理放在自然光照条件下培养12 h,收集烧杯中的溶液,每个处理组5个重复。过滤浓缩后,采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)测定其有机酸、氨基酸和酚酸类物质的组分和含量。色谱柱:DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样量1 μL;进样温度280 °C;无分流比;氦气(99.999%);流量1 mL/min;柱温:90 °C保持1 min,以8 °C/min升至170 °C,以5 °C/min升至240 °C,以20 °C/min升至300 °C,保持6 min;接口温度:280 °C;离子源温度250 °C;电离方式EI源70 eV;检测器电压2 072 V;质量范围33~550 m/z。2块稻田水稻的产量以最终田间收获的总量计算。

1.4 数据处理和统计分析

采用 Excel 2020 与 SPSS 24 进行数据的统计分析,首先对数据进行方差齐性检验,方差齐的数据采用双因素方差分析和独立样本 *T* 检验,并用 Duncan 氏多重比较法来比较处理间的差异显著性 ($P<0.05$ 差异显著, $P<0.01$ 差异极显著)。方差参差不齐的数据进行 $\lg(x+1)$ 对数转换。之后用 Origin 2019 和 TBtools 2021 软件进行图形的绘制。

2 结果

2.1 稻虾共生模式中根系分泌物种类与含量分析

对水稻根系分泌氨基酸含量的影响 随着水稻生育的进程,根系分泌的各种氨基酸除了谷氨酸外都在一定程度上逐渐降低。结实期,2种模式下根系分泌的氨基酸总量和组分均有显著差异 ($P<0.05$)。与 RMC 相比, RSC 模式中氨基酸总的分泌量显著提高了 21.50% ($P<0.05$),其中异亮氨酸和丝氨酸的提高程度最大,分别提高了 136.11% 和 218.54% (表 1)。随着红螯螯虾在稻田中生活时间的加长,这种差异性也越来越显著。RSC 模式中甘氨酸、谷氨酸和亮氨酸均随着水稻灌浆的进程而显著升高 ($P<0.05$),这就说明在稻田中养殖红螯螯虾可以显著提高水稻根系分泌氨基酸的含量,主要是提高了甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和丝氨酸的分泌量。

对水稻根系分泌有机酸及酚酸类物质的影响 2种不同处理模式下水稻根系分泌有机酸和酚酸总量皆随着水稻灌浆的进程而逐渐降低 (表 2, 表 3)。这说明随着水稻根系的衰老,根系分泌有机酸及酚酸的能力也随之下降。在结实后期,与 RMC 相比 RSC 模式中根系有机酸的分泌量明显升高,这说明在 RSC 模式中水稻可以明显提高根系分泌有机酸的含量,与 RMC 相比分泌

表 1 结实期不同处理模式水稻根系分泌氨基酸浓度 ($n=20$)

时期 stage	处理组 treatment	丙氨酸 Ala	甘氨酸 Gly	脯氨酸 Pro	缬氨酸 Val	亮氨酸 Leu	异亮氨酸 Ile	丝氨酸 Ser	天冬氨酸 Asp	谷氨酸 Glu	氨基酸总量 total
结实前期 early grain filling	RMC	3.52±0.63 ^a	4.18±1.37 ^b	0.99±0.15 ^a	4.30±0.17 ^a	8.38±1.73 ^{ab}	3.35±0.65 ^a	12.18±3.10 ^a	3.70±1.11 ^a	0.85±0.28 ^c	41.45±3.53 ^a
	RSC	2.20±0.57 ^{bc}	2.36±0.70 ^c	0.91±0.06 ^c	2.40±0.44 ^b	6.72±1.83 ^b	2.46±0.30 ^b	12.22±3.46 ^a	2.84±0.96 ^{ab}	0.71±0.16 ^c	32.88±4.62 ^b
结实后期 later grain filling	RMC	3.85±1.03 ^a	3.30±0.48 ^{bc}	0.60±0.06 ^b	1.30±0.30 ^c	6.73±1.81 ^b	0.74±0.11 ^d	1.65±0.39 ^b	3.56±0.75 ^a	8.76±0.74 ^a	30.58±1.34 ^c
	RSC	2.40±1.33 ^{bc}	5.80±1.22 ^a	0.46±0.20 ^b	1.50±0.67 ^c	10.20±2.99 ^a	1.75±0.27 ^c	5.25±0.69 ^b	2.08±1.33 ^b	7.64±0.40 ^b	37.1±4.96 ^{ab}

注:同一栏不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著;下同

Notes: Different small letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 level; the same below

表 2 结实期不同处理模式对水稻根系分泌酚酸类物质的影响 ($n=20$)

时期 stage	处理 treatment	肉桂酸 cinnamic acid	对羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid	香豆酸 coumalic acid	酚酸总量 total
结实前期 early grain filling	RMC	24.78±1.26 ^a	370.93±89.01 ^a	130.57±23.67	526.28±110.49 ^a
	RSC	21.44±4.94 ^{ab}	282.46±63.20 ^b	89.28±9.30	393.18±63.21 ^b
结实后期 later grain filling	RMC	18.87±4.77 ^b	66.42±27.33 ^c	36.97±15.95	122.25±35.71 ^c
	RSC	25.14±2.65 ^a	52.88±15.18 ^c	32.64±11.39	110.66±21.02 ^c

表 3 结实期不同处理模式对水稻根系分泌有机酸的影响 ($n=20$)

Tab. 3		Effects of different treatment groups on organic acid secreted by rice roots during grain-filling							$\mu\text{mol/L}$
时期 stage	处理 treatment	柠檬酸 citric acid	琥珀酸 succinic acid	酒石酸 tartaric acid	草酸 oxalic acid	马来酸 fumaric acid	苹果酸 <i>L</i> -malic acid	有机酸总量 total	
结实前期 early grain filling	RMC	209.03±20.75 ^a	11.73±4.68 ^b	267.75±21.64 ^a	344.43±94.98	4.60±0.76 ^c	14.48±3.33 ^b	852.03±99.48 ^a	
	RSC	161.62±58.80 ^a	10.44±6.99 ^b	285.64±124.55 ^a	219.44±159.97	4.36±0.74 ^c	17.44±13.95 ^b	698.94±89.90 ^a	
结实后期 later grain filling	RMC	102.32±2.68 ^b	48.98±8.61 ^a	75.18±9.18 ^c	152.20±33.49	37.08±3.33 ^b	21.83±3.93 ^b	437.60±40.79 ^b	
	RSC	79.36±9.91 ^b	47.72±20.17 ^a	121.68±7.11 ^{bc}	197.64±88.80	41.10±3.09 ^a	38.18±11.13 ^a	525.68±102.21 ^b	

量提高了 12.69%。无论是在结实前期还是后期, RSC 模式下水稻根系分泌酚酸的总量总是低于 EMC 模式 ($P<0.05$), 平均分泌量降低了 9.48%。这说明 RSC 模式下, 可以明显降低水稻根系酚酸的分泌量。

不同处理模式对水稻结实期根系分泌各种有机酸和酚酸类物质含量有较大的影响(表 2, 表 3)。与 RMC 相比, RSC 模式中水稻根系分泌酒石酸、苹果酸、马来酸的含量显著提高 ($P<0.05$), 分别提高了 61.84%、29.07% 和 10.8%; RSC 模式中对羟基苯甲酸和香豆酸分泌量分别较 RMC 降低了 20.38% 和 25.5%。与 RMC 模式相比, RSC 模式中马来酸和苹果酸分泌量上升幅度较大, 酒石酸下降幅度较小。因此在水稻结实期, RSC 模式能明显提高有机酸的分泌量主要是因为提高了马来酸、苹果酸和酒石酸的分泌量; 酚酸分泌总量的降低主要是因为降低了对羟基苯甲酸和香豆酸的分泌量。RMC 模式下水稻总产量 2 414.5 kg, 平均产量 6 585 kg/hm²; RSC 模式下水稻总产量 2 591 kg, 平均产量 7 066.5 kg/hm²。相比于 RMC 模式, RSC 模式下水稻产量平均提高了 7.31%。这说明在稻田中加入红螯螯虾养殖, 可以提高水稻的产量。

2.2 水稻根际土壤微生物多样性及群落结构差异性分析

根际土壤微生物多样性分析 不同处理模式下根际土壤微生物 α 多样性指数统计分析显示:

在水稻结实期, 与 RMC 相比 RSC 模式中 Chao1 和 Shannon 指数皆随着水稻灌浆的进程而升高。虽然差异不显著但是这 2 种指数的升高皆表明 RSC 相比于 RMC 模式能够提高水稻根际土壤微生物的多样性。对水稻结实前后期 2 种处理模式下各个样品测得的覆盖率 (coverage) 都在 92% 以上, 且 Shannon 指数均趋于饱和(表 4)。结果表明本次实验对土壤样品测序深度足够大, 得到的数据量已能够全面反应各样品内的物种及分类信息。

微生物群落结构分析 采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对水稻结实前后期根际土壤进行测定, 为使视图效果最佳, 在门和属分类学水平物种分布柱状图中将丰度低于 1% 的物种归纳为 other。结果显示, 在水稻结实前后期 2 种处理模式下根际土壤微生物在门水平上组成一致, 但各优势菌门(相对丰度>10%)的相对丰度之间存在一定差异。结实前期, 差异不显著, 优势菌门为变形菌门(26.62%)和酸杆菌门(19.43%)。结实后期, RMC 模式下优势种群的门类增加至 4 种, 分别为变形菌门(25.74%)、酸杆菌门(13.81%)、绿弯菌门(10.35%)和放线菌门(10.30%)。而 RSC 模式下的只有 3 种, 变形菌门(22.51%)、酸杆菌门(17.13%)和绿弯菌门(10.33%), 放线菌门的丰度只有 7.47%, 显著低于 RMC 模式 ($P<0.05$)。丰度大于 1% 的菌门共有 15 种, 其中 RSC 模式下 *Methylomirabilota*(3.62%) 和 *Latescibacterota*(2.74%) 的丰度是显著升高 ($P<0.05$), 分别较 RSC 模式提

表 4 不同处理组土壤样品中微生物 α 多样性统计 ($n=20$)

Tab. 4		α diversity statistics of microbes in diferent treatment groups					
时期 stage	处理组 treatment	97%					coverage
		OTU	Chao1	Shannon	Simpson		
结实前期 early grain filling	RMC	7.02×10 ³	9.81×10 ³	7.94×10 ¹	0.98×10 ⁻³	0.93×10 ¹	
	RSC	7.20×10 ³	9.44×10 ³	7.87×10 ¹	1.02×10 ⁻³	0.95×10 ¹	
结实后期 later grain filling	RMC	7.65×10 ³	9.32×10 ³	8.05×10 ¹	0.84×10 ⁻³	0.95×10 ¹	
	RSC	7.00×10 ³	9.78×10 ³	8.01×10 ¹	0.86×10 ⁻³	0.94×10 ¹	

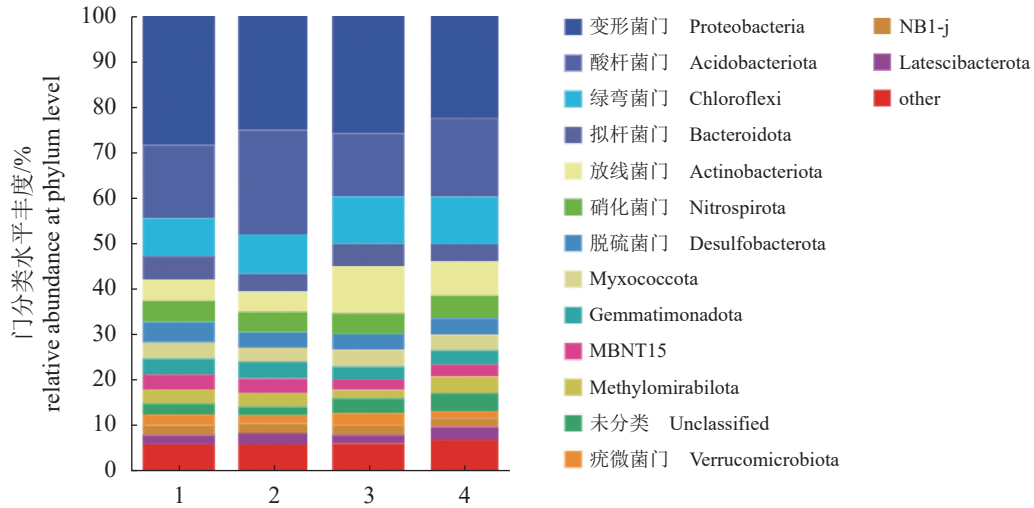


图 2 水稻根际土壤微生物在门分类水平上的物种群落结构组分图 (n=20)

1. 水稻单作结实前期; 2. 稻虾共生结实前期; 3. 水稻单作结实后期; 4. 稻虾共生结实后期; 下同

Fig. 2 Species community structure of rice rhizosphere soil microorganisms at phylum level

1. early grain filling of rice monoculture mode; 2. early grain filling of rice-crayfish integrated mode; 3. early grain filling of rice monoculture mode; 4. later grain filling of rice-crayfish integrated mode; the same below

高了 101.11% 和 48.86% (图 2)。在水稻整个结实期, RSC 模式显著提高了 Methyloirabilota 和 Latescibacterota 菌群的丰度 (P<0.05), 降低了放线菌门的丰度。

在属的分类水平上, 结实前期水稻根际土壤微生物丰度大于 1% 的物种共有 22 种, 占比 45.53%; 到了结实后期丰度大于 1% 的物种减少到了 18 种, 占比 42.29%。结实前期, 这些物种

的丰度在 2 种模式之间皆没有差异性, 到了结实后期, RSC 模式下 *Vicinamibacterales norank* (3.30%)、*Latescibacterota norank* (2.35%) 的丰度都显著高于 RMC 模式 (P<0.05); 与 RMC 相比, RSC 模式中能够提高 *Gemmatimonadaceae uncultured* (2.36%) 的丰度, 平均提高了 13.11%; *Steroidobacteraceae uncultured* (1.04%) 和 *Sutterellaceae uncultured* 属 (0.64%) 的丰度平均降低了 93.59% 和 87.56% (图 3)。

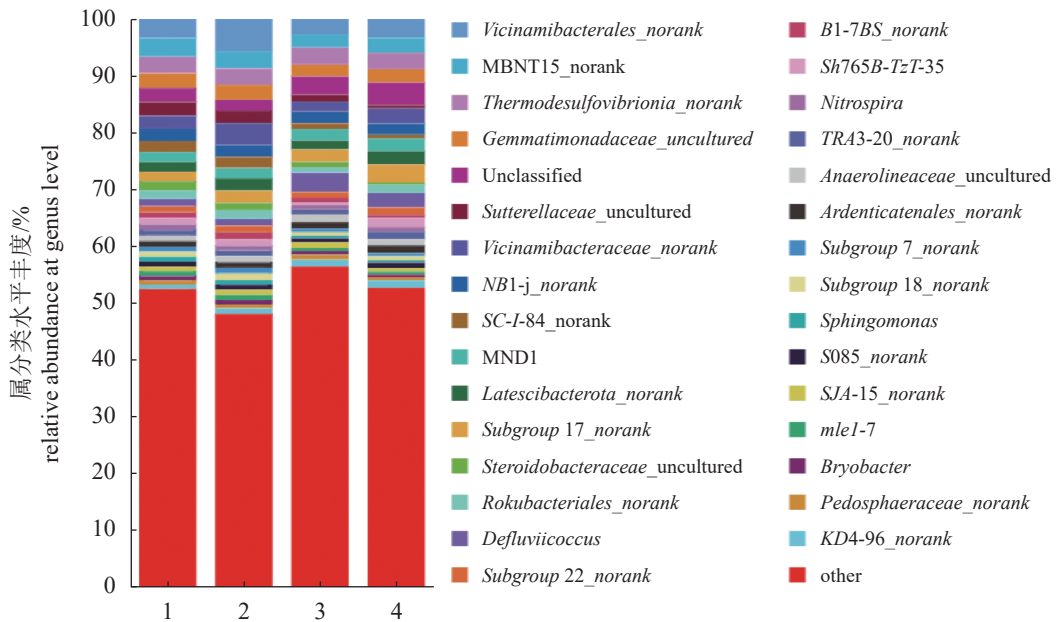


图 3 水稻根际土壤微生物在属分类水平上的物种群落结构组分图 (n=20)

Fig. 3 Species community structure of rice rhizosphere soil microorganisms at genus level

根际土壤微生物 Beta 多样性差异分析 为了进一步了解这 2 种处理模式在水稻根际土壤微生物群落结构上的差异性, 对 2 种模式在水稻结实前后期测定的 OTU 值进行主成分分析 (PCoA)。提取 2 种主成分 PCo1 和 PCo2 作图。结果显示, 结实前期, 这 2 种模式中的样品点高度重叠在一

起, 说明在结实期前期水稻根际微生物群落结构无显著差异; 到了结实后期, 这 2 种模式中的样品点之间距离变大, 且无重叠 (图 4)。这就说明随着红螯螯虾在稻田中存在的时间加长, 水稻根际微生物群落结构组成的差异性也越来越显著。

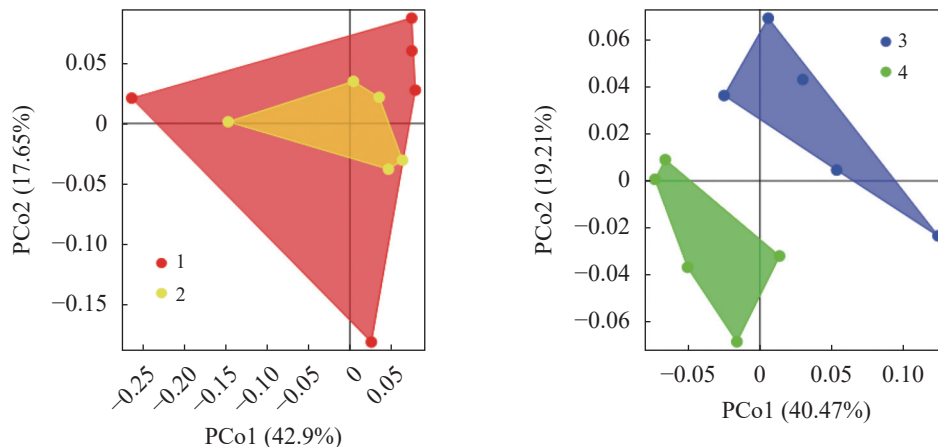


图 4 不同处理模式下水稻根际土壤微生物群落结构的 Beta 多样性分析

Fig. 4 Beta diversity analysis of microbial community structure in rice rhizosphere soil under different treatments

2.3 水稻根际微生物与根系分泌物之间的相关性分析

门水平丰度与水稻根系分泌物含量之间的相关性分析 在门的水平上选取丰度前 5 的优势菌门与根系分泌物做相关性分析, 结果显示, 根系分泌的氨基酸总量与以上 5 种菌门皆没有显著相关性, 但是异亮氨酸、丝氨酸、对羟基苯甲酸、香豆酸及酚酸总量皆与绿弯菌门和放线菌门呈显著负相关; 有机酸总量的分泌量与绿弯菌门和放线菌门均呈显著负相关, 其中酒石酸与绿弯菌门和放线菌门呈显著负相关, 而与酸杆菌门呈显著正相关; 马来酸与酒石酸情况正好相反, 与绿弯菌门和放线菌门均呈显著正相关性 (图 5)。

属水平丰度与水稻根系分泌物含量之间的相关性分析 在属的水平上选取丰度前 10 的种属与根系分泌物之间做相关性分析, 结果显示, 酒石酸与丝氨酸的分泌量与 *Vicinamibacterales-norank* 属呈显著正相关, 而谷氨酸却与之呈显著负相关; 对羟基苯甲酸、香豆酸和酚酸总量的分泌量与 *SC-I-84-norank* 属呈显著正相关, 马来酸则与 *SC-I-84-norank* 属呈显著负相关, 并且苹果酸和甘氨酸的分泌量都与 *SC-I-84-norank* 属呈极显著负相关; 柠檬酸的分泌量与 *SC-I-84-norank*

属呈显著正相关, 马来酸和苹果酸的分泌量皆与 *Sutterellaceae* 属呈显著负相关 (图 6)。这表明根系分泌物的不同组分对土壤微生物的影响不同, 酒石酸和丝氨酸含量的升高会导致 *Vicinamibacterales-norank* 属菌群丰度的升高, 苹果酸、马来酸和异亮氨酸含量的升高会导致放线菌门和 *SC-I-84-norank* 属菌群丰度的降低。

3 讨论

3.1 稻虾共生模式对水稻根系分泌有机酸、氨基酸和酚酸类物质的影响

稻虾共生模式中虾的扰动可以改变稻田土壤的生物肥力, 而土壤的肥力又与植物根系分泌物的含量和组分密切相关^[10]。佘国涵等^[11]对稻虾共生模式下土壤肥力的研究发现, 长期稻虾共作可以显著提高稻田土壤中各粒级团聚体内的有机碳含量, 改善土壤结构, 从而提高稻田土壤的生物肥力。而对水稻不同施肥条件下根系分泌物的研究发现, 在中氮水平的施肥条件下水稻根系分泌有机酸的含量最高; 之后随着施肥量的升高, 水稻根系分泌有机酸的含量反而下降^[12]。有关稻虾共生模式中, 虾的扰动对水稻根系分泌物的研究较少。本研究结果表明, 稻虾共生模式下, 水稻

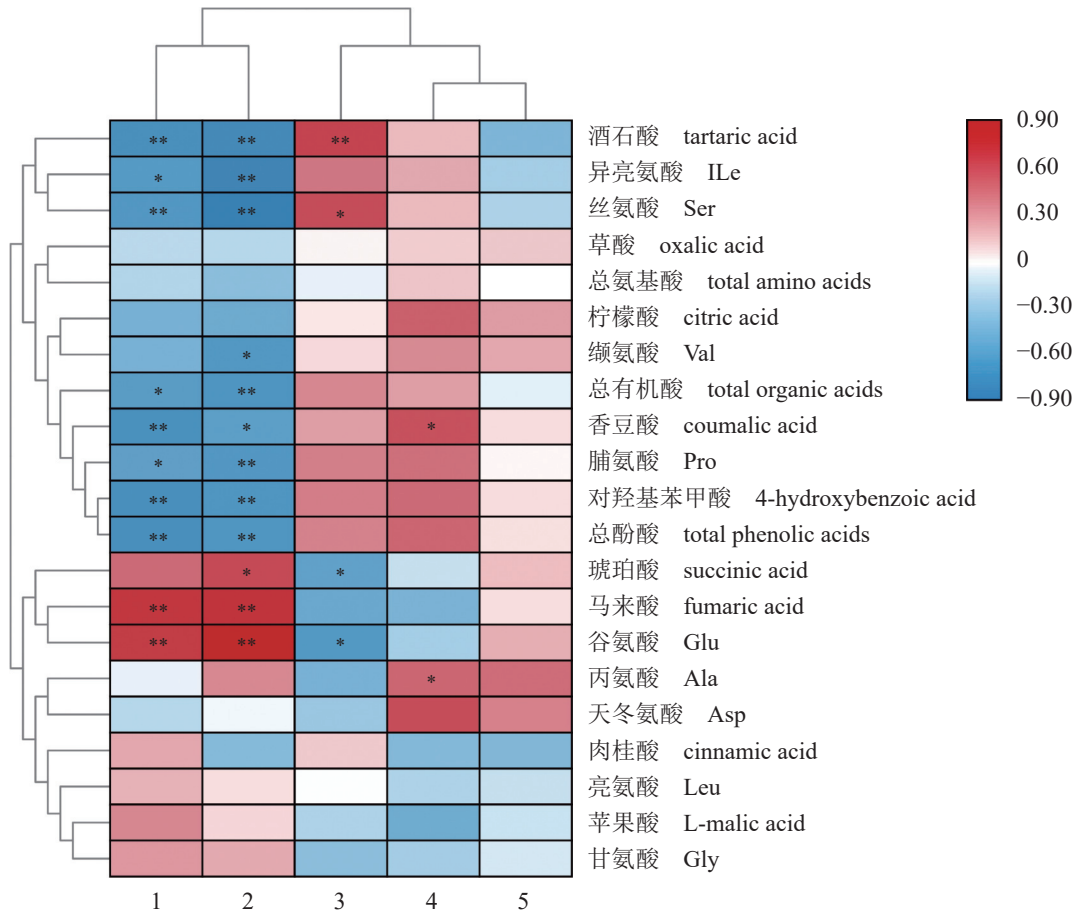


图 5 门水平丰度与水稻根际分泌物含量之间相关性分析热图

1.绿弯菌门, 2.放线菌门, 3.酸杆菌门, 4.变形菌门, 5.拟杆菌门; *在 0.05 水平上显著相关; **在 0.01 水平上显著相关; 下同

Fig. 5 Correlation analysis heat map between the abundance of phylum level and the content of rice rhizosphere exudates

1. Chloroflexi, 2. Actinobacteriota, 3. Acidobacteriota, 4. Proteobacteria, 5. Bacteroidota; *. significant correlation at the level of 0.05; **. significant correlation at the level of 0.01; the same below

结实期根系分泌有机酸和氨基酸的含量显著升高, 尤其是苹果酸、酒石酸、马来酸、异亮氨酸和丝氨酸。一方面可能由于红螯螯虾在田间的摄食、爬行、掘土以及排泄等生物扰动行为可以提高稻田土壤有机碳和纤维素酶的活性, 从而增强土壤有效肥力的释放, 加强水稻根系对营养的吸收, 促进根系分泌更多的有机酸和氨基酸^[13]。另一方面可能是因为虾在稻田中的存在, 可延缓水稻成熟期叶片衰老的过程, 降低根系伤流强度, 从而提高根尖细胞的生理生化功能, 促进水稻根系分泌物的含量^[14-15]。植物根系可以通过分泌大量的有机酸和氨基酸来抵御各种非生物因素的干扰与生物胁迫。根据已有的关于根系分泌物的研究发现, 在缺磷的土壤中水稻根系会通过分泌大量的有机酸和酸性氨基酸, 来降低土壤的 PH 值, 从而促进难溶性磷元素的活化, 同时这些分泌物也能够

促进植物对 P、Fe、Zn、Mn 等矿质元素的吸收利用^[16-17]; 在缺铁的情况下, 植物亦会通过增加根系有机酸的分泌量, 来增加土壤中铁元素的有效性, 并且苹果酸、琥珀酸等有机酸的分泌量增加, 还会促使水稻根际有益菌丰度的升高, 提高水稻的抗疾病能力^[18-19]。

酚酸类物质是植物根系分泌的最为主要的一种化感类化合物, 其含量的高低直接影响着化感作用的强弱。李庆凯等^[20]研究发现, 土壤中酚酸类物质浓度越高, 对周围环境化感抑制作用越强, 并且玉米的根系分泌物可通过提高土壤微生物量、微生物活性及养分含量, 来降低酚酸类物质对土壤微生态环境的化感作用。而水稻化感作用的强弱又与产量紧密结合在一起。王海斌等^[21]的田间试验发现, 水稻的产量与田间杂草生物量呈显著负相关, 与化感作用呈显著正相关。这就说明水

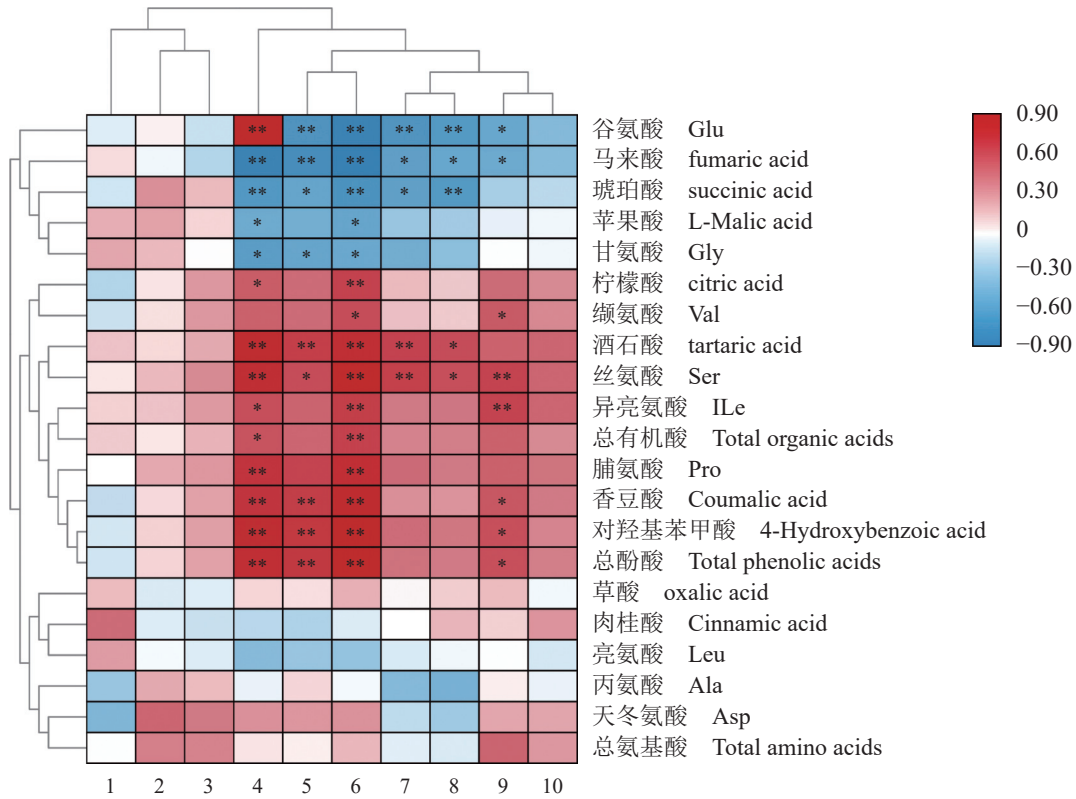


图 6 属水平丰度与水稻根际分泌物含量之间相关性分析热图

Fig. 6 Correlation analysis heat map between the abundance of genus level and the content of rice rhizosphere exudates

- 1. *Latescibacterota_norank*; 2. *Thermodesulfovibrionia_norank*; 3. *NB1-j_norank*; 4. *Sutterellaceae_uncultured*; 5. *Steroidobacteraceae_uncultured*;
- 6. *SC-I-84_norank*; 7. *Vicinamibacterales_norank*; 8. *Vicinamibacteraceae_norank*; 9. *MBNT15_norank*; 10. *Gemmatimonadaceae_uncultured*

稻可以通过分泌酚酸类物质来抑制周边杂草的生长, 从而降低种间竞争能力, 提高自身产量。本实验表明, 在稻虾共生模式中, 降低了水稻结实期根系酚酸类物质的分泌量, 且水稻产量比水稻单作模式下高出 7.31%。这是因为红螯螯虾是杂食性动物且活力强, 对田间杂草具有极强的破坏能力, 能够减少田间杂草量^[22], 从而降低水稻的种间竞争能力, 因此水稻分泌酚酸类化感物质的量也减少。

3.2 稻虾共生模式对根际土壤微生物的影响

底栖动物通过掘穴、觅食等生物扰动改变了土壤营养物质以及氧气的供应, 影响着土壤微生物的群落结构、多样性和功能, 而微生物功能多样性又能够反映土壤肥力和健康状况^[23]。在对花生的研究中发现, 根系分泌物可以促使花生根系假单胞菌 (*RP2*) 的定植, 抑制真菌的生长, 从而促进植物生长^[24]。本实验结果同样发现, 稻虾共生模式中土壤微生物对水稻根系分泌物有着明显的趋化作用, 水稻根系分泌有机酸和氨基酸含量

升高, 同时也导致根际 *Methylomirabilota* 和 *Latescibacteria* 菌群丰度的提高。这是由于稻虾共生模式下水稻根系分泌物的改变, 导致土壤微生物对碳氮源的利用产生趋好性^[25]。研究表明, *Methylomirabilota* 门细菌是一种甲烷氧化菌, 不仅可以氧化稻田释放的甲烷还可以与土壤中硝酸盐或亚硝酸盐还原菌结合, 加速氮元素在土壤中的循环, 增加植物的生长和产量^[26]。*Latescibacteria* 菌群具有降解蛋白质和多糖的能力, 因此, 稻虾共生模式中水稻根系 *Latescibacteria* 菌群丰度的提高可能也是造成只以单糖为基质生存的 *Vicinamibacterales-norank* 菌群丰度在水稻根系升高的原因^[27]。相关性分析表明, 总有机酸分泌量和苹果酸皆与 *Latescibacteria* 菌群呈正相关, 这是因为该种菌群以利用苹果酸为碳源满足自身生长, 苹果酸含量的增加会招募更多的 *Latescibacteria* 菌群富集^[27]。因此, 稻虾共生模式不仅可以通过提高根际有益菌群的丰度加速根系对养分的吸收能力还可以降低稻田温室气体的排放。放线菌主要功能是可以将有机体分解为无机体, 进而促进植物的吸收^[28]。

在 Mendes 等^[29]对甜菜 (*Beta vulgaris*)的研究中发现,有利于甜菜生长的土壤中放线菌门丰度较高。本次对于稻虾共生模式的研究却得到了相反的结果,推测其原因可能是由于环境中氧气含量不同所导致。放线菌门普遍存在于土壤或沉积物中,特别是在水分含量低或有机质含量高的条件下^[30],而本次实验为了满足红螯螯虾生长需求,田间水位保持较高,导致根际长期缺氧,因此丰度才会降低。

饲料种类的不同也会造成养殖底泥微生物种群的变化。周凡等^[31]对不同饲料养殖拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)的研究发现,配合饲料可以显著降低底泥中地杆菌属 (*Geothermobacter*) 和海命菌属 (*Marivita*) 微生物的丰度,且投喂配合饲料的底泥中的优势菌种主要为聚球藻属 (*Synechococcus*)、*Sulfurovum* 属、脱硫叶菌属 (*Desulfobulbus*) 和 *Phaeodactylibacter* 属,与本次实验微生物种类差异较大。本次实验饲料投喂量少,且又投喂到环沟当中,所以饲料投入对稻田整体环境影响较小。

综上所述,稻虾共生模式中由于红螯螯虾对稻田环境整体的扰动作用,影响了水稻根系分泌物的组分和含量,提高了有机酸和氨基酸的分泌量;而土壤中部分微生物对于水稻根系分泌物又有明显的趋化感应现象,从而改变了根际微生物群落的多样性和优势菌群的丰度,影响了水稻对养分吸收和转化的能力,进而提高了水稻的产量。但有关稻虾共生模式中虾的扰动对水稻根系分泌物和根际微生物群落多样性之间相互作用的机理还有待深入研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 杨智景,顾海龙,唐建清,等. 稻-虾与稻-蟹种养模式下的水质及虾、蟹生长动态[J]. *贵州农业科学*, 2018, 46(2): 84-88.
Yang Z J, Gu H L, Tang J Q, et al. Dynamic change of water quality, crayfish and crab growth under two rice-crayfish and rice-crab culture models[J]. *Guizhou Agricultural Science*, 2018, 46(2): 84-88 (in Chinese).
- [2] 罗衡,赵良杰,李丰,等. 养殖蟹的引入对稻田土壤细菌群落结构的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 720-732.
Luo H, Zhao L J, Li F, et al. Effects of the introduction of cultured turtle on soil bacterial community structure in paddy field[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 720-732 (in Chinese).
- [3] 黄智伟,潘志,顾志峰,等. 热带地区红螯螯虾池塘生态养殖技术研究[J]. *中国水产*, 2018(10): 93-96.
Huang Z W, Pan Z, Gu Z F, et al. The Eco-culture technology in pond for red crayfish at tropical region in China[J]. *China Fisheries*, 2018(10): 93-96 (in Chinese).
- [4] 何俊,张究中,蒋造极,等. 水稻—红螯螯虾共作模式与红螯螯虾传统池塘养殖模式对比试验[J]. *水产养殖*, 2019, 40(7): 27-30.
He J, Zhang X Z, Jiang Z J, et al. Contrast experiment of rice-*Cherax quadricarinatus* culture model and traditional pond culture model of *Cherax quadricarinatus*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2019, 40(7): 27-30 (in Chinese).
- [5] 徐祥玉,张敏敏,彭成林,等. 稻虾共作对秸秆还田后稻田温室气体排放的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2017, 25(11): 1591-1603.
Xu X Y, Zhang M M, Peng C L, et al. Effect of rice-crayfish co-culture on greenhouse gases emission in straw-puddled paddy fields[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2017, 25(11): 1591-1603 (in Chinese).
- [6] 袁仁文,刘琳,张蕊,等. 植物根际分泌物与土壤微生物互作关系的机制研究进展[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(2): 26-35.
Yuan R W, Liu L, Zhang R, et al. The interaction mechanism between plant rhizosphere secretion and soil microbe: A review[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(2): 26-35 (in Chinese).
- [7] Insam H, Hutchinson T C, Reber H H. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1996, 28(4-5): 691-694.
- [8] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. *植物生态学报*, 2014, 38(3): 298-310.
Wu L K, Lin X M, Lin W X. Advances and perspective in research on plant-soil-microbe interactions mediated by root exudates[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2014, 38(3): 298-310 (in Chinese).
- [9] 常二华,张慎凤,王志琴,等. 结实期氮磷营养水平对水稻根系和籽粒氨基酸含量的影响[J]. *作物学报*, 2008, 34(4): 612-618.
Chang E H, Zhang S F, Wang Z Q, et al. Effect of nitrogen and phosphorus nutrition level on root and grain amino acid content of rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(4): 612-618.

- gen and phosphorus on the amino acids in root exudates and grains of rice during grain filling[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(4): 612-618 (in Chinese).
- [10] 赵章平, 要凯, 康益晨, 等. 沟垄覆膜栽培对连作马铃薯根系分泌物和土壤养分的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(2): 83-89,97.
Zhao Z P, Yao K, Kang Y C, *et al.* Effects of film mulch and ridge-furrow potato planting on root exudates and soil nutrients under continuous cropping[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2020, 55(2): 83-89,97 (in Chinese).
- [11] 倡国涵, 袁家富, 彭成林, 等. 长期稻虾共作模式提高稻田土壤生物肥力的机理[J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(12): 2168-2176.
Si G H, Yuan J F, Peng C L, *et al.* Mechanism of long-term integrated rice-crayfish farming increasing soil biological fertility of paddy fields[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2020, 26(12): 2168-2176 (in Chinese).
- [12] 徐国伟, 陆大克, 王贺正, 等. 施氮和干湿灌溉对水稻抽穗期根系分泌有机酸的影响[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(4): 516-525.
Xu G W, Lu D K, Wang H Z, *et al.* Coupling effect of alternate wetting and drying irrigation and nitrogen rate on organic acid in rice root secretion at heading stage[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2018, 26(4): 516-525 (in Chinese).
- [13] 许元钊. 克氏原螯虾养殖对稻田生态系统影响的初步研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2020.
Xu Y Z. A preliminary study on the effects of *Procambarus clarkii* aquaculture on paddy field ecosystem[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [14] 李丽娜, 闫淋淋, 曹湊贵, 等. 稻虾共作系统中水稻生长及养分吸收对秸秆还田与投食的响应[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 8-16.
Li L N, Yan L L, Cao C G, *et al.* Effects of straw returning and crayfish feeding on rice growth and nutrient uptake in rice-crayfish ecosystem[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(2): 8-16 (in Chinese).
- [15] 王秀娟, 袁兴福, 娄春荣, 等. 不同氮钾用量对番茄生长和叶片超微结构的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2014(3): 44-48.
Wang X J, Yuan X F, Lou C R, *et al.* Effects of N, K amount on tomato growth and leaf ultrastructure[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2014(3): 44-48 (in Chinese).
- [16] 涂书新, 孙锦荷, 郭智芬, 等. 植物根系分泌物与根际营养关系评述[J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 64-67.
Tu S X, Sun J H, Guo Z F, *et al.* On relationship between root exudates and plant nutrition in rhizosphere[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2000, 9(1): 64-67 (in Chinese).
- [17] Hajiboland R, Yang X E, Römheld V. Effects of bicarbonate and high pH on growth of Zn-efficient and Zn-inefficient genotypes of rice, wheat and rye[J]. *Plant and Soil*, 2003, 250(2): 349-357.
- [18] 史刚荣. 植物根系分泌物的生态效应[J]. *生态学杂志*, 2004, 23(1): 97-101.
Shi G R. Ecological effects of plant root exudates[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(1): 97-101 (in Chinese).
- [19] Lakshmanan V, Kitto S L, Caplan J L, *et al.* Microbe-associated molecular patterns-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(3): 1642-1661.
- [20] 李庆凯, 刘莘, 赵海军, 等. 玉米根系分泌物对连作花生土壤酚酸类物质化感作用的影响[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(3): 119-130.
Li Q K, Liu P, Zhao H J, *et al.* Effects of maize root exudates on allelopathy of phenolic acids in soil of continuous cropping peanut[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2020, 22(3): 119-130 (in Chinese).
- [21] 王海斌, 俞振明, 何海斌, 等. 不同化感潜力水稻化感效应与产量的关系[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(1): 75-79.
Wang H B, Yu Z M, He H B, *et al.* Relationship between allelopathic potential and grain yield of different allelopathic rice accessions[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(1): 75-79 (in Chinese).
- [22] 王茂蝶, 孟立霞. 澳洲淡水龙虾养殖研究进展 [J]. 水产养殖, 2021, 42(06): 35-38.
Wang M D, Meng L X. Research progress on breeding *Cherax quadricarinatus*[J]. *Journal of Aquaculture* 2021, 42(06): 35-38. (in Chinese).
- [23] 倡国涵, 彭成林, 徐祥玉, 等. 稻-虾共作模式对涝渍稻田土壤微生物群落多样性及土壤肥力的影响[J]. 土壤,

- 2016, 48(3): 503-509.
- Si G H, Peng C L, Xu X Y, *et al.* Effects of rice-crayfish integrated mode on soil microbial functional diversity and fertility in waterlogged paddy field[J]. *Soils*, 2016, 48(3): 503-509 (in Chinese).
- [24] Ankati S, Rani T S, Podile A R. Changes in root exudates and root proteins in groundnut-*Pseudomonas* sp. interaction contribute to root colonization by bacteria and defense response of the host[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2019, 38(2): 523-538.
- [25] 刘艳霞, 李想, 蔡刘体, 等. 烟草根系分泌物酚酸类物质的鉴定及其对根际微生物的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(2): 418-428.
- Liu Y X, Li X, Cai L T, *et al.* Identification of phenolic acids in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2016, 22(2): 418-428 (in Chinese).
- [26] Ettwig K F, Butler M K, Le Paslier D, *et al.* Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [27] Farag I F, Youssef N H, Elshahed M S. Global distribution patterns and pangenomic diversity of the candidate phylum “*Latescibacteria*” (WS3)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(10): e00521-17.
- [28] Meier D V, Imminger S, Gillor O, *et al.* Distribution of mixotrophy and desiccation survival mechanisms across microbial genomes in an arid biological soil crust community[J]. *Msystems*, 2021, 6(1): e00786-20.
- [29] Mendes R, Kruijt M, De Bruijn I, *et al.* Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 2011, 332(6033): 1097-1100.
- [30] Huang W, Jiang X. Profiling of sediment microbial community in dongting lake before and after impoundment of the three gorges dam[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, 6(13): 617.
- [31] 周凡, 彭建, 陈丽芝, 等. 配合饲料和冰鲜饵料对拟穴青蟹养殖的影响[J]. *渔业研究*, 2020, 42(4): 356-365.
- Zhou F, Peng J, Chen L Z, *et al.* Evaluation of the effects of formulated diet and trash fish diet on the aquaculture of mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(4): 356-365 (in Chinese).

Effects of rice-crayfish integrated model on root exudates and microorganisms of rice during grain filling

TAO Xianfa¹, LI Bing², YU Zhaoxiong³, HOU Yiran², WANG Long¹, ZHU Jian^{1,2,3*}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

2. Key Laboratory of Integrated Rice-Fish Farming Ecology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The traditional rice-crayfish coculture systems may develop a novel sustainable agriculture by clarifying whether crayfish is serving as a stimulus for rice growth. In order to investigate this mechanism, the experiment selected *Cherax quadricarinatus* as the cultured species and compared rice root exudates (organic acids, amino acids and phenolic acids) and microbial community structure in integrated rice-crayfish farming (RSC) and rice monoculture (RMC). Gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) and Illumina MiSeq sequencers were adopted as the research method. The results showed that the secretions of malic acid, tartaric acid, maleic acid, isoleucine, serine, total organic acids and total amino acids in rice roots were increased significantly in coculture system during the grain filling stage, with the gap reaching 29.07%, 61.84%, 10.8%, 136.11%, 218.54%, 21.50% and 12.69% respectively compared to the control group; The total amount of p-hydroxybenzoic acid, coumaric acid and phenolic acid decreased by 20.38%, 25.5% and 9.48%. In the hard dough stage, the abundance of Methylomirabilota and Latescibacterota were increased in integrated farming system by 101.11% and 48.86%, respectively; At the genus level, the rice-crayfish integrated model significantly increased the abundance of Vicinamibacteria-norank and Latescibacterota-norank by 22.96% and 48.23%. Correlation analysis showed that the total amount of organic acids and phenolic acids secreted by roots were negatively correlated with Chloroflexi and Actinobacteriota. Similarly, tartaric acid, isoleucine, serine and total organic acids were negatively correlated with Actinobacteriota. In contrast, tartaric acid and serine were positively correlated with Vicinabacteria-norank. In conclusion integrated rice-crayfish farming could significantly enhance the secretion of organic acids and amino acids in rice roots and tap sufficient carbon source for the microorganisms of Methylomirabilota, Latescibacterota, Latescibacterota-norank and Vicinamibacteria-norank, thus to stimulate their accumulation in rice rhizosphere and accelerate the release of soil nutrients. These findings provide unique insights into how positive interactions between crayfish and rice root properties in terms of efficient nutrient absorption and how modern agricultural systems might be improved by boosting grain yield and quality.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; rice-crayfish integrated model; root exudates; rhizospheric microorganism; grain filling stage

Corresponding author: ZHU Jian. E-mail: zhuj@ffrc.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China(2019YFD0900305); China Agriculture Research System (CARS-45)