

连作对麦冬根际土壤细菌群落的影响

赵春芳^{1,2} 刘浩^{1,2} 余龙江^{1,2*}

(1. 华中科技大学生命科学与技术学院资源生物学与生物技术研究所 湖北 武汉 430074)

(2. 华中科技大学分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074)

摘要: 以中草药麦冬为研究对象, 采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法, 考察连作对麦冬根际土壤细菌群落的影响。结果表明, 重茬麦冬根际细菌群落的 Shannon-Wiener 指数从苗期至快速生长期、再到块根膨大期分别为 3.36-3.40-3.69, 丰富度指数为 55.0-61.5-63.5, 均匀度指数为 0.84-0.82-0.89; 而同期正茬根际细菌群落的上述指数值分别为 3.66-3.33-3.72、67.5-53.5-63.5 和 0.87-0.84-0.90。通过对土壤细菌群落的 DGGE 图谱进行主成分分析, 结果显示, 上述各个时期重茬与正茬样本均发生显著分离, 表明连作改变了麦冬根际细菌群落的多样性变化趋势和结构组成。进一步比较麦冬块根膨大期根际主要功能菌群的数量变化, 发现连作后氯化细菌和好气性纤维素分解菌数量增加, 而硝化细菌和固氮菌的数量减少。对比发现重茬麦冬的产量仅为正茬的 70.6%, 表明麦冬连作减产与其根际土壤细菌群落的变化相关。

关键词: 麦冬, 连作, 根际, 细菌群落

The Effect of Continous Cropping to Soil Bacterial Community on Liriope Root

ZHAO Chun-Fang^{1,2} LIU Hao^{1,2} YU Long-Jiang^{1,2*}

(1. Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

(2. Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: The continous cropping obstacle widely exists in cash crop cultivation, which usually result in a decline of the crop yield and quality. The origin of continous cropping obstacle is close related with the shift in soil environment, and the evolve of soil microorganism in continous cropping was important. This paper studied the effect of continous cropping on the rhizosphere bacterial using liriope (*Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T.) as testing merials. The diversity of liriope rhizosphere microbial communities was investigated by PCR-DGGE, the Shannon-Weaver indices of the continous cropping liriope rhizosphere microbial communities were 3.36-3.40-3.69 from seedling stage to rapid growing stage and to earthnut intumescencia stage, the richness indices were 55.0-61.5-63.5, the evenness indices were 0.84-0.82-0.89, those indices of normal liriope rhizosphere were 3.66-3.33-3.72, 67.5-53.5-63.5, and 0.87-0.84-0.90, respectively. The result shown that the trend of rhizosphere bacte-

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2006BAI06A15-4-4-2)

* 通讯作者: ✉ yulongjiang@hust.edu.cn

收稿日期: 2010-01-22; 接受日期: 2010-01-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

rial communities diversity variation in the continous cropping liriopoe was different with normal liriopoe. Furthermore, the Principal Components Analysis of DGGE profile of rhizosphere bacterial communities shown that the components of bacterial communities in continous cropping liriopoe were separated from normal liriopoe. That suggested continous cropping could alter the diversity variation trend and components of rhizosphere bacterial communities. Comparing the quantity of soil function bacteria at liriopoe tuberous intumescencia stage, the amount of amonifying bacteria and cellulose decomposition bacteria were increased while nitrobacteria and azotobacter were significant decreased after continous cropping. Besides, the yield of continous cropping was 70.6% of normal, it indicated that the decline in yield of liriopoe in continous cropping was related to the vary of soil bacterial community.

Keywords: Liriopoe, Continous cropping, Rhizosphere, Bacterial community

连作障碍问题广泛存在于各类经济作物的种植过程中,连作经常导致作物生长不良、产量下降。引起连作障碍的原因错综复杂,究其根本在于根际土壤微生物生态失衡^[1]。土壤微生物作为根际生态系统的重要组成部分,参与有机化合物及高等植物和微生物残体的降解、生物固氮作用、土壤中的碳循环和氮循环及磷和硫循环等,是土壤中物质转化、能量流动及生物化学反应的发动机^[2-3]。土壤微生物群落结构组成及其变化在一定程度上反映了土壤环境的生产力和稳定性^[4]。

不同的作物,连作时根际微生物群落的结构和功能的变化特性不尽相同。西瓜^[5]长期连作后,随着种植年限的增加,土壤中细菌和放线菌呈现先升后降的趋势,真菌数量变化趋势则与之相反。大豆^[6]、黄瓜^[7]和麦冬^[8]等作物连作后土壤微生物区系均出现从高肥的“细菌型”向低肥的“真菌型”转化,真菌数量增多使植物更易感染病虫害。这些表明研究根际微生物的群落结构组成及其变化,是研究根际生态变化进而研究连作障碍成因的关键所在,但目前对麦冬连作时根际细菌群落的变化特性研究还少有报道。

本文以常用中药麦冬(*Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T.)为材料,运用变性梯度凝胶电泳技术(Denaturing gradient gel electrophores, DGGE),并结合微生物培养计数方法研究连作时麦冬根际土壤细菌群落的变化,明确连作对于麦冬根际微生物的影响,为发现麦冬连作障碍产生的原因进而克服连作障碍提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 麦冬根际土壤样品

大田麦冬根际土壤样品取自湖北省襄樊市欧庙

镇麦冬种植基地,试验田设有(1.4 m × 1.4 m)重茬试验地3块(记为CC)和(1.4 m × 1.4 m)正茬试验地3块(记为ZC),分别在2008年3、7、12月(即麦冬的苗期、生长期、块根膨大期)取正茬和重茬根际土壤样品,依次记为ZC322与CC322、ZC719与CC719、ZC1208与CC1208,拂去表层土,取麦冬根际2 cm范围内土壤,每实验区随机采样5点混合,作为一个土壤样品,样品采集后立即放4℃冰盒保存,24 h内转移到-20℃保存。于2009年4月收获麦冬块根,计算各试验田的平均产量。

1.2 统计土壤主要功能微生物的数量

采用MPN法统计土壤中的氨化细菌、硝化细菌、好气性纤维素分解菌和固氮菌等生理菌群的数量,培养基分别使用蛋白胨氨化培养基、改良Stephenson培养基、Hutchinson培养基和Ashby培养基^[9]。

1.3 提取土壤样品中微生物总DNA

总DNA提取方法采用SDS-酚氯仿抽提法^[10]。称取1 g土壤样品,加入1 mL磷酸钾缓冲液(pH 7.0),振荡使其充分悬浮,加入50 μL 100 mg/mL溶菌酶,37℃水浴30 min后,再加入125 μL 20% SDS在65℃中水浴30 min,期间每5 min上下轻轻颠倒混匀,12000 r/min离心5 min。取上清液,加入等体积酚氯仿(Tris-苯酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1, V/V/V)静置5 min,12000 r/min离心5 min。吸取上清,加等体积氯仿,12000 r/min离心5 min,重复2次。吸取上清加入等体积异丙醇冰浴2 h,12000 r/min离心5 min。沉淀用75%乙醇洗,12000 r/min离心5 min,重复2次。晾干后加50 μL 无菌超纯水溶解,-20℃保存。

DNA用TIANGel Midi Purification Kit 普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(普通离心柱型)纯化。

1.4 土壤细菌 16S rDNA PCR-DGGE

扩增 16S rDNA 的 V3 区片段, 选用细菌通用引物对^[11] F341-GC: 5'-CGCCGCGCGCGCGGCGG GCGGGGCGGGGACGCGGGGCTACGGGAG GCAGCAG-3'; R518: 5'-ATTACGCGGCTGCTGG -3'。所有 PCR 反应均在 50 μ L 标准反应体系中进行, 其中含有: 5 μ L 10 \times Buffer (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L MgCl₂, pH 8.3), 2 μ L 10 mmol/L 混合 dNTPs, 各 2 μ L 10 μ mol/L 引物 F341 和 R518, 2 μ L DNA 模板, 1 μ L 2.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶, 加超纯水至 50 μ L。扩增反应按下述程序进行: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 93 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 30 min。扩增反应混合物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

DGGE 电泳采用 DcodeTM Universal Mutation Detection Sytem (Bio-Rad)。经垂直电泳和间歇电泳所确定的电泳条件为: 8%丙烯酰胺凝胶, 30%–70% 变性梯度, 1.00 mm 胶厚度, 1 \times TAE 电泳缓冲液, 150 V 稳压, 60 $^{\circ}$ C 恒温下电泳 260 min。电泳结束后使用硝酸银染色, 显色后拍照。

1.5 DGGE 图谱分析

采用 QuantityOne-1-D 软件 (Version 4.62) 对 DGGE 条带进行数字化分析, 采用 Shannon-Wiener 指数(H)、丰富度(S)和均匀度(E)来评价土壤微生物群落的多样性, 公式为: $H = -\sum (P_i \times \ln P_i)$; $E = H/\ln S$ 。式中, P_i 为某一条带的灰度值与该条带所在的泳道中所有条带总灰度平均值的比值, S 为每一泳道的总条带数^[12]。利用 SPSS11.5 软件, 根据泳道的 P_i 值进行主成分分析(PCA)。

2 结果与分析

2.1 连作对麦冬根际细菌群落结构多样性的影响

麦冬重茬与正茬不同时期根际细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱见图 1, 由图可以看出, 平行样之间条带位置及亮度构成的整体形貌很接近, 说明平行样间具有很好的重复性, 该方法能较好的呈现所分析土壤中细菌群落的结构及其变化; 连作后根际细菌的条带数量及亮度仍有一定的相似性, 但也显示有一些条带增加或缺失。

进一步通过软件将 DGGE 条带进行数字化处理, 得到表示土壤多样性指数的 Shannon-Wiener 指数(H)(S-W 指数)、丰富度和均匀度指数, 见表 1。由

表中各个时期样本的多样性指数我们可以看到, 在麦冬生长之初, 正茬土壤中的微生物多样性指数高于重茬, 之后到 7 月份正茬土壤中细菌多样性下降, 而重茬土壤中却上升了, 到 12 月份正茬中则恢复与重茬相近; 正茬土壤细菌多样性在 3 月份与 12 月份没有显著性差异, 而与重茬土壤 3 月份和 7 月份以及正茬土壤 7 月份的细菌多样性有显著性差异。正

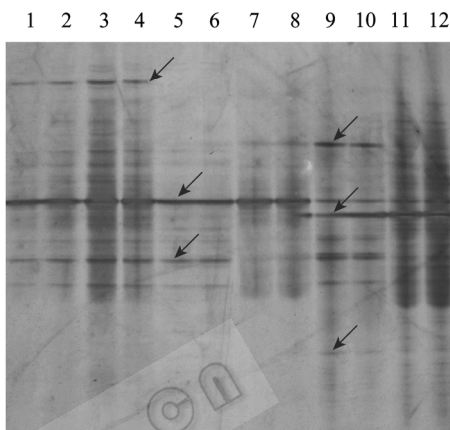


图 1 麦冬不同时期根际细菌 16S rDNA DGGE 图谱
Fig. 1 DGGE patterns of 16S rDNA fragments amplified with DNA from liriopie rhizosphere soil samples

注: 1,2: zc322; 3,4: cc322; 5,6: zc719; 7,8: cc719; 9,10: zc128; 11,12: cc128; zc 为正茬; cc 为重茬; 322, 719 和 128: 采样时间分别为 3 月 22 日、7 月 19 日和 12 月 8 日。

Note: 1,2,5,6,9,10: Normal cropping rhizosphere soil samples at 22 March, 19 July, 8 December 2008, respectively; 3,4,7,8,11,12: Continuous cropping rhizosphere soil samples at 22 March, 19 July, 8 December 2008, respectively.

表 1 麦冬根际细菌 16S rDNA PCR-DGGE 图谱多样性指数(H)、均匀度指数(E)和丰富度(S)
Table 1 Shannon-Wiener diversity (H), evenness index (E) and abundance index (S) of the bacterial community in liriopie rhizosphere soils

样本 Sample	多样性指数 Shannon-Weaver diversity	均匀度指数 Evenness index	丰富度 Abundance index
ZC322	3.66 \pm 0.01a	0.87	67.5 \pm 0.5a
CC322	3.36 \pm 0.14b	0.84	55.0 \pm 5.0b
ZC719	3.33 \pm 0.15b	0.84	53.5 \pm 4.5b
CC719	3.40 \pm 0.17b	0.82	61.5 \pm 5.5b
ZC128	3.72 \pm 0.02a	0.90	63.5 \pm 0.5a
CC128	3.69 \pm 0.04a	0.89	63.5 \pm 0.5a

注: ZC: 正茬; CC: 重茬; 322, 719和128: 采样时间分别为3月22日, 7月19日和12月8日; a, b表示在 $P < 0.05$ 水平下有显著差异。

Note: ZC: Normal cropping; CC: Continuous cropping; 322, 719, 128: Sampling at 22 March, 19 July, 8 December 2008, respectively. Means of 3 replicates \pm standard error. Values in the same column followed by different letters (a,b) are significantly difference ($P < 0.05$).

茬土壤中细菌群落多样性经历了先降后升的过程,与重茬土壤中一直上升的趋势有较大差异。

2.2 连作对麦冬根际细菌群落结构组成的影响

利用 SPSS 软件对 DGGE 图谱各泳道每个条带的 P_i 值进行主成分分析,结果见图 2。主成分分析结果显示, ZC322 与 ZC719 相近, ZC128 与 CC322 和 CC719 相近,而 ZC128 独处一区,在各个时期重茬麦冬根际细菌群落结构组成与正茬麦冬均发生显著分离。

2.3 连作对土壤主要生理菌群的影响

利用 MPN 法统计得到块根膨大期麦冬根际土壤中的氨化细菌、硝化细菌、纤维素分解菌和固氮菌的数量,见表 2。由表可以看出,连作后土壤中的氨化细菌和纤维素分解菌数量增加,而硝化细菌和固氮菌的数量大幅减少,土壤细菌功能群的数量有明显变化,会影响它们所参与的土壤物质元素循环,提示土壤细菌群落的生态功能发生了改变。

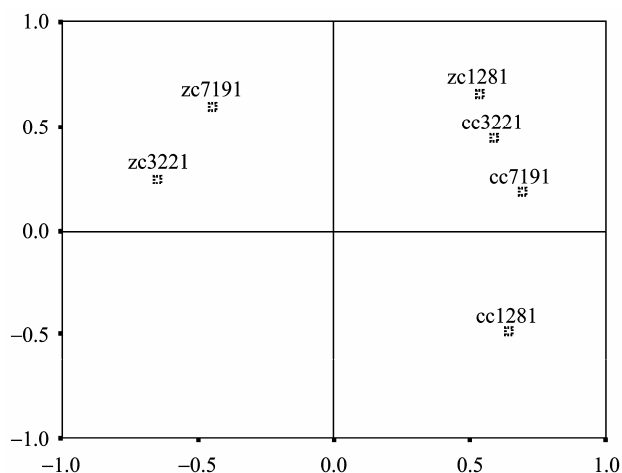


图 2 土壤微生物群落结构主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of the microbial communities in rhizosphere soils

注: ZC: 正茬; CC: 重茬; 322, 719 和 128: 采样时间分别为 3 月 22 日, 7 月 19 日和 12 月 8 日。

Note: ZC: Normal cropping; CC: Continuous cropping; 322, 719, 128: Sampling at 22 March, 19 July, 8 December 2008, respectively.

表 2 主要土壤功能菌群的数量
Table 2 The amount of soil main functional bacteria

样本 Sample	氨化细菌 Amonifying bacteria (g/dry soil)	硝化细菌 Nitrobacteria (g/dry soil)	固氮菌 Azotobacter (g/dry soil)	纤维素分解菌 Cellulose decomposition bacteria (g/dry soil)
正茬 Normal cropping	5.0×10^6	3.5×10^3	1.65×10^2	2.5×10^2
重茬 Continuous cropping	6.0×10^6	2.0×10^3	1.10×10	5.5×10^2

2.4 连作对麦冬产量的影响

重茬与正茬试验田所收获的块根经过严格的分组、清除表面的泥土后计算为: 平均产量分别是 375 和 525 g/m², 前者只有后者的 70.6%左右, 进一步实验证实了连作会使块根的产量降低。

3 讨论

正茬麦冬生长过程中, 从 3 月份至 7 月份为麦冬恢复生长期, 麦冬生长缓慢, 其根际细菌的多样性指数出现下降现象, 之后伴随着麦冬的快速生长, 土壤中细菌的多样性指数在块根膨大期恢复到初期水平。在连作情况下, 初期重茬麦冬根际细菌群落结构多样性指数低于正茬麦冬, 经过麦冬生长期, 土壤中细菌群落多样性指数快速增加, 到麦冬块根膨大期, 重茬土壤细菌群落多样性指数与正茬土壤没有显著差异, 可以看到连作使得麦冬根际微生物群落多样性的变化趋势发生了改变(表 1)。进一步对

土壤细菌群落的 DGGE 图谱进行主成分分析显示, 各个时期的重茬麦冬根际细菌群落结构组成与正茬均发生显著分离(图 2), 这表明连作后土壤细菌群落的结构组成有明显变化。因为作物连作时, 土壤环境相对稳定, 因而对土壤根际微生物的繁殖发育具有定向选择性, 促进或抑制某些微生物生长, 进而改变正常情况下的微生物群落的多样性和土壤的生物活性。根际土壤微生物功能的差异将影响植物所需营养物质的提供^[13], 这又将会影响到植物的生长发育。

从我们的研究结果看, 正常麦冬经过块根膨大期后到第 2 年春季, 根际细菌多样性下降; 如果继续在这片地栽种麦冬, 也就是成为重茬麦冬, 在土壤定向选择压力下, 根际微生物不仅表现为总真菌数上升、总细菌数下降的趋势^[8], 而且细菌群落的结构组成发生了显著的变异, 使得根际土壤微生态环境向不利于麦冬块根膨大的方向变化。对主要功能

细菌群的研究表明, 土壤中的氨化细菌和纤维素分解菌数量增加, 硝化细菌和固氮菌的数量大幅减少, 从中可以反映连作麦冬根际氮素营养中铵态氮的形式增加^[13]。有研究显示, 当植物以铵态氮的形式吸收氮素, 会引起土壤中 H^+ 增加, pH 值下降^[14], 从而导致植物生长不良或发病率提高。例如, 在白菜栽培中施用铵态氮田块的白菜黄化病发生率显著高于施用硝态氮的田块, 番茄青枯病在酸性土壤中的发生率显著高于中性和碱性土壤中的发病率^[15]。因此连作情况下, 根际细菌群落作为重要的介导因素, 可能通过影响土壤中营养元素的供给形式对麦冬进行反作用。同时连作后麦冬的产量只有正常的 70.6%, 这表明麦冬连作减产与根际细菌群落的变化相关。

由以上讨论可知, 连作后麦冬根际细菌群落组成及功能的改变, 使得根际土壤微生态环境发生了变化, 这与麦冬块根产量降低相关。但连作后麦冬根际微生物群落除了上述功能菌外, 其组成中还有哪些菌群发生了大的改变, 以及它们是如何影响麦冬产量的还有待进一步研究。

4 结论

本研究发现连作对麦冬根际土壤细菌群落的结构组成和多样性变化趋势有明显影响; 在麦冬块根膨大期, 连作使得土壤中的氨化细菌和纤维素分解菌数量增加, 而硝化细菌和固氮菌的数量大幅减少, 土壤细菌功能群的数量有明显变化。对比发现重茬麦冬的产量仅为正茬的 70.6%, 表明麦冬连作减产与其根际土壤细菌群落的变化相关。

致谢: 衷心感谢华中科技大学同济医学院的陈家春教授和王小剛副教授在麦冬种植及采样等方面给予的支持与帮助。

参 考 文 献

[1] 阮维斌, 王敬国, 张福锁, 等. 根际微生态系统理论在连作障碍中的应用. 中国农业科技导报, 1999, 1(4):

53-58.

- [2] 孙波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境III: 土壤质量评价的生物学指标. 土壤, 1997(5): 225-234.
- [3] Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 2008(320): 1034-1039.
- [4] Brussaard L, Ruiters PC, Brown GG. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2007(121): 233-244.
- [5] 赵萌, 李敏, 王森焱, 等. 西瓜连作对土壤主要微生物类群和土壤酶活性的影响. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1251-1254.
- [6] 苗淑杰, 乔云发, 韩晓增. 大豆连作障碍的研究进展. 中国生态农业学报, 2007, 15(3): 203-206.
- [7] 吕卫光, 余廷园, 沈其荣, 等. 黄瓜连作对土壤理化性状及生物活性的影响研究. 中国生态农业学报, 2006, 14(2): 119-121.
- [8] 李琼芳. 不同连作年限麦冬根际微生物区系动态研究. 土壤通报, 2006, 37(3): 563-565.
- [9] 李振高, 骆永明, 腾应. 土壤与环境微生物研究法. 北京: 科学出版社, 2008: 93-104.
- [10] Liptay JR, Enzinger C, Johnsen K, et al. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004(36): 1607-1614.
- [11] Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreas L. Soil Community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J*, 2000(64): 1382-1388.
- [12] Zak JC, Willig MR, Moorhead DL, et al. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol Biochem*, 1994(26): 1101-1108.
- [13] 李秀英, 赵秉强, 张夫道, 等. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1591-1599.
- [14] 吴连举, 赵亚会, 关一鸣, 等. 人参连作障碍原因及其防治途径研究进展. 特产研究, 2008, 30(2): 68-72.
- [15] 赵尊练, 杨广君, 巩振辉, 等. 克服蔬菜作物连作障碍问题之研究进展. 中国农学通报, 2007, 23(12): 278-282.