

新疆南疆不同连作年限棉田土壤微生物群落结构的变化

张海燕^{1,2} 贺江舟^{1,2} 徐彪¹ 龚明福¹ 张利莉^{1,2*}

(1. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)
(2. 新疆塔里木大学生命科学学院 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 通过传统培养和 PCR-DGGE 技术, 分析了新疆南疆不同连作年限的棉田土壤微生物的变化情况, 结果表明: 随着连作年限的增加, 土壤中细菌、真菌的数量、比例、多样性指数的变化表现为先增加后下降, 至连作 15 年时达到较低值, 之后随着连作年限的继续增加又表现为回升的趋势。细菌的种类数、优势种在不同连作年限的样品中的变化不明显, 多样性指数变化幅度较小, 群落结构变化不大; 真菌的种类数、优势种在不同连作年限的土样中的变化较大, 群落结构变化较大, 随着连作时间的增加, 优势种的种类趋于单一化, 真菌的群落结构受到连作年限的影响更明显。

关键词: 连作棉田, 土壤微生物, DGGE, 生物多样性

Variety of Soil Microbial Structure in Continuous Cropping Cotton Field in South Xinjiang

ZHANG Hai-Yan^{1,2} HE Jiang-Zhou^{1,2} XU Biao¹ GONG Ming-Fu¹
ZHANG Li-Li^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Biological Resource Protection and Utilization of Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Group, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)
(2. College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

Abstract: Through the method of traditional culture and PCR-DGGE, variety of soil microbial structure in continuous cropping cotton fields in south Xinjiang was analyzed. The results showed with the increase of continuous cropping years, the number of bacteria and fungi, ratio of total bacteria and fungi and Shannon-Weiner index increased at first, then decreased, and after continuous cropping 15 years increased again, it was a lower point in the sample of continuous cropping cotton 15 years. Bacterial diversity and structure changed slightly, while the quantity and species of dominant bacteria were not much different in the fields with different continuous cropping years. Compared with bacteria, fungi structure was more sensitive to continuous cropping years, dominant fungi population presented a single

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项项目(No. 2007CB116303); 国家自然科学基金项目(No. 30960015); 新疆生产建设兵团基础研究项目(No. 2007JC06)

* 通讯作者: Tel: 86-997-4681612; 信箱: zhang63lyly@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-11-24; 接受日期: 2010-01-21

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

tendency and lower species diversity.

Keywords: Continuous cropping cotton field, Soil microbes, DGGE, Biodiversity

棉花是我国主要的经济作物,在我国国民经济中占有很重要的地位。我国中、东部棉花因连作障碍,种植面积不断缩小,目前新疆已成为我国棉花的主要种植区,南疆的很多耕地自开垦以来一直进行棉花连作,新疆棉花由于多年连作而导致棉花病害,尽管棉花枯、黄萎病的发生也十分严重,但并未形成规律性的连作障碍,这一现象引起人们的关注。连作障碍是植物和土壤两个系统内部诸多因素综合作用的结果^[1],土壤微生物对维持土壤系统稳定性、健康和质量非常关键^[2-3],对植物生长具有重要作用^[4]。土壤微生物群落结构的变化会直接影响土壤功能发挥^[5]。有研究表明南疆连作棉田几种可培养有益细菌与连作年限变化之间没有明确的规律,棉花连作对土壤有益细菌的影响较小^[6]。然而,土壤微生物除了可培养有益细菌外,还有其他很多类型的微生物,诸如放线菌、真菌以及一些不可培养的微生物,它们对土壤生态系统可能起着重要的作用,目前尚未见有相关系统研究报道。据估计大约有 90%的微生物不可培养^[7],这限制了人们对土壤微生物资源及其基因资源的研究与利用。目前,对土壤微生物的研究获得巨大进展主要是由于借助了分子生物学的手段,直接从土壤中获得微生物的宏基因组 DNA,利用变形梯度凝胶电泳(DGGE)技术或构建 16S rDNA 文库的方法,分析土壤微生物群落结构。1998 年, Muzyer 等首次将 DGGE 技术应用于分析其微生物种群结构的差异变化^[8],并证实了这种检测技术以其高灵敏性在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和种群差异方面具有独特的优越性。越来越多的人将其应用于追踪微生物的变化与环境条件变化的规律^[9-11]并取得较好的结果。

棉花枯、黄萎病均为土传性的病害,土传病害流行的主要原因在于土壤微生物群落结构失衡,土壤微生态平衡被破坏。本研究以新疆南疆不同连作年限的棉田土壤为研究对象,通过可培养和免培养的方法分析不同连作年限棉田土壤微生物物种数量和多样性变化,揭示不同连作年限对棉田土壤微生物群落结构的影响,为构建土壤健康的微生态系统提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

采样地点位于新疆生产建设兵团农一师三团,地处叶尔羌河冲积平原下游,属于暖温带大陆性干旱荒漠气候,降雨少,光照强,土壤为灰色沙壤土^[12]。于 2008 年 8 月进行土壤样品的采集,棉花种植连作时间分别为 1、2、5、10、15、20 和 25 年,每个样地随机选择 15 个采样点,取棉花窄行间的 0-25 cm 耕层土,均匀混合,过筛。

1.2 可培养棉田土壤细菌、真菌分离计数

土壤细菌和真菌的分离测定采用稀释平板法^[13]。土壤细菌采用牛肉膏蛋白胨(NA)培养基,稀释梯度为 10^{-3} 。土壤真菌采用添加有孟加拉红的马丁氏培养基,稀释梯度为 10^{-2} 。每一样品设 3 个重复,分别计算每克干土中细菌、真菌的数量。

1.3 土壤微生物的 DGGE 分析

提取土壤宏基因组 DNA 进行 PCR 反应:细菌的 16S rDNA 的扩增使用引物 F27 和 R1522,然后以上扩增产物为模板,使用引物 F357-GC 和 R518 进行嵌套式 PCR 扩增;真菌 18S rDNA 的扩增使用引物 Geo11 和 GeoA2,然后以上述扩增产物为模板,利用引物 NS1-GC 和 NS2 进行嵌套式 PCR 扩增。扩增产物再利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测^[14]。

PCR 反应产物的 DGGE 分析采用基因突变检测系统(Bio-Rad, DcodeTM)对 PCR 反应产物进行分离。细菌的 DGGE 检测分析用浓度为 10%、变性剂范围为 30%-60%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,真菌分析用浓度为 6%、变性剂范围为 25%-45%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,150 V,6 h。EB 染色 15 min 后,用凝胶成像系统(Bio-Rad, Gel Doc 2000TM)观察拍照。

1.4 DGGE 图谱分析及数据分析

采用 Quantity One 软件对 DGGE 条带进行数字化分析,依据 Quantity One 软件分析样品的 DGGE 条带的位置和亮度的数字化结果,计算样品中可检测到的 DGGE 条带数,并利用 DGGE 图谱的数字化结果进行微生物群落结构的多样性指数计算和主成分分析。

多样性指数: Shannon-Weiner index = $-\sum(n_i/N)$

$\times \ln(n!/N)$

式中的 $n!$ 为每个带的亮度, N 为某一样品所有亮度的和。

微生物群落结构组成的分析采用 Statistica 6.0 软件处理, 聚类采用 Quantity One 软件。

2 结果与分析

2.1 不同连作年限棉田土壤细菌、真菌总数

分析结果表明, 不同连作年限的棉田土壤细菌、真菌数量有明显差异, 细菌、真菌数量变化均达差异显著水平 ($P < 0.05$), 整体出现波动的动态变化趋势(图 1)。无论细菌还是真菌的数量在连作年限较短的时候均较低, 随着连作年限的增加逐渐增加, 到连作 5 年达到最高值, 之后种群数量又逐渐降低, 到连作 15 年时达到较低值, 随后又出现升高的趋势。细菌在数量上占绝对优势, 细菌与真菌总数的比值变化见图 2。在连作年限较低的情况下, 细菌所占的比例较高, 连作 5 年以上的样品中, 所占的比例较低, 并且在连作 15 年达到最低, 连作 20 年和 25 年的土样中细菌所占的比例开始逐渐回升。

2.2 不同连作年限棉田土壤微生物群落的变化

2.2.1 不同连作年限棉田土壤细菌群落变化情况:

细菌的 DGGE 分析结果如图 3 所示, 利用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱的分析结果, 可以看出细菌的 DGGE 图谱条带较多, 表明细菌的种类比较丰富, 每个样品中的主要条带差别不大, 表明细菌优势种的差别并不大, 多数条带在每个泳道中几乎都存在, 泳道中的条带的差别主要表现在条带的亮弱强度的差别, 表明不同样品中细菌种类组成差别不大, 但不同种类在数量上有一定的差别。Quantity One 软件聚类结果表明, 连作 2 年的土样和连作 5 年的土样首先聚类, 相似性较高, 其次与连作 10 年的样品较为相似, 连作 15 年的样品与连作 25 年的样品的相似程度达到 79%, 连作 20 年的土样与其他的土壤样品的相似程度较低, 连作 1 年的土壤的细菌种类数量单独聚为一类, 与其他的样品的相似程度最低。主成分分析(图 4)显示, 不同样品的根际细菌群落结构的组成差异, 除了连作 10 年的样品, 其他多数样品在主成分分析中横坐标的变异小于纵坐标, 这表明不同的年限的样品在横坐标方向上的差异程度除了连作 10 年的样品以外, 其他样品之间的差异

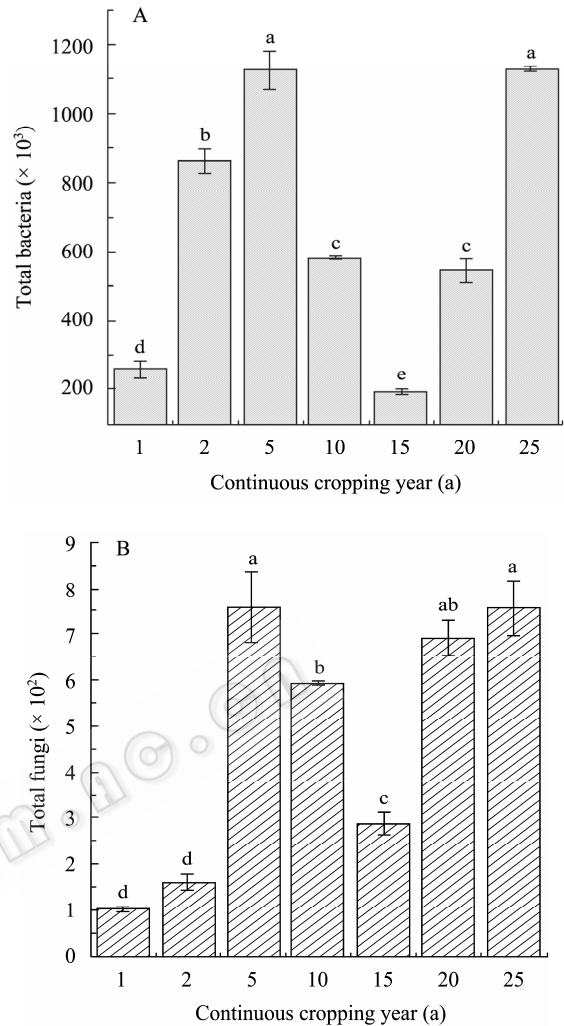


图 1 连作棉田土壤细菌、真菌总数

Fig. 1 Total bacteria (A) and fungi (B) in continuous cropping cotton field soil

注: 不同字母代表差异显著(LSD 检测 $P < 0.05$)。

Note: Different letters are different (LSD test $P < 0.05$).

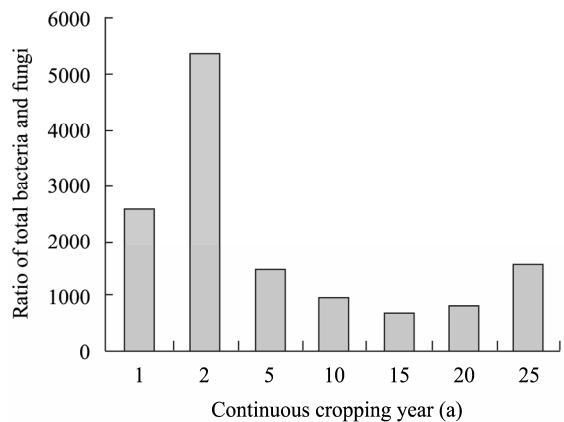


图 2 连作棉田土壤细菌总数与真菌总数的比值

Fig. 2 Ratio of total bacteria and fungi in continuous cropping cotton field soil

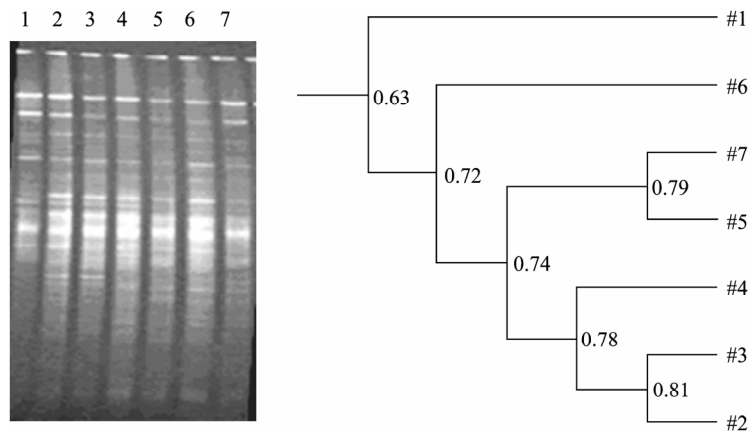


图3 不同连作年限棉田土壤细菌 16S rDNA 片段的 DGGE 图谱及其遗传相似性聚类分析

Fig. 3 DGGE profile of bacteria 16S rDNA fragment and genetic similarity community of continuous cropping cotton field soil

注: 1: 连作 1 年; 2: 连作 2 年; 3: 连作 5 年; 4: 连作 10 年; 5: 连作 15 年; 6: 连作 20 年; 7: 连作 25 年。

Note: 1: Continuous cropping cotton 1 year; 2: Continuous cropping cotton 2 years; 3: Continuous cropping cotton 5 years; 4: Continuous cropping cotton 10 years; 5: Continuous cropping cotton 15 years; 6: Continuous cropping cotton 20 years; 7: Continuous cropping cotton 25 years.

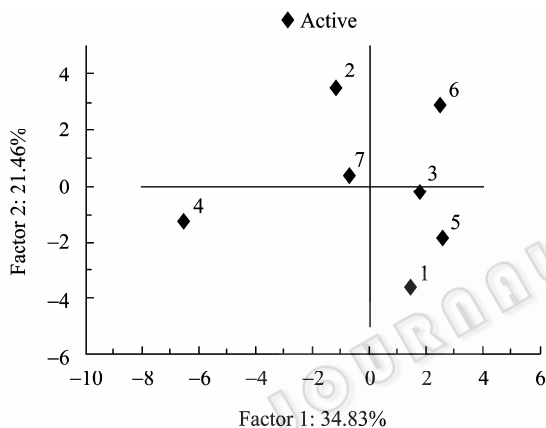


图4 连作棉田土壤细菌群落结构的主成分分析

Fig. 4 Principle components analysis ordination diagrams of bacterial community in cotton soil based on DGGE profile

注: 1: 连作 1 年; 2: 连作 2 年; 3: 连作 5 年; 4: 连作 10 年; 5: 连作 15 年; 6: 连作 20 年; 7: 连作 25 年。

Note: 1: Continuous cropping cotton 1 year; 2: Continuous cropping cotton 2 years; 3: Continuous cropping cotton 5 years; 4: Continuous cropping cotton 10 years; 5: Continuous cropping cotton 15 years; 6: Continuous cropping cotton 20 years; 7: Continuous cropping cotton 25 years.

较小,而在纵坐标方向分布较均匀,差异程度较小,总体上分析不同的连作年限的土壤中细菌的群落结构组成差异不明显。

利用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱数字化结果,计算 Shannon-Weiner 指数,如图 5 所示,细菌的多样性指数较高,表明包含的种类数目较多,个体分配的均匀度较高,连作 15 年的样品的多样性指数最低,表明其个体分配的均匀度及种类数目稍低,

在不同连作年限的土壤中细菌的多样性指数波动幅度不大,表明连作对于棉田土壤中细菌的多样性影响不大,土壤中细菌的种群稳定性较高,不易受到外界环境的影响。

2.2.2 不同连作年限棉田土壤真菌多样性变化情况: 真菌的 DGGE 分析结果如图 6 所示,利用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱的分析结果,可以看出,真菌条带数较细菌的少,代表着真菌的种类数较细菌的少,不同连作棉田的土壤样品真菌 DGGE 电泳的条带数目和强度均存在较大的差异,每个泳道中主条带的位置差别很大,代表着不同样品中真菌类型差别大、数量上的差别较明显、优势种的类型不同,连作 1、2 和 5 年的样品中,条带数较多,并且较亮的条带数较多,代表着这 3 个样品中真菌种类多,优势种类数较多,连作 10、15 年的样品中的较亮的条带数较少,并且总的条带数较少,连作 20 年和连作 25 年的样品中条带数虽然逐渐增多,但每个样品中相对较亮的条带仅有一条,表明连作年限较低的样品中真菌的种类数、优势种的种类数较多,连作 10、15 年的样品中真菌总的种类数、优势种数菌较低,连作 20 年和连作 25 年的样品种类数增多,但是优势种变得较为单一。利用 Quantity One 聚类的结果看出不同连作年限的样品间真菌的相似性与细菌的相似性不一致,真菌的 DGGE 图谱聚类分为两大类,连作 2 年与连作 10 年的样品之间的相似程度最高,其次与连作 15 年的样品较为相似,连作 1 年的样品

与连作 20 年的样品聚在一起, 其次与连作 5 年的土样较为相似, 连作 25 年的土样与其他的土壤样品的相似程度最低。进行主成分分析(图 7), 从而进一步显示不同样品的真菌群落结构的组成差异, 连作 1、5、15、25 年的样品分布于一个区域内, 连作 2、10、20 年的样品之间及其与连作 1、5、15、25 年的样品分布在不同的区域内, 总体分析表明不同的连作年限的土壤中真菌的群落结构组成差异明显。

连作棉田的真菌多样性指数分析结果如图 8 所示, 可以发现真菌的多样性指数普遍低于细菌的多样性指数, 表明真菌的种类数目和均匀度较细菌低, 连作 15 年的样品的多样性指数较低, 连作 10 年的土样的多样性指数最高, 连作 15 年的土样的真菌物种的数目和均匀度也较低, 连作 10 年土样的真菌物种的数目和均匀度也较高, 与细菌多样性指数变化相似。总体看真菌多样性指数变化幅度较细菌大, 表明连作对于棉田土壤的真菌的多样性影响较大, 土壤中真菌的种群稳定性较低, 易受到外界环境的影响。

3 讨论

DGGE 是一种较为直观分析土壤中微生物群落结构的方法, 本研究利用微生物计数和 DGGE 的方法对新疆南疆不同连作年限的棉田土壤细菌、真菌的群落结构组成及变化进行了研究。在不同样

品间, 真菌与细菌的聚类结果差别很大, 表明细菌和真菌类群受到连作条件的不同影响, 从连作棉田土壤中细菌和真菌的比值发现, 细菌始终占绝对优势, 细菌可能是对土壤生态系统贡献最大的类群; 主成分分析结果显示, 随着连作年限的变化, 细菌的群落结构变化不明显, 受到连作条件的影响较小, 可能是新疆南疆棉花连作障碍不明显的原因之一, 但是真菌的群落结构变化较明显, 可能是棉花连作过程中根际分泌物的累积或者棉花秸秆还田的过程中所产生的某些物质对真菌类群的影响更大一些, 至于棉花根际分泌物及秸秆还田所产生的物质成分及其对细菌和真菌的影响, 还有待于进一步研究。

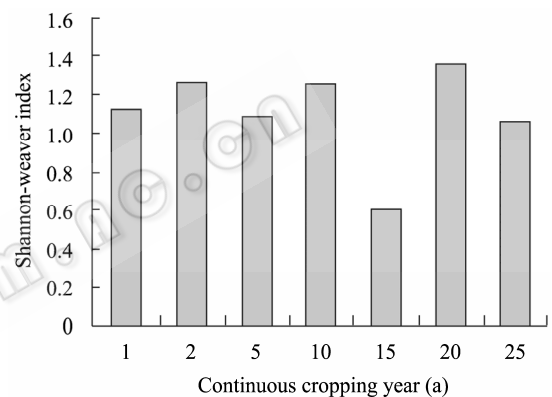


图 5 基于 DGGE 图谱的细菌多样性指数

Fig. 5 shannon-weiner index of bacterial community in cotton soil base on DGGE profile

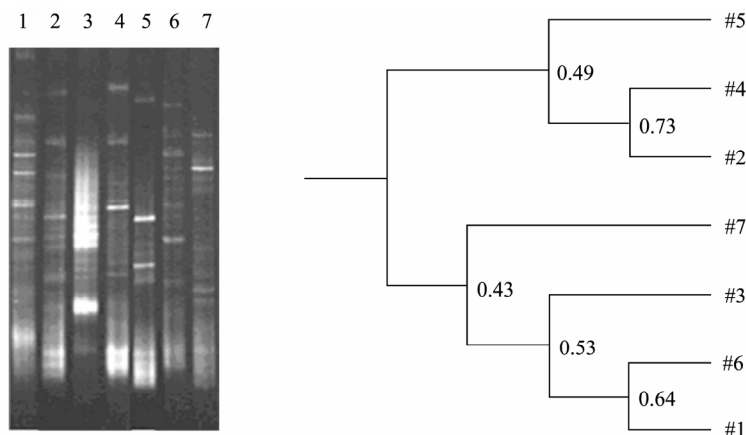


图 6 不同连作年限棉田土壤真菌 18S rDNA 片段的 DGGE 图谱及相似性聚类分析

Fig. 6 DGGE profile of fungi 18S rDNA fragment and similarity community in continuous cropping cotton field soil

注: 1: 连作 1 年; 2: 连作 2 年; 3: 连作 5 年; 4: 连作 10 年; 5: 连作 15 年; 6: 连作 20 年; 7: 连作 25 年。

Note: 1: Continuous cropping cotton 1 year; 2: Continuous cropping cotton 2 years; 3: Continuous cropping cotton 5 years; 4: Continuous cropping cotton 10 years; 5: Continuous cropping cotton 15 years; 6: Continuous cropping cotton 20 years; 7: Continuous cropping cotton 25 years.

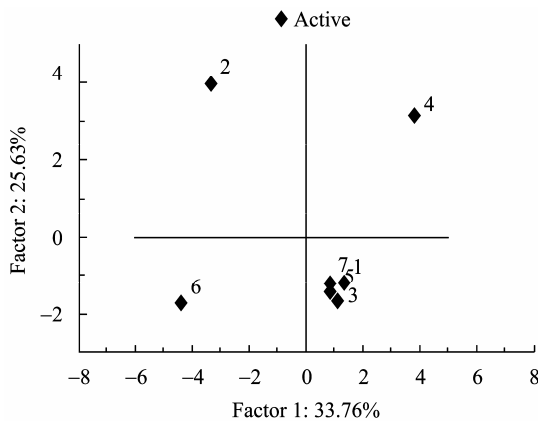


图7 不同连作棉田土壤真菌群落结构的主成分分析
Fig. 7 Principle components analysis ordination diagrams of fungi community of continuous cropping cotton field soil base on DGGE profile

注: 1: 连作1年; 2: 连作2年; 3: 连作5年; 4: 连作10年; 5: 连作15年; 6: 连作20年; 7: 连作25年。

Note: 1: Continuous cropping cotton 1 year; 2: Continuous cropping cotton 2 years; 3: Continuous cropping cotton 5 years; 4: Continuous cropping cotton 10 years; 5: Continuous cropping cotton 15 years; 6: Continuous cropping cotton 20 years; 7: Continuous cropping cotton 25 years.

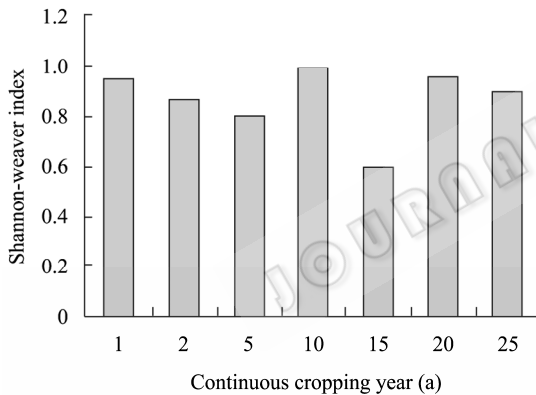


图8 基于 DGGE 图谱的真菌多样性指数
Fig. 8 Shannon-Weiner index of fungi community in cotton soil base on DGGE profile

连作障碍是严重影响农业生产的因素之一, 近年来, 许多学者^[15-17]对于不同作物连作后土壤中微生物的数量、群落结构进行了研究, 结果表明, 随着连作年限的增加, 土壤细菌的数量大大减少, 真菌数量明显增多。真菌数量的增多通常是土壤性质不良的反映指标。连作使细菌类群数量减少, 种群变化出现单一化的趋势。不少学者研究认为, 真菌型土壤是地力衰竭的标志, 细菌型土壤是土壤肥力提高的一个生物指标。但是在本研究中, 以新疆南疆不同连作年限的棉田土壤为研究材料, 并未发现这

种规律性的变化, 土壤随着连作年限的增加, 细菌、真菌的数量并没有呈现规律性的降低或者上升的趋势, 而是出现波动的态势。细菌的种类数、优势种在不同连作年限样品中较稳定, 真菌的种类数表现为先降低后增加的现象, 优势种群有单一化的趋势。新疆南疆有很多耕地自开垦以来一直在进行棉花连作, 并没有形成明显的连作障碍, 可能与土壤中微生物种群结构有很大的关系, 与新疆南疆气候、土壤条件等因素的特殊性有关系。近年来随着引种等原因, 新疆棉田在连作过程中也伴有枯、黄萎病的出现, 但并没有对产量产生较大影响, 可能也与棉田中的土壤微生态系统有关系, 分析了连作棉田中土壤细菌和真菌的数量、比例、种类、多样性, 发现连作15年是南疆棉田连作时间的特殊的值, 真菌、细菌的总数、比例、多样性指数均达到较低值, 但是随着连作年限的继续增加又表现为回升的趋势。新疆的南疆很多耕地由于直接开荒种植棉花, 在连作早期, 真菌、细菌的数量及多样性指数均较低, 由于其本底微生物的数量较少, 在连作的过程中随着有机物质的增多, 土壤微生态结构发生变化, 种类数量逐渐增多, 并且随着近年来的引种, 枯、黄萎病菌的入侵, 大大改变了原有的微生态结构, 连作的过程是土壤微生态系统的平衡在不断地被破坏到重建的过程, 到达15年时, 微生态系统的稳定程度达到最低, 微生物的数量、细菌和真菌的比值、以及多样性都达到较低的值, 此时是其微生态最为脆弱的时期, 而后随着连作年限的增加, 微生物的数量、细菌和真菌的比值、多样性指数又回升, 使其微生态系统趋于达到新的平衡状态, 从而构建相对稳定的微生态系统。

参考文献

- [1] 战秀梅, 韩晓日, 杨劲峰, 等. 大豆连作及其根茬腐解物对大豆根系分泌物中酚酸类物质的影响. 土壤通报, 2004, 35(5): 631-635.
- [2] Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 2004(42): 243-270.
- [3] 郭瑞英, 陈清, 李晓林. 土壤微生物-抑病性与土壤健康. 中国蔬菜, 2005(增刊): 78-82.

- [4] 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用. 土壤, 2003, **35**(1): 18–21.
- [5] 张晶, 张惠文, 李新宇, 等. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性. 应用生态学报, 2006, **17**(6): 1129–1132.
- [6] 龚明福, 赵夏博, 郑贺云, 等. 南疆连作棉田几种有益细菌的动态变化规律. 微生物学通报, 2009, **36**(4): 505–510.
- [7] Amann R, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, **59**(1): 143.
- [8] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1998, **3**(4): 1–27.
- [9] 傅以钢, 王峰, 何培松, 等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析. 中国环境科学, 2005, **25**(B6): 98–101.
- [10] Logemann S, Schantl J, Bijvank S, *et al.* Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **27**(3): 239–250.
- [11] Ishii K, Fukui M, Takii S. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **89**(5): 768–777.
- [12] 郑连真, 郁培培. 三团志. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1996.
- [13] Yoshinori M, Kanno T. Emission of trace gases resulting from rice straw burning. *Soil Science Plant Nutrition*, 1997(43): 849–854.
- [14] 张海燕, 王彩虹, 龚明福, 等. 一种简单有效且适于土壤微生物多样性分析的 DNA 提取方法. 生物技术通报, 2009(8): 151–155.
- [15] 胡元森, 刘亚峰, 吴坤, 等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. 土壤通报, 2006, **37**(1): 126–129.
- [16] 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.
- [17] 肖宏, 于明革. 不同连作苹果园土壤酶活性及微生物状况的调查研究. 山西果树, 2006(4): 5–6.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。