

不同蔬菜根际细菌群落多样性及轮作效应

刘守伟, 于慧颖, 吴凤芝

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以设施内常用的黄瓜、菜豆、番茄和芹菜为试材,采用 PCR-DGGE 技术,研究了 7 种轮作栽培模式对其土壤细菌群落结构多样性的影响。结果表明:第 1 茬 3 种蔬菜中番茄和黄瓜的根际土壤细菌群落结构多样性差异不显著,都极显著高于菜豆($P < 0.01$);第 2 茬轮作处理后,番茄、菜豆、黄瓜 3 种蔬菜与芹菜轮作均可较大幅度地提高根际土壤细菌群落多样性指数和均匀度指数。

关键词:蔬菜轮作;土壤细菌群落多样性;DGGE

中图分类号:S 154.3;S 604⁺.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0103-04

随着设施园艺的不断发展,设施内蔬菜栽种面积逐年增加,其种类也在不断增加,经济效益提高显著,但由此产生的蔬菜的连作障碍日趋明显^[1],成为亟待解决的问题。前人研究表明轮作可以提高作物产量^[2-3]、减轻病害^[4-6]、改善土壤微环境等^[3,7-8],有效解决了连作障碍问题,并已经取得一定的成绩。但其机理尚不十分明确,尤其是有关设施中不同蔬菜轮作对其根际土壤微生物群落多样性的影响还鲜见报道。

该研究以设施蔬菜中主要栽培的番茄、菜豆、芹菜和黄瓜为试材,进行 1 a 2 茬口的 7 种方式的轮作,采用 PCR-DGGE 技术对土壤根际微生物群落多样性进行分析,目的在于探讨不同蔬菜轮作对根际微生物群落多样性的影响,进一步揭示轮作可提高产量、降低病害的机理,为建立和推广合理的栽培制度及设施园艺的可持续发展提供技术支撑和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种为“罗斯喀”,番茄(*Solanum lycopersicum* L.)品种为“东农 709”,菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)品种为“八月绿”,芹菜(*Apium graveolens* L.)品种为“实心芹”。试验土壤为黑土,按照鲍士坦的方法^[9]测定土壤基本理化性质:土壤电导率 0.43 mS/cm, pH 7.64,有机质含量 3.51%,全氮 0.25%,全磷 0.82%,碱解氮 146.6 mg/kg,有效磷 284.2 mg/kg,

速效钾 341.8 mg/kg。

1.2 试验设计

试验于 2006 年 4~10 月在东北农业大学园艺设施工程中心大棚和园艺学院蔬菜生理生态研究室进行,大棚面积 667 m²,试验设 7 个轮作处理(表 1),1 a 2 茬,采取垄作,垄距 60 cm,株距 40 cm,每种轮作处理设 3 次重复,随机区组排列,每个重复面积为 0.6 m×4 m×6 m,重复间距为 0.6 m×2 m×6 m。在第 1 茬拉秧前(2006 年 7 月 15 日)和第 2 茬蔬菜拉秧前(2006 年 10 月 20 日)用抖根法^[10]采集各处理每次重复中的中间 2 垄黄瓜根际土壤,过 80 目筛,保存于-80℃冰箱,用于测定各蔬菜根际细菌群落多样性。

表 1 轮作处理及编号

处理编号	第 1 茬	第 2 茬
Number of treatment	First crop of three vegetables (2006-04-25)	Second of crop rotation vegetables (2006-07-25)
I	番茄	菜豆
II	番茄	芹菜
III	菜豆	番茄
IV	菜豆	芹菜
V	黄瓜	菜豆
VI	黄瓜	芹菜
VII	黄瓜	番茄
CK	黄瓜	黄瓜

1.3 试验方法

1.3.1 土壤微生物群落总 DNA 的提取 参照焦晓丹等^[11]的方法提取土壤总 DNA,纯化采用 Promega Wizard 纯化试剂盒纯化方法。提取的土壤总 DNA 的大小和质量通过 0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.3.2 PCR 扩增反应条件 根据文献^[12]设计细菌 16S rDNA 序列 V3 区段具有特异性的 PCR 引物 338 fGc 和 518 r,引物由上海生工公司合成。其序列分别为: F338GC(5'-CgC CCg CCg CgC gCg gCgggC ggg gCg

第一作者简介:刘守伟(1974-),女,博士,副教授,研究方向为设施园艺与蔬菜生理生态。

责任作者:吴凤芝(1963-),女,博士,教授,博士生导师,“龙江学者”特聘教授,研究方向为设施园艺与蔬菜生理生态。E-mail: fzwu2006@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971998)。

收稿日期:2012-04-22

ggg gCA Cgg ggg gAC TCC TACGgg AggCAG CAg-3') 和 R518(5'-ATT ACC gCg gCT gCT gg-3'). PCR 为 50 mL 体系,其中含 1 mL (约 20 ng) DNA 样品,1.5 mmol/L MgCl₂,0.25 mol/L 正反向引物,400 mmol/L dNTP,1U Taq DNA 聚合酶及 1 倍的反应缓冲液,用无菌双蒸水补到 50 mL。PCR 反应程序为:94 ℃ 变性 4 min;紧接着再 94 ℃ 变性 0.5 min,55 ℃ 退火 0.5 min,72 ℃ 延伸 5 min,共 30 个循环;最后在 72 ℃,延伸 5 min,PCR 产物长约 250 bp。

1.3.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析 凝胶变性梯度为 30%~60%。用 1×TAE 作为电泳缓冲液。每孔上样量为 30 mL PCR 产物加适量的加样缓冲液。电压 150 V,温度 60 ℃,电泳 300 min 后,取凝胶进行银染,最后在扫描仪下观察结果并拍照。

1.4 数据分析

采用 Quantity One(Bio-Rad)软件进行 DGGE 图谱数字化、标准化处理,并计算土壤细菌群落结构多样性指数和均匀度指数;试验中原始数据的整理采用 Microsoft Excel 2003 软件完成;数据处理采用 SAS8.1 和 SPSS 软件,方差分析使用 ANOVA 过程。序列分析采用 NCB I 的 Blast 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列同源性分析,采用 Sequence match 程序(Ribosomal Database Project II-Release 9 website)进行细菌分类分析。

2 结果与分析

2.1 不同蔬菜根际微生物基因组 DNA 的提取纯化及 PCR 扩增结果

图 1a 为提取并纯化后的第 1 茬番茄、菜豆和黄瓜根际土壤微生物总 DNA 电泳图,图 1b 为第 2 茬不同蔬菜轮作后根际土壤微生物总 DNA 提取纯化后电泳图,不同处理均出现大于 10kb 的一条纯 DNA 条带,表明已获得比较纯的土壤微生物总 DNA,可用于下一步的 PCR 扩增。

将提取的 DNA 原液用无菌水稀释 30 倍,采用对大多数细菌的 16S rDNA V3 区通用的引物 F338-GC 和 R518 进行扩增,PCR 产物片段长约 230 bp,如图 2 所示。

2.2 不同蔬菜根际土壤细菌 DGGE 图谱分析

由图 3a 可知,条带 a、c 只在番茄根际土壤中出现,条带 b 仅在菜豆中出现,条带 d 在菜豆及黄瓜中出现,条带 e 在番茄和黄瓜根际土壤中出现。其余条带则为共有条带。

DGGE 条带灰度大说明该种细菌数量大^[13],图 3b 表明,处理Ⅳ的条带亮度要比其它处理强,CK 则最暗。条带 a 出现在处理Ⅱ中,条带 c 出现在处理Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ中,条带 i 在处理Ⅰ、Ⅲ中出现,CK 中有特异条带 h,各处理都具有条带 f、g、j,不同的是在处理Ⅳ中,f、j 条带亮度强于其它处理和 CK。

对各处理根际土壤细菌的 DGGE 图谱中各泳道样

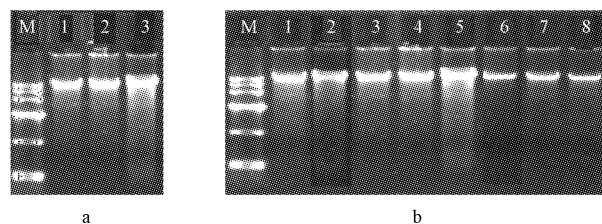


图 1 不同蔬菜根际土壤微生物总 DNA 提取图

注:a 为第 1 茬蔬菜,M:DL 15 000 marker;1~3 分别为:番茄、菜豆、黄瓜,b 为第 2 茬蔬菜,M:DL 15 000 marker;1~8 分别为:处理Ⅰ~Ⅶ,CK。图 2 同。

Fig. 1 DNA patterns of genome DNA of vegetable soil microbes

Note: a indicates the first crop of three vegetables. M:DL 15 000 marker. 1~3: tomato,bean,cucumber. b indicates the second of crop rotation vegetables. M:DL 15 000 marker. 1~8: Treatment I~VII,CK. The same as Fig. 2.

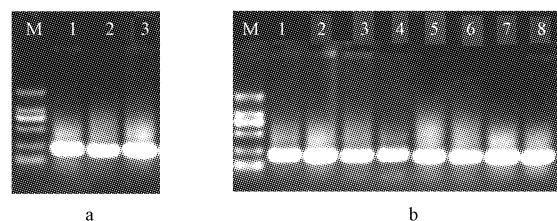


图 2 不同蔬菜根际土壤细菌 16S rDNA 基因扩增产物

Fig. 2 16S rDNA gene amplification product of vegetable soil bacteria

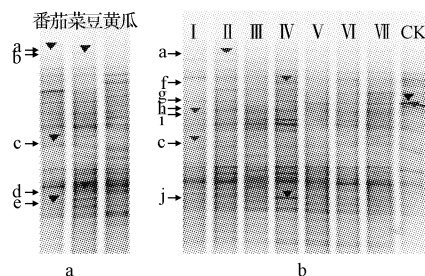


图 3 不同蔬菜根际土壤细菌 DGGE 电泳图

注:a 为第 1 茬蔬菜,M:DL15 000 marker;b 为第 2 茬蔬菜,M:DL 15 000 marker。

Fig. 3 Electropherogram of DGGE of vegetable soil bacteria

Note:a indicates the first crop of three vegetables. M:DL 15 000 marker;b indicates the second of crop rotation vegetables. M:DL 15 000 marker. 品间的相似性进行比较(图 4),泳道比较图中横向的百分数表示戴斯系数,纵向的数字表示第 x 泳道实际条带分布。由图 4a 可知,第 1 茬蔬菜中,黄瓜和菜豆的根际土壤细菌群落结构相似性较高,为 81%;由图 4b 可知,在第 2 茬的各个处理中,处理Ⅳ和处理Ⅴ、处理Ⅰ和处理Ⅱ、处理Ⅵ和处理Ⅶ的相似性均较高,分别为 87%、84%、82%。

2.3 不同蔬菜根际细菌群落结构多样性指数及均匀度指数分析

图 5a 表明,种植第 1 茬后,3 种蔬菜中,以黄瓜的根际土壤细菌群落结构多样性为最高,其次为番茄,与番

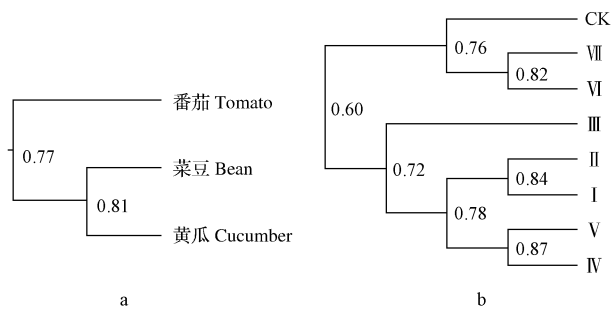


图4 不同蔬菜根际土壤细菌群落相似性分析图

注:a为第1茬蔬菜,b为第2茬蔬菜。

Fig. 4 Cluster analysis (UPGMA) of bacterial communities of vegetable soil

Note:a indicates the first crop of three vegetables, b indicates the second of crop rotation vegetables.

茄相比,二者间无显著差异,但二者都极显著高于菜豆($P<0.01$);从图 5b 可看出,在第 2 茬轮作后,以处理Ⅱ的多样性指数为最高,显著高于处理Ⅶ和 CK($P<0.05$),CK 则最低,除处理Ⅱ外,其它各处理间以及各处理与 CK 间的根际土壤细菌群落结构多样性指数均无显著差异。

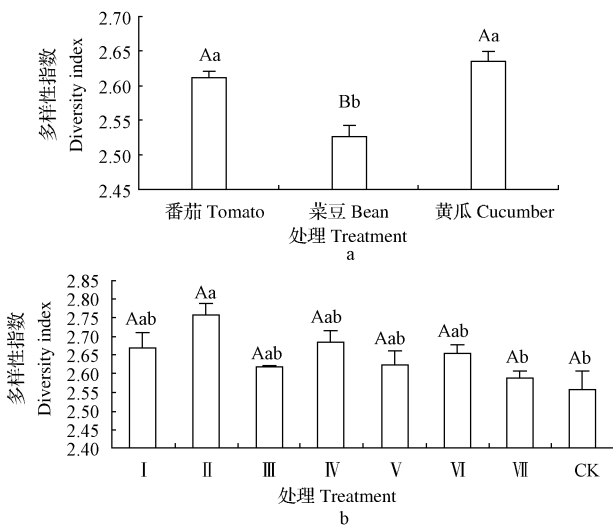


图5 不同蔬菜根际土壤细菌多样性指数

注:a为第1茬蔬菜,b为第2茬蔬菜。小写字母表示 $P<0.05$ 水平上差异显著,大写字母表示 $P<0.01$ 水平上差异极显著。下同。

Fig. 5 Diversity index of vegetable soil bacteria

Note:a indicates the first crop of three vegetables, b indicates the second of crop rotation vegetables, Small letters indicate significant differences at $P<0.05$ level, Capital letters indicate significant differences at $P<0.01$ level. The same as follows.

由图 6 a 可知,不同蔬菜根际土壤细菌群落结构均匀度指数变化情况与多样性指数相同,在第 1 茬中,以黄瓜的根际土壤细菌群落结构均匀度指数为最高,其次为番茄,和番茄相比,二者间无显著差异,但二者都极显著高于菜豆($P<0.01$);由图 6b 可知,轮作后,以处理Ⅱ的均匀度指数为最高,显著高于处理Ⅲ和 CK($P<0.05$),CK 最低,除处理Ⅱ外,其它各处理间以及各处理与 CK 间的

根际土壤细菌群落结构均匀度指数均无显著差异。

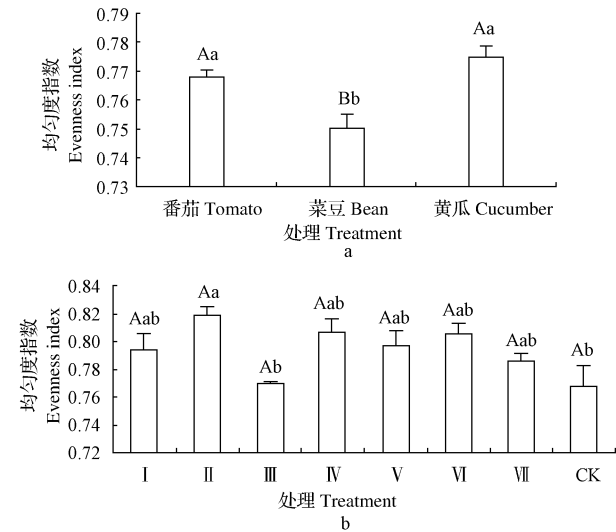


图6 不同蔬菜根际土壤细菌均匀度指数

Fig. 6 Evenness index of vegetable soil bacteria

综上所述,在第 1 茬蔬菜中,以黄瓜、番茄的根际土壤细菌群落结构多样性指数和均匀度指数较高;轮作后,以与芹菜进行轮作的Ⅱ、Ⅳ、Ⅵ 3 个处理较高。

2.4 不同蔬菜根际土壤细菌群落丰富度分析

在 DGGE 图谱分析中,条带数量代表根际土壤细菌群落丰富度,由图 7a 可知,第 1 茬中,番茄根际土壤细菌群落结构丰富度较高,为 30,菜豆、黄瓜次之,均是 29,这表明在拉秧前,番茄根际土壤细菌种群比菜豆、黄瓜高。图 7b 为第 2 茬蔬菜轮作后的土壤细菌群落丰富度情况,处理Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ土壤细菌群落丰富度较高,都是 28,CK 是 27,其它则为 26,因此可知,轮作处理Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的土壤细菌种群要比其它处理丰富。

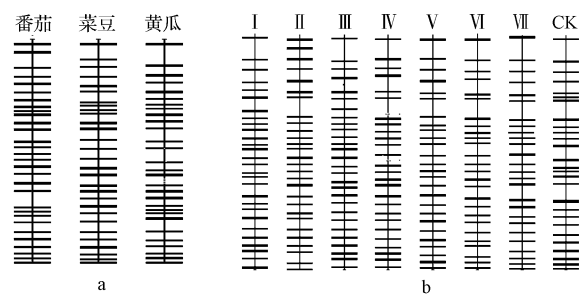


图7 不同蔬菜土壤细菌 DGGE 条带结构图

注:a为第1茬蔬菜,b为第2茬蔬菜。

Fig. 7 Structure of DGGE of vegetable soil bacteria

Note:a indicates the first crop of three vegetables, b indicates the second of crop rotation vegetables.

3 讨论与结论

土壤微生物是土壤生态系统中重要的组成部分,其群落结构组成及变化能反映土壤质量及健全性,同时也是克服连作障碍及其它土壤障碍因子的关键所在。土壤微生物群落结构和组成的多样性和均匀性不仅提高

土壤生态系统的稳定性与和谐性,同时也在一定程度上提高土壤对微生态环境恶化状况的缓冲能力^[14-15]。该研究结果表明,与 CK 相比,7 种轮作处理均可有效的提高根际土壤细菌群落结构的多样性及均匀度。原因可能是,不同轮作蔬菜的根系分泌物、植株(包括根系)残体等在土壤中积累,与连作相比,能供给土壤中的微生物较多的营养物质,使得微生物活性增加,进而提高其群落结构多样性^[16];而且,不同的轮作作物对土壤温度和湿度等环境因子的影响不同,这样可能在一定程度上能够提高土壤细菌群落结构的多样性。至于各个轮作处理间的差异,可能是其根系分泌物和植株残体等在土壤中的积累情况不同所致^[17]。

土壤微生物是表征土壤环境质量的主要指标之一,土壤的微生物群落多样性和生物活性较高,其养分含量也较丰富^[18],微生物群落结构的改变与作物种类、根际养分等密切相关^[19],微生物在土壤养分转化过程中起关键作用,土壤养分含量又制约着微生物的种类和数量^[13]。该研究表明,番茄、菜豆、黄瓜与芹菜轮作的处理,其土壤细菌群落结构多样性和均匀性都高于其它处理和 CK,原因可能是由于芹菜根系极浅,对表层养分吸收较容易,芹菜根系表面离子(NO_3^- , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} 等)的交换吸附活动较频繁,使表层土壤中的营养变化较大,最终增加了根际土壤中细菌结构的多样性。因此芹菜是最适合作为设施蔬菜栽培的轮作蔬菜。此外,蔬菜根系分泌物之间的相互作用也会影响土壤细菌群落结构,该研究中轮作后对土壤微生态环境的改变是否是根系分泌物的作用,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈晓红,邹志荣. 温室蔬菜栽培连作障碍研究现状及防治措施[J]. 陕西农业科学, 2002(12): 36-37.
- [2] 吴焕涛,魏珉,杨凤娟,等. 轮作和休茬对日光温室黄瓜连作土壤的改良效果[J]. 山东农业科学, 2008(5): 59-63.
- [3] 吴凤芝,王学征. 设施黄瓜连作和轮作中土壤微生物群落多样性的

- 变化及其与产量品质的关系[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2274-2280.
- [4] 金扬秀,谢关林,孙祥良,等. 大蒜轮作与瓜类枯萎病发病的关系[J]. 上海交通大学学报, 2003(3): 10-12.
- [5] 孙祥良,谢关林,金扬秀. 轮作与甜瓜类枯萎病发病的关系[J]. 浙江大学学报, 2003, 29: 65-66.
- [6] 许艳丽,王光华,韩晓增. 连、轮作大豆土壤微生物生态分布特征与大豆根部病虫害关系的研究[J]. 农业系统科学与综合研究, 1995, 11(4): 311-314.
- [7] 范君华,刘明,洪远新. 不同利用方式对土壤微生物区系和活性的影响[J]. 塔里木农垦大学学报, 2002, 14(1): 15-17.
- [8] 樊军,郝明德. 长期轮作与施肥对土壤主要微生物类群的影响[J]. 水土保持研究, 2003, 10(1): 88-114.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 56-58, 81-83, 103-107, 183-187, 264-271.
- [10] Riley D, Barker S A. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean root-soil interface[J]. Soil Science Society of America Proceedings, 1969, 33: 905-908.
- [11] 焦晓丹,吴凤芝,高海军. 土壤微生物 RAPD 分析体系的优化研究[J]. 生态学杂志, 2005, 24(8): 921-924.
- [12] Fvreas L, Forney L, Daee F L, et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevan-net, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 3367-3373.
- [13] 于慧颖. 轮作方式对黄瓜根际细菌多样性及产量的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [14] 焦晓丹,吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展[J]. 土壤通报, 2004, 35(6): 789-792.
- [15] 庄岩,吴凤芝,杨阳,等. 轮套作对黄瓜土壤微生物多样性及产量的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(1): 204-209.
- [16] 朱丽霞,张家恩,刘文高. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述[J]. 生态环境, 2003, 12(1): 102-105.
- [17] 王岩,沈其荣,史瑞和,等. 土壤微生物量及其生态效应[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(4): 45-51.
- [18] 杨阳,吴凤芝. 套作不同化感潜力分蘖洋葱对黄瓜生长及土壤微环境的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(10): 2627-2634.
- [19] 吴凤芝,包静,刘淑芹. 盐胁迫对黄瓜根际土壤细菌群落结构和生长发育的影响[J]. 园艺学报, 2010, 37(5): 741-748.

Effect of Diverse Vegetable Rotation System on Rhizosphere Soil Bacteria Community Structure Diversity

LIU Shou-wei, YU Hui-ying, WU Feng-zhi

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Taking four vegetables of cucumber, french bean, tomato, and celery as experimental materials, the effect of diverse vegetable rotation system on rhizosphere soil bacteria community structure diversity under seven different cultivation patterns by PCR-DGGE technology in a shed in north were studied. The results showed that the diversity and evenness indices of bacterial communities of tomato and cucumber were significantly higher than french bean in the first crop of three vegetables ($P < 0.01$); In the second of crop rotation vegetables, rhizosphere soil bacteria diversity and evenness were higher in cultivation pattern of processing II (tomato-celery), processing IV (beans-celery) and processing VI (cucumber-celery). This indicated that celery rotated with different vegetable could improve soil bacteria community structure diversity efficiently.

Key words: vegetable rotation; rhizosphere soil bacteria community structure diversity; DGGE