

不同方式有机物料处理对沙化土壤细菌多样性的影响

沙金龙^{1,2}, 李健², 李志刚^{2,3}

(1. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2. 种苗生物工程国家重点实验室 宁夏林业研究所, 宁夏 银川 750004;

3. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以宁夏银川腹地的沙化土壤为试材,使用变性梯度凝胶电泳法(DGGE),以不做任何处理的土壤为对照(CK),研究了添加杨树碎片、杨树碎片+柳树树枝覆盖、树枝混合粉碎材料覆盖的3种有机物处理方式对沙化土壤细菌多样性的影响。结果表明:3个处理均不同程度改变了土壤细菌群落结构,群落结构的丰富度大小依次为树枝混合粉碎材料覆盖>杨树碎片+柳树树枝覆盖>CK>添加杨树碎片;聚类分析结果显示,CK和树枝混合粉碎材料覆盖,添加杨树碎片和杨树碎片+柳树树枝覆盖分别被聚类到一起,相似性分别是63%和67%;并且分离鉴定出了与降解有机物料相关的菌(*Kocuria* sp. NEAU-ST5-33)相似性为96%的菌。

关键词:有机物料;细菌多样性;变性梯度凝胶电泳(DGGE);16S rDNA

中图分类号:S 154.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0097-05

沙化土壤有机质含量低、土壤孔隙大、结构差、水分和养分很容易流失。恢复沙化土壤肥力、提高有机质含量是改良沙化土壤的重要措施。沙化土壤有机质来源主要依靠施用有机物^[1]。近年来,使用有机物改良土壤已渐显成效。在土壤中施加有机物有利于更新土壤腐殖质组成,维持土壤有机质平衡,改善土壤理化性质,促进土壤养分循环^[2],增加微生物数量并且调控微生物群落结^[3]。微生物是土壤生态系统变化最敏感的指标^[4-5],其多样性在评价生态系统功能^[6-7]、维护生态平衡中发挥着重要作用^[8-10]。

微生物多样性是指微生物在遗传、种类和功能上的变化,其本质属于遗传多样性^[11]。与高等生物相比,微生物的多样性在基因水平上更为突出,不同菌群间的基因表达和遗传物质具有很大的差异^[12]。微生物物种多样性是微生物多样性研究中最基本的内容,土壤微生物是土壤有机质和养分更新、转化和循环的动力,在土壤肥力形成和发展的许多方面起着极重要的作用^[13],同时,土壤微生物多样性与土壤功能密切相关^[14],能够保持土壤系统的动态平衡。微生物多样性代表着微生物

群落的稳定性,也能客观反映土壤胁迫作用和土壤生态机制对群落的影响,因此可以通过向土壤中施加有机物,分析研究土壤中微生物群落结构的变化。

现以宁夏银川腹地的沙化土壤为试材,研究了3种方式的有机物处理对沙化土壤中微生物多样性的影响。以阐明不同方式的有机物处理对沙化土壤的改良效应,以期对沙化土壤的生态修复提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

研究区域位于宁夏银川市西南,地理位置为东经107°22',北纬38°28'。海拔1115 m,属中温带半干旱大陆性气候。银川市地处我国西北内陆,其西、北两面分别是腾格里和乌兰布和沙漠,中部是毛乌素沙地,是我国沙漠化危害最为严重的省区之一。主要气候特点:昼夜温差大,雨雪稀少,蒸发强烈,气候干燥,风大沙多等。年平均气温8.5℃,年平均降水量200 mm。1月份平均最低气温-15.2℃,极端最低气温-27.9℃,7月份平均最高气温30.1℃,极端最高气温37.2℃。相对湿度45%~66%。土壤类型为沙壤土,有机质含量1.14 g/kg, pH 8.53,砂粒含量83.7%,粉粒含量13.7%,粘粒含量2.6%。

1.2 试验材料

供试土壤为宁夏银川腹地的沙化土壤;粉碎至2 cm的杨树木质材料、粉碎至约4 cm的各类树枝混合物(杨树木质材料占50%以上)和柳树枝条(不带叶片)。

1.3 试验方法

1.3.1 2012年10月开始取样。每个处理取5个样,深

第一作者简介:沙金龙(1989-),男,宁夏西吉人,硕士研究生,现主要从事生物化学与分子生物学等研究工作。E-mail:shajinlong12@aliyun.com.

责任作者:李志刚(1985-),男,宁夏海原人,硕士,助理研究员,现主要从事生态学等研究工作。E-mail:lizg001@sina.com.

基金项目:国家“948”资助项目(2013-4-79);国际合作专项资助项目(2011DFG32780)。

收稿日期:2013-10-30

度为 0~20 cm。将取得样品放入自封袋中,贴上标签,保存。试验设 3 个处理,处理 1:土壤 20 cm 深度添加 5%(质量比)的杨树粉碎材料;处理 2:土壤 20 cm 深度添加 5%杨树粉碎材料的基础上,表层全部覆盖 20~30 cm 柳树枝条(不带叶);处理 3:土壤表层覆盖 3 cm 的树枝混合粉碎材料;以不做任何处理的土壤为对照(CK)。每个处理小区面积 3 m×3 m,每个小区间设 3 m 宽的过道。

1.3.2 土壤微生物基因组提取及纯化 采用 OMEGA 公司的 Soil DNA Kit(D5625-01)提取和纯化土壤微生物基因组。

1.3.3 16S rDNA V3 区扩增 PCR 反应参数:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,65℃(每隔一个循环降落 0.5℃)退火 1 min,72℃延伸 45 s,共 24 个循环,然后 94℃变性 45 s,53℃退火 1 min,72℃延伸 45 s,共 11 个循环,最后在 72℃下延伸 5 min。引物:357F:CCTACGG-GAGGCAGCAG; 518R: ATTACCGCGGCTGCTGG; GC-clamp^[15]: CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGG-GGCGGGGGCACGGGGGG。PCR 反应体系:Go Taq Green Master Mix (2X Green Go Taq Reaction Buffer,pH 8.5)400 μM dNTP、3 mM MgCl₂) 25 μL,上游引物(10 μmol/L)2 μL,下游引物(10 μmol/L)2 μL,模板 3 μL,去离子水 18 μL。

1.3.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE) DGGE 的条件为丙烯酰胺凝胶浓度 10%、电泳缓冲液 1×TAE、变性梯度 40%~68%、电泳时间 6 h、电压 160 V、温度 60℃、上样量 40 μL、Gel-RedTM 染色时间 30 min。目标条带的分离、测序方法参考胡元森等^[16]的方法。测序结果在 GeneBank 中进行 BLAST 比对。

2 结果与分析

2.1 土壤总 DNA 提取

使用试剂盒 Soil DNA Kit(D5625-01)提取土壤总 DNA,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测。土壤总 DNA 片段大小约 15 000 bp(图 1)。

2.2 细菌 16S rDNA V3 区 PCR 扩增

以土壤总 DNA 为模板,应用细菌通用引物 357F 和 518R 对 16S rDNA V3 区片段进行扩增,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果见图 2 所示,条带亮度很高,片段大小为 201 bp,无明显的非特异性条带,说明扩增产物高产量、高特异性,可作为 DGGE 样品。

2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

2.3.1 DGGE 图谱以及示意图 对不同样品的扩增产物进行 DGGE 分析,可以分离出数目不等、亮度不同、位置各异的条带。条带数量反映了土样中细菌种群的数量,条带亮度反映了该种细菌的数量。进而可以鉴别出

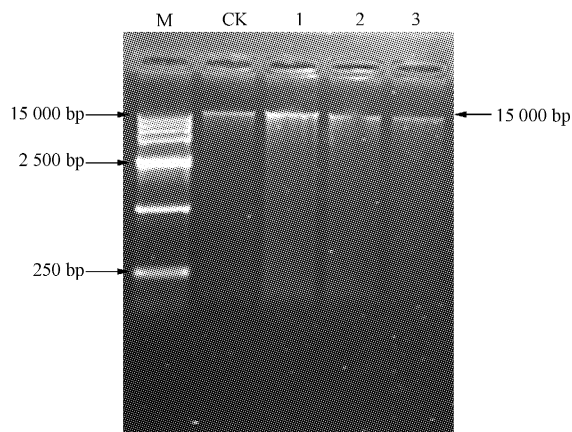


图 1 土壤总 DNA 提取电泳图

注:M:DL 15 000 Marker。CK、1、2、3 分别为对照、添加杨树粉碎材料、添加杨树粉碎材料+覆盖柳树枝条、覆盖树枝混合粉碎材料。下同。

Fig. 1 The electrophoresis of total DNA from soil

Note:M:DL 15 000 Marker. CK is control, 1 is adding poplar woody chips, 2 is adding poplar woody chips+covering with willow branches, 3 is covering with mixed woody chips of poplar and willow. The same as below.

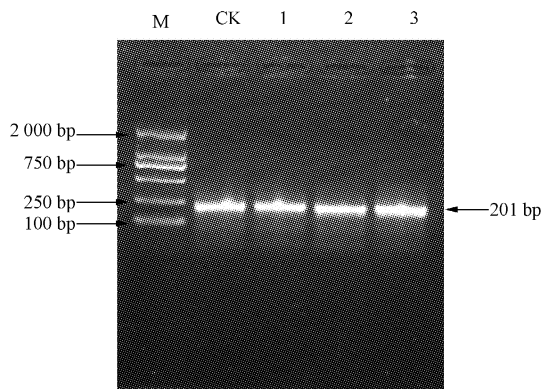


图 2 16S rDNA V3 区扩增结果的电泳图

注:M:DL 2000 Marker。

Fig. 2 The electrophoresis of the 16S rDNA PCR amplification products

Note:M:DL 2000 Marker.

不同处理的土壤样品中微生物群落结构的差异和生物多样性。由图 3、4 不同处理土壤样品 16S rDNA V3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳结果可以看出,各处理的 DGGE 图谱在条带的数量和位置均有一定的差异,CK、处理 1、2 和处理 3 的相似度依次为 67.3%、50.3% 和 58.4%。条带 d、e、f 和 g 是共有条带并且亮度比较高,条带 a、b 和 h 为处理 3 特有条带,条带 c 为处理 2 特有条带。每个样品均有 13 种以上的优势细菌菌群。处理 3 有 26 条带,丰富度最高;处理 1 最低,只有 13 条带。丰富度大小依次是:处理 3>处理 2>CK>处理 1。

2.3.2 聚类分析 根据梯度变性凝胶中每个样品条带的强度和迁移率不同,应用 UPGMA 算法对每个样品的

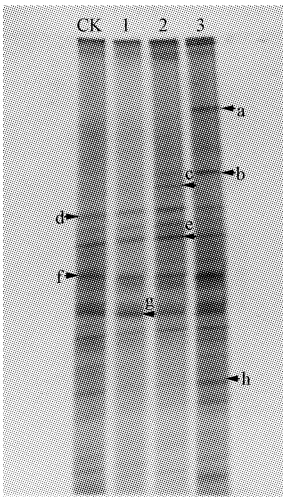


图 3 16S rDNA V3 区扩增片段的 DGGE 分析结果

注:“▲”:标记为切胶回收条带。

Fig. 3 DGGE profile of amplified 16S rDNA fragments from soil samples

Note: ‘▲’: Major bands of 16S rDNA genes fragments were eluted from gel of DGGE.

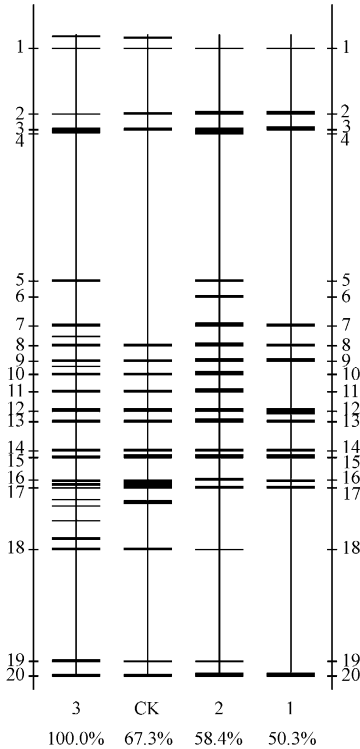


图 4 16S rDNA V3 区扩增产物 DGGE 结果

Fig. 4 DGGE sketch map of amplified 16S rDNA fragments from soil samples

条带图谱进行细菌群落相似性聚类分析。所有样品相似性为 57%,群落结构有较大的差异。在 63%~67%的相似性水平处可将 4 个供试土壤区分开来。处理 1 和处理 2,CK 和处理 3 分别聚类到一起,有比较相似的种

群结构。处理 1 和处理 2 的相似性(67%)大于处理 1 和处理 3(63%)。

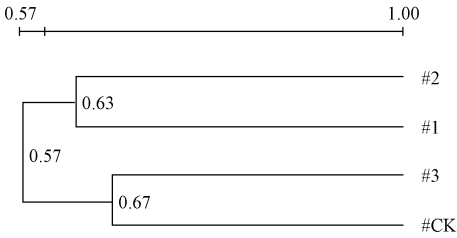


图 5 土壤细菌的 UPGMA 聚类分析结果

Fig. 5 UPGMA clustering analysis of soil bacteria

2.3.3 测序与比对 在 DGGE 图谱中,选取 8 个亮度较强的逐条带进行切胶回收、重新 PCR 扩增、纯化和测序,测序结果在 GeneBank 数据库中进行同源性比对。8 条优势带的基因片段序列与 GeneBank 中的细菌序列相似性如表 1 所示,从这些条带代表的微生物种类可以确定不同处理的土壤中所含细菌群落的优势菌群的组成。一般认为 16S rDNA 序列同源性大于 98%,属于同一种细菌,如果同源性在 93%~95%之间,属于同一个属。如果同源性小于 93%,则可以认为属于不同的属^[17]。8 个优势条带与比对结果相似性均大于 93%,说明和比对的菌属于同一个属。除条带 f 为未知菌的克隆之外,其它的 7 个菌分别属于 5 个不同的属,大多数为不可培养的菌种。条带 d、e、f 和 g 为共有条带,说明是土壤中常见菌群。其中条带 a、b 和 c 是不同方式有机物料处理土壤样品中特有菌群,与有机物料的添加或覆盖有关。条带 a 和 b 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),条带 c 属于考克斯菌属(*Kocuria*),有研究表明考克斯菌属(*Kocuria*)的菌群可以产生木聚糖酶^[18],木聚糖酶可以将木聚糖水解成低聚木糖或木糖,木聚糖是植物细胞中主要的半纤维素成分。

表 1 DGGE 优势条带的基因片段的序列比对结果

Table 1 Comparison of genomic sequences in dominant DGGE bands by sequencing and BLAST analysis

条带 Bands	最相近序列 Most closely related sequences	相似性 Similarity/%
a	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone 10CS85	98
b	<i>Bacillus</i> sp. CJNY56	99
c	<i>Kocuria</i> sp. NEAU-ST5-33	96
d	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone CNY_00847	97
e	Uncultured <i>Kaistobacter</i> sp. clone CH1-98	94
f	Uncultured bacterium clone 2L-002a-D04	93
g	<i>Sphingopyxis</i> sp. MW042	95
h	Uncultured <i>Sphingobium</i> sp. isolate DGGE gel band A1	96

3 结论与讨论

有机物料施入土壤后,有 2 种转化方式。1 种是部分有机物料被分解矿化,以二氧化碳的形式释放到大气

中;另1种是部分有机物料在微生物作用下碳链解体和重组成新的有机质^[19],有机质可以为土壤微生物的生长提供碳源。不同方式的有机物料处理对土壤微生物的影响不同,进而影响微生物的群落结构。DGGE图谱表明,3个处理和CK在多样性方面均有差异。处理间的土壤样品有丰富的多样性组成,相同带谱也有一定的差异与刘恩科等^[20]研究结果一致。优势种群的测序鉴定结果表明大多数为不可培养菌群,这与王岳坤等^[21]的研究结果一致。各处理和CK有4个相同的细菌种群以外,还具有特异性的微生物种属,可能与添加或覆盖有机物料有关。丰富度大小依次是处理3>处理2>CK>处理1。课题组之前研究表明^[22],细菌数量是处理2>处理1>处理3>CK,其可能原因:一是细菌的数量和多样性不成线性关系,这与刘玲等^[23]研究结果一致;二是采用传统的稀释平板法计数细菌数量,都是可培养菌,而DGGE研究的大多是不可培养的菌群。

UPGMA聚类分析表明,处理3和CK,处理1和处理2分别聚类到一起。说明CK和处理3,处理1和处理2在群落结构方面有较高的相似性。可能因为CK和处理3没有向土壤添加有机物,处理3只是覆盖在土壤表面。处理1和处理2均向土壤中添加木质碎片。有机物料处理的土壤中特有菌群包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)和考克斯菌属(*Kocuria*)2个属。分离鉴定出了与GeneBank中*Kocuria* sp. NEAU-ST5-33相似性为96%的菌,可降解有机物料^[18]。由于土壤中微生物群落结构比较复杂,因此对沙化土壤中的细菌群落结构的研究仍需进一步加大取样范围。

参考文献

- [1] 滕险峰,魏自民,李成. 秸秆培肥对风沙土微生物量及土壤酶活性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2003(3):13-14.
- [2] Lohila A, Aurela M, Regina K, et al. Soil and total ecosystem respiration in agricultural fields: effect of soil and crop type[J]. Plant and Soil, 2003, 251(2):303-317.
- [3] 张平究,李恋卿,潘根兴,等. 长期不同施肥下太湖地区黄泥土表土微生物碳氮量及基因多样性变化[J]. 生态学报,2004,24(12):2818-2824.
- [4] Hill G, Mitkowski N, Aldrich-Wolfe L, et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities[J]. Applied soil ecology, 2000, 15(1):25-36.
- [5] Karlen D, Gardner J, Rosek M. A soil quality framework for evaluating the impact of CRP[J]. Journal of production agriculture, 1998, 11(1):56-60.
- [6] Knight B P, McGrath S P, Chaudri A M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1):39-43.
- [7] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review[J]. Biology and Fertility of Soils, 1999, 29(2):111-129.
- [8] Kennedy A, Smith K. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils[J]. Plant and Soil, 1995, 170(1):75-86.
- [9] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, 5(3):240-245.
- [10] 黎宁,李华兴,朱凤娇,等. 菜园土壤微生物生态特征与土壤理化性质的关系[J]. 应用生态学报,2006,17(2):285-290.
- [11] 姚槐应,何振立,黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响[J]. 水土保持学报,2003,17(2):51-54.
- [12] 林先贵,胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能[J]. 土壤学报,2008,45(5):892-900.
- [13] Schweitzer J A, Bailey J K, Fischer D G, et al. Plant-soil-microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms[J]. Ecology, 2008, 89(3):773-781.
- [14] Øvreås L, Torsvik V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities[J]. Microbial Ecology, 1998, 36(3-4):303-315.
- [15] Ferris M, Muyzer G, Ward D. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2):340-346.
- [16] 胡元森,刘亚峰,吴坤,等. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究[J]. 土壤通报,2006,37(1):126-129.
- [17] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. PCR-DGGE技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报,2006,26(11):3610-3616.
- [18] 王哲. *Kocuria* sp. 3-3来源木聚糖酶基因筛选,克隆,表达,性质研究及定点突变研究[D]. 济南:山东大学,2011.
- [19] 李存弟,张皓,严红. 有机物料对土壤有机碳含量的影响[J]. 安徽农业科学,2011,39(22):1346-1346.
- [20] 刘恩科,赵秉强,李秀英,等. 不同施肥制度土壤微生物量碳氮变化及细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 生态学报,2007,27(3):1079-1085.
- [21] 王岳坤,洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 微生物学报,2005,45(2):201-204.
- [22] 沙金龙,李健,李志刚. 添加杨柳树枝对沙化土壤有机碳、含水量及微生物活性的影响[J]. 草业科学,2013,30(9):1308-1312.
- [23] 刘玲,杨殿林,王生荣,等. 转 Bt 基因玉米种植对土壤细菌数量及多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报,2011,27(3):42-47.

Effect of Different Organic Materials Treatment Patterns on Bacterial Diversity in Sandy Soil

SHA Jin-long^{1,2}, LI Jian², LI Zhi-gang^{2,3}

(1. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. State Key Laboratory of the Seedling Bioengineering, Ningxia Forestry Institute, Yinchuan, Ningxia 750004; 3. Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

几种葡萄砧木组培快繁生根研究

郑平生, 李向东, 李国梁

(甘肃省经济作物技术推广站, 甘肃 兰州 730030)

摘要:以葡萄砧木品种“520A”、“贝达”、“SO4”、“变叶葡萄”为试材, 对其进行了组培快繁生根移栽研究。结果表明:GS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是葡萄砧木外植体不定芽诱导及试管苗增殖的最适组合;GS+IBA 0.05 mg/L 处理葡萄砧木试管苗生根效果最好, 以珍珠岩和蛭石为基质试管苗移栽成活率最高。

关键词:葡萄砧木;组培快繁;生根

中图分类号:S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0101-03

葡萄生产中, 由于干旱、寒冷、盐碱、湿涝、病虫害等不利因素的存在影响其生长和结果。选择抗逆性强的砧木进行嫁接栽培, 可以克服自然环境中的不利因素, 扩大葡萄种植范围, 降低生产成本, 提高产量、品质和种植效益。我国自 20 世纪 60 年代开始进行葡萄砧木及嫁接栽培研究, 经过几十年的努力, 引进筛选出了一批抗逆性较强、嫁接亲和力和较好的葡萄砧木, 但在生产中未能全面推广应用, 其中一个主要原因是这些砧木常规繁育生根较难, 繁殖系数低。该试验对几种抗逆性强的葡萄砧木进行了组培快繁及生根研究, 以期高抗逆性葡萄砧木繁育及葡萄嫁接栽培提供依据。

1 材料与方

1.1 试验材料

供试葡萄砧木品种为“520A”、“贝达”、“SO4”、“变叶葡萄”(子午岭野生葡萄, 作为砧木嫁接后适应性强, 有较强的抗病性和抗寒性)。

第一作者简介:郑平生(1975-), 男, 硕士, 农艺师, 现主要从事果树生物技术研究及示范推广等工作。E-mail: zps9999@126.com.

收稿日期:2013-11-07

以 GS 为基本培养基, 添加 15 g/L 蔗糖, 5 g/L 琼脂, pH 为 5.8。

1.2 试验方法

将采集的外植体材料用流水冲洗 1 h, 然后用无菌水漂洗 3 次; 在超净工作台上先用 70% 的酒精浸泡 10 s, 再置于 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中消毒 5 s, 然后用无菌水洗涤 3 次, 用消毒滤纸吸干枝条表面水分待接种。

1.2.1 不定芽诱导与增殖培养 将材料剪成单芽茎段接种于附加不同浓度 6-BA、NAA 的 GS 培养基上进行培养, 每种激素设 0.1、0.5 mg/L 2 个浓度处理, 30 d 统计芽萌发情况。每处理 20 瓶, 每瓶 3 株, 单芽茎段接种。接种后在温度 (25±2)℃、光照强度 2 000~3 000 lx, 24 h 全光照下培养。

1.2.2 生根培养 将诱导生成的葡萄砧木试管苗剪成单芽茎段转接于附加 IBA、IAA 不同浓度的 GS 培养基上, 每种激素设 0.01、0.05、0.10 mg/L 3 个浓度处理。接种 15、30 d 分别统计试管苗株高、茎段数、分生芽数、生根数和根长等指标。每处理 20 瓶, 每瓶 3 株, 单芽茎段接种。接种后在温度 (25±2)℃、光照强度 2 000~3 000 lx, 24 h 全光照下培养。

Abstract: Taking the sandy soil in Yinchuan interior desert as material, the effect of sandy soil bacterial diversity in different organic materials treatments (1. with 5% poplar chips mixed with soil; 2. with 5% poplar chips mixed with soil and covered with willow branches on surface; 3. with soil surface covered by wood chips) were studied, with no treatment as control (CK), the soil bacterial in different treatment were studied by the denatured gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that under the treatments 1, 2, 3, the structure of bacterial community changed in different degrees. The abundance of community structure was highest in treatment 3, then in 2 and lowest in 1. The results of clustering analysis showed that, two groups were clustered. They respectively were CK and 3, which similarity was 63% and treatment 1 and 2, which similarity was 67%. One bacteria which had the 96% similarity with bacteria related to organic materials decomposition was isolated and identified.

Key words: organic materials; bacterial diversity; denatured gradient gel electrophoresis (DGGE); 16S rDNA