

盐胁迫对黄瓜根际土壤细菌群落结构和生长发育的影响

吴凤芝*, 包 静, 刘淑芹

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 以耐盐性不同的两个黄瓜品种‘津春 5 号’(耐盐)和‘津优 1 号’(盐敏感)为研究对象, 设置 4 个 NaCl 浓度处理(0、100、200、300 mmol·L⁻¹), 采用 PCR-DGGE 技术研究整个生长期根际土壤细菌群落结构的变化。结果表明: 盐胁迫能显著降低根际土壤细菌群落的丰富度($P < 0.05$), 低盐处理下, 盐敏感品种根际细菌的丰富度较高; 高盐胁迫下, 耐盐品种根际细菌群落的丰富度较高。高盐胁迫对盐敏感品种根际细菌群落结构组成影响较大。各时期 DGGE 图谱差异条带的序列片段经测序比对, 推测为 4 大细菌类群: Firmicutes、Proteobacteria、Gemmatimonadetes 和 Bacteroidetes, 且大多属于 Proteobacteria (变形菌门)的 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲。随着盐浓度的增加黄瓜的株高和单株产量依次降低。

关键词: 黄瓜; 盐胁迫; 根际土壤; 细菌群落结构; 多样性

中图分类号: S 642.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 05-0741-08

Effects of Salt Stress on Rhizospheric Soil Bacterial Community Structure and Cucumber Yield

WU Feng-zhi*, BAO Jing, and LIU Shu-qin

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

Abstract: In order to study effects of salt stress on changes of soil microbial quantities and the diversity of soil microbial community by the technology of PCR-DGGE, two kinds of cucumbers with different saline tolerance were selected, Jinchun 5 (salt-tolerant) and Jinyou 1 (salt-sensitive), and four concentrations of NaCl were designed (0, 100, 200 and 300 mmol·L⁻¹). The results showed that salt stress could reduce the richness of soil bacterial community significantly ($P < 0.05$). The richness of salt-sensitive cultivar was high under low salt treatment, while the richness of salt-tolerant cultivar was high under high salt treatment. High salt stress had more effects on the rhizosphere bacterial community structure of salt-tolerant cultivar. Sequences of different bands of four stages belonged to four bacterial groups, Firmicutes, Proteobacteria, Gemmatimonadetes and Bacteroidetes. Most of them belonged to Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria. With the increasing of salt concentration, the plant heights of cucumber and yield per plant reduced.

Key words: cucumber; salt stress; rhizospheric soil; bacterial community structure; diversity

收稿日期: 2009-11-16; 修回日期: 2010-03-16

基金项目: 国家‘973’项目(2009CB119004-05); 国家自然科学基金项目(30771252); 黑龙江省教育厅项目(1153018); 黑龙江科技创新团队项目(2008)

* E-mail: fzwu2006@yahoo.com.cn

随着种植年限的增加,设施内黄瓜的连作障碍日趋明显。连作障碍原因很多,其中土壤次生盐渍化、土壤微生物多样性降低(特别是病原微生物引起的土传病害)和连作引起的自毒作用等是主要原因(吴凤芝等,2000;喻景权和杜尧舜,2000; Yao & Wu, 2006)。设施土壤次生盐渍化不仅会影响作物生长,还会直接影响土壤微生物活性,通过改变土壤的部分理化性质来间接地影响土壤微生物的生态环境(章家恩等,2002)。植物相对于土壤微生物群落,对盐分的忍耐性更弱,因此土壤受损引起的植物死亡将先于土壤微生物群落的衰落(Vanessa et al., 2006)。这也是人们常常重视盐分对地上胁迫的研究而忽略了对地下胁迫的研究的主要原因。

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的质量及其健全性(Visser & Parkinson, 1992),同时也是克服连作障碍及其他土壤障碍因子的关键所在(吴凤芝等,2008)。研究表明,盐分胁迫使微生物数量显著降低,耐盐较强的微生物将成为优势种群(林学政等,2006)。近年来有关金属胁迫、不同栽培方式及自毒物质对作物土壤微生物多样性影响的研究报道较多(胡元森等,2007;王光华等,2008;王明道等,2008;吴凤芝等,2008; Wang et al., 2009),但有关盐胁迫对根际土壤微生物群落影响的研究还鲜有报道。

作者以盐胁迫条件下黄瓜各生长时期的根际土壤细菌为研究对象,采用PCR-DGGE技术研究盐胁迫对根际土壤细菌群落结构多样性的影响,旨在为进一步明确设施蔬菜连作障碍中盐分胁迫与土壤微生物的关系奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理

试验于2008年3月至2009年3月在东北农业大学园艺试验站日光节能温室和园艺学院蔬菜生理生态研究室进行。黄瓜(*Cucumis sativus* L.)耐盐品种‘津春5号’和盐敏感品种‘津优1号’由天津蔬菜研究所提供。试验土壤为黑土,按照鲍士旦(2005)方法测定:土壤电导率 $0.53 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 7.16,有机质 $49.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,碱解氮 $306.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷 $281.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾 $393.79 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

设置4个NaCl浓度处理:0(对照)、100、200和 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每个处理3次重复。在黄瓜定植前分别把不同浓度的78 L NaCl盐溶液随机均匀浇入特制栽培槽($4.08 \text{ m} \times 0.48 \text{ m}$)内,并保证盐水浸透土壤而不渗出。选取籽粒饱满、大小均匀的黄瓜种子浸种催芽后播种于装沙育苗盘中育苗(2008年3月17日)。待子叶展平后(3月28日)分苗至 $8 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$ 营养钵,幼苗四叶一心时(4月27日)定植在栽培槽内,常规管理。分别于定植前、定植后30 d(根瓜期)、50 d(盛瓜期)、70 d(拉秧期),采用抖根法(Riley et al., 1969; van Elsas et al., 1986)随机收集每个处理黄瓜根际土壤,过80目筛(吴凤芝和周新刚,2009),置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于土壤微生物群落结构的分析。

1.2 根际土壤细菌分析方法

1.2.1 根际土壤微生物DNA的提取 采用天泽基因工程有限公司生产的天净沙系列试剂盒 Soil DNA out 提取土壤微生物DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 根际土壤细菌16S rDNA的扩增 将提取的DNA原液用 ddH_2O 稀释30倍,采用对大多数细菌的16S rDNA V3区通用的引物对F338-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')(Muyzer et al., 1993)进行PCR。50 μL PCR反应体系:DNA模板1 μL 、Buffer + Mg^{2+} 5 μL 、dNTP 1 μL 、引物各1 μL 、*pfu*酶1 μL 、无菌去离子水40 μL 。PCR反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 69 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增片段长度约230 bp,

1%琼脂糖凝胶电泳检测。将上述扩增产物继续稀释 40 倍, 用 *Taq* 酶再次扩增。50 μL PCR 反应体系: DNA 模板 8 μL 、Buffer 5 μL 、 Mg^{2+} 4 μL 、dNTP 4 μL 、引物各 1.5 μL 、*Taq* 酶 0.4 μL 、无菌去离子水 25.6 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物长 230 bp 左右, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析 使用 DGGE 梯度胶制备装置, 参照 Bassam 等 (1991) 的方法, 在凝胶成像系统下拍照。

1.2.4 细菌 16S rDNA 片段的克隆和测序 切下差异条带, 用聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收, 以不含 GC 夹子的引物对 F338 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 R518 再次进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系: DNA 模板 2 μL 、Buffer 5 μL 、 Mg^{2+} 3 μL 、dNTP 1 μL 、引物各 1 μL 、*Taq* 酶 1 μL 、无菌去离子水 36 μL 。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中检测, 由哈尔滨鑫丰生物材料有限公司进行克隆和测序。

1.3 数据分析

原始数据整理采用 Excel 2003 完成; 数据处理使用 SAS 9.0 软件, 方差分析采用 GLM 过程。

DGGE 图像用 Quantity One V4.6.2 (Bio-Rad) 软件进行分析, 得到各列的条带位置、数字化结果及条带数量信息图, DGGE 条带数量可以代表土壤细菌群落的丰富度 (刘恩科 等, 2007)。

测序所得序列采用 NCBI 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 ([http://rdp.cme.msu.edu/Ribosomal Database Project II -Release 9 website](http://rdp.cme.msu.edu/Ribosomal_Database_Project_II-Release_9_website)) 进行细菌分类分析。序列全部上传至 NCBI 的 GenBank 数据库。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对黄瓜根际土壤电导率的影响

从表 1 可以看出, 两个品种的无盐对照在 4 个取样时期 EC 值相近且变化不大。定植前对土壤进行盐处理, 随着盐处理浓度的增加土壤 EC 值增加, 均超过本底值造成不同程度的盐害。定植后对黄瓜幼苗实行常规管理, 因为不再进行盐处理, 随着滴灌浇水次数的增多和植物根系对离子的吸收利用, 土壤 EC 值逐渐下降。其中根瓜期各处理间差异不显著; 盛瓜期 Y2 显著高于 C0、Y0、Y1 和 C3; 拉秧期 C2、Y2 显著高于 Y0; 盛瓜期与拉秧期的 NaCl 浓度相同处理 C1、Y1, C2、Y2 和 C3、Y3 间 EC 值也有差异, 但差异不显著。

表 1 盐胁迫对黄瓜土壤电导率 (EC) 的影响
Table 1 Effects of salt stress on the soil electrical conductivity

代号 Code	NaCl/ (mmol · L ⁻¹)	品种 Cultivar	定植前 Preplanting	根瓜期 Early fruit stage	盛瓜期 Fruit stage	拉秧期 Uprooting stage
C0	0	津春 5 号 Jinchun 5	0.69 ± 0.03 a	0.83 ± 0.27 a	0.72 ± 0.07 b	0.79 ± 0.14 abc
Y0		津优 1 号 Jinyou 1	0.71 ± 0.09 a	0.66 ± 0.17 a	0.73 ± 0.38 b	0.40 ± 0.04 d
C1	100	津春 5 号 Jinchun 5	1.84 ± 0.40 a	1.05 ± 0.43 a	1.13 ± 0.09 ab	0.42 ± 0.15 cd
Y1		津优 1 号 Jinyou 1	1.12 ± 0.37 a	0.65 ± 0.11 a	0.78 ± 0.03 b	0.43 ± 0.30 bcd
C2	200	津春 5 号 Jinchun 5	2.72 ± 2.14 a	1.38 ± 0.96 a	1.23 ± 0.41 ab	0.89 ± 0.13 a
Y2		津优 1 号 Jinyou 1	2.44 ± 1.42 a	0.85 ± 0.39 a	2.14 ± 1.15 a	0.75 ± 0.11 abc
C3	300	津春 5 号 Jinchun 5	2.80 ± 1.55 a	1.56 ± 1.39 a	0.63 ± 0.07 b	1.04 ± 0.27 a
Y3		津优 1 号 Jinyou 1	3.42 ± 3.35 a	1.67 ± 1.24 a	1.06 ± 0.83 ab	0.80 ± 0.12 ab

2.2 盐胁迫对黄瓜根际土壤细菌群落结构的影响

2.2.1 根际土壤细菌DGGE图谱分析 比较4个取样时期土壤细菌16S rDNA V3区片段PCR产物的DGGE图谱(图1)发现,许多条带为共有条带,但也有一些差异条带,如在定植前的土壤中,条带a、c只在耐盐品种‘津春5号’300 mmol·L⁻¹高盐处理(C3)出现,条带b在盐敏感品种‘津优1号’200和300 mmol·L⁻¹高盐处理(Y2和Y3)中出现;在根瓜期的根际土中,条带d出现在处理Y1和Y2,对照和低盐处理无条带e;盛瓜期条带f在处理C3和Y0、Y2、Y3中出现,条带g只在对照Y0中出现。拉秧期差异条带明显增多,处理C3特有带h,低盐处理Y1无条带i和n,盐敏感品种的对照Y0特有带h、j、m,低盐处理Y1特有带j、k,高盐处理特有带l。

对箭头所指向的条带进行回收、扩增、克隆与测序,将测序结果与NCBI GenBank中已提交的核酸序列进行比对分析并推测种群。由表2可以看出,所测序列与不可培养的土壤细菌克隆同源性较高,在90%以上。测序得出的序列片段经比对推测为4大细菌类群:Firmicutes(硬壁菌门)、Proteobacteria(变形菌门)、Gemmatimonadetes(芽单胞菌门)和Bacteroidetes(黄杆菌门)。条带i和j属于尚未分类的细菌。

9条差异条带的序列属于Proteobacteria(变形菌门)的 α -变形菌纲(条带b、c、g、h、m、n)和 γ -变形菌纲(条带e、k、l);条带a属于硬壁菌门消化球菌科;条带d属于芽单胞菌门芽单胞菌属;条带f属于黄杆菌门黄杆菌科。

2.2.2 盐胁迫对黄瓜根际土壤细菌DGGE条带数的影响 DGGE条带数量可以代表土壤细菌群落的丰富度(Hu et al., 2004)。如表3所示,两品种的对照C0和Y0在各个时期丰富度变化不大且差异不显著($P > 0.05$)。定植前土壤细菌群落丰富度高,相同处理之间差异不显著。随着盐胁迫时间的延长,盐处理土壤的细菌丰富度下降。在黄瓜的不同生长时期,耐盐品种的对照C0丰富度高于Y0。根瓜期和盛瓜期,处理C1的细菌丰富度低于Y1但差异不显著,处理C2的细菌丰富度显著低于Y2,处理C3则显著高于Y3。拉秧期处理C1的细菌丰富度显著低于Y1,处理C2显著高于Y2,处理C3高于Y3但差异不显著。由此可见,盐胁迫能显著降低根际土壤细菌群落的丰富度。低盐处理下,盐敏感品种根际细菌的丰富度较高;高盐胁迫下,耐盐品种根际细菌的丰富度较高。

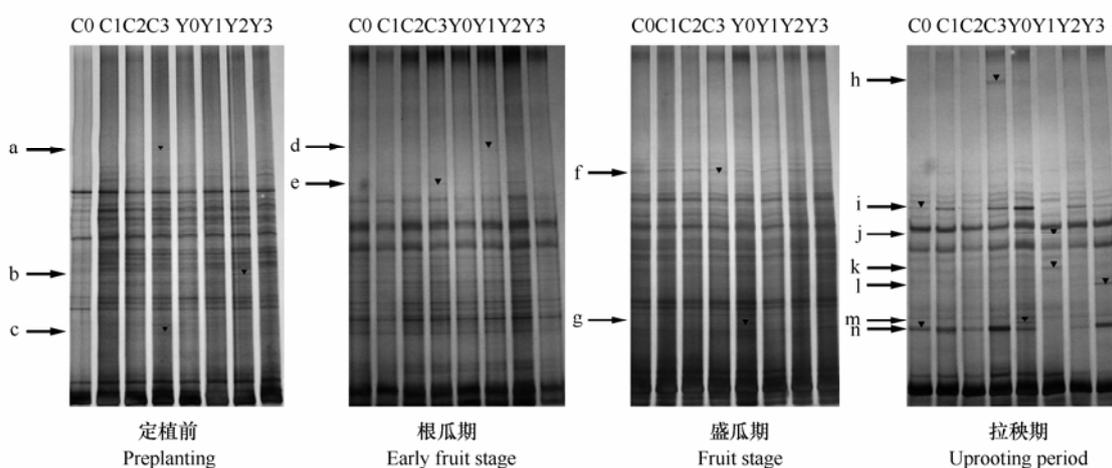


图1 16S rDNA V3片段PCR产物的DGGE图谱

Fig. 1 DGGE electrophoretograms of amplified 16S rDNA fragments from soil samples

表 2 部分差异条带 16S rDNA 基因片段测序结果
Table 2 Sequencing results of 16S rDNA fragments of selected bands

测序条带 Band	片段长 /bp Fragment length	登录号 Accession number	BLAST match			推测种群 Putative population
			相似序列 Similar sequences	相似性/% Identity	登录号 Accession	
a	173	GQ169288	Uncultured bacterium clone Toolik_Jun2005_shrubmin_131	90(157/173)	DQ509814	消化球菌科 Peptococaceae
b	169	GQ169289	Uncultured bacterium clone F12-G01	100(169/169)	FJ615977	鞘氨醇单孢菌属 <i>Sphingomonas</i>
c	169	GQ169290	Uncultured bacterium clone D48 48	95(161/169)	EU580512	紫杆菌属 <i>Porphyrobacter</i>
d	171	GQ169291	Uncultured bacterium clone 2G1-58	94(165/174)	EU160218	芽单孢菌属 <i>Gemmatimonas</i>
e	194	GQ169292	Uncultured bacterium clone CCSD_DF1080_B17	100(194/194)	AY820698	硫发菌目 Thiotrichales
f	189	GQ169293	Uncultured soil bacterium clone F6-68	97(186/190)	EF688374	黄杆菌目 Flavobacteriaceae
g	169	GQ169294	Uncultured Kaistobacter sp. clone Plot03-B03	99(168/169)	EU276569	鞘氨醇单孢菌属 <i>Sphingomonas</i>
h	169	GQ169295	Uncultured Kaistobacter sp. clone Plot17-2D04	96(163/169)	EU440706	鞘氨醇单孢菌属 <i>Sphingomonas</i>
i	173	GQ169296	Uncultured bacterium clone GASP-WC2S1_F12	93(163/174)	EF074958	Uncultured candidate division OD1 bacterium
j	173	GQ169297	Uncultured soil bacterium clone S03	93(163/174)	AF507684	Uncultured candidate division OD1 bacterium
k	194	GQ169298	Uncultured Coxiellaceae bacterium clone Plot03-B05	96(188/194)	EU276556	柯克斯体科 Coxiellaceae
l	194	GQ169299	Uncultured gamma proteo bacterium clone 153 NPW1	97(190/194)	EU447449	肠杆菌科 Enterobacteriaceae
m	169	GQ169300	<i>Agrobacterium</i> sp. IMER-B4-18	98(167/169)	FJ796437	根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>
n	169	GQ169301	Uncultured bacterium clone F12-G12	97(165/169)	FJ615987	鞘氨醇单孢菌属 <i>Sphingomonas</i>

表 3 盐胁迫对黄瓜根际土壤细菌 DGGE 条带数的影响
Table 3 Effects of salt stress on the DGGE band number of soil bacterial

代号 Code	NaCl/ (mmol · L ⁻¹)	品种 Cultivar	定植前 Preplanting	根瓜期 Early fruit stage	盛瓜期 Fruit stage	拉秧期 Uprooting stage
C0	0	津春 5 号 Jinchun 5	22.5 ± 0.7 d	20.0 ± 0.8 bc	20.0 ± 0.8 bc	17.5 ± 0.7 bcd
Y0		津优 1 号 Jinyou 1	25.0 ± 1.4 cd	19.3 ± 0.5 bc	19.3 ± 0.5 bc	17.5 ± 0.7 bcd
C1	100	津春 5 号 Jinchun 5	29.0 ± 2.8 ab	20.0 ± 0.8 bc	20.0 ± 0.8 bc	14.5 ± 2.1 d
Y1		津优 1 号 Jinyou 1	31.5 ± 2.1 a	21.8 ± 0.9 ab	21.8 ± 1.0 ab	21.0 ± 1.4 b
C2	200	津春 5 号 Jinchun 5	30.0 ± 0.0 a	20.0 ± 0.8 bc	20.0 ± 0.8 bc	26.0 ± 2.8 a
Y2		津优 1 号 Jinyou 1	28.5 ± 0.7 ab	23.3 ± 1.9 a	23.3 ± 1.9 a	16.5 ± 0.7 cd
C3	300	津春 5 号 Jinchun 5	29.0 ± 0.0 ab	23.8 ± 3.0 a	23.8 ± 3.0 a	19.5 ± 0.7 bc
Y3		津优 1 号 Jinyou 1	26.0 ± 0.0 bc	17.5 ± 1.9 c	17.5 ± 1.9 c	17.0 ± 1.4 cd

2.3 盐胁迫对黄瓜生长发育的影响

2.3.1 盐胁迫对黄瓜株高的影响 从定植后第 2 周起, 每周测量统计黄瓜植株的株高至盛瓜期, 如表 4 所示。定植后 2 ~ 3 周, 处理 C2、Y2、C3 和 Y3 与对照差异显著 ($P < 0.05$), 随着黄瓜生长时期的延长, 各处理株高间的差异降低, 从定植后第 7 周开始各处理间株高无显著差异。不同品种相同处理间差异不显著。两个黄瓜品种植株的株高整体呈现随盐胁迫的增加而降低的趋势。

表4 盐胁迫对黄瓜株高的影响
Table 4 Effects of salt stress on plant heights of cucumber

代号 Code	定植后周数 Weeks after field planting						
	2	3	4	5	6	7	8
C0	20.79 ± 4.33 a	40.10 ± 10.12 a	74.09 ± 12.72 a	105.91 ± 13.98 a	151.57 ± 17.98 a	180.72 ± 21.81 a	211.86 ± 37.32 a
Y0	16.41 ± 2.35 b	31.93 ± 4.70 ab	61.07 ± 10.16 ab	87.62 ± 14.00 ab	139.44 ± 16.94 ab	175.33 ± 17.71 a	206.22 ± 49.65 a
C1	14.08 ± 6.03 bc	23.51 ± 11.47 bc	53.86 ± 23.60 bc	78.80 ± 32.84 bc	133.43 ± 40.85 abc	171.15 ± 59.59 a	204.56 ± 30.90 a
Y1	12.87 ± 4.88 bc	21.99 ± 10.08 c	50.80 ± 21.58 bc	74.08 ± 29.97 bc	122.11 ± 39.04 abcd	160.40 ± 42.92 a	203.17 ± 45.24 a
C2	10.79 ± 5.03 c	19.73 ± 12.09 c	44.31 ± 10.36 bc	70.66 ± 13.40 bc	125.90 ± 19.74 abcd	156.43 ± 10.93 a	189.88 ± 60.44 a
Y2	10.62 ± 3.87 c	19.71 ± 7.31 c	43.25 ± 23.07 bc	63.59 ± 26.91 bc	110.83 ± 47.46 bcd	145.37 ± 48.82 a	189.50 ± 65.08 a
C3	10.62 ± 3.29 c	18.28 ± 6.52 c	38.98 ± 15.75 c	63.63 ± 31.84 bc	96.40 ± 45.60 cd	139.35 ± 52.85 a	187.78 ± 63.01 a
Y3	9.98 ± 2.20 c	16.29 ± 8.76 c	34.02 ± 21.62 c	53.14 ± 32.70 c	92.70 ± 38.03 d	135.91 ± 52.11 a	182.33 ± 82.37 a

2.3.2 盐胁迫对黄瓜产量的影响 如图2所示,随着盐浓度的增加黄瓜单株产量依次降低,黄瓜产量受到不同程度的盐害。耐盐品种‘津春5号’的单株产量为 $1.78 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$, 100、200、300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理的黄瓜单株产量依次减产 2.66%、18.72%、39.10%,且 300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl高盐处理显著低于对照 ($P < 0.05$)。盐敏感品种‘津优1号’对照的单株产量为 $1.54 \text{ kg} \cdot \text{株}^{-1}$, 100、200、300 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理的黄瓜单株产量依次减产 14.54%、25.77%、32.97%。

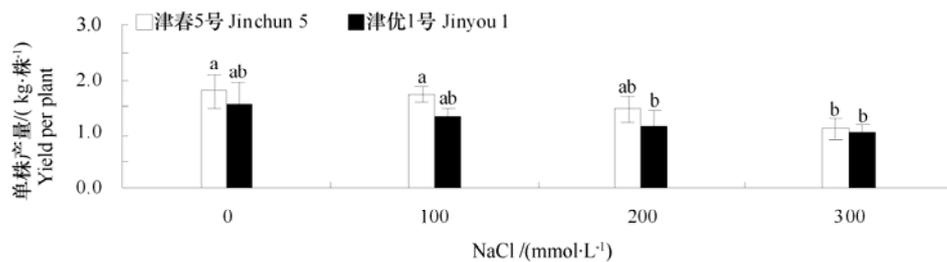


图2 盐胁迫对黄瓜单株产量的影响

Fig. 2 Effects of salt stress on the cucumber yield per plant

3 讨论

根际土壤中存在大量微生物,这些微生物群落结构的改变与作物种类、土壤类型、根际养分和作物生长发育时期等密切相关 (Bowen & Rovira, 1999; Garbeva et al., 2004; 刘俊杰 等, 2008)。

DGGE 根据 DNA 解链行为的不同,可以分离具有相同长度但是碱基对序列不同的 DNA。从 DGGE 图谱可以看到,在黄瓜生长的不同时期存在许多共有条带,表明具有这些条带基因的土壤细菌不受黄瓜品种、采样时期和盐处理的影响,在土壤中比较稳定,这与陈雪丽等 (2008) 研究结果一致。定植前土壤、根瓜期和盛瓜期的根际土差异条带较少,拉秧期根际土壤差异条带较多,说明拉秧期特有细菌种类变化多,这与根系分泌物和土壤理化性质等微生态环境的改变密切相关。差异条带在盐敏感品种的各个处理中都有出现,而耐盐品种只在不同时期的高盐处理 C3 中出现差异条带,说明盐胁迫对盐敏感品种根际细菌群落结构多样性的影响较大。

测序得到的序列片段大多属于 Proteobacteria (变形菌门)。盐胁迫能降低根际土壤细菌群落的丰富度。低盐处理下,盐敏感品种根际细菌的丰富度较高;高盐胁迫下,耐盐品种根际细菌群落的丰富度较高。试验所用土壤中的大部分差异细菌属于 Proteobacteria (变形菌门) 的 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲;条带 a 属于硬壁菌门消化球菌科;条带 d 属于芽单孢菌门芽单孢菌属,这类细菌多生

存在环境较差的条件下,说明盐胁迫可使土壤环境恶化;条带 f 属于黄杆菌门黄杆菌科,条带 l 属于肠杆菌科,它们可能具有除草潜能(王茹华等,2007),黄杆菌还是可以拮抗黄瓜细菌性角斑病的有益菌;条带 m 与根瘤菌属相似性高,此类细菌绝大多数为有益细菌,具有固氮功能。条带 b、g、h、n 属于鞘氨醇单胞菌属,是土壤中的降解细菌(项丽和唐建设,2007)。

对于细菌群落结构多样性的分析基于一个假设,即 DGGE 图谱中的每一个条带代表一个单独的菌种。由于 DNA 的提取和 PCR 在扩增某些未知种群方面的限制(Farrelly et al., 1995, Polz & Cavanaugh, 1998),以及不同序列 DNA 存在共迁移的可能性,使得这种假设存在一定的局限性,并不完全正确。另外,在图像处理过程中,对于在 DGGE 图谱上肉眼可见、但被软件忽略掉的一些小条带进行了手动处理,所以本试验的分析方法并不能完全揭示土壤细菌的实际生态特征。但 DGGE 条带的位置和多少在一定程度上确实能反映细菌的群落结构多样性,DGGE 图谱也提供了一个在分子水平度量微生物群落遗传多样性变化的方法(Stamper et al., 2003),因此 DGGE 可以补充传统微生物培养方法的不足,对进一步了解和研究微生物生态系统有着重要意义。

此外,不同浓度处理下两品种产量之间产生了差异,耐盐品种的产量高于盐敏感品种,但没有达到差异显著,这可能是因为在定植前进行盐处理,之后正常管理,随着黄瓜的生长和灌水次数的增加,盐胁迫程度降低,到中后期(盛瓜期以后)不同盐浓度处理的 EC 值差异不显著,因而没有对产量产生显著性差异,关于这一点还有待于进一步研究。

References

- Bao Shi-dan. 2005. Agricultural soil analysis. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
鲍士旦. 2005. 土壤农化分析. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社.
- Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 196 (1): 80 - 83.
- Bowen G D, Rovira A D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, 66: 101 - 102.
- Chen Xue-li, Wang Guang-hua, Jin Jian, Wang Yu-feng. 2008. Effects of two bacillus strains on microbial community structure in rhizosphere soils of cucumber and tomato. *Chinese Journal of Ecology*, 27 (11): 1895 - 1900. (in Chinese)
陈雪丽, 王光华, 金 剑, 王玉峰. 2008. 两株芽孢杆菌对黄瓜和番茄根际土壤微生物群落结构影响. *生态学杂志*, 27 (11): 1895 - 1900.
- Farrelly V, Rainey F A, Stackebrandt E. 1995. Effect of genome size and copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environl Microbiol*, 61: 2798 - 2801.
- Garbeva P, Veen J A V, Elsas J D V. 2004. Microbial diversity in soil Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 243 - 270.
- Hu Y S, Wu K, Liu N, Chen H G, Jia X C. 2004. Dynamics of microbial communities in bulk and developing cucumber rhizosphere soil. *Agricultural Sciences in China*, 3 (5): 376 - 383.
- Hu Yuan-sen, Wu Kun, Li Cui-xiang, Jia Xin-cheng. 2007. Effect of continuous cropping of cucumber on soil microbial population II—Variation analysis based on DGGE approach. *Scientia Agricultura Sinica*, 40 (10): 2267 - 2273. (in Chinese)
胡元森, 吴 坤, 李翠香, 贾新成. 2007. 黄瓜连作对土壤微生物区系影响 II——基于 DGGE 方法对微生物种群的变化分析. *中国农业科学*, 40 (10): 2267 - 2273.
- Lin Xue-zheng, Chen Kao-shan, He Pei-qing, Shen Ji-hong, Huang Xiao-hang. 2006. The effects of *Suaeda salsa* L. planting on the soil microflora in coastal saline soil. *Acta Ecologica Sinica*, 26 (3): 801 - 807. (in Chinese)
林学政, 陈靠山, 何培青, 沈继红, 黄晓航. 2006. 种植盐地碱蓬改良滨海盐渍土对土壤微生物区系的影响. *生态学报*, 26 (3): 801 - 807.
- Liu En-ke, Zhao Bing-qiang, Li Xiu-ying, Jiang Rui-bo, Hwat Bing So. 2007. Microbial C and N biomass and soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment PCR products under different long-term fertilization systems. *Acta Ecologica Sinica*, 27 (3): 1079 - 1085. (in Chinese)
刘恩科, 赵秉强, 李秀英, 姜瑞波, Hwat Bing So. 2007. 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. *生态学报*, 27 (3): 1079 - 1085.

- Liu Jun-jie, Wang Guang-hua, Jin Jian, Liu Ju-dong, Zhang Qiu-ying, Liu Xiao-bing. 2008. Effect of different phosphorus concentrations on microbial communities in soybean rhizosphere. *Soybean Science*, 27 (5): 801 - 805. (in Chinese)
- 刘俊杰, 王光华, 金 剑, 刘居东, 张秋英, 刘晓冰. 2008. 磷浓度处理对大豆根际土壤微生物群落结构的影响. *大豆科学*, 27 (5): 801 - 805.
- Polz M F, Cavanaugh C M. 1998. Bias in template-to-product ratios in multi-template PCR. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3724 - 3730.
- Riley D, Riley D, Barker S A. 1969. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean root-soil interface. *Soil Sci Soc Amproc*, 33: 905-908.
- Stamper D M, Walch M, Jacobs R N. 2003. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for gray-water treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 852 - 860.
- Vanessa N L Wong, Richard S B Greenel, Brian W Murphy, Ram Dalal, Surender Mann, Graham Farquhar. 2006. The effects of salinity and sodicity on soil organic carbon stocks and fluxes: An overview. *Regolith Consolidation and Dispersion of Ideas*, 7: 367 - 371.
- van Elsas J D, Dijkstra A F, Govaert J M, van Veen J A. 1986. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots. *FEMS Microb Ecol*, 38: 151 - 160.
- Visser S, Parkinson D. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: Soil microorganisms. *Amer J Altam Agric*, 7 (1): 33 - 37.
- Wang Guang-hua, Jin Jian, Liu Jun-jie, Chen Xue-li, Liu Ju-dong, Liu Xiao-bing. 2009. Bacterial community structure in a mollisol under long-term natural restoration, cropping, and bare fallow history estimated by PCR-DGGE. *Pedosphere*, 19 (2): 156 - 165.
- Wang Guang-hua, Liu Jun-jie, Qi Xiao-ning, Jin Jian, Wang Yang, Liu Xiao-Bing. 2008. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. *Acta Ecologica Sinica*, 28 (1): 220 - 226. (in Chinese)
- 王光华, 刘俊杰, 齐晓宁, 金 剑, 王 洋, 刘晓冰. 2008. Biolog 和 PCR-DGGE 技术解析施肥对德惠黑土细菌群落结构和功能的影响. *生态学报*, 28 (1): 220 - 226.
- Wang Ming-dao, Wu Zong-wei, Yuan Zeng-yan, Chen Hong-ge, Wu Kun, Jia Xin-cheng. 2008. Effects of *Rehmannia glutinosa* Libosch. continuous cropping on microbial communities. *Journal of Henan Agricultural University*, 42 (5): 532 - 538. (in Chinese)
- 王明道, 吴宗伟, 原增艳, 陈红歌, 吴 坤, 贾新成. 2008. 怀地黄连作对土壤微生物区系的影响. *河南农业大学学报*, 42 (5): 532 - 538.
- Wang Ru-hua, Zhang Qi-fa, Zhou Bao-li, Lian Hua, Ma Guang-shu. 2007. Analysis on the interaction between root exudates and rhizosphere microbes. *Chinese Journal of Soil Science*, 38 (1): 167 - 172. (in Chinese)
- 王茹华, 张启发, 周宝利, 廉 华, 马光恕. 2007. 浅析植物根分泌物与根际微生物的相互作用关系. *土壤通报*, 38 (1): 167 - 172.
- Wu Feng-zhi, Liu Jing, Yang Yang. 2008. Effects of cinnamic acid on cucumber rhizosphere soil bacterial diversity under salt stress. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 26 (5): 390 - 392. (in Chinese)
- 吴凤芝, 刘 静, 杨 阳. 2008. 盐胁迫下苯丙烯酸对黄瓜根际细菌多样性的影响. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 26 (5): 390 - 392.
- Wu Feng-zhi, Zhou Xin-gang. 2009. Effect of intercropping of cucumber with different crops on cucumber diseases and soil microbial community diversity. *Acta Pedologica Sinica*, 46 (5): 899 - 906. (in Chinese)
- 吴凤芝, 周新刚. 2009. 不同作物间作对黄瓜病害及土壤微生物群落多样性的影响. *土壤学报*, 46 (5): 899 - 906.
- Wu Feng-zhi, Zhao Feng-yan, Liu Yuan-ying. 2000. On the reasons of continuous cropping obstacles in vegetable facility gardening. *Journal of Northeast Agricultural University*, 31 (3): 241 - 247. (in Chinese)
- 吴凤芝, 赵凤艳, 刘元英. 2000. 设施蔬菜连作障碍原因综合分析防治措施. *东北农业大学学报*, 31 (3) : 241 - 247.
- Xiang Li, Tang Jian-she. 2007. Application of denatured gradient gel electrophoresis in environmental microbiology. *Anhui Agri Sci Bull*, 13 (15): 28 - 30. (in Chinese)
- 项 丽, 唐建设. 2007. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在环境微生物生态中的应用. *安徽农学通报*, 13 (15): 28 - 30.
- Yao Huai-ying, Wu Feng-zhi. 2006. Effects of continuous cucumber cropping and alternative rotations under protected cultivation on soil microbial community diversity. *Plant and Soil*, 284: 195 - 203.
- Yu Jing-quan, Du Yao-shun. 2000. Soil-sickness problem in the sustainable development for the protected production of vegetables. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 31 (1): 124 - 126. (in Chinese)
- 喻景权, 杜尧舜. 2000. 蔬菜设施栽培可持续发展中的连作障碍问题. *沈阳农业大学学报*, 31 (1): 124 - 126.
- Zhang Jia-en, Liu Wen-gao, Hu Gang. 2002. The relationship between quantity index of soil microorganisms and soil fertility of different land use systems. *Soil and Environmental Sciences*, 11 (2): 140 - 143. (in Chinese)
- 章家恩, 刘文高, 胡 刚. 2002. 不同土地利用方式下土壤微生物数量与土壤肥力的关系. *土壤与环境*, 11 (2): 140 - 143.