

设施番茄长期连作土壤微生物群落结构及多样性分析

马宁宁, 李天来*

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳 110866)

摘要: 利用 PCR-DGGE 技术, 研究了裸地及不同连作年限的设施番茄栽培土壤中细菌和真菌的群落结构及多样性的变化情况。结果表明: 设施条件下种植番茄明显改变了土壤土著细菌的群落结构, 但连作年限对土壤细菌多样性影响较小, 细菌群落结构变化不大; 土著真菌的群落结构稳定性优于土著细菌, 但土壤真菌的优势种群在不同连作年限的土样中变化较大, 连作显著降低了某些真菌的数量, 同时显著增加了另一些真菌的数量, 其中, 连作 20 年番茄的土壤真菌新出现的优势种群最多, 且与非优势种群的真菌数量差异较大, 这种番茄连作后改变土壤真菌种群平衡的现象可能是导致番茄产生连作障碍的重要原因之一。通过电泳条带的回收、测序, 可知所取土样中的细菌优势种群属于 *Clostridium butyricum*、*Uncultured bacterium*、*Bacillus* 和 *Arthrobacter*, 真菌优势种群属于 *Saccobolus dilutellus*、*Uncultured fungus*、*Lasiobolus ciliatus*、*Spooneromyces laeticolor* 和 *Lasiobolus orbiculoides*。

关键词: 番茄; 长期连作; 土壤微生物; PCR-DGGE; 群落结构; 多样性

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 02-0255-10

Effect of Long-term Continuous Cropping of Protected Tomato on Soil Microbial Community Structure and Diversity

MA Ning-ning and LI Tian-lai*

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Liaoning Province Key Laboratory of Protected Horticulture, Shenyang 110866, China)

Abstract: Community structure and diversity of microorganism in bare soil and continuous cropping protected tomato field were studied with PCR-DGGE technology. Results showed that soil indigenous bacterial community structure was significantly influenced by planting tomato under protected field, but soil bacterial community structure and diversity were not sensitive to continuous cropping years. Compared with soil indigenous bacteria, indigenous fungal community structure was more steady, but the dominant fungi were more different in the fields with different continuous cropping years, continuous cropping significantly decreased the number of some fungi, meanwhile, the number of some other fungi was significantly increased, most dominant fungi populations were enriched in soil with tomato continuous cropping years of 20, and which number was quite different with the non-dominant fungi populations. The

收稿日期: 2012-09-06; 修回日期: 2013-01-09

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2011BAD12B03); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25); 辽宁省重大科技攻关项目 (2011215003); 沈阳市农业科技发展专项 (F11-092-3-00)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tianlaili@126.com)

change of soil fungi population balance that caused by tomato continuous cropping maybe one of the important reasons for the tomato continuous cropping obstacle. Recycling and sequence analysis of prominent electrophoretic bands showed that the dominant bacteria of soil sample belong to *Clostridium butyricum*, *Uncultured bacterium*, *Bacillus* and *Arthrobacter*, while the dominant fungus belong to *Saccobolus dilutellus*, *Uncultured fungus*, *Lasiobolus ciliatus*, *Spooneromyces laeticolor* and *Lasiobolidium orbiculoides*.

Key words: tomato; long-term continuous cropping; soil microbial; PCR-DGGE; community structure; diversity

番茄是设施栽培中重要蔬菜作物之一, 通常连作较为普遍, 从而导致土壤退化, 产量和品质下降(吴凤芝等, 1997)。土壤微生物是土壤生态系统中最重要和最活跃的组分, 它控制着土壤生态系统功能的许多关键过程, 在促进土壤养分转化循环、维持系统稳定性以及可持续利用中占主导地位(章家恩和廖宗文, 2000; Schutter et al., 2001), 可以说土壤微生物的变化是产生作物连作障碍的主要因素。因此, 研究设施作物连作土壤微生物的变化规律, 对于进一步研究解决作物连作障碍问题具有重要意义。

传统的土壤微生物研究主要采用分离培养法, 但这种方法能够分离培养出来的微生物十分有限, 大量微生物不能分离培养出来, 因此, 影响研究结果的正确性。近年来, 采用分子生物学技术研究土壤微生物的报道越来越多, 其中吴凤芝和王学征(2007)采用 RAPD 技术研究黄瓜土壤微生物群落物种多样性、Buchan 等(2003)采用 T-RFLP 技术研究沼泽枯草腐败过程中细菌和真菌的群落动态演替及优势种群, 宋亚娜和林智敏(2010)采用 PCR-DGGE 技术研究水稻生长过程中稻田土壤氨氧化细菌和氨氧化古菌群落结构的变化等均取得较好结果。本研究中以番茄不同连作年限土壤为材料, 采用 PCR-DGGE 技术, 分析土壤微生物的群落结构, 旨在明确设施栽培番茄长期连作土壤微生物群落的演替规律, 为克服连作障碍提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

供试土样采自沈阳市于洪区马三家镇拉马台村种植番茄的日光温室, 该村早在 20 世纪 80 年代中期就进行了温室蔬菜栽培, 番茄的栽培生产历史长, 栽培模式和管理措施较为规范统一, 番茄一年两茬, 每茬 6 穗果, 底肥为粪肥复合肥配施, 冲施肥追肥, 无大规模病害发生。2009 年 4 月选择该村连续种植番茄 4、7、10、15 和 20 年的日光温室, 按照 5 点取样法采集番茄冠幅内 0 ~ 20 cm 的耕层土壤, 同时以温室附近未种植任何作物的露地 0 ~ 20 cm 土壤为对照, 置于无菌袋内带回实验室, 过 2 mm 土筛后于 - 80 °C 保存备用。

1.2 研究方法

1.2.1 土壤微生物基因组 DNA 的提取和纯化

土壤微生物 DNA 的提取在吴敏娜等(2007)的方法基础上略有改进。称取 0.5 g 土样及 0.5 g 灭菌后的石英砂于核酸提取管中, 加入 850 μL 提取缓冲液 (100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol \cdot L⁻¹ 钠 EDTA, pH 8.0; 100 mmol \cdot L⁻¹ 磷酸钠, pH 8.0; 1.5 mol \cdot L⁻¹ NaCl; 1% CTAB), 涡旋振荡 1 min 后用核酸提取仪振荡 30 s, 加入 50 μL 溶菌酶 (100 mg \cdot mL⁻¹)、50 μL 蜗牛酶 (120

mg · mL⁻¹) 和 50 μL 纤维素酶 (120 mg · mL⁻¹), 37 °C 温浴振荡 1 h; 加入 100 μL 20% SDS, 混匀后 65 °C 恒温处理 30 min, 每 10 min 振荡 1 次, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 取上清液加入 0.2 倍体积的 KAc (8 mol · L⁻¹), 冰浴 20 min 后 14 000 r · min⁻¹ 离心 20 min; 取上清液加入 0.5 倍体积的 PEG (20%) 和 0.1 倍体积的 NaCl (5 mol · L⁻¹), 混匀, 室温放置 1 h 后 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 弃去上清液, 沉淀物用 500 μL 70% 的预冷乙醇充分漂洗, 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 待乙醇完全干燥后加入 700 μL TE 和等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 充分混合后 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 取水相再加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 1 遍, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 取水相上清液, 加入 0.1 倍体积的 NaAc (3 mol · L⁻¹) 和 0.6 倍体积的预冷异丙醇, 混匀后室温放置 1 h, 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min; 弃上清液, 沉淀物用 500 μL 70% 的预冷乙醇充分漂洗后溶于 50 μL TE 中, 得到 DNA 粗提液。粗提 DNA 样品用博大泰克 (BioDev) 的 B 型小量 DNA 片段快速纯化回收试剂盒纯化后 -20 °C 保存。用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 的完整性, 以 λ-*Hind* III digest (购自 TaKaRa) 作为 Marker。

1.2.2 样品 DNA 的 PCR 扩增

分别采用细菌通用引物 341f-GC/U758 (Phillips et al., 2008) 和真菌通用引物 403f/662r-GC (Diouf et al., 2006) 对土壤微生物总 DNA 进行 PCR 扩增, 引物具体信息如表 1 所示。细菌 PCR 扩增反应条件是 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 45 s, 每个循环加 1 s, 共 35 个循环, 之后 72 °C 延伸 10 min。真菌 PCR 扩增反应条件是 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。引物 341f 和 662r 的 5' 端分别加 GC 夹用来防止 DNA 片段在进行变性梯度凝胶电泳时过早解链。细菌和真菌的 PCR 反应体系均为 50 μL, 其组成为 DNA 模板 1 μL, 10× PCR 反应缓冲液 5 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP 混合液 4 μL, 20 pmol · L⁻¹ 前后引物各 1 μL, 5 U · μL⁻¹ *Taq* 酶 0.4 μL, 加灭菌去离子水至总体积为 50 μL。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 Primers used for PCR amplification

目的序列 Target sequence	引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	片段长度/bp Fragment size
细菌 16S V3-V4 Bacterial 16S V3-V4	341f-GC* U758	CCTACGGGAGGCAGCAG CTACCAGGTATCTA ATCC	417
真菌 28S Fungal 28S	403f 662r-GC*	GTGAAATTGTTGAAAGGGAA GACTCCTTGGTCCGTGTT	260

* GC 夹 (GC clamp): 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGG-3'.

1.2.3 PCR 产物的 DGGE

DGGE 采用 D-Code system (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), 细菌和真菌分别采用 6% 和 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度均为 30% ~ 60% (100% 变性相当于 7 mol · L⁻¹ 尿素和 40% 去离子甲酰胺), PCR 产物上样量为 40 μL, 在 1× TAE 缓冲液中 (40 mmol · L⁻¹ Tris, 20 mmol · L⁻¹ 冰乙酸, 1 mmol · L⁻¹ Na₂-EDTA), 60 °C 恒温, 200 V 电压条件下电泳 5 h, 电泳后, 用 Genefinder 染料 (1× TAE 稀释 10 000 倍) 染色 40 min, 然后利用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。

1.2.4 DGGE 图谱优势条带的回收和测序

将经过 Genefinder 染色照相后的聚丙烯酰胺凝胶置于紫外灯下, 用灭菌的手术刀片小心切下凝胶中较为明亮清晰的条带, 用无菌的去离子水冲洗掉残留的染色剂后将胶条完全浸于 30 μL TE 中, 4 °C 放置过夜, 使胶条中的 DNA 片段溶出。以 DNA 浸出液为模板, 分别用相应的细菌带夹引物 341f-GC/U758 和真菌带夹引物 403f/662r-GC 按照前述程序进行 PCR 扩增, 扩增产物再用 DGGE 验证扩增片段与所回收条带的电泳行为是否一致, 确定回收条带的正确位置后, 按照前面所述的方法

再次切胶,以回收后的 DNA 为模板,用不带夹的引物 341f/U758 和 403f/662r 再进行 PCR 扩增,扩增产物送大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 纯化测序。

1.3 数据处理

使用图像分析软件 Quantity One (4.3.1) 对 DGGE 图谱进行分析,电泳条带的数量用来代表细菌和真菌的群落丰富度 (S); 利用 DGGE 图谱的数字化结果分别计算土壤样品中细菌和真菌群落的多样性指数 (H), Shannon-Wiener 多样性指数 $H = -\sum (P_i) \ln (P_i)$, 其中 $P_i = n_i/N$, n_i 为某个带的峰强度, N 为该带所在泳道的所有带峰强度之和; 用非加权组平均法 (UPGMA) 对土壤样品进行聚类分析, 形成聚类树状图。将测序结果输入 NCBI 数据库通过 BLAST 软件与已知序列比对, 获取同源性较高的相关基因序列。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增结果

由图 1 可见, 各处理土壤样品中所提取出的 DNA 片段大小相近且均约为 23 kb, 条带纯度和完整性较好, 可以作为模板用于 PCR 扩增, 各处理条带亮度有差异可能是样品中所含的微生物数量不同造成的。

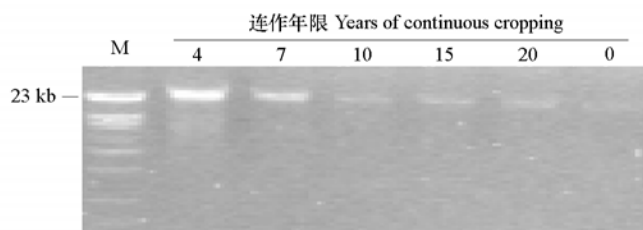


图 1 土壤微生物 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel (0.8%) electrophoresis of microbial DNA extracted from soil

通过浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 如图 2 所示, 各处理的细菌 16S 和真菌 28S rDNA 扩增条带的纯度和亮度都比较好, 没有出现非特异性扩增, 且扩增产物与目的片段长度相近, 分别约为 400 bp 和 260 bp, PCR 扩增效果良好, 扩增产物可以进行 DGGE 实验。

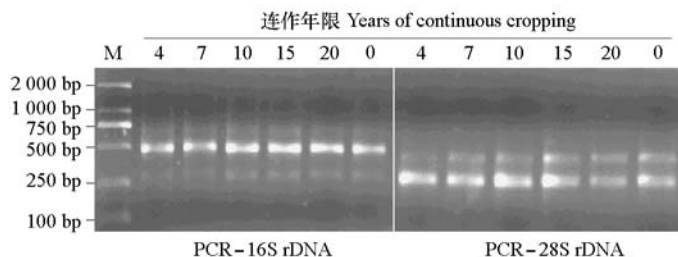


图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel (1.5%) electrophoresis of PCR amplification products

2.2 不同连作年限土壤细菌的群落结构及多样性分析

图 3 为不同连作年限土壤细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱。由图 3 可见,各连作泳道的条带数和位置差异不大,个别条带在亮度上有一定的差别,b、l、c 条带出现在所有连作泳道,但亮度不尽相同,其所代表的细菌种群在连坐初期(4 年)数量较多,连作 7 年后数量减少,随着连作年限的增加,又发生富集,在连作 10 年和 15 年的土壤中成为优势种群,但随着连作进一步继续,它们的优势地位又被其他种群取代;个别连作泳道有其特有的条带,如连作 4 年泳道的 h 条带、15 年泳道的 a、i 条带和 20 年泳道的 j、k 条带,这些条带所代表的细菌种群是相应时期的优势种群,对照泳道的 d、e、f、g 条带在各连作年限泳道中没有出现或亮度大大减弱,这说明设施番茄栽培改变了原土壤细菌的群落结构,一些土著细菌优势种群消失或数量减少。

整个 DGGE 图谱有 35 个带型,各泳道条带数为 22 ~ 27 条不等,其中 7 年连作泳道的条带数最多,但条带间亮度差异不大,没有出现绝对优势种群,各种群间细菌数量较平均,对照泳道的条带数最少。

利用 DGGE 图谱的数字化结果计算各处理土壤细菌的多样性指数如表 2 所示,对照的多样性指数数值最小,细菌群落多样性最低;随着番茄连作年限的增加,土壤细菌多样性指数略有增大,连作 15 年和 20 年的土壤细菌 Shannon-Wiener 指数相同。

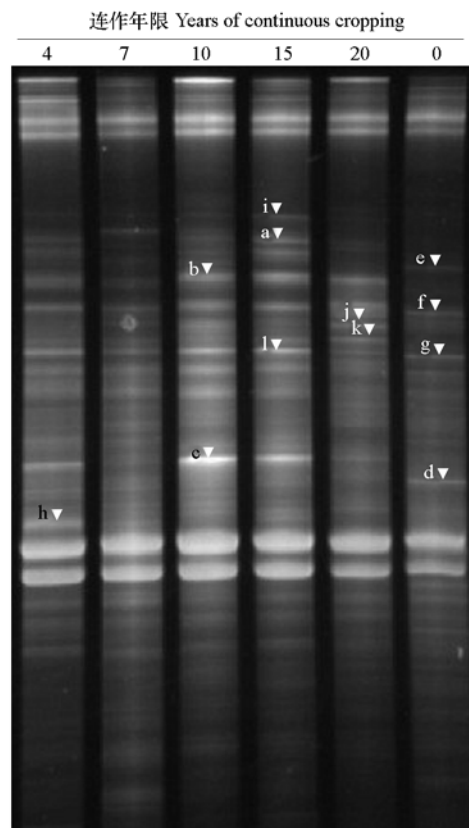


图 3 土壤细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱
Fig. 3 Denaturing gradient gel electrophoresis of bacteria 16S rDNA PCR amplification products

表 2 土壤微生物群落多样性

Table 2 Diversity of soil microorganism community

连作年限 Years of continuous cropping	土壤细菌 Soil bacteria		土壤真菌 Soil fungal	
	丰富度指数 Richness index	多样性指数 Shannon-Wiener index	丰富度指数 Richness index	多样性指数 Shannon-Wiener index
0 (对照 Control)	22	2.70	24	2.59
4	23	2.79	21	2.55
7	27	2.82	33	3.13
10	25	2.86	39	3.28
15	26	2.93	31	2.99
20	24	2.93	32	2.90

采用非加权组平均法 (UPGMA) 对 DGGE 图谱进行聚类分析形成树状图 (图 4)。从图 4 中可以明显看出,连作 4 年和 7 年的 DGGE 指纹图谱最为相似,聚为一类,其次是连作 10 年和 15 年的,相似性为 55%,聚为一簇,连作 20 年作为一个分支,与 4 年、7 年分支的相似性 (0.52) 高于与 10 年、15 年分支的相似性 (0.45),对照单独成为一个分支,与各连作处理的相似性最低,仅为 0.34。各连作处理的相似性都在 0.45 以上。

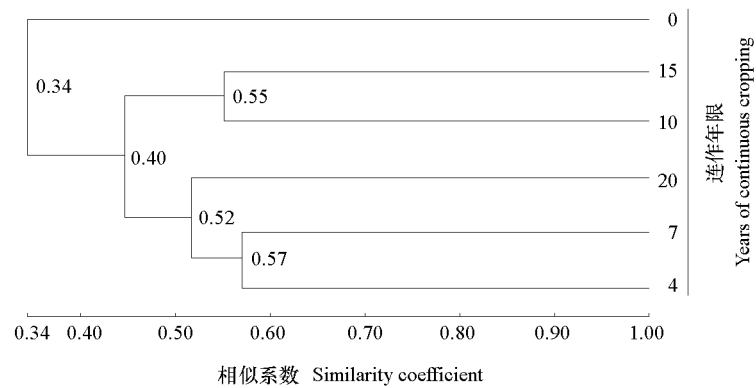


图4 土壤细菌 16S rDNA 的 UPGMA 聚类分析

Fig. 4 UPGMA cluster analysis of bacteria 16S rDNA PCR amplification products

2.3 不同连作年限土壤真菌的群落结构及多样性分析

不同连作年限土壤真菌 28S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱如图 5 所示。

从图 5 可以看出,与细菌 DGGE 图谱相比,真菌的电泳图谱背景清晰,条带明确,各泳道间条带数亮度差异较大,几乎每个泳道都有清晰可辨的特有条带(如 g、a、h、e、i),连作泳道间共有条带的亮度也不同(如 b、c、f、d)。随着连作年限的增加,a、g、h、p 条带的亮度减弱或消失,b、c、n、f 条带的亮度增强,连作 20 年的土壤泳道出现了新的高亮度 o 条带,条带亮度的变化反映了其所代表种群的真菌数量的变化,虽然 20 年连作土壤的条带数不是最多的,但有最多的高亮度条带,与 4 年连作土壤相比,20 年连作土壤新增了高亮度条带 n 和 o,且条带 b、c、k 的亮度大大增强,而条带 d 亮度减弱,g 条带消失,说明番茄经过长期连作,土壤中某些种类的真菌大量富集,其他种类真菌数量减少或消失,这可能是番茄根系分泌物的作用结果。

与土壤细菌不同的是,种植番茄并没有明显改变土壤土著真菌的群落结构,除 i 条带外,其他条带(j、k、l、m)所代表的土著真菌的优势种群没有因为番茄连作而消失,但条带亮度改变较大,真菌数量发生了变化。

土壤样品中真菌基因组 DNA 的 DGGE 图谱共有 50 个不同的带型,每个处理含有 21~39

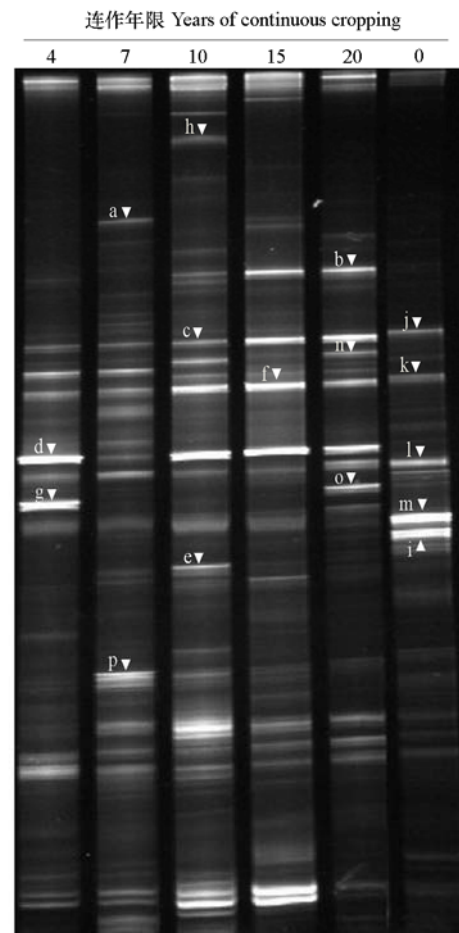


图5 土壤真菌 28S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 5 Denaturing gradient gel electrophoresis of fungal 28S rDNA PCR amplification products

种带型 (表 2), 除对照和连作 4 年处理之外, 所有处理条带数都大于 30, 其中连作 10 年的条带最多, 有 39 条, 随着连作年限的增加, 土壤真菌的丰富度指数呈先上升后下降的变化趋势, 与细菌相比, 不同连作年限土壤真菌多样性指数有较大差异, 连作 4 年土壤真菌多样性指数最低 (2.55), 连作 10 年多样性指数最高 (3.28), 其余处理由低到高依次为对照 < 连作 20 年 < 连作 15 年 < 连作 7 年。

图 6 是不同处理土壤真菌 DGGE 结果的聚类分析图。由图 6 可见, 各处理的 DGGE 指纹图谱差异较大, 相似性较低, 除连作 15 年和 20 年的相似性达到 0.56 以外, 其他处理的相似性均低于 0.5, 其中连作 4 年处理与其他处理的相似性最低, 仅为 0.25, 连作 7 年和 10 年的处理相似性为 0.43, 聚成一类; 对照 (0 年) 和连作 4 年处理与其他处理相似性较低, 分别形成分支, 其中, 对照 (0 年) 与 15 年、20 年分支相似性是 0.39, 与 7 年、10 年分支相似性是 0.29。

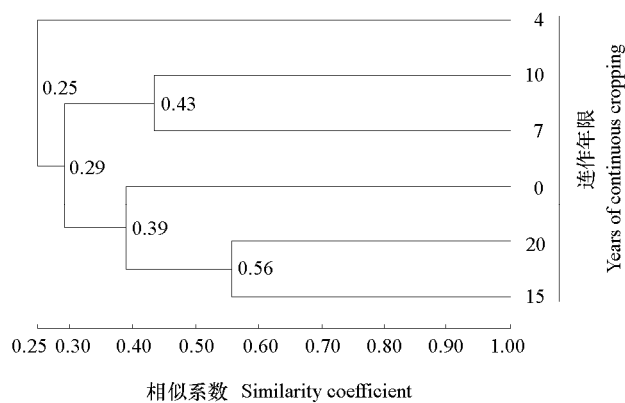


图 6 土壤真菌 28S rDNA 的 UPGMA 聚类分析

Fig. 6 UPGMA cluster analysis of fungal 28S rDNA PCR amplification products

2.4 不同连作年限土壤微生物的优势种群分析

选择图 3 中亮度较高且比较清晰可辨的条带进行切胶回收, 经 PCR 后测序, 条带 a ~ d 测序成功。从图 3 可以看出, 除了 7 年连作土壤外, 其他连作处理都有条带 a 和 c, 但条带亮度有差异, 条带 b 存在于所有连作处理, 代表一种番茄连作土壤中的细菌优势种群, 条带 d 只出现在对照中, 可能是自然土壤中细菌的优势种群。

通过 NCBI 查找比对, 选择与测序序列相似性最高的前两条序列为参考对象, 如表 3 所示, 测序序列与已发表序列的相似性达到 92% ~ 100%, 多数属于未经培养的细菌, 条带 d 序列与已发表的 *Arthrobacter* sp. 和 *Actinomyces* sp. 序列相似性最高, 达到 100%。

对土壤真菌 DGGE 凝胶中的条带进行分离回收, PCR 扩增后测序, 结果即图 5 中的条带 a ~ e 测序成功, 条带 a 是连作 7 年处理特有的条带; 条带 b 存在于除 7 年和对照之外的 4 条泳道, 15 年、20 年处理的亮度较高; c 条带出现在所有土壤样品中, 其中连作 15、20 年处理的亮度最高; 除了 7 年条带 d 在所有连作处理泳道中的亮度都较高, 且并未出现在对照泳道中; e 条带只见于 7 年和 10 年泳道, 后者亮度明显高于前者。将所有测得序列与 NCBI 中已发表序列进行比对, 得到与本试验条件下土壤真菌优势种群序列同源性较高的真菌 (表 3), LF-e 与 *Lasiobolidium orbiculoides* 序列相似性为 100%, 可能是同属真菌, 其余测序序列与已发表序列相似性为 87% ~ 97%。

表 3 土壤微生物的 DGGE 回收条带序列分析

Table 3 Sequence analysis of bands excised from DGGE gel derived from soil microorganism

条带编号 Band No.	序列同源性较高的微生物 Microorganism with the highest identity from NCBI	相似性% Similarity
LB-a	<i>Clostridium butyricum</i> strain W5 (DQ831124)	97
	Uncultured organism clone ELU0147-T221-S-NIPCRAMgANa_000420 (HQ800997)	97
LB-b	Uncultured bacterium clone BFA_100 (EF443777)	99
	Uncultured bacterium clone SSD120_A12 (JQ358480)	99
LB-c	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone OTU76 (JQ217331)	92
	<i>Bacillus</i> sp. LKC-YN001 (JN854133)	92
LB-d	<i>Arthrobacter</i> sp. TXc7-10 (HQ333015)	100
	<i>Actinomyces</i> sp. YACS-36 (DQ649438)	100
LF-a	<i>Saccobolus dilutellus</i> isolate AFTOL-ID 1299 (FJ176870)	90
	Uncultured soil fungus clone Fung.dry.ECATDBG02 (GU376216)	89
LF-b	Uncultured fungus clone gbFC_3b38_043 (DQ901003)	95
	<i>Pezizales</i> sp. BC2 (DQ317324)	87
LF-c	<i>Lasiobolus ciliatus</i> voucher KS-94-005 (DQ167411)	97
	<i>Lasiobolus cuniculi</i> voucher C F-54526 (DQ168338)	97
LF-d	<i>Spooneromyces laeticolor</i> (DQ220434)	93
	Uncultured Ascomycota clone A9YE16RM1 (FJ568096)	93
LF-e	<i>Lasiobolidium orbiculoides</i> (DQ062995)	100
	<i>Pseudombrophila merdaria</i> (DQ062992)	96

注: LB-a ~ LB-d 对应图 3 中条带 a ~ d, LF-a ~ LF-e 对应图 5 中条带 a ~ e。

Note: LB-a ~ LB-d correspond to the bands a ~ d in figure 3, LF-a ~ LF-e correspond to the bands a ~ e in figure 5.

3 讨论

许多研究已表明:作物连作导致土壤微生物群落改变是产生作物连作障碍的重要原因之一。然而,以往研究土壤微生物群落变化多采用微生物培养方法,这种方法受培养条件影响较大,不仅可培养出的微生物有限,而且研究结果也存在一定差异(孙艳艳等,2010;华菊玲等,2012)。近年来,采用分子生物学方法进行作物连作土壤微生物研究已有一些进展。吴凤芝和王学征(2007)利用 RAPD 技术研究了设施黄瓜连作和轮作对土壤微生物群落 DNA 序列多样性的影响,结果发现连作 7 年的土壤微生物群落多样性指数、丰富度及均匀度指数均小于连作 2 年的。李坤等(2009)采用 PCR-DGGE 技术研究葡萄连作对土壤细菌和真菌种群结构及多样性的影响,发现种植葡萄 30 年的连作园土壤细菌和真菌的多样性都大于种植葡萄 3 年的新植园土壤。胡元森等(2007)采用 DGGE 技术研究黄瓜连作对土壤微生物区系的影响,发现连作并未造成土壤菌群大量丢失,菌群构成仍较稳定,但土壤部分种群的数量发生了明显变化。本研究中采用 DGGE 技术研究结果表明,设施番茄栽培土壤细菌丰富度指数、真菌丰富度指数和多样性指数均随连作年限的延长呈先上升后下降的变化趋势,但连作 20 年番茄的土壤细菌及真菌丰富度和多样性指数仍大于连作 4 年的土壤。这说明本试验条件下,番茄长期连作增加了土壤细菌和真菌的丰富度和多样性,这与吴凤芝和王学征(2007)用 RAPD 技术对黄瓜连作土壤微生物的研究结果不一致,结合胡元森等(2007)采用 DGGE 技术研究认为黄瓜连作土壤菌群构成较为稳定,未出现丢失的结果,认为本研究与吴凤芝和王学征(2007)的研究结果不一致的原因可能与 RAPD 和 DGGE 两种分子生物学技术有关,且与随机引物的选择和多少有关,当然作物的不同以及土壤质地和施肥等均会影响结果,有关方面还需做进一步研究。

本研究中,尽管土壤细菌及真菌的丰富度指数和多样性指数均随连作年限的延长而增加,但土壤细菌种群数量差异不大,群落结构较为相似,只是优势种群的种类和数量略有不同;而与细菌相比,土壤真菌对连作的反应更敏感,连作显著降低了某些真菌的数量,同时真菌 DGGE 的每条泳道均有独立且亮度较高的条带,这说明每个不同连作年限的土壤样品中均有降低的真菌种群和升高的真菌种群,其中,连作 20 年土壤的真菌优势种群最多,且与非优势种群的真菌数量差异较大,某些

真菌数量大幅增加, 富集现象明显, 这种番茄连作后改变土壤真菌优势种群平衡可能是导致番茄产生连作障碍的重要原因之一。一些研究 (Saïdou et al., 2006; Wakelin et al., 2008; 张海燕 等, 2010) 也证实土壤细菌与土壤类型密切相关, 而土壤真菌与土壤管理密切相关, 其原因是, 细菌在土壤中数量最多, 且群落结构稳定, 对环境变化的适应力强; 而真菌的数量远远少于细菌, 且对土壤环境变化敏感。对于土壤土著微生物来说, 土著真菌的群落结构稳定性优于土著细菌, 优势种群没有因为受到温度、湿度、人为耕作措施等的影响而消失。测序结果显示, 5 条真菌 DGGE 条带所代表的真菌种群都属于子囊菌纲, 其中 a、c、e 都属于盘菌目, 细菌 DGGE 条带中 d 条带所代表的土著细菌优势种群是放线菌的一种, 而 a、b、c 所代表的连作土壤细菌优势种群分别属于酪酸梭菌、未经培养的细菌和芽孢杆菌, 这些微生物在土壤中的作用还有待于进一步研究。

PCR-DGGE 技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性, 自从 Muzer 等 (1993) 首次将这项技术应用于微生物生态学研究以来, 已有越来越多的人将其作为主要的分子工具之一, 用于研究微生物群落结构、多样性以及微生物种群的动态变化 (Martina et al., 2004; 秦华 等, 2010; 顾美英 等, 2012)。目前国内利用 DGGE 技术研究土壤微生物群落结构及多样性方面多偏重于研究土壤细菌, 而对于土壤真菌的研究少见报道。本研究的结果表明, 以 403f/662r-GC 为引物用于土壤真菌的 DGGE 分析, 得到的电泳图谱背景明确、条带清晰、可分辨条带数量较多, 可以用于研究不同处理下土壤真菌群落的演变情况。以往研究者多针对细菌 16S rDNA 的 V3 可变区设计引物用于 DGGE 实验 (Cindy et al., 2000; 王旭熙 等, 2012), 由于片段较短, 一些相近的细菌不能被区分开来, 致使细菌的分类地位确定不够具体精确。本次试验中以细菌 16S rDNA 的 V3 ~ V4 可变区为目的序列进行 PCR 扩增, 在满足 DGGE 实验条件的前提下增大了片段长度, 有利于进一步区分亲缘关系较接近的细菌种群, 但扩增片段的增大也带来了一些问题, 如电泳条带增多导致条带间分离不完全, 电泳图谱背景模糊, 可分辨条带数减少等, 这些问题需要通过调整变性剂浓度梯度、电压及电泳时间等实验条件来解决。

References

- Buchan A, Newell S Y, Butler M. 2003. Dynamics of bacterial and fungal communities on decaying salt marsh grass. *Appl Environ Microbiol*, 69 (1): 6676 - 6687.
- Cindy H Nakatsu, Vigdis Torsvik, Lise Øvreås. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Sci Soc Am J*, 64 (4): 1382 - 1388.
- Diouf M, Miambi E, Mora P, Delgarde S, Rouland C. 2006. The impact of termite sheetings age on their fungal communities. *European Journal of Soil Biology*, 42 (1): 85 - 91.
- Gu Mei-ying, Xu Wan-li, Mao Jun, Zhang Zhi-dong, Tang Guang-mu, Ge Chun-hui. 2012. Microbial community diversity of rhizosphere soil in continuous cotton cropping system in Xinjiang. *Acta Ecologica Sinica*, 32 (10): 3031 - 3040. (in Chinese)
- 顾美英, 徐万里, 茆 军, 张志东, 唐光木, 葛春辉. 2012. 新疆绿洲农田不同连作年限棉花根际土壤微生物群落多样性. *生态学报*, 32 (10): 3031 - 3040.
- 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.
- Hua Ju-ling, Liu Guang-rong, Huang Jin-song. 2012. Effect of continuous cropping of sesame on rhizospheric microbial communities. *Acta Ecologica Sinica*, 32 (9): 2936 - 2942. (in Chinese)
- 华菊玲, 刘光荣, 黄劲松. 2012. 连作对芝麻根际土壤微生物群落的影响. *生态学报*, 32 (9): 2936 - 2942.
- Li Kun, Guo Xiu-wu, Sun Ying-ni, Zhang Li-heng, Hu Xi-xi. 2009. Effect of grape-replanting on soil bacterial and fungal populations. *Chinese*

- Journal of Applied Ecology, 20 (12): 3109 – 3114. (in Chinese)
- 李 坤, 郭修武, 孙英妮, 张立恒, 胡禧熙. 2009. 葡萄连作对土壤细菌和真菌种群的影响. 应用生态学报, 20 (12): 3109 – 3114.
- Martina S Girvan, Juliet Bullimore, Andrew S Ball, Jules N Pretty, A Mark Osborn. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. Appl Environ Microbiol, 70 (5): 2692 – 2701.
- Muyzer G, Wall E C D, Uitterlinden A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rDNA. Appl Environ Microbiol, 59 (3): 695 – 700.
- Phillips L A, Germida J J, Farrell R E, Greer C W. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. Soil Biology and Biochemistry, 40 (12): 3054 – 3064.
- Qin Hua, Li Guo-dong, Ye Zheng-qian, Xu Qiu-fang, Cao Zhi-hong. 2010. Evolvement of soil bacterial community in intensively managed *Phyllostachys praecox* stand and related affecting factors. Chinese Journal of Applied Ecology, 21 (10): 2645 – 2651. (in Chinese)
- 秦 华, 李国栋, 叶正钱, 徐秋芳, 曹志洪. 2010. 集约种植雷竹林土壤细菌群落结构的演变及其影响因素. 应用生态学报, 21 (10): 2645 – 2651.
- Saïdou Nourou Sall, Dominique Masse, Ndèye Yacine Badiane Ndour, Jean-Luc Chotte. 2006. Does cropping modify the decomposition function and the diversity of the soil microbial community of tropical fallow soil? Applied Soil Ecology, 31 (3): 211 – 219.
- Schutter M E, Sandeno J M, Dick R P. 2001. Seasonal, soil type, alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. Biology Fertility Soils, 34: 397 – 410.
- Song Ya-na, Lin Zhi-min. 2010. Changes in community structures of ammonia oxidizers and potential nitrification rates in red paddy soil at different growth stages of rice. Acta Pedologica Sinica, 47 (5): 987 – 994. (in Chinese)
- 宋亚娜, 林智敏. 2010. 红壤稻田不同生育期土壤氨氧化微生物群落结构和硝化势的变化. 土壤学报, 47 (5): 987 – 994.
- Sun Yan-yan, Jiang Gui-ying, Liu Jian-guo, Zhang Wei, Tang Zhi-min. 2010. Effects of continuous cropping tomato for processing on soil enzyme activities and microbial flora. Acta Ecologica Sinica, 30 (13): 3599 – 3607. (in Chinese)
- 孙艳艳, 蒋桂英, 刘建国, 张 伟, 唐志敏. 2010. 加工番茄连作对农田土壤酶活性及微生物区系的影响. 生态学报, 30 (13): 3599 – 3607.
- Wakelin S A, Macdonald L M, Rogers S L, Gregg A L, Bolger T P, Baldock J A. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. Soil Biology & Biochemistry, 40 (3): 803 – 813.
- Wang Xu-xi, Wu Fu-zhong, Yang Wan-qin, Luo Yi, Wang Ao. 2012. Effects of ginger cropping on bacterial diversity in purple soils in different cropping background. Acta Pedologica Sinica, 49 (1): 147 – 154. (in Chinese)
- 王旭熙, 吴福忠, 杨万勤, 罗 艺, 王 奥. 2012. 不同种植模式背景下栽植生姜对紫色土细菌多样性的影响. 土壤学报, 49 (1): 147 – 154.
- Wu Feng-zhi, Liu De, Wang Dong-kai, Luan Fei-shi, Wang Wei, Kong Xian-ming. 1997. The effects of different years of continuous cropping on the vital-ity of root systems and their qualities in the plastic house tomatoes. Journal of Northeast Agricultural University, 28 (1): 33 – 38. (in Chinese)
- 吴凤芝, 刘 德, 王东凯, 栾非时, 王 伟, 孔鲜鸣. 1997. 大棚番茄不同连作年限对根系活力及其品质的影响. 东北农业大学学报, 28 (1): 33 – 38.
- Wu Feng-zhi, Wang Xue-zheng. 2007. Effect of monocropping and rotation on soil microbial community diversity and cucumber yield, quality under protected cultivation. Scientia Agricultura Sinica, 40 (10): 2274 – 2280. (in Chinese)
- 吴凤芝, 王学征. 2007. 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. 中国农业科学, 40 (10): 2274 – 2280.
- Wu Min-na, Zhang Hui-wen, Li Xin-yu, Su Zhen-cheng, Zhang Cheng-gang. 2007. An extraction method of fungal DNA from soils in North China. Chinese Journal of Ecology, 26 (4): 611 – 616. (in Chinese)
- 吴敏娜, 张惠文, 李新宇, 苏振成, 张成刚. 2007. 提取北方土壤真菌 DNA 的一种方法. 生态学杂志, 26 (4): 611 – 616.
- Zhang Hai-yan, He Jiang-zhou, Xu Biao, Gong Ming-fu, Zhang Li-li. 2010. Variety of soil microbial structure in continuous cropping cotton field in south Xinjiang. Microbiology China, 37 (5): 689 – 695. (in Chinese)
- 张海燕, 贺江舟, 徐 彪, 龚明福, 张利莉. 2010. 新疆南疆不同连作年限棉田土壤微生物群落结构的变化. 微生物学通报, 37 (5): 689 – 695.
- Zhang Jia-en, Liao Zong-wen. 2000. Discussion on soil ecological fertility and its cultivation. Soil and Environmental Sciences, 9 (3): 253 – 256. (in Chinese)
- 章家恩, 廖宗文. 2000. 论土壤的生态肥力及其培育. 土壤与环境, 9 (3): 253 – 256.