红壤连作花生不同生育期根际微生物区系变化研究

王小兵[1,2]，骆永明[2,3]*，刘五星[2]，李振高[2]

(1. 扬州大学 环境科学与工程学院，江苏 扬州 225009；
2. 中国科学院 南京土壤研究所/中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室，江苏 南京 210008；
3. 中国科学院 烟台海岸带研究所，山东 烟台，264003)

摘　要：通过平板计数法及变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析法对红壤旱地 12 年长期连作花生不同生育期根际微生物区系进行研究。结果表明：同一生育期内，随着生育期的进程各处理微生物数量逐渐增加，有机肥处理(M)、有机肥＋有效菌剂处理(BM)的细菌、放线菌数量显著高于化肥处理(F)，真菌数量显著低于化肥处理。通过对 PCR-DGGE 图谱的研究，各施肥处理连作花生根际微生物区系结构趋于单一，主要以鞘胺醇单胞菌属为主，青枯菌量增加，土壤微生物区系变劣。由 DGGE 图谱聚类分析和群落多样性分析进一步可知，有机肥处理、有机肥＋有效菌剂处理的丰富度指数及香农-威纳指数均大于施用化肥处理，施用有机肥添加有效菌剂有利于改善连作花生根际土壤微生物群落多样性。综合而言，土壤微生物区系失衡，土传病害病原菌增加可能是导致花生连作障碍的主要因子。

关键词：红壤；连作花生；生育期；根际微生物区系；DGGE

中图分类号：S 565.2　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1671-4652(2011)04-0023-05

Studies on microbial population dynamics in rhizospheres of the continous cropping peanuts in red soil at different growth periods

WANG Xiao-bing[1,2], LUO Yong-ming[2,3], LIU Wu-xing[2], LI Zhen-gao[2]

(1. *Coll of Envir Sci and Engin*, *Yangzhou Univ*, Yangzhou 225009, China;
2. *Inst of Soil Sci*, *Chin Acad of Sci*/*Key Lab of Soil Envir and Poll Remediation of Chin Acad of Sci*, Nanjing 210008, China;
3. *Yantai Inst of Coastal Zone Res*, *Chin Acad of Sci*, Yantai 264003, China)

ABSTRACT: The microbial population dynamics in the rhizospheres of continous cropping peanuts was studied by the plate counting method and DGGE. The results showed that the numbers of bacteria, actinomycete and fungus significantly increased in peanut continuous cropping soil with long-term fertilization. The numbers of bacteria and actinomycete in M (pig manure) and BM (pig manure with effective microorganisms) were significantly higher than those in F(chemical fertilizer), but the numbers of fungus were less in M and BM than in F. PCR-DGGE analysis indicated that the microbial biodiversity decreased in continuous different fertilization treatments, the dominant species was *Sphingomonas sp*, and the number of *R. solanacearum* increased. The Shannon Index and the Richness of M and BM were higer than F, Compared with F, BM could improve the microbial community diversity in the rhizospheres of continous cropping peanuts. Soil microflora unbalance and increasing soil borne-desease pathogens were two main factors of the peanut continuous cropping obstacle in red soil.

KEY WORDS: red soil; peanut continous cropping; development stage; rhizosphere microbe; DGGE

花生是我国重要的油料作物和经济作物，近几年随着种植结构的调整，种植面积不断扩大。据统计，2002～2006 年花生年均种植面积约 7 300 万 hm^2，在国内大宗农作物中排第 7 位，在国际上仅次于

收稿日期：2011-06-20
基金项目：国家自然科学基金重点资助项目(40432005)；中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-053-3)；江苏省科技支撑计划项目(BE2011360)
作者简介：王小兵(1976－　)，男，江苏东台人，扬州大学讲师，主要从事花生连作障碍机理研究。
* 联系作者，E-mail：xbwangxl@sina.com.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

印度居世界第2位,占全球花生面积的近20%[1]。花生是一种对连作较为敏感的作物,连作年限愈长,减产愈重。花生是低丘红壤区主要经济作物,连作障碍已成为南方低丘红壤区花生产量持续下降的重要因素之一[2]。前人研究[3-4]认为,连作土壤微生物生态平衡破坏是连作障碍的主要原因之一。关于花生连作对土壤微生物的影响,有报道[5-6]认为,花生随着连作年限的增加,土壤和根际的真菌数量大幅度增加,细菌和放线菌数量显著减少。徐瑞富等[7]分离鉴定出连作花生地的主要真菌有曲霉、青霉、镰刀菌、根霉、丛节孢囊和射线串孢囊,土壤真菌化是地力衰竭的标志之一。红壤在我国分布较广,且由于其特殊的成土特性,一般肥力相对较低,与其他类型的土壤有着较大的差异。迄今为止,该地区花生长期连作土壤微生物区系变化尚未见报道,其动态变化与演替规律尚不清楚。因此,本课题组从1996年开始在中国科学院红壤生态实验站布置花生连作长期定位试验,运用传统平板培养方法及现代分子生物学方法对连作花生不同生育期根际微生物区系变化进行跟踪研究,探讨花生连作障碍的成因。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

中国科学院红壤生态实验站位于江西省鹰潭市余江县刘家站(116°55′E,28°12′N)。供试土壤为第四纪红色黏土。其基础理化性质为:pH 3.9,有机质8.44 g·kg^{-1},全氮0.594 g·kg^{-1},全磷0.20 g·kg^{-1},全钾14.50 g·kg^{-1},水解氮43.3 mg·kg^{-1},速效磷痕迹,速效钾84 mg·kg^{-1}。

1.2 试验设计

长期定位试验始于1996年4月,试验布置之前该地属未开垦的荒地。共设3个处理,即单施化肥(F)、有机肥(M)、有机肥+有效菌剂(BM),各处理小区面积为33.3 m^2,重复4次,随机排列。化肥为尿素(N 46%)、钙镁磷(P_2O_5 14%)、氯化钾(K_2O 60%),其用量分别为90、300和225 kg·hm^{-2}。有机肥为当地猪场的猪粪,用量为18 750 kg·hm^{-2}(猪粪干重约90 g·kg^{-1},干猪粪全氮含量约24.8 g·kg^{-1}),有效菌剂为EM菌与本实验室分离的有效菌株混合而成,施用量为20.55 L·hm^{-2},所有肥料作基肥一次性施入。花生品种为赣花5号,每年4月中旬播种,8月中旬收获,常规田间管理,冬季休闲。

1.3 土壤样品采集

在播前、苗期、花期、荚果期和收获期,按5点取样法选取花生植株,去除根部大颗粒土块,采用抖动法采集根际土壤,装袋后带回实验室,及时进行土壤微生物区系的测定。

1.4 分析方法

1)微生物数量测定:细菌、真菌、放线菌分别采用牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏(Martin)培养基、改良高氏一号培养基培养,按稀释平板法计数[8]。

2)DNA提取:采用FastDNA SPIN Kit for Soil试剂盒(美国Qbiogene公司)提取土壤总DNA。具体方法参照文献[9]进行。

3)PCR产物变形梯度凝胶电脉(DGGE):使用引物338f-GC和518r扩增细菌16*S* rDNA基因*V*3区一段大约150 bp的片段(PTC-100,美国MJ Research公司)。50 μL扩增反应体系中包括:1.5 mmol·L^{-1} Mg^{2+},200 mol·L^{-1} dNTP,1.5 mol·L^{-1}引物,1 μL模板,1.5 U *Taq* DNA聚合酶。反应参数:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性1 min,50 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,30个循环;最后72 ℃延伸10 min。使用DCode™ Universal Mutation Detection System(美国Bio-Rad公司),在变性梯度为45%~75%的80 g·L^{-1}聚丙烯酰胺凝胶上进行变性梯度凝胶电泳。电泳前对PCR产物定量、校正使上样量一致。待胶凝固后,加入PCR样品25 μL,在60 ℃、80 V条件下电泳16 h后,使用Sybr Green I染色30 min,染色后用Gel Doc™ EQ(美国Bio-Rad公司)凝胶成像系统成像,使用Quantity One 4.4软件通过分析样品电泳条带来比较各个土壤样品的微生物多样性的一些基本指标[10]。电泳条带的数量可以代表群落DNA序列的丰富度指数(S)。群落DNA序列的多样性采用香农指数(Shannon index)[11]进行分析。DGGE中条带Shannon多样性指数的计算按以下公式进行,通

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

过 Biodap(Biodiversity Data Analysis Package)软件进行分析。

香农(Shannon)指数(H)：

$$H = -\sum_{i=1}^{s} P_i \ln P_i 。$$

式中：P_i 为第 i 条带灰度值占该泳道总灰度的比率；s 为 DGGE 胶中条带数量。

1.5　数据分析

采用 Origin 8.0 作图，SPSS 13.0 进行数据分析，One-way ANOVA 检测显著性差异。

2　结果与分析

2.1　连作花生不同生育期根际土壤可培养微生物群落变化

由图 1 可知，随生育期的延长，土壤微生物群落数量均提高，细菌数量和放线菌数量变化趋势一致，在花期之前上升较慢，花期至荚果期几乎没有变化，荚果期以后急剧上升；而真菌数量增加较快，从播种到收获呈直线上升趋势。在整个生育期中连作花生根际细菌在土壤微生物组成中占有绝对优势，菌数量由大到小依次为细菌、放线菌、真菌，说明细菌在根际微生态中起着重要作用。不同处理间，有机肥处理、有机肥＋菌剂处理的细菌、放线菌数量均高于化肥处理，开花期化肥处理的真菌数量低于有机肥＋菌剂和有机肥处理，而荚果期和收获期时真菌数量高于这两个处理。

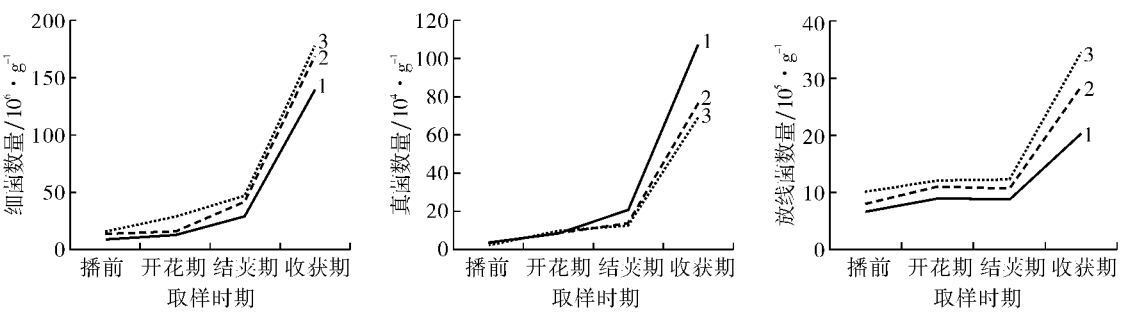

图 1　连作花生生长期内根际土壤细菌群落变化

Fig. 1　Microflora changes in the rhizosphere soil of peanut with continuous cropping during vegetation period

1. F 处理；2. M 处理；3. BM 处理

2.2　连作花生不同生育期根际土壤细菌总群落分析

1) DGGE 图谱分析：从连作花生不同生育期根际土壤中提取到了片段长度约为 23 kb 的土壤总 DNA 基因组，以此为模板，通过特异性引物对 338f-GC 和 518r 进行扩增，扩增片段长约 150 bp。根据 DGGE 的原理，不同细菌的 16S rDNA 片段由于其碱基组成的差异导致电泳时泳动速率的不同，从而在凝胶上得以分开。DGGE 条带数基本体现了根际土壤中细菌种群的数量，而条带亮度则反映该种细菌数量的多少[12]。

由图 2 可知，花生连作不同生育期根际细菌种群构成较稳定，条带 A4、A5、A7、A8、A9、A10 和 A12 在整个生育期均有出现，但某些细菌种群的数量发生较大的变化，如 A4、A9 和 A10 表现出灰度增加的趋势，而 A11 后期成为优势条带，A10 对应的是茄青枯雷尔氏菌条带，后期逐渐增强，发病率上升。不同处理间，A2 在 F 处理中由优势条带逐渐变成非优势条带，而在 BM 处理中整个生育期均为优势条带，A3 在 BM 处理中存在，而 F 处理中没有发现。A6 后期在 F 处理中成为优势条带，而在 BM 处理中没有。A13 在 F 处理中出现，后期成为优势条带。将其中几个条带序列测定后与 GenBank 数据库序列进行比对，结果见表 1。条带 A1 与黄杆菌相似度 97%，而 A3、A4、A5、A9 和 A12 均与鞘胺醇单胞菌属有较近的亲缘关系。A10 条带与茄科雷尔氏菌(R)相似，后期灰度加强。

2) DGGE 图谱相似性分析：采用 Quantity One(美国 Bio-Rad 公司)软件分析连作花生不同生育期根际土壤微生物 DGGE 图谱，根据电泳条带的数量、质量和迁移率进行聚类分析。由图 3 可知，F 和 BM 2 个处理分成 2 类，相似度较低，只有 50%左右。表明红壤花生长期连作后，施用化肥和施用猪粪

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

导致根际微生物区系显著区别。不同生育期间,苗期和花期根际微生物区系相似度很高,F和BM处理分别达到78%和75%。而后期(荚果期、收获期)与前期(播前、开花期)之间相似度降低。

3) DGGE图谱群落多样性分析:根据细菌16S rDNA的PCR-DGGE图谱中条带的位置和亮度的数字化结果计算了细菌群落结构多样性指标。香农指数表明细菌群落多样性,香农指数值越大表明多样性越高。由表2可知,施用化肥的不同生育期根际土壤香农指数平均为3.03,而施用有机肥的为3.14,可见施用有机肥香农指数大于施用化肥;从每条泳道的条带数方面进行细菌群落丰富度比较,施用化肥处理条带总数87条,施用有机肥处理为98条,说明施用有机肥处理丰富度指数大于施用化肥处理。

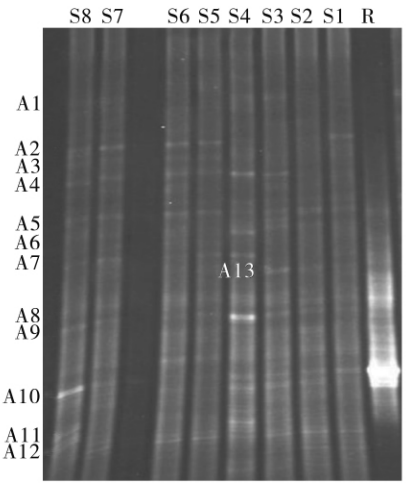

图2 连作花生不同生育期土壤细菌种群DGGE图谱

Fig. 2 DGGE profiles of bacteria in rhizosphere soil of peanut with continuous cropping during vegetation period

R. 茄科雷尔氏菌;S1~S4和S5~S8分别为F小区和BM小区播前、花期、荚果期、收获期根际土

3 小结与讨论

作物经多年连作后,土壤微生物区系发生变化较大。有些微生物种群由于受到连作作物大量积累的根系分泌物和残茬腐解物等化学成分的刺激而变得活跃,生长旺盛,数量大增[13],有些微生物种群由于受到抑制或毒害而生长受阻,数量大减,甚至灭绝,从而引起土壤微生物区系变化和微生态平衡的改变[14-15]。

本研究结果表明,随着花生生长,根系分泌物增多,给根际土壤微生物生长、繁衍提供了丰富的养分,根际土壤微生物数量逐渐增加,这与前人研究[16-17]。结果一致。有研究[18]表明,长期连作导致土壤由"细菌型"向"真菌型"转变,而真菌型土壤是地力衰竭的标志。在本试验中,施用化肥处理根际土壤真菌数量要高于施用有机肥、有机肥+菌剂的处理,表明施用化肥会导致土壤地力衰竭更严重,这与前期研究发现施用化肥处理土传病害发生严重结果一致[19]。

表1 花生不同生育期根际土壤微生物部分DGGE片段序列比对

Tab. 1 Sequence analysis of DGGE bands in the rhizosphere soil during peanut growth

条带	登录号	最相近序列	相似度/%	登录号
A1	AB543520	*Bacterium* E2	97	GQ398342
		Flavobacterium sp. KGF1	97	FJ965845
		Uncultured bacterium clone inwood-o13	97	DQ980879
A3	AB543521	*Sphingobacterium sp.* CI63	100	DQ530166
		Uncultured Sphingobacterium sp. clone IAFIL79	100	DQ145576
		Uncultured bacterium sp. clone: N2-S4E12f	99	AB485589
A4	AB543522	*Uncultured bacterium clone* 15	100	FJ348698
		Uncultured bacterium clone Fin-CL-100621-OTU-32	96	EU808411
		Uncultured bacterium clone AFYEL-aaj68b03	96	EU465103
A5	AB543523	*Uncultured Sphingobacterium sp.* clone 186	100	GQ410437
		Sphingobacterium siyangensis strain YRL14	98	EU373423
		Uncultured bacterium clone D71	97	GQ389199
A9	AB543524	*Uncultured bacterium clone* ZJ36	100	GQ252640
		Sphingobacterium thalpophilum, *strain* DSM 11723T	100	AJ438177
		Uncultured bacterium clone nbw676d09c1	99	GQ113176
A12	AB543525	*Sphingomonas melonis gene*	100	AB201254
		Uncultured Fervidobacterium sp. clone BNB-2	100	FJ898348

近几年,随着分子生物学技术飞速发展,PCR-DGGE、RT-PCR等技术在土壤微生物区系分析中得到了广泛应用[20]。PCR产物DGGE直接以土壤微生物总基因组DNA为研究对象,通过比较细菌种群

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　连作花生不同生育期土壤微生物 DGGE 条带多样性指数和丰富度指数

Tab. 2　Shannon index (H) and richness (S) of DGGE bands in rhizosphere soil of peanut with continuous cropping during vegetation period

生育期	香农指数(H)	丰富度指数(S)
S1	3.06	19
S2	2.94	22
S3	3.21	25
S4	2.94	21
S5	3.09	22
S6	3.13	25
S7	3.28	28
S8	3.07	23

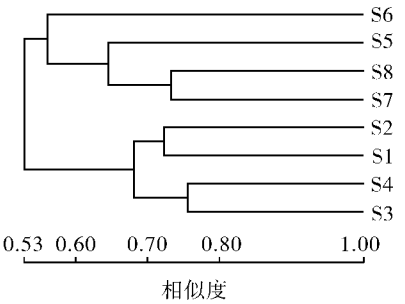

图 3　连作花生不同生育期根际微生物 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 3　Cluster dendrogram analysis of DGGE bands in rhizosphere soil of peanut with continuous cropping during vegetation period

16S rDNA 基因信息来了解其多样性变化，能够更直接更可靠地反映土壤微生物的原始组成情况[21]。花生连作不同生育期 PCR 产物 DGGE 图谱分析结果表明，多年花生连作后，细菌种类减少，连作花生根际土壤微生物区系改变。对 PCR 产物 DGGE 条带进行割胶测序后发现，细菌种群出现单一性趋势，主要以鞘胺醇单胞菌属为主。有研究[22]表明，鞘氨醇单胞菌能够耐受高度贫营养环境和恶劣环境，它们有着特殊的代谢调控机制以适应多变的环境(尤其是营养物缺乏的环境)，能够高效调整自身的生长来抵抗不利的环境变化。由 DGGE 图谱聚类分析和群落多样性分析进一步可知，长期施肥花生连作已导致花生根际土壤微生物结构发生显著变化，施用有机肥处理、有机肥＋有效菌剂处理的丰富度指数、香农指数大于施用化肥处理。Shiomi 等[23]研究抑病土和易染病土壤微生物区系，结果发现，病原菌很难在微生物多样性高的土壤中滋生。本课题组在分析不同施肥处理对连作花生土传病害的影响时发现，施用有机肥、有机肥＋有效菌剂处理能够有效控制土传病害的发生[19]，研究结果证实了花生连作障碍与土壤微生物多样性变化有密切联系。

花生长期连作导致土壤微生物区系发生变化、病原菌的积累，而微生物区系的变化导致花生连作障碍加重。根系分泌物导致根际微生物种群、土壤酶活性、植物营养状态等多种微生态因子的变化，可能是引发土壤物理、化学及生物学性质恶化的最初动力。因此，应加强根分泌物，特别是根分泌物中敏感物质与土壤微生物区系的生态效应研究。

参考文献：

[1] 廖伯寿. 我国花生科研与产业发展现状及对策 [J]. 中国农业信息，2008(5)：18-20.

[2] 王明珠，陈学南. 低丘红壤区花生持续高产的障碍及对策 [J]. 花生学报，2005，34(2)：17-22.

[3] 西尾道德. 土壤管理および连作伴うハクサイ根圈の微生物バィオマスの变化 [J]. 日本土壤肥料学杂志，1984，55(2)：129-136.

[4] Rumberger A，Merwin I A，Thies J E. Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site [J]. Soil Biology & Biochemistry，2007，39(7)：1645-1654.

[5] 封海胜，张恩苏，万书波，等. 花生连作对土壤及根际微生物区系的影响 [J]. 山东农业科学，1993(1)：13-15.

[6] 孙秀山，封海胜，万书波，等. 连作花生主要微生物类群与土壤酶活性变化及其交互作用 [J]. 作物学报，2001，27(5)：617-621.

[7] 徐瑞富，王小龙. 花生连作田土壤微生物群落动态与土壤养分关系研究 [J]. 花生学报，2003，32(3)：19-24.

[8] 李振高，骆永明，滕　应. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 北京：科学出版社，2008.

[9] 滕　应，骆永明，赵祥伟，等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析 [J]. 土壤学报，2004，41(3)：343-347.

[10] 贾志红，易建华，苏以荣，等. 云南玉溪烟区轮作与连作土壤细菌群落多样性比较研究 [J]. 应用与环境生物学报，2011，17 (2)：162-168.

[11] Xue D，Yao H Y，Huang C Y. Microbial biomass，n mineralization and nitrification，enzyme activities，and microbial community diversity in tea orchard soils [J]. Plant Soil，2006，288(1)：319-331.

(下转第 38 面)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[7] 郑霏琴，王宗阳，高继平. 水稻籽粒胚乳总RNA的提取[J]. 植物生理学通讯，1993，29(6)：438-440.
[8] 胡 宏，盛 婧，郭文善，等. 氮素对弱筋小麦宁麦9号淀粉形成的调节效应[J]. 麦类作物学报，2004，24(2)：92-96.
[9] 沈 鹏，金正勋，罗秋香，等. 氮肥对水稻籽粒淀粉合成关键酶活性及蒸煮食味品质的影响[J]. 东北农业大学学报，2005，36(5)：561-566.
[10] Dian W M, Jiang H W, Chen Q S, et al. Cloning characterization of the granle-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm [J]. Planta, 2003, 218(2): 261-278.

(责任编辑 王子斌)

(上接第27面)

[12] 吴宇澄，骆永明，滕 应，等. 多氯联苯污染农田土壤的细菌群落结构差异及其影响因素[J]. 土壤学报，2007，44(5)：854-859.
[13] 松本满夫，西尾道德，草野秀. 异なる地域で连作した陆稻の根面丝状菌フロラ[J]. 日本土壤肥料学杂志，1978，49(6)：443-447.
[14] 平野暁. 物の連作障害-原因、機構、対策の研究[M]. 東京：社団法人農山漁村文化協会，1977.
[15] 马汇泉，郑桂平，赵九州，等. 大豆连作障碍及产生机理[J]. 土壤，1997(1)：46-48.
[16] 胡元森，吴 坤，李翠香，等. 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[J]. 中国农业科学，2007，40(10)：2267-2273.
[17] 王明道，吴宗伟，原增艳，等. 怀地黄连作对土壤微生物区系的影响[J]. 河南农业大学学报，2008，42(5)：532-538.
[18] 孙秀山，封海胜，万书波，等. 连作花生主要微生物类群与土壤酶活性变化及其交互作用[J]. 作物学报，2001，27(5)：617-621.
[19] 王小兵，骆永明，刘五星，等. 长期定位施肥对红壤地区连作花生土传病害、生物学性状及产量的影响[J]. 土壤学报，2011，48(4)：725-730.
[20] Wallis P D, Haynes R J, Hunter C H, et al. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE [J]. Applied Soil Ecology, 2010, 46(1): 147-150.
[21] Hu Y S, Wu K, Liu N, et al. Dynamics of microbial communities in bulk and developing cucumber rhizosphere soil [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(5): 376-383.
[22] 胡 杰，何晓红，李大平，等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报，2007，13(3)：431-437.
[23] Shiomi Y, Nishiyama M, Onizuka T, et al. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3996-4001.

(责任编辑 王子斌)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net