

不同连作茬次黄瓜根际土壤微生物 群落的 T-RFLP 分析*

乔蓬蕾 周新刚 吴凤芝**

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘 要 以不同连作茬次黄瓜根际土壤为研究对象, 利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术研究了土壤细菌、真菌菌群结构的动态变化。结果表明, 黄瓜种植后各时期土壤细菌群落多样性指数大体呈先降低后升高的趋势, 第7茬达到最低; 黄瓜种植后50 d, 真菌的多样性指数从第3茬到第9茬, 呈先降低后升高的趋势, 在第7茬达到最高, 与种植30、40 d变化趋势相反。细菌优势菌群的种(属)数量到第7茬下降到最低, 第9茬又上升, 各茬次细菌出现的优势菌群主要是梭菌纲、 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲以及一些未知菌群。真菌优势菌群种(属)数量第7茬上升最高, 第9茬又下降, 各茬次真菌出现的优势菌群主要是丝孢纲、外生菌根真菌、接合菌纲、伞菌纲、担子菌纲及一些未知真菌。同时, 黄瓜生长时期对土壤细菌和真菌菌群结构的影响大于连作茬次的影响。总之, 连作改变了土壤细菌和真菌的菌群结构及多样性水平, 第7茬黄瓜根际土壤细菌、真菌群落与其他茬次明显不同。

关键词 黄瓜; 连作; 细菌; 真菌; 群落结构

中图分类号 S627 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2014)10-2640-10

T-RFLP analysis of cucumber rhizosphere microbial communities in different cropping seasons. QIAO Peng-lei, ZHOU Xin-gang, WU Feng-zhi** (*College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2014, **33**(10): 2640–2649.

Abstract: In this paper, the dynamic changes in bacterial and fungal community structures in the rhizosphere of cucumber in different cropping seasons were analyzed with the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) method. Results showed that the diversity index of bacterial community decreased from the first to the seventh cropping season, and then increased in the ninth cropping season. At 50 days after sowing, the diversity index of fungal community increased from the third to the seventh cropping season, and then decreased in the ninth cropping season, which was in contrast with the trends observed at 30, 40 days after sowing. The number of predominant bacterial species decreased from the first to the seventh cropping season and then increased in the ninth cropping season, and the predominant species mainly included classes such as Clostridia, γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria and unknown bacteria. The number of predominant fungal species increased from the first to the seventh cropping season, then decreased in the ninth cropping season, and the predominant species mainly included Hyphomycetes, ectomycorrhizal fungi, Zygomycete, Agaricomycetes, Basidiomycetes and unknown fungi. Moreover, the influence of cucumber growth stages on soil bacterial and fungal community structures was stronger than that of cropping seasons. In conclusion, continuous cropping changed the cucumber rhizosphere bacterial and fungal community structures and diversities. Especially, the bacterial and fungal community structures in the seventh cropping season were obviously different from those in the other cropping seasons.

Key words: cucumber; continuous cropping; bacteria; fungi; community structure.

* 国家大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-25)、东北农业大学博士启动基金项目(2014RCB41)、中国博士后科学基金(2014M551206)和黑龙江省博士后经费(LBH-Z13032)资助。

** 通讯作者 E-mail: fzwu2006@aliyun.com

收稿日期: 2014-03-04 接受日期: 2014-06-17

设施园艺在我国发展迅速,随着设施栽种面积的逐年增加,其生产趋于规模化发展。然而,由于生产栽培条件的限制及经济利益的驱使,设施内蔬菜种植种类单一,连作现象普遍存在。连作会导致土壤环境恶化、病虫害加重、产量降低、品质下降等一系列不良反应,严重威胁着设施蔬菜生产的可持续发展,成为生产上一个亟待解决的问题(Yu *et al.*, 2000)。黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是设施蔬菜生产中主要的栽培种类之一,其经济效益显著。由于地质、气候条件的限制及种植习惯等原因,设施黄瓜连作障碍日益加剧,严重地制约了设施蔬菜的生产可持续发展,黄瓜连作障碍问题越来越受重视(Zhou *et al.*, 2011)。

目前有关连作障碍的研究主要集中在根系分泌物的自毒作用、土壤理化性状劣变、土传病害的发生等方面(吴凤芝和刘德,1998;Yu *et al.*, 2000;胡元森等,2006;Huang *et al.*, 2013)。根系分泌物对土壤微生物、尤其是土传病害病原微生物的选择性促进导致微生物群落结构变化,是引发连作障碍的主要原因之一(Zhou *et al.*, 2012;Huang *et al.*, 2013)。关于连作对土壤微生物的影响,国内外已做了大量研究。一般认为,作物连作后土壤微生物菌群结构破坏严重,趋向简单化,有益微生物菌群减少,有害微生物菌群增加(吴凤芝和王学征,2007;Meriles *et al.*, 2009;陈冬梅等,2010)。但也有研究表明,连作可能不会引起土壤微生物菌群的持续破坏,因为微生物能够调整其结构以适应外部环境的变化,从而保持一个长期健康的群落结构,如抑病型土壤的形成(Weller *et al.*, 2002;Postma *et al.*, 2010;Barendsen *et al.*, 2012)。总之,目前关于连作对土壤微生物菌群影响的认知尚不一致。

本课题组前期研究了盆栽温室条件下不同连作茬次黄瓜的生长变化,黄瓜各生长指标在第7茬明显低于其他茬次,表现出明显的生长障碍,第9茬又有所好转(Zhou & Wu, 2012),但在造成这种现象的原因尚不清楚。因此,本研究以不同年限黄瓜连作土壤为研究对象,利用 T-RFLP 技术研究不同连作茬次黄瓜根际土壤细菌、真菌菌群结构的变化,探讨微生物菌群的变化在黄瓜连作障碍发生中所起的作用,为黄瓜连作障碍的缓解与防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试土样

盆栽试验在东北农业大学园艺试验站进行。将取自同一地块的耕层土壤(0~15 cm)均匀地摊放于一个预先挖好的土池内。2005 年开始每年取土池中土装入 30 cm×25 cm×30 cm 的塑料盆,每盆装 8 kg,连续盆栽黄瓜,每年 2 茬,至 2009 年设置成连作 1、3、5、7、9 茬黄瓜的连作土。2009 年 4 月 26 日在盆中直播黄瓜,每茬次黄瓜设 3 次重复,即 3 个小区,每个小区每茬次直播 20 盆,完全随机排列。于每茬次黄瓜种植前每盆施加 0.75 kg 腐熟的猪粪作为底肥(15% 有机质,0.5% N,0.5% P,0.4% K),于黄瓜种植后 31 d 每盆施加 25 g 尿素(N 含量 46%)作为追肥。人工除去杂草,其他常规管理。分别于播后 30、40、50 d,每个小区每茬次随机取 5 株黄瓜,即每个茬次 3 次重复,采用抖落法(Riley & Baker, 1969)收集根区土壤,土壤过 80 目筛,放于-80℃冰箱保存。

1.2 T-RFLP 分析

采用末端限制性片段长度片段多态性(T-RFLP)技术分析土壤细菌、真菌菌群结构,具体方法如下:

(1) 土壤微生物群落 DNA 的提取

用 Power Soil® DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, CA, USA)提取黄瓜根际土壤总 DNA(方法参照试剂盒说明书)。

(2) 土壤细菌 16S rDNA 及真菌 ITS 区扩增和酶切

用带有 FAM 荧光标记物的细菌通用引物对 8f-FAM(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492r(5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')(Matsumoto *et al.*, 2005),进行细菌 PCR 扩增。PCR 扩增采用 3 管平行,反应体系 50 μL 包括:10×PCR buffer 5 μL, Mg²⁺(25 mmol·L⁻¹):4 μL, dNTP(2.5 mmol·L⁻¹):4 μL, 引物:各 0.7 μL, Taq 酶:0.8 μL, 模版:4 μL, 去离子水:30.8 μL。反应条件:94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 61℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min 30 s, 23 个循环;最后 72℃延伸 10 min。取 3 μL 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。所用酶购自北京天根生化科技有限公司,引物由生工生物(上海)有限公司合成。

用带有 FAM 荧光标记物的真菌通用引物对 ITS1F-FAM (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-

3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Curlevski *et al.*, 2010), 进行 PCR 扩增。PCR 扩增采用 3 管平行, 反应体系 50 μ L 包括: PCR Mix: 25 μ L, 引物: 各 0.5 μ L, 模版: 4 μ L, 去离子水: 20 μ L。反应条件采用降落 PCR: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 63 ~ 53 $^{\circ}$ C 每循环-0.5 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 20 循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 10 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 3 μ L 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 所用酶购自北京百泰克生物技术有限公司, 引物由生工生物(上海)有限公司合成。

3 管混合后采用 EasyPure™ Quick Gel Extration Kit 胶回收试剂盒回收。细菌采用限制性内切酶 *MspI* (5'-C * CGG-3') 和 *HhaI* (5'-GCG * C-3'), 真菌采用限制性内切酶 *AluI* (5'-AG * CT-3') 和 *HinfI* (5'-G * ANTC-3') 酶切纯化后的 PCR 产物, 于 37 $^{\circ}$ C 消化 6 h。酶切体系 20 μ L 包括: 限制性内切酶 0.5 μ L, buffer: 2 μ L, PCR 胶回收产物 17.5 μ L, 限制性内切酶购自美国 New England Biolabs 公司。

(3) 毛细管电泳与测序分析

酶切产物送至生工生物(上海)有限公司进行自动测序分析。

(4) T-RFLP 数据处理

T-RFLP 图谱中, 可以粗略地认为每一个末端片段 T-RF (Terminal Restriction Fragment) 峰, 以系统分类操作单元 OTU (Operational Taxonomic Unit) 来表示, 至少代表一种类型的微生物, 因此 T-RFs 的大小和荧光强度(峰面积)可以反映微生物群落的组成结构和变化特征等信息。对于同一种限制性酶, 不同土壤样品片段大小相差 1 ~ 2 bp 的 T-RFs 被认为是相同的; 而对于不同的限制性酶, 同一种土壤样品片段大小相差 1 ~ 2 bp T-RFs 被认为是不相同的。

(5) 菌群多样性分析

每个 T-RF 的丰度百分比(A_p)按照公式 $A_p = n_i / N \times 100\%$ 计算, 式中, n_i 为每个可分辨的 T-RF 的峰面积, N 为所有 T-RF 峰面积的总和 (Lukow *et al.*, 2000)。本文细菌 A_p 值仅采用了片段长度在 50 ~ 946 bp 区间的 T-RF 数值进行计算, 且仅采用 $A_p > 0.5\%$ 的 T-RFs 进行统计分析 (Manzano *et al.*, 2007), 真菌 A_p 值仅采用了片段长度在 50 ~ 600 bp 区间的 T-RFs 数值进行计算, 且仅采用 $A_p > 0.5\%$, 荧光值阈值超过 50 RFU (Relative Fluorescence Units) 的 T-RF, 进行统计分析。以图谱中的每个可统计的 T-RF 视为一个 OTU, 以 T-RF 的相对峰面积作为对应的 OTU 的丰度

(Edel-Hermann *et al.*, 2004)。

在线比对时, 如果经软件分析得到的 T-RFs 与实际测得的长度差别小于 $\pm 1 \sim 2$ bp 的被认为属于相似类群 (Shyu *et al.*, 2007)。将条带信息提交到 MICA 网站 (<http://mica.ibest.uidaho.edu/pat.php>) 进行在线比对, 确定微生物的分类。2 种酶酶切所得片段峰面积都大于 4% 的片段对应的菌群被认为是优势菌群。

1.3 数据分析

试验数据采用 SAS 9.1.3 统计软件中 ANOVA 过程进行单因素方差分析, 采用 Biodap 软件进行 Shannon 多样性指数及 Margalef 丰富度指数分析, 采用 Canoco for Windows 4.5 软件对样品进行主成分分析 (PCA)。

2 结果与分析

2.1 两种限制性内切酶消化产物的 T-RFs 比较

限制性内切酶的合适与否会影响分析的结果, 因此, 可以用几种酶分别酶切, 综合不同酶切结果提高检出效率。一般认为, 能够产生较多 T-RFs 的限制性内切酶更适合分析微生物的群落结构 (Marsh *et al.*, 1999)。本试验中细菌和真菌均采用 2 种限制性内切酶分别消化纯化后的 PCR 产物, 目的是找到适合分析各个样品的最佳限制性内切酶, 以提高试验的准确性。

对于细菌各个取样时期的每个处理, 分别用 *MspI* 和 *HhaI* 2 种限制性内切酶消化后得到的 T-RFs 数目不同, *MspI* 酶产生的 T-RFs 数目基本大于 *HhaI* 酶产生的 T-RFs 数, 所以本试验中采用产生 T-RFs 数较多的 *MspI* 酶计算细菌的数据统计分析。

对于真菌各个取样时期的每个处理, 分别用 *AluI* 和 *HinfI* 2 种限制性内切酶消化后得到的 T-RFs 数目不同, *AluI* 酶产生的 T-RFs 数目均大于 *HinfI* 酶产生的 T-RFs 数, 所以本试验中采用产生 T-RFs 数较多的 *AluI* 酶进行真菌的数据统计分析 (表 1)。

2.2 连作对黄瓜根际土壤细菌群落结构的影响

土壤细菌多样性指数分析表明, 3 个取样时期各茬次之间均匀度指数均无显著差异; 黄瓜种植后 30 d, 不同茬次之间丰富度指数和 Shannon 指数无显著差异, 40 d 时, 第 7 茬则显著低于其他茬次 ($P < 0.05$), 50 d 时, 第 7 茬次显著低于其他茬次 ($P < 0.05$), 第 5 茬次显著低于第 3、9 茬次 ($P < 0.05$), 第 1、3、9 茬次之间无显著差异 (表 2)。

表 1 细菌、真菌各时期不同茬次经两种内切酶消化产生的 T-RFs 数

Table 1 Numbers of T-RFs of bacteria and fungi from every soil sample which was digested by *Msp*I and *Hha*I, *Alu*I and *Hinf*I, respectively

种植天数(d)	茬次	<i>Msp</i> I 酶	<i>Hha</i> I 酶	<i>Alu</i> I 酶	<i>Hinf</i> I 酶
30	1	51.00±3.00 a	46.67±2.08 a	37.33±3.22 ab	30.50±0.71 a
	3	52.33±4.16 a	46.33±3.22 a	45.67±6.51 a	36.00±2.65 a
	5	45.67±8.62 a	38.33±7.23 ab	43.67±5.00 a	35.00±2.65 a
	7	45.33±1.16 a	33.00±3.00 b	31.33±1.53 b	28.33±3.06 a
	9	47.00±3.61 a	38.33±6.11 ab	33.67±5.77 b	29.00±3.61 a
40	1	51.00±1.00 a	49.00±2.46 a	34.67±0.58 b	31.33±2.52 b
	3	48.67±3.79 a	49.67±3.06 a	43.00±1.73 a	38.33±6.35 a
	5	47.67±4.16 a	37.67±1.53 b	36.33±6.43 b	28.66±2.52 b
	7	39.67±2.89 b	36.67±3.51 b	26.67±1.16 c	26.33±2.31 b
	9	49.33±4.93 a	48.33±2.08 a	33.33±0.55 b	32.67±1.53 ab
50	1	45.67±1.53 a	40.67±7.57 bc	41.33±6.81 a	35.33±5.51 ab
	3	46.67±1.16 a	43.67±4.51 abc	40.67±5.51 a	28.33±6.81 b
	5	42.67±1.53 b	49.33±1.53 ab	42.67±11.37 a	34.00±1.00 ab
	7	33.33±3.06 c	38.33±4.73 c	44.67±5.69 a	39.33±2.08 a
	9	49.00±2.00 a	51.67±4.16 a	39.00±10.93 a	40.00±2.00 a

同列同一取样时期不同字母表示茬次间差异达到 0.05 显著水平。下表同。

表 2 连作对黄瓜根际土壤细菌菌群 T-RFLP 图谱多样性指数的影响

Table 2 Diversity indices based on T-RFLP analysis of bacterial community

种植天数(d)	茬次	丰富度指数	香农多样性指数	均匀度指数
30	1	12.71±0.57 a	3.74±0.08 a	0.95±0.01 a
	3	12.97±0.79 a	3.75±0.07 a	0.95±0.00 a
	5	11.67±1.67 a	3.65±0.16 a	0.96±0.01 a
	7	11.62±0.23 a	3.63±0.03 a	0.95±0.00 a
	9	11.94±0.70 a	3.66±0.12 a	0.95±0.01 a
40	1	12.72±0.19 a	3.73±0.03 a	0.95±0.00 a
	3	12.27±0.73 a	3.70±0.08 a	0.95±0.00 a
	5	12.07±0.81 a	3.66±0.09 a	0.95±0.00 a
	7	10.50±0.57 b	3.50±0.07 b	0.95±0.00 a
	9	12.39±0.94 a	3.70±0.10 a	0.95±0.00 a
50	1	11.69±0.30 ab	3.64±0.04 ab	0.95±0.01 a
	3	11.88±0.22 a	3.65±0.04 a	0.95±0.01 a
	5	11.10±0.30 b	3.55±0.03 b	0.95±0.01 a
	7	9.22±0.63 c	3.33±0.09 c	0.95±0.01 a
	9	12.34±0.38 a	3.70±0.05 a	0.95±0.00 a

定植后不同时期根际土壤细菌主成分分析表明:在 3 个取样时期,第 7 茬距离同时期其他各茬次均较远,说明连作第 7 茬的黄瓜土壤细菌菌群结构与其他茬次不同(图 1)。

定植后 3 个时期第 7 茬的土壤样品聚在一起,与其他茬次距离较远,说明种植后不同时期第 7 茬土壤细菌菌群结构与其他茬次不同。黄瓜种植后不同时期与不同连作茬次对黄瓜根际土壤细菌菌群结

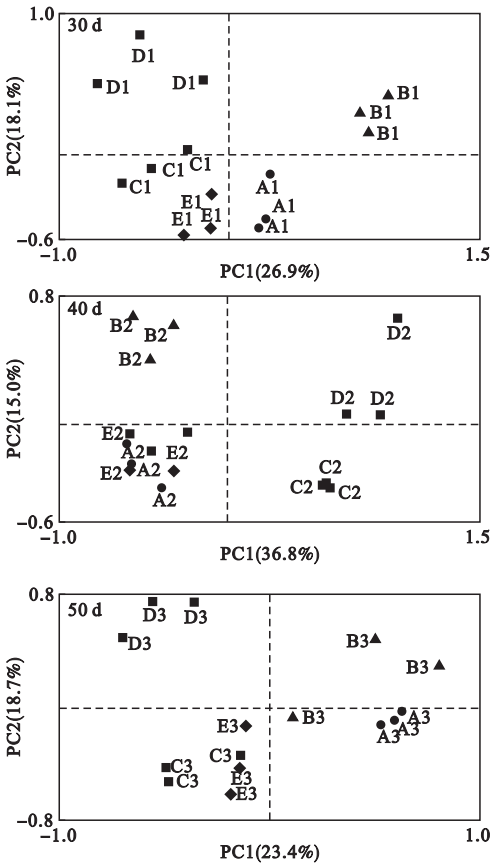


图 1 黄瓜种植后不同时期不同连作茬次根际土壤细菌的主成分分析

Fig.1 PCA analysis of bacteria from rhizosphere soil under continuous monocropping of cucumber at different days after cucumber sowing

A、B、C、D、E 分别代表第 1、3、5、7、9 茬黄瓜;1、2、3 分别代表黄瓜种植后 30、40、50 d。下图同。

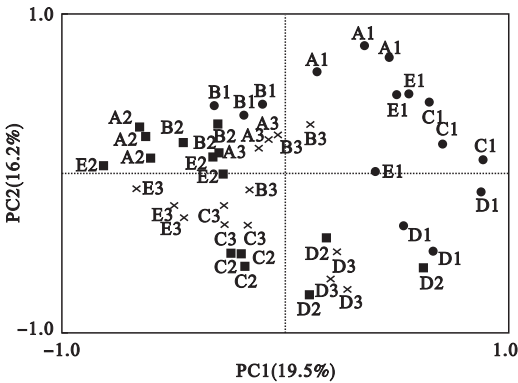


图 2 不同连作茬次黄瓜根际土壤细菌菌群结构主成分分析
Fig.2 PCA analysis of bacteria from rhizosphere soil under continuous monocropping of cucumber after cucumber sowing
A、B、C、D、E 分别代表 1、3、5、7、9 茬;1、2、3 分别代表黄瓜种植后 30、40、50 d。

构菌均产生了影响,种植后 3 个不同时期能够分开,但同一时期不同茬次聚集在一起,说明黄瓜生长时期对细菌的菌群结构影响相对较大(图 2)。

黄瓜种植后各时期细菌优势菌群数随着连作茬次的增加呈先下降后上升的趋势,在第 7 茬次达到最低。黄瓜种植后 30 d,T-RF-511/148 bp 为各茬次共有的,种植后 40、50 d,T-RF-511/148 bp 在第 7 茬次黄瓜土壤中消失。种植后 30 d,优势菌群主要为梭菌属 *Clostridium*(梭菌纲)、巴斯德氏芽菌属 *Pasteuria*(γ -变形菌纲)、土壤杆菌属 *Agrobacterium*(α -变形菌纲),随着连作茬次的增加,这些优势菌群均消失,到第 9 茬又出现了。40、50 d 时,优势菌群主要为梭菌属 *Clostridium*(梭菌纲)、巴斯德氏芽菌属 *Pasteuria*(γ -变形菌纲),这些优势菌群在连作的第 5、7、9 茬中均消失。其余的优势菌群主要是一些未知的 α -变形菌、 γ -变形菌、八叠球菌及未知的细菌(表 3)。

2.3 连作对黄瓜根际土壤真菌群落结构的影响

3 个取样时期各茬次之间均匀度指数无显著差异;种植后 30 d,第 7、9 茬次丰富度指数显著低于第 3、5 茬次($P<0.05$),不同茬次之间 Shannon 指数无显著差异;种植后 40 d,第 3 茬次丰富度指数显著高于其他茬次($P<0.05$),第 7 茬次丰富度指数和 Shannon 指数则显著低于其他茬次($P<0.05$);种植后 50 d,不同茬次之间丰富度指数和 Shannon 指数均无显著差异(表 4)。

定植后 30 d 主成分分析能够较好的将 3 个取

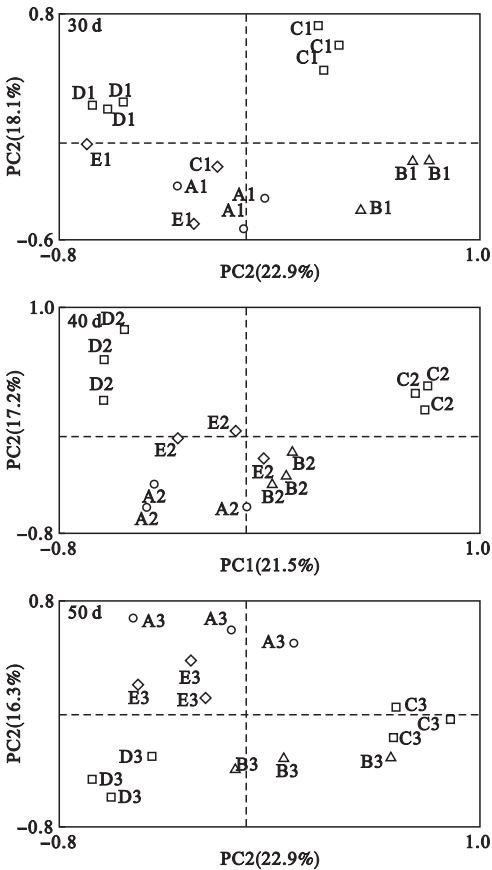


图 3 黄瓜种植后不同时期不同连作茬次黄瓜根际土壤真菌菌群结构的主成分分析
Fig.3 PCA analysis of fungi from rhizosphere soil under continuous monocropping of cucumber at different days after cucumber sowing
A、B、C、D、E 分别代表第 1、3、5、7、9 茬;1、2、3 分别代表黄瓜种植后 30、40、50 d。

样时期各茬次区分出来,其中 30、40 d 时,第 5 茬、第 7 茬的散点与其他散点距离较远,50 d 时,第 7 茬的散点与其他茬的散点距离较远。说明连作条件下真菌菌群结构发生变化(图 3)。

种植后 30、40 d,第 1、3 茬的土壤样品聚在一起,第 5、7、9 茬的土壤样品聚在一起;种植后 50 d,除了第 3 茬外其他茬次聚在一起,与其他时期相距较远。说明种植后 50 d 与种植后 30、40 d 各茬次细菌的菌群结构差异较大,但各茬次之间土壤真菌聚在一起,菌群结构相似。种植后不同时期及不同茬次对黄瓜土壤根际真菌都产生了影响,但依旧能够将种植后 50 d 的土壤真菌样品分离开来,说明种植后不同天数对土壤真菌菌群结构的影响相对较大(图 4)。

黄瓜种植后各时期,真菌的优势菌群随着连作茬次的增加呈先下降后升高再下降的趋势,除黄瓜

表 3 种植后不同时期不同连作茬次黄瓜根际土壤细菌优势菌群分析

Table 3 Analysis of predominant bacteria from rhizosphere soil under continuous monocropping of cucumber at different days after cucumber sowing

种植后天数 (d)	茬次	片段长度 (bp)		相似菌群登陆号	相似菌群
		HhaI	MspI		
30	1	59	148	EU881254	uncultured bacterium KGB200711-011
		59	155	EU735658	uncultured bacterium SN33
		62	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		231	155	AF516396	<i>Pasteuria nishizawae</i> Tohoku
		231	520	GQ503830	<i>Clostridium</i> sp. enrichment culture clone
		231	433	EU307088	uncultured bacterium AEt-130
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		511	401	AB362777	<i>Agrobacterium</i> sp. YT0023
	3	59	148	EU881254	uncultured bacterium KGB200711-011
		59	155	EU735658	uncultured bacterium SN33
		63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		79	139	EF648040	uncultured bacterium HB29
		205	139	EF492894	uncultured bacterium JH-WH45
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
	5	511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		511	400	AB362777	<i>Agrobacterium</i> sp. YT0023
	7	211	143	AY221054;	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
	9	63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		511	401	AB362777	<i>Agrobacterium</i> sp. YT0023
		229	518	AY187622	<i>Clostridium tunisiense</i> DSM 15206
		231	520	GQ503843	<i>Clostridium</i> sp. enrichment culture clone
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
40	1	59	155	EU735658	uncultured bacterium SN33
		63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		205	147	EU881220	uncultured bacterium KNR200711-005
		205	486	HM057747	uncultured gamma proteobacterium D13W12
		231	155	AF516396	<i>Pasteuria nishizawae</i> Tohoku
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
	3	63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		205	486	HM057747	uncultured gamma proteobacterium D13W12
		205	489	DQ675036	uncultured bacterium QHO-B25
		231	155	AF134868	<i>Pasteuria nishizawae</i> North American
				GQ503843	<i>Clostridium</i> sp. enrichment culture clone
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
	5	63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		205	147	EU881220	uncultured bacteriumKNR200711-005
		205	489	DQ675036	uncultured bacterium QHO-B25.
		213	436	AY439187	uncultured bacterium MeCl 21
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
	7	211	493	EU487897	uncultured bacterium CK1C140
		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
	9	63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		205	489	DQ675036	uncultured bacterium QHO-B25
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
50	1	63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		205	147	EU881220	uncultured bacteriumKNR200711-005
		229	518	AY187622	<i>Clostridium tunisiense</i> DSM 15206
		231	155	AF516396	<i>Pasteuria nishizawae</i> Tohoku
		231	520	GQ503843	<i>Clostridium</i> sp. enrichment culture clone
		231	433	EU307088	uncultured bacterium AEt-130
		231	433	EU307088	uncultured bacterium AEt-130

续表 3
Table 3 Continued

种植后天数 (d)	茬次	片段长度 (bp)		相似菌群登陆号	相似菌群
		<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I		
3		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		63	435	EU335427	uncultured bacterium BacC-u054
		205	147	EU881220	uncultured bacteriumKNR200711-005
		231	155	AF516396	<i>Pasteuria nishizawae</i> Tohoku
		231	520	GQ503843	<i>Clostridium</i> sp. enrichment culture clone
		231	433	EU307088	uncultured bacterium AEt-130
		510	436	AF030780	marine snow associated bacterium
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
5		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
7		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
9		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212
		211	143	AY221054	uncultured bacterium CCM19a
		511	148	HM057812	uncultured alpha proteobacterium A8W212

表 4 连作对黄瓜根际土壤真菌菌群 T-RFLP 图谱的多样性指数的影响

Table 4 Diversity indices based on T-RFLP analysis of fungal community

种植天数 (d)	茬次	丰富度指数	香农多样性指数	均匀度指数
30	1	10.03±0.65 ab	3.51±0.07 a	0.99±0.01 a
	3	11.68±1.27 a	3.68±0.14 a	0.98±0.01 a
	5	11.29±0.99 a	3.66±0.10 a	0.97±0.02 a
	7	8.80±0.32 b	3.40±0.07 a	0.99±0.01 a
	9	9.28±1.20 b	3.43±0.16 a	0.98±0.01 a
40	1	9.49±0.12 b	3.51±0.01 a	0.99±0.00 a
	3	11.17±0.34 a	3.62±0.10 a	0.97±0.02 a
	5	9.82±1.32 b	3.44±0.13 a	0.96±0.02 a
	7	7.82±0.25 c	3.20±0.01 b	0.97±0.01 a
	9	9.22±0.12 b	3.46±0.02 a	0.99±0.01 a
50	1	10.82±1.34 a	3.48±0.15 a	0.94±0.02 a
	3	10.70±1.09 a	3.54±0.10 a	0.96±0.01 a
	5	11.06±2.27 a	3.53±0.34 a	0.95±0.02 a
	7	11.49±1.11 a	3.58±0.17 a	0.95±0.02 a
	9	10.34±2.12 a	3.37±0.35 a	0.92±0.02 a

种植后 30 d 外,其他时期第 7 茬土壤的真菌优势菌群种类最高。各时期的真菌菌群有明显差别,真菌的优势菌群主要是丝膜菌属 *Cortinarius* (担子菌纲)、拱顶伞属 *Camarophyllus* (担子菌纲)、鹅膏菌属 *Amanita* (伞菌纲)、伏革菌属 *Corticium* (伞菌纲)、接合菌属 *Zygomycete* (接合菌纲)、未培养的树粉孢属 *Myxotrichaceae* (丝孢纲),外生菌根真菌,未培养的鸡油菌目 (伞菌纲),未培养的棉革菌属 *Tomentella* (伞菌纲),及一些未知真菌 (表 5)。

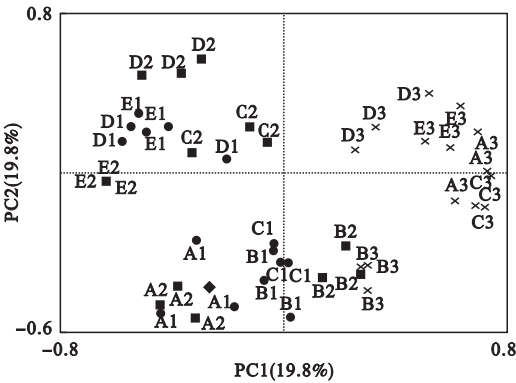


图 4 不同连作茬次黄瓜根际土壤真菌菌群结构主成分分析

Fig. 4 PCA analysis of fungi from rhizosphere soil under continuous monocropping of cucumber after cucumber sowing

A、B、C、D、E 分别代表 1、3、5、7、9 茬;1、2、3 分别代表黄瓜种植后 30、40、50 d。

3 讨论

前人认为,作物连作导致土壤微生物菌群的改变与连作障碍的发生密切相关(Nayyar 2009;Huang et al.,2013)。我们前期对不同连作茬次黄瓜生长指标的测定结果表明,黄瓜的各项生长指标(株高、茎粗、叶面积、根体积、植株干鲜重和根系活力)在第 7 茬明显低于其他茬次,出现明显的连作障碍,到第 9 茬又有所好转(Zhou & Wu,2012)。本试验结果表明,随着连作茬次的增加,黄瓜根际细菌和真菌菌群的多样性水平发生了变化,细菌的多样性水平

表 5 种植后不同时期不同连作茬次黄瓜根际土壤真菌优势菌群分析

Table 5 Analysis of predominant fungi from continuous cropping cycle of cucumber on different days after cucumber sowing

种植后天数 (d)	茬次	片段长度 (bp)		相似菌群的登录号	相似菌群
		<i>AluI</i>	<i>HinfI</i>		
30	1	406	324	FJ475803.1.596	uncultured Myxotrichaceae
		442	301	GU328519.1.1033	uncultured Basidiomycota
	3				
	5	566	328	EU645629.1.712	uncultured ectomycorrhizal fungus
	7	565	212	GU078634.1.602	uncultured fungus
40	1				
		384	301	DQ420868.1.683	uncultured soil fungus
		479	323	AF440673.1.795	uncultured Cantharellales
		479	301	EU917098.1.688	uncultured Basidiomycota
	3	479	323	AF440673.1.795	uncultured Cantharellales
		479	301	EU917098.1.688	uncultured fungus
		479	301	DQ420868.1.683	uncultured soil fungus
	5	462	322	GQ925399.1.664	<i>Amanita oleosa</i>
		463	326	GQ925397.1.669	<i>Amanita grandis</i>
		463	323	GU328555.1.1020	uncultured Basidiomycota
		479	323	AF440673.1.795	uncultured Cantharellales
		479	301	EU917098.1.688	uncultured fungus
		479	301	DQ420868.1.683	uncultured soil fungus
		441	301	GU328519.1.1033	uncultured Basidiomycota
		462	358	EU625823.1.1237	uncultured Tomentella
		479	323	AF440673.1.795	uncultured Cantharellales
		479	358	FJ755876.1.680	<i>Waitea circinata</i>
		479	301	EU917098.1.688	uncultured fungus
	9	384	301	DQ420868.1.683	uncultured soil fungus
		442	301	GU328519.1.1033	uncultured Basidiomycota
50	1	91	384	GU233358.1.732	<i>Camarophyllus</i> sp. PDD 75515
		442	301	GU328519.1.1033	uncultured Basidiomycota
		587	324	GU256972.1.654	uncultured fungus
	3	434	352	DQ420823.1.636	uncultured soil fungus
		464	322	GQ452056.1.754	<i>Cortinarius</i> sp. MLS009
	5	406	324	FJ475803.1.596	uncultured Myxotrichaceae
		442	301	GU328519.1.1033	uncultured Basidiomycota
		472	328	GU328596.1.1028	uncultured Basidiomycota
		471	327	DQ097874.1.818	<i>Cortinarius junghuhnii</i>
		587	324	GU256972.1.654	uncultured fungus
	7	472	328	GU328596.1.1028	uncultured Basidiomycota
		396	315	GU366682.1.593	uncultured fungus
		384	310	EU428773.1.3415	<i>Zygomycete</i> sp. AM-2008a
		565	212	GU078634.1.602	uncultured fungus
		565	328	EU645629.1.712	ectomycorrhizal fungus
		442	301	GU328519.1.1033	uncultured Basidiomycota
	9	472	328	GU328596.1.1028	uncultured Basidiomycota
		587	324	GU256972.1.654	uncultured fungus
		405	324	GU366733.1.602	uncultured fungus
		406	324	FJ475803.1.596	uncultured Myxotrichaceae

呈先下降后升高的趋势,在第 7 茬次达到最低,第 9 茬时又有所上升;真菌的多样性水平随连作茬次的增加则呈现相反的变化趋势。研究表明,连作会导致微生物区系组成发生变化,由细菌型土壤向真菌

型土壤转变,真菌型土壤是地力衰竭的标志,细菌型土壤是土壤肥力提高的一个生物指标 (Larkin, 2003;林茂兹等,2012)。在熟化程度高和肥力好的土壤中,土壤微生物的数量较多,细菌所占的比例较

高,多样性水平高,在土壤质量较差的土壤中,真菌的数量相对较多,多样性水平低(曹正邦和樊庆笙,1957;许光辉等,1984)。随着连作茬次的增加,土壤质量逐渐变差,细菌菌群结构简单、多样性水平下降,真菌则升高(林茂兹等,2012)。随着连作茬次的进一步增加,当土壤中的病原菌达到一定量后,作物会通过调整根系分泌物,自发调节有益微生物的数量来抑制病原菌(Postma *et al.*, 2010; Berendsen *et al.*, 2012)。这可能是黄瓜长势在第9茬又有所好转的原因之一。Zhou等(2014)、Zhou和Wu(2012)利用PCR-DGGE技术研究了连作对黄瓜根际土壤细菌、真菌菌群结构的影响,发现不同连作茬次细菌、真菌的菌群结构不同,但条带数和多样性指数没有明显一致的规律。同时其研究结果也表明,生长期对细菌、真菌的菌群结构影响要大于连作茬次对土壤细菌、真菌菌群结构的影响,本试验的研究结果与之类似。

本研究表明,随着黄瓜种植茬次的增加细菌的优势菌群种(属)数量呈先下降后升高的趋势,连作到第7茬下降到最低,第9茬又有所升高。而真菌的优势菌群种(属)数量呈先下降后升高再下降的趋势,在第7茬时达到最高,第9茬又有所下降。黄瓜种植后30 d时,T-RF-511/148 bp,在所有茬次中均存在。但到黄瓜种植后40、50 d时,T-RF-511/148 bp在第7茬土壤中消失。植物可以通过分泌特定的根系分泌物来选择根际周围的微生物(Berendsen *et al.*, 2012)。植物根系分泌物中的一些物质会对土壤微生物产生抑制或促进的作用。受外界生物(如病原菌、拮抗菌)、非生物因子(如土壤营养含量)的刺激,植物会改变其根系分泌物的组分及含量,因此对土壤微生物也会产生不同的影响(Bais *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012; Bakker *et al.*, 2013)。黄瓜根系分泌物的变化可能导致了T-RF-511/148 bp在第7茬土壤中消失。随着连作茬次的增加,细菌优势菌群梭菌属(梭菌纲)、巴斯德氏芽菌属(γ -变形菌纲)消失了。巴斯德氏芽菌属 *Pasteuria nishizawae* 是防治根结线虫病害的生防因子(钱文娟, 2012),推测它的消失对于黄瓜根结线虫的防治可能产生消极的影响。细菌种(属)的消失,真菌种(属)数量的增加,可能是第7茬的黄瓜根际微生物群落结构表现出明显不同的主要原因之一。

本试验利用T-RFLP技术研究了连作对黄瓜根际土壤微生物菌群的影响,发现黄瓜连作改变了细

菌、真菌的菌群结构及多样性水平;细菌优势菌群数量降低,真菌优势菌群数量的升高,可能是黄瓜连作障碍产生了一定的影响。因此,进一步研究连作对土壤微生物功能及活性的影响,为解决连作障碍提供重要的科学依据。

参考文献

- 曹正邦,樊庆笙. 1957. 施用肥料对于红壤中微生物区系影响的初步分析. 土壤学报, (3): 2.
- 陈冬梅,柯文辉,陈兰兰,等. 2010. 连作对白肋烟根际土壤细菌群落多样性的影响. 应用生态学报, 21(7): 1751-1758.
- 胡元森,刘亚峰,吴坤,等. 2006. 黄瓜连作土壤微生物区系变化研究. 土壤通报, 37(1): 126-129.
- 林茂兹,王海斌,林辉峰. 2012. 太子参连作对根际土壤微生物的影响. 生态学杂志, 31(1): 106-111.
- 钱文娟. 2012. 美国将批准杀线虫剂 *Pasteuria* 登记. 农药市场信息, (3): 41.
- 吴凤芝,刘德. 1998. 大棚蔬菜连作年限对土壤主要理化性状的影响. 中国蔬菜, (4): 5-8.
- 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.
- 许光辉,郑洪元,张德生,等. 1984. 长白山北坡自然保护区森林土壤生物生态分布及其生化特性的研究. 生态学报, 4(3): 207-223.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, *et al.* 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-266.
- Bakker PAHM, Berendsen RL, Doornbos RF, *et al.* 2013. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4: 165.
- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17: 478-486.
- Curlevski NJA, Xu Z, Anderson IC, *et al.* 2010. Converting Australian tropical rainforest to native Araucariaceae plantations alters soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 14-20.
- Edel-Hermann V, Dreumont C, Perez-Piqueres A, *et al.* 2004. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 397-404.
- Huang LF, Song LX, Xia XJ, *et al.* 2013. Plant-soil feedbacks and soil sickness: From mechanisms to application in agriculture. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 232-242.
- Larkin RP. 2003. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization, and fatty acid profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1451-1466.
- Lukow T, Dunfield PF, Liesack W. 2000. Use of the T-RFLP

- technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, **32**: 241–247.
- Manzano M, Moran AC, Tesser B, *et al.* 2007. Role of eukaryotic microbiota in soil survival and catabolic performance of the 2,4-D herbicide degrading bacteria *Cupriavidus necator* JMP134. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**: 115–126.
- Marsh TL. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, **2**: 323–327.
- Matsumoto M, Sakamoto M, Hayashi H, *et al.* 2005. Novel phylogenetic assignment database for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, **61**: 305–319.
- Meriles JM, Vargas Gil S, Conforto C, *et al.* 2009. Soil microbial communities under different soybean cropping systems; Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil and Tillage Research*, **103**: 271–281.
- Nayyar A, Hamel C, Lafond G, *et al.* 2009. Soil microbial quality associated with yield reduction in continuous-pea. *Applied Soil Ecology*, **43**: 115–121.
- Postma J, Scheper RWA, Schilder MT. 2010. Effect of successive cauliflower plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**: 804–812.
- Riley D, Barker SA. 1969. Bicarbonate accumulation and pH changes at the soybean root-soil interface. *Soil Science Society of America Proceedings*, **33**: 905–908.
- Shyu C, Soule T, Bent SJ, *et al.* 2007. MiCA: A web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microbial Ecology*, **53**: 562–570.
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, *et al.* 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 309–348.
- Yu JQ, Shou SY, Qian YR, *et al.* 2000. Autotoxic potential of cucurbit crops. *Plant and Soil*, **223**: 147–151.
- Zhou X, Gao D, Liu J, *et al.* 2014. Changes in rhizosphere soil microbial communities in a continuously monocropped cucumber (*Cucumis sativus* L.) system. *European Journal of Soil Biology*, **60**: 1–8.
- Zhou X, Wu F. 2012. Dynamics of the diversity of fungal and *Fusarium* communities during continuous cropping of cucumber in the greenhouse. *FEMS Microbiology Ecology*, **80**: 469–478.
- Zhou X, Yu G, Wu F. 2011. Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield. *European Journal of Soil Biology*, **47**: 279–287.
- Zhou X, Yu G, Wu F. 2012. Responses of soil microbial communities in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to exogenously applied p-hydroxybenzoic acid. *Journal of Chemical Ecology*, **38**: 975–983.

作者简介 乔蓬蕾,女,1987年生,硕士研究生。主要从事设施园艺与蔬菜生理生态研究。E-mail: qiaopl2008@163.com

责任编辑 魏中青