

黄瓜与小麦和大豆轮作对土壤微生物群落物种多样性的影响

吴凤芝*, 王学征

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 采用黄瓜与小麦和大豆轮作的方式, 研究轮作对黄瓜土壤微生物群落 DNA 序列多样性的影响。结果表明, 黄瓜与小麦和大豆轮作显著提高了土壤微生物多样性指数、丰富度指数和均匀度指数, 两种轮作土壤微生物群落 DNA 序列相似程度高达 0.5678, 而与对照土壤间的相似程度分别为 0.3465 和 0.3124。两种轮作处理的黄瓜产量也显著高于对照 ($P < 0.05$)。说明轮作改善了土壤的微生态环境。

关键词: 黄瓜; 小麦; 大豆; 轮作; 土壤微生物多样性

中图分类号: S 642.2; S 62; S 154 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1543-04

Effect of Soybean - Cucumber and Wheat - Cucumber Rotation on Soil Microbial Community Species Diversity

WU Feng-zhi* and WANG Xue-zheng

(Horticultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Effects of soybean - cucumber and wheat - cucumber rotation on soil microbial community DNA sequence diversity were evaluated using random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. The results showed that grain-cucumber rotation significantly increased the diversity index, richness index and evenness index of soil microbial community, and the soybean - cucumber rotation was more effective than wheat - cucumber rotation in terms of the microbial community. Soil microbial community DNA sequence similarity coefficient between the two rotation soils was 0.5678; However the similarity coefficients between the two rotation soils and control soil were 0.3465 and 0.3124, respectively. Cucumber yields in two rotation soils were also higher than that in control soil significantly. This may imply that rotation can improve soil microbial ecology.

Key words: Cucumber; Wheat; Soybean; Rotation; Soil microbial community

土壤微生物群落结构和组成的多样性与均匀性不仅可提高土壤生态系统的稳定性和和谐性, 同时也可提高对土壤微生态环境恶化的缓冲能力 (章家恩和廖宗文, 2000)。研究表明, 化学污染、种植年限和栽培方式对土壤微生物种群结构和 DNA 序列多样性产生显著影响 (姚健等, 2000; Yao et al., 2006)。

在农业生产中, 作物轮作有利, 连作不利, 早已广为认知, 但对作物轮作有利的原因尚不十分清楚, 特别是轮作对土壤生态环境的影响研究报道较少。作者通过两年的田间试验, 在黄瓜制种棚中, 休闲期以大豆、小麦的 1/3 播种量播种, 封冻前翻入土中, 研究设施黄瓜与大豆和小麦轮作对土壤微生物群落 DNA 序列多样性的影响, 旨在明确轮作后土壤微生物多样性的变化趋势, 为创造良好的土壤生态环境, 制定合理的栽培制度提供理论依据。

收稿日期: 2007-07-13; 修回日期: 2007-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571264; 30230250)

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

1 材料与方 法

以‘津优1号’黄瓜为材料,在东北农业大学试验实习基地黄瓜制种棚内进行试验。土壤的基本理化性状为:碱解氮 $146.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;有效磷 $197.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;速效钾 $231.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;有机质 4.361% ;电导率 $336 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$;pH 7.12。

于黄瓜采收后的8月20日,以小麦 $4.5 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 和大豆 $3.0 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 的播种量条播,60 cm 垄作,以不种植作物的为对照,小区面积为 $2.4 \text{ m} \times 5.0 \text{ m}$,3次重复,随机排列。在封冻前当大豆和小麦生长高度30 cm左右时秋翻,第2年正常种植黄瓜。在黄瓜盛瓜期采集两种处理(分别为黄瓜—小麦—黄瓜轮作和黄瓜—大豆—黄瓜轮作)和对照(黄瓜—休闲—黄瓜)的根际土壤,过2 mm筛,于 -70°C 保存以用于微生物DNA序列多样性分析。

土壤微生物群落DNA的提取采用夏北成等(1998)、焦晓丹和吴凤芝(2005)、Yao等(2006)的SDS/CTAB方法;DNA的纯化采用Promega Wizard 纯化试剂盒;土壤微生物DNA序列PCR扩增采用焦晓丹和吴凤芝(2005)的方法;土壤微生物群落DNA序列多样性指数采用Shannon-Weaver指数及其均匀度指数来表示(陈廷贵和张金屯,2000;姚健等,2000)。

采用随机引物对3种土壤微生物群落总DNA进行扩增,检测群落DNA的一些位点,所扩增的RAPD条带可以初步反映整个群落DNA序列的有关信息。由于采用的是随机引物,每一次扩增反应相当于对整个群落的DNA序列作一次随机取样,扩增的RAPD条带数可以代表群落DNA序列的丰富度指数。在3种处理(含对照)土壤微生物群落中均扩增出的RAPD条带和只在其中两个或一个土壤群落扩增的条带对其丰富度指数的计算有所不同,对其作修正统计,3种土壤群落均扩增出的条带对丰富度指数贡献最小计作0,仅在1个群落中扩增的条带贡献最大计作1,而在2个群落扩增的条带则计作2/3。

土壤微生物群落DNA序列的相似系数表示群落之间DNA序列差异的信息,计算由下式求得: $S_{XY} = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$,式中 S_{XY} 为土壤X和土壤Y之间的DNA序列相似系数, N_{XY} 为土壤X和土壤Y共有的扩增条带, N_X 为土壤X的扩增条带数, N_Y 为土壤Y的扩增条带数(Southwood, 1984)。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物群落DNA序列的总体扩增分析

共检测了10个随机引物,其中引物1268和引物1508的扩增产物如图1。10个引物共计扩增出180个RAPD条带(表1),其中非多态性条带11条,占6.1%,多态性条带169条,占93.9%。非多态性条带指对3种处理的土壤微生物群落DNA均能扩增出的条带,即此种微生物在3种土样中均存在。多态性条带指对3种处理的土壤微生物群落DNA并非全能扩增出的条带。

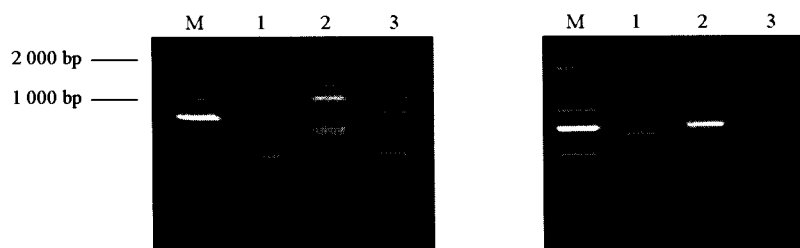


图1 引物1268(左)及引物1508(右)扩增DNA电泳图

1: 黄瓜—小麦—黄瓜; 2: 黄瓜—大豆—黄瓜; 3: 黄瓜—休闲—黄瓜(M: DL2000 marker)。

Fig. 1 Amplified template DNA electrophoretogram with primer 1268 (left) and primer 1508 (right)

1: Soil sample of cucumber - wheat - cucumber; 2: Soil sample of cucumber - soybean - cucumber;

3: Cucumber - leisure - cucumber; M: DL 2000 marker.

表 1 10 种引物对 3 种土壤微生物群落总 DNA 的扩增结果

Table 1 Amplified products of microbial community DNA in three soil samples with ten primers

引物 Primer	扩增条带数 Amplified fragments	非多态性条带数 Nonpolymorphic fragments	多态性条带数 Polymorphic fragments	多态性条带所占比例 Ratio of polymorphic fragments to total fragments(%)
261	13	1	12	92
1387	21	3	18	85
1215	18	0	18	100
1508	17	1	16	100
236	12	1	11	91
O8	27	2	25	92
V3	17	2	15	88
M12	15	0	15	100
A12	23	0	23	100
1268	17	2	15	88
总数 Total	180	11	169	93

2.2 黄瓜与小麦和大豆轮作后对土壤微生物群落 DNA 序列多样性指数的影响

表 2 是黄瓜与小麦和大豆轮作后土壤微生物群落 DNA 序列丰富度指数、修正丰富度指数、多样性指数和均匀度指数的变化。多样性指数表示的是群落物种数及个体数; 均匀度指数表示的是物种个体分布的均匀程度。

表 2 黄瓜根区土壤微生物群落 DNA 序列多样性指数的变化

Table 2 Change of soil microbial community DNA sequence diversity index in the cucumber rhizosphere

土壤样品 Soil sample	丰富度指数 Richness index from RAPD	修正丰富度指数 Modified richness index from RAPD	多样性指数 Diversity index from RAPD	均匀度指数 Evenness index from RAPD
黄瓜—小麦—黄瓜 Cucumber - wheat - cucumber	6.0 ± 0.2 b	4.2 ± 0.1 b	1.89 ± 0.11 a	0.99 ± 0.09 a
黄瓜—大豆—黄瓜 Cucumber - soybean - cucumber	8.3 ± 0.3 a	5.9 ± 0.2 a	1.87 ± 0.18 a	0.99 ± 0.01 a
黄瓜—休闲—黄瓜 Cucumber - leisure - cucumber	4.8 ± 0.2 c	3.5 ± 0.1 c	1.61 ± 0.23 b	0.85 ± 0.07 b

注: 同一列中不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

表 2 结果表明, 黄瓜与小麦和大豆轮作后, 土壤微生物群落 DNA 序列种类增多; 10 个引物扩增的 RAPD 的平均条带数分别为 8.3 条和 6.0 条, 与对照 4.8 条均达到显著差异 ($P < 0.05$), 两种处理间也达到了差异显著水平。修正丰富度指数与丰富度指数趋势一致。多样性指数和均匀度指数的变化与丰富度指数相似, 但两种轮作处理土壤间差异不显著。

2.3 黄瓜根际土壤微生物群落 DNA 序列相似系数

通过计算群落 DNA 序列的相似系数可得到群落之间 DNA 序列差异的信息。黄瓜和小麦轮作的土壤与黄瓜和大豆轮作的土壤 DNA 序列相似系数最大, 为 0.5678; 黄瓜和小麦轮作的土壤, 黄瓜和大豆轮作的土壤与连作 (对照) 的土壤间的相似系数均较低, 分别为 0.3124 和 0.3465。

2.4 黄瓜与小麦和大豆轮作后对黄瓜产量的影响

表 3 是 3 种土壤中黄瓜产量的情况。结果表明, 两种轮作土壤的黄瓜产量显著高于对照土壤的黄瓜产量 ($P < 0.05$), 黄瓜与小麦和大豆轮作不仅提高了土壤微生物群落物种多样性, 改善了

表 3 黄瓜与大豆和小麦轮作后黄瓜产量

Table 3 Effect of soybean - cucumber and wheat - cucumber rotation on cucumber yield

处理 Treatment	产量 Yield ($\times 10^3 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$)
黄瓜—小麦—黄瓜 Cucumber - wheat - cucumber	7 400 ± 282.84 a
黄瓜—大豆—黄瓜 Cucumber - soybean - cucumber	6 000 ± 489.89 a
黄瓜—休闲—黄瓜 Cucumber - leisure - cucumber	4 400 ± 282.84 b

注: 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

土壤的微生态环境,而且提高了黄瓜产量。

在农林业生产中,有连作、轮作和间作等不同栽培模式。研究发现,保护地菜田与稻麦轮作后土壤微生物种群结构发生显著改善(尹睿等,2004);在人工林系统研究中发现混交林土壤中微生物多样性指数比纯林多样性指数高(杜国坚等,1995)。陈灏等(2002)通过对种植不同农作物的农田进行16S rDNA分析,发现种植不同作物的农田中存在其特殊的微生物种群。

本研究结果表明,采用大豆或小麦与黄瓜轮作后,土壤微生物多样性指数增高,其原因可能是由于大豆或小麦的幼嫩秸秆翻耕在土壤中,使土壤微生物可利用的营养发生了变化,并且地上植被也能影响到土壤温度、湿度等环境因素,从而对微生物结构产生不同的影响。有关轮作后的土壤微生物特殊种群变化还有待进一步研究。

References

- Chen Hao, Tang Xiao-shu, Lin Jie, Zhang Bo-sheng, Ren Da-ming. 2002. Community constitute and phylogenetic analysis on soil uncultured microorganism. *Acta Microbiologica Sinica*, 42 (4): 478-483. (in Chinese)
- 陈 灏,唐小树,林 洁,张伯生,任大明. 2002. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究. *微生物学报*, 42 (4): 478-483.
- Chen Ting-gui, Zhang Jin-tun. 2000. Plant species diversity of Shenweigou in Guandi mountains (Shanxi, China) I. richness, evenness and diversity indexes. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 6 (5): 406-411. (in Chinese)
- 陈廷贵,张金屯. 2000. 山西关帝山神尾沟植物群落物种多样性与环境关系的研究 I. 丰富度指数、均匀度指数和物种多样性指数. *应用与环境生物学报*, 6 (5): 406-411.
- Du Guo-jian, Huang Tian-ping, Zhang Qing-rong, Zhang Pu-shan, Cheng Rong-liang. 1995. Studies on soil microorganisms and biochemical properties in mixed forests of Chinese fir. *Journals of Zhejiang Forestry College*, 12 (4): 347-352. (in Chinese)
- 杜国坚,黄天平,张庆荣,张浦山,程荣亮. 1995. 杉木混交林土壤微生物及生化特性和肥力. *浙江林学院学报*, 12 (4): 347-352.
- Jiao Xiao-dan, Wu Feng-zhi, Gao Hai-jun. 2005. Optimization of RAPD conditions for soil microbes. *Chinese Journal of Ecology*, 25 (8): 921-924. (in Chinese)
- 焦晓丹,吴凤芝,高海军. 2005. 土壤微生物 RAPD 分析体系的优化研究. *生态学杂志*, 25 (8): 921-924.
- Southwood T R. 1984. *Ecology research methods*. Luo He-qing trans. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- Southwood T R. 1984. *生态学研究方法*. 罗河清译. 北京: 科学出版社.
- Xia Bei-cheng, Zhou J Z, Tiedje J M. 1998. Application of molecular methods in microbial ecology. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (Natural Science)*, 37 (2): 97-101. (in Chinese)
- 夏北成, Zhou J Z, Tiedje J M. 1998. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用. *中山大学学报 (自然科学版)*, 37 (2): 97-101.
- Yao Huai-ying, Jiao Xiao-dan, 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.
- Yao Jian, Yang Yong-hua, Shen Xiao-rong, Lu Wei-zhong. 2000. A preliminary study on DNA sequence diversity of soil microbial community affected by agricultural chemicals. *Acta Ecologica Sinica*, 20 (6): 1021-1027. (in Chinese)
- 姚 健,杨永华,沈晓蓉,陆维忠. 2000. 农用化学品污染对土壤微生物群落 DNA 序列多样性的影响. *生态学报*, 20 (6): 1021-1027.
- Yin Rui, Zhang Hua-yong, Huang Jin-fa, Lin Xian-gui, Wang Jun-hua, Cao Zhi-hong. 2004. Comparison of microbiological properties between soils of rice-wheat rotation and vegetable cultivation. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 10 (1): 57-62. (in Chinese)
- 尹 睿,张华勇,黄锦法,林先贵,王俊华,曹志洪. 2004. 保护地菜田与稻麦轮作田土壤微生物学特征的比较. *植物营养与肥料学报*, 10 (1): 57-62.
- 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.