

用 PCR-DGGE 研究菌肥对西藏青稞 土壤微生物群落多样性的影响^①

刘晓燕¹, 张磊¹, 韦泽秀², 朱丹¹,
王晓锋¹, 吴先勤¹, 丁红利¹

1. 西南大学 资源环境学院, 重庆 400716; 2. 西藏自治区农业研究所, 拉萨 850032

摘要: 为探讨微生物菌肥对西藏青稞土壤根际微生态的影响, 利用传统纯培养与 PCR-DGGE(聚合酶链式反应—变性梯度凝胶电泳)技术相结合的方法, 研究了谷特微生物菌肥不同施用方式和施肥浓度对西藏青稞根区土壤微生物量和细菌群落结构的影响。结果表明, 与对照相比, 施肥处理显著降低了土壤真菌数量($p < 0.05$), 土壤放线菌数量和微生物量氮含量显著上升($p < 0.05$)。DGGE 分析表明, 菌肥处理土壤与未施菌肥土壤的细菌群落结构存在明显差异, 土壤微生物区系结构发生了改变; DGGE 所反映的土壤细菌多样性可以用来判断菌肥发挥作用的程度, 合理指导菌肥的施用。本研究中, 菌肥的施入促进了土著细菌 *Acidobacteria*、*Actinobacteria* 和 *Bacillus* 的生长, 抑制了土壤中 *Blastomonas*、*Uncultured Rhizobium* 和 *Cyanobacterium* 的生长。两种施肥方式, 根施对青稞根区土壤中细菌、真菌和放线菌数量的影响较叶面喷施大, 根施对土壤微生物区系的改变较叶面喷施高, 根施最佳菌肥施用量为 20.0 mL/hm², 叶面喷施最佳菌肥施用量为 26.7 mL/hm²。本研究为准确预测和评价微生物菌肥的施用效果提供了技术参考。

关键词: 青稞; 微生物菌肥; 细菌群落多样性; PCR-DGGE

中图分类号: Q938

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)7-0039-10

随着人们对农业生产中长期、过量施用化肥所引起的诸如土壤板结、肥力下降、面源污染和 pH 值降低等农业生态环境问题的关注^[1-3], 微生物菌肥作为改善土壤营养状况和提高植物抗逆性的作用越来越受到重视。微生物菌肥是由一种或数种有益微生物经发酵而成的无毒害绿色生物性肥料^[4-5]。它通过施用于土壤后, 菌肥中的微生物的生长可以矿化土壤有机养分, 释放土壤闭蓄态无机养分, 从而改良土壤结构和提高土壤肥力, 因此微生物肥料的施用改善植物的营养条件, 协助农作物吸收养分, 提高植物的抗逆性^[6-8]。近年来, 随着生物技术的不断发展, 微生物肥料的研究与应用有了很大进展^[9], 但我国目前微生物肥料、生物添加剂市场种类繁多, 由于气候条件、地理环境和植株种类的不同, 菌肥的施用效果差异很大^[10-12]。虽然近年来我国建立起了一些规范对微生物肥料市场的法规和标准, 但缺乏利用分子生物学技术来科学评价、有效监测菌肥施用效果。

① 收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 国家农业部“948”资助项目(2011-Z35)。

作者简介: 刘晓燕(1991-), 女, 安徽亳州人, 硕士研究生, 主要从事土壤与环境微生物学研究。

通信作者: 张磊, 博士, 副教授。

西藏地处我国西南边陲,素以“世界屋脊”和“地球第三极”著称.藏东南地区由于受高寒低温等极端环境胁迫的影响,土壤微生物活性下降^[13].土壤养分矿化能力和速率也随之降低^[14],导致土壤较贫瘠.在海拔高度 4 200 m 以上的农田中,青稞是唯一种植的作物,是藏族群众的基本口粮来源,也是西藏地区最具特色的原料作物.因此用微生物菌肥改善当地土壤肥力条件,提高青稞的产量和质量,是维持当地经济社会发展健康发展的重要保障.

目前有关外来微生物菌剂对根际微生态的研究主要集中在解磷解钾菌、固氮菌及其他 PGPR 促生菌方面^[15-16],且大多是采用传统方法,如菌落计数法等,来研究对土壤和植物的施用效果.变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术可快速从土壤中提取微生物 DNA 片段,揭示所研究土壤的微生物群落结构特征,该技术在分析外源物质对土壤细菌群落多样性的影响和种群动态监测方面得到广泛使用^[17-18].

本研究以西藏地区广泛存在的棕色沙壤土为研究对象,在施用微生物菌肥后采用 PCR-DGGE 技术检测微生物菌肥对土壤微生态中细菌群落多样性的影响,研究微生物菌肥对西藏土壤微生物的影响,以期探讨微生物肥料的作用机理,并初步探究采用综合分析指标评价微生物肥料肥效的可行性.

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地为西藏自治区农业研究所 4 号试验地,位于西藏自治区东南部拉萨市雅鲁藏布江支流拉萨河中游,主要地貌为河谷平原,91°02'E,29°38'N,属高原山地气候,海拔 3 650 m,年均温 7.4 ℃,年降雨量 500 mm,降雨集中于 6,7,8,9 月份,多夜雨.

1.2 试验材料

供试青稞品种为藏青 320,由西藏自治区农业研究所制种.供试土壤为河谷农区棕色砂壤土,基础理化性质:全氮 0.98 g/kg、全磷 1.72 g/kg、全钾 5.49 g/kg、碱解氮 113.05 mg/kg、有效磷 17.86 mg/kg、速效钾 31.63 mg/kg、有机质 13.58 mg/kg、pH 值 7.72.供试菌剂为谷特菌肥,购买自禾康肥料有限公司,菌肥配置方法为砂糖 100 g,黄豆粉 100 g,谷特菌 0.25 g,1000 mL 水.

1.3 试验设计

试验设 12 个处理,小区面积 50 m²,3 次重复,施肥方式为化肥+菌肥,分根施(播种前将菌肥稀释后直接施于土壤中)和叶面喷施(三叶期后将菌肥稀释后均匀喷洒到青稞叶面上)两种.化肥的施用量为磷酸二铵 0.5 kg/hm²,尿素 0.33 kg/hm²,氯化钾 0.1 kg/hm²,各处理间化肥施用量保持一致,不同处理的谷特菌肥的施用量见表 1-a, b.种植时间为 2011 年 5 月初,种植期间施肥、灌溉、中耕除草等统一管理.

表 1-a 根施菌剂浓度处理

处 理	Gck	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
菌剂浓度/(mL·hm ⁻²)	0	3.3	6.7	10.0	13.3	16.7	20.0	23.3

表 1-b 叶面喷施菌剂浓度处理

处 理	Yck	Y1	Y2	Y3
菌剂浓度/(mL·hm ⁻²)	0	13.3	26.7	40.0

青稞收获后,在试验小区内用土钻“S”形随机选择 5 个点,采样深度为 0~20 cm,除去可见动植物残体及小石块后混匀.用于测定土壤微生物量的土壤样品保存在 4 ℃冰箱中.用于 PCR-DGGE 分析的样品迅速冻存于-20 ℃冰箱,以进行分子生物学实验.

1.4 测定项目及方法

1.4.1 土壤中可培养真菌、放线菌数量及微生物量氮的测定

土壤中可培养真菌及放线菌的分离和数量测定采用稀释平板法,培养基分别为葡萄糖酵母膏培养基及高氏 1 号培养基^[19].微生物量氮测定采用氯仿熏蒸提取法^[20].

1.4.2 细菌基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

1) 称取 0.5 g 土样,用 OMEGA 公司 E. Z. N. A Soil DNA Kit D5625-01 提取 DNA,得到的 DNA 用 1%琼脂糖电泳检测,并用紫外分光光度计测定其浓度和纯度.由于土壤中含有腐殖酸,影响 DNA 的扩增,本研究采用稀释 20 倍的土壤 DNA 进行扩增.

2) 将基因组 DNA 作为 PCR 的模板,采用细菌 16S rRNA 的 V3 区特异性引物对 F338-GC 和 R518^[21]进行 PCR 扩增.它们的序列分别为 338F-GC(5'-GC-clamp-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG -3')和 518R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3').GC 夹序列为:CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G)(由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成),扩增产物片段长约 200bp.

3) 50 μL PCR 反应体系组成如下:TakaRaTaq(5 U/ μL) 0.25 μL 、10 $\times$ PCR Buffer(Mg^{2+}) 5 μL 、 MgCl_2 (25 mmol/L) 3 μL 、dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 4 μL 、模板为 20 倍稀释的总 DNA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 μL 、引物 1(20 μL) 1 μL 、引物 2(20 μL) 1 μL 、无菌纯水补齐到 50 μL .

4) PCR 反应条件:采用普通 PCR,即预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,32 个 PCR 循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min. PCR 反应的产物用 1.8%琼脂糖电泳检测.

1.4.3 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用 Bio-Rad 公司 DcodeT M 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离.

1) 双梯度变性胶的制备:使用梯度混合装置,制备 8%的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度从 35%(16.8 g urea; 16 mL formamide/100 mL Denaturant)到 60%(25.2 g urea; 24 mL formamide/100 mL Denaturant),其中变性剂和丙烯酰胺的浓度从胶的上方向下方依次递增.

2) PCR 样品的加样:待变性梯度胶完全凝固后,将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中,取 PCR 样品 30 μL 和 6 $\times$ loading buffer 混合后加入上样孔.

3) 电泳、染色及拍照在 70 V 的电压下,60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 14 h.电泳结束后,将凝胶进行 SYBR Green I 避光染色后拍照.

1.4.4 特征条带的回收与测序

将 DGGE 凝胶上不同处理的优势条带用无菌、洁净的刀片切下,放入 1.5 mL 灭菌的离心管中,加入 50 μL 去离子水,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡过夜.次日,取 1 μL 上清液为模板,以不加 GC 夹的引物,按照 1.3.4 中的 PCR 反应体系和程序再次扩增,扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,利用 Biospin 胶回收试剂盒回收目的条带.胶回收产物经 pMD20-T 载体连接,转化 E. coli DH5 α 感受态细胞,在含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基上选择白色克隆子,采用 T 载体通用引物进行菌落 PCR 检测,将菌液送至上海英骏生物技术有限公司测序.

1.5 数据分析

1) 土壤理化性质数据采用 Excel2007 进行标准化处理,应用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行方差分析,5%水平下 LSD 多重比较各处理平均值之间的差异显著性.

2) 用 Bio-Rad 公司的凝胶定量软件 Quantity One 4.6.2 分析 DGGE 指纹图谱中微生物群落结构,计算土壤中细菌的 Shannon 多样性指数(H)、丰富度(S)和聚类分析,其中聚类分析用 UPGMA 方法^[22].

$$H = - \sum (n_i/N) \ln(n_i/N)$$

式中: H 表示 Shannon-Weiner 多样性指数; n_i 是菌种 i 条带的亮度; N 是该泳道中所有条带的总亮度. H

值越大代表的物种多样性越高. S 表示物种种数.

采用 NCBI 数据库进行 Blast 分析, 采用 MEGA 4.0 中的 NEIGHBOR-JOINING^[23] 程序进行细菌聚类分析并构建系统进化树.

2 结果与分析

2.1 菌肥对土壤中可培养真菌、放线菌数量及微生物量氮的影响

土壤中可培养放线菌与真菌数量以及两者之间的比例是反映土壤微生物区系的常用指标. 从表 2 可以看出, 分别施入不同量菌肥, 除 G7 和 Y3(即根施 23.3 mL/hm² 和叶面喷施 40.0 mL/hm², 分别是两种施肥方式的最高施肥量处理)外, 与对照相比, 施肥处理显著降低了土壤中的真菌数量($p<0.05$), 显著增加了土壤中的放线菌数量($p<0.05$). 例如, 根施菌肥处理土壤放线菌数量较对照分别提高的幅度为 115.43%~485.49%, 其中根施 23.3 mL/hm² 提高幅度最低, 根施 20.0 mL/hm² 处理最高; 叶施菌肥处理土壤放线菌数量较对照增长率分别为 899.23%, 1630.06% 和 994.80%, 以叶施 26.7 mL/hm² 提高最多; 谷特菌肥包括的有益微生物主要是放线菌. 上述结果表明施用微生物菌肥可以在很大程度上改变土壤微生物区系. 根施和叶面喷施放线菌增加最多的处理并不是施肥量最多的处理, 而是仅次于最高施肥量的处理, 这可能是由于在相同土壤条件下, 过量菌肥微生物的施入导致营养不足, 无法满足施入微生物的繁殖需求. 施用菌肥青稞根际土壤中 A/F 值较对照增加, 最大值出现在根施菌肥量 10.0 mL/hm² 和 13.3 mL/hm² 处理, 根施 A/F 值整体上大于叶面喷施.

土壤微生物量是土壤有机库中的活性部分, 是土壤生态系统肥力的重要生物学指标^[24]. 施肥处理土壤微生物量氮整体上较对照高, 根施菌肥量 16.7 mL/hm² 和叶施菌肥量 26.7 mL/hm² 微生物量氮含量较对照分别提高 114.59% 和 38.86%. 同时表明根施对土壤微生物区系的影响高于叶面喷施.

表 2 不同施肥处理对青稞土壤可培养真菌和放线菌数量及微生物量氮的影响

处 理	真菌数量 /($\times 10^6$ CFU/g)	放线菌数量 /($\times 10^4$ CFU/g)	放线菌数量/真菌数量 (A/F)	微生物量 N /(mg $\cdot$ kg ⁻¹)
Gck	34.26b	16.33e	0.48	27.97c
G1	8.37c	36.00d	4.30	49.04bc
G2	9.03c	54.44c	6.03	46.43bc
G3	7.37c	77.26b	10.48	25.59c
G4	8.93c	91.08ab	10.20	48.48bc
G5	12.16c	81.62ab	6.71	60.02b
G6	10.08c	95.61a	9.49	42.42bc
G7	33.21b	35.18d	1.06	49.63bc
Yck	25.61b	5.19e	0.20	59.42b
Y1	9.24c	51.86c	9.72	41.76bc
Y2	7.78c	89.79ab	6.67	82.51a
Y3	101.63a	56.82c	0.56	64.68b

注: 表中结果为 3 个重复的平均值. 同列不同字母表示处理间差异显著($p<0.05$).

2.2 土壤细菌的 DGGE 图谱分析

2.2.1 基因组 DNA 的 PCR 扩增

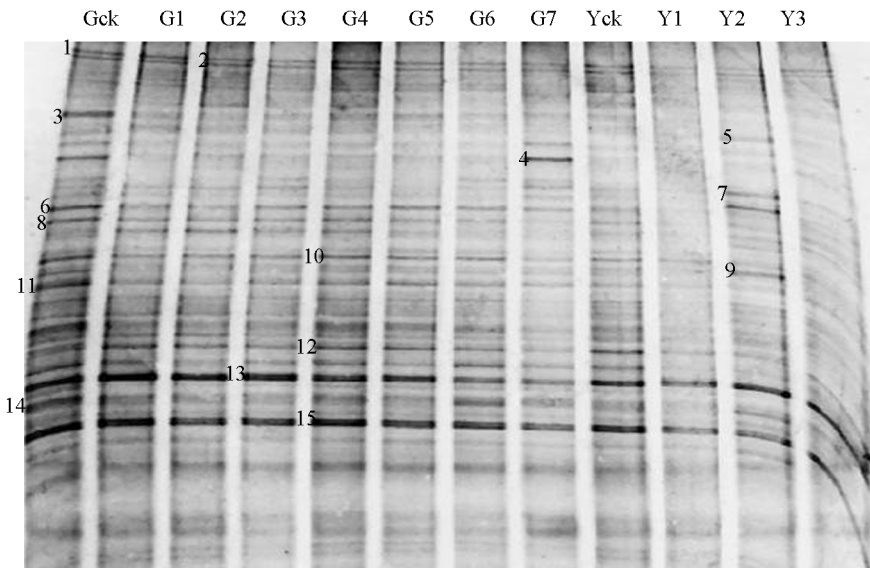
在进行了土壤养分和微生物指标分析后, 本研究试图从分子生物学角度深入地了解菌肥对土壤细菌生物多样性的影响.

以等量的基因组 DNA 为模板, 以细菌的 16S rDNA 的 V3 区通用引物(338F-GC/518R)对每一样品的

基因组 DNA 进行体外扩增, 结果显示所用样品均扩增出单一的目的条带, 得到的目的片段长度约 200bp 左右, 是 16S rDNA V3 区的特异性片段, 可以用于后续的环境样本多样性分析.

2.2.2 根施和叶面喷施不同菌肥施用量土壤细菌的遗传变异

土壤中细菌群落 DGGE 结果如图 1 所示. 不同菌肥施用方式以及不同施用浓度的土壤样品的带型和条带数目有一定差别. 各处理的条带数目、部分特异条带的宽度与着色深度比较, 大致表现出根施高于叶面喷施的趋势, 且根施对照 Gck 高于根施其他处理、叶面喷施对照 Yck 高于叶面喷施其他处理, 说明菌肥的施用的确对根际微生态产生了影响, 且根施和叶面喷施两种方式对土壤表层细菌数量和群落结构的影响存在差异. 条带 1,2,13 和 15 存在于所有处理土壤中, 且条带亮度较高, 表明该条带所代表的微生物是土著种类和优势菌种, 对环境有很好的适应性. 条带 3,6,8,10,11 和 14 来自土著细菌, 菌肥施用量 3.3 mL/hm² 时它们的灰度已明显降低, 随菌肥施用量的增加逐渐减弱或消失, 表明菌肥中以放线菌为主的微生物影响了这些条带所代表的土著细菌的存活. 条带 4 首次出现在对照 Gck 中, 随着菌肥施用量的增加条带 4 消失, 但菌肥施用量达到 23.3 mL/hm² 时条带 4 又再次出现, 表明该微生物为土著细菌, 来自菌肥的放线菌大量滋生时抑制了该菌的存活, 23.3 mL/hm² 施菌肥处理放线菌较对照增量最低, 条带 4 细菌得以滋生; 条带 16 存在于菌肥施用量 3.3~13.3 mL/hm² 之间, 表明该微生物来自菌肥; 条带 5,7 和 9 为叶面喷施处理独有, 在喷施浓度为 26.7 mL/hm² 时出现, 该处理也是叶面喷施处理中放线菌增加最多处理, 表明该浓度下菌肥微生物得到较充分的繁殖条件.



根施土样(G-x)Gck: 0 mL/hm²; G1: 3.3 mL/hm²; G2: 6.7 mL/hm²; G3: 10.0 mL/hm²; G4: 13.3 mL/hm²; G5: 16.7 mL/hm²; G6: 20.0 mL/hm²; G7: 23.3 mL/hm²; 叶面喷施土样(Y-x)Yck: 0 mL/hm²; Y1: 13.3 mL/hm²; Y2: 26.7 mL/hm²; Y3: 40.0 mL/hm², Gck 为根施无菌肥对照, Yck 叶面喷施无菌肥对照.

图 1 收获青稞后表层土壤中细菌 16S rDNA V3 区 DGGE 图谱

2.2.3 不同处理对根际细菌群落结构多样性的影响和聚类分析

根施和叶面喷施不同浓度菌肥处理的细菌群落结构多样性指数(*H*)和条带丰富度(*S*)如表 3 所示. 在两种施用方式中, *H* 和 *S* 均表现为根施高于叶面喷施. 根施处理中, 对照 Gck 的 DNA 条带数量最多, 条带亮度最高(如条带 6 和条带 8), 且 Shannon 多样性指数最高. 随着菌肥浓度的增加至 13.3 mL/hm², 条带信号强度、多样性逐渐下降, 如 Gck 多样性指数比 G2, G4 的分别高 3.0% 和 3.6%. 但当浓度升高至 23.3 mL/hm² (G7)时, 其条带数量和多样性增加, 与对照 Gck 的相当. 该结果与土壤放线菌和真菌数量结果相似, 即来自菌肥的放线菌大量滋生抑制土壤细菌多样性. 叶面喷施处理中, 处理与对照的条带数量和多样性处理间差异不大.

表 3 青稞表层土壤细菌的多样性指数和丰富度

处理	Gck	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	Yck	Y1	Y2	Y3
<i>H</i>	3.13	3.06	3.04	3.06	3.02	3.10	3.08	3.10	3.03	2.97	3.01	3.00
<i>S</i>	39	37	36	35	36	35	37	38	36	34	36	34

注：*H*-Shannon-Wiener 多样性指数，*S*-丰富度。

为进一步了解不同施肥方式和施肥浓度对土壤细菌群落结构的影响，用 UPGMA 法进行聚类分析，结果如图 2 所示。两种施用方式土壤细菌 DGGE 图谱明显地分为两大族群，7 个根施处理聚为一簇，组间相似度最低为 0.82，并进一步和对照 Gck 聚为一簇。其中特别是 G2 和 G3 处理，相似性系数高达 0.91。叶面喷施的 Y1、Y2 和 Y3 聚为一簇，处理组与对照间差异较大。说明菌肥的施肥方式对土壤细菌群落结构的影响大于菌肥施用量对其的影响。

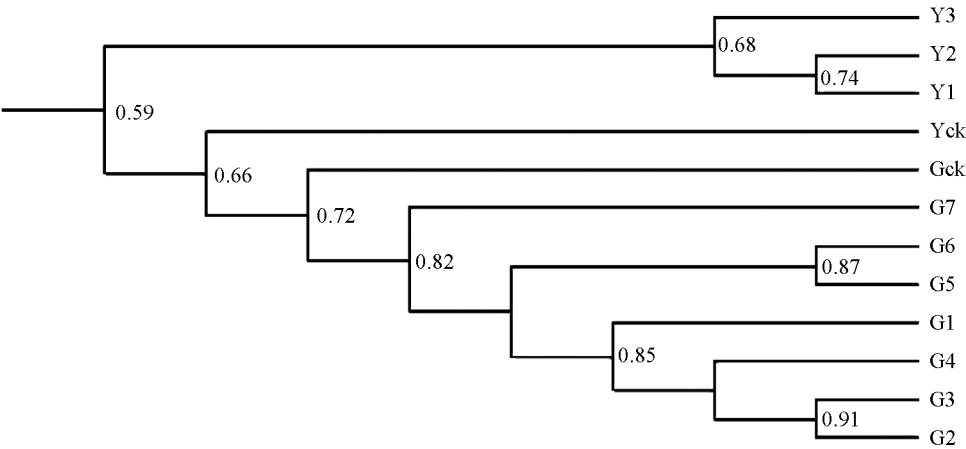


图 2 青稞土壤细菌 DGGE 图谱的聚类分析图

2.2.4 序列测定和分析

根据 DGGE 指纹图谱将各处理中共 16 条特征条带切胶回收，其中条带 16 未成功克隆，因此共获得 15 条序列，在其他研究中有类似现象发生^[25, 26]。如图 2 所示，将 15 条带的 16S rDNA 进行序列测定，获得的序列通过 NCBI 数据库的 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已报道的 16S rDNA 序列进行相似性比对分析。结果表明，15 条所测序列的最相似序列有 4 条来自 GenBank 数据库中未培养的微生物克隆，其余的来自可培养微生物(表 4)，所测序列与数据库中的 16S rDNA 序列拥有较高的相似性($\geq 97\%$)。用这些序列与本实验所得的序列构建进化树，结果如图 4 所示。

系统进化树显示，15 个克隆分属 5 个门：变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)。其中变形细菌、蓝细菌和厚壁菌是优势菌，且是土壤中普遍存在的菌群^[27, 28]。部分放线菌来源于菌肥，如条带 5 和条带 9。根施方式中，与对照相比，菌肥的施用对酸杆菌(*Acidobacteria*，条带 10)、放线菌(*Actinobacteria*，条带 12)和芽胞杆菌(*Bacillus*，条带 13)等土著菌的生长产生了促进作用。菌肥对土著的芽单胞菌属(*Blastomonasstrain*，条带 3)、不可培养的根瘤菌属(*Uncultured Rhizobium*，条带 4)和蓝细菌(*Cyanobacterium*，条带 6)表现出抑制作用，其中条带 4 在菌肥施用量为 23.3 mL/hm² 时才再次出现。根瘤菌属菌株具有固氮作用^[29]，可以增加土壤含氮量。叶面喷施方式中，与对照相比，处理 Y2 引入了放线菌(*Actinobacteria*，条带 5 和条带 9)以及变形菌(*Proteobacteria*，条带 7)，喷施浓度为 26.7 mL/hm² 有利于这 3 种菌的生长。

表 4 青稞表层土壤细菌 DGGE 图谱对应条带的序列比对分析

条带	最相似菌株	相似度/%	系统类群
1	<i>Janthinobacterium</i> sp. R-11(HM069076.1)	100	β-Proteobacteria
2	Uncultured cyanobacterium clone GSY-XJ49(JN225550.1)	100	Cyanobacteria
3	<i>Blastomonasnatatoria</i> strain SBR23(KF013212.1)	100	α-Proteobacteria
4	Uncultured <i>Rhizobiales</i> bacterium clone HS-S-116(HM592597.1)	97	α-Proteobacteria
5	<i>Actinobacterium</i> ZXY038(JN049487.1)	99	Actinobacteria
6	Uncultured cyanobacterium clone(DQ829127.1)	100	Cyanobacteria
7	<i>Ancylobacteroerskovii</i> strain NS05(NR042655.1)	99	α-Proteobacteria
8	<i>Nostoc</i> sp. 'Peltigeraneopolydactylacyanobiont' clone SS5654(DQ265956.1)	100	Cyanobacteria
9	<i>Blastococcusjejuensis</i> strain KST3-10(NR043633.1)	98	Actinobacteria
10	Uncultured Acidobacteria bacterium clone SNNP_2012-141(JX114474.1)	100	Acidobacteria
11	<i>Bacillus</i> sp. A46(HQ433470.1)	100	Firmicutes
12	<i>Blastococcusaggregatus</i> strain CB-281465(JX841003.1)	98	Actinobacteria
13	<i>Bacillus</i> sp. MHS024(DQ993298.1)	99	Firmicutes
14	<i>Brevundimonasnasdae</i> strain W1-2B(NR028633.1)	100	α-Proteobacteria
15	<i>Sphingomonasphyllosphaerae</i> strain FA2(NR029111.1)	100	α-Proteobacteria

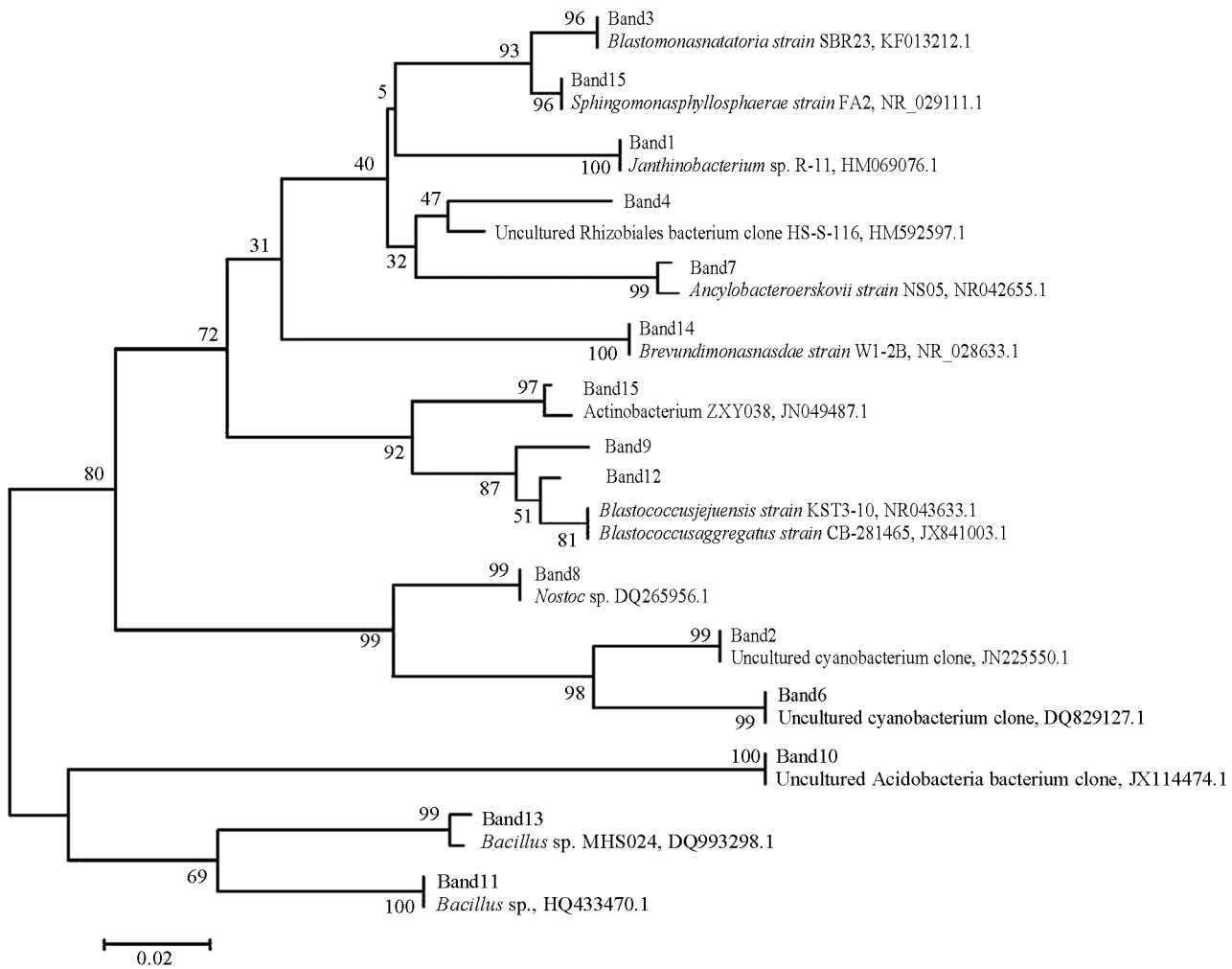


图 3 青稞土壤细菌 DGGE 图谱回收条带与参比序列的系统发育树

3 讨 论

本文采用了传统的纯培养方法结合 DGGE 技术,研究了菌肥对青稞种植土壤中微生物群落的动态变化。一些能够分泌抗生素的土壤微生物能够影响植物根际微生物群体的数量和组成^[30]。薛泉宏研究组^[31-32]运用传统纯培养方法研究用放线菌制剂处理人参、西瓜等,发现土壤中放线菌的数量和比例显著增加,真菌的数量和比例减少。Khaled A. 等^[33]研究发现非链霉素放线菌同样可以抑制土壤中真菌的生长,促进植物的生长。本研究中,施用菌肥后,土壤中放线菌数量显著增加,增加幅度先快后慢;真菌数量显著降低,且真菌降低速度先快后慢,反映了谷特菌肥中放线菌与土壤真菌的拮抗和竞争营养的关系^[34]。

PCR-DGGE 技术是研究环境样品非(难)培养微生物的有效方法。国内外的研究表明,施加外源微生物菌剂可以改变植物根际土著微生物类群^[35-37]。本研究 DGGE 图谱分析表明,施入适宜量菌肥施入后,菌肥微生物能够利用土壤有机无机养分迅速繁殖,本研究谷特菌肥为放线菌剂,菌肥中的放线菌产生抗生素及其竞争养分的能力抑制了真菌和细菌的生长繁殖,因而降低了土壤细菌的多样性。过量菌肥施入后,土壤有限的养分不再满足菌肥微生物大量生长的需要,表现为青稞土壤细菌的多样性缓慢升高,放线菌数量增加有限。所以本研究充分说明菌肥的施用量必须适宜,过多除造成不要的浪费,还影响其对土壤微生物的区系效果的发挥。所以使用 DGGE 测定土壤细菌多样性可以准确反映菌肥微生物繁殖和发挥作用的状况。

本研究中,根施最佳菌肥施用量为 20.0 mL/hm²(G6 处理),G6 处理的放线菌数量、A/F、微生物量氮和香农多样性指数均处于较高水平,叶面喷施最佳菌肥施用量为 26.7 mL/hm²(Y2 处理),其放线菌数量和微生物量氮均显著高于其他处理。不同施肥方式对土壤微生物的影响不同,会导致土壤微生物多样性的系统变化^[27],根施和叶面喷施两种施肥方式对土壤微生物的影响不同,大体表现为根施高于叶面喷施。放线菌数量和 A/F 最大值均出现在根施处理,且根施处理对微生物量氮的提高率是叶面喷施处理的 2.95 倍,根施的着色深度及亮度明显高于叶面喷施,两种施肥方式的表层土壤 Shannon 多样性指数和丰富度指数也表现为根施高于叶面喷施。

传统实验室培养鉴定的微生物种类数量不到其总数的 1%。与传统方法相比,DGGE 技术简单、快速、准确,避开了传统方法中微生物的富集培养,可以对复杂环境进行实时监测。目前对西藏土壤微生物群落的研究还处于起步阶段^[36-37]。在常规土壤养分、土壤微生物分析结果的基础上,运用 PCR-DGGE 技术可以从微生物的角度揭示其多样性,进而准确揭示菌肥对青稞种植土壤微生态的影响。

参考文献:

- [1] 黄国勤,王兴祥,钱海燕,等.施用化肥对农业生态环境的负面影响及对策[J].生态环境,2004,13(4):196-200.
- [2] 夏立江,王宏康.土壤污染及其防治[M].上海:华东理工大学出版社,2001:7.
- [3] 张喜林,周宝库,孙 磊,等.长期施用化肥和有机肥料对黑土酸度的影响[J].土壤通报,2008,39(5):1221-1223.
- [4] 梁如玉,傅淡如,李登煜.水稻施用几种菌肥的根际效应和增产效果[J].土壤肥料,1994,(3):31-33.
- [5] 吴建峰,林先贵.我国微生物肥料研究现状及发展趋势[J].土壤,2002,(2):68-72.
- [6] ABBOTT L K, MURPHY D V. Soil Biological Fertility [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [7] KLOPPER J W, LIFSHITA R, ZABLOTOWICA R M. Free-living Bacterial Inoculation for Enhancing Crop Productivity [J]. Trends in Biotechn, 1989, 7: 39-43.
- [8] STOCKDALE E A, BROOLES P C. Detection and Quantification of the Soil Microbial Biomass Impacts on the Management of Agricultural Soils [J]. Agricultural Sciences, 2006, 144, 285-302.
- [9] TANDON H L, FERTILIZERS S. Organic Manures, Recyclable Wastes and Bio-Fertilizers [M]. New Delhi(India): Fertilizer Development and Consultation Organisation, 1992.
- [10] 任佐华,张于光,李迪强.三江源地区高寒草原土壤微生物活性和微生物量[J].生态学报,2011,31(11):3232-3238.
- [11] STANFORD G, SMITH S J. Nitrogen Mineralization Potential of Soils [J]. Soil Science Society of America, 1972, 36:

- 465—472.
- [12] MUYZER G, DE WAALE C, UITTERLINDEN A G. Profiling of Complex Microbial Population by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16SrRNA [J]. Appl Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695—700.
- [13] LIU X C, ZHANG Y, YANG M, et al. Analysis of Bacterial Community Structures in Two Sewage Treatment Plants with Different Sludge Properties and Treatment Performance by Nested PCR-DGGE Method [J]. Environ Sci, 2007, 19: 60—66.
- [14] RANI A, PORWAL S, SHARMA R, et al. Assessment of Microbial Diversity in Effluent Treatment Plants by Culture Dependent and Culture Independent Approaches [J]. Bioresour Technol, 2008, 99: 7098—7107.
- [15] 邱 勤, 张 磊, 韩 光, 等. 使用 PGPR 菌剂及苜蓿培肥新垦地土壤研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(5): 109—115.
- [16] 韩 光, 张 磊, 邱 琴, 等. 复合型 PGPR 和苜蓿对新垦地土壤培肥效果研究 [J]. 土壤学报, 2011, 48(2): 405—411.
- [17] FELICIC, VETTORIL, GIRALDI E, et al. Single and Co-Inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillumbrasilense* on *Lycopersiconesculentum*: Effects on Plant Growth and Rhizosphere Microbial Community [J]. Appl Soil Ecol, 2008, 40(2): 260—270.
- [18] 司英明, 刘永军, 武钰坤, 等. 人工湿地不同工艺的污染物去除及微生物群落结构分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(8): 1—9.
- [19] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [20] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 231—233.
- [21] OVREAS L, FORNEY L, DAAE F L, et al. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3367—3373.
- [22] NICO BOON, WIM DE WINDT, WILLY VERSTRAETE, et al. Evaluation of Nested PCR-DGGE(Denatureing Gradient Gel Electrophoresis) with Group-Specific 16S rRNA Primers for the Analysis of Bacterial Communities from Different Wastewater Treatment Plants [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39(2): 101—112.
- [23] SAITOU N, NEI M. The Neighbor-Joining Method; a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406—425.
- [24] VANCE E D, BROOKES P C, JENKINSON D S. An Extraction Method for Measuring Microbial Biomass C [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1987, 19(6): 703—707.
- [25] LASSE R, GRIEG F S, LAURA B F, et al. Bacterial Community Composition During Two Consecutive NE Monsoon Periods in the Arabian Sea Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)of rRNA Genes [J]. Deep Sea Research II, 1999, 46(6): 1791—1811.
- [26] 高 菲, 孙慧玲, 许 强, 等. 刺参消化道内含物细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析 [J]. 中国水产科学, 2010, 17(7): 671—679.
- [27] 王奇赞, 徐秋芳, 姜培坤, 等. 天目山毛竹入侵阔叶林后土壤细菌群落 16SrDNA V3 区片段 PCR 的 DGGE 分析 [J]. 土壤学报, 2009, 46(4): 662—669.
- [28] WILHELM R C, NIEDERBERGER T D, GREER C, et al. Microbial Diversity of Active Layer and Permafrost in an Acidic Wetland from the Canadian High Arctic [J]. Can J Microbiol, 2011, 57: 303—315.
- [29] PROVOROV N A, SAINMNAROV U B, TANRIVERDIEV T A, et al. The Contribution of Plant and Bacteria Genotypes in the Growth and Nitrogen Accumulation of the Inoculated Alfalfa [J]. Plant and Siol, 1994, 164, 213—219.
- [30] 金绍龄, 程志斌, 朱彦博, 等. 磷酸二氢钾根施和叶喷效果比较 [J]. 甘肃农业科技, 1991, (3): 25—27.
- [31] 张鸿雁, 薛泉宏, 申光辉, 等. 放线菌制剂对人参生长及根域土壤微生物区系的影响 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2287—2293.
- [32] 周永强, 薛泉宏, 杨 斌, 等. 生防放线菌对西瓜根域微生态的调整效应 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版,

2008, 36(4): 143—150.

- [33] KHALED A. El-Tarabilya, KrishnapillaiSivasithamparam, Non-Streptomycete actinomycetes as Biocontrol Agents of Soil-Borne Fungal Plant Pathogens and as Plant Growth Promoters [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006(38): 1505—1520.
- [34] HARMAN G E. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Derived from Research on Trichoderma harzianum T-22 [J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 377—393.
- [35] 李 飞, 王相晶, 吴青君, 等. 三种药剂喷雾和灌根施药方式对西花蓟马的残留毒力 [J]. 植物保护, 2013, 39(3): 173—177.
- [36] 王启兰, 曹广民, 王长庭. 高寒草甸不同植被土壤微生物数量及微生物生物量的特征 [J]. 生态学杂志, 2007, 26(7): 1002—1008.
- [37] 芦晓飞, 赵志祥, 谢丙炎, 等. 西藏米拉山高寒草甸土壤微生物 DNA 提取及宏基因组 Fosmid 文库构建 [J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 824—829.

A PCR-DGGE-Based Study of the Effects of Microorganism Agents on Soil Microbial Community Diversity in Tibetan Barley-Planting Soil

LIU Xiao-yan¹, ZHANG Lei¹, WEI Ze-xiu²,
ZHU Dan¹, WANG Xiao-feng¹, WU Xian-qin¹, DING Hong-li¹

1. School of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032, China

Abstract: In order to investigate the effects microorganism agents (MA) on soil micro-ecological characteristics in Tibetan barley, a field plot experiment with different managements and different volume of microbial fertilizer was carried out to monitor the soil fertility, soil microbial biomass nitrogen and soil microbial community diversity by the denaturing gradient gelelectrophoresis (DGGE) method after MA application. Compared with the control, fertilization treatment significantly reduced the number of soil fungi ($p < 0.05$), while the soil actinomycetes and microbial biomass nitrogen increased significantly ($p < 0.05$). DGGE profile revealed that microorganism agents affected the structure of bacterial community, and so it can be used to determine the extent of fertilizer and guide fertilizer application. MA application promoted the growth of indigenous bacteria *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and *Bacillus*, but inhibited the growth of *Blastomonas*, uncultured *Rhizobium* and *Cyanobacterium* in the soil. Of the two fertilization methods used, root-application showed a greater influence on soil bacteria, fungi and actinomycetes than foliar spray. The optimum rate of MA application was 20.0 mL/ha for root application and 26.7 mL/ha for foliar spray.

Key words: Tibetan barley; microorganism agent; PCR-DGGE; microbial diversity; soil

