

# 不同连作年限野生地黄根际土壤微生物群落多样性分析

黄伟民, 林文雄

(福建农林大学农业生态研究所)

**摘要:** 以野生地黄头茬土壤、野生地黄重茬土壤、野生状态地黄土壤以及对照土壤为研究对象, 通过磷脂脂肪酸法(PLFA)和末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术, 分析了不同连作年限野生地黄的根际微生物生物量和群落结构的变化。田间生长状况观察发现, 野生地黄连续种植导致植株矮小弱化、块根无法正常生长膨大且出现大量枯萎死亡现象, 而野生状态和头茬种植的野生地黄都能够正常生长, 且未出现病虫害症状。PLFA 分析结果表明, 不同处理情况下地黄根际土壤微生物群落结构存在明显差异, 具体表现为野生状态地黄土壤和头茬土壤菌群相对一致, 重茬与野生状态地黄、头茬地黄相比, 细菌/真菌比例下降。T-RFL 的进一步分析结果表明不同处理情况下地黄根际土壤细菌群落结构也存在一定差异, 比库分析发现, 野生状态地黄和头茬地黄土壤中变形菌门和厚壁菌门占据优势地位。野生状态地黄和头茬地黄根际富集大量 *Bacillus*, *Pseudomonas* 等有益生防菌, 而重茬地黄根际土壤大量滋生病原菌 *Clostridium*, *Flexibacter polymorphus*, *Clostridium ghoni*, 且不利于有益菌群和纤维素降解菌群的定植, qRT-PCR 绝对定量分析也验证了野生状态地黄土壤和头茬土壤中的假单胞菌数量都显著高于重茬土壤。总之, 野生地黄连作同样存在连作障碍问题, 而且连作导致野生地黄根际有益菌数量减少而病原菌大量滋生, 从而降低了野生地黄抵御病害的能力, 导致重茬野生地黄生长发育不良, 产量大幅削减。

**关键词:** 地黄; 磷脂脂肪酸; 末端限制性片段长度多态性; 微生物多样性; 植物根际称  
**中图分类号:** Q946

## Microflora diversity analysis of *R. rehmannia* rhizospheric soil in different monoculture years

HUANG Weimin, LIN Wenxiong

(Institute of agricultural ecology of Fujian Agriculture and Forestry University)

**Abstract:** The rhizospheric soils sampled from the four different plots, including the newly planted, the two-year monoculture, the wild *R. glutinosa* and the control, were used to study the biomass and shifts of soil microflora by PLFA and T-RFLP analysis. It was observed that the wild *R. glutinosa* under continuous monoculture were small and weakening, unable normal growth, withered and ultimately died, while the wild *R. glutinosa* and newly planted were able to grow normally and no plant diseases and insect pests appeared. PLFA analysis indicated that the microbial community structure was significantly different among the wild *R. glutinosa* rhizospheric soils with different years of monoculture. There was relative consistency between wild *R. glutinosa* rhizospheric soil and new planted wild *R. glutinosa* soil. Compared with *R. glutinosa* rhizospheric and new planted soil, The ratio of bacteria/fungus in two-year monoculture soil declined. Furthered analysis by T-RFLP suggested that there were some difference in bacterial community structure of *R. glutinosa* rhizospheric soils. It was found that the bacteria belong to Proteobacteria and Firmicutes were predominant in the wild and newly planted *R. glutinosa* soils. Some beneficial biocontrol bacteria (such as *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc) gathered in the rhizosphere of wild and newly planted *R. glutinosa*, however a large number of pathogenic

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB126309)、国家自然科学基金联合基金项目(U1205021)和国家自然科学基金项目(81303170)资助

**作者简介:** 黄伟民 (1988-), 男, 研究生, 主要研究方向: 植物生理与分子生态学

**通信联系人:** 林文雄 (1957-), 男, 博士, 教授, 主要研究方向: 植物生理与分子生态学. E-mail: wenxiong181@163.com

bacteria bred in the rhizospheric soil of the two-year monoculture *R. glutinosa*, such as *Clostridium*, *Flexibacter polymorphus*, *Clostridium ghoni*, etc, and which went against the colonization of beneficial bacteria and cellulose degradation bacterium. For further study, qRT-PCR analysis verified that the total number of pseudomonads was much higher in wild and newly planted *R. glutinosa* soils than in two-year monoculture soil. In conclusion, wild *R. glutinosa* monoculture exists consecutive monoculture problem as well. And the pathogenic microbes bred seriously in the rhizospheric soil of wild *R. glutinosa* under the monoculture regime, and yet the number of beneficial bacteria declined, which weakened the ability of wild *R. glutinosa* to resist the disease so that the two-year wild *R. glutinosa* grew abnormally and the yield decreased drastically.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa*; PLFA; T-RFLP; Microbial diversity; plant rhizosphere

## 0 引言

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)是一种重要的常用传统补益中药,始载于《神农本草经》,其块根经各种炮制过程后即可入药,具有多种功效,如滋阴补血、清热生津、益精填髓等,是我国常用的大宗药材之一。但是,地黄在栽培过程中存在明显的连作障碍问题,造成产量品质严重下降,甚至绝收,每茬种植后需隔 8-10 年后方可再种<sup>[1]</sup>,这都严重限制了中药资源的可持续生产以及地黄产区区域经济的快速发展。

微生物与土壤生态功能是相辅相成、息息相关的,并且跟植物之间有着紧密的联系,因此,微生物群落的组成及其多样性是衡量土壤性质和功能的一个重要指标。连作障碍形成及加重的原因是极其复杂,根际作为根系、土壤界面的一个微环境,是根系-土壤-微生物三者紧密结合、相互交流的场所<sup>[2]</sup>。植物可以通过根系分泌某些化合物来特定吸引一些微生物类群,也能选择性抑制某些微生物类群<sup>[3]</sup>。反之,微生物类群的数量和多样性发生改变,也会影响土壤微生态的功能<sup>[4]</sup>。王明道等<sup>[5]</sup>运用变性梯度凝胶电泳和传统的平板培养法检测了地黄连作过程中不同连作年限的土壤微生物类群的变化。Van Bruggen 等<sup>[6]</sup>研究发现根际微生物的分布状态与沿根尖的分泌物含量有密切关系,微生物生物量的积累在一定程度上依赖于根系分泌物的释放。因此,了解和分析土壤微生物群落结构及其多样性和动态性等信息,对深入系统地揭示植物连作障碍产生的机理具有重要的意义。

众所周知,传统的微生物培养方法已受到严重的制约,不仅是由于自然界中可培养的微生物只有约 0.01%~10%,而且通过分离得到的微生物不能准确的反应自然环境中此物种的原位信息,因此,通过分子生物学的一些技术来研究土壤微生物的群落和功能多样性就成为了一种必然的趋势。近年来,随着生物学的发展,学科间的联系越来越紧密,因此出现了许多专门用于土壤微生物群落结构分析的研究技术,如限制性片段长度多态性(RFLP)、磷脂脂肪酸(PLFA)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术等<sup>[7]</sup>。目前,T-RFLP 技术在分析比较不同土壤样品中微生物群落的多样性以及探讨不同土壤微生物间的系统发育和亲缘关系方面发挥着重要作用<sup>[8-10]</sup>。分子生物学技术手段的兴起与发展,使得我们对土壤微生物多样性、微生物种群的结构与功能、微生物的系统发生和分类等诸多领域的研究都取得了长足的进步<sup>[11,12]</sup>。

本研究以野生地黄为研究对象,结合运用磷脂脂肪酸法(PLFA)和末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术分析和比较了不同连作年限的野生地黄及野生状态地黄根际微生物群落结构和多样性变化,以期深入揭示药用植物连作障碍形成的分子生态机制及探索合理有效的消减策略提供理论依据。

## 85 1 材料和方法

## 1.1 田间试验及取样方法

以野生品种“地黄”为试验材料, 试验在河南省郑州市河南农业大学试验农场和邻近郊区进行。本研究将野生地黄人工移栽至大田进行连续种植 2 年, 共设置以下四个试验: 野生地黄头茬土壤 (ZC)、野生地黄重茬土壤 (CC)、野生状态地黄土壤 (WR) 以及对照土壤 (CK, 空白土壤)。其中, 野生状态地黄土壤 (WR) 取样地点为河南农业大学试验农场旁的临近郊区, 土壤质地、气候等条件与田间试验基本相同。根际土壤采集方法具体见<sup>[13]</sup>。

## 1.2 土壤有机质及速效养分测定

土壤有机质及速效养分测定: ①有机质测定采用重铬酸钾氧化法②碱解氮的测定采用碱解扩散法③速效磷的测定采用 0.5M NaHCO<sub>3</sub> 浸提-钼锑抗比色法。④速效钾的测定采用 0.5M NH<sub>4</sub>OAC 浸提-火焰光度: ⑤pH 值用 PHS-3C 酸度计进行测定。

## 1.3 磷脂脂肪酸的提取、测定和分析

不同年限地黄根际土壤微生物量的测定采用磷脂脂肪酸 (PLFA) 法。其中磷脂脂肪酸提取方法为 KOH-甲醇溶液甲酯化法<sup>[14,15]</sup>, 以十九烷酸甲酯 (19:0) 为内标, 其浓度为 10 ug/ml。

在对微生物特征性脂肪酸的分析中, 细菌标记性脂肪酸 (如 15:0, 16:1w7c, a17:0, cy19:0 等)<sup>[16,17]</sup>; 真菌标记性脂肪酸 (18:3w, 18:2w6t 等特征脂肪酸)<sup>[18]</sup>; 放线菌标志脂肪酸 (10Me18:0)<sup>[19]</sup>; 原生动植物标记性脂肪酸 (20:4w6c(6,9,12,15)等)<sup>[20]</sup>。

## 1.4 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化

土壤微生物总 DNA 提取参照文献<sup>[21]</sup>稍作修改。

## 1.5 细菌基因组的 PCR 扩增及酶切

细菌 16s rRNA 特异片段采用细菌通用引物进行扩增, 引物为 8-27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492R (5'-TAC GGT ACC TTG TTA CGA CTT-3'), 其中 8-27 引物的 5'端用 FAM 进行荧光标记<sup>[22]</sup>。胶回收试剂盒 (TianGen Biotech Co., Ltd) 回收 PCR 产物, 800 μl 的 PCR 产物回收至 100 μl, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物用 HaeIII, MspI, RsaI, AluI 限制性内切酶进行酶切<sup>[23]</sup>。

## 110 1.6 PCR 产物测序及 T-RFs 分析

酶切产物脱盐后与上样缓冲液及标准 Marker (GeneScan-500, Applied Biosystems) 混合均匀, 96℃ 变性 4min, 迅速置于冰上, 然后在 ABI 自动测序分析仪 (model 3130 Applied Biosystems) 上进行毛细管电泳检测。

测序结果采用 GeneMarker V1.2 进行图谱分析, 进一步, 将四个限制性内切酶 (MspI、HaeIII、AfaI 和 AluI) 酶切产生的 T-RF 片段与 RDP 数据库 (Ribosomal Database Project II, <http://wdcm.nig.ac.jp/RDP/trflp/#program>) 进行比对, 找出各样品中每个 T-RF 片段所对应的微生物种属。

## 1.7 假单胞菌 qRT-PCR 定量分析

假单胞菌 (*Pseudomonas*) 定量分析所用引物为 Ps-for (5'-GGTCTGAGAGGATG ATCAG T-3') 和 Ps-rev (5'-TTAGCTCCACCTCGCGGC-3')<sup>[24]</sup>。PCR 反应体系为: 12.5 μl 2×Taq mixture



(Sangon Biotech Co., Ltd), 引物各 1.0  $\mu\text{l}$ , 1.0  $\mu\text{l}$  模版 DNA, 加 9.5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 总体积为 25  $\mu\text{l}$ 。PCR 扩增程序为: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 61  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  扩增 1.5 min, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  再继续延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.8 数据分析

125 数据采用 Microsoft excel 2003 分析, 方差分析采用 DPS7.0 软件, 主成分分析 (Principal Component Analysis) 采用 SPSS11.0 软件。

## 2 结果

### 2.1 地黄田间生长情况比较

通过对头茬、重茬野生地黄以及野生状态地黄生长情况的观察和比较发现, 头茬野生地黄和重茬野生地黄在长势上存在显著差异, 头茬野生地黄长势旺盛, 地上部植株健壮、叶片宽大, 有利于植株获得较高的光合速率, 并且地下部块根能够正常生长膨大 (图 1A、图 1E-左侧), 与林子中野生状态地黄长势相近 (图 1C), 且无病害症状, 而相比之下, 重茬野生地黄植株矮小, 叶片小, 地下部块根无法伸长生长和膨大, 并且出现明显的枯萎死亡现象 (图 1B、图 1E-右侧), 而野生状态地黄地上部植株长势良好, 块根也能正常膨大 (图 1C、图 1D)。

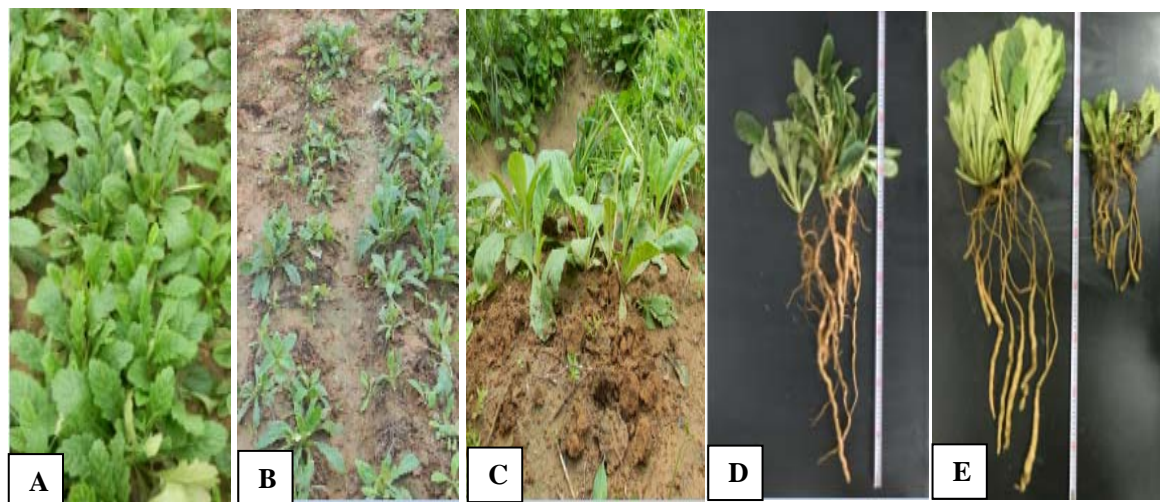


图 1 地黄田间生长情况. A: 正茬野生地黄; B: 重茬野生地黄; C: 野生状态地黄; D: 野生状态地黄地下部; E: 正茬、重茬野生地黄地下部。

140 Figure 1. The growth status of *R. glutinosa* in the field. A: the newly planted *R. glutinosa*; B: the two-year monocultured *R. glutinosa*; C: the wild *R. glutinosa*; D: the tuber roots of the wild *R. glutinosa*; E: the tuber roots of the newly planted and two-year monocultured *R. glutinosa*.

### 2.2 不同连作年限地黄根际土壤化学性质

145 从表 1 可以看出, 不同连作年限地黄根际土壤中速效养分存在显著性差异, 野生状态地黄根际土壤的速效养分均最低, 这可能与野生状态下未施肥以及周围其他植被共同吸收利用有关, 而重茬土壤样品中碱解氮、速效磷、速效钾的含量分别为 4.3493 mg/kg, 11.9510 mg/kg, 21.2820 mg/kg, 都显著高于头茬和野生状态地黄根际土壤, 初步推测地黄连作并未导致土壤速效养分下降, 反而出现积累效应。同时, 发现重茬野生地黄土壤的 pH 值显著低于头茬和野生状态地黄根际土壤。

表 1 不同连作年限地黄根际土壤化学性质比较

150 **Tab.1 The chemical properties of *R. glutinosa* rhizospheric soils with different years of monoculture**

样品Sample	pH值 PH value	碱解氮 (mg/kg) A available nitrogen	速效磷 (mg/kg) A available phosphorus	速效钾 (mg/kg) Available potassium	有机质(g/kg) Organic material
WR	8.2567±0.0145b	2.0533±0.1409c	1.3786±0.0596d	13.4019±0.0471c	7.2867±0.1220c
ZC	8.2300±0.0058b	3.8080±0.2750b	4.0056±0.0469c	18.1379±0.0817b	12.8067±0.0754a
CC	8.0933±0.0088c	4.3493±0.1967ab	11.9510±0.0982a	21.2820±0.4714a	11.2000±0.0907b
CK	8.3233±0.0203a	5.4133±0.4445a	5.5923±0.0225b	12.0954±0.2625d	12.4400±0.0723a

备注: CK表示对照土; ZC表示头茬土壤; WR表示野生土壤; CC表示重茬土壤。同一列不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

Note: CK represents the control soil; ZC represents the newly planted soil; WR represents the wild *R. glutinosa* soil; CC represents the two-year monoculture soil. Different letters within the same columns represents significant difference at 0.05 level.

### 2.3 不同连作年限地黄根际土壤微生物磷脂脂肪酸含量及微生物量变化

经 GC-MS 测定, 共鉴定出 19 种微生物标记性脂肪酸。野生状态地黄、头茬地黄、重茬地黄根际土壤以及空白对照土壤的微生物量分别为 62.255 nmol/g、54.848 nmol/g、48.398 nmol/g、51.566 nmol/g (表 2), 可见, 在连作情况下, 重茬地黄根际土壤总微生物量与头茬相比有所下降。

比较四种土壤中磷脂脂肪酸含量发现 (表 2), 野生地黄的真菌和细菌的含量都较高, 这可能与野外生态系统植被的较为丰富相关, 微生物群落达到一个相对的平衡。通过头茬与重茬的比较发现, 重茬微生物群落中细菌的含量在下降, 而真菌的含量却是上升, 即细菌/真菌比例下降, 这可能由于单一连作导致地黄根际土壤总微生物量降低, 进一步改变其根际土壤微生物群落的分布, 使得根际土壤微生物类型从“细菌型”向“真菌型”的定向转变。

表 2 估算不同连作年限地黄根际土壤微生物量(nmol/g)

Table 2 The microbial biomass in *R. glutinosa* soils with different years of monoculture(nmol/g)

微生物类型 (Microbial group)	WR	ZC	CC	CK
细菌 (Bacterial)	53.599±0.918a	50.143±0.589b	41.706±0.666d	45.971±0.277c
真菌 (Fungi)	6.308±0.034a	2.986±0.038d	4.349±0.086b	3.277±0.031c
细菌/真菌比例 Bacteria/Fungi ratio	8.496±0.101d	16.797±0.150a	9.593±0.054c	14.027±0.068b
放线菌 (Actinomycetes)	1.580±0.045b	1.720±0.045ab	1.769±0.076ab	1.868±0.027a
原生生物 (Protozoa)	0.767±0.044a	0.000±0.000c	0.573±0.023b	0.448±0.025b
标记性PLFA总量 PLFA biomarker contents	62.255±0.940a	54.848±0.663b	48.398±0.783c	51.566±0.333c

备注: CK表示对照土; ZC表示头茬土壤; WR表示野生土壤; CC表示重茬土壤。同一列不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

Note: CK represents the control soil; ZC represents the newly planted soil; WR represents the wild *R. glutinosa* soil; CC represents the two-year monoculture soil. Different letters within the same columns represent significant difference at 0.05 level.

### 2.4 不同连作年限地黄根际土壤细菌群落多样性的变化

#### 2.4.1 不同连作年限地黄根际土壤微生物 DNA 提取及 PCR 扩增

由图 2(左)可以看出, CTAB 法提取的土壤总 DNA 条带较为清晰, 纯度较高。以 Universal DNA Purification Kit 胶回收试剂盒 (天根, 北京) 回收后的 DNA 作为模板进行细菌 16s rRNA PCR 扩增, 回收后, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测, 发现扩增后的 PCR 产物大小在 1500 bp 左右, 且片段特异性良好 (右图)。

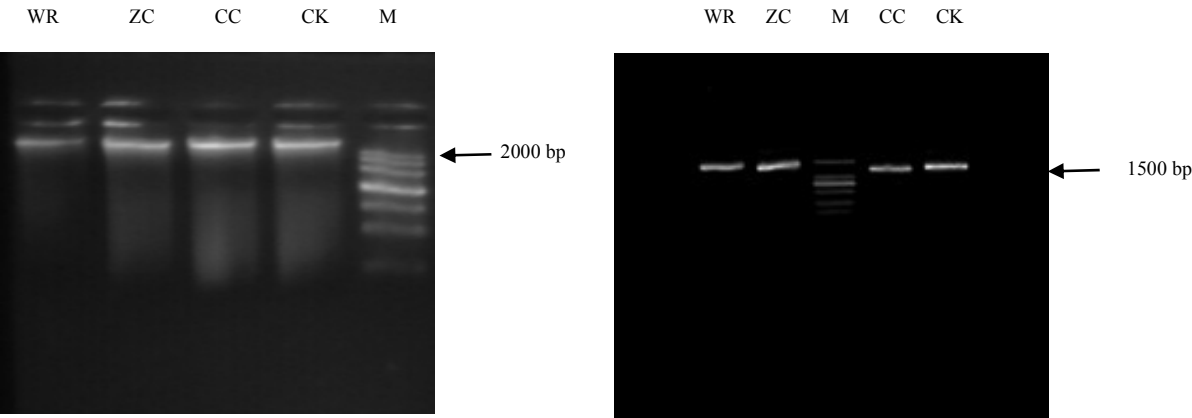


图 2 地黄根际土壤微生物总 DNA 及 16s rRNA 扩增产物  
Fig.2 The electrophoresis results of soil DNA (up-left) and the PCR products of 16s rRNA (up-right)

2.4.2 不同连作年限地黄根际土壤细菌 T-RFLP 图谱分析

将土壤 DNA 扩增后的 16s rRNA 产物经四种限制性内切酶 (MspI、HaeIII、AfaI 和 AluI) 酶切后, 在野生状态地黄土壤中分别检测到 T-RF 片段 155 个、141 个、80 个、140 个; 在地黄头茬土壤中分别检测到 T-RF 片段 137 个、128 个、152 个、109 个; 在地黄重茬土壤分别检测到 T-RF 片段 114 个、122 个、144 个、129 个; 在对照土壤分别检测到 T-RF 片段 127 个、123 个、86 个、165 个。可见, 不同连作年限的地黄根际土壤中细菌群落结构存在一定差异。

2.4.3 不同连作年限地黄根际土壤细菌群落结构分析

根据 MspI 酶切片段的相对含量, 对不同连作年限地黄根际土壤细菌群落结构进行主成分分析 (图 3): 主成分 1、主成分 2、主成分 3 分别解释变量方差的 42.39%、32.22%、25.37%, 三者共解释了变量方差的 100%。从图中可以清楚的看到, 在 A、B 两图中四个样品分别位于不同的象限中, 因此, 主成份 1、主成份 2、主成份 3 能够有效区分不同连作年限地黄根际土壤的细菌群落。由图 3 可见, 四个样品中, 野生地黄和头茬地黄均处于主成份 1 的正半轴, 说明野生地黄和头茬的细菌群落结构较为接近, 重茬与其他三个样相比, 区别较为明显, 处于主成分 1 负半轴的远端, 说明在地黄连作明显改变了根际土壤细菌的群落结构。

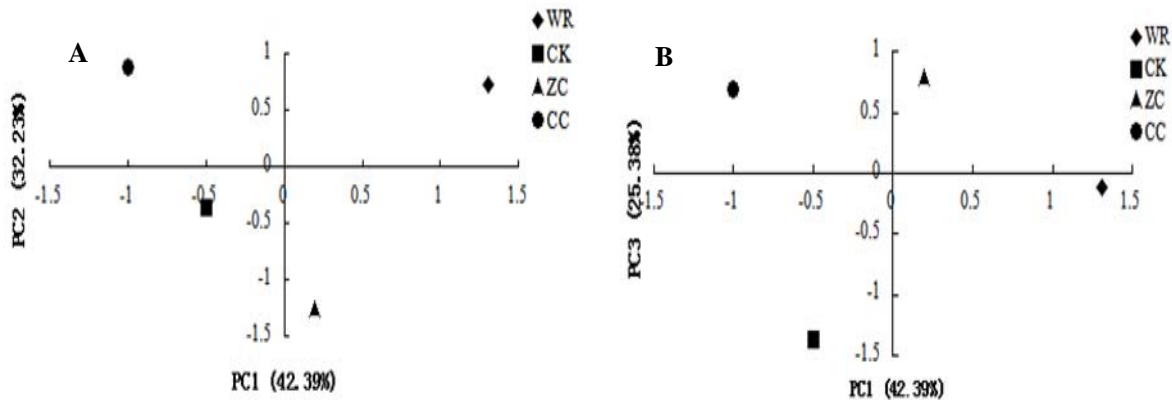


图 3 不同连作年限地黄根际土壤细菌群落结构的主成分分析  
Fig.3 Principal component analysis of rhizospheric bacterial community in *R. glutinosa* rhizospheric soils with the different years of monoculture

通过对不同连作年限地黄根际微生物进行门纲分类分析后发现,变形菌门的细菌种类在野生地黄和头茬地黄根际土壤中所占比例分别为 25.08%和 25.42%, 均高于重茬地黄的 18.16%, 厚壁菌门在野生地黄 (12.54%) 和头茬地黄 (12.71%) 中所占的比例也大于重茬 9.19%。然而,放线菌门在野生地黄、头茬地黄、重茬地黄根际土壤中的比例分别为 9.48%、16.27%、19.34%, 即成逐渐递增的趋势。

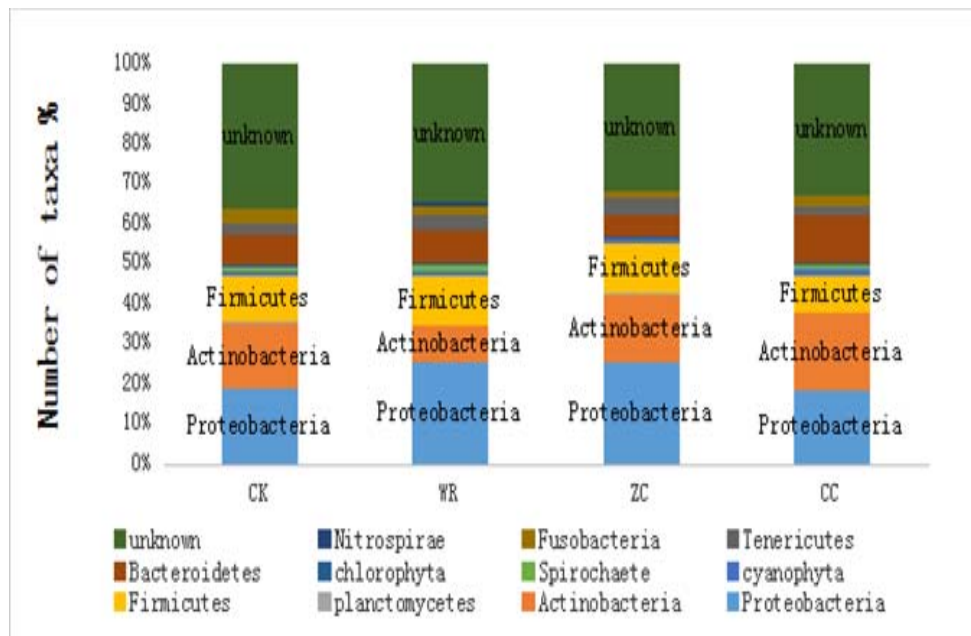


图.4 不同连作年限地黄根际土壤细菌群落结构的数量分析

Fig.4 Number analysis of rhizospheric bacterial community in *R. glutinosa* rhizospheric soils with different years of monoculture

#### 2.4.4 不同连作年限地黄根际土壤细菌群落的功能分析

将四种限制性内切酶酶切产生的 T-RF 片段与 RDP 数据库进行比对, 并对各处理的优势菌群 (即相应的 T-RF 片段相对丰度大于 1%) 进行功能归类分析 (如表 3), 共分为 5 大类: 碳循环、硫循环、纤维降解菌、有益菌以及病原菌。其中, 碳循环功能菌有 2 种: 内酯拟杆菌、醋杆菌属; 硫循环相关菌有 2 种: 热氧化硫化杆菌、硫化杆菌属; 纤维降解菌有 2 种: 均为噬纤维菌属。对这 3 大功能菌群相对含量进行分析发现, 整体来看, 多数碳循环、硫循环或纤维素降解相关的细菌菌群, 在野生地黄和头茬地黄土壤样品中的相对含量都明显高于重茬土壤。可见, 地黄连作导致一些参与土壤营养循环的微生物数量下降。有益菌有 3 种: 芽孢杆菌属、马阔里类芽孢杆菌、假单胞菌属。其中芽孢杆菌属在野生地黄、头茬地黄、重茬地黄、对照土壤中的相对含量分别为 4.56%、4.89%、1.17%、1.62%; 假单胞菌属在野生地黄、头茬地黄、重茬地黄、对照土壤中的相对含量分别为 1.03%、1.13%、0.00%、0.00%。病原菌主要有 3 种: 梭菌属、多形屈挠杆菌、戈氏梭菌。其中梭菌属在野生地黄、头茬地黄、重茬地黄、对照土壤中的相对含量分别为 0.79%、0.76%、2.00%、0.42%; 多形屈挠杆菌在野生地黄、头茬地黄、重茬地黄、对照土壤中的相对含量分别为 1.57%、1.71%、2.92%、1.64%; 戈氏梭菌在野生地黄、头茬地黄、重茬地黄、对照土壤中的相对含量分别为 0.67%、0.94%、1.94%、1.17%。几类有益菌含量变化都呈现重茬地黄土壤低于野生地黄、头茬地黄土壤的变化趋势, 而几类潜在病原菌的含量变化都呈现出重茬地黄土壤高于野生状态地黄、头茬地黄土壤的变化趋势。由此可见, 地黄连作有助于病原微生物的大量滋生, 并且不利于



一些根际有益菌群的生长，比如芽孢杆菌属、马阔里类芽孢杆菌、假单胞菌属等，它们在重茬地黄土壤中的相对含量明显降低。

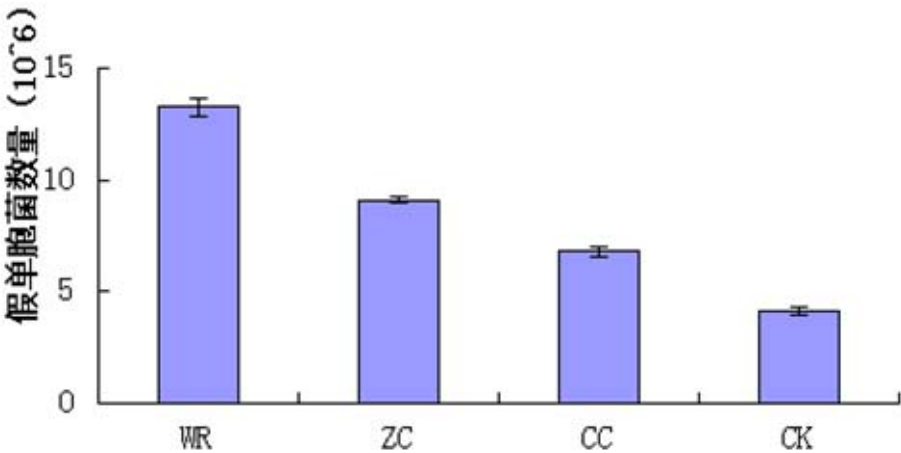
表 3 不同连作年限地黄土壤 T-RFs 相对含量分析

Table.3 The T-RFs relative contents analysis of *R. glutinosa* rhizospheric soils with different years of monoculture

分类	片段	种名/属名	样品名称				
			WR	ZZ	CC	CK	
碳循环	93	<i>Bacteroides splanchnicus</i>	内脏拟杆菌	0.48%	0.60%	1.16%	0.77%
	441	<i>Acetobacter</i>	醋杆菌属	0.88%	0.58%	0.00%	0.00%
硫循环	160	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	热氧化硫化杆菌	4.47%	2.72%	1.28%	2.27%
	473	<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	硫化杆菌属	0.41%	0.43%	1.06%	0.00%
纤维降解	91	<i>Cytophaga</i>	噬纤维菌属	2.00%	2.11%	1.75%	1.64%
	143	<i>Cytophaga</i>	噬纤维菌属	4.56%	4.89%	1.17%	1.62%
	143	<i>Bacillus</i>	芽孢杆菌属	4.56%	4.89%	1.17%	1.62%
有益菌	152	<i>Paenibacillus macquariensis</i>	马阔里类芽孢杆菌	2.79%	2.51%	0.66%	3.38%
	490	<i>Pseudomonas</i>	假单胞菌属	1.03%	1.13%	0.00%	0.00%
病原菌	64	<i>Clostridium</i>	梭菌属	0.79%	0.76%	2.00%	0.42%
	91	<i>Flexibacter polymorphus</i>	多形屈挠杆菌	1.57%	1.71%	2.92%	1.64%
	459	<i>Clostridium ghoni</i>	戈氏梭菌	0.67%	0.94%	1.94%	1.17%

230     2.4.5     不同连作年限地黄根际土壤假单胞菌的荧光定量

基于 T-RFLP 的分析结果，锁定了一类潜在的有益菌群即假单胞菌，本研究进一步采用 qRT-PCR 技术不同连作年限地黄根际土壤中的假单胞菌含量进行绝对定量分析，发现野生状态地黄和头茬地黄根际土壤中假单胞菌含量显著高于重茬土壤，这与 T-RFLP 分析结果相一致，验证了 T-RFLP 结果的准确性。



235

图 5 不同连作年限地黄根际土壤假单胞菌属荧光定量  
Figure.5 RT-PCR of pseudomonas of *R. glutinosa* rhizospheric soils with the different years of monoculture



### 3 讨论

植物连作障碍形成及加重的原因是极其复杂,涉及土壤、植物、微生物等多个方面,一些研究表明土壤理化性状的改变和土壤肥力缺乏是导致作物连作障碍的主要原因<sup>[25]</sup>。而本研究通过对不同处理下地黄根际土壤理化性质和肥力测定发现,重茬土壤样品中碱解氮、速效磷、速效钾的含量都显著高于头茬和野生状态地黄根际土壤,这表明土壤肥力缺失,质地变差并不是导致地黄产质量变劣的主要因素。王茂胜<sup>[26]</sup>等研究发现,随着种植年限的增加,植烟的品质和产量随之下降,而土壤中全氮、全磷、有机质的含量逐渐增加。郭红伟<sup>[27]</sup>等发现辣椒连作下,其全氮、全钾和速效养分都有不同程度的积累。鉴于此,本研究进一步采用 PLFA 和 T-RFLP 两种技术深入分析不同连作年限野生地黄以及野生状态地黄根际土壤微生物群落结构的变化。

PLFA 法分析地黄根际土壤微生物量结果表明,在连作情况下,重茬地黄根际土壤总微生物量与头茬相比有所下降,并且细菌/真菌比例下降,且头茬地黄根际土壤较重茬有较高的微生物多样性。在 T-RFLP 结果确实发现病原菌(梭菌属、多形屈挠杆菌、戈氏梭菌)在重茬地黄根际土壤中大量滋生,本研究认为,不同处理情况下,地黄根际土壤微生物群落结构存在较大差异与地黄根系分泌物有着较大关系,有报道称,植物生长会导致根际微生物组成快速变化,特别是由于根脱落的差异和根渗出物能够导致土壤病原体更易感染植物<sup>[28]</sup>,与本研究结果相一致。另一方面,野生地黄、头茬地黄根际土壤聚集了大量有益菌群,如芽孢杆菌属(*Bacillus*),马阔里类芽孢杆菌(*Paenibacillus macquariensis*),假单胞菌属(*Pseudomonas*)等。芽孢杆菌属和假单胞菌属作为 PGPR 菌株(植物根际促生菌)已被运用到农业作物生产中生物产质量的提高和生产中病害的防治<sup>[29]</sup>。大量报道称 *Pseudomonas* 可以作为一种重要的生物防治菌属,具有潜在的生物防治,抑制土传植物病害的能力<sup>[30,31]</sup>。进一步, qRT-PCR 绝对定量分析也验证了在野生状态地黄和头茬地黄根际土壤中假单胞菌的数量显著高于重茬土壤。如今,生物防治已经被认为是一种具有较大的潜力用于替代化学药物治理土传病害的方法<sup>[9]</sup>。Jetiyanon 等<sup>[32]</sup>报道通过混合使用 PGPR 菌株能够系统性诱导植物对病害产生较强的抗性。Fernando 和 Pierson 共同研究也表明了假单胞菌所产生的吩嗪类物质(phenazine)能够增加其在土壤微生物群落中的竞争力<sup>[33]</sup>。*Cytophaga* 在野生地黄、头茬地黄根际土壤中占具优势的地位, *Cytophaga* 在对植物根系分泌物、纤维素、土壤有机质的物质的降解方面有着重要作用<sup>[34]</sup>,其含量的降低势必会破坏土壤的微环境的营养循环。重茬地黄根际土壤中纤维素降解菌的含量下降势必会影响土壤微生态环境的营养循环,从而降低了地黄抵御病害的能力,最终导致地黄产质量下降。

与传统的分离培养方法相比,新兴的分子生物学技术能够更加准确全面地反映微生物群落结构的组成。在本次研究中以组合 PLFA 法和 T-RFLP 法分析不同年限地黄根际土壤微生物群落结构的变化,能够得到更为准确的结果,因此,采用不同方法的组合用来研究微生物的变化具有一定的研究意义。

### 4 结论

该研究发现野生地黄在连作情况下仍然长势较差,且初步证实了这与其根际土壤总微生物量下降,细菌/真菌比例降低具有一定的相关性。采用分子技术进一步明确了野生地黄连作对其根际土壤细菌群落结构的组成及分布有着很大影响,有益菌数量较少,病原菌大量滋生,而野生地黄土壤和头茬地黄土壤中却聚集较多的有益生防菌,以假单胞菌属,芽孢杆

菌属最为显著,且对不同栽培情况下野生地黄根际土壤假单胞菌属数量进行了绝对定量,变化趋势显著。这一发现从某种程度上揭示了地黄根际土壤有益生防菌的研究价值,为下一步研究提供了更为明确的方向。

### [参考文献] (References)

- [1] 张重义, 林文雄. 药用植物的化感自毒作用与连作障碍 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 189-196.
- [2] Butler J L, Williams M A, Bottomley P J, Myrold D D. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(05): 6793-6800.
- [3] Doornbos R F, van Loon L C, Bakker P A H M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review [J]. Agronomy for Sustainable Development, 2012, (32): 227-243.
- [4] Margaret M. Rhizosphere allelopathy [J]. Allelopathy Journal, 2007, 19(1): 75-84.
- [5] 王明道, 吴宗伟, 原增艳, 陈红歌, 吴坤, 贾新成. 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.
- [6] Van Bruggen A H C, Semenov A M, Zelenev V V. Wavelike distributions of microbial populations along an artificial root moving through soil [J]. Microbial Ecology, 2000, 40: 250-259.
- [7] Ammm R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 143-169.
- [8] 任南琪, 赵阳国, 高崇洋, 王爱杰. TRFLP 在微生物群落结构与动态分析中的应用 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(4): 552-556.
- [9] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis Appl [J]. Environ Microbiol, 2000, 66: 2943-2950.
- [10] Kitts C L. Terminal restriction fragment patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics Curr [J]. Issues Intest Microbiol, 2001, 2: 17-25.
- [11] Ogram A. Discussion soil molecular microbial ecology at age 20: Methodological challenges for the future [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32: 1499-1504.
- [12] Horton T R, Bruns T D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box [J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 1855-1871.
- [13] 迟杰, 杨瑞, 王爱丽. 湿地植物种类和生长方式对根际酚酸酯及其单酯代谢物分布特征的影响 [J]. 湖泊科学, 2012, 24: 416-421.
- [14] Christopher T G, Kate M S. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers [J]. Hydrogeology Journal, 2000, 8: 126-141.
- [15] 刘波, 胡桂萍, 郑雪芳, 张建福, 谢华安. 利用磷脂脂肪酸(PLFAs) 生物标记法分析水稻根际土壤微生物多样性 [J]. 中国水稻科学, 2010, 24 (3): 278-288.
- [16] Bã ã th E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA based techniques [J]. Soil Biol Biochem, 2003, 35: 955-963.
- [17] Ohansen A, Olsson S. Using phospholipid fatty acid technique to study short term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere [J]. Microb Ecol, 2005, 49: 272-281.
- [18] 齐鸿雁, 薛凯, 张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用 [J]. 生态学报, 2003, 23(8): 1577-1579.
- [19] Joergensen R G, Potthoff M. Microbial reaction in activity, biomass and community structure after long-term continuous mixing of a grassland soil [J]. Soil Biol Biochem, 2005, 37: 1249-1258.
- [20] 张秋芳, 刘波, 林营志, 史怀, 杨述省, 周先治. 土壤微生物群落磷脂脂肪酸 PLFA 生物标记多样性 [J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4127-4137.
- [21] Zhou J Z, Mary A B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [22] Sherlyn T, Chang G K, Tongmin S. T-RFLP analysis of structural changes in soil bacterial communities in response to metal and metalloid contamination and initial phytoremediation [J]. Applied Soil Ecology, 2012, 61: 137-146.
- [23] Wang M, Ahrne S, Antonsson M, Molin G. T-RFLP combined with principal component analysis and 16SrRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59: 53-69.
- [24] Tan Y, Ji G. Bacterial community structure and dominant bacteria in activated sludge from a 70 degrees C ultrasound enhanced anaerobic reactor for treating carbazole-containing wastewater [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(1): 174-180.
- [25] Freddy Aleman. Common bean response to tillage intensity and weed control strategies [J]. Cropping system. 2001, 93: 556-563.
- [26] 王茂胜, 姜超英, 潘文杰, 薛小平, 陈懿, 梁永江. 不同连作年限的植烟土壤理化性质与微生物群落动态研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 5033-5034.
- [27] 郭红伟, 郭世荣, 刘来, 孙锦, 黄保健. 辣椒连作对土壤理化性状、植株生理抗性及其离子吸收的影响 [J]. 土壤, 2012, 44(06): 1041-1047.
- [28] Andrew K, Karen H. Beard. Long-term plant growth legacies overwhelm short-term plant growth effects on

- 340 soil microbial community structure [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43: 823-830.
- [29] Bhatta charyya N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture [J]. World J Microbiol Biotechnol. 2012, 28: 1327-1350.
- [30] Viswanathan R, Samiyappan R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum* [J]. Crop Protection, 2002, 21: 1-10.
- 345 [31] Van Elsas J D, Garbeva P, Salles J. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens [J]. Biodegradation, 2002, 13: 29-40.
- [32] Jetiyanon, K., Kloepper, J W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases [J]. Biological Control, 2002, 24: 285-291.
- [33] Fernando W G D, Pierson L S. The effect of increased phenazine antibiotic production on the inhibition of economically important soil-borne plant pathogens by *Pseudomonas aureofaciens* [J]. Arch Phytopathol Plant Prot. 1999, 32: 491-502.
- 350 [34] Zhu Y T, Li H H, Zhou H, Chen G J, Liu W F. Cellulose and cellodextrin utilization by the celullolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 6432-6437.