

文亚雄,刘君昂,刘小平,等. 基于 PCR-DGGE 的间作油茶林土壤细菌多样性[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):57-60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.014

基于 PCR-DGGE 的间作油茶林土壤细菌多样性

文亚雄¹, 刘君昂¹, 刘小平², 周国英¹

(1. 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 湖南长沙 410004; 2. 江西星火农林科技发展有限公司, 江西宜春 336000)

摘要:土壤微生物多样性是评价土壤质量的重要指标,为探究林农间作对油茶林土壤微生物多样性的影响,采用 PCR-DGGE 方法研究了油茶林间作大豆、间作花生 2 种间作模式不同时期对油茶林土壤细菌多样性的影响。结果表明:间作处理各时期的土壤微生物种群相似性、微生物多样性指数均高于对照处理;间作处理微生物多样性指数保持在 3.2~3.4 之间;间作处理各时期土壤微生物均匀度指数为 0.960~0.982;各处理的微生物种群相似性、微生物多样性指数与季节变化相关。

关键词:油茶林;林农间作;土壤微生物;多样性

中图分类号: S154.38⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0057-03

林农间作是指将多年生木本植物通过空间或时间布局与农作物合理安排在同一土地经营单位内,使其中各组分在生态和经济上具有相互作用^[1]。研究表明,间作能显著提高土壤微生物的生物量^[2],改变土壤微生物群落结构,提高土壤微生物的群落结构多样性^[3-4],对土壤有机质的分解、腐殖质的形成、养分的转化与循环等过程^[5]也有促进作用。间作豆科植物还能通过生物固氮提高土壤氮素水平、增加产量^[6-7]。目前,关于林农间作的研究大多关于间作系统中的物理因素,如间作对林下小环境中光、热、水^[8-9]、土壤养分^[10]的影响,而关于间作体系中土壤微生物多样性的研究较少,对油茶林土壤微生物多样性的研究未见报道。油茶是世界四大木本油料植物之一,是我国特有的木本油料植物,广泛分布于我国南方地区^[11]。近年来,随着市场需求的发展及国家对油茶产业的支持,油茶逐渐成为我国南方地区的一种重要经济作物。通过对间作大豆、花生油茶林根区(距植物根系 0~20 cm)土壤微生物多样性进行对比研究,探讨间作大豆、花生对油茶根区土壤微生物多样性的影响,以期为提高油茶林间套作生产的经济效益提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于江西省宜春市袁州区西村镇(27°44′9.83″N, 114°11′24.32″E)油茶基地进行,该地属于中亚热带季风气候区,具有四季分明、热量丰富、降水充沛、日照充足、霜期短、气候资源丰富等特点,有利于农作物和林木生长。试验地的年均日照时数约为 1 737.1 h,年均气温为 16.2~17.7℃,年均

降水量约为 1 624.9 mm,日均温度≥10℃的活动积温为 5 050~5 644℃。试验地土壤为红壤,地力均匀,便于排灌。

试验处理包括间作花生、间作大豆、无处理对照。试验用油茶林为 4 年生油茶幼林,株行距为 2 m×3 m,长势良好。

处理 1:于造林后 1 年开始每年间种大豆,本研究中于 2014 年 4 月底间种,于同年 7 月收获,收获后将大豆苗覆于样地。处理 2:于造林后 1 年开始每年间种花生,本研究中于 2014 年 5 月间种,于同年 8 月收获,收获后将花生苗覆于样地。CK 处理:选取 1 块纯林样地作为无处理对照。

1.2 林间取样

本研究分别采集间作花生油茶林、间作大豆油茶林、对照纯林间作植物收获时及收获后的土壤样品,间作大豆、间作花生处理第 1 次采样时间分别为 7、8 月,收获后第 2 次采样时间分别为 8、10 月。每个处理在样地内以对角线法选取 5 株油茶,采集油茶根区(距油茶根系 0~20 cm)表层 0~20 cm 土壤样品,采集后混合。

将林间取得的土样放入冰盒保存,带回实验室后迅速过 2 mm 土筛,除去杂物。将过筛土样于 -20℃下保存,用于土壤微生物群落结构的研究。样品采集时间及编号见表 1。

表 1 样品采集时间及编号

编号	处理	采集时间	编号	处理	采集时间
1	间作大豆	2014 年 7 月	6	间作花生	2014 年 10 月
2	对照	2014 年 7 月	7	对照	2014 年 10 月
3	间作花生	2014 年 8 月	8	对照	2014 年 12 月
4	西村纯林	2014 年 8 月	9	间作花生	2014 年 12 月
5	间作大豆	2014 年 10 月	10	间作大豆	2014 年 12 月

1.3 土壤微生物多样性的 PCR-DGGE 分析

1.3.1 土壤微生物总 DNA 提取 采用 TIANamp Soil DNA Kit 土壤基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司),按照试剂盒说明书进行土壤微生物总 DNA 提取。

1.3.2 细菌 16S rDNA PCR 扩增 选用细菌通用引物 27f 与 1 492r,338f 与 518r 扩增细菌 16S rDNA V3 可变区,在 338f 5' 端加入 GC 发卡结构,引物序列为:GC338f(5'-CGCCGCGC-GCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGACGCGGGGCCTACGGC

收稿日期:2015-06-19

基金项目:国家公益性行业(林业)科研专项(编号:201304403);中南林业科技大学研究生科技创新基金(编号:CX2013B24)。

作者简介:文亚雄(1990—),男,湖南宁乡人,硕士研究生,主要从事林业微生物学研究。E-mail:564795454@qq.com。

通信作者:刘君昂,教授,博士生导师,主要从事森林健康经营研究。E-mail:522375325@qq.com。

AGGCAGCAG - 3'); 518r (5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3'); 27f (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'); 1492r (5' - TACGGCTACCTTGTACGACTT - 3')。引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。

PCR 扩增反应体系为 25 μ L: 1 μ L DNA 模板、10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L、2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 10.5 μ L。

采用巢式 PCR 扩增 DNA, 第 1 次扩增使用引物 27f、1492r 扩增 16S rDNA V3 区近全长片段, 第 2 次扩增使用引物 GC - 338f、518r。第 1 次 PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。第 2 次 PCR 采用 Touchdown PCR, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C (每个循环下降 0.5 $^{\circ}$ C) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 20 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 土壤微生物多样性的 DGGE 图谱分析 使用 Bio - Rad DCode Universal Mutation Detection System 电泳系统进行 DGGE 分析。采用浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度梯度为 45% ~ 65% (100% 变性浓度为 100 mL 聚丙烯酰胺凝胶中加入 40 mL 去离子甲酰胺与 42 g 尿素), 每孔加样为 25 μ L PCR 产物、5 μ L 6 \times loading buffer, 于 60 $^{\circ}$ C 恒温条件下在 1 \times TAE 缓冲液中 100 V 电泳 10 h。电泳完成后银染照相。

1.4 数据分析

采用 Quantity one 软件识别 PCR - DGGE 图谱中的泳道及条带, 得出量化图及相应数据, 进行数学未成对加权聚类分析 (UPGMA), 计算物种均匀度、Shannon - Wiener 多样性指数。Shannon - Wiener 指数 (H)、均匀度 (E) 的计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i; E = H / \ln S。$$

式中: P_i 为第 i 条条带的优势度, S 为样本的总条带数^[12]。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物琼脂糖电泳检测

所有样品最终 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果(图 1)显示, 该 PCR 方法能较好地扩增目标片段, 目标片段长度约为 200 bp, 无非特异性扩增及引物二聚体, 可用于后续 DGGE 分析。

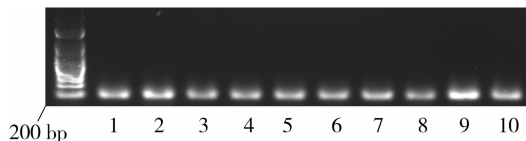
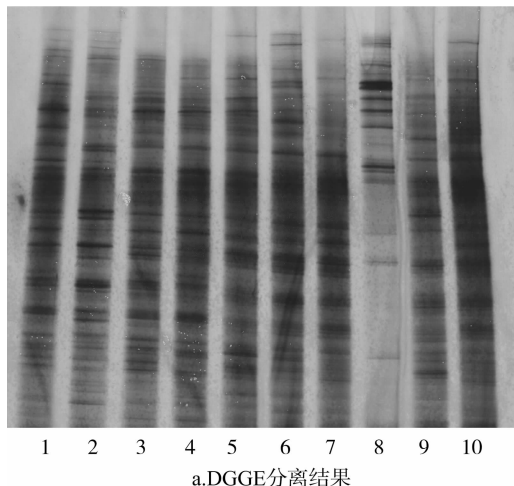


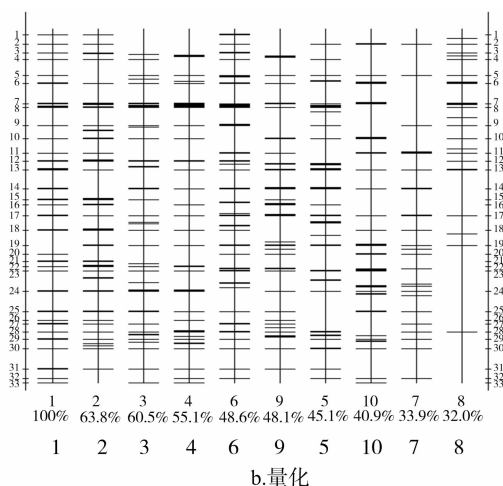
图1 PCR 产物琼脂糖电泳检测结果

2.2 DGGE 图谱分析

对不同间作模式油茶林土壤微生物的 16S rDNA V3 可变区进行 DGGE 图谱分析, 结果(图 2 - a)表明, 各 DGGE 泳道内条带被较好地分离, 不同间作模式土壤微生物 DNA 条带表现出不同的指纹图谱及灰度, 不同样品的细菌群落表现出一定差别。由 DGGE 结果量化图(图 2 - b)可知, 不同样本的条带分别与同批次样本间有较多相同, 表明相同样地内具有较多的共有微生物种群。该类微生物应是土壤中的常见微生物种群, 在土壤中的生长繁殖较为稳定, 但该类微生物 DNA 条带灰度不尽相同, 表明间作处理对土壤微生物的数量也有一定影响。间作处理的条带数量基本多于对照处理, 表明间作处理增加了土壤中微生物的种群数量。



a. DGGE 分离结果



b. 量化

图2 PCR所得间作处理土壤 16S rDNA 的 DGGE 分离结果及量化

2.3 DGGE 图谱聚类分析

以非加权算术平均法 (UPGMA) 对不同间作模式油茶林土壤细菌 DNA 的 DGGE 指纹图谱进行聚类分析。结果(图 3)表明, 季节变化对土壤微生物多样性的影响较大, 不同季节各处理间的相似性均低于 0.60, 相似性水平较低。间作花生与间作大豆处理的相似性较高, 第 1、2 次采样的相似性均为 0.48, 第 3 次采样的相似性为 0.39, 表明间作花生与间作大豆对土壤微生物多样性的影响具有一定相似性。在 3 个不

同采样时间之间, 间作处理的相似性均聚于 0.39, 高于对照处理间的相似性, 表明间作处理能提高土壤微生物种群的稳定性。

2.4 土壤微生物多样性指数分析

根据由 Quantity one 软件得出的不同条带光密度峰值, 运用 Shannon - Wiener 指数公式, 计算得出不同间作处理土壤微生物多样性指数。由图 4、图 5 可知, 间作处理的土壤微生物多样性指数基本高于对照处理, 其中间作花生处理第 1 次采样的多样性指数最高, 达 3.463; 各处理的多样性指数与季

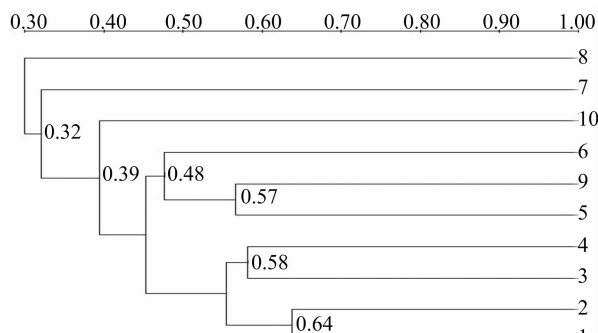


图3 间作豆科植物处理土壤微生物的相似性及UPGMA图

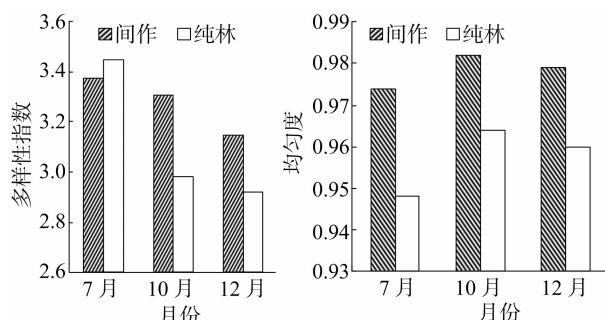


图4 间作大豆处理的土壤微生物多样性指数及均匀度

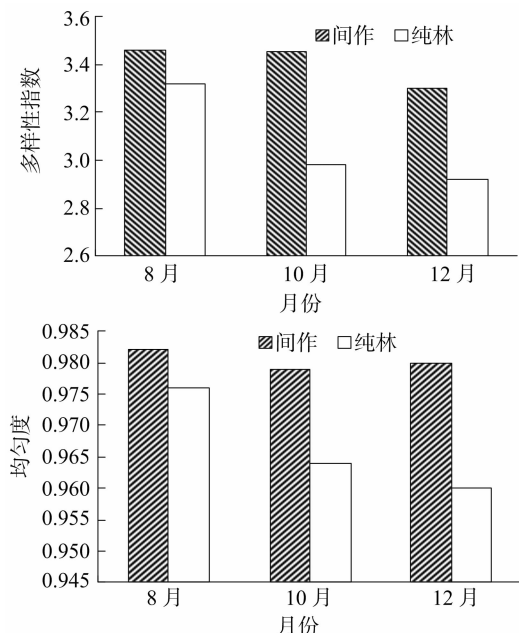


图5 间作花生处理的土壤微生物多样性指数及均匀度

节变化相关,由春季向冬季逐渐降低。间作处理第1次采样的多样性指数与对照处理相近,均处于3.3~3.5之间;间作处理第2、3次采样的多样性指数略有降低,但仍处于3.1以上,而对照处理下降较多,降至3.0以下,间作处理在后期对土壤微生物多样性的影响较大。间作处理的微生物群落均匀度变化较大,表明间作植物处理对油茶林土壤微生物群落结构的影响较大。间作花生处理各时期的多样性指数均高于间作大豆处理,表明间作花生对土壤微生物多样性的影响较大。

3 结论与讨论

土壤微生物是土壤生态系统的主要组成部分,对土壤肥

力、酶活性^[13]、土壤结构等有着重要影响。合理的间作可有效改善土壤微生态环境,提高土壤微生物的群落结构多样性,并对土壤理化性质产生影响。陈永忠等、王瑞等研究表明,间作能提高油茶林土壤养分及微生物数量^[14-15]。张向前等人在研究玉米与花生、大豆间作时发现,间作能显著提高土壤中的微生物数量,且微生物数量与土壤中酶活性呈显著正相关关系^[16]。本研究结果表明,不同间作处理均能提高土壤微生物种群多样性,对土壤微生物数量也有一定影响。

王玉娟等研究表明,稻草覆盖能有效调节土壤温度,具有高温季节降温、低温季节增温的效果,并能改善土壤理化性质^[17-18]。徐华勤等研究发现,稻草覆盖与间作三叶草处理均可提高土壤微生物的活性与丰富度^[19]。在本研究间作豆科植物处理中,豆科植物收获后将植物残体覆盖于林间土地,不仅起到了夏季降温、冬季保温的作用,且随着植物残体的分解,较多的有机质及营养元素流入土壤中,为微生物的生长繁殖提供了有利条件,使间作豆科植物处理的微生物种群相似性及微生物多样性指数始终保持在较高水平。另外,间作植物本身伸展的枝叶也覆盖了地面,可起到降温作用。

随着微生物多样性水平及种群数量的提高,油茶林土壤肥力也受到了影响。贾倩民等研究发现,细菌及放线菌数量与土壤有机质、全氮、全磷、速效氮、速效磷含量呈显著或极显著正相关,真菌数量与土壤全钾、速效磷、速效钾含量呈极显著正相关^[20]。邵英男等认为,N、P含量及土壤pH值与细菌和放线菌的数量呈显著正相关^[21]。本试验数据表明,间作花生并于花生收获后将花生秸秆覆盖于林下土地的林农复合经营模式,对调控油茶林土壤微生物多样性具有较为积极的作用,同时对油茶林土壤肥力具有较好的影响,可在一定程度上促进油茶幼林的生长。

参考文献:

- [1] 李隆. 间套作体系豆科作物固氮生态学原理与应用[M]. 北京:中国农业大学出版社,2013.
- [2] 柴强,黄鹏,黄高宝. 间作对根际土壤微生物和酶活性的影响研究[J]. 草业学报,2005,14(5):105-110.
- [3] 宋亚娜, Marschner P, 张福锁, 等. 小麦/蚕豆、玉米/蚕豆和小麦/玉米间作对根际细菌群落结构的影响[J]. 生态学报,2006,26(7):2268-2274.
- [4] 苏世鸣,任丽轩,霍振华,等. 西瓜与旱作水稻间作改善西瓜连作障碍及对土壤微生物区系的影响[J]. 中国农业科学,2008,41(3):704-712.
- [5] 章家恩,高爱霞,徐华勤,等. 玉米/花生间作对土壤微生物和土壤养分状况的影响[J]. 应用生态学报,2009,20(7):1597-1602.
- [6] 艾为党,李晓林,左元梅,等. 玉米、花生根间菌丝桥对氮传递的研究[J]. 作物学报,2000,26(4):473-481.
- [7] Li L, Zhang F S, Li X L, et al. Inter-specific facilitation of nutrient uptakes by intercropped maize and fiber bean[J]. Nutrient Cycling Agroecosystem,2003,65:61-71.
- [8] 张劲松,宋兆民,孟平,等. 银杏-小麦间作系统水热效应的研究[J]. 林业科学研究,2002(4):457-462.
- [9] Zhilong F, Qiang C, et al. Yield and water consumption characteristics of wheat/maize intercropping with red-uced tillage in an oasis region[J]. European Journal of Agronomy,2013,45(2):52-58.

蒲 鹏,谢晓东,白子彧,等. 禾谷类作物高效启动子分析专用载体 p14781pro-GUS 的构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):60-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.015

禾谷类作物高效启动子分析专用载体 p14781pro-GUS 的构建

蒲 鹏,谢晓东,白子彧,郭 雨,古同华,李 明,王俊斌,孙守钧,丁 博
(天津农学院农学与资源环境学院/天津-布里斯托环境变化对农作物影响研究中心,天津 300384)

摘要:启动子决定了基因的组织器官表达特异性及其在环境、内源激素作用下的诱导型表达,因此对启动子的分析有利于解析基因的表达模式及功能。对玉米 Ubiquitin 启动子控制的 *nptII* 抗性基因添加适宜的酶切位点,连接到 pGWB433 双元载体中,构建目标表达载体 p14781pro-GUS。该载体具有适于在禾谷类作物中筛选转基因植株的 Ubiquitin-nptII 组件、启动子高效克隆的 Gateway 组件,且整合进载体的启动子可控制报告基因 *GUS* 的表达,以确定启动子的转录调控模式,因而能够更加深入便捷地研究禾谷类作物重要性状相关基因的启动子,推动针对重要性状的分子遗传改良。

关键词:启动子;载体构建;p14781pro-GUS;GUS 蛋白;限制性内切酶

中图分类号: Q782 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0060-03

目前,应用于双子叶转基因体系中启动子分析的载体非常丰富,如 pGWB 系列载体,研究也已非常完备。而单子叶植物转基因体系的研究尽管已取得很好进展,但适于单子叶特别是禾谷类作物启动子研究的载体却非常有限。

在植物表达载体中广泛应用的启动子是组成型启动子,例如,绝大多数双子叶转基因植物均使用 CaMV 35S 启动子,

禾谷类转基因植物主要使用来自玉米的 Ubiquitin 启动子^[1]和来自水稻的 Actin I 启动子^[2]。在这些组成型表达启动子的控制下,外源基因可在转基因植物的所有部位和所有发育阶段表达^[3]。

Ubiquitin 启动子是一个在禾谷类作物中有较强表达的启动子,Ubiquitin 启动子来自玉米多聚泛素蛋白基因 (maize polyubi gene),它实际上包括 Ubiquitin 基因的启动子区、5'非翻译区和第一内含子。研究表明,Ubiquitin 启动子在禾谷类作物中能组成型过量表达,表达效率高于 35 S 启动子^[4]。

GUS 的基因 *gusA* (又称 *uidA*) 来自大肠杆菌菌株 K12。Novel 等研究并克隆了含有 *uidA* 基因的 DNA 片段,对其调控部分进行了分析^[5-7]。Jefferson 等进行了 *uidA* 基因的序列分析,该基因编码区长 1 809 bp,并由此发展了 *uidA* 基因作为一个基因融合标记,使其得到了更广泛的应用^[8]。该酶与 5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-葡萄糖苷酸环己胺盐 (X-

收稿日期:2015-09-18

基金项目:国家及天津市大学生创新创业训练计划(编号:201410061004、201410061066、201510061047);天津市高校创新团队培养计划(编号:TD12-5017);天津市千人计划项目“高粱抗性生理及遗传机理的研究”。

作者简介:蒲 鹏(1994—),男,甘肃陇南人,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:1414338588@qq.com。

通信作者:丁 博,硕士,实验师,主要从事作物遗传育种工作。E-mail:yuancircle@126.com。

[10] Yun L, Bi H X, Gao L B, et al. Soil moisture and soil nutrient content in walnut crop intercropping systems in the Loess Plateau of China[J]. Arid Land Research and management, 2012, 26(4): 260-266.

[11] 周国英,宋光桃,李 河. 油茶病虫害防治现状及应对措施[J]. 中南林业科技大学学报,2007(6):179-182.

[12] 刘石泉,胡治远,赵运林. 用 DGGE 法初步解析茯砖茶渥堆发酵过程中真菌群落的结构[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2014(5):494-500,505.

[13] 代金霞,赵 辉. 宁夏荒漠草原固沙植物群落土壤微生物数量及土壤酶活性研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(4):460-462.

[14] 陈永忠,王玉娟,王湘南,等. 间种对油茶林地土壤理化性质及幼林生长量的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2011(5):117-120.

[15] 王 瑞,陈永忠,王玉娟,等. 油茶林地不同间种处理土壤养分及生长量的主成分分析[J]. 中国农学通报,2011(4):30-35.

[16] 张向前,黄国勤,卞新民,等. 间作对玉米品质、产量及土壤微生物数量和酶活性的影响[J]. 生态学报,2012,32(22):7082-7090.

[17] 王玉娟,陈永忠,王 瑞,等. 覆草间种对油茶林土壤养分及生长量影响的主成分分析[J]. 中南林业科技大学学报,2010(6):43-49.

[18] 王玉娟,陈永忠,等. 稻草覆盖对油茶幼林林地土壤温度及新梢的影响[J]. 经济林研究,2009(2):49-52.

[19] 徐华勤,肖润林,宋同清,等. 稻草覆盖与间作三叶草对丘陵茶园土壤微生物群落功能的影响[J]. 生物多样性,2008(2):166-174.

[20] 贾倩民,陈彦云,杨 阳,等. 不同人工草地对干旱区弃耕地土壤理化性质及微生物数量的影响[J]. 水土保持学报,2014(1):178-182,220.

[21] 邵英男,刘延坤,孙清芳,等. 小兴安岭不同林型土壤微生物多样性及其与土壤理化特征关系研究[J]. 中国林副特产,2013(4):17-19.