

杨威, 闫海霞, 刘廷武, 等. 黄瓜和草菇轮作对后茬黄瓜根围细菌多样性及土壤酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 124-128. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.033

# 黄瓜和草菇轮作对后茬黄瓜根围细菌多样性及土壤酶活性的影响

杨威<sup>1</sup>, 闫海霞<sup>2</sup>, 刘廷武<sup>1</sup>, 李师默<sup>1</sup>, 张贝贝<sup>1</sup>, 罗玉明<sup>1</sup>

(1. 淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300;

2. 江苏省淮安市农业技术推广中心, 江苏淮安 223300)

**摘要:**根据本地区设施种植特点, 选择草菇黄瓜轮作及黄瓜单一种植模式, 利用变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, 简称 DGGE)分析轮作对后茬黄瓜根围细菌多样性的影响, 并检测 2 种植条件下黄瓜根围土壤主要土壤酶活性及土壤养分的变化情况。结果表明, 瓜菇轮作能够提高后茬黄瓜根围细菌的多样性, 通过测序比对发现假单胞属细菌为优势种群; 与黄瓜单一种植相比, 轮作条件下土壤酶活性及养分均明显提高, 脲酶活性在 3 个采样时间点分别提高了 21%、30%、23%, 磷酸酶活性分别提高了 22%、34%、55%, 蔗糖酶活性分别提高了 14%、8%、11%, 过氧化氢酶活性分别提高了 92%、141%、27%, 速效磷含量分别提高了 8%、4%、3%, 速效钾含量分别提高了 27%、10%、12%; 水解性氮及有机质含量均呈上升趋势。

**关键词:**黄瓜; 草菇; 轮作; DGGE; 根围细菌多样性; 土壤酶; 养分

**中图分类号:** S344.1<sup>+</sup>5; S436.421.1<sup>+</sup>3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0124-05

植物根围微生态号称植物的“第二基因组”, 有越来越多的研究证明植物根围微生态与植物本身的健康息息相关<sup>[1]</sup>。根据对寄主植物的影响可以把根围微生物分为 3 个主要类群, 即病原微生物、有益微生物以及占主要部分的其他既无害又无益的类群, 这些微生物在生存过程中会通过空间、养分等竞争作用相互影响, 从而影响寄主植物的健康。据报道, 相同的土壤中不同种类植物的根围微生态一般会有较大差别<sup>[2-3]</sup>, 但是相同的植物种类即使生长在不同的土壤中也会建立相同的核心根系微生态<sup>[4-5]</sup>, 说明植物能够主动塑造一个有利于其自身健康的根围微生态。根围微生态除了能够协助寄主植物抑制病害发生<sup>[6]</sup>, 还能够协助寄主吸收营养<sup>[7-8]</sup>, 以及通过增强抗性的方式<sup>[9]</sup>提高寄主对生物及非生物逆境的耐受性<sup>[10]</sup>, 从而最终提高植物的产量<sup>[11]</sup>。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是设施蔬菜生产中主要的栽培作物, 其栽培面积约占设施蔬菜栽培面积的 60%<sup>[12]</sup>。其中, 黄瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumebrium*)引起的重要黄瓜病害, 常年发病率为 10%~30%, 严重年份发病率可达 80%~90%。由于保护地的特殊环境条件和长期连作, 土壤中的病原菌量积累越来越多, 致使黄瓜枯萎病的发生逐年加重。目前, 主要采取嫁接、化学农药以及轮作的方式进行防治。其中, 通过轮作来重塑植物根围微生态从而保障植物健康, 已经得到了广泛的应

用, 特别是针对连作障碍发生严重的设施栽培效果显著<sup>[13-14]</sup>。但目前设施黄瓜的轮作对象主要为玉米<sup>[15]</sup>、叶菜类<sup>[16-17]</sup>、茄果类<sup>[18-19]</sup>等。在环洪泽湖农业种植区特别是淮阴地区普遍采用的是瓜菇轮作模式。通过与草菇进行轮作, 能够有效缓解黄瓜连作造成的土传病害, 且可以提高黄瓜的产量与品质。但目前对菇渣还田后生态效应的关注还不够, 不能从根围微生态角度解释瓜菇轮作在抑制黄瓜土传病害, 特别是枯萎病中的作用机制。

本研究旨在通过对比黄瓜单一种植与瓜菇轮作种植模式下, 黄瓜根围细菌多样性及主要土壤酶活性和土壤养分的变化, 揭示瓜菇轮作模式中菇渣还田后黄瓜根围微生态重置规律, 以期为该轮作模式提供理论依据, 以及为将来防治黄瓜枯萎病微生态制剂的开发提供基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验设计及土壤样品采集

试验地点设在江苏省淮安市丁集镇, 试验时间为 2012 年至 2015 年。选取 2 座黄瓜大棚, 间距 3 m。其中, 1 号大棚为 3 年连作种植黄瓜, 2 号大棚为 3 年瓜菇轮作种植。2015 年 10 月移栽黄瓜, 1、2、3 个月分别采集黄瓜根围土壤, 整个土壤采集过程采用三点取样法, 每座大棚选取 3 个间距 10 m 的采集点, 每点选取 3 株间距为 1 m 的黄瓜植株, 首先将黄瓜植株拔出, 轻轻抖动以去除黏附的大量土壤, 再利用毛刷轻轻刷下紧贴在黄瓜根部的根围土壤, 3 株黄瓜样品混合在一起, 装入塑封袋放在冰盒中带回实验室。轮作组样品分别标记为 T<sub>0-1</sub>、T<sub>0-2</sub>、T<sub>0-3</sub>、T<sub>1-1</sub>、T<sub>1-2</sub>、T<sub>1-3</sub>、T<sub>2-1</sub>、T<sub>2-2</sub>、T<sub>2-3</sub>, 单一种植组样品分别标记为 C<sub>0-1</sub>、C<sub>0-2</sub>、C<sub>0-3</sub>、C<sub>1-1</sub>、C<sub>1-2</sub>、C<sub>1-3</sub>、C<sub>2-1</sub>、C<sub>2-2</sub>、C<sub>2-3</sub>。样品前期处理后, 研磨过 2 mm 筛, 一部分用作土壤总 DNA 的提取、变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction -

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(15)1044]; 江苏省现代农业-研究开发示范类项目(编号: BE2015364)。

作者简介: 杨威(1983—), 男, 河北承德人, 博士, 副教授, 主要从事生物防治研究。E-mail: yangw107@gmail.com。

通信作者: 罗玉明, 教授, 主要从事设施连作障碍研究。Tel: (0517) 83525128; E-mail: yumingluo@163.com。

denaturing gradient gel electrophoresis, 简称 PCR - DGGE) 分析, 另一部分置于阴凉通风处自然干燥至恒质量, 用作土壤理化性质及酶活性检测。剩余的样品则置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 土壤样品 DNA 提取及 DGGE 分析

本研究利用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒(购自 MPbio, 美国)提取土壤样品的总 DNA, 提取方法参照试剂盒的试验说明。以样品基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 GC - 338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列。引物的详细信息如表 1 所示。

表 1 土壤样品 16S rDNA 扩增引物信息

引物名称	引物序列
518R	5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3'
GC - 338F	5' - CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGCGGGG - GCGCGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG - 3'

PCR 扩增体系 ( $50\text{ }\mu\text{L}$ ):  $5\text{ }\mu\text{L}$   $10\times$  PCR buffer,  $3.2\text{ }\mu\text{L}$   $2.5\text{ mmol/L}$  dNTP,  $0.4\text{ }\mu\text{L}$   $5\text{ U}/\mu\text{L}$  rTaq,  $1\text{ }\mu\text{L}$   $20\text{ }\mu\text{mol/L}$  GC - 338F,  $1\text{ }\mu\text{L}$   $20\text{ }\mu\text{mol/L}$  518R,  $50\text{ ng}$  模板 DNA, 用  $\text{ddH}_2\text{O}$  补至  $50\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性  $45\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ ,  $30$  个循环; 最终  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ 。PCR 产物采用 OMEGA 公司的 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。

DGGE 梯度胶根据 Heuer 等的方法<sup>[20]</sup>制备。DGGE 在 DCode 突变检测系统中完成。取  $25\text{ }\mu\text{L}$  PCR 浓缩产物进行 DGGE, DGGE 凝胶变性剂梯度为  $30\% \sim 60\%$ , 丙烯酰胺浓度为  $8\%$  ( $100\%$  浓度定义为  $7\text{ mol/L}$  尿素和  $40\%$  的去离子甲酰胺), 电泳液为  $1\times$  TAE, 电压为  $130\text{ V}$ ,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  下电泳  $7\text{ h}$ 。电泳后用硝酸银浸染  $10 \sim 15\text{ min}$ , 扫描并拍照。比对不同处理组和对照组之间的差异性条带, 切胶回收、测序比对。

测序结果采用 DNASTAR、Cluster 软件进行序列分析, 下载最相似的菌株序列作为系统发育树的参考序列。然后采用 MEGA 软件, 用邻接法 (neighbor - joining method, 简称 NJ 法) 构建系统发育树, 用自展法 (Bootstrap) 生成  $1000$  个自展数据集, 获得一致系统树。采用 CANOCO4.5 软件进行主成分分析。

细菌多样性指数是研究群落物种数、个体数及均匀度的综合指标。根据电泳图谱中样品条带数量及每个条带的强度 (灰度), 对各样品中细菌多样性指数、均匀度、丰富度等指标进行分析。DGGE 图谱采用 Quantity one 软件对每个样品的电泳条带数量、条带密度进行数字化分析, 香农 - 维纳指数、丰富度、均匀度等指标被用来比较不同样品的多样性情况。

### 1.3 土壤酶活性及理化性质测定

土壤酶活性测定包括脲酶、磷酸酶、蔗糖酶、过氧化氢酶活性的测定, 具体方法参照关松荫的方法<sup>[21]</sup>。土壤理化性质指标包括速效氮、速效磷、速效钾及有机质的含量, 具体测定方法参考鲁如坤的方法<sup>[22]</sup>。

试验数据用 Excel 处理后作图, 用 SPSS 16.0 软件对各处理之间的差异性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜根围细菌 DGGE 图谱分析

由表 2 可知, 瓜菇轮作处理相对于黄瓜单一种植组, 黄瓜根围微生物数量呈增加趋势。尤其是随着黄瓜生长期的延

长, 轮作组黄瓜根围微生物多样性相对于单一种植组增加更加明显。从香农 - 维纳指数来看, 单一种植组在 3 个时间点分别为  $2.88$ 、 $2.74$ 、 $2.79$ , 差异较小, 而轮作组在 3 个时间点的香农 - 维纳指数分别为  $2.84$ 、 $3.00$ 、 $3.01$ , 在黄瓜移栽 1 个月时, 瓜菇轮作组与单一种植组相当, 但是随着时间的变化, 该指数逐渐增加, 说明瓜菇轮作能够提高黄瓜根围微生物的多样性。从丰富度来看, 也能够得出与之一致的结论。单一种植组在 3 个时间点的丰富度指数分别为  $20.00$ 、 $18.33$ 、 $18.67$ , 即随着种植时间的延长, 黄瓜根围微生物种类呈下降的趋势; 而轮作组则呈现相反的趋势, 3 个时间点的丰富度指数分别为  $19.67$ 、 $23.67$ 、 $23.00$ , 即随着种植时间的延长, 黄瓜根围微生物种类呈上升趋势。总体来看, 根围微生物种类在第 1 个月变化较大, 而在第 2 和第 3 个月变化不明显。

表 2 基于 DGGE 图谱的土壤样品微生物多样性分析结果

采样时间	编号	香农 - 维纳指数	均匀度	丰富度
黄瓜移栽 1 个月后	$C_0$	2.88	0.97	20.00
	$T_0$	2.84	0.96	19.67
黄瓜移栽 2 个月后	$C_1$	2.74	0.96	18.33
	$T_1$	3.00	0.96	23.67
黄瓜移栽 3 个月后	$C_2$	2.79	0.95	18.67
	$T_2$	3.01	0.96	23.00

### 2.2 DGGE 图谱的主成分分析

为了使 DGGE 的结果更加直观, 本研究中将 DGGE 图谱分析结果进行量化, 根据其灰度进行主成分分析。由图 1 可知, 在黄瓜移栽后短时间内, 轮作组和单一种植组黄瓜根围微生物多样性差异不明显, 但是随着种植时间的延长, 两组之间逐渐出现差异, 说明通过与草菇进行轮作能够改变黄瓜根围微生物的组成与密度, 通过这种改变重新塑造一个有利于寄主植物健康的根围微生态。

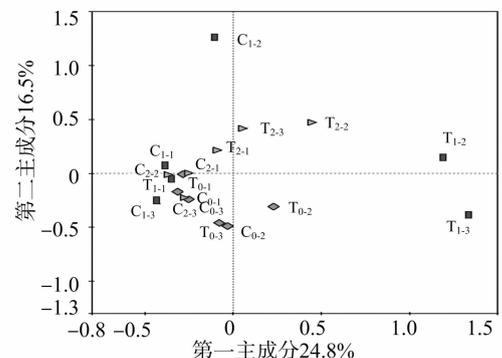


图 1 基于 DGGE 图谱的土壤样品微生物多样性主成分分析结果

### 2.3 DGGE 测序条带的系统发育树构建

为明确瓜菇轮作对黄瓜根围微生物种类的影响, 对 DGGE 图谱中差异条带进行切胶测序比对。由图 2 可知, 在轮作组和单一种植组中有些微生物类群始终为优势种群, 如嗜冷芽孢杆菌属 (Band 25, *Psychrobacillus*)。也有部分条带只在单一种植组属于优势种群, 如芽单胞菌属 (Band 37, *Gemmatimonas*)、厌氧绳菌属 (Band 46, *Bellilinea*) 等。另外, 与草菇轮作后黄瓜根围新出现的微生物类群, 主要包括假单胞属 (Band 3/7/9/11, *Pseudomonas*)、黄杆菌科 (Band 5, *Muricauda*)、脱硫肠杆菌属 (Band 14, *Desulfotomaculum*)、库茨

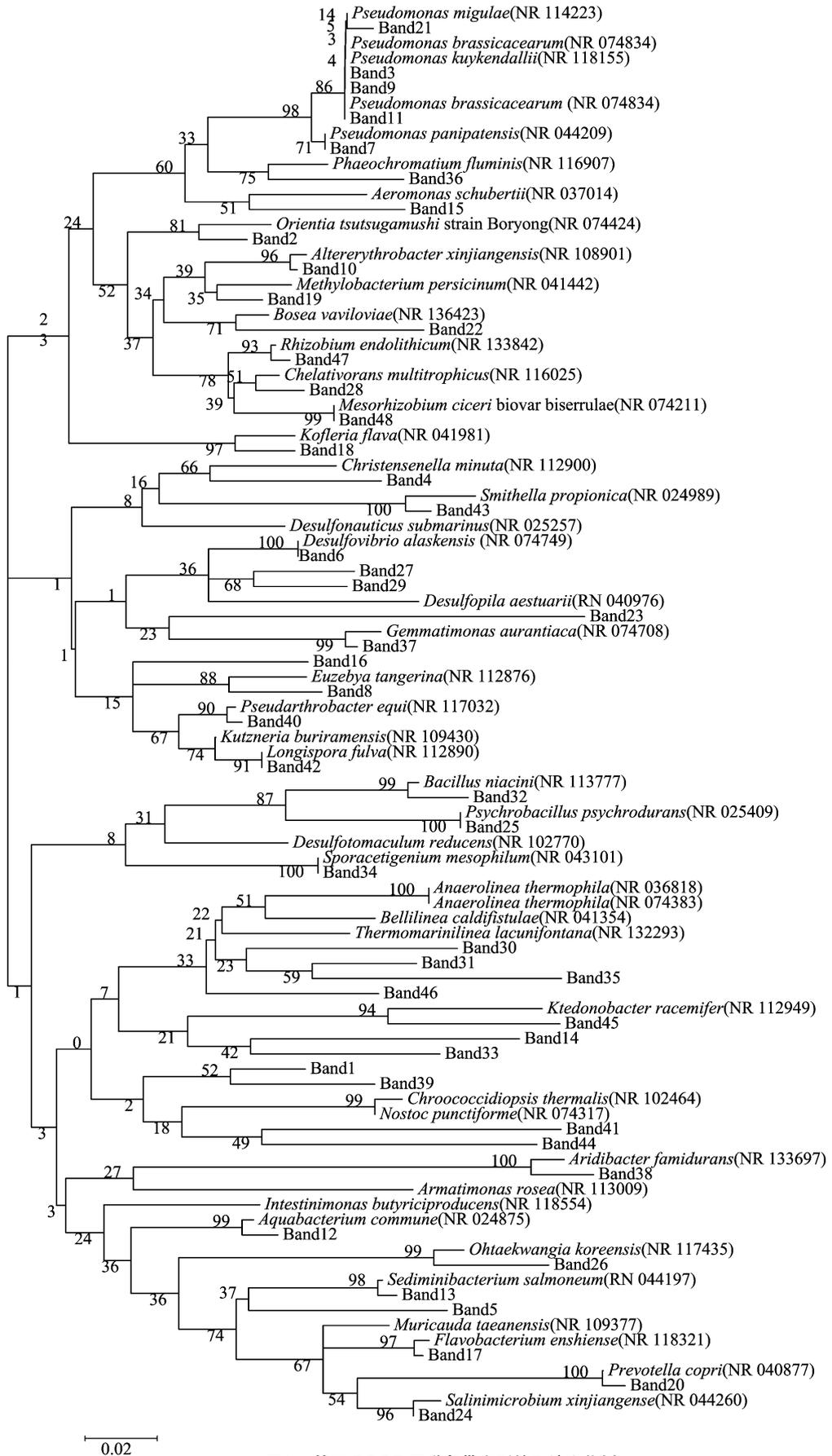


图2 基于 DGGE 图谱条带序列的系统进化树

涅尔氏菌属 (Band 16, *Kutzneria*)、黄杆菌属 (Band 17, *Flavobacterium*)、普雷沃氏菌属 (Band 20, *Prevotella*) 等。其中,出现最多的为假单胞菌属细菌,该属细菌在以往的报道中主要用于防治植物病害。

### 2.4 土壤酶活性测定结果

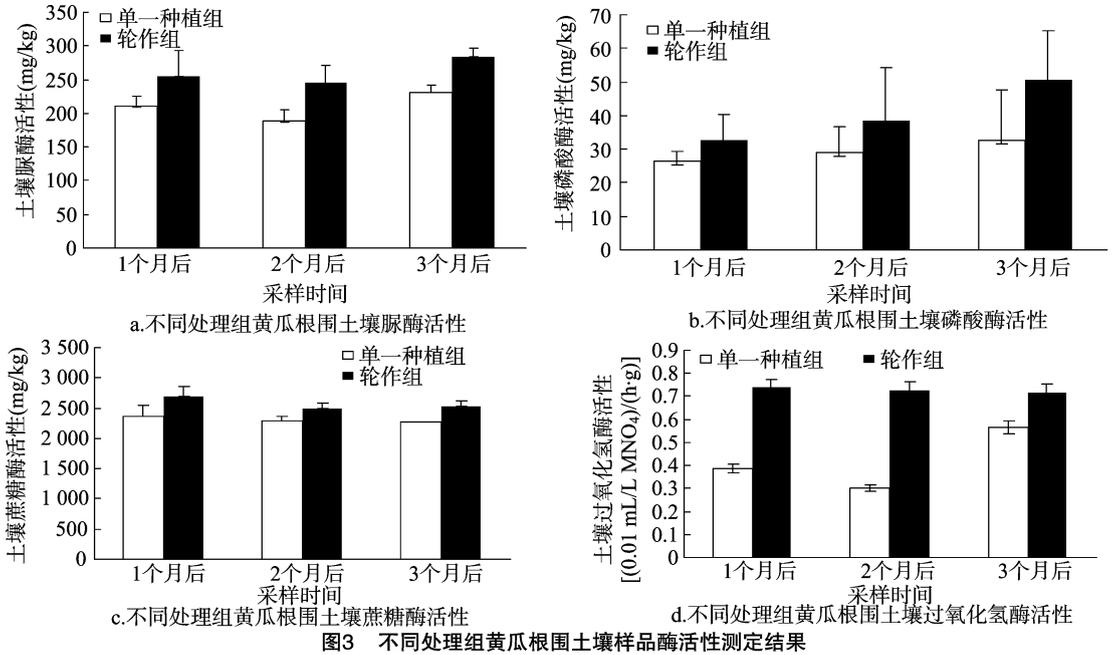


图3 不同处理组黄瓜根围土壤样品酶活性测定结果

### 2.5 土壤主要营养指标测定结果

由图4可知,轮作处理组在黄瓜移栽后3个月内速效磷、速效钾及有机质含量均高于黄瓜单一种植组。其中,轮作组水解性氮含量在黄瓜移栽1个月后低于单一种植组,但是随

由图3可知,轮作处理组相对于黄瓜单一种植组,在黄瓜移栽后3个月内根围土壤酶活性均有明显提高。其中,脲酶活性在3个采样时间点分别提高了21%、30%、23%,磷酸酶活性分别提高了22%、34%、55%,蔗糖酶活性分别提高了14%、8%、11%,过氧化氢酶活性分别提高了92%、141%、27%。

后呈上升趋势,而单一种植组水解性氮含量则持续下降。速效磷和速效钾含量在2个处理组均呈下降趋势,但轮作组在黄瓜移栽后3个采样时间点均明显高于单一种植组,速效磷含量分别提高了8%、4%、3%,速效钾含量分别提高了27%、

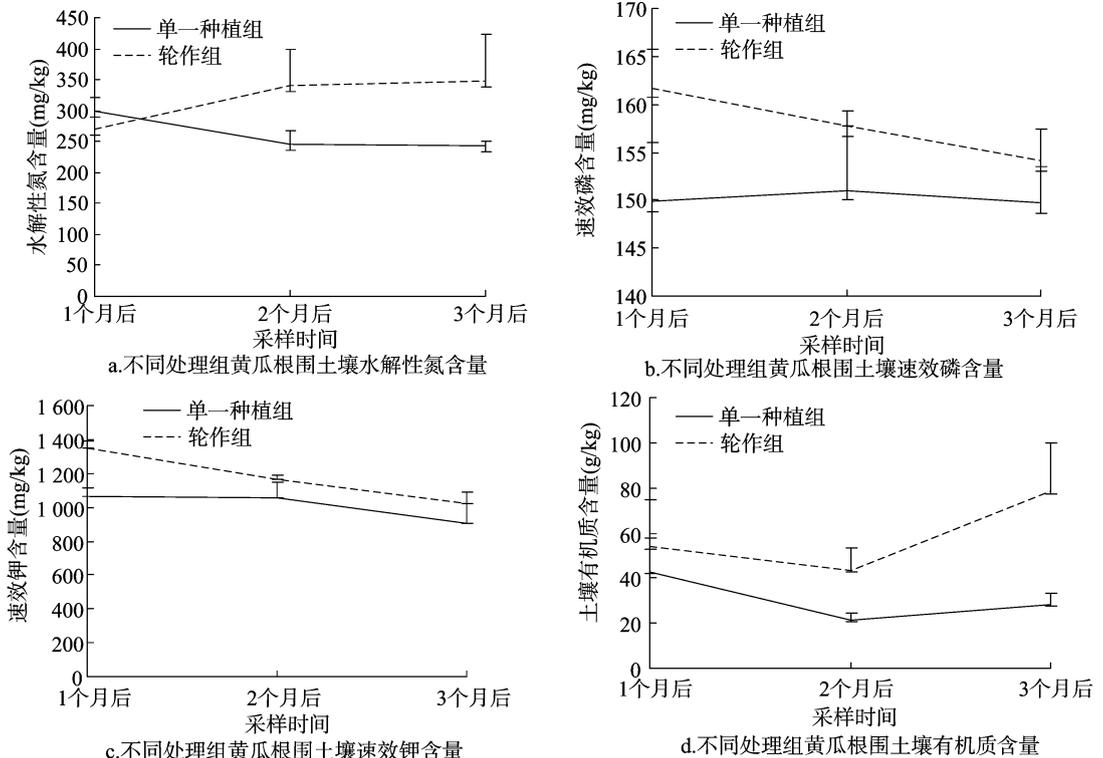


图4 不同处理组黄瓜根围土壤样品营养指标测定结果

10%、12%。说明在黄瓜移栽后初期,轮作组能够为寄主植物提供充足的养分。从土壤有机质含量来看,2个处理组均呈先下降后升高的趋势,但轮作组的下降趋势较缓慢,而后期提高的幅度较大,在1个月时比单一种植组高26%,在3个月时比单一种植组高176%。说明随着黄瓜生长期的延长,在草菇种植期投入的秸秆等基料开始在根围微生物的作用下为寄主植物提供足够的有机质。

### 3 结论与讨论

通过不同类型作物之间的轮作能够有效缓解设施栽培中连作障碍的危害,特别是其中土传病害的传播<sup>[23]</sup>。在环洪泽湖地区,设施黄瓜与草菇轮作是主要的轮作种植模式,能够有效缓解黄瓜根结线虫病及枯萎病的危害<sup>[24-25]</sup>,但是对于其中的作用机制尚未明确。

本研究通过 DGGE 分析方法研究了在瓜菇轮作模式中,后茬黄瓜根围细菌多样性的变化,并测定了相关土壤酶活性及土壤主要养分的变化情况。发现在瓜菇轮作模式中,黄瓜根围细菌多样性显著提高,且其中一些优势种群在整个黄瓜生长期稳定定殖,如假单胞属细菌。同时,与根围微生物活性相关的几种土壤酶活性在轮作条件下均高于单一种植条件,包括脲酶活性、过氧化氢酶活性、蔗糖酶活性、磷酸酶活性。另外,从黄瓜根围土壤中主要养分指标来看,轮作组均显著高于单一种植组,且随着黄瓜生长期的延长,有机质和水解性氮的含量呈上升趋势,而速效磷和钾的含量虽然呈缓慢下降趋势,但均高于单一种植组。说明通过与草菇轮作,能够有效改变后茬黄瓜根围细菌的种群结构,提高根围细菌的多样性及活性,且通过微生物的作用提高根围土壤中几种主要养分的含量。本研究的结果能够为后期相关微生物菌肥及微生态制剂的研究提供基础。

### 参考文献:

[1] Berendsen R L, Pieterse C M, Bakker P A. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486.

[2] Berg G, Opelt K, Zachow C, et al. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56(2): 250-261.

[3] Garbeva P, Elsas J D V, Veen J A V. Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history [J]. Plant & Soil, 2008, 302(1/2): 19-32.

[4] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota [J]. Nature, 2012, 488(749): 91-95.

[5] Lundberg D S, Lebeis S L, Paredes S H, et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome [J]. Nature, 2012, 488(749): 86.

[6] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria [J]. Science, 2011, 332(6033): 1097-1100.

[7] Lugtenberg B J J, Chinawong T F C, Bloemberg G V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms [J]. Antonie Van

Leeuwenhoek, 2002, 81(1/2/3/4): 373-383.

[8] Morrissey J P, Dow J M, Mark G L, et al. Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture [J]. EMBO Reports, 2004, 5(10): 922-926.

[9] Zamioudis C, Pieterse C M. Modulation of host immunity by beneficial microbes [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, 25(2): 139-150.

[10] Selvakumar G, Panneerselvam P. Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops [M]// Maheshwari D K. Bacteria in agrobiology: stress management. Springer Berlin Heidelberg, 2012: 205-224.

[11] Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(1): 11-18.

[12] 王东凯, 杨威, 吴凤芝. 不同栽培模式对设施黄瓜生长发育及土壤微生物数量的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(7): 95-99.

[13] Qiao P L, Zhou X G, Feng Zhi W U, et al. T-RFLP analysis of cucumber rhizosphere microbial communities in different cropping seasons [J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(10): 2640-2649.

[14] 吴宏亮, 康建宏, 陈阜, 等. 不同轮作模式对砂田土壤微生物区系及理化性状的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(6): 674-680.

[15] 唐艳刚, 于迪, 胡凤霞, 等. 黄瓜-玉米轮作对设施连作土壤性状的影响 [J]. 北方园艺, 2014(11): 161-164.

[16] Wu F Z, Yu H Y, Yu G B, et al. Improved bacterial community diversity and cucumber yields in a rotation with kidney bean-celery-cucumber [J]. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science, 2011, 61(2): 122-128.

[17] 时伟, 申太荣, 魏珉, 等. 大葱轮作对温室黄瓜根际土壤微生物多样性的影响 [J]. 山东农业科学, 2014, 46(7): 72-77, 81.

[18] Qiao K, Dong S, Wang H Y, et al. Effectiveness of 1, 3-dichloropropene as an alternative to methyl bromide in rotations of tomato (*Solanum lycopersicum*) and cucumber (*Cucumis sativus*) in China [J]. Crop Protection, 2012, 38(4): 30-34.

[19] Li Y, Wu X, Guo W, et al. Characteristics of greenhouse soil N<sub>2</sub>O emissions in cucumber-tomato rotation system under different nitrogen conditions [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2014, 30(23): 260-267.

[20] Heuer H, Wieland G, Schönfeld J, et al. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis [M]// Rochelle P A. Environmental molecular microbiology: Protocols and applications. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001: 177-190.

[21] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.

[22] 鲁如坤. 土壤农化分析法 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.

[23] 王卫平, 洪春来, 姚燕来, 等. 菇渣基质对黄瓜栽培的效果研究 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(9): 49-50.

[24] 陈月珍, 王其传, 张可站. 日光温室冬春黄瓜夏秋草菇高效栽培模式 [J]. 江苏农业科学, 2007(3): 111-112.

[25] 宛汉斌, 徐冉, 苗环. 日光温室黄瓜与草菇高效轮作栽培技术 [J]. 现代农业科技, 2008(18): 85-86.