

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(7):892–904; 4 July 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140412

地表覆盖对渭北旱作苹果园土壤细菌群落结构及多样性的影响

陈月星¹, 温晓霞¹, 孙瑜琳¹, 张俊丽¹, 林晓丽², 廖允成^{1*}

西北农林科技大学,¹ 农学院,² 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

摘要:【目的】以渭北旱作苹果园 4 种覆盖模式为研究对象,探索了不同覆盖措施对土壤细菌群落结构及多样性的影响。【方法】应用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术结合克隆和测序的方法,分析和比较了不同地表覆盖措施及苹果生育期土壤细菌的群落结构及组成。【结果】不同覆盖模式下土壤细菌群落结构和多样性存在显著差异,细菌优势种群及其数量受覆盖措施和苹果生育期的共同影响:幼果期和膨大期,生草覆盖和秸秆覆盖显著提高了土壤细菌多样性和丰富度,地膜覆盖细菌多样性和丰富度较对照有所提高但未达到显著水平;成熟期对照的细菌多样性达到峰值(2.78)且与其他处理差异显著,这可能是因为土壤中 *r*-策略生存的细菌在该时期得到迅速生长和繁殖的缘故。聚类分析和除趋势对应分析结果显示,细菌群落结构差异与苹果生育期相关,同时受覆盖措施影响,其中生草覆盖与秸秆覆盖土壤样品多聚为一簇,而地膜覆盖与对照相似度较高,说明生草和秸秆覆盖处理土壤细菌群落结构变化比较显著。代表性序列(共 22 条)测序分析显示,果园土壤细菌的优势菌群为 Proteobacteria(10 条)和 Bacteroidetes(5 条),另外 Acidobacteria、Firmicutes、Actinobacteria 等也被检测出。其中有些条带只在特定时期某个处理中表现出优势,如 *Fusobacterium* sp. 只在幼果期秸秆覆盖处理出现,有些条带则为各处理共有只是亮度有所不同,如 *Flavobacterium* sp.,然而这些共有或者特异性条带所代表的细菌类群在土壤中的生态功能及其生理生化特征有待进一步明确。【结论】植物地表覆盖(生草/秸秆)能够显著改变土壤细菌群落结构,提高土壤细菌多样性和丰富度,具有土壤优化效应,而地膜覆盖在本研究中与对照无显著差异。

关键词: 果园,地表覆盖,土壤细菌,PCR-DGGE,克隆测序

中图分类号: Q938 **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0892-13

土壤微生物是土壤生态系统中十分重要和最为活跃的部分,对生态系统的功能及其可持续性发挥着重要作用^[1-2]。其中土壤细菌种类繁多,数量巨大,约占土壤微生物总量的 70%–90%^[3],它们直接或间接参与了许多土壤生物化学循环,如有机物质的分解与合成,土壤结构及腐殖质的形成;它们还能与植物体形成共生与寄生的关系^[4]。Brussard

等^[1]和 Marcel 等^[2]研究发现,土壤中微生物群落结构及其多样性是影响农业生态系统主要功能的重要因素。

黄土高原是我国最大的苹果产区之一,果园面积及苹果产量均占全国的一半以上^[5]。在陕西渭北地区,苹果产业更是当地的支柱产业,承担着经济发展和环境改善的双重任务^[6]。目前流行的传统

基金项目: 国家自然科学基金(31471451)

* 通信作者。E-mail: yunchengliao6912@163.com

作者简介: 陈月星(1984–),女,河北衡水人,博士研究生,主要从事于保护性耕作和环境微生物的相关研究。E-mail: yuexingchen926@163.com

收稿日期: 2014-08-21; **修回日期:** 2014-12-03

果园管理方式(清耕制)易导致土壤有机质匮乏、树体早衰、果实品质下降^[7],近年来已引起了广泛关注。以往研究表明,少耕免耕及地面覆盖措施可以显著改善土壤理化状况,提高果园生产力^[8-10],而土壤环境的变化势必会对土壤微生物的生长、代谢和繁殖产生影响,同时不同的果园管理模式会在不同程度上改变土壤微生物的群落结构,从而影响土壤生态系统的稳定性^[11]。董立国等^[12]应用 Biolog-ECO 技术研究了玉米秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响,发现免耕秸秆覆盖土壤微生物群落丰富度指数和多样性指数均显著高于常规耕作。林运红等^[13]研究了小麦秸秆覆盖后烟田土壤微生物数量的变化规律,结果表明,随着小麦秸秆施用量的增加土壤细菌、真菌、放线菌和纤维素分解菌的数量呈递增的趋势,且显著高于无覆盖处理。刘久俊等^[14]研究了不同覆盖材料和不同覆盖量对杨树林土壤微生物和酶活性的影响,发现覆盖处理的酶活性均高于对照,且随着覆盖量的增加而增强。然而关于地表覆盖对土壤微生物群落结构及多样性影响的研究仍处于基础阶段,以往大部分研究多专注于某一种覆盖对土壤微生物的影响及变化规律或者多种覆盖下土壤微生物在某一时期的差异。因此,为更加全面地了解覆盖措施对土壤微生物群落特征的影响,选取渭北黄土高原常见的4种果园地表覆盖模式为研究对象,应用 PCR-DGGE 与 16S rRNA 基因克隆和测序的方法探究不同覆盖措施对土壤细菌群落结构及多样性的影响及其随苹果生育期的变化,揭示其对地表覆盖的响应特征及变化规律,为地表覆盖措施在苹果栽培过程中的合理应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验区概况

本试验于陕西省延安市洛川县果业研究中心的苹果试验基地进行。洛川县地处渭北黄土高原中部核心地块(35°33′–35°54′N, 109°18′–109°47′E),属于温暖带半湿润大陆性季风气候。平均海拔 1100 m, 年均气温 9.2℃,日照时数 2552 h,大于 10℃积温为 3040℃。多年平均降雨量 576–622 mm,且主要集中在 6–9 月份,约占全年平均降雨量的 80%,具有典型的季节性干旱特点。供试果树为处于盛果期的富士

(*Malus pumila* Mill),品种为长富 2 号,砧木为楸子,种植密度为 2.5 m × 4 m。土壤类型为黄土母质发育而成的疏松的黑垆土,土壤质地为粘土,试验前土壤理化性质为:土壤 pH 7.85、土壤容重 1.35、有机质 6.3 g/kg、碱解氮 17.88 mg/kg、速效钾 110.7 mg/kg、速效磷 4.47 mg/kg。

1.2 试验设计

试验设置 4 个处理,于 2006 年 9 月开始布置:(1)生草覆盖(Grass mulch):2006 年果实收获后,于小区内种植白三叶草(*Trifolium repens* L.),每 3 年重新播种,以确保果树生育期内白三叶的地表覆盖效果;(2)秸秆覆盖(Cornstalk mulch):小区地表覆以玉米秸秆,约 30000 kg/hm²,厚度约 10–15 cm,秸秆于每年的 3 月中旬果树开花前重新铺设;(3)地膜覆盖(Film mulch):于果树行间铺设 3 条宽 80 cm 的白色透明塑料薄膜,并在人为或自然损坏后及时更新;(4)裸地(对照:CK):小区地表不进行任何覆盖。每个处理设置 3 个小区,小区面积为 16 m × 16 m,各小区其他管理措施一致。

1.2.1 土壤样品采集:试验初期在各小区内选定长势基本一致的 3 棵树,予以标记。分别在 2011 年 5 月下旬(幼果期:Young fruit period)、7 月下旬(膨大期:Fruit expanding period)和 10 月下旬(成熟期:Mature period),在标记的树下距离树干 1.0 m 左右半径处随机选点,去除表面覆盖物,用土钻钻取 5–15 cm 土层土样,多点取样均匀混合装入标记好的塑封袋中,剔除石块、草根、秸秆及其他肉眼可见的杂物,过 2 mm 钢筛,于 –80℃ 保存,1 周内完成土壤微生物总 DNA 的提取。

1.2.2 16S rRNA 基因 V3 高变区扩增:土壤微生物总 DNA 的提取应用土壤 DNA 小量提取试剂盒(OMEGA USA),具体操作方法参见说明书。土壤微生物总 DNA 提取产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,于 –20℃ 保存备用。本研究采用巢式 PCR 程序扩增细菌 16S rRNA 基因 V3 区片段,先用引物对 27F/1492R(表 1)扩增细菌 16S rRNA 基因全长序列,参照 Nicomrat 等^[15]的方法;PCR 产物应用 DNA 纯化回收试剂盒(天根,北京)进行纯化回收,再以此回收产物为模板,以 GC-338F/518R(表 1)为引物扩增 V3 区序列(约 250 bp)^[16]。V3 区 PCR 扩增体系:10 × PCR buffer(含 Mg²⁺) 5 μL, dNTPs(各 2.5 mmol/L) 4 μL,正反向引物(5 μmol/L)各 4 μL,模

板 DNA 2 μL, TaKaRa *rTaq* (5 U/μL) 0.5 μL, 补充灭菌蒸馏水至 50 μL; 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃

8 min。每个土样均设置 3 个重复, 合并后采用琼脂糖凝胶 DNA 回收和纯化试剂盒进行回收纯化, 回收产物保存于 -20℃ 用于 DGGE 分析。

表 1. PCR 扩增所用引物

Table 1. PCR primers applied in this paper

Primer	Sequence (5'→3')	Length/bp
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20
1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	19
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	20
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	17
GC clamp	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGCGGGGG	40

1.2.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE):应用 Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA) 进行变性梯度凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度范围为 40% - 60% (100% 的变性剂包含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。将胶板组装好后放入装有 1 × TAE 缓冲液的电泳槽中, 预热到 60℃ 时开始加样, 将经回收纯化的第二轮 PCR 产物 (约 300 ng DNA) 混入 4 μL 6 × loading buffer, 然后注射到上样孔中。电泳在恒温 60℃ 和 120 V 电压条件下电泳 12 h。电泳结束后, 小心取下凝胶并将凝胶浸没在 GelRed 核酸染料 (1: 10000) 中避光染色 15 min, 然后应用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行拍照。

1.2.4 DGGE 条带的回收和测序分析:在紫外灯下将 DGGE 凝胶图谱中分离明显、亮度较高的优势条带和特异性条带进行切割回收, 放入 1.5 mL 的无菌离心管中, 加入 30 μL 的无菌超纯水, 4℃ 保存过夜, 然后以此 DNA 溶液为模版用不含 GC 夹子的引物对 (338F/518R) 进行扩增, 扩增产物经回收纯化后克隆至 pMD18-T 载体, 37℃ 过夜培养, 用载体通用引物 M13 进行菌落 PCR 验证, 将含有正确插入片段的克隆菌液送至英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行序列测定, 测得序列提交至 GenBank 数据库。利用 DNASTar 7.1 软件去除序列两端的载体序列, 利用 RDP (Ribosomal Database Project) 数据库中 Sequence match 程序进行细菌分类 (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)。然后与 NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 数据库中的序列进行比对获取同源性最高的序列, 应用 MEGA 5.0 软件对所有序列 (测定序列及其

同源序列) 进行比对, 采用邻接法和 Jukes-Cantor Model 构建系统发育树。

1.2.5 数据处理及统计分析:应用 Quantity One (Bio-Rad) 软件对 DGGE 图谱上条带的位置和亮度进行数字化分析和聚类分析 (UPGAMA), 计算多样性指数 (H' : Shannon-Wiener)、丰富度指数 (S)、均匀度指数 (E)。应用 CANOCO 4.5 进行除趋势对应分析 (DCA) 对不同处理的细菌群落结构进行排序。细菌多样性指数和均匀度指数分别用如下公式 (1) 和 (2) 进行计算。

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i (\ln P_i)$$

(1)

$$E = H' / \ln S$$

(2)

式中, P_i 为某一样品的第 i 条带的相对亮度; S 为某一样品的条带类型数目 (OTU)。

1.2.6 核酸序列登录号:所获得序列的 GenBank 数据库序列登录号为: KF649162-KF649183

2 结果和分析

2.1 土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱分析

不同覆盖处理下土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱如图 1 所示, 泳道 1 - 12、13 - 24 和 25 - 36 分别表示苹果幼果期、膨大期、成熟期 4 种覆盖措施的土壤样品, 每个样品包含 3 个重复。理论上, 每 1 条带代表 1 个优势菌群或操作分类单元 (OTU, operational taxonomic unit), 条带数目的多寡反映了细菌的多样性高低, 条带的亮度反映了该菌群的相对丰度。从 DGGE 图谱可以看出, 不同土壤样品所获得的条带数目、迁移率及亮度均有所不同,

这表明果园土壤细菌群落结构受覆盖措施和苹果生育期的影响而发生了明显变化。经 Quantity One 凝胶分析软件对 DGGE 图谱数字化分析得知,36 个土壤样品共得到 70 种不同的条带类型(OTU)(图 2),对 DGGE 图谱中优势条带(A-V)进行切胶回收测序(图 1),这些条带在不同覆盖处理及不同苹果生育期分布有所不同;幼果期和膨大期,条带 A、C、D、

F、G 和 H 均属于共有条带;条带 I 和 J 在幼果期的秸秆覆盖处理明显富集;条带 L 和 K 在膨大期的秸秆覆盖处理优势更加显著。成熟期,条带 M、Q、R、H 属于共有条带;条带 N、O、P 在生草覆盖处理优势加强;条带 S、U、V 在裸地处理比较丰富,这些条带的富集或丢失是土壤细菌群落结构发生变化的基础。

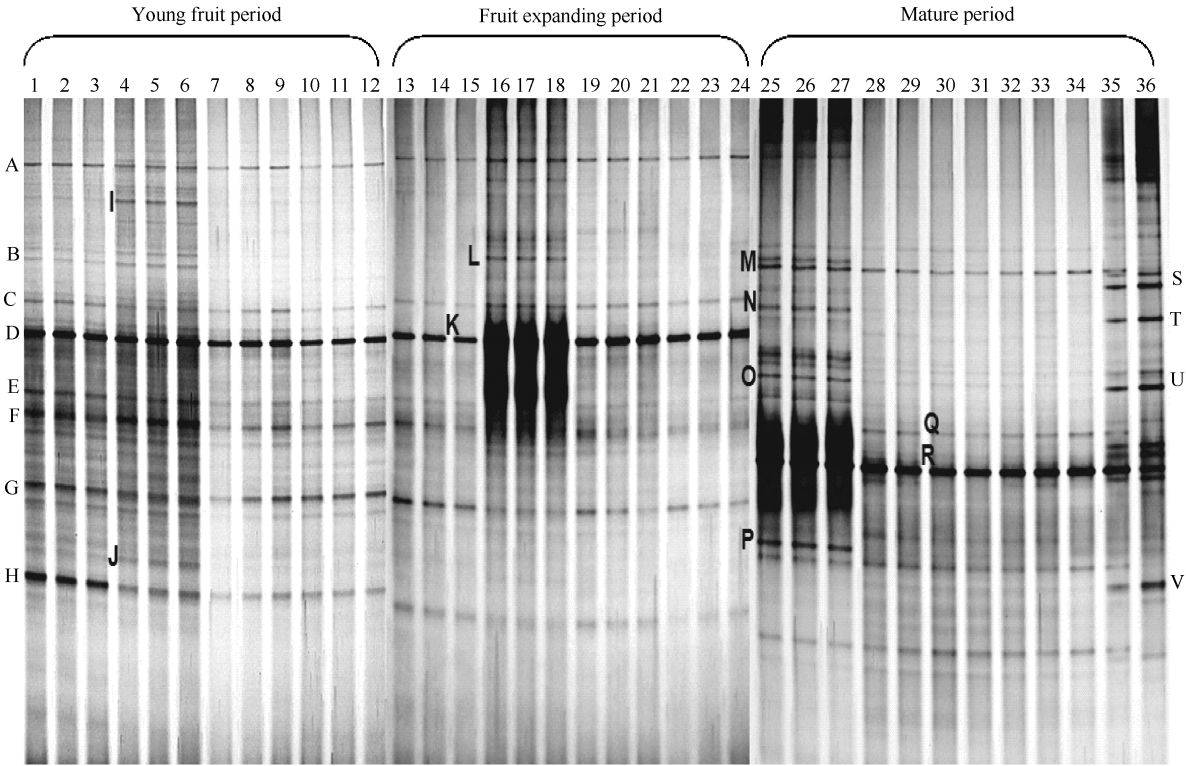


图 1. 不同覆盖措施下土壤细菌群落结构 DGGE 凝胶电泳图谱

Figure 1. DGGE fingerprint of soil bacterial communities with different ground mulch managements. Numbers 1 – 12 represented soil samples at young fruit period. Numbers 1 – 3 indicated soil samples with grass mulch management, 4 – 6 indicated soil samples with cornstalk mulch management, 7 – 9 with film mulch management, and 10 – 12 under CK; Numbers 13 – 24 represented soil samples at fruit expanding period and the sample order was equivalent to 1 – 12; Numbers 25 – 36 represented soil samples at mature period and the sample order was equivalent to 1 – 12. Letters A-V represented bands for cloning and sequencing.

2.2 不同覆盖措施对土壤细菌多样性的影响

细菌群落结构多样性分析结果表明,幼果期和膨大期各覆盖处理土壤细菌香农多样性指数和丰富度指数均高于对照,以秸秆覆盖多样性和丰富度最高(表 2)。幼果期秸秆覆盖处理多样性指数和丰富度指数显著高于地膜覆盖和对照,但是与生草覆盖差异不显著,而生草覆盖与地膜覆盖和对照间差异显著;膨大期各处理多样性指数差异均达到显著水平,由高及低顺序为:秸秆覆盖 > 生草覆盖 > 地膜覆盖 > CK,各覆盖处理的丰富度指数显著高于对照;

成熟期对照的多样性指数最高(2.78)且与其他处理差异显著,其次为生草覆盖(2.54)和秸秆覆盖(2.23),丰富度指数以对照最高(27.3),秸秆覆盖最低(19.7),二者差异显著。整个苹果生育期内,处理间均匀度指数变化幅度较小(0.12 – 0.17),于幼果期和膨大期秸秆覆盖均获得最高的均匀度指数,而成熟期对照的均匀度指数最高(表 2)。以上结果表明,各覆盖处理在幼果期和膨大期提高了土壤细菌群落多样性和丰富度但是对均匀度影响不显著,成熟期对照多样性得到恢复并达到最高值。

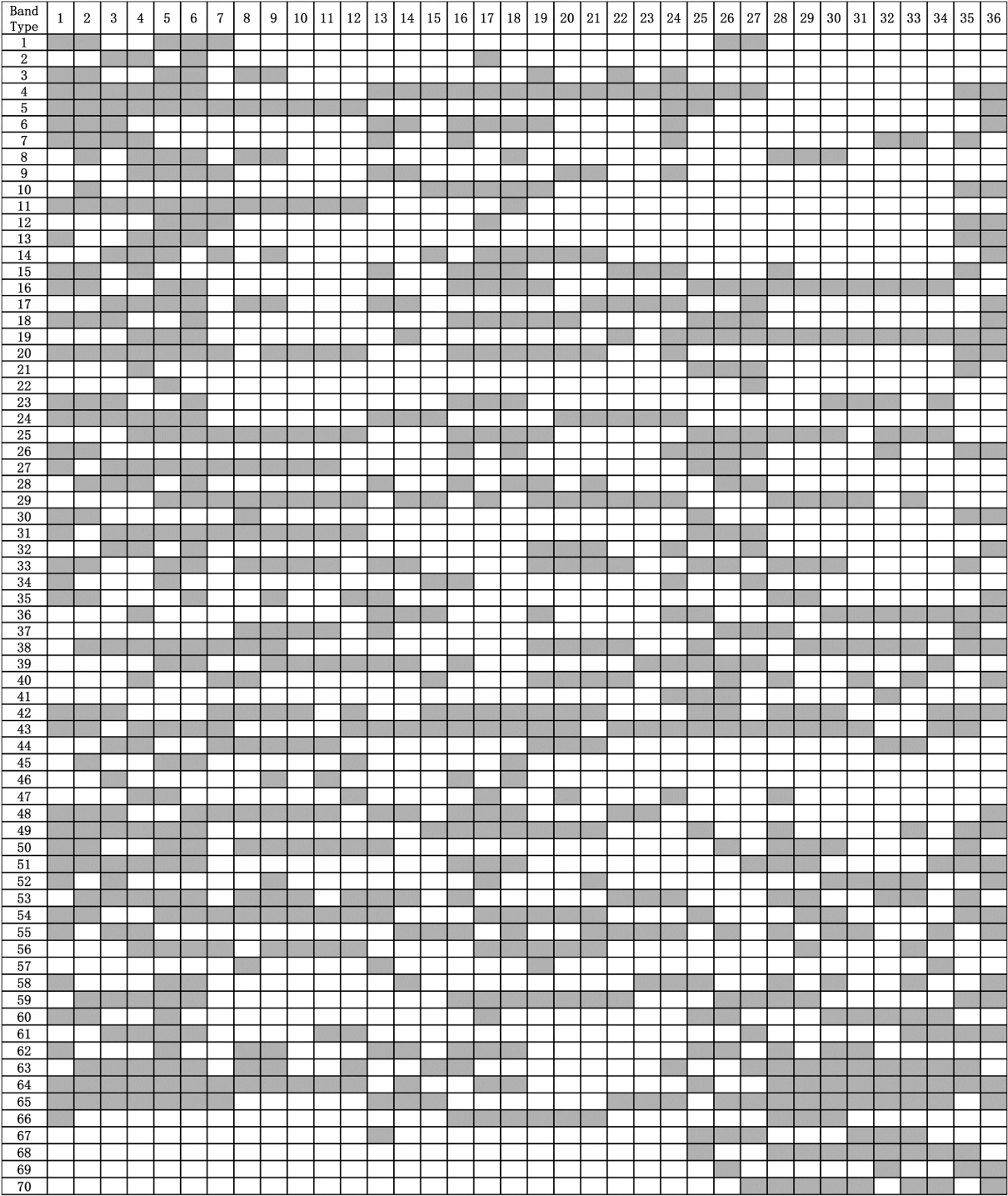


图 2. 不同地表覆盖措施下土壤细菌群落结构 DGGE 图谱条带类型示意图

Figure 2. The diagrammatic drawing of the DGGE profile of soil bacterial communities with different ground mulch managements. What the number in the first row means; 1 – 12 represented soil samples at young fruit period, 1 – 3 indicated soil samples with grass mulch management, 4 – 6 indicated soil samples with cornstalk mulch management, 7 – 9 with film mulch management, and 10 – 12 in CK; 13 – 24 represented soil samples at fruit expanding period and the sample order was equivalent to 1 – 12; 25 – 36 represented soil samples at mature period and the sample order was equivalent to 1 – 12.

表 2. 不同覆盖措施及苹果生育期黄土高原果园土壤细菌群落结构多样性指数分析

Table 2. Soil bacterial diversity indices with different ground mulch managements at apple growth periods

Treatment	Young fruit period			Fruit expanding period			Mature period		
	<i>H'</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H'</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H'</i>	<i>S</i>	<i>E</i>
Grass	2. 86ab	34. 7a	0. 81ab	2. 28b	18. 0c	0. 79a	2. 54ab	25. 3a	0. 79ab
Cornstalk	3. 24a	39. 7a	0. 88a	2. 76a	27. 0a	0. 84a	2. 23bc	19. 7b	0. 72b
Film	2. 28b	24. 3b	0. 71b	2. 41b	22. 0b	0. 78a	2. 13c	22. 7ab	0. 72b
CK	2. 34b	18. 3c	0. 81ab	1. 87c	17. 7c	0. 67b	2. 78a	27. 3a	0. 84a

Different letters in the same line means significant difference at $P < 0.05$.

2.3 不同覆盖措施对土壤细菌群落结构的影响

应用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行数字化分析并计算各泳道的相似度,可以反映出不同样品间土壤细菌群落结构的相似性。从表 3 可以看出,各苹果生育期内,不同覆盖处理间土壤细菌群落结构相似度较低(43. 73% – 90. 81%),幼果期生草覆盖和秸秆覆盖相似度最高,为 90. 81%,成熟期内各覆盖处理间相似度明显低于幼果期和膨大期,而且成熟期各覆盖处理与其他时期处理间相似度较低,说明苹果生育后期土壤细菌群落结构变化较快。

聚类分析结果表明,36 份土壤样品依据苹果生育期而聚集为 3 大主要类群,但是幼果期和膨大期的生草覆盖和秸秆覆盖处理的样品与相应时期的其他样品分离,而 3 个时期中地膜覆盖与对照始终聚集在一起,这表明土壤细菌群落结构在苹果生育期的推动下同时受地表覆盖措施的影响较大;生草覆盖和秸秆覆盖显著改变了果园土壤细菌群落结构,而地膜覆盖对土壤细菌群落结构影响不显著(图 3)。图 4 为除趋势对应分析散点图,可以反映多元变量间的内在联系,样品间距离的远近代表

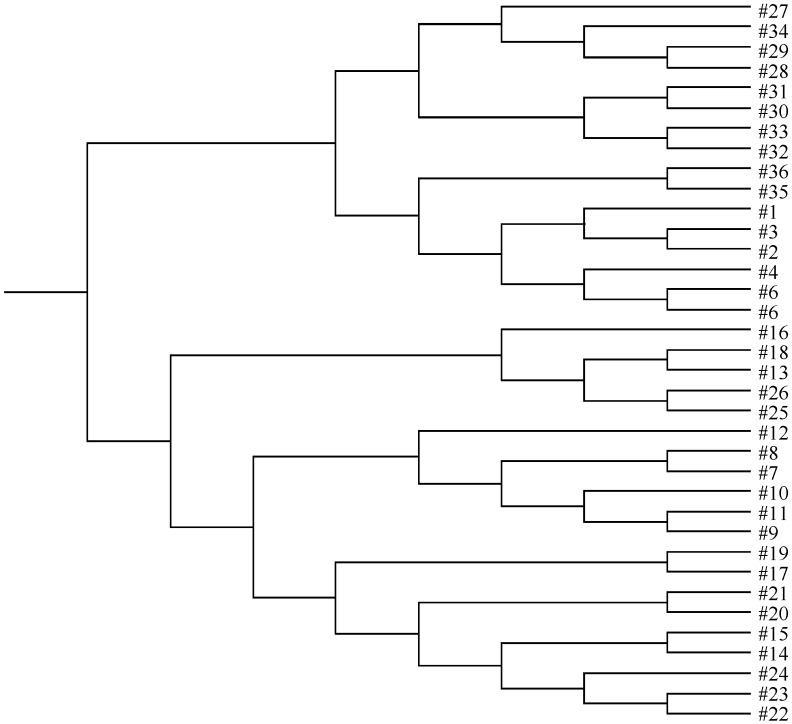


图 3. 不同覆盖措施下黄土高原果园土壤细菌群落结构聚类分析树状图

Figure 3. Phylogenetic tree of soil bacterial communities with different mulching treatments as well as apple growth periods in the apple orchard in Loess Plateau. # 1 – #12 represented soil samples at young fruit period. #1 – #3 indicated soil samples with grass mulch management, #4 – #6 indicated soil samples with cornstalk mulch management, #7 – #9 with film mulch management, and #10 – #12 in CK; #13 – #24 represented soil samples at fruit expanding period and the sample order was equivalent to #1 – #12; #25 – #36 represented soil samples at mature period and the sample order was equivalent to #1 – #12.

土壤细菌群落结构的差异程度,2 个排序轴分别解释了物种总变异的 34.2% 和 30.7%,说明该分布图能够较充分地反映出各处理土壤细菌群落结构的差异。由图 4 可知,各苹果生育期中生草覆盖和秸秆覆盖排序接近,地膜覆盖和对照比较靠近并且远离生草覆盖和秸秆覆盖,与聚类分析结果一致,进一步反映出地表覆盖措施对土壤细菌群落结构的影响。

2.4 特征条带克隆与序列分析

本研究所获得的序列长度为 172 – 198 bp,与 GenBank 数据库比对结果见表 4,序列与 GenBank 数据库中的序列相似度很高(≥98%)。应用 RDP 数据库细菌分类工具对所得序列进行归类分析,其中大部分序列属于变形菌门(Proteobacteria)(D,E,F,G,H,I,K,O,P,R),并以 α-变形菌门(Alphaproteobacteria)最多,其次为拟杆菌门(Bacteroidetes)(A,B,C,U,V),另外,厚壁菌门(Firmicutes)(L,M),放线菌门(Actinobacteria)(N,T),酸杆菌门(Acidobacteria)(Q),梭杆菌门(Fusobacteria)(J)及绿弯菌门(Chloroflexi)(S)亦被检测出来,这表明黄土高原果园土壤中的最主要细菌类群为变形菌门,其数量远远高于其它类细菌,其次为拟杆菌门。结合系统发育树图(图 5)和 DGGE 图谱(图 1)可知,梭杆菌门(Fusobacteria)在幼果期秸秆覆盖处理数量有所增加,但是该优势并未在膨大期和成熟期发现;厚壁菌门(Firmicutes)的数量在膨大期秸秆覆盖处理属

于优势类群,到成熟期其他处理的厚壁菌门也逐渐丰富起来并取得优势地位;在成熟期发现了 3 个新的优势菌群:放线菌类群(N/T),2 个变形细菌类群(O,R),同时在生草覆盖处理变形菌类群(P)和对照处理中拟杆菌类(V)数量比较丰富。

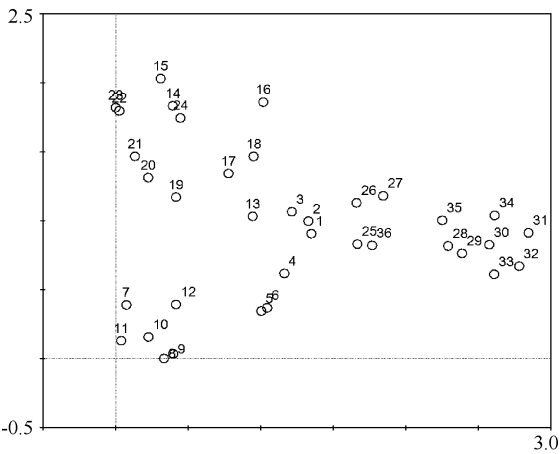


图 4. 不同覆盖措施下土壤细菌群落结构 DCA 分析散点图

Figure 4. DCA analysis of soil bacterial community structure with different ground mulch managements in an apple orchard in Weibei Loess Plateau. Numbers 1 – 12 represented soil samples at young fruit period. Numbers 1 – 3 indicated soil samples with grass mulch management, 4 – 6 indicated soil samples with cornstalk mulch management, 7 – 9 with film mulch management, and 10 – 12 in CK; Numbers 13 – 24 represented soil samples at fruit expanding period and the sample order was equivalent to 1 – 12; Numbers 25 – 36 represented soil samples at mature period and the sample order was equivalent to 1 – 12.

表 3. 不同覆盖措施及苹果生育期果园土壤细菌群落结构相似性矩阵

Table 3. Similarity matrix of soil bacterial community structure with different ground mulch managements during three periods of apple growth in an apple orchard

Soil sample		Young fruit period				Fruit expanding period				Mature period			
		Grass	Cornstalk	Film	CK	Grass	Cornstalk	Film	CK	Grass	Cornstalk	Film	CK
Young fruit period	Grass	98.77											
	Cornstalk	90.81	97.99										
	Film	67.28	72.46	96.45									
	CK	79.77	66.12	90.16	94.14								
Fruit expanding period	Grass	72.85	73.90	88.96	88.45	90.53							
	Cornstalk	79.24	80.33	61.98	63.71	87.56	88.62						
	Film	53.39	67.68	86.87	77.76	76.69	74.99	97.58					
	CK	56.60	72.87	76.29	81.66	67.46	69.01	77.83	98.95				
Mature period	Grass	68.16	89.60	46.63	48.55	63.27	68.29	60.42	68.87	87.47			
	Cornstalk	60.77	66.63	57.77	46.00	64.00	57.88	61.55	60.73	69.96	93.48		
	Film	53.77	66.14	66.63	53.97	60.05	48.70	54.04	66.67	64.28	79.45	98.66	
	CK	71.37	76.67	67.73	46.60	43.73	48.60	44.35	47.59	67.97	81.32	75.10	91.98

Values in this table were the mean.

表 4. PCR-DGGE 凝胶部分条带片段 (16S rRNA) 测序分析结果

Table 4. Band sequences of 16S rRNA fragments for selected bands in PCR-DGGE profile

Sequenced band	Accession number	Homologous sequence	Putative phylum
A	KF649162	Uncultured bacterium clone ncd1312g03c1 (JF096678; 100%)	Bacteroidetes
B	KF649163	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp. clone spr095 (KC886798; 98%)	Bacteroidetes
C	KF649164	<i>Flavobacterium</i> sp. S70. 07. P. BKT. AS. H. Gill. D. M (JX287725; 100%)	Bacteroidetes
D	KF649165	<i>Skermanella</i> sp. B-121-1-2 (KF561388; 100%)	Alphaproteobacteria
E	KF649166	Uncultured bacterium clone LE21_94(HE984958; 100%)	Alphaproteobacteria
F	KF649167	Uncultured bacterium clone lp208 (KC331426; 100%)	Deltaproteobacteria
G	KF649168	Uncultured bacterium clone LE21_94 (HE984958; 100%)	Alphaproteobacteria
H	KF649169	Uncultured <i>Rhodoplanes</i> sp. clone Leob122 (KF226054; 100%)	Alphaproteobacteria
I	KF649170	Uncultured bacterium clone TE1a05g4_3650 (JQ377355; 100%)	Deltaproteobacteria
J	KF649171	<i>Fusobacterium simiae</i> strain ATCC 33568 (NR044689; 100%)	Fusobacteria
K	KF649172	Uncultured bacterium clone lp156 (KC331374; 100%)	Alphaproteobacteria
L	KF649173	Uncultured bacterium clone ncd991e09c1 (HM334783; 100%)	Firmicutes
M	KF649174	Uncultured bacterium clone 31MIC011 (JF340969; 100%)	Firmicutes
N	KF649175	Uncultured bacterium clone lp160 (KC331378; 99%)	Actinobacteria
O	KF649176	Uncultured bacterium clone T8H (KC352386; 100%)	Betaproteobacteria
P	KF649177	Uncultured bacterium clone T2C57 (JQ265467; 100%)	Gammaproteobacteria
Q	KF649178	Uncultured bacterium clone GD25 (JX811383; 100%)	Acidobacteria
R	KF649179	Uncultured bacterium clone PCS_76_132 (JX850582; 99%)	Gammaproteobacteria
S	KF649180	<i>Flavobacterium</i> sp. T92. 09. P. CCF. OH. H. Kidney. D (JX287581; 100%)	Chloroflexi
T	KF649181	Uncultured bacterium clone lp160 (KC331378; 99%)	Actinobacteria
U	KF649182	Uncultured soil bacterium clone S1P2093 (KF145336; 99%)	Bacteroidetes
V	KF649183	Uncultured bacterium clone B8-126 (KF494598; 99%)	Bacteroidetes

3 讨论

3.1 地表覆盖措施对渭北旱作苹果园土壤细菌多样性的影响

作为评价土壤健康状况重要的生物学指标,土壤微生物的群落结构及多样性因农业管理措施而发生相应改变,从而影响农业生态系统的物质循环和能量转换^[17-19]。地表覆盖措施被认为具有改善土壤结构、调节土壤温湿度和提高土壤肥力等生态环境正效应^[20-21],因此,在果园中实施地表覆盖会影响土壤细菌生长、代谢和繁殖,从而影响其群落结构和多样性。前人研究表明,生草或有机物质覆盖(包括施用粪肥和作物秸秆等)能明显改变土壤细菌群落结构、提高细菌多样性^[14, 22]。Yao 等^[23]研究发现,通过保持果园地表植被覆盖可以显著增加土壤可培养细菌的数量。董立国等^[12]研究了免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响,结果表明免耕秸秆覆盖促进了土壤微生物活性且增加了土壤微生物数量。张林森等^[24]通过对麦草覆盖

和起垄黑地膜覆盖下土壤微生物的多样性进行研究,发现 2 种覆盖方式均可提高微生物群落丰富度和多样性。本研究亦表明在幼果期和膨大期生草覆盖和秸秆覆盖土壤细菌多样性和丰富度显著高于对照,这主要是由于生草覆盖和秸秆覆盖通过降低地表光照度,减缓热量向土壤传递来改变果园生态系统的热量传递从而起到了良好的平稳地温作用^[25],同时,在 5 年试验过程中生草覆盖和秸秆覆盖两个处理均得到了不同程度的养分补充,生草覆盖处理中主要来源于白三叶草的根、茎和叶子,秸秆覆盖则是大量的玉米秸秆(总计 150000 kg/hm²),该区域有机质含量水平较低,所覆盖的秸秆对于土壤细菌来说是巨大的碳氮和能源的补充。然而,与以往研究不同的是,本研究中对照土壤细菌多样性指数在苹果成熟期获得最高值,并显著高于其它处理,这可能是由于地表覆盖后某些细菌的明显富集使得群落内优势种群较少,而优势种群数量相对较多,从而导致其多样性指数较低,该结果与构建克隆文库的研究结果一致,通过构建克隆文库发现对照处理获得的细菌种类(门分类水平)最多,为 15 个,其他处理

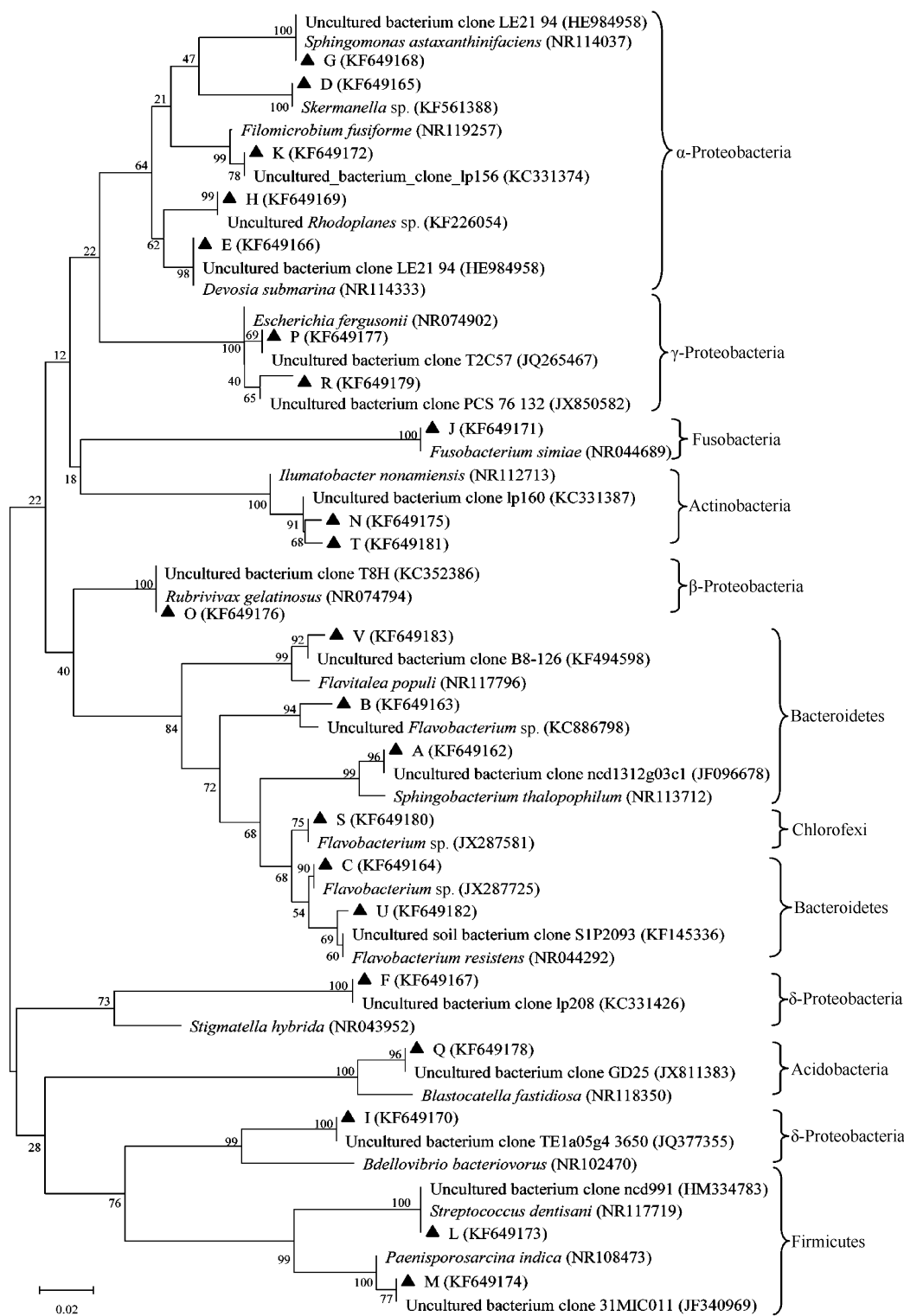


图 5. 条带序列及其相似序列的系统进化树

Figure 5. Phylogenetic tree of band sequences and their similar sequences in GenBank Letters “A-V” represent bands for cloning and sequencing. Numbers in parentheses represent the sequence accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The bar means 2% sequence divergence.

为 12 个(生草覆盖)、10 个(秸秆覆盖)、13 个(地膜覆盖),且覆盖处理优势种群数量高于对照^[26]。

3.2 地表覆盖措施对渭北旱作苹果园土壤细菌群落结构的影响

不同覆盖措施对果园土壤细菌群落结构也产生了较为显著的影响。对不同处理和不同苹果生育期土壤细菌群落结构相似性进行分析,结果显示,成熟期土壤细菌群落结构与幼果期和膨大期相似性较低,均小于 70%,幼果期和膨大期内各处理间相似度较高。这种情况可以应用 Ingvarsson^[27] 的 r-k 生存策略进行解释:在幼果期和膨大期,果树处于营养生长和生殖生长阶段,这个时期气候稳定,三叶草和果树之间及土壤细菌和果树之间存在激烈的水分养分和空间竞争,这时土壤中采用 k-策略(保守主义者)的细菌能够利用竞争到的少量营养物质存活下来,成为优势菌群;成熟期土壤细菌与果树之间及细菌种群之间对环境和养分的竞争逐渐降低,土壤中采用 r-策略(机会主义者)的细菌得到迅速生长和繁殖,从而群落组分发生较大改变。有些细菌类群在 3 个时期中都有发现,只是数量有所改变,这些类群可能代表 2 种策略共存的种类或者它们在 r-k 策略选择的特征差异不明显。聚类分析和 DCA 结果显示,苹果各生育期内生草覆盖和秸秆覆盖土壤细菌群落结构相似度较高且与对照差异显著,而地膜覆盖与对照差异不明显。与本文结果相似,Akihiko 等^[28] 研究发现长期地膜覆盖对土壤可培养细菌数量和细菌群落结构无显著影响,然而地表植被覆盖和有机物质覆盖下土壤细菌群落结构与对照相比差异显著^[29]。细菌群落结构的变化以群落组分变化为基础,以往研究表明,特定环境下较高的土壤温度会促进革兰氏阳性细菌的生长,而某些豆科植物(如野豌豆)的种植会增加土壤中革兰氏阴性细菌的数量^[30]。Wallis 等^[31] 应用 PCR-DGGE 的方法研究了土地利用方式和管理方式对土壤细菌多样性的影响,结果发现,土壤条件(包括有效磷、pH、镁离子、总阳离子、钾和有机质)与土壤细菌群落结构和组成显著相关,其中土壤有机质是影响细菌群落结构的最主要因子。本试验前期结果表明,不同覆盖处理中以秸秆覆盖保水效果最好,其次为生草覆盖和地膜覆盖;土壤日均温表现为:地膜覆盖 > CK > 生草覆盖 > 秸秆覆盖;土壤温度变幅为:CK > 地膜覆盖 > 生草覆盖 > 秸秆覆盖;苹果生育期内,有机

质、全氮、水溶性氮、全磷、有效磷以及全钾等土壤养分在秸秆覆盖处理最高,其次为生草覆盖,地膜覆盖和对照^[7,10]。地表覆盖措施实施所产生的土壤理化性质的变化是土壤细菌群落组分和群落结构发生改变的内在原因,然而不同地域、不同土壤类型及气候条件下地表覆盖后理化性质及细菌群落的变化特征不尽相同,因此地表覆盖措施应因地制宜。

3.3 地表覆盖措施对渭北旱作苹果园土壤细菌群落组成的影响

通过对 DGGE 图谱上优势条带进行分析可知,这些序列对应的同源性最高的细菌分别属于变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌(Actinobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi)。经过序列比对和系统发育分析发现,这些细菌与来自其他土壤类型和生态系统的细菌序列具有较高的相似性,这说明它们在土壤环境中广泛存在。秸秆覆盖处理中变形菌门,梭杆菌门和厚壁菌门数量比较丰富,主要包括根瘤菌、梭菌和链球菌,可能由于他们适应能力和繁殖能力较强,而且有研究表明这些细菌类群在土壤铁元素还原过程中具有重要作用^[32]。生草覆盖处理的特异性优势类群比较丰富,表现为其中 4 个条带(E,N,O,P)比其他处理亮度较高,分别属于 α 变形菌亚门,放线菌, β 变形菌亚门和 γ 变形菌亚门,细分为根瘤菌属,酸微菌属,红长命菌属和埃希氏杆菌属。其中根瘤菌属可以跟植物根系共生从而产生固氮作用,此外,酸微菌属被认为具有氧化金属元素的作用从而使其能够被其他微生物或植物利用^[33],这说明覆盖措施的应用会在一定程度上改变土壤细菌群落的功能特性。由于土壤细菌种类繁多、功能复杂、而且难以在实验室内进行培养,因此对于这些富集或消失的细菌类群的生理生化特征和具体的生态功能等还需进一步研究。

4 结论

植物地表覆盖措施的应用一定时期内丰富了果园土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱条带数量,促进某些类群细菌的生长和繁殖。这些优势主要体现在幼果期和膨大期,这个阶段果树处于营养生长和生殖生长的关键时期,土壤细菌与果树间处于竞争友好并存的关系:该时期黄土高原降雨稀

少,土壤水分亏缺,土壤细菌与果树间存在激烈的水分和养分竞争;同时果树根系分泌物为细菌提供营养物质,细菌则通过其生长代谢将果树不能直接利用的养分进行转化。因此,地表覆盖在黄土高原果园中的具有重要的应用价值和研究意义。本研究对覆盖措施下非根际土壤细菌的主要类群和群落结构进行了初步探索,下一步将对幼果期和膨大期根际土壤细菌群落结构和组成及特定功能菌群(如固氮类细菌)展开研究,为地表覆盖措施在该区域的合理应用提供理论基础。

参考文献

- [1] Brussard L, de Ruiter PC, Brown GG. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2007, 121(3): 233-244.
- [2] Marcel GA. van der Heijden, Cameron Wagg. Soil Microbial diversity and agro-ecosystem functioning. *Plant and Soil*, 2013, 363(1-2): 1-5.
- [3] Wang Y, Hong K. Mangrove soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V3 fragment polymerase chain reaction products. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(2): 201-204. (in Chinese)
王岳坤,洪葵. 红树林土壤细菌 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. *微生物学报*, 2005, 45(2): 201-204.
- [4] Kulmatiski A, Beard KH, Stevens JR, Cobbold SM. Plant-soil feedbacks: A meta-analytical review. *Ecology Letters*, 2008, 11(9): 980-992.
- [5] Cao Y, Li J, Zhang SH, Wang YL, Cheng K, Wang XC, Wang YL, Tahie MN. Characteristics of deep soil desiccation of apple orchards in different weather and landform zones on the Loess Plateau in China. *Transactions of the Chinese Society of Agriculture Engineering*, 2012, 28(15): 72-79. (in Chinese)
曹裕,李军,张社红,王亚莉,程科,王学春, M. Naveed Tahir. 黄土高原苹果园深层土壤干燥化特征. *农业工程学报*, 2012, 28(15): 72-89.
- [6] Gao D, Guo J, Wei Z, Yang CX Effect of orchard mulch on soil quality, growth and development of apple trees. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(5): 770-777. (in Chinese)
高登涛,郭景南,魏志峰,杨朝选. 果园地面覆盖对土壤质量和苹果生长发育的影响. *果树学报*, 2010, 27(5): 770-777.
- [7] Li H, Zhang G, Zhao Z, Li K. Effects of different herbage on soil quality characteristics of non-irrigated apple orchard in Weibei Loess Plateau. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(7): 2070-2076. (in Chinese)
李会科,张广军,赵正阳,李凯荣. 渭北黄土高原旱地果园生草对土壤物理性质的影响. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2070-2076.
- [8] Zhang Y, Xie Y. Effects of different patterns of surface mulching on soil hydrology in an apple orchard. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, 20(2): 85-92. (in Chinese)
张义,谢永生. 不同覆盖措施下苹果园土壤水文差异. *草叶学报*, 2011, 20(2): 85-92.
- [9] Zhang Y, Xie Y, Hao M, She X. Effects of different patterns surface mulching on soil properties and fruit trees growth and yield in an apple orchard. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(2): 279-286. (in Chinese)
张义,谢永生,郝明德,摄晓燕. 不同地表覆盖方式对苹果园土壤性状及果树生长和产量的影响. *应用生态学报*, 2010, 21(2): 279-286.
- [10] Huang JH, Liao YC, Gao MS, Yin RJ. Effects of tillage and mulching on orchard soil moisture content and temperature in Loess Plateau. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(11): 2652-2658. (in Chinese)
黄金辉,廖允成,高茂盛,殷瑞敬. 耕作和覆盖对黄土高原果园土壤水分和温度的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(11): 279-286.
- [11] Morra MJ. Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. *Molecular Ecology*, 1994, 3(1): 53-55.
- [12] Dong L, Yuan H, Li S, Yuan H, Pan Z. Influence on soil microbial community functional diversity for maize no tillage with straw mulch. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2): 444-446. (in Chinese)
董立国,袁汉民,李生宝,袁海燕,潘占兵. 玉米免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态环境学报*, 2010, 19(2): 444-446.
- [13] Lin Y, Cha Y, Mao K, Liu Y. Effects of wheat straw mulching amount on the quantity of microorganisms in different tobacco planting soil. *Crop Research*, 2012, 26(6): 664-667. (in Chinese)
林云红,查永丽,毛昆明,刘彦. 小麦秸秆覆盖量对不同植烟土壤微生物数量的影响. *作物研究*, 2012, 26(6): 664-667.
- [14] Liu J, Fang S, Xie B, Hao J. Effects of bio-mulching

- on rhizosphere soil microbial population, enzyme activity and tree growth in poplar plantation. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19 (6): 1204-1210. (in Chinese)
- 刘久俊,方升佐,谢宝东,郝娟娟. 生物覆盖对杨树人工林根际土壤微生物、酶活性及林木生长的影响. *应用生态学报*, 2008, 19(6): 1204-1210.
- [15] Nicorarat D, Dick WA, Dopson M, Tuovinen OH. Bacterial phylogenetic diversity in a constructed wetland system treating acid coal mine drainage. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(2): 312-321.
- [16] Kihara J, Maritus C, Bationo A, Thuita M, Lesueur D, Herrmann L, Amelung W, Vlek PLG. Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya. *Applied Soil Ecology*, 2012, 58(12): 12-20
- [17] Zhang H, Tang M, Chen H, Du X. Diversity of soil microbial communities in the mycorrhizosphere of five afforestation tree species in the Loess Plateau. *Journal of Beijing Forestry University*, 2008, 30 (3): 85-90. (in Chinese)
- 张海涵,唐明,陈辉,杜小刚. 黄土高原 5 种造林树种菌根根际土壤微生物群落多样性研究. *北京林业大学学报*, 2008, 30(3): 85-90.
- [18] Nair A, Ngouajio M. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Applied Soil Ecology*, 2012, 58: 45-55.
- [19] Qiao Y, Li Z, Wang X, Zhu B, Hu Y, Zeng Z. Effect of legume-cereal mixtures on the diversity of bacterial community in the rhizosphere. *Plant Soil and Environment*, 2012, 58 (4): 174-180.
- [20] Mouhamadou B, Puissant J, Personeni E, Desclos-Theveniau M, Kastl EM, Schlöter M, Zinger L, Roy J, Geremia RA, Lavorel S. Effects of two grass species on the composition of soil fungal communities. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(8): 1131-1139.
- [21] Jumpponen A, Brown SP. The rich and the sensitive: diverse fungal communities change functionally with the warming Arctic. *Molecular Ecology*, 2014, 23 (13): 3127-3129.
- [22] Tu C, Ristaino JB, Hu SJ. Soil microbial biomass and activity in organic tomato farming systems: Effects of organic inputs and straw mulching. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(2): 247-255.
- [23] Yao S, Merwin IA, Bird GW, Abawi GS, Thies JE. Orchard floor management practices that maintain vegetative or biomass groundcover stimulate soil microbial activity and alter soil microbial community composition. *Plant and Soil*, 2005, 271 (1-2): 377-389.
- [24] Zhang L, Liu F, Zhang Y, Li X, Li B, Xu S, Gu J, Han M. Effects of different mulching on soil organic carbon fractions and soil microbial community of apple orchard in Loess Plateau. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(15): 3180-3190. (in Chinese)
- 张林森,刘富庭,张永旺,李雪薇,李丙智,胥生荣,谷洁,韩明玉. 不同覆盖方式对黄土高原地区苹果园土壤有机碳组分及微生物的影响. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3180-3190.
- [25] Zibilshe LM, Markus DJ. Black oat cover crop management effects on soil temperature and biological properties on a mollisol in Texas USA. *Geoderma*, 2009, 149(3): 379-385.
- [26] Chen Y, Wen X, Sun Y, Zhang J, Wu W, Liao Y. Mulching practices altered soil bacterial community structure and improved orchard productivity and apple quality after five growing seasons. *Scientia Horticulturae*, 2014, 172: 248-257.
- [27] Ingvarsson PK. Group selection in density-regulated populations. *Evolutionary Ecology Research*, 1999, 1(5): 527-536.
- [28] Akihiko M, Satoshi I, Nobuaki F, Hiroaki H. Influence for soil environment by continuing use of biodegradable plastic. *Journal of Polymers and the Environment*, 2011, 19(3): 622-627.
- [29] Carrera LM, Buyer JS, Vinyard B, Abdul-Baki AA, Sikora LJ, Teasdale JR. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. *Applied Soil Ecology*, 2007, 37(3): 247-255.
- [30] Buyer JS, Teasdale JR, Roberts DP, Zasada IA, Maul JE. Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(5): 831-841.
- [31] Wallis PD, Haynes RJ, Hunter CH, Morris CD. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology*, 2010, 46(1): 147-150.
- [32] Sar P, Kazy SK, Paul D, Sarkar A. Metal bioremediation by thermophilic microorganisms//

Satyanarayana T, Littlechild J, Kwarabiyasi Y. Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. The Netherlands: Springer, 2013.

[33] Cleaver AA, Burton NP, Norris PR. A novel

Acidimicrobium species in continuous cultures of moderately thermophilic, mineral-sulfide-oxidizing acidophiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(13): 4294-4299.

Effect of ground mulch managements on soil bacterial community structure and diversity in the non-irrigated apple orchard in Weibei Loess Plateau

Yuxing Chen¹, Xiaoxia Wen¹, Yulin Sun¹, Junli Zhang¹, Xiaoli Lin²,
Yuncheng Liao^{1*}

¹College of Agronomy, ²College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract: [**Objective**] We studied the changes in soil bacterial communities induced by ground mulch managements at different apple growth periods. [**Methods**] We adopted the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with PCR-amplified 16S rRNA fragments to determine soil bacterial community structure and diversity. [**Results**] Soil bacterial community structure with different ground mulch managements were significantly different. Both the mulch management strategies and apple growth periods affected the predominant groups and their abundance in soil bacterial communities. Grass mulch and cornstalk mulch treatments had higher bacterial diversity and richness than the control at young fruit period and fruit expanding period, whereas film mulch treatment had no significant difference compared with the control. During mature period, bacterial diversity in the control reached its maximum, which may be ascribed to the rapid growth and reproduction of the r-selection bacteria. The clustering and detrended correspondence analysis revealed that differences in soil bacterial communities were closely correlated to apple growth periods and ground mulch managements. Soil samples from the grass mulch and cornstalk mulch treatments clustered together while those mulched with plastic film treatment were similar to the control. The most abundant phylum in soil bacterial community was Proteobacteria followed by Bacteroidetes. Some other phyla were also detected, such as Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Chloroflexi. [**Conclusion**] Mulching with plant (Grass/Cornstalk) had great effects on soil bacterial community structure and enhanced the diversity while film mulch management had no significant effects.

Keywords: apple orchard, mulching, bacterial community, PCR-DGGE, cloning and sequencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31471451)

* Corresponding author. E-mail: yunchengliao6912@163.com

Received: 21 August 2014/Revised: 3 December 2014