

连作对植烟土壤微生物群落多样性的影响

何川¹, 刘国顺¹, 蒋士君^{2*}

(1. 国家烟草栽培生理生化研究基地, 河南农业大学烟草学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 连作影响土壤健康的微生物学机制分析是当前的研究热点之一。本试验首次采用 BIOLOG 生态板法从生理代谢水平上分析了烟草连作对土壤微生物多样性的影响。对分别来自重庆黔江和河南洛阳不同连作年限的烟田土样研究结果一致表明: (1) 短期连作(连作年限 ≤ 3 a)时的土壤微生物平均吸光度值(AWCD)显著高于4 a和5 a的连作土壤,反映出短期连作土壤仍具有较高的微生物活性;(2) 短期连作时土壤微生物的Shannon指数、Simpson指数显著高于4 a、5 a连作,重庆和河南地区的McIntosh指数总体上表现出短期连作高于长期连作,Shannon均匀度指数则无显著差异;(3) 主成分分析(PCA)结果显示:连作烟田土壤微生物利用的主要碳源是糖类、高分子类和羧酸类,短期连作的土壤微生物具有较高的碳源利用率。综合研究结果表明:短期连作(连作年限 ≤ 3 a)土壤仍保持较高的微生物多样性,但连作4 a、5 a的土壤微生物多样性则急剧降低。本试验结果为烟田土壤健康机制研究的一部分,有助于进一步探讨土壤的可持续利用及土传病害防治新途径。

关键词: 连作烟草; 土壤微生物多样性; 碳源利用; BIOLOG 分析

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2012)04 - 0658 - 06

Effect of Continuous Cropping on Tobacco Soil Microorganism Community Diversity

HE Chuan¹, LIU Guo-shun¹, JIANG Shi-jun^{2*}

(1. National Tobacco Cultivation & Biochemistry Research Center, College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Effect of continuous cropping on soil microorganism mechanism is one of hot research issues at present. The effect of continuous cropping on soil microorganism diversity was analysed at the metabolic level by using BIOLOG. The tobacco soil from Chongqing and Henan was analysed and the results indicated: (1) The average well color development(AWCD) of soil microorganism was significantly higher under short-term continuous cropping(continuous cropping years ≤ 3 years) than 4 and 5 years, this reflected that soil microorganism activities were still high under short-term continuous cropping. (2) The Shannon index and Simpson index of soil microorganism were significantly higher under short-term continuous cropping, the McIntosh index of Chongqing and Henan had the similar law as a whole, the difference of Shannon uniformity index was not significant. (3) The results of principal component analysis(PCA) indicated that carbohydrates, carbohydrates and carboxylic acids which were the main carbon resources were utilized by soil microorganism of continuous tobacco cropping, the soil microorganism had a higher utilization rate of carbon resource under short-term

收稿日期: 2012 - 03 - 02 修回日期: 2012 - 06 - 10

基金项目: 河南省烟草公司科技攻关项目(HYKJ200814)和重庆市烟草公司科技攻关项目(2008YY01009)

作者简介: 何川(1985—)男,硕士生,主要从事土壤碳循环与土壤健康关系研究, E-mail: hechuan050110050@163.com; * 通讯作者: 蒋士君, 副教授, E-mail: jiangsj001@sohu.com。

continuous cropping. The synthetical study indicated that the soil microorganism diversity was higher under short-term continuous cropping, and sharply declined after 4 and 5 years. The test was a part of the research of soil health mechanism, and can provide new ways for sustainable use of soil and control of soil-borne diseases.

Key words: continuous cropping tobacco; diversity of soil microorganism; utilization of carbon resource; BIOLOG analysis

烤烟是我国重要的经济作物,烤烟连作现象比较严重,连作障碍是烟草栽培中的普遍现象,我国烤烟连作面积已达28%以上^[1]。长期连作严重影响了土壤的理化性状和生态环境,而土壤理化性状和土壤生物性状的变化是导致土壤质量下降的重要原因^[2],土壤中的微生物以其丰富的生物多样性使它们成为生态系统中最活跃和具有决定性影响的组份之一,土壤微生物的生态特征因能够反应土壤的健康状况而受到研究者的高度关注。许多研究者从水分^[3]、长期施肥^[4-5]、土地利用方式^[6]、耕作方式等^[7]方面证明了土壤微生物多样性的变化。研究烟草连作对土壤微生物多样性的影响方面已有许多报道,但都是以常规分离培养作为研究手段^[8-10],由于土壤中可分离培养微生物比例较小,因此很难准确研究土壤微生物群落功能多样性。微生物利用 Biolog EcoPlate™微平板中的碳源代谢产生特定“指纹”,与常规分离方法相比,此方法从生理代谢水平上能更准确地反映微生物的多样性^[11]。用 Biolog EcoPlate微生态板分析土壤微生物功能多样性,能较快捷、敏感地反映土壤微生物群落特征的变化,且能得到较为丰富的信息^[12]。国内外从微生物群落生理代谢水平上来研究烟草连作对土壤微生物多样性的报道还比较少见,本试验以 Biolog EcoPlate微平板从生理代谢水平上研究连作对植烟土壤微生物群落水平多样性变化的影响,旨在为进一步解决烟草连作障碍提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土样分别采自重庆市黔江区、河南洛阳的烤烟连作烟田,45个样品全部采自连作年限1~5年的代表性植烟土壤,每个地区同一连作年限的土壤样品不少于3个。其中第1年植烟土壤样品9个、连作2a的9个、连作3a的10个、连作4a的9个、连作5a的8个。五点取样法采集土样,土样过筛后备用。同一地市的土样来自相同的农业环境区域内,以尽量减少土质、地貌、植被等因素对试验结果的影响。采样烟田的施肥管理均按照当地常规生产进行。重庆黔江采样田的烤烟品种为云烟85,河南为中烟100,具体土壤理化性质如下表。

表1 重庆和河南地区的土壤理化性质

Tab. 1 The soil physical-chemical properties of chongqing and henan area

地区 Area	全氮/% Total nitrogen	全磷/% Total phosphorus	全钾/% Total potassium	速效氮/ (mg·kg ⁻¹) Available N	速效磷/ (mg·kg ⁻¹) Available P	速效钾/ (mg·kg ⁻¹) Available K	pH
重庆 Chongqing	0.125	0.039	2.52	89.6	17.3	135.7	6.7
河南 Henan	0.138	0.033	2.89	98.3	16.8	149.2	7.3

重庆和河南分别代表着我国烤烟生产的南方烟区和北方烟区。重庆烟区的青枯病以及河南烟区的黑胫病均是当地生产中的典型土传病害,因此,在上述地区取样分析具有较强的代表性。

1.2 试验方法

试验采用 Biolog EcoPlate™微平板法:称取10g土壤样品加入内有100mL灭菌磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)的三角瓶中,加无菌棉花塞,在200 r/min条件下振荡10 min后在超净台上依次稀释到10⁻²、10⁻³稀释度,并用10⁻³稀释液作工作液。用连续移液枪向 Biolog EcoPlate™微平板孔中加入150 μL土壤提取工作液,置于28℃下恒温培养,分别于24、48、72、96、120、144 h在590 nm波长下读取各孔的吸光度值。

1.3 数据分析

以培养 72 h 的数据用 Excel 2007 计算平均吸光度 (AWCD)、多样性指数如 Shannon 指数、Shannon 均一性指数、Simpson 指数、McIntosh 指数和碳源利用能力,用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析、主成份分析(PCA)。

2 结果与分析

2.1 不同连作年限时土壤微生物活性的 AWCD 值变化

平均吸光值 (average well color development, AWCD) 可作为微生物整体活性的有效指标^[13]。AWCD 值的变化速度(斜率)和最终能达到的值反映了土壤微生物单一能源碳利用能力。短期连作对土壤微生物活性的影响较小甚至有所促进,但长期连作时土壤微生物的活性则显著降低(图 1)。通过 ECO 板的 31 种碳源读数,从图中可发现供试土壤的 AWCD 值随着培养时间的延长逐渐增加。培养时间在 48 h 以前,供试土壤的微生物生理代谢水平相当,48 h 以后 AWCD 值则开始出现明显差异,不论是来自重庆还是河南的连作土样,其短期连作(连作年限 ≤ 3 a)土壤微生物的 AWCD 值在均一致地明显高于长期连作(连作年限 ≥ 4 a) ($P < 0.05$)。连作 2 a 时土壤的 AWCD 值最高,连作 4 a、5 a 的 AWCD 值基本上处于同一水平上。

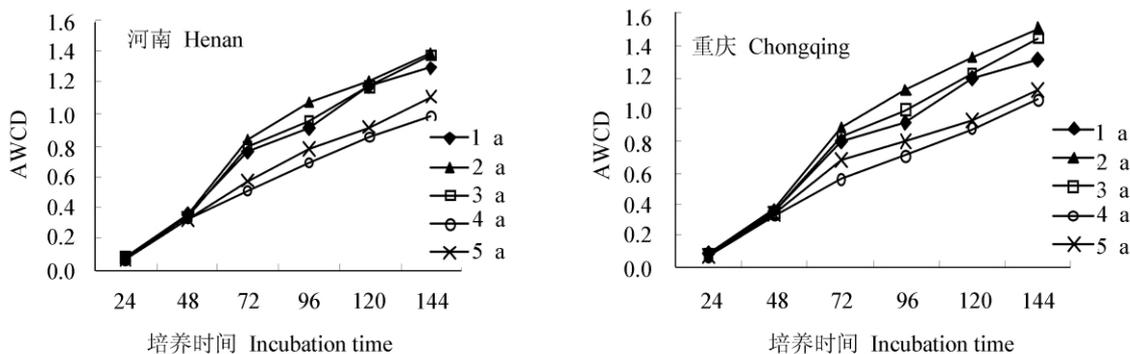


图 1 不同连作年限土壤微生物 AWCD 变化

Fig. 1 Variation in AWCD of soil microbe from different continuous cropping years

2.2 土壤微生物群落的多样性指数分析

Shannon 指数主要反映物种的丰富度,描述了土壤微生物群落功能多样性相对多度的信息。Magurran^[14]研究认为群落的物种丰富度大小对 Shannon 指数的影响较大。由表 1 可以看出,不论是黔江土样还是洛阳土样,短期连作土壤微生物的 Shannon 指数均显著地 ($P < 0.05$) 高于长期连作,说明短期连作对土壤微生物多样性的影响较小,而长期连作能显著降低土壤微生物的物种丰富度。但连作 1、2、3 a 之间,以及连作 4 a、5 a 之间并无显著差异,Shannon 均一性指数是用来刻画群落中各个种的相对密度,其值越接近于 1 时,表明各组成越相似。供试土壤的 Shannon 均一性指数没有显著性差异,且都接近于 1,土壤物种群落组成非常相似。

Simpson 指数反映了群落中常见的物种多少。从表 1 中可以看出,两地区连作 1、2、3 a 与连作 4 a、5 a 之间略有差异,但并不显著。McIntosh 多样性指数基于群落物种多维空间上的多样性指数。重庆地区在连作前 2 a 与连作 3、4、5 a 相比有较高的 McIntosh 多样性指数,河南地区只有在连作 2 a 时表现出较高的 McIntosh 多样性,其它几个连作年限间则无显著差异。

2.3 连作土壤微生物群落的碳源代谢多样性分析

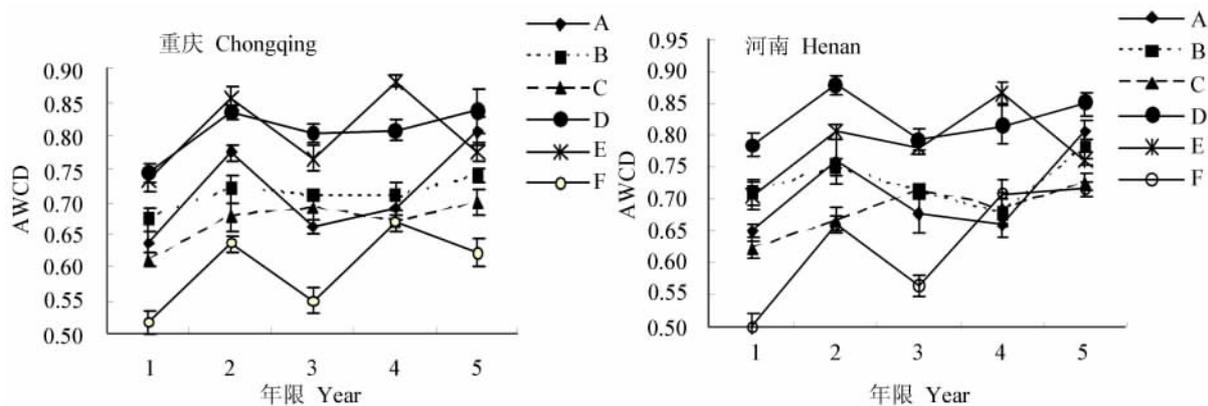
2.3.1 不同连作年限土壤微生物对 BIOLOG - ECO 板 6 类碳源的利用 通过不同连作年限土壤微生物对 BIOLOG - ECO 板 6 大类碳源的利用作显著性差异分析可知(图 2):重庆和河南地区的连作土壤微生物均对糖类和高分子类碳源有较高的利用率,对磷酸碳源的利用率则较低。重庆地区各连作年限土壤微生物对碳源的的能力有很大差异性,总体上表现为微生物对糖类和高分子类碳源的利用率显著高于其它几类碳源 ($P < 0.05$)。连作 5 年时微生物对胺类碳源的利用率回升较快,介于糖类和高分子类之间。胺类碳源利用率在各年限间波动较大,呈先升高后降低再回升的声势,各年限间氨基酸类碳源

利用率均略高于羧酸类,但差异不显著。微生物对磷酸碳源的的利用率最低,显著低于其它 5 类碳源 ($P < 0.05$)。河南地区各年限土壤微生物总体上对糖类碳源利用率最高,与高分子类碳源利用率差异不大,但显著高于其它几类碳源($P < 0.05$)。胺类碳源和氨基酸类、羧酸类碳源利用率与重庆地区表现出相似的规律性,磷酸类碳源连作前 3 年显著低于其它 5 类碳源,但在连作 4、5 a 时与胺类、氨基酸类、羧酸类碳差异不显著。

表 1 不同连作年限土壤微生物多样性指数

Tab. 1 Soil microorganism diversity indices of different continuous cropping years

年限 Year	Shannon 指数 Shannon index		Shannon 均一性指数 Shannon uniformity index		Simpson 指数 Simpson index		Mcintosh 多样性指数 Mcintosh diversity index	
	重庆 Chongqing	河南 Henan	重庆 Chongqing	河南 Henan	重庆 Chongqing	河南 Henan	重庆 Chongqing	河南 Henan
	1	3.604 2 ^a	3.584 3 ^a	0.988 4 ^a	0.987 9 ^a	0.976 2 ^a	0.973 1 ^a	4.383 1 ^a
2	3.695 1 ^a	3.665 4 ^a	0.988 7 ^a	0.988 8 ^a	0.975 2 ^a	0.975 3 ^a	4.372 6 ^a	4.363 6 ^a
3	3.601 8 ^a	3.593 1 ^a	0.991 0 ^a	0.991 1 ^a	0.977 1 ^a	0.971 3 ^a	4.143 8 ^b	4.124 9 ^b
4	3.498 9 ^b	3.479 0 ^b	0.989 8 ^a	0.989 9 ^a	0.966 6 ^{ab}	0.964 9 ^{ab}	4.238 6 ^b	4.237 8 ^{ab}
5	3.400 2 ^{bc}	3.400 1 ^b	0.990 1 ^a	0.9901 ^a	0.965 7 ^{ab}	0.967 9 ^{ab}	3.957 2 ^b	3.995 5 ^b



A 表示胺类; B 表示氨基酸类; C 表示羧酸类; D 表示糖类; E 表示高分子类; F 表示磷酸碳源类。

A is amines; B is amino acids; C is carboxylic acids; D is Carbohydrates; E is Complex carbon sources; F is Phosphate-carbon.

图 2 不同连作年限土壤微生物碳源利用率比较

Fig. 2 Carbon utilization rate of soil microorganism of different continuous cropping years

2.3.2 BIOLOG 结果的主成分分析(PCA) 通过微生物对 6 大类碳源利用能力作 PCA 分析可知(表 2) 重庆和河南地区土壤第一个主成分的方差贡献率分别达到 60.593% 和 66.325%,前两个主成分的方差贡献率累积均达到 85% 以上,说明提取的 2 个主成分可以概括土壤微生物对 6 类碳源的利用信息。

由表 3 可知,糖类和高分子碳源在第 1 主成分上有较高的载荷,重庆和河南分别为 0.928、0.896 和 0.884、0.916,说明第 1 主成分基本上反映了土壤微生物对糖类和高分子类碳源的信息;重庆第 2 主成分氨基酸类碳源的载荷值为 0.925,河南第 2 主成分和羧酸类碳源则具有较高的载荷值,说明第 2 主成分基本上反映了微生物对氨基酸类和羧酸类碳源利用的信息。

在 31 种主成分因子中,从中提取可以聚集单一碳源变量的累积方差贡献率为 59.43% (重庆) 和 60.14% 的前两个主成分 PC1 和 PC2 来分析土壤微生物的群落功能多样性。从图 3 可以看出,两地区 2 a

表 2 全部方差解释表

Tab. 2 Total variance explained

主成分 Component	方差累积值/% Cumulative	
	重庆 Chongqing	河南 Henan
1	60.593	66.325
2	86.248	90.218

表 3 主成分载荷矩阵
Tab. 3 Component matrix

碳源 Carbon resource	重庆 Chongqing		河南 Henan	
	主成分 1 Component 1	主成分 2 Component 2	主成分 1 Component 1	主成分 2 Component 2
胺类 Amines	0.724	0.335	0.805	0.484
氨基酸类 Amino acids	-0.203	0.925	0.635	0.733
羧酸类 Carboxylic acids	0.805	-0.011	-0.466	0.746
糖类 Carbohydrates	0.896	0.363	0.884	-0.150
高分子类 Complex carbon sources	0.928	-0.282	0.916	-0.792
磷酸碳源类 Phosphate - carbon	0.627	-0.208	0.676	-0.103

和 3 a 连作对土壤微生物多样性影响较小。在 5 个连作年限的土壤中,重庆地区在连作前 4 a 时均具有较好的分离,5 a 连作时分离较差,连作 2 a 和 3 a 土壤处在 PC1 和 PC2 的正端,得分较高。河南地区只在连作 2 a 和 3 a 有较好的分离且得分较高,其它 3 个连作年土壤得分较低,对微生物多样性影响较大。比较 5 个不同连作年限土壤在 PC1 和 PC2 轴的分布后发现,短时间连作土壤(前 3 a)对微生物多样性影响较小。

3 结论与讨论

本试验结果表明,(1) 研究结果表明,重庆和河南地区土壤微生物对糖类、高分子类、氨基酸类碳源具有较高的利用率,因此,本研究认为糖灰、高分子类和羧酸类碳源对不同连作年限植烟土壤

微生物有较大影响,其在农业生产中的应用可以作进一步研究,其它研究者研究表明糖类和高分子类在微生物碳源利用中占有总特征碳源很大的比例^[15-17]。(2) 不同连作年限植烟土壤微生物对 31 种碳源的利用能力有所不同,短期连作植烟土壤微生物碳源利用能力较高,说明短期连作的土壤微生物群落的功能性较强,贾志红等^[18]用 PCR - DGGE 方法的研究结果表明连作对土壤微生物多样性的影响较大。(3) 对不同连作年限植烟土壤微生物多样性指数差异分析和 PCA 分析表明,连作年限为 1 ~ 3 a 的植烟土壤对微生物群落多样性影响较小,连作 4 a 和 5 a 的植烟土壤对微生物多样性的影响则相对较大,PCA 分析结果与多样性指数结果相一致。本试验认为烟草连作年限应在 3 a 以内为宜,此年限内土壤微生物的活性和多样性较高。

在反映土壤质量状况上土壤微生物有较高的灵敏度,是近年来研究土壤健康状况不可或缺的生物学指标^[19],土壤微生物群落功能指标与土壤理化性质紧密相关,且相互影响。长期连作使土壤的理化性质和生物学性质恶化,降低土壤微生物的多样性和活性,从而降低烟草的产质量和加重烟草田间病

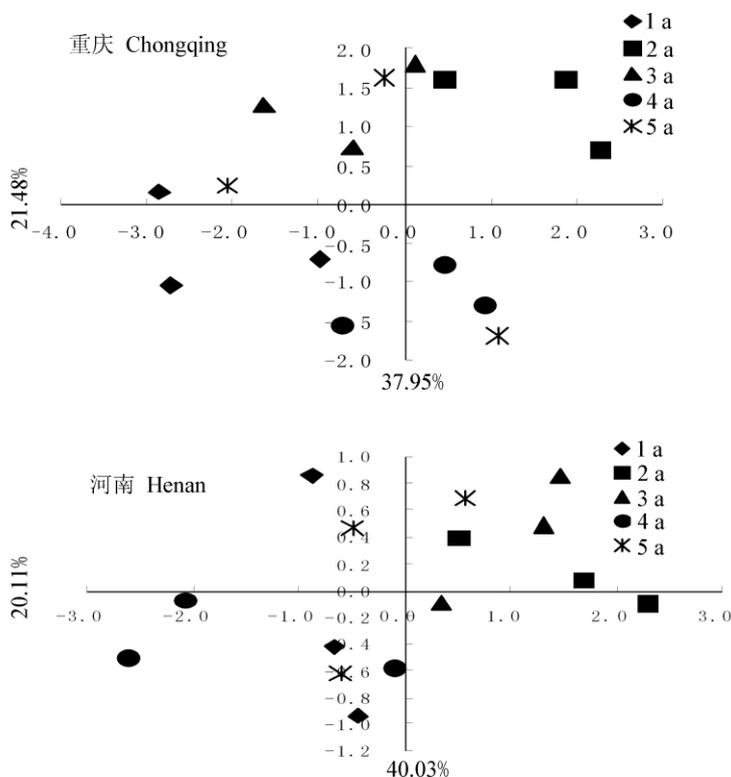


图 3 不同连作年限土壤微生物碳源利用的主成分分析
Fig. 3 Principal components analysis of carbon utilization by soil microorganism of different continuous cropping years

害。本试验借助 BIOLOG 生物学研究手段,力求更准确地阐释连作对土壤微生物群落多功能多样性的影响,以期克服连作障碍提供理论依据。本试验结果为烟田土壤健康机制研究的一部分,有助于进一步探讨土壤的可持续利用及土传病害防治新途径。但土壤微生物多样性和活性对土壤健康的影响机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1]姚槐应,何振立,黄昌勇.不同土地利用方式对红壤微生物的影响[J].水土保持学报,2003,17(2):51-54.
- [2]韦泽秀,梁银丽,井上光弘,等.水肥处理对黄瓜土壤养分、酶及微生物多样性的影响[J].应用生态学报,2009,20(7):1678-1684.
- [3]徐华勤,肖润林,邵冬生,等.长期施肥对茶园土壤微生物群落功能多样性的影响[J].生态学报,2007,27(8):3355-3361.
- [4]郭汉华,易建华,贾志红,等.施肥对烟草生长和根际土壤微生物数量的影响[J].烟草科技,2004(6):39-42.
- [5]陈芝兰,周晓英,何建清.设施栽培措施对土壤微生物区系的影响[J].西藏科技,2007(1):14-15.
- [6]郭利,王学龙,陈永德,等.烟草连作对烟田土壤微生物的影响[J].湖北农业科学,2009,48(10):2443-2445.
- [7]胡汝晓,赵松义,谭周进,等.烟草连作对稻田土壤微生物及酶的影响[J].核农学报,2007,21(5):494-499.
- [8]盘莫谊,张杨珠,肖嫩群,等.烟草连作对旱地土壤微生物及酶活性的影响[J].世界科技研究与发展,2008,30(3):295-297.
- [9]Maguran A E. Ecological diversity and its measurement[M]. Princeton University Press,1988:141-162.
- [10]杜连凤,张维理,武淑霞,等.长江三角洲地区不同种植年限保护菜地土壤质量初探[J].植物营养与肥料学报,2006,12(1):133-137.
- [11]Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environment Microbiology,1991,57:2351-2359.
- [12]李胜华,刘可星,廖宗文.特征碳源简化土壤微生物 Biolog 测定的方法及应用[J].中国农业科学,2010,43(3):523-528.
- [13]董艳,董坤,郑毅,等.种植年限和种植模式对设施土壤微生物区系和酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2009,28(3):527-532.
- [14]郑华,欧阳志云,方治国,等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J].土壤学报,2004,41(3):456-461.
- [15]谭兆赞,刘可星,廖宗文.土壤微生物 BIOLOG 分析中特征碳源的判别[J].华南农业大学学报,2006,27(4):10-13.
- [16]Campbell C D, Grayston S J, Hirst D J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities[J]. Journal of Microbiological Methods,1997(30):33-41.
- [17]Rogers B F, Tate III R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry,2001,33:1389-1401.
- [18]贾志红,易建华,苏以荣,等.烟区轮作与连作土壤细菌群落多样性比较[J].生态环境学报,2010,19(7):1578-1585.
- [19]黎宁,李华兴,朱凤娇,等.菜园土壤微生物生态特征与土壤理化性质的关系[J].应用生态学报,2006,17(2):285-290.