

连作对黑龙江烤烟土壤微生物功能多样性的影响^①

岳冰冰, 李 鑫, 张会慧, 金微微, 许 楠, 朱文旭, 孙广玉*

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘 要: 利用 BiologTM 微平板检测技术研究了烤烟连作对土壤微生物功能多样性的影响。结果表明, 烤烟连作 7 年土壤微生物群落平均颜色变化率(AWCD)显著低于轮作各处理; 土壤微生物功能多样性丰富度指数、Shannon 多样性指数和 Simpson 指数连作处理均低于轮作处理, 且差异达到显著水平($P < 0.05$); 连作 7 年处理土壤微生物功能多样性明显低于连作 2 年处理。在土壤微生物碳源利用上, 烤烟连作 2 年和 7 年处理土壤微生物对聚类化合物、碳水化合物、羧酸类、氨基酸类和其他化合物的利用显著低于正茬轮作处理, 表明烤烟连作降低了土壤微生物的种群多样性和功能多样性, 而且连作年限增加不利于土壤微生物的多样性。

关键词: 烤烟; 连作; 土壤微生物群落; Biolog; 碳源利用

中图分类号: S154.2

烤烟是我国主要经济作物之一, 但由于种植烤烟受到经济利益的驱使和可利用耕地面积的局限性, 烤烟连作难以避免, 由此烤烟连作障碍现象出现。据统计, 每年由于烤烟连作障碍所造成的经济损失高达 40 亿元^[1]。黑龙江省烤烟主要种植在松花江流域和牡丹江流域的暗棕壤地区, 近些年来, 烟草连作面积达到 70% 以上, 多年连作使得当地烤烟产量和品质逐年降低, 因此, 克服连作障碍是当地烤烟产业可持续发展的关键。目前, 国内外学者从烟叶产量和质量^[2]、土壤养分^[3]、根系分泌物^[4]、微生物数量及酶活^[5-6]等方面对烤烟的连作障碍进行了研究。归结起来, 烤烟连作障碍主要是由于土壤养分不均衡、土壤生物学环境变化和植物的化感作用引起的。

土壤微生物作为土壤生态系统的重要组成部分, 是一系列生物化学反应的参与者, 在土壤结构的稳定、植物氮循环、植物病虫害防治等农业生产中具有重要的作用^[7], 而微生物的群落代谢功能多样性是生态系统变化的直接表现, 因此, 研究土壤微生物多样性是农业生态系统分析的可行性方法。Biolog 微平板检测法正是基于微生物对于不同底物碳源的利用不同, 产生不同的代谢图谱来直观地反映出微生物群落的功能多样性, 而被广泛应用于微生物群落多样性的研究。本文利用 Biolog Eco 微平板检测技术, 研究

了短期连作(2 年)和长期连作(7 年)对烟田土壤微生物群落功能多样性的影响, 为进一步探索连作障碍与土壤环境微生物群落功能结构之间的关系, 探讨烤烟连作障碍的发生机理和制定可行的防御措施提供理论与实践依据。

1 研究区概况与研究方法

1.1 研究区概况

试验于黑龙江省宁安市中国烟草东北农业试验基地(129°6'E, 44°58.5'N)进行。试验区属中温带大陆性季风气候, 年平均气温 4.0℃, 年平均降雨量 427.5 mm, 蒸发量 1 635 mm; 土壤类型为河淤土, 土壤质地为壤土, 肥力中等, 其基本理化性状为: pH 6.85, 有机质含量 27.7 g/kg, 全氮 1.9 g/kg, 全磷 1.6 g/kg, 全钾 13.0 g/kg, 速效氮 86.5 mg/kg, 速效磷 36.4 mg/kg, 速效钾 300.0 mg/kg。

1.2 试验设置

试验设 4 个处理: 玉米-大豆-烟草(CK1), 大豆-玉米-烟草(CK2), 烟草连作 2 年(CC2), 烟草连作 7 年(CC7); 每个处理 3 次重复, 随机排列, 共 12 小区, 小区面积为 52.8 m²(8.8 m×6 m), 行距 110 cm, 株距 50 cm。

供试烟草品种为龙江 911。于 2011 年 9 月取样,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771746, 31070307)、黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD201105)和黑龙江省烟草专卖局项目(2007, 2009)资助。

* 通讯作者(sungy@vip.sina.com)

作者简介: 岳冰冰(1986—), 女, 黑龙江双鸭山人, 硕士研究生, 主要从事植物生理学研究。E-mail: swx05249ybb@126.com

取样时作物为烟草, 每个小区随机取 5 个点的根际土, 混合作为一个土样。土壤样品用无菌的封口袋密封, 置于冰盒中带回实验室, 研磨过 2 mm 筛后, 马上进行 Biolog 试验测定。

1.3 Biolog 试验

Biolog 试验参照 Classen 等^[8]的方法。Biolog Eco 微平板购自美国 Biolog 公司(Biolog, Hayward, USA), 采用酶标仪(BIO-TEK Instruments INC, USA)进行测定。

微生物代谢强度采用每孔颜色平均变化率 AWCD(average well color development)来描述^[9], 计算表达式为: $AWCD = \sum (C - R) / 31$, 其中, C 是所测 31 个反应孔的吸光值, R 是对照孔的吸光值。

将 Biolog 微平板上的 31 种碳源分成 6 大类, 分别为羧酸类 9 种、碳水化合物类 7 类、氨基酸类 6 种、聚合物类 4 种、胺类 2 种、其他类化合物 3 种, 选取培养 96 h 的试验结果进行丰富度指数(S)、Shannon 多样性指数(H)、Simpson(D)指数和 McIntosh(U)指数的计算。丰富度指数是指被利用的碳源总数, 即颜色变化的孔数, 光密度值小于 0.25 时视为颜色无变化^[10]; Shannon 多样性指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数计算公式参照 Zak 等^[11]的方法。

1.4 数据处理分析

应用 Microsoft Excel 2003 进行试验数据的计算和作图, SPSS17.0 进行主成分分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 碳源平均颜色变化率(AWCD)

平均颜色变化率(AWCD)是反映土壤微生物群落活性的重要指标, 它通过孔的颜色变化来反映微生物对不同碳源代谢的总体情况^[12], AWCD 值增加得越快, 表明微生物群落的代谢活性越强。由图 1 可知, 随着培养时间的延长, 各土样 AWCD 值都有不同程度的提高, 这表明土壤微生物群落利用碳源量逐渐增加, 代谢活性增强。在培养的前 24 h AWCD 值较小, 且变化趋于平缓, 说明碳源被利用得较少, 24 h 后开

始表现出明显的上升趋势, 172 h 之后 AWCD 值变化趋于平缓, 各处理间差异显著。各处理土壤微生物对单一碳源利用强度由高到低依次为: CK1>CK2>CC2>CC7。由此可见, 以大豆或玉米为前茬的正茬轮作烟田土壤微生物 AWCD 值明显高于连作土壤, 正茬轮作处理之间差异不显著, 但连作 7 年(CC7)处理的 AWCD 值明显低于连作 2 年(CC2)处理, 说明烤烟连作明显降低了土壤微生物碳源利用能力, 使微生物群落代谢活性减弱, 且连作年限越长, 降低得越明显。

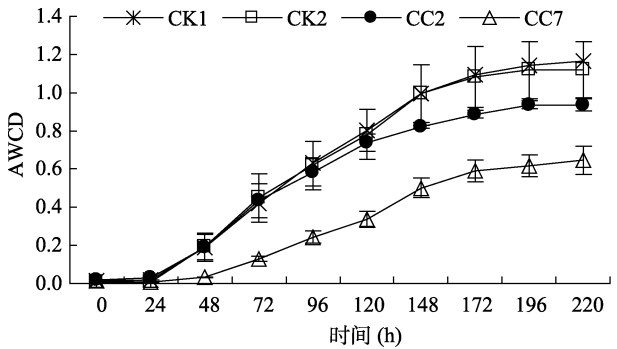


图 1 烤烟连作对土壤微生物 AWCD 的影响
Fig. 1 Effects of continuous tobacco cropping on AWCD of microbial community in soils

2.2 土壤微生物群落功能多样性指数

通过对土壤微生物培养 96 h 的碳源利用程度数据进行多样性指数分析, 可以进一步了解土壤微生物群落活动的整体动态变化。本文通过对丰富度指数、Shannon 多样性指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数的计算, 从物种的数目、多样性、优势度和均匀度方面反映土壤微生物功能多样性。由表 1 可知, CK1 和 CK2 之间的土壤微生物多样性指数差异均不显著, 而 CK1 和 CK2 与 CC7 之间差异显著($P < 0.05$), 即连作降低了土壤微生物多样性。连作 2 年土壤微生物各多样性指数除 Simpson 指数与轮作处理差异显著外, 其他各多样性指数均不显著。

2.3 土壤微生物群落利用碳源的类型

Biolog Eco 微平板上有 31 种碳源, 可分成 6 大类: 聚类化合物、碳水化合物、羧酸类、氨基酸类、

表 1 微生物群落底物代谢功能多样性指数
Table 1 Functional diversity indexes of soil microbial community

处理	Shannon 指数 <i>H</i>	Simpson 指数 <i>D</i>	丰富度指数 <i>S</i>	McIntosh 指数 <i>U</i>
CK1	1.31 ± 0.01a	0.94 ± 0.00 a	23.33 ± 0.58 ab	4.71 ± 0.57 a
CK2	1.32 ± 0.05 a	0.94 ± 0.01 a	24.33 ± 1.53 a	4.64 ± 1.18 a
CC2	1.24 ± 0.03 ab	0.92 ± 0.01 b	21.33 ± 0.58 b	4.97 ± 0.62 a
CC7	1.21 ± 0.06 b	0.92 ± 0.01 b	14.67 ± 2.08 c	2.14 ± 0.33 b

注: 同列不同小写字母表示处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

胺类和其他化合物。将每类碳源的吸光值平均作图,可直观表现各处理对不同碳源的利用情况(图 2)。方差分析结果显示,除胺类外,不同处理土壤微生物对每一碳源的利用差异显著($P<0.05$),说明烟田的土壤微生物对碳水化合物类利用较强,而对胺类利用较弱。不同处理之间,CK1 和 CK2 的土壤微生物对聚类化合物、碳水化合物、羧酸类、氨基酸类和其他化合物的利用显著高于 CC7,这说明连作降低了土壤微生物的碳源利用能力,削弱了土壤微生物群落代谢功能。

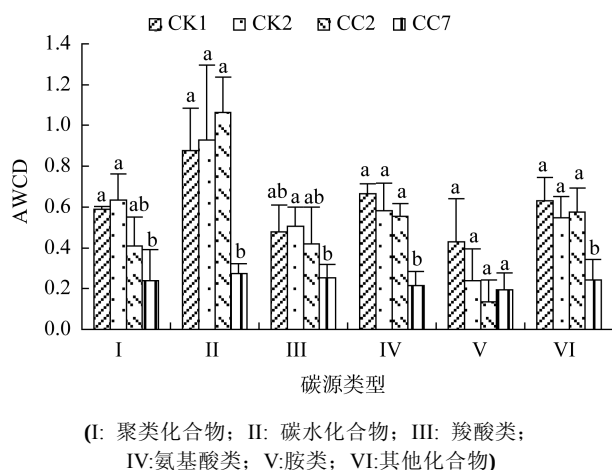


图 2 土壤微生物群落对不同碳源的相对利用情况
Fig. 2 Relative use efficiencies of soil microbial community on different carbon sources

2.4 土壤微生物群落碳源利用的主成分分析

通过主成分分析(principal component analysis, PCA)将不同样本的多元向量降维成互不相关的主元向量,更直观地反映微生物群落代谢特征。分析得知,主元向量的前两个主成分(PC1/PC2)分别解释变量方差的 54.0% 和 36.4%,累积方差贡献率达 90.4%。用 PC1 和 PC2 作图,以区分不同处理间的微生物代谢特征。从图 3 可以看出,烟草连作 7 年(CC7)与其他 3 个处理(CC2、CK1 和 CK2)相比,在 PC2 上有较高得分,烟草连作 2 年(CC2)与正茬轮作处理(CK1 和 CK2)之间差异不显著。通过单一碳源的 AWCD 值与 PC1 和 PC2 的因子得分的相关性分析表明,与主成分 1 显著正相关的碳源有 β -甲基 D-葡萄糖苷、L-丝氨酸和葡萄糖-1-磷酸,其中与葡萄糖-1-磷酸的相关性达到极显著水平($P<0.01$),与主成分 2 显著正相关的碳源有丙酮酸甲酯和氨基乙酰-L-谷氨酸,并且与氨基乙酰-L-谷氨酸达到极显著水平($P<0.01$),在主成分分离中起主要作用的碳源是碳水化合物、氨基酸类和其他化合物类。PCA 结果表明,连作使土壤微生物群落对碳源的代谢特征产生了差异。

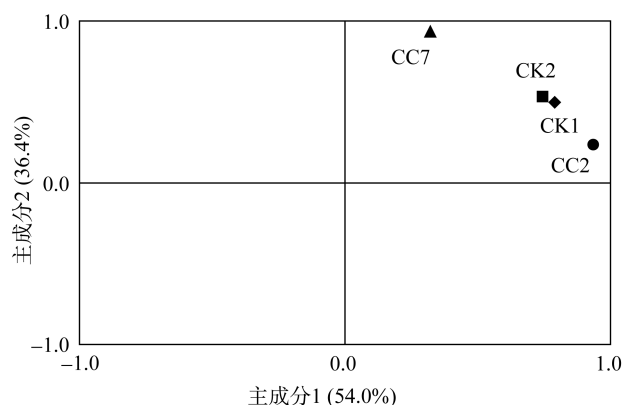


图 3 土壤微生物碳源利用类型的主成分分析
Fig. 3 PCA of different carbon sources for soil microbial community

3 讨论与结论

Biolog 微平板检测技术因其操作方法简便、灵敏度高、无需分离培养纯种微生物等优点而被广泛应用于检测土壤微生物群落多样性^[13]。本文利用具有 31 种不同单一碳源的 Biolog Eco 微平板,对不同种植模式下土壤微生物群落功能多样性进行分析,并进行功能多样性指数的计算。研究结果显示,烤烟连作的两个处理土壤微生物 AWCD 值显著低于以大豆或玉米为前茬的正茬轮作处理,表明烤烟连作明显降低了土壤微生物的碳源利用能力,使微生物群落代谢活性减弱。轮作的两个处理土壤微生物各多样性指数均高于烤烟连作 7 年处理,且差异显著($P<0.05$),说明烤烟连作使土壤微生物功能多样性降低,表现为降低了土壤微生物群落的物种丰富度、优势度和均匀度。烤烟连作 2 年处理土壤微生物与轮作处理除 Simpson 指数差异显著外,其他各多样性指数均不显著,这可能是由于烤烟连作年限较短,只对土壤微生物优势种群的影响显著,而对于种群丰富度和均匀度影响不大。陈义群等^[16]研究不同农业措施对草莓连作土壤微生物群落特征的影响,结果显示草莓连作土壤微生物群落的 AWCD 值明显低于莓-稻轮作,多样性指数 McIntosh 显著降低,而 Shannon 指数和 Simpson 指数变化不大,与本文有一定差异,可能是试验采用的作物不同从而对土壤微生物丰富度指数和均匀度指数影响不同。对不同处理的 Biolog Eco 微平板上的 6 大类碳源相对利用分析可知,除胺类外,不同处理土壤微生物对每一碳源的利用差异显著($P<0.05$),轮作处理土壤微生物对聚类化合物、碳水化合物、羧酸类、氨基酸类和其他化合物的利用显著高于烤烟连作 7 年处理,说明连作降低了土壤微生物的碳源利用能力,削弱了土壤微生物群落代谢功能,这与分析

AWCD 值和多样性指数的结果相一致。对不同处理的碳源利用进行主成分分析,结果证实了连作使土壤微生物群落对碳源的代谢特征产生明显变异。

本研究结果表明,烤烟连作可使土壤微生物群落 AWCD 值、功能多样性指数、碳源利用率显著降低,且连作 7 年处理比连作 2 年处理更为突出,这可能是由于连作抑制了烟田土壤微生物某些种群的生长,从而微生物群落结构单一化,然而其作用机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张继光, 申国明, 张久权, 张忠锋, 石屹, 李世博, 刘海伟, 时鹏. 烟草连作障碍研究进展[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(3): 95-99
- [2] 晋艳, 杨宇虹, 段玉琪, 孔光辉. 烟草轮作、连作对烟叶产量质量的影响[J]. 西南农业学报, 2004, 17(B05): 267-271
- [3] 王连君, 谷思玉. 烤烟连作对土壤养分的影响[J]. 烟草科技, 2004(9): 40-42
- [4] 郭亚利, 李明海, 吴洪田, 袁玲, 黄建国. 烤烟根系分泌物对烤烟幼苗生长和养分吸收的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(3): 458-463
- [5] 郭利, 王学龙, 陈永德, 赵玉刚. 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): 2 443-2 445
- [6] 张友杰, 刘国顺, 叶协锋, 李琰琰, 何川, 李伟, 孟颖梅, 袁冰丽. 烤烟不同生育期土壤酶及微生物活性的变化[J]. 土壤, 2010, 42(1): 39-44
- [7] Parkinson D, Coleman DC. Microbial communities, activity and biomass[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1991, 34(1/4): 3-33
- [8] Haack SK, Garchow H, Klug MJ, Forney LJ. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 1 458-1 468
- [9] 郑华, 陈法霖, 欧阳志云, 方治国, 王效科, 苗鸿. 不同森林土壤微生物群落对 Biolog-GN 板碳源的利用[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1 126-1 130
- [10] Garland J. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24: 289-300
- [11] Zak JC, Willing MR, Moorhead DL, Wildman HG. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26: 1 101-1 108
- [12] Choi K, Dobbs FC. Comparison of two kinds of Biolog microplates(GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36: 203-213
- [13] Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization [J]. Applied Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2 351-2 359
- [14] 陈义群, 董元华, 王辉, 黄冠霖, 霍恒志. 不同农业措施对草莓连作土壤微生物群落特征的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(25): 15 286-15 289, 15 294

Soil Microbial Diversity and Community Structure Under Continuous Tobacco Cropping

YUE Bing-bing, LI Xin, ZHANG Hui-hui, JIN Wei-wei, XU Nan, ZHU Wen-xu, SUN Guang-yu*

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Soil microbial diversity and community structure under continuous tobacco cropping were analyzed by using Biolog microplates. The results showed that the average well color development (AWCD) of soil microbe in 7a continuous tobacco cropping were lower obviously than in rotation; the indices of richness, Shannon-Wiener and Simpson's diversity of microbial metabolic diversity of continuous tobacco cropping were all significantly lower than those of maize-soybean-tobacco or soybean-maize-tobacco rotation; and the functional diversity index of soil microbial community under 7a continuous tobacco cropping was lower than under 2a. The utilization of carbon sources by soil microbes was lower in continuous cropping than in rotation. It suggested that continuous tobacco cropping reduced the diversity of soil microbial community structure and function.

Key words: Tobacco, Continuous cropping, Soil microbial community, Biolog, Carbon source utilization