

不同品种烤烟根际微生物群落结构及多样性研究

李强, 孙敬钊, 皮本阳*, 黄文华, 孔午圆, 陈苏, 贺非 (常德市烟草公司临澧县分公司, 湖南常德 415000)

摘要 [目的]研究不同品种烤烟根际微生物群落结构及多样性差异。[方法]以不同烤烟品种云烟87、云烟97、云烟99和K326为材料,在2015和2016年分别进行田间试验,通过Biolog方法比较不同烤烟品种之间根际土壤微生物群落结构及多样性差异。[结果]土壤微生物群落代谢活性表现为K326>Y97>Y87>Y99;云烟99根际微生物对羧酸类碳源利用最多,而云烟87、云烟97、K326根际微生物对碳水化合物碳源利用最多;主成分分析结果显示,碳水化合物、羧酸、氨基酸与第一主成分(PC1)相关性较高,这3类碳源是区分云烟99与其他3个品种间差异的敏感碳源;不同品种的烤烟,其根际微生物种类和优势种群数量并无差异,但微生物种群的分布情况存在显著差异,尤以K326根际微生物群落物种分布最均匀。[结论]该研究为改善烤烟根际土壤微生态提供理论依据。

关键词 根际土壤;微生物;功能多样性;烤烟

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)30-0160-04

Study on Microbial Community Structure and Diversity in Rhizosphere of Different Flue-cured Tobacco

LI Qiang, SUN Jing-zhao, PI Ben-yang et al (Linli County Branch of Changde Municipal Tobacco Company, Changde, Hunan 415000)

Abstract [Objective] To study microbial community structure and diversity in rhizosphere of different flue-cured tobacco. [Method] Field experiments were conducted in 2015 and 2016 respectively to study the difference of rhizosphere microbial community structure and functional diversity with Biolog technique among Yunyan 87, Yunyan 97, Yunyan 99 and K326 four flue-cured tobacco cultivars. [Result] Metabolic activity of the soil microbial communities followed the order: K326>Y97>Y87>Y99. Carboxylic acids was the most used carbon source by Yunyan 99, but carbohydrates was the most used carbon source by Yunyan 87, Yunyan 97, K326. The result of principal component analysis showed that these 3 types of carbon source were carbohydrates, carboxylic acids and amino acids, which had a high relevance of PC1 and that were used to distinguish Yunyan 99 and other. There was no difference for different flue-cured tobaccos between microbial species and dominant population, but there was significant differences in the distribution of microorganism population. The most uniform was K326. [Conclusion] This study provides theoretical basis for improving the soil microecology of flue-cured tobacco rhizosphere.

Key words Rhizosphere soil; Microorganism; Functional diversity; Flue-cured tobacco

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,在土壤的形成发育、物质循环、肥力演变以及植物生长等方面有极其重要的作用^[1-2]。近年来,随着土地复种指数的提高,以及长期过量施用化肥和农药,导致土壤生态环境不断恶化,土壤板结、微生物种群结构趋劣、烟草病虫害发病率不断上升、烟叶品质下降等问题愈发严重^[3-6]。因此,在农业生产中探究土壤微生物多样性变化以及微生物群落结构特征,对保障作物高产稳产、推动烟叶生产可持续发展具有重要意义。

云烟99、云烟87、云烟97和K326是湖南省浓香型特色烤烟主栽品种,前人对其产量、烟叶品质、生长发育等方面研究较多^[7-10],但不同烤烟品种根际微生态环境之间有何差异,目前鲜见报道。因此,笔者通过小区试验,研究不同品种烤烟根际微生物群落结构及多样性差异,以期改善烤烟根际土壤微生态提供理论依据。

1 材料与方

1.1 试验地概况 于2015、2016年在湖南省常德市临澧县进行试验,土壤类型为黏壤土。0~20 cm耕作层土壤pH 5.9,有机质 16.8 g/kg,碱解氮 114.19 mg/kg,速效磷 18.42 mg/kg,速效钾 134.46 mg/kg。

1.2 试验设计 试验共设4个品种处理:云烟99(Y99)、云烟87(Y87)、云烟97(Y97)、K326,每个处理3次重复。采用随机区组设计,各小区面积30 m²,每小区种50株烤烟,行距120 cm,株距50 cm。区组设通道,四周设保护行。

作者简介 李强(1986—),男,湖南常德人,高级烟叶分级工,从事烟叶生产研究。*通讯作者,烟叶分级技师,硕士,从事烟叶生产研究。

收稿日期 2018-06-22

1.3 取样及分析方法 各品种烤烟于2015年4月10日、2016年4月12日移栽,在烤烟旺长期,即2015年6月11日、2016年6月13日采集根际土壤。按小区5点取样法选取5株烤烟,采用抖土法,先轻轻抖落大块不含根系的非根际土壤,然后轻轻剥离根系表面附着的土壤,获取根际土壤后,用4分法取适量于无菌袋中立即带回实验室。采用Biolog-Eco微平板方法^[11]测定土壤微生物代谢功能多样性。

1.4 指标计算方法 采用平均颜色变化率(average well color development, AWCD)描述土壤微生物群落的代谢活性;采用Shannon多样性指数(H)、Mcintosh均一性指数(U)、Simpson优势度指数(D)表征土壤微生物群落多样性。各指标计算公式^[12-13]:

$AWCD = \sum (C_i - R) / n$,式中, C_i 、 R 分别为反应孔、对照孔在590 nm下的吸光度, n 为培养基碳源种类数。

$H = -\sum (P_i \times \ln P_i)$,式中, P_i 为第*i*孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比值。

$U = \sqrt{\sum (n_i \times n_i)}$,式中, n_i 为第*i*孔的相对吸光值。

$D = 1 / \sum (P_i \times P_i)$,式中, P_i 为第*i*孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比值。

碳源利用率为整个培养过程中该类碳源相对吸光值之和与整个平板相对吸光值总和的比率。

1.5 数据分析 试验数据采用Excel 2007进行处理;采用SPSS 17.0软件进行方差分析、主成分分析,差异显著性分析采用Duncan新复极差方法,显著水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同品种烤烟根际微生物群落代谢活性 AWCD是评

价微生物对碳源利用能力的一个重要指标,反映了土壤微生物的代谢活性,AWCD 值越大,代谢活性越高^[14]。由图 1 可知,随着培养时间的延长,各品种根际微生物 AWCD 值呈先不断增加后趋于稳定的趋势。在培养起始的 24 h 内,各处理 AWCD 值均较低,说明此时根际微生物群落代谢活性较低,碳源基本未利用;在 24 h 后,AWCD 值急速上升,表明微生物

代谢活跃,碳源开始被大量利用;2015 年根际微生物 AWCD 值在 168 h 趋于平缓,2016 年根际微生物 AWCD 值在 144 h 趋于平缓,说明此时微生物活性达到稳定。总体上,AWCD 值整体表现为 K326>Y97>Y87>Y99,说明 K326 根际微生物群落代谢活性最高,云烟 99(Y99)根际微生物群落代谢活性最低。

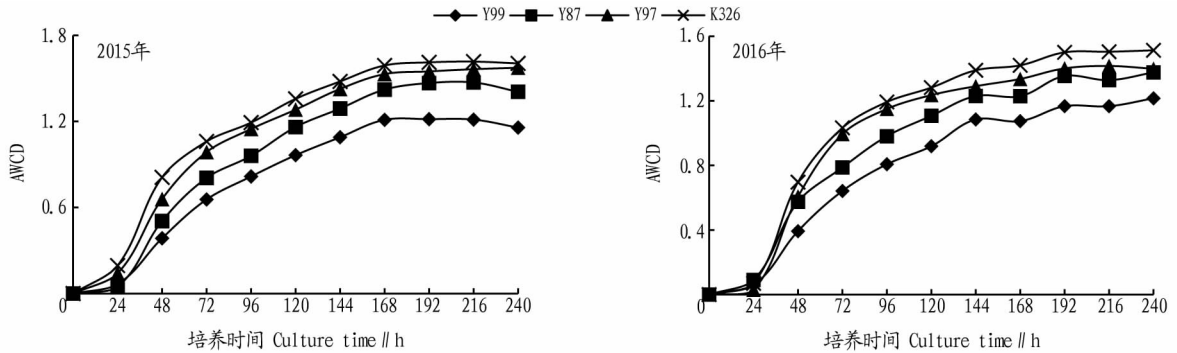


图 1 根际微生物 AWCD 的动态变化

Fig.1 AWCD dynamics of rhizospheric microorganisms

2.2 不同品种烤烟根际微生物碳源利用偏好 土壤微生物活性反映了群落总体的变化,但未反映微生物群落代谢详细信息,研究土壤微生物对碳源的利用偏好,有助于更加全面地了解微生物群落代谢功能特性。根据微生物对营养物质代谢途径的不同,将 Biolog-ECO 微孔板上 31 种底物碳源分为 6 类:碳水化合物、羧酸类、氨基酸类、胺类、聚合物、酚酸类;利用 AWCD 值分别计算出 2015 和 2016 年不同碳源的利用率,然后得出 2 年试验的平均利用率,用以表征根际微生物对碳源的利用偏好。

由图 2 可知,Y99、Y87、Y97、K326 根际微生物对 6 类碳源的利用情况有一定差异,碳源利用率总体以碳水化合物、羧酸类、氨基酸类较高。其中 Y99 根际微生物对羧酸类碳源利用最多,平均利用率为 22.1%,对酚酸类利用最少,平均利用率仅为 8.3%。Y87、Y97、K326 根际微生物利用最多的均是碳水化合物,平均利用率分别为 21.4%、20.3%、19.7%,利用最少的均是酚酸类,平均利用率分别为 9.7%、9.5%、13.1%。由此可知,Y99 根际微生物偏好羧酸类碳源,而 Y87、Y97、K326 根际微生物偏好碳水化合物碳源。

2.3 不同品种烤烟根际微生物碳源利用的主成分分析 为了进一步探讨 4 个不同品种烤烟,其根际微生物碳源利用方式的差异,将根际微生物 120 h 测定的 AWCD 值进行主成分分析,并根据微生物对各类碳源利用的因子权重值,分析不同品种烤烟根际微生物群落多样性的变化。在 2015 和 2016 年的试验中,均提取了 5 个主成分,累计贡献率分别达 94.1%、95.8%,第 1 主成分(PC1)贡献率分别为 59.5%、64.1%。第 2 主成分(PC2)贡献率分别为 12.3%、12.4%。因第 3~5 个主成分贡献率较小,因此取前 2 个主成分进行重点分析。

选取 PC1 和 PC2 的得分做图来表征微生物群落碳源代谢特征。由图 3 可知,2015 和 2016 年试验结果均显示,Y87、Y97、K326 在 PC1 的得分均为正值,根际微生物群落碳源利

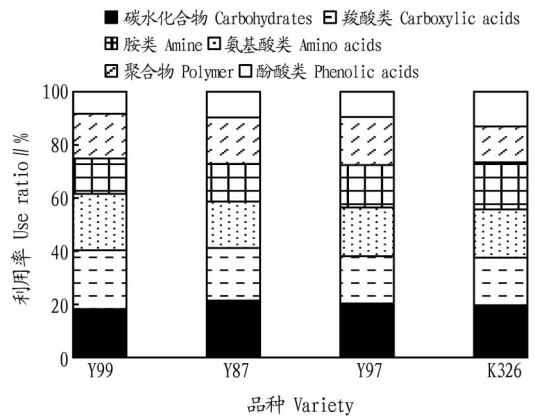


图 2 不同品种烤烟根际微生物对碳源利用率

Fig.2 Carbon source utilization rate by rhizospheric microorganisms of different varieties of flue-cured tobacco

用特征相似,而 Y99 得分值为负值,表明 PC1 的碳源是区分 Y99 与其他 3 个品种间差异的敏感碳源;Y99、Y87、K326 在 PC2 的得分均为正值,根际微生物群落碳源利用特征相似,而 Y97 得分值为负值,表明 PC2 的碳源是区分 Y97 与其他 3 个品种间差异的敏感碳源。

碳源载荷值反映了碳源利用与主因子的相关性,载荷值越高,表示其对主成分的影响越大^[15]。由表 1 可知,2015 年试验中,与 PC1 相关性较高(载荷值>0.6)的碳源有 26 种,其中碳水化合物 9 种,羧酸类 7 种,氨基酸类 5 种,聚合物和胺类均为 2 种,酚酸类 1 种;与 PC2 相关性较高的碳源有 3 种:β-甲基 D-葡萄糖、D-半乳糖醛酸、L-苯基丙氨酸,分别属于碳水化合物、羧酸类、氨基酸类。由图 3 可知,碳水化合物、羧酸、氨基酸是区分云烟 99(Y99)与其他 3 个品种间差异的敏感碳源。

2016 年试验中,与 PC1 相关性较高的碳源有 28 种,其中碳水化合物 9 种,羧酸类 7 种,氨基酸类 6 种,聚合物、酚酸类、胺类均为 2 种;与 PC2 相关性较高的碳源有 2 种:a-丁酮

酸、肝糖,分别属于羧酸类、聚合物。碳水化合物、羧酸、氨基酸是区分 Y99 与其他 3 个品种间差异的敏感碳源,这与 2015 年试验结果一致。

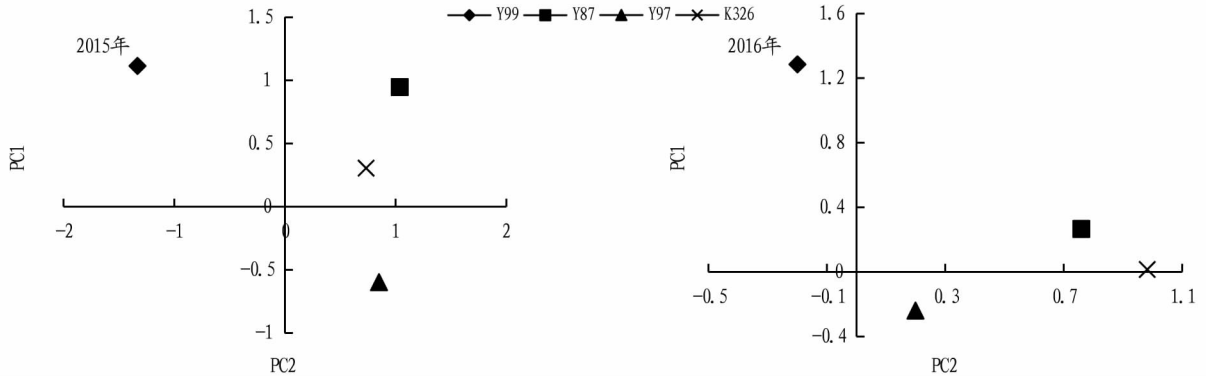


图3 主成分分析

Fig.3 Principal component analysis

表1 31种碳源的主成分载荷值

Table 1 Loading values of principal components of 31 kinds of carbon sources

碳源类型 Carbon source type	底物 Substrates	2015年		2016年		
		PC1	PC2	PC1	PC2	
碳水化合物 Carbohydrates	D-甘露醇 D-Mannitol	0.966		0.844		
	a-D-乳糖 a-D-Lactose	0.925		0.710		
	丙酮酸甲脂 Pyruvic Acid Methyl Ester	0.840		0.942		
	I-赤藻糖醇 I-Erythritol	0.802		0.875		
	D-纤维二糖 D-Cellobiose	0.754		0.855		
	葡萄糖-1-磷酸盐 Glucose-1-Phosphate	0.753		0.699		
	D-木糖 D-Xylose	0.736		0.623		
	β -甲基 D-葡萄糖 β -Methyl-D-Glucoside	0.726	0.601	0.661		
	N-乙酰基-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-Glucosamine	0.634		0.863		
	羧酸类 Carboxylic acids	a-丁酮酸 a-Ketobutyric Acid	0.865		0.746	0.603
D-葡萄糖胺酸 D-Glucosaminic Acid		0.860		0.929		
D-苹果酸 D-Malic Acid		0.843		0.846		
衣康酸 Itaconic Acid		0.801		0.823		
D-半乳糖内酯 D-Galactonic Acid γ -Lactone		0.760		0.768		
γ -羟基丁酸 γ -Hydroxybutyric Acid		0.675		0.601		
D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic Acid		0.613	0.614	0.817		
D,L-a-甘油 D,L-a-Glycerol						
氨基酸类 Amino acids		L-天冬酰胺酸 L-Asparagine	0.920		0.959	
		L-丝氨酸 L-Serine	0.859		0.959	
	L-精氨酸 L-Arginine	0.854		0.815		
	L-苏氨酸 L-Threonine	0.809		0.847		
	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-Glutamic Acid	0.800		0.898		
	L-苯基丙氨酸 L-Phenylalanine		0.790	0.815		
聚合物 Polymers	吐温 80 Tween 80	0.911		0.905		
	吐温 40 Tween 40	0.910		0.954		
	肝糖 Glycogen				0.676	
酚酸类 Phenolic acids	a-环式糊精 a-Cyclodextrin			0.637		
	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy Benzoic Acid	0.887		0.919		
胺类 Amines	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxy Benzoic Acid					
	苯乙基胺 Phenylethyl-amine	0.814		0.863		
	腐胺 Putrescine	0.634		0.727		

2.4 不同品种烤烟根际微生物群落功能多样性指数 不同多样性指数可以从不同方面来描述微生物群落的多样性,多样性指数越大,微生物群落功能多样性越高^[16]。其中 Shannon 多样性指数用来表征生态系统中的物种及其个体数; Simpson 优势度指数反映群落中优势种群的数量; Mcintosh 均一性指数用来描述群落中个体分布的均匀情况^[17-18]。

由表 2 可知,不同品种烤烟,根际微生物群落多样性指

数存在一定差别。各处理 Shannon 指数、Simpson 指数在 2 年的试验中均无显著变化,可见不同品种烤烟之间根际微生物种类和优势种群数量无显著差异。Mcintosh 指数在 2 年试验中均表现为 K326>Y97>Y87>Y99 的规律,且各处理间存在显著差异;其中 K326 的根际微生物 Mcintosh 指数最大,平均为 7.652, Y99 最小,平均为 5.588,前者是后者的 1.37 倍。综合而言,不同品种的烤烟,其根际微生物种类和优势种群数量

并无差异,但微生物种群的分布情况存在显著差异,尤以 K326 根际微生物群落物种分布最均匀。

表 2 根际微生物群落多样性指数

Table 2 Diversity indices of rhizospheric microorganisms communities

年份 Test year	品种 Cultivar	Shannon 指数 Shannon index (H)	Mcintosh 指数 Mcintosh index (U)	Simpson 指数 Simpson index (D)
2015	Y99	3.119 a	5.704 d	0.949 a
	Y87	3.134 a	6.391 c	0.954 a
	Y97	3.274 a	7.221 b	0.959 a
	K326	3.244 a	7.661 a	0.957 a
2016	Y99	3.158 a	5.472 d	0.952 a
	Y87	3.253 a	6.312 c	0.957 a
	Y97	3.273 a	7.130 b	0.959 a
	K326	3.169 a	7.643 a	0.954 a

注:同列不同小写字母表示不同品种间差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercases in the same column stand for significant differences between different varieties at 0.05 level

3 结论与讨论

微生物对碳源利用能力可以反映微生物群落代谢活性水平。王戈等^[19]通过研究云 85、K326、净叶黄、红花大金元 4 种烤烟根际微生物数量及多样性的差异,发现不同品种烤烟根际微生物对碳源总体利用能力存在一定差异,其中云 85 根际微生物群落代谢活性最高。该研究结果表明,根际微生物群落代谢活性表现为 K326 > Y97 > Y87 > Y99, K326 根际微生物群落代谢活性最高,云烟 99 根际微生物群落代谢活性最低。

根际土壤微生物对碳水化合物、羧酸类、氨基酸类、胺类、聚合物和酚酸类 6 类碳源的利用率在一定程度上反映微生物的群落结构。蔡秋华等^[20]研究发现,在寻甸试验点,不同品种对碳源的利用率表现为 K326 > 云烟 87 > 红花大金元;在石林试验点,利用率则表现为红花大金元 > K326 > 云烟 87。该研究结果表明,云烟 99 根际微生物对羧酸类碳源利用最多,而云烟 87、云烟 97、K326 根际微生物对碳水化合物碳源利用最多。

主成分分析结果表明,云烟 87、云烟 97、K326 得分值集中分布在 PC1 正半轴,而云烟 99 则位于 PC1 负半轴;碳水化合物、羧酸类、氨基酸类这 3 类碳源在 PC1 上相关性较高,综合分析认为,云烟 87、云烟 97、K326 偏好碳水化合物、羧酸类、氨基酸类物质。

许玲^[21]通过分析 12 个不同品种烤烟节肢动物群落结

构的差异,发现豫烟 6 号的多样性、均匀度、优势集中性都较高, Y8324 各群落特征指数较低。该研究结果表明,不同品种的烤烟,其根际微生物种类 (Shannon 指数) 和优势种群数量 (Simpson 指数) 并无差异, Mcintosh 指数在 2 年的试验中均表现为 K326 > Y97 > Y87 > Y99 的规律,表明 K326 根际微生物群落物种分布最均匀。

参考文献

- [1] 张立成, 邵继海, 林毅青, 等. 稻-稻-油菜轮作对土壤微生物活性和多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2017, 26(2): 204-210.
- [2] 康林玉, 刘周斌, 欧立军, 等. 土壤微生物促进作物生长发育研究进展[J]. 湖南农业科学, 2017(3): 113-116.
- [3] 孙丹平. 稻田水旱复种轮作对作物生长、资源利用及土壤生态环境的影响[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.
- [4] 杨梅. 四川省主要植烟区土壤生态化学计量学特征研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [5] 李敏, 李琴, 赵丽娜, 等. 我国土壤环境保护标准体系优化研究与建议[J]. 环境科学研究, 2016, 29(12): 1799-1810.
- [6] 李昊. 许昌市襄城县大田烟草病虫害发生与防治情况调查[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- [7] 李世金, 刘国侠, 张国. 不同施氮量及种植密度对云烟 99 农艺性状和经济性状的影响[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(24): 45, 52.
- [8] 杜坚, 王珂清, 张建强, 等. 我国不同生态区云烟 87 烟叶主要化学成分及感官风格差异[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(2): 96-102.
- [9] 王政, 王学杰, 王崇玉. 不同海拔高度云烟 97 生长发育差异比较[J]. 山东农业科学, 2016, 48(5): 35-38.
- [10] 尤垂淮, 江丽芳, 席飞虎, 等. 不同生态区烤烟 K326 质量特征差异分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2016, 45(3): 241-246.
- [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 & environmental microbiology, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [12] YOU M Y, YUAN Y R, LI L J, et al. Soil CO₂ emissions as affected by 20-year continuous cropping in mollisols[J]. Journal of integrative agriculture, 2014, 13(3): 615-623.
- [13] 宋收, 陈晓明, 肖伟, 等. 基于 BIOLOG 指纹解析土壤可培养微生物对铊污染的响应[J]. 核农学报, 2016, 30(6): 1169-1177.
- [14] 程存刚, 赵德英, 吕德国, 等. 植物源有机物料对果园土壤微生物群落多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014(4): 913-922.
- [15] 杨旭初, 龙莉, 屠乃美, 等. 微生物肥料在不同节肥水平下对烟草根际微生物碳代谢指纹的影响[J]. 核农学报, 2017, 31(10): 2016-2022.
- [16] 熊定鹏, 赵广帅, 武建双, 等. 羌塘高寒草地物种多样性与生态系统多功能关系格局[J]. 生态学报, 2016, 36(11): 3362-3371.
- [17] 张仕颖, 夏运生, 肖伟, 等. 除草剂丁草胺对高产水稻土微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(5): 815-819.
- [18] 毛家伟, 张翔, 叶红朝, 等. 土壤改良剂配施氮肥对烤烟 SPAD 值、根系活力及经济性状的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 112-114.
- [19] 王戈, 杨焕文, 赵正雄, 等. 不同抗性烤烟品种根际微生物数量及多样性差异研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(2): 451-458.
- [20] 蔡秋华, 左进香, 李忠环, 等. 抗性烤烟品种根际微生物数量及功能多样性差异[J]. 应用生态学报, 2015, 26(12): 3766-3772.
- [21] 许玲. 烤烟品种和生长势对节肢动物群落动态的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

(上接第 139 页)

- [5] BYRD E T JR. An analysis of variables that influence stakeholder participation and support for sustainable tourism development in rural North Carolina[D]. Raleigh: North Carolina State University, 2003.
- [6] COWLING M, BYGRAVE W D. Entrepreneurship and unemployment: Relationships between unemployment and entrepreneurship in 37 nations participating in the Global Entrepreneurship Monitor (GEM) [R]. London: London Business School, 2003.
- [7] KLINE C, MILBURN L A. Ten categories of entrepreneurial climate to encourage rural tourism development[J]. Leisure studies journal, 2010, 13(1/2): 320-348.

- [8] 叶红. 乡村旅游发展的动力机制研究: 以成都市乡村旅游发展为例[J]. 农村经济, 2007(10): 79-82.
- [9] 杨军. 中国乡村旅游驱动力因子及其系统优化研究[J]. 旅游科学, 2006, 20(4): 7-11.
- [10] 吴必虎, 黄琢玮, 马小萌. 中国城市周边乡村旅游地空间结构[J]. 地理科学, 2004, 24(6): 757-763.
- [11] 潘顺安. 中国乡村旅游驱动力机制与开发模式研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2007.
- [12] 莫林丽. 大别山区红色旅游资源整合开发研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(31): 169-171.
- [13] 鲍菊芽, 胡德华. 加快推进我国农旅深度融合的困难与解决对策: 以浙江省丽水市莲都区为例[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(35): 178-181.