

耕作方式对植烟土壤酚酸类物质的影响

方宇¹, 邓小鹏², 张留臣³, 封幸兵³, 王皓⁴, 李庆鹏⁴, 周彬³, 陈峰³, 王津军³, 张晗³, 李卫³, 陈小龙⁵, 黄飞燕¹, 余磊¹, 童文杰^{1*}, 刘佳妮^{1*}

(1. 昆明学院农学院, 云南省都市特色农业工程技术研究中心, 云南昆明 650214; 2. 云南省烟草农业科学研究院, 云南昆明 650201; 3. 中国烟草总公司云南省公司, 云南昆明 650011; 4. 中国烟叶公司, 北京 100055; 5. 河南中烟工业有限责任公司原料采购中心, 河南郑州 450000)

摘要 [目的]明确不同耕作方式对植烟土壤酚酸类物质积累特征的影响,为缓解其自毒化感作用提供理论依据。[方法]以烤烟“K326”为研究材料,进行大田试验,以旋耕 20 cm(RT20)为对照,利用高效液相色谱法(HPLC)检测旋耕 20 cm(RT20)、翻耕 30 cm(DT30)、深松 30 cm(ST30)和深松 40 cm(ST40)下酚酸类物质的种类和含量,并基于相关性分析和逐步回归模型探讨各酚酸类物质的积累特征及其影响。[结果]不同耕作方式下共检出 6 种酚酸,对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-香豆酸、阿魏酸和酚酸总量在 DT30 处理下含量较低,较 RT20 分别低 13.77%、68.87%、25.81%、19.83%、20.54%、27.09%,且香草酸达到显著差异($P < 0.05$);除肉桂酸外各酚酸类物质含量均随土层的加深逐渐降低,ST40 下对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-香豆酸、阿魏酸和酚酸总量较 ST30 分别低 16.41%、8.39%、17.85%、18.57%、35.68%、26.18%;同在 30 cm 耕作土层中,除肉桂酸外各酚酸含量均表现为 DT30 < ST30,且 DT30 下的对羟基苯甲酸含量较 ST30 低 31.48%,达到显著差异($P < 0.05$)。[结论]翻耕、深松对土壤扰动较大,重塑了根际土壤的不同生态位,对烤烟根际微生态环境产生一定影响,促进了土壤有机质转化和养分循环,有利于酚酸类物质含量的降低。

关键词 耕作方式;植烟土壤;酚酸类物质;积累特征;高相液相色谱法;影响

中图分类号 S153 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)13-0080-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.13.020

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Effects of Tillage Methods on Phenolic Acids in Tobacco Planting Soil**FANG Yu¹, DENG Xiao-peng², ZHANG Liu-cheng³ et al (1. Yunnan Urban Agricultural Engineering & Technological Research Center, College of Agronomy, Kunming University, Kunming, Yunnan 650214; 2. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650201; 3. China National Tobacco Corporation Yunnan Company, Kunming, Yunnan 650011)

Abstract [Objective] To clarify the effect of different tillage methods on the accumulation characteristics of phenolic acids in tobacco-planting soil, and to provide a theoretical basis for alleviating its autotoxic allelopathy. [Method] Using flue-cured tobacco “K326” as the research material, field experiment was conducted, rotary tillage 20 cm (RT20) was used as a control, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect rotary tillage 20 cm (RT20) and tillage 30 cm (DT30), deep pine 30 cm (ST30) and deep pine 40 cm (ST40) types and contents of phenolic acids, and based on correlation analysis and stepwise regression model to explore the accumulation characteristics of phenolic acids and their effects. [Result] A total of 6 phenolic acids were detected under different tillage methods. The total amount of p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, 4-coumaric acid, ferulic acid and phenolic acid were all lower in DT30 treatment. RT20 was 13.77%, 68.87%, 25.81%, 19.83%, 20.54% and 27.09% lower, respectively, and vanillic acid reached a significant difference ($P < 0.05$); except for cinnamic acid, the content of phenolic acids decreased gradually with the deepening of the soil layer, the total amount of para-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, 4-coumaric acid, ferulic acid and phenolic acid in ST40 were 16.41%, 8.39%, 17.85%, 18.57%, 35.68%, 26.18% lower than ST30 respectively. Except for cinnamic acid, the content of each phenolic acid in the 30 cm cultivated soil layer was DT30 < ST30, and the content of p-hydroxybenzoic acid under DT30 was 31.48% lower than that of ST30, reaching a significant difference ($P < 0.05$). [Conclusion] Tillage and subsoiling have greater disturbances to the soil, reshaping different niche of the rhizosphere soil, have a certain impact on the rhizosphere micro-ecological environment of flue-cured tobacco, promote the conversion of soil organic matter and nutrient cycling, which is beneficial to the content of phenolic acids reduce.

Key words Tillage methods; Tobacco planting soil; Phenolic acids; Accumulation characteristics; High-phase liquid chromatography; Effect

烟草是我国重要的经济作物之一,在全国各省均有种植,每年税收占全国总税收的 1/10,是各级财政的重要组成部分^[1]。玉溪是云南省清香型优质烤烟的代表产区,有“云烟之乡”美称,玉溪地处云贵高原西缘,地形复杂,山地面积占 90.6%^[2],决定了玉溪地区主要以山地烟田进行种植,且旋耕、翻耕是其主要的耕作方式。旋耕、翻耕使得土壤耕层浅耕性退化、水土流失、有机质含量降低、生物活性降低等问题突出,最终导致烟草的产量和质量下降,严重制约着烟草

产业的健康发展。土壤酚酸类物质主要来源于植物根系分泌,被土壤和作物根系吸收后产生化感作用^[3-4],其作用强度取决于其在土壤中的积累、降解以及相互之间的作用关系^[5]。不同耕作方式对土壤扰动程度的差异,将会导致土壤中微生物和土壤理化性质的变化,进而影响土壤中酚酸类物质的积累和降解^[6-7],其在土壤中的吸附、滞留、转化直接影响化感作用的效果^[8]。因此,从耕作方式的角度探究酚酸类物质的积累特征并寻求缓解措施具有重要的理论与实际意义。耕作方式是改善土壤质量的一种最为直接有效的方法。有研究表明,深耕和秸秆还田处理能够显著降低土壤容重、提高土壤通气孔隙和烟叶的质量与产量^[9]。对于以叶片为收获器官,在生产过程中力求生长发育水平和品质平衡的烟草来说,适宜的耕作方式尤为重要。刘棋等^[10]研究表明深耕、深松能够有效改善土壤物理性状,促进烤烟根系生长,优

基金项目 中国烟草总公司项目(2018530000241016, 2019530000241028, 2018530000241320)。**作者简介** 方宇(1994—),男,安徽桐城人,硕士研究生,研究方向:植物病理学。*通信作者,童文杰,助理研究员,博士,从事烟草栽培研究;刘佳妮,副教授,博士,硕士生导师,从事植物病理学研究。**收稿日期** 2020-08-15

化根系空间分布。

土壤酚酸类物质是烟草连作障碍中的重要影响因子,目前,其积累特征已在水稻、花生、大豆等作物中予以明确,在烟草根际分泌物中也鉴定出多种酚酸,对土壤中的微生物、酶活性及养分产生不同程度的影响,并通过外源添加酚酸探讨了其化感作用机制^[11-14]。此外,酚酸类物质对植株的致病机制、种子的萌发和胚根的生长产生重要的影响,能够在连作条件下间接地促进部分土传病害的繁殖,提高作物的发病率^[15-16]。相关研究指出,香豆酸能够调节微生物种群结构,抑制尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)的生长^[17];酚酸类物质对烟草黑胫病菌菌丝生长和孢子囊生长量均呈现出低浓度促进、高浓度抑制^[18];且各酚酸之间存在一定的促进或抑制作用,影响酚酸的积累效应^[19]。由此可见,酚酸类物质对烟草的健康生长具有重要的影响。

目前对于酚酸类物质的研究主要集中在分离与鉴定和连作障碍,而其在不同耕作方式土壤中的变化规律及相互作用关系鲜见报道^[20],因此,探明耕作方式对植烟土壤中酚酸类物质积累的影响并采取有效的耕作方式缓解连作障碍和化感作用是烤烟健康生产的关键。该试验采用 HPLC 对 4 种耕作方式下植烟土壤酚酸类物质的种类和含量进行检测分析,探究 4 种耕作方式对植烟土壤酚酸类物质的影响,挑选出对玉溪山地烟区烤烟的提质增效有重要作用的耕作方式;同时,在相关性分析的基础上,利用逐步回归方程模型研究不同耕作方式下植烟土壤中各酚酸类物质的相互影响关系,为研究酚酸类物质在不同耕作方式中的作用机理提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 试验地概况 试验于 2018 年 3—9 月在玉溪市红塔区高仓街道(24°30'N, 103°32'E)进行。试验地为云南省滇中烟区典型的山地烟种植区域,年降雨量为 779.5~989.7 mm,年无霜期为 244~365 d,年平均气温 15.6~23.8 °C,年日照时数 2 115~2 285 h,海拔为 1 760 m,土壤类型为红壤土,前茬作物为小麦。0~20 cm 土层土壤翻耕前的基本理化性质为全氮 0.75 g/kg、全磷 1.28 g/kg、全钾 7.7 g/kg、有效磷 37.4 mg/kg、有机质 17.8 g/kg、速效钾 204 mg/kg、pH 6.72。

1.2 试验设计 试验所需的烟草品种为当地常规烤烟栽培品种“K326”。整个试验共设置 4 种耕作方式处理,采取单因素随机区组试验,4 种处理分别为旋耕 20 cm(RT20,对照)、深耕 30 cm(DT30)、深松 30 cm(ST30)、深松 40 cm(ST40)。旋耕 20 cm:利用旋耕机刀片切削、打碎土块,疏松混耕层土壤,旋耕深度为 20 cm;深耕 30 cm:通过 904 东方红拖拉机三点悬挂铧式犁深翻耕地,深耕深度 30 cm;深松 30 cm(40 cm):通过 904 东方红拖拉机三点悬挂凿式深松铲疏松土壤而不翻转土层,同时利用拖拉机液压控制深松机高度,控制深松深度为 30 cm(40 cm)。深耕、深松完成后,对烟田进行细耙整地。每个处理进行 3 次重复,共 12 个小区,每个小区面积 7.2 m×15.0 m。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 试验仪器。 Waters 2695 高效液相色谱仪;色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);Waters 2487 可变波长检测器;Empower 色谱数据工作站;高纯水制备仪。

1.3.2 试验药剂。 阔马酸(批号 U4CGB-MC)、对羟基苯甲酸(批号 CB27)、香草酸(批号 DM29)、丁香酸(批号 CL28)、4-香豆酸(批号 C10067978)、阿魏酸(批号 1709277)、肉桂酸(批号 110786-201604),纯度均大于 98%。流动相甲醇为色谱醇,液相色谱用水为高纯水。

1.3.3 试验方法。 土壤酚酸类物质的测定采用 HPLC 进行测定,对供试烤烟根际土壤进行风干,去除须根等杂物,过 40 目筛,分别称取 50 g 土样于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 150 mL 2 mol/L NaOH,120 r/min 振荡提取 3 h,静置 3 h,用滤纸过滤。取上清液用 5 mol/L HCl 调节 pH 至 2.5。然后用乙酸乙酯萃取 3 次,合并 3 次萃取液,45 °C 蒸干,用 5 mL 色谱纯甲醇溶解残渣,4 °C 避光保存,过 0.22 μm 滤膜,待测。

流动相 A(0.3%乙酸水溶液)和流动相 B(甲醇)设置的具体梯度为:0 min, A 95%, B 5%;1 min, A 80%, B 20%;5 min, A 70%, B 30%;7.5 min, A 20%, B 80%;10 min, A 95%, B 5%。流速 0.3 mL/min;柱温 35 °C。精密称定阔马酸 0.010 2 g、对羟基苯甲酸 0.010 1 g、香草酸 0.010 2 g、丁香酸 0.010 2 g、4-香豆酸 0.010 2 g、阿魏酸 0.010 2 g、肉桂酸 0.010 2 g 为标准品,置于同一 100 mL 容量瓶中,用 99.9% 的色谱级甲醇精确定容,配制 100 mg/kg 的混合标液,于 4 °C 避光保存,待用。进样量为 10 μL。每个样品分析结束后,延迟 1 min。

1.4 数据分析 利用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析;利用逐步回归模型对酚酸类物质间的相互作用进行分析。

2 结果与分析

2.1 土壤酚酸类物质及其含量变化特征 进样标准品分别为阔马酸、对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-香豆酸、阿魏酸、肉桂酸(图 1),在 RT20、ST30、ST40、DT30 这 4 种耕作方式下的土壤中分别检出对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-香豆酸、阿魏酸、肉桂酸(图 2)。

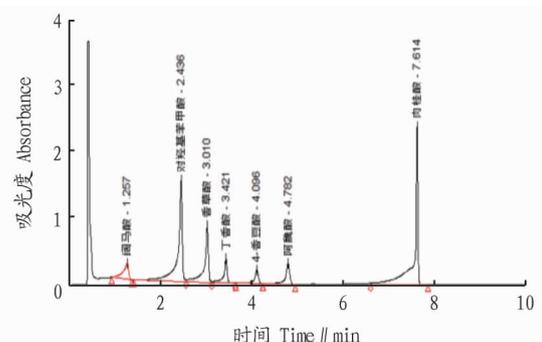


图 1 酚酸标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of phenolic acid standard

2.1.1 不同耕作方式下对羟基苯甲酸的含量变化特征。 从图 3 可以看出,4 种耕作方式下对羟基苯甲酸含量变化特征

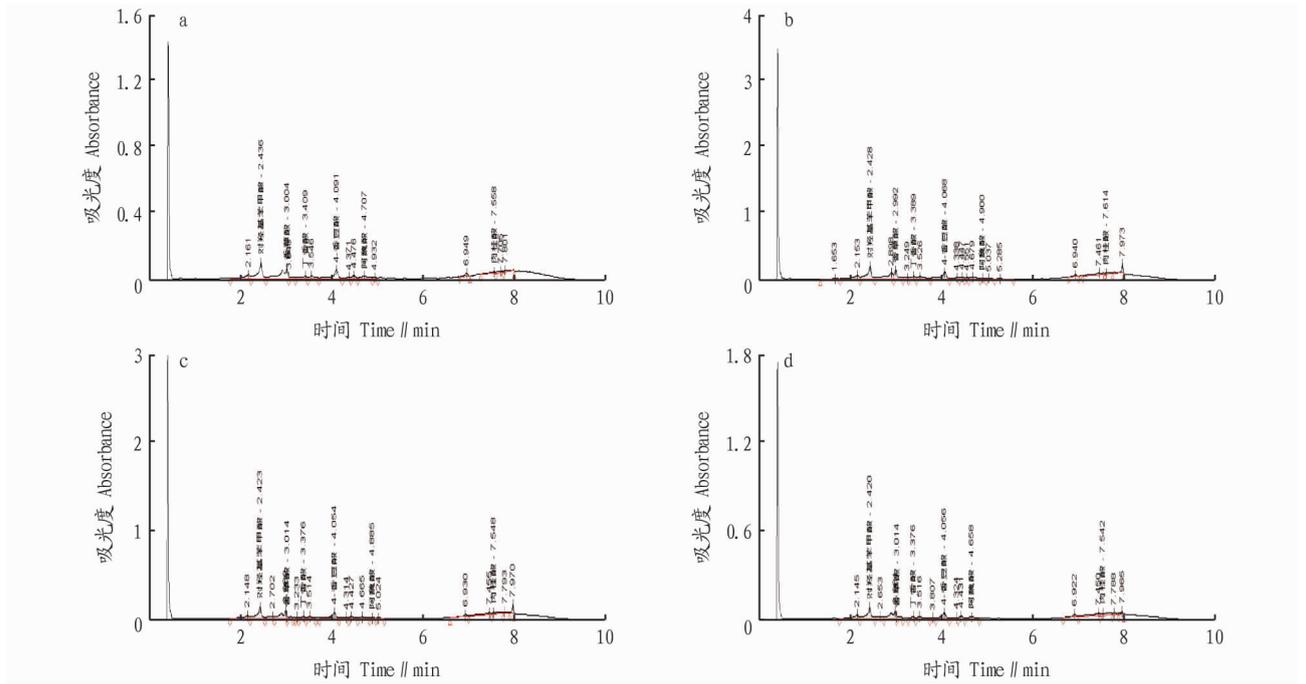
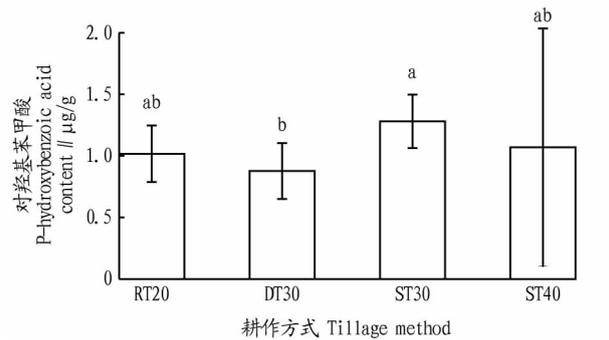


图2 RT20(a)、ST30(b)、ST40(c)和DT30(d)样品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of RT20 (a), ST30 (b), ST40 (c) and DT30 (d) samples

依次表现为 ST30>ST40>RT20>DT30。在 ST30 时其含量最高,高达 1.280 $\mu\text{g/g}$,在 DT30 时其含量最低,为 0.877 $\mu\text{g/g}$;DT30 处理下的对羟基苯甲酸含量较 ST30、ST40、RT20 分别降低了 31.48%、18.04%、13.77%;同在 30 cm 的耕作深度下,DT30 处理下的对羟基苯甲酸含量较 ST30 处理下降了 31.48%,且两处理之间存在显著差异 ($P<0.05$);在同一深松处理下,对羟基苯甲酸含量表现为随着土层深度的增加呈逐渐减少的趋势,其中 ST40 处理较 ST30 处理降低了 16.41%,且两者之间无显著差异 ($P>0.05$);另外,与 RT20 处理对比,DT30 处理使对羟基苯甲酸含量有所降低,而 ST30、ST40 处理未使其含量降低。



注:不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

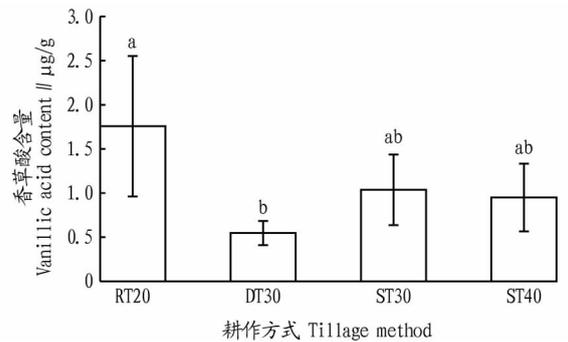
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$)

图3 不同耕作方式下对羟基苯甲酸含量变化

Fig. 3 Variation of p-hydroxybenzoic acid content under different tillage methods

2.1.2 不同耕作方式下香草酸的含量变化特征。从图4可以看出,香草酸经过4种耕作方式处理,香草酸的含量变化

特征依次表现为 RT20>ST30>ST40>DT30。在 RT20 处理下其含量最高,高达 1.757 $\mu\text{g/g}$,在 DT30 时其含量最低,为 0.547 $\mu\text{g/g}$;DT30 处理香草酸含量较 RT20、ST30、ST40 分别下降了 68.87%、47.25%、37.42%,其中与 RT20 处理之间存在显著差异 ($P<0.05$);同在 30 cm 的耕作深度下,DT30 处理较 ST30 处理下降了 47.25%,但两处理间无显著差异 ($P>0.05$);在同一深松处理下,ST40 处理较 ST30 处理降低了 8.39%,两处理间无显著差异 ($P>0.05$);与 RT20 处理相比,ST30、ST40、DT30 的香草酸含量在不同程度下均有所降低。



注:不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

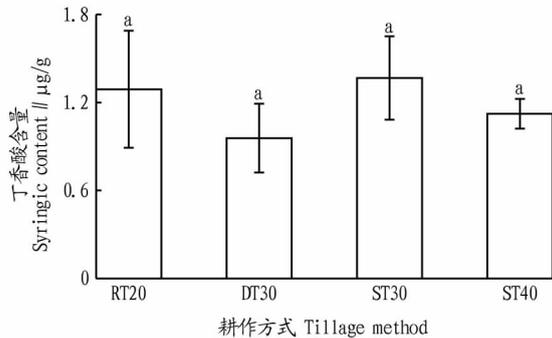
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$)

图4 不同耕作方式下香草酸含量变化

Fig. 4 Variation of vanillic acid content under different tillage methods

2.1.3 不同耕作方式下丁香酸的含量变化特征。从图5可以看出,4种耕作方式下丁香酸含量变化特征表现为 ST30>RT20>ST40>DT30。其中,丁香酸在 ST30 处理时达到最高值 (1.367 $\mu\text{g/g}$),在 DT30 处理下表现为最低 (0.957 $\mu\text{g/g}$),

DT30 处理丁香酸含量较 RT20、ST30、ST40 分别降低了 25.81%、29.99%、14.78%，各处理之间无显著差异 ($P>0.05$)；同在 30 cm 耕作深度下，DT30 处理较 ST30 处理丁香酸含量降低了 29.99%；在同一深松处理下，丁香酸含量表现为随着土层深度的增加而逐渐降低的趋势，ST40 处理较 ST30 处理其含量降低了 17.85%；与 RT20 相比，DT30 处理下丁香酸含量降低幅度最大。



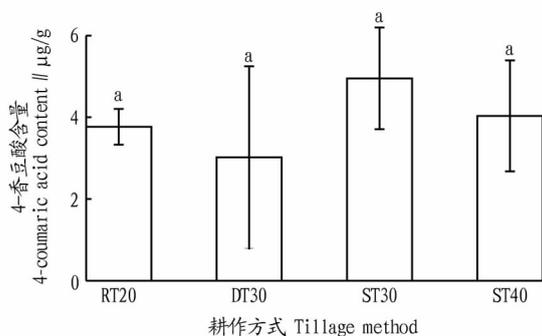
注：相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: The same lowercase letters indicate that the difference is not significant ($P>0.05$)

图 5 不同耕作方式下丁香酸含量变化

Fig. 5 Variation of syringic acid content under different tillage methods

2.1.4 不同耕作方式下 4-香豆酸的含量变化特征。从图 6 可以看出，在 4 种耕作方式下 4-香豆酸含量均无显著差异 ($P>0.05$)。在 4 种耕作方式下 4-香豆酸含量表现为 ST30>ST40>RT20>DT30。4-香豆酸在 ST30 时其含量最高 (4.953 μg/g)，在 DT30 时其含量最低 (3.020 μg/g)，且 DT30 处理 4-香豆酸含量较 RT20、ST30、ST40 分别降低 19.83%、39.03%、25.12%；同在 30 cm 耕作深度下，DT30 处理的 4-香豆酸较 ST30 处理降低了 39.03%；在同一深松耕作方式下，4-香豆酸的含量表现为 ST30>ST40；与 RT20 处理比较，在其他 3 种耕作方式中，只有 DT30 处理使 4-香豆酸含量有所降低。



注：相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)

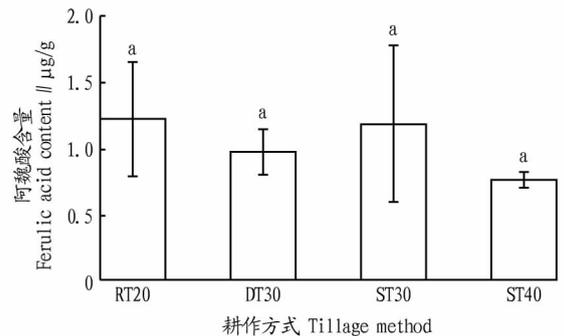
Note: The same lowercase letters indicate that the difference is not significant ($P>0.05$)

图 6 不同耕作方式下 4-香豆酸含量变化

Fig. 6 Variation of 4-konoic acid content under different tillage methods

2.1.5 不同耕作方式下阿魏酸的含量变化特征。从图 7 可

以看出，在 4 种耕作方式下阿魏酸含量表现为 RT20>ST30>DT30>ST40。在 RT20 处理下其含量表现最高 (1.217 μg/g)，在 ST40 处理下其含量表现为最低 (0.757 μg/g)；4 种耕作方式下阿魏酸含量无显著差异 ($P>0.05$)。同在 30 cm 耕作深度下，2 种耕作方式阿魏酸含量表现为 ST30>DT30；在同一深松处理下，ST40 处理阿魏酸含量较 ST30 处理下降了 35.68%；与 RT20 相比，DT30、ST30、ST40 处理均在一定程度上使阿魏酸含量有所下降，分别降低了 20.54%、3.29%、36.89%。



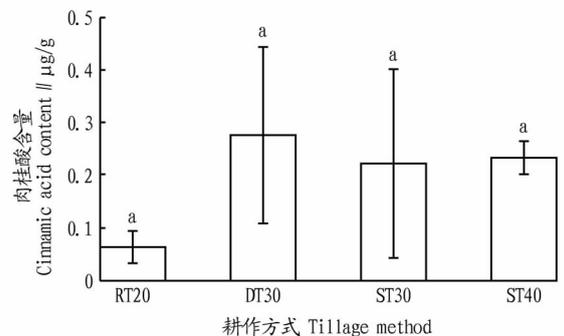
注：相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: The same lowercase letters indicate that the difference is not significant ($P>0.05$)

图 7 不同耕作方式下阿魏酸含量变化

Fig. 7 Variation of ferulic acid content under different tillage methods

2.1.6 不同耕作方式下肉桂酸的含量变化特征。从图 8 可以看出，4 种耕作方式下肉桂酸含量变化特征表现为 DT30>ST40>ST30>RT20。其中，肉桂酸含量在 DT30 处理时达到最高 (0.277 μg/g)，在 RT20 时其含量表现为最低 (0.063 μg/g)，且各种耕作方式之间无显著差异 ($P>0.05$)；在同一深松耕作方式下，ST40 的含量略高于 ST30；同在 30 cm 耕作深度下，ST30 处理下肉桂酸含量较 DT30 降低 24.22%；与 RT20 处理相比较，DT30、ST30、ST40 处理中肉桂酸的含量均有所增加。



注：相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)

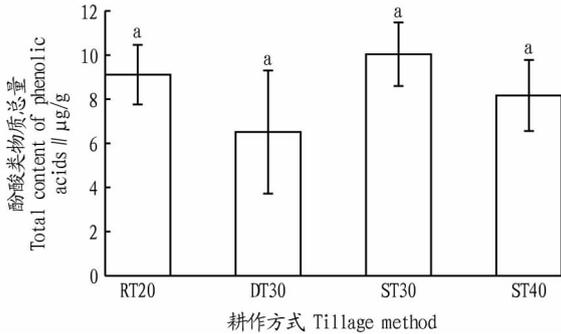
Note: The same lowercase letters indicate that the difference is not significant ($P>0.05$)

图 8 不同耕作方式下肉桂酸含量变化

Fig. 8 Variation of cinnamic acid content under different tillage methods

2.1.7 不同耕作方式下酚酸类物质总含量的变化特征。从

图9可以看出,酚酸类物质总量在4种不同的耕作方式下无显著差异($P>0.05$)。4种耕作方式下酚酸类物质总量变化趋势表现为 $ST30>RT20>ST40>DT30$ 。ST30处理时其含量最高(10.037 $\mu\text{g}/\text{g}$),DT30处理时其含量最低(6.643 $\mu\text{g}/\text{g}$),DT30处理中酚酸类物质总量较RT20、ST30、ST40分别降低27.09%、33.81%、18.66%;同在30 cm耕作深度下,DT30较ST30降低了33.81%;在同一深松耕作下,ST40较ST30下降了1.870 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。与RT20相比,DT30和ST40均能使酚酸类物质总量有所降低,而ST30反而使总含量有所增加。



注:相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)

Note: The same lowercase letters indicate that the difference is not significant ($P>0.05$)

图9 不同耕作方式下酚酸类物质总含量变化

Fig. 9 Changes in the total amount of phenolic acids in different tillage methods

2.2 基于逐步回归模型的酚酸类物质的相互影响关系分析 为了进一步了解测得的6种酚酸类物质含量之间的相互作用关系,对6种酚酸物质的相关性进行分析。结果表明(表1),不同酚酸类物质之间有所差异,其中对羟基苯甲酸与丁香酸和酚酸总量呈极显著正相关($P<0.01$),与4-香豆酸呈显著正相关($P<0.05$);丁香酸与4-香豆酸呈显著正相关,与酚酸总量呈极显著正相关;4-香豆酸与酚酸总量呈显著正相关;其余酚酸类物质之间的相关性均不显著。

逐步回归分析的标准化系数的正负表示自变量对因变量起到促进或抑制作用,标准化系数的大小则表示对应的自变量影响力的大小。基于相关性分析,对各酚酸物质间的相互作用进行逐步回归分析,共筛选出对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-香豆酸、肉桂酸(表2),表明这5种酚酸类物质的含量受其他酚酸类物质的影响,而阿魏酸的含量不受其他酚酸类物质的影响或者影响不显著。其中,丁香酸和4-香豆酸对对羟基苯甲酸均有一定的促进作用,且丁香酸的促进作用大于4-香豆酸;而香草酸则抑制对羟基苯甲酸含量;丁香酸对香草酸具有促进作用,而肉桂酸则相反,且促进作用大于抑制作用;对羟基苯甲酸和香草酸对丁香酸均具有一定的促进作用,且对羟基苯甲酸的影响力较大;对羟基苯甲酸对4-香豆酸具有一定的促进作用;香草酸、丁香酸对肉桂酸分别具有一定的抑制、促进作用,且抑制作用大于促进作用。

表1 酚酸类物质相关性分析

Table 1 Correlation analysis of phenolic acids

酚酸类物质 Phenolic acids	对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	香草酸 Vanillic acid	丁香酸 Yringic acid	4-香豆酸 4-coumaric acid	阿魏酸 Ferulic acid	肉桂酸 Cinnamic acid	总量 Total
对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	1.000						
香草酸 Vanillic acid	0.242	1.000					
丁香酸 Yringic acid	0.907**	0.378	1.000				
4-香豆酸 4-coumaric acid	0.690*	0.028	0.616*	1.000			
阿魏酸 Ferulic acid	-0.116	0.394	-0.215	-0.451	1.000		
肉桂酸 Cinnamic acid	0.215	-0.531	0.081	0.295	-0.488	1.000	
总量 Total	0.830**	0.545	0.823**	0.706*	0.127	-0.074	1.000

注:**在0.01级别(双尾)上相关性显著,*表示在0.05级别(双尾)上相关性显著

Note:** The correlation is significant at the 0.01 level(two-tailed),and * indicates the correlation is significant at the 0.05 level(two-tailed)

表2 各酚酸类物质间的逐步回归方程

Table 2 Stepwise regression equation between various phenolic acids

因变量 Dependent variable	偏回归方程 Partial regression equation	标准化系数 Standardized coefficient	决定系数 Decisive factor	显著性 Distinctiveness
对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	$Y=0.120+0.76SA-0.124VA+0.044K-A$	0.957;-0.335;0.279	0.925	0.000
香草酸 Vanillic acid	$Y=-0.049+1.425SA-2.840CA$	0.663;-0.624	0.740	0.001
丁香酸 Yringic acid	$Y=-0.036+0.961P+0.187VA$	0.763;0.403	0.913	0.000
4-香豆酸 4-coumaric acid	$Y=-0.865+4.533P$	0.718	0.467	0.009
肉桂酸 Cinnamic acid	$Y=0.049-0.228VA+0.333SA$	-1.036;0.704	0.569	0.009

注:P:对羟基苯甲酸;VA:香草酸;SA:丁香酸;4K-A:4-香豆酸;CA:肉桂酸

Note:P: p-hydroxybenzoic acid;VA: vanillic acid;SA: syringic acid;4K-A: 4-coumaric acid;CA: cinnamic acid

3 讨论

酚酸类物质是一类重要的次级代谢产物,广泛存在于高等植物中,与植物的生长密切相关,被认为是最主要的化感自毒物质^[21],其进入到土壤中后能够被微生物利用、土壤吸

附或者在微生物的作用下转化为其他物质。该研究发现,各酚酸类物质含量在4种耕作方式下呈现一定的差异。DT30与RT20相比,除肉桂酸外其余各酚酸类物质含量均有所降低;ST30、ST40与RT20相比,部分酚酸类物质含量有所下

降,这说明3种耕作方式在一定程度上能够有利于酚酸类物质含量的降低。前人研究发现深翻与深松能够有效打破犁底层,增加土壤孔隙、降低土壤容重、改善土壤水分传导性能,使得微生物数量明显升高^[22-23],而微生物能够将酚酸作为碳源进行利用,微生物数量越多其降解速率越快,这与该研究结果一致。RT20耕作需要对土块进行打碎和疏松混拌使土壤表层的动植物残体、腐殖质等物质重新混合分布,致使有机质含量降低,有机质含量越低越有利于肉桂酸的降解,这与李亮亮等^[5]对酚酸类物质在土壤中降解的研究结果一致。此外,除肉桂酸外,各酚酸类物质含量及酚酸总量均呈现出随着耕作土层深度的加深而逐渐降低,呈现出一定的层次性,不同的耕作方式对土壤表层的扰动程度较大,而对于土壤亚表层或者更深的土层扰动相对较小,使得深层土壤中养分、酶活性以及微生物活性变化不大,随着耕作土层的加深,植物根系和作物残体逐渐减少,使得酚酸物质的来源减少,而pH随着土层的加深逐渐升高促进了酚酸物质的降解,从而使酚酸类物质在深层土壤中含量较低。这与及利等^[12,24-25]相关研究中酚酸类物质的含量在不同土层中的分布规律一致。同在30cm土层中,DT30耕作方式下酚酸类物质的含量较ST30低,这与2种耕作方式的差异存在一定的联系,与ST30相比,DT30需要对土壤进行翻转,而ST30则不需要,造成作物残余物、动植物分解物质等累积在土壤表层而对于土壤亚表层的影响较少^[6],DT30通过翻转土壤能够保持土壤疏松和适宜水分,表层养分被翻压到土壤下层,改善了土壤结构和微生物群落结构,有利于微生物的繁殖和pH的升高,提高了酚酸类物质在土壤中的降解速率,使得其含量较ST30低。阿魏酸是烟草根系分泌的主要酚酸,但在4种耕作方式下,4-香豆酸的含量却比阿魏酸的含量高,土壤对4-香豆酸和阿魏酸吸附能力的不同可能是造成两者积累差异的原因之一^[15]。

各酚酸类物质之间存在着一定的协同或抑制作用,对土壤中酚酸类物质的分泌与降解产生一定的影响^[26]。该研究在相关性分析的前提下利用逐步回归方程模型确定了各种酚酸物质之间具有一定的相关性,在此基础上,以各种酚酸类物质为因变量,剔除相应的无关变量后,进一步得出各酚酸类物质之间具有一定的相互作用关系。结果表明,对羟基苯甲酸和丁香酸、香草酸和丁香酸、对羟基苯甲酸和4-香豆酸之间存在相互促进作用,香草酸与肉桂酸之间相互抑制,丁香酸对肉桂酸存在促进作用,香草酸对对羟基苯甲酸存在抑制作用;其中肉桂酸与香草酸、对羟基苯甲酸与丁香酸之间的影响力较大(标准化系数分别为-1.036、0.957)。李琳琳等^[27]在探讨对羟基苯甲酸、香草酸、阿魏酸同时作用时对棉花种子的萌发促进效果时发现这3种物质之间存在拮抗效应,Lyu等^[28]在研究酚酸类物质的协同作用对黄瓜幼苗P吸收的影响时发现不同酚酸物质间存在拮抗效应,这与该研究的结果类似。但王璞等^[29]通过外源添加酚酸对棉花种子萌发影响的研究中发现对羟基苯甲酸、阿魏酸、香草酸之间存在明显的促进作用,这与该研究结论相反,产生差异的原

因可能是由于试验方法、气候条件、种植作物或土壤理化性质的不同而使结论产生差异。

4 结论

综上所述,在4种耕作方式下植烟土壤中的酚酸类物质含量存在差异,翻耕、深松能够有效打破犁底层降低土壤容重,影响土壤有机质转化和养分循环,同时翻耕、深松对土壤扰动较大,创造了不同的生态位,对烤烟根际微生态环境产生重要影响,有利于酚酸类物质含量的降低,且随着土层的加深,酚酸类物质含量逐渐降低且呈现出一定的层次性。上述结果为进一步研究耕作方式对土壤酚酸积累特征的影响提供了理论依据,但受研究手段的限制,只探讨了不同耕作方式下酚酸类物质的积累特征,而不同耕作方式下土壤酶活、微生物、农艺性状等与酚酸类物质的相互影响尚不完全清楚,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 任怀玉. 中国烟草业可持续发展的必由之路——加强烟草业的科技研发与应用[J]. 甘肃农业, 2005(11): 99.
- [2] 杨庆华, 杨世先, 马文彬, 等. 山地农业区耕地资源空间分布状况: 以云南省玉溪市为例[J]. 山地学报, 2005, 23(6): 6749-6755.
- [3] 薛成玉, 吴凤芝, 王洪成, 等. 浅论酚酸与土壤微生物之间的相互作用[J]. 黑龙江农业科学, 2005(3): 45-47.
- [4] 周艳丽, 乔宏宇, 高红春, 等. 甜瓜连作对其根际土壤微生物和酶活性的影响[J]. 北方园艺, 2015(19): 158-161.
- [5] 李亮亮, 李天来, 张思平, 等. 四种酚酸物质在土壤中降解的研究[J]. 土壤通报, 2010, 41(6): 1460-1465.
- [6] 李玉洁, 王慧, 赵建宇, 等. 耕作方式对农田土壤理化因子和生物学特性的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(3): 939-948.
- [7] 孙敬国, 王昌军, 陈振国, 等. 不同耕作方式对土壤及烤烟的影响[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2017, 39(3): 299-304.
- [8] 孟恺琳. 生物炭对湘西四种植烟土壤理化特性的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- [9] 芦伟龙, 董建新, 宋文静, 等. 土壤深耕与秸秆还田对土壤物理性状及烟叶产质量的影响[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(1): 25-32.
- [10] 刘棋, 王津军, 封幸兵, 等. 耕作方式对山地烟田土壤物理性状及烤烟根系空间分布的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(11): 1673-1681.
- [11] 陈冬梅, 杨宇虹, 晋艳, 等. 连作烤烟根际土壤自毒物质成分分析[J]. 草业科学, 2011, 28(10): 1766-1769.
- [12] 及利, 杨雨春, 王君, 等. 不同土地利用方式下酚酸物质与土壤微生物群落的关系[J]. 生态学报, 2019, 39(18): 6710-6720.
- [13] 李庆凯, 刘苹, 唐朝辉, 等. 两种酚酸类物质对花生根部土壤养分、酶活性和产量的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(4): 1189-1195.
- [14] 尹淇林, 谢越. 酚酸类物质导致植物连作障碍的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(34): 20977-20978, 20985.
- [15] ZHANG S S, JIN Y L, ZHU W J, et al. Baicalin released from *Scutellaria baicalensis* induces autotoxicity and promotes soilborne pathogens[J]. Journal of chemical ecology, 2010, 36(3): 329-338.
- [16] 徐婷. 烟草主要连作障碍物的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2013.
- [17] STRINGLIS I A, YU K, FEUSSNER K, et al. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2018, 115(22): E5213-E5222.
- [18] 白羽祥, 朱媛, 杨焕文, 等. 烟草酚酸和有机酸对黑胫病菌生长的影响[J]. 西南农业学报, 2017, 30(6): 1364-1368.
- [19] 周艳丽, 乔宏宇, 高红春, 等. 甜瓜连作对其根际土壤微生物和酶活性的影响[J]. 北方园艺, 2015(19): 158-161.
- [20] 董立国, 袁汉民, 李生宝, 等. 玉米免耕秸秆覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(2): 444-446.
- [21] SAVIRANTA N M, JULKUNEN-TIITTO R, OKSANEN E, et al. Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium pratense* L.) induced by exposure to moderately elevated ozone[J]. Environmental pollution, 2010, 158(2): 440-446.

CGC 型菌体鞭毛变长变密,由于趋化作用,细菌向外部扩散生长。因此,奇异变形杆菌是处于这 2 种状态变化中生长^[22-23]。NJDWZY1.1 的迁徙距离随着培养试剂的延长而增加,其中血平皿最先达到阈值,然后依次为琼脂浓度 2.0%、2.5%、1.5% 的 LB 平皿,在 4、7~8、10 与 12 h 迁徙速度最快,有 4 个峰值,在这几个时间段应该处于 CGC 型状态,其余时间段处于 VC 型状态。在琼脂浓度 0.5% 与 1.0% 的 LB 平皿上未见明显的迁徙现象,其原因可能是 0.5% 与 1.0% 的 LB 平板表面水分含量高,有助于酸性代谢产物的扩散,导致未见迁徙现象。该试验中的迁徙行为与文献报道^[24] 差别较大,可能是由于不同菌属造成的。奇异变形杆菌通过迁徙行为有效提高了其抵抗力和致病力,而此次分离的奇异变形杆菌对 NYG 小鼠具有较强的致病性。

引起小鼠腹泻的原因多种多样,主要分为饲养环境的改变与病原体的感染。由于试验用小鼠饲养在屏障环境中,所以季节的变化已不是造成该小鼠腹泻的主要因素,着重检测了引起小鼠腹泻的病原体,主要分为病毒、细菌与寄生虫。轮状病毒感染通常表现在幼崽腹泻,成年小鼠一般不会发生,而油毛效应是呼肠孤病毒感染的典型特征,根据以上特征可初步排除,而泰泽病原体^[25] 一般为阴性感染,且持续时间较长,但为预防漏检,该试验依然对其抗体进行了检测,结果发现血清中抗体均为阴性。对寄生虫的检测应着重考虑鞭毛虫、纤毛虫、阿米巴变形虫与线虫发现分别检测了 2 只发病 NYG 小鼠与未见症状的哨兵鼠,通过镜检均未发现目标虫体。在病毒与寄生虫均排除的情况下,着重考虑细菌感染的因素。在此次检测中,由于哨兵鼠一直未表现出腹泻症状,因此仅对 NYG 发病鼠采样,最终检测到引起此次发病的致病菌为奇异变形杆菌。对于 NYG 小鼠,因为其高度免疫缺陷性,有其特殊性,极易引起各种病原体与条件性病原体的感染,因此在饲养管理等方面应该更加严格。

参考文献

- [1] 陈淑惠. 奇异变形杆菌致败血症 1 例[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(6): 763, 768.
- [2] ZUNINO P, SOSA V, ALLEN A G, et al. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt11): 3231-3237.
- [3] 马婷婷, 韦显凯, 闭璟珊, 等. 猪源奇异变形杆菌的分离鉴定及其毒力的测定[J]. 中国兽医学报, 2017, 47(10): 1234-1239.
- [4] 段二珍, 夏平安, 张凤华, 等. 狐狸奇异变形杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报, 2008, 38(12): 1050-1054.
- [5] 孙化露, 卢艳, 邹晓艳, 等. 3 株鸽源奇异变形杆菌的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(1): 68-70.
- [6] 王建科, 程悦宁, 易立, 等. 水貂奇异变形杆菌的分离鉴定及 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(4): 852-858.
- [7] 史同瑞, 李丹, 刘宇, 等. 貂奇异变形杆菌的分离及其生物学鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(10): 817-820.
- [8] 王承东, 李德生, 汤纯香, 等. 大熊猫生殖道感染奇异变形杆菌一例[J]. 四川动物, 2007, 26(1): 167.
- [9] 张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂症的一种致病菌——奇异变形杆菌 ZXS02 菌株[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 824-830.
- [10] 罗兆飞, 张为宇, 杨得胜. 动物性食品中奇异变形杆菌 PCR 检测方法的研究[J]. 福建畜牧兽医, 2008, 30(1): 1-3.
- [11] 朱明华, 朱瑞良, 马荣德, 等. 鸡奇异变形杆菌的分离鉴定和 16S rRNA 基因序列测定与系统进化分析[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(6): 804-808.
- [12] 王锦彤, 钟广辉, 熊定凯, 等. 珠江水中检出与沙门氏菌具有共同抗原的奇异变形杆菌[J]. 口岸卫生控制, 2008, 13(2): 23-24.
- [13] 王丹阳, 王旭荣, 张康, 等. 牛病毒性腹泻病毒、大肠杆菌和奇异变形杆菌混合感染致犊牛腹泻的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(1): 189-195.
- [14] 马迪根 M T, 马丁克 J M. 微生物生物学[M]. 李明春, 杨文博, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 2001: 765-773.
- [15] 毛凌哲, 王小琼, 马远东, 等. 3 种细菌鉴定方法鉴定结果的比较和分析[J]. 检验医学, 2016, 31(1): 49-51.
- [16] 邵小华. ATB 细菌鉴定仪与手工法鉴定结果比较分析[J]. 安徽医学, 2009, 30(4): 472-473.
- [17] 乔虹. 临床因素与抗生素耐药的相关性[J]. 国外医学(药学分册), 2006, 33(1): 18-20.
- [18] 刘娜, 史雅瑞, 闫金坤, 等. 鸡源奇异变形杆菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. 中国家禽, 2016, 38(24): 48-51.
- [19] 皇甫和平, 许文博, 石冬梅. 奶牛蜂窝织炎奇异变形杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(10): 32-34.
- [20] 徐传和, 朱洪权, 郑连荣, 等. 奇异变形杆菌培养及其药敏结果分析[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(12): 1566-1568.
- [21] 陈力川. 免疫缺陷小鼠的死亡问题探究及抗生素准确用药策略研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [22] PRÜß B M, CAMPBELL J W, VAN DYK T K, et al. FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the enter-doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer[J]. J Bacteriol, 2003, 185(2): 534-543.
- [23] 赵振鹏, 杨振, 林伟东, 等. 猪源奇异变形杆菌的分离鉴定及菌群运动分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 219-224.
- [24] 周建波, 胡丽萍, 马宁宁, 等. 致羊羔腹泻奇异变形杆菌的分离鉴定及迁徙行为分析[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(7): 1274-1282.
- [25] 陈园生, 李红. 泰泽病原体研究现状[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 45-49.
- [22] LIPIEC J, HATANO R. Quantification of compaction effects on soil physical properties and crop growth[J]. Geoderma, 2003, 116(1/2): 107-136.
- [23] PANDEY D, AGRAWAL M, BOHRA J S. Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation[J]. Soil and tillage research, 2014, 136: 51-60.
- [24] 江周, 何寻阳, 韦映雪, 等. 广西北喀斯特不同植被不同土层的土壤颗粒有机质[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(2): 198-205, 252.
- [25] 李传涵, 李明鹤, 何绍江, 等. 杉木林和阔叶林土壤酚含量及其变化的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(2): 9-14.
- [26] 白羽祥, 史普西, 杨成翠, 等. 连作植烟土壤酚酸类物质积累特征及其相互作用关系分析[J]. 中国土壤与肥料, 2019(3): 22-28.
- [27] 李琳琳, 刘建国, 燕鹏, 等. 不同外源酚酸化感物质组合对棉花种子萌发和幼苗生长的化感效应[J]. 生态科学, 2019, 38(6): 115-119.
- [28] LYU S W, BLUM U, GERIG T M, et al. Effects of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings[J]. Journal of chemical ecology, 1990, 16(8): 2559-2567.
- [29] 王璞, 赵秀琴. 几种化感物质对棉花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(3): 26-31.

(上接第 85 页)