

# 不同种植制度下烤烟根际土壤微生物群落结构的变化

元 野<sup>1,2</sup>, 王光华<sup>3</sup>, 赵光伟<sup>2</sup>, 赵宏伟<sup>1</sup>, 于洪海<sup>4</sup>

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 牡丹江烟草科学研究所, 黑龙江 牡丹江 157011; 3. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001; 4. 哈尔滨烟叶公司 宾县分公司, 黑龙江 宾县 150400)

**摘要:**为解决烤烟连作带来的减产降质、促进烤烟生产的可持续健康发展,研究了不同种植制度下烤烟根际土壤微生物群落的结构变化。结果表明:对于细菌群落结构,连作2a和5a细菌群落结构相似性高,与大豆-玉米-烤烟和玉米-大豆-烤烟根际细菌微生物群落差异大,而大豆-小麦-烤烟根际细菌群落结构处于中间位置。对于真菌群落结构,大豆-小麦-烤烟、大豆-玉米-烤烟和玉米-大豆-烤烟的根际真菌群落结构相似性高,连作2a和5a烟草根际真菌群落结构发生改变,且以连作5a处理的变化为大。说明连作烤烟根际微生物群落结构,特别是根际真菌群落结构改变可能在烟草连作障碍发生中起到重要的作用。

**关键词:**烤烟;根际;土壤;微生物;变化

**中图分类号:**S572

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2011)11-0026-04

烟草是忌连作作物<sup>[1]</sup>。随着大农业环境对烟草种植业的不断冲击,伴随经济利益驱动和耕地有限性及生产栽培条件的限制,烤烟连作的面积逐年增加,且连作障碍有加剧的趋势<sup>[2-4]</sup>。目前研究认为连作障碍产生的原因主要集中在三个方面:(1)连作导致土壤理化性质恶化,使土壤养分含量下降<sup>[5]</sup>、板结和物理性状不良<sup>[6-7]</sup>;(2)连作造成土壤微生物区系发生改变,抑制有益微生物,造成土壤病原菌大量发生,土传病害猖獗<sup>[8-9]</sup>;(3)引发植物化感自毒<sup>[10]</sup>。该试验通过研究不同前茬作物对烤烟根际土壤微生物群落结构变化的影响,旨在从土壤微生态方面进一步阐明烤烟连作障碍因子,为解决烤烟连作带来的减产降质、促进烤烟生产的可持续健康发展和保障原料水平上提供理论依据和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试烤烟品种为龙江911。

### 1.2 试验地概况

田间试验于2009年在牡丹江烟草科学研究所试验基地进行。

### 1.3 方法

1.3.1 试验设计 试验设5个茬口处理:(1)大豆茬(玉米-大豆-烤烟);(2)玉米茬(大豆-玉米-烤烟);(3)小麦茬(大豆-小麦-烤烟);(4)连作2a;(5)连作5a。随机区组设计株,行距1.1m×0.5m,行长6.0m,7行区,小区面积46.2m<sup>2</sup>,施肥量纯氮90kg·hm<sup>-2</sup>,烟草专用精致有机肥225kg·hm<sup>-2</sup>,氮、磷、钾的比例1:2:3,留叶18片。

1.3.2 土壤微生物DNA提取 采用Fast DNA SPIN Kit for Soil(Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA)试剂盒提取土壤微生物DNA。具体方法为:称取0.5g保存在-80℃条件下的烟草根际鲜土,加入到试剂盒中的离心管内,采用Min-Beadbeater珠打法破碎微生物细胞,提取微生物DNA,提取的DNA经70%乙醇洗涤后,在15000r·min<sup>-1</sup>、4℃条件下离心15min, DNA沉淀于室温风干后,溶于100μL TE缓冲液中,放在-20℃冰箱中保存。

1.3.3 PCR反应 以提取的土壤微生物总DNA为模板,针对细菌的16S rDNA的V3区段和真菌18S和5.8S rDNA之间的ITS区进行PCR扩增,采用的引物和PCR反应条件见表1。对于细菌群落,先用引物27f和1492r对微生物

收稿日期:2011-09-01

基金项目:黑龙江省烟草专卖局科技攻关资助项目(HN200820)

第一作者简介:元野(1979-),男,黑龙江省宾县人,硕士,高级农艺师,从事烟草栽培与烘烤研究。E-mail:yuanye934@126.com。

通讯作者:赵宏伟(1964-),女,黑龙江省绥化市人,博士,研究员,从事农业经济作物教学与研究。E-mail:swxqhl@126.com。

16S rDNA 扩增,再以 PCR 产物为模板,用引物 GC-357f 和 517r 进行扩增;真菌群落扩增也采用 两步 PCR,第一步扩增引物为 ITS1f 和 ITS4,第二步扩增引物为 GC-ITS1f 和 ITS2。

表 1 用于细菌和真菌微生物群落 PCR 扩增的引物序列及条件

目的菌	引物名称	引物序列	片段长度/bp	PCR 反应条件
细菌	27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1400	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min (35 个循环); 72℃ 10 min
	1492r	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'		
	GC-357f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	230	
	517r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'		
真菌	ITS1f	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	700	94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 130 s (35 个循环); 72℃ 10 min
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
	GC-ITS1 f	5'-AICCATTCGAATCGGTAIT-3'	300	
	ITS2 r	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'		

注:GC 为 Clamp 5'-CGCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG-3'。

1.3.4 DGGE 采用 DCode 突变检测系统对 PCR 产物进行 DGGE 分析。细菌和真菌群落结构分析所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度均为 8%,电泳液为 1×TAE 溶液。细菌凝胶的变性梯度为 30%~70% (100% 的变性剂为 7 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 40% 甲酰胺),电泳条件为电压 100 V、温度 60℃、电泳时间 14 h。真菌凝胶的变性梯度为 20%~55%,电泳条件为电压 75 V、温度 60℃、电泳时间 16 h。电泳结束后,取下凝胶置于稀释至 3 300 倍的 Gel Red 核酸染料中染色 20 min,UVI 成像系统拍照。

1.3.5 数据分析 采用 Quantity One-1-D 软件 (Version 4.5) 对 DGGE 条带进行数字化分析。根据图谱中条带的有无和亮度,将 DGGE 条带分成 3 级,其中 0 为无条带,1 为弱条带,2 为亮条带。所得数据利用 R 语言,采用矩阵法进行主成分分析 (Principal component analysis: PCA),以解析不同处理间微生物群落结构的差异。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 提取

土壤中微生物总 DNA 代表了土壤微生物群落的基因组成。由于土壤中含有的腐殖质常与提取的微生物 DNA 混合在一起,妨碍后续的 PCR 反应,为此采用试剂盒提取土壤微生物 DNA。采用这种方法提取的 DNA 纯度高,不需要纯化可直接进行 PCR 反应。图 1 为提取的烟草根际微生物 DNA 溶液经过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳的电泳图谱,可知,采用该方法获得了清晰条带,可用于后续的研究。

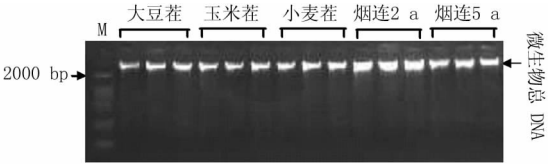


图 1 不同茬口烟草根际土壤微生物总 DNA 琼脂糖凝胶电泳

2.2 PCR 扩增

以提取的 DNA 为模板,采用引物 27f 和 1492r 对细菌 16S rDNA 的 V3 区段进行第一步 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测到了清晰的条带 (见图 2a),其片段长度大小约 1 400 bp 左右。以第一步 PCR 扩增产物为模板,用引物 GC-357f 和 517r 进行第二次 PCR 扩增,经检测得到了片段长度大约为 230 bp 左右的条带 (见图 2b),其大小适合于 DGGE 分析。

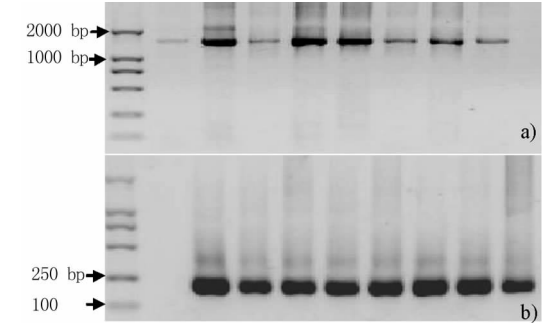


图 2 烟草根际细菌群落 16S rDNA 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳  
a 为第一次 PCR; b 为第二次 PCR

针对真菌群落结果,采用引物 ITS1f 和 ITS4 对土壤总 DNA 的 ITS 区段进行扩增,得到 PCR 产物大约 700 bp (见图 3a)。以此 PCR 产物作为

模板,使用引物 GC-ITS1f 和 ITS2 进行巢式 PCR,得到 PCR 产物大约 300 bp,与目标片段长度一致(见图 3b),可用于 DGGE 分析。

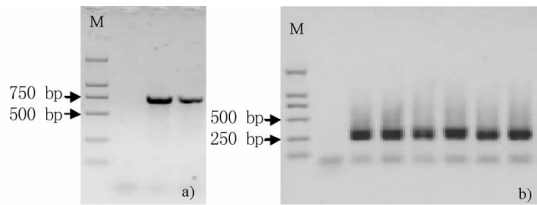


图3 烟草根际真菌群落 ITS rDNA 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

a 为第一次 PCR; b 为第二次 PCR

## 2.3 DGGE 指纹图谱

**2.3.1 细菌群落 DGGE 指纹图谱** 从图 4 可看出,电泳条带越多说明微生物多样性越丰富,条带信号越强说明该微生物数量越多。该研究共得到 61 条不同位置的 DGGE 条带,其中大豆茬处理的条带数为  $50.3 \pm 0.6$ ,玉米茬处理为  $49.7 \pm 1.5$ ,小麦茬处理为  $52.3 \pm 0.6$ ,烟草连作 2 a 处理为  $52.7 \pm 2.3$ ,烟草连作 5 a 处理为  $55.0 \pm 1.0$ (见图 5)。由此可见不同茬口烟草根际细菌群落 DGGE 条带数虽有差异,但差异不显著,总体表现为连作烟草根际细菌种类趋于增加趋势。

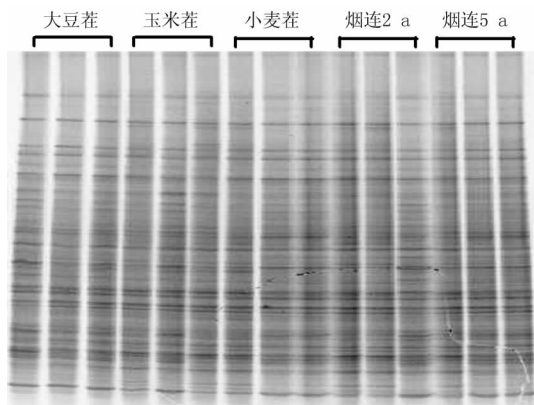


图4 不同茬口烟草细菌群落结构的 DGGE 图谱

由图 4 可知,不同处理烟草根际中存在许多共有条带,说明这些条带所代表的细菌不受茬口和烟草种植年限的影响,结构稳定。不同处理经过 DGGE 都可以分离出数目不等的电泳条带,且部分条带的位置及亮度有一定差异,说明不同茬口细菌群落结构产生变化。对 DGGE 图谱进行主成分分析结果发现(见图 6),连作 2 a 和 5 a 烟草根际细菌群落结构分别分布在第一和第四象限,大豆茬和玉米茬种植的烟草根际细菌群落结构则分别分布在第二和第三象限,而小麦茬烟草

根际细菌分布在第一和第二象限之间。表明不同茬口种植的烟草根际细菌群落结构产生了改变。鉴于主成分 1 解释的群落间变异率为 56.8%,远大于主成分 2 的数值(15.2%),所以连作 2 a 和 5 a 细菌群落结构相似性高,与大豆和玉米茬种植的烟草根际细菌微生物群落差异大,而小麦茬种植的烟草根际细菌群落结构处于中间。分析产生这种现象的原因一方面可能与不同作物对土壤微生物的影响程度存在差异有关,大豆和玉米生物量较小麦高,向土壤中分泌的有机物多,对土壤细菌微生物影响大,导致种植烟草时根际微生物改变相对较强;另一方面也可能与收获时期有关,小麦收获早,根系在土壤中腐解时间长,腐解彻底,导致对下茬作物(烟草)根际细菌群落结构影响相对小。

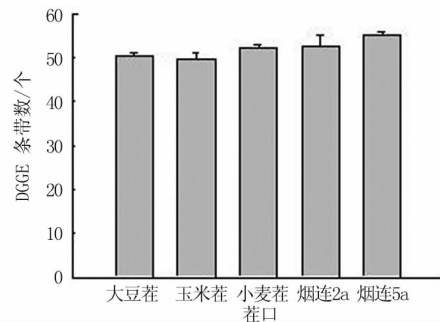


图5 不同茬口烟草细菌群落 DGGE 图谱的条带数

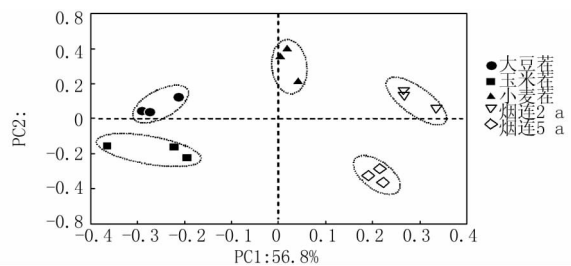


图6 不同茬口烟草细菌群落 DGGE 图谱的主成分分析结果

**2.3.2 真菌群落 DGGE 指纹图谱** 由图 7 可知,与细菌群落结构相比,不同茬口烟草根际真菌群落结构的 DGGE 图谱变化较大。根据条带在图谱中的位置差异,该研究共观察到 40 条不同位置的 DGGE 条带,其中大豆茬处理的条带数为  $30.0 \pm 1.0$ ,玉米茬处理为  $27.7 \pm 0.6$ ,小麦茬处理为  $28.3 \pm 0.6$ ,烟草连作 2 a 处理为  $33.0 \pm 1.7$ ,烟草连作 5 a 处理为  $26.7 \pm 1.2$ (见图 8)。由此可见,3 种轮作处理的烟草根际真菌群落的 DGGE 条带数差异不大,但烟草连作 2 a 处理引起根际真菌条带数增加,差异显著( $P < 0.05$ ),烟

草连作 5 a 时,根际真菌群落条带数又呈现下降趋势(见图 8)。

由图 7 可知,不同处理烟草根际真菌群落中也存在一些共有条带,说明这些条带所表征的真菌不受茬口和烟草种植年限的影响,结构稳定;而其它条带处理间存在位置和亮度上的差异,说明不同茬口真菌群落结构产生变化。对图 7 图谱进行主成分分析结果发现(见图 9),所有处理的真菌群落结构可划分为三大集团,连作 2 a 烟草根际真菌群落结构位于第一象限,连作 5 a 的位于第二象限,而 3 个轮作处理种植烟草的根际真菌群落结构相似性高,分布点主要集中在第一和第四象限。表明烟草连作改变了烟草根际真菌群落结构。与细菌群落主成分分析结果相同,真菌群落的主成分 1 解释变异率(75.1%)远大于主成分 2(11.2%),所以在以轮作烟草处理根际真菌群落为对照,烟草连作 5 a 较连作 2 a 处理对根际真菌群落结构改变影响大。大豆茬、玉米茬和小麦茬种植的烟草根际真菌群落聚集在一起,说明不同轮作处理的烟草根际真菌群落结构相似性高,3 种茬口间差异不显著。

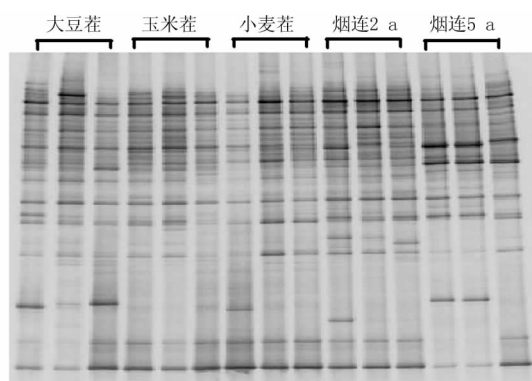


图 7 不同茬口烟草真菌群落结构的 DGGE 图谱

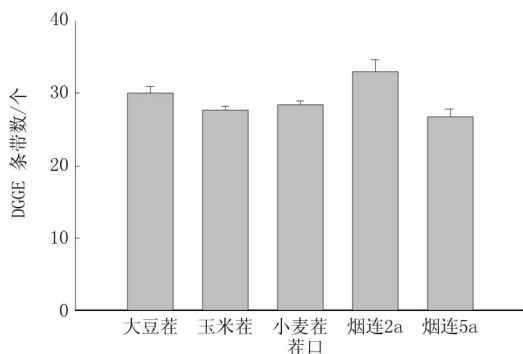


图 8 不同茬口烟草真菌群落 DGGE 图谱的条带数

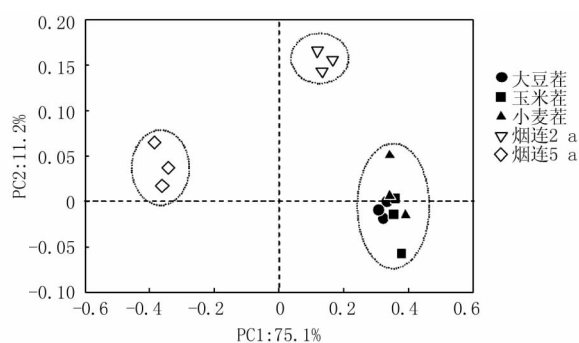


图 9 不同茬口烟草真菌群落 DGGE 图谱的主成分分析结果

### 3 结论

对于细菌群落结构,连作 2 a 和 5 a 细菌群落结构相似性高,与大豆-玉米-烤烟和玉米-大豆-烤烟根际细菌微生物群落差异大,而大豆-小麦-烤烟根际细菌群落结构处于中间位置。对于真菌群落结构,大豆-小麦-烤烟、大豆-玉米-烤烟和玉米-大豆-烤烟的根际真菌群落结构相似性高,连作 2 a 和 5 a 烟草根际真菌群落结构发生改变,且以连作 5 a 处理的变化为大。该试验结果表明,连作烟草根际微生物群落结构,特别是根际真菌群落结构改变可能在烟草连作障碍发生中起到重要的作用。

### 参考文献:

- [1] 晋艳,杨宇虹,段玉琪,等. 烤烟连作对烟叶产量和质量的影响初报[J]. 烟草科技, 2002(1): 41-45.
- [2] 吴凤芝,赵凤艳. 根系分泌物与连作障碍[J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(1): 114-118.
- [3] 高子勤,张淑香. 连作障碍与根际微生态研究 I: 根系分泌物及其生态效应[J]. 应用生态学报, 1999, 9(5): 549-554.
- [4] 张晓玲,潘振刚,周晓峰. 自毒作用与连作障碍[J]. 土壤通报, 2007, 38(4): 781-784.
- [5] 杨江山,张恩和,黄高宝,等. 保护性耕作对麦药轮作土壤酶活性和微生物数量的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 824-829.
- [6] Freddy A. Common bean response to tillage intensity and weed control strategies [J]. Cropping System, 2001, 93: 556-563.
- [7] 童有为,陈淡飞. 温室土壤次生盐渍化的形成和治理途径的研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 159-162.
- [8] 刘德,吴凤芝. 哈尔滨市郊蔬菜大棚土壤盐分状况及其影响[J]. 北方园艺, 1998(6): 1-3.
- [9] 吴凤芝,赵凤艳,谷思玉. 保护地黄瓜连作对土壤生物化学性质的影响[J]. 农业系统科学与综合研究, 2002(18): 20-22.
- [10] 吴凤芝,王伟. 大棚番茄土壤微生物区系研究[J]. 北方园艺, 1999(3): 1-2.

## 几种生物肥对水稻生长的影响

洪秀杰,王冬梅

(大庆市农业技术推广中心,黑龙江 大庆 163411)

**摘要:**为筛选出最佳生物肥配方,通过盆栽试验研究施用不同生物肥对水稻生长的影响。结果表明:在水稻拔节期,供试3种配方生物肥均可显著提高水稻根际土壤中细菌和放线菌数量,对真菌数量影响不明显;可显著提高水稻拔节期的株高、地上生物量,对水稻地下生物量和分蘖数有提高趋势但不显著。在水稻成熟期,可显著提高水稻的穗长和每穗粒数,而对水稻的瘪粒数和百粒重无明显影响。其中生物肥B(牛粪与阿维菌素渣1:1)对提高水稻根际土壤中微生物数量和促进水稻生长的效果最为显著。

**关键词:**水稻;生物肥;根际微生物;水稻生长

**中图分类号:**S511.062

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2011)11-0030-03

水稻是世界上三大粮食作物之一,播种面积占粮食作物播种面积的1/5,年产量约4.8亿t,占世界粮食总产量的1/4,全世界1/2以上的人口以水稻为主食,同时它也是我国三大主栽作物

之一。我国是稻谷生产的大国,据近10年来的统计,水稻播种面积占世界总播种面积的22.8%,年平均生产稻谷却占世界稻谷总产的36.9%,稻谷的平均产量约为5700 kg·hm<sup>-2</sup>,比世界平均产量高,在主要产稻国中名列前茅<sup>[1]</sup>。

施肥是提高水稻单位产量的一个重要的手段<sup>[2]</sup>。化学肥料对水稻增产的贡献达到30%~40%<sup>[3]</sup>。相关的研究内容,包括土壤微生物群落数量、碳氮变化对微生物的影响、耕作方式以及肥

收稿日期:2011-08-02

第一作者简介:洪秀杰(1970-),女,黑龙江省肇东市人,学士,高级农艺师,从事农业技术推广工作。E-mail: hongxiujie1970@163.com。

## Changes of Microbial Community Structure on Flue-cured Tobacco Soil Rhizosphere in Different Cropping Systems

YUAN Ye<sup>1,2</sup>, WANG Guang-hua<sup>3</sup>, ZHAO Guang-wei<sup>2</sup>, ZHAO Hong-wei<sup>1</sup>, YU Hong-hai<sup>4</sup>

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Mudanjiang Tobacco Science Research Institute, Mudanjiang, Heilongjiang 157011; 3. Northeast Institute of Geography and Agro-ecology of Chinese Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150001; 4. Binxian Branch of Harbin Tobacco Leaf Cooperation, Binxian, Heilongjiang 150400)

**Abstract:** To solve the yield reduction and quality brought by continuous cropping, promote sustainable development of flue-cured tobacco production, the change of microbial community structure on flue-cured tobacco soil rhizosphere in the different cropping systems was studied. The results showed that the similarity of flue-cured tobacco continuous cropping system in two and five years was higher for bacterial community structure. There were big differences for bacterial community structure with 'soybean- maize- flue-cured tobacco' and 'maize-soybean- flue-cured tobacco', while 'soybean- wheat- flue-cured tobacco' was middle. As for fungi community structure, the 'soybean- wheat- flue-cured tobacco', 'soybean- maize- flue-cured tobacco' and 'maize- soybean- flue-cured tobacco' were highly similar. The flue-cured tobacco continuous cropping system in two and five years was changed and the continuous change of 5 years was bigger. Therefore, the micro-organisms community structure of flue-cured tobacco continuous cropping, especially the change of rhizosphere fungi community structure may play an important role occurred in flue-cured tobacco continuous cropping obstacles.

**Key words:** flue-cured tobacco; rhizosphere; soil; microorganisms; change