

不同种植模式烟田土壤细菌种群特征与青枯病发生的关系

穰中文¹, 朱三荣², 田峰², 袁谋志², 陈武¹, 戴林建^{1*}

(1.湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省烟草公司湘西自治州公司, 湖南 吉首 416000)

摘要:为明确烟田细菌种群特征与烤烟青枯病发生的相互关系,采用 Miseq 高通量测序技术及生物信息学分析方法,研究了烟草连作(连作 4 年、8 年和 12 年),轮作(烟草-玉米、烟草-百合、烟草-萝卜),绿肥(黑麦草、箭舌豌豆和油菜)还田等种植模式下烟田耕层土壤的细菌种群特征。结果表明:连作年限越长,烟田土壤细菌多样性与均一度越低,土壤细菌生态网络趋于松散,青枯病害发生更为严重,连作 8 年与 12 年烤烟青枯病发病率分别为连作 4 年的 33.60 倍与 33.69 倍;烟草-玉米轮作与黑麦草还田可明显改善烟田细菌群落结构,在青枯病发病盛期,土壤细菌多样性指数分别为 6.42 与 6.92,均一度指数分别为 0.81 与 0.85,青枯病发病率相对较低,分别较烟草连作降低 59.26%与 95.80%;发病盛期,烟田土壤酸杆菌门和总病原菌的种群丰度与烟草青枯病的发病率呈正相关,放线菌门与烟草青枯病发病率呈负相关。

关键词:种植模式;细菌;种群特征;烟田土壤

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0033-06

Relationship between soil bacterial population characteristics and bacterial wilt in tobacco field under different planting patterns

RANG Zhongwen¹, ZHU Sanrong², TIAN Feng², YUAN Mouzhi², CHEN Wu¹, DAI Linjian^{1*}

(1.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Xiangxi Autonomous Prefecture Branch of Hunan Provincial Tobacco Company, Jishou, Hunan 416000, China)

Abstract: In order to clarify the relationship between the characteristics of bacterial population and the occurrence of bacterial wilt in flue-cured tobacco, characteristics of soil bacterial population in tobacco fields under different cropping patterns, including continuous cropping (4 years, 8 years and 12 years), rotation methods (tobacco-maize, tobacco-lily and tobacco-radish) and green manure (ryegrass, common vetch and rape) returning to field were analyzed by using Miseq High-Throughput sequencing technique and bioinformatics. Results showed that the longer the continuous cropping underwent, the lower the soil bacterial diversity and homogeneity exhibited in tobacco fields, with loose bacterial ecological networks and bacterial wilt occurrence rate more seriously. The incidence rates of bacterial wilt with successive 8 years and 12 years of continuous cropping were 33.60 times and 33.69 times higher than that with 4 years of continuous cropping, respectively. Tobacco-corn rotation and ryegrass returning could significantly improve the bacterial community structure: during the peak period of bacterial wilt, the bacterial diversity index of tobacco soil was 6.42 and 6.92, respectively; the bacterial uniformity index were 0.81 and 0.85, respectively; and the incidence of bacterial wilt was low, decreased by 59.26% and 95.80%, respectively, compared to tobacco continuous pattern. *Acidobacteria* and soil total *Solanacearum ralstonia* was positively correlated to while soil *Actinobacteria* was negatively correlated to the incidence of tobacco bacterial wilt.

Keywords: cropping pattern; bacterial; population characteristics; tobacco field soil

收稿日期: 2017-09-08

修回日期: 2017-11-30

基金项目: 湖南省烟草公司湘西自治州公司科技计划项目(YC14012)

作者简介: 穰中文(1982—),男,湖南常德人,博士,讲师,主要从事作物栽培生理与生态研究, rzwronger@126.com; *通信作者,戴林建,博士,副教授,主要从事烟草工程与技术研究, ljd6888@hotmail.com

烟草长期连作会造成烟田土壤质量下降,烟株生长发育受阻,烟草病虫害特别是土传性病害加重,烟叶产量和品质降低。研究表明,调控土壤有益微生物种群结构,对因连作障碍引起的烟草土传病害有较好的抑制效果^[1-2];利用作物多样性种植和采取不同耕作措施有利于构建良好的烟田土壤微生态系统,也能在一定程度上减轻烟草的连作障碍^[3-4]。

连作障碍的发生,取决于作物生长的生物条件与非生物条件^[5]。烤烟根际微生态环境失衡特别是土壤细菌群落变化是引起其连作障碍的主要生物因素^[6],因连作导致作物病害特别是土传性病害的严重发生均与土壤细菌多样性及种群结构的变化有直接关系^[7-9],说明土壤中细菌的种群结构及其丰度是促进土壤微生态平衡的重要因素^[10-12]。大量研究表明,作物轮作^[13-14]、绿肥返田^[15-16](也是一种轮作方式)能增加土壤微生物多样性及土壤酶活性,改善土壤微生态条件,从而减轻作物土传性病害发病率。目前为止,关于不同种植模式下烟田土

壤微生物种群特征及其与烟草青枯病发病关系尚少见报道。为阐明土壤细菌群落特征与烤烟青枯病发病率的关系,笔者拟通过对烤烟不同种植模式下烟田土壤细菌种群结构的特征差异的研究,探明烟草连作障碍发生的微生态机制,为探索减轻烟草青枯病发生的有效种植模式提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

在湖南省湘西自治州的花垣县道二乡、排料乡和凤凰县千工坪乡烟草种植区,按连作年限、轮作作物、绿肥种类分田块采集土样,其中轮作作物与绿肥种类试验均分别另选择烟草连作田块作为对照(CK1与CK2),共采集田块11个(表1),分别于2015年3月30日(冬闲期)和7月28日(青枯病发病盛期),采集耕层0~20 cm土壤约50 g,共220个土样,自封袋单独收集并暂存于装有冰袋的聚乙烯箱中后,集中于-80℃冰箱保存、备测。

表1 土壤样品信息

Table 1 Information of soil samples

种植模式	海拔高度/m	烟草青枯病发病率/%	土壤含水率/%	pH	质地
连作4年	765	1.19	19.96	5.27	黏壤土
连作8年	799	39.98	21.77	5.40	黏壤土
连作12年	766	40.09	23.04	5.15	黏壤土
烟-玉米	494	23.54	22.70	5.16	黏土
烟-百合	495	48.67	23.58	5.13	黏土
烟-萝卜	492	59.62	21.61	5.44	黏土
CK1	497	57.78	21.29	5.56	黏土
黑麦草返田	479	3.38	22.49	4.91	砂/壤土
箭舌豌豆返田	479	8.78	22.50	5.71	砂/壤土
油菜返田	479	22.97	20.39	5.27	砂/壤土
CK2	479	80.45	19.28	5.30	砂/壤土

1.2 方法

土壤总DNA提取、细菌16S rDNA序列PCR扩增以及Miseq测序参照文献^[17]的方法进行。其中,土壤宏基因组高通量测序由北京华大基因研究院完成。

1.3 数据处理与生物信息学分析

软件SPSS 20.0用于各类数据的统计分析。

1) 代表序列分类。利用Bespoken Java程序筛选有效样品序列,并在Silva数据库中(<http://www.>

[arb-silva.de/](http://www.arb-silva.de/))进行分类,即以97%的相似度划分可操作分类单位OTUs,以每一类最丰富OTU作为代表序列(Mothur程序,1.25.1版)。

2) 代表序列的鉴定。利用代表序列分别比对核糖体数据库,以可信度80%为参数,鉴定各代表序列(OTUs)。

3) 基于OUT的数据分析。利用R软件(2.14.2版)分析各代表序列的OTU值,得出各代表序列(各样品)的丰度、均匀度和多样性指数(Shannon-

Wiener 多样性指数、Simpson 多样性指数和均匀度指数)。

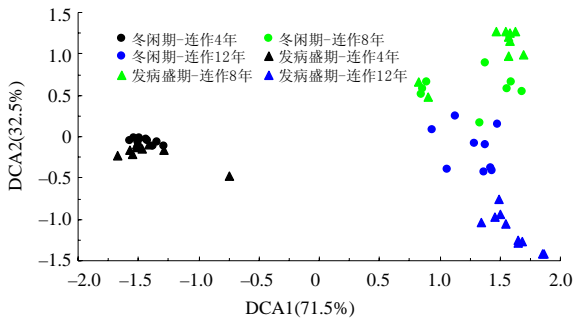
4) 细菌群落结构相似性分析。采用去趋势分析(DCA)法,即采用 UPGMA 聚类分析和主成分分析法(PCA)分析。聚类各样品间影响结构相似性的主要因素,选择权重最大的两类因素进行相似性分析。

5) 分子生态网络构建。以各代表序列为对象,利用软件 Perl scripts 生成分子生态网络关系图。

2 结果与分析

2.1 连作烟田土壤细菌的群落结构及生态网络

连作年限不同,耕层土壤细菌的群落结构具有显著性差异。去趋势对应分析(图1)表明,连作 4 年,冬闲期和发病盛期,烟田细菌群落结构比较相似;连作 8 年和连作 12 年的烟田细菌群落结构比较相似,但与连作 4 年明显不同,说明连作改变了细菌群落的结构与组成。随着连作年限的增长,冬闲期与发病盛期烟田细菌群落均发生较大变化(均一度降低),烟草青枯病的发病率也逐渐增加,连作 8 年与 12 年青枯病发病率分别为连作 4 年的 33.60 倍与 33.69 倍(表 1)。



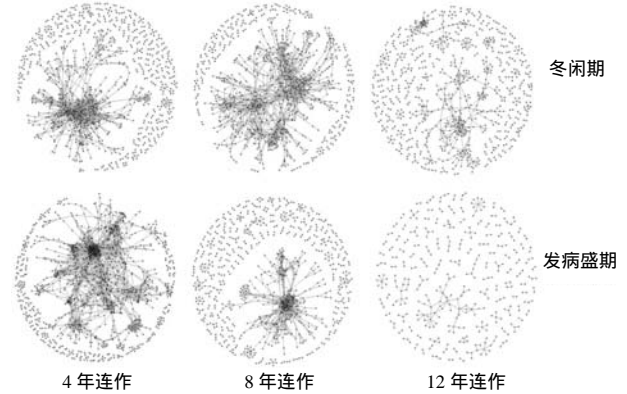
DCA1 为影响土壤样品间细菌群落结构相似性的主要聚类因素,DCA2 为次要聚类因素,括号中的数值表示各类因素的权重;纵、横坐标值表示样品在相关聚类因素(维度)中的评分值。

图 1 连作烟田土壤细菌群落结构的相似性

Fig.1 Similarity of soil bacterial community in different continuous cropping tobacco fields

连作年限不同,土壤细菌生态网络(图 2)存在差异。连作年限增加,无论是冬闲期还是发病盛期,微生物之间的联系逐渐被破坏,生态网络趋于松散,微生物之间的相互作用减少,微生物之间的相互制

衡被破坏,导致根际微生物的多样性降低,发病率随之增高(表 1);在青枯病发病盛期,微生物群落之间互作的紧密程度较冬闲期低,且不同连作年限其微生物互作程度与发病率呈现出相反变化趋势。



图中每一个点表示一个细菌种类,点与点之间的连线表示相互间存在互作。

图 2 连作烟田土壤细菌生态网络

Fig.2 Ecological networks in continuous cropping tobacco field

2.2 轮作烟田土壤细菌的群落结构差异

细菌群落结构分析(表 2)表明,除烤烟-玉米轮作外,发病盛期土壤细菌的多样性和均一度都明显低于冬闲期($P < 0.01$),且烟草-百合轮作、烟草-萝卜轮作与烟草连作烟田土壤细菌种群多样性降低以及均一度减小,说明烤烟-玉米轮作可有效保持细菌群落的多样性,即土壤细菌群落中未出现一类或几类优势种/属现象;群落结构不相似性分析表明,各处理冬闲期和发病盛期之间、各时期不同轮作制度间的细菌群落结构均存在显著差异(表 3)这种差异直观地反映在 DCA 图(图 3)上:冬闲期,烟草-萝卜轮作和烟草-百合轮作的微生物群落结构比较相似,与烟草连作对照的差异大(距离远);发病盛期烟草-萝卜轮作和连作对照比较相似,而烤烟-玉米轮作在各时期的微生物群落与其他处理均有较大差异。同时,轮作玉米后,烟田青枯病发病率最轻,分别较烟草-百合轮作、烟草-萝卜轮作以及烟草连作(CK1)的发病率低 51.63%、60.52%和 59.26%(表 2)。上述结果表明,土壤细菌群落结构与烟草青枯病发病率可能存在某种对应关系。

表 2 轮作烟田土壤的细菌群落结构

Table 2 Soil bacterial community structure in rotation tobacco fields

轮作模式	时期	发病率/%	多样性	均一度	P_1	P_2	P_3
烤烟-玉米	冬闲期	—	6.36	0.81	0.130	0.240	0.001
	发病盛期	23.54%	6.42	0.81			
烤烟-百合	冬闲期	—	6.26	0.82	<0.001	<0.001	0.001
	发病盛期	48.67%	5.50	0.76			
烤烟-萝卜	冬闲期	—	6.44	0.83	<0.001	<0.001	0.001
	发病盛期	59.62%	5.86	0.78			
CK1	冬闲期	—	6.53	0.83	<0.001	<0.001	0.001
	发病盛期	57.78%	6.03	0.80			

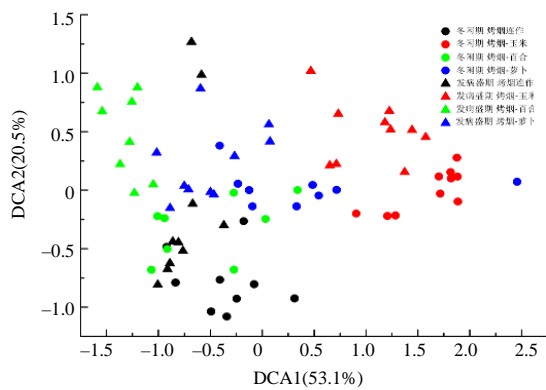
细菌群落多样性指数与均一度指数的数值越大,表示细菌种群多样性越高或均一性越好; P_1 、 P_2 、 P_3 分别为多样性、均一度、不相似性指数的显著性差异。

表 3 轮作烟田土壤细菌群落的多样性差异

Table 3 Diversity difference of soil bacterial community in rotation tobacco fields

采样时期	轮作模式	P 值		
		CK1	烤烟-玉米	烤烟-百合
冬闲期	烤烟-玉米	0.001		
	烤烟-百合	0.006	0.001	
	烤烟-萝卜	0.001	0.001	0.003
发病盛期	烤烟-玉米	0.001		
	烤烟-百合	0.001	0.001	
	烤烟-萝卜	0.001	0.001	0.001

数值为不同轮作(作物)烟田土壤细菌多样性指数的显著性差异。



DCA1 为影响土壤样品间群落结构相似性的主要聚类因素, DCA2 为次要聚类因素, 括号中的数值表示各类因素的权重; 纵、横坐标值表示样品在相关聚类因素(维度)中的评分值。

图 3 轮作烟田土壤细菌群落结构的相似性

Fig.3 Similarity of soil bacterial community in tobacco rotation fields

2.3 绿肥还田烟田土壤的细菌群落结构差异

不同绿肥还田烟田土壤细菌群落多样性存在明显差异。由表 4 可知, 黑麦草还田明显提高了烟田土壤细菌群落多样性, 青枯病的发病率相对较低, 箭舌豌豆还田的发病率次之, 油菜还田的发病率最高, 但均远低于对照(CK2)。黑麦草和箭舌豌豆还田提高了土壤细菌群落的均一度, 但油菜还田

后发病盛期的细菌均一性与对照相比未明显提高, 同时油菜还田后烟草青枯病发病率明显高于其他 2 种绿肥还田处理。2 个取样期, 不同绿肥还田处理土壤细菌群落结构均有显著差异(表 5), 但在冬闲期黑麦草和箭舌豌豆还田土壤细菌群落结构较为相似, 而油菜还田后烟田土壤细菌群落结构与连作处理均相似, 但明显不同于黑麦草和箭舌豌豆还田处理。上述结果表明, 绿肥还田明显改变了土壤细菌群落结构, 进而影响烟草青枯病的发病情况, 黑麦草还田改善烟田土壤细菌群落结构的效果最好。

表 4 绿肥还田烟田土壤的细菌的群落多样性

Table 4 Diversity of soil bacterial community in green manure returning tobacco fields

还田模式	时期	发病率/%	多样性	均一度
黑麦草	冬闲期	—	6.84	0.85
	发病盛期	3.38	6.92	0.85
箭舌豌豆	冬闲期	—	6.79	0.84
	发病盛期	8.78	6.99	0.86
油菜	冬闲期	—	6.78	0.84
	发病盛期	22.97	6.66	0.83
CK2	冬闲期	—	6.52	0.82
	发病盛期	80.45	6.64	0.83

表 5 绿肥还田烟田土壤细菌的群落多样性差异

Table 5 Diversity difference of soil bacterial community in green manure returning tobacco field

采样期	还田模式	P 值		
		黑麦草	箭舌豌豆	油菜
冬闲期	箭舌豌豆	0.240		
	油菜	0.040	0.007	
	CK2	0.001	0.001	0.001
发病盛期	箭舌豌豆	0.001		
	油菜	0.001	0.008	
	CK2	0.001	0.001	0.003

数值为不同轮作(作物)烟田土壤细菌多样性指数的显著性差异。

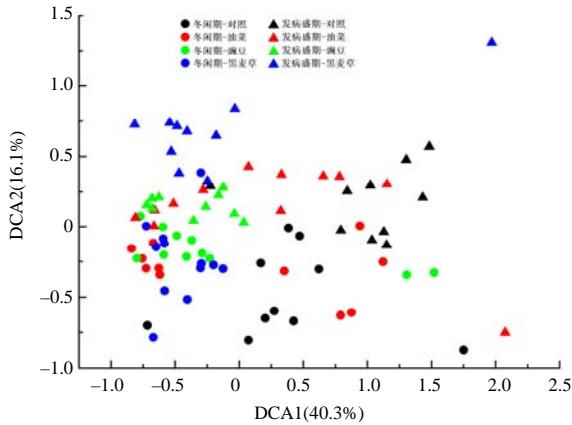


图 4 绿肥还田烟田土壤细菌群落结构的相似性

Fig.4 Similarity of soil bacterial community in green manure returning tobacco fields

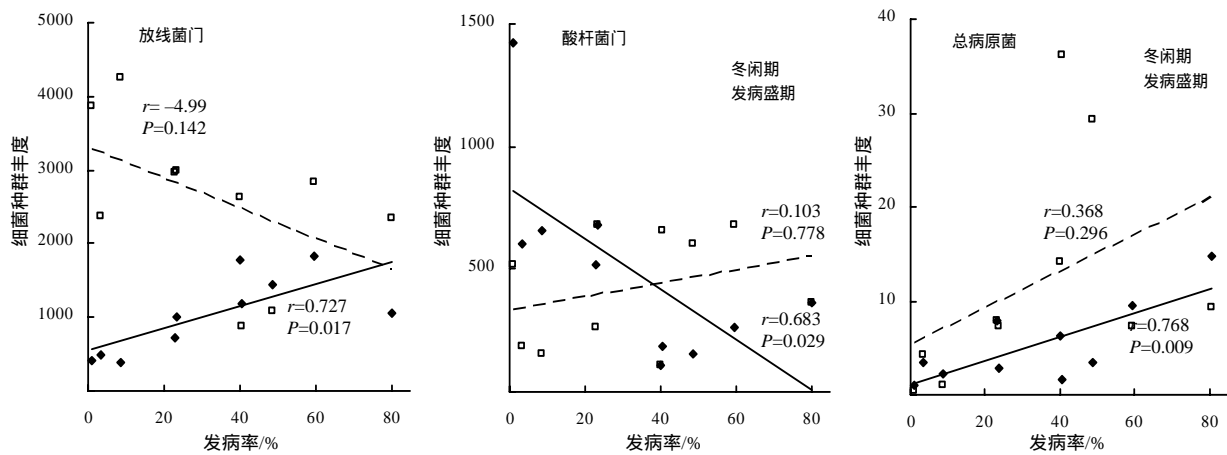


图 5 细菌种群丰度与烟草青枯病发病率的相关性

Fig.5 Relationships between the abundance of soil bacteria populations and the incidence of tobacco wilt disease

3 结论与讨论

本研究结果表明,烟草连作降低了烟田土壤细菌多样性与均一度,破坏了微生物之间的相互制衡,易使病原菌成为优势种群,可能是导致青枯病发生的土壤微生态条件;烟草-玉米轮作以及烟田种植黑麦草还田能明显改善烟田微生物群落结构,进而减轻病害的发生;在门的水平上,发病盛期烟田土壤酸杆菌门和总病原菌的种群丰度与烟草青枯病的发病率呈正相关,而放线菌门与发病率呈负相关。

丰富的土壤微生物多样性是土壤健康的基础^[18],虽然绿肥还田^[19]、种植模式(连作、轮作及间套作)^[20-21]、增施有机肥^[22]等均能引起土壤微生物绝对量的变化,但其土壤微生物的多样性特征仍不清楚。土壤中的微生物不是孤立存在,由于绝大多数微生物不可培养,使得通过高通量测序获得不同

2.4 土壤细菌的种群丰度与烟草青枯病发病率的相关性

不同时期(取样期)烟田土壤细菌种群丰度与烟草青枯病发病率的相关分析(图 5)表明,烟草青枯病发病率与冬闲期烟田土壤放线菌门和总病原菌的种群丰度呈显著正相关,而与酸杆菌门种群丰度呈显著负相关;发病盛期,烟草青枯病发病率与放线菌门种群丰度呈负相关关系,而与酸杆菌门和总病原菌的种群丰度呈正相关,但均未达显著水平。暂未发现其他细菌种群与发病率有直接关联。

OTU 划分水平的数据和通过微生物生态网络构建来预测微生物之间的作用关系成为全面分析土壤中实际发生的相互作用关系的主要方法^[23]。

烟草根系分泌物对根际微生物具有选择或富集作用,这是导致连作烟田土壤微生态失衡的重要因素^[24],也是烟草对连作障碍的反应表现出基因型差异的直接原因^[25]。本研究结果表明,无论是烟草连作,还是烟草与玉米、百合、萝卜轮作,在烟草青枯病发病盛期,烟田土壤细菌的多样性和均一度都明显低于冬闲期;而不论是冬闲期还是发病盛期,烟田土壤细菌群落结构均存在显著差异,同时烟草青枯病害的发生程度也存在对应的差异,其中以烟草-玉米轮作制度下土壤细菌群落的多样性、均一度相对较高,青枯病的发病率相对较低,说明通过合理选择轮作作物来减轻烟草连作障碍具有可行性。

烟草绿肥轮作成本低、便于操作以及改土效果

明显^[26-27],是受青睐的种植模式之一。对于烟草绿肥轮作以及不同绿肥品种搭配对缓解连作障碍的作用机制可从以下2个方面进行阐明:一方面,绿肥还田能够提高烟田土壤微生物数量^[19,28],不同绿肥还田对烟田土壤微生物数量的影响存在差异,以禾本科绿肥如黑麦草对提高烟田土壤微生物数量的效果最好^[19];另一方面,由于绿肥还田明显提高了烟田土壤细菌群落多样性及均一度,且不同种类绿肥还田其微生物群落多样性和均一度存在差异,黑麦草还田后烟田土壤细菌群落多样性及均一度相对较高,其田间烟草青枯病的发病率相对较低。在采取绿肥还田种植模式时,选择绿肥品种应充分考虑其对烟田土壤微生物数量、群落多样性及均一度等方面的促进作用。

参考文献:

- [1] 刘艳霞. 土传烟草青枯病的生物防控及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [2] 何振宇, 戴良英, 陈武. 烟草连作障碍及其防治技术研究进展[J]. 农学学报, 2015, 5(10): 64-69.
- [3] 陈冬梅. 作物多样性栽培对烟草连作障碍的生态调控机制[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [4] 尤垂淮. 不同耕作措施对消减烟草连作障碍的作用机制研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [5] 张子龙, 王文全. 植物连作障碍的形成机制及其调控技术研究进展[J]. 生物学杂志, 2010(5): 69-72.
- [6] NIU J, RANG Z, ZHANG C, et al. The succession pattern of soil microbial communities and its relationship with tobacco bacterial wilt[J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 233-243.
- [7] 马玲, 马琨, 杨桂丽, 等. 马铃薯连作栽培对土壤微生物多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(5): 225-232.
- [8] 孙正国. 连作西瓜的根际土壤酶活性和微生物多样性[J]. 水土保持研究, 2015, 22(5): 46-51.
- [9] 焦永吉, 程功, 马永健, 等. 烟草连作对土壤微生物多样性及酶活性的影响[J]. 土壤与作物, 2014(2): 56-62.
- [10] 吴秉奇, 梁永江, 丁延芹, 等. 两株烟草根际拮抗菌的生防和促生效果研究[J]. 中国烟草科学, 2013(1): 66-71.
- [11] 夏艳, 徐茜, 董瑜, 等. 烟草青枯病菌拮抗菌的筛选、鉴定及生防特性研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(2): 201-207.
- [12] CHEN X, NAN Z. Bacterial diversity and its role in agricultural ecosystems [J]. Pratacultural Science, 2002, 19(9): 34-38.
- [13] 吴宏亮, 康建宏, 陈阜, 等. 不同轮作模式对砂田土壤微生物区系及理化性状的影响[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(6): 674-680.
- [14] 方树民, 唐莉娜, 陈顺辉, 等. 作物轮作对土壤中烟草青枯菌数量及发病的影响[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2): 377-382.
- [15] 张超. 绿肥-烟草轮作对土壤细菌多样性和烟草青枯病发生的影响研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.
- [16] 刘国顺, 罗贞宝, 王岩, 等. 绿肥翻压对烟田土壤理化性状及土壤微生物量的影响[J]. 水土保持学报, 2006, 20(1): 95-98.
- [17] 何振宇. 湘西植烟土壤真菌多样性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [18] 乔保明. 连作烟田土壤健康相关的微生物生态学特征分析及其应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- [19] 张黎明, 邓小华, 周米良, 等. 不同种类绿肥翻压还田对植烟土壤微生物量及酶活性的影响[J]. 中国烟草科学, 2016, 37(4): 13-18.
- [20] 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.
- [21] 冯俊喜, 王树声, 石屹, 等. 山东烟区不同种植模式土壤微生物群落特征研究[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(2): 38-42.
- [22] 李艳平, 刘国顺, 丁松爽, 等. 混合有机肥用量对烤烟根系活力及根际土壤生物特性的影响[J]. 中国烟草科学, 2016, 37(1): 32-36.
- [23] 顾静馨. 土壤微生物生态网络的构建方法及其比较[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [24] 刘艳霞, 李想, 蔡刘体, 等. 烟草根系分泌物酚酸类物质的鉴定及其对根际微生物的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(2): 418-428.
- [25] 许露露. 烟草连作障碍反应的基因型差异及其机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [26] 刘国, 王树林, 沙富云, 等. 长期绿肥还田对烤烟产质量及土壤改良的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(4): 173-177.
- [27] 黄平娜, 秦道珠, 龙怀玉, 等. 绿肥还田对烟田土壤培肥和烤烟产量品质的作用[J]. 土壤通报, 2010, 41(2): 379-382.
- [28] 刘国顺, 李正, 敬海霞, 等. 连年翻压绿肥对植烟土壤微生物量及酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(6): 1472-1478.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维