

绿肥压青对喀斯特地区植烟土壤细菌群落特征的影响

林叶春¹, 李 雨², 陈 伟¹, 陈 懿¹, 高维常¹, 和风梅³, 黄化刚^{4*}, 潘文杰^{1*}

- (1. 贵州省烟草科学研究院, 烟草行业山地烤烟品质与生态重点实验室, 贵州 贵阳 550081;
2. 江苏中烟工业有限责任公司, 江苏 南京 210019; 3. 云南农业大学烟草学院, 云南 昆明 650201;
4. 河南农业大学作物学博士后科研流动站, 河南 郑州 450002)

摘 要: 为研究绿肥压青对喀斯特地区植烟土壤细菌群落特征的影响。采用 Illumina MiSeq 高通量测序, 分析了连续 4 年绿肥 (黑麦草、燕麦、光叶紫花苜蓿和紫云英) 压青对烤烟根际土壤细菌丰富度和多样性的影响。绿肥压青土壤速效钾和有机质含量分别提高了 25.04% ~ 31.00% 和 6.49% ~ 10.84%, 土壤有效磷降低了 0.62% ~ 9.04%; 黑麦草和燕麦压青提高了土壤 pH 值, 而紫云英和光叶紫花苜蓿压青则降低了土壤 pH 值。与无绿肥压青比较, 紫云英压青对土壤细菌 Ace 指数无显著 ($P > 0.05$) 影响, 但黑麦草、光叶紫花苜蓿和燕麦压青分别显著 ($P < 0.05$) 减小了 8.73%、6.41% 和 8.84%; 黑麦草、光叶紫花苜蓿、燕麦和紫云英压青均显著降低了土壤细菌 Shannon 指数, 分别下降了 6.01%、2.01%、2.01% 和 3.34%; 绿肥压青的植烟土壤放线菌门细菌丰度提高了 49.83% ~ 114.95%, 厚壁菌门和疣微菌门分别降低了 20.05% ~ 66.83% 和 25.34% ~ 83.49%。冗余 (RDA) 分析显示, *Rhizomicrobium* 和产黄杆菌属 *Rhodanobacter* 等变形菌门细菌属与土壤全氮和有机质呈正相关关系, 厚壁菌门的优势细菌类群芽孢杆菌属 *Bacillus* 则呈明显的负相关关系。绿肥压青还田提高了植烟土壤水解氮、速效钾和有机质含量, 改变了土壤 pH 值, 调节了细菌群落结构。

关键词: 绿肥; 烤烟; 根际土壤; 细菌多样性; 高通量测序

中图分类号: S142; S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1673-6257 (2018) 03-0161-07

贵州高原位于亚热带喀斯特典型区域, 是中国石灰岩分布最广泛、喀斯特地貌特征最明显的地区, 土壤生态环境恶化较为突出, 严重制约了当地经济和社会的可持续发展^[1]。贵州省是中国第二大烟叶种植区, 2015 年烤烟种植面积 $1.82 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 占当年全国烤烟种植面积的 14.90%, 是贵州省的第七大农作物^[2]。近年, 由于不合理的耕地管理方式, 如烤烟连作^[3]、重施化肥、轻视绿肥^[4]等, 使植烟土壤出现板结粘重、酸化加剧^[5]、有机质含量降低^[6-7]等影响耕地生产力的现象。烟草根系分泌物丰富, 持续单一种植会导致植烟土壤中酚酸类根系分泌物不断积累, 将抑制土壤微生物生长或促进

土壤病原菌增殖^[8], 进而导致连作障碍的发生。

绿肥是农业生产中一种重要的有机物料, 绿肥压青还田在改善土壤理化属性、提高农作物产量、土壤培肥等方面具有重要作用^[9]。持续翻压绿肥可增加土壤中 $> 7 \text{ mm}$ 的团聚体数量, 降低 $< 1 \text{ mm}$ 的团聚体含量, 并显著降低土层 10 cm 处的土壤紧实度^[10]。绿肥压青可显著提高双季稻区稻田土壤的 pH 值和有机质含量^[11], 增加土壤微生物量碳 (SMBC)、微生物量氮 (SMBN) 和微生物商 (MQ)^[12]。多数研究表明, 长期翻压绿肥有利于增加植烟土壤微生物量, 提高土壤脲酶、磷酸酶和过氧化氢酶活性^[10, 13-14]。平板培养法、生物化学法和分子生物学法用于研究细菌多样性的主要方法, 当前, Illumina MiSeq 高通量测序是研究微生物群落结构和多样性的强有力工具^[15]。已有的研究, 主要通过微生物量、高通量测序等技术分析了翻压绿肥对双季稻区土壤微生物的影响, 而利用高通量测序针对喀斯特地区植烟土壤微生物群落结构和多样性的研究鲜见报道。绿肥压青还田有利于缓解烤烟连作障碍^[16], 可能与土壤微生物群落结构改

收稿日期: 2017-09-17; 最后修订日期: 2017-11-04

基金项目: 贵州省科学技术基金项目: 黔科合 J 字 [2013] 2196 号; 贵州省科技重大专项课题: 黔科合重大专项字 [2014] 6015-3; 中国博士后科学基金面上资助 (2015M572017); 中国烟草总公司重点项目 (110201402012)。

作者简介: 林叶春 (1985-), 男, 四川邻水人, 副研究员, 主要从事农田生态健康研究。E-mail: linyechun@live.cn。

通讯作者: 潘文杰, E-mail: wenjiepan@163.com; 黄化刚, E-mail: hhg491124@163.com。

变密切相关^[17]。本文通过多年定位试验,研究了不同冬种绿肥压青对植烟土壤细菌群落特征的影响,为喀斯特地区植烟土壤保育提供理论与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2012 ~ 2016 年连续在贵阳设置盆栽试验, 试验处理分别为冬季无绿肥作物 - 烤烟 (lv_ CK)、冬种黑麦草 - 烤烟 (lv_hmc)、冬种光叶紫花苕 - 烤烟 (lv_msx)、冬种燕麦 - 烤烟 (lv_ym) 和冬种紫云英 - 烤烟 (lv_zyy) 5 个处理, 每个处理 5 次重复。盆栽试验土壤取自贵阳市开阳县龙岗试验基地 0 ~ 20 cm 耕层, 土壤类型为黄壤, 每盆 (盆口直径 33 cm, 盆底直径 20 cm, 盆高 27 cm) 装入上述经风干过筛的土壤 25 kg。每年 10 月将相应的绿肥种子撒播入盆内, 不增施化学肥料, 翌年 4 月按鲜草还田量 22.5 t/hm² 均匀混入土中, 同时混施烤烟专用肥 100 g/盆, 5 月完成烟苗移栽。试验采用滴灌灌溉, 滴头出水量 2 L/h, 其他管理措施同烤烟常规生产。

1.2 样品采集

烤烟盛花期（2016年7月），取烟株不定根根区土壤样品约500 g，于阴凉处风干，用于土壤基本养分测定。采用抖根法取烟株须根根际土壤，去除根系等杂物后用锡箔纸包裹，并迅速装入50 mL离心管中，立即放入液氮冷冻，之后转移至-80℃冰箱中保存用于土壤细菌多样性分析。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤 DNA 提取与扩增

取 0.5 g 保存的烟株根际土壤, 采用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Bio) 试剂盒, 按照操作说明提取土壤总 DNA。经 DNA 浓度和纯度检测后, 利用 ABI GeneAmp[®] 9700 型 PCR 仪, 针对细菌 16S rRNA V₃ ~ V₄ 区进行 PCR 引物扩增。设计引物为 338 F 5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3', 806 R 5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3'。PCR 采用 TransGen AP221 - 02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL 反应体系包括: 4 μL 5 × FastPfu Buffer, 2.0 μL 2.5 mM dNTPs, 0.8 μL 前引物, 0.8 μL 反向引物, 0.2 μL BSA, 10.0 ng DNA 模板以及 0.4 μL FastPfu Polymerase (TransStart FastPfu DNA Polymerase, TransGen)。PCR 扩增程序如下: 先在 95℃ 反应 3 min, 然后进入扩增循环, 每一次

扩增循环分别在 95、55 和 72℃ 下保持 30、30 和 45 s, 共循环 27 次, 在 72℃ 保持 10 min, 最后在 10℃ 条件下结束反应。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并回收。土壤 DNA 提取与 PCR 扩增均由上海某公司完成。

1.3.2 高通量测序

Miseq 文库构建和测序均由上海某公司完成, 测序平台为 Illumina Miseq PE300 测序完成后, 对有效序列进行过滤优化处理, 并根据高于 97% 序列相似性定义 OUT (Operational Taxonomic Units), 对 16S rRNA 细菌的所有 OUT 序列进行生物信息统计分析。

1.4 数据分析

利用 Mothur 软件计算丰富度指数 Ace 和 Chao, 计算多样性指数 Shannon。基于 Silva 数据库, 对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 利用 Excel 和 R 语言工具对统计结果进行图表制作。利用 Canoco 软件 (v. 4.5) 对优势土壤细菌类群和主要土壤化学性质进行冗余 (RDA) 分析, 并做 RDA 排序图。采用 SAS (v. 8.2) 进行数据方差分析, Duncan 比较法进行差异显著性分析 ($P=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌 OUT 统计与多样性分析

测序结果显示：从对照、黑麦草压青、光叶紫花苕压青、燕麦压青和紫云英压青的烟株根际土壤中，得到细菌 16S rRNA 序列（reads）为 30454、30942、25153、30934 和 34168，分别代表了 1 206、1 072、1 085、1 074 和 1 174 种细菌（OTUs）（图 1）。

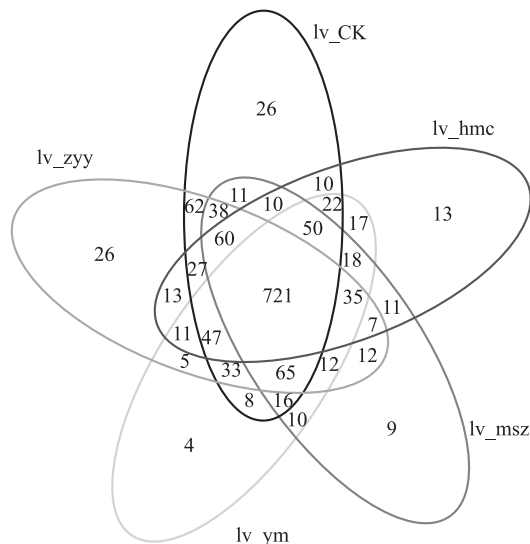


图 1 绿肥压青 OTUs 分布 Venn 图

图 1 反映不同处理土壤样品之间共有和特有的土壤细菌种类，能够直观呈现处理间土壤细菌种类的重叠关系，可以找出不同处理中的核心土壤细菌。从图 1 可以看出，不同处理之间共有的土壤细菌 OTUs 数量为 721 个，对照、黑麦草、光叶紫花苕、燕麦和紫云英压青特有的 OTUs 数量分别为 26、13、9、4 和 26 个，绿肥压青没有增加烟株根际土壤特有细菌种类，而黑麦草、光叶紫花苕和燕麦压青分别使烟株根际土壤特有细菌种类下降了 50.00%、65.39% 和 84.62%。

样品多样性分析可以反映土壤细菌群落的丰富度和多样性，样品测序的相应文库覆盖率在 99% 以上（表 1）。Ace 和 Chao 指数可以反映土壤细菌群落的丰富度，与对照（lv_CK）无绿肥压青比较，

紫云英压青（lv_zyy）土壤细菌 Ace 和 Chao 指数没有显著性差异（ $P > 0.05$ ），黑麦草压青（lv_hmc）、光叶紫花苕压青（lv_msz）和燕麦压青（lv_ym）显著（ $P < 0.05$ ）降低。其中，Ace 指数分别下降了 8.73%、6.41% 和 8.84%，Chao 指数分别降低了 9.32%、7.61% 和 8.67%。冬种紫云英压青还田，烟株根际土壤细菌群落丰富度没有显著变化，冬种黑麦草、光叶紫花苕和燕麦压青还田后土壤细菌群落丰富度均显著减小。

Shannon 指数反映了土壤细菌群落的多样性（表 1）。与无绿肥比较，冬种黑麦草、光叶紫花苕、燕麦和紫云英压青还田均显著降低了 Shannon 指数，分别下降了 6.01%、2.01%、2.01% 和 3.34%。冬种绿肥并压青还田会显著降低烟株根际土壤细菌群落多样性。

表 1 绿肥压青烟株根际土壤细菌群落丰富度和多样性指数

处理	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	覆盖率 (%)
无绿肥 (lv_CK)	1 264.33 ± 21.59a	1 292.33 ± 38.28a	5.99 ± 0.02a	99.59
黑麦草 (lv_hmc)	1 154.00 ± 27.62b	1 172.00 ± 42.32b	5.63 ± 0.02d	99.55
光叶紫花苕 (lv_msz)	1 183.33 ± 31.13b	1 194.00 ± 43.31b	5.87 ± 0.02b	99.36
燕麦 (lv_ym)	1 152.67 ± 27.10b	1 180.33 ± 44.84b	5.87 ± 0.02b	99.56
紫云英 (lv_zyy)	1 267.00 ± 29.61a	1 299.33 ± 49.80a	5.79 ± 0.02c	99.54

注：同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

2.2 土壤细菌类群分析

各处理测序得到的土壤细菌分属 29 个门。其中，优势门类（丰富度 > 0.3%）分别为酸杆菌门 *Acidobacteria*、放线菌门 *Actinobacteria*、拟杆菌门 *Bacteroidetes*、绿弯菌门 *Chloroflexi*、蓝藻门 *Cyanobacteria*、厚壁菌门 *Firmicutes*、芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes*、变形菌门 *Proteobacteria*、*Saccharibacteria* 和疣微菌门 *Verrucomicrobia*，这 10 个优势门类占细菌总量的 95.41% ~ 97.87%（图 2）。与无绿肥对照比较，冬种绿肥并压青还田的烟株根际土壤中，放线菌门的丰富度分别提高了 49.83%（黑麦草压青）、70.72%（燕麦压青）、91.72%（紫云英）和 114.95%（光叶紫花苕），厚壁菌门的丰富度降低了 20.05%（紫云英）、51.66%（光叶紫花苕）、54.00%（燕麦）和 66.83%（黑麦草），疣微菌门的丰富度减少了 25.34%（黑麦草）、55.66%（燕麦）、79.55%（光叶紫花苕）和 83.49%（紫云英），其他细菌门类的变化规律不强。

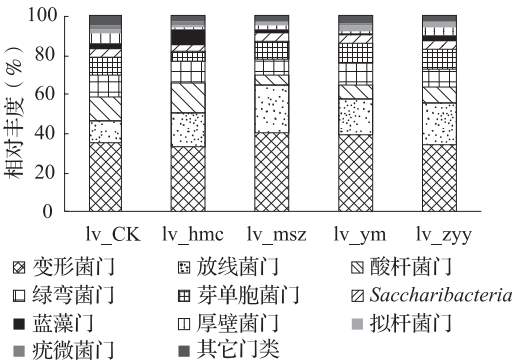


图 2 绿肥压青对烟株根区土壤优势细菌门类的影响（丰富度 > 0.3%）

图 3 为属水平上的土壤细菌分类，将平均丰度小于 1.4% 的细菌属合并为 other；余下的 13 个属中有 3 个属在分类学数据库中没有科学名称，以 norank 作为标记；另有 2 个细菌属为不可培养细菌，以 uncultured 作为标记。芽单胞菌科中的一部分不可培养细菌属（*Gemmatimonadaceae_uncultured*）

平均丰度为 4.5%，占芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 的 52%，在紫云英压青还田中相对丰度最大 (6.5%)，黑麦草压青还田中相对丰度最小 (3.6%)。鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 平均丰度为 4.4%，在变形菌门 (*Proteobacteria*) 中占 12%，在绿肥压青还田中相对丰度均降低。*Gaiellales* (目) 中的一部分属水平不可培养细菌 (*Gaiellales_ uncultured*) 平均丰度为 4.0%，在放线菌门 (*Actinobacteria*) 中占 22%，绿肥压青并还田均提高了相对丰度。芽单胞菌属 (*Gemmatimonas*) 平均丰度为

3.5%，占芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 的 39%，在光叶紫花苕压青还田中相对丰度最大 (4.5%)，黑麦草压青还田中相对丰度最小 (2.1%)。慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 平均丰度为 2.7%，在变形菌门 (*Proteobacteria*) 中占 7%，在光叶紫花苕压青还田中相对丰度最大 (2.9%)，黑麦草压青还田中相对丰度最小 (2.3%)。芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 平均丰度为 2.4%，在厚壁菌门 (*Firmicutes*) 中占 78%，在紫云英压青还田中相对丰度最大 (3.2%)，在黑麦草压青还田中相对丰度最小 (1.4%)。

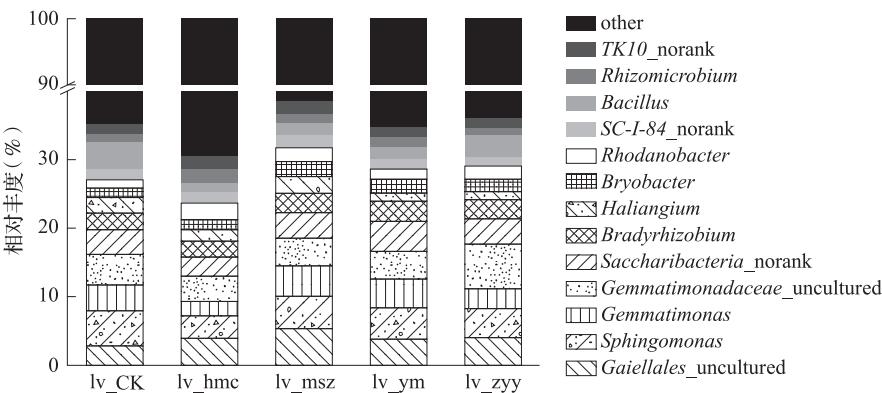


图3 绿肥压青对烟株根区土壤细菌属水平分类的影响

2.3 土壤细菌优势类群与土壤化学指标的 RDA 分析

2012~2016 年间，冬种绿肥压青还田影响烟株根区土壤主要化学性质的变化 (表 2)。与无绿肥 (lv_CK) 比较，黑麦草压青显著提高了土壤全氮含量，黑麦草、光叶紫花苕和燕麦压青显著提高了土壤

水解氮含量；黑麦草和紫云英压青降低了土壤全磷含量，土壤有效磷含量无显著差异；光叶紫花苕和紫云英压青显著降低了土壤全钾含量，与速效钾含量无显著差异；黑麦草和光叶紫花苕压青显著提高了土壤有机质含量；黑麦草和燕麦压青提高了土壤 pH 值，紫云英和光叶紫花苕压青则降低了土壤 pH 值。

表 2 长期绿肥压青烟株根区土壤的主要化学性质

处理	全氮 (g/kg)	水解氮 (mg/kg)	全磷 (g/kg)	有效磷 (mg/kg)	全钾 (g/kg)	速效钾 (mg/kg)	有机质 (g/kg)	pH 值
无绿肥 (lv_CK)	2.06 ± 0.04b	193.72 ± 9.91d	0.85 ± 0.01ab	85.12 ± 6.98a	12.42 ± 0.22a	505.90 ± 38.08a	58.14 ± 1.06b	5.71 ± 0.04b
黑麦草 (lv_hmc)	2.27 ± 0.00a	223.86 ± 7.10a	0.80 ± 0.02c	84.61 ± 4.95a	12.70 ± 0.30a	568.61 ± 39.00a	64.11 ± 0.40a	5.98 ± 0.03a
光叶紫花苕 (lv_msz)	2.12 ± 0.20ab	205.49 ± 1.71bc	0.87 ± 0.01a	79.89 ± 5.72a	11.77 ± 0.28b	543.98 ± 68.86a	63.88 ± 1.75a	5.50 ± 0.11c
燕麦 (lv_ym)	2.12 ± 0.02ab	208.86 ± 1.41b	0.83 ± 0.01b	81.85 ± 9.68a	12.41 ± 0.18a	574.39 ± 28.67a	62.07 ± 1.51ab	5.96 ± 0.09a
紫云英 (lv_zyy)	2.07 ± 0.14b	196.50 ± 0.41cd	0.80 ± 0.02c	79.15 ± 4.62a	11.46 ± 0.48b	532.13 ± 52.82a	58.86 ± 4.17b	5.57 ± 0.03c

根据不同绿肥压青处理中共有的各土壤细菌属并且丰富度 >1% 的类群，选取 13 个土壤细菌属与土壤环境因子进行去趋势对应分析 (DCA)。分析显示最大的梯度长度为 0.394，远小于 3，应选择对土壤细菌属与土壤环境因子做 RDA 分析，以研

究不同绿肥压青烟株根际优势土壤细菌属与土壤 5 个环境化学因子间的关系。RDA 分析显示，前两个轴的特征值分别为 0.588 和 0.234，共解释了土壤优势细菌属类群变异程度的 82.2%。

RDA 分析排序图 (图 4) 表明，土壤环境化学

因子与轴 1 均为负相关, 其中有机质 (SOM) 相关性最大, 相关系数为 -0.9025 ; 土壤全磷 (TP) 和全钾 (TK) 与轴 2 成正相关, 相关系数分别为 0.7472 和 0.2878 , 土壤全氮 (TN)、SOM 和 pH 值与轴 2 成负相关, 相关系数分别为 -0.5199 、 -0.3390 和 -0.0404 。待定 SC-I-84 细菌属与土壤 TN、SOM 和 pH 值呈正相关, 提高土壤 TN、SOM 和 pH 值将增加其种群丰度; 粘球菌目成员 *Haliangium* 与土壤 TP 正相关关系明显, 表明其适宜生长在磷水平较高的土壤中, 相反, *Bryobacter* 则偏好于低磷含量的土壤; *Rhizomicrobium* 与土壤 TN 呈明显正相关, 鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 则呈明显的负相关关系; 芽孢杆菌属 *Bacillus* 和 *Saccharibacteria* 与土壤 SOM 和 pH 值负相关关系明显; 慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和不可培养芽孢菌科 *Gemmatimonadaceae* 与土壤 TK 呈明显负相关关系。可见, 烟株根区不同优势土壤细菌类群对土壤主要化学性质的响应存在差异, 土壤细菌群落结构受土壤环境化学因子的调控。

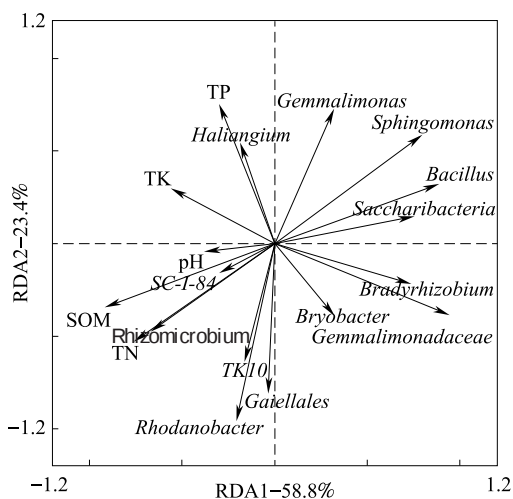


图 4 土壤细菌优势类群 (相对丰度 > 1%) 与环境因子的 RDA 分析

注: TN 表示土壤全氮, TP 表示土壤全磷, TK 表示土壤全钾, SOM 表示土壤有机质, pH 值为土壤提取液酸碱度。

3 讨论

3.1 绿肥压青对土壤细菌群落结构与多样性的影响

绿肥压青对土壤微生物群落的影响最为显著^[11], 本研究以无绿肥压青为对照, 利用 Illumina MiseqPE300 高通量测序平台, 分析了 4 种绿肥压青还田对烟株根际土壤细菌多样性与丰富度的影响。

烟株根际土壤细菌群落在门和属分类水平上的优势细菌类群分析显示, 根际土壤细菌类群分布特征表现为少数常见类群占比较高, 如变形菌门 *Proteobacteria*、放线菌门 *Actinobacteria*、酸杆菌门 *Acidobacteria*、绿弯菌门 *Chloroflexi* 和芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes* 等 5 个细菌门类相对比例达 83%, 其余 24 个少数细菌门类仅占 17%。绿肥压青还田烟株根际土壤细菌的分布特点, 符合生态学经典的物种多度分布特征, 即物种多样性分布表现为大量丰富的不常见种群和少数的常见种群模式, 这与 McGill 等^[18] 和杨浩等^[19] 对微生物群落结构研究的结果一致。

绿肥压青显著降低了烟株根际土壤细菌 Shannon 指数, 降低了细菌多样性, 这与王秀呈^[11] 基于 30 年长期“稻-稻-绿肥”种植模式下稻田土壤微生物多样性研究的结果一致。种植绿肥并压青还田可调节土壤 C/N, 提供碳氮源而影响土壤微生物活性, 改变土壤微生物群落组成和功能^[12]。本研究中, 冬种绿肥并压青提高了放线菌门 *Actinobacteria* 的丰富度, 与放线菌门大多为腐生菌, 以及促进土壤中动植物残体腐烂分解的主要生理功能有关; 冬种绿肥并压青降低了烟株根际土壤厚壁菌门 *Firmicutes* 和疣微菌门 *Verrucomicrobia* 细菌丰富度, 可能与“烤烟-绿肥”轮作改善土壤结构和提高植烟土壤质量存在一定关系^[20-21]。初烤烟叶 (C3F) 化学成分分析显示, 绿肥压青明显增加了烟碱、总氮等含氮化合物含量, 其中, 光叶紫花苜蓿压青烟叶烟碱和总氮含量比无绿肥压青分别提高了 16.75% 和 36.20%。这与绿肥压青提高土壤水解氮和全氮水平密切相关, 与绿肥压青提高放线菌门细菌丰富度以及光叶紫花苜蓿增加慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 丰富度存在一定联系。

3.2 土壤细菌与土壤环境化学因子的关系

微生物的群落结构既受各种生物因素的影响, 还与环境因子的调控密切相关^[22-23]。冬种绿肥并翻压还田, 有利于提高土壤主要养分含量, 改善地力^[24]。本研究中, 持续冬种绿肥并压青还田, 提高了植烟土壤全氮、水解氮、速效钾和有机质含量, 降低了土壤有效磷含量, 改变了土壤全磷、全钾和 pH 值。土壤中主要养分含量等环境因子的变化影响土壤微生物群落结构及丰富度, 但不同环境因子的调控作用存在差异。土壤 pH 值^[25] 和有机质含量^[26] 是引起土壤微生物群落结构变化的主要因

素,而土壤全钾^[22]则没有明显的作用。环境氮磷含量水平高,拟杆菌属、芽孢杆菌属、克雷伯氏菌属和不动杆菌属等细菌丰富度会明显增加^[19]。已有的研究表明,变形菌门的大多数细菌在生物脱氮、去磷及有机物降解过程中起重要作用^[27-28],属于土壤有益菌^[22]。因此,本研究中 *Rhizomicrobium*、*Haliangium* 和产黄杆菌属 *Rhodanobacter* 等变形菌门的细菌属与土壤全氮、全磷和有机质含量呈正相关关系得到了验证。本研究的土壤取样时期为烤烟盛花期,晚于绿肥压青养分释放的高峰期,土壤中的主要化学指标和烟株根际土壤微生物群落结构存在差异,下一步需要补充分析。

4 结论

冬种绿肥翻压还田提高了植烟土壤水解氮、速效钾和有机质含量,降低了土壤有效磷含量,禾本科绿肥可提高土壤 pH 值,豆科绿肥可降低土壤 pH 值。常年种植绿肥并翻压,显著降低了土壤细菌 Ace 和 Shannon 指数,降低土壤细菌丰富度和多样性。不同细菌门类的变化存在差异,冬种绿肥压青还田均提高了放线菌门的丰度,降低了厚壁菌门和疣微菌门类群的丰度。土壤变形菌门优势细菌类群与土壤速效钾和有机质等环境因子呈正相关关系,厚壁菌门的优势细菌类群则呈明显的负相关关系。综上,连续冬种绿肥并压青还田改变了植烟土壤养分状况,调节了烤烟根际土壤细菌群落结构。

参考文献:

- [1] 李娟,龙健,李阳兵. 贵州高原喀斯特山区土壤环境问题与对策 [J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2007, 25 (4): 12-16.
- [2] 中华人民共和国国家统计局. 中国统计年鉴 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2016.
- [3] 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.
- [4] 储刘专,黄树立,孔伟,等. 绿肥翻压利用对干旱年份烤烟生长发育的促进作用 [J]. 华中农业大学学报, 2011, 30 (3): 337-341.
- [5] 魏国胜. 植烟土壤酸化机理及调控技术研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [6] 秦松,闫献芳,冯勇刚. 贵州植烟土壤有机质与氮素特征研究 [J]. 土壤, 2004, 36 (4): 416-419.
- [7] 尚斌,邹焱,徐宜民,等. 贵州中部山区植烟土壤有机质含量与海拔和成土母质之间的关系 [J]. 土壤, 2014, 46 (3): 446-451.
- [8] Wu H W, Haig T, Pratley J. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in shoot tissues [J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 27 (1): 125-135.
- [9] 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.
- [10] 倡国涵,赵书军,王瑞,等. 连年翻压绿肥对植烟土壤物理及生物性状的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20 (4): 905-912.
- [11] 王秀呈. 稻-稻-绿肥长期轮作对水稻土壤及根系细菌群落的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [12] 高嵩涓,曹卫东,白金顺,等. 长期冬种绿肥改变红壤稻田土壤微生物生物量特性 [J]. 土壤学报, 2015, 52 (4): 902-910.
- [13] 李正,刘国顺,敬海霞,等. 翻压绿肥对植烟土壤微生物量及酶活性的影响 [J]. 草业学报, 2011, 20 (3): 225-232.
- [14] 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.
- [15] Robinson C K, Wierzechos J, Black C, et al. Microbial diversity and the presence of algae in halite endolithic communities are correlated to atmospheric moisture in the hyper-arid zone of the Atacama Desert [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17 (2): 299-315.
- [16] 向鹏华,单雪华,黄银章,等. 烟-稻复种连作年限对土壤理化性状及烟叶产量与品质的影响 [J]. 中国土壤与肥料, 2016, (5): 105-109.
- [17] 李增强,王建红,张贤. 绿肥腐解及养分释放过程研究进展 [J]. 中国土壤与肥料, 2017, (4): 8-16.
- [18] McGill B J, Etienne R S, Gray J S, et al. Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework [J]. Ecology Letters, 2007, 10 (10): 995-1015.
- [19] 杨浩,张国珍,杨晓妮,等. 16S rRNA 高通量测序研究集雨窖水中微生物群落结构及多样性 [J]. 环境科学, 2017, 38 (4): 1-17.
- [20] 符建国. 植烟土壤根系分泌物对连作的响应 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [21] 陈春燕. 宏基因组学研究根结线虫病害土壤的细菌生态特征 [D]. 昆明: 云南大学, 2013.
- [22] 曾希柏,王亚男,王玉忠,等. 不同施肥模式对设施菜地细菌群落结构及丰度的影响 [J]. 中国农业科学, 2013, 46 (1): 69-79.
- [23] Liang Y T, Jiang Y J, Wang F, et al. Long-term soil transplant simulating climate change with latitude significantly alters microbial temporal turnover [J]. The ISME Journal, 2015, (9): 2561-2572.
- [24] Yang Z P, Zheng S X, Nie J, et al. Effects of long-term winter planted green manure on distribution and storage of organic carbon and nitrogen in water-stable aggregates of reddish

- paddy soil under a double – rice cropping system [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13 (8): 1772 – 1781.
- [25] 袁飞, 冉炜, 胡江, 等. 变性梯度凝胶电泳法研究我国不同土壤氨氧化细菌群落组成及活性 [J]. 生态学报, 2005, 25 (6): 1318 – 1324.
- [26] Zhang Q C, Shamsi I H, Xu D T, et al. Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure [J]. Applied Soil Ecology, 2012, 57: 1 – 8.
- [27] 唐婧, 徐小蓉, 商传禹, 等. 南明河城区河段细菌多样性与环境因子的关系 [J]. 微生物学报, 2015, 55 (8): 1050 – 1059.
- [28] Nguyen H T T, Le V Q, Hansen A A, et al. High diversity and abundance of putative polyphosphate – accumulating testasphaera – related bacteria in activated sludge systems [J]. Fems Microbiology Ecology, 2011, 76 (2): 256 – 267.

Effects of green manures on the bacterial community characteristics of the rhizosphere soil in flue-cured tobacco

LIN Ye-chun¹, LI Yu², CHEN Wei¹, CHEN Yi¹, GAO Wei-chang¹, HE Feng-mei³, HUANG Hua-gang^{4*}, PAN Wen-jie^{1*} (1. Upland Flue-Cured Tobacco Quality & Ecology Key Laboratory of China Tobacco, Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081; 2. China Tobacco Jiangsu Industrial Co., Ltd., Nanjing 210019; 3. College of Tobacco and Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 4. Crop Science of Post-doctoral Research Stations, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: In this paper the effect of green manure on the bacterial community characteristics of the tobacco-planting soil in karst area was studied. Through 4 years-located experiment, the rhizosphere soil bacterial communities of several green manures were analyzed by the Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology. Contents of soil available K and organic matter were increased by 25.04% ~ 31.00% and 6.49% ~ 10.84%, respectively. Soil available P was reduced by 0.62% ~ 9.04% compared without green manure. Ryegrass and oat improved soil pH. In comparison, milk vetch and hairy vetch decreased soil pH. Compared without green manure, Ace index was significantly ($P > 0.05$) reduced by 8.73%, 6.41% and 8.84% for ryegrass, hairy vetch and oat, respectively, nonetheless, not significantly changed with milk vetch. Green manure significantly decreased Shannon index, for example, ryegrass, hairy vetch, oat and milk vetch reduced Shannon index by 6.01%, 2.01%, 2.01% and 3.34%, respectively. The abundance of *Actinobacteria* increased by 49.83% ~ 114.95%. Furthermore, *Firmicutes* and *Verrucomicrobia* separately decreased by 20.05% ~ 66.83% and 25.34% ~ 83.49% with green manure. The results of RDA analysis suggested that *Rhizomicrobium* and *Rhodanobacter* of *Proteobacteria* had positive correlation with soil available potassium and organic matter, furthermore, *Bacillus* of *Firmicutes* had negative correlation. Green manure increased the contents of soil total N, available K and organic matter, changed soil pH, and modified the bacterial community of the rhizosphere soil in flue-cured tobacco.

Key words: green manure; flue-cured tobacco; rhizosphere soil; bacterial diversity; high-throughput sequencing