

杨 敏,曹敬东,郑元仙,等. 生物有机肥对热区烤烟根际土壤酚酸类物质和细菌群落结构的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):244-251.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.046

# 生物有机肥对热区烤烟根际土壤酚酸类物质和细菌群落结构的影响

杨 敏<sup>1</sup>, 曹敬东<sup>2</sup>, 郑元仙<sup>2</sup>, 王继明<sup>2</sup>, 许银莲<sup>2</sup>, 和明东<sup>2</sup>, 周厚发<sup>2</sup>, 段 杰<sup>2</sup>,  
闫 鼎<sup>3</sup>, 蔡宪杰<sup>3</sup>, 童文杰<sup>4</sup>, 陈小龙<sup>5</sup>, 余 磊<sup>1</sup>, 何元胜<sup>2</sup>

(1. 昆明学院/云南省都市特色农业工程技术研究中心, 云南昆明 650214; 2. 云南省烟草公司临沧市公司, 云南临沧 677000;  
3. 上海烟草集团有限责任公司, 上海 200082; 4. 云南省烟草农业科学研究院, 云南昆明 650201;  
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:**为探明生物有机肥对热区烤烟栽培根际微生态的影响方式及作用规律,以云南热区连作植烟根际土壤为研究对象,采用 HPLC 检测和 Illumina MiSeq 高通量测序技术,分析不同施肥处理对烤烟根际土壤中 7 种酚酸及细菌群落结构的影响。结果表明,2 种生物有机肥处理(T1、T2)均可降低烤烟根际土壤中酚酸类自毒物质的含量,与 CK 相比,T1 处理烤烟根际土壤中对羟基苯甲酸、丁香酸、4-香豆酸的含量分别显著降低了 33.33%、26.11%、19.51% ( $P < 0.05$ ),T2 处理分别显著降低了 27.50%、28.03% 和 19.92% ( $P < 0.05$ );T1、T2 处理的酚酸类物质总量较 CK 分别显著降低了 12.15% 和 10.61% ( $P < 0.05$ );施肥处理后有利于提升烤烟根际土壤中细菌群落的多样性指数和丰富度指数,与 CK 相比,T1、T2 处理的 OTU 丰度分别增加了 8.06% 和 14.48%、Shannon 指数分别增加了 0.49% 和 2.95%、ACE 指数分别增加了 5.21% 和 16.50%、Chao1 指数分别增加了 4.46% 和 15.23%;不同施肥处理细菌优势菌群和相对丰度有差异,T1 处理中鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的相对丰度分别较 CK 增加了 91.72%、106.94% 和 27.48%,同样,T2 处理中上述三者相对丰度较 CK 分别增加了 46.03%、101.73% 和 39.69%。环境因子关联分析表明,烤烟根际土壤中酚酸类自毒物质的含量与部分土壤细菌群落有显著相关性,其中鞘氨醇单胞菌属、假节杆菌属与对羟基苯甲酸、4-香豆酸以及酚酸物质总量均呈显著负相关;芽孢杆菌属(*Bacillus*)、慢生根瘤菌属分别与阿魏酸、丁香酸和 4-香豆酸亦呈显著负相关。说明生物有机肥对植烟土壤有一定的改良与提质效应,有利于创造健康的根际微生态环境,研究可为生物有机肥在云南热区烟田有效利用提供科学依据。

**关键词:**烤烟;连作障碍;生物有机肥;酚酸类物质;细菌群落

**中图分类号:**S154 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)24-0244-08

烤烟是典型的忌连作作物,大量研究表明,连作会导致植烟土壤养分失衡、酶活性变化、微生物多样性降低,自毒物质积累等一系列土壤问题<sup>[1-2]</sup>,进而导致烟株营养失调、土传病害严重发生等生产

问题,从而影响烟叶的产量和质量<sup>[3]</sup>。因此,探明连作障碍的发生原因并采取有效措施缓解连作障碍对烟叶健康生产具有重要理论与实际意义。研究指出,连作障碍的形成及加重是根际土壤系统内部诸多因素综合作用的外在表现,烟草连作导致土壤养分失衡、土壤理化特性恶化,造成土壤中化感类自毒物质的积累,这些物质对土壤微生物特别是病原微生物的选择性促进,以及由此导致的根际土壤微生态系统失衡,是烟草连作障碍产生的主要原因<sup>[4-5]</sup>。酚酸类物质是作物根系所分泌的连作主要障碍物,对土壤理化性质、土壤微生物群落结构以及植物生长均可产生较大影响<sup>[6-7]</sup>;而根际土壤微生物作为土壤中生理活性最强的部分其群落结构和功能多样性直接影响植物对水分、养分的吸收,

收稿日期:2020-04-15

基金项目:中国烟草总公司云南省公司项目(编号:2018530000241020、2018530000241016、2019530000241028、2019530000241011);上海烟草集团基地单元项目(编号:2019-2020)。

作者简介:杨 敏(1993—),女,云南大理人,硕士,主要从事作物健康栽培研究。E-mail:2576241960@qq.com。

通信作者:何元胜,硕士,农艺师,主要从事烟草健康栽培研究, E-mail:376914788@qq.com;余 磊,博士,教授,主要从事作物资源利用与健康栽培研究, E-mail:yulei0425@163.com。

与植物的生长发育密不可分<sup>[8-9]</sup>。然而,研究发现,酚酸类物质在植烟土壤中表现出一定的富集效应,随连作年限增加植烟土壤中酚酸类物质总含量表现出升高的趋势<sup>[10]</sup>,且酚酸物质的积累与植烟土壤理化性状、酶活性和细菌丰度具有极显著相关性<sup>[11]</sup>。总体看来,酚酸类物质在连作植烟土壤中积累在某种程度上加重了烟草连作障碍的发生。

临沧植烟区位于中国云南的西南边陲,主要为热带、亚热带季风气候类型(热区),干雨季分明,雨水较多,太阳辐射较为丰富,为全国新开发的重点烟区之一。但连作导致临沧植烟土壤不断酸化、有机质含量下降及土传病害普遍发生等一系列问题,严重制约了临沧烟草经济的可持续发展。通过土壤调理修复来克服连作障碍已成为近几年研究的热点。大量研究表明,生物有机肥中含有丰富的有机质及大量微生物活体,对土壤的保水性、保肥性、缓冲性和通气状况有较好的协调和改善作用,既可增加土壤有机质含量,提高土壤肥力<sup>[12]</sup>;又能改变土壤微生物群落结构和多样性,改善土壤质地<sup>[13-14]</sup>;还能促进作物对营养元素的吸收、作物生长和提高产量。近年来,生物有机肥在土壤保育方面已受到越来越多的关注,但现有报道多是关于生物有机肥对土壤理化性状的改良及作物生长品质的影响,生物有机肥对烟草根际土壤酚酸类自毒物质积累的影响目前尚不明确,因此,本试验欲通过生物有机肥调理修复连作植烟土壤,同时探明其对连作烤烟根际土壤酚酸类物质及细菌群落的影响,为进一步克服化感自毒引起的热区烤烟连作障碍提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样采集区基本概况

试验于 2018 年 4—12 月在云南省临沧市耿马县勐撒镇云烟 87 烤烟的植烟区(99°23′22″ E, 23°33′40″ N)进行,选取连作障碍严重的烟田,试验区植烟土壤类型为红壤,土壤质地为轻黏土,前茬作物为玉米,翻耕前 0~20 cm 土层土壤理化性状为:pH 值 4.69;有机质 29.13 g/kg;水解性氮 155.28 mg/kg;铵态氮 2.48 mg/kg;有效磷 8.84 mg/kg;速效钾 145.97 mg/kg;烤烟品种为云烟 87。

### 1.2 试验设计和样品采集

试验设置 3 个处理,CK 组表示当地常规施肥

(单施烟草专用复合肥,施基肥 600 kg/hm<sup>2</sup>,养分含量 49%,N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 含量分别为 10%、14%、25%;追肥 300 kg/hm<sup>2</sup>,养分含量 45%,N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 含量分别为 15%、0、30%;T1 组表示烟草专用复合肥减量 10%(施基肥 540 kg/hm<sup>2</sup>,追肥 270 kg/hm<sup>2</sup>) + 生物有机肥 A 150 g/株(青岛海大生物集团有限公司生产,有机质含量 ≥ 45%,总养分 ≥ 5%,水分 ≤ 30%,有效活菌数 ≥ 2.0 亿/g);T2 组表示烟草专用复合肥减量 10%(施基肥 540 kg/hm<sup>2</sup>,追肥 270 kg/hm<sup>2</sup>) + 生物有机肥 B 150 g/株(昆明神瑞农业投资有限公司生产,有机质含量 ≥ 40%,总养分 ≥ 5%,水分 ≤ 30%,有效活菌 B 数 ≥ 2.0 亿/g),生物有机肥于移栽当天作为基肥拌塘施用。在常规栽培管理措施如耕作、排灌、密度、防治病虫害等一致的前提下,采用随机区组排列试验设计,设每处理 3 次重复,常规单垄移栽,行距 1.2 m,株距 0.6 m,移栽后垄高 20.0 cm,每处理种植 100 株。

样品采集:于旺长期按 5 点取样法选取烟株,去除表层土后将烟株整株拔起,抖落较松散的土壤,然后收集附着在根上 0~4 mm 间的土壤作为根际土,去除土样中的杂物,细根后混匀放入自封袋中,混匀的土样分 2 份,一份自然风干保存,一份于 -80 ℃ 冰箱内保存,用于土壤酚酸类物质和土壤微生物的测定。

## 1.3 测定项目与方法

1.3.1 土壤酚酸类物质的测定 土壤酚酸类化合物的测定采用液相色谱法(HPLC)进行。供试烤烟根际土壤风干,除去须根等杂物,过 40 目筛,称取 50 g 置于 250 mL 具塞三角瓶中,加入 150 mL 2 mol/L NaOH,120 r/min 振荡提取 3 h,静置 3 h,采用滤纸过滤。取上清液用 5 mol/L HCl 调至 pH 值为 2.5。然后采用乙酸乙酯萃取 3 次,合并乙酸乙酯萃取液,45 ℃ 蒸干,残渣采用 5 mL 色谱纯甲醇溶解,4 ℃ 避光保存<sup>[15]</sup>。过 0.22 μm 滤膜,待测。

仪器为 Waters 超高效液相色谱仪,色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm,美国 Waters 公司);流动相 A:0.3% 乙酸水溶液;流动相 B:甲醇。梯度洗脱:0 min,流动相 A 95%,B 5%;1 min,流动相 A 80%,B 20%;5 min,流动相 A 70%,B 30%;7.5 min,流动相 A 20%,B 80%;10 min,流动相 A 95%,B 5%;流速为 0.3 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 10 μL。每个周期

分析结束后,等待 1 min,以便去除干扰成分的影响,保证分析结果的稳定性和重复性。

1.3.2 土壤细菌多样性的测定

1.3.2.1 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增 参照 FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP, USA) 土壤基因组 DNA 提取试剂盒的步骤提取各根际土壤样品 DNA, DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop 2000 进行检测,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。使用引物 338F(5′ - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3′) 和 806R(5′ - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3′) 对 16S rDNA 基因 V3 ~ V4 区进行 PCR 扩增<sup>[16]</sup>,扩增程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,27 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增体系为 20 μL:4 μL 5 × FastPfu 缓冲液;2 μL 2.5 mmol/L dNTPs;0.8 μL Forward Primer (5 μmol/L);0.8 μL Reverse Primer (5 μmol/L);0.4 μL FastPfu 聚合酶;0.2 μL BSA;10 ng DNA 模板;加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen USA)) 试剂盒进一步纯化回收后,送上海美吉生物医药科技有限公司进行 MiSeq 测序。

1.3.2.2 下机数据的质控与分析 剔除标签序列 (Barcode) 和引物序列,用 FLASH<sup>[17]</sup> 软件进行序列拼接;通过 Usearch 软件 (Version 7.0) 过滤得到的序列,并去除嵌合体序列得到有效序列;采用 Uparse<sup>[18]</sup> 软件 (Version 7.1) 在 97% 的相似性水平上划分操作分类单元;代表序列用 RDP classifier 软件<sup>[19]</sup> 和 SILVA<sup>[20]</sup> 数据库进行物种注释,利用 Mothur 软件 (Version v. 1.30.1) 作稀释度曲线,计算文库覆盖率 (Coverage), Shannon、Simpson、ACE 及

Chao1 指数,对物种的多样性和丰富度指数进行评价;利用 Qiime 软件 (Version 1.7.0) 建立的 Bray - Curtis 距离算法进行主坐标分析 (PCoA);利用 R 语言中的 Vegan 软件作图进行 RDA 冗余分析,检测环境因子、样本、菌群三者间的关系或者两两之间的关系;通过 Spearman 相关系数计算不同环境因子与微生物物种组成的关系,利用相关性 heatmap 图评估微生物分类与环境变量之间的相关性。

1.4 数据处理

采用 Excel 软件进行数据处理;采用 SPSS 17.0 数据处理系统进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 生物有机肥对烟草根际土壤酚酸类物质的影响

由表 1 可知,不同施肥处理烤烟根际土壤中均检测出 6 种酚酸类物质,分别为对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4 - 香豆酸、阿魏酸、肉桂酸。除肉桂酸变化不明显外,不同处理各酚酸物质的含量有明显差异,施用生物有机肥能降低植烟土壤中部分酚酸物质的含量,T1 处理的对羟基苯甲酸、丁香酸、4 - 香豆酸的含量较 CK 分别降低了 33.33%、26.11%、19.51%,差异显著 ( $P < 0.05$ );T2 处理较 CK 降低了 27.5%、28.03% 和 19.92% ( $P < 0.05$ )。生物有机肥处理后烤烟根际土壤中酚酸物质的总量均低于常规施肥处理,T1、T2 处理酚酸物质总量较 CK 分别降低了 12.15% 和 10.61% ( $P < 0.05$ )。以上结果表明,生物有机肥能在一定程度上降低烤烟根际土壤中酚酸物质的含量,减少化感自毒作用。

表 1 不同处理烤烟根际土壤酚酸类物质的种类和含量

处理	酚酸类物质种类 (μg/g)							
	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	总量
CK	-	1.20 ± 0.017a	0.47 ± 0.006b	1.57 ± 0.013a	12.15 ± 0.021a	0.45 ± 0.044b	0.36 ± 0.032a	16.21 ± 0.059a
T1	-	0.80 ± 0.025c	1.58 ± 0.015a	1.16 ± 0.011b	9.78 ± 0.031b	0.56 ± 0.021b	0.35 ± 0.015a	14.24 ± 0.068b
T2	-	0.87 ± 0.015b	0.33 ± 0.012c	1.13 ± 0.006b	9.73 ± 0.020b	2.07 ± 0.010a	0.36 ± 0.023a	14.49 ± 0.026b

注:“-”表示该类物质未被检出;同列数字后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.2 生物有机肥对烟草根际土壤细菌群落的影响

2.2.1 细菌的 OTU 丰度和 Alpha 多样性 在 97% 相似水平上土壤样品细菌群落 OTU 丰度和多样性指数,由表 2 可知,OTUs 丰度稀释度曲线 (图 1) 显示,随着测序数量的上升,稀释度曲线斜率逐渐下降,趋向平坦,说明测序数量足够。覆盖率

(Coverage) 是指样本中序列被检测出的概率,其值越高,代表本次测序结果越符合样本中微生物的实际情况,在本试验中,3 个处理的覆盖率分别为 98.62%、98.39% 和 98.20% (表 2),表明测序读长足以进行此项分析。

CK、T1、T2 处理根际土壤样品中细菌的 OTU 丰

度分别为 2 396 个、2 589 个和 2 743 个(表 2), T1、T2 处理的 OTU 丰度分别较 CK 增加了 8.06% 和 14.48%。细菌 OTUs 分布韦恩图(图 2)表明, 3 个处理根际土壤中一共有 7 728 个 OTUs, 三者共有的 OTUs 为 1 942 个, 只占 OTUs 总数的 25.13%; CK、T1、T2 处理根际土壤样品中特有的细菌 OTUs 数分别为 105、165 和 234 个, 分别占各自总数的 4.38%、6.37% 和 8.53%; 且 T1、T2 处理特有的 OTUs 数分别为 CK 的 1.57 倍和 2.23 倍。说明不同处理根际细菌群落在 OTUs 水平上存在明显差异。此外, 生

物有机肥对烟草根际土壤细菌群落的多样性和丰富度均有影响, T1、T2 处理的 Shannon 指数较 CK 分别增加了 0.49% 和 2.95%; Simpson 指数分别降低了 3.23% 和 16.13%, 说明, 施用生物有机肥能增加烟草根际土壤中细菌群落的多样性(Shannon 指数值越大, Simpson 指数值越小, 群落多样性越高)。除群落多样性外, 施用生物有机肥还能提高烟草根际土壤中细菌群落的丰富度, 与 CK 相比, T1、T2 处理的 ACE 指数分别增加了 5.21% 和 16.50%; Chao1 指数分别增加了 4.46% 和 15.23%。

表 2 不同处理根际土壤细菌 OTU 丰度和 Alpha 多样性

处理	原始序列数	有效序列数	OTU 丰度	Alpha 多样性				Coverage (%)
				Shannon	Simpson	ACE	Chao1	
CK	40 641	32 199	2 396	6.10	0.006 2	2 290.60	2 333.31	98.62
T1	39 770	29 748	2 589	6.13	0.006 0	2 409.98	2 437.41	98.39
T2	38 894	29 844	2 743	6.28	0.005 2	2 668.59	2 688.58	98.20

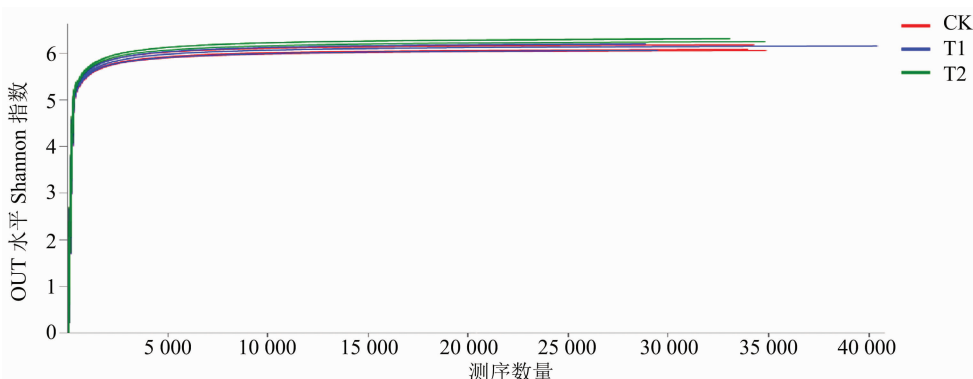


图1 不同处理根际土壤细菌 Shannon 指数稀释度曲线

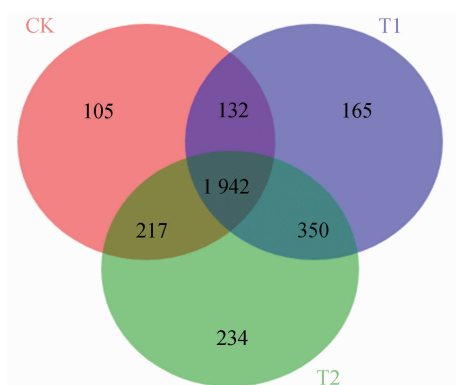


图2 不同处理根际土壤细菌 OTUs 分布韦恩图

**2.2.2 细菌的群落种类组成及相对丰度** 根据各 OTU 中代表序列的物种注释结果, 选取各处理根际土壤样品中细菌在门(Phylum)分类水平上最大丰度排名前 10 的物种, 生成物种相对丰度堆积柱形图

(图 3)。由图 3 可知, 3 个处理根际土壤中细菌在门的分类水平上, 最大丰度排名前 10 的种类为: 变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、Patescibacteria、WPS-2、破壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和浮霉状菌门(Planctomycetes)。CK、T1、T2 处理细菌区系在门水平上的组成相似, 主要由变形菌门、绿弯菌门、放线菌门、酸杆菌门组成, 四者含量分别占各自总量的 80.46%、81.34% 和 83.79%。进一步分析处理间差异表明, 生物有机肥对部分群落的相对丰度有影响, 生物有机肥处理的变形菌门、放线菌门和芽单胞菌门的相对丰度均高于常规施肥处理(CK), T1 处理三者的相对丰度较 CK 分别增加了 27.03%、20.92% 和 35.90%,

T2 处理较 CK 分别增加了 15.94%、12.68% 和 69.23%。有机肥处理中绿弯菌门、WPS-2 和破壁菌门的相对丰度较常规施肥处理(CK)降低,T1 处

理三者的相对丰度较 CK 分别减少了 28.03%、16.74% 和 41.04%;T2 处理减少了 13.87%、35.68% 和 51.93%。

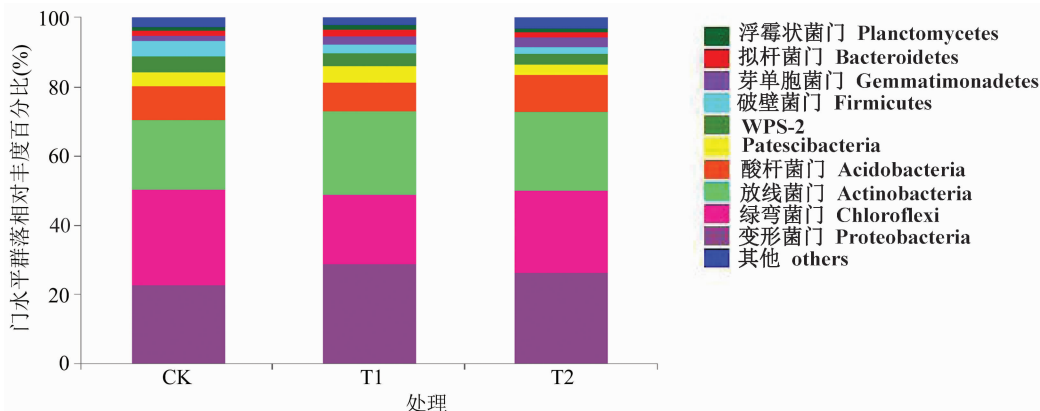


图3 不同处理根际土壤门水平上的细菌相对丰度柱形图

不同处理属水平上细菌群落组成差异分析(图4)表明,在相对丰度排名前20的物种中,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的相对丰度均表现为生物有机肥处理高于常规施肥处理(CK),T1 处理中三者相对丰度分别较 CK 增加了 91.72%、106.94% 和 27.48%,T2 处理中三者相对丰度较 CK 增加了 46.03%、101.73% 和

39.69%;与此相反,生物有机肥处理中热酸菌属(*Acidothermus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度却低于常规施肥处理(CK),T1 处理较 CK 降低了 55.88% 和 59.69%,T2 处理较 CK 降低了 44.12% 和 55.10%。综上所述,2 种生物有机肥处理(T1、T2)间差异不显著,但与常规施肥处理中烟株根际土壤细菌群落组成及相对丰度均存在明显差异。

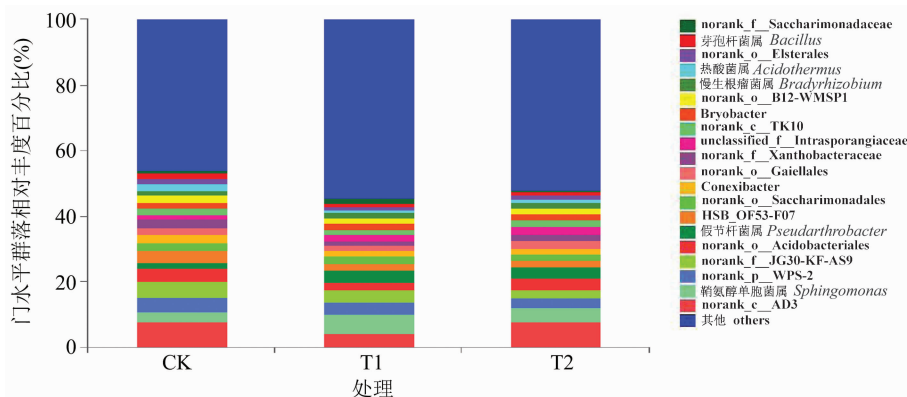


图4 不同处理根际土壤属水平上的细菌相对丰度柱形图

2.2.3 生物有机肥对烟草根际土壤细菌的群落构成的影响 PCoA 主成分分析(图5)表明,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)对样品差异性的解释度分别为 40.75% 和 20.64%,两者总计可解释全部土壤样品的 61.39%。由图5可知,T1 和 T2 处理共同分布在 PC1 的正值区域,虽然 T1 处理分布 PC2 的 0 值和正值区域、T2 处理均分布 PC2 的负值区域,但二者的距离相对较近,说明 2 种生物有机肥处理的细菌物种组成更为相似;总体看来,T1 和 T2 处理主要分布在 PC1 的正值区域,而 CK 主要分布在 PC1

的负值区域,且间隔距离较大,进一步说明生物有机肥处理与常规施肥处理烟株根际土壤细菌物种组成存在明显差异。

2.3 烤烟根际土壤细菌群落组成与环境因子的关联分析

RDA 分析即冗余分析,是环境因子约束化的 PCA 分析,可以将样本和环境因子反映在同一个二维排序图上,直观地反映出环境因子、样品、菌群三者之间的关系或者两两之间的关系。环境因子(酚酸类物质)、优势菌群(属水平)和不同处理间的关



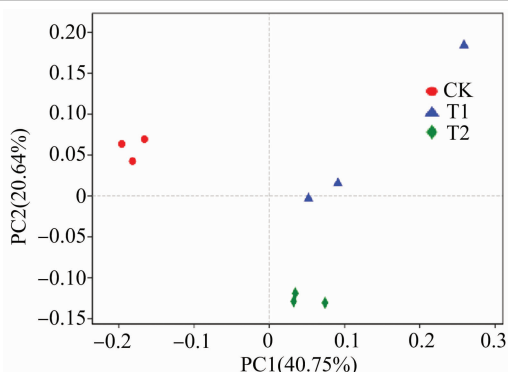


图5 不同处理根际土壤细菌群落组成的 PCoA 分析

系如图 6 所示,图中 RDA 1 和 RDA 2 两轴对样品的解释度分别为 40.83% 和 14.55%,两轴累计解释度为 55.38%。由图 6 可知,不同酚酸物质之间呈不同程度的相关性,对羟基苯甲酸 (PHA)、丁香酸 (SA) 和 4-香豆酸 (CA) 两两呈正相关性,但三者与香草酸 (VA) 和阿魏酸 (FA) 均呈负相关性;香草酸 (VA) 与阿魏酸 (FA) 亦呈负相关。酚酸物质的含量对菌群分布有一定的影响,其中香草酸 (VA) 的影响程度大于其余 4 种酚酸。

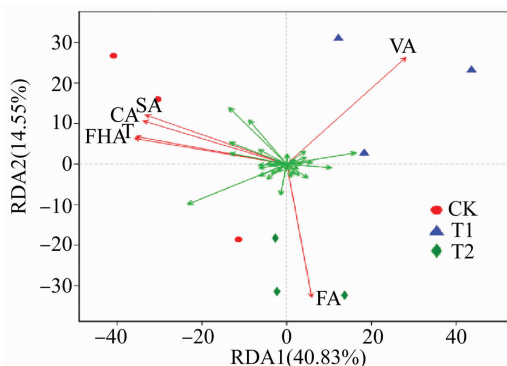


图6 不同处理根际土壤细菌组成与环境因子间 (酚酸物质) 的 RDA 冗余分析

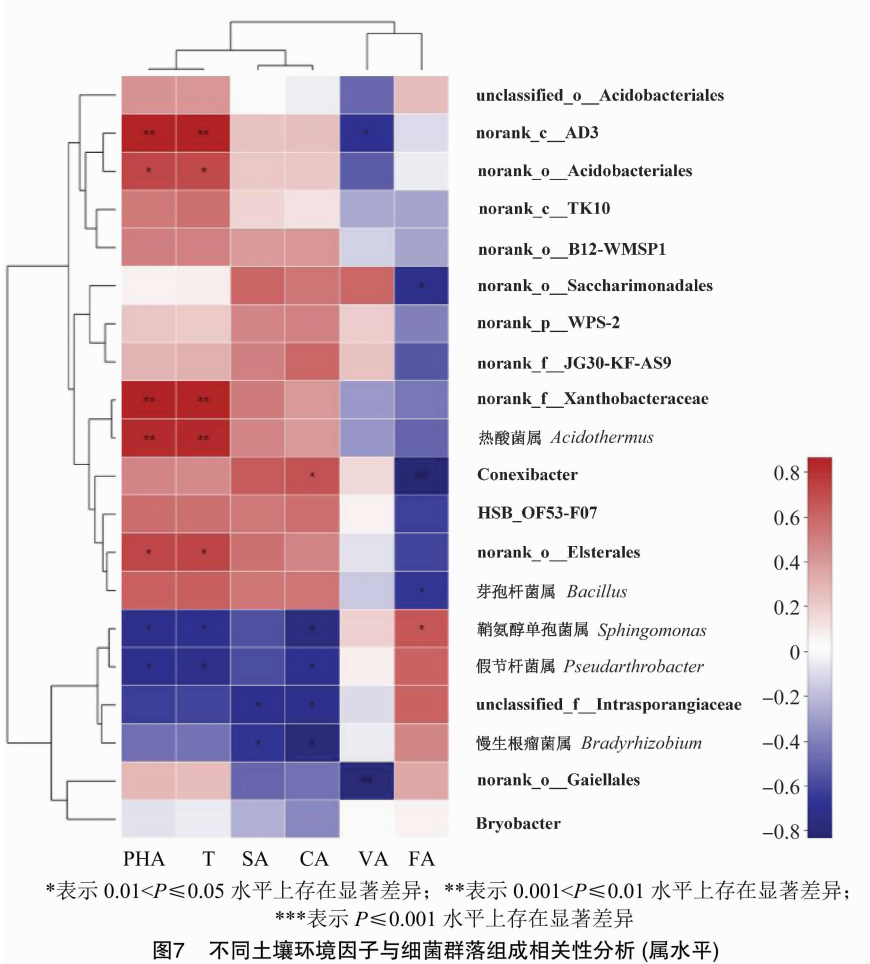
进一步利用 Spearman 相关系数计算不同环境因子与微生物群落组成的关系,由环境因子与细菌群落组成相关性热图可以看出 (图 7),属水平上相对丰度排名前 20 的物种中,热酸菌属 (*Acidothermus*) 与对羟基苯甲酸、酚酸物质总量呈显著正相关,相关系数分别为 0.828、0.833;芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 与阿魏酸呈显著负相关,相关系数为 -0.667;鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 与对羟基苯甲酸、酚酸物质总量以及 4-香豆酸呈显著负相关,与阿魏酸呈显著正相关,相关系数分别为 -0.711、-0.700、-0.762 和 0.667;假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*) 与对羟基苯甲酸、酚酸物质总量

以及 4-香豆酸呈显著负相关,相关系数分别为 -0.703、-0.717 和 -0.695;慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 与丁香酸和 4-香豆酸呈显著负相关,相关系数分别为 -0.672 和 -0.787。此外,一些未被准确分类命名的细菌类群,如 *unclassified\_f\_Intrasporangiaceae*、*norank\_o\_Acidobacteriales*、*norank\_f\_Xanthobacteraceae*、*norank\_c\_AD3* 等菌群均与酚酸类物质的含量呈不同程度的相关性。以上结果表明,烤烟根际土壤中酚酸类化合物含量与土壤细菌群落分布有显著的相关性。

### 3 讨论与结论

酚酸类物质作为单一连作体系中重要的化感物质近年来受到越来越多的关注,业已证明,酚酸类物质在地黄<sup>[21]</sup>、草莓<sup>[22]</sup> 和三七<sup>[23]</sup> 等的连作土壤中的含量数倍于轮作,且其在植烟土壤中同样表现出富集效应,随连作年限增加积累过程明显,酚酸类物质的积累与作物连作障碍的发生关系密切。然而,有研究发现,通过施入不同有机肥提供多样化的碳源,能促进土壤微生物多样化生长,从而能减轻连作病害及自毒作用<sup>[24-25]</sup>。本研究亦发现植烟土壤进行有机肥补充能在一定程度上降低烤烟根际土壤中酚酸物质的含量,2 种生物有机肥处理植烟土壤中对羟基苯甲酸、丁香酸、4-香豆酸的含量均较常规单施烟草专用复合肥有不同程度的减少,且不同施肥处理后烤烟根际土壤中酚酸物质的总量表现为烟草专用复合肥 + 生物有机肥 < 单施烟草专用复合肥,增施生物有机肥后酚酸物质总量降低达 10% 以上,说明,生物有机肥对缓解烟草的化感自毒也有一定的作用。这与前人常规复合肥 + 有机肥较单施常规复合肥更有利于减轻烟草土壤的自毒作用的研究结论<sup>[26]</sup> 相一致。

众多学者研究表明,生物有机肥中含有大量的有机质及微生物活体,能够优化土壤微生物群落结构,增加土壤微生物的功能多样性<sup>[27-28]</sup>。本研究结论与之一致,植烟土壤中增施生物有机肥明显提升了烤烟根际土壤中细菌群落的多样性指数和丰富度指数,与常规单施烟草专用复合肥相比,生物有机肥 T1、T2 处理的 OTU 丰度分别增加了 8.06% 和 14.48%、Shannon 指数分别增加了 0.49% 和 2.95%、ACE 指数分别增加了 5.21% 和 16.50%、Chao1 指数分别增加了 4.46% 和 15.23%。此外,不同施肥处理烤烟根际土壤细菌群落存在明显差



异, 2 种生物有机肥处理的变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 的相对丰度较常规单施烟草专用复合肥均有明显提升, 而绿弯菌门 (Chloroflexi)、WPS-2 和破壁菌门 (Firmicutes) 的相对丰度却有不同程度的降低; 同时, 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 等有益微生物的相对丰度均表现为有机肥处理高于常规单施烟草专用复合肥处理。总体看来, 施用生物有机肥有利于提升植烟土壤中细菌群落的多样性和丰富度, 促进有益土壤微生物的生长。

研究发现, 酚酸类物质可通过直接的自毒作用或间接地抑制或促进土壤微生物生长, 进而显著地影响土壤中微生物的生物量、多样性和群落结构<sup>[29-30]</sup>。环境因子的关联分析表明, 烤烟根际土壤中酚酸类自毒物质的含量与土壤细菌群落的分布有显著的相关性, 其中, 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*) 与

对羟基苯甲酸、酚酸物质总量以及 4-香豆酸均呈显著负相关; 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 与阿魏酸、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 与丁香酸和 4-香豆酸亦呈显著负相关; 与此相反, 热酸菌属 (*Acidothermus*) 与对羟基苯甲酸、酚酸物质总量呈显著正相关。由此可见, 本研究中增施生物有机肥后植烟土壤中鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 等有益微生物的相对丰度增加可能与其根际土壤中对羟基苯甲酸、丁香酸、4-香豆酸的含量以及酚酸物质总量降低密切相关, 但各种酚酸类物质与不同细菌群落的互作及其作用机制还有待进一步研究。

根际微生态是作物-土壤-微生物及其环境相互作用的特殊系统, 作物根系分泌物-土壤-微生物在它们构成的土壤微生态系统中相互作用, 共同影响着作物的生长发育, 协调好它们之间的关系是解决作物连作障碍的关键<sup>[2]</sup>。生物有机肥可通过物理、化学及生物过程参与形成土壤有机-无机

复合体,形成稳定团聚体结构,改善土壤理化性状<sup>[31]</sup>,促进土壤微生物多样性生长,有利于协调作物根系分泌物、土壤、土壤微生物三者之间的关系,营造健康的根际微生态环境,对缓解化感自毒引起的烟草连作障碍能起到一定的提质增效作用。

#### 参考文献:

- [1] 石秋环,焦枫,耿伟,等. 烤烟连作土壤环境中的障碍因子研究综述[J]. 中国烟草学报,2009,15(6):81-84.
- [2] 符建国,贾志红. 烤烟连作障碍产生机制及其调控研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(28):13762-13764.
- [3] 晋艳,杨宇虹,段玉琪,等. 烤烟连作对烟叶产量和质量的影响研究初报[J]. 烟草科技,2002(1):41-45.
- [4] 杨甲华,余佳玲. 烟草连作障碍因子及其解决途径研究进展[J]. 湖南农业科学,2016(8):113-116.
- [5] 陈冬梅,黄锦文,柯文辉,等. 连作烟草根际土壤化感潜力评价及化感物质鉴定[J]. 中国烟草学报,2012,18(1):46-52.
- [6] 田给林,毕艳孟,孙振钧,等. 酚酸类物质在作物连作障碍中的化感效应及其调控研究进展[J]. 中国科技论文,2016,11(6):699-705.
- [7] 马云华,王秀峰,魏珉,等. 黄瓜连作土壤酚酸类物质积累对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(11):2149-2153.
- [8] 高群,孟宪志,于洪飞. 连作障碍原因分析及防治途径研究[J]. 山东农业科学,2006(3):60-63.
- [9] 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,1998(5):102-107.
- [10] 白羽祥,杨焕文,徐照丽,等. 连作檀烟土壤中酚酸物质与土壤因子的关系分析[J]. 浙江农业学报,2018,30(11):1907-1914.
- [11] 白羽祥,杨成翠,史普西,等. 连作植烟土壤酚酸类物质变化特征及其与主要环境因子的 Mantel Test 分析[J]. 中国生态农业学报,2019,27(3):369-379.
- [12] 施河丽,谭军,王兴斌,等. 烟草秸秆生物有机肥对植烟土壤交换性盐基的影响[J]. 中国烟草科学,2015,36(4):80-84.
- [13] 张龙辉,李源环,邓小华,等. 施用石灰和绿肥及生物有机肥后的酸性土壤 pH 和理化性状动态变化[J]. 中国烟草学报,2019,25(3):60-66.
- [14] 潘义宏,顾毓敏,夏贤仁,等. 有机肥与化肥配施对土壤微生物及烟叶品质的影响[J]. 江西农业学报,2019,31(1):30-36.
- [15] 吴立洁,刘杰,王文伟,等. 三七根际土壤中酚酸类物质的鉴定及含量测定[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2014,16(4):825-829.
- [16] 陈乾锦,林书震,李红丽,等. 邵武烟田土壤微生物群落结构变化与烟草青枯病发生关系初报[J]. 中国烟草学报,2019,25(4):64-71.
- [17] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2011,108(Suppl1):4516-4522.
- [18] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods,2013,10(10):996-998.
- [19] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology,2007,73(16):5261-5267.
- [20] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology,1990,215(3):403-410.
- [21] 杜家方,尹文佳,李娟,等. 连作地黄根际土壤中酚酸类物质的动态变化[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):948-952.
- [22] 田给林. 连作草莓土壤酚酸类物质的化感作用及其生物调控研究[D]. 北京:中国农业大学,2015:21-24.
- [23] 吴立洁. 三七根际土壤中酚酸类物质化感作用及其干预措施研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014:17-19.
- [24] Yang Y H, Chen D M, Jin Y, et al. Effect of different fertilizers on functional diversity of microbial flora in rhizospheric soil under tobacco monoculture[J]. Acta Agronomica Sinica,2011,37(1):105-111.
- [25] 张江红. 酚类物质对苹果的化感作用及重茬障碍影响机理的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2005:23-27.
- [26] 杨宇虹,陈冬梅,晋艳,等. 不同肥料种类对连作烟草根际土壤微生物功能多样性的影响[J]. 作物学报,2011,37(1):105-111.
- [27] 赵力光,唐兴莹,汤利,等. 化肥减量配施生物有机肥对植烟土壤微生物区系的影响及其与烤烟青枯病的关系[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2018,33(4):744-750.
- [28] 高飞,汪志鹏,赵贺,等. 低地力条件下有机肥部分替代化肥对作物产量和土壤性状的影响[J]. 江苏农业学报,2020,36(1):83-91.
- [29] Qu X H, Wang J G. Effect of amendments with different phenolic acids on soil microbial biomass, activity, and community diversity[J]. Applied Soil Ecology,2008,39(2):172-179.
- [30] Zhou X, Wu F. p-Coumaric acid influenced cucumber rhizosphere soil microbial communities and the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen[J]. PLoS One,2012,7(10):e48288.
- [31] 曾德武,李立,彭孟祥,等. 商品有机肥特征及其在烟草行业的应用潜力[J]. 现代农业科技,2019(7):177-178,180.