

王丽娜,刘向晖.我国新型职业农民研究的热点领域与未来指向——基于 CNKI 文献知识图谱分析[J].江苏农业科学,2021,49(7):15-20.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.003

我国新型职业农民研究的热点领域与未来指向 ——基于 CNKI 文献知识图谱分析

王丽娜,刘向晖

(新疆农业大学管理学院/新疆农业大学继续教育学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:新型职业农民是当今社会与学术领域关注的焦点,是助力乡村振兴的关键环节。通过筛选 CNKI 网络数据库中探究新型职业农民的相关文献,利用书目共现分析系统提取关键词做共词分析,采用聚类和可视化图谱的方法分类。梳理结果表明,现有研究主要集中在新型职业农民培育与农村人力资本发展、培训需求分析、培育存在问题与对策、培训影响因素及模型分析 4 个研究领域。未来还需要以乡村振兴为战略目标,聚焦新型职业农民内涵与功能责任定位清晰化、培育支持体系多样化、培训远程教育时代化等领域深度展开研究,为农村人力资本发展注入源源活力。

关键词:新型职业农民;共词分析;可视化图谱;乡村振兴

中图分类号:F323.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0015-06

实施乡村振兴战略是党的十九大作出的重大决策部署,是全面建成小康社会的重大历史任务。“十三五”规划指出,新型职业农民逐渐过渡为现代农业的建设者,是实施乡村振兴战略的中坚力量和主体。但改革开放以来,具有一定文化水平、掌握一定专业技能和管理知识理念的农民严重缺乏,目前亟需通过发展新型农民推动农村均衡发展、农业转型,在真正意义上实现乡村振兴。新型职业农民作为“三农”热点研究问题之一,我国学者对其相关领域开展了大量研究,科研成果逐年增加,研究热点不断涌现。本研究针对 15 年内文献作共词分析,意在呈现我国新型职业农民的研究热点与发展轨迹,预判新型职业农民未来发展趋势,以期为该领域进一步研究和开展实践工作提供参考和指引。

1 资料来源与方法

1.1 资料来源

本研究以 CNKI 网络出版总库为文献数据来源,采用高级检索将“主题”设置为检索条件,“新型职业农民”设置为检索内容,时间范围选择 2006—

2020 年,来源类别设定为“核心期刊”“CSSCI、CSCD 来源期刊”,于 2020 年 4 月 5 日检索共得到 547 篇文献,导出筛选后得到的有效文献 466 篇(去除通知与会议专访类非学术文章),文件编码为 ANSI 并以 txt. 格式保存。

1.2 研究工具与进程

本研究以 Bicom 2.0 书目共现分析系统软件和 SPSS 19.0 统计软件为主要研究工具。利用 Bicom 2.0 统计得出各类关键词频次有效合并后的排位,逐次导出词篇与共现矩阵。其次在 SPSS 19.0 中导入词篇矩阵绘制树状图后导出相似矩阵与聚类图,最后利用相异矩阵进行多维尺度分析绘制知识图谱。

2 结果与分析

2.1 文献研究时间分布

文献发表篇数随时间逐年递增(图 1)。核心期刊涉及新型职业农民的研究从 2006 年开始,以培育新型农民视角探索我国农村职业教育的发展,此后该研究经历了一段稳步发展阶段^[1]。直到 2012 年中央一号文件首次提出“大力培育新型职业农民”,此举将之后的研究推上热潮。伴随着乡村振兴战略的提出,2020 年中央一号文件再次提出“整合各类资源,加快构建高素质农民教育培训体系”,这无疑是将新型职业农民的地位进一步明确,从此该研究有望成为社会科学行业关注的焦点。

收稿日期:2020-07-30

作者简介:王丽娜(1995—),女,新疆乌鲁木齐人,硕士研究生,研究方向为农民教育。E-mail:724197300@qq.com。

通信作者:刘向晖,硕士,副教授,研究方向为行政管理、高等教育管理。E-mail:120403772@qq.com。

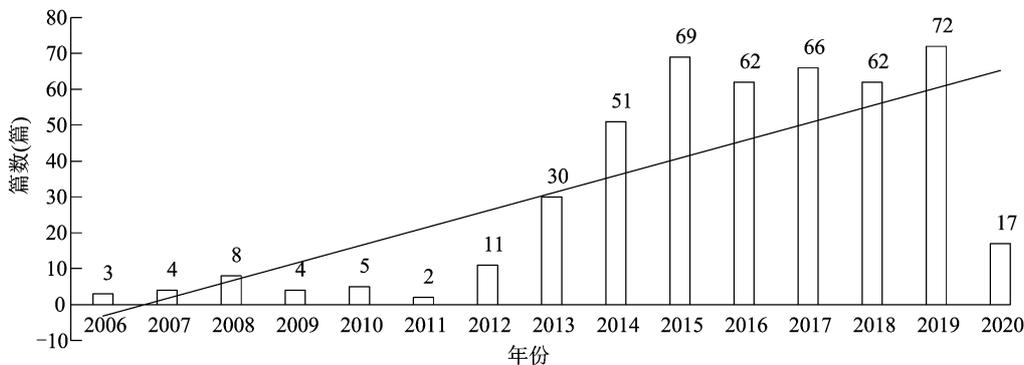


图1 2006—2020年我国新型职业农民研究文献分布

2.2 核心研究机构与核心期刊载文量分布

新型职业农民的研究主要以涉农院校和师范类院校为主(表1)。文中检索文献共来自102个核心期刊,其中发文量15篇及以上的共有8种,从表1可以看出,我国学者关于此类研究主要发表在职教论坛、职业技术教育、农业经济等相关期刊上,相比之下职教论坛发表的核心期刊数量频次最高,在一定程度上说明职教论坛在该领域影响力更为显著,这对于开展新型职业农民的实践工作起到了指导和纲领性的作用。

表1 2006—2020年我国新职业农民核心研究机构与期刊载文量(部分)

研究机构	频次	期刊名称	频次
江苏理工学院	28	职教论坛	61
河北农业大学	14	职业技术教育	45
西北农林科技大学	14	农业经济	38
江西科技师范大学	10	中国职业技术教育	38
河北科技师范	8	成人教育	33
中国农业大学	6	教育与职业	26
长江大学	5	中国成人教育	17
湖南农业大学	5	继续教育研究	15
吉林工程技术师范	5		
青岛农业大学	5		
曲阜师范大学	5		
河北大学	5		

2.3 高频关键词词频统计与分析

关键词既是反映文章主旨与核心内容的线索,也是对文章内容的凝练和高度概括,在文献量化分析中,高频关键词能代表一段时间内学科研究的前沿热点与未来趋势^[2]。本研究经统计共得1799个原始关键词,参照普赖斯高频阈值计算公式 $M = 0.749 \sqrt{N_{\max}}$ (式中: M 为高频阈值, N_{\max} 是论文被引频次最大值)^[3],再结合孙清兰学者提出的高低频词界分估算法^[4],确定高频阈值为13,得到高频关

键词28个,关键词排序可初步一览15年来关于我国新型职业农民研究热点的发展轨迹(表2)。

表2 2006—2020年我国新职业农民高频关键词排序

序号	关键词	频次	序号	关键词	频次
1	新型职业农民	303	15	农村人力资本	25
2	农村职业教育	90	16	涉农院校	25
3	新型职业农民培育	85	17	路径选择	24
4	乡村振兴	47	18	农村成人教育	22
5	新型职业农民培训	44	19	扶持政策	19
6	农业现代化	44	20	培养教育	18
7	职业农民	43	21	新农村建设	17
8	对策建议	42	22	保障措施	16
9	“三农”	39	23	新型农业经营主体	16
10	新型农民	38	24	需求分析	16
11	模式	35	25	培育机制	16
12	城镇化	31	26	影响因素	14
13	问题	26	27	农业供给侧改革	13
14	模型分析	26	28	内涵	13

2.4 高频关键词 Ochiai 系数相异矩阵

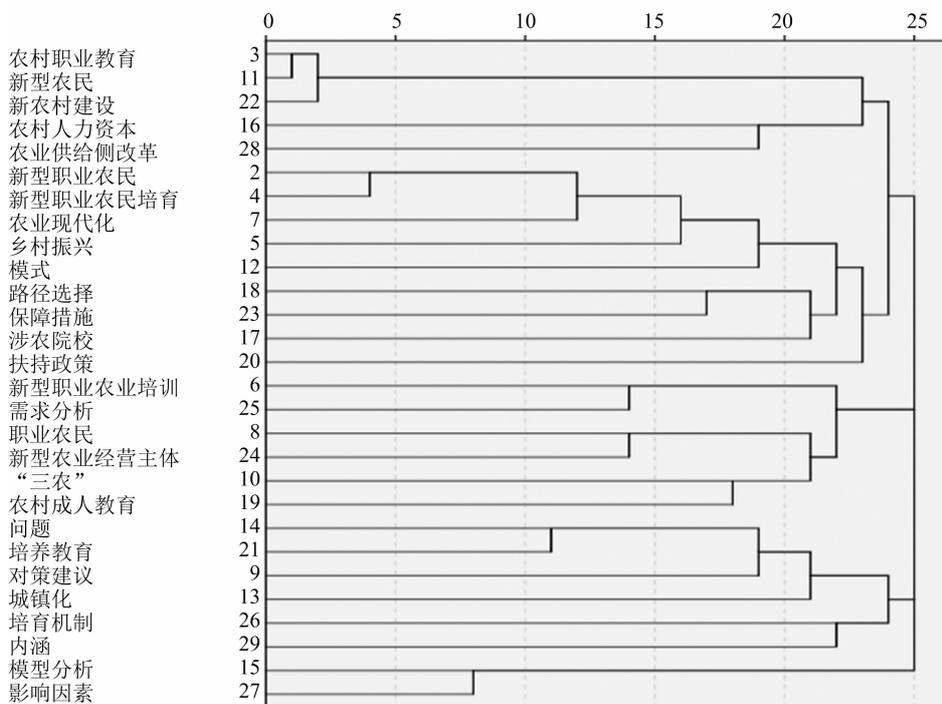
利用 SPSS 19.0 聚类分析词篇矩阵,选取二分类 Ochiai 系数生成相似矩阵(Ochiai 系数是指2个关键词之间的密切联系或疏远程度),再根据公式:相异矩阵 = 1 - 相似矩阵,得出高频关键词 Ochiai 系数矩阵^[5]。从表3可以看出,职业农民(0.982)、新型农民(0.991)、新型职业农民培训(0.823)与本研究主题相关性较高,研究者倾向于关注“三农”问题,这可为后期学者提供参考。

2.5 高频关键词组间联接聚类树及解读

聚类分析是指将抽象对象的集合分类为相似对象再组成集合的过程,通过树状图形式反映热点分类。从图2可以看出,新型职业农民研究热点以4个种类为主:种类1为乡村振兴战略背景下新型职业农民培育与农村人力资本发展;种类2为新型职业农民培训需求分析;种类3为新型职业农民培

表3 高频关键词 Ochiai 系数相异矩阵(部分)

关键词	新型职业农民	农村职业教育	新型职业农民培育	乡村振兴	新型职业农民培训	农业现代化	职业农民	对策建议	“三农”	新型农民
新型职业农民	0.000									
农村职业教育	0.773	0.000								
新型职业农民培育	0.664	0.931	0.000							
乡村振兴	0.715	0.813	0.905	0.000						
新型职业农民培训	0.823	0.951	0.950	0.910	0.000					
农业现代化	0.755	0.870	0.802	0.911	1.000	0.000				
职业农民	0.982	0.967	0.917	0.956	0.859	0.930	0.000			
对策建议	0.758	0.867	0.848	0.954	0.855	0.976	0.976	0.000		
“三农”	0.798	0.881	0.948	0.883	0.876	0.951	0.878	0.900	0.000	
新型农民	0.991	0.620	0.912	1.000	0.900	0.926	0.975	0.924	0.922	0.000



使用平均联接(组间)的树状,更新调整距离聚类合并

图2 高频关键词组间联接聚类树

育存在问题与对策;种类4为新型职业农民培训的影响因素与模型分析。

2.6 研究热点多维尺度分析

在聚类分析的基础上采用多维尺度组图,深入分析主题与各关键词间的关联程度。根据研究对象范畴不同,坐标轴将区间划分为4个象限,第1象限为研究主题所在的核心位置。从图3知识图谱可知,热点1大部分位于第1象限且较为集中,表明新型职业农民与新型职业农民培育、乡村振兴、农村人力资本等研究较为成熟,联系较为紧密;热点2涉及第2、第3、第4象限,以新型职业农民培训需求、“三农”为研究热点,通过分析培训需求从而达

到按需培训、精准扶贫的目标,因此该领域也受到了学者的广泛关注;热点3主要分布在第2、第3象限,新型职业农民培育问题与对策研究比较广泛,所以导致关键词跨度较大;热点4影响因素位于第1象限坐标轴附近,说明该领域与主题关联度较大,是今后研究的重点。

3 新型职业农民研究的前沿热点

3.1 乡村振兴战略背景下新型职业农民培育与农村人力资本发展

农村人力资本是农村经济发展的重要组成部分,是实现乡村振兴的重要人才支撑保障。当社会

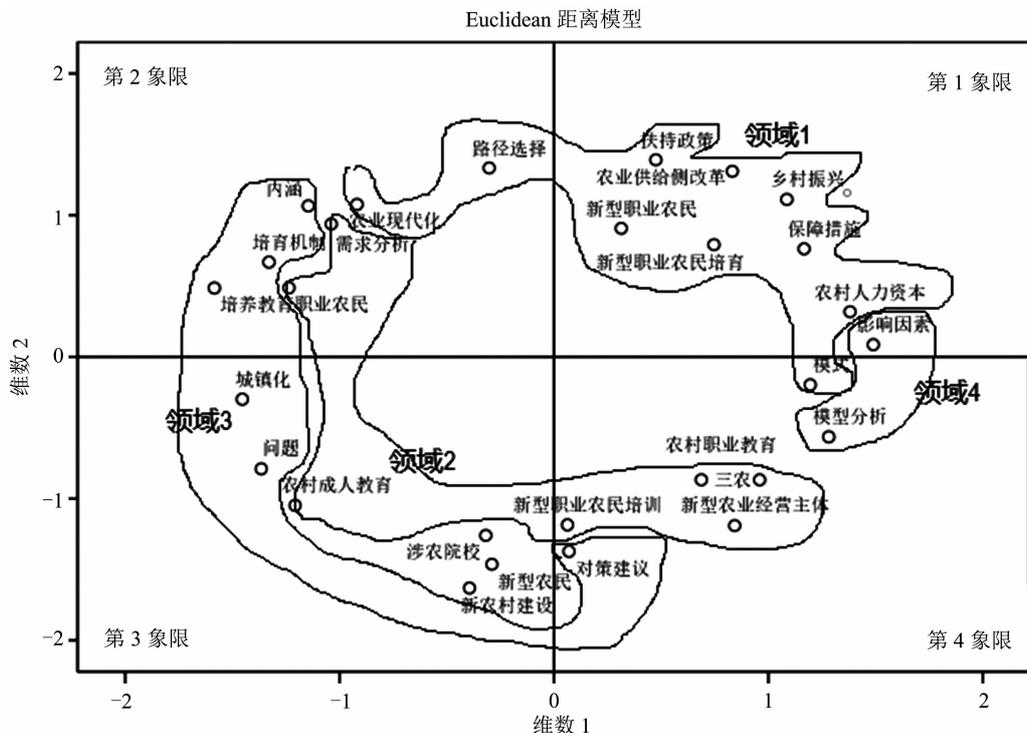


图3 我国新型职业农民研究热点知识图谱

物质资本达到一定量时需尽快投入大量人力资本进入农村,目前仅适用于传统生产要素的农业对经济增长无法做出重大贡献^[6],但发展现代农民与现代技术能够促使农村经济增长,这便催生当代新型职业农民这支队伍^[7]。新型职业农民培育作为我国农村人力资源的主要开发形式,在提高农民生产技能和文化素养的同时促进农业经济增长,为新农村的开发与建设不断输入新鲜血液起着至关重要的作用^[8]。从职业教育角度助推新型职业农民培育,主动将成人纳入农村职业教育当中,多渠道丰富农村人力资本是推动农村发展、解决人才瓶颈问题的重要举措之一^[9]。因此,以培育和引进新型职业农民作为农村人才输入途径、尝试新的发展理念为指导、不断审视新型职业农民在农村人力资本开发和农村社会发展中的地位和作用,以期为我国实现乡村振兴、发展为“人才强国”建立坚实基础。

3.2 新型职业农民培训需求分析

据了解目前农民参与培训的需求主要涉及3个方面:(1)农民注重培训内容实用性和形式多样性,对了解种养殖技术、农业政策较为感兴趣且偏好闲时参与培训;(2)农民对于得到证书、获得政策扶持、获得尊重而参加培训的需求较少,但也有部分农民对此感兴趣;(3)随着现代农业的推进,农民对农机操作、贮藏加工、农产品营销等技术也有了一

定的关注。以上需求表明,农民对自身主导产业的发展十分重视,市场化意识逐渐由传统生产向市场转变,参与培训有较强理性和目的性^[10]。因此,国家应当重视新型职业农民培训工作,满足以农民切身需求为目的进行供给,以提高技能和增加收入为主要目标,为农民提供农用技术和教育培训、提升专业技能和文化素养,不断了解他们的职业特点和务农需求,建立健全农业推广课程,加强技术辅导、师资建设、后续跟进反馈机制等。大力呼吁社会支持农业教育,使农业教育培训供需平衡,这样不仅有助于对接精准扶贫,还能使农民获得专业技能从而有效控制脱贫后不返贫^[11]。

3.3 新型职业农民培育存在问题与对策

我国新型职业农民培育受限于传统与现代因素的影响,目前仍存在一些问题。其中培育体系、机制尚未完善,缺乏职业农民资格准入制度,导致农民身份依旧没有改变^[12];政策保障不完善落实不到位的问题制约新型职业农民的培育进度,市场保障政策不到位导致农产品滞销,亟需解决销路问题^[13];培育当中缺乏农业生产技能和市场营销能力培训,资金与师资需求量较大,以致农民参与培训的积极性不高,培育实效甚微^[14];由相关部门根据专家的专业领域和借鉴其他地区经验决定培训内容,理论知识依靠“大水漫灌”的方式并不合理^[15]。

针对培育留存问题很多学者也提出了相应对策。在政策制度方面:相关机构应不断完善农民培育制度体系建设,建立网络化管理体系,强调数字化教学的推广与应用;不断完善培训运行管理机制,加强师资建设和加大资金投入力度,并根据实际情况制定惠农利农政策,确立相应的奖励机制^[16-17]。在培训内容方面:政府、高校、培训机构形成合力,扩大培训对象范围,将教育资源配置均等;改善培训方式并明确培训目标,倾向小规模产业农民的农业生产技能培训^[18]。因此,根据问题适时调整培育策略,呼吁社会各界关注“三农”问题,有利于助推农民成长与农村发展取得共赢。

3.4 新型职业农民培训的影响因素与模型分析

在新型职业农民培训过程中,性别、年龄、身体状况、文化水平、职业背景、所属经营主体、年收入、参加培训经历、对政策了解程度、培训时间、内容、体系等内外部因素都会影响农民的参训意愿^[19-20]。清晰影响农民参训因素后可逐步将负面因素破解消除,从而解决农民培训存在的实际问题,将培训参与率及实效提高。模型分析是指在相关数据解析过程中运用的方法和工具。对农民参训影响因素多采用二分类和多分类 Logistic、Multinomial Logit、二值响应 Probit 模型来进行分析,该类模型使用调查问卷易形成研究地域化的特征,以此探究某区域内农民参训影响最大的因素^[21];对于培训影响因素间关联关系和层次结构可运用 ISM 模型解析^[22],最终培训效果可采用熵权 TOPSIS 评价法对培训效果进行测度,该模型不仅将某项指标的重要程度客观反映于指标体系中,还能有效消除内部产生的主观影响因素,直观反映指标权重随时间变化的状况^[23]。总之,该热点主要是运用各种模型将新型职业农民培训的影响因素或与该因素相关的领域,建立拟合度较高的模型进行分析,并有针对性地提出建议,用量化的方法将研究热点逐一呈现。

4 新型职业农民研究的未来指向

4.1 新型职业农民的内涵与功能责任定位清晰化

习近平总书记关于新型职业农民的内涵指出:以爱农业为基础,懂技术为核心,善经营为关键的 3 个鲜明特征,与现代社会提升农民、先进技术武装农民、加速构建新型职业农民队伍让农民身份不再传统落后成为与时俱进的体面职业一脉相承^[24]。将农村职业教育定位于新型职业农民培育,是职业

教育多方位转型升级解决现实问题的手段之一;提高对新型职业农民的现实定位和认知水平,有助于精确把握他们的价值和作用。成为具有一定文化素养与科技知识、掌握现代化农业生产技能、拥有社会责任感的农业从业者,是时代赋予新型职业农民的使命和责任定位。因此,只有将新型职业农民的概念内涵、功能责任定位不断清晰化,才能助推农民向职业化、生产方式向机械化、农业向现代化的方向稳步迈进^[25-26]。

4.2 新型职业农民培育支持体系多样化发展

培育体系是指按既定的社会需求,由国家、社会、企业、学校等若干要素按照一定的秩序和内部联系组织协调形成相互支持的有机整体。我国现有新型职业农民培育体系依旧存在较多问题,机构设置重叠导致相关部门职责混乱,为数不多面向“三农”服务的院校涉农专业薄弱,现有体系无法满足培育工作的需求^[27]。因此,针对这一问题提出新型职业农民培育体系应该向多样化发展,统筹利用各级各类农业职业院校、农技推广中心、科研中心等师资力量,将“政府+企业+社会”的模式运用到新型职业农民培育当中,利用农村合作社、龙头企业等相关社会企业与政府和高校相互作用,形成多元主体协同发展的培育体系,发挥市场主导的作用,建立科学合理多样化的新型职业农民培育体系是未来发展的方向,也是学者今后应该关注的重点^[28-29]。

4.3 新型职业农民培训远程教育时代化发展

最终发现对新型职业农民“互联网远程教育”的研究也有少数学者感兴趣。随着网络电视、互联网的普及,远程教育也逐渐成为农民培训的有效途径之一。互联网远程教育可以改变传统的培训方式,使教育资源共享,农民不再受到单一培训方式和机构的制约。由农民自主选择课程,可以有效提升教育机会公平性,“村村通”的普及可解除由于时间地点受限阻碍农民参与培训。目前网络销售已成为现代农业发展的新兴方式,构建“互联网+订单农业”平台可有效拓宽农产品营销渠道与知名度,信息互联和资源共享为农民创收营造了新的环境^[30]。因此,发挥网络优势,借助现代信息技术平台推广智慧农业,紧跟时代步伐,真正实现农业农村现代化意义重大。但目前乡村基础设施不健全,导致互联网基础设施未能全面覆盖,人力资本投资力度欠缺导致互联网技术人才匮乏,种种因素限制

互联网远程教育向未来时代化发展。因此,今后应该更加具体深入探究数字化网络对农民终身教育的作用,为新型职业农民培训远程教育时代化发展提供可供借鉴的意义和价值。

5 结论与展望

伴随着乡村振兴战略的推进和现代农业发展脚步的加快,为新型职业农民提供了新的挑战和机遇,通过研究我国新型职业农民,发现其热点主要围绕4个方面。基于独特关键词分析,推断未来还需要从新型职业农民的内涵与功能责任定位、培育支持体系多样化发展、培训远程教育时代化发展等领域深度展开。结合新型职业农民的研究现状和新农村发展面临的形式和任务,对未来研究提出以下建议:(1)聚焦农村职业教育改革的重点问题和新型职业农民短板,关注成人教育、农业供给侧改革,农村电商等主题。(2)加强对新型职业农民微观实践研究,目前学术界的研究以宏观层面定性为主,但新型职业农民具有很强的实践性,需要将重心下移到农民培训、田间课堂,将研究视角聚焦到具体微观角度。(3)创新培育模式,因地制宜构建适合我国各地区的培育模式,对乡村振兴和培育新型职业农民具有重要的指引价值。未来职业农民这支新型队伍必将持续壮大,成为实现我国农业农村现代化和乡村振兴的主力军。

参考文献:

- [1]王丽君,祝士明.从培育新型农民视角探索我国农村职业教育发展之路[J].安徽农业科学,2006,34(7):1456-1457.
- [2]李伟.农村成人教育助力乡村振兴——我国农村成人教育研究热点的文献计量可视化分析[J].成人教育,2019,39(2):48-55.
- [3]郭文斌.知识图谱理论在教育与心理研究中的应用[M].杭州:浙江大学出版社,2015:111.
- [4]孙清兰.高频词与低频词的界分及词频估算法[J].中国图书馆学报,1992(2):78-81,95.
- [5]陈琪.我国农村职业教育研究热点的知识图谱[J].职业技术教育,2017,38(10):69-74.
- [6]蒋海曦,蒋玲.乡村人力资本振兴:中国农民工回流意愿研究[J].四川大学学报(哲学社会科学版),2019(5):151-161.
- [7]西奥多·舒尔茨.改造传统农业[M].北京:商务印书馆,2003.
- [8]张亿钧,朱建文,李想.基于人力资本投资视角的新型职业农民培育研究[J].中国成人教育,2018(24):165-169.
- [9]韩丽娜.新型职业农民培育背景下农村职业教育改革分析[J].农业经济,2020(3):84-86.
- [10]于兴业,刘望,刘家富.生产经营型职业农民职业知识和技能需求研究——基于黑龙江省5县的调查[J].现代远程教育,2019(2):87-96.
- [11]易阳,董成.湖北省新型职业农民培训需求调查分析[J].湖北农业科学,2014,53(14):3427-3429.
- [12]胡焱,王伯达.新型职业农民培育困境及对策研究[J].理论月刊,2017(8):148-152.
- [13]刘西涛.现代农业视角下新型职业农民培育:现实困境与制度设计[J].职业技术教育,2016,37(13):60-64.
- [14]黎家远.新型职业农民培育中的财政支持问题研究——以四川省为例[J].农村经济,2015(5):113-117.
- [15]孔韬.乡村振兴战略背景下新型职业农民培育的困境与出路[J].中国职业技术教育,2019(6):80-85.
- [16]唐伟.乡村振兴背景下广西新型职业农民培育对策研究[J].现代商业,2020(9):61-62.
- [17]李丹.新型职业农民培育的机制构建与路径选择[J].继续教育研究,2017(7):28-30.
- [18]何嵘珍.新型职业农民培训模式及其效果影响因素分析[J].现代营销(信息版),2019(3):180-181.
- [19]傅雪梅,陈光燕,庄天慧,等.新型职业农民培育扶持政策满意度影响因素分析——基于对成都市304位参训农民的调查[J].江苏农业科学,2016,44(8):540-544.
- [20]翟黎明,夏显力,孙养学.农户参与新型职业农民培训意愿及影响因素分析——对陕西关中四市的调查[J].职业技术教育,2016,37(21):55-59.
- [21]王晓曦,耿树海,刘建业.基于ISM模型的河北省新型职业农民培育影响因素分析[J].河北科技师范学院学报(社会科学版),2018,17(3):15-19.
- [22]廖开妍,杨锦秀,刘昕禹.新型职业农民培训效果评价及其影响因素——对四川省成都市812位参训农民的调查[J].职业技术教育,2019,40(36):45-50.
- [23]薛晴,陈会谦,孙秀芳.新时代新型职业农民的特征内涵及理论价值[J].农业经济,2019(8):72-74.
- [24]张彩娟.乡村振兴背景下新型职业农民技能培训的责任定位、角色冲突与推进省思[J].职业技术教育,2019,40(25):49-54.
- [25]肖良,付文学.新型职业农民培育的时代坐标与现实定位[J].新乡学院学报,2019,36(10):8-10.
- [26]马明,梁智慧,闵海燕.新型职业农民培育问题思考[J].农业经济,2018(8):70-71.
- [27]童举希,陈蓓蕾,章霞.基于模块化的新型职业农民培育体系创新研究[J].江苏农业科学,2015,43(12):527-529.
- [28]徐万厚,吴洋.昌平农广校:校社结合拓宽互联网培训新模式[J].农民科技培训,2016(3):33-35.
- [29]张晓燕.基于新型职业农民培育需求的农业职业教育发展研究[J].江苏农业科学,2020,48(15):18-21.
- [30]王雪松,赵丹.“互联网+新型职业农民培训”的作用、应用困境及对策[J].成人教育,2018,38(1):60-64.

张霞,许秀梅. 基于 OWA 算子的新型女职业农民职业胜任素质评价[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):21-27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.004

基于 OWA 算子的新型女职业农民职业胜任素质评价

张霞,许秀梅

(青岛农业大学管理学院,山东青岛 266109)

摘要:本研究以青岛农业大学新型女职业农民法律素质培训班的 60 名女学员调查数据为依据,构建新型女职业农民的胜任素质评价模型,应用 OWA 算子函数,对新型女职业农民胜任素质现状进行评价。评价结果显示,新型女职业农民整体受教育程度不高,在胜任素质方面还存在不同程度的提升空间,尤其在生态素质方面须要提高。最后根据各维度素质存在的不足,从加强本土女农民基础教育、吸引女大学生成为新型女职业农民、消除女农民社会性别差异、与农业院校联合培养等方面提出新型女职业农民胜任素质提升路径。

关键词:OWA 算子函数;新型女职业农民;胜任素质;评价;素质提升

中图分类号:F323.6;G725 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0021-06

2020 年中央一号文件提出要推动人才下乡,加快构建高素质农民教育培训体系,培养更多懂农业、爱农业并且能够扎根乡村的人才,推动更多农业科技成果应用到田地里^[1]。然而,目前在田间地头参与农业生产的农民女性居多,约占农村农业从业者总数的 65%^[2]。造成这一现象的原因是男性劳动力在城镇化进程中选择外出打工^[3]。女农民则无疑成为我国乡村振兴战略实施的重要力量。但目前大多数农村地区女农民文化程度不高、职业素质较低,不能较好地适应现代化农业发展的需求。为了更好地发挥女性农民在乡村振兴和农业现代化发展中的作用,须不断提高女性农民从业素质,将其培育成新型职业农民。本研究拟通过构建新型女职业农民胜任素质评价模型,对新型女职业农民胜任素质的现状进行评价研究,找出问题与不足,针对性地提出提升建议,以上分析可以为提升乡村振兴人才培养效果提供有益的借鉴。

1 相关文献综述

1.1 新型女职业农民

收稿日期:2020-08-28

资助基金:山东省社会科学规划项目(编号:19CQXJ39);青岛市社会科学规划项目(编号:QDSKL1901173);青岛农业大学继续教育课题(编号:JXJY20-01)。

作者简介:张霞(1985—),女,山东青岛人,硕士研究生,研究方向为农业管理。E-mail:877014178@qq.com。

通信作者:许秀梅,博士,教授,硕士生导师,研究方向为农业科技创新。E-mail:shareshare@163.com。

近年来,一些学者对以务农为职业的现代女性农业从业者进行了不同程度的探究。其中杨德兴等认为,女性农业从业者是农业现代化建设不可或缺的主体力量^[4]。杨亚利指出,农村青壮年男劳动力在农业产业结构调整的情况下大量外出务工,女性农民则无疑变成农业农村发展的主体力量,并且指出其普遍存在文化程度和道德素质偏低的现象^[5]。康芳民认为,在我国的农业发展越来越以女性为主的背景下,要解决我国的农民问题关键要不断培育新型职业女农民^[6]。从乡村振兴的角度看,在农村劳动力中,女性农民占 3/5 以上^[7],农业女性化特征日益明显^[8],培育新型女职业农民能够在很大程度上助推乡村振兴工作。杨梅等指出,现代女性农业从业者培育工作刻不容缓,应被深刻认识,对女性职业农民加以器重,为乡村振兴和现代农业发展增加力量^[9]。胡红等认为,农业生产迫切需要解决的问题就是提高女性农业从业者的知识和技术水平,而女农民在获得农业技术知识方面是被动、从属的角色,因此在培育女农民时应注意多采用更适合于女农民的培育方式^[10]。综合以上学者的研究发现,在新型女职业农民的研究上大多是对现状及问题进行统计描述,然后从宏观上提出解决对策。本研究把以上多位学者的研究结论作为研究依据并对研究的不足之处进行总结。发现前人的研究没有针对性地制定培养路线,有的放矢地提出措施建议。本研究在前人研究的基础上,聚焦现代女性职业农民,分析现代女性农业从业者存在的问题与不足,并提出措施建议。

1.2 新型女职业农民职业胜任素质

新时代的农民,应具备符合农业现代化发展的职业胜任素质^[11]。围绕胜任素质,多位学者进行了不同视角的探究。杨艳丽等构建了新型职业农民应具有的文化知识水平、农业常识和市场营销、产品推广、专业技术、团队合作等生产经营能力以及人际沟通能力、使用新技术新要素的能力还有创新思维和创业能力等从业素质体系^[12]。陈春霞等提出,新型职业农民的胜任素质由从农动机、模式创新力、关系资本积累能力、农人新思维等 17 项要素构成^[13]。为了解决谁来种地、如何种地的问题,势必需要一批以农业为固定职业的新型人才,即新型职业农民^[14]。近年来,农村越来越多的男性选择进城务工或从事其他非农职业,据相关调查显示,在农业生产者中女性约占 65%,女性农业从业者在生产中发挥主要作用^[15]。

纵观几位学者的研究发现,学者们从不同视角建立指标体系进行评价研究,但是都没有针对女性职业农民独有的特点,建立符合新型女职业农民特质的指标体系。因此,本研究将结合新型女职业农民区别于男性农业从业者的特点,建立一套符合新型女职业农民特质的胜任素质指标评价体系,对当前我国新型女职业农民胜任素质现状进行具体评估,并以青岛农业大学新型女职业农民法律素质培训班为例进行实地调查,通过调查,从多维度分析当前新型女职业农民胜任素质的现状与不足,尽可能全面地提出措施建议,以期为我国新型女性农业人才培育工作提供参考。

2 新型女职业农民胜任素质模型构建

2.1 一级指标设计

本研究通过文献分析法,整理出以下 8 个维度的一级指标:基本特质(B_1)是指与新型女职业农民职业特征相符的基本能力,这些能力可以是先天具备的也可以是后天习得的;科技素质(B_2)是指新型女职业农民对农业科技意识、科技知识、科技技能以及科技信息和科技价值观所掌握的程度以及在农业生产实践中熟练应用的程度^[16];经营管理素质(B_3)是新型女职业农民的市场信息分析能力、市场机会识别能力以及资源整合能力等各方面的经营管理素质水平^[17];法律素质(B_4)是指新型女职业农民对与其自身相关的生产、生活方面的法律知识、行政法规的掌握程度^[18];思想道德素质(B_5)是

指新型女职业农民在个人品德方面能做到诚信正直、有责任心并乐于分享劳动经验和心得感受的程度;身心健康素质(B_6)包括身体素质和心理素质,身体素质主要是指新型女职业农民自身身体健康状况和对自身健康水平的管理能力,心理素质是指新型女职业农民在思想、感情等方面的内心活动,良好的心理素质,如积极进取、自信乐观等;专业素质(B_7)是指个体经过培训和考核后获得的农业方面或其他有利于农业发展方面的专业技术能力;生态素质(B_8)是指新型女职业农民是否具有能适应现代农业发展的绿色环保意识和安全生产责任感,是否能全面掌握生态农业综合知识。

2.2 二级指标设计

8 个维度只是对新型女职业农民胜任素质模型的框架性描述,为了让模型具有更好的可操作性,本研究对 8 个维度做出更加详细的二级指标进行描述,在综合前人研究成果的基础上,拟从受教育程度、职业认同、主体意识等 3 个指标来描述基本特质;拟从科技意识、科技知识、科技实践能力等 3 个指标来描述科技素质;拟从识别市场机会能力、资源整合能力、信息分析能力等 3 个指标来描述经营管理素质;拟从法律政策知识、法律思维、法律敏感度等 3 个方面来描述法律素质;拟从诚信正直、责任意识、共享意识等 3 个指标来描述思想道德素质;拟从积极进取、自信乐观、健康管理能力等 3 个指标来描述身心健康素质;拟从农业综合知识、市场营销知识、财务管理知识等 3 个指标来描述专业素质;拟从绿色环保意识、安全绿色生产责任、生态农业综合知识等 3 个指标来描述生态素质。建立起新型女职业农民胜任素质评价指标体系(表 1)。

3 研究设计

本研究用专家打分法、访谈法确定新型女职业农民胜任素质模型的各项一级指标和二级指标权重。访谈对象是青岛市西海岸参加青岛农业大学新型女职业农民法律培训班的学员。然后结合 OWA 算子函数对各级指标进行计算分析。根据一二级指标设计问卷内容,将设计好的问卷发放给该期培训学员。调查过程中,向学员发放调查问卷,总共发出 60 份,收回有效问卷 57 份,回收率达到 98.3%。

为了保证问卷可信度,本研究在获取问卷数据后,对问卷数据进行了信度、效度检验,以保障问卷设计的科学性。首先,用科伦巴赫(Cronbach's α)

表 1 新型女职业农民胜任素质评价指标体系

目标层	一级指标	二级指标
新型女职业农民 胜任素质(A)	基本特质(B ₁)	受教育程度(C ₁₁)
		职业认同(C ₁₂)
		主体意识(C ₁₃)
	科技素质(B ₂)	科技意识(C ₂₁)
		科技知识(C ₂₂)
		科技实践能力(C ₂₃)
	经营管理素质(B ₃)	识别市场机会能力(C ₃₁)
		资源整合能力(C ₃₂)
信息分析能力(C ₃₃)		
法律素质(B ₄)	法律政策知识(C ₄₁)	
	法律思维(C ₄₂)	
	法律敏感度(C ₄₃)	
思想道德素质(B ₅)	诚信正直(C ₅₁)	
	责任意识(C ₅₂)	
	共享意识(C ₅₃)	
身心健康素质(B ₆)	积极进取(C ₆₁)	
	自信乐观(C ₆₂)	
	健康管理能力(C ₆₃)	
专业素质(B ₇)	农业综合知识(C ₇₁)	
	市场营销知识(C ₇₂)	
	财务管理知识(C ₇₃)	
生态素质(B ₈)	绿色环保意识(C ₈₁)	
	安全绿色生产责任(C ₈₂)	
	生态农业综合知识(C ₈₃)	

一致性系数来进行效度检验,根据 α 系数的检验标准可知, α 越大,表明问卷设计可靠性越大。本研究设计问卷信度系数为 0.968,大于 0.9,各个维度的 α 系数也都大于 0.7,说明研究数据总体与维度信度较高,基于该问卷进行数据统计分析将得到具有可靠性的结果。接下来进行效度分析,采用常用的 KMO 检验法。本研究中 KMO 的值为 0.766,表明数据亦具有较高效度。基于该数据所做的统计分析具有较好的可信度。

4 基于 OWA 算子的新型女职业农民职业胜任素质评价

4.1 一级指标权重计算与分析

通过专家访谈,邀请 6 位新型职业农民培育方面的专家对各项指标进行权重评分,运用 OWA 算子,计算新型女职业农民胜任素质的 8 个一级指标权重值。这种方法能最大限度减少决策数据极值对整体决策数据的影响,使确定的指标权重相对合理,具体步骤如下。

4.1.1 专家打分 邀请 6 位专家,根据同一层次指标的重要性程度对新型职业农民胜任素质评价指标(C_{ij})进行打分(0~10分),得到原始决策数据(a₁,a₂,a₃,...,a_{n-1},a_n),将已知决策数据按降序排列,并从 0 开始重新编号,得到新数列(b₀,b₁,b₂,...,b_{n-2},b_{n-1}),其中(b₀≥b₁≥b₂≥...≥b_j≥...≥b_{n-2}≥b_{n-1})。

4.1.2 位置赋权 数据 b_j 的比重分别对应组合数 C_{n-1}^j,也即 n 个数据 b₀,b₁,b₂,...,b_{n-1} 分别对应 n 个组合数 C_{n-1}⁰,C_{n-1}¹,C_{n-1}²,...,C_{n-1}ⁿ⁻¹,故得赋权向量:

$$k_{j+1} = \frac{C_{n-1}^j}{\sum_{k=0}^{n-1} C_{n-1}^k}, j=0,1,2,\dots,n-1. \quad (1)$$

根据二项式定理,有:

$$\sum_{k=0}^{n-1} C_{n-1}^k = 2^{n-1}. \quad (2)$$

$$\text{即得 } k_{j+1} = \frac{C_{n-1}^j}{2^{n-1}}, j=0,1,2,\dots,n-1. \quad (3)$$

4.1.2.1 确定绝对权重 利用赋权向量(k_{j+1})对打分数据集(b₀,b₁,b₂,...,b_{n-2},b_{n-1})进行加权,得到新型职业农民胜任素质评价指标 C_{ij} 的绝对权重值(ω_i[']):

$$\omega_i' = \sum_{k=0}^{n-1} k_{j+1} b_j, i=1,2,\dots,m. \quad (4)$$

式中:m 表示指标因素的个数。

4.1.2.2 确定相对权重 计算新型职业农民胜任素质评价指标 C_{ij} 的相对权重值(ω_i),即

$$\omega_i = \frac{\omega_i'}{\sum_{i=1}^m \omega_i'}, i=1,2,\dots,m. \quad (5)$$

专家打分结果见表 2。

表 2 一级指标专家打分

专家序号	得分(分)							
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈
专家 1	8.0	8.5	8.5	8.5	8.5	9.0	8.5	9.0
专家 2	7.5	7.5	9.0	9.0	7.5	9.5	8.5	9.5
专家 3	7.5	7.5	8.5	8.0	8.0	8.5	8.0	8.5
专家 4	7.0	7.5	9.0	9.0	9.0	9.5	9.0	9.5
专家 5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	10.0	8.5	9.0
专家 6	8.5	8.5	9.5	9.5	9.0	9.5	9.5	9.5

根据公式(1)至公式(5),可得一级指标的相对权重见表 3。

由表 3 可知,身心健康素质指标权重为 0.140 3,是所有一级指标中最重要指标;次要指标为经营管理素质,权重为 0.130 8;法律素质

表 3 一级指标的相对权重

目标层	一级指标	权重	排序
新型女职业农民胜任素质(A)	基本特质(B ₁)	0.116 7	6
	科技素质(B ₂)	0.119 3	5
	经营管理素质(B ₃)	0.130 8	2
	法律素质(B ₄)	0.130 5	3
	思想道德素质(B ₅)	0.126 4	4
	身心健康素质(B ₆)	0.140 3	1
	专业素质(B ₇)	0.119 3	5
	生态素质(B ₈)	0.116 7	6

和思想道德素质权重分别为 0.130 5、0.126 4,位列第 3、第 4;科技素质和专业素质同为次不重要指标,而最不重要的 2 个指标为基本特质和生态素质。

4.2 二级指标权重计算与分析

根据问卷调查结果,计算每项二级指标在其所属一级指标中的权重并排序,具体见表 4。

表 4 新型女职业农民胜任素质二级指标权重

一级指标	二级指标	平均分 (分)	权重	二级指标 在所属一 级指标中 权重排序
基本特质(B ₁)	受教育程度(C ₁₁)	6.5	0.295	3
	职业认同(C ₁₂)	7.6	0.345	2
	主体意识(C ₁₃)	7.9	0.359	1
科技素质(B ₂)	科技意识(C ₂₁)	7.3	0.332	2
	科技知识(C ₂₂)	7.1	0.323	3
	科技实践能力(C ₂₃)	7.6	0.345	1
经营管理素质 (B ₃)	识别市场机会能力(C ₃₁)	7.5	0.326	3
	资源整合能力(C ₃₂)	7.7	0.335	2
	信息分析能力(C ₃₃)	7.8	0.339	1
法律素质(B ₄)	法律政策知识(C ₄₁)	7.5	0.355	1
	法律思维(C ₄₂)	6.8	0.322	2
	法律敏感度(C ₄₃)	6.8	0.322	2
思想道德素质 (B ₅)	诚信正直(C ₅₁)	8.1	0.338	1
	责任意识(C ₅₂)	8.1	0.338	1
	共享意识(C ₅₃)	7.8	0.325	2
身心健康素质 (B ₆)	积极进取(C ₆₁)	7.8	0.342	1
	自信乐观(C ₆₂)	7.6	0.333	2
	健康管理能力(C ₆₃)	7.4	0.325	3
专业素质(B ₇)	农业综合知识(C ₇₁)	7.8	0.358	1
	市场营销知识(C ₇₂)	7.2	0.330	2
	财务管理知识(C ₇₃)	6.8	0.312	3
生态素质(B ₈)	绿色环保意识(C ₈₁)	7.9	0.341	1
	安全绿色生产责任(C ₈₂)	7.6	0.328	3
	生态农业综合知识(C ₈₃)	7.7	0.332	2

分析表 4 可知,在基本特质中主体意识排第 1 位,说明经过前期的培育,新型女职业农民的主体意识已经有了很大程度的提高,然而与男性职业农民相比,女性平时忙于家庭事务,因此学习主动性不强,学习能力也落后于男性,这也导致新型女职业农民的受教育程度偏低,普遍得不到提高;在科技素质中,科技实践能力得分最高,说明新型女职业农民的实践能力在培育过程中得到了明显提高,然而由于总体文化素质偏低等原因,新型女职业农民计算机互联网知识匮乏,而且缺乏创新能力;在经营管理素质中,信息分析能力占第 1 位,说明新型女职业农民的信息分析能力已经有所提升,但资源整合能力仍然较差,市场眼光不足,不能及时了解市场动向和把握市场机会;在法律素质中,法律政策知识排名第 1,说明目前新型女职业农民来经过培训已经初步掌握了一定的法律知识,但法律敏感度和法律思维仍然不足;在思想道德素质中,诚信正直和责任意识并列第 1 位,说明新型女职业农民能够做到诚信正直并具有一定的责任意识,但在经营传承与分享方面仍然做的不够好;在身心健康素质中,积极进取排第 1 位,说明新型女职业农民已经有了改变现状积极进取的态度。而女性农民主体参与培育具有很强的示范作用,能够对身边其他女农民产生积极影响,但其自身仍存在自信心不足等悲观现象,身心健康管理意识也比较薄弱;在专业素质中,农业综合知识排第 1 位,说明作为农民,新型女职业农民已经掌握了一定的农业科学知识,但其他方面的专业知识仍有待提高;在生态素质中,绿色环保意识排第 1 位,说明新型女职业农民的绿色环保意识初步形成,但生态农业综合知识仍有待充实,安全绿色生产责任感不足,须要不断提高。

4.3 组合权重计算与综合评价分析

由表 5 可知,经过权重排序后,部分指标排名并列,因此 24 项二级指标权重总体按照 1~12 名排序。根据排名分析,本研究总结出新型女职业农民胜任素质状况,具体如下。

文化程度普遍偏低。基本特质中的受教育程度排第 12 名,是所有素质中得分最低的指标,说明新型女职业农民的文化程度普遍偏低。

科技素质还存在差距。科技素质中的 3 项二级指标科技实践能力、科技意识、科技知识排名分别为第 7、第 8、第 9,女性职业农民的科技素质有所提高,但距离乡村振兴战略和现代农业发展的具体要

表 5 新型女职业农民胜任素质评价指标权重

目标层	一级指标	一级指标权重	二级指标	二级指标权重	组合权重	排序
新型职业农民胜任素质(A)	基本特质(B ₁)	0.116 7	受教育程度(C ₁₁)	0.295	0.034	12
			职业认同(C ₁₂)	0.345	0.040	8
			主体意识(C ₁₃)	0.359	0.042	6
	科技素质(B ₂)	0.119 3	科技意识(C ₂₁)	0.332	0.040	8
			科技知识(C ₂₂)	0.323	0.039	9
			科技实践能力(C ₂₃)	0.345	0.041	7
	经营管理素质(B ₃)	0.130 8	识别市场机会能力(C ₃₁)	0.326	0.043	5
			资源整合能力(C ₃₂)	0.335	0.044	4
			信息分析能力(C ₃₃)	0.339	0.044	4
	法律素质(B ₄)	0.130 5	法律政策知识(C ₄₁)	0.355	0.046	3
			法律思维(C ₄₂)	0.322	0.042	6
			法律敏感度(C ₄₃)	0.322	0.042	6
	思想道德素质(B ₅)	0.126 4	诚信正直(C ₅₁)	0.338	0.043	5
			责任意识(C ₅₂)	0.338	0.043	5
			共享意识(C ₅₃)	0.325	0.041	7
	身心健康素质(B ₆)	0.140 3	积极进取(C ₆₁)	0.342	0.048	1
			自信乐观(C ₆₂)	0.333	0.047	2
			健康管理能力(C ₆₃)	0.325	0.046	3
	专业素质(B ₇)	0.119 3	农业综合知识(C ₇₁)	0.358	0.043	5
			市场营销知识(C ₇₂)	0.330	0.039	9
			财务管理知识(C ₇₃)	0.312	0.037	11
	生态素质(B ₈)	0.116 7	绿色环保意识(C ₈₁)	0.341	0.040	8
			安全绿色生产责任(C ₈₂)	0.328	0.038	10
			生态农业综合知识(C ₈₃)	0.332	0.039	9

求还存在较大差距。

经营管理水平有待提高。在经营管理素质中,资源整合能力和信息分析能力排名第4,识别市场机会能力排名第5。总体来看,经过培育,新型女职业农民已经具备较高的资源整合能力和信息分析能力,并且已经具备了一定的市场风险意识,具有一定的识别市场机会的能力,整体来看新型女职业农民的经营管理水平已经有所提高,但仍有较大的进步空间。

法律知识不足。法律素质中,法律政策知识排名第3,法律思维和法律敏感度排名第6。过去,新型女职业农民掌握的法律知识局限在选举、婚姻、继承等政治、生活方面,经过一段时间的专题培训,新型女职业农民所掌握的专业性法律知识明显增多。大部分女性职业农民已经初步建立基本的法治观念,认可用法律手段来解决问题。然而,一旦遇到具体问题,绝大多数农村妇女仍然选择非法律

手段解决问题。可见,多数女性职业农民的法律思维和法律敏感度仍不强,不能真正落实到实际行动中。

思想道德素质偏低。从表5中可以看出,思想道德素质中的共享意识排第7名,诚信正直和责任意识都排第5名。目前女性农民的思想道德观念依然处在比较陈旧的传统模式,共享意识淡薄,小农思想严重,存在“等、要、靠”的现象。因此,新型女职业农民的共享意识培育工作有待加强,整体思想道德素质仍有待提高。

继续保持良好的身心健康素质。由表5可知,随着生活水平的提高,新型职业女农民的身心健康素质良好。然而仍然存在小部分的女农民对身心健康认识不足,健康查体意识淡薄,即使查出问题,也迫于经济压力,不想去医治,觉得小毛病忍忍就好了。有关数据显示,中国每年有约16万名农村妇女存在心理健康问题^[19]。显然,新型女职业农民

的身体健康素质和心理健康素质还有提升空间。因此,在继续保持新型女职业农民良好的身心健康素质的同时,要帮助身心健康素质较弱的女农民提高自身健康素质。

专业理论知识薄弱。由表 5 可知,财务管理知识排名第 11,科技知识、市场营销知识、生态农业综合知识并列第 9 名,排名也比较靠后,这说明新型女职业农民没有形成系统的现代专业理论知识,知识结构缺乏时代性、先进性、实用性,无法应对新时代农业发展面临的挑战。

绿色生态环保发展理念不足。生态素质中的 3 项二级指标排名分别为第 8、第 9、第 10,可见生态素质总体排名靠后,说明新型女职业农民的绿色环保意识、生态农业综合知识、安全绿色生产责任素质已经跟不上新时代乡村振兴战略的要求,因此,当前应着力培育新型女职业女农民的绿色生态环保发展理念,提高其生态素质。

5 新型女职业农民胜任素质提升路径

5.1 着力提高新型女职业农民受教育程度

本研究结果表明,新型女职业农民受教育程度普遍不高,要解决这一问题,应做到内优外化。所谓“内优”是指要提高本土新型女职业农民的文化教育水平,尤其农村基础教育应受到高度重视,在农村基础教育方面应该投入更多的资金,使农村教学环境变得越来越好,才会有更多的人才愿意留在农村。另外还要转变农村重男轻女的观念,使农村留守女童从小就能接受良好的基础教育。二是要加强宣传,促进职业农民来源多元化。目前,新型女职业农民的主要来源是在农村务农的女农民。为壮大技能型和经营型女职业农民的队伍,优化新型女职业农民队伍结构,应加强宣传和政策倡导,鼓励农业相关专业女大学生回乡就业和创业,成为新型女职业农民。

5.2 消除女职业农民社会性别差异

根据评价结果可见,经过前期的培训,新型女职业农民的科技素质、经营管理素质、法律素质、思想道德素质都有了较大幅度的提升,但还存在提升空间。为了更大程度地提升女农民的这些胜任素质,最根本的是要使农村妇女具有独立的经济来源,不再依附于男性,这样才能更好地消除社会性别差异。农村劳动力中妇女占大多数,性别平等能更有效地促进乡村振兴战略开展。例如政府主导

开办传统手工艺品传习班,根据当地人文资源就地取材,与当地相关企业签订收购合同,或者建立电商销售平台,保证妇女农民有固定收入。

5.3 联合农业院校培育新型女职业农民

建议政府利用农业院校的先天优势,与当地农业院校联合培养新型女职业农民。尤其是在专业素质和生态素质方面。从评价结果看,新型女职业农民的专业素质和生态素质相比其他素质更为薄弱,而农业院校办学历史悠久,教师资源优厚,教学设备先进,培训体系成熟。根据乡村振兴战略总体要求,构建有关农业综合、财务管理、市场营销和生态农业等多个领域知识体系,形成新型女职业农民培育的长效机制,有效提高新型女职业农民的专业素质和生态素质,为乡村振兴战略实施提供人才保障。

参考文献:

- [1] 2020 年中央 1 号文件[J]. 中国农民合作社, 2020(3): 15.
- [2] 全国妇联妇女发展部农村处. 培育新型职业女农民 助推现代农业发展——关于新形势下新型职业女农民培训工作的思考[J]. 中国妇运, 2015(4): 21-24.
- [3] 何明丽. 乡村振兴背景下培育新型女农民的对策研究[J]. 现代商贸工业, 2018, 39(20): 115-116.
- [4] 杨德兴, 袁美勤. 苏州女性农民推动现代农业迈上新台阶对策研究[J]. 中国农业教育, 2017, 24(1): 41-47.
- [5] 杨亚利. 女性农民参与新农村文化建设的有效途径探析——以陕西为例[J]. 西北大学学报(哲学社会科学版), 2011, 41(2): 26-29.
- [6] 康芳民. 培养新型女农民为新农村建设提供动力保障[J]. 理论导刊, 2009, 31(7): 64-66, 69.
- [7] 刘琼. 农村新型职业女农民教育培训现状及其策略[J]. 长江丛刊, 2018, 35(18): 138-139.
- [8] 沈彤, 赵丹. 农村留守妇女参与新型职业农民培训的问题、原因与对策[J]. 中国成人教育, 2019, 28(19): 87-91.
- [9] 杨梅, 刘庆, 赵惠燕. 新型女职业农民的特质及面临的挑战[J]. 中国农业教育, 2019, 19(5): 57-64.
- [10] 胡红, 付少平. 不同知识传播渠道对女性农民影响的调查分析——以女性农民接受农业科技知识为例[J]. 西北农林科技大学学报(社会科学版), 2012, 12(1): 13-15, 20.
- [11] 李行. 现代农民素质能力建设简析[J]. 现代化农业, 2019, 41(10): 67-68.
- [12] 杨艳丽, 李丽, 李冰. 乡村振兴战略下新型职业农民从业素质提升研究[J]. 成人教育, 2018, 38(2): 67-70.
- [13] 陈春霞, 石伟平. “生产经营型”新型职业农民胜任素质的要素构成研究——基于行为事件访谈法[J]. 现代远程教育, 2020, 37(1): 11-18.
- [14] 廖开妍, 杨锦秀, 刘昕禹. 新型职业农民培训效果评价及其影响因素——对四川省成都市 812 位参训农民的调查[J]. 职业技术教育, 2019, 40(36): 45-50.

张淑华,李炳军. 基于灰色关联分析的农村居民收入动态分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):27-32.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.005

基于灰色关联分析的农村居民收入动态分析

张淑华,李炳军

(河南农业大学信息与管理科学学院,河南郑州 450002)

摘要:随着各种惠农政策的不断出台,为适应各种形式的变化,及时掌握农村居民增收的影响因素的变动变得极其重要。运用灰色关联聚类的方法从中部地区6个省中选出山西省、河南省、江西省等3个省作为研究省份,首先基于所选的中部3个省2009—2017年的数据,分析3个省农村居民的收入现状;然后在精准扶贫政策背景下,通过分析将数据分为2009—2013年、2014—2017年2个阶段,再分别运用灰色关联的方法分析农村居民总收入与其构成的灰色关联度,对比分析发现,各省的主要影响因素与总收入的关联度各不相同,但约束或促进总收入增加的原因却具有共性,并且3个省农村居民的工资性收入与家庭经营性收入的总和占比在缓慢下降,表现出农村居民的收入结构正在向多元化形式转变;最终针对如何增加农村居民收入提出相关政策建议。

关键词:灰色关联分析;动态分析;农村居民;增收问题;收入结构;农民增收

中图分类号: F323.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0027-06

自2004年以来,中央以“三农”(农业、农村、农民)为主题连续15年颁布了中央一号文件。2004年提出促进农村居民增收问题;2009年强调了农村居民收入持续增长的重要性;2018年提出实施乡村振兴战略等。这些文件足以强调在中国社会主义现代化时期“三农”问题最高优先重视的地位,而“三农”问题的重点还是在于提高农村居民的收入。是否能建成小康社会,重点是看贫困老乡能不能脱贫。2013年,习近平总书记首次提出精准扶贫的概念,党的十九大报告中也指出,要坚决打好精准脱贫攻坚战,全面建成小康社会。而贫困户多为农村居民,因此,此项政策对农村居民增收也起到了积极的影响。

现有文献在各个方面运用各种方法对农村居民收入结构进行了研究,成果非常显著。王艳等根据1993—2013年面板数据,经过统计数据和构建计量经济模型分析了收入结构、财政支出对居民消费结构的影响^[1]。徐会奇等实证分析发现,收入不确定性是影响消费的重要因素^[2]。邱慧等基于2006—2015年山西省面板数据,研究了农村居民人均年收入与其他8项主要消费支出的关联程度^[3]。张彧泽等选取2001—2015年我国31个省的面板数据,探究了农村居民的收入不确定性对消费结构的影响^[4]。杨园争等追踪调查了我国8个省份农户的收入情况,运用计量经济学模型计算分析了收入流动对收入分配的影响^[5]。张桓森等对吉林省城乡居民收入差距的发展变化趋势进行了分析,得出城镇和农村居民收入都是快速增长的状态,但城乡居民收入差距越来越大的结论^[6]。通过计算分析近年来的数据,发现工资性收入差异是引起地区间农村居民可支配收入差距形成的主要原因,同时也是缩小收入差距的重要因素^[7]。刘伟等以行业间、城乡间与地区间3个维度的收入分配差距为切入点,探究了我国收入分配结构的演变史,分析其原

收稿日期:2020-07-29

基金项目:河南省软科学研究重点项目(编号:202400410051);河南省软科学项目(编号:172400410015)。

作者简介:张淑华(1995—),女,河南周口人,硕士研究生,主要研究方向为灰色系统理论和农业系统工程。E-mail: hnszhzhang@163.com。

通信作者:李炳军,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为灰色系统理论和农业系统工程。E-mail: zzbjun@163.com。

[15] 傅锦敏. 新型女性职业农民培养的研究——以湖州市长兴县为例[D]. 杭州:浙江农林大学,2018:19-26.

[16] 贾钢涛,卫梦思. 新时代背景下培育农民科技素质研究——以陕西省为例[J]. 中国职业技术教育,2018,26(15):35-40.

[17] 李维晶. 农业产业化发展背景下农村经济管理人才培养探讨

[J]. 商讯,2019,37(19):188-189.

[18] 王乐杰,沈蕾. 城镇化视阈下的新型职业农民素质模型构建[J]. 西北人口,2014,35(3):90-95,101.

[19] 康芳民. 新农村建设需要着力培养新型女农民——农村妇女素质的分析与调查[J]. 管理观察,2008,15(12):124-126.

因并提出了相关对策^[8]。Ren 等实证分析得出,过大的城乡收入差距将影响经济增长的基础、运行和结果^[9]。Kibriya 等经过对印度经济的考察,发现减少农村贫困似乎比减少城乡贫困方面更有效^[10]。刘赛红等选取 2000—2015 年我国 30 个省份的面板数据,采用空间面板模型分析得出推动农业振兴、加强农村信贷投入有助于城乡居民收入差距的缩小^[11]。詹长春等分析研究了医疗保障在收入再分配中产生的逆向效应,并提出解决该效应的相关政策建议^[12]。

但大部分的学者仅对一个时间序列的纯收入或可支配收入进行分析,而以农村居民总收入作为因变量,将往年数据与现阶段数据作对比,分析其趋势变化的相关研究文献却很少。因此,本研究在精准扶贫政策背景下,试用 2009—2013 年、2014—2017 年 2 个阶段的数据,用灰色关系聚类方法选出中部地区山西省、河南省、江西省等 3 个省进行研究,首先运用灰色关联分析的方法对比分析 3 个省的农村居民收入构成与总收入的关联度,探究农村居民的不同收入来源对总收入的影响程度,并基于结论提出使农村居民收入稳定增长的适当政策建议,以期为政府对农村居民增收政策的调整提供参考。

1 理论与数据来源

1.1 灰色关联分析理论

灰色系统是著名学者邓聚龙教授于 1982 年创建,它主要运用的对象具有贫信息、小样本、不确定性的特点。灰色关联分析^[13]的系统中参考数列和比较数列 2 个因素之间的灰色关联度越接近于 1,相应序列的几何形状越接近,联系越紧密,关联程度就越大,也即说明该比较数列因素是影响系统发展的主要影响因素。农村居民的总收入及其构成具有明显的信息不完全、随机和模糊的性质,是一个比较典型的灰色系统。

下面是灰色关联分析的具体计算步骤:

(1) 给出参考数列、比较数列;设本研究的系统行为序列为

$$X = \{x_i | i \in N, N = 0, 1, 2, \dots, m, m \geq 2; x_i [x_i(1), x_i(2), \dots, x_i(n)], x_i(k) \in x_i, k \in K, K = 1, 2, \dots, n, n \geq 3\}.$$

式中: $x_0(k)$, ($k = 1, 2, \dots, n$) 为参考数列,代表农村居民人均总收入; $x_i(k)$, ($i = 1, 2, \dots, m; k = 1, 2, \dots,$

n) 为比较数列,代表总收入的影响因子(人均工资性收入、人均家庭经营收入、人均第一二三产业收入、人均财产性收入、人均转移性收入等)。

(2) 对各序列进行无量纲化处理;令

$$X_i' = \frac{X_i}{x_i(1)} = [x_i'(1), x_i'(2), \dots, x_i'(n)], i = 0, 1, 2, \dots, m. \quad (1)$$

(3) 求 X_0 与 X_i 初值像相应的分量之差的绝对值序列,记

$$\Delta_i(k) = |x_0'(k) - x_i'(k)|, \Delta_i(k) = [\Delta_i(1), \Delta_i(2), \dots, \Delta_i(n)], i = 1, 2, \dots, m. \quad (2)$$

(4) 求 $\Delta_i(k) = |x_0'(k) - x_i'(k)|$, $k = 1, 2, \dots, n; i = 1, 2, \dots, l$ 的最大值和最小值,记为

$$M = \max_i \max_k \Delta_i(k), m = \min_i \min_k \Delta_i(k). \quad (3)$$

(5) 计算关联系数

$$r_{oi}(k) = \frac{m + \kappa M}{\Delta_i(k) + \kappa M}, \kappa \in (0, 1), k = 1, 2, \dots, n; i = 1, 2, \dots, m. \quad (4)$$

式中: κ 为分辨系数(也称作灰数白化值),本研究取 $\kappa = 0.5$ 。

(6) 求出关联系数的平均值即为所要的关联度,根据关联度数值大小进行排序,通过排序能反映出各因素对总收入影响的大小。

$$r_{oi} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n r_{oi}(k), k = 1, 2, \dots, n; i = 1, 2, \dots, m. \quad (5)$$

1.2 数据来源

通过对中部 6 个省(山西省、河南省、江西省、安徽省、湖北省、湖南省)2009—2017 年的人均国内生产总值(GDP)进行灰色关联聚类,可将中部 6 个省分为 2 类(山西省、河南省、江西省、安徽省、湖南省为一类,湖北省自为一类),并用人均 GDP 来表现农村居民的贫困程度,进而更好体现精准扶贫等政策对农村居民收入结构的影响,从而提出更加精准的政策建议。因此,本研究拟选山西省、河南省、江西省、安徽省、湖南省等 5 个省作为研究对象,但因中部地区的安徽省、湖南省 2 个省的部分指标数据缺失,且通过聚类分析发现江西省与安徽省、湖南省的关联度较大,因此本研究选取中部地区的山西省、河南省、江西省等 3 个省作为研究省份,为保证数据分析的可比性,数据来源于 2010—2018 年《山西统计年鉴》《河南统计年鉴》《江西统计年鉴》《中国统计年鉴》。本研究采用 2009—2017 年的时间序列数据进行分析。根据统计年鉴指标解释,人均总

收入为农村居民收入水平的指标。因此,本研究选取人均总收入作为参考数列,并选取人均总收入的四大来源以及人均家庭经营性收入中的人均第一二三产业收入为其影响因素,作为比较数列。

2 农村居民收入结构的灰色关联分析

2.1 农村居民收入结构现状

随着时代的变迁,社会环境的变化,经济的不断繁荣,我国农村也随之表现出许多新的情况,农村居民收入也出现了很多新的变化。

从整理的数据(表1)可知,2010—2017年中部地区山西省、河南省、江西省等3个省人均总收入绝对量不断增加,3个省农村居民人均总收入均实现成倍增长;江西省农村居民人均总收入由7 468.53元上升到16 196.34元,增幅为8 727.81元;河南省农村居民人均总收入增幅次之,为8 337.00元;山西省农村居民人均总收入增幅最小,为6 455.79元;山西省、河南省、江西省3个省的平均年增长率分别为11.27%、11.86%、12.06%,均低于全国12.79%的平均年增长率。

表1 中部地区山西省、河南省、江西省3个省农村居民人均收入与全国的比较

年份	省份							
	山西省		河南省		江西省		全国	
	农村居民人均收入(元)	增长率(%)	农村居民人均收入(元)	增长率(%)	农村居民人均收入(元)	增长率(%)	农村居民人均收入(元)	增长率(%)
2010	6 393.62	11.80	7 293.00	10.85	7 468.53	10.41	5 153.17	14.86
2011	7 419.90	15.82	8 725.00	14.22	8 994.48	13.01	5 919.01	17.88
2012	8 203.71	12.62	9 829.00	12.35	10 039.13	13.52	6 977.29	13.46
2013	9 102.63	9.05	11 345.00	9.57	10 864.47	11.38	9 429.60	19.11
2014	10 767.80	18.29	12 738.00	12.28	12 502.94	15.08	10 488.90	11.23
2015	11 402.60	7.31	13 667.00	8.04	13 926.04	9.01	11 421.70	8.89
2016	12 167.18	5.90	14 384.00	6.48	15 371.65	8.20	12 363.40	8.24
2017	12 819.41	6.51	15 630.00	6.51	16 196.34	8.81	13 432.40	8.65

注:资料根据国家及各省份统计年鉴整理所得;其中,增长率=(本年绝对量-上年绝对量)/上年绝对量。

从图1至图3可以看出,通过分析3个省农村居民各收入来源占总收入的比例,从总体看,山西省主要收入来源正在从家庭经营性收入转向工资性收入;而河南省、江西省2个省仍然是以家庭经营性收入作为主要收入来源,但2个省的工资性收入占比正在波动上升、家庭经营性收入占比有缓慢下降的趋势。体现了农村居民的收入来源正在由以第一产业收入为主转变为多样化形式的收入为主。

因此,为了适应各种形式的变化,必须及时掌握农村居民收入结构变动的影响因素。

2.2 农村居民收入结构的灰色关联分析

在2013年精准扶贫政策提出的背景下,通过观察统计的数据(表1)发现,2014年相对于2013年3个省的总收入有较大的提高,2013年山西省、河南省、江西省3个省的人均总收入分别为9 102.63、11 345.00、10 864.47元,2014年3个省的人均总收

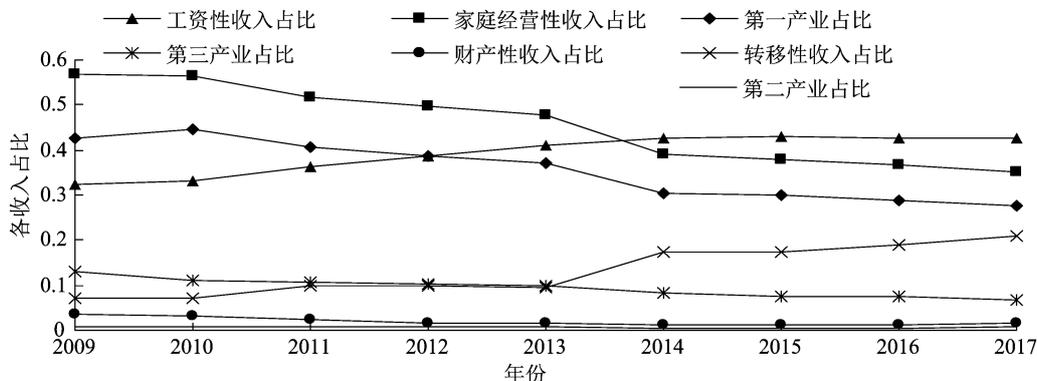


图1 山西省各类收入来源占总收入的比重

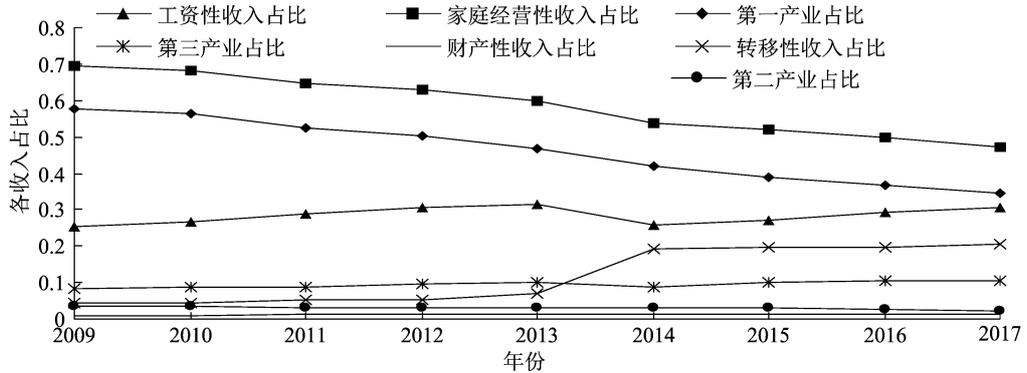


图2 河南省各类收入来源占总收入的比重

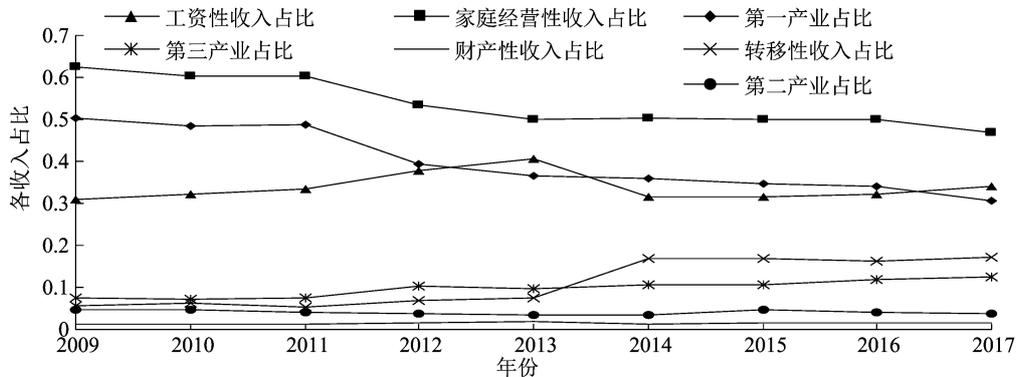


图3 江西省各类收入来源占总收入的比重

人分别增至10 767.80、12 738.00、12 502.94元,增长率分别为18.29%、12.28%、15.08%,均高于平均年增长率(3个省人均总收入年增长率分别为11.27%、11.86%、12.06%),增长率明显提高。因此,本研究将2009—2017年数据分为2009—2013

年、2014—2017年2个阶段,通过灰色关联分析方法,分析农村居民收入影响因素对总收入的影响程度,计算各影响因素的关联度,并将各关联度排序,得出不同的影响因素对总收入的影响程度,分别得到3个省的关联度(表2、表3)。

表2 2009—2013年农村居民总收入与影响因子的关联度

指标	山西省		河南省		江西省	
	关联度	排序	关联度	排序	关联度	排序
工资性收入(x_1)	0.680 437	3	0.611 648	6	0.664 629	5
家庭经营性收(x_2)	0.705 494	1	0.638 057	4	0.829 507	4
第一产业收入(x_3)	0.703 555	2	0.641 765	3	0.662 990	3
第二产业收入(x_4)	0.664 790	6	0.608 537	7	0.615 213	7
第三产业收入(x_5)	0.636 256	7	0.667 414	2	0.719 753	1
财产性收入(x_6)	0.675 274	4	0.614 415	5	0.706 530	2
转移性收入(x_7)	0.672 380	5	0.716 694	1	0.656 854	6

2.2.1 工资性收入水平及构成变化 总的来看,山西省、河南省、江西省等3个省的工资性收入与总收入的灰色关联度,在2009—2013年河南省、江西省2个省的排名较低(第6名、第5名),表现出农村居民的就业率或工资薪酬在此阶段并不高,而山西省相对来说较高(第3名),已经体现出工资性收入对总收入的重要影响。在2014—2017年河南省、江西

省2个省的排名逐渐提高(第2名、第3名),表明工资性收入对总收入的增加变得较为重要,符合2个省作为人口大省的基本省情;尽管山西省的排名下降到第5名,但其工资性收入仍占总收入较大比重,增加工资性收入依然至关重要;同时也说明,近年来工业化、城镇化的发展加大了农村居民的就业机会,这也是使得3个省农村居民工资性收入增加、关

表3 2014—2017年农村居民总收入与影响因子的关联度

指标	山西省		河南省		江西省	
	关联度	排序	关联度	排序	关联度	排序
工资性收入(x_1)	0.515 572	5	0.673 249	2	0.735 115	2
家庭经营性收(x_2)	0.509 574	6	0.606 615	4	0.829 507	1
第一产业收入(x_3)	0.509 521	7	0.586 783	5	0.662 990	5
第二产业收入(x_4)	0.604 457	2	0.584 041	6	0.615 213	6
第三产业收入(x_5)	0.767 794	1	0.529 793	7	0.672 176	4
财产性收入(x_6)	0.524 582	4	0.735 192	1	0.537 742	7
转移性收入(x_7)	0.531 788	3	0.656 358	3	0.689 902	3

关联度排名提高的主要缘故。

2.2.2 家庭经营性收入水平及构成变化 从2009—2013年来看,山西省、河南省、江西省等3个省的家庭经营性收入在3个省农村居民总收入中占据较大的比重,且关联度排序较靠前,表明在此阶段,家庭经营性收入是促进农村居民总收入增加的首要因素。山西省还处于以农业生产收入来促进总收入增长的阶段,而河南省、江西省2个省则是第三产业收入对总收入的增加产生较大的影响;第二产业无论是从绝对值上,还是关联度排名上均对总收入增收的贡献率较低;身为农业大省,中部地区的山西省、河南省、江西省等3个省对于第一产业收入的增加也不能忽视。

2014—2017年期间,3个省家庭经营性收入的灰色关联度有升有降,表现出3个省农村农业结构的动态变化:山西省正在由以单一的农业生产促进增收向农业与非农业共同促进总收入增长的方向发展;河南省以家庭经营性收入带动总收入增长的作用受到局限;该收入对江西省农村居民收入增长影响是最大的,是江西省农村居民总收入不断增长的基础。同时体现出农村一二三产业融合^[14]的重要性。

2.2.3 财产性收入水平及构成变化 从表2、表3可以看出,2009—2013年、2014—2017年2个阶段山西省、河南省、江西省等3个省的财产性收入与总收入的灰色关联度排名变化波动较大,表明前期农村居民的财产性收入仍然有限,同时也可以反映出农村的基础设施建设并不完善,导致以土地流转、租金收入等方式的财产性收入受到局限;但后期由于农村经济的不断繁荣、土地政策的改革以及农村的基础设施得到改善等一些惠农政策的实施,加快了财产性收入的增长。特别是河南省,财产性收入的持续增长对农村居民的增收有非常大的影响。

由于提升农村交通基础设施存量对农村居民人均纯收入及其人均工资性收入和人均家庭经营纯收入均具有非线性正向促进作用^[15],因此3个省均须注重对农村基础设施的投入。

2.2.4 转移性收入水平及构成变化 2009—2013年阶段,在转移性收入与总收入的灰色关联度中,在河南省排名为首位,表明政府补贴带来的收益对河南省农村居民总收入的增长具有举足轻重的作用;而在山西省、江西省的排名分别为第5、第6名,均比较靠后,表明这2个省的转移性收入对总收入的增长作用贡献较小,转移支付体系有待改善。2014—2017年阶段,3个省的转移性收入与总收入的灰色关联度排名均变为第3名,体现近年来国家的各项惠农补贴范围的扩大及对补助标准的改善,使农村医疗设施等建设得到完善,使得农村居民转移性收入不断增长,提高了3个省转移性收入对总收入增加的贡献率。因此,3个省应保持财政支农投入的增长,以满足促进农村居民收入增长的根本需求^[16]。

在分2个阶段分析各影响因素对农村居民总收入的关联度的基础上,明确了现阶段农民收入结构变动的影响因素,可为接下来的预测分析、政策建议提供理论依据。

3 结论和建议

自精准扶贫政策提出以来,虽然3个省农村居民的总收入有明显增加,但平均年增长率仍低于全国平均年增长率,较难确保与全国建成小康社会的步调保持一致。同时3个省的城乡居民收入差距逐步扩大,因此,要实现全面建成小康社会的工作重心在农村。通过对3个省总收入及其构成结构的分析,发现3个省农村居民收入的影响因素对总收入的影响程度为(2014—2017年)第三产业收入>第

二产业收入 > 转移性收入 > 财产性收入 > 工资性收入 > 家庭经营性收入 > 第一产业收入(山西省); $x_6 > x_1 > x_7 > x_2 > x_3 > x_4 > x_5 >$ (河南省); $x_2 > x_1 > x_7 > x_5 > x_3 > x_4 > x_6$ (江西省)。2014—2017年农村居民的工资性收入与家庭经营性收入总和占总收入比例3个省均在79%~82%之间,而2009—2013年阶段的占比高达88%~94%,随着总收入的持续增长,工资性收入与家庭经营性收入的总和占比在缓慢下降,表现出农村居民正在向多元化形式的收入结构转变。

当前,我国正处于全面建成小康社会的冲刺阶段,要实现农村居民收入的稳定增长,提高农村居民的生活水平,可从以下几个方面提出农村居民增收的建议。

(1)促进农村居民工资性收入的提高。3个省应加快推进劳动力保障体系的健全、先进农业技术、管理方法的引进、农村人才队伍的建设,以及设施农业的发展^[17],促进农业转型及发展,从而保障农村居民工资性收入的稳定增长。(2)保证农村居民家庭经济性收入的持续增长。3个省应加强水利设施、农业现代化、城镇化的建设,加大对“三农”扶持的力度,加快农村一二三产业的融合,增强农村居民的环保意识^[18]。(3)为农村居民财产性收入的提高增添动力。3个省应加快落实土地流转制度、农村基础设施建设、深化农村金融机制、财税政策改革。(4)增加农村居民的转移性收入。增加对土地、粮食以及大型农业机械的补贴,加大对农村医疗、文化娱乐等的投资。

综上所述,要不断加强省际、地市、各县之间的交流,引进国内外资金、项目,加强企业之间的合作,加大招商引资,建立当地的特色产业,同时可为农村居民双创工作提供更好的外部环境^[19]。实现农村居民、企业、政府之间的相互促进,省际之间相互带动,进而实现农村居民增收,进一步缩小省际、城乡之间的差距。

参考文献:

[1]王艳,郝丛卉,卢虹好. 收入结构、财政支出影响农村居民消费

结构的实证研究[J]. 西安理工大学学报,2018,34(3):364-370.

- [2]徐会奇,卢强,王克稳. 农村居民收入不确定性对消费的影响研究——基于灰色关联分析[J]. 华东经济管理,2014,28(2):29-33.
- [3]邱慧,黄解宇,李珏. 山西省农村居民收入与消费结构的灰色关联分析[J]. 数学的实践与认识,2018,48(12):283-286.
- [4]张彧泽,赵新泉. 收入不确定性对农村居民消费结构影响分析[J]. 商业经济研究,2018(16):40-44.
- [5]杨国争,方向明. 中国农村居民的收入分配与收入流动性[J]. 劳动经济研究,2018,6(5):3-19.
- [6]张桓森,于卓熙,王丽敏. 基于联立方程和分布滞后模型的吉林省城乡居民收入差距影响因素分析[J]. 统计学与应用,2015(4):209-218.
- [7]郭惠武. 中国地区间农村居民收入差距变化及结构分解[J]. 开发研究,2018(6):72-78.
- [8]刘伟,王灿,赵晓军,等. 中国收入分配差距:现状、原因和对策研究[J]. 中国人民大学学报,2018,32(5):25-43.
- [9]Ren B P, Chao X J. How does the urban-rural income gap affect the quality of China's economic growth? [J]. China Political Economy, 2018,1(6):136-148.
- [10]Kibriya S, Bessler D, Price E. Linkages between poverty and income inequality of urban-rural sector: a time series analysis of India's urban-based aspirations from 1951 to 1994 [J]. Applied Economics Letters, 2019,26(6):446-453.
- [11]刘赛红,王志飞. 农村信贷投入、农业振兴与城乡居民收入差距研究[J]. 云南财经大学学报,2019,35(3):94-104.
- [12]詹长春,郑珊珊. 农村居民医疗保障“逆向”收入再分配效应形成机制及克服——以江苏省为例[J]. 农业经济问题,2018(10):85-93.
- [13]刘思峰. 灰色系统理论及其应用[M]. 8版. 北京:科学出版社,2017.
- [14]郭军,张效榕,孔祥智. 农村一二三产业融合与农民增收——基于河南省农村一二三产业融合案例[J]. 农业经济问题,2019(3):135-144.
- [15]任晓红,但婷,王春杨. 农村交通基础设施对农村居民收入的门槛效应分析[J]. 经济问题,2018(5):46-52,63.
- [16]王涛,赵星. 中国农村金融发展对农村居民收入结构影响的实证研究[J]. 商业经济,2019(6):3-5,43.
- [17]胥慧敏,王秀丽,李玲,等. 河南省设施农业发展潜力评价与布局优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):286-293.
- [18]侯冠平,刘晓梅. 新形势下经济增长与财政支出对城乡收入不平衡性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(13):330-336.
- [19]谭明交. 农业农村双创工作的成效机制研究[J]. 中国农业资源与区划,2019,40(8):209-218.

李朝晖,许侨,蔡京伟,等. 烟草甲的防治研究进展[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):33-43.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.006

烟草甲的防治研究进展

李朝晖,许侨,蔡京伟,王泽宇,李加伟,熊亚南

(江苏中烟工业责任有限公司淮阴卷烟厂,江苏淮安 223300)

摘要:烟草甲 [*Lasioderma serricorne* (Fabricius)] 作为世界范围内最重要的烟草仓储害虫之一,一直是烟草仓储领域的研究热点,因其食性广、抗药性强和繁殖能力强等特点在防治方面有很多的问题,现行的防治方法较为单一,无法应对复杂多样的仓储实际情况,综述国内外报道的烟草甲的物理、化学和生物防治方法,并对使用范围广、使用效果好和防治潜力大的一些防治方法进行重点介绍;近 10 年来分子生物学的迅速发展使烟草甲的研究方法日新月异,分子生物学成为烟草甲防治研究的重要手段,综述近 10 年分子生物学与烟草甲研究这 2 个交叉领域中的主要成果,并对现行烟草甲研究中使用的分子生物学工具进行了评价。

关键词:烟草甲;化学防治;物理防治;生物防治;分子生物学;烟草仓储害虫

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0033-11

烟草甲 [*Lasioderma serricorne* (Fabricius)] 属鞘翅目窃蠹科,是世界烟草仓储行业的重要仓储害虫,约 3 000 年前在图坦卡蒙的坟墓中首次发现,Fabricius 在 1792 年首次用科学的分类学方法描述了烟草甲^[1],在卷烟行业兴起的 19 世纪中期就有关于其危害烟草的报道^[1-2]。随着世界范围内卷烟行业生产规模的不断扩大,卷烟最主要的原材料——烟叶的仓储规模也随之扩大,且由于新烟草工艺的出现,烟叶一般须要在仓库内醇化 2~3 年方可使用,这都导致烟草甲危害范围和规模的扩大。在我国,每年因蛀烟害虫所引起的烟叶质量损失约占总仓储烟叶数量的 1.64%,因烟草甲所造成的损失占总损失的 98% 以上^[3]。凌成兴曾在 2016 年的全国烟叶工作大会对全国的烟叶库存进行公示,截至 2016 年 6 月,全国烟叶在储烟仓库总库存量约 7 934 万担(1 担 = 50 kg),以此数据推论每年因烟草甲所引起的质量损失的烟叶约 130 万担,以收购价 100 元/kg 计算,每年约有 65 亿人民币的经济损失;从国外报道来看,因烟草甲造成的质量损失的烟叶占总仓储烟叶数量的 1%~5%,有个别地区虫害发生严重的,损失可达 50%;世界范围内每年因烟草甲造成的烟叶经济损失超过 3 亿美元^[4]。烟

草甲不仅通过进食直接降低烟叶质量,而且烟草甲进食后产生的虫粪及其死亡后的虫尸还会对成品卷烟质量造成影响,有虫尸和虫粪的卷烟点燃后出现烟气不纯、恶臭气味等现象,引发消费者投诉。自 2003 年我国加入世界贸易组织(World Trade Organization,简称 WTO)以来,卷烟市场的竞争从单纯的国有品牌竞争到现在的国际品牌竞争,且日益激烈,不合格的卷烟产品极不利于塑造卷烟品牌。因此,卷烟工业公司对烟叶仓储的要求也不断提高,但现行烟叶仓储防治烟草甲的方法却较为单一,且无法保证烟叶在烟草甲威胁下的质量^[5]。本文综合国内外烟草甲的防治方法,现总结如下。

1 物理防治

1.1 温控防治

1.1.1 高温杀虫 烟叶是卷烟的主要原料,卷烟企业采购的烟叶通常情况下需要 1~3 年的醇化期,使烟叶醇化至最佳口感。在田间采回—复烤加工—仓库存储—交付卷烟厂使用这一烟叶传递链上,复烤加工阶段的高温可以有效杀死田间采回烟叶上可能存在的成虫和虫卵,在复烤加工的烟叶真空回潮时可有效杀死烟草甲。奚家勤等的研究表明,当真空回潮温度高于 60 ℃ 持续 3 min、70 ℃ 保持 2 min 或 55 ℃ 保持 4 min,能杀死所有虫态烟草甲^[6]。

除了在复烤加工阶段杀虫,还有其他的借助高温杀虫的方法^[7-8]。Makhijani 曾报道利用灌注高

收稿日期:2020-07-14

基金项目:江苏中烟淮阴卷烟厂青年创新项目。

作者简介:李朝晖(1994—),男,江苏淮安人,硕士,助理工程师,主要从事植物保护研究。E-mail:49080921@qq.com。

温空气杀死仓储害虫的方法,通过灌注高温空气将仓库升温至 50~60℃并保持 24~36 h,可杀死烟草甲等害虫,这项技术自 2005 年美国禁用甲基溴后得到了广泛的使用^[9];事实上,大部分烟草甲在高温环境中只需几个小时便会死亡,Yu 等报道在 50℃条件下保持 166 min 或在 54℃条件下保持 38 min 就可以灭杀 99% 各虫态烟草甲^[10]。而对少部分未在短时间内死去的烟草甲,这可能是烟草甲应对高温胁迫的机制起到了作用,Li 等研究表明,烟草甲可以快速适应高温,36~42℃的高温会提升烟草甲的耐热性,经过高温驯化的烟草甲在 42℃处理时表现出亚致死性,但随着温度处理时间的延长和处理温度的提高,烟草甲仍会死亡^[11]。

1.1.2 恒温控制 烟草甲幼虫发育起点温度为 17.66℃,当仓库温度控制在 18℃时,烟草甲完成幼虫阶段发育需要 802 d^[12-13]。巴西地区烟草仓库温度常年维持在 18℃,取得良好的控制效果^[14];我国长沙卷烟厂于 20 世纪 90 年代在浏阳地区常年保持 17~20℃的岩洞内储存烟叶,在储存期间基本无烟草甲危害发生;上海和厦门等地烟叶存储仓库加装了空调调节系统,恒温恒湿,烟叶醇化效果好且无烟草甲发生。通过恒温控制,不仅可以降低烟草甲的危害,还可以更好地控制烟叶醇化进程^[15]。

1.1.3 低温杀虫 烟草甲生物研究表明,在 -20~5℃区间内,随着温度的升高,各虫态均致死的时间为 -20℃,1 h; -15℃,5 h; -10℃,18 h; -5℃,7 d; 0℃,13 d; 5℃,28 d^[16]。基于这一研究成果,许多储烟仓库使用低温灭杀烟草甲。延吉卷烟厂和郑州卷烟厂在冬季开仓利用低温杀虫,延吉卷烟厂开仓 48 h 后所有供试烟草甲全部死亡;郑州卷烟厂经过冬季低温开仓后,供试烟草甲也全部死亡;在国外也有利用低温杀死烟草甲的报道^[17-19]。烟草甲的卵因在各虫态下对化学药剂处理表现低敏感性成为烟叶存储仓库防治的难题,已有多项研究表明,烟草甲的卵在低温处理时表现出高敏感性^[16,20],易被低温杀死,因此低温杀虫是未来烟草甲防治研究中的一个重要方向。

1.2 气调防治

烟草甲必须有足够 O₂ 才能完成生命周期,长期在低氧环境中,烟草甲会很快死亡。据报道,在 0.5%~0.8% O₂ 条件下,烟草甲 LD₉₉ 为 6.9 d^[21]。早在 1918 年,美国 Bailey 等就提出了通过脱氧气调杀虫的方法提高仓储质量的建议。但受制于仓储

条件和生产力水平,化学防治因其经济性仍是防治仓储害虫的主要方法。但随着化学试剂的滥用,人畜中毒和环境污染问题屡见报端,人们逐渐意识到化学药剂对环境的破坏和对人身安全的威胁,1980 年,美国通过了关于利用气体仓储食品的议案,气调防治也逐渐成为仓储领域的研究热门。

1.2.1 充 N₂ 法 N₂ 是地球大气中的重要组成部分,自然空气中约含 78% 的 N₂。研究表明,在储烟仓库充 N₂ 6 d 后,烟草甲各虫态致死率达 100%,与化学防治方法相比,防治时间大大缩短,低氧浓度 (1.5%~2.0% O₂) 环境下对 3 种虫态烟草甲综合致死效果较好,在烟叶养护过程中能够有效杀灭烟草甲^[22-23];李灿对 N₂ 杀虫机制进行了阐述,高压冲 N₂ 后,烟草甲体内氧化作用循环被打破,在烟草甲体内现存糖无氧分解完之后,烟草甲死亡率大幅提升,且在低氧条件下,烟草甲体内呼吸作用不得不分解体内 H₂O,导致烟草甲脱水死亡^[24]。江苏中烟工业有限公司、广东中烟工业有限责任公司部分烟叶仓储库区使用冲 N₂ 杀虫法,取得了很好的防治效果。

1.2.2 充 CO₂ 法 CO₂ 是大气的重要组成,自然空气中约含 0.04% CO₂,因其制造简单也常被用于烟草甲的气调防治。Gerard 以高压二氧化碳处理烟草甲,发现在 4 000 kPa 条件下 30 min 或 3 000 kPa 条件下 50 min,可杀死烟草甲^[1];Navarro 研究了不同温度和气压下 CO₂ 处理后烟草甲的致死作用,结果表明以 30℃、3 333 Pa 处理烟草甲成虫,成虫 LT₉₉ 为 15 h^[25];Gunasekaran 研究了不同 CO₂ 浓度对烟草甲的致死作用,结果表明以 70%、40% 的 CO₂ 分别处理 48、96 h 后,烟草甲死亡率达 100%,且蛹的耐气能力比卵、幼虫、成虫的强,Gunasekaran 还发现,经 CO₂ 处理后幸存的烟草甲成虫,其繁殖潜力大幅下降,几乎不能产生后代^[26]。

1.2.3 充混合气体法 在充 N₂ 和充 CO₂ 防控烟草甲时,人们发现将 N₂、CO₂ 和 O₂ 这 3 种气体混合后灭杀烟草甲的效果更好。Childs 研究表明,以 65:8:27 的体积比混合 CO₂:O₂:N₂ 灭杀烟草甲,处理 1 h 后,部分烟草甲的卵失活;3 d 后卵失活率为 99.9%,2 d 后 99.9% 的成虫死亡,4 d 后 99.8% 的幼虫死亡,7 d 后 99.2% 的蛹死亡^[27]。充混合气体法相比充单一气体法而言,在更短时间内有更好的杀虫效果,且这种方法允许更高的氧气含量,这意味着对仓储设施的密闭性要求稍微降低,

能够更广泛的应用。

1.2.4 气氛调控剂 气氛调控剂是一种新型绿色仓贮养护技术,该产品能有效降低烟叶贮存环境内 O_2 浓度,提升 CO_2 浓度。当环境内 CO_2 浓度上升至 70% 并保持 28.58 h 后,可至 99% 的各虫态烟草甲死亡;48 h 后,可至 100% 的烟草甲死亡^[28]。使用气氛调控剂时,先将气氛调控剂放在烟垛上部,然后用塑料帷幕封闭烟垛,使用气氛调控剂后,帷幕内 CO_2 浓度很快上升至 90% 以上,灭杀所有烟草甲。使用气氛调控剂不仅可以保证封闭烟垛内无烟草甲危害,还可以提高烟叶醇化效果,且气氛调控剂具有安全性高、经济实惠和不燃不爆等特点,对仓储条件的要求也较低,已在全国多个省市使用^[29]。

1.3 物理隔离防治

1.3.1 硅藻土 硅藻土(diatomite,简称 DE)是一种生物成因的硅质沉积岩,其化学组成以 SiO_2 为主,矿物成分主要是蛋白石。我国硅藻土储量为 3.2 亿 t,远景储量达 20 多亿 t,是一种较为廉价,已规模开发且用途广泛的产品,在农业中,硅藻土通常被用作杀虫剂和土壤改良剂^[30]。巴西储烟仓库曾用硅藻土防治烟草甲,施用硅藻土 24 h 后,89% 的烟草甲种群衰退,在使用后前 3 个月,烟草甲种群增长得到显著抑制^[14]。

1.3.2 电网 Matsuda 提出了一种双功能电场屏蔽器,以隔绝烟草甲进入仓库^[31]。屏蔽层由平行排列的绝缘铁丝(ICW)和位于 ICW 两侧的 2 个接地导体网组成。使用电压发生器将负电荷(0.1 ~ 8.0 kV)施加到绝缘电线上,使用于覆盖电线的绝缘子套管极化,使绝缘子的外表面负电,正向在电线的内导体表面正电。ICW 的负表面电荷在接地网中引起静电感应,而在面对 ICW 的网表面上产生相反的电荷。在 ICW 和接地网之间的空间中形成了一个电场,场强与施加到 ICW 上的电压增加成正比。到达接地网外表面的烟草甲被阻止进入网内。当电网的电压越大,电网的阻止能力越强。当 ICW 的负电荷超过 4.1 kV 时,未发现烟草甲进入电网。

1.4 辐射防治

自 20 世纪初,研究者就已经开始研究用辐射防治害虫,大体分为 3 个方向,分别是辐射诱变、辐射不育和辐射杀虫,其中辐射杀虫以其时效性强的特点研究最多,应用最广^[32-34]。现有的对辐射杀虫的

研究报道集中在 γ 射线上。 γ 射线对烟草甲有显著的灭杀作用,杀虫效果与辐射剂量及辐射剂量率呈正相关,当剂量水平在 1.0 ~ 1.5 kGy 之间时,可以直接灭杀烟草甲成虫;当剂量水平低于 1.0 kGy 时,依然能够有效杀伤害虫^[35-36]。辐射技术不仅能够灭杀害虫,还能提升烟草品质、防止烟草霉变且无生物毒性^[37-40],目前我国尚未开放烟草行业辐射准许,但仓储粮食已有开放辐射准许并出台相关标准,辐射技术在烟叶仓储领域内的应用值得期待。

2 化学防治

2.1 磷化铝

磷化铝是全球烟草仓储防治烟草甲最主要、最广泛的化学药剂,1975 年被国际烟草企业选用作为储烟仓库烟草甲的熏蒸剂^[41]。在过去的近 50 年中,磷化铝也取得了很好的防治效果^[42-44]。但磷化铝产生的 PH_3 是剧毒气体,国家“十三五”规划中将其列为高毒农药,且许多企业为追求高防效长期过量使用,而连续、单一的使用也带来了许多问题,这其中最严重的就是烟草甲对磷化铝抗药性的增强。Rajendran 报道在印度发生了世界上第 1 例 PH_3 熏蒸失败的案例^[45];Zettler 等在美国北卡州的部分烟草仓库中用 PH_3 熏蒸烟草甲,发现超过 1/2 储烟仓库中的烟草甲对 PH_3 具有不同程度的抗药性,当地烟草甲种群中有部分表现出高度抗性^[46];Savidou 等从 25 个国家收集了 31 个种群的烟草甲,测试了它们的磷耐受性,结果表明,来自 12 个国家的 17 个烟草甲种群表现出抗药性,有 1 个种群表现出 5 倍于正常种群的抗药性^[47]。我国尚未有 PH_3 熏蒸失败的报道,但郭超等研究表明, PH_3 在 250 mL/m³ 剂量下维持 132 h 方可完全杀死烟草甲,且该剂量并不能杜绝烟草甲的危害^[48]。这可能表明烟草甲已经对 PH_3 产生高抗性。且以实际应用来看,我国 GB/T 23220—2008《烟叶储存保管方法》规定,储烟仓库每年均需熏蒸 2 次,但即使每年熏蒸 2 次 PH_3 ,我国每年仍有大量烟草因烟草甲而遭受质量损失,这从侧面说明单一熏蒸对烟草甲防治效果比较有限。因此,高效低毒且对非靶标生物安全、不产生或产生抗药性较慢的新药剂或新方法成为许多研究者的目标。但新药剂的研发周期长,且防效难以探明,因此一些研究者转向对 PH_3 的施药方式和施药工具进行了改进,并取得了不错的效果。彭涛等在 PH_3 中混合 CO_2 ,以 1.5 g/m³ 使用量封闭 96 h,

对烟草甲各虫态都有很好的灭杀效果^[49]；丁碧军将 6 g/m³ 的药剂量平均分成 2 次使用，中间间隔 10 d，灭杀作用与一次性施药时的灭杀作用无显著差异^[50]；李谋智等采用干净便宜的新式 PH₃ 发生器，提高了安全性，且减少了磷化铝的用量^[51-52]；日本学者 Haradah 等的研究表明，如果温度 ≥25 ℃，熏蒸时间 96 h 以上，即使是较低浓度的 PH₃ 也能杀死全部虫态的烟草甲^[53]。

2.2 保护剂

除了磷化铝熏蒸以外，目前还有一些化学药剂能够防治烟草甲，效果较好的有菊酯类、甲基嘧啶磷类、敌百虫和敌敌畏等一些药剂，但这些药剂均存在一些问题，例如穿透能力弱，无法穿透烟箱灭杀烟草甲；毒性强，对人体危害大；短期内过量使用后药效迅速下降，烟草甲对其产生抗药性；对烟草甲蛹期不敏感；再猖獗等诸多问题。因此化学药剂只能作为烟草甲防治的补充手段。当监测到虫情并且虫情未达到熏蒸标准时，这些药剂可以限制烟草甲种群数量和生存空间，起到一定的防控作用。

综合近期报道，现行使用防护剂综合防效好的是菊酯类药剂，例如除虫菊酯、溴氢菊酯和高效氯氟氢菊酯等。以 10 mg/kg 高效氯氟氢菊酯处理烟草甲，4 d 后虫口衰减率为 85.7%，6 d 后烟草甲幼虫校正死亡率为 80.2%，对烟草甲 3 龄幼虫的种群抑制率为 85.1%，溴氢菊酯防效稍弱于高效氯氟氢菊酯，使用 6 d 后幼虫的校正死亡率为 71.4%，对 3 龄幼虫的种群抑制率为 71.3%^[54]；以 4 mg/m³ 施用除虫菊酯 24 h 后，空间防效高达 90%^[55]。

2.3 植物提取物

植物在与昆虫长期的协同进化中，为应对昆虫的胁迫产生了许多对昆虫具有防御能力的次生代谢物质，这些次生物质种类超过 40 万种^[56]。我国有丰富的植物资源，已报道对烟草甲具有防治效果的植物至少有 14 科 23 种^[57]。从这些植物中提取出的杀虫有效成分根据构成其化学结构骨架不同可分为柠檬素、倍半萜和二萜、生物碱和植物精油。

2.3.1 植物精油 植物精油是目前研究最广的植物类防护剂，按作用类型分为熏蒸、触杀、胃毒、驱避和抑制生长发育等，其中熏蒸为主要使用方式^[58]。Samuel 等从小豆蔻、胡椒和郁金香中分别提取精油并喷回，发现这 3 种精油均可有效阻止烟草甲侵染，并阻止烟草甲化蛹，且在高浓度时(0.1 mg/10 g)，3 种

精油对烟草甲各虫态致死率达 100%^[59]；Chan 等从肉桂、芥菜和辣根等 5 种植物中提取精油，并测定了其杀虫活性，结果表明肉桂精油熏蒸杀虫效果与其他 4 种植物精油存在显著性差异，杀虫效果最佳^[60]；国内也有相似报道，已有许多研究者投身于这方面的研究，他们从多种香料及花卉中提取植物精油，发现提取物对烟草甲有熏蒸、驱避和触杀等众多作用，结果表明植物精油是开发利用前景很好的植物性杀虫剂(保护剂)^[61-72]。

2.3.2 生物碱 生物碱的定义是含负氧化态的存在于生物有机体中的环状化合物。植物体内存在一些具有杀虫活性的生物碱，它们具有胃毒、化学不育、驱避和触杀等作用。华中农业大学李建洪课题组与郑州烟草研究院合作提取了 20 余种植物的 80 多种植物提取物，其中对烟草甲表现出高毒性的生物碱有 SJA 和 TFG 的丙酮、石油醚、乙酸乙酯以及乙醇提取物，浓度为 0.1 g/mL 施药 3 d 后，供试烟草甲的校正死亡率均达 100%；AKI 的石油醚提取物以 0.05 g/mL 浓度施药 3 d 后，供试烟草甲校正死亡率也达到 100%^[69]；赵海刚对 AGS 的杀虫活性进行了分析，其研究表明，α-细辛醚是 AGS 的主要杀虫活性^[72]。

2.3.3 倍半萜和二萜 倍半萜和二萜是由异戊二烯单位构成的环、链状聚合体。4 分子异戊二烯是二萜，3 分子异戊二烯是倍半萜。赵海刚分析了 CTM 的丙酮、石油醚、乙酸乙酯以及乙醇提取物对烟草甲成虫的生物活性，发现以驱避和触杀毒性为主，且以 0.05 g/mL 浓度施药 1 d 后，供试烟草甲成虫校正死亡率达 100%^[72]。

2.3.4 柠檬素 在芸香科、苦木科和楝科等植物中存在一些三萜类化合物，这些化合物也被称为柠檬素类化合物^[73]。柠檬素类化合物中，最负盛名的是从楝科印楝中提取出的印楝素。印楝素具有多种杀虫活性，最显著的是拒食作用和抑制生长发育。Hans 将保幼激素与印楝提取物相比，发现印楝提取物对烟草甲幼虫的防控效果更佳^[74]；程新胜等将甲基嘧啶磷与印楝提取物的触杀毒性相比，发现印楝素对烟草甲触杀毒性较低，但具有明显的后效作用^[75]。

2.4 黑光灯

黑光灯是一种气体放电灯，它能发射人眼观察不到的 330~400 nm 的紫外线光波，可与诱捕装置配合使用。多项研究表明，烟草甲成虫具有趋光

性^[76-77]。利用昆虫的趋光性诱捕烟草甲,可以作为虫情预报的一种手段。Papadopoulou 等将食物诱捕器、性诱剂和黑光灯诱捕器在相同条件下进行实仓试验,结果表明黑光灯诱捕器在这 3 种诱捕器中的诱捕效果最佳^[78];在国内还尚未有实仓使用黑光灯诱捕烟草甲的报道。

3 生物防治

随着生活水平的提高和经济的发展,更多的人开始重视食品安全问题。同时,随着前几年国家“双减”指导思想的提出,表明我国将大力发展绿色农业,维护生态安全。因此,除了化学药剂防治以外,许多研究者开始探寻高效简易的烟草甲防治新方法。综合国内外烟草甲的生物防治的研究报道,大体分为 3 个大方向:昆虫激素、微生物和自然天敌。

3.1 昆虫激素

对烟草甲的昆虫激素研究主要集中在性信息素和保幼激素 2 个领域。

对烟草甲的性信息素的研究始于 1980 年。20 世纪 80 年代,日本 Chuman 等首先从雌性烟草甲体内分离出了(6S,7S)4,6-二甲基-7-羟基-壬烷-酮-3(serricomine),并很快商品化,目前仍在日本储烟仓库中使用。在此基础上,德国的 Vonwiltko 等在 1982 年发现并合成了环化-serricomineo,1983 年德国的 Heermann 等合成了脱水-serricomine^[79]。国内学者对烟草甲性信息素的研究起步较国外晚,但也涌现了一批成果。在国内,毛若云等首次成功合成了 2 种烟草甲虫雌性信息素:2,6-二乙基-3,5-二甲基-2,3-二氢吡喃和 4,6-二甲基-7-羟基-壬烷-酮-3^[80];吴江等以(S)-脯氨酸及丙炔醇为原料,合成了烟草甲性信息素,亦有很好的引诱作用^[81]。目前烟草甲雌性信息素共有 6 种,serricorole 和 serricorone 的性刺激效果较强,但性诱效果较弱,serricorole 作为产卵抑制物能阻止雌烟草甲在已着卵的物体上产卵;性信息素 4S,6S,7S-serricomine 吸引力最强,其中 6-二甲基-3-壬酮,(4S,6S,7S)-7-羟基-4 对雄性烟草甲成虫有很强的性刺激性和引诱性^[82]。烟草甲性诱剂已成为储烟仓库必不可少的防控措施,在监测烟草甲方面有不可替代的作用。

保幼激素别称返幼激素,Ryan 用带有保幼激素的烟叶饲喂烟草甲后,烟草甲不能正常发育,幼虫

无法化蛹完成生命周期^[1]。根据这一特性,国外有学者研究并发明了烟草保护剂 Kabat,在复烤加工阶段以 $5.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mg/m}^3$ 使用烟草保护剂 Kabat 喷在烟叶上,可保护烟叶 2~4 年不受损伤^[83];国内也有使用保幼激素类药剂防治烟草甲的报道,杨长举等使用小麦中蒙 515 浓度为 10^{-5} mg/m^3 时可防治烟草甲达 2 年之久^[57];洪深求等使用双氧威以 10~20 mg/kg 的浓度处理烟叶 10 个月后,供试烟草甲死亡率达 100%^[84]。

3.2 微生物

对烟草甲的微生物研究主要集中在苏云金芽孢杆菌(*Bt*)和白僵菌上。

白僵菌是一种子囊菌类的虫生真菌,只有少部分白僵菌对烟草甲有较强的毒力,因此想要用白僵菌防治烟草甲就需要研究者们先筛选出一些毒力较强的样本。已报道筛选出的高毒力白僵菌有球孢白僵菌[*Beauveria bassiana*(Balsamo)]、布氏白僵菌[*B. brongniartii*(Sacc.)]和白僵菌菌株 Bb050722,均对烟草甲有一定的致死作用^[85-86];白僵菌菌株 Bb050722 以 1.46×10^8 个孢子/mL 浓度处理供试烟草甲,18、21、25、28 °C 时烟草甲 2 龄幼虫半数致死时间(LT₅₀)分别为 6.3、3.9、3.6、4.1 d,结果表明,白僵菌对烟草甲有不错的防控效果^[86];刘爱英等测定白僵菌粉对烟草甲的毒力,发现施药 21 d 后烟草甲死亡率为 84.4%,且证明了烟草甲可以带菌迁飞^[87];罗力等对烟草甲带菌迁飞现象进行了进一步研究,其研究结果表明烟草甲可以带菌迁飞 40 m 以上,实仓使用时集中释放白僵菌比分散释放效果好^[88];张晓敏等针对醇化仓库高温低湿环境筛选能够耐受 -0.8 MPa 的较低水势和 35 °C 环境条件,且生长稳定的突变菌株,能在醇化仓库恶劣的环境胁迫下长期生存^[89]。

Bt 是微生物研究领域的热门之一,*Bt* 在形成孢子时产生的蛋白质类芽孢体内物质对广谱昆虫有高致死性,如今已有防治水稻二化螟、大螟等害虫的成熟商品^[90]。一些学者进行了 *Bt* 对烟草甲防治效果的研究。Kaelin 等从烟末中分离出 3 种 *Bt* 菌株,用这 3 种 *Bt* 菌株处理烟草甲 7 d 后,供试烟草甲幼虫致死率最高可达 80%^[91];Tsuchiya 等从 2 000 多种分离物中筛选出了 28 种分离物,这 28 种分离物对幼虫有强致死作用,并证明 β 外毒素是烟草甲生物活性的关键^[92]。高家合从 10 多个地区共采集到 801 个烟叶样品,并从中分离得到 736 株 *Bt*

菌株,对这些菌株的生物毒力进行测定,结果表明所得菌株中有9个菌株接种12 d后,供试烟草甲校正死亡率超过95%^[93];齐绪峰等通过在东南沿海地区、东北、华东、华中和西南地区的7家卷烟厂的烟叶仓库中采集到各种类型的样品共521份,从中分离出*Bt*菌株952株并对其进行毒力鉴定,结果表明,有18株对烟草甲的杀虫活性较高,施药后3 d,有13株菌株对烟草甲的校正死亡率超过70%;施药后9 d,有12株菌株对烟草甲的校正死亡率超过80%,有3株菌株对烟草甲的杀虫活性最高,校正死亡率达90%以上^[94];世界顶级烟草公司——菲利普·莫里斯公司在欧洲的实验室从仓储烟草中分离的*Bt*菌株毒力测定结果显示,施药后烟草甲校正死亡率为83%。*Bt*制剂在防控烟草甲方面有很大的潜力可供挖掘,有很好的应用前景^[95]。

3.3 自然天敌

烟草甲已知的自然天敌较少,何榕宾等分别对福建省和贵州省烟草甲天敌资源进行了调查,估计烟草甲的天敌有5目8科13种^[96-97];郭军等在贵阳地区进行了烟草甲天敌资源调查,发现象虫金小蜂[*Anisopteromalus calandrae* (Howard)]是贵阳地区烟草甲的优势种寄生蜂,研究了其生物学特性并对其防控烟草甲的潜力做了评估,结果表明,1只象虫金小蜂在24 h内可以寄生14.14头烟草甲老熟幼虫,5.19只烟草甲蛹,具有一定防控烟草甲的潜力^[98];国外报道的烟草甲天敌资源有腐食酪螨[*Tyrophagus putrescentiae* (Schränk)]、米象金小蜂[*Lariophagus distinguens* (Ferster)]、象虫金小蜂[*A. calandrae* (Howard)]和伍异金小蜂[*Anisopteromalus quinarius*]^[99-103],但均未见进一步在生物防治应用方面的研究报道。

4 烟草甲的分子生物学研究进展

分子生物学是从分子水平阐明生命现象和本质的科学,随着近10年来分子生物学的迅速发展,一些研究者希望从分子层面寻找到防治烟草甲的办法,目前对烟草甲分子生物学的研究主要集中在*Cry*基因、系统发育、热激蛋白和蛋白酶基因等方面,研究内容集中在基因克隆、基因功能鉴定和系统发育等方面,较为片面,未构成较为整体的研究体系;从基因组学角度宏观地阐释烟草甲各基因组的结构、进化、定位、编辑和功能的研究较少,且现有研究手段大多停留在转录组测序后的基因克隆

表达验证阶段,深入至蛋白表达差异分析研究较少,已较为普遍使用的一些蛋白层次的研究手段,如蛋白纯化和蛋白质印迹法等基本未见在烟草甲的研究中使用。总而言之,期待更多新的分子生物学的研究方法被用于烟草甲的研究之中。

4.1 *Cry* 基因

*Cry*基因是从苏云金芽孢杆菌中提取的具有单独杀虫活性的晶体蛋白,也是国内外应用开发最多的抗虫基因,世界范围内已有500多种*Cry*基因被报道^[104]。传统的*Cry*基因命名系统将*Cry*基因分为5个大类,分别是*CryI*、*CryII*、*CryIII*、*CryIV*、*CryV*^[105],如今的*Cry*基因命名系统用简化了罗马数字表达,换用阿拉伯数字命名,并分4个级别对*Cry*基因进行每一位的命名,已报道的500多种*Cry*基因按新的命名方法可以分为60多大类。而国内外已报道的从各国家和地区的加工厂和烟仓的烟草残渣、成品烟叶及死亡的烟草甲中提取出来的对烟草甲有一定毒杀效果的*Cry*基因属类较多。例如,高家合等从云南省烟草科学研究所分离的752株*Bt*菌株中分离得到27株含*Cry*基因的*Bt*菌株,20株分属*Cry4*,7株分属*CryI*^[106];胡逸超等对苏云金芽孢杆菌菌株GXZY032的*Cry*基因类型做了鉴定,该菌株上有*CryI*、*CryII*和*Cry10*这3种类型*Cry*杀虫基因^[107],Michel从15个国家的加工厂和烟仓中收集烟草甲死亡尸体、加工碎片和烟叶样品共126个,检测分离出的107株*Bt*菌株分属*CryI*(18%)、*Cry2*(23%)和*Cry3*(59%)^[108];Höfte等对3株*Bt*菌株进行了测序比对,发现其*Cry*基因均为*CryIII A*杀虫基因^[109]。研究者们从大量*Bt*菌株中筛选出一些对烟草甲毒力较强的菌株并对其毒性做了测定,测定的结果显示,毒力最高的*Bt*菌株对烟草甲幼虫的99%致死浓度(LC₉₉)为9 d,且基本所有筛选出的*Bt*菌株在施用9 d后都能达到80%以上的防效,这表明开发*Bt*试剂防治烟草甲是可行的。但对目前已报道的这些*Cry*基因的分类分析发现,*Cry3*类的*Cry*基因数量占有所有基因数量的百分比比预想的要小。*Cry3*基因是被公认的对鞘翅目昆虫毒力最强一类的*Cry*基因^[110],烟草甲属鞘翅目窃蠹科,*Cry3*基因对烟草甲防治的效果应当更好,因此建议在以后的取样中,应当从协同进化的角度考虑,着重收集烟草甲样本,以寻找到对烟草甲专性更强的菌株。

4.2 系统发育学

系统发育学是重建地球生命进化史的科学,传

统的系统发育学仅仅依靠形态学数据进行分类,但物种的种下分化往往产生极相似的亚种,且传统分类学的较高专业知识储备要求严重阻碍了系统发育学的研究。随着交叉学科的发展,分子生物学引入后系统发育学有了新的研究手段。许多研究者开始尝试使用分子学方法研究烟草甲的系统发育。Coelho - Bortolo 等在巴西储烟仓库收集了 11 个烟草甲种群,并用 20 多个随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 引物对所收集到的种群进行测序,对得到的 350 多条基因序列做了系统发育分析,构建了系统发育树,研究结果表明,不同地区烟草甲种群内有高度遗传变异性,且这种遗传的变异性会随着被侵染的烟叶的交流而增强^[110]; Blanc 等从 15 个国家收集了 16 个烟草甲种群,用扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, 简称 AFLP) 方法得到了 16 个烟草甲种群的基因序列,并建立了系统发育树,但 Blanc 的研究结果表明,不同地区的烟草甲种群构建的系统发育树种遗传差异不大,并将这一结果同样归结于烟叶在全球范围内的流动^[111]。随着经济全球化进程的加速,烟叶作为世界最重要的经济作物之一,必然在全球范围内加速流动,烟叶在世界范围的流动究竟对烟草甲种群的遗传分化有什么样的影响,还须要研究者们更进一步的研究,相应的研究成果对协同进化等一些大生物的基本问题也有很重要的意义。

分子生物学研究方法除了被用于烟草甲种群的遗传分化性研究上,还被研究者用于烟草甲的重要共生菌 YSL 上。Noda 等用电泳对烟草甲的重要共生菌 YSL 的染色体 DNA 进行分离,结果表明其染色体数为 11 条,基因组大小为 20.9 Mbp,并对 YSL 进行了系统发育学分析,结果表明 YSL 来源于早期的真子囊菌纲的丝状真菌,后期发展为甲虫类的专有共生菌^[112]。

4.3 热激蛋白

昆虫是变温动物,对于昆虫的生命活动,温度是最重要的影响因素,昆虫的温度耐受性机制是决定其种群在特定生态环境下能否得以存活的一个重要条件。已有研究表明,昆虫对温度胁迫的耐受能力除了与其种群遗传特效有关之外,不同的昆虫还会采用不同的生化及生理策略来抵御温度胁迫。这其中,昆虫面对温度胁迫时的热激蛋白的诱导表达是目前研究最多、也是被认为与昆虫的温

度耐受性关系最密切的因素之一^[113]。但最新的研究成果表明,热激蛋白不仅参与昆虫应对温度胁迫的调节,还可能参与了其他外界胁迫的调节。Yang 等研究了 4 个小分子量热激蛋白基因 *LsHsp19.4*、*LsHsp20.2*、*LsHsp20.3*、*LsHsp22.2* 等在烟草甲各时期的表达水平以及面对 CO₂ 气调胁迫时的表达水平,结果表明,*LsHsp20.2* 和 *LsHsp22.2* 在成虫时表达量最高,*LsHsp19.4* 和 *LsHsp20.3* 在蛹期表达量最高,在面对 CO₂ 气调胁迫时,*LsHsp20.2* 和 *LsHsp20.3* 表达量有显著的上调,但 *LsHsp19.4* 的表达量却下调了,这表明部分热激蛋白基因也参与了烟草甲应对外界胁迫的应激响应^[113]。

4.4 一些重要的酶基因克隆及功能验证

酶是由活细胞产生的,对其底物具有高度催化效能和高度特异性的 RNA 或蛋白质,是一类极为重要的生物催化剂,如果缺少酶,生命体将无法顺利完成发育周期^[114]。许多学者针对烟草甲的一些重要的酶基因进行了相应的研究。

谷胱甘肽 *S*-转移酶是各种亲电子化合物与催化还原型谷胱甘肽进行亲核加成反应的酶,是昆虫体内的重要代谢解毒酶。严毅等从转录组中筛选出了谷胱甘肽 *S*-转移酶基因 *LsGSTe1*,并用甲酸乙酯对供试烟草甲进行胁迫,结果表明,30% 致死浓度 (LC₃₀) (10 μL/L) 和 LC₅₀ (20 μL/L) 的甲酸乙酯对烟草甲 5 龄幼虫熏蒸胁迫后,幼虫体内 *LsGSTe1* 的表达水平显著升高,与对照组相比分别是对照组的 2.96、5.80 倍。RNA 干扰 (RNAi) 72 h 后, ds *LsGSTe1* 注射组与对照 (ds GFP 组) 相比,LC₅₀ 浓度的甲酸乙酯处理 5 龄幼虫的死亡率明显提高了 32.4%,这表明 *LsGSTe1* 可能参与了烟草甲对甲酸乙酯的代谢和解毒过程^[115]; 许抗抗等从转录组中筛选出了谷胱甘肽 *S*-转移酶基因 *LsGSTt1*、*LsGSTd1* 和 *LsGSTs1*,并对其在 CO₂ 胁迫下的表达量进行了研究,结果表明,用 LC₅₀、LC₃₀、10% 致死浓度 (LC₁₀) 这 3 个 CO₂ 浓度处理烟草甲低龄幼虫 6 h 后,烟草甲中 *LsGSTd1* 表达量与对照组无显著性差异,而 *LsGSTt1* 和 *LsGSTs1* 表达量与对照组相比有显著性差异,表达量上调,这表明 *LsGSTt1* 和 *LsGSTs1* 参与了烟草甲对 CO₂ 气调胁迫的应激响应^[116]; 李灿等也进行了谷胱甘肽 *S*-转移酶对 CO₂ 气调胁迫下的反应机制研究,结果表明烟草甲在受到 CO₂ 气调胁迫 3、6、9 h 后,谷胱甘肽 *S*-转移酶活性被激活^[117]。

丝氨酸蛋白酶是一个蛋白酶家族,它们的作用是断裂大分子蛋白质中的肽键,使之成为小分子蛋白质,对昆虫的先天免疫反应机制有重要作用。陈春旭从转录组中筛选出了 4 个具有 clip 结构域的丝氨酸蛋白酶基因 *LsCLIP*、*LsCLIP2*、*LsCLIP3*、*LsCLIP4*,通过 RT-PCR 克隆得到了其全长序列,并用 qPCR 解析了所得到的 *LsCLIPs* 基因的时空表达模式和 20-羟基蜕皮激素(20E)的诱导表达模式,并在此基础上用 RNAi 技术对 *LsCLIPs* 基因在烟草甲的先天免疫和生长发育中的功能进行了验证,结果表明,20E 可以诱导 *LsCLIPs* 基因的高表达,4 个 *LsCLIPs* 基因在烟草甲生命周期各阶段皆有表达,用 20E 注射烟草甲高龄幼虫后 *LsCLIPs* 基因表达量有显著上调,这些结果表明 *LsCLIPs* 基因参与了烟草甲对免疫胁迫的应激响应和生长发育^[118]。

几丁质是仅次于纤维素的自然界中含量第二多的多糖,也是烟草甲的外壳的重要组成部分。杨文佳等对烟草甲控制几丁质的重要基因——几丁质脱乙酰酶 1 基因进行了研究,从送测的烟草甲转录组中筛选后通过 RT-PCR 克隆得到几丁质脱乙酰酶基因 *LsCDA1*,对烟草甲 4 龄幼虫注射 20-羟基蜕皮酮诱导后 *LsCDA1* 基因的表达量显著上调,这表明 *LsCDA1* 参与了烟草甲体内激素调节,同时杨文佳等对该结果通过 RNAi 技术进行了验证,结果表明注射该基因双链核糖核酸(dsRNA)后,*LsCDA1* 表达量下调 87%,供试烟草甲不能蜕皮、腹部皱缩死亡或蜕皮时间推迟,不能正常完成生命周期^[119];Chen 等研究了烟草甲几丁质降解的重要基因——N-乙酰谷氨酸合成酶基因 *LsNAG1*,结果表明,*LsNAG1* 在幼虫后期和蛹期后期表达水平最高,*LsNAG1* 经 20-羟基蜕皮酮诱导后表达量显著上调,烟草甲 4 龄幼虫和烟草甲的蛹注入该基因 dsRNA 后,这 2 个阶段的 *LsNAG1* 表达量显著下调,供试烟草甲出现严重的蜕皮和高死亡率现象,与注入 ds GFP 的对照组相比,注入 *LsNAG1* 的烟草甲蛹和烟草甲 4 龄幼虫的死亡率分别高了 83%、48%,这表明 *LsNAG1* 在烟草甲幼虫至蛹和蛹至成虫期有很重要的作用,并且可以作为新杀虫剂的靶标^[120]。

羧酸酯酶是昆虫体内最重要的解毒酶之一,在对杀虫剂的抗性形成和对外源化合物的解毒代谢中起着重要作用。朱晓晔等从转录组中筛选后,通过 RT-PCR 克隆得到的 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 表达量在供试烟草甲经过 CO₂ 胁迫后与对照组相比

明显上调,且这 2 个基因在烟草甲高龄幼虫期表达量显著高于烟草甲其他生命周期的表达量,这表明 *LsCarEB1* 和 *LsCarEB2* 是响应 CO₂ 胁迫的重要机制之一,而且在烟草甲的生命周期中有重要作用^[121]。

4.5 抗生素基因

在日本,烟草甲还被作为医学昆虫。Watanabe 等在 14 个不同地区日本牙科诊所中收集烟草甲种群,并对这些烟草甲抗药基因 *MecA*、*VanA*、*VanB*、*BlaIMP*、*BlaVIM* 等做了研究,结果表明,供试烟草甲饲喂抗生素类药品后,这几种基因表达量没有明显上调或下调,烟草甲对抗生素类药品无抗药性,对烟草甲抗药基因的研究,可能为解决人类抗生素抗药性问题提供一定的思路^[122]。

参考文献:

- [1] Ryan L. Post-harvest infestation control[M]. London: Chapman & Hall, 1995: 143-144.
- [2] 白旭光. 储藏物害虫与防治[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 294-295.
- [3] 宋纪真, 冯大成. 全国贮烟害虫危害程度的调查研究[J]. 烟草科技, 1995(4): 26-30.
- [4] Micillus B, Pascale K, Ferruccio G, et al. *Bacillus thuringiensis* (bt) for the control of insect pests in stored tobacco: a review [J]. Contributions to Tobacco Research, 2002, 20(1): 15-22.
- [5] Kim Y I, Lee S W, Kim Y J, et al. Effect of the establishment of cigarette beetle population on the quality of stored cnidium rhizome and angelica radix at room temperature [J]. Academic Journal, 2017, 25(4): 224-230.
- [6] 奚家勤, 尹启生, 宋纪真, 等. 高温、真空回潮及烟叶复烤杀虫工艺研究[J]. 烟草科技, 2009(1): 60-63.
- [7] Dean G A. Heat as a means of controlling mill insects [J]. Journal of Economic Entomology, 1911, 4: 142-158.
- [8] Fields P G, White N D G. Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects [J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47(1): 331-359.
- [9] Makhijani A, Gurney K. Mending the ozone hole: science, technology, and policy [M]. Cambridge: The Massachusetts Institute of Technology Press, 1995: 38-55.
- [10] Yu C, Subramanyam B, Flinn P W, et al. Susceptibility of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) life stages to elevated temperatures used during structural heat treatments [J]. Journal of Economic Entomology, 2011, 104(1): 317-324.
- [11] Li M, Li X J, Lü J H, et al. The effect of acclimation on heat tolerance of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) [J]. Journal of Thermal Biology, 2018, 71: 153-157.
- [12] 陈永年, 彭清云. 烟草甲的生态学及其防治的调查研究[J]. 湖南农业大学学报, 1995, 21(5): 467-471.
- [13] Yang W J, Xu K K, Cao Y, et al. Identification and expression

- analysis of four small heat shock protein genes in cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) [J]. *Insects*, 2019, 10(5): 139.
- [14] Costa D A, Khler A. An alternative to control *Lasioderma serricorne* (Fabricius) with diatomaceous earth in tobacco warehouse storage rooms in southern Brazil, RS [C]//Abstracts of the Meeting of the Coresta Agro & Phyto Study Groups, 2003: 56.
- [15] 梁伟, 赵艳珍, 孙建生, 等. 低温对片烟外观质量及香味前体物的影响[J]. *湖南农业科学*, 2020(2): 68-71, 75.
- [16] 朱元, 吴剑, 陈波, 等. 烟草甲研究现状[C]//云南省烟草学会农业专业委员会 2011—2012 年学术年会论文集, 2012.
- [17] Chaudhry M Q, Bell H A, Savvidou N, et al. Effect of low temperatures on the rate of respiration and uptake of phosphine in different Life stages of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Fabricius) [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2004, 40(2): 125-134.
- [18] Lineuza L, Maria A, Sonia M, et al. Development of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) in different diets at different temperatures[J]. *Biotemas*, 2010, 23(4): 21-23.
- [19] Collins D, Conyers S. The effect of sub-zero temperatures on different lifestages of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) and *Ephestiu elutella* (Hübner) [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2010, 46(4): 17-19.
- [20] 彭智伟. 长沙地区烟仓内烟草甲发生动态与防治研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008: 8-15.
- [21] Imai T, Fukazawa N. Susceptibility of the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) to hypoxia [J]. *Applied Entomology and Zoology*, 2012, 47(4): 429-432.
- [22] 吕建华, 马丹, 苏新宏, 等. 三种非化学防治方法对烟草甲的控制作用[J]. *中国烟草科学*, 2016, 37(5): 47-50.
- [23] 彭琛, 林锐峰, 任胜超, 等. 富氮控氧法对 3 种虫态烟草甲杀灭效果[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(31): 122-126.
- [24] 李灿. 中药材储藏期主要害虫种群生态及气调毒理研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008: 15-47.
- [25] Navarro S, Finkelmall S, Donahay E, et al. Integrated storage pest control methods using vacuum or CO₂ in transportable systems[J]. *IOBC/WPRS Bulletin*, 2002, 25(3): 207-214.
- [26] Gunasekaran N, Rajendran S. Toxicity of carbon dioxide to drugstore beetle *Stegobium paniceum* and cigarette beetle *Lasioderma serricorne* [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2005, 41(3): 283-294.
- [27] Childs D P, Overby J E. Mortality of the cigarette beetle in high-carbon dioxide atmospheres[J]. *Journal of Economic Entomology*, 1983, 76(3): 544-546.
- [28] 曹宇, 杨文佳, 孟永禄, 等. CO₂ 气调对烟草甲的毒力及其能源物质的影响[C]//中国植物保护学会 2015 年学术年会论文集. 长春, 2015.
- [29] 白建保. 新编烟草病虫害防治图说[M]. 郑州: 河南人民出版社, 2010: 149-226.
- [30] 刘小青, 曹阳, 李燕羽. 硅藻土杀虫剂的研究和应用进展[J]. *粮油仓储科技通讯*, 2006(1): 32-35, 42.
- [31] Matsuda Y, Nonomura T, Kakutani K, et al. A newly devised electric field screen for avoidance and capture of cigarette beetles and vinegar flies[J]. *Crop Protection*, 2011, 30(2): 155-162.
- [32] 陈云堂, 郭东权, 王娟娟. 辐照技术在我国烟草中的应用研究进展[J]. *中国烟草科学*, 2011, 32(2): 90-95.
- [33] 钟青. 电子束辐照害虫控制效果及对储存烟叶的影响研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 32-39.
- [34] 丁小令, 陈荫槐, 林平, 等. 烟叶辐射杀虫效果研究初报[J]. *贵州农业科学*, 1991(2): 27-30.
- [35] Nablo S V, Wood J C, Desrosiers M F, et al. A fluidized bed process for electron sterilization of powders [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 1998, 52(1): 479-485.
- [36] Cleghorn D A, Nablo S V, Ferro D N, et al. Electron beam treatment parameters for control of stored product insects [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2002, 63(3): 575-579.
- [37] 谢宗传, 曹虹, 陈炳松, 等. 卷烟辐照防霉试验[J]. *烟草科技*, 1988(5): 24-26.
- [38] 朱夕初, 徐庄, 李云英, 等. 卷烟辐照防霉试验[J]. *江苏农业科学*, 1988(12): 33-34.
- [39] 王应昌, 陈云堂, 王桂芝, 等. 原烟辐照醇化实验研究[J]. *烟草科技*, 1991(4): 12-14.
- [40] 刘践, 谢宗传, 张克林. 卷烟辐照防霉的经济可行性评价[J]. *商品储运与养护*, 2001(1): 42-43.
- [41] Subramanyam B, Hagstun D W. Integrated management of insects in stored products [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1996: 304-320, 373-384.
- [42] 伍长春, 黄萍, 薛卓联, 等. 磷化铝、溴甲烷熏蒸处理和热处理对陈皮仓储害虫的杀灭效果[J]. *生物灾害科学*, 2017, 40(4): 280-283.
- [43] 齐凌峰. 不同磷化铝施药量的熏蒸效果研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(35): 17559-17561.
- [44] 李彩霞. 如何正确使用磷化铝杀灭烟仓害虫[J]. *烟草科技*, 1996(5): 48.
- [45] Rajendran S, Narasimhan K S. Phosphine resistance in the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) and overcoming control failures during fumigation of stored tobacco [J]. *International Journal of Pest Manage*, 1994, 40: 207-210.
- [46] Zettler J L, Keev D W. Phosphine resistance in the cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae) associated with tobacco storage in the southeastern United States [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1994, 87(3): 546-550.
- [47] Savvidou N, Mills K, Pennington A, et al. Phosphine resistance in *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) [C]//Advances in Stored Product Protection International Working Conference on Stored Product Protection, 2003.
- [48] 郭超, 劳传忠, 曾伶, 等. 磷化氢对烟草甲不同虫态的毒力研究[J]. *粮食储藏*, 2015, 44(6): 6-9.
- [49] 彭涛, 刘师伟, 谭琳, 等. 磷化氢-二氧化碳混合熏蒸对烟草甲虫卵灭杀效果研究[J]. *农业科学与技术*, 2015, 16(12): 2730-2732.
- [50] 丁碧军. 如何提高磷化铝熏杀烟仓害虫的效果[J]. *烟草科技*, 1999(3): 3-5.

[51] 李谋智. 磷化铝熏蒸杀虫剂仓储烟叶熏蒸技术初探[J]. 企业技术开发, 1997(9): 14-16.

[52] 郭道林, 蒲玮, 严晓平, 等. 国外储藏物气调与熏蒸研究进展——第八届国际储藏物气调与熏蒸大会国外报告综述[J]. 粮食储藏, 2004, 33(6): 44-48, 52.

[53] Haradah H, Orui Y, Imai T, et al. Effective phosphine fumigation against phosphine susceptible or resistant cigarette beetles (*Lasioderma serricorne*) [C]// Abstracts of the Meeting of the Coresta Agro & Phyto Study Groups, 2003: 57.

[54] 唐兴贵, 班国相, 罗倩茜, 等. 12 种杀虫剂对烟草甲的室内防治效果[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(2): 252-256.

[55] 周汉平, 宋纪真, 齐凌峰, 等. 3 种防护剂对烟草甲和烟草粉螟的防治效果[J]. 烟草科技, 2008(6): 60-62.

[56] Swain T. Secondary compounds as protective agents[J]. Annual Review of Plant Physiol, 1977, 28: 479-501.

[57] 杨长举, 唐国文, 薛东. 21 世纪的储粮害虫防治[J]. 湖北植保, 2004(5): 45-48.

[58] 徐汉虹, 张志祥, 查友贵. 中国植物性农药开发前景[J]. 农药, 2003, 42(3): 1-10.

[59] Samuel R, Prabhu V K K, Narayanan C S. Influence of spice essential oil on the life history of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) [J]. Entomology, 1984, 9: 69-74.

[60] Chan P, Kim S, Young J. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects[J]. Stored Product Research, 2003, 39: 333-342.

[61] 孙伟, 王淳凯, 蔡云升, 等. 16 种芳香植物精油抗氧化活性的比较研究[J]. 食品科技, 2004(11): 55-57.

[62] 侯华民, 冯俊涛, 陈安良, 等. 植物精油对几种害虫的毒杀活性[J]. 天然产物研究与开发, 2002(6): 27-30.

[63] 梁俊玉, 颜珊珊, 徐婕, 等. 川甘亚菊挥发油对赤拟谷盗与烟草甲的生物活性[J]. 林产化学与工业, 2019, 39(6): 123-128.

[64] 张莉娟, 周家欣, 王梦真, 等. 头花杜桐挥发油的化学成分分析及其对 3 种仓储害虫的毒杀作用[J]. 植物保护, 2019, 45(3): 119-124.

[65] 李媛, 邵亚洲, 张敏敏, 等. 细叶亚菊挥发油化学组成及其对赤拟谷盗和烟草甲的杀虫活性研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(4): 100-106.

[66] 吴彦, 尤春雪, 田兆福, 等. 牡荆叶挥发油对烟草甲的杀虫活性[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 97-102, 109.

[67] 李为争, 范荫荫, 安靖靖, 等. 烟草甲植物源驱避剂的筛选[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(5): 93-97.

[68] 王秀芳, 任文伟, 王新伟, 等. 植物精油对烟草甲触杀、熏蒸和驱避作用研究[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(2): 67-70.

[69] 赵海刚, 宋纪真, 谢剑平, 等. 一些植物提取物对烟草甲虫生物活性的影响[J]. 烟草科技, 2005(9): 39-42.

[70] 安靖靖, 李为争, 原国辉, 等. 烟草甲对 20 种植物材料及其提取物的选择反应[J]. 河南农业大学学报, 2009, 43(2): 186-190.

[71] 王春, 杨德军, 胡仕林. 植物精油对烟草甲害虫的毒力测定[J]. 生命科学研究, 2001, 5(3): 223-226.

[72] 赵海刚. 植物提取物对烟草甲的生物活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006: 14-46.

[73] 徐汉虹, 黄继光. 鱼藤酮的研究进展[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 140-143.

[74] Hans J E. Alternative forms of storage protection: biological insecticides for the control of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*) and the tobacco moth (*Ephestia elutella*) [J]. Beitrage Zur Tabakforschung International, 1997, 17(2): 31-47.

[75] 程新胜, 范方兵. 几种药剂对烟草甲的生物活性评价[J]. 粮油仓储科技通讯, 2002(5): 24-25, 36.

[76] 王方晓, 魏重生, 冯小明. 烟草甲的研究[J]. 中国烟草科学, 1998(2): 3-5.

[77] 张生芳. 中国储藏物甲虫[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998: 279-280.

[78] Papadopoulou S C, Buchelos C T. Comparison of trapping efficacy for *Lasioderma serricorne* (F.) adults with electric, pheromone, food attractant and control-adhesive traps [J]. Journal of Stored Products Research, 2002, 38: 375-383.

[79] 古昆, 李鲜, 陈静渡, 等. 烟草甲虫性信息素(7S)-(一)-4,6-二甲基-7-羟基-3-壬酮的立体选择性合成[J]. 应用化学, 2001, 18(8): 662-663.

[80] 毛若云, 宋纪真, 李云. 烟草甲虫雌性信息素的合成及应用[J]. 中国烟草学报, 1992, 1(1): 15-23.

[81] 吴江, 匡晓帆. 烟草甲性信息素的合成[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1999, 36(6): 1100-1105.

[82] 王颖. 济南地区储烟害虫的发生特点及防治技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009: 15-31.

[83] Manzelli M A. Management of stored tobacco pests, the cigarette beetle and tobacco moth with methoprene [J]. Journal of Economic Entomology, 1982(4): 721-723.

[84] 洪深求, 程新胜, 魏重生. 昆虫保幼激素类似物“双氧威”对烟草甲的生物学效应[J]. 烟草科技, 2006(12): 55-57.

[85] 刘爱英, 邹晓, 胡海燕, 等. 烟草仓储甲虫致病真菌筛选研究初报[C]//第八届海峡两岸菌物学学术研讨会论文集. 长春, 2007.

[86] 朱元, 方力, 陈斌, 等. 球孢白僵菌对烟草甲幼虫的毒力测定[J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(1): 42-46.

[87] 刘爱英, 罗力, 邹晓, 等. 白僵菌对烟草粉螟及烟草甲的致病性研究[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(9): 84-86.

[88] 罗力, 刘爱英, 邹晓, 等. 烟草甲带菌迁飞试验[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(11): 89-91.

[89] 张晓敏, 杨辉, 施鸣, 等. 防治烟草甲白僵菌的仓储应用菌株选育[J]. 中国烟草学报, 2015, 21(2): 79-84.

[90] 李朝晖. 扬州地区二化螟主要寄生蜂越冬特点及盘绒茧蜂的研究应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2019: 5-39.

[91] Kaelin P, Zaugg L, Albertini A M, et al. Activity of *Bacillus thuringiensis* isolates on *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae) [J]. Journal of Stored Products Research, 1999, 35(2): 145-158.

[92] Tsuchiya S, Kasaishi Y, Harada H, et al. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) [J]. Journal

- of Invertebrate Pathology, 2002, 81(2): 122-126.
- [93] 高家合. 我国复烤烟叶苏云金芽孢杆菌的分离及杀虫特性测定[J]. 中国烟草科学, 2005(1): 34-38.
- [94] 齐绪峰, 宋纪真, 谢剑平, 等. 贮烟仓库中苏云金芽孢杆菌对烟草甲的杀灭活性[J]. 烟草科技, 2006(5): 57-59.
- [95] 郑宪滨. 苏云金芽孢杆菌(*Bt*)生物技术在仓储烟草害虫防治中的作用[J]. 烟草科技, 2000(11): 30-32.
- [96] 何榕宾, 陈乾锦, 张玉珍, 等. 福建省烟仓害虫及其天敌调查[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2002, 24(5): 612-616.
- [97] 高念昭. 贵州烟仓昆虫天敌初步观察[J]. 中国生物防治, 1996(3): 45-46.
- [98] 郭军, 戴仁怀, 杨洪, 等. 烟草甲的优良寄生蜂象虫金小蜂的生物学特性[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(5): 649-655.
- [99] Papadopoulou S C, Buchelos C T. Comparison of trapping efficacy for *Lasioderma serricorne* (F.) adults with electric, pheromone, food attractant and control-adhesive traps [J]. Journal of Stored Products Research, 2002, 38(4): 375-383.
- [100] Athanasiou C G, Papadopoulous S. *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae), an ectoparasitoid of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) found for the first time in tobacco stores in Greece [J]. Journal of Pest Science, 2004, 77(3): 183-184.
- [101] Belda C, Riudavets J. Attraction of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae) to odors from grain and stored product pests in a Y-tube olfactometer [J]. Biological Control, 2010, 54(1): 29-34.
- [102] Baur H, Kranz-Baltensperger Y, Cruaud A, et al. Morphometric analysis and taxonomic revision of *Anisopteromalus* Ruschka (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae) - an integrative approach [J]. Systematic Entomology, 2014, 39(4): 691-709.
- [103] Hamouda A, Ikbal C, Khaoula Z, et al. A new pteromalid species: *Anisopteromalus quinarius* (Gokhman & Baur, 2014) found in Tunisia [J]. Entomology and Applied Science Letters, 2017, 4(4): 7-10.
- [104] 宋敏, 林祥明, 刘丽军. *Cry* 基因家族的专利分布研究 [J]. 生物技术通报, 2010(1): 1-8.
- [105] Madigan M, Martinko J. Brock biology of microorganisms [M]. 11th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2005, 143-195.
- [106] 高家合. 含 *cryI* 或 *cryV* 毒素蛋白基因 *Bt* 菌的鉴定及生物测定 [J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(3): 221-224.
- [107] 胡逸超, 孙建生, 李季刚, 等. 对烟草甲幼虫有毒杀作用的苏云金芽孢杆菌的分离与鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(11): 5053-5057.
- [108] Michel B, Kaelin P, Gadani F. 苏云金杆菌防治储烟害虫研究进展 [J]. 烟草科技, 2003(6): 26-30.
- [109] Höfte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* [J]. Microbiological Reviews, 1989, 53(2): 242-255.
- [110] Coelho-Bortolo T, Mangolin C A, Lapenta A S. Genetic variability in the natural populations of *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae), detected by RAPD markers and by esterase isozymes [J]. Bulletin of Entomological Research, 2016, 106(1): 47-53.
- [111] Blanc M P, Lugon-Moulin N, Panighini C, et al. Structure of worldwide populations of *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae) as revealed by amplified fragment length polymorphism profiles [J]. Bulletin of Entomological Research, 2006, 96(2): 111-116.
- [112] Noda H, Kawahara N. Electrophoretic karyotype of intracellular yeast-like symbiotes in rice planthoppers and anobiid beetles [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1995, 65(2): 118-124.
- [113] Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution [J]. Nature, 1998, 396(6709): 336-342.
- [114] 宋文静, 宋科, 董建新, 等. 铵硝混合营养对烟草苗期氮代谢酶及内源生长素的影响 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 100-104.
- [115] 严毅, 许抗抗, 杨洪, 等. 烟草甲谷胱甘肽 S-转移酶基因 *LsGSTe1* 的表达及其与甲酸乙酯耐受性的关系 [J]. 昆虫学报, 2020, 63(1): 1-10.
- [116] 许抗抗, 丁天波, 严毅, 等. CO₂ 气调胁迫下烟草甲谷胱甘肽 S-转移酶基因的表达分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2017, 43(5): 599-607.
- [117] 李灿, 李子忠. 气调胁迫下 3 种中药材储藏期害虫谷胱甘肽转移酶活性研究 [J]. 植物保护, 2009, 35(2): 91-94.
- [118] 陈春旭. 烟草甲 4 个 *clip* 丝氨酸蛋白酶基因的鉴定及生理功能分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2019: 11-45.
- [119] 杨文佳, 许抗抗, 闫欣, 等. 烟草甲几丁质脱乙酰酶 1 基因的分子特性及功能 [C]// 绿色生态可持续发展与植物保护——中国植物保护学会第十二次全国会员代表大会暨学术年会论文集, 2017: 187.
- [120] Chen X Y, Xu K K, Yan X, et al. Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase gene and its involvement in the development of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) [J]. Journal of Stored Products Research, 2018, 77: 156-165.
- [121] 朱晓晔, 丁天波, 许抗抗, 等. 烟草甲两个羧酸酯酶基因的克隆及表达模式 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2018, 57(4): 136-144.
- [122] Watanabe A, Takaku S, Yokota K, et al. A survey of *Lasioderma serricorne* (Fabricius) in Japanese dental clinics [J]. Biocontrol Science, 2019, 24(2): 117-121.

许 凤,杨秀梅,张丽芳,等. 观赏植物抗病育种研究进展[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):44-51.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.007

观赏植物抗病育种研究进展

许 凤¹,杨秀梅¹,张丽芳¹,王丽花¹,苏 艳¹,瞿素萍¹,张艺萍^{1,2}

(1. 云南省农业科学院花卉研究所/国家观赏园艺工程技术研究中心/云南省花卉育种重点实验室/云南省花卉工程技术研究中心/昆明市花卉遗传改良重点实验室,云南昆明 650205; 2. 云南云科花卉有限公司,云南昆明 650200)

摘要:在观赏植物的栽培和售后期间经常会发生各种各样的病害,类病毒和病毒、植原体、细菌、卵菌及真菌均可危害观赏植物。与化学防治的短期效应相比,抗病育种是一种可持续的作物保护方法。挖掘和增强观赏植物抗病性可以减少对其他控制策略的需求。因此,提高抗病性通常是观赏植物育种者优先考虑的因素,选育观赏形状好且抗病的品种一直都是观赏植物育种者的目标。本文综述了在观赏植物抗病育种过程中危害观赏植物的病原物生活方式和宿主特异性、观赏植物的抗病机制、抗病性测定方法、抗病育种技术等,展望了观赏植物抗病育种的方向,以期对观赏园艺植物抗病品种的选育提供理论参考。

关键词:生物测定;抗病性;植物病原物;观赏植物

中图分类号:S680.34 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0044-07

许多观赏植物作为盆栽、切花或园林植物在栽培和售后的过程中都会受到不同微生物的危害。类病毒和病毒、植原体、细菌、卵菌及真菌均可危害观赏植物。由于新出现的病害、病原物的变化及寄主范围的变化,观赏植物的病理学问题也在不断发展。新病原物数量的增加受气候变化、植物材料的国际贸易等的影响。与作物化学保护产品的短期效应相比,提高抗病性的育种是一种可持续的作物保护方法。挖掘和增强观赏植物抗病性可以减少对其他控制策略的需求。

与其他农作物相比,观赏植物的抗病育种起步较迟。其原因一是观赏植物的抗病育种受到大量观赏物种和病原物种类的多样性以及其特定的生活方式、寄主范围等的限制。二是观赏植物育种主要是一个直观的过程,而不是基于特定的选择方案。通常仅在育种后期才观察植物的抗性^[1]。三

是可用的资源在育种方案中应用得较少。低经济价值的作物和世代周期进一步限制了资源的利用。在较大的学科领域共享资源和信息,如常见的蔬菜育种,但在观赏植物中相当有限^[2]。四是观赏植物育种的局限性还包括由多倍体引起的复杂遗传学。首先涉及的常常是挖掘新特征且具有市场价值的观赏植物。育种目标通常取决于经济重要性。因此,抗病性的需求还取决于病原物的经济影响。新品种结合增强抗病性应满足所有与品质和产量相关的特性^[1]。

可以通过常规育种(包括生物测定)、应用生物技术手段或标记辅助选择及引入新的育种技术来提高观赏植物的抗病性。

1 病原物生活方式和宿主特异性

观赏植物上的病原物多样性广泛。有些病原物是高度特异性的,称为宿主特异性,而另一些病原物则有很广的寄主范围。对于育种者来说,了解特定病原物和介导宿主特异性或生活方式的因素是必不可少的,了解植物感病或抗病性的致病机制有助于培育出具有抗病性的作物。观赏植物和病害的多样性及其特定的寄主范围和生活方式使得抗病育种变得复杂。

根据病原物以植物为食的方式,可以将它们分为3类:腐生型、寄生型和半寄生型。腐生型病原物在定殖之前或期间杀死植物细胞。寄生型病原物

收稿日期:2020-07-16

基金项目:云南省科技人才和平台计划(编号:2017HB083);云南省重点新产品开发专项(编号:2016BB009);云南省国际科技合作项目(编号:2018IA049);部省合建项目(编号:2018BSHJ0108)。

作者简介:许 凤(1984—),女,云南昆明人,硕士,助理研究员,主要从事观赏园艺植物资源与育种研究。E-mail:148422486@qq.com。

通信作者:张艺萍,博士,研究员,主要从事观赏园艺植物抗病育种研究,E-mail:blackfarinj@126.com;瞿素萍,硕士,研究员,主要从事观赏园艺植物繁育与育种研究,E-mail:1035496319@qq.com。

通常是专性寄生物,没有植物就无法生长。半寄生型病原物以寄生性开始,但在后期变成腐生性的。寄生型通常是寄主特异性的,而腐生型通常具有更广泛的寄主范围,但有些是寄主特异性的^[3]。

在卵菌纲疫霉属(*Phytophthora*)中,如在桉木上的 *P. alni* 或橡树上的 *P. quercina* 就是寄主特异性的^[4]。其他疫霉属的真菌寄主范围很广:*P. ramorum* 有 100 多种寄主植物种^[5],*P. cinnamomi* 甚至可以感染数千种寄主植物^[6]。疫霉属真菌都能在许多木本观赏植物上发现,如山茶、杜鹃和莢蒾。一些疫霉菌病原物可能是腐生性的,而另一些可能是半寄生性的:有时它们的行为在其生命周期中发生变化,或者它们的行为不仅取决于其所属物种,而且还取决于其寄主植物^[7]。

真菌葡萄孢属中的植物病原物也是如此。灰霉病的病原物灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是一种腐生性真菌的教科书实例,该真菌在真双子叶植物(包括许多观赏植物种)中具有非常广泛的寄主范围^[8]。然而,有些葡萄孢属物种的寄主范围非常狭窄,包括一些观赏植物上的特异性葡萄孢,如郁金香上的 *B. tulipa*,百合上的 *B. elliptica*,唐菖蒲上的 *B. gladiolorum*,番红花上的 *B. croci*,金盏花上的 *B. calthae*,花毛茛上的 *B. ranunculi*,天竺葵上的 *B. pelargonii*,芍药上的 *B. paeoniae*,风信子上的 *B. hyacinthi*,水仙鳞茎上的 *B. narcissicola* 和水仙叶上的 *B. polyblastis*,雪莲花上的 *B. galanthina*,鸢尾上的 *B. convuluta*^[9]。葡萄孢属的进化已被 Staats 等的分子系统发育研究所证实^[10]。值得注意的是,并不是所有的葡萄孢属都是腐生性的,有些具有腐生性生活方式^[11]。

病毒、类病毒以及真菌病原物如白粉病菌和锈菌是寄生性植物病原物的示例。许多植物物种,包括观赏植物,都容易发生白粉病。尽管如此,致病菌要么是严格寄主特异性的,要么具有非常狭窄的寄主范围。如在玫瑰上,白粉病由真菌 *Podosphaera pannosa* 引起;在杜鹃花上,该病是由 *Erysiphe azalea* 引起的;在紫丁香上则是 *Microsphaera penicillata* 引起的等。锈病也是如此,菊花上的白锈病是由 *Puccinia horiana* 引起,玫瑰上的锈病是 *Phragmidium* spp. 引起的等。

像 *Xylella fastidiosa* 这样毁灭性的细菌实际上是半寄生性的。当细菌转换到腐生阶段时才会发病,而病原物在其半寄生性阶段可能很长一段时间

内不会发病^[12]。

2 观赏植物的病害控制

在园艺中可以通过集约且高度可控的栽培方法,即配备有水、肥和气候控制系统的温室来避免非生物胁迫。园艺中的生物胁迫可以成功应用化学药品来控制。然而,今天在观赏植物的保护方面显然存在不足。一方面,针对农药使用有更严格的规定,有害生物综合治理(IPM)措施的义务以及消费者对环境问题认识的提高,如关注“授粉友好型”植物上的化学残留物^[13]导致了在观赏植物贸易中对残留物有更多的规范和要求。另一方面,观赏植物市场成功的主要标准是植物的审美价值,因此,病害造成的所有损害都会降低作物的价值^[14]。因此,化学保护仍然是获得顶级产品的首选解决方案。尽管如此,让专业人员和最终用户减少农药使用的政府政策是必须的,而且消费者对于环境友好型园艺产品的认识和需求也越来越高。

与农作物相比,观赏产品的附加值更高。由于耕种面积通常很小,在观赏植物保护方面的创新受到限制。从开阔的田间苗圃到温室栽培的盆栽植物和切花,植物种类和生长系统的高度差异给必要的植物毒性测试增加了困难。因此,农作物保护产品的生产者很少去申请专门应用于观赏植物的产品注册。为了克服这些问题,一些国家允许第三方(官方机构、科学机构或咨询机构)获得次要作物的授权。

2.1 抗病机制

植物病原物的攻击会触发植物的免疫反应。Jones 等的拉链模型是植物对病原物侵袭反应最广泛接受的解释^[14-15]。在第一阶段,病原物相关分子模式(plant pathogen-associated molecular patterns,简称 PAMP)通过植物模式识别受体(pattern recognition receptors,简称 PRR)识别病原物的保守结构。保守结构的 1 个例子是几乎所有鞭毛细菌中都存在细菌鞭毛蛋白。对保守结构的这种认识导致了第 1 步防御反应的激活:植物免疫反应(pattern-triggered immunity,简称 PTI),通常可以成功地抵御病原物。PTI 反应包括胼质沉积、细胞壁变化以及防御相关蛋白和植保素的积累^[16]。一些病原物分泌出毒性因子,从而抑制 PTI 导致植物产生效应因子激活的感病性(effector-triggered susceptibility,简称 ETS)。该阶段的植物反应是程序性细胞死亡

(programmed cell death, 简称 PCD) 和过敏反应 (hyper-sensitivity responses, 简称 HR), 这些都是基于效应因子激活的感病性 (ETI)。已知这些机制对 (半) 寄生型致病菌最有效^[15]。当受到昆虫和腐生性病原物的攻击后, 激发了基于损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, 简称 DAMP) 的机理。这种类型的损伤会导致各种宿主防御反应, 类似于 PAMP 三角反应^[17]。

由 ETI 和 PTI 诱导的信号传导途径的下游, 涉及 3 种植物胁迫激素: 水杨酸 (SA)、茉莉酸 (JA)、乙烯 (ET) 是对生物胁迫反应后诱导的胁迫激素。当对寄生性和半寄生性病原物产生抗性时, 会开启 SA 途径。腐生性病原物和虫害会刺激 JA 和 ET 途径。植物防御信号传导途径也涉及其他激素如脱落酸 (ABA)、生长素、赤霉素 (GA)、细胞分裂素 (CTK)、油菜素内酯 (BR) 和肽激素^[18]。对防御网络激素调节的更多了解可能会为抗病育种开辟新的前景。育种者对植物免疫反应的激活很感兴趣。通过应用特定激发子或植物激活剂上调抗病性的植物基因型在抗病性方面具有优势。触发免疫反应将导致病程相关蛋白质的形成、细胞壁增强、激素调节的变化等^[3]。

植物与病原物之间的某些特定相互作用已得到充分研究, 并改良了作物的抗病性。在农作物中, 抗病基因 (*R* 基因) 和与抗病相关的不同 *R* 基因或数量性状基因座 (QTL) 组合的品种应用得到了发展。聚合 *R* 基因和 QTL 被认为是抗性育种的一种较好策略^[19]。然而, 在观赏植物育种中, 这些应用尚不发达。另一种方法是基于病原物与宿主之间兼容性的丧失。根据 *S* 基因的原理, 抗性本身不是渗入的, 而是感病性的丧失。这种基于 *S* 基因失活的抗性被认为更广谱和更持久, 因此具有非常好的育种潜力^[20]。根据感染的阶段, 可以识别出 3 类 *S* 基因: 早期病原物侵入, 宿主防御调节和病原物在宿主中继续侵染^[21]。基于 *S* 基因的抗病性教科书示例是在大麦中发现的霉病位点抗性基因 *O* (*MLO*)^[22]。在发现大麦的广谱白粉病抗性是基于 *mlo* 基因功能丧失后, 还在拟南芥、番茄和豌豆等其他植物中研究了该基因与白粉病之间的关系。功能丧失的隐性等位基因 (*mlo*) 可以介导对白粉病的广谱抗性, 并在育种方面很有前途^[21]。许多观赏植物容易感染白粉病。因此, *mlo* 功能丧失可为观赏植物抗白粉病的研究提供新思路。第 1 次的尝试是

在月季中, 已从 1 种大型月季的 EST 序列中分离出 4 个 *MLO* 同源基因并进行了鉴定^[23]。

植物病原物, 特别是细菌中的基因组测序使得对病原物的多样性和进化以及细菌生活方式和致病性有了更深入的了解^[24]。现在, 植物病原物正受到大规模遗传方法的影响; 突变体的收集用于提供基于功能的毒性基因信息。将来, 无论在病害管理策略中, 还是在宿主抗性育种中, 病原效应物的鉴定将变得越来越重要^[25]。

2.2 抗病育种

2.2.1 常规抗病育种

在观赏植物中, 关于抗病育种的例子很少。因此, 在某些情况下, 化学农药无法再维持作物正常生长, 就需要其他的解决方案。病害的经济影响与对抗病的迫切需要有关。如由 *Calonectria* spp. 引起黄杨木的巨大损失之后, 启动育种计划的唯一原因就是提高抗病性^[26]。

抗病育种中应用的方法取决于作物和病原物的类型。循环选择是一种常规方法, 旨在进行反复的选择, 可以通过连续选择如聚合抗性基因来实施, 经过几代后就会增加不同的特征。另一种方法是对每个特征 (包括抗病性) 应用独立的淘汰标准。这样, 只有在每种性状 (包括抗病性) 的阈值水平以上的植株才能保留。在指标选择方面, 对基因型的综合表现进行了评价。一个基因型表现优异的性状被认为是对表现较差的性状的补偿。根据抗病性在选择中作为不同性状组合的价值, 抗病性可以在几代间得到改善。然而, 抗病育种可能会产生副作用, 如在抗病和作物产量之间进行权衡的适应度成本。病原菌的重要性及其流行和危害界定了特定农作物抗病性状的重要性。

在观赏植物中, 不经常报道 (再) 利用野生远缘种和种间杂交来定向引入抗病性。如在几个月季种中发现了对几种病害的抗性。但是到目前为止, 野生种质的利用仅应用于庭园月季, 在庭园月季中, 月季类型和倍性水平会发生很大变化, 并且由于种植者和消费者的需求, 抗病性已经作为优先考虑的性状。在切花月季中, 狭窄的遗传背景、对不同世代回交的需要以及四倍体是在育种中引入较好抗性月季种的一个障碍。在袋鼠爪 (*Anigozanthos* spp.) 中, 种间杂交正是用于培育抗病品种, 主要是抗由 *Puccinia haemodori* 引起的锈病和由 *Alternaria anigozanthi* 引起的墨斑病^[27]。在其他情况下, 抗病性是种间杂交的副效应。在绣球花育种中已经看

到了这一点。*Hydrangea angustifolia* 种与商业上重要的种 *H. macrophylla* 杂交后产生的杂种对白粉病具有更好的抗性,这就是以导入其他更理想的性状为主要育种目标的一种副效应^[28]。

常规抗病育种需要有效的筛选技术来选择最佳的父母本和优良的后代。因此,表型鉴定是筛选植物抗病性的基础。在过去的 10 年中,通过传感器开发和高性能计算的技术进步,在基于高通量表型分析方法的开发方面取得了巨大的进步^[29]。同样,观赏植物育种尚未利用高通量表型技术。

选择的筛选方法和生物测定需要病理学方面的知识,特别是病原菌群体内的变异可以抵消有效的筛选。因此,测试方法必须可控且可重复,并应在对病原物种群内多样性的抗性方面反映植物的性能。

寄主、病原物和环境之间的相互作用通常很复杂,可能使植物的抗病性评估变得复杂甚至抵消抗病性。在实践中,经常观察到生物测定的可重复性受环境变化或其他(非)生物胁迫的影响。测试可以在实验室和生长室中进行,也可以在正常的生长条件下甚至在组织培养中进行^[30]。实验室测试可提供更好的标准化和更好的受控环境。它们通常在离体的叶片或叶盘上进行,如对天竺葵属(*Pelargonium* spp.) 的葡萄孢菌(*Botrytis*) 具有抗性^[30]。组织培养中的再生可用作选择机制:例子包括耐镰刀菌的康乃馨^[31]和百合^[32]的筛选。组织培养测试是在添加了尖孢镰刀菌培养滤液的培养基上进行的。在尖孢镰刀菌滤液存在的情况下,两种作物的再生植株中都筛选到了对病原物抗性明显提高的植株。

2.2.2 生物技术在抗病育种中的应用 分子标记辅助选择(MAS)和与抗病性连锁的 QTL 已开发用于许多农作物和病原物。MAS 在植物育种中的应用在以下方面值得关注:(1)难以表型表达成本高或周期长的性状;(2)取决于发育阶段或特定环境的性状;(3)回交选择隐性等位基因;(4)聚合基因^[33]。总的来说,MAS 在育种计划中的应用落后于预期。主要问题是复杂的性状、与表型选择相比的成本效率、用于 QTL 定位的高通量精确表型、有用的计算工具及与环境相互作用的基因型和上位性。因此,在许多农作物中,不能将 QTL 验证为有用的 MAS^[34]。在观赏植物中,提高抗病性的分子标记仅在有限的程度上应用。Arens 等综述了观赏植

物的研究进展^[2],主要列举了郁金香对 3 种病害的抗性即尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、郁金香碎裂病毒、灰霉菌(*Botrytis tulipae*)及 SNP 标记的应用。同样在多倍体中,已经开发了应用于抗病性的标记,如在月季中已经开发出抗月季不同病原物的抗性标记和 QTL^[35-36],但在月季育种实践中并不常用。Debener 等综述了不同的新技术,如下一代测序(NGS)方法和靶向突变方法,用于检测、分析和利用月季中的防御基因^[37]。

受不同基因影响的复杂性状对于传统的 MAS 来说太困难了。但是现在基因组选择使用所有的标记数据进行性能预测,从而获得更准确的预测。系统方法将改进和廉价的“基因组”技术与高通量表型相结合。这种方法将有助于研究植物和病原物代谢组的相互作用和相互作用中的生理学,并将这些数据与环境变化关联起来。这些将最终改善病害管理策略^[38]。这里的挑战是要将实验室知识转化为田间条件并应用于商业育种。越来越多的测序基因组可供使用,包括几种观赏植物,如蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)^[39]。

基因改良(GM)已发现可用于抗病育种:值得注意的是,北美已批准的转基因田间试验总数中约有 10%旨在提高抗病性。这个比例已经保持 15 年不变^[39]。在某些地方,法律的限制也阻碍了转基因方法在观赏植物上的应用。尽管法律上有严格的限制,但仍有许多文献介绍了有关观赏植物的基因转化,其中大多数适用于切花。与许多其他技术相反,大量的基因工程研究应用于改良许多不同观赏植物的抗病性。最近发表的 2 篇有关切花的基因工程^[40]和普通观赏植物的基因工程^[41]的综述,其中包括抗病性的遗传转化工作。许多观赏植物中组织培养方案的可用性可能解释了其在遗传转化研究中的受欢迎程度。迄今为止,尚无抗病性提高的转基因观赏植物商品化生产。

遗传改良中最流行的观赏植物是菊花,也是其对病害的抗性。在菊花中,基于 hpaGXoo 基因和木梅 *Prunus mumei* 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(polygalacturonase - inhibiting protein,简称 PGIP)基因^[42-43]的过表达可获得对 *Alternaria tenuissima* 的抗病性。通过将水稻几丁质酶基因(*CHI - II*)整合到 CMV(cucumber mosaic virus)的外壳蛋白(cp)基因中^[44]可获得对由针壳孢属(*Septoria*)引起的叶斑病的抗性,通过核衣壳基因整合可获得番茄斑萎病

毒(TSWV)的抗性^[45],基于水稻几丁质酶^[46]和 *N*-甲基转移酶基因(*CaXMT1*, *CaMXMT1* 和 *CaDXMT1*)可获得灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的抗性^[47]。

在月季中,转基因方法已用于改良抗病性,但所有方法仅导致水平抗性增加。通过引入不同的基因可增加黑斑病抗性^[48-50]。据报道,在引入抗菌蛋白 AceAMP1^[51]和几丁质酶基因^[52]后,白粉病抗性增强。

在非洲菊中,通过导入 *NP* 基因(核蛋白基因)获得了抗 TSWV 的植株^[53]。在一品红中,病毒衍生的发夹 RNA 结构获得了对一品红花叶病毒(*poinsettia mosaic virus*, 简称 PnMV)的抗性^[54]。在唐菖蒲中,应用转基因方法引入了对大豆黄化花叶病毒(BYMV)和 CMV 的抗性。由于对 BYMV 的抗性不稳定,因此结果各不相同^[55]。对 CMV 的抗性取决于病毒亚组对植物的侵染力^[56-58]。Kamo 等还介绍了唐菖蒲对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗性^[59-60]。

在百合中,通过水稻几丁质酶 10(*RCH10*)基因过表达开发了对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)抗性增强的转基因植株^[61]。通过应用有缺陷的 CMV 复制酶基因来改良百合对 CMV 的抗性^[42]。Vieira 等通过 *OeIΔD86* 的过表达获得了对根结线虫(*Pratylenchus penetrans*)的抗性植株^[62]。

在蝴蝶兰中,通过 CymMV 外壳蛋白(*CP*)基因渗入获得了对大花蕙兰花叶病毒(*Cymbidium mosaic virus*, 简称 CymMV)的抗性^[63]。将具有 CymMV *CP* 的蝴蝶兰植株用甜椒铁氧还蛋白的 cDNA 重新转化,可获得兼具病毒抗性和对胡萝卜杆菌(*Pectobacterium carotovora*)的抗性^[64]。

新的育种技术(NBT)在研究和应用育种方面都有很高的期望。应用 NBT 提高抗病性受到越来越多的关注:这些技术包括锌指核酸内切酶,类似转录激活子的效应核酸酶(TALENs)和 CRISPR/Cas9 技术。CRISPR/Cas9 等基因组编辑技术目前获得了最多的关注。CRISPR/Cas9 的作用方式是基因的失活、改变或插入,与其他技术相比,其精度要高得多。像转基因技术一样,政府现在必须决定是否将使用这种技术产生的栽培品种投放市场。NBT 在提高抗病性方面的应用潜力与对植物-病原物互作的了解取得了巨大进展有关,但是这种知识仍主要应用于实验室和生长室测试的模型系统中,而

对于不同作物和病原物组合的病原物效应知之甚少。因此,用于病害控制的模式触发和效应触发免疫(PTI 和 ETI)的调节是新兴的研究领域之一。观赏植物遗传转化方面的大量经验推动了人们对应用 NBT 的期望,尤其是由于预期的法律限制较少。Xiong 等回顾了基因组编辑技术在园艺作物育种(包括观赏植物)中的潜力^[65]。*MLO* 基因的应用引起了人们的关注;一个有前景的例子是通过禁用 *MLO* 基因获得抗白粉病植株的可能^[66]。

3 展望

使用抗性品种是控制植物病原物最有效、最持久的方法。简便而适当的筛选方法有助于创建更多的抗病性观赏植物。不同观赏植物育种者分享的经验表明,生物测定法是普遍使用的方法,对于某些作物,它是筛选和选择的重要工具之一。这些测试的可重复性和有效性至关重要,但是,对于某些植物-病原物组合而言,可能会出现一些问题。在许多观赏植物中,通过育种提高了抗病性。这些成功的例子将有助于在其他观赏植物上开发类似的计划,并有望激发育种者对在其他作物的其他病害上培育抗病品种的热情。

如与其他 IPM 手段结合应用时,抗病性的小幅提高可能对种植者产生积极影响。较慢或较少程度的病害发展可能增加与其他病原物竞争所采取措施的成功率。

在观赏植物中,可以获得大量关于生物技术方法特别是遗传转化方面的文献。抗病分子标记已经在某些观赏植物上开发。通常与分子方法相比,对植物性状的筛选成本更高。

基于高通量测序的新进展已用于其他农作物。现在这些应用为观赏植物育种铺平了道路,但仍需要更多关于植物-病原物相互作用的知识来研发每种植物上的病原物。植物种类的广泛差异,阻碍了观赏植物抗病育种的发展。然而,对模式植物和重要经济作物的基本了解和可用的一般知识都越来越多,同时正在开发具有较好抗性的新技术。新的育种技术可能会在没有法律限制的情况下取代遗传转化,但是在将这些技术应用于观赏植物之前,仍有许多工作要做。

最后,成本效益将决定特定观赏植物对病原物抗病性的重要性。可以预期,减少农药使用的立法只会增加种植者和消费者对抗病植物的需求,并将

迫使育种者致力于抗病性的研究和开发。

参考文献:

- [1] Debener T. Current strategies and future prospects of resistance breeding in ornamentals [J]. *Acta Horticulture*, 2009, 836: 125 – 130.
- [2] Arens P, Bijman P, Tang N, et al. Mapping of disease resistance in ornamentals; a long haul [J]. *Acta Horticulture*, 2012, 953: 231 – 237.
- [3] Hofte M. Basal and induced disease resistance mechanisms in ornamentals [J]. *Acta Horticulture*, 2015, 1087: 473 – 478.
- [4] Jung T, Cooke D, Blaschke H, et al. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks [J]. *Mycological Research*, 1999, 103(7): 785 – 798.
- [5] Grünwald N J, Garbelotto M, Goss E M, et al. Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* [J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(3): 131 – 138.
- [6] Hardham A R. *Phytophthora cinnamomi* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(6): 589 – 604.
- [7] Fawke S, Doumane M, Schornack S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 263 – 280.
- [8] Jarvis W R. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity [M]. 15th ed. Ottawa: Canadian Department of Agriculture, 1977.
- [9] Hennebert G L. *Botrytis* and *Botrytis* - like genera [J]. *Persoonia*, 1973, 7: 183 – 204.
- [10] Staats M, van Baarlen P, van Kan J A L. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2004, 22: 333 – 346.
- [11] van Kan J A L, Shaw M W, Grant - Downton R T. *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15: 957 – 961.
- [12] Armijo G, Schlechter R, Agurto M, et al. Grapevine pathogenic microorganisms; understanding infection strategies and host response scenarios [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 382.
- [13] Lentola A, David A, Abdul - Sada A, et al. Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 228: 297 – 304.
- [14] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323 – 329.
- [15] Oßwald W, Fleischmann F, Rigling D, et al. Strategies of attack and defence in woody plant - *Phytophthora* interactions [J]. *Forest Pathology*, 2014, 44(3): 169 – 190.
- [16] Galletti R, de Lorenzo G, Ferrari S. Host - derived signals activate plant innate immunity [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(1): 33 – 34.
- [17] Bari R, Jones J D. Role of plant hormones in plant defence responses [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(4): 473 – 488.
- [18] Pilet - Navel M L, Moury B, Caffier V, et al. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1838.
- [19] Pavan S, Jacobsen E, Visser R G, et al. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad - spectrum resistance [J]. *Molecular Breeding*, 2010, 25(1): 1 – 12.
- [20] van Schie C C N, Takken F L W. Susceptibility genes 101: how to be a good host [J]. *Annual Review Phytopathology*, 2014, 52: 551 – 581.
- [21] Jorgensen I H. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley [J]. *Euphytica*, 1992, 63(1): 141 – 152.
- [22] Kaufmann H, Qiu X, Wehmeyer J, et al. Isolation, molecular characterization, and mapping of four rose *MLO* orthologs [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 244.
- [23] Arnold D L, Jackson R W. Bacterial genomes: evolution of pathogenicity [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 385 – 391.
- [24] Motaung T E, Saitoh H, Tsilo T J. Large - scale molecular genetic analysis in plant - pathogenic fungi: a decade of genome - wide functional analysis [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(5): 754 – 764.
- [25] van Laere K, Hermans D, Leus L, et al. Interspecific hybridisation within *Buxus* spp. [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 185: 139 – 144.
- [26] Grown D J. Phenotypic recurrent selection for disease tolerance in *Anigozanthos* spp. L [J]. *Acta Horticulture*, 2009, 1097: 101 – 106.
- [27] Kardos J H, Robacker C D, Dirr M A, et al. Production and verification of *Hydrangea macrophylla* × *H. angustipetala* hybrids [J]. *Hortscience*, 2009, 44: 1534 – 1537.
- [28] Shakoor N, Lee S, Mockler T C. High throughput phenotyping to accelerate crop breeding and monitoring of diseases in the field [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 38: 184 – 192.
- [29] van den Bulk R W. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding [J]. *Euphytica*, 1991, 56: 269 – 285.
- [30] Uchneat M S, Zhigilei A, Craig R. Differential response to foliar infection with *Botrytis cinerea* within the genus *Pelargonium* [J]. *Journal of America Society Horticulture Sciences*, 1999, 124: 76 – 80.
- [31] Thakur M, Sharma D, Sharma S. In vitro selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* [J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20(9): 825 – 828.
- [32] Zhang Y P, Jiang S, Qu S P, et al. In vitro selection for *Fusarium* resistant oriental lily mutants using culture filtrate of the fungal agent [J]. *Acta Horticulture*, 2014, 1027: 205 – 212.
- [33] Xu Y, Crouch J H. Marker - assisted selection in plant breeding: from publication to practice [J]. *Crop Sciences*, 2008, 48: 391 – 407.
- [34] Ortega F, Lopez - Vizcon C. Application of molecular marker -

- assisted selection (MAS) for disease resistance in a practical potato breeding programme[J]. *Potato Res*, 2012, 55: 1 – 13.
- [35] Neale D B, Kremer A. Forest tree genomics: growing resources and applications[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12 (2): 111 – 122.
- [36] Koning – Boucoiran C F, Gitonga V W, Yan Z, et al. The mode of inheritance in tetraploid cut roses [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125 (3): 591 – 607.
- [37] Debener T, Byrne D H. Disease resistance breeding in rose: current status and potential of biotechnological tools [J]. *Plant Science*, 2014, 228: 107 – 117.
- [38] 欧阳迪莎. 可持续农业中的植物病害管理[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [39] Cai J, Liu X, Vanneste K, et al. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris* [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47 (1): 65 – 72.
- [40] Collinge D B, Jørgensen H J, Lund O S, et al. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2010, 48: 269 – 291.
- [41] Sharma R, Messar Y. Transgenics in ornamental crops: creating novelties in economically important cut flowers [J]. *Current Sciences*, 2017, 113: 43 – 52.
- [42] Azadi P, Otang N V, Supaporn H, et al. Increased resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in *Lilium* transformed with a defective CMV replicase gene [J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33 (6): 1249 – 1255.
- [43] Xu G J, Chen S M, Chen F D. Transgenic chrysanthemum plants expressing a harpinXoo gene demonstrate induced resistance to alternaria leaf spot and accelerated development [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, 57 (4): 548 – 553.
- [44] Xu G, Liu Y, Chen S, et al. Potential structural and biochemical mechanisms of compositae wild species resistance to *Alternaria tenuissima* [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, 58 (3): 491 – 497.
- [45] Sen S, Kumar S, Ghani M, et al. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with rice chitinase gene for improved resistance against *Septoria obesa* [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2013, 12 (1): 1 – 10.
- [46] Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, et al. Transgenic chrysanthemum [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 1999, 82 (1): 113 – 123.
- [47] Sherman J M, Moyer J W, Daub M E. Tomato spotted wilt virus resistance in chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid gene [J]. *Plant Disease*, 1998, 82 (4): 407 – 414.
- [48] Kim Y S, Lim S, Yoda H, et al. Simultaneous activation of salicylate production and fungal resistance in transgenic *Chrysanthemum* producing caffeine [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2011, 6 (3): 409 – 412.
- [49] Marchant R, Davey M R, Lucas J A, et al. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf) [J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4 (3): 187 – 194.
- [50] Dohm A, Ludwig C, Schilling D, et al. Transformation of roses with genes for antifungal proteins [J]. *Acta Horticulture*, 2001, 547: 27 – 33.
- [51] Dohm A, Ludwig C, Schilling D, et al. Transformation of roses with genes for antifungal proteins to reduce their susceptibility to fungal diseases [J]. *Acta Horticulture*, 2002, 572: 105 – 111.
- [52] Li X, Gasic K, Cammue B, et al. Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace – AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*) [J]. *Planta*, 2003, 218 (2): 226 – 232.
- [53] Pourhosseini L, Kermani M J, Habashi A A, et al. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis in different genotypes of *Rosa* hybrid [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2013, 112: 101 – 108.
- [54] Korbin M. Assessment of gerbera plants genetically modified with TSWV nucleocapsid gene [J]. *J Fruit Ornament Plant Res*, 2006, 14: 85 – 93.
- [55] Clarke J L, Spetz C, Haugli S, et al. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, with virus – derived hairpin RNA constructs confers resistance to *Poinsettia* mosaic virus [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27 (6): 1027 – 1038.
- [56] Kamo K, Gera A, Cohen J, et al. Transgenic gladiolus plants transformed with the bean yellow mosaic virus coat – protein gene in either sense or antisense orientation [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23 (9): 654 – 663.
- [57] Kamo K, Jordan R, Guaragna M A, et al. Resistance to cucumber mosaic virus in gladiolus plants transformed with either a defective replicase or coat protein subgroup II gene from cucumber mosaic virus [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29 (7): 695 – 704.
- [58] Kamo K, Aebig J, Guaragna M A, et al. Gladiolus plants transformed with single – chain variable fragment antibodies to cucumber mosaic virus [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2012, 110 (1): 13 – 21.
- [59] Kamo K, Lakshman D, Baughan G, et al. Expression of a synthetic antimicrobial peptide, D4E1, in gladiolus plants for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 121 (2): 459 – 467.
- [60] Kamo K, Lakshman D, Pandey R, et al. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* in transgenic gladiolus plants expressing either a bacterial chloroperoxidase or fungal chitinase genes [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, 124 (3): 541 – 553.
- [61] de Caceres Gonzalez F F N, Davey M R, Sanchez E C, et al. Conferred resistance to *Botrytis cinerea* in *Lilium* by overexpression of the *RCH10* chitinase gene [J]. *Plant Cell Report*, 2015, 34: 1201 – 1209.
- [62] Vieira P, Wantoch S, Lilley C J, et al. Expression of a cystatin transgene can confer resistance to root lesion nematodes in *Lilium longiflorum* cv. ‘Nellie White’ [J]. *Transgenic Research*, 2015, 24

耿宁宁,戴竹青,牛丽影,等. 膳食纤维调节肠道微生物对机体健康的影响研究进展[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):51-56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.008

膳食纤维调节肠道微生物对机体健康的影响研究进展

耿宁宁^{1,2},戴竹青²,牛丽影²,刘春菊²,吴刚³,宋江峰^{1,2}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014;
3. 江苏嘉安食品有限公司,江苏南通 226363)

摘要:膳食纤维具有独特的理化性质和广泛功能特性,膳食纤维及其发酵产物短链脂肪酸(short chain fatty acids, 简称 SAFCs)可选择性地改变肠道微生物的组成,进而起到预防糖尿病、降低血糖血压、控制体质量、提高免疫力、降低炎症因子表达水平和患心脑血管疾病风险的作用效果。在查阅大量文献的基础上对膳食纤维的分类、理化性质、功能特性以及影响机体健康的机制进行了综述并对未来的研究进行展望。

关键词:膳食纤维;肠道微生物;短链脂肪酸;机体健康;糖尿病;心血管疾病

中图分类号: TS201.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0051-06

近些年,人们的饮食习惯发生了很大变化,高度加工的面粉、大米及高热量、高脂肪和高胆固醇动物性食物的摄入引起一系列的代谢性疾病发病率急剧升高,饮食健康成为人们关注的焦点。由于富含膳食纤维的食品可以降低代谢性疾病的发生率,因此成为研究的热点^[1-2]。膳食纤维主要通过改变胃肠道内容物的性质以及其他营养、化学物质的吸收方式发挥作用^[3]。再者,肠道中存在以细菌为主,包括病毒、原生动物、古细菌、真菌等十分丰富的微生物群,其中拟杆菌属和硬毛菌属的含量占据肠道微生物的90%以上^[4]。膳食纤维可经肠道微生物发酵产生一系列的短链脂肪酸(short chain fatty acid, 简称 SAFCs)、乳酸和氢气、二氧化碳甲烷等气体,SAFCs在肠道中能够调节肠道微生物的组

成和比例,从而有利于机体健康^[5]。随着现代生物技术手段的发展,肠道微生物与一系列慢性代谢疾病的关系也引起了人们的注意^[6],研究肠道微生物与机体健康之间的关系变得愈发重要,本文主要从膳食纤维在肠道微生物的作用下引起微生物群、机体代谢以及内分泌的变化最终影响机体健康等方面进行综述,以期对膳食纤维和肠道微生物的进一步研究提供参考。

1 膳食纤维的分类及理化性质

2008年,国际食品法典委员会定义膳食纤维为由多个单体单元构成的不会被人小肠中的内源酶水解的碳水化合物聚合物^[7]。包括非淀粉多糖(纤维素、半纤维素、果胶、树胶、黏液、 β -葡聚糖)、抗性低聚糖类(菊粉、低聚果糖、半乳低聚糖)、抗性淀粉、木质素等^[8]。

膳食纤维的分类方法有很多种。一般根据膳食纤维是否溶于水为可溶性膳食纤维(soluble dietary fiber, 简称 SDF)和不溶性膳食纤维(insoluble dietary fiber, 简称 IDF),SDF包括果胶、 β -葡聚糖、树胶和一些半纤维素,而IDF主要由细胞壁成分组

收稿日期:2020-08-03

基金项目:江苏省重点研发计划(现代农业)项目(编号:BE2019324)。

作者简介:耿宁宁(1996—),女,河南许昌人,硕士研究生,主要从事果蔬加工研究。E-mail:1584940455@qq.com。

通信作者:宋江峰,博士,副研究员,湖北随州人,主要从事果蔬加工与品质功能调控研究。E-mail:songjiangfeng102@163.com。

(3):421-432.

[63] Liao L J, Pan I C, Chan Y L, et al. Transgene silencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of cymbidium mosaic virus is a manifestation of RNA-mediated resistance [J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13(3): 229-242.

[64] Chan Y L, Lin K H, Sanjaya, et al. Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack [J]. *Transgenic*

Research, 2005, 14(3): 279-288.

[65] Xiong J S, Ding J, Li Y. Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding [J]. *Horticulture research*, 2015, 2(1): 1-10.

[66] Rispaal N, Rubiales D. Genome-wide identification and comparison of legume MLO gene family [J]. *Scientific reports*, 2016, 6(1): 1-12.

成,包括木质素、纤维素和一些半纤维素^[9]。SDF 在肠道中可以形成黏性凝胶,经肠道微生物发酵后产生 SAFCs 等物质,而 IDF 可以增加肠道内容物的持水力,增大粪便体积,减缓胃排空等^[10]。根据来源可分为植物膳食纤维和动物膳食纤维,植物膳食纤维又可分为谷物膳食纤维和果蔬膳食纤维。人体摄入的膳食纤维以谷物膳食纤维为主,占总量的 50%,其次是蔬菜膳食纤维,占总量的 30%~40%,16%左右来源于水果^[11]。不同来源的膳食纤维中 SDF 和 IDF 的比例不同,如柑橘类果皮的 IDF 含量为 48.5%~50.3%,而 SDF 含量为 12.9%~14.1%^[12]。当 SDF 含量占总膳食纤维含量比例为 30%~50%时,具有最佳的调节肠道生理和降低胆固醇效应^[13]。

膳食纤维的理化特性包括溶解性、黏性、粒径、吸附性和持水性等,主要与膳食纤维的分子量和结构有关。高度晶体化的膳食纤维通常难溶于水,而结构不规则的膳食纤维更易溶于水,膳食纤维中基团的电荷含量也会影响其溶解性^[14]。膳食纤维的黏度受分子量、化学成分、持水量、粒径、溶液的温度、加工时间等条件以及 pH 值等^[15]因素的影响,粒径越小,膳食纤维黏度越大,膳食纤维黏度的增加会使肠道内容物黏度增大,有利于阻止肠道上皮细胞对营养物的吸收^[16]。

膳食纤维的生理特性包括降血压、预防心脏病、预防中风、控制体质量、减缓胃肠道疾病、改善血脂水平、控制餐后血糖、提高免疫力等。尽管膳食纤维在增大粪便体积,降低餐后血糖指数和维持正常血液胆固醇水平的功能已被广泛接受,但增强免疫力、抗癌等一系列有益功能还有待考证^[10]。另外,膳食纤维的摄入还可以增加人体对维生素 A、维生素 B1、维生素 C、维生素 E 以及钙、铁、锌、钾、锰、铜等矿物质的吸收^[17],而且可以吸附胆汁,阻止其转变为次生胆汁,加快胆固醇的消耗^[8]。

2 膳食纤维对肠道的调节作用

膳食纤维对肠道的影响体现在多方面,包括调节食欲、为结肠上皮细胞提供能量、促进肠道黏膜的产生、刺激肠蠕动和增强消化功能等。膳食纤维在厌氧条件下被结肠中的微生物发酵产生乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和异戊酸等 SAFCs^[18]。不同种类膳食纤维发酵产生的 SAFCs 有所不同,如果胶和木聚糖通常被发酵成乙酸盐,阿拉伯半乳糖被发酵成乙

酸盐和丙酸盐,丁酸盐由淀粉发酵而来^[19]。膳食纤维的摄入通常会使小肠、盲肠、结肠等消化器官的大小和长度发生改变,与肠道上皮形态有关,最终会影响肠道消化和水解功能^[20]。肠道作为消化系统的主要组成部分,须要承担管腔内存在的巨大微生物负荷,并且还要预防感染和防止有害物质通过淋巴和血液系统传递到身体其他部位,维持上皮层的完整性对确保将肠腔中的内容物与淋巴和血液系统区分开至关重要^[21]。

黏膜屏障是肠道主要防御机制之一,起到保护肠道上皮抵抗化学和生物危害的屏障作用。膳食纤维能够增加组成肠道黏膜的黏蛋白向腔内释放并为大肠中益生菌的生长和繁殖提供更多底物,试验结果表明,摄入膳食纤维后黏蛋白种类比例发生了变化^[22]。多项试验结果表明,包含大量可溶性和不溶性膳食纤维的饮食可增加黏液层对结肠的保护作用^[8]。可发酵膳食纤维形成的 SCFAs 对上皮黏膜的完整性产生积极影响^[21]。人类干预研究表明,补充抗性淀粉(23 g/d)或聚右旋糖(12 g/d)50 d 会导致直肠黏膜信号通路的改变,这可能与结肠癌发生有关^[23]。

肠道上皮是黏膜外的另一层屏障。位于隐窝底部的干细胞经常分裂产生大量的转运扩增细胞,这些细胞会不断地向腔表面上皮移近,从而更好地分化为吸收性细胞、肠内分泌细胞、杯状细胞、簇状细胞和特定部位的 M 细胞等不同类型的细胞,所有分化的细胞都在大肠上皮的屏障功能中发挥重要作用^[24]。膳食纤维在肠道中发酵产生丁酸酯对肠道上皮有积极的作用,首先它是上皮细胞的首选底物,其次能通过降低肠道上皮中局部氧诱导因子的浓度改善肠道屏障^[25]。

3 膳食纤维调节肠道微生物对机体健康的影响

3.1 糖尿病

α 细胞功能异常,胰高血糖素的分泌不会被胰岛素抑制或 β 细胞功能不全导致胰岛素的生成和分泌受损都会引起二型糖尿病(type 2 diabetes,简称 T2D),但机体抗胰岛素是 T2D 主要发病因素^[26]。此外,T2D 还伴随着肠道微生物群在机体内的比例的变化。研究表明,对 T2D 患者进行微生物群落测定,发现其共同特征为缺乏生产丁酸盐的肠道菌种包括梭状芽胞杆菌、直肠细菌、小肠玫瑰菌、肠内营养菌和玫瑰糖原菌,但硫酸盐还原菌、脱硫弧菌、加

氏乳杆菌、罗伊氏乳杆菌和植物乳酸杆菌数量增加^[27]。

膳食纤维可通过阻止机体对营养物质的吸收或经肠道微生物发酵产生的 SAFCs 进而对 T2D 预防和血糖控制产生一定的作用。对 T2D 的队列试验结果表明,谷物膳食纤维摄入量与患 T2D 的风险有关,当饮食中存在含量较高的能够被机体快速吸收的碳水化合物或含有较低谷物膳食纤维时会增加机体患 T2D 的风险^[28],另有试验发现谷物纤维对预防 T2D 的能力比水果等来源的膳食纤维更高^[29],这说明谷物纤维降低 T2D 风险的机制与其对血糖的影响几乎没有关系^[30]。由此推测,谷物膳食纤维对 T2D 的影响可能与其自身的性质有关。

膳食纤维发酵产生 SAFCs 主要通过结肠上皮细胞上的受体对其他器官进行调节起到控制血糖作用。SCFAs 通过 G 蛋白偶联受体 41(G protein-coupled receptors,简称 GPCR41)或 G 蛋白偶联受体 43(G protein-coupled receptors,简称 GPCR43)调节胰腺 β 细胞的增殖和胰岛素的生物合成;通过血液运输到各个器官,作为氧化、脂质合成和能量代谢的底物;在肝细胞促进糖异生。肠内分泌细胞上的 GPCR41 被激活刺激肠道激素肽的分泌,减少能量摄入^[31]。

当 GPCR43 受到 SCFAs 刺激后,会触发肠降血糖素激素胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1,简称 GLP-1)的产生,从而降低胃排空率,增加外周葡萄糖清除率并改善胰岛素分泌^[32]。GLP-1 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(glucose-dependent insulintropic polypeptide,简称 GIP)通过平衡胰岛素和葡萄糖的分泌来维持葡萄糖的稳态。SCFAs 可通过激活游离脂肪酸受体 2(recombinant free fatty acid receptor 2,简称 FFAR2)来诱导 GLP-1 和胰岛淀粉样多肽的分泌。GLP-1 受体通过诱导胰岛素分泌并抑制胰高血糖素分泌来调节胰腺激素的分泌^[33]。

回肠和结肠末端产生 GLP-1 的 L 细胞上有大量的 SCFAs 受体,因此,肠道中的 SCFAs 可通过 FFAR2 促进 L 细胞产生 GLP-1。在这个过程中起作用的主要是 SAFCs 中的丁酸类。首先丁酸酯通过上调负责 GLP-1 合成和分泌的基因来增强 GLP-1 的分泌,促进 GLP-1 活性增强和胰岛素敏感性提升。其次通过刺激胰腺 β 细胞诱导 GLP-1 和 GIP 分泌,不过,在这个过程中丁酸盐通过游离脂

肪酸受体 3(recombinant free fatty acid receptor 3,简称 FFAR3)才能最大程度传递诱导 GLP-1 产生的信号^[34]。SCFAs 通过激活 GLP-1 受体可改善蛋白激酶 B(protein kinase B,简称 PKB)和胰十二指肠同源框因子-1(pancreatic and duodenal homeobox factor 1,简称 PDX1)介导胰岛细胞增殖和保护作用^[34-36]。间接证据表明,SCFAs 可以通过 GLP-1 介导胞内磷脂酰肌醇激酶依赖性叉头框蛋白 O1(polyclonal antibody to forkhead box protein O1,简称 FOXO1)抑制和 PDX1 上调来阻止 FOXO1 引起的胰腺 β 细胞去分化和反分化^[37-38]。丁酸钠也被证明具有胰腺发育因子性质,它可以在 GLP-1 存在的情况下诱导巢蛋白增强绿色荧光蛋白祖细胞转化为胰岛素分泌细胞促进胰岛素分泌^[36,39]。另外,丁酸盐还可以诱导胰腺发育基因和 β 细胞胚胎干细胞分化,促进 β 细胞的发育、增殖、分化和功能化^[40]。

3.2 肠道免疫与炎症

肠道淋巴组织是人体免疫系统的最大组成部分,并且具有防御功能。免疫系统通常由脂多糖、肽聚糖、多糖、脂蛋白酸、脂蛋白、微球蛋白等特定的细菌抗原触发,这些结构能够被受体识别,并引发多种反应,对于维持肠道屏障的完整性和宿主微生物的动态平衡至关重要^[41-42]。膳食纤维可直接与具有免疫调节作用的 Toll 样受体结合^[43],有研究指出摄入膳食纤维后,免疫反应中观察到免疫防御系统的警惕性更高,但由于缺乏关于人体健康或疾病的有效生物标记物,这些结果的相关性仍不确定^[44]。

肠道菌群作为关键的稳态调节器,可通过产生 SCFAs 调节能量代谢并有助于降低炎症水平^[41]。研究表明,SCFAs 可通过多种机制促进肠道屏障功能和肠道免疫稳态,有利于预防克罗恩病和溃疡性结肠炎等炎症性疾病,从而通过免疫调节纤维在肠道中的亲和力,并增加构成肠道微生物菌群中的有益细菌比例^[45]。

SAFCs 促进肠道适应性免疫,抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,简称 HDAC)导致哺乳动物雷帕霉素靶蛋白途径活化和白介素 10(interleukin-10,简称 IL-10)产生^[44]。SCFAs 受体 FFAR2 会影响介导的炎症的单核细胞和嗜中性粒细胞分化和激活并且激活细胞内信号通路,丝裂原活化蛋白激酶,蛋白激酶 C 和磷脂酶 C 来触发白细胞循环募集至炎症位点^[46]。另外,SCFAs 引起

GPCR109a 信号传导诱导白细胞介素 IL-18 转录, 促进 NLRP3 炎症小体, IL-18 从其前肽成熟^[47]。SCFAs 激活 T 调节细胞 (regulatory T cells, 简称 Tregs) 上 GPCR43 诱导 Tregs 抑制结肠炎症和癌变的增殖和下调嗜中性粒细胞的趋化性受体 CXCR2 的表达, 从而抑制了它们的趋化性。

丁酸酯通过下调肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , 简称 TNF- α) 介导的人血管内皮细胞黏附分子 1 的表达从而阻止白细胞迁移并且诱导 IL-10 介导的 Tregs 功能抑制炎症^[48], 激活 GPCR109a 促进结肠巨噬细胞和树突状细胞 (dendritic cell, 简称 DC) 功能成熟, 刺激转化生长因子的产生, 诱导产生 Tregs 和 IL-10 的 T 细胞^[49], DC 产生 IL-10 和视黄酸, 刺激幼稚 T 细胞转化为 Tregs 并抑制促进炎症和结肠癌发生的辅助性 T 细胞 17 的产生^[50]。另外, 丙酸酯和丁酸酯可以有效抑制核因子 kb (NF-kb) 信号通路的活化^[49], 炎性细胞因子基因的表达及其在体外的释放并通过下调肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , 简称 IL-1 β) 和 IL-6 等促炎症细胞因子发挥抗炎作用^[51]。丁酸盐和乙酸盐在 DC 和 T 细胞中也起到组蛋白脱乙酰基酶抑制剂的作用, 能够达到调节基因表达的目的^[52]。

3.3 心血管疾病和肥胖等

人们饮食的变化导致了高血压、冠状动脉硬化、心力衰竭、中风等多种心血管疾病的发病率不断攀升。推算我国心血管病现患人数 2.9 亿, 心血管病死亡率占城乡居民总疾病死亡率的首位, 尤其凸显的是农村居民的心血管病死亡率大幅上升^[53]。有研究表明, 膳食纤维摄入量最高的人患冠心病的风险比摄入量最低的人低 29%, 每天摄入约 6 g SDF 可降低血清低密度脂蛋白胆固醇约 5.4%, 降低患冠心病的风险约 9%^[8]。维持血压动态平衡是一个复杂的生理过程, 其中 SCFAs 通过多种受体发挥作用。具体来说, 丙酸酯激活 GPCR41, 从而降低高血压^[54]。最近发现膳食纤维改变了结肠微生物群的组成和 SCFAs 的产生进而调节胃肠道受体, 有助于控制血压^[55-58]。膳食纤维对血压的影响取决于其类型 (不溶或可溶)、剂量与来源等^[59-61]。通常, 可溶性纤维比不溶性纤维具有更好的降血压作用, 这种作用在年龄大、超重的老年人群中体现的较为明显^[60-61]。

膳食纤维主要通过直接作用和间接作用控制

体质量。大多数 SDF 可增加肠内容物的黏度, 这可能会延迟胃排空和肠道吸收^[45]。在小肠中, SDF 可能会使餐后的血糖和胰岛素反应减弱, 这与饥饿反馈率的降低和随后能量摄入有关^[8]。在一项随机、双盲、对照试验中, 48 名超重或肥胖成年人 (BMI > 25 kg/m²) 服用寡聚果糖 21 g/d, 为期 12 周, 结果表明, 机体质量减少 (1.0 ± 0.4) kg, 同时减少胃饥饿素分泌, 增加循环胃肽类激素酪肽水平, 减少热量摄入, 降低血糖和胰岛素水平^[62]。目前, 部分研究表明, 肥胖人群体内的厚壁菌门/拟杆菌门比例高于瘦弱人群, 厚壁菌可将多糖转换为可吸收的单糖类和 SAFCs, 产生更多可吸收的能量, 导致肥胖^[23,30,63]。膳食纤维可增加拟杆菌门与厚壁菌门在肠道中的比例, 从而避免肥胖的发生^[64]。另外, 膳食纤维及其在肠道菌群的发酵产物对改变肥胖相关基因的表达起着重要作用, 膳食纤维可以通过控制基因表达预防肥胖^[65]。

4 结论与展望

膳食纤维主要通过改变胃肠道内容物性质以及其他营养、化学物质的吸收方式; 经肠道微生物发酵产生 SAFCs 调节肠道微生物的组成和比例, 从而发挥预防糖尿病、降低血糖血压、控制体质量、提高免疫力、降低炎症因子表达水平和患心脑血管疾病等机体健康效应作用。但膳食纤维、肠道微生物与机体健康的关系错综复杂, 随着对研究的不断深入, 明确膳食纤维的来源、加工方法和组成成分如何影响肠道微生物群; 研发适宜的膳食纤维改性技术, 获得理想的膳食纤维组成; 创造与体内更为相似的体外试验条件, 清晰阐明膳食纤维调节机体健康的作用机制, 这可为预防和治疗代谢性疾病提供新的思路。总体来说, 膳食纤维作为一类人体必需的营养物质, 具备良好的健康功能作用, 具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Erkkilä A T, Lichtenstein A H. Fiber and cardiovascular disease risk: how strong is the evidence? [J]. The Journal of Cardiovascular Nursing, 2006, 21(1): 3-8.
- [2] Abdul-Hamid A, Luan Y S. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran [J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 15-19.
- [3] Eastwood M, Kritchevsky D. Dietary fiber: how did we get where we are? [J]. Annual Review of Nutrition, 2005, 25(1): 1-8.

- [4] Jonsson A L, Backhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2017, 14(2): 79–87.
- [5] Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora – mediated fermentation of dietary fibre [J]. *Mutation Research*, 2009, 682(1): 39–53.
- [6] Payne A, Zihler A, Chassard C, et al. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling [J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(1): 17–25.
- [7] Verspreet J, Damen B, Broekaert W F, et al. A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2016, 7: 167–190.
- [8] Campos – Vega R, Dave Oomah B, Vergara – Castañeda H A. *In vivo* and *in vitro* studies on dietary fiber and gut health [M] // Hosseini F, Dave Oomah B, Campos – Vega R. *Dietary fiber functionality in food and nutraceuticals: from plant to gut*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2017.
- [9] Chuang S C, Norat T, Murphy N, et al. Fiber intake and total and cause – specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 96(1): 164–174.
- [10] Anderson J W, Baird P, Davis R J, et al. Health benefits of dietary fiber [J]. *Nutrition Reviews*, 2009, 67(4): 188–205.
- [11] Dhingra D, Michael M, Rajput H, et al. Dietary fibre in foods: a review [J]. *Journal of Food Science and Technology – Mysore*, 2012, 49(3): 255–266.
- [12] Wang L, Xu H G, Yuan F, et al. Physicochemical characterization of five types of citrus dietary fibers [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015, 4(2): 250–258.
- [13] Ajila C M, Bhat S G, Prasada R U. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1006–1011.
- [14] Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, et al. Dietary fibre and fibre – rich by – products of food processing: characterisation, technological functionality and commercial applications: a review [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(2): 411–421.
- [15] 蔡松铃, 刘琳, 战倩, 等. 膳食纤维的黏度特性及其生理功能研究进展 [J]. *食品科学*, 2020, 41(3): 224–231.
- [16] Theuwissen E, Mensink R P. Water – soluble dietary fibers and cardiovascular disease [J]. *Physiology & Behavior*, 2008, 94(2): 285–292.
- [17] Li H, Yang C H, Kim S H. Research on the facilitation of dietary fiber to body digestive function [J]. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2015, 9(1): 48–51.
- [18] Dongowski G, Huth M, Gebhardt E, et al. Dietary fiber – rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats [J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(12): 3704–3714.
- [19] Macfarlane S, Macfarlane G T, Cummings J H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract [J]. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 24(5): 701–714.
- [20] Costello S P, Soo W, Bryant R V, et al. Systematic review with meta – analysis: faecal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis [J]. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2017, 46(3): 213–224.
- [21] Cui J, Lian Y, Zhao C, et al. Dietary fibers from fruits and vegetables and their health benefits via modulation of gut microbiota [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(5): 1514–1532.
- [22] Shan M, Gentile M, Yeiser J R, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals [J]. *Science*, 2013, 342(6157): 447–453.
- [23] Morowitz M J, di Caro V, Pang D, et al. Dietary supplementation with nonfermentable fiber alters the gut microbiota and confers protection in murine models of sepsis [J]. *Critical Care Medicine*, 2017, 45(5): 516–523.
- [24] Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(1): 19–33.
- [25] Kelly C J, Zheng L, Campbell E L, et al. Crosstalk between microbiota – derived short – chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function [J]. *Cell Host and Microbe*, 2015, 17(5): 662–671.
- [26] Fu Z, Gilbert E R, Liu D M. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta – cell dysfunction in diabetes [J]. *Current Diabetes Reviews*, 2013, 9(1): 25–53.
- [27] Delzenne N M, Cani P D, Everard A, et al. Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(10): 2206–2217.
- [28] Schulze M B, Liu S, Rimm E B, et al. Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle – aged women [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 80(2): 348–356.
- [29] Merae M P. Dietary fiber intake and type 2 diabetes mellitus: an umbrella review of meta – analyses [J]. *Journal of Chiropractic Medicine*, 2018, 17(1): 44–53.
- [30] Davison K M, Temple N J. Cereal fiber, fruit fiber, and type 2 diabetes: explaining the paradox [J]. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 2018, 32(2): 240–245.
- [31] Chambers E S, Viardot A, Psychas A, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults [J]. *Gut*, 2015, 64(11): 1744–1754.
- [32] Grasset E, Puel A, Charpentier J, et al. A specific gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces GLP – 1 resistance through an enteric NO – dependent and gut – brain axis mechanism [J]. *Cell metabolism*, 2017, 25(5): 1075–1090.
- [33] Mandaliya D K, Seshadri S. Short chain fatty acids, pancreatic dysfunction and type 2 diabetes [J]. *Pancreatology*, 2019, 19(4): 617–622.
- [34] Lin H V, Frassetto A, Kowalik Jr E J, et al. Butyrate and propionate protect against diet – induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3 – independent mechanisms [J]. *PLoS*

- One,2012,7(4):e35240.
- [35] Perfetti R, Hui H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells[J]. *Hormone and Metabolic Research*,2004, 36(11/12):804-810.
- [36] Li Y Z, Cao X M, Li L X, et al. β -Cell Pdx1 expression is essential for the gluco-regulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1[J]. *Diabetes*,2005,54(2):482-491.
- [37] Talchai C, Xuan S H, Lin H V, et al. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure[J]. *Cell*, 2012,150(6):1223-1234.
- [38] Kitamura T. The role of FOXO1 in β -cell failure and type 2 diabetes mellitus [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2013, 9(10):615-623.
- [39] Li L, Ren L L, Qi H, et al. Combination of GLP-1 and sodium butyrate promote differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells[J]. *Tissue and Cell*,2008,40(6):437-445.
- [40] Goicoa S, Alvarez S, Ricordi C, et al. Sodium butyrate activates genes of early pancreatic development in embryonic stem cells[J]. *Cloning and Stem Cells*,2006,8(3):140-149.
- [41] Pedersen H K, Gudmundsdottir V, Nielsen H B, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity[J]. *Nature*,2016,535(7612):376.
- [42] Hooper O V, Littman D R, Macpherson A J. Interactions between the microbiota and the immune system [J]. *Science*, 2012, 336(6086):1268-1273.
- [43] Vogt L, Ramasamy U, Meyer D, et al. Immune modulation by different types of β 2 \rightarrow 1-fructans is toll-like receptor dependent [J]. *PLoS One*,2013,8(7):e68367.
- [44] Albers R, Bourdet-Sicard R, Braun D, et al. Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health[J]. *The British Journal of Nutrition*,2013,110(Suppl 2):1-30.
- [45] Chawla R, Patil G R. Soluble dietary fiber [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*,2010,9(2):178-196.
- [46] Vinolo M R, Rodrigues H G, Nachbar R T, et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids [J]. *Nutrients*, 2011, 3(10):858-876.
- [47] Macia L, Tan J, Vieira A T, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome [J]. *Nature communications*,2015,6:6734.
- [48] Meijer K, de Vos P, Priebe M G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2010,13(6):715-721.
- [49] Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis[J]. *Immunity*, 2014,40(1):128-139.
- [50] Kalala G, Kambashi B, Everaert N, et al. Characterization of fructans and dietary fibre profiles in raw and steamed vegetables [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*,2018,69(6):682-689.
- [51] Raso G M, Simeoli R, Russo R A, et al. Effects of sodium butyrate and its synthetic amide derivative on liver inflammation and glucose tolerance in an animal model of steatosis induced by high fat diet [J]. *PLoS One*,2013,8(7):e68626.
- [52] Morrison D J, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism [J]. *Gut Microbes*,2016,7(3):189-200.
- [53] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. *中国循环杂志*,2019,34(3):209-220.
- [54] Natarajan N, Hori D, Flavahan S, et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41 [J]. *Physiological Genomics*,2016,48(11):826-834.
- [55] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans [J]. *Cell*, 2016,164(3):337-340.
- [56] Montandon S, Jormayez F R. Effects of antidiabetic drugs on gut microbiota composition [J]. *Genes*,2017,8(10):250.
- [57] O'Hara A M, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ [J]. *EMBO Reports*,2006,7(1):688-693.
- [58] Weickert M, Pfeiffer A F. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes [J]. *The Journal of Nutrition*,2008,138(3):439-442.
- [59] Wu G D, Compher C, Chen E Z, et al. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production [J]. *Gut*,2016,65(1):63-72.
- [60] Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella* [J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(6):971-982.
- [61] Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*,2014,37(8):2343-2350.
- [62] Canfora E E, Jocken J W, Blaak E E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity [J]. *Nature Reviews Endocrinology*,2015,11(10):577-591.
- [63] Zou J, Chassaing B, Singh V, et al. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health [J]. *Cell Host & Microbe*,2018, 23(1):41-53.
- [64] Walker A W, Ince J, Duncan S H, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota [J]. *The ISME Journal*,2011,5(2):220-230.
- [65] Drew J E, Reichardt N, Williams L M, et al. Dietary fibers inhibit obesity in mice, but host responses in the cecum and liver appear unrelated to fiber-specific changes in cecal bacterial taxonomic composition [J]. *Scientific reports*,2018,8(1):1-11.

方伟敏,弓淑桦,何卜卜,等. NaCl 胁迫对宁夏枸杞组培苗抗氧化酶及相关基因表达模式的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):57-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.009

NaCl 胁迫对宁夏枸杞组培苗抗氧化酶 及相关基因表达模式的影响

方伟敏,弓淑桦,何卜卜,田世彪,赵会君

(北方民族大学生物科学与工程学院国家民委生态系统建模及应用重点实验室,宁夏银川 750021)

摘要:以枸杞 1 号无菌实生苗的叶片、下胚轴以及茎尖生长点组织为材料,以 MS 为基础培养基,设置不同的激素浓度比例,诱导不同外植体产生丛生芽并完成形态建成。采用水培处理方式,分别设置 0、100、200 mmol/L NaCl 胁迫梯度,于处理后 1、2、3 d 分别测定地上部超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性,利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *APX*、*Cu/Zn-SOD*、*GST*、*Fe-SOD* 基因的表达变化模式。结果表明,MS + 1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 0.2 mg/L 萘乙酸(NAA)的培养基能快速诱导顶端组织及叶片组织中丛生芽的生长,而茎段呈现愈伤化和玻璃化情况,丛生芽在 MS 培养基上能完成生根,形态建成良好。盐胁迫下的叶片中保持着较高浓度的 POD 酶活性,而 CAT 活性却被抑制,与抗氧化胁迫相关的 *SOD*、*GST* 以及 *APX* 基因在盐胁迫下表达倍数显著性增加,而 *Fe-SOD* 酶基因却显著性被抑制,本研究为宁夏枸杞组培快繁体系的建立,组培苗抗盐机制提供了理论支持。

关键词:宁夏枸杞;组织培养;盐胁迫;抗氧化酶;实时荧光定量

中图分类号: S567.1⁺90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0057-05

宁夏枸杞是宁夏回族自治区特色资源植物,宁夏枸杞中富含枸杞多糖、黄酮、多酚等多种成分,因此是药食同源性功能保健食品,具有极高的经济价值和药用价值^[1-4]。由于宁夏枸杞分布广泛,对盐碱、干旱、冷冻等环境胁迫具有极强的耐受性,在河北省沿海盐碱地、新疆自治区、甘肃省等土壤贫瘠之地也得到了大面积引种植,也是典型的植被恢复树种和经济树种^[5]。

在植物抗逆机制中,抗氧化酶系统及其关键基因起到重要作用^[6],超氧化物歧化酶(SOD)一般可以分为 *Cu/Zn-SOD*、*Fe-SOD* 和 *Mn-SOD* 3 种,其关键基因 *Fe-SOD*、*Mn-SOD*、*Cu/Zn-SOD* 的高效表达,是保持 SOD 酶活性的主要因素,*SOD* 酶基因能够受重金属、盐碱以及干旱等逆境环境的诱导而高效表达^[7]。过氧化物酶(POD)主要是在植物受到胁迫产生过氧化物时具有防御性的一种酶,细

胞壁为首先受到重金属胁迫的部位,POD 酶作为可以调节细胞壁代谢的一种酶,可以减轻植株受迫害的程度,同时,POD 酶还参与细胞壁木质素形成和细胞凋亡等生理活动^[8-10]。过氧化氢酶(CAT)是一种金属合成酶,其主要作用是使过氧化氢分解成氧和水,CAT 也参与了植物对逆境胁迫的响应^[11]。

由于宁夏枸杞是异花授粉,遗传背景复杂,自然环境中野生群体之间的抗逆差异较大,甚至现有栽培品种之间的抗逆能力也有很大差别^[12],而关于宁夏枸杞单一遗传背景下组培苗的抗逆研究报道较少,在短期内要获得大量遗传背景单一的群体,须要建立宁夏枸杞的快繁体系,已有很多关于宁夏枸杞组培体系的报道^[13-14],但是通过愈伤诱导的方法会产生大量的玻璃化苗,并且试验周期太长。本试验以无菌枸杞实生苗为材料,以不同的组织为外植体,拟建立、优化无菌枸杞苗的组织培养快速繁殖体系,降低枸杞苗外植体褐化死亡率,降低枸杞外植体玻璃化率,缩短培养周期,通过对遗传背景单一稳定的组培苗的耐盐能力的研究,能够更加准确地揭示枸杞的抗盐机制,以期为宁夏枸杞组织培养快繁体系的建立和组培苗的盐碱地生长提供理论依据。

收稿日期:2020-08-27

基金项目:北方民族大学国家级大学生创新项目(编号:201811407015);宁夏自然科学基金(编号:2019A0040)。

作者简介:方伟敏(1997—),男,福建漳州人,研究方向葡萄与葡萄酒酿造。E-mail:fangweimin0505@sina.cn。

通信作者:赵会君,博士,讲师,研究方向为植物抗逆生物学。E-mail:zhaohuijun1022@163.com。

1 材料与方 法

1.1 材料种植

所有试验都于北方民族大学生物科学与工程分子生物学实验室进行。宁杞 1 号成熟饱满的种子经蒸馏水冲洗干净后,于超净台中经 10% 次氯酸钠溶液消毒 8 min 后,用无菌水冲洗 2~3 遍,然后接种到 1/2 MS 培养基上,在 25 ℃ 培养箱中培养,待培养 20 d 左右时,茎尖和叶片组织接种于不同激素比例的诱导培养基上,用于愈伤及不定芽的诱导和遗传转化。

1.2 宁夏枸杞组培快繁体系的建立

将枸杞叶片及顶端生长点剪下(叶片经手术刀划伤)后接种于 8 种添加了不同激素的 MS 固体培养基中(pH 值为 6.0),激素配比见表 1,每个处理重复 5 次,每个培养瓶中接种外植体 20 个,培养条件:温度为 25 ℃,湿度为 40%,光照 12 h/d。每 15 d 继代 1 次,并记录愈伤及不定芽生长情况,统计玻璃化率。

表 1 不同激素浓度配比及外植体接种种类

处理	激素浓度配比	接种外植体种类
M1	0.4 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M2	0.4 mg/L 6-BA + 0.7 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M3	0.4 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M4	0.5 mg/L 6-BA + 0.7 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M5	0.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M6	0.7 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M7	1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴
M8	1.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA	茎尖生长点,叶片,下胚轴

1.3 组培苗的生根

选取生长健康的不定芽为生根外植体,配制不同激素比例的生根培养基进行生根培养,激素配比主要为 1/2 MS + 0.2 mg/L NAA (芸乙酸) + 0.6 mg/L IBA (3-吲哚丁酸)、1/2 MS + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA、1/2 MS + 0.4 mg/L NAA + 0.6 mg/L IBA 以及 MS 培养基,20 d 后观察生根情况。

1.4 组培苗的水培及处理

选取在 MS 培养基中生根的组培苗,移栽在 1/2 Hogland (霍格兰) 营养液中培养 1 周,换在全 Hogland 营养液中培养至 10 cm 高时用于抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性的测定及实时荧光定量 PCR 检测。

1.4.1 枸杞苗叶片中 SOD、POD、CAT 酶活性的测定 选取长势均匀一致的水培枸杞苗,在 Hogland 营养液中分别设置 3 种不同浓度梯度的 NaCl (0、100、200 mmol/L),每个处理重复 3 次,于处理 24、48、72 h 后取样,分别称取每个处理的新鲜成熟叶片各 0.5 g 于研钵中,加 5 mL 酶提取液在冰浴中研磨均浆,于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液即为酶粗提液。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性测定参考代其林等的方法^[15-16],每个处理重复 3 次,相关数据用软件计算方差和平均值。

1.4.2 枸杞苗的 RNA 提取及 cDNA 合成 选取长势均一的水培苗,经 200 mmol/L 氯化钠处理,于处理后 0、2、12、24、48 h 分别取新鲜叶片于液氮速冻,利用 Invitrogen trizol 试剂按照试剂盒说明书操作步骤提取总 RNA 并检测完整性,取 1 μg 总 RNA 经脱氧核糖核酸酶处理后用 M-MLV 逆转录酶(美国英杰生命技术有限公司)合成 cDNA。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达 根据实验室已经建立的宁夏枸杞转录组数据库里的表达序列标签(EST)序列,筛选了 *Cu/Zn-SOD*、*Fe-SOD*、*APX*、*GST* 等与抗氧化胁迫相关的基因,利用 Primer Express 3.0 软件设计实时荧光定量 PCR 引物,采用美国 MX3000pTM qPCR 实时荧光定量 PCR 仪,以宁夏枸杞的 β -actin 基因作为内参基因^[17],SYBR Green realtime PCR Master mix [东洋纺(上海)生物科技有限公司] 为荧光染料,模板采用稀释 20 倍的 cDNA,重复 3 次,总反应体系为 20 μL,反应条件为 95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,45 个循环。PCR 结束后进行溶解曲线分析,所需引物序列见表 2。

表 2 实时荧光定量 PCR 所用引物

基因	引物(5'→3')	注释
<i>Cu/Zn-SOD</i>	F:GAAGGCTGTGCTGTTCTTAAGG,R:ATGAAGTCCAGGAGTAAGTCCAGTTAAA	Cu/Zn-SOD 超氧化物歧化酶
<i>GST</i>	F:AATCAATCACAACACCCAATAAACTC,R:TCATATGGCAGGTGCTTTTCC	谷胱甘肽 S-转移酶
<i>Fe-SOD</i>	F:CCATGGACGAACCTTATCAAAGTAACA,R:TGGATTCCCAGAAGAAATCATGA	超氧化物歧化酶
<i>APX</i>	F:GTTGCCATCAGACAAGGCTCTACT,R:TTCATCCGCAGCATATTTCTCA	过氧化物酶

2 结果与分析

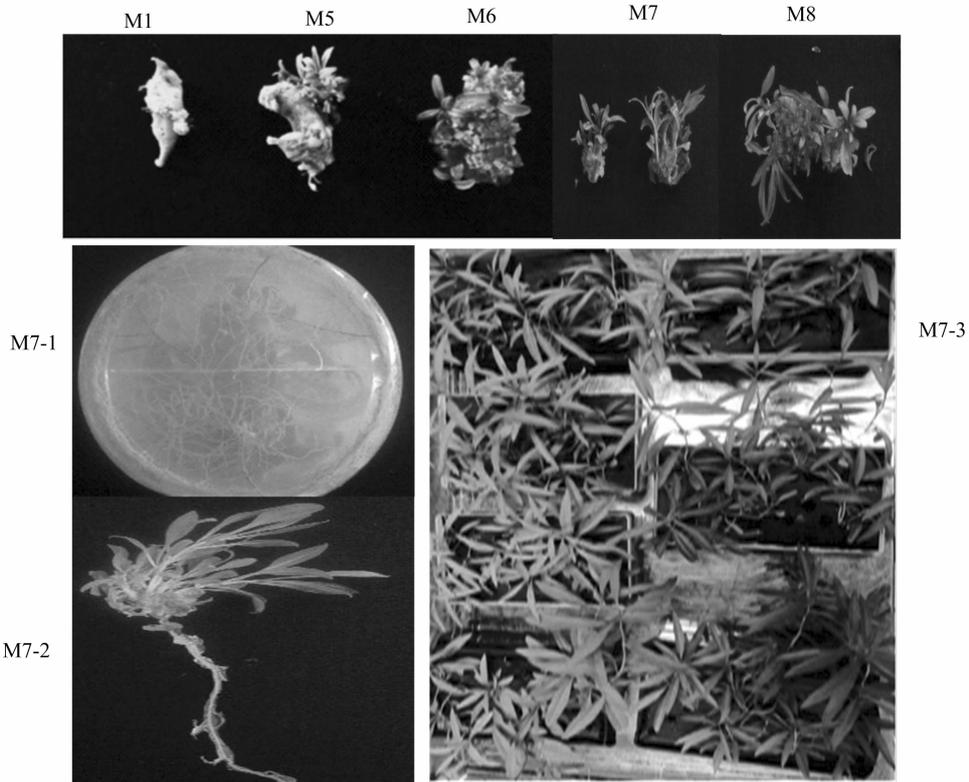
2.1 不同激素浓度处理对宁夏枸杞茎尖、下胚轴、叶片组织不定芽的诱导

由表 3 可知, 宁夏枸杞 1 号的茎尖及叶片在不同激素浓度上的生长变化情况, 经过 30 d 诱导, 茎尖在激素浓度为 M7(1.0 mg/L 6BA + 0.2 mg/L NAA) 培

养基中丛生芽芽点生长较多而几乎没有明显的玻璃化情况, 适合用于宁夏枸杞 1 号茎尖外植体不定芽的诱导, 而叶片在 M8(1.0 mg/L 6BA + 0.4 mg/L NAA) 培养基上经过诱导后产生的不定芽生长最好, 无明显玻璃化, 因此 M8 培养基可用于诱导叶片不定芽的形成。诱导的不定芽在 MS 培养基上就能快速完成生根, 水培苗长势健康正常(图 1)。

表 3 不同外植体生长变化统计

处理	叶片生长状态	茎尖生长状态	下胚轴生长状态
M1	愈伤化, 翠绿	呈愈伤化, 玻璃化	愈伤化, 发白, 紧密
M2	愈伤化, 翠绿	轻度玻璃化	愈伤化, 发白
M3	愈伤化, 翠绿	芽点密集, 轻度玻璃化	愈伤化, 发白
M4	愈伤化, 愈伤翠绿	芽点密集, 玻璃化	愈伤化, 翠绿
M5	愈伤化, 愈伤浅绿色	玻璃化严重	愈伤化, 翠绿, 玻璃化严重
M6	愈伤化, 愈伤浅绿色	玻璃化严重	愈伤化, 翠绿, 玻璃化严重
M7	叶片膨大发白, 不定芽生长缓慢, 生长正常	芽点密集, 丛生芽较多, 无明显玻璃化	有不定芽产生, 无明显玻璃化
M8	轻微愈伤化, 丛生芽多, 生长正常	芽点密集, 部分轻度玻璃化	有不定芽产生, 部分轻微玻璃化



M1、M5、M6、M8—诱导叶片不定芽的生长情况; M7-1—M7 诱导的不定芽在 MS 培养基上生根情况; M7-2—M7 诱导的不定芽在 MS 培养基上形态建成情况; M7-3—生根苗移栽在霍格兰培养基上的生长情况

图 1 不同激素下茎尖及叶片不定芽的诱导情况及生根

2.2 不定芽的快繁及生根

挑选 5 株丛生芽长势较好的外植体, 将其丛生芽独立分开, 分别进行继代培养, 2 周继代 1 次, 继代 3 次后统计丛生芽数, 统计结果见表 4。经过 2

次继代后快繁群体迅速增加, 且快繁出的植株长势良好, 玻璃化率极低, 因此, 本试验所建立的快繁体系达到预期效果。将不定芽移栽在 MS 培养基上, 经过 20 d 的生根培养, 不定芽完成了完整的形态建成, 根

系生长良好,移栽在 Hogland 营养液中生长正常。

表4 快繁体系的建立

繁殖代数 (代)	丛生芽数(株)					丛生芽 总数(株)
	第1株	第2株	第3株	第4株	第5株	
1	1	1	1	1	1	5
2	4	3	6	4	5	22
3	28	19	48	23	26	144
玻璃化率(%)	2	5	2	2	4	3

2.3 不同浓度的 NaCl 胁迫对叶片 SOD、POD、CAT 抗氧化酶活性的影响

组培苗在 100、200 mmol/L NaCl 处理下的叶片组织中的 CAT、POD 及 SOD 酶活性见图 2。与 CK 相比,在不同浓度的 NaCl 胁迫下,CAT 酶活性在 100 mmol/L NaCl 处理 1 d 后显著性增加,随着胁迫时间延长而下降,而 POD 酶活性在胁迫 3 d 后达到显著或极显著水平,SOD 酶活性在 200 mmol/L 的 NaCl 处理 1 d 和 2 d 后呈下降趋势,但是在胁迫 3 d 后增加,但没达到显著水平。

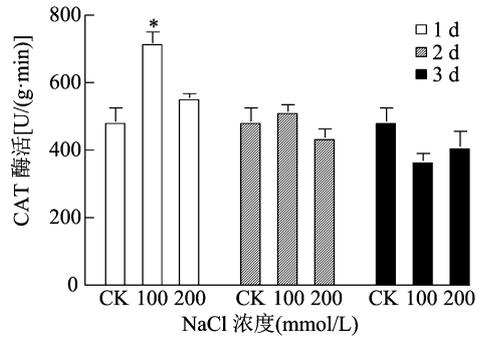
2.4 不同浓度的 NaCl 胁迫对相关基因表达的影响

对 4 个与抗氧化胁迫相关的基因进行实时荧光定量 PCR 分析,结果见图 3。与对照相比,APX 基因在胁迫后 48 h 表达量显著性增加,是对照的 4.6 倍;Cu/Zn-SOD 基因在处理 24 h 显著增加,是对照的 1.95 倍,Fe-SOD 基因的表达在处理 12 h 就已开始显著被抑制,随着时间延长,在 48 h 时极显著降低,是对照的 0.18 倍,而 GST 基因随着胁迫时间延长,表达倍数在 24 h 达到了最高,是对照的 6.28 倍,4 个基因对盐碱胁迫进行了积极响应。

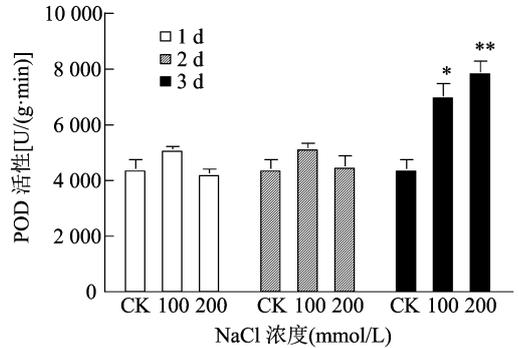
3 结论与讨论

宁夏枸杞优良的抗逆性机制目前仍然是研究的重点之一^[5],目前枸杞主要以扦插的方式进行繁殖育种,而扦插受到自然环境等外界因素的影响。通过建立稳定优良的快繁体系,不仅可以保留枸杞原有的优良性状,也可以在短期内获得大量遗传背景单一的无性系,为后期的基础理论研究和育种提供理论和技术支持。

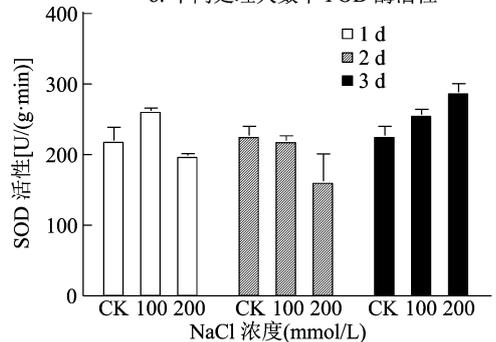
本研究选择宁杞 1 号无菌实生苗的茎尖和叶片为试验材料,以 MS 培养基为基本培养基,利用不同浓度配比的激素进行不定芽的诱导,筛选出不同外植体组织培养快速繁殖过程中适宜的培养基和激素浓度配比,确定了 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L



a. 不同处理天数下 CAT 酶活性



b. 不同处理天数下 POD 酶活性



c. 不同处理天数下 SOD 酶活性

*、** 分别表示与 CK 相比在 0.05、0.01 水平上差异显著,图 3 同

图2 不同浓度的 NaCl 处理下 CAT、POD 以及 SOD 酶活性

NAA 为茎尖生长点不定芽诱导的最佳培养基浓度,MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA 为叶片不定芽诱导的最佳培养基,叶片或茎尖可以不通过愈伤再分化途径就可以培养产生不定芽,并进一步筛选到了最适不定芽增殖的培养基,大大地降低了玻璃化率,缩短了组培时间,不定芽最后经 MS 培养基培养就可以快速生根。

经过对这些遗传背景单一的组培苗进行盐碱胁迫,发现 POD 酶活性在叶片中存在极显著增加,表明 POD 在植物响应盐碱胁迫、清除过氧化物质的过程中起重要的作用,而 CAT 酶活性在叶片中随着时间延长都呈下降趋势,众多研究发现,随着盐碱浓度的增加和胁迫时间的延长,CAT 酶活性呈现先上升后下降趋势^[18],高盐浓度显著抑制了 CAT 酶

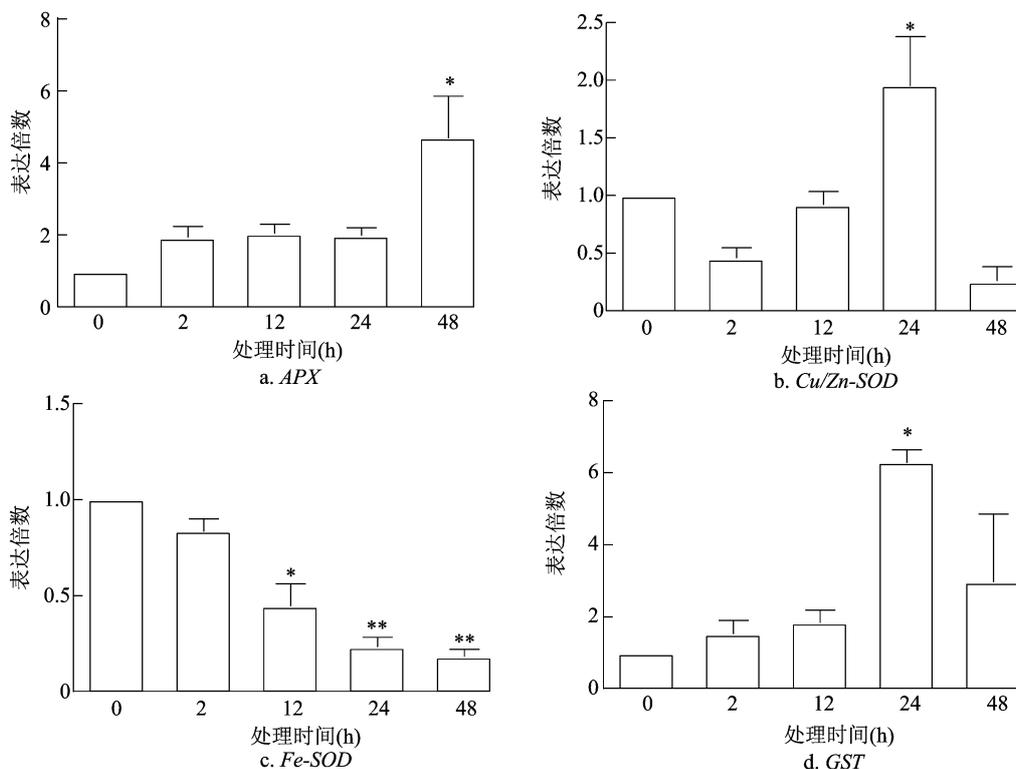


图3 4个抗氧化相关基因在200 mmol/L的氯化钠胁迫下的表达模式

活性^[9]。沈金玲等研究结果表明,盐胁迫下部分CAT酶基因的表达倍数降低^[19],因此推测,可能由于盐胁迫降低了CAT酶基因的表达倍数,从而影响了CAT酶的整体活性,这有待于后期继续研究;通过对SOD酶的2个基因的表达模式进行研究发现,Cu/Zn-SOD在胁迫后24 h显著性增加,而Fe-SOD基因却呈现被极显著抑制的趋势,这可能是导致SOD酶活性不高的主要原因之一。有研究表明,谷胱甘肽转移酶参与了植物对多种逆境胁迫的响应^[20],刘明坤通过将GST基因转入烟草中,显著提高了转基因烟草的耐盐性,GST和APX基因表达倍数极显著增加,暗示该基因能积极响应盐胁迫,可能在枸杞耐受盐碱胁迫中起到重要作用^[21]。

参考文献:

- [1] 马琳,马然,王艺,等. 枸杞多糖对小鼠海马神经元细胞系缺糖缺氧再灌注损伤的影响[J]. 中国新药杂志,2018,27(10): 1172-1175.
- [2] Wang Y, Bai F, Luo Q, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides grafted with doxorubicin: an efficient pH-responsive anticancer drug delivery system [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 964-970.
- [3] Bakr S A, Siew M K, Salihin B A. The effects of *Lycium barbarum* water extract and fish collagen on milk proteolysis and *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of yogurt [J].

Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020.

- [4] 李永盛,王茂鹤,刘建飞,等. 枸杞多糖对乙醇诱导肝细胞损伤的保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 549-556.
- [5] 刘艳,姚延栋. 种植枸杞对晋北重度盐碱地的改良作用[J]. 山西林业科技, 2015, 44(3): 16-19.
- [6] Zhao J H, Li H X, Zhang C Z, et al. Physiological response of four wolfberry (*Lycium* Linn.) species under drought stress [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(3): 603-612.
- [7] Arora D, Bhatla S C. Melatonin and nitric oxide regulate sunflower seedling growth under salt stress accompanying differential expression of Cu/Zn SOD and Mn SOD [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, 106: 315-328.
- [8] 刘尊英. 绿芦笋(*Asparagus officinalis* L.)木质化的生理生化基础及其调控技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [9] Baniyasadi F, Saffari V R, Moud A A M. Physiological and growth responses of *Calendula officinalis* L. plants to the interaction effects of polyamines and salt stress [J]. Scientia Horticulturae, 2018, 234: 312-317.
- [10] 张晶. 盐碱胁迫对8种冬青生长生理的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019.
- [11] Boojar M M A, Goodarzi F. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine [J]. Chemosphere, 2007, 67(11): 2138-2147.
- [12] 仲怡铭, 王三英, 张广忠, 等. 10个枸杞品种在盐碱地上的栽培特性研究[J]. 经济林研究, 2017, 35(4): 202-206.
- [13] 唐晓杰, 孙萍, 马德宝. 枸杞组织培养快速繁殖技术[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2011, 12(2): 204-207.

张雪如,王稳利,邱宗波,等. 高山松 miR171a 及其靶基因的鉴定与表达分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):62-66.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.010

高山松 miR171a 及其靶基因的鉴定与表达分析

张雪如^{1,2}, 王稳利^{1,2}, 邱宗波^{1,2}, 曾倩倩^{1,2}

(1. 河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007; 2. 河南省农业微生物生态与技术国际联合实验室/河南师范大学,河南新乡 453007)

摘要:以裸子植物高山松为试验材料,利用笔者所在实验室前期构建的高山松 miRNA 数据,通过生物信息学方法筛选与高山松生长发育相关的 miR171a,并通过基于 RNA 连接酶的 cDNA 末端快速扩增法(RLM-5'RACE)验证得出,GRAS 家族转录因子(Unigene10015)和肌动蛋白结合蛋白(Unigene83401)的基因为高山松 miR171a 的靶基因。通过 PCR 技术克隆得到的高山松 miR171a 前体序列可形成茎环发夹结构,但其成熟序列的碱基保守性较差。系统进化分析显示,pde-miR171a 与裸子植物火炬松的进化关系较近。经 qRT-PCR 分析发现,pde-miR171a 在高山松茎中的相对表达量最高,其次是在针叶中,而靶基因 Unigene10015 在茎、针叶中的相对表达量较低,暗示 pde-miR171a 可以通过调控靶基因 Unigene10015 而参与高山松的生长发育。

关键词:高山松;miR171;靶基因;荧光定量 PCR

中图分类号: S718.46 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0062-05

microRNA(miRNA)是一类由 21~24 个核苷酸组成的内源性单链小 RNA,主要是在转录后水平介导靶 mRNA 的降解或翻译抑制来调控基因表达^[1]。自研究者从秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现第 1 个 miRNA 以来,miRNA 一直是研究的热点^[2]。近年来,越来越多的研究发现,miRNAs 在高山松(*Pinus densata*)的生长发育^[3]、杉木种子的萌发^[4]及落叶松体胚的生长发育和形态建成等方面起着重要的调控作用^[5]。

miR171 是在植物中最早发现的 miRNAs 家族成员之一^[6],在拟南芥中有 3 个 miRNA 成员,分别是 ath-miR171a、ath-miR171b 和 ath-miR171c^[7]。通过基于 RNA 连接酶的 cDNA 末端快速扩增(RNA ligase-mediated 5' rapid amplification of cDNA ends,简称 RLM-5'RACE)试验,研究者发现水稻中的 miR171 能介导靶基因 *OsHAM*(GRAS 家族转录因子)mRNA 的剪切降解,从而促进水稻营养生长向生殖生长的过渡及根尖分生组织稳态的形成^[8]。杨树 miR171 通过调控 GRAS 转录因子而参与杨树的生长发育和光形态建成的调控^[9]。张力等研究发现,烟草 miR171c 通过负调控 SCL 靶基因 *TC134811*、*TC127385*,使植物出现顶端优势丧失和茎秆增多等表型^[10]。尽管目前关于 miR171 在多个植物中功能的研究较多,但目前在裸子植物高山松中,miR171 的鉴定及其在高山松生长发育过程

收稿日期:2020-08-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31500499);河南省高校科技创新人才项目(编号:16HASTIT019)。

作者简介:张雪如(1996—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事植物发育生物学方面的研究。E-mail:1365655297@qq.com。

通信作者:邱宗波,博士,教授,主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail:qjzongbo@126.com。

[14] 郑国琴,柳金凤. 宁夏枸杞叶片组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2012(1):122-124.

[15] 代其林. 水杨酸对低温下水稻幼苗生理生化特性的影响[D]. 成都:四川大学,2004.

[16] 吴倩. CAT 调控水稻叶片光呼吸过程中抗氧化系统的机理研究[D]. 扬州:扬州大学,2013.

[17] Sun H P, Li F, Ruan Q M, et al. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in *Hedera helix* L. [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 108: 286-294.

[18] 缪珊,夏振平,李志强. NaCl 胁迫对 3 种狼尾草生长及生理

特性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2019(6):132-136.

[19] 沈金玲,钟镇芬,黄永健,等. 盐胁迫对桉树(*Eucalyptus*)活性氧代谢和 CAT 基因表达的影响[J]. 分子植物育种,2020,18(5):1661-1665.

[20] Zhang Y Y, Liu J H. Transgenic alfalfa plants co-expressing glutathione S-transferase (GST) and human CYP2E1 show enhanced resistance to mixed contaminants of heavy metals and organic pollutants [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 189(1):357-362.

[21] 刘明坤. 西伯利亚蓼 GST 和 CS 基因双价载体构建及转酵母和烟草研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2009.

中的功能尚不清楚。

高山松是一种具有重要生态意义的裸子植物^[11]。本研究根据高山松小 RNA 高通量测序结果获得的 miR171a, 进行前体序列的克隆与分析。通过在线预测网站获得 miR171a 的靶基因, 并通过 RLM-5'RACE 进行验证。同时还分析了 miR171a 及其靶基因在高山松不同组织部位的表达特性, 为揭示 miR171a 在高山松生长发育中的作用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2 月龄的高山松幼苗于 2019 年 5 月置于温室中培养(昼一夜生长温度周期为 25 ℃—18 ℃, 光—暗周期为 16 h—8 h, 相对湿度为 65% ~ 70%)。

1.2 高山松 miR171 前体序列的克隆及其二级结构预测

使用植物 Concert Plant RNA Reagent (美国 Invitrogen 公司) 从 2 月龄的高山松幼苗中提取总 RNA。从笔者所在实验室得到的高山松 miRNA 高通量测序数据中获得高山松 miR171a 的前体序列: 5'-AAAGAAUGUGAUGUUGGCUAGGCUCAAUCG GAUUGUAACGCCACGGAAUUUGGUCUUGUGAU

CUGAUUGAGCCGUGCCAAUAUCACAUUCUAAC-3', 用 Primer 5.0 软件设计特异性引物进行 PCR 扩增(表 1)。采用 Clustalx 2.0 软件, 以高粱 *sbi*-miR171a、拟南芥 *ath*-miR171a、油菜 *bn*a-miR171a、玉米 *zma*-miR171a、大豆 *gma*-miR171a、火炬松 *pta*-miR171a、毛白杨 *ppt*-miR171a、水稻 *osa*-miR171a、毛果杨 *ptc*-miR171a 及卷柏 *smo*-miR171a 的成熟序列为模板进行序列比对。用 MEGA 7.0 构建 miR171a 前体序列的系统进化树, 通过 RNAfold web server 在线软件预测 miR171a 前体序列的二级结构。

1.3 高山松 miR171a 靶基因的预测与切割位点的验证

将高山松 miR171a 的成熟序列提交到靶基因在线预测网站 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 上, 以高山松的转录组数据库作为靶标, 设置期望值为 2.5, 其余参数为默认值。将预测到的靶基因比对到 GO (gene ontology) 数据库中, 确定其功能。依据靶基因的 cDNA 序列, 用 Primer 5.0 软件设计用于 RLM-5'RACE 的引物(表 1)。RLM-5'RACE 试验参照孔雷等的方法^[12], 扩增出的特异产物后进行克隆测序。

表 1 RT-PCR、RT-qPCR 和 RLM-5'RACE 的引物

用途	引物	序列(5'→3')
RT-PCR	<i>pde</i> -miR171 F	GCAGATGCTACAGTGTGTAAACG
	<i>pde</i> -miR171 R	AATGGAATGGAATGGAGTGGATGA
RT-qPCR	<i>pde</i> -miR171 F	TGTTGGCTAGGCTCAATCGG
	<i>pde</i> -miR171 R	TGTGATATTTGGCAGCGCTCA
	<i>Unigene10015</i> F	AATAATGGTGAAGCCAGACT
	<i>Unigene10015</i> R	CTGTTGTAAGTGGCTACTTGG
RLM-5'RACE	<i>pde</i> - <i>actin</i> F	AGAAATCCAGCCCCTTGTA
	<i>pde</i> - <i>actin</i> R	CCCCATACCAACCATCACA
	<i>Unigene10015</i> -outer	TCCAGCGGTGAAGAGATATTTGAA
	<i>Unigene10015</i> -inner	GCGGTGAAGAGATATTTGAAGTTG
	<i>Unigene45569</i> -outer	TTGAATCTTTGAGCAACACGCACA
	<i>Unigene45569</i> -inner	CTTTGAGCAACACGCACAATGACT

1.4 实时荧光定量 PCR

使用植物 Concert Plant RNA Reagent (美国 Invitrogen 公司) 分别提取 2 月龄高山松幼苗根、茎和针叶的总 RNA。用 Superscript II reverse transcriptase (美国 Invitrogen 公司) 进行反转录。荧光定量试验使用 Thunderbird SYBR Green PCR

Master Mix 试剂盒(日本 Toyobo 公司)。以 *actin* 作为 miR171a 和靶基因 *Unigene10015* 的内参基因。利用 Rotor-Gene 3000 型实时 PCR 扩增仪检测, 每个样品设 3 次生物学重复。基因相对表达量的测定采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (C 表示循环数; T 表示荧光阈值)^[13], 将基因在根中的表达水平设成 1。

2 结果与分析

2.1 pde - miR171a 前体序列的扩增及二级结构的预测

从笔者所在实验室前期得到的高山松 miRNA 高通量测序数据中筛选得到高山松 miR171a 的前体序列,进行引物设计,以高山松基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到高山松 miR171a 的前体序列长度为 96 bp(图 1)。用 RNAfold 软件在线分析其二级结构,发现高山松 pre - miR171a 可折叠成典型的茎环发夹结构(图 2),预测得出其二级结构的最小折叠自由能(minimal folding free energy, 简称 MFE)为 -230.74 kJ/mol,最小折叠自由能指数

(minimal folding free energy index, MFEI)为 1.28, miR171a 的成熟序列(5' - UGAUUGAGCCGUGCCA AUAUC - 3')位于茎环结构的 3'端。

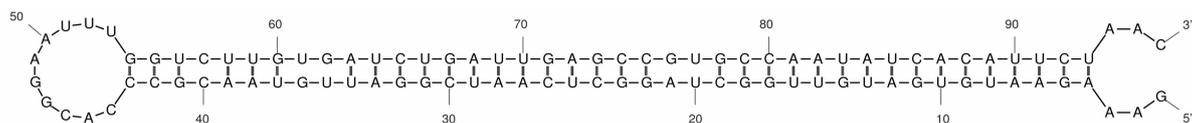


图2 pde-miR171a 前体的茎环结构

2.2 高山松 miR171a 成熟序列和前体序列的分析

对 miRBase 数据库中不同植物的 miR171a 成熟序列与高山松 miR171a(pde - miR171a)的成熟序列进行比对,发现除了高粱 sbi - miR171a、pde - miR171a 的成熟序列完全一致外,其他物种的 miR171a 如拟南芥 ath - miR171a、玉米 zma - miR171a、火炬松 pta - miR171a、水稻 osa - miR171a、油菜 bna - miR171a、大豆 gma - miR171a、毛白杨 ppt - miR171a、毛果杨 ptc - miR171a 及卷柏 smo - miR171a 与高山松 pde - miR171a 的成熟序列间有 1 个或多个碱基的差异(图 3),表明高山松 pde - miR171a 的成熟序列在不同物种中的保守性不高。用 MEGA 7.0 对毛白杨、玉米、卷柏、高粱、拟南芥、火炬松、大豆、水稻、油菜和高山松的 MIR171a 共 25 个成员构建系统发育树。结果(图 4)显示,不同物种的 MIR171 前体保守性不高,高山松与火炬松的前体序列聚为一类,二者间的进化关系较近。

2.3 高山松 miR171a 靶基因的预测及 RLM - 5' RACE 验证

以高山松 miR171 成熟序列为对象、高山松转录组数据库为靶标,用 psRNAtarget 进行 pde - miR171a 靶基因预测。如表 2 所示,pde - miR171a 的靶基因分别为 GRAS 家族转录因子(Unigene10015)、肌动蛋白结合蛋白(Unigene83401)及未知蛋白(Unigene84522),其中 pde - miR171a 与高山松 GRAS 家族转录因子

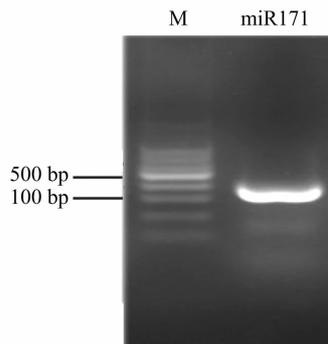


图1 高山松 miR171a 前体序列的扩增结果

拟南芥 ath-miR171a	TGATTGAGCCGCGCCAATATC...	21
油菜 bna-miR171a	...TTGAGCCGTGCCAATATCACG	21
大豆 gma-miR171a	...TGAGCCGTGCCAATATCACG	20
水稻 osa-miR171a	TGATTGAGCCGCGCCAATATC...	21
高山松 pde-miR171a	TGATTGAGCCGTGCCAATATC...	21
毛白杨 ppt-miR171a	...TGAGCCGCGCCAATATCACA	20
火炬松 pta-miR171a	TGATTGAGACGAGTCCATATC...	21
毛果杨 ptc-miR171a	...TTGAGCCGTGCCAATATCACG	21
高粱 sbi-miR171a	TGATTGAGCCGTGCCAATATC...	21
卷柏 smo-miR171a	...TTGAGCCGTGCCAATATCACT	21
玉米 zma-miR171a	TGATTGAGCCGCGCCAATAT...	20
consensus	**** * * * * *	

图3 不同植物 miR171a 成熟序列比对

(Unigene10015)的匹配程度最高。

为了进一步验证高山松 miR171a 对潜在靶基因是否存在剪切作用,笔者用 RLM - 5' RACE 方法对靶基因 Unigene10015、Unigene83401 mRNA 的 3'端剪切产物进行扩增。测序结果表明,高山松 pde - miR171a 对 GRAS 家族转录因子的剪切位点位于第 13 个至第 14 个碱基之间,对肌动蛋白结合蛋白的剪切位点位于经典切割位点下游第 20 个碱基处(图 5),表明 GRAS 家族转录因子(Unigene10015)和肌动蛋白结合蛋白(Unigene83401)的基因确实是 miR171a 的靶基因,miR171a 可以在转录后水平调控 GRAS 家族转录因子和肌动蛋白结合蛋白基因的表达。

2.4 高山松 pde - miR171a 及其靶基因 Unigene10015 在不同组织中的表达分析

通过荧光定量 PCR 检测 pde - miR171a 及其靶基因 Unigene10015 在高山松根、茎和针叶中的表达

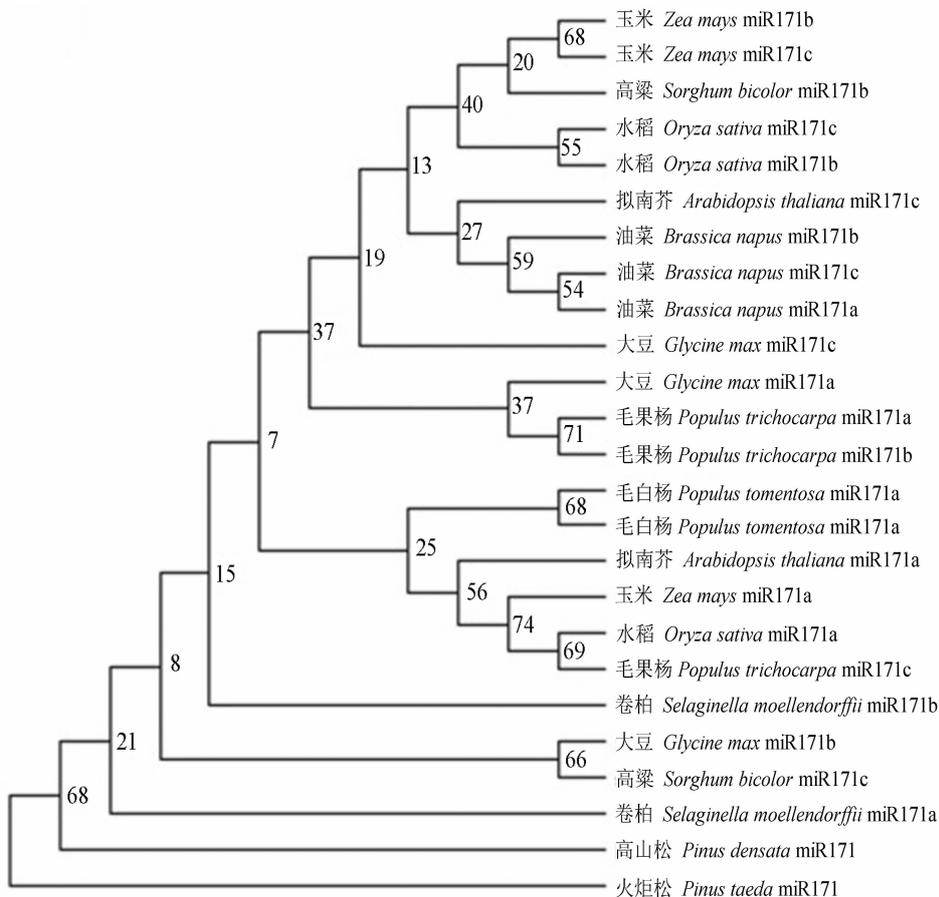
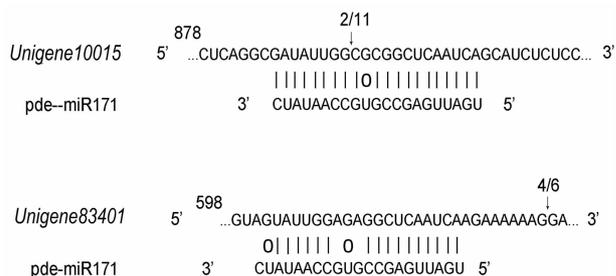


图4 高山松与其他植物种 miR171 前体序列的系统进化树分析

表 2 高山松 miR171a 靶基因及功能预测结果

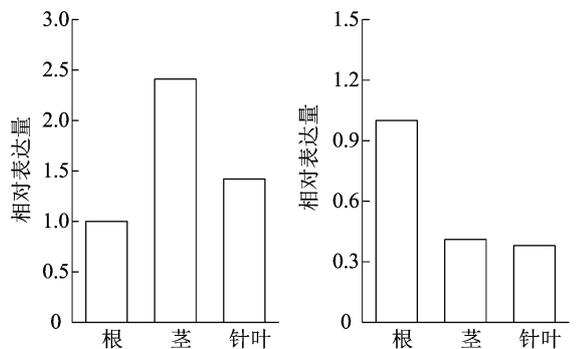
靶基因	得分	靶蛋白	GO 注释
<i>Unigene10015</i>	0.5	GRAS 家族转录因子	DNA binding
<i>Unigene84522</i>	0.5	未知蛋白	
<i>Unigene83401</i>	3.0	肌动蛋白结合蛋白	<i>actin binding</i>



箭头表示 miR171a 对靶基因的剪切位点

图5 高山松 miR171a 靶基因切割位点的验证

情况。结果（图 6）显示，pde - miR171a、*Unigene10015* 在高山松不同组织中的表达情况存在差异，pde - miR171a 在茎中的相对表达量最高，其次在针叶中，而靶基因 *Unigene10015* 在茎、针叶中的相对表达量最低；靶基因 *Unigene10015* 的相对表达量与 pde - miR171a 的相对表达量呈负相关。



a. miR171a 在根、茎和针叶中的相对表达量 b. *Unigene10015* 在根、茎和针叶中的相对表达量
图6 pde-miR171a 和靶基因 *Unigene10015* 在高山松根、茎和针叶中的相对表达量

3 讨论与结论

随着高通量测序技术的快速发展,对裸子植物进行高通量转录组测序的研究不断增多,有助于通过生物信息学方法对 miRNAs 的鉴定提供数据基础^[14-16]。本研究对鉴定到的 miR171a 前体基因 Pre - miR171a 进行克隆,得到 miR171a 的前体序列长度为 96 bp,可形成稳定的茎环发夹结构,说明 miR171a 确实在高山松中存在并表达。最小折叠自

由能指数 (minimal folding free energy index, 简称 MFEI) 是将 miRNA 与其他小分子 RNA 区分开来的重要参数, 一般植物的 MFEI 大于 0.85^[17]。在本研究中, miR71a 前体的 MFEI 为 1.28, 显著高于黑胡椒 miR171 前体的 MFEI (0.80)^[6], 但与拟南芥^[18]、水稻^[8] 和烟草^[10] 中 miRNA 前体的 MFEI 类似。这些结果为进一步研究高山松 miR171a 的功能奠定了基础。

植物的成熟 miRNA 能通过核酸互补指导 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 去切割或者抑制靶基因表达^[19]。目前主要采用 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 的方法验证 miRNA 对靶基因 mRNA 的切割作用^[12]。笔者用 RLM-5'RACE 方法对预测的 2 个靶基因 *Unigene10015* (GRAS 家族转录因子)、*Unigene83401* (肌动蛋白结合蛋白) 进行验证。结果显示, 高山松 miR171a 介导靶基因 *Unigene10015* (GRAS 家族转录因子) 的 mRNA 剪切降解, 且剪切位点在第 13、第 14 位碱基之间。通过 5'RACE 试验方法发现, 拟南芥中 GRAS 家族转录因子 Scarecrow-Like 是 miR171 的靶基因, 切割位点也在第 13、第 14 位碱基之间^[7]。另外, 高山松 miR171a 与靶基因 *Unigene83401* (肌动蛋白结合蛋白) 的切割位点在典型的 miRNA 切割位点下游第 20 个碱基处, 这可能是由于 siRNA 在 miRNA 切割位点下游第 20 个核苷酸处发生的第 2 次切割^[20]。以上结果表明, miR71a 能够通过识别、结合, 然后切割相应的靶基因, 从而调控高山松的生长发育。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Zhang B H, Pan X P, Cobb G P, et al. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact [J]. *Developmental Biology*, 2006, 289(1): 3-16.
- [3] Wan L C, Zhang H Y, Lu S F, et al. Transcriptome-wide identification and characterization of miRNAs from *Pinus densata* [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 132-142.
- [4] Cao D C, Xu H M, Zhao Y Y, et al. Transcriptome and degradome sequencing reveals dormancy mechanisms of *Cunninghamia lanceolata* seeds [J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(4): 2347-2362.
- [5] Li W F, Zhang S G, Han S Y, et al. The post-transcriptional regulation of LaSCL6, by miR171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10(1): 223-229.
- [6] Asha S, Nisha J, Soniya E V. *In silico* characterisation and phylogenetic analysis of two evolutionarily conserved miRNAs (miR166 and miR171) from black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31: 707-718.
- [7] Llave C, Xie Z X, Kasschau K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA [J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [8] Fan T, Li X M, Yang W, et al. Rice osa-miR171c mediates phase change from vegetative to reproductive development and shoot apical meristem maintenance by repressing four *OsHAM* transcription factors [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125833.
- [9] 刘志祥, 曾超珍, 曾渭贤, 等. 杨树 MIR171 基因家族进化与功能分化研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(2): 313-319.
- [10] 张力, 沙爱华. 烟草 microRNA171c 的功能分析 [J]. *植物科学学报*, 2016, 34(5): 775-780.
- [11] Wang B S, Mao J F, Gao J, et al. Colonization of the Tibetan plateau by the homoploid hybrid pine *Pinus densata* [J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20(18): 3796-3811.
- [12] 孔雷, 朱向向, 王屹玮, 等. 茶树 miR164a 及其靶基因的鉴定与表达分析 [J]. *茶叶科学*, 2018, 38(6): 547-558.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] Qiu Z B, Wan L C, Chen T, et al. The regulation of cambial activity in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) involves extensive transcriptome remodelling [J]. *New Phytologist*, 2013, 199(3): 708-719.
- [15] Wang L, Zhao J, Luo K, et al. Deep sequencing discovery and profiling of conserved and novel miRNAs in the ovule of *Ginkgo biloba* [J]. *Trees*, 2016, 30(5): 1557-1567.
- [16] Wen C H, Lin S S, Chu F H. Transcriptome analysis of a subtropical deciduous tree: autumn leaf senescence gene expression profile of *Formosan gum* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(1): 163-174.
- [17] Zhang B H, Pan X P, Cox S B, et al. Evidence that miRNAs are different from other RNAs [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(2): 246-254.
- [18] Wang L, Mai Y X, Zhang Y C, et al. 2010. MicroRNA171c-targeted *SCL6-II*, *SCL6-III* and *SCL6-IV* genes regulate shoot branching in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 3(5): 794-806.
- [19] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 642-655.
- [20] Ronemus M, Vaughn M W, Martienssen R A. MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(7): 1559-1574.

何雨航, 杜易桓, 郭 昊, 等. 水稻 *OsENOD93b* 基因组织表达模式与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(7): 67-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.011

水稻 *OsENOD93b* 基因组织表达模式与生物信息学分析

何雨航, 杜易桓, 郭 昊, 赵 頔, 马银花

(湖南人文科技学院农业与生物技术学院/农田杂草防控技术与应用协同创新中心, 湖南娄底 417000)

摘要: 主要探究 *OsENOD93b* 基因在水稻中的组织表达模式, 并对其作生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR 技术分析 *OsENOD93b* 基因的表达模式。用 ExPASy - Protparam、ProtScale、CDD、SOPMA、Phyre 2、Psort 等在线工具对 *OsENOD93b* 进行生物信息学分析。经组织表达模式分析可知, *OsENOD93b* 基因在叶片中的含量最多, 其次是茎, 含量最少的为根。通过 ExPASy - Protparam 分析发现, *OsENOD93b* 分子量为 16.429 89 ku, 是一种具有亲水性的不稳定的碱性蛋白。该蛋白属于 ENOD93 超级家族。通过 SOPMA 在线软件对 *OsENOD93b* 蛋白的二级结构进行分析预测, 发现其由无规则卷曲 (41.56%)、 α -螺旋 (39.61%)、延伸链区 (14.94%) 和 β -转角 (3.90%) 4 种形式组成。此外, 利用不同在线工具对 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构、保守区域、亚细胞定位进行生物信息学分析。结果表明, *OsENOD93b* 基因在进化过程中具有一定的保守性, 并有多样的潜在功能待研究。研究结果为进一步探明 *OsENOD93b* 基因的生物功能提供了依据。

关键词: 水稻; ENOD; *OsENOD93b*; 组织表达模式分析; 生物信息学

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0067-04

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是稻属谷类作物, 这类经济作物需要吸收氮素合成自身需要的营养物质, 因此对水稻结瘤固氮潜能进行研究具有重大的经济意义^[1-2]。生物学上一般把宿主植物基因编码的根瘤特异性蛋白统称为结瘤素, 编码这些物质的基因称为结瘤素基因^[3]。按照结瘤素基因出现的早晚和功能不同, 将其分为早期结瘤素基因、晚期结瘤素基因^[4-5]。根据不同结瘤基因突变体对结瘤过程的影响, 将结瘤基因分为共同结瘤基因、寄主专一性基因、调节基因三大类^[6]。早期结瘤素基因参与根瘤菌的侵染和根瘤发育过程, 而晚期结瘤素基因主要负责根瘤的功能^[7]。早期结瘤素基因包括豌豆 (*Pisum sativum* L.) 中的 *PsSYM10*、*PsENOD5*、*PsENOD12A*, 大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 中的 *ENOD2B*、蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (Linn.) Link.] 中的 *CpNOD* 等。晚期结瘤素基因有紫云英

(*Astragalus sinicus* L.) 的 *As II C259*、*AsG2511*、*AsNODF32* 及百脉根 (*Lotus corniculatus* Linn.) 的 *LjCyp5* 等^[8-15]。到目前为止, 大豆早期结瘤素中研究得最清楚的是 *N-75* 基因, 晚期结瘤素中研究得较清楚的是豆血红蛋白, 它是豆科植物根瘤内的一种血红蛋白, 主要功能是运输氧、降低拟菌体周围的氧分压^[4]。

利用 *ENODZ* 的 mRNA 作探针进行研究发现在豌豆、菜豆及苜蓿中都有 1 段与 *ENODZ* 同源的基因。另外有报道显示, 不同宿主植物内含有的早期结瘤素基因的类型不同, 但均含有 *Enod2*、*Enod5*、*Enod12*、*Enod40*^[16-17]。*ENOD93* 就是一种早期结瘤素, 它在根瘤形成过程中的作用机制及在非豆科植物中的功能并不明确, 还有待进一步的研究^[4]。此外, *Sym* (symbiotic) 基因也属于早期结瘤素基因, 它是一类存在于豌豆中的共生基因^[18]。

研究人员利用生物信息学方法证明, 水稻基因组有 31 个基因与结瘤素基因具有高度同源性, 如水稻基因 *CAC39050*、*S23543*、*BAB63833*、*BAB93352* 与结瘤素基因的同源性高达 70% 以上^[7]。据报道, 大豆早期结瘤素基因 *Gmenod40* 和水稻早期结瘤素基因 *Osenod40* 的表达模式相似^[19-20]。此外, 已发表的文献显示, 豆科植物苜蓿的早期结瘤素基因 *Mrenod40* 在水稻、苜蓿中的表达方式相同^[2,21]。水

收稿日期: 2020-08-25

基金项目: 湖南省自然科学基金 (编号: 2019JJ50281); 湖南省教育厅项目 (编号: 18B455); 国家级大学生创新创业训练计划平台项目 (编号: 201910553027X)。

作者简介: 何雨航 (1999—), 女, 湖南邵阳人, 主要从事水稻遗传及转基因方面的研究。E-mail: 1835147713@qq.com。

通信作者: 马银花, 博士, 讲师, 主要从事水稻遗传及转基因方面的研究。E-mail: mayinhua1988@126.com。

稻结瘤素的研究对于提高水稻产量和经济价值有着举足轻重的作用,发现更多具有特异性功能的结瘤素家族成员也是目前研究的重要任务。

本试验以水稻为研究对象,对筛选出的 *OsENOD93b* (*LOC_Os02g13380*) 进行理化性质分析与亲水性疏水性、保守区域、蛋白二级、三级结构预测,并进行亚细胞定位,以期为深入研究该基因提供理论依据,丰富水稻结瘤素基因家族的种类。

1 材料与方法

1.1 *OsENOD93b* 蛋白的生物信息学预测

OsENOD93b 蛋白的理化性质使用线上工具 ExPASy - Protparam 进行分析;亲水性、疏水性使用 ProtScale 线上软件进行分析;蛋白保守功能区通过 CDD 软件进行在线分析;蛋白二级结构使用线上工具 SOPMA 进行分析;蛋白三级结构通过 Phyre 2 软件进行预测,蛋白亚细胞定位使用在线网站 Psort 进行分析。上述各软件的网址见表 1^[22]。

1.2 *OsENOD93b* 组织表达模式分析

首先进行水稻各组织器官总 RNA 的提取,其次,将获得的 RNA 进行反转录形成 cDNA,以此进行组织表达模式分析,具体步骤参考 Ma 等的方法^[23-24]。

表 1 分析软件的名称和网址

软件名称	网址
ExPASy - Protparam	https://web.expasy.org/protparam/
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
Phyre 2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
Psort	https://www.genscript.com/psort.html

2 结果与分析

2.1 *OsENOD93b* 蛋白理化性质分析与亲水性预测

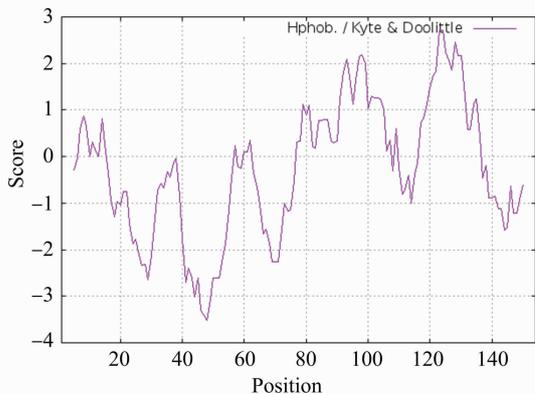
ExPASy - Protparam 线上软件的分析结果表明, *OsENOD93b* 是 1 个由 154 个氨基酸构成、分子式为 $C_{711}H_{1181}N_{227}O_{210}S_5$ 、相对分子量为 16.429 89 ku、理论等电点 (theoretical pI) 为 11.42 的蛋白质。该蛋白质富含强碱性氨基酸 [包括精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys) 等, 共计 23 个], 且含有大量强酸性氨基酸 [包括天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu), 共计 9 个]。 *OsENOD93b* 蛋白的不稳定指数为 67.09, 表现出不稳定性, 其脂肪系数为 81.88。表 2 关于氨基酸组成的分析结果显示, 丙氨酸 (Ala)、精氨酸、丝氨酸 (Ser)、亮氨酸 (Leu)、脯氨酸 (Pro)、甘氨酸 (Gly)、缬氨酸 (Val) 所占比例较高, 分别为 14.9%、10.4%、9.1%、7.1%、7.1%、6.5%、6.5%, 色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 所占比例较低, 都为 0.6%。用 ProtScale 线上工具对 *OsENOD93b* 蛋白的亲水性进行预测, 发现 *OsENOD93b* 蛋白的氨基酸组成中既有亲水氨基酸, 又有疏水氨基酸 (图 1), 其中主要包含亲水性氨基酸, 因此判断该蛋白为亲水性蛋白。综上, *OsENOD93b* 蛋白是 1 个具有亲水性的不稳定的碱性蛋白。

表 2 *OsENOD93b* 蛋白不同氨基酸所占比例

氨基酸含量	数量 (个)	占比 (%)
丙氨酸 (Ala, A)	23	14.9
精氨酸 (Arg, R)	16	10.4
天冬酰胺 (Asn, N)	8	5.2
天冬氨酸 (Asp, D)	4	2.6
半胱氨酸 (Cys, C)	2	1.3
谷氨酰胺 (Gln, Q)	5	3.2
谷氨酸 (Glu, E)	5	3.2
甘氨酸 (Gly, G)	10	6.5
组氨酸 (His, H)	2	1.3
异亮氨酸 (Ile, I)	8	5.2
亮氨酸 (Leu, L)	11	7.1
赖氨酸 (Lys, K)	7	4.5
甲硫氨酸 (Met, M)	3	1.9
苯丙氨酸 (Phe, F)	4	2.6
脯氨酸 (Pro, P)	11	7.1
丝氨酸 (Ser, S)	14	9.1
苏氨酸 (Thr, T)	9	5.8
色氨酸 (Trp, W)	1	0.6
酪氨酸 (Tyr, Y)	1	0.6
缬氨酸 (Val, V)	10	6.5

2.2 *OsENOD93b* 蛋白的保守域

用 CDD 在线软件对 *OsENOD93b* 蛋白的保守功



score值表示氨基酸残基疏水性,该分值越高则表示所测蛋白的疏水性越强,分值越低代表亲水性越强

图1 OsENOD93b 蛋白的疏水性/亲水性预测分析

能域进行预测,由图 2 可知,*OsENOD93b* 基因的特异性匹配 (specific hits) 和非特异性匹配 (non-specific hits) 都在 ENOD93,且该蛋白属于 ENOD93 superfamily (ENOD93 超级家族)。

2.3 *OsENOD93b* 蛋白的二级结构

利用线上工具 SOPMA 预测 *OsENOD93b* 蛋白的二级结构。由图 3 可以看出,*OsENOD93b* 蛋白的二级结构主要由无规则卷曲 (41.56%)、 α -螺旋 (39.61%)、延伸链区 (14.94%) 和 β -转角 (3.90%) 组成。因此可知,该蛋白的空间构象可能主要由无规则卷曲结构构成。

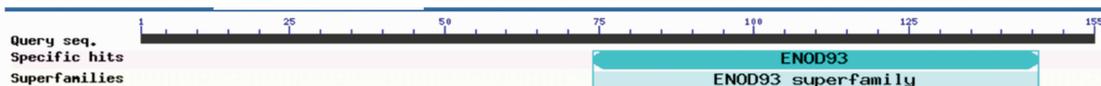
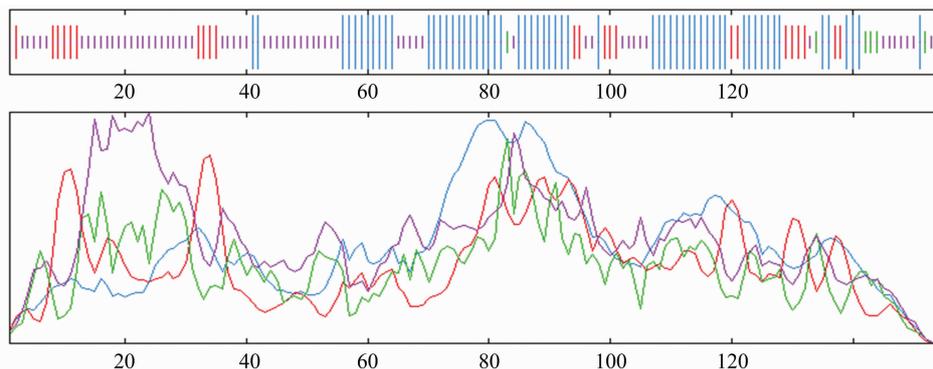


图2 *OsENOD93b* 基因编码蛋白的保守功能域



蓝色曲线表示蛋白 α -螺旋,红色曲线表示延伸链区,绿色曲线表示 β -转角,紫色曲线表示无规则卷曲

图3 *OsENOD93b* 编码蛋白的二级结构

2.4 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构预测

利用线上工具 Phyre2 预测 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构。由图 4 可以看出,该蛋白只含有 1 条肽链,没有三级结构,说明该蛋白空间构象较简单,且不能折叠形成特异的空间构象。



图4 *OsENOD93b* 蛋白的三级结构预测

2.5 *OsENOD93b* 蛋白的亚细胞定位

通过线上工具 Psort 对 *OsENOD93b* 蛋白进行亚细胞定位,结果(表 3)表明,该蛋白定位在线粒体的可能性为 30.4%,定位在细胞质的可能性为 26.1%,定位在细胞核、内质网、高尔基体、液泡、分泌系统囊泡、细胞外(包括细胞壁)等地方的可能性分别为 8.7%、8.7%、8.7%、8.7%、4.3%、4.3%。根据上述数据推测,*OsENOD93b* 蛋白定位在线粒体的可能性最大,其次是细胞质,也可能是胞核、内质网、高尔基体、液泡、分泌系统囊泡和细胞外(包括细胞壁)。

2.6 *OsENOD93b* 基因组织表达模式分析

首先,通过特定方法提取水稻根、茎、叶的 RNA,将其反转录成 cDNA。其次,利用实时荧光定量 PCR 的方法,检测 *OsENOD93b* 基因在不同组织器官中的表达水平。研究结果显示,*OsENOD93b* 基

表3 OsENOD93b 蛋白定位在不同亚细胞结构中的可能性

亚细胞结构	可能性 (%)
线粒体	30.4
细胞质	26.1
细胞核	8.7
内质网	8.7
液泡	8.7
高尔基体	8.7
分泌系统囊泡	4.3
细胞外(包括细胞壁)	4.3

因的总体表达水平相对较高,在根、茎、叶器官中均有表达,在叶中的表达量最高,其次是茎中,表达量最少的为根中(图5)。上述结果表明,OsENOD93b的功能在不同植物中可能具有一定的潜在多样性。

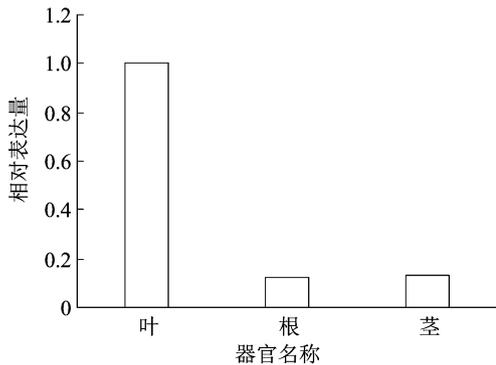


图5 OsENOD93b 的组织表达模式

3 讨论

本研究发现,OsENOD93b 在水稻根、茎、叶中有不同水平的表达,在叶中的表达量最高,在根、茎中的表达量相对较低。但是根据其在各组织中均有表达,且相对表达量较高的情况来看,OsENOD93b 基因在水稻早期结瘤素家族中有着举足轻重的地位。因此,对 OsENOD93b 表达的特异性进行详细研究,有助于探明 OsENOD93b 蛋白功能的特异性。

生物信息学分析发现,OsENOD93b 蛋白是一个亲水的、不稳定的碱性蛋白,属于 ENOD93 superfamily(ENOD93 超级家族)。蛋白二级结构预测发现,该蛋白晶体的空间构象可能是以无规则卷曲结构构成的;OsENOD93b 蛋白没有三级结构,由 1 条链组成;此外,OsENOD93b 蛋白定位预测结果表明,它定位于线粒体的可能性最大,比定位在细胞质的可能性更大。由此可见,OsENOD93b 蛋白极有可能在线粒体中表达其功能。但目前尚未发现

OsENOD93b 在线粒体中的详细功能。后续将对 OsENOD93b 进行功能性研究,以期发现对未来新型水稻品种有利的功能。

4 结论

组织表达模式分析结果表明,OsNOD93b 参与各组织的表达,在叶中的表达明显。通过 ExPASy - ProtParam 在线软件预测可知,OsNOD93b 是一个具有亲水性、保守的、碱性的、不稳定的蛋白分子,亚细胞定位预测结果显示,该蛋白可能在定位线粒体中,以高水平、保守的方式调控水稻的重要生物学功能及作用机制。

参考文献:

- [1] Dey M, Datta S K. Promiscuity of hosting nitrogen fixation in rice: an overview from the legume perspective [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(3): 281 - 314.
- [2] 王彦章, 俞冠翘, 沈善炯, 等. 大豆早期结瘤素基因 *enod2B* 启动子在水稻中的表达受结瘤因子诱导 [J]. 科学通报, 2004, 49(3): 238 - 244.
- [3] 曹鹏. 放线菌根瘤结构及四川桉木光合特性研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2008: 1 - 75.
- [4] 王洪隆, 荆玉祥. 豆科植物根瘤发生的分子生物学 [J]. 植物学通报, 1991, 8(1): 1 - 8.
- [5] 王喆. 蜡梅结瘤素基因 *CpNOD* 的克隆与表达分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2012: 1 - 75.
- [6] 樊妤姬, 陈丽梅, 马庆生. 根瘤菌共生结瘤基因的分子遗传学研究进展 [J]. 遗传, 1998(2): 3 - 5.
- [7] 王彦章, 俞冠翘, 朱家璧. 水稻中结瘤素基因的同源基因研究 [J]. 中国水稻科学, 2005, 19(3): 202 - 208.
- [8] 谢玉会, 田婷婷, 黄国栋, 等. 豌豆早期结瘤素基因 *PsSYM10* 的克隆及其表达载体的构建 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(6): 69 - 72.
- [9] Albrecht C, Geurts R, Lapeyrie F, et al. Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A* [J]. The Plant Journal, 1998, 15(5): 605 - 614.
- [10] 王洪伟, 张兴国, 黎林, 等. 豌豆早期结瘤素基因 *ENOD12A* 的克隆及与 *PsLectin* 基因二元表达载体的构建 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2009, 34(3): 202 - 205.
- [11] 王彦章, 俞冠翘, 沈善炯, 等. 大豆早期结瘤素基因 *enod2B* 启动子在水稻中的表达受结瘤因子诱导 [J]. 科学通报, 2004, 49(3): 238 - 244.
- [12] 王喆, 汤玲, 睦顺照, 等. 蜡梅结瘤素基因 *CpNOD* 的克隆与表达分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(2): 20 - 26.
- [13] 丑敏霞, 魏新元, 陈大松, 等. 紫云英参与共生固氮的 2 个新结瘤基因的分离与鉴定 [J]. 科学通报, 2007, 52(18): 2140 - 2146.
- [14] 李一星. 半胱氨酸蛋白酶基因 *Asnod32* 在紫云英根瘤衰老过程中的功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

杨滨娟,张颖睿,袁嘉欣,等. 紫云英与氮肥配施对水稻氮素吸收利用的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):71-77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.012

紫云英与氮肥配施对水稻氮素吸收利用的影响

杨滨娟,张颖睿,袁嘉欣,黄国勤

(江西农业大学农学院/江西农业大学生态科学研究中心,江西南昌 330045)

摘要:为了探明紫云英还田配施减量氮肥的作用机制,为南方稻田合理施肥提供理论指导和技术支撑。在“紫云英-双季稻”复种型农作制度基础上,采用大田试验,设置3个梯度的紫云英还田量,并配施相应的减量氮肥,以常规施肥作对照,分析不同紫云英与氮肥配施比例对水稻产量、干物质积累情况以及氮素积累的影响,并利用施氮量和水稻产量建立纯N-紫云英-水稻产量的关系模型。研究表明:紫云英 27 000 kg/hm² + 纯N 120 kg/hm² 有提高早稻产量的趋势,紫云英 45 000 kg/hm² + 纯N 60 kg/hm² 的晚稻产量最高,从全年产量来看,紫云英 36 000 kg/hm² + 纯N 90 kg/hm² 表现最佳。与常规施肥相比,翻压紫云英还田可以提高早稻中后期干物质积累比例,提高植株氮素积累量和氮收获指数。紫云英替代系数的变化表明,在早稻供氮量充足的情况下,随着紫云英还田量在全部施肥量中比例的增加,紫云英替代氮肥效应的能力逐渐减弱。

关键词:水稻;施氮水平;紫云英;氮素吸收利用;关系模型

中图分类号: S551;S344 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0071-07

长江中下游冬闲田、冬季光温水热等资源的合理开发利用一直是我国重点关注的农业问题^[1-2]。江西、湖南等省是我国双季稻主产区,但在晚稻收

获后由于茬口紧、冬种作物品种少、经济效益低等原因,90%以上的农户会选择撂荒,造成土地和光、温、水、热资源的严重浪费^[3-5]。利用冬闲田种植紫云英、油菜等绿肥,可以美化农村环境,带动当地旅游产业的兴起和发展^[6],还可以减少粉尘扬灰,降低雾霾指数,有利于改善空气质量^[7],能够防止水土流失,改善土壤肥力,维持稻田生态环境^[8-9]。氮素是水稻生长必不可少的营养元素之一^[10],但氮肥的过量施用,不仅会导致水稻贪青晚熟、倒伏减产,降低氮肥利用效率^[11],还极易造成土壤中氮素盈余,导致农业资源浪费、水体富营养化等环境问

收稿日期:2020-07-06

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0300208);国家自然科学基金(编号:41661070)。

作者简介:杨滨娟(1985—),女,山东淄博人,博士,助理研究员,主要从事耕作制度与农业生态研究。E-mail: yangbinjuan@jxau.edu.cn。

通信作者:黄国勤,博士,教授,主要从事作物学、生态学、农业发展与区域农业、资源环境与可持续发展等研究。E-mail: hgqjxes@sina.com。

[15] 苟洪兰. 半胱氨酸蛋白酶基因在百脉根根瘤衰老中的功能研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012.

[16] 黄家凤,李克梅,王爱英,等. 豆科植物-根瘤菌共生固氮的分子机理[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2002,6(1):74-78.

[17] Borisov A Y, Tsyganov V E, Ovtsyna A O, et al. Genetic programs for development of nodules and Arbuscular mycorrhiza in Legumes: solid facts and unsolved problems[C]//Sustainable Agriculture and the Environment Proceedings of the 14th International Nitrogen Fixation Congress. Springer,2004:261-263.

[18] 黎林. 豌豆早期结瘤素基因克隆及 *PsENOD12A* 与 *PsLectin* 基因导入烟草研究[D]. 重庆:西南大学,2009:1-71.

[19] Reddy P M, Aggarwal R K, Ramos M C, et al. Widespread occurrence of the homologue of the early nodulin (*ENOD*) genes in *Oryza* species and related grasses[J]. Biochemical and Biophysical

Research Communications,1999,258(1):148-154.

[20] Kouchi H, Takane K I, So R B, et al. Rice *ENOD40*: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules[J]. The Plant Journal,1999,18(2):121-129.

[21] Dey M, Torrizo L B, Chaudhuri R K, et al. Transgenic rice harbouring legume *ENOD40* gene[J]. Rice Genet Newsl,1999,16:147-149.

[22] 高南,李俊林,郝东利,等. *O_sAKT2/3* 基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):25-27.

[23] Ma Y H, Zhao Y, Shanguan X X, et al. Overexpression of *O_sRRK1* changes leaf morphology and defense to insect in rice[J]. Frontiers in Plant Science,2017,8:1-14.

[24] 马银花,李萍芳,何雨航,等. 水稻 *O_sRRK1* 蛋白的进化分析及其亚细胞定位[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),2020,33(3):371-376.

题^[12]。因此,如何在维持水稻产量的同时提高氮肥利用效率,减少环境污染,实现水稻优质、高产、高效是当前水稻生产亟待解决的问题^[13-14]。农业农村部启动“减肥减药”行动,力争在 2020 年实现农作物化肥、农药施用量零增长,如何做到“减肥”但不减产,有机肥的使用是关键,提高有机肥的利用率,保证土壤肥力不减,那么基础产出能力就不会降低^[15-17]。胡安永等研究发现,紫云英—水稻轮作模式下的水稻植株氮素积累量显著大于冬闲—水稻、小麦—水稻和油菜—水稻^[18-19]。Mohanty 等研究表明,与单施化肥相比,绿肥和化肥配施可以显著提高作物氮肥利用率^[20]。杨滨娟等研究表明,在紫云英盛花期,翻压 60% 的鲜草量配施常规施氮的 60% 氮肥可以有效提高氮肥利用效率,改善稻田氮素循环情况^[21]。因此,冬种紫云英配施减量氮肥是目前绿肥在水稻生产中应用的发展趋势^[22],但现有研究多是针对紫云英鲜草全量或某特定鲜草量还田后氮肥减施量的研究,鲜有研究不同紫云英鲜草量全量还田条件下氮肥的减施比例。本试验根据前期盆栽试验结果^[23],结合大田紫云英实际生长情况,分析不同紫云英鲜草量全量还田条件下,减施氮肥对水稻产量、干物质积累情况以及氮素积累的影响,利用施氮量和水稻产量建立纯 N—紫云英—水稻产量的关系模型,旨在探明紫云英还田配施减量氮肥的最优模式,为南方稻田合理施肥提供理论指导和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验地地理位置与气候条件

于 2015 年 9 月至 2017 年 12 月,试验在江西农业大学科技园水稻试验田(115°55'E、28°46'N)进行。试验地属于亚热带季风性湿润气候,年均太阳总辐射量为 4.79×10^{13} J/hm²,年均日照时数为 1 852 h,年均日温 ≥ 0 °C 的积温达 6 450 °C,年降水量 1 624 mm,年平均气温在 17.1~17.8 °C。供试土壤为发育于第四纪的红黏土,为亚热带典型红壤分布区。试验前表层 0~15 cm 土壤 pH 值 5.97,碱解氮含量 23.33 mg/kg,有效磷含量 15.58 mg/kg,速效钾含量 34.75 mg/kg,有机质含量 24.58 g/kg,全氮含量 1.97 g/kg,全磷含量 0.23 g/kg,全钾含量 26.49 g/kg。

1.2 试验设计与材料

根据前期盆栽试验结果^[23],在大田试验中考虑

紫云英的实际生长情况,设定 4 个梯度的紫云英鲜草还田量,即 0、27 000、36 000、45 000 kg/hm²,设定 4 个梯度的早稻氮肥施用量,即纯 N180(常规施氮)、120、90、60 kg/hm²。每个处理 4 次重复,共 16 个小区,小区面积为 16.5 m²(5.5 m×3 m),小区之间用水泥埂隔开,以防止水肥串流。为了使大田试验更具有实际操作的意义,晚稻施肥不进行减氮处理,按常规施肥量进行,详见表 1。

表 1 大田试验设计

处理	紫云英还田量 (kg/hm ²)	早稻纯 N 施用量 (kg/hm ²)	晚稻纯 N 施用量 (kg/hm ²)
A	0	180	180
B	27 000	120	180
C	36 000	90	180
D	45 000	60	180

供试紫云英为余江大叶籽,早稻为中嘉早 17,晚稻为天优华占。紫云英播种量分别为 51.0、37.5、25.5 kg/hm²,播种时间在 2016 年 10 月 4 日,播种时用钙镁磷肥(含 P₂O₅ 12%)拌种,P₂O₅ 用量 45 kg/hm²,所用磷肥在水稻施肥总量中扣除,紫云英在盛花期(2017 年 4 月 1 日)还田,鲜草含水量 90.20%,干草含氮量 2.74%。早稻于 2017 年 3 月 27 日播种,4 月 27 日移栽,7 月 23 日收割。晚稻于 2017 年 6 月 28 日播种,7 月 29 日移栽,10 月 29 日收割。移栽时行距 23 cm,株距 20 cm,每小区 338 丛(20.48 丛/m²)。

常规施肥种类及用量:每季施纯 N 180 kg/hm²(肥料品种为尿素,含 N 46%),P₂O₅ 90 kg/hm²(肥料品种为钙镁磷肥,含 P₂O₅ 12%),K₂O 120 kg/hm²(肥料品种为氯化钾,含 K₂O 60%)。氮肥按基肥:分蘖肥:穗肥=3:4:3 施用;磷肥作基肥一次性施入;钾肥按分蘖肥:穗肥=7:3 施用。基肥在插秧前 1 d 施下,分蘖肥在水稻移栽后 5~7 d 时施用,穗肥在主茎幼穗长 1~2 cm 时施用。其他田间管理措施同一般大田。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 作物产量 冬季作物紫云英在其盛花期,采用五点法,每点测 1 m² 生物量鲜质量。水稻在成熟期每个小区随机取 5 丛植株,自然风干做考种材料,测定穗长、每穗粒数、实粒数、千粒质量和有效穗数;水稻收获时,每个小区单独打谷晾晒,测定各小区产量。

1.3.2 水稻主要生育期含氮量及氮素吸收利用效

率测定 每个时期植株干物质积累称量结束后,将其粉碎混匀,采用 $H_2SO_4 - H_2O_2$ 消化,以半微量凯氏定氮法测定植株各器官全氮含量^[24]。其他指标计算方法如下^[25]:

氮素干物质生产效率(kg/kg) = 单位面积植株干物质积累量/单位面积植株氮素积累总量;

氮素稻谷生产效率(kg/kg) = 单位面积籽粒产量/单位面积植株氮素积累总量;

氮素收获指数 = 籽粒氮素积累量/地上部氮素积累总量 × 100%;

氮素减投比 = (常规施氮量 - 实际施氮量)/紫云英还田氮素总量。

1.4 数据处理

采用 Excel 2016 软件进行数据计算统计及绘图,采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析和多重比较,在 $\alpha=0.05$ 水平下进行方差分析,采用 Duncan's 新

复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 紫云英还田与氮肥配施对水稻产量及产量构成因素的影响

从表 2 可以看出,各处理间的早稻、晚稻和全年产量均差异不显著。

从表 3 早稻数据可以看出,处理 B 的穗长最大,处理 A 最小,且显著低于处理 B 和处理 C ($P < 0.05$)。处理 B 的结实率最低,与其他处理间差异显著 ($P < 0.05$),且对照处理 A 的结实率最高,为 82.31%,较处理 B 高出 13.27%。在每穗粒数、千粒质量和有效穗数方面,各处理间差异均不显著。晚稻数据显示,各因素指标的 4 个处理之间,大小均无显著性差异。可以看出,不同的紫云英翻压量配施减量氮肥能够保持水稻产量,不会造成水稻减产。

表 2 2017 年早、晚稻产量及全年产量

处理	产量(kg/hm ²)		
	早稻	晚稻	全年
A	7 425.94 ± 776.97a	7 380.62 ± 197.64a	14 806.55 ± 885.40a
B	7 614.30 ± 613.49a	7 180.01 ± 514.33a	14 794.30 ± 655.01a
C	7 373.03 ± 554.22a	7 584.98 ± 466.45a	14 958.01 ± 697.25a
D	6 874.25 ± 656.52a	7 731.67 ± 333.43a	14 605.92 ± 789.30a

注:数据为 4 个重复的平均值 ± 标准误;同列数据后不同小写字母分别表示差异达 5% 显著水平。下表同。

表 3 2017 年早、晚稻产量构成因素

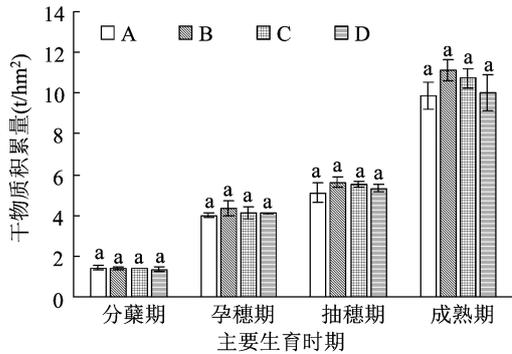
处理	穗长 (cm)	每穗粒数 (粒/穗)	结实率 (%)	千粒质量 (g)	有效穗数 (万个/hm ²)	
						早稻
早稻	A	18.70 ± 0.22b	157.63 ± 4.60a	82.31 ± 2.68a	24.91 ± 0.81ab	227.33 ± 6.53a
	B	19.81 ± 0.33a	162.51 ± 4.56a	72.67 ± 1.13b	26.86 ± 0.87a	239.10 ± 20.62a
	C	19.62 ± 0.21a	166.97 ± 4.04a	77.64 ± 0.70a	25.91 ± 0.76a	219.65 ± 15.54a
	D	19.28 ± 0.31ab	156.47 ± 3.43a	79.19 ± 1.10a	25.09 ± 1.00a	220.16 ± 12.89a
晚稻	A	21.37 ± 0.46a	158.36 ± 6.47a	82.23 ± 2.10a	25.68 ± 1.47a	223.74 ± 13.82a
	B	21.19 ± 0.28a	159.49 ± 9.41a	81.98 ± 3.31a	23.99 ± 0.52a	230.40 ± 15.36a
	C	21.50 ± 0.40a	168.91 ± 4.55a	80.32 ± 1.59a	25.38 ± 0.05a	220.16 ± 10.66a
	D	22.12 ± 0.11a	168.21 ± 3.97a	80.11 ± 2.59a	24.42 ± 0.58a	235.52 ± 7.43a

2.2 紫云英还田与氮肥配施对早稻干物质生产特性的影响

2.2.1 早稻主要生育期的干物质量 从图 1 可以看出,各时期各处理之间干物质量差异均不显著。在分蘖期,处理 A 的干物质量略高于其他处理,而在其他时期,均为处理 B 最高,各处理之间的差异随着水稻的生长越来越明显。在孕穗期、抽穗期和成熟期,各处理干物质量大小趋势一致。可以看出,紫云英与减量氮肥和常规施肥对早稻干物质积

累影响的差异主要体现在早稻生长的中后期。

2.2.2 早稻主要生育阶段干物质积累量和比例 从图 2 可以看出,在播种—分蘖期,干物质积累比例最大的是处理 A,最小的是处理 B;在分蘖—孕穗期干物质积累比例最大的是处理 D,最小的是处理 C;在孕穗—抽穗期积累比例最大的是处理 C,最小的是处理 A;在抽穗—成熟期积累比例最大的是处理 B,最小的是处理 D。可以得出,紫云英与氮肥减量配施可以提高早稻在孕穗—抽穗期阶段的干物质



同一时期不同小写字母表示不同处理间差异达 5% 显著水平。

图 3 同

图1 2017 年早稻主要生育期干物质质量

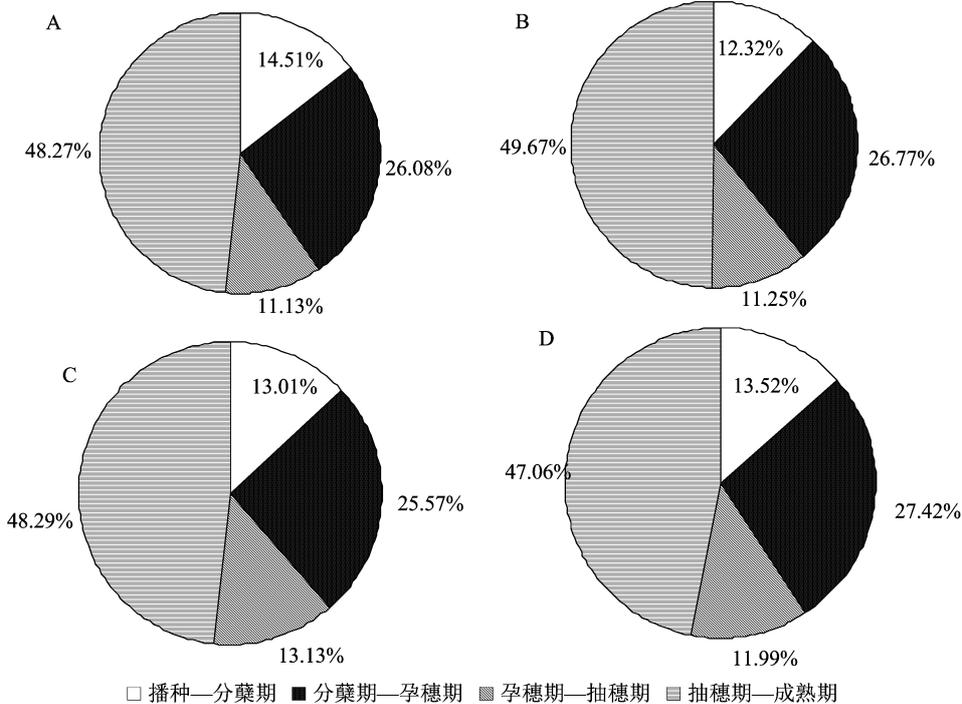


图2 2017 年早稻主要生育阶段干物质积累比例

表 4 2017 年早稻主要生育期各器官含氮量

%

处理	分蘖期		孕穗期		抽穗期			成熟期		
	茎	叶	茎	叶	茎	叶	穗	茎	叶	穗
A	2.30a	4.62a	1.62a	3.72a	1.31b	3.63ab	1.49ab	0.96b	2.46ab	1.31a
B	2.30a	4.66a	1.65a	3.78a	1.29b	3.63ab	1.44ab	0.96ab	2.46ab	1.32a
C	2.40a	4.53a	1.56a	3.74a	1.40ab	3.52b	1.55a	0.97ab	2.36b	1.35a
D	2.37a	4.66a	1.64a	3.72a	1.47a	3.67a	1.30b	0.98a	2.52a	1.33a

2.3.2 早稻主要生育期氮素积累量 从图 3 可以看出,各个时期的氮素积累量在各处理间差异均不显著。在分蘖期,氮素积累量最大的为处理 A,在孕穗期、抽穗期和成熟期,氮素积累最高的为处理 B,且对照处理 A 的氮素积累量持续最低。在成熟期,

积累比例。

2.3 紫云英还田与氮肥配施对早稻氮素吸收利用的影响

2.3.1 早稻主要生育期各器官含氮量 植株含氮量直接反映了水稻吸收氮素的能力。从表 4 可以看出,在分蘖期和孕穗期,各处理茎、叶含氮量之间差异均不显著。到抽穗期,各器官含氮量出现明显差异,处理 D 的茎含氮量显著高于处理 B 和对照处理 A ($P < 0.05$)。在成熟期,茎和叶的含氮量均是处理 D 最大,成熟期处理 C 的穗含氮量最高,但各处理间差异不显著。由此可见,本试验中 3 种配施方式下早稻各器官含氮量与常规施肥方式在同一水平。

处理 B 的氮素积累量比对照处理 A 高出 13.61%,比处理 C 和 D 分别高出 6.69%、9.40%。由此可见,紫云英翻压还田配施减量氮肥对早稻氮素积累的影响主要表现在中后期,且氮素积累总量随着紫云英翻压比例的增加而减少。

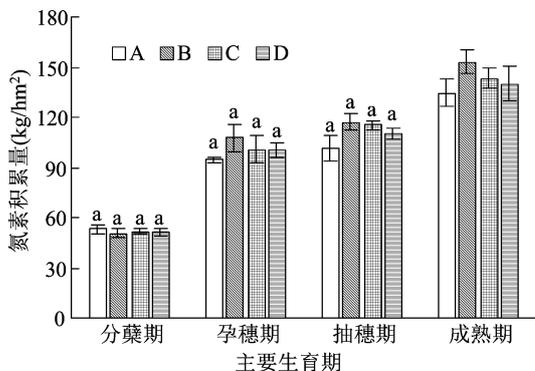


图3 2017年早稻主要生育期氮素积累量

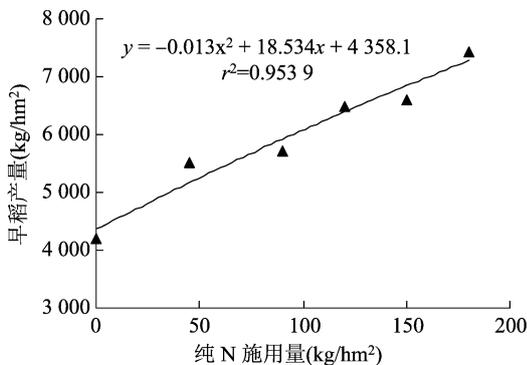


图4 纯氮用量与早稻产量关系模型

2.3.3 早稻氮素利用效率 由表5可知,氮素干物质生产效率、氮素稻谷生产效率和氮素收获指数在各处理之间均无显著差异。处理C的氮素干物质生产效率为74.98 kg/kg,较对照处理A高1.94%,氮素干物质生产效率最低的为处理D。氮素稻谷生产效率最高的为处理A,高出其他处理平均值6.02 kg/kg,最低的为处理B。氮素收获指数最高的为处理C,比对照处理A高3.07%,处理D的氮素收获指数最低。由此可见,本试验中的3种配施方式下早稻氮素吸收利用效率与常规施肥方式在同一水平。

表5 2017年早稻氮素吸收利用效率

处理	氮素干物质生产效率 (kg/kg)	氮素稻谷生产效率 (kg/kg)	氮素收获指数 (%)
A	73.55 ± 1.13a	56.67 ± 8.88a	62.48 ± 2.77a
B	73.10 ± 1.73a	49.58 ± 2.00a	63.38 ± 1.59a
C	74.98 ± 2.34a	51.71 ± 4.40a	64.40 ± 1.50a
D	71.86 ± 1.44a	50.65 ± 7.54a	60.62 ± 0.64a

2.4 纯N-水稻产量关系模型及紫云英替代系数

2.4.1 纯N-水稻产量关系模型 氮肥施用量对水稻生长动态、干物质积累、产量构成、植株含氮量等的影响,最终反映为对产量的影响。众多研究表明,水稻产量随着施氮量的增加呈现先增加后减少的趋势,其过程可用抛物线方程来描述^[26],其表达式为:

$$Y = a_1 + a_2N + a_3N^2 \quad (1)$$

式中:Y代表水稻产量;N代表纯氮施用量; a_1 、 a_2 、 a_3 为方程系数。根据江西农业大学科技园生态学试验基地(115°55'E、28°46'N)水稻试验田近年试验结果^[27]得出,江西农业大学科技园生态学试验基地水稻试验田的纯N与水稻产量的回归统计方程(图4)为:

$$Y = 4358.1 + 18.534N - 0.013N^2 (r^2 = 0.9539) \quad (2)$$

2.4.2 纯N-紫云英还田量-水稻产量关系模型及紫云英替代系数 在紫云英-双季稻种植模式中,翻压紫云英还田时其植株中的氮素可代替部分氮肥为水稻提供养分,因此在纯N-产量关系中,其纯N部分可增加为:纯N+紫云英提供的氮。根据公式(2)可以得出纯N-紫云英还田量-水稻产量关系模型,其表达式为:

$$Y = 4358.1 + 18.534(N + eM) - 0.013(N + eM)^2 \quad (3)$$

式中:M代表紫云英还田量;e为紫云英替代系数,e的大小反映紫云英还田对氮肥效应替代能力的强弱。

由公式(3)得到2017年紫云英还田量-水稻模式中的紫云英替代系数(表6),从表中数据可以看出,随着紫云英还田量在全部施肥量中的比例增加,紫云英替代系数减小。在紫云英还田量为27000 kg/hm²时,紫云英替代系数最高,为3.406 × 10⁻³;还田量为45000 kg/hm²时,紫云英替代系数为2.173 × 10⁻³。表中氮素减投比数据显示,各试验处理的氮素减投比均小于1,说明各处理的紫云英还田氮素总量均大于该处理的氮肥减施量,即该处理在早稻季供氮量充足。

3 讨论

绿肥和化肥配合施用,既可以保证水稻需肥高峰期的营养供应,又能保证肥效平稳,在水稻中后期可以显著提高植株对肥料的吸收利用^[28-30]。钱晨晨等研究表明,紫云英与氮肥配施的氮素积累量均较单施氮肥有显著提高,其增幅在6.95%~18.68%;且氮收获指数以紫云英配施纯N 90 kg/hm²处理最高^[31]。廖育林等研究表明,减少20%施氮量与紫云英配合能够维持水稻生长季的持续供氮,促进植株氮素吸收;而减少40%的施氮量

表 6 早稻纯氮-紫云英还田量-产量关系

处理	氮肥施用量 (kg/hm ²)	紫云英还田量 (kg/hm ²)	稻谷产量 (kg/hm ²)	<i>e</i>	氮素减投比
A	180	0	7 425.94		
B	120	27 000	7 614.30	3.406×10^{-3}	0.83
C	90	36 000	7 373.03	2.842×10^{-3}	0.93
D	60	45 000	6 874.25	2.173×10^{-3}	0.99

与紫云英配合,在早稻中后期供氮充足,有利于氮素向籽粒转运,提高氮素收获指数^[32]。有研究表明,大田冬种紫云英有利于水稻对氮素的吸收利用,可以有效提高稻田氮肥利用率^[28-29,33]。鲁艳红等通过研究紫云英与氮肥配施对氮素利用率的影响,发现混施处理的水稻植株氮素积累量较单施氮肥的有所提高^[34]。本研究中,紫云英 27 000 kg/hm² + 纯 N 180 kg/hm² 和紫云英 45 000 kg/hm² + 纯 N 180 kg/hm² 的成熟期氮素积累量较常规施氮处理有所提高,这与前人的结果一致。但各施肥处理成熟期穗的含氮量低于常规施氮处理,可能是因为紫云英配施氮肥主要是通过提高水稻干物质,从而提高了氮素积累量。水稻氮肥利用率低是目前水稻生产面临的重要问题,而且过量施用氮肥不利于水稻对氮肥的吸收利用^[35-36]。本研究中,紫云英可以代替一部分氮肥,在保证水稻产量的同时提高氮肥利用率,这与前人研究结果^[32,37]类似。另外,紫云英还田的处理氮素稻谷生产效率均较常规施肥处理低,说明紫云英还田后,显著提高了早稻干物质积累量,而多吸收的氮素没有增加早稻产量,这与前人的研究结果^[38-40]相似。董作珍等研究发现,通过施肥水平提高水稻植株氮素积累量,其中更多的氮素是被积累在水稻秸秆中^[41]。而本试验中,紫云英还田的紫云英 27 000 kg/hm² + 纯 N 120 kg/hm² 和紫云英 36 000 kg/hm² + 纯 N 90 kg/hm² 的氮收获指数均较常规施肥的高,说明紫云英还田有利于氮素在籽粒中积累。

刘春增等在河南信阳进行了 3 年的定位试验,通过对翻压紫云英配施减氮处理对土壤养分和产量的比较分析显示,紫云英在还田量为 22 500 kg/hm² 的情况下,化肥使用量可以减少到常规施用量的 40%^[42]。周兴等在湖南省南县的 4 年大田定位试验结果显示,紫云英还田量在 22 500 kg/hm² 的情况下,减少化肥用量 20% 和 40% 对水稻增产的效果分别为 2.37%、3.34%^[43]。本试验中,紫云英 27 000 kg/hm² + 纯 N 120 kg/hm² 对早稻增产

2.54%,而紫云英 36 000 kg/hm² + 纯 N 90 kg/hm² 和紫云英 45 000 kg/hm² + 纯 N 60 kg/hm² 分别造成早稻减产 0.71%、7.43%。各试验处理的土壤有效养分含量均有提高的趋势,其中碱解氮、速效钾和有机质含量及土壤 pH 值较对照处理平均提高 4.39%、4.99%、6.91% 和 1.47%。说明翻压紫云英还田 + ≥50% 氮肥,在氮素供应充足时,可以维持土壤肥力且不减产,甚至有小幅增产^[44],而当紫云英还田 + <50% 氮肥时,即使紫云英还田氮素总量充足,也会造成水稻减产,说明紫云英还田的氮素相对于化肥肥料,其氮素供应能力相对不足^[45],进一步说明紫云英可以作为氮肥补充氮源,但不宜作为水稻氮源供应作物^[46]。

4 结论

紫云英 27 000 kg/hm² + 纯 N 120 kg/hm² 有提高早稻产量的趋势,紫云英 45 000 kg/hm² + 纯 N 60 kg/hm² 处理的晚稻产量最高,从全年产量来看,紫云英 36 000 kg/hm² + 纯 N 90 kg/hm² 处理最佳。与常规施肥相比,翻压紫云英还田可以提高早稻中后期干物质积累比例,提高植株氮素积累量和氮收获指数。紫云英替代系数的变化表明,在早稻供氮量充足的情况下,随着紫云英还田量在全部施肥量中比例的增加,紫云英替代氮肥效应的能力逐渐减弱。各处理的氮素减投比均小于 1,即本试验中翻压紫云英还田配施减量氮肥处理对早稻供氮量充足。

参考文献:

- [1] 翟孟源,徐新良,姜小三. 我国长江中下游农业区冬闲田的遥感监测分析[J]. 地球信息科学学报,2012,14(3):389-397.
- [2] 关世怀,何勤红,杨长青. 当前冬闲田利用状况调查与思考[J]. 农村经济与科技,2016,27(7):37-38.
- [3] 王华,杨知建,李果. 我国南方双季稻区冬闲田种草模式探讨[J]. 作物研究,2014,28(2):201-203.
- [4] 陈中督. 农作措施对双季稻田固碳减排效应与农户低碳技术采纳行为研究[D]. 北京:中国农业大学,2017:1-10.
- [5] 张颖睿,黄国勤. 安福县冬闲田开发利用调研报告[M]. 北京:中国环境出版社,2017:203-212.

- [6]苏启陶,钱晨晨,黄国勤.金溪县冬闲田开发利用调研报告[M].北京:中国环境出版社,2017:222-228.
- [7]金妹兰,侯立春,徐磊.长江中下游地区耕地复种指数变化与国家粮食安全[J].中国农学通报,2011,27(17):208-212.
- [8]Ohba S Y, Matsuo T, Takagi M. Mosquitoes and other aquatic insects in fallow field biotopes and rice paddy fields [J]. Medical and Veterinary Entomology, 2013, 27(1): 96-103.
- [9]王志强,王海,黄国勤.都昌县冬季农业开发利用调研报告[J].农学学报,2016,6(8):70-74.
- [10]刘海东,唐湘如,赵烈,等.不同施肥深度对直播水稻氮素积累与转移的影响[J].华北农学报,2016,31(5):216-221.
- [11]赵宏伟,沙汉景.我国稻田氮肥利用率的研究进展[J].东北农业大学学报,2014,45(2):116-122.
- [12]Roelcke M, Han Y, Schlee K H, et al. Recent trends and recommendations for nitrogen fertilization in intensive agriculture in Eastern China [J]. Pedosphere, 2004, 14(4): 449-460.
- [13]艾玉春,董月,汪吉东,等.水稻产量主要养分限制因子及养分运筹应对技术研究[J].江苏农业学报,2015,31(3):558-563.
- [14]曾祥明,韩宝吉,徐芳森,等.不同基础地力土壤优化施肥对水稻产量和氮肥利用率的影响[J].中国农业科学,2012,45(14):2886-2894.
- [15]沈静文.农业部正式启动2020年化肥、农药用量零增长行动[J].农药市场信息,2015(7):11.
- [16]卢松.到2020年实现化肥零增长[N].河南日报,2015-04-04(3).
- [17]袁嫚嫚,刘勤,张少磊.太湖地区稻田土壤冬绿肥固氮特性研究[J].土壤通报,2010,41(5):1115-1119.
- [18]胡安永,刘勤,孙星,等.太湖地区不同轮作模式下的稻田氮素平衡研究[J].中国生态农业学报,2014,22(5):509-515.
- [19]周春火,潘晓华,吴建富,等.不同复种方式对早稻产量和氮素吸收利用的影响[J].江西农业大学学报,2013,35(1):13-17,32.
- [20]Mohanty S, Nayak A K, Kumar A, et al. Carbon and Nitrogen mineralization kinetics in soil of rice-rice system under long term application of chemical fertilizers and farmyard manure [J]. European Journal of Soil Biology, 2013, 58(4): 113-121.
- [21]杨滨娟,黄国勤,陈洪俊,等.利于水稻氮素吸收的绿肥翻压量和施氮水平研究[J].植物营养与肥料学报,2016,22(5):1187-1195.
- [22]高菊生,曹卫东,李本荣,等.充分利用冬闲稻田大力发展绿肥生产[J].耕作与栽培,2009(2):1-2,12.
- [23]张颖睿,杨滨娟,黄国勤.紫云英翻压量与不同施氮量对水稻生长和氮素吸收利用的影响[J].生态学杂志,2018,37(2):430-437.
- [24]鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000:23.
- [25]钱晨晨.紫云英翻压还田与氮肥配施对水稻生长、稻田重金属含量及养分平衡的影响[D].南昌:江西农业大学,2017.
- [26]薛正平.精准农业变量施肥技术及其环境经济效益[D].南京:南京农业大学,2007.
- [27]杨滨娟.冬种绿肥与稻草还田对农田生态系统生产力及土壤环境的影响[D].南昌:江西农业大学,2014:16-19.
- [28]赵琦.水稻氮肥利用效率的研究进展[J].中国稻米,2016,22(6):15-19.
- [29]张立进,杨滨娟,黄国勤,等.绿肥轮作对早稻生长动态及氮素吸收利用的影响[J].农业科学与技术(英文版),2015,30(5):962-967.
- [30]孙晓,尹皓婵,张占田,等.海藻提取物对水稻产量及养分利用的影响[J].江苏农业科学,2020,48(16):100-103.
- [31]钱晨晨,王淑彬,杨滨娟,等.紫云英与氮肥配施对早稻干物质生产及氮素吸收利用的影响[J].中国生态农业学报,2017,25(4):563-571.
- [32]廖育林,鲁艳红,谢坚,等.紫云英配施控释氮肥对早稻产量及氮素吸收利用的影响[J].水土保持学报,2015,29(3):190-195,201.
- [33]王建红,曹凯,张贤.紫云英还田配施化肥对单季晚稻养分利用和产量的影响[J].土壤学报,2014,51(4):888-896.
- [34]鲁艳红,廖育林,聂军,等.紫云英与尿素或控释尿素配施对双季稻产量及氮钾利用率的影响[J].植物营养与肥料学报,2017,23(2):360-368.
- [35]彭耀林,朱俊英,唐建军,等.有机无机肥长期配施对水稻产量及干物质生产特性的影响[J].江西农业大学学报,2004,26(4):485-490.
- [36]侯云鹏,韩立国,孔丽丽,等.不同施氮水平下水稻的养分吸收、转运及土壤氮素平衡[J].植物营养与肥料学报,2015,21(4):836-845.
- [37]马艳芹,钱晨晨,邓丽萍,等.紫云英配施氮肥对双季稻产量、干物质质量及氮素吸收利用的影响[J].核农学报,2017,31(12):2399-2407.
- [38]刘红江,郭智,郑建初,等.太湖地区氮肥减量对水稻产量和氮素流失的影响[J].生态学杂志,2017,36(3):713-718.
- [39]王伟妮,鲁剑巍,何予卿,等.氮、磷、钾肥对水稻产量、品质及养分吸收利用的影响[J].中国水稻科学,2011,25(6):645-653.
- [40]姚雄,李经勇,文明,等.川东南冬水田单季籼稻高效施氮技术分析[J].云南农业大学学报(自然科学版),2016,31(1):141-147.
- [41]董作珍,吴良欢,柴婕,等.不同氮磷钾处理对浙优1号水稻产量、品质、养分吸收利用及经济效益的影响[J].中国水稻科学,2015(4):399-407.
- [42]刘春增,刘小粉,李本银,等.紫云英配施不同用量化肥对土壤养分、团聚性及水稻产量的影响[J].土壤通报,2013,44(2):409-413.
- [43]周兴,谢坚,廖育林,等.基于紫云英利用的化肥施用方式对水稻产量和土壤碳氮含量的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2013,39(2):188-193.
- [44]Zhao X, Wang S Q, Xing G X. Maintaining rice yield and reducing N pollution by substituting winter legume for wheat in a heavily-fertilized rice-based cropping system of Southeast China [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2015, 202: 79-89.
- [45]Tirol-Padre A, Ladha J K, Regmi A P, et al. Organic amendment affect soil parameters in two long-term rice-wheat experiments [J]. Soil Science Society of America Journal, 2007, 71(2): 442-452.
- [46]Dawe D, Dobermann A, Ladha J K, et al. Do organic amendments improve yield trends and profitability in intensive rice systems? [J]. Field Crops Research, 2003, 83(2): 191-213.

李志博,徐建伟,张小均,等. 基于快速叶绿素荧光鉴定北疆不同时代主栽棉花品种的耐冷性[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):78-88.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.013

基于快速叶绿素荧光鉴定北疆不同时代 主栽棉花品种的耐冷性

李志博,徐建伟,张小均,钟信念,闫 臣,魏亦农

(石河子大学农学院/新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室,新疆石河子 832003)

摘要:为筛选棉花耐冷资源,建立棉花耐冷性鉴定评价方法,基于快速叶绿素荧光分析技术,采用冷害因子指数结合模糊隶属函数法对北疆不同时代的代表棉花品种在不同生育期的耐冷性进行了鉴定评价,筛选棉花耐冷性的关键快速叶绿素荧光参数。结果表明,随低温胁迫时间的延长,不同生育期棉花功能叶片的 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 ET_o/ABS 、 RC/CS_o 、 PI_{ABS} 呈逐渐下降趋势,而 F_o/F_m 、 ABS/RC 、 DI_o/RC 呈上升趋势,且相同胁迫时间下吐絮期的荧光值跟其他生育期都有明显差别。同一棉花品种在不同生育期的耐冷性鉴定分级结果不完全相同,全生育期耐冷性达到高抗的有新陆早 19 号、新陆早 33 号和新陆早 45 号,不抗的为新陆早 23 号。随时代更替,北疆棉花品种耐冷性呈先升后降的趋势,但耐冷性好于其他棉区材料。棉花盛蕾期的耐冷性对全生育期的耐冷性影响最大。除了花铃期,其他生育期的 F_o/F_m 耐冷因子指数对棉花的耐冷性都具有较大的直接和间接作用,可作为棉花耐冷性鉴定的关键因子。本研究探讨了快速叶绿素荧光技术在棉花耐冷性鉴定上的应用,评价了北疆不同时代主栽棉花不同生育期的耐冷性,建立了不同生育期棉花耐冷性鉴定的线性回归模型。

关键词:棉花;快速叶绿素荧光;耐冷性;生育期;北疆

中图分类号: S562.01;Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0078-11

低温是影响植物地域分布、生长发育、产量和品质的基本因素^[1-3]。棉花属冷敏感性作物,低温冷害是影响棉花生产的最主要灾害。北疆棉区作为新疆棉花生产的一个重要分支,在我国棉花可持续发展中具有重要地位^[4],但该区位于天山北坡海拔 400 m 以下,积温低、无霜期短,属典型的早熟或极早熟棉区,容易受到倒春寒和早霜的影响^[4-5],导致棉花种子萌发力降低^[6-8],幼苗抗冷性变弱^[7-9],生育期延迟^[5,10],产量下降^[10-11]以及品质变差等^[12-13],因此,北疆棉花的早熟性和幼苗期等生育早期的耐冷性鉴定、生理机制等方面得到了早期研究者的普遍关注^[6-9,14]。近年来,随着全球气候

变暖,极端气候类型增加,中后期棉花遭受低温冷害的频率增加,北疆棉花早熟性有所降低^[15],潜在地增大了该区棉花受低温冷害的风险。鉴定北疆棉花不同生育时期的耐冷性,了解棉花品种的耐冷性演替规律,对建立棉花耐冷性鉴定方法、探索棉花耐冷机制、确定北疆棉花育种目标等具有重要意义。

叶绿素荧光分析技术是一种基于光合作用理论的探测植物光合生理状况及外界因子影响的活体测定和诊断技术,能“内在性”反映叶片光合作用过程中光系统对光能的吸收、传递、耗散、分配等过程^[16],在植物的光合作用机制^[16]和抗逆生理^[17-19]研究上得到了大量应用,其参数常作为逆境条件下植物抗逆反应的指标之一。基于生物膜能量流动为基础的快速荧光诱导动力学因其获得数据量大、仪器便于携带且操作简便等特点^[20],近年来越来越多地被应用于植物抗逆性鉴定^[17-19,21]、植物生理^[19]、遗传育种^[21-23]等领域。本研究拟以快速叶绿素荧光诱导动力学测定为基础,对北疆棉区不同世代的代表性棉花在不同生育时期的耐冷性进行鉴定评价,期望筛选耐冷型棉花资源,建立棉花耐

收稿日期:2020-06-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560074);石河子大学动植物培育专项(编号:YZZX201602);新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室开放课题(编号:201902)。

作者简介:李志博(1978—),男,甘肃镇原人,博士,高级实验师,主要从事棉花抗逆生理及分子生物学机制及新品种选育研究。

E-mail: lzb_oea@shzu.edu.cn。

通信作者:魏亦农,教授,主要从事棉花遗传育种研究。E-mail: weiyinong@163.com。

冷性鉴定评价的快速荧光动力学方法。

代选育、种植的代表性品种;3 份引自中国农业科学院棉花种质资源中心,苗期耐冷性比较突出;1 份为新疆南疆棉区主栽的中熟棉花品种。材料均由石河子大学棉花研究所收集和保存,材料基本信息见表 1。

1 材料与方 法

1.1 材 料

参试材料 28 份,其中 24 份为北疆棉区不同时

表 1 试验材料基本信息

文中编号	材料名称	审定年度	选(引)育单位(人)
MH1	新陆早 7 号	1997	新疆石河子棉花研究所
MH2	新陆早 8 号	1997	新疆石河子棉花研究所
MH3	新陆早 10 号	1999	新疆石河子棉花研究所
MH4	新陆早 13 号	2002	新疆生产建设兵团农七师农业科学研究所
MH5	新陆早 19 号	2004	新疆石河子棉花研究所
MH6	新陆早 21 号	2005	石河子富依德科技有限公司
MH7	新陆早 23 号	2005	新疆锦棉种业有限责任公司
MH8	新陆早 24 号	2005	新疆康地种业科技股份有限公司
MH9	新陆早 25 号	2006	新疆生产建设兵团农七师农业科学研究所
MH10	新陆早 26 号	2006	新疆天合种业有限责任公司
MH11	新陆早 33 号	2007	新疆农垦科学院棉花研究所
MH12	新陆早 35 号	2007	新疆生产建设兵团农七师农业科学研究所
MH13	新陆早 36 号	2007	新疆石河子棉花研究所
MH14	新陆早 41 号	2009	新疆富全新科种业有限责任公司
MH15	新陆早 42 号	2009	新疆农垦科学院棉花研究所
MH16	新陆早 45 号	2010	新疆农垦科学院棉花研究所/新疆西部种业有限公司
MH17	新陆早 46 号	2010	新疆石河子棉花研究所/石河子庄稼汉公司
MH18	新陆早 48 号	2010	新疆惠远农业科技发展有限公司
MH19	新陆早 50 号	2011	新疆农业科学院经济作物研究所
MH20	新陆早 54 号	2012	新疆金宏祥高科农业股份公司
MH21	新陆早 60 号	2013	新疆农垦科学院棉花研究所
MH22	新陆早 61 号	2013	新疆承天种业科技股份有限公司
MH23	新陆早 66 号	2014	新疆金丰源种业股份有限公司
MH24	新陆早 74 号	2017	新疆石河子农业科学研究院
MH25	中棉所 35 号	1999	中国农业科学院棉花研究所
MH26	中 J9645	2017	中国农业科学院棉花研究所
MH27	中 JX4	2017	中国农业科学院棉花研究所
MH28	新陆中 26 号	2006	新疆巴州富全新科种业有限责任公司

1.2 方 法

1.2.1 试验设计 各参试棉花材料种子于 2019 年 4 月 20 日人工点播于石河子大学棉花研究所专用育种大田。栽培模式为覆膜高密度膜下滴灌,宽窄行种植,行距 30 cm + 60 cm + 30 cm,株距 10 cm。每膜种植 4 小行,1 膜为 1 小区,小区长 8 m、宽 1.5 m。每材料种植 1 小区,管理方式同常规大田。

分别于苗期、盛蕾期、花铃期、吐絮期在每个材料种植小区中段选不缺苗且生长一致的连续 7 株棉株,带叶柄剪取功能叶用自封袋密封放在专用取样

盒中带回实验室,在 RZX 型人工智能气候箱中进行 6 d 的 4 ℃低温处理。

1.2.2 快速叶绿素荧光参数测定 用英国 Hansatech 公司的植物效率仪(PEA)每天测定各棉花材料低温处理(0 d 为处理前)的快速叶绿素荧光参数,测定前叶片暗适应 20 min。仪器设置激发光强 3 500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。最大光化学效率(F_v/F_m)、用于热耗散的量子比率($t=0$ 时)(F_o/F_m)、单位面积吸收的光能($t=0$ 时)(ABS/CS_o)、单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)、单位反应中心耗散的

能量($t=0$ 时)(DI_0/RC)、单位反应中心捕获的用于还原 QA 的能量($t=0$ 时)(TR_0/RC)、单位反应中心捕获的用于电子传递的能量($t=0$ 时)(ET_0/RC)及以吸收光能为基础的性能指数 PI_{ABS} 等参数由仪器自动测定读出,用于计算电子传递的量子产额($t=0$ 时) [$ET_0/ABS = (ET_0/RC)/(ABS/RC)$]、单位面积内反应中心的数量($t=0$ 时) [$RC/CS_0 = (ABS/CS_0)/(ABS/RC)$] [24]。

1.2.3 耐冷因子指数计算及耐冷性鉴定 参考 Strauss 等 [24] 和李志博等 [23] 的鉴定方法并略有改动计算快速叶绿素荧光参数耐冷因子指数 (CFI): $CFI = \sum W_p \cdot LOGR_p$ (CFP), W_p 指不同处理时期的权重系数, R_p (CFP) 指不同处理时期相对叶绿素荧光参数,为该处理时期相应时间 (d) 的相对荧光参数的平均值。本试验分为 3 个胁迫处理时期,其中第 1 天和第 2 天为短期处理,第 3 天和第 4 天为中期处理,第 5 天和第 6 天为长期处理,各处理时期的权重系数依次为 1、3、5。

用模糊隶属函数法鉴定评价参试材料的耐冷性。模糊隶属函数公式为 $Y(u) = (Y - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$,与棉花耐冷性负相关用反隶属函数公式: $Y(u) = 1 - (Y - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$ 中。公式中, Y 指不同参试材料的耐冷因子指数值, Y_{max} 指所有参试材料中耐冷因子指数最大值, Y_{min} 指所有参试材料中耐冷因子指数最小值。棉花耐冷性分级参考付凤玲等的标准 [25] 略有修改: ≥ 0.75 为高抗, $0.61 \sim 0.74$ 为抗, $0.46 \sim 0.60$ 为中抗, $0.31 \sim 0.45$ 为弱抗, ≤ 0.30 为不抗。某一荧光参数下的耐冷性为该荧光参数耐冷因子指数隶属值,不同生育期棉花的耐冷性为该生育期各荧光参数耐冷因子指数隶属值的平均值,全生育期棉花耐冷性为各生育期棉花耐冷性的平均值。

1.2.4 数据处理与分析 用 SPSS 13.0 对测试数据进行统计分析,用 SIGMAPLOT 12.5 进行制图。分析和作图数据均为平均值 \pm 标准误。

2 结果与分析

2.1 不同生育期胁迫时间对棉花主要快速荧光参数的影响

由图 1 可见,随着胁迫时间的延长,各生育期棉花叶片的 F_v/F_m 、 F_v/F_0 、 ET_0/ABS 、 RC/CS_0 、 PI_{ABS} 均呈明显下降变化趋势,且同一胁迫时间下,幼苗期、盛蕾期和花铃期间各荧光参数值差异不大,而吐絮

期的各荧光参数值都低于其他 3 个生育期,尤其胁迫第 3 天起,差异更加明显。不同生育期棉花叶片的 ABS/RC 、 DI_0/RC 随胁迫时间明显上升,且吐絮期的上升幅度大于其他生育期。不同生育期棉花叶片的 TR_0/RC 、 ET_0/RC 随胁迫时间呈先上升后下降的趋势,且苗期的下降时间较晚,幅度较小。

2.2 不同生育期各棉花的耐冷因子指数及耐冷性评价

根据不同生育期棉花主要荧光参数随胁迫时间的响应趋势,选择了受胁迫时间影响且变化规律明显的荧光参数计算其耐冷因子指数,以耐冷因子指数为参数鉴定了各个棉花材料在该参数下的耐冷性及整个生育期的耐冷性。可以看出,同一生育期不同材料的耐冷性具有明显差异,且同一材料不同荧光参数评价的耐冷性分级结果不完全相同。

苗期(表 2):中棉所 36 号(MH25)和中 JX4(MH27) 8 个耐冷因子指数隶属值的鉴定结果均为高抗,新陆早 54 号(MH20)除了 ABS/RC 和 RC/CS_0 隶属值的鉴定结果为抗、新陆早 66 号(MH23)除了 F_0/F_m 和 ET_0/ABS 鉴定为抗外,其余指标的鉴定结果均为高抗;而新陆早 7 号(MH1)和新陆早 24 号(MH8) 8 个耐冷因子指数隶属值的鉴定结果均为不抗,新陆早 23 号(MH7)也有 6 个耐冷因子指数隶属值的鉴定结果为不抗。

盛蕾期(表 3):新陆早 7 号(MH1)、新陆早 8 号(MH2)、新陆早 19 号(MH5)、新陆早 21 号(MH6)、新陆早 26 号(MH10)、新陆早 35 号(MH12)、新陆早 74 号(MH24)和新陆中 26 号(MH28)的 8 个冷害因子指数的隶属值鉴定结果均为高抗,新陆早 24 号(MH8)和新陆早 25 号(MH9)有 6 个冷害因子指数的隶属值鉴定结果为高抗;但新陆早 23 号(MH7)、新陆早 42 号(MH15)和新陆早 50 号(MH19)有 6 个耐冷因子指数隶属值的鉴定结果为不抗。

花铃期(表 4):新陆早 24 号(MH8)、新陆早 36 号(MH13)和新陆早 45 号(MH16)的 8 个耐冷因子指数的鉴定结果均为高抗,新陆早 13 号(MH14)和新陆早 19 号(MH5)有 7 个耐冷因子指数的鉴定结果为高抗、1 个鉴定结果为抗;而新陆早 54 号(MH20)、中棉所 36 号(MH25)的 8 个耐冷因子指数鉴定结果均为不抗。

吐絮期(表 5):新陆早 19 号(MH5)、新陆早 7 号(MH1)和新陆早 60 号(MH21)分别有 3~4 个耐

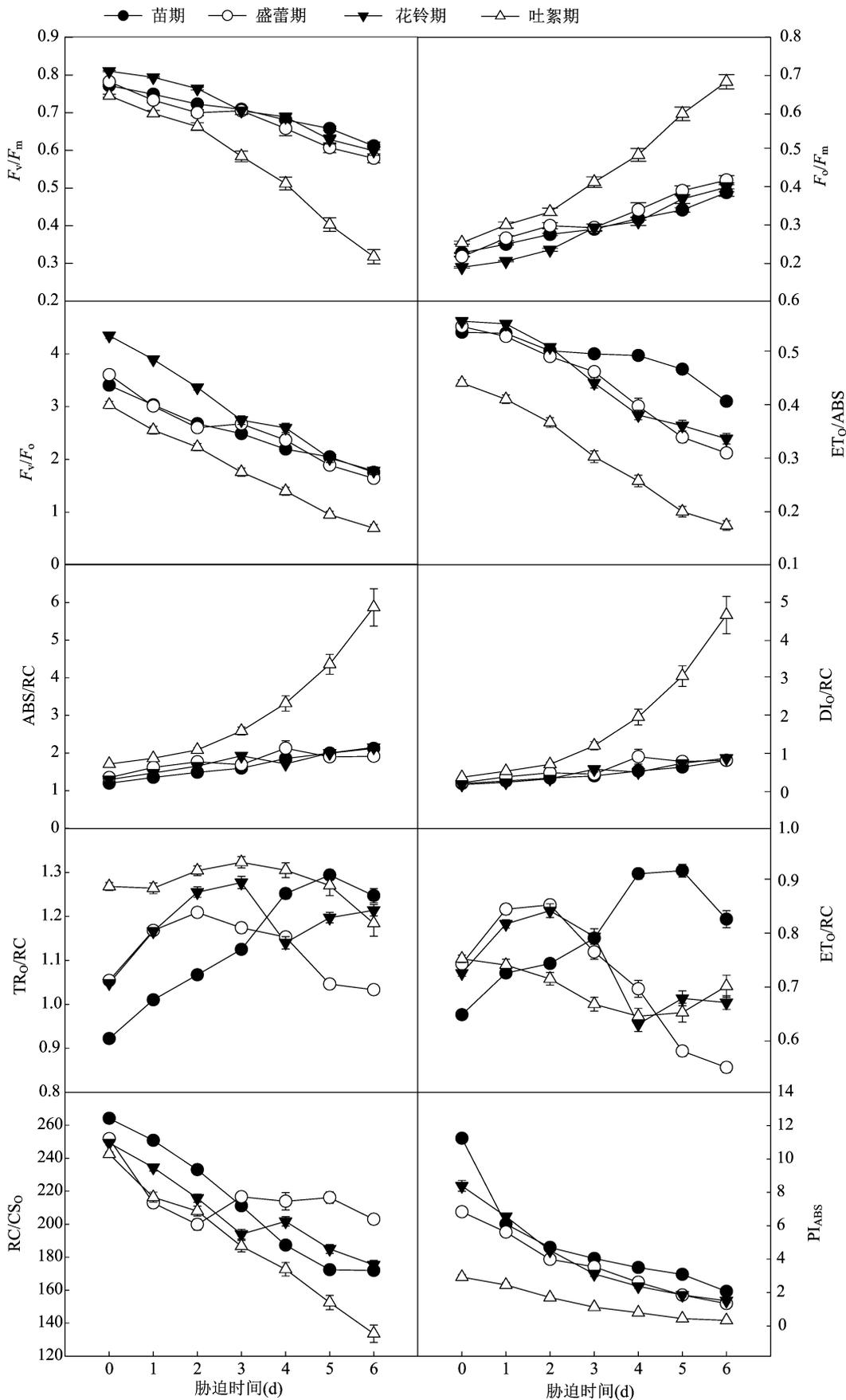


图1 不同生育期快速荧光参数对胁迫时间的响应

表 2 苗期各棉花主要荧光参数耐冷因子指数及耐冷性鉴定

品种	F_v/F_m	F_o/F_m	F_v/F_o	ET_o/ABS	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	综合耐冷性隶属值
MH1	-1.086	2.170	-3.099	-1.823	2.235	4.466	-1.486	-6.932	0.173
MH2	-0.870	1.900	-2.721	-1.371	1.921	3.846	-1.451	-6.175	0.398
MH3	-0.736	1.930	-2.617	-1.048	2.051	4.004	-1.403	-5.712	0.461
MH4	-0.754	1.931	-2.635	-1.241	1.610	3.578	-1.170	-5.839	0.509
MH5	-0.803	1.995	-2.669	-1.309	1.906	3.973	-1.328	-5.892	0.426
MH6	-0.669	1.711	-2.307	-0.677	2.195	3.935	-1.796	-4.379	0.563
MH7	-0.934	2.390	-2.894	-1.744	1.909	4.589	-1.161	-6.371	0.268
MH8	-0.961	2.373	-3.300	-1.362	2.560	4.952	-2.025	-7.055	0.104
MH9	-0.711	1.908	-2.551	-0.958	1.803	3.729	-1.421	-5.160	0.534
MH10	-0.822	2.180	-2.864	-1.278	2.384	4.661	-1.859	-6.103	0.266
MH11	-0.550	1.647	-2.153	-0.665	1.792	3.463	-1.403	-4.288	0.695
MH12	-0.638	1.831	-2.357	-0.926	1.904	3.761	-1.503	-4.992	0.561
MH13	-0.772	2.083	-2.564	-1.267	1.752	3.929	-1.241	-5.202	0.481
MH14	-0.619	1.865	-2.268	-0.928	1.690	3.607	-1.155	-4.525	0.640
MH15	-0.622	1.830	-2.353	-0.856	1.882	3.734	-1.206	-4.811	0.607
MH16	-0.600	1.807	-2.220	-0.854	1.682	3.542	-1.297	-4.499	0.652
MH17	-0.718	2.042	-2.465	-0.966	2.083	4.249	-1.392	-4.798	0.492
MH18	-0.787	2.157	-2.709	-1.404	2.023	4.287	-1.345	-6.089	0.366
MH19	-0.575	1.569	-2.134	-0.597	1.921	3.494	-1.495	-4.111	0.694
MH20	-0.465	1.431	-1.862	-0.499	1.721	3.162	-1.406	-3.661	0.814
MH21	-0.995	2.430	-3.333	-1.161	2.551	5.017	-2.298	-6.223	0.114
MH22	-0.581	1.641	-2.193	-0.757	1.868	3.527	-1.523	-4.582	0.648
MH23	-0.548	1.659	-1.910	-1.016	1.131	2.930	-0.867	-4.390	0.798
MH24	-0.838	2.120	-2.385	-1.611	2.102	4.786	-1.924	-4.904	0.325
MH25	-0.370	1.242	-1.596	-0.588	1.370	2.625	-1.058	-3.703	0.944
MH26	-0.968	2.139	-2.582	-1.740	1.695	4.060	-0.987	-5.444	0.403
MH27	-0.424	1.351	-1.635	-0.759	1.071	2.457	-0.879	-3.916	0.942
MH28	-0.480	1.461	-1.880	-0.939	0.995	2.487	-0.789	-4.221	0.887

冷因子指数值在 28 个材料中达到最值,其他耐冷因子指数值在所有材料中的位次也十分靠前,耐冷性综合隶属值鉴定结果为高抗;新陆早 33 号(MH11)、新陆早 35 号(MH12)、新陆早 54 号(MH20)和新陆早 74 号(MH24)尽管没有耐冷因子指数位于最值,但几乎所有的耐冷因子指数位次都平均靠前,耐冷性隶属值综合鉴定结果也为高抗。新陆早 10 号(MH3)、新陆早 48 号(MH18)、中棉所 36 号(MH25)和中 JX4(MH27)的耐冷性隶属值综合鉴定结果为不抗。

从不同生育期的耐冷性鉴定结果来看,同一棉花在不同生育期的耐冷性分级结果不同,有时甚至会有很大的差别,如新陆早 7 号在盛蕾期和吐絮期的耐冷性鉴定结果为高抗,而幼苗期的鉴定结果为

不抗,花铃期的鉴定结果为抗;中 JX4 在幼苗期和盛蕾期的耐冷性鉴定结果为高抗,而花铃期和吐絮期的鉴定结果为不抗。不同生育期参试棉花材料的耐冷性鉴定分级的比例有所差别,其中抗性(高抗、抗)为盛蕾期 > 吐絮期 > 苗期 = 花铃期,其比例依次为 67.86%、46.43%、39.29%、39.29%,而不抗为花铃期 > 幼苗期 > 吐絮期 > 盛蕾期,其比例依次为 21.43%、17.86%、14.29%、10.71%。

2.3 不同生育期北疆不同时代棉花耐冷性演替变化分析

以引进的苗期耐冷性强的棉花(MH25、MH26、MH27)为对照,对不同生育期北疆不同时代棉花的耐冷性变化趋势进行了分析(图 2)。可以看出,随时代演替,北疆棉区选育的棉花品种在幼苗期、吐絮

表3 盛蕾期各棉花主要荧光参数耐冷因子指数及耐冷性鉴定

品种	F_v/F_m	F_o/F_m	F_v/F_o	ET_o/ABS	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	综合耐冷性隶属值
MH1	-0.453	1.317	-1.640	-1.277	0.996	2.382	-0.777	-4.496	0.836
MH2	-0.463	1.235	-1.502	-1.329	0.658	2.004	-0.364	-4.182	0.880
MH3	-1.215	2.586	-3.272	-2.586	1.325	4.067	-0.852	-7.251	0.562
MH4	-0.819	2.011	-2.531	-1.933	1.049	3.139	-0.637	-6.204	0.702
MH5	-0.208	0.660	-0.843	-0.724	0.580	1.246	-0.420	-2.800	0.993
MH6	-0.361	1.103	-1.251	-1.196	0.925	2.125	-0.648	-4.150	0.882
MH7	-1.983	2.443	-2.702	-5.070	4.722	7.659	-3.637	-3.964	0.244
MH8	-0.566	1.578	-1.905	-0.930	1.038	2.675	-1.012	-3.510	0.822
MH9	-0.497	1.406	-1.480	-1.378	1.094	2.712	-0.887	-4.244	0.822
MH10	-0.260	0.804	-0.940	-0.698	0.675	1.525	-0.467	-2.726	0.973
MH11	-1.289	2.542	-2.998	-2.120	1.766	4.647	-1.130	-4.935	0.585
MH12	-0.541	1.425	-1.483	-1.206	0.935	2.557	-0.594	-3.350	0.857
MH13	-0.729	1.512	-2.052	-1.371	0.607	2.155	-0.531	-3.895	0.833
MH14	-1.780	2.847	-4.183	-2.611	1.651	4.719	-0.928	-6.787	0.475
MH15	-2.145	3.529	-5.022	-4.255	3.306	7.577	-1.954	-9.948	0.156
MH16	-0.705	1.913	-2.272	-1.676	0.947	3.029	-0.678	-5.294	0.746
MH17	-0.586	1.458	-1.655	-0.811	1.130	2.766	-0.753	-2.571	0.857
MH18	-1.298	2.692	-3.091	-2.789	2.119	5.529	-0.934	-6.038	0.517
MH19	-2.311	3.579	-5.457	-4.071	2.871	6.758	-1.878	-9.831	0.171
MH20	-1.618	3.005	-4.139	-2.796	1.659	4.985	-1.177	-7.498	0.446
MH21	-1.076	2.301	-2.826	-2.064	1.314	3.925	-0.845	-4.740	0.656
MH22	-0.784	1.833	-2.308	-1.161	0.894	2.848	-0.770	-3.618	0.789
MH23	-0.590	1.292	-1.527	-1.221	0.908	2.450	-0.757	-3.046	0.860
MH24	-0.528	1.222	-1.567	-1.109	0.763	2.033	-0.712	-3.628	0.873
MH25	-1.145	2.472	-2.754	-2.349	1.975	5.222	-1.323	-5.211	0.567
MH26	-0.539	1.447	-1.775	-1.361	0.935	2.442	-0.675	-4.823	0.818
MH27	-0.626	1.623	-1.668	-1.567	1.094	3.125	-0.509	-3.333	0.816
MH28	-0.456	1.206	-1.405	-1.124	0.816	2.113	-0.743	-3.618	0.878

期的耐冷性逐步增强,盛蕾期逐步下降,而花铃期表现为先上升后下降趋势。与对照相比,北疆棉花早期(幼苗期、盛蕾期)的耐冷性低于对照,中后期(花铃期、吐絮期)的耐冷性高于对照。全生育期来看,北疆不同时代选育的棉花耐冷性呈先上升后下降的趋势,但耐冷性好于对照。

2.4 不同生育期棉花耐冷快速荧光鉴定体系的分析

2.4.1 不同生育期棉花耐冷性关系及棉花耐冷性关键生育期分析

从表6看出,不同生育期棉花耐冷性的隶属值之间两两呈差异不显著,表明同一棉花品种在不同生育期的耐冷性关系不大,不同生育期棉花的耐冷机制存在差异。但不同生育期棉花的耐冷性对整个棉花生长发育过程中的耐冷性影

响不一样,盛蕾期、花铃期和吐絮期的耐冷性对整个棉花全生育期的耐冷性有极显著影响,而苗期影响不大,按影响大小依次为盛蕾期 > 花铃期 > 吐絮期 > 苗期。

2.4.2 不同生育期影响棉花耐冷性的关键荧光参数分析

从表7看出,除了吐絮期的 RC/CS_o ,其他生育期的每一个指标因子的评价结果均与该生育期棉花耐冷性的整体评价结果呈极显著正相关,表明每个荧光指标因子间存在着密切的相互作用或共同影响着棉花的耐冷性。

2.4.3 不同生育期影响棉花耐冷性的荧光参数耐冷因子指数通径分析

为更好地了解荧光耐冷因子指数之间的关系及其对棉花耐冷性的作用效应,对耐冷因子指数进行了通径分析,从分析结果(表

表 4 花铃期各棉花主要荧光参数耐冷因子指数及耐冷性鉴定

品种	F_v/F_m	F_o/F_m	F_v/F_o	ET_o/ABS	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	综合耐冷性隶属值
MH1	-0.781	1.884	-1.965	-1.563	1.240	3.568	-1.101	-3.853	0.613
MH2	-1.200	2.169	-2.944	-2.075	1.707	4.074	-1.448	-5.675	0.390
MH3	-1.086	2.359	-2.794	-2.182	1.702	4.323	-1.323	-5.993	0.393
MH4	-0.281	0.771	-0.988	-0.408	0.635	1.445	-1.023	-2.112	0.937
MH5	-0.338	1.054	-1.158	-0.464	0.751	1.887	-0.908	-1.926	0.905
MH6	-0.618	1.785	-2.096	-1.339	1.144	3.024	-0.914	-4.793	0.660
MH7	-0.914	2.546	-2.936	-1.916	1.867	4.723	-1.368	-5.876	0.386
MH8	-0.304	1.086	-1.350	-0.618	0.909	2.012	-0.772	-2.266	0.885
MH9	-0.691	1.809	-2.148	-1.608	1.291	3.227	-0.922	-5.450	0.609
MH10	-0.765	2.322	-2.653	-1.659	1.352	3.891	-0.973	-5.726	0.526
MH11	-0.612	1.574	-1.822	-1.019	0.967	2.702	-0.932	-2.538	0.754
MH12	-0.827	2.321	-2.582	-1.712	1.152	3.749	-0.693	-4.501	0.584
MH13	-0.419	1.323	-1.591	-0.787	0.764	2.146	-0.705	-3.272	0.839
MH14	-0.579	1.719	-2.101	-0.942	1.195	2.963	-1.051	-3.701	0.691
MH15	-1.013	2.780	-3.285	-2.179	1.664	4.674	-1.221	-6.822	0.350
MH16	-0.446	1.461	-1.489	-1.009	0.593	2.140	-0.440	-3.186	0.860
MH17	-1.332	2.914	-3.861	-2.507	1.560	4.596	-0.834	-7.258	0.310
MH18	-0.538	1.709	-1.604	-1.189	0.912	3.001	-0.388	-3.659	0.780
MH19	-1.247	2.883	-3.638	-2.528	1.795	4.860	-1.109	-7.904	0.269
MH20	-1.346	3.334	-3.847	-2.533	2.557	6.306	-1.771	-7.575	0.091
MH21	-1.055	2.784	-3.443	-1.756	2.425	5.386	-1.808	-5.478	0.265
MH22	-0.657	2.169	-2.636	-1.166	2.162	4.478	-1.701	-4.279	0.463
MH23	-0.700	1.933	-2.364	-1.119	1.699	3.754	-1.345	-3.682	0.573
MH24	-0.868	2.510	-2.759	-2.106	1.593	4.338	-1.247	-6.617	0.414
MH25	-1.537	3.409	-4.383	-3.033	2.126	5.684	-1.689	-8.765	0.054
MH26	-0.970	2.828	-3.172	-2.189	1.972	5.046	-1.559	-6.711	0.298
MH27	-1.365	3.122	-3.711	-2.482	2.308	5.690	-1.214	-7.080	0.198
MH28	-0.775	2.277	-2.789	-1.377	2.045	4.414	-1.524	-5.355	0.436

8)可以看出,苗期 F_o/F_m 耐冷因子指数的直接途径系数在所有直接途径系数中最大,且其间接途径系数也是所有系数中最大,此外, F_v/F_o 也具有较高的直接和间接途径系数;盛蕾期直接效应和间接效应表现最突出的是 F_o/F_m 耐冷因子指数;花铃期直接途径系数最大的依次为 ET_o/ABS 、 ABS/RC 、 F_v/F_m 、 F_o/F_m ,但它们之间差别不大,且 F_v/F_m 、 F_o/F_m 对其他因子的间接系数远远大于 ET_o/ABS 、 ABS/RC 对其他因子的间接系数;而吐絮期直接途径系数较大的有 ABS/RC 、 DI_o/RC 、 F_o/F_m ,但 F_o/F_m 和 DI_o/RC 耐冷因子指数对其他荧光参数耐冷因子指数的间接效应强于 ABS/RC 。

总体来看,各个生育期的最大直接途径系数耐冷因子指数略有不同,说明各个生育期棉花耐冷性

的耐冷机制和关键因子耐冷指数是有差别的。但几乎各个生育期 F_o/F_m 耐冷因子指数的直接途径系数及其对其他耐冷因子指数的间接途径系数都最大,表明对各个生育期的棉花耐冷性均具有较强的直接和间接作用,可作为不同生育期棉花耐冷性评价的通用指标。

2.4.4 不同生育期基于棉花耐冷性关键影响因子的线性回归分析 选取直接效应和间接效应都比较突出的耐冷因子指数为自变量,棉花的耐冷性为依变量建立不同生育期棉花耐冷性的鉴定模型(表 9),每个模型的决定系数都在 0.96 以上,反映了鉴定模型中所选的耐冷因子指数决定了棉花耐冷性的绝大部分,是影响棉花耐冷性或可作为棉花耐冷性评价的关键因子,而且线性回归模型的回归系数

表5 吐絮期各棉花主要荧光参数耐冷因子指数及耐冷性鉴定

品种	F_v/F_m	F_o/F_m	F_v/F_o	ET_o/ABS	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	耐冷性隶属值
MH1	-0.593	1.044	-1.570	-1.421	0.882	2.050	-0.564	-3.823	0.947
MH2	-4.137	2.807	-6.860	-3.444	3.644	6.501	-2.076	-6.557	0.352
MH3	-5.264	3.361	-8.284	-3.948	3.442	6.914	-2.320	-8.225	0.223
MH4	-3.428	2.504	-5.365	-3.420	3.712	6.623	-2.644	-5.476	0.414
MH5	-0.489	0.819	-0.927	-1.294	0.961	2.181	-0.804	-2.235	0.991
MH6	-2.758	2.549	-4.293	-3.527	3.775	6.605	-2.958	-5.182	0.442
MH7	-2.840	2.531	-5.284	-3.017	3.075	5.660	-2.226	-7.170	0.468
MH8	-1.144	1.796	-2.043	-2.849	2.112	4.716	-1.312	-3.737	0.727
MH9	-2.866	1.981	-4.521	-3.922	3.955	6.268	-2.496	-6.827	0.429
MH10	-1.797	2.213	-3.889	-2.549	2.207	4.509	-1.485	-7.235	0.616
MH11	-0.728	1.458	-2.178	-1.603	0.906	2.448	-0.962	-4.692	0.878
MH12	-1.017	1.470	-1.669	-2.163	2.184	4.432	-1.492	-2.718	0.794
MH13	-1.681	2.436	-3.072	-2.941	2.218	5.129	-1.439	-4.713	0.633
MH14	-2.286	2.701	-4.099	-3.708	3.228	6.488	-2.630	-6.919	0.444
MH15	-1.379	2.155	-2.979	-2.678	1.907	4.335	-1.557	-5.867	0.674
MH16	-1.095	2.152	-2.505	-2.307	1.723	4.444	-1.245	-4.186	0.738
MH17	-2.267	2.428	-4.241	-2.951	2.720	5.379	-1.477	-6.895	0.541
MH18	-3.223	3.408	-6.150	-4.260	3.988	7.637	-1.963	-10.497	0.235
MH19	-1.795	2.884	-4.142	-3.584	2.760	5.988	-1.863	-8.104	0.472
MH20	-0.956	2.010	-2.337	-1.807	1.552	3.895	-1.098	-4.049	0.791
MH21	-0.947	1.265	-1.620	-1.284	1.859	3.503	-2.817	-2.219	0.859
MH22	-1.302	2.141	-2.528	-2.263	3.031	6.272	-9.257	-3.337	0.549
MH23	-1.798	2.499	-3.236	-2.541	2.208	5.084	-1.724	-5.040	0.632
MH24	-1.044	2.047	-2.312	-1.879	2.077	4.848	-1.326	-3.508	0.752
MH25	-3.919	2.965	-6.304	-4.537	4.379	7.509	-3.592	-8.432	0.221
MH26	-2.294	2.431	-4.108	-2.432	2.899	5.590	-2.294	-4.947	0.570
MH27	-3.351	3.455	-6.343	-4.437	4.373	8.318	-2.760	-9.236	0.200
MH28	-1.508	2.667	-3.253	-2.451	3.008	6.241	-2.308	-5.217	0.572

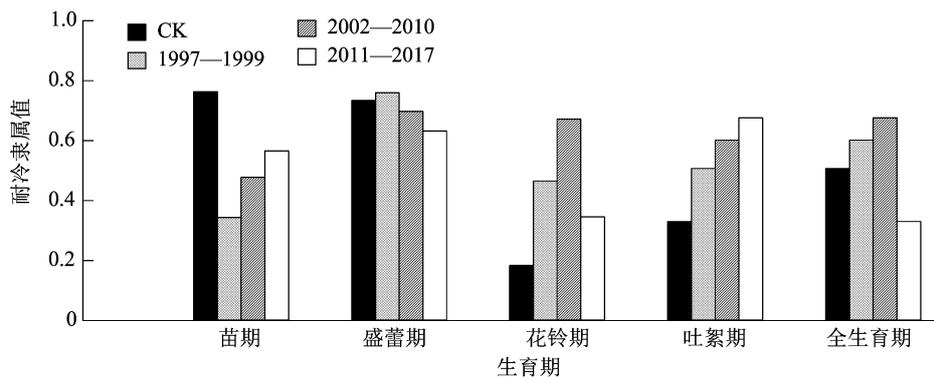


图2 新疆不同时代主栽棉花不同生育期耐冷性变化

表6 不同生育期间及其与棉花全生育期耐冷性相关分析

生育期	相关系数			
	盛蕾期	花铃期	吐絮期	全生育期
苗期	-0.158	-0.311	-0.319	0.101
盛蕾期		0.319	0.209	0.680**
花铃期			0.273	0.662**
吐絮期				0.562**

注：*、** 分别表示在 0.05、0.01 水平上显著相关。表7 同。

检验几乎都达到了极显著差异水平。

3 讨论与结论

3.1 快速叶绿素荧光技术在棉花耐冷性鉴定评价上的应用

正常的光合能力是植物耐逆性的重要生理基础。叶绿素荧光技术能“内在”地反映植物光合作用信息^[16-17],已广泛应用于植物的抗逆资源鉴定和

表 7 不同生育期棉花耐冷性隶属值与各荧光耐冷因子指数隶属值相关性分析

生育期	相关系数							
	F_v/F_m	F_o/F_m	F_v/F_o	ET_o/ABS	ABS/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}
苗期	0.959 **	0.955 **	0.971 **	0.771 **	0.845 **	0.962 **	0.670 **	0.910 **
盛蕾期	0.986 **	0.949 **	0.927 **	0.967 **	0.890 **	0.978 **	0.792 **	0.830 **
花铃期	0.951 **	0.976 **	0.981 **	0.930 **	0.922 **	0.983 **	0.737 **	0.930 **
吐絮期	0.912 **	0.922 **	0.936 **	0.946 **	0.948 **	0.957 **	0.364	0.850 **

表 8 不同生育期棉花耐冷性荧光耐冷因子指数通径系数

生育期	因子 r	$\rightarrow F_v/F_m$	$\rightarrow F_o/F_m$	$\rightarrow F_v/F_o$	$\rightarrow ET_o/ABS$	$\rightarrow ABS/RC$	$\rightarrow DI_o/RC$	$\rightarrow RC/CS_o$	$\rightarrow PI_{ABS}$
苗期	F_v/F_m	0.025	0.055	-0.078	-0.046	0.057	0.113	-0.038	-0.175
	F_o/F_m	-3.031	3.484	-9.479	-4.776	6.692	13.399	-5.055	-21.512
	F_v/F_o	-1.813	4.753	2.463	-2.581	5.051	9.861	-3.455	-14.067
	ET_o/ABS	-0.583	1.494	-2.039	0.774	1.246	2.768	-0.905	-4.518
	ABS/RC	-0.657	1.632	-2.184	-1.071	0.818	3.251	-1.087	-4.821
	DI_o/RC	0.741	-1.896	2.557	0.750	-2.433	-1.108	1.990	4.853
	RC/CS_o	0.344	-0.880	1.065	0.642	-0.703	-1.689	-0.368	2.345
	PI_{ABS}	0.561	-1.385	1.926	0.795	-1.494	-2.891	1.182	-0.584
盛蕾期	F_v/F_m	1.298	1.710	-2.129	-1.658	1.293	3.093	-1.009	-5.838
	F_o/F_m	-0.977	2.109	-3.168	-2.803	1.388	4.227	-0.768	-8.822
	F_v/F_o	-0.465	0.990	0.383	-0.990	0.507	1.558	-0.326	-2.777
	ET_o/ABS	-0.192	0.471	-0.593	0.234	0.246	0.736	-0.149	-1.454
	ABS/RC	-0.219	0.695	-0.888	-0.762	1.053	1.312	-0.442	-2.948
	DI_o/RC	0.306	-0.936	1.061	1.014	-0.785	-0.848	0.550	3.520
	RC/CS_o	0.558	-0.687	0.760	1.426	-1.328	-2.154	-0.281	1.115
	PI_{ABS}	0.053	-0.148	0.179	0.087	-0.098	-0.251	0.095	-0.094
花铃期	F_v/F_m	-1.678	-3.161	3.297	2.622	-2.080	-5.986	1.847	6.464
	F_o/F_m	-1.412	1.177	-3.465	-2.442	2.009	4.795	-1.704	-6.679
	F_v/F_o	-0.776	1.685	0.714	-1.559	1.216	3.088	-0.945	-4.281
	ET_o/ABS	-0.529	1.453	-1.862	1.884	1.196	2.723	-1.927	-3.979
	ABS/RC	0.586	-1.827	2.008	0.804	-1.734	-3.271	1.574	3.339
	DI_o/RC	-0.252	0.727	-0.854	-0.545	0.466	0.407	-0.372	-1.952
	RC/CS_o	0.783	-2.180	2.514	1.641	-1.599	-4.044	-0.856	5.031
	PI_{ABS}	0.089	-0.317	0.394	0.181	-0.266	-0.588	0.226	-0.292
吐絮期	F_v/F_m	0.038	0.040	-0.060	-0.054	0.034	0.078	-0.021	-0.145
	F_o/F_m	1.655	-0.400	2.744	1.378	-1.458	-2.601	0.831	2.623
	F_v/F_o	-0.279	0.178	0.053	-0.209	0.182	0.366	-0.123	-0.435
	ET_o/ABS	0.107	-0.078	0.167	-0.031	-0.115	-0.206	0.082	0.170
	ABS/RC	0.383	-0.642	0.727	1.014	-0.784	-1.709	0.630	1.752
	DI_o/RC	-1.797	1.661	-2.798	-2.299	2.460	0.652	-1.928	-3.377
	RC/CS_o	-0.051	0.045	-0.094	-0.054	0.055	0.101	0.018	-0.128
	PI_{ABS}	0.056	-0.088	0.100	0.139	-0.103	-0.230	0.064	0.049

筛选^[18-19,21-23],且在植物抗冷性上已显示出良好的应用前景^[18,23]。有研究发现,低温下多数植物会产生光抑制,对叶绿素荧光参数产生显著的影响,但叶绿素荧光参数变化与植物种类、处理温度、处理

方式等有关系,迄今还没有一个叶绿素荧光参数可以有效地鉴定评价所有植物的抗寒能力^[18],因此用叶绿素荧光技术筛选和鉴定抗寒植物时采用的叶绿素荧光参数指标有所不同。以生物膜能量流动为

表 9 不同生育期棉花耐冷性鉴定的线性回归模型

生育期	线性回归模型	R^2	回归系数检验		
			t_0	t_1	t_2
苗期	$Y = 1.850 - 0.281F_0/F_m + 0.326F_v/F_0$	0.961	32.793 **	23.393 **	5.598 **
盛蕾期	$Y = 1.081 + 0.346F_v/F_m - 0.034F_0/F_m$	0.973	40.085 **	8.234	-1.078 **
花铃期	$Y = 1.242 + 0.208F_v/F_m - 0.254F_0/F_m$	0.963	36.087 **	2.598 *	-6.388 **
吐絮期	$Y = 1.263 - 0.151F_0/F_m - 0.128ABS/RC$	0.968	45.981 **	-7.754 **	-9.994 **

基础的快速叶绿素荧光诱导曲线的数据分析方法 (JIP - test), 可以捕捉诱导曲线上部分更丰富的信息^[17,20], 且 O - J - I - P 曲线的形状和参数对外界环境的变化十分敏感^[20,23-24], 越来越多地应用于植物的耐逆性鉴定评价。本课题组曾初次用 O - J - I - P 动力学的 F_v/F_m 和 PI 参数研究了北疆棉区 22 个主栽棉花的幼苗耐冷性差异^[23], 结果跟 Strauss 等对南非大豆耐冷性分类的结果^[24] 相符。本试验用快速叶绿素荧光进一步分析了北疆不同世代主栽棉花在不同生育时期的耐冷性, 涉及了多个快速荧光参数, 研究结果表明, 不同生育期的棉花耐冷性鉴定的适宜快速荧光参数不同。

3.2 不同生育期棉花耐冷性差异及耐冷指标筛选

植物耐冷性是植物对低温胁迫强度和时间的综合适应, 同时受生长发育时期、处理方法、环境因素等各个因素的影响^[1,7,9,14]。不同棉花在不同生育时期的耐冷性不完全一致^[7], 表明棉花耐冷性具有多样性和丰富的遗传基础, 同时也说明不同生育期棉花耐冷机制不一样, 需要对不同生育期的棉花耐冷指标分别进行筛选。有研究表明, 棉花种子的萌发能力随温度的降低而下降, 种子萌发指标与种子耐冷萌发力显著相关^[6-7,14], 其中发芽指数为低温下影响棉花种子萌发的关键指标^[6,14], 与辣椒、玉米等萌发期抗冷鉴定采用发芽指数作为评价指标相同, 但王俊娟等认为, 由于受子叶光合作用的影响, 萌发期棉花抗冷鉴定不宜采用发芽指数或出苗率作为评价指标, 可以 0 °C 处理 4 d, 28 °C 条件下恢复正常生长 7 d 的相对子叶平展率作为鉴定指标^[7]。在苗期耐冷性鉴定中, 很多人将幼苗的外观形态作为耐冷鉴定标准^[9], 如低温后的死苗率^[7], 冷害指数^[26] 等, 而且普遍认为, 冷害指数和棉花幼苗的耐冷性密切相关^[7,9,27]。在生理生化响应上, 抗氧化酶活性、膜稳定性及渗透调节物质是植物耐冷研究的主要内容。多数研究表明, 主要抗氧化酶 POD、CAT 活性在不同耐冷型棉花幼苗间有差异变

化^[7,26], 而 SOD 活性变化不大, 同时王俊娟等发现, 棉花幼苗地下部根系的抗氧酶活性比地上部对低温冷害的响应更明显^[7]。细胞质膜被认为是植物低温胁迫的关键位点, 膜稳定或透性相关指标也常被人们用来作为衡量植物耐冷性的指标, 棉花幼苗叶片的细胞膜透性物质 (MDA) 与棉苗耐冷性密切相关, 可作为棉花幼苗耐冷性鉴定的指标^[7,25], 还有研究发现, 棉花幼苗的耐冷性跟可溶性蛋白含量、脯氨酸含量等有关。而王冀川等认为, 棉花的耐冷性是多个指标因子共同作用的结果, 用单一或几个指标评价棉花的耐冷性可能存在误差^[27]。

由于受低温处理条件等因素的影响, 前人对棉花耐冷的研究多局限于生育前期^[6-7,9,14,28] (萌发期、幼苗期), 而生育中后期是棉花生殖生长、产量、品质形成的关键时期^[4,11,15], 是棉花温度需求较高的时段, 低温冷害的影响可能更大, 低温冷害研究也具有重要意义。在建立不同生育时期的棉花耐冷鉴定的快速叶绿素荧光模型基础上, 本试验初次对棉花生育期后期的耐冷性鉴定评价指标做了筛选, 研究发现, 快速荧光参数 F_0/F_m 、 F_v/F_m 为花铃期棉花耐冷性的关键指标, F_0/F_m 和 ABS/RC 为吐絮期棉花耐冷性的关键指标。研究还发现, 不同生育期棉花的耐冷性对整个生育期棉花耐冷性的影响大小为盛蕾期 > 花铃期 > 吐絮期 > 苗期, 进一步说明了后期低温对棉花较大的影响作用。

3.3 北疆棉花耐冷性评价及早熟育种的必要性

新疆是我国最大的棉花生产基地, 北疆亚棉区是新疆棉区一个重要组成部分^[4]。相对其他亚棉区, 北疆棉区积温低, 棉花生育期短^[5,10,15], 因此, 研究者们对北疆棉区适宜棉花材料的耐冷性进行大量的鉴定和筛选, 早熟也成为北疆棉区棉花育种的主要目标。近年来, 随着全球气温普遍增温, 棉花适宜生育期有延长趋势^[15], 生育期较长的品种相对更容易获得高产, 引起育种者们有忽略棉花早熟性的倾向, 如李春平等在分析北疆棉花早熟育种问题

时认为,北疆棉区棉花风险面积比例较小,应选育生育期在 125 d 或稍长的品种^[29],而本研究也发现,2011—2017 年间审定的适宜北疆棉区的代表棉花品种比 2001—2010 年间的代表棉花品种的耐冷性降低,因此,北疆棉花在坚持棉花品质和产量为首要育种目标时,依然应该把早熟性放到棉花育种目标的首要地位,不但是抵御棉花遭受的低温冷害伤害的需要,而且在未来棉花机械采收的叶片脱落和脱叶剂的施用效应上可能发挥着重要的作用。

快速叶绿素荧光技术可以应用于棉花耐冷性鉴定评价。不同生育期棉花耐冷性鉴定的快速荧光指标不同,建立了不同生育期棉花耐冷性鉴定的数学模型。在参试材料中,全生育期耐冷性表现高抗的棉花有新陆早 19 号、新陆早 33 号和新陆早 45 号,不抗的为新陆早 23 号;随时代更替,北疆不同世代选育的棉花品种耐冷性呈先上升后下降的趋势,但耐冷性好于其他棉区材料。

参考文献:

- [1] Margesin R, Neuner G, Storey K B. Cold-loving microbes, plants, and animals - fundamental and applied aspects [J]. *Die Naturwissenschaften*, 2007, 94(2): 77-99.
- [2] Yadav S K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2010, 30(3): 515-527.
- [3] 刘辉, 李德军, 邓治. 植物应答低温胁迫的转录调控网络研究进展[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(18): 3523-3533.
- [4] 新疆棉花高产优质高效理论与实践[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2004.
- [5] 周小云, 胡文冉, 杨洋, 等. 北疆春季棉花延迟型冷害的综合防治措施[J]. *棉花学报*, 2016, 38(5): 46-49.
- [6] 高利英, 邓永胜, 韩宗福, 等. 黄淮棉区棉花品种种子萌发期低温耐受性评价[J]. *棉花学报*, 2018, 30(6): 455-463.
- [7] 王俊娟, 王德龙, 阴祖军, 等. 陆地棉萌发至幼苗期抗冷性的鉴定[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(17): 3332-3346.
- [8] Gai Y P, Li X Z, Ji X L, et al. Chilling stress accelerates degradation of seed storage protein and photosynthetic protein during cotton seed germination[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2008, 194(4): 278-288.
- [9] 王俊娟, 王帅, 陆许可, 等. 棉花幼苗对低温胁迫的响应及抗冷机制初步研究[J]. *棉花学报*, 2017, 29(2): 147-156.
- [10] 谢芳, 童忠, 刘静. 新疆乌苏市近 20a 气候变化及其对棉花生育期的影响[J]. *中国棉花*, 2018, 45(10): 36-38, 40.
- [11] 李玉强. 低温冷害对尉犁县棉花生长发育的影响分析[J]. *农业灾害研究*, 2018, 8(5): 42-43.
- [12] Zheng M, Wang Y, Liu K, et al. Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to low temperature stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(4): 399-409.
- [13] Jimmy Z, James R, Matthew I. Impact of temperature and relative humidity on the near infrared spectroscopy measurements of cotton fiber micronaire [J]. *Journal Indexing and Metrics*, 2018, 88(20): 2279-2291.
- [14] 徐建伟, 张晨, 曾晓燕, 等. 近十年新疆北疆主栽棉花种子低温萌发能力差异评价[J]. *新疆农业科学*, 2017, 54(9): 1569-1578.
- [15] 胡莉婷, 胡琦, 潘学标, 等. 气候变暖和覆膜对新疆不同熟性棉花种植区划的影响[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(2): 90-99.
- [16] Baker N R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo* [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 89-113.
- [17] Kalaji H M, Rastogi A, Živčák M, et al. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors [J]. *Photosynthetica*, 2018, 56(3): 953-961.
- [18] 周蕴薇, 刘艳萍, 戴思兰. 用叶绿素荧光分析技术鉴定植物抗寒性的剖析[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(5): 945-950.
- [19] Kalaji H M, Jajoo A, Oukarroum A, et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(4): 102.
- [20] 李鹏民, 高辉远, Strasser R J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(6): 559-566.
- [21] 张淑英, 褚贵新, 梁永超. 不同铵硝配比对低温胁迫下棉花幼苗光合及叶绿素荧光参数的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2018, 30(5): 34-39.
- [22] Zushi K, Matsuzoe N. Using of chlorophyll a fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 219: 216-221.
- [23] 李志博, 华显伟, 魏亦农, 等. 叶绿素荧光动力学 O-J-I-P 参数在棉花幼苗耐冷性评价上的应用[J]. *棉花学报*, 2010, 22(2): 132-137.
- [24] Strauss A J, Kruger G H, Strasser R J, et al. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 56(2): 147-157.
- [25] 付凤玲, 李晚忱, 潘光堂. 模糊隶属法对玉米苗期耐旱性的拟合分析[J]. *干旱地区农业研究*, 2003, 21(1): 83-85, 125.
- [26] 李志博, 曹连莆, 魏亦农, 等. 荒漠绿洲区棉花幼苗耐寒生理特性及其评价指标分析[J]. *棉花学报*, 2010, 22(6): 568-573.
- [27] 王冀川, 黄琪, 徐雅丽. 棉花抗冷指标的灰色关联度分析[J]. *江西棉花*, 2001, 23(2): 6-9.
- [28] 夏军, 王远远, 乔露, 等. 营养元素引发对低温下棉苗保护性酶活性及叶绿素荧光参数的影响[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(16): 89-92.
- [29] 李春平, 刘忠山, 张大伟, 等. 北疆棉花早熟育种探讨[J]. *中国棉花*, 2014, 41(1): 5-7.

魏晓奕,张佩,徐进,等. 油菜产量因素预测方法研究[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):89-94.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.014

油菜产量因素预测方法研究

魏晓奕¹,张佩²,徐进³,朱宝¹

(1. 江苏省气象信息中心,江苏南京 210008; 2. 江苏省气候中心,江苏南京 210008; 3. 江苏省气象探测中心,江苏南京 210008)

摘要:以油菜单株第一分枝数、单株籽粒质量、单株荚果数、千粒质量、籽粒与茎秆比、产量等为预测对象,利用观测品种同为秦油2号的淮安站1995—2004年油菜农业气象观测资料及对应的气象观测资料,充分考虑油菜各生育阶段的生理特性及其对气象条件的不同要求,梳理确定育苗期 ≥ 0 ℃有效积温等35个气象因子,分别采用多元线性回归及BP神经网络等2种方法构建油菜产量因素的预测模型,并利用观测品种也为秦油2号的镇江站及射阳站1996—2000年、金坛站1997—2000年数据资料验证所构建模型的预测效果。对比分析2种模型的预测效果发现,BP神经网络模型在预测精度和稳定性上均优于线性回归模型,能对具有交互作用下的众多气象因子和产量因子进行非线性映射,可以更好地反映出油菜产量因素与相关气象因子间的函数关系。

关键词:BP神经网络;多元线性回归;产量预测方法;油菜产量因素

中图分类号:S165+.27 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0089-06

我国作物产量预测研究发展至今,成熟应用于业务服务中的模型仍以构建气象因子与对应气象产量间的数学模型为基础^[1-3]。气象产量的获取,须要对实际产量数据进行平滑处理,由于此过程消减了气象因子的波动性,导致气象产量并不能精确反映实际产量的变化。而气象因子的波动性直接影响作物特定生育阶段的生长状况,并反映在产量因素的变化上。准确预报产量因素不仅可以辅助预测最终产量,更重要的是可以揭示气象因子影响作物生育过程的机制,使产量预测更具有生理学意义。目前有关气象因子与产量因素的研究还主要集中在1个或几个气象因子对特定生育阶段的影响^[4-6];由于影响产量因素的因子复杂,不同因子间还存在相互影响甚至消减作用,对产量因素预测的研究鲜见报道。

目前,产量预测普遍直接选用时段内的平均气温、累积降水量及总日照时数等常规气象因子进行模型构建^[7-11],而较少考虑作物自身的生理特性。

在实际生产中,作物在不同生育阶段对气象因子波动的响应是不同的^[6,12-13],因此本研究结合油菜生理特性,选用不同生育阶段的关键气象因子进行产量因素预测模型的构建。

在众多作物产量预测模型的构建方法中,多元回归法由于原理简单、使用便捷,在研究中被普遍使用^[14-15]。它采用线性顺序处理的方法,适用于以多个自变量因子来解释某一因变量,但它对复杂过程的模拟有一定的局限。与多元回归不同,BP(back propagation)神经网络可学习并存储大量输入-输出模式的映射关系,而又无需事前揭示描述其数学方程,因此可以逼近任意连续函数,从而具有很强的非线性映射能力,已得到广泛应用^[16-19],如病虫害预测^[20-21]、小气候预测^[22]、产量预测^[23-24]等农业气象预测。这些应用大多数还只是采用了多因素对单因素关联模型的构建方法。

江苏省油菜种植面积近年来有所调减,但仍是最重要的油料作物,且单位面积产量水平一直位于全国前列。因此,本研究以秦油2号油菜5个产量因素及最终产量为研究对象,选用淮安站1995—2004年、镇江站1996—2000年、射阳站1996—2000年、金坛站1997—2000年的油菜农业气象观测资料进行分析,以避免因品种差异对预测结果带来误差。首先结合油菜的生理特性,梳理并确定不同发育期的气象指标因子;在此基础上,运用多元线性回归和BP神经网络2种方法进行油菜产量因素预

收稿日期:2020-07-27

基金项目:江苏省“333工程”高层次人才培养科研项目(编号: BRA2019348);2019年国内外作物产量气象预报专项;江苏省气象局科技项目(编号:KM201905)。

作者简介:魏晓奕(1984—),女,山东济南人,工程师,主要从事气象资料研究。E-mail:topw4489@sina.com。

通信作者:张佩,硕士,副研级高级工程师,主要从事应用气象研究。E-mail:78073954@qq.com。

测模型的构建,并对比分析 2 种方法在预测效果的差异,以确定适用于江苏省油菜产量因素预测的最佳方法。

1 资料与方法

1.1 资料来源

江苏省油菜农业气象观测普遍从 20 世纪 80 年代初至中后期开始。由于油菜种植区域的调整缩减,油菜的农气观测站点于 2000、2011 年也相应进行了调整。为了避免品种差异对产量预测的影响,确定观测品种同为秦油 2 号的年序为分析样本,数据分别来自淮安站(1995—2004 年)、镇江站(1996—2000 年)、射阳站(1996—2000 年)及金坛站(1997—2000 年)。

油菜农业气象观测资料及气象观测资料源于江苏省气象信息中心。其中,油菜农业气象观测资料主要包括各发育期出现时间、产量因素(单株第一分枝数、单株籽粒质量、单株荚果数、千粒质量、籽粒与茎秆比)及产量,气象观测资料为对应年份前一年 9 月中旬至当年 5 月下旬的逐日观测资料,气象因素主要包括平均气温、最低气温、最高气温、降水量、日照时数、日出日落时间等。

1.2 气象因子的选择

本研究将油菜一生划分为育苗期(播种至移栽期)、大田苗期(移栽至现蕾期)、蕾薹期(现蕾至开花期)、花果期(开花至成熟期)4 个生育期阶段进行研究。

1.2.1 热量因子 已有研究表明,油菜不同生育阶段对温度的要求不同,其中育苗期温度过低,不利于出苗及出苗后生长,一般 5 ℃ 以下要 20 d 以上才能出苗;苗期适宜生长温度为 10 ~ 20 ℃,遇短期 0 ℃ 以下低温不致受冻,但若持续时间长则也会受害。蕾薹期是油菜搭好丰产架子的关键时期,一般春后气温达 5 ℃ 以上即现蕾,10 ℃ 以上迅速抽薹,此时若遇 0 ℃ 以下低温则导致裂薹和死蕾发生,进而影响产量。花果期前期当气温低于 10 ℃ 时,会减少开花数量,当气温低于 5 ℃,则开花停止;当籽粒灌浆时日最高温度超过 30 ℃,会出现高温逼熟现象^[25]。

因此,本研究以各生育阶段的关键温度(育苗期为 0 ℃;大田苗期、蕾薹期皆为 0、5 ℃;花果期为 0、10 ℃)为节点,统计了 4 个生育期阶段内各大于等于关键温度的有效积温(T_i),日平均温度低于关

键温度的日数($D_{\bar{t}_m < t_0}$)、日最低温度低于关键温度的日数($D_{t_1 \leq t_0}$),日平均温度高于关键温度的日数($D_{\bar{t}_m \geq t_0}$)。同时,考虑到花果期温度过高,可能影响油菜籽粒的灌浆充实,最终影响产量,因此,本研究还统计了花果期日最高温度 ≥ 30 ℃ 的高温日数($D_{t_h \geq 30}$)。

$$T_i = \sum_{m=1}^n (t_m - t_0); \quad (1)$$

$$D_{\bar{t}_m < t_0} = \sum_{m=1}^n d_m, d_m = \begin{cases} 0, \bar{t}_m \geq t_0 \\ 1, \bar{t}_m < t_0 \end{cases}; \quad (2)$$

$$D_{t_1 \leq t_0} = \sum_{m=1}^n d_m, d_m = \begin{cases} 0, t_1 > t_0 \\ 1, t_1 \leq t_0 \end{cases}; \quad (3)$$

$$D_{\bar{t}_m \geq t_0} = n - D_{\bar{t}_m < t_0}; \quad (4)$$

$$D_{t_h \geq 30} = \sum_{m=1}^n d_m, d_m = \begin{cases} 1, t_h \geq 30 \text{ }^\circ\text{C} \\ 0, t_h < 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{cases}. \quad (5)$$

式中: i 表示生育阶段序号数,取 1、2、3、4; m 表示每个生育阶段内的日序; n 表示每个生育阶段的长度,即时间,d; t_m 为逐日平均温度,℃; t_1 为逐日最低温度,℃; t_h 为逐日最高温度,℃; t_0 为生长关键温度,℃,育苗期取{0}、大田苗期、蕾薹期取{0,5}、花果期取{0,5,10}。

1.2.2 日照、降水因子 日照、降水因子主要统计了 4 个生育期阶段内的总日照时数 S_i 、总可照时数 S_{a_i} 、总降水量 R_i 。

$$S_i = \sum_{m=1}^n S_m; \quad (6)$$

$$S_{a_i} = \sum_{m=1}^n (S_{as_m} - S_{ar_m}); \quad (7)$$

$$R_i = \sum_{m=1}^n R_m. \quad (8)$$

式中: S_m 为逐日日照时数,h; S_{as_m} 逐日日落时间,h; S_{ar_m} 逐日日出时间,h; R_m 为逐日降水量,mm。

最终梳理确定 35 个自变量因子。

1.3 预测模型构建方法

1.3.1 多元线性回归模型构建 本研究利用 SPSS 软件,采用全相关方法首先对育苗期 ≥ 0 ℃ 有效积温等 35 个气象因子与单株第一分枝数等 5 个油菜产量因素及产量进行相关分析,然后基于最小二乘法(ordinary least square, OLS),采用逐步回归法构建油菜各产量因素预测的最优回归模型。

设 Y_c 为油菜产量因素, x_j 分别代表不同气象因子,以用来说明 Y_c ,则构建油菜产量因素与各气象因子之间的线性关系模型:

$$Y_c = \sum_{j=1}^q a_j x_j + a_0 \quad (9)$$

式中: a_0 为随机变量, 为常数项; a_j 是各气象因子 x_j 对应的偏回归系数, 表示在其他气象因子不变的情况下, x_j 增加或减少 1 个单位引起 Y_c 增减的平均值。 c 为油菜产量因素数量, 本研究取 6 个; j 为气象因子序号; q 为参与建模的气象因子数量, 个。

1.3.2 BP 神经网络模型构建 BP 神经网络模型拓扑结构包括输入层(input)、隐层(hidden layer)和输出层(output layer)。为做有效对比, 使用与多元回归模型相同的 35 个气象因子作为输入层因子, 输出层为单株第一分枝数等 5 个油菜产量因素及产量。

神经网络法的预测精度主要受制于隐含层节点数; 若节点数过少, 将影响网络的学习效果, 则须要增加训练次数, 而这又会降低训练的精度; 反之, 网络训练时间增加, 网络易过拟合。本研究先由经验公式(10)确定不同的神经元数^[26], 然后进行训练对比, 以得到最佳的隐含层神经元数。

$$p = \sqrt{o+l} + \alpha \quad (10)$$

式中: p 、 o 、 l 分别为隐含层、输入层及输出层的神经元数, 个; α 代表 1~10 的常数。

本研究主要采用 MATLAB 2016R 软件的 Neural

Network Toolbox 来构建气象因子与油菜产量因素的 BP 神经网络预测模型, 操作步骤如下: (1) 数据的归一化处理。由于影响油菜产量因子的气象因子较多, 且气象因子原始数据的级差差异明显, 本研究在进行 BP 神经网络构建前先对原始数据进行归一化处理。(2) 网络训练。将数据的 70% 用于模型训练, 30% 用于预测检验。设置模型的收敛误差为 0.000 1, 学习速率为 0.05, 最大训练轮数为 5 000。

利用所构建的多元回归模型和 BP 神经网络模型对镇江站及射阳站 1996—2000 年、金坛站 1997—2000 年各产量要素进行模型预测精度 PA_c 验证, 并将二者进行对比分析。预测精度 PA_c 的计算公式如下:

$$PA_c = \left(1 - \left| \frac{Y_c - Y_a}{Y_a} \right| \right) \times 100\% \quad (11)$$

式中: Y_a 为油菜产量要素的实际值。

2 结果分析

2.1 多元线性回归模型及其变量解释

由表 1 可以看出, 5 个油菜产量要素及产量预测模型的拟合优度均较好, 模型 R^2 均在 0.8 以上, 尤其 Y_2 、 Y_3 和 Y_4 的 R^2 达到 0.96 以上。

表 1 油菜产量因素的多元回归预测模型构建及模型拟合度检验判定结果

产量因素	预测模型	R^2	校正 R^2
产量(yield)	$Y_1 = -60.927 + 0.312x_1 - 0.288x_2$	0.803	0.747
单株第一分枝数(FBN)	$Y_2 = 14.997 - 0.011x_2 - 0.011x_3 - 0.003x_4$	0.977	0.966
单株籽粒质量(SW)	$Y_3 = 40.919 - 0.234x_5 - 0.320x_6 + 0.131x_7 + 0.016x_1$	0.997	0.994
单株荚果数(PN)	$Y_4 = 114.466 + 0.333x_2 + 0.291x_8 + 1.264x_9$	0.964	0.946
千粒质量(1 000GW)	$Y_5 = 3.321 + 0.032x_{10} + 0.001x_{11}$	0.865	0.827
籽粒与茎秆比(SST)	$Y_6 = -0.621 + 0.011x_{10} + 0.001x_{11}$	0.815	0.762

注: x_1 为花果期 ≥ 0 °C 有效积温; x_2 为育苗期总日照时数; x_3 为育苗期总降水量; x_4 为大田苗期总日照时数; x_5 为大田苗期总可照时数; x_6 为蕾薹期日最低温度 ≤ 5 °C 时间, d; x_7 为大田苗期日最低温度 ≤ 0 °C 时间, d; x_8 为大田苗期总降水量; x_9 为大田苗期日平均温度 > 5 °C 时间, d; x_{10} 为花果期日最低温度 ≤ 10 °C 时间, d; x_{11} 为育苗期 ≥ 0 °C 有效积温。

由表 1 可知, 对于油菜产量来说, 它主要由花果期 ≥ 0 °C 有效积温、育苗期总日照时数解释。从各产量因素的解释变量来看, 油菜的单株第一分枝数以育苗期总日照时数和总降水量、大田苗期总日照时数为主要解释变量; 单株籽粒质量主要由大田苗期总可照时数、蕾薹期日最低温度 ≤ 5 °C 时间、大田苗期日最低温度 ≤ 0 °C 时间及花果期 ≥ 0 °C 有效积温共同解释; 单株荚果数主要由育苗期总日照时数、大田苗期总降水量及大田苗期日平均温度 > 5 °C 时间共同解释; 千粒质量、籽粒与茎秆比均主要由花

果期日最低温度 ≤ 10 °C 时间及育苗期 ≥ 0 °C 有效积温 2 个因子解释。

2.2 2 种模型对产量因素的预报效果对比

根据公式(10), 经过多次优选后, 发现 $o = 35$, $l = 6$, $\alpha = 7$ 时, $p = 14$, 此结构下 BP 网络收敛效果最佳, 由此确定本研究最佳 BP 神经网络结构为 35 - 14 - 6。

通过 BP 神经网络模型得到的预测值与多元回归模型的预测结果进行比较后发现, BP 神经网络模型预测精度普遍表现更优。从总体预测精度(图 1)

来看, BP神经网络模型对油菜各产量因素的预测精度平均较多元回归模型明显提高, 其中除对单株第一分枝数的预测精度略低于多元回归模型外, 在其他各产量因素的预测上, BP神经网络模型均具有更高的精度, 其中单株籽粒质量和千粒质量分别提高8.96、8.01百分点, 籽粒与茎秆比提高了22.41百分点, 产量提高4.66百分点。同时, BP神经网络模型对不同产量因素的预测精度的标准差为5.41%, 明显低于多元回归模型的10.75%, 这说明BP神经网络非线性的建模特征对处理多因子有着更强的能力, 对不同产量因素预测的稳定性更高。

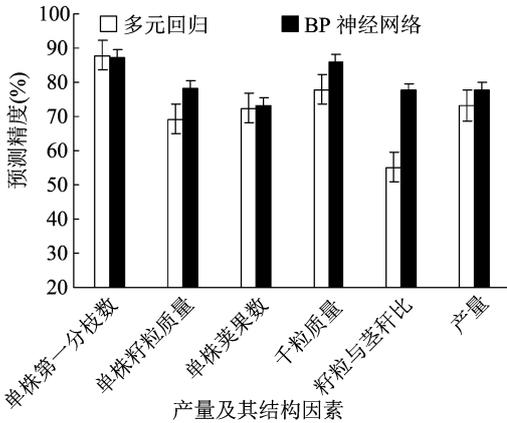


图1 BP神经网络和多元回归模型的预测精度对比

2.3 2种模型在不同地区的预报效果对比

进一步对镇江、金坛和射阳的预报效果(图2至图4)进行分析发现, 无论是BP神经网络模型还是多元回归模型, 对镇江、金坛地区油菜各产量因素的预测精度均普遍高于射阳, 这可能是由于射阳地处江苏东部沿海, 具有较明显的海洋性气候特征, 镇江、金坛与淮安同处中西部内陆, 气候特征较为相似。

其中, BP神经网络模型对镇江油菜各产量因素的预测精度平均达81.54%, 较多元回归模型提升7.43百分点, 且在对每一个结构因素的预测上, BP神经网络均表现更优, 提升效果依次为单株荚果数(19.11百分点) > 千粒质量(8.37百分点) > 单株籽粒质量(7.00百分点) > 籽粒与茎秆比(5.08百分点) > 单株第一分枝数(3.35百分点) > 产量(1.65百分点)。BP神经网络模型对金坛油菜各产量因素的平均预测精度达87.00%, 较多元回归模型提升了5.19百分点, 就各产量因素来看, 对单株第一分枝数和产量的预测精度略低于多元回归模型, 对千粒质量的预测精度提升最高, 达17.52百分

点, 对单株荚果数、籽粒与茎秆比和单株籽粒质量的预测精度分别提升了11.31、8.89、1.05百分点。射阳站油菜各产量因素的多云回归模型的预测精度平均仅为66.49%, 采用BP神经网络建模后, 预测精度提高了8.46百分点; 但对单株第一分枝数和单株荚果数的预测效果, 多元回归模型明显优于BP神经网络模型。

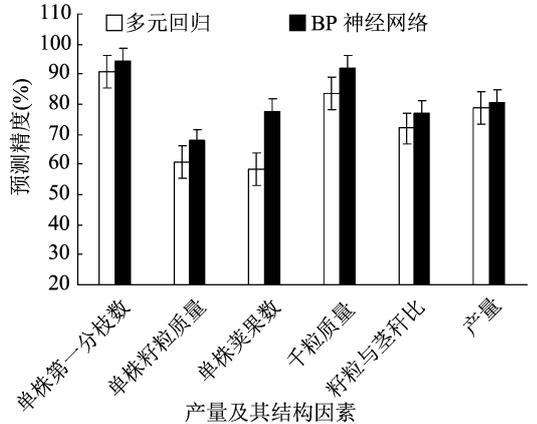


图2 BP神经网络和多元回归预测精度对比(镇江站)

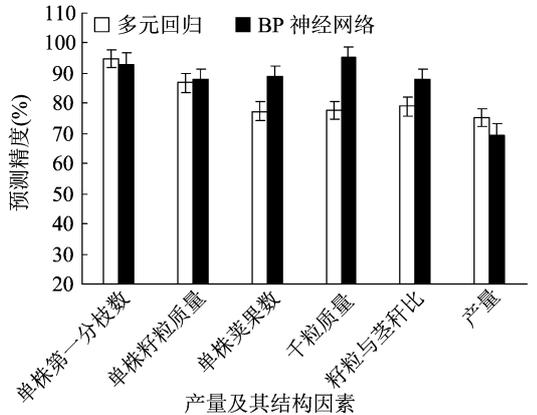


图3 BP神经网络和多元回归预测精度对比(金坛站)

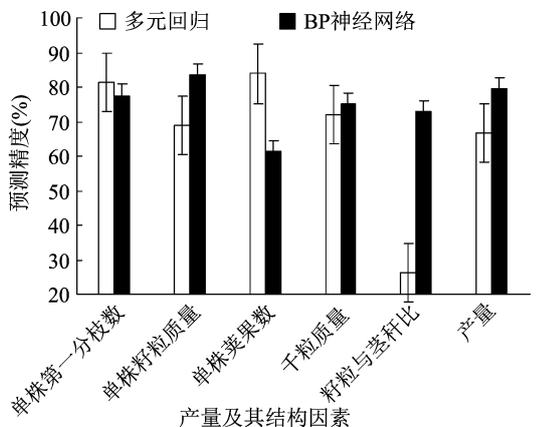


图4 BP神经网络和多元回归预测精度对比(射阳站)

3 讨论与结论

从农学角度来看,正是各产量因素的波动才引起作物产量的变化。本研究以油菜单株第一分枝数、单株籽粒质量、单株荚果数、千粒质量、籽粒与茎秆比与产量等作为预测对象,选用淮安站油菜观测品种同为秦油 2 号的数据资料进行模型构建,有效避免了地区、品种对产量因素的影响。另外,淮安 1995—2004 年油菜观测为同一地块,可认为土壤条件基本不变,且农业气象观测人员的田间管理措施也基本一致。因此,可以近似认为该观测地块 1995—2004 年油菜产量因素的波动主要是由气象因子的变化造成的。

在气象因子的选择上,充分考虑油菜不同生育阶段对温、光、水的不同要求^[25],本研究以各生育阶段的关键温度为节点,统计与油菜产量因素密切相关的育苗期 ≥ 0 °C 有效积温等 35 个气象因子,并利用多元回归模型在众多气象因子中找出限制各产量因素的主要因素。从多元线性回归模型分析结果可以看出,油菜产量主要由花果期 ≥ 0 °C 有效积温及育苗期总日照时数解释,其中花果期 ≥ 0 °C 有效积温越大,越利于油菜产量的提高。从各产量因素的解释变量来看,油菜的单株第一分枝数和单株荚果数均主要取决于油菜生长前期的气象条件,其中单株第一分枝数以育苗期总日照时数和总降水量、大田苗期总日照时数为主要解释变量,这可能是由于江苏省冬春季热量条件可完全满足油菜前期生长的需求,日照和降水成为了生长的主要限制气象因子^[27]。单株籽粒质量受影响的生育阶段较多,其主要由大田苗期总日照时数、蕾薹期日最低温度 ≤ 5 °C 时间、大田苗期日最低温度 ≤ 0 °C 时间及花果期 ≥ 0 °C 有效积温共同解释,其中蕾薹期日最低温度 < 5 °C 时间与单株籽粒质量成负相关,这主要是因为蕾薹期若遇到低于 5 °C 低温天气,不利于油菜现蕾抽薹及开花授粉,会影响油菜荚果的发育,进而影响后期籽粒形成^[25]。单株荚果数与生长前期的光温水条件均关系密切。千粒质量、籽粒与茎秆比均主要由花果期日最低温度 ≤ 10 °C 时间及育苗期 ≥ 0 °C 有效积温 2 个因子解释,其中育苗期 ≥ 0 °C 有效积温越高,越利于油菜千粒质量的提高,这说明油菜籽粒的灌浆充实不仅与生长后期的气象条件有关,前期的生长积累,也影响了后期的生长;花果期日最低温度 ≤ 10 °C 时间越多,可能会

拉长籽粒的灌浆充实时间,从而增加籽粒的积累,同时也使茎秆的营养向籽粒转化得更多,促使籽粒与茎秆的比值增大。从以上模型构建的结果可以看出,产量因素的多元线性回归预测模型都反映出了实际生产中出现的油菜生长状况,弥补了气象产量模型的不足。

但气象因子不是独立存在的,它们之间相互影响、相互制约,而由于多元回归模型摒弃了其他因子,仅把与产量因素相关性大的主要因子作为预报因子进行建模,当气象条件出现较大波动尤其是当被摒弃的因子发生异常时,多元回归模型就会放大气象因子的波动性,其预测结果就会产生较大误差。因此,它仅适用于气象条件稳定的时间区段。同时,由于多元回归模型是一种线性估计算法,受因子互作的影响易出现对称、丛聚及屏蔽等效应而导致模型的预测精度不高,且缺乏稳定性。

BP 神经网络模型对油菜各产量结构的预测精度总体优于多元线性回归模型,且具有更好的稳定性。但 BP 神经网络自身也存在缺点,由于其没有对主导预测因子进行筛选的功能^[22],大部分基于 BP 神经网络的产量预测研究普遍只针对产量一个因素,即为非线性多对一映射,且多为纯方法论研究,对模型的生理学意义较少关注。本研究在建模前,充分考虑了油菜各生育阶段的生理特征及其对气象条件的不同要求,梳理了具有生理学意义的 35 个因子,在一定程度上弥补了 BP 神经网络缺少生理解释的不足。同时,充分利用了 BP 神经网络的非线性映射的优势,实现多因素对多因素关联预测模型的构建。

综上,在进行油菜产量因素的预测过程中,BP 神经网络模型的预测效果优于多元回归,且预测稳定性高,说明 BP 神经网络模型有更好的抗干扰性,能对具有交互作用下的气象因子和产量因子进行非线性映射,可以更好地反映出油菜产量因素与相关气象因子间的函数关系。同时,BP 神经网络可以实现多因子输入及多因子输出,较多元回归模型每种因变量都要建立不同模型,更为简便快捷,可以应用在油菜产量预测的气象业务服务上,但仍有一些问题有待进一步研究。如模型对单株籽粒质量、单株荚果数的预测结果误差较大,且对射阳地区油菜各产量因素的预测效果总体仍有偏差。

因此,下一步仍将继续对提升模型对不同预报对象、不同地区的预测效果开展研究。同时,本研

究仅分析了油菜各产量因素与光、温、水因子的关联模型,但众所周知,影响作物产量形成的气象因素还有很多,如太阳辐射、环境二氧化碳浓度等,甚至大尺度的海温、环流背景都会对产量的形成产生影响。另外,除了气象因素,土壤条件、人为的田管措施等也会影响产量形成。由此可见,如何综合考虑多种因素、利用非线性理论提高产量因素的预测效果是未来的另一个研究重点。

参考文献:

[1]王贺然,张慧,王莹,等. 基于两种方法建立辽宁大豆产量丰歉预报模型对比[J]. 中国农业气象,2018,39(11):725-738.

[2]王培娟,张佳华,谢东辉,等. A2 和 B2 情景下冀鲁豫冬小麦气象产量估算[J]. 应用气象学报,2011,22(5):549-557.

[3]王媛,方修琦,徐铁,等. 气候变化背景下“气候产量”计算方法的探讨[J]. 自然资源学报,2004,19(4):531-536.

[4]孙建,饶月亮,乐美旺,等. 干旱胁迫对芝麻生长与产量性状的影响及其抗旱性综合评价[J]. 中国油料作物学报,2010,32(4):55-533.

[5]袁晋,罗庆明,刘卫国,等. 气象因子对川中丘陵地区带状套作大豆产量的影响[J]. 中国油料作物学报,2014,36(6):777-783.

[6]涂玉琴,戴兴临. 花期低温阴雨对甘蓝型油菜产量和种子含油量的影响[J]. 中国油料作物学报,2011,33(5):470-475.

[7]吴普特,赵西宁. 气候变化对中国农业用水和粮食生产的影响[J]. 农业工程学报,2010,26(2):1-6.

[8]高永刚,顾红,姬菊枝,等. 近 43 年来黑龙江气候变化对农作物产量影响的模拟研究[J]. 应用气象学报,2007,18(4):532-538.

[9]蒯涛,谢云,刘刚,等. 黑龙江省气候变化对粮食生产的影响[J]. 自然资源学报,2008,23(2):307-318.

[10]谢远玉,张智勇,刘翠华,等. 赣州近 30 年气候变化对双季早稻产量的影响[J]. 中国农业气象,2011,32(3):388-393.

[11]孙卫国,程炳岩,杨沈斌,等. 区域气候变化对华东地区水稻产量的影响[J]. 中国农业气象,2011,32(2):227-234.

[12]张海燕,解备涛,段文学,等. 不同时期干旱胁迫对甘薯光合效

率和耗水特性的影响[J]. 应用生态学报,2018,29(6):1943-1950.

[13]宋广树,孙忠富,孙蕾,等. 东北中部地区水稻不同生育时期低温处理下生理变化及耐冷性比较[J]. 生态学报,2011,31(13):3788-3795.

[14]钱锦霞,郭建平. 郑州地区冬小麦产量构成要素的回归模型[J]. 应用气象学报,2012,23(4):500-504.

[15]易雪,王建林,宋迎波. 气候适宜指数在早稻产量动态预报上的应用[J]. 气象,2010,36(6):85-89.

[16]Green T R, Salas J D, Martinez A, et al. Relating crop yield to topographic attributes using Spatial Analysis Neural Networks and regression [J]. Science Direct, 2007,139(1/2):23-37.

[17]邵月红,张万昌,刘永和,等. BP 神经网络在多普勒雷达降水量的估测中的应用[J]. 高原气象,2009,28(4):846-853.

[18]瞿英,王冕,董文旭,等. 基于 BP 神经网络的农田大气气浓度预测[J]. 中国生态农业学报(中英文),2019,27(4):519-528.

[19]侯艺璇,赵华甫,吴克宁,等. 基于 BP 神经网络的作物 Cd 含量预测及安全种植分区[J]. 资源科学,2018,40(12):2414-2424.

[20]刘庭洋,李焯,浦仕磊,等. 基于 BP 神经网络的稻瘟病预测预报研究[J]. 西南农业学报,2017,30(7):1546-1553.

[21]靳然,李生才. 基于小波神经网络和 BP 神经网络的麦蚜发生期预测对比[J]. 植物保护学报,2016,43(3):353-361.

[22]温永菁,李春,薛庆禹,等. 基于逐步回归与 BP 神经网络的光温室温湿度预测模型对比分析[J]. 中国农学通报,2018,34(16):115-125.

[23]戎陆庆,陈飞,欧阳浩. 基于 GRA&BPNN 的广西粮食产量预测研究[J]. 中国农业资源与区划,2017,38(2):105-111.

[24]庄星,韩飞. 基于混合群智能算法优化 BP 神经网络的粮食产量预测[J]. 江苏大学学报(自然科学版),2019,40(2):209-215.

[25]杨文钰,屠乃美,张洪程,等. 作物栽培学各论[M]. 北京:中国农业出版社,2003.

[26]陶海龙. 基于混合智能算法的铁路运量预测研究[D]. 兰州:兰州交通大学,2012.

[27]张佩,田娜,赵会颖,等. 江苏省冬小麦气候适宜度动态模型建立及应用[J]. 气象科学,2015,35(4):468-473.

万佳森,原秦英,李东利,等. 奶牛粪肥对玉米光合特性、产量及经济效益的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):95-100.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.015

奶牛粪肥对玉米光合特性、产量及经济效益的影响

万佳森¹,原秦英²,李东利¹,周喜荣¹,刘智¹,田超¹,刘少泉¹,孙权¹

(1.宁夏大学农学院,宁夏银川750021;2.宁夏工商技术学院,宁夏银川750021)

摘要:探究在滴灌条件下奶牛粪肥对宁夏地区玉米光合特性、产量及经济效益的影响。以绿博6号玉米为供试材料,设置6种发酵的奶牛粪施用水水平(0、200、400、600、800、1 000 kg/666.7 m²)。结果表明,不同奶牛粪肥施用量可以促进玉米株高、茎粗、叶绿素含量;在玉米抽雄期,施1 000 kg/666.7 m²处理的气孔导度、胞间CO₂浓度、蒸腾速率最高,分别较对照提高135.29%、107.94%、113.56%;施600 kg/666.7 m²处理净光合速率最高,较对照显著提高18.42%;施800 kg/666.7 m²处理的玉米增产效果最佳,玉米的单穗粒数、百粒质量、籽粒产量分别较对照显著增加61.72%、67.22%、170.46%,施800、1 000 kg/666.7 m²处理之间的百粒质量和籽粒产量均无显著性差异;施400、800 kg/666.7 m²处理玉米的经济效益分别较对照显著增加230.34%、275.33%。说明不同有机肥施用量均可促进玉米光合作用,提高玉米产量,增加经济效益,通过施肥量与产量函数模型得出最高产量施肥量为899.01 kg/666.7 m²,最大经济效益施肥量为699.44 kg/666.7 m²,经主成分分析综合评价结果得出,施800 kg/666.7 m²处理的有机肥施用量最佳。

关键词:奶牛粪;光合特性;土壤肥力;玉米产量;经济效益

中图分类号: S513.06 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0095-06

我国畜禽养殖业的产物每年生产量约达57亿t,含有的氮磷钾养分总量可达7 300万t^[1],畜禽粪便中不仅含有作物可吸收的养分,还可以提高土壤肥力,改善土壤结构,促进土壤保墒保温效果^[2],这就使畜禽粪便成为我国有机肥的主要来源。而奶牛养殖业生产在宁夏规模相对较大,同时畜禽粪污资源量大,因不合理处理会造成大量资源浪费。目前,通过科学技术高效利用发酵畜禽粪便,将其制成高品质的有机肥来代替化肥,可提高土壤肥力,减少环境面源污染,促进有机农业的发展。畜禽粪便发酵后的有机肥,不仅养分全面,肥效持久,还能培肥地力,促进养地和用地的合理结合^[3],减少因化肥施入带来的负面效果,增加土壤碳氮,为作物生长提供必需营养元素,有利于农业健康发展,促进资源可持续发展^[4]。

近年来关于有机肥的研究颇多,李恕艳等研究表明,施用38 t/hm²有机肥对番茄增产效果最

佳^[5],可改善番茄品质,促进作物生长发育^[6]。武星魁等研究表明,有机肥替代化肥比例为25%时包心菜产量最高^[7],这是因为有机肥可以提高土壤碳氮含量,维持土壤有机质和速效养分^[8]。胡诚等研究发现,长期施有机肥可降低土壤容重,改善土壤孔隙,补充土壤氮素,进而提高土壤肥力,增加小麦产量^[9-10]。前人的研究结果表明,有机肥中含有大量有益菌,可阻止土传病害传播。有机肥施用量为50%时可显著增强作物光合能力,改良西瓜连作障碍,有利于作物增产^[11]。有研究报道,有机肥可抑制土传病害,防止土壤盐渍化,改善土壤的物理结构^[12],对提高土壤碳源,以保证养分充足供应,对作物生长具有重要作用。

在滴灌条件下,在宁夏半干旱地区有机肥对作物生长发育的报道较少,本研究针对宁夏地处西北、水资源匮乏、土壤肥力贫瘠,但养殖业发达、畜禽粪污污染资源量大等特点,探索滴灌条件下奶牛粪好氧发酵对玉米生长发育、产量及经济效益的影响。研究在滴灌条件下奶牛粪好氧发酵生产高品质有机肥,通过滴灌方式,研究不同施肥量对土壤肥力、玉米生长发育、产量及经济效益的影响,探索有机肥最佳施用量、最佳经济效益,旨在为该地区奶牛粪高效合理利用及玉米高产高效栽培提供理

收稿日期:2020-09-09

基金项目:宁夏重点研发计划重大专项(编号:2019BCF01001)。

作者简介:万佳森(1992—),宁夏银川人,硕士研究生,研究方向为农业资源利用。E-mail:987549113@qq.com。

通信作者:孙权,博士,教授,博士生导师,从事农业资源利用教学与科研工作。E-mail:sqnxu@sina.com。

论指导。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

试验于 2019 年 4—10 月在宁夏银川市兴庆区月牙湖乡俊华农牧有限公司农场(38°13′46.71″N, 106°13′59.23″E)进行,海拔为 1 100 m,年均气温 ≥ 10 °C 的积温为 3 300 °C,无霜期为 140~160 d,年均日照时数为 3 000 h,日温差为 13 °C,年降水量为 180~200 mm,年均气温为 8.5 °C。供试土壤是耕种多年后形成的改良型土壤。土壤 0~20 cm 耕层土壤基本理化性质:pH 值为 8.26,有机质含量为 7.62 g/kg,碱解氮含量为 47.72 mg/kg,速效磷含量为 22.16 mg/kg,速效钾含量为 50.55 mg/kg,全盐含量为 0.46 g/kg。

1.2 试验材料

供试玉米品种为国家审定品种绿博 6 号。

试验选用好氧发酵完成的奶牛粪,符合 NY 525—2012《有机肥料》质量标准。其基本理化性质:有机质含量为 46.86%,全氮含量为 40.31 g/kg,全磷含量为 11.65 g/kg,全钾含量为 16.52 g/kg,pH 值为 8.22,全盐含量为 15.58 g/kg。

1.3 试验设计

采用单因素随机区组试验设计。试验设置 6 个奶牛粪肥施肥水平:CK (0 kg/666.7 m²)、N1 (200 kg/666.7 m²)、N2 (400 kg/666.7 m²)、N3 (600 kg/666.7 m²)、N4 (800 kg/666.7 m²)、N5 (1 000 kg/666.7 m²),共 6 个处理,每个处理重复 3 次,共 18 个小区,小区面积为 11 m×30 m=330 m²,随机排列。在播前整地,划好小区后,用电子秤称量奶牛粪,奶牛粪全部基施,撒施于地表,翻耕,耙磨;气吸式精量播种机单粒播种,2019 年 5 月 8 日播种,播深 5~10 cm,宽窄行种植,宽行为 70 cm,窄行为 40 cm,平均行距为 55 cm;株距为 20 cm,窄行铺设 1 条滴灌带,玉米生育期采用滴灌,共滴灌 14 次,总滴灌量为 2 600 m³/hm²,种植密度为 6 060 株/666.7 m²,2019 年 10 月收获。

1.4 测定项目及指标

1.4.1 土壤养分指标的测定 采集方法:按照随机、等量的原则,采用“S”形采集土壤样品,采集 0~20 cm 土层土样带回实验室风干、研磨、过筛。有机质含量采用重铬酸钾容量法—外加热法测定;土壤全氮含量采用半微量凯氏定氮法测定;全磷含量采

用钼锑抗比色法测定;速效磷含量采用 0.5 mol/L NaHCO₃ 浸提—钼锑抗比色法测定;速效钾含量采用 1 mol/L NH₄OAc 溶液浸提—火焰光度法(FP 6400 型)测定。

1.4.2 玉米形态和光合指标的测定 在玉米抽雄期后测定形态光合指标,玉米株高用钢尺测量,茎粗用数显游标卡尺(0.01 mm)测定近地面茎粗(mm),每次测量 10 株取平均值。用 SPAD-502 便携式叶绿素仪测量 1 次叶绿素含量,每张叶片测定其基部、中部、尖部的叶绿素含量取其平均值。选择晴天采用 CI-6400 便携式光合测量仪测定光合速率、蒸腾速率、胞间 CO₂ 浓度、气孔导度等。

1.4.3 玉米产量指标测定 在玉米生理成熟后,各处理除去两边行及两端各 1 m 取中间 8 行,进行田间综合性状调查。统计株数和果穗数,各小区取 20 株玉米的果穗进行室内考种,测定小区产量。产值=籽粒产量×籽粒价格;经济效益=产值-总成本。

1.5 数据统计分析

试验数据采用 Excel 2010 软件整理数据和绘图,同时采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,并对相关性指标进行差异性分析($P < 0.05, n = 5$)。

2 结果与分析

2.1 不同奶牛粪肥施用量对玉米生长指标的影响

由表 1 可知,在玉米成熟期,施奶牛粪肥处理在不同程度上增加了玉米株高和茎粗,提高了叶绿素含量。N1、N2、N3、N4、N5 处理株高分别较 CK 增加 37.92%、36.74%、46.56%、50.49%、48.13%。不同施肥量处理玉米茎粗均高于 CK,不同处理间无显著性差异。不同施肥量对玉米叶绿素含量有显著影响,N1、N2、N3、N4、N5 处理的叶绿素含量较 CK 分别显著增加 28.72%、30.32%、18.23%、54.43%、19.44%,不同处理间无显著性差异。

表 1 奶牛粪肥不同施用量对玉米生长指标的影响

处理	株高 (cm)	茎粗 (cm)	叶绿素含量
CK	254.50 ± 13.46c	2.20 ± 0.14b	33.07 ± 1.57c
N1	351.00 ± 9.90abc	4.10 ± 0.29a	42.57 ± 2.11b
N2	348.00 ± 11.31abc	3.70 ± 0.21a	43.10 ± 0.91b
N3	373.00 ± 7.07ab	3.62 ± 0.03a	39.10 ± 3.01b
N4	383.00 ± 8.46a	3.65 ± 0.50a	51.07 ± 2.05a
N5	377.00 ± 12.73ab	3.51 ± 0.35a	39.50 ± 2.11b

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,表 2 至表 4 同。

2.2 不同奶牛粪肥施用量对玉米光合特性的影响

由表 2 可知,在玉米抽雄期,N3、N4、N5 处理净光合速率分别较 CK 显著提高 18.42%、12.79%、15.70%。N5 处理的气孔导度、胞间 CO₂ 浓度、蒸腾速率最高,分别较 CK 显著提高 135.29%、

107.94%、113.56%。N2 和 N3 处理气孔导度分别较 CK 提高 70.58%、52.94%。N2、N3 和 N4 处理的胞间 CO₂ 浓度无显著性差异。N1、N2、N3、N4、N5 处理的蒸腾速率分别较 CK 增加 23.72%、46.61%、35.17%、55.51%、113.56%。

表 2 不同奶牛粪肥施用量对玉米光合特性的影响

处理	净光合速率 [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	气孔导度 [$\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]	胞间 CO ₂ 浓度 ($\mu\text{mol}/\text{mol}$)	蒸腾速率 [$\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$]
CK	26.12 ± 0.36d	0.17 ± 0.01d	108.99 ± 10.62c	2.36 ± 0.12c
N1	26.87 ± 1.13cd	0.20 ± 0.00cd	131.76 ± 17.15bc	2.92 ± 0.09bc
N2	27.73 ± 0.25bcd	0.29 ± 0.05bc	187.32 ± 20.46b	3.46 ± 0.32b
N3	30.93 ± 1.71a	0.26 ± 0.02bcd	184.23 ± 7.87b	3.19 ± 0.14bc
N4	29.46 ± 0.71abc	0.32 ± 0.04ab	167.93 ± 2.87b	3.67 ± 0.22b
N5	30.22 ± 0.48ab	0.40 ± 0.04a	226.64 ± 7.08a	5.04 ± 0.51a

2.3 不同奶牛粪肥施用量对玉米农艺性状的影响

由表 3 可知,不同奶牛粪肥施用量对玉米农艺性状有重要影响,随着施肥量增加,玉米穗行数增加,N1、N2、N3、N4、N5 处理穗行数分别较 CK 显著增加 22.50%、25.05%、30.00%、32.55%、35.03%,且不同处理间无显著性差异。不同处理的行粒数与 CK 有显著性差异,N1、N2、N3、N4、N5 处理行粒数分别较 CK 增加 9.00%、21.37%、23.60%、26.97%、18.00%,以 N4 处理的行粒数最

高,N3 和 N4 处理无显著性差异。N1、N2、N3、N4、N5 处理的穗粗分别较 CK 显著增加 69.59%、66.32%、65.90%、69.08%、66.04%,且不同处理间无显著性差异。N2、N3、N4、N5 处理的穗长分别较 CK 显著增加 42.13%、48.24%、38.46%、36.03%。不同处理的秃尖长较 CK 分别降低 44.78%、59.20%、60.12%、57.05%、64.41%,不同处理间无显著性差异。

表 3 不同奶牛粪肥施用量对玉米农艺性状的影响

处理	穗行数 (行)	行粒数 (粒)	穗长 (cm)	穗粗 (mm)	秃尖长 (cm)
CK	13.33 ± 0.33b	29.66 ± 0.33c	13.60 ± 0.20b	31.21 ± 1.60b	3.26 ± 0.18a
N1	16.33 ± 0.66a	32.33 ± 1.45bc	16.50 ± 3.03ab	52.93 ± 0.35a	1.80 ± 0.41b
N2	16.67 ± 0.66a	36.00 ± 1.00ab	19.33 ± 0.33a	51.91 ± 0.33a	1.33 ± 0.44b
N3	17.33 ± 0.33a	36.66 ± 1.20a	20.16 ± 0.60a	51.78 ± 1.21a	1.30 ± 0.47b
N4	17.67 ± 0.00a	37.66 ± 0.88a	18.83 ± 0.16a	52.77 ± 0.51a	1.40 ± 0.49b
N5	18.00 ± 0.66a	35.00 ± 2.08ab	18.50 ± 0.50a	51.82 ± 0.35a	1.16 ± 0.27b

2.4 不同奶牛粪肥施用量对玉米产量的影响

由表 4 可知,奶牛粪肥对玉米产量有显著影响,不同奶牛粪施用量均可以显著提高玉米产量。N1、N2、N3、N4、N5 处理单穗粒数分别较 CK 显著增加 35.91%、57.92%、60.37%、61.72%、59.69%,N2、N3 和 N5 处理间差异不显著。N1、N2、N3、N4、N5 处理玉米百粒质量分别较 CK 显著增加 19.63%、38.32%、36.18%、67.22%、60.93%,N2 和 N3 处理无显著性差异,N4 和 N5 处理无显著性差异。N1、N2、N3、N4、N5 处理玉米籽粒产量分别较 CK 显著

增加 62.59%、118.40%、118.40%、170.46%、157.05%,N4 和 N5 处理无显著性差异,N2 和 N3 处理之间差异不显著。不同施肥处理的单株鲜质量与 CK 有显著性差异,N1、N2、N3、N4、N5 处理单株鲜质量分别较 CK 显著增加 57.89%、105.26%、147.36%、273.68%、278.94%。N4 和 N5 处理间无显著性差异,N1 和 N3 处理间差异显著。

2.5 不同奶牛粪肥施用量对玉米经济效益的影响

由表 5 可知,不同奶牛粪施用量处理可显著提高玉米产值。各处理玉米产值由高到低为 N4 > N5 >

表 4 不同奶牛粪肥施用量对玉米产量的影响

处理	单穗粒数 (粒)	百粒质量 (g)	籽粒产量 (kg/666.7 m ²)	单株鲜质量 (kg/株)
CK	395.33 ± 18.12c	21.45 ± 0.6d	483.32 ± 13.52d	0.19 ± 0.02d
N1	537.33 ± 13.92b	25.66 ± 0.44c	785.86 ± 13.39c	0.30 ± 0.02c
N2	624.33 ± 25.51ab	29.67 ± 0.55b	1 055.89 ± 19.53b	0.39 ± 0.01bc
N3	634.00 ± 7.21ab	29.21 ± 1.03b	1 055.52 ± 37.04b	0.47 ± 0.01b
N4	639.33 ± 7.68a	35.87 ± 0.61a	1 307.20 ± 22.25a	0.71 ± 0.05a
N5	631.33 ± 64.54ab	34.52 ± 1.22a	1 242.39 ± 44.05a	0.72 ± 0.15a

N2 > N3 > N1 > CK, 产值以 N4 和 N5 处理效果最佳, 分别较 CK 增加 170.46%、157.05%。各处理玉米经济效益高低顺序为 N4 > N2 > N1 > N5 > N3 > CK, 经济效益以 N4 和 N2 处理最佳, 分别较 CK 增

加 275.33%、230.34%。而产投比高低顺序为 N2 > N4 > N1 > N3 > N5 > CK, 产投比以 N2 处理和 N4 处理效果最佳, 分别较 CK 增加 26.92%、27.56%。

表 5 不同奶牛粪施用量对籽粒玉米经济效益的影响

处理	成本 (元/666.7 m ²)	其他成本 (元/666.7 m ²)	总成本 (元/666.7 m ²)	产值 (元/666.7 m ²)	经济效益 (元/666.7 m ²)	产投比
CK	0	465	465	724.98d	259.98	1.56
N1	130	465	595	1 178.79c	853.79	1.98
N2	260	465	725	1 583.84b	858.84	2.18
N3	390	465	855	1 583.28b	728.28	1.85
N4	520	465	985	1 960.80a	975.80	1.99
N5	650	465	1 115	1 863.59a	748.59	1.67

注:其他成本包含 45 元/666.7 m² 机耕、50 元/666.7 m² 种子、25 元/666.7 m² 播种、15 元/666.7 m² 除草剂、50 元/666.7 m² 电费、200 元/666.7 m² 追肥、20 元/666.7 m² 农药、60 元/666.7 m² 机收、1.50 元/kg 籽粒玉米、650 元/t 奶牛粪肥。

2.6 不同奶牛粪肥最佳施用量

为直观形象地描述不同奶牛粪肥施用量与玉米产量的关系, 将不同奶牛粪肥施用量与玉米产量的关系绘于图 1, 玉米产量随着奶牛粪肥施用量的增加而增加, 达到一定值后随着奶牛粪肥施用量的增加, 玉米产量有下降的趋势, 根据函数模型得出玉米产量(y)和有机肥施用量(x)的相关性, 二者的关系为 $y = -0.0009x^2 + 1.6183x + 491.88$ ($r^2 = 0.9626$), 籽粒玉米价格为 1.50 元/kg, 有机肥价格为 650 元/t, 由函数公式得出, 最高产量施肥量为 899.01 kg/666.7 m², 最大经济效益施肥量为 699.44 kg/666.7 m²。

2.7 主成分分析

由表 6 可知, 为明确最佳奶牛粪肥施用量, 对所有测定指标进行主成分分析, 经综合客观分析, 第 1 个主成分的累积贡献率达 79%, 第 2 个主成分累积贡献率达 92%, 综上所述, 处理 N4 得分最高, 处理 N5 得分次之, 因此综合考虑各项指标, N4 处理的施

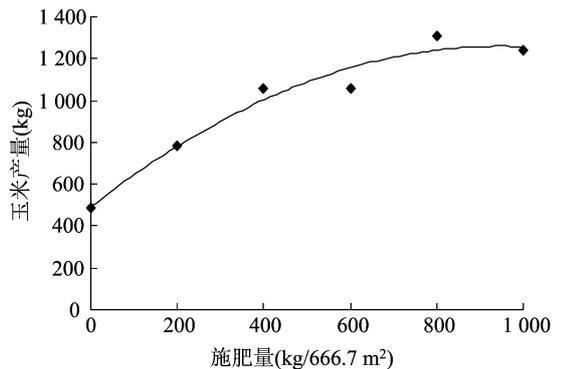


图 1 不同有机肥施用量与玉米产量的关系

肥量最佳。

3 讨论与结论

3.1 不同奶牛粪肥对玉米生长的影响

有机肥对调节土壤碳氮, 促进作物生长发育有重要作用^[12-13]。臧小平等研究认为, 施有机肥不仅可以提高土壤碳的积累, 还有利于对作物株高、茎

表6 不同奶牛粪肥处理的综合评价

处理	主成分得分(F1)	主成分得分(F2)	主成分贡献率(%)	综合得分	排名
CK	-0.94	-1.73	79	-2.33	6
N1	-1.06	0.67	92	-0.22	5
N2	-0.38	0.81		0.45	3
N3	0.26	0.22		0.41	4
N4	0.53	0.67		1.04	1
N5	1.58	-0.65		0.65	2

粗、叶绿素的增加^[14]。王亚雄等研究发现,施用不同有机肥可以增加土壤氮磷钾含量,增加枸杞光合能力,促进枸杞生长发育,提高枸杞的品质^[15]。本研究发现,有机肥不仅促进玉米生长,还增强叶片光合效率,这与前人的研究结果相似。分析其原因可能是有机肥可以显著增加土壤的碳、全氮和有效磷的含量^[16],且有机肥可以在土壤中矿化,补充土壤氮素^[17],同时氮磷钾含量供应充足,有利于叶片光合作用,促进玉米生长,还可能是因为发酵腐熟的奶牛粪中含有大量的有机质,可以改善土壤结构,增加土壤孔隙,降低土壤容重,促进玉米根系生长,从而有利于作物生长发育^[18-20]。

3.2 不同奶牛粪肥对玉米产量及经济效益的影响

有研究认为,施用有机肥可以补充土壤氮磷钾含量,促进作物高效优质生产,增加春玉米、葡萄、番茄等产量^[21-24]。杜少平等研究表明,施用有机肥既能提高土壤肥力,还能促进西瓜成活率,增加西瓜产量^[11]。谢军等研究发现,有机肥替代化肥可以显著增加玉米氮素,提高玉米产量^[25]。李娟等指出,深松耕作方式施 22.5 t/hm² 有机肥可以增加玉米的穗粒数、百粒质量、籽粒产量^[26]。陈爱晶等研究表明,增施 20% 的有机肥既能促进土壤有机质含量增加,还可以提高水稻产量^[27]。本研究发现,施有机肥可以显著增加玉米单穗粒数、穗粒数、百粒质量、穗长、穗粗,提高玉米产量。这与前人的研究结果一致,一方面是因为奶牛粪发酵后含有作物可以吸收的养分较全面,能够补充玉米整个生育期对养分的需求。同时奶牛粪中大量的有机质可以改善土壤物理结构,增加土壤保水保肥性能,为作物提供充足的碳氮,促进作物生长^[28]。另一方面可能是奶牛粪的施入,可以提高土壤有机质含量,减少土壤中部分磷固定,增加土壤有效磷含量,促进作物对磷素的吸收^[29]。而且奶牛粪发酵腐熟后有大量微生物,可以调节土壤理化性质,增加土壤中养

分,补充部分土壤中养分被固持,从而提高土壤养分^[30-32]。

有研究显示,作物施肥量和玉米产量的关系呈抛物线形^[33]。本研究发现,玉米产量和有机肥施肥量有显著相关性,随着有机肥施肥量的增加玉米产量也在增加,当超过一定施肥量时,玉米产量有所下降。通过数值模拟得出最高产量施肥量为 899.01 kg/666.7 m²,最大经济效益施肥量为 699.44 kg/666.7 m²。本试验经综合评价得出,800 kg/666.7 m² 处理的有机肥施肥量最佳,而施 1 000 kg/666.7 m² 处理的籽粒产量低于施 800 kg/666.7 m² 处理,这是因为过量施肥会降低作物对养分的利用效率^[8]。而李娟等指出,在深松模式下施 22.5 t/hm² 有机肥处理玉米产量最高^[26],这与前人研究结果不一致,分析其原因一方面可能是研究区域土壤基础肥力有差异,不同耕作方式也有一定的影响,作物类型不同,不同灌溉方式和灌水量有差异^[34-35],也会影响作物产量和经济效益^[36];另一方面可能与有机肥类型相关^[37],有机肥种类较多,且养分比例不一致,同时有机肥施肥量也不同。

在本试验中,与不施肥相比,发酵的奶牛粪在一定程度上可以提高土壤肥力,促进玉米生长发育,实现玉米增产创收。经综合评价得出,其中以施 800 kg/666.7 m² 有机肥玉米株高、茎粗最佳。施 1 000 kg/666.7 m² 玉米光合作用最强,气孔导度、胞间 CO₂ 浓度、蒸腾速率最高。施 800 kg/666.7 m² 的单穗粒数、百粒质量、籽粒产量、单株鲜质量较优,同时产值和经济效益最高。通过玉米籽粒产量和施肥量函数模型的相关性分析可知,二者的关系为 $y = -0.0009x^2 + 1.6183x + 491.88$ ($r^2 = 0.9626$),得出最高产量施肥量为 899.01 kg/666.7 m²,最大经济效益施肥量为 699.44 kg/666.7 m²。经客观综合评价得出,在滴灌条件下,施 800 kg/666.7 m² 处理的玉米株高、茎粗最优,同时可以提高土壤肥力,有利

于玉米生长发育,且玉米增产效果明显,玉米产量和经济效益最高。

参考文献:

- [1]牛新胜,巨晓棠. 我国有机肥料资源及利用[J]. 植物营养与肥料学报,2017,23(6):1462-1479.
- [2]刘晓燕,金继运,任天志,等. 中国有机肥料养分资源潜力和环境风险分析[J]. 应用生态学报,2010,21(8):2092-2098.
- [3]杨帆,李荣,崔勇,等. 我国有机肥料资源利用现状与发展建议[J]. 中国土壤与肥料,2010(4):77-82.
- [4]张志毅,熊桂云,吴茂前,等. 有机培肥与耕作方式对稻麦轮作土壤团聚体和有机碳组分的影响[J]. 中国生态农业学报,2020,28(3):405-412.
- [5]李恕艳,李吉进,张邦喜,等. 施用有机肥对番茄品质风味的影响[J]. 中国土壤与肥料,2017(2):114-119,135.
- [6]鱼欢,杨改河,王之杰. 不同施氮量及基追比例对玉米冠层生理性状和产量的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(2):266-273.
- [7]武星魁,姜振萃,陆志新,等. 有机肥部分替代化肥氮对叶菜产量和环境效应的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文),2020,28(3):349-356.
- [8]龚雪蛟,秦琳,刘飞,等. 有机类肥料对土壤养分含量的影响[J]. 应用生态学报,2020,31(4):1403-1416.
- [9]胡诚,曹志平,胡菊,等. 长期施用生物有机肥土壤的氮矿化[J]. 生态学报,2009,29(4):2080-2086.
- [10]胡安新. 有机肥小麦肥效试验[J]. 农业工程技术,2019,39(14):22-23.
- [11]杜少平,马忠明,薛亮. 有机无机肥配施对砂田西瓜产量、品质及水氮利用率的影响[J]. 果树学报,2020,37(3):380-389.
- [12]赵昌杰,张强,刘松忠,等. 有机肥施用对葡萄园土壤特性及里扎马特葡萄产量、品质的影响[J]. 安徽农业科学,2013,41(1):101-103.
- [13]李庆康,张永春,杨其飞,等. 生物有机肥肥效机理及应用前景展望[J]. 中国生态农业学报,2003,11(2):78-80.
- [14]臧小平,周兆禧,林兴娥,等. 不同用量有机肥对芒果果实品质及土壤肥力的影响[J]. 中国土壤与肥料,2016(1):98-101.
- [15]王亚雄,常少刚,王锐,等. 不同有机肥对宁夏枸杞生长、产量及品质的影响[J]. 中国土壤与肥料,2019(5):91-95.
- [16]宇万太,姜子绍,马强,等. 施用有机肥对土壤肥力的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2009,15(5):1057-1064.
- [17]唐继伟,林治安,许建新,等. 有机肥与无机肥在提高土壤肥力中的作用[J]. 中国土壤与肥料,2006(3):44-47.
- [18]陈大超,张跃强,甘涛,等. 有机肥施用量及深度对柑橘产量和品质的影响[J]. 中国土壤与肥料,2018(4):143-147.
- [19]邵慧芸,李紫玥,刘丹,等. 有机肥施用量对土壤有机碳组分和团聚体稳定性的影响[J]. 环境科学,2019,40(10):4691-4699.
- [20]王立刚,李维炯,邱建军,等. 生物有机肥对作物生长、土壤肥力及产量的效应研究[J]. 土壤肥料,2004(5):12-16.
- [21]党翼,张建军,赵刚,等. 不同用量的有机肥对陇东旱地春玉米生长特性及产量的影响[J]. 中国土壤与肥料,2015(3):62-67.
- [22]徐立功,徐坤,刘会诚. 生物有机肥对番茄生长发育及产量品质的影响[J]. 中国蔬菜,2006(4):8-11.
- [23]邢金金,邢英英,王秀康,等. 不同施肥量对陕北日光温室番茄生长、产量和土壤硝态氮的影响[J]. 灌溉排水学报,2018,37(6):29-35.
- [24]孙信成,田军,张忠武,等. 施肥量对洞庭湖区大棚苦瓜生长和产量的影响[J]. 灌溉排水学报,2019,38(增刊1):19-21.
- [25]谢军,赵亚南,陈轩敬,等. 有机肥氮替代化肥氮提高玉米产量和氮素吸收利用效率[J]. 中国农业科学,2016,49(20):3934-3943.
- [26]李娟,葛磊,曹婷婷,等. 有机肥施用量和耕作方式对旱地土壤水分利用效率及作物生产力的影响[J]. 水土保持学报,2019,33(2):121-127.
- [27]陈爱晶,秦光蔚. 有机肥氮素20%替代化肥氮素对水稻产量的影响研究[J]. 上海农业科技,2017(6):95-96.
- [28]李佳进,肖丽霞,刘银芬. 增施有机肥对土壤理化性状及水稻产量的影响[J]. 上海农业科技,2020(1):107-108,110.
- [29]Zhang M, Li B, Xiong Z Q. Effects of organic fertilizer on net global warming potential under an intensively managed, vegetable field in southeastern China; a three-year field study[J]. Atmospheric Environment,2016,145:92-103.
- [30]王静,王磊,张爱君,等. 长期增施有机肥对土壤不同组分有机磷含量及微生物丰度的影响[J]. 生态与农村环境学报,2020,36(9):1161-1168.
- [31]弓萌萌,王红,张雪梅,等. 不同有机肥施用量对苹果园土壤养分及酶活性的影响[J]. 西北林学院学报,2019,34(3):74-78,97.
- [32]化党领,介晓磊,张一平,等. 有机肥对石灰性土壤肥力属性的长期影响[J]. 生态学杂志,2005,24(9):1053-1057.
- [33]夏文豪,刘涛,唐诚,等. 北疆滴灌玉米施氮量估算及减氮增铵效应[J]. 干旱地区农业研究,2017,35(1):79-84,102.
- [34]何振嘉,刘全祖. 水肥耦合对贺兰山东麓滴灌酿酒葡萄产量和品质的影响[J]. 灌溉排水学报,2020,39(5):65-74.
- [35]张仔罗,文雯,曹硕,等. 滴灌灌溉量和频次对小麦-青贮玉米复播体系蒸腾量和作物系数的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(13):104-109.
- [36]Efla E A, Mofunanya A A J, Ngele B A. Effect of organic manure and agricultural lime on growth and yield of two bean varieties[J]. International Journal of Plant & Soil Science,2019,30(4):1-18.
- [37]朱晓晖,杜晓玉,张维理. 有机肥种类对土壤有效磷累积量的影响及其流失风险[J]. 中国土壤与肥料,2013(5):14-18.

付丹丹,谢永春,普布贵吉. 西藏黑青稞氮磷钾配施效果研究[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):101-105.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.016

西藏黑青稞氮磷钾配施效果研究

付丹丹, 谢永春, 普布贵吉

(西藏自治区农牧科学院农业资源与环境研究所, 西藏拉萨 850032)

摘要:通过大田试验对西藏隆子县测土配方推荐施肥($N_2P_2K_2$)进行优化设计,设立14个不同的氮磷钾配施处理和1个有机肥单施处理,设立配方施肥、常规施肥和对照试验,采用回归方程计算最佳施肥配比和推荐施肥量。结果显示,当地黑青稞氮、磷、钾肥最佳施肥量质量比为1:0.43:0.5,推荐施肥量为N 66.75 kg/hm²、P₂O₅ 28.65 kg/hm²、K₂O 33.9 kg/hm²。在不施肥基础上单施有机肥17 500 kg/hm²,黑青稞可增产35.3%,通过增加氮肥和有机肥的投入,使得常规施肥处理的黑青稞平均产量高于配方施肥处理。氮含量是限制黑青稞产量的主要因子,其次是磷含量,最后是钾含量。在当地测土配方施肥的基础上,增氮、减钾可获得高产。

关键词:西藏;黑青稞;氮;磷;钾;最佳施肥;配方施肥

中图分类号: S512.306 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0101-05

青稞又称为裸大麦,是青藏高原地区的特色农作物,也是藏民族的主粮,其种植面积约占该地区粮食种植面积的60%以上,产量占比达该地区粮食总产量的58%~60%^[1-3]。青稞富含生命活性物质,营养丰富,有特殊的高抗氧化性^[4-6]。由于产区环境以及种植方式的差异,青稞品种资源极其丰富,按其颜色分为白青稞、紫青稞、黑青稞等^[7]。其中黑青稞具有高纤维、高维生素、高蛋白质、高β-葡聚糖、低脂肪和低糖等特点,并且还富含多种有利于人体健康的矿物质元素,如铜、锌、钙、磷、铁以及微量元素硒(具有防癌抗癌作用),是青稞中的极品,备受消费者青睐^[8]。由于黑青稞对种植环境的特殊需求,其栽培区域分布较小,主要位于西藏山南、四川甘孜、青海玉树和云南迪庆,其中西藏山南隆子黑青稞被批准为我国地理标志产品,生长海拔为3 800~4 200 m,具有特殊的高抗氧化性及营养含量,深受广大消费者的喜爱^[9-12]。目前,黑青稞的研究主要集中于特异功能物质的提取和加工,在品种和栽培研究方面的相关研究有所欠缺,特别是

在施肥领域研究较少。施肥是影响作物品质、产量、土壤肥力以及可持续利用的农业措施之一。科学合理施肥,不仅能够提高作物产量,改善农产品品质,还能改善土壤结构,提高土壤质量和生产力,同时也降低了施肥成本,减少环境污染。但是,盲目过量施肥不仅会使作物减产,影响农产品品质,还会导致农田土壤污染,同时造成水体和空气污染^[13-15]。为了探究西藏隆子黑青稞的需肥特征,进一步验证当地测土配方施肥数据的可靠性,通过大田试验,采用肥料效应函数分析和大田实际情况对比,以期寻求最佳配方施肥、实现高产提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验区概况

试验于2018年4—9月在西藏山南市隆子县新巴村(28°14'0"N,92°22'3"E,海拔3 900 m)进行。该地区年平均气温为5.5℃,年降水量为297.41 mm,年无霜期为238.3 d,年平均日照时数为3 005.9 h,属高原温带大陆性季风气候。试验地土壤质地为黏土,0~20 cm土层有机质含量15.3 g/kg,全氮含量1.14 g/kg,碱解氮含量124 mg/kg,速效磷含量75.5 mg/kg,速效钾含量143 mg/kg,pH值为8.0。

1.2 试验材料

参试作物品种为当地主栽黑青稞。试验地氮

收稿日期:2020-04-21

基金项目:西藏自治区科技重大专项(编号:XZ2019NA01-03)。

作者简介:付丹丹(1992—),女,陕西西安人,研究实习生,主要从事农业资源与环境研究。E-mail:18208046891@163.com。

通信作者:谢永春,硕士,助理研究员,主要从事旱作栽培、土壤养分高效利用及生态循环农业研究。E-mail:xieyongchun2008@163.com。

肥选用尿素(N 含量 46%)、磷肥选用磷酸二铵(P_2O_5 含量 46%)、钾肥选用氯化钾(K_2O 含量 60%),有机肥为羊粪土杂鲜基。

1.3 试验设计

1.3.1 不同氮磷钾配施方案 试验采用优化配方施肥方案设计,设计推荐施肥量为 $N_{60}P_{30}K_{42}$ [下标为每公顷纯养分的施肥量(kg),下同]。有机肥、钾肥和磷肥在播前撒施耕地做基肥一次性施用,氮肥基肥占 80%,追肥占 20%,追肥在 5 月下旬青稞分蘖期除草后撒施灌水。设 15 个处理,每个处理 3 次重复,小区面积 21 m^2 (长 7 m,宽 3 m),随机区组排列,行距 25 cm,播种密度为 360 万株/ hm^2 。试验地于 2018 年 4 月 20 日机耕灭茬,耕深 30 cm;2018 年 4 月 23 日灌水 1 次;2018 年 4 月 28 日播种,2018 年 8 月 21 日青稞成熟后收获,各处理的田间管理措施均一致(表 1)。

表 1 不同氮磷钾配施方案

编号	处理	施肥量(kg/ hm^2)			
		N	P_2O_5	K_2O	农家肥
1	$N_0P_0K_0$	0	0	0	0
2	$N_0P_2K_2$	0	30	42	0
3	$N_1P_2K_2$	30	30	42	0
4	$N_2P_0K_2$	60	0	42	0
5	$N_2P_1K_2$	60	15	42	0
6	$N_2P_2K_2$	60	30	42	0
7	$N_2P_3K_2$	60	45	42	0
8	$N_2P_2K_0$	60	30	0	0
9	$N_2P_2K_1$	60	30	21	0
10	$N_2P_2K_3$	60	30	63	0
11	$N_3P_2K_2$	90	30	42	0
12	$N_1P_1K_2$	30	15	42	0
13	$N_1P_2K_1$	30	30	21	0
14	$N_2P_1K_1$	60	15	21	0
15	$N_0P_0K_0 + M$	0	0	0	17 500

1.3.2 配方施肥田间效果试验 试验设 3 个处理,每个处理 3 次重复,小区面积 20 m^2 ($5\text{ m} \times 4\text{ m}$)。处理分别为测土配方施肥:采用上述试验设计 1 中 $N_2P_2K_2$ 处理的施肥量,即每公顷施肥量为 $N_{60}P_{30}K_{42}$ [下标为公顷纯养分施肥量(kg),所用肥料为尿素、磷酸二铵和氯化钾];农民常规施肥: $N_{96}P_{69}K_{60}$ (折合尿素含量 $150\text{ kg}/\text{hm}^2$,磷酸二铵含量 $150\text{ kg}/\text{hm}^2$,农家肥 $17\ 500\text{ kg}/\text{hm}^2$);不施肥。播种时磷酸二铵、农家肥和氯化钾一次性基施,尿素分为 80% 基肥和 20% 追肥,施肥方式和追肥比例同“1.3.1”节。

1.4 样品采集与测定

生育期内记录黑青稞各个关键生育时期,在黑青稞成熟期每小区随机选取 1 m^2 样方进行考种,测定黑青稞的干物质、穗数、茎蘖数、株高、穗长、穗粒数、千粒质量;产量按照试验小区单打实收计算。

1.5 数据处理

用 SPSS 21.0 对数据进行显著性分析,Excel 2010 进行数据作图处理。

2 结果与分析

2.1 不同氮磷钾配施效果

2.1.1 不同氮磷钾配比的黑青稞地力产量与土壤肥力 从供试土壤来看,土壤有机质、氮素、钾素含量属于中等水平,仅速效磷含量较高,总体上属于中等肥力,土壤偏碱。由表 1 可知,与测土配方施肥 $N_2P_2K_2$ 处理相比,黑青稞对土壤肥力的依存率为 45.9%,氮、磷、钾缺素区(对应处理编号分别为 2、4、8)的相对产量分别为 48.6%、78.4%、83.8%,以地力产量评价供试土壤的肥力,供氮水平低下,供磷和钾水平中上。说明本试验地氮素含量是限制产量的主要因子,其次是磷素含量,最后是钾素含量。与 $N_0P_0K_0$ 处理相比, $N_0P_0K_0 + M$ 处理增施有机肥后增产 35.3%,且产量高于 $N_0P_2K_2$ 处理,说明施 $17\ 500\text{ kg}/\text{hm}^2$ 的农家肥可以替代 $N_0P_2K_2$ 水平的氮磷钾供给。

表 2 黑青稞各缺素处理与测土配方处理的比值

编号	处理	产量 (kg/hm^2)	缺肥占 $N_2P_2K_2$ 比例(%)
1	$N_0P_0K_0$	2 833.5	45.9
2	$N_0P_2K_2$	3 000.0	48.6
4	$N_2P_0K_2$	4 833.0	78.4
6	$N_2P_2K_2$	6 166.5	100.0
8	$N_2P_2K_0$	5 167.5	83.8
15	$N_0P_0K_0 + M$	3 834.0	62.2

2.1.2 不同氮磷钾配比对黑青稞产量的影响 从图 1 可以看出,黑青稞的产量因处理不同而明显不同。当 P、K 含量为 2 水平时,随着 N 水平的增加,黑青稞产量先增加后减少,最高产量 N 素水平为 2 水平($N_2P_2K_2$);当 N、K 含量为 2 水平时,随着单因素磷 P 水平的增加,黑青稞产量先增后减,最高产量 P 素水平为 1 水平($N_2P_1K_2$);当 N、P 含量为 2 水平时,随着单因素 K 水平用量的增加,黑青稞产量先增后减,最高产量 K 素水平为 1 水平($N_2P_2K_1$);

当 N、P、K 其中 2 种肥料含量为 2 水平时,任意 1 种肥料过量施肥(3 水平)黑青稞均出现负增长。其中 $N_2P_1K_2$ 、 $N_2P_2K_1$ 处理的产量明显高于其他处理,处理 $N_2P_1K_2$ 配比施肥量的黑青稞产量最高为 $6\ 834\ \text{kg}/\text{hm}^2$,产量最低的是处理 $N_0P_0K_0$,为 $2\ 833.5\ \text{kg}/\text{hm}^2$ 。说明在测土配方施肥量($N_2P_2K_2$)的基础上减施磷肥或钾肥可提高产量。

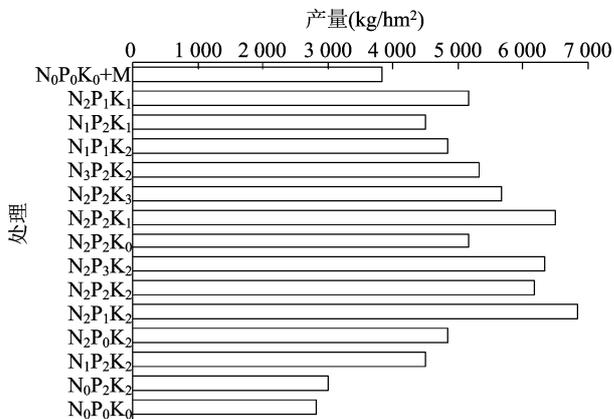


图1 不同处理下黑青稞的产量

2.1.3 肥料效应函数的拟合 通常情况下,将第 2 水平施肥量视为最佳施肥量。因此,在研究单因素的肥料效应时,将其他 2 个因素定为 2 水平,此时其他 2 个因素施肥量可视为最佳施肥量,排除因其他施肥量不足或过量而造成的影响。进行肥料效应函数拟合时,选用编号为 2、3、6、11 的处理可求得以 P_2K_2 水平为基础,产量与施氮量的一元效应方程;选用编号为 4、5、6、7 的处理可求得产量与磷肥用量的一元效应方程;选用编号为 6、8、9、10 的处理可求得产量与钾肥用量的一元效应方程。计算最佳经济施肥量时,纯 N、P、K 价格分别按 5 978、1 833、5 750 元/t 计算,黑青稞按 6 元/kg 计算。

单因素一元二次肥料效应函数模型拟合方程如下:

$$Y = c + bX + aX^2。$$

式中: Y 为产量, a 为二次回归系数, b 为一次回归系数, c 为常量, X 为肥料用量。

黑青稞氮肥效应一元二次方程: $Y = 191.115 + 87.208X - 9.719X^2$ ($r = 0.967$),对回归方程进行检验,由表 3 和表 4 可知, F 值 (7.202) $> F_{0.05}$ (0.225),说明氮肥用量和黑青稞产量之间存在显著回归关系,施氮肥对黑青稞产量有显著影响。当 P、K 含量在 2 水平时,最高产量施氮量为 $67.2\ \text{kg}/\text{hm}^2$, Y 产量为 $5\ 801.1\ \text{kg}/\text{hm}^2$;经济产量施

表 3 N 素方差分析参数

项目	SS	df	MS	F 值	P 值
回归分析	22 743.483	2	11 371.742	7.202	0.255
残差	1 578.864	1	1 578.864		
总计	24 322.348	3			

注:SS 表示离均差平方和,df 表示自由度;MS 表示均方。表 5、表 7 同。

表 4 N 素回归参数

项目	系数值	标准误差	t 值	P 值	系数值 95% 置信限	
					下限	上限
c	191.115	38.729	4.935	0.127	-300.981	683.211
b	87.208	31.097	2.804	0.218	-307.924	482.339
a	-9.719	4.967	-1.957	0.301	-72.829	53.391

氮量 $66.5\ \text{kg}/\text{hm}^2$ 。

黑青稞磷肥效应一元二次方程: $Y = 333.875 + 117.275X - 30.575X^2$ ($r = 0.848$),对回归方程进行检验,由表 5 和表 6 可知, F 值 (1.28) $> F_{0.05}$ (0.529),说明磷肥用量和黑青稞产量之间存在显著回归关系,施磷肥对黑青稞产量有显著影响。当 N、K 含量在 2 水平时,最高产量施磷量为 $28.8\ \text{kg}/\text{hm}^2$, Y 产量为 $6\ 695.0\ \text{kg}/\text{hm}^2$;经济产量施磷量 $27\ \text{kg}/\text{hm}^2$ 。

表 5 P 素方差分析参数

项目	SS	df	MS	F 值	P 值
回归分析	7 003.335	2	3 501.668	1.284	0.529
残差	2 726.112	1	2 726.112		
总计	9 729.448	3			

表 6 P 素回归参数

项目	系数值	标准误差	t 值	P 值	系数值 95% 置信限	
					下限	上限
c	333.875	50.890	6.561	0.096	-312.745	980.496
b	117.275	81.725	1.435	0.387	-921.140	1 155.690
a	-30.575	26.106	-1.171	0.450	-362.284	301.134

黑青稞钾肥效应一元二次方程: $Y = 349.51 + 71.007X - 15.5867X^2$ ($r = 0.943$),对回归方程进行检验,由表 7 和表 8 可知, F 值 (4.018) $> F_{0.05}$ (0.333),说明钾肥用量和黑青稞产量之间存在显著回归关系,施钾肥对黑青稞产量有显著影响。当

表 7 K 素方差分析参数

项目	SS	df	MS	F 值	P 值
回归分析	4 034.298	2	2 017.149	4.018	0.333
残差	502.002	1	502.002		
总计	4536.300	3			

表 8 K 素回归参数

项目	系数值	标准误差	t 值	P 值	系数值 95% 置信限	
					下限	上限
c	349.510	21.838	16.005	0.040	72.031	626.989
b	71.007	25.050	2.835	0.216	-247.283	389.298
a	-15.587	5.716	-2.727	0.224	-88.211	57.038

N、P 含量在 2 水平时,最高产量施钾量为 34.2 kg/hm²,Y 产量为 6 455.7 kg/hm²;经济产量施钾量 33.6 kg/hm²。

综上所述,在推荐施肥 N₂P₂K₂ 的水平上增氮、减磷或钾可以获得最高产量和经济产量。

双因素肥料效应函数拟合时,选用处理 2~7 和 10~12,可求得在 K₂ 水平下的 N、P 含量二元二次肥料效应方程;选取编号为 4~10 和 14 处理,可求得 N₂ 水平下的 PK 二元二次肥料效应方程;选取处理 2、3、6、8~11 和 13 可求得 P₂ 水平下的 NK 二元二次肥料效应方程。不同氮磷钾二元肥料效应方

程见表 9,各方程均通过了显著性检验,说明二元二次肥料效应方程拟合准确。

N、P 配施时,最高产量及施肥量: N = 62.6 kg/hm², P = 30.9 kg/hm², K = 42.0 kg/hm², Y = 6 261.0 kg/hm²;即增氮增磷可获得高产。

P、K 配施时,最高产量及施肥量: N = 60.0 kg/hm², P = 33.3 kg/hm², K = 36.1 kg/hm², Y = 6 474.0 kg/hm²;即增磷减钾可获得高产。

N、K 配施时,最高产量及施肥量: N = 67.8 kg/hm², P = 30.0 kg/hm², K = 30.9 kg/hm², Y = 6 100.5 kg/hm²。即增氮减钾可获得高产。

三因素肥料效应函数拟合时,三元二次方程相关系数最高,其方程为 $Y = 182.905 + 68.736N - 17.083P + 49.045K + 17.389NP - 0.563NK - 0.379PK - 11.268N^2 - 8.735P^2 - 9.018K^2$ ($R^2 = 0.853$),但黑青稞产量 Y 与磷肥用量成反比(P 的系数为负),且此方程未能通过显著性检验。

表 9 二元二次肥料效应方程

配施方案	方程	R ²	F 值	P 值
N、P	$Y = 64.231 + 123.02N + 93.577P - 13.404N^2 - 17.278P^2 - 5.378NP$	0.914	3.065	0.193
P、K	$Y = 67.445 + 173.366P + 142.314K - 23.439P^2 - 16.298K^2 - 28.698PK$	0.748	0.761	0.633
N、K	$Y = 76.572 + 116.321N + 64.998K - 11.526N^2 - 9.322K^2 - 5.853NK$	0.943	4.853	0.112

注:方程中 N、P、K 分别表示 N、P、K 含量。

2.2 配方施肥对黑青稞生物学性状与产量的影响

从表 10 可知,配方施肥的穗长、株高、茎蘖数、穗粒数高于常规施肥和对照;其中,配方施肥和常规施肥差异不显著,但配方施肥和常规施肥的株高

显著高于对照。从产量及其构成要素来看,千粒质量、穗数、产量和干物质均以常规施肥处理最高,配方施肥优于对照。千粒质量表现为常规施肥显著高于配方施肥,产量两者之间差异不显著。

表 10 不同施肥下黑青稞的农艺性状和产量构成要素

处理	穗长 (cm)	株高 (cm)	茎蘖数 (万株/hm ²)	穗数 (万穗/hm ²)	穗粒数 (个)	千粒质量 (g)	产量 (kg/hm ²)	干物质含量 (kg/hm ²)
配方施肥	6.1a	89.6a	1 482.0a	874.5a	46.1a	43.9b	4 167a	9 126a
常规施肥	5.8a	89.2a	1465.5a	964.5a	40.2ab	51.5a	4 458a	10 251a
不施肥	5.4a	75.5b	1357.5a	859.5a	30.4b	42.2b	2550b	6 000b

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

单从产量方面来看,施肥对黑青稞产量影响显著,其中配方施肥平均产量为 4 167 kg/hm²,常规施肥为 4 458 kg/hm²,较对照 2 550 kg/hm² 分别增产 63.4% 和 74.8%,配方施肥和常规施肥与对照处理间的差异达显著水平。这是因为常规施肥处理增加了有机肥,根据上述“2.1.1”节分析认为,17 500 kg/hm² 的农家肥可以替代 N₀P₂K₂ 水平的氮

磷钾,另在模拟方程中求得,在配方施肥(N₂P₂K₂)的水平上增施氮磷肥、减施钾肥可获得高产,而常规施肥恰好符合此施肥条件,因此产量高于配方施肥。

3 讨论与结论

本试验以当地测土配方推荐施肥量 N₂P₂K₂ (每

公顷施纯氮、磷、钾含量分别为 60、30、42 kg) 为基础,通过增减施肥量,研究了不同施肥水平下黑青稞产量与氮、磷、钾用量的肥料效应。结果显示氮素是限制黑青稞产量的主要因子,其次是磷素,最后是钾素,与前人的青稞需肥特征研究结论^[12,16]一致。有研究指出,西藏青稞农田施用有机肥后,青稞产量明显增产,农田土壤肥力得到改善,主要体现在土壤有机质含量增加,表层土壤容重减小,土壤 pH 值稳定,土壤微生物量碳含量增加^[13-14]。本试验发现,在不施化肥的基础上单施有机肥 17 500 kg/hm²,黑青稞可增产 35.3%,有机肥可以替代 N₀P₂K₂ 水平的氮磷钾,马瑞萍等研究指出,在青稞不减产的情况下,有机肥可替代 1/3 的 N、P、K 配施肥,但有机肥需施用量加倍增加^[17]。

对其进行一元二次方程模拟时发现,在推荐施肥量(N₂P₂K₂)的基础上,增施氮肥、减施磷肥或钾肥可以获得最高产量和经济产量;二元二次方程模拟时发现,增氮、增磷、减钾可获得高产,综合 2 种模拟可知,增氮、减钾可获得高产。采用一元二次方程的单因素最高施肥量和最佳经济施肥量平均值,综合方程得出试验区中等肥力地块的黑青稞最佳施肥量配比为 1 : 0.43 : 0.5,最佳施肥量为 N 含量 66.75 kg/hm²、P₂O₅ 含量 28.65 kg/hm²、K₂O 含量 33.9 kg/hm²,比当地推荐的配方施肥增加 N 含量 6.75 kg/hm²、减少 P₂O₅ 含量 1.35 kg/hm²、减少 K₂O 含量 8.1 kg/hm²。在青稞最佳施肥配比和推荐施肥量上,因地域不同而不同,拉萨周边的白青稞氮磷钾最佳配比为 1 : 0.33 ~ 0.37 : 0.53 ~ 0.65,推荐施肥量为 N 112 ~ 137 kg/hm²、P₂O₅ 37.5 ~ 51.6 kg/hm²、K₂O 60 ~ 85.8 kg/hm²^[16,18-19];林芝波密白青稞的氮、磷、钾推荐施肥量为 138、90、66 kg/hm²^[20]。对比本试验研究结果发现,黑青稞的氮磷钾配比和白青稞的基本一致,氮磷钾用量均低于白青稞。本试验在推荐施肥量的基础上进行优化设计,得出了最佳施肥量,与推荐施肥量相比略有不同,但函数法模拟肥料效应具有一定的局限性,还需对最佳施肥配比进一步验证。

通过对比配方施肥和常规施肥发现,配方施肥平均产量为 4 176 kg/hm²,常规施肥为 4 458 kg/hm²,这是因为常规施肥虽然没有施钾,但增加了氮肥和有机肥的用量,故在黑青稞栽培中,考虑平衡施肥的同时,不可忽视有机肥的投入,在氮磷钾配施的基础上,增施有机肥对于提高黑青稞

产量具有重要的作用。

参考文献:

- [1] Liu Z F, Yao Z J, Yu C Q, et al. Assessing crop water demand and deficit for the growth of spring highland barley in Tibet, China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013, 12(3): 541 - 551.
- [2] 龚凌霄. 青稞全谷物及其防治代谢综合征的作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 15.
- [3] 梁珠英. 试论藏区青稞产业发展现状及对策措施[J]. *青海农林科技*, 2014(3): 41 - 45.
- [4] Abdel - Haleem A M, Awad R A. Some quality attributes of low fat ice cream substituted with hullless barley flour and barley β - glucan [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6425 - 6434.
- [5] 臧靖巍, 阚建全, 陈宗道, 等. 青稞的成分研究及其应用现状[J]. *中国食品添加剂*, 2006(4): 43 - 46.
- [6] 杨希娟, 党 斌, 张 杰, 等. 黑青稞麸皮结合态酚类物质大孔树脂分离纯化工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(21): 295 - 303.
- [7] 林 津, 洛桑仁青, 周陶鸿, 等. 西藏山南隆子县黑青稞与白青稞的营养成分及生理活性物质的比较分析[J]. *食品科技*, 2016, 41(10): 88 - 92.
- [8] 谭大明, 谭海运, 刘国一, 等. 西藏不同黑青稞品种的农艺性状和营养品质分析[J]. *麦类作物学报*, 2018, 38(2): 142 - 147.
- [9] 梁寒峭, 李金霞, 陈建国, 等. 黑青稞营养成分的检测与分析[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 180 - 182, 188.
- [10] 陈建国, 梁寒峭, 李金霞, 等. 响应曲面法优化黑青稞花青素的提取工艺[J]. *食品工业*, 2016, 37(1): 80 - 83.
- [11] 张一鸣, 吴跃中, 杨士花, 等. 云南黑青稞多酚的提取及纯化工艺研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(5): 206 - 213.
- [12] 土旦次仁. 西藏隆子黑青稞“3414”肥料效应试验[J]. *西藏农业科技*, 2018, 40(2): 28 - 31.
- [13] 王国强, 薛书浩, 彭 婧, 等. 不同施肥处理对西藏青稞产量和土壤结构的影响[J]. *西南农业学报*, 2017, 30(5): 1127 - 1131.
- [14] 李 猛, 何永涛, 孙 维, 等. 不同施肥模式下西藏农田土壤质量的变化[J]. *干旱地区农业研究*, 2018, 36(3): 144 - 148.
- [15] 朱明霞, 靳玉龙, 白 婷, 等. 不同施肥水平下春青稞籽粒灌浆特性[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(22): 72 - 76.
- [16] 李 雪, 赵润彪, 张 玉. 林周县春青稞“3414”肥料效应田间试验研究[J]. *西藏科技*, 2014(1): 3 - 6.
- [17] 马瑞萍, 尼玛扎西, 高 雪, 等. 不同有机肥与化肥配施对西藏青稞生长发育与产量的影响[J]. *大麦与谷类科学*, 2018, 35(5): 17 - 23.
- [18] 边巴卓玛. “春青稞 3414”肥料试验效应分析[J]. *西藏农业科技*, 2017, 39(2): 16 - 18.
- [19] 胡 俊, 陈初红, 尼玛卓拉, 等. 2010 年拉萨市春青稞“3414”肥料效应试验报告[J]. *西藏农业科技*, 2013, 35(2): 20 - 22.
- [20] 曹连梅, 郝建伟. 青稞“3414”肥效研究[J]. *农技服务*, 2011, 28(2): 182, 217.

卫甜,吕敏,刘怀阿,等. 抗稻瘟病生防细菌的分离与筛选[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):106-111.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.017

抗稻瘟病生防细菌的分离与筛选

卫甜,吕敏,刘怀阿,朱锦磊,苏建坤

(江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007)

摘要:由病原真菌 *Magnaporthe oryzae* 引起的稻瘟病是水稻生产上的一种毁灭性病害。从稻瘟病发病严重的田块分别采集健康株和病株,从 14 个不同生境(土壤、根茎叶围、根茎叶内)中共分离得到 304 株潜在生防细菌。通过对各细菌胞外产酶活性(葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶)及产吡啶乙酸活性进行测定,并根据不同指标对细菌进行赋值,最终选择评分 ≥ 3 分的 114 株细菌进行稻瘟病菌的平板拮抗试验,从中筛选得到 15 株对稻瘟病菌有明显拮抗作用的生防细菌。最终根据赋值评分结果及平板拮抗试验在实验室条件下对筛选出的 17 株具有防治稻瘟病潜在能力的生防细菌进行 16S rDNA 鉴定,鉴定结果表明,有 15 株为芽孢杆菌,1 株为糖霉菌,另 1 株为水库杆菌。本研究以此建立一个针对稻瘟病生防细菌筛选的系统,得到的生防细菌可以为田间防治稻瘟病并最终应用于实际生产提供理论基础。

关键词:稻瘟病;细菌筛选;酶活性测定;平板拮抗;生防细菌

中图分类号: S435.111.4⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)07-0106-05

水稻(*Oryza sativa*)是草本稻属中的一种,全球近 50% 的人口以此为主粮^[1]。2019 年全球水稻种植面积约为 1.63 亿 hm^2 ,其中我国水稻种植面积约占全球的 18.57%。由病原真菌稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的稻瘟病是水稻生产上的一种毁灭性病害,被列为水稻三大病害之首,每年可造成 10%~20% 的产量损失,危害严重的地区损失达到 40%~50%^[2]。抗病育种、化学防治是目前针对稻瘟病防治的主要手段。

在抗病育种方面,由于稻瘟病病原真菌变异分化速度快、多样性程度高及新的生理小种层出不穷,但常规育种方法选育周期长,育出的抗病品种抗性单一,并且抗性丧失比较快,使抗病品种的广谱抗性和持久抗性难以实现,育种行业发展举步维艰^[3]。在化学防治方面,相继出现了一些防治稻瘟病效果较好的化学农药。据相关报道,0.2% 苯丙烯菌酮微乳剂、30% 戊唑·嘧菌酯悬浮剂、9% 吡唑醚菌酯(稻清)微囊悬浮剂等均对稻瘟病的防效可

达到 60%~90%^[4-6]。化学农药的出现虽在一定程度上解决了稻瘟病防治难的问题,但随着公众食品安全意识的提高,其过量使用带来了病原菌抗性增强、环境污染加重、稻米农药残留等新问题。化学防治带来了植物抗药性及食品安全问题,而传统的农业防治又难达到预期的控制效果。在这种形式下,利用有益微生物来防治该病成为一种新的防治方向。

本研究通过筛选生防菌对稻瘟病进行防治,最终筛选得到 17 株具有生防潜力的细菌,以此为基础,建立防治稻瘟病快速筛选、评估体系,期为生物农药田间防控稻瘟病提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 稻瘟病生防细菌的采集与分离

细菌采集:于 2018 年 9 月在江苏省扬州市广陵区湾头水稻试验基地稻瘟病发病严重的地块,采用 5 点取样法分别采集健康植株和发病植株及其根围土壤。将采集后的样品迅速装入写好编号的塑料袋中带回实验室进行分离,植株体表及体内细菌的分离方法分别参照 Berg 等的方法^[7-8]。

细菌编号:B 表示病株,J 表示健康株;土壤分离的细菌用 T 表示;根围细菌用 GW 表示,根内细菌用 GN 表示;茎围细菌用 JW 表示,茎内细菌用 JN 表示;叶围细菌用 YW 表示,叶内细菌用 YN 表示;阿拉伯数字连续表示每次保留的细菌数量。如:细菌

收稿日期:2020-06-04

基金项目:江苏里下河地区农业科学研究所专项基金[编号: SJ(17)103]。

作者简介:卫甜(1990—),女,山西运城人,硕士,助理研究员,主要从事植物病害的生物防治工作。Tel:(0514)87302229;E-mail:weitian900128@163.com。

通信作者:苏建坤,硕士,研究员,主要从事植物病虫害的绿色防控工作。Tel:(0514)87302325;E-mail:yzsujk@163.com。

编号为 BGW11,表示从发病植株根围分离保留的第 11 株细菌,以此类推。

1.2 产酶和代谢产物活性测定

产纤维素酶活性的测定:将待鉴定的菌落用牙签转移到纤维素酶活性测定平板,28 ℃ 条件下培养 48 h,用 1 g/L 的刚果红溶液染 1 h 后,倒掉染液,用 1 mmol/L 的 NaCl 溶液浸泡 1 h^[9];产蛋白酶活性的测定采用同样的方法,将待鉴定的菌落转移到蛋白培养基于 28 ℃ 培养箱中培养 3 d^[10];产 β -1,3-葡聚糖酶活性的测定:将待鉴定的菌落用牙签转移到葡聚糖平板上,28 ℃ 培养 48 h。以上均须观察透明圈有无,并记录透明圈大小。产吡啶乙酸活性的测定,完全参照 Sawar 等的方法^[11]。

1.3 细菌的赋值评估

潜在生防细菌赋值评估,评分如下:产蛋白酶、纤维素酶活性各 3 分,其中酶活透明圈半径为 0 ~ 3 mm 赋 1 分,3 ~ 6 mm 赋 2 分,>6 mm 赋 3 分;产吡啶乙酸和葡聚糖酶活性各赋 1 分,共计 8 分。

1.4 细菌对稻瘟病菌的平板拮抗

采用对峙培养法,将保存于 4 ℃ 冰箱中的稻瘟病菌斜面用接种针接种到马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基平板上活化,待菌丝长满平板后用灭菌的打孔器从菌落外边缘均匀地打成直径为 8 mm 的圆形菌块。将菌丝块接种在 PDA 平板的中心,在其四周距中心约 35 mm 处分别接种 1 株待测定的

细菌。25 ℃ 条件下培养至菌丝长满平板后,分别记录各抑菌圈的半径(cm),重复 4 次。

1.5 细菌的 16S rDNA 鉴定

引物采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 U8 - 27、L1494 - 1514,测序由通用生物系统(安徽)有限公司完成。获得的 16S rDNA 序列在 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)中进行比对,取得鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 不同生境中生防菌的分离结果

本次试验共从水稻 14 个不同生境(分别是健康株和病株的根茎叶围、根茎叶内以及土壤等)中分离得到 304 株生防细菌(表 1)。其中从健康株和病株不同生境中分离得到的细菌数量分别为 140、164 株,分别占总分离菌数的 46.05%、53.95%,总体相差不大。而从健康株叶围、病株茎围以及病株根围分离得到的细菌数量最多,分别为 36、35、34 株,共占总菌数的 34.54%。叶内分离到的细菌总数为 13 株,只占总菌数的 4.28%。整体来说,本研究通过对水稻稻瘟病健康株各个生境进行细菌分离,初步获得了数量比较丰富的潜在生防菌。

2.2 细菌产酶活性测定结果

研究发现,生防细菌产生的某些次生代谢产物如水解酶蛋白酶、纤维素酶以及胞壁降解酶 β -1,

表 1 水稻不同生境中细菌的数量及细菌产酶代谢活性

微生境	植株	数量 (株)	比例 (%)	产蛋白酶的菌株		产纤维素酶的菌株		产葡聚糖酶的菌株		产吡啶乙酸的菌株	
				数量(株)	比例(%)	数量(株)	比例(%)	数量(株)	比例(%)	数量(株)	比例(%)
土壤	健康株	20	6.58	19	95.00	6	30.00	4	20.00	1	5.00
	病株	28	9.21	26	92.86	10	35.71	7	25.00	0	0
根围	健康株	26	8.55	21	80.77	17	65.38	5	19.23	0	0
	病株	34	11.18	28	82.35	14	41.18	6	17.65	0	0
根内	健康株	15	4.93	13	86.67	6	40.00	2	13.33	1	6.67
	病株	24	7.89	19	79.17	3	12.50	5	20.83	0	0
茎围	健康株	29	9.54	17	58.62	7	24.14	6	20.69	0	0
	病株	35	11.51	24	68.57	8	22.86	6	17.14	1	2.86
茎内	健康株	9	2.96	7	77.78	2	22.22	2	22.22	1	11.11
	病株	13	4.28	11	84.62	1	7.69	1	7.69	1	7.69
叶围	健康株	36	11.84	21	58.33	9	25.00	3	8.33	0	0
	病株	22	7.24	18	81.82	8	36.36	6	27.27	2	9.09
叶内	健康株	5	1.64	5	100	3	60.00	1	20.00	1	20.00
	病株	8	2.63	6	75.00	4	50.00	3	37.50	2	25.00
总计		304	100.00	235	77.30	98	32.24	57	18.75	10	3.29

注:所占比例计算方法为在 304 株细菌中,具有某种酶活性的细菌数量除以该生境中所有细菌的数量。

3-葡聚糖酶会帮助增强寄主植物的竞争力;吡啶乙酸作为一种生长激素,会影响植物细胞的分裂、伸长、分化和种子萌发、根系的发育以及营养生长过程。为此,对从不同生境中分离得到的 304 株细菌分别进行胞外酶活性及产吡啶乙酸活性测定,结果(表 1)表明,在 304 株潜在生防菌中,具有蛋白酶活性的细菌最多,共计 235 株,占总菌数的 77.30%;其次是纤维素酶(98 株)、葡聚糖酶(57 株),分别占总菌数的 32.24%、18.75%;产吡啶乙酸的生防细菌最少(10 株),只占 3.29%。

具体分析各种酶活性发现,在健康株中,产蛋白酶活性高的细菌来源于叶内,高达 100%,产纤维素酶活性高的细菌来源于根围(65.38%),产葡聚糖酶活性高的细菌来源于茎内(22.22%),产吡啶乙酸活性高的细菌来源于叶内(20.00%);在病株中,产蛋白酶活性高的细菌来源于根围(82.35%),产纤维素酶活性高的细菌来源于叶内(50.00%),产葡聚糖酶活性高的细菌来源于叶内(37.50%),产吡啶乙酸活性高的细菌来源于叶内(25.00%)。总之,在不同植株生境中分离得到的细菌产酶活性和产吡啶乙酸能力差异较大,从病株不同生境中分离得到的细菌数量明显高于健康株生境。无论是健康或发病植株,从叶围和根围中分离得到的细菌普遍具有较高的产酶活性。

2.3 细菌中酶活性赋值得分结果

对分离得到的 304 株潜在生防细菌进行赋值评估,评分较高的说明防治稻瘟病效果好的可能性高。在 304 株细菌中,有 256 株细菌至少具有 1 种活性,其中有 3 株细菌同时具有 4 种活性,有 23 株细菌具有 3 种活性,有 91 株细菌具有 2 种活性。具有 4 种活性的 3 株生防细菌全部来自健康植株内,赋予最高分值 8 分。7 株生防菌评分为 7 分,大多数来自病株。根据赋值评分结果,选取赋值评分 ≥ 3 分的细菌对稻瘟病菌进行平板拮抗试验,共计 114 株(表 2)。

2.4 细菌对稻瘟病菌的平板拮抗结果

通过 114 株细菌对稻瘟病菌的平板拮抗试验,发现共 15 株对稻瘟病菌具有不同程度的抑制效果,占总测定菌数的 13.16%。抑菌率在 50% 以上的有 10 株,其中 7 株来源于病株,3 株来源于健康株(表 3)。来自健康株叶围的 JYW21 对稻瘟病菌的抑制率最高,达 78.25%。

表 2 114 株生防细菌产酶活性赋值得分

编号	细菌编号	生境	赋值得分(分)				总计
			产蛋白酶活性	产纤维素酶活性	产葡聚糖酶活性	产吡啶乙酸活性	
1	JT7	健康株土壤	3	3	1	1	8
2	JGN15	健康株根内	3	3	1	1	8
3	JJN9	健康株茎内	3	3	1	1	8
4	BGW11	病株根围	3	3	1	0	7
5	BGW16	病株根围	3	3	1	0	7
6	BJW35	病株茎围	3	3	1	0	7
7	BT7	病株土壤	3	3	1	0	7
8	BYN8	病株叶内	3	3	1	0	7
9	JYN4	健康株叶内	3	3	1	0	7
10	JYN5	健康株叶内	3	3	0	1	7
11	BGW4	病株根围	3	3	0	0	6
12	BGW9	病株根围	3	2	1	0	6
13	BGW13	病株根围	3	3	0	0	6
14	BGW15	病株根围	3	3	0	0	6
15	BJW5	病株茎围	3	3	0	0	6
16	BYW17	病株叶围	3	2	1	0	6
17	BT5	病株土壤	3	3	0	0	6
18	BT16	病株土壤	3	3	0	0	6
19	BT17	病株土壤	3	3	0	0	6
20	JGW20	健康株根围	3	3	0	0	6
21	JYW5	健康株叶围	3	2	1	0	6
22	JYW23	健康株叶围	3	3	0	0	6
23	JT8	健康株土壤	3	2	1	0	6
24	JT12	健康株土壤	3	3	0	0	6
25	JT13	健康株土壤	3	3	0	0	6
26	JT16	健康株土壤	3	3	0	0	6
27	BGN12	病株根内	2	3	1	0	6
28	BJN1	病株茎内	3	3	0	0	6
29	JGN9	健康株根内	3	2	1	0	6
30	JYN2	健康株叶内	3	3	0	0	6
31	BGW5	病株根围	3	1	1	0	5
32	BGW6	病株根围	3	2	0	0	5
33	BGW19	病株根围	3	2	0	0	5
34	BJW3	病株茎围	3	2	0	0	5
35	BYW10	病株叶围	3	1	0	1	5
36	BT13	病株土壤	3	2	0	0	5
37	JGW1	健康株根围	3	2	0	0	5
38	JGW6	健康株根围	2	3	0	0	5
39	JGW11	健康株根围	2	3	0	0	5
40	JGW12	健康株根围	3	2	0	0	5
41	JGW15	健康株根围	2	2	1	0	5
42	JJW8	健康株茎围	2	3	0	0	5
43	JJW9	健康株茎围	2	3	0	0	5

表2(续)

编号	细菌编号	生境	赋值得分(分)				总计
			产蛋白酶活性	产纤维素酶活性	产葡聚糖酶活性	产吡啶乙酸活性	
44	JYW22	健康株叶围	3	2	0	0	5
45	JYW32	健康株叶围	3	2	0	0	5
46	JYW36	健康株叶围	2	3	0	0	5
47	JT3	健康株土壤	3	2	0	0	5
48	BGN15	病株根内	2	3	0	0	5
49	JGN14	健康株根内	2	3	0	0	5
50	BGW3	病株根围	1	2	1	0	4
51	BGW7	病株根围	3	0	1	0	4
52	BGW22	病株根围	3	1	0	0	4
53	BGW24	病株根围	2	2	0	0	4
54	BJW22	病株茎围	2	2	0	0	4
55	BJW25	病株茎围	3	0	1	0	4
56	BYW11	病株叶围	2	2	0	0	4
57	BT4	病株土壤	3	1	0	0	4
58	BT15	病株土壤	3	1	0	0	4
59	BT23	病株土壤	3	1	0	0	4
60	BT24	病株土壤	3	0	1	0	4
61	JGW8	健康株根围	3	1	0	0	4
62	JGW13	健康株根围	2	1	1	0	4
63	JGW14	健康株根围	2	1	1	0	4
64	JJW5	健康株茎围	2	2	0	0	4
65	JJW6	健康株茎围	2	1	1	0	4
66	JYW21	健康株叶围	2	2	0	0	4
67	JYW35	健康株叶围	3	0	1	0	4
68	JT14	健康株土壤	3	0	1	0	4
69	JT20	健康株土壤	3	0	1	0	4
70	BGN20	病株根内	3	1	0	0	4
71	BJN10	病株茎内	1	3	0	0	4
72	BYN2	病株叶内	2	1	1	0	4
73	JGN7	健康株根内	3	1	0	0	4
74	JGN8	健康株根内	3	1	0	0	4
75	JJN2	健康株茎内	3	0	1	0	4
76	BGW12	病株根围	3	0	0	0	3
77	BGW14	病株根围	3	0	0	0	3
78	BGW18	病株根围	3	0	0	0	3
79	BJW1	病株茎围	3	0	0	0	3
80	BJW7	病株茎围	2	1	0	0	3
81	BJW10	病株茎围	2	1	0	0	3
82	BJW32	病株茎围	2	1	0	0	3
83	BYW1	病株叶围	2	1	0	0	3
84	BYW8	病株叶围	3	0	0	0	3
85	BYW13	病株叶围	3	0	0	0	3
86	BYW21	病株叶围	1	1	1	0	3

表2(续)

编号	细菌编号	生境	赋值得分(分)				总计
			产蛋白酶活性	产纤维素酶活性	产葡聚糖酶活性	产吡啶乙酸活性	
87	BT2	病株土壤	2	0	1	0	3
88	BT6	病株土壤	3	0	0	0	3
89	BT18	病株土壤	3	0	0	0	3
90	BT26	病株土壤	3	0	0	0	3
91	JGW2	健康株根围	2	1	0	0	3
92	JGW4	健康株根围	1	2	0	0	3
93	JGW5	健康株根围	0	3	0	0	3
94	JGW16	健康株根围	2	1	0	0	3
95	JGW25	健康株根围	2	0	1	0	3
96	JJW13	健康株茎围	1	2	0	0	3
97	JYW6	健康株叶围	2	0	1	0	3
98	JYW10	健康株叶围	3	0	0	0	3
99	JYW11	健康株叶围	3	0	0	0	3
100	JYW18	健康株叶围	1	2	0	0	3
101	JYW25	健康株叶围	3	0	0	0	3
102	JYW26	健康株叶围	1	2	0	0	3
103	JYW31	健康株叶围	0	3	0	0	3
104	JT6	健康株土壤	3	0	0	0	3
105	BGN2	病株根内	3	0	0	0	3
106	BGN16	病株根内	2	0	1	0	3
107	BJN2	病株茎内	3	0	0	0	3
108	BJN3	病株茎内	3	0	0	0	3
109	BJN7	病株茎内	3	0	0	0	3
110	BJN12	病株茎内	3	0	0	0	3
111	BYN3	病株叶内	1	1	1	0	3
112	BYN7	病株叶内	3	0	0	0	3
113	JGN5	健康株根内	3	0	0	0	3
114	JGN6	健康株根内	3	0	0	0	3

2.5 生防菌的鉴定结果

结合表2的酶活测定结果,选取赋值评估为8分,外加15株对稻瘟病具有明显拮抗作用的生防细菌,本次共初步得到17株潜在生防细菌。根据16S rDNA基因序列的测序结果,与BLAST数据库的比对结果(表4)显示,筛选出的17株细菌中有1株为糖霉菌属(*Glycomyces*)细菌,1株为水库杆菌属(*Piscinibacter*)细菌,另外15株均为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌,其中4株为蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),4株为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*),2株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

3 结论与讨论

本研究在对防治稻瘟病生防细菌的酶活筛选、

表 3 15 株细菌对稻瘟病菌的平板拮抗活性

编号	细菌	抑菌圈半径 (cm)	抑菌率 (%)
1	BGW9	2.29 ± 0.05cd	57.17
2	BGW11	1.25 ± 0.23gh	31.33
3	BJW25	2.03 ± 0.39de	50.75
4	BYW11	2.24 ± 0.12cd	56.00
5	BYW21	2.05 ± 0.04de	51.17
6	BT6	2.23 ± 0.02cd	55.75
7	BT16	2.33 ± 0.20cd	58.25
8	JGW5	1.03 ± 0.02h	25.83
9	JJW5	1.70 ± 0.28ef	42.42
10	JYW21	3.13 ± 0.02a	78.25
11	JYW26	2.28 ± 0.25cd	56.92
12	BGN2	1.81 ± 0.31ef	45.17
13	JJN2	1.55 ± 0.03fg	38.83
14	JGN15	2.56 ± 0.11bc	64.00
15	JYN4	2.96 ± 0.66ab	74.00

注:抑菌圈半径的数据为算术平均数 ± 标准差;数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

表 4 17 株生防细菌的测序比对结果

细菌	最相似细菌
BGW9	<i>Bacillus cereus</i>
BGW11	<i>Glycomyces dulcitolivorans</i>
BJW25	<i>Bacillus altitudinis</i>
BYW11	<i>Bacillus altitudinis</i>
BYW21	<i>Bacillus</i> sp.
BT6	<i>Bacillus cereus</i>
BT16	<i>Bacillus cereus</i>
JGW5	<i>Piscinibacter defluvi</i>
JJW5	<i>Bacillus</i> sp.
JYW21	<i>Bacillus altitudinis</i>
JYW26	<i>Bacillus altitudinis</i>
BGN2	<i>Bacillus</i> sp.
JJN2	<i>Bacillus subtilis</i>
JYN4	<i>Bacillus cereus</i>
JT7	<i>Bacillus thuringiensis</i>
JGN15	<i>Bacillus subtilis</i>
JJN9	<i>Bacillus licheniformis</i>

平板拮抗及赋值评估体系时发现,在植株不同生境中分离得到的细菌产酶活性和产吡啶乙酸能力差异较大,从病株不同生境中分离得到的具有产酶活性和产吡啶乙酸能力的细菌数量明显高于健康株生境,可能是由于在稻瘟病菌侵染的情况下,更能激发植株体内的防御反应,分离得到的细菌产生

防御酶活性也相对更高。对稻瘟病菌的平板拮抗是建立在酶活筛选基础上的,因为有些细菌酶活评分很高但对稻瘟病菌并未表现出明显的拮抗效果(如来源于健康土壤内的 JT7),分析可能是由于该细菌对稻瘟病的防治并不会直接杀死病原菌,而是通过诱导抗病性。在分离得到的细菌田间防效指标未知的情况下,评估生防细菌潜能应该是取两者之和更为客观科学。因此,该体系可以作为针对稻瘟病筛选生防细菌的基础,为大规模筛选生防细菌体系的建立提供参考。

本研究以此体系为基础最终得到具有防治稻瘟病潜在能力的 17 株生防细菌,并且其中 9 株来源于健康株,分析可能是此时植株生境有益生菌能保护植物,抑制病原菌发生发展,而有益生菌也会相应发展成为优势菌群,但最终得到的 17 株细菌也不能说对稻瘟病的防治会有绝对的效果,后期仍须进行温室及田间试验等研究,主要由于当这些细菌实际应用于水稻时,其防效必将会受到田间土壤、气候、温湿度、土壤微生物等诸多因素的综合影响。

芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的细菌早已在国内外得到了广泛的关注,应用潜力最大^[12]。其广泛受关注的原因是芽孢杆菌易于分离和纯化,同时能产生耐热、抗逆性强的芽孢,且制剂稳定、抑菌能力强、施用方便、便于运输^[13]。针对稻瘟病的生物防治,早有研究报道,从水稻根际筛选的 208 株细菌对稻瘟病菌有较好的拮抗作用,其中包括蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在内的一些芽孢杆菌防效可达 50% 以上^[14];枯草芽孢杆菌 IK-1080 的培养滤液,当芽孢浓度在 1×10^8 、 5×10^8 CFU/mL 时,明显可以抑制稻瘟病菌分生孢子萌发和菌丝生长,叶瘟的发生率分别减轻 13.8%、7.7%,产量损失减少 52.2%、73.5%^[15];从水稻根系土壤中分离得到的枯草芽孢杆菌 T492 对稻瘟病菌的抑制率达 62.6%^[16]。本次试验初步得到 17 株生防细菌,经过鉴定绝大多数为芽孢杆菌,相信对稻瘟病的生物防治具有重要意义,后续将专门对芽孢杆菌的生防效果进行系统评价并且研究其抗病机制,从理论及实际应用为稻瘟病的生物防治提供基础。

参考文献:

- [1] Ju C X, Buresh R J, Wang Z Q, et al. Root and shoot traits for rice varieties with higher grain yield and higher nitrogen use efficiency at lower nitrogen rates application[J]. Field Crops Reserch, 2015, 175: 47-55.

李德全,汪宝华,曹云英,等. 生防菌 NH-8 及其高效突变体诱导番茄抗性的比较[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):111-114.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.018

生防菌 NH-8 及其高效突变体诱导番茄抗性的比较

李德全,汪宝华,曹云英,邓自发

(南通大学生命科学学院/农业部南方平原玉米科学观测实验站,江苏南通 226019)

摘要:在比较枯草芽孢杆菌 NH-8 及其突变体 B2、H7 抑菌活性的基础上,以苏粉 8 号番茄幼苗为试材,比较枯草芽孢杆菌 NH-8 及其高效突变体对番茄幼苗生长、抗性酶活性的影响。结果表明,NH-8 菌株及其高效突变菌株对番茄生长具有明显的促进作用,接种 H7 菌株的番茄幼苗其幼苗株高、主茎高度、鲜质量、干质量分别为 42.50 cm、2.82 cm、14.98 g/株、4.65 g/株,较清水对照增加 73.04%、276.00%、77.28%、100.43%;2 个高效突变菌株的拮抗能力较枯草芽孢杆菌 NH-8 有所提高,其促生作用和诱导抗性酶活性大多相应增强;接种生防菌株 H7 的番茄叶片过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶活性相对最大,分别为 4.5、55.5、47.6、14.7 U。

关键词:枯草芽孢杆菌 NH-8;突变体;番茄;抗性酶;酶活性;抗性诱导

中图分类号:S641.201 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0111-04

芽孢杆菌为芽孢杆菌科、芽孢杆菌属革兰氏阳性菌,既能产生芽孢以抵抗各种化学和物理的胁迫,又能产生多种抗菌活性物质抑制病原物,促进植物生长,在植物病害生物防治中应用广泛^[1-5]。

诱导植物产生抗病性保护是植物产生主动抗性的一种表现,经典抗性诱导是在植物体上先接种病原菌或诱导物,导致在接种部位产生病斑,进而产生系统抗病性,而多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等酶的活性大小往往与植物抗性强弱有密切关系^[6-9],可用于指征植物对病原菌的抗性能力。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)NH-8 是从近

收稿日期:2020-07-09

基金项目:江苏省南通市应用基础研究项目(编号:MS12015089);南通大学重点项目(编号:03080227)。

作者简介:李德全(1975—),男,江苏丰县人,博士,副教授,从事生物防治和抗性生理研究。E-mail:lideduan@ntu.edu.cn。

[2]王巧兰,郭刚. 水稻稻瘟病生物防治研究进展[J]. 河南农业科学,2005(10):10-13.

[3]王丹,沙岩,胡俊峰,等. 抗稻瘟病基因的克隆及其分子育种研究进展[J]. 分子植物育种,2019,17(14):4661-4666.

[4]陈婷婷,向礼波,龚双军,等. 0.2% 苯丙烯菌酮微乳剂防治水稻稻瘟病田间药效试验[J]. 湖北植保,2019(5):4-6.

[5]周柏超. 30% 戊唑·啉菌酯悬浮剂防治水稻纹枯病和稻瘟病试验总结[J]. 现代农业,2019(8):30.

[6]冯春水,张再仁,陈文化. 水稻稻瘟病防治药剂筛选研究[J]. 湖北农业科学,2019,58(22):108-110.

[7]Berg G, Kurze S, Buchner A, et al. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to *Verticillium* wilts[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(12):1128-1137.

[8]Krechel A, Faupel A, Hallmann J, et al. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(9):772-786.

[9]Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and

Applied Chemistry, 1987, 59(2):257-268.

[10]Yang J H, Liu H X, Zhu G M, et al. Diversity analysis of antagonists from rice associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(1):91-104.

[11]Sarwar M, Kremer R J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method[J]. Letters in Applied Microbiology, 1995, 20(5):282-285.

[12]孔令春,魏松红,王海宁,等. 抗稻瘟病的生防细菌筛选与鉴定[J]. 沈阳农业大学学报,2018,49(6):655-660.

[13]朱玥妍,刘姣,杜春梅. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(34):16635-16658.

[14]彭化贤,刘波微,陈小娟,等. 水稻稻瘟病拮抗细菌的筛选与防治初探[J]. 中国生物防治,2002,18(1):25-27.

[15]Taguchi Y, Hyakumachi M, Horinouchi H, et al. Biological control of rice blast disease by *Bacillus subtilis* IK-1080[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2003, 69(2):85-9

[16]张芬. 水稻稻瘟病和白叶枯病拮抗细菌的筛选及防治作用研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.

海藻分离筛选到的具有良好抑菌活性的产芽孢杆菌^[10],生长快,能产生抗生素,对多种植物病原生物具有较强的拮抗作用,是一种能在植物病害防治中发挥重要作用的生物防治因子^[11]。本试验利用比单一诱变更为有效的氮离子注入法^[12]对海洋细菌 NH-8 进行诱变处理,筛选获得 2 株拮抗性能比菌株 NH-8 更为高效的突变体;在此基础上,以苏粉 8 号番茄幼苗为试材,测定接种生防菌 NH-8 和 2 株高效突变菌株的番茄叶片多酚氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等活性水平,并分析比较其对番茄幼苗的控病促生作用,旨在明确生防菌 NH-8 和 2 株突变菌株的诱抗能力,为评价该生防菌株的应用价值、生防作用机制及对植物病害的有效防治提供新途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

枯草芽孢杆菌 NH-8 及其高效突变菌株 B2、H7、小麦纹枯病原菌,由南通大学生命科学学院实验室保存提供,供试番茄品种为苏粉 8 号。

1.2 试验时间、地点

田间盆栽试验于 2019 年 2—5 月选择在南通大学植物试验园进行,室内试验在南通大学生物技术重点实验室进行。

1.3 菌株 NH-8 及其高效突变株的抑菌活性比较

以小麦纹枯菌为指示菌,采用平板对峙法验证抑菌活性,其具体操作过程:将菌株 NH-8 及其 2 株突变菌株分别移植到牛肉膏、蛋白胨液体培养基中,26 ℃、140 r/min 振荡培养 36 h,备用;将纹枯病原菌移植到直径为 90 mm 的 PDA 平板上,26 ℃ 培养 48 h;打孔器打孔,将菌块移植到直径为 90 mm 的空白 PDA 平板中央培养 8 h,对角接种 NH-8 及其 2 株高效突变体,26 ℃ 培养 48 h;测量接种菌株的菌圈直径,计算抑制率,重复 6 次。抑制率计算公式:

$$\text{抑制率} = \text{菌圈直径} / 45 \times 100\%。$$

式中:45 为平板半径值,mm。

1.4 菌株 NH-8 及其高效突变菌株对番茄生长的影响

选取生长相对一致的番茄幼苗,移栽到按顺序摆放、装有灭菌土的塑料盆中,每盆移栽 1 株,接种菌含量为 10^{10} CFU/mL 的菌株 NH-8 及其高效突变菌株发酵液 250 mL/株,分别以空白培养基、清水

处理为对照,移栽后 15、25 d 再用相应的溶液处理 1 次;定植后 30 d,每处理随机选择 5 点,每点选取番茄 6 株,取出植株,用自来水洗净,晾干;分别采用直尺、游标卡尺测量株高、短缩茎粗度,采用电子秤称量植株的鲜质量、干质量;称量干质量时,将番茄植株在烘箱中 55 ℃ 烘干。每次处理试验植株数为 30 株,重复 4 次。

1.5 番茄叶片抗性酶活性的测定

1.5.1 接种处理 以番茄幼苗为试材,分别喷施菌含量为 10^{10} CFU/mL 的 NH-8、H7、B2 菌株发酵液 100 mL/株,以喷等量清水为对照,共计 4 个处理;分别在接种后 1、2、3、4、5、6 d 取适量番茄叶片,测定其抗性酶活性,重复 4 次。

1.5.2 番茄叶片酶活性测定方法^[13] (1)过氧化物酶和多酚氧化酶。取番茄叶片 1.2 g,加入 pH 值 6.8 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 5 mL、石英砂少许,冰浴下研磨成匀浆;4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,采用紫外分光光度计测定波长。过氧化物酶:以 0.18 mol/L 愈疮木酚为底物,室温反应 6 min,以测定波长为 460 nm 的吸光度 $D_{460 \text{ nm}}$ 1 min 增加 0.1 所需酶量为 1 个酶活单位, U;多酚氧化酶:以 150 μmol/L 联苯三酚为底物,反应 10 min,加入 15% H_2SO_4 中止,以测定波长为 420 nm 的吸光度 $D_{420 \text{ nm}}$ 1 min 增加 0.001 所需酶量为 1 个酶活单位, U。(2)超氧化物歧化酶和过氧化氢酶。取番茄叶片 1.2 g,加入 pH 值 7.8 的 0.05 mol/L 缓冲液 5 mL、石英砂少许,冰浴下研磨成匀浆;4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,采用紫外分光光度计测定波长。超氧化物歧化酶:测定波长为 560 nm 的吸光度值 $D_{560 \text{ nm}}$,以抑制氮蓝四唑光化学还原 50% 为 1 个酶活性单位, U;过氧化氢酶:测定以 0.2% 过氧化氢为底物,室温反应 3 min,以测定波长为 240 nm 的吸光度 $D_{240 \text{ nm}}$ 1 min 减少 0.01 所需酶量为 1 个酶活单位, U。

2 结果与分析

2.1 菌株 NH-8 及其高效突变体的抑菌效果

由表 1、图 1 可见,菌株 NH-8 的 2 个高效突变体 H7、B2 的抑菌率分别为 80.4%、72.0%,其拮抗能力明显好于出发菌株 NH-8,分别较菌株 NH-8 增加 23.6、32.0 百分点;H7 菌株对纹枯病原菌的拮抗能力最强,其菌落直径相对最大,为 36.2 cm。

表1 菌株 NH-8 及其高效突变体对纹枯病原菌的抑菌效果比较

菌株	直径 (mm)	抑菌率 (%)
NH-8	21.6	48.4
H7	36.2	80.4
B2	32.4	72.0

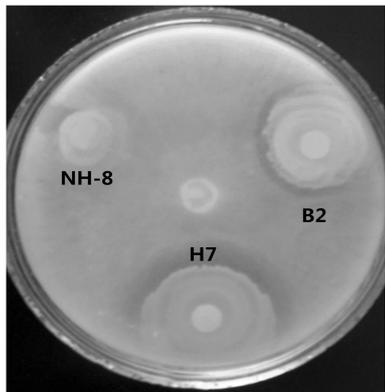


图1 菌株 NH-8 及其高效突变菌株对纹枯病原菌的抑制效果

2.2 菌株 NH-8 及其高效突变体对番茄幼苗的促生效果

由表2可见,与对照相比,各个菌株发酵液处理对番茄生长均有显著的促生作用($P < 0.05$),菌株

发酵液处理 20 d,番茄幼苗株高、主茎高度、鲜质量、干质量分别显著高于清水对照,其中接种 H7 菌株的番茄幼苗增加相对最高,幼苗株高、主茎高度、鲜质量、干质量分别为 42.50 cm、2.82 cm、14.98 g/株、4.65 g/株,分别较清水对照显著增加 73.04%、276.00%、77.28%、100.43% ($P < 0.05$)。

表2 菌株 NH-8 及其突变体对番茄生长的影响

处理	株高 (cm)	主茎高度 (cm)	鲜质量 (g/株)	干质量 (g/株)
NH-8 菌剂	30.67b	1.27b	12.67c	3.32b
H7 菌剂	42.50a	2.82a	14.98a	4.65a
B2 菌剂	39.40a	2.41a	13.76b	4.33a
清水对照	24.56c	0.75c	8.45d	2.32c

注:同列数据后不同小写字母表示不同处理间达显著差异($P < 0.05$)。

2.3 菌株 NH-8 及其突变体处理对番茄抗性酶活性的影响

由图2可见,喷施拮抗菌 NH-8 及其高效突变株 B2、H7 菌液,番茄叶片抗氧化酶活性均呈先上升后下降趋势。接种 H7 菌液的番茄叶片其过氧化物酶活性在接种 3 d、多酚氧化酶活性在接种 4 d、超氧

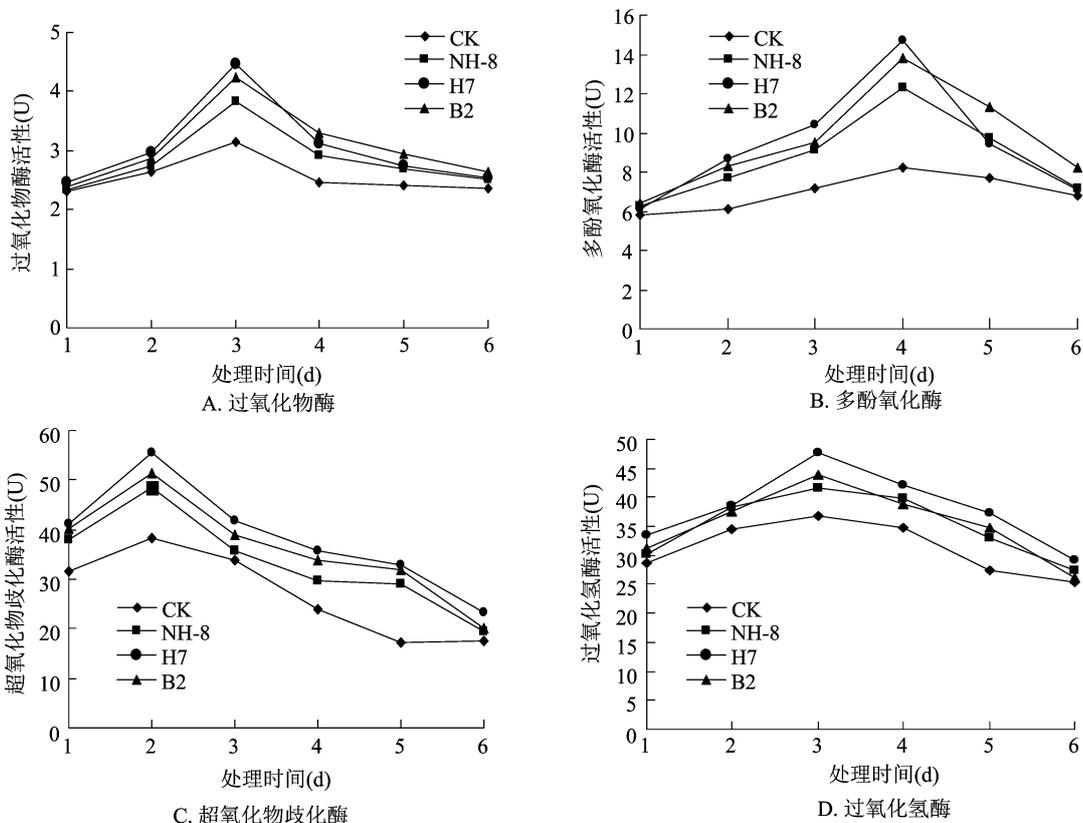


图2 拮抗菌 NH-8 及其高效突变菌株对番茄叶片内 4 种防御性酶活性的影响

化物歧化酶活性在接种2 d、过氧化氢酶活性在接种3 d时达到最大,4个酶活性分别为4.5、14.7、55.5、47.6 U,接种6 d时均接近于对照水平;B2、H7这两个高效突变株的防御酶活性多高于出发菌株NH-8,说明防御酶系的活性随着拮抗菌株的拮抗能力和促生作用提高而增强。

3 结论与讨论

有研究认为,诱导植物获得系统抗性(SAR)在生防菌防病作用中起重要的作用^[14],而诱导抗病性保护是植物产生主动抗性的一种表现^[15]。王美琴等认为,生防菌可以影响与植物抗病性相关的重要酶活性,植物早期防御反应可提高木质化程度,增强氧化酶活性等,这都与诱导抗病性有关^[16-17]。枯草芽孢杆菌对人畜无毒害,对环境无污染,具有明显的抗菌活性和极强的抗逆能力,本试验采用的枯草芽孢杆菌NH-8对多种植物病原生物具有较强的拮抗性能,与其高效突变菌株对番茄幼苗生长有明显的促进作用。本试验盆栽促生试验结果显示,接种H7菌株的番茄幼苗的株高、主茎高度、鲜质量、干质量分别为42.50 cm、2.82 cm、14.98 g/株、4.65 g/株,较清水对照显著增加73.04%、276.00%、77.28%、100.43% ($P < 0.05$)。

生防菌对植物病害的防病作用可能是促生、产生抗菌物质及诱导宿主抗性产生等多因素综合作用的结果^[18-19]。拮抗菌株NH-8和突变菌株可以诱导番茄幼苗叶片内过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶等与抗病性相关的防御酶活性大幅度提高,而2个高效突变株的防御酶活性比出发菌株NH-8略高。因此,有必要进一步加强高效突变菌株的研发与应用。

参考文献:

[1] Yourman L F, Jeffers S N. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea* [J]. *Plant Disease*, 1999, 83(6): 569-575.

[2] Wsahington W S, Shanmuganathan N. Fungicide control of strawberry fruit rots and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinera* to iprodione, benomyl and dichlofluanid [J]. *Crop Protection*, 1992, 11(4): 355-360.

[3] Peng G, Sutton J C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry [J]. *Plant Pathology*, 1991, 13(3): 247-257.

[4] 张鹏, 洪葵, 庄令, 等. 抗真菌活性物质的分离纯化及生物活性研究 [J]. *福建热作科技*, 2006, 31(1): 5-7.

[5] Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis* [J]. *Biologicals*, 1997, 25(3): 289-297.

[6] 何红, 欧雄常, 王立才, 等. 红树内生海洋细菌CIII-1菌株对辣椒青枯病的防病效果 [J]. *植物保护学报*, 2008, 35(6): 497-500.

[7] Mohammed S H, Saedy M A, Enan M R, et al. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* [J]. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2008, 7(1): 57-66.

[8] 李德全, 钱亚明, 周鸣鸣, 等. 海洋细菌NH-8防治草莓灰霉病机理及其抗菌物质分析 [J]. *植物保护学报*, 2016, 43(2): 215-221.

[9] 李德全, 谈蓉, 周鸣鸣, 等. 筛选和利用海洋细菌防治玉米纹枯病试验 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(8): 118-120, 121.

[10] 陈志谊, 刘永锋, 陆凡. 井冈霉素和生防菌Bs-916协同抗病作用及增效机理 [J]. *植物保护学报*, 2003, 30(4): 431-434.

[11] Rosslenbroich H J, Stuebler D. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management [J]. *Crop Protection*, 2000, 19(8/10): 557-561.

[12] 余增亮. 离子束生物技术引论 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 34-46.

[13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 25-49.

[14] van Peer R, Niemann G J, Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium wilt* of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417 [J]. *Phytopathology*, 1991, 81: 728-734.

[15] 田黎, 顾振芳, 陈杰, 等. 海洋细菌B-9987菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用 [J]. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 77-80.

[16] 王美琴, 贺运春, 薛丽, 等. 番茄内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选 [J]. *植物保护学报*, 2007, 34(5): 559-560.

[17] Jeon Y H, Chang S P, Hwang I G. Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 13(6): 881-891.

[18] 李德全, 邓自发, 曹云英, 等. 芽孢杆菌NH-8对番茄根结线虫病的生防效果 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(8): 108-110.

[19] Hong H, Qiu S, Fangping H, et al. Advance in biological effects of endophytic bacteria [J]. *Bacteria Journal of Microbiology*, 2004, 24(3): 40-45.

高小宁,孙辉,李婷,等. 广东省甘蔗褐斑病菌(*Cercospora longipes*)的生物学特性[J]. 江苏农业科学,2021,49(7):115-118.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.07.019

广东省甘蔗褐斑病菌(*Cercospora longipes*)的生物学特性

高小宁¹, 孙辉², 李婷², 齐永文¹

[1. 广东省生物工程研究所(广州甘蔗糖业研究所)/广东省甘蔗遗传改良工程技术中心,广东广州 510316;

2. 仲恺农业工程学院农学与生命学院,广东广州 510225]

摘要:以广东省甘蔗褐斑病菌(*Cercospora longipes*) CL12 分离株为对象,研究了温度、pH 值、培养基种类、不同碳源和氮源对菌株菌丝生长和分生孢子萌发的影响,为进一步研究甘蔗尾孢引起的褐斑病的发生规律和防治药剂筛选奠定基础。结果表明,CL12 分离株的菌丝在供试的 10 种培养基上都可以生长,但表现出较大差异;其中 PDA 和 PSA 培养基有利于菌丝生长,而 MS 和 N6 培养基不适合该菌生长。以 Czapek 培养基作为基础,果糖作为碳源、牛肉膏和酵母粉作为氮源最适宜病菌的菌丝生长。菌丝生长的温度范围为 5~35℃,最适温度为 25℃;菌丝生长最适 pH 值为 5,在 pH 值为 4.0~10.0 均可生长;分生孢子萌发的温度范围为 15~35℃,pH 值为 4.0~10.0,最适萌发条件为 25℃,pH 值为 6.0。

关键词:甘蔗;甘蔗尾孢菌;培养特性;孢子萌发;碳源;氮源

中图分类号:S435.661 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)07-0115-04

甘蔗(*Saccharum* spp.)是我国最重要的糖料作物,而病害是影响甘蔗生产的重要因素。目前世界上已经报道的甘蔗病害达 130 种,我国记录的甘蔗侵染性病害已超过 50 种^[1],其中由真菌引起的褐锈病(brown rust)、梢腐病(pokkah boeng)、褐条病(brown stripe)、褐斑病(brown spot)等叶部病害在我国蔗区发生普遍,对甘蔗生产造成了严重威胁。由甘蔗尾孢(*Cercospora longipes* E. E. Butler)引起的甘蔗褐斑病^[2]于 1906 年首次在印度发现,目前在世界甘蔗产区广泛分布。褐斑病主要危害甘蔗叶片,发病初期受害叶片呈黄色小斑点,随后扩大形成具有黄色晕圈的长梭形红褐色病斑,田间湿度较大时,叶片背面产生灰色霉层,严重发病可导致叶片提前枯死,呈现“火烧”状,从而给甘蔗生产造成严重损失^[3]。褐斑病作为甘蔗的主要叶部病害之一,前期研究人员对该病害在我国不同蔗区的分布和

危害情况进行了大量的调查分析,发现该病害在我国蔗区广西、云南、广东、贵州、海南等地广泛分布,常年危害,对甘蔗正常生长产生了一定的影响^[4-8],并评价了几种化学药剂对该病害的防治效果,发现苯甲·啉菌酯对甘蔗褐斑病表现出良好的防效^[5]。然而,已有研究中缺少对其病原菌生物学特性的相关报道。

了解病菌的生物学特性是深入理解病害发生规律的基础,进而为病害的有效防控提供理论依据。在前期研究中,笔者从广东省翁源县采集甘蔗褐斑病病样并对其病菌进行分离鉴定和致病性测定,获得 1 株甘蔗尾孢(*C. longipes*)分离株 CL12。因此,本研究以分离株 CL12 为对象,研究温度、pH 值以及营养条件对其菌丝生长和分生孢子萌发的影响,以期为进一步研究病害发生流行规律,制定防治技术方案奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:甘蔗尾孢(*C. longipes*) CL12 分离株,按常规方法在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上繁殖、保存备用。菌株 CL12 生物学特性测定试验于 2019 年在广东省科学院生物工程研究所进行。

供试培养基及其配方:PDA(200 g/L 马铃薯、

收稿日期:2020-07-15

基金项目:广东省科学院研究所绩效考核引导专项(编号:2020GDASYL-20200302005);广东省甘蔗剑麻产业技术体系创新团队项目(编号:2019KJ104-05);广东省重点领域研发计划(编号:2019B020238001)

作者简介:高小宁(1978—),女,陕西岐山人,博士,副教授,从事甘蔗病害研究。Tel:(020)34397561;E-mail:gxn336@126.com。

通信作者:齐永文,博士,研究员,从事甘蔗遗传育种研究。Tel:(020)84178036;E-mail:yongwen2001@163.com。

20 g/L 葡萄糖、15 g/L 琼脂粉)、PSA(200 g/L 马铃薯、20 g/L 蔗糖、15 g/L 琼脂粉)、MEA(30 g/L 麦芽浸粉、3.0 g/L 大豆蛋白胨、15 g/L 琼脂粉)、CAM(2.0 g/L 玉米浸粉、15 g/L 琼脂粉)、Czapek(3 g/L NaNO_3 、1 g/L KH_2PO_4 、0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/L KCl 、0.01 g/L FeSO_4 、30 g/L 蔗糖、15 g/L 琼脂粉)、LBA(10 g/L NaCl 、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、15 g/L 琼脂粉)、YPD(20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、15 g/L 琼脂粉)、N6 [2 830 mg/L KNO_3 、463 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、166 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、185 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、400 mg/L KH_2PO_4 、27.8 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、4.4 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1.6 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.8 mg/L H_2BO_3 、1.6 mg/L KI 、2 mg/L 甘氨酸、0.5 mg/L 烟酸]、MS [1 900 mg/L KNO_3 、1 650 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、170 mg/L KH_2PO_4 、370 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、440 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.83 mg/L KI 、6.2 mg/L H_2BO_3 、22.3 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、8.6 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、37.25 mg/L Na_2EDTA 、27.85 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg/L 肌醇、2 mg/L 甘氨酸、0.5 mg/L 烟酸、0.5 mg/L 盐酸吡哆醇、0.1 mg/L 盐酸硫胺素、30 g/L 蔗糖、15 g/L 琼脂粉]、WA(15 g/L 琼脂)。上述培养中的 N6 和 MS 购自 Sigma 公司,其他培养基均按照配方进行配制;配制好的培养基于灭菌锅中 121 °C 湿热高压灭菌 20 min 后备用。

1.2 营养条件对菌丝生长的影响

1.2.1 不同培养基对菌丝生长的影响

在培养 20 d 的分离株 CL12 菌落边缘,用灭菌打孔器取直径 5 mm 的菌饼,分别转接于 PDA、PSA、MEA、CAM、Czapek、LBA、YPD、N6、MS 和 WA 等 10 种不同培养基制成的平板中央。将培养皿置于 25 °C 培养箱中恒温避光培养,每处理 3 次重复。采用“十”字交叉法每 7 d 测量菌落直径,观察并记录菌落形态^[9]。

1.2.2 不同碳源对菌丝生长的影响

以 Czapek 培养基作为基础,分别以等量的葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖、可溶性淀粉、麦芽糖、山梨醇和肌醇替代其中的蔗糖,制成不同碳源培养基。按照“1.2.1”节所描述的方法进行病菌的接种、培养、观察菌落生长情况并测量菌落直径。每处理重复 3 次。

1.2.3 不同氮源对菌丝生长的影响

以 Czapek 培

培养基作为基础,分别以等量的牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、甘氨酸、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 替代其中 NaNO_3 ,制成不同氮源培养基。按照“1.2.1”节所描述的方法进行病菌的接种、培养、观察菌落生长情况并测量菌落直径。每处理重复 3 次。

1.3 培养条件对菌丝生长的影响

1.3.1 温度对菌丝生长的影响

以 PDA 作为培养基,将接菌的培养皿分别置于 5、10、15、20、25、30、35、40 °C 下培养。按照“1.2.1”节所描述的方法进行病菌的接种、培养、观察菌落生长情况并测量菌落直径。每处理重复 3 次。

1.3.2 pH 值对菌丝生长的影响

用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH ,将 PDA 培养基的 pH 值调制成 4、5、6、7、8、9、10。按照“1.2.1”节所描述的方法进行病菌的接种、培养、观察菌落生长情况并测量菌落直径。每处理重复 3 次。

1.4 培养条件对分生孢子萌发的影响

1.4.1 温度对分生孢子萌发的影响

用玉米叶粉碳酸钙琼脂培养基(MLPCA)培养分生孢子,用无菌水配制为每视野(10×40)20~30 个分生孢子的悬浮液,采用凹孔载玻片法进行孢子萌发试验^[9]。将装有分生孢子悬浮液的凹玻片分别置于 5、10、15、20、25、30、35、40 °C 下,于 3、6 h 镜检分生孢子萌发情况,计算萌发率。每处理重复 3 次。

1.4.2 pH 值对分生孢子萌发的影响

用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH ,将无菌水配制成 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10 共 7 个梯度的溶液。按照“1.4.1”节的方法进行分生孢子萌发试验。每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 营养条件对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响

2.1.1 不同培养基对菌丝生长的影响

由表 1 可知,甘蔗尾孢菌在供试的 10 种培养基上均可生长,但生长情况差异较大。从菌落形态和生长速度来看,PDA、PSA、YPD 较适宜于甘蔗尾孢的菌丝生长,其次为 CAM 和 MEA;在 WA 上菌丝极为稀疏,而 MS 和 N6 培养基不适合甘蔗尾孢的菌丝生长。

2.1.2 不同碳源对菌丝生长的影响

由表 2 可知,分离株 CL12 能够利用多种单糖、多糖和可溶性淀粉作为碳源,不同碳源对其菌丝生长有一定影响。在供试的 8 种碳源中,果糖是甘蔗尾孢菌的最佳碳

表 1 不同培养基对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响

培养基	菌落直径 (mm)			
	14 d	21 d	28 d	35 d
PDA	7.6c	13.3c	18.6c	23.1b
PSA	10.8b	16.4b	21.0b	22.9b
MEA	5.8c	9.5c	13.7c	17.8d
CAM	11.3b	15.9b	17.7c	18.3d
Czapek	1.8e	4.1e	6.6e	9.3e
LBA	4.5d	7.2d	7.6e	7.9f
YPD	6.0c	11.0c	15.9d	20.7c
N6	3.4d	6.5d	3.8f	5.5g
MS	2.8d	3.4e	4.7f	6.9f
WA	13.6a	22.0a	29.4a	36.6a

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。表 2、表 3 同。

表 2 不同碳源对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响

碳源	菌落直径 (mm)			
	14 d	21 d	28 d	35 d
葡萄糖	3.6b	7.9a	11.4a	14.9b
半乳糖	3.0b	6.5b	9.0c	12.1c
果糖	4.2b	9.1a	13.9a	18.4a
甘露糖	3.7b	6.0b	8.6c	10.9d
可溶性淀粉	1.7c	4.4c	7.0d	9.9d
麦芽糖	4.6b	8.6a	12.0b	14.8b
山梨醇	3.8b	7.3a	9.7c	12.1c
肌醇	5.8a	9.4a	12.2b	14.7b

源,葡萄糖、麦芽糖和肌醇次之,其对可溶性淀粉的利用较差。

2.1.3 不同氮源对甘蔗尾孢菌丝生长的影响

甘蔗尾孢菌丝在不同氮源培养基中的生长情况(表 3)表明,分离株 CL12 能够不同程度地利用无机氮源和有氮源,但不同氮源对病菌菌丝生长影响显著。供试菌株最适氮源为牛肉膏和酵母粉,其次为蛋白胨,对 NH_4Cl 和 NH_4NO_3 的利用较差。

2.2 培养条件对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响

2.2.1 温度对菌丝生长的影响

不同温度对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的测试结果(图 1)表明,该分离株在 5 ~ 35 °C 温度范围内均可生长,高于 35 °C 不能生长,最适生长温度为 25 °C。

2.2.2 pH 值对菌丝生长的影响

分离株 CL12 在 4.0 ~ 10 的 7 个 pH 值梯度条件下均可生长,对 pH

表 3 不同氮源对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响

氮源	菌落直径 (mm)			
	14d	21d	28d	35d
牛肉膏	10.2a	16.1a	21.0a	25.2a
酵母粉	9.9a	16.2a	20.9a	24.6a
蛋白胨	7.5b	12.0b	17.2b	21.2b
甘氨酸	2.7d	6.2c	10.2c	13.3c
NH_4Cl	2.1d	5.2c	6.1d	6.9e
NH_4NO_3	3.2d	5.5c	7.5d	8.5d
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3.9c	7.0c	10.9c	14.1c

值表现出较广的适应范围,其中在 pH 值为 5 的条件下菌落直径最大,表明该分离株比较适合偏酸的生长环境(图 2)。

2.3 培养条件对甘蔗尾孢 CL12 分离株分生孢子萌发的影响

2.3.1 温度对分生孢子萌发的影响

甘蔗尾孢 CL12 分离株的分生孢子萌发率在不同温度下存在较大差异(图 3)。该菌株分生孢子在 15 ~ 35 °C 温度范围内均可萌发,最适萌发温度为 25 °C,高于 35 °C 或低于 10 °C 均不能萌发。

2.3.2 pH 值对菌丝生长的影响

甘蔗尾孢分离株 CL12 的分生孢子在 pH 值 4 ~ 10 的 7 个梯度条件下均可正常萌发(图 4),表现出较广 pH 值适应性;其中 pH 值在 5 ~ 9 的范围内,分生孢子萌发率均高于 85%。

3 结论与讨论

尾孢菌类真菌是无性型真菌丝孢菌纲,丝孢目,由 Fresenius 在 1863 年建立^[10]。尾孢菌属(*Cercospora* Fresen.)是重要的植物病原菌,可危害植物的不同部位,形成明显的坏死斑^[11]。该类真菌能够侵染多种农作物和经济作物,致使受害植物出现叶片枯黄,提前落叶、落花、落果,严重影响作物生长,造成一定的经济损失^[12]。由玉蜀黍尾孢菌(*C. zeae - maydis* Tehon et Daniels)引起的玉米灰斑病在我国广泛分布,已经成为玉米生产种的重要问题^[13];甜菜尾孢菌(*C. beticola*)引起的褐斑病是甜菜生产中的重要叶部病害,在全世界严重发生^[14]。由甘蔗尾孢菌(*C. longipes*)引起的甘蔗褐斑病在我国蔗区均有分布,是经常发生且造成危害的主要叶部病害之一。

然而,尾孢菌在人工培养基上生长缓慢,导致

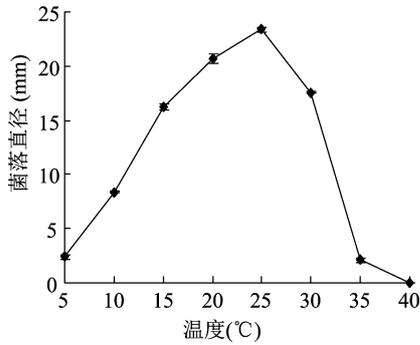


图1 温度对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响(35 d)

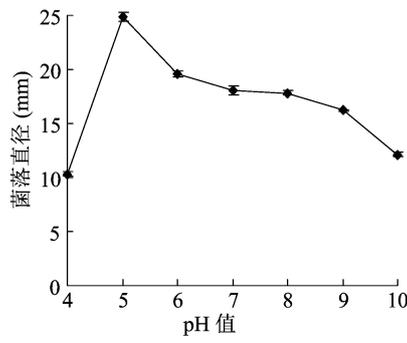


图2 pH 值对甘蔗尾孢 CL12 分离株菌丝生长的影响(35 d)

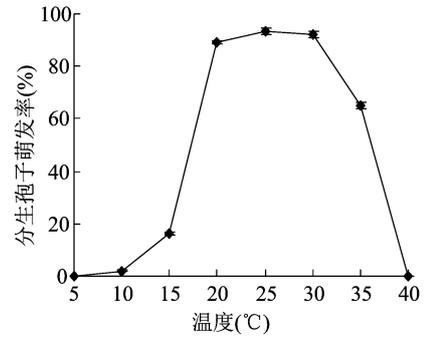


图3 温度对甘蔗尾孢 CL12 分离株分生孢子萌发的影响(6 h)

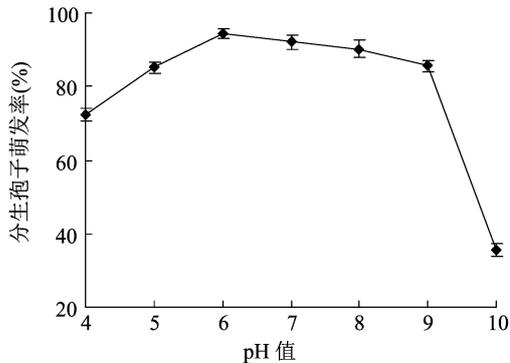


图4 pH 值对甘蔗尾孢 CL12 分离株分生孢子萌发的影响(6 h)

对甘蔗褐斑病的研究仅停留在对病害的田间调查, 缺少对其病菌的生物学特性的研究, 从而限制了对该病害侵染过程和发病规律的认识。因此, 本试验通过对甘蔗尾孢 CL12 分离株的培养形状、温度、pH 值的适应性以及不同营养利用情况的研究, 明确其基本生物学特性。研究结果表明, CL12 分离株对温度有较广的适应性, 5 ~ 35 °C 均可生长, 但其 20 ~ 25 °C 的最适生长温度相同, 这与甘蔗生长及其褐斑病发生区域的气候条件相一致。但与刘可杰等报道的玉米尾孢病菌在 10 ~ 30 °C 范围内均可生长^[15], 略有不同。同时, 研究发现该病菌对不同营养的利用差异显著。CL12 分离株在 PDA、PSA、YPD 等培养基上生长良好, 菌落生长速度较快, 菌丝致密; 在 WA 培养基上虽然菌落扩展速度最快, 但菌丝非常稀疏, 其生长特性与已经报道的玉米灰斑病菌基本一致^[15]。同时, 研究发现果糖、牛肉膏和酵母粉是甘蔗尾孢 CL2 分离株最适合的碳源、氮源; 而对于玉米尾孢病菌, 可溶性淀粉和麦芽糖是其最佳碳源, 说明不同的尾孢菌的营养利用情况有较大差异。本试验通过对甘蔗褐斑病菌生物学特性的研究, 基本明确了甘蔗尾孢菌适宜的培养条件

和营养条件。然而, 由于本试验只针对从广东省分离获得的 1 株甘蔗尾孢菌的培养特性进行分析, 那么病菌群体的不同菌株间、不同地区的菌株间是否存在差异, 还须进一步研究。

参考文献:

- [1] 鲁国东, 黎常窗, 潘崇忠, 等. 中国甘蔗病害名录[J]. 甘蔗, 1997, 4(4): 19-23.
- [2] 郭英兰, 刘锡璠. 中国真菌志(第二十四卷: 尾孢属)[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [3] 李增平, 张树珍. 海南甘蔗病虫害诊断图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 18-19.
- [4] 韦金菊, 邓展云, 黄诚华, 等. 广西甘蔗主要真菌病害调查初报[J]. 南方农业学报, 2012, 43(9): 1316-1319.
- [5] 龙友华, 刘洋洋, 吴小毛, 等. 贵州甘蔗真菌病害初步调查及褐斑病防治药剂筛选[J]. 植物保护, 2015, 41(4): 186-190.
- [6] 尹 炯, 李文凤, 罗志明, 等. 云南甘蔗病虫害发生危害新特点及防控对策[J]. 中国农学通报, 2018, 34(32): 119-124.
- [7] 熊国如, 李增平, 赵婷婷, 等. 海南蔗区甘蔗病害种类及发生情况[J]. 热带作物学报, 2010, 31(9): 1588-1595.
- [8] 黄鸿能. 广东蔗区甘蔗病害种类和分布的调查及其主要病害的防治[J]. 甘蔗糖业, 1987(5): 50-52.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 140-154.
- [10] Chupp C. A monograph of the fungus genus *Cercospora*[M]. New York: Ilhaca, 1954: 1-667.
- [11] Agrios G N. Plant Pathology[M]. 5th ed. New York: Elsevier Academic Press, 2005: 385-614.
- [12] 谢学文, 赵 倩, 郭英兰. 尾孢菌属和假尾孢菌属新纪录种[J]. 菌物学报, 2017, 36(8): 1164-1167.
- [13] 刘庆奎, 秦子惠, 张小利, 等. 中国玉米灰斑病原菌的鉴定及其基本特征研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 4044-4057.
- [14] 邹锋康, 丁广洲, 贾海伦, 等. 甜菜褐斑病及种质资源抗性研究进展[J]. 中国糖料, 2019, 41(4): 63-69.
- [15] 刘可杰, 徐 婧, 胡 兰, 等. 引起玉米灰斑病的 2 种尾孢菌生物学特性比较[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(3): 342-346.