

## 保护性耕作对大豆生长发育及土壤微生物多样性影响

向新华<sup>1,2</sup>, 魏巍<sup>1</sup>, 张兴义<sup>1</sup>, 许艳丽<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/黑土区农业生态国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**明确保护性耕作对作物生长发育和土壤微生物群落的影响对于土壤管理具有重要意义。在中国科学院海伦长期定位区设置了免耕(NR)、少耕(RT)和旋松(ROT)3个耕作处理,研究了保护性耕作下大豆生长发育和产量情况,同时采用荧光定量PCR(Real-time PCR)和变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法分析了土壤微生物多样性变化。研究结果显示:在苗期免耕和少耕对大豆生长具有一定的抑制作用,同时加重根腐病病害,但在成熟期免耕和少耕大豆生长优势明显,产量显著增加,其中少耕最高,比旋松增产3.9%,达到2 507.3 kg·hm<sup>-2</sup>。3种耕作方式对土壤细菌数量影响不大,真菌数量是免耕>少耕>旋松( $P<0.05$ ),其中免耕菌落数(CFU)和基因组DNA质量分别比旋松增加31.9%和13.3%,旋松和少耕的细菌/真菌比值要明显高于免耕。DGGE电泳分析表明,免耕和少耕对土壤细菌多样性增加不明显,但可以显著提高真菌多样性。主成分分析得出少耕和旋松细菌群落具有较高的相似性,而真菌群落结构3种耕作方式差异明显。

**关键词:**保护性耕作;免耕;少耕;大豆;生长发育;微生物群落

中图分类号:S565.1;S154.3

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)03-0321-08

## Effect of Conservation Tillage Systems on Soybean Growth and Soil Microbial Diversity

XIANG Xin-hua<sup>1,2</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>, ZHANG Xing-yi<sup>1</sup>, XU Yan-li<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; 2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The effect of conservation tillage on crop growth and soil microbial community play an important role in soil management. A long-term tillage experiment was conducted at Hailun Agro-Ecological Experiment Station of the Chinese Academy of Sciences. Tillage systems included no-tillage (NT), reduced tillage (RT) and rotary tillage (ROT). The study was to determine soybean growth and yield under conservation tillage, and analyze soil microbial diversity with Real-time QPCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). NT and RT inhibited soybean growth and increased the disease severity of root rot at seedling stage. Soybean growth and yield was significantly increased under NT and RT compared with ROT at maturing stage. The highest yield of 2 507.3 kg·ha<sup>-1</sup> was obtained under RT, which was increased by 3.9% compared with ROT. The three tillage systems had no significant effect on the amount of bacteria, and the amount of fungi was NT > RT > ROT ( $P<0.05$ ). The colony forming units (CFU) and the genomic DNA quality of soil fungi were increased by 31.9% and 13.3% under NT compared with ROT, respectively. The ratio of bacteria and fungi was increased significantly under RT and ROT. DGGE fingerprint showed that the soil bacterial diversity had no significant difference under three tillage systems, however, NT and RT increased soil fungal diversity. Principal component analysis (PCA) of DGGE banding patterns indicated that the bacterial community structure had a higher similarity under RT and ROT, and significant differences were observed on the fungal community structure under three tillage systems.

**Key words:** Conservation tillage; No-tillage; Reduced tillage; Soybean; Growth; Microbial community

保护性耕作(conservation tillage, CT)是在保护环境、提高环境质量的前提下,实行免耕和少耕、秸秆覆盖的一种农田管理方式<sup>[1]</sup>。其优点是能够减少风蚀和水蚀,缓解土壤侵蚀,有效利用农田水分,增强土壤肥力和抗旱能力,进而提高作物产量,降低生产成本<sup>[2]</sup>。此外秸秆覆盖还可增加有机物料还田量,提高土壤有机质含量,改善土壤物理、化学及生物性状,促进团聚体的形成,提高土壤持水性

和透气性,从而增加微生物活性、多样性和生物质量保持力,最终改善土壤质量和生态环境<sup>[3,4]</sup>,进而改善作物的生长环境从而直接、间接促进作物生长发育。保护性耕作的效益也通过作物的生长发育过程最终在产量上得到体现<sup>[5]</sup>。

东北黑土区是世界上仅有的三大块黑土带之一,因其质地疏松、土质肥沃、有机质含量丰富,而成为我国重要的商品粮生产基地,但由于长期的掠

收稿日期:2013-01-13

基金项目:中国科学院知识创新工程(KZCX02-YW-408-3)。

第一作者简介:向新华(1987-),男,在读硕士,主要从事土壤微生物研究。E-mail:xxh19870618@163.com。

通讯作者:许艳丽(1958-),女,研究员,博士生导师,主要从事作物病虫害发生、生物生态控制和土壤微生态研究。

E-mail:xyll@neigae.hrb.ac.cn。

夺式经营和不合理的耕作制度使黑土严重退化<sup>[6-7]</sup>。因此我国也开展了大量的保护性耕作研究,但主要集中在土壤有机质成分、物理性质、水热保持、防止土壤侵蚀等土壤理化性质研究,对土壤微生物研究还相对较少,特别微生物多样性更鲜有报道<sup>[8-9]</sup>。土壤微生物是土壤有机质的活性库,在土壤有机质的分解和养分循环中起重要作用,是反映土壤微生物活性的直接指标<sup>[10]</sup>。通常土壤微生物对耕作方式和作物覆盖较为敏感,在土壤有机质发生变化之前就能检测到微生物量的变化,因而对土壤环境质量的预测和评价有着至关重要的意义<sup>[11]</sup>。传统平板计数,其可培养微生物只占环境样品中的极少部分(0.1%~1.0%),不能真实反应微生物数量和群落结构。实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术作为一种免培养的核酸定量手段,以其高灵敏性、高特异性、高精度度、实时性、污染少等优点,在微生物生态学中逐渐得到广泛的应用<sup>[12]</sup>。变性梯度凝胶电泳(DGGE)是DNA指纹分析法的一种,其可以对土壤样品中微生物群落的总体组成结构、具体成员的分类地位及相互之间的亲缘关系、种群动态变化进行分析。结合该两种方法分析较传统培养法可提供更多、更全面、更准确的信息<sup>[13]</sup>。因此,现采用 Real-time PCR 结合 PCR-DGGE 技术,对黑土区保护性耕作下大豆田土壤微生物多样性以及作物生长发育进行分析,明确保护性耕作对农田作物生态和土壤微生态的影响,旨在为建立合理的黑土耕作制度和实现土地可持续利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

试验设在中国科学院海伦农业生态试验站耕作定位试验区,位于黑龙江省海伦市(47°26'N, 126°38'E)。土壤类型为中厚层黑土,是在第四纪形成的黄土状母质上发育起来的地带性土壤,土壤质地比较粘,渗透能力弱,毛管水运移速率较慢,土壤持水能力和保水能力较强,储水库容较大<sup>[14]</sup>。定位试验从2003年开始,设置了旋松耕作(rotary tillage,秋季收获后用旋松机旋松起垄)为对照、少耕(reduced tillage,夏季垄沟深松,收获后留茬越冬)和免耕(no tillage,秋收后秸秆粉碎覆盖,免耕播种,不进行任何耕翻)3种耕作方式,作物轮作方式为玉米-大豆-玉米-大豆。每个处理3次重复,2012年种植大豆<sup>[8]</sup>。

于2012年6月7日(大豆苗期,VE)进行土壤采样,用土钻按5点取样法进行土样采集,去除0~

5 cm 表土,采集非根际5~20 cm 土壤样品,混合均匀后用无菌封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室,新鲜土样过2 mm 土壤筛,于4℃保存备用。

### 1.2 测定项目与方法

1.2.1 大豆苗期生长发育指标调查 大豆幼苗和考种采样,每个处理连续采10株,3次重复,测定大豆株高、根长、地上部干重和地下部干重(105℃烘箱中杀青30 min 后降温至70~80℃烘干至恒重)、结荚数以及百粒重,同时调查根腐病发病程度,记录发病级别,计算病情指数<sup>[15]</sup>。成熟时每小区采3个点,每点2 m<sup>2</sup>进行产量测定。

1.2.2 土壤细菌和真菌分离计数 土壤细菌和真菌的计数,分别使用牛肉膏蛋白胨培养基和孟加拉红培养基进行传统平板培养。

1.2.3 土壤细菌和真菌 Real-time PCR 定量检测 土壤微生物 DNA 提取采用美国 Omega 公司的 Soil DNA Kit,称0.5 g 土壤样品进行提取。用体积分数为0.8%的琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量。

细菌和真菌群落 Real-time PCR 应用经形态学鉴定及单胞分离得到的荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)和尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)的基因组 DNA 作为标准品(由实验室保存,荧光假单胞杆菌和尖镰孢菌基因组 DNA 浓度分别为94.5和28.4 ng·μL<sup>-1</sup>)。细菌定量采用引物 Eub338(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 Eub518(5'-AT-TACCGCGGCTGCTGG-3'),真菌定量引物采用 5.8S(5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3')和 ITS1F(5'-CTTG-GTCATTTAGAGGAAGTAA-3'),引物订自大连宝生物工程公司,下同<sup>[16]</sup>。细菌和真菌的 Real-time PCR 反应体系均为20 μL,应用大连宝生物工程公司的 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒进行扩增。PCR 反应条件也同为95℃预变性5 s;然后94℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸30 s,并收集荧光信号,40个循环;72℃5 min。熔点曲线分析温度设为65~95℃,每隔0.2℃收集荧光信号1 s<sup>[17-18]</sup>。

1.2.4 土壤 PCR-DGGE 分析 以提取土壤 DNA 模板,采用2轮 PCR。细菌2次 PCR 引物均为16S rDNA V3 区的通用引物对 F357-GC(5'-CCTACGG-GAGGCAGCAG-3')和 R518 进行 PCR(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')扩增<sup>[19]</sup>,扩增片段长度约为230 bp。真菌第一轮 PCR 引物为 ITS1(5'-CTTG-GTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS4(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'),以第一轮 PCR 产物为模板,第二轮 PCR 引物为 GC-ITS1f(5'-AICCAT-TCAATCGGTAIT-3')和 ITS2(5'-GCTGCGTTCT-

TCATCGATGC-3')<sup>[20-21]</sup>。细菌和真菌所有 PCR 反应体系均为:10 × PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL; 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>的 dNTP 为 2 μL;两条引物使用浓度 100 μmol·L<sup>-1</sup>,各 0.125 μL;Taq DNA 聚合酶 0.5 U;模板 DNA 1 μL;最后补加灭菌去离子水至 25 μL。细菌反应程序均为:94℃ 预变性 3 min,前 15 个循环为 94℃ 1 min,65℃ 1 min,72℃ 1 min,后 20 个循环为 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,最后在 72℃ 延伸 10 min。真菌反应程序均为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环,最后在 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

DGGE 在变性梯度凝胶电泳仪上进行(Bio-Rad, CA, USA),丙烯酰胺凝胶强度为 8%,细菌变性剂梯度为 30%~70%,真菌变性剂梯度为 40%~60%,凝胶板制作好后,组装放入含有 1 × TAE 的电泳槽中,预热到 60℃时,加样。每孔加入 20 μL 的 PCR 产物并加入 10 μL 2 × Loading Dye 混匀,加样完成后,接通电泳电源,细菌在 90 V、60℃条件下电泳 14 h,真菌在 75 V、60℃条件下电泳 17 h。电泳结束后,将凝胶置于 Genefinder DNA 染色液中染色 30 min;将染色后的凝胶用 GelDoc 凝胶成像系统拍照。

1.3 数据分析方法

Real-time PCR 数据采用 MJ Opticon Monitor TM 3.1 实时荧光定量分析软件进行分析;DGGE 电泳条带灰度数据,采用 Quantity One(Version 4.5)分析软件(Bio-Rad)进行分析;Shannon-Wiener index(H)计算方法采用罗海峰等的方法<sup>[22]</sup>。所得数据经 Microsoft Excel 2003 进行处理,采用 SPSS 19.0 统计软件进行差异显著性和主成分分析。

2 结果与分析

2.1 大豆生长发育

2.1.1 大豆苗期生长发育及根腐病 3 种耕作方式下,大豆株高、根长以及地下干重都是旋松处理明显大于免耕和少耕处理( $P < 0.05$ ),而免耕和少耕处理之间差异不显著;地上干重表现为旋松 > 少耕 > 免耕,且处理间差异显著( $P < 0.05$ ),其中旋松比免耕处理增加 108%,比少耕处理增加 68%;而根腐病病情指数免耕和少耕处理明显比旋松严重,但发病指数都不高,没有对大豆造成严重危害(表 1)。由此说明在大豆苗期,免耕和少耕对大豆生长发育具有严重的影响,导致地上地下部分矮化、弱化,有机物积累减少,而根腐病有加重的趋势。

表 1 保护性耕作对大豆生长发育及根腐病影响  
Table 1 Conservative tillage system on soybean growth and root rot disease

处理 Treatment	根长 Root length/cm	株高 Plant height/cm	地上干重/株 Dry shoot weight per plant/g	地下干重/株 Dry root weight per plant/g	病情指数 Disease index
免耕 NT	8.4 ± 1.0 b	11.9 ± 2.2 b	0.64 ± 0.13 c	0.20 ± 0.03 b	48 ± 19 a
少耕 RT	8.4 ± 1.2 b	12.2 ± 1.9 b	0.79 ± 0.11 b	0.23 ± 0.02 b	34 ± 13 ab
旋松 ROT	10.4 ± 0.9 a	14.8 ± 1.6 a	1.33 ± 0.17 a	0.30 ± 0.06 a	26 ± 10 b

同列数值后不同小写字母表示差异显著水平( $P \leq 0.05$ ),下同。

NT; no-tillage; RT; reduced tillage; ROT; rotary tillage. Values within a column followed by different letters are significantly different at 0.05 probability level. The same below.

2.1.2 大豆产量性状及产量 测产和考种结果(表 2)显示,大豆株高、有效荚数、单株粒数以及产量都是免耕和少耕处理都较为接近,但明显大于旋松处理,而百粒重三者差异不大。免耕和少耕处理的株高明显大于旋松处理( $P < 0.05$ ),有效荚数比旋

松处理都增加 8.3%,单株粒数分别增加 14.3% 和 8.3%。而产量则是少耕处理最高,达到 2 507.3 kg·hm<sup>-2</sup>,分别比免耕和旋松处理增产 2.0% 和 3.9%。由此可以看出,免耕、少耕可以明显促进大豆产量性状的发育生长,并未引起大豆产量降低。

表 2 保护性耕作对大豆产量性状及产量的影响  
Table 2 Conservative tillage system on soybean yield components and yield

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	有效荚数 Pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	产量 Yield/kg·hm <sup>-2</sup>	百粒重 100-seed weight/g
免耕 NT	73.1 ± 2.7 a	39 ± 2.7 a	96 ± 10.7 a	2458.9 ± 361.0 a	15.1 ± 0.9 a
少耕 RT	73.4 ± 1.5 a	39 ± 1.8 a	91 ± 5.9 a	2507.3 ± 292.6 a	14.7 ± 0.3 a
旋松 ROT	68.5 ± 1.4 b	36 ± 3.8 a	84 ± 9.1 a	2413.7 ± 287.6 a	15.0 ± 0.5 a

## 2.2 大豆苗期土壤微生物群落数量

土壤微生物数量分析结果见表3。平板计数法显示,免耕处理土壤细菌 CFU(平板菌落数量)数,稍高于少耕和旋松处理,但差异不明显( $P>0.05$ )。Real-time PCR 方法分析表明少耕处理土壤细菌基因组 DNA 质量要高于免耕和旋松处理,而其差异性同样不显著( $P>0.05$ )。说明两种保护性耕作与传统旋松耕作对土壤细菌种群密度影响不明显。然而土壤真菌 CFU 数差异明显( $P<0.05$ ),其中免耕和少耕两种保护性耕作分别比旋松增加 32% 和 12%。同时 Real-time PCR 分析表明,土壤基因组 DNA 质量免耕和少耕处理都略高于旋松处理,但 3 种耕作方式之间差异不明显( $P>0.05$ )。虽然平板计数法与 Real-time PCR 检测结果有一定差异,但都有一个共同的趋势:两种保护性耕作都能明显增加土

壤真菌种群密度。可能是由于秸秆覆盖,土壤中有有机质和水分含量增加,土表水分蒸发减少,从而更有利于土壤中的真菌生长<sup>[23]</sup>。

土壤细菌总数免耕处理最高,达到  $2.71 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ ,是真菌 CFU 数的 120 倍;荧光定量 PCR 分析也可以看出,少耕处理细菌 DNA 含量最大,每克土壤样品达到 504 ng,是其真菌 DNA 质量的 1.93 倍。无论传统还是分子方法分析都可以看出,土壤中细菌的数量远远大于真菌,其丰富度也较高。土壤细菌与真菌比值可以反应土壤的健康程度<sup>[24]</sup>,旋松耕作方式下土壤细菌/真菌比值高于免耕和少耕处理,其中 CFU 的比值增加较为明显,其旋松比免耕处理高 21.8%。表明土壤旋松有利于增加细菌/真菌的比值,从而改善土壤健康,有效抑制有害微生物生长。

表3 保护性耕作对土壤微生物数量的影响

Table 3 Conservative tillage system on microorganism amount in soil

处理 Treatment	细菌 Bacteria		真菌 Fungi		细菌真菌比率 The ratio of bacteria to fungi	
	CFU $/ \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	基因组 DNA Genomic DNA $/ \times 10^2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$	CFU $/ \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	基因组 DNA Genomic DNA $/ \times 10^2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$	CFU 比率 Ratio of CFU	DNA 比率 Ratio of genomic DNA
免耕 NT	$2.71 \pm 0.21 \text{ a}$	$4.66 \pm 0.18 \text{ a}$	$2.28 \pm 0.09 \text{ a}$	$2.82 \pm 0.58 \text{ a}$	$119.2 \pm 4.5 \text{ b}$	$1.7 \pm 0.3 \text{ a}$
少耕 RT	$2.54 \pm 0.11 \text{ a}$	$5.04 \pm 1.18 \text{ a}$	$1.94 \pm 0.014 \text{ b}$	$2.59 \pm 0.45 \text{ a}$	$131.1 \pm 3.9 \text{ ab}$	$1.9 \pm 0.2 \text{ a}$
旋松 ROT	$2.51 \pm 0.59 \text{ a}$	$4.61 \pm 0.41 \text{ a}$	$1.73 \pm 0.05 \text{ c}$	$2.49 \pm 0.07 \text{ a}$	$145.0 \pm 13.5 \text{ a}$	$1.9 \pm 0.1 \text{ a}$

## 2.3 土壤细菌群落多样性

2.3.1 细菌群落 DGGE 图谱及多样性 由图1可知,细菌 DGGE 图谱条带较为密集,且多数条带之间亮度差异不大,表明土壤中细菌优势种群种类较多,且彼此相对数量较为均衡。其次不同耕作处理间细菌 DGGE 图谱具有很强的相似性,很多条带为共有性有带,说明这些条带所代表的细菌很稳定,受耕作方式影响较小。但有些在同一位置条带,不同处理间亮度差异明显,表明其菌落数量差异较大。

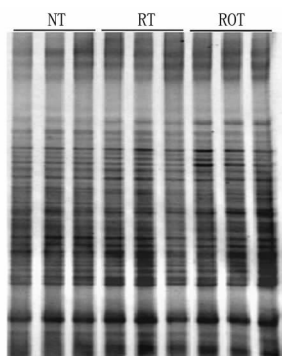


图1 不同耕作方式下细菌 16S rDNA 片段 DGGE 结果

Fig. 1 DGGE profile of bacteria 16S rDNA fragment in different tillage systems

对比 3 种耕作方式的细菌 DGGE 图谱可以发现(表4),3 种耕作方式下细菌 DGGE 的条带数和 Shannon 多样性指数都差异不明显( $P>0.05$ ),DGGE 条带数免耕处理略高于少耕和旋松处理,少耕与旋松处理几乎无差异。而 Shannon 多样性指数则表现为免耕>少耕>旋松,其中免耕处理相对最高,但与少耕和旋松处理差异不明显( $P>0.05$ )。因此,耕作方式对土壤细菌多样性影响较小。

表4 不同耕作方式大豆苗期细菌 DGGE

图谱条带数和 Shannon 多样性

Table 4 DGGE bands number and Shannon index of bacteria communities in different tillage systems

处理 Treatment	条带数 Bands number	多样性指数 Shannon index
免耕 NT	$30.3 \pm 0.6 \text{ a}$	$3.39 \pm 0.02 \text{ a}$
少耕 RT	$28.7 \pm 2.3 \text{ a}$	$3.30 \pm 0.09 \text{ a}$
旋松 ROT	$28.3 \pm 1.2 \text{ a}$	$3.33 \pm 0.05 \text{ a}$

2.3.2 细菌群落 DGGE 图谱主成份分析 由图2可知,不同耕作方式下土壤细菌结构存在明显差异。PCA 图将整个细菌群落分为两个集团,其中少耕和旋松处理聚为一个集团,位于第一和第四象

限,表明少耕和旋松处理土壤细菌群落相似度较高。而免耕处理位于第三象限,与少耕和旋松处理差异较为显著,说明免耕相对于少耕和旋松细菌菌落明显不同,差异性较大。

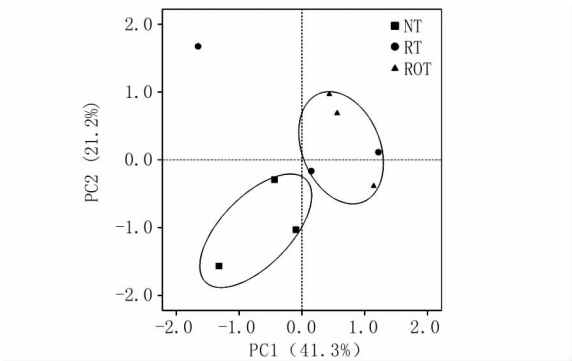


图2 不同耕作下细菌群落 DGGE 主成分分析图谱  
Fig.2 Principal component analysis on change of bacteria diversity in different tillage systems

2.4 土壤真菌群落多样性

2.4.1 真菌群落 DGGE 图谱及多样性 与细菌菌落结构不同,真菌 DGGE 条带数量明显减少(图3),代表真菌种类较少,且每个泳道只有少数条带特别亮,为土壤中真菌优势菌落,表明其优势种群较少。从 DGGE 图谱来看,3 种耕作方式 DGGE 条带数目和亮度存在明显差异,每个泳道中主条带的位置差别很大,代表着不同耕作方式中真菌种类差别很大,数量上的差别较为明显,优势种不同。其中免耕和少耕处理 DGGE 条带数较多,条带相似度高,但优势条带存在较大差异,而旋松处理条带则分布较为集中,条带数目较少,具有明显的 6 个优势条带,其条带位置明显与免耕和少耕处理不同,表明其优势真菌种群也存在明显差异。

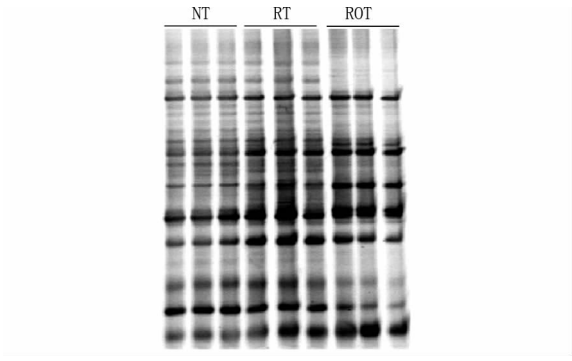


图3 不同耕作下真菌 ITS rDNA 片段 DGGE 结果  
Fig.3 DGGE profile of fungi ITS rDNA fragment in different tillage systems

应用 Shannon 指数计算 DGGE 条带丰富度(表5),发现耕作方式对土壤真菌群落多样性影响较大,旋松处理的真菌种群丰富明显低于免耕和少耕

处理( $P < 0.05$ ),仅为 3.17,而少耕和免耕处理间差异不明显。DGGE 条带数也呈现同样的趋势,免耕和少耕处理分别比旋松处理多 3 和 5 条,且都是少耕处理相对最高。

表5 不同耕作方式下大豆苗期真菌 DGGE 图谱条带数和多样性  
Table 5 DGGE band number and Shannon index of fungi communities in different tillage systems

处理 Treatment	条带数 Bands number	多样性指数 Shannon index
免耕 NT	28.3 ± 0.6 a	3.30 ± 0.01 a
少耕 RT	30.0 ± 1.7 a	3.37 ± 0.06 a
旋松 ROT	25.0 ± 1.7 b	3.17 ± 0.08 b

2.4.2 真菌群落 DGGE 条带多样性 主成分分析(图4)可以进一步揭示土壤真菌群落组成差异,两个主要成分 PC1 和 PC2 分别解释了总变量的 43.2% 和 32.4%。3 种耕作处理明显聚为 3 个集群,其中少耕和旋松处理分别位于第一和第二象限,而免耕处理位于第三、四象限交叉处,表明其真菌群落差异较大。此外免耕和少耕处理在 PC1 得分很接近,得分基本都为正值,而旋松处理得分值却为负值。说明在免耕和少耕两种保护性耕作下,土壤真菌群落构成发生明显变化。

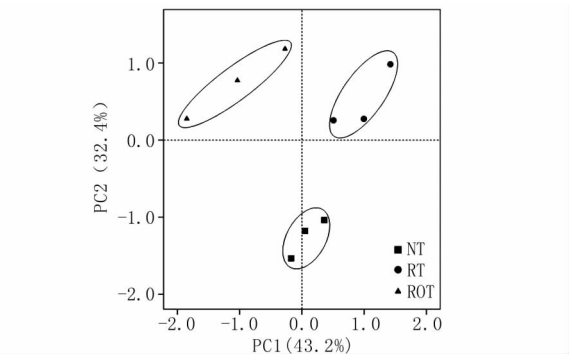


图4 不同耕作下真菌群落 DGGE 主成分分析图谱  
Fig.4 Principal component analysis on change of fungi diversity in different tillage systems

3 结论与讨论

本研究结果表明,免耕和少耕条件下,大豆苗期生长受到抑制,发育程度明显弱于旋松大豆植株,并且根腐病害有加重的趋势,但免耕和少耕田大豆产量均高于旋耕。苗期生长受抑制可能是由于免耕等保护性耕作减少土壤翻耕,杂草种子落在土表后更容易生根发芽,导致杂草生长茂盛,从而和作物激烈竞争光照和养分<sup>[25]</sup>。大豆根系生长较弱,可能是由于免耕和少耕土壤耕层具有较高紧实

度,从而对植物根系生长发育产生一定影响<sup>[26]</sup>。长期免耕可以导致土传病害的加重,有报道在长期免耕的土壤中,镰孢菌种类和数量明显增加<sup>[27]</sup>,而在我国东北地区镰孢菌是大豆根腐病重要的病原菌<sup>[28]</sup>,从而免耕可加剧根腐病的发生,进而影响大豆根系健康。在苗期,保护性耕作大豆生长态势较弱<sup>[29]</sup>,但随着生育期的推进,杂草的生长逐渐被抑制,对大豆发育影响减弱<sup>[30]</sup>。此外保护性耕作有秸秆覆盖,土壤有机质含量和土壤肥力高,土壤持水性好,因此在成熟期保护性耕作大豆生长态势明显好于传统旋松处理,大豆产量也明显增加<sup>[31]</sup>。免耕还可减少耕作成本,作物的秸秆增加有机肥施入,并增加土壤保水保肥性,因此,免耕可以提高综合经济效益。

本研究结果显示免耕和少耕方式没有明显增加土壤细菌数量,而能显著提高土壤中真菌数量,土壤适量耕作能提高细菌/真菌的比值,改善土壤健康。虽然保护性耕作秸秆覆盖增加土壤有机质含量,提高土壤肥力,保持土壤水分,更有利于微生物繁殖。但同时由于免耕方式下,土壤长期的缺少翻动,紧实度增加,通气性不佳,也使微生物的繁殖受到一定抑制<sup>[32]</sup>。免耕条件下真菌数量明显增加,这可能是由于秸秆覆盖地表使土壤表层温度较传统耕作低,而真菌在低温环境中的适应性要比细菌强<sup>[33]</sup>;其次免耕土壤中,真菌菌丝可能不会像在传统耕作中那样被切断,而是保留下来形成一个网状结构,真菌可以通过该网状结构进行养分转移和通气,有利于真菌的生长<sup>[34]</sup>。

本研究发现免耕和少耕方式对土壤细菌多样性无明显影响,而显著提高了真菌多样性。通过主成分分析可知少耕和旋松细菌群落具有较高的相似性,3种耕作方式下真菌群落结构存在明显差异。可能是因为免耕秸秆覆盖,土壤有机质和水分增加<sup>[3]</sup>,更有利于细菌繁殖。同时由于其土壤紧实度增加,通气性差,细菌生长受到抑制,所以对细菌群落数量影响不大,从而导致 Shannon 多样性差异不明显<sup>[34]</sup>。此外免耕处理中部分好氧细菌生长受到抑制,异养型细菌大量繁殖,从而使其在细菌群落组成上发生明显变化<sup>[35]</sup>。保护性耕作措施可以改变土壤的微生态环境,进而影响土壤微生物群落的结构。Helgason 于 2010 应用 PCR-DGGE 分析加拿大 3 个不同地区草场土壤群落结构发现,免耕和传统耕作土壤细菌种群分布无明显差异,而真菌结构差异显著,免耕和传统耕作提高了真菌种群多样性<sup>[36]</sup>。Robert 等 2007 年的研究发现在 0~2 cm 土壤中,免耕加黑麦草覆盖处理的土壤含有较多的异

氧细菌和真菌,但是在 2~10 cm 的土层中的数量则显著下降,在单独免耕处理的土壤中也发现了这种趋势,说明保护性耕作能够增加表层土壤的微生物多样性,从而有利于土壤质量的提高<sup>[37]</sup>。

保护性耕作具有众多优点,能控制土壤侵蚀,改善土壤理化性质,提高土壤肥力,增加蓄水保墒能力,提高水分利用率<sup>[38]</sup>;增加土壤微生物的量,提高其多样性<sup>[39]</sup>;减少劳动量,节省时间和能源,降低生产成本,促进作物生产,提高作物产量<sup>[40]</sup>。同时随着保护性耕作大规模的开展,也相应地出现了一些问题。首先,保护性耕作早春地温回升较慢,造成春播作物播种期延迟、出苗保苗难和幼苗生长缓慢的问题<sup>[41]</sup>。其次,由于保护性耕作不翻动土壤,杂草不能掩埋,多年生杂草有增加趋势,杂草种类也发生着显著变化,同时,土传病害和害虫的发生几率提高,严重影响作物出苗率及生长发育<sup>[42]</sup>。保护性耕作也导致土壤变酸,影响钙、磷等元素的利用,对作物生长不利<sup>[43]</sup>。然而随着研究的深入,能够进一步了解保护性耕作的效应,同时也能够对保护性耕作中遇到的问题提供应对措施,从而为保护性耕作更好地实施和推广提供理论依据和技术支持。

**致谢:**感谢中国科学院海伦农田生态实验站赵权老师在试验中提供的支持和帮助。

## 参考文献

- [1] 张海林,高旺盛,陈阜,等. 保护性耕作研究现状、发展趋势及对策[J]. 中国农业大学学报,2005,10(1):16-20. (Zhang H L, Gao W S, Chen F, et al. Prospects and present situation of conservation tillage[J]. Journal of China Agricultural University, 2005, 10(1):16-20.)
- [2] Walter M, Steve T, Sue W, et al. Effect of minimum tillage and mulching on maize yield and water content of clayey and sandy soils[J]. Physics and Chemistry of the Earth, 2007, 32: 1127-1134.
- [3] 刘爽,张兴义. 保护性耕作下黑土水热动态研究[J]. 干旱地区农业研究,2010,28(6):15-22. (Liu S, Zhang X Y. Dynamics of soil water and temperature under conservational soil tillage[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2010, 28(6):15-22.)
- [4] 张彬,白震,解宏图,等. 保护性耕作对黑土微生物群落的影响[J]. 中国生态农业学报,2010,18(1):83-88. (Zhang B, Bai Z, Xie H T, et al. Effect of conservation tillage on microbial community in Chinese mollisol[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18(1):83-88.)
- [5] Lopez-Fando C, Dorado J, Pardo M T. Effects of zone-tillage in rotation with no-tillage on soil properties and crop yields in a semi-arid soil from central Spain[J]. Soil & Tillage Research, 2007, 95: 266-276.
- [6] 魏丹,杨谦,迟凤琴. 东北黑土区土壤资源现状与存在问题[J]. 黑龙江农业科学,2006(6):69-72. (Wei D, Yang Q, Chi F

- Q. The soil resource conditions and the problems in northeast black soil regions [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2006 (6): 69-72. )
- [7] 辛刚, 颜丽, 汪景宽, 等. 不同开垦年限黑土有机质变化的研究 [J]. *土壤通报*, 2002, 33 (5): 332-335. (Xin G, Yan L, Wang J K, et al. Changes of organic carbon in black soils with the different reclamation years [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2002, 33 (5): 332-335. )
- [8] Chen Y, Liu S, Li H, et al. Effects of conservation tillage on corn and soybean yield in the humid continental climate region of Northeast China [J]. *Soil & Tillage Research*, 2011, 115: 56-61.
- [9] 黄丹丹, 刘淑霞, 张晓平, 等. 保护性耕作下土壤团聚体组成及其有机碳分布特征 [J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31 (8): 1560-1565. (Huang D D, Liu S X, Zhang X P, et al. Constitute and organic carbon distribution of soil aggregates under conservation tillage [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31 (8): 1560-1565. )
- [10] Carina R A, Roberto A. Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass [J]. *Biology Fertility Soils*, 2000, 31: 157-161.
- [11] 张彬, 何红波, 白震, 等. 保护性耕作对土壤微生物特性和酶活性的影响 [J]. *土壤通报*, 2010, 41 (1): 230-236. (Zhang B, He H B, Bai Z, et al. The effects of conservation tillage on the characteristics of soil microorganisms and the activities of soil enzymes [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2010, 41 (1): 230-236. )
- [12] 张晶, 张慧文, 张成刚. 实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用 [J]. *生态学报*, 2005, 25 (6): 1445-1450. (Zhang J, Zhang H W, Zhang C G. Real-time fluorescent quantitative PCR and its application in microbial ecology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (6): 1445-1450. )
- [13] 周琳, 张骁君, 李国勋, 等. DGGE/TGGE 技术在土壤微生物分子生态学中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2006 (5): 67-71. (Zhou L, Zhang X J, Li G X, et al. The application of DGGE/TGGE techniques in molecular microbial ecology of soil [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006 (5): 67-71. )
- [14] 孟凯, 张兴义, 随跃宇, 等. 黑龙江海伦农田黑土水分特征 [J]. *土壤通报*, 2003, 34 (1): 11-14. (Meng K, Zhang X Y, Sui Y Y, et al. Black soil water characteristic in Hailun, Heilongjiang [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2003, 34 (1): 11-14. )
- [15] Kirkpatrick M T, Rupe J C, Rothrock C S. Soybean response to flooded soil conditions and the association with soil borne plant pathogenic genera [J]. *Plant Disease*, 2006, 90: 592-596.
- [16] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 4117-4120.
- [17] 顾卿, 许艳丽, 魏巍, 等. 土壤细菌群落密度实时荧光定量 PCR 检测体系的建立 [J]. *土壤与作物*, 2012, 1 (2): 117-120. (Gu Q, Xu Y L, Wei W, et al. The establishment of the Real-Time PCR system for detecting soil bacteria abundance [J]. *Soil and Crop*, 2012, 1 (2): 117-120. )
- [18] Nicolas C, Prevost B, Richard C, et al. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by Real-Time Quantitative PCR [J]. *PLOS One*, 2011, 6 (9): 1-13.
- [19] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (3): 695-700.
- [20] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2: 113-118.
- [21] Anderson I C, Parkin P I. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68: 248-253.
- [22] 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋. 乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响 [J]. *微生物学报*, 2004, 44 (4): 519-522. (Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. The impact of acetochl on the bacterial diversity in soil [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (4): 519-522. )
- [23] 高云超, 朱文珊, 陈文新. 秸秆覆盖免耕土壤真菌群落结构与生态特征研究 [J]. *生态学报*, 2001, 21 (10): 1706-1712. (Gao Y C, Zhu W S, Chen W X. Community structures of saprophytic soil microfungi in three differently cultivated field soils in the North of China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21 (10): 1706-1712. )
- [24] 周丽霞, 丁明懋. 土壤微生物学特性对土壤健康的指示作用 [J]. *生物多样性*, 2007, 15 (2): 162-171. (Zhou L X, Ding M G. Soil microbial characteristics as bioindicators of soil health [J]. *Biodiversity Science*, 2007, 15 (2): 162-171. )
- [25] 谢瑞芝, 李少昆, 李小君, 等. 中国保护性耕作研究分析: 保护性耕作与作物生产 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40 (9): 1914-1924. (Xie R Z, Li S K, Li X J, et al. The analysis of conservation tillage in China—conservation tillage and crop production: reviewing the evidence [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40 (9): 1914-1924. )
- [26] Varsa E C, Chong S K, Abolaji J O, et al. Effect of deep tillage on soil physical characteristics and corn root growth and production [J]. *Soil & Tillage Research*, 1997, 43: 219-228.
- [27] Siegrid S, Ingrid L. Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil [J]. *Plant and Soil*, 2004, 267: 13-22.
- [28] Wei W, Xu Y L, Li S, et al. Analysis of *Fusarium* populations in a soybean field under different fertilization management by real-time quantitative PCR and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2012, 94 (1): 119-126.
- [29] Meng J, Xu Y L, Li S X, et al. Soybean growth and soil microbial populations under conventional and conservational tillage systems [J]. *Journal of Crop Improvement*, 2011, 24 (4): 337-348.
- [30] 韩惠芳, 宁堂原, 李增嘉, 等. 保护性耕作和杂草管理对冬小麦农田土壤水分及有机碳的影响 [J]. *应用生态学报*, 2011, 22 (5): 1183-1188. (Han H F, Ning T Y, Li Z T, et al. Effects of conservation tillage and weed control on soil water and organic carbon contents in winter wheat field [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22 (5): 1183-1188. )
- [31] 张晓平, 李文凤, 梁爱珍, 等. 中层黑土不同耕作方式下玉米和大豆产量及经济效益分析 [J]. *中国生态农业学报*, 2008, 16 (4): 858-864. (Zhang X P, Li W F, Liang A Z, et al. Yield and profitability of corn and soybean under different tillage in the black soils of Northeast China [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2008, 16 (4): 858-864. )

斯变化不大,在黑河则随播种期延迟而逐渐缩短。说明播期对全生育期的影响主要是通过对始花期到成熟期的影响实现的。光温效应对产量性状有显著影响,后期温度的升高和日照时数的减少能增加单株荚数;后期日照时数减少和温度的增加能显著增加单株粒数;后期温度的升高能显著增加百粒重和产量。

同一地点不同播期间产量性状相比,2008 年绥化以 5 月 23 日播期的单株荚数、单株粒数和产量最高。2009 年佳木斯以 5 月 27 日播期、黑河以 5 月 11 日播期的单株荚数、单株粒数和产量最高,齐齐哈尔 2009 年 6 月 13 日播期和 2010 年 5 月 27 日播期的单株荚数、单株粒数、百粒重和产量最高。由此可看出,黑河 45 生育进程和产量性状受年际间光温变化的影响,该品种有其生长发育所需温度、降水、日照时数的适应范围及最适条件,而且这些条件是衡量其生长发育好坏的重要标准。当适应范围和适宜条件不能满足的情况下,生长发育就要受到水、热、光等生态条件的限制,导致产量性状下降甚至最终不能正常成熟等现象。与其要求的最宜条件越接近,其生长发育越趋于良好,产量越高,反之产量就越低。

## 参考文献

- [1] 韩天富,王金陵. 大豆开花后光周期反应的研究[J]. 植物学报,1995(11):863-869. ( Han T F, Wang J L. Studies on the post-flowering photoperiodic responses of soybeans[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1995(11):863-869. )
- [2] 韩天富,王金陵. 中国大豆不同生态类型开花至成熟期对光周期的反应[J]. 作物学报,1996(1):20-26. ( Han T F, Wang J L. Different ecological types of Chinese soybean blossom to maturity in response to photoperiod[J]. Acta Agronomica Sinica, 1996(1):20-26. )
- [3] 胡国华,宁海龙,王寒冬,等. 光照强度对大豆产量及品质的影响 I. 全生育期光照强度变化对大豆脂肪和蛋白质含量的影响[J]. 中国油料作物学报,2004(2):87-89. ( Hu G H, Ning H L, Wang H D, et al. Effect of photo-intensity on quality and yield of soybeans I. Effect of light-intensity on oil content and protein content of soybeans in the whole growth period[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004(2):87-89. )
- [4] Lawn R J, Byth D E. Responses of soya bean to planting date in South-Eastern Queensland. I Influence of photoperiod and temperature on phasic developmental patterns[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1937,24:67-80.
- [5] Johnson H W, Borthwich H A, Leffel R C. Effect of photoperiod and time of planting on rates of development of the soybean in various stages of the life cycle[J]. Botanical Gazette, 1960,122(2):77-95.
- [6] Chapman J. The influence of photoperiod and temperature on the pre-flowering phase length of eleven soybean cultivars in northern Natal[J]. South African Journal of Plant and Soil, 1986,3(2):61-65.
- [7] Fehr W R, Caviness C E. Stage of soybean development[M]. Iowa; Iowa State Univ. Coop. Ext. Serv. Spec. Rep. 1977,80:1-12.
- [8] 罗珠珠,黄高宝,张仁陟,等. 长期保护性耕作对黄土高原旱地土壤肥力质量的影响[J]. 中国生态农业学报,2010,18(3):458-464. ( Lou Z Z, Huang G B, Zhang R Z, et al. Effect of long-term conservation tillage on soil fertility in rain-fed areas of the Loess Plateau[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010,18(3):458-464. )
- [9] Janna P, Marie P, Erland B. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005,52:49-58.
- [10] Klein D A, Paschke M W. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology[J]. Microbial Ecology, 2004,47:224-235.
- [11] 高云超,蔡作新,朱文珊,等. 秸秆覆盖免耕对土壤氮素转化细菌区系的影响[J]. 生态科学,2003,22(2):150-152. ( Gao Y C, Cai Z X, Zhu W S, et al. Effects of straw mulch no-tillage on community composition of soil nitrogen transferous bacteria[J]. Journal of Ecological Science, 2003,22(2):150-152. )
- [12] Helgason B L, Walley F L, Germida J J. Long-term no-till management affects microbial biomass but not community composition in Canadian prairie agroecosystems[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2010,42:2192-2202.
- [13] Roberto A, Carmine C, Antonio G, et al. Functional and molecular responses of microbial communities under differing soil management practices[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004,36:1873-1883.
- [14] 杨学明,张晓平,方华军,等. 北美保护性耕作及对中国的意义[J]. 应用生态学报,2004,15(2):335-340. ( Yang X M, Zhang X P, Fang H J, et al. Conservation tillage systems in North America and their significance for China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004,15(2):335-340. )
- [15] 王芸,李增嘉,韩宾,等. 保护性耕作对土壤微生物量及活性的影响[J]. 生态学报,2007,27(8):3384-3390. ( Wang Y, Li Z J, Han B, et al. Effects of conservation tillage on soil microbial biomass and activity[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007,27(8):3384-3390. )
- [16] Mahdi M, Kaisi A, Xinhua Y. Stepwise time response of corn yield and economic return to no tillage[J]. Soil & Tillage Research, 2004,78:91-101.
- [17] 张少良,张兴义,于同艳,等. 黑土区耕作措施对春季耕层温度的影响[J]. 农业现代化研究,2009,30(1):114-117. ( Zhang S L, Zhang X Y, Yu T Y, et al. Effects of tillage on soil temperature of plough layer in spring of black soil regions of China[J]. Research of Agricultural Modernization, 2009,30(1):114-117. )
- [18] 张雪松,曹永胜,曹克强. 保护性耕作条件下河北粮食作物植物保护新问题和治理对策[J]. 植物保护,2006,32(2):19-22. ( Zhang X S, Cao Y S, Cao K Q. Management of pests on crops under the conservative farming system[J]. Plant Protection, 2006,32(2):19-22. )
- [19] 兰全美,张锡洲,李廷轩. 水旱轮作条件下免耕土壤主要理化特性研究[J]. 水土保持学报,2009,23(1):145-149. ( Lan Q M, Zhang X Z, Li T X. Study on main physicochemical properties in no-tillage soil under paddy-upland rotation[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2009,23(1):145-149. )

(上接第 327 页)