

# Biolog—ECO 解析不同大豆基因型 R1 期根际微生物群落功能多样性特征

金 剑<sup>1,2</sup>, 王光华<sup>1</sup>, 陈雪丽<sup>1</sup>, 刘晓冰<sup>1</sup>, Stephen J Herbert<sup>3</sup>

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所黑土重点实验室, 哈尔滨 150081; 2. 大豆生物学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030; 3. 美国麻省大学植物与土壤科学系, 阿姆斯特市 01003, 美国)

**摘要** 利用 Biolog—Eco 技术对 2 个不同大豆基因型 R1 期的根际和非根际微生物群落功能多样性进行研究。结果表明, 大豆根际微生物利用碳源量在整个培养过程都显著高于非根际, 根际微生物的生理活性显著地高于非根际; 不同基因型大豆对根际微生物群落功能多样性有显著影响, 高产大豆北丰 11 根际微生物总体表现较高的活性, 而且根际微生物利用碳源的类型有别于海 9731, 其利用羧酸类和多聚物相对较多, 如  $\alpha$ -丁酮酸、4-羟基苯甲酸、衣康酸、肝糖、吐温 40 和吐温 80; 而海 9731 利用氨基酸类及胺/氨类碳源较多, 如腐胺和 L-精氨酸。

**关键词** 大豆; 根际; AWCD; 微生物多样性; 黑土

**中图分类号** S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0565-06

## ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY FUNCTIONAL DIVERSITY IN RHIZOSPHERE OF DIFFERENT SOYBEAN GENOTYPES AT R1 STAGE USING BIOLOG—ECO METHOD

JIN Jian<sup>1,2</sup>, WANG Guang-hua<sup>1</sup>, CHEN Xue-li<sup>1</sup>, LIU Xiao-bing<sup>1</sup>, Stephen J Herbert<sup>3</sup>

(1. Key Lab of Black Soil, Northeast Institute of Geography and Agro-ecology, Chinese Academy of Science, Harbin 150081; 2. Key Laboratory of Soybean Biology of Ministry of Education, Harbin 150030; 3. Department of Plant and Soil Sciences, University of Massachusetts, Amherst 01003, MA, USA)

**Abstract** The microbial community functional diversity in rhizosphere and bulk soil of two soybean genotypes at R1 stage was investigated with the Biolog method. The results showed that the microbe in rhizosphere utilized more carbons during the entire incubation period, compared with bulk soil, which indicated that the metabolism activity of microbe in rhizosphere was high; soybean genotype significantly influenced the microbial community functional diversity and the microbe in rhizosphere of Beifeng 11 had relatively higher activity of metabolism than that of Hai 9731. Furthermore, the category of carbon utilized by microbial community in rhizosphere of Beifeng 11 was different from Hai 9731. Beifeng 11 preferred carboxylic acids and polymers such as  $\alpha$ -Keto butyric acid, 4-Hydroxy benzoic acid, itaconic acid, glycogen, tween 40, tween 80, while Hai 9731 preferred amino acids and amines such as putrescine and L-arginine.

收稿日期: 2007-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(40541004)和黑龙江省杰出青年基金(JC200617)

作者简介: 金 剑(1974-), 男, 副研, 博士, 主要从事黑土区作物生理生态研究。

**Key words** Soybean; Rhizosphere; AWCD; Microbial diversity; Mollisol

Biolog 是描述微生物群落功能变化的重要指标,其反应特征能代表实际土壤微生物群体底物利用的动力学特征<sup>[1,2]</sup>。Biolog 的数据也十分适合进行主成分分析及其它多元统计方法,通过分析碳源底物的利用情况,来解析微生物群落生理特征的变化,从而区分不同微生物群落产生的不同代谢多样性类型<sup>[3]</sup>。Biolog 技术广泛应用于评价土壤微生物群落的功能多样性,如比较不同土壤类型<sup>[3]</sup>、同类土壤不同植物物种<sup>[4]</sup>、不同植被根际土壤微生物群落的功能多样性<sup>[5]</sup>。然而,有关黑土区不同大豆基因型的根际微生物功能多样性的研究还未见报道。

针对 2 个不同产量类型的大豆,在植株生长代谢比较旺盛的 R1 期,进行根际微生物群落功能多样性差异研究,解析不同基因型大豆根际微生物群落功能的差异及其对碳源特异利用的情况。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆基因型 北丰 11 和海 9731。北丰 11 在黑龙江省第 3 积温区有一定的种植面积,属高产类型,而海 9731 属低产类型,且在以往的研究已对这 2 个基因型进行了产量及有关生理特性的比较<sup>[6,7]</sup>。

1.1.2 土壤 取自地处东北松嫩平原的海伦市,土壤为典型中层黑土(Mollisol),土壤有机质 47.5 g/kg、全氮 2.12 g/kg、全磷 0.872 g/kg、全钾 19.9 g/kg、碱解氮 175.0 mg/kg、有效磷 39.6 mg/kg、速效钾 185mg/kg、pH 值 7.01(v : w = 2.5 : 1)。风干后的土壤过 4 mm 筛,备用。

1.2 大豆生长条件

试验采用盆栽于 2005 年在中国科学院东北地理与农业生态所(北纬 45°41.8',东经 126°38.1')进行。随机处理,6 次重复。为放大根际效应,每个盆(直径 35 cm,高 28 cm)中装入 17 kg 比例为 4 : 1 的沙土混和物,同时均匀混入基础养分:CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 326 mg/kg、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 439 mg/kg、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 167 mg/kg、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 43 mg/kg、Fe-EDTA 9 mg/kg、ZnSO<sub>4</sub> 6 mg/kg 和 CuSO<sub>4</sub> 5 mg/kg<sup>[8]</sup>。装沙土时,每盆等距放置 3 个尼龙筛网袋(直径 10 cm,高 28 cm),其可将根际与非根际土壤隔开,大豆播种及根系生长在网袋内。尼龙网可

以防止根系穿透,而保证水分和养分在各层间自由运移。每个尼龙网袋中播种 3 粒大小均匀一致的大豆种子,出苗 5 d 后定苗至 1 株。盆放置在玻璃温室内生长,并在生长期每天向根箱补给蒸馏水,使土壤持水量保持在 70% 左右。自出苗第 2 周开始,向每盆中补充营养液 150 mL,营养液成分为 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 600 μmol/L、CaSO<sub>4</sub> 600 μmol/L、MgSO<sub>4</sub> 200 μmol/L、Na-FeEDTA 10 μmol/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5 μmol/L、MnSO<sub>4</sub> 1 μmol/L、CoSO<sub>4</sub> 0.2 μmol/L、CuSO<sub>4</sub> 0.2 μmol/L、NaMO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.03 μmol/L 和 Zn SO<sub>4</sub> 0.75 μmol/L。

1.3 土壤样品采集及 Biolog-ECO 分析

1.3.1 土壤样品采集 大豆花期(R<sub>1</sub>)进行取样,将植株地上和地下部分开。小心地拆除尼龙网袋,采用抖根法取得根际土<sup>[8]</sup>,尼龙网袋外的土为非根际土。并将根际土和非根际土立即放入-80℃的超低温冰箱中保存。

1.3.2 Biolog-ECO Biolog 技术通过分布于 96 孔中的碳源底物来分析评价土壤微生物生理代谢特征。本研究采用有 31 种碳源(表 1)的生态板(Biolog-ECO)分析微生物群落的代谢特征,即功能多样性<sup>[9,10]</sup>。ECO 板的接种液的制备采用 Classen<sup>[11]</sup>的方法。首先土壤样品在 25℃ 条件下活化 24 h,取 3 g 土放入 27 mL 的 0.85 mol/L NaCl 溶液,振荡 30 min 后,吸取 3 mL 上清,加入 27 mL NaCl 溶液,混匀后再吸取 3 mL 上清,加入 27 mL NaCl 溶液。最终的稀释比例为:1 : 1000。向 ECO 板的各孔中加入 150 μL 的稀释液,每个土样 3 次重复,将接种好的微孔板放在保湿的容器中,并放入 25℃ 的恒温培养箱中。分别于 24 h、36 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h 和 192 h 在 ELx808-Biolog 微孔板读数仪(BIO-TEK Instruments INC, USA)上进行测定,测定波长分别为 590 nm(颜色+浊度)和 750 nm(浊度)。

1.4 数据统计分析

微生物代谢活性用 590 nm 下的值减去 750 nm 下的值表示<sup>[11]</sup>,并且<0.06 和>-0.06 的值修正为 0。孔的平均颜色变化率(Average well color development, AWCD)计算方法如下<sup>[1,12]</sup>:

AWCD = Σ(C-R)/n

公式中:C 为每个碳源孔的两波段光密度差值;

R 为对照孔的光密度值;

n 为培养基碳源种类数,本研究中为 31。

主成分分析应用 SPSS (Version10.0 for Windows) 软件的 Data Reduction 程序<sup>[13]</sup>, 绘图应用 Sigma—plot 2000 软件。

2 结果与分析

2.1 根际微生物利用全部碳源的动力学特征

平均颜色变化率(AWCD)是反映土壤微生物代谢活性,即利用单一碳源的能力重要指标<sup>[1,14]</sup>。计算 31 种碳源的 AWCD 可见(图 1),随着培养时间的延长,微生物利用碳源量呈逐渐增加的趋势。大豆根际利用碳源总量在整个培养过程都显著高于非根际,说明根际微生物的生理活性显著地高于非根际。比较 2 个基因型,在 120 h 前根际 AWCD 差异并不明显,而后北丰 11 则显著地高于海 9731,说明北丰 11 根际微生物利用碳源能力强,总体表现较高的活性。

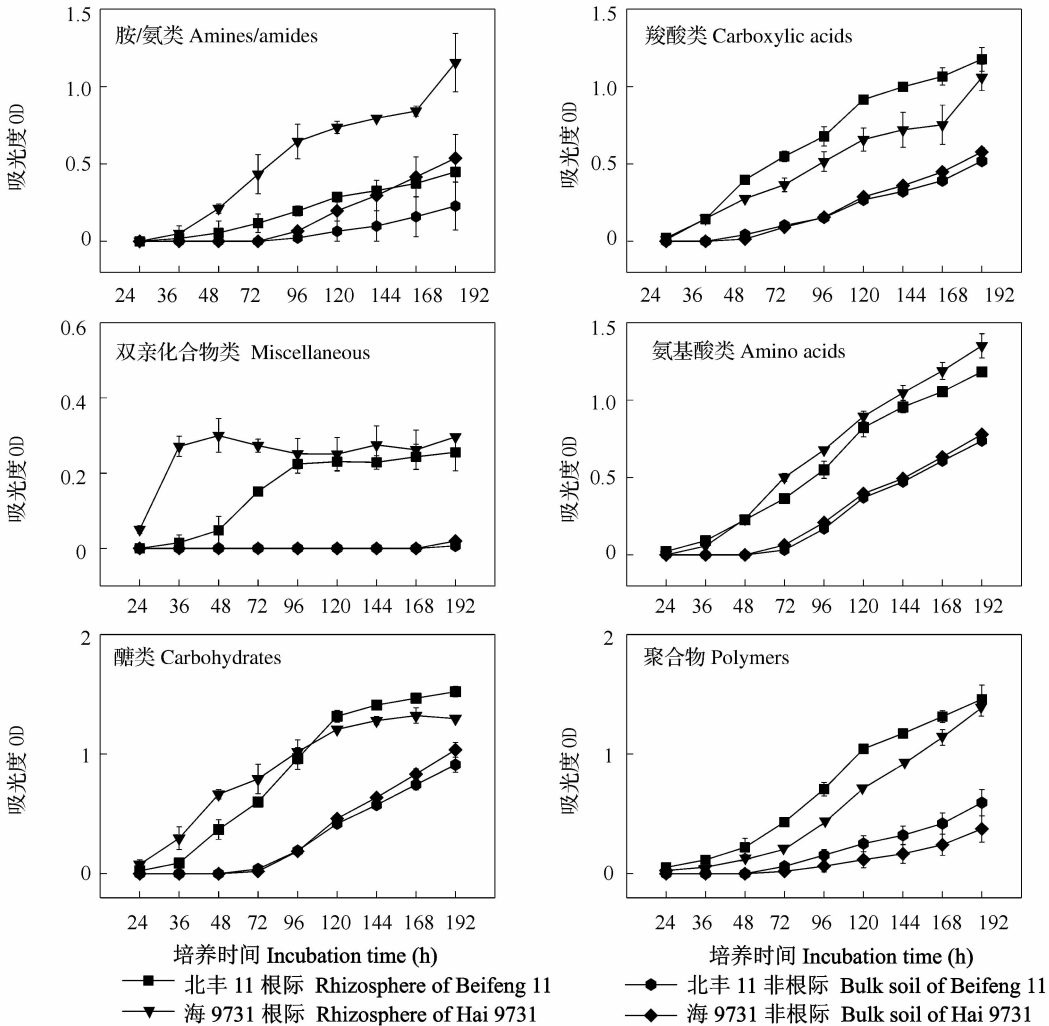


图 2 两基因型根际、非根际微生物利用不同种类碳源的平均颜色变化率(AWCD)

Fig. 2 AWCD for different carbon sources utilized by microbe in rhizosphere and bulk soil of two soybean genotypes

2.2 根际微生物利用不同种类碳源的动力学特征

按化学基团的性质对 ECO 板上的 31 种碳源分成 6 类,即胺/氨基化合物类、氨基酸类、酯类、羧酸类、双亲化合物类和聚合物,并将每类碳源的 OD 值平均。由图 2 可见,6 类碳源均呈现出随着培养时间的延长,微生物利用碳源的量逐渐增加的趋势,而且根际微生物活性高于非根际。2 基因型间在利用碳源种类上也存在较大差异,北丰 11 根际微生物利用羧酸类化合物及聚合物在培养 72 h 后都有明显的优势,对酯类的利用则表现为在培养 96 h 前,北丰 11 低于海 9731,而后高于海 9731;海 9731 对胺/氨基及氨基酸类碳源的利用高于北丰 11,对双亲类化合物的利用在培养 96 h 前明显高于北丰 11,但此后则无明显差异。

2.3 根际微生物群落功能多样性的主成分分析

不同大豆基因型根际土壤微生物群落代谢多样性经主成分分析表明(图 3),根际与非根际微生物群落有明显的分异,而且不同基因型的根际微生物群落在主成分 1 和主成分 2 的得分系数均差异显著,说明其在生理代谢上存在明显的差异,不同基因型的大豆对根际微生物群落功能有显著影响。

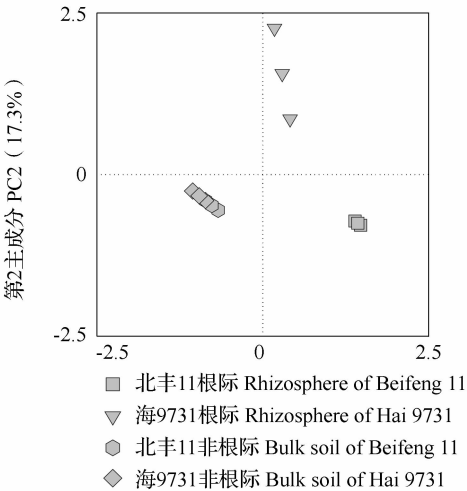


图 3 不同大豆基因型根际、非根际微生物功能多样性的主成分分析

Fig. 3 Principal analysis on microbial function diversity in rhizosphere and bulk soil of different soybean genotypes

由于第 1、2 主成分(PCA)分别占总变异的 64.7%和 17.3%,第 1 主成分是变异的主要来源。所以,从 31 种碳源在 2 个主成分上的载荷值可见(表 1),除 i-赤藓糖醇、2-羟基苯甲酸、D-半乳糖酸  $\gamma$ -内酯、D,L- $\alpha$ -磷酸甘油及丙酮酸甲酯外,其余 26 种碳源均集中在第 1 主成分上,决定了主成分 1 的分异,而影响主成

分 2 的主要碳源主要是腐胺、L-精氨酸、 $\alpha$ -丁酮酸、2-羟基苯甲酸、D-半乳糖酸  $\gamma$ -内酯、D,L- $\alpha$ -磷酸甘油和丙酮酸甲酯。综合第 1、2 主成分结果,被北丰 11 根际微生物群落特异利用的碳源有: $\alpha$ -丁酮酸、4-羟基苯甲酸、衣康酸、肝糖、吐温 40 和吐温 80;被海 9731 特异利用的碳源有:腐胺、L-精氨酸、2-羟基苯甲酸、D-半乳糖酸  $\gamma$ -内酯和 D,L- $\alpha$ -磷酸甘油。其它碳源则是共同被两基因型共同利用或均不被利用。

3 讨论

虽然 Biolog 技术与传统的培养法有相似的缺点<sup>[15,16]</sup>,都会抑制某些种群的生长,但在微孔中的微生物群落并不会被定向选择到一种,而且底物碳源的多样性决定了 Biolog 能产生广泛的选择压,从而使得不可培养的微生物种群也能在微孔板上生存,使其发生颜色反应<sup>[8]</sup>。本研究中,不同大豆基因型的根际与非根际微生物利用碳源的差异也充分说明了 Biolog 是研究微生物群落功能多样性的较理想方法之一。

植物根系之所以对土壤微生物群落有着显著的影响是因为根际环境非常有利于微生物的生存,使得微生物群落结构发生较大的改变<sup>[17~19]</sup>,本研究根际微生物群落可利用的碳源种类和量都显著高于非根际也证明了这一点。不同植物、不同基因型根际微生物区系不同<sup>[20]</sup>,而改变了的根际微生物的群落结构必然导致根际微生物生理代谢等功能特性的变化。经 AWCD 及主成分分析,北丰 11 在 R1 期根际微生物利用碳源的类型明显有别于海 9731,既其利用羧酸类和多聚物相对较多,如  $\alpha$ -丁酮酸、4-羟基苯甲酸、衣康酸、肝糖、吐温 40 和吐温 80;而海 9731 利用氨基酸类及胺/氨基碳源较多,如腐胺和 L-精氨酸。导致这种微生物群落功能变化的原因很可能与这 2 基因型所分泌的根系分泌物种类及根系脱落物成分差异有关。有研究证明,根系分泌物不仅为根际微生物提供所需的能源,而且不同根系分泌物直接影响着根际微生物的数量和种群结构<sup>[21~23]</sup>,根分泌物的多样性是根际微生物区系建立的先决条件,在一定程度上主宰着根际微生物生态演替和种群格局的变化<sup>[20]</sup>。所以,不同基因型根系分泌物的差异,及其对根际微生物群落结构和功能的特异影响还有待于深入研究。

表 1 ECO 板上 31 种碳源在第 1、2 主成分上的载荷值

Table 1 Thirty-one carbon substrates loaded on the first and second principal components in analysis of ECO microplate data

碳源化学类别 Chemical guild		底物 Substrates	分子式 Chemical formula	第 1 主成分 PC1	第 2 主成分 PC2
胺/氨基化合物类 Amines/amides	苯乙胺 Phenylethylamine		C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	-0.68 *	0.26
	腐胺 Putrescine		C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	0.59 *	0.71 *
氨基酸类 Amino acids	甘氨酸-L-谷氨酸 Glycyl-L-glutamic acid		C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.93 *	0.32
	L-精氨酸 L-Arginine		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0.73 *	0.58 *
	L-天门冬酰胺 L-Asparagine		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.90 *	0.34
	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine		C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	-0.69 *	-0.29
	L-丝氨酸 L-Serine		C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	0.84 *	0.46
	L-苏氨酸 L-Threonine		C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	-0.71 *	0.25
	α-D-乳糖 α-D-Lactose		C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	0.92 *	0.36
糖类 Carbohydrates	β-甲基-D-葡萄糖苷 β-Methyl-D-glucoside		C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0.92 *	0.26
	D-纤维二糖 D-Cellobiose		C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	0.82 *	0.56
	D-甘露醇 D-Mannitol		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0.94 *	0.33
	D-木糖/戊醛糖 D-Xylose		C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	0.89 *	0.34
	i-赤藓糖醇 i-Erythritol		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.01	-0.24
	N-乙酰-D 葡萄糖氨 N-Acetyl-D-glucosamine		C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub>	0.97 *	0.14
羧酸类 Carboxylic acids	γ-羟丁酸 γ-Hydroxy butyric acid		C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.85 *	0.31
	α-丁酮酸 α-Keto butyric acid		C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.66 *	-0.64 *
	2-羟基苯甲酸 2-Hydroxy benzoic acid		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.09	0.89 *
	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxy benzoic acid		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.86 *	-0.23
	D-半乳糖酸 γ-内酯 D-Galactonic acid γ-lactone		C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0.51	0.82 *
	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid		C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0.84 *	0.16
	D-葡糖胺酸 D-Glucosaminic acid		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>6</sub>	0.94 *	0.15
	D-苹果酸 D-Malic acid		C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	0.85 *	0.34
	衣康酸 Itaconic acid		C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.86 *	-0.45
	D,L-α-磷酸甘油 D,L-α-Glycerol phosphate		C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> P	0.090.89 *	
双亲化合物类 Miscellaneous	1-磷酸葡萄糖 Glucose-1-phosphate		C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P	0.90 *	0.42
	丙酮酸甲酯 Pyruvic acid methyl ester		C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.08	-0.85 *
聚合物 Polymers	α-环式糊精 α-Cyclodextrin		C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	0.73 *	0.51
	肝糖 Glycogen		(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	0.97 *	-0.16
	吐温 40 Tween 40		—	0.84 *	-0.21
	吐温 80 Tween 80		—	0.94 *	-0.02

\* 代表在 P< 0.05 水平上显著 . \* Indicating significant at P< 0.05.

## 参 考 文 献

- [1] 郑华, 欧阳志云, 方志国, 等. Biolog 在土壤微生物群落功能多样性研究的应用 [J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 456—461.
- [2] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述 [J]. 土壤, 2004, 36(4): 346—350.
- [3] Ritz K., Dighton J., Giller K. E. Beyond the Biomass: Compositional and functional analysis of soil microbial communities [M]. John Wiley & Sons, Chichester, U. K., 1994.
- [4] Zak C. J. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach [J]. Soil Biology. Biochemistry. 1994, 26: 1101—1108.
- [5] Grayston S. J., Wang S., Campbell C. D., et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1998, 30: 369—378.
- [6] Liu X. B., Jin J., Herbert S. J., et al. Yield components, dry matter, LAI and LAD of soybeans in Northeast China [J]. Field Crop Research, 2005, 93: 85—93.
- [7] 金剑, 王光华, 刘晓冰, 等. 利用根箱法解析大豆苗期氮磷吸收及其在根际分布的特征 [J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 281—285.
- [8] Marschner P., Neumann G., Kania A., et al. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) [J]. Plant Soil, 2002, 246: 167—174.
- [9] Mafham J. P., Boddy L., Randerson P. F. Analysis of microbial community functional diversity using sole — carbon — source utilisation profiles—a critique [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42: 1—14.
- [10] Garland J. L., Mills A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community — level sole — carbon — source utilization [J]. Applied and Environment Microbiology, 1991, 57(5): 2351—2359.
- [11] Classen A. T., Boyle S. I., Haskins K. E., et al. Community — level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44: 319—328.
- [12] Choi K., Dobbs F. C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities [J]. Journal of Microbiology Methods, 1999, 36: 203—213.
- [13] Anderson I. C., Campbell C. D., Prosser J. I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient [J]. Environment Microbiology, 2003, 5(11): 1121—1132.
- [14] Zabinski C. A., Gannon J. E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities [J]. Environmental Management, 1997, 21(2): 233—238.
- [15] Haack S. K., Garchow H., Klug M. J. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns [J]. Applied and Environment Microbiology Ecology, 1995, 61: 1458—1468.
- [16] Konopka A., Oliver L., Turco R. F. J. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 35: 103—115.
- [17] Barber D. A., Lynch J. M. Microbial growth in the Rhizosphere [J]. Soil Biology & Biochemistry 1977, 21: 773—778.
- [18] Foster R. C. Microenvironments of soil microorganism [J]. Biology Fertilizer Soils, 1988, 6: 189—203.
- [19] Lynch J. M. The Rhizosphere [M]. John Wiley & Sons, Chichester, U. K., 1990.
- [20] 朱丽霞, 章家恩, 刘文高. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述 [J]. 生态环境, 2003, 12(1): 102—105.
- [21] Bakken L. R. Microbial growth and immobilization/mineralization of N in the Rhizosphere [J]. Symbiosis, 1990, 9: 37—41.
- [22] Texier M., Billes G. The role of the rhizosphere on C and N cycles in a plant — soil system [J]. Symbiosis, 1990, 9: 117—123.
- [23] 申建波, 张福锁, 毛达如. 根际微生态系统中的碳循环 [J]. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(2): 232—240.