

徐鸿斌,王绍明,蒋静,等. 新疆栽培红花根际土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记多样性分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):364-368,441. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.123

# 新疆栽培红花根际土壤微生物群落磷脂脂肪酸生物标记多样性分析

徐鸿斌<sup>1</sup>, 王绍明<sup>1</sup>, 蒋静<sup>1</sup>, 马晓丽<sup>1</sup>, 张霞<sup>1</sup>, 于雄胜<sup>2</sup>

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003; 2. 浙江大学环境与资源学院, 浙江杭州 310029)

**摘要:**采用磷脂脂肪酸(PLFAs)生物标记法,分析相同栽培条件下5种新疆栽培红花根际土壤微生物群落结构。结果表明,红花根际土壤微生物磷脂脂肪酸生物标记丰富,共检测到48种磷脂脂肪酸,其中有32种为完全分布型生物标记,16种为不完全分布型生物标记;红花根际土壤中PLFAs含量细菌>真菌>放线菌。不同红花材料根际土壤微生物PLFAs生物标记组成结构存在差异。对红花根际土壤特征PLFAs生物标记细菌16:0、真菌18:1 $\omega$ 9c、甲烷氧化菌16:1 $\omega$ 5c和硫酸盐还原菌10Me16:0比较可知,云红5号的细菌16:0、真菌18:1 $\omega$ 9c、甲烷氧化菌16:1 $\omega$ 5c和硫酸盐还原菌10Me16:0明显低于其他4个品种红花,新红1号的细菌16:0、真菌18:1 $\omega$ 9c、甲烷氧化菌16:1 $\omega$ 5c和硫酸盐还原菌10Me16:0含量最高。放线菌10Me17:0含量,5个红花品种相近。

**关键词:**红花;根际;土壤微生物;磷脂脂肪酸(PLFAs)

**中图分类号:** S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0364-05

根际是一个由根系分泌物输入高能量而导致微生物剧烈活动的生态系统<sup>[1]</sup>。根际土壤微生物可影响土壤营养的分解、转化和植物的吸收利用,也是衡量土壤肥力和养分的重要指标<sup>[2-5]</sup>。此外,根际土壤微生物种群结构与作物产量密切相关,微生物种群结构失衡是导致药用作物发病和减产的主要原因<sup>[6-8]</sup>。诸多研究表明,根际微生物在不同植物物种间存在差异<sup>[9-11]</sup>,在同一植物物种的不同生长阶段和不同基因型间也存在差异<sup>[12-14]</sup>。探讨作物与其根际土壤微生物多样性之间的内在联系,对于了解作物品种遗传特性、土壤适应性和制定栽培管理方案具有重要参考意义<sup>[15]</sup>。国内外科研工作者对此十分重视,并发展出 BIOLOG 平板法,磷脂脂肪酸生物标记法(PLFAs)和基于 PCR 的核酸分析等研究手段。PLFAs 生物标记法根据磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)的结构多样性和生物特异性,能揭示某一类或某种特定微生物的存在及丰度,能够准确客观地反映土壤中微生物量和群落结构的差异,目前广泛应用于原位土壤微生物群落的多样性研究。

菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)是一种集药材、油料、染料和饲料为一体的特种经济作物<sup>[16]</sup>,目前全球广泛栽种,新疆是我国红花的主要产区,约占全国红花种植面积及产量的80%<sup>[17]</sup>。红花以其卓越的药用和经济价值受到国内外研究者的关注。但对于红花的研究多集中在化学成分和药理研究,近年来,对红花土壤根际微生物群落的研究逐渐增

多,陆爽研究了红花土壤微生物数量及影响因子分析,发现含水率、有机质、有效氮是决定土壤微生物群落分布的主导因子<sup>[18]</sup>;郭欢等研究了 AM 真菌对红花根围微生物多样性特性的影响,发现 AM 真菌从时间和空间上影响红花根围微生物的多样性特征<sup>[19]</sup>。

本研究采用 PLFAs 技术,以在同一试验田的5种栽培品种的红花根际土壤为研究对象,探讨相同栽培条件下,不同红花品种对根际土壤微生物区系的影响,以及红花品种与根际土壤微生物之间的内在联系。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验地概况

试验地位于新疆石河子大学试验田(40°16'58.4"N, 86°03'15.87"E),区域气候属典型大陆性干旱半干旱气候。年降水量为200~500 mm,冬季平均积雪深度20~40 cm。年平均气温4~6℃,日平均气温>10℃的年积温2 500~2 900℃,无霜期120~135 d。

### 1.2 供试材料

供试红花品种分别为新红1号、新红4号、云红5号、裕民无刺和采毛红花。

### 1.3 田间试验设计和性状调查

试验于2013年4—9月在石河子大学试验田进行。设计5个小区,每个小区5行,行距20 cm,穴距15 cm,每穴播3~5粒种子,正常大田管理。5月10日播种,5月17日出苗,7月6日初花,整个生育期灌水3次。按生育期分别在莲座期(5月28日)、伸长期(6月24日)、盛花期(7月27日)和种子成熟期(9月5日)取根际土壤,同时对每个品种随机挑选5株红花,考查株高、分枝数,花蕾数。

### 1.4 根际土壤取样方法

根际土壤取样方法采用“抖根法”:先将植物根系从土壤

收稿日期:2014

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160410);国家人力资源和社会保障部留学回国人员科技活动项目(编号:2011LX005)。

作者简介:徐鸿斌(1989—),男,浙江萧山人,硕士研究生,从事植物学研究。E-mail:stephen89@126.com。

通信作者:王绍明,教授,博士生导师。E-mail:westwild@vip.sina.com。

中挖出,抖掉与根系结合松散的土壤,将与根系紧密结合在 0~4 mm 范围的土壤用刷子搜集作为根际土壤。按“S”形随机选 5 个点采集根际土壤混合土样,取样过程中去除凋落等有机质。取回鲜土后,立即过筛,分装保存于 -80 °C 下,用于微生物脂肪酸多样性 PLFAs 研究。每个样品重复 3 次。

### 1.5 磷脂脂肪酸 (PLFAs) 检测

PLFA 的提取过程和分析参考 Frostegård 等<sup>[20]</sup> 和 Kourtev 等<sup>[21]</sup> 的方法。步骤如下:取 3 g 土壤样品于 50 mL 离心管,加入 3.2 mL 磷酸盐缓冲液、4 mL 氯仿和 8 mL 甲醇振荡,遮光下水平振荡 2 h 后 1 000 r/min 离心 15 min,在转移液加入 4.8 mL 柠檬酸缓冲液和 6 mL 氯仿,4 °C 冰箱保存,遮光静置过夜。取氯仿相氮气吹干,加入 1 mL 甲醇振荡溶解充分,氮气吹干,重复 3~4 次。氯仿溶解样品,活性硅胶柱纯化,收集甲醇相,N<sub>2</sub> 吹干,0 °C 下保存。用 1 mL 甲醇甲苯溶解磷脂,1 mL KOH 甲醇溶液 37 °C 水浴 15 min,加 2 mL 正己烷氯仿混合液,0.3 mL 1 mol/L 醋酸,2 mL 去离子水混匀,1 000 r/min 下离心 15 min 取上层有机相,N<sub>2</sub> 吹干。用正己烷溶磷脂脂肪

酸甲酯,转移到 GC 内标管,加入 20 μL 内标并上机测定。

PLFAs 的检测采用美国 MIDI 公司生产的微生物自动鉴定系统 (Sherloc Microbial Identification System Sherlock MIS4.5) 进行,包括美国 Agilent6890N 型气相色谱仪,全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器。

色谱条件为二阶程序升高柱温,170 °C 起始,5 °C/min 升至 260 °C,而后升温至 310 °C,维持 90 s;气化室温度 250 °C,检测器温度 300 °C;载气为 H<sub>2</sub> (2 mL/min),尾吹气为 N<sub>2</sub> (30 mL/min);柱前压 68.95 kPa;进样量 1 μL,进样分流比 100:1,电子轰击电离源 (EI) 到质谱检测,峰面积通过计算机自动积分。

### 1.6 数据分析

1.6.1 根际微生物种类的 PLFAs 生物标记的识别 Tunlid 等<sup>[22]</sup> 曾发现直接从土壤中提取的 PLFAs 量可以准确地表达土壤微生物的种类和生物量 (表 1)。利用 PLFAs 的种类和数量对红花材料的根际微生物群落进行分析。数据均采用单因子方差分析,所用软件为 SPSS19.0。

表 1 估算微生物生物量的磷脂脂肪酸

微生物类型	磷脂脂肪酸标记	参考文献
细菌	12:0,14:0,16:0,i19:0,20:0	[23-26]
革兰氏阳性细菌	a16:0,i16:0,a17:0,i17:0,i18:0	[23,27]
革兰氏阴性细菌	i15:0 3OH,16:1ω9c,17:1ω8c,cy17:0,i17:0 3OH	[23,28]
好氧细菌	i14:0,a14:0,i15 2OH,a15:0,i15:0	[27,29-30]
假单胞杆菌	18:1ω7	[27]
硫酸盐还原细菌	10Me16:0	[25]
甲烷氧化菌	16:1ω5c	[31]
放线菌	10Me 17:0,10Me18:0	[28-29]
纤维菌属	11Me 18:1ω7c	[24,29]
真菌	18:3ω6c(6,9,12),18:1ω9c	[32]
嗜热解氢杆菌	18:0	[24]
伯克霍尔德菌	cy19:0ω8c	[28]
原生动物	20:4ω6,9,12,15c	[33]

1.6.2 红花根际土壤微生物 PLFAs 的分布特性 以 5 种供试红花材料为指标,以检测出的 45 种 PLFAs 为样本,进行单因子方差分析,构建矩阵,以兰氏距离为聚类尺度,类平均法进行聚类分析。所用软件为 DPS 6.55。

1.6.3 PLFAs 种类和含量及特征磷脂脂肪酸生物标记在不同品种红花间的差异 用 16:0 指示细菌<sup>[20]</sup>,18:1ω9c 指示真菌<sup>[30]</sup>,10Me17:0 指示放线菌<sup>[25-26]</sup>,16:1ω5c 作为甲烷氧化菌<sup>[28]</sup>,10Me16:0 指示硫酸盐还原细菌<sup>[22]</sup> 进行单因子方差分析,所用软件为 SPSS19.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 红花品种开花期根际微生物群落 PLFA 生物标记分布特性

磷脂脂肪酸生物标记 PLFAs 检测结果表明红花根际微生物群落 PLFAs 种类丰富,含有各类饱和、不饱和、分支和环状的 PLFAs 生物标记。试验共检测出 C12~C20 共 48 种 PLFAs 生物标记 (表 2)。其中 a14:0、i14:0、a15:0、i15:0、16:1ω7c 等 PLFAs 生物标记指示耗氧细菌;a16:0、i16:0、a17:0、i17:0 等 PLFAs 生物标记指示革兰氏阳性菌;17:1ω8c、cy17:0、i17:0 3OH 等 PLFAs 生物标记指示革兰

氏阴性菌;10Me17:0、10Me18:0 等 PLFAs 生物标记指示放线菌;18:3ω6c (6,9,12)、18:1ω9c、18:1ω9c 等 PLFAs 生物标记指示真菌;20:4ω6,9,12,15c 生物标记指示原生生物。

PLFAs 生物标记在 5 个红花品种根际中的分布存在两种类型:一类为完全分布,即 PLFAs 生物标记在所有供试品种根际土壤中都分布,检测到 32 种完全分布的生物标记,包括 i14:0、i15:0、16:0、10Me16:0 等;另一类为不完全分布,即 PLFAs 生物标记只在某些红花品种根际土壤中存在,此类 PLFAs 生物标记共有 16 中,如 16:0 N alcohol、a17:1ω9c、a16:0、i19:0 等 (表 2)。

对红花根际土壤微生物 PLFAs 进行聚类分析,当兰氏距离为 5 时,将 PLFAs 可分为 3 大亚群 (图 1),亚群 I 包含 25 个完全分布的 PLFAs 标记和 16 个不完全分布 PLFAs 标记,该亚群的特点是:磷脂脂肪酸含量低,变化幅度在 0.087 6 ~ 2.664 9 nmol/g,含量最高的是 18:0,含量最低的是 a16:0;亚群 II 包含 i15:0、16:1ω7c、10Me16:0、cy19:0ω8c、18:1ω9c、18:1ω7c 共 6 个磷脂脂肪酸生物标记,该亚群特点是属于完全分布类型且分布量大;亚群 III 只含有 16:0 一个磷脂脂肪酸标记,其特征为完全分布,且分布量大。

表 2 不同红花品种开花期根际土壤微生物群落 PLFAs 标记

磷脂脂肪酸 生物标记	微生物类型	磷脂脂肪酸含量 (nmol/g)				
		新红 1 号	新红 4 号	云红 5 号	裕民无刺	采毛红花
12 : 0	细菌	0.115 1 ± 0.038 8a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
i13 : 0	细菌 G <sup>-</sup>	0.090 3 ± 0.034 2a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
i14 : 0	耗氧细菌 G <sup>+</sup>	0.417 6 ± 0.000 9a	0.236 7 ± 0.044 4b	0.226 8 ± 0.005 5b	0.255 8 ± 0.000 4b	0.420 0 ± 0.067 7a
14 : 1ω5c	放线菌	0.556 1 ± 0.010 6ab	0.439 3 ± 0.026 5a	0.546 4 ± 0.051 6ab	0.663 9 ± 0.085 0b	0.690 0 ± 0.030 7b
14 : 0	细菌 G <sup>+</sup>	0.610 5 ± 0.045 2ab	0.413 3 ± 0.072 3a	0.409 8 ± 0.014 4a	0.526 2 ± 0.074 1ab	0.643 5 ± 0.069 9b
i15 : 1G	细菌	0.356 4 ± 0.137 7a	0.166 6 ± 0.034 0a	0.214 1 ± 0.066 3a	0.229 8 ± 0.057 0a	0.333 3 ± 0.165 4a
i15 : 1I	细菌	0.289 4 ± 0.030 4a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0a
a15 : 1A	细菌	0.244 0 ± 0.020 0a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0.196 6 ± 0.026 8a
i15 : 0	耗氧细菌 G <sup>+</sup>	4.148 3 ± 0.201 9a	2.815 2 ± 0.417 1b	2.496 3 ± 0.090 0b	2.803 1 ± 0.013 3b	3.624 1 ± 0.494 2a
a15 : 0	细菌 G <sup>-</sup>	2.506 7 ± 0.099 5a	1.835 5 ± 0.223 0b	1.617 4 ± 0.109 7b	1.747 8 ± 0.046 1b	2.361 7 ± 0.151 5b
15 : 1ω6c	甲烷氧化菌	0.100 0 ± 0.044 2a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
15 : 0	细菌 G <sup>+</sup>	0.546 5 ± 0.033 1a	0.339 4 ± 0.048 3b	0.300 6 ± 0.003 6b	0.302 4 ± 0.036 6b	0.477 4 ± 0.085 4a
i16 : 1H	细菌	0.654 4 ± 0.006 3a	0.492 4 ± 0.106 9ab	0.405 8 ± 0.015 4b	0.412 9 ± 0.058 1b	0.514 2 ± 0.053 2ab
16 : 0 N alcohol	细菌 G <sup>+</sup>	0.105 4 ± 0.007 5a	0.122 4 ± 0.001 8a	0.102 7 ± 0.014 8a	0 ± 0b	0 ± 0b
i16 : 0	细菌 G <sup>+</sup>	2.014 9 ± 0.000 4a	1.629 4 ± 0.246 6ab	1.322 8 ± 0.089 9b	1.425 8 ± 0.114 7b	1.866 0 ± 0.195 7ab
a16 : 0	嗜热解氢杆菌	0.087 6 ± 0.006 3a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
16 : 1ω9c	细菌 G <sup>-</sup>	0.740 9 ± 0.032 8a	0.642 0 ± 0.015 5a	0.582 1 ± 0.064 7a	0.563 0 ± 0.048 7a	0.680 9 ± 0.076 8a
16 : 1ω7c	耗氧细菌 G <sup>+</sup>	3.852 4 ± 0.125 5a	3.160 8 ± 0.248 9a	2.770 2 ± 0.333 7a	2.981 8 ± 0.531 1a	3.699 5 ± 0.370 2a
16 : 1ω5c	甲烷氧化菌	2.625 9 ± 0.192 9b	2.126 4 ± 0.294 8ab	1.716 3 ± 0.146 2a	2.064 7 ± 0.246 3ab	2.264 4 ± 0.286 6ab
16 : 0	细菌	9.617 7 ± 0.407 8c	8.862 3 ± 0.061 4bc	6.756 4 ± 0.353 6a	8.337 1 ± 0.151 1b	9.322 0 ± 0.148 7c
i15 : 0 3OH	细菌 G <sup>+</sup>	0.214 4 ± 0.004 8a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
10 Me 16 : 0	硫酸盐还原菌	6.431 6 ± 0.075 4b	6.107 6 ± 0.139 4b	4.726 8 ± 0.521 5a	5.578 1 ± 0.191 0ab	5.877 5 ± 0.264 6b
17 : 1 ANTEISO B/i	细菌	0.513 4 ± 0.078 4a	1.112 6 ± 0.008 3a	0 ± 0a	1.136 9 ± 0.683 6a	0 ± 0a
a17 : 1ω9c	细菌 G <sup>-</sup>	0.844 1 ± 0.201 7a	0 ± 0b	0.598 3 ± 0.100 4a	0.542 2 ± 0.036 3b	0.779 4 ± 0.123 9a
i17 : 0	细菌 G <sup>+</sup>	1.577 1 ± 0.043 2a	1.351 7 ± 0.182 9ab	1.076 0 ± 0.091 7b	1.084 6 ± 0.157 1b	1.340 4 ± 0.078 2ab
a17 : 0	细菌 G <sup>+</sup>	1.549 5 ± 0.006 0a	1.295 7 ± 0.102 6a	1.135 0 ± 0.080 9b	1.155 9 ± 0.098 2b	1.360 0 ± 0.083 5ab
17 : 1ω8c	细菌 G <sup>-</sup>	0.796 1 ± 0.004 3a	0.717 4 ± 0.040 5a	0.621 3 ± 0.066 7a	0.624 2 ± 0.114 8a	0.853 4 ± 0.051 4a
cy17 : 0	细菌 G <sup>-</sup>	2.013 5 ± 0.132 7a	1.727 2 ± 0.189 6ab	1.378 6 ± 0.187 4b	1.472 5 ± 0.202 9ab	1.735 8 ± 0.129 0ab
17 : 0	节杆菌	0.628 6 ± 0.001 8a	0.488 5 ± 0.063 8b	0.397 5 ± 0.023 5b	0.398 9 ± 0.033 3b	0.533 4 ± 0.028 1ab
16 : 1 2OH	雷尔氏菌属	0.573 7 ± 0.002 2a	0.470 8 ± 0.013 7b	0.442 4 ± 0.034 1b	0.501 5 ± 0.032 7ab	0.495 0 ± 0.009 9ab
10Me 17 : 0	放线菌	0.502 2 ± 0.001 0a	0.364 4 ± 0.047 8b	0.340 5 ± 0.011 2b	0.294 0 ± 0.058 2b	0.386 0 ± 0.015 0ab
i18 : 0	细菌	0.497 8 ± 0.186 3a	0.562 6 ± 0.104 4a	0.450 4 ± 0.002 6a	0 ± 0b	0 ± 0b
18 : 3ω6c(6,9,12)	真菌	0 ± 0b	0 ± 0b	0.250 2 ± 0.012 5a	0 ± 0b	0 ± 0b
18 : 2ω6,9c	真菌	2.514 0 ± 0.051 0ab	2.015 5 ± 0.212 6ab	1.619 5 ± 0.002 3a	1.898 6 ± 0.540 6ab	2.712 0 ± 0.153 6b
18 : 1ω9c	真菌	5.541 5 ± 0.119 8a	5.209 7 ± 0.351 4a	3.964 8 ± 0.338 5b	5.200 8 ± 0.119 7a	5.566 1 ± 0.117 8a
18 : 1ω7c	假单胞杆菌	6.941 9 ± 0.103 6a	6.088 7 ± 0.437 1a	5.146 9 ± 0.831 8a	6.249 0 ± 0.252 5a	6.460 6 ± 0.423 0a
18 : 0	嗜热解氢杆菌	2.664 9 ± 0.064 8a	2.385 3 ± 0.179 4ab	2.002 7 ± 0.088 8a	2.176 1 ± 0.180 3ab	2.508 8 ± 0.140 4ab
11 Me 18 : 1ω7c	纤维菌属	0.770 2 ± 0.006 9a	0.661 3 ± 0.053 1ab	0.531 2 ± 0.069 1a	0.568 4 ± 0.088 8ab	0.697 1 ± 0.048 3ab
i17 : 0 3OH	细菌	0.725 2 ± 0.180 1a	0.721 1 ± 0.009 8a	0.682 9 ± 0.007 8a	1.067 3 ± 0.316 2a	0.751 1 ± 0.054 1a
10Me18 : 0	放线菌	1.444 7 ± 0.113 0a	1.199 6 ± 0.099 6ab	1.013 9 ± 0.011 4a	1.130 6 ± 0.016 6ab	1.245 8 ± 0.170 3ab
19 : 1ω11c	细菌	0.397 7 ± 0.003 0c	0 ± 0a	0.273 0 ± 0.002 8b	0.400 9 ± 0.047 5c	0.285 5 ± 0.020 1b
i19 : 1 I	细菌	0.152 8 ± 0.046 2a	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
i19 : 0	细菌	0.198 0 ± 0.018 2a	0.155 3 ± 0.020 3b	0 ± 0c	0 ± 0c	0 ± 0c
cy 19 : 0ω8c	伯克霍尔德菌	4.365 2 ± 0.163 5a	3.921 0 ± 0.448 1ab	2.711 6 ± 0.374 9b	3.225 4 ± 0.331 5ab	3.416 5 ± 0.273 8ab
20 : 4ω6,9,12,15c	原生动物	0.640 8 ± 0.043 0ab	0.600 0 ± 0.079 1ab	0.477 6 ± 0.047 4a	0.573 2 ± 0.069 1a	0.691 2 ± 0.227 9b
20 : 0 ISO	细菌	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0.526 9 ± 0.051 0b	0 ± 0a
20 : 1ω9c	嗜热解氢杆菌	0.729 7 ± 0.050 9a	0.533 2 ± 0.105 3ab	0.420 9 ± 0.011 8ab	0.369 6 ± 0.034 3b	0.567 8 ± 0.102 0ab
20 : 0	细菌	0.447 1 ± 0.017 4a	0.349 3 ± 0.056 7a	0.261 8 ± 0.009 0a	0.295 0 ± 0.024 8a	0.409 4 ± 0.093 3a

注:i,a,cy 和 Me 分别表示异丙基、反异丙基、环丙基和甲基分支脂肪酸;ω 后跟的数字表示出现双键的碳原子位序;c 和 t 分别表示该双键为顺式构型和反式构型。数值为平均值 ± 标准误。同一行中,数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 不同红花品种根际土壤中细菌、真菌、放线菌 PLFAs 生物标记含量比较

磷脂脂肪酸生物标记 16 : 0 指示细菌,18 : 1ω9c 指示真

菌,10Me 18 : 0 指示放线菌。这 3 类微生物在红花根际土壤中的分布特点见图 2。总体而言,指示细菌的特征磷脂脂肪酸 16 : 0 在不同品种红花根际土壤中的分布含量变化范围为

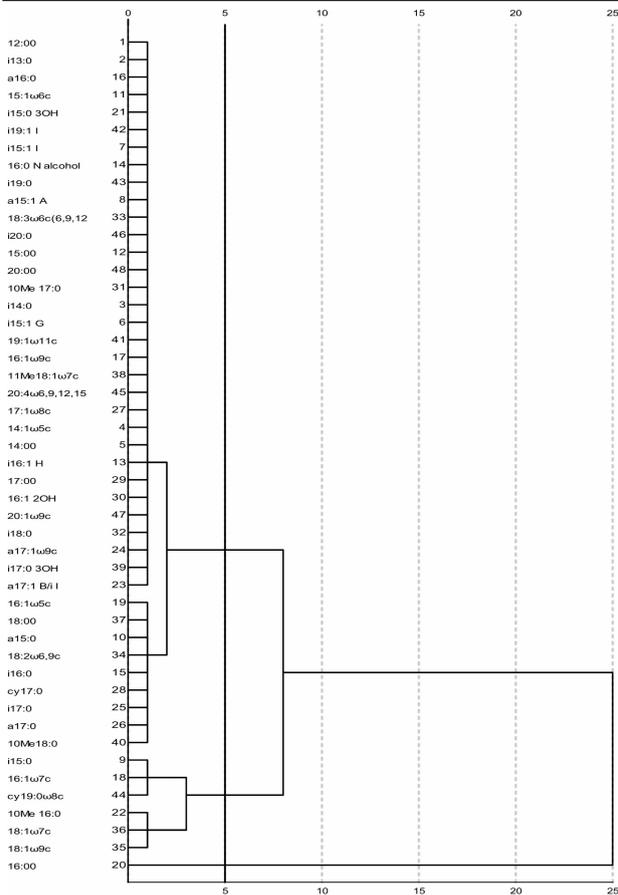


图1 红花根际土壤微生物PLFAs聚类分析

6.76 ~ 9.62 nmol/g; 指示真菌的磷脂脂肪酸 18 : 1ω9c 次之, 变化范围为 3.96 ~ 5.57 nmol/g; 指示放线菌的磷脂脂肪酸 10Me 18 : 0 含量最低, 变化范围为 1.01 ~ 1.45 nmol/g。同时由图 3 可见, 不同红花材料根际土壤微生物磷脂脂肪酸含量差异显著, 其中, 16 : 0 在新红 1 号根际土壤中含量最高, PLFAs 值为 9.62 nmol/g, 在云红 5 号中最低, PLFAs 值为 6.76 nmol/g; 18 : 1ω9c 在新红 1 号中含量最高, PLFAs 值为 5.57 nmol/g, 在云红 5 号中最低, PLFAs 值为 3.96 nmol/g; 10Me 18 : 0 在 5 个红花品种中含量相近。

### 2.3 不同红花品种根际土壤甲烷氧化菌和硫酸盐还原菌 PLFAs 生物标记比较

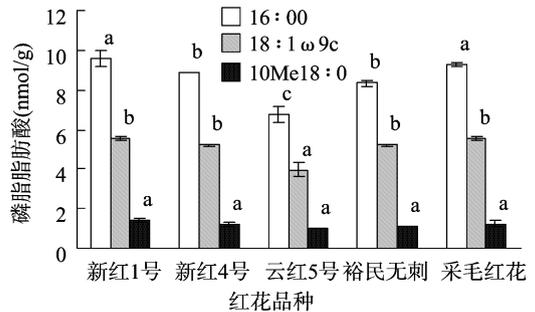


图2 不同红花品种根际土壤的特征微生物磷脂脂肪酸含量比较

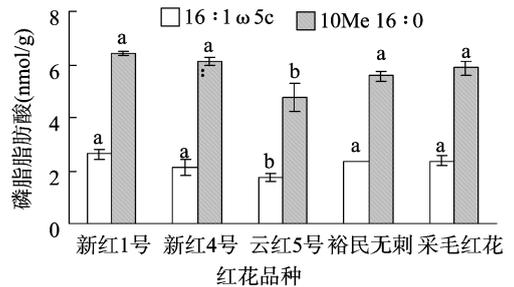


图3 不同红花根际土壤甲烷氧化菌和硫酸盐还原菌 PLFAs 生物标记含量

磷脂脂肪酸生物标记 16 : 1ω5c 指示甲烷氧化菌, 10Me16 : 0 指示硫酸盐还原菌, 它们在 5 种红花品种根际土壤中的含量比较见图 3。由图 3 可知, 10Me16 : 0 的含量高于 16 : 1ω5c 的含量, 10Me16 : 0 最高为新红 1 号, PLFAs 值为 6.43 nmol/g, 最低为云红 5 号, PLFAs 值为 4.73 nmol/g; 在 5 种红花品种中, 新红 1 号的 16 : 1ω5c 生物标记含量最高, 为 2.63 nmol/g, 含量最低的为云红 5 号, PLFAs 值为 1.72 nmol/g。

### 2.4 红花根际土壤微生物 PLFAs 生物标记的生态学指数

由表 3 可知, 不同品种红花根际土壤微生物 PLFAs 生物标记的种类和含量存在差异, PLFAs 生物标记种类的变化范围为 35 ~ 46, 含量变化范围为 54.42 ~ 73.36 nmol/g; 磷脂脂肪酸生物标记的生态学指数存在差异, 其中 Simpson 指数均大于 0.934, Shannon - Wiener 多样性指数变化范围为 3.05 ~ 3.11, 均匀度指数变化范围为 0.534 1 ~ 0.615 7。

表 3 PLFAs 生物标记、生态学指数和红花品种特性

红花品种	磷脂脂肪酸标记		微生物 PLFAs 生物标记生态学指数			红花品种特性	
	频次	总量 (nmol/g)	Simpson 指数	Shannon - Wiener 指数	均匀度指数	花蕾数(个)	株高(cm)
新红 1 号	46	73.355 9 ± 1.944 6a	0.941 8 ± 0.000 1a	3.201 5 ± 0.002 5a	0.534 1 ± 0.001 3a	7.0 ± 1.26a	74.84 ± 5.62a
新红 4 号	36	64.221 2 ± 7.057 6ab	0.933 9 ± 0.003 2b	3.055 0 ± 0.025 0b	0.589 6 ± 0.014 7b	11.4 ± 2.66a	96.56 ± 7.50bc
云红 5 号	37	60.644 3 ± 4.085 9ab	0.938 1 ± 0.002 0ab	3.115 0 ± 0.030 0ab	0.609 5 ± 0.018 2b	8.6 ± 3.51a	78.20 ± 9.50ab
裕民无刺	35	54.415 2 ± 9.628 7ab	0.933 9 ± 0.000 3b	3.050 5 ± 0.003 5b	0.603 5 ± 0.002 2b	7.6 ± 4.04a	92.20 ± 15.12abc
采毛红花	35	48.594 2 ± 3.807 7b	0.936 0 ± 0.002 1ab	3.070 0 ± 0.019 0b	0.615 7 ± 0.011 7b	11.4 ± 5.94a	102.60 ± 11.91c

注: 同列数据后不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

### 3 结论

土壤微生物与红花生长息息相关, 人们对于红花的研究多关注在其药理研究或栽培技术的探索, 对红花土壤微生物

的研究较少, 陆爽等<sup>[34]</sup>对新疆栽培红花的生长期土壤微生物群落结构研究结果表明, 微生物总数表现为伸长期 > 种子成熟期 > 莲座期 > 花期。郭欢等<sup>[35]</sup>研究了水肥处理对红花根际化学计量特征的影响, 结果表明施肥可以明显提高红花根

际微生物生物 C、N、P 含量,合理的水肥配施有利于土壤养分的提高。

本研究利用 PLFAs 法,分析新疆 5 种主栽红花品种新红 1 号、新红 4 号、云红 5 号、裕民无刺和采毛红花根际土壤微生物群落结构的差异,研究结果表明:(1)红花根际土壤微生物磷脂脂肪酸生物标记丰富,5 种红花根际土壤中存在大量完全分布型磷脂脂肪酸,同时也存在各自特有的不完全分布型种类,其中新红 1 号特有磷脂脂肪酸有 12 : 0、i13 : 0、15 : 1ω6c、a16 : 0、i19 : 0、19 : 1ω11c。Garcia - Villaraco 等<sup>[36]</sup>研究结果表明,不同基因型的拟南芥的根际微生物群落之间差异显著<sup>[24]</sup>。其他研究结果也证明不同植物种类,同种植物不同基因型,植物年龄及根际分泌物都能影响微生物种群结构。(2)根际土壤微生物磷脂脂肪酸在生态学指数:多样性(Simpson)、丰富度(Shannon)、均匀度(Evenness)等指数上无显著差异,可能原因是几种红花品种之间亲缘关系较近,其根际分泌物差异不明显。

由于微生物传统的培养方法只能得到可培养的土壤微生物信息,且仅占全部微生物不到 1% 的比例,因此本研究采用磷脂脂肪酸(PLFAs)生物标记法进行研究,与传统方法及生理学方法、分子生物学方法相比,具有以下优点:(1)PLFA 法能直接有效地从土壤中获得微生物群落信息,适合微生物群落的动态研究;(2)磷脂脂肪酸成分不受质粒损失或增加的影响,也几乎不受有机体变化影响,试验结果更加客观、可靠;(3)实验条件要求低、操作难度小,且测试功能多;(4)能定量描述环境样品汇总的微生物群体,适合用于微生物群落的总体分析。因此,该方法在微生物多样性的研究中得到越来越多的应用。尽管 PLFA 法在分析土壤环境微生物中有许多优势,但也存在不足。首先,由于并不知道土壤中所有微生物的特征脂肪酸,因此在许多情况下,土壤中存在的某种特殊脂肪酸无法与土壤中特定种类的微生物相对应,因而,磷脂脂肪酸分析方法不能对微生物在种或菌株水平上加以区分;其次,细菌和真菌能够产生大量不同类型的磷脂脂肪酸,因而生长条件的改变或环境胁迫都能导致脂肪酸类型的改变<sup>[37]</sup>。

致谢:本研究土壤磷脂脂肪酸 PLFAs 的检测在浙江大学环境与资源学院、水土资源与环境研究所实验室完成,徐建明教授和于胜雄同志等提供了实验条件并给予实验技术指导,在此表示感谢!

#### 参考文献:

[1] Lynch J M, Whipps J M. Substrate flow in the rhizosphere[J]. Plant Soil, 1990, 129: 1 - 10.

[2] 张成娥, 刘国彬, 陈小利. 坡地不同利用方式下土壤微生物和酶活性以及生物量特征[J]. 土壤通报, 1999, 30(3): 7 - 9.

[3] 罗明, 单娜娜, 文启凯, 等. 几种固沙植物根际土壤微生物特性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(6): 618 - 622.

[4] 杨海君, 肖启明, 刘安元. 土壤微生物多样性及其作用研究进展[J]. 南华大学学报: 自然科学版, 2005, 19(4): 21 - 26, 31.

[5] 张强, 魏钦平, 齐鸿雁, 等. 北京果园土壤养分和 pH 与微生物数量的相关分析及优化方案[J]. 果树学报, 2011, 28(1): 15 - 19.

[6] 刘涛, 刁治民, 祁永青, 等. 根际微生物及对植物生长效应的初步研究[J]. 青海草业, 2008, 17(4): 41 - 44, 47.

[7] 张淑香, 高子勤. 连作障碍与根际微生态研究 II. 根系分泌物与

酚酸物质[J]. 应用生态学报, 2000, 11(1): 152 - 156.

[8] 张淑香, 高子勤, 刘海玲. 连作障碍与根际微生态研究 III. 土壤酚酸物质及其生物学效应[J]. 应用生态学报, 2000, 11(5): 741 - 744.

[9] Morse C C, Yevdokimov I V, Deluca T H. In situ extraction of rhizosphere organic compounds from contrasting plant communities[J]. Comm Soil Sci Plant Anal, 2000, 31: 725 - 742.

[10] Schilling G, Gransee A, Deubel A, et al. Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere[J]. Z Pflanzenernähr Bodenk, 1998, 161: 465 - 478.

[11] Söderberg K H, Probanza A, Jumpponen A, et al. The microbial community in the rhizosphere determined by community - level physiological profiles (CLPP) and direct soil and cfu PLFA techniques[J]. Applied Soil Ecology, 2004, 25: 135 - 145.

[12] Ruiz P M, Lucas G J, Ramos B, et al. Seasonal diversity changes in alder (*Alnus glutinosa*) rhizosphere microbial communities throughout a phenological cycle[J]. Applied Soil Ecology, 2005, 29: 215 - 224.

[13] Lucas G J, Probanza A, Ramos B, et al. Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of four *Lupinus* species based on PCR-RAPDs[J]. J Plant Nutr Soil Sci, 2001, 164: 1 - 7.

[14] Swinnen J, van Veen J A. Merckx R <sup>14</sup>C pulse labelling of field grown spring wheat: an evaluation of its use in rhizosphere carbon budget estimation[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1994, 26: 161 - 170.

[15] Kandeler E, Marschner P, Tschirko D, et al. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize[J]. Plant and Soil, 2002, 238(2): 301 - 312.

[16] 赵钢, 王安虎. 红花的资源及药用价值[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 24 - 25.

[17] 王兆木. 发展新疆红花产业的思路与对策[J]. 新疆农业科学, 1998(6): 241 - 243, 249.

[18] 陆爽, 张霞, 谭勇, 等. 北疆栽培红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 土壤微生物数量及其影响因子分析[J]. 土壤通报, 2011, 42(5): 1093 - 1098.

[19] 郭欢, 曾广萍, 刘红玲, 等. 丛枝菌根真菌对红花根围微生物多样性特征的影响[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1214 - 1224.

[20] Frostegård A, Tunlid A, Baati E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 3605 - 3617.

[21] Kourtev P S, Ehrenfeld J G, Haggblom M. Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003, 35: 895 - 905.

[22] Tunlid A, Hoitink H J, Low C. Characterization of bacteria that suppress rhizoctonia damping - off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 55(6): 1367 - 1374.

[23] White D C, Davis W M, Nickels J S, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate[J]. Oecologia, 1979, 40: 51 - 62.

[24] Baath E, Anderson T H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA - based techniques[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(7): 955 - 963.

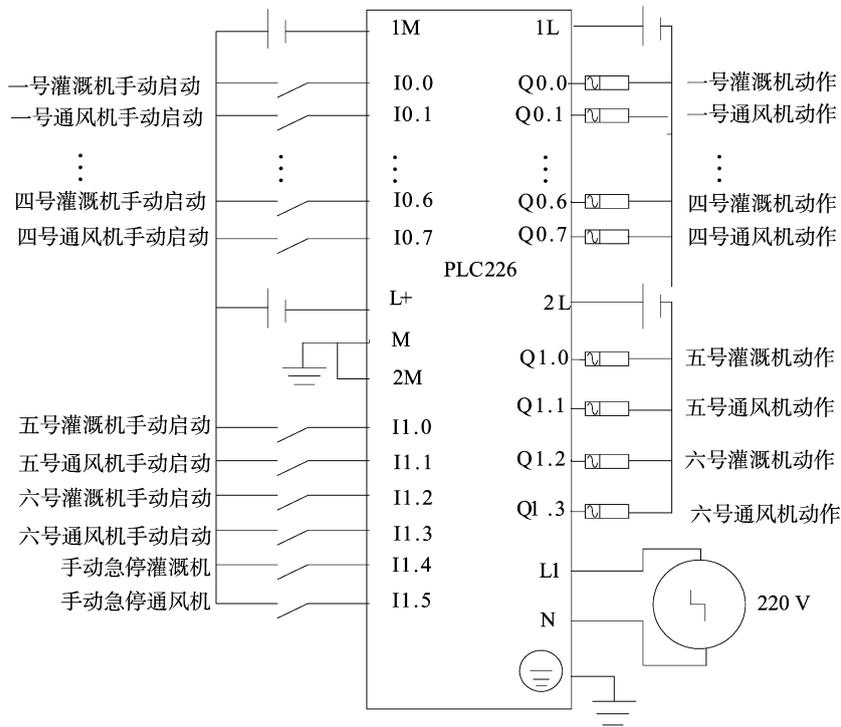


图4 外部接线端子图

(上接第368页)

- [25] Johansen A, Olsson S. Using phospholipid fatty acid technique to study short-term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Dr54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere [J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(2): 272-281.
- [26] Kimura M, Asakawa S. Comparison of community structures of microbiota at main habitats in rice field ecosystems based on phospholipid fatty acid analysis [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2006, 43(1): 20-29.
- [27] Vestal J R, White D C. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities [J]. *Bioscience*, 1989, 39: 535-541.
- [28] Frostegård A, Bååth E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil [J]. *Biol Fertil Soils*, 1996, 22: 59-65.
- [29] Joergensen R G, Potthoff M. Microbial reaction in activity, biomass, and community structure after long-term continuous mixing of a grassland soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(7): 1249-1258.
- [30] Miethling R, Wieland G, Backhaus H, et al. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 [J]. *Microbial Ecology*, 2000, 41: 43-56.
- [31] Innes L, Hobbs P J, Bardgett R D. The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40(1): 7-13.
- [32] Zelles L, Bai Y Q, Rackwitz R, et al. Determination of phospholipid and lipopolysaccharide derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structure in soils [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19: 115-123.
- [33] Yu S, He Z L, Huang C Y. Advances in their search of soil microorganisms and their mediated processes under heavy metal stress [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2003, 14: 618-622.
- [34] 陆爽, 张霞, 谭勇, 等. 栽培红花生长期土壤微生物与土壤理化因子动态 [J]. *草业科学*, 2011, 28(12): 2084-2091.
- [35] 郭欢, 刘斌, 马晓丽, 等. 不同水肥处理对红花根际化学计量特征的影响 [J]. *北方园艺*, 2013(16): 202-207.
- [36] Garcia-Villaraco V A, Probanza A, Gutierrez M F J, et al. Characterization of the rhizosphere microbial community from different *Arabidopsis thaliana* genotypes using phospholipid fatty acids (PLFA) analysis [J]. *Plant and Soil*, 2010, 329(1/2): 315-325.
- [37] Hill G T, Mikowski N A. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities [J]. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15: 25-36.