

# 黄瓜种子发芽期微生物代谢的群落特性研究

马艳,常志州\*,赵江涛,王小妹,黄红英,叶小梅,张建英

(江苏省农业科学院农业资源与环境研究所,江苏南京 210014)

**摘要:** 用 BIOLOG GN 板方法研究了 4 个黄瓜品种,在发芽 12h、36h、72h 时种子周围的微生物群落结构和功能多样性。结果表明,在微生物的碳代谢特征上,不同黄瓜品种在发芽 12h、36h、72h 时有显著差别,同一品种不同处理之间也有差异。在碳代谢类型上,糖类利用程度最高(OD > 1.4),氨基酸类利用程度最低(OD < 0.8),有机酸的利用居中;黄瓜种子发芽期间,微生物在碳源代谢方面优势群落的演变特点是:氨基酸类代谢群→有机酸类代谢群→糖类代谢群,且最终以代谢糖类的微生物为优势种群。

**关键词:** BIOLOG; 碳代谢; 黄瓜种子; 微生物群落

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2006)01-0109-06

## Studies on microbial community characteristic at germination stage of cucumber seeds

MA Yan, CHANG Zhi-zhou\*, ZHAO Jiang-tao, WANG Xiao-mei, HUANG Hong-ying, YE Xiao-mei, ZHANG Jian-ying

(Institute for Agricultural Resources and Environments of Jiangsu AAS, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Using BIOLOG method, the microbial community and functional diversity around circumference of cucumber seeds of four different cucumber species were studied during different germinating phases of 12h, 36h, and 72h. Seed were cultured in pots which were placed in light-emitted feeding box. The microorganisms around circumference of cucumber seeds were cultured in GN plate with 96 small rooms and the OD value was determined at different culture time. The results showed that characteristics of carbon metabolism were various among different cucumber species with the germinating time of 12h and 36h, so were the different treatments on the same species. Regarding the C metabolic forms, the utilization rate of saccharide was the highest (OD > 1.4), while the utilization rate of amino-acid was the lowest (OD < 0.8), and the organic acid was intermediate. During the time of seed germination, the evolvement characters of dominant microbial community in term of C source metabolism were: amino acid community → organic acid community → sugar metabolism community, which was the dormant one ultimately.

**Key words:** BIOLOG; carbon metabolism; cucumber seed; microbial community

BIOLOG 方法最早是由 Garland 和 Mills<sup>[1]</sup> 提出的,通过测试微生物对单一碳源的利用程度,来反映微生物群体水平的生理轮廓<sup>[2]</sup>,是一种简单、快速、以群落水平碳源利用类型为基础的 BIOLOG 氧化还原技术,现已广泛用于评价各种生境下微生物群落的功能多样性:不同类型的土壤<sup>[1]</sup>、生长不同植被

的土壤<sup>[3]</sup>、不同管理策略下的农业土壤<sup>[4]</sup>和不同植被的根际土壤<sup>[5]</sup>等土壤微生物群落<sup>[6-8]</sup>、水体微生物群落<sup>[9-10]</sup>、活性污泥中的微生物群落<sup>[11]</sup>等,但用于分析种子萌发期间及苗期根际微生物代谢种群及结构,国内尚未见报道。

猝倒病是黄瓜苗期的主要病害,该病害的致病

收稿日期: 2004-12-31

修改稿收到日期: 2005-05-12

基金项目: 国家 863 项目(2002AA601012-02); 江苏省自然基金项目(BK2003118); 江苏省农科院基金项目(6110546)资助。

作者简介: 马艳(1971—),女,江苏铜山人,助理研究员,博士,主要从事农业微生物与多功能肥料研究工作。\* 通讯作者  
本研究报告在数据的处理上得到南京农业大学刘向东博士和刘满强博士的大力帮助,特致感谢!

菌主要是腐霉属的瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 和终极腐霉 (*P. ultimum* trow)。腐霉主要以孢子、孢子囊或游动孢子形式从种子或植株根部侵染寄主引起发病,而孢子、孢子囊或游动孢子的萌发需要外源的营养,如种子萌发期间或根系分泌的氨基酸、碳水化合物、挥发性化合物(醛、醇)等小分子物质<sup>[12-13]</sup>。能优先利用这些物质的微生物就会定植在种子周围或根际,占领生态位点,形成一道生物屏障,使得腐霉病菌缺乏必须的营养而不能在种子周围或根际萌发、定植、侵染寄主<sup>[14-16]</sup>。Van Dijk 和 Nelson<sup>[17]</sup>对棉花猝倒病的研究表明,能优先利用脂肪酸的微生物种群是棉花种子周围的优势群落,该种群通过与终极腐霉竞争利用棉花种子发芽期间分泌的脂肪酸抑制其萌发、侵染,在棉花种子周围能明确检测到大量未萌发的孢子囊。因此,研究并阐明黄瓜种子萌发、种苗期根际的碳代谢微生物种群结构,对随后的改善或优化黄瓜根际微生物种群结构,预防黄瓜猝倒病的发生都具重要的理论与实践意义,同时也为研究植物根际微生物与病原菌相互关系提供了一条新的思路。

## 1 材料与方法

试验采用塑料钵 (12cm × 12cm × 9cm), 每盆装 150 克自然风干土, 播 15 粒黄瓜种子, 每个黄瓜品种重复 3 次, 共计 9 盆, 置于光照培养箱中 25℃ 培养, 每天光照 12h。黄瓜品种为津研四号(简称 JY), 九龙 401(简称 JL), 江蔬露丰(简称 JS), 种子从市场购买, 未经种衣剂处理。黄瓜种子用 0.5% 的次氯酸钠浸泡 20min 后, 用无菌水冲洗 3 次备用。供试土壤采自江苏省农科院菜园土, 自然风干。

黄瓜种子发芽期间分别在发芽后第 12h、第 36h、第 72h 在种子周围提取微生物: 从钵中取 15 粒黄瓜种子置于盛有 10mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 160r/min, 25℃ 下震荡 15min, 静置 5min, 取上清液用无菌生理盐水稀释, 控制细菌浓度在  $10^5 \sim 10^6$  cfu/mL, 在 BIOLOG GN 板的每个孔中接种 125 $\mu$ L 稀释菌液, 密封后放置在 25℃ 恒温培养, 在不同的培养时间于 590nm 波长处在 Biolog Enax 自动读盘机(美国 Biolog 公司产)上利用 Biolog Microlog 软件进行吸光度的读数和数据收集, 即 GN 板的 96 孔中接种微生物后在不同的培养时间, 测定 GN 板中 96 个孔的吸光值(OD 值)。BIOLOG GN 板购自美国的 Biolog 公司, 为 96 孔板, 含有一个对照孔和 95 种碳源, 碳源种类主要是糖类、有机酸和氨基酸。

所有数据的统计分析均由 SPSS11.5 统计软件完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 种子根际微生物对碳源的总体利用情况

图 1a、1b 反映了 GN 板中样品的孔平均染色程度(Average well color development, AWCD)随培养时间的变化情况。在 12h 之内 AWCD 值很小, 说明在 12h 之内碳源基本上未被利用; 而在 24h 以后, AWCD 急剧升高, 反映出此后碳源开始被大幅度利用。图 1a 看出, 在整个培养期间, 对于津研四号和九龙 401 两个黄瓜品种, 同一品种不同发芽时间的处理 AWCD 值相差不大, 即对碳源的利用情况差别不大, 特别是九龙 401 的三个种子发芽时间处理仅在培养 72h 后 AWCD 才开始有差异; 而江蔬露丰品种的三个种子发芽时间处理在培养 24h 后, AWCD 即有差别, 且随着培养时间的增加, 差别增大。方差分析显示, 江蔬露丰的三个种子不同发芽时间处理在培养 36h 时, 处理间 AWCD 值差异不显著; 培养到 60h, 不同处理之间 AWCD 值差异达显著水平。培养到 96h, 发芽 12h 的处理 AWCD 值为 0.688, 发芽 36h 的处理 AWCD 值为 0.960, 发芽 72h 的处理 AWCD 值为 1.141, 3 个处理间差异达极显著水平( $P = 0.01$ ), 表现出发芽时间越长的处理, 微生物对碳源的利用越强, 即微生物活动越强。说明江蔬露丰品种在种子不同发芽时间, 其周围微生物的总体活动强度明显不同; 而其余两个品种培养到 96h, 不同发芽时间处理的 AWCD 值无明显差别。

不同黄瓜品种, 同一发芽时间处理对碳源的利用也不尽相同。图 1b 显示, 发芽第 12h 处理, 种子周围微生物对碳源的利用, 品种间差别最明显。江蔬露丰在整个培养期间 AWCD 都明显低于其余二个品种, 培养 96h, 津研四号和九龙 401 的 AWCD 分别为 1.108 和 0.907, 而江蔬露丰的 AWCD 为 0.688, 差异达极显著水平( $P = 0.01$ ); AWCD 值达到 0.6 时, 江蔬露丰需要 96h, 而津研四号和九龙 401 只需 60h。津研四号和九龙 401 两个品种的 AWCD 值在培养 72h 后开始出现差别; 发芽第 36h, 九龙 401 与其他两品种在培养 36h 后开始有差别; 而发芽 72h 处理, 三个品种的 AWCD 在整个培养期间几乎无差别, 说明种子周围微生物对碳源的利用情况没有差别, 进一步表明种子发芽 72h 后, 微生物群落的碳代谢总体来讲比较稳定, 对品种间种子周围的微生物的碳代谢群落无明显影响。

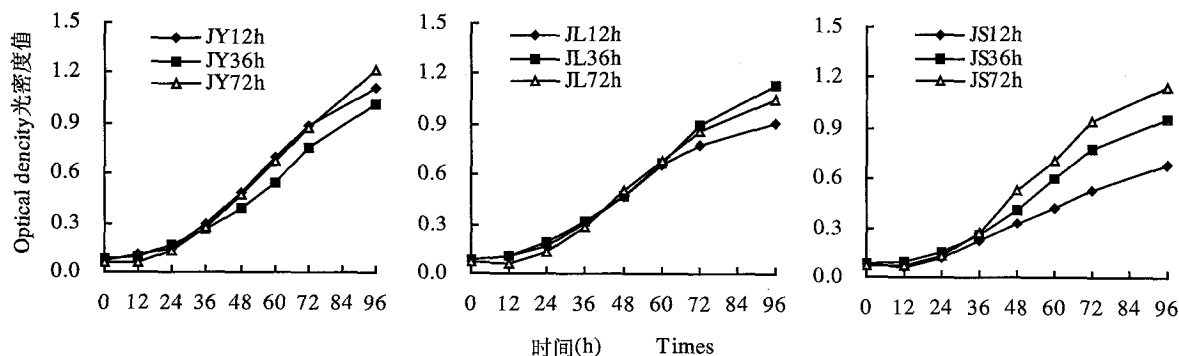


图 1a 不同培养时间对同一黄瓜品种不同发芽处理 AWCD 值的影响

Fig. 1a Effects of different incubation times on AWCD of same cucumber varieties under three germination treatments

(AWCD: GN 板中样品的孔平均染色程度 Average well color development,

JY:津研四号 Jinyan 4, JL:九龙 401 Jiulong 401, JS:江蔬露丰 Jiangsu lufeng, 下同 same as follows)

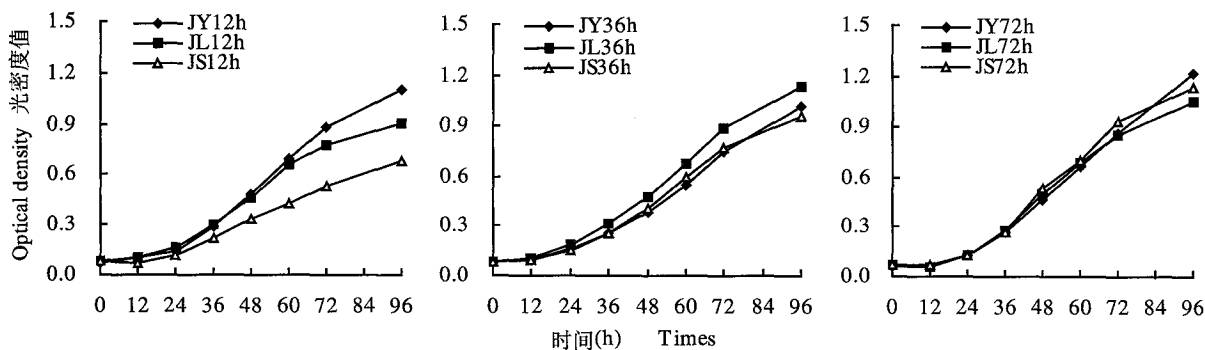


图 1b 不同培养时间对 3 个黄瓜品种相同发芽处理 AWCD 值的影响

Fig. 1b Effects of different incubation times on AWCD of 3 cucumber varieties under same germination treatments

## 2.2 对不同类型碳源的利用情况

三个黄瓜品种在不同发芽时间处理,其种子周围微生物对不同类型碳源的利用也有不同程度的差异。图 2 为各处理微生物利用三类碳源的变化。对糖类的利用特点是培养 36h 后光密度值(OD 值)急剧升高,表明糖的消耗速度在 36h 后加快,但品种间有差异。津研四号发芽 36h 的处理在培养 48h 后对碳源的消耗明显低于该品种发芽 12h 及 72h 的处理,九龙 401 不同处理差异不大;而江蔬露丰在培养 36h,发芽 12h、36h、72h 的 3 个处理 AWCD 分别为 0.184、0.232、0.280;培养 96h, AWCD 值分别为 0.647、1.354、1.589 差别达极显著水平( $P = 0.01$ )。表现出发芽时间越长,OD 值越大,即微生物对碳源的利用越强(图 2a)。

对有机酸和氨基酸的利用特点是培养 12h 后 OD 值就开始急剧升高,表明有机酸(图 2b)和氨基

酸(图 2c)的消耗速度在 12h 后加快,比糖类提前了 24h,说明在种子发芽早期利用有机酸及氨基酸的微生物为优势种群。但不同品种间或同一品种的不同处理间差别不大,表明种子发芽期间其周围代谢有机酸及氨基酸的微生物群落结构比较接近,几乎不受品种间遗传特性的影响。

纵观不同品种、相同品种不同发芽时间种子周围的微生物对不同碳源的利用可知以糖类的 OD 值最大( $> 1.4$ ),利用程度最高,但利用时间延迟,即 36h 后开始快速消耗;氨基酸类的 OD 值最小( $< 0.8$ ),利用程度最低,但短时间内(12h 后)即开始被利用;而有机酸的利用程度介于两者之间。表明在黄瓜种子发芽期间,微生物在碳源代谢方面优势群落的演变特点是:氨基酸类代谢群 $\rightarrow$ 有机酸类代谢群 $\rightarrow$ 糖类代谢群,且最终以代谢糖类的微生物为优势种群。

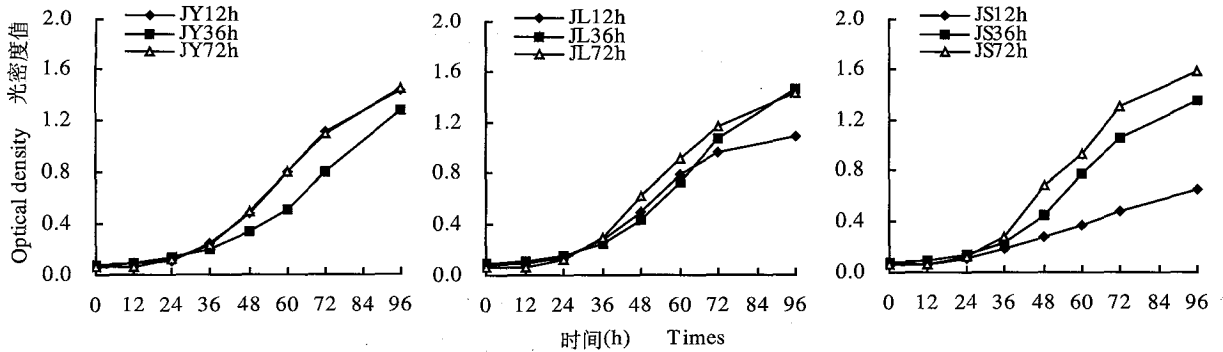


图 2a 不同黄瓜品种在 3 个发芽时间处理对糖类物质的利用  
 Fig.2a Saccharide used by different cucumber varieties under 3 germination treatments

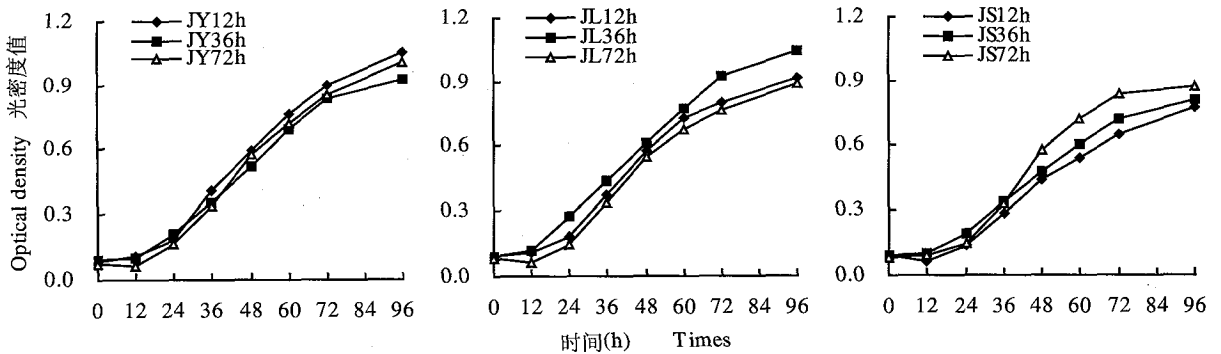


图 2b 不同黄瓜品种在 3 个发芽时间处理对有机酸的利用  
 Fig.2b Organic acids used by different cucumber varieties under 3 germination treatments

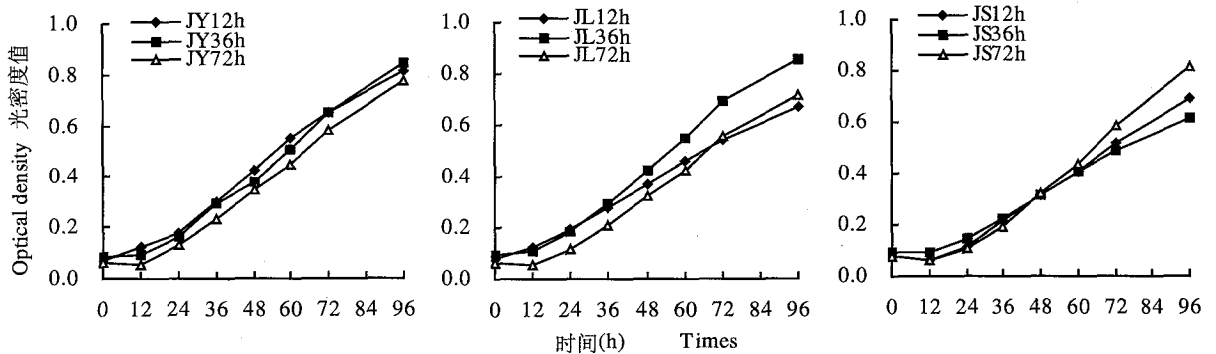


图 2c 不同黄瓜品种在 3 个发芽时间处理对氨基酸的利用  
 Fig.2c Amino acids used by different cucumber varieties under 3 germination treatments

### 2.3 主成分分析结果

主成分分析可以将不同样本的多元向量变换为互不相关的主元向量 (PRIN1 和 PRIN2 是主元向量的分量), 在降维后的主元向量空间中可以用点的位置直观地反映出不同微生物群落的代谢特征。

为了探讨三个黄瓜品种不同发芽时间处理微生物群落结构的变化情况, 对 24h、48h 和 72h 三个测

定时间点的 Biolog 数据进行标准化变换后实施典型变量分析, 两个主因子的分析 (图 3) 看出, 在 PRIN1 - PRIN2 因子图上, 三个不同时间点之间有显著区别, 但在具体的某一时间, 如 24h, 所有处理均处于 PRIN2 因子的负端, 数值在 -6 到 -8 之间, 相对差别不大, 而在 PRIN1 因子上, 不同处理间有差别, 但跨度不大, 从 -0.7 到 1.0; 48h 时, 在 PRIN1、PRIN2

因子的正、负端均有投影点分布,在 PRIN1 因子上,除了个别处理由时间点 24h 的负端变为正端,其余处理均表现为从正端向负端移动,而在 PRIN2 因子上,所有处理均是从负端向正端移动;时间点 72h 时,在 PRIN1 因子上,从 -3.8 到 5.7,处理间差别为

极显著( $P = 0.01$ ),在 PRIN2 因子上,所有处理都处于正端,但变化较大,从 3.0 到 11.2。从以上分析可以得出各个品种不同发芽时间处理微生物代谢变化趋势相同,但培养时间延长,处理间差别变大。

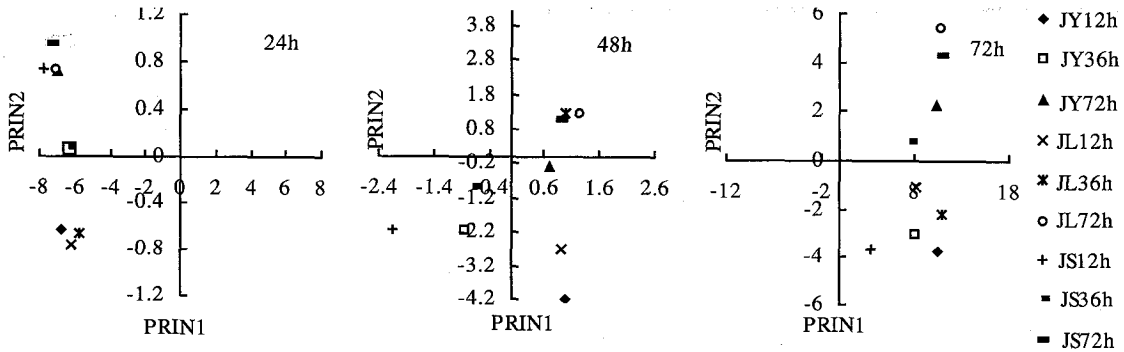


图3 不同时间点 Biolog 结果的特征变量因子图解

Fig.3 Canonical variate factors of biolog data at different time points

### 3 讨论

本研究采用 BIOLOG GN 板不仅能有效区分不同黄瓜品种、不同发芽时间的种子周围或根际在微生物群落结构方面的差异性,而且能区分微生物对碳源的利用程度和方式。

微生物群落结构特征反映了微生物所处的微环境的营养物质构成特点。Koji<sup>[18]</sup>通过人为接种营养竞争菌 *Enterobacter cloacae* 研究了胡萝卜、黄瓜、棉花、莴苣、西红柿和小麦种子发芽期间的种子分泌物对瓜果腐霉孢子囊发芽的抑制及生防效果,结果发现种子分泌物被 *Enterobacter cloacae* 优先利用,使腐霉菌孢子囊发芽率低于 15%,对猝倒病的生防效果为 62.1% ~ 81.5%;同时还发现 *Enterobacter cloacae* 在不同作物上的生防效果差别很大,主要因为不同作物品种、不同发芽时间种子的分泌物各异,从而决定 *Enterobacter cloacae* 能否充分利用这些分泌物,在种子周围成为优势种群达到抑制病原菌发芽、入侵的效果。

本研究结果表明,不同黄瓜品种在不同的发芽时间,种子周围及根际的优势微生物群落有差异,由此可能造成这些微生物群落与种子周围或根际病原菌竞争利用种子或根系分泌物的能力不同,从而对病原菌的抑制效果不同。明确了某种作物在生长过程中根际微生物的群落特征及演变规律,可以指导开发更具有针对性、实用性的微生物生防产品。这

从一方面解释了在生产中为什么大部分生防菌剂在不同的作物上、不同的土壤条件下效果不同,主要因为外加的菌剂不一定都能适应种子周围或根际的微生物生态的不断变化,缺乏竞争优势而难以形成优势种群,在实际生产应用中如何解决这一难题,还需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 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 Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 2351-2359.
- [2] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential source utilization[J]. *Soil Biology and Biochem.*, 1996, 28: 213-221.
- [3] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L *et al.* Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach [J]. *Soil Biology Biochem.* [J], 1994, 26: 1101-1108.
- [4] Bossio D D, Scow K M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 4043-4050.
- [5] Crayston S J, Wang S, Campbell C D *et al.* Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere[J]. *Soil Biology. Biochem.*, 1998, 30: 369-378.
- [6] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 赵同谦. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用[J]. *土壤学报*, 2004, 41(3): 456-461.  
Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, Zhao T Q. Application of BIOLOG to study on soil microbial community functional diversity [J]. *Acta*

- Pedologica Sinica, 2004, 41(3): 456-461.
- [7] 杨元根, Paterson E, Campbell C. 用微生物对单一碳源利用方法探讨重金属在城市土壤中积累的环境效应[J]. 地球化学, 2001, 30(5): 459-464.
- Yang Y G, Paterson E, Campbell C. Environmental effects of heavy metal accumulation in urban soils by application of biolog method[J]. Geochimica, 2001, 30(5): 459-464.
- [8] 杨元根, Paterson E, Campbell C. Biolog 方法在区分城市土壤与农村土壤微生物特性上的应用[J]. 土壤学报, 2002, 39(4): 582-588.
- Yang Y G, Paterson E, Campbell C. Application of BIOLOG to study on soil microbial characterization of urban soils and rural soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2002, 39(4): 582-588.
- [9] 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]. J. Microb. Methods, 1999, 36: 203-213.
- [10] 席劲瑛, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 138-141.
- Xi J Y, Hu H Y, Qian Y. Application of biolog system in the study of microbial community[J]. Acta Microbiologica Sinica., 2003, 43(1): 138-141.
- [11] Kaiser S K, Guckert J B, Gedhill D W. Comparison of activated sludge microbial communities using biolog<sup>TM</sup> microplates[J]. Water Sci. and Tech., 1998, 37(4-5): 57-63.
- [12] Nelson E B. Rapid germination of sporangia of *Pythium* species in response to volatiles from germinating seeds[J]. Phytopathology, 1987, 77: 1108-1112.
- [13] Paulitz T C. Effect of *pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean[J]. Phytopathology, 1991, 81: 1282-1287.
- [14] Roberts D P, Dery P D, Hebbar P K et al. Biological control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum* with a root-colonization-deficient strain of *Escherichia coli* [J]. J. Phytopathol., 1997, 145: 383-388.
- [15] Elad Y, Baker R. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydo-spore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp.[J]. Phytopathology, 1985, 75: 1053-1059.
- [16] Elad Y, Chet I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria[J]. Phytopathology, 1987, 77: 190-195.
- [17] van Dijk K, Nelson E B. Inactivation of seed exudate stimulants of *Pythium ultimum* sporangium germination by biocontrol strains of *Enterobacter cloacae* and other seed-associated bacteria[J]. Soil Biology and Bioch., 1998, 30: 183-192.
- [18] Kageyama K, Nelson E B. Differential inactivation of seed exudates stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species[J]. Applied and Environ. Microbiol., 2003, 69(2): 1114-1120.