

曲晓华, 赵晓燕, 马杰, 等. 大豆根系分泌物中特定物质对土壤微生物活性的影响 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (3): 298-302.  
QU X-H, ZHAO X-Y, MA J, et al. Effect of Soybean Root Exudates on Microbial Biomass and Activity in Soil [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (3): 298-302.

## 大豆根系分泌物中特定物质对土壤微生物活性的影响

曲晓华<sup>1</sup>, 赵晓燕<sup>2</sup>, 马杰<sup>3</sup>, 谭飞<sup>4</sup>, 王敬国<sup>5</sup>

(1. 山东省威海市园林管理局, 山东 威海 264200; 2. 山东省科学院中日友好生物技术研究中心, 山东 济南 250014; 3. 山东省威海市环境保护局, 山东 威海 264200; 4. 山东高速路桥养护有限公司, 山东 济南 250014; 5. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100083)

**摘要:** 以黑龙江省正茬土壤为研究对象, 采用室内回接培养的方法, 研究了大豆根系分泌物中 2 种有机酸 (苹果酸、酒石酸) 和 3 种酚酸 (油酸甲酯、2, 4-二叔丁基苯酚和香草酸) 对土壤微生物量和微生物活性的影响, 并通过测定土壤微生物 C/N 比, 初步确定有显著作用的分泌物组分。结果表明, 苹果酸、酒石酸和油酸甲酯的加入对微生物来说是有益的, 化感作用并没有表现出来; 而 2, 4-二叔丁基苯酚和香草酸的加入, 对土壤微生物的生长表现为低浓度促进高浓度抑制, 对土壤微生物有化感作用。

**关键词:** 大豆; 根系分泌物; 特定物质; 土壤微生物; 微生物活性

**中图分类号:** S 565

**文献标识码:** A

### Effect of Soybean Root Exudates on Microbial Biomass and Activity in Soil

QU Xiao-hua<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-yan<sup>2</sup>, MA Jie<sup>3</sup>, TAN Fei<sup>4</sup>, WANG Jing-guo<sup>5</sup>

(1. Weihai Landscape Administration, Weihai, Shandong 264200; 2. China-Japan Friendship Biotechnology Research Center, Ji'nan, Shandong 250014, China; 3. Weihai Environmental Protection Agency, Weihai, Shandong 264200, China; 4. Shandong Road-bridge High-speed Maintenance Co Ltd, Ji'nan, Shandong 250014, China; 5. Department of Plant Nutrition, College of Agricultural Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** This study aimed to determine the relationship between allelopathy and soil microorganisms in order to find out the possible barriers that inhibit continuous cropping of soybeans. By altering two organic acids (i. e. , malic and tartaric acid) and three phenolic acids (i. e. , oleic acid methyl ester, 2,4-dinitrophenol and vanillic acid) among the known soybean root exudates, the effect on the biomass and activity of the microbes in soil was determined. Using the soil sample collected from the continuous cropping field in Heilongjiang province, the in-lab frankia culture method was employed and the carbon/nitrogen ratio of the soil microbial biomass measured to preliminary identify the major components in the exudate. The results indicated that the addition of malic acid, tartaric acid and oleic acid methyl ester benefitted the microbial growth without allelopathy effect. On the other hand, the addition of 2,4-dinitrophenol and vanillic acid at low concentrations increased the microbial biomass, while reduced it at high concentrations. The results suggested that 2,4-dinitrophenol and vanillic acid might play an important role in the soybean allelopathy.

**Key words:** soybean; root exudates; specific substance; microbial biomass; microbial activity; allelopathy

大豆连作导致产量下降, 通常减产幅度在 10%~35%<sup>[1]</sup>。大量研究表明, 大豆连作障碍产生的机理比较复杂, 是多种因素共同作用的结果, 包

括土壤物理和化学性质变化<sup>[2]</sup>、土壤养分亏缺<sup>[3]</sup>以及大豆根际土传病害的发生<sup>[4]</sup>。近年来, 连作大豆根分泌物的化感作用备受众多学者的重视<sup>[5-6]</sup>。根

收稿日期: 2014-12-05 初稿; 2015-02-26 修改稿

作者简介: 曲晓华 (1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物营养 (E-mail: 45900251@qq. com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270768)

分泌物是植物产生化感物质的一个重要来源,根系不仅通过主动释放和淀积多种有机物质,为根际微生物提供碳源、能量和生长因子,同时还释放化感物质、信号物质,这些物质在根系和微生物的信息交流和能量流动方面具有十分重要的作用<sup>[7-9]</sup>。

据研究,大豆根系分泌物、大豆残茬的腐解产物及土壤中含有多种酚酸类、有机酸、氨基酸和黄酮类等,并对这些物质的作用机理进行了探讨<sup>[10-14]</sup>,但关于这些物质及其不同浓度对土壤微生物能否产生化感作用的研究报道很少。本研究以黑龙江省正茬土壤为研究对象,采用室内回接培养的方法,研究了前期经 GC-MS 确定的大豆根系分泌物和根残茬腐解液中的 2 种有机酸-苹果酸和酒石酸和 3 种酚酸-油酸甲酯、2,4-二叔丁基苯酚和香草酸<sup>[15]</sup>,对土壤微生物量和微生物活性的影响,并通过测定土壤微生物 C/N 比,初步确定有显著作用的分泌物组分,探讨连作大豆根际有机化合物对土壤微生物种群的诱导作用,旨在揭示致毒物质与土壤微生物的关系,以期减轻连作障碍,提高连作大豆的产量和品质提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 供试大豆品种** 采用绥农 10 号作为供试大豆品种。

**1.1.2 植株培养** 采用水培的方法收集其根系分泌物。选取饱满且大小一致的大豆种子,用清水冲洗干净,经 5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  消毒 30 min,用去离子水冲洗干净。用饱和  $\text{CaSO}_4$  浸泡 2 h 后,将种子散放在底部放有湿润滤纸的托盘上,种子的上边用湿润滤纸盖住,于黑暗处催芽 24 h。待大豆种子露白时,将其播种于用饱和  $\text{CaSO}_4$  浸泡过的粗砂中育苗。当大豆第 1 片真叶刚露出时,小心从粗砂中取出幼苗,用去离子水洗掉附着在根上的砂子,将其移入营养液进行培养。营养液最初浓度为正常浓度的一半, pH 值为 6.3。每盆种植大豆 5 株,盆的容积为 2 L,3 d 后换成正常浓度进行培养,以后每 3 d 更换 1 次营养液,连续通气。水培营养液配方如下:  $7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$ ,  $6.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA-Fe}$ ,  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $2.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ ,  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

**1.1.3 根系分泌物的收集** 在大豆生长的花期收集根系分泌物进行分析。早晨培养 2 h 后(大约 10:00),将大豆植株取出,用去离子水冲洗 3~5 遍(以去除附着在根系上的养分离子及根系脱落物),将其置于 200 mL 去离子水中按原条件光照培养 2 h 后,取出放回原处。迅速向收集液中加入 2 滴浓  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,抑制微生物对根系分泌物的分解作用<sup>[16]</sup>,然后用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤,以除去根尖脱落物和粘胶物质,收集到的即为根系分泌物。

**1.1.4 土壤培养** 采自黑龙江省农科院大豆连作长期试验站正茬土,土样的基本理化性质如下: pH 值 7.06、有机质 29.24  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、全氮 1.17  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效磷 38.46  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效钾 105.89  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。将一系列土壤分别加入不同浓度梯度的各种分泌物的纯品,乙醇作为溶剂,用蒸馏水补充保持土壤含水量,在 25℃ 恒温下暗培养 10 d,处理如下:分别加入油酸甲酯 0、0.02、0.2、2.0  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 2,4-二叔丁基苯酚 0、0.03、0.3、3.0  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 香草酸 0、0.05、0.1、0.2  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 苹果酸 0、0.2、0.5、1.0  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 酒石酸 0、0.2、0.5、1.0  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,以上各物质的浓度参考了前期工作的试验结果,根据土壤中的实际浓度而设置的<sup>[15, 17-18]</sup>,以收集到等体积的大豆根系分泌物作为对照,进行土壤培养试验,每个处理重复 3 次。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 土壤微生物 C 和 N 测定** 采用氯仿熏蒸-0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{K}_2\text{SO}_4$  浸提法;土壤微生物 C 采用  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  氧化法<sup>[19]</sup>;土壤微生物 N 采用茚三酮比色法。

**1.2.2 土壤微生物呼吸的测定** 采用  $\text{CO}_2$  吸收法。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生物碳

土壤微生物碳的变化反映了微生物利用土壤碳源进行自身细胞合成而大量繁殖及细胞解体有机碳矿化的过程,能够反映土壤微生物总量。从图 1 可以看出,与对照相比,苹果酸和酒石酸在较低浓度条件下,微生物碳低于对照,随着浓度的增加,微生物碳呈现逐渐增加的趋势,在最高浓度条件下,微生物碳均高于对照,差异达到显著水平,也就是说,苹果酸和酒石酸的添加,不同浓度处理对土壤微生物产生了促进作用,所以它们对土壤微生物并

没有表现出化感作用。

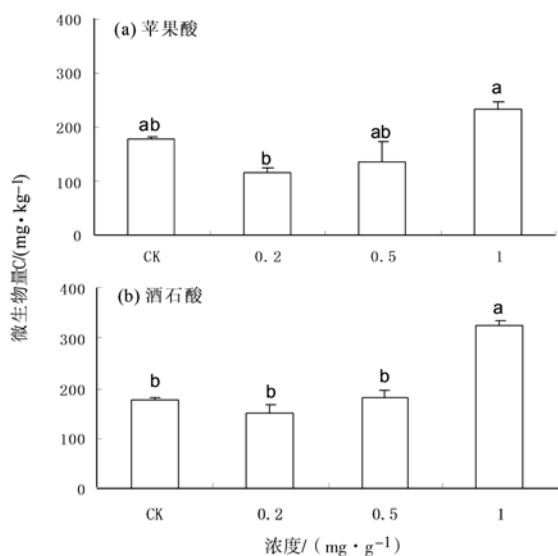


图 1 添加 2 种有机酸对土壤微生物碳的影响

Fig. 1 Effect of two organic acids on soil microbial biomass carbon

结果(图 2)表明,随着油酸甲酯浓度的增加,微生物碳呈现递增的规律,结果和酒石酸的结果有点类似,同样没有表现出化感作用;随着 2,4-二叔丁基苯酚浓度的增加,微生物碳呈现先增后减的趋势,在浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  达到最大值,然后随着浓度的增加,微生物碳又会减少。这就说明,2,4-二叔丁基苯酚的加入,在较低浓度时作为一种有机物质被微生物所利用,对微生物来说时有益的,但是随着浓度的增加,2,4-二叔丁基苯酚的化感作用逐渐表现出来,对微生物的抑制作用越来越明显,使微生物总量减少,微生物活性降低。所以,可以初步判断 2,4-二叔丁基苯酚可能有化感作用;随着香草酸的加入,在浓度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时微生物碳达到最大,但随着浓度的增加,出现减少的趋势,再随着浓度的增加又会有所回升,这说明香草酸在浓度为  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时表现出化感作用。

## 2.2 土壤微生物呼吸和呼吸熵 $q\text{CO}_2$

土壤基础呼吸强度反映微生物对土壤有机质转化程度,是土壤能量传递强度的一个重要参数,不同微生物的呼吸强度不同,与细菌相比,真菌的呼吸作用相对较弱<sup>[20]</sup>;呼吸熵是微生物呼吸速率与微生物碳之比,即单位微生物量的呼吸强度,可以反映微生物的活性大小,因此土壤基础呼吸及呼吸熵的波动可能指示着土壤微生物区系的变化<sup>[21]</sup>。从表 1 可以看出,土壤微生物呼吸的变化规律与微

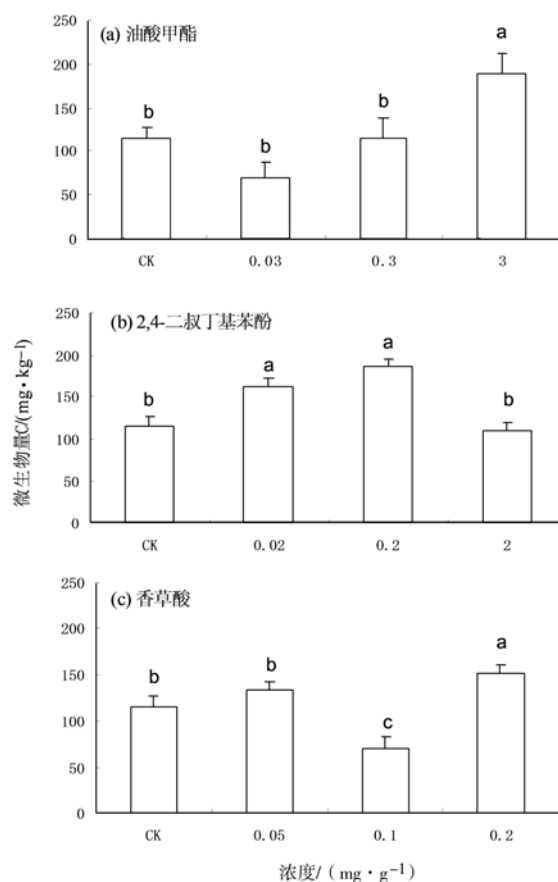


图 2 添加 3 种酚酸对土壤微生物碳的影响

Fig. 2 Effect of three phenolic acids on soil microbial biomass carbon

生物碳的趋势一致,随着处理浓度的增加,微生物呼吸逐渐增加,而呼吸熵  $q\text{CO}_2$  则出现递减的趋势,差异达到显著水平,这说明这 2 种有机酸的添加,作为碳源为微生物所吸收和利用,而增加微生物量,促进微生物活性,提高了微生物对碳源的利用效率。随着油酸甲酯处理浓度的增加,土壤微生物呼吸的变化规律与微生物碳的趋势一致,微生物呼吸逐渐增加,而呼吸熵  $q\text{CO}_2$  则出现递减的趋势,微生物对碳源的利用效率逐渐增加,差异达到显著水平;2,4-二叔丁基苯酚的结果有所不同,随着处理浓度的增加,微生物呼吸呈现先增加后减少的趋势,在浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时达到最大,而呼吸熵  $q\text{CO}_2$  正好相反,在浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时最小,说明土壤微生物在浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时对碳源的利用效率最大,差异达到显著水平;对香草酸而言,微生物呼吸变化不大,呼吸熵  $q\text{CO}_2$  在浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时最小,微生物对碳源的利用率达到最大。

表 1 添加 2 种有机酸和 3 种酚酸对土壤微生物呼吸和呼吸熵的影响

Table 1 Effect of two organic acids and three phenolic acids on respiration and respiratory quotient of soil microorganisms

处理	浓度/ (mg·g <sup>-1</sup> )	微生物呼吸 BSR/ (mg CO <sub>2</sub> -C kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	呼吸熵 qCO <sub>2</sub> / (h <sup>-1</sup> )
苹果酸	CK	15.0±0.1a	0.08±0.002ab
	0.5	12.5±0.2d	0.11±0.008a
	1.0	13.4±0.1c	0.10±0.030a
	2.0	13.6±0.2b	0.06±0.003b
酒石酸	CK	15.0±0.1a	0.08±0.002ab
	0.5	13.5±0.2b	0.90±0.010a
	1.0	14.0±0.5b	0.08±0.007b
	2.0	15.8±0.3a	0.05±0.001c
油酸甲酯	CK	14.3±0.1b	0.124±0.010b
	0.03	13.6±0.2c	0.193±0.045a
	0.3	14.9±0.1b	0.128±0.028ab
	3.0	18.4±0.3a	0.097±0.021b
2,4-二叔丁基苯酚	CK	14.3±0.1b	0.124±0.012a
	0.02	13.4±0.2c	0.082±0.005b
	0.2	15.1±0.2a	0.081±0.005b
	2.0	13.4±0.1c	0.123±0.012a
香草酸	CK	14.3±0.1a	0.124±0.012b
	0.05	14.9±0.5a	0.13±0.005b
	0.1	14.2±0.5a	0.205±0.039a
	0.2	14.7±0.3a	0.097±0.006b

2.3 微生物 C/N

微生物 C/N 比在一定程度上反映了不同处理对土壤微生物数量和种群结构的影响。微生物 C/N 比值较小，为 3~6，说明细菌占优势；如果微生物 C/N 比值较大，为 7~12，说明真菌占优势<sup>[22]</sup>。苹果酸和酒石酸的加入，在较低浓度条件下，微生物 C/N 比值显著低于对照，随着处理浓度的增加，微生物 C/N 比值呈递增的趋势，不过在最高浓度条件下仍然低于对照，说明苹果酸和酒石酸的加入有利于细菌的生长（图 3）。图 4 表明，随着香草酸处理浓度的加大，微生物 C/N 比值呈现递增的趋势，在浓度最大时，微生物 C/N 比值高于对照，差异达到显著水平，这与微生物碳的变化规律是一致的；2,4-二叔丁基苯酚和香草酸的加入，在较低浓度条件下，微生物 C/N 比值高于对照，随着 2,4-二叔丁基苯酚和香草酸处理浓度的增加，微生物 C/N 比值呈现减少趋势，随着浓度的再增加，2,4-二叔丁基苯酚处理的微生物 C/N 比值仍然逐渐递减，而香草酸有所不同，随着香草酸浓度的加大，微生物 C/N 比值有所回

升，这与微生物碳的变化规律也是一致的。

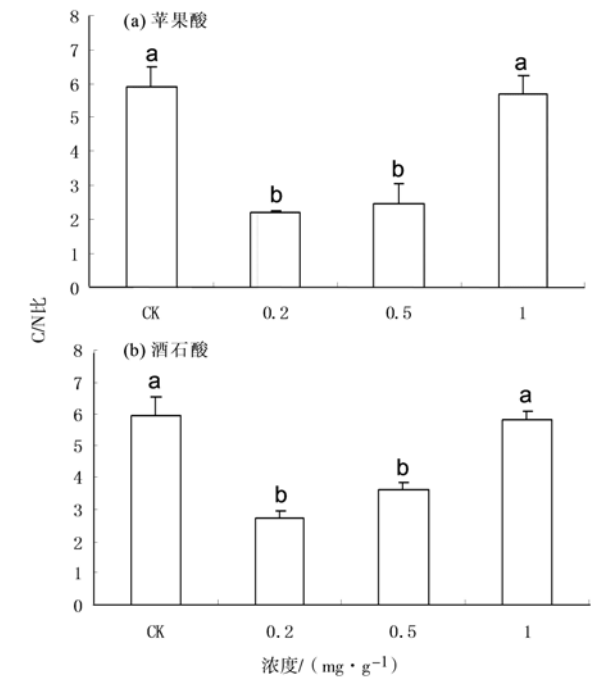


图 3 添加 2 种有机酸对土壤微生物碳氮比的影响  
Fig. 3 Effect of two organic acids on soil microbial biomass C/N ratio

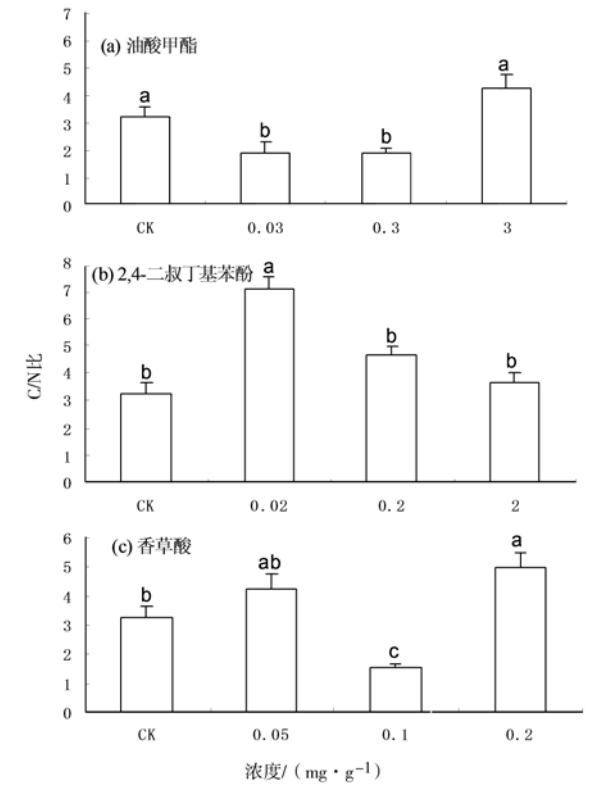


图 4 添加 3 种酚酸对土壤微生物碳氮比的影响  
Fig. 4 Effect of three phenolic acids on soil microbial biomass C/N ratio

### 3 讨 论

本研究使我们对大豆根系分泌物中特定物质对土壤的微生物区系的影响有一个初步了解：苹果酸、酒石酸和油酸甲酯的加入对微生物来说是有益的，化感作用并没有表现出来；而 2, 4-二叔丁基苯酚和香草酸的加入，对土壤微生物的生长表现为低浓度促进高浓度抑制，对土壤微生物有化感作用。今后还需力争从根际微生态系统入手，进一步加强这些特定物质与连作大豆根际土壤微生物优势种群（特别是有害生物）之间相互关系的研究。考虑到微生物生境和区系，分子生物学技术是一种有效的研究手段。应用分子生物学技术（如常用的 RFLP、RAPD、AFLP 及 DGGE 等）能更精确地揭示微生物的种类和遗传多样性，获得更多的微生物生态信息。国内外学者在这方面进行不断的探索<sup>[23]</sup>，所以应用分子生物学技术研究大豆根系分泌物中特定物质及其对微生物生态的影响，以便了解大豆连作障碍的机理，为根际微生态系统调控，及建立良好的根际生物群落提供理论依据。

#### 参考文献：

- [1] 单海艳. 我省大豆重迎茬减产原因及解决途径 [J]. 职大学报, 2004, (2): 11—12.
- [2] 计钟程, 许文芝. 重迎地减产于土壤环境变化 [J]. 大豆科学, 1995, 14 (4): 321—329.
- [3] 王震宇, 王英祥, 陈祖仁. 重茬大豆生长发育障碍机制初探 [J]. 大豆科学, 1991, 10 (1): 31—36.
- [4] 马汇泉. 大豆根腐病生态学的研究 [J]. 中国油料, 1995, (6): 47—48.
- [5] 韩丽梅, 沈其荣, 王树起, 等. 大豆根茬木霉腐解产物的鉴定及其化感作用的研究 [J]. 应用生态学报, 2002, 13 (10): 1295—1299.
- [6] 战秀梅, 韩晓日, 杨劲峰, 等. 大豆连作及其根茬腐解物对大豆根系分泌物中酚酸类物质的影响 [J]. 土壤通报, 2004, 35 (5): 631—635.
- [7] GARCIA-GARRIDO J M, OCAMPO J A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. J Exp Bot, 2002, 53: 1377—1386.
- [8] BAIS H P, PARK S W, WEIR T L, et al. How plants communicate using the underground information superhighway [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 26—32.
- [9] UVINI GUNAWARDENA, MARIANELA RODRIGUEZ, DAVID STRANEY, et al. Tissue-Specific Localization of Pea Root Infection by *Nectria haematococca*. Mechanisms and Consequences [J]. Plant Physiol, 2005, 137 (4): 1363—1374.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 王树起, 韩丽梅, 杨振明. 不同有机酸对大豆生长的化感效应 [J]. 大豆科学, 2002, 21 (4): 27—33.
- [13] 何志鸿, 刘忠堂, 许艳丽, 等. 大豆重迎茬减产的原因及农艺对策研究—重迎茬大豆的根际土壤有机化合物 [J]. 黑龙江农业科学, 2003, (5): 1—5.
- [14] 阮维斌, 刘默涵, 黄斌, 等. 两种羟基苯乙酸对大豆萌发的化感效应研究 [J]. 应用生态学报, 2003, 14 (5): 785—788.
- [15] 张俊英. 不同抗性大豆品种根系分泌物的化感作用及其组分分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [16] SHEN J B, C. TANG Z. Rengel, et al. Root-induced acidification and excess cation uptake by *N<sub>2</sub>-fixing Lupinus albus* grown in phosphorus-deficient soil [J]. Plant Soil, 2004, 260: 69—77.
- [17] 黄斌. 大豆残茬中异黄酮的分离、鉴定与其化感作用的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- [18] 阎飞. 大豆残茬中化感物质的分离、鉴定及其化感作用的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [19] 林启美, 吴玉光, 刘焕龙. 熏蒸法测定土壤微生物量碳微生物碳的改进 [J]. 生态学杂志, 1999, 18 (2): 63—66.
- [20] DAI J, BECQUER T, ROUILLER J H, et al. Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Cd^{2+}$  contaminated soils [J]. Appl Soil Ecol, 2004, 25: 99—109.
- [21] ANDREAS F, PAUL M. Microbial biomass and size-density fractions differ between soil of organic and conventional agricultural systems [J]. Soil Biol Biochem, 2000, 32: 757—768.
- [22] BEHERA N, SAHANI U. Soil microbial biomass and activity in response to Eucalyptus plantation and natural regeneration on tropical soil [J]. For Ecol Manag, 2003, 174: 1—11.
- [23] FORNEY L J, ZHOU X, CELESTE J B. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king [J]. Curr Opin Microbiol, 2004, (7): 210—220.

(责任编辑: 林海清)