

燕麦/大豆和燕麦/花生间作对根际土壤固氮细菌 多样性与群落结构的影响

冯晓敏¹ 杨永^{1,2} 任长忠³ 胡跃高¹ 曾昭海^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 新疆农业科学院 哈密瓜研究中心, 乌鲁木齐 830091;

3. 吉林省白城市农业科学院, 吉林 白城 137000)

摘要 运用 PCR-DGGE 技术研究燕麦/豆科不同间作组合和单作处理对根际土壤固氮细菌的群落结构及多样性的影响。结果表明:不同生育时期,单作燕麦根际固氮微生物群落结构存在明显差异;在间作系统中,除灌浆期差异显著外,间作燕麦根际固氮微生物群落比较稳定。在整个生育期,间作豆科作物相对于其单作,根际固氮微生物群落较为接近。间作系统中作物根际固氮微生物群落结构更为稳定,变化幅度小,或趋于一致,尤其在燕麦/大豆间作系统中表现更为突出。DGGE 条带测序可知,燕麦的根际固氮微生物都属于变形菌门,主要为 α -变形菌纲的慢生根瘤菌属、 β -变形菌纲的 *Azohydromonas* 和少数其他菌属。豆科作物根际固氮细菌种类较丰富,主要为 α -变形菌纲的慢生根瘤菌属、 β -变形菌纲的 *Azohydromonas* 和 *Pseudacidovorax*、 γ -变形菌纲的克雷白氏杆菌属及少数 *Cyanobacteri* 和一些不可培养固氮菌群,且存在一些燕麦根际不存在的菌属,如鱼腥藻属和 *Ideonella*。总体来看,燕麦/豆科间作能够影响作物根际土壤固氮菌的群落结构,有助于深化对燕麦合理间作栽培模式的认识。

关键词 PCR-DGGE; 间作; *nifH* 基因; 燕麦; 大豆; 花生; 群落多样性; 群落结构

中图分类号 S 519; S 311

文章编号 1007-4333(2016)01-0022-11

文献标志码 A

Effects of oat-soybean and oat-groundnut intercropping on the diversity and community composition of soil nitrogen-fixing bacterial in rhizosphere soil

FENG Xiao-min¹, YANG Yong^{1,2}, REN Chang-zhong³, HU Yue-gao¹, ZENG Zhao-hai^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Hami Melon Research Center, Xinjiang Academy of Agriculture Sciences, Urumqi 830091, China;

3. Baicheng Academy of Agricultural Sciences in Jilin, Baicheng 137000, China)

Abstract Being an indicator of environment variation, nitrogen-fixing bacterial community is very sensitive to the variation of environment. But the relationship between those two is unclear. This study aimed to investigate the variation of nitrogen-fixing bacterial community diversity responded to different intercropping systems by targeting *nifH* gene. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and DNA clone technology were employed to investigate the variation of nitrogen-fixing bacterial community in rhizosphere soil as affected by oat/soybean intercropping, oat/groundnut intercropping and monocropping of these three crops. Principal component analysis indicated that nitrogen-fixing bacterial community in rhizosphere soil was relatively stable and barely changed within the intercropping system, especially in oat-soybean intercropping system. Based on the DGGE bands sequencing and

收稿日期: 2015-03-19

基金项目: 国家燕麦荞麦产业技术体系项目(CARS-08-B-1); 国家自然科学基金项目(30871491); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD16B15); 公益性行业(农业)科研专项(201503121-11)

第一作者: 冯晓敏, 博士研究生, E-mail: fengxiaomin.1986@163.com

通讯作者: 曾昭海, 副教授, 博士, 主要从事作物栽培及土壤微生态研究, E-mail: zengzhaohai@cau.edu.cn

Phylogenetic analysis of *nifH* gene, nitrogen fixing microbes mainly affiliated to *Bradyrhizobium Jordan* of α -*Proteobacteria*, *Azohydromonas* of β -*Proteobacteria*, and few other species. The rhizosphere of beans had a complicated composition, including *B. Jordan* of α -*Proteobacteria*, *Azohydromonas* and *Pseudacidovorax* of β -*Proteobacteria*, *Klebsiella pneumonia* of γ -*Proteobacteria*, *Cyanobacteri* and some uncultured bacteria. In conclusion, the oat-beans intercropping systems had effects on the diversity and community structure of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of plants. It would help us to understand the positive effects of oat-beans intercropping.

Keywords PCR-DGGE; intercropping; *nifH* gene; oat-soybean; oat-groundnut; nitrogen-fixing bacterial community diversity; community composition

农田生态系统中,土壤微生物多样性通过各种途径参与土壤养分转化和物质循环,保证了生态系统的正常运转和稳定性^[1]。近年来人们开始关注和认识土壤微生物的生态功能,利用土壤微生物结构来衡量土壤健康质量的优劣。生物固氮是土壤中有有效性氮素的主要来源之一^[2],是大气氮素进入生态系统物质循环的主要途径,在土壤生态环境中,氮素的固定和利用与固氮微生物群落多样性和结构的变化密切相关。由于固氮菌是土壤氮素循环中重要的功能细菌,研究不同种植制度下土壤固氮细菌群落结构的差异,对于建立合理的种植模式、维持土壤质量具有重要意义。已有的研究表明,在固氮微生物体内存在着一种能编码铁蛋白的基因 *nifH* 基因,且与其他固氮功能基因相比,其序列数据信息也较为丰富^[3-5]。Young 等^[6]研究发现,与 16S rRNA 基因相比,*nifH* 基因的系统发育树与其极相似,因此,运用分子生物学手段研究不同环境 *nifH* 基因多样性成为人们关注的热点。前人利用分子生物学的方法对海洋^[7]、淡水^[8]、土壤和根际^[9]等生境的研究显示不同生态环境中 *nifH* 基因的群落结构和多样性存在明显的差异^[10]。但对豆科和非豆科作物根际土壤固氮微生物的研究很少有报道^[11-14]。

变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 最早是用于检测 DNA 突变的技术^[15],但因其能减小传统细菌培养分离中分析的误差,成为一种分析土壤微生物群落构成的有效手段;同时 DGGE 技术还用于分析生态环境因素如土壤和作物种类^[16]、根际分泌物^[17]、养分情况^[18]、菌根的接种^[19]和种植方式^[20]等对作物群落结构的影响。宋亚娜等^[21]利用 DGGE 法研究了不同种植体系中根际微生物群落结构;周岚等^[22]利用 PCR-DGGE 技术研究了玉米-大豆轮作及氮肥利用对土壤细菌群落结构的影响;彭东海等^[23]研究了间作大豆对甘蔗根际固氮土壤细菌及固氮菌多样性的影

响。总之,在农田生态系统中,不同生境和种植制度均影响土壤中 *nifH* 基因的结构和功能。

间套作作为中国传统精耕细作农业的重要组成部分,具有增产、提高资源利用效率、持续控制病虫害等优势,不仅能增加地上部的生物多样性,也可以增加地下部的土壤微生物多样性^[24],已成为缓解连作障碍的关键途径之一。目前的研究主要集中在养分吸收、资源利用和产量构成方面,如间作系统中光照和水分利用、氮素等养分吸收情况。关于土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性和结构的研究和报道较少,尤其是禾本科作物的根际土壤固氮微生物多样性。

燕麦 (*Avena L.*) 属禾本科早熟禾亚科燕麦属一年生草本植物,是世界八大粮食作物之一^[25],我国种植面积约 60 万 hm^2 ,其中裸燕麦的播种面积约占燕麦总面积的 92%,白城地区为燕麦的新型产区,国内外对其研究主要集中在种质资源评价、新品种培育、抗逆性、种质资源和营养成分等方面^[26-27],有关燕麦栽培管理尤其是燕麦与豆科间作对根际固氮微生物的结构与多样性方面的报道较少。

本研究利用 PCR-DGGE 技术,拟探讨燕麦/大豆、燕麦/花生的间作体系中根际固氮微生物多样性的变化,从微生物多样性角度阐明间作种植体系产量优势的作用机理,以期为合理间作模式构建和农业可持续发展提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点

本研究在吉林省白城市农科院试验田 ($45^{\circ}27'N$, $122^{\circ}48'E$) 进行,属温带大陆性季风气候,该区年降雨量为 407.9 mm,年均气温为 $4.9^{\circ}C$,无霜期 157 d。供试土壤类型属于砂壤土,土壤理化性质为:有机质 13.30 g/kg,碱解氮 117.40 mg/kg,全氮 1.65 g/kg,有效磷 95.90 mg/kg,有效钾 93.30 mg/kg,土壤 pH 为 6.9。

1.2 试验方案

1.2.1 田间试验

试验设5个处理,分别是单作燕麦(O)、单作大豆(S)、单作花生(G)、燕麦/大豆(OS)、燕麦/花生(OG),为单因素随机区组设计,每个处理重复4次,共20个小区,小区面积28 m²。燕麦品种为白燕2号、大豆品种为96136品系、花生品种为白院花1号,均来源于白城市农科院。不施氮肥,磷肥等作基肥一次性施入,各处理肥料用量分别为磷肥(P₂O₅)55 kg/hm²、钾肥(K₂O)45 kg/hm²、硫酸亚铁4.5 kg/hm²、硼酸1 kg/hm²、钼酸钠1.5 kg/hm²。

单作燕麦行距30 cm,播种量200 kg/hm²;单作大豆行距为60 cm,株距为10 cm,密度约为17万株/hm²;单作花生行距为60 cm,穴距为20 cm,每穴2株,密度约为17万株/hm²。每个间作处理中包括2行燕麦和2行豆科,燕麦和豆科作物的行间距为20 cm,燕麦、大豆和花生同时播种,播种时间为2011年5月17日和2012年5月24日,燕麦收获时间为2011年8月12日和2012年8月14日,大豆和花生于9月7日和9月16日收获。

1.2.2 土壤样品的采集和保存

2012年于燕麦的不同生育期(拔节期、灌浆期及成熟期)取样,不同处理均为4个重复,在不同小区随机选取2株作物,用土钻将燕麦、大豆和花生的根系从土壤中挖出,尽量保持根系的完整性,去掉和根系结合松散的土体土,取与根系紧密结合的土壤。然后将4次重复获取的根际土混合视为1个样品。根际土样过2 mm的筛子以除去杂物,然后迅速用锡箔纸打包,液氮速冻,保存于-80℃冰箱,用于研究土壤*nifH*基因群落结构^[13]。

1.3 分析方法

1.3.1 土壤样品DNA的提取

称取保存于-80℃的土壤样品0.3 g,每个处理3次重复,采用FastDNA[®]SPIN Kit For Soil(Q-Biogene,美国)的试剂盒方法,用30 μL灭菌的超纯水溶解,按照操作说明提取土壤DNA,DNA片段长度用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,DNA的浓度和纯度用微量紫外分光光度计测定。

1.3.2 土壤DNA的PCR扩增

固氮微生物*nifH*基因序列用巢式PCR(Nested PCR)方法扩增。

第一轮PCR:采用引物为固氮菌*nifH*基因的引物PolF(5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3')

和PolR(5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'),反应体系为:10×buffer(天根生化科技公司,北京)5 μL,dNTPs(2 mmol/L各碱基,上海生物工程公司,上海)4 μL,上下游引物各0.5 μL(10 pmol/μL),*Taq* DNA聚合酶(2.5 U/μL,天根生物公司,北京)1 μL,ddH₂O 38 μL,DNA模版1 μL,终体积为50 μL。PCR反应条件为:95℃,预变性15 min;94℃变性1 min,59℃退火1 min,72℃延伸1 min,扩增30个循环;72℃,延伸10 min。

第二轮PCR:以第一轮PCR产物为模板,引物为PolI(5'-TGCGAICCSAAIGCIGACTC-3')和AQER-GC30(5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGACGATGT-3'),反应体系为:10×buffer(天根生化科技公司,北京)5 μL,dNTPs(2 mmol/L各碱基,上海生物工程公司,上海)4 μL,上下游引物各1 μL(10 pmol/μL),*Taq* DNA聚合酶(2.5 U/μL,天根生物公司,北京)1 μL,ddH₂O 36 μL,以2 μL第一轮PCR产物作为模版,终体积为50 μL。反应程序为在第一轮PCR的基础上,退火温度变为57℃,扩增28个循环,其他反应步骤与条件同第一轮PCR反应。

1.3.3 DGGE和染色

对第二轮的PCR产物,采用Dcode[™]通用突变检测系统(Bio-Rad,美国)进行DGGE分析,上样量为20 μL。DGGE采用1 mm厚聚丙烯酰胺凝胶,固氮微生物*nifH*基因凝胶梯度为6%~12%,变性梯度为40%~65%,在1×TAE缓冲液中,75 V、60℃条件下电泳16 h。用10 mL SYBR green I(1:10 000)核酸染料染色,染色时间为30 min,然后用Alpha Innotech chemilmage 5500 CCD成像仪拍摄并记录。

1.3.4 系统发育分析

回收DGGE图谱分离凝胶上主要的DNA条带,将获得的PCR扩增产物使用相应载体克隆和测序。各条带均经NCBI数据库的Blast比对分析,以便确定序列的微生物类型。并提交序列号获得登录号,对于需要分析的DGGE条带,利用MEGA 5.1软件以邻接法(Neighborjoining, NJ)构建*nifH*基因的系统发育树,并用Bootstrap验证。

1.4 数据处理及分析

对DGGE指纹图谱中DNA条带的位置和亮度采用Quantity One软件(Bio-Rad公司,美国)进行数字分析处理,同时在图像处理过程中,对于一些被

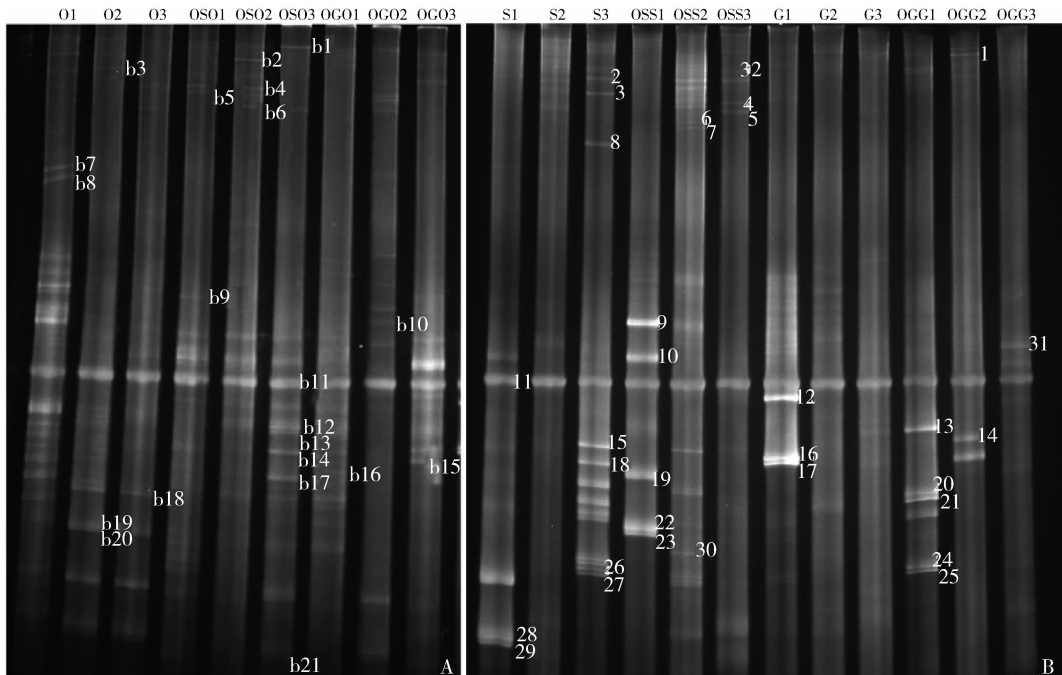
软件自动忽略的条带,进行手动添加,软件会自动计算条带的密度。利用 Canoco for windows 4.5 软件,利用不同样品、不同条带的位置和亮度并得出数值,进行主成分分析。

2 结果分析

2.1 *nifH* 基因 PCR 产物的 DGGE 图谱分析

对根际土壤固氮菌的第二轮 PCR 产物进行 DGGE 分析,得到根际土壤固氮菌的 DGGE 图谱(图 1)。从图中可见:不同处理、不同生育期中的土壤样品,条带的数量和迁移强度是不同的,电泳条带多,表明该处理的土壤样品 *nifH* 基因的多样性稳定,每个泳道中,不同处理条带的亮度差异较大,表

明不同处理所含特定的固氮菌数量有明显差异。但不同生育期、不同处理的土壤样品的 DGGE 图谱又存在一定的相似性,在燕麦和豆科作物根际土壤固氮微生物的 DGGE 图谱中,都存在 1 条共有的条带 11,表明该细菌群属于优势菌群。然而由于细菌的丰富度不同,条带的亮暗程度也不同。单作燕麦拔节期条带最为丰富,但随着生育期,条带逐渐减少。而间作燕麦与其恰好相反,条带随生育期呈递增趋势。单作大豆在鼓粒期条带最为丰富,而间作大豆在分枝期和开花结荚期条带较为丰富,在鼓粒期条带最少。单作花生和间作花生的条带随生育期均呈减少趋势,但在同一时期,间作比单作的条带更为丰富。



O: 单作燕麦; OSO: 同大豆间作燕麦; OGO: 同花生间作燕麦; S: 单作大豆; OSS: 间作大豆; G: 单作花生; OGG: 间作花生; 1: 拔节期; 2: 灌浆期; 3: 成熟期。图 2 同

O: Monoculture oat; OSO: Oat intercropped with soybean; OGO: Oat intercropped with groundnut; S: Monoculture soybean; OSS: Soybean intercropped with oat; G: Monoculture groundnut; OGG: Groundnut intercropped with oat; 1: Jointing stage; 2: Filling stage; 3: Mature stage. The same as figure 2

图 1 土壤固氮细菌 *nifH* 基因的 PCR-DGGE 图谱

Fig. 1 PCR-DGGE profiles of soil microbial *nifH* genes

2.2 根际固氮细菌群落结构 DGGE 图谱的主成分分析

利用 Quantity one 软件获得 DGGE 图谱中条带的位置和亮度的数字化结果,进一步利用 Canoco for windows 软件进行 PCA 分析,显示了在燕麦/大豆和燕麦/花生间作组合中,燕麦的根际固氮菌群落结构特征存在差异。由图 2(a)可知,单作燕麦根际

土壤固氮微生物群落结构在拔节期、灌浆期及成熟期差异显著,表明生育期对单作燕麦根际土壤固氮微生物群落结构影响较大。燕麦/大豆和燕麦/花生间作组合中,燕麦根际土壤固氮微生物群落结构在拔节期和成熟期均无显著性差异,但均与灌浆期差异显著,表明在燕麦灌浆期作物根际土壤固氮微生物较为活跃,群落结构变化较大。花生根际土壤固

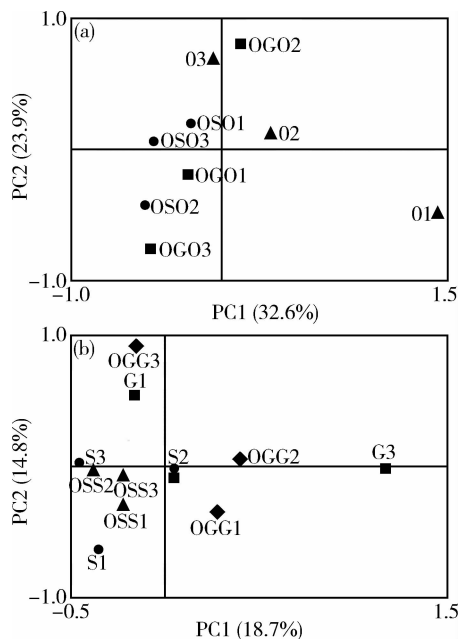


图2 燕麦(a)和豆科作物(b)根际土壤固氮微生物群落结构的主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of DGGE banding patterns in rhizosphere soil of oat (a) and beans (b)

氮微生物群落结构在作物不同生育时期变化较大,无论间作还是单作均表现为差异明显。不同生育时期的间作大豆均位于第三象限,根际土壤固氮微生物群落较为稳定,在不同生育时期无显著性差异。而3个时期的单作大豆分别处于第三象限、第四象限和第二象限,差异显著(图2(b))。总的来看,间作系统有助于维持作物根际固氮微生物群落结构处于较为稳定的状态,在燕麦/大豆间作系统中表现更为突出。

2.3 DGGE 条带的测序分析

从燕麦根际 *nifH* 基因的 DGGE 图谱上分离割胶后回收 21 个条带(b1~b21),测序后序列长度在 297~301 bp,利用 Blast 软件将测序得到的基因序列与 GeneBank 数据库进行比对,结果发现,本研究的 21 个条带的序列与已知序列具有较高的相似性,相似度为 86%~100%,其中仅 b3、b8 与 AJ563958、GQ241353 相似度低于 90%,分别为 86% 和 89%(表 1),表明这些序列与已有的固氮微生物都有一定的亲缘关系但又不完全相同,固氮微生物多样性的变化很可能是对单作燕麦和间作燕麦处理下根际土壤变化的反映。

表 1 燕麦根际固氮微生物 DGGE 凝胶条带回收序列 blast 分析结果

Table 1 Blast analysis result of DGGE gel bands recovery sequences from oat rhizosphere soil nitrogen-fixing microorganism

条带 Band	碱基数 Bases number	GenBank 登陆号 GenBank number	相似度 Similarity	相似菌株及其来源 Similar strains and their sources
1	298	AJ505315	91%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Rhizobiaceae</i> ; <i>Sinorhizobium/Ensifer</i> group; <i>Sinorhizobium</i>
2,16	298	AB188122	96%	<i>Beta proteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Alcaligenaceae</i> ; <i>Azohydromonas</i>
3	298	AJ563958	86%	<i>Gamma proteobacteria</i> ; <i>Methylococcales</i> ; <i>Methylococcaceae</i> ; <i>Methylococcus</i>
4	298	GQ249664	92%	<i>Beta proteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Comamonadaceae</i> ; <i>Pseudacidovorax</i>
5	298	GQ161239	94%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhodospirillales</i> ; <i>Rhodospirillaceae</i> ; <i>Azospirillum</i>
6	298	AM110718	92%	<i>Beta proteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Burkholderiaceae</i> ; <i>Burkholderia</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i> complex
7	297	JX081993	91%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Rhizobiaceae</i> ; <i>Sinorhizobium/Ensifer</i> group; <i>Ensifer</i>
8	298	GQ241353	89%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Rhizobiaceae</i> ; <i>Rhizobium/Agrobacterium</i> group; <i>Rhizobium</i>
9	298	EF394167	100%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Bradyrhizobiaceae</i> ; <i>Bradyrhizobium</i>
10	298	AB201627	96%	<i>Beta proteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Alcaligenaceae</i> ; <i>Azohydromonas</i>
11,20	298	GQ336846	93%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Bradyrhizobiaceae</i> ; <i>Bradyrhizobium</i>
12,14	298	AB188121	98%	<i>Beta proteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Alcaligenaceae</i> ; <i>Azohydromonas</i>
13	298	FJ347449	95%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Bradyrhizobiaceae</i> ; <i>Bradyrhizobium</i>
15	298	FJ514065	93%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Bradyrhizobiaceae</i> ; <i>Bradyrhizobium</i>
17,19	298	AB201627	97%	<i>Beta proteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Alcaligenaceae</i> ; <i>Azohydromonas</i>
18	298	AB542351	95%	<i>Alpha proteobacteria</i> ; <i>Rhizobiales</i> ; <i>Bradyrhizobiaceae</i> ; <i>Bradyrhizobium</i>
21	301	FJ593867	97%	<i>Gamma proteobacteria</i> ; <i>Enterobacteriales</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Klebsiella</i>

依据豆科 DGGE 图谱挑取了 32 个条带(其中 12、16 和 18 因回收失败丢弃),克隆后进行了测序,序列长度在 297~301 bp。利用 Blast 软件,将测序得到的序列与 GeneBank 数据库比对,获取近似菌

株的 *nifH* 序列。大部分克隆与可培养固氮微生物具有较高的相似性,相似性在 85%~98%,有少部分克隆与不可培养固氮微生物具有较高相似性,相似性在 90%~91%(表 2)。

表 2 豆科作物根际固氮微生物 DGGE 凝胶条带回收序列 blast 分析结果

Table 2 Blast analysis result of DGGE gel bands recovery sequences from legume rhizosphere soil nitrogen-fixing microorganism

条带 Band	碱基数 Bases number	GenBank 登陆号 GenBank number	相似度 Similarity	相似菌株及其来源 Similar strains and their sources
1	299	AJ563959	85%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alpha proteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Rhodoblastus</i>
2,29	298	HQ335786	90%	<i>Bacteria; environmental samples</i>
3	298	GQ161239	90%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alpha proteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Azospirillum</i>
4,5,7	298	GQ249664	92%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Beta proteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Pseudacidovorax</i>
6	301	AB740524	87%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alpha proteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium group; Rhizobium.</i>
8	298	AB542352	95%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alpha proteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium</i>
9,32	298	AB188122	96%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Beta proteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Azohydromonas</i>
10	298	JX081993	95%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alpha proteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Sinorhizobium/Ensifer group Ensifer.</i>
11	298	FJ347446	93%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Alpha proteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium</i>
13,21	201	FJ593867	97%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gamma proteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Klebsiella</i>
14	297	U73136	81%	<i>Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales; Pseudanabaena</i>
15,31	298	HQ335733	90%	<i>Bacteria; environmental samples</i>
17	298	EU542578	98%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Beta proteobacteria; Burkholderiales; Ideonella</i>
19,23	298	AF046839	86%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gamma proteobacteria</i>
20	301	V00631	98%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Gamma proteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Klebsiella</i>
22	298	AF216879	86%	<i>nitrogen-fixing bacterium SC16</i>
24,27	298	CP003153	89%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Beta proteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Azospira</i>
25	298	HQ335717	90%	<i>Bacteria; environmental samples</i>
26	298	JN862627	91%	<i>Bacteria; environmental samples</i>
28,30	298	AB201627	91/96%	<i>Bacteria; Proteobacteria; Beta proteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Azohydromonas</i>

2.4 根际固氮微生物群落的系统发育

采用 Mega 5.1 中邻接法从 DGGE 图谱克隆序列中挑选出 21 个, 并与 21 个相近的菌株序列结合, 建立关于 *nifH* 基因的系统发育树, 可以直观发现 21 个条带的近缘种均为变形菌门中的三大变形菌纲, 分别是 α -、 β 和 γ -*proteobacteria*, 其中 α -*proteobacteria* 又包含慢生根瘤菌属 (b9、b11、b13、

b15、b18 和 b20)、中华根瘤菌属 (b1)、固氮螺菌属 (b5)、剑菌属 (b7) 和根瘤菌属 (b8); β -*proteobacteria* 包含 *Azohydromonas* (b2、b10、b12、b14、b16、b17 和 b19)、*pseudacidovorax* (b4) 和伯克氏菌属 (b6); γ -*proteobacteria* 包含甲基球菌属 (b3) 和克雷白氏杆菌属 (b21) (图 3)。

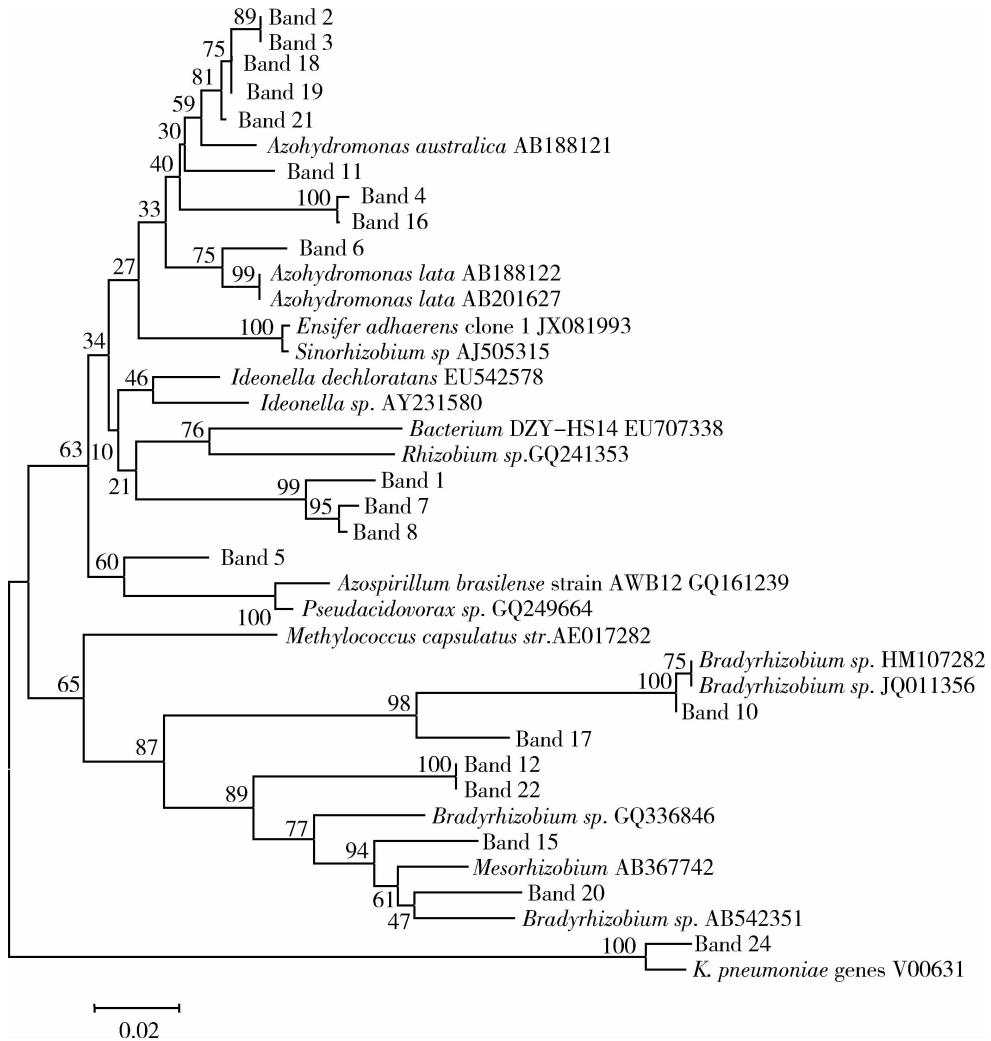


图 3 燕麦根际固氮微生物群落系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of nitrogen-fixation microbiology community in oat rhizosphere soil

从豆科作物根际固氮微生物的 DGGE 图谱中, 挑选了 29 个条带的克隆序列与 19 个相近菌株序列建立了 *nifH* 系统发育树。序列多为变形菌门, 此外还发现了蓝藻菌门 (b14), 系统发育关系如图 4 所示, 变形菌门又可分为三大纲: α -、 β 和 γ -*proteobacteria*。其中 α -*proteobacteria* 包含红芽杆菌属 (b1)、固氮螺菌属 (b3)、慢生根瘤菌属 (b8 和

b11) 和剑菌属 (b10); β -*proteobacteria* 包含 *Pseudacidovorax* (b4、b5 和 b7)、*Azohydromonas* (b9、b28、b30 和 b32)、*Ideonella* (b17) 和 *Azospira* (b24 和 b27); γ -*proteobacteria* 主要为克雷白氏杆菌属 (b13、b20 和 b21), b19 和 b23 条带亦与 γ -*proteobacteria* 相似度较高, 但未查找到其菌属分类信息 (图 4)。

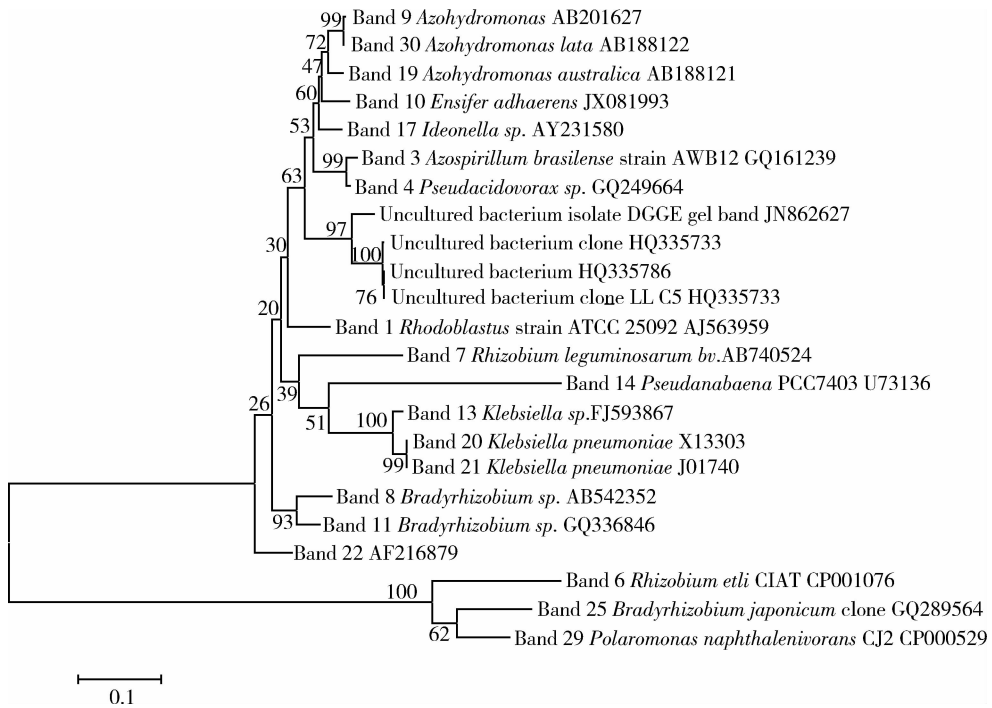


图 4 豆科根际固氮微生物群落系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of nitrogen-fixation microbiology community in beans rhizosphere soil

3 讨论与结论

氮素的循环与土壤根际微生物多样性是相互关联的,合理的间作组合能增加农田生态系统中作物的种类和改善其生态功能,维持地下部微生物多样性的稳定,同时减少有害微生物在单一作物栽培中的发病率^[28-29]。PCR-DGGE 指纹图谱技术可用于研究微生物基因多样性和群落结构,但由于在研究过程中,发现泳道中条带过多且密,而且有些是肉眼看不到的,这样会影响结果的准确性,尤其是将 16SrDNA 的 PCR 片段作为研究对象时影响更为明显,近年研究对象开始转向具有特定功能的细菌,如固氮菌,可以更准确地表现生态系统中耕作措施对于土壤生态环境的影响^[21]。土壤中氮素的高效循环利用以及氮素固定的高低均与固氮菌的群落结构有关^[2]。同时本研究所取样品为不同生育时期的作物根际土壤,因此得到的 *nifH* 基因多样性和结构在一定程度上能反映土壤固氮微生物的多样性和群落结构^[30]。

从 DGGE 图谱中可看出,不同处理优势菌群有着较大差异,虽群落组成相近,但各成分的含量有着较大的差异,可能不会影响该处理的群落多样性,却

会对其群落结构造成重大影响。间作对固氮微生物群落结构的影响与其对固氮微生物群落多样性及丰富度的影响并不完全一致。在根际土壤中,同大豆间作燕麦与单作燕麦固氮微生物 *nifH* 基因群落结构比较相近,但两者与同花生间作燕麦根际固氮微生物差异较大。

从系统发育树分析结果可知,在燕麦根际土壤中主要分布着 α - β 和 γ -*proteobacteria*, 其中 α -*proteobacteria*、 β -*proteobacteria* 占主导地位,且在不同生育期和不同处理中,3 个菌纲的分布均表现不同的差异。这可能与作物在不同情况下对根际固氮微生物的选择有关。前人^[31-33]研究发现,作物根际土壤中存在的固氮菌主要是以下几种:变形菌门 (*Roteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和蓝藻菌门 (*Cyanobacteria*),这与本研究的结果一致。不同处理的燕麦条带亮度和属种类不同,如在 O、OGO 和 OSO 中,b11 为 3 个不同处理的共有条带,表明不论是单作还是间作,均存在 α -变形菌纲的慢生根瘤菌属,但条带亮度、位置及属的类型也有差异,只有 OSO 的 b1 条带较亮,该条带为中华根瘤菌属,在 OGO 中存在 b10 条带,且较亮,该条带为 *Azohydromonas*。豆科作物与燕麦根际虽然也有相

同种类的属,如 b11(慢生根瘤菌属),但豆科作物的属的种类更加丰富。间作大豆与单作相比,b9 和 b10 条带较亮,表明 *Azohydromonas* 和剑菌属较丰富,在间作花生系统中,b1 条带存在差异,表明在间作花生中存在红芽杆菌属,但间作系统中不同菌属的功能还需要进一步的研究。

地上部植物作为初级生产者作为地下部的生物提供有机碳源,如根内或根中的微生物,对地下部系统具有驱动作用,同时不同作物根际分泌的不同根系分泌物,为微生物的生长提供碳源和能源^[34],因此地下部微生物对地上部植物群落结构与功能有一定的影响^[35]。DGGE 图谱和测序结果显示单作豆科固氮微生物的种类多于单作燕麦,说明植物本身也对土壤固氮微生物的种类有一定的影响,而与单作处理相比,间作模式下土壤固氮微生物的组成发生很大变化,土壤固氮微生物的种类也增加,进一步说明了地上部作物丰富的同时,土壤中微生物也会相应增加。这与李刚等^[35]的研究一致。不同豆科作物与燕麦间作通过影响根系分泌物而对根际微生物产生不同的调控,根际微生物的改变又影响其对根际碳源的利用而影响作物的生长。表明间作系统根系分泌物-根际微生物的互作对作物的生长有重要的作用。因此不同豆科作物与燕麦间作对糖、氨基酸和有机酸等碳源的影响还需要作进一步的分析。

本研究首次对不同间作组合燕麦根际土壤固氮微生物群落结构进行了分析比较。结果表明,燕麦/大豆、燕麦/花生组合时,根际固氮微生物 *nifH* 基因群落结构存在差异。固氮菌的结构受到环境的影响,如土壤类型、养分状况和耕作体系等^[36-37],而燕麦根际固氮微生物群落结构不仅受控于其中 1 个因素,可能受几个相互关联的环境因子影响。虽然该大田试验为 2 年,但土壤只选取 2012 年的情况,燕麦、大豆和花生在单作、间作处理下,根际固氮微生物群落结构的差异可能会随试验时间的延长,其效果和变化会表现得不同,而且对固氮细菌群落多样性与结构变化与间作系统中作物根际氮素养分转移、吸收利用、产量优势及土壤固氮菌 *nifH* 基因对间作体系的贡献还有待深入研究。

结论:燕麦/豆科体系改变了燕麦根际土壤固氮细菌的群落组成,但对群落物种的优势度影响较小。间作燕麦根际固氮微生物群落多样性及丰富度较为稳定,但在不同生育期表现不同,间作组合和生育期均对燕麦、大豆和花生根际固氮微生物 *nifH* 基因

群落结构产生影响。因此,间作可能对改善东北白城地区砂壤土供氮能力有一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Zhang F S, Li L. Using competitive and facilitative interaction in intercropping system to enhance crop productivity and nutrient-use efficiency[J]. *Plant Soil*, 2003, 248(1/2): 305-312
- [2] Zou Y K, Zhang J N, Yang D L, Chen X R, Zhao J N, Xiu W M, Lai X, Li G. Effects of different land use patterns on *nifH* genetic diversity of soil nitrogen-fixing microbial communities in *Leymus chinensis* steppe[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(2): 150-156
- [3] Wakelin S A, Gupta V V S R, Forrester S T. Regional and local factors affecting diversity abundance and activity of free-living N₂-fixing bacteria in Australian agricultural soils [J]. *Pedobiologia*, 2010, 53(6): 391-399
- [4] Orr C H, James A, Leifert C, Cooper J M, Cummings S. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(3): 911-919
- [5] Zhan J, Sun Q Y. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings [J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(3): 157-165
- [6] Young J P W, Stacy G, Burris R H, Evans H J. *Biological Nitrogen Fixation Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms*[M]. New York: Chapman and Hall, 1992: 43-86
- [7] Zehr J P, Mellon M T, Zani S. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by application of nitrogenous (*nifH*) genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 64(9): 3444-3450
- [8] MacGregor B J, van Mooy B, Baker B J, Mellon M, Moisaner P H, Paerl H W, Zehr J, Hollander D, Stahl D A. Microbiological molecular biological and stable isotopic evidence for nitrogen fixation in the open waters of Lake Michigan[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(3): 205-219
- [9] Baudoin E, Benizri E, Guckert A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in buck soil and maize rhizosphere[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35(9): 1183-1192
- [10] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M. Nitrogenous gene diversity and microbial community structure: Across-system comparison [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539-554
- [11] Roesch L F W, Camargo F A O, Bento F M, Triplett E W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and

- stem of field-grown maize[J]. *Plant and Soil*, 2008, 302(1/2): 91-104
- [12] Venieraki A, Dimou M, Pergalis P, kefalogianni L, Chatzipavlidis L, Katinakis P. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat [J]. *Microbial Ecology*, 2001, 61(2): 277-285
- [13] Marntensson L, Diez B, Warttainen I, Zheng W W, El-shehawry R, Rasmussen U. Diazotrophic diversity *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian China [J]. *Plant and Soil*, 2009, 325(1/2): 207-218
- [14] Rosch C, Bothe H. Diversity of total nitrogen-fixing and denitrifying bacteria in an acid forest soil [J]. *European Journal of Soil Science*, 2009, 60 (6): 883-894
- [15] Ferris M J, Monrozier M J, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined population inhabiting a hot spring microbialmat community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 340-346
- [16] Marschner P, Yang C H, Lieberei R, Crowley D E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(11): 1437-1445
- [17] Raudoin E, Benizri, Guckert A. Impact of artificial root exudate on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2003, 35 (3): 1183-1192
- [18] Yang C H, Crowley D E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (1): 345-351
- [19] Marschner P, Baumann K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonization in split-root maize[J]. *Plant Soil*, 2003, 251(2): 279-289
- [20] Alvey S, Yang C H, Buerkert A, Crowley D E. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west African[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37 (2): 73-82
- [21] 宋亚娜, 李隆, 包兴国, 张福锁, 郑伟文. 应用 DGGE 技术研究间、轮作对根际氨氧化细菌和固氮菌群落结构的影响[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 506-511
- Song Y N, Li L, Bao X G, Zhang F S, Zheng W W. A Study of rhizosphere ammonia-oxidizer and N_2 -fixer community composition in different cropping systems by DGGE[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2006, 28(4): 506-51 (in Chinese)
- [22] 周岚, 杨永, 王占海, 陈阜, 曾昭海. 玉米-大豆轮作及氮肥施用对土壤细菌群落结构的影响[J]. 作物学报, 2013, 39 (11): 2016-2022
- Zhou L, Yang Y, Wang Z H, Chen F, Zeng Z H. Influence of maize-soybean rotation and N fertilizer on bacterial community composition[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(11): 2016-2022 (in Chinese)
- [23] 彭东海, 杨建波, 李健, 邢永秀, 覃刘东, 杨丽涛, 李杨瑞. 间作大豆对甘蔗根际土壤细菌及固氮菌多样性的影响[J]. 植物生态学报, 2014, 38(9): 959-969
- Peng D H, Yang J B, Li J, Xing Y X, Tan L D, Yang L T, Li Y R. Effects of intercropping with soybean on bacterial and nitrogen-fixing bacterial diversity in the rhizosphere of sugarcane[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2014, 38(9): 959-969 (in Chinese)
- [24] 宋亚娜, Marschner Petra, 张福锁, 包兴国, 李隆. 小麦/蚕豆、玉米/蚕豆和小麦/玉米间作对根际细菌群落结构的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2268-2274
- Song Y N, Marschner Petra, Zhang F S, Bao X G, Li L. Effect of intercropping on bacterial community composition in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L) maize (*Zea mays* L) and faba bean (*Vicia faba* L)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(7): 2268-2274 (in Chinese)
- [25] Doehlert D C, McMullen M S, Jannink J L, Panigrahi S, Gu H Z, Riveland N R. Evaluation of oat kernel sizeniformity [J]. *Crop Science*, 2004, 44(4): 1178-1186
- [26] 王旭, 曾昭海, 朱波, 胡跃高, 林叶春, 陈恭, 芦金生, 袁喜兰. 燕麦与箭筈豌豆不同混作模式对根际土壤微生物数量的影响[J]. 草业学报, 2009, 18(6): 151-157
- Wang X, Zeng Z H, Zhu B, Hu Y G, Lin Y C, Chen G, Lu J S, Yuan X L. Effects of oat mixed with common vetch on the microorganism populations in rhizosphere soil [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18(6): 151-157 (in Chinese)
- [27] Verma O P, Yadama R B. Salt tolerance of some oats varieties at germination and seedling stage[J]. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 1986, 156(2): 123-127
- [28] 雷娟利. 蔬菜土壤生态系统微生物分子生态学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006, 33-34
- Lei J L. Study on microbial molecular ecology of soil ecological system of vegetable[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006, 33-34 (in Chinese)
- [29] 郑超, 谭中文, 刘月廉. 菠萝-甘蔗轮作制度对甘蔗生长和土壤微生物区系的影响[J]. 热带作物学报, 2004, 25(3): 29-32
- Zhen C, Tan Z W, Liu Y L. Effect of crop rotation system (Pineapples-Sugarcane) on sugarcane growth and soil microflora [J]. *Chinese Journal of Tropical Crop*, 2004, 25(3): 29-32 (in Chinese)
- [30] 董志新, 孙波, 殷士学, 隋跃宇. 气候条件和作物对黑土和潮土固氮微生物群落多样性的影响[J]. 土壤学报, 2012, 49(1): 130-138
- Dong Z X, Sun B, Yin S X, Sui Y Y. Impacts of climate and cropping on community diversity of diazotrophs in pachic udic argiboroll and fluventic ustochrept [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(1): 130-138 (in Chinese)
- [31] 王丽娟, 李刚, 赵建宁, 红雨, 修伟明, 王慧, 章秋燕, 杨殿林. 耐

- 除草剂基因大豆对根际土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(6): 703-711
- Wang L J, Li G, Zhao J N, Hong Y, Xiu W M, Wang H, Zhang Q Y, Yang D L. Effects of herbicide tolerant transgenic soybeans on the diversity of soil nitrogen: Fixing bacterial *nifH* genes in rhizosphere[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35(6): 703-711 (in Chinese)
- [32] Coelho M R, de Vos M, Carneiro N P. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer[J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2008, 279(1): 15-22
- [33] Widmer F, Shaffer B T, Porteous L A, Seidler R J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 374-380
- [34] Chen Z, Liu J B, Wu M N, Xie X L, Wu J S, Wei W X. Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(2): 446-459
- [35] 李刚, 王丽娟, 李玉洁, 乔江, 张海芳, 宋晓龙, 杨殿林. 呼伦贝尔沙地不同植被恢复模式对土壤固氮微生物多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(6): 1639-1646
- Li G, Wang L J, Li Y J, Qiao J, Zhang H F, Song X L, Yang D L. Effects of different vegetation restoration patterns on the diversity of soil nitrogen-fixing microbes in Hulunbeier sandy land[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(6): 1639-1646 (in Chinese)
- [36] Poly F, Ranjard L, Nazaret S. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2255-2262
- [37] 刘骁蓓, 涂仕华, 孙锡发, 辜运富, 张先琴, 张小平. 秸秆还田与施肥对稻田土壤微生物生物量及固氮微生物群落结构的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(17): 5210-5218
- Liu X Q, Tu S H, Sun X F, Gu Y F, Zhang X Q, Zhang X P. Effect of different fertilizer combinations and straw return on microbial biomass and nitrogen-fixing bacteria community in a paddy soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(17): 5210-5218 (in Chinese)

责任编辑: 袁文业