

# 长期施肥对黑土大豆根瘤菌群体结构和多样性的影响

关大伟<sup>1,2</sup> 李 力<sup>1,2</sup> 姜 昕<sup>1,2</sup> 马鸣超<sup>1,2</sup> 曹凤明<sup>1,2</sup> 周宝库<sup>3</sup> 李 俊<sup>1,2\*</sup>

1 (中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

2 (农业部微生物产品质量安全风险评估实验室, 北京 100081)

3 (黑龙江省农业科学院土壤肥料与环境资源研究所, 哈尔滨 150006)

**摘要:** 为揭示长期施肥对黑土大豆根瘤菌群体结构和多样性的影响, 采用BOX-PCR、IGS-PCR-RFLP和16S rDNA基因序列分析法, 对分离自黑龙江省7种长期不同施肥处理的254株大豆根瘤菌进行了遗传多样性和系统发育分析, 结合土壤理化性质分析了大豆根瘤菌群体结构和多样性与土壤因子间的关系。7种处理分别为不施肥(CK)、有机肥(OM)、单施氮肥(N<sub>1</sub>)、单施2倍氮肥(N<sub>2</sub>)、氮肥+有机肥(N<sub>1</sub>+OM)、氮肥磷肥混施(N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>)和2倍氮肥磷肥混施(N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>)。系统发育分析结果表明, 所有供试菌株均为慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*), 其中大部分菌株与日本慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)相似性最高, 少部分菌株与辽宁慢生大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium liaoningense*)相似性最高。BOX-PCR聚类分析结果表明, 供试菌株在70%相似性水平上分为15个群, 在与施肥处理相关性分析中分为3个群体, 分别对应于不施化肥处理(CK和OM)、化学氮肥处理(N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>1</sub>+OM)、氮肥磷肥处理(N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>)。典范对应分析结果表明, 土壤pH、速效氮和速效磷与根瘤菌群体结构相关性极显著( $P=0.002, 0.004, 0.002$ )。不同施肥措施下大豆根瘤菌的多样性有明显差异: N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>处理的丰富度指数和Shannon-Wiener指数显著高于其他处理; OM处理的Simpson指数最高; N<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>处理的3种多样性指数都显著低于其他处理。通径分析结果表明, pH、速效磷对多样性指数有较高的直接正效应; 速效氮通过pH的间接负效应影响多样性指数。本研究表明, 长期施用化肥改变了根瘤菌群体结构, 单施氮肥减少大豆根瘤菌多样性, 而氮肥磷肥混施则有助于提高大豆根瘤菌多样性。

**关键词:** 多样性指数, BOX-PCR, IGS-PCR-RFLP, 典型对应分析, 通径分析

## Influence of long-term fertilization on the community structure and diversity of soybean rhizobia in black soil

Dawei Guan<sup>1,2</sup>, Li Li<sup>1,2</sup>, Xin Jiang<sup>1,2</sup>, Mingchao Ma<sup>1,2</sup>, Fengming Cao<sup>1,2</sup>, Baoku Zhou<sup>3</sup>, Jun Li<sup>1,2\*</sup>

1 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081

2 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Microbial Products, Ministry of Agriculture, Beijing 100081

3 Institute of Soil Fertilizer and Environment Resources, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150006

**Abstract:** The objectives of this study were to explore the effects of long-term fertilization on the community structure and diversity of soybean rhizobia in black soil. BOX-PCR, IGS-PCR-RFLP and 16S rDNA gene sequencing methods were used to analyze the genetic diversity of the 254 soybean rhizobia isolated from 7 treatments at Heilongjiang Long-term Fertilization Experiment Station. The 7 treatments were as follows: no fertilization (CK), organic manure (OM), chemical nitrogen (N<sub>1</sub>), double chemical nitrogen (N<sub>2</sub>), chemical nitrogen-phosphorus (N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>), double chemical nitrogen-phosphorus (N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>), chemical nitrogen plus organic manure (N<sub>1</sub>+OM). Soil properties were measured and analyzed to test for relationships with the community and diversity of soybean rhizobia. All of the tested rhizobia belonged to *Bradyrhizobium*, of which the majority were closely related to *B. japonicum* and the others closely to *B. liaoningense*. BOX-PCR fingerprints

收稿日期: 2014-07-10; 接受日期: 2014-12-30

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-04), 黑龙江省自然科学基金项目(ZD200813-02)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jli@caas.ac.cn

showed that the tested rhizobia could be divided into 15 groups at 70% similarity level. These groups clustered into 3 communities that correspond to no chemical fertilizer treatments (CK, OM), chemical nitrogen fertilizer treatments ( $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_1+OM$ ), and chemical nitrogen-phosphorus treatments ( $N_1P_1$ ,  $N_2P_2$ ), respectively. Canonical correspondence analysis showed that pH, available N, and available P of the soil were significantly correlated with the community of rhizobia ( $P=0.002$ ,  $0.004$ ,  $0.002$ , respectively). Soybean rhizobia diversity indices varied significantly among fertilization treatments. Shannon-Wiener and species richness index were highest in  $N_2P_2$  and Simpson index was highest in the OM treatment. The species richness, Shannon-Wiener and Simpson index in  $N_1$  and  $N_2$  were significantly lower than those in other treatments. The results of path analysis showed that the pH and available P had the greatest direct positive effects on the 3 indices, and that available N indirectly affected the 3 indices through pH. In conclusion, long-term chemical fertilization results in changes to community structure of soybean rhizobia in black soil, and application of chemical nitrogen fertilizer by itself reduces the diversity of soybean rhizobia, while application of nitrogen-phosphorus has the opposite effect.

**Key words:** diversity indices, BOX-PCR, IGS-PCR-RFLP, canonical correspondence analysis, path analysis

根瘤菌与豆科作物之间的共生固氮体系是生物固氮中效率最高的体系, 可为豆科作物提供50–90%的氮素营养(李俊等, 2011; Guan *et al.*, 2012), 全球每年所固定的氮素达到7千万吨(Li *et al.*, 2011; Youseif *et al.*, 2014)。根瘤菌作为高效共生固氮体系的主要成员, 是自然界和农业系统中最有价值的微生物资源之一。因此, 开展农业生态系统中的大豆根瘤菌资源多样性研究, 对揭示大豆根瘤菌种群及其多样性演变过程, 指导高效根瘤菌株的选育和应用具有重要意义。

根瘤菌的分布与其环境条件密切相关, 其中土壤理化性质是重要的影响因素(Herrmann *et al.*, 2014; Youseif *et al.*, 2014)。有研究发现土壤pH对快生根瘤菌与慢生根瘤菌的丰度均有很大影响, 快生根瘤菌在碱性土壤中明显更多(Mothapo *et al.*, 2013)。Li等(2012)发现根瘤菌的分布与土壤中养分含量密切相关。豆科作物根瘤菌多样性研究结果表明, 环境条件对根瘤菌的影响不仅表现在种属水平, 也表现在遗传多样性的水平上(Tian *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2008; Nassira *et al.*, 2014)。以往的研究多是以特定空间的典型区域为研究对象(张伟涛, 2006; Man *et al.*, 2008; 王卫卫等, 2013), 而对长期施肥条件下土壤理化性质演变所引起的根瘤菌群体结构和多样性的变化还鲜有报道。

黑龙江省是我国大豆主产区, 占我国大豆种植面积和总产量的1/3左右(王英等, 2011)。黑土是黑龙江省主要的耕地土壤类型, 占全省耕地总面积的31%, 也是大豆主要的种植区域(孙景玲等, 2013)。目前黑龙江大豆生产中普遍施用化肥, 特别是氮肥

过量施用的情况尤为严重(宋英博, 2010; 孙振宁等, 2012), 影响了大豆根瘤菌的生物固氮作用(Escuredo *et al.*, 1996; 王树起等, 2009)。为此, 本文以黑龙江省农业科学院土壤肥料与环境资源研究所于1979年建立的黑土长期定位施肥土壤中分离的大豆根瘤菌为对象, 采用BOX-PCR和IGS-PCR-RFLP基因序列分析方法, 结合土壤理化性质, 研究了大豆根瘤菌对不同施肥制度的响应特征, 以期探明土壤理化性质的变化对大豆根瘤菌群体结构和多样性的影响, 同时发现对环境变化的具有适应能力的优良根瘤菌菌株, 为我国大豆根瘤菌的应用提供材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计

实验在黑龙江省农业科学院“黑土肥力与肥效长期定位实验地”进行。实验点位于黑龙江省哈尔滨市( $45^{\circ}40' N$ ,  $126^{\circ}35' E$ ), 属于典型的季风性气候, 年平均气温 $3.0^{\circ}C$ , 年平均降水量575 mm, 年平均蒸发量1,315 mm。实验土壤为东北典型的农田黑土, 基础理化性质为: 有机质26.7 g/kg; 碱解氮151.1 mg/kg; 有效磷( $P_2O_5$ ) 51.0 mg/kg; 有效钾( $K_2O$ ) 200 mg/kg; pH 7.22。

长期定位实验开始于1979年, 实验设13个处理, 按小麦—大豆—玉米顺序轮作。本研究选其中的7个处理: (1)不施肥(CK); (2)有机肥(OM); (3)单施氮肥( $N_1$ ); (4)单施2倍氮肥( $N_2$ ); (5)氮肥磷肥混施( $N_1P_1$ ); (6)2倍氮肥磷肥混施( $N_2P_2$ ); (7)氮肥和有机肥( $N_1+OM$ )。各处理肥料的用量和类型见表1。

表1 各处理施肥种类、施用量及分离菌株数量  
Table 1 The dose of different fertilization and number of isolated rhizobium strains

处理 Treatment	施肥种类 Fertilizer type	施用量 Dose of fertilization (kg/ha)	菌株数量 Number of strains
CK	不施肥 No fertilizer	0	32
OM	马粪 Horse manure	18,600	32
N <sub>1</sub> +OM	尿素+马粪 Urea + Horse manure	75+18,600	45
N <sub>1</sub>	尿素 Urea	75	48
N <sub>2</sub>	尿素 Urea	150	41
N <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	尿素+过磷酸钙 Urea & Calcium superphosphate	75+150	28
N <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	尿素+过磷酸钙 Urea & Calcium superphosphate	150 +300	28

1.2 菌株的分离与参比菌株

将根瘤用无菌水洗涤后, 用体积浓度95%的酒精浸泡30 s, 再用1 g/L HgCl<sub>2</sub>溶液消毒5 min。采用平板划线法分离、纯化菌株, 挑取单菌落。革兰氏染色, 镜检, 斜面保藏。菌株的回接验证采用蛭石盆栽的方法, 使用的大豆品种为黑农63。45 d后观察植株是否结瘤, 判定回接菌株是否为根瘤菌。共获得254株根瘤菌, 各处理分离的菌株数量见表1。

参比菌株为*Bradyrhizobium japonicum* USDA 6<sup>T</sup>、*Bradyrhizobium elkanii* USDA 76<sup>T</sup>、*Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU10071<sup>T</sup>、*Bradyrhizobium liaoningense* USDA 3622<sup>T</sup>、*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup>、*Sinorhizobium fredii* USDA 205<sup>T</sup>。

1.3 土壤的采集和基本理化性质的测定

土壤样品采集于2011年7月, 采用五点采样法, 采样深度为0–20 cm, 将5个点混匀作为一个样。CK、N<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>处理的部分土样保存于4℃冰箱, 用于根瘤菌数量的测定。土壤风干后过1 mm筛, 采用常规分析法(鲁如坤, 2000)测定土壤pH、有机质、速效氮、速效磷和速效钾等理化指标。

1.4 总DNA的提取

使用GUTC硅藻土法提取总DNA(Terefework *et al.*, 2001)。

1.5 BOX-PCR、IGS-PCR-RFLP 和 16S rDNA PCR扩增

BOX-PCR所用引物序列为: 5'-CTACGGCAA-GGCGACGCTGACG-3', PCR反应条件按照文献(Grossman *et al.*, 2011)操作。IGS-PCR-RFLP所用正向引物为: FGPS1490 5'-CCGGGTTTCCCCATTC-GG-3', 反向引物为: FGPS132 5'-TGCGGCATCA-

CCTCCTT-3', PCR反应条件按照文献(Terefework *et al.*, 2001)操作。IGS-PCR-RFLP扩增产物分别用3种限制性内切酶进行酶切: *Msp* I、*Mbo* I和*Hae* III, 酶切反应体系按照限制性内切酶自带说明书进行。16S rDNA PCR采用细菌通用引物27F 5'-AGAGTT-TGATCCTGGCTCA-3'和1492R 5'-GGTTACCTTG-TTACGACTT-3', PCR反应条件按照文献(Terefework *et al.*, 2001)操作, 16S rDNA序列的测定由宝锐通生物科技(北京)有限公司完成。

1.6 系统发育树的构建

从GenBank中获取参比菌株的16S rDNA序列, 通过MEGA version 5.1软件完成序列的比对和系统发育树的构建。序列比对采用Clustal W, 系统发育树的构建采用Neighbour-Joining模型, 自展分析采用1,000次重复, 并采用DNAMAN version 6.0.3.99计算供试菌株及参比菌株序列的相似性值。

1.7 土壤中根瘤菌数量的测定

2012年7–9月采用最大或然数法(Most Probable Number, MPN)测定CK、N<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>3个处理土壤中根瘤菌数量。取10 g土壤加入到100 mL无菌水中, 制成1比1×10<sup>1</sup>土壤悬液, 按1:10进行系列稀释, 得到1比1×10<sup>2</sup>, …… 1比1×10<sup>6</sup>土壤悬液。将土壤悬液接种到蛭石盆栽中(按无菌操作进行), 每个稀释度接种3盆, 每盆种植3颗大豆(黑农63), 每颗大豆接种1 mL土壤悬液。以无菌水为阴性对照。45 d后观察植株是否结瘤, 如果1盆中至少有1颗植株结瘤, 则该盆为阳性。根据土壤悬液各稀释系列浓度盆栽阳性数量结果, 在MPN统计表中查出近似值, 即可计算出土壤中根瘤菌数量(Vincent, 1970)。

1.8 数据计算和处理

处理根瘤菌的多样性采用以下指数表述(马克

平, 1994): 物种丰富度指数为 $R = (S-1)/\ln N$ ; Shannon-Wiener多样性指数为 $H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ ; Simpson优势度指数为 $D = 1/\sum_{i=1}^S P_i^2$ 。其中 $S$ 为BOX-PCR分群总数,  $P_i$ 为第 $i$ 群的比例,  $P_i = N_i/N$ ,  $N_i$ 为处理中第 $i$ 个群的个体数,  $N$ 为所有群的个体数量。

使用CANOCO 5.0软件进行大豆根瘤菌群体结构和土壤理化性质的典范对应分析(CCA); 使用SPSS17.0软件分析差异显著性、处理与BOX-PCR群之间的相关性、多样性与土壤理化指标的通径分析。

2 结果

2.1 BOX-PCR聚类分析

供试的254株大豆根瘤菌株的BOX-PCR电泳图谱显示条带数量在14–18个之间, 条带大小约为0.2–4.0 kb。将同一处理相同的图谱类型合并, 共有39个图谱类型, 每个图谱类型选取1个菌株进行聚类分析, 聚类结果、菌株分离地点及每个图谱类型菌株数量见图1。供试菌株在54.87%的相似性水平上与*B. japonium* USDA6<sup>T</sup>、*B. diazoefficiens* USDA110<sup>T</sup>和*B. liaoningense* USDA3622<sup>T</sup>聚在一起。依据

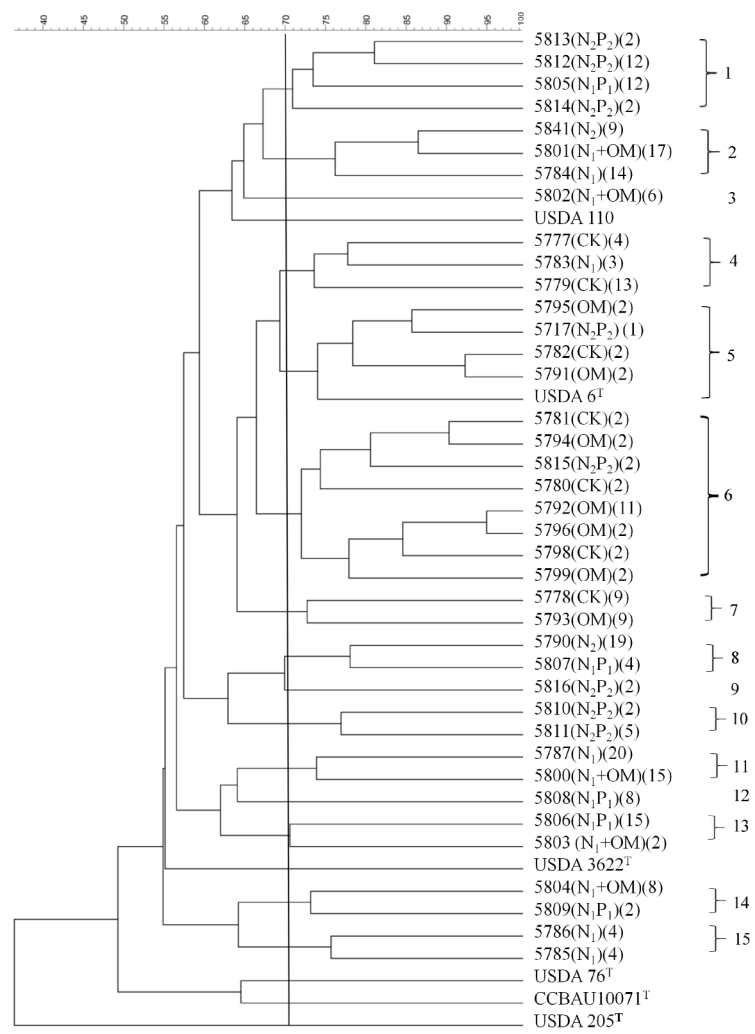


图1 BOX-PCR图谱聚类分析树状图。括号内的处理编号代表菌株分离地点, 括号内的数字代表具有相同BOX-PCR图谱的菌株数量。

Fig. 1 The dendrogram of BOX-PCR cluster analysis. The codes of the treatments in parenthesis refer to sampling sites, and the numbers in parenthesis refer to the strain numbers with same BOX-PCR type.

BOX-PCR 在相似性 70% 即可独立成群的原则 (Kaschuk *et al.*, 2006; Grossman *et al.*, 2011), 供试菌株在 70% 的相似性水平上被分为 15 个群, 按从上往下的顺序依次编号为 1–15 (图 1)。

## 2.2 IGS-PCR-RFLP 聚类分析

将 BOX-PCR 选取的 39 个菌株的 IGS-PCR-RFLP 结果进行聚类分析。结果 (图 2) 显示, 供试菌株在 84.37% 的相似性水平上与 *B. japonium* USDA6<sup>T</sup>、*B. diazoefficiens* USDA 110<sup>T</sup> 和 *B. liaoningense* USDA3622<sup>T</sup> 聚在一起, 与 BOX-PCR 结果一致。在

87.47% 的相似性水平下参比菌株可以分开, 因此选取此相似性水平进行 IGS-RFLP 分群 (Lu *et al.*, 2009), 供试菌株共分为 A、B、C 三个群。在 94.29% 的相似性水平上, 群 A 分为 A1 和 A2 两个亚群; 群 B 分为 B1、B2、B3 和 B4 四个亚群; 群 C 分为 C1 和 C2 两个亚群。

## 2.3 16S rDNA 全序列系统发育分析

根据 IGS PCR-RFLP 的聚类分析结果, 选用 IGS 各亚群代表菌株 8 株进行 16S rDNA 序列测定和构建系统发育树。从图 3 可知, 菌株 5779、5798、5782

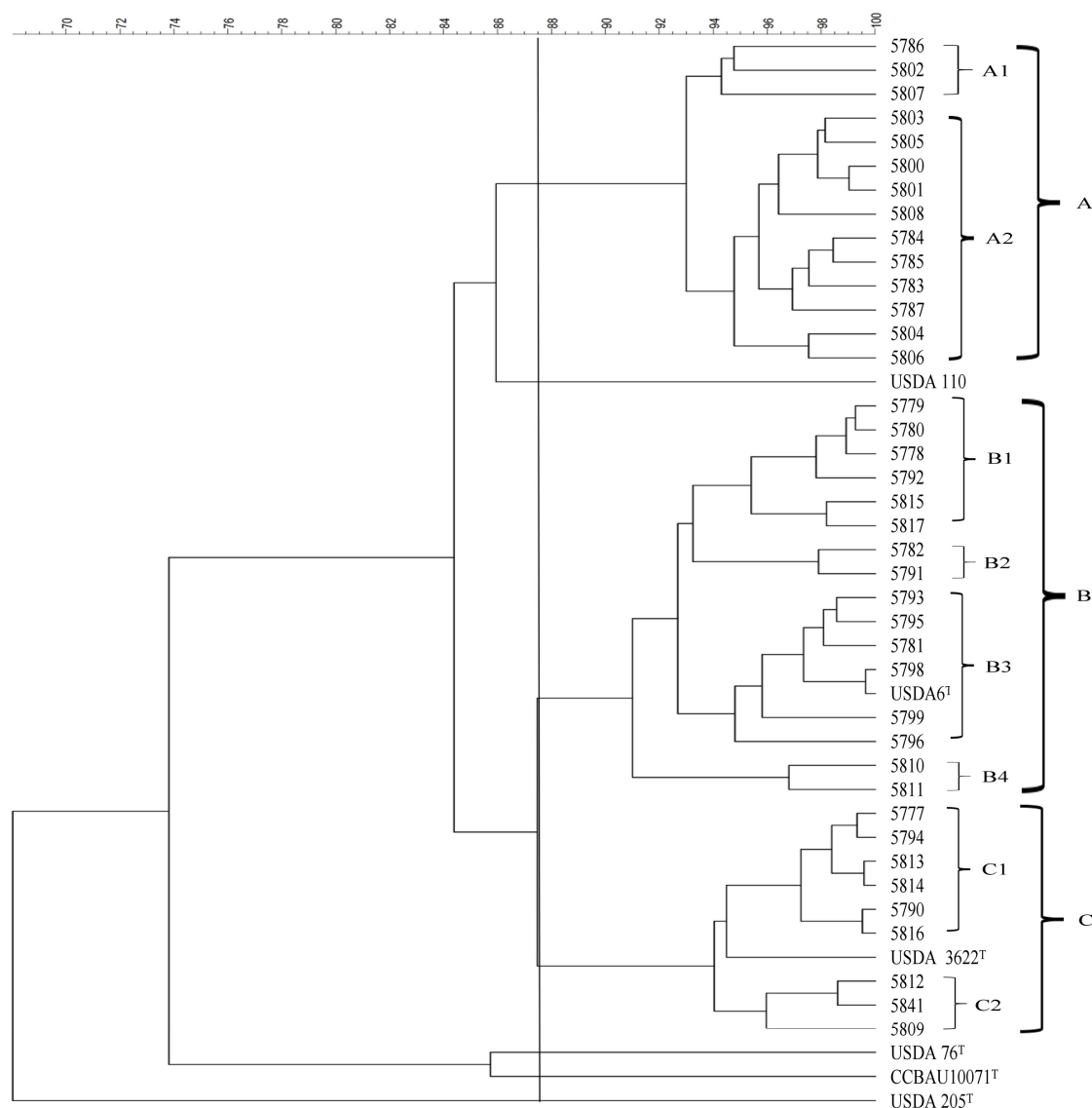


图2 IGS PCR-RFLP 指纹图谱聚类分析树状图。A1 和 A2 为群 A 的亚群, B1、B2、B3 和 B4 为群 B 的亚群, C1 和 C2 为群 C 的亚群。  
Fig. 2 The dendrogram of IGS PCR-RFLP cluster analysis. A1 and A2 are subgroups of A group, B1, B2, B3 and B4 are subgroups of B group, and C1 and C2 are subgroups of C group.

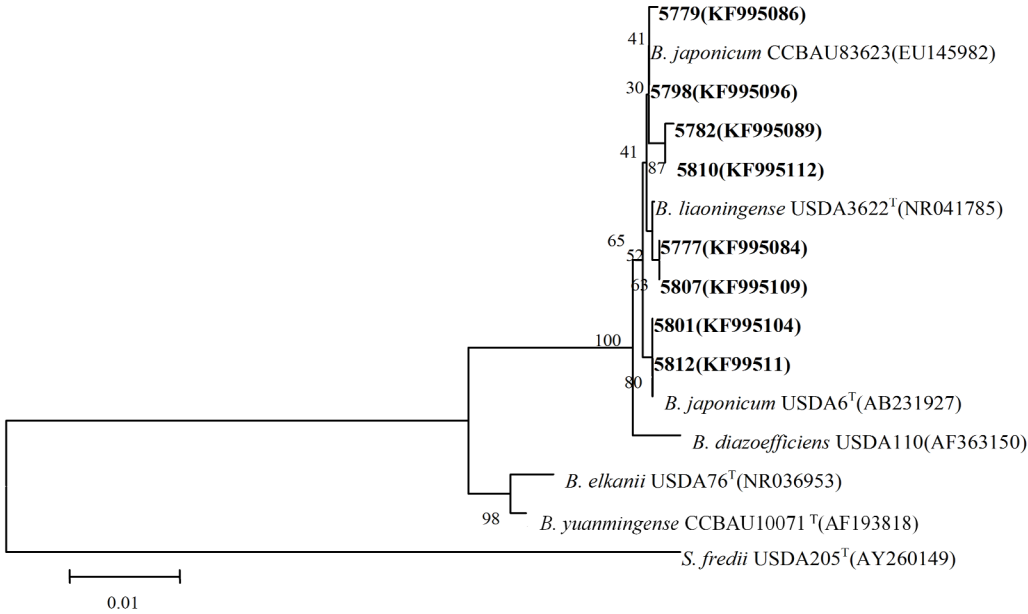


图3 代表菌株与参比菌株16S rDNA序列的Neighbor-joining聚类图。图中分支上的数字表示可信度, 括号内为GenBank登录号, 0.01表示遗传距离。  
Fig. 3 Neighbor-joining clustering phylogenetic tree of 16S rDNA sequence between representatives of isolated rhizobia and the reference strains. The values on branch stand for reliabilities and the numbers in the parenthesis are GenBank accession numbers. 0.01 denoted genetic distances.

和5810与模式菌株*B. japonicum* CCBAU83623聚在一起; 菌株5801和5812与模式菌株*B. japonicum* USDA6<sup>T</sup>聚在一起; 菌株5777和5807与模式菌株*B. liaoningense* USDA3622<sup>T</sup>聚在一起; 所有菌株均与模式菌株*B. elkanii* USDA76<sup>T</sup>、*B. yuanmingense* CCBAU10071<sup>T</sup>、*S. fredii* USDA205<sup>T</sup>分开。以上结果表明供试菌株均为慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*), 其中大部分菌株与*B. japonicum*亲缘关系最近, 部分菌株与*B. liaoningense*亲缘关系最近。

2.4 不同施肥处理对大豆根瘤菌群体结构的影响

BOX-PCR图谱具有菌株特异性, 适合于种及种以下水平上的遗传多样性研究(张红侠等, 2010), 因此本研究对BOX-PCR分群结果与施肥处理进行了相关性分析。结果(图4)显示, 根据施肥处理和BOX-PCR群之间的距离, 形成了明显的3个大群: 2个不施化肥处理(CK和OM)、3个施化学氮肥处理( $N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_1+OM$ )、2个氮肥磷肥混施处理( $N_1P_1$ 和 $N_2P_2$ )分别聚在一起, 形成3种施肥类型。从图4可知, BOX-PCR群中, 群4、5、6、7形成一个群体, 与不施化肥处理相对应; 群2、3、8、11、14、15形成一个群体, 与施化学氮肥处理相对应; 群1、9、10、

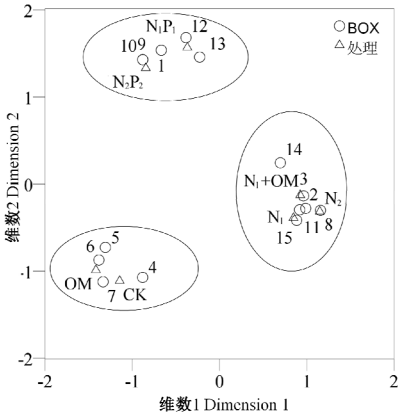


图4 大豆根瘤菌的BOX-PCR群与施肥处理进行相关性分析。图中○代表处理; △代表BOX-PCR群。  
Fig. 4 Correlation analysis between fertilization treatments and BOX-PCR genomic groups of soybean rhizobia. ○ Treatments; △ Groups of BOX-PCR in the figure.

12、13形成一个群体, 与化学氮肥磷肥混施处理相对应。施肥处理和BOX-PCR群之间的相关性为0.346( $P>0.05$ ), 虽然两者没有达到显著相关, 但从以上结果可以看出: 同一种施肥类型的土壤根瘤菌具有相似的群体结构, 不同施肥类型的土壤根瘤菌

表2 不同施肥处理土壤的理化性质  
Table 2 Soil properties in different fertilization treatments

施肥处理 Treatments	pH	有机质含量 Organic manure (g/kg)	速效氮含量 Available N (mg/kg)	速效磷含量 Available P (mg/kg)	速效钾含量 Available K (mg/kg)
CK	6.91 <sup>b</sup>	22.3 <sup>d</sup>	54.10 <sup>c</sup>	2.32 <sup>f</sup>	175.27 <sup>b</sup>
OM	7.01 <sup>a</sup>	25.0 <sup>b</sup>	76.96 <sup>c</sup>	13.02 <sup>d</sup>	201.85 <sup>a</sup>
N <sub>1</sub>	5.94 <sup>d</sup>	22.9 <sup>cd</sup>	75.85 <sup>c</sup>	2.92 <sup>f</sup>	158.40 <sup>d</sup>
N <sub>2</sub>	5.00 <sup>e</sup>	23.0 <sup>c</sup>	95.39 <sup>a</sup>	5.48 <sup>e</sup>	143.78 <sup>e</sup>
N <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	5.94 <sup>d</sup>	24.5 <sup>b</sup>	69.12 <sup>d</sup>	58.10 <sup>b</sup>	167.00 <sup>c</sup>
N <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	4.94 <sup>e</sup>	23.6 <sup>c</sup>	95.65 <sup>a</sup>	124.93 <sup>a</sup>	154.12 <sup>d</sup>
N <sub>1</sub> +OM	6.32 <sup>c</sup>	28.0 <sup>a</sup>	85.72 <sup>b</sup>	14.35 <sup>c</sup>	199.58 <sup>a</sup>

上标不同字母表示不同处理间差异达5%显著水平 Values followed by different superscripts among treatments mean significant at 0.05 level

群体结构之间差异较大;同不施肥对照相比,化肥对土壤中根瘤菌的群体结构影响较强,而有机肥对土壤根瘤菌的群体结构影响轻微。

2.5 大豆根瘤菌群体结构与土壤理化性质对应分析

土壤理化性质测定结果显示(表2),在长期施肥条件下各处理的土壤理化性质出现了不同程度的变化。用CANOCO 5.0软件对BOX-PCR分群结果和土壤理化性质进行典范对应分析(CCA),结果显示(图5),第一轴(PC1)和第二轴(PC2)轴共解释变异的47.64%。通过蒙特卡罗排列检验(Monte Carlo permutation test),排除贡献小的因子,发现pH、速效氮和速效磷与根瘤菌群体结构极显著相关( $P=0.002, 0.004, 0.002$ ),具有独立解释的显著性。

CCA分析结果显示,主要来自CK和OM处理的群体位于第三象限,与pH值正相关,与速效磷和速效氮负相关;主要来自N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>和N<sub>1</sub>+OM处理的群体位于第一和第四象限,与速效氮正相关,与速效磷和pH值负相关;主要来自N<sub>1</sub>P<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>处理的群体位于第二象限,与速效磷和速效氮正相关,与pH值负相关。从以上结果可以看出,长期不同施肥处理改变了土壤性状,对不同群体的根瘤菌产生了特异的选择压力,从而导致其群体结构发生变化。

2.6 长期单施氮肥对土壤中大豆根瘤数量的影响

使用MPN法测定了CK、N<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>处理的土壤中大豆根瘤菌数量。结果为:CK处理 $9.33\times10^5$ 个/g; N<sub>1</sub>处理 $2.33\times10^5$ 个/g; N<sub>2</sub>处理 $2.33\times10^4$ 个/g。从以上结果可以看出,不同氮肥用量处理间的土壤大豆根瘤菌数量差异显著,在单施氮肥的条件下,氮肥用量越多,土壤中根瘤菌数量呈现减少的趋势。

2.7 不同施肥处理对大豆根瘤菌多样性的影响

运用群落生态学方法,根据BOX-PCR 100%相

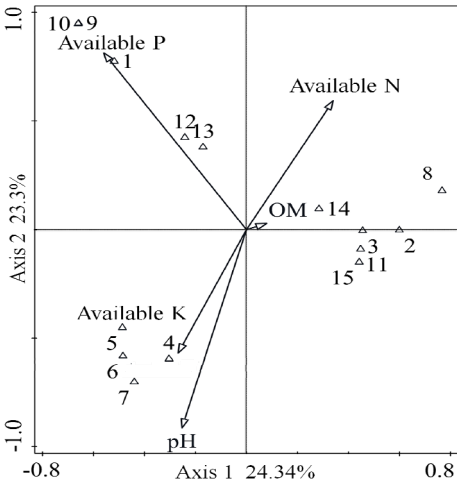


图5 大豆根瘤菌的BOX-PCR群与土壤理化性质典范对应分析。图中△代表BOX-PCR群。  
Fig. 5 Canonical correspondence analysis between soil properties and BOX-PCR genomic groups of soybean rhizobia. △ Groups of BOX-PCR in the figure.

似性水平上的图谱类型总数,计算了各处理大豆根瘤菌的丰富度指数、Simpson指数和Shannon-Wiener指数(表3)。结果显示:在各处理中,N<sub>2</sub>P<sub>2</sub>处理的丰富度指数和Shannon-Wiener指数显著高于其他处理;OM处理的Simpson指数最高;N<sub>1</sub>和N<sub>2</sub>处理的3种指数都显著低于其他处理,并且N<sub>2</sub>处理低于N<sub>1</sub>处理。以上结果说明长期单施氮肥对大豆根瘤菌的多样性有抑制作用,氮肥用量越多,抑制作用越强,而氮肥与磷肥、有机肥配施可以缓解氮肥对根瘤菌多样性的抑制。

2.8 土壤理化性质与大豆根瘤菌多样性指数的相关性和通径分析

土壤各理化指标与3种多样性指数相关性结果



表3 不同施肥处理大豆根瘤菌多样性指数  
Table 3 The diversity indexes of rhizobia in different fertilization treatments

多样性指数 Diversity index	施肥处理 Treatments						
	CK	OM	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	N <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	N <sub>1</sub> +OM
丰富度指数 Richness index	1.485 <sup>b*</sup>	1.553 <sup>b</sup>	1.101 <sup>d</sup>	0.281 <sup>c</sup>	1.294 <sup>c</sup>	2.175 <sup>a</sup>	1.108 <sup>d</sup>
Simpson指数 Simpson index	0.767 <sup>a</sup>	0.815 <sup>a</sup>	0.562 <sup>c</sup>	0.431 <sup>c</sup>	0.682 <sup>b</sup>	0.707 <sup>b</sup>	0.706 <sup>b</sup>
Shannon-Wiener指数 Shannon-Wiener index	1.416 <sup>b</sup>	1.249 <sup>c</sup>	0.993 <sup>d</sup>	0.622 <sup>c</sup>	1.444 <sup>b</sup>	1.572 <sup>a</sup>	1.404 <sup>b</sup>

上标不同字母表示不同处理间差异达5%显著水平。Values followed by different superscripts among treatments mean significant at 0.05 level.

表4 土壤理化性质对大豆根瘤菌多样性的通径分析  
Table 4 Analysis of path coefficients between diversity index of rhizobia and soil properties

多样性指数 Diversity index	土壤养分 Soil properties	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	相关系数 Correlation coefficient
丰富度指数 Richness index	X <sub>1</sub>	<u>0.462</u>	0.117	-0.077	-0.836	-0.334
	X <sub>2</sub>	0.118	<u>1.166</u>	0.002	-0.604	0.682
	X <sub>3</sub>	0.074	0.009	<u>-0.309</u>	0.253	0.027
	X <sub>4</sub>	-0.226	-0.640	-0.071	<u>1.100</u>	0.163
Shannon-Wiener指数 Shannon-Wiener index	X <sub>1</sub>	<u>-0.521</u>	0.386	0.092	-0.274	-0.317
	X <sub>2</sub>	-0.206	<u>0.976</u>	-0.003	-0.198	0.569
	X <sub>3</sub>	0.130	-0.008	<u>0.370</u>	0.083	0.575
	X <sub>4</sub>	0.396	-0.536	0.085	<u>0.360</u>	0.305
Simpson指数 Simpson index	X <sub>1</sub>	<u>-0.039</u>	0.317	-0.002	-0.870	-0.594
	X <sub>2</sub>	-0.015	<u>0.801</u>	0.000	-0.628	0.158
	X <sub>3</sub>	-0.010	-0.006	<u>-0.010</u>	0.263	0.237
	X <sub>4</sub>	0.030	-0.440	0.000	<u>1.144</u>	0.734

X<sub>1</sub>–X<sub>4</sub>分别代表速效氮、速效磷、有机质和pH; 划横线的数据为直接通径系数, 其他为间接通径系数。X<sub>1</sub>–X<sub>4</sub> indicate available N, available P, organic matter and pH, respectively. The underlined data are direct path coefficients, other data are indirect path coefficients.

表明(表4), 速效磷、pH和有机质与3种多样性指数均为不显著正相关, 而速效氮与3种多样性指数均为不显著负相关。采用通径分析方法进一步分析各理化指标对多样性指数直接和间接的作用, 结果显示(表4): 土壤速效磷对3种多样性指数均为直接正效应, 分别为1.166、0.976和0.801; pH值对3种多样性指数均为直接正效应, 分别为1.100、0.360和1.144; 速效氮对3种多样性指数的直接效应分别为0.462、-0.521和-0.039, 其对丰富度指数和Simpson指数的直接效应小于pH的间接效应(-0.836, -0.870)。由此可见, 速效磷和pH对多样性指数有直接影响, 速效氮主要通过pH的间接负效应影响多样性指数。

3 讨论

我国是大豆的起源地, 有多种根瘤菌可以与大豆结瘤, 其中东北地区主要以*B. japonicum*为主, 还包括少量的*B. liaoningense*和*B. elkanii* (张伟涛等, 2006; Wang *et al.*, 2009)。本研究中大

部分菌株与*B. japonicum*亲缘关系最近, 部分菌株与*B. liaoningense*亲缘关系最近, 但没有发现*B. elkanii*。王卫卫等(2013)对东北地区312株根瘤菌大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育关系进行了分析, 也同样没有发现该种, 这可能与*B. elkanii*在东北地区存在过少有关(Man *et al.*, 2008)。

我国根瘤菌的分布存在着明显的地域特征, 不仅表现在属种的分布上(陈文新等, 2004), 而且受环境的影响, 同一个种的不同基因型群体也表现出地区分布的差异性(张美玲等, 2008)。本研究中, 大豆根瘤菌的群体结构与施用肥料的类型具有一定程度的关联。其中CK处理与OM处理具有相似的群体结构, 而与化肥处理的根瘤菌群体结构有很大差异, 这说明化肥处理对大豆根瘤菌群体结构的影响大于有机肥处理, 此研究结果与刘朴方等(2012)一致。CCA分析结果显示, 根瘤菌群体结构变化与土壤pH、速效氮含量和速效磷含量显著相关( $P < 0.05$ ), 与有机质含量不显著相关, 进一步表明了施用化肥对根瘤菌群体结构产生了重要影响。当土壤



肥力发生显著变化时,土壤中的细菌为适应环境会做出相应的反馈(Smit *et al.*, 2001; Buckley *et al.*, 2003),导致对生境变化较敏感的基因型群体结构发生了显著变化,其中一部分群体受激发效应,群体丰度上升,而另一部分群体丰度下降甚至消失(Michie *et al.*, 2006)。本研究中在各化肥处理相对应的根瘤菌群体中没有一株菌来自CK和OM处理(图1),印证了上述研究的结论。

以往研究表明,土壤pH酸化会抑制土壤中腐生根瘤菌的生长(Brockwell *et al.*, 1991, Riccillo *et al.*, 2000),降低丰富度指数(Andrade *et al.*, 2002)。本研究中,在单施氮肥的条件下,随着氮肥的用量增加,土壤速效氮含量越高, pH越低(表2),根瘤菌的数量和多样性指数也随之下降,这与以前的研究结果相一致。通径分析结果表明(表4),速效氮主要是通过pH的间接作用影响根瘤菌多样性指数。前人研究结果显示,长期施用化学氮肥会导致土壤酸化(Malhi *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2010),因此可以推断,长期单独施用化学氮肥使土壤pH显著下降,从而进一步造成土壤中根瘤菌数量和多样性降低。

磷是影响共生固氮的非常重要的营养元素,豆科植物的结瘤、固氮酶的活性与土壤中磷的供应水平成正相关(Hellsten *et al.*, 2001)。有关磷肥对土壤微生物特别是对根瘤菌的影响研究较少,但已发现磷肥会影响土壤中某些微生物的菌群结构和组成(Jorquera *et al.*, 2013),如Li等(2012)认为*Mesorhizobium*属的分布与速效磷含量有关。本研究中磷肥与氮肥配施用处理根瘤菌的3种多样性指数显著高于单施氮肥处理(表3),通径分析结果(表4)进一步证实了速效磷含量对3种多样性指数均有较高的直接正效应(表4),表明了磷肥有助于提高大豆根瘤菌的多样性。

长期施用化学氮肥不仅影响结瘤和固氮作用,而且通过改变土壤理化性质进而抑制根瘤菌的数量和多样性。因此在大豆生产中应减少氮肥用量,重视氮肥与有机肥、磷肥的合理配合施用,以维持土壤根瘤菌多样性,充分发挥大豆生物固氮作用。供试菌株中部分群体具有耐高氮和低pH的特性,可进一步筛选高效菌株应用到化学氮肥大量施用地区。

## 参考文献

- Andrade DS, Murphy PJ, Giller KE (2002) The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Applied Environmental Microbiology*, **68**, 4025–4034.
- Brockwell J, Pilka A, Holliday RA (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **31**, 211–219.
- Buckley DH, Schmidt TM (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, **5**, 441–452.
- Chen WX (陈文新), Wang ET (汪恩涛), Chen WF (陈文峰) (2004) The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), **37**, 81–86. (in Chinese with English abstract)
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Klucas RV, Becana M (1996) Involvement of activated oxygen in nitrate induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology*, **110**, 1187–1195.
- Grossman JM, Schipanski ME, Sooksanguan T, Seehaver S, Drinkwater LE (2011) Diversity of rhizobia in soybean [*Glycine max* (Vinton)] nodules varies under organic and conventional management. *Applied Soil Ecology*, **50**, 14–20.
- Guan DW, Ma MC, Ma ZY, Jiang X, Li L, Cao FM, Shen DL, Chen HJ, Li J (2012) Analysis of two *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic matching for nodulation by primary proteomic. *Journal of Integrative Agriculture*, **11**, 1377–1383.
- Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Christie P, Gouldin KWT (2010) Significant acidification in major Chinese croplands. *Science*, **327**, 1008–1010.
- Hellsten A, Huss-Danell K (2001) Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science*, **50**, 135–142.
- Herrmann L, Chotte JL, Thuita M, Lesueur D (2014) Effects of cropping systems, maize residues application and N fertilization on promiscuous soybean yields and diversity of native rhizobia in Central Kenya. *Pedobiologia*, **57**, 75–85.
- Jorquera MA, Martínez OA, Marileo LG, Acuña JJ, Saggart S, Mora ML (2013) Effect of nitrogen and phosphorus fertilization on the composition of rhizobacterial communities of two Chilean Andisol pastures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **30**, 99–107.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS, Campo RJ (2006) Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, **32**, 210–220.
- Lei X, Wang ET, Chen WF, Sui XH, Chen WX (2008) Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Archives of Microbiology*, **190**, 657–671.

- Li J (李俊), Shen DL (沈德龙), Lin XG (林先贵) (2011) *Agricultural Microbial Research and Industrialization Progress* (农业微生物研究与产业化进展). Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Li J, Xiao WL, Ma MC, Guan DW, Jiang X, Cao FM, Shen DL, Chen HJ, Li L (2011) Proteomic study on two *Bradyrhizobium japonicum* strains with different competitiveness for nodulation. *Agricultural Sciences in China* (中国农业科学英文版), **10**, 1072–1079.
- Li M, Li Y, Chen WF, Sui XH, Li Y, Li Y Jr, Wang ET, Chen WX (2012) Genetic diversity, community structure and distribution of rhizobia in the root nodules of *Caragana* spp. from arid and semi-arid alkaline deserts, in the north of China. *Systematic and Applied Microbiology*, **35**, 239–245.
- Liu PF (刘朴方), Wang HY (王宏燕) (2012) Effects of organic and chemical fertilizer applications on the diversity of soybean rhizobia. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), **31**, 1468–1472. (in Chinese with English abstract)
- Lu RK (鲁如坤) (2000) *Analysis Methods of Soil and Agricultural Chemistry* (土壤农化分析). China Agricultural Science and Technology Publishing House, Beijing. (in Chinese)
- Lu YL, Chen WF, Wang ET, Guan SH, Yan XR, Chen WX (2009) Genetic diversity and biogeography of rhizobia associated with *Caragana* species in three ecological regions of China. *Systematic and Applied Microbiology*, **32**, 351–361.
- Qian YQ(钱迎倩), Ma KP (马克平) (1994) The measurement of community diversity. In: *Principles and Methodologies of Biodiversity Studies* (生物多样性研究的原理与方法). China Science and Technology Press, Beijing. (in Chinese)
- Malhi SS, Nyborg M, Harapiak JT (1998) Effects of long-term N fertilizer-induced acidification and liming on micronutrients in soil and in brome grass hay. *Soil and Tillage Research*, **48**, 91–101.
- Man CX, Wang H, Chen WF, Sui XH, Wang ET, Chen WC (2008) Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China. *Plant and Soil*, **310**, 77–87.
- Michie KA, Löwe J (2006) Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annual Review of Biochemistry*, **75**, 467–492.
- Mothapo NV, Grossman JM, Maul JE, Shi W, Isleib T (2013) Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. *Applied Soil Ecology*, **64**, 201–213.
- Nassira R, Gilles B, Abdelhamid D, Karine H, Philippe LL, Gisèle L (2014) Genotypic and symbiotic diversity of rhizobium populations associated with cultivated lentil and pea in sub-humid and semi-arid regions of Eastern Algeria. *Systematic and Applied Microbiology*, **37**, 368–375.
- Riccillo PM, Muglia CI, Bruijn FJ, Roe AJ, Booth IR, Aguilar OM (2000) Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology*, **182**, 1748–1753.
- Smit E, Leeflang P, Gommans S, Broek J, Mil S, Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2284–2291.
- Song YB (宋英博) (2010) Effect of different nitrogen application on protein and fat content in soybean. *Heilongjiang Agricultural Sciences* (黑龙江农业科学), **7**, 52–53. (in Chinese with English abstract)
- Sun JL (孙景玲), Wei D (魏丹), Ma XZ (马星竹), Liu DZ (刘德志), Guo WY (郭文义), Liu XL (刘晓莉), Lu WC (鹿文成) (2013) Establishing fertilization recommendation index of soybean in black soil region of Heilongjiang Province. *Soybean Science* (大豆科学), **32**, 512–516. (in Chinese with English abstract)
- Sun ZN (孙振宇), Duan XW (段兴武), Xie Y (谢云), Liu G (刘刚) (2012) Nutrient supplying capacity of typical black soil and fertilizer use efficiency of soybean in Heilongjiang Province. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), **28**(15), 46–51. (in Chinese with English abstract)
- Terefework Z, Kajjalainen S, Lindström K (2001) AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*, **91**, 169–180.
- Tian CF, Wang ET, Han TX, Sui XH, Chen WX (2007) Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Archives of Microbiology*, **188**, 273–282.
- Vicent JM (1970) *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. International Biological Programme Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wang H, Man CX, Wang ET, Chen WX (2009) Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. *Plant and Soil*, **314**, 169–182.
- Wang SQ (王树起), Han XZ (韩晓增), Qiao YF (乔云发), Yan J (严君), Li XH (李晓慧) (2009) Nodule growth, nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L.) as affected by nitrogen application. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), **24**, 176–179. (in Chinese with English abstract)
- Wang WW (王卫卫), Guan DW (关大伟), Ma MC (马鸣超), Li L (李力), Cao FM (曹凤明), Li J (李俊) (2013) Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from northeast China. *Soybean Science* (大豆科学), **32**, 433–437. (in Chinese with English abstract)
- Wang Y (王英), Xie Y (谢云), Liu G (刘刚), Duan XW (段兴武), Sun ZN (孙振宇) (2011) Experimental study on the impact of soil moisture on soybean growth in the North eastern black soil area of China. *Agricultural Research in the Arid Areas* (干旱农业研究), **29**(3), 53–57. (in Chinese with English abstract)
- Youseif SH, Abd El-Megeed FH, Ageez A, Mohamed ZK,

- Shamseldin A, Saleh SA (2014) Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. *European Journal of Soil Biology*, **60**, 34–43.
- Zhang HX (张红侠), Feng RH (冯瑞华), Li J (李俊), Guan DW (关大伟), Cao FM (曹凤明) (2010) Genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia isolated from the regions of Loess Plateau in China. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), **50**, 1466–1473. (in Chinese with English abstract)
- Zhang ML (张美玲), Zhu B (朱博), Li X (李旭), Ju WT (鞠文庭), Wei GH (韦革宏) (2008) Genetic diversity and co-evolution of *Vicia* rhizobia in different geographical environments. *Journal of Northwest A & F University* (西北农林科技大学学报), **36**, 192–198. (in Chinese with English abstract)
- Zhang WT (张伟涛), Yang KJ (杨江科), Yuan TY (袁天英), Zhou JC (周俊初) (2006) Genetic diversity and phylogeny of soybean bradyrhizobia isolated from south and north region of China. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), **46**, 127–131. (in Chinese with English abstract)

(责任编辑: 郭良栋 责任编辑: 时意专)