

农肥和化肥施用对大豆根瘤菌多样性的影响*

刘朴方 王宏燕**

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要 基于6年的黑土培肥定位试验,从大豆根瘤中提取根瘤菌DNA,采用PCR-DGGE与克隆测序技术相结合的方法,分析了施用农肥和化肥对根瘤菌多样性的影响。DGGE图谱分析表明:对照(不施肥)处理的 *nifH* 基因条带数和多样性指数最大,各处理多样性指数差异显著,大小顺序为:对照>农肥高量>农肥低量=农化1:1>化肥高量>化肥低量。聚类分析显示,施用化肥的处理与其他处理相似性仅为66%,说明施用化肥的处理与其他处理相比大豆根瘤菌群落结构差异较大,显著改变了根瘤菌的群落结构。DGGE测序结果显示,大部分根瘤菌属于慢生根瘤菌属。农肥和化肥的施用均降低了大豆根瘤菌多样性,其中化肥处理更明显地降低了根瘤菌多样性。

关键词 农肥; 化肥; 大豆根瘤菌; *nifH*; PCR-DGGE

中图分类号 Q938.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)6-1468-05

Effects of organic and chemical fertilizer applications on the diversity of soybean rhizobia. LIU Pu-fang, WANG Hong-yan** (College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(6): 1468-1472.

Abstract: The rhizobial DNA was extracted from the root nodules of soybean plants at a 6-year experiment site on black soil, and PCR-DGGE and clone sequencing were adopted to analyze the effects of different fertilization treatments on the diversity of soybean rhizobia. In the treatment no fertilization, the band number of *nifH* gene and the diversity indices were the highest, and there existed significant differences in the diversity indices among different treatments, with the order of no fertilization > high application rate of organic manure > low application rate of organic manure, 1/2 organic manure plus 1/2 chemical fertilizer > high application rate of chemical fertilizer > low application rate of chemical fertilizer. Cluster analysis demonstrated that the fingerprints in treatments of chemical fertilization only had a similarity of 66% with those in other treatments, suggesting that chemical fertilization could significantly alter the community structure of soybean rhizobia. The PCR-DGGE and clone sequencing showed that most of the rhizobia were belonged to *Bradyrhizobium*. The application of organic manure and chemical fertilizer, especially the latter, could decrease the diversity of soybean rhizobia.

Key words: organic manure; chemical fertilizer; soybean rhizobia; *nifH*; PCR-DGGE.

虽然大豆根瘤具有较强的固氮能力,其固氮量占总氮吸收量的50%~60%(田艳洪等,2008),但仅靠根瘤固氮还不能完全满足大豆对氮素的需要,必须补充适量的氮肥(谷秋荣等,2010)。作物与根瘤菌的有效共生生成根瘤往往受到生态环境与肥力的影响(王克武等,2003;范富等,2006)。目前有关施肥对根瘤生长及固氮酶活性的研究较多(朱长甫

等,1995;杨子文等,2009),但施肥对根瘤菌多样性影响的研究鲜有报道。

已有研究根瘤菌一般是采集目的地土壤,用宿主植物捕集,然后分离纯化出根瘤菌进行研究(杨江科和周俊初,2000;陈文新,2004;张伟涛等,2006)。然而处于共生状态时,根瘤菌是以类菌体形式存在于同豆科植物形成的根瘤中,其形态及生理特性均与腐生状态的根瘤菌有差别(陈强等,2002)。本实验为了研究不同培肥方式对大豆根瘤菌多样性的影响,直接从大豆根瘤中提取DNA,用

* 国家科技支撑计划(2009BADB3B01)、东北农业大学博士启动基金(2010RCB28)、黑龙江省教育厅课题(193135)资助。

** 通讯作者 E-mail: why220@126.com

收稿日期: 2011-11-15 接受日期: 2012-02-16

nifH 基因特异引物对进行 PCR 扩增,然后用 DGGE 技术和克隆测序技术对 PCR 产物分析,以期明确农肥和化肥对大豆根瘤菌多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地概况和供试作物

试验地点设在哈尔滨市东北农业大学试验基地,年平均气温在 5 ℃ 左右,年降雨量 480 mm 左右,年日照时数 2500 h 左右,年有效积温 2300 ~ 2700 ℃。试验地进行长期定位培肥试验,始于 2003 年,轮作方式为大豆-玉米-玉米。土壤为黑土,理化性质为:有机质 28.9 g · kg⁻¹,全氮 0.3 g · kg⁻¹,全磷 4.4 g · kg⁻¹,碱解氮 168.6 mg · kg⁻¹,速效磷 37.7 mg · kg⁻¹,速效钾 88.2 mg · kg⁻¹,pH 值 6.39。

供试作物为大豆,品种为东农 42。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计及样品采集 本试验共设 6 个处理,为不施肥对照(1)、农肥低量(2)、农肥高量(3)、化肥低量(4)、化肥高量(5)、农肥化肥等量 1:1(6)。每个处理设 3 个小区(即重复 3 次),共 18 个小区。每个小区长 12 m,宽 4.2 m,面积为 50.4 m²。采取一次性施肥方案,施肥量及施肥方式见表 1。在 2010 年 7 月末,大豆鼓粒期,每个小区随机选 1 棵植株,连根带根部土壤挖出迅速带到实验室。

1.2.2 DNA 提取 采集的植株用水冲净根部的土壤,每颗植株随机选摘 1 个根瘤,相同处理的 3 个根瘤放在一起,先用 95% 乙醇处理 20 s,用超纯水冲洗 3 次后,用 0.1% 氯化汞处理 3 min,再用超纯水冲洗 3 次。将根瘤分别置于 1.5 mL Eppendorf 管中,按照陈强等(2002)方法提取根瘤菌类菌体 DNA。

1.2.3 PCR 扩增 固氮菌扩增采用 *nifH* 基因的特异引物对 POLF-GC 和 AQER 进行 PCR,扩增片段长度为 320 bp。POLFGC: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC

GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C TGC GAY CCSAAR GCB GAC TC-3'; AQER: 5'-GACG ATG TAG ATY TCC TG-3'(Poly *et al.*, 2001; 罗青等,2008),引物由上海生工合成。

反应体系:20 pmol 每种引物,1 U 的 Taq DNA polymerase, 5 μL 的 10 × buffer (free MgCl₂), 1.5 mmol · L⁻¹ 的 MgCl₂, 200 μmol · L⁻¹ dNTP (每种 10 mmol · L⁻¹), 100 ng 的模板 DNA, 终体积 50 μL。充分混匀,短暂离心,使附着管壁上的样品聚集在一起。反应条件:94 ℃、5 min, 94 ℃、1 min, 48 ℃、1 min, 72 ℃、1 min, 35 个循环; 72 ℃、7 min。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行电泳分离,丙烯酰胺凝胶强度为 8%,变性剂梯度为 35% ~ 60%,电泳缓冲液为 1 × TAE,将 10 μL PCR 产物和 10 μL 6 × loading buffer 混合好后,用微量进样器加入胶孔中,电压为 200 V,电泳温度为 60 ℃,电泳时间为 5 h,电泳结束后,用 AgNO₃ 染色,在凝胶成像仪下观察结果并拍照。

1.2.5 DGGE 图谱中优势条带回收与测序 用无菌手术刀从胶上不同位置切取 10 条优势条带,按照 Bowattee 等(2006)的方法回收 DGGE 带,由博仕生物技术有限责任公司纯化克隆条带并测定其序列,将所得 DNA 序列与 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中的已有序列进行序列比对并且登录 GenBank 获取测定序列的具体信息。

1.2.6 数据分析 采用 quantity one 对 DGGE 图谱中条带的位置和亮度进行数字化处理;采用 Excel 2003 对试验数据进行处理;SPSS 16.0 进行单因素方差分析和差异显著性检验(Duncan's Test)。采用 Quantity one 软件对不同样品进行聚类分析。多样性指数采用 D_{sh} 表示,其公式为:

$$D_{sh} = - \sum P_i \ln P_i = - \sum (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

式中: D_{sh} 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度,而条带的强度则通过条带的峰面积来表示; P_i 为某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率; N_i 为峰面积; N 为所有峰的总面积。

2 结果与分析

2.1 DGGE 图谱分析

对 PCR 产物进行 DGGE 电泳,得到 DGGE 指纹

表 1 不同培肥方式及肥料用量 (kg · hm⁻²)

Table 1 Different fertilizing patterns and dosage

标号	处理	肥料用量	N 含量
1	对照		0
2	农肥低量	堆肥 8100	187.5
3	农肥高量	堆肥 13500	262.5
4	化肥低量	磷酸二铵 150 尿素 45	187.5
5	化肥高量	磷酸二铵 250 尿素 75	262.5
6	农化 1:1	磷酸二铵 75 尿素 22.5 堆肥 4050	187.5

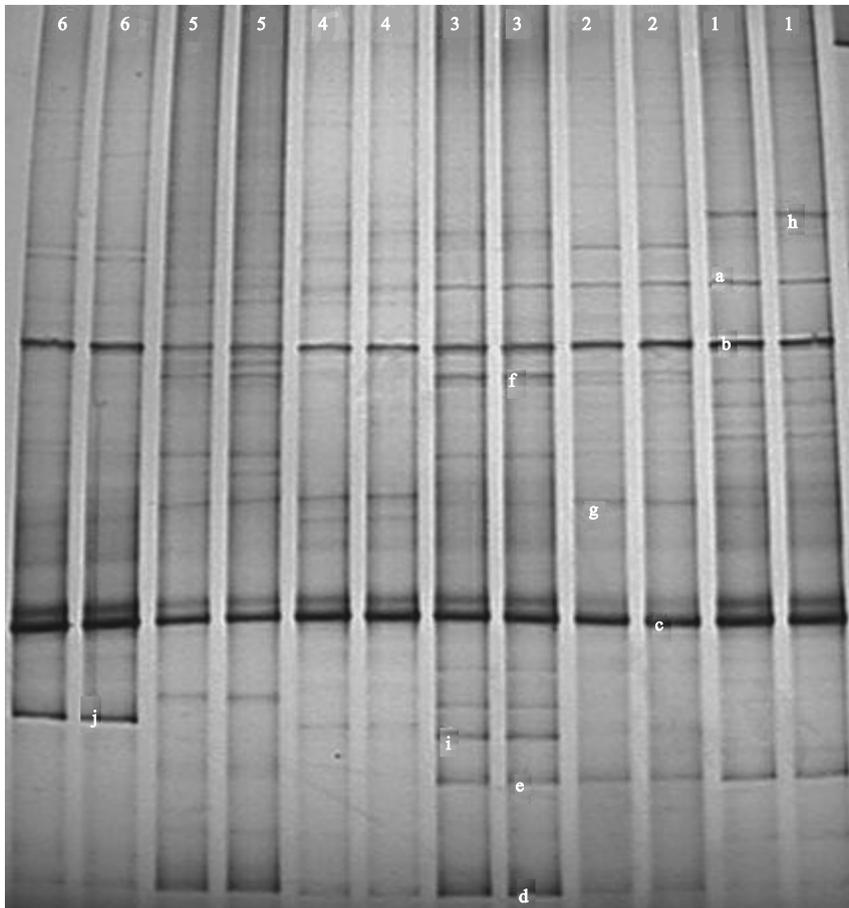


图1 不同施肥处理的 DGGE 指纹图谱 (标记处为条带被切取测序)

Fig. 1 DGGE fingerprinting of different fertilization treatments

1 对照(不施肥);2 农肥低量;3 农肥高量;4 化肥低量;5 化肥高量;6 农化1:1。

图谱(图1)。根据数字化处理结果得出:不同处理的条带数、条带位置和亮度存在一定的差异。部分条带为共有条带,如条带 b、c、d。说明这些条带所代表的根瘤菌很稳定,不易受培肥条件的影响。但同样存在一些特有条带,如条带 h、i,说明施用化肥与农肥对根瘤菌群落结构有不同程度的影响。

从 DGGE 图谱上得到的信息进行数字化分析后计算得到生物多样性指数(表2),对照处理的多

表2 不同施肥处理根瘤菌 DGGE 图谱条带数、多样性指数
Table 2 Number of DGGE bands, diversity index of rhizobia influenced by different fertilization treatments

处理	条带数	多样性指数
农化1:1	22	2.53±0.01 c
化肥高量	16	2.41±0.01 b
化肥低量	16	2.34±0.03 a
农肥高量	20	2.61±0.01 d
农肥低量	20	2.53±0.02 c
对照	29	2.89±0.01 e

数据为平均数±标准误;同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

样性指数最高为 2.89,化肥低量处理的多样性指数最低为 2.34。说明不同处理均降低了根瘤菌多样性,但相比农肥处理,化肥处理更明显的降低了根瘤菌多样性。

应用 Quantity one 将 DGGE 指纹图谱进行聚类(图2)分析,结果表明,农肥低量与农肥高量 DGGE

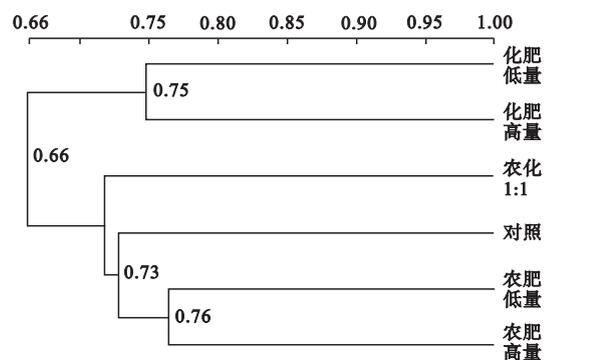


图2 不同施肥处理 DGGE 图谱聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of different fertilization treatments

表3 DGGE 条带比对结果

Table 3 BLAST analysis on the sequences of the *nifH* /DGGE excised and sequenced bands sequencing

条带编号	GenBank 中最匹配菌株或克隆	相似度(%)	GenBank 登录号
a	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> strain CCBAU 05705 nitrogenase Fe protein (<i>nifH</i>) gene	100	HQ174495.1
b	<i>Bradyrhizobium japonicum nifH</i> gene for nitrogenase reductase, partial cds, strain: NBRC 14783	99	AB573866.1
c	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> strain LMG 6138 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds	99	HM047126.1
d	Uncultured soil bacterium clone 72 <i>nifH</i> (<i>nifH</i>) gene, partial cds	96	FJ841948.1
e	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> strain CCBAU 83789 nitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds	96	EU146014.1
f	Uncultured bacterium <i>nifH</i> gene for nitrogenase Fe protein, partial cds, clone: DNA6	100	AB365418.1
g	Uncultured bacterium clone CO70 <i>NifH</i> -like (<i>nifH</i>) gene, partial sequence	99	DQ983050.2
h	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> strain CCBAU 53119 nitrogenase reductase-like (<i>nifH</i>) gene, partial sequence	100	EF394160.1
i	<i>Sinorhizobium fredii</i> strain CPAC 402 clone 2 <i>NifH</i> (<i>nifH</i>) gene	98	DQ485715.1
j	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> bv. <i>glycinearum</i> strain Nepl dinitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene, partial cds	99	AY599088.1

指纹图谱相似性最高为 76%,其次是化肥高量和化肥低量的相似性为 75%。而化肥处理和其他处理之间的相似性仅为 66%。结果表明,化肥处理的群落结构与其他处理相差较大,施用化肥明显改变了大豆根瘤菌的群落结构。

2.2 固氮 *nifH* 基因的 DGGE 条带测序

切取的条带经过测序后采用 BLAST 比对,在 GenBank 中都找到相似性超过 96% 的近源菌株,详细信息见表 3。

3 讨论

根瘤菌生活在土壤中,以动植物残体为养料,过着“腐生生活”。当土壤中有相应的豆科植物生长时,根瘤菌迅速向豆科作物根部靠拢,形成根瘤进行固氮作用。本实验表明,不同的培肥处理均降低了黑土大豆根瘤菌的多样性,其原因可能有:1) 培肥处理影响了在土壤中“腐生生活”状态的根瘤菌。2) 培肥处理影响土壤中根瘤菌进入大豆植株根部形成根瘤。3) 对以上两个过程均有影响。陈文新等(2004)根据 20 多年的研究提出有关根瘤菌与豆科植物共生关系后认为:同一种植物在不同生态环境中可与不同根瘤菌结瘤固氮。这与本实验结果相符合。不同的培肥处理改变了土壤环境,造成了土壤结构和理化性质的变化,从而影响了大豆根瘤菌的多样性。

在多样性指数上,不同施肥处理的多样性指数均低于对照,其中化肥处理的多样性指数最小,说明化肥的施用更显著地降低了根瘤菌多样性。其次,

高量处理的条带数量和低量处理相近,但多样性指数却大于低量处理,从 DGGE 图谱中也能看出,在一些共有条带上,高量处理的亮度大于低量处理,说明施用高量肥料能促进某些根瘤菌的生长发育,其机理有待于进一步研究。

经过克隆测序和 blast 比对,发现相似菌大部分为慢生根瘤菌属。其原因为快生型大豆根瘤菌的固氮基因在大质粒上(Young & Haukka, 1996),而慢生型大豆根瘤菌的所有固氮基因(14 个 *nif* 和 *fix* 基因,分属 9 个操纵子)均位于染色体上(李颖等,1999;杨成运等,2011)。本实验提取的根瘤 DNA 可能并不包含质粒 DNA,有待于进一步实验深入验证。

今后,还应结合培肥方式对根瘤固氮活性和根瘤菌多样性的影响进行深入研究;且应结合培肥措施对根瘤固氮活性和作物产量的影响做进一步研究,以期在保障产量同时减少对农田生态系统影响的前提下,寻找更合理的施肥措施。

参考文献

- 陈强,张小平,李登煜,等. 2002. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法. 微生物学通报, **29**(6): 65-68.
- 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 2004. 根瘤菌豆科植物共生多样性与地理环境的关系. 中国农业科学, **37**(1): 81-86.
- 陈文新. 2004. 中国豆科植物根瘤菌资源多样性与系统发育. 中国农业大学学报, **9**(2): 6-7.
- 范富,张庆国,张永亮,等. 2006. 施肥对紫花苜蓿根瘤的影响. 农业网络信息, (7): 15-18.
- 谷秋荣,郭鹏旭,薛晓娅. 2010. 不同氮肥类型对大豆根瘤

- 生长特性及籽粒产量和品质的影响. 中国农学通报, **26** (14): 226–228.
- 李颖, 白雨, 陈文新. 1999. 沙坡头地区根瘤菌 DNA 同源性及 16S rDNA 全序列. 微生物学报, **39**(2): 95–99.
- 罗青, 宋亚娜, 郑伟文. 2008. PCR-DGGE 法研究福建省稻田土壤微生物地区多态性. 中国生态农业学报, **16** (3): 669–674.
- 田艳洪, 刘元英, 张文钊, 等. 2008. 不同时期施用氮肥对大豆根瘤固氮酶活性及产量的影响. 东北农业大学学报, **39**(5): 15–19.
- 王克武, 陈清, 李晓林. 2003. 施用硼、锌、钼肥对紫花苜蓿生长及品质的影响. 草业学报, (3): 24–28.
- 杨成运, 周俊初, 杨江科, 等. 2011. 我国亚热带地区快生型大豆根瘤菌遗传多样性研究. 河南农业科学, **40** (1): 48–53.
- 杨江科, 周俊初. 2000. 潍坊、花园口土样中土著大豆根瘤菌的遗传多样性研究. 应用与环境生物学报, **6**(3): 259–262.
- 杨子文, 沈禹颖, 谢田玲, 等. 2009. 外源供氮水平对大豆生物固氮效率的影响. 西北植物学报, **29**(3): 574–579.
- 张伟涛, 杨江科, 袁天英, 等. 2006. 我国南北大豆产区慢生大豆根瘤菌的遗传多样性和系统发育研究. 微生物学报, **46**(1): 127–131.
- 朱长甫, 苗以农, 刘学军, 等. 1995. 野生大豆 (*Glycine soja*) 酰胺含量与根瘤固氮活力的关系. 植物生理学报, **21** (3): 307–312.
- Bowattea S, Ishihara R, Asakawa S, *et al.* 2006. Characterization of ammonia oxidizing bacteria associated with weeds in a Japanese paddy field using *amoA* gene fragments. *Soil Science and Plant Nutrition*, **52**: 593–600.
- Poly F, Monrozier MJ, Bally R. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, **152**: 95–103.
- Young JPW, Haukka KE. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, **133**: 87–94.
-
- 作者简介** 刘朴方,男,1987年生,硕士研究生,主要从事微生物分子生态学方面的研究。E-mail: liu870228@126.com
- 责任编辑** 魏中青
-