



野葛根际固氮微生物群落分布特征及其影响因素

刘璐¹, 蒋慧丹¹, 张鑫², 彭迪^{1*}

1 湖南省农业科学院, 湖南省农业生物技术研究所, 湖南 长沙 410125

2 湖南省农业科学院, 湖南省植物保护研究所, 湖南 长沙 410125

刘璐, 蒋慧丹, 张鑫, 彭迪. 野葛根际固氮微生物群落分布特征及其影响因素. 微生物学报, 2022, 62(2): 590–601.

Liu Lu, Jiang Huidan, Zhang Xin, Peng Di. Distribution pattern and influencing factors of nitrogen-fixing microbial community in the rhizosphere of *Pueraria lobata*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 590–601.

摘要:【目的】研究野葛根际固氮微生物群落的空间分布特征, 同时结合地理气候因子、土壤理化性质探讨影响野葛根际固氮微生物群落的空间分布特征的主要因素。【方法】在野葛广泛分布的广西、江西和湖南采集 17 份野葛根际土壤, 测定土壤常规理化性质, 进行基于 MiSeq 测序平台的 *nifH* 基因高通量测序, 采用多元统计分析方法探索固氮微生物群落结构与环境因子之间的关系。【结果】不同采样区域固氮微生物 α 多样性无显著差异; 同一采样区内各样点的固氮微生物群落结构与组成较相似, 而不同采样区之间固氮微生物群落结构与组成差异较大, 这表明固氮微生物群落存在明显的区域性分布特征。野葛根际土壤中固氮微生物主要归属于变形菌门(*Proteobacteria*) (相对丰度>60%), 在目水平上, 已注释出的固氮微生物主要归属于根瘤菌目(*Rhizobiales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*)。根瘤菌目相对丰度在江西采样区最高, 伯克氏菌目相对丰度在湖南采样区最高。pH、交换性钙、全钾、海拔和年平均气温对土壤固氮微生物群落结构的影响较大。优势种群伯克氏菌目与 pH、交换性钙和全钾正相关, 与 C/N 负相关; 优势种群根瘤菌目与 pH、交换性钙、海拔和年均温负相关, 与全钾和砂粒含量正相关。【结论】不同地理区域野葛根际土壤中固氮微生物 α 多样性无显著差异, 但固氮微生物群落结构与组成存在明显的区域性分布特征。其群落组成受地理环境和土壤理化性质的共同影响, 且固氮微生物

基金项目: 国家自然科学基金(41701293); 湖南省自然科学基金(2019JJ50316); 广西重点研发计划(桂科 AB17129009)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (41701293), by the Hunan Natural Science Foundation (2019JJ50316) and by the Guangxi Key Research and Development Program (AB17129009)

*Corresponding author. E-mail: smileadi@126.com

Received: 25 April 2021; Revised: 13 July 2021; Published online: 22 July 2021

不同种群对环境因子的响应存在差异。

关键词: 固氮微生物; *nifH* 基因; 高通量测序; 野葛

Distribution pattern and influencing factors of nitrogen-fixing microbial community in the rhizosphere of *Pueraria lobata*

LIU Lu¹, JIANG Huidan¹, ZHANG Xin², PENG Di^{1*}

¹ Hunan Province Institute of Agricultural Biotechnology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

² Hunan Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

Abstract: [Objective] The aims of this study were to clarify the spatial pattern of the nitrogen-fixing microbial community in the rhizosphere of Kudzu (*Pueraria lobata*), and to explore the relationship between environmental factors and the spatial pattern. **[Methods]** A total of 17 rhizosphere soil samples were collected from Hunan, Jiangxi, and Guangxi province, where Kudzu was widely distributed. The physical and chemical parameters of the samples were measured by routine methods, and the composition and diversity of nitrogen-fixing microbial community was performed by high-throughput sequencing of *nifH* gene. Multivariate statistical analysis was used to explore the relationship between the composition of the nitrogen-fixing microbial community and environmental factors. **[Results]** The α diversity of nitrogen-fixing microorganisms were not significantly different among three sampling regions. The composition of nitrogen-fixing microbial communities were similar in the same sampling region, while were quite different among three sampling regions. It indicated that biogeographical pattern of nitrogen-fixing microbial community was existed. The predominant phylum of nitrogen fixing microorganisms was *Proteobacteria*, whose relative abundance accounted for more than 60%. At the order level, the species that could be annotated mainly belonged to *Rhizobiales* and *Burkholderiales*. The relative abundance of *Rhizobiales* was highest in Jiangxi, while the relative abundance of *Burkholderiales* was highest in Hunan. pH, exchangeable calcium, total potassium, elevation and annual mean temperature were the main factors that influenced the composition of nitrogen fixing community. *Burkholderiales* was positively correlated with pH, exchangeable calcium and total potassium; while was negatively correlated with the ratio of carbon to nitrogen. *Rhizobiales* was positively correlated with total potassium and the content of sand, while was negatively correlated with pH, exchangeable calcium, elevation and annual mean temperature. **[Conclusion]** There was no significant difference in the α diversity of nitrogen-fixing microorganisms in the Kudzu rhizosphere soil across different geographical regions; while a clear biogeographical pattern of nitrogen-fixing microorganisms was existed. The spatial pattern of the community was jointly affected by the geographic and soil factors; in addition, the effects of the same environmental factor were distinct for different nitrogen-fixing microbial populations.

Keywords: nitrogen-fixing microbes; *nifH* gene; high-throughput sequencing; *Pueraria lobata*

固氮微生物通过固氮酶将大气 N_2 转化为植物有效氮,从而为生态系统提供额外的氮源,是全球氮循环的重要参与者^[1]。生态系统中绝大多数生物可利用形式的氮主要来源于土壤固氮微生物群落的生物固氮作用^[2]。固氮微生物数量和群落结构对土壤氮素固定及维持氮素循环平衡具有重要意义,可作为衡量土壤质量的重要指标^[3-4]。目前,已发现 60 多个属的固氮微生物,主要包括固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)等^[5]。固氮微生物中均含有编码固氮酶铁蛋白组分的 *nifH* 基因,该基因序列高度保守、数据信息丰富且存在可变区域,是广泛用于研究固氮微生物群落结构的分子标记基因^[6]。大量研究表明,固氮微生物群落的结构与组成受非生物和生物因素影响,如植被类型、耕作方式、土壤理化性质(pH、有效氮)等因素的影响^[7-9]。在不同母岩和植被下固氮微生物群落结构和多样性差异较大;长期施加氮肥会使土壤固氮微生物的竞争能力下降,进而改变其多样性、群落结构与组成^[3,5]。

野葛系豆科葛属蔓生性、多年生落叶藤本植物,广泛分布于我国除新疆、青海及西藏外的其他地区,具有适应性广、生长快、抗逆性强、耐瘠薄等特性,是优良的水土保持植物和畜禽饲料^[10]。同时,野葛能够与根瘤菌建立共生关系,通过生物固氮作用改善土壤结构、提高土壤肥力^[11-12]。野葛的肥大块根称为葛根,其富含优质淀粉和黄酮类物质,具有很好的保健功能,被国家卫生部列入药、食同源的天然植物名单,是世界上重要的粮食替代作物之一^[13]。目前,我国野葛和栽培葛面积近 100 万 hm^2 ,且用作中药材、提取和加工食品的比例大幅度上升^[14]。目前,关注野葛药用价值的研究很多,

但是关于野葛根际微生物的研究尚未见报道。前期研究发现土壤固氮微生物表现出明显的生物地理分布现象,如种-面积关系和多样性-环境梯度关系,但野葛根际固氮微生物群落是否也存在显著的生物地理学分布格局仍不清楚^[15]。因此,探究野葛根际固氮微生物群落的空间分布特征及其影响因素有助于理解野葛根际微生物的群落构建机制、根际微生物之间的潜在相互作用等,对于充分发挥野葛的生态作用具有重要意义。

本文选择野葛分布广泛的广西、湖南、江西三省为研究区域,采集野葛根际土壤样品,采用 *nifH* 基因高通量测序研究野葛根际固氮微生物群落的空间分布特征,同时结合地理气候因子、土壤理化性质探讨影响野葛根际固氮微生物群落的空间分布特征的主要因素,以期生物固氮潜力的开发及生态恢复提供科学参考。

1 研究区域与研究方法

1.1 样品采集

野葛在南方各省市均有分布,其中以广西、湖南、江西三省的资源最为丰富。本研究于 2019 年 7-8 月在广西河池、江西鹰潭和湖南长沙 3 个采样区域进行野葛根际土壤样品的采集。每个采样区设置 5-6 个采样点,样点距离大于 20 km。为使样品具有代表性,在每个采样点随机选取 3 株(尽可能涵盖不同生境)野葛(株间距离 1-2 km),采集表层(0-20 cm)根际土壤,等量混合成一份样品,再分成两份:一份用锡箔纸包好装入布袋中,立刻置于液氮罐中保存,用于提取土壤 DNA;另一份装入自封袋中,带回实验室风干,研磨过筛,待测土壤理化指标。采样同时,详细记录采样点的地理信息(表 1)。

表 1 采样点地理信息

Table 1 The geographic information of sampling sites

Sampling region	Sample ID	Longitude	Latitude	Elevation/m	Annual mean temperature/°C	Annual precipitation/mm
Hunan	HN01	E113°08'48.56"	N28°01'33.95"	83	18.4	1 534
	HN02	E113°10'36.85"	N27°56'37.48"	55	18.6	1 411
	HN03	E113°19'13.35"	N27°46'47.31"	81	18.6	1 454
	HN04	E113°01'27.63"	N27°40'39.56"	79	18.5	1 394
	HN05	E112°43'45.94"	N28°13'10.41"	74	18.2	1 296
	HN06	E113°17'18.45"	N28°18'07.07"	61	18.3	1 309
Jiangxi	JX01	E116°15'11.66"	N28°18'04.39"	57	18.7	1 713
	JX02	E116°34'03.95"	N28°16'40.01"	70	18.8	1 730
	JX03	E116°41'41.38"	N28°07'04.34"	37	19.2	1 814
	JX04	E116°54'52.73"	N28°04'14.76"	92	19.1	1 701
	JX05	E117°05'45.05"	N28°27'47.76"	89	18.8	1 885
Guangxi	GX01	E108°04'20.62"	N24°53'06.37"	556	18.9	1 816
	GX02	E107°51'49.79"	N24°41'16.91"	260	20.7	1 220
	GX03	E108°09'46.90"	N24°38'35.39"	292	20.4	1 541
	GX04	E108°24'02.03"	N24°55'49.43"	465	19.2	1 648
	GX05	E108°29'56.78"	N24°40'14.08"	305	20.2	1 485
	GX06	E108°19'33.41"	N24°44'45.67"	326	20.1	1 687

1.2 样品分析

称取 0.5 g 土壤, 采用 E.Z.N.A.[®] soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) 提取土壤微生物基因组总 DNA。采用 *nifH*-F (5'-AAA GGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3') 和 *nifH*-R (5'-TTGTTSGCSGCRACATSGCCATCAT-3') 引物对扩增 *nifH* 基因^[16], 扩增体系如下: 4 μL 5× FastPfu Buffer, 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 0.8 μL 正向引物(5 μmol/L), 0.8 μL 反向引物(5 μmol/L), 0.4 μL FastPfu 聚合酶, 0.2 μL BSA, 10 ng DNA 模板, 补 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行基于 MiSeq (Illumina, San Diego, USA) 测序平台的双末端测序。

土壤理化性质测定参照鲁如坤的《土壤农业化学分析方法》^[17]。pH 测定采用电位法(水土

比 2.5:1.0); 机械组成测定采用吸管法, 土壤质地划分采用国际制分类法; 有机碳(SOC)测定采用重铬酸钾容量法-外加热法; 全氮(TN)测定采用凯氏定氮法; 全磷(TP)测定采用 NaOH 熔融-钼锑抗比色法; 全钾(TK)测定采用 NaOH 熔融-火焰光度法; 碱解氮(AN)测定采用碱解扩散法; 速效磷(AP)测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法; 速效钾(AK)测定采用乙酸铵浸提-火焰光度法; 交换性钙、镁(Ex-Ca、Ex-Mg)测定采用乙酸铵浸提-原子吸收法; 有效态钼(A-Mo)的测定采用草酸铵浸提-极谱法。

1.3 数据分析

采用 Flash 和 Trimmomatic 软件对测序结果进行质量过滤和优质序列拼接; 采用 UPARSE 软件按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU 聚类, 在聚类过程中去除嵌合体, 得到 OTU 的代表序列。利用 RDP classifier 对每条序列进行物种分类注释, 比对 FGR 数据库,

设置比对阈值为 70%。为保证所有样品测序深度一致,降低 PCR 扩增所带来的误差,按最小样本序列数进行抽平,最终得到的 OTU 分类表用于后续的群落结构分析。利用 Mothur 软件计算 α 多样性指数,在 SPSS 22.0 软件中采用单因素方差分析、多重比较(LSD 法)检验固氮微生物 α 多样性、土壤理化因子的差异显著性;利用 R 软件的 Vegan 包绘制 Heatmap 图和 Venn 图,研究固氮微生物的群落组成及差异;采用 Canoco 4.5 软件中的 RDA 分析探索固氮菌群落结构与环境变量之间的关系。测序数据已上传至 NCBI SRA 数据库(BioProject ID: PRJNA723480; Accessions: SAMN18819290–SAMN18819306)。

2 结果与分析

2.1 高通量测序概况及质量评估

使用 Illumina Miseq 测序平台对野葛根际土壤固氮微生物进行高通量测序分析,共得到优化序列 280 982 条,通过质控后获得有效序列 222 792 条,各样品的有效序列为 8 997–17 386 条。按最小样本序列数抽平后进行 OTU 划分和物种注释,共获得 3 070 个 OTUs(表 2)。各样本 OTU 数为 117–532 个,各样本测序覆盖度均高于 99%。采用 Sobs 指数和 Shannon-Wiener 指数分别绘制稀释曲线,结果表明曲线逐步趋向平坦,说明测序数据量合理,可以反映样本中绝大多数的固氮微生物多样性信息。

2.2 固氮微生物群落多样性及群落组成

本研究选取 Sobs、ACE 和 Chao1 指数来表征物种丰富度;选取 Shannoneven 指数来表征物种均匀度;选取 Shannon、Simpson 指数来表征 α 多样性。结果表明:不同采样区域间固氮微生物 α 多样性无显著差异;广西采样区固氮微生物的丰富度、Shannon 多样性略高于湖南和江西采样区(表 3)。由 Heatmap 图可看出,来

表 2 *nifH* 基因高通量测序概况

Table 2 Summary of *nifH* sequences

Sample ID	Optimized sequence ^a	Effective sequence ^b	OTUs ^c	Coverage
GX01	17 696	12 554	429	0.991
GX02	24 409	17 214	532	0.989
GX03	12 733	10 760	293	0.996
GX04	17 855	13 519	451	0.992
GX05	14 263	12 655	387	0.995
GX06	22 816	17 386	387	0.991
HN01	11 599	9 257	329	0.995
HN02	15 413	11 972	325	0.995
HN03	13 087	10 938	298	0.997
HN04	10 890	8 997	118	0.999
HN05	14 684	9 954	426	0.994
HN06	17 009	14 002	518	0.992
JX01	14 390	12 674	224	0.997
JX02	21 494	16 351	247	0.994
JX03	17 861	16 369	391	0.995
JX04	20 551	15 915	476	0.993
JX05	14 232	12 275	374	0.996

a: paired-end reads were merged and this sequence defined as optimized sequence; b: excluded chimeric sequences and other low-quality sequences in the optimized sequences, and then obtained effective sequences; c: operational taxonomic unit (OTU) defined by the boundary of 97.7% identity.

源于同一采样区的样点聚类在一起,来源于不同采样区的样点分成 3 簇,这表明来源于同一采样区的固氮微生物群落结构较相似,存在明显的区域性分布特征(图 1)。

Venn 图可看出 3 个采样区域共有 OTU 数量为 141 个,独有的 OTU 数量分别为 958、659 和 795 个(图 2A)。根据物种注释结果统计发现:本研究中野葛根际土壤中固氮微生物主要归属于变形菌门(*Proteobacteria*) (>60%),另外有 20%左右的 OTU 无法注释,这说明土壤中仍蕴藏着较多的、未知的固氮微生物资源,有待进一步研究。在目水平上,已注释出的固氮微生物主要归属于根瘤菌目(*Rhizobiales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*);在科水平上,已注释出

表 3 不同采样区域固氮微生物群落的 α 多样性

Table 3 α diversity of diazotroph community in different sampling regions

Diversity indices	Guangxi	Hunan	Jiangxi
Richness			
Sobs	413.17±79.52a	335.67±134.43a	342.40±105.27a
ACE	456.38±95.24a	355.33±145.74a	365.80±106.95a
Chao1	455.97±93.76a	354.80±143.83a	367.94±106.60a
Evenness			
Shannoneven	0.76±0.06a	0.73±0.07a	0.77±0.08a
α diversity			
Shannon	4.58±0.41a	4.17±0.56a	4.48±0.61a
Simpson	0.03±0.02a	0.05±0.03a	0.03±0.02a

Data are means±SD ($n=3$). Different lower-case letters in the same row show significant differences of the mean by *LSD* test ($P<0.05$).

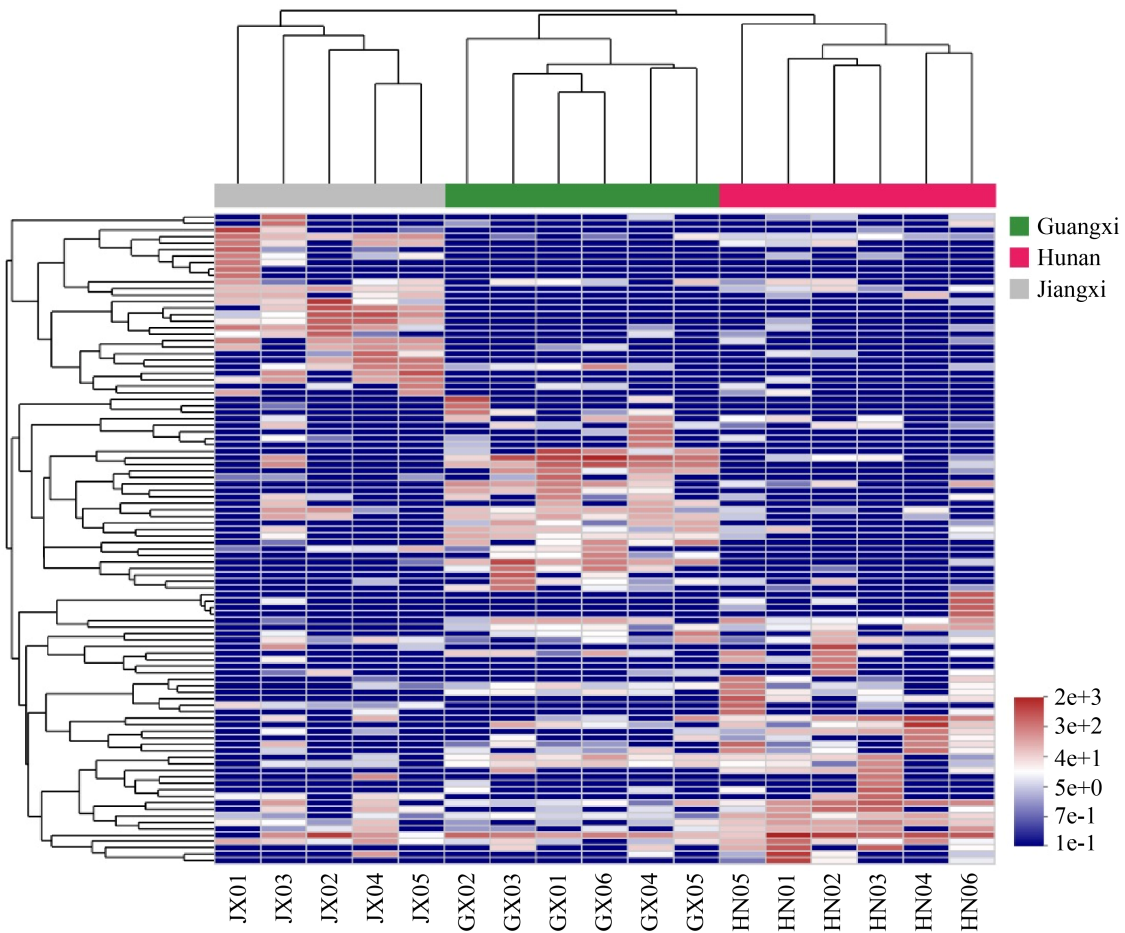


图 1 野葛根际土壤固氮微生物群落(相对丰度前 100 的 OTUs)热图

Figure 1 Heatmap of diazotroph community (the 100 most abundant OTUs) in Kudzu rhizosphere soil.

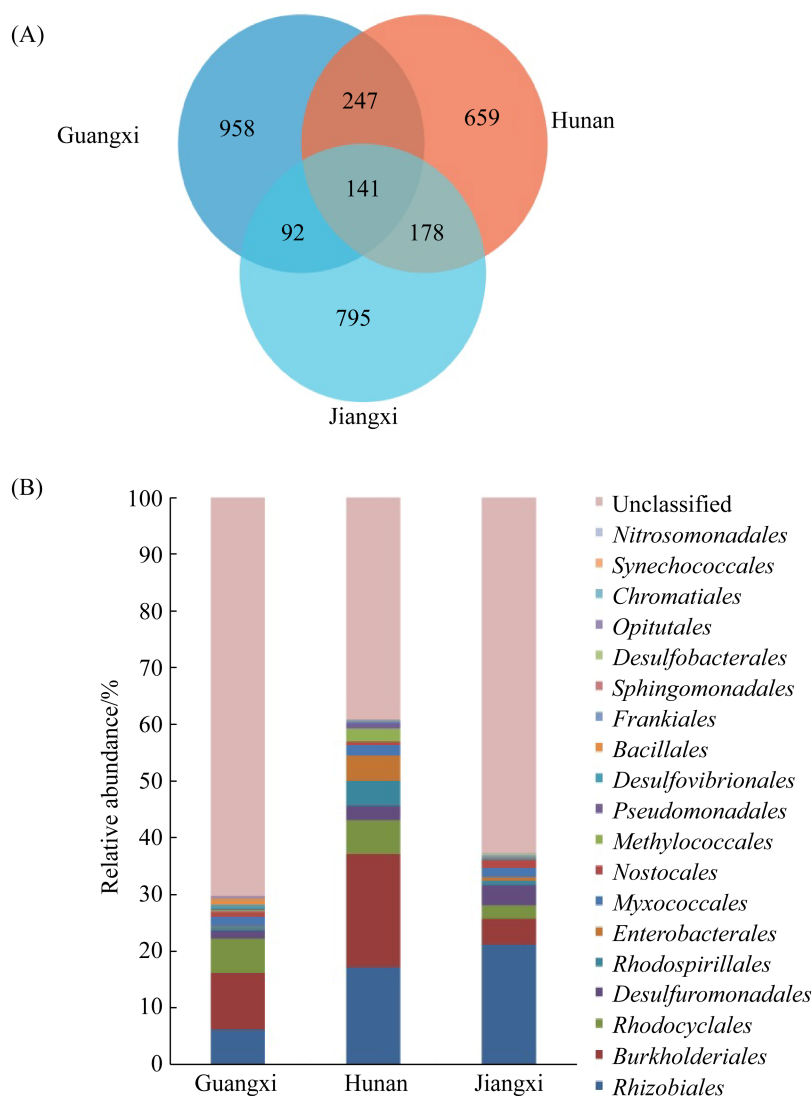


图 2 固氮微生物群落差异分析

Figure 2 The variance analysis of nitrogen-fixing microbial community. A: at the OTU level; B: at the order level.

的固氮微生物主要归属于慢生根瘤菌科 (*Bradyrhizobiaceae*); 在属水平上, 已注释出的固氮微生物主要归属于慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)。由图 2B 可看出, 不同采样区之间固氮微生物群落组成存在显著差异, 根瘤菌目相对丰度在江西采样区最高, 伯克氏菌目相对丰度在湖南采样区最高。

2.3 固氮微生物群落结构与环境因子的相关性分析

不同采样区域的土壤理化性质如表 4。江西采样点土壤为酸性, pH 为 5.25, 广西和湖南采样点土壤 pH 分别为 7.20 和 7.44。广西样点土壤以粘土为主, 湖南和江西样点土壤以粘壤土为主。不同采样区域之间土壤 SOC、TN、TP

表 4 不同采样区域的土壤理化性质

Table 4 Soil physicochemical properties in different sampling regions

Soil properties	Hunan	Jiangxi	Guangxi	<i>F</i>	<i>P</i>
pH	7.20±0.60a	5.25±0.25b	7.44±0.49a	32.631	0.000
Sand/%	45.41±11.28a	51.26±11.78a	28.70±6.39b	7.775	0.005
Silt/%	33.77±6.62ab	26.42±8.92b	38.44±2.02a	4.976	0.023
Clay/%	20.81±5.62b	22.32±6.85b	32.85±7.30a	5.791	0.015
SOC/(g/kg)	13.40±7.37b	10.73±5.75b	39.06±14.58a	13.472	0.001
TN/(g/kg)	1.27±0.54b	1.08±0.57b	3.70±1.18a	17.808	0.000
C/N	10.14±1.84a	10.01±1.35a	10.47±1.82a	0.108	0.898
TP/(g/kg)	0.45±0.15b	0.51±0.21b	0.83±0.20a	7.209	0.007
TK/(g/kg)	17.07±5.66a	13.72±5.01a	7.25±3.06b	6.775	0.009
AN/(mg/kg)	83.33±51.99b	92.00±30.07b	284.33±106.18a	14.377	0.000
AP/(mg/kg)	9.37±14.13a	5.06±6.08a	13.90±17.72a	0.552	0.588
AK/(mg/kg)	161.83±113.62a	80.20±42.25a	183.33±85.07a	2.045	0.166
Ex-Ca/(cmol/kg)	9.33±3.29a	3.72±2.44b	11.43±4.22a	7.106	0.007
Ex-Mg/(cmol/kg)	0.72±0.47a	0.52±0.29a	1.77±1.74a	2.205	0.147
A-Mo/(mg/kg)	0.13±0.11a	0.18±0.07a	0.20±0.17a	0.451	0.646

Data are means±SD ($n=3$). Different lower-case letters in the same row show significant differences of the mean by *LSD* test ($P<0.05$). SOC: soil organic carbon; TN: total nitrogen; C/N: ratio of carbon to nitrogen; TP: total phosphorus; TK: total potassium; AN: available nitrogen; AP: available phosphorus; AK: available potassium; Ex-Ca: exchangeable calcium; Ex-Mg: exchangeable magnesium; A-Mo: available molybdenum.

和 AN 含量存在显著差异, 且广西采样区显著高于其他采样区($F=13.47$, $P=0.001$; $F=17.81$, $P=0.000$; $F=7.21$, $P=0.007$; $F=14.38$, $P=0.000$)。广西采样区土壤 TK 含量为 7.25 g/kg, 显著低于湖南和广西采样区($F=6.78$, $P=0.009$); 江西采样区土壤 Ex-Ca 含量为 3.72 cmol/kg, 显著低于其他采样区($F=7.11$, $P=0.007$)。不同采样区之间土壤 C/N、AP、AK、Ex-Mg 和 A-Mo 含量无显著性差异。

由于很多环境因子之间具有较强多重共线性(相关)关系, 因此在进行 RDA 分析前首先采用方差膨胀因子(variance inflation factor, VIF)分析筛选出多重共线性较小的环境因子。过滤掉 VIF 值大于 10 的环境因子, 最终筛选

出 pH、C/N、TK、AP、AK、Ex-Ca、海拔、年均温、砂粒含量和粉粒含量用于后续分析。RDA 分析结果表明: 在目水平上, 第一排序轴和第二排序轴分别解释固氮微生物群落组成 31.45%和 20.52%的差异; 其中 pH、Ex-Ca、TK、海拔和年均温对土壤固氮微生物群落结构的影响较大。优势种群伯克氏菌目与 pH、Ex-Ca 和 TK 正相关, 与 C/N 负相关; 优势种群根瘤菌目与 pH、Ex-Ca、海拔和年均温负相关, 与 TK 和砂粒含量呈正相关(图 3)。由此可见, 固氮微生物群落结构受地理环境和土壤理化性质的共同影响, 且固氮微生物不同种群对环境因子的响应并不一致, 具有各自的生态位。

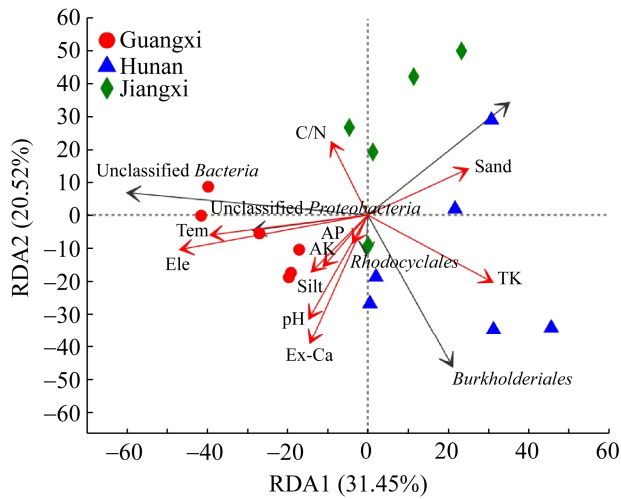


图 3 目水平上固氮微生物群落与环境因子的冗余分析

Figure 3 Redundancy analysis (RDA) between the diazotroph community at the order level and environmental factors. Tem: annual mean temperature; Ele: elevation; Ex-Ca: exchangeable calcium; AP: available phosphorus; AK: available potassium; C/N: ratio of carbon to nitrogen; TK: total potassium.

3 讨论

野葛属豆科蝶形花亚科，广泛分布于我国各地，能与根瘤菌建立共生关系，适于作为先锋植物应用于退化生态系统的植被和土壤恢复^[10]。根际存在着许多对植物有益的微生物群落，包括根际促生菌、病原菌等^[15]。其中，固氮微生物是根际一类重要的功能菌群，在土壤氮素循环中发挥着不可取代的作用，其群落结构组成对土壤氮素固定及维持氮素循环平衡具有重要意义^[18]。以往的研究表明土壤微生物存在显著的生物地理学分布格局，且决定其生物地理分布的因素因研究空间尺度大小而异^[19]。不同于非豆科植物，豆科植物根际中存在大量共生根瘤菌，因此其根际固氮微生物可能表现出不同的生物地理分布模式^[20]。本研究基于野葛

根际土壤功能基因 *nifH* 的高通量测序分析，研究发现固氮微生物群落结构和组成存在明显的区域性分布特征，这与前期研究结果一致。张宝刚研究^[15]发现土壤和大豆根际的固氮微生物虽然都呈现出显著的距离-衰减关系，但是土壤固氮微生物较大豆根际具有更高的空间转变速率。因此，今后需要进一步研究野葛非根际土与根际土两个生境之间固氮微生物地理分布格局的差异及其形成机制。

固氮微生物具有很高的多样性，包含了变形菌门(*Proteobacteria*)中的 α 、 β 、 γ 和 δ 纲、厚壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)等^[21]。其中， α 变形菌纲中的固氮菌主要分布于根瘤菌目(*Rhizobiales*)， β 变形菌纲中的固氮菌主要分布于红环菌目(*Rhodocyclales*)，蓝藻主要分布于念珠藻目(*Nostocales*)^[18]。无论农业、草地还是森林土壤，变形菌门都是固氮菌群落的优势类群^[22-23]。本研究中，野葛根际土壤中固氮微生物主要归属于变形菌门(*Proteobacteria*) (相对丰度超过 60%)，该研究结果与陈玉真等^[9]的研究结果一致。在目水平上，根瘤菌目(*Rhizobiales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*)为优势类群；在属水平上，慢生根瘤菌属为野葛根际土壤固氮微生物的绝对优势菌群。这与我们前期的研究结果一致：野葛根瘤和根际土壤中根瘤菌种群主要为慢生根瘤菌^[11]。慢生根瘤菌不仅能作为共生根瘤菌，与野葛建立共生关系进行生物固氮，也能在根际通过分泌生长激素、增强抗病性和抗逆境等间接促进植物生长^[11]。

已有研究表明，环境因素(如气候、土壤、植物和动物)驱动了土壤微生物群落在全球尺度上的分布^[24]。除此之外，历史因素(如古气候特征)和微生物本身特征(如体型、附着和定殖能力)对土壤微生物群落分布的影响也十分重要^[25]。

当代环境因素对垄间土壤微生物群落分布起主要作用, 而地理空间距离对根际微生物群落分布有更大的贡献^[26-27]。本研究中, 地理气候因子(海拔和年均温)和土壤理化因子(pH、C/N、全钾和交换性钙等)共同影响野葛根际土壤固氮微生物群落结构和组成。从 RDA 图上可看出, 广西与湖南、江西样点分别集中于左、右两个象限。在第一轴上, 海拔、年均温以及土壤全钾的影响较大; 在第二轴上, pH、交换性钙和 C/N 的影响较大。全钾、交换性钙与成土过程和母质密切相关, 广西以碱性石灰土为主, 而湖南、江西以酸性红壤为主。前人研究表明^[5], 不同母岩条件下固氮微生物群落结构和多样性存在明显差异, 本研究结果与之一致。另外, 土壤全钾和交换性钙含量也可能通过影响微生物个体的生活史策略、固氮酶活性等间接影响固氮微生物群落结构与组成^[3]。Fierer 等^[28]发现土壤 pH 是驱动固氮微生物多样性和群落组成的关键因子。固氮过程会消耗大量用于生长的碳、磷等能源物质, 土壤中碳源的量是影响固氮微生物群落特征的关键因素^[29]。固氮微生物在氮素缺乏的土壤中更具竞争优势, 高氮水平会降低生态系统对固氮微生物的依赖性^[30]。在今后的研究中, 有必要深入探索环境因子对固氮微生物特定类群的调控机制, 进一步通过合成生物学方法重塑根际微生物群落, 以便更好地发挥固氮微生物的生态功能。

4 结论

本研究基于 MiSeq 测序平台的 *nifH* 基因高通量测序, 研究了野葛根际土壤中固氮微生物群落的空间分布特征及其与土壤因子之间的关系。结果表明: 固氮微生物群落结构与组成存在明显的区域性分布特征, 但固氮微生物的 α 多样性无显著差异。地理气候因子和土壤理

化因子共同影响野葛根际土壤固氮微生物群落结构和组成。野葛根际土壤中固氮微生物主要归属于变形菌门, 其中能注释出的固氮微生物主要归属于根瘤菌目和伯克氏菌目。伯克氏菌目与 C/N 负相关, 与 pH、交换性钙和全钾正相关; 根瘤菌目与 pH、交换性钙、海拔和年均温负相关, 与全钾和砂粒含量呈正相关。固氮微生物不同种群对环境因子的响应并不一致, 存在各自的生态位。本研究中, 有 20%左右的序列无法注释, 预示存在着一些未知的固氮微生物尚未被认知。在今后的研究中, 有必要通过高通量培养和鉴定技术扩大参考数据库; 以及深入探索土壤环境因子对固氮微生物特定类群的调控机制, 进一步通过合成生物学方法重塑根际微生物群落。

参考文献

- [1] Vitousek PM, Menge DNL, Reed SC, Cleveland CC. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1621): 20130119.
- [2] Che RX, Deng YC, Wang F, Wang WJ, Xu ZH, Hao YB, Xue K, Zhang B, Tang L, Zhou HK, Cui XY. Autotrophic and symbiotic diazotrophs dominate nitrogen-fixing communities in Tibetan grassland soils. *Science of the Total Environment*, 2018, 639: 997-1006.
- [3] 刘璐, 何寻阳, 杜虎, 王克林. 喀斯特土壤固氮微生物群落与植被、土壤的关系. *生态学报*, 2017, 37(12): 4037-4044.
Liu L, He XY, Du H, Wang KL. The relationships among nitrogen-fixing microbial communities, plant communities, and soil properties in Karst regions. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(12): 4037-4044. (in Chinese)
- [4] Mirza BS, McGlenn DJ, Bohannon BJM, Nüsslein K, Tiedje JM, Rodrigues JLM. Diazotrophs show signs of restoration in Amazon rain forest soils with ecosystem rehabilitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(10): 1-10.

- [5] 赵辉, 周运超. 不同母岩发育马尾松土壤固氮菌群落结构和丰度特征. *生态学报*, 2020, 40(17): 6189–6201.
Zhao H, Zhou YC. Characteristics of structure and abundance of the nitrogen-fixing bacterial community in *Pinus massoniana* soil developed from different parent rocks. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(17): 6189–6201. (in Chinese)
- [6] Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539–554.
- [7] Fang WS, Yan DD, Wang QX, Huang B, Ren ZJ, Wang XL, Wang XN, Li Y, Ouyang CB, Migheli Q, Cao AC. Changes in the abundance and community composition of different nitrogen cycling groups in response to fumigation with 1,3-dichloropropene. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 44–55.
- [8] Tang HM, Li C, Cheng KK, Shi LH, Wen L, Li WY, Xiao XP. Effect of different Short-term tillage management on nitrogen-fixing bacteria community in a double-cropping paddy field of Southern China. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(3): 241–252.
- [9] 陈玉真, 王峰, 吴志丹, 张文锦, 翁伯琦, 尤志明. 林地转变为茶园对土壤固氮菌群落结构及多样性的影响. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(5): 1096–1106.
Chen YZ, Wang F, Wu ZD, Zhang WJ, Weng BQ, You ZM. Effects of soil nitrogen-fixing bacteria community and diversity after converting forestland into tea garden. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2020, 26(5): 1096–1106. (in Chinese)
- [10] 胡书娟, 詹庆才, 刘璐. 葛属植物-根瘤菌共生体的研究进展. *湖南农业科学*, 2020(12): 96–100.
Hu SJ, Zhan QC, Liu L. Research progress of *Pueraria-rhizobium* symbiont. *Hunan Agricultural Sciences*, 2020(12): 96–100. (in Chinese)
- [11] 刘璐, 何寻阳, 谢强, 王克林. 桂西北喀斯特常见豆科植物根瘤菌的遗传多样性. *应用生态学报*, 2015, 26(12): 3663–3669.
Liu L, He XY, Xie Q, Wang KL. Genetic diversity of rhizobia isolated from common legumes in the Karst area, Northwest Guangxi. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(12): 3663–3669. (in Chinese)
- [12] 陈强. 四川省根瘤菌多样性和系统发育研究及葛属根瘤菌分类地位的确定. 中国农业大学学位论文, 2004.
- [13] Ahmad B, Khan S, Liu Y, Xue MZ, Nabi G, Kumar S, Alshwmi M, Qarluq AW. Molecular mechanisms of anticancer activities of puerarin. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 79–90.
- [14] 贺媛媛. 药食同源产品(玛咖、葛根)产地鉴别技术研究. 中国农业科学院学位论文, 2020.
- [15] 张宝刚. 中国大豆根系微生物的生物地理分布和共发生模式研究. 西北农林科技大学博士学位论文, 2018.
- [16] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3818–3829.
- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [18] 徐鹏霞, 韩丽丽, 贺纪正, 罗锋, 张丽梅. 非共生生物固氮微生物分子生态学研究进展. *应用生态学报*, 2017, 28(10): 3440–3450.
Xu PX, Han LL, He JZ, Luo F, Zhang LM. Research advance on molecular ecology of asymbiotic nitrogen fixation microbes. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(10): 3440–3450. (in Chinese)
- [19] Talbot JM, Bruns TD, Taylor JW, Smith DP, Branco S, Glassman SI, Erlandson S, Vilgalys R, Liao HL, Smith ME, Peay KG. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(17): 6341–6346.
- [20] Xiong HY, Zhang XX, Guo HJ, Ji YY, Li Y, Wang XL, Zhao W, Mo FY, Chen JC, Yang T, Zong XX, Chen WX, Tian CF. The epidemicity of facultative microsymbionts in faba bean rhizosphere soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 243–252.
- [21] Gaby JC, Buckley DH. A global census of nitrogenase diversity. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1790–1799.
- [22] 靳希桐, 胡文革, 贺帅兵, 周婷婷, 王月娥, 钟镇涛. 不同时期艾比湖湿地盐角草群落土壤固氮微生物的多样性分析. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1600–1611.
Jin XT, Hu WG, He SB, Zhou TT, Wang YE, Zhong ZT. Diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms in *Salicornia europaea* community of Ebinur Lake wetland during different periods. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1600–1611. (in Chinese)
- [23] 宋延静, 马兰, 李萌, 付娆, 梁晓艳, 张海洋, 王向誉, 郭洪恩. 黄河三角洲芦苇根际固氮微生物的空间分布特征. *河南农业大学学报*, 2020, 54(6): 1026–1032, 1040.
Song YJ, Ma L, Li M, Fu R, Liang XY, Zhang HY, Wang XY, Guo HE. Spatial distribution of

- nitrogen-fixing microbes in rhizosphere soil of *phragmites australis* in Yellow River Delta. *Journal of Henan Agricultural University*, 2020, 54(6): 1026–1032, 1040. (in Chinese)
- [24] 褚海燕, 冯毛毛, 柳旭, 时玉, 杨腾, 高贵锋. 土壤微生物生物地理学: 国内进展与国际前沿. *土壤学报*, 2020, 57(3): 515–529.
- Chu HY, Feng MM, Liu X, Shi Y, Yang T, Gao GF. Soil microbial biogeography: recent advances in China and research frontiers in the world. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(3): 515–529. (in Chinese)
- [25] 刘璐, 詹庆才, 彭伟正. 根瘤菌生物地理学的研究进展. *微生物学报*, 2018, 58(2): 202–208.
- Liu L, Zhan QC, Peng WZ. Advances in biogeography of rhizobia. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(2): 202–208. (in Chinese)
- [26] Fan KK, Cardona C, Li YT, Shi Y, Xiang XJ, Shen CC, Wang HF, Gilbert JA, Chu HY. Rhizosphere-associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 275–284.
- [27] Zhang KP, Adams JM, Shi Y, Yang T, Sun RB, He D, Ni YY, Chu HY. Environment and geographic distance differ in relative importance for determining fungal community of rhizosphere and bulk soil. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(9): 3649–3659.
- [28] Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(3): 626–631.
- [29] 杨璐, 曾闹华, 白金顺, 周兴, 周国朋, 高嵩涓, 聂军, 曹卫东. 紫云英季土壤固氮微生物对外源碳氮投入的响应. *中国农业科学*, 2020, 53(1): 105–116.
- Yang L, Zeng NH, Bai JS, Zhou X, Zhou GP, Gao SJ, Nie J, Cao WD. Responses of soil diazotroph community to rice straw, glucose and nitrogen addition during Chinese milk vetch growth. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(1): 105–116. (in Chinese)
- [30] 王磊, 王静, 张爱君, 张辉, 张永春. 小麦-甘薯轮作长期增施有机肥对碱性土壤固氮菌群落结构及多样性的影响. *生态学报*, 2020, 40(16): 5771–5782.
- Wang L, Wang J, Zhang AJ, Zhang H, Zhang YC. Effects of long-term organic fertilization on soil diazotrophic community structure and diversity under wheat-sweet potato rotation system. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(16): 5771–5782. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)