

刘 丽, 杨 静, 李成云. 玉米-大豆间作对玉米根际氨氧化微生物的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1278-1287.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.012

玉米-大豆间作对玉米根际氨氧化微生物的影响

刘 丽^{1,2}, 杨 静¹, 李成云¹

(1. 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201; 2. 西南林业大学生物多样性保护与利用学院, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 以氨单加氧酶基因(*amoA*)为分子标记, 采用 real time PCR 和克隆文库的方法, 研究玉米-大豆间作对玉米根际氨氧化古菌(AOA)和氨氧化细菌(AOB)的丰度、群落多样性及系统发育的影响。结果表明, 间作玉米根际总细菌和 AOA 的数量均显著高于单作玉米根际。概念种或操作分类单元(OTUs)分析结果表明, 间作玉米根际 AOA 和 AOB 的多样性均高于单作玉米根际。间作玉米根际 AOA 共获得 23 个 OTU, AOB 共获得 16 个 OTU, 单作玉米根际 AOA 和 AOB 分别获得 13 个 OTU 和 20 个 OTU。系统发育分析结果表明, 间作抑制了玉米根际 AOB 的 Nitrosomonadaceae 类群生长, 促进了 *Nitrosospira* cluster 3a 类群和 1 个新类群的生长。AOA 则在间作的玉米根际下分散到不同分支中, 并在一定程度上促进了 cluster water 类群和 cluster 1 类群的生长, 抑制了 cluster 6 类群的生长。

关键词: 间作; 玉米根际; 氨氧化微生物; 丰度; 多样性

中图分类号: S344.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1278-10

Effects of maize-soybean intercropping on the ammonia oxidizing microbes in the rhizosphere of maize

LIU Li^{1,2}, YANG Jing¹, LI Cheng-yun¹

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Biodiversity Conservation and Utilization, Southwest Forestry University, Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming 650224, China)

Abstract: The abundance and composition of maize rhizosphere ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) were investigated by using quantitative real-time polymerase chain reaction, cloning and sequencing approaches based on *amoA* genes. Intercropping maize rhizosphere had a higher copy numbers of 16 S rRNA and AOA *amoA* genes than the monoculture maize rhizosphere. Operational taxonomic unit (OTU) analysis results showed that the diversity of AOA and AOB was improved by intercropping. The number of OTU was 23 of AOA and 16 of AOB in intercropping maize rhizosphere. In monoculture maize rhizosphere, the number of OTU was 13 of AOA and 20 of AOB. Phylogenetic analyses of the *amoA* gene fragments showed that the intercropping inhibited the Nitrosomonadaceae group of AOB and cluster 6 of AOA, but promoted the *Nitrosospira* cluster 3a and a new lineage of AOB and the cluster water and cluster 1 of AOA.

Key words: intercropping; maize rhizosphere; ammonia-oxidation microorganism; abundance; diversity

收稿日期: 2017-06-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0200400); 云南省林业一级学科项目(No.51600625)

作者简介: 刘 丽(1976-), 女, 黑龙江鹤岗人, 硕士, 高级实验师, 主要从事植物相关微生物研究。(Tel) 13987126283; (E-mail) cathly@126.com

通讯作者: 李成云, (Tel) 13708705575; (E-mail) licheng_yun@163.com

间作作为发展可持续农业的重要手段之一, 在世界范围内广泛应用^[1-2], 其中玉米-大豆间作又是中国最常见的农业生产模式之一, 与单作相比具有明显的产量优势^[3]。在玉米-大豆间作体系中, 玉米是占主导地位的作物^[4], 具有相对优势^[5]。土壤微

生物多样性和群落结构能影响包括营养元素循环在内的许多生态系统功能^[6],根际微生物是与植物生长直接相关的土壤微生物。因此,在间作体系中,根际有益微生物与根的互作对间作优势的体现具有重要作用。氨氧化细菌(AOB)和氨氧化古菌(AOA)是土壤中参与硝化作用的重要微生物,是土壤生态系统中较敏感的功能性微生物类群,可以通过改变无机氮的组成进而影响作物的生长。间作改变了根际土壤微生物的数量和群落结构,提高了作物对氮素吸收的有效性^[7]。但目前国内外对间作根际氨氧化微生物的研究尚很匮乏。

氨单加氧酶(*AMO*)是硝化作用过程中起始和限速步骤的关键酶。*AMO*的编码基因包括3个亚基,即*amoA*、*amoB*和*amoC*,其中*amoA*在AOA和AOB中均具有较高的拷贝数。基于*amoA*基因进行氨氧化微生物亲缘关系分析,其灵敏度和特异性均优于基于核糖体RNA的16S亚基(16S rRNA)序列分析的结果^[8]。另外,与16S rRNA相比,*amoA*基因具有更高的核苷酸变异率,这个特点也使得*amoA*基因更适合遗传发育分析^[9]。基于*amoA*基因序列的系统发育分析结果,Prosser等^[10]将AOA分为海洋环境类群、土壤环境类群和嗜热环境类群,而Pester等^[11]综合多数据分析,认为应分为*Nitrosopumilus* cluster类群、*Nitrososphaera* cluster类群、*Nitrosocaldus*类群、*Nitrosotalea*类群和*Nitrososphaera* sister cluster类群。基于*amoA*基因序列的同源性分析结果,AOB分为cluster 1、cluster 2、cluster 3a、cluster 3b、cluster 4、cluster 9、cluster 10、cluster 11和cluster 12,共9个cluster,其中cluster 2、cluster 3和cluster 4与基于16S rRNA序列系统发育分析的分组相同^[12]。

AOA和AOB在氮素循环中具有重要作用,具有作为土壤质量指示生物的潜在重要性,而玉米-大豆间作中玉米又是主导作物。因此,本试验拟采用荧光定量方法分析玉米根际AOA和AOB的丰度,构建*amoA*克隆文库,分析玉米根际AOA和AOB群落结构,分析间作对玉米根际AOA和AOB的数量及群落结构的影响,以期为合理选肥以及氮素利用率的提高奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验地点与土壤样品采集

试验小区设在云南昆明西南林业大学后山实

基地(种植前为荒草地)。试验地面积约200 m²,包括玉米(云瑞6号)单作、大豆(华严1号)单作和玉米-大豆间作3个种植模式,每个种植模式重复3次,随机区组设计,具体种植行株距同刘朝茂等^[13]。前期通过biolog技术监测根区土壤微生物时间动态,发现在作物的整个生长期(5-10月),以8月份微生物功能多样性的间作效应最明显,故选择8月(玉米抽穗期)的土样用于分析氨氧化微生物。

每个小区随机取5株玉米,用抖落法获取根际土壤,将5株玉米的根际土样混合均匀作为1个小区的样品,一部分直接进行土壤理化性质分析,一部分直接进行土壤总DNA提取,剩余部分存放于-80℃冰箱。土壤样品分别标记为间作玉米土壤(IM)和单作玉米土壤(MM)2个处理。

1.2 土壤理化性质分析

播种前每个小区采用5点取样法取样,测土壤基本理化性质,各个小区土壤的基本理化性质均无显著差异。所有理化性质均由云南同川农业分析测试技术有限公司按国家农业行业标准或国际标准进行检测。

1.3 土壤样品总DNA的提取

土壤的总DNA用MoBio PowerSoil[®] DNA Isolation Kit试剂盒(MoBio公司产品)提取,具体操作步骤见试剂盒说明书。为使提取的土壤总DNA具有代表性,每个样品重复提取3次总DNA,并将3次提取的DNA混合,作为一个样品的总DNA。

1.4 *amoA*基因克隆文库构建

*amoA*基因PCR扩增引物如表1显示,PCR扩增体系为50 μl:引物(10 mmol/L)各1 μl,DNA模板2 μl,EasyTaq[®] PCR Super Mix(Trans公司产品)25 μl,ddH₂O补足至50 μl。PCR反应扩增程序为:95℃预变性5 min;94℃1 min;AOA*amoA*基因53℃退火,AOB*amoA*基因55℃退火45 s,72℃延伸45 s,共40个循环,72℃延伸7 min。PCR产物用0.6%琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶纯化试剂盒(TaKaRa公司产品)对PCR产物进行纯化,纯化的DNA连接到pGEM-T Easy Vector载体,转化进入感受态细胞大肠杆菌Jm109,蓝白斑筛选后,用载体通用引物(T7:SP6)进行菌液PCR,验证阳性克隆。利用Minibest Plasmid Purification Kit(TaKaRa公司产品)质粒提取试剂盒提取重组质粒DNA,送至华大基因有限公司进行测序。

表1 PCR扩增引物

Table 1 Primers of PCR

引物	序列 (5'→3')	片段长度 (bp)	参考文献
<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGCTGGT	491	[14]
<i>amoA</i> -2R	CCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
Arch- <i>amoA</i> F	STAATGGTCTGGCTTAGACG	635	[15]
Arch- <i>amoA</i> R	GCGGCCATCCATCTGTATGT		
1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	172	[16]
1541R	AAGGAGGTGATCCRGCCGCA		

1.5 *amoA* 基因定量

重组质粒测序结果采用 GenBank 的 Blast 软件进行比对,重组质粒与细菌(JQ865218.1)和泉古菌(KF975987.1)这2个已知菌株 *amoA* 基因的同源性均达 99%,表明该质粒可以作为绝对荧光定量 PCR 分析的标准 DNA。以其为模板进行荧光定量 PCR 扩增,分别获得各基因标准曲线。获得 16S rDNA 基因标准曲线的 R^2 为 0.991 1,斜率为 -3.633 8;AOB *amoA* 标准曲线的 R^2 为 0.864 0,斜率为 -3.735 3;AOA *amoA* 标准曲线的 R^2 为 0.973 2,斜率为 -3.445 1。每个样品扩增标准曲线的同时进行样品的荧光定量 PCR 扩增。

细菌 16S rRNA 基因、AOB *amoA* 基因以及 AOA *amoA* 基因的定量 PCR 均采用 SYBY Green 法进行测定。扩增体系参考试剂盒说明书。各基因反应程序如下:

16S rRNA 基因和 AOB *amoA* 基因荧光定量 PCR 采用两步法,即 95 °C 5 min;94 °C 15 s,60 °C

30 s,40 个循环。AOA *amoA* 基因荧光定量 PCR 采用三步法,即 95 °C 5 min;94 °C 45 s,53 °C 1 min,68 °C 45 s,40 个循环。

1.6 数据统计分析与系统发育分析

因为 *amoA* 基因有较强的保守性,所以可以应用 2%~5% 的阈值分析克隆文库的稀疏性^[17]。本研究按 5% 来划分 *amoA* 基因的概念种或操作分类单元(OTUs)。用 Mothur ver 1.36.1 软件^[18] 进行稀疏曲线、辛普森指数和香农指数分析。克隆文库覆盖率(C)用公式 $C=1-(N/individual)$ 计算,其中 N 为只出现 1 次的克隆子数, $individual$ 为总的阳性克隆序列数。对 GenBank 数据库中每个 OTU 的代表序列进行 Blast 比对,获取同源性高的以及不同分类来源的代表性 *amoA* 基因序列,用 mega 5.0 软件进行多序列比对,用临近分析法构建系统发育树,自展系数 1 000。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

表 2 显示,间作玉米根际(IM)的 pH 值明显低于单作玉米根际(MM) ($P<0.05$)。间作玉米根际的 NO_3^- -N 含量显著高于单作玉米根际,而间作玉米根际与单作玉米根际中 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 含量的差异均不显著。 NO_2^- -N 极不稳定,易转化为 NO_3^- -N,因此间作与单作玉米根际的 NO_2^- -N 含量没有显著差异。间作玉米根际的 NH_4^+ -N 含量与 NO_3^- -N 含量和 NO_2^- -N 含量和的比值显著低于单作玉米根际,由此推测,与单作玉米根际相比,间作玉米根际可能发生了较强的硝化作用。

表2 根际土壤理化性质

Table 2 Basic chemical properties of the rhizosphere soil

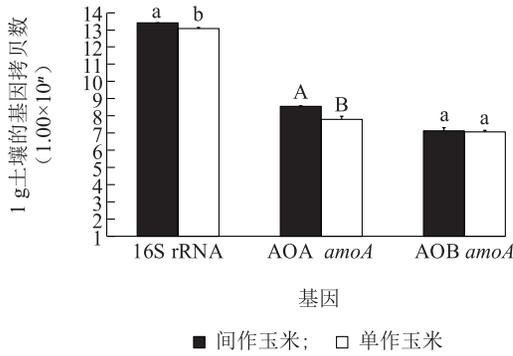
处理	pH 值	NH_4^+ -N 含量 (mg/kg)	NO_2^- -N 含量 (mg/kg)	NO_3^- -N 含量 (mg/kg)	$NH_4^+/(NO_2^-+NO_3^-)$
间作玉米	5.87±0.17a	1.82±0.21a	0.14±0.03ab	1.40±0.38a	1.18±0.21a
单作玉米	6.62±0.02b	2.00±0.93a	0.08±0.01a	0.55±0.17b	3.17±1.12b

同列数据后不同小写字母表示不同处理间的差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 玉米根际各基因丰度

利用 real-time PCR 方法检测了间作玉米根际和单作玉米根际中的细菌丰度、AOA *amoA* 基因丰度和 AOB *amoA* 基因丰度。结果(图 1)显示,间作玉米根际中细菌 16S rRNA 的拷贝数显著高于单作玉米根际,即间作玉米根际细菌的丰度显著高于单作玉米根际。间

作玉米根际中的 AOA *amoA* 基因丰度极显著高于单作玉米根际,而间作玉米根际中的 AOB *amoA* 基因丰度与单作玉米根际中的 AOB *amoA* 基因丰度无显著差异。间作玉米根际中的 AOA *amoA* 基因丰度是 AOB *amoA* 基因丰度的 26 倍,单作玉米根际中的 AOA *amoA* 基因丰度是 AOB *amoA* 基因丰度的 6 倍。



不同大写字母表示单作玉米根际与间作玉米根际中同一基因的基因拷贝数差异极显著($P < 0.01$);不同小写字母表示单作玉米根际与间作玉米根际中同一基因的基因拷贝数差异显著($P < 0.05$)。

图1 玉米根际 16S rRNA 及氨氧化微生物 *amoA* 基因丰度
Fig.1 Abundance of 16S rRNA and ammonia-oxidizing microorganisms *amoA* gene

2.3 AOB 与 AOA 的多样性分析

间作玉米根际中获得 AOB 有效阳性克隆序列 34 个, AOA 阳性克隆 42 个, 单作玉米根际中获得 AOB 有效阳性克隆序列 41 个, AOA 阳性克隆 31 个(表 3)。利用 Mothur 软件进行 OTU 相关分析, 从稀释曲线(图 2)中可以看出, 各文库用于测序的克隆数量达到或接近饱和, 文库覆盖率均在 67% 以上(表 3), 说明本研究得到的氨氧化微生物种群信息能较好地反应环境中真实的氨氧化微生物多样性。

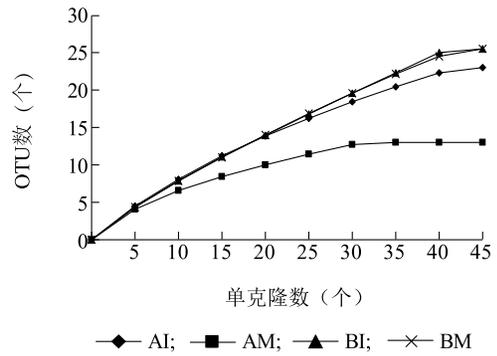
在种的水平上($distance = 0.05$), 利用 Mothur 软件分析不同处理氨氧化微生物的多样性指数, 间作玉米根际中 AOA 的多样性指数最高, 且明显高于单作玉米根际, 间作玉米根际中的 AOB 多样性指数也高于单作玉米根际, 但差异不大(表 3)。

表 3 不同处理克隆文库多样性指标

Table 3 Microbial indices of the clone libraries

文库	克隆数	OTU 数	H 指数	1/Simpsons 指数	覆盖率 (%)
AI	42	23	2.88	20.00	67
AM	31	13	2.24	9.09	74
BI	34	16	2.86	14.29	71
BM	41	20	2.85	12.50	68

AI: 间作玉米根际 AOA; AM: 单作玉米根际 AOA; BI: 间作玉米根际 AOB; BM: 单作玉米根际 AOB; OTU: 概念种或操作分类单元; H 指数: 香农-维纳多样性指数; Simpsons 指数: 辛普森多样性指数。



OTU、AI、AM、BI、BM 见表 3 注。

图 2 克隆文库稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves of different samples

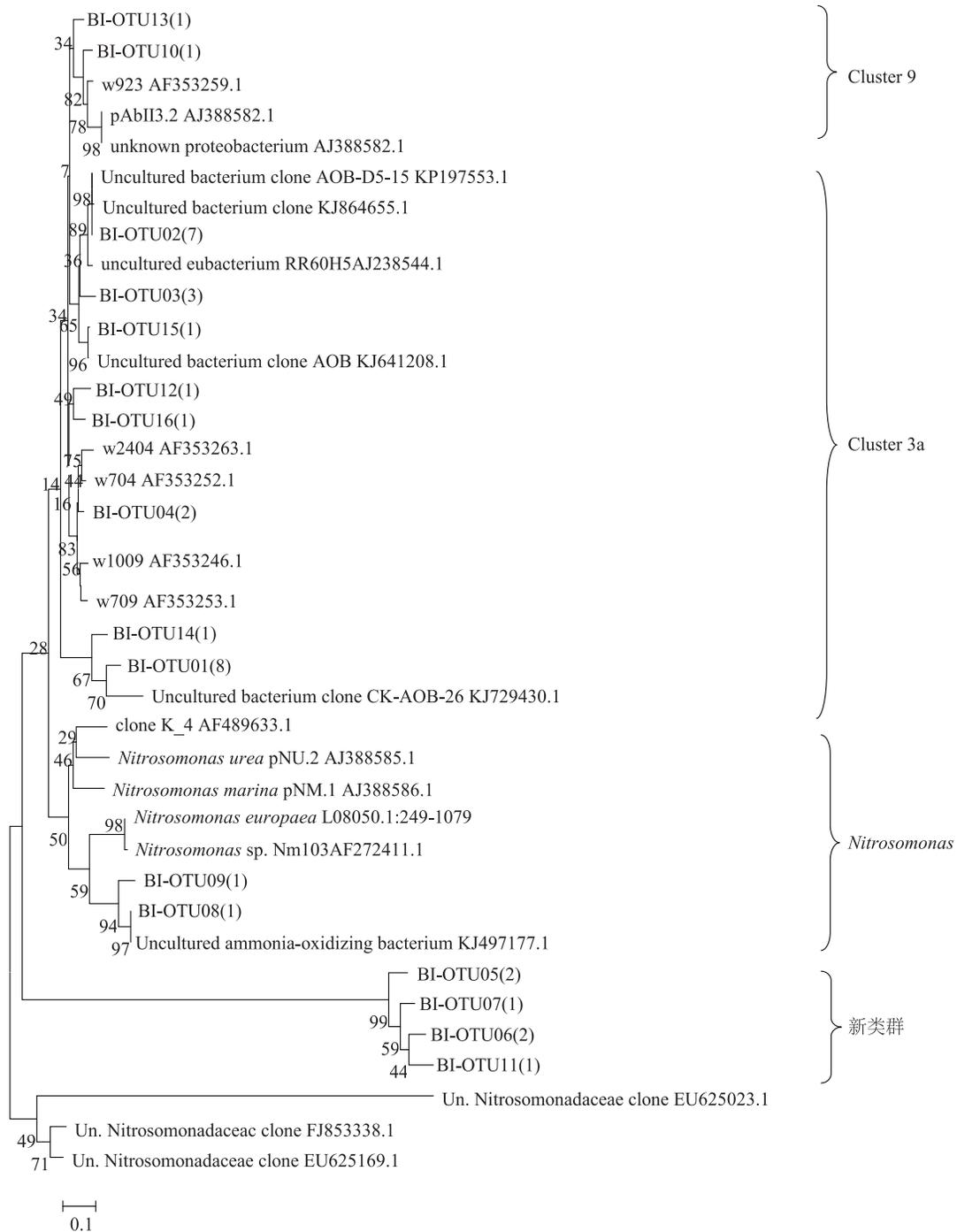
2.4 基于 *amoA* 基因的氨氧化微生物系统发育及群落结构组成分析

利用 Mothur 软件划分 OTU, 将每个 OTU 的代表序列与 GenBank 中的序列进行比对, 间作玉米根际 AOB 共获得 16 个 OTU, 其中有 10 个 OTU 代表序列与 GenBank 数据库中已有 *amoA* 基因序列的相似性达 98%~100%, 4 个 OTU 在 GenBank 中未找到相似序列。单作玉米根际 AOB 共获得 20 个 OTU, 全部 OTU 均具有已知的相似序列, 其中 15 个 OTU 与 GenBank 中序列的相似性达 98%~100%。间作玉米根际 AOA 共获得 23 个 OTU, 全部 OTU 均具有已知的相似序列, 其中 18 个 OTU 与 GenBank 中序列的相似性达 98%~100%。单作玉米根际 AOA 共获得 13 个 OTU, 全部 OTU 均具有已知的相似序列, 其中 11 个 OTU 与 GenBank 中序列的相似性高于 98%。

系统发育分析结果(图 3)表明, 间作玉米根际中的 AOB 划分为 4 个组, 即现研究已有的 *Nitrosospira amoA* (cluster 3a)、*Nitrosospira amoA* (cluster 9)、*Nitrosomonas* 和 1 个新的类群。间作玉米根际氨氧化细菌优势菌群(包含序列数 ≥ 3) BI-OTU01、BI-OTU02 和 BI-OTU03 主要集中在 *Nitrosospira amoA* (cluster 3a) 这个组, 占克隆总数的 53%。在 cluster 3a 组中还出现了由 BI-OTU12 和 BI-OTU16 组成的 1 个新的分支。此外, 在间作玉米根际的 AOB 中出现了 1 个新类群, 且这个类群当中的全部序列在 GenBank 中均未找到相似序列。单作玉米根际 AOB 则被划分为 *Nitrosospira amoA* (cluster 3a)、*Nitrosospira amoA* (cluster 9)、*Nitrosomonas*、未知的亚硝化单胞菌科 *Nitrosomonadaceae* 和 1 个新类群(图 4)。优势菌群 BM-OTU01、BM-OTU04 仍属于 cluster 3a 组, 占克隆总数的 37%,

但优势群 BI-OTU03 则属于 Nitrosomonadaceae 组, 单作玉米根际的 20 个 OTU 中有 9 个 OTU 属于 Nitro-

somonadaceae 组, 占克隆总数的 34%, 说明玉米-大豆间作改变了玉米根际 AOB 的结构。



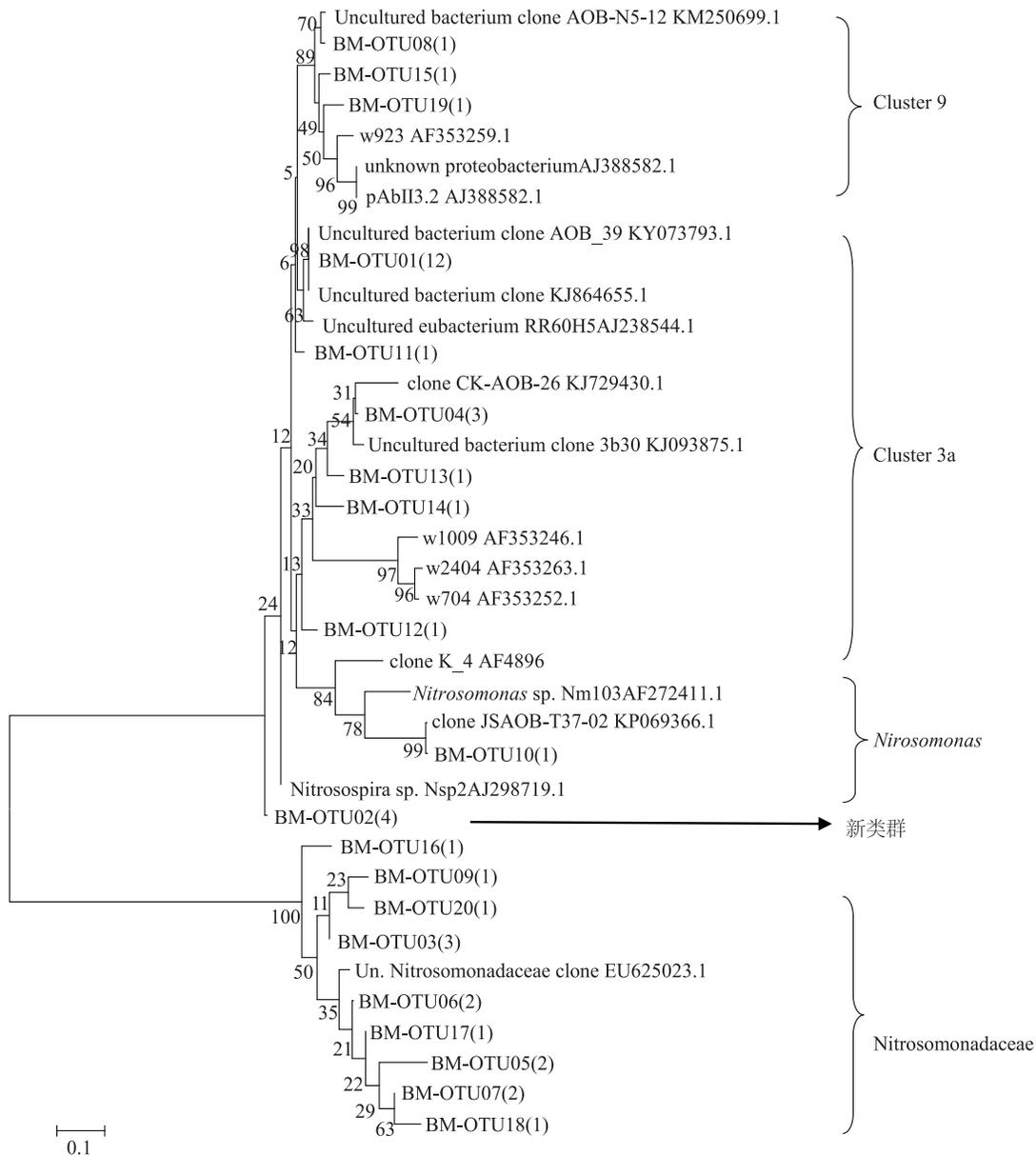
BI: 间作玉米根际中的氨氧化细菌。

图 3 依据 *amoA* 功能基因序列构建的间作玉米根际中氨氧化细菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic trees of intercropping maize rhizosphere ammonia-oxidizing bacteria targeted on *amoA* gene

与 GenBank 进行比对, 全部 AOA 的 OTU 均被鉴定为未知的或不可培养的 AOA 以及不可培养的中温泉古菌。系统发育分析结果(图 5、图 6)表明, 不同处

理的 AOA 类群均分为 6 个 cluster, 包括已有文献中记录的土壤 AOA 类群 (cluster 1、cluster 6、cluster 8、cluster S) 以及水生环境类群 (cluster water)。间作玉



BM:单作玉米根际中的氨氧化细菌。

图4 依据 *amoA* 功能基因序列构建的单作玉米根际中氨氧化细菌的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic trees of monoculture maize rhizosphere ammonia-oxidizing bacteria targeted on *amoA* gene

米根际的 AOA 优势菌群 OTU01 属于 cluster 6 (17%), OTU02 归属于新类群 (14%), OTU03 属于 cluster 1 (7%)。单作玉米根际的 AOA 优势菌群 OTU01 和 OTU03 均属于新类群 (39%), OTU02 则属于 cluster 6 (19%)。即单作玉米根际的 AOA 优势菌群都集中在 cluster 6 和新类群这 2 个类群中。间作玉米根际的 AOA 优势菌群则分散在不同的类群中, 表明有较高的遗传多样性。单作和间作玉米根际的 AOA 均有 OTU 分属于水生环境的类群。其中间作玉

米根际 AOA 的 cluster water 占 10%, 单作玉米根际 AOA 的 cluster water 占 3%。间作玉米根际中 AOA 的 cluster 1 占总克隆的 10%, cluster 6 占 5%, cluster 8 占 12%, cluster S 占 2%, 新类群占 48%; 单作玉米根际中 AOA 的 cluster 1 占 3%, cluster 6 占 23%, cluster 8 占 13%, cluster S 占 6%, 新类群占 52%。表明间作在一定程度上促进了 cluster water 和 cluster 1 的生长, 抑制了 cluster 6 的生长。可见间作可以改变玉米根际中 AOA 的群落结构。



AI:间作玉米根际中的氨氧化古菌。

图5 依据 *amoA* 功能基因序列构建的间作玉米根际中氨氧化古菌的系统发育树

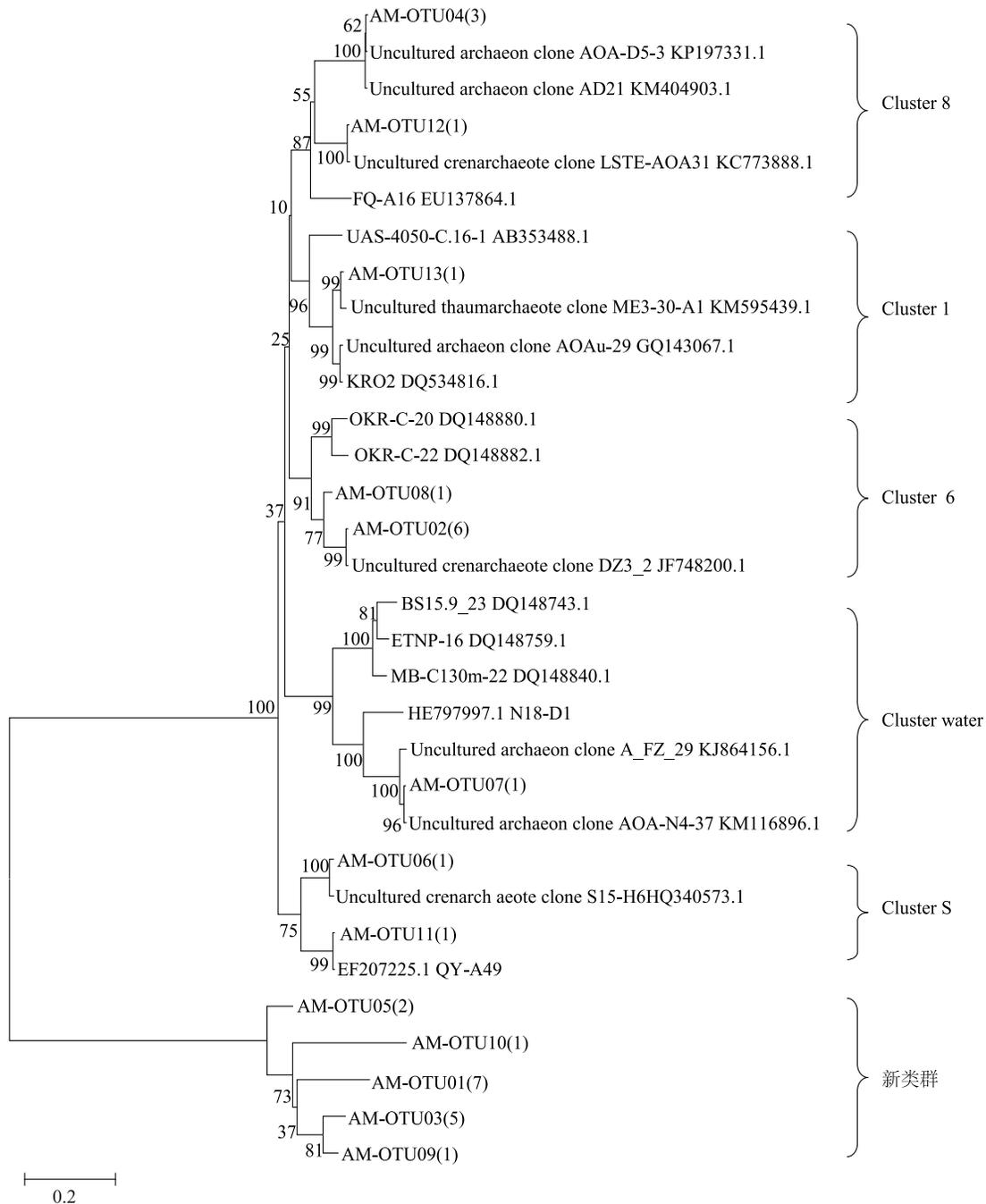
Fig.5 Phylogenetic trees of intercropping maize rhizosphere ammonia-oxidizing archaea targeted on *amoA* gene

3 讨论

通过荧光定量和克隆文库的方法分别研究了玉米-大豆间作对玉米根际中氨氧化微生物数量及结构的影响。荧光定量方法在检测环境中特定基因方面非常有效,本研究利用这个方法检测出玉米根际的细

菌总数远高于功能微生物类群氨氧化细菌总数。

基因丰度分析结果表明,间作玉米根际中的总细菌丰度显著高于单作玉米根际。有研究发现,玉米-大豆间作能显著提高根际中可培养细菌的数量^[19-20]。本研究利用 real time PCR 方法,进一步证实间作显著提高了根际中细菌的总量。对根际中氨



AM:单作玉米根际中的氨氧化古菌。

图 6 依据 *amoA* 功能基因序列构建的单作玉米根际中氨氧化古菌的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic trees of monoculture maize rhizosphere ammonia-oxidizing archaea targeted on *amoA* gene

氧化微生物数量的研究表明,无论是在单作玉米根际还是间作玉米根际中,均为氨氧化古菌的数量多于氨氧化细菌,即氨氧化古菌起主导作用。间作的种植模式显著提高了 AOA 的基因丰度,即增强了氨氧化古菌的主导作用。有研究认为土壤中 AOA 的数量远远多于 AOB,并且 AOA 对土壤氮素

的转化更为重要^[21-22]。然而也有研究认为,一般农田土壤中主导氨氧化过程的是 AOB 而不是 AOA^[23]。那么这些研究为什么会出现矛盾的结果呢?可能是因为研究的土壤环境条件不同。Di 等^[24]指出,在氮源丰富的土壤中主导氨氧化过程的是 AOB。Verhamme 等^[25]认为,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量为

0.20 mg/kg的环境中, AOA 生长势优于 AOB, 而 AOB 只在氨态氮含量为 200 mg/kg 的条件下生长显著。叶磊等^[26]的研究结果也表明, 在氨氮浓度较低 (5.31 mg/kg) 的情况下, AOA 为主导。另有研究结果表明, 酸性土壤中 AOA 的丰度高于 AOB 的丰度^[27], 无机自养的 AOA 主导氨氧化过程^[28]。本研究土壤理化性质的分析结果表明, 间作种植会显著降低玉米根际的 pH, 那么间作是如何改变根际 pH 的? 如何改变氨氧化微生物数量的? 两者的变化是否存在内在的联系, 这是另一个值得深入探讨的课题。本研究发现, 与单作相比, 玉米-大豆间作显著改变了玉米根际 AOA 的丰度, 但对 AOB 丰度的影响不显著, 可见 AOA 的丰度对间作反应更加敏感, 也说明 AOA 对植物根际的氧化作用和根的部分分泌物具有更好的适应性。除了土壤环境条件之外, 植被及农业管理模式也是影响 AOA 的主要因素。

Herrmann 等^[29]的研究结果表明, 植物根际硝化速率与 AOA 数量有显著的相关性, 而与 AOB 数量的相关性不明显, AOA 的丰度与土壤硝化潜势显著正相关^[30], 可以据此间接推测间作玉米根际可能有更高的硝化速率。玉米等禾本科作物更偏好硝态氮, 即硝态氮对禾本科作物的促生作用更明显, 但由于铵态氮肥具有节约能源等优势, 势必会成为未来氮肥的主流。因此, 这一偏好只能通过铵态氮的高效硝化加以解决^[31]。本研究从土壤理化性质和氨氧化微生物丰度 2 个方面证明玉米-大豆间作能增强玉米根际微生物的硝化能力, 从氨氧化微生物角度解释了间作的增产机理。

对玉米根际氨氧化微生物多样性的分析结果表明, 间作增加了玉米根际的 AOA 多样性和 AOB 多样性, 且 AOA 多样性增加的更明显。何贵伦等^[32]对枣树-棉花间作模式下的氨氧化细菌进行研究, 发现间作种植模式下氨氧化细菌的多样性指数、均匀度指数和丰富度均高于纯枣林和单作棉田。Wang 等^[33]认为在绝大多数的生态环境中, 亚硝化单胞菌属 *Nitrosomonas* 和螺菌属 *Nitrospira* 是优势菌种, 特别是在农田土壤中 *Nitrospira* 是优势菌种^[34-35], 这些研究结果都支持本研究的结果。Chen 等^[36]研究发现, 在富营养环境中, *Nitrosomonas* 类群分布更为广泛, 而 *Nitrospira* 类群一般在寡营养环境中为优势群体。本研究发现, 玉米-大豆间作也能促进 *Nitrospira* 类群增多, 另一个值得关注的是间作还促进了玉米根际一个新类群的增

多, 由于这个新类群中的全部序列在 GenBank 上还没有相似序列, 所以暂时还不能得出间作玉米究竟是促进了哪一类 AOB 生长的结论。玉米根际 AOA 系统发育树分析结果表明, 玉米根际中有属于水生环境的 AOA 类群, 说明玉米根际环境相对贫瘠, 而间作似乎又一定程度上促进了水生环境 AOA 类群的增长。基于 *amoA* 基因的 AOA 的最新系统发育分类指出, cluster water 属于 *Nitrososphaera* cluster, 而土壤类群中的 cluster 1 和 cluster 6 均归属于亚硝化侏儒菌属^[11]。虽然克隆文库所有 AOA 的 *amoA* 基因序列均在 GenBank 中找到了相似序列, 但由于不可培养的古菌种类较多, 因此需要开发更多不可培养微生物的研究技术, 如基因表达技术等, 才能更好地揭示不可培养微生物在作物生长发育及土壤养分转化中的作用。

参考文献:

- [1] 熊 军, 闫海锋, 韦绍丽, 等. 木薯+花生间作对作物光合特性、农艺性状和产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 165-168.
- [2] 杨建波, 彭东海, 覃刘东, 等. 低氮条件下间作大豆对宿根蔗内生固氮菌固氮酶活性、氮素积累及产量的影响[J]. 南方农业学报, 2015, 46(2): 210-215.
- [3] MARTIN R C, VOLDENG H D, SMITH D L. Intercropping corn and soybean for silage in a cool-temperature region: yield, protein and economic effects[J]. Field Crops Research, 1990, 23(3/4): 295-310.
- [4] MUYAYABANTU G M, KADIATA B D, NKONGOLO K K. Assessing the effects of integrated soil fertility management on biological efficiency and economic advantages of intercropped maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) in DR Congo[J]. American Journal of Experimental Agriculture, 2013, 3(3): 520-541.
- [5] WANG G, SHENG L, ZHAO D, et al. Allocation of nitrogen and carbon is regulated by nodulation and mycorrhizal networks in soybean/maize intercropping system[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1901.
- [6] WAGG C, BENDER S F, WIDMER F, et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(14): 5266-5270.
- [7] LI W, LI L, SUN J, et al. Effects of intercropping and nitrogen application on nitrate present in the profile of an Orthic Anthrosol in Northwest China[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2005, 105(3): 483-491.
- [8] AAKRA, UTÅKER J B, NES I F, et al. An evaluated improvement of the extinction dilution method for isolation of ammonia-oxidizing bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 39(1): 23-31.
- [9] PURKHOLD U, POMMERENING-RÖSER A, JURETSCHKO S, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers

- based on comparative 16 S rRNA and *amoA* sequence analysis; implications for molecular diversity surveys [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5368-5382.
- [10] PROSSER J I, NICOL G W. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 2931-2941.
- [11] PESTER M, RATTEI T, FLECHL S, et al. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2): 525-539.
- [12] AVRAHAMIS S, CONRAD R. Patterns of community change among ammonia oxidizers in meadow soils upon long-term incubation at different temperatures [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6152-6164.
- [13] 刘朝茂,李成云. 玉米与大豆间作对玉米叶片衰老的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(2): 322-326.
- [14] ROTTHAUWE J H, WITZEL K P, LIESACK W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4704-4712.
- [15] FRANCIS C A, ROBERTS K J, BEMAN J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [16] HE J Z, SHEN J P, ZHANG L M, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9): 2364-2374.
- [17] FRANCIS C A, O'MULLAN G D, WARD B B. Diversity of ammonia monooxygenase (*amoA*) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments [J]. *Geobiology*, 2003, 1(2): 129-140.
- [18] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [19] 张向前,黄国勤,卞新民,等. 间作对玉米品质、产量及土壤微生物数量和酶活性的影响 [J]. *生态学报*, 2012, 32(22): 7082-7090.
- [20] 董晓钢,汤利,郑毅,等. 不同玉米大豆间作处理根系互作对根际微生物数量的影响 [J]. *云南农业大学学报*, 2015, 30(4): 624-628.
- [21] LEININGER S, URICH T, SCHLOTTER M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. *Nature*, 2006, 442(7104): 806-809.
- [22] CHEN X P, ZHU Y G, XIA Y, et al. Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(8): 1978-1987.
- [23] JIA Z, CONRAD R. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil [J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(7): 1658-1671.
- [24] DI H J, CAMERON K C, SHEN J P, et al. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils [J]. *Nature Geosci*, 2009, 2(9): 621-624.
- [25] VERHAMME D T, PROSSER J I, NICOL G W. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms [J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 1067.
- [26] 叶磊,祝贵兵,王雨,等. 白洋淀湖滨湿地岸边带氨氧化古菌与氨氧化细菌的分布特性 [J]. *生态学报*, 2011, 31(8): 2209-2215.
- [27] CHEN X, ZHANG L M, SHEN J P, et al. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2011, 47(3): 323-331.
- [28] LU L, HAN W, ZHANG J, et al. Nitrification of archaeal ammonia oxidizers in acid soils is supported by hydrolysis of urea [J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(10): 1978.
- [29] HERRMANN M, SAUNDERS A M, SCHRAMM A. Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(10): 3279-3283.
- [30] YAO H, GAO Y, NICOL G W, et al. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4618-4625.
- [31] 柴强,胡发龙,陈桂平. 禾豆间作氮素高效利用机理及农艺调控途径研究进展 [J]. *中国生态农业学报*, 2017, 25(1): 19-26.
- [32] 何贵伦,罗明,韩剑,等. 枣树棉花间作与单作土壤氨氧化细菌 *amoA* 基因多样性的比较与分析 [J]. *新疆农业大学学报*, 2015, 38(2): 126-135.
- [33] WANG Y, KE X, WU L, et al. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(1): 27-36.
- [34] SHEN J, ZHANG L, ZHU Y, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1601-1611.
- [35] STEPHEN J R, MCCAIG A E, SMITH Z, et al. Molecular diversity of soil and marine 16 S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 4147-4154.
- [36] CHEN G Y, QIU S L, ZHOU Y Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu) [J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(3): 173-178.

(责任编辑:王妮)