

DOI: 10.11766/trxb201901040008

黄瑞林, 张娜, 孙波, 梁玉婷. 典型农田根际土壤伯克霍尔德氏菌群落结构及其多样性[J]. 土壤学报, 2020, 57 (4): 975–985.

HUANG Ruilin, ZHANG Na, SUN Bo, LIANG Yuting. Community Structure of Burkholderiales and Its Diversity in Typical Maize Rhizosphere Soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57 (4): 975–985.

典型农田根际土壤伯克霍尔德氏菌群落结构及其多样性^{*}

黄瑞林¹, 张 娜², 孙 波², 梁玉婷^{2†}

(1. 常州大学环境与安全工程学院, 江苏常州 213164; 2. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

摘要: 在根际环境中伯克霍尔德氏菌(Burkholderiales)是一类重要的植物促生菌, 其群落结构变化可能会影响植物的生长和发育。本研究针对伯克霍尔德氏菌目, 采用特异性引物 16S rRNA 基因高通量测序技术, 研究了田间条件下黑土、潮土和红壤中玉米根际伯克霍尔德氏菌群落结构及其对地上部作物生物量和产量的可能影响。结果表明: 在三种土壤类型中, 与未施肥相比, 施肥对伯克霍尔德氏菌目的丰富度和多样性均没有显著影响。在伯克霍尔德氏菌的科水平主要检测到三类细菌, 分别为草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)和伯克氏菌科(Burkholderiaceae), 且草酸杆菌科是其中的优势菌。此外, 施肥显著增加了有机质含量较低的潮土中马赛菌(*Massilia* spp. 和 *Massilia* sp. WG5)和伯克氏菌(*Burkholderia* spp.)的相对丰度($P<0.05$); 增加了酸性红壤中草螺旋菌(*Herbaspirillum* sp. ZM319)的相对丰度, 但降低了*Noviherbaspirillum* spp. 的相对丰度($P<0.05$); 而在有机质含量最高的黑土中, 所有检测到的伯克霍尔德氏菌均无明显地变化。进一步分析表明, 土壤有效磷、速效钾含量和土壤 pH 是影响这几类细菌的主要因素, 而马赛菌群落的变化可能会影响玉米地上部生物量和产量。本研究表明, 尽管化学施肥是影响玉米地上部生物量和产量的主要原因, 但是伯克霍尔德氏菌等根际微生物群落也可能是影响它们的潜在生物因素。

关键词: 伯克霍尔德氏菌; 马赛菌属; 根际微生物; 施肥; 溶磷

中图分类号: X172 文献标志码: A

Community Structure of Burkholderiales and Its Diversity in Typical Maize Rhizosphere Soil

HUANG Ruilin¹, ZHANG Na², SUN Bo², LIANG Yuting^{2†}

(1. School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: [Objective] Under the class β -proteobacteria, Burkholderiales is a kind of Gram-negative bacteria, characterized physiologically as strict aerobic, facultative anaerobic and obligate anaerobic chemoheterotrophic types, and composed mainly of Burkholaceae, Oxalobacteriaceae, Alcaligenaceae, and Comamonadaceae in taxonomy. In rhizospheric environment, Burkholderiales is an important group of pro-growth bacteria that can promote growth and development of plants. It can not only

* 国家自然科学基金项目(41622104)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.41622104)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ytliang@issas.ac.cn

作者简介: 黄瑞林(1992—), 男, 河南项城人, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤微生物。E-mail: fhruilin@163.com

收稿日期: 2019-01-04; 收到修改稿日期: 2019-04-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2019-05-09

promote plant growth by producing phytohormones, but also improve the environment in which plants grow via nitrogen fixation, nodulation and phosphorus solubilization. Studies, so far accomplished, have demonstrated that soil physicochemical properties, soil pH, soil type and fertilization can affect the community structure and composition of Burkholderiales, but failed to address variation of the effects with soil type and its potential relationship with crop yield. 【Method】 In this study, 16S rRNA high-throughput sequencing of Burkholderiales was performed with a pair of specific primers. Based on the findings, responses of Burkholderiales to nitrogen, phosphorus and potassium fertilization (N, P and K) in community structure and of the maize crops in three different types of agricultural soils (phaeozem, cambisol and acrisol) in shoot biomass and yield were investigated.

【Result】 Results show that application of chemical fertilizer did not affect much richness and diversity of the Burkholderiales in the three types of soil, as compared to the unfertilized plot. Moreover, three taxa of bacteria, i.e. Oxalobacteraceae, Comamonadaceae, and Burkholderiaceae, were detected at the family level of Burkholderiales. And Oxalobacteraceae was the dominant group. In addition, fertilization markedly increased relative abundance of the *Burkholderia* (mainly *Burkholderia* spp.) and *Massilia* (mainly *Massilia* spp. and *Massilia* sp. WG5) in the cambisol low in organic matter ($P<0.01$), while it significantly increased relative abundance of the *Herbaspirillum* (mainly *Herbaspirillum* sp. ZM319), but decreased that of the *Noviherbaspirillum* (mainly *Noviherbaspirillum* spp.) ($P<0.01$) in acidic acrisol. However, it did not affect much the relative abundance of all detected groups of Burkholderiales in the phaeozem high in soil organic matter and nutrient. Pearson correlation analysis and canonical correspondence analysis (CCA) indicates that nutrient (such as AP and AK) content and soil pH are the main factors affecting the community composition and structure of these bacteria (*Burkholderia*, *Massilia*, *Herbaspirillum* and *Noviherbaspirillum*). Furthermore, linear regression analysis and Mantel test shows that only the relative abundance of *Massilia* is significantly correlated with the shoot biomass and yield of maize ($P<0.05$). All these statistical analyses demonstrate that changes in community structure of *Massilia* may affect shoot biomass and yield of the crop. 【Conclusion】 This study indicates that although chemical fertilization is the main cause of the increase in shoot biomass and yield of maize, changes in community structure of rhizosphere microbes, such as Burkholderiales, may also be potential biological factors affecting shoot biomass and yield of maize.

Key words: Burkholderiales; *Massilia*; Rhizosphere microbes; Fertilization; Phosphorus solubilization

栖息于植物根、茎或叶的伯克霍尔德氏菌目属于变形菌门下的 β -变形菌纲,是一类革兰氏阴性菌,其生理特征主要表现为严格需氧、兼性厌氧和专性厌氧化能异养型,主要类群包括:伯克氏菌科、草酸杆菌科、产碱菌科 (Alcaligenaceae) 和丛毛单胞菌科^[1-2]。其中多数是具有固氮、结瘤、溶磷和产生植物激素等功能的植物促生菌。如越南伯克霍尔德菌 (*Burkholderia vietnamiensis*) 和库鲁利伯克霍尔德菌 (*Burkholderia kururiensis*) 具有固定空气中游离态氮的功能^[3];瘤状伯克霍尔德菌 (*Burkholderia phymatum*) 除具有固氮功能外还能够在植物的根部结瘤^[4]。Castanheira 等^[5]通过基因组指纹图谱和 16S rRNA 高通量测序发现禾谷伯克霍尔德菌 (*Burkholderia graminis*)、真菌伯克霍尔德菌 (*Burkholderia fungorum*) 和属于洋葱伯克氏菌群 (*Burkholderia cepacia* complex) 的菌株具有溶解矿物质磷、合成吲哚乙酸、生成铁载体以及拮抗植物

致病卵菌的能力。此外,一些洋葱伯克霍尔德菌的菌株能够栖息于谷物、玉米和水稻等作物的根际,通过提高作物养分吸收的方式增加作物产量^[6-7]。可见,伯克霍尔德氏菌具有促进植物生长和发育的潜力。

大量研究表明,温度、海拔高度、土壤 pH 和土壤类型是影响细菌群落的重要因素^[8-10],因此它们也可能与伯克霍尔德氏菌的群落结构和组成密切相关。Stopnisek 等^[11]对不同生态系统、气候条件和土壤类型中的伯克氏菌进行 16S rRNA 高通量测序和 qPCR 分析,表明年均温度、海拔、地理位置(经纬度)和土壤类型会显著影响伯克氏菌属的群落组成和结构。此外,氮肥和磷肥的施加也可能会影响根际土壤中的伯克霍尔德氏菌的群落结构、组成和功能。Tilman 等^[12]研究表明长期施氮肥尤其是以硫酸铵作为氮肥会引起土壤酸化。在酸性环境下(3.5~7),伯克氏菌属(属于伯克霍尔德菌目,伯克氏菌科)有明显的竞争优势^[11],因此氮肥施加引

起的土壤酸化可能会带来该菌丰度的增加。与长期施加磷肥的土壤相比, 不施加磷肥处理显著地增加了一类重要的溶磷菌——马赛菌属 (*Massilia*) (属于伯克霍尔德菌目, 草酸菌科) 的丰度^[13]。不仅如此, 磷肥对伯克霍尔德氏菌的影响还与磷肥的种类密切相关。在玉米根际, 与重过磷酸钙 (triple superphosphate) 作为磷肥相比, 长期以磷矿石 (rock phosphate) 作为磷肥能够显著地增加草酸杆菌科 (主要是马赛菌属和草螺菌属) 的丰度^[14]。最近, 在海伦长期施磷矿石的农业土壤中, 研究者分离到了一种具有溶磷能力的马赛菌并命名为: 12-OD1^{T[15]}。目前已发表的研究大多数是关于伯克霍尔德氏菌群落变化和物种鉴定分离, 对伯克霍尔德氏菌在不同类型土壤中的比较及其与作物产量的潜在关系有待于进一步研究。

本研究选择了三种典型农田土壤 (黑土、潮土和红壤) 作为供试土壤, 在同一海拔高度和气候类型的田间条件下设置了施肥 (氮磷钾) 和不施肥两种处理。通过对伯克霍尔德氏菌的引物序列^[16]进行 16S rRNA 高通量测序, 研究了玉米根际伯克霍尔德菌的群落结构和组成的变化及其对玉米地上生物量和产量可能的影响。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

田间试验设置于中国科学院封丘农业生态实验站 (114°24' E, 35°00' N), 位于河南省封丘县潘店乡, 海拔 67.5 m, 属半干旱、半湿润的暖温带季风气候, 年均温为 13.9°C, 年降水量为 605 mm, 主要集中在 6—9 月份。年日照时数 2 300~2 500 h。无

霜期为 220 d 左右。

1.2 研究方法

于 2005 年 10 月布置微区试验, 选择三种长期旱地耕作的农田土壤 (耕作历史 20 年以上), 分别为采自东北松嫩平原海伦的黑土、采自黄淮海平原封丘的黄河冲积物发育的潮土和采自南方丘陵区鹰潭的第四纪红黏土发育的红壤, 各土壤理化性质见表 1。在各地分层 (20 cm 每层) 采集三种土壤的剖面 (1.2 m 宽×1.4 m 长×1 m 深), 运至封丘站后按原来的土层顺序分别填装到长 1.2 m、宽 1.4 m、深 1 m 的试验小区, 每种土壤设置 2 种处理, 每种处理设置 3 个重复 (3×2×3)。小区为砌砖水泥池 (微区面积 1.2 m×1.4 m=1.68 m²), 小区隔墙厚 20 cm, 露出地表 20 cm, 底部铺石英沙, 内壁覆盖防水布。

2 种处理分别为: (1) 不施肥处理 (Unfertilized): 每年 6 月初种植 1 季玉米, 品种为当地品种郑单 958, 不施用任何肥料, 采用雨养, 不灌溉, 人工定期除草; (2) 常规施肥处理 (NPK): 每年种植 1 季玉米, 施肥量为 N 150 kg·hm⁻²、P₂O₅ 75 kg·hm⁻²、K₂O 60 kg·hm⁻², 肥料分别为尿素、(NH₄)₂HPO₄ 和 KCl, 种植前施加底肥 (1/2 氮肥、全部磷肥和钾肥), 玉米大喇叭口期追施尿素 (1/2 氮肥), 其他条件与不施肥处理相同。本研究试验样品于 2016 年玉米成熟期 (9 月 18 日) 采集。

玉米根际土壤采用抖根法收集^[17-18], 具体操作如下: 首先剧烈抖动玉米的根, 去除根表面附着的大多数土壤, 只保留根周围 1 mm 左右的土视为根际土; 其次称取 5 g 含有根际土的根放入 100 mL 的无菌锥形瓶中, 并向其中加入 50 mL 0.85% 的 NaCl 溶液 (经灭菌), 使用无菌镊子小心地将根际土洗下,

表 1 供试土壤基本理化性质 (2005 年)

Table 1 Physicochemical properties of the tested soils in the experiment of this study

土壤 Soil	土壤有机质		全氮	全磷	全钾	硝态氮	铵态氮	有效磷	速效钾
	pH	SOM/ (g·kg ⁻¹)	Total N/ (g·kg ⁻¹)	Total P/ (g·kg ⁻¹)	Total K/ (g·kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)	Available P/ (mg·kg ⁻¹)	Readily available K/ (mg·kg ⁻¹)
黑土 Phaeozem	5.94±0.00	49.65±4.42	2.43±0.06	0.25±0.01	14.85±0.13	21.28±3.02	21.08±1.85	26.34±0.86	141.73±5.05
潮土 Cambisol	8.23±0.00	8.35±0.22	0.66±0.01	0.18±0.04	12.99±0.32	23.67±1.43	15.16±0.23	11.80±4.30	68.87±0.19
红壤 Acrisol	5.02±0.00	8.53±0.70	0.83±0.33	0.08±0.01	6.93±0.44	17.62±0.85	19.15±0.21	35.33±3.98	219.40±4.41

直至根表面无明显土壤(重复该过程3次);最后将所有含有根际土的NaCl溶液小心转移至灭菌过的50 mL离心管中,以9 000 r·min⁻¹的速度离心10 min,倒去上清液后收集根际土(收集三次得到的所有根际土)。采集到的根际土分别以4℃和-20℃保存,以进行理化指标的检测和DNA提取。需要检测的理化指标测定方法参照文献[19],包括土壤有机质含量、pH和营养物质含量(全氮、全磷、全钾、有效磷、速效钾和碱解氮)。

1.3 DNA提取和高通量测序

准确称量1 g玉米根际土壤于无菌研钵中并加入0.5 g无菌石英砂,液氮研磨;使用Power Soil DNA isolation kit提取土壤总DNA。提取后使用超微量分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, U.S.A)上机检测各样品DNA的质量和浓度,浓度 $\geq 20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $\text{OD}_{260/280} = 1.8 \sim 2.0$ 的样品为合格样品,合格样品在-80℃条件下保存。

利用Illumina测序平台,对18个根际土壤样本的DNA做伯克霍尔德氏菌进行高通量测序,以标准的细菌基因组DNA Mix作为阳性对照,根据选定的检测区域确定相对应的扩增引物,对各样本的检测区域做高保真PCR扩增。伯克霍尔德氏菌的16S rRNA(V4-V5区)扩增引物序列为^[16]: Primer F = Illumina adapter sequence 1 + TTTGGACAATGG GGGCAAC, Primer R = Illumina adapter sequence 2 + CTTCGTTACCAAGTCAATGAAGA。研究表明该引物所得序列有99%属于伯克霍尔德氏菌^[16],且使用该引物在BLAST数据库对比确定其属于特异性引物。该细菌的16S rRNA(V4-V5区)区域扩增的PCR条件为:预变性步骤设置95℃、2 min;变性步骤设置94℃、20 s,退火步骤设置55℃、40 s,延伸步骤设置72℃、1 min,重复循环变性-退火-延伸三个步骤35次;末延伸步骤设置72℃、2 min。利用带有Index序列的引物,通过高保真PCR将特定的标签序列导入文库末端。样本添加特异性标签序列的PCR条件为:预变性步骤设置98℃、30 s;变性步骤设置98℃、10 s,退火步骤设置65℃、30 s,延伸步骤设置72℃、30 s,重复循环变性-退火-延伸三个步骤11次;末延伸步骤设置72℃、5 min。之后应用核酸纯化磁珠纯化扩增产物,得到样本的原始文库。利用Qubit荧光定量仪对文库精确定量,按相应比例(摩尔比)混合样本。通过Agilent 2100

Bioanalyzer生物分析仪检测混合样本的文库插入片段的大小,确认在210~252 bp之间无非特异性扩增,并准确定量测序文库浓度。采用Miseq系列测序仪2×250 bp的双端测序策略对文库做测序。原始下机数据经过质量控制和过滤后,利用UPARSE软件对其做OTU(Operational Taxonomic Unit)聚类分析,分类依据参照RDP(Ribosomal Database Project)数据库的RDP Release 11.5版本。细菌测序中每个样本获得的序列数范围为40 607~65 060 reads,为了尽量减少样本中读取计数变化的影响,本研究基于样本序列最低数量(40 607 reads)对其进行抽平处理,按照97%的相似性对所有序列做OTU划分,各样品文库的覆盖率达到98%以上。

1.4 数据分析

本研究计算了同一土壤类型下施肥和不施肥对根际土壤中物种相对丰度的影响,且使用热图(heatmap)对数据进行了可视化,使用了皮尔森(Pearson)相关分析,以检验不同理化性质与物种相对丰度之间的相关性。同时利用典范对应分析(CCA)以研究不同理化指标对施肥情况下相对丰度显著变化的伯克霍尔德氏菌群落结构和分布的影响。利用R语言中的lm函数对物种相对丰度变化与玉米地上生物量和产量进行了线性拟合。所有这些分析都是在R语言(R 3.5.1)中进行的(<https://www.r-project.org/>)。所涉及的R包分别为pheatmap、corrplot和vegan^[20]。

为了评估土壤理化性质,伯克霍尔德氏菌的相对丰度与玉米地上生物量和产量之间的直接和间接联系,本研究构建了结构方程模型^[21](structural equation modeling, SEM)。构建过程主要分为以下三个步骤:首先基于已经掌握的知识和过去已发表过的文献,判断预测因子之间可能存在的相关性并预设模型;其次检验数据是否符合正态分布,对不符合正态分布的数据进行对数转换,加载数据后检查模型的整体适应性,本研究使用了 χ^2 检测(当 $P > 0.05$ 时模型适应良好)、拟合优度指标(GFI,当 $GFI > 0.9$ 时模型适应良好)和近似均方根误差^[22](RMSEA,当 $RMSEA < 0.05$ 且 $P > 0.05$ 时模型适应良好)来判断模型的适应性,对于某些即使对数转换后也难以符合正态分布的变量本研究使用了Bollen-Stine bootstrap检测(当bootstrap $P > 0.05$ 时模型适应良好);最后通过合理的模型拟合,本研究

解释了模型的路径系数以及其对应的显著性 P 值, 并且本研究还计算了标准总体影响 (standardized total effects, 对两个变量之间的直接和间接影响求和)。所有的结构方程分析在 IBM® SPSS® Amos 20.0 (AMOS IBM USA) 中完成。

2 结 果

2.1 不同土壤类型下施肥对土壤理化性质、玉米地上部生物量和产量的影响

在本研究中, 施肥会显著增加三种土壤类型中

的全磷、有效磷含量和玉米地上部生物量 ($P<0.05$); 而对土壤水分含量、pH、土壤有机质和玉米产量的改变会受到土壤类型的影响 (表 2)。例如, 施肥会提高黑土的水分含量, 提高黑土和潮土中的土壤有机质, 而对红壤中的水分含量和土壤有机质含量并无显著的影响。此外, 同种土壤与移置前相比, 移置后其产量均有显著的提高 ($P<0.001$)。

2.2 施肥对伯克霍尔德氏菌群落的影响

基于对伯克霍尔德氏菌的 16s rRNA 测序分析表明, 相比黑土和潮土, 红壤中伯克霍尔德氏菌的丰富度和多样性较低; 在同种土壤类型中, 与未施

表 2 同种土壤类型下施肥对土壤理化性质、玉米地上部生物量和产量的影响 (2016)

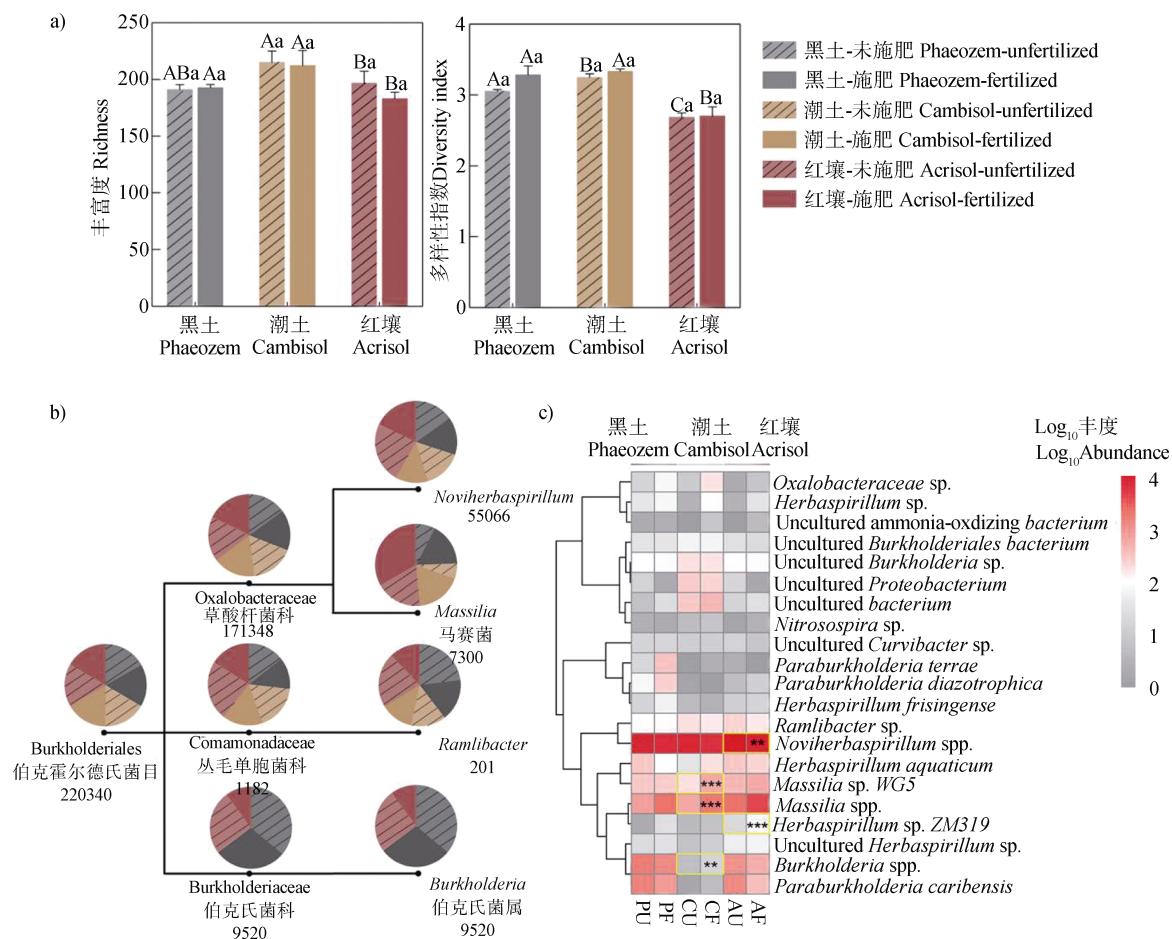
Table 2 Effects of fertilization on physicochemical properties, shoot biomass and yield of maize in soils the same in soil type

土壤 Soil	处理 Treatment	含水量 (g·kg ⁻¹)	Moisture/ pH	土壤有机质 SOM/ (g·kg ⁻¹)	全氮 Total N/ (g·kg ⁻¹)	全磷 Total P/ (g·kg ⁻¹)	全钾 Total K/ (g·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ -N/ (mg·kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ -N/ (mg·kg ⁻¹)
黑土	未施肥	260.1 ± 5.4	7.01 ± 0.04	46.75 ± 1.89	2.06 ± 0.05	0.86 ± 0.05	17.87 ± 1.19	4.96 ± 2.50	6.44 ± 2.36
Phaeozem	施肥	272.9 ± 2.9	6.94 ± 0.07	50.09 ± 0.18	2.12 ± 0.02	1.02 ± 0.03	19.79 ± 0.53	10.52 ± 3.18	5.66 ± 0.80
	<i>P</i>	0.02	0.19	0.04	0.13	< 0.01	0.06	0.08	0.62
潮土	未施肥	170.9 ± 6.7	8.63 ± 0.02	9.22 ± 0.21	0.61 ± 0.03	0.73 ± 0.05	17.38 ± 0.34	4.13 ± 0.73	4.7 ± 1.35
Cambisol	施肥	162.1 ± 3.1	8.59 ± 0.06	10.63 ± 0.34	0.63 ± 0.01	0.85 ± 0.02	17.48 ± 0.20	10.07 ± 3.74	6.15 ± 1.77
	<i>P</i>	0.11	0.34	< 0.01	0.32	0.02	0.69	0.06	0.34
红壤	未施肥	170.1 ± 3.9	6.91 ± 0.09	12.45 ± 1.16	0.82 ± 0.09	0.49 ± 0.01	9.84 ± 0.41	1.56 ± 0.01	5.57 ± 1.29
Acrisol	施肥	163.6 ± 9.8	6.70 ± 0.07	13.72 ± 1.82	0.83 ± 0.01	0.59 ± 0.03	9.71 ± 0.33	4.80 ± 0.99	4.50 ± 2.20
	<i>P</i>	0.35	0.04	0.36	0.85	0.01	0.69	< 0.01	0.51
原位地上部生 原位产量									
土壤 Soil	处理 Treatment	碱解氮 Alkali-hydrolyzable N/ (mg·kg ⁻¹)	有效磷 Available P/ (mg·kg ⁻¹)	速效钾 Readily available K/ (mg·kg ⁻¹)	地上部生物量 Shoot biomass/ (1000 kg·hm ⁻²)	产量 Yield/ 物量 In-situ biomass / (1000 kg·hm ⁻²)	In-situ biomass / (1000 kg·hm ⁻²)	In-situ yield /	In-situ yield /
黑土	未施肥	210.70 ± 22.45	23.75 ± 1.11	180.8 ± 14.6	9.37 ± 0.86	10.15 ± 0.72	7.62 ± 0.26	3.34 ± 0.63	
Phaeozem	施肥	200.90 ± 22.45	42.72 ± 2.97	270.8 ± 19.1	15.77 ± 1.22	14.15 ± 2.90	16.79 ± 0.89	10.02 ± 0.91	
	<i>P</i>	0.62	< 0.001	< 0.01	< 0.01	0.08	< 0.001	< 0.001	
潮土	未施肥	55.13 ± 19.45	1.71 ± 0.07	101.7 ± 10.1	5.08 ± 0.70	8.11 ± 0.83	—	—	
Cambisol	施肥	50.23 ± 8.49	5.11 ± 0.36	115.0 ± 12.5	15.05 ± 0.86	13.57 ± 0.92	—	—	
	<i>P</i>	0.71	< 0.001	0.22	< 0.001	< 0.01	—	—	
红壤	未施肥	50.23 ± 5.61	15.17 ± 0.24	250.0 ± 2.5	5.35 ± 0.24	9.84 ± 0.47	1.56 ± 0.16	0.37 ± 0.05	
Acrisol	施肥	55.13 ± 9.23	32.97 ± 1.91	283.3 ± 28.9	13.63 ± 1.25	13.27 ± 0.50	1.50 ± 0.01	1.18 ± 0.11	
	<i>P</i>	0.49	< 0.001	0.21	< 0.001	< 0.001	0.51	< 0.001	

注: 未施肥处理 unfertilized treatment; 施肥处理 fertilized treatment; 加粗表示处理之间存在显著差异 ($P<0.05$)。下同。Note: Unfertilized treatment, fertilized treatment; bold indicates significant different between treatments ($P<0.05$)。The same below.

肥土壤相比,施肥并未显著地影响伯克霍尔德氏菌的丰富度和多样性(图1a)。本研究主要检测到三类主要的伯克霍尔德氏菌,分别为草酸杆菌科、丛毛单胞菌科和伯克氏菌科(图1b),其中草酸杆菌均是优势菌。伯克氏菌科在潮土中丰度最低。进一步分析表明,施肥对种水平伯克霍尔德氏菌相对丰度的影响可能与土壤类型有关(图1c)。例如,在潮土中施肥显著地

增加了 *Burkholderia* spp. (属于伯克氏菌属)、*Massilia* spp. (属于马赛菌属) 和 *Massilia* sp. WG5 (属于马赛菌属) 的相对丰度;在红壤中施肥处理显著增加了 *Herbaspirillum* sp. ZM319 的相对丰度(属于草螺旋菌属),显著降低了 *Novitherbaspirillum* spp. 的相对丰度($P<0.05$);而在黑土中施肥对所有检测到的伯克霍尔德氏菌的相对丰度均无显著影响。



注:图a)伯克霍尔德氏菌的丰富度和多样性,其中小写字母代表同种土壤施肥与不施肥之间的比较,大写字母代表同一处理(施肥或不施肥)下不同土壤之间的比较,不同字母表示存在显著差异;图b)同一微生物分类等级下,不同处理土壤中微生物的相对丰度,其中数字代表测序得到的序列数,其中在属水平下只展示了相对丰度在该属中大于1%的物种;图c)种水平伯克霍尔德氏菌的热图分析,P代表黑土Phaeozem,C代表潮土Cambisol,A代表红壤Acrisol,U代表未施肥unfertilized,F代表施肥fertilized,如PU代表黑土未施肥;黄色方框代表在同一种土壤下施肥与未施肥之间的比较;“*”代表显著性水平 $P<0.05$,“**”代表 $P<0.01$,“***”代表 $P<0.001$ 。下同。Note: Fig. a) richness and diversity of Burkholderiales, in which lowercase letters represent a comparison between fertilized and unfertilized treatment under the same soil, capital letters represent a comparison between different soils under the same treatment, different letters indicate significant difference; Fig. b) relative abundances of microbes under different treated soils at the same classification level, in which numbers represent reads obtained by sequencing, only species with a relative abundance greater than 1% are shown at the genus level; Fig. c) heatmap analysis of Burkholderiales at the level of species, in which P, C, A, U and F represent Phaeozem, Cambisol, Acrisol, unfertilized and fertilized treatment, respectively. For example, PU represent Phaeozem-unfertilized; yellow boxes represent a comparison between fertilized and unfertilized treatment under the same soil. “*” represents significance level $P<0.05$, “**” represents significance level $P<0.01$, “***” represents significance level $P<0.001$. The same below.

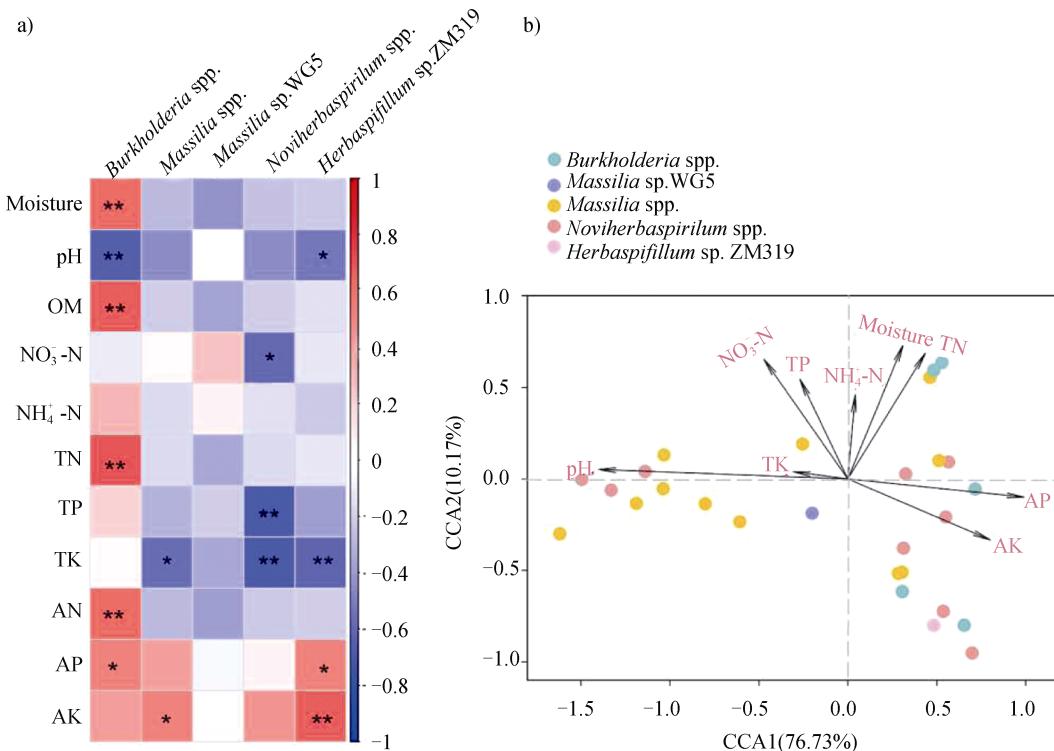
图1 同种土壤类型下施肥对伯克霍尔德氏菌群落的影响

Fig. 1 Effect of fertilization on Burkholderiales community in soils the same in soil type

2.3 土壤理化性质与伯克霍尔德氏菌群落之间的关系

皮尔森相关分析表明土壤理化性质的改变(如:水分含量、土壤有机质含量、pH、碱解氮和有效磷等)均会影响到 *Burkholderia* spp.的相对丰

度,但不会显著影响 *Massilia* sp. WG5 的相对丰度(图 2a)。典范对应分析(CCA) pH、硝态氮(NO_3^- -N)、速效钾(AK)和有效磷(AP)含量的变化是影响伯克霍尔德氏菌群落结构变化的主要因素(图 2b)。



注:图 a) 为存在显著变化的伯克霍尔德氏菌与土壤理化性质之间的相关性分析,颜色深度代表相关性强弱,蓝色表示负相关,红色表示正相关;图 b) 为典范对应(CCA)分析。Note: Fig. a) correlation analysis between Burkholderiales with significant changes and the soil physicochemical properties, in which color depth represents the strength of the correlation, blue indicates the negative correlation, and red indicates the positive correlation; Fig. b) canonical correspondence analysis (CCA).

图 2 土壤理化性质与伯克霍尔德氏菌群落的联系

Fig. 2 Relationships between soil physicochemical properties and Burkholderiales community

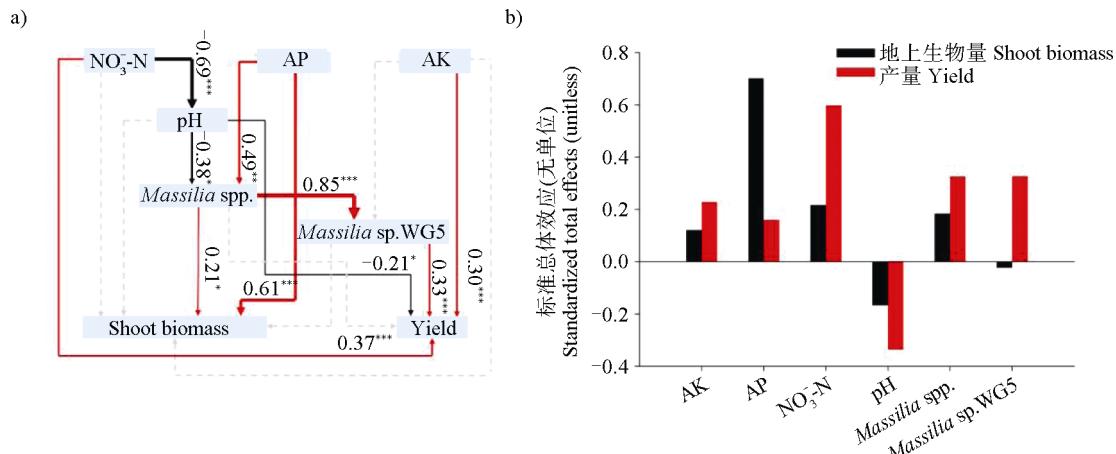
2.4 生物因素、非生物因素与玉米地上部生物量和产量之间的关系

利用结构方程模型,建立了土壤营养状况、pH 及伯克霍尔德氏菌相对丰度与玉米地上部生物量和产量之间潜在的直接和间接联系。结果表明:施肥对土壤营养状态的改善既能够直接地影响玉米地上部生物量(如有效磷)和产量(如硝态氮和速效钾),也能够通过影响土壤 pH 和马赛菌属的群落结构间接产生影响(图 3a)。此外,虽然施肥导致的土壤理化性质的改变对 *Massilia* sp. WG5 的相对丰度变化均无显著影响(图 2),但是属于马赛菌属的同种微生物之间存在明显的正相关关系($r = 0.85$,

$P < 0.01$),这意味着其同属内的其他物种可能通过增加 *Massilia* sp. WG5 的相对丰度从而影响玉米的产量。此外,标准总体效应的结果表明了有效磷和硝态氮含量的增加是提高玉米地上部生物量和产量的最主要因素,马赛菌属相对丰度的变化也会潜在影响玉米地上部生物量和产量(图 3b)。

2.5 伯克霍尔德氏菌相对丰度与玉米地上部生物量和产量的关系

对伯克霍尔德氏菌相对丰度与玉米地上部生物量和产量的线性回归分析表明,其中马赛菌属的 *Massilia* sp. WG5 和 *Massilia* spp. 的相对丰度与玉米产量存在明显的线性相关(图 4)($P < 0.05$)。在不



注: 图 a) 为结构方程模型 (SEM), $\chi^2 = 7.051$, $P = 0.632$, $df = 9$; bootstrap $P = 0.806$; GFI = 0.931; RMSEA = 0.000, $P = 0.662$, 灰色带箭头的虚线代表没有显著相关, 红色带箭头的实线代表显著正相关, 黑色带箭头的实线代表显著负相关; 图 b) 为结构方程模型中各指标对地上部生物量和产量的总影响。Note: Fig. a) structural equation model (SEM), $\chi^2 = 7.051$, $P = 0.632$, $df = 9$; bootstrap $P = 0.806$; GFI = 0.931; RMSEA = 0.000, $P = 0.662$, in which dotted grey arrows represent non-significant paths ($P > 0.05$), solid red arrows represent positive paths ($P < 0.05$), solid black arrows represent negative paths ($P < 0.05$). Fig. b) total effect of each index on shoot biomass and yield in structural equation model.

图 3 土壤理化性质、伯克霍尔德氏菌相对丰度与地上部生物量和产量之间的结构方程模型

Fig. 3 Structural equation model for relationships of soil physicochemical properties and relative abundance of Burkholderiales with shoot biomass and yield of the crop

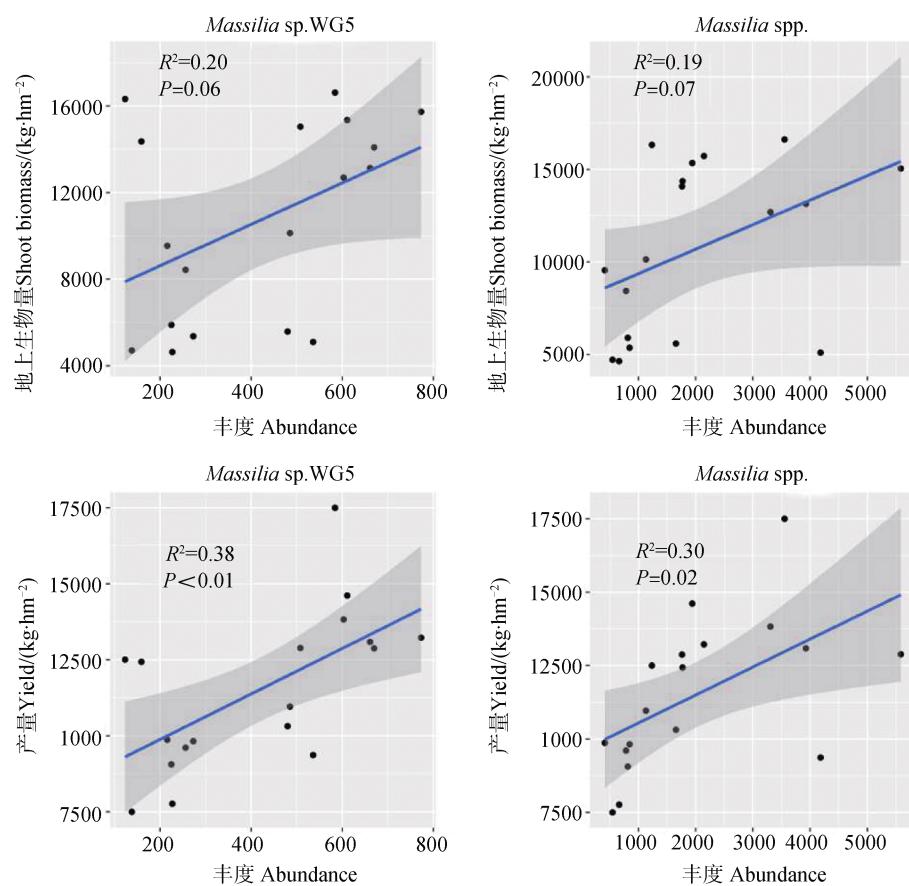


图 4 伯克霍尔德氏菌与地上部生物量和产量的线性拟合

Fig. 4 Linear fitting of the relationship of Burkholderiales with shoot biomass and yield of the crop

同土壤中施肥对这两种菌的影响并不一致, 仅在有机质含量不高、土壤呈碱性的潮土中, 施肥才会显著影响马赛菌的相对丰度; Mantel 检测也发现仅在潮土中马赛菌相对丰度变化与玉米地上部生物量和产量之间有显著相关性(表 3)。

3 讨 论

基于伯克霍尔德氏菌的 16S rRNA 测序数据, 本研究发现在同种土壤中施肥并没有显著改变根际

土壤中伯克霍尔德氏菌的 α 多样性(图 1a), 这可能是因为在根际土壤中存在大量的根际分泌物^[23-24], 所以根际环境中碳可能不是伯克霍尔德氏菌的限制性因素^[25]。这一点与 Stopnisek 等^[11]的研究结果一致, 土壤中有机质的含量不会影响伯克霍尔德氏菌的多样性。此外, 在本研究中草酸菌科是伯克霍尔德氏菌群落内的优势菌(图 1b)。有证据表明该菌的多样性主要受菌根真菌的影响^[26-27], 其大多数成员与菌根真菌存在共生关系^[28], 所以施肥可能对草酸菌科下群落的多样性影响较弱。

表 3 不同土壤类型下两种马赛菌对地上部分生物量和作物产量的 Mantel 检测

Table 3 Mantel test of the relationships of shoot biomass and crop yield with two species of rhizosphere *Massilia* bacteria relative to soil type

	黑土 Phaeozem				潮土 Cambisol				红壤 Acrisol			
	<i>Massilia</i> spp.		<i>Massilia</i> sp. WG5		<i>Massilia</i> spp.		<i>Massilia</i> sp. WG5		<i>Massilia</i> spp.		<i>Massilia</i> sp. WG5	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
地上部生物量 Shoot biomass	0.03	0.11	-0.07	0.43	0.64	0.02	0.75	0.04	0.47	<0.01	-0.13	0.65
产量 Yield	0.52	0.1	0.52	0.08	0.64	0.01	0.68	0.06	-0.05	0.58	-0.03	0.54

研究表明在根际土壤草酸杆菌科下的马赛菌属是一种重要的功能菌^[29], 该菌属中的多数成员具有溶磷^[15]、降解菲^[30]及提高作物对盐的耐受力的功能^[31]。与过去的研究一致^[25], 在三种土壤中, 本研究均发现了丰富的马赛菌(图 1b 和图 1c)。然而, 只有在潮土中马赛菌(主要是 *Massilia* sp. WG5 和 *Massilia* spp.)的相对丰度对施肥有显著的响应, 这可能与该菌的生存策略有关。研究表明富营养生存策略的细菌有更快的生长速度, 同时对竞争和营养状态的改变有更高的敏感性^[32-33]。已有研究证明了马赛菌属于富营养型细菌^[25], 并且大量存在于根际土壤中^[34]。在本研究中结构方程模型分析发现土壤中有效磷含量与马赛菌(主要是 *Massilia* spp.)的相对丰度显著正相关(图 3a; $r = 0.49$, $P < 0.01$), 而硝态氮含量的变化能够间接影响马赛菌的相对丰度。因此, 在有效磷含量被显著改善而土壤 pH 没有变化的潮土中马赛菌对施肥会有一个明显的响应。对于黑土而言, 因为其本身具有很高的有机质和有效磷含量(表 2), 因此在该土壤类型下碳和营养物质不是马赛菌属生长和繁殖的限制因子。黑土含有丰富的碳和营养物质, 因此其可能包含更多的

营富营养生存策略的微生物, 这可能会给马赛菌属带来较大的竞争压力^[25]; 同时, 在移置到封丘后其土壤有机质含量的明显降低, 这将进一步增加富营养微生物间对生态位和生存空间的竞争。因此, 施肥虽然会增加黑土中有效磷和速效钾的含量, 但是这些营养物质的改善并没有增加马赛菌属的相对丰度。本研究中施肥显著降低了红壤的 pH, 从而增加马赛菌(主要是 *Massilia* spp.)的相对丰度(图 3a), 这意味着马赛菌更适合生活在偏酸性的土壤中。

本研究结果表明在弱碱性和有机质含量较低的潮土中, 马赛菌属相对丰度的增加可能是提高玉米地上部生物量和产量的一个潜在生物途径(图 3 和图 4)。这可能是由于以下原因: 首先大量的研究证明了马赛菌是一类具有溶磷能力的菌属^[13-15, 34], 在过去的研究中无论是磷缺乏的土壤中^[13], 还是在长期施加磷矿石^[14]的土壤中均有发现丰富的马赛菌。相关研究还表明马赛菌的丰度与磷酸酶的活性显著正相关^[34]。因此, 潮土中马赛菌相对丰度的增加能够为玉米提供更多的有效磷。在本研究中, Mantel 检测也证明了在潮土中该菌属相对丰度的变化显著影响玉米地上部生物量和产量(表 3)。其次, Silva

等^[14]在研究发现马赛菌属有利于提高玉米对磷的吸收能力。在本研究中,施肥土壤中玉米地上生物量和产量的变化分别是黑土中增加了68.30%和39.41%;潮土中增加了196.26%和67.32%;红壤中增加了155.14%和34.86%(表2),潮土中玉米地上生物量和产量的增加相比于黑土和红壤来说更高。施肥是提高玉米生物量和产量的重要因素(图3b),潮土中马赛菌属群落结构的变化可能也是提高玉米地上生物量和产量的重要潜在生物因素。

4 结 论

氮磷钾施肥显著增加潮土中 *Burkholderia* spp.、*Massilia* spp. 和 *Massilia* sp. WG5 的相对丰度;增加红壤中 *Herbaspirillum* sp. ZM319 的相对丰度,降低红壤中 *Noviherbspirillum* spp. 的相对丰度($P<0.05$);黑土中所有检测到的伯克霍尔德氏菌的相对丰度均无显著影响。基于统计学分析,本研究发现马赛菌属相对丰度的变化可能是改变玉米地上生物量和产量的潜在生物途径。由于该结果是基于统计学分析得到的,未来需要增加实验对其进一步验证。

参考文献 (References)

- [1] Pérez-Pantoja D, Donoso R, Agulló L, et al. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14 (5): 1091—1117.
- [2] Stoyanova M, Pavlina I, Moncheva P, et al. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2007, 21 (3): 306—310.
- [3] Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, et al. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene(TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50 (2): 743—749.
- [4] Vandamme P, Henry D, Coenye T, et al. *Burkholderia anthonina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2002, 33 (2): 143—149.
- [5] Castanheira N, Dourado A C, Kruz S, et al. Plant growth-promoting *Burkholderia* species isolated from annual ryegrass in Portuguese soils[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120 (3): 724—739.
- [6] Trân Van V, Berge O, Ngô Kê S, et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam[J]. Plant and Soil, 2000, 218 (1/2): 273—284.
- [7] Pallud C, Viallard V, Balandreau J, et al. Combined use of a specific probe and PCAT medium to study *Burkholderia* in soil[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 47 (1): 25—34.
- [8] Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5 (9): 719—729.
- [9] Chu H Y, Lin X G, Fujii T, et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39 (11): 2971—2976.
- [10] Fierer N, Jackson R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103 (3): 626—631.
- [11] Stopnisek N, Bodenhausen N, Frey B, et al. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16 (6): 1503—1512.
- [12] Tilman D, Dodd M, Silvertown J, et al. The park grass experiment: Insights from the most long-term ecological study[M]//Leigh R A, Johnston A E. Long-term experiments in agricultural and ecological science. Wallingford, UK: CABI, 1994: 287—303.
- [13] Samaddar S, Chatterjee P, Truu J, et al. Long-term phosphorus limitation changes the bacterial community structure and functioning in paddy soils[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 134: 111—115.
- [14] Silva U C, Medeiros J D, Leite L R, et al. Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1266. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01266>.
- [15] Zheng B X, Bi Q F, Hao X L, et al. *Massilia phosphatilytica* sp. nov., a phosphate solubilizing bacteria isolated from a long-term fertilized soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67 (8): 2514—2519.
- [16] Itoh H, Aita M, Nagayama A, et al. Evidence of environmental and vertical transmission of *Burkholderia* symbionts in the oriental chinch bug, *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80 (19): 5974—5983.
- [17] Teixeira L C R S, Peixoto R S, Cury J C, et al. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica[J]. The

- ISME Journal, 2010, 4 (8): 989—1001.
- [18] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112 (8): E911—E920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>.
- [19] Lu R K. Analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. [鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.]
- [20] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology[J]. Journal of Vegetation Science, 2003, 14 (6): 927—930.
- [21] Grace J B. Structural equation modeling natural systems[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [22] Schermelleh-Engel K, Moosbrugger H. Evaluating the fit of structural equation models: Tests of significance and descriptive goodness-of-fit measures[J]. Methods of Psychological Research Online, 2003, 2 (8): 23—74.
- [23] Dennis P G, Miller A J, Hirsch P R. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72 (3): 313—327.
- [24] Eisenhauer N, Lanoue A, Strecker T, et al. Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44641.
- [25] Ofek M, Hadar Y, Minz D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae) [J]. PLoS One, 2012, 7 (7): e40117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040117>.
- [26] Offre P, Pivato B, Mazurier S, et al. Microdiversity of *Burkholderiales* associated with mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of *Medicago truncatula*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65 (2): 180—192.
- [27] de Boer W, Folman L B, Summerbell R C, et al. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29 (4): 795—811.
- [28] Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P, et al. ‘*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*’ gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53 (1): 121—124.
- [29] Yang E D, Cui D X, Wang W Y. Research progress on the genus *Massilia*[J]. Microbiology China, 2019, 46 (6): 1537—1548. [杨恩东, 崔丹曦, 汪维云. 马赛菌属细菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46 (6): 1537—1548.]
- [30] Lou J, Gu H P, Wang H Z, et al. Complete genome sequence of *Massilia* sp. WG5, an efficient phenanthrene-degrading bacterium from soil[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 218: 49—50.
- [31] Krishnamoorthy R, Kim K, Subramanian P, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria isolated from salt-affected soil enhances the tolerance of maize to salinity in coastal reclamation soil[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 231: 233—239.
- [32] Barbosa E R M, Tomlinson K W, Carvalheiro L G, et al. Short-term effect of nutrient availability and rainfall distribution on biomass production and leaf nutrient content of savanna tree species[J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e92619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092619>.
- [33] Suding K N, Collins S L, Gough L, et al. Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (12): 4387—4392.
- [34] Cardinale M, Suarez C, Steffens D, et al. Effect of different soil phosphate sources on the active bacterial microbiota is greater in the rhizosphere than in the endorhiza of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Microbial Ecology, 2019, 77 (3): 689—700.

(责任编辑: 卢萍)