

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2021.04.010

张燕辉, 胡天龙, 王慧, 等. 利用 $^{15}\text{N}_2$ 直接标记法研究水稻种植对稻田固氮量和固氮活性的影响. 土壤, 2021, 53(4): 739–745.

利用 $^{15}\text{N}_2$ 直接标记法研究水稻种植对稻田固氮量和固氮活性的影响^①

张燕辉^{1,2}, 胡天龙^{1,2}, 王慧^{1,2}, 靳海洋^{1,2}, 刘本娟^{1,2}, 刘红涛^{1,2}, 刘琦³, 林志斌^{1,2}, 蔺兴武^{1,2}, 谢祖彬^{1*}

(1 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; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 南京林业大学林学院, 南京 210008)

摘要: 稻田固氮对土壤维持肥力有着重要的作用, 但水稻种植与固氮菌及其活性之间的关系尚不清楚。本试验利用 $^{15}\text{N}_2$ 直接标记法测定了低位砂姜土发育的筒育水耕人为土在种水稻和不种水稻条件下的生物固氮量, 及其在土壤不同层次(0~1、1~5、5~15 cm) 和水稻中的分配, 并通过实时荧光定量 PCR 技术测定了土壤中固氮菌 *nifH* DNA 及 RNA 基因数量。结果表明: 种水稻处理显著提高了土壤各层固氮量, 尤其提高了 1~5 cm 和 5~15 cm 土层土壤固氮量对总固氮量的贡献; 种水稻处理的总固氮量是不种水稻处理的 10.3 倍; 水稻植株中生物固定的氮占总固氮量的 31.48%; 在 0~1 cm 土层, 种水稻处理显著提高了 *nifH* RNA 基因数量, 而对 *nifH* DNA 基因数量的增加不显著。可见, 水稻种植没有增加固氮菌的数量, 稻田固氮量的增加是因为水稻种植极大地促进了固氮菌 *nifH* 基因的表达, 提高了固氮菌的固氮活性。

关键词: 生物固氮; 固氮活性; 稻田; $^{15}\text{N}_2$ 直接标记法; *nifH* 反转录

中图分类号: S51; S-3 文献标志码: A

Effects of Rice Planting on Nitrogen Fixation Amount and Activity in Paddy Field Using $^{15}\text{N}_2$ Direct Labeling Method

ZHANG Yanhui^{1,2}, HU Tianlong^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, JIN Haiyang^{1,2}, LIU Benjuan^{1,2}, LIU Hongtao^{1,2}, LIU Qi³, LIN Zhibin^{1,2}, LIN Xinwu^{1,2}, XIE Zubin^{1*}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 College of forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210008, China)

Abstract: Paddy N_2 fixation plays an important role for soil fertility maintenance, however, the relationship between rice planting and activity of diazotrophs to fix N_2 remains elusive. In this paper the amount of biological nitrogen fixation (BNF) and its distribution in different soil layers (0–1, 1–5, 5–15 cm) and rice were measured by $^{15}\text{N}_2$ direct labeling method. The abundances of nitrogen fixing bacteria and active nitrogen fixing bacteria in soil were determined by real-time quantitative PCR (qPCR). The results showed that rice planting significantly increased nitrogen fixation amount in each soil layer, and also increased the contribution of 1–5 cm and 5–15 cm layers to total nitrogen fixation. Total nitrogen fixation amount in rice planting treatment was 10.3 times higher than CK. The fixed N_2 allocated to rice plants accounted for 31.48% of the total nitrogen fixation. In 0–1cm soil layer, rice planting significantly increased the number of *nifH* RNA gene, but did not significantly increase the number of *nifH* DNA gene. These results indicate that rice planting did not increase the number of nitrogen fixing bacteria. The increase of nitrogen fixation amount in rice field is because rice planting greatly promoted the expression of *nifH* gene of nitrogen fixing bacteria, thus improved nitrogen fixation activity of nitrogen fixing bacteria.

Key words: Biological nitrogen fixation; Nitrogen fixation activity; Paddy field; $^{15}\text{N}_2$ direct labeling method; *nifH* reverse transcription

①基金项目: 国家科技基础性工作专项(2015FY110700)和国家自然科学基金项目(31870500; 41501273)资助。

* 通讯作者(zbxie@issas.ac.cn)

作者简介: 张燕辉(1988—), 男, 湖南怀化人, 博士研究生, 主要从事稻田生物固氮研究。E-mail: yhzhang@issas.ac.cn

水稻是人类所需的三大主要粮食作物之一,据估计,水稻养活了全世界 50%、亚洲 85% 的人口^[1]。随着全世界人口不断增长,粮食产量也需要进一步提高。水稻产量的提升受到稻田土壤缺氮的限制,为补充农田中的氮素,大量的化学氮肥被施入,导致了高浪费和严重的环境污染^[2]。而固氮微生物自身固定的氮素能被植物有效利用,且不产生环境污染问题。自身固氮也是许多生态系统氮的主要输入途径,维持着全球植物的生产力^[3]。在 Haber-Bosch 发明工业合成氮肥以前,水稻田中的氮素来源主要是生物固氮,所以生物固定的氮被认为是谷物生产中潜在且有吸引力的替代氮源^[4]。

种植水稻甚至种植不同品种的水稻均会改变稻田土壤微生物生长环境,从而改变稻田微生物群落结构。固氮菌作为稻田中广泛存在的细菌,其群落结构及其固氮能力也会受到种植水稻的影响^[5-6]。如 Yoshida 和 Ancajas^[7]通过乙炔还原法研究发现,无论是在雨季还是旱季,无论淹水还是干旱稻田,整个生长季种水稻处理比不种水稻处理生物固氮量均高出 2 倍左右。Bei 等^[8]通过 ¹⁵N₂ 直接标记法研究发现,培养 70 d 种水稻处理 ¹⁵N 固定量均高于不种水稻处理。不同水稻品种也会影响稻田生物固氮,研究发现杂交稻品种(HY)比自交稻品种(W23)对稻田生物固氮促进作用更大^[9-10]。Ito 等^[11]用两种水稻品种进行水培,发现其固氮活性相差近 1 倍。可见,水稻种植与否及其品种对稻田固氮量有很大影响,因此在估算稻田固氮潜力时,必须要考虑水稻种植情况及其品种。而在 1 年时间内,撂荒和水稻生长季稻田土壤对生物固氮量的贡献分别是多少,目前还不清楚。

固氮量由活跃固氮微生物的数量以及固氮活性决定。编码固氮酶铁蛋白亚基的 *nifH* 基因通常被用来研究固氮微生物和评估固氮潜力^[12]。前期研究大多数基于 *nifH* DNA 基因进行分析,这些研究提供了固氮微生物潜在固氮活性的很多有价值的信息^[13-15]。但是研究发现,*nifH* 基因拷贝数与固氮活性并没有显著的相关性^[16-17]。固氮菌基因拷贝数仅能代表土壤中固氮菌的数量,不能直接说明其参与了固氮过程。而从土壤中直接提取 RNA,再反转录成 cDNA,然后对 cDNA 的 *nifH* 基因进行定量扩增,得出 *nifH* 转录拷贝数被认为更能代表固氮微生物活性^[15,18]。

研究稻田生物固氮,首先要对稻田固氮量进行测定。目前在水稻土壤中测定固氮量常用的方法有:乙

炔还原法^[19-20]、¹⁵N₂ 自然丰度法^[21]、¹⁵N₂ 同位素稀释法^[20]、氮素平衡法^[22]等非直接的测定方法,这些方法由于缺少准确的转换因子,或者要考虑氮源、氮损失等各种因素而存在很大的不确定性。测定固氮量最直接的方法是 ¹⁵N₂ 气体标记法,该方法不需要转换系数,不受外来氮源干扰,从而能够准确测定固氮量^[23-24]。该方法难点在于要长时间保持系统密闭性,且为了反映田间水稻生长的真实环境,需要实现标记箱内 CO₂ 浓度、O₂ 浓度、温度和光照条件等环境与大田环境相似;另外,高纯度高丰度 ¹⁵N₂ 气体价格十分昂贵,这些都限制了该方法在自然环境条件下的广泛应用^[25]。

本试验利用 ¹⁵N₂ 标记密闭生长箱系统^[8],在田间环境下,自插秧后进行 ¹⁵N₂ 直接标记整个生长季,测定下位砂姜土在种水稻和不种水稻情况下的生物固氮量,并对土壤 DNA 和 cDNA 的 *nifH* 基因进行实时荧光定量 PCR 扩增,测定固氮菌数量以及固氮酶基因表达量,从而计算其固氮活性。

1 材料与方 法

1.1 试验地描述和土壤理化性质

试验地位于江苏省扬州市小纪镇马凌村良种场(32°35'5" N, 119°42'0" E),该地区气候条件为典型亚热带季风气候,年降水量 1 000 mm 左右,年蒸发量大于 1 100 mm,年均气温 15 °C,年日照时间大于 2 000 h,年无霜 220 d。试验地种植模式为稻麦轮作,土壤类型为下位砂姜土发育的筒育水耕人为土^[26]。2017 年水稻季后,随机取试验地耕作层(0 ~ 15 cm)土壤,风干过 4 mm 筛备用。土壤 pH 为 6.1,砂粒质量占比 7.4%,粉粒质量占比 78.0%,黏粒质量占比 14.6%。更多土壤理化性质详见 Wang 等^[27]。

1.2 田间 ¹⁵N₂ 标记盆栽试验

田间 ¹⁵N₂ 标记盆栽试验时间为 2018 年 7 月 23 日至 2018 年 10 月 23 日。试验设种水稻和不种水稻、标记和不标记 4 个处理,每个处理 3 次重复。标记的 3 个重复分别放在 3 个标记箱中,即每个箱中只放置 1 个重复。不标记处理的 3 个重复放在箱外进行(作为自然丰度的对照处理,用于计算标记箱内样品和空气的 ¹⁵N 原子百分超)。3 个 ¹⁵N₂ 标记密闭生长箱(长 × 宽 × 高 = 1 160 mm × 680 mm × 890 mm)平行放置于田间,3 个箱体间隔为 1 m。用 40 L ¹⁵N₂ (99 atom% ¹⁵N) 置换箱内 40 L 空气,使得 3 个箱子内的 ¹⁵N 丰度为 9% 左右。¹⁵N₂ 根据 Ohyama 和 Kumazawa^[28]描述的方法进行制备和纯化。箱内温度设定为外界温度正

负 1°C , 箱内 CO_2 浓度设定为 $400 \mu\text{L} \pm 20 \mu\text{L}$ 。箱内由于植物光合作用产生的多余氧气通过除氧剂去除, 使得箱内的 O_2 浓度维持在 21% 左右。更多关于 $^{15}\text{N}_2$ 标记密闭生长箱的设计及其控制系统的信息详见 Bei 等^[8]。

试验时, 将土壤样品风干过筛 (<5 mm) 后称取 1.3 kg 装入盆 (长 × 宽 × 高 = 9 cm × 9 cm × 20 cm) 中 15 cm 高; 在盆中浇水至高于土面 1 ~ 2 cm, 浸泡 1 周后, 每盆施 116.37 mg 的 KH_2PO_4 和 32.55 mg KCl (相当于 P_2O_5 75 kg/hm² 和 K_2O 75 kg/hm²), 不施氮肥; 然后从大田移栽两个月大的水稻苗 (*Oryza sativa* L., 品种为武运粳 23) 至盆中, 每盆种 1 棵。所有盆栽均放置在户外 1 周, 确保秧苗存活后, 再放入标记箱内。整个生长季保持盆内 1 cm 高水层 (烤田期除外)。每周采集 1 次箱内气体, 用于观测箱内 $^{15}\text{N}_2$ 变化情况。

1.3 样品采集及 $^{15}\text{N}_2$ 丰度测定

经过 90 d 的 $^{15}\text{N}_2$ 持续标记后, 打开标记箱, 采集土壤和植株样品。水稻植株分两部分采集: 地上部 (茎叶穗) 和地下部 (根)。每个盆栽的土样分三层 (0 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 15 cm) 采集。一部分土样作为鲜土放入液氮后, 带回实验室保存在 -80°C 冰箱用作后续分子实验; 另一部分土样风干、磨细、过筛 (Retsch MM 400 mixer mill, Retsch, Haan, Germany), 用元素分析仪和同位素质谱联用仪测定其全氮含量和 ^{15}N 丰度 (Thermo Finnigan Flash EA-Delta V IRMS 联用仪)。

1.4 土壤 DNA 及 RNA 提取

使用 RNeasy[®] PowerSoil[®] Total RNA Kit (Qiagen) 试剂盒提取土壤总 RNA, 用 RNeasy[®] MinElute[®] Cleanup (Qiagen) 对总 RNA 进一步纯化, 用 Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) 试剂盒对提取的总 RNA 进行 DNA 进一步去除和反转录, 反转录的 cDNA 保存至 -80°C 冰箱备用。使用 RNeasy[®] PowerSoil[®] DNA Elution Kit (Qiagen) 试剂盒提取土壤总 DNA, 提取好的土壤 DNA 样品用微量紫外可见分光光度计 (NanoVue Plus, USA) 测定纯度及浓度, 然后保存于 -20°C 备用。

1.5 实时荧光定量 PCR (qPCR)

对样品的 DNA 及 cDNA 的 *nifH* 基因用引物 polF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) / polR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) 进行定量 PCR 扩增, 程序为: 95°C , 10 min; 35 循环 (95°C , 30 s; 58°C , 35 s; 72°C , 45 s); 72°C , 10 min。

1.6 数据处理与分析

1) 计算公式。从空气中固定的氮素占整个水稻-土壤系统全部氮素的比例 (%N fixation) 可以通过下式计算:

$$\%N \text{ fixation} = \frac{\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{excess samples}}}{\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N}_{\text{excess gas}}} \times 100$$

式中: atom% $^{15}\text{N}_{\text{excess samples}}$ 为标记箱内样品的 ^{15}N 原子百分超; atom% $^{15}\text{N}_{\text{excess gas}}$ 为标记箱内空气中的 ^{15}N 原子百分超。atom% $^{15}\text{N}_{\text{excess samples}} = ^{15}\text{N}_2$ 标记箱内样品的 ^{15}N 丰度 (^{15}N atom%) - 箱外对照样品的 ^{15}N 丰度 (^{15}N atom%)。atom% $^{15}\text{N}_{\text{excess gas}} = ^{15}\text{N}_2$ 标记箱内空气的 ^{15}N 丰度 - 箱外空气的 ^{15}N 丰度。

整个水稻-土壤系统的固氮量 = 样品总氮 (N mg/盆) × %N fixation

固氮活性 = 固氮量 (mg) / *nifH* RNA 基因拷贝数

2) 数据统计分析。文中所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件作单因素方差分析, 用 Turkey 法进行多重比较。

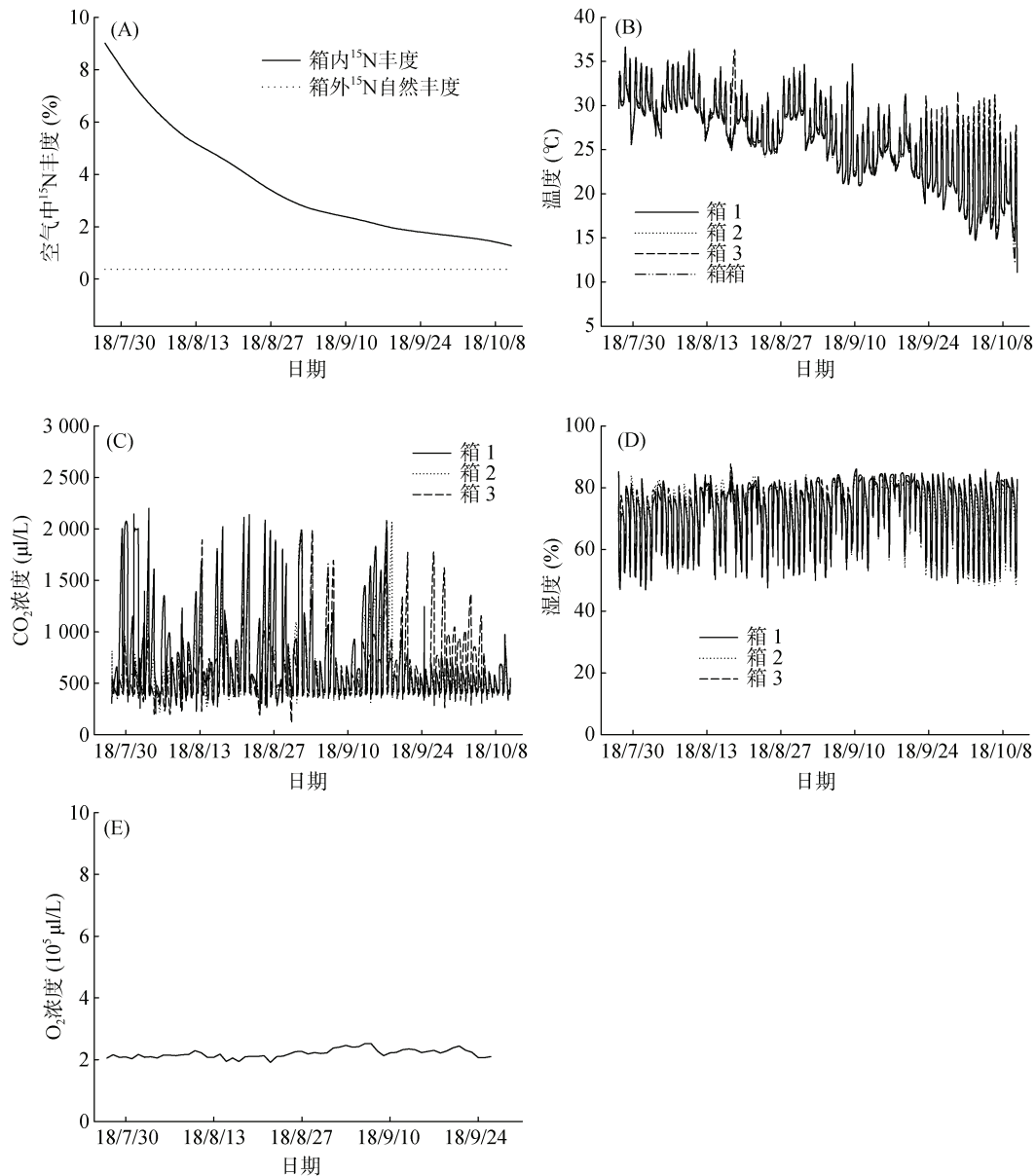
2 结果

2.1 $^{15}\text{N}_2$ 标记箱田间运行情况

3 个 $^{15}\text{N}_2$ 标记密闭生长箱平行置于水稻田 (间隔 1 m), 标记时间从 2018 年 7 月 23 日至 2018 年 10 月 23 日, 自水稻生长的苗期至成熟期。标记箱内气体中 $^{15}\text{N}_2$ 丰度最高为 9.37%, 最低为 0.80%, 平均为 3.73% (图 1A)。自动控制密闭标记生长箱内的温度基本与田间温度保持一致 (图 1B)。箱内 CO_2 浓度在经过一晚水稻呼吸作用累积后, 早上最高达约 2 000 μL , 在经过大约 1 h 的光合作用消耗后, 浓度逐渐降至设定的 $400 \mu\text{L} \pm 20 \mu\text{L}$ 范围, 随后白天一直维持在这个范围 (图 1C)。箱内相对湿度在 50% ~ 80% (图 1D)。箱内光合作用产生的 O_2 通过定期测量和利用除氧剂 (铁粉) 消除, 浓度始终维持在 $2.1 \times 10^5 \mu\text{L}$ (图 1E)。

2.2 稻田土壤中含有的固氮量

经过 90 d $^{15}\text{N}_2$ 标记试验, 种水稻处理 0 ~ 1 cm 土层土壤的总氮量显著高于不种水稻处理; 而其他土层 (1 ~ 5、5 ~ 15 cm) 以及整个盆中土壤, 种水稻和不种水稻两处理的总氮量没有显著差异 (表 1)。在所有土层 (0 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 15 cm) 中, 种水稻处理的 ^{15}N 原子百分超和固氮量均显著高于不种水稻处理。种水稻处理的固氮量在土壤为 4.229 mg/盆, 占水稻-土壤系统总固氮量的 68.52%; 0 ~ 1、1 ~ 5、5 ~ 15 cm 各土层的固氮量分别占土壤中总固氮量的 39.91%、



(A: 标记箱内外 $^{15}\text{N}_2$ 丰度的动态变化, B: 标记箱及箱外田间空气温度小时变化值, C: 白天标记箱内 CO_2 浓度小时变化值, D: 白天标记箱内相对湿度小时变化值, E: 标记箱内 O_2 浓度变化值)

图 1 整个水稻生长季田间 ^{15}N 标记生长箱运行情况

Fig. 1 Operation of $^{15}\text{N}_2$ -labelling growth chambers in the whole rice growing season

表 1 $^{15}\text{N}_2$ 标记试验 90 d 后, 种水稻和不种水稻处理不同土层的总氮量、 ^{15}N 原子百分超和固氮量

Table 1 Total N, ^{15}N atom % excess N fixation at different soil depths in pots with or without rice in $^{15}\text{N}_2$ -labelled chambers after labelled for 90 days

处理	土层(cm)	总氮量 (g/盆)	^{15}N 原子百分超(%)	固氮量(mg/盆)
种水稻	0~1	0.170 ± 0.008 bA	0.032 ± 0.010 aA	1.688 ± 0.317 aA
	1~5	0.269 ± 0.052 bA	0.013 ± 0.001 bA	0.696 ± 0.070 bA
	5~15	1.508 ± 0.052 aA	0.003 ± 0.001 cA	1.845 ± 0.120 aA
	合计	1.947 ± 0.049 A		4.229 ± 0.325 A
不种水稻	0~1	0.081 ± 0.010 bB	0.012 ± 0.000 aB	0.322 ± 0.076 aB
	1~5	0.190 ± 0.021 bA	0.002 ± 0.001 bB	0.034 ± 0.001 bB
	5~15	1.634 ± 0.071 aA	0.001 ± 0.000 bB	0.243 ± 0.020 aB
	合计	1.905 ± 0.063 A		0.599 ± 0.069 B

注: 表中数据为平均值±标准误差($n=3$); 同列不同大写字母表示同一土层种水稻和不种水稻间差异达显著水平($P<0.05$); 同列不同小写字母表示同种处理不同土壤层之间差异达显著水平($P<0.05$)。

16.46% 和占 43.63%。不种水稻处理的总固氮量为 0.599 mg/盆，0~1、1~5、5~15 cm 各土层的固氮量分别占土壤总固氮量的 53.76%、5.68% 和 40.57%。

2.3 水稻中含有的固氮量

水稻根部的总氮量显著低于地上部，而水稻根部的 ¹⁵N 原子百分超显著高于地上部(表 2)。水稻植株固氮量在根部和地上部则没有显著差异。生物固氮量在整个水稻植株中的分配为 1.943 mg/盆，占种水稻处理水稻-土壤系统总固氮量的 31.48%，其中，水稻植株中根占 56.18%，地上部分占 43.82%。

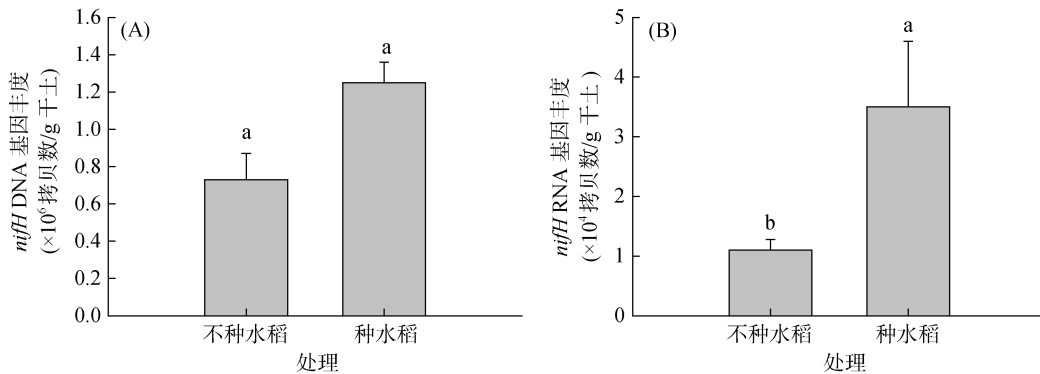
2.4 稻田土壤中 DNA 及 cDNA 的 *nifH* 基因丰度及固氮活性

由图 2A 可知，种水稻处理的 *nifH* 基因丰度为 1.25×10^6 拷贝数/g 干土，高于不种水稻处理的 0.73×10^6 拷贝数/g 干土，但二者差异未达显著水平。而种水稻处理的 *nifH* 反转录基因丰度为 3.53×10^4 拷贝数/g 干土，显著高于不种水稻处理的 1.14×10^4 拷贝数/g 干土(图 2B)。种水稻显著提高了固氮微生物平均固氮活性(图 3)，其固氮活性是不种水稻处理的 2.74 倍。

表 2 ¹⁵N₂ 标记试验 90 d 后，种水稻处理水稻根和地上部的生物量、总氮量、¹⁵N 原子百分超和固氮量
Table 2 Dry weight, total N, ¹⁵N atom % excess N fixation in rice roots, rice above ground parts and whole plant in ¹⁵N₂-labelled chambers after labelled for 90 days

处理	植物样品	干重(g/盆)	总氮量(g/盆)	¹⁵ N 原子百分超	固氮量(mg/盆)
种水稻	根	4.40 ± 0.93 b	0.037 ± 0.006 b	0.096 ± 0.005 a	1.091 ± 0.304 a
	地上部	11.31 ± 0.79 a	0.104 ± 0.003 a	0.032 ± 0.003 b	0.851 ± 0.053 a
	整株	15.70 ± 0.17	0.140 ± 0.003		1.942 ± 0.229

注：表中数据为平均值±标准误差(n=3)，同列不同小写字母表示水稻不同部位间差异达到显著水平(P<0.05)。



(图中误差线表示标准误差(n=3)，条形柱上不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)；下同)

图 2 种水稻和不种水稻盆栽中 0~1cm 土壤中 *nifH* DNA 基因(A)和 *nifH* RNA 基因(B)拷贝数
Fig. 2 Copy numbers of *nifH* DNA gene(A) and *nifH* RNA gene (B) in 0-1 cm soil layers in pots with or without rice

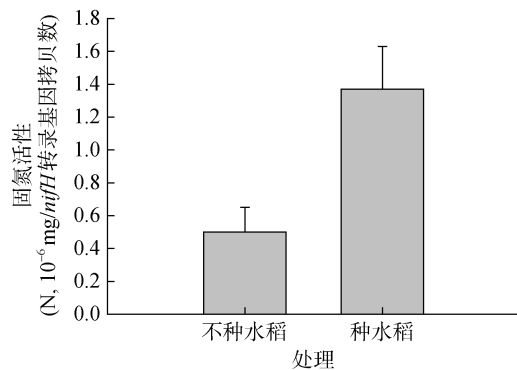


图 3 种水稻和不种水稻盆栽中 0~1cm 土壤中固氮菌固氮活性

Fig. 3 Average nitrogen fixation activities of nitrogen-fixing bacteria in 0-1 cm soil layers in pots with or without rice

3 讨论

与不种水稻处理相比，种水稻处理在所有土层(0~1、1~5、5~15 cm)均显著增加了固氮量(表 1)，种水稻处理的总固氮量是不种水稻处理固氮量的 10.3 倍。生物固氮是一个极耗能的过程，因而也是一个需要碳源较多的过程^[29-30]。水稻种植提高生物固氮量，一方面可能是由于水稻根系分泌的大量有机物质为生物固氮过程提供了能量来源^[18,31-32]。虽然固氮量因固氮微生物及植物种类的变化而差异较大，但植物通过为细菌生长和固氮菌提供碳源而发挥决定性作用^[4]。植物固定的碳有很大一部分被分配到地下部，平均 40% 的光合产物被转移到地下生物量中，而其

中通常又有 12% 被转化为根分泌物及其衍生代谢物和微生物生物量碳^[33]。另一方面,水稻根系吸收了部分氮素,从而为固氮微生物创造了一定的低氮环境,减少氨抑制作用^[34-35]。而且水稻能把大气中的 N₂ 转运到根部再扩散到根际,从而被根际固氮菌利用^[36]。

不论是种水稻处理,还是不种水稻处理,0~1 cm 土层的 ¹⁵N 原子百分超均显著高于 1~5 cm 和 5~15 cm,说明距离土壤表面越近,固氮作用越明显。种水稻处理在 0~1 cm 土层的固氮量显著高于 1~5 cm 土层,而与 5~15 cm 土层没有显著差异,说明 0~1 cm 土层虽然固氮作用强烈,但是土壤体积有限,而在 5~15 cm 土层,虽然固氮作用不如 0~1 cm 层强烈,但是体量庞大,最终在总的固氮量上并不比 0~1 cm 土层少。另外,种水稻处理的 1~5 cm 土层和 5~15 cm 土层固氮量对土壤-水稻系统总固氮量的贡献高于不种植水稻处理,尤其是 1~5 cm 土层。种水稻处理 1~5 cm 土层的贡献为 16.46%,而不种水稻处理仅为 5.68%。这可能是因为在相对较深层土壤中,异养微生物占绝大多数,而异养微生物不能自己产生能源,水稻分泌的能源物质则正好补充了这一点,说明种水稻对异养固氮微生物的促进作用在深层更加明显^[8]。

种水稻显著提高了 *nifH* RNA 基因数量而对 *nifH* 基因数量的增加不显著,说明种水稻没有显著增加固氮微生物的数量,而是促进了固氮微生物固氮基因 *nifH* 的表达,显著提高了固氮微生物的活性(图 2、图 3)。这可能与水稻种植对土壤环境的改变及水稻根系分泌物有关。植物通过根系生长影响土壤空间结构^[37],并通过根际分泌物为微生物生长提供基质^[38]。植物根系分泌物由糖、有机酸和黏液等低分子化合物组成,是土壤微生物的活性碳源^[39]。土壤碳源有效性及其组成是影响土壤微生物活性的关键,充足的土壤有效碳源,为生物固氮过程提供了能源,促进了固氮微生物固氮基因 *nifH* 的表达^[40]。因此,水稻种植虽然没有增加固氮菌的数量,但是显著增加了固氮菌固氮基因 *nifH* 的表达量,从而显著提高了稻田生物固氮量。

4 结论

本研究利用 ¹⁵N₂ 直接标记技术测定了稻田固氮量,利用实时荧光定量 PCR 技术测定了固氮菌 *nifH* 基因及其反转录基因拷贝数,结果表明,种水稻显著增加了稻田各层土壤(0~1、1~5、5~15 cm)的固氮

量。种水稻和不种水稻的固氮作用都是越靠近土壤表层(0~1 cm)越强烈,但是种水稻对较深土壤(1~5 cm 和 5~15 cm)固氮作用的促进作用更加明显。水稻种植没有增加固氮菌的数量,稻田固氮量的增加是因为水稻种植极大地促进了固氮菌 *nifH* 基因的表达,提高了固氮菌的固氮活性。

致谢: 本研究的大田试验得到了江都 FACE 实验站的朱国新和实验室王志玲的帮助,得到了南京土壤研究所刘钢高级工程师的技术指导,在此表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Sahoo R K, Ansari M W, Dangar T K, et al. Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement[J]. *Protoplasma*, 2014, 251(3): 511-523.
- [2] Xie G H, Cai M Y, Tao G C, et al. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2003, 37(1): 29-38.
- [3] Dynarski K A, Houlton B Z. Nutrient limitation of terrestrial free-living nitrogen fixation[J]. *The New Phytologist*, 2018, 217(3): 1050-1061.
- [4] Rosenblueth M, Ormeño-Orrillo E, López-López A, et al. Nitrogen fixation in cereals[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1794.
- [5] Ladha J K, Reddy P M. Extension of nitrogen fixation to rice—Necessity and possibilities[J]. *GeoJournal*, 1995, 35(3): 363-372.
- [6] Yoneyama T, Terakado-Tonooka J, Minamisawa K. Exploration of bacterial N₂-fixation systems in association with soil-grown sugarcane, sweet potato, and paddy rice: A review and synthesis[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2017, 63(6): 578-590.
- [7] Yoshida T, Ancajas R R. Nitrogen-fixing activity in upland and flooded rice fields[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1973, 37(1): 42-46.
- [8] Bei Q C, Liu G, Tang H Y, et al. Heterotrophic and phototrophic ¹⁵N₂ fixation and distribution of fixed ¹⁵N in a flooded rice-soil system[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 59: 25-31.
- [9] Ladha J K, Reddy P M. Nitrogen fixation in rice systems: State of knowledge and future prospects[J]. *Plant and Soil*, 2003, 252(1): 151-167.
- [10] Ma J, Bei Q C, Wang X J, et al. Paddy system with a hybrid rice enhances cyanobacteria *Nostoc* and increases N₂ fixation[J]. *Pedosphere*, 2019, 29(3): 374-387.
- [11] Ito O, Cabrera D, Watanabe I. Fixation of dinitrogen-15 associated with rice plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(3): 554-558.

- [12] Raymond J, Siefert J L, Staples C R, et al. The natural history of nitrogen fixation[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(3): 541–554.
- [13] Hsu S F, Buckley D H. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(1): 124–136.
- [14] Nelson D R, Mele P M. The impact of crop residue amendments and lime on microbial community structure and nitrogen-fixing bacteria in the wheat rhizosphere[J]. *Soil Research*, 2006, 44(4): 319.
- [15] Tang Y F, Zhang M M, Chen A L, et al. Impact of fertilization regimes on diazotroph community compositions and N₂-fixation activity in paddy soil[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017, 247: 1–8.
- [16] Knelman J E, Legg T M, O'Neill S P, et al. Bacterial community structure and function change in association with colonizer plants during early primary succession in a glacier forefield[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 46: 172–180.
- [17] Patra A K, Abbadie L, Clays-Josserand A, et al. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(6): 1005–1016.
- [18] Bürgmann H, Meier S, Bunge M, et al. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(11): 1711–1724.
- [19] Bergersen F J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay[J]. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1970, 23(4): 1015.
- [20] Mariotti A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements[J]. *Nature*, 1983, 303(5919): 685–687.
- [21] Bremer E, van Kessel C. Appraisal of the nitrogen-15 natural-abundance method for quantifying dinitrogen fixation[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1990, 54(2): 404–411.
- [22] Giller K E, Day J M, Dart P J, et al. A method for measuring the transfer of fixed nitrogen from free-living bacteria to higher plants using ¹⁵N₂[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1984, 2(6): 307–316.
- [23] Burrell R H, Miller C E. Application of ¹⁵N to the study of biological nitrogen fixation[J]. *Science*, 1941, 93(2405): 114–115.
- [24] 朱兆良, 陈德立, 张绍林, 等. 稻田非共生固氮对当季水稻吸收氮的贡献[J]. *土壤*, 1986, 18(5): 225–229.
- [25] Unkovich M J, Peoples M B, David F H, et al. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems[J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2008, 54: 333–340.
- [26] 中国科学院南京土壤研究所土壤系统分类. 中国土壤系统分类检索[M]. 3版. 合肥: 中国科学技术大学, 2001.
- [27] Wang X J, Liu B J, Ma J, et al. Soil aluminum oxides determine biological nitrogen fixation and diazotrophic communities across major types of paddy soils in China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 131: 81–89.
- [28] Ohyama T, Kumazawa K. A simple method for the preparation, purification and storage of ¹⁵N₂ gas for biological nitrogen fixation studies[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1981, 27(2): 263–265.
- [29] Carnahan J E, Mortenson L E, Mower H F, et al. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1960, 44: 520–535.
- [30] Mortenson L E. Ferredoxin and atp, requirements for nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*[J]. *PNAS*, 1964, 52(2): 272–279.
- [31] Knauth S, Hurek T, Brar D, et al. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of nifH gene pools in roots of rice[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(11): 1725–1733.
- [32] Stewart W D. Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 1969, 172(1029): 367–388.
- [33] Jones D L, Nguyen C, Finlay R D. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface[J]. *Plant and Soil*, 2009, 321(1/2): 5–33.
- [34] Reed S C, Cleveland C C, Townsend A R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2011, 42(1): 489–512.
- [35] York L M, Carminati A, Mooney S J, et al. The holistic rhizosphere: Integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(12): 3629–3643.
- [36] Yoshida T, Broadbent F E. Movement of atmospheric nitrogen in rice plants[J]. *Soil Science*, 1975, 120(4): 288–291.
- [37] Angers D A, Caron J. Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks[J]. *Biogeochemistry*, 1998, 42(1/2): 55–72.
- [38] Lynch J M, Whipps J M. Substrate flow in the rhizosphere[J]. *Plant and Soil*, 1990, 129(1): 1–10.
- [39] Bais H P, Weir T L, Perry L G, et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57(1): 233–266.
- [40] Smercina D N, Evans S E, Friesen M L, et al. Erratum for smercina et al., “to fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere”[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(22): e02546-18.