



不同改良处理对梅州离子型稀土矿废弃地大豆根瘤菌多样性的影响

刘明骞^{1,2}, 张新鑫³, 马佳慧³, 李其斌³, 陈丽君⁴, 周 玮^{2,3,5}, 马 玲^{2,3,5}, 陈晓阳^{2,3,5}

(1. 华南农业大学 华南农业博物馆筹建办公室, 广东 广州 501642; 2. 广东省木本饲料工程技术研究中心, 广东 广州 501642; 3. 华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 501642; 4. 华南农业大学 试验中心(农事训练中心), 广东 广州 501642; 5. 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 501642)

摘 要:为评价梅州离子型稀土矿废弃地不同土壤改良措施对大豆根瘤菌多样性的影响,通过 *niH*-PCR-DGGE 技术对不同土壤改良处理条件下大豆根瘤菌群落的多样性进行表征。结果表明:7 种不同土壤改良处理的 DGGE 图谱条带数目不等,位置各异,说明梅州离子型稀土矿废弃地大豆的根瘤菌群落结构受改良措施的影响较大,具有较强的可塑性。其中 T4 处理(有机肥+生物炭+钝化剂)的条带数最多,多样性指数最高,说明该处理对增加大豆根瘤菌的多样性效果最好,可作为以后土壤改良的参考依据。聚类分析结果显示:7 个处理可分为 4 个类群,CK 单独为一个类群,T1(有机肥)、T2(有机肥+生物炭)为一个类群,T4(有机肥+生物炭+钝化剂)和 T5(有机肥+菌剂+蚯蚓)为一个类群,T3(有机肥+钝化剂)和 T6(有机肥+菌剂+蚯蚓+生物炭+钝化剂)为一个类群。生物炭与钝化剂组合处理、菌剂与蚯蚓的组合处理对增加大豆根瘤内根瘤菌的多样性效果较显著。通过序列比对和系统发育树可以看出,在梅州黄畲地区稀土采矿迹地,大豆主要与慢生根瘤菌属菌株共生结瘤,也可与中华根瘤菌属菌株共生。大豆根瘤内根瘤菌的多样性与土壤镉含量之间为显著正相关关系,与土壤有机质、氮、磷等营养指标之间为负相关关系,说明根瘤菌可能在提高大豆耐镉方面具有重要作用。

关键词:大豆;离子型稀土矿;根瘤菌;DGGE;多样性

The Effect of Different Restorative Treatments on the Diversity of Soybean Rhizobia in the Abandoned Land of Ionic Rare Earth Mine

LIU Ming-qian^{1,2}, ZHANG Xin-xin³, MA Jia-hui³, LI Qi-bin³, CHEN Li-jun⁴, ZHOU Wei^{2,3,5}, MA Ling^{2,3,5}, CHEN Xiao-yang^{2,3,5}

(1. Preparation Office of South China Agricultural Museum, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Province Research Center of Woody Forage Engineering Technology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 4. Center for Teaching & Research Base, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 5. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to evaluate the effect of different improvement measures on the diversity of rhizobium of soybean (*Glycine max*) in the abandoned land of ionic rare earth mine, *niH*-PCR-DGGE was used to manifestate the diversity of Rhizobia. The results of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprint showed that there were differences in the number, the positions and the brightness of bands depended on different restorative treatments, which showed that different soil amendments had a significant effect on the community structure of Rhizobium. The number and diversity index of bands of T4 treatment (fertilizer + biochar + deactivator) were highest, it was best to improve the diversity of rhizobium of soybean. The results of cluster analysis showed that 7 treatments could be divided into four groups, CK was group 1, T1 and T2 were group 2, T4 and T5 were group 3, T3 and T6 were group 4. The combination of biochar and passivator, the combination of bacterial manure and earthworm had the more significant effect on increasing the diversity of rhizobia in root nodules of soybean. According to sequence comparison and phylogenetic tree, soybean is mainly lived in symbiosis with *Bradyrhizobium*, and also coexisted with *Sinorhizobium* in the abandoned land of ionic rare earth mine of Meizhou, Guangdong. There was significant positive correlation between the diversity of rhizobium and soil cadmium content, and negative correlation among the diversity of rhizobium and soil organic matter, nitrogen, phosphorus and other nutritional indicators, which suggesting that rhizobium may play an important role in improving the cadmium tolerance of soybean.

Keywords: Soybean (*Glycine max*); Ionic rare earth mine; Rhizobia; DGGE; Diversity

收稿日期:2018-10-11

基金项目:中央财政林业示范推广项目[(2015)GDTK-08];广东省林业科技创新项目(2017KJCX033);广东省科技计划(2015A020209139, 2015B020207002);广东省大学生创新训练项目(201710564034)。

第一作者简介:刘明骞(1987-),男,博士,实验师,主要从事植物遗传与应用研究。E-mail:liumq@scau.edu.cn。

通讯作者:陈晓阳(1958-),男,博士,教授,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:xychen@scau.edu.cn。

稀土是极其重要的战略资源。我国南方的稀土矿主要为中国特有的离子型稀土矿,其稀土元素大多以离子的形态赋存在土壤中,稀土品味相对较低,所以主要采用浸提工艺提取稀土,造成植被破坏、水土流失和矿区土壤极度贫瘠等严重问题,已成为当地可持续发展的制约因素,土壤修复研究迫在眉睫^[1-4]。因植物修复具有成本低、不破坏场地结构且无二次污染等优点,已成为矿区土壤修复的主要选择之一。但由于离子型稀土矿废弃地极度贫瘠,植物很难生存,成为早期生物生长和群落演替的主要限制因子^[2,5]。

豆科改良植物因与根瘤菌共生,可固定大气中的氮素,减少了对土壤中氮素的依赖,成为离子型稀土矿废弃地植物修复的优选植物。大豆是一种优良的高蛋白油料作物,其根瘤发达,固氮能力较强。种植大豆不仅有助于土壤改良,且大豆残体进入土壤中腐解后可有效增加土壤有机碳的含量,有助于改善离子型稀土矿废弃地土壤中碳、氮等含量极低的现状^[6-9]。研究离子型稀土矿废弃地不同土壤改良措施对大豆根瘤菌多样性的影响,有助于了解大豆根瘤菌与土壤改良措施之间的关系,提高大豆的固氮效率,减少改良成本,为日后土壤改良提供一定的理论基础。本研究以梅州市平远县黄畬地区稀土采矿迹地为试验地,通过 *nifH*-PCR-DGGE 技术研究土壤中氮、磷、镉等的含量对大豆根瘤菌多样性的影响,旨在为稀土矿区生态修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验大豆品种为华春9号。

1.2 主要仪器与试剂

PCR 反应扩增仪 (Bio-Rad); DK-8D 型电热恒温水槽 (太仓市科教器材厂); DYY-8 型稳压稳流电泳仪 (北京六一); YXJ-2 离心机 (BBI); H6-1 微型电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂); 凝胶成像系统 (上海山富); 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 仪 (Bio-Rad)。

Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs 和标准分子量 Marker DL2000 均购自宝生物 (TaKaRa) 公司; 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 无水乙醇、氯化汞、氯仿、异丙醇、异戊醇、二甲苯青、溴酚蓝、硫代硫酸钠、硼酸、甲醛、冰醋酸、无水 Na₂CO₃、AgNO₃ 等均为分析纯, 购自鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 试验设计

试验地点位于广东省梅州市平远县黄畬村稀土采矿迹地 (E115°49'57", N24°48'33") 的西北部, 属亚热带季风气候区。本研究所选稀土矿山, 20 世纪 90 年代期间进行过开采, 现已废弃超过 20 年, 土地裸露, 极为贫瘠。原土 pH4.82、全氮 0.022 g·kg⁻¹、碱解氮 27.363 mg·kg⁻¹、全磷 0.039 g·kg⁻¹、速效磷 0.434 mg·kg⁻¹、全钾 37.059 g·kg⁻¹、速效钾 52.813 mg·kg⁻¹、有机质 6.896 g·kg⁻¹。

试验设置 7 种处理方式, 分别为: CK (对照); T1 (有机肥); T2 (有机肥 + 生物炭); T3 (有机肥 + 钝化剂); T4 (有机肥 + 生物炭 + 钝化剂); T5 (有机肥 + 菌剂 + 蚯蚓); T6 (有机肥 + 菌剂 + 蚯蚓 + 生物炭 + 钝化剂)。各试验处理的生化试剂用量详见表 1。2017 年 6 月初, 于大豆初荚期采集根瘤, 每个小区随机选 6 个植株, 每株采集 1 个根瘤。

表 1 不同试验处理各处理剂用量

Table 1 The dosage of reagent in each restorative treatments

处理 Treatment	有机肥 Fertilizer/(kg·m ⁻²)	生物炭 Biochar/(kg·m ⁻²)	钝化剂 Deactivator/(kg·m ⁻²)	菌剂 Bacterial manure/(cfu·m ⁻²)	蚯蚓 Earthworm
CK	—	—	—	—	—
T1	2.5	—	—	—	—
T2	2.5	3	—	—	—
T3	2.5	—	0.2	—	—
T4	2.5	3	0.2	—	—
T5	2.5	—	—	10 ¹¹	30
T6	2.5	3	0.2	10 ¹¹	30

1.4 方法

1.4.1 根瘤菌处理 将采集到的根瘤菌迅速放入带变色硅胶的密封袋中。将根瘤清洗干净后,4℃下在生理盐水中浸泡至完全膨胀,用 95% 乙醇浸泡 30 s,再用 0.1% HgCl₂ 灭菌后,用无菌水冲洗 5 次,晾干备用。

1.4.2 目的基因片段扩增 采用基因组快速抽提试剂盒 (OMEGA HP Plant) 提取根瘤全基因组 DNA。用 0.8% ~ 1.0% 琼脂糖凝胶检验 DNA 质量,采用 *nifH* 基因的特异引物, POLF-GC (CGC-CCGCCGCGCCCCGCGCCGGCCCCGCCGCCCGCC-CCTGCGAYCCSAARGCBGACTC)/AQER (GACGATGTAGATYTCCTG)^[10] 进行扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应程序为:94℃ 4 min 预变性;94℃ 0.5 min,48℃ 1 min,72℃ 0.5 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。片段长度大小约为 360 bp。

1.4.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE 电泳) 取 400 ng PCR 产物样品,采用 D-Code 突变检测系统进行 DGGE 电泳。所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (丙稀酰胺:双丙稀酰胺=37.5:1),变性剂浓度为 35% ~ 65% (100% 的变性剂为 40% 甲酰胺、7 mol·L⁻¹ 尿素)。在 60 V 电压下,60℃ 恒温,1 × TAE 溶液中电泳 16 h。电泳完毕后,用超纯水冲洗胶,然后将胶块放进含 EB 的染液中,摇床上染色 30 min,UVI 成像系统拍照。

选取 DGGE 图谱的代表性条带,将代表性条带完整地切下回收,送华大基因公司测序。序列进行比对、处理后,在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)网站进行 Blast 比对以确定菌株的归属信息,利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,并采用 ITOL 网站(<https://itol.embl.de/>)对进化树美化。

1.5 数据分析

DGGE 图像采用 Quantity One 软件进行数字化识别和处理分析,用于计算多样性指数,利用相似性矩阵,通过 UPGMA(The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages)方法对不同改良措施进行聚类分析。代表性条带 DNA 序列经 DNAMAN 软件进行初步比对,然后利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

香农-维纳多样性指数(H) = $-\sum P_i(\ln P_i)$, 式中 $P_i = n_i/N$, n_i 为 DGGE 图谱中第 i 条带的峰密度, N 为全部条带峰密度的总和。

Simpson 多样性指数(D) = $1 - \sum P_i^2$ 。

Pielou 均匀度指数(EH) = $H/\ln S$, H 为多样性

指数, S 为各泳道的条带数目。

2 结果与分析

2.1 大豆 *nifH* 基因 PCR 扩增结果

采用 *nifH* 基因的特异引物 POLF-GC/AQER 对大豆根瘤全基因组 DNA 进行扩增,所得产物用 0.8% ~ 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 1)。结果显示,所扩增片段大小约为 360 bp,扩增产物质量较高,符合后续试验要求。

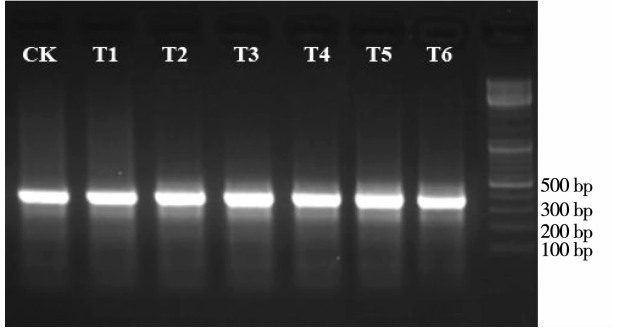


图 1 不同处理下大豆根瘤菌 *nifH* 基因片段电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of the *nifH* fragment of soybean rhizobium in different restorative treatments

2.2 DGGE 电泳图谱多样性分析

对扩增所得的 *nifH* 基因 PCR 产物进行 DGGE 电泳,得到其 DGGE 指纹图谱(图 2A),并通过 Quantity One 软件进行数字化处理,得到示意图(图 2B),指纹图谱中各序号标示条带同样用于后续序列测定分析。结果显示:稀土采矿迹地不同改良处理情况下,大豆根瘤菌 DGGE 图谱中条带数、条带位置和亮度都存在一定的差异,说明不同土壤改良方式对大豆根瘤菌群落结构的影响比较显著。其中部分条带为共有条带,说明这些条带所代表的根瘤菌比较稳定,不易受土壤条件的影响。

根据 DGGE 指纹图谱计算不同处理条件下大豆根瘤菌多样性指数(表 2)。T6 处理的条带数最少,为 13 条,香农-维纳多样性指数、Pielou 均匀度指数和 Simpson 多样性指数均最低;CK(对照)、T1 和 T2 处理的条带数均较少,且多样性指数和均匀度指数均相对较低;T4 处理的条带数最多,为 23 条,多样性指数和均匀度指数均最高。方差分析结果显示,不同改良处理间大豆根瘤菌多样性指数存在极显著差异($P < 0.01$)。结果表明,除 T6 处理外,其它不同改良处理均提高了大豆根瘤菌的多样性,尤其是有机肥、生物炭和钝化剂复合处理对提高根瘤菌多样性的效果最显著。其中 T4 处理(有机肥+生物炭+钝化剂)条件下,大豆根瘤菌的多样性的最高。

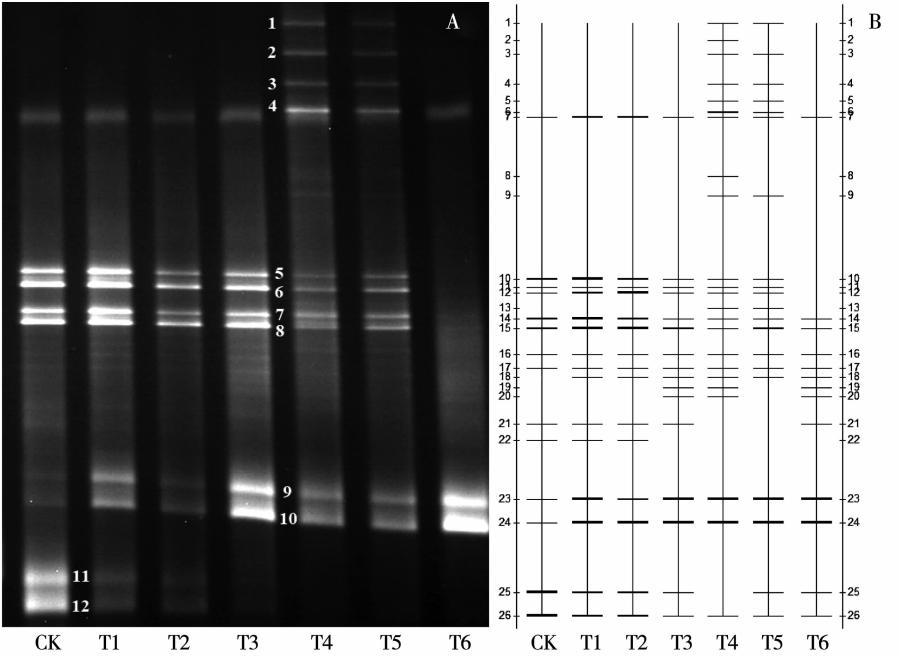


图 2 *nifH* 扩增片段 DGGE 电泳图谱 (A) 及其示意图 (B)

Fig. 2 The DGGE fingerprint and schematic map of the amplified fragments of *nifH*

表 2 不同改良处理下大豆根瘤菌多样性指数

Table 2 The diversity index of soybean rhizobium in different restorative treatments

处理 Treatment	条带数 Richness	香农 - 维纳多样性指数 Diversity index	Simpson 多样性指数 Simpson's diversity index	Pielou 均匀度指数 Pielou's evenness index
CK	14	2. 2563	0. 8848	0. 8550
T1	15	2. 3299	0. 8877	0. 8603
T2	15	2. 2819	0. 8714	0. 8426
T3	16	2. 3337	0. 8839	0. 8417
T4	23	2. 8580	0. 9291	0. 9115
T5	20	2. 6763	0. 9177	0. 8934
T6	13	2. 1165	0. 8335	0. 8252

2.3 DGGE 图谱聚类分析

对所得 DGGE 图谱的相似性分析得到不同改良处理条件下大豆根瘤菌群落相似性指数(表 3)。通过分析各处理间的相似性矩阵可以发现,不同改良处理条件下大豆根瘤菌多样性的相似性差异很大。各处理下大豆根瘤菌的多样性与空白对照的

相似性较低(<60%),尤其是 T4 处理(有机肥 + 生物炭 + 钝化剂)和 T6 处理(有机肥 + 生物炭 + 钝化剂 + 菌剂 + 蚯蚓)。说明施入外源土壤改良物质可能改变了土壤中根瘤菌的群落结构,进而影响了大豆根瘤菌的多样性。T5 和 T6 处理与其它处理相似性较小,可能与其添加了菌剂有关。

表 3 不同改良处理下大豆根瘤菌相似性指数

Table 3 The similarity index of soybean rhizobium in different restorative treatments

处理 Treatment	CK	T1	T2	T3	T4	T5	T6
CK	100						
T1	55. 8	100					
T2	60. 3	83. 0	100				
T3	45. 1	67. 7	56. 4	100			
T4	26. 9	54. 1	42. 0	72. 3	100		
T5	38. 4	61. 1	50. 5	82. 7	82. 9	100	
T6	18. 7	51. 7	37. 4	78. 5	71. 2	69. 0	100

对不同改良措施进行聚类分析(图3),在 Dice 系数为 0.75 处可将所有处理分成 4 类:对照处理 CK 单独为一类,其条带数和多样性指数较小,且与其它处理差异相对较大;T1、T2 处理分为一类,其条带数和多样性指数均相似,条带较少;T3 和 T6 处理距离较近聚为一类;T4 和 T5 处理的条带数和多样

性指数均较高,单独为一类。说明适当的有机肥、生物炭、钝化剂、菌剂和蚯蚓等处理方式均可以增加大豆根瘤菌的多样性,其中,生物炭与钝化剂组合处理、菌剂与蚯蚓的组合处理对增加大豆根瘤内根瘤菌的多样性效果最显著。

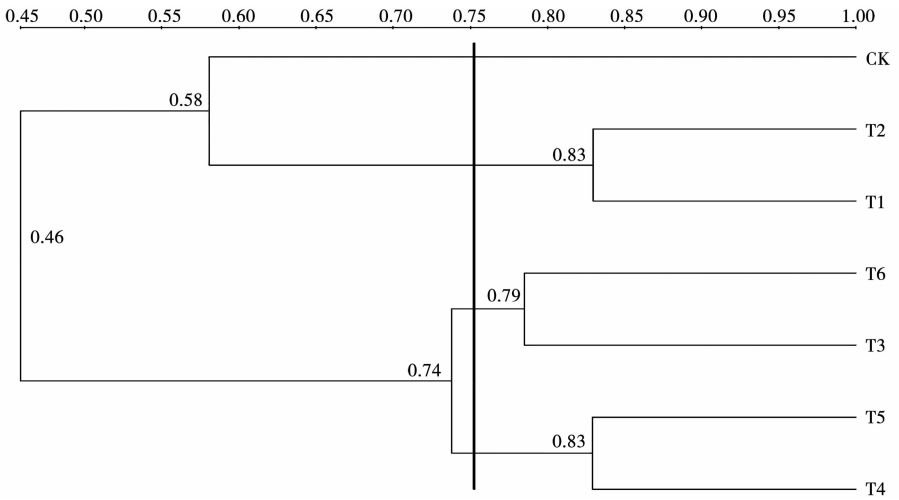


图3 不同改良处理大豆根瘤菌 DGGE 谱图的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis of DGGE fingerprint of soybean rhizobium in different restorative treatments

2.4 代表性条带测序分析

对稀土采矿迹地不同处理条件下大豆根瘤菌 DGGE 图谱中的 12 条代表性条带(图 2A)回收后测序,构建系统发生树如图 4 所示。通过序列比对与系统发育树可以看出,有 2 个代表性条带与中华根

瘤菌属(*Sinorhizobium*)的 *S. fredii* 聚为一类,其它 10 个条带均与慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的菌株聚为一类。说明在黄畬地区离子型稀土矿废弃地,大豆的根瘤中的根瘤菌主要为慢生根瘤菌属菌株,也可与中华根瘤菌属菌株共生。

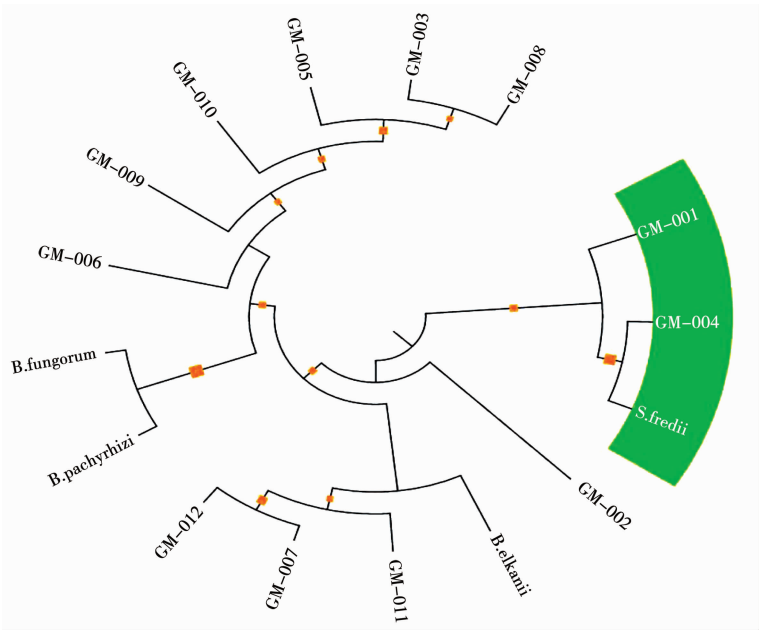


图4 不同改良处理下大豆根瘤菌 DGGE 图谱代表性条带系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on representative bands of DGGE fingerprint of soybean rhizobium

2.5 大豆根瘤菌多样性与环境因子的相关性分析

根据 DGGE 谱图条带所得不同处理情况下大豆根瘤菌的多样性与土壤理化性质进行相关性分析(表4)。大豆根瘤内根瘤菌的多样性与土壤中镉含量之间为显著正相关关系,相关系数高达 0.959,说明大豆根瘤内根瘤菌的多样性与土壤镉含量密切相关,根瘤菌可能对提高大豆的耐镉能力有重要作用^[11]。大豆根瘤内根瘤菌的多样性与 pH 呈正

表4 大豆根瘤菌多样性与土壤理化性质之间的相关性指数

Table 4 The correlation index between the diversity index and soil chemical properties						
项目 Items	pH	有机质 Organic matter	全氮 Total nitrogen	全磷 Total phosphorus	有效磷 Available phosphorus	全镉 All cadmium
相关系数 Conelation coefficient	0.381	-0.204	-0.826	-0.145	-0.097	0.959
显著性 P	0.619	0.796	0.174	0.855	0.903	0.041

3 讨论

离子型稀土矿废弃地极度贫瘠,碳、氮、磷等营养元素的含量极低,植物很难生存,植被自然恢复艰难。在进行适当土壤改良的基础上进行植物修复是一个恰当可行的方法。氮的缺乏是采矿地早期生物生长和群落演替的主要限制因子,而豆科植物可与根瘤菌行成植物-根瘤菌复合系统,可固定、利用大气中的氮,减少了对土壤中氮素的依赖,是切实、可行的土壤改良办法,但这方面的研究还比较少^[13-14]。

利用 PCR-DGGE 技术分析不同土壤改良处理下大豆根瘤内根瘤菌 *nifH* 基因片段的多样性分析结果显示,7 种不同的处理所得条带数目不等,位置各异。其中存在部分共有条带,表明这些条带所代表的根瘤菌种类和数量较稳定,基本不受施肥管理等措施的影响;大部分条带为特异性条带,受改良处理的影响条带变化明显,说明梅州黄畬稀土采矿迹地大豆的根瘤菌群落结构受改良措施的影响非常大,具有极强的可塑性。

作为生物体组成的最主要元素之一,碳元素的缺乏极大限制了生物的群落结构。施用生物炭不仅可以适当补充土壤中的碳含量,还可改变土壤磷含量、pH、土壤持水性、阳离子交换量等土壤理化性质,并可以促进土壤微生物的多样性,提升土壤的生态功能^[15-18]。钝化剂可以缓解土壤中重金属(本文试验用地主要超标重金属为镉)的危害,可以提高土壤中微生物的多样性。而所用的芽孢杆菌属能产生胞外多糖,有利于提高根瘤菌的多样性并促进根瘤菌结瘤^[19-20];蚯蚓不仅可以改善土壤结构,提高土壤速效养分,还对土壤酶活性和土壤中微生物的多样性和群落结构产生积极的影响^[21-22]。也

相关关系,说明土壤酸性越强,根瘤菌的多样性越小。在酸性较强的离子型稀土矿废弃地,要注重对耐酸性较强根瘤菌的筛选和应用。大豆根瘤内根瘤菌的多样性与土壤有机质、氮、磷等营养指标之间为负相关关系,对根瘤菌多样性的影响效果表现为全氮>有机质>全磷>有效磷。这可能与根瘤菌不仅可以与大豆共生固氮,还可以促进大豆对磷等营养元素的吸收有关^[12]。

可能是虽然 T4 处理(有机肥+生物炭+钝化剂)与 T5 处理(有机肥+菌剂+蚯蚓)所采用的改良措施不同,但二者根瘤菌多样性都较高,且出现了较多的差异性条带,聚类分析中,二者聚为一类的原因。同时采用有机肥、生物炭、钝化剂、菌剂、蚯蚓组合处理的复杂改良方法反而减少了大豆根瘤菌的多样性,这可能与植物和根瘤菌之间营养物质的分配有关,此组合处理后土壤营养元素较为丰富,可基本满足大豆的需求,弱化了大豆-根瘤菌共生体系的必需性,导致大豆根瘤内根瘤菌的多样性相对较小^[23-24]。研究结果说明利用豆科植物改良离子型稀土矿废弃地可选用一定的改良措施,促进植物根瘤菌的多样性,提高固氮效率,以最小的投入起到最理想的改良效果。

4 结论

综上所述,梅州离子型稀土矿废弃地不同土壤改良措施对大豆根瘤菌多样性有比较显著的影响,其中有机肥+生物炭+钝化剂改良处理情况下大豆根瘤菌的多样性指数最高,说明该处理对增加大豆根瘤菌的多样性效果最好,可作为以后土壤改良的参考依据。在梅州离子型稀土矿迹地,大豆主要与慢生根瘤菌属菌株共生结瘤,也可与中华根瘤菌属菌株共生。大豆根瘤内根瘤菌的多样性与土壤中镉含量之间显著正相关,与土壤有机质、氮、磷等营养指标之间为负相关,说明根瘤菌可能在提高大豆耐镉能力方面具有重要作用。

参考文献

[1] 马秀丽. 南方稀土矿治理区植物群落特征及其土壤效应[D]. 福州:福建师范大学, 2015: 1-10. (Ma X L. Plant community character and its soil effect in rare earth element mining area of Fu-

- jian province, South China[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2015: 1-10.)
- [2] 刘文深, 刘畅, 王志威, 等. 离子型稀土矿尾砂地植被恢复障碍因子研究[J]. 土壤学报, 2015, 52(4): 879-887. (Liu W S, Liu C, Wang Z W, et al. Limiting factors for restoration of dumping sites of ionic rare earth mine tailings[J]. Acta Pedologica Sinica, 2015, 52(4): 879-887.)
- [3] 黄华谷, 黄铁兰, 周兆帅, 等. 广东三个离子吸附型稀土矿的地球化学特征及开采现状[J]. 岩矿测试, 2014, 33(5): 737-746. (Huang H G, Huang T L, Zhou Z S, et al. Mining situation and geochemistry characteristics of three ion adsorption rare-earth deposit in Guangdong province[J]. Rock and Mineral Analysis, 2014, 33(5): 737-746.)
- [4] 池汝安, 田君. 风化壳淋积型稀土矿评述[J]. 中国稀土学报, 2007, 25(6): 641-650. (Chi R A, Tian J. Review of weathered crust rare earth ore[J]. Journal of the Chinese Rare Earth Society, 2007, 25(6): 641-650.)
- [5] 金姝兰, 黄益宗. 稀土元素对农田生态系统的影响研究进展[J]. 生态学报, 2013, 33(16): 4836-4845. (Jin S L, Huang Y Z. A review on rare earth elements in farmland ecosystem[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(16): 4836-4845.)
- [6] 连腾祥. 大豆光合碳在黑土中的转化过程及细菌群落特征[D]. 长春: 中国科学院研究生院(中国科学院东北地理与农业生态研究所), 2016: 53-66. (Lian T X. The turnover of photosynthetic carbon of soybean and relevant bacterial community characteristics in the Mollisols[D]. Changchun: Northeast Institute of geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, 2016: 53-66.)
- [7] 陈雪丽, 王玉峰, 李伟群, 等. 黑土区连作大豆根际微生物群落结构的动态变化[J]. 大豆科学, 2018, 37(5): 748-755. (Chen X L, Wang Y F, Li W Q, et al. Dynamic evolution of microbial community in the rhizosphere of continuous cropping of soybean in black soil [J]. Soybean Science, 2018, 37(5): 748-755.)
- [8] 郭慧娟. 大豆快生根瘤菌共生基因的遗传分化及快慢生根瘤菌对土壤微生物的影响比较[D]. 北京: 中国农业大学, 2014: 1-8. (Guo H J. Replicon-dependent differentiation of symbiosis-related genes in *Sinorhizobium* strains and the effect on soil microbial community of *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014: 1-8.)
- [9] 关大伟, 李力, 姜昕, 等. 长期施肥对黑土大豆根瘤菌群体结构和多样性的影响[J]. 生物多样性, 2015, 23(1): 68-78. (Guan D W, Li L, Jiang X, et al. Influence of long-term fertilization on the community structure and diversity of soybean rhizobia in black soil[J]. Biodiversity Science, 2015, 23(1): 68-78.)
- [10] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(1): 95-103.
- [11] 沈建秀. 接种根瘤菌后刺槐对镉胁迫的响应[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017: 16-30. (Shen J X. Response of *Robinia pseudoacacia* to cadmium stress after inoculation with rhizobium [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017: 16-30.)
- [12] Jin Y, Liu H, Luo D, et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways [J]. Nature Communications, 2016, 7: 12433.
- [13] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison [J]. Environ Microbiol, 2003, 5(7): 539-554.
- [14] 唐凤灶. 安徽铜陵铜尾矿原生演替过程中的土壤固氮菌研究[D]. 广州: 中山大学, 2010: 5-30. (Tang F Z. Soil nitrogen-fixing microorganisms in primary succession of copper mine tailings at Tongling, Anhui, China[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010: 5-30.)
- [15] 姚钦. 生物炭施用对东北黑土土壤理化性质和微生物多样性的影响[D]. 长春: 中国科学院大学(中国科学院东北地理与农业生态研究所), 2017: 21-39. (Yao Q. Effect of biochar addition on soil physicochemical properties and microbial diversity in a black soil of northeast China[D]. Changchun: Northeast Institute of geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, 2017: 21-39.)
- [16] Kolton M, Graber E R, Tsehansky L, et al. Biochar-stimulated plant performance is strongly linked to microbial diversity and metabolic potential in the rhizosphere[J]. New Phytologist, 2017, 213(3): 1393-1404.
- [17] 唐行灿, 陈金林. 生物炭对土壤理化和微生物性质影响研究进展[J]. 生态科学, 2018, 37(1): 192-199. (Tang X C, Chen J L. Review of the effect of biochar on soil physicochemical and microbial properties [J]. Ecological Science, 2018, 37(1): 192-199.)
- [18] 何莉莉, 杨慧敏, 钟哲科, 等. 生物炭对农田土壤细菌群落多样性影响的 PCR-DGGE 分析[J]. 生态学报, 2014, 34(15): 4288-4294. (He L L, Yang H M, Zhong Z K, et al. PCR-DGGE analysis of soil bacterium community diversity in farmland influenced by biochar[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(15): 4288-4294.)
- [19] Wu J, Wang J, Zhang X, et al. A *gyrB*-targeted PCR for rapid identification of *Paenibacillus mucilaginosus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 739-747.
- [20] Ma M, Wang Z, Li L, et al. Complete genome sequence of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016, a bacterium functional as microbial fertilizer [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(10): 2777-2778.
- [21] 李敏. 铅镉污染土壤的稳定化及蚯蚓联合植物修复[D]. 上海: 华东师范大学, 2018: 45-54. (Li M. Stabilization and earthworm-assisted phytoremediation of Pb-Cd contaminated soil [D]. Shanghai: East China Normal University, 2018: 45-54.)
- [22] 李彦霏, 邵明安, 王娇. 蚯蚓粪施用方式及用量对土壤入渗的影响[J/OL]. 土壤学报, DOI:10.11766/trxb201807250261. (Li Y P, Shao M A, Wang J. Effects of pattern and amount of earthworm cast application on water infiltration in soil [J/OL]. Acta Pedologica Sinica, DOI:10.11766/trxb201807250261.)
- [23] Peix A, Ramirez-Bahena M H, Velazquez E, et al. Bacterial associations with legumes[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2015, 34(1-3SI): 17-42.
- [24] Clua J, Roda C, Eugenia Z, et al. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis[J]. Genes, 2018, 9(3): 125.