

东北早晚熟菜豆根际与根瘤微生物差异及根瘤菌固氮能力

石晴^{1,2,3#}, 汪芳芳^{1,2,3#}, 徐伟慧^{1,2,3}, 陈文晶^{1,2,3}, 常春玲^{1,2,3}, 胡云龙^{1,2,3}, 王志刚^{1,2,3*}

- 1 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔
- 2 黑龙江省农业微生物制剂产业化技术创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔
- 3 黑龙江省农用生物制剂产业化协同创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔

石晴, 汪芳芳, 徐伟慧, 陈文晶, 常春玲, 胡云龙, 王志刚. 东北早晚熟菜豆根际与根瘤微生物差异及根瘤菌固氮能力[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 567-581.

SHI Qing, WANG Fangfang, XU Weihui, CHEN Wenjing, CHANG Chunling, HU Yunlong, WANG Zhigang. Differences of rhizosphere and root nodule microorganisms between early and late maturing varieties of *Phaseolus vulgaris* in northeast China and nitrogen-fixing capacity of rhizobia[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 567-581.

摘要: 菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是全球最为重要的食用豆类之一, 根际微生物与植物互惠互利, 同时也是促进作物生长及健康的重要因素, 然而, 如何利用豆类植物微生物组促进作物生长的探索尚显不足。【目的】分析紫冠与巨冠菜豆的根际与根瘤细菌群落结构与功能的差异; 筛选根瘤菌并探究其固氮和促生性能。【方法】利用 16S rRNA 基因测序技术, 分析 2 种菜豆根际与根瘤细菌的差异; 采用平板划线法筛选根瘤菌, 利用无氮蛭石盆栽试验对 11 株根瘤菌的固氮性能及促生效果进行评估。【结果】巨冠菜豆的根际土壤细菌群落多样性显著低于紫冠菜豆, 同时 2 种菜豆根际样品中细菌多样性显著高于根瘤样品。此外, 菜豆根际富集了根瘤菌属(*Rhizobium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、伯克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia*)等有益菌属。其中, *Rhizobium* 是 2 种菜豆根瘤中的优势菌属。Gephi 网络分析表明, 根际与根瘤细菌群落呈正相关, 占比分别为 75.52% 和 86.67%; PICRUSt2 功能预测结果表明, 菜豆根际细菌群落中碳水化合物、氨基酸和脂质代谢等功能丰度较高, 且具有较高的氮代谢功能基因丰度。无氮蛭石盆栽试验表明, *Rhizobium lusitanum* NZ5 和 *R. etli* GLJ10 显著增加了紫冠菜豆地下干重, 分别增加了 43.21% 和

资助项目: 黑龙江省自然科学基金(JQ2023D001); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费(145309401); 黑龙江省省属本科高校“优秀青年教师基础研究支持计划”(YQJH2023099)

This work was supported by the Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation (JQ2023D001), the Heilongjiang Provincial Colleges and Universities Basic Scientific Research Business Fund (145309401), and the Heilongjiang Provincial Undergraduate Colleges and Universities “Outstanding Young Teachers Basic Research Support Program” (YQJH2023099).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wangzhigang@qqhru.edu.cn

Received: 2024-09-14; Accepted: 2024-10-29; Published online: 2024-12-04

48.15%; *R. lusitanum* NZ5、*R. etli* GLZ1 和 *R. changzhiense* GLJ12 能显著增加巨冠菜豆地下干重，分别增加了 77.37%、68.42% 和 67.37%。【结论】菜豆能够选择性地从土壤中富集多种微生物，在其根际建立一个紧密协同且功能强大的微生物群落，且接种不同根瘤菌对菜豆的促生效果存在差异。

关键词：菜豆；根际微生物；根瘤菌；固氮；微生物群落

Differences of rhizosphere and root nodule microorganisms between early and late maturing varieties of *Phaseolus vulgaris* in northeast China and nitrogen-fixing capacity of rhizobia

SHI Qing^{1,2,3#}, WANG Fangfang^{1,2,3#}, XU Weihui^{1,2,3}, CHEN Wenjing^{1,2,3}, CHANG Chunling^{1,2,3}, HU Yunlong^{1,2,3}, WANG Zhigang^{1,2,3*}

1 College of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang, China

2 Heilongjiang Provincial Technology Innovation Center of Agromicrobial Preparation Industrialization, Qiqihar, Heilongjiang, China

3 Heilongjiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agrobiological Preparation Industrialization, Qiqihar, Heilongjiang, China

Abstract: *Phaseolus vulgaris* L. is one of the key edible legumes in the world. Rhizosphere microorganisms have mutually beneficial interactions with plants, being important factors promoting crop growth and health. However, studies are limited regarding how to utilize the microbiomes of legumes to promote crop growth. **[Objective]** To investigate the structural and functional differences of microbial communities in the rhizosphere and root nodules between two varieties ('Ziguan' and 'Juguan') of *P. vulgaris*, screen rhizobial strains, and evaluate their nitrogen-fixing and growth-promoting properties. **[Methods]** We employed 16S rRNA gene sequencing to analyze the bacterial community structures in the rhizosphere and root nodules of the two varieties. The rhizobial strains were screened by the plate streaking method. Pot experiments with nitrogen-free vermiculite were carried out to evaluate the nitrogen-fixing performance of the 11 rhizobial strains screened out. **[Results]** The bacterial diversity in the rhizosphere soil of 'Juguan' was significantly lower than that of 'Ziguan', and the bacterial diversity in the rhizosphere soil samples of both varieties was significantly higher than that in the root nodule samples. In addition, the rhizosphere of *P. vulgaris* harbored beneficial bacterial genera such as *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, among which *Rhizobium* was dominant in the root nodules of both varieties. Gephi network analysis showed that bacterial communities in the rhizosphere and root nodules had positive correlations, with the relative abundance of 75.52% and 86.67%, respectively. PICRUSt2 function prediction indicated that the bacteria in the rhizosphere mainly had the functions related to carbohydrate, amino acid, and lipid metabolism, with abundant genes involved in nitrogen metabolism. Pot experiments showed that *Rhizobium lusitanum* NZ5 and *R. etli* GLJ10 increased the underground dry weight of 'Ziguan' by 43.21% and 48.15%,

respectively. *R. lusitanum* NZ5, *R. etli* GLZ1, and *R. changzhiense* GLJ12 increased the underground dry weight of ‘Juguan’ by 77.37%, 68.42%, and 67.37%, respectively. [Conclusion] *P. vulgaris* possesses ability to selectively enrich a variety of microorganisms in the soil, establishing a closely coordinated and highly functional microbial community in the rhizosphere. Moreover, different rhizobial strains exerted varied growth-promoting effects on *P. vulgaris*.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.; rhizosphere microorganisms; *Rhizobium*; nitrogen fixation; microbial community

菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是一种重要的豆类作物, 是人体必需氨基酸与营养物质的优质来源^[1-2]。大多数豆科植物能够与根瘤菌建立共生关系, 根瘤菌诱发根瘤产生, 赋予了豆科植物独特的生态优势^[3]。在自然界中, 豆科植物-根瘤菌共生体系是最重要的固氮体系之一^[3-5]。研究表明, 根瘤菌能够促进毛叶苕子、箭筈豌豆(*Vicia sativa*)以及苜蓿(*Medicago*)等豆科植物的生长^[6-7], 还可以促进农业作物大豆(*Glycine max*)的生长^[8]。使用根瘤菌菌剂可以改良土壤肥力, 促进作物生长, 从而提高豆科作物产量, 对农业生产具有积极的促进作用^[9]。适应能力较强的土著根瘤菌在形成根瘤和自然存活方面具有一定的优势, 因此, 筛选土著根瘤菌并用作接种剂能提高作物的固氮性能, 且具有很强的竞争力^[10]。Mir 等^[11]从红三叶草根瘤中分离得到 8 株土著根瘤菌, 其中 4 株菌能够合成吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA); 3 株菌具有溶解钾、产铁载体和几丁质酶的特性; 2 株菌具有较好的促生性能, 且能够在菜豆根上定殖, 从而增加菜豆产量。

根际是距离植物根部 1–2 mm 的狭窄动态区, 是地球上最动态的界面之一^[12]。根际微生物群落主要由变形菌门(*Pseudomonadota*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)和厚壁菌门(*Bacillota*)等物种组成^[13-17]。在豆科植物三叶草(*Trifolium pratense*)中, 变形菌门(*Pseudomonadota*)占根际菌群的 90.7%, 其中根

瘤菌(*Rhizobium*)占 70.0%。已知根际微生物群落的组成和活性受植物基因型、土壤性质和植物营养状况的影响。此外, 同一作物的不同品种间, 土壤微生物群落可能存在差异^[18-19]; 同一作物在不同生长阶段^[20-21]和不同营养状态^[22-23]下, 土壤微生物均会存在一定的动态变化。研究表明, 野生大麦(*Hordeum vulgare*)中, 丛毛单孢菌科、黄杆菌科与根瘤菌科为大麦根际富集的优势菌科^[17]; 玉米的基因型对玉米根际微生物群落多样性具有显著的影响^[24]; 然而, 关于东北地区不同生育期菜豆品种微生物组的差异, 目前尚不清楚。

因此, 对不同生育期菜豆品种的根际微生物群落进行分析, 有助于了解不同生育期菜豆品种的微生物多样性, 并对优势微生物群落及根瘤菌的筛选具有重要意义。本研究采用 16S rRNA 基因扩增子测序技术, 探究不同生育期菜豆品种土壤微生物的结构及功能差异; 通过筛选不同菜豆品种的根瘤菌并进行盆栽试验, 探究了在无氮条件下根瘤菌对 2 种菜豆的促生效果及固氮性能的影响, 以期为提高菜豆产量、改进品质以及菜豆专用菌肥的开发提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

两种菜豆均为我国东北地区特有且优质的蔓生食荚菜豆品种, 其中紫冠菜豆较早熟且产量高、巨冠菜豆较晚熟且适于速冻加工, 两种

菜豆均由黑龙江大学培育。

1.2 菜豆土壤样品采集

根瘤样品与土壤样品采集自齐齐哈尔市梅里斯区(123°74'E, 47°40'N)菜豆种植田。于菜豆开花结荚期收集健康植株根系上的红色根瘤与根际土壤。

紫冠、巨冠菜豆根际土壤样品分别命名为 ZGGJ、JGGJ, 紫冠、巨冠菜豆根瘤样品分别命名为 ZGGL、JGGL。

1.3 16S rRNA 基因扩增子测序

根据 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek 公司)说明书提取样品总 DNA, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度, 将提取的 DNA 送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 基因扩增子测序。用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 区^[25]。在 Illumina MiSeq PE300 测序平台上测序, 在美吉云平台上进行可视化分析。

1.4 菜豆根瘤菌的分离纯化与鉴定

挑选 40 个较大的红色根瘤进行表面消毒, 依次使用 70% 乙醇、3% 次氯酸钠各消毒 2 min, 然后用无菌水冲洗干净。将消毒后的根瘤对半切开, 使用无菌接种环固定根瘤横切面于根瘤菌固体培养基表面进行划线, 28 °C 下培养 2-7 d, 挑取不同形态的单菌落进行纯化并编号。

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 提取 DNA, 选择通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rRNA 基因序列扩增^[26], 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(长春)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序, 将获得的菌

株序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 序列比对分析, 并构建系统发育树^[27]。

1.5 单一根瘤菌对菜豆的促生效果及固氮性能评价

利用蛭石盆栽试验评估单一根瘤菌的固氮性能, 将健康饱满的菜豆种子依次浸泡于 75% 乙醇(5 min)和 3% 次氯酸钠溶液(3 min), 然后用无菌水冲洗 8-10 次。将消毒后的菜豆种子播种于装有 2 L 灭菌蛭石的花盆中。菜豆幼苗子叶展开后, 在其根部接种 OD_{600} 值为 0.5 的根瘤菌悬液(2×10^8 CFU/mL) 1 mL, 每周补充 100 mL 无氮霍格兰(Hoagland)营养液; 空白对照为无氮霍格兰营养液条件不接种根瘤菌, 阳性对照为全氮霍格兰营养液条件下不接种根瘤菌。其间浇灌适量无菌水保持蛭石湿润, 每个处理设置 8 个平行。培养条件: 30 °C 光照(12 h), 20 °C 黑暗(12 h)。植株生长 35 d 后, 即菜豆开花初期, 将植株取出, 用剪刀从植株根与茎连接处剪断, 测量菜豆植株地上部分与根部干重、根瘤数及根瘤干重。

1.6 数据处理

采用 Excel 2016 进行数据处理, 运用 SPSS 22.0 进行统计分析, 利用 R 语言 4.1.2、Gephi-0.10.1 和 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据可视化; MEGA 11.0 软件构建菌株系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菜豆根际与根瘤细菌群落多样性分析

16S rRNA 基因测序共获得的 5 971 条细菌扩增子序列变体 (amplicon sequence variant, ASVs), 注释到分类细菌 1 497 种, 细菌属 773 个。2 个菜豆品种的根际与根瘤细菌群落 α 多样性分析如图 1 所示, 不同菜豆的 Shannon 指数

存在显著差异, 根际样品中的细菌群落多样性显著高于根瘤样品($P<0.001$)。巨冠菜豆的根际土壤细菌多样性低于紫冠菜豆($P<0.05$)。对根际与根瘤细菌群落组成的 PCoA 分析结果显示, 对不同菜豆样品差异性解释度 PC1 为 84.32%, PC2 为 9.79%, 共解释了全部样品 94.11% 的差异。2 种菜豆的根际细菌群落存在显著差异, 其中巨冠根际主要分布于 PC1 的负值区域, 而紫

冠根际主要分布于 PC1 的正值区域; 不同菜豆根际细菌群落呈现出明显分离, 但根瘤中细菌群落又很好地聚集在一起。

2.2 菜豆根际与根瘤细菌群落结构组成分析

在门水平上, 对菜豆根际与根瘤细菌的物种组成及相对丰度进行了分析(图 2A)。由图 2A 可知, 2 个品种根瘤中变形菌门

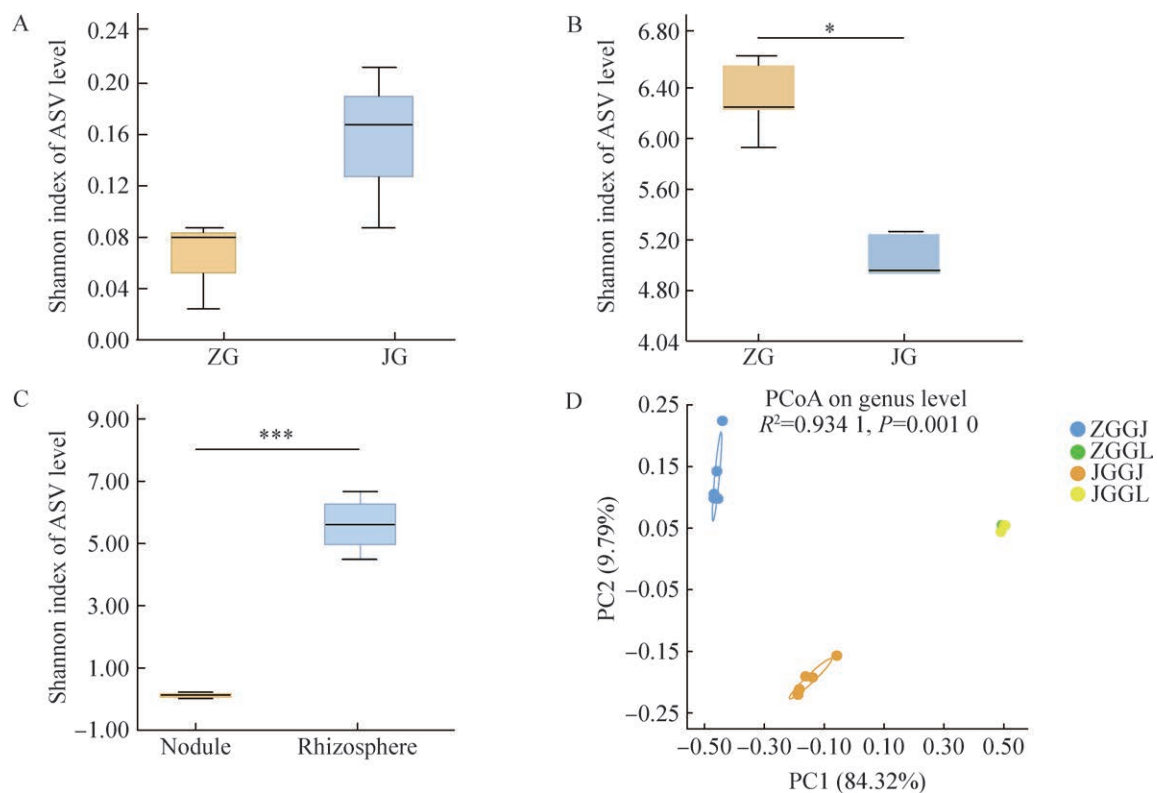


图1 根瘤细菌群落的 α 多样性与PCoA分析。 A: 不同菜豆根瘤间 α 多样性分析; B: 不同菜豆根际间 α 多样性分析; C: 根瘤与根际间 α 多样性分析; D: 菜豆根际土壤细菌群落PCoA分析。ZG代表紫冠菜豆, JG代表巨冠菜豆; *代表不同品种间的显著性水平(*: $P<0.05$), ***代表根瘤与根际间的显著性水平(***: $P<0.001$); 误差条表示重复间的标准误差。

Figure 1 Alpha diversity and PCoA analysis of rhizobia bacterial communities. A: Analysis of alpha diversity among different root nodules of *Phaseolus vulgaris*; B: Analysis of alpha diversity between the rhizospheres of different *Phaseolus vulgaris*; C: Analysis of alpha diversity between nodules and rhizospheres; D: PCoA analysis of bacterial communities in the rhizosphere soil of *Phaseolus vulgaris*. ZG stands for *Phaseolus purpurea*, and JG stands for *Phaseolus megalombis*. * represents the level of significance between different varieties (*: $P<0.05$), and *** in Figure C represents the significant between nodules and rhizosphere (***: $P<0.001$); The error bar shows the standard error of four replicate pots.

(*Pseudomonadota*)的相对丰度高达 99.70%。不同菜豆制品根际的细菌群落结构组成差异较大,与紫冠根际相比,巨冠根际变形菌门(*Pseudomonadota*)与拟杆菌门(*Bacteroidota*)的相对丰度分别增加 23.39% 和 35.13%,放线菌门(*Actinomycetota*)降低了 35.60%。菜豆根际土壤中存在的优势菌门为变形菌门(*Pseudomonadota*, 32.49%–54.73%)、放线菌门(*Actinomycetota*, 19.00%–29.88%)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*, 5.35%–11.19%)、绿弯菌门(*Chloroflexota*, 4.18%–8.07%)、拟杆菌门(*Bacteroidota*, 3.71%–7.49%)和厚壁菌门(*Bacillota*, 3.64%–5.59%)。

菜豆根际与根瘤细菌属组成及相对丰度如图 2B 所示。*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 是根瘤细菌群落组成中丰度最高的优势菌属,其相对丰度高达 98.84%–99.44%,占据菜豆根瘤细菌群落中主要生态位。这表明 *Allorhizobium-Neorhizobium-*

Pararhizobium-Rhizobium 极有可能与 2 种菜豆共生结瘤。2 个菜豆制品的根际细菌群落存在显著差异,巨冠菜豆根际中 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 的相对丰度较紫冠菜豆增加了 92.68%。紫冠菜豆根际优势菌属是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、未分类的微球菌科(*unclassified_f_Micrococcaceae*)、副伯克霍尔氏菌属(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*),约占整个细菌群落的 16.58%,巨冠菜豆根际优势菌属分别是 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*unclassified_f_Micrococcaceae*、*Sphingomonas* 和芽孢杆菌属(*Bacillus*),约占细菌群落的 38.02%。综上所述,不同生育期的菜豆制品影响了根际细菌群落的聚集。

2.3 紫冠与巨冠根际细菌群落差异分析

为探究紫冠与巨冠根际中是否富集一些特异菌属,分析了门水平与属水平上紫冠与巨冠根际样品中细菌组成的差异,如图 3 所示,前

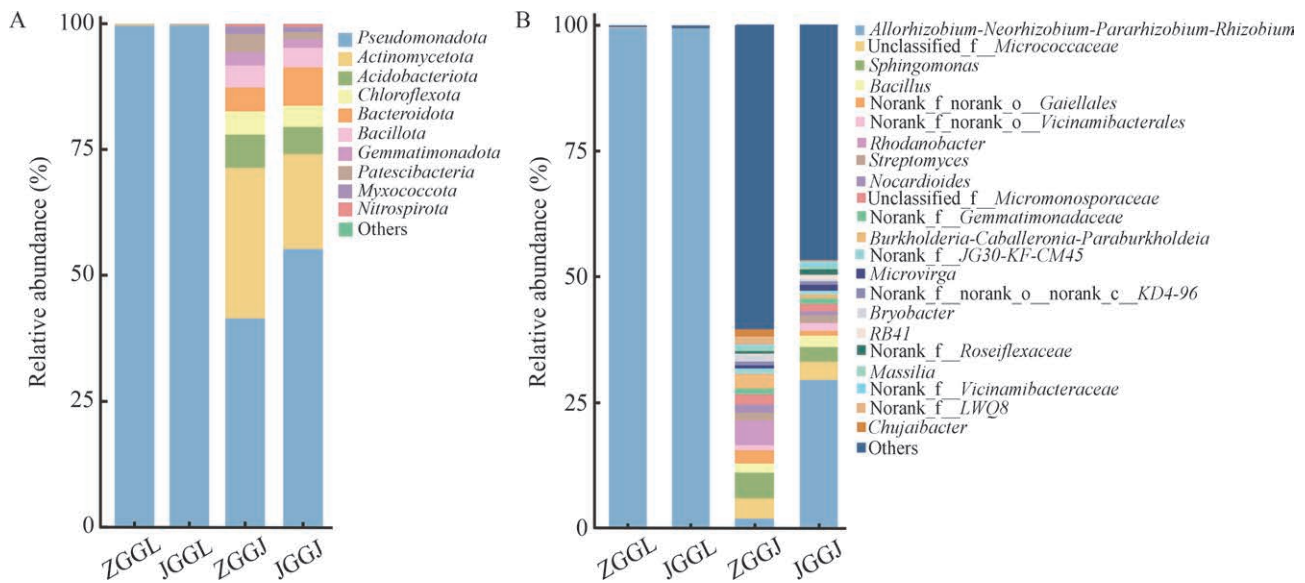


图2 菜豆根际与根瘤细菌群落。A: 门水平细菌门群落组成; B: 属水平细菌群落组成。

Figure 2 Rhizosphere and rhizobia bacterial community of *Phaseolus vulgaris*. A: Bacterial phylum community composition at phylum level; B: Bacterial community composition at genus level.

10 个差异菌门均存在显著差异。巨冠菜豆较紫冠菜豆根际显著富集了 *Pseudomonadota* 与 *Bacteroidota*, 紫冠菜豆较巨冠菜豆根际显著富集了 *Actinomycetota*、*Patescibacteris*、出芽单胞菌门 (*Gemmatimonadota*)等菌门($P<0.05$); 前 10 个差异菌属中, 紫冠与巨冠菜豆有 10 个菌属存在差异, 与紫冠菜豆根际相比, 巨冠菜豆仅富集了 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, 而与巨冠菜豆相比 *Sphingomonas*、*Rhodanobacter*、*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 等菌属显著富集于紫冠菜豆中($P<0.05$)。由此可见, 菜豆有选择地对根际细菌群落进行组装, 而有益菌属的富集可能与

不同生育期的菜豆品种分泌的根系分泌物有关。

2.4 不同根际与根瘤间微生物相互作用网络

利用软件 Gephi-0.10.1, 对菜豆根际与根瘤中细菌群落属水平排名前 30 的优势菌属进行共现网络分析(图 4)。研究发现, 根际土壤中存在 433 种相关性, 根瘤中存在 45 种相关性, 正相关占比分别为 75.52% 和 86.67%, 与根际相比, 根瘤内相互作用网络相对简单, 但正相关占比最高。其中菜豆根瘤、根际 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 与 *Bradyrhizobium* 之间呈正相关关

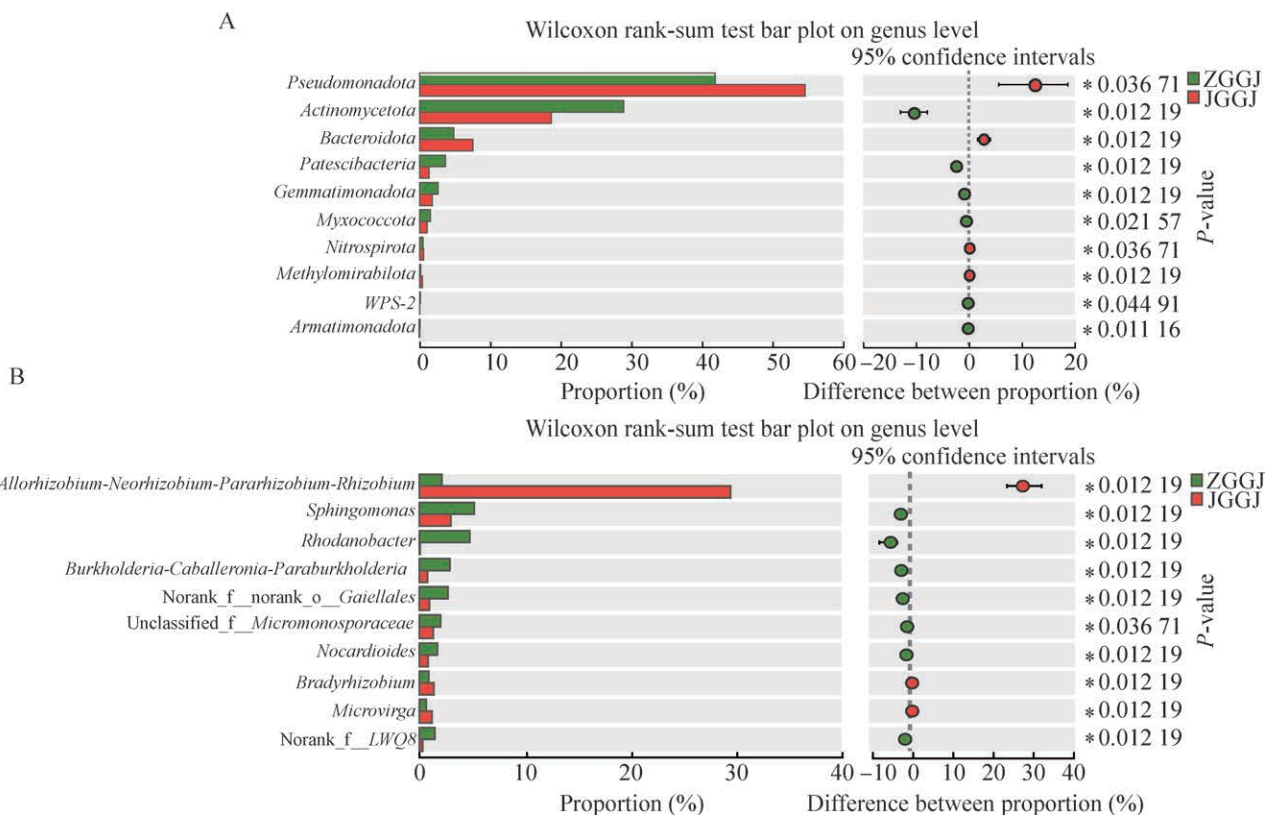


图3 两种菜豆品种根际细菌群落差异。A: 根际门水平细菌群落差异; B: 根际属水平细菌群落差异。*代表显著性水平($P<0.05$)。

Figure 3 Differences in rhizosphere bacterial communities between the two *Phaseolus vulgaris* L. ($P<0.05$). A: Differences in bacterial communities at the rhizosphere phylum level; B: Differences in bacterial communities at the rhizosphere level. *: Significance level ($P<0.05$).

系。在根际中 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 与 *Bradyrhizobium* 分别与 9 种和 5 种不同的菌属呈正相关，表明这些类群可能影响这 2 种根瘤菌结瘤；在根瘤中 *Unclassified_f_Micrococcaceae*、*Norank_f_norank_o_Saccharimonadales*、链霉菌属

(*Streptomyces*)、*Sphingomonas*、新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)与 2 种根瘤菌呈正相关，表明这些菌属能够与根瘤菌共存，不会相互排斥。

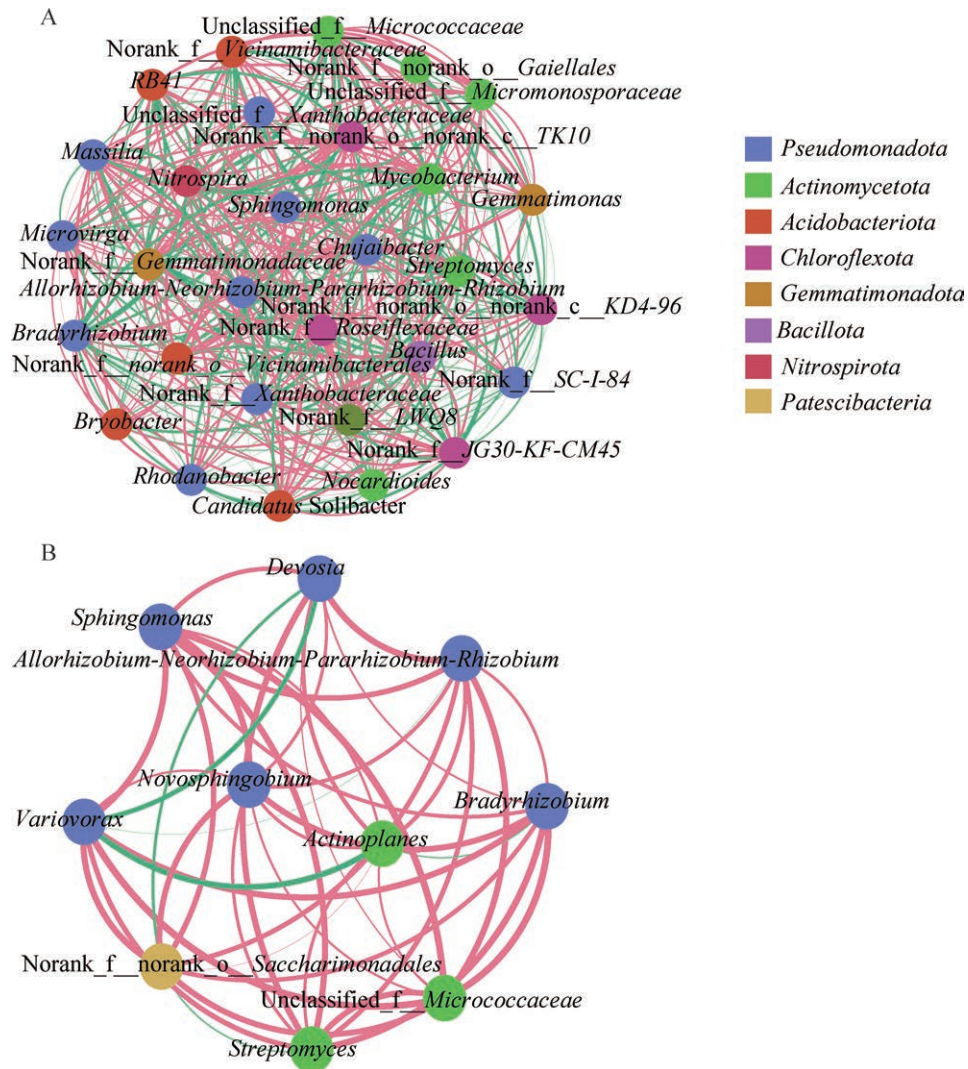


图4 菜豆根际土壤(A)和根瘤(B)中优势微生物群属水平的共现网络。节点大小代表物种的丰度大小，不同的颜色代表相应的门水平，红色线条代表正相关，绿色线条代表负相关，粗细代表相关值大小，在显著相关($P < 0.01$, Spearman等级相关检验)和高度相关(Spearman $|r| > 0.70$)的节点之间绘制连接。

Figure 4 Co-occurrence network at the level of dominant microbiota in rhizosphere soil (A) and nodules (B) of *Phaseolus vulgaris*. Node size indicates species abundance, different colors indicate the corresponding gate level classification, line color represents correlation, red represents positive correlation, green represents negative correlation, and thickness represents correlation value size; Draw connections between nodes that are significantly ($P < 0.01$, Spearman rank correlation test) and highly correlated (Spearman $|r| > 0.70$).

2.5 不同菜豆根际与根瘤细菌群落功能预测分析

通过 PICRUST2 软件对菜豆根际与根瘤细菌群落进行功能预测，利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对数据进行比对，结果如图 5A 所示。在根瘤中免疫系统(immune system)、细胞

运动 (cell motility)、循环系统 (circulatory system)、外源物质的生物降解和代谢 (xenobiotics biodegradation and metabolism)、细胞生长与死亡(cell growth and death)、发育和再生 (development and regeneration)、神经系统 (nervous system)和膜转运(membrane transport)等功能富集，推测根瘤内细菌通过细胞膜与植物

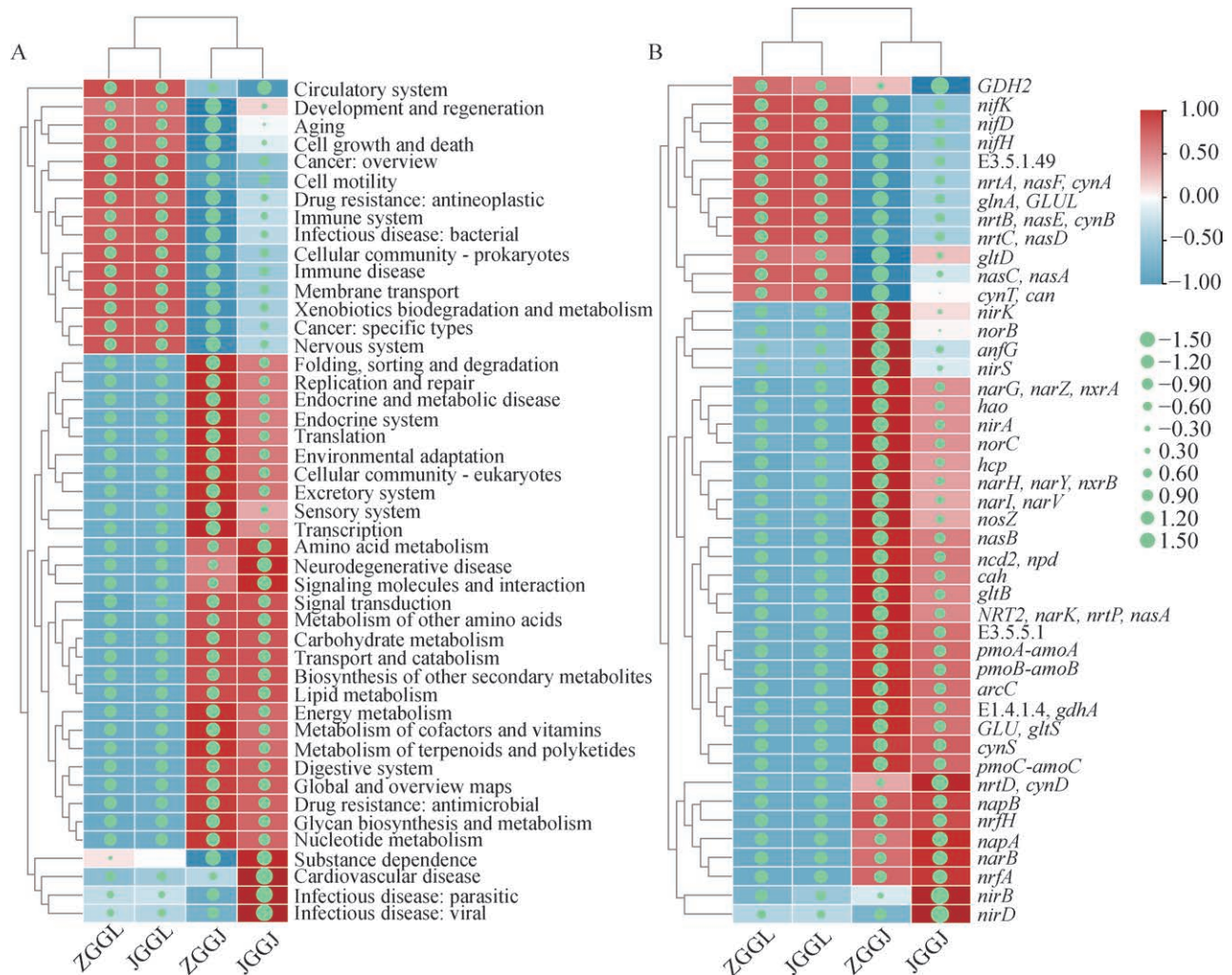


图5 菜豆根际与根瘤功能基因与氮代谢基因丰度。A：菜豆根际与根瘤细菌群落PICRUST2功能预测；B：菜豆根际与根瘤细菌群落中氮代谢相关基因的富集分析。

Figure 5 Rhizosphere and nodule functional genes and nitrogen metabolism gene abundance in *Phaseolus vulgaris*. A: PICRUST2 function prediction of rhizosphere and rhizobia bacterial communities in *Phaseolus vulgaris*; B: Enrichment analysis of genes related to nitrogen metabolism in the rhizosphere and rhizobia bacterial communities of *Phaseolus vulgaris*.

进行物质交换, 利用植物提供的营养物质维持细胞。根际细菌的功能与物质代谢、遗传信息处理、生物有机系统和细胞过程相关, 其中转录(transcription)、翻译(translation)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、能量代谢(energy metabolism)、脂质代谢(lipid metabolism)、环境适应(environmental adaptation)、运输和分解代谢(transport and catabolism)、其他次生代谢物的生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites)等功能富集, 推测根际有细菌大量繁殖, 物质与能量代谢旺盛, 同时合成多种次生代谢产物。

将预测的 KO (KEGG orthology)值与 KEGG 数据库中氮代谢相关的 69 个直系同源基因进行比对, 如图 5B 所示, 共发现 45 个与氮代谢功能相关的基因, 表明根际细菌群落存在丰富氮代谢功能。根瘤中细菌氮代谢功能基因富集情况与根际不同, 根瘤中富集了编码钼铁固氮酶的 *nifD*、*nifH*、*nifK* 基因, 与硝化过程相关的 *hcp*、*hao*、*pmoA-amoA*、*pmoB-amo* 和 *BpmoC-amoC* 基因丰度很低。对根际氮代谢基因丰度进行分析后, 发现紫冠菜豆根际 *anfG* (固氮酶 δ 亚基)的基因丰度较高, 巨冠菜豆根际 *anfG* 基因丰度较低, 但 *nifDHK* 基因丰度较高; 巨冠菜豆根际参与异化硝酸盐还原的基因 *nirDB* 丰度较高, 2 种菜豆根际中参与硝酸盐同化的基因 *NRT2*、*narK*、*nrtP*、*nasA* 丰度升高, 可能有助于硝酸盐转化为亚硝酸盐。

2.6 根瘤菌的分离及鉴定

通过根瘤菌固体培养基分离纯化, 共得到根瘤菌 11 株。对菌株进行安全性评价后, 发现 11 株细菌均不产生溶血圈, 因此判断这 11 株细菌无溶血性, 可用于后续实验。如图 6 所示, 通过根瘤菌培养基以及 16S rRNA 基因序列分析

发现, 葡萄牙根瘤菌(*Rhizobium lusitanum*) KZ5-1、葡萄牙根瘤菌(*R. lusitanum*) NZ5、葡萄牙根瘤菌(*R. lusitanum*) KZ7、长治根瘤菌(*R. changzhiense*) GLJ10、豆根瘤菌(*R. etli*) GLZ1、豆根瘤菌(*R. etli*) GLZ10、豆根瘤菌(*R. etli*) GLZ14、埃斯佩兰萨根瘤菌(*R. esperanzae*) GLJ2、埃斯佩兰萨根瘤菌(*R. esperanzae*) GLJ7、长治根瘤菌(*R. changzhiense*) GLZ5 和长治根瘤菌(*R. changzhiense*) GLJ12 均属于根瘤菌属(*Rhizobium*)。

2.7 无氮条件下单接种根瘤菌的促生效果

通过无氮蛭石盆栽试验评估 11 株根瘤菌的促生效果。如图 7 所示, 在所有处理组中, 仅有使用霍格兰含氮营养液的植株生物量显著高于空白对照(霍格兰无氮营养液, CK); 而在无氮处理组中 *R. lusitanum* NZ5 与 *R. changzhiense* GLJ10 的接种能够显著增加紫冠菜豆地下部干重, 较 CK 处理分别增加了 43.21%、48.15% (图 7A); *R. lusitanum* NZ5、*R. etli* GLZ1 和 *R. changzhiense* GLJ12 能够显著增加巨冠菜豆植株地下部分干重, 较 CK 处理组分别增加了 77.37%、68.42%、67.37% (图 7B); 每周施用 100 mL 全氮营养液能够显著促进紫冠菜豆结瘤, 抑制巨冠菜豆结瘤, 但效果不显著; 共有 8 个根瘤菌接种处理显著增加了紫冠菜豆结瘤数, 降低了平均根瘤干重; 共有 3 个根瘤菌处理显著增加了巨冠菜豆结瘤数($P < 0.05$) (图 7C、7D)。

3 讨论

根际微生物是宿主植物不可分割的一部分, 它对植物生长和健康至关重要^[28]。通常情况下, 植物的基因型与根际微生物群落结构显著相关^[24]。自然条件下, 植物通过选择土壤中与其形成共生关系的不同微生物, 组装成复杂的根



图6 基于16S rRNA基因序列构建的根瘤菌系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of rhizobia based on 16S rRNA gene sequences.

际微生物群落。这种宿主介导的微生物组工程是一种“自上而下”的策略，能够改善植物的生长和环境适应性。

本研究发现，不同生育期菜豆品种的根际细菌群落组成存在差异。在门水平分类上，*Pseudomonadota* 在巨冠菜豆根际中丰度高于紫冠菜豆，而 *Actinomycetota* 在紫冠菜豆中的丰度较高。已知 *Pseudomonadota* 是利用根分泌物的主要成员之一，也是常见的根际定殖菌^[29]；而 *Actinomycetota* 则能够通过产生铁载体，间接促进植物对营养物质的吸收与利用^[30]。在属水平

分类中，2种菜豆的根瘤与巨冠菜豆的根际均显著富集了固氮细菌 *Rhizobium*，但紫冠菜豆中 *Rhizobium* 丰度较低，除固氮作用外，富集在菜豆根际的微生物可能还具有多种其他功能。例如，在紫冠菜豆中丰度较高的 *Sphingomonas* 能够通过产生赤霉素与生长素等植物激素从而促进作物生长^[31]。在菜豆根际细菌群落的研究中发现，不同菜豆品种会从土壤中招募特定细菌促进菜豆生长，最终建立不同的根际细菌群落。豆科植物根瘤是由根瘤菌诱导形成的独特生态位，豆科植物与根瘤菌共生受豆科宿主、环境

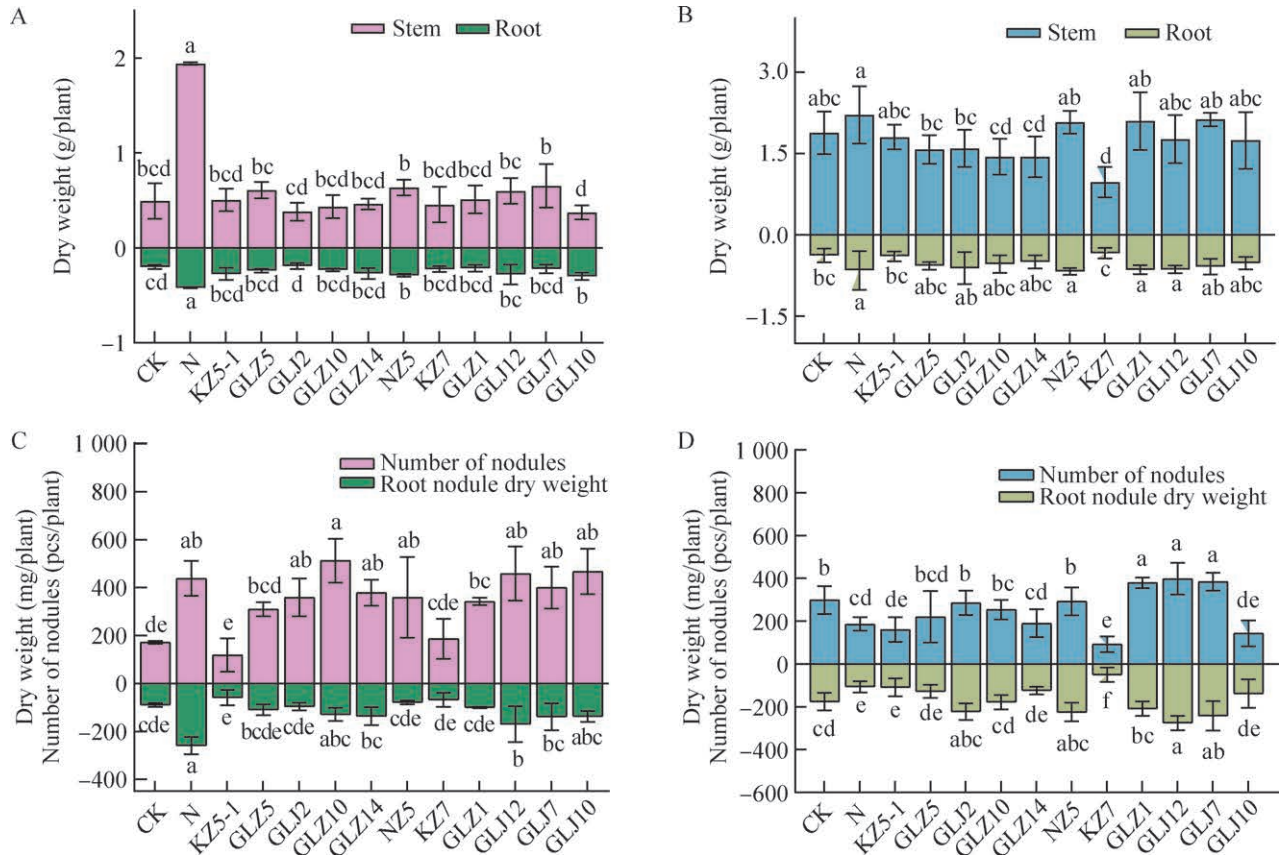


图7 单接种根瘤菌对紫冠(A, C)与巨冠(B, D)菜豆的促生效应。不同的小写字母表示显著差异($P < 0.05$)。Figure 7 The growth-promoting effect of single inoculation of rhizobia on *Phaseolus purpurea* (A, C) and on *Phaseolus megalombis* (B, D). Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

因素及共生根瘤菌的影响。分析根瘤内细菌群落多样性的组成后发现, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 在 2 种菜豆中均是优势菌属, 占整个细菌群落的 98.84%–99.44%。总体而言, 菜豆的基因型影响了根际细菌群落的聚集, 并为了自身的生长有选择地对根际细菌群落进行组装。

微生物网络揭示了土壤微生物群落间的相互作用与共现模式, 这些模式可能会影响土壤微生物群落间的构造与组成。共现网络分析显示, 根瘤内细菌群落结构相比于根际而言更为单一, 但根瘤有益菌属与 *Rhizobium* 之间存在较高的正相关关系, 例如 *Bradyrhizobium*、*Streptomyces*、

Sphingomonas、*Devosia* 等菌属^[32]。通过 PICRUSt2 功能预测分析, 发现不同菜豆根际中细菌的主要功能会随着细菌群落组成、结构及多样性的改变而改变。在菜豆根际中, 富集了与氨基酸、脂质代谢、合成次生代谢产物等功能有关的细菌, 它们能增加土壤养分有效性, 引起植物有机物的合成、运输与积累, 从而促进植物的生长^[33]。此外, 根际细菌产生的次生代谢产物在促进植物生长和保护植物健康方面发挥着重要作用, 例如通过产生植物激素促进植物的生长和发育, 产生抗生素、病原体抑制酶和挥发性化合物来保护植物免受病原体入侵^[34]。同时, 菜豆根际中富集了较多的与同化

和异化硝酸盐还原相关的基因, 而与硝化作用有关的基因丰度较低, 在根瘤中主要富集了固氮相关基因 *nifD*、*nifH*、*nifK*, 这些基因有利于土壤氮素的固定^[35], 为提升氮代谢效率奠定了基础。

豆类作物是农业系统中的重要组成部分, 与其共生的根瘤菌能够将环境中的氮气转化为作物可利用的氮, 有效的根瘤菌-植物共生能减少豆类种植过程中对化学肥料的需求^[36]。我们通过平板划线法分离到的 11 株菌均属于 *Rhizobium*, 无氮蛭石盆栽试验表明, 不同的根瘤菌株对菜豆地上和地下部分呈现出不同的促生效果(图 7), 这与不同根瘤菌对海南主栽菜用大豆品种的促生效果类似^[37]。Aguilar 等^[38]研究发现, 菜豆种皮上携带有根瘤菌, 根瘤菌也通过附着在菜豆种子上进行传播^[38]。本研究发现, 空白对照植株根部也形成了根瘤, 这可能与菜豆种皮携带的根瘤菌有关。

4 结论

16S rRNA 基因扩增子测序技术揭示了不同生育期的 2 种菜豆品种根际细菌群落存在差异, 同时根瘤与根际的细菌群落组成也存在较大差异。菜豆根瘤中的优势菌门为 *Pseudomonadota*, 优势菌属为 *Rhizobium*, 该菌属同样在根际富集, 2 种菜豆的根际中还特异性富集了 *Sphingomonas*、*Burkholderia* 等有益菌属。2 种菜豆根际均富集了与氮、磷循环和氮代谢相关的功能基因。

通过分离纯化获得了 11 株根瘤菌, 其中 *R. etli* GLJ10 显著增加了紫冠菜豆地下部分干重; *R. etli* GLZ1 和 *R. changzhiense* GLJ12 则显著增加了巨冠菜豆地下部分干重, 而 *R. lusitanum* NZ5 对菜豆地上和地下生物量均有显著的促进作用。8 株根瘤菌显著增加了紫冠菜豆结瘤数;

3 株根瘤菌处理显著增加了巨冠菜豆结瘤数。综上所述, 不同生育期的菜豆会影响其根际细菌群落的组成, 并且不同的根瘤菌对菜豆的促生效果不同。

作者贡献声明

石晴: 负责写作和编辑工作; 汪芳芳: 负责研究设计、实验操作和数据收集; 徐伟慧: 负责文章修改及论文润色; 陈文晶: 写作审编; 常春玲: 写作审编; 胡云龙: 写作审编; 王志刚: 负责实验技术路线的构思。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] DWIVEDI SL, SAHRAWAT KL, UPADHYAYA HD, MENGONI A, GALARDINI M, BAZZICALUPO M, BIONDI EG, HUNGRIA M, KASCHUK G, BLAIR MW, ORTIZ R. Advances in host plant and *Rhizobium* genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes[M]//Advances in Agronomy. Amsterdam: Elsevier, 2015: 1-116.
- [2] 汪云吉. 花芸豆 α -淀粉酶抑制剂提取物的制备及提取残渣的利用[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2021. WANG YJ. Preparation of α -amylase inhibitor extract from kidney bean and utilization of extraction residue[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [3] ZHONG YJ, YANG YQ, LIU P, XU RN, RENSING C, FU XD, LIAO H. Genotype and *Rhizobium* inoculation modulate the assembly of soybean rhizobacterial communities[J]. Plant, Cell & Environment, 2019, 42(6): 2028-2044.
- [4] 燕永亮. 生物固氮: 促进化肥减施增效, 助力农业绿色发展[J]. 生物技术通报, 2019, 35(10): 6-7. YAN YL. Biological nitrogen fixation: promoting the reduction of chemical fertilizers and increasing efficiency, and helping the green development of agriculture[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(10): 6-7 (in Chinese).
- [5] 王艳辉, 王亚平. 花生接种根瘤菌剂田间应用效果[J]. 中国农技推广, 2013, 29(11): 33-34. WANG YH, WANG YP. Field application effect of peanut inoculated with rhizobia agent[J]. China Agricultural Technology Extension, 2013, 29(11): 33-34 (in Chinese).

- [6] 韩梅, 张宏亮, 郭石生, 陈占全. 接种根瘤菌对绿肥作物毛苕子结瘤能力的影响[J]. 中国种业, 2011(S2): 41-42.
HAN M, ZHANG HL, GUO SS, CHEN ZQ. Effect of rhizobia inoculation on nodulation ability of green manure crops, *Jatropha curcas* L. [J]. China Seed Industry, 2011(S2): 41-42 (in Chinese).
- [7] 付萍. 根瘤菌对箭筈豌豆结瘤固氮的影响[J]. 草业科学, 2016, 33(4): 584-588.
FU P. Effects of different rhizobia on nodulation of *Vicia sativa*[J]. Pratacultural Science, 2016, 33(4): 584-588 (in Chinese).
- [8] 李艳萍, 张敏, 袁梅, 陈劲伊, 邓祖科, 杨升辉, 陈文浩, 陈文峰. 根瘤菌和复合促生菌对大豆结瘤和生长的影响[J]. 大豆科学, 2017, 36(4): 583-591.
LI YP, ZHANG M, YUAN M, CHEN JY, DENG ZK, YANG SH, CHEN WH, CHEN WF. Influence of combination of rhizobia and compound growth-promoting bacteria on the nodulation and growth of soybean[J]. Soybean Science, 2017, 36(4): 583-591 (in Chinese).
- [9] 管凤贞, 邱宏端, 陈济琛, 林新坚. 根瘤菌菌剂的研究与开发现状[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 755-759.
GUAN FZ, QIU HD, CHEN JC, LIN XJ. *Rhizobium* inoculants: research progress and development status[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 755-759 (in Chinese).
- [10] TRABELSI D, MENGONI A, BEN AMMAR H, MHAMDI R. Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(1): 211-222.
- [11] MIR MI, MUKKAMULA N, KUMAR BK, RAGHU K, PARRAY JA, KHAN I, HAMEEDA B, BABALOLA OO. Impact of microbial consortium of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium mayense* on the growth of *Phaseolus vulgaris* L.[J]. South African Journal of Botany, 2024, 168: 562-572.
- [12] 张蕾, 徐慧敏, 朱宝利. 根际微生物与植物再植病的发生发展关系[J]. 微生物学报, 2016, 56(8): 1234-1241.
ZHANG L, XU HM, ZHU BL. Association of rhizosphere soil microbiome with the occurrence and development of replant disease: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(8): 1234-1241 (in Chinese).
- [13] BODENHAUSEN N, HORTON MW, BERGELSON J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56329.
- [14] BULGARELLI D, SCHLAEPPI K, SPAEPEN S, VER LOREN van THEMAAT E, SCHULZE-LEFERT P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 807-838.
- [15] GUTTMAN DS, McHARDY AC, SCHULZE-LEFERT P. Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions[J]. Nature Reviews Genetics, 2014, 15(12): 797-813.
- [16] SCHLAEPPI K, DOMBROWSKI N, OTER RG, VER LOREN van THEMAAT E, SCHULZE-LEFERT P. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(2): 585-592.
- [17] BULGARELLI D, GARRIDO-OTER R, MÜNCH PC, WEIMAN A, DRÖGE J, PAN Y, McHARDY AC, SCHULZE-LEFERT P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(3): 392-403.
- [18] 农泽梅, 史国英, 曾泉, 叶雪莲, 秦华东, 胡春锦. 不同甘蔗品种根际土壤酶活性及微生物群落多样性分析[J]. 热带作物学报, 2020, 41(4): 819-828.
NONG ZM, SHI GY, ZENG Q, YE XL, QIN HD, HU CJ. Analysis on enzyme activity and microbial community diversity in rhizosphere soil of different sugarcane varieties[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(4): 819-828 (in Chinese).
- [19] 崔纪超, 武小霞, 林怡, 钟玉扬, 余金姜, 王义祥, 中奕, 黄枝. 甘薯根际土壤微生物群落结构及多样性分析[J]. 西南农业学报, 2022, 35(9): 2086-2095.
CUI JC, WU XX, LIN Y, ZHONG YY, YU JJ, WANG YX, ZHONG Y, HUANG Z. Community structure and diversity in rhizosphere soil of sweet potato[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2022, 35(9): 2086-2095 (in Chinese).
- [20] 张亮. 百合不同生育期根际土壤微生物和酶活性的变化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008.
ZHANG L. Changes of microbial and enzyme activities in rhizosphere soil of lily at different growth stages[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2008 (in Chinese).
- [21] 孙建波, 畅文军, 李文彬, 张世清, 李春强, 彭明. 香蕉不同生育期根际微生物量及土壤酶活性的变化研究[J]. 生态环境学报, 2022, 31(6): 1169-1174.
SUN JB, CHANG WJ, LI WB, ZHANG SQ, LI CQ, PENG M. Dynamics of soil microbial biomass and enzyme activities in rhizosphere soil at different growing stages of banana[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2022, 31(6): 1169-1174 (in Chinese).
- [22] 钟文辉, 蔡祖聪. 土壤管理措施及环境因素对土壤微生物多样性影响研究进展[J]. 生物多样性, 2004, 12(4): 456-465.
ZHONG WH, CAI ZC. Effect of soil management practices and environmental factors on soil microbial diversity: a review[J]. Chinese Biodiversity, 2004, 12(4): 456-465 (in Chinese).
- [23] 刘芳, 汪航飞, 蒲春燕, 蔡紫阳, 吴三林. 不同施肥对葡萄苗根际微生物量、土壤酶活性和生理的影响[J]. 四川农业大学学报, 2023, 41(2): 318-324.
LIU F, WANG HF, PU CY, CAI ZY, WU SL. Effects of different fertilization on rhizosphere microbial biomass, soil enzyme activity and physiology of grape seedlings [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2023, 41(2): 318-324 (in Chinese).
- [24] PEIFFER JA, SPOR A, KOREN O, JIN Z, TRINGE SG, DANGL JL, BUCKLER ES, LEY RE. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(16): 6548-6553.

- [25] 刘明艳, 马嘉哈, 李瑜, 刘文霞, 秦鸿娟, 高配科. 16S rRNA 基因高变区 V4 和 V3-V4 及测序深度对油藏细菌菌群分析的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 440-449.
LIU MY, MA JH, LI Y, LIU WX, QIN HJ, GAO PK. Influence of 16S rRNA gene V4 and V3-V4 sequencing and sequencing depth on unraveling bacterial communities inhabiting oil reservoirs[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 440-449 (in Chinese).
- [26] 刘昆昂, 黄亚丽, 贾振华, 马宏, 宋水山. 拮抗灰霉病菌的芽孢杆菌筛选、鉴定及其代谢产物抑菌效果研究[J]. 华北农学报, 2020, 35(3): 200-207.
LIU KA, HUANG YL, JIA ZH, MA H, SONG SS. Screening and identification of *Bacillus* sp. and its metabolites inhibitory effect against *Botrytis cinerea*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2020, 35(3): 200-207 (in Chinese).
- [27] 罗莎莉, 王幼娟, 陆星, 陈康, 王秀荣. 耐镉促生菌株的分离鉴定及对大豆的促生效应[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3137-3149.
LUO SL, WANG YJ, LU X, CHEN K, WANG XR. Isolation and identification of cadmium-resistant growth-promoting strains and their growth-promoting effects on soybean[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3137-3149 (in Chinese).
- [28] TRIVEDI P, LEACH JE, TRINGE SG, SA TM, SINGH BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(11): 607-621.
- [29] PÉREZ-JARAMILLO JE, de HOLLANDER M, RAMÍREZ CA, MENDES R, RAAIJMAKERS JM, CARRIÓN VJ. Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (*Phaseolus vulgaris*) in native and agricultural soils from Colombia[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 114.
- [30] WU QH, DEERING RW, ZHANG GY, WANG BX, LI X, SUN JD, CHEN JW, ZHANG HW, ROWLEY DC, WANG H. Albisporechelin, a new hydroxamate type siderophore from the deep ocean sediment-derived actinomycete *Amycolatopsis albispora* WP1^T[J]. Marine Drugs, 2018, 16(6): 199.
- [31] De OLIVEIRA-LONGATTI SM, MARTINS de SOUSA P, MARCIANO MARRA L, AVELAR FERREIRA PA, de SOUZA MOREIRA FM. *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in a dystrophic oxisol[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 1825-1832.
- [32] ZGADZAJ R, JAMES EK, KELLY S, KAWAHARADA Y, de JONGE N, JENSEN DB, MADSEN LH, RADUTOIU S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(6): e1005280.
- [33] OLDROYD GED, LEYSER O. A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment[J]. Science, 2020, 368(6486): eaba0196.
- [34] YANG SD, LIU HW, XIE PH, WEN T, SHEN QR, YUAN J. Emerging pathways for engineering the rhizosphere microbiome for optimal plant health[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(11): 4441-4449.
- [35] 郭辉, 连延浩, 赵志博, 任永哲, 王志强, 林同保. 大豆和玉米茬口对冬小麦根际土壤细菌群落结构和功能的影响[J]. 河南农业科学, 2024, 53(7): 79-89.
GUO H, LIAN YH, ZHAO ZB, REN YZ, WANG ZQ, LIN TB. Effects of soybean and maize stubbles on bacterial community structure and function in winter wheat rhizosphere soil[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2024, 53(7): 79-89 (in Chinese).
- [36] HOWIESON JG, DILWORTH MJ. Working with Rhizobia[M]. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016: 1-314.
- [37] 朱佳豪, 焦健, 蒲怡, 林清喜, 林杉. 固氮根瘤菌与海南主栽菜用大豆的共生匹配性和促生效应[J]. 大豆科学, 2023, 42(4): 441-450.
ZHU JH, JIAO J, PU Y, LIN QX, LIN S. Symbiotic compatibility and growth promotion effect of nitrogen fixing rhizobia on Hainan vegetable-type soybean[J]. Soybean Science, 2023, 42(4): 441-450 (in Chinese).
- [38] AGUILAR A, MORA Y, DÁVALOS A, GIRARD L, MORA J, PERALTA H. Analysis of genome sequence and symbiotic ability of rhizobial strains isolated from seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 645.