

研究报告



两株芽孢杆菌对花生幼苗生长及其根际土壤微生物群落结构的影响

黄文茂 韩丽珍* 王欢

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室
山地生态与农业生物工程协同创新中心 贵州 贵阳 550025

摘要:【背景】贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)和坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)对花生的促生作用及促生机制研究尚未见报道。【目的】从微生物群落结构和土壤氮磷钾有效养分两个方面综合解析两株芽孢杆菌(贝莱斯芽孢杆菌 HP9 和坚强芽孢杆菌 HP10)对花生的促生机制。【方法】以两株芽孢杆菌为研究对象,通过单独灌根或混合灌根盆栽花生,测定其对花生生长及根际土壤氮磷钾有效养分的影响;利用高通量测序技术分析灌根组与对照组花生根际土壤的细菌和真菌群落结构及多样性。

【结果】与对照组相比,3个灌根处理组均明显促进了花生幼苗茎部的伸长及鲜重的增加,根际土壤碱解氮含量显著提高,有效磷和速效钾含量有不同程度增加。芽孢杆菌对花生根际土壤的微生物多样性无显著影响,但影响了细菌和真菌的群落结构组成。灌根处理组根际土壤的拟杆菌门及 *Mortierellomycota* 等相对丰度显著增加,在属水平上,农杆菌属、节杆菌属、芽孢杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、黄杆菌属、*Pedobacter*、极地单胞菌属、假单胞菌属、鞘脂单胞菌属、寡养单胞菌属等属的相对丰度明显提高,而且无色杆菌属、短波单胞菌属、金黄色杆菌属、苍白杆菌属、鞘氨醇杆菌属和鞘氨醇盒菌属等6个细菌属仅见于3个灌根处理组中。主成分分析结果显示,与对照相比,3个灌根处理组之间的根际土壤微生物群落结构具有更高的相似性。【结论】贝莱斯芽孢杆菌 HP9 和坚强芽孢杆菌 HP10 菌株可以影响根际土壤的微生物群落结构组成,提高根际土壤功能微生物的相对丰度,从而改善土壤肥力,促进花生幼苗生长。

关键词: 芽孢杆菌,花生,促生,微生物群落结构

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760030); Science and Technology Project of Guizhou Province ([2017] 5788); Science and Technology Support Project of Guizhou Province ([2017] 2575)

*Corresponding author: E-mail: hanlizhen11@163.com

Received: 24-11-2019; **Accepted:** 12-02-2020; **Published online:** 15-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31760030); 贵州省科技计划(黔科合平台人才[2017] 5788); 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2017] 2575)

*通信作者: E-mail: hanlizhen11@163.com

收稿日期: 2019-11-24; **接受日期:** 2020-02-12; **网络首发日期:** 2020-05-15

Effects of two *Bacillus* spp. strains on the growth of peanut seedling and microbial community structure in rhizosphere soil

HUANG Wen-Mao HAN Li-Zhen* WANG Huan

Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education); Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB); College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: **[Background]** The growth-promoting effects and mechanisms of *Bacillus velezensis* and *Bacillus firmus* on peanut seedlings have not been reported. **[Objective]** This study comprehensively explored the growth-promoting mechanism of two *Bacillus* strains on peanut by analyzing of rhizosphere microbial community and soil available nutrients, including nitrogen, phosphorus and potassium. **[Methods]** Two strains (named as *Bacillus velezensis* HP9, *Bacillus firmus* HP10) were irrigated-root alone, or mixed on peanut seedling by pot experiment, their effects on peanut's growth and available nutrients of rhizosphere soil were assessed. The community structure and diversity of bacteria and fungi in rhizosphere soil, including irrigated-root groups and control group, were analyzed by high-throughput sequencing technology, too. **[Results]** Comparing to control group, stem length and fresh weight of treated peanuts were obviously increased; in rhizosphere soil, alkali-hydrolyzed nitrogen contents was improved greatly, available phosphorus and potassium contents were also increased differently. When *Bacillus* strains were irrigated with peanut seedlings, there were no significant influence on microbial diversity of rhizosphere soil, but microbial community structure, including bacteria and fungi, were affected. At the phylum level, the relative abundance of *Bacteroidetes* and *Mortierellomycota* increased significantly in three treated groups. Relative abundance of these genus, such as *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, were significantly improved; and six bacterial genus, including *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium* and *Sphingopyxis*, were only detected in three treated groups. Using the method of principal component analysis, community structure of rhizosphere soil were found more similar in treated groups than the control. **[Conclusion]** *Bacillus velezensis* HP9 and *Bacillus firmus* HP10 could influence microbial community structure and increase the relative abundance of functional flora in rhizosphere soil, thus the soil fertility was improved and the growth of peanut seedling was promoted, too.

Keywords: *Bacillus* spp., Peanut, Growth-promoting, Microbial community structure

花生(*Arachis hypogaea* Linn.)属于地上开花地下结果的一年生豆科植物,因丰富的含油量(约52%)和蛋白质含量(约26%)已成为我国除油菜外第二大油料作物和重要的出口创汇农产品^[1]。近年来,人们为了提高农作物产出,长期大量施用化肥、农药,致使作物根际土壤酶活和微生物群落多样性降低,土壤肥力受损,土壤板结严重^[2-3]。因此,在农业生产活动中,兼顾土壤肥力和作物产量对我国农业的科学高效发展具有重要意义。

土壤微生物在土壤微生态系统中扮演着重要

的角色,是土壤生物区系的关键性功能要素^[4],在参与土壤形成与发育、物质转化和能量传递等过程中发挥重要作用,是评价土壤肥力和健康状况的一个重要指标^[5-6]。土壤微生物群落多样性是维持土壤稳定性、提高土壤生产力和可持续性的基础^[7-9],也是当前微生物生态学及环境科学研究的重点内容之一。研究表明,在土壤局部区域引入外源细菌后,或通过定殖于植物根际形成一定的种群密度^[10-12],或只能在一定时期内存活于植物根际,但却可以通过影响土壤优势种群从而调控

整个根际微生物区系的群落结构^[13]。这些外源微生物的进入在一定程度可通过调控土壤中原有的微生物群落多样性而达到提高土壤肥力、改善土壤质量的作用, 但引入不当也有可能造成土壤微生态失衡^[14]。因此, 综合评价引入外源细菌对植物生长、土壤质量及根际土壤微生物群落多样性的影响非常重要。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是一类重要的微生物菌种资源, 因其能产生芽孢及促生机制的多样性, 在生物肥料和生物农药等领域受到广泛关注。目前对芽孢杆菌的报道主要集中在促生菌株的筛选及促生效果、生防机制等方面^[15-17], 而关于芽孢杆菌菌剂灌根对花生根际土壤微生物群落多样性影响的研究鲜有报道。本课题组在前期研究中, 将从茶树根际分离到的 2 个细菌菌株 HP9 和 HP10 分别鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)及坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*), 初步研究结果显示两株菌具有溶磷能力, 对花生有促生作用^[18]。本研究拟利用两株芽孢杆菌及混合菌株对花生进行灌根, 通过高通量测序技术分析其对花生根际土壤微生物多样性和群落结构的影响, 结合花生幼苗的生长特性以及根际土壤的氮磷钾有效养分变化综合评价该两株菌的促生效应, 为深入探究芽孢杆菌对花生的促生机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及试验样品

供试菌株为 *B. velezensis* HP9 和 *B. firmus* HP10, 由本课题组从贵州省遵义市绥阳县宽阔水自然保护区茶园的茶树根际土壤中分离筛选得到; 供试花生品种为“黔花生 1 号”。

1.2 主要试剂和仪器

NucleoSpin® Soil Kit, Macherey-Nagel 公司; Qubit® dsDNA BR Assay Kit, ThermoFisher 公司; Agencourt AMPure XP Beads, Beckman Coulter 公司。UV-8000 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; Qubit 荧光仪、VS-24SMTI

高速冷冻离心机, Vision Science 公司; MiSeq 测序仪, Illumina 公司。

1.3 供试土壤及试验用盆

试验土壤类型为黄壤, 土壤采集地点位于贵州省贵阳市花溪区养牛村 (E106°39'11", N26°26'57"), 经去除砾石及植物枯枝碎屑后备用。试验用盆高 11.5 cm、盆口直径 12 cm、盆底直径 9 cm。

1.4 菌剂的制备

分别取少量 *B. velezensis* HP9 和 *B. firmus* HP10 的甘油保种液至 LB 培养基中, 180 r/min、30 °C 活化过夜, 翌日转接至新鲜 LB 培养基中继续扩培 24 h, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 后, 弃去上清以无菌水重悬菌体、调节 OD_{600} 值为 1.0, 即为 HP9 和 HP10 菌剂, 混合菌剂是将以上菌悬液按 1:1 体积比混合制成。

1.5 试验设计及样品采集

花生种子经消毒后通过培养皿滤纸法进行萌芽, 待胚芽突破种皮 1 cm 后选取长势一致的种苗移栽至装有 300 g 土壤的育苗盆中, 每盆种植 1 株。盆栽试验设 4 种处理: 空白对照(CK)、*B. velezensis* HP9 灌根处理组、*B. firmus* HP10 灌根处理组、混合菌剂灌根处理组(HP9+HP10), 每种处理设 6 个重复, 共计 24 盆。菌液采用灌根法, 每隔 2 日浇一次, 每次 5 mL, CK 组采用 5 mL 无菌水。所有处理置于日光温室下进行培养, 整个生育期未添加任何营养物质。

30 d 后进行花生植株生长指标测定及其根际土壤取样, 植株采集采用连土掘起法, 根际土壤采集参照 Courchesne 等^[19]方法。相同处理的 6 个重复分为 3 组(2 盆/组), 分别取每组的 2 盆根际土壤等量混合为一份土样, 每个处理采得 3 份土样, 共计 12 份根际土壤样本; 每份土样取 5 g 置于 -80 °C 用于根际土壤总 DNA 提取, 剩余土样用于测定土壤氮磷钾有效养分含量。

1.6 植株生长指标及根际土壤氮、磷、钾有效养分含量测定

花生植株样本地地上部和地下部经清水洗净后,用滤纸吸干表面水分,分别测定植株的茎长、根长和鲜重。

根际土壤氮、磷、钾有效养分含量的测定方法^[20]:碱解氮(alkali-hydrolyzed nitrogen, AN)采用碱解扩散法(GB7849-87),有效磷(available P, AP)采用碳酸氢钠法(NY/T 1121.7-2014),速效钾(available K, AK)采用乙酸铵浸提-火焰分光光度法(NY/T 889-2004)。

1.7 花生根际土壤总 DNA 的提取和 PCR 扩增

根际土壤 DNA 经 DNA Isolate Kit 提取并纯化后,对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区段和真菌 18S rRNA 基因的 ITS1 区段进行 PCR 扩增^[21-22]及测序分析,PCR 扩增以带 Barcode 序列的特异引物进行,细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区段扩增引物为 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3');真菌 18S rRNA 基因 ITS1 区段扩增引物为 ITS5-1737F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS2-2043R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')。

1.8 高通量测序数据处理

采用 Illumina MiSeq 平台对 PCR 扩增获得的 DNA 片段进行双端(paired-end)测序(深圳华大基因科技服务有限公司)。测序下机得到的原始数据经数据过滤,截除质量值低于 20 的 Reads 末端序列,去除接头污染 Reads,去除含 N 的 Reads,去除低复杂度 Reads。然后使用 FLASH (fast length adjustment of short reads, V1.2.11)^[23],利用重叠关系将双末端测序得到的成对 Reads 组装成一条序列,得到高变区 Tags (最小匹配长度为 15 bp,重叠区域允许错配率为 0.1,去除没有 Overlap 关系的 Reads),利用 USEARCH (V7.0.1090)将 Tags 聚类为 OTU,得到 OTU 代表序列后,通过 RDP

classifier (V2.2)软件将 OTU 代表序列与数据库 Greengene_2013_5_99 比对,并进行物种注释,置信度阈值设置为 0.6。

1.9 统计与分析

选择 97% 相似度 OTU 进行多样性指数计算,以 Mothur (V1.30.1)进行 α 多样性分析,利用 R 软件(V3.1.1)绘制物种稀释性曲线图;通过 R 语言中 ade4 包进行主成分分析(principal component analysis, PCA);结合 R 语言相关软件绘制物种群落结构组分图和热图(heatmap);不同处理间花生的幼苗生长指标、根际土壤氮磷钾有效养分含量、微生物多样性指数及物种组成结构差异性通过 SPSS 20.0 进行 One way-ANOVA 方差分析及 Duncan 检验。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌菌剂灌根对花生幼苗生长及其根际土壤氮、磷、钾有效养分的影响

生长指标的测定结果显示(表 1),菌剂灌根对花生幼苗均有不同程度的促进作用(图 1)。HP9、HP10 及 HP9+HP10 三个处理组均显著地促进了幼苗地上部的生长,相较于 CK,HP9 灌根的花生茎长增长 31.03%,其次是混合菌剂灌根组,而 HP10 对根的促生作用最优,较对照增长 23.70%。3 个不同处理均对幼苗鲜重影响显著,尤以混合菌剂灌根处理组表现突出,较对照组增加 120.97%,而 HP9、HP10 灌根的鲜重分别增加 91.28%和 59.30% ($P<0.05$)。

经芽孢杆菌菌剂灌根后,花生根际土壤的碱解氮、有效磷及速效钾含量有不同程度的提高(表 1)。其中,HP9、HP10 及混合菌剂灌根组的碱解氮含量均显著增高($P<0.05$),相比对照分别提高 84.35%、62.18%和 71.38%;而有效磷含量分别提高 21.62%、7.21%和 6.61%,速效钾含量提高 9.57%、3.91%和 0.85%,有效磷和速效钾含量的改变未达显著水平。

表 1 不同处理对花生幼苗生长及根际土壤氮、磷、钾有效养分含量的影响

Table 1 Effects of different treatments on growth of peanut seedlings and available nutrient content of nitrogen, phosphorus and potassium in rhizosphere soil

处理 Treatment	生长指标 Growth index			有效养分 Available nutrients		
	茎长 Stem length (cm)	根长 Root length (cm)	鲜重 Plant weight (g)	碱解氮 AN (mg/kg)	有效磷 AP (mg/kg)	速效钾 AK (mg/kg)
CK	20.95±0.78c	20.25±1.83b	1.72±0.13c	290.00±6.56b	3.33±0.19a	156.67±2.40a
HP9	27.45±0.87a	22.56±1.41ab	3.29±0.18ab	534.33±64.34a	4.05±0.46a	171.67±6.39a
HP10	23.90±0.79b	25.05±1.38a	2.74±0.31b	470.33±20.28a	3.57±0.38a	161.67±10.48a
HP9+HP10	25.77±1.03ab	24.58±0.98ab	3.81±0.32a	497.00±28.29a	3.55±0.10a	158.00±0.55a

注: HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: 对照. 同列不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$).

Note: HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: Control. Different lowercase letters of the same column represent different treatment's significant difference at 0.05 level.

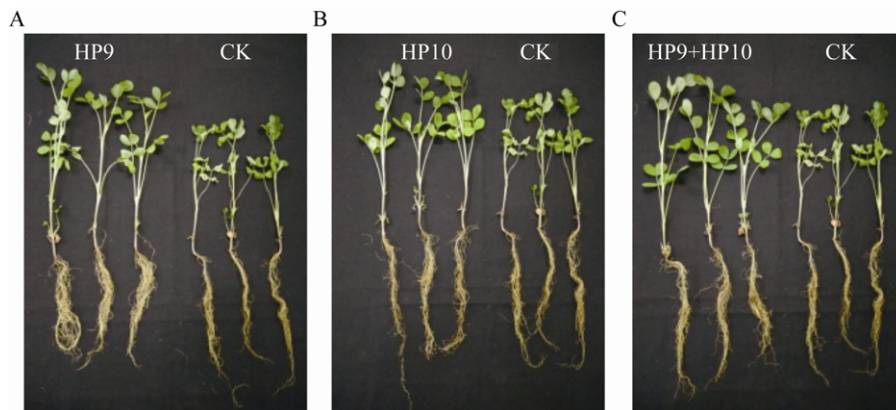


图 1 不同处理对花生幼苗生长的影响

Figure 1 Effects of different treatments on growth of peanut seedlings

Note: A: HP9; B: HP10; C: HP9+HP10. HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: Control.

2.2 花生根际土壤微生物多样性及群落结构

2.2.1 根际土壤测序结果分析

利用高通量测序技术对 12 份土壤样本提取的 DNA 扩增测序并优化后, 共获得高质量的细菌有效序列 722 163 条, 平均每个样本 60 180 条; 真菌有效序列 663 580 条, 平均每个样本 55 298 条。12 份土样在 97% 相似水平下聚类分析共得到 2 842 个细菌 OTU, 1 469 个真菌 OTU, 所有土样的序列稀释曲线逐渐趋于平缓(图 2), 说明该测序深度合理, 能够比较完整地反映出土壤中细菌群落和真菌群落的结构和种类。

2.2.2 根际土壤微生物的 OTU 及 α 多样性分析

对不同实验组 OTU 进行分析, 与对照的 2 033 个 OTU 数相比, 混合菌剂灌根处理组的细菌物种数

增加了 164 个, 而 HP9 和 HP10 处理组则有所降低, OTU 分别为 2 023 和 1 943; 真菌物种数排序为 CK (637) > HP9 (632) > HP9+HP10 (626) > HP10 (610)。主成分分析结果表明, 经芽孢杆菌菌剂灌根的 3 个处理组间, 花生根际土壤细菌及真菌的群落相似性高于对照组(图 3)。在 97% 分类水平下, 对花生根际土壤的微生物群落多样性与相对丰度进行 α 多样性分析(表 2)。Chao1 指数分析结果显示, HP9 单独灌根和混合灌根均略微提高了花生根际土壤细菌和真菌的丰富度; Simpson 指数结果显示灌根处理组提高了根际土壤细菌的物种多样性, 降低了真菌的物种多样性, 混合菌剂灌根处理组表现更明显, 但处理组的多样性指数与对照组相比均未达到差异显著水平($P > 0.05$)。

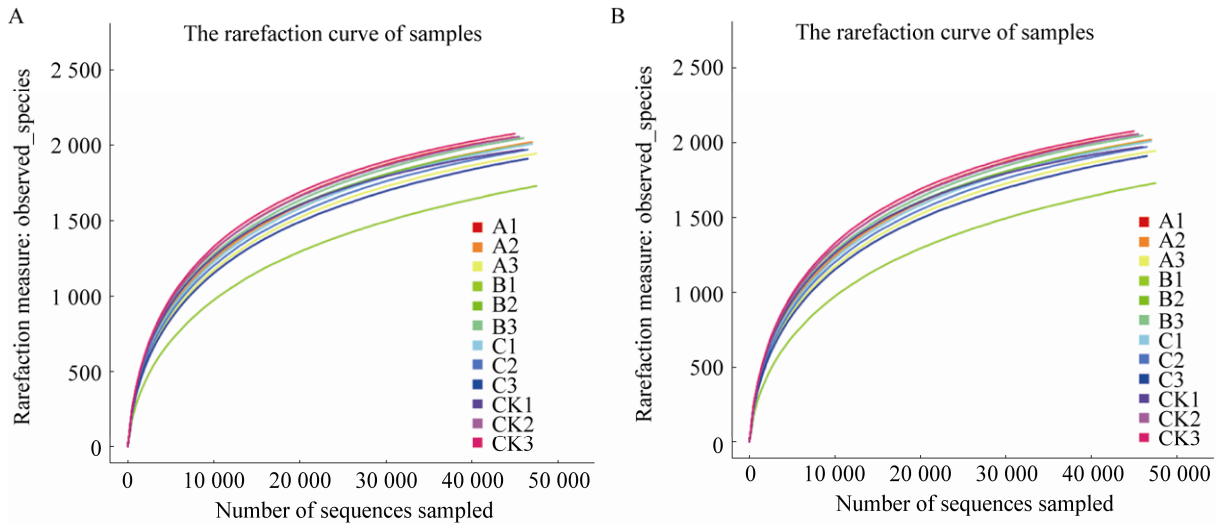


图 2 在 97%相似水平下所有土样所观察到物种数的稀释曲线

Figure 2 Rarefaction curves of the observed species at 97% similarity level for all soil samples

注: A: 细菌; B: 真菌. A1-3: *B. velezensis* HP9; B1-3: *B. firmus* HP10; C1-3: *B. velezensis* HP9+*B. firmus* HP10; CK: 对照; 相同字母后不同数字编号表示 3 个重复.

Note: A: Bacteria; B: Fungi. A1-3: *B. velezensis* HP9; B1-3: *B. firmus* HP10; C1-3: *B. velezensis* HP9+*B. firmus* HP10; CK: Control; The different numbers after the same letter represent 3 repetitions.

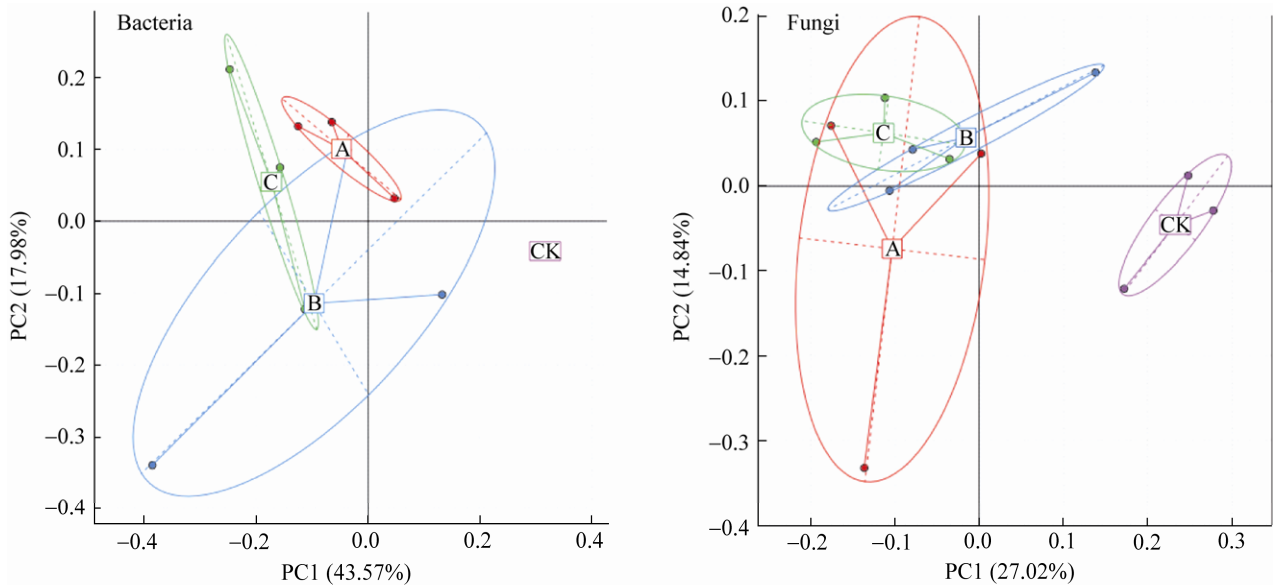


图 3 不同处理花生根际土壤微生物群落的主成分分析

Figure 3 Principal component analysis (PCA) of microbial communities in peanut rhizosphere soil with different treatments

注: A: *B. velezensis* HP9; B: *B. firmus* HP10; C: *B. velezensis* HP9+*B. firmus* HP10; CK: 对照.

Note: A: *B. velezensis* HP9; B: *B. firmus* HP10; C: *B. velezensis* HP9+*B. firmus* HP10; CK: Control.

表 2 不同处理对花生根际土壤微生物 α 多样性指数的影响

Table 2 Effect of different treatments on alpha diversity index of microorganism in peanut rhizosphere soil

处理 Treatment	细菌 Bacteria			真菌 Fungi		
	OTUs	Chao1 index	Simpson index	OTUs	Chao1 index	Simpson index
CK	2 033.67±32.66a	2 286.18±54.59a	0.018±0.001a	636.67±19.34a	676.42±18.34a	0.060±0.005a
HP9	2 022.67±17.05a	2 298.55±32.67a	0.015±0.002a	632.33±12.69a	725.80±20.68a	0.099±0.024a
HP10	1 943.00±81.54a	2 261.21±36.42a	0.016±0.004a	609.67±23.40a	670.91±21.74a	0.100±0.018a
HP9+HP10	2 297.33±338.42a	2 305.40±12.18a	0.014±0.001a	625.67±26.86a	702.30±20.62a	0.100±0.011a

注: HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: 对照. 同列不同小写字母表示差异性显著($P<0.05$).

Note: HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: Control. Different lowercase letters of the same column represent different treatment's significant difference at 0.05 level.

2.2.3 花生根际土壤微生物群落结构特征

将 12 份花生根际土壤样品经聚类分析所获得的 2 842 个细菌 OTU 归属到 27 个门(图 4A), 结果显示酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、TM7、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 和蓝藻门 (*Cyanobacteria*) 等 11 个门为花生根际土壤的优势细菌类群, 约占所有细菌的 97% 以上。12 份花生根际土壤样品经聚类分析所获得的 1 469 个真菌 OTU 归属到 13 个门(图 4B), 包括子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、*Mortierellomycota*、*Calcarisporiellomycota*、尾虫门 (*Cercozoa*)、壶菌门 (*Chytridiomycota*)、虫霉门 (*Entomophthoromycota*)、根肿黑粉菌门 (*Entorrhizomycota*)、梳霉门 (*Kickxellomycota*)、毛霉门 (*Mucoromycota*)、油壶菌门 (*Olpidiomycota*)、隐真菌门 (*Rozellomycota*) 和 GS19; 其中优势真菌类群为子囊菌门、担子菌门和 *Mortierellomycota*, 约占所有真菌的 93.05%–95.58%。

除未分类和相对丰度低于 0.5% 的门之外, 在灌根处理组的花生根际土壤细菌中, 拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门、蓝藻门等类群的相对丰度有不同程度升高, 其中拟杆菌门丰度显著提高 ($P<0.05$); 而酸杆菌门、疣微菌门、放线菌门、绿

弯菌门、浮霉菌门等相对丰度有所降低, 以疣微菌门和浮霉菌门下降最显著 ($P<0.05$)。此外, 混合菌剂灌根处理组中芽单胞菌门和绿弯菌门的相对丰度均显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 5A)。对于真菌而言, 芽孢杆菌菌剂灌根显著提高了 *Mortierellomycota* 的相对丰度 ($P<0.05$), 降低了子囊菌门、担子菌门、油壶菌门和 GS19 的相对丰度, 其中担子菌门和 GS19 的降幅达到显著水平 ($P<0.05$) (图 5B)。

属水平上的物种聚类热图分析显示, 3 个菌剂处理组根际土壤微生物的序列进化关系较对照更近, 而在 3 个处理组间则表现为 HP10 及混合菌剂灌根处理组更近的序列进化关系。具体来说, 细菌如农杆菌属 (*Agrobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、*Pedobacter*、极地单胞菌属 (*Polaromonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*) 和寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 等属的相对丰度在芽孢杆菌菌剂灌根的花生根际土壤中明显升高, 而慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、*Candidatus_Koribacter*、*Candidatus_Solibacter*、*Candidatus_Xiphinematobacter*、DA101 和红游动菌属 (*Rhodoplanes*) 等属则相反; 对于真菌而言, 节丛孢属 (*Arthrobotrys*)、镰孢属 (*Fusarium*)、*Fusicolla*、土赤壳属 (*Ilyonectria*) 和被孢霉属 (*Mortierella*) 等属相比对照有所提高, 鞘孢属 (*Chalara*)、外瓶霉属

(*Exophiala*)、*Geminibasidium*、*Leohumicola*、*Lophiostoma*、枝孢瓶霉属(*Cladophialophora*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)和蜡壳菌属(*Sebacina*)等属的相对丰度在灌根处理组均不同程度降低(图 6)。此外,与对照相比,仅在芽孢杆菌菌剂灌

根的花生根际土壤中检测到 6 个细菌属(表 3),分别为无色杆菌属(*Achromobacter*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、金黄色杆菌属(*Chryseobacterium*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)和鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)。

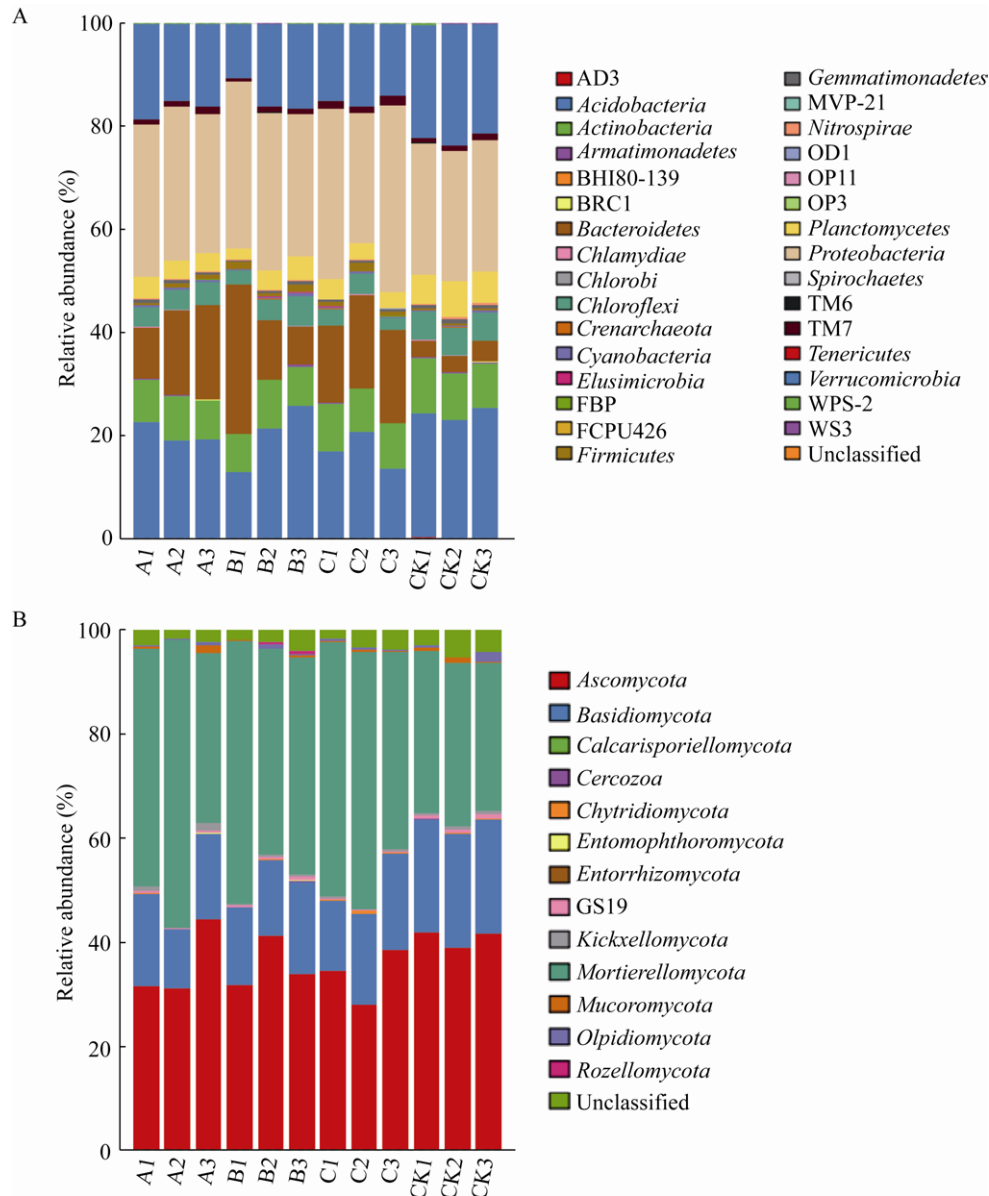


图 4 不同处理对花生根际土壤微生物群落结构的影响

Figure 4 Effects of different treatments on microbial community structure in peanut rhizosphere soil

注: A: 细菌; B: 真菌. A1-3: *B. velezensis* HP9; B1-3: *B. firmus* HP10; C1-3: *B. velezensis* HP9+*B. firmus* HP10; CK: 对照; 相同字母后不同数字编号表示 3 个重复.

Note: A: Bacteria; B: Fungi. A1-3: *B. velezensis* HP9; B1-3: *B. firmus* HP10; C1-3: *B. velezensis* HP9+*B. firmus* HP10; CK: Control; The different numbers after the same letter represent 3 repetitions.

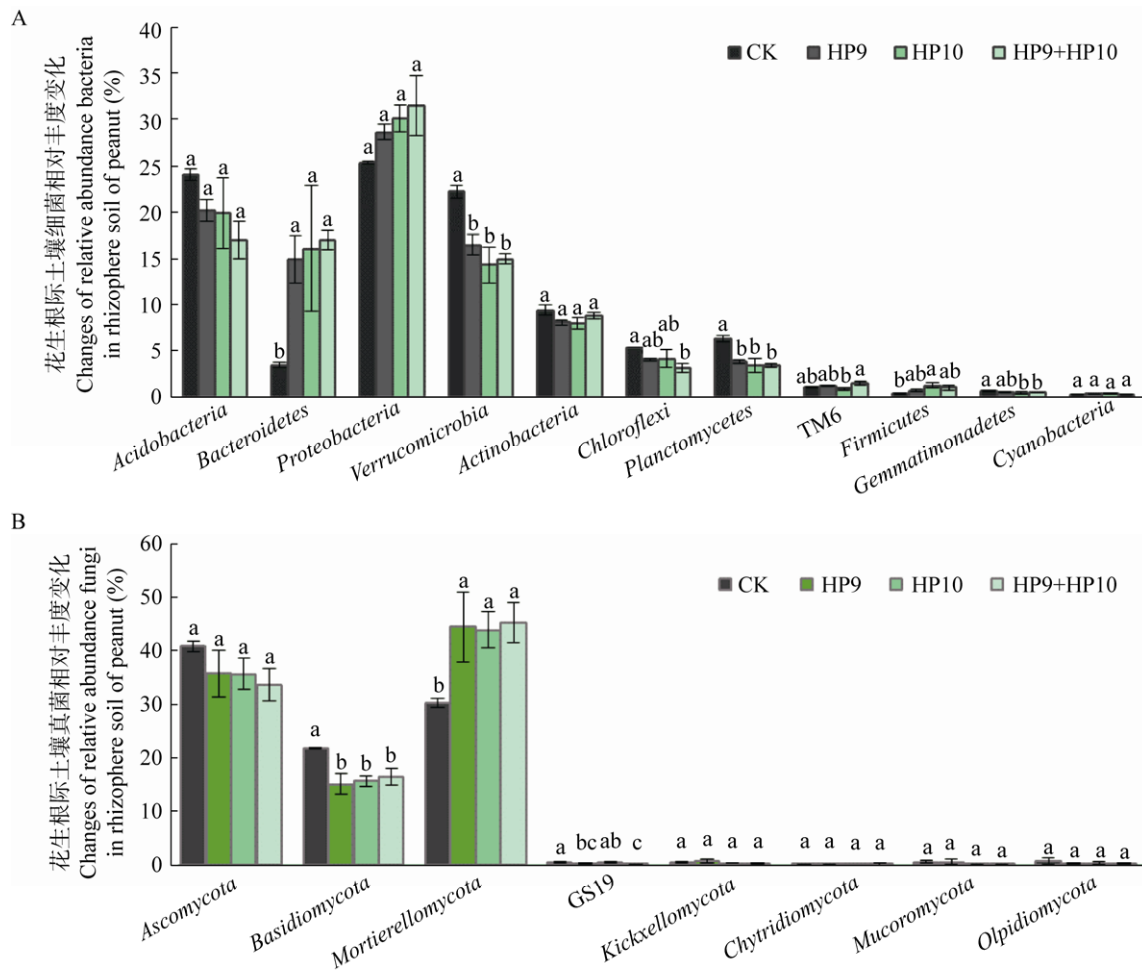


图 5 不同处理对门水平下花生根际土壤微生物(相对丰度>0.5%)的影响

Figure 5 Effect of different treatments on microorganisms (relative abundance>0.5%) in peanut rhizosphere soil at the phylum level

注: A: 细菌; B: 真菌. HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: 对照; 不同小写字母表示不同处理间的差异显著($P<0.05$).

Note: A: Bacteria; B: Fungi. HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: Control; The different lowercases represent different treatment's significant difference at 0.05 level.

3 讨论

本研究利用了 2 个不同种的芽孢杆菌菌株进行花生的灌根实验。贝莱斯芽孢杆菌是 2005 年发现的一个新种, 能通过合成脂肽类物质而产生抗菌活性^[24], 利用该菌的促生研究报道很少。Meng 等发现 *B. velezensis* BAC03 在抑制疮痂链霉菌 (*Streptomyces scabies*) 的同时, 也可通过产生吡啶乙酸、NH₃ 等物质促进胡萝卜、辣椒、甜菜、南瓜、番茄等蔬菜的生长^[25]。本研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌 HP9 菌株还可以促进花生幼苗茎部的明显

伸长及鲜重的显著增加, 对花生表现出明显的促生效应。坚强芽孢杆菌作为促生菌在其他植物上已有报道, 研究发现 *B. firmus* TG-1 通过提高番茄植株的根系还原强度而增强了根系活力, 进而促进番茄根部的生长^[26]; Khan 等利用 *B. firmus* NARS1 对鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)种子涂种处理后, 植株的根部和茎部分别增长了 36.70% 和 10.95%^[27]; 本研究也发现坚强芽孢杆菌 HP10 处理花生对根部的促生效果更显著, 其机制是否相同仍有待于进一步研究。另外, 本研究还发现贝莱

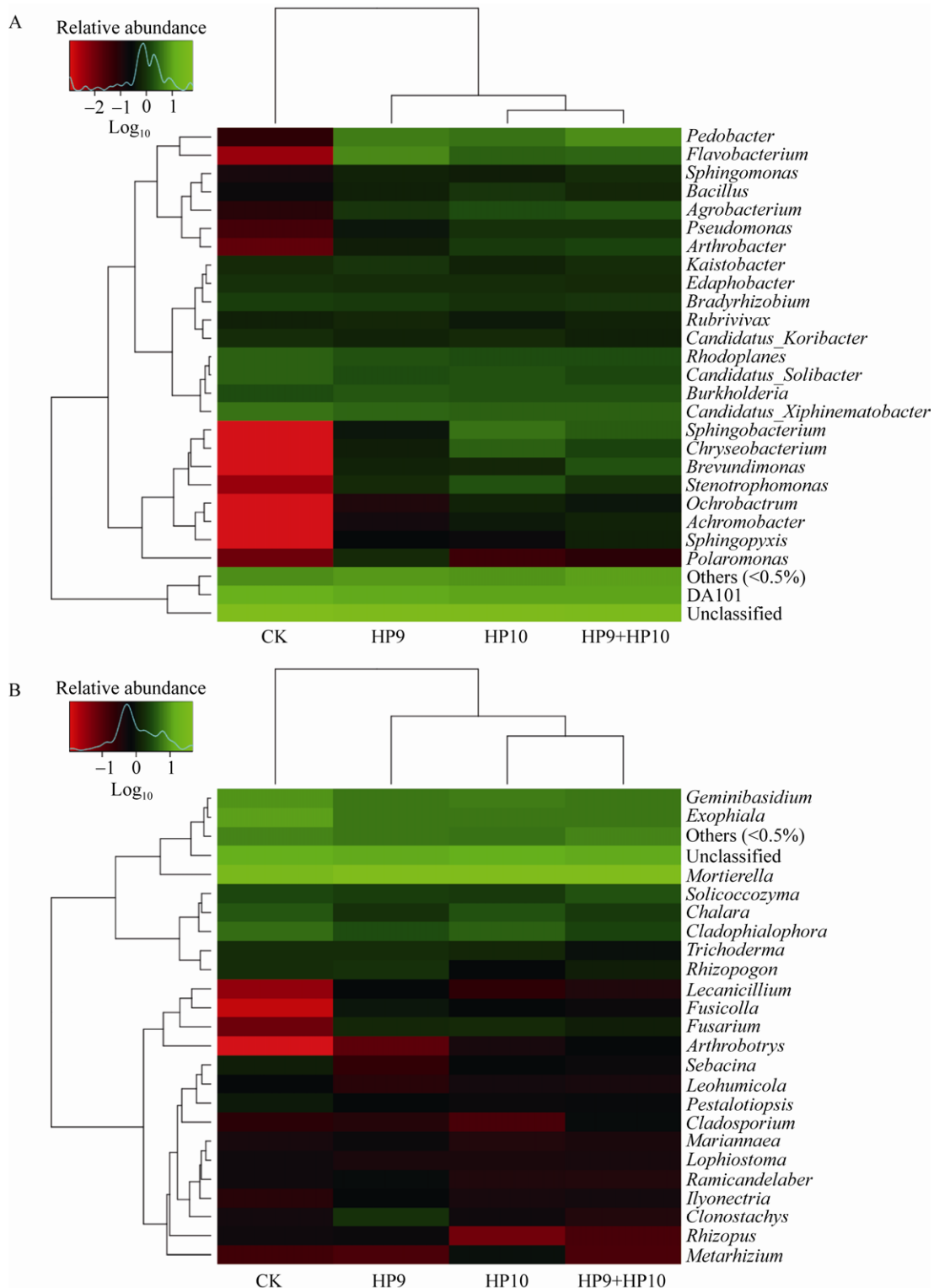


图 6 不同处理花生根际土壤微生物属水平的热图和聚类分析图

Figure 6 Heatmap and cluster relationship of microorganism in peanut rhizosphere soil with different treatments at the genus level

Note: A: Bacteria; B: Fungi. HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10; CK: Control.

表 3 芽孢杆菌灌根处理的花生根际土壤中特有的细菌属(相对丰度, %)

Table 3 The unique genus of bacteria in peanut rhizosphere soil treated with *Bacillus* spp. (relative abundance, %)

处理 Treatment	无色杆菌属 <i>Achromobacter</i>	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	金黄色杆菌属 <i>Chryseobacterium</i>	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>	鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	鞘氨醇盒菌属 <i>Sphingopyxis</i>
HP9	0.157±0.058	0.611±0.147	0.476±0.272	0.109±0.048	0.362±0.061	0.251±0.111
HP10	0.432±0.180	0.662±0.331	2.614±2.309	0.563±0.353	3.581±3.298	0.192±0.130
HP9+HP10	0.603±0.075	1.997±1.077	1.431±0.844	0.399±0.114	2.314±1.724	0.512±0.220

Note: HP9: *B. velezensis* HP9; HP10: *B. firmus* HP10.

斯芽孢杆菌 HP9 和坚强芽孢杆菌 HP10 混合菌剂灌根处理组花生的茎部、根部整体增长更均衡统一, 植株鲜重的增加也最明显, 呈现出一定的协同促生效应。

据报道芽孢杆菌可通过定殖而影响土壤优势菌群, 或可通过分泌抑菌物质以改变土壤微生物的群落结构^[10-12,28]。本研究中, 从 α 多样性指数来看, 处理组与对照组根际土壤细菌和真菌的多样性并无显著差异, 但是主成分分析显示, 与对照相比, 3 个芽孢杆菌灌根处理组间的细菌及真菌的群落结构更为相似。处理组根际土壤的拟杆菌门、变形菌门、TM7、厚壁菌门及蓝藻门的相对丰度均有提高, 这与前人^[29]研究结论基本一致。属水平上, 处理组的根际土壤中如农杆菌属、节杆菌属、芽孢杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、假单胞菌属及鞘脂单胞菌属等功能菌群的相对丰度明显提高; 还检测到有 6 个独有的细菌属, 即无色杆菌属、短波单胞菌属、金黄色杆菌属、苍白杆菌属、鞘氨醇杆菌属和鞘氨醇盒菌属。无色杆菌属^[30]、短波单胞菌属^[31]、苍白杆菌属^[32]和鞘氨醇杆菌属^[33]等被报道具有一定的促生作用。可见, 芽孢杆菌菌株的灌根处理在一定程度上提高了土壤中具促生功能微生物的相对丰度。慢生根瘤菌属在处理组根际土壤中的丰度有所降低, 这是否由于芽孢杆菌灌根的花生已显著提高了根际土壤中的碱解氮含量所致仍有待于进一步研究。对真菌群落结构的影响分析显示, 处理组 *Mortierellomycota* 的相对丰度显著提高, 属水平上的分析表明, 这主要归因于被孢霉属相对丰度的

增加, 作为一群有益的微生物类群, 被孢霉属具有溶磷、提供氮营养以及增强作物抗病性等多种促生作用^[34-35]。此外, 处理组子囊菌门、担子菌门、油壶菌门和 GS19 的相对丰度降低。据报道绝大多数植物病害都是由担子菌门病原菌引起, 如最常见的白粉病、锈病和立枯病等^[36], 担子菌门丰度的降低在一定程度上也使花生感染该门病原菌的可能性下降。

4 结论

本研究利用高通量测序技术、结合土壤氮磷钾有效养分, 综合评价芽孢杆菌菌剂灌根对花生促生作用的影响。研究结果显示, 贝莱斯芽孢杆菌 HP9、坚强芽孢杆菌 HP10 及其混合菌剂灌根后影响了花生根际土壤的微生物群落结构, 拟杆菌门、变形菌门及 *Mortierellomycota* 等丰度提高, 明显增加了农杆菌属、节杆菌属、芽孢杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、假单胞菌属及鞘脂单胞菌属等功能菌群的丰度, 降低了酸杆菌门、疣微菌门、放线菌门、子囊菌门和担子菌门等的丰度, 并检测到无色杆菌属、短波单胞菌属、金黄色杆菌属、苍白杆菌属、鞘氨醇杆菌属和鞘氨醇盒菌属等 6 个特有细菌属。显然, 芽孢杆菌灌根处理后, 具促生功能的微生物菌群明显增多, 导致花生根际土壤有益微生物的活化, 从而提高了根际土壤养分的有效性并促进了花生植株的生长。

REFERENCES

- [1] Shen HY, Xiong HC, Guo XT, et al. A new method of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in peanut plants[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2012, 18(2):

- 518-522 (in Chinese)
申红芸, 熊宏春, 郭笑彤, 等. 一种发根农杆菌介导的花生遗传转化新方法[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(2): 518-522
- [2] Wang CB, Zheng YP, Liang XY, et al. Effects of fertilization on soil fertility indices and yield of dry-land peanut[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(4): 1300-1307 (in Chinese)
王才斌, 郑亚萍, 梁晓艳, 等. 施肥对旱地花生主要土壤肥力指标及产量的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(4): 1300-1307
- [3] Zhao Z, Chen W, Wang H, et al. Effects of bio-manure combined with chemical fertilizer reduced in application rate on soil fertility and yield and quality of tomato[J]. Acta Pedologica Sinica, 2018, 55(5): 1243-1253 (in Chinese)
赵政, 陈巍, 王欢, 等. 木霉微生物肥与减量化肥配施对番茄产量、品质及土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 2018, 55(5): 1243-1253
- [4] Zhao J. Biological monitoring and assessment of soil health[J]. Soils, 2006, 38(2): 136-142 (in Chinese)
赵吉. 土壤健康的生物学监测与评价[J]. 土壤, 2006, 38(2): 136-142
- [5] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, et al. Microbial diversity and soil functions[J]. European Journal of Soil Science, 2003, 54(4): 655-670
- [6] Romaniuk R, Giuffrè L, Costantini A, et al. A comparison of indexing methods to evaluate quality of soils: the role of soil microbiological properties[J]. Soil Research, 2011, 49(8): 733-741
- [7] Giller D, Shaulov A, Prozorov R, et al. Disorder-induced transition to entangled vortex solid in Nd-Ce-Cu-O crystal[J]. Physical Review Letters, 1997, 79(13): 2542-2545
- [8] Zhang ZY, Chen H, Yang YH, et al. Effects of continuous cropping on bacterial community diversity in rhizosphere soil of *Rehmannia glutinosa*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(11): 2843-2848 (in Chinese)
张重义, 陈慧, 杨艳会, 等. 连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2843-2848
- [9] de Feudis M, Cardelli V, Massaccesi L, et al. Altitude affects the quality of the water-extractable organic matter (WEOM) from rhizosphere and bulk soil in European beech forests[J]. Geoderma, 2017, 302: 6-13
- [10] Holl FB, Chanway CP. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(4): 303-308
- [11] Hatzinger PB, Alexander M. Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa[J]. Plant and Soil, 1994, 158(2): 211-222
- [12] Kang YJ, Shen M, Wang HL, et al. Effects of two plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on yardlong bean early seedlings growth and indigenous soil bacterial community[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(8): 1537-1543 (in Chinese)
康贻军, 沈敏, 王欢莉, 等. 两株 PGPR 对豇豆苗期生长及土著细菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(8): 1537-1543
- [13] Buddrus-Schiemann K, Schmid M, Schreiner K, et al. Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(2): 381-393
- [14] Han T, Zhang LM, Gao JM, et al. Correlation between root irrigation of *Bacillus subtilis* Tpb55 and variation of bacterial diversity in tobacco rhizosphere[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(5): 835-845 (in Chinese)
韩腾, 张立猛, 高加明, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Tpb55 灌根与烟草根围细菌多样性变化的相关性[J]. 微生物学报, 2016, 56(5): 835-845
- [15] Tao J, Li H, Li C. Growth-promotion and disease control effect of combination BCL-8 on tomato and growth-promotion mechanism[J]. Plant Protection, 2010, 36(1): 87-91 (in Chinese)
陶晶, 李晖, 李春. 芽孢杆菌组合 BCL-8 对番茄的促生防病效果及其促生机制初探[J]. 植物保护, 2010, 36(1): 87-91
- [16] Zhang DY, Liu Y, Wu Y, et al. Isolation and identification of IAA-producing strains from peanut rhizosphere and its promoting effects on peanut growth[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(1): 104-110 (in Chinese)
张东艳, 刘晔, 吴越, 等. 花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(1): 104-110
- [17] Li YM, Wang QY, Tu WG, et al. Growth promoting activity of siderophore secreting bacteria for peanut plant under nickel stress[J]. Microbiology China, 2017, 44(8): 1882-1890 (in Chinese)
李艳梅, 王琼瑶, 涂卫国, 等. 镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1882-1890
- [18] Han LZ, Zhou J, Wang H. Identification and phosphorus-dissolving characteristics of two *Bacillus* strains promoted on peanut growth[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(9): 4066-4076 (in Chinese)
韩丽珍, 周静, 王欢. 两株对花生促生的芽孢杆菌的鉴定及溶磷特性研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(9): 4066-4076
- [19] Courchesne F, Gobran GR. Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand[J]. Soil Science Society of America Journal, 1997, 61(4): 1245-1249
- [20] Yin BZ, Zhen WC, Guo LG. The soil ecological-environment characteristics in wheat growing season under different tillage treatments in Haihe lowland plain[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2015, 29(1): 186-194 (in Chinese)
尹宝重, 甄文超, 郭丽果. 海河低平原不同耕作方式下麦田土壤生态环境特征[J]. 水土保持学报, 2015, 29(1):

- 186-194
- [21] Yu HT, Zhou ZX, Lu WQ. Microbial diversity of soybean meal hydrolysate treated by keratinase[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 729-740 (in Chinese)
于海涛, 周智旋, 陆文清. 角蛋白酶水解豆粕的微生物多样性分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 729-740
- [22] Schmidt V, Plenz B, Pfaff M, et al. Disseminated systemic mycosis in Veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) caused by *Chamaeleomyces granulomatis*[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 161(1/2): 145-152
- [23] Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform[J]. Microbiome, 2014, 2(1): 6
- [24] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195
- [25] Meng QX, Jiang H, Hao JJ. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth[J]. Biological Control, 2016, 98: 18-26
- [26] Liu T. A study on the colonization and promoting plant growth of tomato endophytic *Bacillus* in Xi'ning area[D]. Xi'ning: Master's Thesis of Qinghai Normal University, 2010 (in Chinese)
刘涛. 西宁地区番茄内生芽孢杆菌定殖规律及促生效应的研究[D]. 西宁: 青海师范大学硕士学位论文, 2010
- [27] Khan M, Patel CB. Plant growth promoting effect of *Bacillus firmus* strain NARS1 isolated from Central Himalayan region of India on *Cicer arietinum* at low temperature[A]//Proceedings of the 8th African Crop Science Society Conference[C]. El-Minia, Egypt: African Crop Science Society, 2007
- [28] Cheng HB, Chen W, Gu ZR, et al. Influence of nutritional additives on propagation and production of antifungal substance of *Bacillus subtilis* G3^{str} in soil[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(2): 142-145 (in Chinese)
程洪斌, 陈伟, 顾真荣, 等. 营养添加剂对枯草芽孢杆菌 G3^{str} 在土壤中繁殖及其抑菌物质分泌能力的影响[J]. 中国生物防治, 2006, 22(2): 142-145
- [29] He GQ, Chen SF. Influence of nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacterial agents on bacterial community in wheat rhizosphere soil[J]. Journal of China Agricultural University, 2015, 20(5): 81-88 (in Chinese)
贺国强, 陈三凤. 固氮、解磷复合菌剂对小麦根际土壤细菌群落的影响[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(5): 81-88
- [30] Sheng H, Wang DD, Li HC, et al. Community diversity of bacteria producing ACC deaminase in rhizosphere of wheat[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2017, 45(6): 89-95 (in Chinese)
盛浩, 汪丹丹, 李海超, 等. 小麦根际产 ACC 脱氨酶细菌种群的多样性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2017, 45(6): 89-95
- [31] Tong WJ, Zhang L, Xue QY, et al. Isolation of endophytic bacteria in *Dendrobium loddigesii* collected from different locations and comparison on their plant-growth-promoting potential[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2014, 23(1): 16-23 (in Chinese)
童文君, 张礼, 薛庆云, 等. 不同产地美花石斛内生细菌分离及促生潜力比较[J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(1): 16-23
- [32] Cui XS, Wang W, Zhang R, et al. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria based on rhizosphere nutrition competitiveness and investigation of their promoting effects[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(6): 958-966 (in Chinese)
崔晓双, 王伟, 张如, 等. 基于根际营养竞争的植物根际促生菌的筛选及促生效应研究[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(6): 958-966
- [33] Ji WX, Li HL, Leng X, et al. Isolation and promoting growth properties of endophytic bacteria producing ACC deaminase of *Panax ginseng*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2019, 41(2): 168-174 (in Chinese)
姬文秀, 李虎林, 冷雪, 等. 产 ACC 脱氨酶人参内生细菌的分离和促生特性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(2): 168-174
- [34] Zhang HS, Wu XH, Li G, et al. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 543
- [35] Liao XG, Fang WG, Lin LC, et al. *Metarhizium robertsii* produces an extracellular invertase (MrINV) that plays a pivotal role in rhizospheric interactions and root colonization[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e78118
- [36] Sheikhezati Issa. Urumqi, korla and Ili ornamental plant fungi disease investigation[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2016 (in Chinese)
谢海尔扎提·艾萨. 乌鲁木齐、库尔勒和伊犁园林观赏植物真菌病害调查[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2016