



## 研究报告

## 丛枝菌根真菌和根瘤菌互作对苜蓿根际土壤细菌群落结构的影响及 PICRUSt 功能预测分析

杨盼<sup>1</sup> 翟亚萍<sup>1</sup> 赵祥<sup>1</sup> 王绍明<sup>1</sup> 刘红玲<sup>2</sup> 张霞<sup>\*1</sup>

1 石河子大学生命科学学院 新疆 石河子 832000

2 成都师范学院 四川 成都 611130

**摘要:**【背景】紫花苜蓿是优良的豆科牧草，可以与丛枝菌根(*Arbuscular mycorrhizae*, AM)真菌和根瘤菌形成共生关系，接种 AM 真菌和根瘤菌可以促进土壤氮、磷循环以及提高苜蓿产量。【目的】探究接种 AM 真菌和根瘤菌对苜蓿根际细菌群落结构和功能的影响。【方法】采集 6 个不同处理组苜蓿根际、非根际土壤样品，基于细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行高通量测序，分析比较不同处理组苜蓿根际、非根际土壤中细菌群落分布的规律，并采用 PICRUSt 软件对不同处理组间菌群功能进行预测。【结果】36 个土壤样品中共检测到 3 849 个 OTU，分属于 50 门 59 纲 132 目 249 科 595 属 398 种。其中主要的优势菌门为 *Proteobacteria* (52.81%–81.46%)、*Bacteroidetes* (7.83%–19.68%) 及 *Actinobacteria* (2.21%–16.4%)。与不接种相比，接种根内球囊霉和摩西球囊霉分别提高了 *Gammaproteobacteria* 和 *Bacteroidia* 有益菌的丰度，接种根瘤菌提高了固氮菌(*Alphaproteobacteria*)的丰度。PICRUSt 功能预测表明，细菌菌群共有 35 个子功能，菌群功能丰富，代谢为最主要的功能，并且接种根瘤菌可增加氨基酸代谢，从而有利于植株 N 素循环，而接种 AM 真菌可能对于 N 循环有一定的抑制作用，相比于单接种 AM 真菌，双接种 AM 真菌和根瘤菌处理组碳水化合物代谢更强，从而更有益于植株的氮、磷循环。【结论】接种 AM 真菌和根瘤菌可分别提高苜蓿根系与氮、磷循环有关的不同有益菌的丰度，从而更有益于植株的氮、磷循环，该结果为提高植株养分吸收、提高苜蓿产量以及菌肥开发利用提供了科学依据。

**关键词:** 苜蓿，高通量测序，细菌多样性，细菌群落结构，细菌功能预测

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31560656, 31871568)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-993-2058500; E-mail: xiazh@shzu.edu.cn

**Received:** 24-11-2019; **Accepted:** 28-01-2020; **Published online:** 24-02-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31560656, 31871568)

**\*通信作者:** Tel: 0993-2058500; E-mail: xiazh@shzu.edu.cn

收稿日期: 2019-11-24; 接受日期: 2020-01-28; 网络首发日期: 2020-02-24

## Effect of interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* on *Medicago sativa* rhizosphere soil bacterial community structure and PICRUSt functional prediction

YANG Pan<sup>1</sup> ZHAI Ya-Ping<sup>1</sup> ZHAO Xiang<sup>1</sup> WANG Shao-Ming<sup>1</sup> LIU Hong-Ling<sup>2</sup>  
ZHANG Xia<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China

2 Chengdu Normal University, Chengdu, Sichuan 611130, China

**Abstract:** [Background] *Medicago sativa* is excellent leguminous forage that can reciprocate with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and rhizobium. Inoculation of AM fungi and rhizobium can promote soil nitrogen and phosphorus cycling and increase alfalfa yield. [Objective] To study the effects of AM fungi and *Rhizobium* on the structure and function of rhizosphere bacterial community. [Methods] Rhizosphere and non-rhizosphere soil samples of six different treatment groups were collected, based on the high-throughput sequencing technology of bacterial 16S rRNA gene V3–V4 region. The bacterial diversity and community distribution in the rhizosphere and non-rhizosphere soils of different inoculation treatment groups were analyzed and compared. PICRUSt software was applied to predict the function of bacterial microbiota between different treatment groups. [Results] A total of 3 849 OTU were obtained from 36 soil samples, belonging to 398 species of 50 divisions, 59 classes, 132 orders, 249 families and 595 genera. The main dominant bacteria were *Proteobacteria* (66.79%, 52.81%–81.46%), *Bacteroidetes* (7.83%–19.68%) and *Actinobacteria* (2.21%–16.40%). Compared with no inoculation, the inoculation treatment of *Glomus intraradices* and *G. mosseae* increased the beneficial bacteria of *Gammaproteobacteria* and *Bacteroidia*, inoculation with *Rhizobium* increased the abundance of the nitrogen-fixing bacteria *Alphaproteobacteria*. PICRUSt function prediction analysis indicated that the bacterial microbiota had a total of 35 sub-functions. Inoculation with rhizobium can increase amino acid metabolism, which is conducive to plant N-nutrient cycle, and inoculation with AM fungi may have a certain inhibitory effect on N-cycle. Compared with single inoculation with AM fungi, double inoculation with AM fungi and rhizobium treatment group had stronger carbohydrate metabolism, which was more beneficial to plant nitrogen and phosphorus cycle. [Conclusion] The inoculation with AM fungi and rhizobium can increase the abundance of different beneficial bacteria related to nitrogen and phosphorus cycle in alfalfa, the results provide a scientific basis for plant nutrient uptake, the increase of alfalfa yield and the development and utilization of bacterial fertilizer.

**Keywords:** *Medicago sativa*, High-throughput sequencing, Bacterial diversity, Bacterial community structure, Bacterial function prediction

苜蓿(*Medicago sativa*)为多年生豆科牧草,具有产量高、适应性强、抗旱耐盐碱、家畜适口性好等特点,被称为“牧草之王”<sup>[1]</sup>。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是通过与寄主植物形成“菌根”结构,从而与寄主植物建立共生关系的有益微生物<sup>[2]</sup>,AM真菌和植物共生可以使AM真菌的根外菌丝逐渐向周围伸展,显著扩大了根系的吸收面积与结构<sup>[3]</sup>,从而提高植物根系对土

壤中所需理化物质的吸收。根瘤菌是革兰氏阴性细菌,在土壤中广泛分布,通过侵染豆科植物根部与该植物共生形成根瘤结构,从而增加植物根部对氮素的吸收<sup>[4]</sup>。目前,有研究发现豆科作物接种AMF和根瘤菌具有协同促进作用<sup>[5]</sup>,而且研究发现,无论单接种AM真菌、根瘤菌或二者混合接种,均可以促进植物养分吸收、提高抗逆性(如抗病性)<sup>[6-8]</sup>、改良土壤结构<sup>[9]</sup>、提高难溶性养分的溶解

度等,从而对苜蓿产量提高有显著促进作用。

土壤微生物对植被的生长发育及产量有重要影响,是植物和土壤连接的媒介,其中数量最大、分布最广的就是细菌。细菌对于土壤的氮磷循环、养分吸收等过程,以及对土壤生态系统的稳定、土壤肥力的保存具有至关重要的作用<sup>[10]</sup>。接种 AM 真菌和根瘤菌后必然会对苜蓿土壤微生物群落组成与结构产生一定的影响,因此,研究接种 AM 真菌和根瘤菌后土壤细菌的群落结构和多样性,对于阐明接种 AM 真菌和根瘤菌后对植物促进作用的机理具有重要意义。

随着测序技术的发展,具有高通量、高准确度和低成本优势的高通量测序技术已广泛应用于根际微生物的研究中,现已成为研究环境微生物多样性及群落结构差异的重要手段<sup>[11-14]</sup>。相比于传统的测序技术,高通量测序技术可以更为真实全面地反映微生物群落组成的多样性。本研究通过高通量测序技术研究不同接种处理组土壤微生物的群落组成和多样性,以期了解接种 AM 真菌和根瘤菌影响了哪些关键菌群,及其在苜蓿生长过程中发挥的作用,并结合 PICRUST 预测分析不同接种处理土壤微生物功能的变化,从而为接种 AM 真菌和根瘤菌促进植株养分吸收、提高抗逆性、促进苜蓿产量提高等提供微生物方面的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试紫花苜蓿种子,产地新疆自治区石河子市。挑选大小一致、饱满的种子,经质量分数为 10%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 10 min 后用无菌水冲洗 5 遍,将苜蓿种子浸泡在少量无菌水中催芽过夜。

供试 AM 真菌:摩西球囊霉(*Glomus mosseae*, G.m)和根内球囊霉(*Glomus intraradices*, G.i)由青岛农业大学菌根生物技术研究所刘润进教授提供。根瘤菌选用苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*),由石河子大学农学院提供。

以土壤:沙:蛭石按 5:3:2 的体积比混匀的混合

土壤作为供试土壤。分别将土壤、沙、蛭石经 1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 2 h,自然冷却后再次灭菌 2 h。盆栽容器为 17×11×15 cm (盆口直径×盆底直径×高)规格的塑料盆,盆经过 0.2%高锰酸钾浸泡过夜,用无菌水冲洗风干备用。

主要试剂和仪器:Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer, New England Biolabs 公司; Gene JET<sup>™</sup> Gel Extraction Kit, Thermo Scientific 公司; Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns, Thermo Fisher 公司。Ion S5TMXL 仪器, Thermo Fisher 公司;智能光照培养箱,浙江托普云农科技股份有限公司。

### 1.2 试 验 方 法

#### 1.2.1 室内幼苗培养

实验设置 6 个接种处理组:(1)单独接种摩西球囊霉(G.m);(2)单独接种根内球囊霉(G.i);(3)单独接种根瘤菌(K);(4)双接种摩西球囊霉和根瘤菌(G.m-K);(5)双接种根内球囊霉和根瘤菌(G.i-K);(6)不接种(CK)。

挑选已经发芽的种子进行播种,每盆装入 4 kg 混合灭菌土。接种方法为:AM 真菌接种与播种同步进行,以含有 AM 真菌孢子、菌丝以及寄主植物根段的混合物土壤作为接种菌剂,均匀撒于种子下约 2 cm 处,每盆穴播苜蓿种子 20 粒,菌剂 20 g,不接种和单独接种根瘤菌处理则添加等量灭活菌剂;根瘤菌接种前需对根瘤菌进行活化和培养,配制成菌悬液(根瘤菌数约 10<sup>9</sup> CFU/mL),在间苗后采用注射器进行根灌接种,接种量为 8 mL,不接种和单接种 AM 真菌则注射 8 mL 无菌水;AM 真菌与根瘤菌双接种时,先进行 AM 真菌接种以及播种覆土,待间苗后进行根瘤菌接种,方法同根瘤菌的单接种,每种处理 5 组重复,待幼苗生长 7 d 后间苗,每盆留下 10 株长势一致且粗壮的幼苗。盆栽前期 50 d 内使用智能光照培养箱进行培养,培养箱设置为白天 28 °C 16 h,光照强度为最大光强的 80%,夜晚(黑暗) 23 °C 8 h。盆栽后期 50-60 d 转移到室内培养,室内培养条件为白天 25-33 °C,

夜晚 20–25 °C。

### 1.2.2 室外幼苗的移栽

2018年5月4日于新疆石河子市147团苜蓿大田采集距地面5–30 cm的土壤,取部分土壤自然风干后检测土壤性质,土壤概况为pH 7.9、含水率8.35%、全氮0.57 g/kg、全磷0.31 g/kg、全钾30.89 g/kg、碱解氮32.47 mg/kg、有效磷26.23 mg/kg、速效钾496.96 mg/kg、有机质29.22 g/kg。将带回实验室的剩余土壤分装后经 $1 \times 10^5$  Pa高压灭菌2 h,自然冷却备用。苜蓿幼苗移栽后在石河子大学试验地培养(86°05'72"E, 44°30'29"N, 404 m),该区气候较为干燥,年降雨量约125–208 mm,年平均气温7.2 °C,属典型大陆性干旱气候。幼苗移栽前将70×70×70 cm(长×宽×高)的定制玻璃缸埋入土壤中50 cm深,以保持缸内与缸外土壤温度一致,用酒精擦拭玻璃缸内侧除菌,将灭菌土壤倒入玻璃缸中,每个玻璃缸内装入60×70×70 cm灭菌土,试验设置6组处理。

2018年6月28日,对室内培养60 d的紫花苜蓿进行接种效应分析,确保苜蓿根系被AM真菌或根瘤菌侵染后,将室内培养的紫花苜蓿移栽至室外缸内,每个玻璃缸内移栽30株长势一致的苜蓿,行距12 cm,移栽工作在1 d内完成。室外生长期间,初次浇水要浇透土壤,接下来每2周浇灌一次,采用均匀洒水的方式在每个缸中浇入等量无菌水6 L。

### 1.2.3 样品的采集

于2018年9月30日在石河子大学试验地分别采集6个处理组CK、G.m、G.i、K、G.m-K、G.i-K根际(记为CKTR、GMR、GIR、KR、GMKR、GIKR)及非根际土壤(记为CKTB、GMB、GIB、KB、GMKB、GIKB)。采集根际土样时,采用“抖根法”,首先将植物根部上结合松散的土壤抖掉,再拿小刷子刷下根部0–4 mm范围内的土壤作为根际土壤,在采集根际土旁选取没有苜蓿生长的地方采集同等深度的土壤作为非根际土壤。土壤采集后放入冰盒带回实验室,保存于–80 °C冰箱备用。

### 1.2.4 细菌16S rRNA基因高通量测序

试验采用CTAB法提取各组土壤基因组DNA,并通过琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度和纯度。分别将每组样品提取的DNA放入不同的离心管,并用无菌水稀释至1 ng/ $\mu$ L。以稀释后的DNA为模板,对16S rRNA基因的V3–V4区片段进行PCR扩增,扩增过程使用带有Barcode的特异引物515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR反应体系:2×Phusion Master Mix 15  $\mu$ L,515F、806R(2  $\mu$ mol/L)各3  $\mu$ L,基因组DNA(1 ng/ $\mu$ L)7  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L。PCR反应条件:98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30个循环;72 °C 5 min; 4 °C保存。将扩增产物通过琼脂糖凝胶回收、纯化洗脱后用琼脂糖电泳进行检测。将PCR产物使用ThermoFisher的Ion S5™ XL平台进行高通量测序。完成测序后,将测定的序列剪切优化后以97%的序列一致性将序列聚类为操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)。根据OTU聚类,统计分析其各个分类水平上的群落结构和组成,并使用PICRUSt软件进行基因功能预测,根据功能分类丰度,绘制功能丰度热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌群落结构分析

对12组36个土壤样品进行16S rRNA基因高通量测序,得到了2 880 072个Raw reads,经序列过滤和去除嵌合体序列,最后得到的优质序列共2 720 025条,平均长度为418.42 bp。以97%的相似度划分,得到3 849个OTU。12组土壤样品的细菌覆盖率为99.5%–99.6%,说明取样合理,所测结果能够较为真实地反映不同处理组紫花苜蓿土壤中的细菌群落。

36个苜蓿土壤样品的3 849个OTU分属于50门59纲132目249科595属398种。由图1可知,在不同处理组中,相对丰度较高的细菌门分别为Proteobacteria(52.81%–81.46%)、Bacteroidetes

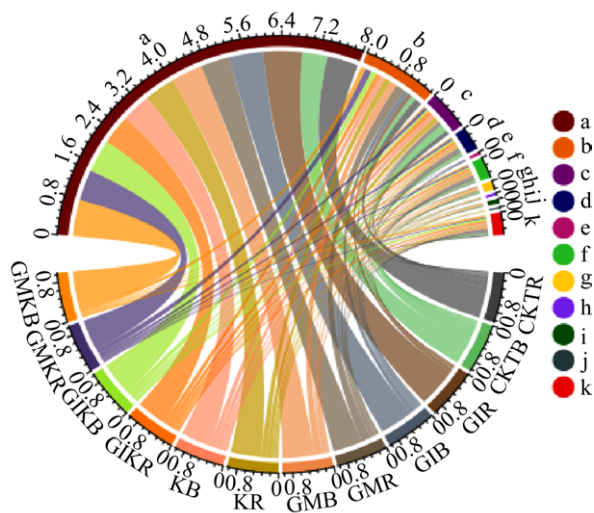


图 1 不同接种处理下苜蓿土壤细菌门水平的相对丰度弦图

Figure 1 Relative abundance chord diagram of soil bacterial at division level under different inoculation treatments

注: a: 变形菌门; b: 拟杆菌门; c: 放线菌门; d: 厚壁菌门; e: 梭杆菌门; f: 芽单胞菌门; g: 酸杆菌门; h: Unidentified\_Bacteria; i: 疣微菌门; j: *Berkelbacteria*; k: 稀有细菌类群。

Note: a: *Proteobacteria*; b: *Bacteroidetes*; c: *Actinobacteria*; d: *Firmicutes*; e: *Fusobacteria*; f: *Gemmatimonadetes*; g: *Acidobacteria*; h: Unidentified\_Bacteria; i: *Verrucomicrobia*; j: *Berkelbacteria*; k: Others.

(7.83%–19.68%)、*Actinobacteria* (2.21%–16.4%)、*Firmicutes* (1.22%–7.31%)、*Gemmatimonadetes* (2.01%–5.43%)、*Acidobacteria* (0.61%–2.14%)、*Verrucomicrobia* (0.40%–1.02%)、Unidentified\_

*Bacteria* (0.12%–0.90%)、*Fusobacteria* (0.01%–3.93%)和 *Berkelbacteria* (0.02%–1.06%)。在门水平上, *Proteobacteria* 占绝对优势。

研究共检测到细菌 59 纲, 丰度较高的纲分别为 *Gammaproteobacteria* (39.2%–69.19%)、*Bacteroidia* (7.5%–19.53%)、*Alphaproteobacteria* (7.17%–16.74%)、*Bacilli* (0.85%–6.72%)、*Acidimicrobiia* (0.69%–3.63%)、*Clostridia* (0.31%–2.73%) 和 *Fusobacteriia* (0.02%–3.92%)。由图 2 可以得知, *Gammaproteobacteria* 是在纲水平占绝对优势的细菌类群, 隶属于变形菌门。相较于不接种组, *Gammaproteobacteria* 丰度在 GIR 和 GMKR 处理组中分别增加了 42.93%和 10.79%, 在 GIKR 处理组降低了 1.97%。*Bacteroidia* 丰度在 GMR 处理组中增加了 25.8%, 而且除了 KR 处理组, *Alphaproteobacteria* 在其他接种处理组均显著降低( $P<0.05$ )。

## 2.2 细菌群落间相似性分析

试验通过高通量测序在 6 个不同处理组共检测到 595 属, 其中优势细菌属(丰度>1%)为 *Stenotrophomonas*、*Lysobacter*、*Pontibacter*、*Bacillus*、*Sphingomonas*、*Rheinheimera* 及 *Cellvibrio*, 其中 *Stenotrophomonas* 为占绝对优势的菌属。为了研究不同接种处理组在属水平的组成差异, 绘制了各属的相对丰度热图(图 3)。

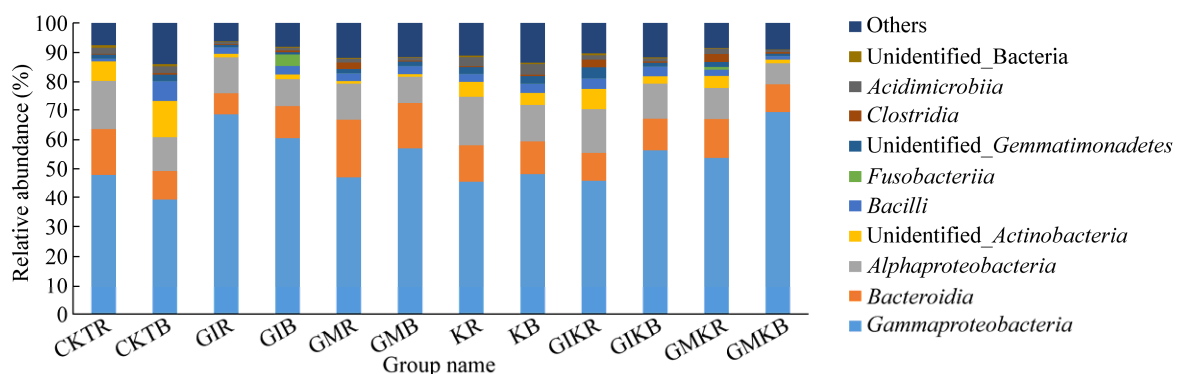


图 2 不同接种处理下苜蓿土壤纲水平细菌菌群组成

Figure 2 Relative abundance chord diagram of soil bacterial at class level under different inoculation treatments

注: Unidentified: 分类地位不明确的细菌类群; Others: 稀有细菌类群。

Note: Unidentified: Bacterial sequences that were not identified into anyone in databases; Others: Rare groups.

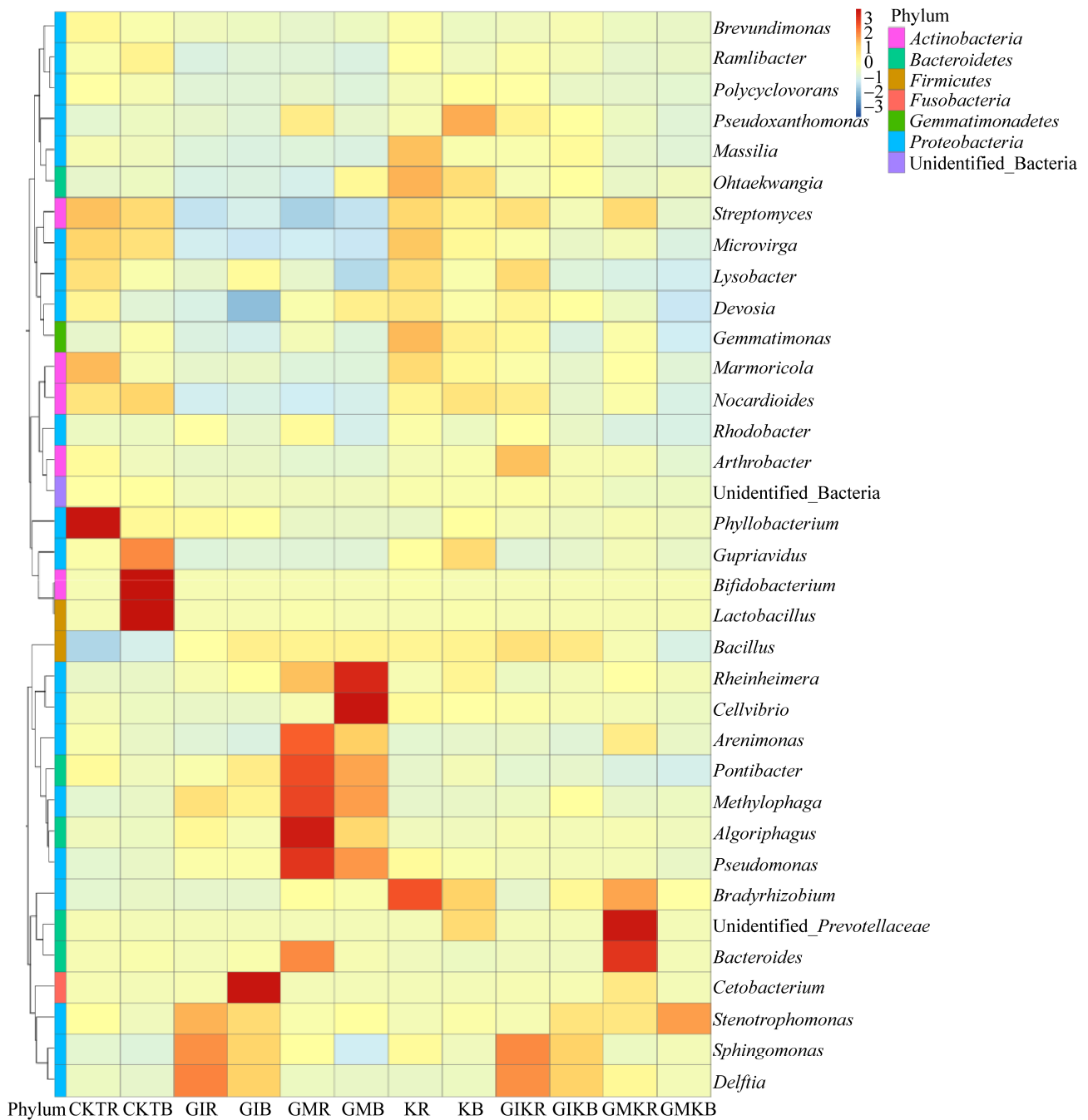


图 3 不同接种处理下苜蓿土壤细菌属水平丰度热图  
**Figure 3 Abundance heat map of bacterial at genus level under different inoculation treatments**

由图 3 可知, CKTR 处理组中丰度较大的属有 *Phyllobacterium*、*Brevundimonas* 及 *Marmoricola*, CKTB 处理组中 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 丰度较高, GIR 处理组中丰度较大的属有 *Stenotrophomonas*、*Sphingomonas* 及 *Delftia*, 而且

*Sphingomonas* 和 *Delftia* 两属在 GIB、GIKR、GIKB 处理组中丰度也较大,但在其他组细菌群落中显著降低甚至消失;在 GIB 处理组中丰度较大的属有 *Cetobacterium*, GMR 处理组中丰度较大的属有 *Algoriphagus*、*Pseudomonas*、*Pontibacter*、

*Arenimonas* 及 *Methylophage*, GMB 处理组中丰度较大的属有 *Rheinheimera* 和 *Cellvibrio*, KR 处理组中 *Massilia*、*Gemmatimonas* 及 *Bradyrhizobium* 丰度较大, KB 处理组中 *Pseudomonas* 丰度较大, GIKR 处理组中 *Arthrobacter*、*Unidentified\_Lachnospiraceae* 及 *Faecalibacterium* 丰度较大, GIKB 处理组中 *Pedobacter* 丰度较大, GMKR 处理组中 *Unidentified\_Prevotellaceae* 和 *Bacteroides* 丰度较大, GMKB 处理组中 *Stenotrophomonas* 丰度较大。

### 2.3 细菌功能预测

为了了解不同处理组苜蓿土壤根际、非根际细

菌的功能, 采用 PICRUSt 软件进行了细菌功能预测。该软件基于 GreenGene 数据库构建细菌域全谱系的基因功能图谱, 随后将菌群组成“映射”到数据库中, 进行菌群代谢功能预测。在一级功能层中, 除未分类功能组外, 共有 6 类生物功能代谢通路, 分别为: Organismal systems、Metabolism、Genetic information processing、Environmental information processing、Cellular processes、Human diseases (图 4)。其中最主要的功能为 Metabolism 和 Genetic information processing 和 Environmental information processing, 在不同处理组中它们的平均占比分别为 48.68%、20.43% 及 15.23%。在基因二级功能层

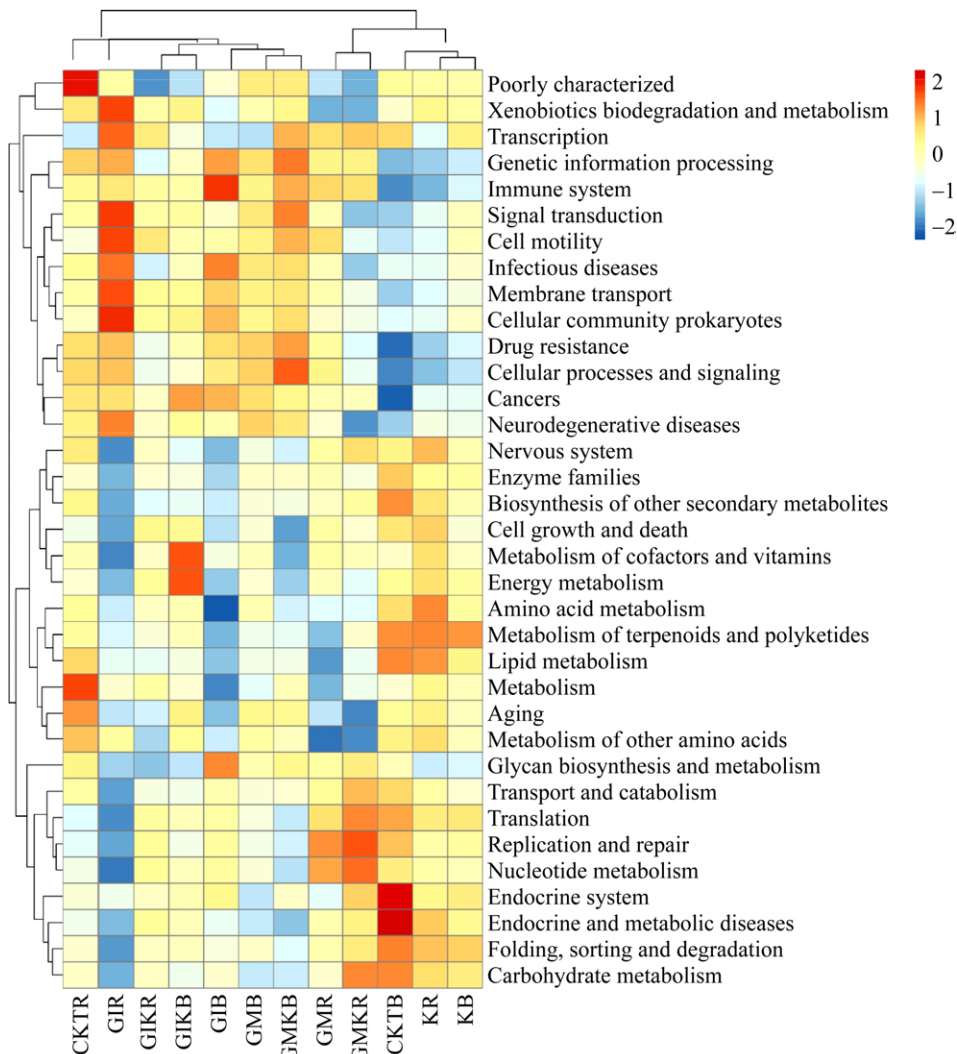


图 4 不同接种处理下苜蓿土壤细菌功能多样性热图

Figure 4 Heat map of bacterial functional diversity in alfalfa soil under different inoculation treatments

预测分析中发现其由氨基酸代谢、碳水化合物代谢、外源物质降解及代谢、膜转运、转录、复制和修复、能量代谢、传染病、细胞生长和死亡、传染病等 35 个子功能组成(图 4)。在所有处理组中占比较高的子功能(占比>5%)主要为膜转运、碳水化合物代谢、氨基酸代谢及翻译。相较于不接种组,氨基酸代谢在 GIR、GMR、GIKR 和 GMKR 处理组分别降低了 1.98%、1.65%、0.75%和 1.66%,在 KR 处理组提高了 1.71%;碳水化合物代谢在 GIR 和 GMR 处理组分别降低了 3.77%和 0.12%,在 KR、GIKR 和 GMKR 处理组分别升高了 2.8%、0.25%和 4.42%。相较于不接种组, GIR 处理组中微生物群落外源物质降解及代谢、转运、细胞运动性、传染病、膜转运、细胞过程和信号转导等功能明显增强,在 GMR 和 GMKR 处理组中微生物群落复制和修复、碳水化合物代谢、核苷酸代谢、翻译等功能明显增强,在 KR 处理组中脂质代谢、氨基酸代谢、萜类和聚酮类化合物代谢、能量代谢等功能增强。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 不同接种处理苜蓿根际细菌群落结构分析

本研究通过高通量测序分析了不同接种处理下苜蓿根际和非根际土壤细菌群落结构组成,在门水平上, *Proteobacteria*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 及 *Gemmatimonadetes* 在不同处理组中丰度相对较高(>3%),而且 *Proteobacteria* 为各个接种处理组中占绝对优势的细菌类群(图 1)。目前发现大多数植物的内生菌门均以 *Proteobacteria* 为主,如黑枸杞<sup>[15]</sup>、*Zostera japonica*<sup>[16]</sup>、香蕉<sup>[17]</sup>和玉米<sup>[18]</sup>等。变形菌门是细菌中最大的一门,属于革兰氏阴性菌,有研究推测变形菌门在各种植物根际微生物区系中占优势可能是因为它在各种植物根际生长速度较快<sup>[19]</sup>。本研究中,*Proteobacteria*下的 *Gammaproteobacteria* 是最优势菌纲, *Gammaproteobacteria* 中具有许多促生长细菌(plant growth promoting *Rhizobacteria*, PGPR),可以释放植物激素<sup>[20]</sup>以及抵抗土壤病原

菌<sup>[21]</sup>;相较于对照组, GIR 与 GMKR 处理组中 *Gammaproteobacteria* 的丰度分别增加了 42.93%和 10.79%,GIKR 处理组中 *Gammaproteobacteria* 的丰度则降低了 1.97% ( $P<0.05$ ),推测单独接种根内球囊霉、双接种摩西球囊霉和根瘤菌可提高苜蓿根际有益菌的丰度,而双接种根内球囊霉和根瘤菌可能对土壤有益菌的丰度增加有一定的抑制作用。另外,相较于对照组, *Proteobacteria* 下的另一菌纲 *Alphaproteobacteria* 的丰度在 GIR、GMR、GIKR 和 GMKR 处理组中显著降低,在 KR 处理组无明显变化。*Alphaproteobacteria* 中含有大量能与植物共生的其他固氮细菌<sup>[22]</sup>,说明接种的根瘤菌可能与其他固氮菌具有协同促进作用,而接种 AM 真菌后可能由于植株分泌物的改变或微生物间的竞争拮抗作用,使得 AM 真菌对其他固氮菌具有抑制作用。另外,采样时间在 9 月底,早晚温差大可能会造成很多微生物死亡,推测接种根瘤菌可能会提高其他固氮菌的耐低温能力。本研究中, *Bacteroidetes* 是仅次于 *Proteobacteria* 的优势菌群, *Bacteroidia* 是本研究中隶属于 *Bacteroidetes* 的第二大菌纲, *Bacteroidia* 与植物氮、磷、蛋白质的代谢以及纤维素的降解和提高植物抗逆性等方面具有重要作用。Wang 等<sup>[23]</sup>研究结果表明,施用微生物菌剂可以促进土壤根际中 *Bacteroidia* 和 *Actinobacteria* 等有益菌丰度的增加。本实验与其研究结果一致,在本研究中,相较于不接种组, *Bacteroidia* 在 GMR 处理组中增加了 25.8%, *Actinobacteria* 在 KR 处理组增加了 1.87%, *Firmicutes* 在 GIR、GMR、KR、GIKR 和 GMKR 处理组中分别增加了 1.1、3.0、1.5、4.2 和 3.1 倍。有研究发现, *Actinobacteria*、*Firmicutes* 可以产生抗生素,并对土壤病原菌有一定的拮抗作用<sup>[24]</sup>,推测接种 AM 真菌和根瘤菌可提高苜蓿植株的氮、磷循环,以及提高苜蓿植株的抗病能力,并且就抗病能力来说,双接种处理组可能高于单接种处理组。



此外,土壤细菌类群组成较为复杂,本研究中发现在属水平上不同处理组间菌群的丰度差异较大。相较于对照组,在 GIR 处理组中丰度较大的属有 *Stenotrophomonas*、*Sphingomonas* 及 *Delftia*,且 *Sphingomonas* 和 *Delftia* 两属细菌在 GIB、GIKR、GIKB 处理组中丰度也较大,而在其他处理组中显著降低( $P<0.05$ );在 GMR 处理组中丰度较大的细菌属有 *Algoriphagus*、*Pseudomonas*、*Pontibacter*、*Arenimonas* 及 *Methylophage*;在 KR 处理组中 *Massilia*、*Gemmatimonas* 及 *Bradyrhizobium* 丰度较大;在 GIKR 处理组中 *Arthrobacter* 和 *Faecalibacterium* 丰度较大;在 GMKR 处理组中 *Bacteroides* 丰度较大。在不同处理组中,寡养单孢菌属(*Stenotrophomonas*)为已分类最优势属。相较于不接种组,寡养单孢菌属(*Stenotrophomonas*)在 GIR 处理组中增加了 45.6%,在 GIKR 处理组中则降低了 19.2%。目前,已有研究表明,寡养单孢菌属(*Stenotrophomonas*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为有机化合物降解菌,具有分泌过氧化氢酶的能力,是可以提高植物抗逆性的土壤益生菌<sup>[25]</sup>。*Delftia* 具有抑制多种致病菌的作用<sup>[26]</sup>;芽孢杆菌属(*Gemmatimonas*)、假单孢菌属(*Pseudomonas*)和 *Massilia* 可以通过生成和释放生长素和赤霉素等植物激素促进植物生长,而且芽孢杆菌属(*Gemmatimonas*)和假单孢菌属(*Pseudomonas*)可以通过固氮、溶磷等促进对养分的吸收,进而改善根系构型,减少肥料的施用<sup>[27-29]</sup>,*Massilia*<sup>[30]</sup>则对疫霉菌(*Phytophthora*)有体外拮抗作用,可提高植物的抗病性。*Pontibacter* 属细菌具有耐盐、耐碱、耐旱等作用,可显著提高土壤的抗逆性<sup>[31]</sup>。有研究发现,*Bradyrhizobium*<sup>[32]</sup>和节杆菌属(*Arthrobacter*)<sup>[33]</sup>与土壤的氮元素循环密切相关,且 *Bradyrhizobium*、*Arthrobacter* 均属于固氮菌,具有结瘤固氮作用;拟杆菌属(*Bacteroides*)和糖代谢、氮代谢、脂化酶等密切相关,对于氮和磷表现良好的适应性<sup>[34]</sup>。本研究中,相较于不接种组,单接种根瘤菌中的特

有属 *Massilia*、*Gemmatimonas* 和 *Bradyrhizobium* 促进了苜蓿根际结瘤固氮的能力,单接种根内球囊霉与摩西球囊霉中特有属 *Stenotrophomonas*、*Delftia* 和 *Pseudomonas* 等提高了苜蓿根际土壤磷素循环、植物激素的释放以及对病原菌的抵御能力,对提高植物的抗病、抗逆性以及提高植物的产量、减少肥料的施用有极其重要的作用。

### 3.2 细菌群落功能预测分析

PICRUSt 软件是最新兴起的细菌群落功能预测的平台,较多应用于土壤细菌群落功能预测<sup>[35]</sup>。为探明不同处理组中苜蓿根际和非根际土壤细菌的功能,本研究将 MiSeq 高通量测序结果进行 PICRUSt 功能预测分析。结果表明,不同处理组中苜蓿根际和非根际土壤细菌共涉及代谢、遗传信息处理、环境信息处理等 6 个代谢通路,分属于 35 个子功能,表现出功能上的丰富性。在本研究中,不同接种处理组中的主要功能基因均为代谢相关功能,其所占比例最大,说明代谢在苜蓿生长过程起着极其重要的作用,这与前人的研究结果一致,前人研究表明,土壤微生物通过代谢活动促进植物生长、提高作物产量,例如链霉菌、芽孢杆菌、假单胞菌等通过代谢产生抗生素、抑菌蛋白及促进植物生长激素等,从而达到控制病原菌以及促进植物生长的作用,并且固氮、溶磷等作用也是通过代谢而促进根系对氮、磷养分的吸收<sup>[36-39]</sup>。此外,在本研究中与代谢相关的二级功能层中氨基酸代谢、碳水化合物代谢占比较高,研究表明,氨基酸代谢主要通过脱氨作用、转氨作用、联合脱氨或脱羧作用分解成  $\alpha$ -酮酸、胺类及二氧化碳,氨基酸代谢与植株氮素的循环息息相关<sup>[40]</sup>。在本研究中,相较于不接种组,氨基酸代谢在 GIR、GMR、GIKR 和 GMKR 处理组分别降低了 1.98%、1.65%、0.75% 和 1.66%,在 KR 处理组提高了 1.71%,进一步证明了接种根瘤菌可能促进植物氮素循环,而接种 AM 真菌可能对于氮循环有一定的抑制作用。另外有研究表明,碳水化合物代谢与植物体内氮、磷密

切相关,氮、磷循环的增加可促进植株碳水化合物的代谢<sup>[41]</sup>。在本研究中,碳水化合物代谢在 GIR 和 GMR 处理组分别降低了 3.77% 和 0.12%,在 KR、GIKR 和 GMKR 处理组分别升高了 2.8%、0.25% 和 4.42%。GIKR 和 GMKR 处理组碳水化合物代谢相比于 GIR 和 GMR 处理组显著提高,推测相比于单接种 AM 真菌,双接种 AM 真菌和根瘤菌更有益于植株的氮、磷循环。

综上所述,相较于不接种,不同接种处理会分别促进不同有益菌的增加,从而对苜蓿养分吸收、抗逆性的增加有一定的抑制作用,例如接种中华根瘤菌增加了苜蓿根际 *Alphaproteobacteria* 等促进氮循环的细菌丰度,接种根内球囊霉和摩西球囊霉分别增加了苜蓿根际 *Gammaproteobacteria* 和 *Bacteroidia* 等对磷循环有促进作用的有益菌的丰度。另外, PICRUSt 功能预测表明,代谢为苜蓿生长过程中最主要的功能,接种根瘤菌可通过增加氨基酸代谢而有利于植株氮素循环,而接种 AM 真菌可能对于氮循环有一定的抑制作用,并且相比于单接种 AM 真菌,双接种 AM 真菌和根瘤菌处理组碳水化合物代谢更强,从而更有益于植株的氮、磷循环。

## REFERENCES

- [1] Liu YN, Shi YH, Yan XB, et al. Effect of alfalfa hay substituting for part of the concentrate, on the production of cows and economic profit[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(6): 190-197 (in Chinese)  
刘艳娜, 史莹华, 严学兵, 等. 苜蓿青干草替代部分精料对奶牛生产性能及经济效益的影响[J]. *草业学报*, 2013, 22(6): 190-197
- [2] Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis[J]. *Quarterly Review of Biology*, 2008, 3(3): 273-281
- [3] Smith FA, Grace EJ, Smith SE. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses[J]. *New Phytologist*, 2009, 182(2): 347-358
- [4] Chakraborty U, Purkayastha RP. Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30(3): 285-289
- [5] Zhuang Q, Zhao XJ, Song FQ. *Amorpha fruticosa* arbuscular mycorrhizal (AM) root exudates induced nodulation factors of rhizobia and their interactions[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, 33(3): 164-168 (in Chinese)  
庄倩, 赵晓娟, 宋福强. 紫穗槐丛枝菌根(AM)根系分泌物诱导根瘤菌结瘤因子及作用研究[J]. *西北林学院学报*, 2018, 33(3): 164-168
- [6] Rabie GH. Induction of fungal disease resistance in *Vicia faba* by dual inoculation with *Rhizobium leguminosarum* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Mycopathologia*, 1998, 141(3): 159-166
- [7] Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants[J]. *New Phytologist*, 2001, 151(2): 493-502
- [8] Vivas A, Vörös I, Biró B, et al. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels[J]. *Environmental Pollution*, 2003, 126(2): 179-189
- [9] Ye JS, Li T, Hu YJ, et al. Influences of AM fungi on plant growth and water-stable soil aggregates under drought stresses[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(4): 1080-1090 (in Chinese)  
叶佳舒, 李涛, 胡亚军, 等. 干旱条件下 AM 真菌对植物生长和土壤水稳定性团聚体的影响[J]. *生态学报*, 2013, 33(4): 1080-1090
- [10] Burns KN, Kluepfel DA, Strauss SL, et al. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 232-247
- [11] Lu H, Zhao H, Sheng YY, et al. Soil prokaryotic community characteristics in two alpine meadow types based on high-throughput sequencing techniques[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(22): 8080-8087 (in Chinese)  
卢慧, 赵珩, 盛玉钰, 等. 基于高通量测序的两种高寒草甸土壤原核生物群落特征研究[J]. *生态学报*, 2018, 38(22): 8080-8087
- [12] Liu KH, Ding XW, Zhang B, et al. High-throughput sequencing to reveal fungal diversity in hot springs of Rehai at Tengchong in Yunnan[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(9): 1314-1322 (in Chinese)  
刘开辉, 丁小维, 张波, 等. 高通量测序分析云南腾冲热海热泉真菌多样性[J]. *微生物学报*, 2017, 57(9): 1314-1322
- [13] Li YK, Sun YF, Lei YH, et al. Fungal community diversity in rhizosphere soil of *Lycium barbarum* L. based on high-throughput sequencing[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(7): 1049-1059 (in Chinese)  
李越颀, 孙燕飞, 雷勇辉, 等. 枸杞根际土壤真菌群落多样性的高通量测序[J]. *微生物学报*, 2017, 57(7): 1049-1059
- [14] Zhang GQ, Zhao P, Dong YX, et al. Effects of a novel

- fertilizer synergist on fungi diversity from potato rhizosphere soil[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(11): 2644-2651 (in Chinese)
- 张国青, 赵盼, 董彦旭, 等. 高通量测序分析环保肥料增效剂对马铃薯根际土壤真菌多样性变化影响[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(11): 2644-2651
- [15] Li Y, He XM, Yang XD, et al. The microbial community diversity of the rhizosphere and bulk soils of *Lycium ruthenicum* in different habitats[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(17): 5983-5995 (in Chinese)
- 李岩, 何学敏, 杨晓东, 等. 不同生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性[J]. *生态学报*, 2018, 38(17): 5983-5995
- [16] Liu PY, Zhang HK, Chen L, et al. Rhizosphere microbial community structure and function of *Zostera japonica* in the distribution area of seagrass beds in the Yellow Sea and Bohai Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(8): 1484-1499 (in Chinese)
- 刘鹏远, 张海坤, 陈琳, 等. 黄渤海海草分布区日本鳗草根际微生物群落结构特征及其功能分析[J]. *微生物学报*, 2019, 59(8): 1484-1499
- [17] Wang MY, Hou SZ, Dong T, et al. Effects of banana pseudostem biochar on bacterial abundance and community structure in rhizosphere soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(7): 1363-1372 (in Chinese)
- 王明元, 侯式贞, 董涛, 等. 香蕉假茎生物炭对根际土壤细菌丰度和群落结构的影响[J]. *微生物学报*, 2019, 59(7): 1363-1372
- [18] Liu QC. Analyzing composition of bacterial community and screening of biocontrol bacteria strains in maize rhizosphere[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese)
- 刘泉成. 玉米根际微生物群落特征分析及生防菌筛选[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2018
- [19] Du YX, Xie BM, Cai HS, et al. Structural and functional diversity of rhizosphere microbial community of nine plant species in the Daqing saline-alkali soil region[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(3): 740-747 (in Chinese)
- 杜滢鑫, 谢宝明, 蔡洪生, 等. 大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构及功能多样性[J]. *生态学报*, 2016, 36(3): 740-747
- [20] Palaniyandi SA, Damodharan K, Yang SH, et al. *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(3): 766-773
- [21] Jošić D, Ćirić A, Soković M, et al. Antifungal activities of indigenous plant growth promoting *Pseudomonas* spp. from alfalfa and clover rhizosphere[J]. *Frontiers in Life Science*, 2015, 8(2): 131-138
- [22] Dedysh SN, Ricke P, Liesack W. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria[J]. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1301-1313
- [23] Wang M, Li SS, Chen SB, et al. Manipulation of the rhizosphere bacterial community by biofertilizers is associated with mitigation of cadmium phytotoxicity[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 649: 413-421
- [24] Xiong W, Zhao QY, Zhao J, et al. Different continuous cropping spans significantly affect microbial community membership and structure in a vanilla-grown soil as revealed by deep pyrosequencing[J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70(1): 209-218
- [25] Chen DM, Ke WH, Chen LL, et al. Diversity of bacterial community in rhizosphere soils under effects of continuously planting burley tobacco[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(7): 1751-1758 (in Chinese)
- 陈冬梅, 柯文辉, 陈兰兰, 等. 连作对白肋烟根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(7): 1751-1758
- [26] Liang XJ, Guo DH, Liu YZ, et al. Identification of a *Delftia* sp. NF83-1 and its antagonistic performance[A]// Proceedings of 2014 Annual Meeting of Chinese Society of Plant Protection[C]. Xiamen: Chinese Society for Plant Protection, 2014 (in Chinese)
- 梁雪杰, 郭殿豪, 刘卮洲, 等. 一株戴尔福特菌 *Delftia* sp. NF83-1 的鉴定及其拮抗性评价[A]//2014年中国植物保护学会学术年会论文集[C]. 厦门: 中国植物保护学会, 2014
- [27] Chen WL, Li J, Zhu HH, et al. A review of the regulation of plant root system architecture by rhizosphere microorganisms[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(17): 5285-5297 (in Chinese)
- 陈伟立, 李娟, 朱红惠, 等. 根际微生物调控植物根系构型研究进展[J]. *生态学报*, 2016, 36(17): 5285-5297
- [28] Zhou WJ, Lü DG, Qin SJ. Research progress in interaction between plant and rhizosphere microorganism[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2016, 38(3): 253-260 (in Chinese)
- 周文杰, 吕德国, 秦嗣军. 植物与根际微生物相互作用关系研究进展[J]. *吉林农业大学学报*, 2016, 38(3): 253-260
- [29] Nosheen A, Bano A, Ullah F, et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on root morphology of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.)[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(59): 12639-12649
- [30] Ofek M, Hadar Y, Minz D. Ecology of root colonizing *Massilia* (*Oxalobacteraceae*)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40117
- [31] Dai WK, Fang CX. Trans-omics study of two desert bacteria *Pontibacter korlensis* and *Pontibacter akesuensis*[A]// Proceedings of the 16th National Symposium on

- Environmental Microbiology[C]. Lanzhou: Chinese society of Microbiology, 2013: 38-39 (in Chinese)
- 戴文魁, 方呈祥. 两株沙漠细菌 *Pontibacter korlensis* 和 *Pontibacter akesuensis* 的 trans-omics 研究[A]//第十六次全国环境微生物学学术研讨会论文集[C]. 兰州: 中国微生物学会, 2013: 38-39
- [32] Wu WX. Studies on the autotoxic substances of tobacco and the effects of autotoxic substances on the rhizospheric microbiology[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese)
- 吴文祥. 烟草自毒物质及其对根际土壤微生物影响的研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2010
- [33] Jiang Y, Zhou JG, Zou YP, et al. Isolation and primary identification of a new nitrogen-fixation *Arthrobacter* strain[J]. Journal of Central China Normal University (Natural Sciences), 2004, 38(2): 210-214 (in Chinese)
- 江月, 周建刚, 邹煜平, 等. 一种有固氮能力的节杆菌菌株的分离和初步鉴定[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2004, 38(2): 210-214
- [34] Tang J, Xu XR, Shang CY, et al. Association of bacterial diversity in city area of Nanming river with environmental factors[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(8): 1050-1059 (in Chinese)
- 唐婧, 徐小蓉, 商传禹, 等. 南明河城区河段细菌多样性与环境因子的关系[J]. 微生物学报, 2015, 55(8): 1050-1059
- [35] Song TJ, Yang JS, Zhou J, et al. Analysis of composition and difference of soil bacteria functional genes of in different *Corydalis yanhusuo* producing areas based on Miseq sequencing technology[J]. Journal of Zhejiang Chinese Medical University, 2018, 42(3): 178-186 (in Chinese)
- 宋腾蛟, 杨蒋舜, 周静, 等. 基于 MiSeq 测序技术分析不同元胡产区土壤细菌功能基因组与差异[J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(3): 178-186
- [36] Song M, Yun HY, Kim YH. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium cf. incarnatum*[J]. Journal of Ginseng Research, 2014, 38(2): 136-145
- [37] Ma L. Isolation of antagonistic bacterium strains against pathogen causing black scurf of potato and the acting mechanism[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 马龙. 马铃薯黑痣病生防细菌的筛选鉴定及其生防作用机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016
- [38] Wang QL, Zhang DZ, Wang JF, et al. Effects of plant growth-promoting bacterial on the growth of maize and the IAA secrete ability detection[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2015, 30(4): 494-498 (in Chinese)
- 汪钱龙, 张德智, 王菊芬, 等. 不同植物促生细菌对玉米生长的影响及其生长素分泌能力研究[J]. 云南农业大学学报, 2015, 30(4): 494-498
- [39] Rahman MS, Quadir QF, Rahman A, et al. Screening and characterization of phosphorus solubilizing bacteria and their effect on rice seedlings[J]. Research in Agriculture Livestock and Fisheries, 2014, 1(1): 27-35
- [40] Hu JW, Zhu RG, Wang HB, et al. Free amino acids in pine needles response to environment nitrogen[J]. Biological Chemical Engineering, 2017, 3(3): 5-8 (in Chinese)
- 胡居吾, 朱仁果, 王慧宾, 等. 松针中游离氨基酸代谢对环境氮的响应[J]. 生物化工, 2017, 3(3): 5-8
- [41] Gao ML. Study on the effects of phosphorus on tomato yield and quality[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2003 (in Chinese)
- 高美玲. 磷对番茄产量和品质影响的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2003