

促生菌种组合提高玉米根际土壤有益微生物基因丰度及促生效应研究

张文丽, 万雨欣[†], 徐伟慧, 王志刚*, 陈文晶, 胡云龙

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 / 黑龙江省农业微生物制剂产业化技术创新中心 / 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 161006)

摘要:【目的】微生物肥料一般采用复合菌种提高有益菌在作物根际的定殖和促生效果。我们对本实验室前期分离鉴定的 26 个具有不同功能的玉米根际菌株进行复配, 并研究复合菌株在土壤中的有益作用及其促生效果。【方法】按照功能共构建了 4 组合成菌群: C1, 将铁载体分泌量最高的解磷菌、解钾菌、自生固氮菌、联合固氮菌各 1 株进行组合; C2, 将吲哚乙酸 (IAA) 分泌量最高的解磷菌、解钾菌、自生固氮菌、联合固氮菌各 1 株进行组合; C3, 每个菌属选择 1 株综合促生能力最强的菌株进行组合; C4, 由 C1 与 C2 所有菌株组合。用以上 4 组菌群在灭菌土壤和未灭菌土壤上分别进行玉米接种菌剂和土壤浇灌菌剂盆栽试验, 包括无菌剂对照在内共 10 个处理, 灭菌土壤处理分别记为 MCK、MC1、MC2、MC3、MC4, 未灭菌土壤处理分别记为 WCK、WC1、WC2、WC3 和 WC4。玉米接菌试验是将初生胚根长 1~2 cm 的玉米种子浸泡在菌群悬浮液中 1 h, 然后种植在灭菌土壤和未灭菌土壤中, 9 天后测定株高、鲜重、根长、根尖数和分叉数。土壤浇灌试验采用种子发芽方法, 将种子播在灭菌和未灭菌土壤中, 每 5 天浇灌 1 次菌悬液, 待玉米生长 15 天后, 收集玉米根际土壤用于宏基因组学测序, 揭示菌群对玉米根际微生物的影响及其促生机制。【结果】4 个复合菌剂相比, C4 表现出最好的综合促生能力。玉米接种 C4 后, 幼苗株高、地上鲜重、根鲜重、根长、根尖数和分叉数在灭菌组中分别比对照提高了 28.97%、46.00%、59.99%、61.99%、62.27% 和 46.70%, 在未灭菌组中分别提高了 27.49%、25.86%、50.13%、40.11%、62.26% 和 82.55%。复合菌群 C4 提高了根际土壤中有益菌属 *Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Duganella*、*Cellvibrio*、*Pantoea*、*Pseudoxanthomonas* 的丰度, 在浇灌菌群 C4 的玉米根际土壤中, 有益菌属 *Enterobacter* 和 *Klebsiella* 的注释丰度与对照组相比显著提高。菌群 C4 提高了根际土壤中磷和氮的转运、IAA 的合成、铁载体的转运与调控系统和碳循环相关的功能基因的丰度, 部分丰度上升的功能基因的微生物溯源分析结果显示, 多数有益微生物的菌属丰度与功能基因丰度呈正相关, 同时在 *ugqB*、*phnW* 的基因集中注释到了菌群 C4 的成员 *Klebsiella*。【结论】菌群 C4 改变了玉米根际细菌群落组成, 提高了有益菌属丰度, 富集了促生相关功能基因, 具备微生物复合菌肥开发的潜能。

关键词: 生物肥料; 促生机制; 植物根际促生菌; 合成菌群; 玉米

Combination of microbial strains and the promotion effect on beneficial soil microbial genes and maize growth

ZHANG Wen-li, WAN Yu-xin[†], XU Wei-hui, WANG Zhi-gang*, CHEN Wen-jing, HU Yun-long
(College of Life Science and Agroforestry, University of Qiqihar / Heilongjiang Provincial Technology Innovation Center of Agromicrobial Preparation Industrialization / Heilongjiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agrobiological Preparation Industrialization, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: 【Objective】Biofertilizers containing composite strains are generally more effective to improve the colonization of beneficial bacteria in crop rhizosphere. We identified 26 strains in maize rhizosphere with different functions in our laboratory and constructed four composite strains. In this research, we investigated their effects in

收稿日期: 2023-09-04 接受日期: 2024-01-06

基金项目: 黑龙江省杰出青年基金项目 (JQ2023D001); 黑龙江省重点研发计划项目 (GA21B007)。

联系方式: 张文丽 E-mail: 1147182987@qq.com; [†]共同第一作者 万雨欣 E-mail: 1795832598@qq.com

* 通信作者 王志刚 E-mail: wangzhigang@qqhru.edu.cn

assembling beneficial genus in rhizosphere soil and growth-promotion on crops. **【 Methods 】** The 26 strains belong to four functional groups: phosphate solubilizing bacteria, potassium solubilizing bacteria, autochthonous nitrogen-fixing bacteria and combined nitrogen-fixing bacteria. The composite microbial agents (SynComs) were constructed by combining one strain from each of the four functional groups. C1 contains the four strains with the highest secretion of iron carriers; C2 contains the four strains with the highest secretion of indole acetic acid (IAA); C3 contains the four strains with the strongest growth promotion; C4 contains all the strains in C1 and C2. Maize pot experiment was conducted using the four SynComs under sterilized soil (MCK, MC1, MC2, MC3, MC4), and unsterilized soil (WCK, WC1, WC2, WC3, and WC4). Maize seeds with primary radicle length of 1–2 cm were soaked in the suspension of SynComs for 1 h, and then planted in sterilized and unsterilized soil. After 9 days, the seedlings were harvested for the measurement of plant height, fresh weight, root length, number of root tips and number of forks. The same maize seeds were planted in sterilized and unsterilized soils, and watered with the composite strain suspension every 5 days. And the maize was harvested after 15 days growth for collecting the rhizosphere soil for metagenomics sequencing. **【 Results 】** The SynComs C4 exhibited the best integrative ability among the four SynComs. Compared with the corresponding CK, C4 significantly promoted plant height, aboveground fresh weight, root fresh weight, root length, number of root tips and number of forks of maize seedlings by 28.97%, 46.00%, 59.99%, 61.99%, 62.27%, and 46.70% in sterilized group, and by 27.49%, 25.86%, 50.13%, 40.11%, 62.26% and 82.55% in unsterilized group, respectively. SynComs C4 increased the abundance of beneficial bacterial genera such as *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Duganella*, *Cellvibrio*, *Pantoea*, and *Pseudoxanthomonas*. Genera *Enterobacter* and *Klebsiella* in maize rhizosphere water with SynComs C4 had significantly higher annotated abundance than the control. SynComs C4 increased the abundance of functional genes related to phosphorus and nitrogen transport, IAA synthesis, iron carrier transport and carbon cycling in the rhizosphere soil, microbial traceability analyses of some of the functional genes with increased abundance showed a positive correlation between genus abundance and functional gene abundance for most beneficial microorganisms, while the members of SynComs C4 (*Klebsiella*) were annotated in the gene sets of *ugqB*, *phnW*. **【 Conclusions 】** SynComs C4 changed the rhizosphere soil bacterial community composition, increased the abundance of beneficial bacterial genera and enriched growth-promoting related functional genes, and possessed the potential for the development of microbial composite fertilizers.

Key words: biofertilizer; growth-promoting mechanism; plant growth-promoting rhizobacteria; synthetic microbial communities; maize

玉米是我国最重要的农作物之一, 全国玉米种植面积占农作物播种面积的 37%, 其年产量高达 27255.2 万 t^[1]。玉米是高产喜肥作物^[2], 然而, 大量使用化肥破坏土壤结构, 同时加剧环境负担^[3–4]。植物根际促生细菌 (PGPR) 是一类定殖于植物根际并能对植物生长产生促进作用的有益菌, 在微生物肥料领域具有重要的应用价值^[5]。PGPR 是最常用的微生物肥料的菌种来源^[6]。研究发现, PGPR 菌肥与半量化肥共同处理黑青稞, 供试的 PGPR 菌肥大多数能显著促进黑青稞生长、提高产量和改善营养品质^[7]。然而, 单一菌株施入土壤后, 难以与土著微生物竞争^[8], 不能在植物根系上很好地定殖, 达不到预期的效果^[9–10]。复合菌剂具有协同作用, 通过分泌不同生理活性物质, 影响植株的生理代谢活动, 促进植物

生长。以梭梭根际促生菌为主要菌源制备的复合菌肥, 与单株菌肥相比, 显著提高了番茄产量且优化了番茄根际土壤特性^[11]。由 4 株促生菌组成的细菌联盟, 通过增加植物激素、土壤养分的有效性以及有益菌群的丰度, 间接促进了植物的生长^[12]。玉米施用生物菌肥能够减少化肥用量并提高玉米产量^[13], 但近年来, 如何制备玉米根际促生合成菌群并研究其促生效应的相关报道较少。

本研究以前期从玉米根际筛选出的 26 株优质 PGPR, 根据菌株的解磷、解钾、固氮、分泌吲哚乙酸 (IAA) 和产铁载体的特性, 构建多个合成菌群。通过宏基因组测序, 揭示玉米根际促生菌群对玉米的促生机制, 为玉米根际促生菌肥的开发提供菌种资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试玉米为垦粘 1 号，购自齐齐哈尔市胜利种子商店。

供试土壤采自黑龙江省齐齐哈尔市梅里斯区，土壤基本理化性质如下：有机质 22.85 g/kg，全氮 2.19 g/kg，有效磷 4.12 mg/kg，速效钾 136 mg/kg，pH 为 7.58。

供试菌株由齐齐哈尔大学微生物学实验室提供。依据菌株具有的解磷、解钾、固氮、分泌 IAA 和产铁载体能力，构建合成菌群。具体信息如表 1 所示。

1.2 复合菌剂促生效果盆栽试验

挑选健康、完整的玉米种子，放置于 5% (v/v) 次氯酸钠中浸泡 3 min，然后在 70% (v/v) 乙醇中浸泡 3 min，最后用无菌蒸馏水冲洗 3 次。种子在光照培养箱 (Thermo Scientific, 美国) 中培养至芽长 1~2 cm。将各功能菌株分别活化于牛肉膏蛋白胨培养基中，30℃、200 r/min 振荡过夜，吸取适量菌液稀释 100 或 1000 倍并在旋涡混合仪上混合均匀，用细菌计数板统计菌数，并计算原始菌液浓度，将菌液离心并收集菌体至 10 mL 离心管中。将收集的菌体

悬浮于 1×磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，并将各菌株的悬浮液稀释至 10⁸ CFU/mL。选择无拮抗作用的菌株，根据表 1 的原则进行组合构建，将各菌株的悬浮液等体积混合于 50 mL 离心管中，制备成多菌株悬浮液。

此外，将表面灭菌并发芽的玉米种子浸泡在悬浮液中 1 h，并用等量的灭菌 PBS 缓冲溶液浸泡作为对照。将接种菌悬浮液的玉米种子用镊子分别播种在灭菌土壤和未灭菌土壤中，进行盆栽试验。盆栽试验共设置 10 个处理：MCK (灭菌土+灭菌水)、WCK (未灭菌土+灭菌水)、MC1 (灭菌土+合成菌群 C1)、WC1 (未灭菌土+合成菌群 C1)、MC2 (灭菌土+合成菌群 C2)、WC2 (未灭菌土+合成菌群 C2)、MC3 (灭菌土+合成菌群 C3)、WC3 (未灭菌土+合成菌群 WC3)、MC4 (灭菌土+合成菌群 C4) 和 WC4 (未灭菌土+合成菌群 C4)。在恒温恒湿培养箱中培养 9 天。轻轻将玉米幼苗从土壤中拔出，用流动水将根部清洗干净后，测量其株高和鲜重，并用根系扫描仪分析其根长、根尖数和分叉数。

1.3 土壤施用复合菌剂试验

采用同样方法处理玉米种子，播种在灭菌和未灭菌土壤中。每 5 天浇灌 1 次菌株悬浮液 (×10⁸ CFU/mL, 5 mL)，待玉米幼苗生长至第 15 天，将玉米幼苗轻轻拔出，刷去大块土壤，摇晃去除多余土壤，仅保

表 1 菌群构建原则及组合方式

Table 1 Principles of synthetic microbial community construction and combination

合成菌群 Synthetic microbial communities (SynComs)	构建原则 Construction principle	菌株组成 Strain composition
C1	每个菌属选择一株铁载体分泌量最高的菌株进行组合 One strain with the highest secretion of iron carriers from each genus was selected, including one phosphate solubilizing bacteria strain, one potassium solubilizing bacteria strain, one autochthonous N-fixing bacteria strain and one combined N-fixing bacteria strain	<i>Enterobacter huaxiensis</i> LN1, <i>Bacillus velezensis</i> P33, <i>Enterobacter huaxiensis</i> K6, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ZN17
C2	每个菌属选择一株吲哚乙酸 (IAA) 分泌量最高的菌株进行组合 One strain with the highest secretion of indole acetic acid (IAA) from each genus was selected	<i>Lelliottia jeotgali</i> P43, <i>Klebsiella granulomatis</i> K11, <i>Klebsiella granulomatis</i> LN3, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ZN18
C3	每个菌属选择一株促生综合能力最强的菌株进行组合 One strain from each genus with the strongest growth promotion effect was selected	<i>Lelliottia jeotgali</i> P23, <i>Enterobacter hormaechei</i> P24, <i>Priestia filamentosa</i> P37, <i>Pseudomonas hunanensis</i> P45, <i>Staphylococcus epidermidis</i> P46, <i>Agrobacterium arsenijevicii</i> ZN4, <i>Klebsiella granulomatis</i> K5, <i>Bacillus zanthoxyli</i> LN2
C4	将合成菌群C1与合成菌群C2的所有菌株进行合并 Amalgamation of all strains in SynComs C1 and SynComs C2	<i>Lelliottia jeotgali</i> P43, <i>Klebsiella granulomatis</i> K11, <i>Klebsiella granulomatis</i> LN3, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ZN18, <i>Bacillus velezensis</i> P33, <i>Enterobacter huaxiensis</i> K6, <i>Enterobacter huaxiensis</i> LN1, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ZN17

留紧贴根部约 1 mm 的土壤, 经离心、超声振荡后收集根际土壤^[14]。收集促生效果最佳的菌群处理组及对照组玉米幼苗的根际土壤, 用于宏基因组学测序。每个处理设置 3 个重复。使用 FastDNA®SPIN 试剂盒 (MP Biomedicals, Solon, USA), 从 0.5 g 土壤中提取总 DNA^[15]。使用 Illumina NovaSeq 测序平台进行宏基因组测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。使用 SOAPaligner 软件, 将样品中高质量 reads 与非冗余基因集比对, 统计基因的丰度信息。使用 Diamond 将非冗余基因集的氨基酸序列与 NR 数据库和 KEGG 数据库比对, 并通过分类学信息数据库获得对应的物种注释, 同时获得基因对应的 KEGG 功能信息, 使用 KO、Pathway 对应的基因丰度总和计算对应功能类别的丰度。

1.4 统计分析

利用托普根系分析仪对根系数据进行分析, 用 Excel 进行数据整理。利用 SPSS 26 软件的 Student's T 检验方法在 0.05 水平进行差异显著性分析, 采用 Origin 2021 作图。

2 结果与分析

2.1 复合菌群的促生效果分析

对 C1、C2、C3 和 C4 菌群的促生效果进行盆栽验证, 结果 (图 1) 表明, C4 处理后的灭菌组 (MC4) 与对照组 (MCK) 相比, 玉米幼苗的株高、地上鲜重、根鲜重、根长、根尖数和分叉数分别提高了 28.97%、46.00%、59.99%、61.99%、62.27% 和 46.70%。在未灭菌组 (WC4) 分别提高了 27.49%、25.86%、50.13%、40.11%、62.26% 和 82.55%。对根鲜重进行测定后发现, 菌群 C1 在未灭菌组中的促生效果最好, 根鲜重提高了 72.67%, 而在灭菌组中 C2 促生效果最好, 根鲜重提高了 81.23%。对 4 个菌群的综合能力进行分析, 发现无论在灭菌组还是未灭菌组, 菌群 C4 都具有最强的综合能力, 其次是菌群 C2、C1 和 C3。

2.2 菌群 C4 对根际细菌群落多样性的影响

接种菌群 C4 后玉米根际细菌属水平的 α 多样性分析和 β 多样性分析结果 (图 2) 显示, 在灭菌组中, MC4 的 Chao 指数显著高于 MCK; 在未灭菌组处理中, WC4 的 Simpson 指数显著低于 WCK。这说明接种菌群 C4 改变了土壤微生物 α 多样性及丰富度。

采用非度量多维尺度 NMDS 进行微生物群落的

距离分析, 表征 β 多样性。在属水平上, 在灭菌与未灭菌处理中, 应力函数值均为 0.000, 小于 0.05 (图 2), 能较好地揭示不同处理间细菌群落组成的差异, 初步判断复合菌群的接种影响了细菌群落的组成。

2.3 菌群处理对玉米根际微生物群落的影响

对相对丰度大于 1% 的菌属进行注释, 将相对丰度小于 1% 的菌属合并。图 3A 和 3C 显示, 不同处理在属水平上的土壤细菌群落组成存在差异。在灭菌组处理中, 相对丰度较高的菌属包括 *Massilia*、*Kosakonia*、*Duganella*、*Pseudomonas*、*Exiguobacterium*、*Stenotrophomonas* 等。而未灭菌组中相对丰度较高的菌属包括 *Actinbacteria*、*Chloroflexi*、*Rubrobacter*、*Nocardioides*、*Arthrobacter* 等。

对丰度前 25 的菌属进行了两组比较分析, 图 3B 和 3D 显示, 在 MC4 处理中 *Duganella*、*Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Cellvibrio*、*Azoarcus*、*Fluviicola*、*Streptomyces*、*Delftia*、*Pseudoduganella*、*Dyadobacter* 和 *Sphingobium* 相对丰度与对照相比显著上升, 分别上升了 37.53%、12.53%、46.24%、50.89%、109.63%、34.83%、101.67%、27.06%、26.09%、95.23% 和 118.18%。在 WC4 处理中, *Lysobacter*、*Azospirillum*、*Pseudoxanthomonas*、*Pantoea*、*Pseudomonas* 和 *Klebsiella* 的相对丰度与对照相比显著上升, 分别上升了 36.17%、45.45%、102.27%、17.9%、104.9% 和 38.7%。

2.4 菌群 C4 的成员在玉米根际中丰度变化分析

菌群 C4 中包含 2 株 *Enterobacter*, 4 株 *Klebsiella*, 1 株 *Bacillus* 和 1 株 *Lelliottia*, 将这 8 株菌所属的 4 个菌属与 NR 数据库进行对比, 获得了样本物种的分类学注释信息, 注释结果如图 4 所示。*Enterobacter* 和 *Klebsiella* 在 MC4 和 WC4 处理中的注释丰度与对照相比均显著上升, 其中 *Enterobacter* 注释到的丰度最高。而 *Bacillus* 和 *Lelliottia* 的注释丰度与对照组相比虽略有上升, 但未有显著差异。

2.5 玉米根际土壤中促生相关基因的注释结果及分析

基于 KEGG 数据库对宏基因组数据中的相关功能基因进行注释, 分别注释了磷转化相关基因 (图 5A)、固氮相关基因 (图 5B)、IAA 合成、铁载体转运调控、碳循环及微生物对植物的影响相关基因 (图 6) 的丰度。将注释到的相关基因以 Heatmap 图的方式进行聚类分析。如图 5A 所示, 在灭菌处理共筛选到 34 个与有机酸合成、磷的溶解和转运有关的基

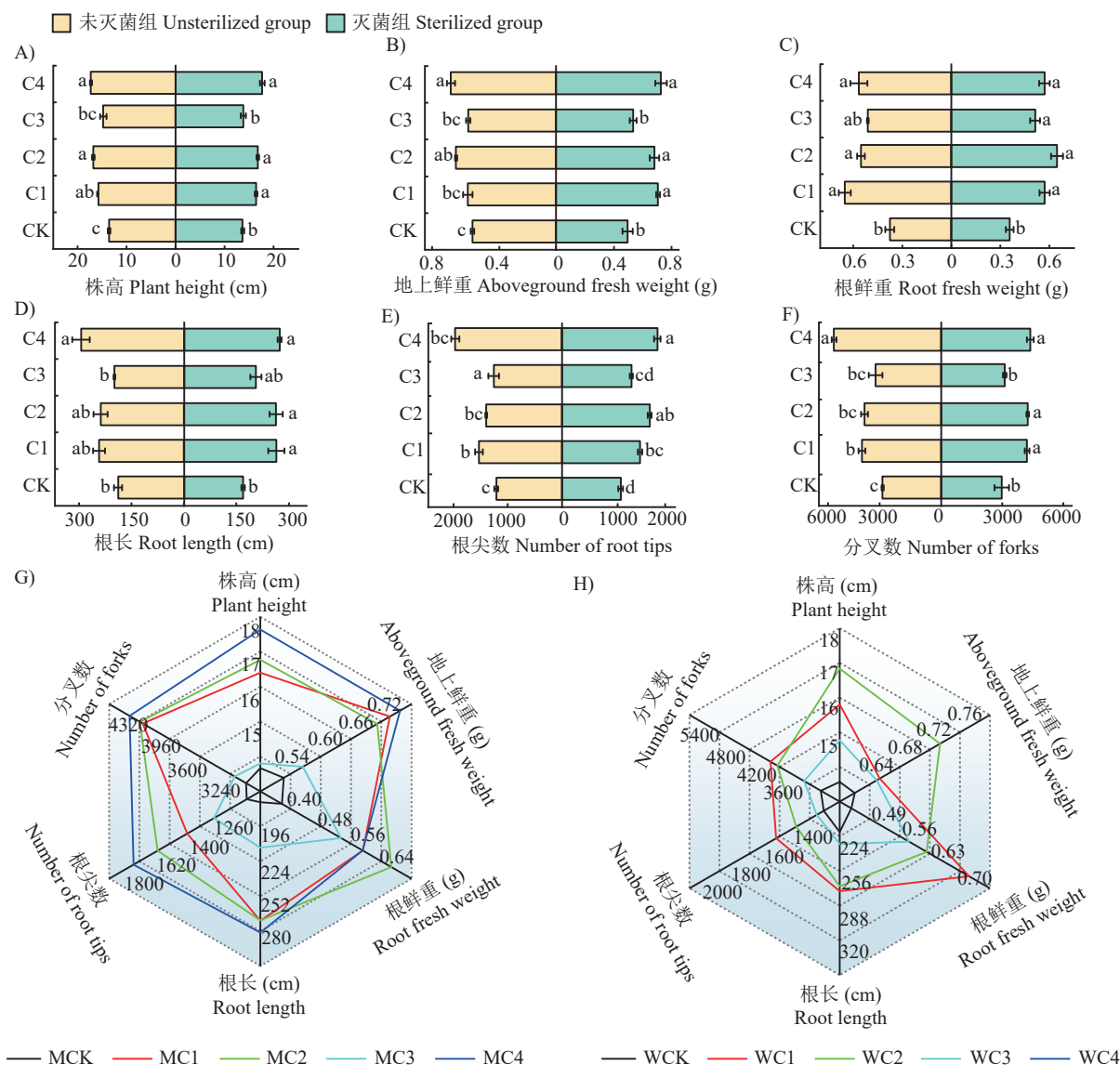


图 1 合成菌群对玉米幼苗生长的影响及菌群综合能力评价

Fig. 1 Effects of SynComs on the growth of maize seedlings and evaluation of the integrated capacity of the SynComs

注: M—灭菌土处理, W—未灭菌土处理。柱旁不同小写字母表示不同处理之间玉米幼苗指标差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: M—Sterilized soil treatment; W—Unsterilized soil treatment. Different small letters beside the bars indicate significant differences in maize seedling indexes among treatments ($P < 0.05$).

因。在未灭菌处理中共筛选到 33 个相关基因, 结果显示, 接种菌群 C4 后, *pho*、*gcd*、*phn*、*ugp*、*ppx* 等基因都在 MC4 和 WC4 处理组显著富集。说明菌群 C4 处理后的土壤中解磷相关功能基因的数量增多, 可提升土壤中的磷转化效率。图 5B 显示, 接种菌群 C4 后, *nif*、*vnf*、*nrt*、*nar* 等与固氮及氮代谢相关的基因, 在 MC4 和 WC4 处理组丰度显著上升。说明接种菌群 C4 后, 可通过提升土壤中固氮基因的丰度来提高土壤的固氮活性。

对不同处理组中与 IAA 合成、铁载体转运调控、碳循环及微生物对植物的影响的相关基因各 10

个进行了聚类分析 (图 6), 发现 *iaaH*、*iaaA*、*iro*、*bas*、*fhu* 等基因都在菌群 C4 处理后富集。因此, 菌群 C4 可以通过增加促生相关功能基因的丰度来丰富土壤功能, 进而达到促生的效果。

2.6 玉米根际土壤中促生相关基因的溯源分析

为探索功能基因及功能菌株间的联系, 图 7 分别筛选了结果 2.5 中在 MC4 和 WC4 处理组丰度均上升的部分功能基因 (*nifK*, *nasA*, *nifH*, *norB*, *ugpB*, *phnW*, *phnJ*), 并对其进行微生物溯源分析, 构建单个基因的基因集后进行物种注释、功能注释, 得到携带相同功能基因但在分类上不同的微生物菌属分

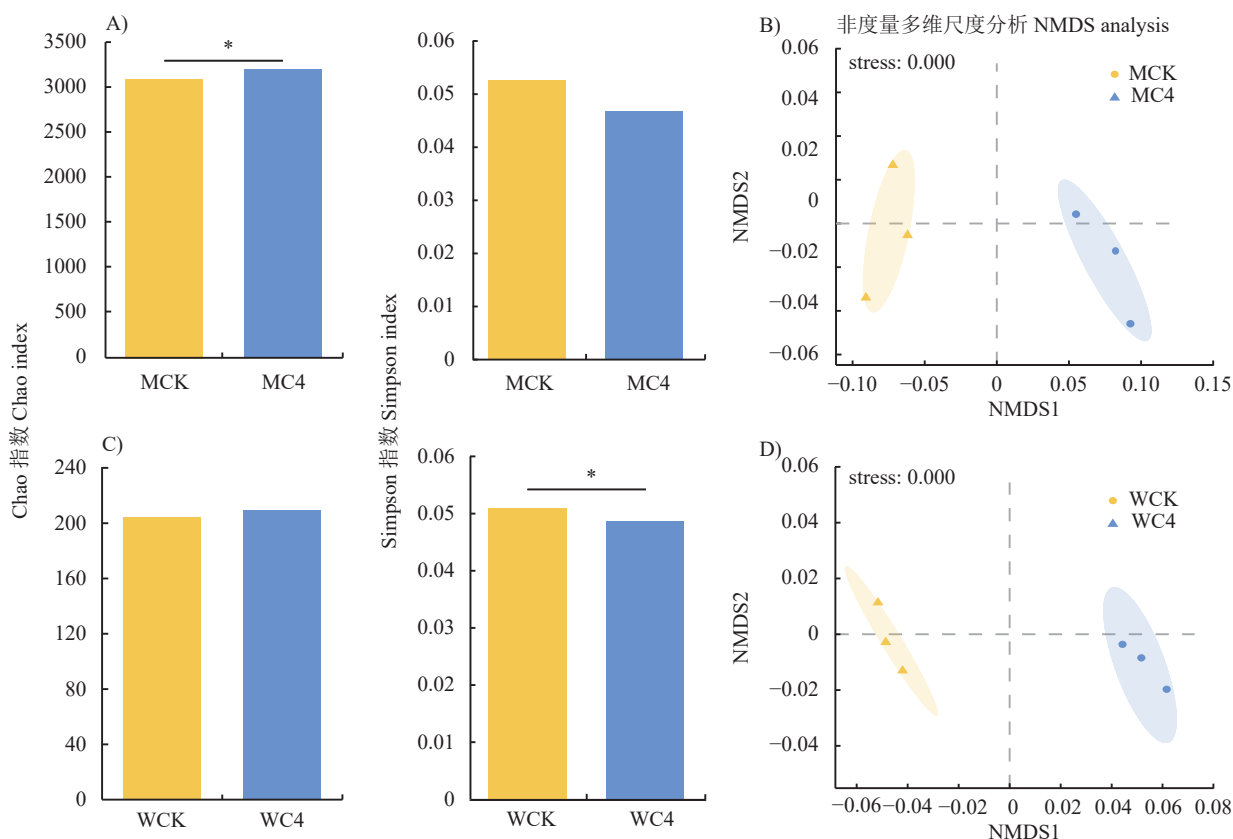


图 2 玉米根际细菌群落 α 多样性和 β 多样性

Fig. 2 α -Diversity and β -diversity in rhizosphere soil of maize

注: M—灭菌土处理, W—未灭菌土处理。*表示不同处理组间 α 多样性指数差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: M—Sterilized soil treatment, W—Unsterilized soil treatment. "*" indicates significant difference in α -diversity index between the two groups ($P < 0.05$).

类信息。并将追溯到的微生物 (属水平) 丰度与功能基因丰度进行线性回归方程拟合, 得到相关性系数。结果表明, 丰度上升的 *Pseudomonas* 在 7 个基因集中均被注释到, 在 *ugqB*、*phnW* 的基因集中注释到了与菌群 C4 的部分成员相同的菌属 *Klebsiella*。相关系数的分析结果显示, 多数有益微生物菌属丰度与功能基因丰度呈正相关。说明菌群 C4 通过提高玉米根际土壤的有益菌属丰度来富集促生相关功能基因, 进而发挥其促生功能。

3 讨论

合成菌群中包括多个微生物物种, 功能不同的微生物菌株通过协同作用, 为植物寄主提供多种利益, 使植物更好地适应新环境, 以改善植物生长并最终提高作物产量^[16-17]。物种间可通过营养互补和代谢分工等不同的代谢作用, 影响彼此之间的相互作用, 进而影响菌群的作用效果^[18-19]。

接种菌群 C4 后, 未灭菌与灭菌土壤中的细菌群

落存在差异, 这可能是由于在灭菌土壤中加入促生菌群后重塑了土壤微生物群落。*Pseudomonas* 被证明具有溶磷的作用^[20]。*Klebsiella* 也被证明可在无氮环境中生长, 溶解无机磷和钾, 并产生 IAA 和铁载体^[21]。*Duganella*、*Pseudoduganella*、*Delftia*、*Azoarcus* 都被证明具有高效的固氮作用, 并可以改善氮代谢^[22-24]。*Streptomyces* 在土壤中无处不在, 以产生次生代谢物而闻名, 研究表明它会被特异性地招募到植物的根际和内圈^[25]。以上菌属均在本研究 MC4 处理中被注释到且丰度与对照相比显著上升。*Pantoea* 和 *Azospirillum* 可以提高固氮酶的活性, 提高植物的产量^[26]; *Lysobacter* 具有杀线虫活性、产 ACC 脱氢酶和促进植物生长的能力^[27]; *Enterobacter* 可通过固氮、产 IAA 等作用促进玉米生长^[28]。在 WC4 处理组中, *Pantoea*、*Azospirillum*、*Lysobacter*、*Enterobacter* 等有益细菌的丰度与对照相比显著上升。其中 *Pseudomonas* 和 *Klebsiella* 在 MC4 和 WC4 处理组中的相对丰度均显著增加。显著增加的菌属

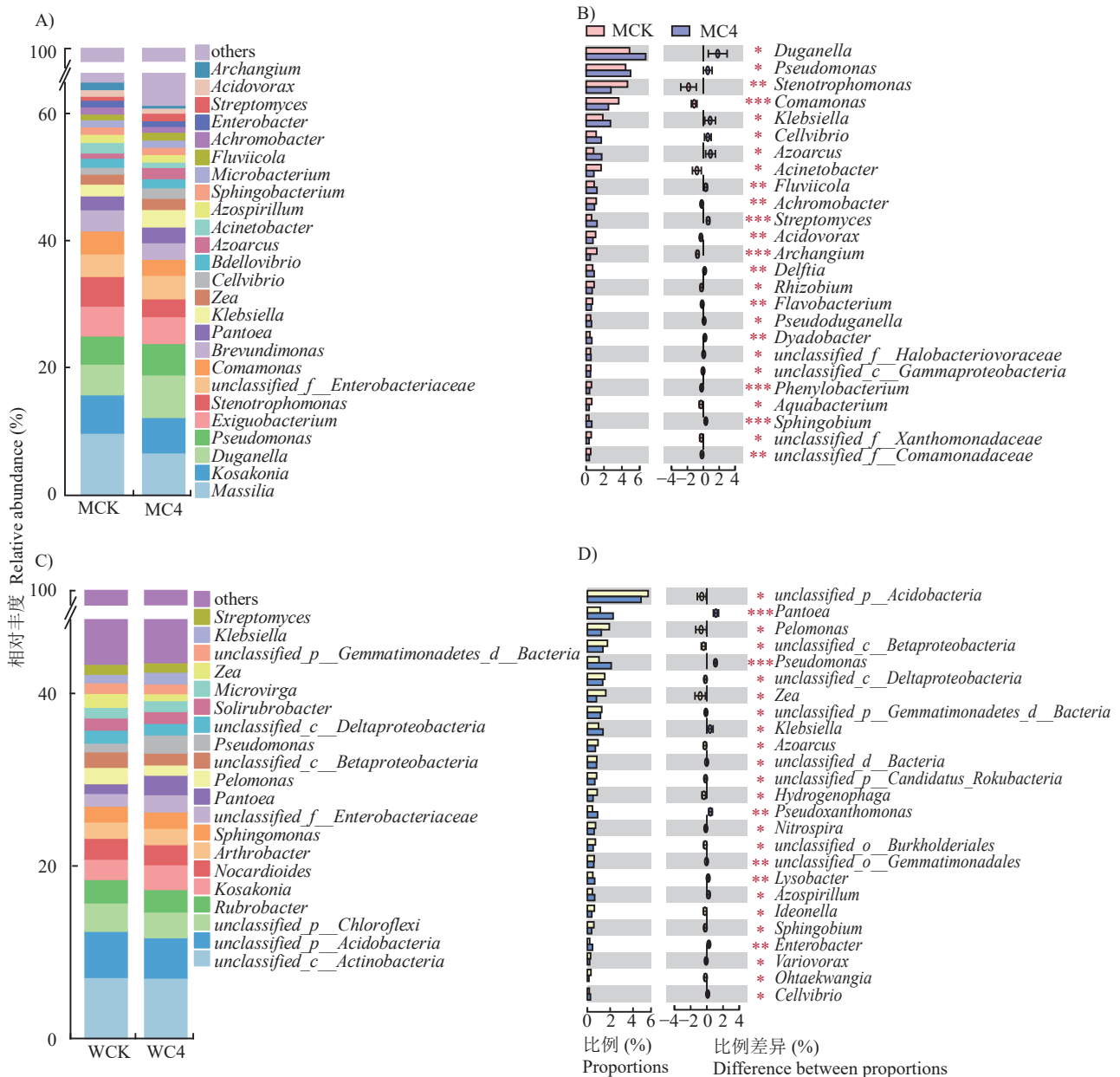


图3 不同处理组的属水平细菌群落组成及两组显著差异菌属比较分析

Fig. 3 Bacterial community composition at genus level in rhizosphere soil of C4 group treatment and comparison of genera showing significant difference with control

注: MCK、MC4 为灭菌土对照、C4 菌群组, WCK、WC4 分别为未灭菌土对照、C4 菌群组。*, **, *** 分别表示不同处理间在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 水平差异显著。

Note: MCK and MC4 represent the sterilized soil control and C4 group; WCK and WC4 represent the unsterilized soil control and C4 group. *, ** and *** indicate significant difference between treatments at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$ levels, respectively.

大多是潜在的植物生长促进细菌, 证明加入菌群可提高促生相关的有益菌的丰度, 以此促进植物生长^[29]。物种注释的结果表明, 菌群 C4 所包含的 4 个菌属均可在根际土壤中被注释到。其中, *Enterobacter* 和 *Klebsiella* 在 MC4 和 WC4 处理中的丰度均显著增加, 而 *Bacillus* 和 *Lelliottia* 虽然注释到但丰度变化不大, 它们可以分泌植物生长激素和提高植物营养

元素吸收来促进植物生长^[30]。

本研究筛选了一些功能基因进而揭示菌群的促生机制。*gcd*、*ppa* 和 *ppx* 是与磷增溶有关的基因, *phoA* 和 *phoD* 与有机磷的矿化有关, *ugpQ*、*phoB* 和 *phoR* 与磷酸盐转运蛋白有关^[31-33], *pqq*、*gdh* 与编码膜结合的葡萄糖脱氢酶相关^[34], 由 *PPX* 基因编码的外聚磷酸酶被证明, 其在无机聚磷酸盐降解成磷酸

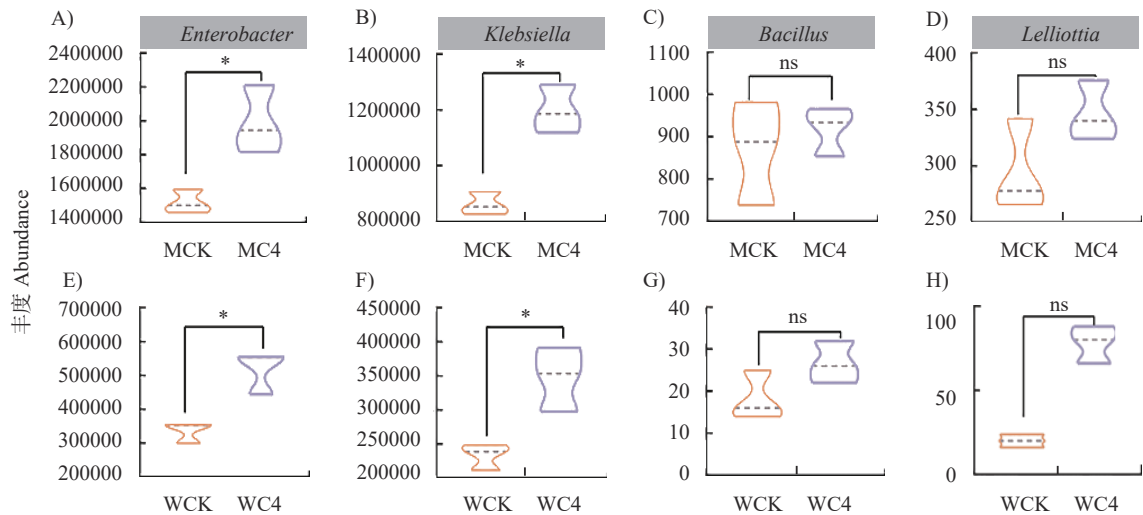


图 4 菌群 C4 中各菌属在灭菌和非灭菌根际土壤中的丰度

Fig. 4 The abundance of genus of the syncoms C4 in rhizosphere of sterilized and unsterilized soil

注: MCK、MC4 分别为灭菌土对照、C4 菌群组, WCK、WC4 分别为未灭菌土对照、C4 菌群组。*表示 CK 与 C4 菌群组间微生物丰度差异显著 ($P<0.05$), ns 表示差异不显著。

Note: MCK and MC4 represent the sterilized soil control and C4 group; WCK and WC4 represent the unsterilized soil control and C4 group. * indicates significant difference in microbial abundance between CK and C4 group ($P<0.05$), and ns indicates no significant difference.

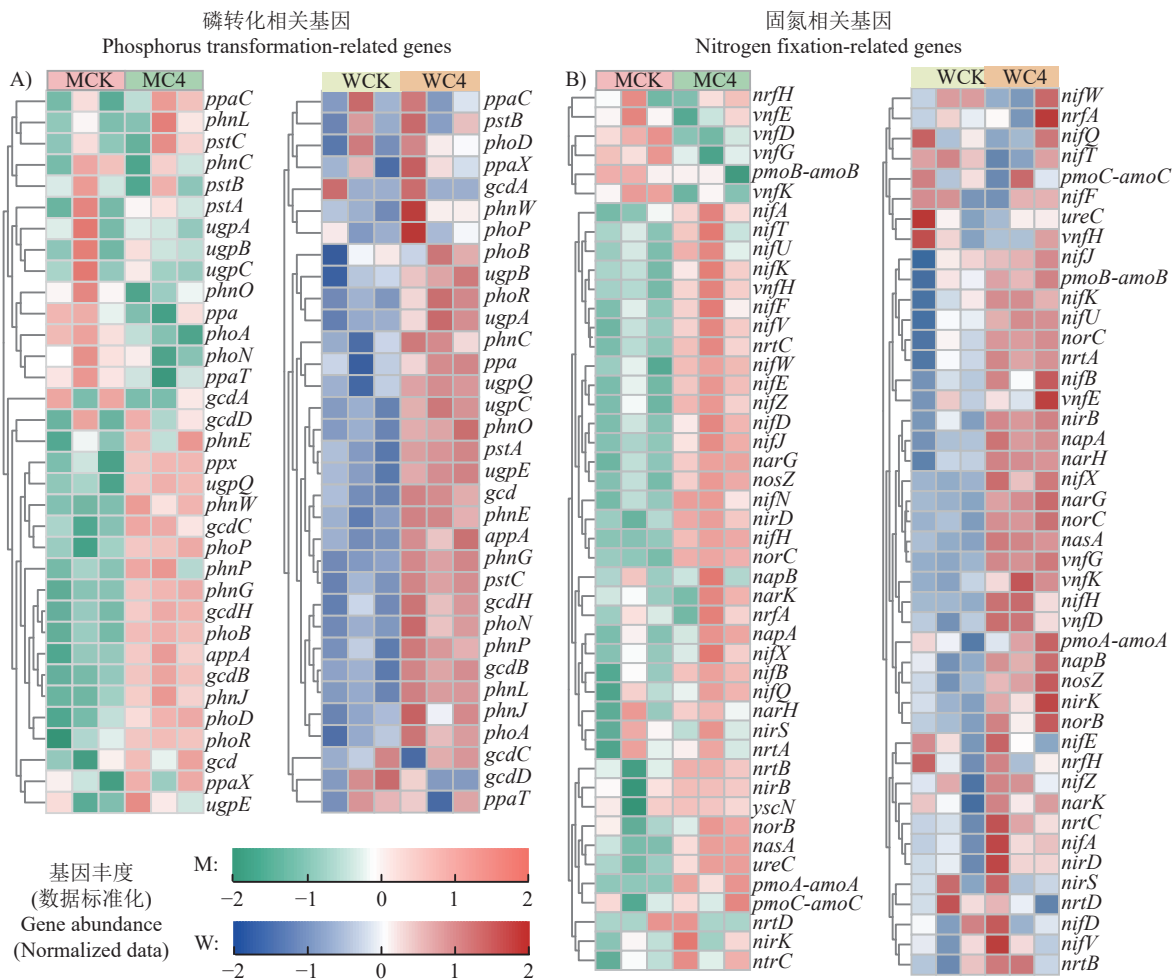


图 5 磷转化、固氮相关基因的丰度 heatmap

Fig. 5 Heatmap of abundance of genes related to phosphorus transformation and nitrogen fixation

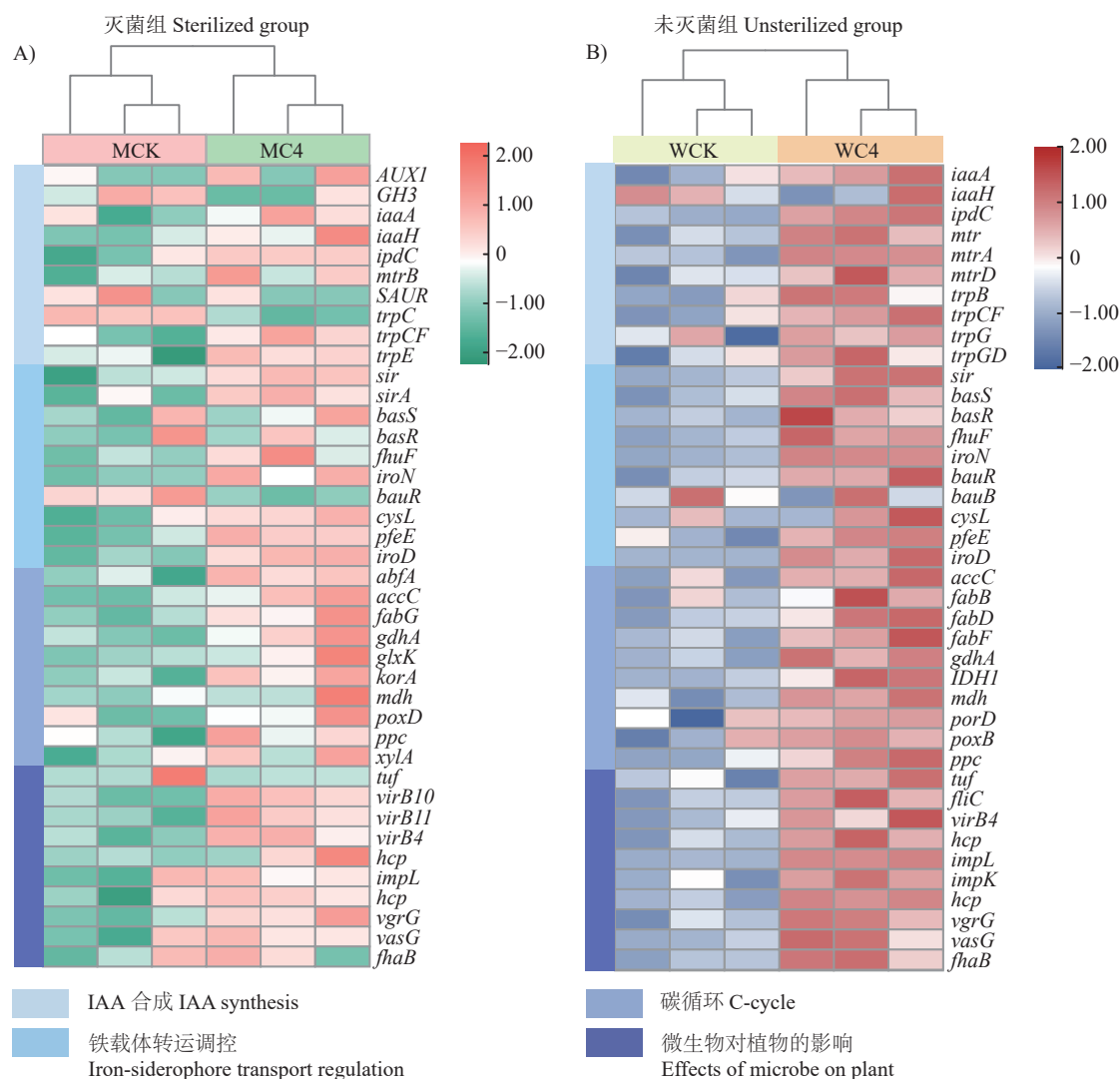


图6 IAA合成、铁载体转运调控、碳循环及微生物对植物的影响相关基因的丰度
Fig. 6 The abundance of genes related to IAA synthesis, iron-siderophore transport regulation, C-cycle and effects of microbe on plant

盐的过程中发挥重要作用^[35]。本研究基于宏基因组数据筛选了与解磷相关的基因，结果显示，上述与解磷相关基因的丰度都在MC4和WC4处理中升高，说明菌群可能通过提升磷转运相关基因的丰度，有效地获取和竞争磷元素，利用微生物群落来提高可持续农业中的磷有效性。固氮基因家族*nif*相关的基因都是固氮所必需的基因^[36]，*nir*、*nor*和*nos*等基因都是参与氮循环的基因^[37]。上述基因在接种菌群C4后的丰度都得到提升，说明菌群C4可能通过提升土壤中固氮基因的丰度来改善土壤的固氮活性，从而提高植物对氮元素的利用率。碳循环、微生物对植物的影响、IAA合成及铁载体的转运与调控均是与植物促生密切相关的因素。*fab*、*gdh*、*ppc*是参与碳循环和转运的相关基因^[37]。*vir*基因家族与膜转运、细菌分泌系统相关，*tur*是植物-病原体相互作用

用相关途径的重要基因，*hcp*是能量代谢相关途径的重要基因，*imp*、*vgr*和*vas*是与生物膜形成相关的基因，以上基因都是与微生物对植物的影响相关的基因^[37]。*iaaH*、*iaaA*等基因与IAA的合成有关^[38]；*iro*、*bas*、*fhu*等基因与铁载体合成、运输及调节相关^[39]；本研究结果表明上述基因在MC4和WC4处理中的丰度升高，证明菌群C4还可能通过提高碳循环、微生物对植物的影响、IAA的合成及铁载体的转运与调控相关功能基因的丰度，来实现对植物促生和保护植物健康的作用。

4 结论

复合菌群C4为本研究中促生能力最强的菌群，菌群C4显著提高玉米幼苗的株高、鲜重、根长、根尖数和分叉数，影响玉米根际微生物的组成和功

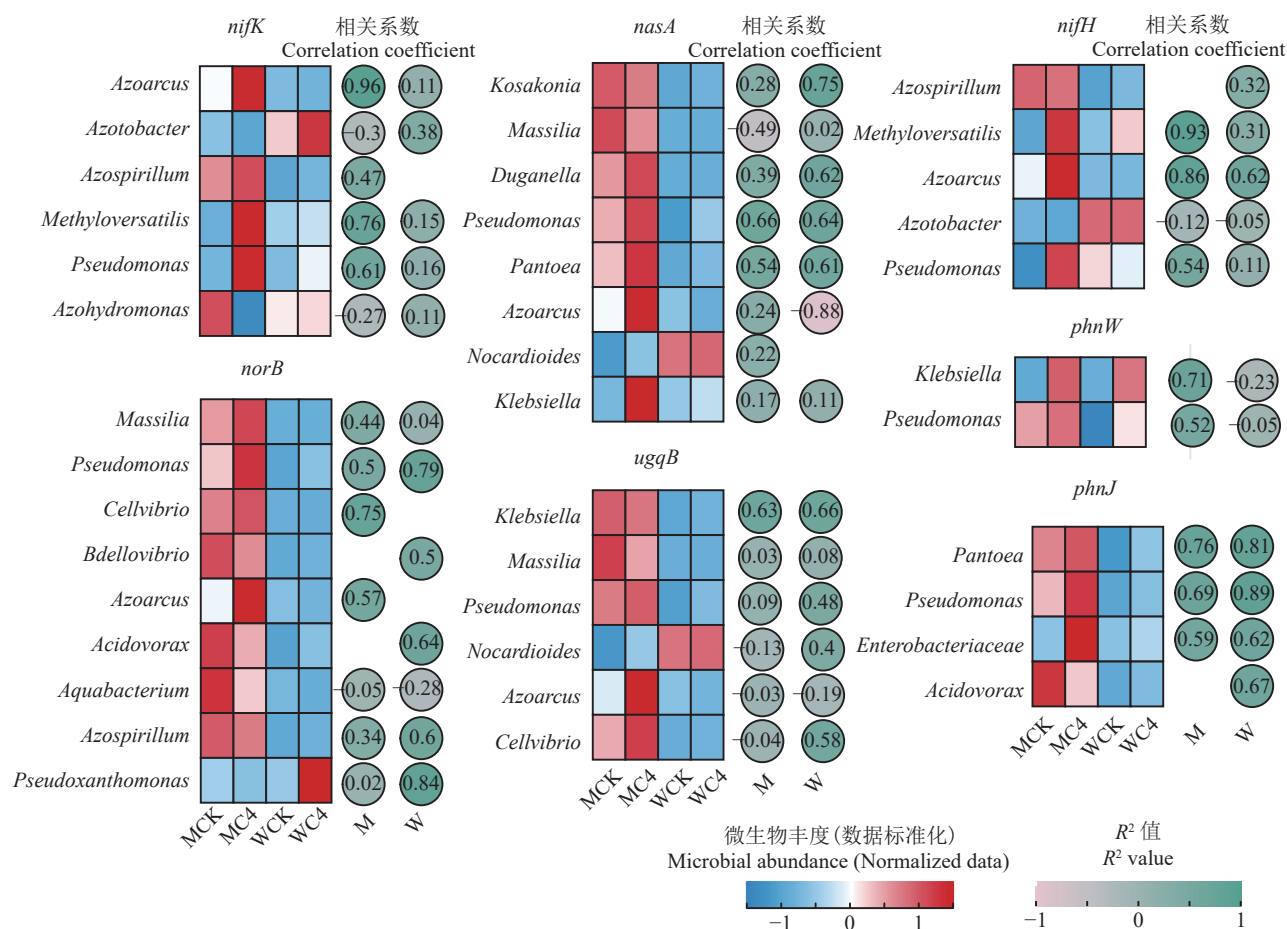


图 7 功能基因在属水平上的微生物溯源及菌属丰度与功能基因丰度的相关性分析

Fig. 7 Microbial traceability of functional genes at the genus level and correlation analysis between microbial genus abundance and functional gene abundance

能, 提高微生物群落的多样性及丰富度, 亦可以提升有益菌及相关功能基因丰度以促进玉米生长。因此, 菌群 C4 具有良好的促生能力, 具备微生物复合菌肥开发的潜能。

参考文献:

- [1] 齐驰名. 2021年国内玉米市场回顾与2022年展望[J]. 中国粮食经济, 2022, (4): 48–51.
Qi C M. Domestic corn market review 2021 and outlook[J]. China Grain Economy, 2022, (4): 48–51.
- [2] 穆心愿, 齐建双, 丁勇, 等. 黄淮海南部夏玉米对氮、磷、钾亏缺的响应及基因型差异[J]. 玉米科学, 2023, 31(3): 128–136.
Mu X Y, Qi J S, Ding Y, *et al.* Responses of different maize varieties to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency in south of Huang-Huai-Hai plain[J]. Journal of Maize Sciences, 2023, 31(3): 128–136.
- [3] 刘悦, 李青超, 兰英, 等. 植物根际促生菌的筛选、定殖分析及对玉米生长的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2023, (3): 73–78.
Liu Y, Li Q C, Lan Y, *et al.* Screening and colonization analysis of rhizosphere bacteria and effects on maize growth[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2023, (3): 73–78.
- [4] 李中建, 靳宛松. “藏粮于地、藏粮于技”战略下保障粮食安全的机制与意义[J]. 中国集体经济, 2023, (23): 32–36.
Li Z J, Jin W S. Mechanisms and significance of guaranteeing food security under the strategy of "hiding food in the land and technology"[J]. China Collective Economy, 2023, (23): 32–36.
- [5] 晋婷婷, 曹永清, 李云玲, 等. 一株连香树根际促生细菌LWK2的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1917–1940.
Jin T T, Cao Y Q, Li Y L, *et al.* Isolation, identification, and whole-genome sequence analysis of a plant growth-promoting bacterium LWK2 from *Cercidiphyllum japonicum* rhizosphere[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1917–1940.
- [6] 马长义, 李珊珊, 贡嘉伟, 等. 乙偶姻和枯草芽孢杆菌NRCB002的促生机制[J]. 植物营养与肥料学报, 2023, 29(3): 582–590.
Ma C Y, Li S S, Gong J W, *et al.* Mechanism of growth promotion by acetoin and *Bacillus subtilis* NRCB002[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2023, 29(3): 582–590.
- [7] 何建清, 张格杰. 植物根际促生菌肥代替部分化肥对黑青稞生长、产量和品质的影响[J]. 河南农业科学, 2022, 51(7): 93–101.
He J Q, Zhang G J. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) fertilizer instead of part of chemical fertilizer on growth, yield and quality of black highland barley[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(7): 93–101.
- [8] 张亮. 高效解磷菌对不同土壤的适用性研究及对桉树生长的影响

- [D]. 福建福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2019.
- Zhang L. The applicability research of the phosphate-solubilizing bacteria in different soils and the influence on the growth of eucalyptus[D]. Fuzhou, Fujian: MS Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2019.
- [9] Hezekiah K, Mungai N W, Moses T, *et al.* Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 141–151.
- [10] Qiu Z G, Egidi E, Liu H W, *et al.* New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering[J]. *Biotechnology Advances: An International Review Journal*, 2019, 37(6): 107371.
- [11] 赵玲玉, 索升州, 赵祺, 等. 梭梭根际促生菌(PGPR)菌肥对番茄产量、品质和土壤特性的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2022, 57(3): 42–51.
- Zhao L Y, Suo S Z, Zhao Q, *et al.* Effects of biofertilizers with PGPR strains from rhizosphere of *Haloxylon ammodendron* on fruit yield, quality and soil characteristics of tomato[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2022, 57(3): 42–51.
- [12] Kaur S, Egidi E, Qiu Z, *et al.* Synthetic community improves crop performance and alters rhizosphere microbial communities[J]. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 2022, 1(2): 118–131.
- [13] 范丙全. 我国生物肥料研究与应用进展[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(6): 1602–1613.
- Fan B Q. Advances in biofertilizer research and development in China[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2017, 23(6): 1602–1613.
- [14] Khan M U, Li P, Amjad H, *et al.* Exploring the potential of overexpressed *osCIPK2* rice as a nitrogen utilization efficient crop and analysis of its associated rhizo-compartmental microbial communities[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3636.
- [15] Chang W N, Chen W J, Hu Y L, Wang Z G. *Bacillus altitudinis* LZP02 improves rice growth by reshaping the rhizosphere microbiome [J/OL]. *Plant and Soil*, 2023: 1–16 [2024-01-16]. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06435-3>.
- [16] Parnell J J, Berka R, Young H A, *et al.* From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1110.
- [17] Carrión V J, Perez-Jaramillo J, Cordovez V, *et al.* Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome[J]. *Science*, 2019, 366: 606–612.
- [18] Zhang J H, Wei L F, Yang J, *et al.* *Panax notoginseng* probiotic consortia: Reshaping the rhizospheric microbiome and its role in suppressing root-rot disease of *panax notoginseng*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 701.
- [19] Pacheco A R, Moel M, Segrè D. Costless metabolic secretions as drivers of interspecies interactions in microbial ecosystems[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 103.
- [20] 李慧萍, 甘雅楠, 韩庆庆, 等. 祁连山云杉林土壤溶磷细菌的分离及对白三叶的促生效应[J]. *草地学报*, 2022, 30(4): 879–888.
- Li H P, Gan Y N, Han Q Q, *et al.* Isolation of phosphate solubilizing bacteria from soil of spruce forest in the Qilian Mountains and their growth promotion effects in White Clover[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(4): 879–888.
- [21] Zhang M, Zhang C, Zhang S S, *et al.* *Klebsiella jilensis* 2N3 promotes maize growth and induces resistance to northern corn leaf blight[J]. *Biological Control*, 2021, 156: 104554.
- [22] Kamira B, Fan L M, Ji L, *et al.* Defining the nitrogen fixation community size, structure and relevancy in Nile tilapia aquaculture pond waters[J]. *Akinik Publications*, 2016, 4(3): 33–44.
- [23] Dias da Silveira A P I, Raquel de P C M, Fernanda C F, *et al.* Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019, 112(2): 283–295.
- [24] Suarez C, Ratering S, Kramer I, Schnell S. *Cellvibrio diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of salt meadow plants and emended description of the genus *Cellvibrio* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 481.
- [25] Worsley S F, Newitt J, Rassbach J, *et al.* *Streptomyces* endophytes promote host health and enhance growth across plant species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e01053-20.
- [26] Singh R K, Singh P, Guo D J, *et al.* Root-derived endophytic diazotrophic bacteria *Pantoea cypripedii* AF1 and *Kosakonia arachidis* EF1 promote nitrogen assimilation and growth in sugarcane[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 774707.
- [27] Laborda P, Ling J, Chen X, Liu F Q. ACC deaminase from lysobacter gummosus OH17 can promote root growth in *Oryza sativa* nipponbare plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66: 3675–3682.
- [28] Ogbo F, Okonkwo J. Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from the roots of maize[J]. *Advances in Microbiology*, 2012, 2(3): 368–374.
- [29] Wang M, Li S S, Chen S B, *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.
- [30] Lópezbucio J, Camposcuevas J C, Hernándezcalderón E, *et al.* *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2007, 20(2): 207–217.
- [31] Liang J L, Liu J, Jia P, *et al.* Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(6): 1600–1613.
- [32] Liu W B, Ling N, Luo G W, *et al.* Active *phoD*-harboring bacteria are enriched by long-term organic fertilization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 152(10): 108071.
- [33] Hsieh Y J, Wanner B L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(2): 198–203.
- [34] Goldstein A H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by

- gram negative bacteria[J]. [Biological Agriculture and Horticulture](#), 1995, 12(2): 185–193.
- [35] Song H, Dharmasena M N, Wang C, *et al.* Structure and activity of PPX/GppA homologs from *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*[J]. [FEBS Journal](#), 2020, 287(9): 1865–1885.
- [36] Li Q, Zhang H W, Song Y, *et al.* Alanine synthesized by alanine dehydrogenase enables ammonium-tolerant nitrogen fixation in *Paenibacillus sabinae* T27[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(49): e2215855119.
- [37] Zheng X H, Oba B T, Wang H, *et al.* Organo-mineral complexes alter bacterial composition and induce carbon and nitrogen cycling in the rhizosphere[J]. [Science of the Total Environment](#), 2022, 836: 155671.
- [38] 冯寒骞, 李超. 生长素信号转导研究进展[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(7): 24–30.
- Feng H Q, Li C. Research advances of auxin signal transduction[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(7): 24–30.
- [39] Sheldon J R, Skaar E P. *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence[J]. [PLoS Pathogens](#), 2020, 16(10): e1008995.