

沙棘通过自主选择塑造根瘤内生微生物组

翟柯尧¹, 刘娟¹, 董玥¹, 李亚涛¹, 贺义才², 孙海红³, 马玉超^{*1}

1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

2 山西省林业和草原科学研究院林木育种所, 山西 太原 030012

3 辽宁省杨树研究所, 辽宁 阜新 115000

翟柯尧, 刘娟, 董玥, 李亚涛, 贺义才, 孙海红, 马玉超. 沙棘通过自主选择塑造根瘤内生微生物组[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3881-3898.

ZHAI Keyao, LIU Juan, DONG Yue, LI Yatao, HE Yicai, SUN Haihong, MA Yuchao. *Hippophae rhamnoides* shapes endophytic microbiome in root nodule by self-selection[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3881-3898.

摘要: 【背景】解析植物微生物群落结构是利用微生物组工程强化植物抗生物和非生物胁迫水平、提高农林产品质量和品质的基础。固氮根瘤是沙棘具有抗旱、抗寒和抗贫瘠等多种优良生物性状的关键。【目的】比较分析沙棘根际土和根瘤内细菌群落结构的组成及影响因素, 为揭示沙棘-弗兰克氏菌共生和植物-微生物互作协同抗逆机制提供理论基础。【方法】从辽宁、陕西和山西采集样品, 通过 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区的高通量测序技术, 采用生物信息学方法比较分析沙棘根际土和根瘤内细菌群落组成和丰度差异, 并探索土壤理化性质对根际土细菌群落结构的影响。【结果】沙棘根际土和根瘤内的细菌群落均以放线菌门(*Actinobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)为主要优势菌门, 且根瘤内弗兰克氏菌属(*Frankia*)为绝对优势菌属; 根际土前 10 个优势菌门的丰度在三地样品间均存在显著差异, 仅存在唯一共有的优势菌属(鞘氨醇单胞菌属, *Sphingomonas*), 且前 35 个优势属中有 27 个属在三地间存在明显丰度差异; 土壤 pH 和速效钾是沙棘根际土细菌群落多样性的主要影响因素; 根瘤内优势门和属在三省份间存在高度的保守性, 仅异根瘤菌属(*Allorhizobium*)存在显著丰度差异; 受宿主选择的影响, 根际土和根瘤内细菌多样性和丰富性存在不完全的统一性。【结论】沙棘根际土细菌群落多样性受土壤 pH 和速效钾的强烈影响, 沙棘根瘤通过自宿主选择从根际土中筛选获得相对保守和稳定的细菌群落。

关键词: 沙棘; 根际土; 根瘤; 16S rRNA 基因; 细菌群落结构; 影响因素

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD2201203); 国家林业局公益性行业科研专项(201304409); 北京市科技新星项目(2011033)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD2201203), the National Forestry Public Welfare Industry Research Project (201304409), and the Beijing Nova Program (2011033).

*Corresponding author. E-mail: mayuchao@bjfu.edu.cn

Received: 2022-12-10; Accepted: 2023-03-01; Published online: 2023-03-31

Hippophae rhamnoides shapes endophytic microbiome in root nodule by self-selection

ZHAI Keyao¹, LIU Juan¹, DONG Yue¹, LI Yatao¹, HE Yicai², SUN Haihong³, MA Yuchao^{*1}

¹ College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

² Forest Breeding Institute of Shanxi Academy of Forestry and Grassland Sciences, Taiyuan 030012, Shanxi, China

³ Liaoning Poplar Research Institute, Fuxin 115000, Liaoning, China

Abstract: [Background] Revealing the microbiome structure of plants is critical for enhancing plant tolerance to biotic and abiotic stresses and improving the quality of agricultural and forestry products. The nitrogen-fixing nodules of *Hippophae rhamnoides* is the key to the tolerance to drought, cold, and barren soil. **[Objective]** To provide a theoretical basis for revealing the roles of *H. rhamnoides*-*Frankia* symbiosis and plant-microbiome interaction in plant tolerance to stress, we studied the structure and influencing factors of bacterial community in the rhizosphere soil and root nodules of *H. rhamnoides*. **[Methods]** The rhizosphere soil and root nodules of *H. rhamnoides* were collected from 3 sampling sites in Liaoning, Shaanxi, and Shanxi, and high-throughput sequencing was performed for the V3–V4 variable regions of the 16S rRNA gene. The bioinformatics tools were employed to compare the community structure and abundance of bacteria between the soil and nodule samples. Furthermore, the effects of soil physical and chemical properties on the bacterial community structure in rhizosphere soil were explored. **[Results]** *Actinobacteria* and *Proteobacteria* were the dominant phyla in the rhizosphere soil and root nodule, and *Frankia* was the dominant genus in the root nodule of *H. rhamnoides*. The three provinces showed significant differences in the abundance of the top 10 dominant phyla and 27 of the top 35 dominant genera in the rhizosphere soil, and they shared only one common dominant genus *Sphingomonas*. Soil pH and soluble potassium were the main factors affecting the bacterial diversity in rhizosphere soil of *H. rhamnoides*. The dominant phyla and genera in the root nodules were highly conserved among the three provinces, and only *Allorhizobium* had significant differences in abundance among the three provinces. The diversity and abundance of bacteria in rhizosphere soil and root nodules were not completely consistent. **[Conclusion]** The bacterial diversity in the rhizosphere soil of *H. rhamnoides* is strongly affected by soil pH and available potassium. The root nodules of *H. rhamnoides* assemble a conserved and stable microbiome by self-host selection of bacteria from the rhizosphere soil.

Keywords: *Hippophae rhamnoides*; rhizosphere soil; root nodules; 16S rRNA gene; bacterial community structure; influencing factor

根际微生物组被认为是植物的第二基因组, 其组成受气候、土壤质地、含水量、pH等物理因素和土壤养分含量等化学因素的影响^[1]。对植物生长有益的根际微生物不但可以

通过固氮、降解矿物质、合成植物激素等直接促进植物生长发育, 同时还可以通过产生次级代谢产物和诱导植物抗性等协助植物抵御生物和非生物胁迫, 从而提高植物的健康水平和生

产力^[2]。土壤是植物内生微生物组的“种子库”，植物不同生态位(根际、根际和叶际等)因受宿主的选择压力而富集不同的微生物组^[3]。根瘤是植物和结瘤菌“结盟”形成的共生器官，植物为结瘤菌提供碳源，结瘤菌利用体内的固氮酶将空气中的氮气还原为氨供植物生长发育，植物-结瘤菌实现氮碳交换的互利互惠。根瘤内以结瘤菌为主，但同时也存在着丰富的非结瘤内生菌^[4-5]，且多株分离自根瘤的非结瘤内生菌具有植物促生功能和协助根瘤形成功能^[6-7]。根瘤是结瘤植物的特殊生态位，其内部微生物群落多来源于根际土^[8]，根瘤内微生物群落受宿主的选择压力程度是尚未明确的科学问题。

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是胡颓子科(*Elaeagnaceae*)落叶灌木或小乔木，广泛分布于亚洲和欧洲。因其果实含有多不饱和脂肪酸、类胡萝卜素、糖醇、超氧化物歧化酶和植物甾醇等近 200 种营养和生物活性化合物，被列为营养和药用双重目的“药食同源”水果^[9]。沙棘具有耐寒、耐旱、耐高温、耐贫瘠等多种优良的生物学性状，因此具有防风固沙、水土保持、改善土壤等多种生态价值^[10]。沙棘具有如此多的优良生物学性状，关键在于根部能够结瘤固氮，而共生结瘤又受到多种因素的影响，包括根际和根瘤内微生物群落结构、海拔、气候、沙棘树龄、土壤类型、理化特性和肥力等^[11]。沙棘高质量基因组测序的完成和沙棘-弗兰克氏菌共生分子机制的最新进展^[12]，使沙棘-弗兰克氏菌成为木本植物中共生固氮机制研究的明星体系。沙棘根际土和根瘤内均存在丰富的微生物^[13]，且从根瘤中也分离获得多株促生菌^[14]，但根瘤内生菌的稳定性、功能及受宿主选择压力程度也非常重要，对其进行深入研究有助于设计增强沙棘结瘤率的有效方法，从而服务于沙棘的森林培育和生产应用。

本研究从辽宁、陕西和山西三地采集了中国沙棘的根际土和根瘤样品，采用 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区的高通量测序技术解读细菌的群落结构，比较分析土壤理化性质对沙棘根际土细菌群落的影响、三地来源样品间细菌群落组成和丰度差异，以及根际土和根瘤内的细菌群落组成和丰度差异，以期为深入研究沙棘根际和根瘤内细菌群落组装机制和有益内生菌的开发利用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

1.1.1 沙棘根际土和根瘤样品采集

2019 年 9 月于辽宁、陕西、山西 3 个省份分别设定 3 个 20 m×20 m 的人工沙棘林地样方，样地的气候特征、沙棘的生长特征和土壤类型见表 1。每个样方内采用五点法选择 5 株代表性植株，在每个植株的 4 个方向采集根际土和根系样品，每个样方内取得的同类样品等比混合均匀后作为一个样品。样品采集时，去除表层土，在 10–30 cm 深度挖出根后抖落根周松散的土，用无菌毛刷刷下黏附在根上的土壤作为根际土，将根际土和根系样品分别装入无菌袋中低温运输回实验室。将每个根际土样品分为两份，一份用于土壤理化性质分析(4 °C 保存)，一份用于根际微生物高通量测序分析(–80 °C 保存)。将根系根瘤摘下后，用 75% 的乙醇浸泡 3 min 进行表面消毒，之后保存于 –80 °C，用于根瘤内 16S rRNA 基因扩增子测序分析。

1.1.2 主要试剂和仪器

PowerSoil DNA Isolation Kit, MoBio 公司; E.Z.N.A.® Plant DNA Kit, Omega Bio-Tek 公司。便携式 pH 计, Sartorius 公司; 连续流动分析仪, Seal 公司。

表 1 三省沙棘林地采样信息

Table 1 The sampling information of *Hippophae rhamnoides* forest lands in three provinces

样品 编号 Sample ID	采样地 Sampling site	年平均温度和无霜期 ^a Annual average temperature (°C) and frost-free period (d) ^a	年平均降水量和湿度 ^a Annual average precipitation (mm) and humidity (%) ^a	采样点 海拔 Altitude (m)	株高 Plants height (m)	冠幅 Crown width (m ²)	树龄 Tree age (year)	土壤质地 Soil texture
L1	辽宁省彰武县	7.2, 156	510.3, 61	127	3.0–3.8	2.1–3.3	6	砂土
L2	Zhangwu County,			245	2.8–3.6	3.2–4.5	7	Sandy soil
L3	Liaoning Province			225	2.6–2.8	3.2–4.3	6	
S1	陕西省榆阳区	8.3, 150	365.7, 52	1 075	2.5	2.7	9	沙壤土
S2	Yuyang District,			1 075	4.6	3.6	9	Sandy
S3	Shaanxi Province			1 075	3.1	2.1	9	loam soil
X1	山西省怀仁县	7.9, 141	367.0, 48	962	1.5–1.7	0.3–1.2	3	沙壤土
X2	Huairan County,			1 062	1.7–1.8	0.4–0.8	5	Sandy
X3	Shanxi Province			973	1.8–2.0	0.3–0.5	4	loam soil

L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西. ^a: 数据来源于国家气象科学数据中心

L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi. ^a: Data from the National Meteorological Sciences Data Center.

1.2 土壤理化性质测定

风干土样研磨后过 20 目筛, 根据《土壤农业化学分析方法》^[15]测定土壤理化特征: 采用电极法测量土壤 pH; 利用质量法测定土壤中总盐(total salt, TS)含量; 采用重铬酸钾氧化容量法测定土壤有机质(organic matter, OM)含量; 采用半微量开尔文蒸馏法测定总氮(total nitrogen, TN)含量; 氯化钾浸出后用流动分析仪测定土壤速效氮(available nitrogen, AN)含量; 采用酸溶-钼锑抗比色法测定土壤总磷(total phosphorus, TP)含量; 采用盐酸-氟化铵法测定土壤速效磷(available phosphorus, AP)含量; 采用氢氟酸-高氯酸消煮法测定土壤总钾(total potassium, TK)含量; 采用乙酸铵法测定土壤速效钾(available potassium, AK)含量。

1.3 16S rRNA 基因序列扩增和高通量测序

使用 PowerSoil DNA Isolation Kit 提取土壤样本的基因组 DNA, 使用 E.Z.N.A.® Plant DNA Kit 提取根瘤样本的基因组。使用带有 barcode 的引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩

增细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 可变区序列^[16]。PCR 扩增产物经 1% (质量体积分数)琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 用于构建微生物多样性测序文库。使用 Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台进行 paired-end 测序, 由北京奥维森基因科技有限公司完成。

1.4 数据分析处理

利用 QIIME1 v1.8.0 和 Pear v0.9.6 对 Illumina HiSeq 双端测序数据进行过滤和拼接, 使用 Vsearch v2.7.1 去除嵌合体, 并用 UPARSE 软件按 97% 的序列相似性获得 OTU。以 Silva128 数据库为参照, 使用 RDP classifier 算法对不同 OTU 进行物种分类注释。利用 QIIME1 v1.8.0 软件计算各根际土细菌 α 多样性指数(包括 Shannon 和 Chao1 等指数)。利用主成分分析(principal component analysis, PCA)和冗余分析(redundancy analysis, RDA)探索不同根际土细菌群落分化特征, 以及环境因子与细菌群落之间的相关性。以上分析均利用 R 软件包“vegan”、Canoco v5.0 和 Origin v8.0 统计软件进行。

2 结果与分析

2.1 沙棘根际土壤的理化性质

辽宁、陕西和山西三省拥有丰富的沙棘资源,气候条件迥异,是典型的沙棘生境代表(表1)。辽宁省彰武县属于温和半湿润的季风大陆性气候,昼夜温差大,最高温度 37.4 °C,最低温度 -30.4 °C,年均降水量 510.3 mm,平均相对湿度 61%。陕西和山西为风大、干旱气候,年平均降水量少。陕西省榆阳区属于中温带大陆性季风气候,样品采集地金鸡滩村位于毛乌素沙漠南缘风沙草滩区;而山西省属于温带大陆性气候,最冷月平均气温-9.2 °C,最热月平均气温 22.7 °C。这些气候条件必然影响土壤的理化性质和微生物群落的组成。利用森林土壤农化分析标准方法,我们测定了采集自辽宁、陕西和山西三地的沙棘根际土样品的 pH、全盐量、有机质、总氮、总磷、总钾、速效氮、速效磷和速效钾含量。结果显示,对于土壤 pH,来自陕西的样品最高(8.3),来自辽宁的样品最低(7.4);对于全盐含量,来自陕西的样品最高(0.26%),来自山西的样品最低(0.21%);而对于总氮、总磷、总钾、速效氮、速效磷和速效钾含量,来自陕西的样品最低,分别为 0.23 g/kg、0.19 g/kg、15.87 g/kg、7.02 mg/kg、5.34 mg/kg 和 41.83 mg/kg,来自山西的样品最高,分别为 0.68 g/kg、0.53 g/kg、21.39 g/kg、41.53 mg/kg、10.37 mg/kg 和 57.31 mg/kg。上述结果表明,除有机质和速效磷外,土壤 pH、全盐、总氮、总磷、总钾、速效氮、速效磷和速效钾含量在 3 个样点间均存在显著差异(图 1),这些差异可能显著地影响根际微生物群落的构成和丰度。

2.2 沙棘根际土细菌群落组成分析

2.2.1 细菌群落丰富度和多样性分析

采用 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区的高

通量测序技术,共获得 72 738-226 132 条原始序列,经去除嵌合体、短序列后得到优质序列 67 793-209 665 条,有效序列所占百分比为 79.71%-93.20%,优质序列长度分布于 400-440 bp 之间,测序深度均在 97%以上,数据量足够大,可以反映样本中绝大多数的原核微生物信息(表 2)。Clean 数据经聚类,来自辽宁、陕西和山西样品地的沙棘根际土中细菌 OTU 数量分别为 5 654、3 944 和 5 307,其中共有 OTU 数量为 2 356 (图 2A)。对于 Chao1 指数,辽宁>山西>陕西,表明来自辽宁样品地的沙棘根际土中 OTU 数目最多,细菌物种数量最多,其次为来自山西的样品,来自陕西的样品所含细菌物种数量最少。对于 Shannon 指数,山西>辽宁>陕西,表明来自山西样品地的沙棘根际细菌群落的多样性最高,其次为来自辽宁的样品,来自陕西样品地的沙棘根际土壤中细菌群落多样性最低(表 2)。

2.2.2 在门水平上的物种差异分析

基于 unweighted UniFrac 距离矩阵和平均聚类法(UPGMA),我们构建了前 10 个优势门(占总原核微生物的 98.53%-99.68%)的物种相对丰度图(图 3A)。来自辽宁、陕西和山西三地样品的沙棘根际土壤的细菌群落均以放线菌门(*Actinobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)为主,放线菌门在上述 3 个省份样品中分别占 32.76%、58.44%和 19.13%,变形菌门分别占 43.12%、19.61%和 31.00%。除这 2 个门外,在辽宁样品中绿弯菌门(*Chloroflexi*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)占比也较高,分别约为 5.8%、4.85%和 3.14%;在陕西样品中厚壁菌门(*Firmicutes*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)占比也比较高,分别占比约 7.69%、3.72%、3.41%和 2.04%;在山

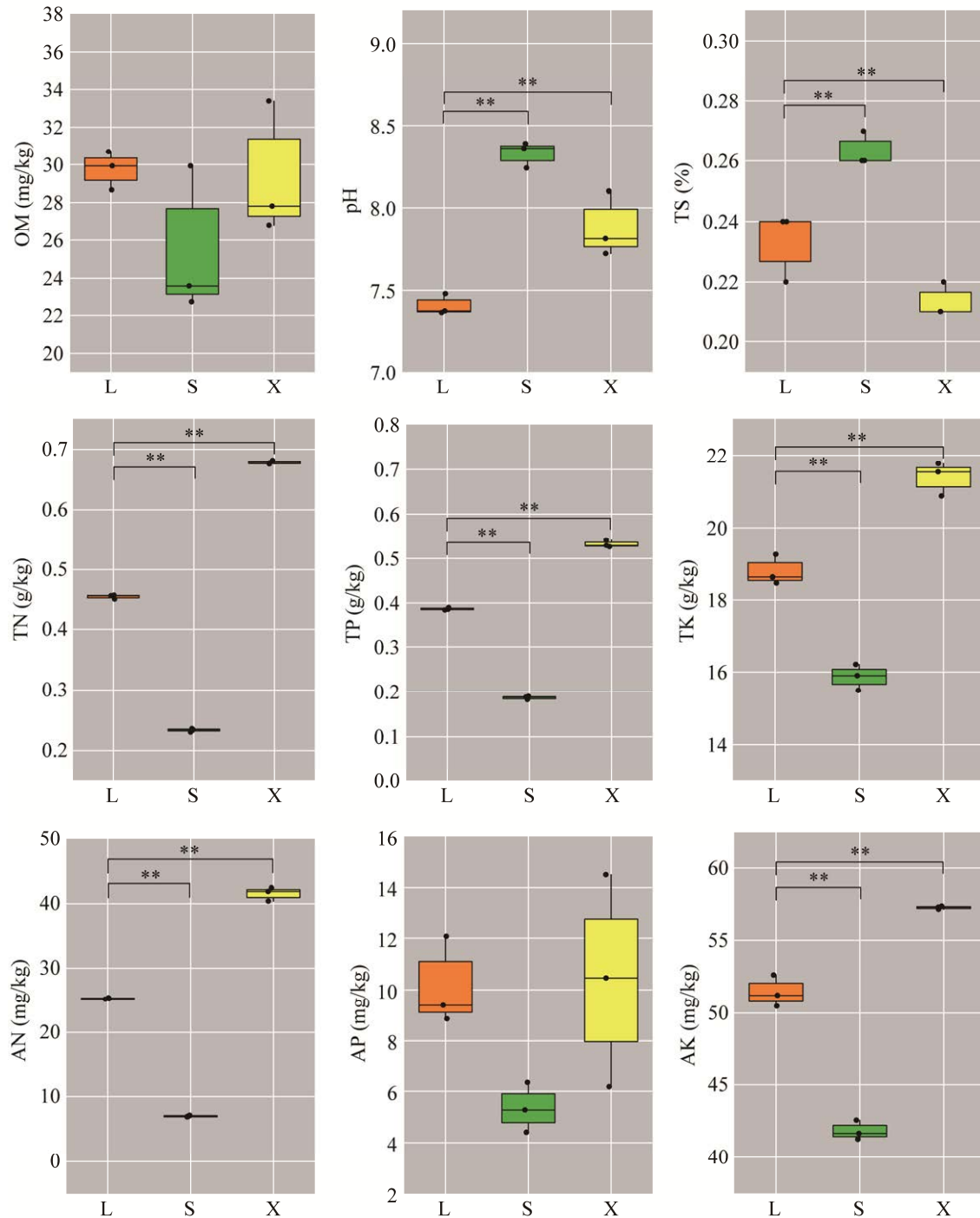


图 1 沙棘根际土的理化性质 L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西; OM: 有机质; TS: 全盐量; TN: 总氮; TP: 总磷; TK: 总钾; AN: 速效氮; AP: 速效磷; AK: 速效钾. **: $P < 0.01$

Figure 1 The physicochemical properties of rhizosphere soil of *Hippophae rhamnoides*. L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi; OM: Organic matter; TS: Total salt content; TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; TK: Total potassium; AN: Available nitrogen; AP: Available phosphorus; AK: Available potassium. **: $P < 0.01$.

表 2 沙棘根际土壤与根瘤菌多样性指数比较

Table 2 Comparison of diversity index between rhizosphere soil and rhizobia in *Hippophae rhamnoides*

样本编号 Sample ID	Chao1		Shannon		Coverage (%)	
	根际土 Rhizosphere soil	根瘤 Nodule	根际土 Rhizosphere soil	根瘤 Nodule	根际土 Rhizosphere soil	根瘤 Nodule
L	5 404.85±144.87a	481.49±187.50a	9.51±0.30a	1.57±0.78	0.97±0.00	1.00±0.00
S	3 747.61±266.24c	454.09±38.89b	6.84±0.60b	1.64±0.87	0.98±0.00	1.00±0.00
X	4 896.85±123.79b	733.00±114.79a	10.24±0.05a	3.02±2.40	0.98±0.00	1.00±0.00

同列不同小写字母表示不同地域样品间差异显著($P<0.05$). L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among samples from different regions ($P<0.05$).

L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi.

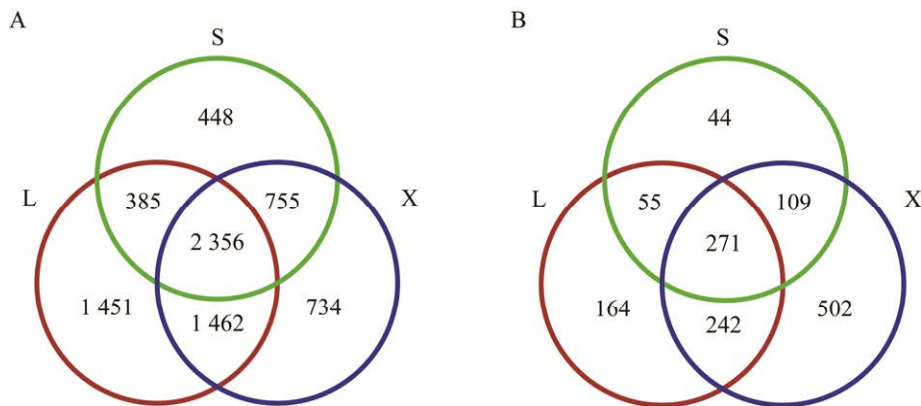


图 2 根际土(A)和根瘤样品(B)中 OTU 的韦恩图 L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西

Figure 2 The Venn diagrams of OTU in rhizosphere soil (A) and nodules (B). L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi.

西样品中酸杆菌门(*Acidobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)也有较高的菌群占比,分别为 14.63%、9.17%、8.97%和 6.23%。但物种丰度差异分析显示(图 3B),来自辽宁、陕西和山西三地的沙棘根际土的前 10 个优势门的物种丰度均存在显著差异,且除蓝细菌门(*Cyanobacteria*)外,放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和浮霉

菌门(*Planctomycetes*)的丰度差异非常显著。以上结果表明,在门水平上,沙棘根际土细菌群落组成存在一定的保守性,但三地样品间物种丰度差异显著。

2.2.3 在属水平上的物种差异分析

来自辽宁、陕西和山西三地样品的沙棘根际分别包含 515、435 和 426 属,细菌多样性具有明显的地域区别。唯一共有的优势菌属是鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*),在辽宁、陕西、山西样品中分别占 2.38%、4.07%和 4.62%。来自辽宁的沙棘根际土的优势菌属还包括属于变形菌门(*Proteobacteria*)的假单胞菌属

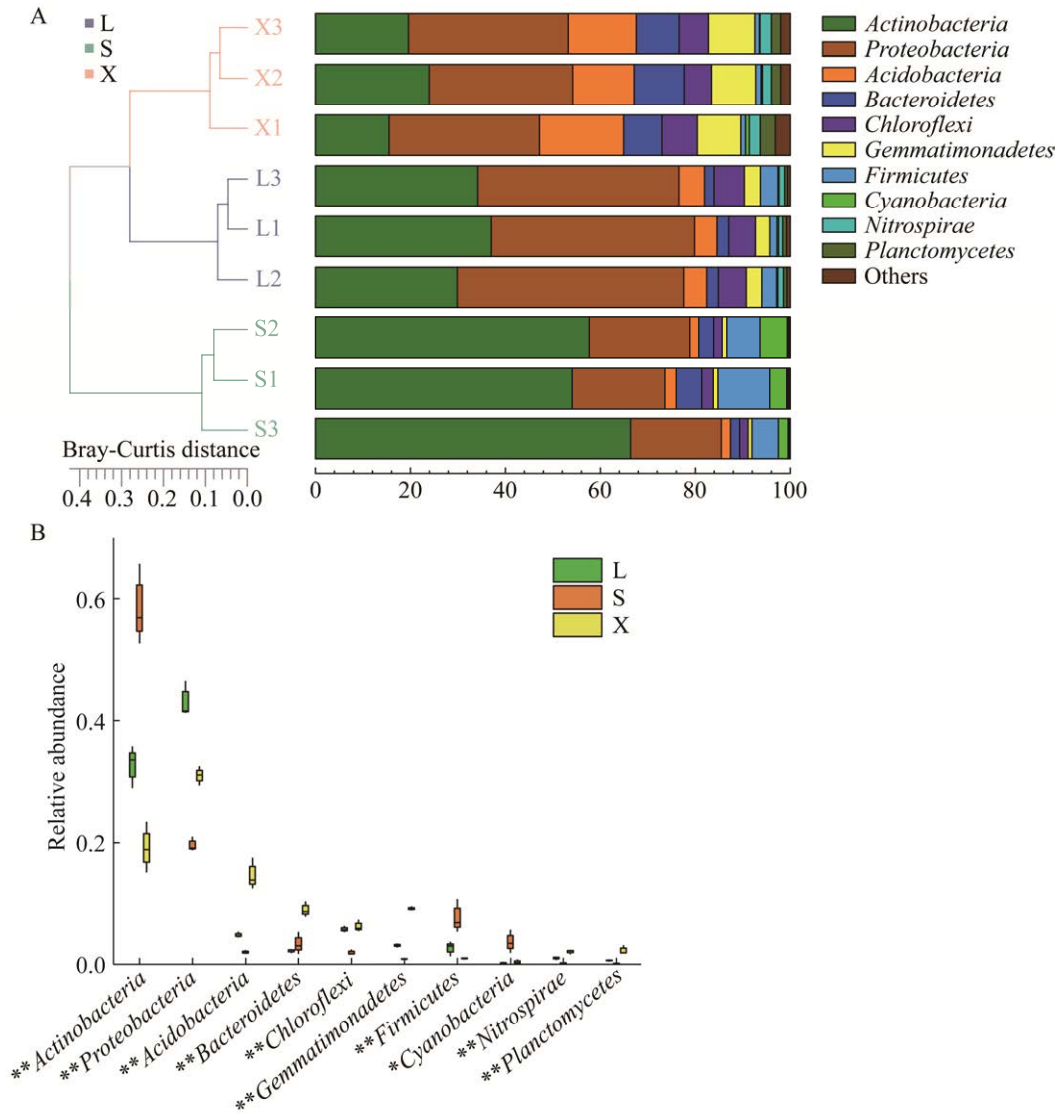


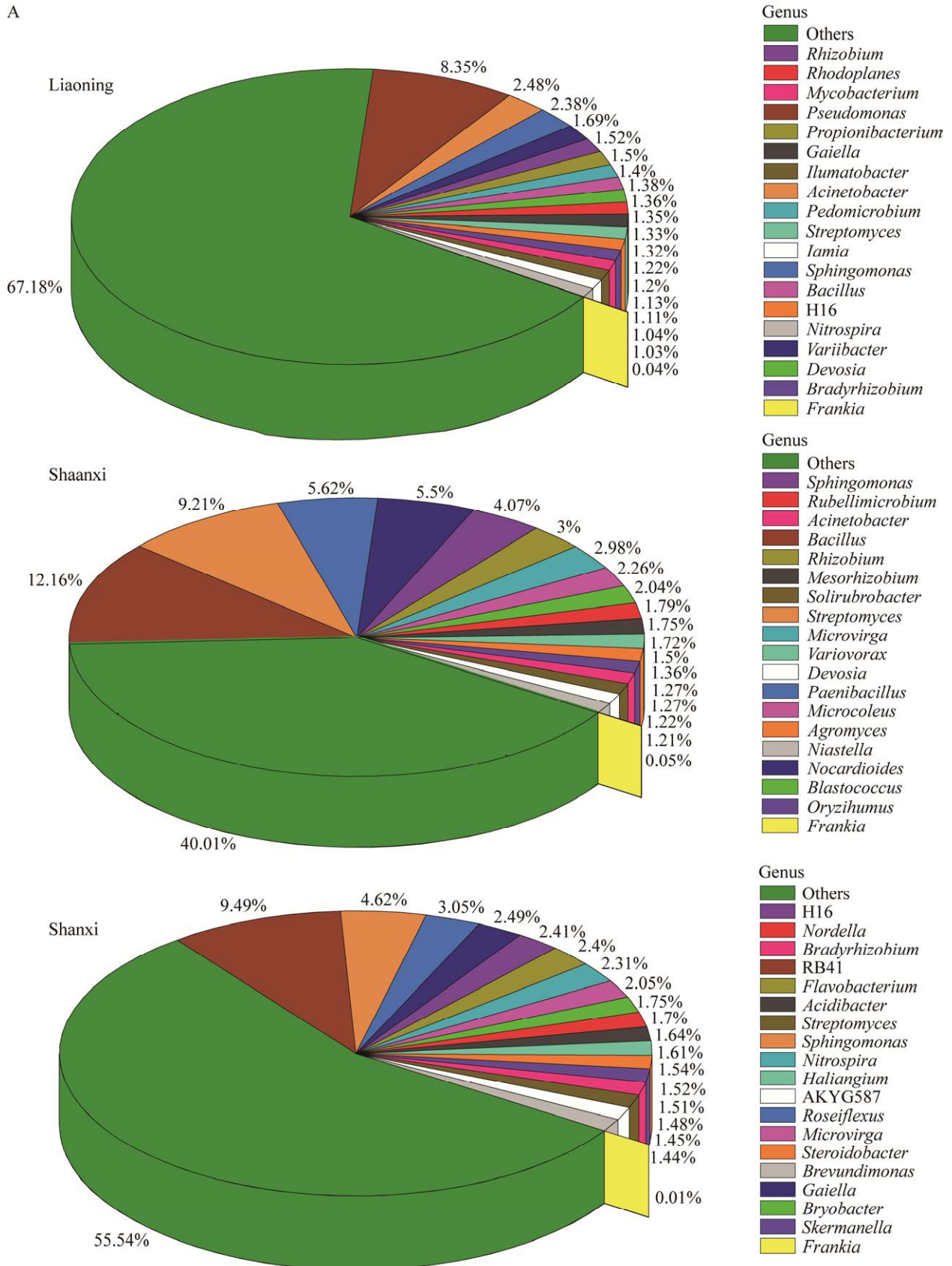
图 3 根际土中门分类水平的细菌群落分析 A: 基于 Bray-Curtis 距离和最高 10 个门相对丰度的 UPGMA 聚类. B: 三省样品差异显著的指示菌. L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 3 Analysis of phylum taxonomic bacterial communities in rhizosphere soil. A: UPGMA clustering based on Bray-Curtis distance and relative abundance of the top 10 phyla. B: Indicator bacteria with significant differences between Liaoning, Shaanxi and Shanxi. L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和 *Variibacter*, 相对丰度分别为 8.35%、2.48%和 1.69%; 来自陕西样品的优势菌属还包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和类诺卡氏菌属(*Nocardioides*), 相对丰度分别为 12.16%、9.21%、

5.62%和 5.5%; 来自山西样品的优势菌属还包括 RB41、玫瑰弯菌属(*Roseiflexus*)、*Gaiella* 和 H16, 相对丰度分别为 9.49%、3.05%、2.49%和 2.41%(图 4A), 在属的水平上, 结果表明三地来源沙棘根际土细菌群落组成和丰度存在明显的差异。

A



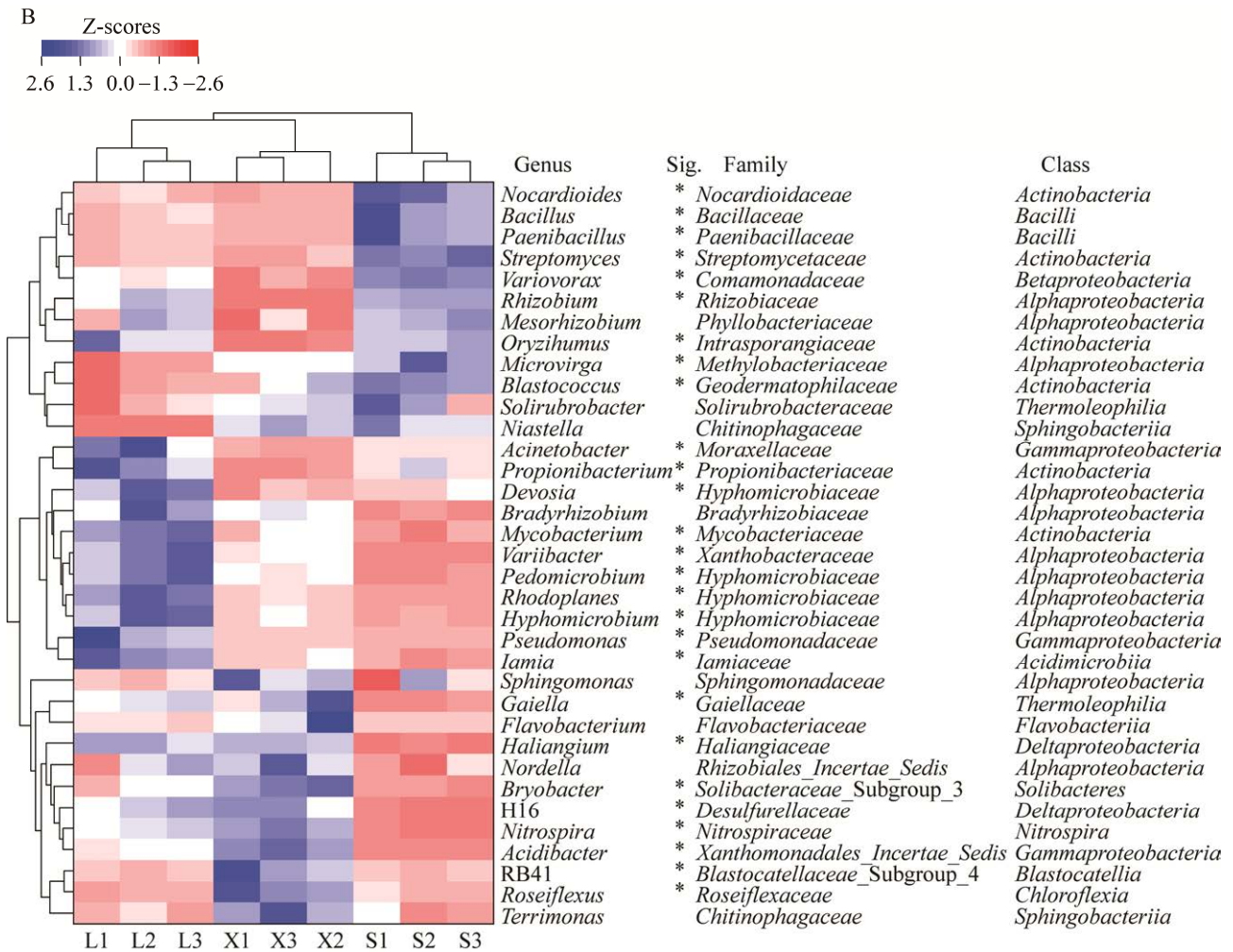


图 4 属水平上的根际土细菌群落分析 A: 属水平的细菌丰度比例. B: 丰度最高的 35 个属的归一化热图. 热图是基于行 z 分数的颜色编码. L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西. *: $P < 0.05$

Figure 4 Rhizosphere soil bacterial community analysis at genus level. A: Bacterial abundance ratio at the genus level. B: Normalized heat maps of the 35 genera with the highest abundance. Heat map is color-coded based on row z-scores. L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi. *: $P < 0.05$.

为深入比较三地样品间的物种丰度差异, 我们筛选丰度最高的前 35 个属(分别占辽宁、陕西和山西三地总属的 62.93%、66.32%、54.39%), 经组间归一化后绘制层次聚类的相对丰度热图(图 4B)。结果表明, 只有 8 个属在三地样品中无丰度差异, 其他 27 个属均存在显著丰度差异。对于丙酸杆菌科(*Propionibacteria*)的丙酸杆菌属(*Propionibacterium*), 莫拉氏菌科

(*Moraxellaceae*)的不动杆菌属(*Acinetobacter*), 分枝杆菌科(*Mycobacteriaceae*)的分枝杆菌属(*Mycobacterium*), 假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)的假单胞菌属(*Pseudomonas*), 黄色杆菌科(*Xanthobacteraceae*)的 *Variibacter*, 以及属于生丝微菌科(*Hyphomicrobiaceae*)的几个属, 包括土微菌属(*Pedomicrobium*)、红游动菌属(*Rhodoplanes*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、

德沃斯菌属(*Devosia*), 在辽宁样品沙棘根际土中的相对丰度显著高于其他两地样品。类诺卡氏菌科(*Nocardioideae*)的类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌科(*Paenibacillaceae*)的类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、链霉菌科(*Streptomycetaceae*)的链霉菌属(*Streptomyces*)、丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)的贪噬菌属(*Variovorax*)和根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)的根瘤菌属(*Rhizobium*)的相对丰度在陕西样品的沙棘根际土中最高。对于 *Haliangiaceae* 的 *Haliangium*、*Solibacteraceae*_Subgroup_3 的 *Bryobacter*、*Xanthomonadales*_Incertae_Sedis 的 *Acidibacter*、*Blastocatellaceae*_Subgroup_4 的 RB41、*Roseiflexaceae* 的玫瑰弯菌属(*Roseiflexus*), 在山西样品的沙棘根际土中的相对丰度显著高于其他两地。以上结果说明, 在属水平上, 三地沙棘根际土细菌群落的优势物种组成和多个物种丰度均存在明显差异。

2.2.4 细菌群落与土壤理化性质的相关性分析

土壤养分特征不仅能反映土壤生产力, 而且对陆地生态系统土壤细菌群落多样性和结构的形成具有重要作用^[17]。来自辽宁、陕西和山西三地的沙棘根际土细菌群落在门水平上具有一定的保守性, 但属水平上群落差异显著。因此, 基于高通量测序的 OTU, 我们通过主成分分析(principal component analysis, PCA)和冗余分析(redundancy analysis, RDA)进一步研究了土壤理化性质对沙棘根际细菌分布和群落组成的影响。

在门水平上, 主成分 1 (RDA1)和主成分 2 (RDA2)共解释了 96.55%的细菌变量, 其中 RDA1 解释了 81.57%的细菌变量, 主要将辽宁、山西两样地沙棘根际微生物与陕西样地区分开; RDA2 解释了 14.98%的细菌变量, 主要将山西、陕西两样地沙棘根际微生物与辽宁样地

区分开(图 5A)。速效钾(AK)对门水平群落变异的贡献率为 77.8%, 且对物种的影响具有显著性, 可以认为是驱动群落变异的主要因子。放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和蓝细菌门(*Cyanobacteria*)与 AK 呈负相关关系, 山西沙棘样地土壤 AK 的含量显著高于辽宁沙棘样地, 而陕西样地所含 AK 最低(图 1), 表明在陕西沙棘样地根际群落结构中放线菌门、厚壁菌门和蓝细菌门受 AK 含量影响较小, 因为相比之下这 3 门在陕西样品地丰度最高。其他 7 个主要的细菌门, 包括变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和浮霉菌门(*Planctomycetes*)均与 AK 呈正相关。

在属水平, 主成分 1 (RDA1)和主成分 2 (RDA2)共解释了 92.65%的变量, 其中 RDA1 解释了 55.56%的细菌变量, RDA2 解释了 37.09%的细菌变量(图 5B)。两种土壤因子 pH 和 AK 在属水平对群落变异的贡献率分别为 47.6%和 33.2%, 可认为是属水平上区分 3 个沙棘林地和解释微生物群落差异的主要因素。微小杆菌属(*Microvirga*)、芽球菌属(*Blastococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)与 pH 呈正相关关系, 陕西沙棘林地 pH 值为 8.24–8.39, 显著高于其他两地, 可能该 pH 范围更适合以上菌属的生存繁殖。然而大部分菌属, 如鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Gaiella*、硝化螺菌属(*Nitrospira*)和 *Nordella* 的相对丰度都与土壤中 AK 浓度呈正相关关系, 与门水平的结果相对应。上述结果说明 AK 和 pH 在构建和稳定沙棘样地根际土壤细菌群落中发挥着重要的作用。

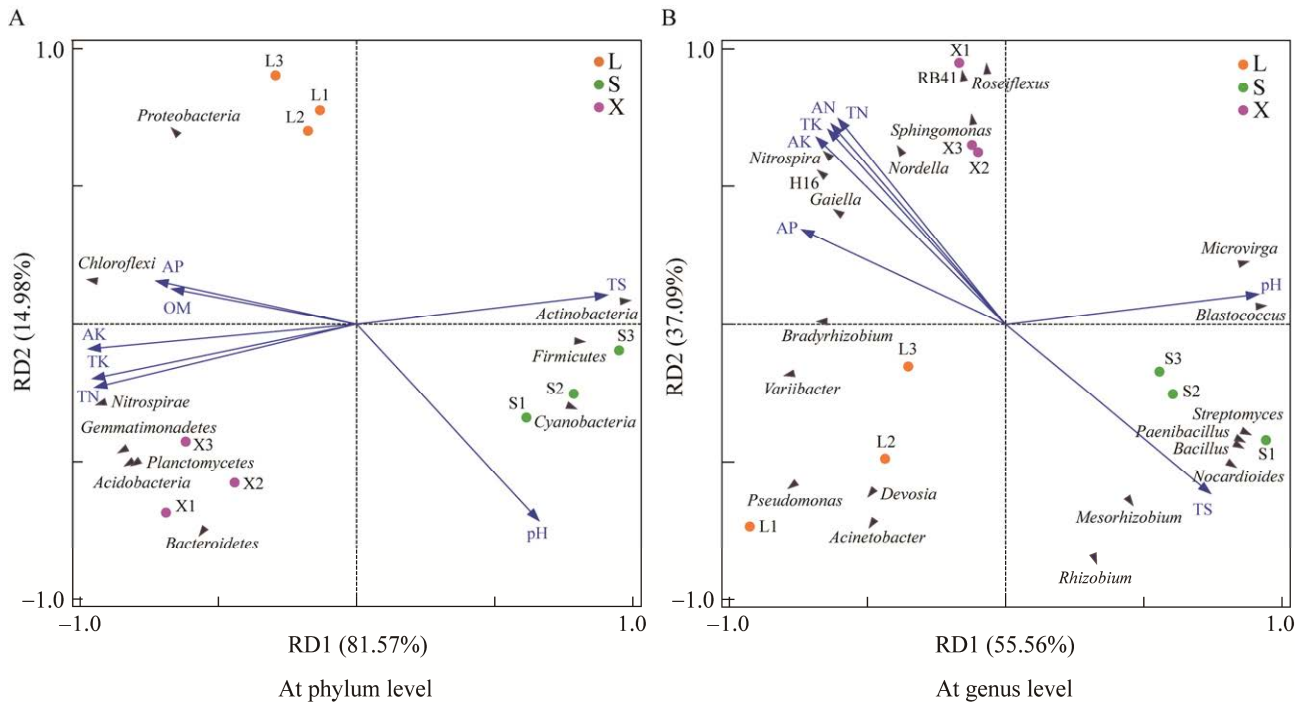


图5 门水平(A)和属水平(B)上细菌与土壤物理化学因素的冗余分析 L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西
Figure 5 Redundancy analysis for the bacteria among samples at phylum (A) and genus (B) levels with edaphic physicochemical factors, respectively. L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi.

2.3 根瘤内细菌群落组成分析

测序后的 clean 数据经聚类,我们发现采集自辽宁、陕西和山西样品地的沙棘根瘤中细菌 OTU 数目分别为 732、479 和 1 124, 其中共有 OTU 数目为 271 (图 2B)。Chao1 指数和 Shannon 指数分别可以反映出样品中物种丰富度和物种多样性。对于 Chao1 指数, 山西>辽宁>陕西, 表明来自山西的样品的沙棘根瘤中 OTU 数目最多, 即细菌物种数量最多, 其次为来自辽宁的样品, 来自陕西的样品所含细菌物种数量最少。对于 Shannon 指数, 山西>陕西>辽宁, 表明来自山西样品的沙棘根瘤的细菌群落多样性最高, 其次为来自陕西的样品, 来自辽宁样品的沙棘根际土壤的细菌群落多样性最低(表 2)。在门水平上, 沙棘根瘤内的细菌以放线菌门 (*Actinobacteria*) 为主要优势菌门, 占 81.0%, 其

次为变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*), 分别占 10.2%、6.2% 和 1.4%, 且各主要门在辽宁、陕西和山西三地样品之前无明显丰度差异。在属水平上, 沙棘根瘤细菌中弗兰克氏菌属 (*Frankia*) 为绝对优势菌属, 占比为 66.5%–82.1%。此外还存在一些其他内生菌, 如芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、异根瘤菌属 (*Allorhizobium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 等可能在植物生长和结瘤过程中发挥着重要的作用。对丰度最高的前 20 个属进行差异分析, 发现仅异根瘤菌属 (*Allorhizobium*) 在三地间存在显著丰度差异(图 6)。上述结果表明, 沙棘根瘤内细菌群落多样性明显低于根际土, 以弗兰克氏菌属 (*Frankia*) 为主, 且相对保守。

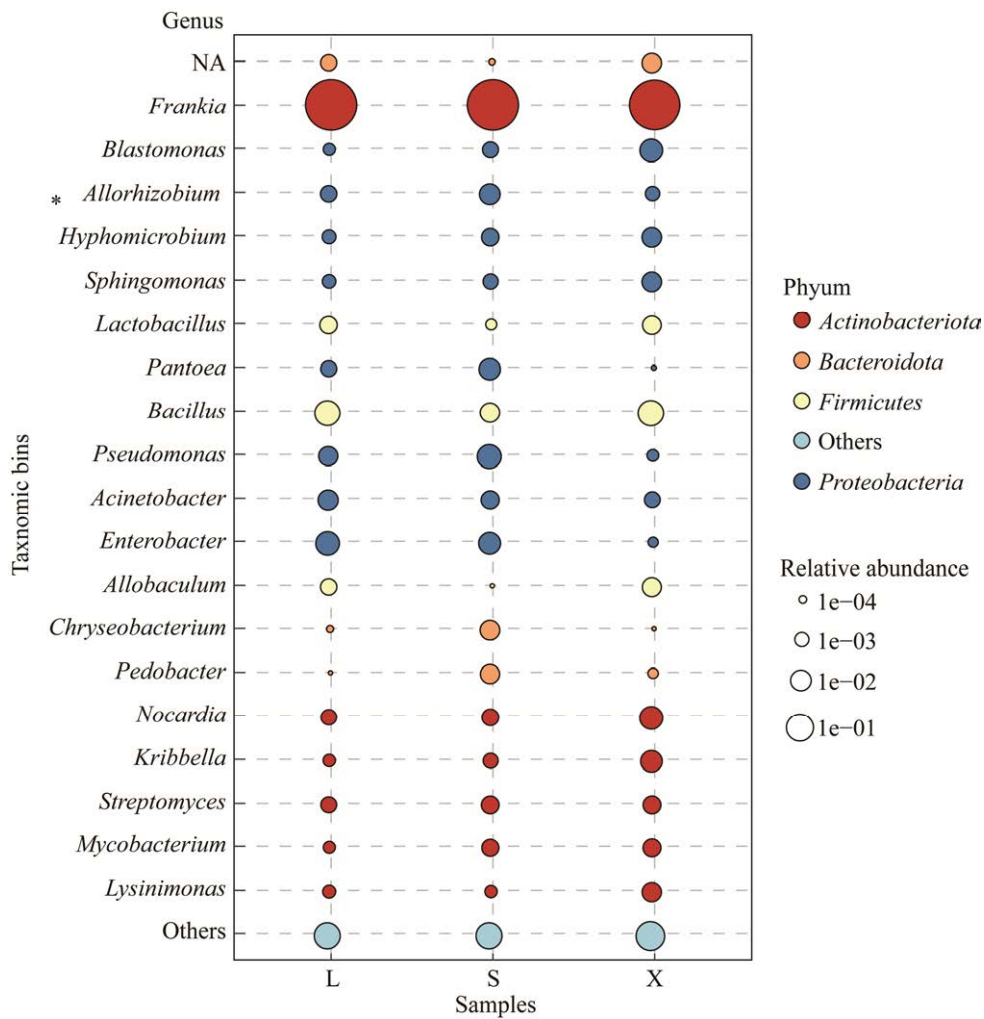


图 6 根瘤样品中细菌前 20 个属的气泡图 L: 辽宁; S: 陕西; X: 山西. *: $P < 0.05$

Figure 6 The bubble maps of the top 20 genera of bacteria in the nodules. L: Liaoning; S: Shaanxi; X: Shanxi. *: $P < 0.05$.

2.4 根瘤内与根际土的细菌群落差异性分析

对沙棘根际土和根瘤内细菌种类和多样性进行比较分析,我们发现根瘤内 OTU 数目仅为根际土的 10.27%–17.14%,根际土细菌 Chao1 指数和 Shannon 指数分别是根瘤内细菌的 11.23 倍和 6.06 倍(表 2)。因此,沙棘根际土细菌的细菌丰富度与多样性均高于根瘤内细菌,群落结构也更加复杂。在门水平上,根际土和根瘤内的优势门具有一致性,均为放线菌门(*Actinobacteria*)菌门、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门

(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)。在属水平上,根际土和根瘤内细菌丰度存在明显的差异,根瘤内弗兰克氏菌属(*Frankia*)占绝对的优势,而根际土中仅为 0.01%–0.05% (图 4A)。除弗兰克氏菌属(*Frankia*)外,对根际土和根瘤中丰度最高的前 15 属进行 Stamp 差异分析(图 7),我们发现克里布所菌(*Kribbella*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、埃氏慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)

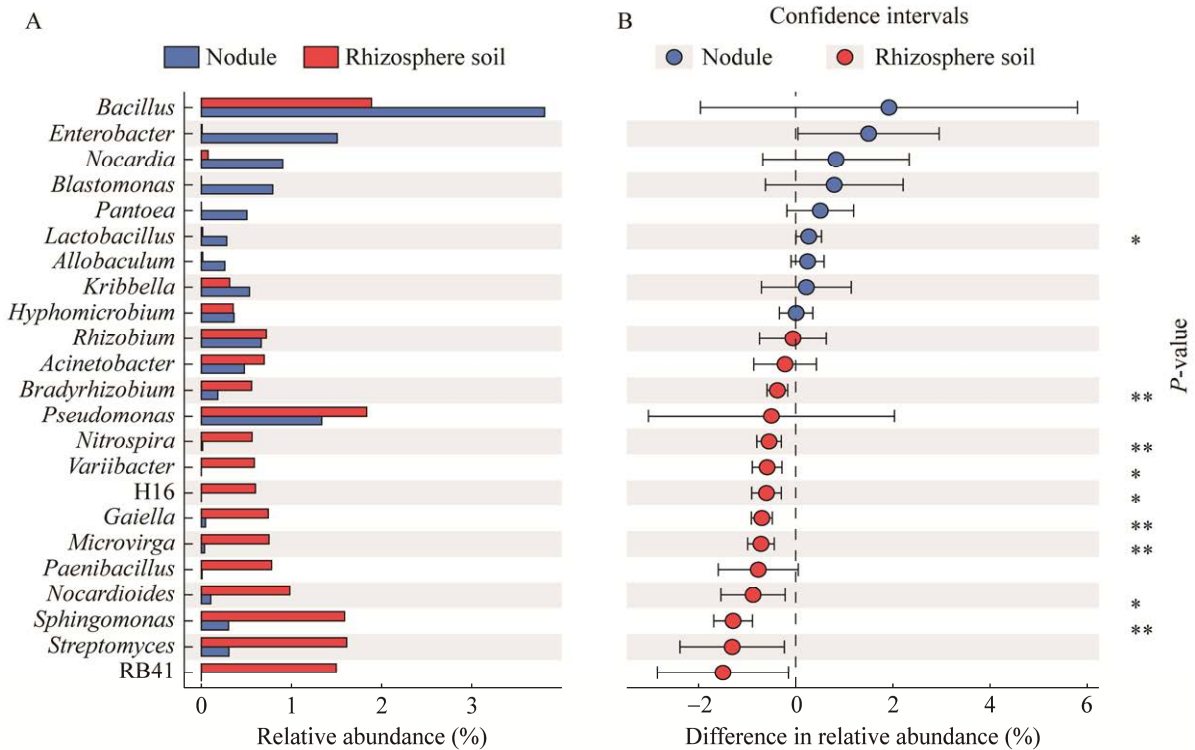


图7 根际土与根瘤中细菌属水平相对丰度 Stamp 差异分析 A: 样品沙棘根际土和根瘤(除弗兰克氏菌属以外)中最高 15 菌属的相对丰度. B: 这些菌属在沙棘根际土和根瘤中的差异显著性分析. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Figure 7 Analysis of the relative abundance of bacteria genus in rhizosphere soil and nodule by Stamp. A: The relative abundance of the top 15 bacteria genera in the rhizosphere soil and nodules of samples of *Hippophae rhamnoides* (other than *Frankia*). B: Analysis of the significance of differences between these genus in the rhizosphere soil and nodules of *Hippophae rhamnoides*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

在根际土中和根瘤中有相似的丰度, 表明根瘤内这些菌主要来源于土壤, 且丰度受根际土的影响; 硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)、*Gaiella*、微枝形杆菌(*Microvirga*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)和链霉菌属(*Streptomyces*)在根际土中丰度为 0.56%–1.61%, 而在根瘤中丰度仅为 0.01%–0.31%; 而在根际土中丰度较高的 RB41、H16 和变异杆菌属(*Variibacter*)在根瘤中未发现; 除绝对优势菌属弗兰克氏菌属(*Frankia*)外, 肠杆菌属(*Enterobacter*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和异杆菌属

(*Allobaculum*)等在根瘤中的相对丰度大于在根际土中的相对丰度; 值得注意的是, 以一定丰度存在于根瘤中的芽单胞菌属(*Blastomonas*)和泛菌属(*Pantoea*)未在根际土中发现, 这表明根瘤中定殖的菌群不止来自于周围根际土壤, 还可能来源于有缺口的茎和叶片, 甚至某些细菌还会以专性寄生的方式存在于种子或根瘤内^[18]。即便沙棘根际土和根瘤内部分菌属存在组成和丰度差异, 但上述结果说明, 根瘤内细菌群落主要来源于根际土, 且植物宿主通过自主选择富集了相对稳定的细菌群落组成和丰度。

3 讨论

根际微生物组(rhizosphere microbiome)是植物从其种子库土壤微生物组中有选择地招募在根际聚集动态微生物集群。正确管理植物根际微生物组不仅能促进宿主营养吸收、抵抗病虫害及适应环境胁迫,还可能促进健康土壤的形成,增强土壤生态系统的服务功能。宿主植物类型决定了根际微生物群落的组成。随着高质量基因组测序的完成^[12],集食药价值 and 生态效益于一身的沙棘将成为研究木本非豆科植物-弗兰克氏菌共生固氮机制和植物微生物组的理想模型。在本研究中,我们选择气候特征和土壤理化性质迥异的辽宁、陕西和山西三地采集沙棘样品进行根际微生物群落组成和驱动因素的相关性分析。结果表明沙棘根际微生物组均以放线菌门(*Actinobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)为主,这与张爱梅等^[8]的研究结果一致。但是在属水平上,除了唯一共有优势属鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)外,三地均具有各自特异的优势细菌群落组成。辽宁样地沙棘根际的优势菌属的成员具有多方面的功能,其中丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)细菌和德沃斯菌属(*Devosia*)细菌具有固氮能力^[19-20],不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌和假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌产植物生长激素吲哚乙酸和次级代谢产物,可改善根系对铁、磷等矿物质的吸收和利用^[21],红游动菌属(*Rhodoplanes*)细菌和生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)细菌在污染物的生物修复中发挥积极的作用^[22-23]。陕西样地沙棘根际的优势菌属成员中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)细菌是典型的多功能植物生防促生菌^[24],类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)细菌是沙棘-弗兰克氏菌共生结

瘤的“helper”菌株^[25],且除根瘤菌外均具有强的抗逆能力。山西样地沙棘根际的群落组成和丰度与陕西样地类似,可能是相似的土壤质地和干旱等条件驱动的结果,所不同的是山西样地显著富集了促进土壤碳循环的细菌,包括酸性杆菌属(*Acidibacter*)^[26]、玫瑰弯菌属(*Roseiflexus*)^[27]和苔藓菌(*Bryobacter*)细菌^[28]。上述分析结果表明,根际细菌存在功能冗余性,三地沙棘根际土细菌群落的功能类似,组成和丰度的明显差异可能是环境条件驱动的结果。

在同一种植物范围内,除了气候和土壤质地外,土壤理化性质也是根际微生物组的重要驱动因素。土壤复杂的物理化学性质,可直接改变土壤微生物群落的组成,进而造成根际微生物组装配过程中初始微生物群落的差异,最终影响根际微生物组的组成。pH 被认为是影响土壤微生物群落结构最重要的化学特性之一,土壤的酸碱环境可影响土壤中植物重要营养元素磷的存在形态与生物有效性^[29]。钾是仅次于氮、磷的植物生长必需的第三大营养物质,可以“激活”植物体内 70 多种不同酶,从而在植物的生长发育和代谢过程中起重要作用;如果缺钾,植物将更容易受到病虫害的影响,生长缓慢、种子小、质量差、产量低;虽然土壤中的钾储量很大,但大部分的钾(约 98%)不能直接被植物吸收利用^[30]。土壤中的溶钾菌通过产各种有机酸将不溶性的钾化合物转化为可溶性形式,供植物生长利用^[31]。土壤质量的维持是环境和可持续农林业的关键因素,而固氮、分解有机质、解磷、解钾等功能微生物多样性的增加是土壤质量维持的关键因素。我们对沙棘根际土微生物群落和土壤理化性质进行了 RDA 分析。速效钾(AK)对门水平和属水平细菌群落变异的贡献率分别为 77.8%和 33.2%, pH 对属水平细菌群落变异的贡献率为 47.6%,这暗示

AK 和 pH 是驱动三地沙棘根际土壤微生物群落组成和丰度差异的重要因素,这通常会影响植物的生长和适应性。

植物内生菌是栖居在植物组织内部、以宿主植物代谢物为营养物质的一类微生物。植物内生菌促进植物的生长发育,通过增强营养物质吸收、与病原菌竞争生态位、通过产抗菌物质和诱导植物抗性等机制提高宿主植物的抗逆性。宿主植物的类型和不同生态位(根、茎、叶、花和果等)因代谢物的成分组成和丰度差异塑造了不同的内生微生物组。根瘤是结瘤植物的特殊生态位,宿主植物塑造了以结瘤菌为主、丰富的非结瘤菌并存的内生微生物组。沙棘是先锋树种,与弗兰克氏菌结瘤共生贡献于土壤氮循环。弗兰克氏菌和非结瘤菌共同构成的内生微生物组是沙棘宿主生长和可塑性的关键。沙棘根瘤内存在丰富的非结瘤内生菌资源^[13],并建立了内生菌资源库^[32],且分离获得的菌株具有多种植物促生功能,包括产吲哚乙酸、铁载体、纤维素酶和胞外多糖,以及溶磷和抑制植物病原菌等^[14]。然而仅从根瘤中简单分离和鉴定非结瘤内生菌可能不足以明确它们作为有益内生菌的作用,它们在根瘤中的相对丰度和被寄主植物的优先选择同样重要。我们对三地沙棘根瘤内生菌进行比较分析,结果显示在门和属水平都存在非常稳定的群落组成和丰度(仅异根瘤菌属存在显著丰度差异),表明环境条件的差异对根瘤内生菌群落组成和丰度的影响较小。通过对三地沙棘根瘤和根际土内的细菌种类进行比较分析,结果显示仅有芽单胞菌属(*Blastomonas*)和泛菌属(*Pantoea*)未在根际土中发现,其他菌均来源于根际土,证明了根际土是根瘤内生菌“种子库”的这一说法。有些菌在根瘤和根际土中存在相似的丰度,而有些菌在根际土中丰度较高,根瘤中丰度低,有些菌根

际土中丰度低根瘤中丰度却很高,这表明宿主选择性地塑造了根瘤内生细菌群落的构成和丰度。从低丰度的根际土中富集到根瘤中的肠杆菌属(*Enterobacter*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和异杆菌属(*Allobaculum*)细菌可能对植物生长和根瘤发育过程起重要作用。乳杆菌属(*Lactobacillus*)细菌^[33]和肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌^[24]通过固氮、溶磷和解钾等提高营养成分的有效性以促进植物生长;接种泛菌属(*Pantoea*)细菌菌株可增强接种植物的抗病性^[21];诺卡氏菌属(*Nocardia*)细菌不但促进植物生长,而且可能作为“辅助细菌”(helper bacteria)在早期根瘤形成过程中起作用,但这些菌的具体功能机制还有待深入研究。

4 结论

辽宁、陕西和山西三地沙棘根际土的 pH、全盐、总氮、总磷、总钾、速效氮、速效磷和速效钾含量存在显著差异;在门水平上细菌群落以放线菌门(*Actinobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)为主,在属水平上唯一共有优势属为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*);三地间沙棘根际细菌群落组成和丰度在门和属水平上均存在非常显著的差异,且受根际土 pH 和速效钾的强烈影响。沙棘根瘤内生菌在门水平上以放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为主,在属水平上弗兰克氏菌属(*Frankia*)占绝对的优势;三地间沙棘根瘤内生菌群落组成非常保守,仅异根瘤菌属(*Allorhizobium*)存在丰度差异。根瘤内除芽单胞菌属(*Blastomonas*)和泛菌属(*Pantoea*)外均来源于根际土,但是丰度差异存在不同情况,包括根瘤中丰度为零、根际土>根瘤、丰度相似、根瘤>根际土,说明沙棘通过自主选择塑造了稳定的根瘤内生微生物组。

REFERENCES

- [1] NAYLOR D, MCCLURE R, JANSSON J. Trends in microbial community composition and function by soil depth[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 540.
- [2] BAI B, LIU WD, QIU XY, ZHANG J, ZHANG JY, BAI Y. The root microbiome: community assembly and its contributions to plant fitness[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 230-243.
- [3] 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.
- [4] BENDER FR, ALVES LC, da SILVA JFM, RIBEIRO RA, PAULI G, NOGUEIRA MA, HUNGRIA M. Microbiome of nodules and roots of soybean and common bean: searching for differences associated with contrasting performances in symbiotic nitrogen fixation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 12035.
- [5] MAYHOOD P, MIRZA BS. Soybean root nodule and rhizosphere microbiome: distribution of rhizobial and nonrhizobial endophytes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(10): e02884-e02820.
- [6] SOARES R, TREJO J, LORITE MJ, FIGUEIRA E, SANJUÁN J, VIDEIRA E CASTRO I. Diversity, phylogeny and plant growth promotion traits of nodule associated bacteria isolated from *Lotus parviflorus*[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 499.
- [7] CARDOSO P, ALVES A, SILVEIRA P, SÁ C, FIDALGO C, FREITAS R, FIGUEIRA E. Bacteria from nodules of wild legume species: phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645: 1094-1102.
- [8] 张爱梅, 韩雪英, 孙坤, 张世虎, 孔维宝, 牛世全, 朱学泰. 高通量测序分析中国沙棘根瘤与根际土壤细菌多样性[J]. *草原与草坪*, 2018, 38(2): 49-55.
ZHANG AM, HAN XY, SUN K, ZHANG SH, KONG WB, NIU SQ, ZHU XT. Root nodules endophytic and rhizosphere soil bacteria diversity of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* based on high-throughput sequencing[J]. *Grassland and Turf*, 2018, 38(2): 49-55 (in Chinese).
- [9] 李月. 药食两用沙棘的品质评价研究[D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2022.
LI Y. Study on quality evaluation of *Hippophae fructus* for medicine and food[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College, 2022 (in Chinese).
- [10] CIESAROVÁ Z, MURKOVIC M, CEJPEK K, KREPS F, TOBOLKOVÁ B, KOPLÍK R, BELAJOVÁ E, KUKUROVÁ K, DAŠKO L, PANOVSÁ Z, REVENCO D, BURČOVÁ Z. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review[J]. *Food Research International (Ottawa, Ont)*, 2020, 133: 109170.
- [11] PESCE C, OSHONE R, HURST SG IV, KLEINER VA, TISA LS. Stable transformation of the *Actinobacteria Frankia* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(15): e00957-e00919.
- [12] WU ZF, CHEN HY, PAN Y, FENG H, FANG DM, YANG J, WANG YY, YANG J, SAHU SK, LIU JL, XING YE, WANG XL, LIU M, LUO XY, GAO P, LI LF, LIU ZJ, YANG HM, LIU X, XU X, et al. Genome of *Hippophae rhamnoides* provides insights into a conserved molecular mechanism in actinorhizal and rhizobial symbioses[J]. *New Phytologist*, 2022, 235(1): 276-291.
- [13] 樊梦颖, 张明明, 张情, 张春丽, 刘西平. 不同月份沙棘根瘤细菌群落结构特征的分析对比[J]. *西北林学院学报*, 2020, 35(6): 160-167.
FAN MY, ZHANG MM, ZHANG Q, ZHANG CL, LIU XP. Comparison of the characteristics of bacterial community in root nodules of *Hippophae rhamnoides* in different months[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2020, 35(6): 160-167 (in Chinese).
- [14] 张爱梅, 吴菊艳, 韩雪英, 孔维宝. 沙棘根瘤内生细菌中抑菌促生菌株的筛选和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1041-1051.
ZHANG AM, WU JY, HAN XY, KONG WB. Screening and identification of antagonistic and plant-growth promoting endophytic bacteria from *Seabuckthorn nodules*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1041-1051 (in Chinese).
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
LU RK. Methods of Soil Agrochemical Analysis[M]. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 2000 (in Chinese).
- [16] YANG C, LIU N, ZHANG YG. Soil aggregates regulate the impact of soil bacterial and fungal communities on soil respiration[J]. *Geoderma*, 2019, 337: 444-452.
- [17] LIU J, HE XW, SUN JY, MA YC. A degeneration gradient of poplar trees contributes to the taxonomic,

- functional, and resistome diversity of bacterial communities in rhizosphere soils[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7): 3438.
- [18] SCHÖN ME, MARTIJN J, VOSSEBERG J, KÖSTLBACHER S, ETTEMA TJG. The evolutionary origin of host association in the *Rickettsiales*[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(8): 1189-1199.
- [19] PIWOWAREK K, LIPÍŃSKA E, HAĆ-SZYMAŃCZUK E, KIELISZEK M, ŚCIBISZ I. *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 515-538.
- [20] IKBAL, PASSRICHA N, SAIFI SK, SIKKA VK, TUTEJA N. Multilegume biofertilizer: a dream-ScienceDirect[M]//SHARMA V, SALWAN R, AL-ANI LKT. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*. Amsterdam: Elsevier Inc, 2020: 35-45 (in Netherlands).
- [21] MUKHERJEE A, BHOWMICK S, YADAV S, RASHID MM, CHOUHAN GK, VAISHYA JK, VERMA JP. Re-vitalizing of endophytic microbes for soil health management and plant protection[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(9): 399.
- [22] 王莉, 凌琪, 伍昌年, 李顺鹏, 蒋建东, 王敏. *Hyphomicrobium* sp. MAP-1 菌株修复甲胺磷乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的实验研究[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(1): 81-87.
- WANG L, LING Q, WU CN, LI SP, JIANG JD, WANG M. Bioremediation on the soil contaminated by methamidophos, acephate and isocarbophos by *Hyphomicrobium* sp. MAP-1[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(1): 81-87 (in Chinese).
- [23] GOSAI HB, PANSERIYA HZ, PATEL PG, PATEL AC, SHANKAR A, VARJANI S, DAVE BP. Exploring bacterial communities through metagenomics during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated sediments[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 842: 156794.
- [24] SOHN SI, AHN JH, PANDIAN S, OH YJ, SHIN EK, KANG HJ, CHO WS, CHO YS, SHIN KS. Dynamics of bacterial community structure in the rhizosphere and root nodule of soybean: impacts of growth stages and varieties[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5577.
- [25] GHODHBANE-GTARI F, NOUIOUI I, CHAIR M, BOUDABOUS A, GTARI M. 16S–23S rRNA intergenic spacer region variability in the genus *Frankia*[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(3): 487-495.
- [26] AI C, ZHANG SQ, ZHANG X, GUO DD, ZHOU W, HUANG SM. Distinct responses of soil bacterial and fungal communities to changes in fertilization regime and crop rotation[J]. *Geoderma*, 2018, 319: 156-166.
- [27] KLATT CG, LIU ZF, LUDWIG M, KÜHL M, JENSEN SI, BRYANT DA, WARD DM. Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic *Chloroflexi* inhabiting a microbial mat in a geothermal spring[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(9): 1775-1789.
- [28] WANG WJ, LIU AR, FU WT, PENG DL, WANG G, JI J, JIN C, GUAN CF. Tobacco-associated with *Methylophilus* sp. FP-6 enhances phytoremediation of benzophenone-3 through regulating soil microbial community, increasing photosynthetic capacity and maintaining redox homeostasis of plant[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 431: 128588.
- [29] HAVLIN JL. Soil: fertility and nutrient management[M]//HAVLIN JL. *Landscape and Land Capacity*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2020: 251-265.
- [30] VELÁZQUEZ E, SILVA LR, RAMÍREZ-BAHENA MH, PEIX A. Diversity of potassium-solubilizing microorganisms and their interactions with plants[M]//MEENA VS, MAURYA BR, VERMA JP, MEENA RS. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. New Delhi: Springer, 2016: 99-110.
- [31] POKHAREL A, MIRZA BS, DAWSON JO, HAHN D. *Frankia* populations in soil and root nodules of sympatrically grown *Alnus* taxa[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 61(1): 92-100.
- [32] 魏继华, 李佳益, 刘宏, 张建国, 罗红梅, 何彩云. 沙棘根瘤内生菌株库构建与微生物多样性分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, 39(2): 356-363.
- WEI JH, LI JY, LIU H, ZHANG JG, LUO HM, HE CY. Construction of endophytic strain bank of seabuckthorn nodule and an analysis of microbial diversity[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, 39(2): 356-363 (in Chinese).
- [33] PANDEY SN, ABID M, ABID ALI KHAN MM. Diversity, functions, and stress responses of soil microorganisms[M]//EGAMBERDIEVA D, AHMAD P. *Plant Microbiome: Stress Response*. vol 5. Singapore: Springer, 2018: 1-19.