



花生根际促生复合菌剂对连作花生生理生化指标和根际细菌群落的影响

于宏¹, 王孟亮¹, 刘希建¹, 董静怡¹, 王丹丹^{1*}, 解志红^{1*}, 余义发²

1 山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271018

2 南宁汉和生物科技股份有限公司, 广西 南宁 201315

于宏, 王孟亮, 刘希建, 董静怡, 王丹丹, 解志红, 余义发. 花生根际促生复合菌剂对连作花生生理生化指标和根际细菌群落的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1233-1248.

YU Hong, WANG Mengliang, LIU Xijian, DONG Jingyi, WANG Dandan, XIE Zhihong, YU Yifa. Effects of a compound inoculant of peanut growth-promoting rhizobacteria on physiological and biochemical indexes of peanut plants in a continuous cropping system and rhizosphere bacterial community[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1233-1248.

摘要: 【目的】利用多功能根际促生菌剂促进花生生长, 缓解连作障碍对花生的生长抑制。【方法】从 10 年连作花生根际土中筛选根际微生物, 测定其促生及拮抗能力, 并经 16S rRNA 基因测序确定菌株分类。选取 3 株功能互补且相互之间无生长抑制的根际促生菌制备微生物复合菌剂, 利用发芽及盆栽试验验证微生物复合菌剂的促生效应。利用高通量测序技术对花生根际土壤细菌的 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行测序分析。【结果】从连作花生根际中共筛选获得 37 株具有促生及抑制植物病原菌生长能力的根际促生菌, 选取 3 株制备微生物复合菌剂。与空白对照相比, 复合菌剂显著提升花生发芽率 13.22%; 与单独使用根际促生菌相比, 复合菌剂显著提升花生发芽率分别为 6.99%、7.51%、8.87%。施用复合菌剂对花生根系形态、根瘤数量、叶绿素含量、植株光合参数和植株抗氧化酶活均有显著促进作用, 花生根系总长、根尖数、主根直径、根系体积和根系活力分别增加了 43.50%、49.31%、15.11%、16.92%和 112.16%; 花生苗期、花针期叶片叶绿素含量和光合作用均得到显著的提高; 花生根瘤数量每株增加 34 个。施用复合菌剂后对花生的根际细菌多样性影响并不显著, 在门水平上的优势菌门变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*)占 70% 以上。在属水平上新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)是优势菌属。【结论】本研究研制的花生根

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2021QC175); 山东省重点研发计划(2021CXGC010804)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QC175) and the Key Research and Development Program of Shandong Province (2021CXGC010804).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Dandan, wangddnan@163.com; XIE Zhihong, zhihongxie211@163.com

Received: 2023-11-06; Accepted: 2023-12-27; Published online: 2024-01-04

际促生复合菌剂可有效促进花生种子发芽、花生根系生长、提高叶片叶绿素含量以及促进植物光合作用，为缓解花生连作障碍及丰产增收提供有效的技术支持。

关键词：花生；根际促生菌；复合菌剂；连作障碍；促生

Effects of a compound inoculant of peanut growth-promoting rhizobacteria on physiological and biochemical indexes of peanut plants in a continuous cropping system and rhizosphere bacterial community

YU Hong¹, WANG Mengliang¹, LIU Xijian¹, DONG Jingyi¹, WANG Dandan^{1*}, XIE Zhihong^{1*}, YU Yifa²

1 College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

2 Nanning Hanhe Biotechnology Co., Ltd., Nanning 201315, Guangxi, China

Abstract: [Objective] To apply multifunctional plant growth-promoting rhizobacteria to enhance peanut growth and mitigate the inhibitory effects caused by continuous cropping. [Methods] Plant growth-promoting rhizobacteria were screened from the rhizosphere soil of peanut plants in a system with continuous cropping for ten years, and their growth-promoting and antagonistic abilities were determined. The strains were identified by 16S rRNA gene sequencing. Three plant growth-promoting rhizobacterial strains with complementary functions and no growth inhibition between each other were selected to prepare a compound microbial inoculant, the plant growth-promoting effect of which was examined by seed germination and pot experiments. High-throughput sequencing was carried out for the V3–V4 region of bacterial 16S rRNA gene. [Results] A total of 37 plant growth-promoting rhizobacterial strains capable of promoting plant growth and inhibiting pathogen growth were screened from the rhizosphere of peanut plants in a continuous cropping system. Three strains were selected to prepare the compound inoculant. Compared with the blank control, the compound inoculant increased the germination rate of peanut by 13.22%. Compared with the treatments with the three strains alone, the compound inoculant increased the germination rate by 6.99%, 7.51%, and 8.87%, respectively. The application of the compound inoculant had significant promoting effects on the root morphology, number of nodules, chlorophyll relative content (SPAD), photosynthetic parameters, and antioxidant enzyme activity of peanut plants. Specifically, it increased the total root length, number of root tips, taproot diameter, root volume, and root activity by 43.50%, 49.31%, 15.11%, 16.92%, and 112.16%, respectively. The application of the compound inoculant significantly increased the leaf SPAD value and promoted the photosynthesis of peanut plants at seedling stage and flowering stage. Furthermore, it increased the number of

root nodules by 34 nodules per plant. However, the application of the compound inoculant had no significant effect on the bacterial diversity in peanut rhizosphere. The dominant phyla were *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, and *Bacteroidota*, accounting for more than 70%. *Novosphingobium* and *Sphingomonas* were the dominant genera. **[Conclusion]** The compound inoculant of plant growth-promoting rhizobacteria improved the seed germination, root growth, leaf SPAD value, and photosynthesis of peanut plants, providing technical support for alleviating continuous cropping obstacles and promoting the healthy growth of peanut plants.

Keywords: peanut; plant growth-promoting rhizobacteria; compound bacterial inoculant; continuous cropping obstacles; growth promotion

花生是我国主要油料作物、经济作物, 其种植面积次于大豆和油菜籽, 位居第三, 产量仅次于大豆, 居第二位^[1-2]。近年来, 全球花生种植面积、产量持续增长。2022 年中国花生总种植面积 4.75×10^5 hm², 总产量 1 820 万 t, 每公顷产量为 3 831.15 kg。由于我国耕地资源有限, 且受到气候条件、土壤质量和种植习惯的影响, 导致我国连作花生种植面积不断增加。因此, 解决花生连作障碍成为一项迫切需要解决的问题。连续种植花生会导致产量降低和品质变差, 主要与病原菌富集、营养元素缺乏等因素相关^[3-4]。

为防治花生连作障碍可采取多种措施, 包括深耕翻土、重视有机肥的施用、轮作、覆膜栽培以及有益微生物的配施等方式^[5-6]。近年来, 采用有益微生物缓解花生连作障碍取得了显著成效。崔利等^[7] 研究报道摩西管柄囊霉 (*Funneliformis mosseae*) 可以使花生根际曲霉、镰刀菌和赤霉菌丰度降低, 增加细菌盖勒氏菌 (*Gaiella*) 丰度, 增强连作土壤对致病菌的抵御能力, 从而提高花生产量和品质。王丹丹等^[8] 筛选出芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) B28 根际促生菌可显著缓解酚酸对花生种子发芽的抑制, 并明显促进花生幼苗的生长。李丽娜^[9] 通过光合细菌调理花生连作土壤具有明显的效果。但是单一促生菌存在功能单一、适应能力弱等问题, 施用过程中会受到环境的限制。将不同能力的功能菌株组合可得

到促生功能更强、更稳定的微生物复合菌剂^[10]。研究证明, 国内外已经具有优势互补并且功能多样的微生物复合菌剂。刘畅等^[11] 利用具有溶磷固氮能力的伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia* sp.) P10 与具有解钾能力的弯曲芽孢杆菌 (*Bacillus flexus*) GD12 复合配施显著提高了花生的株高和生物量。赵思琦等^[12] 利用解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) FH-1 与短波单胞菌 (*Brevundimonas* sp.) NYM-3 按照 1:1 的比例混合施用可提升水稻鲜重 3.93%–32.90%。

根际促生菌对植物健康生长具有重要意义, 目前, 针对缓解花生连作障碍的微生物复合菌剂研究较少。本研究通过筛选多功能根际促生菌, 配制复合菌剂, 验证对花生发芽及生长促生能力, 为缓解花生连作障碍提供有效的技术支撑, 也对根际促生菌的机制研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤

花生根际土样取自山东省农业科学院连作 10 年的花生试验田, 将花生整株采集, 取花生根系 1 cm 内的根际土, 于 4 °C 保藏。盆栽土壤样品取自山东农业大学试验站连作 10 年的花生田, 土壤的理化性质如表 1 所示。

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Basic physical and chemical properties of tested soil

Basic physical and chemical properties	Results
pH 值 pH value	6.90±0.02
电导率 EC (μs/cm)	280.12±0.15
全氮 Total nitrogen (g/kg)	1.64±0.32
有效磷 Olsen-P (mg/kg)	51.06±0.11
速效钾 Available potassium (mg/kg)	183.03±0.31
有机碳 Soil organic carbon (g/kg)	20.51±0.08

1.1.2 培养基

LB 培养基、无氮(nitrogen free medium, NFM)培养基参考文献[13]配制, 无机磷(inorganic phosphorus, PKO)培养基(Pikovaskaia's)、有机磷培养基参考文献[14]配制, 铬天青(chrome azurol S, CAS)培养基参考文献[15]配制。

1.2 根际细菌的分离及筛选

取约 1 g 的花生根系土, 将其放置于装有 10 mL 灭菌的 PBS 缓冲溶液的离心管中, 振荡 5 min 获得土壤悬浮液。按浓度梯度稀释到 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 吸取 100 μL 涂布于 LB 固体培养基上, 每个梯度做 3 次重复, 30 °C 培养 24 h。

1.2.1 菌株的能力测定

固氮能力测定: 将分离纯化后的菌株分别接种于无氮固体培养基上, 30 °C 培养 24 h 观察菌株生长情况, 确定其是否具有固氮能力。

产铁载体能力测定: 采用 CAS 检测法, 记录橙色晕圈的颜色和大小, 使用游标卡尺测量单菌落橙色铁载体晕圈直径(D)和菌落直径(d), 通过 D/d 的比值来判断菌株产铁载体能力^[16]。

溶磷能力测定: 通过钼锑抗比色法测定培养液中可溶性磷的含量^[17]。最后根据有效磷标准曲线计算解磷量。

产生长素吲哚乙酸(3-indoleacetic acid, IAA)能力测定: 采用 Salkowski 比色法测定菌株产 IAA 能力。反应后红色越深, 菌株产 IAA 能力越强。在 530 nm 下测定其吸光度, 然后根据 IAA

的标准曲线计算产 IAA 量。

抑制病原菌能力测定: 选取 4 株植物病原性真菌, 采用平板对峙法进行生长抑制实验, 通过观察拮抗圈的大小, 检测目标根际促生菌对植物病原菌的生长抑制活性。4 株植物病原菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、腐皮镰孢菌(*Fungi imperfecti*)、黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)和疫霉菌(*Phytophthora capsici*)。

1.2.2 菌株的分子生物学鉴定

提取菌株基因组 DNA, 使用引物对 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1429R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')扩增其 16S rRNA 基因序列, PCR 预混液体系(50 μL): 2×PCR 缓冲液 25 μL, DNA 模板 2 μL, 上、下游引物各 1.25 μL, 用 dd H₂O 补至 50 μL。反应条件: 94 °C 预热 3 min; 90 °C 变性 30 s, 58 °C 复性 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 90 s, 10 °C 保存。将所得产物送青岛睿博兴科生物技术有限公司测序。将所得序列上传至 EzBioCloud 网站数据库与已知序列进行比对^[18], 选取相关序列利用 MEGA X 采用邻接法(neighbor-joining)绘制系统发育树, 自展值为 1 000 次^[19]。

1.3 复合菌剂的制备

1.3.1 根际促生菌拮抗性验证

选择 3 株根际促生菌制备复合菌剂, 挑取单菌落于 LB 固体培养基上交叉划线, 在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 观察是否存在生长抑制。

1.3.2 复合菌剂的配制

将 3 株促生菌分别在 LB 固体培养基中活化, 然后挑取单菌落接种到 LB 液体培养基的试管中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.8, 将种子液按照 1% 的量接种到 200 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 无菌 PBS 缓冲溶液将其洗涤 3 次后重悬, 按照 1:1:1 的比例混合得到微生物复合菌剂。

1.4 试验设计

1.4.1 花生发芽试验

促生细菌:细菌在 OD_{600} 为 0.8 时, 5 000 r/min 离心 3 min, 收集菌体, 菌体用磷酸缓冲溶液清洗 3 次后重悬, 接种量为 1%。

CK 为只加入无菌水的空白对照。设置 4 个处理, 分别为 T1、T2、T3、T4。T1、T2、T3 是在 CK 的基础上分别加入筛选到的促生细菌, T4 为复合菌剂。每个处理 20 粒(已消毒)种子, 设置 3 次重复, 培养 4 d。

发芽指标测定: 以露白 > 1/2 种子长为标准。

发芽率(势) = (发芽种子数 / 供试种子数) × 100%。

1.4.2 花生盆栽试验

盆栽试验于 2023 年 4 月 23 日在山东农业大学试验田温室进行。盆栽试验采用高 17 cm、上直径 19 cm、底直径 14 cm 的花盆, 每盆装入土壤、蛭石、珍珠岩的比例为 3:1:1。

将活化好的菌株菌液统一调节 OD_{600} 值为 0.8, 每盆加入 37.5 mL 菌液, 将菌液与土壤充分混合后进行花生移苗。共 2 个试验处理, 分别为 CK (不做任何处理)、T4 (加入 37.5 mL 复合菌剂菌液), 每个处理设置 5 个重复, 每盆种 1 株花生。花生种子催芽 7 d, 催芽结束后选取长势相同植株移栽到花盆中, 在花盆中培养 45 d 后测定花生根系形态、根瘤数量、花生叶片叶绿素含量(chlorophyll relative content, SPAD)、光合参数、花生酶活。

花生根系形态测定: 采用植物根系分析仪(山东方科仪器有限公司)扫描花生根系, 扫描后保存图像, 采用 WinRHIZO 根系分析系统对根系扫描图像进行根系总长、根尖数、主根直径和根系体积等分析。

花生根系活力测定: 使用植物根系活力检测试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)测定(TTC

比色法)。

花生根瘤及鲜重测定: 整株取出后将根瘤摘下, 统计根瘤个数并称鲜重。

花生叶片 SPAD 值测定: 通过叶绿素分析仪进行测定花生苗期、花针期的叶片 SPAD 值。

花生酶活测定: 超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性按照超氧化歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化物酶(POD)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书测定。

花生光合参数的测定: 使用光合仪测定。

1.5 数据处理

利用 Microsoft Excel 进行数据分析与图表制作, 利用 SPSS 13.0 进行最小差异显著性(least-significant difference, LSD)及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 根际促生菌的筛选

从连作花生根际土中共筛选获得 37 株根际细菌, 其中 30 株具有固氮能力, 2 株为产铁载体菌株, 5 株为解磷菌株, 11 株为产 IAA 菌株, 9 株为抗病原菌菌株。从筛选出的根际细菌中挑选 2 株具有较强溶磷、固氮、产铁载体和产 IAA 功能菌株 J28 和 J1-3 (表 2), 以及 1 株具有拮抗植物病原菌能力的菌株 T14 (表 3、图 1), 进行进一步验证。

2.2 根际促生菌分子生物学鉴定

如图 2 所示经过核苷酸序列比对, 发现菌株 J1-3 与变形假单胞杆菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)的 16S rRNA 基因序列相似度最高; 菌株 J28 与分散泛菌(*Pantoea dispersa*)的 16S rRNA 基因序列相似度最高; 菌株 T14 与特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)的 16S rRNA 基因序列相似度最高, 相似度均高于 99%。

表 2 菌株促生功能鉴定

Table 2 Identification of growth promoting function of strain

菌株	固氮能力	产铁载体能力	溶有机磷能力	溶无机磷能力	IAA 产率
Strain	Nitrogen fixing capacity	Siderophore capacity (cm)	Organophosphates solubility (mg/mL)	Inorganic phosphate solubility (mg/mL)	IAA production (mg/L)
J28	+	3.22±0.27	161.00±0.23	209.00±0.15	11.00±0.14
J1-3	+	1.91±0.14	228.00±0.03	183.00±0.12	56.68±0.12
T14	+	—	157.00±0.13	—	—

+: This function exists; -: No this function.

表 3 菌株拮抗能力的测定

Table 3 Determination of antagonistic ability of strains

菌株	尖孢镰刀菌	腐皮镰孢菌	曲霉菌	疫霉菌
Strain	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fungi imperfecti</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Phytophthora capsici</i>
T14	++	++	+	++
J28	—	—	—	—
J1-3	—	—	—	—

++: Strong inhibition (the radius>2 mm); +: Inhibition (<2 mm); -: No inhibition.

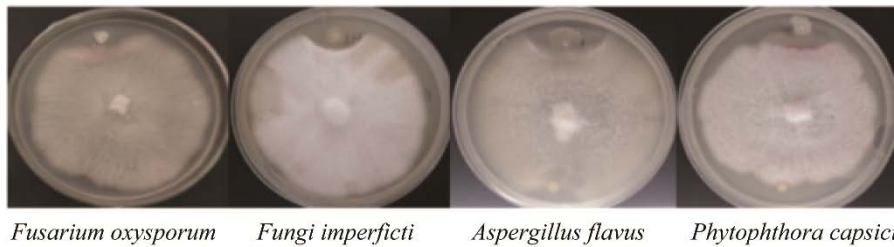


图 1 T14 对 4 种病原菌的拮抗图

Figure 1 Antagonism of T14 against four pathogens.

2.3 菌株拮抗实验

将特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*) T14、分散泛菌 (*Pantoea dispersa*) J28、变形假单胞杆菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) J1-3 交叉划线验证菌株之间的拮抗性, 结果如图 3 所示, 3 个菌株之间未出现两两拮抗的现象。

2.4 根际促生菌对花生发芽的影响

花生发芽试验如图 4 所示, 不同促生菌及复合菌剂对花生种子萌发的影响如图 5 所示, J1-3 (T1)、J28 (T2)、T14 (T3) 与 CK 相比在相同的外界条件下对花生发芽具有显著的促进作用。各处理 24 h 后开始发芽, 生长到 96 h 后观察花生种子发芽情况。结果发现清水处理的空白对照花生发芽率为

82.62%, 菌株 J1-3 处理组 (T1) 花生发芽率为 87.41%, 菌株 J28 处理组 (T2) 花生发芽率为 87.00%, 菌株 T14 处理组 (T3) 花生发芽率为 85.91%, 复合菌剂处理组 (T4) 花生发芽率为 93.53%。结果表明这 3 株促生菌均能促进花生种子的萌发, 并且按比例混合后能够显著地提高花生的发芽率。

2.5 复合菌剂对花生植株的影响

2.5.1 复合菌剂对花生叶片 SPAD 值及光合参数的影响

花生盆栽试验如图 6 所示, 叶片 SPAD 值的变化如图 7 所示, 苗期、花针期添加复合菌剂后 SPAD 含量分别增加了 5.30%、7.50%, 说明微生物复合菌剂能够显著促进花生叶绿素含量的积累。

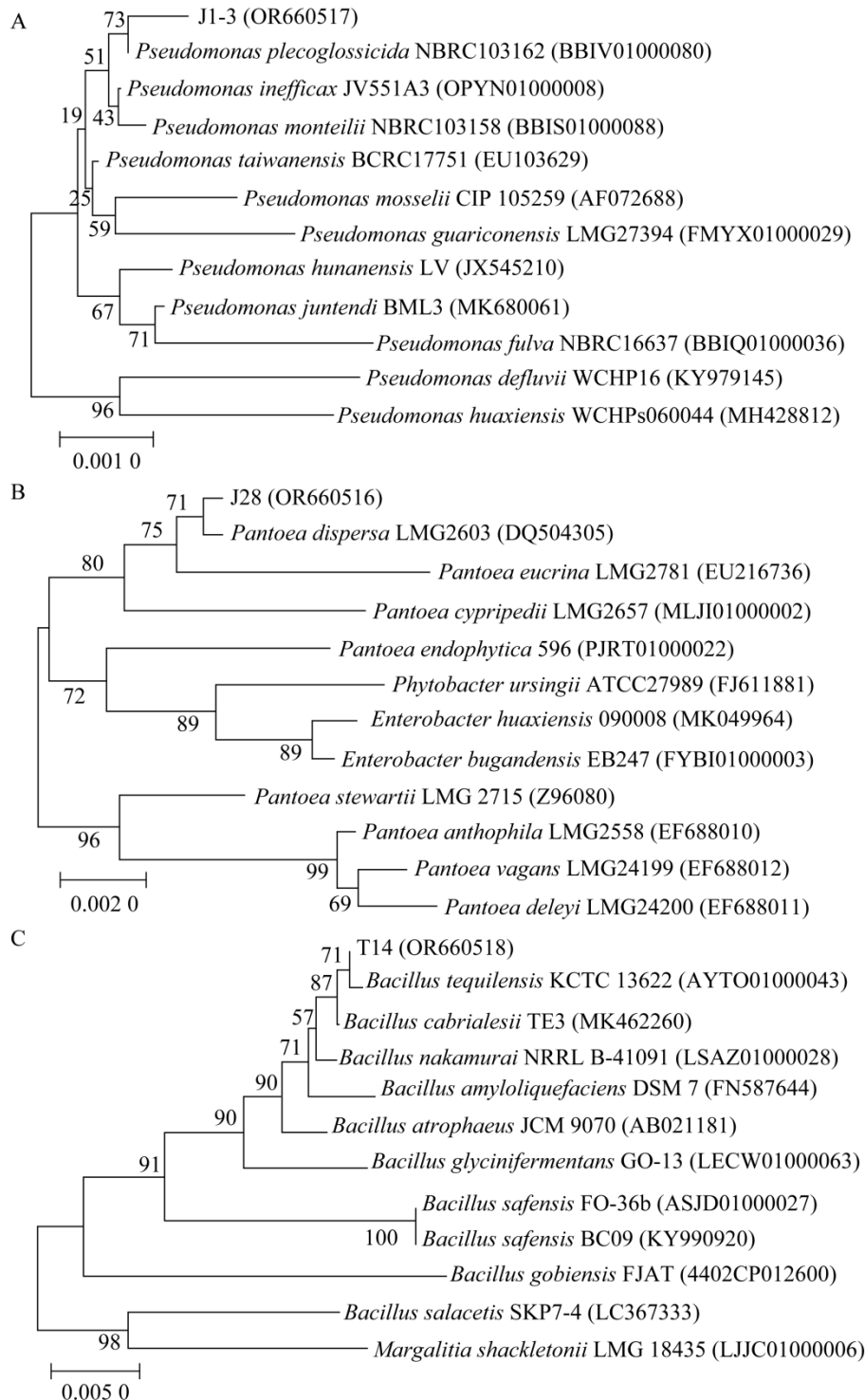


图 2 三株菌的系统发育树 序号为序列 GenBank 登录号；分支点数值代表进化树 bootstrap 值；分支长度代表进化距离

Figure 2 Phylogenetic tree of three strains. The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown before the name of the strain. Values at branch nodes represent bootstrap value. The length of branch represents the evolutionary distance.

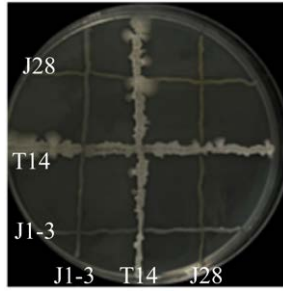


图 3 三株菌间的拮抗验证

Figure 3 Verification of antagonism between three strains.



图 4 不同处理下花生的发芽情况

Figure 4 Germination of peanuts with different treatments.

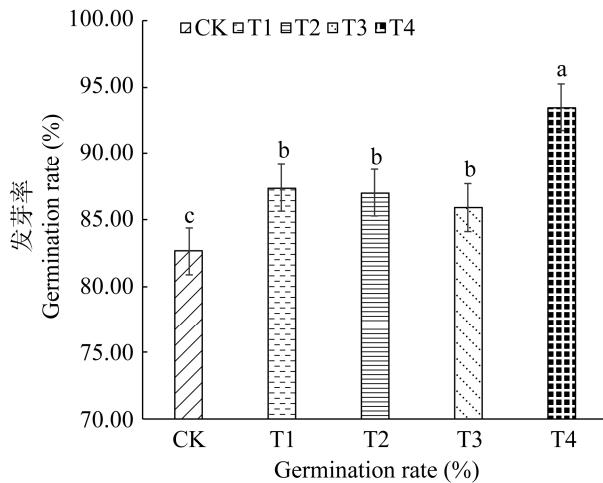


图 5 不同菌剂处理下花生的发芽率

Figure 5 Germination rate of peanut treated with different bacteria. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).



CK T4

图 6 花生盆栽试验

Figure 6 The pot experiment of peanut.

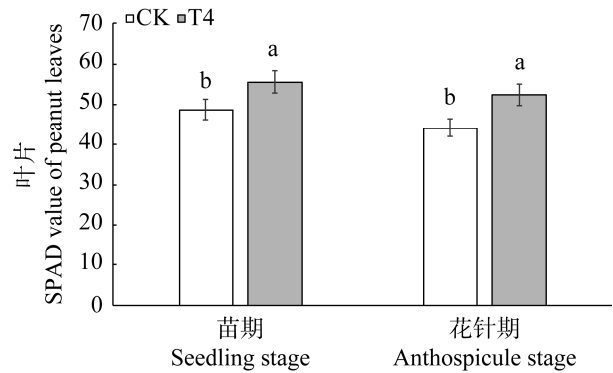


图 7 不同时期花生叶片 SPAD 值

Figure 7 SPAD values of peanut leaves in different periods. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

花生不同时期光合参数如图 8 所示,施用复合菌剂后花生光合参数除胞间二氧化碳含量外,气孔导度、净光合速率、蒸腾速率均显著增加,其中在苗期分别增加了 161.71%、52.53%、108.34%;花针期分别增加了 27.92%、6.61%、14.70%。说明复合菌剂可显著提高花生植株的光合速率,促进花生生长。

2.5.2 复合菌剂对花生根际形态的影响

复合菌剂对花生根系形态影响显著,施用复合菌剂后与对照处理相比花生根系总长、根尖数、主根直径和根系体积分别增加了 43.50%、49.31%、15.11%和 16.92% (表 4)。总体来看施用复合菌剂显著促进了花生根系的生长。

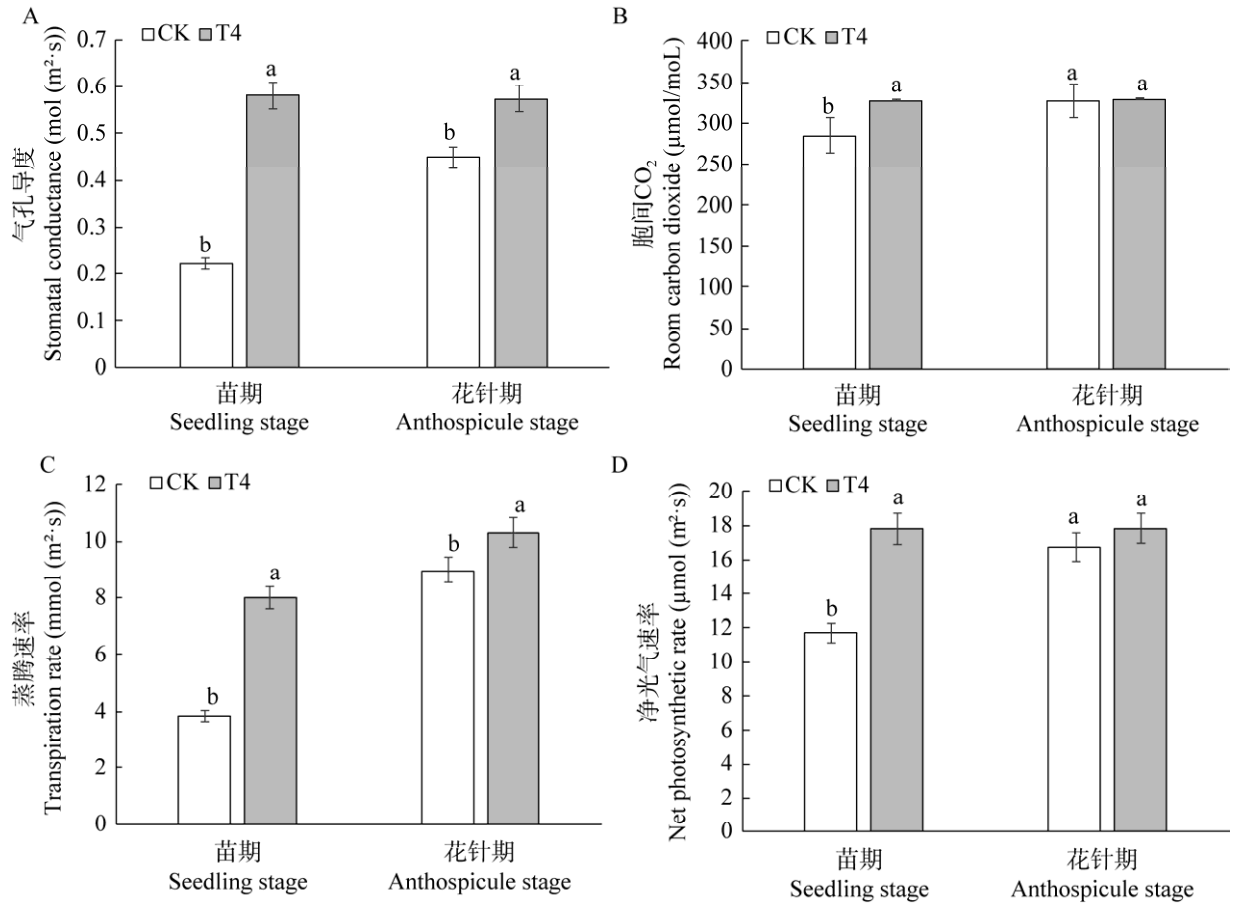


图 8 施用微生物菌剂后不同时期的光合参数

Figure 8 Photosynthetic parameters of different periods after application of microbial inoculants. A: Stomatal conductance. B: Room carbon dioxide. C: Transpiration rate. D: Net photosynthetic rate. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表 4 复合菌剂对花生根系的影响

Table 4 Effects of compound bacteria on peanut root morphology

处理	根系总长	根尖数(株/个)	主根直径	根系体积
Treatment	Total root length (cm)	Number of apex (plant/piece)	Taproot diameter (mm)	Root volume (cm ³)
CK	344.10±0.24b	754.00±0.54b	0.65±0.12b	378.70±0.21b
T4	493.80±0.15a	1 126.00±0.43a	0.76±0.09a	435.91±0.22a

Different lowercase letters in a column indicate significant differences among treatments at ($P < 0.05$), respectively.

2.5.3 复合菌剂对花生根瘤数目及鲜重的影响

图 9 为花生根系形态扫描图, 如图 10 所示, 施用复合菌剂后花生根瘤数显著增加, 较对照相

比根瘤数每株平均增加了 34 个, 根瘤鲜重增加了 25.82%, 根系活力增加了 112.16%。总体来看, 施用复合菌剂后提高了根系活力, 促进根系生长。

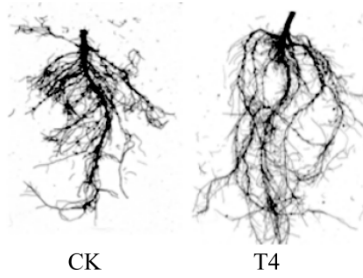


图9 复合菌剂对花生根系形态的影响
Figure 9 Effect of compound bacteria on peanut root morphology.

2.6 复合菌剂对花生植株酶活的影响

POD、SOD 和 CAT 是生物适应和抵抗逆境胁迫的重要酶，也是清除活性氧的关键酶，被称为抗氧化酶。如图 11 所示施用微生物复合菌剂后，显著提高花生植物抗氧化酶的活性，POD、SOD 和 CAT 酶活分别提高了 30.51%、12.60%、57.62%。这说明微生物复合菌剂可以提高花生对外界环境胁迫的适应性，使植株细胞免受外界环境的伤害。

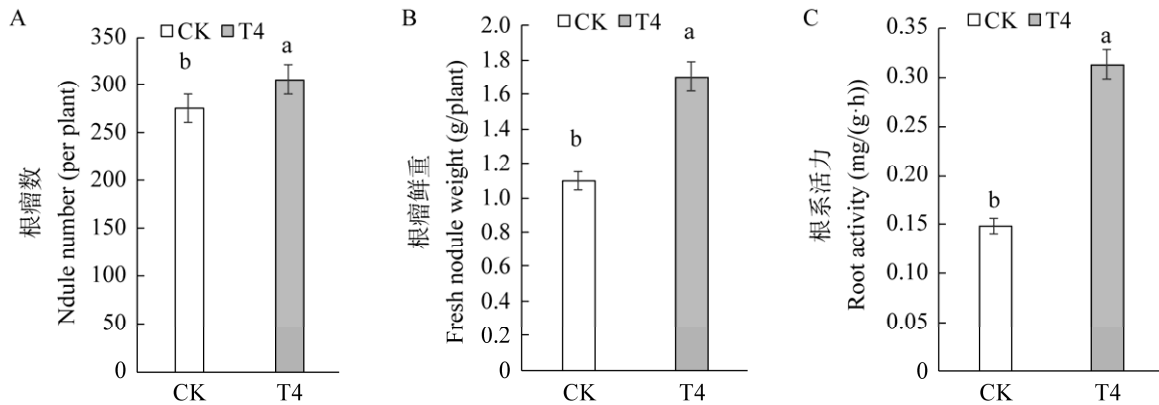


图10 复合菌剂对花生根系的影响

Figure 10 Effects of compound inoculants on peanut roots. A: Number of nodules. B: Fresh weight of nodules. C: Root activity. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

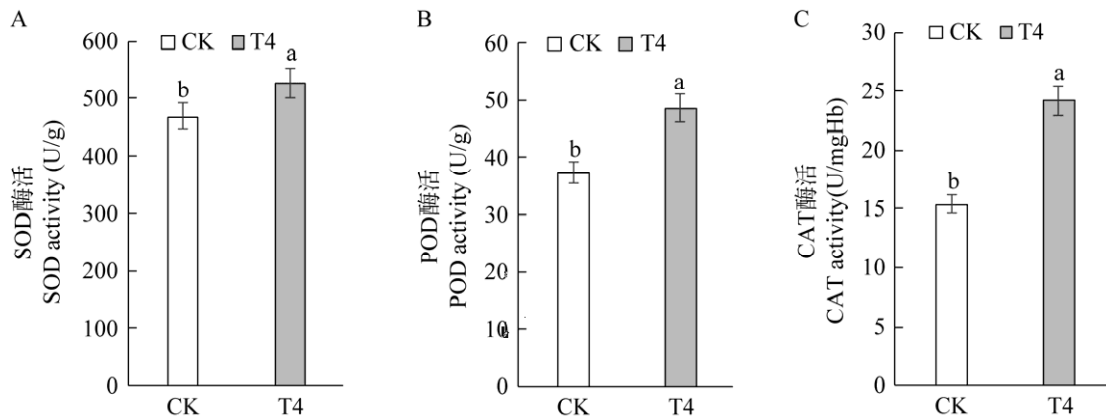


图11 复合菌剂对花生植株酶活的影响

Figure 11 Effect of compound bacteria on peanut plant enzyme activity. A: SOD. B: POD. C: CAT. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

2.7 复合菌剂对花生根际土壤微生物的影响

2.7.1 对根际土壤微生物 α 多样性和 β 多样性的影响

α 多样性分析表明, 复合菌剂处理后, 根际细菌的 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数无显著差异, Goods_coverage 指数显著低于对照处理(图 12)。Goods_coverage 指数越高说明物种丰富度越低, 这表明施用复合菌剂后显著提高了物种的丰富度。

对花生根际土壤样本进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA), 结果如图 13A 所示, PC1 为 82.40%, PC2 为 7.80%, 共解释了细菌群落结构差异的 90%。两个投影之间的距离越近表明两个样本群里的结构越相似。从图 13A 可以看出施用复合菌剂后花生根际细菌群落组成与对照处理相比有一定的相似度。从图 13B 聚类分析看出施用复合菌剂与对照处理分成了不同的分支, 样本间的分支长度越短, 说明两样本越相似。对照组分支较复合菌剂处理的

分支短, 说明对照组 3 个分支之间样本相似度较高。而复合菌剂处理后两个分支之间较长说明组间具有一定的差异, 但与对照处理之间的差距不大, 说明施用复合菌剂和对照组细菌群落组成差异不大。因此施用微生物菌剂后根际土壤细菌群落具有一定的相似性。

2.7.2 对根际土壤微生物组成分析

对盆栽花生根际土壤微生物分类组学成分分析发现, 在门水平变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*) 是优势菌门, 占 70%以上。如图 14A 所示, 施用复合菌剂后变形菌门、拟杆菌门相对丰度增加。从属水平进行分析发现新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、*Allorhizobium*、*Burkholderia* 和溶杆菌属(*Lysobacter*)是优势菌属, 如图 14B 所示, 施用复合菌剂后 *Novosphingobium*、*Sphingomonas* 属细菌相对丰度降低, *Lysobacter* 属相对丰度增加。

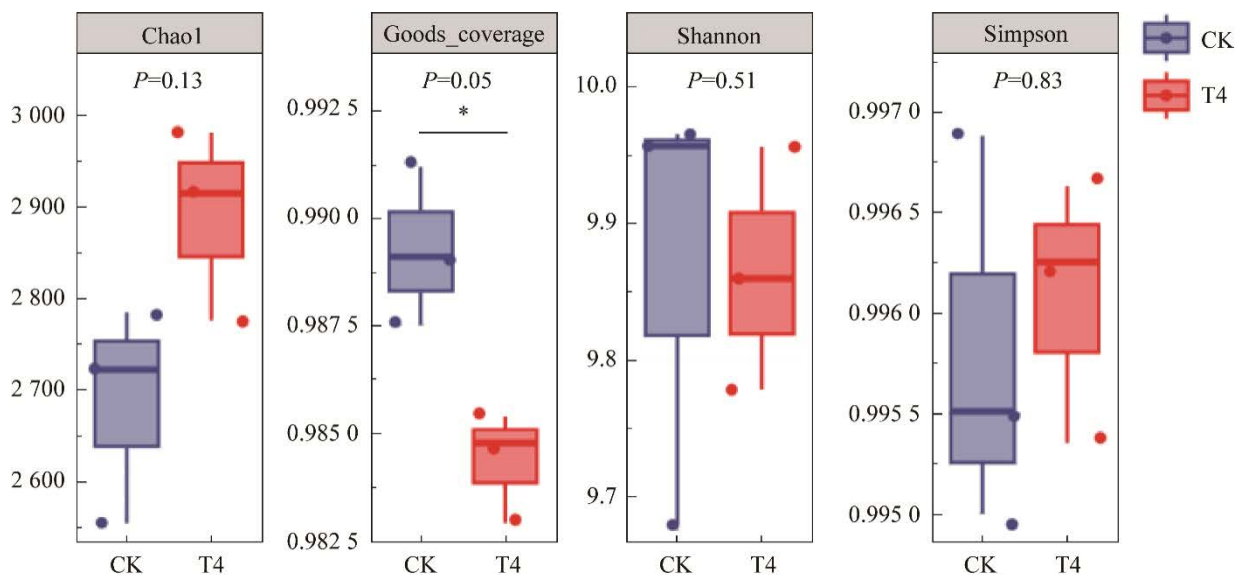


图 12 不同处理花生根际细菌 α 多样性

Figure 12 Alpha diversity of bacterial in rhizosphere under different treatments. *: Existence significance, $P \leq 0.05$.

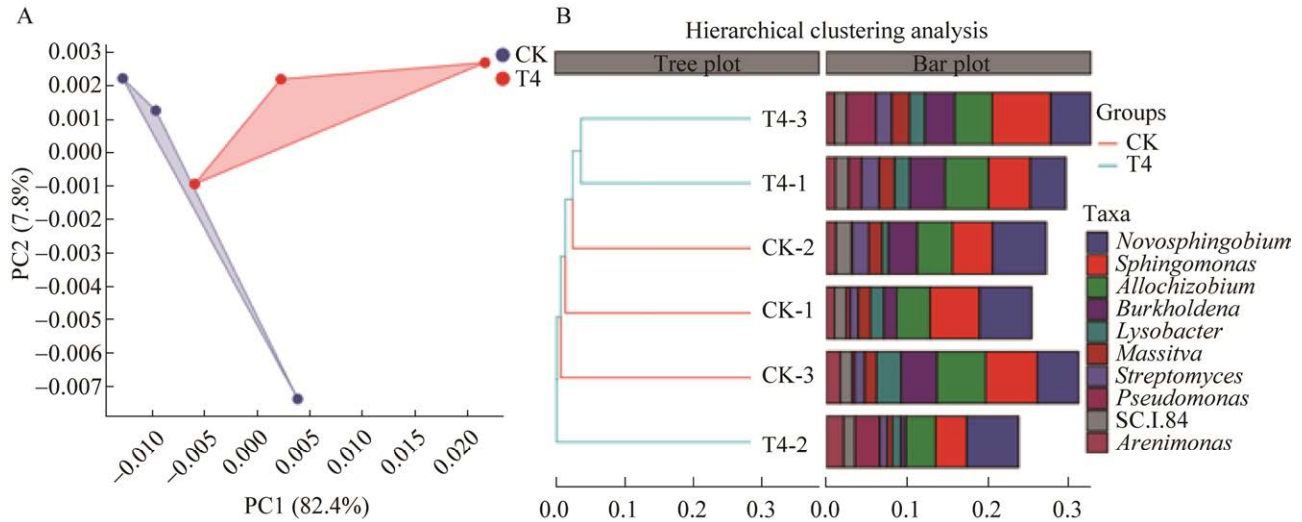


图 13 不同处理花生根际细菌 β 多样性分析(A)和 PCA 分析(B)层次聚类分析

Figure 13 Beta diversity analysis of rhizosphere bacteria under different treatments (A) and PCA analysis (B) hierarchical cluster analysis.

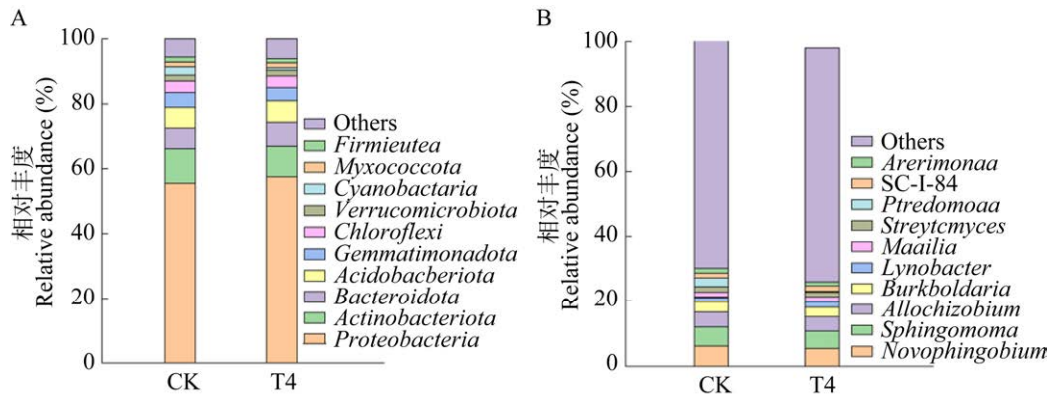


图 14 花生根际细菌门水平(A)和属水平(B)的相对丰度

Figure 14 Relative abundance at the phyla level (A) and genus level (B) in the rhizosphere.

3 讨论

根际促生菌通过特定的功能来促进植物生长的研究已有很多报道, Preston^[20]提出许多与植物相关的假单胞菌通过抑制病原微生物、合成植物激素和促进植物抗病性的增加来促进植物生长。Purtschert-Montenegro 等^[21]研究发现恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)定殖与植物根际

能够借助 IVB 型分泌系统(type IVB secretion system, T4BSS)杀死多种土壤和植物相关的革兰氏阴性细菌。Jeon 等^[22]的研究发现内生的 *Bacillus tequilensis* 可以提高藻类细胞密度、干重、叶绿素含量和虾青素含量。Azeem 等^[23]的研究发现沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*) PM22 促进植物生长和耐盐的能力, 原因是 *B. safensis* PM22 在盐胁迫的条件下产生大量的胞外多糖、

IAA、铁载体和 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase, ACC-脱氨酶)。Jiang 等^[24]研究发现 *Pantoea dispersa* 可以抑制甘薯植株中的黑腐病, 突出了其作为生物防治剂的潜力。Singh 等^[25]首次报道了 *Pantoea dispersa* AA7 和 *Enterobacter asburiae* BY4 对甘蔗生长的促进作用。本研究从连作花生根际土中筛选出的 3 株根际促生菌株 J1-3、J28、T14, 经鉴定分别为 *Pseudomonas plecoglossicida*、*Pantoea dispersa* 及 *Bacillus tequilensis*, 均具有促进花生种子发芽及植株生长的能力, 具有较好的应用前景。

研究发现使用植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)菌株不仅能有效提高植物产量, 而且还能有效防控植物病害^[26]。衣政凯^[27]筛选获得的 *Bacillus amyloliquefaciens* 41B-1 能有效抑制花生白绢病原菌。杨倩倩^[28]从花生根际土壤中筛选出的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Y₁₄ 对花生白绢病原菌具有显著拮抗作用, 抑菌率为 67.10%, 防病效果显著。与上述研究相同, 本研究筛选出的芽孢杆菌对病原菌也具有显著的拮抗作用, 与上述研究结果不同的是 *B. tequilensis* T14 对病原真菌的拮抗作用具有广泛性, 如表 3 所示, 可同时抑制多种病原菌。然而, T14 不具有溶无机磷、产铁载体、产 IAA 的功能, 这意味着它不能利用溶无机磷途径、产铁载体以及产 IAA 途径来抑制病原真菌的生长, 其抑制病原真菌的能力可归因于利用其他分子途径来抑制真菌病原体的生长。本研究结果与 Baard 等^[29]的研究结果相同, *B. tequilensis* 具有拮抗 4 种病原真菌的能力。

微生物复合菌剂克服了单一菌剂目标单一、

功能单一的缺点, 它具有功能全面、配伍合理、经济效益高的优点。前人研究表明, 微生物复合菌剂可有效地改善作物品质并促进作物生长。如赵晓玲^[30]研究发现, 叶面喷施 EM 微生物菌剂可以使辣椒产量提高 44.05%。何嘉等^[31]研究表明, 使用丛枝菌根真菌和解淀粉芽孢杆菌复合菌剂可使枸杞产量提高 46.22%。刘畅等^[11]研究表明 *B. flexus* GD12 和 *Burkholderia* sp. P10 复合对花生生长有显著促进作用, 与对照组相比花生株高增加 37.60%。何飞燕^[32]认为, 微生物复合菌剂在花生不同生长期对花生叶片 SPAD 值均具有提高的作用。本研究与上述结果相同, 将芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) T14、分散泛菌(*Pantoea dispersa*) J28、变形假单胞杆菌(*Pseudomonas plecoglossicida*) J1-3 等比例混合显著促进花生根系的生长、增加花生根瘤数量以及提高叶片 SPAD 值, 可有效提高花生抗逆性。与上述结果不同的是, 本研究中利用了促生效果较强的分散泛菌进行复合菌剂的制备。本研究在探讨微生物复合菌剂对连作花生生长的影响中菌株配比单一, 后续将进一步优化不同菌株之间的配比比例。

4 结论

本研究筛选出 3 株功能较强的菌株, 经鉴定为变形假单胞杆菌属(*Pseudomonas plecoglossicida*) J1-3、分散泛菌属(*Pantoea dispersa*) J28、芽孢杆菌属菌(*Bacillus tequilensis*) T14, 3 株菌复合菌剂功能最强, 对花生的发芽、植株的生长起到显著的促进作用, 并未改变花生根际细菌群落的多样性。本研究为生物缓解花生连作障碍提供理论依据, 为缓解花生连作障碍及促进花生生长提供了良好的菌种资源。

参考文献

- [1] 唐朝辉, 郭峰, 张佳蕾, 杨莎, 孟静静, 耿耘, 王建国, 李新国, 万书波. 花生连作障碍发生机理及其缓解对策研究进展[J]. 花生学报, 2019, 48(1): 66-70.
TANG CH, GUO F, ZHANG JL, YANG S, MENG JJ, GENG Y, WANG JG, LI XG, WAN SB. Research progress on mechanism of peanut continuous cropping obstacle and its mitigation countermeasures[J]. *Journal of Peanut Science*, 2019, 48(1): 66-70 (in Chinese).
- [2] 任春玲. 国内外花生产业发展动态与河南省花生产业前景分析[J]. 河南农业, 2023(10): 28-34.
REN CL. Development trends of peanut industry at home and abroad and prospect analysis of peanut industry in Henan Province[J]. *Henan Agriculture*, 2023(10): 28-34 (in Chinese).
- [3] 杨珍, 戴传超, 王兴祥, 李孝刚. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展[J]. 土壤学报, 2019, 56(1): 12-22.
YANG Z, DAI CC, WANG XX, LI XG. Advance in research on rhizosphere microbial mechanisms of crop soil-borne fungal diseases[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56(1): 12-22 (in Chinese).
- [4] 王兴祥, 张桃林, 戴传超. 连作花生土壤障碍原因及消除技术研究进展[J]. 土壤, 2010, 42(4): 505-512.
WANG XX, ZHANG TL, DAI CC. Advance in mechanism and countermeasures of peanut succession monocropping obstacles[J]. *Soils*, 2010, 42(4): 505-512 (in Chinese).
- [5] 戴传超, 张伟. 有益微生物缓解花生连作障碍机理研究进展[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(1): 1-8.
DAI CC, ZHANG W. Research progress on the beneficial microbe-mediated alleviation of peanut continuous cropping obstacle[J]. *Journal of Microbiology*, 2022, 42(1): 1-8 (in Chinese).
- [6] 敖礼林, 饶卫华. 花生连作障碍防治措施[J]. 农村百事通, 2019(4): 40-41.
AO LL, RAO WH. Prevention and control measures of peanut continuous cropping obstacles[J]. *Nongcun Baishitong*, 2019(4): 40-41 (in Chinese).
- [7] 崔利, 郭峰, 张佳蕾, 杨莎, 王建国, 孟静静, 耿耘, 李新国, 万书波. 摩西斗管囊霉改善连作花生根际土壤的微环境[J]. 植物生态学报, 2019, 43(8): 718-728.
CUI L, GUO F, ZHANG JL, YANG S, WANG JG, MENG JJ, GENG Y, LI XG, WAN SB. Improvement of continuous microbial environment in peanut rhizosphere soil by *Funneliformis mosseae*[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2019, 43(8): 718-728 (in Chinese).
- [8] 王丹丹, 殷志秋, 孙丽, 刘鑫蓓, 刘佳凝, 庞诗琪, 解志红. 缓解花生连作障碍的根际促生菌分离及功能鉴定[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 4086-4096.
WANG DD, YIN ZQ, SUN L, LIU XB, LIU JN, PANG SQ, XIE ZH. Isolation and identification of peanut plant-growth promoting rhizobacteria with the potential to alleviate continuous cropping obstacle[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 4086-4096 (in Chinese).
- [9] 李丽娜. 光合细菌对花生连作土壤的调理作用[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2017.
Li LN. Conditioning effect of photosynthetic bacteria on soil of peanut continuous cropping[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [10] 李俊, 姜昕, 李力, 沈德龙. 微生物肥料的发展与土壤生物肥力的维持[J]. 中国土壤与肥料, 2006(4): 1-5.
LI J, JIANG X, LI L, SHEN DL. Development of microbial fertilizer and maintaining of soil biological fertility[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2006(4): 1-5 (in Chinese).
- [11] 刘畅, 黄文茂, 韩丽珍. PGPR 复合菌系对花生生长及根际土壤微生物的影响[J]. 西南农业学报, 2019, 32(10): 2367-2372.
LIU C, HUANG WM, HAN LZ. Effect of PGPR compound flora on peanut seedling growth and rhizosphere soil microorganism[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 32(10): 2367-2372 (in Chinese).
- [12] 赵思崎, 王敬敬, 杨宗政, 李晴晴, 杨榕, 赵维, 徐松, 朱丹, 黄志勇. 微生物复合菌剂的制备[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1492-1502.
ZHAO SQ, WANG JJ, YANG ZZ, LI QQ, YANG R, ZHAO W, XU S, ZHU D, HUANG ZY. Preparation of microbial complex bactericides[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1492-1502. (in Chinese)

- [13] 韩文星, 姚拓, 席琳乔, 孙红阳, 刘雯雯, 孙丽娜. PGPR 菌肥制作及其对燕麦生长和品质影响的研究[J]. 草业学报, 2008, 17(2): 75-84.
HAN WX, YAO T, XI LQ, SUN HY, LIU WW, SUN LN. PGPR bio-fertilizers producing and its effect on *Avena sativa* growth and quality development[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2008, 17(2): 75-84 (in Chinese).
- [14] 黎萍, 高新星, 韩昆明, 孙利芹, 李岩. 花生根际微生物的分离及高效功能菌株筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4433-4447.
LI P, GAO XX, HAN KM, SUN LQ, LI Y. Isolation and efficient strain screening of microorganisms from peanut rhizosphere[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4433-4447 (in Chinese).
- [15] 王平, 董飏, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
WANG P, DONG B, LI FD, HU ZJ. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. Microbiology, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese).
- [16] SCHWYN B, NEILANDS JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56.
- [17] 孙亚凯. 功能性微生物菌株的筛选及组合菌群活性研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2007.
SUN YK. Screening of functional microbial strains and study on the activity of combined flora[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2007 (in Chinese).
- [18] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [19] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [20] PRESTON GM. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2004, 359(1446): 907-918.
- [21] PURTSCHERT-MONTENEGRO G, CÁRCAMO-OYARCE G, PINTO-CARBÓ M, AGNOLI K, BAILLY A, EBERL L. *Pseudomonas putida* mediates bacterial killing, biofilm invasion and biocontrol with a type IVB secretion system[J]. Nature Microbiology, 2022, 7(10): 1547-1557.
- [22] JEON MS, HAN SI, AHN JW, JUNG JH, CHOI JS, CHOI YE. Endophyte *Bacillus tequilensis* improves the growth of microalgae *Haematococcus lacustris* by regulating host cell metabolism[J]. Bioresource Technology, 2023, 387: 129546.
- [23] AZEEM MA, SHAH FH, ULLAH A, ALI K, JONES DA, KHAN MEH, ASHRAF A. Biochemical characterization of halotolerant *Bacillus safensis* PM22 and its potential to enhance growth of maize under salinity stress[J]. Plants, 2022, 11(13): 1721.
- [24] JIANG LM, JEONG JC, LEE JS, PARK JM, YANG JW, LEE MH, CHOI SH, KIM CY, KIM DH, KIM SW, LEE J. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 16354.
- [25] SINGH P, SINGH RK, LI HB, GUO DJ, SHARMA A, LAKSHMANAN P, MALVIYA MK, SONG XP, SOLANKI MK, VERMA KK, YANG LT, LI YR. Diazotrophic bacteria *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae* promote sugarcane growth by inducing nitrogen uptake and defense-related gene expression[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 600417.
- [26] 杨莱, 高婷, 李滢璟, 魏崇瑶, 高森, 马莲菊. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究[J]. 生物技术通报, 2020(5): 104-109.
YANG M, GAO T, LI YJ, WEI CY, GAO M, MA LJ. Isolation and screening of plant growth-promoting rhizobacteria in pepper and their disease-resistant growth-promoting characteristics[J]. Biotechnology Bulletin, 2020(5): 104-109 (in Chinese).
- [27] 衣政凯. 花生根际土壤细菌多样性及生防细菌效果评价[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2022.
YI ZK. Diversity of bacteria in peanut rhizosphere soil and evaluation of biocontrol effect of bacteria[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [28] 杨倩倩. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) Y₁₄ 对花生的促生防病效果及其机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2016.

- YANG QQ. Effect of *Bacillus subtilis* Y₁₄ on growth and disease prevention of peanut and its mechanism[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [29] BAARD V, BAKARE OO, DANIEL AI, NKOMO M, GOKUL A, KEYSTER M, KLEIN A. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species[J]. *Pathogens*, 2023, 12(2): 254.
- [30] 赵晓玲. EM 微生物菌剂不同施用方法对大棚辣椒产量和品质的影响[J]. *长江蔬菜*, 2015(8): 58-60.
- ZHAO XL. Effects of different application methods of EM microbial agent on yield and quality of greenhouse pepper[J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2015(8): 58-60 (in Chinese).
- [31] 何嘉, 马婷慧, 白小军, 李清清, 高立原, 郝万亮, 赵阳阳. 不同微生物菌剂对枸杞生长发育及产量品质的影响[J]. *西南农业学报*, 2021, 34(6): 1296-1301.
- HE J, MA TH, BAI XJ, LI QQ, GAO LY, HAO WL, ZHAO YY. Effects of different microbial agents on growth, yield and quality of *Lycium barbarum* L.[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 34(6): 1296-1301 (in Chinese).
- [32] 何飞燕. 复合微生物菌剂对花生的促生作用及土壤细菌菌群变化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2020.
- HE FY. Study on the growth promotion effect of compound microbial agents on peanuts and the changes of soil bacterial flora[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2020 (in Chinese).