



白刺花根瘤菌与非根瘤菌在不同培养条件下互作模式的转变

艾加敏, 李静, 任明霞, 余天飞, 郑超超, 柳晓东, 姜影影, 赵瑞华, 邓振山*

延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

艾加敏, 李静, 任明霞, 余天飞, 郑超超, 柳晓东, 姜影影, 赵瑞华, 邓振山. 白刺花根瘤菌与非根瘤菌在不同培养条件下互作模式的转变. 微生物学报, 2022, 62(9): 3558–3575.

Ai Jiamin, Li Jing, Ren Mingxia, Yu Tianfei, Zheng Chaochao, Liu Xiaodong, Jiang Yingying, Zhao Ruihua, Deng Zhenshan. Transformation of the interaction pattern between rhizobia and non-rhizobia of *Sophora davidii* under different culture conditions. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3558–3575.

摘要:【目的】除根瘤菌外, 豆科植物根瘤中还存在着大量的非根瘤菌, 它们存在的意义及其潜在的生态学功能还不清楚, 尤其是它们与根瘤菌间的互作机制更需揭示。【方法】以从陕北旱区野生白刺花根瘤中分离得到的根瘤菌和非根瘤菌为研究对象, 采用共培养、二分隔平板实验和单独培养的方法, 于正常培养条件下从白刺花根瘤中筛选出有互作效应的菌株, 测定其对 pH 和 NaCl 的耐受性以及对各种氮源的利用情况, 并通过根瘤菌的菌落直径、生长曲线和多糖产量来表征其互作效应, 进一步探明互作菌株在盐碱和营养胁迫条件下互作效应转变的机制。【结果】在盐碱胁迫下, 非根瘤菌 *Pseudomonas oryzihabitans* BT-147 和 *Priestia aryabhatai* BT-59 对 *Rhizobium azibense* BT-170 互作效果由正常培养条件下的抑制转变为促生, 与对照组相比试验组 *R. azibense* BT-170 菌落直径分别增加了 0.803 mm 和 1.034 mm。 *Bacillus siamensis* BT-9-1 在正常培养条件下抑制 *Mesorhizobium metallidurans* YC-39 的生长, 而在盐碱胁迫下表现为促生作用, 与对照组相比试验组 *M. metallidurans* YC-39 菌落直径增加了 1.019 mm, 多糖产量由 1.088 μg/mL 增加到 2.555 μg/mL。在以谷氨酸作为唯一氮源时, *Pseudomonas oryzihabitans* BT-147 和 *Priestia aryabhatai* BT-59 对 *R. azibense* BT-170 的互作效果转变为促生作用, *R. azibense* BT-170 试验组与对照组菌落直径差分别达到 1.348 mm 和 2.196 mm, 其多糖产量从对照组的 0.559 μg/mL 分别增

基金项目: 国家自然科学基金(32160003); 2021 年延安大学校级大学生创新创业训练计划(D2021116)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32160003) and by the 2021 University-Level Student Innovation and Entrepreneurship Training Program at Yan'an University (D2021116)

*Corresponding author. E-mail: zhenshandeng214@163.com

Received: 24 January 2022; Revised: 5 March 2022; Published online: 22 March 2022

加到 0.821 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.341 $\mu\text{g/mL}$ 。【结论】在盐碱和氮源的胁迫下, 非根瘤菌 *Pseudomonas oryzae* BT-147 和 *Priestia aryabhattai* BT-59 对 *R. azibense* BT-170 互作效果由正常培养条件下的抑制转变为促生, 并显著提高了 *R. azibense* BT-170 多糖的产量($P<0.05$), 不同培养条件下根瘤菌与非根瘤菌互作模式的转变, 提高了根瘤菌的抗逆性, 扩大了根瘤菌可利用氮源的范围, 揭示了非根瘤菌在根瘤微生态中所发挥的作用, 并从体外简化了根瘤微生态中复杂的相互作用。

关键词: 根瘤菌; 非根瘤菌; 互作模式; 胞外多糖

Transformation of the interaction pattern between rhizobia and non-rhizobia of *Sophora davidii* under different culture conditions

AI Jiamin, LI Jing, REN Mingxia, YU Tianfei, ZHENG Chaochao, LIU Xiaodong, JIANG Yingying, ZHAO Ruihua, DENG Zhenshan*

School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] In addition to rhizobia, non-rhizobia have been simultaneously isolated from the same root nodules, and the existence of non-rhizobia in root nodules of *Fabaceae* plants was a universal phenomenon. Their colonization meaning and potential ecological functions have been unknown so far. Moreover, the real relationships between rhizobia and non-rhizobia remain unclear. Therefore, the interactions and mechanism of their co-evolution should be investigated intensively and further studied. This paper was designed to reveal the interactions between rhizobia and non-rhizobia in root nodule microbiome of *Sophora davidii* and to further explore the shift in the interaction pattern between them under different culture conditions. [Methods] The rhizobia and non-rhizobia isolated from the root nodules of wild *Sophora davidii* in arid areas of Northern Shaanxi Province was taken as the subjects. The interacting strains were screened based on co-culture, two-compartment culture and pure culture, and were investigated for the tolerance to pH and NaCl and the utilization of various nitrogen sources. The colony diameter, growth curve and polysaccharide production of the rhizobia were used to evaluate the interaction effects, so as to further explore the transformation mechanism underlying the interaction effects of strains under saline-alkali and nutritional stresses. [Results] Under saline-alkali stress, the interaction effects of the non-rhizobia *Pseudomonas oryzae* BT-147 and *Priestia aryabhattai* BT-59 on *Rhizobium azibense* BT-170 changed from inhibition under normal culture conditions to promotion. The colony diameter of *R. azibense* BT-170 increased by 0.803 mm and 1.034 mm, respectively in test groups as compared with the condition in control group. When *Bacillus siamensis* BT-9-1 was co-cultured with *Mesorhizobium metallidurans* YC-39 under saline-alkali stress, the interaction pattern changed to promotion from inhibition under normal culture conditions. Compared with control group, the test group had increased colony diameter of *M.*

metallidurans YC-39 by 1.019 mm, and the exopolysaccharide production rose from 1.088 $\mu\text{g/mL}$ to 2.555 $\mu\text{g/mL}$. When Glutamic acid was used as the only nitrogen source, the non-rhizobia *Pseudomonas oryzihabitans* BT-147 and *Priestia aryabhatai* BT-59 had promotion effects on *R. azibense* BT-170, and the difference in colony diameter of *R. azibense* BT-170 between test group and control group reached 1.348 mm and 2.196 mm, respectively. The exopolysaccharides yield of *R. azibense* BT-170 increased from 0.559 $\mu\text{g/mL}$ in control group to 0.821 $\mu\text{g/mL}$ and 3.341 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **[Conclusion]** Under saline-alkali and nitrogen source stresses, the interaction effects of the non-rhizobia *Pseudomonas oryzihabitans* BT-147 and *Priestia aryabhatai* BT-59 on *R. azibense* BT-170 changed to promotion from inhibition under normal culture conditions and enhanced the exopolysaccharides production of *R. azibense* BT-170 ($P < 0.05$). The shift in the interaction pattern between rhizobia and non-rhizobia under different culture conditions improved the stress resistance of rhizobia and expanded the range of nitrogen sources available to rhizobia, revealing the role of non-rhizobia in root nodule microbiome and simplifying the complex interactions in root nodule microbiome *in vitro*.

Keywords: rhizobia; non-rhizobia; interaction; exopolysaccharides

根瘤菌是革兰氏阴性细菌，广泛分布于土壤中，可侵染豆科植物根部形成根瘤，与豆科植物共生固氮，为植物提供氮源^[1-2]。在研究根瘤微生物生态细菌群落组成中，普遍发现豆科植物根瘤内除根瘤菌外，其中还存在着大量的非根瘤内生细菌(non-rhizobia endophyte, NRE)^[3]，包括 *Rahnella*、*Bacillus*、*Enterobacter*、*Pantoea*、*Agrobacterium*、*Pseudomonas*、*Burkholderia*、*Herbaspirillum*、*Paenibacillus*、*Klebsiella*、*Endobacter*、*Chryseobacterium*、*Stenotrophomonas*、*Azospirillum*、*Gluconacetobacter*、*Variovorax*、*Arthrobacter*、*Micromonospora*、*Hyphomicrobium* 等。根瘤内的这些非根瘤菌将根瘤作为其栖息和繁殖场所，同时，对宿主植物发挥着广泛的有益效应^[4-6]。

根瘤中大量的微生物形成了复杂的群落，负责重要的生态功能。组学的方法为我们提供了有关植物和土壤等相关微生物群落的组成、多样性、代谢潜力和生态位的丰富信息^[7]。然而，为了全面了解微生物的功能和它们在环境

中的相互作用，我们必须观察到从体内的整个群落到体外的单个微生物^[8]。由于根瘤相对封闭的微环境以及物种的多样性与复杂性，给原位探究整个根瘤微生态带来了相当大的挑战。因此将微生物群落还原为一些小的群落或成对的相互作用，可以进行详细的机制研究。这种简化也是在实验室研究分离的微生物和理解自然微生物群落集体活动之间的重要联系^[9]。

目前许多研究开始考虑细菌的群落环境，研究了不同物种共培养时，细菌行为的改变和次级代谢产物的产生。微生物共培养，即在同一封闭环境中培养 2 种或 2 种以上微生物^[10]。共培养的方法已经应用于研究不同的问题，例如阐明共生现象^[11]、调查人类微生物群落的相互作用^[12]，以及诱导一些新化合物的产生^[13]等。

先前的研究表明，当不同的生物体在一起培养时，会发生明显的代谢变化。这意味着微生物相互作用调节了次生代谢产物的生物合成途径^[14]。而共培养被证明是一种收获具有明显生物活性代谢产物的有效方法，它能触发“隐蔽

的”天然产物的生物合成途径。例如当革兰氏阳性放线菌天蓝色链霉菌与其他放线菌^[15]或真菌^[16]共培养时,它产生许多化合物,包括次生代谢物和铁载体,这些在单一培养中并没有被检测到,并且通常是特定相互作用所独有的^[17]。综上所述,微生物的共培养导致不同形态的相互作用模式,在共培养的微生物菌株中,各种沉默基因都得到了表达。这一现象突出了微生物共培养诱导次生代谢物产生的潜力,可能导致发现新的化学物质^[13]。

而培养条件的改变影响微生物的次生代谢产物(代谢表达),对于微生物共培养的相互作用模式的转变也起到了主导作用^[18]。变化的参数主要包括光^[19]、pH 值、温度和氧气供应,以及碳、氮、磷的来源和 NaCl 浓度^[18]等。而共培养条件下的相互作用模式大致可分为互利共生^[20]、竞争和保持中性等^[21]。

从生化角度来看,所有这些相互作用现象的特征是诱导具有生物活性的代谢产物或毒素等。而这些代谢产物大致可分为 2 大类,第一类为挥发性有机化合物 (volatile organic compounds, VOCs)^[22-23],第二类为扩散性有机化合物^[13]。

而目前共培养的研究方法主要应用于研究链霉菌与真菌^[16]、放线菌与真菌^[24]之间的相互作用,以期产生新的抗生素类天然活性药物,亦或是用于研究土壤远源物种之间的相互作用^[25]。而基于共培养去简化根瘤微生态中根瘤菌与非根瘤菌之间的相互作用以及根瘤微生态中群落的构建却鲜有报道。并且对根瘤微生态中的这些非根瘤菌的研究也主要集中在多样性、对植物的促生特性等方面,而对其在根瘤微生态中所发挥的生态作用,以及对根瘤微生态中群落的构建,尤其是它们与根瘤菌之间的互作关系及其机制还需要深入研究。尽管国内外学者在

非根瘤菌方面开展了一些研究^[26-28],但是,它们与根瘤菌间的协同进化关系尚未明确。因此,目前关于这一课题的研究基本上还处于初期的探索阶段,很多问题尚未得到充分的阐明。

白刺花 [*Sophora davidii* (Franch.) Skeels] 别名狼牙刺、苦刺、马蹄针,属豆科槐属,为我国的原产植物。作为陕北乡土豆科固氮灌木,其根系发达,耐干旱、瘠薄,可生长于因长期土壤侵蚀而形成的破碎地形、黄土侵蚀坡面和黄土峭壁等严酷的生境中。在干旱区植物群落演替、物种多样性维持及土壤改良与防治水土流失等方面有着重要的生态学价值,是陕北干旱区主要分布的旱生灌丛优势种和陕北“退耕还林工程”的主要植被之一。而且与草本植物相比较,固氮灌木可显著增加土壤中有效氮和磷含量等,所以白刺花是干旱区生态恢复中的先锋植物和最佳的候选者^[29]。

以白刺花根瘤菌与非根瘤菌为研究材料,采用共培养、二分隔板实验和单独培养的方法,于正常培养条件下从白刺花根瘤中筛选出有互作效应的菌株,测定其对 pH 和 NaCl 的耐受性以及对各种氮源的利用情况,并通过根瘤菌的菌落直径、生长曲线和多糖产量来表征其互作效应,进一步探究互作菌株在盐碱和营养胁迫条件下互作效应的转变,为进一步研究胁迫条件下根瘤菌与非根瘤菌在代谢水平上的互养关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株为实验室前期分离自陕北旱区野生白刺花的根瘤,将采集到的根瘤进行表面消毒,95%乙醇溶液处理 2.5 min,0.2% HgCl₂ 溶液消毒 5 min,无菌水冲洗 5 次,取最后一次冲洗的无菌水 30 μL 于 PYG 与 YMA 培养基上进

行涂布, 为对照组, 确保表面消毒彻底, 分离到的细菌均为根瘤内生细菌。用无菌刀片将消毒根瘤切为两半, 将根瘤切面在 PYG 与 YMA 培养基表面划线, 挑取单菌落进行纯化。共分离到非根瘤菌 193 株, 隶属于 51 个属, 根瘤菌 3 株, 分别为 *Pararhizobium giardinii* BT-196-1、*Rhizobium azibense* BT-170 和 *Mesorhizobium metallidurans* YC-39, 以上菌株均在 -80°C 冷冻保藏在 20% 甘油中。

1.2 菌种活化及种子液的制备

将保存在 -80°C 冰箱的菌株于平板划线, 28°C 培养, 连续划线培养 3 次, 使菌株处于最佳生长状态。挑取活化后的根瘤菌接种于 YMA 培养基上, 非根瘤菌接种于 PYG 培养基上, 28°C 培养 4 d 后用无菌水冲脱菌体, 分别接种在 YMA、PYG 液体培养基中, 28°C 、180 r/min 培养 3 d, 然后 4°C 、12 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 使用 ddH_2O 调节菌体 $OD_{600}=1.00$, 备用。

用于培养根瘤菌的 YMA 培养基配方为 (g/L): 甘露醇 10, 酵母粉 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.1, K_2HPO_4 0.25, KH_2PO_4 0.25, pH 7.0, 121°C 灭菌 20 min, 配制固体时需另加入 15–20 g 琼脂粉。

用于培养非根瘤菌的 PYG 培养基配方为 (g/L): 蛋白胨 5, 酵母粉 0.2, 葡萄糖 5, 牛肉膏 3, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, pH 7.2, 121°C 灭菌 20 min, 配制固体时需另加入 15–20 g 琼脂粉。

1.3 互作菌株的筛选

1.3.1 共同培养条件下菌株互作

使用平板对峙法对有互作效果的菌株进行筛选^[30], 首先将根瘤菌接种在 YMA 固体培养基中间位置, 然后在距离根瘤菌 1.5 cm 和 1.0 cm 处接种非根瘤菌, 28°C 培养 7 d 后, 使用讯数全自动菌落分析仪测量根瘤菌菌落直径, 以接

种在培养基边缘的根瘤菌为对照, 计算根瘤菌菌落直径的差值, 如差值为正, 则认为非根瘤菌对根瘤菌的生长起促进作用, 反之为抑制作用, 以上试验种子液接种量均为 $2\ \mu\text{L}$, $OD_{600}=1.00$, 设置 3 个平行对照。

共同培养下, 菌株的互作效果以根瘤菌的生长曲线进行评价。将共同培养条件下有互作效果的根瘤菌和非根瘤菌的种子液 1.0 mL 共同接种 YMA 液体培养基中, 28°C 、180 r/min 培养 3 d 后, 将菌液在 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液, 然后使用 $0.1\ \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤上清液, 并按照 1:1 (V:V) 的比例添加至新的 YMA 液体培养中, 最后接种 1.0 mL 根瘤菌种子液, 28°C 、180 r/min 条件下培养, 每隔 3 h 取 5.0 mL 菌液测定 OD_{600} 吸光值, 绘制菌株生长曲线, 以未添加共培养滤液为对照, 以上试验设置 3 个平行对照。

1.3.2 非根瘤菌产 VOCs 的鉴定以及对根瘤菌生长的影响

利用二分隔板培养根瘤菌与非根瘤菌^[30], 将 $2.0\ \mu\text{L}$ 根瘤菌菌悬液点接于左室, 取 $20\ \mu\text{L}$ 非根瘤菌菌悬液涂布于右室, 以右室不涂布非根瘤菌菌悬液的平板为对照, 试验组设置 3 个平行对照, 平板于 28°C 培养 4–7 d 后, 测量根瘤菌菌落直径, 计算根瘤菌试验组与对照组菌落直径的差值, 如差值为正, 则认为非根瘤菌产生了对根瘤菌生长有促进作用的 VOCs, 差值为负则产生对根瘤菌生长有抑制作用的 VOCs, 如果根瘤菌试验组与对照组菌落直径没有差别, 则认为两者之间没有影响。

1.3.3 非根瘤菌单独培养条件下对根瘤菌生长的影响

在 YMA 固体培养基放置 $0.1\ \mu\text{m}$ 水系混合纤维微孔无菌滤膜, 然后在滤膜中间位置接种 $2.0\ \mu\text{L}$ 非根瘤菌种子液, 28°C 培养 3 d 后, 除

去滤膜, 在接种根瘤菌的位置接种 2.0 μL 非根瘤菌, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后测量根瘤菌菌落直径, 以接种在培养基边缘的根瘤菌为对照, 计算根瘤菌菌落直径的差值, 评价互作效果, 以上试验设置 3 个平行对照^[18]。

非根瘤菌单独培养条件下对根瘤菌生长的影响以根瘤菌的生长曲线进行评价, 具体方法参照 1.3.1, 其中在 YMA 液体培养基中添加的滤液为仅接种非根瘤菌的滤液。

1.4 胁迫条件下菌株的互作

1.4.1 胁迫条件确定

对菌株盐碱耐受性和氮源利用进行测试, 耐受盐度设置为 0%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%, pH 梯度依次设置为 4、5、6、7、8、9、10、11, 盐碱胁迫条件为: 非根瘤菌的生长不受抑制, 但根瘤菌的生长会显著受到抑制时的 pH 和盐度; 测试的氮源为酵母粉、硝酸钠、硫酸铵、硝酸铵、尿素、硝酸钾、磷酸二氢氨、氯化铵、酸水解酪蛋白、L-色氨酸、甘氨酸、L-半胱氨酸、L-苯丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸 15 种氮源, 各测试氮源终浓度为 3 g/L, 营养缺乏条件为: 在该种氮源下, 非根瘤菌生长不受抑制, 但是根瘤菌的生长显著受到抑制。

1.4.2 胁迫条件下菌株互作

将 YMA 培养基的初始条件调节至 1.4.1 所确定的盐碱条件的氮源, 其余步骤同 1.3.1。

1.5 互作体系中根瘤菌多糖含量测定

对正常和胁迫条件下具有互作的体系中根瘤菌的多糖含量进行测定, 以评价其互作效果。胞外多糖采用苯酚-硫酸法进行测定^[31]。胞外多糖提取参考王路瑶等^[32]的方法。

1.6 数据处理

使用 GraphPad prism 8.0.2 软件进行数据统计和绘图, 并进行单因素方差分析, 如果 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异, 使用 R 语言中“pheatmap”程序包绘制热图。

2 结果与分析

2.1 正常培养条件下根瘤菌与非根瘤菌的相互作用

2.1.1 共培养条件下根瘤菌与非根瘤菌的相互作用

将 193 株非根瘤菌与 3 株根瘤菌 *Pararhizobium giardinii* BT-196-1、*Rhizobium azibense* BT-170、*Mesorhizobium metallidurans* YC-39, 在 YMA 培养基上共培养, 结果表明 193 株非根瘤菌中, 与 3 株根瘤菌存在相互作用的共 15 株, 隶属于 10 个属, 其余菌株则对根瘤菌的生长不产生影响。存在相互作用的 15 株非根瘤菌中, 对 *P. giardinii* BT-196-1 的生长起到促进作用的共 6 株菌, 抑制作用的共 5 株菌; 对 *R. azibense* BT-170 生长起到促进作用的共 6 株菌, 抑制作用的共 4 株菌; 对 *M. metallidurans* YC-39 生长起到促进作用的共 4 株菌, 抑制作用的共 9 株菌(图 1)。

2.1.2 二分隔培养条件下非根瘤菌对根瘤菌生长的影响

通过二分隔平板实验, 从 193 株非根瘤菌中筛选得到 3 株产 VOCs 的非根瘤菌, 并且对根瘤菌的生长存在促进或者抑制的效果。*Streptomyces xanthophaeus* BT-91-2 和 *Nocardia brasiliensis* BT-123-2 对 *M. metallidurans* YC-39 的生长表现出抑制作用, 与对照组相比 *M. metallidurans* YC-39 试验组菌落直径分别减少了 1.00 mm 和 0.80 mm。*Microbacterium oxydans* YC-30 对 *M. metallidurans* YC-39 的生长表现出促进的作用, 与对照组相比 *M. metallidurans* YC-39 试验组菌落直径增加了 1.60 mm (图 2A), 与正常条件下共培养互作效果保持一致。*S. xanthophaeus* BT-91-2 和 *N. brasiliensis* BT-123-2 对 *P. giardinii* BT-196-1 的生长表现出促进的作用(图 2B), 与对照组相比 *P. giardinii* BT-196-1 试验组菌落直径分别增加了 1.66 mm 和 0.78 mm, 与正常条件下共培养互作

效果保持一致。*S. xanthophaeus* BT-91-2 和 *N. brasiliensis* BT-123-2 对 *R. azibense* BT-170 的生长表现出促进的作用, 与对照组相比 *R. azibense* BT-170 试验组菌落直径分别增加了 0.76 mm 和 0.75 mm, 但促生作用主要发生在生长的后期, 可能与 VOCs 的积累有关(图 2C), 与正常条件下共培养互作效果保持一致。*M. oxydans* YC-30 与 *P. giardinii* BT-196-1、*R. azibense* BT-170 共培养时, 对二者的生长都表现出抑制作用, 但利用二分隔平板培养时却对 2 株根瘤菌的生长没有产生

影响。与正常条件下共培养相比, 当 *M. oxydans* YC-30 与 *M. metallidurans* YC-39 在二分隔平板上培养时, *M. metallidurans* YC-39 试验组(1.5 cm 处)与对照组菌落直径差显著减小。*N. brasiliensis* BT-123-2 与 *R. azibense* BT-170 在二分隔平板上培养时, 其试验组(1.5 cm 处)与对照组菌落直径差显著减小($P < 0.05$)。这可能是由于在共培养时, 根瘤菌与非根瘤菌之间通过代谢产物的交换从而影响彼此, 而在二分隔平板培养时, 二者之间没有代谢产物的交换。

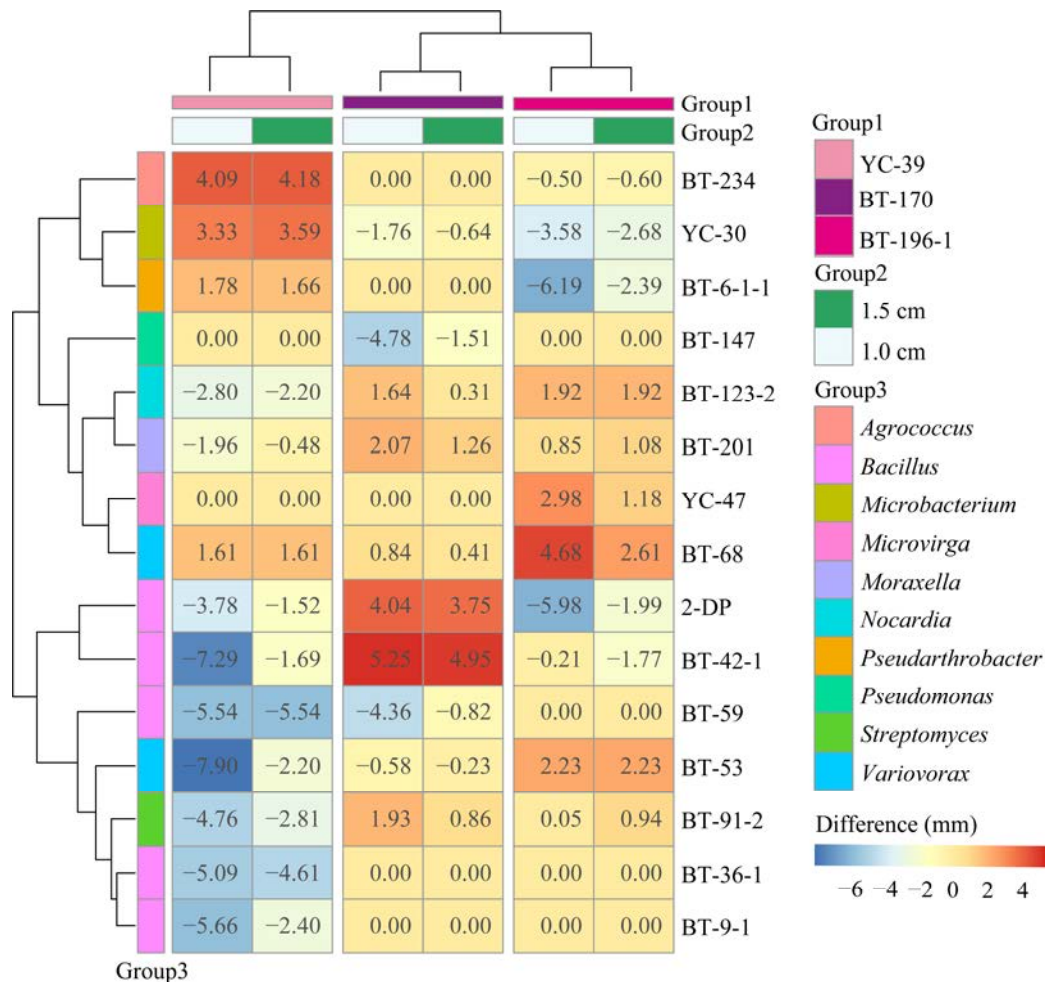


图 1 共培养条件下, 根瘤菌与非根瘤菌接种距离为 1.0 cm 和 1.5 cm 时, 根瘤菌与对照组菌落直径差值所构建热图

Figure 1 The heat map constructed by the difference in diameter of rhizobia and control group when the inoculation distance between rhizobia and NRE under co-culture is 1.0 cm and 1.5 cm.

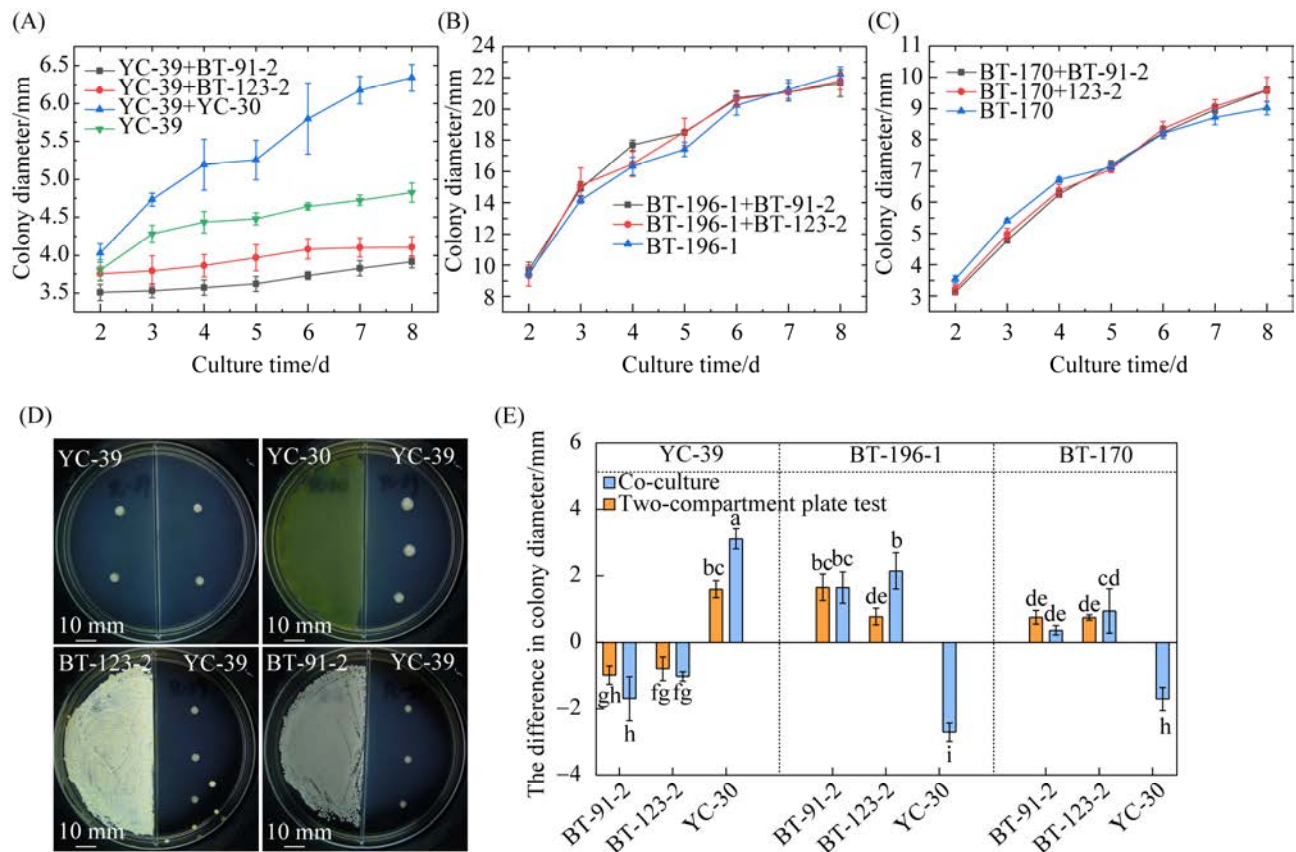


图 2 二分隔培养条件下根瘤菌与非根瘤菌的交互

Figure 2 Interaction between rhizobia and NRE in two-compartment plate. A: change of colony diameter of *M. metallidurans* YC-39 on two-compartment plate culture with *S. xanthophaeus* BT-91-2, *N. brasiliensis* BT-123-2 and *M. xydans* YC-30; B: change of colony diameter of *P. giardinii* BT-196-1 on two-compartment plate culture with *S. xanthophaeus* BT-91-2 and *N. brasiliensis* BT-123-2; C: change of colony diameter of *R. azibense* BT-170 on two-compartment plate culture with BT-91-2 and *N. brasiliensis* BT-123-2; D: *M. metallidurans* YC-39 were co-culture with *S. xanthophaeus* BT-91-2, *N. brasiliensis* BT-123-2 and *M. xydans* YC-30 on two-compartment plate; E: comparison of colony diameter difference between rizobium test group (1.5 cm distances) and control group under co-culture and two-compartment plate culture conditions (Welch *t*-test, $P < 0.05$).

2.1.3 单独培养条件下非根瘤菌对根瘤菌生长的影响

通过二分隔平板实验, 从 15 株有交互效应的非根瘤菌中筛选出 3 株产 VOCs 的非根瘤菌, 并且这 3 株非根瘤菌所产生的 VOCs 对根瘤菌的生长存在影响, 鉴于 VOCs 收集较难和不可控性, 因此选择剩余的 12 株非根瘤菌进行单独培养, 探究非根瘤菌在单独培养条件下的代谢

产物对根瘤菌生长的影响。

利用单独培养条件下根瘤菌试验组与对照组菌落直径之差构建热图(图 3), 结果显示, 有 4 株非根瘤菌对 *P. giardinii* BT-196-1 的生长表现出抑制作用; 有 2 株非根瘤菌对 *P. giardinii* BT-196-1 的生长表现出促进作用。有 2 株非根瘤菌对 *R. azibense* BT-170 的生长表现出抑制作用; 有 5 株非根瘤菌对 *R. azibense* BT-170 的生

长表现出促进作用。有 4 株非根瘤菌对 *M. metallidurans* YC-39 的生长表现出抑制作用；有 3 株非根瘤菌对 *M. metallidurans* YC-39 的生长表现出促进作用。此外，*Brevibacillus formosus* 2-DP 对 3 株根瘤菌的生长均表现出显

著的抑制，且根瘤菌试验组与对照组菌落直径差分别达到 15.34、5.37、5.14 mm，并且通过延长培养时间，试验组根瘤菌菌落直径不发生明显增长(图 3B)。

通过比较非根瘤菌单独培养与共培养在距

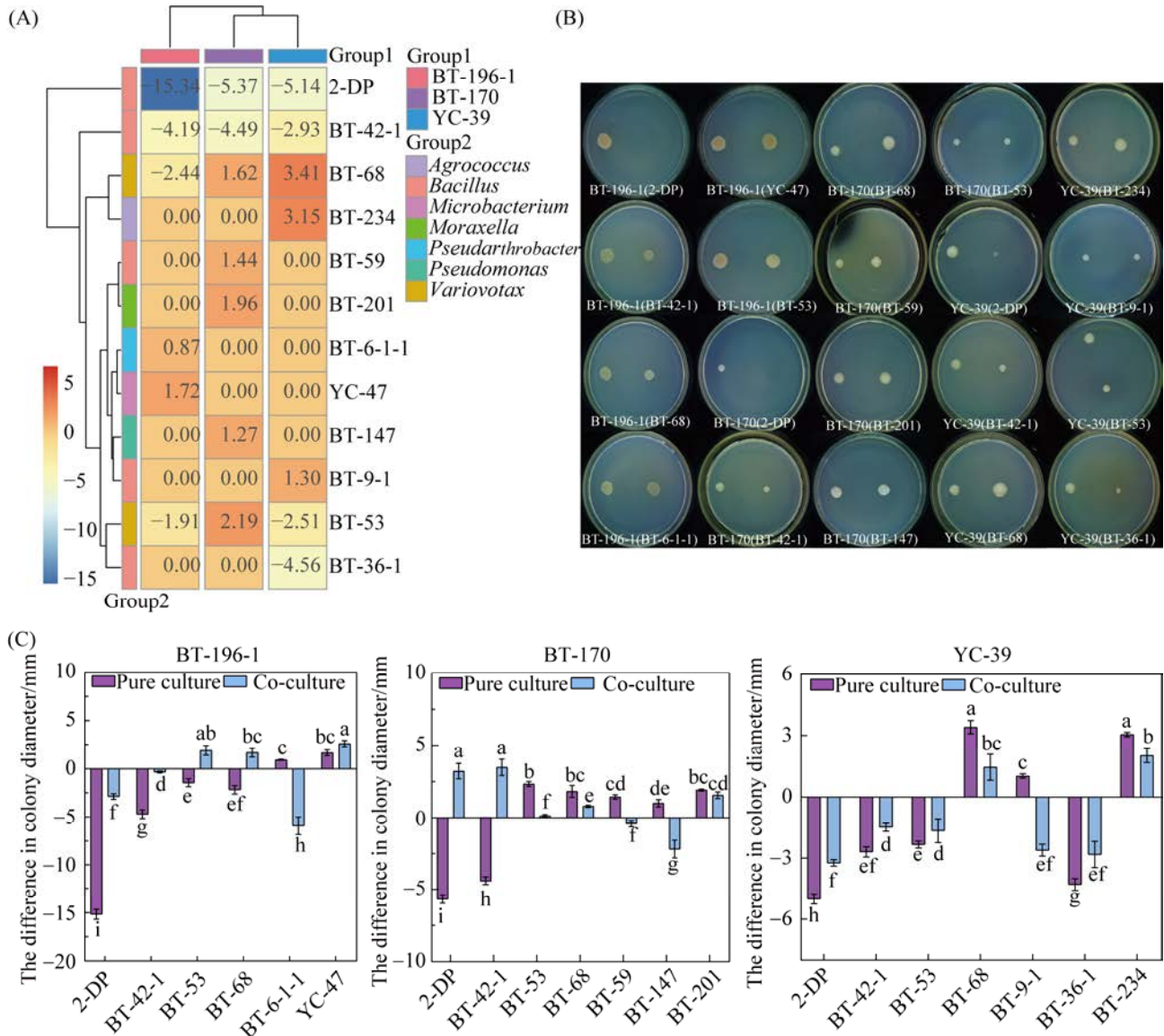


图 3 非根瘤菌单独培养条件下的交互

Figure 3 Interaction under pure culture conditions of NRE. A: construct a heatmap based on the difference between the colony diameter of the rhizobia test group and the control group under pure culture; B: the effect of NRE pure culture conditions on the growth of rhizobia, the left side of the plate is the control group, and the right side is the test group; C: comparison of the colony diameter difference between the rhizobia test group (1.5 cm distances) and the control group under the conditions of pure culture and co-culture with rhizobia (Welch *t*-test, $P < 0.05$).

离非根瘤菌 1.5 cm 处根瘤菌试验组与对照组菌落直径之差(图 3C)。其中 *Variovorax paradoxus* BT-53、*Variovorax ureilyticus* BT-68 与 *P. giardinii* BT-196-1 的互作效果由共培养的促生作用转变为单独培养条件下的抑制作用。*Pseudarthrobacter polychromogenes* BT-6-1-1 与 *P. giardinii* BT-196-1 的互作效果由共培养的抑制作用转变为单独培养条件下的促生作用。*B. formosus* 2-DP、*Bacillus cereus* BT-42-1 与 *R. azibense* BT-170 的互作效果由共培养的促生作用转变为单独培养条件下的抑制作用。*Priestia aryabhatai*

BT-59、*Pseudomonas oryzae* BT-147 与 *R. azibense* BT-170 的互作效果由共培养的抑制作用转变为单独培养条件下的促生作用。*Bacillus siamensis* BT-9-1 与 *M. metallidurans* YC-39 的互作效果由共培养的抑制作用转变为单独培养条件下的促生作用。其余非根瘤菌与根瘤菌的互作效果在两种培养方式下保持一致(图 3C, 图 4)。

上述结果为在正常条件下的互作模式,通过比较共培养、二分隔平板实验和单独培养条件下非根瘤菌对根瘤菌生长的影响,试验从 15 株对根瘤菌生长存在促生或抑制效果的非根瘤菌中,筛

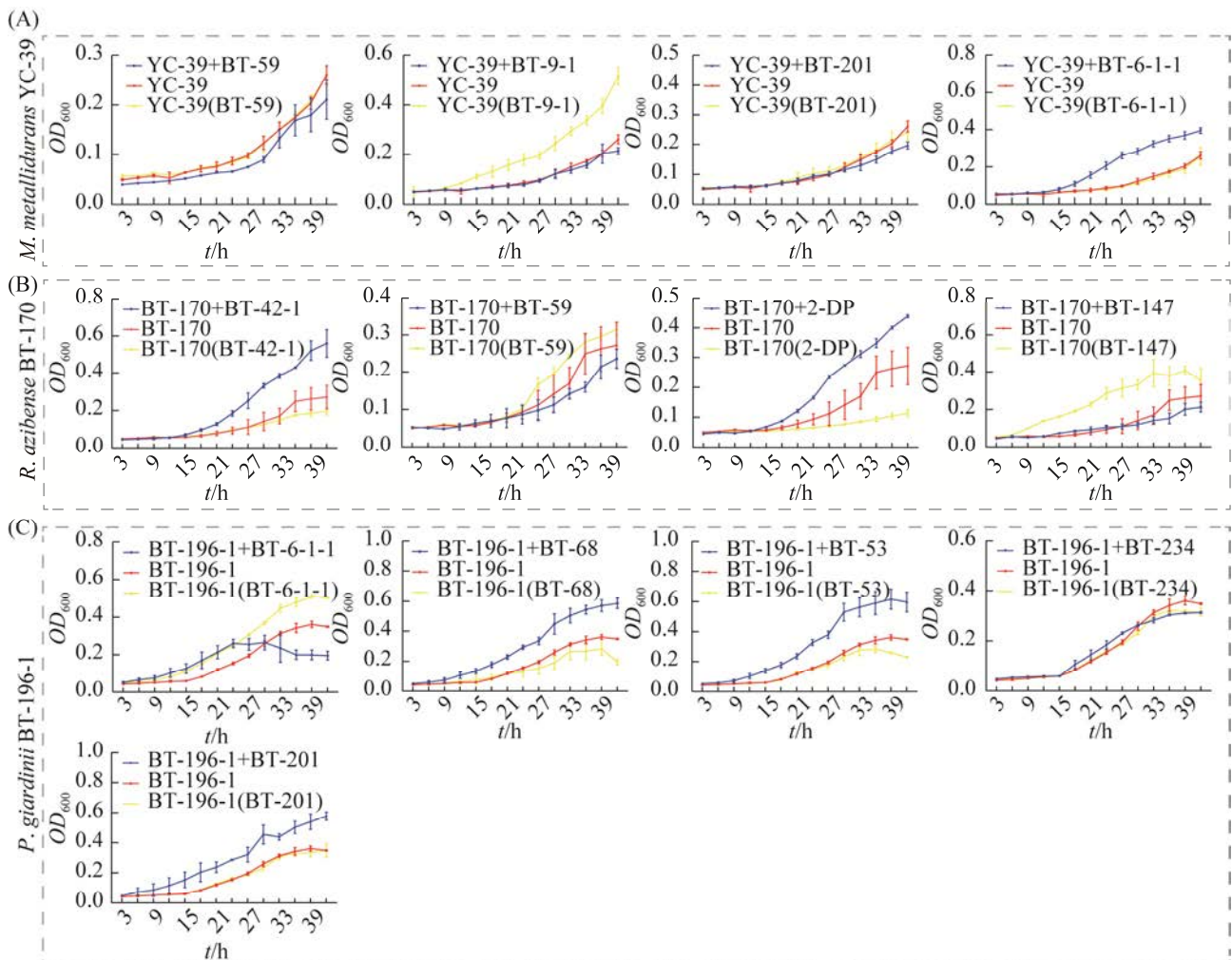


图 4 根瘤菌生长曲线

Figure 4 Rhizobium growth curves in red for control rhizobia, in blue for rhizobia growth curves under co-culture conditions and in yellow for rhizobia growth curves under NRE alone. A: *M. metallidurans* YC-39; B: *R. azibense* BT-170; C: *P. giardinii* BT-196-1.

选得到 10 株与根瘤菌在平板上共培养存在相互作用的非根瘤菌,这些非根瘤菌不产生对根瘤菌生长存在影响的 VOCs, 并且其在与根瘤菌共培养和单独培养时,与根瘤菌的互作模式发生了转变,这种互作模式的转变可能是由于在共培养条件下,根瘤菌与非根瘤菌的代谢产物发生了改变。因此,试验选择这 10 株非根瘤菌探究其在胁迫环境下与根瘤菌互作模式的转变。

2.2 胁迫条件下根瘤菌与非根瘤菌的相互作用

2.2.1 盐碱胁迫下根瘤菌与非根瘤菌的相互作用

(1) 盐碱胁迫条件的确定

三株根瘤菌对 pH 的耐受范围较广,在 pH 5-10 都可生长,其中 *P. giardinii* BT-196-1 最适 pH 为 5, *R. azibense* BT-170、*M. metallidurans* 最适 pH 均为 6。但 3 株根瘤菌对盐度的耐受范

围较窄,在测试到的盐度内只在 NaCl 浓度为 0%和 0.5%时生长,在 NaCl 浓度为 0%时,生长较好,而在 NaCl 浓度为 0.5%时可以生长但是生长较差。在 NaCl 浓度为 1%、2%、3%、4%、5%、6%的条件下 3 株根瘤菌均不能正常生长。而 10 株非根瘤菌对 pH 和 NaCl 浓度的耐受范围较广(图 6)。根据根瘤菌与非根瘤菌对 pH 和 NaCl 浓度的耐受范围,选择 pH 为 8.5、NaCl 浓度为 0.5%为盐碱胁迫条件,在此条件下根瘤菌的生长受到显著抑制。

(2) 盐碱胁迫下的互作

在盐碱条件下, *P. giardinii* BT-196-1 与非根瘤菌 *P. polychromogenes* BT-6-1-1、*V. ureilyticus* BT-68、*V. paradoxus* BT-53、*B. cereus* BT-42-1、*B. formosus* 2-DP 共培养都没有表现

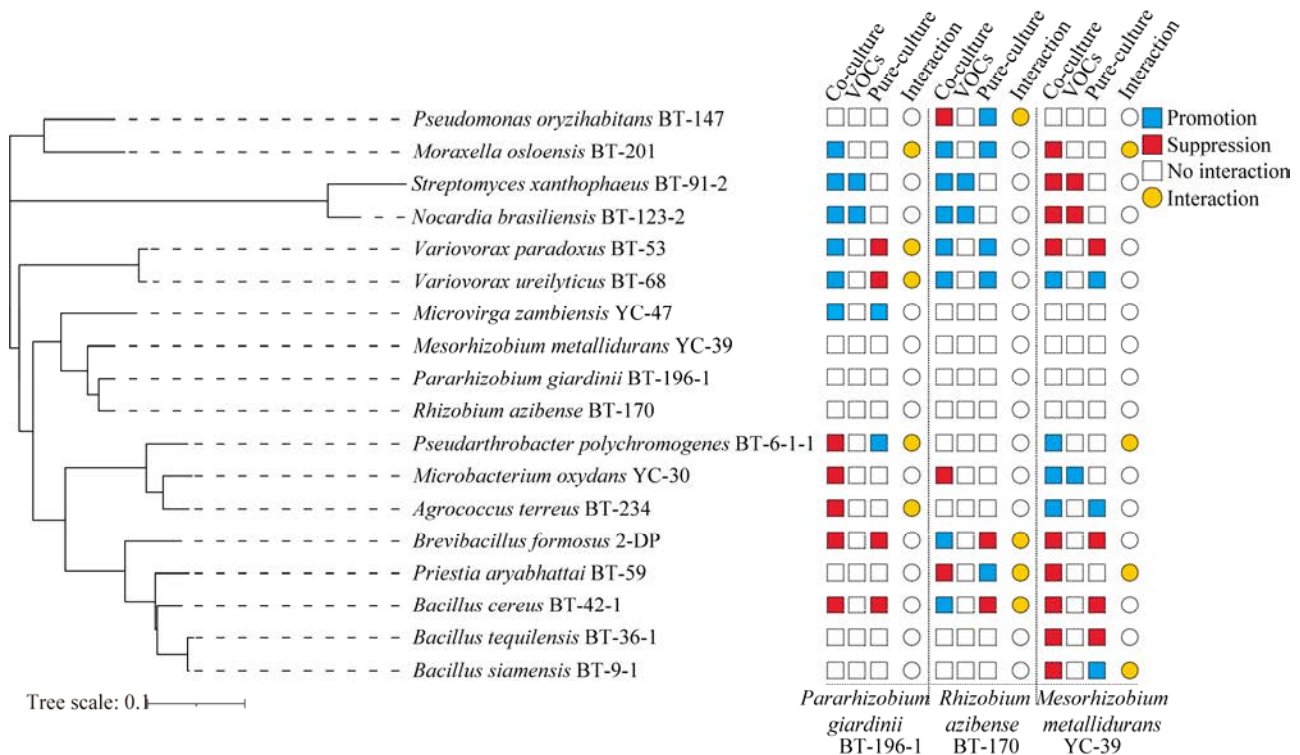


图 5 基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树

Figure 5 The phylogenetic tree of the NRE based on 16S rRNA gene sequence. Blue indicates that NRE exhibit a pro-growth effect on the growth of rhizobia, red indicates inhibition, white indicates no interaction between the two, and yellow indicates interaction between NRE and rhizobia.

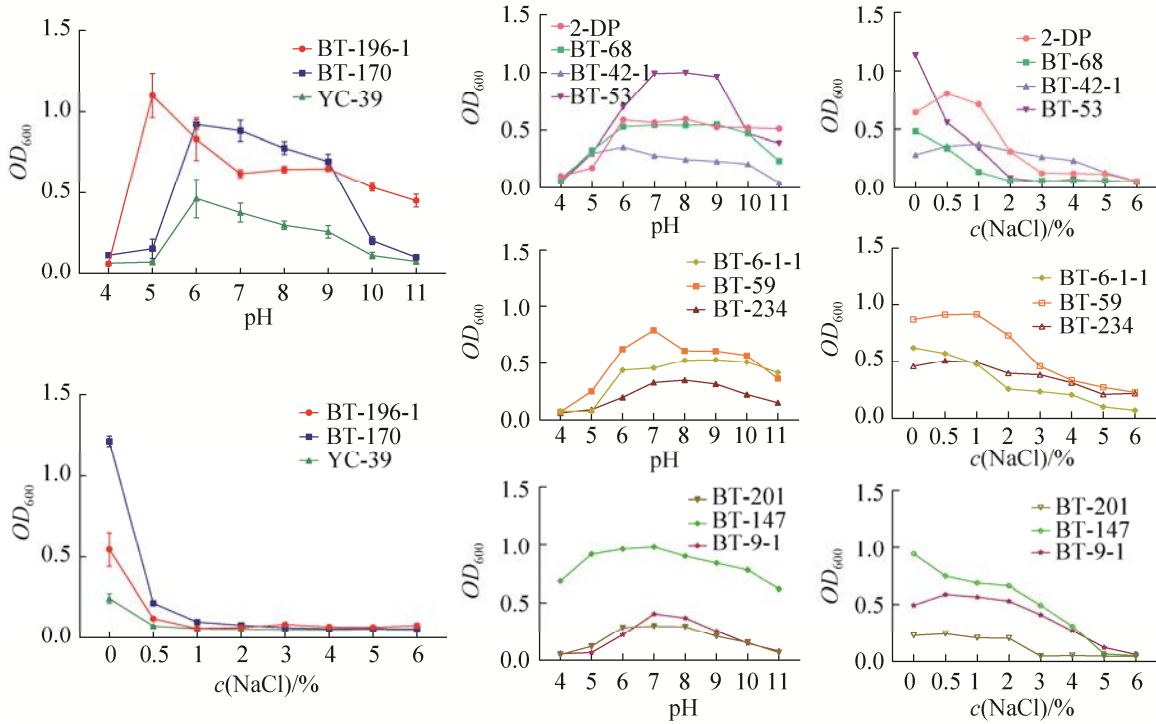


图 6 根瘤菌与非根瘤菌在不同盐浓度和 pH 条件下的生长情况

Figure 6 Growth of rhizobia and NRE under different salt concentration and pH conditions.

出明显的交互, 但 *B. formosus* 2-DP 在与其他 2 株根瘤菌共培养时, 对 2 株根瘤菌的生长都表现出明显的抑制作用。此外非根瘤菌 *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59 对 *R. azibense* BT-170 的生长表现出促进作用, 结果与在正常条件下共培养的作用效果相反。*B. siamensis* BT-9-1 在盐碱条件下对 *M. metallidurans* YC-39 表现出促生作用, 结果与在正常条件下共培养的作用效果相反。并且, *B. siamensis* BT-9-1 与 *M. metallidurans* YC-39 在盐碱条件下共培养时, 不仅促进了 *M. metallidurans* YC-39 的生长, 且与对照组相比显著提高了 *M. metallidurans* YC-39 多糖的产量($P < 0.001$) (图 7)。

2.2.2 氮源胁迫下根瘤菌与非根瘤菌的相互作用

(1) 氮源胁迫条件的确定

以无氮源培养基为阴性对照, 其他氮源与其进行显著性分析。在测试的 15 中氮源中 3 株根瘤菌的最适氮源均为酵母粉, 且 3 株根瘤菌

均不能利用谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和尿素。总体来看, 3 株根瘤菌对有机氮源的利用率高于无机氮源。在有机氮源中, 对氨基酸类的氮源利用率低; 在无机氮源中, *P. giardinii* BT-196-1 对硝态氮的利用率高于铵态氮, 而 *R. azibense* BT-170、*M. metallidurans* YC-39 对铵态氮的利用率高于硝态氮(图 8A)。而非根瘤菌中 *Priestia aryabhattai* BT-59、*Pseudarthrobacter polychromogenes* BT-6-1-1、*V. paradoxus* BT-53、*V. ureilyticus* BT-68、*Pseudomonas oryzae* BT-147 对氮源的利用较广, 且 *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59 均能够利用根瘤菌所不能利用的谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和尿素做为唯一氮源生长(图 8B)。因此选择谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸和尿素做为唯一氮源, 研究 *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59 与 3 株根瘤菌的相互作用。

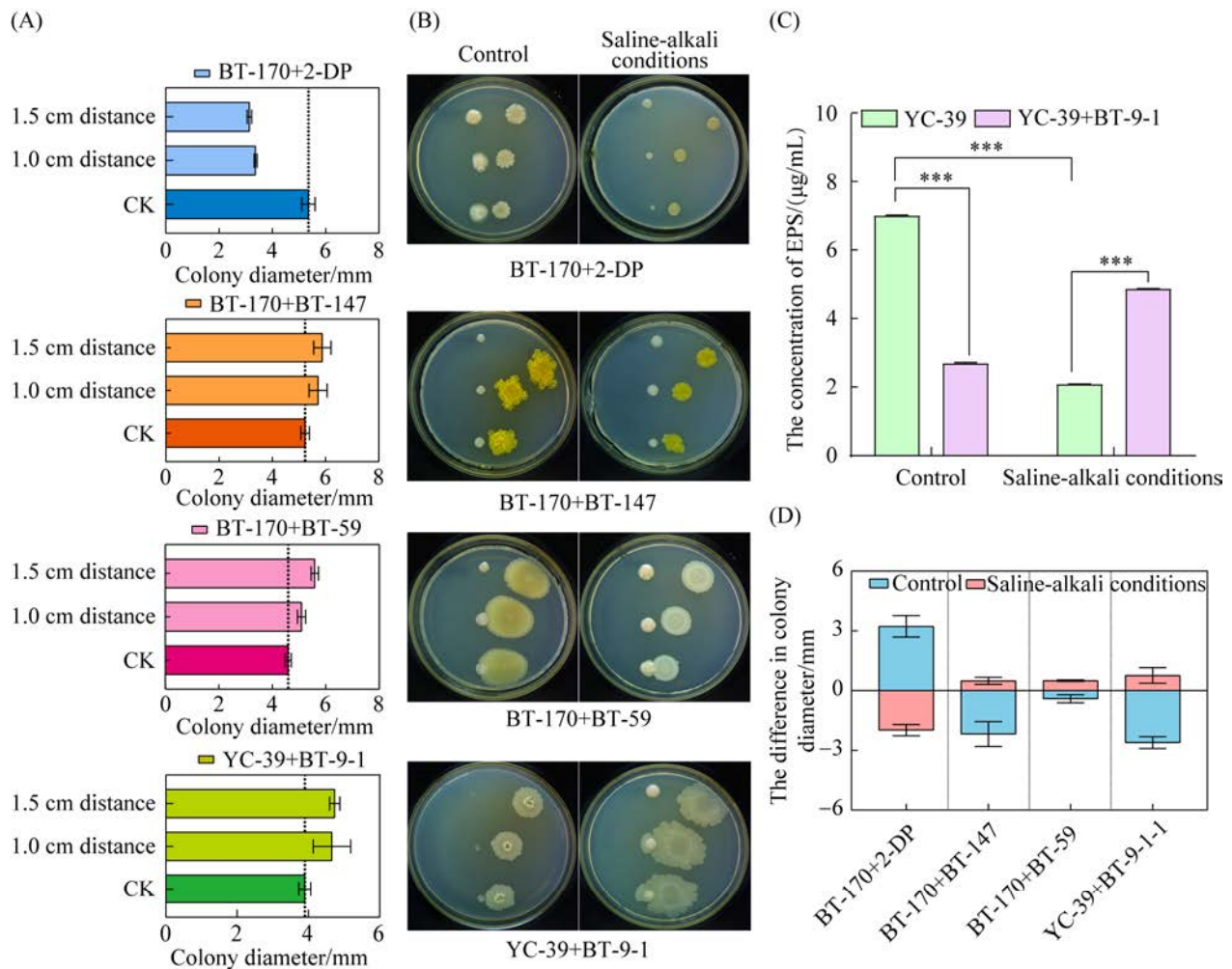


图 7 根瘤菌与非根瘤菌在盐碱条件下的互动

Figure 7 Interaction between rhizobia and NRE under saline-alkali conditions. A: colony diameter of rhizobia at 1.5 cm and 1.0 cm away from non-rhizobium under saline-alkali conditions; B: co-cultivation of rhizobia and NRE under saline-alkali conditions and control conditions; C: comparison of the production of EPS when *M. metallidurans* YC-39 and *Bacillus siamensis* BT-9-1 were co-cultured under saline-alkali conditions and under control conditions. Asterisks (*, ** and ***) indicate significant difference from the control (Welch *t*-test, $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$). D: comparison of the colony diameter difference between the rhizobia test group (1.5 cm distances) and the control group under saline-alkali conditions and normal conditions.

(2) 氮源胁迫下的互动

结果表明,在以半胱氨酸、甘氨酸和尿素作为唯一氮源的情况下, *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59与3株根瘤菌不发生相互作用,即对3株根瘤菌的生长不存在促生或抑制的效果。但以谷氨酸作为唯一氮源的情况下, *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai*

BT-59不仅对 *R. azibense* BT-170表现出促生作用,并且与对照组相比试验组多糖产量显著增加,分别增加了 $0.262 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.782 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$)。且与正常条件下共培养相比,在以谷氨酸作为唯一氮源的情况下 *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59与 *R. azibense* BT-170之间的互动效果均由抑制转变为促生(图 9)。

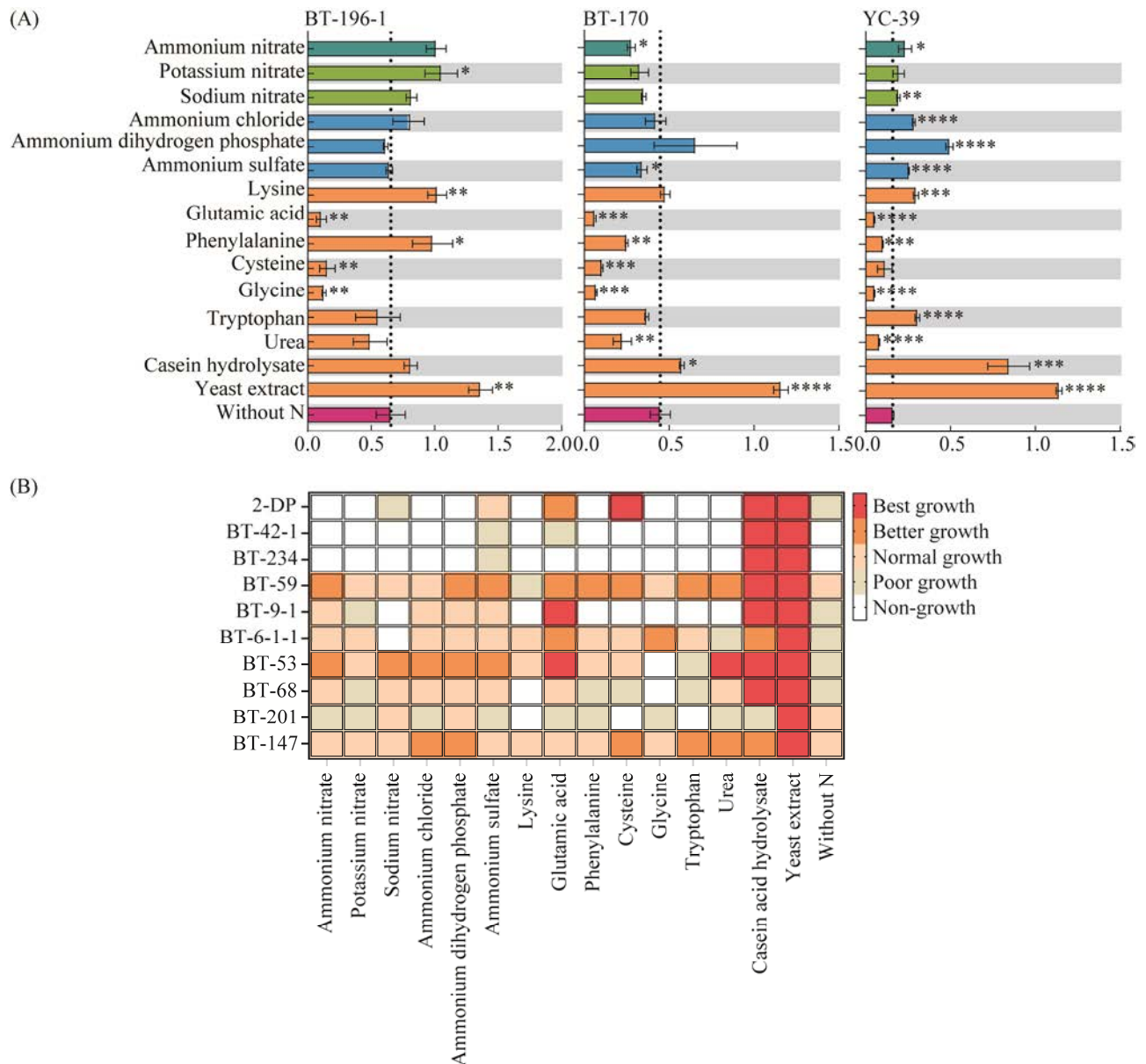


图 8 根瘤菌与非根瘤菌对不同氮源的利用

Figure 8 Utilization of different nitrogen sources by rhizobia and NRE. Asterisks (*, ** and ***) indicate significant difference from the without N (Welch t -test, $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$).

3 讨论

非根瘤菌将植物根瘤作为其栖息和繁殖场所, 对宿主植物有着广泛的有益效应, 包括对宿主植物的促生作用^[5,33]、固氮作用^[34]、铁载体介导的互作^[35]、提高宿主植物的抗逆能力^[34], 并对多种植物病原菌有生物防治作用。不仅如

此, 这些非根瘤菌可直接与根瘤菌相互作用, 影响根瘤菌的生长与定殖进而影响植物的固氮作用。如 Han 等^[36]通过非根瘤菌与根瘤菌的相互作用和结瘤试验表明, *Bacillus cereus* 分别特异性地促进和抑制了中华根瘤菌和慢生根瘤菌的生长, 缓解了盐碱条件对中华根瘤菌结瘤的影响, 并影响了其在根瘤中的定殖。

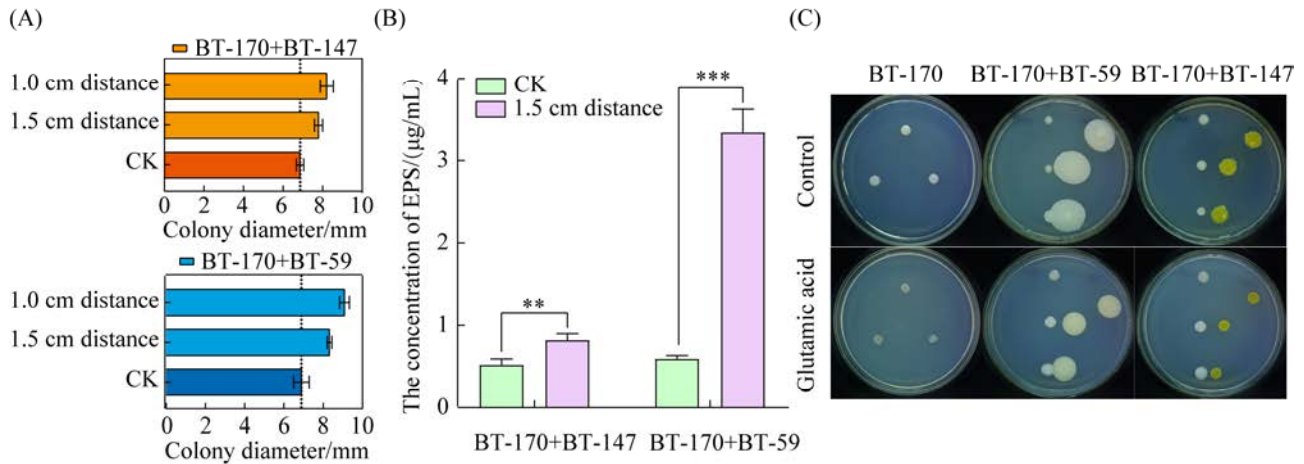


图 9 以谷氨酸为唯一氮源条件下的互作

Figure 9 Interaction with glutamic acid as the sole nitrogen source. A: colony diameter of rhizobia with Glutamic acid as the sole nitrogen source; B: the EPS production of *R. azibense* BT-170 when co-cultured with NRE with glutamic acid as the sole nitrogen source. Asterisks (*, ** and ***) indicate significant difference from the control (Welch *t*-test, $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$); C: Interaction of rhizobia and NRE using glutamic acid and yeast powder as nitrogen sources.

在本研究中, *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59 在盐碱条件下与 *R. azibense* BT-170 共培养时, 互作模式由正常培养条件下的抑制作用转变为促生作用; 而当非根瘤菌 *B. siamensis* BT-9-1 与 *M. metallidurans* YC-39 在盐碱条件下共培养时, 非根瘤菌明显促进了 *M. metallidurans* YC-39 多糖的产生。研究表明, 胞外多糖(EPS)在根瘤菌共生中发挥着主要的作用, EPS 产生的调控, 经常与 *nod* 因子调控相关联^[37], 在根感染和根瘤菌入侵中起到信号作用。并且 EPS 的产生可以减少菌体与宿主细胞的直接接触, 减弱宿主植物的防御反应, 促进根瘤菌的侵染以及转移和定殖^[38]。与正常培养条件相比较, 这种互作模式的转变, 使得根瘤菌可以对抗不利环境, 有利于根瘤菌在植物体内的定殖, 促进植物的结瘤固氮。

此外一些非根瘤菌能够产生对根瘤菌有促生作用的 VOCs 并且能够诱导 *nod-D* 的依赖性表达^[20]。而在本研究中, *M. oxydans* YC-30 与

M. metallidurans YC-39 在二分隔板共培养时, 对 *M. metallidurans* YC-39 表现出促生的效果, 可能是产生了某种对根瘤菌生长有促进作用的挥发性有机物。而 *S. xanthophaeus* BT-91-2、*N. brasiliensis* BT-123-2 在与根瘤菌共培养时, 对根瘤菌的生长都表现出抑制作用。下一步可对挥发性物质进行分离鉴定, 利用 q-PCR 对根瘤菌 *nod* 基因的表达进行检测。

能够广泛地利用氮源是根瘤菌适应各种土壤环境的重要生存能力指标^[39]。相比非根瘤菌, 根瘤菌对氮源的利用范围较窄, 因此, 提高根瘤菌对不同氮源的利用范围和能力, 能够提高豆科植物与根瘤菌共生体系的固氮能力和固氮量。在本试验中, *Pseudomonas oryzae* BT-147、*Priestia aryabhattai* BT-59 与 *R. azibense* BT-170 的共培养使得根瘤菌能够更好地利用原本不能利用的谷氨酸, 且与对照组相比, 试验组的多糖含量明显升高。与正常培养条件相比较, 这种互作模式的转变, 可以进一步扩大根瘤菌可利用的氮源。

在本研究中, 将根瘤菌与非根瘤菌之间的互作效应, 分为促生作用、抑制作用与保持中性。通过比较不同培养条件下根瘤菌与非根瘤菌的互作, 我们发现抑制作用占据了大部分, 且抑制的相互作用往往更多出现在与根瘤菌亲缘关系较远的菌属(图 5)。这可能与不同的菌株在根瘤微生态中占据不同的生态位导致的, 亲缘关系较远的菌株存在着不同的进化意义与方向, 因而在营养有限的环境下将产生激烈的竞争, 研究表明基于竞争的筛选有利于建立保护性的微生物群落^[21], 这使得根瘤微生态在波动的土壤环境中得以保持稳定。而促生作用的菌株多出现在亲缘关系较近的菌属, 在亲缘关系较近的菌株中也存在着部分抑制作用, 但这种抑制作用并不是进化意义上真正的竞争, 因为亲缘关系较近的菌株通常具有相同的进化意义和方向, 而在这种情况下进化理论预测进化会倾向于有利于群体的表型, 从而减少营养物质的竞争^[40]。生态位的竞争对于细菌调控网络的形成和功能有着广泛的影响, 这也为我们在实验室研究分离的细菌来研究自然微生物群落的构建机制建立了联系。

微生物已经被证明可以生物合成多种分子, 但基因组测序的最新进展表明, 这些微生物有可能产生结构更多样化的次生代谢产物。因此, 许多微生物基因簇在标准的实验室生长条件下可能是沉默的, 而这些次生代谢产物的产生取决于生长或培养条件。本研究中, 在正常条件下共培养和单独培养根瘤菌与非根瘤菌, 二者之间的互作模式发生了转化, 而这种转化可能就是由于在共培养的条件下, 根瘤菌与非根瘤菌之间发生了物质交换, 在代谢上形成互养关系, 亦或是在共培养的条件下诱导产生了新的化合物。因此改变培养基和营养物质

以模拟不同的环境, 从而诱导产生不同的代谢物可能是导致不同培养条件下根瘤菌与非根瘤菌互作模式转变的关键因素。

因此, 要深入研究这些相互作用, 就需要对生物体的次生代谢产物组成有准确的了解。在某些情况下, 诱导代谢产物发生显著的改变时, 可以使用简单的方法, 如薄层色谱(TLC)或高效液相色谱(HPLC)^[41], 很容易被监测到。在其他情况下, 当没有观察到显著的代谢产物改变时, 需要使用包含高级数据挖掘的代谢组学方法^[42]。因此, 下一步我们将对不同培养条件下的根瘤菌和非根瘤菌使用代谢组、转录组进行分析, 以期揭示不同培养条件下根瘤菌与非根瘤菌互作模式转变的机制。

4 结论

本研究通过在不同的培养条件下, 共培养和单独培养白刺花根瘤菌与非根瘤菌, 探究了不同培养条件下根瘤菌与非根瘤菌相互作用模式的转变。结果表明, 在正常培养条件下大多数的非根瘤菌对根瘤菌的生长起到抑制作用, 且抑制作用往往出现在与根瘤菌亲缘关系较远的菌株, 而促生作用出现在与其亲缘关系较近的菌属。研究获得 3 株产 VOCs 的非根瘤菌, 其中 *N. brasiliensis* BT-123-2 和 *S. xanthophaeus* BT-91-2 对 *M. metallidurans* YC-39 的生长起到抑制作用, *M. oxydans* YC-30 对 *M. metallidurans* YC-39 的生长起到促进的作用。与正常培养条件下的共培养相比, 在盐碱和以谷氨酸作为唯一氮源的条件 下非根瘤菌 *Pseudomonas oryzihabitans* BT-147 和 *Priestia aryabhatai* BT-59 对 *R. azibense* BT-170 的生长都从抑制转变为促生作用, 且提高了其多糖产量。这种互作模式的转变提高了根瘤菌的抗逆性, 扩大了根瘤菌可利用氮源的范围。

参考文献

- [1] 伍惠, 钟喆栋, 王学路, 陈大松, 李友国. 与黑龙江大豆主栽品种匹配的优良根瘤菌筛选与鉴定. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 39–46.
Wu H, Zhong ZD, Wang XL, Chen DS, Li YG. Screening and identification of elite rhizobia matched with main cultivars of soybean in Heilongjiang Province. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(1): 39–46. (in Chinese)
- [2] 胡倡, 李慧明, 伍惠, 林会, 李友国. 解磷菌和根瘤菌复合接种对大豆和紫云英共生固氮的影响. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 38–45.
Hu C, Li HM, Wu H, Lin H, Li YG. Effects of co-inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and *Rhizobium* on symbiotic nitrogen fixation of soybean and *Astragalus sinensis*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(4): 38–45. (in Chinese)
- [3] De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 1–11.
- [4] Ibáñez F, Angelini J, Taurian T, Tonelli ML, Fabra A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(1): 49–55.
- [5] Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M, Zafar M. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(2): 719–725.
- [6] Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 2003, 255(2): 571–586.
- [7] Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(10): 579–590.
- [8] Abreu NA, Taga ME. Decoding molecular interactions in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(5): 648–663.
- [9] Blasche S, Kim Y, Oliveira AP, Patil KR. Model microbial communities for ecosystems biology. *Current Opinion in Systems Biology*, 2017, 6: 51–57.
- [10] Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(6): 1180–1204.
- [11] Moree WJ, Yang JY, Zhao XL, Liu WT, Aparicio M, Atencio L, Ballesteros J, Sánchez J, Gavilán RG, Gutiérrez M, Dorrestein PC. Imaging mass spectrometry of a coral microbe interaction with fungi. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39(7): 1045–1054.
- [12] Cui LJ, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Medicine*, 2013, 5(7): 63.
- [13] Wu C, Zacchetti B, Ram AFJ, Van Wezel GP, Claessen D, Hae Choi Y. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10868.
- [14] Traxler MF, Watrous JD, Alexandrov T, Dorrestein PC, Kolter R. Inter species interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio*, 2013, 4(4): e00459–e00413.
- [15] Westhoff S, Van Wezel GP, Rozen DE. Distance-dependent danger responses in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 36: 95–101.
- [16] Jones SE, Ho L, Rees CA, Hill JE, Nodwell JR, Elliot MA. *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *eLife*, 2017, 6: e21738.
- [17] Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 2007, 24(4): 814–842.
- [18] McCully LM, Bitzer AS, Seaton SC, Smith LM, Silby MW. Inter species social spreading: interaction between two sessile soil bacteria leads to emergence of surface motility. *mSphere*, 2019, 4(1): e00696-18.
- [19] Tisch D, Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(5): 1259–1277.
- [20] Geetha Thanuja K, Annadurai B, Thankappan S, Uthandi S. Non-rhizobial endophytic (NRE) yeasts assist nodulation of *Rhizobium* in root nodules of blackgram (*Vigna mungo* L.). *Archives of Microbiology*, 2020, 202(10): 2739–2749.
- [21] Worsley SF, Innocent TM, Holmes NA, Al-Bassam MM, Schiøtt M, Wilkinson B, Murrell JC, Boomsma JJ, Yu DW, Hutchings MI. Competition-based screening helps to secure the evolutionary stability of a defensive microbiome. *BMC Biology*, 2021, 19(1): 205.
- [22] Briard B, Heddergott C, Latgé JP. Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, 2016, 7(2): e00219.
- [23] Cordovez V, Carrion VJ, Etalo DW, Mumm R, Zhu H, Van Wezel GP, Raaijmakers JM. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1081.
- [24] Oh DC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Induced production of emericellamides A and B from the

- marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *Journal of Natural Products*, 2007, 70(4): 515–520.
- [25] Garbeva P, Silby MW, Raaijmakers JM, Levy SB, Boer WD. Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 973–985.
- [26] 刘杰, 汪恩涛, 陈文新. 豆科植物根瘤内生细菌的发现及其研究进展. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1001–1006.
Liu J, Wang ET, Chen WX. Discovery and research progress of endophytic bacteria in the root nodules of legumes—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1001–1006. (in Chinese)
- [27] 张晓霞, 马晓彤, 姜瑞波. 根瘤菌分类研究进展及存在的争议. *微生物学通报*, 2010, 37(4): 601–606.
Zhang XX, Ma XT, Jiang RB. Taxonomy of rhizobia: progress and disputation. *Microbiology China*, 2010, 37(4): 601–606. (in Chinese)
- [28] 王志伟, 陈永敢, 王庆臻, 纪燕玲. 中国植物内生微生物研究的发展和展望. *微生物学通报*, 2014, 41(3): 482–496.
Wang ZW, Chen YG, Wang QC, Ji YL. Progresses and perspectives of studies on plant endophytic microbes in China. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 482–496. (in Chinese)
- [29] Song CJ, Ma KM, Fu BJ, Qu LY, Xu XL, Liu Y, Zhong JF. Distribution patterns of shrubby N-fixers and non-N fixers in an arid valley in Southwest China: implications for ecological restoration. *Ecological Research*, 2010, 25(3): 553–564.
- [30] 高亚慧, 姜明国, 丰景, 周桂. 基于产生促生挥发性物质的潜在 PGPR 菌株筛选及其促生特性研究. *生物技术通报*, 2022, 38(3): 103–112.
GAO YH, JIANG MG, FENG J, ZHOU G. Screening of potential PGPR strains based on the production of growth-promoting volatile compounds and study on their growthpromoting characteristics. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(3): 103–112. (in Chinese)
- [31] Zhang B, Sun BS, Jin M, Gong TS, Gao ZH. Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in submerged MBR. *Desalination*, 2008, 227(1/2/3): 286–294.
- [32] 王路瑶, 汤斌. 根瘤菌胞外多糖的分离纯化及组分分析. *食品与发酵工业*, 2019, 45(11): 71–77.
Wang LY, Tang B. Isolation, purification and component analysis of extracellular polysaccharides from *Rhizobium*. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(11): 71–77. (in Chinese)
- [33] Zhao LF, Xu YJ, Ma ZQ, Deng ZS, Shan CJ, Wei GH. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 2013, 44(2): 623–631.
- [34] Andrews M, Hodge S, Raven JA. Positive plant microbial interactions. *Annals of Applied Biology*, 2010, 157(3): 317–320.
- [35] Rajendran G, Sing F, Desai AJ, Archana G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp.. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4544–4550.
- [36] Han Q, Ma Q, Chen Y, Tian B, Xu L, Bai Y, Chen W, Li X. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. *The ISME Journal*, 2020, 14(8): 1915–1928.
- [37] Acosta-Jurado S, Fuentes-Romero F, Ruiz-Sainz JE, Janczarek M, Vinardell JM. Rhizobial exopolysaccharides: genetic regulation of their synthesis and relevance in symbiosis with legumes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6233.
- [38] 赵龙飞, 徐亚军. 根瘤菌胞外多糖的结构与功能研究进展. *中国酿造*, 2008, 27(24): 18–20.
Zhao LF, Xu YJ. The research progress of rhizobia exopolysaccharides' structure and function. *China Brewing*, 2008, 27(24): 18–20. (in Chinese)
- [39] 李友国, 周俊初. 影响根瘤菌共生固氮效率的主要因素及遗传改造. *微生物学通报*, 2002, 29(6): 86–89.
Li YG, Zhou JC. Major factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia and genetic modification. *Microbiology China*, 2002, 29(6): 86–89. (in Chinese)
- [40] Cornforth DM, Foster KR. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 285–293.
- [41] 郭玉华, 舒雪纯, 张影波, 官玲亮, 于福来, 元超. 基于超高效液相色谱-电喷雾-质谱、天然产物词典和活性筛选的艾纳香内生真菌次生代谢产物. *微生物学通报*, 2020, 47(2): 552–561.
Guo YH, Shu XC, Zhang YB, Guan LL, Yu FL, Yuan C. Screening of bioactive secondary metabolites of endophytes associated with *Blumea balsamifera* (L.) DC. by UPLC-QToF-MS, DNP and bio-assay. *Microbiology China*, 2020, 47(2): 552–561. (in Chinese)
- [42] Nguyen QT, Merlo ME, Medema MH, Jankevics A, Breitling R, Takano E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. *FEBS Letters*, 2012, 586(15): 2177–2183.