

DOI:10.11686/cyxb2025190

http://cyxb.magtech.com.cn

王召明, 郑丽娜, 张跃华, 等. 低秋眠耐寒苜蓿根系微生物组装特征及其品种间差异. 草业学报, 2026, 35(2): 195—207.

WANG Zhao-ming, ZHENG Li-na, ZHANG Yue-hua, et al. Bacterial community assembly in the rhizosphere and endosphere of different perennial alfalfa varieties with low fall dormancy rates. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(2): 195—207.

## 低秋眠耐寒苜蓿根系微生物组装特征及其品种间差异

王召明<sup>1</sup>, 郑丽娜<sup>1</sup>, 张跃华<sup>1</sup>, 赵韦<sup>1</sup>, 陈翔<sup>1,2</sup>, 贾振宇<sup>1\*</sup>

(1. 蒙草生态环境(集团)股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 010030; 2. 乌拉盖草甸草原生态系统内蒙古自治区野外科学观测研究站, 内蒙古锡林郭勒 026000)

**摘要:** 植物生长与抗逆表现依赖于植物根与共生微生物之间的有益互作。低秋眠级苜蓿在短日照和低温条件下适应性强, 但其根系相关微生物组装特征及其品种间差异尚不明确。本研究依托甘肃甘南野外试验站, 种植 4 种低秋眠级苜蓿品种: 兰苜 1 号、公农 1 号、金皇后(前 3 种均为紫花苜蓿)和甘农 1 号(杂花苜蓿)。利用 16S rRNA 基因扩增子测序, 系统分析 4 个苜蓿品种根际与根内细菌群落特征及组装机制。结果表明, 苜蓿根际细菌群落物种多样性显著高于根内, 不同品种之间根系细菌群落结构同样差异显著。与其他品种相比, 新型耐寒品系兰苜 1 号在根际特异性富集了链嗜酸菌属, 并在一定程度上提高了根系富集的细菌群落物种多样性, 增强了微生物共网络的复杂性和连通性。群落构建过程分析表明, 所有品种根际和根内细菌群落组装主要受到异质性选择(42%~55%)和匀质性选择(56%~83%)过程影响, 其中兰苜 1 号、公农 1 号和甘农 1 号品种根系细菌群落相比于金皇后受到更大程度的确定性选择过程影响。本研究揭示了低秋眠级苜蓿根际与根内微生物群落的组装模式及品种间差异, 为调控植物微生物组以提升寒区牧草适应性提供理论依据。

**关键词:** 多年生苜蓿; 根际; 根内; 品种差异; 共发生网络; 群落组装

## Bacterial community assembly in the rhizosphere and endosphere of different perennial alfalfa varieties with low fall dormancy rates

WANG Zhao-ming<sup>1</sup>, ZHENG Li-na<sup>1</sup>, ZHANG Yue-hua<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>1</sup>, CHEN Xiang<sup>1,2</sup>, JIA Zhen-yu<sup>1\*</sup>

1. M-Grass Ecology and Environment (Group) Co., Ltd., Hohhot 010030, China; 2. Ulagai Meadow Steppe Ecosystem Field Scientific Observation and Research Station in Inner Mongolia Autonomous Region, Xilingol League 026000, China

**Abstract:** Plant growth and stress resilience rely on beneficial interactions between roots and symbiotic microorganisms. Low fall dormancy alfalfa (*Medicago sativa*) varieties exhibit strong adaptability to short-day and low-temperature conditions, but the characteristics of their root-associated microbial assemblies and cultivar-specific variations remain unclear. In this study, four low fall dormancy alfalfa cultivars—‘Lanmu No. 1’, ‘Gongnong No. 1’, ‘Golden empress’ (all *M. sativa*), and ‘Gannong No. 1’ (*Medicago lupulina*)—were cultivated at a field experimental station in Gannan, Gansu Province. Using 16S rRNA gene amplicon sequencing, we analyzed rhizospheric and endophytic bacterial communities and their assembly mechanisms. The results show that bacterial alpha diversity was significantly higher in the rhizosphere than in endosphere, with distinct community structures observed among cultivars. Compared with the other cultivars, the cold-tolerant cultivar ‘Lanmu No. 1’ was

收稿日期: 2025-05-09; 改回日期: 2025-06-11

基金项目: 和林科技重大专项(2023-重-1)资助。

作者简介: 王召明(1969—), 男, 蒙古族, 内蒙古乌拉特中旗人, 本科。E-mail: mcstzln@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: Jzhenyu0612@163.com

uniquely enriched with *Streptacidiphilus* in the rhizosphere, showed increased endophytic bacterial diversity, and greater complexity and connectivity of microbial co-occurrence networks. Analysis of community assembly processes revealed that both rhizospheric and root endophytic communities were primarily governed by heterogeneous selection (42%–55%) and homogeneous selection (56%–83%). Notably, deterministic selection had a stronger influence on root-associated communities in ‘Lanmu No. 1’, ‘Gongnong No. 1’, and ‘Gannong No. 1’ than in ‘Golden empress’. This study elucidates the assembly patterns and cultivar-driven divergence of root-associated microbiomes in low fall dormancy alfalfa. These results provide a theoretical foundation for microbiome manipulation to improve forage crop adaptability in cold, high-altitude regions.

**Key words:** perennial alfalfa; rhizosphere; endosphere; variety differences; co-occurrence network; community assembly

植物与微生物在长期协同进化过程中形成了紧密的互作关系,共同构成了一个动态平衡的生命共同体。植物根是与土壤和微生物群之间紧密互动的重要器官<sup>[1-3]</sup>。根系相关微生物组作为植物第二基因组的重要组成部分,为宿主提供多种功能,包括营养物质的获取、激素的分泌和逆境抵抗<sup>[4-6]</sup>。植物通过根系分泌过程从土体环境中选择招募微生物在根际与根内定殖<sup>[7-8]</sup>。植物不同品种通过改变根系分泌物组成,进而影响根相关微生物群落组成和功能。例如,水稻(*Oryza sativa*)不同品种的根系代谢物差异导致其根际富集的甲烷氧化菌丰度显著不同<sup>[9]</sup>;玉米(*Zea mays*)杂交种相较于传统品种,其根际微生物组的氮循环功能更强<sup>[10]</sup>。然而,这些研究多聚焦于一年生作物,而对多年生牧草[如苜蓿(*Medicago sativa*)]这类长期与土壤微生物互作的植物关注不足,导致对长期共生系统中微生物群落构建及功能群驱动的植物适应性进化缺乏深入理解。

高海拔寒区植物对低温、干燥等逆境的适应和抵抗力不仅依赖于自身遗传调控,还与微生物组的协同互作密切相关。研究发现植物益生菌如假单胞菌(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)等能够诱导植物抗逆基因表达、增强抗氧化酶活性,从而提高植物对低温等环境胁迫的耐受能力<sup>[11]</sup>。此外,寒冷地区植物根际中常富集某些耐寒微生物类群,提示其在植物越冬适应中可能发挥关键功能<sup>[11-12]</sup>。多年生苜蓿由于其较高的耐寒、耐旱和再生性被广泛应用于西北高寒地区脆弱生态系统的植被修复,但不同品种间根系微生物组的组装差异及其对越冬适应性的潜在贡献尚不明确。了解多年生系统植物-微生物互作过程有助于为调控农业微生物组提升植物抗逆性提供理论基础。

微生物群落的多样性、互作关系及其稳定性受群落构建过程的驱动,这一过程通常由确定性(deterministic)和随机性(stochastic)因素共同调控<sup>[13]</sup>。确定性过程强调环境筛选(如pH、养分)和生物互作(如宿主选择、竞争)对微生物组成的定向影响;而随机性过程则包括随机扩散、生态漂变等中性效应。现有研究普遍认为,植物根系相关微生物组的组装以确定性过程为主导<sup>[6-7]</sup>,这主要归因于植物通过光合碳分配(约30%的碳运输至根部)主动调控根际微环境,从而选择性地招募有益微生物以提高植物适应性<sup>[14]</sup>。然而,不同植物品种(尤其是遗传背景差异显著的栽培品种)如何通过特异性调控影响微生物群落构建过程,目前仍缺乏系统研究。

本研究以甘肃甘南野外试验站种植的4种多年生苜蓿品种(兰苜1号、甘农1号、公农1号、金皇后)为对象,通过16S rRNA基因扩增子测序,解析其根际与根内微生物组的组成差异及群落构建过程。重点探讨不同秋眠级苜蓿品种根际与根内:1)微生物组成特征及差异;2)微生物共发生网络特征;3)群落组装过程差异。研究将为定向选育抗逆苜蓿品种及设计微生物组调控策略提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

甘肃甘南野外试验站位于甘肃省甘南藏族自治州夏河县达麦乡黄茨滩村(N 33°06', E 100°46'),属青藏高原东北边缘过渡带,海拔2880 m。气候类型为高原寒温带气候,年均温1~4℃,年降水量为400~800 mm,土壤类

型为砂质壤土。选取 4 种低秋眠级苜蓿作为研究对象:甘农 1 号(Gannong No. 1, Gan1, 杂花苜蓿 *Medicago ruthenica*)、公农 1 号(Gongnong No. 1, Gong1, 紫花苜蓿)、金皇后(Golden empress, GE, 紫花苜蓿)、兰苜 1 号(Lanmu No. 1, Lan1, 紫花苜蓿)。其中甘农 1 号是国内育成的耐寒杂花苜蓿品种,由紫花苜蓿和黄花苜蓿(*M. falcata*)杂交育成,抗寒性强、越冬性好,越冬率显著高于国内同类抗寒品种,可在海拔 3000 m 左右、年均气温 0 °C 左右的高寒地区种植;公农 1 号是由吉林省农业科学院选育而成,在东北地区具有较好的越冬表现,具有耐寒冷、耐干旱、高产稳产的优良性状;金皇后是国外育成的耐寒品种,由美国育成,国内引进栽培,秋眠级数 2~3 级,耐寒、耐旱、再生性好,适应性广;兰苜 1 号是兰州大学经多年选育得到的新品系,以陇中苜蓿(*M. sativa* ‘Longzhong’)、前郭苜蓿(*M. sativa* ‘Qianguo’)、高加索苜蓿(*M. sativa* var. *caucasica*)、苏联蓝苜蓿(*M. sativa* ‘Soviet Blue’) 4 种苜蓿为亲本,经开放授粉选育而成,耐寒性强,高产,在青藏高原地区具有相对较好的栽培表现。试验布局如图 1a 所示,样地概况如图 1b 所示。共设置 20 个试验小区,包含 4 个苜蓿品种(系),每个品种(系)处理包含 5 个重复。所有小区按随机区组排列设计。每个小区面积 27 m<sup>2</sup>(9 m×3 m),每小区间隔为 0.5 m。于 2022 年 5 月播种,播种方式为条播,播种深度 0.5~1.0 cm,行间距为 30 cm,播种量为 7.5 kg·hm<sup>-2</sup>。灌溉依靠自然降水,生长过程中无水肥管理。

1.2 样品采集

于 2024 年 5 月底(苜蓿分枝期)进行样品采集,采集期间当地月均温 9.7 °C、月平均降水量约 41.6 mm。收集苜蓿根与根际土壤样品,置于冰盒中运往实验室进行进一步处理(图 1c)。根际土壤样品收集方法参考前人研

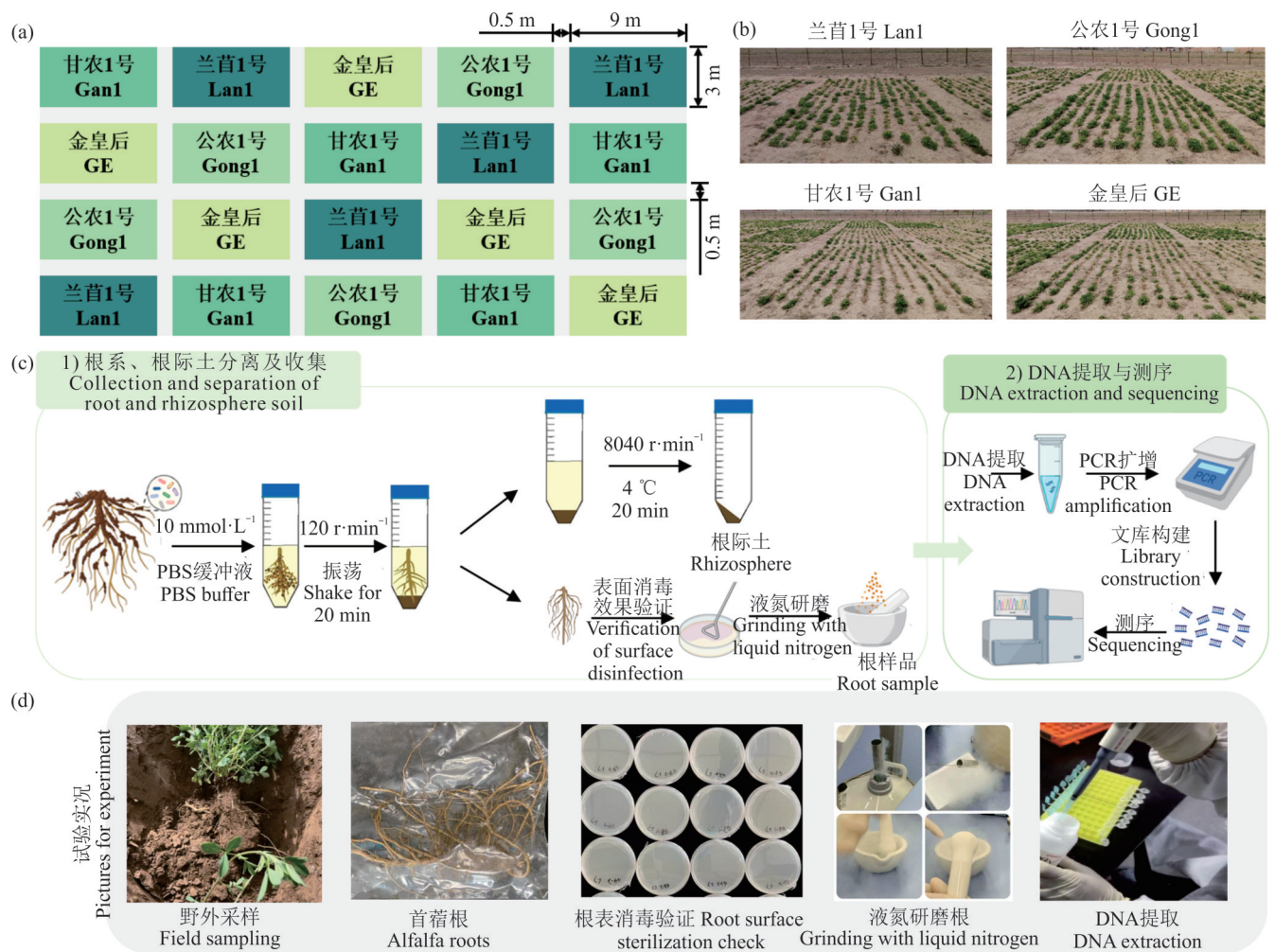


图 1 甘肃省甘南野外试验设置(a, b)及样品采集处理流程(c, d)

Fig. 1 Field experiment setup (a, b) and sample collection and processing (c, d) in Gannan, Gansu Province

究<sup>[7-8]</sup>。将根与根际土置入含有 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PBS缓冲液的50 mL离心管中,以 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡20 min。随后取出植物根,将剩余土壤悬液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 $8040\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心20 min,去上清,获得根际土样品。使用70%乙醇溶液对植物根进行表面消毒5 min,随后使用2.5%的次氯酸钠溶液浸泡3 min,最后使用无菌水冲洗5次<sup>[15]</sup>。收集最后一次冲洗后的无菌水接种到LB固体培养基(胰蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母提取粉 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钠 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂粉 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )中,进行根表消毒效果验证。如果24 h后仍未有菌斑形成,证明表面消毒效果良好。将根系样品剪切成约2 cm小段,按1:5(w/v)比例加入PBS缓冲液(含Tween 20),研磨杵手动研磨,直至组织完全破碎成匀浆。所有样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

### 1.3 DNA提取与高通量测序

使用Fast DNA土壤试剂盒(MP Biomedicals, Cleveland, OH, 美国)对根际土和根研磨样品进行DNA提取(图1c,d)。使用分光光度计(NanoDrop, ND2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, 美国)评估DNA的质量和数量,然后用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性。利用引物343F(5-TACGGRAGGCAGCAG-3)和798R(5-AGGGTATCTAATCCT-3)扩增细菌16S rRNA基因的V3~V4区<sup>[7,16]</sup>。扩增子采用Illumina Miseq系统进行测序。

DNA序列利用USEARCH软件进行质量控制<sup>[17]</sup>,去除长度 $<200\text{ bp}$ 的序列和含有不明确的碱基或任何未解析核苷酸的序列,识别并移除嵌合体。使用unoise 3软件将剩余的高质量序列聚类为零半径操作分类单元(zero-radius operational taxonomic unit, zOTUs)<sup>[18]</sup>。共获得细菌16S rRNA基因的读数4268888条。利用核糖体数据库(Ribosomal Database Project, RDP)对各zOTUs序列进行物种分类。

### 1.4 数据统计与分析

使用R 3.6.3的“vegan”包(<http://www.r-project.org>)计算细菌群落观察到的zOTUs数量(丰富度指数),用于表征微生物群落的 $\alpha$ 多样性。基于Bray-Curtis相异度矩阵,通过主坐标分析(PCoA;使用ape包)可视化群落结构分异,并采用置换多元方差分析(PERMANOVA)检验组间差异显著性(根际 vs 根内、品种间),统计结果以 $R^2$ 和 $P$ 值标注。基于DESeq2对根际与内生微生物的数据进行差异分析( $|\log_2(\text{Fold change})|>1, P_{\text{adj}}<0.05$ , 统计学 $P$ 值),采用火山图分品种展示根际与根内的微生物分布差异<sup>[19]</sup>。

基于各苜蓿材料根际和根内细菌zOTU相对丰度矩阵,采用WGCNA包计算Pearson相关系数( $r$ ),经Benjamini-Hochberg校正( $P<0.05$ 且 $|r|>0.5$ 筛选显著关联)<sup>[20]</sup>。通过iGraph构建无向加权网络<sup>[21]</sup>。删除自相关边及孤立节点后,利用ggplot2分品种可视化节点一边拓扑结构,揭示不同苜蓿材料驱动的微生物互作模式差异。

确定性过程包括异质性选择和均质化选择,而随机过程又分为均质化扩散和扩散限制过程<sup>[13]</sup>。为了推断细菌群落的组装过程,利用环境微生物宏基因组学(<http://mem.rcees.ac.cn:8080/>)计算 $\beta$ 最邻近指数( $\beta\text{NTI}$ )和基于Bray-Curtis的Raup Crick距离( $\text{RC}_{\text{bray}}$ )<sup>[22]</sup>。采用Feng等<sup>[23]</sup>的研究方法,即 $\beta\text{NTI}$ 值 $<-2$ 表示均质选择, $>2$ 表示变量选择;在 $-2\sim 2, \text{RC}_{\text{bray}}<-0.95$ 时的 $\beta\text{NTI}$ 表示均匀化扩散;在 $-2\sim 2, \text{RC}_{\text{bray}}>0.95$ 时的 $\beta\text{NTI}$ 表示扩散限制;当 $\beta\text{NTI}$ 在 $-2\sim 2, \text{RC}_{\text{bray}}$ 在 $-0.95\sim 0.95$ 时,表示无主导进程。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同苜蓿品种的根际与根内细菌物种组成

Alpha多样性的箱线图结果表明,根际细菌群落物种丰富度指数显著高于根内群落(图2a)。根际细菌群落虽整体高于根内细菌群落,但品种间差异未达统计学显著性( $P>0.05$ ,图2b);根内细菌丰富度在不同苜蓿品种间未呈现显著差异(图2c)。与其他苜蓿品种相比,兰苜1号(Lan1)在根际环境中表现出细菌丰富度提升趋势,证明该品系可能存在促进根际细菌定殖的潜在特性。门水平物种组成结果表明,根际细菌群落中,拟杆菌门、放线菌门和Beta变形菌门相对丰度普遍高于根内;根内细菌群落中,Gamma变形菌门相对丰度相比于根际明显提升,Alpha变形菌门同步增加(图2d)。兰苜1号相比于其他品种,根内Alpha变形菌门相对丰度最高,Gamma变形菌门相对丰度较小。

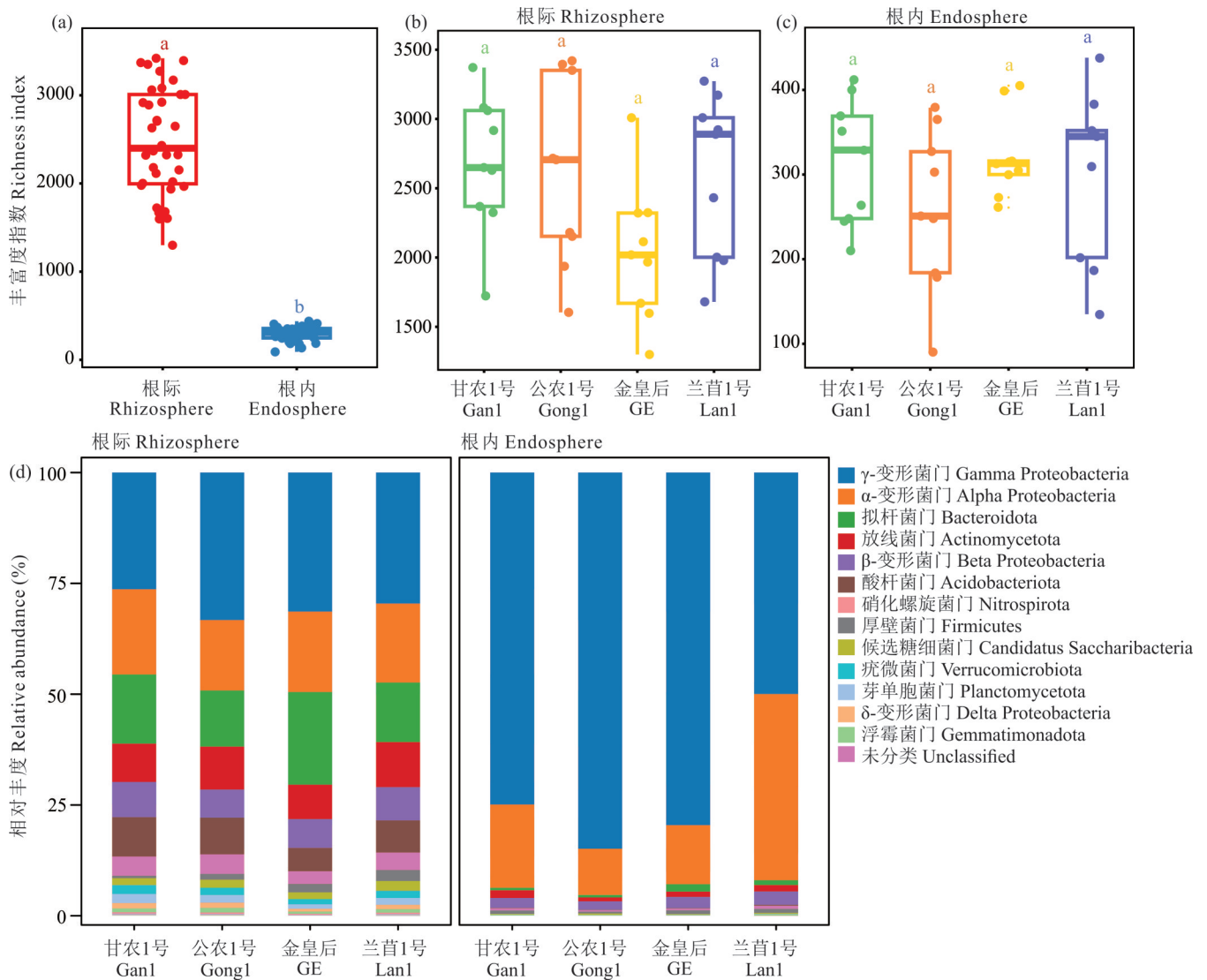


图 2 不同苜蓿品种的根际与根内微生物多样性差异 (a、b、c) 及门水平物种组成 (d) among different alfalfa varieties

不同苜蓿品种包括: 甘农 1 号 (Gan1)、公农 1 号 (Gong1)、金皇后 (GE) 与 兰苜 1 号 (Lan1)。下同。Different alfalfa varieties include: Gannong No.1 (Gan1), Gongnong No.1 (Gong1), Golden empress (GE) and Lanmu No.1 (Lan1). The same below.

### 2.2 不同苜蓿品种的根际与根内细菌群落间组成差异

Beta 多样性分析显示, 根际与根内细菌群落结构存在显著差异: 根际细菌群落沿 PC1 轴 (解释度 31%) 明显右偏, 与根内细菌群落形成空间隔离; PERMANOVA 检验证实组间差异极显著 ( $R^2=0.29$ ,  $P=0.001$ ), PC1 轴箱线图显示根际样本分布值中位数显著高于根内 (图 3)。

基于 PCoA 与 PERMANOVA 的 beta 多样性分析显示, 在根际细菌群落中 (图 3b), 群落结构沿 PC1 (18%) 与 PC2 (9%) 轴扩散, 同样检测到显著的组间差异 ( $R^2=0.13$ ,  $P=0.004$ )。根内 (图 3c) 细菌群落中, 4 个苜蓿品种的细菌群落沿 PC1 (23%) 与 PC2 (21%) 轴呈现弥散分布, 但未形成显著的空间分离 (PC1/PC2 轴组间差异  $P>0.05$ ), PERMANOVA 检验揭示根内细菌群落存在显著的品种间差异 ( $R^2=0.14$ ,  $P=0.02$ )。

### 2.3 不同苜蓿品种的根际与根内差异物种

通过富集分析寻找各处理之间丰度发生显著变化的差异性物种。结果表明, 所有品种均呈现根际富集主导现象 (图 4)。根内群落也富集了一些特异性微生物 (54~72 个), 但数量显著低于根际富集物种 (355~565 个)。

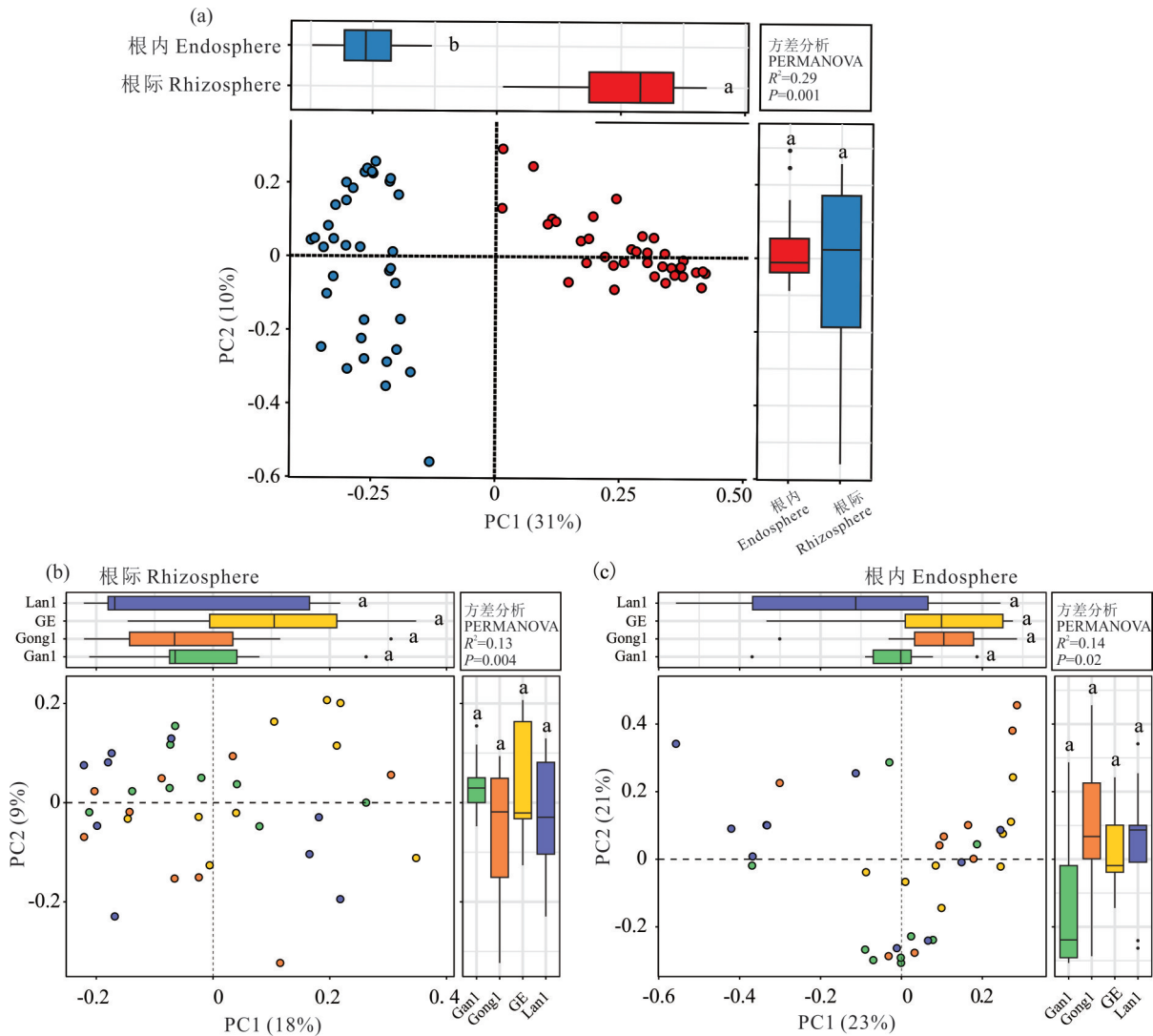


图3 不同苜蓿品种的根际与根内微生物 beta 多样性分析

Fig. 3 Beta diversity of rhizosphere and endophytic microorganisms in different alfalfa varieties

(a): 根际与根内细菌群落的整体差异 Overall differences in rhizosphere vs endosphere bacterial communities; (b): 品种间根际细菌群落的差异 Differences in rhizosphere bacterial communities among varieties; (c): 品种间根内细菌群落的差异 Differences in endophytic bacterial communities among varieties.

其中甘农1号富集最多,为72个,兰苜1号总富集数(56)与公农1号(54)、金皇后(63)相近。进一步筛选在4种苜蓿根内均显著富集的物种构建系统发育树(图4e),结果表明,相比于根际细菌群落,苜蓿内生环境主要选择富集了Alpha变形菌门、Gamma变形菌门以及放线菌门类物种。其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)、副伯克霍尔氏菌(*Paraburkholderia*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、赫氏单胞菌属(*Herminiimonas*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、拉尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、副萨特氏菌属(*Parasutterella*)、莹黄菌(*Yinghuangia*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)等细菌成员在4种苜蓿根内均显著富集,证明其是苜蓿内生主导细菌类群。

进一步寻找新品系兰苜1号与其他3个品种间存在显著差异的物种(图5)。通过火山图差异分析比较兰苜1号(Lan1)与3个对照品种的根际细菌组成,发现其与公农1号(Gong1)最相近(图5b),与金皇后(GE)相比差异最大(图5c)。进一步挑选不同品种间丰度存在显著差异的根际细菌物种进行韦恩图分析,结果显示与公农1号相比,兰苜1号(Lan1)仅使8个微生物丰度显著上调和5个微生物下调(图5d,e)。与金皇后品种相比,兰苜1号

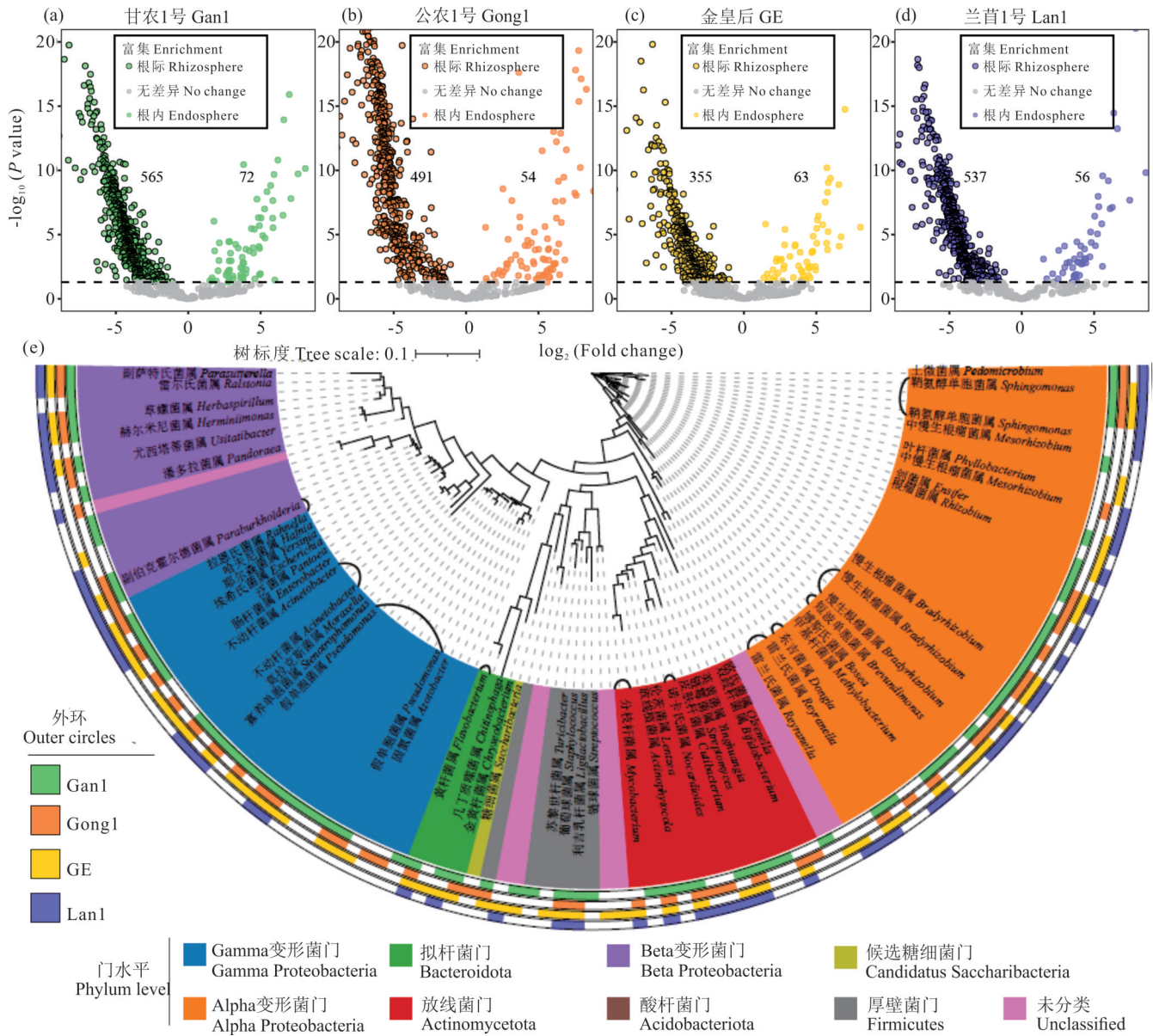


图 4 不同苜蓿品种的根际与根内丰度存在显著差异的微生物数量及根内富集的微生物种类

Fig. 4 Number of microorganisms with significant differences in rhizosphere and endosphere abundance among alfalfa varieties and the taxonomy of microorganisms enriched in endosphere

(a)、(b)、(c)、(d): 不同苜蓿品种根际-根内细菌物种富集分析 Enrichment analysis of rhizosphere and endosphere bacterial species in different varieties; (e): 根内富集的细菌物种的系统发育关系及其在不同苜蓿品种中的分布模式 Phylogenetic relationships of bacterial species enriched in endosphere and their distribution in different varieties.

(Lan1)特异性上调22个微生物并下调19个微生物。而同时与其他3个品种比较时,兰苜1号(Lan1)均显著富集了细菌zOTU1426,该菌隶属于放线菌门中的链嗜酸菌属(*Streptacidiphilus*,图5d),但没有在兰苜1号根际环境中发现明显受抑制的细菌类群(图5e)。

### 2.4 不同苜蓿品种的根际与根内微生物共发生网络

使用WGCNA共发生网络分析探究不同苜蓿品种根际与根内细菌互作特征(图6)。结果表明,除甘农1号外,根际网络明显复杂于根内,所有品种根际细菌网络边数(Edges)均高于根内细菌群落。如公农1号(Gong1)根内边数达3623,根际边数3899。金皇后根际边数和兰苜1号根际边数也都远远大于根内边数。

兰苜1号在根内的网络复杂程度仅次于公农1号,高于甘农1号和金皇后。在根际中,兰苜1号网络复杂程度低于公农1号和金皇后,但是远远大于甘农1号。

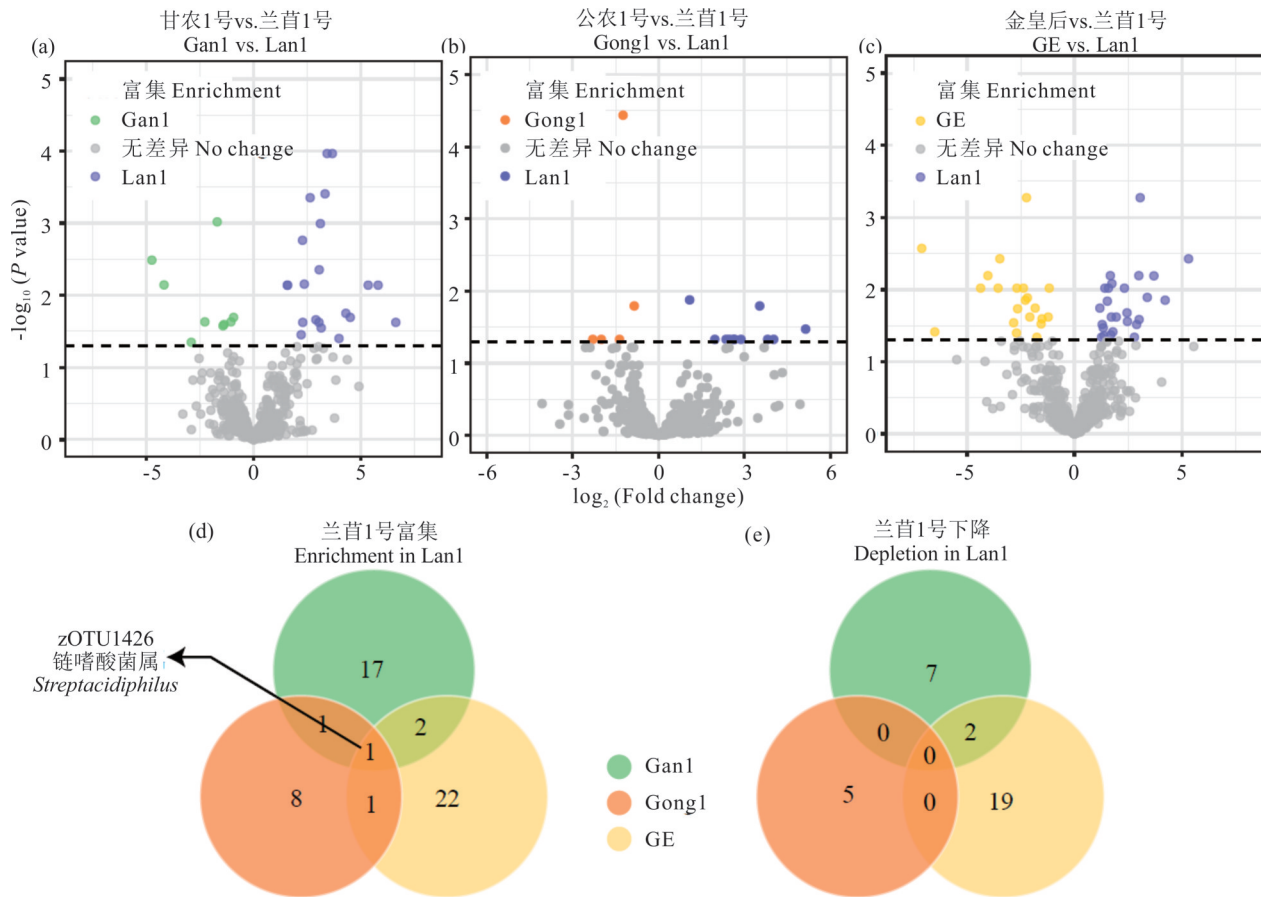


图5 兰苜1号(Lan1)与其他品种根际微生物差异分析

Fig. 5 Differential analysis of rhizosphere microorganisms between Lanmu No. 1 (Lan1) and other varieties

(a)、(b)、(c)分别是甘农1号、公农1号、金皇后与兰苜1号相比的根际细菌丰度差异分析 The differences in rhizosphere bacterial abundance between Gan1 and Lan1, between Gong1 and Lan1, and between GE and Lan1, respectively; (d): 兰苜1号根际相比于其他品种富集的细菌种类数 The number of bacterial species enriched in the rhizosphere of Lan1 compared to other varieties; (e): 兰苜1号根际相比于其他品种消减的细菌种类数 The number of bacterial species reduced in the rhizosphere of Lan1 compared to other varieties.

### 2.5 不同苜蓿品种的根际与根内微生物群落组装过程

使用 $\beta$ 最近邻指数( $\beta$ NTI)和Bray-Curtis的Raup Crick距离指数评估不同苜蓿品种根际、根内细菌群落组装过程。由图7可知,不同品种根际与根内细菌群落构建过程主要受到确定性过程影响。其中根内相比于根际环境,受到更大程度的确定性过程影响。根际细菌群落主要受到异质性选择(42%~55%)和扩散限制影响(45%~58%)。

根内细菌群落组装过程主要受到确定性的匀质化选择作用影响(56%~83%)。此外,金皇后(GE)和兰苜1号(Lan1)根内细菌群落还受到一定程度的异质性选择作用影响(16%和8%)。此外,匀质化扩散对根内细菌群落组装影响较小(1%~6%)。还有一些非主要过程,如弱选择、弱扩散作用,对根内细菌群落构建过程也起到一定推动作用(11%~29%)。

## 3 讨论

低秋眠级苜蓿作为高寒地区优质饲草作物,其耐寒性直接影响产量稳定性与生态适应性。新型耐寒性品种培育对草地农业发展至关重要。根系微生物组被视为植物抗逆性调控的关键“第二基因组”,但不同苜蓿品种根系微生物组装过程及其与耐寒性之间的潜在关联仍缺乏系统解析。本研究依托长期野外定位观测平台,系统解析了不同苜蓿品种的根系微生物群落特征差异。结果表明,不同苜蓿品种影响根际根内细菌群落组成、互作网络

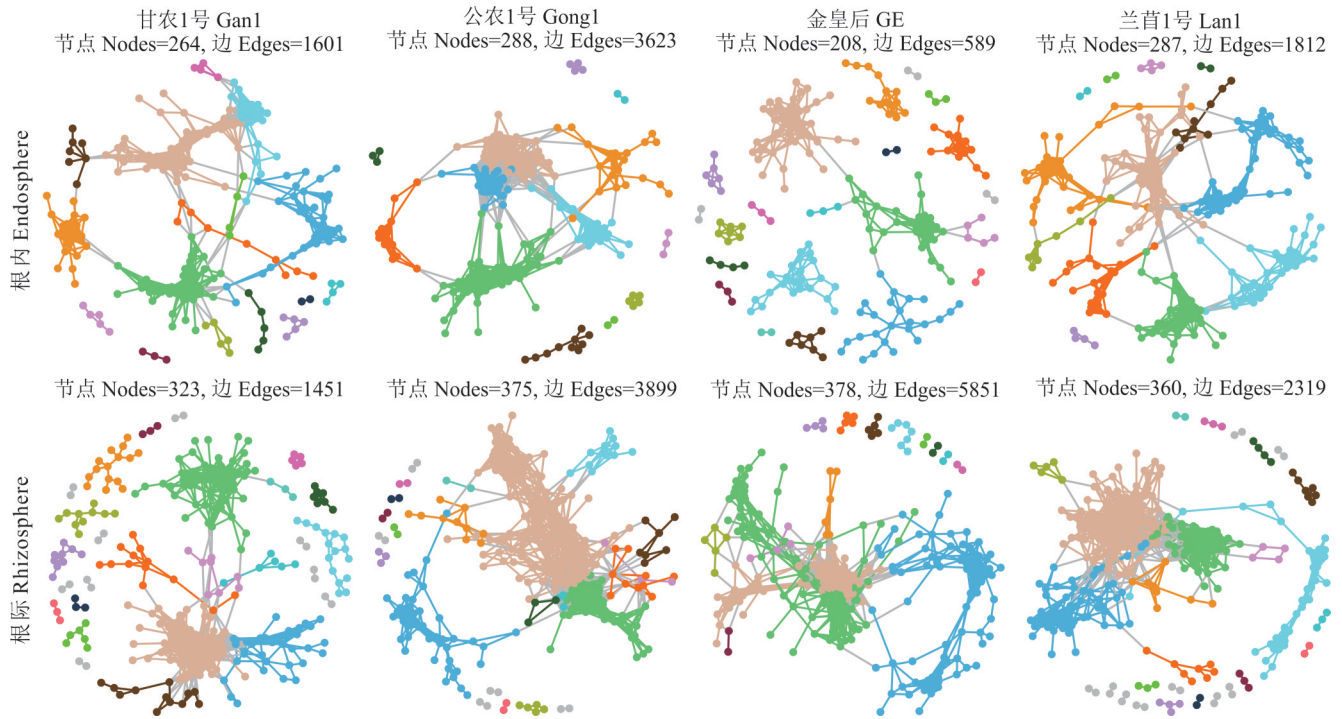


图 6 不同品种根际与根内微生物互作网络拓扑结构特征

Fig. 6 The topological structures of the interaction network of rhizosphere and endophytic bacteria in different varieties

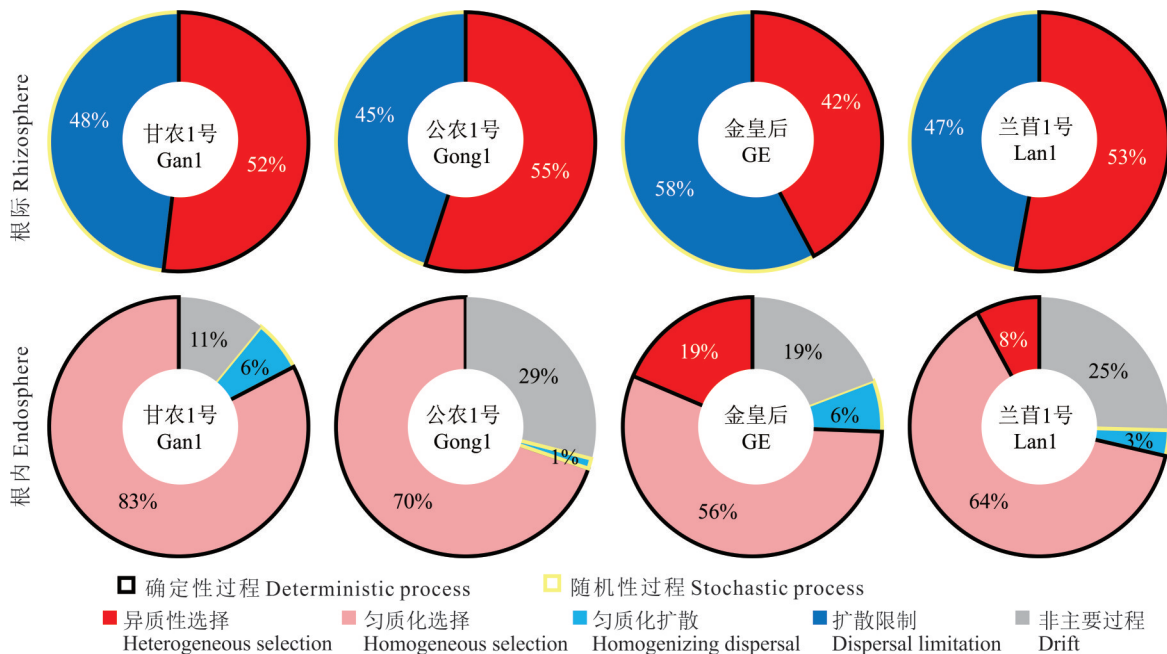


图 7 不同苜蓿品种根内和根际微生物群落构建过程

Fig. 7 Community assembly processes of rhizosphere and endosphere bacteria in different alfalfa varieties

特征以及群落构建过程,其中新品系兰苜1号可以一定程度提高根际、根内细菌多样性,增加细菌互作网络结构复杂性,表明其可能通过维持微生物组稳定性影响宿主的生态适应性。

### 3.1 不同苜蓿品种根际根内细菌物种组成特征与差异

一般情况下,根系微生物群的多样化始于根际部分<sup>[6]</sup>。根系分泌物被认为是微生物的碳源和能量来源,招募了栖息在土壤中的细菌<sup>[24]</sup>。植物品种与基因型会影响植物的生理特征和根系分泌物的组成<sup>[25-26]</sup>。前人研究表

明,更多的根系分泌物输入可以刺激根际微生物物种数的增加,这可能是增加微生物多样性的基本机制<sup>[7]</sup>。了解生物多样性是生态学的一个核心目标,因为生态系统的多样性、功能和稳定性之间存在关联<sup>[27-28]</sup>。此外,一些研究证实,较高的生物多样性与抵抗环境胁迫有关<sup>[29-30]</sup>。本研究结果表明,尽管不同品种之间根际和根内细菌Alpha多样性没有显著差异,新品系兰苜1号在一定程度上增加了根际和根内细菌物种多样性。一般而言,微生物多样性与其宿主植物的抗逆性存在显著正相关关系<sup>[31]</sup>,因此推测,新品系兰苜1号根系的高生物多样性可能帮助其抵御低温胁迫。

物种差异性分析表明,相比于其他3个苜蓿品种,新品系兰苜1号在根际明显富集了链嗜酸菌属的成员。该菌属属于放线菌门,其典型特征为嗜酸性与次级代谢产物合成能力。已有研究表明,链嗜酸菌属可能通过合成与抗冻相关的代谢产物来增强宿主植物抗寒性。例如通过分泌胞外多糖与抗冻肽,降低根际微环境冰点,缓解细胞膜低温损伤<sup>[32]</sup>。此外,链嗜酸菌属还可以调控植物激素,产生ACC脱氨酶,降解乙烯前体(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC),减轻低温胁迫诱导的植物衰老<sup>[4]</sup>;一些链嗜酸菌属分泌的生长素(3-indoleacetic acid, IAA)或可促进苜蓿根系发育,增强低温下的养分吸收能力<sup>[5]</sup>。尽管鲜有研究对链嗜酸菌属在植物抗寒中的作用进行直接验证,但鉴于其在极端环境(如酸性土壤、北极苔原)中的广泛分布<sup>[7]</sup>,以及放线菌门在植物抗逆中的已知功能,其可能是苜蓿-微生物互作的关键参与者。未来需通过分离培养、无菌体系接种试验进一步确认其功能。

此外假单胞菌属在苜蓿根际富集,其中部分菌株被证明具有缓解植物生物和非生物胁迫的能力<sup>[33-35]</sup>。植物在特定胁迫条件下会通过根系分泌物调控其根际微生物组,从而招募更加多样的微生物类群以增强自身适应性<sup>[7, 36]</sup>。本研究进一步发现,兰苜1号在根际富集了更多种类的细菌物种(图5),这可能是其更强环境适应能力的微生物基础,并提示这些富集的细菌可能在帮助苜蓿抵御不利环境方面发挥潜在作用。

### 3.2 不同苜蓿品种根际根内细菌共发生网络特征差异

识别微生物互作特征有助于明确群落结构和动态<sup>[28]</sup>,种间相互作用与关键生态过程和植物适应性密切相关<sup>[37]</sup>。本研究结果表明,新品系兰苜1号根际微生物网络复杂性高于其他3个品种,这可能与兰苜1号根系微生物的多样性较大有关<sup>[4, 31, 38-39]</sup>。兰苜1号吸引了较多的微生物类群在根际定殖,较高的微生物多样性导致菌株代谢物种类增加,使物种间的养分相互作用网络(如交互饲养)复杂化。较复杂的相互作用可能有助于生态系统功能的多样性和稳定性<sup>[7, 40]</sup>。

此外本研究还发现,兰苜1号明显增加了网络模块之间的相互联系(图6),提高了网络连通性,有助于增强群落组织结构稳定性<sup>[7, 41]</sup>。模块化结构反映了微生物群落内部的功能分化与协同整合<sup>[41]</sup>。每个模块通常由具有相似生态功能或环境偏好的微生物类群组成,而模块间的连接则代表了不同功能群之间的物质交换与信息传递。模块结构之间的联系增强有助于缓冲外界环境扰动;当某一功能模块在环境扰动下受到抑制时,高度互联的网络可通过其他模块的互补作用维持整体功能稳定<sup>[8]</sup>。研究发现,微生物共发生网络复杂程度与植物对胁迫的抵抗力呈正向关联<sup>[7]</sup>。据此可以推测,与其他品种相比,兰苜1号复杂的微生物网络结构特征可能是其在田间试验中表现出更强越冬能力的原因。复杂的微生物互作网络通过功能冗余维持关键代谢功能,并通过群体感应协调微生物与宿主之间的抗寒信号响应,提高系统稳定性和胁迫抵御能力。表明兰苜1号可能通过“微生物网络强化”策略提升其环境适应性。这一发现为理解植物-微生物共适应机制提供了新视角,也使未来通过调控微生物网络结构来培育抗逆作物品种成为可能。后续研究可通过构建合成微生物群落来验证特定网络结构特征与植物抗寒性的因果关系,为农业应用提供更直接的指导。

### 3.3 田块尺度苜蓿根系细菌群落组装主要受到确定性过程影响

了解微生物群落组装的生态过程有助于识别微生物群落组成随环境变化的变化<sup>[23]</sup>。确定过程和随机过程是微生物群落聚集的两种对立机制,然而,绝对确定性或随机过程不存在,这是由这两种过程在原生生态系统中的相对贡献驱动的<sup>[13]</sup>。在本田间试验区块尺度中,苜蓿根系细菌群落组装主要受到确定性过程影响(图7),这与前人研究结果类似,证明主要受到宿主植物的选择塑造作用<sup>[7]</sup>。苜蓿不同根区(根际与根内)对细菌群落组装过程

具有明显影响,而品种效应影响较弱。其中根际主要受到异质性选择和扩散限制过程影响,而根内主要受到匀质化选择过程的影响(图 7)。相比于根际,根内微生物群落组装受到更高比例的确定性过程影响,表明苜蓿根系对进入根内的细菌类群具有更强的选择塑造作用。根内细菌群落受匀质化选择过程主导,可能是由于不同品种苜蓿根内细菌群落相对稳定一致,吸引了具有相似功能的微生物,导致了群落组成趋同(图 5)。此外还发现,新品系兰苜 1 号和金皇后根内细菌群落还受到一定程度的异质性选择的影响。这说明根相关微生物群落组装主要受到确定性过程驱动,其中异质性选择对根际微生物的独特塑造作用更为突出,这可能是植物根系分泌的选择作用导致的<sup>[7]</sup>。多年生苜蓿可能通过分泌大量黄酮类化合物提高根微生物组的多样性,富集有益于植物生长和抗逆的功能菌群,从而塑造有利于抗寒适应的根际微环境<sup>[42-43]</sup>。前人研究大多基于盆栽试验中的确定性过程,而较少关注田间条件下微生物群落构建的随机过程<sup>[6,44]</sup>。随机性过程在根际群落构建过程中同样占有重要作用。可能的原因之一是物种的优先效应。该理论认为即使环境条件在空间上是同质的,物种到达给定地点的顺序和时间是随机的<sup>[45]</sup>。即使所有物种都可以进入群落,也会导致非常不同的群落组成<sup>[46]</sup>。因此,土壤微生物群落的高多样性可能使植物在根系微生物群的物种库中发生显著变化,从而形成个性化的物种分布模式,即使在局域尺度上也是如此<sup>[47]</sup>。这个解释可能支持本研究在根际群落构建过程中发现的结果,即在其他条件相同的情况下,微生物群落受到一定程度的随机性过程影响。

#### 4 结论

田间条件下,不同苜蓿品种未显著改变物种 Alpha 多样性,显著改变了物种组成。新型耐寒品种兰苜 1 号相比于其他已有品种,一定程度上提高了根系细菌群落物种多样性、共发生网络复杂程度和连通性,并在根际富集了链嗜酸菌属。根际细菌群落组装主要受到异质性选择和扩散限制过程影响,而根内主要受到匀质化选择过程的影响。

**致谢:**感谢兰州大学草地微生物研究中心在样品采集、数据收集和分析上给予的支持和帮助,为本论文的顺利完成提供了有力的保障。

#### 参考文献 References:

- [1] Shi S, Nuccio E E, Shi Z J, *et al.* The interconnected rhizosphere: High network complexity dominates rhizosphere assemblages. *Ecology Letters*, 2016, 19(8): 926–936.
- [2] Ruan Y, Wang D S, Guo S W, *et al.* Fingerprints of carbon metabolisms of gourd as rootstock and watermelon as scion in rhizosphere of different types of soils—characteristics and differences. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55(4): 967–976.  
阮杨, 王东升, 郭世伟, 等. 葫芦与西瓜砧穗在不同土壤上根际碳代谢指纹特征与差异. *土壤学报*, 2018, 55(4): 967–976.
- [3] Kuzyakov Y, Razavi B S. Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 135(9): 343–360.
- [4] Nuccio E E, Starr E, Karaoz U, *et al.* Niche differentiation is spatially and temporally regulated in the rhizosphere. *The ISME Journal*, 2020, 14(4): 999–1014.
- [5] Ravanbakhsh M, Kowalchuk G A, Jousset A. Root-associated microorganisms reprogram plant life history along the growth–stress resistance tradeoff. *The ISME Journal*, 2019, 13(12): 3093–3101.
- [6] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, *et al.* Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(8): 911–920.
- [7] Ruan Y, Wang T T, Guo S W, *et al.* Plant grafting shapes complexity and co-occurrence of rhizobacterial assemblages. *Microbial Ecology*, 2020, 80(8): 643–655.
- [8] Ruan Y, Wang T T, Guo S W, *et al.* Chimeric plants favor asynchrony of conditionally rare bacterial species facilitating functional complementarity in rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 2022, 58(4): 459–470.
- [9] Li B, Li Y Y, Wu H M, *et al.* Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N<sub>2</sub> fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(23): 6496–6501.

- [10] Liu Q, Dai H C, Cheng H, *et al.* Rhizosphere-associated bacterial and fungal communities of two maize hybrids under increased nitrogen fertilization. *Frontiers in Plant Science*, 2025, 16: 1549995.
- [11] Hou M, Leng C, Zhu J, *et al.* Alpine and subalpine plant microbiome mediated plants adapt to the cold environment: A systematic review. *Environmental Microbiome*, 2024, 19(1): 82.
- [12] Lan H, Gorfer M, Otgonsuren B, *et al.* Growth characteristics and freezing tolerance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi: responses to normal and freezing temperatures. *Forests*, 2025, 16(2): 191.
- [13] Zhou J Z, Ning D L. Stochastic community assembly: Does it matter in microbial ecology? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2017, 81(4): 1–32.
- [14] Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 2018, 23(1): 25–41.
- [15] Wang T T, Ruan Y, Xu Q C, *et al.* Effect of plant-derived microbial soil legacy in a grafting system—a turn for the better. *Microbiome*, 2024, 12(1): 234.
- [16] Li H, Wang J, Liu Q, *et al.* Effects of consecutive monoculture of sweet potato on soil bacterial community as determined by pyrosequencing. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59(2): 181–191.
- [17] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than blast. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [18] Ruan Y, Ling N, Jiang S J, *et al.* Warming and altered precipitation independently and interactively suppress alpine soil microbial growth in a decadal-long experiment. *eLife*, 2024, 12: 1–17.
- [19] Kong Y L, Ling N, Xue C, *et al.* Long-term fertilization regimes change soil nitrification potential by impacting active autotrophic ammonia oxidizers and nitrite oxidizers as assessed by DNA stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(4): 1224–1240.
- [20] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 559.
- [21] Yang X, Li X F, Xie G Q, *et al.* Experimental construction plan for network data mining based on igraph. *Computer Knowledge and Technology*, 2019, 15(21): 29–31.  
杨雄, 李晓芳, 谢光前, 等. 基于 igraph 的网络数据挖掘实验建设方案. *电脑知识与技术*, 2019, 15(21): 29–31.
- [22] Feng K, Zhang Z J, Cai W W, *et al.* Biodiversity and species competition regulate the resilience of microbial biofilm community. *Molecular Ecology*, 2017, 26(21): 6170–6182.
- [23] Feng Y, Chen R, Stegen J C, *et al.* Two key features influencing community assembly processes at regional scale: Initial state and degree of change in environmental conditions. *Molecular Ecology*, 2018, 27(24): 5238–5251.
- [24] Ling N, Song Y, Raza W, *et al.* The response of root-associated bacterial community to the grafting of watermelon. *Plant and Soil*, 2015, 391(1): 253–264.
- [25] Wang J, Jiang L B, Wu R L. Plant grafting: How genetic exchange promotes vascular reconnection. *New Phytologist*, 2017, 214(1): 56–65.
- [26] Gaion L A, Trevisan B L, Carvalho R F. Grafting in vegetable crops: A great technique for agriculture. *International Journal of Vegetable Science*, 2018, 24(1): 85–102.
- [27] Maynard D S, Crowther T W, Bradford M A. Competitive network determines the direction of the diversity-function relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(43): 11464–11469.
- [28] Konopka A, Lindemann S, Fredrickson J. Dynamics in microbial communities: Unraveling mechanisms to identify principles. *The ISME Journal*, 2015, 9(7): 1488–1495.
- [29] Wei Z, Yang T, Friman V P, *et al.* Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 8413.
- [30] van Elsas J D, Chiurazzi M, Mallon C A, *et al.* Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(4): 1159–1164.
- [31] Song Y, Zhu C, Raza W, *et al.* Coupling of the chemical niche and microbiome in the rhizosphere: Implications from watermelon grafting. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2016, 3(3): 249–262.
- [32] Chen X, Wu J H, Yang F J, *et al.* New insight into the mechanism by which antifreeze peptides regulate the physiological function of *Streptococcus thermophilus* subjected to freezing stress. *Journal of Advanced Research*, 2023, 45(5): 127–140.
- [33] Berendsen R L, van Verk M C, Stringlis I A, *et al.* Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS 374 and WCS 417. *BMC Genomics*, 2015, 16(539): 1–23.

- [34] Chatterjee P, Samaddar S, Anandham R, *et al.* Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* os261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 705.
- [35] Subramanian P, Kim K, Krishnamoorthy R, *et al.* Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0161592.
- [36] Matteo C, Alessandra S D F, Stefania D, *et al.* Native soils with their microbiotas elicit a state of alert in tomato plants. *New Phytologist*, 2018, 220(4): 1296–1308.
- [37] Layeghifard M, Hwang D M, Guttman D S. Disentangling interactions in the microbiome: A network perspective. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(3): 217–228.
- [38] Toju H, Okayasu K, Notaguchi M. Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1787.
- [39] Song Y, Ling N, Ma J H, *et al.* Grafting resulted in a distinct proteomic profile of watermelon root exudates relative to the ungrafted watermelon and the rootstock plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2016, 35(3): 778–791.
- [40] Wagg C, Schlaeppi K, Banerjee S, *et al.* Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4841.
- [41] Peng G S, Wu J. Optimal network topology for structural robustness based on natural connectivity. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, 2016, 443: 212–220.
- [42] Hassan S, Mathesius U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(9): 3429–3444.
- [43] He D X, Singh S K, Peng L, *et al.* Flavonoid-attracted *Aeromonas* sp. from the Arabidopsis root microbiome enhances plant dehydration resistance. *The ISME Journal*, 2022, 16(11): 2622–2632.
- [44] Attia S, Russel J, Mortensen M S, *et al.* Unexpected diversity among small-scale sample replicates of defined plant root compartments. *The ISME Journal*, 2022, 16(4): 997–1003.
- [45] Fukami T. Historical contingency in community assembly: Integrating niches, species pools, and priority effects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 2015, 46(1): 1–23.
- [46] Chase J M. Community assembly: When should history matter? *Oecologia*, 2003, 136(4): 489–498.
- [47] Doornbos R F, Loon L C V, Bakker P A H M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012, 32(1): 227–243.