

酸铝胁迫土壤中耐铝大豆根际不同部位细菌群落结构、功能及其对促生菌富集作用的研究

文钟灵, 杨旻恺, 陈星雨, 郝晨宇, 任然, 储淑娟, 韩洪苇, 林红燕, 陆桂华, 戚金亮, 杨永华

南京大学植物分子生物学研究所, 医药生物技术国家重点实验室, 生命科学学院, 南京 210023

摘要: 针对酸性土壤中影响作物生产的主要限制因子(pH 及其铝毒), 选用耐酸铝且具有固氮能力的豆科作物是改良该类土壤、促进农业生产的有效措施之一, 至于其所关联的根际微生物是否起到相应的促进作用, 一直为国内外学者所关注和探究。为此, 本研究以铝耐受型大豆品种基因型(BX10)和铝敏感型大豆品种基因型(BD2)为材料, 以酸性红壤为生长介质, 采样部位按照土层到根系的距离由远到近的顺序划分为: 根外对照土(bulk soil, BS)、两侧根际土(rhizospheric soil at two sides, SRH)、刷后根际土(rhizospheric soil after brush, BRH)和冲洗后的根际土(rhizospheric soil after wash, WRH)。利用 Illumina MiSeq 对 16S rRNA 基因扩增产物的高变区 V4 进行高通量测序, 研究了不同耐铝基因型大豆根际细菌群落的结构、功能与分子遗传多样性的差异性作用。结果表明, 各处理间大豆根际细菌群落的 α 多样性无显著性差异, β 多样性差异也均不显著。PCA 和 PCoA 分析可见 BRH 和 WRH 部位的物种组成较为一致, 而 BS 和 SRH 部位具有相似的物种组成, 说明植物生长主要影响根际的 BRH 及 WRH 部位的微生物, 对 SRH 影响较小。对各分类水平物种组成和丰度进行比较, 门分类水平三元图表明两个基因型大豆均在 WRH 部位富集蓝细菌门(Cyanobacteria)细菌; 统计分析表明铝耐受型大豆(BX10)根部对于增强植物抗逆性的植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)有富集作用, 这些富集的细菌包括蓝细菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)等, 以及部分与固氮和耐铝的功能相关的属种。另对同一个基因型大豆不同采样部位间进行比较分析, 结果显示土壤不同采样部位可以选择性富集不同的 PGPR 物种。此外, 16S rDNA 的同源蛋白簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)功能预测分析的结果表明, 多个 COG 包括 COG0347、COG1348、COG1433、COG2710、COG3870、COG4656、COG5420、COG5456 和 COG5554 均可能与固氮直接相关; BD2 相比于 BX10, 结果显示在 BRH 和 WRH 部位似乎平均更易富集固氮直接相关的 COG, 其可能的原因尚待进一步研究。

关键词: 酸性土壤; 耐铝大豆; 根际; 细菌群落; 植物根际促生菌

收稿日期: 2020-11-30; 修回日期: 2020-12-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(编号: 2016YFD0101005)、国家自然科学基金项目(编号: 31870495, 31372140)、教育部创新团队项目(编号: IRT_14R27)资助[Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0101005), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31870495, 31372140), and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University from the Ministry of Education of China (No. IRT_14R27)]

作者简介: 文钟灵, 博士研究生, 研究方向: 土壤分子微生物学。E-mail: DG1730028@smail.nju.edu.cn

杨旻恺, 博士研究生, 研究方向: 土壤分子微生物学。E-mail: minkaiyang@163.com

文钟灵和杨旻恺并列第一作者。

通讯作者: 杨永华, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子代谢与生物技术安全。E-mail: yangyh@nju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.20-409

网络出版时间: 2021/1/28 10:45:54

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20210127.1604.002.html>

Bacterial composition, function and the enrichment of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in differential rhizosphere compartments of Al-tolerant soybean in acidic soil

Zhongling Wen, Minkai Yang, Xingyu Chen, Chenyu Hao, Ran Ren, Shujuan Chu, Hongwei Han, Hongyan Lin, Guihua Lu, Jinliang Qi, Yonghua Yang

Institute for Plant Molecular Biology, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Abstract: Low pH with aluminum (Al) toxicity are the main limiting factors affecting crop production in acidic soil. Selection of legume crops with acid tolerance and nitrogen-fixation ability should be one of the effective measures to improve soil quality and promote agricultural production. The role of the rhizosphere microorganisms in this process has raised concerns among the research community. In this study, BX10 (Al-tolerant soybean) and BD2 (Al-sensitive soybean) were selected as plant materials. Acidic soil was used as growth medium. The soil layers from the outside to the inside of the root are bulk soil (BS), rhizosphere soil at two sides (SRH), rhizosphere soil after brushing (BRH) and rhizosphere soil after washing (WRH), respectively. High-throughput sequencing of 16S rDNA amplicons of the V4 region using the Illumina MiSeq platform was performed to compare the differences of structure, function and molecular genetic diversity of rhizosphere bacterial community of different genotypes of soybean. The results showed that there was no significant difference in alpha diversity and beta diversity in rhizosphere bacterial community among the treatments. PCA and PCoA analysis showed that BRH and WRH had similar species composition, while BS and SRH also had similar species composition, which indicated that plant mainly affected the rhizosphere bacterial community on sampling compartments BRH and WRH. The composition and abundance of rhizosphere bacterial community among the treatments were then compared at different taxonomic levels. The ternary diagram of phylum level showed that Cyanobacteria were enriched in WRH. Statistical analysis showed that the roots of Al-tolerant soybean BX10 had an enrichment effect on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), which included Cyanobacteria, Bacteroides, Proteobacteria and some genera and species related to the function of nitrogen fixation and aluminum tolerance. The rhizosphere bacterial community from different sampling compartments of the same genotype soybean also were selectively enriched in different PGPR. In addition, the functional prediction analysis showed that there was no significant difference in the classification and abundance of COG (clusters of orthologous groups of proteins) function among different treatments. Several COGs might be directly related to nitrogen fixation, including COG0347, COG1348, COG1433, COG2710, COG3870, COG4656, COG5420, COG5456 and COG5554. Al-sensitive soybean BD2 was more likely to be enriched in these COGs than BX10 in BRH and WRH, and the possible reason remains to be further investigated in the future.

Keywords: acidic soil; aluminum-tolerant soybean; rhizosphere; bacterial community; PGPR

在粮食和土地与人口增长之间的矛盾日益尖锐的今天, 传统的耕作栽培技术已经根本无法满足人们的需求, 为了促进农业生产, 选用何种适宜的农作物一直是国内外所关注的问题。大豆是世界上重

要的蛋白质和油源, 在酸性土壤中大量栽培。由于大豆的生物固氮能力, 其可以作为优良的轮作和间作作物, 以提高土壤肥力和结构^[1]。全球可耕地的 50% 为酸性土壤, 在中国酸性土壤约占土地总面

积的 20%^[2]。大多数酸性土壤中, 植物生长受到以下几个因素的限制, 包括铝的毒性水平, 以及一些必需元素的如氮(N)、磷(P)和一些微量营养素的不足, 导致作物产量低^[3]。氮元素是植株生长必需的大量营养元素, 自然界的氮主要以氮气形式存在, 无法被植株直接利用^[4], 豆科植物与根瘤菌之间所形成的共生固氮体系具有较强的共生固氮能力, 这种能力使豆科植物成为自然界氮输入的重要来源, 同时也成为人类食物中蛋白质的重要来源^[5]。铝是酸性土壤作物生产的主要限制因子之一(pH<5)^[6], 酸性土壤条件下, 铝以有活性的毒性的形式释放到土壤溶液中, 达到能抑制根系生长或损伤根的水平, 进而抑制水分和矿物质的吸收, 降低根系活力, 降低叶片光合作用, 抑制大豆生长^[7,8]。植物对铝毒害的抗性机制很多, 如有机物的渗出、根际 pH 的变化、细胞壁的交换性结合等^[9]。植物可以释放有机酸、酚类化合物、多肽和其他化合物作为根系分泌物, 减少酸性土壤中的铝毒害。有机酸能螯合有毒铝元素和活化磷元素, 铝毒害和磷缺乏均可激活有机酸的外排^[10], 大量证据表明根系有机酸分泌是植物耐铝的主要机制^[11]。

根际是根的表面和贴近根的周围的土层, 一般指离根轴表面数毫米范围之内, 是土壤-根系-微生物相互作用的微区域。根际有益微生物, 主要是指对植物生长发育具有直接或间接促进作用的或对植物根际有害微生物具有拮抗作用的土壤微生物, 其中植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)可以改变土壤中无效矿质元素的形态, 使其更容易被植物吸收利用^[12]。

本研究使用的大豆品种为铝耐受型大豆 Baxi 10 (BX10)和铝敏感型大豆 Bendi 2 (BD2), BX10 大豆起源于巴西, 比起源于中国广东的 BD2 大豆更耐铝^[13]。前者在 Al^{3+} 处理下受到的根系生长抑制作用比后者轻^[14]。这两个大豆基因型因其不同的耐铝性而受到广泛的研究。之前的研究表明, 与铝敏感型大豆 BD2 相比, 铝耐受型大豆 BX10 具有更大的柠檬酸盐流出速率和产量, 磷脂脂肪酸在不同时期也存在差异。此外, BX10 根际土壤中革兰氏阴性菌(GN)和革兰氏阳性菌(GP)的比值与 BD2 相比存在变化^[15,16]。那么, 除了植物有机酸分泌这一常见抗酸

铝策略外, 铝耐受型大豆 BX10 和铝敏感型大豆 BD2 的根际会不会通过对于不同微生物的富集(例如各种 PGPR), 成为 BX10 在酸性土壤中获得更好生长状态的又一因素呢? 因此, 本研究通过对土壤根际微生物的 16S rDNA(V4 可变区)扩增子进行测序分析, 试图分析 BX10 和 BD2 对根际微生物群落和微生物代谢活动的影响, 探讨大豆根际的不同部位与大豆根际微生物群落之间的联系。

1 材料与方法

1.1 植物、土壤材料及取样方法

本研究选择两个基因型的大豆(*Glycine max*(L.) Merr.): BX10 (Baxi 10, 耐铝基因型)和 BD2 (Bendi 2, 铝敏感基因型)^[13]。种植前, 我们对大豆种子使用 95%乙醇消毒 30 s, 2.5%次氯酸钠消毒 5 min, 并使用无菌水冲洗 3~5 遍。酸性土壤(pH 4.43, 交换性铝含量为 1.45 cmol/kg)取自中国科学院江西鹰潭红壤生态试验站(28.208° N, 116.937° E)^[17]。本研究中所使用的根际箱的具体规格与本课题组之前报道的一致, 专利申请公布号为 CN 102175487 A^[15,16]。根际箱的具体标准为长 200 mm、宽 150 mm、深 200 mm, 在中部种植大豆时, 用尼龙薄膜将根际箱分为 5 个部分, 以限制根而不限水分和营养^[18]。本研究在开花期采集土壤样品(种植后 60 天), 采样方法沿用前人的研究并稍作了修改^[19,20]。根据采样部位到根系的距离由远到近的土层分为 4 个部分: 根外对照土(bulk soil, BS)、两侧根际土(rhizospheric soil at two sides, SRH)、刷后根际土(rhizospheric soil after brush, BRH)和冲洗后的根际土(rhizospheric soil after wash, WRH); 用磷酸盐缓冲盐水冲洗后, 在 4000×g 下离心 10 min 收集。所有这些样本在-80℃下保存用于提取 DNA。

1.2 DNA 提取及 16S rDNA 扩增子测序信息

使用 PowerSoil DNA 分离试剂盒(MoBio Laboratories Inc, USA)提取 DNA, 操作流程与先前研究一致^[21,22]。提取 DNA 后在 1%琼脂糖凝胶上评估 DNA 样本的质量, 并使用 Qubit 荧光计(Qubit 2.0, Invitrogen, USA)对样本进行量化, 以尽量减少微生

物群落调查中的可变性^[23]。对提取后基因组 DNA 进行检测, 确保每份 DNA 样品的浓度皆大于 0.4 ng/ μ L^[23]。采用改良后的双端达到 250 nt 的高通量测序, 使用引物 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增 V4 区^[24,25]。进行 PCR 扩增和 PCR 产物纯化的步骤方法如之前文章所述^[22,26]。通过华大基因有限公司(中国武汉)在 Illumina MiSeq 平台上进行高通量测序。共 24 个测序数据已上传 NCBI, SRA 编号为 PRJNA 613772 (接收后自动释放)。

1.3 alpha 多样性及 beta 多样性分析

本研究使用 Rank-Abundance 曲线来解释物种丰度/均匀度。采用 Venn 图和 Pan/Core 分析方法计算多个样本中共有/共享的 OTU 数目。根据 OTUs 和物种注释结果进行 alpha 和 beta 多样性分析。为了分析环境中微生物物种多样性的复杂性, 本研究采用 alpha 多样性来反映群落丰富度(sobs 指数、Chao 指数和 Ace 指数)、群落多样性(Shannon 指数和 Simpson 指数)和群落覆盖度(Coverage 指数), 而 beta 多样性分析采用 QIIME (v1.8.0)计算, 然后用不同的距离矩阵对样本的物种复杂度差异进行评价和对比^[27,28]。本研究使用主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)和主坐标分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)来研究样本群落组成的相似性或差异性。三元图结果分析参照 Bulgarelli 等人提出的方法^[29]。

1.4 功能预测分析和统计分析

16S rDNA 的 COG 功能预测分析分类通过 PICRUSt 软件在 I-Sanger 平台上进行(<http://www.i-sanger.com>)。相似性分析(the analysis of similarities, ANOSIM)和置换多因素方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA, 又称 Adonis 分析)使用 I-Sanger 平台, 利用 silva128/16S 数据库(<http://www.arb-silva.de>)根据最小样本数序列对样本进行抽平。在统计分析中, 显著性差异主要使用单因素方差分析(one-way ANOVA)。整个 16S rDNA 测序结果的数据分析参照了刘永鑫等人介绍的方法^[30]。

2 结果与分析

2.1 BX10 和 BD2 根际细菌群落的 alpha 多样性总体无差异

在这项研究中, 根际箱的设计和使用与本课题组之前的报道一致^[15,16]。24 个样品的测序片段总数为 892,331, 平均每个样品约 37,180 个片段, 范围从 36,311~40,950 不等。各样本序列平均长度约为 253 bp。Rank-Abundance 曲线比较光滑, 说明 24 个样品的丰度和均匀度较高, 测序深度和质量均满足要求, 说明 OTU 覆盖了根相关细菌群落中足够的可检测物种(附图 1)。Pan 分析和 Core 分析发现所有样品共有的物种数为 472, 而所有样品所含物种总数为 3697(附图 2)。

为了比较分析 BX10 和 BD2 根际细菌群落的 alpha 多样性, 研究首先分析了不同 alpha 多样性指数的稀释曲线。稀释曲线表明, 测序数据量合理, 数据量大, 覆盖率足够, 足以反映绝大多数微生物多样性信息。图 1 显示了 6 个不同 alpha 多样性指数的结果。sobs、Chao 和 Ace 指数(图 1, A~C)和覆盖指数(图 1F)的结果表明, 各样本的群落丰富度和群落覆盖度无显著性差异。虽然 Shannon 指数(1D)在各样本间无显著差异, Simpson 指数(1E)的结果表明, BX_16FWRH 的群落多样性低于 BD_16FWRH。

2.2 BX10 和 BD2 根际细菌群落 beta 多样性无显著性差异

Venn 图显示, 每个样品的 OTU 数相似, 而 BX10 和 BD2 中 BS、SRH、BRH 和 WRH 的总共享 OTU 分别为 1581 和 1582(附图 3)。此外, BX_16FSRH、BX_16FBRH、BX_16FWRH、BD_16FWRH、BD_16FBRH 和 BD_16FSRH 共有 OTU 数目为 1437 个。通过 OTU 绘制的 PCA 和 PCoA 图, 对比检测花期 BX10 和 BD2 的 BS、SRH、BRH 和 WRH 样品之间 OTU 组成的差异(图 2)。主成分分析 PCA 图表明, 同一技术重复的样品聚为一组, 同一取样部位不同基因型大豆之间未显著区分(图 2A)。基于 Bray Curtis 的主坐标分析 PCoA 图表也得到了相同的结果(图 2B), 且 BX_16FBRH、BX_16FWRH 和

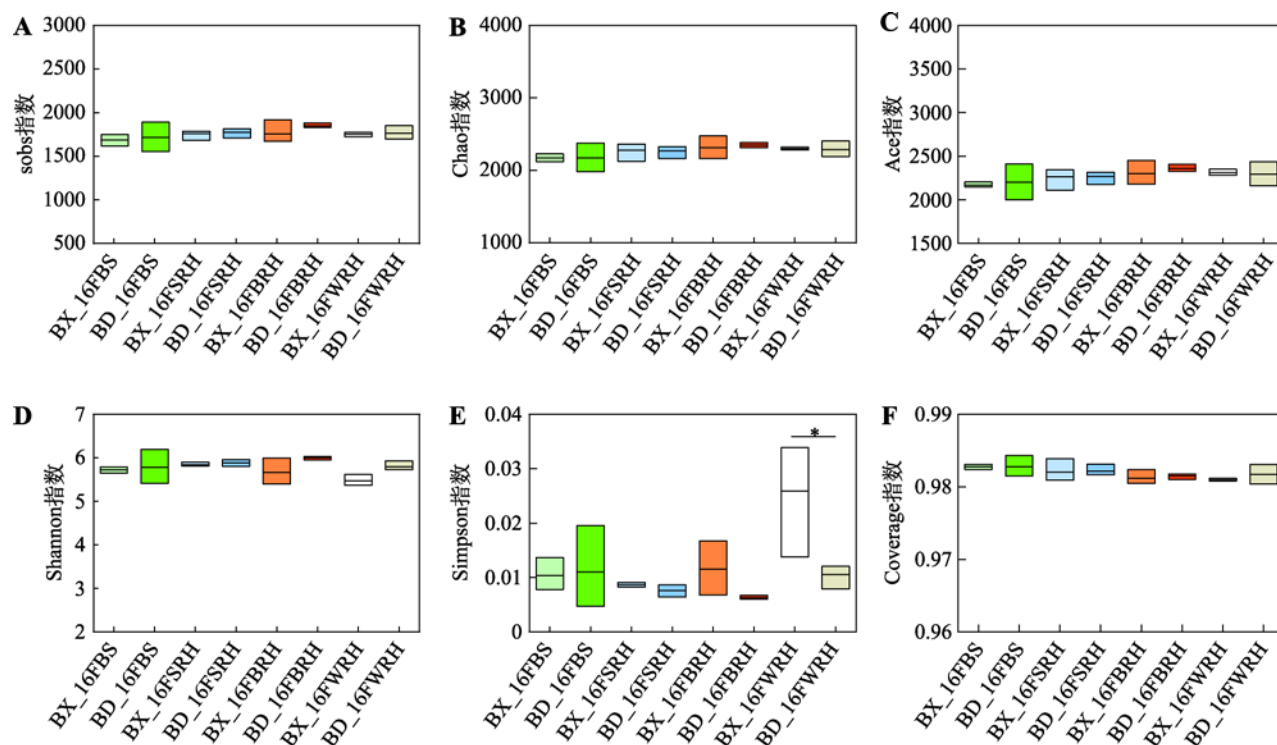


图 1 Alpha 多样性的箱型图

Fig. 1 Box diagram of alpha diversity

A: sobs 指数的 alpha 多样性的箱型图; B: Chao 指数的 alpha 多样性的箱型图; C: Ace 指数的 alpha 多样性的箱型图; D: Shannon 指数的 alpha 多样性的箱型图; E: Simpson 指数的 alpha 多样性的箱型图; F: Coverage 指数的 alpha 多样性的箱型图。BX 和 BD 分别代表耐铝大豆 BX10 和铝敏感大豆 BD2; F 代表花期; BS、SRH、BRH 和 WRH 分别代表根围土、两侧根际土、刷后根际土和冲洗后根际土; 显著性检验采用单因素方差分析, *表示 BX10 和 BD2 组之间存在显著差异($P < 0.05$)。

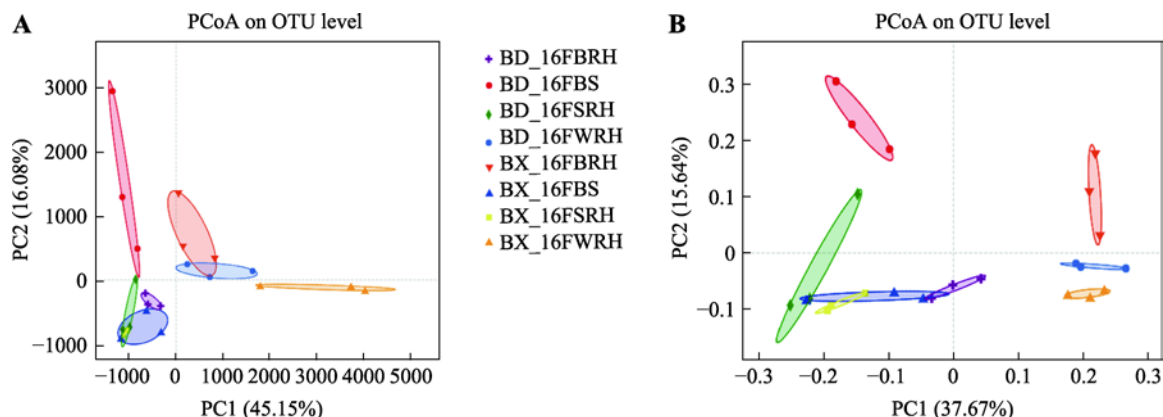


图 2 细菌群落丰度的主成分分析和主坐标分析图

Fig. 2 PCA and PCoA of bacterial community

A: 细菌群落 OTU 丰度基于欧氏距离的主成分分析图; B: 细菌群落 OTU 丰度基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析图。详细处理信息同图 1。

BD_16FWRH 聚集更紧密。基于 weighted Unifrac 距离的 PCoA 与基于 Bray Curtis 的 PCoA 图表相似, 而基于 unweighted Unifrac 距离的 PCoA 图显示在

BX10 和 BD2 根际细菌群落中, BS 和 SRH 距离较近, 而 BRH 和 WRH 更可能聚集在一个组中(附图 4)。

ANOSIM 和 Adonis 分析的结果表明, 同一采样

部位, BX10 和 BD2 根际细菌群落的 beta 多样性在统计学意义上仍无显著差异($P>0.05$); 同时, BX10 的 4 个不同采样部位之间以及 BD2 的 4 个不同采样部位之间的根际细菌群落 beta 多样也均无显著差异($P>0.05$) (表 1)。

2.3 大豆基因型和采样部位影响了根际细菌群落各分类水平的组成

根据样品的分类分析结果, 可以直观地了解每个样品在不同的分类层次(门、纲、目、科、属、种)的细菌群落组成和丰度。本研究首先选取了相对丰富最高的 13 个主要门分类水平物种进行作图比较(图 3)。如图所示, 丰度最高的 6 个门分别是变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微杆菌门(Verrucomicrobia)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)。并且, 蓝细菌门(Cyanobacteria)在不同采样部位差异明显, 特别是 WRH 部位极高(图 3)。

以 3 个根际采样部位绘制的三元图的结果表明,

两种基因型大豆的根部微生物群落, 都存在蓝细菌门在 WRH 部位富集的情况(图 4)。因为蓝细菌门的丰度在 WRH 部位的丰度为 17.05% 和 18.92%, 其他部位平均丰度仅为 3.5%, 证明测序结果并未被植物叶绿体严重干扰, 故蓝细菌门丰度数据是可信的。

属分类水平物种组成丰度分析表明, 各样本之间, 根瘤菌属(*Rhizobium*)的丰度无显著性差异。伯克氏菌属(*Burkholderia*)在 BX_16FBRH 中丰度高于所有其他样品。此外, 还存在嗜酸栖热菌属(*Acidothermus*)在 BD_16FBS 显著高于其他样本, 以及粘液细菌属(*Mucilaginibacter*)存在 BX_16FBRH>BX_16FSRH, BD_16FBRH>BD_16FSRH 的现象, 即在 FBSH 这个部位对 *Mucilaginibacter* 属存在富集作用(附表 1)。

种分类水平物种组成丰度分析可以找到 8 个种(表 2), 分别是埃氏慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium elkanii*), 约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*), 短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*), 脆假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)和放射型根瘤菌(*Rhizobium*

表 1 不同样品细菌群落结构的统计分析

Table 1 Statistical analysis of bacterial community structure

对比样本信息	Adonis 分析		ANOSIM 分析	
	R^2	P -value	Statistic	P -value
BX_16FBS vs. BD_16FBS	0.487	0.1	1	0.098
BX_16FSRH vs. BD_16FSRH	0.291	0.2	0.2593	0.186
BX_16FBRH vs. BD_16FBRH	0.512	0.1	1	0.098
BX_16FWRH vs. BD_16FWRH	0.327	0.1	0.4815	0.098
BX_16FBS vs. BX_16FSRH	0.231	0.2	0.037	0.4
BX_16FBS vs. BX_16FBRH	0.580	0.1	1	0.098
BX_16FBS vs. BX_16FWRH	0.584	0.1	1	0.098
BX_16FSRH vs. BX_16FBRH	0.680	0.1	1	0.098
BX_16FSRH vs. BX_16FWRH	0.718	0.1	1	0.098
BX_16FBRH vs. BX_16FWRH	0.488	0.1	0.8148	0.098
BD_16FBS vs. BD_16FSRH	0.479	0.1	0.6296	0.098
BD_16FBS vs. BD_16FBRH	0.556	0.1	1	0.098
BD_16FBS vs. BD_16FWRH	0.603	0.1	1	0.098
BD_16FSRH vs. BD_16FBRH	0.447	0.1	0.9259	0.098
BD_16FSRH vs. BD_16FWRH	0.620	0.1	1	0.098
BD_16FBRH vs. BD_16FWRH	0.373	0.1	0.5926	0.098

ANOSIM 和 Adonis 基于 Bray Curtis 距离进行比较。详细处理信息同图 1。 $P>0.05$ 表明, 同一基因型大豆不同取样部位和同一取样部位不同基因型大豆的样品两两对比没有显著差异。

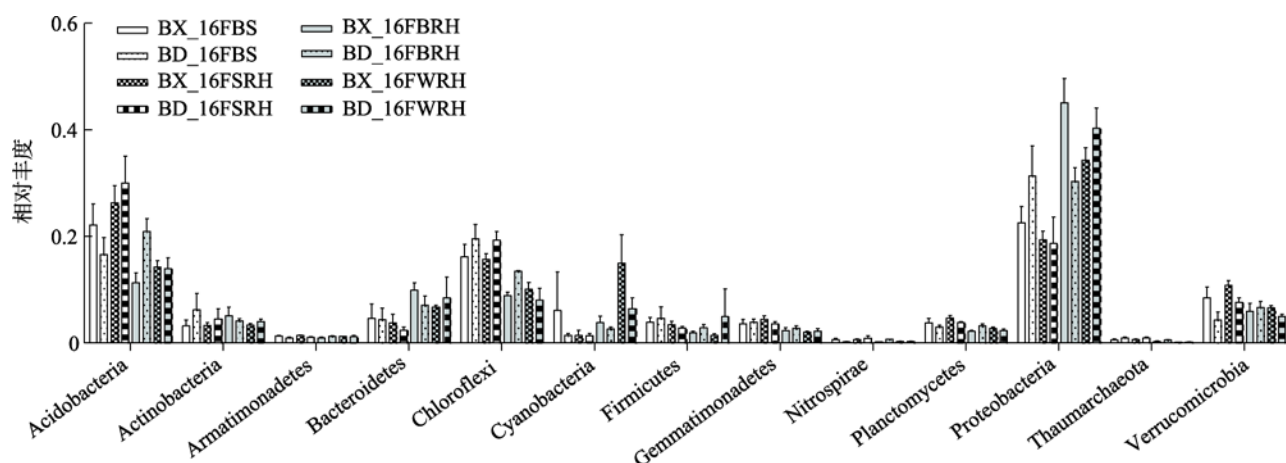


图 3 各样本中相对丰富最高的 13 个主要门水平物种(>1%)

Fig. 3 Relative abundances of top 13 major phyla in each sample (>1%)

所选的 13 个主要门水平物种的相对丰度皆大于 1%。详细处理信息同图 1。

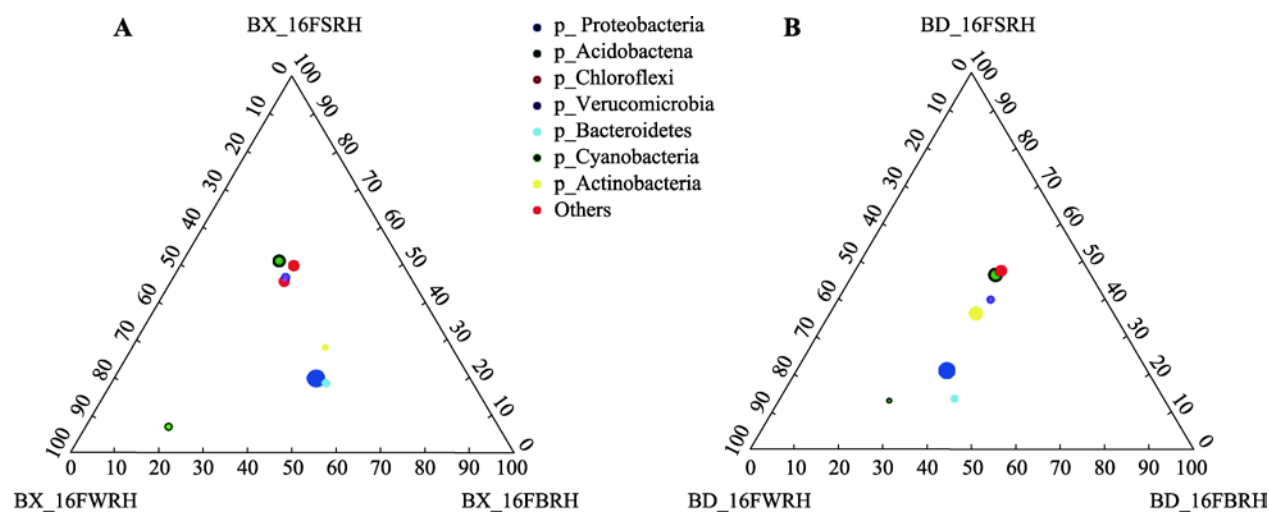


图 4 门分类水平 3 个根际采样部位三元图

Fig. 4 Ternary plot of three sampling compartments at phylum level

A: 铝耐受型大豆 BX10 根际 3 个采样部位三元图; B: 铝敏感型大豆 BD2 根际 3 个采样部位三元图。详细处理信息同图 1。

radiobacter), 他们属于变形菌门; 氧化假节杆菌 (*Pseudarthrobacter oxydans*) 和甲基营养节杆菌 (*Arthrobacter methylotrophus*) 属于放线菌门, 浅绿气球菌 (*Aerococcus viridans*) 属于厚壁菌门 (Firmicutes)。统计学分析 (one-way ANOVA) 的结果表明, *P. fragi* 的丰度在各样品之间无显著性差异, *B. elkanii* 在 BD_16FWRH 中的丰度远高于 BD2 的其他采样部位。*A. johnsonii*、*B. diminuta*、*R. radiobacter* 和 *A. viridans* 都发现在 BD_16FBS 的丰度远高于其他样本, 而 *P. oxydans* 和 *A. methylotrophus* 的丰度则有 BX_16FBRH 大于 BX10 其他样品的情况。

2.4 铝敏感型大豆 BD2 富集与固氮直接相关的功能基因

利用 PICRUSt 软件进行 16S rDNA 的 COG (clusters of orthologous groups of proteins, 同源蛋白簇) 功能预测和分析。如附图 5 所示, COG 功能的分类组成及其丰度在各处理间并无显著差异。此外存在几种丰度较高的功能基因, 如氨基酸转运与代谢 (amino acid transport and metabolism)、细胞壁/膜/包膜生物发生 (cell wall/membrane/envelope biogenesis)、信号传导机制 (signal transduction mechanism) 等。此

表 2 种分类水平物种在各样本中的相对丰度

Table 2 Relative abundances of species in each sample

门	种	BX_ 16FBS	BD_ 16FBS	BX_ 16FSRH	BD_ 16FSRH	BX_ 16FBRH	BD_ 16FBRH	BX_ 16FWRH	BD_ 16FWRH
Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	0.004479	0.005202	0.004444	0.00565	0.005994	0.00844	0.009164	0.01695
		0.002549	0.004582	0.003583	0.003583	0.009508	0.00627	0.005788	0.015985
		0.006856	0.004926	0.004685	0.003032	0.012988	0.012919	0.009439	0.020912
Proteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	0.008957	0	0.00565	3.45E-05	0	0	0
		0	0.043752	0	0	0	0	0	0
		0	0.10349	0	0	0	0	0	0.002963
Proteobacteria	<i>Brevundimonas diminuta</i>	0	0.003824	0	0.003032	0	0	0	0
		0	0.019844	0	0	0	0	0	0
		0	0.051021	0	0	0	0	0	3.45E-05
Proteobacteria	<i>Pseudomonas fragi</i>	0	0.000276	0	0.000138	0	0	3.45E-05	0
		0	0.000551	0	0	0	0	0	6.89E-05
		0	0	0	0	0.000103	0	0	0.01006
Proteobacteria	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0	0.004065	0	0.00248	0.000207	0.000172	0.000517	0.000241
		0	0.012333	0	3.45E-05	6.89E-05	0	6.89E-05	0.000965
		3.45E-05	0.028215	0	0	0.001034	0.000138	0.00062	0.000241
Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	0.000103	0.007441	0.000172	0.003376	0.017294	0.000448	0.000103	0.000103
		0.000138	0.004547	0.000103	0.000138	0.005409	0.000207	0.000103	0.000103
		0.000276	0.004134	0.000138	6.89E-05	0.011128	0.000172	6.89E-05	0.000551
Actinobacteria	<i>Arthrobacter methylophilus</i>	0.000103	0.000448	3.45E-05	0.000517	0.01664	6.89E-05	6.89E-05	3.45E-05
		0	0.000517	0.000103	0	0.002859	6.89E-05	0	0
		3.45E-05	6.89E-05	0	3.45E-05	0.004341	0	3.45E-05	0
Firmicutes	<i>Aerococcus viridans</i>	0	0.002825	0	0.002308	0	0	0	0
		0	0.010783	0	0	0	0	0	0
		0	0.027492	0	0	0	0	0	6.89E-05

精确到种分类水平共找出 8 个种，属于变形菌门、放菌门和厚壁菌门。处理信息同图 1。

外，从 COG 功能的相对丰度进行比较，COG0347、COG1348、COG1433、COG2710、COG3870、COG4656、COG5420、COG5456 和 COG5554 等 9 个同源蛋白簇均可能与固氮直接相关(表 3)。单因素方差分析进行显著性检验表明，相比于 BX10，BD2 在 BRH 中富集 COG1433 和 COG3870，而在 WRH 中富集 COG5420 和 COG5554。

3 讨论

本课题组之前的研究发现，耐铝大豆 BX10 和铝敏感大豆 BD2 诱导的根际土壤细菌和有机酸与群

落功能有所不同^[15,16]。具体体现在，根际土壤有机酸分析表明，BX10 提高了柠檬酸的浓度，而 BD2 降低了柠檬酸的浓度；苹果酸仅在 BX10 根际土壤中存在。群落水平的生理分析表明，BX10 对有机碳底物代谢能力的影响可能大于 BD2。序列分析表明，两种大豆对一些根际细菌有刺激作用，如不动杆菌(*Acinetobacter*)、阿米巴假丝酵母(*Candidatus Amoebinatus*)和未培养的蛋白杆菌(uncultured proteobacterium)。群落水平的生理分析表明，BX10 对有机碳底物代谢能力的影响可能大于 BD2。不仅如此，两种大豆不同时期分泌的有机酸不同，且在不同生长时期，真菌/细菌比例及革兰氏阴性/阳性菌的比例也

表 3 固氮相关 COG 功能分类统计

Table 3 Statistics of COG function classification related to nitrogen-fixation

COG #	BX_16FBS	BD_16FBS	BX_16FSRH	BD_16FSRH	BX_16FBRH	BD_16FBRH	BX_16FWRH	BD_16FWRH	描述
COG0347	25713	17226	24360	21215	18905	20106	22367	20821	氮调节蛋白 P-II
	22495	19480	25742	24097	21382	22359	21680	20935	
	21566	15366	24226	23440	19788	21784	21537	20783	
COG1348	2601	2259	2034	2311	1925	2744	4363	3265	参与固氮过程中的关键酶反应
	4592	2250	2263	2079	2724	2609	3280	3692	
	2323	2362	2828	2047	2841	2845	4484	3643	
COG1433	2101	1652	2160	1511	1037	1977	1515	1704	二氮酶铁钼辅因子生物合成蛋白
	2290	1246	2080	2330	1211	2081	1301	1584	
	1915	1048	1943	2114	1508	1864	1343	1970	
COG2710	7747	6738	6558	6756	6622	8012	15425	10254	固氮酶
	12624	6483	7108	6558	8883	8205	11132	11770	
	7342	7092	7938	6503	8734	8086	15733	10877	
COG3870	2011	1483	1766	1322	547	1221	717	911	来自氮调节蛋白 P-II 的蛋白质
	1285	1245	1779	2107	675	1327	769	727	
	1488	1421	1553	1967	726	1339	701	776	
COG4656	2338	2037	2173	1998	1798	2088	1615	1589	固氮所需
	2161	1974	2105	1788	1831	2003	1919	1697	
	2030	1701	2229	1797	1930	1996	1610	2008	
COG5420	164	229	140	218	380	340	379	542	固氮
	221	170	159	128	426	273	289	500	
	236	155	184	125	609	397	367	653	
COG5456	253	534	305	508	738	909	1101	1418	固氮蛋白 FixH
	283	658	430	273	934	758	1045	1416	
	707	1229	362	280	1175	931	917	2132	
COG5554	156	192	135	206	373	364	421	593	固氮蛋白
	211	158	162	129	440	273	340	557	
	257	146	175	121	609	411	374	709	

处理信息同图 1。显著性差异检验采用单因素方差分析，数字加粗表示 BX10 和 BD2 组之间存在显著差异($P<0.05$)。

各不相同。与 BD2 相比, BX10 的磷脂脂肪酸在苗期和开花期具有较高的多样性, 在结荚期有较低的多样性^[15,16]。以上研究揭示了两种大豆根际细菌可能与其分泌有机酸有关。而本研究的目的, 主要是通过分析高通量测序的结果, 研究大豆基因型和宿主生态位(不同采样部位)对酸性红壤中大豆根际细菌群落组成和结构的影响。

本研究首先进行 alpha 多样性指数的分析, 发现测序数据量合理且群落覆盖度较好。进行显著性差异分析发现除却 BX_16FWRH 在 simpson 指数上略

高于 BD_16FWRH 外, 剩下的各指数中 BX10 和 BD2 在相同采样部位的 alpha 多样性无显著性差异。甚至相同大豆(BX10 或 BD)对比不同采样部位也无显著性差异。对 beta 多样性分析的结果同样发现, 发现在同一采样部位, BX10 和 BD2 根际细菌群落的 beta 多样性在统计学意义上仍无显著性差异; 同一基因型的 4 个不同取样部位的样品也无显著性差异。

Beta 多样性是 Whittaker 于 1960 年提出的, 定义为群落组成变化的程度, 或群落分化的程度, 与环境的复杂梯度或环境的模式有关^[31]。其不仅可以

反映样本之间的多样性距离关系,而且还可以反映生物群落之间的分化程度。影响细菌群落的 beta 多样性的因素很多,而细微的差别(各样本在具体某些属、种等的差异)往往会被掩埋在总体的无差异中。因此本研究中着重对比了各分类水平物种的组成和相对丰度。

本研究发现蓝细菌门在不同采样部位差异明显,特别是 WRH 部位极高。做三个根际采样部位三元图发现,两种基因型大豆的根部微生物群落,都存在蓝细菌门在 WRH 部位富集的情况,而这些细菌多为 PGPR。目前已测序的能够固氮的微生物主要有:变形菌门、蓝细菌门、放线菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、绿菌门(Chlorobi)及广古菌门(Euryarchaeota)^[32-35]。蓝细菌门可以作为一种天然的生物肥料,在提高土壤肥力,进而提高植物性能方面发挥着重要作用。有文献证实,蓝细菌门可以帮助植物在胁迫环境下获得更好的形态、生理生化和抗氧化防御系统属性(生长特性、产量构成、光合效率,增强一系列酶活等)^[36]。也就是说,BX10 的根部对于蓝细菌,或者说这类可以增强植物抗逆性的 PGPR,存在一定的富集作用,而 BD2 从三元图上来说也有富集的趋势,却在统计学意义上没有显著差异,这可以从侧面说明 BX10,或者说可能是 BX10 的根系分泌物,增强了植物根部对某些有益菌的富集招募作用。也可能是因为所取样品重复数不足,误差的存在导致了显著性差异的不显著。

植物根际微生物群落主要由四种细菌组成:放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门^[37-42]。本研究首先对厚壁菌门在不同样本中的丰度进行比较,结果显示不同样本中厚壁菌门丰度无显著变化,说明厚壁菌门在酸性土壤中丰度较低是一个普遍现象,而不是因为种植的大豆和大豆根系的环境引起的。芽孢杆菌目(Bacillales)属于厚壁菌门,且其中很多属种属于 PGPR,结果表明各样本之间芽孢杆菌目的丰度无显著变化。最后对属分类水平一些主要的丰度有差异的物种进行分析(one-way ANOVA)。其他 3 种被广泛报道作为根际微生物群落的主要组成的放线菌门,拟杆菌门和变形菌门也进行了显著性差异分析,发现放线菌门在各样本间无差异,而拟杆菌门的 BX_16FWRH 和 BX_16FBRH 的丰度显著高于

BX_16FSRH,变形菌门更是存在 BX_16FWRH>BX_16FBRH>BX_16FSRH 的现象,证明变形菌门受根部影响显著,呈梯度积累富集。

利用本课题组之前从酸性红壤中分离出一株根瘤菌(命名为 *R.T-1*)的 16S rDNA 测序数据,在 NCBI 网站上进行比对发现和 *Rhizobium indigoferae*、*Rhizobium leguminosarum* 以及 *Rhizobium laguerreae* 聚为一支。因此本研究也研究了各采样部位根瘤菌属 *Rhizobium* 的丰度差异,根瘤菌属属于变形菌门(Proteobacteria), α 变形菌纲(Alpha-proteobacteria)。我们发现同一采样部位两个基因型相比,根瘤菌属 *Rhizobium* 的丰度无显著性差异。这也从侧面说明根瘤菌 *R.T-1* 在红壤中含量稳定,所以容易被分离鉴定出来。伯克氏菌属(*Burkholderia*)属于变形菌门, β 变形菌纲(Beta-proteobacteria),在 BX_16FBRH 中丰度高于所有其他样品。伯克氏菌属被报道与固氮相关,同时也有研究发现他们之中有的种属于耐铝细菌^[43,44]。这可能和 BX10 相比 BD2 在酸性土壤中拥有较好的生长优势有关。此外,还存在嗜酸栖热菌属 *Acidothermus* (属于放线菌门)在 BD_16FBS 显著高于其他样品的现象。以及粘液细菌属 *Mucilagibacter* (属于拟杆菌门),存在 FBRH 在两个基因型都显著高于对应的 FSRH (即 BX_16FBRH>BX_16FSRH, BD_16FBRH>BD_16FSRH)。即在 FBSH 这个部位对 *Mucilagibacter* 属存在富集作用。

精确到种分类水平后我们找到 8 个种,分别进行了统计学分析。我们发现, *Pseudomonas fragi* 的丰度在各样品之间无显著性差异,此菌与腐生代谢/食品腐败相关^[45,46]。而 *Bradyrhizobium elkanii* 在 BD_16FWRH 中的丰度远高于 BD2 的其他采样部位。*Acinetobacter johnsonii*, *Brevundimonas diminuta*, *Rhizobium radiobacter* 和 *Aerococcus viridans* 都发现在 BD_16FBS 的丰度远高于其他样本。其中 *B.elkanii* 属于共生固氮菌,它存在于植物的根瘤,甚至可以进入大豆的根瘤内部,发挥共生固氮作用。生物固氮提供了生物圈 65%的可用氮,是世界上固定大气氮的最大来源^[47]; *A.johnsonii*, 参与反硝化作用(denitrification)^[48,49]; *B.diminuta* 即可以作为人类的病原菌,也可以帮助植物缓解砷毒害及促进生长^[50,51]; *A.viridans* 是一种在环境中广泛传播的细菌,临床上

这种细菌与动物和人类的不同疾病有关^[52]。*Pseudarthrobacter oxydans* 和 *Arthrobacter methylotrophus* 的丰度则有 BX_16FBRH 大于 BX10 其他样品的情况。*P.oxydans* 被报道与具有 ACC 脱氨酶活性的固氮菌序列相似性达到 99.132%^[53], *A.methylotrophus* 则存在二甲基砷和二甲基亚砷还原酶活性, 二甲基砷和二甲基亚砷在自然界中主要存在于海洋和土壤中, 在植物生长中作为营养物质被吸收^[54]。酸杆菌门虽然也是根际微生物群落的重要组成部分, 但是精确到分类水平并未找到属于酸杆菌门的细菌^[55]。三代 16S rDNA 全长测序相比于二代 16S rDNA 可变区片段的测序, 其更长的读长的优势无疑也会在今后的研究中起到更大的作用。

16S rDNA 的功能预测与分析的结果表明, 各样本在 16S 功能预测上组成和丰度一致。通过单因素方差分析比较了与固氮有直接关系的 COG 功能基因在各样本的丰度, 研究发现在根外对照土中, BX10 相比 BD2 富集 COG0347 和 COG1348。这个现象可能是由于实验误差引起的, 也有可能是因为耐铝大豆防止功能冗余而产生的对固氮菌的排斥作用, 值得进一步分析。同时本研究还发现, BD2 相比 BX10 在刷后根际土中富集 COG1433 和 COG3870, 在冲洗后的根际土中富集 COG5420 和 COG5554。这可能是因为发现不同采样部位不同基因型各富集不同的与固氮有直接关系的 COG 功能基因铝敏感型大豆为了在酸铝环境中获得更好生长状态的一种补偿机制。

综上所述, 各样本在 alpha 多样性, beta 多样性上无显著性差异。在同一个基因型大豆不同采样部位间比较分析表明存在不同部位选择性富集不同的 PGPR 的现象。PCA 和 PCoA 分析说明植物生长主要影响根际的 BRH 及 WRH 部位的微生物, 对 SRH 部位影响较小, 而 BRH 及 WRH 部位距离植物根的物理距离相对更近。门分类水平物种丰度进行比较表明, WRH 部位存在富集蓝细菌门的现象。统计分析发现 BX10 根部对于增强植物抗逆性的 PGPR 有富集作用, 包括蓝细菌门、拟杆菌门和变形菌门等, 其中部分属种还与固氮和耐铝的功能相关, 这也能部分解释为什么 BX10 可以在酸性红壤中获得更好的生长状态。最后, 16S rDNA 的 COG 功能预测和

分析的结果表明, 铝敏感型大豆 BD2 对于与固氮相关的功能基因存在富集作用, 这可能与 BD2 为了在酸铝环境中生长的补偿机制相关, 还有待进一步研究证实。

附录:

附加材料详见文章电子版 www.chinagene.cn。

参考文献(References):

- [1] Cheng FX, Cao GQ, Wang XR, Zhao J, Yan XL, Liao H. Isolation and application of effective nitrogen fixation rhizobial strains on low-phosphorus acid soils in South China. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(3): 412–420. [DOI]
- [2] Kochian LV. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46, 237–260. [DOI]
- [3] Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 459–493. [DOI]
- [4] Li SX. The current state and prospect of plant nutrition and fertilizer science. *Plant Nutr Fert Sci*, 1999, 5(3): 193–205.
李生秀. 植物营养与肥料学科的现状与展望. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(3): 193–205. [DOI]
- [5] Xu QP. Nitrogen cycle and nitrogen fixation. *Middle School Biol*, 2005, 21(3): 11–13.
徐清平. 氮循环与固氮. 中学生物学, 2005, 21(3): 11–13. [DOI]
- [6] Foy CD. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun Soil Sci Plan*, 1988, 19(7–12): 959–987. [DOI]
- [7] Zhang X, Liu P, Yang Y, Xu G. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Bot Stud*, 2007, 48(4): 435–444. [DOI]
- [8] Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC, Randall PJ. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (I. Uptake and distribution of aluminum in root apices). *Plant Physiol*, 1993, 103(3): 685–693. [DOI]
- [9] Vitorello VA, Capaldi FR, Stefanuto VA. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian J Plant Physiol*, 2005, 17: 129–143. [DOI]

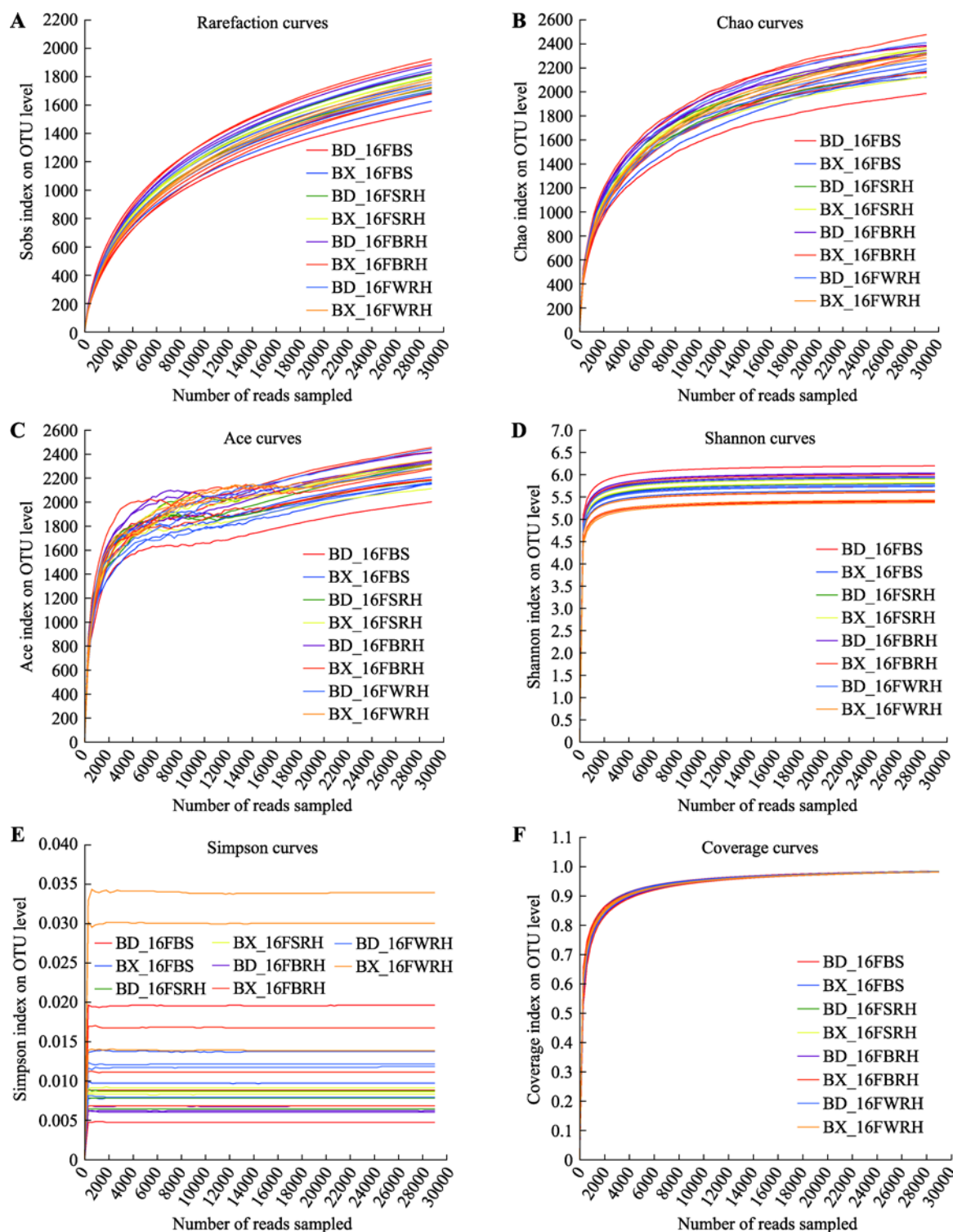
- [10] Ryan PR, Delhaize E, Jones DL. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 527–560. [\[DOI\]](#)
- [11] Yang ZM, Sivaguru M, Horst WJ, Matsumoto H. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant*, 2000, 110(1): 72–77. [\[DOI\]](#)
- [12] Avis TJ, Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40(7): 1733–1740. [\[DOI\]](#)
- [13] Dong DF, Peng XX, Yan XL. Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. *Physiol Plant*, 2004, 122(2): 190–199. [\[DOI\]](#)
- [14] Zhen Y, Miao L, Su J, Liu SH, Yin YL, Wang SS, Pang YJ, Shen HG, Tian DC, Qi JL, Yang YH. Differential responses of anti-oxidative enzymes to aluminum stress in tolerant and sensitive soybean genotypes. *J Plant Nutr*, 2009, 32(8): 1255–1270. [\[DOI\]](#)
- [15] Yang T, Ding Y, Zhu Y, Li Y, Wang X, Yang R, Lu G, Qi J, Yang Y. Rhizosphere bacteria induced by aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybeans in acid soil. *Plant Soil Environ*, 2012, 58(6): 262–267. [\[DOI\]](#)
- [16] Yang TY, Liu GL, Li YC, Zhu SM, Zou AL, Qi JL, Yang YH. Rhizosphere microbial communities and organic acids secreted by aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybean in acid soil. *Biol Fert Soils*, 2012, 48(1): 97–108. [\[DOI\]](#)
- [17] Li YC, Yang TY, Zhang PP, Zou AL, Peng X, Wang LL, Yang RW, Qi JL, Yang YH. Differential responses of the diazotrophic community to aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybean genotypes in acidic soil. *Eur J Soil Biol*, 2012, 53: 76–85. [\[DOI\]](#)
- [18] Li YL, Fan XR, Shen QR. The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen-use efficiency in rice plants. *Plant Cell Environ*, 2008, 31(1): 73–85. [\[DOI\]](#)
- [19] Inceoglu O, Salles JF, van Overbeek L, van Elsas JD. Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(11): 3675–3684. [\[DOI\]](#)
- [20] Lu GH, Tang CY, Hua XM, Cheng J, Wang GH, Zhu YL, Zhang LY, Shou HX, Qi JL, Yang YH. Effects of an EPSPS-transgenic soybean line ZUTS31 on root-associated bacterial communities during field growth. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192008. [\[DOI\]](#)
- [21] Lu GH, Zhu YL, Kong LR, Cheng J, Tang CY, Hua XM, Meng FF, Pang YJ, Yang RW, Qi JL, Yang YH. Impact of a glyphosate-tolerant soybean line on the rhizobacteria, revealed by Illumina MiSeq. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(3): 561–572. [\[DOI\]](#)
- [22] Wen ZL, Yang MK, Du MH, Zhong ZZ, Lu YT, Wang GH, Hua XM, Fazal A, Mu CH, Yan SF, Zhen Y, Yang RW, Qi JL, Hong Z, Lu GH, Yang YH. Enrichments/derichments of root-associated bacteria related to plant growth and nutrition caused by the growth of an EPSPS-transgenic maize line in the field. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1335. [\[DOI\]](#)
- [23] Kennedy K, Hall MW, Lynch MDJ, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD. Evaluating bias of illumina-based bacterial 16S rRNA gene profiles. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(18): 5717–5722. [\[DOI\]](#)
- [24] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*, 2012, 6(8): 1621–1624. [\[DOI\]](#)
- [25] Kozich JJ, Westcott S L, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(17): 5112–5120. [\[DOI\]](#)
- [26] Lu GH, Hua XM, Liang L, Wen ZL, Du MH, Meng FF, Pang YJ, Qi JL, Tang CY, Yang YH. Identification of major rhizobacterial taxa affected by a glyphosate-tolerant soybean line via shotgun metagenomic approach. *Genes*, 2018, 9(4): 214. [\[DOI\]](#)
- [27] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335–336. [\[DOI\]](#)
- [28] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing

- and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(23): 7537–7541. [DOI]
- [29] Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy AC, Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(3): 392–403. [DOI]
- [30] Liu YX, Qin Y, Guo XX, Bai Y. Methods and applications for microbiome data analysis. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(9): 845–862.
- 刘永鑫, 秦媛, 郭晓璇, 白洋. 微生物组数据分析方法与应用. *遗传*, 2019, 41(9): 845–862. [DOI]
- [31] Whittaker RH. Vegetation of the siskiyou mountains, oregon and california. *Ecol Monogr*, 1960, 30(4): 280–338. [DOI]
- [32] Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC, Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC genomics*, 2012, 13: 162. [DOI]
- [33] Franche C, Lindström K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 2008, 321(1–2): 35–59. [DOI]
- [34] Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol*, 2009, 17(10): 458–466. [DOI]
- [35] Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ. Bacterial associations with legumes. *Crit Rev Plant Sci*, 2014, 34(1–3): 17–42. [DOI]
- [36] Zaki SS, Belal EEE, Rady MM. Cyanobacteria and glutathione applications improve productivity, nutrient contents, and antioxidant systems of salt-stressed soybean plant. *Int Lett Nat Sci*, 2019, 76: 72–85. [DOI]
- [37] Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC. Global patterns in belowground communities. *Ecol Lett*, 2009, 12(11): 1238–1249. [DOI]
- [38] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, van Themaat EVL, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 2012, 488(7409): 91–95. [DOI]
- [39] Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, Del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 2012, 488(7409): 86–90. [DOI]
- [40] Schlaeppi K, Dombrowski N, Oter RG, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(2): 585–592. [DOI]
- [41] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellin C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(8): E911–920. [DOI]
- [42] Hu YL, Dai R, Liu YX, Zhang JY, Hu B, Chu CC, Yuan HB, Bai Y. Analysis of rice root bacterial microbiota of nipponbare and ir24. *Hereditas(Beijing)*, 2020, 42(5): 506–518.
- 胡雅丽, 戴睿, 刘永鑫, 张婧赢, 胡斌, 储成才, 袁怀波, 白洋. 水稻典型品种日本晴和 IR24 根系微生物组的解析. *遗传*, 2020, 42(5): 506–518. [DOI]
- [43] Minerdi D, Fani R, Gallo R, Boarino A, Bonfante P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(2): 725–732. [DOI]
- [44] Huang SC, Wang XD, Liu X, He GH, Wu JC. Isolation, identification, and characterization of an aluminum-tolerant bacterium *Burkholderia* sp. SB1 from an acidic red soil. *Pedosphere*, 2018, 28(6): 905–912. [DOI]
- [45] De Filippis F, La Stora A, Villani F, Ercolini D. Strain-level diversity analysis of *Pseudomonas fragi* after in situ pangenome reconstruction shows distinctive spoilage-associated metabolic traits clearly selected by different storage conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 85(1): e02212–e02218. [DOI]
- [46] Stanborough T, Fegan N, Powell SM, Tamplin M, Chandry PS. Vibrioferin production by the food spoilage bacterium *Pseudomonas fragi*. *FEMS Microbiol Lett*, 2018, 365(6). [DOI]
- [47] Ludwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*, 2003, 422(6933): 722–726. [DOI]
- [48] Zhang Y, Wang XJ, Wang WQ, Sun ZT, Li J. Investigation of growth kinetics and partial denitrification performance in strain *Acinetobacter johnsonii* under different environmental conditions. *R Soc Open Sci*, 2019, 6(12): 191275. [DOI]
- [49] Wen G, Wang T, Li K, Wang HY, Wang JY, Huang TL. Aerobic denitrification performance of strain *Acinetobacter*

- johnsonii* WGX-9 using different natural organic matter as carbon source: Effect of molecular weight. *Water Res*, 2019, 164: 114956. [DOI]
- [50] Menuet M, Bittar F, Stremler N, Dubus JC, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. First isolation of two colistin-resistant emerging pathogens, *Brevundimonas diminuta* and *Ochrobactrum anthropi*, in a woman with cystic fibrosis: a case report. *J Med Case Rep*, 2008, 2: 373. [DOI]
- [51] Singh N, Marwa N, Mishra SK, Mishra J, Verma PC, Rathaur S, Singh N. *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2016, 125: 25–34. [DOI]
- [52] Liu G, Liu YX, Ali T, Ferreri M, Gao J, Chen W, Yin JH, Su JL, Fanning S, Han B. Molecular and phenotypic characterization of *Aerococcus viridans* associated with subclinical bovine mastitis. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0125001. [DOI]
- [53] Busse HJ. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66(1): 9–37. [DOI]
- [54] Borodina E, Kelly DP, Schumann P, Rainey FA, Ward-Rainey NL, Wood AP. Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Arch Microbiol*, 2002, 177(2): 173–183. [DOI]
- [55] Li ZF, Feng ZL, Zhao LH, Shi YQ, Feng HJ, Zhu HQ. Effects of transgenic cotton expressing chitinase and glucanase genes on the diversity of soil bacterial community. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(8): 821–827.
- 李志芳, 冯自力, 赵丽红, 师勇强, 冯鸿杰, 朱荷琴. 转几丁质酶和葡聚糖酶双价基因棉花对土壤细菌种群多样性的影响. *遗传*, 2015, 37(8): 821–827. [DOI]

(责任编辑: 孔凡江)

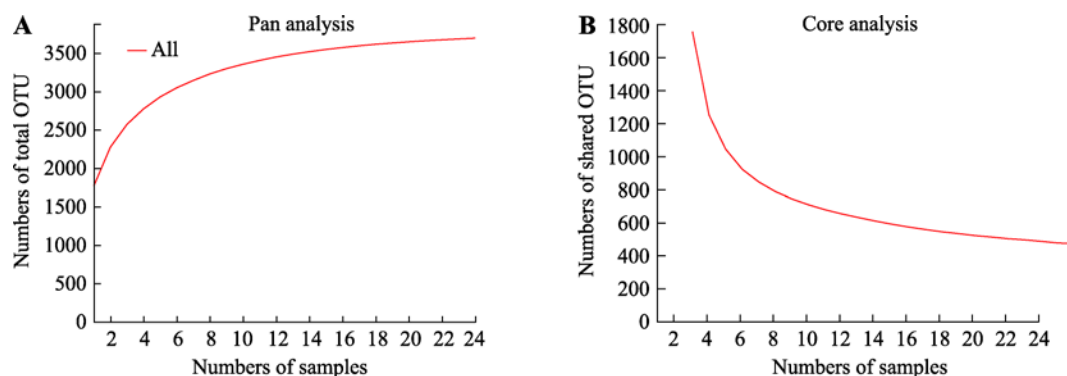
附录: 附加材料



附图 1 Alpha 多样性稀释曲线图

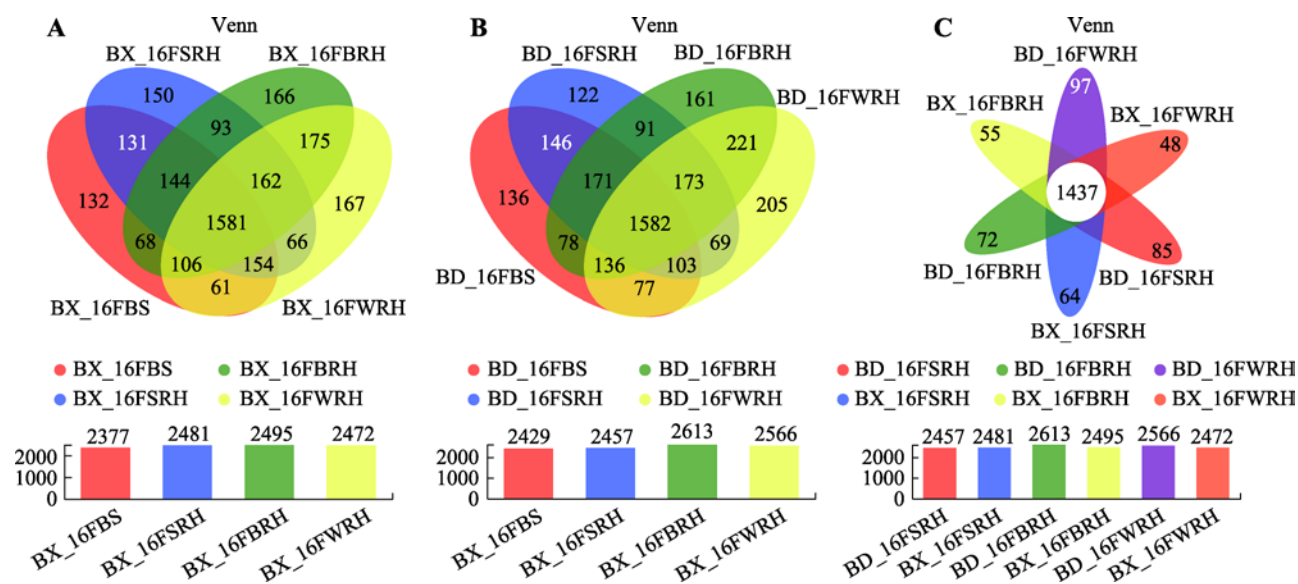
Fig. S1 Dilution curve of alpha diversity

BX 和 BD 分别代表耐铝大豆 BX10 和铝敏感大豆 BD2; F 代表花期; BS、SRH、BRH 和 WRH 分别代表根围土、两侧根际土、刷后根际土和冲洗后根际土。



附图 2 Pan 分析和 Core 分析曲线图

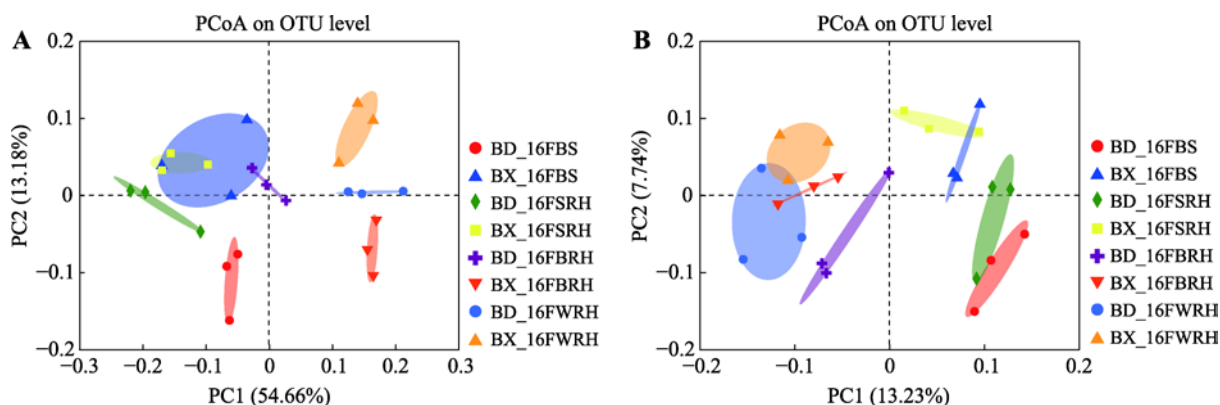
Fig. S2 Curves of Pan analysis and Core analysis



附图 3 不同样品之间 Venn 图对比

Fig. S3 Venn chart of each samples

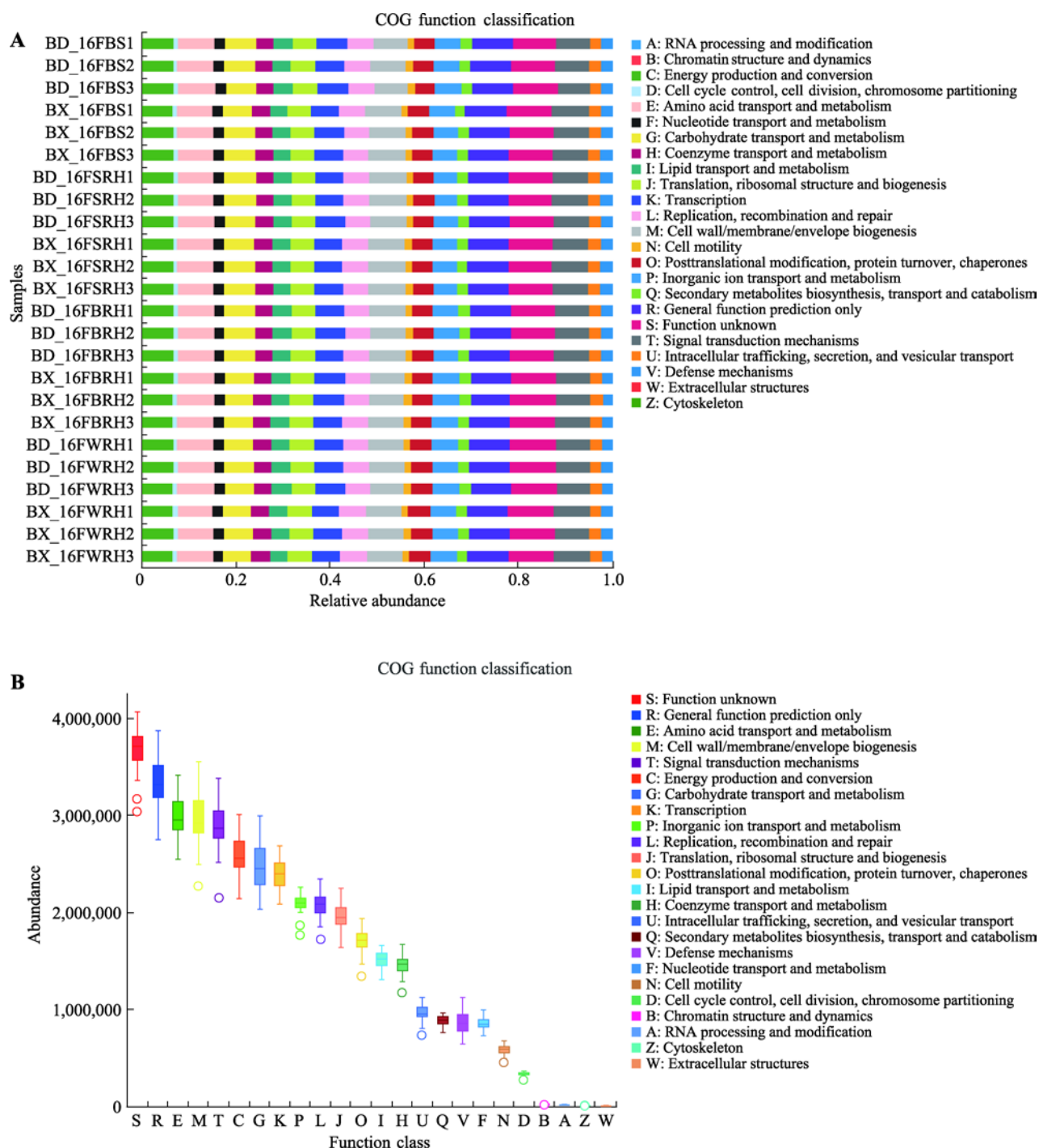
A: 铝耐受型大豆 BX10 四个采样部位的 Venn 图; B: 铝敏感型大豆 BD2 四个采样部位的 Venn 图; C: 所有处理比较的 Venn 图。处理信息同附图 1。



附图 4 细菌群落丰度主坐标分析图

Fig. S4 PCoA of bacterial community

A: 基于 weighted-Unifrac 距离的 PCoA 图; B: 基于 unweighted-Unifrac 距离的 PCoA 图。处理信息同附图 1。



附图 5 根际细菌群落 COG 功能基因预测丰度图

Fig. S5 Relative abundance of COG function prediction of bacterial communities

A: COG 功能分类组成及其丰度柱形图; B: COG 功能分类丰度箱型图。处理信息同附图 1。

附表 1 属分类水平物种在各样本中丰度

Supplementary Table 1 Relative abundance of species at genus level in each samples

Genus	BX_16FWRH3	BX_16FWRH2	BX_16FWRH1	BD_16FBS1	BD_16FBS2	BD_16FBS3
<i>Sphingomonas</i>	0.040996	0.057843	0.041616	0.0483	0.043339	0.042133
<i>Bryobacter</i>	0.021704	0.02384	0.023668	0.01981	0.021049	0.022634
<i>Mucilaginibacter</i>	0.026389	0.026699	0.017329	0.02784	0.030248	0.007028
<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	0.024563	0.055776	0.024839	0.01247	0.004961	0.007441
<i>Massilia</i>	0.004272	0.006373	0.00348	0.01316	0.033038	0.014917
<i>Phenylobacterium</i>	0.020843	0.024529	0.019051	0.00617	0.004547	0.003583
<i>Acidibacter</i>	0.015675	0.017088	0.020912	0.01612	0.00472	0.005857
<i>Candidatus_Solibacter</i>	0.010301	0.011128	0.009474	0.01027	0.009439	0.009887
<i>Flavisolibacter</i>	0.009302	0.008303	0.005994	0.00985	0.01602	0.006373
<i>Gemmatimonas</i>	0.00534	0.005064	0.004444	0.01495	0.014194	0.009577
<i>Bradyrhizobium</i>	0.009198	0.005788	0.009439	0.0052	0.004582	0.004926
<i>Ralstonia</i>	0.010749	0.010921	0.004823	0.00617	0.004237	0.002033
<i>Granulicella</i>	0.008061	0.00658	0.006132	0.00537	0.005684	0.006959
<i>Dyella</i>	0.008475	0.024081	0.010507	0.00348	0.001826	0.001585
<i>Acinetobacter</i>	0	3.45E-05	0	0.00896	0.043752	0.103559
<i>Thermosporothrix</i>	0.010439	0.012161	0.017811	0.00382	0.001344	0.001654
<i>Niastella</i>	0.009474	0.012196	0.010886	0.00555	0.001034	0.00062
<i>Bacillus</i>	0.000655	0.001964	0.003101	0.00513	0.011024	0.027767
<i>Sorangium</i>	0.005615	0.003824	0.004651	0.00961	0.005615	0.004858
<i>Rhodanobacter</i>	0.006718	0.006132	0.008165	0.00382	0.002377	0.00124
<i>Terracidiphilus</i>	0.01006	0.009646	0.006856	0.00365	0.004065	0.00248
<i>Rhizobium</i>	0.010818	0.007545	0.003893	0.00496	0.012678	0.030007
<i>Acidothermus</i>	0.003135	0.002894	0.003342	0.01977	0.007372	0.009784
<i>Nitrospira</i>	0.002274	0.003445	0.002825	0.003	0.001998	0.00155
<i>Haliangium</i>	0.005374	0.004479	0.004789	0.00431	0.002859	0.002239
<i>Actinospica</i>	0.00503	0.001068	0.005926	0.00872	0.000965	0.000861
<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0.00382	0.019844	0.051021
<i>Lactococcus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Asticcacaulis</i>	0.003617	0.008234	0.002687	0.00282	0.000379	0.000655
<i>Pseudarthrobacter</i>	0.000103	0.000103	6.89E-05	0.00744	0.004547	0.004134
<i>Achromobacter</i>	0	6.89E-05	3.45E-05	0.0032	0.015882	0.030868
<i>Methylothermus</i>	0.000827	0.000517	0.000103	0.00014	0.005684	6.89E-05
<i>Aerococcus</i>	0	0	0	0.00282	0.010783	0.027492
<i>Helicobacter</i>	0.00124	0.000241	0.003445	0.0000689	3.45E-05	0
<i>Arthrobacter</i>	6.89E-05	0	3.45E-05	0.00045	0.000517	0.000103
<i>Pseudomonas</i>	3.45E-05	0	0	0.00034	0.000551	0

续附表

Genus	BX_16FSRH3	BX_16FSRH2	BX_16FSRH1	BD_16FSRH3	BD_16FSRH2	BD_16FSRH1
<i>Sphingomonas</i>	0.037379	0.041926	0.054535	0.04499	0.030902	0.035725
<i>Bryobacter</i>	0.042684	0.050401	0.037517	0.02673	0.04706	0.050505
<i>Mucilaginibacter</i>	0.007751	0.010301	0.008647	0.00768	0.002584	0.004926
<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	0.011644	0.009061	0.01223	0.01392	0.004823	0.00596
<i>Massilia</i>	0.000586	0.002446	0.00441	0.02205	0.000448	0.001171
<i>Phenylobacterium</i>	0.004031	0.007166	0.006615	0.01037	0.002239	0.004754
<i>Acidibacter</i>	0.023254	0.01192	0.011403	0.00985	0.009474	0.009991
<i>Candidatus_Solibacter</i>	0.018259	0.022014	0.01571	0.01223	0.024322	0.020291
<i>Flavisolibacter</i>	0.004031	0.005857	0.014745	0.01071	0.005478	0.006718
<i>Gemmatimonas</i>	0.008337	0.00975	0.016088	0.01192	0.006959	0.007924
<i>Bradyrhizobium</i>	0.004444	0.003583	0.004685	0.00565	0.003583	0.003032
<i>Ralstonia</i>	0.002067	0.001344	0.002584	0.00427	0.000792	0.001275
<i>Granulicella</i>	0.007476	0.007717	0.007614	0.0073	0.003514	0.004754
<i>Dyella</i>	0.001998	0.000861	0.003755	0.00541	0.001688	0.002653
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0.00565	0	3.45E-05
<i>Thermosporothrix</i>	0.008406	0.001068	0.007235	0.00231	0.003307	0.003066
<i>Niastella</i>	0.00379	0.001447	0.009233	0.00551	0.003238	0.00565
<i>Bacillus</i>	0.012333	0.000965	0.001137	0.00462	0.001585	0.001791
<i>Sorangium</i>	0.004754	0.003548	0.004272	0.00758	0.003858	0.00472
<i>Rhodanobacter</i>	0.00155	0.002722	0.003101	0.00262	0.001137	0.001723
<i>Terracidiphilus</i>	0.0041	0.003101	0.004789	0.00372	0.002136	0.002859
<i>Rhizobium</i>	0.000207	0.000723	0.000896	0.0032	0.000207	0.000172
<i>Acidothermus</i>	0.004203	0.002928	0.003824	0.01051	0.00472	0.005926
<i>Nitrospira</i>	0.007545	0.006511	0.004513	0.00293	0.012264	0.010163
<i>Haliangium</i>	0.002963	0.002963	0.002687	0.00451	0.002859	0.003376
<i>Actinospica</i>	0.003066	0.000413	0.004926	0.00269	0.004444	0.003617
<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0.00303	0	0
<i>Lactococcus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Asticcacaulis</i>	0.000172	0.001412	0.000965	0.00072	0.000276	0.000345
<i>Pseudarthrobacter</i>	0.000172	0.000103	0.000138	0.00338	0.000138	6.89E-05
<i>Achromobacter</i>	0	0	0	0.00272	0	0
<i>Methylothermobacter</i>	0.000207	0.000345	0.002412	0.0000689	0	3.45E-05
<i>Aerococcus</i>	0	0	0	0.00231	0	0
<i>Helimonas</i>	0	0.000138	0	0.0000345	3.45E-05	6.89E-05
<i>Arthrobacter</i>	3.45E-05	0.000103	0	0.00052	0	3.45E-05
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0.00017	0	0

续附表

Genus	BD_16FWRH2	BD_16FWRH1	BD_16FWRH3	BX_16FBS3	BX_16FBS1	BX_16FBS2
<i>Sphingomonas</i>	0.039825	0.045957	0.070452	0.06177	0.063079	0.049437
<i>Bryobacter</i>	0.026183	0.019396	0.01254	0.04572	0.033796	0.034864
<i>Mucilaginibacter</i>	0.039067	0.042202	0.020016	0.00469	0.021256	0.038275
<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	0.04706	0.033796	0.013505	0.01003	0.009474	0.031591
<i>Massilia</i>	0.007855	0.010852	0.002205	0.00279	0.005133	0.002722
<i>Phenylobacterium</i>	0.029765	0.028904	0.052882	0.00217	0.005374	0.009991
<i>Acidibacter</i>	0.011679	0.016364	0.021291	0.01034	0.005857	0.025218
<i>Candidatus_Solibacter</i>	0.007269	0.007993	0.005857	0.01936	0.011644	0.011403
<i>Flavisolibacter</i>	0.010232	0.020843	0.005753	0.00641	0.018672	0.006925
<i>Gemmatimonas</i>	0.004547	0.0041	0.005891	0.01034	0.007958	0.006856
<i>Bradyrhizobium</i>	0.016984	0.015985	0.020912	0.00448	0.002549	0.006925
<i>Ralstonia</i>	0.009233	0.009198	0.004651	0.00227	0.001895	0.007097
<i>Granulicella</i>	0.009887	0.006993	0.008061	0.00637	0.004789	0.010266
<i>Dyella</i>	0.023151	0.010301	0.008854	0.00055	0.002067	0.002549
<i>Acinetobacter</i>	0	6.89E-05	0.00472	0	0	0
<i>Thermosporothrix</i>	0.007235	0.005168	0.003032	0.00152	0.001068	0.039343
<i>Niastella</i>	0.008199	0.017673	0.007028	0.00072	0.000758	0.007924
<i>Bacillus</i>	0.004203	0.009198	0.012264	0.00158	0.00124	0.002446
<i>Sorangium</i>	0.006304	0.009371	0.010163	0.00396	0.005237	0.003583
<i>Rhodanobacter</i>	0.00472	0.011472	0.012264	0.00251	0.005099	0.010266
<i>Terracidiphilus</i>	0.011782	0.008578	0.001998	0.00296	0.004306	0.005822
<i>Rhizobium</i>	0.008785	0.008957	0.004823	0.0000689	0.000103	0.000482
<i>Acidothermus</i>	0.003411	0.002825	0.00248	0.00338	0.002997	0.003617
<i>Nitrospira</i>	0.002722	0.003514	0.002308	0.00882	0.0041	0.004892
<i>Haliangium</i>	0.006546	0.007269	0.012919	0.00286	0.004203	0.00217
<i>Actinospica</i>	0.00503	0.007304	0.003652	0.00055	0.000551	0.012781
<i>Brevundimonas</i>	0	0	3.45E-05	0	0	0
<i>Lactococcus</i>	0	0	0.074999	0	0	0
<i>Asticcacaulis</i>	0.004789	0.005512	0.004961	0.00024	0.00031	0.014504
<i>Pseudarthrobacter</i>	0.000103	0.000103	0.000551	0.0001	0.000138	0.000276
<i>Achromobacter</i>	3.45E-05	0.001378	0.000138	0.0000345	0	3.45E-05
<i>Methylothermus</i>	3.45E-05	0.000965	0.000379	0.00303	0.000586	0.000345
<i>Aerococcus</i>	0	0	6.89E-05	0	0	0
<i>Heliomonas</i>	0.000689	0.002343	0.000758	0	0.000103	0
<i>Arthrobacter</i>	3.45E-05	0	0	0.0001	0	3.45E-05
<i>Pseudomonas</i>	0	0.000103	0.017122	0	0	6.89E-05

续附表

Genus	BX_16FBRH2	BX_16FBRH3	BX_16FBRH1	BD_16FBRH2	BD_16FBRH3	BD_16FBRH1
<i>Sphingomonas</i>	0.027871	0.045544	0.036483	0.07166	0.043029	0.068178
<i>Bryobacter</i>	0.014917	0.018776	0.017191	0.02746	0.033899	0.035553
<i>Mucilaginibacter</i>	0.046681	0.067179	0.038516	0.02849	0.014538	0.029834
<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	0.040996	0.058738	0.032728	0.03745	0.01378	0.03135
<i>Massilia</i>	0.133462	0.02949	0.042684	0.00593	0.007304	0.006167
<i>Phenylobacterium</i>	0.011748	0.01974	0.015365	0.01619	0.016502	0.020257
<i>Acidibacter</i>	0.01068	0.01347	0.012161	0.01433	0.016054	0.009439
<i>Candidatus_Solibacter</i>	0.005684	0.006615	0.005512	0.01233	0.017914	0.011024
<i>Flavisolibacter</i>	0.004479	0.009405	0.010301	0.0165	0.012161	0.010645
<i>Gemmatimonas</i>	0.004031	0.005512	0.007751	0.00444	0.004995	0.007235
<i>Bradyrhizobium</i>	0.005994	0.009508	0.012988	0.00847	0.00627	0.012919
<i>Ralstonia</i>	0.05047	0.01726	0.018879	0.00682	0.002825	0.003376
<i>Granulicella</i>	0.00565	0.007614	0.007062	0.00906	0.008303	0.009646
<i>Dyella</i>	0.007441	0.021566	0.008061	0.00706	0.001929	0.008854
<i>Acinetobacter</i>	3.45E-05	0	0	0	0	0
<i>Thermosporothrix</i>	0.006787	0.004961	0.006167	0.00768	0.004582	0.004651
<i>Niastella</i>	0.004272	0.007889	0.005684	0.01003	0.010542	0.007372
<i>Bacillus</i>	0.002205	0.002894	0.006511	0.00975	0.001447	0.003583
<i>Sorangium</i>	0.003514	0.003927	0.005719	0.0051	0.005478	0.003342
<i>Rhodanobacter</i>	0.007614	0.007062	0.008268	0.00634	0.004616	0.006201
<i>Terracidiphilus</i>	0.002377	0.008888	0.005133	0.0072	0.004306	0.00472
<i>Rhizobium</i>	0.003204	0.006098	0.008475	0.00183	0.001585	0.0041
<i>Acidothermus</i>	0.002997	0.002343	0.003927	0.00537	0.003238	0.00472
<i>Nitrospira</i>	0.001654	0.002067	0.002067	0.00668	0.006546	0.006959
<i>Haliangium</i>	0.003893	0.003652	0.00596	0.00479	0.006787	0.002584
<i>Actinospica</i>	0.001412	0.000861	0.003342	0.00641	0.003652	0.005684
<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Asticcacaulis</i>	0.001688	0.002653	0.003686	0.00296	0.001344	0.003927
<i>Pseudarthrobacter</i>	0.017294	0.005409	0.011128	0.00045	0.000207	0.000172
<i>Achromobacter</i>	6.89E-05	0.000207	0.000138	0.0000689	0	0.000138
<i>Methylothermus</i>	0.004892	0.004341	0.019396	0.0000689	6.89E-05	3.45E-05
<i>Aerococcus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Helioimonas</i>	0.016433	0.005374	0.00093	0.00034	0.000172	0.000379
<i>Arthrobacter</i>	0.016709	0.002859	0.004375	0.0000689	6.89E-05	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0.000103	0.0001	0	0

处理信息同附图 1。