

基于传统分离和高通量测序的健康和患锈腐病西洋参根际土壤微生物群落分析

李玲玉^{1,2}, 黄璐琦^{3a}, 李政⁴, 王晓¹, 刘伟¹, 张华敏^{3b}, 马春霞^{1,3a,3b,3c*}

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014; 2. 山东农业大学 食品科学与工程学院 山东省高校食品加工技术与质量控制重点实验室, 山东 泰安 271018; 3. 中国中医科学院 a. 中药资源中心 地道药材国家重点实验室培育基地; b. 中药研究所; c. 博士后流动站 中国中医科学院博士后管理办公室, 北京 100700; 4. 山东省生态环境规划研究院, 山东 济南 250101)

摘要: 探究健康和患锈腐病西洋参根际土壤微生物的群落多样性和可培养菌株分离, 以期为西洋参锈腐病发生机制及防控提供参考。利用传统分离技术和高通量测序技术分析健康和患锈腐病西洋参的根际土壤, 探究其微生物的群落组成及多样性变化。经由传统分离技术合计得到 24 株细菌和 25 株真菌, 优势菌属包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和青霉菌属 (*Penicillium*)。高通量测序结果显示, 健康和锈腐病土壤中细菌群落均以蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和变形门 (Proteobacteria) 为主; 患锈腐病组有所降低的为蓝细菌门 (Cyanobacteria)、软壁菌门 (Tenericutes) 和变形菌门 (Proteobacteria), 大幅上调的为拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 与厚壁菌门 (Firmicutes)。健康和锈腐病土壤内所含的真菌群落以子囊菌门 (Ascomycota) 为主, 被锈腐病感染后有所上调的为担子菌亚门 (Basidiomycota)、子囊菌门 (Ascomycota) 与被孢霉门 (Mortierellomycota)。感染锈腐病根际土壤细菌多样性明显减少。研究表明健康和锈腐病土壤微生物群落组成与数量明显不同, 为西洋参锈腐病的发病机制及防控技术提供了理论依据。

关键词: 西洋参; 根际土壤; 细菌和真菌; 锈腐病; 高通量测序; 传统分离方法

中图分类号: S567 文献标志码: A 文章编号: 1002-4026(2023)02-0041-09

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



Analysis of microbial communities of healthy and rusty root-rot *Panax quinquefolium* L. rhizosphere soil using traditional isolation and high-throughput sequencing

LI Lingyu^{1,2}, HUANG Luqi^{3a}, LI Zheng⁴, WANG Xiao¹, LIU Wei¹,
ZHANG Huamin^{3b}, MA Chunxia^{1,3a,3b,3c*}

收稿日期: 2022-07-05

基金项目: 中央本级重大增减支项目(2060302)

作者简介: 李玲玉(1996—), 女, 博士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: sdnydxly@163.com

* 通信作者, 马春霞, 女, 助理研究员, 研究方向为微生物学。Tel: 18753162707, E-mail: machunxia8927@163.com

1. Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology(Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China;
2. Key Laboratory of Food Processing Technology and Quality Control of Shandong Higher Education Institutes, College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;
3. a. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica; b. Institute of Chinese Materia Medica; c. Postdoctoral Management Office of China Academy of Chinese Medical Sciences, Mobile Post-Doctoral Stations, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
4. Shandong Academy for Environmental Planning, Jinan 250101, China)

Abstract : To investigate the diversity of microbial communities and to obtain culturable strains from healthy and rusty root-rot rhizosphere soil samples of *Panax quinquefolius* L., it is necessary to provide a reference for the occurrence mechanism and prevention and control strategies for rusty root-rot. Traditional isolation and high-throughput sequencing were used for analyzing the healthy and rusty root-rot soil samples of *Panax quinquefolius* L. to explore their structural composition and diversity. In total, 24 strains of bacteria and 25 strains of fungi were isolated using the traditional isolation techniques, and the dominant genera were *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Penicillium*. The results of Illumina Miseq high-throughput sequencing revealed that *Cyanobacteria* and *Proteobacteria* dominated the bacterial communities in the healthy and rusty root-rot soil samples. Notably, the phylum proportions of *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, and *Tenericutes* in the rusty root-rot soil samples significantly decreased, whereas those of *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Acidobacteria* significantly increased. Furthermore, the bacterial diversity of the infected rusty root-rot rhizosphere soil decreased significantly. In conclusion, the composition and quantity of soil microbial communities were significantly different between the healthy and rusty root-rot soil samples, and this provides a theoretical basis for the study of the occurrence mechanism and prevention and control strategies for rusty root-rot *Panax quinquefolium* L.

Key words : *Panax quinquefolium* L.; rhizosphere soil; bacteria and fungi; rusty root-rot; high-throughput sequencing; traditional isolation methods

西洋参 *Panax quinquefolius* L. 又称五叶人参、美国参、花旗参, 属于五加科、人参属, 其药用价值部位为根, 极具滋补作用^[1]。西洋参原产于北美洲, 20 世纪 70 年代开始引种到我国, 广泛应用于药品和食品领域。西洋参含有多糖、皂苷、多肽、脂肪酸等多种营养成分, 其中人参皂苷是主要活性成分^[2]。《中国药典(2020 年版)》描述西洋参的功效为清热生津、补气养阴^[3]。现代药理研究表明, 西洋参具有增强免疫、抗肿瘤及减轻更年期综合症等多种作用^[4]。

然而, 随着西洋参种植面积的扩大, 连作障碍问题日益突出, 其中锈腐病是导致西洋参减产和质量下降的主要原因之一。锈腐病发病初期根部表面会出现铁锈色的斑点, 土壤潮湿时会伴有寄生菌的侵染, 造成根部部分或完全腐烂。除了土壤理化性质劣化、化感自毒、病虫害等原因外, 土壤微生物菌群失调是西洋参根部发生锈腐病的重要因素^[5]。前期对西洋参锈腐病的研究主要集中在单一致病菌, 而土壤微生物丰度及含量变化可以打破根际微生物之间的生态平衡, 其群落丰度和多样性对维持土壤质量和揭示西洋参病害机制及防治至关重要。

Dong 等^[6]采用高通量测序的方法研究了连作过程中西洋参土壤微生物多样性的变化, 结果显示, 随着年限的增加, 细菌多样性减少, 真菌多样性增加。此外, 郭瑞齐等^[7]通过比较未种植西洋参和种植西洋参 1~4 年的西洋参根际土壤的细菌群落, 发现随着种植年限的增加根际土壤细菌的种类及多样性呈下降趋势。其中, 柱孢属真菌(*Cylindrocarpon*) 是引起西洋参锈腐病的重要病原菌; 此外, 在患锈腐病的西洋参中也分离到镰刀菌(*Fusarium*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、*Rhexocercosporidium* 等菌株^[8-10]。这些优势菌的差异性可能与气候、土壤性质、土壤中微生物的种类与丰度以及西洋参的品种等多种因素有关。山东威海是我国重要的西洋参主产区, 所以研究该地区的侵染性病原微生物的分离及防治具有重要的研究价值。

传统分离方法是微生物研究的常用方法, 虽不能全面反映微生物生态系统的真实情况, 却可以得到菌株实体。高通量测序法是一种新型的分子生物技术, 能对整个样品的微生物种类、丰度及功能进行分析, 可完

整地体现微生物群落的特征,为解决西洋参锈腐病提供了方法^[11]。结合两者优势,可通过高通量测序技术指导传统培养方法分离西洋参根际微生物。

本研究基于高通量测序技术和传统分离方法对威海市文登区的西洋参根际土壤进行初步研究,分析了健康和锈腐病西洋参根际土微生物结构组成及丰度变化,为深入探讨西洋参锈腐病的发生机制提供了参考,对改良西洋参根际土的土壤环境提供了理论依据。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

NanoDrop 2000(美国赛默飞世尔公司),3730 XL 测序仪、2720 PCR 仪(美国 ABI 公司),Mini Pro 300V Power Supply 电泳仪(美国 Major Science 公司),NovaSeq6000 测序仪(美国 Illumina 公司),ZD-85 气浴恒温振荡器(国旺仪器制造公司(常州)),ZXJD-A1270 霉菌培养箱(智城公司(上海))。

1.2 实验材料

样品采于山东省威海市文登区,为4年生西洋参根际土壤。随机选取20株健康和20株锈腐病的西洋参,将西洋参根部拔起,装入自封袋,编号,密封并带回实验室。样品经山东省科学院王晓研究员鉴定为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L.的根。将西洋参分为(6+6+8)三组,分别收集距离根部1~2 cm 的土壤,混合均匀,过40目筛去除固形物,三个生物学重复的健康根际土样品分别标记为 h.1, h.2, h.3(健康组),锈腐病组根际土样品分别标记为 r.1, r.2, r.3(锈腐病组),用于后续微生物分离和测序。

2 方法与结果

2.1 传统分离法

2.1.1 根际土微生物的分离纯化

准确称取 10.0 ± 0.1 g 土壤,加入 90 mL 无菌水中,混匀,180 r/min 下振荡 30 min,获得 1 g/mL 的土壤悬浊液,用无菌水依次将上清液稀释到 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ g/mL。西洋参根际土微生物的分离分别采用营养琼脂、LB 琼脂和 PDA 培养基。吸取合适浓度的样品稀释液 100 μ L 滴在培养基上,均匀涂布至吸收,30 $^{\circ}$ C 培养 1~7 d,挑取单菌落纯培养,筛选出培养特征不同的菌落,划线法接种,保存。

2.1.2 根际土细菌总 DNA 提取、16S rDNA 扩增和鉴定

将分离的单菌落进行摇床培养,用 2 mL 离心管收集 1.0×10^9 ($OD_{600}(1 \sim 1.5) \times 1.0$ mL) 的细菌培养物,12 000 r/min 离心 30 s,得到菌体沉淀,然后利用试剂盒提取细菌的总 DNA。模板采用提取的 DNA,扩增所用引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')。PCR 扩增体系为 1.0 μ L DNA,5.0 μ L 10 \times Buffer(含 2.5 mmol/L Mg^{2+}),1.0 μ L Taq 聚合酶,1.0 μ L dNT,1.5 μ L 27F 引物,1.5 μ L 1 492 R 引物和 39.0 μ L 去离子水;扩增步骤如下:95 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 0.5 min \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 0.5 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1.5 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7 min,实施 35 次扩增循环。待反应结束,使用 1% 琼脂糖(AG)凝胶电泳测定。借助凝胶回收试剂盒完成 PCR 产物的回收,对于已纯化菌株的 PCR 产物,借助测序仪实施 DNA 测序。借助 BLAST 程序和核酸数据库 NCBI 对已拼接序列文件展开搜索,获得最为接近于待测物种序列的物种信息,具体结果详见表 1。

表1 基于纯培养鉴定方法的西洋参根际土的细菌组成

Table 1 Determination of the bacterial composition of *Panax quinquefolium* L. rhizosphere soil using pure culture identification method

类别	菌属	菌种	菌种中文名称	数量	序号
健康土壤组	短杆菌属	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	耐寒短杆菌	2	1, 2
		<i>Bacillus pacificus</i>	太平洋芽孢杆菌	3	3, 12, 13
	芽孢杆菌属	<i>Bacillus depressus</i>	凹陷芽孢杆菌	1	4
		<i>Bacillus acidiceles</i>	酸快生芽孢杆菌	2	6, 11
		<i>Bacillus mesonae</i>	凉粉草芽孢杆菌	1	10
		<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌	1	14
		<i>Bacillus toyonensis</i>	东京芽孢杆菌	1	16
	类芽孢杆菌属	<i>Bacillus marisflavi</i>	黄海芽孢杆菌	1	17
		<i>Paenibacillus lactis</i>	乳酸类芽孢杆菌	1	5
	赖氨酸芽孢杆菌属	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	台中类芽孢杆菌	1	7
		<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>	无	1	8
	节杆菌属	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌	1	9
<i>Arthrobacter silviterrae</i>		无	1	15	
锈腐病土壤组	寡养单胞菌属	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	嗜根寡养单胞菌	1	18
	根瘤菌属	<i>Rhizobium nepotum</i>	无	1	19
	假单胞菌属	<i>Pseudomonas brenneri</i>	布氏假单胞菌	1	20
		<i>Pseudomonas koreensis</i>	韩国假单胞菌	1	21
	<i>Pseudomonas grimontii</i>	无	2	22, 23	
芽孢杆菌属	<i>Bacillus cereus</i>	蜡状芽孢杆菌	1	24	

其中,共分离获得 24 株细菌,包括从健康西洋参根际土壤中分离到 17 株细菌(SUB163912731419)和土锈病西洋参根际土壤中分离到 7 株细菌(SUB163918772667)。从健康土壤组中鉴定出芽孢杆菌属、短杆菌、类芽孢杆菌、赖氨酸芽孢杆菌和节杆菌属;在锈腐病组鉴定出了寡养单胞菌属、根瘤菌属、假单胞菌属和芽孢杆菌。结果显示,芽孢杆菌和假单胞菌分别为健康和锈腐病西洋参根际土壤中的优势菌属。

2.1.3 根际土真菌总 DNA 提取、ITS 扩增和鉴定

借助真菌提取试剂盒,完成真菌 DNA 的提取。对于真菌,在模板为所得 DNA 下实施 ITS 扩增,引物分别是 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3');扩增反应体系除了 27F 和 1492R 引物换为 ITS1 和 ITS4 引物外,PCR 扩增反应体系和扩增程序和鉴定与 2.1.2 一致。真菌鉴定结果见表 2。

表 2 基于纯培养鉴定方法的西洋参根际土的真菌组成

Table 2 Fungi composition of rhizosphere soil of *Panax quinquefolium* L. by pure culture identification method

类别	菌属	菌种	菌种中文名称	数量	序号
健康土壤组	帚枝霉属	<i>Sarocladium strictum</i>	紧密帚枝霉	1	25
	青霉属	<i>Penicillium raperi</i>	无	2	26, 38
		<i>Penicillium ortum</i>	无	1	27, 32
		<i>Penicillium oxalicum</i>	无	1	30
		<i>Penicillium cremeogriseum</i>	无	1	33
	不整孢菌属	<i>Plectosphaerella niemeijerum</i>	无	2	28
	枝顶孢属	<i>Acremonium egyptiacum</i>	无	1	29, 37
	毛霉菌属	<i>Mucor moelleri</i>	无	1	31
	曲霉属	<i>Aspergillus versicolor</i>	无	1	34
	链格孢属	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	无	1	35
	锥毛壳属	<i>Coniochaeta canina</i>	无	1	36
	镰刀菌属	<i>Fusarium falciforme</i>	无	1	39
	锈腐病土壤组	链格孢属	<i>Alternaria alternate</i>	无	2
伞状霉属		<i>Umbelopsis vinacea</i>	无	2	42, 46
篮状菌属		<i>Talaromyces helicus</i>	无	1	43
		<i>Talaromyces verruculosus</i>	无	1	44, 49
毛壳菌属		<i>Chaetomium lentum</i>	无	1	45
青霉属		<i>Penicillium ilterdanum</i>	无	1	47
未培养属		<i>Uncultured fungus</i>	无	1	48

结果表明,从根际土壤中共分离获得 25 株真菌,包括从健康西洋参根际土壤中分离到 15 株真菌 (SUB1639272388803) 和土锈病西洋参根际土壤中分离到 10 株真菌 (SUB1639299433676)。对于真菌,传统分离方法得到的真菌进化距离较大,具有较远的亲缘关系。自健康组与锈腐病组皆分离得到青霉属和链格孢属。另外,自健康组内分离出帚枝霉属、不整孢菌属、枝顶孢属、毛霉菌属、曲霉属、锥毛壳属;自锈腐病组内分离出伞状霉属、篮状菌属、毛壳菌属和镰刀菌属。

2.2 高通量测序方法

2.2.1 根际土基因组的 DNA 提取和 PCR 扩增及检测

借助 FastDNA[®] Spin Kit 土壤 DNA 提取试剂盒,完成土壤样品内基因组总 DNA 的提取,AG 凝胶电泳测定目标 DNA 片段的完整性与大小,对其浓度与纯度展开进一步准确测定。把提取所得基因组 DNA 当做模板,对于 16S V4 区引物(515F 与 806R)以及 ITS 1 区引物(ITS5-1737F 与 ITS2-2043R),经由真菌特异引物实施 PCR 扩增。利用 QIAquick 琼脂糖凝胶试剂盒回收目标 DNA 片段后,进行文库构建和上机测序。

2.2.2 序列结果质量分析

自下机数据内对各样本数据进行有效拆分,将引物序列截去,借助 FLASH 有效拼接各样本的序列,获得原始序列数据。在质控过滤以及嵌合体序列去除结束,获得对后续分析有应用价值的有效数据。拼接的原始数据上传至国家微生物科学数据中心 (SUB1647514035706)。

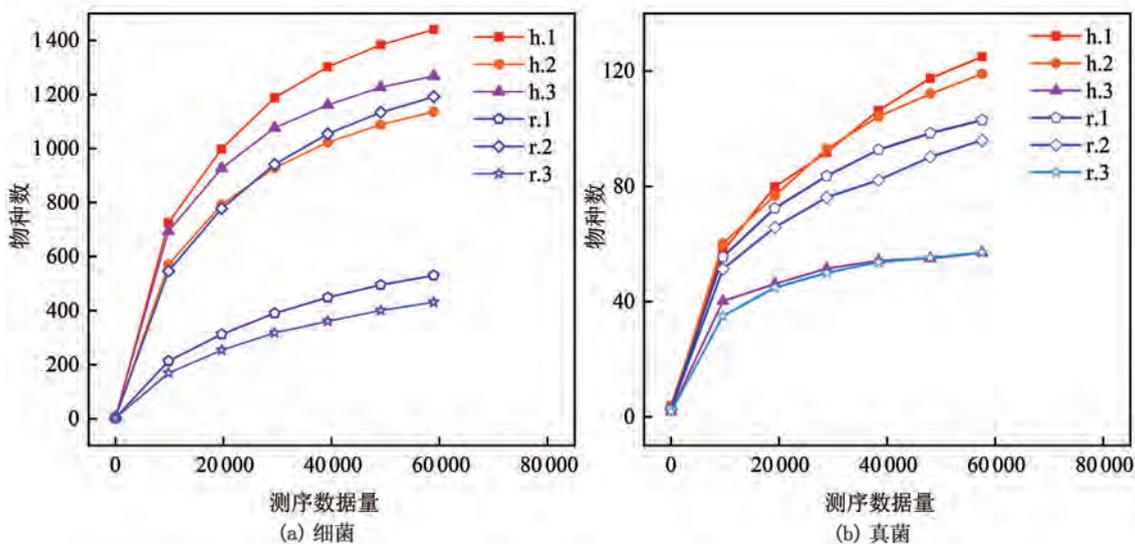
从西洋参根际土的细菌和真菌分别获得 75 975 条、71 075 条高质量的基因序列,74 329 条、68 907 条分类注释序列,用于后续构建分类单元 (operational taxonomic unit, OTUs) 和获得注释信息。有效细菌和真菌序列分别获得 1 138 和 116 个 OTUs (表 3)。

表3 西洋参根际土的细菌和真菌注释情况

Table 3 Notes on bacteria and fungi in rhizosphere soil of *Panax quinquefolium* L.

类群	总序列数/条	分类注释序列/条	未分类序列/条	未聚类序列/条	OTUs 数/个
细菌	75 975	74 329	5	1 641	1 138
真菌	71 075	68 907	44	2 124	116

以抽取的测序数据量(Sequences number)与对应的物种数(OTU numbers)来构建稀释曲线,用于判断当前测序深度下测序数据量是否能够反映检测到的物种数。从图1(a)和(b)可以看出,两组样本随着测序深度增加,曲线均已经趋于平缓,说明在当前测序深度下测序数据合理,可反映样本中绝大多数细菌和真菌的物种信息。此外,根据稀释曲线可以看出,细菌群落的物种数高于真菌群落的物种数,健康组物种数高于锈腐病组。



注:h.1, h.2 和 h.3 为健康西洋参土壤样品;r.1, r.2 和 r.3 为锈腐病西洋参土壤样品。

图1 根际土中细菌和真菌稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curve of bacteria and fungi in rhizosphere soil

2.2.4 OTU 聚类、物种注释和物种丰度分析

在 97% 相似水平下,使用 Uparse 对 2 组样本的非重复序列进行 OTU 聚类。利用 Mothur 方法计算 Alpha 多样性,SSU rRNA 数据库和 MUSCLE 软件进行物种注释和多序列比对分析。根据分类学分析结果,使用 R 语言对数据进行计算,可获得样本在门、纲、目、科、属各个分类水平上的分类情况,进而了解微生物的种类及丰度,观察一定条件下的物种的相对丰度。

2 组根际土壤样本细菌 OTUs 归类到 32 门 48 纲 110 目 213 科 432 属;真菌 OTUs 归类到 6 门 11 纲 17 目 26 科 26 属。在门和属水平上对锈腐病组和健康组 2 组样品的物种组成进行分析。图 2(a)是门水平下健康和锈腐病西洋参根际细菌的相对丰度累加图,反映的是最大丰度排名前 10 的物种。其中,健康组和锈腐病组相对丰度占比 0.4% 以上的细菌名称见表 4。

图 2(b)为属水平下健康和锈腐病西洋参根际细菌的相对丰度累加图。由图可得,未明确的蓝细菌属 (*unidentified Cyanobacteria*) 是优势属。其中,锈腐病组的拟杆菌属 (*Bacteroides*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、土生单胞菌属 (*Terrimonas*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、未明确的肠杆菌属 (*unidentified Enterobacteriaceae*)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*) 等根际细菌菌群明显高于健康组,上述菌群在锈腐病组的占比依次为 1.51%、1.08%、0.80%、0.76%、0.52%、0.45%。

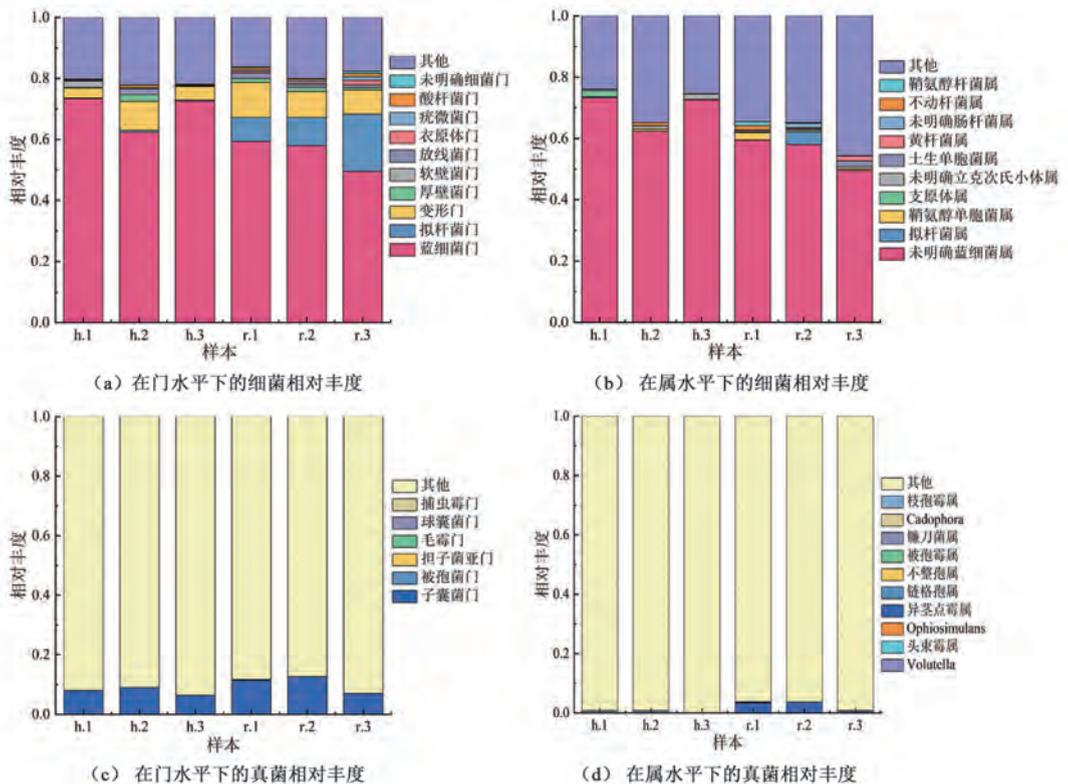
两组西洋参土壤中测得的真菌菌群较少,仅有 6 个门和 10 个属,且占比不足 15%,结果见图 2(c)和(d)。

根际土壤真菌合计鉴定出 6 个门类,分别为子囊菌门(Ascomycota)、捕虫霉门(Zoopagomycota)、被孢菌门(Mortierellomycota)、球囊菌门(Glomeromycota)、毛霉门(Mucoromycota)、担子菌亚门(Basidiomycota),其中子囊菌门(Ascomycota)在鉴定出的土壤菌群中有较高的丰度(健康组 7.76%;锈腐病组 10.31%)。从属水平看,鉴定出的真菌相对丰度较少。其中,从健康组中鉴定出异茎点霉属(*Paraphoma*)、链格孢属(*Alternaria*)、不整孢菌属(*Plectosphaerella*)、被孢霉属(*Mortierella*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、*Cadophora*、*Ophiosimulans*、*Volutella* 以及头束霉属(*Cephalotrichum*)这 10 个菌属,以链格孢菌(*Alternaria*)最多,占总真菌的 0.46%。锈腐病真菌中以异茎点霉属(*Paraphoma*)和不整孢菌属(*Plectosphaerella*)最多,分别占总真菌的 2.54%和 0.10%。

表 4 门水平下的西洋参根际土细菌的物种相对丰度

Table 4 Relative abundance of rhizosphere bacteria at a phylum classification level

健康组		锈腐病组	
细菌名称	相对丰度/%	细菌名称	相对丰度/%
蓝细菌门(Cyanobacteria)	69.40	蓝细菌门(Cyanobacteria)	55.61
变形门(Proteobacteria)	9.32	拟杆菌门(Bacteroidetes)	11.95
厚壁菌门(Firmicutes)	0.84	变形门(Proteobacteria)	5.71
放线菌门(Actinobacteria)	0.82	放线菌门(Actinobacteria)	1.17
软壁菌门(Tenericutes)	0.66	厚壁菌门(Firmicutes)	1.14
酸杆菌门(Acidobacteria)	0.46	衣原体门(Chlamydiae)	0.87
拟杆菌门(Bacteroidetes)	0.43	酸杆菌门(Acidobacteria)	0.79
		疣微菌门(Verrucomicrobia)	0.79
		未明确细菌门(unidentified Bacteria)	0.43



注:h.1, h.2 和 h.3 为健康西洋参土壤样品;r.1, r.2 和 r.3 为锈腐病西洋参土壤样品;其他为图中除 10 个门和属之外的所有门和属的相对丰度之和。

图 2 不同分类水平下的根际微生物类群相对丰度分布

Fig.2 Relative abundance of rhizosphere microorganism communities at different classification levels

2.2.6 物种多样性分析

Alpha 多样性可用于反映群落的物种丰富度和多样性。在相似度 97% 的水平下,利用 Coverage、Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 等指数揭示西洋参根际土壤微生物群落的物种丰富度和多样性(表 5)。

Coverage 用于表示样品测序的覆盖度,6 个样本在文库中的覆盖率高于 99.9%,能够代表西洋参根际土壤微生物的真实信息。Chao1 和 ACE 指数可用于评估物种的丰富度。健康与锈腐病细菌组的 Chao1 指数分别平均为 1 417.610 和 839.363,ACE 指数分别平均为 1 441.020 和 911.925,说明健康组细菌物种数量高于锈腐病组。真菌的 Chao1 指数分别平均为 115.686 和 104.781,ACE 指数分别平均为 130.042 和 104.449,说明健康组真菌物种数量略高于锈腐病组。Shannon 和 Simpson 指数可用于衡量西洋参根际土壤微生物的多样性,其中 Shannon 指数大小与物种多样性成正比,Simpson 指数成反比。健康与锈腐病组细菌的 Shannon 指数分别平均为 4.033 和 2.256,Simpson 指数分别平均为 0.573 和 0.732,说明健康组的细菌多样性高于锈腐病组;真菌的 Shannon 指数分别平均为 1.411 和 1.349,Simpson 指数分别平均为 0.363 和 0.370,说明两组的真菌多样性无明显差异,健康组略高于锈腐病组。Alpha 多样性分析结果与根际土中细菌与真菌稀释曲线分析一致。

表 5 根际土细菌和真菌 Alpha 多样性指数

Table 5 Alpha diversity indices of bacteria and fungi in rhizosphere soil

样品	细菌群落				真菌群落			
	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
h.1	642.240	721.451	1.889	0.531	118.000	123.665	1.823	0.480
h.2	1 315.991	1 409.744	3.092	0.654	138.273	129.343	1.306	0.360
h.3	559.857	604.581	1.788	0.533	58.071	60.338	0.917	0.248
r.1	1 607.267	1 638.178	3.870	0.700	151.559	182.789	1.818	0.465
r.2	1 268.550	1 295.635	3.537	0.698	134.500	144.014	1.342	0.361
r.3	1 377.013	1 389.246	4.691	0.798	61.000	63.322	1.073	0.285

注:h.1, h.2 和 h.3 为健康西洋参土壤样品;r.1, r.2 和 r.3 为锈腐病西洋参土壤样品。

3 讨论与结论

3.1 传统培养方法分离根际土壤微生物

近年来,研究发现芽孢杆菌属是健康西洋参内生菌和根际土壤中的优势菌,可以产生酶类、细菌素、多肽抗生素等多种次生代谢产物,是西洋参生长的有益菌^[12]。在分离的 24 株细菌中,其中 11 株为芽孢杆菌,说明芽孢杆菌是西洋参根际土壤中的优势菌^[13]。在分离的 25 株真菌中,健康组西洋参土壤中青霉属占比最多。芽孢杆菌属和青霉菌属是医用抗生素的主要来源,且西洋参微生物次级代谢产物资源并未得到充分开发,这将在下一步工作中进行。

传统方法在锈腐病组分离获得假单胞菌(布氏假单胞菌、韩国假单胞菌和 *Pseudomonas grimontii*) 和根瘤菌,这与先前 Choi 等^[10]在西洋参锈腐病参种分离获得 *Pseudomonas marginalis*、*P. veronii*、*Pseudomonas* sp.、*Rhizobium leguminosarum* 和 *R. tropica* 等在属水平结果一致,但在菌种水平上存在差异。此外,Punja 等^[9]的研究表明西洋参根部表面颜色的变化与酚类化合物在细胞中紊乱积累和细胞中镰刀菌属(*Fusarium falciforme*)的菌丝有关。本研究中,在锈腐病西洋参根际土中分离得到一株镰刀菌(*Fusarium falciforme*),说明该菌株可能与西洋参出现锈腐病有关,需要进一步探究。

3.2 染病和健康西洋参根际土壤微生物多样性

目前,关于锈腐病侵染对西洋参根际土壤微生物群落多样性造成的影响未见报道,本研究以健康和锈腐病西洋参根际土为研究对象,采用高通量测序技术,分析了两者根际土微生物之间的群落结构及多样性差异。从 Chao 1、ACE、Shannon 和 Simpson(表 4)4 个多样性指数变化可知,锈腐病原菌的入侵改变了西洋参

根际土壤微生物群落的多样性。从整体上看,土壤细菌群落多样性高于真菌群落多样性,感染锈腐病后的根际土壤中的细菌多样性减少;土壤真菌多样性略有减少,并无明显差异。其中,土壤细菌的变化规律与沈宗专等^[14]关于罹患青枯病的番茄土壤细菌相似,原因可能是细菌多样性与生态系统生产力之间存在正相关性。真菌的变化规律与伍晓丽等^[15]关于健康和根腐病根际土壤真菌组成的研究相似,此外,研究发现连作障碍也可能与真菌多样性减少有关^[16]。

3.3 染病和健康西洋参根际土壤细菌群落组成及差异性

此项研究分析了威海市的健康和感染锈腐病西洋参的根际土壤细菌群落结构。被锈腐病感染后,蓝细菌门(Cyanobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和软壁菌门(Tenericutes)比例大幅降低,如此可见三者皆对锈腐病原菌具备一定敏感性。另外,一旦患锈腐病,拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和酸杆菌门(Acidobacteria)大幅上调;同时疣微菌门(Verrucomicrobia)和衣原体门(Chlamydiae)产生,说明这些菌株可能有诱导或者防御西洋参锈腐病的作用。

3.4 感病和健康西洋参根际土壤真菌群落组成及差异性

通过 ITS 测序鉴定出的西洋参根际土壤真菌在门水平下组成相对简单,包括 6 个门类,其中子囊菌门(Ascomycota)最多。感染锈腐病后子囊菌门(Ascomycota)、被孢霉门(Mortierellomycota)和担子菌亚门(Basidiomycota)比例明显增加,说明这些真菌可能诱导或者防御西洋参锈腐病。从属水平看,鉴定出的真菌的相对丰度较少,锈腐病组鉴定出异茎点霉属(*Paraphoma*)和不整孢菌属(*Plectosphaerella*)最多;健康组的链格孢菌(*Alternaria*)最多。目前,已利用传统方法在健康组土壤中分离到了帚枝霉属、曲霉属、链格孢属和不整孢属;在锈腐病土壤中分离到了毛壳菌属、镰刀菌属和链格孢属等。当前进行传统培养菌株鉴定的较少,在未来的研究中,笔者将依据高通量测序结果进一步分离和鉴定。

本研究结合传统分离及高通量测序非培养技术两种方法,获得了大量西洋参根际土壤真菌和细菌微生物群落信息,初步明确了健康和锈腐病西洋参根际土所包含的微生物群落组成及多样性,探讨了微生物在健康和锈腐病西洋参根际土之间的差异。本研究充分挖掘西洋参根际土壤中的微生物资源,探讨健康和锈腐病西洋参微生物之间的联系,为建立西洋参根际土壤微生物系统、病原学研究及生物防治提供参考,为西洋参功能菌株筛选及活性成分的富集提供数据支撑。

参考文献:

- [1]李春莲,万楚军,龚雪,等.西洋参种质资源及品种选育技术研究进展[J].西北农业学报,2021(3):321-332.
- [2]WEI G F, YANG F, WEI F G, et al. Metabolomes and transcriptomes revealed the saponin distribution in root tissues of *Panax quinquefolius* and *Panax notoginseng*[J]. Journal of Ginseng Research, 2020(44): 757-769. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.05.009.
- [3]国家药典委员会.中华人民共和国药典2020年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:136.
- [4]谢佳明,阚玉娜,刘笑男,等.西洋参人参皂昔结构多样性及药理活性研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(1):75-80.
- [5]蒋丽,郭瑞齐,管仁伟,等.西洋参连作障碍原因分析及对策[J].辽宁中医杂志,2020,47(10):122-124.
- [6]DONG L L, XU J, ZHANG L J, et al. High-throughput sequencing technology reveals that continuous cropping of American ginseng results in changes in the microbial community in arable soil[J]. Chinese Medicine, 2017, 12: 18. DOI: 10.1186/s13020-017-0139-8.
- [7]郭瑞齐,管仁伟,李红霞,等.西洋参栽培过程中根际土壤细菌群落差异性分析[J].中华中医药学刊,2022,40(11):91-94.DOI:10.13193/j.issn.1073-7717.2022.11.022.
- [8]FARH M E, KIM Y J, KIM Y J, et al. *Cylindrocarpus destructans*/*Ilyonectria radicola*-species complex: Causative agent of ginseng root-rot disease and rusty symptoms[J]. Journal of Ginseng Research, 2018, 42(1): 9-15. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.01.004.