



王秋宇,王越,牛福傲,等.三种促生细菌对人参及其根际微生态结构和功能的影响[J].黑龙江农业科学,2024(11):59-71.

三种促生细菌对人参及其根际微生态结构和功能的影响

王秋宇,王越,牛福傲,韩丹,南力

(延边大学农学院,吉林延吉133002)

摘要:为促进大田栽参土壤改良,并开发功能性微生物菌肥,以3种促生细菌[欧文氏菌属(*Erwinia*)G115、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)G119和赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)G209]分别处理大田栽参土壤,对人参根际细菌群体组成结构、土壤理化性质及人参幼苗的生长状态进行测定,研究根际促生细菌对人参的促生效应和对根际微生物群落及功能的影响。结果表明,促生细菌处理人参幼苗与对照组相比,根际土壤有机质、总氮、pH和叶干重变化不大,有效磷、速效钾、蔗糖酶、根际土壤脲酶和根鲜重有显著差异。3种促生细菌处理与对照组相比,包括变形菌门(*Proteobacteria*),放线菌门(*Actinobacteria*)等8个菌门人参根际细菌门水平相对丰度大于1%,其中变形菌门是主要优势菌门。3种促生细菌处理对人参根际细菌属水平影响较大,其中,根瘤菌属(*Rhizobium*)是促生细菌处理后与对照差异显著且丰度大于1%的共有菌属,所有丰度大于1%的属促生细菌处理后其增加的相对丰度比例均在120%以上。通过PICRUST软件预测3种促生细菌处理后人参根际细菌功能,获得一级功能层6个方面的生物代谢功能,二级功能层35种预测功能,三级功能层33种预测功能,与对照组相比,外源促生细菌处理可改变人参根际细菌多方面的功能,且改变功能的效果是双向的,既有增加的效果,也有降低的效果。说明外源促生细菌处理可改变人参根际细菌群落的遗传多样性,显著增加根系分泌物和细菌感受信号等功能。

关键词:人参;促生细菌;根际细菌;群体结构;功能预测

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)号称“百草之王”,为五加科(*Araliaceae*)人参属(*Panax*)多年生宿根性草本植物,是我国传统的中药材之一^[1]。人参对中枢神经系统、心血管系统、消化系统、内分泌系统以及生殖系统的疾病都有较好的治疗作用。近年来,由于人们对替代医学和健康食品的关注度日益增加,具有补益功效的人参消费市场不断扩大,人参用量大幅提高。中国东部长白山区,具有以人参为主体独特丰富的特产资源,并已经形成了特色产业发展的基本规模。为提高人参保苗率和产量,人参种植过程中大量添加农药和化肥,导致生产的药材农残及重金属含量严重超标,加之人参种植过程中较为严重的连作障碍经常发生,这些问题严重制约了人参种植业的绿色健康发展。

Klopper等^[2]引入了植物根际促生细菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)这个术语,PGPR是指在植物根际(或根内)定殖能

够促进植物生长的细菌。根际是植物根系存在的土壤环境,是微生物活动最活跃的区域,它形成一个有限的营养池,微生物在其中提取必要的大量和微量营养素^[3]。植物根分泌物能够调整微生物群落以应对环境变化,微生物也通过自身代谢活动改变根系分泌物的组成以利于自身生存。通过外源添加具有特定功能的PGPR,改变根际微生物的优势或特定菌群的丰度和多样性,进一步影响根围微环境,最终调节植物的生长和发育。PGPR作为生物肥料正成为有机农业的一个重要方面,并逐渐成为全球经济和农业生产的主要参与者。然而,生物肥料应用的影响因素较多,使用的生物肥料是否会破坏土壤中微生物的相互作用,是需要进一步深入探讨的课题。

高通量测序被称为下一代测序技术(Next Generation Sequencing, NGS),它能够利用从环境等样本中获取的基因组DNA直接构建文库并进行测序分析,在微生物的群落结构分析方面有

收稿日期:2024-07-10

基金项目:吉林省科技厅项目(20230402028GH);延边州科技发展计划项目(492023018)。

第一作者:王秋宇(2000—),男,硕士研究生,从事特种作物资源与利用研究。E-mail:1960244503@qq.com。

通信作者:南力(1988—),女,博士,硕导,从事植物栽培和抗氧化活性、特种作物资源与利用研究。E-mail:nanli12@163.com。

着明显的优势^[4]。高通量测序产生的 16S rRNA 基因测序数据覆盖率极高,可以较全面地估计微生物群体的物种组成和丰度,与传统方法相比,具有能够更加真实地揭示环境微生物群体丰富度和多样性的特性^[5]。目前对非林地栽参的研究主要包括土壤养分^[6]、土壤酶活性^[7]、人参皂苷和病虫害防治等方面,且大多是基于可控环境的盆栽试验的结果,而探讨促生菌对农田人参根际细菌群落影响方面的研究较少。本研究于农田环境下接种前期筛选的促生菌,探讨其对人参根围细菌群落丰度、多样性及其基因功能的影响,以期为促进生菌作为生物菌肥的实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试人参品种为大马牙,种子采自延边朝鲜族自治州和龙参场。试验于 2023 年 5 月在吉林省延边朝鲜族自治州敦化农田人参栽培基地进行,田间管理与正常林地人参场管理相同。

1.2 方法

1.2.1 人参根际土壤采集和促生菌分离鉴定

于延边朝鲜族自治州和龙参场,采用多点取样法,取样地设置 3 个样点,每个样点随机选取 10 株人参根际土进行混合。采集时先除去土壤表面枯枝落叶层,将人参整根挖起,将人参根部附着土壤轻轻抖落后,收集须根 2 mm 范围内的土壤,装入保鲜袋,保存在 4℃ 冰箱中。

促生菌分离和鉴定:利用稀释倍数法制备人参根际土壤和根内生细菌稀释液,利用涂布平板法均匀地涂布于营养琼脂(NA)、R₂A 琼脂培养基(R₂A)、金氏培养基(KBA)中,于恒温培养箱中培养 72 h,挑取单一菌落,划线接种到新的纯化培养基,多次重复直至获取单一菌株。分离细菌的促生功能分别进行溶磷、解钾、固氮、产铁载体、产吡啶乙酸、产 ACC 脱氢酶等方面的筛选,并选取功能较好的细菌进行分子鉴定^[8]。

1.2.2 促生菌对人参影响的田间试验 试验设计:人参种子依次用 75%乙醇浸泡 5 min,1%次氯酸钠浸泡 5 min,最后用无菌水冲洗 3 次。将灭菌的人参种子播种于田间,试验设 4 个处理,包括 3 种促生菌处理和 1 个对照组(无菌水)处理,处理 1(CK):无菌水;处理 2:欧文氏菌属(*Erwinia*)G115 菌剂;处理 3:苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)G119 菌剂;处理 4:赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)

G209 菌剂。每个处理 20 次重复,共处理 80 株人参。出苗后,对各处理长势良好的人参幼苗根围灌入相应的菌剂,每株 30 mL,菌液浓度均为 1.0×10^8 CFU·mL⁻¹,对照组灌入 30 mL 无菌水,每隔 6 d 施入 1 次,共施入 8 次。

样品采集:8 次菌液施入结束后,于 70 d 后采用多点取样法,取样地设置 3 个样点,每个样点随机选取 10 株一年生人参全株,用无菌剪刀将整株人参根、茎分离,置于 50 mL 灭菌离心管中,加入磷酸缓冲盐溶液(pH7.8)40 mL,放入冰盒迅速带回实验室。置于空气浴振荡器振荡 2 h,转速为 200 r·min⁻¹,取出人参根,10 000 r·min⁻¹ 离心,倒掉上层液体,下层沉淀即为根际土壤样本。

1.2.3 测定项目及方法 (1)生物量参数测定:称量采集样本鲜根质量和干叶质量,3 次重复。

(2)土壤理化指标和酶活的测定:采用凯氏消化 AA3 连续流动分析仪测定土壤全氮含量。前处理用 H₂SO₄/HClO₄ 和 NaHCO₃ 萃取消解后,采用流动注射自动分析仪(Technicon, AA3, 德国)测定土壤总氮(TN)^[9];利用重铬酸钾法测定土壤有机质含量^[10]。按照毛雪梅^[11]的方法测定土壤有效磷、速效钾的含量。分别按照 Piotrowska 等^[12]、Han 等^[13]的方法测定土壤脲酶、蔗糖酶活性。

(3)细菌基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增:采用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals, Solon, USA)提取。以稀释后的基因组 DNA 为模板,采用 16S rRNA V3-V4 区带 Barcode 的特异引物 515F: GTGCCAGCMGC-CGCGGTAA 和 907R: CCGTCAATTCCTTT-GAGTTT 进行 PCR 扩增。采用英国 Biolabs 公司 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 的酶和缓冲液。30 μL PCR 扩增反应体系:Phusion Master Mix(2×)15 μL;引物(2 μmol·L⁻¹)3 μL;模板 DNA(1 ng·μL⁻¹)10 μL;无菌水 2 μL。反应程序:98℃ 预变性 1 min;98℃ 变性 10 s;53℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 30 s;共 29 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测。根据 PCR 产物浓度进行等浓度混样,充分混匀后使用 1×TAE 浓度为 2%的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物,切胶回收目的条带。产物纯化试剂盒使用 GeneJET 胶回收试剂盒(Thermo Scientific)。

(4)文库构建和上机测序:文库的构建采用 New England Biolabs 公司的 NEB Next[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒,利用 Qubit 定量和检测构建好的文库,检测合格后使用 Illumina 平台进行上机测序。

1.2.4 物种多样性组成和功能分析 物种注释与评估:测序得到的原始数据经拼接、过滤,去除 barcode 和引物序列,采用 UCHIME 软件进一步去掉嵌合体序列,以矫正测序误差,最终得到有效数据以备进一步分析。依据 Edgar^[14]的 UPARSE 方法,将上述获得的优质序列根据大于或等于 97%相似度的原则进行 OTU 聚类,进而选出各 OTU 中数量最多的序列为代表性序列,即为 OTU 对应的物种分类。以 OTU 聚类结果为基础,注释每个 OTU 的代表序列,获得相应的物种信息以及丰度分布。基于 OTUs 计算样品的多样性指数,包括 Shannon、Simpson、Chao1、ACE 指数等。获得的 OTUs 与 RDP(Ribosomal Database Project)数据库已知序列进行比对,利用 PyNAST 软件(Python Nearest Alignment Space Termination)将代表性序列与参比序列均匀对齐^[15]。最后,用 Fast tree 软件^[16]构建系统发育树。分析采用对优化序列进行随机抽样的方法,以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建稀释曲线(rarefaction curve),以得出样品的取样深度情况。默认是在 97%相似性水平下划分 OTU 并制作各样品的稀释曲线。

物种组成和样本比较分析:基于 OTUs 绘制 Venn 图,获取单个样品内部物种丰度和均匀度,以及不同样品间的共有和独有的 OTUs 信息等。进行群落组成分析,建立群落柱形图、Heatmap 图等。通过 PCoA、PCA 和 NMDS 等分析进一步获取不同样品之间的群落结构差异,降维图和样品聚类树进行展示。结合环境参数进行 CCA/RDA 分析与环境因子的相关性分析,获取影响组间群落差异的环境因子。细菌群落结构的 β 多样性使用基于 Unweighted Unifrac 矩阵的 Principal Component Analysis(PCA)分析,各样品细菌群落的分级聚类(Hierarchical clustering)采用 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)方法进行分析,Mantel test 用于分析细菌整体群落与环境理化参数之间的相关性,以上分

析使用 R 软件(Version 3.3.2)的 vegan 数据包操作完成。

采用 PICRUSt 软件预测分析促生菌处理后人参根际细菌功能,通过分别与 KEGG 功能数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)的比对分析,获得一级、二级、三级功能层方面的变异信息。

PICRUSt 基因功能预测分析:先根据已测微生物基因组的 16S rRNA 基因全长序列,推断它们的共同祖先的基因功能谱;对 Greengenes 数据库中其他未测物种的基因功能谱进行推断,构建细菌域全谱系的基因功能预测谱,将测序得到的菌群组成“映射”到数据库中,对菌群代谢功能进行预测。将 biom 文件上传至 Galaxy 网站(<http://picrust.github.io/picrust/>),获得 COG 和 KEGG 数据库功能预测信息,参考 KEGG Orthology 功能基因类别将此预测信息划分归类,即得到该预测基因组的功能基因丰度,采用 Heml heatmap illustrator program(1.0.3)软件绘制热图。

1.2.5 数据分析 使用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件分析数据,采用双因素方差分析来评估各处理之间的显著性差异水平。使用最小显著差异($P<0.05$)来进行不同处理间均值的显著性差异比较。

2 结果与分析

2.1 促生细菌功能筛选与鉴定

由表 1 可知,经功能筛选获得表现较好的 3 株促生细菌 G115、G119、G209。G115 菌株具有溶磷能力、产氨气能力、产铁载体能力、解钾能力、产 ACC 能力;G119 菌株具有产氨气能力、解钾能力、产 ACC 能力;G209 菌株具有溶磷能力、产氨气能力、产铁载体能力。且 3 株促生细菌都具有抑制黑霉病和灰斑病的能力。经分子生物学鉴定结果 3 株促生细菌分别为欧文氏菌属(*Erwinia persicina*) G115、苍白杆菌属(*Ochrobactrum pituitosum*) G119、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*) G209,菌株形态如图 1 所示。

G115 菌株为白色菌落,圆形且扁平,表面不光滑且不透明,边缘整齐,有光泽。G119 菌株为白色菌落,圆形且近乎球形,表面光滑且不透明,边缘整齐,有光泽。G209 菌株为粉色菌落,形状为圆形,表面平整光滑且不透明,边缘整齐,有光泽。

表 1 促生细菌功能筛选与鉴定

菌株	溶磷	产 NH ₃	产铁载体	解钾	IAA	ACC	病原体拮抗作用		基于 16S sRNA 测序的最大相似度≥97%
							黑斑病	灰霉病	
G80	—	—	—	+	—	1.521	—	—	KU977119.1 <i>Enterobacter aerogenes</i> strain
G81	—	—	—	+	—	2.635	—	—	KU160628.1 <i>Enterobacter cloacae</i> strain JP6
G97	—	+	—	—	—	0.453	—	—	KX911980.1 <i>Bacillus</i> sp. strain EAC
G101	—	—	—	—	+	0.299	—	—	KU179330.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> strain L14
G104	—	+	+	—	—	0.287	—	—	MF962585.1 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain
G106	+	+	+	+	—	0.022	—	—	KU877656.1 <i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain
G111	+	+	+	+	—	0.080	—	+	KC355341.1 <i>Rhizobium</i> sp. CR 5-1
G114	—	—	+	—	+	0.051	+	+	KY945860.1 <i>Stenotrophomonas</i> sp. strain
G115	+	+	+	+	—	0.162	+	+	AB907778.1 <i>Erwinia persicina</i> strain;IAM 12843
G116	—	—	+	—	+	0.020	+	+	LC133680.2 <i>Stenotrophomonas</i> sp. JCM 28649
G119	—	+	—	+	—	0.127	+	+	FJ870981.1 <i>Ochrobactrum</i> sp. 112
G129	—	—	—	—	+	0.012	—	—	KC759400.1 <i>Enterobacter</i> sp. WAB1915
G149	—	—	—	+	—	0.657	—	—	LC133735.2 <i>Microbacterium</i> sp. JCM 28704
G150	—	+	—	—	+	0.741	—	—	KT766060.1 <i>Sphingobacterium canadense</i> strain
G188	—	—	—	+	—	0.845	—	+	AM990996.1 <i>Bacillus subtilis</i>
G191	—	+	+	—	—	0.064	—	—	JN084155.1 <i>Bacillus aryabhattai</i> strain Y8
G199	—	—	—	+	—	0.213	—	—	LC133599.2 <i>Stenotrophomonas</i> sp. JCM 28252
G204	+	+	+	+	+	0.251	+	+	JX257179.1 <i>Pantoea agglomerans</i> strain Z01
G206	+	—	+	—	—	0.028	—	—	KY440054.1 <i>Pseudomonas</i> sp. strain M6
G209	+	+	+	—	—	0.918	+	+	EF472269.1 <i>Bacillus fusiformis</i> LQ88

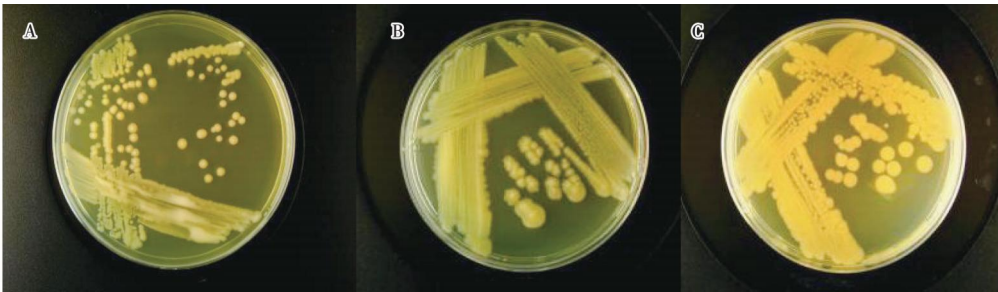


图 1 G115(A)、G119(B)和 G209(C)3 种促生细菌形态

2.2 促生细菌对人参幼苗的影响

2.2.1 促生细菌对人参幼苗生物量的影响 由表 2 可知,G115、G119、G209 三种不同的促生细菌处理人参幼苗组与对照组相比,叶干重并未受到显著影响,各处理人参叶干重基本稳定在 0.03~0.04 g。G119 和 G209 处理组的人参幼苗根鲜重均显著高于对照组,分别提高了 48.1%和 53.8%。G119 和 G209 两种促生细菌在促进人参幼苗根系生长方面具有显著效果。G155 处理组根鲜重与对照组无显著性差异。

2.2.2 促生细菌对人参土壤理化指标的影响 由表 3 可知,G115、G119、G209 三种不同的促生细菌处理组与对照组相比,人参土壤 pH、有机

质、土壤总氮均无显著性差异。G119 和 G209 处理有效磷含量显著高于对照处理,分别提高了 69.9%和 68.9%。G115 处理组与对照组有效磷含量无显著性差异。G119 和 G209 处理速效钾含量显著高于对照处理,分别提高了 8.6%和 13.4%。G115 处理组与对照组速效钾含量无显著性差异。

表 2 促生细菌对人参幼苗生物量的影响

处理	叶干重/g	根鲜重/g
CK	0.04±0.001 a	0.52±0.02 b
G115	0.03±0.002 a	0.54±0.02 b
G119	0.03±0.001 a	0.77±0.02 a
G209	0.04±0.001 a	0.80±0.02 a

注:同列数据不同小写字母表示菌种间在 P<0.05 水平差异显著。下同。

表 3 促生细菌对人参土壤理化性质的影响

处理	pH	有机质/(mg·kg ⁻¹)	总氮/(mg·kg ⁻¹)	有效磷/(mg·kg ⁻¹)	速效钾/(mg·kg ⁻¹)
CK	5.71±0.14 a	48.07±1.81 a	2.45±0.03 a	28.34±0.01 b	135.53±0.03 b
G115	5.60±0.21 a	48.33±1.22 a	2.45±0.02 a	27.00±0.01 b	133.93±0.02 b
G119	5.54±0.08 a	49.92±1.14 a	2.47±0.03 a	48.14±0.01 a	147.25±0.02 a
G209	5.58±0.11 a	49.38±0.83 a	2.46±0.04 a	47.87±0.01 a	153.63±0.02 a

2.2.3 促生细菌对人参土壤酶活性的影响 由表 4 可知,G119 和 G209 处理脲酶活性显著高于对照处理,均提高了 15.3%。G115 处理组与对照组脲酶活性无显著性差异。G119 和 G209 处理的蔗糖酶活性均显著高于对照组,均能有效提高土壤蔗糖酶活性。G115 处理组提升幅度相对较小,提高了 7.4%。G119 和 G209 处理组分别提高了 13.1%和 15.6%。

表 4 促生细菌对人参土壤酶活性的影响

处理	单位:mg·kg ⁻¹	
	脲酶	蔗糖酶
CK	8.86±0.45 b	49.85±2.25 b
G115	9.42±0.22 b	53.56±1.65 ab
G119	10.22±1.03 a	56.37±4.77 a
G209	10.22±0.85 a	57.62±3.52 a

2.3 促生细菌对人参根际细菌群落结构和组成的影响

2.3.1 测序结果及质量评估 经测序共获得 1 355 819 条双端序列,经过过滤和连接,得到 921 375 条有效序列,其中各样本特有序列平均为 5 402 个,平均读长为 416 bp。拼接和优化后的序列被随机抽平至 55 000 条用于后续生物信息

学分析。在 97%相似水平下进行 OTU 聚类以进行物种注释,15 个样品 OTU 数量为 3 139~3 599 个,总计产生 OTU 为 49 210 个。各样品的稀释性曲线均随测序的深入逐渐平缓并逐渐与横坐标平行,各样品的测序数量约为 55 000 条时测序趋向于饱和,说明此测序数据量能够体现各样品真实物种多样性。通过分析样本量饱和度,随样本数量的增加曲线趋于与横坐标平行,可知样本量足够,测序结果可用做进一步的多样性分析。

2.3.2 促生细菌对人参根际细菌群落组成和相对丰度的影响 由图 2 可知,3 种促生菌处理与清水对照处理人参根际细菌 8 个菌门相对丰度大于 1%,包括变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae),变形菌门是主要优势菌门,对比清水对照,3 种促生菌菌肥处理中,土壤中的变形菌门含量明显升高,硝化螺旋菌门含量减少。所有处理的优势菌门及各处理根系细菌门水平相对丰度差异较大,说明促生细菌改变了人参根际土壤细菌门的含量,根际细菌群落结构多样化。

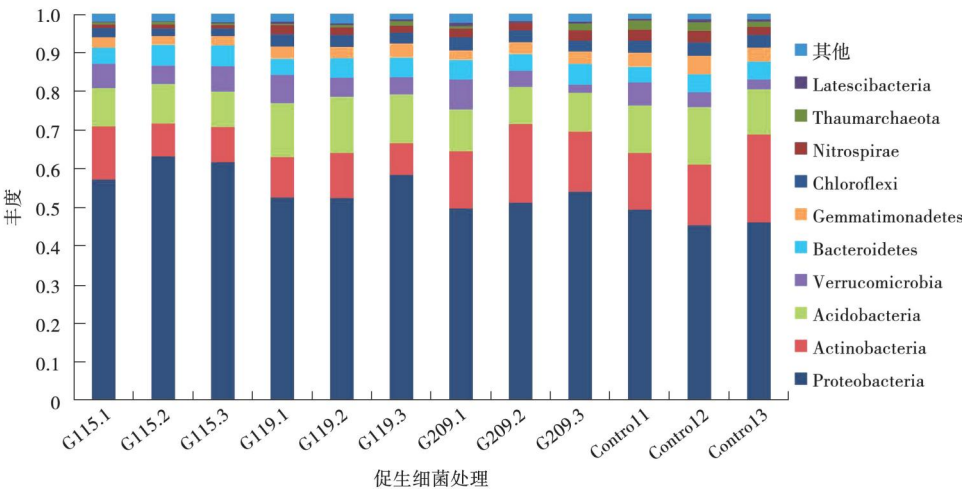


图 2 不同促生细菌处理下人参根际细菌门水平相对丰度

由图 3 可知,不同促生细菌处理后人参根际优势菌属整体上由多到少为硝脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、苯基杆菌属(*Pheny-*

lobacterium)、嘉利翁氏菌属(*Gaiella*)、鞘脂菌属(*Sphingobium*)、盐厌氧菌属(*Haliangium*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、贪噬菌属(*Variovorax*)和 *Rhizomicrobium*。各处理属水平相对

丰度范围分别为 2.41%~3.54%、2.06~3.04%、0.64%~2.27%、0.84%~2.03%、0.73%~1.58%、0.55%~1.55%、0.35%~1.49%和 0.28%~1.23%。以上结果表明,外源促生细菌处理对人参根际细菌属水平组成比例有

较大影响,通过外源促生细菌处理可改变根际细菌群落结构,有效地改变根际细菌的属水平组成比例,促进或抑制特定菌群的生长,从而优化根际微生态环境,为人参的生长提供更为有利的条件。

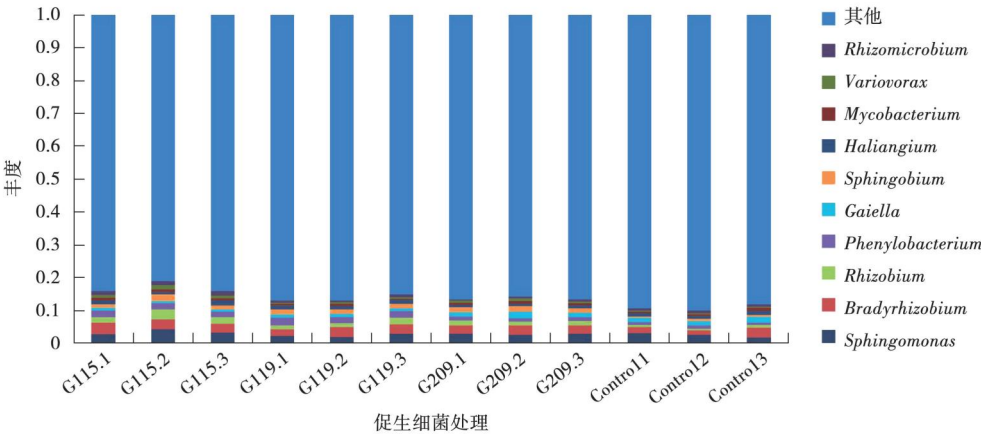


图 3 不同促生细菌处理下人参根际细菌属水平相对丰度

2.3.3 促生细菌对人参根际细菌群落影响的差异比较 对门、纲、目、科水平各处理菌群丰度进

行比较,其具有显著性差异 Biomaker 的进化分支图和差异菌属示于图 4~图 9。

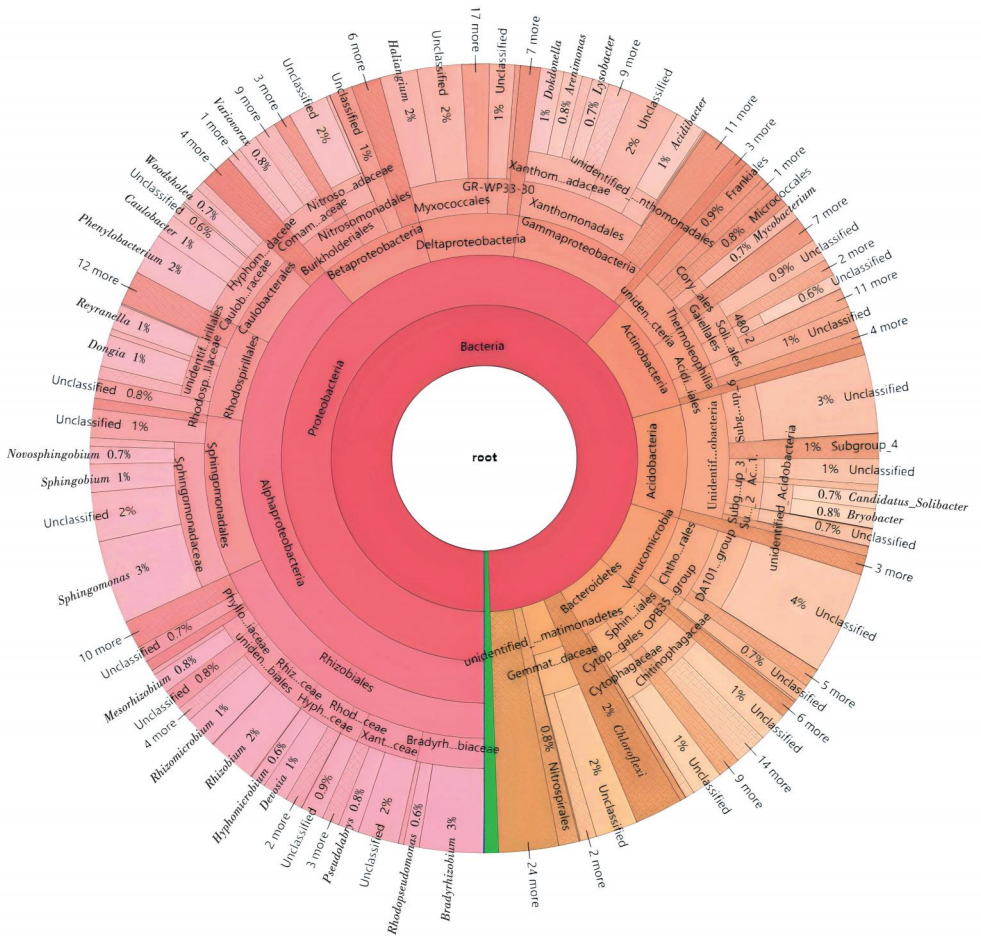


图 4 促生细菌 G115 处理下人参根际细菌进化分支图

由图 4 可知,G115 促生细菌处理与清水对照处理相比,显著增加菌群分类,包括门水平为变形菌门(Proteobacteria),纲水平为 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria),目水平为鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales),科水平为柄杆菌科(Caulobacteraceae)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae);显著减少的菌群包括门水平为放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria),纲水平为未鉴定的酸杆菌纲(Acidobacteria)、嗜热油菌纲(Thermoleophila)。

由图 5 可知,G119 促生菌处理与清水对照处理相比,显著增加菌群分类包括门水平为变形菌门(Proteobacteria),纲水平为 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria),目水平为鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales),科水平为鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae);显著减少的菌群门水平为放线菌门(Actinobacteria),纲水平为未鉴定的放线菌纲(Actinobacteria)、嗜热油菌纲(Thermoleophila),目水平为黄单胞菌目(Xanthomonadales)。

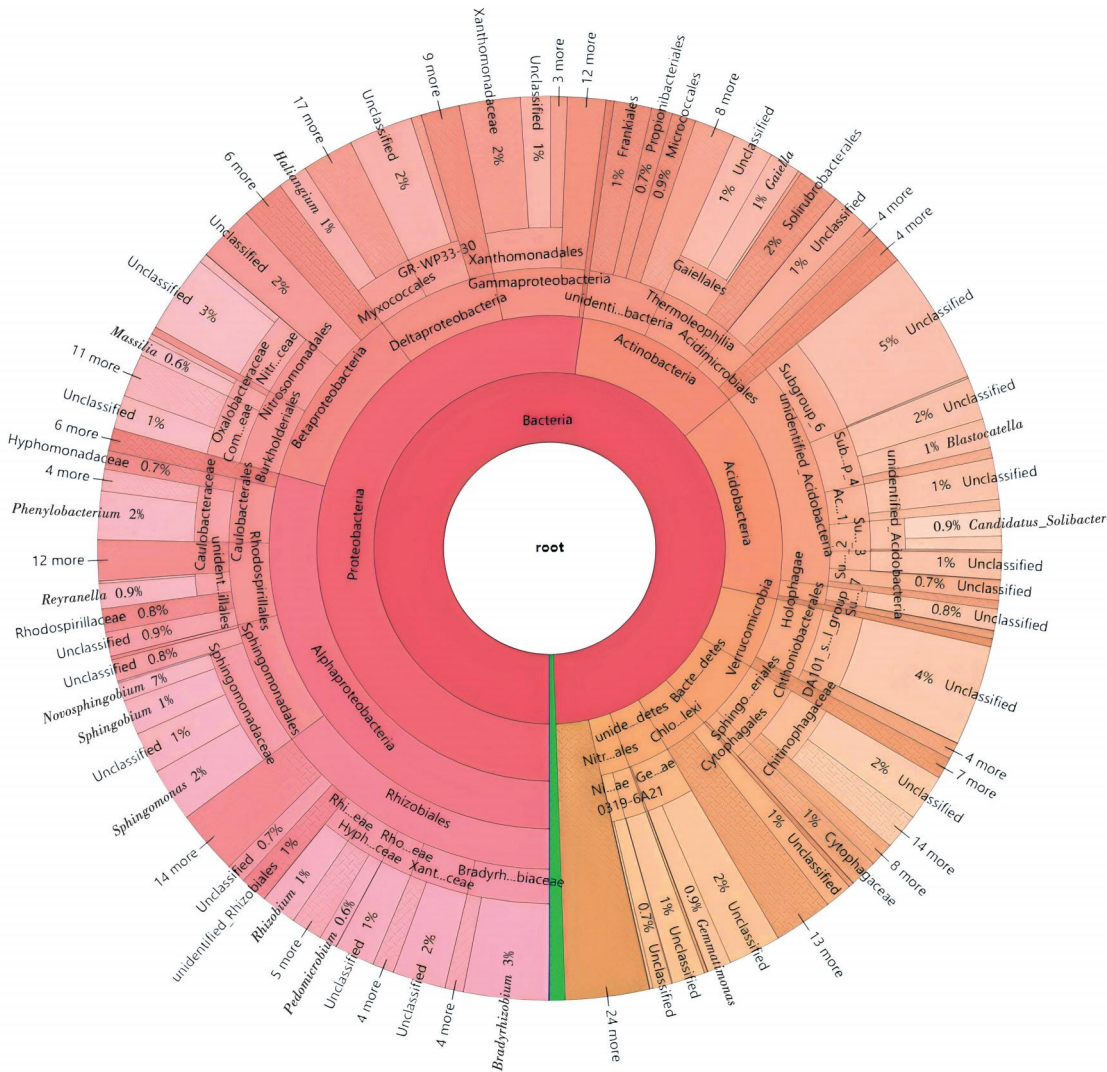


图 5 促生细菌 G119 处理下人参根际细菌进化分支图

由图 6 可知,G209 促生细菌处理与清水对照处理相比,显著增加菌群分类包括门水平为变形菌门(Proteobacteria),纲水平为 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria),目水平为鞘脂单胞菌目

(Sphingomonadales),科水平为鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae);显著减少的菌群包括门水平为放线菌门(Actinobacteria),纲水平为未鉴定的放线菌纲(Actinobacteria)。

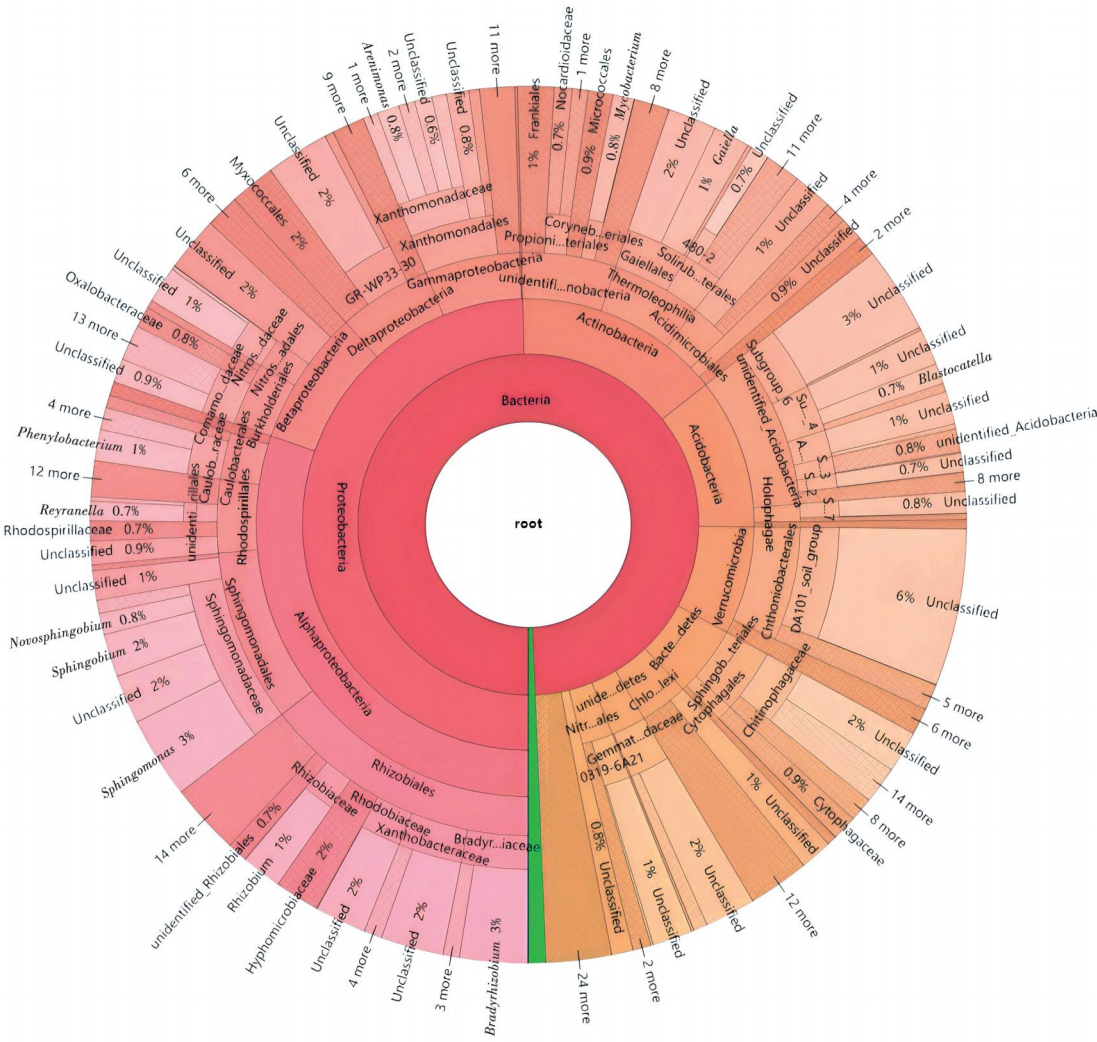


图 6 促生细菌 G209 处理下人参根际细菌进化分支图

由图 7 可知,G115 促生菌处理后显著增加且丰度大于 1% 的菌属包括根瘤菌属(*Rhizobium*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)、*Rhizomicrobium*、柄杆菌属(*Caulobacter*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和独岛杆菌属(*Dokdonella*),其比对照增加的比例分别为 254.69%、190.63%、185.71%、284.62%和 180.00%;显著减少的菌属相对丰度均低于 1%,包括土微菌属(*Pedomicrobium*)等。

由图 7 可知,G115 促生菌处理后显著增加且丰度大于 1% 的菌属包括根瘤菌属(*Rhizobium*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)、*Rhizomicrobium*、柄杆菌属(*Caulobacter*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和独岛杆菌属(*Dokdonella*),其比对照增加的比例分别为 254.69%、190.63%、185.71%、284.62%和 180.00%;显著减少的菌属相对丰度均低于 1%,包括土微菌属(*Pedomicrobium*)等。

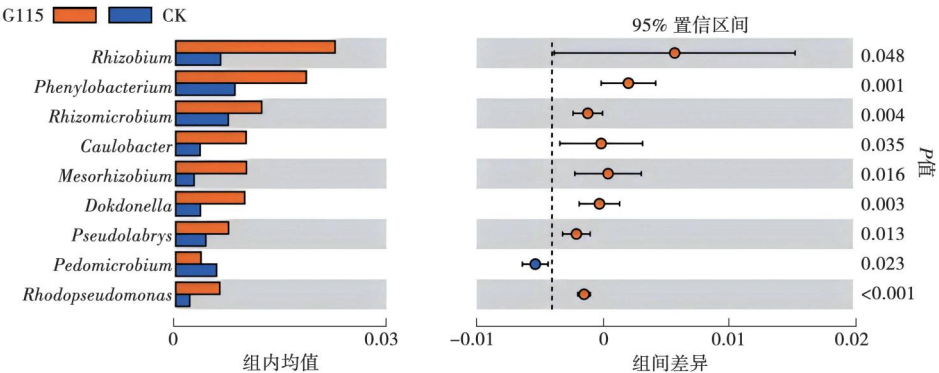


图 7 促生细菌 G115 处理下人参根际细菌差异比较

由图 8 可知,G119 促生菌处理后显著增加且丰度大于 1% 的菌属包括根瘤菌属(*Rhizobium*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)和鞘脂菌属(*Sphingobium*),其增加的比例分别为 132.81%、

141.67%和 156.36%;显著减少的菌属相对丰度均低于 1%,包括酸胞菌属(*Acidbacter*)、木洞菌属(*Woodsholea*)和红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)等。

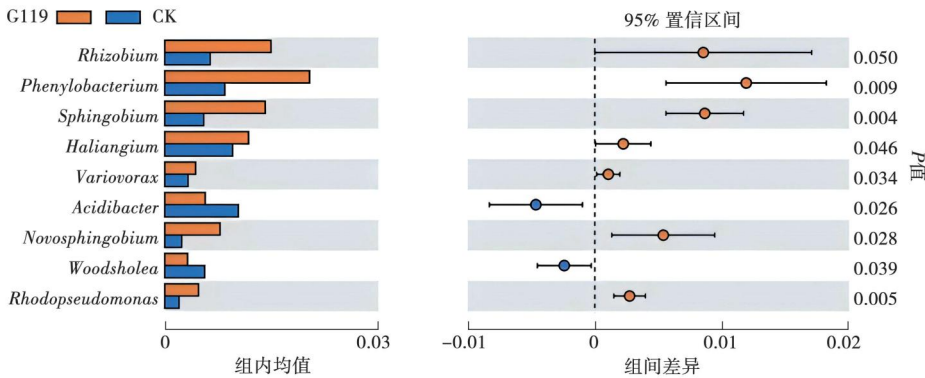


图 8 促生细菌 G119 处理下人参根际细菌差异比较

由图 9 可知,G209 促生菌处理后显著增加且丰度大于 1% 的菌属包括根瘤菌属(*Rhizobium*)和鞘脂菌属(*Sphingobium*),其比对照增加的比例分别

为 126.67%和 210.00%。

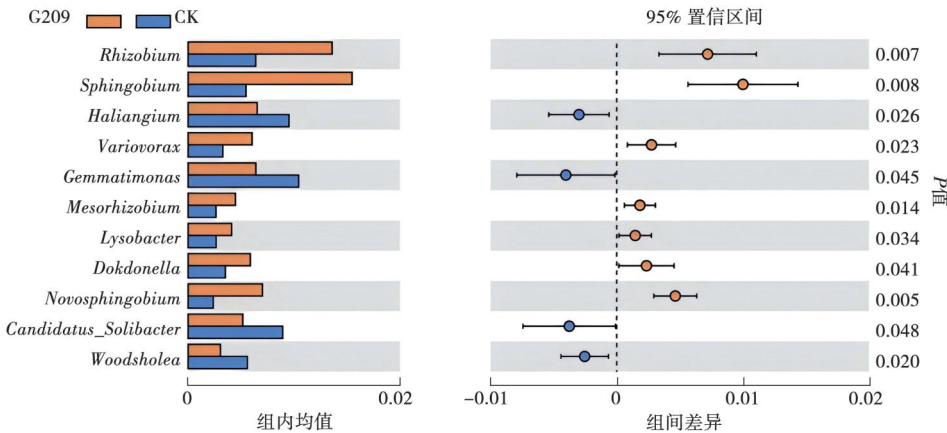


图 9 促生细菌 G209 处理下人参根际细菌差异比较

综上可知,G115、G119 和 G209 促生细菌处理对人参根际细菌属水平影响较大,其中,根瘤菌属(*Rhizobium*)是促生菌处理后与对照差异显著且丰度大于 1% 的共有菌属,所有丰度大于 1% 的属促生菌处理后其增加的相对丰度比例均在 120% 以上。

不同促生菌处理与清水对照处理的根际细菌属水平差异比较结果表明,不同促生菌间对属水平上的根际细菌群落组成和丰度的影响有显著的遗传差异,通过外源促生菌处理可以改变人参属水平上的根际细菌群落组成和丰度,进而改变属水平上的根际细菌遗传多样性。

2.4 促生细菌对人参根际细菌群落多样性的影响

由图 10 可知,各处理的 Shannon 指数由大到小依次为 CK、G119、G209、G115,其中 G119 和 G209 促生菌处理与清水对照处理相比无显著性差异,G115 处理与清水对照处理相比差异显著;各处理的 Simpson 指数由大到小依次为 CK、G119、G209、G115,其中 G119 和 G209 促生菌处理与清水对照处理相比无显著差异,G115 促生菌处理与清水对照处理相比差异显著;各处理的 Chao1 指数由大到小依次为 CK、G209、G119、G115,其中 G119 和 G209 促生菌处理与清水对

照处理相比无显著差异, G115 促生菌处理与清水对照处理相比差异显著; 各处理的 ACE 值由大到小依次为 CK、G209、G119、G115, 其中 G119 和 G209 促生菌处理与清水对照处理相比无显著差异, G115 促生菌处理与清水对照处理相比差异显著。

由以上结果可知, G119 和 G209 促生菌处理后的人参根际细菌群落多样性和丰富度基本不变, 而 G115 促生菌处理后人参根际细菌群落多样性和丰富度反而均降低。说明通过外源促生菌处理可改变人参根际细菌群落多样性和丰富度, 但不同促生菌间效果差异很大, 既有多样性和丰富度改变较小的促生菌, 也有显著降低的促生菌, 因促生菌种类不同而异。

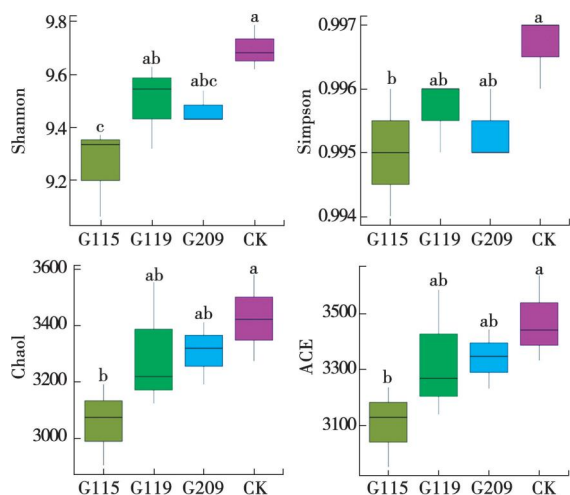


图 10 不同促生细菌处理下人参根际细菌 Alpha 多样性指数

2.5 促生细菌对人参根际细菌群落功能的影响

促生细菌处理和清水对照处理的根际细菌在一级功能层均获得 6 个方面的生物代谢功能, 包括有机系统 (Organismal Systems)、新陈代谢 (Metabolism)、环境信息处理 (Environmental Information Processing)、遗传信息处理 (Genetic Information Processing)、细胞过程 (Cellular Processes) 和人类疾病 (Human Diseases), 其中有机系统、遗传信息处理、环境信息处理是占比最多的功能 (>90%), 各处理之间在一级功能层预测的基因数无显著差异。

促生细菌处理和清水处理对照的根际细菌获得的二级功能层, 包括膜转运 (Membrane Transport)、氨基酸代谢 (Amino Acid Metabolism)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate Metabolism)、复制和修复 (Replication and Repair) 等 35 种预测功能, 其中 G119 促生菌处理与清水对照处理相比预测基因

拷贝数增加的功能体现在信号分子和互作 (Signaling Molecules and Interaction)、信号转导 (Signal Transduction)、细胞过程和信号 (Cellular Processes and Signaling)、细胞活动 (Cell Motility)、循环系统 (Circulatory System)、感染疾病 (Infectious Diseases)、细胞生长和死亡 (Cell Growth and Death) 等方面; 而 G119 促生菌处理与清水对照处理相比预测基因拷贝数减少的功能体现在包括碳水化合物代谢、氨基酸代谢等方面。

促生菌处理和清水对照处理的根际细菌获得的三级功能层, 包括转运体 (Transporters)、ABC 转运体 (ABC transporters)、DNA 修复和重组蛋白 (DNA repair and recombination proteins)、双组分系统 (Two component system)、细菌移动蛋白 (Bacterial Motility Proteins) 等 33 种预测功能 (图 11), 其中 G119 促生菌处理与清水对照处理相比预测基因拷贝数增加的功能体现在分泌系统 (Secretion System)、双组分系统、染色体 (Chromosome)、伴侣和折叠催化剂、细菌移动蛋白和其他未知功能等方面, 而 G119 促生菌处理与清水对照处理相比预测基因拷贝数减少的功能体现在包括丙酮酸盐代谢、膜代谢、糖酵解和糖异生等方面。

由以上结果可知, 通过外源促生细菌处理可改变人参根际细菌多方面的功能, 改变功能的效果是双向, 既有增加的效果, 也有降低的效果。

3 讨论

3.1 不同促生菌对人参幼苗生物量、根际土壤理化指标和酶活的变化

在本研究中, 3 种促生细菌对人参生长的影响程度随接种分离株的不同有差异。生物量结果根鲜重方面来看, G209 和 G119 菌株的生长均明显优于对照。何艳慧^[17]所用的促生菌株 Rs-198 可以显著提高辣椒根部的生物量。本研究与前人的结果一致, 芽孢杆菌属和苍白杆菌属分离株与未接种对照相比, 产量有所提高^[18]。同时何艳慧^[17]的结果表明, 3 种促生细菌复配施用在不发生病害的情况下可以获得最高生物量和产量。G204 分离株具有所评价的所有促生特性, 但效果不是最好的, 表示植物促生长机制可能没有叠加, 也可能存在替代, 类似的结果已经得到证实^[19]。植物根系活力会影响根系分泌物或根际微生物对土壤酶活性的影响^[20], 表明这是植物与土壤相互作用的重要指标。

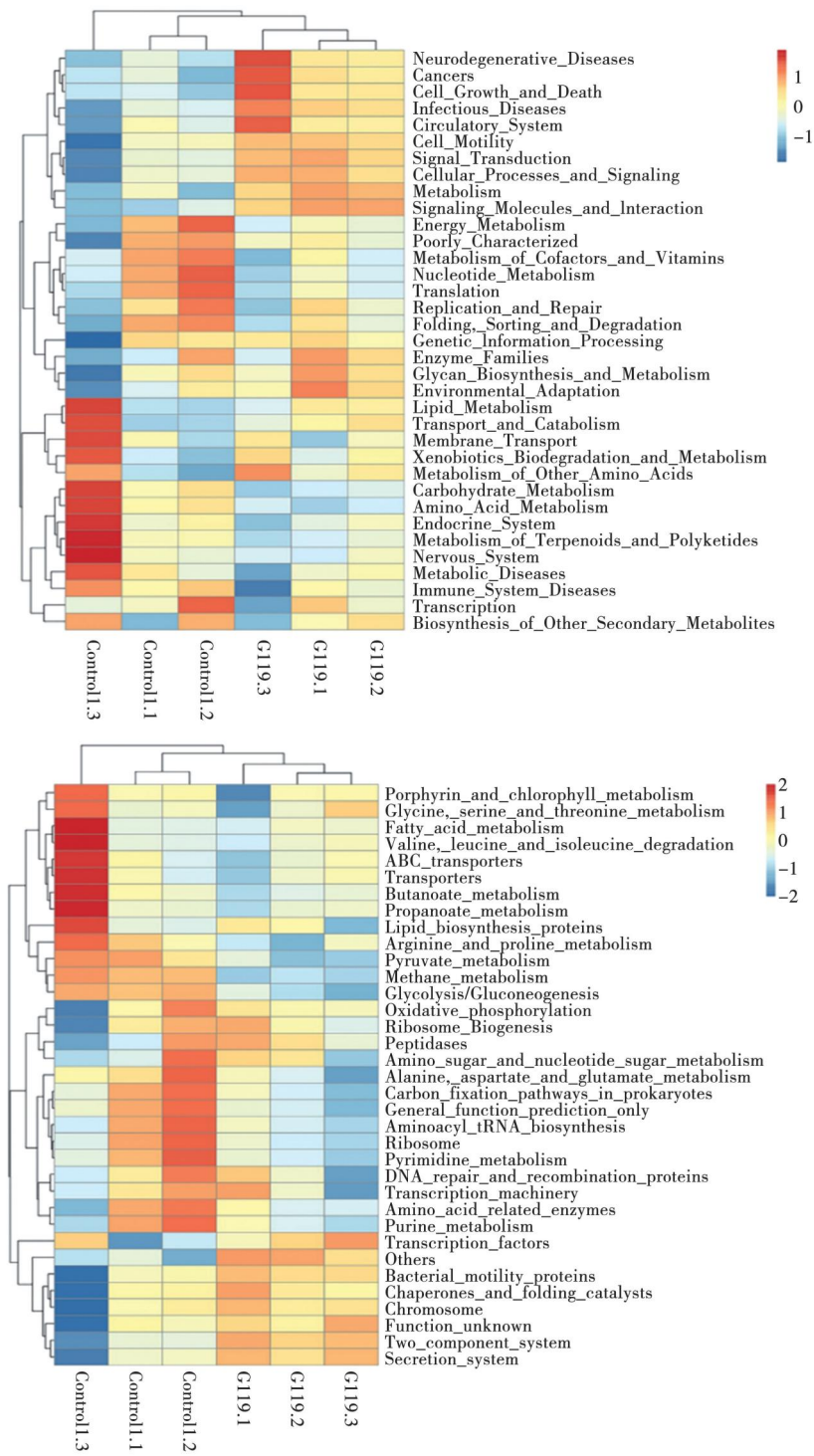


图 11 不同促生菌处理下人参根际细菌预测基因功能热图

3.2 不同促生菌对人参根际土壤微生物群落组成的变化

虽然微生物肥料已投放市场,并对其中使用的菌种进行了研究,但对向当地土壤微生物群落中添加大量外来微生物的影响研究不足。有必要评估微生物群落转移的重要性,以及它们如何影

响土壤和作物,便于精准添加,从而改变土壤在养分循环中的性能和促进植物生长的能力^[21]。细菌群落结构的变化直接影响着土壤的质量和健

际和叶片时,并未对生菜根际的细菌群落结构产生显著影响。与此相反,本研究通过外源促生菌处理可以改变人参根际细菌群落门水平和属水平的组成和丰度以及细菌群落多样性和丰富度,但不同促生菌间效果差异很大。李旖曦等^[24]通过接种外源植物促生细菌(Plant Growth-Promoting Bacteria,PGPB)显著改变蜈蚣草根际微生物群落的相对丰度、均匀度和结构组成,其中变形菌门、放线菌门对外源 PGPB 的响应较显著。本研究与前人的结果一致,不同处理促生菌处理对人参根际细菌门水平、属水平影响均较大,变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)是所有处理的优势菌门,各处理根际细菌门水平相对丰度差异较大;根瘤菌属是促生菌处理后与对照差异显著且丰度大于 1% 的共有菌属,所有丰度大于 1% 的菌属在促生菌处理后其增加的相对丰度比例均在 120% 以上,促生菌处理后根际土壤中根瘤菌相对丰度增加,与既往报道结果一致^[25-26],这可能成为其作为 PGPB 应用的间接有利因素。G119 和 G209 处理后的人参根际细菌群落多样性和丰富度基本没有变化,而 G115 处理后人参根际细菌群落多样性和丰富度反而降低。由此可见,促生菌不仅具有促进人参生长的直接功能,而且还间接对根际细菌群体结构和多样性产生影响。因此,在验证促生菌促生功能以外有必要进行根际微生态变化的考量。

本研究筛选出的 3 个菌种有望在人参生产中发挥重要作用,在人参生长的关键阶段引入这 3 个菌种,减少化肥农药的使用,能够保障人参的品质与安全。考虑将这 3 种菌进行组合应用,以发挥其协同作用,进一步提高防治效果。对此,课题组将继续研究优异促生菌制备复合应用型菌肥,将其进行不同配比和时间施用后对人参的响应状况做进一步分析评价。对于实际应用中的复杂环境还需进一步验证和优化,开展更多的田间试验和实际应用研究,以验证菌种在实际生产中的效果和可行性。针对不同的人参种植区域和土壤条件,制定相应的菌种应用方案。由于不同的地理环境和土壤条件可能对菌种的生长和活性产生影响,因此,在实际应用中,需要根据当地的具体情况,选择合适的菌种类型和配比,以达到最佳的生产效果。结合人参的生长习性和栽培环境,调整菌种的配比和使用方式,以实现最佳防治效果,为人参促生新型复合菌肥的推广应用奠定基础。

4 结论

综上所述,采用接种人参根际促生细菌 G115、G119 和 G209 的农田栽参试验,明确 3 种菌的促

生效应以及不同时间施加对土壤中微生物的影响。研究表明,3 种外源促生细菌处理显著改善土壤有效磷、速效钾含量,以及土壤酶活性,提高了人参的根鲜重;外源促生细菌处理可改变根际优势菌门的组成和比例,不同促生菌对根际细菌门水平和属水平的群落组成和丰度的影响存在显著的遗传差异,其中根瘤菌属是 3 种促生细菌处理后与对照差异最显著且丰度大于 1% 的共有菌属。同时,外源促生细菌处理可改变人参根际细菌群落的遗传多样性,显著增加根系分泌物、细菌感受信号等功能。

参考文献:

- [1] SHIN K, GUO H Y, CHA Y, et al. CereboostTM, an American ginseng extract, improves cognitive function *via* up-regulation of choline acetyltransferase expression and neuroprotection[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2016, 78: 53-58.
- [2] KLOPPER J W, SCHROTH M N, VÉGÉTALE ET P B. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes [C]. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Tours, France, 1978: 879-882.
- [3] 贺文婧, 陆旭桐, 蒋毅宁, 等. 植物根际促生菌研究文献计量分析[J]. 土壤通报, 2023, 54(4): 978-988.
- [4] LIU L, LI Y H, LI S L, et al. Comparison of next-generation sequencing systems[J]. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2012, 2012: 251364.
- [5] MOROZOVA O, MARRA M A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics [J]. Genomics, 2008, 92(5): 255-264.
- [6] 何宛晟, 卢广林, 赵权, 等. 不同改良剂对人参土壤及其生长发育的影响[J]. 分子植物育种, 2018, 16(20): 6826-6831.
- [7] 董林林, 徐江, 牛玮浩, 等. 改良措施对农田土壤微生物生态及人参育苗率的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4334-4339.
- [8] 姬文秀, 李虎林, 冷雪, 等. 产 ACC 脱氨酶人参内生细菌的分离和促生特性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(2): 168-174.
- [9] 祁瑜, 黄永梅, 王艳, 等. 施氮对几种草地植物生物量及其分配的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(18): 5121-5129.
- [10] TU X J, HU Z B, ZHAO T, et al. High-throughput determination of the organic matter content in soil and municipal sludge by headspace gas chromatography[J]. Analytical Methods, 2019, 11(47): 5963-5968.
- [11] 毛雪梅. 土壤中有效氮、磷、钾测定方法相关性研究[J]. 世界有色金属, 2020(4): 160-161.
- [12] PIOTROWSKA A, WILCZEWSKI E. Effects of catch crops cultivated for green manure and mineral nitrogen fertilization on soil enzyme activities and chemical properties [J]. Geoderma, 2012, 189: 72-80.
- [13] HAN L L, SU D R, LV S H, et al. Responses of biogeochemical characteristics and enzyme activities in sediment to climate warming under a simulation experiment in geographically isolated wetlands of the Hulunbuir Grassland, China[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(9): 968.
- [14] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2014, 11(10): 973-975.

- 2013, 10(10): 996-998.
- [15] XU J, YANG Q. Isolation and characterization of rice straw degrading *Streptomyces griseorubens* C-5 [J]. Biodegradation, 2010, 21(1): 107-116.
- [16] PRICE M N, DEHAL P S, ARKIN A P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(7): 1641-1650.
- [17] 何艳慧. 解盐促生菌 *Pseudomonas* sp. rs-198 全基因组学分析及其与植物根际互作机制研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2020.
- [18] HAHM M S, SUMAYO M, HWANG Y J, et al. Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(3): 380-385.
- [19] ISLAM S, AKANDA A M, PROVA A, et al. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 6: 1360.
- [20] KONG L, WANG Y B, ZHAO L N, et al. Enzyme and root activities in surface-flow constructed wetlands[J]. Chemosphere, 2009, 76(5): 601-608.
- [21] PEREIRA E SILVA M C, SEMENOV A V, SCHMITT H, et al. Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 57: 995-1002.
- [22] RUTGERS M, VAÑV I, WIND B, et al. Rapid method for assessing pollution-induced community tolerance in contaminated soil [J]. Environ Toxicol Chem, 1998, 17: 2210-2213.
- [23] KRÖBER M, WIBBERG D, GROSCH R, et al. Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 252.
- [24] 李旖曦, 陈涵冰, 王耀强, 等. 耐砷促生菌对超富集植物蜈蚣草砷吸收及根际微生物群落的调控作用[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2401-2414.
- [25] PRAKAMHANG J, TITABUTR P, BOONKRD N, et al. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application [J]. Applied Soil Ecology, 2015, 85: 38-49.
- [26] YADAV J. Enhancement of nodulation and yield of chickpea by coinoculation of Indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth-promoting rhizobacteria in Eastern Uttar Pradesh [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2012, 43: 605-621.

Effects of Three Types of Growth-Promoting Bacteria on Growth and Rhizosphere Bacterial Population of Ginseng

WANG Qiuyu, WANG Yue, NIU Fuao, HAN Dan, NAN Li

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In order to promote soil improvement of ginseng fields and development of functional microbial fertilizer, three kinds of plant growth-promoting bacteria (*Erwinia* G115, *Ochrobactrum* G119 and *Lysinibacillus* G209) were used to treat the soil of ginseng fields. The composition structure of ginseng rhizosphere bacterial population, soil physical and chemical properties and the growth status of ginseng seedlings were measured to study the growth-promoting effect of rhizosphere growth-promoting bacteria on ginseng and its effect on rhizosphere microbial community and function. The results indicated that compared to the control group, the treatments with growth-promoting bacteria on ginseng seedlings showed insignificant changes in rhizosphere soil organic matter, total nitrogen, pH, and leaf dry weight, whereas there were significant differences observed in available phosphorus, available potassium, invertase, rhizosphere soil urease, and root fresh weight. Compared with the control group, the treatments with the three growth-promoting bacteria revealed that the relative abundance of eight bacterial phyla in the ginseng rhizosphere, including Proteobacteria and Actinobacteria, exceeded 1% at the phylum level. Among these, Proteobacteria was the dominant phylum. The three growth-promoting bacteria treatments had a significant impact on the genus level of bacteria in the ginseng rhizosphere. Specifically, *Rhizobium* was a common genus that showed significant differences and an abundance greater than 1% after treatment with growth-promoting bacteria compared to the control. For all genera with an abundance greater than 1%, the relative abundance proportion increased by more than 120% after treatment with the growth-promoting bacteria. By using PICRUST software, the functional profiles of bacterial communities in the ginseng rhizosphere after treatment with the three growth-promoting bacteria were predicted, yielding six categories of biological metabolic functions at the Level 1 functional layer, 35 predicted functions at the Level 2 functional layer, and 33 predicted functions at the Level 3 functional layer. Compared to the control group, exogenous application of growth-promoting bacteria could alter various functions of bacteria in the ginseng rhizosphere, and the effects of these changes were bidirectional, resulting in both increases and decreases in functionalities. The treatment of exogenous PGPB changed the genetic diversity of the bacterial community in ginseng, and significantly increased the functions of root exudates and bacterial sensing signals.

Keywords: *panax ginseng*; growth-promoting bacteria; rhizosphere bacteria; population structure; function prediction