



研究报告

云南文山健康三七种植年限对根际微生物群落的影响

唐彬彬^{1,2} 董姚君^{1,2} 贺密密^{1,2} 刘健峰^{1,2} 吴凯^{*1,2} 官会林¹ 赵立兴³ 尹芳^{1,2}
张无敌^{1,2} 龚明¹

1 云南师范大学 云南 昆明 650500

2 云南师范大学云南省沼气工程技术研究中心 云南 昆明 650500

3 云南大学微生物研究所 云南 昆明 650091

摘要:【背景】三七的连作障碍与微生物区系失衡有一定关联,了解种植年限对三七微生物区系的影响,判断根际微生物区系是否失衡,对三七连作障碍的防治具有重要意义。【目的】探究文山不同种植年限健康三七根际土壤细菌和真菌群落结构、多样性差异,以及与种植年限之间的关联,为后续缓解三七连作障碍提供理论依据。【方法】采集一年生、二年生和三年生健康三七根际土壤,采用16S rRNA 基因和 ITS 序列进行高通量测序。对测序结果进行分析,比较一年生、二年生和三年生健康三七根际土壤细菌和真菌的多样性和群落分布规律及与种植年限的关联。【结果】一年生健康三七根际细菌和真菌群落的 α 指数均显著高于二年生和三年生。通过 β 多样性分析发现,一年生健康三七根际土壤中真菌群落结构与其他年限的真菌群落结构有较大差异。相关性分析结果表明,真菌的均匀度和香农指数与种植年限呈现显著的负相关性,其余指数不显著相关。三七根际丰富度前三的门和属,除 *Acidobacteria* 和 *Aquicella* 丰富度随着三七种植年限的增加而显著增加外,其余群落丰度都与种植年限呈负相关。细菌中 *Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 和真菌中 *Ascomycota*、*Basidiomycota*、*Chytridiomycota* 的丰富度随着种植年限增加而降低。在属水平上,细菌中 *Opitut* 和真菌中 *Mortierella*、*Clitopilus*、*Pholiota* 的丰富度随着三七种植年限的增加而降低。在二年生三七根际土壤中病原真菌 *Alternaria*、*Cylindrocarpon*、*Fusarium* 和 *Pestalotiopsis* 的丰富度低于一年生和三年生,而有益真菌 *Mucor* 和 *Bacillus* 的丰富度却呈相反趋势。同时,有益细菌 *Flavobacterium* 和有益真菌 *Myxocephala*、*Aspergillus* 的丰富度随着种植年限的增加呈下降趋势。【结论】三七种植年限的增加,会引起三七根际微生物区系失衡,增加根际病原真菌属的丰度,同时降低一些有益真菌属的丰度。

关键词: 三七, 种植年限, 高通量测序, 根际微生物区系

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51366015, 41661069); Science and Technology Programs of Yunnan Province (2016FB076, 2016FD019); Science Foundation of Yunnan Provincial Education Department (2015Y107); China Postdoctoral Science Foundation (2015M582765XB); Collaborative Innovation Center for Renewable Energy Research and Development in Southwestern China (05300205020516009)

***Corresponding author:** E-mail: kaiwu8868@hotmail.com

Received: 05-03-2020; **Accepted:** 26-05-2020; **Published online:** 30-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(51366015, 41661069); 云南省应用基础研究计划(2016FB076, 2016FD019); 云南省教育厅科研基金(2015Y107); 中国博士后面上项目(2015M582765XB); 西南地区可再生能源研究与开发协同创新中心联合资助项目(05300205020516009)

***通信作者:** E-mail: kaiwu8868@hotmail.com

收稿日期: 2020-03-05; **接受日期:** 2020-05-26; **网络首发日期:** 2020-06-30

Effects of different planting years of healthy *Panax notoginseng* on the rhizosphere microbial community in Wenshan of Yunnan province

TANG Bin-Bin^{1,2} DONG Yao-Jun^{1,2} HE Mi-Mi^{1,2} LIU Jian-Feng^{1,2} WU Kai^{*1,2}
GUAN Hui-Lin¹ ZHAO Li-Xing³ YIN Fang^{1,2} ZHANG Wu-Di^{1,2} GONG Ming¹

1 Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Yunnan Research Center of Biogas Engineering and Technology, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

3 Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China

Abstract: [Background] The severe continuous cropping obstacles of *Panax notoginseng* may be related to the microbial community imbalance. Hence, it is important to know whether the microflora could be imbalanced with the change of planting years of *Panax notoginseng* during the planting process. **[Objective]** Structure and diversity differences of bacterial and fungal communities in rhizosphere soils of healthy *Panax notoginseng* with different planting years were studied. Our research can also provide theoretical basis for further reducing *Panax notoginseng* monocropping obstacle. **[Methods]** The samples were collected from *Panax notoginseng* healthy rhizosphere soil planting for one-, two- and three-year in Yanshan county of Wenshan. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene and ITS genes were used to compare the diversity and community distribution of bacterial and fungal in rhizosphere soils of healthy *Panax notoginseng* planting for one-, two- and three-year. **[Results]** The alpha indices of the one-year healthy rhizosphere bacterial and fungal rhizosphere communities were obviously higher than those of the two- and three-year samples. The results of beta diversity revealed that the bacterial community structures in the one-year *Panax notoginseng* rhizosphere were different with other treatments. The results of correlation analysis showed that the equitability and shannon indices of fungi showed significant negative correlations with planting years, while the other indices were not significantly correlated. The abundances of *Acidobacteria* and *Aquicella* increased with the plantation year, while other top three phylum and genus were all negatively related to the planting years. Among them, the abundance of *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Chytridiomycota* phylum decreased with planting years increasing. At the genus level, the abundances of *Opitutus* of bacteria, *Mortierella*, *Clitopilus* and *Pholiota* of fungi decreased with planting years increasing. The abundances of *Alternaria*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium* and *Pestalotiopsis* genus of two-year rhizosphere soil would be lower than that of one- and three-year treatments, while the abundances of *Mucor* and *Bacillus* would show opposite trend. Meanwhile, the richness of the beneficial bacteria like *Flavobacterium*, beneficial fungi like *Myxocephala* and *Aspergillus* decreased with planting years increasing. **[Conclusion]** With the increase of *Panax notoginseng* planting years, the microbial community of *Panax notoginseng* rhizosphere was imbalanced. The abundances of pathogenic fungal genus were enhanced with planting years increasing, while the abundances of beneficial fungal genus were decreased.

Keywords: *Panax notoginseng*, Planting years, High-throughput sequencing, Rhizosphere microflora

三七(*Panax notoginseng*)是五加科植物, 又称文三七、田七, 是著名的道地药材, 具有化瘀止血、活血定痛的功效。三七和人参同属五加科, 为多年生作物, 两者都有严重的连作障碍, 这可能与其种植一个周期后引起的自毒物质积累和微生物区系

失衡有关^[1-2]。连作障碍产生的原因主要有根际土壤微生物群落变化、土传病虫害增加、化感物质积累及土壤理化性状恶变等多个方面。同时, 土壤中的营养成分过剩或者缺乏(营养失衡)会导致植物生长变弱, 而连作会使土壤的微生态环境发生改

变,使得土壤病原菌增多^[3]。Ying 等^[4]对人参土壤根际微生物群落代谢功能影响的研究发现,连作会较大幅度地改变根际微生物,表现为对病原菌的拮抗减弱,使其成为优势菌群,造成微生物区系失衡。然而谢秋丽^[5]通过田七根际土壤微生物群落研究发现,随着田七株龄的增加,根际微生物环境发生改变;此外,微生物的数量和结构也发生变化,其中,放线菌、细菌和真菌的数量都有不同程度的减少。

根际微生物生活于植株根部,与植株和周围土壤之间发生着各种关系,对其在土壤和植株根部生态功能的了解,能够为生防菌的有效施用提供理论依据和技术指导^[6]。同时,根际土壤细菌、放线菌的数量和土壤总呼吸速率与植物种植时间变化有关^[3,7]。根际土壤微生物的数量、种类、代谢活性以及微生物间的相互作用决定着植物的健康状况^[8]。三七种植对土壤中的微生物、土壤酶、土壤养分都会产生影响^[3]。在不同的种植年限中,三七土壤根际微生物群落可能有着较大的差异性,而这些差异性可能会造成微生物区系失衡,从而引起严重的连作障碍。

因此,探究不同种植年限的健康三七根际微生物区系,有助于了解是否在种植过程中微生物区系会随着三七种植年限的变化而失衡,使得益生微生物种群减少而富集有害微生物种群,以期为进一步缓解三七连作障碍提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

土壤样品于 2016 年 5 月采集自云南省文山壮族苗族自治州砚山县苗乡科技公司三七种植基地。三七根际土壤获取方法参照文献^[9]: 一年生、二年生和三年生健康三七连根带土放入袋中,而后将三七根部用力抖动,抖下来的土即为土体土壤,剩下的附着于根部薄层 1–2 mm 的土壤即为根际土壤。一年生三七是由种子发芽生长而来;二年生三七是指移栽的三七籽条(已经生长一年)发芽生长

而来;三年生三七是二年生苗发芽生长而来。每个处理采集 3 个重复的样品。上述采集土壤为砖红壤。采集的根际土壤用于提取土壤总 DNA 及后续高通量测序。

1.1.2 主要试剂和仪器

PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO 公司。MiSeq PE250 测序平台, Illumina 公司。

1.2 根际土壤总 DNA 的提取

按照 PowerSoil DNA Isolation Kit 说明书提取土壤总 DNA,步骤简述如下: 首先称取 0.7 g 的 -80 °C 存放的土壤样品加入 PowerBead 管中,轻轻旋转混合,然后按照相应步骤分别用 C1–C6 试剂提取,获得土壤总 DNA。最后土壤总 DNA 通过凝胶电泳确认。

1.3 PCR 扩增和 MiSeq 测序

细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增使用的通用引物^[10]为 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'); 真菌 ITS 的 PCR 扩增使用的通用引物^[11]为 ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。以所提取的土壤总 DNA 为模板进行 PCR 扩增^[10], PCR 扩增产物纯化后进行文库构建及上机测序,由南京派森诺基因科技有限公司完成。

1.4 MiSeq 数据提取

在测试数据的基础上,通过 QIIME 软件根据相应的 Barcode 信息对测序后的原始序列进行各样品的序列分配,并且根据细菌和真菌引物去除接头和引物序列,通过序列质控,去除低质量的序列^[12]。然后,细菌和真菌分别使用 Greengenes 13_8 数据库^[13]和 UNITE 数据库^[14]进行比对,完成筛选后的序列在 97%水平上生成操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)表格。利用 UCHIME 去除嵌合体之后^[15],在细菌 80%和真菌 50%的置信度阈值内,将 16S rRNA 基因序列及 ITS 序列通过 RDP Classifier 分别与 RDP 16S rRNA 基因数据库^[16]和 ITS 数据库比对分类,获得分类数据。

1.5 群落数据分析

依据 OTU 聚类结果, 用 QIIME 软件对 OTU 进行 α 多样性计算分析, 以得到相应的指数 ACE、Chao1、Shannon、Equitability。其中, ACE 用来估计群落中含有 OTU 数目的指数, 是生态学中估计物种总数的常用指数之一; Chao1 指数在生态学中常用来估计物种总数; Shannon 值越大, 说明群落多样性越高; Equitability 根据 Shannon 指数值计算, 其值越大表明物种丰度分布越均匀, 当其值为 1 时表明样品中的物种丰度分布绝对均匀。对于 β 多样性, 使用 R 软件进行 Bray-Curtis 距离分析, 并且绘制主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA), 以得到分组的群落结构差异。

1.6 数据统计学分析

使用 Excel 2016 和 SPSS Statistics 17 软件处理数据, 并利用 Origin 9 作图。

2 结果与分析

2.1 不同种植年限健康三七根际微生物区系 α 多样性分析

通过对不同种植年限健康三七根际细菌 α 多样性指数分析发现, 细菌多样性并没有随着三七种植年限的增加而形成增加或递减的趋势, 而是形成一个 U 型的曲线(图 1)。其中, 三七种植第一年的 ACE、Chao1 和 Shannon 指数最高, 均匀度也更好。随着种植年限的增加, 种植第二年的细菌 α 多样性指数均显著降低。但是三七生长到第三年时, 细菌

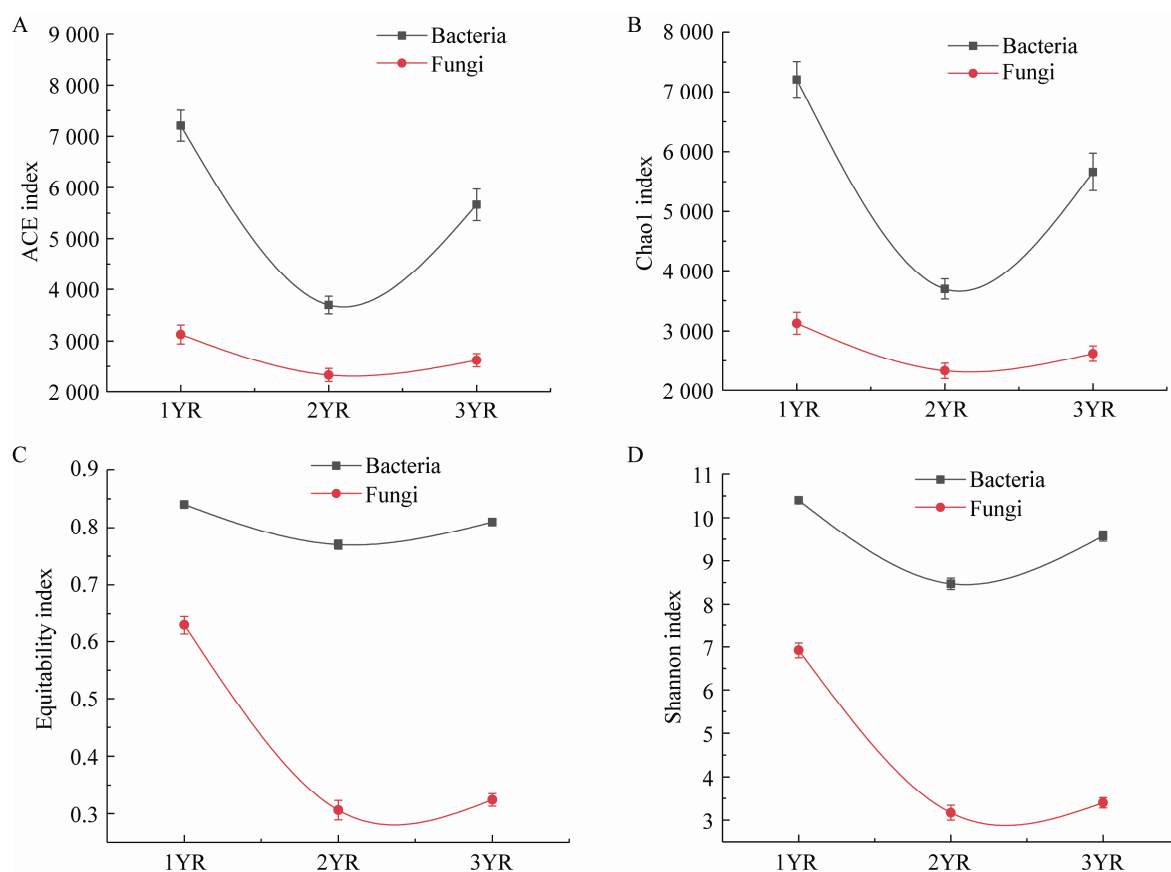


图 1 不同种植年限健康三七根际细菌和真菌 α 多样性

Figure 1 Bacterial and fungal alpha diversity of healthy *Panax notoginseng* rhizosphere with different planting years

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七。

Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*.

各类多样性指数和均匀度指数均又有所增加,其中 ACE 指数有显著性增加(图 1)。

对于 3 个处理的真菌 α 多样性对比分析发现,真菌的多样性指数呈现趋势与细菌一致,并且形成的 U 型曲线更为明显。主要表现为:二年生三七根际真菌区系 ACE、Chao1 和 Shannon 指数及均一性指数较一年和三年生三七处理组低,其中一年生三七根际真菌多样性各指数均最高,表明种植前期三七种植年限的增加会一定程度上降低三七根际真菌区系的多样性,但是随着时间的推移,三七根际真菌区系的多样性会增加。

2.2 不同种植年限健康三七根际微生物区系 β 多样性分析

通过分析细菌 β 多样性可知,相同种植年限的三七根际土中的细菌群落在 X 轴(40.63%)和 Y 轴(33.30%)可以较好地聚合(图 2A),表明分析结果较好。然而不同种植年限三七根际土中的细菌群落可以明显地区分开,说明各处理的细菌群落结构有所不同。在 X 轴(89.7%)和 Y 轴(5.34%)的真菌群落 PCoA 图中(图 2B),一年生三七根际土中的真菌群落与其他年生的真菌群落能明显区分开,但是二年生与三年生的三七根际土中的真菌群落却没有显著地分离,而是聚在一起,说明随种植年限

的增长,在第一年真菌群落结构变化较大,随后的 2 年中真菌群落结构变化不明显。

2.3 不同种植年限健康三七根际微生物区系门和属水平的分析

通过分析所测样品细菌门水平丰富度可知,各处理都具有相似的门,但是丰富度均有所不同(图 3A)。丰富度最高的细菌门群落是 *Proteobacteria*。AD3、*Acidobacteria* 和 *Chlamydiae* 这 3 个门的丰富度随种植年限增加而有所富集, *Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 和 *Verrucomicrobia* 的丰富度随着种植年限增加而有所降低。此外,还有些细菌门 *Chloroflexi*、*Gemmatimonadetes*、*Nitrospirae* 和 *Planctomycetes* 的丰富度在第一年和第三年均比第二年高,但是 GAL15 的丰富度在第一年和第三年均比第二年低,表明二年生三七能富集 GAL15 细菌。

进一步分析不同样品真菌门水平的丰富度发现,不同于上述细菌,大部分真菌门的丰富度低于 1%。对丰富度大于 1%的真菌门进行比较(图 3B),发现不同种植年限三七根际土中真菌 *Ascomycota* 门的丰富度最高,其次为 *Zygomycota*、*Basidiomycota* 和 *Chytridiomycota* 这 3 个门。进一步分析发现, *Ascomycota*、*Basidiomycota*、

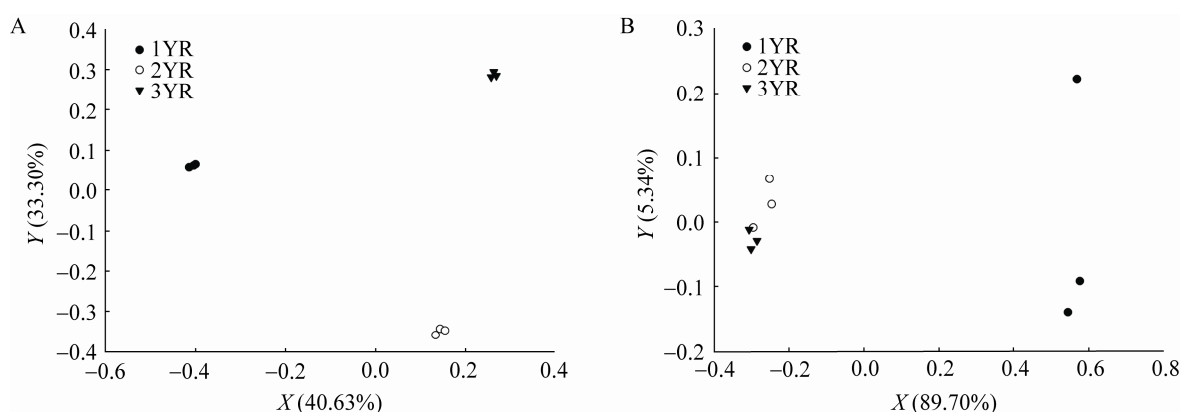


图 2 不同种植年限三七根际细菌(A)和真菌(B)群落 PCoA 图

Figure 2 Bacterial and fungal PCoA plots of the *Panax notoginseng* rhizosphere soil with different planting years

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七。

Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*.

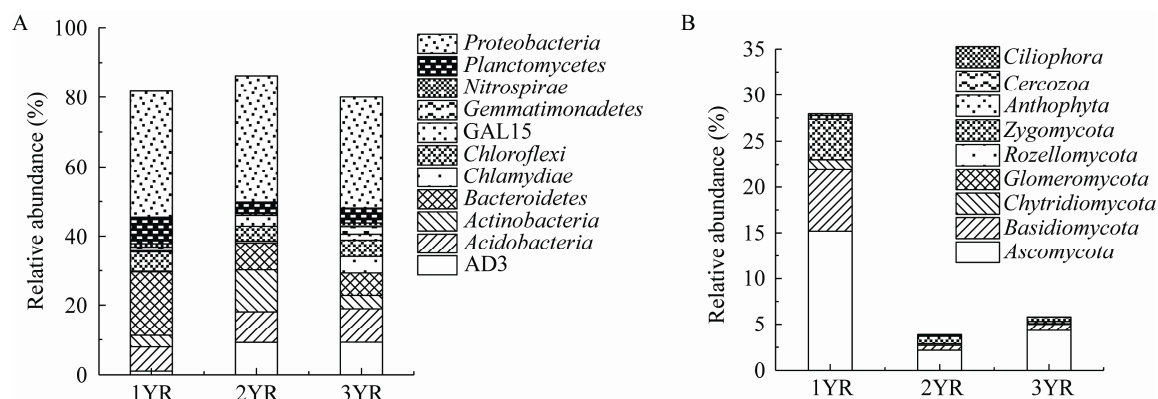


图3 门水平(>1%)上不同种植年限三七根际细菌(A)和真菌(B)群落结构

Figure 3 The composition of bacterial and fungal community of the *Panax notoginseng* rhizosphere soil with different planting years at the phylum level (>1%)

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七.

Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*.

Chytridiomycota 和 *Zygomycota* 这4个真菌门的丰富度在一年生三七根际土中最高, 另外, *Zygomycota* 门的丰富度随着三七种植年限的增加而降低。

通过分析3个处理中细菌丰富度在前15的属可知, *Flavobacterium*、*Opitutus*、*Rhodoplanes*、*Pseudomonas* 和 *Cellvibrio* 的丰富度随着三七种植年限的增加而有所降低, 但 *Aquicella*、*Candidatus Rhabdochlamydia* 和 *Rhizobium* 的丰富度随着三七种植年限的增加而明显增加(图4A)。此外, 相比一年生和三年生处理组, *Kaistobacter* 和 *Pedobacter* 的丰富度在二年生三七根际明显变多, 而 *Sphingomonas* 的丰富度在二年生三七根际丰富度则明显减少, 推测二年生三七能富集 *Kaistobacter* 和 *Pedobacter*, 但一定程度上会排斥 *Sphingomonas* 的细菌。进一步分析真菌丰富度在前15的属可知, 在一年生三七根际中 *Mortierella* 属的丰富度最高, 其次为 *Clitopilus* 和 *Pholiota* (图4B)。在一年生三七根际中, 除了上述3个属之外, 其他属的丰富度大致较均匀, 丰富度通常在0.3%–0.7%。随着三七种植年限的增加, *Mortierella*、*Clitopilus* 和 *Pholiota* 的丰富度反而逐年递减。然而 *Geminibasidium*、*Aspergillus*、*Cercophora* 和 *Cladophialophora* 的丰富度在三年生三七根际土中

最高, 但是其丰富度都低于0.7%。对于二年生三七根际中, 除了 *Mortierella* 的丰富度在0.7%以上以外, 其余的丰富度都低于0.1%。

2.4 种植年限与三七根际细菌和真菌群落的皮尔森相关性分析

通过对种植年限与三七根际细菌和真菌丰富度前三的优势门和属之间皮尔森相关性分析发现(表1), 除 *Proteobacteria* 细菌门和 *Ascomycota* 真菌门的相关性不显著外, 种植年限与其余丰富度前三的优势门群落和属群落都有着显著的相关性。大多数的优势菌群, 随着种植年限的增长, 其丰富度都受到三七种植年限的影响呈现下降趋势, 但是 *Acidobacteria* 细菌门和 *Aquicella* 细菌属的丰富度却呈现上升趋势。同时, 在对种植年限与三七根际细菌和真菌的 α 多样性相关指数分析表明, 仅真菌的均匀度和香农指数与种植年限呈现显著的负相关性, 其余都不显著相关。随着种植年限的推移, 三七根际微生物真菌群落的多样性和均匀度呈现下降趋势, 这与图1的数据结果相符。在三七种植过程中, 根际土壤的微生物群落发生较大的改变, 造成土壤中有益微生物减少, 从而减弱对三七根腐病病原菌的拮抗作用, 引起微生物区系失衡。

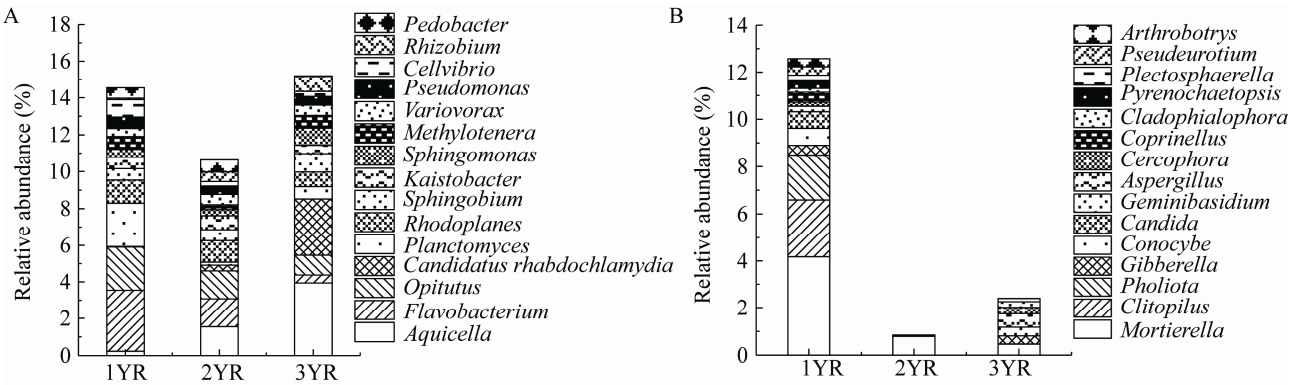


图 4 在属水平上(前 15)不同种植年限三七根际细菌(A)和真菌(B)群落结构
Figure 4 The composition of bacterial (A) and fungal (B) community of the *Panax notoginseng* rhizosphere soil with different planting years at the genus level (top 15)

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七.
Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*.

表 1 种植年限与三七根际微生物群落的皮尔森相关性分析
Table 1 Pearson correlation analysis between planting years and microbial community of the *Panax notoginseng* rhizosphere soil

分类	名称	皮尔森相关性	分类	名称	皮尔森相关性
Classification	Name	Pearson correlation	Classification	Name	Pearson correlation
细菌指数	ACE	-0.501	真菌指数	ACE	-0.500
Bacterial indexes	Chao1	-0.434	Fungal indexes	Chao1	-0.587
	Equitability	-0.422		Equitability	-0.837**
	Shannon	-0.426		Shannon	-0.835**
细菌门	<i>Proteobacteria</i>	-0.581	真菌门	<i>Ascomycota</i>	-0.626
Bacterial phylum	<i>Bacteroidetes</i>	-0.878**	Fungal phylum	<i>Basidiomycota</i>	-0.844**
	<i>Acidobacteria</i>	0.786*		<i>Chytridiomycota</i>	-0.829**
	<i>Aquicella</i>	0.974**	真菌属	<i>Mortierella</i>	-0.799**
Bacterial genus	<i>Flavobacterium</i>	-0.949**	Fungal genus	<i>Clitopilus</i>	-0.815**
	<i>Opitutus</i>	-0.696*		<i>Pholiota</i>	-0.851**

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七. **: 在 0.01 水平(双侧)上显著相关; *: 在 0.05 水平(双侧)上显著相关.
Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*. **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.

进一步对比不同种植年限三七根际土壤中致病菌和有益菌属丰度可知, 致病真菌 *Alternaria*、*Cylindrocarpon*、*Fusarium* 和 *Pestalotiopsis* 属群落的丰度呈现 U 型趋势, 即在一年生和三年生的三七根际土壤中的丰度显著高于二年生(图 5), 而有益真菌 *Mucor* 属和有益细菌 *Bacillus* 属的丰度与致

病性真菌群落的丰度呈相反趋势(图 6)。但是, 有益真菌 *Myxocephala* 属和 *Aspergillus* 属的丰度随着种植年限的增加呈现下降趋势, 这与优势有益真菌 *Mortierella* 属的变化趋势相似。从群落整体结构来看, 随种植年限的推移, 有益真菌的丰度呈现下降趋势, 而病真菌群落却呈现上升趋势。

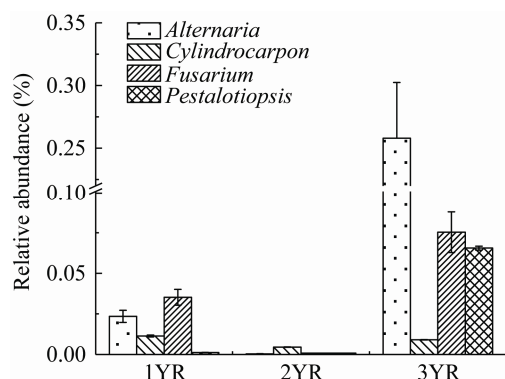


图5 不同种植年限三七根际部分病原菌群落结构

Figure 5 The pathogen community composition of the *Panax notoginseng* rhizosphere soil with different planting years

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七。

Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*.

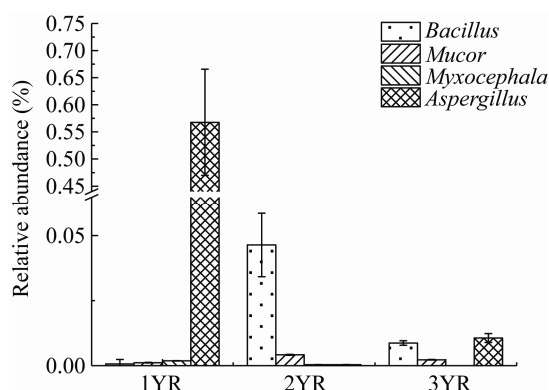


图6 不同种植年限三七根际部分有益菌群落结构

Figure 6 Beneficial microbial community composition of the *Panax notoginseng* rhizosphere soil with different planting years

注: 1YR: 一年生健康三七; 2YR: 二年生健康三七; 3YR: 三年生健康三七。

Note: 1YR: One-year healthy *Panax notoginseng*; 2YR: Two-year healthy *Panax notoginseng*; 3YR: Three-year healthy *Panax notoginseng*.

3 讨论与结论

根际微生物-植物-环境之间有着敏感的互作关系, 因此, 根际土壤微生物的多样性、生理活性及微生物间的相互作用影响着植物的健康状

况^[17]。不同种植年限和不同生育期的人参根际细菌和真菌群落多样性具有明显差异, 主要表现为: 在结果期, 四年生人参根际细菌多样性显著高于二年生人参; 而在生根期, 其三年生和四年生细菌多样性则明显低于二年生人参^[18]。本研究发现, 细菌群落多样性并没有形成明显的随三七种植年限增加而增加或降低的线性关系, 而是形成一个 U 型关系, 这一结果与 Tan 等^[19]和苗翠苹^[20]的研究结果相一致。另外, 相关性分析发现, 真菌的香农指数和均匀度指数随三七种植年限的增加而减少。但是其他学者研究发现真菌群落的香农指数随三七种植年限的增加而增加^[20-21]。

比较不同种植年限三七根际土壤中的细菌群落发现, *Bacteroidetes* 门和 *Proteobacteria* 门的丰富度随三七种植年限的增加而降低。*Bacteroidetes* 门的丰富度变化与苗翠萍的研究结果相一致^[20], 但是 *Proteobacteria* 门的丰富度变化则相反。然而 *Acidobacteria* 门和 *Chlamydiae* 门的丰度随着三七种植年限的增加而增加。研究表明, 三七根腐病主要病原细菌为 *Pseudomonas* 属^[22-23], 并且 *Pseudomonas* 属细菌在三七连作障碍的形成过程中具有较强的致病性^[24]。在属水平上, *Pseudomonas* 属的丰富度却随着三七种植年限的增加而减少, 表明三七种植年限的增加反而不利于该属生长。研究发现, *Flavobacterium* 具有拮抗辣椒土传真菌病害的效果^[25], 在三七根腐病根际土壤中, *Flavobacterium* 的丰富度显著高于健康根际土壤^[20,26]。然而本文研究发现, 随着三七种植年限的增加, 该益生菌属反而减少, 因此一定程度上不利于后续三七的连作。

在真菌群落中, *Ascomycota*、*Basidiomycota*、*Chytridiomycota* 和 *Zygomycota* 这 4 个门在不同种植年限下都是属于优势菌群, 在健康与根腐病的三七土壤群落对比中, 苗翠苹^[20]研究发现, 在黄腐型和急性青枯型根腐病的土壤中 *Ascomycota* 显著增加, 这说明在健康的三七根际土壤中 *Ascomycota*

和 *Basidiomycota* 受到抑制, 而且随种植年限增加呈现下降趋势。有学者^[19,26]认为 *Zygomycota* 作为有益菌群对某些病原菌有抑制作用, 但是在本研究中, *Zygomycota* 的丰富度随种植年限的增加却呈现下降趋势, 这可能由于三七种植年限的增加反而不利于三七根际有益真菌的生长有关。优势种群 *Zygomycota* 中 *Mortierella* 的丰富度随三七种植年限的增加而减少, 可能使得真菌属水平上种群失衡引起一些致病菌的种群丰富度增加, 这可能会促进后续三七连作障碍的发生^[19,26]。

植物可以通过根系分泌物的变化直接或间接改变根际微生物群落的组成来影响病原菌^[27]。在本研究中, 随着种植年限的增加, 有益真菌 *Myxocephala* 和 *Aspergillus* 的丰富度呈现下降趋势, 而病原真菌 *Alternaria*、*Cylindrocarpon*、*Fusarium* 和 *Pestalotiopsis* 却呈上升趋势, 这可能与三七不同生长时期的根系分泌物组分和浓度有关。Li 等^[28]的研究表明, 三七根系分泌物中的人参皂苷会富集潜在的致病性真菌群落, 如 *Alternaria*、*Cylindrocarpon*、*Gibberella*、*Phoma* 和 *Fusarium*, 而减少有益真菌群落的丰度, 如 *Acremonium*、*Mucor* 和 *Ochroconis*, 并且致病菌群落相对丰度与有益菌群相对丰度呈显著负相关。此外, 李云龙等^[29]研究发现使用土壤强还原处理能降低土壤中皂苷含量, 改良土壤微生物区系, 有效缓解三七连作障碍, 提升存苗率。因此, 后续调控微生物群落及其生境环境因子可能是缓解连作障碍三七的有效策略。通过了解不同三七种植年限对微生物区系的影响, 有助于开发相应的农业措施, 延缓三七连作障碍。

REFERENCES

- [1] Dong LL, Xu J, Li Y, et al. Manipulation of microbial community in the rhizosphere alleviates the replanting issues in *Panax ginseng*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 125: 64-74
- [2] Li YL, Wang BY, Chang YF, et al. Reductive soil disinfection effectively alleviates the replant failure of Sanqi ginseng through allelochemical degradation and pathogen suppression[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(8): 3581-3595
- [3] Xun LL. Micro ecological research of different *Panax notoginseng* planting soil[D]. Xianyang: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2013 (in Chinese)
寻路路. 三七种植不同土壤微生态研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2013
- [4] Ying YX, Ding WL, Zhou YQ, et al. Influence of *Panax ginseng* continuous cropping on metabolic function of soil microbial communities[J]. Chinese Herbal Medicines, 2012, 4(4): 329-334
- [5] Xie QL. Studies on the microbial community of rhizosphere soil of *Panax notoginseng* and its physical characteristics[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2015 (in Chinese)
谢秋丽. 田七根际土壤微生物群落及其生理特征研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2015
- [6] Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(S1): 487-511
- [7] Zhang CB, Jin ZX, Ke SX, et al. The seasonal dynamics of soil microbial number and respiration rate in heptacodium miconioides community[J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 6-9 (in Chinese)
张崇邦, 金则新, 柯世省, 等. 七子花土壤微生物数量及呼吸速率的季节动态[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 6-9
- [8] Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8): 478-486
- [9] Smalla K, Wieland G, Buchner A, et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4742-4751
- [10] Xiong W, Guo S, Jousset A, et al. Bio-fertilizer application induces soil suppressiveness against *Fusarium* wilt disease by reshaping the soil microbiome[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 114: 238-247
- [11] Zhang ZD, Zhu J, Tang QY, et al. Effects of different amplification primers on diversity analysis of endophytic fungi in *Salicornia europaea* by the high-throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 411-419 (in Chinese)
张志东, 朱静, 唐琦勇, 等. 不同扩增引物对高通量测序分析盐角草内生真菌多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 411-419
- [12] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [13] McDonald D, Price MN, Goodrich J, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea[J]. The ISME

- Journal, 2012, 6(3): 610-618
- [14] Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271-5277
- [15] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200
- [16] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267
- [17] Tan Y, Cui YS, Ji XL, et al. Research progress in microorganism changes of rhizospheric soil and root endogenous and ecology during continuous cropping of *Panax notoginseng*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(2): 391-399 (in Chinese)
谭勇, 崔尹瞻, 季秀玲, 等. 三七连作的根际、根内微生物变化与生态学研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(2): 391-399
- [18] Dong LL, Xu J, Zhang LJ, et al. Rhizospheric microbial communities are driven by *Panax ginseng* at different growth stages and biocontrol bacteria alleviates replanting mortality[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8(2): 272-282
- [19] Tan Y, Cui YS, Li HY, et al. Diversity and composition of rhizospheric soil and root endogenous bacteria in *Panax notoginseng* during continuous cropping practices[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(4): 337-344
- [20] Miao CP. Microbial community characteristics in rhizosphere soil of *Panax notoginseng*[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2015: 24-376 (in Chinese)
苗翠苹. 三七根际土壤微生物的群落特征[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2015: 24-36
- [21] Tan Y, Cui YS, Li HY, et al. Rhizospheric soil and root endogenous fungal diversity and composition in response to continuous *Panax notoginseng* cropping practices[J]. *Microbiological Research*, 2017, 194: 10-19
- [22] Luo WF, Yu SF, He CF, et al. On the combined infection of root rot pathogens on *Panax notoginseng*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1997, 27(1): 85-91 (in Chinese)
罗文富, 喻盛甫, 贺承福, 等. 三七根腐病病原及复合侵染的研究[J]. *植物病理学报*, 1997, 27(1): 85-91
- [23] Wei W, Yang M, Liu YX, et al. Fertilizer N application rate impacts plant-soil feedback in a sanqi production system[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 796-807
- [24] Gu Y, Wei Z, Wang XQ, et al. Pathogen invasion indirectly changes the composition of soil microbiome via shifts in root exudation profile[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(7): 997-1005
- [25] Sang MK, Kim KD. The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(2): 383-398
- [26] Wu ZX, Hao ZP, Chen YL, et al. Characterization of fungal community composition and carbon source utilization in the rhizosphere soil of *Panax notoginseng* suffering from root-rot disease[J]. *Mycosystema*, 2015, 34(1): 65-74 (in Chinese)
吴照祥, 郝志鹏, 陈永亮, 等. 三七根腐病株根际土壤真菌群落组成与碳源利用特征研究[J]. *菌物学报*, 2015, 34(1): 65-74
- [27] Jiang N, Qin LY, Ye YF. Research advances in diseases of *Panax notoginseng*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(9): 1070-1074 (in Chinese)
蒋妮, 覃柳燕, 叶云峰. 三七病害研究进展[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(9): 1070-1074
- [28] Li YL, Dai SY, Wang BY, et al. Autotoxic ginsenoside disrupts soil fungal microbiomes by stimulating potentially pathogenic microbes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(9): e00130-20
- [29] Li YL, Wang BY, Chang YF, et al. Effects of reductive soil disinfestation on obstacles and growth of replant seedlings in Sanqi ginseng mono-cropped soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56(3): 703-715 (in Chinese)
李云龙, 王宝英, 常亚锋, 等. 土壤强还原处理对三七连作障碍因子及再植三七生长的影响[J]. *土壤学报*, 2019, 56(3): 703-715