

· 药 学 基 础 ·

## 西洋参根部内生微生物多样性分析

王正鹏<sup>1</sup>, 刘天睿<sup>2</sup>, 赵玉洋<sup>3</sup>, 金艳<sup>3</sup>, 黄璐琦<sup>1,3\*</sup>, 袁媛<sup>3\*</sup>

(1. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 3. 中国中医科学院中医药健康产业研究所, 南昌 330115; 4. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:分析西洋参(*Panax quinquefolium*)根部内生微生物的群落结构,寻找西洋参根部内生真菌和内生细菌的优势菌属,为建立西洋参根部内生微生物库奠定基础。方法:采用PacBio Sequel II测序平台,对采自山东文登的6株西洋参根部组织进行内转录间隔区(ITS)和16S测序。结果:西洋参根部内生细菌共鉴定到8门、11纲、23目、27科、53属,其中优势菌属为一种伯克氏菌(unidentified Burkholderiaceae)和一种根瘤菌(unidentified Rhizobiaceae)等。西洋参根部内生真菌共鉴定到9门、23纲、35目、43科、48属,其中优势菌属为一种柔膜菌(unclassified Helotiales)和假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)等。根部内生细菌群落结构显示,一种根瘤菌(unidentified Rhizobiaceae)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和草螺菌属(*Herbaspirillum*)等固氮菌在西洋参根部具有较高的相对丰度,暗示氮元素对西洋参根系生长发育的重要性。根部内生真菌群落结构显示,山东地区西洋参可能受到柔膜菌目真菌侵染的威胁。结论:西洋参根部内生细菌和真菌具有丰富的多样性,为进一步研究西洋参根与内生微生物的互作、筛选促进西洋参根系生长的内生细菌和内生真菌提供科学依据。

**[关键词]** 西洋参; 内生微生物; 16S测序; 内转录间隔区(ITS)测序; 多样性

**[中图分类号]** R284.2;R289;R287;R22;R2-031;R33;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0160-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230214

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230109.0948.001.html>

**[网络出版日期]** 2023-01-10 10:11:34

### Diversity of Endophytes in *Panax quinquefolium* Root

WANG Zhengpeng<sup>1</sup>, LIU Tianrui<sup>2</sup>, ZHAO Yuyang<sup>3</sup>, JIN Yan<sup>3</sup>, HUANG Luqi<sup>1,3\*</sup>, YUAN Yuan<sup>3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330115, China; 3. National Resource Center for Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the community structure of endophytes in *Panax quinquefolium* root and explore the dominant endophytic bacteria and fungi, to provide scientific basis for the establishment of endophytic microbial bank in *P. quinquefolium* root. **Method:** Internal Transcribed Spacer (ITS) sequencing and 16S sequencing were performed on six *P. quinquefolium* root samples collected from Wendeng, Shandong province on PacBio Sequel II. **Result:** A total of 8 phyla, 11 classes, 23 orders, 27 families and 53 genera of endophytic bacteria were identified in *P. quinquefolium* root, among which an unidentified Burkholderiaceae and

**[收稿日期]** 2022-11-07

**[基金项目]** 东城区优秀人才培养项目(2021-dchrepyzz-7);国家自然科学基金项目(82173926,81891013);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A041,CI2021B014);中央本级重大增减支项目(2060302);青年岐黄学者项目;国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-D-202005)

**[第一作者]** 王正鹏,在读硕士,从事分子生药学研究,E-mail:747061409@qq.com

**[通信作者]** \*袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y\_yuan0732@163.com;

\*黄璐琦,研究员,博士生导师,从事中药资源与分子生药学研究,Tel:010-64044340,E-mail:huangluqi01@126.com

an unidentified Rhizobiaceae were dominant. A total of 9 phyla, 23 classes, 35 orders, 43 families and 48 genera of endophytic fungi were identified in *P. quinquefolium* root, among which an unclassified Helotiales and *Pseudogymnoascus* were dominant. The community structure of endophytic bacteria revealed that the roots were selectively enriched with nitrogen-fixing bacteria such as unidentified Rhizobiaceae, *Bradyrhizobium* and *Herbaspirillum*, which suggested that nitrogen is important for the growth of *P. quinquefolium* root. The community structure of endophytic fungi indicated that *P. quinquefolium* in Shandong province might be infected by unclassified Helotiales. **Conclusion:** There is a rich diversity of endophytic bacteria and fungi in *P. quinquefolium* root, which provides scientific basis for studying the interaction of the plant with endophytic microorganisms and screening the endophytes to promote the growth of *P. quinquefolium* root.

**[Keywords]** *Panax quinquefolium*; endophyte; 16S sequencing; internal transcribed spacer (ITS) sequencing; diversity

西洋参为五加科人参属多年生草本植物,以干燥根入药,甘、微苦,凉。归心、肺、肾经,具有补气养阴,清热生津之功效<sup>[1]</sup>。西洋参原产于北美,分布在北纬 30°~48°,东经 67°~95°的美洲森林中,1978年我国成功引种,逐渐形成以吉林、陕西、北京和山东为中心的西洋参栽培区<sup>[1]</sup>。

植物内生菌是指在其生活史的某一阶段或者全部阶段,生活于健康植物的组织或器官内部、且不形成明显侵染的微生物,包含内生细菌、内生真菌和内生放线菌。研究表明,植物在生长发育的特定阶段通常具有稳定的内生菌群落,这些内生菌以植物的内部环境作为独特的生态位,保护自身免受外部环境剧烈变化的影响<sup>[2]</sup>。同时,丰富的内生菌群落可以通过多种方式调节宿主植物的生长发育,包括合成吲哚乙酸<sup>[3]</sup>、通过固氮和溶磷作用促进植物生长<sup>[2,4-5]</sup>、改善植物渗透调节能力<sup>[6]</sup>等。例如从药用植物中分离得到的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)具有高效的产生长素能力,将其作为玉米种子的生物接种剂,可显著增加玉米的根长及根系质量<sup>[7]</sup>。植物内生菌还可以协助宿主抵抗生物胁迫和非生物胁迫<sup>[8-9]</sup>,例如芽孢杆菌 Fc11(*Bacillus Fc11*)可抑制姜茎基腐病病原菌(*Pythium myriotylum*)、棒孢叶斑病病原菌(*Corynespora cassicola*)等多种病原菌的菌丝生长<sup>[10]</sup>;谷氨酸杆菌(*Glutamicibacter halophytocola*)可协助补血草(*Limonium sinense*)抵抗钠盐胁迫<sup>[11]</sup>;自菊科植物中分离的白粉寄生菌(*Ampelomyces* sp.)可提高番茄在干旱胁迫下的耐受性<sup>[12]</sup>。植物内生菌还参与调节药用植物次生代谢产物含量<sup>[3]</sup>,例如从白术中分离得到的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)可通过赤霉素和茉莉酸信号通路提高白术中倍半萜类化合物的合成<sup>[13]</sup>。植物内生菌还

可以参与植物根系形态的构建,提高根系生物量<sup>[2]</sup>,如接种 *Acrocalymma vagum* 的红豆树(*Ormosia hosiei*)幼苗在生长 114 d 后其根鲜重、根体积、根表面积、根叉和根尖数均显著高于未接种苗<sup>[14]</sup>。综上,植物内生菌具有促进植物生长、改变植物根系形态、提高植物抗逆性、生产具有生物活性的次生代谢产物等价值,在农业、医药领域广泛应用<sup>[2,15]</sup>。

西洋参易发生真菌性病害,如根腐病、锈腐病等病害危害西洋参根部,严重影响西洋参药材的质量和产量<sup>[16]</sup>。近年来,因地制宜协调使用生物防治和化学防治成为西洋参病害防治的新策略<sup>[16]</sup>。研究表明生长年限久的西洋参其根际土壤真菌多样性较低,可能是造成西洋参连作障碍的原因之一<sup>[17]</sup>。同时,已有研究表明分离自人参属植物的内生菌具有促进人参皂苷合成的作用,例如将从人参中分离得到的多粘芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)进行回接,可使人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、Re、Rb<sub>1</sub> 等的含量显著增加<sup>[3]</sup>。因此,研究西洋参根部内生微生物的群落结构,可能为发展西洋参病害的生物防治,缓解西洋参连作障碍,促进西洋参中次生代谢产物的合成提供理论依据。我国西洋参栽培区以吉林、陕西、山东、北京为主,已有研究报道西洋参内生微生物群落结构具有非常丰富的多样性,不同产地西洋参根部内微生物群落结构差异显著<sup>[18]</sup>。研究显示山东文登西洋参根部内生真菌以 *Plectosphaerella* 和镰刀菌属(*Fusarium*)为优势菌属,但科水平和属水平上归属至 unclassified 类的物种相对丰度总和>50%,说明山东地区西洋参根部真菌群落结构需要进一步完善<sup>[18]</sup>。已有研究显示吉林长白山西洋参根部内生细菌以乳杆菌属(*Lactobacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)为优势菌属,而北京和

山东地区西洋参根部内生细菌的群落结构未见报道<sup>[19]</sup>。综上所述,研究西洋参根部内生微生物的群落结构具有重要意义,且山东地区西洋参根部内生微生物库尚需完善。

本文采用PacBio Sequel II三代测序平台对16S和内转录间隔区(ITS)片段进行测序,分析山东文登西洋参根部内生真菌和细菌的物种组成、优势菌属及物种多样性,以期为西洋参根部内生微生物库的建立做出贡献。同时,本研究也为研究西洋参根部和微生物互作,筛选促进西洋参根部发育的微生物提供依据。

## 1 材料

**1.1 实验材料** 三年生西洋参新鲜样本采自山东省威海市文登区侯家镇(威海金颐阳药业有限公司西洋参种植基地),共6株,采样时间为2021年6月30日。西洋参样本经中国中医科学院中药资源中心金艳副研究员鉴定为西洋参 *Panax quinquefolium*,保存于中国中医科学院中药资源中心。

**1.2 仪器与试剂** Invitrogen Qubit 4型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Agilent 2100型生物分析仪(美国Agilent公司),PacBio Sequel II测序平台(美国PacBio公司)。

Phusion® High-Fidelity 聚合酶链式反应(PCR) Kit(美国New England Biolabs公司,批号E0553L),QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒(德国Qiagen公司,批号28706),AMPure PB磁珠、SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0(美国PacBio公司,批号分别为102-182-500、100-938-900),引物合成于生工生物工程(上海)有限公司。

## 2 方法

**2.1 样本处理方法** 西洋参根经无菌水重复洗涤3次,5%次氯酸钠表面消毒后,以无菌水洗净。用灭菌刀片切取根部组织,经75%乙醇溶液反复擦拭,最后用无菌水清洗表面,分装至灭菌的2 mL离心管。

**2.2 DNA提取及PCR扩增** 采用CTAB法提取6株西洋参根部新鲜样本的基因组DNA,经1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性,电泳条件为 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,20 min,以无菌水稀释至 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

以稀释后的基因组DNA为模板进行PCR,PCR使用Phusion® High-Fidelity PCR Kit试剂盒。16S片段引物序列为27F: 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3',1492R: 5'-GNTACCTTGTACGACTT-

3'。ITS片段引物序列为ITS9 munngs: 5'-TACACA CCGCCCGTCG-3', ITS4 ngsUni: 5'-CCTSCSCTT ANT DATATGC-3'。PCR产物经2%的琼脂糖凝胶电泳检测,以QIAquick Gel Extraction Kit胶回收试剂盒回收产物中的目的条带。

**2.3 文库构建及测序方法** 以AMPure PB磁珠对DNA片段进行纯化,构建SMRT Bell文库。构建好的文库经Qubit浓度定量,并利用Agilent 2100检测插入片段大小,随后采用PacBio Sequel II平台进行测序。

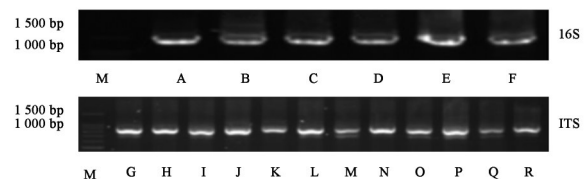
**2.4 基于测序数据进行分类单元(OTU)聚类和物种注释** OTU聚类和物种分类分析,利用Uparse软件(Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse>)对测序得到的Clean Reads进行聚类,并划分分类单元,序列相似性域值为97%。

采用Silva数据库(<http://www.arb-silva.de>)利用16S序列进行物种注释,注释方法为mothur法。采用Unite数据库(<https://unite.ut.ee>)利用ITS序列进行物种注释,注释方法为Blast。依据分类学信息在各分类学水平kingdom(界)、phylum(门)、class(纲)、order(目)、family(科)、genus(属)、species(种)统计微生物群落组成。

**2.5 Alpha多样性分析** 使用Qiime软件(Version 1.9.1)计算Shannon、Simpson、Ace、Chao指数,使用R软件(Version 4.2.1)绘制Rank abundance曲线和物种相对丰度累积图。

## 3 结果

**3.1 DNA提取与PCR扩增** 样本为经表面灭菌的3年生西洋参根,采自山东文登,共计6个生物学重复,命名为XYS1~XYS6。琼脂糖凝胶电泳显示基因组DNA完整性良好。16S片段扩增条带清晰,PCR产物大小在1400 bp左右;ITS片段扩增条带清晰,PCR产物大小在700 bp左右。见图1。



注: M.100 bp DNA Ladder; A、G、R.XYS1; B、N、O.XYS5; C、H、I.XYS2; D、P、Q.XYS6; E、J、K.XYS3; F、L、M.XYS4

图1 DNA琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis diagram of DNA

**3.2 测序质量分析** 采用PacBio Sequel II三代测序平台对6株西洋参样本的16S片段和ITS片段测

序,测序信息分别见表1和表2。16S片段测序共获得有效序列74 931条,平均序列长度1 418 bp。ITS片段测序共获得有效序列79 252条,平均序列长度604 bp。

表1 16S测序数据信息

Table 1 Sample test sequence information of 16S

样品	Raw reads	Clean reads	碱基数 /nt	平均读长/nt	Effective /%
XYS1	14 560	13 687	19 352 449	1 413	94.00
XYS2	14 593	14 305	20 308 084	1 419	98.03
XYS3	13 753	13 484	19 114 847	1 417	98.04
XYS4	10 348	10 142	14 402 792	1 420	98.01
XYS5	14 620	12 720	18 009 639	1 415	87.00
XYS6	12 317	10 593	15 077 612	1 423	86.00

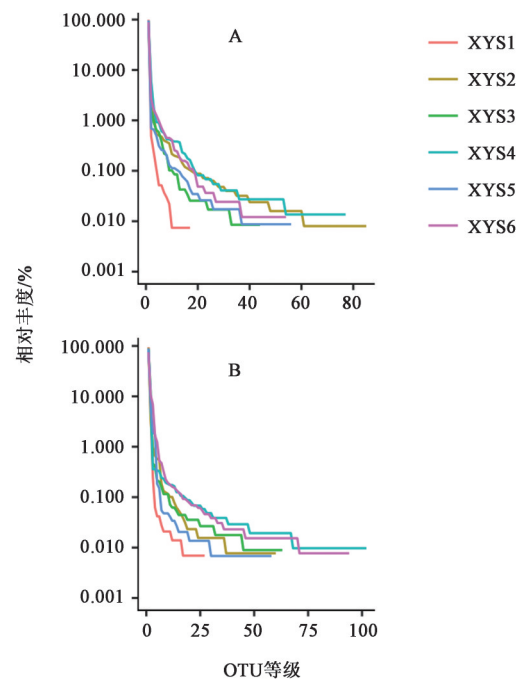
表2 ITS测序数据信息

Table 2 Sample test sequence information of ITS

样品	Raw reads	Clean reads	碱基数 /nt	平均读长/nt	Effective /%
XYS1	16 209	14 589	8 790 027	602	90.01
XYS2	13 712	13 301	8 103 605	609	97.00
XYS3	12 059	11 578	7 172 394	619	96.01
XYS4	11 991	11 033	6 536 340	592	92.01
XYS5	15 510	14 890	8 989 169	603	96.00
XYS6	14 589	13 861	8 267 758	596	95.01

**3.3 OTU等级丰度分析** 依据16S片段测序结果,西洋参根部样本中内生细菌可被划分为154个OTU,覆盖8门、11纲、23目、27科、53属;依据ITS片段测序结果,西洋参根部样本中内生真菌可被划分为172个OTU,9门,覆盖23纲、35目、43科、48属。从OTU等级丰度曲线图可以看出,样本XYS1曲线较为陡峭,说明其根部内生细菌和真菌的物种均匀度均较低,见图2;样本XYS2和XYS4的16S片段OTU等级丰度的曲线相对平缓,说明其内生细菌的物种分布更为均匀;样本XYS4和XYS6的ITS片段OTU等级丰度的曲线相对平缓,说明其内生真菌的物种分布更为均匀。

**3.4 Alpha多样性分析** 采用Shannon、Simpson、Chao、Ace等指数对西洋参样本根部内生细菌和真菌的Alpha多样性进行评价。Shannon和Simpson指数主要用于描述群落多样性,即物种丰富度和均匀度,Shannon指数越大、Simpson指数越小,群落多样性越高。而Chao和Ace指数主要用于评价群落内物种数量,数值越大则群落内物种的数量越多。



注:A.细菌;B.真菌

图2 西洋参根部内生细菌和真菌的OTU等级丰度

Fig. 2 Curves of rank-abundance of bacteria and fungus in roots of *Panax quinquefolium*

从表3可知,样本XYS4的Shannon指数最高,表明其根部内生细菌群落多样性相对较高;而样本XYS2的Chao和Ace指数最高,表明其根部内生细菌物种数量最多。从表4可知,样本XYS6的Shannon指数最高,表明其根部内生真菌群落多样性较高,而样本XYS4的Chao和Ace指数最高,表明其根部内生真菌物种数量最多。

表3 西洋参根部细菌的Alpha多样性

Table 3 Alpha diversity of bacteria in roots of *Panax quinquefolium*

样品	Alpha多样性			
	Shannon	Simpson	Ace	Chao
XYS1	0.112 0	0.022 0	12.483 0	11.250 0
XYS2	0.867 0	0.180 0	90.959 0	87.769 0
XYS3	0.498 0	0.106 0	63.756 0	66.200 0
XYS4	1.243 0	0.289 0	71.512 0	68.565 0
XYS5	0.435 0	0.083 0	77.040 0	69.750 0
XYS6	0.954 0	0.214 0	54.629 0	55.000 0

**3.5 西洋参内生细菌群落结构** 利用16S序列进行物种注释,西洋参根部内生细菌相对丰度排在前十的优势菌科有伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、Rhodanobacteraceae科、黄色杆菌科(Xanthobacteraceae)、微杆菌科

表4 西洋参根部真菌的Alpha多样性

Table 4 Alpha diversity of fungus in roots of *Panax quinquefolium*

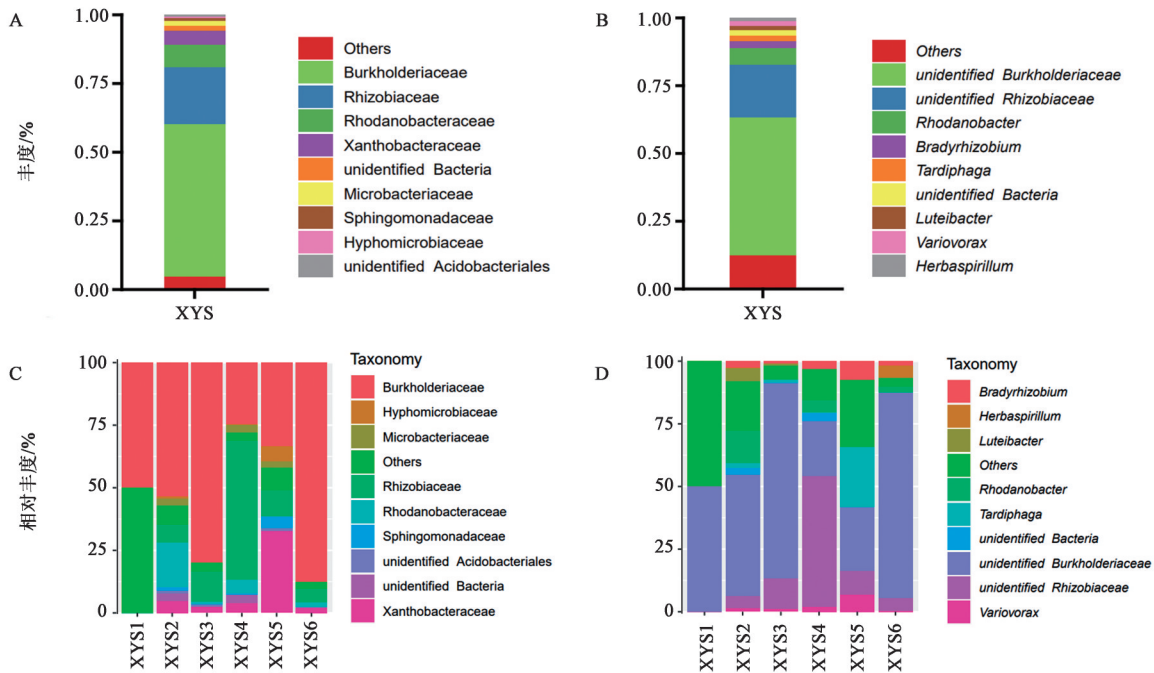
样品	Alpha多样性			
	Shannon	Simpson	Ace	Chao
XYS1	0.390 0	0.118 0	29.390 0	26.600 0
XYS2	0.648 0	0.150 0	54.747 0	49.118 0
XYS3	0.870 0	0.266 0	63.095 0	61.400 0
XYS4	1.042 0	0.262 0	140.007 0	130.333 0
XYS5	0.718 0	0.197 0	53.340 0	50.750 0
XYS6	1.534 0	0.419 0	107.797 0	99.789 0

(Microbacteriaceae)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、生丝微生物科(Hyphomicrobiaceae)等。其中伯克氏菌科(Burkholderiaceae)和根瘤菌科(Rhizobiaceae)的相对丰度最高。见图3。

西洋参根部内生细菌相对丰度排在前10的优势菌属为罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、慢生根瘤菌

属(*Bradyrhizobium*)、*Tardiphaga*属、*Luteibacter*属、贪食菌属(*Variovorax*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、一种伯克氏菌(unidentified Burkholderiaceae)、一种根瘤菌(unidentified Rhizobiaceae)等。其中unidentified Burkholderiaceae和unidentified Rhizobiaceae的相对丰度最高,慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、一种根瘤菌(unidentified Rhizobiaceae)等固氮菌在西洋参根部内生细菌中相对丰度位于前10。

3.6 西洋参内生真菌群落结构 利用ITS序列进行物种注释,西洋参根部内生真菌相对丰度排在前10的优势菌科分属有unclassified Helotiales、Pezizomycotina fam Incertae sedis、Pseudeurotiaceae、锁掷酵母科(Sporidiobolaceae)、unclassified Rozellomycota、Phaeosphaeriaceae、Plectosphaerellaceae、Holtermanniaceae fam Incertae sedis和柔膜菌科(Helotiaceae)等,其中一种柔膜菌(unclassified Helotiales)的相对丰度最高。



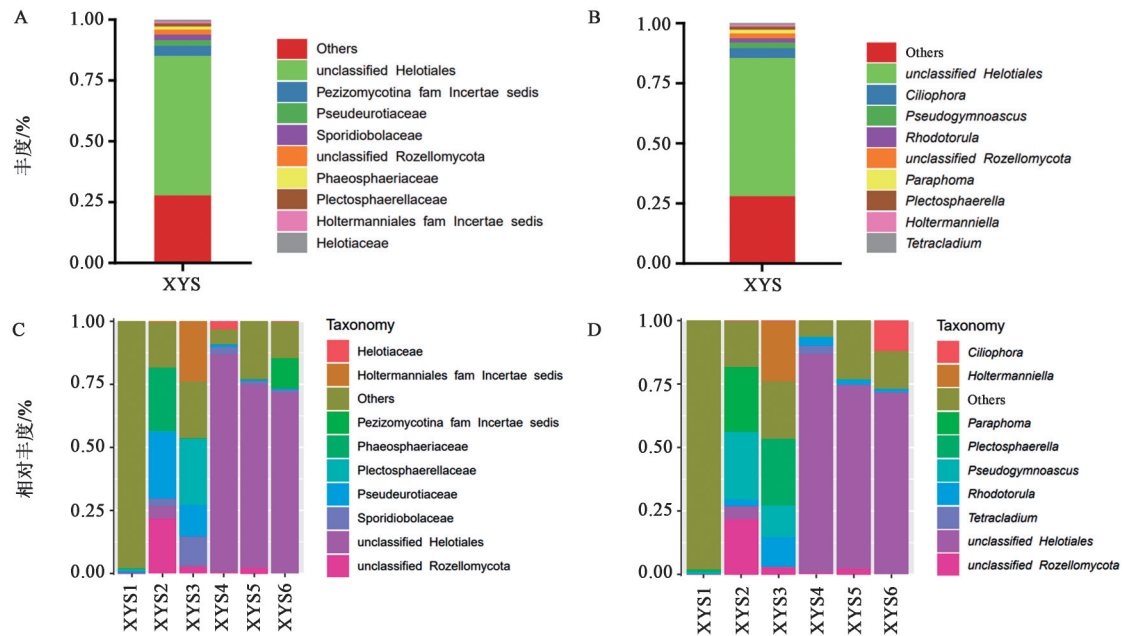
注:A.科水平总相对丰度累积图;B.属水平总相对丰度累积图;C.科水平各样本相对丰度累积图;D.属水平各样本相对丰度累积图;图示为相对丰度排序前10的物种,不同颜色在柱形图中的高度表示该物种的相对丰度,相对丰度低于前10的物种统一用Others表示

图3 西洋参根部内生细菌相对丰度累积

Fig. 3 Composition of bacteria in roots of *Panax quinquefolium*

西洋参根部内生真菌相对丰度排在前10的优势菌属为纤毛虫属(*Ciliophora*)、假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、异茎点霉属(*Paraphoma*)、*Plectosphaerella*属、霍特曼尼

菌属(*Holtermanniella*)、四枝孢属(*Tetracladium*)、一种柔膜菌(unclassified Helotiales)、一种罗兹菌(unclassified Rozellomycota)等,其中一种柔膜菌(unclassified Helotiales)的相对丰度最高。见图4。



注:A.科水平总相对丰度累积图;B.属水平总相对丰度累积图;C.科水平各样本相对丰度累积图;D.属水平各样本相对丰度累积图图示为相对丰度排序前10的物种,不同颜色在柱形图中的高度表示该物种的相对丰度,相对丰度低于前10的物种统一用Others表示

图4 西洋参根部内生真菌相对丰度累积

Fig. 4 Composition of fungus in roots of *Panax quinquefolium*

#### 4 讨论

本研究采用PacBio Sequel II三代测序平台对16S和ITS片段进行测序,平均测序长度分别为1 418 bp和604 bp。相较二代扩增子测序,PacBio Sequel II平台在兼顾测序的准确率和高通量的同时,具有读长更长的特点,使OTU划分和种属水平上的物种分类更加精准。研究发现6个西洋参样本间 $\alpha$ 多样性指数差异较大(表3、表4),这反应各样本间物种数目、物种丰度和物种均匀度存在较大差异。根据OTU等级丰度图和西洋参根部内生真菌相对丰度累积图显示(图2、图4),样本XYS1包含的OTU数量少,且内生真菌的物种丰度和均匀度与其他样本存在较大差异,这可能是由于随机取样下XYS1的土壤微生物环境与其他样品存在差异。西洋参根部内生真菌各样本相对丰度累积图显示XYS4、XYS5和XYS6中一种柔膜菌(unclassified Helotiales)的相对丰度明显高于其他样本(图4D),暗示各样本间 $\alpha$ 多样性指数差异可能是部分样本受柔膜菌目真菌的侵染导致。根据已有研究可知,不同西洋参样本间根部内生微生物 $\alpha$ 多样性常见差异,可能受样本土壤微生物环境、生长环境、取样部位等因素的影响<sup>[19]</sup>。

西洋参内生细菌群落结构显示,西洋参根部内生细菌的优势菌科包括伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、

Rhodanobacteraceae科等;西洋参根部内生细菌的优势菌属为一种伯克氏菌(unidentified Burkholderiaceae)和一种根瘤菌(unidentified Rhizobiaceae)等。研究表明,三七分泌到土壤中的人参皂苷可以丰富土壤中的伯克霍尔德里氏菌(*Burkholderia* sp.),缓解土壤毒素和土壤致病菌的积累<sup>[20]</sup>;而自发生根腐病的西洋参根部分离得到的两株伯克霍尔德里氏菌对多种西洋参病原菌具有显著抑制作用<sup>[21]</sup>。伯克氏菌科细菌多具有促进植物根系生长,协助抵抗植物病原菌侵染的作用<sup>[22]</sup>。已有研究报道部分伯克氏菌科(Burkholderiaceae)细菌可随人参的生长年限增加在土壤中显著富集<sup>[23]</sup>。本研究发现伯克氏菌科细菌在西洋参根内显著富集,暗示西洋参可能通过在根部富集伯克氏菌,促进自身根系生长、协助抵御植物病害。根瘤菌科(Rhizobiaceae)细菌是典型的固氮菌,具有固定大气中的氮、改善植物营养吸收、促进植物生长等作用<sup>[24]</sup>。已有报道认为根瘤菌科*Ciceribacter*属的A.sl09在具有固氮功能的同时,具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,可将人参皂苷Rd转化为人参皂苷F<sub>2</sub><sup>[25]</sup>;自人参栽培土壤中分离得到的根瘤菌DCY116T(*Rhizobium panacihumi*),可协助人参幼苗抵抗重金属胁迫,提高其根系生物量、脯氨酸含量、总酚酸含量和总可溶性糖含量<sup>[26]</sup>。本研究发现一种根瘤菌(unidentified Rhizobiaceae)、慢生根瘤菌属

(*Bradyrhizobium*)和草螺菌属(*Herbaspirillum*)在西洋参根部内生细菌中均具有较高的相对丰度,表明西洋参在根内选择性富集固氮菌,暗示氮元素对西洋参根系生长发育十分重要。同时,丰富的根瘤菌可能有助于参与西洋参抵抗胁迫和调节次生代谢产物的积累。

西洋参内生真菌群落结构显示,西洋参根部内生真菌的优势菌属为一种柔膜菌(unclassified Helotiales)和假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)等。柔膜菌目(Helotiales)下属如暗色孢科(Dermateaceae)、核盘菌科(Sclerotiniaceae)、星裂盘菌科(Phacidiaceae)等多为植物病原菌<sup>[27]</sup>,暗示山东文登地区西洋参病害主要来自柔膜菌目真菌的侵染。同时在西洋参内生真菌群落中也鉴定到假裸囊菌属和红酵母属等相对丰度较高的有益真菌。已有研究表明,假裸囊菌属(*Pseudogymnoascus*)真菌在连作土壤环境下,促进人参生物量的提高、协助抵抗病原真菌的侵害<sup>[28]</sup>;红酵母属(*Rhodotorula*)真菌则对草莓采摘后期的真菌病害具有显著的生物防治效果<sup>[29]</sup>。综上所述,采自山东的西洋参可能受到柔膜菌目病原真菌的侵害,同时西洋参也通过募集生防真菌抵御真菌病害。

根部内生真菌和内生细菌是西洋参内生态系统的重要组成部分,具有促进西洋参根系生长、提高西洋参抗逆性、提高人参皂苷含量等作用,参与西洋参药材“优形优质”的形成<sup>[30]</sup>。本研究对西洋参根部内生细菌和真菌的群落结构和物种多样性进行评价,为西洋参根部内生微生物库的建立奠定基础。同时,研究结果也为研究西洋参根与内生微生物的互作、筛选促进西洋参根系生长的内生细菌和内生真菌提供科学依据。最后,西洋参根部内生真菌和细菌存在较多未被分类的菌属,在体现西洋参根部内生细菌和真菌多样性的同时,也说明对西洋参内生微生物的研究及分类学鉴定有待完善。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 张正海,雷慧霞,钱佳奇,等. 西洋参的引种简史[J]. 人参研究,2020,32(2):59-62.
- [2] WU W, CHEN W, LIU S, et al. Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 646146.
- [3] GAO Y, LIU Q, ZANG P, et al. An endophytic bacterium isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer

enhances growth, reduces morbidity, and stimulates ginsenoside biosynthesis [J]. Phytochem Lett, 2015, doi:10.1016/j.phytol.2014.12.007.

- [4] 李卓蔚,郎佳琪,孟琦,等. 接种解有机磷细菌对滇重楼品质及土壤肥力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(16):156-164.
- [5] 刘迎雪,赵滢,张宝香,等. 植物内生细菌来源及生物学功能研究进展[J]. 特产研究,2020,42(4):60-67.
- [6] ZHU Y. Isolation and identification of *Ammodendron bifolium* endophytic bacteria and the action mechanism of selected isolates-induced seed germination and their effects on host osmotic-stress tolerance [J]. Arch Microbiol, 2019, 201(4):431-442.
- [7] FOUDA A, EID A M, ELSAIED A, et al. Plant growth-promoting endophytic bacterial community inhabiting the leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC inherent to arid regions[J]. Plants, 2021, 10(1):76.
- [8] ABDELSHAFY MOHAMAD O A, MA J B, LIU Y H, et al. Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum* [J]. Front Plant Sci, 2020, 11:47.
- [9] CASTRONOVO L M, VASSALLO A, MENGONI A, et al. Medicinal plants and their bacterial microbiota: A review on antimicrobial compounds production for plant and human health [J]. Pathogens, 2021, 10(2):106.
- [10] JAYAKUMAR A, KRISHNA A, MOHAN M, et al. Plant growth enhancement, disease resistance, and elemental modulatory effects of plant probiotic endophytic *Bacillus* sp. Fc11 [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2019, 11(2):526-534.
- [11] QIN S, FENG W W, ZHANG Y J, et al. Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 [J]. Appl Environ Microb, 2018, 84(19):e01533-18.
- [12] MORSY M, CLECKLER B, ARMUELLES-MILLICAN H. Fungal endophytes promote tomato growth and enhance drought and salt tolerance [J]. Plants, 2020, 9(7):877.
- [13] YANG H R, YUAN J, LIU L H, et al. Endophytic *pseudomonas fluorescens* induced sesquiterpenoid accumulation mediated by gibberellic acid and jasmonic acid in *Atractylodes macrocephala* Koidz plantlets [J]. Appl Environ Microb, 2019, 138(3):445-457.

- [14] LIU Y, WEI X. Dark septate endophyte improves drought tolerance of *Ormosia hosiei* Hemsley & EH Wilson by modulating root morphology, ultrastructure, and the ratio of root hormones [J]. *Forests*, 2019, 10(10): 830.
- [15] YAN L, ZHU J, ZHAO X, et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(8): 3327-3340.
- [16] 田小曼. 西洋参主要病害及其防治[J]. *农业与技术*, 2021, 41(20): 58-61.
- [17] 郭瑞齐, 管仁伟, 林慧彬. 生长年限对西洋参根际土真菌群落结构的影响及多样性分析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(8): 4731-4736.
- [18] 田丽霞. 微生物及气候因子对西洋参品质的影响[D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
- [19] 张臣. 西洋参内生菌和根际微生物菌群结构分析及皂苷生物转化研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [20] LUO L, WANG L, DENG L, et al. Enrichment of *Burkholderia* in the rhizosphere by autotoxic ginsenosides to alleviate negative plant-soil feedback [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(3): e0140021.
- [21] 章嘉会, 魏艳丽, 李红梅, 等. 两株西洋参根际拮抗细菌的鉴定及其抑菌促生效果[J]. *山东农业科学*, 2022, 54(7): 143-148.
- [22] CILLERO J I, HENRÍQUEZ P A, LEDGER T W, et al. Individual competence predominates over host nutritional status in *Arabidopsis* root exudate-mediated bacterial enrichment in a combination of four *Burkholderiaceae* species [J]. *BMC Microbiol*, 2022, 22(1): 218.
- [23] FUJII T, MINAMI M, WATANABE T, et al. Characterization of inter-annual changes in soil microbial flora of *Panax ginseng* cultivation fields in Shimane Prefecture of Western Japan by DNA metabarcoding using next-generation sequencing [J]. *J Nat Med*, 2021, 75(4): 1067-1079.
- [24] KUMAR N, SRIVASTAVA P, VISHWAKARMA K, et al. The rhizobium-plant symbiosis: State of the art [J]. *Plant Microbe Symbiosis*, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-36248-5\_1.
- [25] SIDDIQI M Z, CHOI G M, IM W T. *Ciceribacter azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing *Bacterium* isolated from activated sludge [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2018, 68(2): 482-486.
- [26] NAKAYASU M, YAMAZAKI S, AOKI Y, et al. Triterpenoid and steroidal saponins differentially influence soil bacterial genera [J]. *Plants*, 2021, 10(10): 2189.
- [27] QUANDT C A, HAELEWATERS D. Phylogenetic advances in Leotiomycetes, an understudied clade of taxonomically and ecologically diverse fungi [J]. *Encyclopedia Mycol*, 2021, 1: 284-294.
- [28] LIU C, XIA R, TANG M, et al. Improved ginseng production under continuous cropping through soil health reinforcement and rhizosphere microbial manipulation with biochar: A field study of *Panax ginseng* from Northeast China [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: 108.
- [29] GU N, ZHANG X, GU X, et al. Transcriptomic and proteomic analysis of the mechanisms involved in enhanced disease resistance of strawberries induced by *Rhodotorula mucilaginosa* cultured with chitosan [J]. *Postharvest Biol Tec*, 2021, 172: 111355.
- [30] 兰艺鸣, 李佳思, 韩梅, 等. 不同林型对林下参产量质量及土壤微生态的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(13): 181-188.

[责任编辑 顾雪竹]