

周界, 李明, 徐友阳, 等. 基于高通量测序的穿心莲连作根际土壤细菌群落多样性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 55-63.
ZHOU Jie, LI Ming, XU Youyang, et al. Analysis of bacterial community diversity in rhizosphere soil of continuous cropping *Andrographis paniculata* based on high-throughput sequencing[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 55-63.

基于高通量测序的穿心莲连作根际土壤 细菌群落多样性分析

周 界¹, 李 明^{1,2}, 徐友阳³, 洪 彪¹, 段书蕾¹, 张慧晔³, 邹江林³

(1 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006; 2 国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点实验室,
广东 广州 510006; 3 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515)

摘要:【目的】研究穿心莲 *Andrographis paniculata* 连作对土壤细菌多样性及种群结构的影响。【方法】通过 16S rRNA 基因高通量测序对连作组 (连作 5 年穿心莲的根际土壤) 和对照组 (连作 5 年穿心莲周边相同土质的未耕作自然土壤) 样品进行测序分析, 比较 2 组土壤细菌的丰富度、多样性和群落结构差异。【结果】 α 多样性指数分析结果显示, 连作组土壤中细菌丰富度指数 Chao1 指数、Observed species 指数显著低于对照组 ($P<0.05$), 连作组土壤中的多样性指数 Shannon 指数和 Simpson 指数均低于对照组, 但差异不显著。主坐标分析及分子方差分析进行组间群落结构差异显著性分析结果显示, 穿心莲连作显著改变了土壤细菌群落结构 ($P<0.05$)。从 2 个处理组土壤样品中共检测到 2769 个可操作分类单元, 分属于 47 门 885 属, 穿心莲连作明显改变了土壤细菌在门和属水平上的结构分布。在门分类水平上, 酸杆菌门 Acidobacteria、变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes 和 Patescibacteria 等 11 个细菌门是 2 个处理组的主要细菌类群, 连作组土壤中变形菌门和酸杆菌门的相对丰度较对照组分别增加了 21.97% 和 46.33% ($P<0.05$), 而 Patescibacteria 较对照组减少了 68.99% ($P<0.05$); 在属分类水平上, 有 10 个优势菌属的相对丰度变化显著 ($P<0.05$), 其中连作组土壤中有益生防细菌黄杆菌属 *Flavobacterium* 和 *Haliangium* 的相对丰度较对照组分别减少了 78.40% 和 54.55%, 而植物病原细菌伯克氏菌属 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 的相对丰度较对照组增加了 804.17%。【结论】穿心莲 5 年连作降低了土壤细菌丰富度和多样性水平, 使土壤微生态系统稳定性降低, 同时有益菌相对丰度显著降低, 而病原菌相对丰度显著增加造成细菌群落结构改变。上述变化打破了原有的土壤微生态平衡, 可能是穿心莲连作障碍的重要原因之一。

关键词: 穿心莲; 连作障碍; 土壤细菌种群结构; 高通量测序; 相对丰度
中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)03-0055-09

Analysis of bacterial community diversity in rhizosphere soil of continuous cropping *Andrographis paniculata* based on high-throughput sequencing

ZHOU Jie¹, LI Ming^{1,2}, XU Youyang³, HONG Biao¹, DUAN Shulei¹, ZHANG Huiye³, ZOU Jianglin³
(1 School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2 Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Production & Development of Cantonese Medicinal Materials, Guangzhou 510006, China; 3 Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China)

收稿日期: 2020-06-25 网络首发时间: 2021-04-02 10:41:08
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210402.1019.008.html>
作者简介: 周 界 (1994—), 男, 硕士研究生, E-mail: 15707489965@163.com; 通信作者: 李 明 (1963—), 女, 教授, 博士, E-mail: 13539843803@163.com
基金项目: 广东省科技计划 (2016A020226050); 广东省重点领域研发计划 (2020B020221002)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of continuous cropping of *Andrographis paniculata* on soil bacterial diversity and community structure. 【Method】 Sequencing analysis of samples from continuous cropping group (rhizosphere soil of *A. paniculata* continuous cropping for five years) and control group (uncultivated natural soil with the same texture as the soil around *A. paniculata* continuous cropping for five years) were performed using 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology. The differences in richness, diversity and community structure of soil bacteria from two groups were analyzed. 【Result】 The analysis results of α diversity index showed that the bacterial richness indices (Chao1 index and Observed species index) in the soil of continuous cropping group were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$), and the diversity indices (Shannon index and Simpson index) in the soil of continuous cropping group were lower than those of the control group, but the differences were not significant. Principal coordinates analysis and molecular variance analysis of community structure between groups showed that continuous cropping of *A. paniculata* significantly changed soil bacterial community structure ($P<0.05$). A total of 2 769 operational taxonomic units were detected from the soil samples of two groups, belonging to 47 phyla and 885 genera. Continuous cropping of *A. paniculata* obviously changed the structure distribution of soil bacteria at the phylum and genus level. At the phylum classification level, 11 bacterial phyla including Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Patescibacteria and etc. were the main bacterial communities in two groups. Compared with the control group, the relative abundance of Proteobacteria and Acidobacteria in the continuous cropping group increased by 21.97% and 46.33% respectively ($P<0.05$), while the relative abundance of Patescibacteria reduced by 68.99% ($P<0.05$). At the genus classification level, the relative abundance of 10 dominant bacterial genera changed significantly ($P<0.05$). Among them, compared with the control group, the relative abundance of the beneficial bacteria *Flavobacterium* and *Haliangium* in the soil of continuous cropping group reduced by 78.40% and 54.55% respectively, while the relative abundance of the plant pathogenic bacterium *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* in the soil of continuous cropping group increased by 804.17%. 【Conclusion】 After five years of *A. paniculata* continuous cultivation, the level of soil bacterial richness and diversity decreased. At the same time, the relative abundance of beneficial bacteria significantly reduced, while the relative abundance of pathogenic bacteria significantly increased, causing a change in the bacterial community structure. The above-mentioned changes broke the original soil microecological balance, which may be one of the important reasons for *A. paniculata* continuous cropping obstacles.

Key words: *Andrographis paniculata*; continuous cropping obstacle; soil bacterial community structure; high-throughput sequencing; relative abundance

中药穿心莲为爵床科 Acanthaceae 植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分, 具有清热解毒、凉血、消肿的功效, 用于感冒发热、咽喉肿痛、口舌生疮、顿咳劳嗽、泄泻痢疾、热淋涩痛、痈肿疮疡、蛇虫咬伤等^[1], 素有“中药抗生素”之称。现代药理研究证明, 穿心莲具有抗菌、抗氧化、抗疟、抗血管生成、抗炎、抗糖尿病等多种药理作用, 由于其显著的临床疗效而被广泛应用, 需求量大, 但连作障碍问题使其质量和产量不稳定^[2]。很多栽培药用植物都存在不同程度的连作障碍, 如人参^[3]、西洋参^[4]、三七^[5]等, 药用植物产生连作障碍的原因有很多, 主要包括: 化感自毒作用、土壤物理性质恶化和养分失衡、土传病害增加、根际土壤微生物群落变化^[6-7]等。目前关于穿心莲连作障碍成因的

研究主要集中在化感自毒作用^[8-12], 也有关于利用平板计数法、BIOLOG 微平板法和 T-RFLP 技术研究连作穿心莲根际土壤微生物的数量、结构和功能多样性的报道^[13]。高通量测序技术具有免培养、高通量的优点, 是获取大量土壤微生物信息的良好工具^[14], 本研究采用 16S rRNA 基因高通量测序研究穿心莲连作对土壤细菌多样性及群落结构的影响, 为揭示穿心莲连作障碍的成因及作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

土样采集地点位于广东省清远市英德市大湾镇, 采集时间为 2018 年 10 月。五点取样法采样, 利用抖根法收集穿心莲根际土壤, 所采土壤样品分为

2 个处理组: 连作组 (连作 5 年穿心莲的根际土壤) 和对照组 (连作 5 年穿心莲周边相同母质的未耕作自然土壤), 每组 5 次重复, 所采土样去除植物残体和石砾等杂物后放入灭菌样品袋, 置冰盒中运回, 在实验室-80 ℃ 条件下保存, 待用。

1.2 仪器与试剂

Daek reader (Clare Chemical Research); Qubit™ fluorometer (Invitrogen); 微型离心机 (Baygene); 涡旋混合器 (其林贝尔); NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific); 电泳仪 (北京六一); 凝胶成像仪 (Tanon); PCR 仪 (BioRad); 冷冻离心机 (Eppendorf)。

MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit (MOBIO); Premix Taq (Ex Taq Version 2.0 plus dye)、DL15000 DNA Marker、100bp DNA Ladder 和 DL2000 DNA Marker (TaKaRa); 琼脂糖 (浩玛生物); Primer 和 Quant-iT™ Broad-Range DNA Assay Kit (Invitrogen); E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega); NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs)。

1.3 细菌多样性测定

DNA 提取与 PCR 扩增: 按照 DNA 提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 抽提后, 利用 NanoDrop One 检测 DNA 的浓度和纯度。PCR 扩增采用的引物为细菌 16S rRNA 基因中的 V4~V5 区引物 515 F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')。PCR 反应体系为: Premix Taq 25 μL, 10 mmol/L 的上、下游引物各 1 μL, DNA (20 ng/μl) 3 μL, Nuclease-free water 20 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃ 5 min; 然后 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s 进行 30 个循环; 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存。PCR 反应结束后, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段长度和浓度。利用 GeneTools Analysis Software (Version 4.03.05.0, SynGene) 对 PCR 产物进行浓度对比后, 按照等质量原则计算各样品所需体积, 将各 PCR 产物进行混合。使用 E.Z.N.A.®Gel Extraction Kit 凝胶

回收试剂盒回收 PCR 混合产物, TE 缓冲液洗脱回收目标 DNA 片段。

建库与测序: 按照 NEBNext®Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®标准流程进行建库操作。使用 Illumina Hiseq 2500 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。(以上试验均由广东美格基因科技有限公司完成)。

1.4 数据处理与分析

对 Illumina Hiseq 2500 测序得到的双端序列数据过滤, 进行前期的质量控制, 然后根据双端序列之间的重叠关系进行拼接, 同时对拼接序列进行质量过滤, 得到有效的拼接序列, 将具有 97% 一致性的序列聚类成为可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU)。将每个 OTU 的代表序列与 Silva 数据库比对, 获得代表性序列物种在各分类水平的注释信息。基于 OTU 丰度表, 使用 QIIME 软件包中的 make_rarefaction_plots.py 等脚本进行 Observed species 指数的稀释曲线数据计算, 并使用 R 软件绘制稀释曲线。基于均一化的 OTU 丰度表, 使用 QIIME 软件包 (V1.9.1) 中的 alpha_diversity.py 脚本进行 4 种多样性指数 (Observed species、Chao1、Shannon、Simpson) 的计算。基于 Unweighted Unifrac 距离矩阵, 使用 qiime2 和 ggplot2 软件包进行主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 并绘图, 采用 PCoA 及分子方差分析 (Analysis of molecular variance, Amova) 进行组间群落结构差异显著性分析。使用 R 软件绘制柱状图、热图等。使用 Excel 2016 和 SPSS 24.0 软件对试验数据进行统计分析, 对处理组间的差异采用独立样本 *t* 检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 穿心莲连作处理对土壤细菌 α 多样性的影响
α 多样性分析结果 (表 1) 显示, 连作组土壤中的丰富度指数包括 Chao1 指数和 Observed species 指数均显著低于对照组 (*P*<0.05), 表明穿心莲连作使土壤细菌群落丰富度显著降低; 连作组土壤中的

表 1 穿心莲连作土壤与对照土壤细菌的 α 多样性¹⁾

Table 1 α diversity of bacteria in soil with continuous cropping of *Andrographis paniculata* and control soil

组别 Group	Chao1 指数 Chao1 index	Observed species 指数 Observed species index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
对照组 Control group	2 798.60±72.31	1 994.60±83.74	9.05±0.40	0.992±0.006 4
连作组 Continuous cropping group	2 546.67±67.61	1 782.40±45.94	8.92±0.12	0.991±0.002 2
<i>P</i>	0.000***	0.001**	0.517	0.877

1) 表中数据为平均值±标准差; “***” 和 “**” 分别表示差异达到 0.01 和 0.001 的显著水平 (*t* 检验)
1) Data in the table are means ± standard deviations; “**” and “***” indicate differences at 0.01 and 0.001 significance levels respectively (*t* test)

多样性指数包括 Shannon 指数和 Simpson 指数均低于对照组,但差异并不显著。整体结果表明穿心莲连作使根际土壤细菌群落多样性减少。

2.2 穿心莲连作处理对土壤细菌 β 多样性的影响

β 多样性是对不同样品间的微生物群落构成进行比较。PCoA 分析中,样品的空间距离越接近,表示样品的物种组成结构越相似。对连作组与对照组土壤样品进行 PCoA 分析(图 1),PC1 的贡献率为 33.63%,PC2 的贡献率为 13.47%,2 个主成分的累计贡献率为 47.10%,可以表征所有的变量特征。结果显示,对照组的 5 个样本能够与连作组 5 个样本明显分开,说明 2 个处理组样品的物种组成结构产生了明显差异。Amova 分析可用于组间群落结构差异显著性分析, P 值小于 0.05 说明组间差异显著。对连作组与对照组土壤样品进行 Amova 分析,结果显示 Amova 分析中 $P=0.011<0.05$,说明两者组间群落结构差异显著。综上所述,穿心莲 5 年连作显著改变了土壤细菌群落结构。

2.3 穿心莲连作处理对土壤细菌群落组成及丰度的影响

基于 Unweighted Unifrac 距离矩阵,通过非加权组平均聚类分析(Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)法对连作组与对照组土壤样品进行门水平上的聚类与柱状图组合分

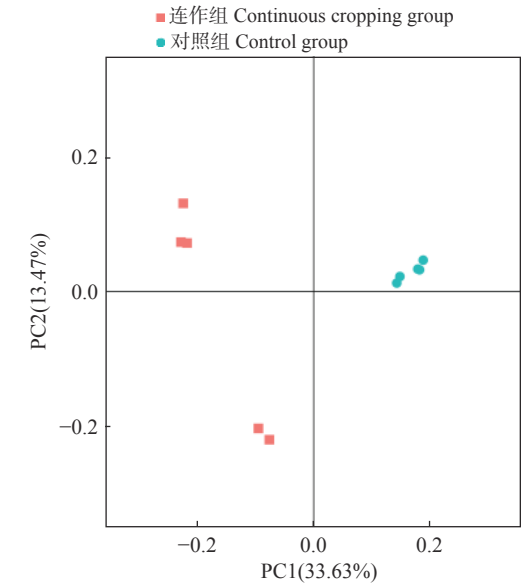
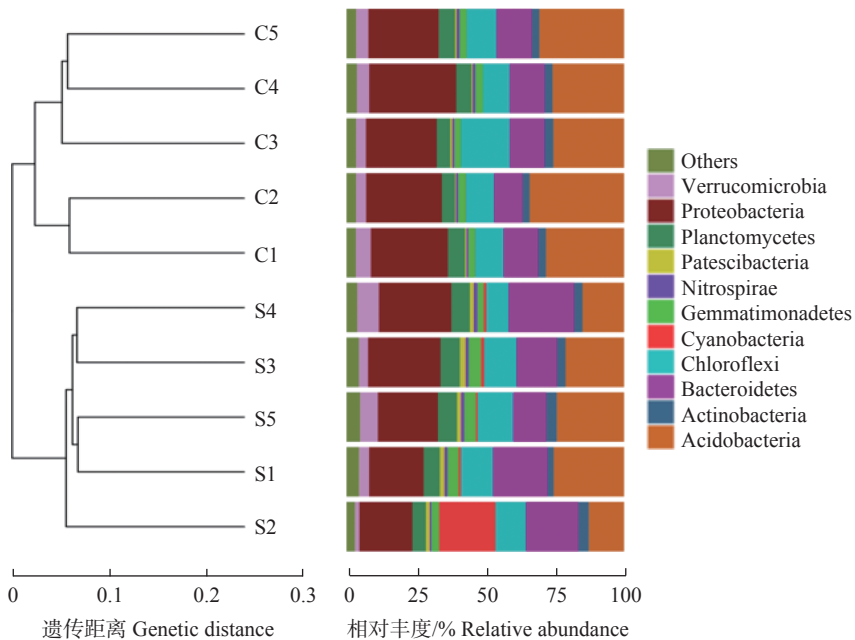


图 1 穿心莲连作土壤与对照土壤的 PCoA (Unweighted Unifrac) 分析

Fig. 1 PCoA (Unweighted Unifrac) analysis of soil of *Andrographis paniculata* continuous cropping and control

析(图 2)。结果显示,连作组 5 个样本与对照组土壤 5 个样本在门水平上各自聚为一类,说明穿心莲 5 年连作明显改变了土壤细菌在门水平上的结构分布。从 2 个处理共检测到 2 769 个 OTU,分属于 47 个门,其中变形菌门 Proteobacteria (相对丰度为



S1~S5 为对照组, C1~C5 为连作组; 图中左侧是 UPGMA 聚类树结构, 右侧是各样品在门水平上的物种相对丰度分布图
S1~S5 belong to the control group, C1~C5 belong to the continuous cropping group; The left side of the figure is the UPGMA cluster tree structure, and the right side is the relative abundance distribution map of each sample at the phylum level

图 2 穿心莲连作土壤与对照土壤细菌在门水平上的 UPGMA 聚类与柱状图组合分析
Fig. 2 UPGMA clustering and histogram combination analysis of bacteria in soil of *Andrographis paniculata* continuous cropping and control at the phylum level

22.53%~27.48%)、酸杆菌门 *Acidobacteria* (相对丰度为 19.62%~28.71%)、拟杆菌门 *Bacteroidetes* (相对丰度为 12.14%~17.75%)、绿弯菌门 *Chloroflexi* (相对丰度为 10.96%~11.62%)、浮霉菌门 *Planctomycetes* (相对丰度为 5.43%~6.26%)、疣微菌门 *Verrucomicrobia* (相对丰度为 4.24%~4.50%)、放线菌门 *Actinobacteria* (相对丰度为 2.86%~3.18%)、芽单胞菌门 *Gemmatimonadetes* (相对丰度为 2.48%~3.53%)、蓝藻细菌门 *Cyanobacteria* (相对丰度为 0.10%~4.81%)、*Patescibacteria* (相对丰度为 0.49%~1.58%) 和硝化螺旋菌门 *Nitrospirae* (相对丰度为 0.89%~1.09%) 这 11 个细菌门是 2 个处理组

的主要细菌类群, 上述门类相对丰度累计在连作组和对照组土壤中分别占细菌总数的 96.44% 和 95.81%。

对连作组与对照组土壤细菌主要细菌门的相对丰度采用独立样本 *t* 检验进行差异显著性分析 (表 2)。结果显示, 拟杆菌门、芽单胞菌门、放线菌门、绿弯菌门、蓝藻细菌门、硝化螺旋菌门、浮霉菌门、疣微菌门的相对丰度在 2 种处理土壤中差异不显著, 而变形菌门、酸杆菌门、*Patescibacteria* 的相对丰度在不同处理土壤中差异显著 ($P<0.05$), 其中连作组土壤中变形菌门、酸杆菌门的相对丰度较对照组分别增加了 21.97%、46.33% ($P<0.05$), 而 *Patescibacteria* 较对照组减少了 68.99% ($P<0.05$)。

表 2 穿心莲连作土壤与对照土壤主要细菌门的相对丰度比较¹⁾

Table 2 Comparison of relative abundance of major bacterial phylums in soil of *Andrographis paniculata* continuous cropping and control

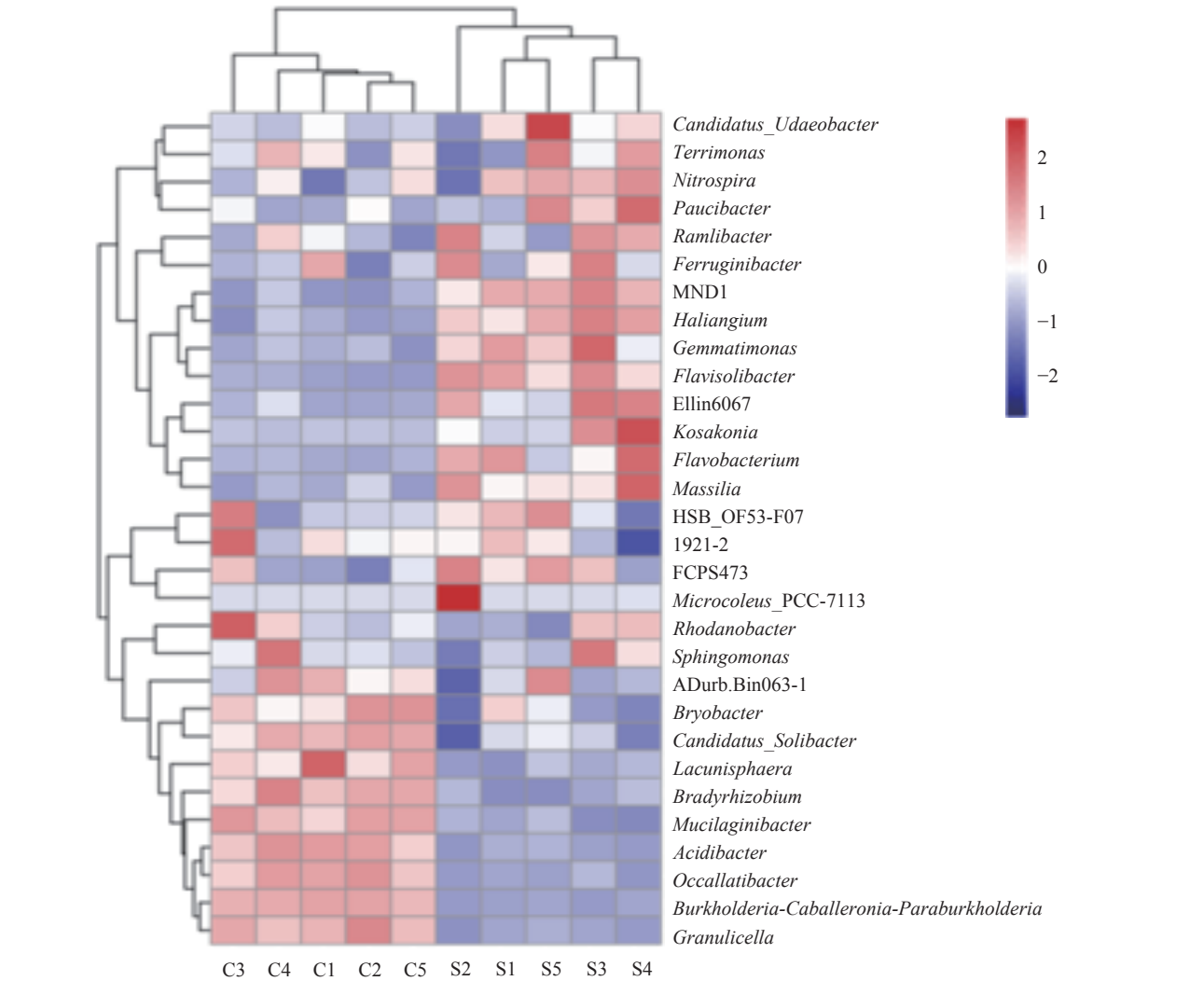
门 Phylum	相对丰度/% Relative abundance		<i>P</i>
	对照组	连作组	
	Control group	Continuous cropping group	
变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	22.53±3.40	27.48±2.42	0.029*
酸杆菌门 <i>Acidobacteria</i>	19.62±5.60	28.71±3.56	0.015*
拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>	17.75±4.57	12.14±1.05	0.050
绿弯菌门 <i>Chloroflexi</i>	10.96±1.81	11.62±3.33	0.705
浮霉菌门 <i>Planctomycetes</i>	6.26±0.91	5.43±0.60	0.129
疣微菌门 <i>Verrucomicrobia</i>	4.50±2.52	4.24±0.74	0.834
放线菌门 <i>Actinobacteria</i>	3.18±0.65	2.86±0.23	0.325
芽单胞菌门 <i>Gemmatimonadetes</i>	3.53±0.93	2.48±0.17	0.064
蓝藻细菌门 <i>Cyanobacteria</i>	4.81±8.69	0.10±0.04	0.293
<i>Patescibacteria</i>	1.58±0.27	0.49±0.15	0.000***
硝化螺旋菌门 <i>Nitrospirae</i>	1.09±0.26	0.89±0.17	0.184

1) 表中数据为平均值±标准差; “*” 和 “***” 分别表示差异达到 0.05 和 0.001 的显著水平 (*t* 检验)

1) Data in the table are means ± standard deviations; “*” and “***” indicate differences at 0.05 and 0.001 significance levels respectively (*t* test)

在属分类水平上, 根据所有样品在属分类水平的物种注释及丰度信息, 选取穿心莲连作土壤与对照土壤细菌丰度排名前 30 个物种及其在每个样品中的丰度信息绘制热图, 并从分类信息和样品间差异 2 个层面进行聚类 (图 3)。结果显示, 穿心莲连作土壤 5 个样本与对照土壤 5 个样本丰度排名前 30 个属的相对丰度各自聚为一类, 说明穿心莲 5 年连作明显改变了土壤细菌在属水平上的结构分布。2 个处理组的主要细菌属为黄杆菌属 *Flavobacterium*

(相对丰度为 1.84%~8.52%)、*Bryobacter* (相对丰度为 1.57%~2.15%)、伯克氏菌属 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (相对丰度为 0.24%~2.17%)、HSB_OF53-F07 (相对丰度为 1.81%~1.94%)、*Candidatus_Solibacter* (相对丰度为 1.03%~1.76%)、ADurb.Bin063-1 (相对丰度为 1.16%~1.65%)、MND1 (相对丰度为 0.37%~1.46%)、*Acidibacter* (相对丰度为 0.28%~1.43%)、*Mucilaginibacter* (相对丰度为 0.38~1.37%)、



S1~S5 为对照组, C1~C5 为连作组; 热图中着色方格对应的值为样品在属分类上的 Z 值, 即为样品在该分类上的相对丰度和所有样品在该分类的平均相对丰度的差除以所有样品在该分类上的标准差所得到的值; 方格颜色越红, 说明该样品相对丰度越高

S1~S5 belong to the control group, C1~C5 belong to the continuous cropping group; The value corresponding to the colored square in the heatmap is the Z score of a sample in the genus classification, which is the difference between the relative abundance of the sample in the category and the average relative abundance of all samples in the category divided by the standard deviation of all samples in the category; The redder the color of the box, the higher the relative abundance of the sample

图 3 穿心莲连作土壤与对照土壤中相对丰度前 30 的细菌群落在属水平的 heatmap

Fig. 3 Heat map of bacterial communities with top 30 relative abundances in soil of *Andrographis paniculata* continuous cropping and control at the genus level

Ellin6067 (相对丰度为 0.41%~1.19%)、芽单胞菌属 *Gemmatimonas* (相对丰度为 0.57%~1.18%)、*Haliangium* (相对丰度为 0.50%~1.10%)、硝化螺旋菌属 *Nitrospira* (相对丰度为 0.88%~1.08%)、*Candidatus_Udaeobacter* (相对丰度为 0.68%~1.07%) 和 1921-2 (相对丰度为 0.87%~1.00%)。

对穿心莲连作土壤与对照土壤细菌主要细菌属的相对丰度采用独立样本 *t* 检验进行差异显著性分析 (表 3)。结果显示, HSB_OF53-F07、ADurb.Bin063-1、硝化螺旋菌属、1921-2、*Candidatus_Udaeobacter* 的相对丰度在 2 种处理土壤中差异不

显著 ($P>0.05$), 而黄杆菌属、*Bryobacter*、*Candidatus_Solibacter*、伯克氏菌属、MND1、芽单胞菌属、*Mucilaginibacter*、*Acidibacter*、Ellin6067、*Haliangium* 的相对丰度在不同处理土壤中差异显著 ($P<0.05$), 其中连作组土壤中 *Bryobacter*、*Candidatus_Solibacter*、*Mucilaginibacter*、*Acidibacter*、伯克氏菌属的相对丰度较对照组分别增加了 36.94%、70.87%、260.53%、410.71% 和 804.17% ($P<0.05$), 而黄杆菌属、MND1、芽单胞菌属、Ellin6067、*Haliangium* 的相对丰度较对照组分别减少了 78.40%、74.66%、51.69%、65.55% 和 54.55% ($P<0.05$)。

表 3 穿心莲连作土壤与对照土壤细菌主要细菌属相对丰度比较¹⁾

Table 3 Comparison of relative abundance of major bacterial genera in soil of *Andrographis paniculata* continuous cropping and control

属 Genus	相对丰度/% Relative abundance		P
	对照组	连作组	
	Control group	Continuous cropping group	
<i>Flavobacterium</i>	8.52±4.19	1.84±0.41	0.023*
HSB_OF53-F07	1.94±0.50	1.81±0.49	0.672
<i>Bryobacter</i>	1.57±0.35	2.15±0.23	0.014*
ADurb.Bin063-1	1.16±0.66	1.65±0.38	0.182
<i>Candidatus_Solibacter</i>	1.03±0.33	1.76±0.17	0.005**
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0.24±0.05	2.17±0.13	0.000***
<i>Nitrospira</i>	1.08±0.26	0.88±0.17	0.172
1921-2	0.87±0.20	1.00±0.18	0.319
MND1	1.46±0.28	0.37±0.16	0.000***
<i>Candidatus_Udaeobacter</i>	1.07±0.63	0.68±0.11	0.216
<i>Gemmatimonas</i>	1.18±0.31	0.57±0.09	0.010*
<i>Mucilaginibacter</i>	0.38±0.15	1.37±0.18	0.000***
<i>Acidibacter</i>	0.28±0.09	1.43±0.23	0.000***
Ellin6067	1.19±0.52	0.41±0.14	0.026*
<i>Haliangium</i>	1.10±0.18	0.50±0.08	0.000***

1) 表中数据为平均值±标准差; “*”、“**”和“***”分别表示差异达到0.05、0.01和0.001的显著水平(*t*检验)

1) Data in the table are means±standard deviations; “*”, “**” and “***” indicate differences at 0.05, 0.01 and 0.001 significance levels respectively (*t* test)

3 讨论与结论

土壤中的微生物群落对植物的生长发育具有重要作用^[15], 其中细菌具有维持土壤肥力的作用^[16], 连作通常会使土壤细菌数量降低, 导致土壤肥力类型由高肥力的“细菌型”向低肥力的“真菌型”转化^[17]。土壤细菌的丰富度和多样性对于维持土壤生态健康发挥着关键作用^[18]。本研究发现, 5 年连作处理使穿心莲根际土壤细菌较对照丰富度显著降低, 多样性减少, 与谭勇等^[19]对未种植三七土壤与 3 年生三七根际土壤细菌群落多样性水平研究的结果类似。穿心莲在其生长过程中会向土壤中释放阿魏酸、对羟基苯甲酸等酚酸类化感自毒物质^[20]。有研究指出, 一定浓度的阿魏酸、对羟基苯甲酸及其混合酚酸会抑制土壤氨化细菌、硝化细菌和反硝化细菌的生长^[21]。据此可以推测, 在本研究中, 经

过 5 年连作处理后, 穿心莲根际土壤中可能积累了一定量的化感自毒物质而抑制了部分土壤细菌的生长, 从而降低了细菌种群多样性和丰富度水平。

本研究结果显示, 穿心莲 5 年连作显著改变了土壤细菌群落结构。从 2 个处理组土壤样品中共检测到 2 769 个 OTU, 分属于 47 门 885 属, 穿心莲 5 年连作明显改变了土壤细菌在门和属水平上的结构分布。在门水平上, 连作穿心莲根际土壤中优势细菌类群为变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门、疣微菌门、放线菌门和芽单胞菌门, 与前人研究连作穿心莲的优势细菌类群结果大致相同^[13]。在 2 个处理组中丰度最高的是变形菌门和酸杆菌门, 这 2 种菌门在 2 个处理组中合计占比均超过 40%。变形菌门在土壤中的 C、N 和 S 循环中起着关键作用^[22], 但同时也含有一些致病菌^[23], 因此连作组土壤中变形菌门的相对丰度较对照组显著

增加,可能会增加一些不利于穿心莲生长发育的致病菌。酸杆菌门是寡营养细菌^[24],可以作为较贫瘠土壤环境的指示^[25],而连作组土壤中酸杆菌门的相对丰度较对照组显著增加,说明连作土壤的营养状况出现恶化。门水平上变化显著的还有 *Patescibacteria*,但 *Patescibacteria* 没有可培养细菌代表,目前对其功能还不了解^[26]。在属水平上,有 10 个优势菌属的相对丰度变化显著 ($P<0.05$),其中拟杆菌门下的黄杆菌属、变形菌门下的伯克氏菌属、*Haliangium* 尤其值得关注。有报道指出黄杆菌属具有植物促生作用^[27],部分菌群可产生较高活性的几丁质酶抑制植物病原真菌的生长^[28]。已有研究从 *Haliangium* 中分离出抗植物病原真菌物质,说明 *Haliangium* 具有潜在的生防作用^[29]。连作组中黄杆菌属和 *Haliangium* 相对丰度较对照组显著减少,这 2 种有益生防细菌的相对丰度显著下降可能导致土壤中植物病原真菌数量增加。伯克氏菌属是一类重要的植物病原细菌,会引起植物腐烂、枯萎和严重坏死等病害症状^[30],因此连作组土壤中伯克氏菌属相对丰度的显著增加可能会对穿心莲的生长发育产生负面影响。

综上所述,穿心莲 5 年连作降低了土壤细菌丰富度和多样性水平,使土壤微生态系统稳定性降低,同时有益菌相对丰度显著降低,而病原菌相对丰度显著增加造成细菌群落结构改变。土壤细菌丰富度和多样性水平降低,细菌群落结构改变,打破了原有的土壤微生态平衡,可能是穿心莲连作障碍的重要原因之一。合理轮作、间作及施加合适的土壤改良剂等措施可以增加土壤微生物多样性和改善土壤微生物群落结构,对土壤微生态环境产生积极影响,是缓解连作障碍的有效措施^[31-34],目前有关穿心莲连作障碍缓解措施的研究正在进行中。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1 部: 2015 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 268.

[2] LI J R, CHEN X Z, ZHAN R T, et al. Transcriptome profiling reveals metabolic alteration in *Andrographis paniculata* response to continuous cropping[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 137: 585-596.

[3] 王瑞, 董林林, 徐江, 等. 基于病虫害综合防治的人参连作障碍消减策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3890-3896.

[4] 蒋景龙, 余妙, 李丽, 等. 西洋参根腐病发生与根际土壤细菌群落结构变化关系研究[J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4399-4407.

[5] QIAO Y J, ZHANG J J, SHANG J H, et al. GC-MS-based identification and statistical analysis of liposoluble components in the rhizosphere soils of *Panax notoginseng*[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(36): 20557-20564.

[6] 张亚琴, 陈雨, 雷飞益, 等. 药用植物化感自毒作用研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1946-1956.

[7] 檀国印, 杨志玲, 袁志林, 等. 药用植物连作障碍及其防治途径研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(4): 197-204.

[8] 曾令杰, 刘意, 褚晨亮, 等. 穿心莲化感作用与 GAP 栽培规范的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 5-7.

[9] 李俊仁, 陈秀珍, 刘凯频, 等. 穿心莲连作土壤提取物对其种子的化感作用[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(3): 389-395.

[10] 李玲梅, 李明. 不同处理方法对穿心莲种子萌发影响的初步研究[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(4): 371-374.

[11] 黎韵琪, 李明, 唐堃, 等. 穿心莲营养体的化感自毒作用研究[J]. 北方园艺, 2014(21): 157-160.

[12] ZHENG Y B, LI M. Autotoxicity of phenolic acids in root exudates of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees[J]. *Allelopathy Journal*, 2018, 45(2): 153-162.

[13] 李珍, 陈义三, 陈荣珠, 等. 生物炭对连作穿心莲根际土壤微生物的影响[J]. 上饶师范学院学报, 2019, 39(6): 50-55.

[14] BRUMFIELD K D, HUQ A, COLWELL R R, et al. Microbial resolution of whole genome shotgun and 16S amplicon metagenomic sequencing using publicly available NEON data[J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228899. doi: 10.1371/journal.pone.0228899.eCollection2020.

[15] MENDES R, GARBEVA P, RAAIJMAKERS J M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 634-663.

[16] 沈菊培, 张丽梅, 贺纪正. 几种农田土壤中古菌、真菌和细菌的数量分布特征[J]. 应用生态学报, 2011, 22(11): 2996-3002.

[17] 胡江春, 薛德林, 王书锦, 等. 大豆连作障碍研究III. 海洋放线菌 MB-97 促进连作大豆增产机理[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(9): 1095-1098.

[18] 寇智瑞, 周鑫斌. 不同连作年限黄壤烟田土壤细菌群落的差异[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(3): 511-521.

[19] 谭勇, 崔尹瞻, 季秀玲, 等. 三七种植前后土壤细菌群落结构与多样性分析[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2016, 41(6): 92-99.

[20] 张庚. 穿心莲 (*Andrographis paniculata*(Brum. f.)Nees)

连作的自毒作用研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2010.

[21] 母容, 潘开文, 王进闯, 等. 阿魏酸、对羟基苯甲酸及其混合液对土壤氮及相关微生物的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(3): 793-800.

[22] WANG Y Z, XU X M, LIU T M, et al. Analysis of bacterial and fungal communities in continuous-cropping ramie (*Boehmerianivea* L. Gaud) fields in different areas in China[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3264.

[23] 张重义, 陈慧, 杨艳会, 等. 连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2843-2848.

[24] JOHNSTON-MONJE D, LUNDBERG D S, LAZAROVITS G, et al. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil[J]. *Plant and Soil*, 2016, 405(1/2): 337-355.

[25] 何玮, 郭琳微, 樊鹏辉, 等. 黄花棘豆在腐解过程中的化感作用及其土壤细菌群落结构分析[J]. *草业学报*, 2015, 24(7): 21-29.

[26] FREY B, RIME T, PHILLIPS M, et al. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3): fiw018. doi: 10.1093/femsec/fiw018.

[27] BHATTACHARYYA P N, JHA D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350.

[28] 陈三凤, 李季伦, 裘维蕃. 关于抑制植物病原真菌几丁质酶来源及效应的研究强作用黄杆菌的分离和鉴定[J]. *植物病理学报*, 1992(4): 37-41.

[29] KUNDIM B A, ITOU Y, SAKAGAMI Y, et al. New haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2003, 56(7): 630-638.

[30] 张琦梦. 伯克氏菌属植物病原菌 DNA 条形码检测技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.

[31] ZHAO J, ZHANG D, YANG Y Q, et al. Dissecting the effect of continuous cropping of potato on soil bacterial communities as revealed by high-throughput sequencing[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233356. doi: 10.1371/journal.pone.0233356.

[32] DU L, HUANG B, DU N, et al. Effects of garlic/cucumber relay intercropping on soil enzyme activities and the microbial environment in continuous cropping[J]. *HortScience*, 2017, 52(1): 78-84.

[33] 王悦, 杨贝贝, 王浩, 等. 不同种植模式下丹参根际土壤微生物群落结构变化[J]. *生态学报*, 2019, 39(13): 4832-4843.

[34] 王彩云, 武春成, 曹霞, 等. 生物炭对温室黄瓜不同连作年限土壤养分和微生物群落多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(4): 1359-1366.

【责任编辑 庄 延】