

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (2) :205 - 213; 4 February 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140289

## 三七连作根际土壤微生物区系的 16S rRNA 系统遗传多样性

陆晓菊<sup>1</sup>, 官会林<sup>1\*</sup>, 张正芸<sup>1</sup>, 马永存<sup>2</sup>, 唐蜀昆<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 云南师范大学能源与环境科学学院, 云南 昆明 650092

<sup>2</sup> 云南大学云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091

**摘要:** 【目的】针对三七连作土传病害的生物防治技术研究, 探讨其根际土壤微生物多样性与根腐病害的关联性。【方法】采集三七连作 6 年的健康植株与根腐病植株根际土壤, 采用多种培养基进行分离、纯化, 并对分离菌株提取 DNA, 用其 16S rRNA 序列的通用引物进行 PCR 扩增, 进行 Blast 同源及其系统进化树分析。【结果】从采集样品中分离出的菌株分布于细菌域 (Bacteria) 中的 4 个门 (Phyla) 共 40 个属 (Genera), 其中从健康植株组土壤中培养出 179 株菌, 分布于 30 个属, 以伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 及芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为优势菌群; 根腐病株组土样共培养出 117 株菌, 分布于 29 个属, 以罗尔斯顿菌属 (*Ralstonia*——病原菌)、单胞菌属 (*Sphingomonas*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 等为优势菌群; 其中黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 的分离菌株仅从病株组土壤中分离到; 发现其可能新种 5 株; 健康组与根腐病组土壤 EC 值及各元素离子浓度差异明显 ( $P < 0.05$ ), 健康组土壤中的优势微生物种群分布与土样中的 EC 值、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{K}^+$  及全盐量呈负相关关系 (显著度  $P < 0.01$ )。【结论】研究表明, 诱导三七连作土传病害的发生, 除病原菌作用影响外, 还与土壤理化性质和土壤微生物的种群结构及其优势微生物的种群比例具有密切的关联性, 特别是土壤中有益微生物 (*Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces* 等) 的丰度, 对评价三七土壤健康状况及病害防治预报具有重要的指导意义。

**关键词:** 三七, 根腐病害, 土壤微生物, 多样性分析, 土壤理化性质

**中图分类号:** Q938.1      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0205-09

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属植物, 是我国名贵地道中药材, 主产于云南, 广西及四川等地有少量栽培<sup>[1-2]</sup>。三七是性喜温暖阴湿的多年生植物, 通常采用免耕阴蔽的栽培方式, 因连年大面积单一种植, 导致土壤连作障碍因素日益突出, 特别是土传根腐病害严重, 因根腐病害的常年损失达 5% - 20%, 严重的达 70% 以

上, 成为制约三七产业持续发展的重要屏障<sup>[3-4]</sup>。土壤系统不健康的一个重要表征是土传病害的爆发, 这是土壤微生物群落结构失衡和微生态环境恶化的结果<sup>[5-6]</sup>, 土壤微生物是影响土壤生态过程的一个重要因素, 土壤微生物结构稳定和功能性多样性对维持土壤系统健康起着重要的作用<sup>[7-8]</sup>, 其活性可作为土壤肥力评价的参考指标之一, 同时也是土

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (41361075); 云南省应用基础研究重点项目 (2013FA015); 云南省教育厅科学研究基金重大专项项目 (ZD2013008)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-871-65912903; E-mail: ghl0871@aliyun.com

**作者简介:** 陆晓菊 (1990 -), 女, 云南人, 硕士研究生, 从事土壤微生物生态研究。E-mail: lukechen615@163.com

**收稿日期:** 2014-06-05; **修回日期:** 2014-10-13

壤自净能力评价的一个重要指标<sup>[9-10]</sup>。土壤微生物作为土壤有机质和养分转化与循环的动力,直接关系到土壤养分的有效性<sup>[11]</sup>。近年来,将土壤微生物群落结构组成作为土壤质量健康与否的生物学诊断指标研究已备受关注<sup>[10-12]</sup>。

目前对于三七连作障碍的研究侧重于从土壤理化性质和土壤供肥性能等方面研究<sup>[13-14]</sup>,而结合土壤微生物种群结构及其多样性与连作障碍互作影响方面的研究鲜见报道。土壤微生物的多样性和群落结构变化在一定程度上反映了土壤的质量<sup>[15]</sup>,而土壤微生物结构和活性的稳定性取决于微生物多样性<sup>[16]</sup>。本文针对三七连作障碍土壤根腐病害的生物防治技术,采用现代分子生物技术的研究方法,对比研究根际土壤理化性质与微生物区系及多样性分布与根腐病害的关联性,为三七种植土壤质量评价及其连作障碍土壤的生物修复方面提供指导依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品采集:**样品于2013年8月9日采集于文山州丘北和砚山三七集中种植区的二年生长期的三七园地土壤,采样区已连续种植三七6年,由于多年连作,三七园地土壤供肥性能及土传病害等障碍因素突出。按三七健康株组与根腐病组土壤编号,分别采集植株根系附着土装入自封保鲜袋,样品编号为健康株组土样 YH、QH,根腐病组土样 YB、QB,每组编号样本 70-80 株根系附着土混匀。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**配制培养基试剂均为国产分析纯试剂;dNTPs、*Taq* 酶、引物 PA、PB 等购自上海生工生物工程技术有限公司;DNA Marker 购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司。电泳仪购自 Bio-Rad 公司;PCR 仪购自德国 Biometra 公司;28℃ 恒温培养箱购自上海精宏实验设备有限公司(GNP-9050 型)。

**1.1.3 分离培养基:**高氏一号琼脂培养基;牛肉膏蛋白胨培养基;淀粉-酪蛋白培养基(MS5);淀粉-纤维素培养基(T3);国际链霉菌计划培养基4(ISP4);马铃薯浸汁培养基(PDA);马丁氏琼脂培养基;察氏琼脂培养基。pH 值为 5.5-6.0。

### 1.2 菌种分离采用平板梯度稀释法

2.0 g 新鲜土样加入 20.0 mL 无菌水,室

温,150 r/min 摇匀 45 min,使土样分散。取 1 mL 加入 9.0 mL 无菌水,连续稀释 3 次。取 100 μL 样品液均匀涂布在分离培养基上。28℃ 培养 4 d,同一土样的分离培养基根据菌落形态、大小、颜色去重复后,进行平板菌落计数、挑单菌落在 ISP2 琼脂培养基上划线纯化,纯化后菌株用于后续实验。

### 1.3 分离菌株的基因组提取

**1.3.1 菌体 DNA 的提取:**参照徐平、冯广达、袁小凤等<sup>[16-19]</sup>的方法进行。

**1.3.2 16S rRNA 基因扩增:**16S rRNA 基因扩增,正向引物:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3';反向引物:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min 30 s,32 个循环;72℃ 10 min。

### 1.4 16S rRNA 基因测序及系统进化分析

16S rRNA 基因的 PCR 产物由上海生工生物工程技术有限公司完成测序,测序所得结果用 Blast 软件在 GenBank/EMBL/DDBJ 等数据库结合 EzTaxon server 软件在其生效发表种数据库中进行相似性搜索。选取同源性比较高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象,用 Clustal-X 软件进行多重序列比对,利用 MEGA 5.1 软件,采用邻接法(Neighbor Joining Method)进行系统进化树构建,使用生态学多样性统计工具中的 PAST 软件来对其三七健康土壤与根腐发病土壤的原核微生物类群进行主成分及聚类分析(PCA)<sup>[20]</sup>。

### 1.5 土壤理化指标检测:

分别把健康株组(YH、QH)和根腐病组(YB、QB)土壤样品放置于室内通风阴干,磨细,过 100 目筛子,取出 50 g 风干土与 250 mL 去离子水(1:5 水土比)经过浸泡和振动使土壤盐分充分溶解后,进行土壤盐分离离子元素的测定。Ca<sup>2+</sup> 用 0.01 mol/L 的 EDTA 二钠盐滴定法;CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 用双指示剂滴定法;Cl<sup>-</sup> 用 0.025 mol/L 的 AgNO<sub>3</sub> 滴定;NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 用酚二磺酸比色法;SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 用 EDTA 间接络合滴定;K<sup>+</sup> 用火焰光度计测定;全盐含量用烘干法测定;土壤 EC 值用 LF91 型电导率仪测定<sup>[21]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 三七根际土壤各类微生物区系差异

采用牛肉膏蛋白胨、MS5、T3、ISP4、PDA、马丁

氏及高氏培养基, 分别对三七健康组和根腐病组土壤中的微生物进行培养分离, 经纯化、形态去重复后共分到 296 个菌。从表 1 看出, 植株健康组 YH 和 QH 土壤中微生物总菌株数分别为 99 株、80 株, 植株根腐病组 YB 和 QB 土壤中的微生物总菌株数则分别为 53 株、64 株; 从细菌、放线菌与真菌的分

布比例来看, 健康组土壤中放线菌与总菌株比例均高于根腐病株土壤, 而真菌占总菌株比例则相反, 表现为健康组土壤低于根腐病组土壤, 而细菌占总菌株数比例总体差异不大。因此, 植株根腐病组与健康组土壤中的三大类群微生物区系及其比例方面, 都有不同程度的差异性。

表 1. 三七植株健康组与根腐病组根际土壤微生物群落差异

Table 1. The discrepancy of Microbial Populations in the healthy and blight *Panax notoginseng* soils

Soil samples	Strains number			Total number	Percentage /%		
	Fungi	Bacteria	Actinomyces		Fungi	Bacteria	Actinomyces
YH	5	56	38	99	5.05	56.57	38.38
YB	9	36	8	53	16.98	67.92	15.09
QH	6	45	29	80	7.50	56.25	36.25
QB	16	39	9	64	25.00	60.94	14.01

## 2. 2 基于 16S rRNA 基因系统进化的群落区系分析

对已分离得到的形态去重复的 296 株菌进行 16(18)S rRNA 基因测序, 剔除重复序列, 并构建基于 16S rRNA 基因的系统进化树(图 1)。结果表明, 已分离的 260 株菌(不含真菌株)分布于细菌域中的 4 个门共 40 个属, 并且植株健康组与根腐病组土壤中的细菌群落区系组成具有明显差异(表 2)。其中, 从植株健康组 YH 和 QH 土壤中分离的菌株主要分布于变形菌门(Proteobacteria)中的 *Burkholderia*, 放线菌门(Actinobacteria)中的 *Arthrobacter*, *Streptomyces* 以及壁厚菌门(Firmicutes)中的 *Bacillus*, 没有分离到拟杆菌门(Bacteroidetes)的菌株; 而从根腐病组 QB 和 YB 土壤中分离的菌株主要分布于变形杆菌门(Proteobacteria)中的 *Ralstonia*, *Sphingomonas*, 放线菌门(Actinobacteria)中的 *Arthrobacter* 和壁厚菌门(Firmicutes)中的 *Paenibacillus* 以及拟杆菌门(Bacteroidetes)中的 *Chryseobacterium*, *Pedobacte*, *Dyadobacter* 菌株。因此, 三七健康组与根腐病组土壤中的细菌群落区系组成差异主要体现在: (1) 变形菌门(Proteobacteria)中的 *Burkholderia*, 放线菌门(Actinobacteria)中的 *Arthrobacter*, *Streptomyces* 以及壁厚菌门(Firmicutes)中的 *Bacillus* 菌株是健康组土壤的优势菌群。(2) 变形杆菌门(Proteobacteria)中的 *Ralstonia* 和 *Stenotrophomonas* 是根腐病组土壤中的优势类群。(3) 其他属的菌株在根腐病组和健康组土壤中的分布差异性不大, 但从其多样性上反映

出健康组土壤比根腐病组土壤丰富。

## 2. 3 三七根际土壤原核微生物区系属间差异

进一步统计分析三七根际土壤原核微生物区系属间差异发现: 植株根腐病组与健康组土壤, 在根系原核微生物区系属间具有明显差异(表 3), 其中植株健康组土样培养出 179 株菌, 来源于 30 个属; 而根腐病株组土样共培养出 117 株菌, 来源于 29 属。在植株健康组土壤中以伯克氏菌(*Burkholderia*)、链霉菌(*Streptomyces*)及节细菌(*Arthrobacter*)为优势菌群; 在根腐病株组土壤中, 罗尔斯顿菌(*Ralstonia*——病原菌), 寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)种类较多。

## 2. 4 三七根际土壤微生物区系种间差异

将测序结果进行 Blast 同源分析, 将其同源性大于 98% 的菌株, 暂定为与其最相似的种, 而同源性大于 90% 而小于 98% 的菌株, 暂定为潜在新种。从表 4 看出, 在三七健康组土壤中发现与 *Arthrobacter psychrochitiniphilus*, *Cupriavidus gilardii* 最相近的 3 株分离菌株, 其 16S rRNA 基因同源性低于 98%, 为潜在新种, 在根腐病组土壤中发现与 *Pseudoduganella violaceinigra* 最相近的 2 株分离菌株, 其 16S rRNA 基因同源性也低于 98%, 为潜在新种。在健康植株土壤中以伯克氏菌属(*Burkholderia*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、链霉菌属(*Streptomyces*)及芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌群; 根腐病株组以罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*——病原菌)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)等为优势菌群。从表中可以看出, 其他属的分离菌株对于三七



图 1. 三七健康植株与根腐病株根际土壤细菌群落基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 1. Neighbour-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences obtained from the soil samples from root area of healthy and root rot plants in soil and their closely related sequences downloaded from GenBank. All of bootstrap values over 50 are shown based on neighbour-joining analyses of 1000 resamples datasets. Bar, 0.05 sequence divergence. The sequence of *Methanobacterium aarhusense* DSM 15219<sup>T</sup> (AY386124) was used as outgroup. Note: red mark indicated strains from the rhizosphere soil of root rot plants; blue mark indicated strains from the rhizosphere of healthy plants.

表 2. 三七健康组与根腐病组根际土壤微生物菌株差异

Table 2. The Discrepancy of Microbial Strains in the healthy and blight *Panax notoginseng* soils

Soil samples	Strains number				Total number	Percentage / %			
	Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria	Bacteroidetes		Proteobacteria	Firmicutes	Actinobacteria	Bacteroidetes
YH	53	19	27	0	99	53.53	19.19	27.27	0
YB	36	7	8	2	53	67.92	13.21	15.09	3.77
QH	50	11	19	0	80	62.50	13.75	23.75	0
QB	42	6	12	4	64	65.63	9.37	18.75	6.25

表 3. 三七健康组与根腐病组根际土壤细菌的属间差异

Table 3. The Discrepancy among microbial intergeneric in the healthy and blight *Panax notoginseng* soils

Genera	In healthy soil	In blight soil
<i>Burkholderia</i>	39	7
<i>Ralstonia</i>	2	14
<i>Cupriavidus</i>	9	4
<i>Novosphingobium</i>	2	4
<i>Arthrobacter</i>	25	9
<i>Curtobacterium</i>	2	0
<i>Bacillus</i>	13	6
<i>Sphingobium</i>	1	0
<i>Rhodococcus</i>	6	3
<i>Herbaspirillum</i>	1	0
<i>Mesorhizobium</i>	4	0
<i>Leifsonia</i>	1	0
<i>Streptomyces</i>	13	7
<i>Brevundimonas</i>	2	0
<i>Sphingomonas</i>	6	7
<i>Mycobacterium</i>	2	0
<i>Amycolatopsis</i>	2	3
<i>Flavobacterium</i>	0	2
<i>Microbacterium</i>	2	4
<i>Pseudoxanthomonas</i>	2	3
<i>Acinetobacter</i>	3	2
<i>Pedobacter</i>	0	1
<i>Stenotrophomonas</i>	2	13
<i>Variovorax</i>	2	4
<i>Enterobacter</i>	0	3
<i>Comamonas</i>	0	2
<i>Serratia</i>	0	2
<i>Kaistia</i>	1	3
<i>Massilia</i>	6	2
<i>Pseudoduganella</i>	7	1
<i>Pseudogulbenkiania</i>	2	0
<i>Duganella</i>	3	2
<i>Sinomona</i>	5	0
<i>Paenibacillus</i>	4	3
<i>Micrococcus</i>	4	0
<i>Methylobacterium</i>	2	0
<i>Achromobacter</i>	0	1
<i>Delftia</i>	4	1
<i>Dyadobacter</i>	0	2
<i>Bosea</i>	0	2
Total	179 Strain / 30 genera	117 Strain / 29 genera

健康土壤和发病土壤来说差异不大。无论是三七健康植株还是根腐病株土壤,其真菌的种群数均较少,其中健康植株土壤中的真菌主要是展青霉(*Penicillium patulum*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)其种群相对少。根腐病植株土壤中的真菌种群和菌种都相对比较丰富,除了展青霉(*Penicillium patulum*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)主要是尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*-病原菌),还有芽枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)。

使用生态学多样性统计工具中的 PAST 软件来对其三七健康土壤与根腐发病土壤的原核微生物类群进行主成分及聚类分析的结果如图 2 所示。图中 1-17 分别代表健康植株和根腐病植株土壤中分离得到的菌株的各个属,1-17 分别为:*Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Streptomyces*, *Sinomona*, *Variovorax*, *Cupriavidus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Massilia*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Pseudoduganella*, *Pedobacter*。分析结果显示:第 1 和第 2 主成份 (PCA1、PCA2) 分别占总变异的 70.69% 和 19.12%, 所以第 1 和第 2 主成份是变异的主要来源。并且第一个主成分中的健康组 (QH、YH) 与根腐病组 (QB、YB) 间土壤微生物多样性分布具有显著的差异性 ( $P < 0.01$ ), 健康组土样微生物群落分布均匀, 种群相对丰富, 尤其是健康组的 1 (*Burkholderia*), 2 (*Arthrobacter*), 3 (*Bacillus*), 5 (*Streptomyces*) 均在 PCA1 的正方向; 而根腐病组土样微生物群落分布相对集中, 种群数量少, 并且根腐病土样中的优势菌群 4 (*Ralstonia*), 13 (*Stenotrophomonas*) 则只在其负方向; 健康植株组 QH 与 YH 土样之间微生物多样性分布差异不明显 ( $P > 0.05$ ); 根腐病组土样 QB 与 YB 之间的微生物多样性分布差异也不明显 ( $P > 0.05$ )。而健康组和根腐病组土样中分离得到的微生物类群多样性组成及其区系分布有明显变化差异。

表 4. 三七健康组与根腐病组根际土壤微生物区系种间差异

Table 4. The Discrepancy among microbial interspecific in the healthy and blight *Panax notoginseng* soils

Species	Similarity /%	In healthy soil	In blight soil
<i>Burkholderia dabaoshanensis</i>	99.25	8	2
<i>Burkholderia stabilis</i>	100	8	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	97.85	4	0
<i>Burkholderia anthina</i>	100	5	0
<i>Ralstonia pickettii</i>	99.7	0	9
<i>Ralstonia insidiosus</i>	98.17	0	7
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	100	5	4
<i>Arthrobacter alkaliphilus</i>	99.85	2	0
<i>Arthrobacter humicola</i>	99.85	3	0
<i>Arthrobacter niigatensis</i>	100	3	0
<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>	97.12	2	0
<i>Arthrobacter defluvi</i>	99.26	3	0
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	99.25	6	1
<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	99.7	7	2
<i>Bacillus safensis</i>	100	7	0
<i>Bacillus tequilensis</i>	99.8	5	0
<i>Cupriavidus gilardii</i>	97.05	1	0
<i>Cupriavidus necator</i>	98.31	5	1
<i>Variovorax boronicumulans</i>	99.85	1	3
<i>Massilia albidiflava</i>	97.7	5	0
<i>Novosphingobium rosa</i>	98.0	2	3
<i>Rhodococcus jialingiae</i>	100	4	0
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	100	3	1
<i>Sphingomonas asaccharolytica</i>	98.48	2	4
<i>Mycobacterium boenickei</i>	99.78	2	0
<i>Microbacterium xylanilyticum</i>	100	1	3
<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	99.36	2	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98.59	0	4
<i>Stenotrophomonas terrae</i>	99.83	0	3
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99.25	0	6
<i>Enterobacter amnigenus</i>	100	0	2
<i>Massilia aerilata</i>	97.69	4	0
<i>Pseudoduganella violaceinigra</i>	97.73	7	2
<i>Sinomonas flava</i>	98.8	2	0
<i>Penicillium patulum</i>	100	8	3
<i>Hypocrea virens</i>	100	2	5

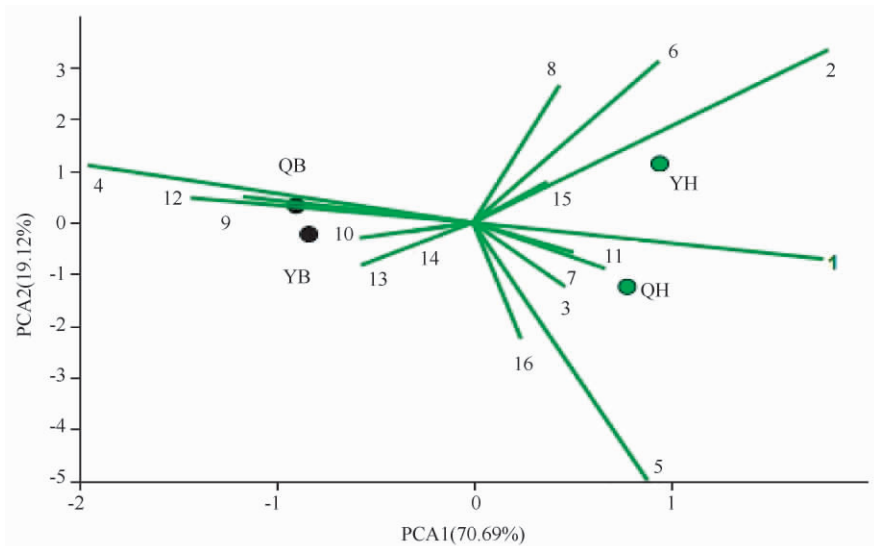


图 2. 三七土样样品中原核生物类群分布的 PCA 分析 (选择贡献率在 50% 以上的分离菌株各属进行 PCA 分析)

Figure 2. The PCA analysis of distribution of prokaryotic microbe groups in *Panax notoginseng* soil samples. The rates of strains selected for PCA analysis was more than for 50% in all the isolated microbe.

## 2.5 土壤理化性状的影响

通过对采样 Q 区和 Y 区的植株健康组 (QH、YH) 和根腐病组 (QB、YB) 土样的理化性质进行检测发现:相同区域的土壤样品,其根腐病土壤中的各元素离子浓度及全盐量和 EC 值均高于健康组土壤 (表 5),说明植物根区养分累积,根部吸收功能减弱。经配对 t 检验变化差异均达差异性显著水平 ( $P < 0.05$ );进一步研究发现,健康组土壤中的优势类群

1 (*Burkholderia*)、2 (*Arthrobacter*)、3 (*Bacillus*)、5 (*Streptomyces*) 等的分布与土样中的 EC 值、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{K}^+$ 、全盐量等呈负相关关系 (显著度  $P < 0.01$ ),而根腐病组土壤中的优势菌群则是跟这些离子组分呈正相关的关系。说明健康组土壤中的优势类群的生长受到这些高浓度的离子组分的影响。

表 5. 三七健康组与根腐病组土壤理化性状检测结果

Table 5. The results of soil physical and chemical properties in the healthy and blight *Panax notoginseng* soils

Number	PH	$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{HCO}_3^-$	$\text{CL}^-$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{NO}_3^-$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+$	Total salt	EC value
QH	4.96 ± 0.18	0.26 ± 0.03	0.07 ± 0.01	25.90 ± 2.11	624.50 ± 21.42	698.00 ± 33.21	13.60 ± 1.05	79.60 ± 5.61	1.44 ± 0.56	0.66 ± 0.12
QB	5.23 ± 0.21	0.38 ± 0.07	0.10 ± 0.03	43.10 ± 4.41	701.10 ± 18.61	762.60 ± 38.02	23.80 ± 2.17	85.70 ± 6.87	1.62 ± 0.21	0.81 ± 0.15
YH	5.14 ± 0.20	0.34 ± 0.04	0.11 ± 0.02	38.80 ± 2.89	613.60 ± 24.02	574.20 ± 21.87	14.30 ± 1.33	106.80 ± 12.30	1.35 ± 0.43	0.52 ± 0.09
YB	5.43 ± 0.36	0.41 ± 0.04	0.16 ± 0.04	58.00 ± 5.12	697.90 ± 35.61	698.70 ± 19.86	26.40 ± 3.42	112.30 ± 14.78	1.59 ± 0.22	0.79 ± 0.16

$\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CL}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ : mg/kg; Total salt: g/kg; EC value: ms/cm.

## 3 讨论

近年来,针对三七连作障碍方面的研究已有相关的报道<sup>[22-24]</sup>。但从土壤微生物多样性及土壤理化性质差异变化方面,来反映三七土壤健康状况方面的研究尚未见报道。通过此次研究,得到以下推论或结论供商榷:

(1) 三七栽培的土壤质量健康与否及其土传根腐病害的发生蔓延,与该区域土壤原核微生物种群变化具有密切的关联性。研究发现,三七植株健康组和根腐病组土壤中的原核微生物群落组成、种群比例及其种群多样性分布等,均有不同程度的差异 (表 1, 表 2); 植株健康组土壤比根腐病组土壤中的原核微生物多样性 (特别是植物益生菌和放线菌类群) 更为丰富,其中在健康土壤中是伯克氏菌 (*Burkholderia*), 链霉菌 (*Streptomyces*), 节细菌 (*Arthrobacter*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus*) 为优势菌群 (表 3, 4), 而根腐病株组土壤中以罗尔斯顿菌 (*Ralstonia*——植物病原菌), 寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*) 种类较多; 其中无论是健康组还是根腐病组土壤 *Burkholderia*, *Bacillus* 的多样性分布和放线菌门各个属的多样性分布呈正相关关系, 它们之间存在相互促进生长的协作关系。而 *Burkholderia* 属类群与放线菌门各属之间如何互相促进生长, 以及 *Burkholderia*, *Bacillus* 和 *Arthrobacter* 等各个属如何协作抑制三七病原菌, *Ralstonia* 是否

会抑制以上几个属的微生物生长等问题则有待于进一步研究。

(2) 在研究中发现了黄杆菌属和肠杆菌属的菌株仅从根腐发病土壤中分离到, 尽管数量较少, 但是这两个属的菌株多报道为致病菌, 而健康土壤中并未分离到, 虽然整个分离过程中所有条件都是一致的, 但是否健康土壤中没有这两个属的菌株还有待于通过改变其分离条件等来进行更深入的研究。

(3) 研究发现了土壤中高浓度的盐分 (EC 值) 及离子浓度影响着微生物的种群结构及其有益微生物 (*Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces* 等) 类群多样性的丰度, 但如何受到这些离子组分的抑制及其抑制机制等方面有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Chen Z, Ceng J. The investigation of Notoginseng planting industry present situation. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2002, 25 (6): 387-389. (in Chinese)  
陈中坚, 曾江. 三七种植业现状调查. *中药材*, 2002, 25 (6): 387-389.
- [2] Long C. Notoginseng research review. *Journal of Practical Traditional Chinese Medicine*, 2013 (6): 502-503. (in Chinese)  
龙朝明. 三七研究综述. *实用中医药杂志*, 2013 (6): 502-503.
- [3] Guan H, Yang J, Chen Y, Cui X, Wang Y, Zhang Y. Change of rhizospheric microbe colony in cultivated soil and its correlation to root rot disease in panax notoginseng. *Soils*, 2010, 42 (3): 378-384. (in

- Chinese)
- 官会林, 杨建忠, 陈煜君, 崔秀明, 王勇, 张云峰. 三七设施栽培根际微生物菌群变化及其与三七根腐病的相关性研究. *土壤*, 2010, 42 (3) : 378-384.
- [4] You C, Guan H, Tu W, Luo Q, Chen X, Xie J. Theoretical thinking about panax notoginseng no-tillage cropping soil barriers and mitigation measures. *Journal of Yunnan Normal University*, 2010, 30 (3) : 44-48. (in Chinese)
- 游春梅, 官会林, 屠文, 罗群, 陈晓波, 谢建. 三七免耕连作土壤障碍因素及其消减措施的理论思考. *云南师范大学学报*, 2010, 30 (3) : 44-48.
- [5] Guan H, Chen Y, Liu S, Zhang W, Xia C. On the relationship between root rot in panax notoginseng and soil microbes. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2006, 28 (5) : 706-709. (in Chinese)
- 官会林, 陈煜君, 刘士清, 张无敌, 夏朝凤. 三七种植土壤微生物类群动态与根腐病的关系. *西南农业大学学报*, 2006, 28 (5) : 706-709.
- [6] Zhao Q. Strategic Thinking of soil science in china. *Soils*, 2009, 41 (5) : 681-688. (in Chinese)
- 赵其国. 土壤科学发展的战略思考. *土壤*, 2009, 41 (5) : 681-688.
- [7] Jacobsen CS, Hjelmsø MH. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 15-20.
- [8] Rutigliano F, Castaldi S, D'Ascoli R, Papa S, Carfora A, Marzaioli R, Fioretto A. Soil activities related to nitrogen cycle under three plant cover types in Mediterranean environment. *Applied Soil Ecology*, 2009, 43 (1) : 40-46.
- [9] Fierer N, Schimel JP, Holden PA. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35 (1) : 167-176.
- [10] Chen M, Duan Z, Lin X. Status quo and prospects of the study on soil quality standards in China. *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48 (5) : 1059-1071. (in Chinese)
- 陈美军, 段增强, 林先贵. 中国土壤质量标准研究现状及展望. *土壤学报*, 2011, 48 (5) : 1059-1071.
- [11] Jiao Y, Cheng G, Ma Y, Wang W, Li J, Qiao B, Jiang S. Effects of continuous tobacco on soil microbial diversity and enzyme activities. *Soil and Crop*, 2014, 2: 003. (in Chinese)
- 焦永吉, 程功, 马永健, 王伟超, 李建华, 乔保明, 蒋士君. 烟草连作对土壤微生物多样性及酶活性的影响. *土壤与作物*, 2014, 2: 003.
- [12] Van Bruggen A, Semenov A. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, 2000, 15 (1) : 13-24.
- [13] Jian Z, Wang W, You P. Analysis of element contents in soil for continuous cropping panax notoginseng. *Modern Chinese Medicine*, 2009, 11 (4) : 10-11. (in Chinese)
- 简在友, 王文全, 游佩进. 三七连作土壤元素含量分析. *中国现代中药*, 2009, 11 (4) : 10-11.
- [14] Liu L, Zhao A, Yang Y, Jin H, Cui X, Ou X, Liu D. Comparative analysis of physical and chemical properties of panax notoginseng replant soils in different intervals. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 26 (5) : 1946-1952. (in Chinese)
- 刘莉, 赵安洁, 杨雁, 金航, 崔秀明, 欧小宏, 刘大会. 三七不同间隔年限种植土壤的理化性状比较分析. *西南农业学报*, 2013, 26 (5) : 1946-1952.
- [15] Sha Y. Research method comparison of contaminated soil microbial diversity. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science & Technology*, 2014, 55 (3) : 24-28. (in Chinese)
- 沙月霞. 污染土壤微生物多样性研究方法的比较. *宁夏农林科技*, 2014, 55 (3) : 24-28.
- [16] Tardy V, Mathieu O, Lévêque J, Terrat S, Chabbi A, Lemanceau P, Ranjard L, Maron PA. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 2014, 6 (2) : 173-183.
- [17] Feng G, Chen M, Yang R, Zhu H. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34 (3) : 439-442. (in Chinese)
- 冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 朱红惠. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较. *华南农业大学学报*, 2013, 34 (3) : 439-442.
- [18] Xu P, Li W, Xu L, Jiang C. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Journal of Microbiology Reported*, 2003, 30 (4) : 82-84. (in Chinese)
- 徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, 30 (4) : 82-84.
- [19] Yuan X, Lu J, Song H, Liu W. Optimal design of the method of fungi DNA extraction from the soil of fritillaria thunbergii. *Journal of Zhejiang Chinese Medical University*, 2013 (1) : 69-73. (in Chinese)
- 袁小凤, 路京, 宋皓军, 刘文洪. 浙贝母土壤真菌 DNA 提取方法的优化. *浙江中医药大学学报*, 2013 (1) : 69-73.
- [20] Zhang Z, Wang W, Miao Z, Li S, Yang J. Application of



principal component analysis in comprehensive assessment of soil quality under *Panax notoginseng* continuous planting. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32 (6): 1636-1644. (in Chinese)

张子龙, 王文全, 缪作清, 李世东, 杨建忠. 主成分分析在三七连作土壤质量综合评价中的应用. *生态学杂志*, 2013, 32 (6): 1636-1644.

[21] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.

[22] Gao Q, Meng X, Yu H. Reason analysis and control methods of succession cropping obstacle. *Shandong*

*Agricultural Sciences*, 2006 (3): 60-63. (in Chinese)

高群, 孟宪志, 于洪飞. 连作障碍原因分析及防治途径研究. *山东农业科学*, 2006 (3): 60-63.

[23] Hu Z, You C, Zhang T. Discussing the obstacles caused by continuous notoginseng cropping. *Journal of Wenshan University*, 2011, 3: 004. (in Chinese)

胡展育, 游春梅, 张铁. 三七连作障碍的探讨. *文山学院学报*, 2011, 3: 004.

[24] 肖慧, 曾燕, 李进瞳, 李兴, 李世东, 马承铸, 严新, 郭兰萍, 王继永. 三七连作障碍缓解方法初探. *现代中药研究与实践*, 2010 (3): 5-7.

## Microbial distribution and 16S rRNA diversity in the rhizosphere soil of *Panax notoginseng*

Xiaoju Lu<sup>1</sup>, Huilin Guan<sup>1\*</sup>, Zhengyun Zhang<sup>1</sup>, Yongcun Ma<sup>2</sup>, Shukun Tang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Energy and Environment Science College, Yunnan Normal University, Kunming 650092, Yunnan Province, China

<sup>2</sup> Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan Province, China

**Abstract:** [Objective] We studied the correlation between the microbial diversity in *Panax notoginseng* root soil and its root rot diseases, to find biological control approaches in *Panax notoginseng* soil borne diseases. [Methods] We isolated bacterial strains from the rhizosphere soils of healthy and root rot *Panax notoginseng* plants that are cultured continuously for 6 years in Wenshan Region. After separation and purification, we obtained DNA. On the basis of 16S rRNA's general primer we carried out PCR amplification, conducted blast gene similarity and analyzed phylogenetic information.

[Results] The isolated bacterial strains distributed to 4 phyla, 40 genera of bacteria, 179 isolates from the samples of healthy *Panax notoginseng* rhizosphere soil belong to 30 genera and *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Bacillus* are the dominant microflora. Additionally, 117 isolates from the samples of root rot *Panax notoginseng* rhizosphere soil belong to 29 genera and *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* as the dominant microflora. Among them, *Flavobacterium* and *Enterobacter* were only isolated from the samples of root rot *Panax notoginseng* rhizosphere soil. At least 5 isolates are novel species; the ions concentration and electrical conductivity value show distinct discrepancy between the two groups ( $P < 0.05$ ); the microbial amount of dominant species in the healthy soil samples present negative correlation with electrical conductivity value, the concentration of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{K}^+$  and total salt ( $P < 0.01$ ).

[Conclusion] In addition to pathogen infection, the physical and chemical characteristics, microbial community structure and the proportion of dominant species are also closely related to notoginseng continuous cropping soil borne disease. Especially the beneficial microorganisms (*Burkholderia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, etc.) abundance is significant to evaluate the soil healthy condition and accurately disease control & forecast for *Panax notoginseng* cultivation.

**Keywords:** *Panax notoginseng*, root rot, soil microbes, diversity analysis, physical-chemical characteristics of soil

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Research of National Natural Science Foundation of China (41361075), by the Key Research Program of Application Foundation of Yunnan Province (2013FA015) and by the Major Special Project of Scientific Research Fund in Yunnan Education Department (ZD2013008)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-871-65912903; E-mail: ghl0871@aliyun.com

Received: 5 June 2014/ Revised: 13 October 2014