

黄 靖,陈 婵. 接种促生菌对金线莲生物活性成分及土壤细菌群落的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(23):184-191.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.23.028

# 接种促生菌对金线莲生物活性成分 及土壤细菌群落的影响

黄 靖,陈 婵

(福建农业职业技术学院,福建福州 350119)

**摘要:**采用盆栽试验,设置单独接种解淀粉芽孢杆菌[*Bacillus amyloliquefaciens* (BA)]、枯草芽孢杆菌[*Bacillus subtilis* (BS)]及其组合接种处理(BA+BS),以不接种处理为对照(CK),探索接种促生菌对金线莲生物活性成分含量及土壤细菌群落的影响。结果表明,培养期内 *B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis* 皆可在金线莲根际土壤中存活,且二者组合接种更易形成生物膜。与 CK 处理相比,BA、BS 处理能够分泌铁载体、植酸酶、生长素和玉米素以促进生物量、皂苷和黄酮(槲皮素、山柰酚、异鼠李素)累积,BA+BS 处理具有最大值。16S rRNA 高通量测序结果表明,与 CK 处理相比,BA+BS 处理下细菌群落具有更高的丰富度,且细菌门、属水平群落结构丰度皆发生了明显变化,以慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、玫瑰弯菌属(*Roseiarcus*)为主的有益微生物的丰度增加,与病原菌累积相关的黄色杆菌科未分类属(*norank\_f\_Xanthobacteraceae*)的丰度显著降低。相关分析结果进一步表明,生物活性成分与相关有益菌属的丰度皆呈显著或极显著正相关,而与 *norank\_f\_Xanthobacteraceae* 的丰度呈极显著负相关。综上,接种 *B. amyloliquefaciens* 和 *B. subtilis* 可通过增加有益微生物的丰度和降低有害微生物的丰度以改善金线莲的健康和提高生物活性化合物的含量。

**关键词:**金线莲;芽孢杆菌;生物活性化合物;细菌群落;相对丰度

**中图分类号:**S182;S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)23-0184-08

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)别称金线兰,广泛分布于中国、印度、尼泊尔、日本和越南等国,是一种罕见的多年生名贵中草药<sup>[1]</sup>。在我国,金线莲主要种植于福建、浙江、贵州和台湾等地区。现有研究表明,金线莲含有多多种生物活性物质,包括黄酮类、多糖类、人参皂苷、类固醇、三萜、氨基酸及生物碱等<sup>[2]</sup>,具有增强免疫力、防止肝损伤和氧化、降低血糖等药理作用<sup>[3]</sup>。由于金线莲药用价值极高,在医药制剂方面供不应求,且在市场需求日益增长的美容和饮品中也逐渐普及,目前已成为我国发展最为快速的中药材之一。

金线莲作为一种遮阴植物,对气候环境有着严格要求,其植株矮小、根系浅;因此,对各种生态资源的利用率均较低,且在栽培过程中常发生软腐病、茎腐病、灰霉病、难疫病等病害,给种植者造成了巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。根际是土壤、根系和微生物紧密联系和相互作用的区域<sup>[5]</sup>。药用植物的根际

包括促进植物生长的有益微生物,同时也包括通过自毒作用、改变土壤理化性质和降低土壤肥力的有害微生物,因此根际微生物群落影响着药用作物的产量<sup>[6]</sup>。目前,化学农药制剂是防治金线莲病虫害的主要手段,但农药残留超标、病原菌抗药性增加及作用无靶标等问题已严重影响了金线莲的安全生产。微生物施用策略表现出的无公害、长效性及费用低廉等优势<sup>[7]</sup>,使得功能菌防治技术成为控制植物病害的最佳选择之一。目前,药用植物与根际微生物关系的研究尚处于起步阶段。大多数研究均集中在幼苗和组织培养阶段内生真菌和金线莲的共生培养。如郭顺星等从金线莲根际中分离得到 21 种菌根真菌,离体培养发现 6 种菌根真菌促进了天麻种子萌发,5 种真菌显著促进了金线莲幼苗的生长<sup>[8]</sup>。然而,目前关于在温室或林下进行根系促生菌与金线莲共培养以改善该植物的生长和代谢的研究仍较少。

植物根际促生菌(PGPR)是一类生活在土壤或依附于植物根系的有益微生物,PGPR 可提高作物病害防治效果并促进植物生长<sup>[9]</sup>。如 Dunlap 等发现,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) FZB42 可产生多种抗生素化合物和吲哚-3-乙酸(IAA)从而有效防治金线莲灰霉病的发生,并促进

收稿日期:2022-01-05

基金项目:福建省科技计划引导性项目(编号:2020N0023)。

作者简介:黄 靖(1981—),男,福建福州人,硕士,副教授,主要从事植物生物技术研究。E-mail:13509366616@139.com。

植株生长<sup>[10]</sup>。Zhang 等的研究表明,菌根真菌(*Ceratobasidium* sp.)AR2 可与金线莲共生,促进金线莲次生代谢水平,提高总黄酮、生物碱、鼠李糖和花青素-3-葡萄糖苷氯化物等活性化合物的含量<sup>[11]</sup>。Arkhipova 等的研究表明,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)组合施用可促进宿主的细胞分裂素(CKs)分泌,从而提高宿主生理代谢<sup>[6]</sup>。上述研究为促生菌应用于金线莲培养提供了一定的理论依据。然而,土壤环境是决定植物生长的重要因素,目前关于施用促生菌对土壤微生物体系的研究鲜有报道。基于此,本研究基于高通量测序技术,探索了接种 2 株芽孢杆菌对金线莲皂苷、黄酮等生物活性化合物及土壤微生物群落的影响,以期为促进金线莲产业的绿色可持续发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试地点与材料

试验于 2021 年 6—7 月在福建农业职业技术学院光照培养室中进行。培养室条件:光周期(白天/黑夜)为 12 h/12 h,空气相对湿度为 75%,温度为 20~25℃。金线莲购自连江金草农业开发有限责任公司。

促生菌均属于芽孢杆菌属,分别为解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,均由中国农业微生物菌种保藏管理中心提供,*B. amyloliquefaciens* 保藏编号为 ACCC 60428,*B. subtilis* 保藏编号为 ACCC 60429,两者均分离自番茄根际土壤。*B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis* 均采用牛肉膏蛋白胨液体培养基在恒温摇床(30℃、180 r/min)振荡培养 24 h 获得接种菌剂( $2.0 \times 10^8$  CFU/mL)。

盆栽试验所用土壤取自福建农业职业技术学院试验田(119°38'43"E,25°46'29"N)0~20 cm 表层土壤。供试土壤为红壤,土壤理化性质:pH 值为 5.85,有机质含量为 24.75 g/kg,全氮含量为 1.22 g/kg,碱解氮含量为 65.08 mg/kg,有效磷含量为 34.91 mg/kg,速效钾含量为 107.62 mg/kg。

### 1.2 试验设计

试验采用完全随机设计,设置 4 个处理,CK:原土培养,不接种微生物菌剂;BA:接种解淀粉芽孢杆菌;BS:接种枯草芽孢杆菌;BA+BS:接种解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌。每个处理重复 8 次。

采用黑色圆聚乙烯塑胶桶,每盆装土 1.5 kg,将

来自无性繁殖的 3 株金线莲小植株移入盆中。对于 BA、BS 处理皆采用灌根的方式施用 10 mL 菌剂,BA+BS 处理 2 种菌剂各 5 mL,CK 处理即施用同等用量的无菌牛肉膏蛋白胨液体培养液。土壤持水量保持为 75%,试验培育 40 d。

### 1.3 样品采集及测定分析

1.3.1 栽培期菌株存活数及生物膜形成情况测定 为评估施入金线莲栽培土壤中菌株的存活数,采用平板计数,每周检查土壤中解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌菌株的活菌数,重复 3 次。

生物膜测定即在 96 孔塑料培养板中分别加入 150  $\mu$ L  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.5 的解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌菌液,重复 3 次,放入培养箱 30℃ 静置培养 48 h,观察菌株生物膜形成情况。

1.3.2 解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的功能代谢物分析 2 种菌株的溶磷性、植酸酶分泌和嗜铁能力按照李春雨描述的方法<sup>[12]</sup>进行。植物生长调节剂,如吲哚-3-乙酸、玉米素(ZE)和赤霉素(GA)的检测如下:将 0.5 mL 解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌发酵液接种于 50 mL LB 培养基中。培养物在恒温振荡器(180 r/min、30℃)中振荡培养 18 h;振荡培养结束后 7 000 r/min 离心 5 min,取上清液,经 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤,再采用乙酸乙酯萃取。

IAA、ZE 和 GA 的高效液相色谱(HPLC)分析在配备  $C_{18}$  小柱(4.6 mm  $\times$  150 mm,5  $\mu$ m)的 Agilent Poroshell 1200 系统上进行。溶剂体系为甲醇和 0.075% 乙酸水溶液(体积比为 45:55),流速为 0.7 mL/min,30℃ 条件下反应 20 min。使用紫外分光光度法分别在 218、270、200 nm 处检测 IAA、ZE 和 GA 的吸光度。

1.3.3 金线莲生物活性化合物的提取与测定 本研究中涉及的金线莲生物活性化合物包括多糖、槲皮素、山柰酚、异鼠李素、皂苷等。多糖含量采用优化的苯酚-硫酸法测定<sup>[13]</sup>。槲皮素、山柰酚及异鼠李素皆采用高效液相色谱法测定,具体步骤参照张玲等的研究<sup>[14]</sup>。皂苷含量采用甲醇-超声法提取,按 NY/T 1842—2010《人参中皂苷的测定》标准采用高效液相色谱测定<sup>[15]</sup>。

1.3.4 金线莲根际细菌群落的高通量测序 称取土壤样品 0.25 g,采用土壤 DNA 试剂盒(MO Bio Laboratories, USA)提取总基因组 DNA。采用 NanoDrop® ND-2000c 紫外-可见分光光度计

(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 通过光度法检查提取的基因组 DNA 的数量和质量。细菌 qRT-PCR 扩增引物采用细菌 16S rRNA V3 ~ V4 区间: 338F (5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3'), 806R (5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3')。

每个样品的 qRT-PCR 反应体系为 25.00  $\mu$ L, 包括 5.00  $\mu$ L 反应缓冲液、5.00  $\mu$ L GC 缓冲液、2.00  $\mu$ L dNTP (2.5 mmol/L)、1.00  $\mu$ L 正向引物 (10  $\mu$ mol/L)、1.00  $\mu$ L 反向引物 (10  $\mu$ mol/L)、2.00  $\mu$ L DNA 模板、8.75  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、0.25  $\mu$ L Q5 DNA 聚合酶。PCR 热循环条件如下: 初始变性 98  $^{\circ}$ C 120 s, 30 个循环, 98  $^{\circ}$ C 15 s, 退火 55  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s, 最终 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。通过 16S rRNA 扩增子测序检查土壤细菌多样性和群落组成, 扩增完毕后, 借助 Illumina MiSeq 平台进行 Next Generation Sequencing Service 测序。Illumina Miseq<sup>TM</sup> 得到的原始数据采用 CASAVA-FLASH 进行过滤-拼接后, 利用 QIIME 对每条序列与 Silva 数据库 (SSU123) 比对进行物种分类注释。利用 Mothur 软件统计每个生物样本的  $\alpha$  多样性指数。以上分析委托上海天昊生物科技有限公司完成。

1.4 统计分析

采用 Microsoft excel 2016 进行数据整理, 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素 (ANOVA) 方差分析, 采用最小显著差异 (LSD) 法进行显著性检验 ( $\alpha = 0.05$ ), 采用 Origin 9 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 促生菌生物膜形成情况及在土壤中的存活数

由图 1-A 可知, 随试验培养周期的延长, 土壤中解淀粉芽孢杆菌 (BA)、枯草芽孢杆菌 (BS) 及其组合施用处理 (BA + BS) 的浓度均呈下降趋势。在培养第 1 周中, BA、BS 处理的活菌数明显下降, 其中, BS 处理的下降幅度最为明显; 培养第 2 周时, BA、BS 处理的活菌数进一步降低, 此时, BA、BS 处理的活菌数仅为原菌剂的 1/2; 此后 3 周 BA、BS 处理的活菌数下降减缓, 当培养第 5 周时 BA、BS 处理的活菌数分别约为  $0.25 \times 10^8$ 、 $0.33 \times 10^8$  CFU/g。而当两者组合施用 (BA + BS) 情况下, 其活菌数下降幅度缓慢, 且任一培养周期段皆明显高于单一菌株施用处理 (BA、BS), 施入土壤 5 周后, BA + BS 处理的活菌数为  $0.81 \times 10^8$  CFU/g。

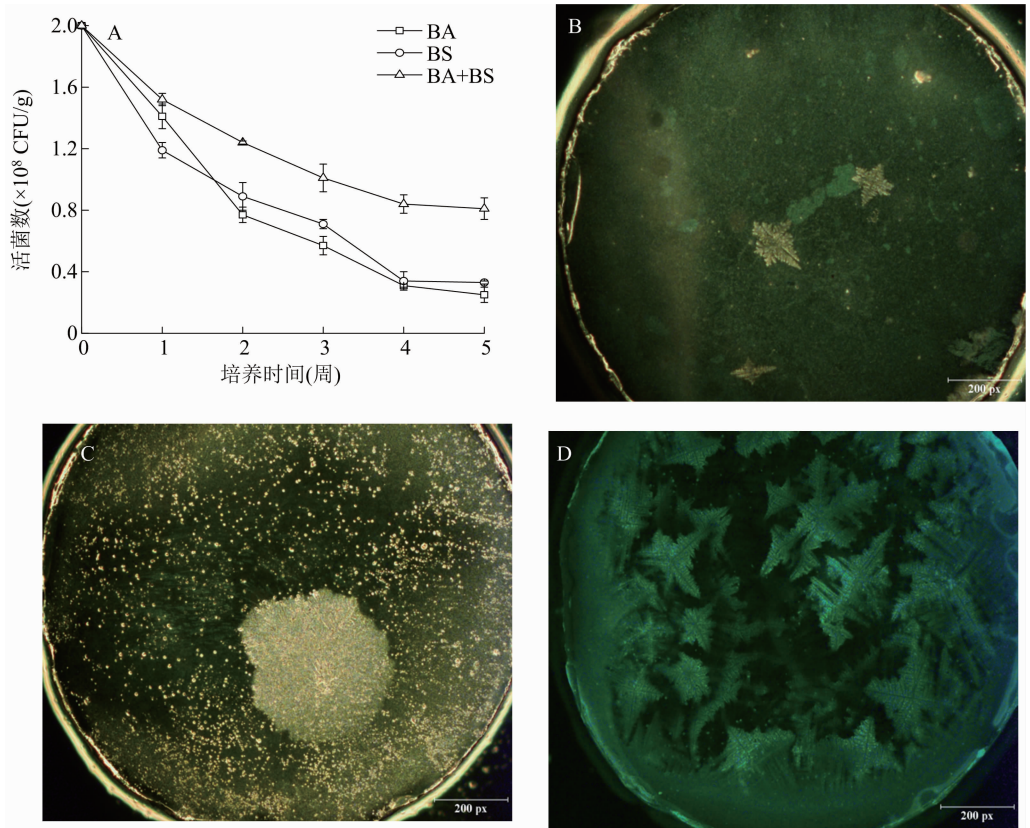


图 A 中的 BA+BS 处理的活菌数为 2 种菌活菌数之和  
图1 菌株存活情况及 BA(B)、BS(C)、BA+BS(D) 处理生物膜形成情况

由图 1 - B 可知,单一培养解淀粉芽孢杆菌 (BA) 不形成聚集体生物膜,单一培养枯草芽孢杆菌 (BS) 形成少量生物膜 (图 1 - C),表明 BS 处理比 BA 处理更容易形成生物膜。当解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌组合施用,生物膜的数量明显增加,明显高于单一菌株处理 (图 1 - D),表明解淀粉芽孢杆菌的存在可促进枯草芽孢杆菌生物膜的形成,且共培养条件下比单一培养更容易形成聚集体。

## 2.2 促生菌的功能代谢物分析

由表 1 可知,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌均能分泌植酸酶和铁载体,且前者具备溶磷能力。基于 HPLC 分析显示,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌均可分泌生长素、玉米素,2 种菌株均不分泌赤霉素,且前者的 IAA 分泌能力大于后者,而后的 ZE 分泌能力大于前者。结果表明,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可通过自身代谢产生多种植物激素从而有利于宿主植物生长。

## 2.3 接种促生菌对金线莲生物活性化合物含量的影响

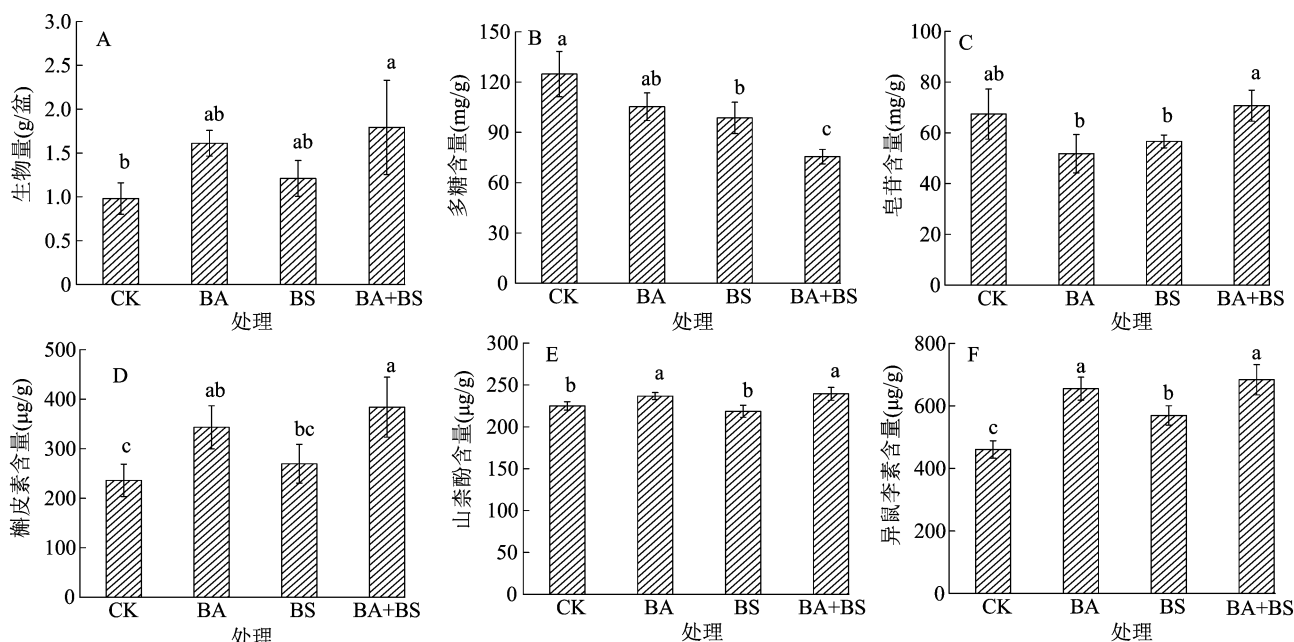
由图 2 可知,当解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌与金线莲培养时,多糖含量降低,生物量、皂苷和 3 种黄酮(槲皮素、山柰酚、异鼠李素)的含量整体增

表 1 解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的功能代谢物分析

功能	解淀粉芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌
分泌植酸酶	+	+
溶磷能力	+	-
分泌铁载体	+	+
分泌生长素 (IAA) 的量 (mg/mL)	3.09	1.07
分泌玉米素 (ZE) 的量 (mg/mL)	0.25	4.45
分泌赤霉素 (GA) 的量 (mg/mL)	-	-

注:表中“+”表示具备该功能,“-”表示不具备该功能。

加。由图 2 - A 可知,生物量中,以 BA + BS 处理整体较高,CK、BS、BA 处理较 BA + BS 处理降低 10.10% ~ 45.26%,其中,BA + BS 与 CK 处理差异显著 ( $P < 0.05$ )。由图 2 - B 可知,多糖含量中,各处理表现为 CK > BA > BS > BA + BS,其中,CK、BS、BA 处理较 BA + BS 处理分别显著提高 65.26%、39.46%、30.61%。由图 2 - C 可知,皂苷含量以 BA + BS 处理最高,CK 处理其次,两者无显著差异,且与 BA、BS 处理相比,BA + BS 处理分别显著提高 26.72%、19.92%。由图 2 - D 至图 2 - F 可知,3 种黄酮(槲皮素、山柰酚、异鼠李素)的含量均整体表现为 CK < BS < BA < BA + BS,且 BA + BS 处理均显著大于 CK、BS 处理。



图中不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

图2 接种促生菌对金线莲生物活性化合物含量的影响

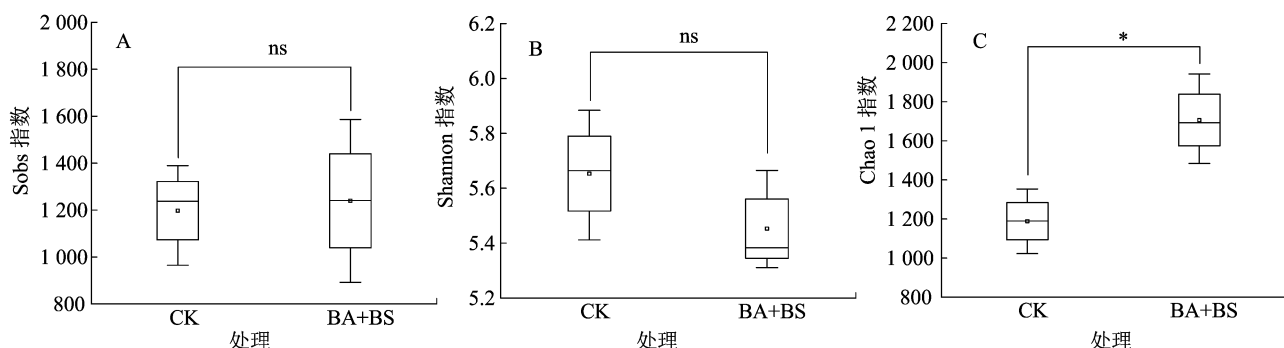
## 2.4 接种促生菌对金线莲栽培土壤 α 多样性的影响

细菌 α 多样性是用于评估细菌物种数量 (Sobs

指数)、多样性 (Shannon 指数) 和丰富度 (Chao1 指数) 的重要指标。由图 3 可知,在 2 种菌株组合施用处理 (BA + BS) 与不接种处理 (CK) 的 α 多样性指数

中, Sobs 指数以 BA + BS 处理大于 CK, Shannon 指数则以 CK 大于 BA + BS 处理, 但 2 个处理的 Sobs、Shannon 指数均无显著差异。而在 Chao1 指数中,

以 BA + BS 处理显著大于 CK 处理, 表明 2 种菌株组合施用对金线莲土壤细菌物种总量及多样性无明显影响, 但可提高细菌的丰富度。



图中桥线上 ns、\* 分别表示无显著差异、在 0.05 水平上差异显著

图3 接种促生菌对金线莲栽培土壤 Alpha 多样性的影响

## 2.5 接种促生菌对金线莲栽培土壤细菌群落结构的影响

在为期 40 d 的培养中, 在门水平组成上, CK 处理与 BA + BS 处理基本一致, 但在丰度上存在一定差异。由图 4 - A 可知, 变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 最为丰富, 三者总丰度在 CK、BA + BS 处理中各占总丰度的 84.55%、79.26%。绿弯菌门 (Chloroflexi) 在 CK、BA + BS 处理中各占比总丰度的 13.869%、2.454%。浮霉菌门 (Planctomycetes) 的丰度从 CK 处理的 3.75% 在接种处理后略微增加至 4.05%。芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为厚壁菌门 (Firmicutes) 的重要属类, 与 CK 处理相比, 添加 2 种菌株培养后土壤中厚壁菌门的丰度由 0.78% 显著提高至 2.13%。

在属水平上, 由图 4 - B 可知, CK 处理中热酸菌属 (*Acidothermus*) 相对丰度为 8.04%, 添加 2 种菌株显著提高了热酸菌属的相对丰度, 此时丰度为 11.75%。类似地, 康奈斯氏杆菌属 (*Conexibacter*) 从 CK 处理的 1.24% 在接种促生菌后升高至 3.33%。相比之下, 黄色杆菌科类 (norank\_f\_Xanthobacteraceae) 的丰度急剧降低。

## 2.6 接种促生菌对金线莲栽培土壤细菌属水平群落差异的影响

由图 5 可知, 在 CK、BA + BS 处理间丰度差异最大的前 15 个菌属, 除出芽菌科未分类属 (norank\_f\_Gemmataceae) 外, CK、BA + BS 处理间的其他 14 属皆存在显著差异。其中, 热酸菌属 (*Acidothermus*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、norank\_o\_Subgroup\_

2、酸杆菌目未分类属 (norank\_o\_Acidobacteriales)、康奈斯氏杆菌属 (*Conexibacter*)、玫瑰弯菌属 (*Roseiarcus*)、norank\_c\_Actinobacteria、不动杆菌属 (*Acidibacter*) 的相对丰度以 BA + BS 显著高于 CK 处理。而在黄色杆菌科未分类属 (norank\_f\_Xanthobacteraceae)、norank\_c\_AD3、norank\_o\_IMCC26256、norank\_o\_Elsterales、norank\_c\_Subgroup\_6、*Candidatus\_Solibacter* 则以 CK 处理的相对丰度显著高于 BA + BS 处理。

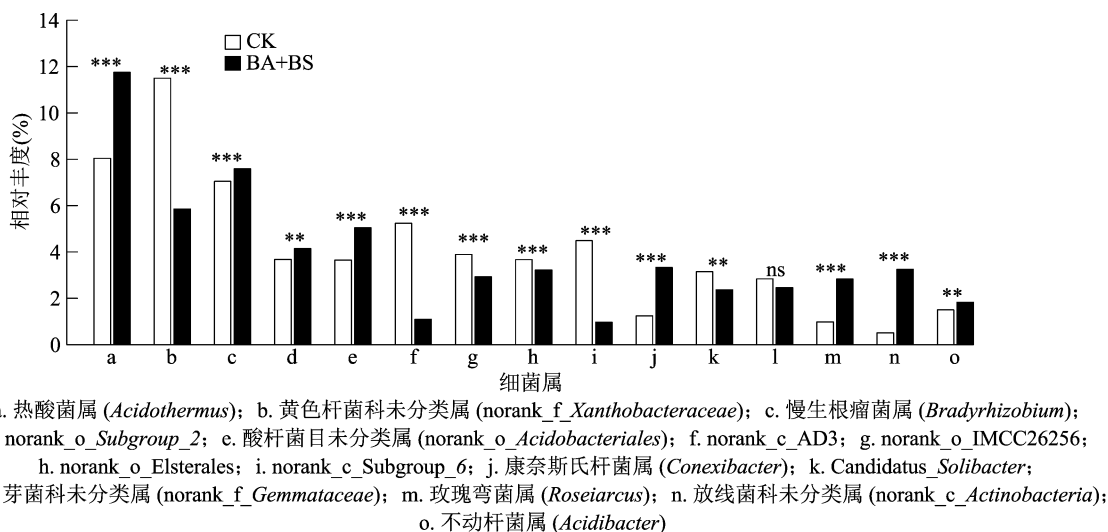
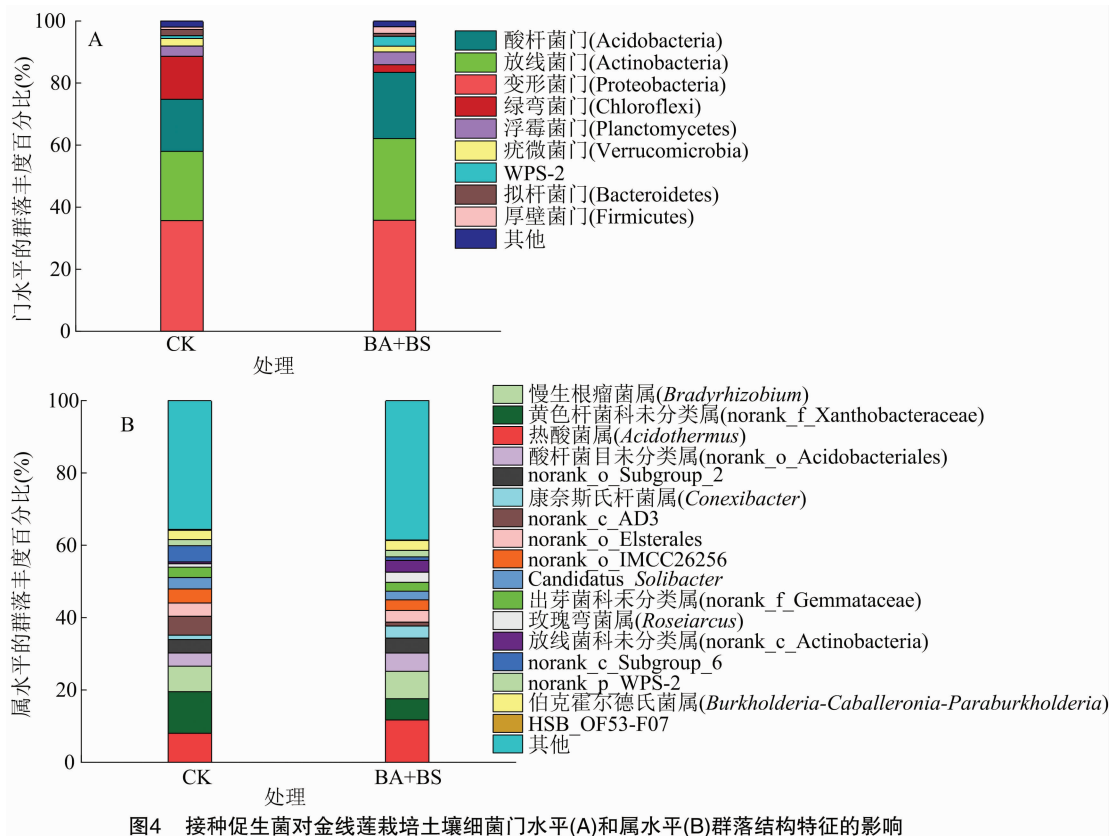
## 2.7 促生菌处理下土壤细菌丰度与生物活性化合物的相关性分析

由表 2 可知, *Candidatus\_Solibacter* 与多糖、皂苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素等的含量之间皆不存在明显相关性。就多糖含量而言, 其与热酸菌属 (*Acidothermus*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、norank\_o\_Subgroup\_2、norank\_o\_Acidobacteriales、康奈斯氏杆菌属 (*Conexibacter*)、玫瑰弯菌属 (*Roseiarcus*)、norank\_c\_Actinobacteria、不动杆菌属 (*Acidibacter*) 呈显著或极限显著负相关, 与黄色杆菌未分类属 (norank\_f\_Xanthobacteraceae)、norank\_c\_AD3、norank\_o\_IMCC26256、norank\_o\_Elsterales、norank\_c\_Subgroup\_6、norank\_f\_Gemmataceae 呈显著或极显著正相关。14 个菌属的丰度与皂苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量的相关性有多糖含量的相关性趋势相反。

## 3 讨论与结论

芽孢杆菌属具有较佳的生防及促生功能, 可形成菌液制剂且产孢稳定, 因此越来越多地用于农业





\*\*, \*\*\* 分别表示 CK 处理与 BA+BS 处理在 0.01、0.001 水平上存在显著差异, ns 表示处理间无显著差异

系统<sup>[7]</sup>。其中,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌是应用最为广泛的芽孢杆菌属成员,两者皆可分泌低分子量多肽及胞外水解酶等活性物质以抑制病原菌,且可产生植物激素促进植物生长发育<sup>[16]</sup>。

本研究结果表明,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可在金线莲的根际土壤存活,且这 2 种菌株可以相互促进形成生物膜。生物膜是不同细菌交换

代谢产物的场所,其中,一些细菌可利用其他细菌的代谢产物作为电子受体或供体,从而提高生物膜的功能<sup>[17]</sup>。前人的研究表明,多物种的协同作用可促进群落生物膜的形成<sup>[18]</sup>,这可能是菌株间的生防分泌物与细胞膜铁离子转运通道 FeuABC 的调控蛋白特异性结合,并诱导 *feuABC* 基因的表达,从而提高胞内铁离子浓度和促进生物膜形成<sup>[19]</sup>。

表 2 促生菌处理下土壤细菌属水平差异菌属丰度与生物活性化合物含量的相关性分析结果

菌属	相关系数				
	多糖含量	皂苷含量	槲皮素含量	山柰酚含量	异鼠李素含量
热酸菌属 ( <i>Acidothermus</i> )	-0.752 **	0.313	0.914 **	0.613 **	0.775 **
黄色杆菌科未分类属 (norank_f_Xanthobacteraceae)	0.514 *	-0.101	-0.877 **	-0.504 *	-0.814 **
慢生根瘤菌属 ( <i>Bradyrhizobium</i> )	-0.693 **	0.175	0.853 **	0.552 *	0.858 **
norank_o_Subgroup_2	-0.760 **	0.464	0.828 **	0.567 *	0.711 **
酸杆菌目未分类属 (norank_o_Acidobacteriales)	-0.713 **	0.169	0.834 **	0.671 **	0.940 **
norank_c_AD3	0.869 **	-0.245	-0.919 **	-0.525 *	-0.717 **
norank_o_IMCC26256	0.752 **	-0.218	-0.802 **	-0.540 *	-0.762 **
norank_o_Elsterales	0.603 *	-0.167	-0.967 **	-0.639 **	-0.733 **
norank_c_Subgroup_6	0.749 **	-0.402	-0.824 **	-0.572 *	-0.699 **
康奈斯氏杆菌属 ( <i>Conexibacter</i> )	-0.742 **	0.391	0.888 **	0.544 *	0.821 **
<i>Candidatus_Solibacter</i>	0.124	-0.026	-0.302	-0.089	-0.317
出芽菌科未分类属 (norank_f_Gemmataceae)	0.573 *	-0.285	-0.791 **	-0.506 *	-0.732 **
玫瑰弯菌属 ( <i>Roseiarcus</i> )	-0.801 **	0.443	0.923 **	0.681 **	0.797 **
放线菌科未分类属 (norank_c_Actinobacteria)	-0.766 **	0.138	0.989 **	0.654 **	0.673 **
不动杆菌属 ( <i>Acidibacter</i> )	-0.521 *	0.258	0.872 **	0.617 **	0.862 **

注:表中\*、\*\* 分别表示在 0.05、0.01 水平上显著、极显著相关。

本研究中,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的功能代谢产物分析结果表明,2 种菌株皆可分泌植酸酶、铁载体、生长素和玉米素;此外,枯草芽孢杆菌可溶解磷。土壤微生物可为植物生长提供养分,溶解土壤中难溶的磷,在非共生条件下固氮<sup>[20]</sup>;此外,部分促生菌可分泌铁载体从而提高土壤中铁的利用率<sup>[21]</sup>。由此可见,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌具有较佳的促生及生防潜力。Idris 等的研究表明,解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens* FZB42)分泌 IAA 是该菌株影响植物生长的主要机制之一<sup>[22]</sup>。另一项研究报道,PGPR 通过产生亚精胺和赤霉素促进植物生长<sup>[23]</sup>。本研究中,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的发酵液中未检出亚精胺和赤霉素,说明不同促生菌分泌的植物生长激素的种类和含量不同。

金线莲含有黄酮、多糖、皂苷、生物碱、甾醇、有机酸及微量元素等多种活性成分<sup>[2-3]</sup>,不同活性成分对植物生长发育及药用功能不同。本研究中,2 种芽孢杆菌属菌株与金线莲共培养时,皂苷和 3 种黄酮(槲皮素、山柰酚、异鼠李素)的含量普遍增加,但多糖含量下降。植物多糖作为环境响应物质,可作为碳源产生细胞外基质输送至根际从而介导植物根部周围细菌生物膜的形成<sup>[24]</sup>。因此,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可使用金线莲中的多糖及其衍生物以便更好地在根际定殖,因此多糖含量下

降。此外,在活性成分中,皂苷和黄酮是金线莲的特征成分,具有药用和食用价值,且金线莲生物量在接种促生菌的条件下增加;因此,多糖含量的降低并不代表金线莲多糖分泌水平的降低,可能是根际微生物截取的结果。Rahman 等的研究表明,植物促生菌芽孢杆菌属和伯霍尔德杆菌属(*Paraburkholderia*)可提高草莓果实中抗氧化剂的含量,如酚类物质、类胡萝卜素、黄酮类化合物和花青素<sup>[25]</sup>。这些研究表明,添加有益微生物可诱导宿主作物的生物活性成分的合成。

近年来,微生物肥料对根际微生物群或植物微生物群的调控得到广泛研究,且根际微生物群落比寄主植物编码更多的基因,通过合作和竞争形成稳定的群落结构,对植物的健康和生长至关重要。本研究中,细菌  $\alpha$  多样性指数表明,解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌组合施用对金线莲土壤细菌物种总量及多样性无明显影响,但提高了细菌群落的丰富度。根际细菌群落中,在门水平上,部分细菌门丰度发生显著变化,如绿弯菌门(*Chloroflexi*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对丰度皆明显提高,Chloroflexi 是光合细菌的主要细菌门之一,Planctomycetes 是全球氮循环和污水处理贡献最大的主要细菌门,在厌氧和自养代谢中具有独特的氧化铵的作用,芽孢杆菌属于厚壁菌门(*Firmicutes*),是主要的生防菌株来源门类<sup>[12,26]</sup>。

此外,在属水平上,以热酸菌属(*Acidothermus*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、玫瑰弯菌属(*Roseiarcus*)为主的菌属丰度发生显著上调,而病原菌较多的黄色杆菌科未分类属(*norank\_f\_Xanthobacteraceae*)的丰度急剧降低。相关分析结果进一步表明,皂苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素的含量与以热酸菌属(*Acidothermus*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、玫瑰弯菌属(*Roseiarcus*)为主的有益菌属的丰度皆呈显著或极显著正相关,而与黄色杆菌科未分类属(*norank\_f\_Xanthobacteraceae*)的丰度呈极显著负相关。这些结果表明接种解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌可通过增加有益微生物的丰度和降低有害微生物的丰度来改善金线莲的健康及生物活性化合物的合成水平。

#### 参考文献:

- [1] 邵清松,叶申怡,周爱存,等. 金线莲种苗繁育及栽培模式研究现状与展望[J]. 中国中药杂志,2016,41(2):160-166.
- [2] 甘金佳,蒋水元,李虹,等. 不同栽培基质对金线莲生长和主要活性成分的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):112-114.
- [3] 沈廷明,吴仲玉,黄春情,等. 金线莲化学成分、药理、组培及栽培研究进展[J]. 海峡药学,2016,28(12):26-30.
- [4] Chen Q H, Li B J, Liu P Q, et al. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on *Anoectochilus roxburghii* in China [J]. Plant Disease, 2016, 100(2):531.
- [5] Wu N, Li Z, Meng S, et al. Soil properties and microbial community in the rhizosphere of *Populus alba* var. *pyramidalis* along a chronosequence[J]. Microbiol Res, 2021, 250:126812.
- [6] Arkhipova T N, Prinsen E, Veselov S U, et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil [J]. Plant and Soil, 2007, 292(1):305-315.
- [7] 陈海念,冯蓉,杨胜竹,等. 1株生防菌的鉴定及其发酵条件优化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2020,46(2):177-188.
- [8] 郭顺星,陈晓梅,于雪梅,等. 金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究[J]. 中国药学杂志,2000,35(7):443-445.
- [9] Cao Y, Pi H L, Chandransu P, et al. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* [J]. Scientific Reports, 2018, 8:4360.
- [10] Dunlap C A, Kim S J, Kwon S W, et al. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7):2104-2109.
- [11] Zhang Y, Li Y Y, Guo S X. Effects of the mycorrhizal fungus *Ceratobasidium* sp. AR2 on growth and flavonoid accumulation in

- Anoectochilus roxburghii* [J]. PeerJ, 2020, 8:e8346.
- [12] 李春雨. 解淀粉芽孢杆菌 SQRT3 防控番茄土传青枯病及其机理研究[D]. 南京:南京农业大学,2014.
- [13] 张锦雀,吴晓珊,朱善岚,等. 金线莲多糖苯酚-硫酸法测定条件的优化[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(2):113-116.
- [14] 张玲,李岩,田文睿,等. 河北环渤海地区补血草不同部位黄酮类化合物的研究[J]. 中国食品学报,2014,14(4):57-63.
- [15] 中华人民共和国农业部. 人参中皂苷的测定:NY/T 1842—2010[S]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [16] 叶晶晶,曹宁宁,吴建梅,等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(8):185-190.
- [17] McGlynn S E, Chadwick G L, Kempes C P, et al. Single cell activity reveals direct electron transfer in methanotrophic consortia [J]. Nature, 2015, 526(7574):531-535.
- [18] Burmølle M, Webb J S, Rao D, et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6):3916-3923.
- [19] Xu Z H, Mandic M, Mulec I, Zhang H H, et al. Antibiotic bacillomycin D affects iron acquisition and biofilm formation in *Bacillus velezensis* through a btr-mediated FeuABC-dependent pathway [J]. Cell Reports, 2019, 29(5):1192-1202. e5.
- [20] 曹本福,姜海霞,刘丽,等. 丛枝菌根菌丝网络在植物互作中的作用机制研究进展[J]. 应用生态学报,2021,32(9):3385-3396.
- [21] 殷奥杰,王齐,葛森森,等. 微生物铁载体的应用研究进展[J]. 环境保护与循环经济,2021,41(7):20-24,69.
- [22] Idris E E, Bochow H, Ross H, et al. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37 [J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2004, 111:583-597.
- [23] Xie S S, Wu H J, Zang H Y, et al. Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105 [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(7):655-663.
- [24] Zhang Y, Chen F S, Wu X Q, et al. Isolation and characterization of two phosphate-solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments [J]. PLoS One, 2018, 13(7):e0199625.
- [25] Rahman M, Sabir A A, Mukta J A, et al. Plant probiotic bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):2504.
- [26] Fuerst J A, Sagulenko E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6):403-413.