

基于 Illumina Novaseq 高通量测序技术分析番红花不同生长期根际土壤中放线菌群落结构与多样性研究

邱远金, 张际昭, 赵亚琴, 阿依别克·热合木都拉, 樊丛照, 王果平, 朱 里*

(新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 国家中医药管理局新疆中药民族药资源重点研究室, 新疆 乌鲁木齐 830002)

【摘要】目的 以新疆番红花 *Crocus sativus* L. 不同生长期的根际土壤为材料, 研究土壤放线菌群落结构与多样性。**方法** 提取番红花不同生长时期的根际土壤放线菌总 DNA, 应用 Illumina Novaseq 高通量测序平台进行测序分析。**结果** 对番红花 3 个生长期(生长初期 S1、生长中期 S2、生长后期 S3)的 3 组样本进行高通量测序, 共获得 1686 个分类单元(OTUs), 包含 15 个放线菌门; 并对检测到的放线菌属级相对丰度前 20 的放线菌属进行了分析; 在放线菌门水平, 番红花 3 个生长期共有优势放线菌群落为放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形杆菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes); 在放线菌属水平, 番红花 3 个生长期共有优势放线菌群落为红球菌属(*Rhodococcus*)、芽球菌属(*Blastococcus*)、弗兰克氏菌属(*Frankia*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和康奈斯氏杆菌属(*Conexibacter*); 不同之处, 番红花 S1 还有诺卡氏菌属(*Nocardioideae*)、分枝菌酸杆形菌属(*Mycobacterium*)和暂定微丝菌属(*Candidatus Microthrix*)优势群落, S2 有节杆菌属(*Arthrobacter*)、分枝菌酸杆形菌属(*Mycobacterium*)和威廉姆氏菌属(*Williamsia*), S3 有诺卡氏菌属(*Nocardioideae*)、土壤红杆菌属(*Solirubrobacter*)、贫养杆菌属(*Modestobacter*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)和短状杆菌属(*Brachybacterium*)。Alpha 多样性和 Beta 多样性分析结果表明, 不同生长期的番红花根际土壤中放线菌群落结构与多样性存在差异, 其多样性随番红花的生长呈现不断上升的趋势。**结论** 该研究在番红花根际土壤中检测到对病原微生物具有拮抗作用、可合成次级代谢产物、相对丰度较大的根际促生菌和稀有放线菌资源, 可为进一步研究其对番红花的促生功能、抗逆性作用和根际微环境中对病原菌、病毒等有害微生物的拮抗机制, 以及根际微生物间相互作用对番红花种球品质影响的研究奠定坚实基础。

【关键词】 高通量测序; 番红花; 根际土壤; 放线菌群落; 结构与多样性

DOI 标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2024.13.23

【中图分类号】S567 【文献标识码】A 【文章编号】1008-0805(2024)13-3039-08

土壤中含有丰富的细菌、真菌和放线菌微生物, 这些微生物资源不同于动物和植物, 它们是土壤中最活跃的生物体, 是近几年主要研究热点之一, 在生物、医药、农业和其他部门具有广阔的开发应用前景。微生物中的放线菌门属于细菌界, 是以分裂或分生孢子繁殖为主要繁殖方式, 且具有气生菌丝的革兰氏阳性菌^[1-3]。绝大部分放线菌是有较高经济价值的有益菌, 广泛分布于各种生态系统中, 与植物健康生长、发育和人们日常生活、生产密切相关, 主要缘于放线菌具有优异的代谢潜能, 能合成如抗菌、抗真菌、抗原生动物、抗病毒等的次生代谢物, 具有明显的抑菌、抗肿瘤、酶抑制等生物活性, 在土壤生态系统的修复中也有较大的应用价值^[4,5]。药用植物根际土壤中蕴藏着丰富的放线菌等促生菌资源, 能改善药用植物根系养分有效吸收与利用, 能有效抑制根际土壤病原菌活性而促进药用植物健康生长和发育, 进而影响药用植物的

品质^[6,7]。因此, 开展药用植物根际放线菌的研究, 不仅能为药用植物的生长繁育、抗病机制、生态种植模式的研究奠定理论基础, 还能为研究药用植物绿色可持续发展提供新思路。

番红花 *Crocus sativus* L., 常称西红花、藏红花, 系鸢尾科番红花属多年生草本植物^[8], 常以其花柱和柱头(花丝)作原料, 有着“植物黄金”的美称^[9]。西名贵红花中药材, 具有活血化瘀、凉血解毒、消肿止痛、解郁安神等功效^[10,11]; 还可用作日用化工、食品、香料等原料, 表现出较高的药用价值和经济价值^[12,13]。番红花主要产于伊朗、希腊、意大利等国, 而我国非原产地, 汉晋时期随佛教经我国西藏传入内地, 从而得名“藏红花”^[14,15], 目前已在上海、安徽、浙江等地形成规模化人工种植^[16]。新疆番红花引种栽培始于上世纪八十年代, 主要在新疆乌鲁木齐市、昌吉、策勒县等地区有大规模的种植并获得成功, 这为新疆推广种植番红花

收稿日期: 2024-04-01; 修订日期: 2024-10-29

基金项目: 丝绸之路经济带创新驱动发展试验区科技发展计划项目(2023LQ01002-01);

新疆维吾尔自治区重大专项项目(2023AD3C05-2); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01A82)

作者简介: 邱远金(1981-), 男(汉族), 四川内江人, 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所副研究员, 硕士学位, 主要从事中药资源学研究工作。

*通讯作者简介: 朱 里(1982-), 男(汉族), 河南商丘人, 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所研究员, 硕士学位, 主要从事中药资源与栽培研究工作。

奠定了重要基础^[17,18]。新疆和田皮山县位于新疆维吾尔自治区南部,塔克拉玛干大沙漠南缘,喀喇昆仑山北麓,气候属暖温带大陆性气候,与番红花适宜生长气候相似,其纬度又与番红花原产国伊朗非常接近,因此该地区具有种植番红花的较大潜力。2018 年为落实和有效衔接和田皮山县“精准扶贫”与“乡村振兴”工作任务,快速实现脱贫与振兴,结合皮山县多冷凉干燥的气候,经专家调研、论证,从安徽亳州源和堂药业股份有限公司购进番红花种球,引进并优化了“两段式”番红花栽培技术,即采取室内培育采花抽取花丝(7 月至 11 月初)与大田种球繁育(11 月初至次年 4 月底)相结合的种植模式^[19,20]。人工种植番红花常以无性繁育为主要繁殖手段,导致番红花繁育过程中易积累病害,其中极易发生种球腐烂病;据文献报道,每年约有 30% 以上种植面积遭受病害影响,致使球茎种源减产非常严重,造成严重的经济损失,极大影响番红花品质和产业发展^[21,22]。

在新疆番红花种植与种球储藏过程中,常发生种球腐烂病病害。球茎受到病原菌侵染,在发病初期难以及时发现与防治,常运用化学药剂短暂浸置球茎进行杀菌预防,虽然在短期内能够有效抑制病原菌侵染而降低病害发生几率,但同时可抑制有益微生物的生长,从而打破种球微环境中微生物平衡,降低种球对病原菌的抗病能力,并影响药材品质;同时也会造成大幅度增加植株农药残留、环境污染以及对人体健康的不利影响等问题。综上所述,运用化学药剂防治手段非中药材病虫害防治的最佳选择,而利用微生态原理中微生物间的竞争及拮抗关系为探索药用植物病害防控方法提供了新的研究思路。据文献报道,关于番红花根际土壤微生物中细菌、真菌以及球茎内生菌的研究报道比较多^[21,22,24],而涉及番红花根际土壤中放线菌的相关研究报道较少。在此基础上,本试验利用 Illumina Novaseq 高通量测序方法开展新疆番红花球茎根际土壤放线菌组成结构与多样性初步研究,以期了解土壤放线菌群落组成与变化规律,为探索番红花根际放线菌的开发利用及番红花根腐病的生物防治提供研究基础和技术支撑,对番红花病害的科学防控与绿色可持续发展具有促进意义。

1 材料与方法

1.1 材料

样品经新疆维吾尔自治区中药民族药研究所王果平研究员鉴定为番红花 *Crocus sativus* L.。

1.2 方法

1.2.1 番红花种植地情况

新疆番红花种植基地位于新疆和田地区皮山县科克铁热克乡,地理位置:北纬 37°38'11" 东经 78°17'46",

海拔约 1300m。皮山县位于新疆维吾尔自治区南部,塔克拉玛干沙漠南缘,喀喇昆仑山北麓,东与和田县、墨玉县毗邻,西同叶城县相连,南与印度交界,北与麦盖提县、巴楚县接壤,其海拔 1200 ~ 1400m,气候属暖温带大陆性气候,其特点是四季分明,夏长春秋短,冬季严寒,日照时间长,无霜期长,昼夜温差大,年平均气温 11.8℃;年平均无霜期 217d,年总辐射 138kJ · cm⁻²。

1.2.2 土壤样本采集与理化性质测定

1.2.2.1 土壤样本采集

番红花种植前,在地块设置 3 个土壤样品采集点(编号 T1、T2 和 T3),去除土壤表层杂物,挖取 0 ~ 20cm 土壤,清除土壤中的碎石、根系等杂质,将每个采集点的土壤充分混匀后平均分成 3 份,得到 9 份土壤样本,干冰冻存,用于测定土壤理化性质。番红花根际土壤样本采集,于 2019 年 12 月开始采集,连续采集番红花生长初期(2019 年 12 月中旬, S1)、生长中期(2020 年 1 月底, S2)、生长后期(2020 年 4 月初, S3),均采用 5 点 S 形法挖取 15 ~ 20 cm 深度的土壤,去除土壤样品中根系等杂质,每次采集根际土壤样本 16 份共 48 份,干冰冰盒保藏带回实验室,后置于 -80℃ 冰箱中冻存。

1.2.2.2 土壤理化性质测定

将采集的土壤样品风干、过 1 号筛,测定土壤有效磷、速效钾、有机质和全氮含量,以及土壤 pH。土壤有效磷含量按照中华人民共和国农业行业标准 NY/T 1121.7-2014 土壤检测第七部分/土壤有效磷的测定方法使用紫外分光光度计进行测定^[25],速效钾含量按照中华人民共和国农业行业标准 NY/T 889-2004 土壤速效钾和缓效钾含量的测定方法使用火焰光度计进行测定^[26],有机质含量按照中华人民共和国林业行业标准 LY/T 1237-1999 森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算方法进行测定^[27],全氮含量按照中华人民共和国林业行业标准 LY/T 1228-2015 森林土壤氮的测定方法使用凯氏定氮仪进行测定^[28],土壤 pH 使用 pH 计测定。

1.2.3 土壤微生物总 DNA 提取

使用土壤微生物 DNA 提取试剂盒 E. Z. N. A. Soil DNA kit(Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA),参照试剂盒说明书提取土壤微生物 DNA,利用 1.2% 琼脂糖凝胶对 DNA 质量进行电泳检测。

1.2.4 PCR 扩增和 Novaseq 测序

番红花根际土壤样品中放线菌 16S rRNA 的引物设计和 PCR 扩增均由陕西艾睿生物科技有限公司完成。放线菌基因扩增通用前引物为 F341(5'-GCTACGGGAGGCAGCAG-3')和后引物 R534(5'-AT-TACCGCGGCTGCTGG-3')。25μL 扩增体系为:5 × reaction buffer 5μL, 5 × GC buffer 5.0μL, dNTP

(2.5 mmol/L) 2.00 μ L, 引物 F (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 引物 R (10 μ mol/L) 1.0 μ L, DNA 模板 2 μ L, 灭菌超纯水 8.75 μ L, Q5 DNA Polymerase 0.25 μ L; PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2min, 98 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 5min, 25~30 个循环。同一样品均进行 3 次 PCR, PCR 扩增结束后, 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。纯化后的 PCR 产物由陕西艾睿生物科技有限公司利用 Novaseq6000 PE250 高通量进行双端测序。

1.2.5 数据分析

对于放线菌的 16S rRNA 基因, 使用 QIIME 对 FASTQ 格式的双端序列逐一进行质量筛查和质量过滤。应用 QIIME 软件调用 DADA2 方法进行去引物、质量过滤、去噪处理, 并检查和剔除嵌合体序列, 得到最终有效数据。采用 QIIME2 的 classify - sklearn 算

法^[29]; 对于每个 OTUs 的代表序列, 在 QIIME2 软件中使用默认参数, 应用 Naive Bayes 分类器与 Silva 数据库^[30] 对比获得 OTUs 分类学信息并进行物种注释。利用 QIIME 软件计算根际土壤放线菌的 Alpha 和 Beta 多样性和根际土壤样本中共有 OTUs 数量, 绘制 OTU - Venn 图, 并开展组间物种差异分析等。

2 结果

2.1 种植地土壤理化性质

新疆番红花种植地土壤理化性质测定结果见表 1。栽培地土壤为碱性土壤, pH 值为 7.89~7.93, 有效磷、速效钾、有机质和全氮分别为 60.3~62.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、130~141 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、4.20~4.40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 0.26~0.28 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 1 土壤理化参数 ($\bar{x} \pm s$)

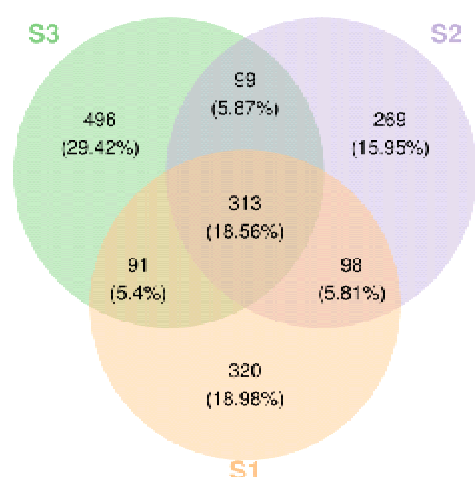
样品编号	项目及结果				
	pH 值	有效磷/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	速效钾/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	有机质/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	全氮/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
T1	7.90 $\pm$ 0.02	62.6 $\pm$ 1.69	141 $\pm$ 4.94	4.40 $\pm$ 0.30	0.27 $\pm$ 0.02
T2	7.93 $\pm$ 0.04	60.3 $\pm$ 1.85	130 $\pm$ 3.74	4.20 $\pm$ 0.18	0.28 $\pm$ 0.02
T3	7.89 $\pm$ 0.02	62.4 $\pm$ 1.44	136 $\pm$ 4.16	4.33 $\pm$ 0.20	0.26 $\pm$ 0.05

$n = 3$

2.2 不同生长时期番红花根际土壤放线菌 OTUs

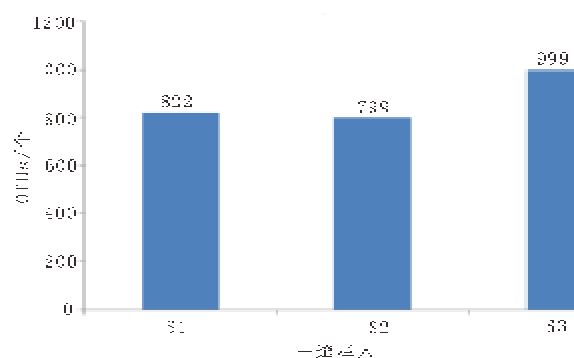
OTUs 是便于分析的假定分类单位, 本试验将相似性高于 97% 的有效序列归为一类, 48 个样本共获得 1686 个 OTUs, 其中新疆番红花生长初期 (S1) 根际土壤样本中有 822 个 OTUs, 生长中期 (S2) 中有 739 个 OTUs, 生长后期 (S3) 有 999 个 OTUs。从韦恩图 (图 1)

可以看出, 番红花生长的 3 个阶段共有 OTUs 313 个, 占总数的 18.56%; S1 独有的 OTUs 数量为 320 个, 占总数的 18.98%; S2 独有的 OTUs 数量为 269 个, 占总数的 15.95%; S3 独有的 OTUs 数量为 496 个, 占总数的 29.42%; OTUs 数量大小为 S3 > S1 > S2。



S1. 生长初期 S2. 生长中期 S3. 生长后期

图 1 番红花根际土壤样本放线菌 OTUs 数量的韦恩图



2.3 不同生长时期番红花根际土壤放线菌群落多样性分析

2.3.1 Alpha 多样性分析

α 多样性是反映丰富度和均匀度的综合性指标,

其中, 赵氏指数 (Chao1) 反映样本中所含 OTUs 数目, 指数值越大代表样本中所含物种越多; Observed species 指数 (Sobs) 表示该样品中含有的物种数目, 数值越高表明样品物种丰富度越高; Shannon 指数和 Simp-

son 指数反映样品群落的丰富度和均匀度,Shannon 值越大,说明群落多样性越大,而 Simpson 指数相反,其值越小代表多样性越大^[31]。从表 2 可以看出 3 个生长期的番红花根际土壤样本,Shannon 指数分布在 6.0276 ~ 6.1538 之间,Simpson 指数均在 1 以下,说明 48 个样本的物种多样性存在一定的差异,其中 Chao1 和 Sobs 指数存在显著性差异,Simpson、Simpson、Shannon 和覆盖

率无统计学意义。不同生长期的番红花土壤放线菌丰富度指数 Chao1s、Sobs 呈现规律均为 S3 > S2 > S1,表明在番红花生长过程中根际土壤放线菌物种数随着植株生长呈上升趋势;放线菌测序覆盖率为 99.99%,表明具有足够测序深度,可反映出番红花根际土壤样本放线菌菌落组成信息。

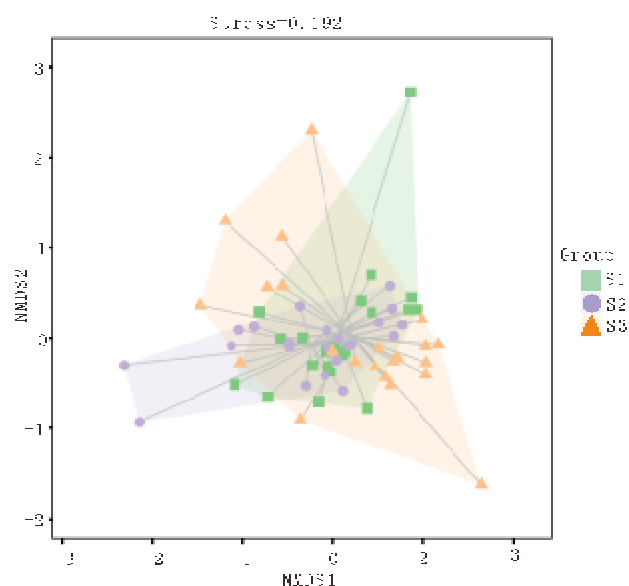
表 2 番红花根际土壤放线菌丰富度和多样性指数

组名	赵氏指数	辛普森指数	香农指数	观察到的种类	覆盖率/%
生长初期 S1	116.7538a	0.975139a	6.0601a	118.06a	99.99
生长中期 S2	116.7688a	0.975437a	6.0276a	119.09a	99.99
生长后期 S3	123.9462b	0.975658a	6.1538a	125.33b	99.99

不同小写字母表示存在差异显著($P < 0.05$)

2.3.2 Beta 多样性分析

应用非量度多维尺度分析(NMDS)研究多个样本的分类,进一步呈现样本间物种组成差异性,其中样品间点距离越近,群落组成的相似度就越高,反之则相似度越低;NMDS 结果应力值(Stress)越小越好,一般认为 < 0.2 时,NMDS 分析的结果较可靠^[32]。由图 2 可知,NMDS 应力值 Stress 为 0.192(< 0.2),表明 NMDS 分析结果可靠。番红花三个生长时期根际土壤样本中放线菌物种组成存在一定差异;其中番红花 S3 根际土壤样本点分别与 S1、S2 土壤样本距离较远,S1 与 S2 距离较近,表明番红花 S1 与 S2 根际土壤中放线菌物种组成相似度高于 S3。



S1. 生长初期 S2. 生长中期 S3. 生长后期
图 2 番红花根际土壤放线菌群落的 NMDS 分析

2.4 番红花不同生长阶段根际土壤放线菌物种丰度聚类

依照所有样本在放线菌属级的物种注释和丰度信

息,综合番红花不同生长时期的各土壤样本,对根际放线菌群落相对丰度前 50 的属进行聚类分析绘制出热图。依据分类信息以及各组间的差异程度,找出样本中聚集性更强的物种(见图 3),图中红色表示上调,蓝色表示下调,-1、-0.5、0、0.5 和 1 表示微生物种群相对丰度变化的不同程度。研究结果显示,番红花 S1 和 S3 根际样本集中到一个分支,与 S2 距离较远,表明 S1 与 S3 菌群相对丰度差异小,而 S1、S3 与 S2 之间的菌群相对丰度差异较大。

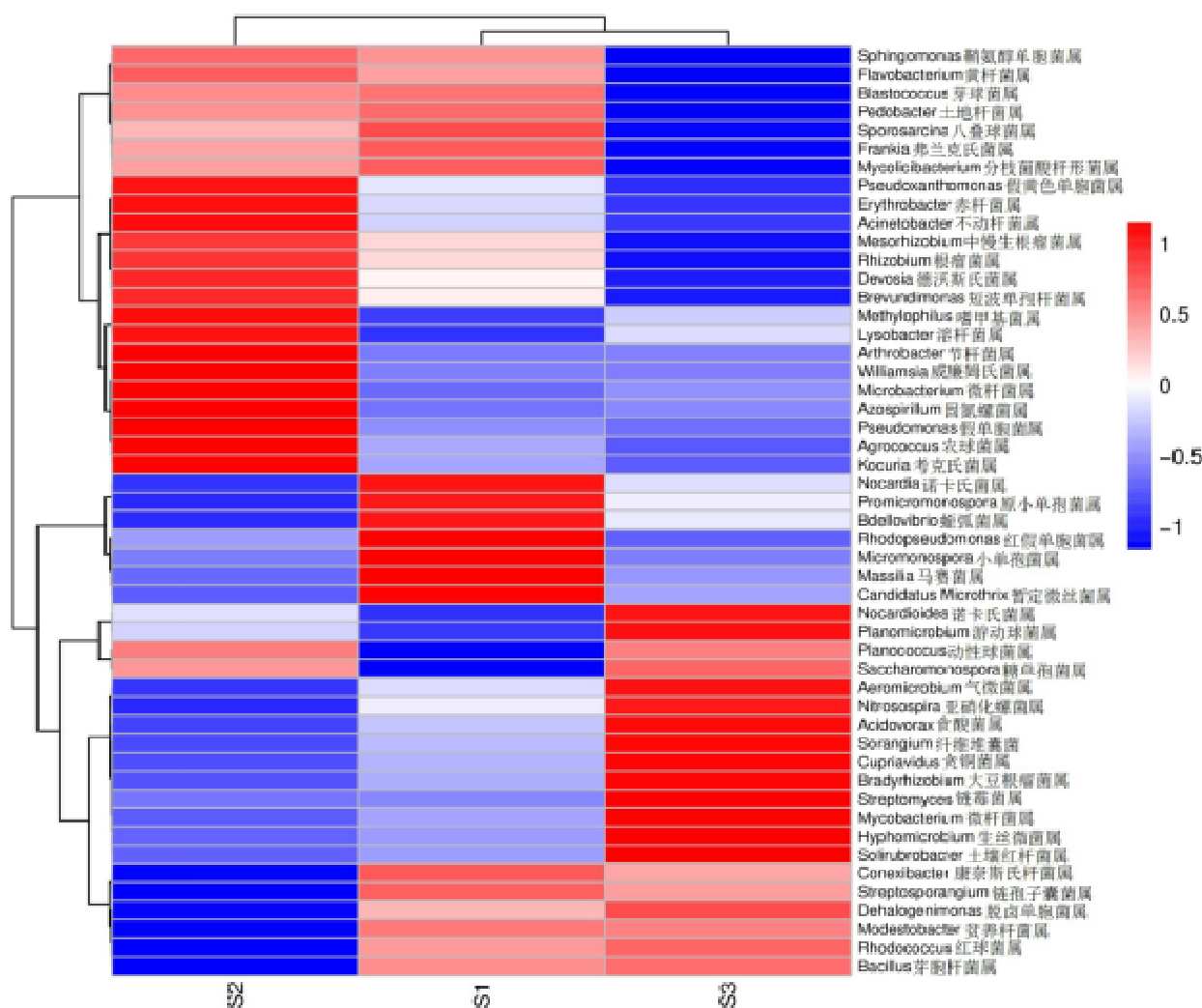
2.5 不同生长时期新疆番红花根际土壤放线菌群落结构组成

通过 Illumina 高通量测序技术测序分析,番红花根际土壤中共检测到多个放线菌门,图 4 是按相对丰度大小前 15 的门制成的柱状图,主要有放线菌门(Actinobacteria)、变形杆菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝菌门(Cyanobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、扭柄藻门(Streptophyta)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、螺旋体门(Spirochaetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、产水菌门(Aquificae);番红花三个生长期共有优势放线菌门为放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形杆菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),此四个放线菌门在番红花生长过程中占据绝对优势;其中以放线菌门(Actinobacteria)相对丰度最大,不同生长期相对丰度变化规律为 S3 > S1 > S2;其次为变形杆菌门(Proteobacteria),相对丰度次之,丰度变化规律为 S2 > S1 > S3;产水菌门(Aquificae)相对丰度最小。

由图 5 可知,番红花 3 个生长期的根际放线菌群落在属水平上的组成与相对丰度存在差异,去除未分类的放线菌属,在检测到的放线菌属中选择相对丰度

占比前 20 的放线菌属进行分析。番红花三个生长期共有优势放线菌群落以红球菌属 (*Rhodococcus*)、芽球菌属 (*Blastococcus*)、弗兰克氏菌属 (*Frankia*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、微杆菌属 (*Microbacterium*) 和康奈斯氏杆菌属 (*Conexibacter*) 为主; 其中红球菌属 (*Rhodococcus*) 相对丰度最大, 芽球菌属 (*Blastococcus*) 次之, 皮肤球菌属 (*Kytococcus*) 最小。番红花 3 个生长期的优势放线菌群落除上述共有群落外: 一方面, 生长初期 S1 还有诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、分枝菌酸杆形菌属 (*Mycolicibacterium*) 和暂定微丝菌属 (*Candidatus Microthrix*) 优势群落, S2 有节杆菌属 (*Arthrobacter*)、分枝菌酸杆

形菌属 (*Mycolicibacterium*) 和威廉姆氏菌属 (*Williamsia*), S3 有诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、土壤红杆菌属 (*Solirubrobacter*)、贫养杆菌属 (*Modestobacter*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、糖霉菌属 (*Glycomyces*) 和短状杆菌属 (*Brachybacterium*); 另一方面, 生长期 S1 与 S2 还共有分枝菌酸杆形菌属 (*Mycolicibacterium*) 优势群落, S1 与 S3 共有诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) 优势群落。在番红花生长过程中分枝菌酸杆形菌属 (*Mycolicibacterium*) 相对丰度大小变化趋势为 S1 > S2 > S3, 诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) 相对丰度为 S1 > S3 > S2。



S1. 生长初期 S2. 生长中期 S3. 生长后期

图 3 番红花根际土壤放线菌属水平聚类热图

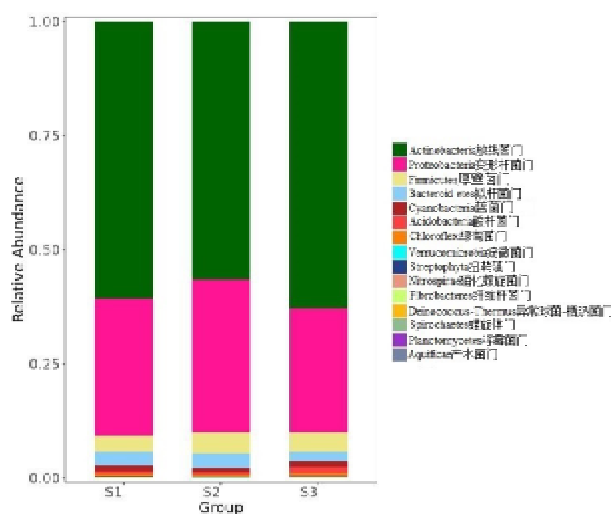
3 讨论

3.1 从生态学角度分析

植物可提供许多生态位供根际促生菌生长和繁殖, 二者在根际区域微环境中形成了共生关系而长期共存^[35], 若微环境发生变化, 可能引起植物受到不利因素影响而制约植株的正常生长, 根际微环境中微生物组成

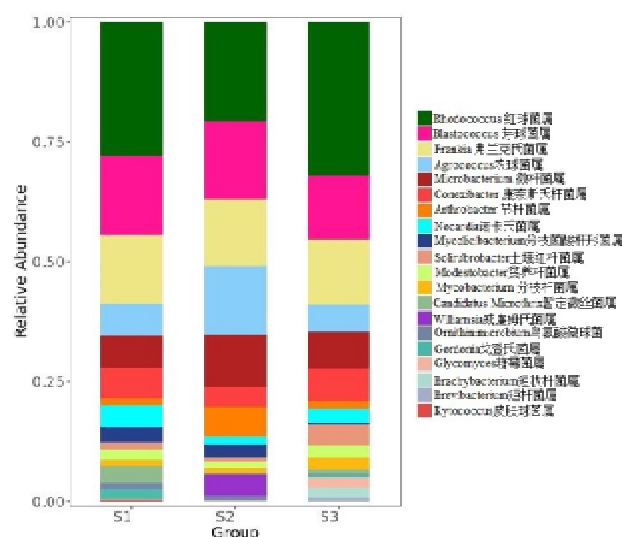
结构与多样性也会受到影响^[34,35]。放线菌广泛分布于不同的自然环境中, 是土壤生态体系中重要组成部分, 土壤微生物中主要类群之一, 也是最早被研究用于生物防治的微生物^[35]。一方面, 其种类繁多、数量之大, 代谢功能千差万别, 可影响土壤生态系统的结构和功能, 净化环境、改良土壤^[36]; 另一方面, 因放线菌能产生多

种次生代谢产物而影响植物生长发育^[37],可增强植物抗性提高植株抵抗病害及适应环境的能力^[38]。目前,药用植物生产过程中面临着病虫害侵害、药材减产、品质下降、农药物质残留等引起药材安全的问题,严重阻碍了中医药产业发展。在植物病害防治研究方面,放线菌作为生物防治剂和微生物菌剂受到广泛关注,成为研究的焦点之一^[35,36]。因此,通过对药用植物根际土壤中放线菌相关研究,分析放线菌防病促生功能机制,为开发绿色健康的生物防治剂、促进药用植物的安全生产及绿色可持续发展具有重要意义。



S1. 生长初期 S2. 生长中期 S3. 生长后期

图4 番红花根际土壤放线菌门水平组成



S1. 生长初期 S2. 生长中期 S3. 生长后期

图5 番红花根际土壤放线菌属组成

3.2 高通量测序已是微生物分析方面常用的实验手段
可无需分离纯培养菌株直接通过测定样本总DNA来研究根际微生物群落的结构和功能信息,全面、准确

地反映土壤整体微生物群落结构和物种遗传多样性,以及客观地分析具有重要功能的微生物群落信息^[34,37,38]。本研究运用高通量测序技术对新疆皮山县种植的番红花不同生长时期的根际土壤样本的放线菌免培养多样性进行了测序和分析。样品 α 多样性指数分析显示放线菌群落的相对丰度在番红花生长后期分别与生长初期、生长中期有所差异,并且导致这种差异的主要原因是获得的放线菌物种信息数目的变化引起的。通过 β -多样性非量度多维尺度分析(NMDS)可以看出番红花生长后期可以与其他期进行区分,但样本间点的距离差异并不显著。在整个番红花种植生长期,根际放线菌组成结构与多样性呈现种类相对稳定,部分放线菌数量变化明显的特点。

3.3 番红花根际土壤中放线菌群落门水平结构与多样性分析

在门水平上根际放线菌优势群落主要以放线菌门、厚壁菌门、变形杆菌门和拟杆菌门为主,其中以放线菌门相对丰度最大,变形杆菌门相对丰度次之,而产水菌门相对丰度最小。本研究结果与周琳等在崇明地区番红花根际土壤微生物多样性研究中检测到放线菌门水平上的结果相似,均检测到放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门等9个放线菌门,但优势放线菌组成存显著差异;由此可见,番红花不同生长时期以及相同生长期不同栽培地土壤中微生物群落结构与多样性存在差异,主要原因是受番红花生长不同时期、土壤理化性质、栽培模式以及缺乏统一田间管理技术规程等因素影响^[29,39]。据相关文献报道,生活在植物组织或根际微环境中的拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)中大部分属于植物促生菌,可促进植物吸收和利用土壤中矿物质营养,或增强植物抗性抑制有害生物侵袭^[40]。在本研究中番红花不同生长期的根际土壤样本中也检测拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门等优势放线菌群落,这些微生物在番红花生长过程中作为根际促生菌是否具有抑制球茎病原菌活性和增强植株抵抗病害能力的作用,需要进一步开展研究加以揭示。虽然在番红花不同生长期根际土壤中均存在大量放线菌门(Actinobacteria)微生物群落,但目前并未发现放线菌门有促进植物生长方面的活性报道^[41]。

3.4 番红花根际土壤中放线菌群落属水平结构与多样性分析

番红花种植生长过程中优势菌群为红球菌属、芽球菌属、弗兰克氏菌属、农杆菌属、微杆菌属和康奈斯氏杆菌属。除上述共有优势群落外,S1、S2共有分枝菌酸杆形菌属优势群落,S1与S3共有诺卡氏菌属优势群落。根据文献报道,除链霉菌属以外的放线菌均为稀有放线菌^[42]。本研究中番红花根际土壤链霉菌属群落相对丰度较小,并未列在相对丰度前20中,表明番红花根际土

壤中稀有放线菌资源非常丰富,尤其以芽球菌属、红球菌属、弗兰克氏菌属和衣球菌属为代表。据相关研究表明,芽球菌属和红球菌属具有抑制病原微生物活性^[43]。在番红花生长期初期和末期均检测到相对丰度较大的稀有放线菌诺卡氏菌属菌群,该属放线菌中极少有病原菌,对病原微生物具有拮抗作用,是最有可能获得新的抗生素、酶制剂等具有生物活性物质的一类安全资源菌,在治理环境污染上具有广阔的研究前景^[42-44]。在番红花生长期中期,威廉姆氏菌属放线菌相对丰度明显高于番红花生长期初期和生长末期;据文献报道,威廉姆氏菌属具有合成抗生素等次级代谢产物,促进植物生长的作用^[45]。

番红花根际微环境为根际促生菌、植物病原菌、病毒等微生物提供了生存区域,其中根际土壤中部分放线菌、真菌、病毒都能引起番红花球茎腐烂病害的发生^[46,47],成为当前制约番红花产业发展的主要因素。本研究通过高通量测序技术在番红花根际土壤中检测到优势放线菌群落拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、芽球菌属、红球菌属、诺卡氏菌属和威廉姆氏菌属等根际促生菌,这些能合成次生代谢产物、抑制病原菌的放线菌,可以进一步研究其对番红花的促生功能、抗逆性作用和对根际微环境中病原菌、病毒等有害微生物的拮抗机制,以及在根际微生物间相互作用过程中对番红花种球品质的影响,可全面而系统地揭示番红花根际土壤放线菌的价值与应用前景。因此,在后续的研究工作中,一方面可继续培养、筛选和测定这些菌株抑制番红花病原菌活性的作用,研究其产生具抗菌活性次生代谢物质的机制;另一方面,针对番红花球茎常见的病原菌筛选出具有较好拮抗活性的微生物资源并制作相应产品进行应用,助力番红花种植产业绿色可持续发展。

参考文献:

- [1] 彭楚. 太白山典型植被土壤放线菌多样性及其资源研究[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文,2018.
- [2] 张超群,戴建荣. 放线菌的研究现状与展望[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(1):110.
- [3] Stackebrandt E, Schumann P. Introduction to the taxonomy of actinobacteria[M]. New York: Springer, 2006: 297.
- [4] 李春霞,吴兴彪,靳亚忠. 根系代谢物介导的植物-微生物互作研究进展[J]. 微生物学报,2022,62(9):3318.
- [5] Vineeta S, Shafiqul H, Harehita S, et al. Isolation, Screening, and Identification of Novel Isolates of Actinomycetes from India for Antimicrobial Applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2007, 7:1921.
- [6] 勾宇春,王宗抗,张志鹏,等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2023,29(2):495.
- [7] Saleem M, Law AD, Moe LA. Nicotiana roots recruit rare rhizosphere taxa as major root-inhabiting microbes[J]. Microbial ecology, 2016, 71(2):469.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:134.
- [9] Sajjan Thakur, Harish Chander Dutt. Floral Phenology and Adequate Collection Time of Flowers of *Crocus sativus* L.: An Expensive Spice[J]. Natl. Acad. Sci. Lett., 2021, 44(3):275.
- [10] Bhandari PR. *Crocus sativus* L. (saffron) for cancer chemoprevention: a mini review[J]. J Tradit Complement Med, 2015, 5(2):81.
- [11] Moradzadeh M, Kalami MR, Avan A. The antileukemic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its related molecular targets: a mini review[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4):4732.
- [12] Alavizadeh SH, Hosseini-zadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 64:65.
- [13] Malayk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice saffron[J]. Food Res Int, 2010, 43(8):1981.
- [14] Siavash Ehsan Falahat, Hashem Hadil, Sina Siavash Moghaddam, et al. Exploring cultivation site of saffron (*Crocus sativus* L.) by utilizing GIS linked to AHP[J]. Spat. Inf. Res., 2019, 27(3):285.
- [15] 杨美蓉,冉家栋,齐煜东,等. 西红花全球生态适宜区预测及生态特征[J]. 中国现代中药, 2021, 23(9):1534.
- [16] 张雪松,张文浩,刘鲁江,等. 我国西红花可持续发展建议[J]. 西藏农业科技, 2021, 43(1):101.
- [17] 马晓彬,许立君,马晓蓓. 藏红花在新疆昌吉地区引种栽培的研究[J]. 新疆中医药, 2017, 35(3):70.
- [18] 兰卫,朱金芳,耿直. 新疆西红花的种植技术[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(8):874.
- [19] 刘大连. 开发西红花繁荣民族经济[J]. 医药世界, 2003, (1):58.
- [20] 饶君凤,王根法,吕伟德. 浙江省西红花“二段法”优质高产栽培技术研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(9):5214.
- [21] 杜雪,李秀娟,桂思琦,等. 西红花放线菌性病害与生防菌鉴定研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(6):1279.
- [22] 李军,高广春,李白,等. 西红花球茎腐烂病发生及综合防控对策[J]. 植物保护, 2023, 49(6):10.
- [23] 周琳,杨柳燕,蔡友铭,等. 崇明西红花根际土壤微生物和球茎微生物多样性分析[J]. 核农学报, 2020, 34(11):2452.
- [24] 徐静,石书兵,秦小钢,等. 核桃林间作西红花对其土壤微生物数量的动态变化[J]. 新疆农业科学, 2023, 60(8):2022.
- [25] 农业部种植业管理司. 土壤检测 第7部分/酸性土壤有效磷的测定:NY/T 1121.7-2014[S]. 北京:中国农业出版社,2014:1.
- [26] 中华人民共和国农业部. 土壤速效钾和缓效钾含量的测定:NY/T 889-2004[S]. 北京:中国农业出版社,2004:1.
- [27] 中国林业科学研究院林业研究所. 森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算:LY/T 1237-1999[S]. 北京:中国林业出版社,1999:1.
- [28] 中国林业科学研究院林业研究所. 森林土壤氮的测定:LY/T 1228-2015[S]. 北京:中国标准出版社,2015:1.
- [29] Bokulich NA, Keshler BD, Ram RJ, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with qiime2's q2-classifier plugin. Microbiome, 2018, 6(1):90.
- [30] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res, 2013, 41:D590.
- [31] 陈冉,张艳欣,王丹丹. 基于高通量测序与 UPLC-Q-TOF 技术的不同产地银杏叶内生菌与其主要化学成分相关性探究[J]. 中国现代中药, 2021, 23(12):2096.
- [32] Legendre P, Legendre L. Numerical ecology (second edition) [M]. Elsevier, 1998:444.
- [33] Jann, Lasee, Gr Nemeyer, et al. Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia[J]. Plant & Soil, 2012, 356(1):67.
- [34] 文京伟,李香真,姚敏杰. 植物根际微生物群落构建的研究进展

- [J]. 微生物学报, 2021, 61(2): 231.
- [35] 杜用玺. 丹参根际放线菌的防病促牛功能研究[D]. 广东药科大学硕士学位论文, 2021.
- [36] 陈长, 孙晓宇, 赵玲候, 等. 不同种植期棚室黄瓜土壤放线菌多样性研究[J]. 土壤通报, 2018, 49(3): 587.
- [37] Sathya A, Vijayabharathi R, Gopal Akrisman S. Plant growth - promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes [J]. Biotech. 2017, 7(2): 102.
- [38] 郭鼎齐, 管仁伟, 李红霞, 等. 基于高通量测序分析传统轮作对西洋参参田土壤细菌群落结构影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1477.
- [39] Yandigeri MS, Meena KK, Singh D, et al. Drought - tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2012, 68(3): 4110.
- [40] Klopper JW. Plant growth - promoting rhizobacteria on radishes [C]. Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, 1978: 879.
- [41] 王震. 甘蔗根际放线菌资源筛选及促生机制研究[D]. 广西大学博士学位论文, 2020.
- [42] 王雪寒, 夏冬双, 武志华, 等. 内蒙古西部地区土壤放线菌的多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4340.
- [43] 刘敏, 车文学, 边伟杰, 等. 八门湾红树林土壤放线菌多样性及抗病原菌活性分析[J]. 海洋与湖泊, 2022, 53(2): 352.
- [44] Selim M, Abdelhamid S, Mohamed S. Secondary metabolites and biodiversity of Actinomycetes [J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2021, 19(1): 72.
- [45] Zhang MJ, Li XH, Peng LY, et al. *Williamsia aurantiacus* sp. nov., a novel actinobacterium producer of antimicrobial compounds isolated from the marine sponge [J]. Archives of Microbiology, 2019, 201: 691.
- [46] Sakaki T, Takeshima T, Tominaga M, et al. Recurrence of ICA - PCoA a aneurysm after neck clipping [J]. Journal of Neurosurgery, 1994, 80(1): 58.
- [47] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 62: 142.

Actinomycete Community Structures and Diversities in Rhizosphere Soils in Different Growth Stages of *Crocus sativus* L. Analyzed Based on Illumina Novaseq high - throughput sequencing

QIU Yuan-jin, ZHANG Ji-zhao, ZHAO Ya-qin, AYBEK · Rehmetulla, FAN Cong-zhao, WANG Guo-ping, ZHU Jun*

(Xinjiang Uygur Autonomous Region Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Research Institute, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Resources Key Laboratory, Urumqi 830002, China)

Abstract: **Objective** To study the structures and diversities of soil actinomycete community in the rhizosphere soils of *C. sativus* L. at different growth stages. **Methods** The total DNA of rhizosphere soil Actinomycetes in different growth stages of *C. sativus* L. was extracted and sequenced using Illumina Novaseq high - throughput sequencing platform. **Results** A total of 1686 taxa (OTUs), including 15 phyla, were obtained from three groups of samples from three growth stages of saffron (S1 at initial growth stage, S2 at middle growth stage and S3 at late growth stage) by high - throughput sequencing. The top 20 Actinomycetes with relative abundance were analyzed. Among them, the dominant actinomycete communities at Phyla level of saffron in different growth stages include Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes. And the dominant actinomycete communities at genus level of saffron in different growth stages are *Rhodococcus*, *Blastococcus*, *Frankia*, *Agrococcus*, *Microbacterium* and *Conexobacter*. The differences are that the dominant actinomycete communities in S1 growth stage also include *Nocardioides*, *Mycolicibacterium* and *Candidatus Microthrix*, and S2 includes *Arthrobacter*, *Mycolicibacterium* and *Williamsia*, S3 also includes *Nocardioides*, *Solirubrobacter*, *Modestobacter*, *Mycobacterium*, *Glycomyces* and *Brachyobacterium*. The results of Alpha and Beta diversity analysis showed that the diversity of actinomycete communities in the rhizosphere soils of *C. sativus* L. at different growth stages are diverse. And the diversity of actinomycete community shows a rising trend with the growth of *C. sativus* L. **Conclusion** In this study, the rhizosphere growth promoting bacteria and rare actinomycete with antagonistic effect on pathogenic microorganisms, synthesis of secondary metabolites, and relative abundance in the rhizosphere soils of *C. sativus* L. can be detected. These results laid an important foundation for further study of its growth promoting function, stress resistance on saffron and antagonistic mechanism against pathogenic bacteria, viruses and other harmful microorganisms in the rhizosphere microenvironment, as well as the influence of rhizosphere microbial interaction on seed ball quality of saffron bulb.

Key words: High - throughput sequencing; *Crocus sativus* L.; Rhizosphere soil; Actinomycete Community; Structure and diversity

(责任编辑: 杜国安)