

榨菜根肿病不同发病程度田 根际土壤真菌群落多样性研究

王殿东¹, 田雪亮², 潘丽梅¹

(1. 长江师范学院 生命科学与技术学院, 重庆 408100; 2. 河南科技学院 资环学院, 河南 新乡 453003)

摘要:以榨菜根肿病发病程度不同的根际土壤为分离对象,采用454焦磷酸高通量测序方法,研究了榨菜根肿病对根际土壤真菌群落的影响,并对榨菜根际土壤真菌的18S rDNA序列进行大规模测序,揭示根肿病不同程度发病田根际土壤真菌群落的变化特征。结果表明:土壤中子囊菌为优势真菌类群,其次为担子菌;重病田土壤中植物病原真菌数量高于其它发病田;重病田土壤真菌群落的Shannon和Simpson多样性指数、OTU数量和属的数量均低于其它发病田;表明榨菜根肿病在一定程度上影响根际土壤真菌群落的结构,这可能与根肿菌造成榨菜根系破坏后,其根系分泌物旺盛有关。

关键词:榨菜根肿病;根际土壤真菌;土传植物病原真菌;多样性指数

中图分类号:S 637.306⁺.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0115-04

芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)属原生生物界根肿菌门,主要危害白菜、油菜、榨菜、萝卜等十字花科植物,造成植物根部肿大,影响植物吸收,同时根肿菌侵染造成植物根系表皮破裂,土壤中其它病原菌侵入,导致植物根系腐烂,植株矮小黄化甚至死亡,严重时减产。芸薹根肿菌可在土壤中长期存活,一旦田间发病,难以消除,田块无法继续种植十字花科作物。

“涪陵榨菜”已经成为我国重庆的特色产业,涪陵区

榨菜的种植面积和产量均居全国第一位。自1994年在涪陵地区发现榨菜根肿病,目前该病已成为榨菜的主要病害^[1-2]。涪陵地区榨菜连作年限达10~20年。连作已造成土壤退化,出现连作障碍,改变了土壤微生物群落。作为土传病害,根肿病的发生与土壤微生物、植物根系分泌物和土壤理化性质密切相关。

根肿菌侵染造成植物形成根瘤,根的生理状态和形态结构发生明显改变,且表皮开裂,根系内含物大量渗漏到土壤中。相比健康根系,根瘤分泌物多,营养物质更丰富,这可能吸引更多的微生物聚集在植物根系周围。植物根系分泌物能为病原菌萌发和生长提供营养物质,且病原菌在根系分泌物的引导下侵入植物。根肿菌休眠孢子在十字花科植物根系分泌物刺激下才能萌发^[3],这利于根肿菌侵染寄主植物。由此可见,根肿菌侵染改变植物生长状态,造成根系分泌物渗漏,可能改

第一作者简介:王殿东(1979-),男,博士,副教授,研究方向为植物病理与土传病害及植物寄生线虫。E-mail:ddwangwill@163.com.

责任作者:潘丽梅(1963-),女,硕士,教授,现主要从事植物病理学等研究工作。E-mail:good2094@yeah.net.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31170463);重庆市教委青年骨干教师资助计划资助项目。

收稿日期:2016-02-14

Abstract: Taking *Dasineura pyrivora* Bouche as test object, using microscopy and field statistics methods, the damage symptoms, morphological characteristics of its egg, larvae and adult were illustrated, its biological characteristics, such as spawning behavior, the population dynamics of the pear midge and its natural enemies were systemically investigated as well. The results showed that three generations of pear midge occurred every year in pear-production area in Hubei Province, the period of the overwintering generation adult emergence lasted for a longer time, which began from late February and reached the emergence peak on late March. There were three damage peaks caused by the larvae population of pear midge per year, which happened 20—30 days after the adult emergence. The larvae developed into pupae when the temperature was higher than 30 °C. The natural insect enemies of pear midge mainly included *Chrysopa*, *Harmonia axyridis*, *Propylaea japonica*, *Syrphus fly*, spider and ant.

Keywords: *Dasineura pyrivora*; biological characteristic; population dynamics

变根际土壤微生物群落结构,但具体机制还不明确。

根际土壤真菌与植物存在密切的互作关系,同时参与土壤碳、氮、磷等养分转化^[4],具有重要的生态意义。因此,为了明确榨菜根肿病对根际土壤真菌群落的影响,现采用 454 高通量测序分析不同发病程度榨菜根肿病田根际土壤真菌群落差异,为生态防治榨菜根肿病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以榨菜根系土壤为研究对象。

台式高速冷冻离心机(thermo X1R, 15200rpm)、微量分光光度计(thermo Nano Drop2000)、电子天平(北京赛多利斯 BSA124S, 0.000 1 g)、FastDNA® Spin Kit for Soil 土壤 DNA 提取试剂盒。

1.2 试验方法

1.2.1 田间取样 取样地点位于重庆市涪陵区南沱镇。选择不同发病程度榨菜田块,根肿病发病程度分别为不发病(病株率 0)、发病较轻(病株率 0~5%)、中度发病(病株率 6%~10%)、重度发病(病株率大于 11%)^[1]。采样时间为 12 月 20 日,此时为榨菜根肿病发病中期。采用五点取样法,从田间随机选取 5 点,每个点选取 5 株榨菜。将榨菜从土壤中连根拔出,采用抖根法将榨菜根系粘附的土壤抖落,收集到自封袋中。带回实验室,置于-20℃冰箱保存。

1.2.2 榨菜根际土壤微生物总 DNA 提取 每份土壤样品做 3 次重复,每份称取 0.5 g,提取 DNA,将 3 次重复样品混合作为每个土壤样品微生物总 DNA。将 DNA 溶解于 50 μ L TE 缓冲液(10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, pH 8.0),并测定 DNA 浓度和纯度

(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀)。将符合质量要求的土壤微生物总 DNA 保存于-20℃冰箱,待用。

1.2.3 根际土壤真菌 454 高通量测序 将总 DNA 送上海生工测序公司进行 454 高通量测序。采用真菌 18S rDNA 通用引物: 5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCAT CAGCTATAGCGTACAGTAGTCAATGCTTGTCTC-3', 加粗序列为不同样品的分子标签。共计 4 个土壤样品进行高通量测序。所得序列进行净化,去除嵌合体序列和过长过短序列(小于 100 bp 或大于 600 bp),然后以 97% 阈值进行 OTU 划分,以每个 OTU 代表序列在 NCBI 数据库进行比对,划分真菌物种,将物种划分到纲、亚门、属,并依据各 OTU 的序列数量计算多样性指数^[5]。Shannon 多样性指数计算公式: $H = -\sum (P_i)(\ln P_i)$, 式中 P_i 为此物种个体数占总个体数比例; Simpson 多样性指数计算公式: $D = 1 - \sum P_i^2$, 式中 P_i 种的个体数占群落中总个体数的比例。

1.3 数据分析

采用 Excel 进行数据统计及分析。

2 结果与分析

2.1 高通量测序数据特征

用带有不同分子标签的引物扩增土壤真菌 18S rDNA 序列,所得序列带有分子标签,依据分子标签对序列进行分类,并统计序列的相关数据,以确认测序的精度和准度。由表 1 可以看出,重度发病田土壤样品所得序列最多,去除过长过短和杂合体后序列剩余 6 782 条。所得序列平均长度在 509.4~524.3 bp,这是 454 高通量测序单反应的标准长度。说明序列质量较高,可以进行后续分析。

表 1

高通量测序所得序列数据特征

Table 1

Features of high throughput sequencing data

样品来源	分子标签	初级序列数量	序列平均长度	净化序列数量	序列平均长度
Sample source	Molecule label	Primary sequence number	Sequence average length/bp	Purification sequence number	Sequence average length/bp
无病田 Disease free field	TGTTAGTGTGA	3 027	515.1	2 959	513.1
轻度发病田 Mild disease field	TGTCACACGA	3 620	483.2	3 519	509.4
中度发病田 Moderate disease field	TGTCGTGCA	5 143	518.4	5 014	522.1
重度发病田 Heavy disease field	ACACATACGC	6 782	525.7	6 649	524.3

2.2 不同发病程度榨菜根际土壤真菌类群差别

由图 1 可知,子囊菌亚门在各发病程度土壤中比例最高,为优势真菌类群。无病田为 43.13%,轻度发病田为 55.13%,中度发病田为 56.72%,重度发病田为 74.24%。担子菌亚门在各发病土壤比例居第 2 位,其中无病田比例最高为 38.93%,轻度发病田和重度发病田比例较接近,分别为 22.89%和 21.90%,而重度发病田担子菌亚门占第 3 位,比例为 10.20%。壶菌亚门真菌在无病田比例为 15.45%,轻度发病田为 19.63%,中度

发病田 15.34%,重度发病田 14.04%。毛霉亚门、球囊菌亚门和捕虫菌亚门在各发病田比例均较低,为非优势真菌类群。

由表 2 可知,无病田土壤真菌中被孢霉属(*Mortierella*)比例最高为 18.8%,其次为子囊菌门的 *Diatrype* 属,所占比例为 16.6%。这 2 个属真菌为优势类群。*Blyttiomycetes* 比例为 9.9%,而其它属比例均较低。轻度发病田土壤真菌以 *Blyttiomycetes* 为优势真菌类群,比例为 26.0%,其次为被孢霉属,比例为 13.1%。其

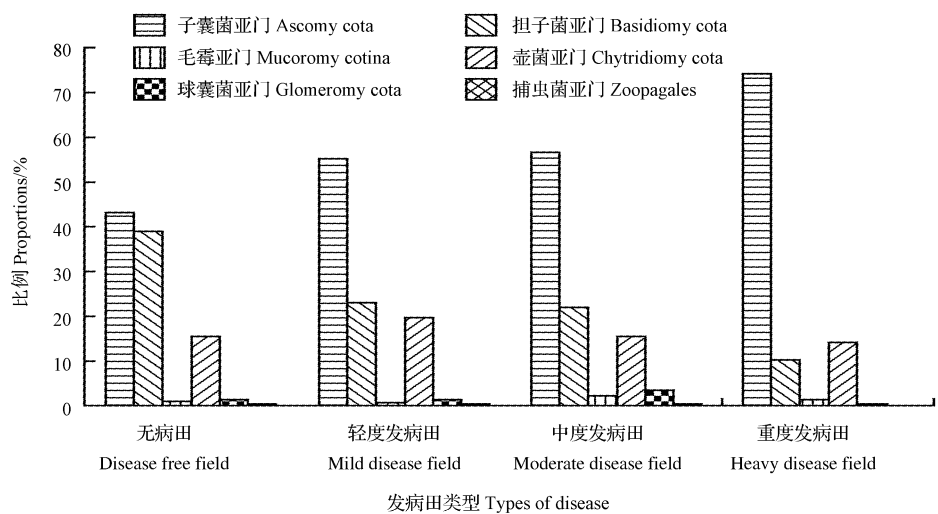


图 1 不同程度发病田中各类群根际真菌比例

Fig. 1 Proportions of rhizosphere fungi in field with different levelsof tuber mustard clubroot disease

表 2 不同发病田代表性根际土壤真菌属比例

Table 2 Percentage of representative rhizosphere soil fungi %

属名 Genus	无病田 Disease free field	轻度发病田 Mild disease field	中度发病田 Moderate disease field	重度发病田 Heavy disease field
肉座菌属 <i>Hypocrea</i>	2.2	1.9	2.8	22.8
青霉属 <i>Penicillium</i> ,	0.6	0.3	2.1	24.1
<i>Blyttomyces</i>	9.9	26.0	1.0	—
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	0.5	1.5	—	8.1
地丝霉属 <i>Geomyces</i>	0.6	0.1	—	6.6
被孢霉属 <i>Mortierella</i>	18.8	13.1	5.7	4.4
赤霉属 <i>Gibberella</i> ,	1.2	0.5	—	5.9
<i>Tetrachaetum</i> ,	0.3	0.1	11.1	—
<i>Kionochaeta</i> ,	0.1	—	—	—
<i>Phialosimplex</i>	0.5	—	—	—
旋孢腔菌属 <i>Cochliobolus</i> ,	5.7	0.7	0.5	0.8
<i>Diatrype</i>	16.6	12.0	7.5	—
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0.4	—	0.5	0.5
镰刀菌属 <i>Fusarium</i> ,	0.1	0.2	—	5.4
<i>Geosmithia</i> ,	—	0.4	0.3	—
<i>Mallochybe</i>	—	—	0.0	0.3
茎点霉属 <i>Phoma</i>	1.9	1.4	2.3	—
链格孢属 <i>Alternaria</i>	0.1	—	—	3.2

它属真菌比例少,为稀有真菌类群。中度发病田,土壤真菌优势类群为 *Tetrachaetum*,比例 11.1%,其次为 *Diatrype*,其比例为 7.5%,被孢霉属为 5.7%。其它的真菌属比例较低。重度发病田,优势土壤真菌类群为青霉属(*Penicillium*)和肉座菌属(*Hypocrea*),其比例为 24.1%和 22.8%。其次为毛壳菌属(*Chaetomium*)比例为 8.1%,地丝霉属比例为 6.6%,赤霉属(*Gibberella*)比例为 5.9%,镰刀菌属(*Fusarium*)比例为 5.4%,被孢霉属比例为 4.4%。赤霉属、镰刀菌属和链格孢属包含多种植物病原真菌。重度发病田植物病原真菌数量多可能是榨菜长期连作导致的。

从多样性指数来看(表 3),无病田根际土壤真菌群

落的 Shannon 和 Simpson 指数最高,其次是轻度发病田和中度发病田,而重度发病田较低。OTU 数量也呈现同样的变化,其中无病田 OTU 数量最多,为 1 231 个,而重度发病田 OTU 数量最少,为 955 个。

表 3 不同发病田根际土壤真菌群落多样性指数

Table 3 The diversity index of rhizosphere soil fungi community

多样性指数 Index of diversity	无病田 Disease free field	轻度发病田 Mild disease field	中度发病田 Moderate disease field	重度发病田 Heavy disease field
Shannon	3.463	3.211	3.053	2.857
Simpson	0.958	0.931	0.914	0.881
OTUs	1 231	1 212	1 056	955

3 讨论

该研究利用 454 高通量测序在深度和广度上揭示根肿病不同发病程度田榨菜根际土壤真菌群落特征,结果表明,子囊菌和担子菌是榨菜根际土壤的优势真菌类群,然而,不同发病程度田土壤真菌群落存在一定差异,尤其重病田中植物病原真菌的比例高于其它田块。

涪陵地区榨菜根肿病重度发病田种植榨菜年限较长,由于多年连作,产生了连作障碍。连作障碍涉及到植物、土壤、环境等生物和非生物诸多因素,是植物—土壤—微生物及其环境内部诸多因素综合作用的外观表现^[6]。连作障碍造成土壤生物群落改变,导致植物土传病害严重发生,如根结线虫病、根腐病、枯萎病等^[7]。该研究发现榨菜根肿病重度发生田中植物病原真菌比例较高。这可能是发病榨菜根系表皮破裂,外渗物质增多,植物病原真菌富集在根系周围。与根肿菌相似的病原物—根结线虫同样造成植物根系肿大,调节植物根系分泌物,改变根际土壤微生物群落结构,造成根际土壤放线菌数量明显下降,而植物病原菌数量上升^[8]。根结线虫与土传病原真菌形成符合侵染,造成植物根系腐

烂^[9]。同样,榨菜发生根肿病后,根系腐烂,存在大量的植物病原真菌,如尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、串珠镰刀菌等(数据未发表),这表明根肿菌与土传植物病原真菌存在协同侵染。

重度发病田土壤真菌中还发现比例较高的生防真菌,如肉座菌属比例为 22.8%,毛壳菌属比例为 8.1%,其它土壤中比例均较低。肉座菌属包含木霉菌的有形态阶段,木霉(*Trichoderma* spp.)是优良的生防真菌,能够抑制多种植物病原真菌。CHEAH 等^[10]从花椰菜根围土壤中分离 3 株木霉,能够降低花椰菜根肿病发病率。毛壳菌属的球毛壳菌(*C. globosum*)也是重要的生防菌,产生抗生素和细胞壁降解酶,对多种土传植物病原菌具有抑制作用^[11]。从油菜根分离的球毛壳菌能够显著降低油菜根肿病发病率,并且其产生的 C16 鞘氨醇和植物鞘氨醇能够抑制根肿菌休眠孢子萌发^[12]。HJORT 等^[13]发现土壤微生物的种类与根肿病发病存在一定关系,当土壤中可降解几丁质的菌类增多时,能够抑制根肿病发生。木霉能够产生大量的几丁质酶,降解病原真菌的细胞壁,可能在抑病土传病害中起着重要作用。WORKU 等^[14]也发现某些抑病土强烈抑制大白菜根肿病的发生。该研究中,毛壳菌属和肉座菌属真菌在各时期土壤中比例较为稳定,可能具有一定生防功能。下一步需要从榨菜根际分离对根肿菌具有抑制作用的生防菌,并深入研究根肿菌与土传植物病原真菌的协同侵染。

参考文献

- [1] 高明泉,彭洪江,王旭,等.涪陵榨菜根肿病的危害与产量损失测定[J].植物保护,2002,28(6):31-33.
- [2] 肖崇刚,郭向华,韩海波,等.涪陵榨菜根肿病菌鉴定及主要特性[J].西南农业大学学报,2002,24(4):539-541.
- [3] 王旭祎,彭洪江,肖崇刚.茎瘤芥(榨菜)根肿病病原初步鉴定及发病

影响因素[J].西南农业学报,2002,15(4):75-78.

- [4] LIN X, FENG Y, ZHANG H, et al. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing[J]. Environmental Science and Technology, 2012, 46(11): 5764-5771.
- [5] GIHRING T M, GREEN S J, SCHADT C W. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(2): 285-290.
- [6] ZHANG S H, CAO Z P, CHENG Y F, et al. Change of soil protozoa community structure under different farming practices[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, 11(17): 3140-3147.
- [7] 何文寿.设施农业中存在的土壤障碍及其对策研究进展[J].土壤, 2004, 36(3): 235-242.
- [8] ABAWI G S, WIDMER T L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops[J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15(1): 37-47.
- [9] SON S H, KHAN Z, KIM S G, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and *Fusarium* wilt fungus[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(2): 524-532.
- [10] CHEAH L H, VEERAKONE S, KENT G. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. [J]. New Zealand Plant Protection, 2000, 53: 18-21.
- [11] GAO K X, MENDGEN K. Seed-transmitted beneficial endophytic *Stagonospora* sp. can penetrate the walls of the root epidermis, but does not proliferate in the cortex of *Phragmites australis* [J]. Canadian Journal of Botany, 2006, 84: 981-988.
- [12] 印容.球毛壳菌对油菜根肿病拮抗机制的研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [13] HJORT K, PRESTI I, ELVÄNG A. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(6): 2819-2828.
- [14] WORKU Y, GERHARDSON B. Suppressiveness to clubroot, pea root rot and *Fusarium* wilt in Swedish soils[J]. Journal of Phytopathology, 1996, 144(3): 143-146.

Study on Rhizosphere Soil Fungal Community in Field With Different Levels of Tuber Mustard Clubroot Disease

WANG Diandong¹, TIAN Xueliang², PAN Limei¹

(1. Life Science and Technology College, Yangtze Normal University, Chongqing 408100; 2. Investment and Environmental College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: Taking rhizosphere soils of tuber with different levels of tuber mustard clubroot disease as materials, using 454 high throughput sequencing method, the effect of tuber mustard clubroot disease on fungal community in soil and change characteristics were studied. The results showed that the dominant fungal group was *Ascomycetes*, followed by *Basidiomycota* in all of the soil samples. The percentage of plant pathogenic fungi in heavy tuber mustard clubroot disease field was higher than other disease fields. The diversity index of Shannon and Simpson and number of OTU in heavy tuber mustard clubroot disease field were lower than others. The result reflected that tuber mustard clubroot could affect rhizosphere soil fungal community to some extent. This was probably related to root exudate of tuber mustard after damaged by *Plasmodiophora brassicae*.

Keywords: tuber mustard clubroot; rhizosphere soil fungi; soil-borne plant pathogenic fungi; diversity index