

DOI: 10.5846/stxb201901190151

伍文宪, 黄小琴, 张蕾, 杨潇湘, 黎怀忠, 刘勇. 十字花科作物根肿病对根际土壤微生物群落的影响. 生态学报, 2020, 40(5): 1532-1541.

Wu W X, Huang X Q, Zhang L, Yang X X, Li H Z, Liu Y. Crucifer clubroot disease changes the microbial community structure of rhizosphere soil. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(5): 1532-1541.

十字花科作物根肿病对根际土壤微生物群落的影响

伍文宪¹, 黄小琴¹, 张蕾¹, 杨潇湘¹, 黎怀忠², 刘勇^{1,*}

1 四川省农业科学院植物保护研究所, 农业部西南作物有害生物综合治理重点实验室, 成都 610066

2 成都市郫都区农业和林业局, 成都 611730

摘要:为探究根肿病对十字花科作物根际土壤微生物多样性的影响,以罹病大白菜和健康株根际土壤为研究对象,采用高通量测序技术对 2 组样本的细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 基因进行序列测定,分析了样本间的微生物群落结构和组成差异,同时测定根际土壤理化性质,探讨根肿病、土壤微生物群落、土壤环境因子三者的相关性。研究表明:1) 患病植株根际土壤 pH 和总磷、总钾、碱解氮、速效钾含量显著低于正常植株根际土,而交换性钙含量明显增加。2) 根肿病的发生降低了根际土壤中细菌种群的丰富度和多样性程度,但对根际土壤中的真菌 α -多样性无明显影响。3) 变形菌门、拟杆菌门、放线菌门等是所测土壤样本的主要优势细菌种群,其中患病植株根际土壤中拟杆菌门丰度显著高于健康植株根际土壤,放线菌门丰度则显著降低($P < 0.05$)。优势细菌纲为 γ -变形菌纲、拟杆菌纲、 α -变形菌纲、放线菌纲、酸杆菌纲等,2 组土壤样本间多种优势细菌纲相对丰度差异显著。4) 根际土壤优势真菌类群为子囊菌门、被孢霉门、担子菌门和壶菌门,其相对丰度在患病和健康株根际土壤样本中均有明显差异。主要真菌纲为散囊菌纲、被孢霉纲、锤舌菌纲等,并且土壤样本间的多种优势真菌纲相对丰度存在显著性差异。5) 主坐标分析结果表明病株根际土壤与健康株根际土壤细菌和真菌群落结构差异明显,冗余分析结果显示速效钾和交换性钙是根际土壤微生物群落变化的主要影响因素。研究结果为揭示根肿病发生的根际微生态机制以及研发根肿病综合防控技术提供理论支撑。

关键词:根肿病;根际土壤;高通量测序;微生物群落

Crucifer clubroot disease changes the microbial community structure of rhizosphere soil

WU Wenxian¹, HUANG Xiaoqin¹, ZHANG Lei¹, YANG Xiaoxiang¹, LI Huaizhong², LIU Yong^{1,*}

1 Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management in Southwest Agriculture Crops of Ministry of Agriculture, Chengdu 610066, China

2 Agriculture and forestry Bureau of Pidu District, Chengdu 611730, China

Abstract: To determine the effects of clubroot disease on microbial diversity of rhizosphere soils, the bacterial 16S rDNA region and fungal ITS region from the rhizosphere soils of clubroot-infected and healthy Chinese cabbage were sequenced and analyzed to evaluate the microbial community composition and structure. Moreover, we also measured the physiochemical properties of the two groups of soil samples, aiming to establish the relationship among clubroot occurrence, microbial community structures, and soil environmental factors. Soil pH and the contents of total phosphorus, total potassium, available nitrogen, and available phosphorus were significantly lower in the rhizosphere soil of clubroot-infected Chinese cabbage than those of healthy plants, whereas the exchangeable calcium content was increased in diseased soil. The

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0200600, 2018YFD0200903);四川省创新能力提升工程(2016QNJJ-010);国家现代农业产业技术体系四川油菜创新团队岗位(2019-2023)

收稿日期:2019-01-19; 网络出版日期:2019-12-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liuyongdr@163.com

occurrence of clubroot significantly reduced the richness and diversity of bacterial populations but had no significant effect on the fungal alpha-diversity in rhizosphere soils. The dominant bacterial phyla for the two groups of soil samples were Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, and Chloroflexi, of which Bacteroidetes had a higher abundance in the rhizosphere soil of clubroot-infected Chinese cabbage than that of healthy plants ($P < 0.05$), whereas Actinobacteria had a lower abundance ($P < 0.05$). At the class level, Gammaproteobacteria, Bacteroidia, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, and Acidobacteria were the predominant bacterial communities, and the relative abundance of Bacteroidia, Actinobacteria, Oxyphotobacteria were significantly different between the two blocks ($P < 0.05$). The dominant fungal phyla were Ascomycota, Mortierellomycota, Basidiomycota, and Chytridiomycota, whereas Eurotiomycetes, Mortierellomycetes, Leotiomycetes, Sordariomycetes, and Dothideomycetes were the predominant classes, and the relative abundance of these dominant phyla and classes were significantly different between Group 1 and 2 ($P < 0.05$). Principal coordinates analysis (PCoA) showed that clubroot played an important role on the structure change of the soil microbial community, and distance-based redundancy analyses (db-RDA) indicated that soil available phosphorus and exchangeable calcium were the principal factors that correlated with the microbial community structure of rhizosphere soil. This research revealed micro-ecological changes of the rhizosphere with the occurrence of clubroot disease and provided theoretical support for developing a comprehensive control method of clubroot disease.

Key Words: clubroot; rhizosphere soil; high-throughput sequencing; microbial community

十字花科作物根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)侵染引起的一种毁灭性土传病害^[1],在世界范围内造成油菜和十字花科蔬菜严重的经济损失,在我国,根肿病的为害范围已经覆盖了所有十字花科作物的主栽区,危害程度逐年加重,根肿病已成为制约十字花科作物生产的主要病害之一^[2-3]。根肿病病原菌具生命力强(其休眠孢子在土壤中存活 20 年之久仍保持侵染能力)、侵染效率高(土壤中极低病原孢子浓度即可造成十字花科作物罹病)、传播途径多样(可随流水、农事操作等传播扩散)等特点,导致该病害菌源广泛传播、种群结构复杂、防治难度高^[4-5]。传统的根肿病防治方法主要集中于化学防治、抗病品种选育以及栽培措施上,在减轻根肿病发生上取得了一定成效,但也存在诸多弊端,例如育成的抗病品种在根肿病流行区连续种植 3 年以上即有丧失抗性的风险^[6-8]。近年来,人们寄希望土壤改良的农业措施和生物防治方法以达到有效防控根肿病流行发生的目的,如通过调节土壤 pH、增加土壤有机质含量、施用恢复土壤微生物平衡的生防制剂来恶化根肿病原的生存环境,取得了不错的防病效果^[9-11],土壤微生态治理已然成为十字花科作物根肿病防治的主要途径之一^[12]。

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,参与并推动了生态环境中物质和能量的流动和转移^[13],其群落结构组成与土壤健康状况有密切联系,是评价土壤质量的重要指标^[14]。土传病害的爆发是土壤微生物特别是根际土壤微生物群落结构失衡的结果,病害的发生打破了植物-土壤-微生物相对稳定的生态系统,深刻影响着土壤微生态(土壤理化性质、微生物群落结构、土壤酶活等)环境^[15]。近年来,我国作物土传病发病率不断上升,对此,土传病害发生与根际土壤微生物相应地成为研究热点之一^[16-17]。李金萍等^[18]研究表明青稞根腐病显著改变根际土壤微生物组成,碳、氮、磷等物质代谢受到抑制,并且能量代谢发生紊乱。陆晓菊等^[19]在研究三七根际土壤微生物区系遗传多样性中发现,土传病害的发生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。Shen 等^[20]研究显示香蕉枯萎病的发生与土壤微生物群落结构和土壤有机质含量紧密相关。目前,针对十字花科作物根肿病对寄主根际土壤微生物群落影响的研究尚无人报道,本研究以罹病大白菜和健康株根际土壤为研究对象,采用高通量测序技术结合生物信息学技术分析 2 组样本间的根际土壤细菌和真菌物种组成、群落结构及多样性,同时测定根肿病对根际土壤理化性质影响,旨在分析根肿病、微生物群落以及土壤理化性质三者间的相关性,通过研究根际土壤中微生物群落的结构差异,探究土壤中制约根肿病发生的关键因素,为揭示根肿病发生的根际微生态机制以及研发根肿

病综合防控技术提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 研究区概况、土壤采集和理化性质测定

研究区位于成都平原腹心地带的郫都区唐昌镇柏木村,地理坐标为 30°54′56.61″N, 103°48′32.43″E, 海拔 (574±20) m, 属亚热带季风性湿润气候, 年平均气温 16℃, 无霜期大于 340 d, 降水集中于 7—8 月, 年均降水量 979.4 mm, 平均相对湿度为 82%, 年日照率仅 24%—32%, 日照 1014.0 h。土壤类型灰色潮土性水稻土, 土地垦殖指数高, 土壤采集样地的周年种植模式为大白菜-黄瓜-大白菜。

于 2018 年 11 月 19 日在研究区的同一田块进行采样, 采用多点采样法取样, 在试验田的未发病中心区域选取呈三角形的 3 个采样点, 每个采样点距离 10 m, 每个采样点按 5 点取样法将植株挖出, 抖落根部附着的疏松土壤后, 收集与根系结合紧密的土壤, 混合均匀后合为一个土壤样品, 共计 3 个重复。健康大白菜根际土壤样品采集与罹病植株根际土采样方法一致, 土样装密封袋低温带回实验室, 过 2 mm 筛后立即保存在超低温冰箱 (-80℃) 冷冻暂存。

土壤样本的各项理化性质测定由四川省农业科学院土壤肥料研究所分析测试研究室完成, 检测方法均依据国家农业标准进行测定。

1.2 土壤微生物总 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

根际土壤 DNA 采用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 试剂盒 (OMEGA 公司, 美国) 进行提取, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific 公司, 美国) 分光光度仪检测提取的 DNA 含量和纯度。对细菌的 16S rDNA 的 V4 区进行 PCR 扩增, 采用的引物为 515F (5′-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3′) 和 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)^[21], 利用引物 ITS1-1737F (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′) 和 ITS2-2043R (5′-GCTGCGTTCATCGATGC-3′) 对真菌 rDNA ITS1 区进行 PCR 扩增^[22]。PCR 反应体系为 50 μL, 包括稀释后的模板基因组 DNA, 带 Barcode 的特异引物, Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs 公司, 英国) 和高保真酶 (Thermo Fisher 公司, 美国) 等。扩增程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。对扩增的 PCR 产物进行质量检测, 根据产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物, 剪切目标条带后使用 GeneJET (Thermo Scientific 公司, 美国) 胶回收试剂盒回收产物。将纯化质量合格的 PCR 产物用于 DNA 文库构建, 委托北京诺和致源科技有限公司执行建库及测序工作。

1.3 数据处理和统计分析

下机的数据经 Cutadapt (V1.9.1, <http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>) 过滤掉低质量 reads, 随后根据 Barcode 序列将 reads 拆分并截去引物序列和 Barcode 标签, 得到原始数据 (Raw reads), 再通过去除嵌合体序列处理, 最终得到有效数据 (Clean Reads)^[23]。使用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://www.drive5.com/uparse/>) 将 97% 以上一致性的 Clean Reads 聚类为一个操作分类单元 (OTU, Operational Taxonomic Unit)^[24], 使用 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 中的比对方法 (http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html) 与数据库 Unit (v7.2, <https://unite.ut.ee/>) 对 OTUs 进行物种注释分析, 并在各分类水平上统计样本的群落组成^[25-26]。OTUs 间的系统发生关系则通过 MUSCLE (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>) 软件进行快速多序列比对^[27]。最后得到的各样品数据, 以样品数据量最少的为标准进行均一化处理。

通过 Qiime 软件 (Version 1.9.1) 计算 α-多样性指数, 配对样本 T 检验进行理化性质数据和样本间的 α-多样性指数差异分析, 利用 R 软件 (Version 2.15.3) 绘制稀释曲线, 主坐标分析 (PCoA) 图用 R 软件的 WGCNA, stats 和 ggplot2 软件包绘制, 对环境因子进行筛选的方差膨胀因子检验 (VIF, Variance inflation) 使用的是 vegan 包中的 vif.cca 函数, 冗余分析 (RDA, Redundancy Analysis) 是通过 vegan 包中的 rda 函数进行的排序分析。

2 结果与分析

2.1 罹病与健康植株根际土壤理化性质差异

对患根肿病的大白菜和健康株根际土壤进行理化性质测定,结果显示两个区组样本间的有机质、全氮、有效磷含量以及碳氮比无显著性差异($P>0.05$),患病植株根际土壤 pH 值,全磷、全钾、碱解氮和速效钾含量显著低于健康根际土壤($P<0.05$),而土壤交换性钙含量显著高于健康植株根际土壤($P<0.05$)(表 1)。

表 1 发病植株和健康植株根际土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of rhizosphere soils in the infected (Group 1) and healthy (Group 2) plants					
土壤样本 Soil samples	pH	有机质 Organic matter/ (g/kg)	全氮 TN/ (g/kg)	碳氮比 C/N ratio	全磷 TP/ (g/kg)
Group 1	4.61±0.09bA	27.50±1.84aA	2.01±0.12aA	7.97±0.80aA	1.79±0.08bA
Group 2	4.81±0.10aA	27.03±0.81aA	2.24±0.10aA	7.01±0.13aA	1.85±0.08aA
土壤样本 Soil samples	全钾 TK/ (g/kg)	碱解氮 AN/ (mg/kg)	有效磷 AP/ (mg/kg)	速效钾 AK/ (mg/kg)	交换性钙 ECa/ (cmol/kg)
Group 1	20.43±0.13bA	326.67±29.94bA	127.00±9.43aA	500.00±61.51bA	7.37±0.40aA
Group 2	23.69±0.28aA	401.00±35.00aA	134.63±9.05aA	809.33±52.31aA	6.30±0bA

Group 1 代表患根肿病大白菜根际土壤样本,Group 2 表示健康植株根际土壤样本,下同。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),同一列不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

2.2 根肿病对土壤细菌和真菌群落 Alpha 多样性影响

对 2 区组共计 6 个土壤样本高通量测序,结果显示患根肿病的大白菜根际土壤共获得细菌和真菌有效序列分别为 80147 和 74510 条,健康植株根际土壤则获得的细菌和真菌的有效序列数分别为 81784 和 80106 条。从表 2 和表 3 中可知,无论细菌还是真菌,其测序覆盖度均高达 99% 以上,说明本试验测序深度接近饱和,土壤中的物种未被测出的概率低,测序结果能够真实反映土壤中细菌和真菌情况。

表 2 患根肿病和健康植株根际土壤细菌 α-多样性指数

Table 2 Alpha diversity indices for rhizosphere bacteria communities in the infected (Group 1) and healthy (Group 2) plants					
土壤样本 Soil samples	操作分类单元 Operational Taxonomic Units(OTUs)	香农指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	覆盖度 Coverage/%
Group 1	1174±36bB	7.19±0.26bA	1164.90±40.06bA	1161.67±45.85bB	99.80
Group 2	1343±52aA	7.92±0.04aA	1324.89±59.71aA	1318.17±50.20aA	99.83

表 3 患根肿病与健康植株根际土壤真菌 α-多样性指数

Table 3 Alpha diversity indices for rhizosphere fungal communities in the infected (Group 1) and healthy (Group 2) plants					
土壤样本 Soil samples	操作分类单元 Operational Taxonomic Units(OTUs)	香农指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	覆盖度 Coverage/%
Group 1	818±19aA	6.42±0.11aA	798.06±31.14aA	824.49±28.91aA	99.73
Group 2	890±71aA	6.76±0.52aA	877.29±42.49aA	890.35±51.77aA	99.77

分析罹病和健康植株根际土壤微生物 α-多样性发现,患病植株根际土壤中检测到细菌 OTU 数目为 1174 个,检测到真菌 OTU 数目为 818 个,健康株系根际土壤中检测到 1343 个细菌 OTU 和 890 个真菌 OTU,2 个区组间的细菌 OTU 数目存在极显著差异($P<0.01$)。Shannon 指数可反映微生物的多样性程度,而 Chao1 指数和 ACE 指数表示土壤中微生物群落物种丰富度^[28],从表 2 可知,患病根际土壤细菌 Shannon 指数和 Chao1 指

数显著低于健康株根际土壤 ($P < 0.05$), 并且 ACE 指数极显著低于健康株根际土壤 ($P < 0.01$)。从表 3 可知, 2 区组间的真菌 OTU 数目、Shannon 指数、Chao1 指数、ACE 指数等未达到显著性差异。以上结果表明, 患病植株根际土壤细菌数量下降极为明显, 且细菌群落多样性程度和丰富度均显著低于健康根际土壤, 而根肿病没有改变寄主根际土壤的真菌物种数和各项 α -多样性指数。

2.3 根际土壤微生物群落组成和结构分析

对测序结果进行物种注释, 结果显示所测土壤样本中的总计 2517 个细菌 OTUs 分属于 28 门 40 纲 91 目 168 科 326 属, 主要细菌门 (相对丰度 $\geq 1\%$) 分别是变形菌门 (Proteobacteria) 61.13%, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 13.43%, 放线菌门 (Actinobacteria) 6.93%, 酸杆菌门 (Acidobacteria) 5.10%, 绿弯菌门 (Chloroflexi) 3.42%, 未知细菌门 (unidentified bacteria) 2.71%, 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 2.37% 和厚壁菌门 (Firmicutes) 1.46%。主要细菌纲 (相对丰度 $\geq 1\%$) 分别是 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 49.38%, 拟杆菌纲 (Bacteroidia) 13.46%, α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 11.65%, 放线菌纲 (Actinobacteria) 5.35%, 酸杆菌纲 (Acidobacteria) 4.73%, 未知细菌纲 (unidentified bacteria) 2.88%, 芽单胞菌纲 (Gemmatimonadetes) 2.36% 以及纤维杆菌纲 (Ktedonobacteria) 2.20%, 其余细菌门类所占比例均低于 1%, 共占 7.98%。差异分析结果表明, 患病植株根际土壤拟杆菌门相对丰度显著高于健康植株根际土壤, 但放线菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.05$) (图 1)。细菌纲分类水平上, 患根肿病植株与健康株根际土壤在拟杆菌纲、放线菌纲、未知细菌纲和生养光细菌纲上有显著差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

而真菌的 1708 个 OTU 隶属于 14 门 41 纲 87 目 146 科 207 属, 主要真菌门是子囊菌门 (Ascomycota) 40.97%, 担子菌门 (Basidiomycota) 9.50%, 被孢霉门 (Mortierellomycota) 9.43%, 壶菌门 (Chytridiomycota) 4.33%, 其他门占比 35.78%。T 检验结果表明, 2 区组在这 4 个真菌门水平上的相对丰度均存在着显著性差异 ($P < 0.05$) (图 3)。真菌纲水平上, 主要由散囊菌纲 (Eurotiomycetes)、被孢霉纲 (Mortierellomycetes)、锤舌菌纲 (Leotiomycetes)、粪壳菌纲 (Sordariomycetes)、座囊菌纲 (Dothideomycetes)、银耳纲 (Tremellomycetes)、Rhizophlyctidomycetes 纲、壶菌纲 (Chytridiomycetes)、伞菌纲 (Agaricomycetes) 等优势菌纲组成, 在患病植株根际土壤中, 按丰富度由高到低的排列顺序为: 被孢霉纲 > 粪壳菌纲 > 座囊菌纲 > 散囊菌纲 > 锤舌菌纲 > 银耳纲 > Rhizophlyctidomycetes 纲 > 壶菌纲 > 伞菌纲, 而在健康植株根际土壤中的丰度顺序是: 散囊菌纲 > 粪壳菌纲 > 银耳纲 > 被孢霉纲 > 座囊菌纲 > 茶渍纲 > 伞菌纲 > 锤舌菌纲 > 壶菌纲 > Rhizophlyctidomycetes 纲, 并且通过物种差异分析, 发现患病和健康植株根际土壤中的被孢霉纲、锤舌菌纲、Rhizophlyctidomycetes 纲和壶菌纲相对丰度存在显著性差异 ($P < 0.05$), 并且在散囊菌纲中的相对丰度差异达极显著水平 ($P < 0.01$) (图 4)。

主坐标分析 (PCoA) 是通过一系列的特征值和特征向量排序从多维数据中提取最主要的元素和结构, 可直观反映样本间的微生物群落结构差异。PCoA 可基于 Unweighted Unifrac 距离和 Weighted Unifrac 距离这两种形式进行分析, 如果样本间距离相近, 说明物种组成结构相似。本研究采用基于 Weighted Unifrac 距离进行 PCoA 分析, 结果表明, 无论是细菌还是真菌, 患根肿病后的植株和健康植株根际土壤样本间的距离相差较大, 说明根肿病改变了根际土壤微生物群落结构 (图 5)。

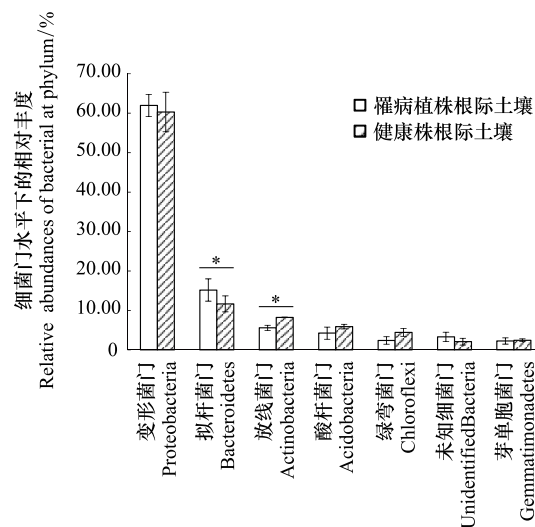


图 1 门水平下的细菌群落组成

Fig.1 Composition of bacterial community at phylum level

* 表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)

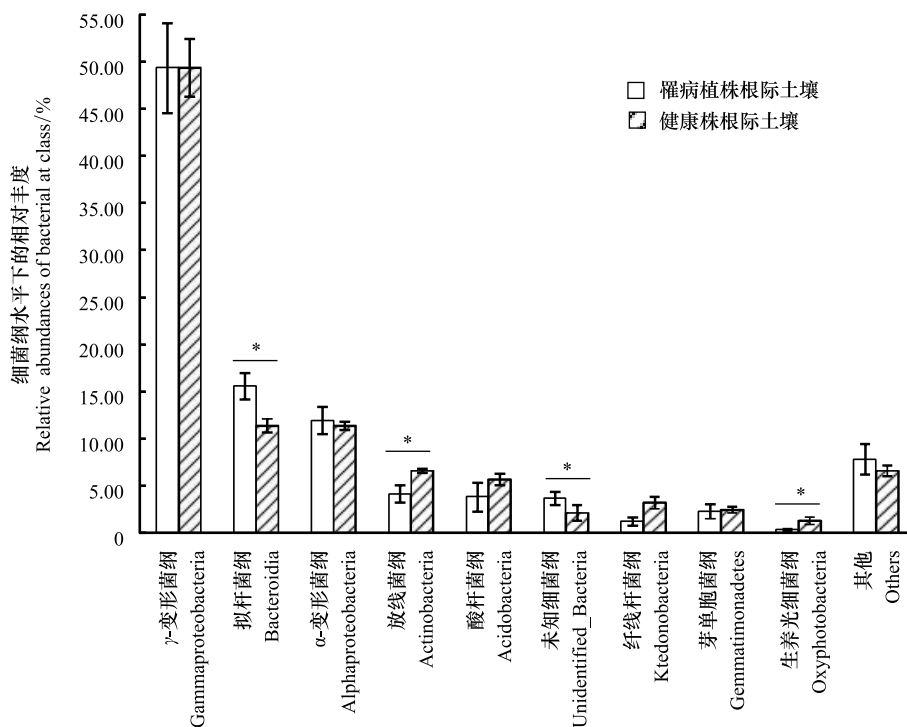


图2 纲水平下土壤细菌群落组成

Fig.2 Composition of bacterial community at class level

2.4 微生物群落与土壤理化因子相关性分析

采取矩阵检验分析和经方差膨胀因子(VIF)筛选后基于距离的冗余分析(db-RDA)环境因子与微生物群落结构关系,其中环境因子为在2组根际土壤样本间有显著性差异的pH、全磷(TP)、全钾(TK)、碱解氮(AN)、速效钾(AK)和可交换性钙(ECa),微生物群落数据为样品中OTUs的相对丰度,从表4可知,全钾、碱解氮、交换性钙与细菌群落结构存在显著相关性,而对根际土壤真菌群落而言,全钾、速效钾和交换性钙是重要的影响因子。由于对微生物菌群产生影响的相关环境因子较多,并且环境因子存在严重的自相关性,因此在进行环境因子与微生物群落结构分析时,有必要对环境因子进行筛选,VIF检验可以计算每一个环境因子的VIF值,当值大于20时则被认定为无用的环境因子,进而达到过滤筛选环境因子的目的,本研究基于VIF的冗余分析结果如图6所示,对于细菌群落而言,全磷、速效钾和可交换性钙解释了84.69%的总特征值,并且这3个土壤化学因子对根际土壤真菌群落结构的影响,解释了83.33%的总特征值,说明全磷、速效钾和可交换性钙对根际土壤微生物有较大影响。进一步分析表明,速效钾和交换性钙是影响根际土壤微生物群落改变的主要环境因子,且与速效钾呈显著性正相关($P<0.05$),与可交换性钙呈显著性负相关($P<0.05$)。

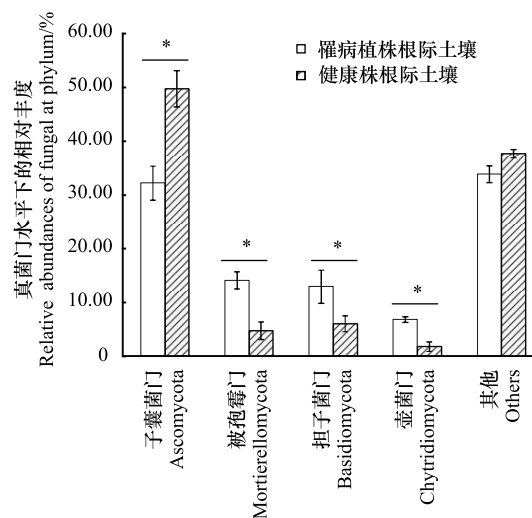


图3 土壤真菌在门水平上的群落组成

Fig.3 Rhizosphere soil fungal phylum community composition

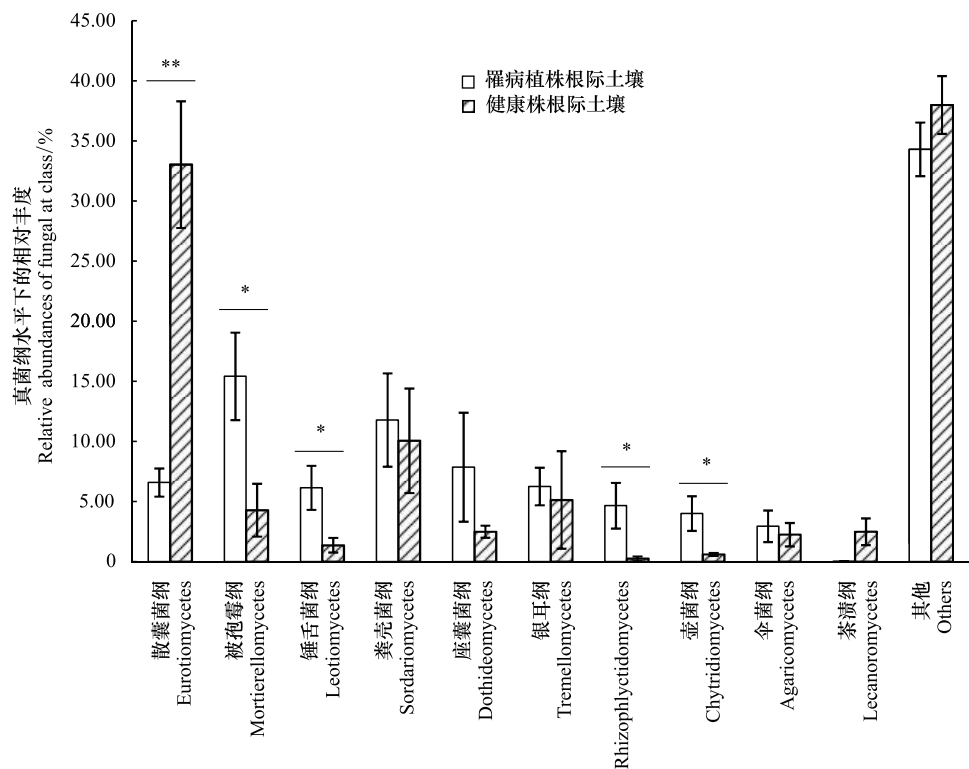


图 4 土壤真菌在纲水平上的群落组成

Fig.4 Soil fungal community composition at the class level

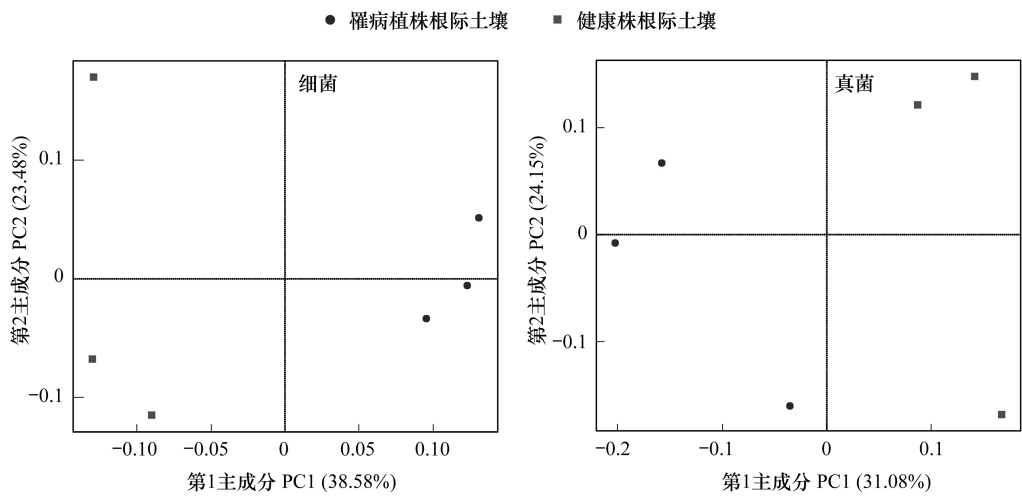


图 5 基于 weighted unifrac 距离的根际土壤微生物群落主坐标分析

Fig.5 Principal co-ordinates analysis (PCoA) of bacteria and fungi communities difference based on weighted unifrac distance

PCoA: 主坐标分析 Principal co-ordinates analysis

表 4 土壤理化因子与细菌和真菌群落结构的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between the bacterial and fungal community structures with the different soil physical and chemical factors							
微生物群落 Microbial community	pH	全磷 TP	全钾 TK	碱解氮 AN	速效钾 AK	交换性钙 ECa	总因子 Overall
细菌群落 Bacteria community	0.336	0.048	0.600 *	0.460 *	0.286	0.534 *	0.521 *
真菌群落 Fungal community	0.554	0.116	0.750 *	0.468	0.639 *	0.612 *	0.682 *

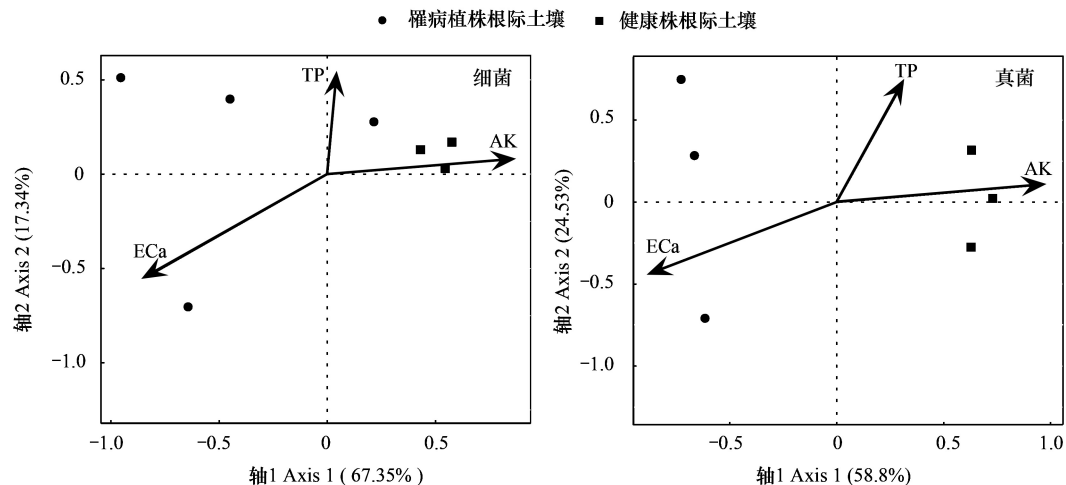


图6 经 VIF 筛选后的土壤理化因子与土壤微生物群落冗余分析

Fig.6 Redundancy analysis on microbial communities by soil variables after screening by variance inflation factor test

3 讨论

土壤理化性质与植物土传病害的发生有直接的联系,例如钾、钙等元素直接关系到植物的抗病性,氮、磷、钾的比例失调显著增加病害的发生几率,有机质含量多少与土传病害的病情指数呈显著性负相关^[20,29-30]。因此,详细了解土壤理化性质对解释根肿病的发生具有重要意义,本研究的土壤理化性质测定结果显示,患病植株根际土壤的 pH 值及全磷、全钾、碱解氮、速效钾含量显著低于对照。而 pH 的下降导致的土壤酸性环境利于根肿病孢子萌发、侵染和传播,试验结果恰与前期研究相吻合,另外,患病植物根际土壤的全钾和速效钾含量显著低于对照也从侧面解释了草木灰防控根肿病的有效性,草木灰的 pH 值高达 12 左右,主要成分为碳酸钾,施用草木灰可增加土壤钾含量以及提高 pH 以恶化根肿病病原菌生存环境,以此达到防控根肿病的目的。病株土样中碱解氮含量下降与宋旭红等^[31]的研究结果一致,而碱解氮含量与土壤脲酶活性密切相关,推测病株土壤中的脲酶活性降低影响了碱解氮的形成。通常来讲,土壤中高含量可交换性钙可一定程度减轻病害的危害,但有意思的是患根肿病大白菜根际土可交换性钙浓度要比健康株根际土要明显升高,其原因有可能是根肿病侵染寄主根部后,一方面阻止植物根系对 Ca^{2+} 吸收,另一方面引起寄主 Ca^{2+} 外溢,进而增加了根际土壤可交换性钙含量^[32-34]。因此,提高土壤 pH,增施钾肥,调减氮肥,均衡施肥对于防控根肿病是必要的。

土壤微生物指标是指示土壤健康的重要因子,土壤微生物群落多样性对于土壤生态及作物健康至关重要^[16],当根际微生物特别是细菌区系结构合理,多样性程度越高,物种越丰富,作物抗病能力就越强^[35], α -多样性分析结果表明,无论是罹病还是健康的植株,其根际土壤中的细菌 OTUs 数都比真菌的要多,说明根际土壤中细菌种群数量要高于真菌,这与李岩等^[36]在研究根际土与非根际土中得出的土壤中微生物以细菌为主一致的结果相似。与此同时,根肿病侵染寄主后,引起寄主根际土壤的细菌数量急剧下降,多样性程度和丰富度也显著低于健康植株根际土壤,有研究认为土壤细菌的数量和多样性的高低在一定程度上反映了土壤的健康状况,细菌型土壤是土壤肥力提高的一个生物指标^[17,37],本研究结果说明根肿病占领根际生态位后,对根际土壤的细菌影响较大,导致土壤中细菌种群数量急剧减少,群落多样性趋于单一,土壤有由“细菌型”向“真菌型”方向转化的趋势,影响到土壤生态系统,从而使得土壤微生态发生变化。

微生物对土壤环境敏感,植物种类、耕作方式、土壤营养状况、气候变化等等均会不同程度改变土壤群落结构和微生物的组成^[38-40],植物土传病害发生后,根际土壤的微生物组成和优势微生物也会发生一定程度的改变,李雪萍等^[18]研究表明青稞根腐病导致根际土壤的放线菌等其他有益细菌减少,Benizri 等^[41]研究桃树

根部病害对根际土壤微生物关系时,发现桃树根部发病与根际土壤拮抗细菌数量和种类降低有密切联系。在本研究中,根肿病显著改变了根际土壤微生物的群落结构,并且分析群落组成,发现无论是细菌还是真菌,其优势种群丰度存在较为明显的变化,受根肿菌侵染的植株根际土壤放线菌的相对丰度显著降低,生养光细菌等有益微生物数量亦明显下降。另外,子囊菌门、被孢霉门、担子菌门和壶菌门是根际土壤丰度最高的真菌类群,李岩等^[36]对枸杞根际土壤真菌群落的研究发现,子囊菌、担子菌和被孢霉是根际土壤中的优势菌群,高雪峰等^[42]在短花针茅草原土壤微生物群落研究中发现子囊菌门、接合菌门、担子菌门和壶菌门是优势真菌类群,本研究与这些研究结果的真菌群落主要构成类似。前人报道子囊菌门大多数为腐生菌,对降解土壤有机质等养分循环起着重要作用,是土壤中主要的真菌分解者^[43],本试验结果显示健康植株根际土壤子囊菌门丰度显著高于患病根际土壤,说明根肿菌可能对土壤的养分循环也起到了不同程度地干扰作用。除此之外,2个区组间多种真菌类群的相对丰度发生变化,意味着根肿病对土壤中优势真菌群落组成影响较大。

矩阵检验分析表明,土壤理化因子对微生物群落变化密切相关,土壤中全钾、碱解氮和交换性钙对细菌群落结构影响显著,真菌群落结构则与土壤全钾、速效钾和交换性钙相关。经 VIF 筛选后的冗余分析结果显示,速效钾和可交换性钙是影响细菌和真菌群落结构的主要因子,并且健康植株根际土壤微生物对速效钾表现出正相关性。后续我们通过方差分解分析(VPA, Variance partitioning canonical correspondence analysis)研究土壤各环境因子对微生物群落分布的解释量,发现全钾、速效钾和可交换性钙对根际土壤细菌群落分布差异贡献度达 68.43%,对真菌群落分布贡献度为 71.79%,说明钾和钙两种元素对根肿病发生和微生物群落变化起着重要作用。综上,根肿病的发生与根际土壤微生态环境失衡显著相关,它改变了微生物结构,影响了微生物群落多样性,特别是生防有益微生物丰富度,与此同时,土壤理化因子与微生物群落结构存在着紧密联系。

4 结论

患根肿病植株根际土壤 pH 值和全磷、全钾、碱解氮、速效钾含量显著低于健康植株根际土壤,交换性钙含量显著增加;根肿病引起寄主根际土壤细菌数量急剧减少,并且显著降低了根际细菌的丰富度和多样性程度,但真菌物种数、丰富度和多样性程度在罹病和健康植株根际土壤间则无显著性变化;根肿病改变了根际土壤微生物群落结构,提高了拟杆菌、真菌壶菌、被孢霉、担子菌等的相对丰度,降低了放线菌、生养光细菌等有益微生物的相对丰度;土壤微生物群落受多种土壤理化因子影响,其中速效钾和交换性钙是影响患根肿病和健康植株根际土壤微生物结构变化的主要因子。本研究可为优化微生态调控措施,提升植物根际微生态抗性来防控根肿病提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] 马坡,李晓楠,庞文星,战宗祥,张椿雨,朴钟云.芸薹根肿菌 SSR 标记的开发及遗传多样性研究.中国油料作物学报,2018,40(6): 872-878.
- [2] 王靖,黄云,李小兰,黎怀忠.十字花科根肿病研究进展.植物保护,2011,37(6): 153-158.
- [3] 李金萍,柴阿丽,孙日飞,李宝聚.十字花科蔬菜根肿病研究新进展.中国蔬菜,2012,1(8): 1-4.
- [4] Ahmed H U, Hwang S F, Strelkov S E, Gossen B D, Peng G, Howard R J, Turnbull G D. Assessment of bait crops to reduce inoculum of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola. Canadian Journal of Plant Science, 2011, 91(3): 545-551.
- [5] Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita R N, Kato T, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S. Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. PLoS One, 2013, 8(1): e54745.
- [6] 陈坤荣,任莉,刘凡,徐理,孙超超,方小平.三种杀菌剂防治油菜根肿病技术研究.中国油料作物学报,2013,35(4): 424-427.
- [7] 江莹芬,战宗祥,朴钟云,张椿雨.油菜抗根肿病资源创新与利用的研究进展与展望.作物学报,2018,44(11): 1592-1599.
- [8] 靳博红.太白高山蔬菜轻简高效轮作模式及栽培技术研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [9] Hwang S F, Howard R J, Strelkov S E, Gossen B D, Peng G. Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(S1): 49-65.
- [10] Liu C M, Yang Z F, He P F, Munir S, Wu Y X, Ho H, He Y Q. Deciphering the bacterial and fungal communities in clubroot-affected cabbage rhizosphere treated with *Bacillus Subtilis* XF-1. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, 256: 12-22.
- [11] He P J, Cui W Y, Munir S, He P F, Li X Y, Wu Y X, Yang X W, Tang P, He Y Q. *Plasmodiophora brassicae* root hair interaction and control by *Bacillus subtilis* XF-1 in Chinese cabbage. Biological Control, 2019, 128: 56-63.
- [12] 杨珍,戴传超,王兴祥,李孝刚.作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展.土壤学报,2019,56(1): 12-22.

- [13] Yang Y F, Wu L W, Lin Q Y, Yuan M T, Xu D P, Yu H, Hu Y G, Duan J C, Li X Z, He Z L, Xue K, van Nostrand J, Wang S P, Zhou J Z. Responses of the functional structure of soil microbial community to livestock grazing in the Tibetan alpine grassland. *Global Change Biology*, 2013, 19(2): 637-648.
- [14] Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty N K, Bhatnagar S, Eisen J A, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(8): E911-E920.
- [15] 李雪萍. 青藏高原青稞根腐类病害及其对根际土壤微生态的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [16] 蔡祖聪, 黄新琦. 土壤学不应忽视对作物土传病原微生物的研究. *土壤学报*, 2016, 53(2): 305-310.
- [17] 刘海洋, 姚举, 张仁福, 王伟, 余璇, 王琦. 黄萎病不同发生程度棉田中土壤微生物多样性. *生态学报*, 2018, 38(5): 1619-1629.
- [18] 李雪萍, 李建宏, 漆永红, 郭炜, 李潇, 李敏权. 青稞根腐病对根际土壤微生物及酶活性的影响. *生态学报*, 2017, 37(17): 5640-5649.
- [19] 陆晓菊, 官会林, 张正芸, 马永存, 唐蜀昆. 三七连作根际土壤微生物区系的 16S rRNA 系统遗传多样性. *微生物学报*, 2015, 55(2): 205-213.
- [20] Shen Z Z, Penton C R, Lv N N, Xue C, Yuan X F, Ruan Y Z, Li R, Shen Q R. Banana *Fusarium* wilt disease incidence is influenced by shifts of soil microbial communities under different monoculture spans. *Microbial Ecology*, 2018, 75(3): 739-750.
- [21] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, Berg-Lyons D, Lozupone C A, Turnbaugh P J, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(S1): 4516-4522.
- [22] Zinger L, Shahnava B, Baptist F, Geremia R A, Choler P. Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *The ISME Journal*, 2009, 3(7): 850-859.
- [23] Clarke K R, Ainsworth M. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, 92: 205-219.
- [24] Jiao S, Liu Z S, Lin Y B, Yang J, Chen W M, Wei G H. Bacterial communities in oil contaminated soils: biogeography and co-occurrence patterns. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 98: 64-73.
- [25] Qin J J, Li Y R, Cai Z M, Li S H, Zhu J F, Zhang F, Liang S S, Zhang W W, Guan Y L, Shen D Q, Peng Y Q, Zhang D Y, Jie Z Y, Wu W X, Qin Y W, Xue W B, Li J H, Han L C, Lu D H, Wu P X, Dai Y L, Sun X J, Li Z S, Tang A F, Zhong S L, Li X P, Chen W N, Xu R, Wang M B, Feng Q, Gong M H, Yu J, Zhang Y Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto J M, Zhang Z X, Chen H, Yang R F, Zheng W M, Li S G, Yang H M, Wang J, Ehrlich S D, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [26] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [27] Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch P C, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy A C, Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(3): 392-403.
- [28] 叶雯, 李永春, 喻卫武, 叶晓明, 钱宇汀, 戴文圣. 不同种植年限香榧根际土壤微生物多样性. *应用生态学报*, 2018, 29(11): 3783-3792.
- [29] 于威, 依艳丽, 杨蕾. 土壤中钙、氮含量对番茄枯萎病抗性的影响. *中国土壤与肥料*, 2016, (1): 134-140.
- [30] 郑世燕, 丁伟, 杜根平, 杨亮, 刘晓姣, 张永强. 增施矿质营养对烟草青枯病的控病效果及其作用机理. *中国农业科学*, 2014, 47(6): 1099-1110.
- [31] 宋旭红, 王钰, 李隆云, 谭均. 石柱黄连根腐病根际土壤细菌微生态研究. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1304-1311.
- [32] Niwa R, Kumei T, Nomura Y, Yoshida S, Osaki M, Ezawa T. Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes suppression of the clubroot disease of crucifers. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(3): 778-785.
- [33] Takahashi H, Takita K, Kishimoto T, Mitsui T, Hori H. Ca^{2+} is required by clubroot resistant turnip cells for transient increases in PAL activity that follow inoculation with *Plasmiodiophora brassicae*. *Journal of Phytopathology*, 2002, 150(10): 529-535.
- [34] Kageyama K, Asano T. Life cycle of *Plasmiodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2009, 28(3): 203.
- [35] 吕宁, 石磊, 刘海燕, 司爱君, 李全胜, 张国丽, 陈云. 生物药剂滴施对棉花黄萎病及根际土壤微生物数量和多样性的影响. *应用生态学报*, 2019, 30(2): 602-614.
- [36] 李岩, 何学敏, 杨晓东, 张雪妮, 吕光辉. 不同生境黑果枸杞根际与非根际土壤微生物群落多样性. *生态学报*, 2018, 38(17): 5983-5995.
- [37] 张丽娟, 曲继松, 郭文忠, 杨冬艳, 冯海萍. 微生物菌肥对黄河上游地区设施土壤微生物及酶活性的影响. *中国土壤与肥料*, 2014, (5): 32-36, 99-99.
- [38] 刘奎, 葛壮, 徐英德, 刘磊, 叶超, 李明, 赵搏, 梁爱珍, 张彬, 汪景宽. 不同耕作方式下黑土微生物群落对干湿交替的响应. *土壤学报*. (2018-12-26). <http://www.cnki.net/KCMS/detail/32.1119.P.20181226.1705.002.html>.
- [39] 邓超超, 李玲玲, 谢军红, 彭正凯, 王进斌, 颜健辉, 沈吉成, Essel E. 耕作措施对陇中旱农区土壤细菌群落的影响. *土壤学报*, 2019, 56(1): 210-219.
- [40] 邓娇娇, 周永斌, 殷有, 魏亚伟, 秦胜金, 朱文旭. 辽东山区典型人工针叶林土壤细菌群落多样性特征. *生态学报*, 2019, 39(3): 997-1008.
- [41] Benizri E, Piutti S, Verger S, Pagès L, Vercambre G, Poessel J L, Michelot P. Replant diseases: bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(9): 1738-1746.
- [42] 高雪峰, 韩国栋, 张国刚. 短花针茅荒漠草原土壤微生物群落组成及结构. *生态学报*, 2017, 37(15): 5129-5136.
- [43] Beimforde C, Feldberg K, Nylander S, Rikkinen J, Tuovila H, Dörfelt H, Gube M, Jackson D J, Reitner J, Seyfullah L J, Schmidt A R. Estimating the phanerozoic history of the Ascomycota lineages: combining fossil and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2014, 78: 386-398.