

DOI: 10.20103/j.stxb.202408131913

许世洋,李雪萍,漆永红,李建军.青稞苗期根腐病不同发病率农田植株根际土壤真菌群落差异.生态学报,2025,45(8):3907-3920.

Xu S Y, Li X P, Qi Y H, Li J J. Differences in fungal communities within the rhizosphere soil of naked barley at various incidences of seedling root rot in the field. *Acta Ecologica Sinica*, 2025, 45(8): 3907-3920.

青稞苗期根腐病不同发病率农田植株根际土壤真菌群落差异

许世洋,李雪萍*,漆永红,李建军

甘肃省农业科学院植物保护研究所,兰州 730070

摘要:青稞苗期根腐病发生广泛、危害严重,明确不同发病率条件下根际土壤真菌群落差异,对其精准、高效防控意义重大。以青稞苗期农田内健康(MH)和根腐病发病率为5%(MD1)、10%(MD2)、15%(MD3)、20%(MD4)根际土壤为研究对象,提取其总DNA,扩增18S rDNA区,通过Illumina-Miseq平台进行高通量测序,分类、注释所得序列,分析其群落物种多样性、物种组成及结构差异。结果表明:MD2特有OTU及OTU总数最多,MD1最少,MD2与MD3共有OTU最多,MD2物种丰富度维度、遗传距离指数、丰富度估计量指数均显著最高。随发病率升高,优势菌门子囊菌门、担子菌门相对丰度降低,分别显著富集于MD1、MD3;毛霉菌门与子囊菌门变化规律一致。优势菌纲粪壳菌纲显著富集于MH中,植株发病后其丰度下降;座囊菌纲、锤舌菌纲、盘菌纲在MD1中显著富集,球囊霉纲在MD2中相对丰度最高,在MD3中最低。发病样本中,盘菌科、口蘑科、粪盘菌科、暗壳腔菌科等优势菌科相对丰度总体变化与发病率呈负相关,发病后盘菌科丰度显著降低;MD1与MD2真菌多样性与群落结构组成相似度较高,MD3则与MD4相似度更高。因此,青稞苗期根腐病的发生使不同菌群间的健康良性互作平衡被打破,发病初期激活了植物根际系统防御机制,刺激有益菌群富集,流行后期病原真菌占据主导地位,有益菌群被抑制,真菌群落物种多样性降低。

关键词:青稞;根腐病;真菌多样性;群落结构

Differences in fungal communities within the rhizosphere soil of naked barley at various incidences of seedling root rot in the field

XU Shiyang, LI Xueping*, QI Yonghong, LI Jianjun

Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China

Abstract: Seedling root rot is widespread and devastating to naked barley, yet the differences of fungal community in rhizosphere soil across differing disease incidences remain unclear, hindering the development of specific and effective control strategies. To clarify these dynamics, rhizosphere soil samples from healthy (MH) and seedling naked barley affected by root rot with incidences of 5% (MD1), 10% (MD2), 15% (MD3), and 20% (MD4) were selected for DNA extraction, with the 18S rDNA region amplified and subjected to high-throughput sequencing via Illumina-Miseq. These sequences were classified taxonomically, annotated, and analyzed to identify differences in fungal community diversity, composition, and structure. The OTU classification outcomes indicated that MD2 harbored the greatest number of OTUs and unique OTUs, whereas MD1 contained the fewest. The shared OTUs between MH and MD1, MD1 and MD4 were minimal, contrasted with the abundant shared OTUs between MH and MD3. Observed species, PD whole tree, and Chao1 indices of MD2 were significantly the highest among the samples. Examining fungal community structure and composition at various taxonomic

基金项目:国家自然科学基金项目(32060037);甘肃省农业科学院重点研发计划项目(2023GAAS22)

收稿日期:2024-08-13; **网络出版日期:**2025-01-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lixueping@gsagr.cn

levels, along with LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) analysis, showed that the relative abundance of dominant phyla, such as Ascomycota and Basidiomycota, displayed opposing trends with escalating disease incidence, with notable enrichment in MD1 and MD3, respectively. The dominant class Sordariomycetes was enriched in MH and its abundance waned post-infection. Classes such as Dothideomycetes, Leotiomycetes, and Pezizomycetes were enriched in MD1. Glomerales showed peak abundance in MD2 and a nadir in MD3. In diseased samples, the relative abundance of dominant families like Pezizaceae, Tricholomataceae, Ascobolaceae, and Phaeosphaeriaceae generally inversely changed with the changing incidence. The abundance of Pezizaceae significantly declined, but other families with variable increases. Correlation clustering and PCA analysis indicated that the fungal diversity and community structures of MD3 and MD4 were similar, as were those of MD1 and MD2 to a greater extent. These insights imply that during the spread of seedling root rot, pathogenic fungi impede the enrichment of other microbial communities, diminishing fungal species diversity and disrupting the equilibrium of beneficial interactions among microorganisms. Moreover, the prevalent pathogenic groups vary with different incidences, and the functional impact of the same microbial community differs across naked barley fields. The incipient phase of root rot (5%—10% incidence) may stimulate rhizosphere defense of fungi and promote beneficial microbial enrichment to sustain soil ecological stability. However, the capacity for self-stabilization of rhizosphere soil fungal community is limited, allowing pathogenic fungi to dominate, beneficial fungal communities are suppressed, and fungal community species diversity decreases in the later prevalence of the disease (15%—20% incidence).

Key Words: naked barley; root rot; fungal diversity; community structure

青稞是我国青藏高原地区(下述简称“藏区”)主产粮、经、饲兼用型一年生禾本科作物,其营养价值丰富、抗逆性强,深受消费者和种植者喜爱^[1-2]。但其种植区域有限、常年连作现象普遍,导致根腐病广泛发生,青稞品质、产量严重下降,对藏区粮食安全及草地农业生态的可持续、高质量发展构成了威胁^[3-4]。根腐病作为青稞生长发育中最常见的土传病害类型之一,在世界主要青稞种植区内均有发生,其隐蔽性强、危害性大、传播迅速,被称为“植物癌症”,一旦发生很难被根除,典型症状表现为植株根及茎基部缢缩发干或腐烂,由多种生物、非生物因子综合作用引起^[3-6]。

苗期是防控根腐病的首要时期,若发病后防治不及时甚至可致全田植株死亡,发生绝收现象^[7]。根际作为植物-土壤-微生物互作的热点区域,其土壤生态与作物根部健康状况直接关联,明确植物根际土壤生态状况是有效实施根腐病防控策略的关键前提^[8-9]。针对青稞苗期根腐病本课题组前期研究^[10-12]发现,青稞苗期根腐病发生后,不同发病率条件下植株根际土壤理化性质、酶活性和微生物数量等变化各不相同,细菌多样性及其群落结构也存有差异,但真菌群落的响应变化尚不明确。土壤真菌作为土壤生态系统的重要组分,在驱动土壤物质循环、能量流动、信息传递和调节土壤理化性质、生物类群结构及多样性等方面发挥着重要作用,也是联系植物与其根际土壤生态的关键枢纽因子,其多样性及群落结构的变化动态是反映植物及土壤健康状态的重要指标^[9,13-14]。其中,有益菌群的富集可极大地激发植物防病促生效应,并修复、改善植株根际土壤生态,促进土壤生态的健康演化^[15-16]。而有害菌群的大量繁殖、传播则会干扰植株根际土壤微生物群落结构、正常的养分周转及能量代谢,使得根际土壤生态恶化^[17-18]。因此,通过明确根腐病流行中植株根际土壤不同效应真菌类群的演化动态可为病害有效防控、筛选高效生防资源、促进土壤生态健康演化等提供重要指导^[15,18-19]。

现有研究发现我国藏区青稞根腐病主要由镰孢菌(*Fusarium* sp.)、麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)、链格孢(*Alternaria alternata*)等病原真菌感染引起^[3-4],但其与植株根际土壤中其他真菌类群的共存关系及相互作用尚不明确,限制了有益菌群的合理开发和有效利用。另一方面,发病率是监测作物病害流行态势的关键指标,目前研究^[20-22]多集中于比较健康与患病植株根际土壤真菌群落多样性及结构的差异,而关于不同发病率下根际土壤真菌群落的研究较少,限制了精准、高效的生物或生态防控策略实施。因此,本

研究以藏区不同根腐病发病率苗期青稞根际土壤为研究对象,提取其遗传物质,高通量测定其 18S rDNA 区序列,以获得物种信息,并分析、比较其物种多样性及群落结构差异,明确青稞苗期根腐病发生对其根际土壤真菌群落的影响及不同发病率条件下不同真菌类群相互作用机制,以期为全面掌握苗期青稞根腐病的成病机制、制定并实施精准高效的防控策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究区位于青藏高原东北边缘的甘肃省甘南藏族自治州卓尼县(102°46′—104°02′E, 34°10′—35°10′N),地势呈西南高、东北低,由西南向东北倾斜,地形以高山丘陵居多。平均海拔为 2951 m,属高寒干旱区,年均气温 4.6℃,年均降水量 487.1 mm^[12]。该区域是藏区青稞主产区之一,青稞种植面积约占粮食作物种植总面积的 48.5%^[4]。

1.2 青稞根际土壤样品采集

2022 年 6 月 5 日—8 日赴研究区调查统计不同青稞农田内根腐病发病率,为避免边际效应,选取距地块边缘 5 m 内区域进行^[23]:发病率(%)=根腐病发病面积/地块总面积×100%。健康地块内通过五点采样法采集健康植株 15 株,发病地块内通过五点采样法采集不同发病斑块内植株各 15 株,收集其根际土壤样品并混匀,去除动植物残体、石砾等杂质后过 2 mm 孔筛,并分装至 10 mL 无菌离心管中,低温运输至实验室。根据上述统计发现木耳镇、柳林镇、申藏乡、阿子滩乡青稞苗期根腐病发病率均为 0—20%,从中选取健康及发病率为 5%、10%、15%、20%地块土壤样品各 1 份,并按发病率分别混匀,分别标记为 MH、MD1、MD2、MD3、MD4, -20℃ 冰箱保存备用。

1.3 土壤 DNA 提取、扩增及测序

采用土壤 DNA 提取试剂盒(Soil DNA Kit, Omega Bio-tek, American),按说明书步骤提取不同发病率土壤样品总 DNA,每发病率对应 3 份。分别采用 Nanodrop 微量分光光度计(NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, American)和 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的浓度和纯度,合格后送至上海欧易生物医学科技有限公司委托其使用引物 817 F(5′-TTAGCATGGAATAATRAATAGGA-3′)和 1196 R(5′-TCTGGACCTGGTGAAGTTTCC-3′)对 18S rDNA 区进行 PCR 扩增,产物纯化后构建文库,检验合格后通过 Illumina-Miseq 平台进行高通量测序。

1.4 物种信息分类与注释

使用 Trimmomatic v.0.35 软件将 Illumina-Miseq 测序得到的原始数据进行去杂^[24],后使用 Flash v.1.2.11 对双端测序结果进行拼接^[25],QIIME 中的 split_libraries v.1.8 软件去除含 N 碱基、单碱基重复大于 8 及长度小于 200 bp 的序列^[26],UCHIME v.2.4.2 去除嵌合体^[27],最后使用 Vsearch v.2.4.2 软件按照 97% 相似度将得到序列进行分类^[28],并选取 OTU 中丰度最大的序列作为代表序列,采用 RDP classifier Naive Bayesian 分类算法将代表序列与 Silva 数据库进行比对^[29],得到不同 OTU 的分类注释信息。

1.5 真菌群落多样性及结构分析

测序数据量、质量检测合格后,基于最佳测序深度下不同发病率农田内青稞根际土壤真菌 OTU 组成及数量绘制 UpSet-韦恩图,计算真菌群落的 α 多样性指数(物种丰富度维度、遗传距离指数、丰富度估计量指数、测序深度指数、Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数)并绘制箱线图,以分析、比较样本中真菌群落多样性及差异。汇总不同分类水平下各样本注释信息,根据不同分类层级上菌群相对丰度绘制 Circos 圈图、彩带图、聚类分析热图和带差异显著性标记的柱状图以比较不同发病率农田内青稞根际土壤真菌物种组成及群落结构差异;采用 LEfSe 分析比较相对丰度具有显著差异的物种,并通过 LDA Score 评估其影响力。最后进行 Pearson 相关性聚类分析及主成分分析(Principal Component Analysis, PCA),以明确不同发病率农田内青稞根际土壤真菌群落差异。以上绘图均通过 Rstudio v.4.4.1 完成。

2 结果与分析

2.1 不同发病率农田内青稞根际土壤真菌群落 OTU 数量分析

对所得真菌 18S rDNA 序列进行质控、过滤后,共收集到 111805 条优质序列,长度集中在 390—409 bp。如图 1 所示,以 97%相似度聚类为 866 个 OTU,样本含有 OTU 数越多,特有 OTU 数越多,发病率为 10%样本(MD2)包含 OTU 数量最多,为 469 个,且其特有 OTU 最多,为 162 个。发病率为 5%样本(MD1)最少,为 281 个,特有 OTU 仅为 41 个。不同发病率样本间共有 OTU 数量为 135 个,健康(MH)与发病率 5%样本(MD1)共有 OTU 最少,与发病率为 15%样本(MD3)共有 OTU 最多。发病样本中,MD2、MD3 样本共有 OTU 最多,发病率为 MD1、MD4 样本共有 OTU 最少,所有发病样本共有 OTU 数量为 6 个。

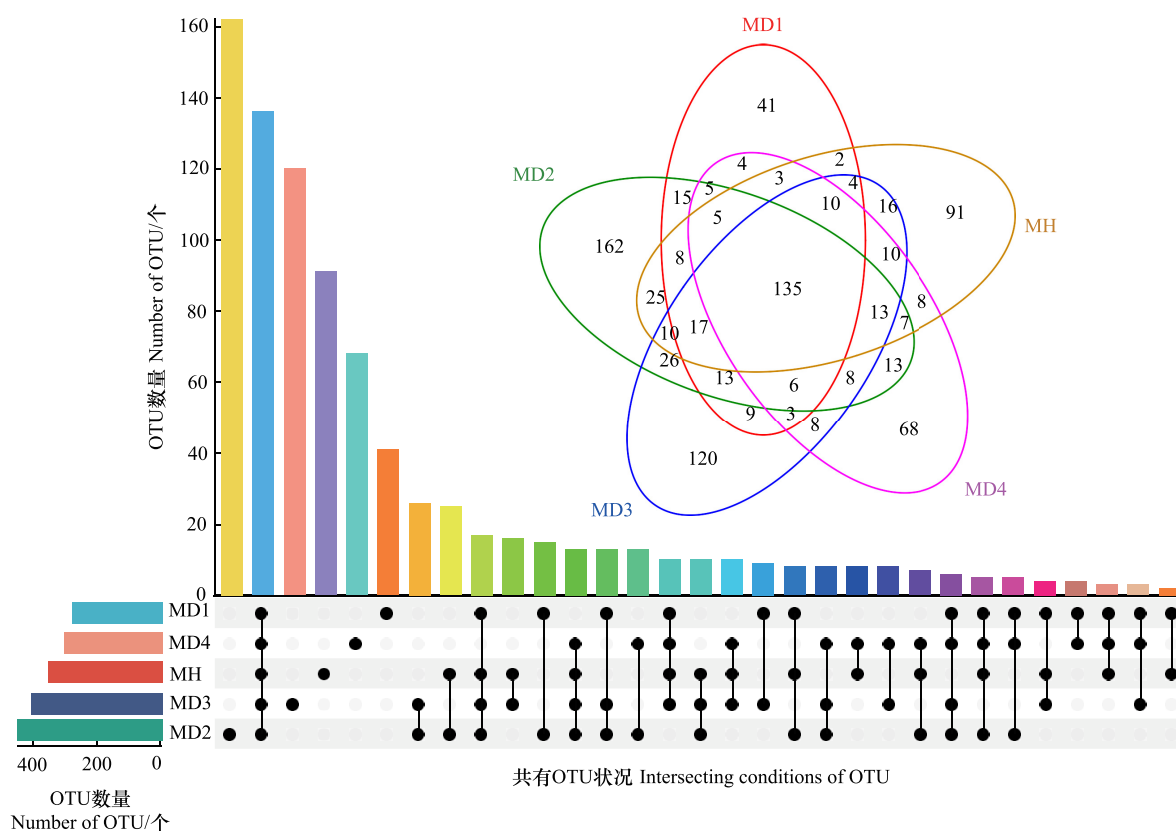


图1 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落 OTU

Fig.1 Composition and difference of fungal OTU in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

MH 表示健康土壤样品,MD1 表示发病率为 5%土壤样品,MD2 表示发病率为 10%土壤样品,MD3 表示发病率为 15%土壤样品,MD4 表示发病率为 20%土壤样品

2.2 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落 α 多样性指数

如图 2 所示,各样本测序深度指数均在 0.99 以上,表明测序数据量合理,测序结果可靠。其中,发病率为 10%样本(MD2)真菌群落物种丰富度维度(Observed species)、遗传距离指数(PD whole tree)、Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数较其他样本均显著最高($P < 0.0001$),丰富度估计量指数(Chao1)除与健康样本(MH)无显著差异外,亦显著高于其他各样本($P < 0.001$)。MH 物种丰富度维度、遗传距离指数、丰富度估计量指数均显著高于发病率为 5%、20%样本(MD1、MD4),而 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数显著低于 MD1($P < 0.0001$),除 Shannon-Wiener 指数与 MD4 相差不大,Simpson 指数也显著低于 MD1($P < 0.0001$),且各样本中其 Simpson 指数最低。发病率为 10%、15%样本中真菌群落丰富度估计量指数与 MH 无显著差异,MD2、MD3 中

真菌群落 α -多样性指数均显著高于 MH ($P < 0.01$)。发病率为 10%—20% 时,样本间 α 多样性指数均差异显著,除 MD4 的 Simpson 指数显著高于发病率为 15% 样本 (MD3),发病率越高,真菌群落物种丰富度维度、遗传距离指数、丰富度估计量指数和 Shannon-Wiener 指数越低。

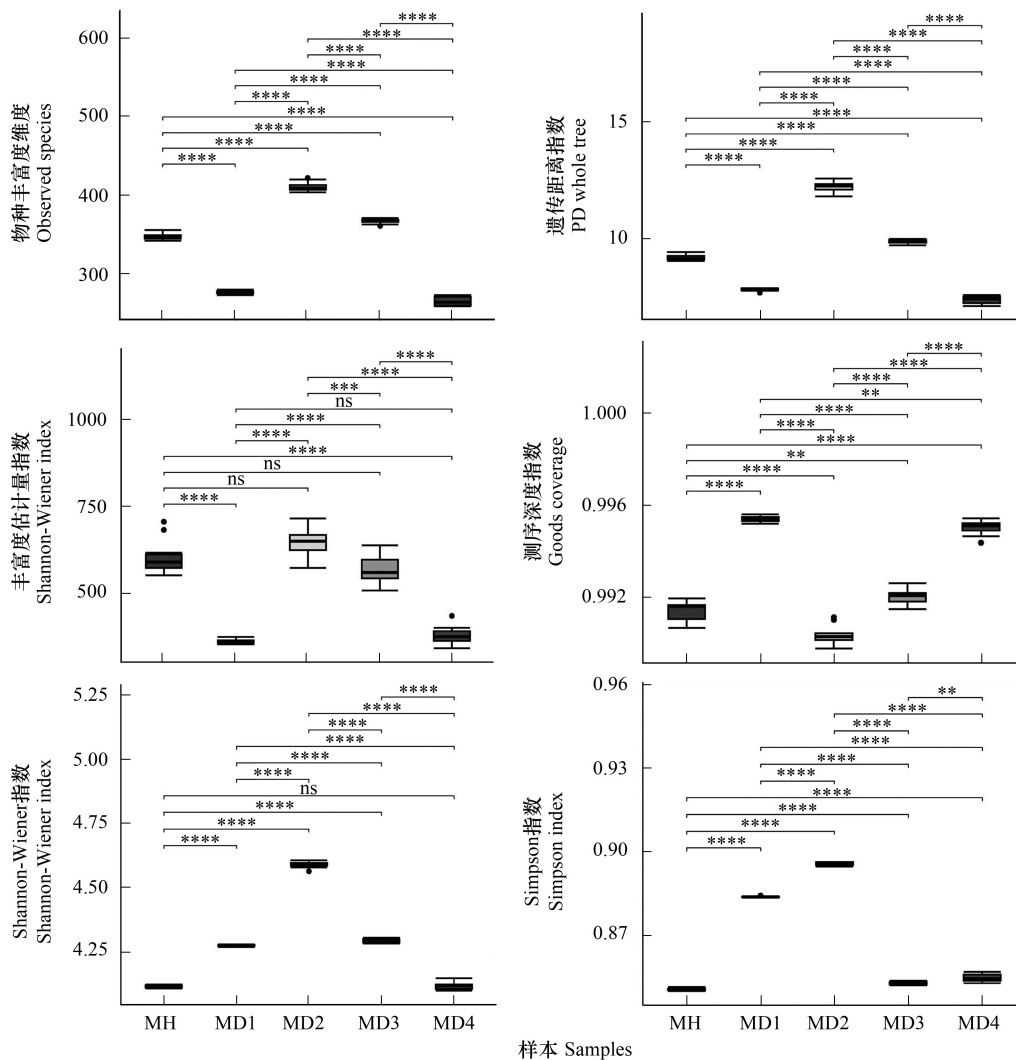


图2 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落 α -多样性指数

Fig.2 Alpha-diversity indexes of fungal community in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

ns 表示无显著差异 ($P > 0.05$), * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$, **** 表示 $P < 0.0001$

2.3 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落结构组成及差异

2.3.1 不同分类层级上真菌群落结构组成及差异

子囊菌门 (Ascomycota)、毛霉菌门 (Mucoromycotina)、担子菌门 (Basidiomycota) 和捕虫霉门 (Zoopagomycotina) 等为不同发病率下苗期青稞根际土壤真菌群落中优势菌门 (图 3)。子囊菌门相对丰度为 47.65%—59.94%, 不同发病率样本中其相对丰度均差异显著 ($P < 0.01$), MD1 中其相对丰度最高 ($P < 0.001$), MD3 中最低。毛霉菌门相对丰度为 4.59%—6.21%, MD1 中其相对丰度显著最高 ($P < 0.05$); MH 中其相对丰度最低, 除 MD1, 较其他发病率样本均无显著差异。担子菌门相对丰度为 1.94%—4.37%, MD4 相对丰度显著最高, MD1 显著最低 ($P < 0.05$), MH、MD2、MD3 样本间无显著差异。捕虫霉门 (Zoopagomycotina) 相对丰度为 0.94%—3.28%, MD4 相对丰度显著最高 ($P < 0.05$), MH 最低, 且除与 MD2 无显著差异外, 与其他样本均差异显著 ($P < 0.05$)。

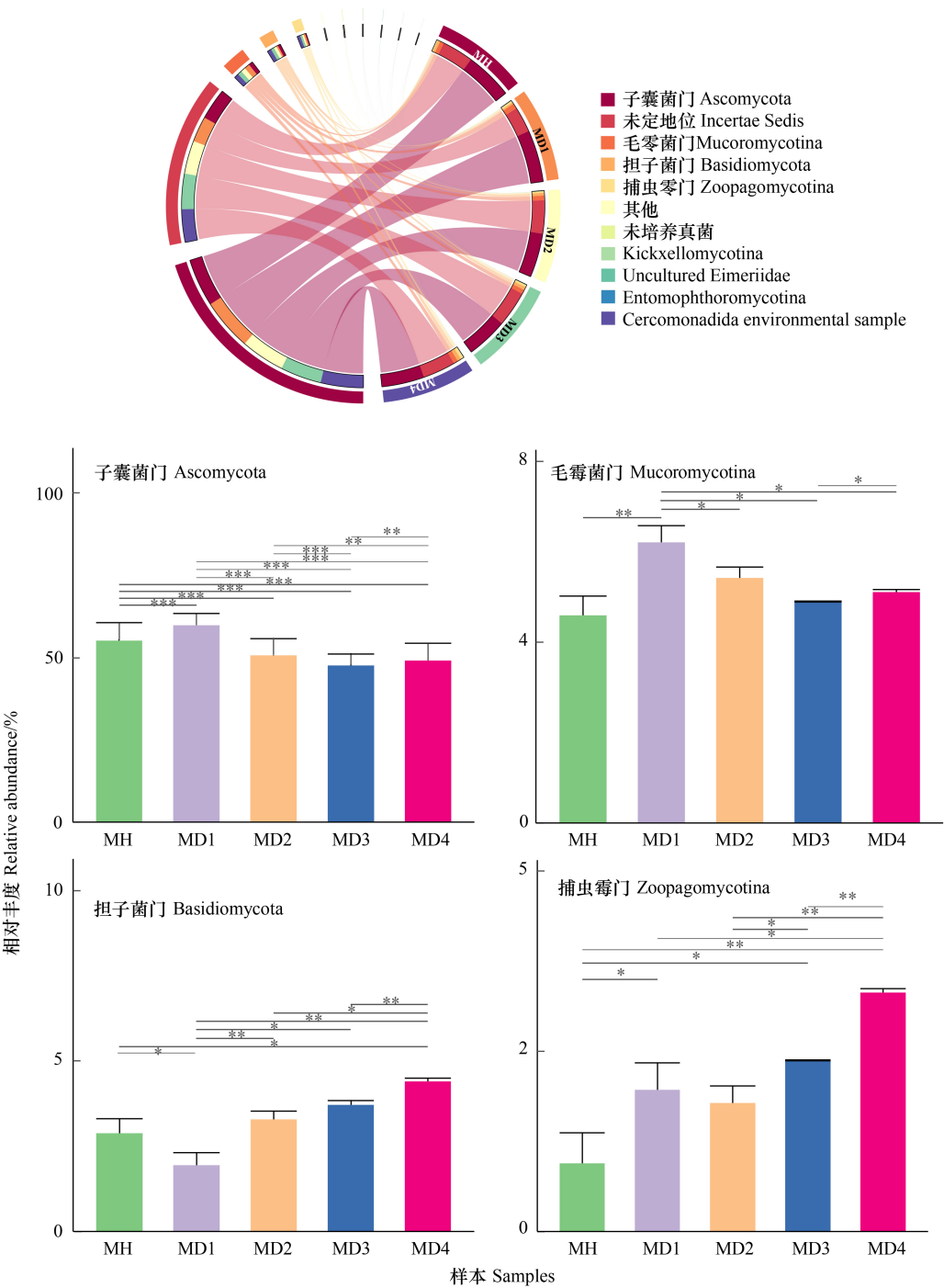


图3 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落门结构组成及差异

Fig.3 Characterization at phylum level of fungal community in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

如图4所示,不同发病率苗期青稞根际土壤样本中优势真菌纲为粪壳菌纲(Sordariomycetes, 26.04%—33.46%)、壶菌纲(Chytridiales, 13.86%—31.89%)、球囊霉纲(Glomerales, 4.89%—15.31%)、座囊菌纲(Dothideomycetes, 6%—10.94%)、锤舌菌纲(Leotiomyces, 5.38%—7.88%)、盘菌纲(Pezizomycetes, 3.91%—6.1%)、被孢霉纲(Mortierellales, 3.48%—5.62%)、散囊菌纲(Eurotiomycetes, 1.81%—4.58%)、捕虫霉纲(Zoopagales, 1.75%—3.28%)、伞菌纲(Agaricomycetes, 0.69%—2.23%)。粪壳菌纲、散囊菌纲和银耳纲等在MH中最高,捕虫霉纲、座囊菌纲最低;座囊菌纲、被孢霉纲、锤舌菌纲、盘菌纲在MD1中最高,壶菌纲、散囊菌纲、伞菌纲最低;球囊霉纲在MD2中最高,在MD3中最低,壶菌纲在MD3中最高;捕虫霉纲在MD4中最高。

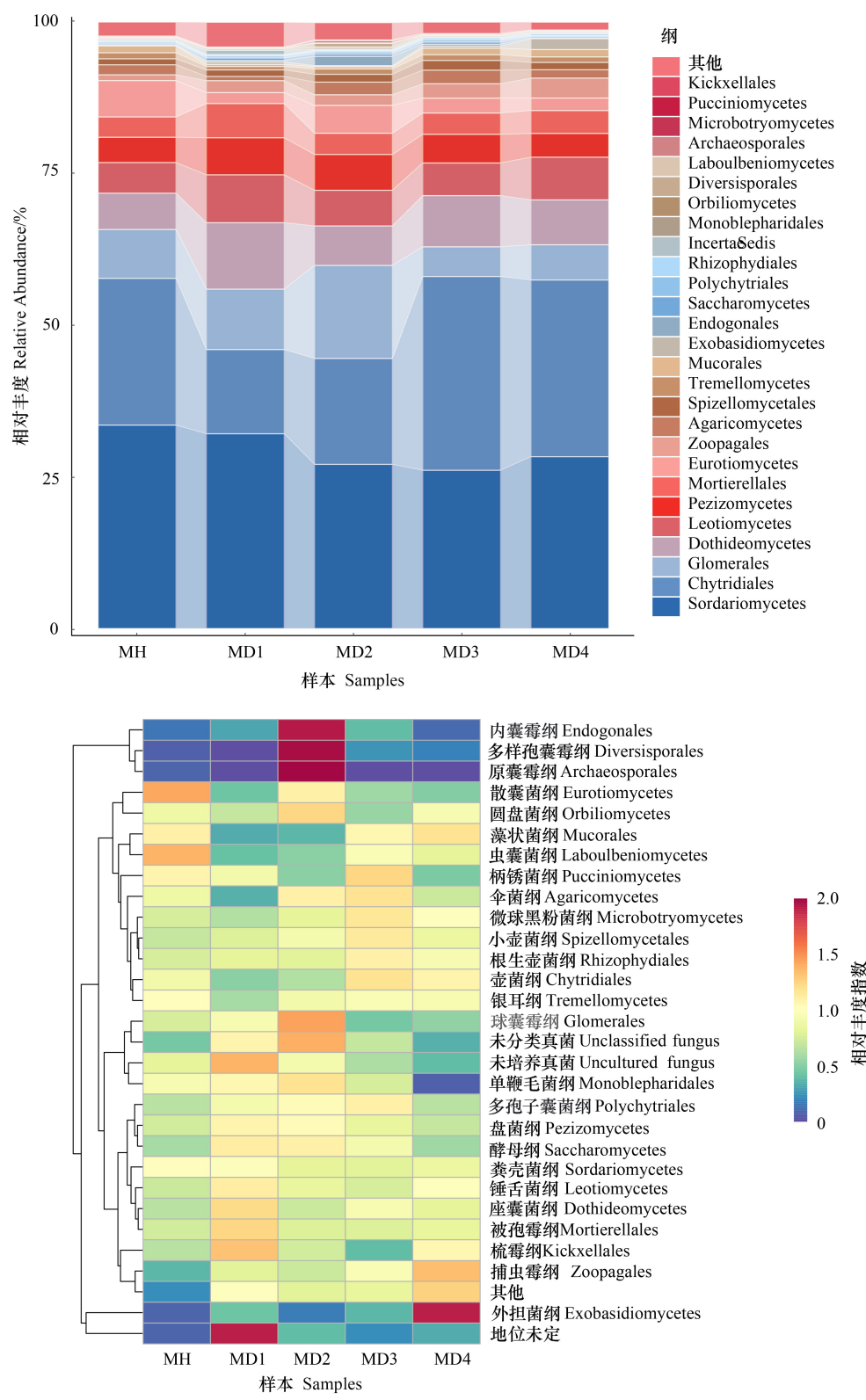


图 4 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落纲结构组成及差异

Fig.4 Characterization at class level of fungal community in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

由不同样本各菌群聚类分析结果可知,壶菌纲、散囊菌纲和伞菌纲相关性较强,聚为一支;被孢霉纲、座囊菌纲、锤舌菌纲、粪壳菌纲、盘菌纲、捕虫霉纲和球囊霉纲聚为一支。其中,座囊菌纲与被孢霉纲、壶菌纲与银耳

纲(Tremellomycetes)、球囊霉纲与盘菌纲、酵母纲(Saccharomycetes)、散囊菌纲与圆盘菌纲(Orbiliomycetes)随发病率变化规律一致。

科水平上(图5),盘菌科(Pezizaceae)、口蘑科(Tricholomataceae)、粪盘菌科(Ascobolaceae)、暗壳腔菌科(Phaeosphaeriaceae)为优势菌科,相对丰度分别为21.45%—28.88%、3.44%—7.07%、3.73%—6.0%、2.59%—

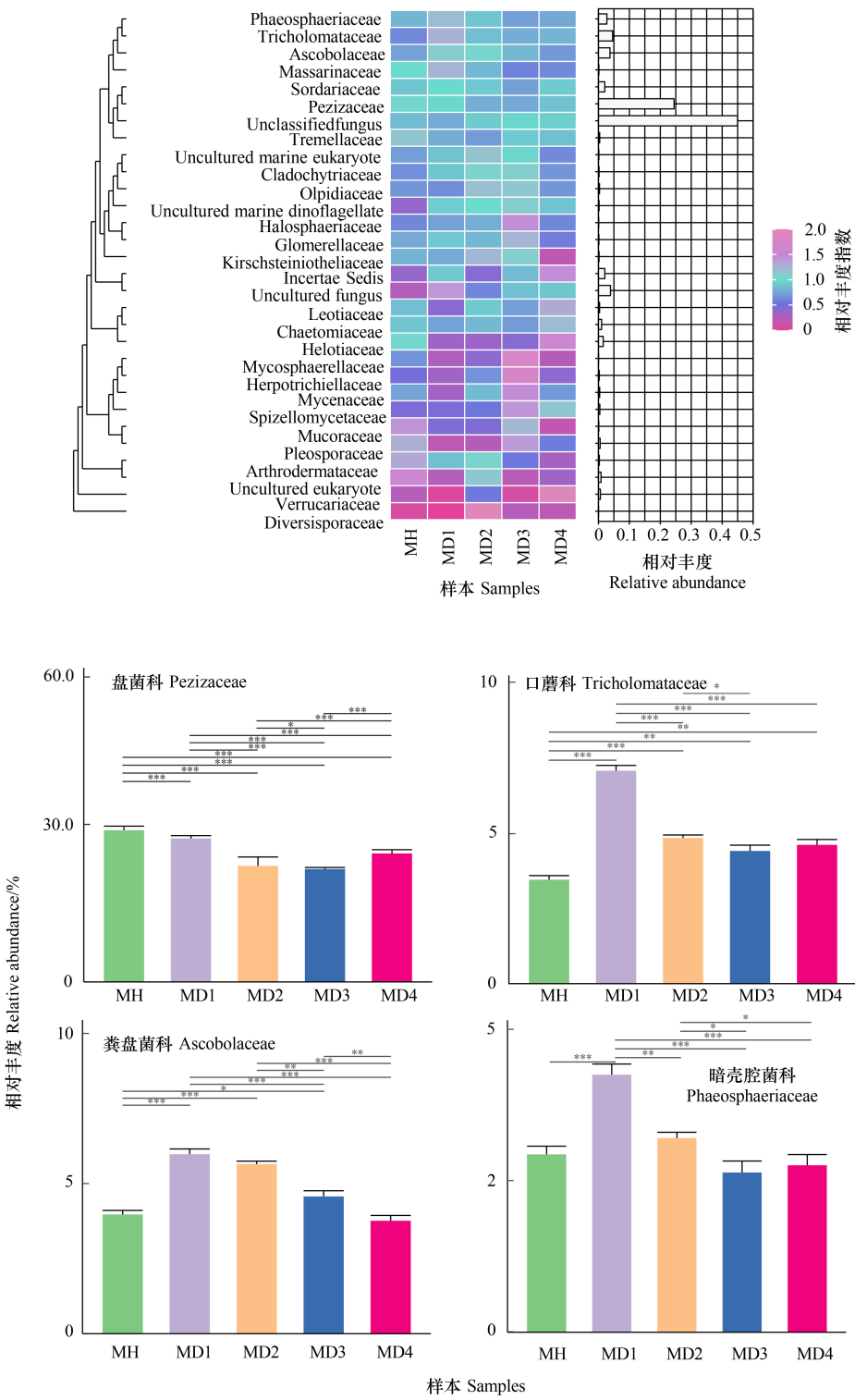


图5 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落科结构组成及差异

Fig.5 Characterization at family level of fungal community in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

4.28%。其中,盘菌科的相对丰度在各样本中均存有显著差异,且除 MD2 与 MD3 在 $P<0.05$ 水平上差异显著,其他各样本间均在 $P<0.001$ 水平上差异显著,其相对丰度在 MH 中最高,在 MD3 中最低。口蘑科相对丰度在 MD1 中显著最高($P<0.001$),在 MH 中显著最低($P<0.001$),在 MD2 和 MD4、MD3 和 MD4 间均差异不显著。粪盘菌科相对丰度在 MH 中最低,在 MD1 中最高,发病率越高,其相对丰度越低。暗壳腔菌科在不同发病率样本中的丰度分布与口蘑科总体一致,但 MD3 中其相对丰度最低,与 MH、MD4 无显著差异。

2.3.2 不同分类层级上真菌群落的 LEfSe 分析

由 LDA 值分布柱状图、进化分支图可知(图 6),不同发病率样本中共有 28 个不同分类水平上真菌群落存在显著差异($LDA \geq 4$ 、 $P < 0.05$)。其中, MH 主要富集粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)、散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)、散囊菌目(*Eurotiales*)等生物标记物。MD1 包含生物标记物最多(11 个),包括盘菌亚门(*Pezizomycotina*)、子囊菌门(*Ascomycota*)、座囊菌纲(*Dothideomycetes*)、葡萄座腔菌目(*Botryosphaeriales*)、锤舌菌纲(*Leotiomycetes*)、被孢霉目(*Mortierellales*)、盘菌目(*Pezizales*)、盘菌纲(*Pezizomycetes*)等,显著高于其他样本。MD2、MD3、MD4 包含生物标记物均为 4 个,其中, MD2 主要富集壶菌目(*Chytridiales*)、壶菌纲(*Chytridiomycetes*)和壶菌门(*Chytridiomycota*), MD3 中为担子菌门(*Basidiomycota*)、伞菌亚门(*Agaricomycotina*)、接合菌门(*Zygomycota*)、伞菌纲(*Agaricomycetes*), MD4 中为捕虫霉门(*Zoopagomycotina*)和捕虫霉目(*Zoopagales*)。

2.4 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落总体差异

针对不同发病青稞根际土壤真菌群落 OTU 进行相关性分析发现(图 7), MD3、MD4 中真菌群落正相关性较大,相关性系数为 0.70; MD1、MD3 间则负相关性大,相关系数为 -0.82,与 MD4 亦呈负相关(-0.74)。健康样本则与各发病样本间的相关性均不大,说明根腐病的发生改变了原有青稞根际土壤真菌群落结构,且发病率相近的样本之间表现出正相关的变化趋势,发病率差异大的样本间真菌群落结构则易呈现出相反的变化规律。聚类分析发现, MD3、MD4 聚类距离较近, MD1、MD2 距离更近,健康样本与发病样本的距离均较远。主成分分析与聚类分析结果一致, MD3、MD4 部分重叠,说明其间真菌多样性及群落结构相似度较高; MD1、MD2 与 MD3、MD4 不在同一象限内,说明其差异较大。MD2 部分在第三象限内与 MD1 重叠,说明之间真菌群落结构具有一定的相似性。

3 讨论

3.1 青稞苗期根腐病不同发病率农田内植株根际土壤真菌群落物种多样性分布特征及差异

“植物-土壤-微生物”三者相辅相成、互相作用而成的植物根际土壤微生态系统中,真菌多样性是真核生物多样性的主要贡献者之一,也是表征植物防御病害能力及土壤质量、生态恢复潜力等的关键指标^[8-9,30]。不同发病率样本中真菌 OTU 数量和 α -多样性指数从真菌群落稳定性、物种组成变化、遗传多样性及适应性等多个维度直观反映了根际土壤真菌群落物种多样性变化。本研究发现健康与发病样本间、不同发病率样本间真菌群落 OTU、特有 OTU 数量和 α -多样性指数均存有不同程度差异,不同样本中共有 OTU 数量仅占探测 OTU 总数的 15.59%,且各样本间 α -多样性指数多差异显著,直观反映苗期青稞根际土壤真菌群落对根腐病发生响应敏感,不同发病率条件下真菌群落面临的环境选择压力不同,其物种多样性及不同菌群间的互作机制存有较大差异。发病率为 5%、20% 样本(MD1、MD4)中 OTU、特有 OTU 数量均低于健康样本(MH),物种丰富度维度(Observed species)、遗传距离指数(PD whole tree)等显著低于 MH,而发病率为 10%、15% 样本(MD2、MD3)中上述指标均显著高于 MH,说明青稞苗期根腐病的发生对其根际真菌群落物种多样性变化既有反向的抑制作用,也有正向的促进作用,与已报道^[20-22,31]作物根腐病发生后其根际土壤真菌群落多样性降低或升高的单一变化规律有所不同。可能机制为:病原真菌的定殖侵染和繁殖同其他菌群间形成了竞争作用,抑制了其他菌群富集,原有群落稳态受到破坏,真菌多样性降低;另一方面病原真菌的不断侵染、繁殖激活了植物根际系统的防御机制,有效刺激了植物根际招募其他有益菌群以抵御病害侵袭,致使群落多样性增

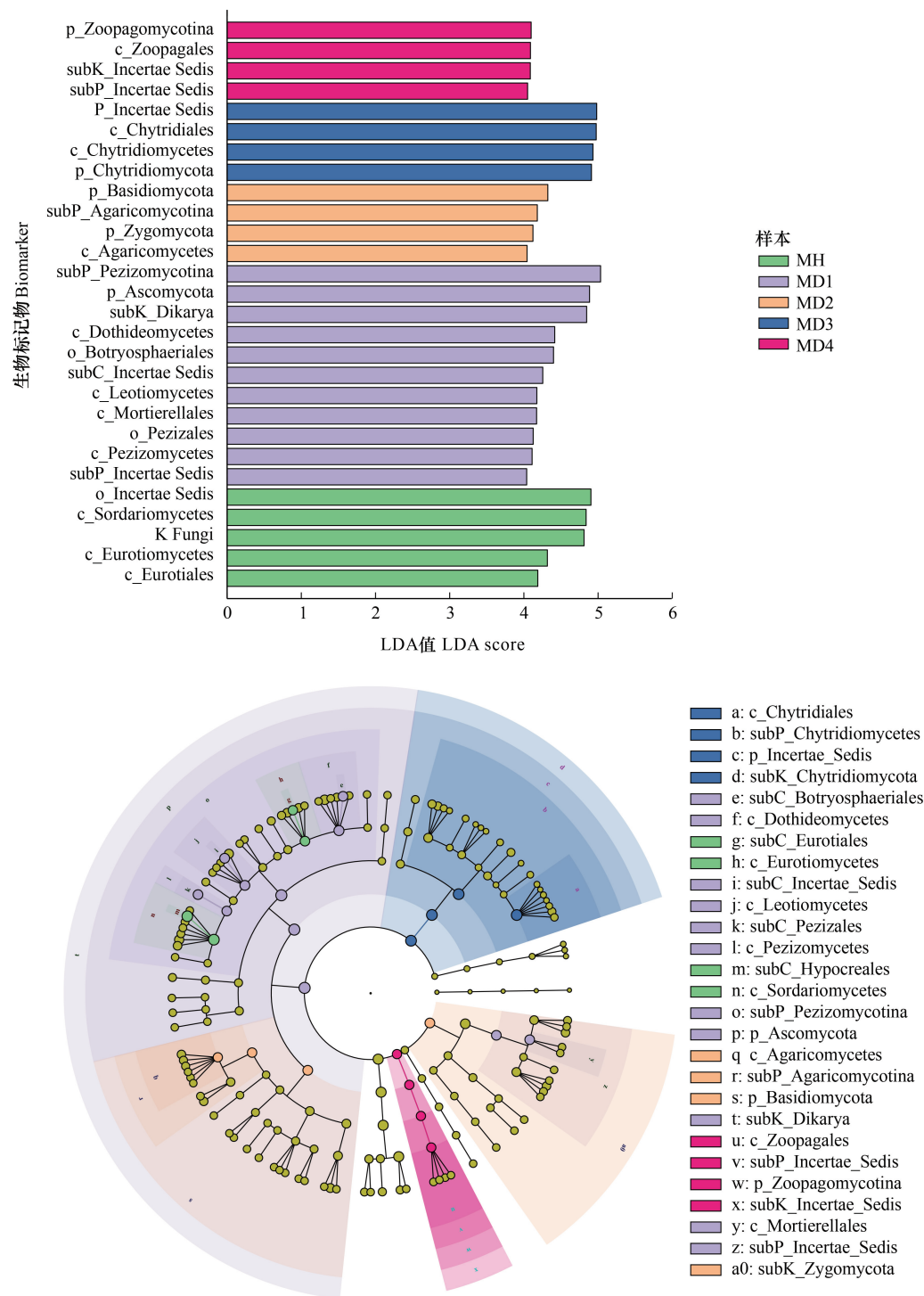


图 6 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落结构组成的 LefSe 分析

Fig.6 LefSe analysis of fungal community in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

加^[32]。本研究中 MH 与 MD2、发病样本中的 MD2、MD3 共有 OTU 最多, MH、MD2、MD3 仅丰富度估计量指数相差不大, 这可能由于植株根际土壤菌群存有一定的内稳态调节能力, 有益菌群的富集能够进一步促使物种总数增加以调节维持物种丰富度, 并使其维持稳定在一定范围内以防止病害的蔓延扩散。发病样本中 MD1、MD4 的物种丰富度维度、遗传距离指数和丰富度估计量指数均显著最低, 但两者共有 OTU 最少, 说明青稞苗期根腐病虽能够显著降低植株根际土壤真菌群落多样性, 但不同发病率下的物种组成却存有较大差异。且

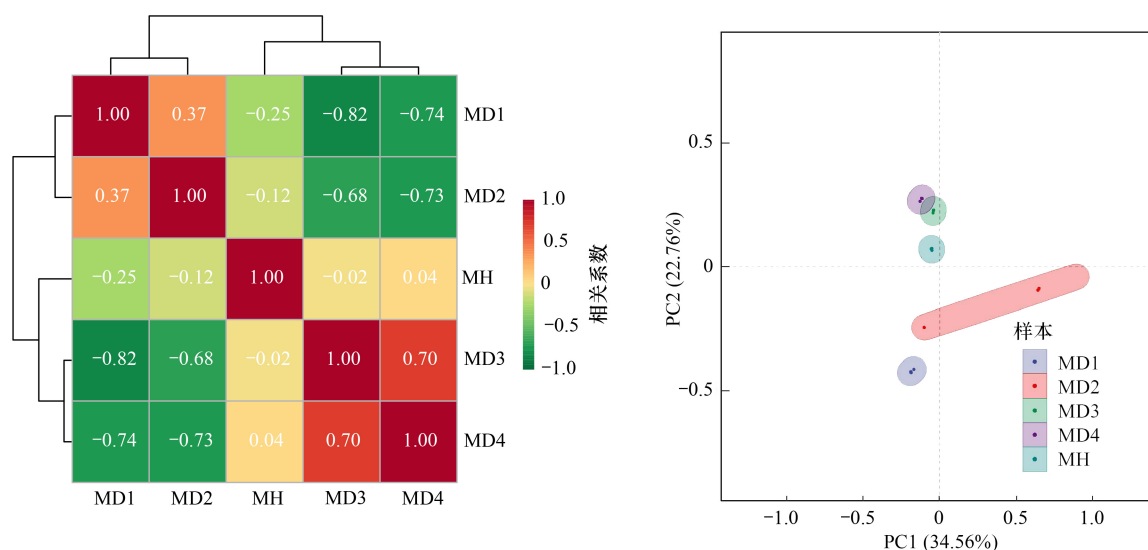


图7 不同发病率下青稞根际土壤真菌群落相关性聚类(左)及主成分分析(右)

Fig.7 Correlation clustering (left) and principal component analysis (right) of fungal communities in rhizosphere soil of naked barley with different seedling root rot incidences

左图不同色块及标注数字表示两两样本间的 Pearson 相关性大小

MH 的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数均显著低于 MD1, Shannon-Wiener 指数与 MD4 相差不大, Simpson 指数也显著低于 MD1, MD1 的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数均显著高于 MD4。其可能原因是:根腐病原真菌定殖侵染初期(发病率较低时),病原真菌虽尚未形成足够的丰度优势,却有效抑制了土壤中抗性较弱、丰度较低菌群的存活,故丰度较高菌群的优势地位更加凸显、分布也更均匀;而由低发病率向高发病率的转变过程中,病原真菌的进一步侵染、繁殖,原有的健康土壤生态不断恶化,病原真菌不断繁殖形成足够的丰度优势,逐渐占据主导地位,而原有生态中占有较高丰度水平的大量菌群因受到不同程度的削弱作用而致数量降低,但其丰度分布仍较为均匀^[10,19-22,33]。当发病率 $\geq 10\%$ 时,发病率越高,样本包含 OTU、特有 OTU 及物种丰富度维度、遗传距离指数、丰富度估计量指数和 Shannon-Wiener 指数等越低,进一步说明苗期青稞根际土壤生态系统的维稳能力具有一定限度^[8-9,13,19]。

3.2 青稞苗期根腐病不同发病率农田内植株根际土壤真菌群落物种组成及结构差异

子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)是全世界已发现的土壤真菌类群中相对丰度最高的真菌类群^[34-35],也是卷丹百合(*Lilium lancifolium*)^[20]、芍药(*Paeonia lactiflora*)^[21]、星油藤(*Plukenetia volubilis*)^[22]等多种作物根腐病植株根际土壤真菌中主要优势菌群。本研究发现,子囊菌门、担子菌门作为青稞苗期根腐病根际土壤主要真菌类群的同时,其相对丰度因根腐病发生表现相反的变化特点,这与贺璐^[20]、张英英^[21]、Uwaremwe^[22]等研究结果一致。已有研究^[36]发现子囊菌门、担子菌门、毛霉菌门(Mucoromycotina)许多真菌类群均能引发作物根腐病,本研究各样本中子囊菌门相对丰度(47.65%—59.94%)远高于毛霉菌门(4.59%—6.21%)、担子菌门(1.94%—4.37%)等优势菌门,MH 中子囊菌门、毛霉菌门和担子菌门相对丰度与部分发病样本相差不大,甚至显著高于部分发病样本,说明苗期青稞的健康根际土壤真菌群落本身便可能包含大量潜在致病菌群,致使其根腐病发生蔓延的主要原因是不同菌群间的健康良性互作平衡被打破。毛霉菌门相对丰度因根腐病发病率差异表现与子囊菌门一致,均在 MD1 中相对丰度显著最高,发病率越高相对丰度越低,而担子菌门相对丰度在 MD1 中显著最低,且发病率越高其相对丰度越高,这可能由于低发病率条件下致病真菌类群主要来自子囊菌门和毛霉菌门,而当发病率较高时担子菌门中的致病类群才逐渐占据一定的生态优势,并不断繁殖扩增形成对植株的侵染。MD1 中捕虫霉门(Zoopagomycotina)相对丰度显著高于 MH,发

病率 $\geq 10\%$ 时,发病率增加其相对丰度也显著增高,且 MH 中担子菌门、捕虫霉门相对丰度与 MD2 均无显著差异,说明捕虫霉门真菌可能起到了辅助子囊菌门、毛霉菌门及担子菌门中致病菌群侵染的作用,但限于目前有关捕虫霉门有关方面研究尚匮乏,其作用机制仍待进一步深入探讨。

粪壳菌纲(Sordariomycetes)、壶菌纲(Chytridiales)、球囊霉纲(Glomerales)、座囊菌纲(Dothideomycetes)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)、盘菌纲(Pezizomycetes)、被孢霉纲(Mortierellales)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、捕虫霉纲(Zoopagales)、伞菌纲(Agaricomycetes)等为青稞苗期根腐病根际土壤中优势菌纲,但在青稞苗期根腐病不同发病率样本中的丰度分布各有差异,这可能由于不同发病率下真菌群落的演化状态不同,不同菌纲功能效应差异所致。粪壳菌纲是子囊菌门中丰度最高、包含真菌类型最为丰富的菌纲之一,其功能定位主要包括植物病原真菌、内生菌、腐生菌、粪食性真菌等^[37],青稞根腐病优势病原镰孢菌(*Fusarium* sp.)隶属于该纲。而本研究发现其显著富集在 MH 中,植株发病后其丰度下降,这可能由于健康青稞田内其主要富集在植株根际土壤中作为腐生菌、粪食性真菌等用于分解土壤有机质、促进土壤养分周转而供给植株生长,而当受到环境胁迫、植株免疫能力衰退后,其角色转变为病原菌、内生菌形成对植株根部的侵染、转移定殖其中,在根际土壤中的丰度降低,同时也说明其丰度具有指示青稞苗期根腐病发生的潜力。座囊菌纲、盘菌纲真菌均可作为植物病原菌或腐生真菌,兼具有引发作物病害和分解植物残体的功能效应^[38–39],且有报道发现盘菌纲真菌还能引发作物根腐病^[40]。本研究发现座囊菌纲、盘菌纲在 MD1 样本中显著富集,推测可能机制为:病原不断侵染导致植株对病原真菌的抗性减弱,盘菌纲中的根腐病病原真菌也开始形成侵染,其初步定殖侵染需要大量养分,座囊菌纲、盘菌纲内腐生菌大量富集以提供足够的养分供给。球囊霉纲为丛枝菌根真菌(Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF)的主要类群之一^[41],具有促进寄主植物生长发育、改善其根际结构、增强其抗病性等积极作用^[42],而伞菌纲真菌则多为腐生菌。本研究发现球囊霉纲在 MD2 中相对丰度最高,在 MD3 中最低,且 MD2 中伞菌纲显著富集,进一步说明当青稞苗期根腐病发病率在一定范围内,植株根际土壤中有益菌群及腐生菌群会不断聚集以响应病害的蔓延扩展进程。而过高的发病率不利于丛枝菌根真菌存活。限于目前已报道寄生青稞的 AMF 菌株数量寥寥无几、AMF 资源挖掘困难^[43],今后或可从根腐病发病率较低的苗期青稞根际土壤中筛选可以高效共生的 AMF 以用于青稞根腐类病害高效生物防控。壶菌目(Chytridiales)隶属于壶菌门下的壶菌纲,已有研究发现其可作为有害真菌介导土壤病毒的传播,也可作为有益真菌用于防治根结线虫^[44]。其在 MD3 中显著富集,可能是高发病率条件下根际土壤病毒、根结线虫等其他生物类群侵染所致,具体仍待进一步验证。

盘菌科(Pezizaceae)、口蘑科(Tricholomataceae)、粪盘菌科(Ascobolaceae)、暗壳腔菌科(Phaeosphaeriaceae)等不同发病率青稞根际土壤真菌群落中优势菌科均为重要的腐生真菌类群,相对丰度在发病样本中总体表现出与发病率负相关的差异性分布特点,且盘菌科在发病后较 MH 丰度显著降低,而其他科相对丰度均有不同程度增高,可能由于根腐病流行不同阶段分解的有机质来源、种类及病原真菌群体养分需求不同,致使富集的腐生真菌类群组成也有所差异^[45–46]。本研究中,属、种水平上大多菌群分类地位无法确定,说明高通量测序技术在属、种水平上对真菌进行准确分类仍具有一定的局限性^[16],也可能受藏区独特的生态环境致使其遗传信息与其他已知物种差异较大而缺乏有效参考比对的影响^[47]。

3.3 青稞苗期根腐病不同发病率农田内植株根际土壤真菌群落差异

不同根腐病发病率苗期青稞根际土壤真菌群落相关性聚类分析、PCA 综合分析结果说明不同发病率样本内真菌群落所处演化状态不同:发病率较高样本间(MD3、MD4)真菌多样性与群落结构组成相似,而发病率较低样本(MD1、MD2)相似度更高。其可能机制为青稞苗期根腐发生初期(发病率 5%–10%),土壤中有有益真菌在植株根际不断聚集以抵御病害发展,在根际土壤中占有丰度优势的病原真菌总体丰度降低;而根腐病流行后期(发病率 15%–20%),病原真菌的繁殖扩增不断取代部分有益真菌的生态位,在植物根际土壤生态演化中重新占据主导地位^[46]。

4 结论

(1) 青稞苗期健康植株根际土壤真菌群落潜存大量致病菌群,致使根腐病发生蔓延的主要原因是病原真菌的定殖侵染和繁殖抑制其他菌群富集,破坏原有群落生态,致使真菌群落物种多样性降低,不同菌群间的健康良性互作平衡被打破。

(2) 不同发病率条件下显著富集的真菌类群各不相同,优势病原类群也存有差异,同一菌群在不同发病率青稞农田内功能效应不同。

(3) 青稞苗期根腐病的发生初期(发病率 5%—10%)能够激活植物根际系统防御机制、刺激有益菌群(如 AMF)富集,以维持土壤生态稳定,但根际土壤真菌群落自身维稳能力有限,根腐病流行后期(发病率 15%—20%)病原真菌仍占据主导地位。故针对青稞苗期根腐病应采取“早发现、早防控”的防治策略,以免病害过度蔓延扩展对其根际土壤生态造成难以逆转的损失。

参考文献(References):

- [1] 姚晓华,吴昆仑. 青稞脂质转运蛋白基因 *blt4.9* 的克隆及其对非生物胁迫的响应. 作物学报,2016,42(3): 399-406.
- [2] 阚建全,洪晴悦. 青稞生物活性成分及其生理功能研究进展. 食品科学技术学报,2020,38(6): 11-20.
- [3] 李雪萍,李敏权,许世洋,刘梅金,漆永红,李建军,李晓蓉. 青稞镰孢根腐病病原鉴定及致病性分析. 麦类作物学报,2022,42(9): 1149-1161.
- [4] 李雪萍,刘梅金,许世洋,郭建伟,漆永红,李敏权. 青稞普通根腐病的调查与病原鉴定. 草业学报,2021,30(7): 190-198.
- [5] Williamson-Benavides B A, Dhingra A. Understanding root rot disease in agricultural crops. Horticulturae,2021,7(2): 33.
- [6] Govaerts B, Mezzalama M, Sayre K D, Crossa J, Nicol J M, Deckers J. Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on maize/wheat root rot and nematode populations in subtropical highlands. Applied Soil Ecology,2006,32(3): 305-315.
- [7] Septiani P, Lanubile A, Stagnati L, Busconi M, Nelissen H, Pè M E, Dell'Acqua M, Marocco A. Unravelling the genetic basis of *Fusarium* seedling rot resistance in the MAGIC maize population: novel targets for breeding. Scientific Reports,2019,9(1): 5665.
- [8] Chen Y, Bonkowski M, Shen Y, Griffiths B S, Jiang Y J, Wang X Y, Sun B. Root ethylene mediates rhizosphere microbial community reconstruction when chemically detecting cyanide produced by neighbouring plants. Microbiome,2020,8(1): 4.
- [9] Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science,2012,17(8): 478-486.
- [10] 漆永红,曹素芳,李雪萍,李敏权. 甘南州临潭县青稞根际土壤养分含量、酶活性和微生物数量与根腐病的关系研究. 草地学报,2018,26(4): 877-884.
- [11] 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.
- [12] 许世洋,李雪萍,李敏权,郭致杰,漆永红,李建军,荆卓琼. 青稞苗期根腐病对根际土壤细菌群落结构的影响. 草原与草坪,2023,43(5): 120-128.
- [13] Liu S G, García-Palacios P, Tedersoo L, Guirado E, van der Heijden M G A, Wagg C, Chen D M, Wang Q K, Wang J T, Singh B K, Delgado-Baquerizo M. Phylotype diversity within soil fungal functional groups drives ecosystem stability. Nature Ecology & Evolution,2022,6(7): 900-909.
- [14] Baldrian P, Bell-Dereske L, Lepinay C, Větrovský T, Kohout P. Fungal communities in soils under global change. Studies in Mycology,2022,103: 1-24.
- [15] 张静,王平,杨明新,谷强,纪宝明. 植物-土壤反馈与草地群落演替: 菌根真菌和土壤病原菌的调控作用. 生态学报,2021,41(24): 9878-9885.
- [16] Nilsson R H, Anslan S, Bahram M, Wurzbacher C, Baldrian P, Tedersoo L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. Nature Reviews Microbiology,2019,17(2): 95-109.
- [17] Trivedi P, Leach J E, Tringe S G, Sa T M, Singh B K. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nature Reviews Microbiology,2020,18(11): 607-621.
- [18] Snelders N C, Rovenich H, Petti G C, Rocafort M, van den Berg G C M, Vorholt J A, Mesters J R, Seidl M F, Nijland R, Thomma B P H J. Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. Nature Plants,2020,6(11): 1365-1374.
- [19] 刘京伟,李香真,姚敏杰. 植物根际微生物群落构建的研究进展. 微生物学报,2021,61(2): 231-248.
- [20] 贺璐,马杰,傅淋,肖才升,刘芳,赵瑞元,李庠. 卷丹百合根腐病植株与健康植株根际土壤真菌群落结构差异. 西南农业学报,2023,36(11): 2419-2425.
- [21] 张英英,吴之涛,杨宪忠,魏玉杰,吴芳,杜雷超. 白芍根腐病病株与健康植株根际土壤微生物群落及酶活性变化. 西南农业学报,2024,37(1): 109-118.
- [22] Uwaremwe C, Bao W J, Daoura B G, Mishra S, Zhang X X, Shen L J, Xia S W, Yang X D. Shift in the rhizosphere soil fungal community associated with root rot infection of *Plukenetia volubilis* Linneo caused by *Fusarium* and *Rhizopus* species. International Microbiology,2024,27(4):

- 1231-1247.
- [23] 方中达. 植病研究方法 (第三版). 北京: 中国农业出版社, 1998: 6-13.
- [24] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [25] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [26] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman F D, Costello E K, Fierer N, Peña A G, Goodrich J K, Gordon J I, Huttley G A, Kelley S T, Knights D, Koenig J E, Ley R E, Lozupone C A, McDonald D, Muegge B D, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky J R, Turnbaugh P J, Walters W A, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [27] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of *Chimera* detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [28] Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [29] Balvočiūtė M, Huson D H. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT-how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*, 2017, 18(Suppl 2): 114.
- [30] Li Y N, Steenwyk J L, Chang Y, Wang Y, James T Y, Stajich J E, Spatafora J W, Groenewald M, Dunn C W, Hittinger C T, Shen X X, Rokas A. A genome-scale phylogeny of the Kingdom Fungi. *Current Biology*, 2021, 31(8): 1653-1665.
- [31] 高芬, 闫欢, 王梦亮, 秦雪梅. 土壤微生物菌群变化对土传病害的影响及生物调控. *中国农学通报*, 2020, 36(13): 160-164.
- [32] Santoyo G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of Advanced Research*, 2022, 40: 45-58.
- [33] Smith G R, Steidinger B S, Bruns T D, Peay K G. Competition colonization tradeoffs structure fungal diversity. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1758-1767.
- [34] 施笑笑, 王教瑜, 王艳丽, 孙国昌. 子囊菌交配型位点与交配型基因研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1572-1581.
- [35] Riley R, Salamov A A, Brown D W, Nagy L G, Floudas D, Held B W, Levasseur A, Lombard V, Morin E, Otillar R, Lindquist E A, Sun H, LaButti K M, Schmutz J, Jabbour D, Luo H, Baker S E, Pisabarro A G, Walton J D, Blanchette R A, Henrissat B, Martin F, Cullen D, Hibbett D S, Grigoriev I V. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(27): 9923-9928.
- [36] 王科, 刘芳, 蔡磊. 中国农业植物病原菌物常见种属名录. *菌物学报*, 2022, 41(3): 361-386.
- [37] Zhang N, Castlebury L A, Miller A N, Huhndorf S M, Schoch C L, Seifert K A, Rossman A Y, Rogers J D, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Sung G H. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 2006, 98(6): 1076-1087.
- [38] Ohm R A, Feau N, Henrissat B, Schoch C L, Horwitz B A, Barry K W, Condon B J, Copeland A C, Dhillon B, Glaser F, Hesse C N, Kosti I, Labutti K, Lindquist E A, Lucas S, Salamov A A, Bradshaw R E, Ciuffetti L, Hamelin R C, Kema G H J, Lawrence C, Scott J A, Spatafora J W, Turgeon B G, de Wit P J G M, Zhong S B, Goodwin S B, Grigoriev I V. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(12): e1003037.
- [39] Healy R A, Arnold A E, Bonito G, Huang Y L, Lemmond B, Pfister D H, Smith M E. Endophytism and endolichenism in pezizomycetes: the exception or the rule? *New Phytologist*, 2022, 233(5): 1974-1983.
- [40] Mattupalli C, Shiller J B, Kankanala P, Krom N, Marek S M, Mysore K S, Young C A. The first genomic resources for *Phymatotrichopsis omnivora*, a soilborne pezizomycete pathogen with a broad host range. *Phytopathology*, 2021, 111(10): 1897-1900.
- [41] 王幼珊, 刘润进. 球囊菌门丛枝菌根真菌最新分类系统菌种名录. *菌物学报*, 2017, 36(7): 820-850.
- [42] 储薇, 郭信来, 张晨, 周柳婷, 吴则焰, 林文雄. 丛枝菌根真菌-植物-根际微生物互作研究进展与展望. *中国生态农业学报 (中英文)*, 2022, 30(11): 1709-1721.
- [43] 王幼珊, 张淑彬, 殷晓芳, 刘建斌, 武凤霞. 中国大陆地区丛枝菌根真菌菌种资源的分离鉴定与形态学特征. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2154-2165.
- [44] van de Vossen B T L H, Warris S, Nguyen H D T, van Gent-Pelzer M P E, Joly D L, van de Geest H C, Bonants P J M, Smith D S, Lévesque C A, van der Lee T A J. Comparative genomics of chytrid fungi reveal insights into the obligate biotrophic and pathogenic lifestyle of *Synchytrium endobioticum*. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 8672.
- [45] Crowther T W, Boddy L, Hefin Jones T. Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus-grazer interactions. *The ISME Journal*, 2012, 6(11): 1992-2001.
- [46] 李洁, 李杏春, 郭良栋. 真菌群落构建机制研究进展. *菌物学报*, 2023, 42(1): 13-25.
- [47] 李平星, 高晨真, 罗艳华, 郭辉, 孙伟. 青藏高原生态资产空间差异及其价值化潜力. *生态学报*, 2024, 44(5): 1808-1821.