

茎瘤芥（榨菜）根肿病不同发病时期根际土壤真菌群落变化特征的高通量分析

王殿东¹ 谭永忠¹ 田雪亮² 张超¹ 秦明一¹ 潘丽梅^{1*}

(¹ 长江师范学院, 重庆 408100; ² 河南科技学院, 河南新乡 453003)

摘 要: 茎瘤芥（榨菜）根肿病是一种土传病害，与根际土壤真菌群落存在密切关系。本试验采用 454 高通量测序方法，以土壤真菌的 18S rDNA 序列为靶标，研究茎瘤芥根肿病不同发病时期（移栽前、移栽后发病前、发病初期、发病中期、采收后）土壤真菌群落的变化规律。结果表明：经 454 高通量测序，茎瘤芥根肿病各发病时期的 OUT 平均数量为 1 056 个。依据 OUT 所属真菌物种信息对土壤真菌群落结构进行分析，子囊菌亚门真菌在各个时期土壤中均为优势真菌类群，其次为担子菌亚门真菌。移栽后发病前、发病初期和发病中期土壤真菌群落的 Shannon 和 Simpson 多样性指数、OTU 数量和属的数量均高于移栽前和采收后，表明茎瘤芥根肿病发生发展时期土壤真菌群落多样性较高，这可能与茎瘤芥生长季节根系分泌物旺盛有关。

关键词: 茎瘤芥；根肿病；土壤真菌；高通量测序；多样性指数

重庆市涪陵区茎瘤芥（榨菜）种植面积和产量均居全国第一位，涪陵榨菜已经成为重庆市的特色农业。但是自 1994 年在涪陵地区发现茎瘤芥根肿病以来，目前该病已成为茎瘤芥的主要病害，田间发病率 30%~50%，发病地块很难再继续种植茎瘤芥，造成茎瘤芥种植面积下降，严重威胁重庆市茎瘤芥产业的可持续发展（裴晓兔等，2013；黄芸等，2014）。

茎瘤芥根肿病由芸薹根肿菌引起，该病菌可在土壤中长期存活，一旦田间发病，难以消除（王靖等，2011）。作为土传病害，茎瘤芥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，尤其与根际土壤微生物的关系密切（罗远莉等，2011）。在土壤微生物中，根际微生物生活在植物根系影响的范围之内，与植物根系关系更为密切。根际微生物还能通过营养竞争、产生抗性

物质和酶类、消耗植物根系分泌物来阻止病原微生物在植物根际定殖，调节植物免疫反应、提高其抗病能力，产生植物激素促进植物生长等（Berendsen et al., 2012）。其中根际真菌是土壤有机质层重要的微生物类群，可与土壤胶体形成菌丝桥，参与土壤碳、氮、磷等养分转化（Lin et al., 2012），在土壤生态系统中起着重要的作用。

鉴于土壤真菌的重要生态功能，其在茎瘤芥根肿病发生过程中可能起着重要的作用，然而目前针对该方面的研究较少。为了明确茎瘤芥根肿病发病地块根际土壤真菌群落的变化特征，本试验采用 454 高通量测序方法，分析茎瘤芥根肿病不同发病时期土壤真菌群落结构的变化规律，以期揭示根际土壤真菌群落在茎瘤芥根肿病发生过程中的生态作用。

1 材料与方法

1.1 取样地点和取样方法

取样时间为 2013 年 9 月至 2014 年 1 月；取样地点位于重庆市涪陵区百胜镇，种植茎瘤芥 15 a，茎瘤芥根肿病发病率高，病株率 30%。

土壤取样分为 5 个时期：移栽前（标号 A，9 月 20 日）、移栽后发病前（标号 B，10 月 20 日）、发病初期（标号 C，11 月 20 日）、发病中期（标号

王殿东，男，博士，副教授，主要从事植物土传病害、植物寄生线虫等方面的研究，E-mail: ddwangwill@163.com

* 通讯作者（Corresponding author）：潘丽梅，女，教授，主要从事植物病理学方面的研究，E-mail: good2094@yeah.net

收稿日期：2015-12-21；接受日期：2016-03-03

基金项目：国家自然科学基金项目（31170463），重庆市青年骨干教师自助计划项目

D, 12月20日)、采收后(标号E, 1月20日)。采用五点取样法, 移栽前和采收后, 在田间随机选取5点, 首先去除2 cm厚表层土, 用土壤取样器打取20 cm深度的土壤; 移栽后发病前、发病初期和发病中期, 在田间随机选取5点, 每点取5株茎瘤芥植株, 共计25株, 将植株从土壤中拔出, 采用抖根法将根系粘附的土壤抖落, 收集到自封袋中, 将25株茎瘤芥根际土壤混合在一起作为1份土壤样品。将土壤样品带回实验室, -20℃冰箱保存。

1.2 土壤微生物总DNA提取

为了减少土壤取样的偏差性, 保证土壤DNA样品能够代表土壤微生物群落, 从每份土壤样品中分3次分别称取0.5 g土壤, 按照FastDNA® Spin Kit for Soil说明书流程提取土壤微生物基因组DNA, 将3次提取的土壤DNA混合, 作为每份土壤样品的总DNA。置于-20℃冰箱保存。

将100 ng土壤总DNA溶解于50 μL TE缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH=8.0), 然后用微量移液器吸取2 μL, 采用微量紫外分光光度计(NanoDrop ND-1000 UV-Vis)测定DNA浓度和纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀)。

1.3 根际土壤真菌高通量测序

将土壤总DNA送生工生物工程(上海)股份有限公司进行454高通量测序。土壤真菌测序引物为5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTATAGCGTAXXXXXXXXXXXCAGTAGTCATATGCTTGTC TC-3', 其中XXXXXXXXXX为Barcode序列, 该引物由测序公司设计并验证, 可以扩增真菌的18S rDNA部分序列; 不同发病时期的土壤总DNA分别用不同的Barcode序列区分(表1), 以便于生物信息分析时根据Barcode序列所获取的高通量测序序列进行归类。测序数据去除嵌合体序列, 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、目、科、属, 并依据各个OTU的序列数量计算多样性指数(Gihring et al., 2012)。

Simpson多样性指数: $D=1-\sum P_i^2$, 式中 P_i 为每个物种个体数占群落物种总个体数的比例。

Shannon多样性指数: $H'=-\sum (P_i)(\ln P_i)$, 式中 P_i 为每个物种个体数占群落物种总个体数的比例。

2 结果与分析

2.1 高通量测序数据特征

从表1可以看出, 茎瘤芥根肿病不同发病时期土壤微生物基因组总DNA的序列数量有所差异, 其中发病中期所得序列最多, 去除杂合体后剩余7 694条; 净化序列平均长度在519.6~529.7 bp之间, 这是454高通量测序单反应的标准长度。说明所得序列质量较高, 可以进行后续分析。

表1 茎瘤芥根肿病不同发病时期土壤微生物基因组总DNA高通量测序所得序列数据特征

取样时期	Barcode	初级序列		净化序列	
		数量 条	平均长度/bp	数量 条	平均长度/bp
移栽前	CTATAGCGTA	3 015	513.1	2 949	523.1
移栽后发病前	TACGTCATCA	4 680	463.3	4 119	519.9
发病初期	TAGTCGCATA	6 138	514.4	6 011	524.1
发病中期	TATATATACA	7 928	515.6	7 694	529.7
采收后	TATGCTACTA	4 567	510.1	4 474	519.6

2.2 不同发病时期的土壤真菌类群

由图1可见, 子囊菌亚门真菌在各个时期土壤中的占比最高, 为优势真菌类群; 移栽前为73.18%, 移栽后发病前降低到48.77%, 发病初期上升至77.17%, 发病中期和采收后降低到62.56%和56.34%。担子菌亚门真菌在土壤中的占比除发病中期外, 其他各个时期均居第二位, 其中采收后占比最高, 为38.06%; 移栽前和移栽后发病前占比比较接近, 分别为24.19%和25.08%; 发病初期降低到14.99%; 发病中期占比最低, 为6.12%。壶菌亚门真菌在土壤中的占比呈逐渐升高、然

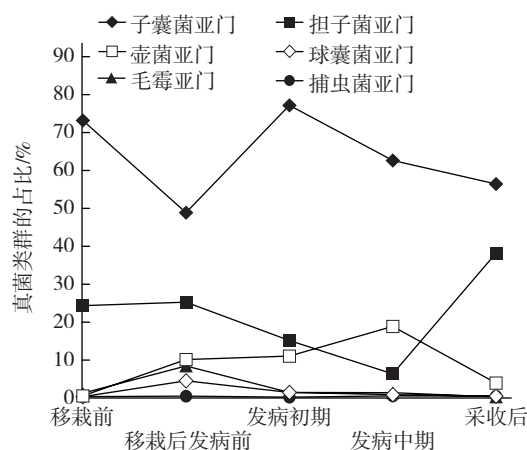


图1 茎瘤芥根肿病不同发病时期土壤中真菌类群的比例变化

后降低的趋势,移栽前为 0.34%,移栽后发病前升高到 9.93%,发病初期达到 10.84%,发病中期占比最高为 18.69%,采收后下降至 3.73%。毛霉亚门真菌在移栽后发病前占比最高,为 8.22%;其他时期占比相对较低。球囊菌亚门真菌和捕虫菌亚门真菌在各个时期土壤中的占比均较低,为非优势真菌类群。

在属分类水平上,移栽前土壤真菌类群共计 56 个属,其中 *Turbinellus* 占比最高,为 38.1%,其次为肉座菌属 (*Hypocrea*) (19.3%)、青霉属 (*Penicillium*) (17.3%),这 3 个属真菌为优势类群;其他属占比均较低,如毛壳菌属 (*Chaetomium*) 为 4.1%、*Chytriumyces* 为 4.8%,其余属的占比均小于 3% (表 2)。

表 2 部分根际土壤真菌属在茎瘤芥根肿病不同发病时期的比例变化

属	移栽前	移栽后发病前	发病初期	发病中期	采收后
<i>Turbinellus</i>	38.1	3.7	1.4	1.6	49.9
肉座菌属 (<i>Hypocrea</i>)	19.3	3.0	1.8	2.6	5.7
被孢霉属 (<i>Mortierella</i>)	0	11.9	5.5	19.9	1.8
壶菌属 (<i>Chytridium</i>)	0	3.5	22.8	13.8	2.1
青霉属 (<i>Penicillium</i>)	17.3	3.3	5.1	0.4	0.4
地丝霉属 (<i>Geomyces</i>)	1.5	1.3	1.8	14.0	3.1
小克银汉霉属 (<i>Cunninghamella</i>)	1.2	6.6	14.0	0.7	1.5
毛壳菌属 (<i>Chaetomium</i>)	4.1	4.4	3.9	1.3	2.7
盾巨孢囊霉属 (<i>Scutellospora</i>)	0	7.8	6.4	0.9	0.7
酵母属 (<i>Leucosporidium</i>)	0	0	0.5	9.1	0.1
<i>Knufia</i>	0.1	6.8	3.5	1.6	0.9
<i>Coniochaeta</i>	1.1	3.4	3.4	0.9	1.5
<i>Chytriumyces</i>	4.8	4.8	1.9	1.9	1.7
<i>Rhizophydiales</i>	0	5.1	1.2	0.9	0.6
<i>Hyphoderma</i>	0.5	0	0	1.7	4.6
<i>Mortierellaceae</i>	0	4.0	1.3	1.1	0.7
<i>Sistotrema</i>	0	0	1.1	1.2	3.3
<i>Mycocalia</i>	0	0.3	0.4	3.2	0
<i>Diatrype</i>	0	3.3	0.3	3.6	0.5

移栽后发病前土壤真菌类群共计 65 个属,其中被孢霉属 (*Mortierella*) 占比最高,为 11.9%,其次为盾巨孢囊霉属 (*Scutellospora*) (7.8%)、*Knufia* (6.8%)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella*) (6.6%)、*Rhizophydiales* (5.1%)、*Chytriumyces* (4.8%)、毛壳菌属 (4.4%)、*Mortierellaceae* (4.0%)、*Turbinellus* (3.7%)、壶菌属 (*Chytridium*) (3.5%)、*Coniochaeta* (3.4%)、青霉属 (3.3%)、*Diatrype*

(3.3%) 和肉座菌属 (3.0%); 其余属的占比均小于 3%,为稀有真菌类群 (表 2)。

发病初期土壤真菌类群共计 76 个属,其中优势类群为壶菌属,占比为 22.8%,其次为小克银汉霉属 (14.0%)、盾巨孢囊霉属 (6.4%)、被孢霉属 (5.5%)、青霉属 (5.1%)、毛壳菌属 (3.9%)、*Knufia* (3.5%)、*Coniochaeta* (3.4%); 其余属的占比均小于 3%,为稀有真菌类群 (表 2)。

发病中期土壤真菌类群共计 87 个属,其中优势类群为被孢霉属,占比为 19.9%,其次为地丝霉属 (*Geomyces*) (14.0%)、壶菌属 (13.8%)、酵母属 (*Leucosporidium*) (9.1%)、*Diatrype* (3.6%)、*Mycocalia* (3.2%); 其余属的占比均小于 3%,为稀有真菌类群 (表 2)。

采收后土壤真菌类群共计 75 个属,其中优势类群为 *Turbinellus*,占比为 49.9%,其次为肉座菌属 (5.7%)、*Hyphoderma* (4.6%)、*Sistotrema* (3.3%)、地丝霉属 (3.1%); 其余 70 个属的占比均小于 3%,为稀有真菌类群 (表 2)。

从表 2 还可以看出, *Turbinellus* 在移栽前和采收后的占比较高,分别为 38.1% 和 49.9%,而其他 3 个时期的占比较低;肉座菌属在移栽前占比最高,为 19.3%,在其他 4 个时期的占比均低于 6%;同样,青霉属在移栽前的占比最高,其他时期均明显降低;壶菌属在移栽前未发现,移栽后发病前占比为 3.5%,发病初期升到最高 22.8%,发病中期下降到 13.8%,采收后为 2.1%;毛壳菌属在各个时期的比例变化不大,发病中期和采收后略有降低。

从表 3 可以看出, Shannon 和 Simpson 多样性指数在移栽后发病前、发病初期及发病中期较高,而在移栽前和采收后较低。OTU 数量也呈现同样的变化趋势,其中移栽后发病前 OTU 数量最多,为 1 430 个;而采收后 OTU 数量最少,为 623 个。属

表 3 茎瘤芥根肿病不同发病时期根际土壤真菌群落的多样性指数

取样时期	Shannon 多样性指数	Simpson 多样性指数	OTU/个	属/个
移栽前	2.063	0.781	707	56
移栽后发病前	3.410	0.952	1 430	65
发病初期	3.064	0.910	1 362	76
发病中期	3.057	0.906	1 158	87
采收后	2.407	0.738	623	75

的数量在发病中期最多,移栽前最少。产生这种现象的原因可能是移栽前和采收后没有茎瘤芥植株,根系分泌物少,所以根际土壤真菌的数量也较少。

3 结论与讨论

本试验结果表明,在移栽后发病前、发病初期和发病中期茎瘤芥植株根际土壤真菌群落多样性较高,这3个时期也是根肿病菌侵染茎瘤芥植株和植株发病的时期,亦是茎瘤芥植株生长旺盛时期,根系分泌物较多,如氨基酸、糖类物质,为土壤真菌提供了大量营养,刺激土壤真菌生长。同时,根肿病菌侵染改变了茎瘤芥植株根系形态,造成根系表皮破裂,根系分泌物渗漏(王旭祎等,2002;王芳展等,2012),这为土壤真菌提供了更多营养,造成土壤真菌种群和数量增加。根结线虫侵染植株后致使根系形成根结,症状类似于根肿病,也导致根系分泌物渗漏,从而刺激某些根际土壤微生物数量升高(Tian et al., 2015)。这两种病害改变土壤微生物群落结构的机制可能类似,都是作用于植物根系,造成根系分泌物增加,刺激土壤微生物生长,从而改变土壤微生物群落结构。在移栽前和采收后,田间缺乏寄主植物,土壤养分较少,所以土壤真菌群落的多样性也较低。Cesco等(2012)、Putten等(2013)的研究也表明土壤真菌与植物存在密切关系,植物生长季节根际土壤真菌的多样性相对较高,而非生长季节根际土壤真菌的多样性相对较低。

本试验中,茎瘤芥植株根际土壤优势真菌为子囊菌,其次是担子菌。在其他土壤中,子囊菌和担子菌也是优势真菌类群(Xu et al., 2012; McGuire et al., 2013)。这两类真菌大多为土壤习居菌,依靠分解土壤有机物或植物根系分泌物生活,在维持土壤微生物生态平衡中起着重要作用。此外,某些根际微生物具有促进植物生长、提高植物抗病性等特性(Berendsen et al., 2012)。本试验中发现茎瘤芥植株根际土壤中也存在生防真菌,如肉座菌属在移栽前比例最高,为19.3%,该属包含木霉菌的有形态阶段。木霉(*Trichoderma* spp.)是真菌类群中重要的生防菌,能够抑制多种植物病原菌(Harman, 2006)。Cheah等(2000)从花椰菜根围土壤中分离出3株木霉菌株,能够降低花椰菜根肿病的发病率。此外,毛壳菌属也包含多种生防真菌,如球毛

壳菌(*C. globosum*)对多种土传病原菌具有抑制作用,其抑菌机理是产生抗生素和细胞壁降解酶(Gao & Mendgen, 2006)。油菜内生真菌球毛壳菌能够使油菜根肿病的发病率从76.74%降低到20.00%,其产生的C16鞘氨醇和植物鞘氨醇能够明显降低根肿病菌休眠孢子的萌发率(印容, 2011)。本试验中,毛壳菌属真菌在各个时期土壤中的比例较为稳定,可能具有一定生防功能。

在本试验中,青霉属和被孢霉属的占比也相对较高,其中移栽后发病前和发病中期土壤中被孢霉属真菌比例最高,青霉属在移栽前土壤中的比例也较高,说明这两个属的真菌在茎瘤芥植株根际也占据较高生态位。赵文静等(2014)的研究表明,不同林型土壤中青霉属和被孢霉属也是优势真菌类群。说明这两类真菌可能是土壤中常见的真菌类群,具有一定的生态功能。*Turbineilus*在移栽前和采收后两个时期为优势真菌类群,但是关于该菌的研究较少,其生态功能未明确。由于本试验是针对真菌18S rDNA序列采用454高通量技术进行测序,序列比对和物种分类也是以真菌数据库为主,而根肿病菌划归为粘菌门,其序列并未存在于真菌数据库中,在后期分析时根肿病菌序列并未匹配到相应的比对靶标,因此根肿病菌在土壤中的变化规律并未体现出来,这需要下一步的工作来揭示根肿病菌的变化规律。然而,从根肿病发病阶段来看,根肿病的发生与茎瘤芥生长规律密切相关,而茎瘤芥生长又影响了根际土壤真菌群落结构,本试验结果仅在群落结构上分析了土壤真菌群落的变化规律,下一步将对土壤真菌进行宏转录组分析,在转录水平上揭示土壤真菌在根肿病发病过程中的生态功能。

参考文献

- 黄芸,徐莉,肖崇刚,刘翠平,陈国康. 2014. 根肿菌侵染对茎瘤芥(榨菜)根系玉米素和吲哚乙酸含量的影响. 中国蔬菜, (2): 41-44.
- 罗远莉,殷幼平,裴晓兔,王旭祎,冷蓉,赵守忠,王中康. 2011. 十字花科根肿病致病机理的研究现状与进展 // 郭泽建,侯明生. 中国植物病理学会2011年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社.
- 裴晓兔,王中康,罗远莉,殷幼平. 2013. 茎瘤芥PR4基因的克隆与表达分析. 应用与环境生物学报, 19(6): 974-979.

- 王芳展, 刘亚培, 张梅, 胡帅, 刘振宇, 余小林. 2012. 十字花科作物根肿病的侵染生理与抗性遗传研究进展. 中国油料作物学报, 34 (2): 215–224.
- 王靖, 黄云, 李小兰, 黎怀忠. 2011. 十字花科根肿病研究进展. 植物保护, 37 (6): 153–158.
- 王旭祎, 彭洪江, 肖崇刚. 2002. 茎瘤芥(榨菜)根肿病病原初步鉴定及发病影响因素. 西南农业学报, 15 (4): 75–78.
- 印容. 2011. 球毛壳菌对油菜根肿病拮抗机制的研究〔硕士论文〕. 武汉: 华中农业大学.
- 赵文静, 周明, 孙海, 崔岱宗, 赵敏. 2014. 额尔古纳国家级自然保护区内4种林型土壤真菌的多样性. 东北林业大学学报, 42 (5): 105–109.
- Berendsen R L, Pieterse C M J, Bakker P A H M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science, 17 (8): 478–486.
- Cesco S, Mimmo T, Tonon G, Tomasi N, Pinton R, Terzano R, Nannipieri P. 2012. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A Review Biology and Fertility of Soils, 48 (2): 123–149.
- Cheah L H, Veerakone S, Kent G. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. New Zealand Plant Protection, 53: 18–21.
- Gao K X, Mendgen K. 2006. Seed-transmitted beneficial endophytic *Stagonospora* spp. can penetrate the walls of the root epidermis, but does not proliferate in the cortex of *Phragmites australis*. Canadian Journal of Botany, 84: 981–988.
- Gihring T M, Green S J, Schadt C W. 2012. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. Environmental Microbiology, 14 (2): 285–290.
- Harman G E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology, 96 (2): 190–194.
- Klironomos J N, Kulmatiski A, Schweitzer J A, Suding K N, van de Voorde T F J, Wardle D A. 2013. Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. Journal of Ecology, 101 (2): 265–276.
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H. 2012. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing. Environmental Science & Technology, 46 (11): 5764–5771.
- McGuire K L, Allison S D, Fierer N, Treseder K K. 2013. Ectomycorrhizal-dominated boreal and tropical forests have distinct fungal communities, but analogous spatial patterns across soil horizons. PLoS One, 8 (7): e68278.
- Putten W H, Bardgett R D, Bever J D T, Bezemer M, Casper B B, Fukami T, Kardol P, Tian B Y, Cao Y, Zhang K Q. 2015. Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots. Scientific Reports, 5: 17087.
- Xu L, Ravnskov S, Larsen J, Nilsson R H, Nicolaisen M. 2012. Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. Soil Biology and Biochemistry, 46: 26–32.

High Throughput Analysis on Change Characteristics of Rhizosphere Soil Fungal Community during Different Occurance Times of Tuber Mustard Clubroot Disease

WANG Dian-dong¹, TAN Yong-zhong¹, TIAN Xue-liang², ZHANG Chao¹, QIN Ming-yi¹, PAN Li-mei^{1*}
(¹Yangtze Normal College, Chongqing 408100, China; ²Henan Institute of Science and Technology, Xinxing 453003, Henan, China)

Abstract: Tuber mustard clubroot is a soil-borne disease and closely related with soil fungal community. In this study, the change regulation of soil fungal community during different occurrence times of tuber mustard clubroot (pre-transplanting, premorbid after transplant, early and middle stages of disease occurrence, after harvest) was sequenced by 454 high-throughout method using 18S rDNA sequence of soil fungi as target. The results showed that average of 1 056 OTUs (Operational Taxonomic Units) were obtained from one soil sample. According to taxonomy of each OTU, the dominant group was *Ascomycetes*, followed by *Basidiomycota*. The diversity indexes of Shannon and Simpson, numbers of OTU and genera in premorbid after transplanting, early and middle stages were all higher than that in pre-transplanting stage and after harvesting stage. The results indicated that the diversity of soil fungal community is higher in the period of tuber mustard clubroot development. It might be related to the vigorous production of root exudate of tuber mustard.

Key words: Tumorous stem mustard; Clubroot; Soil fungi; High-throughout sequencing; Diversity index