

## 天麻褐腐病与土壤微生物菌群结构的关联分析

唐鑫<sup>1</sup>, 张进强<sup>1</sup>, 滕力庆<sup>1</sup>, 周涛<sup>1\*</sup>, 袁青松<sup>1</sup>, 江维克<sup>1</sup>, 郭兰萍<sup>2</sup>,  
徐娇<sup>1</sup>, 王晓<sup>3</sup>, 张光文<sup>4</sup>, 潘成<sup>4</sup>

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;  
3. 山东省分析测试中心, 济南 250014; 4. 贵州乌蒙腾菌业有限公司, 贵州大方 551600)

**[摘要]** 目的: 研究褐腐天麻与土壤微生物菌群的组成及变化, 阐述天麻种植过程中天麻褐腐病与土壤微生物菌群之间的关系, 为揭示天麻褐腐病的原因提供理论基础。方法: 采用内转录间隔区(ITS)和16S rDNA高通量测序技术, 分别对健康、褐腐天麻及其周际土壤中真菌和细菌的微生物多样性、群落组成结构、群落结构相似性进行分析。结果: 与健康组相比, 褐腐天麻及其土壤中真菌和细菌分类单元(OTUs)数目均有增加, 且土壤中真菌、细菌丰富度和多样性显著增高, 褐腐天麻真菌多样性显著降低, 细菌多样性显著增高。在属分类水平上, 健康天麻及其周际土壤中的优势真菌属为被孢霉属 *Mortierella*, 该属在褐腐天麻及其土壤中分别减少 7.62% 和 15.75%, 优势细菌属为慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和 *Burkholderia-Paraburkholderia*; 褐腐天麻及其周际土壤中的优势真菌属为土赤壳属 *Ilyonectria*, 优势细菌属分别为沙雷氏菌属 *Serratia* 和慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*。结论: 褐腐天麻与其周际土壤中真菌菌群具有极高相似度, 说明土壤微生物真菌群落变化在一定程度上造成天麻褐腐病的发生, 其中褐腐天麻真菌群落组成中致病真菌土赤壳属 *Ilyonectria* 成为优势菌属, 推测该菌属可能含有天麻褐腐病的致病菌。

**[关键词]** 天麻; 土壤; 微生物多样性; 褐腐病

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0153-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202083

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200911.0938.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-11 15:21

### Association Study Between Rhizoma *Gastrodia elata* Brown-rot and Soil Microbial Communities

TANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Jin-qiang<sup>1</sup>, TENG Li-qing<sup>1</sup>, ZHOU Tao<sup>1\*</sup>, YUAN Qing-song<sup>1</sup>, JIANG Wei-ke<sup>1</sup>,  
GUO Lan-ping<sup>2</sup>, XU Jiao<sup>1</sup>, WANG Xiao<sup>3</sup>, ZHANG Guang-wen<sup>4</sup>, PAN Cheng<sup>4</sup>

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;  
2. National Resource Center for Chinese Meteria Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences,  
Beijing 100700, China; 3. Shandong Analysis and Test Center, Ji'nan 250014, China;  
4. Guizhou Wumeng Teng Fungus Industry Limited Company, Dafang 551600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the microbial community composition and diversity of brown-rot *Gastrodia elata* and its surface soil, in order to explain the relationship between brown-rot *G. elata* and soil microflora in *G. elata* planting process and provide theoretical basis for revealing the reasons of *G. elata* brown-rot disease. **Method:** Used internal transcribed spacer region(ITS) and 16S rDNA high-throughput sequencing

**[收稿日期]** 20200216(019)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81960694); 中央本级重大增减支项目(2060302); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2019]5611号); 贵州省高层次创新型百层次人才项目(黔科合平台人才[2018]5638); 贵州省教育厅创新群体重大研究项目(黔教合KY字[2018]022); 现代农业产业技术体系项目(CARS-21)

**[第一作者]** 唐鑫, 在读硕士, 从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制工作, E-mail: 1793501250@qq.com

**[通信作者]** \*周涛, 博士, 教授, 从事中药资源调查与整理工作, E-mail: taozhou88@163.com

technologies to detect the microbial diversity, community structure composition and community structure similarity of fungi and bacteria in healthy tuber, Brown-rot tuber, healthy soil and Brown-rot soil. **Result:** Compared with health groups, the number of fungi and bacteria operational taxonomic units (OTUs) was increased in brown-rot *G. elata* and its soil, and the abundance and diversity of fungi and bacteria in brown-rot *G. elata* soil were significantly decreased. The diversity of fungi in the tubers of brown-rot *G. elata* was significantly reduced, while the diversity of bacteria was significantly decreased. At the genus level, *Mortierella* was dominant fungi genus in healthy tuber and healthy soil, which was reduced 7.62% and 15.75% respectively in brown-rot tuber and brown-rot soil. And the dominant bacteria genus was *Bradyrhizobium* and *Burkholderia-Paraburkholderia* respectively. *Ilyonectria* was dominant fungi genus in brown-rot tuber and brown-rot soil, the dominant bacteria genus was *Serratia* and *Bradyrhizobium* respectively. **Conclusion:** The fungal flora in the tuber of brown-rot *G. elata* had a very high degree of similarity to that in the surrounding soil. These results indicated that the change of soil microbial fungal community caused the occurrence of *G. elata* brown-rot disease to a certain extent. And the pathogenic fungal *Ilyonectria* was dominant genus in fungi community of brown-rot tuber and brown-rot soil. *Ilyonectria* may have the main *G. elata* brown-rot disease pathogen.

[Key words] *Gastrodia elata*; soil; microbial diversity; brown-rot

天麻 *Gastrodia elata* 为兰科多年生异养型植物,其干燥块茎具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效,用于治疗小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等病症<sup>[1]</sup>,俗称“治风之神药”。天麻栽培品种主要有红天麻、乌天麻、乌红杂交天麻,其中乌天麻品质高、口感好,备受青睐。但乌天麻抗病性较差,每年有近20%的乌天麻因遭受病原菌侵染而腐烂,腐烂病害已成为限制乌天麻发展的主要因素之一。天麻的病害有黑腐病、褐腐病、锈腐病、黑斑病、软腐病等<sup>[2]</sup>。褐腐病是天麻腐烂病害中最为常见的一种,症状表现为块茎腐烂,皮部萎黄,初期表面呈灰褐色,有中部下陷的圆形病斑,切开块茎内部腐烂,病斑为多个愈合不规则褐色大斑块,手捏有白色乳浆状物,严重者病害组织全腐烂成液状<sup>[3]</sup>。因此,重视天麻褐腐病,探究其致病原因,对减少天麻病害,保障天麻产量和质量有着重要意义。

植物的生长环境在其病害的发生及发展中起到关键作用,尤其是土壤微生物多样性程度对维持植物的健康至关重要<sup>[4]</sup>。如果土壤微生物环境遭到破坏,常会导致植物内生菌群结构的紊乱,从而引发病害。然而,天麻褐腐病与土壤微生物菌群结构之间的关系尚不清楚,本实验对患褐腐病的天麻及其周际土壤微生物菌群进行研究,探索天麻种植过程中天麻褐腐病与土壤微生物菌群之间的关系,为防治天麻褐腐病提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 健康、褐腐天麻及其周际土壤样品的收集

2018年12月于贵州乌蒙藤菌业有限公司天麻种植基地(海拔1781 m, 105°55'16"E, 27°13'47"N)采集样本。随机选取3个采样点,在每个采样点挖取的天麻中随机选择5窝健康天麻(分别编号为HT1-1, HT1-2, HT1-3, HT1-4, HT1-5; HT2-1, HT2-2, HT2-3, HT2-4, HT2-5; HT3-1, HT3-2, HT3-3, HT3-4, HT3-5)和5窝褐腐天麻(分别编号为BT1-1, BT1-2, BT1-3, BT1-4, BT1-5; BT2-1, BT2-2, BT2-3, BT2-4, BT2-5; BT3-1, BT3-2, BT3-3, BT3-4, BT3-5)。本实验共采集了15窝健康天麻样本和15窝褐腐天麻样本,将每窝天麻分别收集于样本袋中,并做好标记。并采集上述15窝健康天麻的周际土壤(分别编号为HS1-1, HS1-2, HS1-3, HS1-4, HS1-5; HS2-1, HS2-2, HS2-3, HS2-4, HS2-5; HS3-1, HS3-2, HS3-3, HS3-4, HS3-5)和15窝褐腐天麻的周际土壤(分别编号为BS1-1, BS1-2, BS1-3, BS1-4, BS1-5; BS2-1, BS2-2, BS2-3, BS2-4, BS2-5; BS3-1, BS3-2, BS3-3, BS3-4, BS3-5)。土壤采集时,分别将天麻块茎、蜜环菌菌索周边的土壤小心去除,采集其周边厚度约5 mm的土壤作为样品,做好标记,确保土壤样本与天麻样本一一对应。

**1.1.2 主要仪器与试剂** 9700型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI Gene Amp<sup>®</sup>); E. Z. N. A. <sup>®</sup> soil DNA Kit试剂盒(美国Omega Bio-tek, Norcross GA)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 样品处理及总DNA提取** 天麻样本处理及总DNA提取:分别从每窝天麻中选取1个约100 g

的天麻作为检测样本,所选的天麻在形态大小上大致保持一致,褐腐天麻的样本至少有1/2被感染。用自来水将天麻表面的土壤冲洗干净,并用75%乙醇冲洗5遍,后用纯水清洗3~4次。将清洗干净的天麻置于超净工作台中,用无菌的刀片从中间横切,褐腐天麻从病健交界处切取一片0.1 g的薄片,健康天麻从相同位置采集0.1 g的薄片。同一采样点采集的5个样本混合,采集到一个离心管中,保证每个采样点共有0.5 g的混合样本,3个采集地的15份样本混合后每组获得3份健康天麻混合样本(分别编号为HT1,HT2,HT3)及3份褐腐天麻样本(分别编号为BT1,BT2,BT3),用于后续的总DNA的提取扩增及测序。天麻样品按照E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA Kit试剂盒操作步骤进行样本总DNA提取,利用NanoDrop2000超微量分光光度计及1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度和纯度后,进行16S rDNA和ITS扩增。

土壤样本处理及总DNA提取:在超净工作台中去除土壤样本中的石头、动植物残体等杂质,过2 mm网筛,并分别将同一个采样点的5个土壤样本混合,搅拌均匀,称取混合土壤样本0.5 g,3个采集地的15份样本混合后每组获得3份健康天麻周际土壤混合样本(分别编号为HS1,HS2,HS3)及3份褐腐天麻周际土壤样本(分别编号为BS1,BS2,BS3),用于后续的总DNA的提取扩增及测序。按照E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA Kit试剂盒操作步骤进行土壤样本总DNA提取,利用NanoDrop2000超微量分光光度计及1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的浓度和纯度后,进行16S rDNA和ITS扩增。

**1.2.2 基因扩增及高通量测序** 采用引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌16S rDNA基因的V3-V4区域进行扩增,并使用引物ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对真菌DNA基因的ITS区域进行扩增。细菌的PCR采用反应体系20  $\mu$ L,包括5 $\times$ FastPfu Buffer 4  $\mu$ L,2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs 2  $\mu$ L,338F/806R(浓度5  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.8  $\mu$ L, FastPfu 聚合酶 0.4  $\mu$ L, BSA 0.2  $\mu$ L, DNA模板 10 ng, 无菌超纯水补充至20  $\mu$ L。真菌PCR采用反应体系20  $\mu$ L,包括10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L,2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs 2  $\mu$ L,ITS1F/ITS2R(浓度5  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.8  $\mu$ L, rTaq 聚合酶 0.2  $\mu$ L, BSA 0.2  $\mu$ L, DNA模板 10 ng, 无菌超纯水补充至20  $\mu$ L。

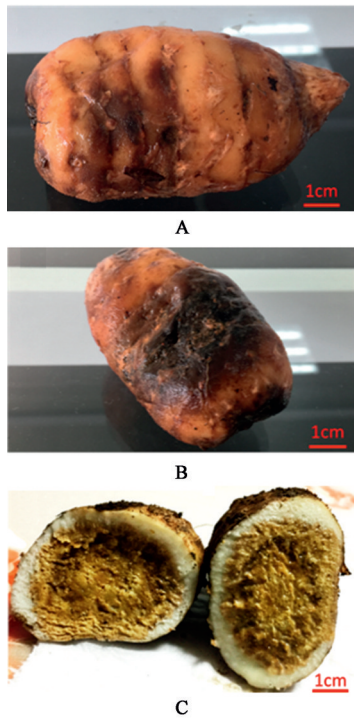
整个过程在PCR仪中进行,程序如下,95  $^{\circ}$ C下预变性3 min;95  $^{\circ}$ C下变性30 s,55  $^{\circ}$ C下退火30 s,72  $^{\circ}$ C下延伸45 s,真菌扩增35个循环,细菌扩增27个循环;72  $^{\circ}$ C后延伸10 min。2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。高通量测序文库的构建和基于Illumina MiSeq平台的测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

**1.2.3 数据分析** MiSeq测序得到的是双端序列数据,采用FLASH与Trimmomatic对双端序列进行拼接、质控,过滤reads尾部质量值20以下的碱基,去除含N碱基的reads。经过质量过滤,去除嵌合体序列,最终得到的序列用于OTU分析<sup>[5]</sup>。利用USEARCH(v7.0)按照97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行OTU聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到OTU的代表序列。采用RDP classifier贝叶斯算法对OTU代表序列进行分类学分析。基于OTU的结果计算菌群多样性,菌群多样性指数采用Ace指数,Shannon指数,Simpson指数,Chao指数,Coverage指数,其中Ace指数,Chao指数反映群落的丰富度,指数越高表示群落物种越丰富;Shannon指数,Simpson指数反映群落多样性,Shannon指数越高表示群落物种多样性越高,而Simpson指数越低表示群落物种多样性越高<sup>[6]</sup>;Coverage指数反映群落覆盖度。结合使用R语言等相关软件对样品进行维恩图、群落结构组分图等相关分析。本文的数据结果分析均取用各组3批样本所测得结果的平均值。

## 2 结果与分析

**2.1 微生物群落多样性分析** 真菌测序分析结果显示,健康、褐腐天麻及其周际土壤中有效序列数目分别为128 583,63 924,121 173,197 658条,对各组样品进行OTU种类进行统计,分别有970,414,1 475,1 927种。细菌中各组样品有效序列数目分别为103 176,64 824,61 914,83 625条,OTU种类分别有1 567,1 534,1 694,2 256种。上述结果表明,褐腐天麻及其周际土壤中真菌、细菌的OTU数目和种类与健康天麻相比均明显增多。褐腐天麻照片见图1。

土壤微生物多样性分析结果显示,褐腐天麻周际土壤中真菌、细菌的Ace,Shannon,Chao指数与健康天麻周际土壤相比明显增多,见表1,2。表明天麻发生褐腐病后土壤的真菌、细菌丰富度和多样性显著增高。与健康天麻相比,褐腐天麻中真菌的Shannon指数和Chao指数显著降低,见表3;而细菌



A. 轻度褐腐病害天麻样本; B. 重度褐腐病害天麻样本; C. 重度褐腐病害天麻横切面

图1 患褐腐病的天麻样本

Fig. 1 Simple of brown-rot *Gastrodia elata*'s tubers

表1 健康、褐腐天麻周际土壤真菌群落多样性指数分析 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Analysis of tuber surface soil fungus community diversity in healthy and brown-rot *Gastrodia elata* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品名	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage/%
健康天麻周际土壤	1 247.50±24.65 <sup>b</sup>	1 236.90±31.10 <sup>b</sup>	4.772 1±0.063 9 <sup>b</sup>	0.025 3±0.001 2 <sup>a</sup>	99.5
褐腐天麻周际土壤	1 586.60±37.56 <sup>a</sup>	1 575.40±54.11 <sup>a</sup>	4.987 1±0.048 5 <sup>a</sup>	0.022 0±0.001 7 <sup>a</sup>	99.6

注:同一列不同小写字母表示同一指标具有显著差异;n表示测定样本数(同一采样点采集的5个样本混合,n=3表示3个采集地的15个样本混合后每组获得3份健康天麻周际土壤混合样本和3份褐腐天麻周际土壤样本(表2~4同))。

表2 健康、褐腐天麻周际土壤细菌群落多样性指数分析 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Analysis of tuber surface soil bacteria community diversity in healthy and brown-rot *Gastrodia elata* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品名	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage/%
健康天麻周际土壤	1 599.70±40.78 <sup>b</sup>	1 633.50±48.72 <sup>b</sup>	5.870 3±0.071 5 <sup>b</sup>	0.009 3±0.001 1a	98.4
褐腐天麻周际土壤	2 141.40±63.03 <sup>a</sup>	2 162.50±86.20 <sup>a</sup>	6.258 2±0.194 3 <sup>a</sup>	0.006 9±0.003 1 <sup>a</sup>	97.8

表3 健康、褐腐天麻真菌群落多样性指数分析 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Analysis of tuber fungus community diversity in healthy and brown-rot *Gastrodia elata* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品名	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage/%
健康天麻	594.20±45.88 <sup>a</sup>	596.21±54.27 <sup>a</sup>	3.604 4±0.459 2 <sup>a</sup>	0.080 8±0.031 3 <sup>b</sup>	99.7
褐腐天麻	493.60±123.26 <sup>a</sup>	457.48±2.66 <sup>b</sup>	2.008 7±0.007 3 <sup>b</sup>	0.272 4±0.012 1 <sup>a</sup>	99.7

表4 健康、褐腐天麻细菌群落多样性指数分析 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

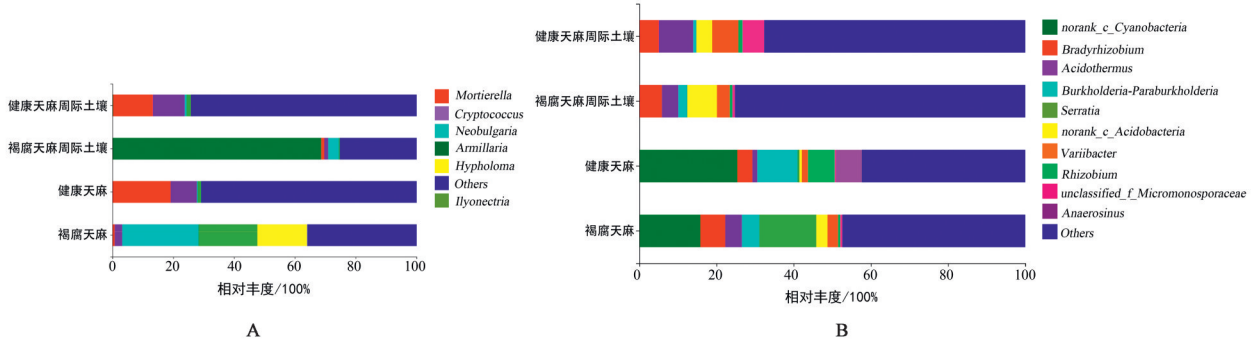
Table 4 Analysis of tuber bacteria community diversity in healthy and brown-rot *Gastrodia elata* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品名	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage/%
健康天麻	1 258.10±48.06 <sup>b</sup>	1 273.00±63.88 <sup>a</sup>	3.792 8±0.246 5 <sup>b</sup>	0.119 9±0.079 9 <sup>a</sup>	98.5
褐腐天麻	1 468.80±80.84 <sup>a</sup>	1 467.30±128.91 <sup>a</sup>	4.548 5±0.002 9 <sup>a</sup>	0.082 1±0.033 4 <sup>a</sup>	98.3

的 Ace 指数和 Shannon 指数显著增加,见表4。表明褐腐天麻中真菌的丰富度及多样性降低,而细菌的丰富度及多样性增加。4组样本中 Coverage 指数都接近 100%,表示样本序列中未被测出的概率低,在该水平上的测序结果能够反映出所测样本中真菌、细菌的真实情况。

2.2 微生物群落结构组成分析 微生物群落组成水平的分析结果见图2,健康天麻周际土壤中的优势真菌属为被孢霉属 *Mortierella*, 占比为 20.60%, 优势细菌属为慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*, 占比 3.88%;褐腐天麻周际土壤中的优势真菌属为被孢霉属 *Mortierella* 和隐球菌属 *Cryptococcus*, 占比分别为 12.98% 和 10.49%, 优势细菌属为慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium*, 占比 5.84%;健康天麻中的优势真菌属为被孢霉属 *Mortierella* 和隐球菌属 *Cryptococcus*, 占比分别为 16.49% 和 8.21%, 优势细菌属为 *Burkholderia-Paraburkholderia*, 占比为 10.40%, 其次为根瘤菌属 *Rhizobium* 与 *Anaerobaculum*, 占比分别为 6.93%, 6.72%;褐腐天麻中的优势真菌属为 *Neobulgaria*, 土赤壳属 *Ilyonectria*, 花边伞属

*Hypoholoma*, 占比分别为 24.45%, 19.86%, 16.83%, 优势细菌属为沙雷氏菌属 *Serratia*, 占比 14.74%。



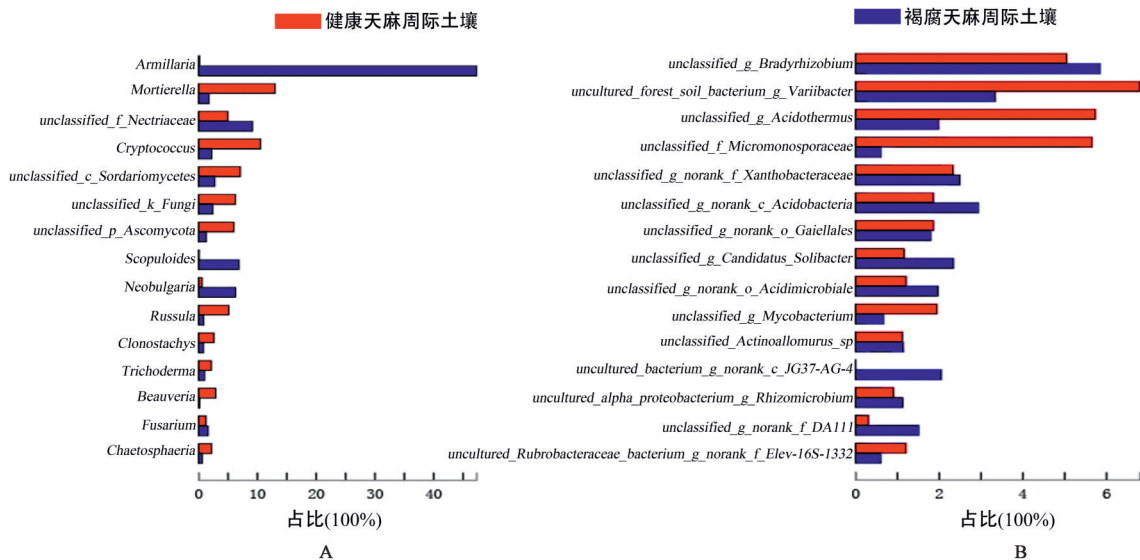
A. 真菌群落属水平的组成; B. 细菌群落属水平的组成

图2 健康、褐腐天麻及其周际土壤微生物群落组成

Fig. 2 Varieties of tuber and surface soil fungus community composition in healthy and brown-rot *Gastrodia elata*

微生物群落属水平的差异性分析结果见图3, 4。与正常天麻相比, 褐腐天麻周际土壤中被孢霉属 *Mortierella* 和隐球菌属 *Cryptococcus* 真菌分别减少和增加了 7.62%, 3.12%, 土赤壳属 *Ilyonectria*, 紫螺菌属 *Neobulgaria* 真菌分别增加 0.19%, 0.5%; 此外, *Burkholderia-Paraburkholderia* 细菌增加 1.49%; 褐腐天麻中紫螺菌属 *Neobulgaria*, 土赤壳属

*lyonectria*, 花边伞属 *Hypoholoma* 真菌分别增加 24.19%, 18.77%, 16.83%, 被孢霉属 *Mortierella*, 隐球菌属 *Cryptococcus* 真菌分别减少 15.75%, 5.68%。此外, 沙雷氏菌属 *Serratia* 细菌增加 14.25%, *Burkholderia-Paraburkholderia*, 根瘤菌属 *Rhizobium*, *Anaerosinus* 细菌分别减少 5.90%, 6.31%, 6.71%。



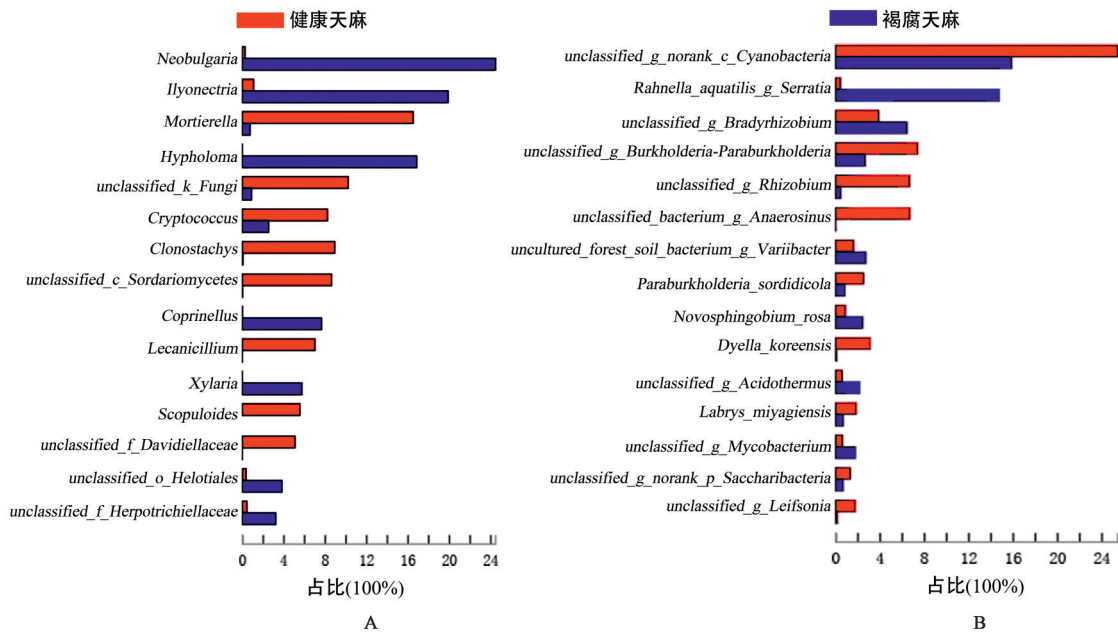
A. 天麻周际土壤真菌群落组成在属水平的差异; B. 天麻周际土壤细菌群落组成在属水平的差异

图3 健康、褐腐天麻周际土壤真菌和细菌群落组成差异

Fig. 3 Difference of bacteria and fungi community composition in surface soil of healthy and brown-rot *Gastrodia elata*

**2.3 微生物结构相似性分析** 健康、褐腐天麻及其周际土壤中分别有 289, 137, 300, 369 种真菌, 670, 784, 631, 892 种细菌。健康天麻的块茎与其周际土壤共有的真菌为 186 种, 细菌 565 种, 超过总土壤微生物种类一半, 表明在正常情况下, 土壤微生物菌群能够调控天麻内生微生物的菌群结构; 与健康天麻周际土壤相比, 褐腐天麻的周际土壤中新增了 8

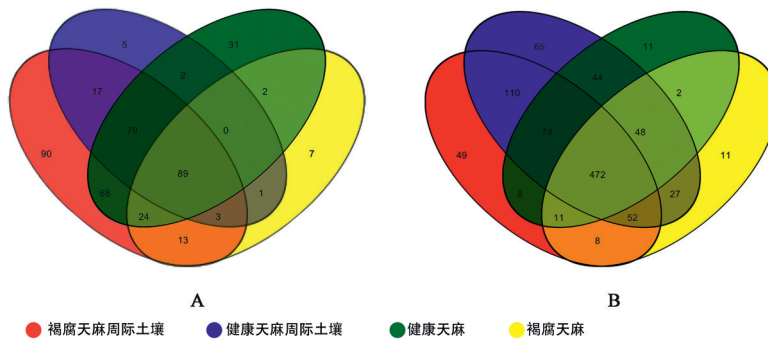
种真菌及 184 种细菌, 其中 1 种真菌及 75 种细菌在褐腐天麻中被发现; 褐腐天麻比健康天麻新增了 18 种真菌及 98 种细菌, 其中 4 种真菌及 120 种细菌均来自周际土壤, 表明天麻褐腐病的发生与其周际土壤微生物之间有着密切的联系。此外, 在褐腐天麻中发现特有真菌 7 种, 细菌 11 种; 周际土壤中发现特有的真菌 90 种, 细菌 65 种。见图 5。



A. 天麻真菌群落组成在属水平的差异; B. 天麻细菌群落组成在属水平的差异

图4 健康、褐腐天麻真菌和细菌群落组成差异

Fig. 4 Difference of bacteria and fungi community composition in tuber of healthy and brown-rot *Gastrodia elata*



A. 真菌种水平的 Venn 分析; B. 细菌种水平的 Venn 分析

图5 健康、褐腐天麻及其周际土壤微生物群落种类 Venn

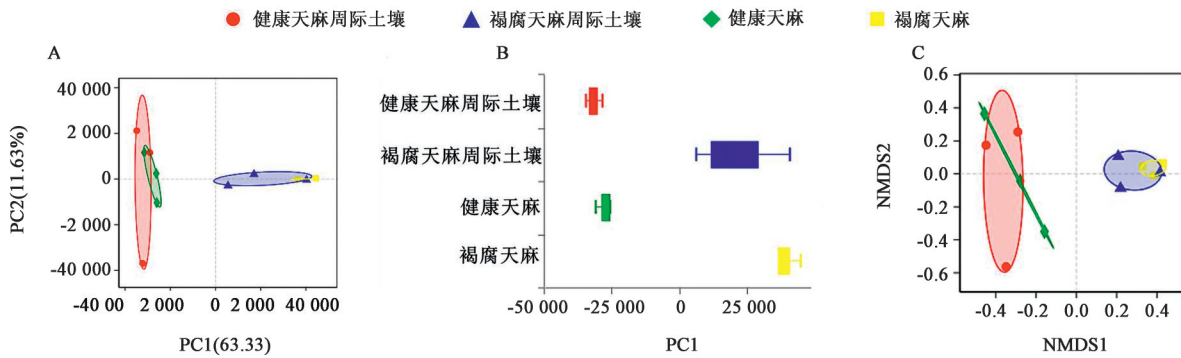
Fig. 5 Venn diagram analysis of healthy and brown-rot *Gastrodia elata*'s soils and tubers microbial species composition

相似度分析结果见图6,7,褐腐天麻及其周际土壤真菌菌群在种水平上与健康天麻的菌群差异较大,而健康、褐腐天麻中的细菌菌群在种水平上与周际土壤的菌群差异较小。此外,健康、褐腐天麻真菌菌群与其周际土壤中的菌群相似度极高。表明天麻褐腐病的发生及发展与其周际土壤真菌群落结构的变化有关。

### 3 讨论与结论

褐腐病是天麻典型土传病害,本文通过对健康、患褐腐病的天麻及其周际土壤进行微生物多样性分析,结果表明健康天麻及其土壤的优势真菌菌属为被孢霉属 *Mortierella*,而在天麻患褐腐病后的土壤和天麻中该菌属占比均减少,与LIU等<sup>[7]</sup>研究

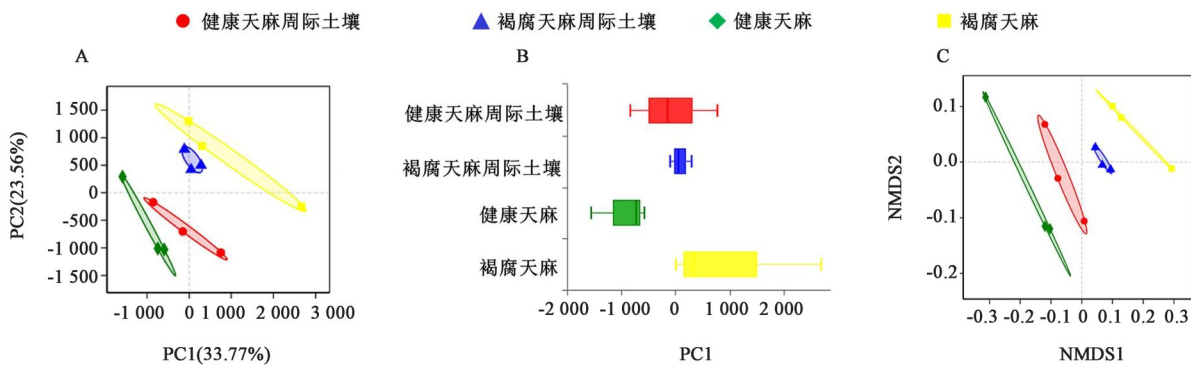
结果一致,被孢霉属 *Mortierella* 在健康人参根中广泛存在,对促进人参根健康具有重要作用;被孢霉属 *Mortierella* 在抑制土源性病原菌、辅助植物对磷的吸收,以及保持植物健康方面占着重要的角色<sup>[8]</sup>。此外,本研究在褐腐天麻及其土壤中发现担子菌门的变化最为明显,其中花边伞属 *Hypholoma* 与土赤壳属 *Ilyonectria* 占比均显著增加,推测可能是担子菌门真菌增多导致种植天麻过程中土壤微生物多样性平衡失衡,被孢霉属 *Mortierella* 减少,病原真菌趁机侵染天麻,导致天麻病害。土赤壳属 *Ilyonectria* 广泛分布于木本和草本植物的根内以及土壤中<sup>[9]</sup>,该属大多数种类为植物病原菌,可引起植物根腐病和黑腐病等,如可引起高丽参锈腐病<sup>[7]</sup>、三



A. 真菌群落在种水平上的PCA分析;B. 真菌群落在PCA分析时在PC1轴的分布;C. 真菌群落在种水平上的NMDS分析, stress=0.081

图6 健康、褐腐天麻及其周际土壤真菌群落相似度分析

Fig. 6 Similarity analysis of fungus community composition in tuber and surface soil of healthy and brown-rot *Gastrodia elata*



A. 细菌群落在种水平上的PCA分析;B. 细菌群落在PCA分析时在PC1轴的分布;C. 细菌群落在种水平上的NMDS分析, stress=0.051

图7 健康、褐腐天麻及其周际土壤细菌群落相似度分析

Fig. 7 Similarity analysis of bacteria community composition in tuber and surface soil of healthy and brown-rot *Gastrodia elata*

七锈斑病<sup>[10]</sup>和葡萄根黑腐病<sup>[11]</sup>。白滨等<sup>[12]</sup>通过收集患病百合鳞茎进行病原真菌分离,其中土赤壳属 *Ilyonectria* 的分离频率达到 46.86%,并在该属的 3 个菌株对百合的致病性进行了确认。本研究发现患褐腐病的天麻中土赤壳属 *Ilyonectria* 占比大,推测该属可能含有天麻褐腐病的致病菌。

相似度分析结果显示,褐腐天麻中的真菌菌群与其周际土壤中的菌群相似度较高,表明天麻褐腐病的发生及发展与其周际土壤真菌群落结构的变化有关,天麻内生真菌有很大一部分来自于土壤,在正常情况下,天麻内外能够维持在一个相对稳定的状态,当土壤或天麻中的微生物菌群发生大幅改变时,便会破坏天麻及土壤间的微生物稳态,从而导致天麻病害的发生。土赤壳属 *Ilyonectria* 是一类腐生真菌或弱寄生真菌,一般潜伏在菌材、土壤或者种麻中,条件适宜随时可在寄主上开始营腐生生活,活力增强,进而侵染天麻引起发病<sup>[13]</sup>。此外,随着天麻种植区域的集中及种植年限的延长,土壤微生物群落结构改变,且土壤中有病麻残体可作为病

害菌的侵染对象,此时的土壤环境更适宜病害菌的生存<sup>[14]</sup>。因此建议栽培天麻采用轮作,修复土壤微生物群落结构;种植天麻前对土壤进行严格的杀菌消毒,挑选优质新鲜无菌的菌材,不能使用旧菌材,以及选用无机械损伤、无杂菌的种麻等可能有助于减轻天麻褐腐病的发生。刘欣然<sup>[15]</sup>提出 10% 苯醚甲环唑 WG 对人参锈腐病病原菌包含土赤壳属真菌的孢子萌发和菌丝生长抑制效果明显,可借鉴此方法对种植天麻的土壤及菌材进行杀菌,抑制土赤壳属真菌的生长繁殖,同时应首先检验该药物是否对天麻伴生菌具有毒害作用。

综上所述,通过本文的研究分析,得出土壤真菌群落结构的变化与天麻患褐腐病密切相关,其中变化明显的植物病害相关属是土赤壳属 *Ilyonectria*。本文结果对揭示天麻遭受褐腐病的原因,并为后续防治天麻褐腐病提供理论依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:58.

- [ 2 ] 梁玉芳. 宁蒗县天麻主要病害及防治措施[J]. 云南农业, 2016(8):37-38.
- [ 3 ] 曾令祥, 袁洁, 李德友, 等. 贵州地道中药材天麻 GAP 基地病虫害种类调查及综合防治[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(4):86-88.
- [ 4 ] LIU Y Q, WU L, WU X W, et al. Analysis of microbial diversity in soil under ginger cultivation [J]. Scientifica, 2017, 2017:1-4.
- [ 5 ] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods, 2013, 10(10):996-998.
- [ 6 ] 李金融, 侯湖平, 王琛, 等. 基于高通量测序的复垦土壤细菌多样性研究[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(12):148-157.
- [ 7 ] LIU D F, SUN H J, MA H W. Deciphering microbiome related to rusty roots of *Panax ginseng* and evaluation of antagonists against pathogenic *Ilyonectria* [J]. Frontiers Microbiol, 2019, 10:1350.
- [ 8 ] MIAO C P, MI Q L, QIAO X G, et al. Rhizospheric fungi of *Panax notoginseng*: diversity and antagonism to host phytopathogens [J]. J Ginseng Res, 2016, 40(2):127-134.
- [ 9 ] 王玉君, 张丽春, 郭顺星. 土赤壳属三个中国新记录种[J]. 菌物学报, 2015, 34(6):1209-1214.
- [ 10 ] ZHU B, WANG S, MI C Y, et al. Genome sequence resource for *Ilyonectria mors-panacis*, causing rusty root rot of *Panax notoginseng* [J]. Mol Plant Microbe In: MPMI, 2019, 32(11):1468-1471.
- [ 11 ] MARTÍNEZ-DIZ M P, DÍAZ-LOSADA E, ARMENGOL J, et al. First report of *Ilyonectria robusta* causing black foot disease of grapevine in Spain [J]. Plant Dis, 2018, 102:2381.
- [ 12 ] 白滨, 何苏琴, 于安芬, 等. 兰州百合褐腐病罹病根和根盘及鳞片分出的真菌和卵菌[J]. 甘肃农业科技, 2018(1):16-20, 95.
- [ 13 ] 余昌俊, 王绍柏, 刘雪梅. 三峡地区天麻主要病害无公害防控技术[J]. 中国食用菌, 2009, 28(6):53-55.
- [ 14 ] 吴丽伟. 天麻、蜜环菌化感现象及天麻连作障碍原因探讨[D]. 北京:中国协和医科大学, 2009.
- [ 15 ] 刘欣然. 东北地区人参锈腐病菌分子鉴定及药剂筛选[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2019.

[责任编辑 顾雪竹]