

## 枯萎病对菊花根际土壤微生物群落结构的影响

陈巧环<sup>1</sup>, 苗玉焕<sup>1</sup>, 王铁霖<sup>2</sup>, 郭兰萍<sup>1,2</sup>, 刘大会<sup>1\*</sup>

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探究患枯萎病菊花与健康菊花根际土壤微生物群落的差异。方法:以患病菊花植株和健康菊花植株根际土壤为研究材料,采用高通量测序技术对患病植株和健康植株样本的细菌16S rDNA和真菌内部转录间隔区(ITS)基因进行序列测定并进行数据分析。结果:枯萎病的发生降低了菊花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 $\alpha$ -多样性无明显影响。菊花健康植株根际土壤细菌微生物中酸杆菌门、芽单胞菌门、硝化螺旋菌门占比高于患病植株,而变形菌门、拟杆菌门占比低于患病植株( $P<0.05$ )。菊花患病植株根际土壤中镰刀菌属(*Fusarium*)真菌占比分别为27.49%、14.53%、11.94%,而健康植株镰刀菌属真菌占比分别为0.47%、1.01%、0.67%。菊花患病植株根际土壤中会出现细菌性致病菌果胶杆菌属(*Pectobacterium*)和菊迪基氏菌属(*Dickeya*),而健康植株根际土壤中硝化类细菌、解毒类细菌、光合细菌等丰度高于患病植株。结论:患有枯萎病地块菊花植株根际土壤微生物中细菌的物种多样性和丰富度降低,并大量富集镰刀菌属致病真菌和积累果胶杆菌属与菊迪基氏菌属致病细菌,而健康菊花植株根际土壤微生物有益菌占比明显高于患病植株。

**[关键词]** 菊花; 枯萎病; 根际土壤; 微生物群落; 高通量测序

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0180-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210713

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210326.1446.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-3-29 10:08

### *Fusarium* Wilt Changes Microbial Community Structure in Rhizosphere Soil of *Chrysanthemum morifolium*

CHEN Qiao-huan<sup>1</sup>, MIAO Yu-huan<sup>1</sup>, WANG Tie-lin<sup>2</sup>, GUO Lan-ping<sup>1,2</sup>, LIU Da-hui<sup>1\*</sup>

(1. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the differences in rhizosphere microbial community structure between *Fusarium* wilt-infected and healthy *Chrysanthemum morifolium* plants. **Method:** The rhizosphere soils of diseased and healthy *C. morifolium* plants were sampled and subjected to high-throughput 16S ribosomal DNA (rDNA) and internal transcribed spacer (ITS) sequencing, to identify the microbial community structure including bacteria and fungi. **Result:** *Fusarium* wilt reduced the bacterial abundance and diversity but had no significant effect on fungal alpha-diversity. The proportions of Acidobacteria, Gemmatimonadetes, and Nitrospirae in rhizosphere soil of healthy *C. morifolium* plants were higher than those of diseased plants, while the proportions of Proteobacteria and Bacteroidetes were lower ( $P<0.05$ ). *Fusarium* fungi accounted for 27.49%, 14.53%, and 11.94% in diseased plants whereas 0.47%, 1.01%, and 0.67% in healthy plants. Pathogenic bacteria *Pectobacterium* and *Dickeya* were enriched in rhizosphere soil of diseased plants. The abundances of nitrifying,

**[收稿日期]** 20210216(013)

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2017YFC1700704,2018YFD0201107);中央本级重大增减支项目(2060302);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21)

**[第一作者]** 陈巧环,在读硕士,从事中药的品种、质量及资源开发研究,E-mail:1297716454@qq.com

**[通信作者]** \*刘大会,教授,博士生导师,从事中药资源品质评价与开发研究,Tel:027-68890106,E-mail:liudahui@hbtc.edu.cn

detoxifying, and photosynthetic bacteria in rhizosphere soil of healthy plants were higher than those of diseased plants. **Conclusion:** *Fusarium* wilt reduces the bacterial richness and diversity and triggers the enrichment of massive *Fusarium* fungi, *Pectobacterium*, and *Dickeya*. The proportion of beneficial bacteria in rhizosphere soil of healthy plants is significantly higher than that of diseased plants.

**[Key words]** *Chrysanthemum morifolium*; *Fusarium* wilt; rhizosphere soil; microbial community; high-throughput sequencing

菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* 的干燥头状花序,为我国药食同源中药材,具有散风清热,平肝明目,清热解毒的功效,用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花、疮痈肿毒<sup>[1]</sup>。现代药理研究发现,菊花及其有效成分具有抗肿瘤、调血脂、抑菌、镇痛、免疫调节、抗疲劳等多种药理作用<sup>[2]</sup>。当前中药材农药残留问题越来越受到行业关注,2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)已明确要求植物类中药材禁用33种农药。中药材种植生产上病虫害频发,是导致中药材农药残留超标的关键因素。我国菊花种植上存在着枯萎病、白绢病、黑斑病、炭疽病、病毒病、蚜虫等病虫害问题,导致菊花药材存在着农药残留超标的风险。湖北大别山区的麻城具有悠久的菊花种植历史,其种植规模达600万m<sup>2</sup>,是我国药用菊花的主要产区之一。近年来麻城菊花种植上7—9月的枯萎病发病较为严重,发病植株常表现为植株根系死亡,皮层腐烂脱落,木质部完全变为黑色,呈纤维状,严重时整株枯死,植株易拔出。多数田块出现整片植株死亡的现象,发病率甚至高达100%,严重影响菊花产量与农民的经济收益。笔者从患枯萎病植株中筛出尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌和少部分其他镰刀菌。该属病菌在带病秧苗、土壤和病残体中越冬,成为次年的初侵染源,可在土壤中存活8~20年<sup>[3]</sup>,且传播速度快,在生产上造成很大的损失。麻城菊花常年采用单一化、集约化种植模式,随着种植年限的增加,田间病原菌数量也持续累加,导致病害进一步加重,使得种植户不得不放弃一些重病区的地块,并造成麻城菊花种植面积逐年萎缩,严重威胁麻城菊花产业的可持续发展。现生产上菊花病害多以化学防治为主,但该方法常常造成菊花农药残留超标且成效欠佳;有研究表明采用农业措施和生物措施能够有效防控土传病害的流行发生,如增施生物有机肥<sup>[4-5]</sup>与生防制剂<sup>[6-8]</sup>可通过改善土壤微生物生态以控制土传病害的传播与蔓延。

药用植物根际土壤微生物群落结构组成与土壤健康状况有密切联系,对药用植物的生长发育、

产量、质量和抗逆能力等有重要影响。土壤传播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环境<sup>[9]</sup>。而镰刀菌属(*Fusarium*)真菌是重要植物病原菌,已引起三七<sup>[10]</sup>、白术<sup>[11]</sup>、人参<sup>[12]</sup>等药用植物根腐病,其引起的土传性病害在生产上往往难以防控,严重影响作物产量和品质。根际微生物组成既可以通过有害病原微生物的积累而导致植株的大量死亡<sup>[13]</sup>,也可以通过有益微生物的养分竞争、拮抗作用和诱导系统抗性机制抑制土壤中病原菌,进而促进植物生长<sup>[14]</sup>。本研究以爆发枯萎病菊花和健康植株的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分析菊花病株和健康植株根际土壤细菌和真菌物种组成、群落结构及多样性,从而揭示菊花枯萎病发生的根际土壤微生物多样性的差异及变化规律,为菊花枯萎病的综合防治提供参考。

## 1 材料

研究区位于湖北省麻城市,地理位置坐标N31°17'16",E115°03'02",海拔66m,大陆湿润性季风气候,年平均气温13~16℃,月平均最高气温7月25.9~28.2℃,年平均日照时数1634~2229h,年平均降水量在1112.2~1688.7mm,全年无霜期237d。

Inolab7310型台式pH计(德国WTW公司);SE1501FZH型电子天平(奥豪斯仪器有限公司);Milli-Q系列超纯水机(德国默克公司);FLx800型荧光分析仪(美国BioTek);DNA凝胶回收试剂盒(美国AXYGEN公司);Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(美国Thermo Fisher Scientific公司);Q5高保真DNA聚合酶(美国NEB公司);High Sensitivity DNA Kit(美国Agilent公司);TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit, MiSeq Reagent Kit V3(600 cycles)(美国Illumina公司);磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氢氧化钠、浓盐酸(均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

## 2 方法

**2.1 根际土壤样品采集与处理** 于2019年7月在研究区进行采样,采用多点采样法取样,在试验田的发病地块(发病率100%)随机选取6个采样点进行患病植株的采集,健康地块(发病率0%)随机选取6个采样点进行健康植株的采集,且健康地块与发病地块相邻。将去除大块土壤的菊花植株根收集于50 mL无菌管中,置于冰上运输至实验室。晃动根部,去除根部松散的土壤后,用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)缓冲液洗下残留根部土壤并进行收集;然后将各处理的2株菊花的根际土壤混匀作为一份样,最终形成3组重复,枯萎病菊花根际土壤编号为A1, A2, A3,健康菊花根际土壤编号B1, B2, B3。样品采用液氮速冻,置于-80℃冰箱保存。

**2.2 土壤微生物高通量测序** 样品送于上海派森诺生物科技股份有限公司进行高通量测序。基于16S rDNA序列和内转录间隔区(ITS)序列对土壤中细菌和真菌进行聚合酶链式反应(PCR)扩增和产物纯化、定量和均一化构建文库并在Agilent Bioanalyzer上进行质检,质检合格的文库用Illumina HiSeq 2500进行测序。为了整合原始双端测序数据,首先采用滑动窗口法对FASTQ格式的双端序列逐一作质量筛查。随后,利用FLASH软件,对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接。根据聚类分析序列之间的相似性分为多个操作分类单元(OTUs),序列相似性阈值设为97%,将物种OTUs进行聚类和生物信息统计分析。对于不同类别的序列,分别采用各自特定数据库作为OTUs分类地位鉴定的模板序列,如针对细菌的16S rRNA基因数据库选用Silva数据库(Release132, <http://www.arb-silva.de>),针对真菌ITS序列:采用UNITE数据库(Release 7.0, <https://unite.ut.ee/>)。

### 2.3 测序数据分析

**2.3.1 OTUs分析** 绘制稀疏曲线可以预测样本在一系列给定的测序深度下,所可能包含的物种总数及其中每个物种的相对丰度,还可以在相同的测序深度下,比较不同样本中OTUs数的多少,从而在一定程度上衡量每个样本的多样性高低。通过韦恩图可直观地呈现各样本(组)所共有和独有OTUs所占的比例。

**2.3.2  $\alpha$ 多样性分析** 常用的度量指数主要包括侧重于体现群落丰富度Chao1指数和ACE指数,以及兼顾群落均匀度的Shannon指数和Simpson

指数<sup>[15]</sup>。

**2.3.3  $\beta$ 多样性分析**  $\beta$ 多样性分析包括主成分分析(PCA)和样本层级聚类(hierarchical clustering)。基于Weighted UniFrac距离进行PCA,如果样本间距离相近,说明物种组成结构相似。Weighted UniFrac距离与Unweighted Unifrac距离不同的是更侧重于描述由群落成员丰度梯度的改变导致的样本差异。本研究基于Weighted UniFrac距离矩阵,采用非加权配对平均法进行层次聚类绘制系统发育树。

**2.3.4 物种组成分析** 通过数据分析6个样品在门水平上的群落结构组成情况,并通过群落柱形图分析6个样品在属水平上的群落结构组成情况。

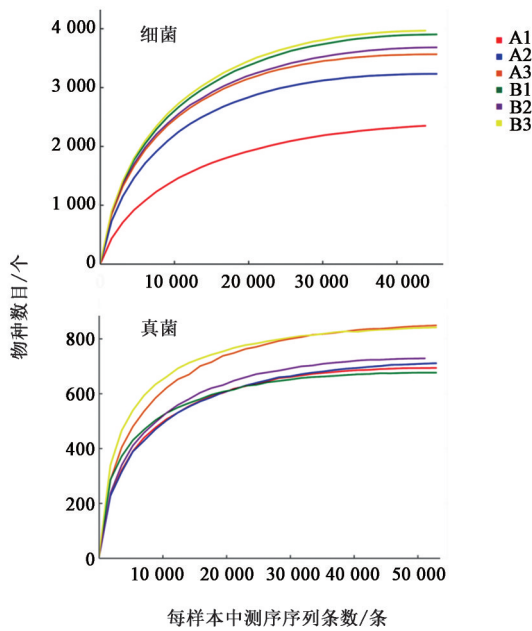
**2.4 数据处理** 采用Excel 2010软件进行统计分析,并采用 $t$ -检验进行双重比较。

## 3 结果与分析

**3.1 田间病害调查** 田间调查发现,麻城菊花枯萎病始发于6月中下旬,且7,8月达到峰值,田间发病率达50%~100%,9月后田间发病范围开始明显下降。发病植株会出现叶下垂、发黄、萎蔫、枯萎等症状;同一植株中也有黄化枯萎叶片出现于茎的一侧,而另一侧的叶片仍正常。正常花蕾和花的生长发育迟缓或受阻。由于入侵维管组织的病原菌不断增殖,可观察到茎下部出现裂隙和褐变,将茎秆横切或纵切,发现其维管束变褐,有时髓部空心,向上扩展枝条的维管束也逐渐变成淡褐色,向下扩展根部外皮坏死或变黑腐烂,根毛脱落。随着疾病的发展,维管组织被阻塞,无法转运水分和所需的营养物质,最终导致植物死亡。调查麻城洪家河村的菊花种植基地时发现,有一地块菊花出现100%发病情况,而其相邻地块菊花却全部健康。

**3.2 患病植株和健康植株根际土壤OTUs物种分类统计** 6个样品中DNA的16S rDNA经测序共分析得到410 966条有效序列数据,ITS区共分析得到422 576条有效序列数据,16S区序列长度主要范围为404~433 bp,ITS区序列长度主要范围较广(144~322 bp)。根据结果制作稀疏曲线,曲线越平缓,表明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性,继续增加测序深度已无法检测到大量的尚未发现的新OTUs,可以看出样品OTUs水平随着测序片段的增加而迅速增加,达到峰值后保持稳定,说明测序结果良好可用于后续实验分析。见图1。

通过对韦恩图分析可得,患病植株和健康植株样品所共有的细菌OTUs数为2 834个,其中患病植



A1~A3. 患病植株根际土壤; B1~B3. 健康植株根际土壤(图2, 3同)

图1 患病植株和健康植株 OTUs 水平根际土壤微生物稀疏曲线

Fig. 1 Rarefaction curve diagram of microorganism composition in diseased and healthy *Chrysanthemum morifolium* at OTUs level

株所特有的 OTUs 数目分别为 2 140 个, 健康植株所

特有的 OTUs 数目分别为 3 030 个; 患病植株和健康植株样品所共有的真菌 OTUs 数为 540 个, 其中患病植株所特有的 OTUs 数目分别为 801 个, 健康植株所特有的 OTUs 数目分别为 926 个。可以看出, 健康植株根际土壤中所特有的细菌和真菌 OTUs 数都高于患病植株, 特别是健康植株根际土壤细菌的 OTUs 数高于患病植株将近 1 000。由此说明, 健康植株根际土壤微生物物种丰富度高于患病植株, 尤其体现在两者细菌丰度度的差异上。

**3.3 患病植株和健康植株根际土壤微生物群落  $\alpha$  多样性影响** 本试验根据 Shannon, Simpson, Ace, Chao1 指数得到表 1, 从 Shannon, Simpson, Ace 和 Chao1 指数可得, 健康植株根际土壤细菌的物种多样性和物种丰富度都高于患病植株, 且丰富度指数存在显著差异。健康植株根际土壤真菌的物种多样性略高于患病植株, 而丰富度略低于患病植株。可以得知, 重病地中枯萎病的发生对菊花根际土壤细菌物种多样性和物种丰富度的影响较大, 而对根际土壤真菌物种多样性和物种丰富度几乎无影响。

表 1 患病植株和健康植株根际土壤细菌和真菌  $\alpha$  多样性指数分析 ( $\bar{x} \pm s, n=21$ )

Table 1 Analysis of bacterial and fungal alpha-diversity in rhizosphere soil of diseased and healthy *Chrysanthemum morifolium* ( $\bar{x} \pm s, n=21$ )

菌类	处理	多样性指数		丰富度指数	
		Shannon	Simpson	Ace	Chao1
细菌	患病植株	8.73 $\pm$ 1.78	0.956 6 $\pm$ 0.053 9	3 092.73 $\pm$ 454.64 <sup>1)</sup>	3 069.15 $\pm$ 486.56 <sup>1)</sup>
	健康植株	10.51 $\pm$ 0.04	0.998 1 $\pm$ 0.000 2	3 856.54 $\pm$ 118.58	3 851.79 $\pm$ 122.12
真菌	患病植株	5.67 $\pm$ 0.29	0.930 1 $\pm$ 0.012 5	761.33 $\pm$ 74.93	756.93 $\pm$ 73.89
	健康植株	6.20 $\pm$ 0.38	0.950 9 $\pm$ 0.007 9	753.31 $\pm$ 74.24	751.69 $\pm$ 72.06

注: 患病植株与健康植株数据比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.4 患病植株和健康植株根际土壤微生物群落  $\beta$  多样性影响** 在 OTUs 水平对  $\beta$  多样性进行评估, 比较患病植株与健康植株细菌和真菌群落结构组成, 用主坐标分析(PCoA)显示样本中细菌和真菌群落结构的整体有所差异, 由图 2 可以看出患病植株和健康植株细菌和真菌群落的相对分散程度不同, 健康植株菊花根际土细菌和真菌的微生物群落较为集中, 3 组的重复数据距离并不远, 说明重复较好, 且与患病植株的样本组成可以很好分开, 而患病植株菊花根际土细菌和真菌的微生物群落较为分散, 说明患病植株组内微生物群落相似性低。采用加权组平均法(UPGMA)对样品进行样本层级聚类分析。由图 3 显示, 患病植株 3 组细菌和真菌分别聚在一类, 健康植株 3 组细菌和真菌分别聚在一类, 说

明患病植株相对于健康植株的根际土壤真菌、细菌群落组成有很大不同。结果表明, 无论是细菌还是真菌, 患枯萎病植株和健康植株根际土壤样本间的距离相差较大。

**3.5 患病植株和健康植株根际土壤微生物组成比较** 患病植株和健康植株根际土壤微生物门水平的分布情况见表 2。患病植株和健康植株根际土壤中丰度最大的 10 个门类分别是变形菌门(Proteobacteria), 酸杆菌门(Acidobacteria), 放线菌门(Actinobacteria), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 绿弯菌门(Chloroflexi), 芽单胞菌门(Gemmatimonadetes), Patescibacteria, 疣微菌门(Verrucomicrobia), 厚壁菌门(Firmicutes), 硝化螺旋菌门(Nitrospirae)。其中优势变形菌门在患病植

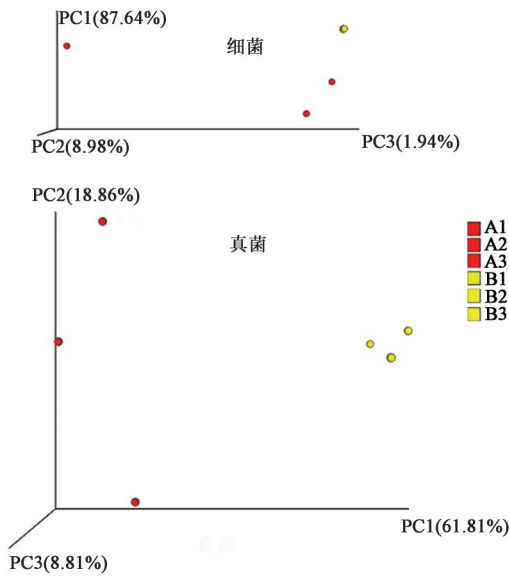


图2 患病植株和健康植株根际土壤细菌和真菌群落主坐标分析  
Fig. 2 Principal coordinate analysis of rhizosphere soil bacterial and fungal community of diseased and healthy *Chrysanthemum morifolium*

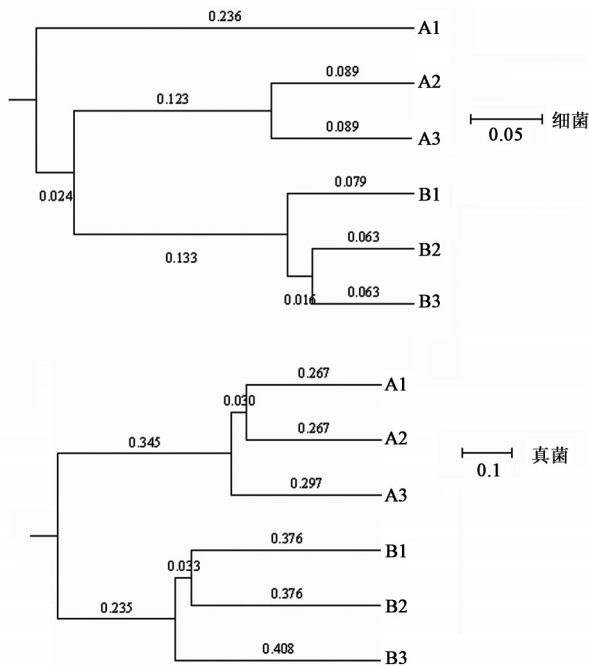


图3 患病植株和健康植株根际土壤细菌和真菌群落样本层级聚类分析  
Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of rhizosphere soil bacterial and fungal community of diseased and healthy *Chrysanthemum morifolium*

株和健康植株根际土壤中占比最高,分别为(64.00±13.62)%,(45.07±0.62)%,其次是酸杆菌门,分别占(4.80±1.44)%和(16.97±1.18)%,第三为放线菌门,分别占(6.87±2.27)%和(8.43±0.76)%。另外,患病植株和健康植株根际土壤中芽单胞菌门

(Gemmatimonadetes)存在显著差异,分别占(2.47±1.11)%和(7.30±1.42)%;患病植株和健康植株根际土壤中硝化螺旋菌门(Nitrospirae)存在极显著差异,分别占(0.33±0.12)%和(1.57±0.12)%。患病植株和健康植株根际土壤中的优势真菌种群在门水平的丰度分布主要有子囊菌门(Ascomycota),担子菌门(Basidiomycota),罗兹菌门(Rozellomycota),被孢霉菌门(Mortierellomycota),其中子囊菌门(Ascomycota)患病植株和健康植株根际土壤中丰度最大,分别占比为(76.73±4.88)%,(58.83±9.72)%,其次是担子菌门(Basidiomycota),分别占比为(3.70±1.85)%,(19.43±6.25)%,且两者存在显著差异。丰度分析表明,健康植株根际土壤细菌微生物中酸杆菌门,放线菌门,绿弯菌门,芽单胞菌门,Patescibacteria,疣微菌门,硝化螺旋菌门占比高于患病植株,而变形菌门、拟杆菌门占比低于患病植株。健康植株根际土壤真菌微生物中子囊菌门的占比低于患病植株,而担子菌门和罗兹菌门、被孢霉菌门的占比高于患病植株。

表2 门水平患病植株和健康植株细菌和真菌物种差异分析( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=21$ )

Table 2 Analysis of bacterial and fungal species difference between diseased and healthy *Chrysanthemum morifolium* at phylum level ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=21$ )

微生物	物种(门)	占比平均值/%	
		患病植株	健康植株
细菌	变形菌门	64.00±13.62 <sup>1)</sup>	45.07±0.62
	酸杆菌门	4.80±1.44 <sup>2)</sup>	16.97±1.18
	放线菌门	6.87±2.27	8.43±0.76
	拟杆菌门	10.23±4.22 <sup>1)</sup>	2.87±0.54
	Chloroflexi	5.13±3.46	6.90±0.37
	Gemmatimonadetes	2.47±1.11 <sup>1)</sup>	7.30±1.421
	Patescibacteria	1.83±0.66	2.97±0.12
真菌	Verrucomicrobia	1.20±0.75	1.77±0.26
	Firmicutes	1.47±0.38	1.47±0.25
	Nitrospirae	0.33±0.12 <sup>2)</sup>	1.57±0.12
	Ascomycota	76.73±4.88 <sup>1)</sup>	58.83±9.72
	Basidiomycota	3.70±1.85 <sup>1)</sup>	19.43±6.25
	Rozellomycota	0.43±0.17 <sup>1)</sup>	7.8±4.56
	Mortierellomycota	1.17±0.31	1.60±0.43
	other	16.27±3.48 <sup>1)</sup>	7.8±4.56

注:患病植株与健康植株数据比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

从属水平来看,患病植株和健康植株根际土壤中的优势细菌在属水平的丰度分布情况见表3。患

病植株根际土壤所特有的菌属有果胶杆菌属 (*Pectobacterium*), 菊迪基氏菌属 (*Dickeya*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*), 其中果胶杆菌属和菊迪基氏菌属在 A1 组占比为 29.48%, 18.28%, 在 A2 组也有少部分占例, 分别为 3.06%, 1.92%。健康植株根际土壤所特有的菌属为 *MND1*, 且未培养的芽单胞菌科 (*Gemmatimonadaceae*), *Candidatus Solibacter*, *Haliangium*, *Bryobacter*, 未培养的酸杆菌 (*Acidobacteria Bacterium*), 硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 丰度显著高于患病植株根际土壤。患病植株根际土壤的镰刀菌属明显高于健康植株根际土壤, 患病植株镰刀菌属真菌占比分别为 27.49%, 14.53%, 11.94%, 而健康植株镰刀菌属真菌占比分别为 0.47%, 1.01%, 0.67%。患病植株根际土壤真菌中 *Apiotrichum*, *Solicoccozyma*, *Acrophialophora* 与健康植株根际土壤存在极显著性差异, 且 *Massaria*, *Saitozyma*, *Sagenomella* 存在显著性差异, 见表 4。患枯萎病植株的根际土壤细菌和真菌群落结构与健康植株有很大的差异, 重病田中患有枯萎病菊花植株根际土壤微生物中镰刀菌属致病菌出现富集, 而健康田中健康菊花植株根际土壤微生物有益菌占比明显高于患病植株。

#### 4 讨论与结论

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, 当根际微生物特别是细菌区系结构合理, 物种多样性程度和丰富度越高, 作物抗病能力就越强<sup>[16]</sup>。本研究中  $\alpha$ -多样性分析表明患病植株的细菌物种多样性和丰富度低于健康植株, 而真菌多样性差异较小, 这与邓晓等<sup>[17]</sup>研究结果相似。伍文宪等<sup>[18]</sup>研究根肿病感染十字花科作物后, 发现病株根际土壤与健康植株根际土壤优势菌群结构差异明显, 本研究中  $\beta$ -多样性分析结果表明患病植株根际土壤微生物群落的组成和丰度与健康植株根际土壤存在较大差异。对 2 种生境的优势细菌种群在门水平分析表明, 健康植株根际土壤细菌微生物中酸杆菌门, 放线菌门, 绿弯菌门, 芽单胞菌门, *Patescibacteria*, 疣微菌门, 硝化螺旋菌门占比均高于患病植株, 并对 2 种生境的优势细菌种群进行属水平上的分析, 发现果胶杆菌属, 菊迪基氏菌属这些常见的病原菌为患病植株根际土壤所特有的菌属, 而 *MND1*, 未培养的芽单胞菌科 (*Gemmatimonadaceae*), *Candidatus Solibacter*, *Bryobacter*, 未培养的酸杆菌 (*Acidobacteria Bacterium*), 硝化螺旋菌属这些有益菌群丰富度均

表 3 属水平患病植株和健康植株细菌物种差异分析 ( $\bar{x}\pm s, n=21$ )

Table 3 Analysis of bacterial species difference between diseased and healthy *C.morifolium* at genus level ( $\bar{x}\pm s, n=21$ )

细菌物种(属)	占比平均值/%	
	患病植株	健康植株
果胶杆菌属	10.87±13.24 <sup>2)</sup>	0.00±0.00
菊迪基氏菌属	6.73±8.22 <sup>2)</sup>	0.00±0.00
未培养的芽单胞菌科	1.20±0.57 <sup>2)</sup>	5.30±0.91
Gaiellales uncultured unidentified	0.90±0.36 <sup>2)</sup>	2.63±0.29
Roseiflexaceae uncultured	3.20±3.26	0.17±0.09
<i>Sphingomonas</i>	1.43±0.19	1.73±0.54
<i>Gemmatimonas</i>	1.03±0.45	2.07±0.39
<i>Rhodanobacter</i>	1.20±0.54	1.80±0.45
<i>Enterobacter</i>	2.97±3.49 <sup>2)</sup>	0.00±0.00
<i>Candidatus Solibacter</i>	0.57±0.12 <sup>1)</sup>	2.40±0.59
MND1	0.00±0.00 <sup>2)</sup>	2.60±0.14
<i>Bradyrhizobium</i>	1.33±0.34	1.13±0.21
<i>Aquicella</i>	1.03±0.40	1.33±0.29
<i>Haliangium</i>	0.40±0.24 <sup>1)</sup>	1.87±0.45
<i>Bryobacter</i>	0.80±0.22 <sup>1)</sup>	1.4±0.22
未培养的酸杆菌	0.17±0.05 <sup>2)</sup>	1.87±0.26
硝化螺旋菌属	0.33±0.12 <sup>2)</sup>	1.57±0.12
<i>Pseudomonas</i>	1.70±0.16 <sup>2)</sup>	0.10±0.00
<i>Bacillus</i>	0.80±0.42	0.87±0.21
<i>Pseudolabrys</i>	0.63±0.17 <sup>1)</sup>	1.03±0.05

显著低于健康植株根际土壤。对患病植株和健康植株根际土壤真菌进行属水平上的分析, 发现患病植株根际土壤中镰刀菌属真菌占比分别为 27.49% (A1), 14.53% (A2), 11.94% (A3), 而健康植株镰刀菌属真菌占比分别为 0.47% (B1), 1.01% (B2), 0.67% (B3)。从麻城菊花重病地收集的病株中筛选出的致病菌也为镰刀菌属真菌, 可以推断出菊花根际土壤中镰刀菌属真菌占比与菊花植株病害发生息息相关。由此可见患枯萎病植株土壤中的根际微生态发生了重大变化, 微生物种类减少, 多样性水平下降, 特别是有益微生物的种类极其数量都大量降低, 病原菌上升, 群落结构发生倾斜, 植物的生存空间遭到极大的破坏, 无法正常发育。

药用种植过程中出现连作障碍的现象非常普遍, 特别在一些道地产区出现连作障碍现象更为明显。研究表明随土壤连作年限的增加, 会出现有益微生物量逐渐减少, 而有害微生物量却逐渐增加的现象<sup>[19]</sup>, 并且会出现由高肥力的细菌型土壤转变为

表4 属水平患病植株和健康植株真菌物种差异分析 ( $\bar{x}\pm s, n=21$ )  
Table 4 Analysis of fungal species difference between diseased and healthy *C.morifolium* at genus level ( $\bar{x}\pm s, n=21$ )

真菌物种(属)	占比平均值/%	
	患病植株	健康植株
镰刀菌属	17.99±6.80 <sup>1)</sup>	0.72±0.22
<i>Chaetomium</i>	5.51±3.03	5.45±0.78
<i>Massaria</i>	15.40±5.95 <sup>1)</sup>	0.01±0.01
<i>Apiotrichum</i>	0.03±0.03 <sup>2)</sup>	9.89±1.81
<i>Solicoccozyma</i>	0.37±0.18 <sup>2)</sup>	3.8±0.53
<i>Mortierella</i>	1.18±0.32	1.62±0.44
<i>Microidium</i>	1.10±0.42	1.39±0.50
<i>Acrophialophora</i>	0.90±0.23 <sup>2)</sup>	0.05±0.06
<i>Saitozyma</i>	0.23±0.07 <sup>1)</sup>	2.37±1.04
<i>Sagenomella</i>	0.01±0.02 <sup>1)</sup>	1.15±0.50
<i>Aspergillus</i>	0.49±0.40	0.26±0.14
<i>Papiliotrema</i>	0.59±0.33	0.52±0.37
<i>Trichoderma</i>	0.69±0.54	0.35±0.32
<i>Rhizopus</i>	0.12±0.03	0.87±0.63
<i>Staphylotrichum</i>	0.73±0.50	0.26±0.07
<i>Penicillium</i>	0.35±0.12	0.63±0.25

低肥力的真菌型土壤的现象<sup>[20]</sup>,这种根际微生物群落结构失调及病原菌数量增加是造成药用植物连作障碍的原因之一。本研究中重病地为连作地,枯萎病的爆发使连作地中病原菌数量急剧增加,导致土壤群落结构严重失调,进一步加剧菊花产量缩减,给农户带来巨大损失。本研究发现患枯萎病菊花根际土壤中致病菌丰度占优势,有益菌数量大大缩减;而对麻城菊花连作障碍的形成机制及缓解措施有待于进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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,2020:323-324.  
[2] 瞿璐,王涛,董勇喆,等. 菊花化学成分与药理作用的研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,38(1):98-104.  
[3] SINGH P K, KUMAR V. *Fusarium* wilt of *Chrysanthemum* - problems and prospects [J]. Plant Pathol Quarantine, 2014, 4(1):33-42.  
[4] 王超,李刚,黄思杰,等. 枯草芽胞杆菌菌肥对有机冬瓜根区土壤微生物生态的影响[J]. 微生物学通报,2019, 46(3):563-576.  
[5] 赵兰凤. 生物有机肥对香蕉枯萎病及土壤微生物学特性的影响研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.

[6] NIU B, PAULSON J N, ZHENG X, et al. Simplified and representative bacterial community of maize roots [J]. PNAS, 2017, 114(12): 2450-2459  
[7] 柳少燕,陈捷胤,李蕾,等. 拮抗菌与病原菌碳水化合物酶类比较分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(1):97-104  
[8] 梁银,张谷月,王辰,等. 一株拮抗放线菌的鉴定及其对黄瓜枯萎病的生防效应研究[J]. 土壤学报, 2013, 50(4):810-817  
[9] 李雪萍. 青藏高原青稞根腐类病害及其对根际土壤微生物生态的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.  
[10] 毛忠顺,龙月娟,朱书生,等. 三七根腐病研究进展[J]. 中药材,2013,36(12):2051-2054.  
[11] 刘凡. 白术根腐病病原鉴定,生物学特性和防治研究[D]. 雅安:四川农业大学,2012.  
[12] 王瑞,董林林,徐江,等. 农田栽参模式中人参根腐病原菌鉴定与防治[J]. 中国中药杂志,2016,41(10): 1787-1791.  
[13] SANTHANAM R, LUU V T, WEINHOLD A, et al. Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping [J]. Proc Natl Acad Sci, 2015, 112 (36) : E5013-E5020.  
[14] BAKKER P A H M, DOORNBOS R F, ZAMIOUDIS C, et al. Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome [J]. Plant Pathol J, 2013, 29 (2):136-143.  
[15] 徐娇,欧小宏,江维克,等. 天麻-冬荪轮种模式对土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国中药杂志,2020, 45(3):463-471.  
[16] 吕宁,石磊,刘海燕,等. 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[J]. 应用生态学报,2019,30(2):602-614.  
[17] 邓晓,李勤奋,武春媛,等. 健康香蕉 (*Musa paradisiaca*) 植株与枯萎病患植株根区土壤细菌多样性的比较研究[J]. 生态环境学报,2015,24(3): 402-408.  
[18] 伍文宪,黄小琴,张蕾,等. 十字花科作物根肿病对根际土壤微生物群落的影响[J]. 生态学报,2020,40 (5):1532-1541.  
[19] 周芳,曹国璠,李金玲,等. 药用植物连作障碍机制及其缓解措施研究进展[J]. 山地农业生物学报,2019, 38(3):67-72.  
[20] 吴林坤,黄伟民,王娟英,等. 不同连作年限野生地黄根际土壤微生物群落多样性分析[J]. 作物学报, 2015,41(2):308-317.

[责任编辑 顾雪竹]