

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.04.007

多花黄精根腐病对根际土壤酶活性及真菌群落变化的影响

韩 凤^{1,2}, 林茂祥¹, 章文伟¹, 李巧玲¹,
肖 忠^{1,2}, 谭秋生¹, 杨 毅¹, 李品明¹

1. 重庆市药物种植研究所, 重庆 南川 408435; 2. 重庆市中药良种选育与评价工程技术中心, 重庆 南川 408435

摘要: 对多花黄精根腐病病株及健株根际土样的理化性质、酶活性变化及真菌种群群落进行分析, 探索多花黄精根际土壤真菌群落组成与根腐病发生的关系, 为有效防治多花黄精根腐病的发生提供一定的理论依据. 以种植 3 年的健株(HJJ)、病株(HJB)根际土壤和未种植(HJCK)土壤为实验材料, 采用常规方法测量土壤理化性质和相关土壤酶活性, 并利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 对 3 种土样真菌群落结构进行分析. 结果表明: 与多花黄精健根相比, 病根根际土壤的 pH 值、碱解氮、速效磷、速效钾质量分数降低, 有机质有所升高; 根际土壤中的脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶、酸性磷酸酶、酸性蛋白酶活性均减弱. 高通量测序 3 个土样共产生 215 191 条 Clean tags, 平均产生 71 730 条 Clean tags; 根际土壤中真菌 DNA 测序结果显示, 在 97% 的 ITS 序列同源水平下划为 1 193 个 OTU, 被注释到 11 门、28 纲、62 目、125 科、197 属、209 种, 根际土壤中真菌多样性为 HJCK>HJB>HJJ. 在门和属水平上, 根际土壤中前 3 位的优势种群分别为子囊菌门(Ascomycota)、丝孢菌门(Mortierellomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和侧耳属(*Pleurotus*)、被孢霉属(*Mortierella*)、镰刀霉属(*Fusarium*). 因此得出, 多花黄精根腐病的发生改变了根际土壤的理化性质、酶活性和真菌群落结构.

关 键 词: 多花黄精; 高通量测序; 根腐病; 根际土壤; 理化性质; 酶活性; 真菌群落

中图分类号: S435 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2021)04-0053-09

多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua)又名姜形黄精, 为药食同源植物, 以根茎入药^[1]. 始载于《名医别录》, 性平, 味甘, 归脾、肾、肺经, 具有健脾润肺、补脾益气、滋肾填精的功效^[2], 根茎主要含有多糖、黄酮类、皂苷类、蒽醌类和挥发油类等化学成分, 还含有氨基酸及 Fe、Zn 等微量元素^[3]. 现代药理研究表明, 多花黄精具有抗氧化、抗衰老、抗抑郁、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、降血糖、调节免疫力、改善记忆功能和防治老年痴呆等作用^[3-4]. 多花黄精人工栽培研究多有报道^[5-7], 但有关多花黄精与微生物尤其是土壤真菌的研究未见报道. 随着多花黄精的大规模引种栽培, 病害也在不断增加, 给药农造成严重的经济损失. 而根腐病是由镰刀菌属引发的一种土传病害^[8], 是影响多花黄精产量与质量的

收稿日期: 2020-03-19
基金项目: 重庆市科委科研机构绩效激励引导专项(cstc2017jxjl-jbky120018); 重庆市科卫联合中医药科研项目(2019zy023281); 重庆市卫健委中医药科技项目(zy201702147).
作者简介: 韩 凤, 副研究员, 主要从事药用植物栽培的研究.
通信作者: 李品明, 研究员.

主要病害。近年来,作物健康与其根际土壤微生物之间的关系已成为研究热点。诸多研究表明,植物病害、连作障碍与土壤微生物生态失衡有一定的关系^[9-11]。本研究采用高通量测序方法,分析未种植多花黄精土壤、种植 3 年生健康多花黄精与患根腐病多花黄精的根际土壤之间真菌群落多样性和组成的变化,从植物与微生物根际互动角度出发,以期明确多花黄精根际土壤的真菌群落组成及其与根腐病的关系,为多花黄精根腐病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

所采集的土壤样品分别来自重庆市南川区槐坪多花黄精种植基地(东经 107°13′18.33″,北纬 29°08′15.07″),海拔 781 m,年降水量为 1 100 mm,年均气温为 16 ℃。土壤类型为砂壤土,随机采集 3 年生栽培 5 株多花黄精健株、病株根际土壤混合,5 点法采集未种植土壤混匀,分别记为 HJJ,HJB,未种植作物的荒地土壤为对照组(HJCK)。将土样分为 2 份,分别用于 DNA 提取和理化性质及土壤酶活性测定,前者保存于-80 ℃冰箱中,后者自然阴干后进行。

1.2 样品测定

1.2.1 土壤理化性质

参考关松荫^[12]、鲍士旦^[13]的方法分别测定土壤 pH 值、有机质、速效氮、速效磷、速效钾的质量分数。

1.2.2 酶活性测定

参考关松荫^[12]、赵兰坡^[14]的方法分别测定土壤中脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶、磷酸酶及蛋白酶活性。

1.2.3 土壤根际真菌的高通量测序

采用 MP Fast@DNA 试剂盒(MP Biomedicals, CA, USA),按照试剂盒使用说明书的操作流程,提取不同土壤样品的总 DNA。通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳(电泳仪,DYY-6C,北京六一)检测 DNA 提取质量,同时采用紫外分光光度计(1810D,北京普析)对 DNA 进行定量。PCR 扩增所用引物为真菌 ITS1 引物(ITS1F: 5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′和 ITS2R: 5′-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′对 ITS 区真菌进行扩增,PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后,利用凝胶回收试剂盒对目标片段进行回收,将回收产物送至北京百迈克生物科技有限公司,利用 Illumina Hiseq 2500 平台进行高通量测序。

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 和 DPS 7.05 对土壤理化性质、酶活性等数据进行分析。使用 FLASH v 1.2.7 软件,通过 overlap 对每个样品的 reads 进行拼接,得到拼接序列即原始 Tags 数据(Raw Tags);使用 Trimmomatic v 0.33 软件,对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤,得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags);使用 UCHIME v 4.2 软件,鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据(Effective Tags);使用 QIIME(version 1.8.0)软件,对 Tags 在 97%的相似度水平下进行聚类,获得 OTU,并基于 UNITE(真菌)分类学数据库对 OTU 进行分类学注释。使用 Mothur(version v. 1.30)软件,对 3 个土壤样品进行 Alpha 多样性指数评估。使用 QIIME 软件进行 Beta 多样性分析,考察土样间群落结构的相似性。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

从多花黄精健株(HJJ)、病株(HJB)和对照(HJCK)根际土壤的理化性质变化(表 1)可以看出,土壤 pH 值变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB,病株根际土壤 pH 值显著低于健株和对照($p<0.05$),表明经种植多花黄精和感病后土壤逐渐酸化,土壤质量下降。有机质质量分数变化趋势为 HJB>HJJ>HJCK,病株根际土壤有机质质量分数显著高于健株和对照($p<0.05$),但健株与对照差异无统计学意义($p>0.05$)。碱解

氮质量分数变化趋势为 HJJ>HJCK>HJB, 三者之间差异有统计学意义($p<0.05$). 速效磷质量分数变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 对照速效磷质量分数高于健株和病株, 三者之间差异有统计学意义($p<0.05$). 速效钾质量分数变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 对照速效钾质量分数高于健株和病株, 三者之间差异有统计学意义($p<0.05$). 可见, 多花黄精感染根腐病后, 可引起土样中 pH 值、有机质、碱解氮、速效磷、速效钾的质量分数发生明显改变.

表 1 不同土壤样品的理化性质($\bar{x}\pm s, n=3$)

土壤样品	pH 值	有机质/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	碱解氮/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效磷/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效钾/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
HJB	5.72±0.01c	6.73±0.13a	139.54±2.01c	136.09±0.79c	168.43±2.81c
HJJ	6.06±0.02b	6.24±0.09b	161.38±1.37a	141.26±1.04b	196.36±2.06b
HJCK	6.53±0.02a	6.19±0.16b	153.07±1.84b	172.54±1.30a	203.74±4.12a

注: 同一列中小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.2 土壤酶活性分析

土壤酶是土壤的重要组成部分之一^[12], 土壤酶活性的高低能反映土壤生物活性, 也是预测植物病害发生的一个重要指标^[15-16]. 多花黄精健株(HJJ)、病株(HJB)和对照(HJCK)土壤酶活性变化(表 2)结果表明: 多花黄精病株土样中脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶、酸性磷酸酶、酸性蛋白酶活性均呈下降趋势. 土壤脲酶活性变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 三者差异有统计学意义($p<0.05$). 土壤蔗糖酶活性变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 健株、对照与病株差异有统计学意义($p<0.05$), 但健株与对照差异无统计学意义($p>0.05$). 土壤过氧化氢酶活性变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 对照显著高于病株和健株, 差异有统计学意义($p<0.05$), 但病株与健株差异无统计学意义($p>0.05$). 酸性磷酸酶活性变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 病株低于健株和对照, 但三者之间差异无统计学意义($p>0.05$). 酸性蛋白酶活性变化趋势为 HJCK>HJJ>HJB, 对照和健株显著高于病株, 差异有统计学意义($p<0.05$), 但对照与健株差异无统计学意义($p>0.05$). 由此可见, 多花黄精感染根腐病后, 土壤酶活性发生了不同变化, 表明多花黄精根腐病的发生会导致土壤代谢过程的改变和紊乱.

表 2 不同土壤样品酶活性变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

土壤样品	脲酶/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	蔗糖酶/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	过氧化氢酶/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	酸性磷酸酶/ ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	酸性蛋白酶/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
HJB	436.79±5.43 c	41.80±0.66 b	413.35±3.81 b	1 409.14±18.94 a	35.42±0.94 b
HJJ	449.91±4.55 b	44.65±0.76 a	420.30±5.15 b	1 416.29±35.57 a	51.53±1.76 a
HJCK	505.57±4.86 a	45.02±0.41 a	462.11±0.41 a	1 432.23±28.86 a	60.41±2.44 a

注: 同一列中小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.3 土壤微生物群落结构

2.3.1 序列长度分布

3 个土壤样品经测序共获得 239 928 对 Reads(读长), 双端 Reads 拼接、过滤后共产生 215 191 条 Clean tags, 平均产生 71 730 条 Clean tags, 最少产生 70 527 条 Clean tags.

2.3.2 不同土壤样品真菌 ITS1 序列的稀释曲线和 OTUs Venn 图

通过高通量测序, 获得 HJB,HJJ,HJCK 3 个土壤样品真菌群落的优化序列及其属或种类数(OTUs)等信息. 分别随机抽取真菌测序样品的 ITS1 序列读数(Reads), 以其属或种类数(OTUs)为纵坐标, ITS1 序列读数(Reads)为横坐标, 获得真菌的稀释曲线(图 1). 由图 1 可知, 真菌的 ITS1 序列读数超过 40 000, 即 OTUs 值达到 650 后, 曲线逐渐趋于平缓, 说明本次实验的测序量达到饱和, 表明 PCR 扩增的序列基本能体现出土壤样品中真菌群落的组成.

根据不同的相似度水平,使用 Usearch 软件^[17]对 Tags 在 97%的相似度水平下进行聚类、获得 OTU,并基于 UNITE(真菌)分类学数据库对 OTU 进行分类学注释.从图 2 中得出,共产生 1 193 个 OTU,其中, HJCK 组样品的 OTU 最多,为 653 个;其次为 HJB 组样品,为 575 个; HJJ 组的最少,为 573 个,说明 HJCK 组真菌丰度最高, HJB 和 HJJ 组真菌丰度较低,即种植多花黄精后土壤真菌种类均有所下降. HJCK 和 HJJ 共同含有 44 个 OTU, HJCK 和 HJB 共同含有 54 个 OTU, HJJ 和 HJB 共同含有 196 个 OTU,以上数据说明 HJJ 和 HJB 的真菌群落相似度较高, HJCK 和 HJJ 的真菌群落相似度较低. HJJ, HJB 和 HJCK 土壤样品共同含有 157 个 OTU, 占总 OTU 的 13.16%,表明各个土壤样品拥有不同的 OTU,这是多花黄精与土壤微生物相互作用的结果.

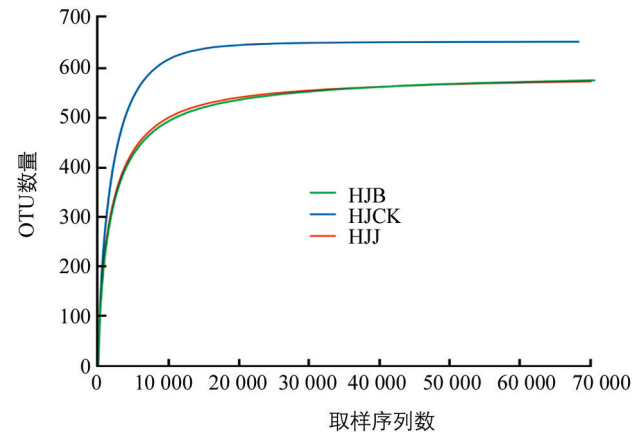


图 1 相似度为 97%条件下各土壤样品的稀释曲线

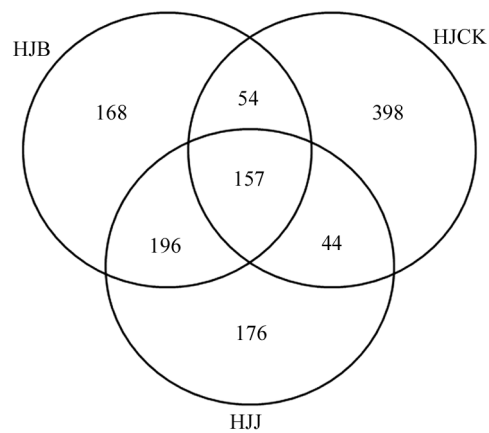


图 2 真菌群落 OTUs Venn 图

2.3.3 ITS1 序列的测序质量及多样性统计分析

通过高通量测序及生物信息学分析(表 3), HJB, HJJ, HJCK 土样中 OTU 数分别为 575, 573, 653. ACE 和 Chao 1 指数可估计土壤样品群落的丰度,其指数越大,表明群落丰度越大. HJB, HJJ, HJCK 组中 ACE 指数分别为 1 696.15, 1 657.80, 1 724.58, Chao 1 指数分别为 1 704.45, 1 671.00, 1 745.52. HJB, HJJ, HJCK 组中辛普森指数分别为 0.036 9, 0.023 2 和 0.021 7, 香浓指数分别为 6.631 1, 6.653 5 和 6.640 5. HJB, HJJ, HJCK 土壤样品测序覆盖率分别为 0.998 5%, 0.998 6%, 0.999 4%,说明土壤样品中被测到的序列概率较高,足以覆盖样品菌落组成,能较全面地反映土壤样品的真实情况.

表 3 不同土样物种丰度和多样性指数

样品名称	OTU 数	ACE 指数	Chao 1 指数	辛普森指数	香浓指数	覆盖率/%
HJB	575	1 696.15	1 704.45	0.036 9	6.631 1	0.998 5
HJJ	573	1 657.80	1 671.00	0.023 2	6.653 5	0.998 6
HJCK	653	1 724.58	1 745.52	0.021 7	6.640 5	0.999 4

2.3.4 真菌群落的组成

从门水平的分类看, HJB, HJJ 和 HJCK 土壤样品真菌主要分布于 11 个门,且真菌群落丰度存在一定的差异.从图 3 可以看出,丰度前 10 的分别为 Ascomycota(子囊菌门), Mortierellomycota(丝孢菌门), Basidiomycota(担子菌门), Rozellomycota(隐真菌门), Glomeromycota(球囊菌门), Chytridiomycota(壶菌门), Olpidiomyocota(油壶菌门), Kickxellomycota(梳霉门), Mucoromycota(毛霉门)和 Basidiobolomycota(蛙粪霉门)等.其中, Ascomycota 在所有土样中的平均丰度为 45.36%,是最具有优势的物种,且在 HJCK 中的丰度比在 HJB 和 HJJ 中的高, HJB 和 HJJ 的丰度分别为 36.02%和 35.52%;而第三大门担子菌门(Basidiomycota)平均丰度分别为 14.17%,病株的丰度约为健株的 1.43 倍.可见,种植多花

黄精后根际土壤真菌多样性降低，根腐病发生后根际土壤真菌群落多样性有所增加，这说明担子菌门与多花黄精根腐病有一定的相关性. 健株和病株土样都有隐真菌门(Rozellomycota)，而对照土样中没有；油壶菌门(Olpidiomycota)为健根土样特有门，病株和对照土壤都没有. 另外 HJB,HJJ,HJCK 还有相对丰度约为 26.42%，28.45%和 14.33%的待定真菌(Fungi_unclassified)等类群在 Gen Bank 中没有被明确分类.

从纲水平的分类看，3 种多花黄精土壤样品中共获得 28 纲，其中病株真菌主要分布于 21 个纲，健株真菌主要分布于 19 个纲，对照真菌主要分布于 23 个纲. 主要有 Sordariomycetes(子囊菌纲)，Mortierellomycetes(被孢霉纲)，Agaricomycetes(蘑菇纲)，Tremellomycetes(银耳纲)，Dothideomycetes(座囊菌纲)，Eurotiomycetes(散囊菌纲)，Leotiomycetes(锤舌菌纲)，Rozellomycotina_cls_Incertae_sedis(无中文名)，Laboulbeniomycetes(虫囊菌纲)，Pezizomycetes(盘菌纲)等，其中 Sordariomycetes 是最具有优势的物种，HJCK,HJB 和 HJJ 组的丰度分别为 31.10%，19.95%和 23.69%. Mortierellomycetes，Agaricomycetes，Tremellomycetes，Dothideomycetes，Eurotiomycetes，Leotiomycetes，Rozellomycotina_cls_Incertae_sedis，Laboulbeniomycetes，Pezizomycetes 平均丰度分别为 15.15%，9.15%，4.88%，4.58%，2.98%，2.67%，1.41%，1.06%，1.03%. 另外 HJB,HJJ,HJCK 还有相对丰度约为 29.84%，32.26%和 17.56%的待定真菌(Fungi_unclassified)等类群在 Gen Bank 中没有被明确分类.

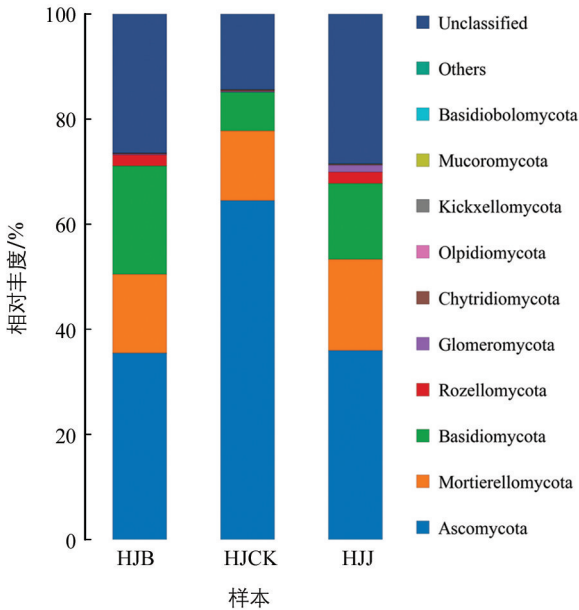


图 3 不同土样根际真菌群落在门水平上的分布

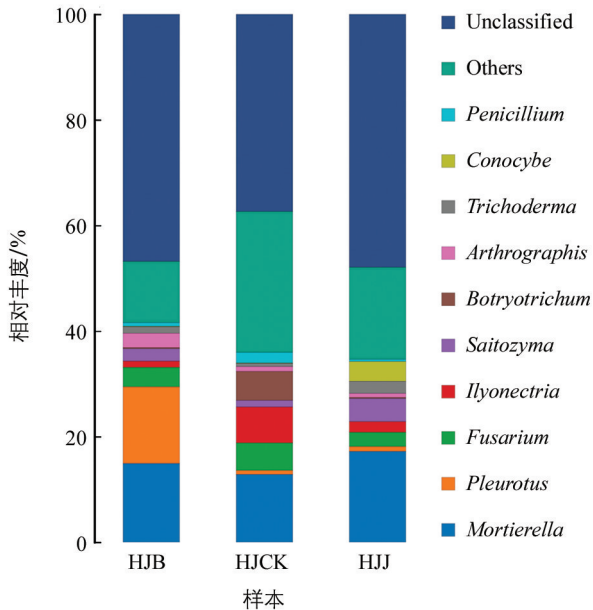


图 4 不同土样根际真菌群落在属水平上的分布

从目水平的分类看，3 种多花黄精土壤样品中共获得 62 目，其中病株真菌主要分布于 51 个目，健株真菌主要分布于 46 个目，对照真菌主要分布于 50 个目. 多花黄精根际真菌主要分布的 10 个目分别为 Hypocreales(肉座菌目)，Mortierellales(被孢霉目)，Agaricales(伞菌目)，Sordariales(粪壳菌目)，Tremellales(银耳目)，Pleosporales(假球壳目)，Helotiales(柔膜菌目)，Eurotiales(散子囊菌目)，Dothideomycetes_ord_Incertae_sedis(无中文名)，GS08(无中文名)等，其中 Hypocreales 是最具有优势的物种，HJCK,HJB 和 HJJ 组的相对丰度分别为 19.46%，13.41%和 13.45%. Mortierellales，Agaricales，Sordariales，Tremellales，Pleosporales，Helotiales，Eurotiales，Dothideomycetes_ord_Incertae_sedis，GS08 平均丰度分别为 15.15%，7.93%，5.97%，2.75%，2.47%，2.41%，2.10%，1.50%，1.38%. 另外 HJB，HJJ,HJCK 还有相对丰度约为 28.84%，30.22%和 15.71%的待定真菌(Fungi_unclassified)等类群在 Gen Bank 中没有被明确分类.

从科水平的分类看, 3 种多花黄精土壤样品中共获得 125 科, 其中病株真菌主要分布于 81 个科, 健株真菌主要分布于 78 个科, 对照真菌主要分布于 103 个科. 多花黄精根际真菌主要分布的 10 个科分别为 Mortierellaceae(被孢霉科), Nectriaceae(丛赤壳科), Pleurotaceae(侧耳科), Chaetomiaceae(毛壳菌科), Trimorphomycetaceae(无中文名), Aspergillaceae(曲霉菌科), Eremomycetaceae(沙漠壳菌科), Hypocreaceae(肉座菌科), Bolbitiaceae(粪锈伞科), Lasiosphaeriaceae(毛球壳科)等, 其中 Mortierellaceae 是最具有优势的物种, HJJ, HJB 和 HJCK 组的丰度为 17.26%, 14.94% 和 13.22%. Nectriaceae, Pleurotaceae, Chaetomiaceae, Trimorphomycetaceae, Aspergillaceae, Eremomycetaceae, Hypocreaceae, Bolbitiaceae, Lasiosphaeriaceae 平均丰度分别为 13.48%, 5.86%, 4.08%, 2.65%, 1.77%, 1.50%, 1.45%, 1.30%, 1.20%. 另外 HJB, HJJ, HJCK 还有相对丰度约为 39.63%, 40.41% 和 21.60% 的待定真菌(Fungi_unclassified)等类群在 Gen Bank 中没有被明确分类.

从属水平的分类看, 前 10 位真菌见图 4. 3 种多花黄精土壤样品共获得 197 属, 其中病株土样中所含真菌为 114 属, 主要有 *Pleurotus*(侧耳属, 15.13%), *Mortierella*(被孢霉属, 14.94%), *Fusarium*(镰刀霉属, 3.02%), *Arthrographis*(节改菌属, 2.65%), *Saitozyma*(无中文名, 2.37%), *Trichoderma*(木霉属, 1.32%), *Ilyonectria*(土赤壳属, 1.23%), *Botryotrichum*(毛葡萄属, 0.20%). HJJ 土样中所含真菌为 102 属, 主要有 *Mortierella*(17.27%), *Saitozyma*(4.36%), *Conocybe*(锥盖伞属, 3.75%), *Fusarium*(2.68%), *Trichoderma*(2.30%), *Ilyonectria*(2.02%), *Pleurotus*(0.91%). HJCK 土样中所含真菌为 154 属, 主要有 *Mortierella*(12.86%), *Ilyonectria*(6.80%), *Botryotrichum*(5.48%), *Fusarium*(5.20%), *Penicillium*(青霉属, 2.07%), *Saitozyma*(沙蜥属, 1.22%), *Arthrographis*(0.92%), *Pleurotus*(0.79%). 另外 HJB, HJJ, HJCK 还有相对丰度约为 46.77%, 47.91% 和 37.38% 的待定真菌(Fungi_unclassified)等类群在 Gen Bank 中没有被明确分类.

2.3.5 根际真菌群落的 beta 多样性分析

在属水平对不同根际土壤群落组成结构进行 PCA 主成分分析, 与健根相比, 多花黄精感病后, 根际土壤真菌群落的主成分发生了变异, 坐标轴中样本对应的主成分变异度分别为 69.14%, 30.86%(图 5). HJB 位于 Y 轴右侧的 X 轴下方, HJJ 位于 Y 轴左侧的 X 轴上方, HJCK 位于 Y 轴左侧的 X 轴下方. 从 3 个土样 UPGMA 聚类结果(图 6)可以看出, HJB 和 HJJ 土样距离较近, 表明它们两者真菌群落结构相似度较高; HJB, HJJ 与 HJCK 间距离相对较远, 表明 HJCK 与 HJB, HJJ 真菌群落结构均具有明显差异.

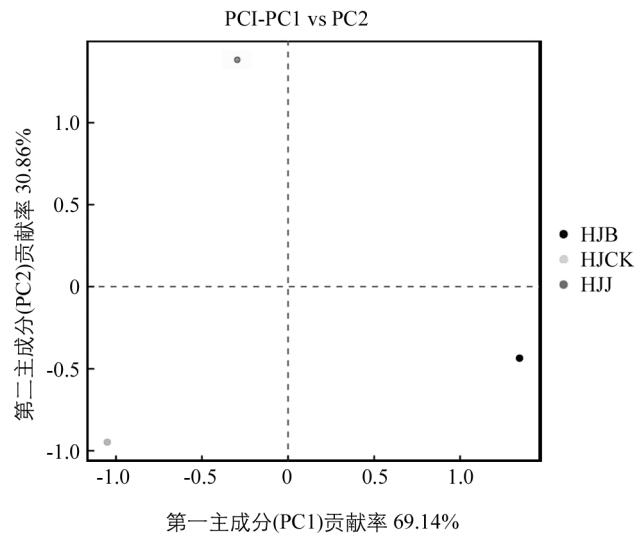


图 5 土样真菌群落的 PCA 排序图

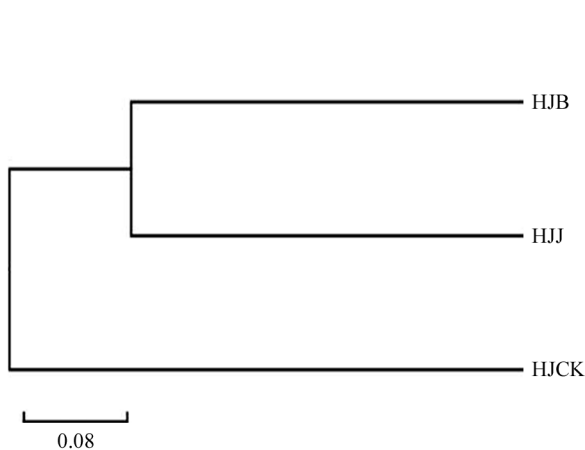


图 6 真菌群落的 UPGMA 聚类

2.3.6 根际土壤理化性质与镰刀菌属相关性分析

为了更好地了解土壤理化性质与多花黄精根腐病的关系,对多花黄精根际土壤理化性质与镰刀菌属的相关性进行了分析,从表 4 可以看出,镰刀菌属与 pH 值、速效磷呈极显著正相关($p<0.01$);镰刀菌属与速效钾呈显著正相关($p<0.05$);镰刀菌属与有机质、碱解氮无显著相关性.由此表明土壤的理化指标能够影响多花黄精根际土壤中的真菌,特别是镰刀菌属的种类和数量等.

表 4 根际土壤理化性质与镰刀菌属相关性分析

	pH 值	有机质	碱解氮	速效磷	速效钾	镰刀菌属
pH 值	1.000					
有机质	-0.009	1.000				
碱解氮	0.538	0.367	1.000			
速效磷	0.846	-0.541	0.006	1.000		
速效钾	0.914	0.397	0.833	0.558	1.000	
镰刀菌属	0.955**	-0.305	0.264	0.996**	0.753*	1.000

注: * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义.

3 结论与讨论

植物与其根际土壤关系最为密切,根际土壤中的微生物是根际微生态的重要组成部分,对植物生长发育起着至关重要的作用^[17].研究表明,作物病害和土壤理化性质之间相互作用并存在一定的关系,如土壤 pH 值,含水量, N,P,K 元素质量分数等直接或间接影响植物的抗病性^[18].本实验结果表明,与健株相比,多花黄精病株根际土壤 pH 值、碱解氮、速效磷及速效钾质量分数等非生物因子均呈下降趋势,尤其是碱解氮质量分数下降明显,而有机质质量分数则相反,呈上升趋势.这与陈杰等^[19]对马铃薯健、病株根际土壤中有机质、pH 值、速效磷、速效钾的研究结果一致.相关性分析发现,土壤 pH 值与土壤真菌(镰刀菌属)呈极显著正相关,这说明土壤 pH 值的改变是产生多花黄精根腐病的原因之一,在多花黄精大田生产中,可以根据土壤 pH 值的变化特征,通过调节土壤 pH 值,如施用腐殖酸类有机肥加以改善,以防治根腐病的发生.

土壤酶活性是衡量土壤质量变化的指标之一,其中蔗糖酶、磷酸酶、脲酶等水解酶的总体活性对评价土壤肥力水平具有重要意义^[20].本实验发现,与健根相比,病根根际土壤中的脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶、酸性磷酸酶和酸性蛋白酶活性均有不同程度的降低,这与游春梅等^[15]、寻路路等^[21]在不同作物的研究中结论相似,说明脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶、酸性磷酸酶和酸性蛋白酶等与植物病害的发生有关,在不同植物上都有类似现象.多花黄精根腐病不同发病程度的酶活性变化趋势还有待进一步研究.

真菌是土壤微生物的重要组成部分,多数作物病害的发生与真菌群落结构、多样性等密切相关^[22].本实验通过分析比较多花黄精根腐病植株和健康植株根际土壤真菌群落结构及多样性差异,发现病株根际土壤真菌丰度及多样性都高于健株根际土,说明土壤真菌群落的变化受生长植株的影响,还与土壤因子、生态扰动有关^[23-24].3 种土样中为 Ascomycota, Mortierellomycota, Basidiomycota 为优势种群门, *Pleurotus*, *Mortierella*, *Fusarium* 为优势种群属,这与杨珍等^[25]报道的子囊菌门、镰刀菌属等是多种植物根际真菌优势类群的研究结论基本一致.镰刀菌属中的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和腐皮镰刀菌(*F. solani*)被认为是造成多花黄精根腐病的两种致病菌^[8].研究发现,病株中镰刀菌属相对丰度高于健株根际土壤,这与于慧瑛等^[9]研究根腐人参根际土壤中的真菌结果相似.与多花黄精健根根际土壤中木霉属相比,病根较健株降低了 42.61%.由此表明病株根际土壤真菌群落结构失衡,有益菌减少,导致病原菌大量滋生和繁殖.木霉属已被证实对植物生长具有明显的促进作用,在多花黄精生产中,充分利用这一有益菌有

助于减少农药化肥的使用,促进生长和防控病害的发生.

多花黄精感染根腐病后,根际土壤中理化性质、酶活性、真菌群落组成及多样性都发生了改变,病原菌相对丰度增加而有益真菌相对丰度降低,导致土壤微生态环境的恶化、微生物群落结构失衡,从而造成根际微生物种类明显不同,影响多花黄精的生长.另外,多花黄精根际土壤中存在木霉属等生防真菌,因此,应进一步筛选根际微生物对病原菌有抑制作用的微生物,为有效利用植物微生态调控措施防止多花黄精根腐病提供理论依据.

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: 化学工业出版社, 2015.
- [2] 王雨婷, 刘婉滢, 沈舶宁, 等. 黄精的本草考证 [J]. 中医药学报, 2019, 47(3): 81-86.
- [3] 陈 辉, 冯珊珊, 孙彦君, 等. 3 种药用黄精的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2329-2338.
- [4] 陈 晔, 孙晓生. 黄精的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 328-330.
- [5] 芮龙燕, 黄亚玲. 多花黄精的种茎选择及杉木林下种植技术的研究 [J]. 安徽林业科技, 2015, 41(6): 47-49.
- [6] 郁连红, 杨 军, 姚青菊. 土壤施硼、锌、锰肥对多花黄精药材产量及药效成分含量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 257-260.
- [7] 章文前. 不同郁闭度和坡位对毛竹林下套种多花黄精的影响 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 12959-12960.
- [8] 韩 凤, 李巧玲, 韩如刚, 等. 渝产多花黄精根腐病原菌的分离与鉴定 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(11): 3693-3698.
- [9] 于慧瑛, 吕国忠, 孙晓东, 等. 病健人参根际土壤真菌种类及数量的研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8279-8291.
- [10] 宋旭红, 谭 均, 李隆云, 等. Illumina 高通量测序揭示黄连根腐根际土壤真菌群落组成及多样性 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5396-5403.
- [11] 赵 帆. 不同连作年限草莓根际土壤微生物多样性变化 [D]. 合肥: 安徽大学, 2018.
- [12] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [13] 鲍士旦. 土壤农化学分析 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [14] 赵兰坡. 土壤酶活性测定方法的探讨 [M]. 北京: 中国学术期刊电子出版社, 2012.
- [15] 游春梅, 陆晓菊, 官会林. 三七设施栽培根腐病害与土壤酶活性的关联性 [J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2014, 34(6): 25-29.
- [16] EDGAR R. UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [17] 崔佩佩, 武爱莲, 王劲松, 等. 不同施肥处理对高粱根际土壤微生物功能多样性的影响 [J]. 华北农学报, 2018, 33(5): 195-202.
- [18] 陈艳丽, 姚爱梅, 徐 义, 等. 土壤化学性质和微生物群落结构与姜瘟发生相关性分析 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 152-157.
- [19] 陈 杰, 郭天文, 谭雪莲, 等. 马铃薯连作地健康株与病株根区土壤微生态特性比较 [J]. 作物学报, 2013, 39(11): 2055-2064.
- [20] 万忠梅, 宋长春. 土壤酶活性对生态环境的响应研究进展 [J]. 土壤通报, 2009, 40(4): 951-956.
- [21] 寻路路, 赵宏光, 梁宗锁, 等. 三七根腐病病株和健株根域土壤微生态研究 [J]. 西北农业学报, 2013, 22(11): 146-151.
- [22] 杨 璐, 杜岩新, 徐利娟, 等. 土壤微生态环境对樱桃树“黑疙瘩”病发生的影响 [J]. 土壤, 2017, 49(2): 308-313.
- [23] 滕 左, 宋春红, 于 杰. 基于 DNA 宏条形码的莼菜大田土壤真菌多样性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(9): 52-58.
- [24] 吴雪莲, 周 倩, 辜夕容, 等. 西南林区 3 株外生菌根真菌对酸铝胁迫的营养响应与抗铝性 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(8): 13-19.
- [25] 杨 珍, 戴传超, 王兴祥, 等. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展 [J]. 土壤学报, 2019, 56(1): 13-22.

Effects of *Polygonatum cyrtonema* Root Rot on Rhizosphere Soil Enzyme Activity and Fungal Community

HAN Feng^{1,2}, LIN Mao-xiang¹, ZHANG Wen-wei¹, LI Qiao-ling¹,
XIAO Zhong^{1,2}, TAN Qiu-sheng¹, YANG Yi¹, LI Pin-ming¹

1. The Research Institute of Medicine Plantation of Chongqing, Nanchuan Chongqing 408435, China;

2. Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of
Chinese Materia Medica, Nanchuan Chongqing 408435, China

Abstract: In order to provide a theoretical basis for the effective prevention and control of the occurrence of *Polygonatum cyrtonema* root rot, the physical and chemical properties, enzyme activity changes and fungal population communities of rhizosphere soil samples of the roots of the diseased plants and healthy plants of *P. cyrtonema* were analyzed, and the relationship between the fungal community composition in rhizosphere soil of *P. cyrtonema* and the occurrence of the root rot was explored in a study reported in this paper. The rhizosphere soil of 3-year-old healthy plants (HJJ) and diseased plants (HJB) and the non-planted (HJCK) soil were used as experimental materials. Their physical and chemical properties and related soil enzyme activities were measured with conventional methods, and Illumina MiSeq high-throughput Sequencing technology was used to analyze the community structure of the three soil samples. Compared with those of the healthy *P. cyrtonema* plants, the pH, available N, available P and available K in the rhizosphere soil of the diseased plants decreased, while the organic matter increased; and the urease, sucrase, catalase, acid phosphatase and acid protease activities in the rhizosphere soil all decreased. A total of 215 191 clean tags were produced by high-throughput sequencing, averaging 71 730 clean tag per soil sample. The results of fungal DNA sequencing in rhizosphere soil were delineated as 1 193 OTU at 97% ITS sequence homology level, which were annotated to 11 phylum, 28 classes, 62 orders, 125 families, 197 genera and 209 species. The fungal diversity in the rhizosphere soil was HJCK>HJB>HJJ. At the level of phylum, Ascomycota, Mortierellomycota and Basidiomycota were the top three dominant populations in the rhizosphere soil, while at the level of genus, *Pleurotus*, *Mortierella* and *Fusarium* were the top three. In conclusion, the occurrence of *P. cyrtonema* root rot changed the physical and chemical properties, enzyme activities and fungal community structure of the rhizosphere soil.

Key words: *Polygonatum cyrtonema*; high-throughput sequencing; root rot; rhizosphere soil; chemical and physical properties; soil enzyme activity; fungal community

责任编辑 周仁惠