

# 黄连根腐病发生与根际土壤、根茎内生、叶内生细菌群落结构变化关系

唐涛<sup>1</sup>, 袁斌<sup>2</sup>, 王帆帆<sup>1</sup>, 郭杰<sup>1</sup>, 郭晓亮<sup>1</sup>,  
段媛媛<sup>1</sup>, 游景茂<sup>1\*</sup>

(1. 湖北省农业科学院中药材研究所, 恩施 445000; 2. 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 武汉 430064)

**摘要** 为了探讨细菌群落结构与黄连根腐病发生的关系, 本文分析了两个不同地点健康和染病黄连的根茎、叶内生细菌和根际土壤细菌的组成和差异。结果显示, 黄连根茎、叶片和根际土壤样品中根际土壤细菌群落多样性最丰富, 根茎内生菌次之。在所有样品中, 主要的优势菌门为变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes 和绿弯菌门 Chloroflexi。相较于健康黄连组样品, 染病黄连根际土壤、根茎和叶片样品中多个菌属细菌相对丰度发生显著改变, 如 *Vibrionimonas*, 乳杆菌属 *Lactobacillus* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 等, 表明可能与黄连根腐病的发生有一定关联。此外, RDA 分析表明, 伯克氏菌属 *Burkholderia*、全噬菌属 *Holophaga* 和雷尔氏菌属 *Ralstonia* 与黄连根际土壤有机质、有效氮、pH 有显著相关性。本研究分析了两个不同地点的健康和染病黄连根际、叶片内生细菌和根际土壤细菌群落结构差异, 为综合分析黄连根腐病的成因和机制提供了参考。

**关键词** 黄连; 根腐病; 细菌群落结构; 高通量测序; 多样性

中图分类号: S435.675 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2020648

## Relationships between the occurrence of root-rot and the change in the community structure of rhizosphere soil bacteria, rhizome and leaf endophytic bacteria of *Coptis chinensis*

TANG Tao<sup>1</sup>, YUAN Bin<sup>2</sup>, WANG Fanfan<sup>1</sup>, GUO Jie<sup>1</sup>, GUO Xiaoliang<sup>1</sup>,  
DUAN Yuanyuan<sup>1</sup>, YOU Jingmao<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Herbal Medicines, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, China;  
2. Institute of Plant Protection, Soil and Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

**Abstract** To explore the relationships between the bacterial community structure and the occurrence of *Coptis chinensis* root rot, the composition and diversity of endophytic bacteria in rhizomes, leaves and rhizosphere soils bacteria of healthy and infected *Coptis chinensis* in two different locations were analyzed. The results showed that the rhizosphere soil bacterial communities had the greatest diversity, followed by endophytic bacteria in rhizomes. Overall, the dominant phyla were Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and Chloroflexi. Compared with bacteria from the healthy *C. chinensis* samples, the relative abundance of bacteria of multiple genera detected in rhizosphere soil, rhizome and leaf samples from infected *C. chinensis* changed significantly, for example *Vibrionimonas*, *Lactobacillus*, *Sphingomonas*, etc., suggested that these bacteria might be related to the occurrence of *C. chinensis* root rot. In addition, the RDA analysis showed that *Burkholderia*, *Holophaga*, *Ralstonia*, etc. were significantly correlated with organic matter, available nitrogen and pH value of rhizosphere soil. This study analyzed the composition and diversity of endophytic bacteria in rhizomes, leaves, and bacteria in rhizosphere soil of *C. chinensis* from two different locations, and provided a theoretical basis for the comprehensive analysis of the causes and mechanisms of *C. chinensis* root rot.

**Key words** *Coptis chinensis*; root-rot; bacterial community structure; high-throughput sequencing; diversity

收稿日期: 2020-12-06 修订日期: 2021-01-04

基金项目: 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室开放基金(2020ZTSJ6); 湖北省农业科技创新中心项目(2020-620-003-001); 恩施州研发计划(D20190015); 湖北省农业科学院中药材研究所青年基金(2020ZYCJJ03)

\* 通信作者 E-mail: jingmaoyou@126.com

黄连 *Coptis chinensis* 为毛茛科 Ranunculaceae 黄连属 *Coptis* 多年生草本植物,以根茎入药,具有广泛抗菌、抗病毒和抗氧化作用<sup>[1]</sup>。此外,黄连常用作糖尿病降糖和抗肿瘤的药物<sup>[2]</sup>。最新研究表明,黄连解毒汤中的活性物质能通过多靶点、多通路治疗新型冠状病毒肺炎<sup>[3]</sup>。恩施土家族苗族自治州是黄连的主产区之一,总种植面积在 5 000 hm<sup>2</sup> 左右,总产量 2 600 t<sup>[4]</sup>。然而,随着种植规模的不断扩大和连续多年栽培导致利川等地黄连不明原因根腐病发生严重,造成大面积减产甚至绝收,严重影响了黄连的产量、质量和农户的种植热情。有报道称镰刀菌 *Fusarium* spp. 是黄连根腐病病原真菌之一<sup>[5]</sup>,本文前期研究分离到娄斗菜茎点霉 *Phoma aquilegiicola* 为病原真菌之一。黄连根腐病病原菌种类多,具体病因复杂,防控难度较大。

近年来,众多研究表明根际土壤微生物区系变化是影响中药材种植连作障碍的重要因素<sup>[6]</sup>,微生物在土壤-根际-植物之间形成了一个植物与环境相联系的动态组合,而根际微生物组成和多样性的改变会影响土壤微生态功能,破坏土壤-根际-植物之间的微生物动态平衡,间接影响作物生长<sup>[7]</sup>。相关研究表明,植物在受到病原菌侵染后,植物根际土壤、茎秆以及叶际微生物群落结构都会发生变化。刘海洋等<sup>[8]</sup>对黄萎病棉田土壤真菌群落结构分析发现,重病棉田土壤真菌 OTU 数量、丰度均高于轻病或无病田,而真菌多样性降低。罗路云等<sup>[9]</sup>报道,南瓜叶际细菌群落  $\alpha$  多样性随着叶片白粉病病情等级的增加呈现出先降低后升高的趋势。本研究采用 Illumina Miseq 高通量测序技术对两个不同地点的健康、染病黄连的根茎、叶片内生细菌和根际土壤细菌的组成及多样性进行分析,为进一步分析黄连根腐病成因和发生机制提供理论依据,这对黄连产业的健康可持续发展具有十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

所有样品于 2019 年 10 月采集于恩施州利川市箭竹溪镇黄连种植基地(30°22'N,108°35'E,海拔 1 300 m)。样品采集自两个不同地点,两地距离在 3 km 以上。共分为 12 组:1)大道角村健康黄连根际土壤组,编号 DJT;2)大道角村根腐病黄连根际土壤组,编号 DBT;3)大道角村健康黄连根茎组,编号 DJG;4)大道角村根腐病黄连根茎组,编号 DBG;5)大道角村健康黄连叶片组,编号 DJY;6)大道角村

根腐病黄连叶片组,编号 DBY;7)板厂坪村健康黄连根际土壤组,编号 BJT;8)板厂坪村根腐病黄连根际土壤组,编号 BBT;9)板厂坪村健康黄连根茎组,编号 BJG;10)板厂坪村根腐病黄连根茎组,编号 BBG;11)板厂坪村健康黄连叶片组,编号 BJY;12)板厂坪村根腐病黄连叶片组,编号 BBY。分别在同一垄的 5 个不同位置取样混合均匀为一个样品,取地下 5~10 cm 左右的根际土壤,根茎样品和叶片样品在取样之后立即用 75%乙醇进行表面消毒,每组样品分别在不同位置采集 3 个样品为试验重复。样品装入无菌 50 mL 离心管中,低温运输至实验室,在 4℃ 条件下储藏备用。

### 1.2 土壤养分检测

速效氮测定采用凯氏定氮仪法<sup>[10]</sup>,速效磷测定采用 Bray 法<sup>[11]</sup>,速效钾测定采用醋酸铵-原子吸收光谱仪法<sup>[12]</sup>,pH 测定采用点位法<sup>[13]</sup>,全氮采用凯氏法<sup>[14]</sup>,全磷采用碱熔法<sup>[15]</sup>,全钾采用火焰原子吸收法<sup>[16]</sup>。

### 1.3 样品总 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit(MOBIO, 美国)提取根际土壤样品微生物总 DNA。根茎和叶片剪碎液氮处理磨碎后,采用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit 提取总 DNA。同时采用 Nanodrop 对 DNA 进行定量,并通过 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。采用通用引物 338 F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806 R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对 16S rDNA 的 V3~V4 区进行 PCR 扩增。PCR 扩增采用全式金公司的 Pfu 高保真 DNA 聚合酶,并严格控制扩增循环数,使循环数尽可能低的同时,也保证同一批样本的扩增条件一致。PCR 产物采用 Vazyme VAHT-STM DNA Clean Beads 试剂盒进行磁珠纯化回收。

### 1.4 文库制备与上机测序

采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库。构建好的文库经检测合格后,使用 Illumina Miseq 平台测序,委托上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

### 1.5 测序数据处理和 OTU 聚类分析

采用 Illumina MiSeq 平台对群落 DNA 片段进行双端(paired-end)测序,运用 QIIME 软件(Quantitative Insights Into Microbial Ecology,v1.8.0,http://qiime.org/)识别疑问序列,采用 USEARCH(v5.2.236,http://www.drive5.com/usearch/)检

查并剔除嵌合体序列,获得每个样品的有效序列。采用 UCLUST 序列比对工具对前述获得的序列按 97% 的序列一致性进行归并和 OTU (operational taxonomic unit) 划分,并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。将丰度值低于全体样本测序总量 0.001% (十万分之一) 的 OTU 去除,并将去除了稀有 OTU 的丰度矩阵用于后续的一系列分析。

### 1.6 菌群组成及差异分析

使用 QIIME 软件和 R 软件,获取每个样本在门和属水平的物种组成和丰度分布情况,并绘制成柱状图。根据所有样本在属水平的物种组成及丰度信息,选取丰度排名前 50 的属,根据其在每个样本中的丰度信息,从物种和样本 2 个层面进行聚类,采用 R 软件制作热图。通过 R 软件,对属水平的群落组成结构进行主成分分析 (PCA),并且以二维图像描述样本间的自然分布特征。使用 Mothur 软件,调用 Metastats 的统计学算法,对门和属水平的各个分类单元在组之间的序列量 (即绝对丰度) 差异进行两两比较检验。

### 1.7 不同样品细菌组成的 NMDS 分析

非量度多维尺度分析 (NMDS) 是通过将样本距离矩阵作降维分解,简化数据结构,从而在特定距离尺度下描述样本的分布特征。与 PCA 分析不同, NMDS 分析不依赖于特征根和特征向量的计算,而是通过对样本距离进行等级排序,使样本在低维空间中的排序尽可能符合彼此之间的相似距离的远近关系 (而非确切的距离数值)。因此, NMDS 分析不受样本相似距离数值的影响,仅考虑彼此之间的大小关系,对于结构复杂的数据,排序结果可能更稳定。NMDS 是距离值的秩次 (数据排名) 信息的评估,图形上样本信息仅反映样本间数据秩次信息的远近,而不反映真实的数值差异,横纵坐标轴并无权重意义,横轴不一定比纵轴更加重要。NMDS 整体降维效果由 (Stress) 进行判断。NMDS 结果的应力

值越小越好,一般认为当该值小于 0.2 时, NMDS 分析的结果较可靠。

### 1.8 细菌多样性和群落结构与环境因子的关系分析

细菌群落结构和环境因子的关联性采用 R 软件包进行冗余分析 (redundancy analysis, RDA)。RDA 分析是将样本和环境因子反映在同一个二维排序图上,箭头连线之间的夹角表示相关性,锐角为正相关,钝角为负相关。夹角越小,相关性越高。

### 1.9 数据统计与分析

采用 Excel 2019 和 Prism 6.0 对数据进行统计分析和差异显著性检验 ( $t$ -test,  $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 健康黄连和根腐病黄连根际土壤养分变化

如表 1 所示, 2 个不同地点健康黄连根际土壤 pH 显著高于根腐病黄连根际土壤 ( $P < 0.05$ ), 此外, 健康黄连根际土壤有机质、碱解氮、速效磷、全磷、全氮均显著高于根腐病黄连根际土壤 ( $P < 0.05$ )。但是速效钾和全钾含量在 2 个不同地点表现不一致, 在大道角村样品中根腐病黄连根际土壤速效钾含量显著高于健康黄连根际土壤 ( $P < 0.05$ ), 全钾含量没有显著差异。板厂坪村样品中根腐病黄连根际土壤速效钾含量和全钾含量均显著低于健康黄连根际土壤 ( $P < 0.05$ )。这表明土壤 pH、有机质、碱解氮、速效磷、全磷、全氮含量可能与黄连根腐病发生有一定联系。

### 2.2 健康黄连和根腐病黄连根际土壤、根茎、叶片样品的 $\alpha$ 多样性分析

对健康黄连和根腐病黄连根际土壤、根茎、叶片样品采用 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序, 去噪后用于后续分析的有效序列共 6 082 093 条, 各样品序列信息详见表 2。

表 1 不同黄连样品根际土壤养分<sup>1)</sup>

Table 1 The nutrients in rhizosphere soil of different *Coptis chinensis* samples

采集地 Collection site	取样部位 Sampling location	pH	有机质/g · kg <sup>-1</sup> Organic matter	碱解氮/mg · kg <sup>-1</sup> Available nitrogen	速效磷/mg · kg <sup>-1</sup> Available phosphorus
大道角村 Dadaojiao village	染病黄连	(4.73 ± 0.025)d	(17.94 ± 0.688)b	(64.74 ± 1.335)d	(105.23 ± 2.147)b
	健康黄连	(4.80 ± 0.021)c	(19.11 ± 0.203)a	(71.85 ± 3.359)c	(137.96 ± 0.941)a
板厂坪村 Banchangping village	染病黄连	(4.91 ± 0.021)b	(15.81 ± 0.341)c	(87.43 ± 1.541)b	(31.04 ± 0.332)d
	健康黄连	(5.18 ± 0.025)a	(18.27 ± 0.611)ab	(152.39 ± 3.359)a	(70.13 ± 1.657)c

续表 1 Table 1(Continued)

采集地 Collection site	取样部位 Sampling location	速效钾/mg·kg <sup>-1</sup> Available potassium	全氮/% Total nitrogen	全磷/% Total phosphorus	全钾/% Total potassium
大道角村 Dadaojiao village	染病黄连	(146.95±0.738)c	(0.12±0.005)b	(0.11±0.001)b	(2.29±0.043)a
	健康黄连	(128.23±1.224)d	(0.13±0.002)a	(0.15±0.001)a	(2.23±0.036)a
板厂坪村 Banchangping village	染病黄连	(151.21±0.738)b	(0.12±0.002)b	(0.05±0.001)d	(2.08±0.010)c
	健康黄连	(217.72±1.279)a	(0.14±0.002)a	(0.06±0.001)c	(2.12±0.020)b

1) 表中同列不同小写字母表示经 GraphPad Prism 软件中的多重 t 测验分析样品间差异显著(P<0.05)。

Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by multiple t test on GraphPad Prism at 0.05 level.

表 2 不同黄连样品序列信息

Table 2 Sequence information of different *Coptis chinensis* samples

采集地 Collection site	取样部位 Sampling location	原始序列数/条 Input sequence	净化序列数/条 Filtered sequence	有效序列数/条 Denoised sequence	平均长度/bp Average length
大道角村 Dadaojiao village	健康黄连根际土壤	604 848	567 856	550 097	415
	染病黄连根际土壤	540 929	509 486	490 228	413
	健康黄连根茎	605 538	564 713	557 131	414
	染病黄连根茎	541 665	499 250	489 962	410
	健康黄连叶片	514 776	483 071	481 327	411
	染病黄连叶片	482 808	452 918	449 284	412
板厂坪村 Banchangping village	健康黄连根际土壤	592 358	558 040	541 483	414
	染病黄连根际土壤	546 918	510 733	488 702	413
	健康黄连根茎	509 435	477 073	473 596	410
	染病黄连根茎	551 714	510 796	502 799	412
	健康黄连叶片	555 648	523 186	521 929	411
	染病黄连叶片	589 342	537 398	535 555	412

对所有样品细菌 α 多样性指数进行分析表明,根腐病黄连根际土壤、根茎、叶片样品的丰富度指数(observed-species, Chao1)普遍高于对应的健康黄连样品,仅根际土壤样品无显著差异,这表明根腐病黄连根茎、叶片样品的丰富度高于对应的健康黄连样品。从种群多样性指数(Shannon 和 Simpson)的差异可以看出,根腐病黄连根际土壤、根茎、叶片样品与对应的健康黄连样品细菌种群多样性指数差异并不明显,有病样高于健康样品,也有健康样品高于根腐病样,多数没有显著差异(表 3)。总体上看,根际土壤样品种群丰富度和多样性大于根茎样品,根茎样品种群丰富度和多样性大于叶片

样品。

### 2.3 测序深度和 OTU 聚类分析

测序结果经稀释曲线(rarefaction curve)检查显示合理,12 组共 36 个样品测序结果中包含了大多数细菌类群,测序深度覆盖了试验样品中所有测序对象,基本可以反映样品中绝大多数的细菌多样性信息。从花瓣图可以看出,黄连根际土壤细菌群落丰富度最高,均在 800~1 000 个 OTUs,其次是根茎样品,约有 300~600 个 OTUs,黄连叶片样品细菌群落丰富度最低,均在 100~300 个 OTUs(图 1)。此外,12 组样品共有的 OTU 只有 4 个,这说明各个样品间细菌群落组成相差较大。

表 3 不同黄连样品的 α 多样性指数<sup>1)</sup>

Table 3 The alpha diversity index of different *Coptis chinensis* samples

采集地 Collection site	取样部位 Sampling location	Chao1	Simpson	Shannon	均匀度/% Uniformity	覆盖度/% Coverage
大道角村 Dadaojiao village	健康黄连根际土壤	(5 574.35±273.88)a	(1.00±0.000 17)a	(10.57±0.08)a	(85.50±0.17)a	(99.39±0.06)a
	染病黄连根际土壤	(5 953.34±836.05)a	(1.00±0.000 44)a	(10.69±0.23)a	(85.71±0.50)a	(99.42±0.18)a
	健康黄连根茎	(1 728.72±191.91)b	(0.96±0.001 14)b	(7.19±0.07)b	(67.23±0.40)b	(99.71±0.10)a
	染病黄连根茎	(2 656.36±113.72)a	(0.99±0.000 12)a	(9.21±0.03)a	(81.32±0.02)a	(99.58±0.10)a
	健康黄连叶片	(292.83±26.65)b	(0.98±0.001 23)a	(6.82±0.02)a	(83.94±0.83)a	(98.81±0.43)a
	染病黄连叶片	(393.73±27.99)a	(0.95±0.000 18)b	(5.61±0.02)b	(70.84±0.18)b	(96.45±0.25)b

续表 3 Table 3(Continued)

采集地 Collection site	取样部位 Sampling location	Chao1	Simpson	Shannon	均匀度/% Uniformity	覆盖度/% Coverage
板厂坪村 Banchangping village	健康黄连根际土壤	(6 118.22±329.76)a	(0.998 3±0.000 19)a	(10.82±0.09)a	(86.55±0.33)a	(99.36±0.10)b
	染病黄连根际土壤	(6 261.93±783.85)a	(0.997 8±0.000 19)b	(10.88±0.13)a	(86.54±0.23)a	(99.54±0.13)a
	健康黄连根茎	(873.88±31.67)b	(0.988 5±0.000 61)a	(7.88±0.04)b	(80.91±0.34)a	(99.68±0.05)a
	染病黄连根茎	(2 128.97±67.36)a	(0.987 2±0.000 36)b	(8.39±0.04)a	(77.96±0.13)b	(97.70±0.11)b
	健康黄连叶片	(109.73±20.83)b	(0.962 9±0.005 32)b	(5.67±0.20)b	(84.45±1.47)a	(98.83±0.89)a
	染病黄连叶片	(240.78±12.53)a	(0.975 5±0.001 24)a	(6.42±0.01)a	(84.99±0.56)a	(93.82±0.59)b

1) 表中数据为平均值±SE。不同小写字母表示相同地点和取样部位的病健样品间经 GraphPad Prism 软件中的 *t* 测验  $\alpha$  多样性指数差异显著 ( $P<0.05$ )。

The data in the table are mean±SE. The different lowercase letters indicate significant difference between healthy and infected samples from the same collection site and sampling location ( $P<0.05$ ). These data are analyzed by *t*-test on GraphPad Prism at 0.05 level.

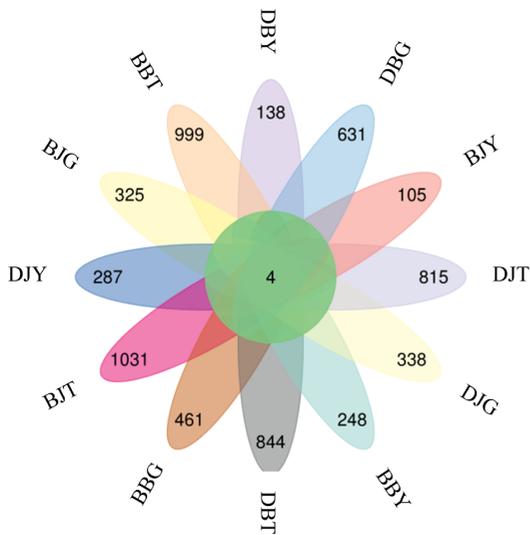


图 1 不同黄连样品 16S rDNA 测序的 OTU 花瓣图

Fig. 1 OTU petal map of 16S rDNA sequencing of different *Coptis chinensis* samples

## 2.4 不同样品的细菌物种组成

如图 2 所示,根际土壤、根茎和叶片样品细菌组成在门水平上的丰富度差异较大,根际土壤样品相对丰度前 5 的菌群依次为变形菌门 Proteobacteria (27.94%~48.43%)、酸杆菌门 Acidobacteria (11.45%~26.78%)、放线菌门 Actinobacteria (8.08%~13.17%)、绿弯菌门 Chloroflexi (4.14%~16.52%)、拟杆菌门 Bacteroidetes (4.44%~7.71%);根茎样品相对丰度前 5 的菌群依次为变形菌门 (62.66%~74.18%)、放线菌门 (10.43%~18.47%)、拟杆菌门 (4.20%~9.90%)、酸杆菌门 (1.75%~3.05%)、绿弯菌门 (0.26%~1.29%);叶片样品相对丰度前 5 的菌群依次为变形菌门 (64.15%~88.05%)、放线菌门 (0.73%~21.12%)、拟杆菌门 (6.49%~21.12%)、绿弯菌门 (0.26%~1.29%)、厚壁菌门 Firmicutes (0.23%~

图中数字为各样本的 OTU 数量。

DJT: 大道角村健康黄连根际土壤样品; DBT: 大道角村染病黄连根际土壤样品; DJG: 大道角村健康黄连根茎样品; DBG: 大道角村染病黄连根茎样品; DJY: 大道角村健康黄连叶片样品; DBY: 大道角村染病黄连叶片样品; BJT: 板厂坪村健康黄连根际土壤样品; BBT: 板厂坪村染病黄连根际土壤样品; BJG: 板厂坪村健康黄连根茎样品; BBG: 板厂坪村染病黄连根茎样品; BJY: 板厂坪村健康黄连叶片样品; BBY: 板厂坪村染病黄连叶片样品。下同

The figures in petal map are the number of OTU for each sample.

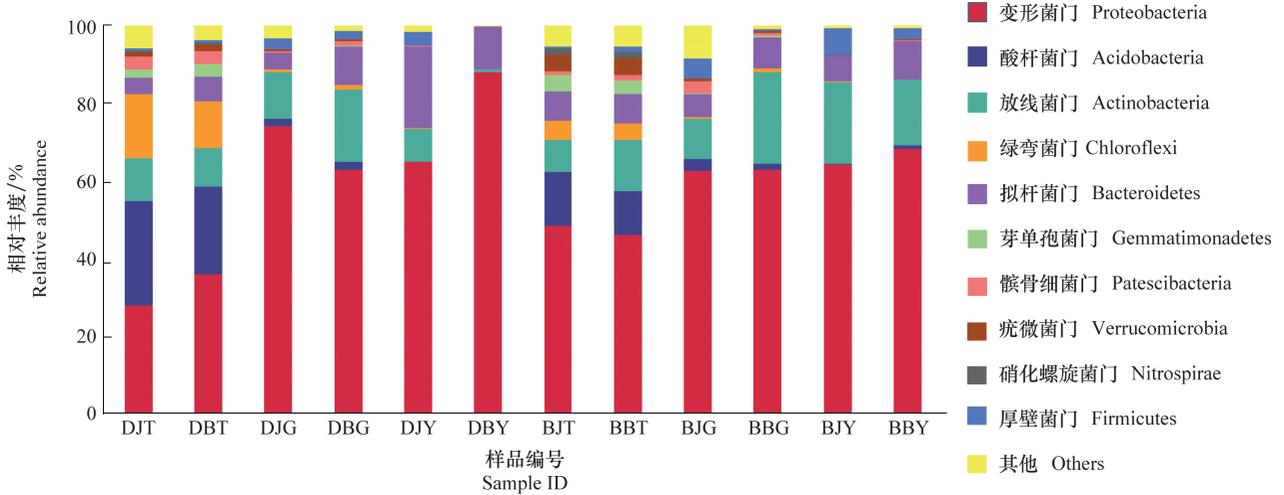
DJT: Rhizosphere soil samples of healthy *Coptis chinensis* in Dadaojiao village; DBT: Rhizosphere soil samples of *C. chinensis* infected with root-rot in Dadaojiao village; DJG: Rhizome samples of healthy *C. chinensis* in Dadaojiao village; DBG: Rhizome samples of *C. chinensis* infected with root-rot in Dadaojiao village; DJY: Leaf samples of healthy *C. chinensis* in Dadaojiao village; DBY: Leaf samples of *C. chinensis* infected with root-rot in Dadaojiao village; BJT: Rhizosphere soil samples of healthy *C. chinensis* in Banchangping village; BBT: Rhizosphere soil samples of *C. chinensis* infected with root-rot in Banchangping village; BJG: Rhizome samples of healthy *C. chinensis* in Banchangping village; BBG: Rhizome samples of *C. chinensis* infected with root-rot in Banchangping village; BJY: Leaf samples of healthy *C. chinensis* in Banchangping village; BBY: Leaf samples of *C. chinensis* infected with root-rot in Banchangping village. The same applies below

7.02%)。相同地点相同部位根腐病和健康黄连样品相比较,细菌菌群组成差异不明显,但各菌门相对丰度差异明显,如大道角村根腐病黄连根际土壤样品较健康黄连根际土壤样品变形菌门丰度显著上升,酸杆菌门和绿弯菌门丰度显著下降 ( $P<0.05$ )。

为了更直观地展示所有根腐病和健康黄连样品细菌群落结构的差异,根据所有样品在属水平上细菌群落结构差异,绘制了相对丰度前 20 属的相对丰度堆积图。如图 3 所示,各样品属水平细菌组成差异较大,其中土壤样品细菌多样性更丰富,前 20 属细菌相对丰度仅占 10% 左右。其次为黄连根茎样品,前 20 属细菌相对丰度占 40% 左右。黄连叶片样品细菌多样性最差,前 20 属细菌相对丰度占 70% 左右。土壤样品、根茎样品和叶片样品之间细菌组成差异明显,而土壤样品、根茎样品和叶片样品内部差异较小。黄连根际土壤样品细菌组成复杂多

样,相对丰度较高的属为全噬菌属 *Holophaga*、嗜酸栖热菌属 *Acidothermus*、*Pseudolabrys* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 等。黄连叶片样品细菌组成最简单,相对丰度较高的属为甲基杆菌属 *Methylobacterium*、鞘氨醇单胞菌属、雷尔氏菌属 *Ralsto-*

*nia* 和薄层菌属 *Hymenobacter* 等。黄连根茎样品细菌组成与叶片样品比较相似,相对丰度较高的属为鞘氨醇单胞菌属、伯克氏菌属 *Burkholderia*、慢生根瘤菌属 *Bradyrhizobium* 和异根瘤菌属 *Allorhizobium*。

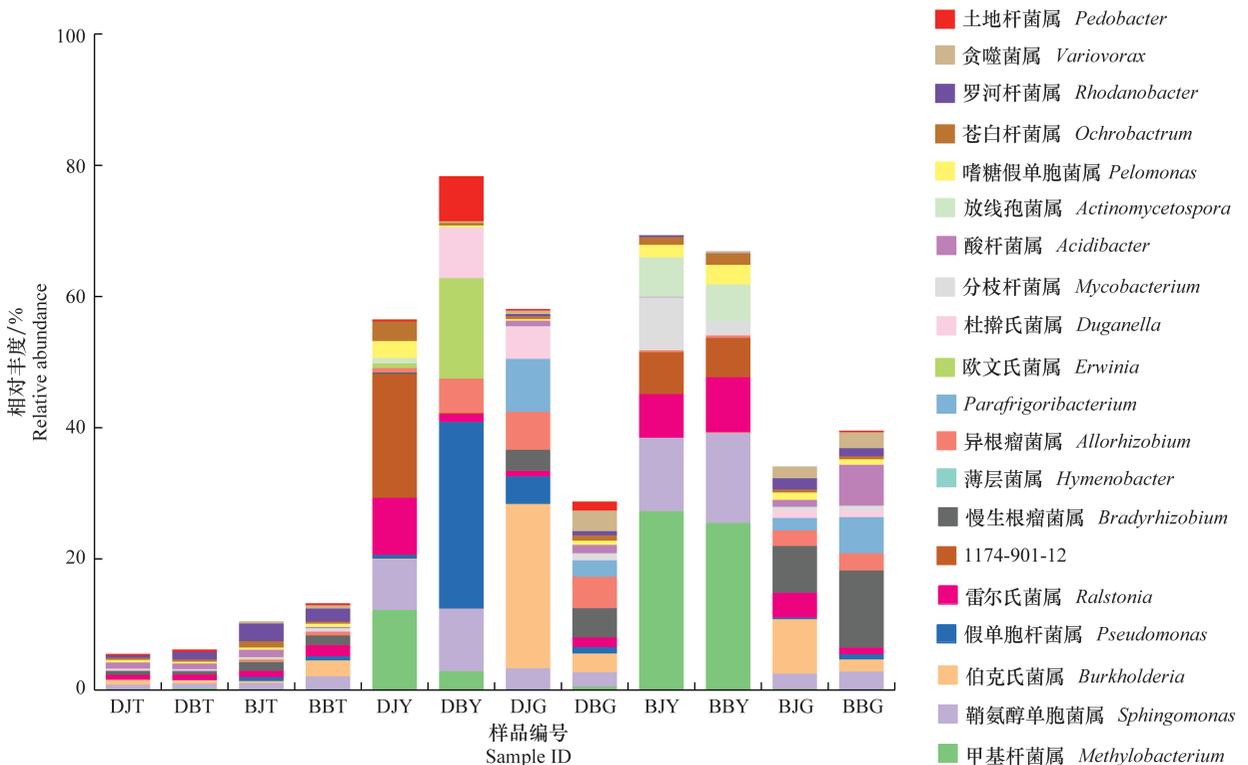


样品编号所代表的样点信息同图1

Sample point information represented by letters is the same as in figure 1

图2 不同黄连样品的门水平细菌组成

Fig. 2 Bacterial composition at the phylum level of different *Coptis chinensis* samples



样品编号所代表的样点信息同图1

Sample point information represented by letters is the same as in figure 1

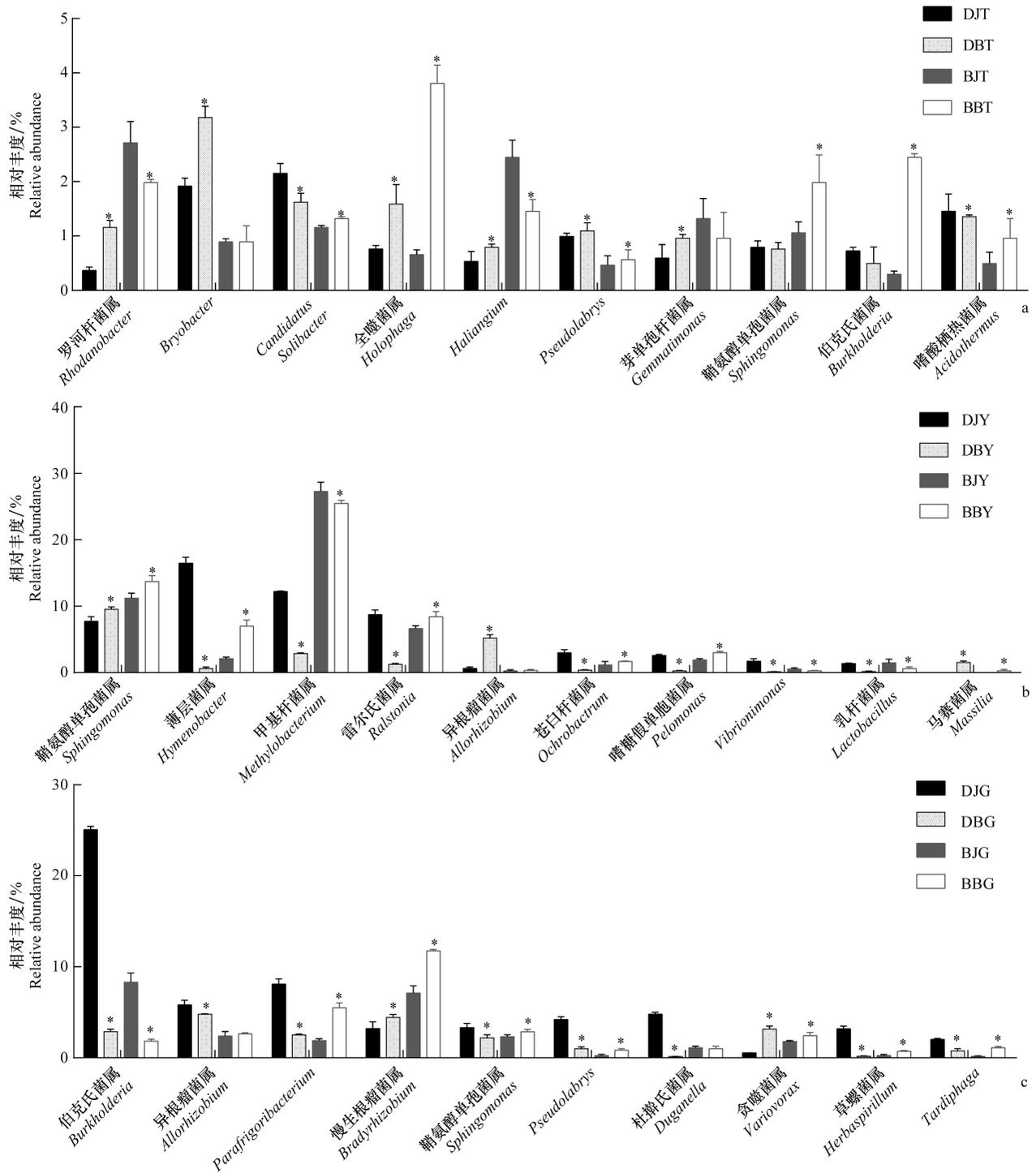
图3 不同黄连样品的属水平细菌堆积图

Fig. 3 The bacterial accumulation diagram at the genus level of different *Coptis chinensis* samples

## 2.5 不同样品细菌组成差异性分析与根腐病发生关联性分析

为进一步分析各细菌群落与黄连根腐病发生的

关系, 选取相对丰度前 10 的细菌群落分析各处理间细菌群落的差异与黄连根腐病发生的关联。如图 4 所示, 健康黄连样品与染病黄连样品的部分细菌菌



样品编号所代表的样点信息同图1。a: 不同黄连根际土壤样品细菌属水平群落结构差异; b: 不同黄连叶片样品内生细菌属水平群落结构差异; c: 不同黄连根茎内生细菌属水平群落结构差异; \*表示对应染病样品与健康样品存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

Sample point information represented by letters is the same as in figure 1. a: The difference in the bacterial community structure at the genus level in different *C. chinensis* rhizosphere soil samples; b: The difference in the endophytic bacterial community structure at the genus level in different *C. chinensis* leaf samples; c: The difference in the endophytic bacterial community structure at genus level in different *C. chinensis* rhizome samples. \* indicates significant difference between the infected samples and the corresponding healthy samples ( $P < 0.05$ )

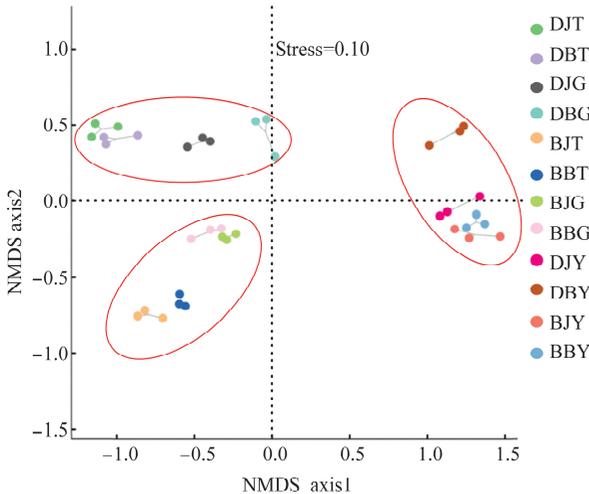
图 4 不同黄连样品的属水平细菌相对丰度差异

Fig. 4 The differences in the relative abundances of bacteria at the genus level in different *Coptis chinensis* samples

群相对丰度差异明显。在两个不同地点根际土壤样品中,全噬菌属和 *Pseudolabrys* 的相对丰度均为染病黄连根际土壤样品高于健康黄连根际土壤样品(图 4a);在两个不同地点黄连叶片样品中,*Vibriionimas* 和乳杆菌属 *Lactobacillus* 的相对丰度均为染病黄连叶片样品低于健康黄连叶片样品,鞘氨醇单胞菌属的相对丰度均为染病黄连叶片样品高于健康黄连叶片样品(图 4b);在两个不同地点黄连根茎样品中,伯克氏菌属的相对丰度均为染病黄连根茎样品低于健康黄连根茎样品,慢生根瘤菌属和贪噬菌属 *Variovorax* 的相对丰度均为染病黄连根茎样品高于健康黄连根茎样品(图 4c)。而其他菌属在两地不同样品中的差异不一致。两组样品染病组症状相同,因此推测在大道角村和板厂坪村健康黄连根际土壤样品和染病黄连根际土壤样品中相对丰度变化趋势相同的菌群更有可能与黄连根腐病发生有一定关联。

### 2.6 不同样品细菌组成的 NMDS 分析

如图 5 所示,总体上看所有样品大致聚集于 3 个区域,分别为大道角的根际土壤和根茎样品、板厂坪的根际土壤和根茎样品、两地的黄连叶片样品。两地黄连根际土壤和根茎样品分布较为集中,而与叶片样品距离较远,说明黄连根际土壤样品细菌群落与根茎样品细菌群落亲缘关系较近,根茎样品细菌群落中部分菌群可能直接来源于根际土壤。相同地点相同部位不同染病状态的样品区分不明显,而不同采样地点的样品区分明显,这表明地域因素对



图例中字母代表的样点信息同图1  
Sample point information represented by letters in the legend is the same as in figure 1

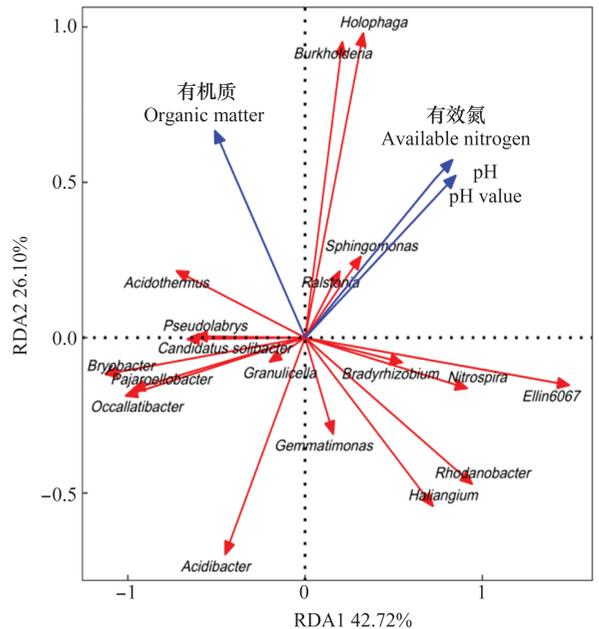
图 5 不同黄连样品 NMDS 二维排序图

Fig. 5 Two-dimensional sequence NMDS diagram of different *Coptis chinensis* samples

黄连细菌群落组成影响较大,是影响黄连各样品细菌群落组成的主要因素。而是否染病对样品细菌群落组成的影响相对较小。

### 2.7 细菌多样性和群落结构与环境因子的关系

利用 RDA 分析不同地点健康黄连和染病黄连根际土壤细菌主要差异菌群与土壤环境因子之间的关系,结果如图 6 所示,黄连根际土壤中土壤有效氮和 pH 与伯克氏菌属 *Burkholderia*、全噬菌属 *Holophaga*、雷尔氏菌属 *Ralstonia* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* 显著正相关。黄连根际土壤中有有机质含量与嗜酸栖热菌属 *Acidothermus* 显著相关。



RDA二维排序图中,红色箭头代表细菌群落,蓝色箭头代表环境因素。箭头线之间的角度指示相关性,锐角为正相关性,钝角为负相关性。角度越小,相关性越高  
RDA analysis reflects the sample and environmental factors in the same two-dimensional ranking chart. The red arrows represent bacterial communities and the blue arrows represent environmental factors. The angle between the arrow lines indicates their correlation: an acute angle is a positive correlation, and an obtuse angle is a negative correlation. The smaller the angle, the closer the correlation

图 6 黄连根际土壤细菌群落与环境因子的 RDA 图

Fig. 6 RDA ordination graph for the bacterial community and environmental factors in rhizosphere soils of *Coptis chinensis*

### 3 讨论

黄连根际土壤样品中细菌群落主要为变形菌门、酸杆菌门、放线菌门和绿弯菌门,这一结果与前人关于土壤细菌群落结构的测序分析结果相同<sup>[17-18]</sup>。但与宋旭红等<sup>[19]</sup>所测石柱县黄连根际土壤微生物结果不尽相同,这可能是因为采样地点的差异造成的。微生物种群的丰富度和多样性在土壤

质量、功能和土壤生态系统的可持续发展中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。在一定程度上,土壤微生物群落结构的变化可以反映出土壤质量的变化。有研究表明,土壤微生物种群丰富度和多样性的降低可能与连作障碍<sup>[21]</sup>和植株抗病能力<sup>[18]</sup>有一定关系。本研究中,健康黄连根际土壤样品与感染根腐病黄连土壤样品细菌群落多样性并没有显著差异,但健康黄连根际土壤样品与感染根腐病黄连土壤样品的部分菌群的相对丰度存在明显差异。在门水平上,酸杆菌门和绿弯菌门在健康黄连根际土壤样品中相对丰度显著高于感染根腐病黄连土壤样品,变形菌门和拟杆菌门在健康黄连根际土壤样品中相对丰度显著低于感染根腐病黄连土壤样品。从黄连根际土壤、根茎和叶片样品中相对丰度前 10 的属来看,全噬菌属、慢生根瘤菌属和贪噬菌属等的相对丰度与黄连根腐病的发生呈正相关。*Vibrionimonas*、乳杆菌属和伯克氏菌属等的相对丰度与黄连根腐病的发生呈负相关。鞘氨醇单胞菌属能提高植物抗逆性,常被视作植物益生菌<sup>[22]</sup>。在染病黄连叶片样品中鞘氨醇单胞菌属相对丰度高于健康黄连叶片样品,这可能是由于染病的逆环境因素刺激了其在叶片中的积累。这也提示我们,后续研究黄连根腐病生防菌筛选工作时,不仅要关注和黄连根腐病的发生呈负相关的相关菌群,也要重点关注部分染病样品中丰度较高的有益菌群。谢学文等就从番茄根际土壤中筛选出番茄疫霉 *Phytophthora capsici* Leonian 的拮抗菌<sup>[23]</sup>。此外, $\alpha$ 多样性分析表明相同地点相同部位健康样品和染病样品之间菌群结构差异表现为根茎样品和叶片样品差异大于根际土壤样品差异。相关菌群可能通过分泌物促使植物发病,也可能通过降解土壤中有机质,产生某种抑制病原生长的物质,从而减缓病害的发生<sup>[24]</sup>。此外,测序发现黄连根茎样品和叶片样品中细菌群落丰富度和多样性显著低于黄连根际土壤样品。这可能是由于黄连内部某些物质具有一定抑菌作用,因为黄连本身就具有解毒抗菌的作用。李阳波等研究发现黄连根须浸提液对细菌有一定抑制作用<sup>[25]</sup>,这应该也是相同原理。在分析染病根际土壤养分时发现,染病黄连根际土壤样品有机质、碱解氮、速效磷、全磷、全氮均显著高于健康黄连根际土壤。同时我们在调查过程中发现,农户在种植过程中大量使用化肥,这可能也是黄连根腐病严重的一个重要原因。在分析根茎样品细菌群落结构时发现,慢生根瘤菌属和异根瘤菌属相对丰度

很高。慢生根瘤菌属和异根瘤菌属能与植物互利共生通过生物固氮为植物提供养分<sup>[26]</sup>。在大豆等豆科植物中根瘤菌能寄生植物形成根瘤,在黄连种植过程中也发现在须根上有类似根瘤的存在。这是首次有关黄连根瘤菌的报道,当然慢生根瘤菌属和异根瘤菌属是否发挥固氮作用需要进一步研究。

此外,本研究仅分析了染病后黄连根际土壤、根茎和叶片样本中细菌群落结构的变化,对于染病样本真菌群落结构的变化需要进一步研究。宋旭红等<sup>[19]</sup>研究发现黄连根腐病植株土壤中子囊菌门、担子菌门和壶菌门相对丰度显著高于健康黄连植株,而接合菌门、囊球菌门的相对丰度显著低于健康黄连植株。丹参红叶病病株根区土细菌数量较健株减少 41.3%,真菌和放线菌数量分别较健株增 156.6%和 189.5%<sup>[27]</sup>。也有研究表明真菌与豆科植物根部病害的发生关系密切,是潜在的土壤生物指示因子<sup>[28]</sup>。这些都说明根际土壤和植物体内真菌和细菌都与植物病害的发生有一定关系。

总之,本研究通过对两个不同地点黄连根际土壤、根茎、叶片样品细菌群落结构多样性分析表明:在细菌多样性上,黄连根际土壤样品>根茎样品>叶片样品。在所有样品中,主要的优势菌门为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和绿弯菌门。相较于健康黄连组样品,染病黄连根际土壤、根茎和叶片样品中多个菌属细菌相对丰度发生显著改变,如 *Vibrionimonas*、乳杆菌属和鞘氨醇单胞菌属等可能与黄连根腐病的发生有一定关联。此外,RDA 分析表明,伯克氏菌属、全噬菌属和雷尔氏菌属与黄连根际土壤有机质、有效氮、pH 有显著相关性。这些都为黄连根腐病防治提供了理论依据,同时也为黄连根腐病生物防治等提供了研究基础。

## 参考文献

- [1] 马伯艳,李寒,李云凤,等. 黄连及其有效成分降糖作用的研究进展及量效关系[J]. 中成药, 2019, 41(12): 2970-2973.
- [2] 马国琴,刘东玲. 黄连药理研究进展[J]. 甘肃农业, 2019(10): 97-99.
- [3] 黄浪浪,王建安,徐驹,等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制研究[J]. 中药材, 2020, 43(3): 779-785.
- [4] 唐春梓,刘国华,廖朝林,等. 湖北恩施地道药材黄连的发展历史与开发前景[J]. 宁夏农林科技, 2011, 52(12): 191-192.
- [5] 伍晓丽,王钰,刘飞,等. 黄连根腐病镰刀菌属病原真菌鉴定[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1323-1328.

度量。例如阿维菌素和井冈霉素,它们对靶标生物都是高效的。但是它们对环境生物的毒性相差很大,阿维菌素是高毒,而井冈霉素是微毒。

由此我们建议,在农药减施增效的评价工作中,从绿色防控、保护生态环境的角度来看,作物上农药的使用不仅仅是减量,应该是在保障防病治虫,农作物增产增收的前提下,综合考虑选用毒性指数低的农药,鼓励农药减量化走出一条绿色发展道路。

## 参考文献

- [1] 周真,路奎远,于辉,等. 农药使用情况调查、存在的问题及建议[J]. 农药科学与管理, 2010, 31(4): 18-21.
- [2] 周增辉,陈晓龙,章志云. 主要农作物农药使用中存在的问题与
- (上接 81 页)
- [6] 余妙,蒋景龙,任绪明,等. 西洋参根腐病发生与根际真菌群落变化关系研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2038-2047.
- [7] 张淑婷,周利华,赵文卓. 植物内生细菌对植物健康的作用[J]. 植物医生, 2020, 33(1): 6-11.
- [8] 刘海洋,王伟,张仁福,等. 黄萎病不同发生程度棉田土壤中的真菌群落特征分析[J]. 中国农业科学, 2019, 52(3): 455-465.
- [9] 罗路云,张卓,金德才,等. 南瓜白粉病不同病情等级下叶际细菌群落结构和多样性[J]. 植物病理学报, 2017, 47(5): 688-695.
- [10] 莎娜,张三粉,骆洪,等. 两种土壤碱解氮测定方法的比较[J]. 内蒙古农业科技, 2014(6): 25-26.
- [11] 宋涛,朴世领,陈旸,等. 苹果梨园土壤 pH 和有效磷的变化[J]. 延边大学农学学报, 2018, 40(3): 9-15.
- [12] 安家琦,范鹏志,张钰,等. 用原子吸收分光光度计测定土壤速效钾含量[J]. 农业工程技术, 2020, 40(11): 46-47.
- [13] 王瑞琨. 用电位法测定土壤 pH 值[J]. 山西化工, 2018, 38(3): 64-65.
- [14] 刘燕. 《土壤质量 全氮的测定 凯氏法》的方法改进[J]. 化工管理, 2020(14): 45-46.
- [15] 郭鑫,陈魏,张及亮,等. 土壤磷含量的测定方法[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(2): 108-110.
- [16] 朱波,倪俊,高丽,等. 土壤全磷全钾同时测定方法研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(15): 110-111.
- [17] HUANG Junsheng, HU Bin, QI Kainin, et al. Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in a subalpine spruce plantation [J]. European Journal of Soil Biology, 2016, 72: 35-41.
- [18] TAN Yong, CUI Yinshan, LI Haoyu, et al. Rhizospheric soil and root endogenous fungal diversity and composition in response to continuous *Panax notoginseng* cropping practices

应对措施[J]. 上海农业科技, 2011(2): 25.

- [3] 金书秦,杜珉. 棉农的农药使用行为及政策建议——基于河北曲周的跟踪性调查[J]. 中国棉花, 2013, 40(5): 1-4.
- [4] WILLIAMSON S, BALL A, PRETTY J. Trends in pesticide use and drivers for safer pest management in four African countries [J]. Crop Protection, 2008, 27(10): 1327-1334.
- [5] SNELDERA D J, MASIPIQUEN M D, DE SNOO G R. Risk assessment of pesticide usage by smallholder farmers in the Cagayan Valley (Philippines)[J]. Crop Protection, 2007, 27(3): 747-762.
- [6] 王淑洁. 农药毒性[M]//中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书—农药卷. 北京:中国农业出版社, 1993: 235-236.
- [7] 农业部种植业管理司,农业部农药检定所. 新编农药手册[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社, 2015.
- [8] 唐启义, DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社, 2013.
- (责任编辑:杨明丽)
- [J]. Microbiological Research, 2017, 194: 10-19.
- [19] 宋旭红,王钰,李隆云,等. 石柱黄连根腐病根际土壤细菌微生态研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1304-1311.
- [20] KENNEDY A C, SMITH K L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils [J]. Plant Soil, 1995, 170(1): 75-86.
- [21] WU Xiong, LI Zhigang, LIU Hongjun, et al. The effective of long-term continuous cropping of black pepper on soil bacterial communities as determined by 454 pyrosequencing [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0136946. DOI: 10.1371/journal.pone.0136946.
- [22] 缪作清,李世东,刘杏忠,等. 三七根腐病原研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378.
- [23] 谢学文,赵显榕,孙雪莹,等. 番茄疫霉根腐病生防菌的分离鉴定及其防治效果[J]. 植物病理学报, 2020, 50(5): 610-617.
- [24] 朱菲莹,张屹,肖姬玲,等. 生物有机肥对土壤微生物群落结构变化及西瓜枯萎病的调控[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2323-2333.
- [25] 李阳波,何林卫,张薇,等. 黄连须根浸提液对土壤微生物及酶活性的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 4205-4210.
- [26] FERNANDO S G, EDSON C S, PAULO H P, et al. Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence [J/OL]. Applied Soil Ecology, 2021, 157: 103764. DOI: 10.1016/j.apsoil.2020.103764.
- [27] 段佳丽,舒志明,薛泉宏,等. 丹参红叶病发生的微生态机制[J]. 应用生态学报, 2013, 24(7): 1991-1999.
- [28] 陆晓菊,官会林,张正芸,等. 三七连作根际土壤微生物区系的 16S rRNA 系统遗传多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 205-213.
- (责任编辑:杨明丽)