

基于高通量测序的紫花丹参与白花丹参根际真菌群落结构研究

蒋靖怡^{1,2} 杜用玺¹ 王铁霖¹ 池秀莲¹ 吕朝耕¹ 王 升¹ 康传志¹ 张 燕¹ 孙 楷¹ 郭兰萍¹

(1 中国中医科学院中药资源中心/道地药材国家重点实验室培育基地,北京,100700; 2 全国农业技术推广服务中心,北京,100125)

摘要 目的:通过分析紫花丹参与白花丹参根际土壤真菌群落结构与差异性物种组成,为研究丹参根际微生态提供科学依据。方法:该研究以同一地块种植的紫花丹参与白花丹参的根际真菌为研究对象,采用 ITS 高通量测序技术研究其菌落特征及差异性物种。结果:紫花丹参与白花丹参在根际真菌上群落结构上存在显著差异。盘菌纲、盘菌目与肉座菌科为其二者的差异性物种。结论:紫花丹参与白花丹参对根际真菌的定殖具有选择性。

关键词 紫花丹参;白花丹参;根际;土壤真菌;群落结构

Community Structure and Diversity of Soil Fungi in Rhizosphere of *Salvia miltiorrhiza* and *S. miltiorrhiza* f. *alba*. Based on Pyrosequencing

Jiang Jingyi^{1,2}, Du Yongxi¹, Wang Tielin¹, Chi Xiulian¹, Lyu Chaogeng¹, Wang Sheng¹,
Kang Chuazhi¹, Zhang Yan¹, Sun Kai¹, Guo Lanping¹

(1 State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2 National Agricultural Technology Extension and Service Center, Beijing 100125, China)

Abstract Objective: To analyze rhizosphere soil fungal community structure and differential species composition of *Salvia miltiorrhiza* and *S. miltiorrhiza* f. *alba*, and to provide scientific basis for studying the rhizosphere microecology of *Salvia miltiorrhiza*. **Methods:** In this study, the rhizosphere fungi of *Salvia miltiorrhiza* and *S. miltiorrhiza* f. *alba* grown in the same plot were taken as the research object. The ITS high-throughput sequencing technology was used to study its colony characteristics and differential species. **Results:** There were significant differences in the community structure of rhizospheric fungi between *Salvia miltiorrhiza* and *S. miltiorrhiza* f. *alba*. Discophyte, Discophyta, and Sarcophagaceae were the differences between them. **Conclusion:** The participation of *Salvia miltiorrhiza* and *S. miltiorrhiza* f. *alba* is selective for colonization of rhizosphere fungi.

Key Words *Salvia miltiorrhiza*; *Salvia miltiorrhiza* f. *alba*; Rhizosphere; Soil fungi; Community structure and function

中图分类号:R282.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.003

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)是唇形科鼠尾草属的多年生草本植物,主要以其根和根茎入药,具有祛瘀止痛,活血通经、凉血消痈等疗效,是我国大宗常用的中药材^[1]。一般以紫花丹参作为药用,而白花丹参是紫花丹参的白花变型^[2]。前人主要针对二者的生物量积累速率^[3-4]、活性成分含量^[5]以及根际化感效应^[6-7]等方面进行比较研究。近年来,国内外市场对丹参的需求逐渐增加,野生资源逐渐稀缺。目前,市场上的丹参主要依靠人工栽培供给。但是随着丹参的重茬连作,土壤生态环境日益恶化,地上植株与地下根系生长逐渐偏小,土壤微生物群落结构单一,病虫害加重,严重者出现大面积生理性死苗。因此,连作障碍已成为丹参生产上的重大技术

难题^[8]。

已有研究表明,丹参重茬连作后,其根际土壤的真菌群落结构发生显著变化^[9]。真菌是土壤生态系统中的重要组成部分^[10],对土壤中有机的分解^[11]、物质循环以及能量传递发挥着重要作用,是土壤中一类极其重要的微生物^[12]。土壤中的真菌还可通过分泌抑菌物质来抑制病原菌的生长,从而降低植物病害的发生率^[13]。根际真菌在土壤生态系统的发展、功能、稳定等诸多方面发挥着重要作用^[14]。因此,了解植物根际土壤真菌的多样性及其复杂的群落结构组成是土壤微生物生态学研究的核心问题之一,对保障丹参优质高产及其连作障碍防治具有重要意义。

基金项目:国家自然科学基金项目(81891014,81703648);国家重点研发计划项目(2017YFC1700701,2017YFC1701405);中国中医科学院重点领域(ZZ10-027);财政部中央本级专项(2060302),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ZZ13-YQ-084);中国中医科学院中药资源中心自主选题(ZZXT201705)

作者简介:蒋靖怡(1994.12—),女,硕士,研究方向:中药资源,E-mail:1184615738@qq.com

通信作者:孙楷(1987.04—),女,博士,助理研究员,研究方向:中药资源,E-mail:sun-kai@pku.edu.cn;郭兰萍(1969.08—),女,博士,研究员,研究方向:中药资源,E-mail:glp01@126.com

传统的土壤微生物研究方法会受到各种因素的制约,例如纯培养技术中分离技术的限制以及 Biolog 法中发酵条件的限制^[15],这些通常都会导致低估计微生物的群落结构组成^[16]。随着分子生物学技术的发展,产生了高通量、高灵敏度、高准确性和低运行成本的高通量技术(High-throughput Sequencing)^[17]。将该技术应用于土壤根际微生物的研究,可有效避免了传统的土壤微生物研究方法的弊端。目前,该测序技术已成功应用于微生物多样性方面的研究中^[18-20]。

因此,本研究以同一地块栽培的白花丹参与紫花丹参为研究对象,采用 ITS 高通量测序技术研究二者的根际真菌群落特征,旨在阐明紫花丹参与白花丹参根际真菌群落的相似性与差异性,为进一步研究丹参根际微生态特征、根际功能菌株的筛选和应用提供依据,为人工调节丹参根际微环境、提升栽培丹参的产量品质、改善栽培地生态环境、解决丹参连作障碍等问题提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集 2018 年 6 月于北京市百鸣堂农场采集根际土壤样品,选择种植过程中未使用任何肥料、农药与除草剂的丹参混合栽培地进行取样。采集时随机选取二年生紫花丹参与白花丹参各 5 株,将丹参植株与其下土体完整取出,抖落根系外围土壤,取仍附着于根系表面的土壤作为根际土壤。土样过 80 目筛去除植物根系等杂质,立即存放于 -80 ℃ 冰箱内备用。

1.2 土壤微生物 DNA 提取 采用 CTAB 法提取土壤样本总 DNA,将提取到的 DNA 样品溶于 100 μL 的去离子水中,取 5 μL DNA 用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,分析 DNA 的完整性和相对浓度。

1.3 ITS 基因扩增与测序 采用引物 ITS1-1F-F (5'-CTTGCTCATTTAGAGGAAGTAA-3')/ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 扩增真菌 ITS1 区域。PCR 扩增体系如下:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环,72 ℃ 延伸 7 min。获得 PCR 产物后,进行琼脂糖凝胶电泳检测后,使用 Thermo Scientific 公司 GeneJET 胶回收试剂盒回收 PCR 产物,使用 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建,构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Thermofisher 的 Life Ion S5TM 或 Ion S5TMXL 进行上机测序

1.4 数据分析 采用 Cutadapt^[21] 先对 reads 进行低

质量部分剪切,再根据 Barcode 从得到的 reads 中拆分出各样品数据,截去 Barcode 和引物序列,初步质控得到原始数据。经过以上处理后,得到的 Reads 需要进行去除嵌合体序列的处理,Reads 序列通过与数据库进行比对,检测嵌合体序列^[22],并最终去除其中的嵌合体序列^[23],得到最终的有效数据。利用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001),对所有样品的全部 Clean Reads 以 97% 相似水平将序列聚类成为 OTUs (Operational Taxonomic Units)。用 Mothur 方法与 SILVA^[24] 的 SSUrRNA 数据库^[25] 进行物种注释分析(设定阈值为 0.8 ~ 1)。使用 Excel 2013 和 SPSS 19.0 统计软件对相对丰度数据进行统计分析,并通过制作箱形图描述不同分类水平下紫花丹参与白花丹参根际真菌的优势类群。通过线性判别分析(Linear Discriminant Analysis, LDA)对根际真菌群落进行 LEfSe 分析(LDA Score 3.5),寻找紫花丹参与白花丹参根际土壤真菌中有显著差异的物种。使用 Qiime 软件(Version 1.9.1) 计算 Chao1、Shannon-Wiener、Simpson、ACE(abundance-based coverage estimator)等 α 多样性指数,并进行组间差异检验。利用 Qiime 软件(Version 1.9.1) 计算 Unifrac 距离,使用 R 软件绘制 NMDS 图。

2 结果与分析

2.1 紫花丹参与白花丹参根际真菌群落 OTU 分析 真菌 ITS 高通量测序共获得优化序列 817 008 条,平均长度 229.9 bp。见表 1。10 个样本获得的序列均超过 50 000 条 reads,所有样品的测序深度均超过 96%,稀释曲线趋于平台期,测序效果理想。

表 1 高通量测序数据概况

样本	原始序列 (条)	优化序列 (条)	平均长度 (bp)	测序深度 指数
白花丹参 1	81 840	80 209	229	98.01
白花丹参 2	81 930	80 258	228	97.96
白花丹参 3	81 549	80 413	228	98.61
白花丹参 4	81 318	80 084	228	98.48
白花丹参 5	81 543	80 424	229	98.63
紫花丹参 1	81 591	80 220	232	98.32
紫花丹参 2	81 295	80 202	235	98.66
紫花丹参 3	81 402	80 085	231	98.38
紫花丹参 4	81 290	80 125	229	98.57
紫花丹参 5	83 250	80 122	230	96.24

2.2 紫花丹参与白花丹参根际真菌多样性指数分析 Alpha 多样性指数用于体现真菌群落的丰富度和多样性。通过计算 Shannon-Wiener、Simpson、Chao1、ACE 等 α 多样性指数。见表 2。对紫花丹参与白花丹参根际土壤真菌群落进行 α 多样性分析。Shan-

non-Wiener 指数与 Simpson 指数常被用于估算群落物种多样性, Simpson 指数常用来估算物种均匀度, Shannon-Wiener 指数则常被用于估算物种的丰富度, 指数越大, 表明样品中菌群的丰富度与均匀度越高。估算样品中微生物的丰富度则常用 Chao1 指数与 ACE 指数, 指数越大, 表明菌群的丰富度越高。ACE 指数可排除测序误差等干扰, 用来衡量样本的真实物种种类, ACE 值越大, 样本的真实物种种类越多。统计结果表明, 紫花与白花丹参的各个多样性指数差异均无统计学意义, 说明紫花与白花丹参根际土壤中真菌群落中菌群的丰富度与均匀度均较为一致。

表 2 紫花丹参与白花丹参根际土壤真菌多样性指数

物种	Shannon-Wiener	Simpson	Chao1	ACE
白花丹参	6.705	0.960	956.137	959.573
紫花丹参	7.245	0.983	998.219	1 002.938

2.3 紫花丹参与白花丹参根际真菌群落结构分析

如图 1 所示, 在门类水平上看, 紫花丹参与白花丹参根际真菌中仅被检测 5 个真菌门类, 分别是: 子囊菌门、担子菌门、接合菌门、球囊菌门和壶菌门。其中, 紫花丹参与白花丹参根际优势菌门均为子囊菌门, 其相对丰度分别在紫花丹参与白花丹参根际中为 55.04% 和 53.68%。其次为担子菌门和接合菌门, 其相对丰度在紫花丹参与白花丹参根际中均达到 10% 以上。球囊菌门在紫花丹参与白花丹参根际中仅在 5% 左右, 壶菌门在紫花丹参与白花丹参根际真菌中相对丰度最小(0.39%, 0.82%)。

在纲水平上看, 粪壳菌纲的相对丰度在紫花丹参与白花丹参根际真菌中排在首位, 相对丰度分别为: 38.40% 和 38.43%。紫花丹参与白花丹参根际中排名前 6 的真菌纲类均一致, 其相对丰度之和分别在紫花丹参和白花丹参中达到 85.81% 和 89.58%。除去排名前 6 的真菌纲类, 紫花丹参与白花丹参根际开始表现出差异。盘菌纲在紫花丹参中的相对丰度达到 3.59%, 排在第七, 而在白花丹参中其相对丰度为 1.11%, 比紫花丹参低 2.48%, 名列第 9。锤舌菌纲与散囊菌纲在紫花丹参根际中排在第八, 第九, 而在白花丹参根际中排在第 7, 第 8 的位置上。壶菌纲在紫花丹参根际中排在了第 10 的位置, 但未进入白花丹参根际前 10 的位置, 而 Incertae sedis Ascomycota 在白花丹参根际中排名第 10, 却未进入紫花丹参根际前 10。

在目类水平上看, 紫花丹参与白花丹参根际真

菌群落表现出更多的差异。紫花丹参根际排名前 10 的类群中包含了盘菌目、伞菌目以及鸡油菌目, 而在白花丹参根际排名前 10 的菌群均不包含上述的 3 个目类菌群, 而包含了紫花丹参根际排名前 10 中未出现的柔膜菌目、煤炱目和 Coniochaetales。其中, 盘菌目在紫花丹参根际中相对丰度为 2.40%, 而在白花丹参中仅为 0.58%, 比在紫花丹参中低 1.82%。肉座菌目在紫花丹参根际中排在首位, 而 Cystofilobasidiales 在白花丹参根际中位于首位。肉座菌目、Cystofilobasidiales、Mortierellales、粪壳菌目、球囊霉目、格孢腔菌目在紫花丹参与白花丹参根际中相对丰度均较高, 均排在前 6, 其相对丰度之和在紫花丹参与白花丹参中分别达到 62.53% 和 67.29%, 但是其目类菌群在排名顺序上均存在差异。

从科类水平上看, 紫花丹参与白花丹参的根际真菌排名前 10 的菌群种类也存在差异。生赤壳科、肉座菌科以及毛球壳科在紫花丹参根际中均属于优势菌群, 分别排在第 6、第 8 及第 10, 而在白花丹参根际中的优势菌群不包含上述科类菌群。锥毛壳科、格孢腔菌科和麦角(菌)科在白花丹参根际中排在第 6、第 8 及第 9 的位置, 但不属于紫花丹参根际的优势科类菌群。其中, 肉座菌科在紫花丹参根际中其相对丰度为 1.44%, 而在白花丹参中仅只有 0.57%, 比紫花丹参少 0.87%。

在科水平上, 囊担菌科和丛赤壳科的菌群相对丰度均排在紫花丹参与白花丹参根际中的首位(14.25%, 22.59%) 和第 2(8.79%, 8.76%)。其次是被孢霉科、Incertae sedis Hypocreales 和 Glomeraceae。前述 3 个科类菌群在紫花丹参与白花丹参根际中排名存在差异, 但是其相对丰度均较高, 其相对丰度之和分别达到 16.49% 和 15.15%, 分别占分类学地位明确的科类菌群的 26.21% 和 21.92%。

2.4 紫花丹参与白花丹参根际真菌群落结构组成

为能更直观地反映出样品间的差异程度, 对紫花丹参与白花丹参根际真菌群落结构进行非度量多维尺度(NMDS)分析, 基于 Bray-Cruits 相异指数, 将其拟合到 10 个丹参样本的 NMDS 排序图上, 样品点的排布代表了样品与样品之间的相似程度。见图 2。紫花丹参主要分布在 MDS1 轴的正端及 MDS2 轴的正端, 白花丹参主要分布在 MDS1 轴的负端及 MDS2 轴的负端, 两者可明显地区分开, 说明紫花丹参与白花丹参在根际真菌上群落结构上差异有统计学意义。

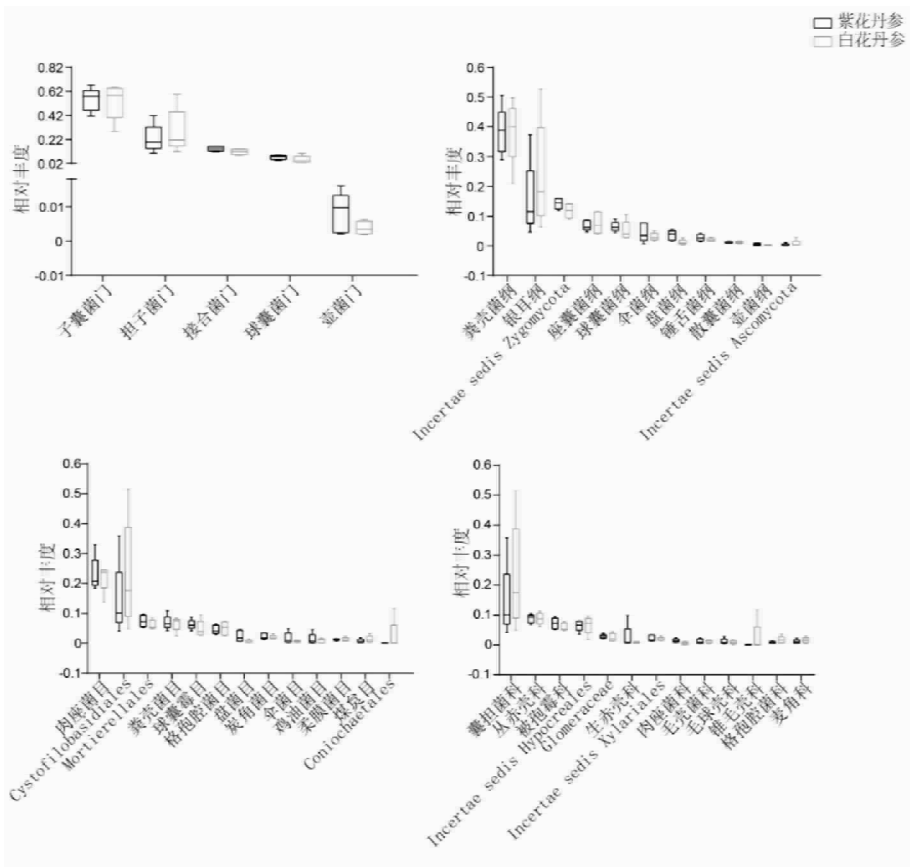


图1 紫花与白花丹参根际真菌优势菌群相对丰度

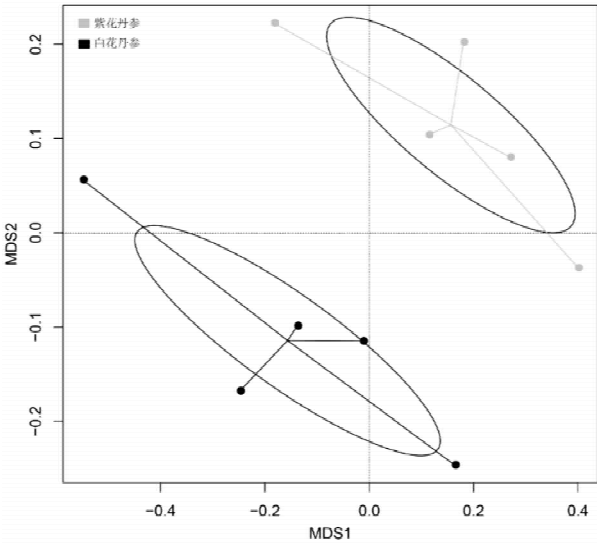


图2 紫花丹参与白花丹参根际真菌群落
基于 OTU 水平的 NMDS 分析

2.5 紫花丹参与白花丹参根际真菌群落差异性物种分析 采用 LEfSe 方法对紫花丹参与白花丹参所有根际土壤真菌类群分析主要差异性物种。图中 LDA Score 的值代表了差异物种的影响大小, LDA 值越大, 代表菌群差异性越大。LDA Score 预设值 3.5, 高于 3.5 视为差异有统计学意义。见图 3。盘菌纲、盘菌目与肉座菌科这 3 类菌群在紫花丹参根

际中的相对丰度均显著高于白花丹参根际, 且盘菌纲的 LDA 值最大, 说明盘菌纲在紫花丹参与白花丹参根际中差异最大。

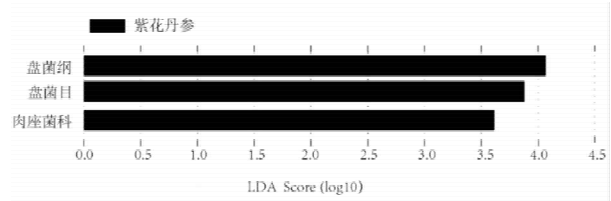


图3 紫花丹参与白花丹参根际土壤细菌 LEfSe 分析图
3 讨论

本研究采用高通量测序平台对紫花丹参与白花丹参根际真菌群落多样性进行初步研究, 初步获得其根际在门、纲、目、科等不同分类水平的优势类群和相对丰度。研究结果表明: α 多样性指数显示紫花丹参与白花丹参的根际真菌多样性差异无统计学意义; β 多样性组间分析表明紫花丹参与白花丹参在根际真菌群落结构上差异显著。通过 LEfSe 差异分析, 发现肉座菌科、盘菌目与盘菌纲这 3 类菌群在紫花丹参根际中均显著高于白花丹参。已有研究证明, 根际真菌会受到植物种类的调控, 在植物根际会选择性富集, 从而导致植物根际微生物的群落组成和结构差异有统计学意义^[26]。这一结果与 Liu 等

人研究结果一致^[14]。

土壤真菌可以通过释放土壤酶来催化土壤中的各种生物化学反应,例如:氧化还原反应、有机质矿化、腐殖质合成、污染物降解及生长活性物质释放等,可促进土壤结构和质地的形成,加快土壤养分的转化、提高土壤肥力和生物的有效性,保证土壤微生物区系的平衡^[27]。本研究结果表明紫花丹参与白花丹参根际中子囊菌门的相对丰度最大,位于首位。本研究发现肉座菌目与粪壳菌目为紫花丹参与白花丹参根际的优势菌目,尤其是肉座菌目,其相对丰度达到 20% 以上,前人研究表明子囊菌门的肉座菌目、粪壳菌目具有降解腐烂有机质、降解纤维素等作用^[28],这可能与丹参根际土壤中的养分转化和碳代谢相关^[29]。

综上所述,本研究首次采用高通量测序技术深入研究紫花丹参与白花丹参的土壤真菌群落组成及多样性,旨在揭示紫花丹参与白花丹参根际真菌群落结构的差异,进一步揭示丹参根际微生态特征,为阐释丹参-土壤-真菌之间的相互作用奠定基础,为解决丹参连作障碍提供技术支持。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版[S]. 1 部. 北京:中国医药科技出版社,2015:76.
- [2] 中国科学院植物志编辑部委员会. 中国植物志[M]. 66 卷. 北京:科学出版社,1990:148.
- [3] 杨先国,刘塔斯,林丽美,等. 湖南地区白花丹参的引种试验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):117-120.
- [4] 李长峰. 丹参与白花丹参的比较研究[D]. 济南:山东中医药大学,2008.
- [5] 刘伟,张琳,周洁,等. 白花丹参与丹参活性成分积累比较研究[J]. 植物科学学报,2013,31(6):596-602.
- [6] 周洁,王晓,刘建华,等. 白花丹参与紫花丹参对菰蓝化感效应比较研究[J]. 中药材,2013,36(9):1389-1391.
- [7] 周洁,王晓,刘建华,等. 丹参与白花丹参对黄芩化感效应的比较研究[J]. 山东科学,2012,25(5):30-34.
- [8] 张辰露,孙群,叶青. 连作对丹参生长的障碍效应[J]. 西北植物学报,2005,25(5):1029-1034.
- [9] 刘伟,周冰谦,王晓,等. 基于 ITS 序列的丹参连作根际土壤真菌群落组成及多样性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):130-135.
- [10] Tomáš Větrovsky, Baldrian P. Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing; current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED[J]. Biology & Fertility of Soils, 2013,49(8):1027.
- [11] Bridge P D, Spooner B M. Soil fungi: diversity and detection[J]. Plant Soil, 2001(232):147.
- [12] 李越颢,孙燕飞,雷勇辉,等. 枸杞根际土壤真菌群落多样性的高通量测序[J]. 微生物学报,2017,57(7):1049-1059.

- [13] Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. FEMS Microbiol Rev, 2013,37(5):634-663.
- [14] Liu P, Wang XH, Li JG, et al. Pyrosequencing reveals fungal communities in the rhizosphere of Xinjiang Jujube[J]. Biomed Res Int, 2015,2015:972481.
- [15] 詹伟. 金钗石斛根际土壤细菌和放线菌分离及抑菌活性研究[D]. 贵阳:贵州师范大学,2016.
- [16] Jia H F, Sun Z X, Li G H. A four-stage constructed wetland system for treating polluted water from an urban river[J]. Ecological Engineering, 2014,71(1):48.
- [17] 张玥,胡云飞,王树茂,等. 茶园年限对根际土壤真菌群落结构及多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报,2018,24(5):972.
- [18] Hao DC, Song SM, Mu J, et al. Unearthing microbial diversity of Taxus rhizosphere via MiSeq high-throughput amplicon sequencing and isolate characterization[J]. Sci Rep, 2016,6:22006.
- [19] Xu X, Chen C, Zhang Z, et al. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with Chenopodium ambrosioides revealed by MiSeq sequencing investigation[J]. Sci Rep, 2017,7:45134.
- [20] Dong L, Xu J, Zhang L, et al. High-throughput sequencing technology reveals that continuous cropping of American ginseng results in changes in the microbial community in arable soil[J]. Chin Med, 2017,12:18.
- [21] Marcel M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. Embnet Journal, 2011,17(1):10-12.
- [22] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011,27(16):2194-2200.
- [23] Haas BJ, Gevers D, Earl AM, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Res, 2011,21(3):494-504.
- [24] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007,73(16):5261-5267.
- [25] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Res, 2013,41(Database issue):D590-596.
- [26] 张敏,周鹏,李永华. 苦楝-小麦农林复合生态系统土壤真菌群落结构分析[J]. 林业科学,2015,51(10):26-34.
- [27] 叶协锋,张友杰,鲁喜梅,等. 土壤微生物与土壤营养关系研究进展[J]. 土壤通报,2010,41(1):237-241.
- [28] Shanthiyaa V, Saravanakumar D, Rajendran L, et al. Use of chaetomium globosum for biocontrol of potato late blight disease[J]. Crop Prot, 2013,25:33.
- [29] Daynes CM, McGee PA, Midgley DJ. Utilisation of plant cell-wall polysaccharides and organic phosphorus substrates by isolates of Aspergillus and Penicillium isolated from soil[J]. Fung Ecol, 2008,1(23):94-98.