

文章编号: 1674-7054(2022)01-0027-09



# 基于宏基因组测序的橡胶林病原微生物的分析

全飞<sup>1,2</sup>, 兰国玉<sup>1</sup>, 魏亚情<sup>1,4</sup>, 李明美<sup>1,5</sup>, 孙树晴<sup>1,6</sup>, 杜昊楠<sup>1,6</sup>

(1. 中国热带农业科学院 橡胶研究所, 海口 571101; 2. 海南大学 植物保护学院, 海口 570228;

3. 海南儋州热带农业生态系统国家野外科学观测研究站, 海南 儋州 571737; 4. 海南大学 生态与环境学院, 海口 570228; 5. 海南大学 林学院, 海口 570228; 6. 海南大学 热带作物学院, 海口 570228)

**摘要:** 为了解橡胶 [*Hevea brasiliensis* (H. B. K.) Muell.-Arg.] 林土壤和根系(根际和根表)广谱病原微生物的组成及其影响因素, 以海南(儋州、万宁和乐东)和西双版纳(景洪、勐仑和勐满)地区健康橡胶林的土壤、根际和根表为材料, 采用宏基因组测序技术, 分析橡胶林病原微生物的组成及其影响因素。结果表明, 植物病原微生物在门的水平为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和子囊菌门(Ascomycota); 病原微生物在属水平为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、劳尔氏菌属(*Ralstonia*)、伯克霍尔德里氏菌属(*Burkholderia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、泛菌属(*Pantoea*)、麦角菌属(*Clavibacter*)、果胶杆菌属(*Pectobacterium*)和木质部小菌属(*Xylella*), 在属水平上主要以子囊菌门为主。海南和西双版纳地区的根际病原微生物在属水平上无显著差异。土壤和根际样本病原微生物组成相似, 各根表样本病原微生物组成相似, 硝态氮与病原微生物呈显著正相关。

**关键词:** 橡胶林; 宏基因组测序; 土壤; 根系; 病原微生物

**中图分类号:** S 714.3 **文献标志码:** A

**引用格式:** 全飞, 兰国玉, 魏亚情, 等. 基于宏基因组测序的橡胶林病原微生物的分析 [J]. 热带生物学报, 2022, 13(1): 27-35. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2022.01.005

橡胶树 [*Hevea brasiliensis* (H. B. K.) Muell.-Arg.] 原产于巴西亚马孙地区, 19 世纪引入亚洲热带地区<sup>[1]</sup>, 橡胶种植面积迅速扩大<sup>[2-4]</sup>, 2017 年世界橡胶种植面积达到 1484 万  $\text{hm}^2$ <sup>[5]</sup>。我国橡胶人工林主要分布在海南和云南西双版纳, 约占我国橡胶种植总面积的 91.3%<sup>[6]</sup>。海南岛橡胶林的分布约占海南岛植被总面积的四分之一<sup>[7]</sup>。西双版纳是东南亚热带北缘重要的典型橡胶产区<sup>[8]</sup>, 西双版纳橡胶林约占西双版纳植被总面积的 40%, 2010 年西双版纳的橡胶人工林种植面积约 50 万  $\text{hm}^2$ <sup>[9]</sup>。橡胶人工林已成为我国热带地区重要的森林生态系统, 对维持热带陆地生态系统的平衡起着重要作用<sup>[10]</sup>。橡胶树受多种真菌致病因子的影响<sup>[11]</sup>。真

菌根病以破坏橡胶林根系对土壤的水分和养分的吸收与利用方式对橡胶根系造成危害。此外, 真菌根部疾病通常只有在感染扩散至根部死亡时才被观察到, 此时多已超过有效治疗的程度<sup>[12]</sup>。

感染橡胶树根部的真菌病原体为白根病 (*Rigidoporus microporus*)、褐根病 (*Phellinus noxius*) 和红根病 (*Ganoderma pseudoferreum*)<sup>[13-14]</sup>。在经济上, 白根病是橡胶树上最重要的病害, 在全世界都造成橡胶产量的严重损失<sup>[15]</sup>。褐腐病和红腐病对橡胶林的经济影响较小, 因为它们通常生长缓慢, 对树木生长和乳胶生产的影响较小<sup>[13]</sup>。白根病可以感染整个热带地区的橡胶树, 它是影响东南亚橡胶林的主要疾病之一<sup>[15-16]</sup>。健康树木接

收稿日期: 2021-05-25

修回日期: 2021-11-05

基金项目: 海南省重点研发项目(ZDYF2019145); 国家自然科学基金项目(31770661); 海南省自然科学基金高层次人才项目(320RC733)

第一作者: 全飞(1995-), 男, 海南大学植物保护学院 2018 级硕士研究生. E-mail: 1948917467@qq.com

通信作者: 兰国玉(1977-), 男, 研究员. 研究方向: 森林生态学. E-mail: langyri@163.com

触到受感染的树根和木质碎屑,感染的根被大量的白色菌丝体覆盖,最初为褐色,后来为白色,因此, *Rigidoporus microporus* 有白根病的俗称<sup>[16]</sup>,在感染后期,真菌产生橙褐色子实体,新鲜时边缘为亮黄色,而树干底部周围的下表面变成红棕色<sup>[15]</sup>。在感染阶段,橡胶树的叶子开始变黄,最后这种疾病破坏了树冠和根系,导致树木死亡<sup>[16]</sup>。许多植物病原体感染橡胶树后无明显症状<sup>[17]</sup>,并且可以在不利的环境条件下持续存在<sup>[18]</sup>。在疾病暴发之前,这些病原体通常基本上是潜在的。然而,这些病原体可以通过基于DNA的方法检测<sup>[19]</sup>。因此,基于DNA的方法可以全面了解潜在的植物病原菌群落。1978年,植物病理学家<sup>[20]</sup>将植物病原菌划分为:农杆菌属(*Agrobacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等,归功于DNA测序技术和分类方法的进步,目前植物病原菌已有39个属<sup>[21]</sup>。

宏基因组测序技术较全面的反映了样本中微生物群落的组成。笔者通过宏基因组测序技术了解橡胶林土壤、根际、根表的病原微生物,并通过数据分析进一步了解微生物间的互作关系,对橡胶林土壤改良、提高橡胶树抗性和乳胶产量、并为橡胶林的病害预防及生长管理提供有效信息,对促进橡胶林生态多样性研究、病虫害的综合防控和橡胶产业的可持续发展具有理论和实践意义。

## 1 材料与方法

**1.1 采样方法** 在海南(儋州、万宁和乐东)和西双版纳(景洪、勐仑和勐满)采集健康橡胶树的土壤和根系样本。

理化分析和土壤微生物采样:采样前用70%酒精取样器具需进行消毒灭菌处理。去除表面浮土,采样员戴上无菌手套,以橡胶树树干为圆心(半径为0.5 m),在圆上随机取3个点,去除表层5 cm的土壤,在5~20 cm土层采集橡胶树根际周围土壤200 g,去除可见杂质,用2 mm筛网过筛处理,然后将3份土壤混合均匀,分别用自封袋装500 g土壤作为理化分析样品和取5~10 g土壤装入无菌离心管中,一并放入保温盒中带回实验室,所有样品置于干冰寄送至美吉生物公司测序。

根际微生物取样:采样前用70%酒精对取样器具进行消毒灭菌处理。用消毒的剪刀在土壤微生物采样的3个点上分别剪取5~8根直径2 mm以内细根系,每根根系长约9~12 cm(尽量不要碰伤表皮),每个点在根系周围1 mm采集橡胶树根际土壤,把根际土壤抖落在无菌自封袋中,去除植物根、动物残骸及其他杂质,过0.85 mm筛,将3份土样混合均匀,取5~10 g装入无菌离心管,一并低温运至实验室,所有样品置于干冰中,送美吉生物公司测序。

根表微生物取样:采样员戴上无菌手套,在根际微生物取样中剪取的根系置于保温盒内保存,24 h内送回实验室。在实验室用无菌刷轻轻刷去根系表层附着的土壤,将根系置于无菌离心管中,浸没于无菌PBS缓冲溶液,在180 r·min<sup>-1</sup>下清洗20 min;用无菌镊子取出根系组织,将根系再次置于无菌离心管中加入无菌PBS缓冲溶液,在180 r·min<sup>-1</sup>下清洗20 min;取出根系组织,将根系再次置于无菌离心管中加入无菌PBS缓冲溶液,超声波洗涤10 min(超声波清洗器设置:160 W,30 s/30 s,10 min)。将3次洗涤液置于无菌离心管中,用12 000 g离心10 min,收集沉淀(根表微生物)并置于-80 °C冰箱保存。所有根表微生物样品置于干冰中至美吉生物公司测序。

**1.2 土壤理化分析** 土壤理化和养分测定参考鲁如坤<sup>[22]</sup>的方法。土壤理化性质测定了土壤含水率和pH。土壤养分测定主要有土壤有机质、速效氮(氨态氮和硝态氮)、速效磷、速效钾、全氮、全磷、全钾(表1)。土壤有机碳测定采用重铬酸钾-外加热法;全氮测定采用靛酚蓝比色法;全磷测定采用钼锑抗比色法;全钾采用火焰光度计法;速效钾采用醋酸铵提取火焰光度计法;速效磷测定采用盐酸氟化铵法。硝态氮测定采用氯化钠提取法,氨态氮测定采用靛酚蓝比色法。

**1.3 宏基因组测序分析** 采用Illumina HiSeq PE150/250高通量测序平台。使用fastp软件对序列进行质控,得到clean reads序列,然后利用Megahit软件进行序列组装,得到的组装序列通过MetaGene软件进行基因预测(序列长度≥100 bp),利用CD-HIT软件和SOAPaligner软件进行聚类(90% identity、90% coverage)和基因的丰度计算

表 1 宏基因组测序土壤样本养分

环境因子	S_01	S_02	S_03	S_04	S_05	S_06
速效磷(AP)/(mg·kg <sup>-1</sup> )	21.16	1.95	1.36	5.02	3.47	2.64
有机质(SOM)/(g·kg <sup>-1</sup> )	7.87	15.38	10.22	35.20	22.01	16.64
硝态氮(NO <sub>3</sub> N)/(mg·kg <sup>-1</sup> )	13.82	15.34	4.27	18.37	7.30	7.44
氨态氮(NH <sub>4</sub> N)/(mg·kg <sup>-1</sup> )	6.33	14.46	18.96	22.11	25.41	15.16
速效钾(AK)/(mg·kg <sup>-1</sup> )	20.07	28.72	54.47	35.06	78.50	39.31
pH	3.76	4.28	4.44	3.78	4.90	4.72
含水量(WC)/%	14.48	19.37	19.82	29.77	25.19	16.68
全磷(TP)/(g·kg <sup>-1</sup> )	0.55	0.86	0.49	1.38	1.07	0.67
全氮(TN)/(g·kg <sup>-1</sup> )	0.72	1.48	1.03	2.67	1.78	1.22
全钾(TK)/(g·kg <sup>-1</sup> )	12.96	11.23	33.94	8.34	17.83	6.91

(95% identity), 比对 NR 数据库获得样本的物种分类学注释信息, 通过 NR 库中的分类学信息数据库获得物种注释结果, 计算物种的丰度, 并统计各个样品在界、门、纲、目、科、属和种的分类学水平上物种的丰度, 从而构建相应分类学水平上的丰度表。比对病原与宿主互作数据库(PHI), 对橡胶林土壤、根际及根表进行植物病原物种注释, 得到橡胶林土壤、根际及根表植物病原物种信息, 并进行生物信息学分析。

**1.4 数据分析** RDA 即冗余分析, 是约束化的 PCA 分析, 从图中可以直观地看出样本分布和环境因子间的关系。RDA 主要用于分析物种或功能与环境因子之间关系, RDA 是基于线性模型。使用 R 语言 vegan 包中 RDA 分析和作图。主坐标分析(PCoA), 是一种非约束性的数据降维分析方法, 研究样本群落组成的相似性或差异性, PCoA 是基于所选距离矩阵进行作图。本研究选用 bray\_curtis 距离算法, 通过降维的方式来找出影响样本群落组成差异的潜在主成分。使用 R 语言 PCoA 分析作图。

## 2 结果与分析

**2.1 病原微生物组成分析** 通过宏基因组测序结果与病原和宿主互作数据库比对注释, 得到植物病原微生物在土壤、根际及根表的组成, 病原微生物在门、属和种水平分别为: 4、30 和 53(表 2)。

由图 1 可知, 植物病原微生物在门的水平上属于: 变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和子囊菌门(Ascomycota), 其中变形菌门在土壤、根际及根表的平均占比为 90.67%, 根际样本占比最大, 根表样本占比最少; 放线菌门在土壤、根际及根表的平均占比为 7.67%, 根表样本占比最多, 根际样本占比最少; 子囊菌门在土壤、根际及根表的平均占比为 1.11%, 根表样本占比最多, 根际样本占比最少。

由图 2 可知, 病原微生物在属水平上属于: 假单孢菌属(*Pseudomonas*)、劳尔氏菌属(*Ralstonia*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、泛菌属(*Pantoea*)、麦角菌属(*Clavibacter*)、果胶杆菌属(*Pectobacterium*)和木质部小菌属(*Xylella*)。假单孢菌属在土壤、根际及根表的占比为 61.20%, 根际样本占比最大, 根表样本占比最少; 劳尔氏菌属在土壤、根际及根表的占比为 10.70%, 根际样本占比最少, 根表样本占比最大; 伯克霍尔德氏菌属在土壤、根际及根表的占比为 6.80%, 根际样本占比最少, 根表样本占比最大; 链霉菌属在土壤、根际及根表的占比为 6.38%, 根际样本占比最少, 根表样本占比最大; 农杆菌属在土壤、根际及根表的占比为 4.45%, 根际样本占比最少, 根表样本占比最大。根表样本中病原菌占比相对平均, 而根

表 2 海南与西双版纳橡胶林土壤、根际及根表病原微生物

门	属	种	S_01	S_02	S_03	S_04	S_05	S_06	R_01	R_02	R_03	R_04	R_05	R_06	RP_01	RP_02	RP_03	RP_04	RP_05	RP_06	
Actinobacteria	<i>Clavibacter</i>	<i>Clavibacter_michiganensis</i>	136	168	258	112	46	54	128	150	52	102	36	74	484	476	1034	120	36	74	
Actinobacteria	<i>Sreptomyces</i>	<i>Sreptomyces_scbiei</i>	974	682	912	792	258	246	496	732	418	1148	264	382	1278	1616	1134	732	426	516	
Ascomycota	<i>Zymoseptoria</i>	<i>Zymoseptoria_tritici</i>	12	10	8	4	2	0	2	10	6	8	6	2	12	10	4	4	8	12	2
Ascomycota	<i>Leptosphaeria</i>	<i>Leptosphaeria_maculans</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0	2	10	0
Ascomycota	<i>Parastagonospora</i>	<i>Parastagonospora_nodorum</i>	12	4	0	0	0	0	0	2	2	14	0	0	2	4	0	0	6	0	4
Ascomycota	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria_alternata</i>	0	4	8	0	0	2	0	4	10	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Ascomycota	<i>Bipolaris</i>	<i>Bipolaris_maydis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
Ascomycota	<i>Bipolaris</i>	<i>Bipolaris_sorokiniana</i>	6	0	6	12	0	0	0	4	0	24	0	0	0	0	2	10	0	4	4
Ascomycota	<i>Bipolaris</i>	<i>Bipolaris_zeicola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	2
Ascomycota	<i>Pyrenophora</i>	<i>Pyrenophora_tritici-repentis</i>	10	4	6	0	0	0	2	2	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Ascomycota	<i>Setosphaeria</i>	<i>Setosphaeria_turcica</i>	0	0	0	6	2	2	0	0	0	8	0	0	6	2	0	0	8	4	4
Ascomycota	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium_expansum</i>	0	0	0	14	0	0	2	0	0	6	0	2	0	0	0	0	10	0	0
Ascomycota	<i>Botrytis</i>	<i>Botrytis_cinerea</i>	0	12	6	6	0	6	0	18	8	8	0	0	4	0	0	0	2	0	4
Ascomycota	<i>Sclerotinia</i>	<i>Sclerotinia_sclerotiorum</i>	22	8	2	6	0	0	0	4	30	2	2	16	4	8	4	12	6	2	2
Ascomycota	<i>Colleotrichum</i>	<i>Colleotrichum_glaeosporioides</i>	6	6	0	10	4	10	4	6	0	6	2	4	12	8	0	16	2	2	2
Ascomycota	<i>Colleotrichum</i>	<i>Colleotrichum_graminicola</i>	0	6	0	4	0	0	0	12	0	8	0	4	0	6	0	4	0	0	0
Ascomycota	<i>Colleotrichum</i>	<i>Colleotrichum_higginsianum</i>	8	0	0	2	2	0	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Ascomycota	<i>Colleotrichum</i>	<i>Colleotrichum_orbitulare</i>	0	4	6	0	0	4	0	6	0	6	0	0	30	42	12	14	8	8	8
Ascomycota	<i>Claviceps</i>	<i>Claviceps_purpurea</i>	10	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0
Ascomycota	<i>Metarhizium</i>	<i>Metarhizium_robertsii</i>	22	14	0	2	0	10	12	18	4	2	8	2	2	6	6	2	8	0	0
Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium_fujikuroi</i>	0	2	0	0	0	0	0	6	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0
Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium_oxysporum</i>	86	38	10	28	0	0	12	60	8	20	4	8	4	22	12	10	0	4	4
Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium_verticilloides</i>	0	0	2	16	2	0	0	0	0	2	0	2	0	2	8	0	0	0	0

续表 2

门	属	种	S_01	S_02	S_03	S_04	S_05	S_06	R_01	R_02	R_03	R_04	R_05	R_06	RP_01	RP_02	RP_03	RP_04	RP_05	RP_06
Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>Nectria haematococca</i>	12	0	4	0	2	0	2	10	4	4	0	0	2	0	12	4	4	0
Ascomycota	<i>Gaeumannomyces</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	50	12	2	24	6	4	14	14	6	2	4	2	2	8	60	8	2	2
Ascomycota	<i>Grossmannia</i>	<i>Grossmannia clavigera</i>	10	0	2	0	0	2	6	2	0	2	0	0	0	4	8	4	4	14
Ascomycota	<i>Rosellinia</i>	<i>Rosellinia necatrix</i>	10	26	4	30	2	10	26	22	10	54	24	6	28	56	40	36	2	20
Basidiomycota	<i>Puccinia</i>	<i>Puccinia striiformis</i>	24	0	16	0	2	2	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	22
Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	280	518	242	462	164	224	244	598	234	518	196	226	310	478	332	380	236	218
Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium vitis</i>	86	146	112	216	64	82	104	188	132	222	56	106	146	146	146	200	78	154
Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	480	738	610	590	298	340	790	760	438	604	242	352	1008	2858	208	566	362	414
Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia glumae</i>	140	126	104	110	118	94	196	104	96	134	108	162	74	158	50	130	76	90
Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	1460	2024	1450	1294	1060	852	1274	1794	1480	1304	1046	1032	1050	1710	614	1402	888	804
Proteobacteria	<i>Dickeya</i>	<i>Dickeya dadantii</i>	14	40	14	28	2	4	10	52	18	38	8	14	24	22	24	10	8	26
Proteobacteria	<i>Dickeya</i>	<i>Dickeya solani</i>	20	30	12	24	24	8	0	14	22	40	30	14	136	6	6	20	10	24
Proteobacteria	<i>Erythrina</i>	<i>Erythrina amylovora</i>	4	14	6	6	2	4	4	10	2	18	0	2	128	60	122	6	14	4
Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea ananatis</i>	12	2	10	10	12	2	2	2	0	18	2	2	558	398	4294	2	10	42
Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea stewartii</i>	56	32	18	20	34	36	56	22	48	50	28	22	152	80	576	18	40	64
Proteobacteria	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pectobacterium atropiscicum</i>	18	6	0	0	2	0	4	0	0	0	0	0	4	12	10	2	4	4
Proteobacteria	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	68	96	74	86	34	42	58	106	54	62	20	24	194	142	494	62	60	202
Proteobacteria	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	4	12	0	16	4	0	0	14	4	12	0	2	28	46	34	6	8	6
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	800	1070	636	686	884	974	1304	990	1318	772	766	1032	540	702	568	552	458	420
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	20	4	6	30	8	2	16	20	10	32	2	6	16	16	12	10	8	6
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	696	804	668	758	133742005818386	982	24716	834	1064618296	942	946	728	692	794	558			
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	0	10	10	2	10	24	14	18	28	0	20	10	2	4	0	6	4	4

际样本中病原菌主要为假单孢菌属, 占比达到 81.44%。在属水平上主要以子囊菌门为主。

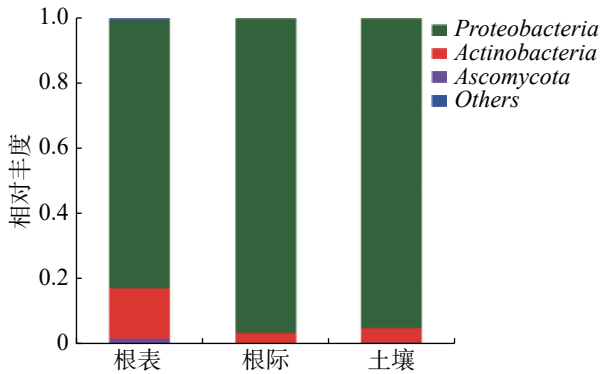


图 1 门水平上土壤、根际及根表病原微生物相对丰度

Soil 表示土壤样本微生物组成, Rhizosphere 表示根际样本微生物组成, Rhizoplane 表示根表样本微生物组成, others 表示相对丰度<0.01 的物种, 下同。

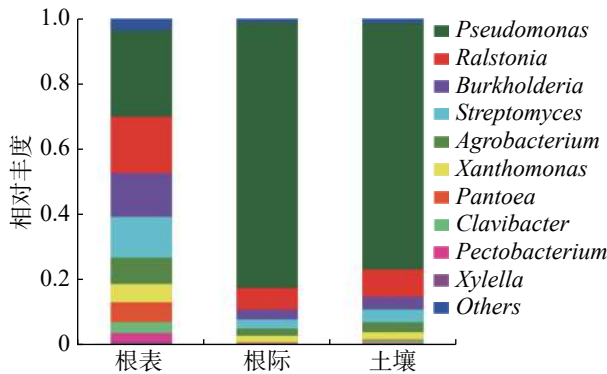


图 2 属水平上土壤、根际及根表病原微生物相对丰度

由图 3 可知, 在土壤、根际及根表样本属水平上, 假单孢菌属和欧文氏菌属 (*Erwinia*) 有显著差异 ( $P=0.03$ ), 泛菌属和果胶杆菌属有极显著差异 ( $P<0.01$ )。其中假单孢菌属在根表样本中的丰度明显小于土壤和根际样本, 欧文氏菌属、泛菌属和果胶杆菌在根表样本中的丰度明显大于土壤和根际样本。由图 4 可知, 两地根际病原微生物在属水平上无显著差异。

**2.2 病原微生物 PCoA 分析** 由图 5 可知, PC1 轴解释 74.07%, PC2 轴解释 10.57%。由图 5 和图 6 可知, 根表样本离散程度低, 说明病原微生物在根表样本中分布均匀, 而土壤和根际样本则相反。土壤和根际样本置信椭圆高度重合, 说明土壤和根际样本病原微生物差异更小, 根表样本在 PC1 轴高度聚类, 也说明病原微生物在根表样本中高度相似, 但乐东的根表样本有一点差异。

**2.3 病原微生物与环境因子相关性分析** 基于病原微生物属水平 RDA 分析, 由图 6 可知, RDA1 轴解释 25.23%, RDA2 轴解释 0.47%, 勐仑和勐满土壤和根际样本病原微生物组成相似, 乐东根表样本与其他根表样本有差异。由图 6 和表 3 可知, 只有硝态氮与病原微生物呈显著正相关 ( $P<0.05$ ), 其他环境因子与病原微生物无显著关系。

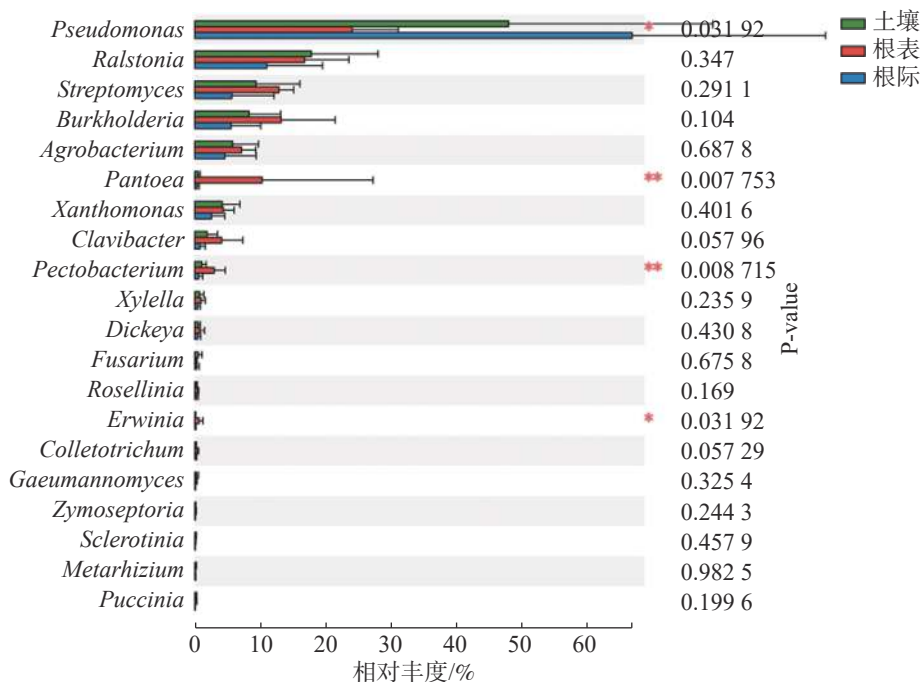


图 3 属水平上土壤、根际及根表病原微生物相对丰度差异选取丰度前 20 的物种。

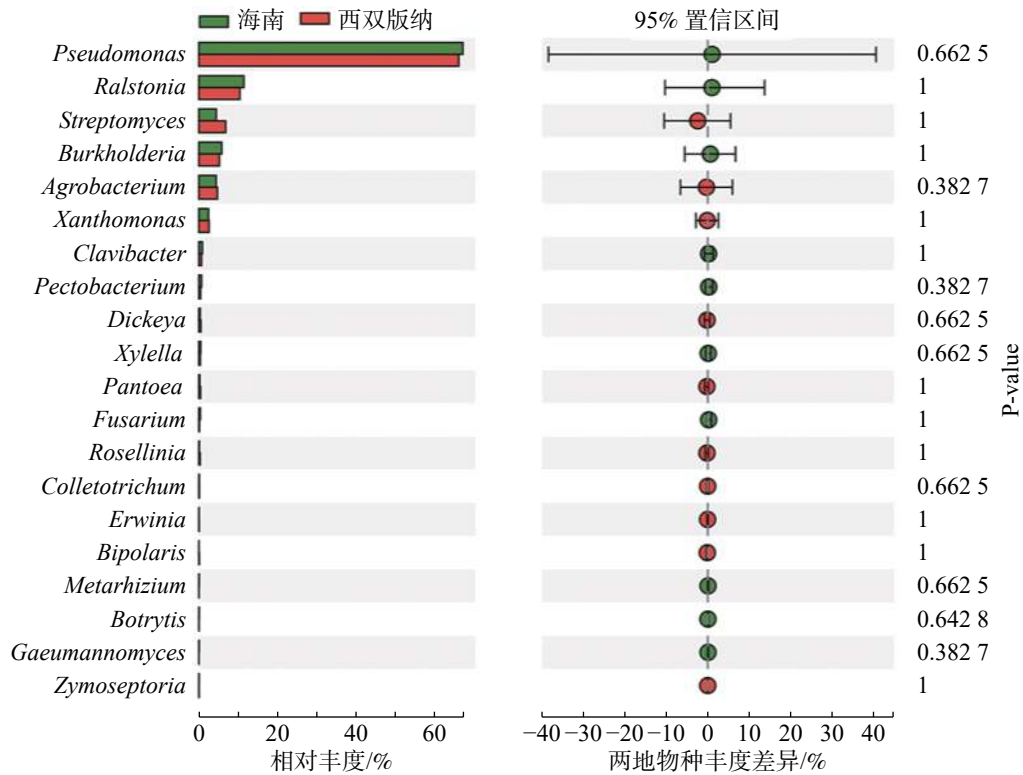


图 4 两地根际病原微生物在属水平上的组成差异  
选取丰度前 20 的物种。

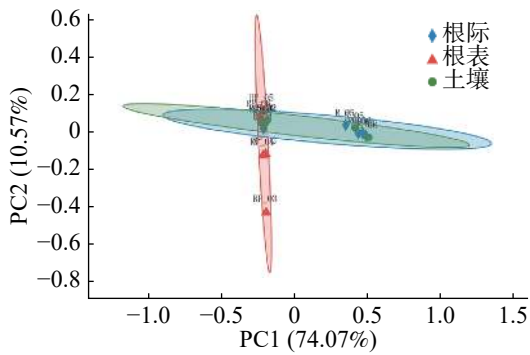


图 5 土壤、根际及根表病原微生物 PCoA 分析

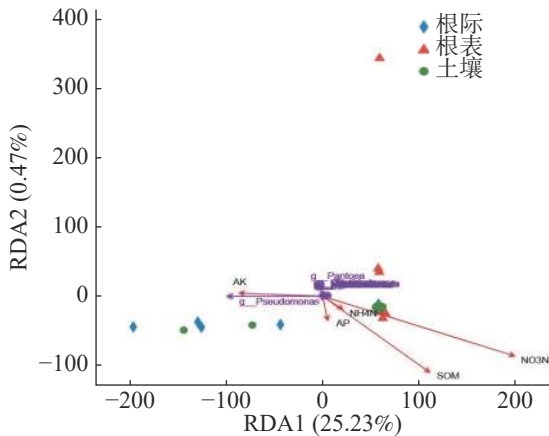


图 6 土壤、根际及根表病原微生物 RDA 分析

选取丰度前 20 的属水平的病原微生物, 箭头表示方向, 红色的线表示环境因子, 紫色的线表示病原微生物。

表 3 病原微生物 RDA 分析相关性因子

	RDA1	RDA2	$R^2$	$P\_values$
AP	0.41	-0.91	0.01	0.944
SOM	0.70	-0.71	0.17	0.302
NO3N	0.82	-0.57	0.30	0.039
NH4N	0.71	-0.70	0.00	0.97
AK	-0.93	0.36	0.04	0.761
pH	-0.99	0.13	0.10	0.522
WC	0.85	-0.53	0.10	0.507
TP	0.72	-0.69	0.25	0.128
TN	0.77	-0.64	0.18	0.277
TK	-0.47	0.88	0.28	0.099
Longitude	-0.03	1.00	0.12	0.361
Latitude	0.10	-0.99	0.16	0.241
Elevation	0.07	-1.00	0.11	0.395

### 3 讨论

通过宏基因组测序结果与病原和宿主互作数据库比对注释, 得到植物病原微生物在土壤、根际及根表的组成。研究表明<sup>[1]</sup>, 橡胶树受到多种真菌致病因子的影响, 而本实验结果表明, 健康土壤中, 土壤、根际及根表样本中均未出现引起橡胶树

根病的真菌,说明健康土壤中有抑制致病菌的有益微生物,这与 Weller 等<sup>[23]</sup> 研究结果相似。有研究表明<sup>[24]</sup>,多年生作物不断地从土壤中吸收养分,导致土壤肥力下降,而土壤养分缺乏会增加植物对感染的敏感性,本实验结果表明,硝态氮与病原微生物呈显著正相关,其他环境因子与病原微生物无显著关系。那么在橡胶林施肥时,是否可以增加氨态氮的比例,从而减少病原微生物的种类和丰度。

实验结果表明,植物病原微生物在门的水平上属于变形菌门、放线菌门和子囊菌门,其中变形菌门在根表样本占比最少,而放线菌门和子囊菌门在根表样本占比则最多,表明放线菌门和子囊菌门的病原微生物更适应根表环境,或者说根表环境吸引放线菌门和子囊菌门的病原微生物定殖,表明不仅有益微生物会被植物根系招募,某些病原微生物也会被植物根系招募。土壤和根际样本病原微生物组成相似,各根表样本病原微生物组成相似,表明病原微生物的组成可能与根表环境有关。在属水平上,病原微生物以子囊菌门种类最多,表明子囊菌门的病原微生物在橡胶树根系中分布广泛。假单孢菌属主要分布在土壤和根际,欧文氏菌属、泛菌属和果胶杆菌主要分布在根表。两地根际病原微生物在属水平上无显著差异。

## 参考文献:

- [1] LIMKAISANG S, KOM-UN S, FURTADO EL, et al. Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree [J]. *Mycoscience*, 2005, 46: 220 – 226.
- [2] MANIVONG V, CRAMB R A. Economics of smallholder rubber expansion in Northern Laos [J]. *Agroforestry System*, 2008, 74: 113 – 125.
- [3] QIU J. Where the rubber meets the garden [J]. *Nature*, 2009, 457: 246 – 247.
- [4] FOX J, VOGLER J B, SEN O L, et al. Simulating land-cover change in montane mainland Southeast Asia [J]. *Environmental Management*, 2012, 49: 968 – 979.
- [5] 莫业勇, 杨琳. 2017年国内外天然橡胶产业发展形势[J]. *世界热带农业信息*, 2018(2): 1 – 3.
- [6] 刘锐金, 莫业勇. 橡胶产业现状与展望——2012年中国橡胶年会综述[J]. *热带农业科学*, 2012, 32(6): 76 – 79.
- [7] ZHAI D, XU J, DAI Z, et al. Rubber and pulp plantations represent a double threat to Hainan's natural tropical forests [J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 96: 64 – 73.
- [8] LI H, AIDE T M, MA Y, et al. Demand for rubber is causing the loss of high diversity rain forest in SW China [J]. *Biodiversity Conservation*, 2007, 16: 1731 – 1745.
- [9] XU J, GRUMBINE R E, BECKSCHÄFER P. Landscape transformation through the use of ecological and socioeconomic indicators in Xishuangbanna, Southwest China, Mekong Region [J]. *Ecol. Indic*, 2014, 36: 749 – 756.
- [10] 兰国玉, 王纪坤, 吴志祥, 等. 海南岛橡胶林群落种子植物区系组成成分分析[J]. *西北林学院学报*, 2013, 28(2): 37 – 41.
- [11] NANDRIS D, NICOLE M, GEIGER J P. Root rot disease of rubber trees [J]. *Plant Dis*, 1987, 71: 298 – 306.
- [12] GUYOT J, FLORI A. Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber trees [J]. *CropProt*, 2002, 21: 461 – 466.
- [13] JAYASINGHE C K. Check List of rubber pathogens in Sri Lanka [M]. National Science Foundation, Sri Lanka, 2001.
- [14] OGBEBOR O N, ADEKUNLE A T, EGHAFONA N O, et al. *Ganoderma pseudoferreum*: Biological control possibilities with microorganisms isolated from soils of rubber plantations in Nigeria [J]. *Afr. J. Gen. Agric*, 2010, 6: 301 – 305.
- [15] DHAL N K. Plant Science [M]. India: Institute of Minerals and Materials Technology, 2012.
- [16] OMO-IKERODAH E E, OMORUSI V I, MOKWUNYE M U B. Challenges and progress in the control of white root rot disease of *Hevea brasiliensis* in Africa [J]. *World Rural Obs*, 2012, 4: 1 – 2.
- [17] STERGIPOULOS I, GORDON T R. Cryptic fungal infections: The hidden agenda of plant pathogens [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 506.
- [18] CRONE M, MCCOMB J A, O'BRIEN P A, et al. Survival of *Phytophthora cinnamomi* as oospores, stromata, and thick-walled chlamydospores in roots of symptomatic and asymptomatic annual and herbaceous perennial plant species [J]. *Fungal Biology*, 2013, 117(2): 112 – 123.
- [19] MAKIOLA A, DICKIE I A, HOLDAWAY R J. Biases in the metabarcoding of plant pathogens using rust fungi as a model system [J]. *Microbiology Open*, 2019, 8(7): e00780.
- [20] YOUNG J M, DYE D W, BRADBURY J F, et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria [J]. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1978, 21: 153 – 177.
- [21] BULL C T, COUTINHO T A, DENNY T P, et al. List of new names of plant pathogenic bacteria (2011–2012) [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2014, 96(2): 223 – 226.
- [22] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [23] WELLER D M, LANDA B, MAVRODI O V, et al. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots [J]. *Plant Biol*, 2007, 9: 4 – 20.
- [24] CUMAGUN J. Plant Pathology [M]. Slavka Krautzeka: InTech, 2012.



## Analysis of pathogenic microorganisms in rubber plantations based on macrogenome sequencing

QUAN Fei<sup>1,2</sup>, LAN Guoyu<sup>1</sup>, WEI Yaqing<sup>1,4</sup>, LI Mingmei<sup>1,5</sup>, SUN Shuqing<sup>1,6</sup>, DU Haonan<sup>1,6</sup>

(1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101; 2. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3. Hainan Danzhou National Field Observation and Research Station for Tropical Agroecosystem, Danzhou, Hainan 571737; 4. College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 5. College of Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 6. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** In order to understand the composition and influencing factors of broad-spectrum pathogenic microorganisms in soil and root (rhizosphere and rhizoplane) of rubber plantations, metagenome sequencing was used to analyze the composition and influencing factors of pathogenic microorganisms in soil, rhizosphere and rhizoplane of healthy rubber plantations in Hainan (Danzhou, Wanning and Ledong) and Xishuangbanna (Jinghong, Menglun and Mengman). The results showed that plant pathogenic microorganisms belonged to Proteobacteria, Actinobacteria and Ascomycota at the phylum level, and to *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* and *Xylella* at the genus level with Ascomycota as the main pathogen at the genus level. There was no significant difference in pathogenic microorganisms in the rhizospheres between the rubber plantations in Hainan and Xishuangbanna. The composition of pathogenic microorganisms was similar in the soil and rhizosphere samples, and similar in the rhizoplane samples. There was a significant positive correlation between  $\text{NH}_4\text{-N}$  and pathogenic microorganisms. In conclusion there was no significant difference in pathogenic microorganisms in soil, rhizosphere and rhizoplane between the rubber plantations in Hainan and Xishuangbanna. A significant positive correlation was observed between pathogenic microorganisms and  $\text{NH}_4\text{-N}$ , and that the composition of pathogenic microorganisms was related to the exudates of the rhizoplane.

**Keywords:** rubber plantation; metagenome sequencing; soil; root; pathogenic microorganisms

(责任编辑:吴志祥 责任编辑:叶 静)