

三七根腐病原菌毁灭柱孢霉分子定量检测方法及其应用

吴照祥¹ 郝志鹏¹ 曾燕² 郭兰萍³ 黄璐琦³ 王勇⁴ 陈保冬^{1*}

(1. 中国科学院生态环境研究中心 城市与区域生态国家重点实验室 北京 100085)

(2. 中国药材公司 北京 100097)

(3. 道地药材国家重点实验室 中国中医科学院中药资源中心 北京 100700)

(4. 文山学院 文山三七研究院 云南 文山 663000)

摘要:【目的】建立一种快速准确的三七根腐病原真菌毁灭柱孢霉(*Cylindrocarpon destructans*)的分子定量检测方法,探讨毁灭柱孢霉与植株生长和 AM 真菌侵染之间的数量效应关系。【方法】根据 GenBank 登录的毁灭柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段,设计特异性引物对 CDU2 和 CDL2b,利用含有 SYBR Green I 的实时荧光定量 PCR 建立毁灭柱孢霉定量检测方法,检测三七根际土壤毁灭柱孢霉 rDNA 基因 IGS 片段拷贝数,并分析其与植株生物量和 AM 真菌侵染之间的关系。【结果】发病植株根际土壤毁灭柱孢霉 rDNA 基因 IGS 片段拷贝数显著高于健康植株。三七根际土壤中毁灭柱孢霉数量与植株地上部生物量以及菌根侵染强度呈显著负相关($P < 0.05$),与根系生物量以及根内丛枝丰度相关性不显著。【结论】基于实时定量 PCR 技术建立的毁灭柱孢霉的分子定量方法能够有效反映三七根际土壤中毁灭柱孢霉的数量及其与植株生长和 AM 真菌侵染的关系。

关键词: 三七, 根腐病, 毁灭柱孢霉, 定量 PCR, AM 真菌

Molecular quantification of *Cylindrocarpon destructans* in the rhizosphere of *Panax notoginseng* for predicting plant growth response

WU Zhao-Xiang¹ HAO Zhi-Peng¹ ZENG Yan² GUO Lan-Ping³ HUANG Lu-Qi³
WANG Yong⁴ CHEN Bao-Dong^{1*}

(1. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

(2. China National Group Corporation of Traditional and Herbal Medicine, Beijing 100097, China)

(3. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

(4. Wenshan Institute of Sanchi Ginseng, Wenshan, Yunnan 663000, China)

Abstract: [Objective] To establish a fast and accurate quantification method for *Cylindrocarpon destructans* causing root rot disease in the rhizosphere of *Panax notoginseng*, and to reveal the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41101245); 国家科技支撑计划项目(No. 2012BAI29B02)

*通讯作者: Tel: 86-10-62849068; 信箱: bdchen@rcees.ac.cn

收稿日期: 2014-07-21; 接受日期: 2014-10-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-31

correlation of *C. destructans* abundance with plant growth and AM fungal colonization. **[Methods]** Based on the rDNA IGS sequence of *C. destructans* obtained from GenBank, specific primer pair CDU2 and CDL2b was designed. Molecular quantification of *C. destructans* by real-time PCR with SYBR Green I was established. IGS fragment copies of *C. destructans* in the rhizosphere of *Panax notoginseng* in field was detected with the newly established method and its relationships with plant biomass and AM fungal colonization were statistically analyzed. **[Results]** *C. destructans* was more abundant in rhizosphere of infected *P. notoginseng* than that of healthy plants ($P<0.05$). IGS fragment copies of *C. destructans* was negatively correlated with shoot biomass and mycorrhizal colonization rate, but the correlation between IGS fragment copies of *C. destructans* and root biomass and arbuscule abundance were insignificant. **[Conclusion]** The quantification method for *C. destructans* based on real-time PCR could well reflect the population dynamics of *C. destructans* in the rhizosphere of *P. notoginseng* in relation to plant growth and AM fungal colonization.

Keywords: *Panax notoginseng*, Root rot disease, *Cylindrocarpon destructans*, Real-time PCR, AM fungi

三七[*Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen]是一种五加科人参属多年生草本植物, 以其干燥的块根及茎入药, 具有止血散瘀、消肿定痛等良好功效^[1], 已成为我国特有的大宗中药材之一。除广东、广西有极少量栽培外, 目前三七主要分布于我国云南省文山壮族苗族自治州及其相邻地区^[2]。由于长期的单一化、规模化密集栽培, 加上阴凉潮湿的栽培环境及其自身的生理特性^[3], 三七生产过程中普遍出现严重的连作障碍现象^[4], 主要表现为不能连茬栽培和随着在地时间的延长土传病害发生愈发严重, 其中根腐病的发生尤为突出^[5]。三七根腐病的发生常常使七农遭受不同程度的经济损失, 年平均损失在5%-20%之间, 严重时全园绝收, 已经成为阻碍产区三七种植业发展的主要制约因子之一^[6]。

三七根腐病在各个季节均有发生, 每年有两次发病高峰期, 分别是3-4月和7-8月, 与雨水充沛程度以及空气湿度密切相关^[7]。关于三七根腐病病原已有不少的研究, 其结果各不相同。Ma等^[8]认为土壤真菌可能是引发三七根腐病发生的主导因子, 也有研究^[9-10]认为细菌的侵染在根腐病的发生过程中起主导作用。对其他具有严重连作障碍的作物开展的研究多数表明随着连作时间的延长, 土壤微生物群落逐渐从细菌主导型向真菌主导型转化^[11-12], 我们认为在三七根腐病发生过程中真菌的主导地位可能更加突出^[13]。通过进一步对根腐病田间跟

踪、病原分离鉴定等研究, 缪作清等^[3]认为毁灭柱孢霉(*Cylindrocarpon destructans*)和三七黄腐病菌(*C. didymum*)是田间三七根腐病的重要病原菌。朱有勇院士研究团队针对三七根腐病开展了深入而细致的研究工作, 通过严格的分离、鉴定以及回接和再分离等程序后确定了毁灭柱孢霉是三七根腐病的重要病原菌地位^[14]。目前, 三七根际土壤毁灭柱孢霉的定量检测及其数量与植株生长、健康状况等的数量效应关系方面的研究尚未有报道。

AM真菌是一种能与80%以上的陆生植物共生的有益土壤微生物^[15], 与宿主植物建成良好共生后能够帮助宿主植物吸收矿质养分^[16], 改善植物营养状况并提高其质量和产量^[17], 增强其对生物和非生物胁迫的抗性^[18-20]。已有研究表明大田条件下AM真菌的侵染状况与三七植株的健康状况密切相关^[21]。根据生态位理论, 在资源有限的情况下, 不同生态元占据相同生态位时就会出现典型的竞争共存和竞争淘汰的现象^[22], 这也是AM真菌增强宿主对生物胁迫特别是土传病害抵抗能力的理论基础^[23]。目前, 三七根腐病的微生物防治方面的研究工作开展较少, AM真菌与病原菌侵染三七根系的相互关系还鲜有报道。

本研究利用含有SYBR Green I的实时荧光定量PCR对三七根际土壤毁灭柱孢霉进行定量检测, 旨在构建其定量检测方法。同时, 应用相关分析探

究根际土壤毁坏柱孢霉的数量与植株生长以及 AM 真菌侵染的数量效应关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标准菌株 *C. destructans* ACCC36225 由中国农业微生物菌种保藏管理中心(Agricultural Culture Collection of China, ACCC)提供, 该菌株由中国农业科学院植物保护研究所自云南省文山壮族苗族自治州砚山县两年生三七黄腐病块根组织分离获得。

试验样品采自三七道地产区云南省文山壮族苗族自治州 6 个三年生三七栽培样点。各样点前茬未种植过三七或栽种三七后已经轮作 10 年以上(前茬作物均为玉米)。各样地三七的平均发病率在 30% 以下(表 1)。

提取基因组的试剂盒 DNA FastDNA[®] SPIN 购于美国 MP Biomedicals 公司; 琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒 QIA quick gel extraction 购于美国 QIAGEN 公司; 质粒提取纯化试剂盒 MiniBEST Plasmid Purification Kit 购自大连 TaKaRa Biotechnology 公司; 测定质粒浓度用 Nanodrop[®] ND-1000 购自美国 NanoDrop Technologies 公司; pGEM-T Easy 载体购自美国 Promega Corp.公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli* JM109)感受态细胞购自大连 TaKaRa Biotechnology 公司; SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 购自大连 TaKaRa Biotechnology 公司; iCycler iQ5 Thermocycler 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和特异性检测: 根据 Kernaghan 等^[24]设计的引物对 CDU1 和 CDL1b 对混合土壤样品 DNA 以及毁坏柱孢霉纯培养菌株 DNA 进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行测序并与毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列(GenBank 登录号: AY037554)进行比对。在此基础上利用 Primer Premier 5.0 设计其特异性定量引物 CDU2 (5'-GCTACCCCTATAGCGCAG GTG-3')和 CDL2b (5'-CCGTACTGGCTGAAGAGT CA-3'), 目标扩增片段长度 152 bp。利用设计的引物对 CDU2 和 CDL2b 再次对混合土壤样品 DNA 和纯培养毁坏柱孢霉菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增并测序验证。

1.2.2 标准曲线的制作: 用于毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段扩增的标准曲线采用 *C. destructans* ACCC36225 作为标准品来源。ACCC36225 在 PDA 培养基上菌落呈现褐色(图 1A), 具有大小分生孢子。大分生孢子呈柱状, 有 1-3 个隔, 大小约为 (27-38) μm×(5-7) μm; 具有黄色、间生或顶生的厚垣孢子, 近球形, 直径约为 12-16 μm。收集 ACCC36225 菌丝和孢子等菌物材料, 采用 FastDNA[®] SPIN 试剂盒提取其纯培养菌株全基因组 DNA, 经 PCR 扩增、1%琼脂糖凝胶分离后, 回收 152 bp 大小的目标条带, 用 QIA quick gel extraction 试剂盒纯化。纯化后的产物经测序验证后连接到 pGEM-T Easy 载体上。将连接后的载体转入大肠杆菌(*Escherichia coli* JM109)感受态细胞, 挑取经蓝

表 1 采样点基本信息和三七整体发病率					
Table 1 Coordinates of sampling sites and disease incidence of <i>P. notoginseng</i> plants					
代码 Code	行政区划 Administrative area	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude (m)	发病率 Disease incidence (%)
1	干河乡	23°42'31.00"N	104°25'11.07"E	1 524	15
2	追栗街彝族乡	23°18'28.35"N	104°20'44.85"E	1 390	30
3	追栗街彝族乡	23°18'29.18"N	104°20'43.14"E	1 382	10
4	柳井彝族乡	23°11'00.86"N	104°13'27.03"E	1 552	15
5	古木镇	23°13'48.43"N	104°12'39.84"E	1 593	5
6	古木镇	23°13'53.53"N	104°12'01.63"E	1 684	5

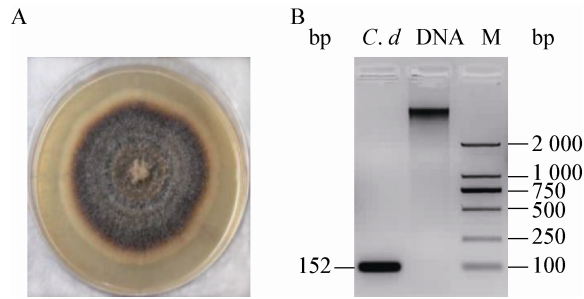


图1 毁灭柱孢霉 *C. destructans* ACCC36225 菌落形态(A)和特异性目标基因片段电泳图谱(B)

Figure 1 Colonial morphology of *C. destructans* on PDA (A) and electrophoresis spectrum of targeted gene fragment (B)

Note: M: DNA marker DL2000.

白斑筛选和菌落 PCR 鉴定所获得的阳性克隆子送交北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序验证。所得克隆子经含有 Ampicillin 的 LB 液体培养基在 37 °C、200 r/min 培养过夜,采用 MiniBEST Plasmid Purification Kit 质粒提取纯化试剂盒提取质粒,并用 Nanodrop® ND-1000 测定质粒浓度。标准品质粒 DNA 模板中的毁灭柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段的拷贝数浓度(拷贝/μL)依照如下方法进行计算:基于标准品质粒 DNA 的大小为 3 015 bp,每个标准品质粒 DNA 只含有一个毁灭柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列拷贝,且 1 bp 的平均摩尔质量为 660 g/mol,根据公式计算出标准品质粒 DNA 模板中目标片段的拷贝数浓度, rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝数浓度(拷贝/μL)=[6×10^{23} (拷贝/mol)]×[DNA 浓度(mg/L)/[一个基因组的摩尔质量(g/mol)]]。

将标准品质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释制作的 10^{-1} – 10^{-7} 系列标准样品和待测样品同时进行扩增,根据所得标准曲线计算出待测样品中的目标基因拷贝数,最后以每克干土的目标基因拷贝数为单位进行分析。

1.2.3 定量 PCR 体系: 定量 PCR 体系(25 μL)包括 12.5 μL SYBR® Premix Ex Taq™, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 灭菌超纯水 10.5 μL, 模板 DNA 1 μL (约 1–10 ng)。反应在 iCycler iQ5

Thermocycler 上按照以下程序运行: 94 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 10 min。起始模板浓度由 C_t 值确定,采用 iCycler 软件(Version 1.0.1384.0 CR)进行数据分析。按照 0.1 °C/s 的升温速率从 65 °C 升至 95 °C 进行熔解曲线的分析验证,分析标准曲线的扩增效率,并检测线性相关系数。

1.2.4 病原菌毁灭柱孢霉数量与植物生长及 AM 真菌侵染效应分析: 按照 6 级标准^[25]划分根腐病发生等级,其中 0 级:主根、须根健全,无病斑;1 级:主根上有零星病斑,但不连片,须根上无病斑;2 级:主根病斑连片,但小于根部周长的 1/4,须根略微发病;3 级:主根病斑大于周长的 1/4,但小于 1/2,须根病斑较多,但不连片;4 级:主根病斑大于周长的 1/2,但小于根部周长的 3/4,须根略微发病;5 级:整个根部均有病斑包围,根部腐烂,须根近无。每个样点按照蛇形法分别采集 3–4 株健康和 3–4 级的发病植株,其中健康植株地上部和根系表观生长正常,发病植株地上部发生萎蔫,块根中部及末端出现典型组织腐烂坏死病征。采用抖根法获得相应根际土壤样品^[26]。沿土表分离植株地上部和根系,与根际土壤一道置冰上运回实验室。用自来水和去离子水冲洗干净植株根系,取下全部的细根剪成大约 1 cm 长的根段,剪下的根段先经过透明、酸化处理,再采用曲利苯蓝染色和乳酸甘油脱色后随机挑选 30 条根段制作临时装片。依据 Duc 等^[27]的方法,按照菌根侵染和丛枝丰度分级的标准,设置等级参数,借助“Mycocalc”软件,计算出表征 AM 真菌侵染状况的菌根侵染强度 M%和整个根系的丛枝丰度 A%。剩下的试验样品置 80 °C 烘箱中烘至恒重后称取干物重,经折算获得总干重。土壤样品装入无菌袋置低温下运回实验室,过 2 mm 筛处理后一部分风干用于土壤理化性状分析,一部分保存于–80 °C,用于毁灭柱孢霉分子生态学定量分析。土壤理化性状指标按史瑞和等^[28]《土壤农化分析(第 3 版)》所述方法测定并进行配对 *T* 检验,

结果显示健康株和发病株根际土壤的物理化学性状无显著差异,其中 pH 值(水土比 1:2.5) 4.66–5.52, 有机质(重铬酸钾氧化还原滴定法) 8.74–16.41 g/kg, 速效磷(0.5 mol/L NaHCO₃ 提取, 钼锑抗比色) 98.54–386.60 μg/g。土壤粒径组成基本一致, 粘粒 1.37%–57.66%、粉粒 24.95%–69.87% 和沙粒 5.14%–51.36%。土壤样品使用 FastDNA[®] SPIN 试剂盒提取其总基因组 DNA, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段大小, 并用 Nanodrop[®] ND-1000 测定其浓度和纯度, 于–20 °C 保存待用。

1.3 数据分析

所有试验数据使用 Microsoft Excel 进行均值和标准误计算并作图, 使用 SPSS 统计软件(SPSS 16.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, USA)对数据进行统计分析, 其中健康植株和发病植株根际毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝数浓度及植株生物量采用配对 *t* 检验, 病原菌 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝数浓度通过对数(log)正态分布转化后进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 毁坏柱孢霉定量检测体系构建

借助引物对 CDL1b 和 CDU1 分别对纯培养菌株 DNA 和混合土壤样品 DNA 进行扩增并测序, 获得了单一的序列, 经比对发现该序列与 AY037554 对应区段有 99%的相似性。在该序列的基础上设计的定量引物对 CDL2b 和 CDU2, 对纯培养菌株 DNA 和混合土壤样品 DNA 进行再次扩增并测序也获得了单一的序列, 证明所设计引物是毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列的特异性引物。

C. destructans ACCC36225 在 PDA 培养基上菌落形态如图 1A 所示。经 DNA 提取、特异性引物的 PCR 扩增和测序验证获得 152 bp 的 rDNA 基因 IGS 序列的特异性目标片段(图 1B), 该目标片段经连接、转化、质粒提取和再次测序验证获得浓度为 3.13×10^8 拷贝/μL 含有毁坏柱孢霉特异性目标片段

的质粒 DNA。对 10^{-1} – 10^{-7} 系列标准样品进行定量 PCR 扩增, 以 *C_t* 值为纵坐标, 以稀释倍数的对数为横坐标, 获得定量 PCR 标准曲线(图 2B), 其相关系数为 0.999, 扩增效率为 90.0%, 认为定量 PCR 对标准样品质粒 DNA 在 10^{-1} – 10^{-7} 的梯度稀释范围内具有很好的线性关系。在 PCR 扩增后进行溶解曲线分析, 结果表明该 PCR 反应过程中没有引物二聚体和非特异性扩增产物的产生(图 2A)。

2.2 三七植株根际土壤中毁坏柱孢霉的定量检测

将上述质粒 DNA 按照 10 倍梯度稀释所得的 10^{-1} – 10^{-7} 系列标准样品和待测样品同时进行定量 PCR 扩增, 获得标准曲线(图 2B)并对待测样品中的目标基因拷贝数进行换算, 得到待测样品中毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝浓度, 结果显示三七健康植株根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝浓度显著高于健康植株(表 2, $P < 0.05$), 发病植株为 8.38×10^4 – 1.94×10^7 拷贝/g 干土, 健康植株为 7.18×10^3 – 1.02×10^5 拷贝/g 干土。

2.3 三七植株根际土壤毁坏柱孢霉与植株生物量的关系

健康植株地上部生物量略高于病害植株($P=0.06$), 但两者根系生物量无显著差异。三七根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝浓度经对数(log)正态转化后与地上部和根系生物量进行相关分析, 结果如图 3 所示, 根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝浓度与植株地上部生物量表现出显著的负相关关系(图 3A, $P < 0.05$), 植株地上部生物量随着根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝的上升而降低, 但与根系生物量相关关系不显著(图 3B, $P=0.066$)。

2.4 三七植株根际土壤中毁坏柱孢霉与 AM 真菌侵染程度的关系

三七健康植株的 AM 真菌侵染强度为 $21.86\% \pm 4.11\%$, 显著高于发病植株的 $11.01\% \pm 2.92\%$

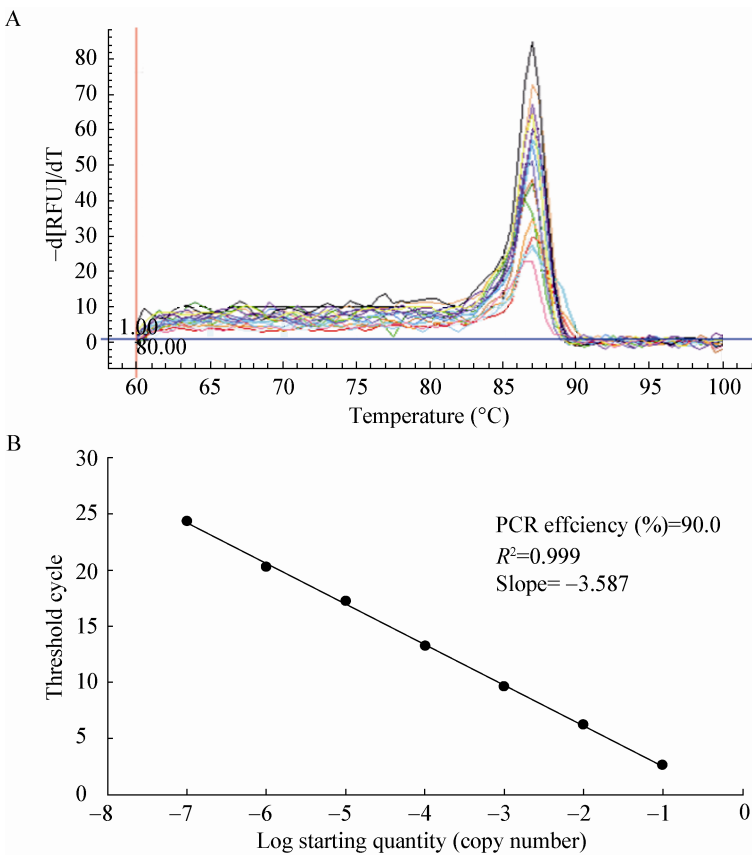


图 2 定量 PCR 的溶解曲线(A)和标准曲线(B)
Figure 2 Melting curve (A) and standard curve (B) of quantitative PCR

表 2 植株根际毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝数 Table 2 Copy number of <i>C. destructans</i> rDNA gene IGS fragment		
样地编号 Sampling site	健康植株 Healthy plant (copies/g)	发病植株 Infected plant (copies/g)
1	7.18E+03	8.38E+04
2	7.50E+04	3.20E+06
3	2.61E+04	1.94E+06
4	1.02E+05	1.44E+07
5	4.90E+04	6.62E+06
6	2.83E+04	1.94E+07
均值 Average	4.80E+04a	7.61E+06b
标准差 Standard deviation	1.44E+04	3.13E+06

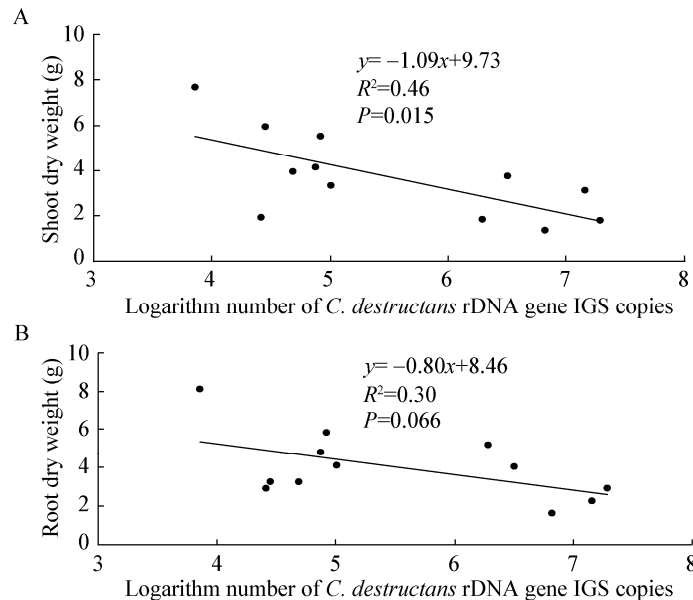


图3 三七根际毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列拷贝数与三七植株植物地上部(A)和根系(B)生物量的相关关系

Figure 3 The correlation of rDNA IGS fragment copies of *C. destructans* in the rhizosphere of *P. notoginseng* with plant shoot (A) and root (B) biomass

($P=0.015$), 但丛枝丰度没有表现出显著性差异 (0.4%–15.62%)。三七根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段拷贝浓度经对数(log)正态转化后与 AM 真菌侵染程度进行相关分析发现, 根际土壤毁

坏柱孢霉与菌根侵染强度显著负相关图 4A, ($P < 0.05$), 植株根际土壤毁坏柱孢霉的数量随着菌根侵染强度的升高而减少, 而与丛枝丰度无显著相关关系(图 4B, $P=0.124$)。

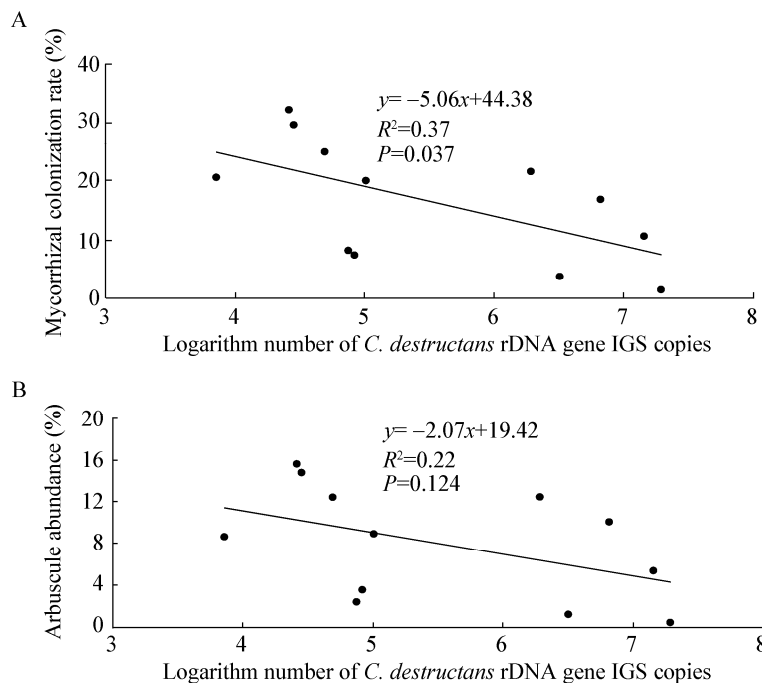


图4 三七根际毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列拷贝数与菌根侵染强度(A)以及丛枝丰度(B)的相关关系

Figure 4 The correlation of rDNA IGS fragment copies of *C. destructans* in the rhizosphere of *P. notoginseng* with mycorrhizal colonization rate (A) and arbuscule abundance (B) in plant roots

3 讨论

本研究建立了一种针对三七植株根际土壤中根腐病重要病原真菌毁坏柱孢霉的分子定量检测方法。该方法摆脱了传统的纯培养过程,与传统检测方法相比,具有高效、简单和快速等诸多优点。另外,本研究也初步探讨了三七植株根际土壤毁坏柱孢霉数量与植株生物量以及 AM 真菌侵染程度之间的数量效应关系。

实时荧光定量分析包括相对定量和绝对定量,两者各有优缺点和特定应用范畴,需要根据研究者的研究目的选择使用^[29]。本研究采用了绝对定量分析的方法,它可以得到各个不同样本中目的基因的拷贝数和浓度,结果显示发病植株根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段的拷贝浓度显著高于健康植株,另外对三七植株根系内的毁坏柱孢霉进行相对定量分析也发现发病植株根系毁坏柱孢霉相对数量显著高于健康植株(结果未显示),这说明该病原菌在三七根腐病的发生过程中的确具有重要作用,这也验证了前人的研究结果^[3,14]。毁坏柱孢霉是一种多寄主病原菌,普遍存在于农业生态系统中,能侵染多种作物并对其产生不同程度的伤害,目前报道较多的有苹果^[30]、人参^[31-32]、西洋参^[33]和油橄榄^[34]等。因此,在三七种植前,种植地块的选择对三七生产过程中根腐病病害的发生与否以及发生程度至关重要。目前关于该病原菌数量与三七根腐病发生的临界阈值还缺乏深入的研究,该问题的解决将为三七种植地块的选择提供重要的决策支持。

三七根腐病主要表现为地上部萎蔫,块根中部及末端出现组织腐烂坏死^[3-4,7]。通过分析发现三七根际土壤毁坏柱孢霉 rDNA 基因 IGS 序列片段的拷贝浓度与植株地上部生物量呈显著的负相关关系,而与根系生物量相关关系不显著。分析其原因我们认为三七植株根系被该病原菌侵染后消耗其营养转化为自身生物量,并通过影响植株生理作用引起其地上部的黄化、萎蔫。由于光合作用受阻和营养

向下传递的双重作用,植株地上部生物量急剧下降。由于病原菌侵染可能诱导植株地上部光合产物更多向根部转运,因而根系生物量对病害的响应可能与地上部响应并不同步。与此类似,Aldea 的研究也发现根系中侵染中柱的真菌数量与地上部的生长量成显著负相关关系^[35]。病原菌侵染植物后,以植物组织为养料快速繁殖、扩散,并引起植物组织的发病症状。Johnson 等^[36]的研究发现引发柑橘黄龙病的病原细菌 *Candidatus liberibacter* 侵染植株后迅速扩散到植株地上部,并在根部产生病症前引发地上部萎蔫,但是目前关于病原真菌在寄主体内扩散过程还不明了。

AM 真菌能够与绝大多数的陆生植物形成共生,促进其营养吸收、水分运输,增强其对生物胁迫和非生物胁迫的抗性^[15-20]。三七作为一种菌根植物,与 AM 真菌共生后其生长和病原菌抗性都有显著的提高^[37]。本研究结果显示随 AM 真菌侵染程度的提高,三七植株根际土壤病原真菌毁坏柱孢霉的数量显著下降,表明 AM 真菌可能提高了三七对病原菌的抵抗能力。AM 真菌增强植株抵抗病原菌的机制包括体质增强、生理调节以及生态位竞争等诸多理论,但对于三七该作用机制尚待进一步研究。

三七根腐病病原真菌毁坏柱孢霉分子定量检测方法的建立为该病原菌致病过程以及预防研究奠定了方法基础。后续需要进一步明确毁坏柱孢霉的致病数量阈值,深入研究该病原菌致病过程与机制,并有针对性地研究其防治方法,特别需要加强对包括菌根技术在内的生物防治方法的探索。

参 考 文 献

- [1] Guo HB, Cui XM, An N, et al. Sanchi ginseng (*Panax notoginseng* (Burkill) FH Chen) in China: distribution, cultivation and variations[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2010, 57(3): 453-460
- [2] Guan HL, Chen YJ, Zhu HC, et al. Characteristic study of rhizome-microorganism in soil of diseased *Panax notoginseng*[J]. Agriculture and Technology, 2006, 25(6): 453-460 (in Chinese) 官会林, 陈昱君, 朱海春, 等. 三七病株根际土壤微生物特征研究[J]. 农业与技术, 2006, 25(6): 56-58
- [3] Miu ZQ, Li SD, Liu XZ, et al. The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root disease[J]. Scientia Agricultural Sinica, 2006, 39(7): 1371-1378 (in Chinese)

- 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 等. 三七根腐病病原研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378
- [4] Ma CZ, Li SD, Gu ZR, et al. Measures of integrated control of root rot complex of continuous cropping *Panax notoginseng* and their control efficacy[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2006, 22(4): 63-68 (in Chinese)
- 马承铸, 李世东, 顾真荣, 等. 三七连作田根腐病复合综合征综合治理措施与效果[J]. 上海农业学报, 2007, 22(4): 63-68
- [5] Yang JZ, Sun YQ, Wei ML, et al. The effect on growth of *Panax notoginseng* in soil under rotation for the different years[J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2012, 26(2): 6-8 (in Chinese)
- 杨建忠, 孙玉琴, 韦美丽, 等. 不同轮作年限土壤对三七生长的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(2): 6-8
- [6] Wang CL, Yu SF. Studies on relationship between root rot on *Panax notoginseng* Burk. H. Chen and its environmental conditions[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1998, 23(12): 714-716 (in Chinese)
- 王朝梁, 喻盛甫. 三七根腐病发生与环境条件关系的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 714-716
- [7] Chen YJ, Wang Y. Studies on relationship between root rot on *Panax notoginseng* Burk. H. Chen and environmental factors[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2001(6): 33-35 (in Chinese)
- 陈昱君, 王勇. 三七根腐病发生与生态因子的关系[J]. 云南农业科技, 2001(6): 33-35
- [8] Ma L, Cao YH, Cheng MH, et al. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013, 103(2): 299-312
- [9] Luo WF, He CF. On the combined infection of root rot pathogens on *Panax notoginseng*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(1): 85-91 (in Chinese)
- 罗文富, 贺承福. 三七根腐病病原及复合侵染的研究[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 85-91
- [10] Luo WF, Yu SF, Huang Q, et al. Studies on pathogenic bacteria in complex infection of *Panax notoginseng* root rot[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 1999, 2(14): 123-127 (in Chinese)
- 罗文富, 喻盛甫, 黄琼, 等. 三七根腐病复合侵染中病原细菌的研究[J]. 云南农业大学学报, 1999, 2(14): 123-127
- [11] Zhang Y, Liu ZG. Studies on the reason and the control practice of *Platyodon grandmorum* (Jacq.) A.Dc continuous obstacle[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2007(2): 107-109 (in Chinese)
- 张雁, 刘自刚. 桔梗连作障碍成因及其对策初探[J]. 陕西农业科学, 2007(2): 107-109
- [12] Meng PP, Liu X, Qiu HZ, et al. Fungal population structure and its biological effect in rhizosphere soil of continuously cropped potato[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(11): 3079-3086 (in Chinese)
- 孟品品, 刘星, 邱慧珍, 等. 连作马铃薯根际土壤真菌种群结构及其生物效应[J]. 应用生态学报, 2012, 23(11): 3079-3086
- [13] Wu ZX, Hao ZP, Chen YL, et al. Characterization of fungal community composition and carbon source utilization in the rhizosphere soil of *Panax notoginseng* suffering from root-rot disease[J]. Mycosystema, 2014. DOI: 10.13346/j.mycosystema.130164 (on line in Chinese)
- 吴照祥, 郝志鹏, 陈永亮, 等. 三七根腐病株根际土壤真菌群落组成与碳源利用特征研究[J]. 菌物学报, 2014. DOI: 10.13346/j.mycosystema.130164
- [14] Mao ZS, Long YJ, Zhu YY, et al. First report of *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans* causing black root rot of Sanqi (*Panax notoginseng*) in China[J]. Plant Disease, 2014, 98(1): 162
- [15] Remy W, Taylor TN, Hass H, et al. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(25): 11841-11843
- [16] Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbiosis 2nd ed[M]. London: Academic Press, 1997
- [17] Ismail Y, McCormick S, Hijri M. The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*, controls the mycotoxin production of *Fusarium sambucinum* in the pathogenesis of potato[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 348(1): 46-51
- [18] Chandanie WA, Kubota M, Hyakumachi M. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth-promoting fungi and their significance for enhancing plant growth and suppressing damping-off of cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. Applied Soil Ecology, 2009, 41(3): 336-341
- [19] Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R. Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought - induced plant genes?[J]. New Phytologist, 2006, 171(4): 693-698
- [20] Liu R, Dai M, Wu X, et al. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Mycorrhiza, 2012, 22(4): 289-296
- [21] Zhang ZH, Chen D, Zhao DD, et al. Colonization of arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytes in *Panax notoginseng*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(17): 2311-2315 (in Chinese)
- 张智慧, 陈迪, 赵丹丹, 等. 三七根中从枝菌根真菌与深色有隔内生真菌侵染状况研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2311-2315
- [22] Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, et al. Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(5): 855-869
- [23] Whipps JM. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens[J]. Canadian Journal of Botany, 2004, 82(8): 1198-1227
- [24] Kernaghan G, Reeleder RD, Hoke SMT. Quantification of *Cylindrocarpon destructans* f. sp. *panacis* in soils by real-time PCR[J]. Plant Pathology, 2007, 56(3): 508-516
- [25] Wallenhammar AC, Almquist C, Söderström M, et al. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR[J]. Plant Pathology, 2012, 61(1): 16-28
- [26] Riley D, Barber SA. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes at the root-soil interface[J]. Soil Science Society of America Journal, 1971, 35(2): 301-306
- [27] Duc G, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V, et al. First report of non-mycorrhizal plant mutants (*Myc*) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.)[J]. Plant Science, 1989, 60(2): 215-222
- [28] Shi RH, Bao SD, Qin HY. Soil Agro-chemistry Analysis[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 1996
- 史瑞和, 鲍士旦, 秦怀英. 土壤农化分析[M]. 第2版. 北京: 农业出版社, 1996
- [29] Li FL, Li XZ, Min FX, et al. Application of real-time quantitative PCR on detection of fungal plant disease[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(4): 151-155 (in Chinese)
- 李凤兰, 李学湛, 闵凡祥, 等. 实时定量 PCR 在植物真菌病

原体定量检测中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(4): 151-155

[30] Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Mostert L, et al. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR[J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 129(4): 637-651

[31] Jang CS, Lim JH, Seo MW, et al. Direct detection of *Cylindrocarpon destructans*, root rot pathogen of Ginseng by nested PCR from soil samples[J]. Mycobiology, 2010, 38(1): 33-38

[32] Rahman M, Punja ZK. Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*[J]. Phytopathology, 2005, 95(12): 1381-1390

[33] Reeleder RD, Roy R, Capell B. Seed and root rots of ginseng (*Panax quinquefolius*) caused by *Cylindrocarpon destructans* and *Fusarium* spp.[J]. Journal of Ginseng Research, 2002, 26(3): 151-158

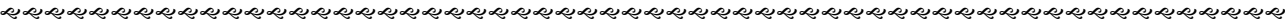
[34] Báidez AG, Gómez P, Del Río JA, et al. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2006, 69(4): 224-229

[35] Aldea V. Role of microorganism in rhizosphere for determining “soil sickness” in fruit culture[J]. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum, 1998, 477: 67-73

[36] Johnson EG, Wu J, Bright DB, et al. Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms[J]. Plant Pathology, 2014, 63: 290-298

[37] Zeng Y. Impacts of arbuscular mycorrhizal symbiosis on the growth, active ingredients and disease resistance of *Panax notoginseng*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Normal University, 2013

曾燕. 丛枝菌根对三七生长、药效成分及抗病性的影响[D]. 北京: 北京师范大学博士学位论文, 2013



2015 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
13	生物安全培训会议	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	9 月	80	武汉	18600189362
14	医学微生物学与免疫学专委会青年学组成立并学组研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	9 月下旬	100	重庆	hoofuquan@aliyun.com
15	第十一届全国病毒学学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	10 月	600	湖北武汉	吴莹 wuying@im.ac.cn
16	全国发酵过程优化与控制高级技术培训班	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	10 月	80-100	上海	刘健 jliu@nc-bio.com
17	2015 年医学真菌学新进展学术研讨会暨中美真菌班举办三十周年纪念会	中国微生物学会真菌学专业委员会	10 月	200	江苏南京	刘维达
18	2015 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月 23-26 日	600	湖北宜昌	杨海花, 王旭 010-64807200
19	第十八次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月 13-16 日	500	江苏镇江	蒋建东 025-84399726
20	第十届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11 月底	100	湖北武汉	胡晓敏 huxm@wh.iov.cn
21	中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	12 月	150	四川宜宾	010-53218310
22	生物安全研讨会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	12 月	60	北京	18600189362
23	微生物的全基因组测序及生物信息学分析	中国微生物学会生物制品专业委员会	待定	150	待定	67095437/67095601