

病原菌对木论保护区野生兜兰的危害及潜在风险分析

郑玲玲 杨晶晶 林汉业 钟其璇 陈 乐 覃勇荣

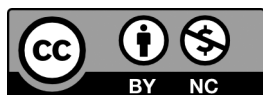
河池学院化学与生物工程学院, 宜州

摘 要 | 为了说明病原菌对岩溶地区珍稀野生兰科植物的危害, 以便更好地对其进行保护, 在野外调查的基础上, 利用 Illumina 高通量测序, 研究了硬叶兜兰根际土壤微生物的多样性, 并对菌群的功能进行预测。结果表明: 不同采样点和不同分布点硬叶兜兰的土壤理化特性有显著差异, 但染病植株与非染病植株根际土壤理化特性的差异并不显著; 除个别植株外, 染病植株与非染病植株根际土壤细菌和真菌群落的多样性指数有显著差异, 而真菌和细菌的群落丰富度指数没有显著差异; 在门水平上, 染病兜兰根际土壤细菌中的酸杆菌门相对丰度(25.48%)明显高于非染病兜兰(15.26%); 基于 KEGG 对比染病兜兰与非染病兜兰根际土壤中的植物致病功能基因分类, 发现 K01637 与 K01467 这两个通路在染病兜兰样品中丰度显著提高($p < 0.05$), 表明这些功能通路可能是致病菌对野生兜兰的入侵途径; Lefse 分析显示, *Cladophialophora* 显著富集于染病组, 疑似致病菌。由此可以推测, 土壤理化背景和土壤养分的差异可能不是硬叶兜兰染病的主要影响因素, 硬叶兜兰致病的原因比较复杂, 细菌和真菌均有可能是硬叶兜兰的致病菌, 但具体病因有待进一步研究确定。

关键词 | 木论保护区; 野生兜兰; 病原菌危害; 潜在风险

Copyright © 2021 by author (s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



基金项目: 广西高校重点实验室项目(桂教科研〔2010〕6号), 河池学院硕士专业学位建设基金课题(2016HJA007), 河池学院高层次人才科研启动费项目(XJ2018GKQ016), 河池学院重点实验室项目(校政发〔2016〕91号), 广西高校大学生创新创业计划训练项目(202010605063)。

通讯作者: 覃勇荣(1963—), 男, 汉族, 广西平南人, 硕士, 教授, 主要从事岩溶地区珍稀野生植物资源生物学保育及生态环境保护研究, E-mail: 1595677337@qq.com。

文章引用: 郑玲玲, 杨晶晶, 林汉业, 等. 病原菌对木论保护区野生兜兰的危害及潜在风险分析[J]. 植物学进展, 2021, 3(1): 1-14.

<https://doi.org/10.35534/aps.0301001>

兰科植物是观赏价值极高的植物类群，部分种类还具有极高的药用价值。目前，关于野生兜兰的研究，大多集中在生境调查、资源分布、植物分类鉴定、引种栽培、人工快繁、药用成分提取等方面^[1-6]。广西木论国家级自然保护区地处桂西北喀斯特地区，物种丰富、森林覆盖率达97%，被誉为北回归线上的一颗绿色明珠^[7]。该保护区野生兰科植物有120多种，其中，兜兰属植物就有硬叶兜兰、麻栗坡兜兰、小叶兜兰、带叶兜兰、白花兜兰5种^[8]。虽然国内学者对木论保护区野生兜兰的迁地保护和回归种植等问题进行一些相关研究，但是，关于病原菌对该保护区野生兜兰的危害及潜在风险的研究，鲜有文献公开报道。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

2019年11月上旬至2020年5月中旬，笔者多次到木论保护区硬叶兜兰的分布点进行调研和采样，用梅花形采样法采集硬叶兜兰0~20 cm的根际土。采样时，抖落硬叶兜兰根系大块土壤，用干净毛刷轻轻地将根上0~5 mm的土壤刷下作为根际土，将土样混合均匀后装入无菌自封袋中，低温保存，用于土壤微生物的测定（将PB设为染病兜兰组，NPB为非染病兜兰对照组）；同时按常规方法采集用于理化分析的土壤样品，迅速带回实验室，按常规方法进行处理。

1.2 土壤理化性质测定

将从野外采集的土壤样品自然风干，分别过60目和100目的标准筛。土壤含水量测定用重量法；土壤有机质含量测定用重铬酸钾—浓硫酸氧化比色法^[9-11]；土壤全氮含量测定用凯氏定氮法^[12-14]；土壤全磷含量测定用氢氧化钠碱熔—钼蓝比色法^[15-17]；土壤全钾含量测定用氢氧化钠碱熔—火焰光度计法^[18, 19]；土壤pH测定用电位法^[20]。

1.3 土壤微生物总 DNA 的提取和测序

采用 OMEGA 土壤 DNA 提取试剂盒对土壤 DNA 基因组进行提取，每个样品 3 次重复，以降低 DNA 提取过程中造成的误差。样品总 DNA 提取后，采用 Illumina Hiseq PE250 测序平台的通用引物对细菌 16S rRNA 基因 V3 ~ V4 区域和真菌 ITS1 区域分别进行 PCR 扩增，PCR 扩增产物用 1 % 琼脂糖电泳法检测合适后，送至生物工程有限公司 Illumina Hiseq PE250 高通量测序技术平台进行测序^[21]。

1.4 数据分析

理化数据分析用 SPSS 21.0 软件进行。高通量数据运用 QIIME2 dada2 插件进行质控，修剪，去噪，拼接，以及去除嵌合体后，得到了最终的特征序列表格^[22]。ANCOM，ANOVA，Kruskal Wallis，Lefse 和 DEseq2 等方法被运用来鉴定分组和样本间丰度有差异的细菌^[23]。使用了冗余分析方法（RDA）来揭示微生物群落与相关环境因子之间的潜在关联^[24]。

2 结果与分析

2.1 硬叶兜兰根际土壤的理化分析

木论自然保护区硬叶兜兰分布点土壤理化性质的分析结果见表 1 和表 2。

表 1 硬叶兜兰明利分布点的土壤理化特性比较

Table 1 Comparison of soil physical and chemical characteristics of *Paphiopedilum micranthum* distribution points in Mingli

样点	pH	含水量 /%	有机质 (g/kg)	全磷 (g/kg)	全钾 (g/kg)	全氮 (g/kg)
明利 1/PB	7.63 ± 0.01	10.08 ± 0.52	27.65 ± 0.18	0.33 ± 0.05	5.93 ± 0.26	0.78 ± 0.02
明利 2/NPB	6.55 ± 0.07	2.99 ± 0.08	21.08 ± 0.28	0.33 ± 0.02	6.15 ± 0.16	0.24 ± 0.00
<i>t</i>	28.504	23.341	34.111	-0.224	-1.272	45.208
<i>p</i>	0.0001**	0.001**	0.0001**	0.834	0.272	0.0001**

注：在各采样点中，“/”后的大写字母 PB 代表染病植株，NPB 代表非染病植株，下同。

表2 硬叶兜兰下寨分布点的土壤理化特性比较

Table 2 Comparison of soil physical and chemical characteristics of *P. micranthum* distribution points in Xiazhai

采样点	pH	含水量 (%)	有机质 (g/kg)	全磷 (g/kg)	全钾 (g/kg)	全氮 (g/kg)
下寨 1/NPB	7.18 ± 0.03 ^B	8.31 ± 0.08 ^D	58.81 ± 1.36 ^{BC}	0.37 ± 0.02 ^F	3.18 ± 0.24 ^H	2.04 ± 0.88 ^A
下寨 2/NPB	6.48 ± 0.01 ^{CD}	2.55 ± 0.10 ^C	46.93 ± 0.28 ^E	0.17 ± 0.01 ^H	3.42 ± 0.04 ^H	1.06 ± 0.04 ^{CDE}
下寨 3/PB	7.08 ± 0.02 ^B	9.24 ± 0.00 ^{BC}	61.20 ± 1.25 ^A	0.48 ± 0.01 ^{CD}	4.47 ± 0.39 ^G	1.75 ± 0.07 ^{ABCD}
下寨 4/PB	6.03 ± 0.02 ^F	4.22 ± 0.12 ^F	53.25 ± 0.29 ^D	0.28 ± 0.03 ^G	4.48 ± 0.20 ^G	0.95 ± 0.10 ^E
下寨 5/NPB	5.99 ± 0.01 ^F	9.36 ± 0.09 ^{BC}	57.63 ± 1.38 ^{BC}	0.44 ± 0.03 ^{DE}	5.33 ± 0.19 ^{CDE}	1.76 ± 0.07 ^{ABC}
下寨 6/PB	6.03 ± 0.00 ^F	10.82 ± 0.0 ^A	56.98 ± 0.73 ^C	0.60 ± 0.01 ^B	5.62 ± 0.14 ^C	1.11 ± 0.31 ^{CDE}
下寨 7/NPB	6.65 ± 0.11 ^C	11.38 ± 0.17 ^{AA}	27.26 ± 0.38 ^{CH}	0.44 ± 0.02 ^{DE}	5.42 ± 0.23 ^{CD}	1.03 ± 0.04 ^E
下寨 8/NPB	6.29 ± 0.04 ^{DE}	2.37 ± 0.21 ^G	16.28 ± 0.3 ^J	1.14 ± 0.08 ^A	4.95 ± 0.40 ^{EF}	1.93 ± 0.76 ^{AB}
下寨 9/NPB	6.25 ± 0.17 ^E	6.66 ± 0.59 ^E	42.18 ± 0.67 ^F	0.52 ± 0.02 ^C	5.08 ± 0.08 ^{DEF}	1.24 ± 0.06 ^{BCDE}
下寨 10/PB	4.61 ± 0.04 ^G	6.88 ± 0.54 ^E	46.96 ± 1.33 ^E	0.46 ± 0.02 ^{CDE}	4.73 ± 0.04 ^{FG}	0.88 ± 0.14 ^E
下寨 11/PB	6.65 ± 0.03 ^C	9.90 ± 0.58 ^B	21.49 ± 1.06 ^I	0.15 ± 0.01 ^H	8.34 ± 0.05 ^A	1.04 ± 0.02 ^{DE}
下寨 12/NPB	6.54 ± 0.26 ^C	9.29 ± 0.05 ^{BC}	59.41 ± 0.61 ^{AB}	0.46 ± 0.03 ^{CDE}	4.90 ± 0.26 ^{EF}	1.76 ± 0.05 ^{ABC}
下寨 13/NPB	7.68 ± 0.02 ^A	8.95 ± 0.03 ^{CD}	25.71 ± 0.19 ^H	0.61 ± 0.01 ^B	4.83 ± 0.11 ^{FG}	0.81 ± 0.01 ^E
下寨 14/NPB	7.60 ± 0.04 ^A	9.89 ± 0.14 ^B	28.49 ± 0.73 ^G	0.41 ± 0.01 ^{EF}	6.15 ± 0.16 ^B	0.78 ± 0.13 ^E
<i>F</i>	190.545	215.051	941.921	165.309	101.57	4.949
<i>p</i>	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**

从上述结果可知,硬叶兜兰不同采样点的土壤理化性质具有显著差异,其土壤 pH 大部分为中性,少数为弱酸性或酸性;从不同营养成分的比较中发现,除全钾外,下寨分布点的土壤营养要优于明利分布点。

为了说明染病植株与非染病植株根际土壤理化性质的差异,根据表1和表2数据整理,可得表3。由表3可以看出,染病植株与无病植株根际土壤的各项理化指标的差异并不显著,说明硬叶兜兰病害发生的主要因素可能并不是其土壤理化性质的差异造成的。

表3 硬叶兜兰染病与非染病植株根际土壤理化性质的差异比较

Table 3 Comparison of physical and chemical properties of rhizosphere soil between infected and non-infected *P. micranthum*

	pH	含水量 (%)	有机质 (g/kg)	全磷 (g/kg)	全钾 (g/kg)	全氮 (g/kg)
PB	6.44 ± 0.91	8.61 ± 2.26	42.08 ± 15.58	0.38 ± 0.15	5.64 ± 1.42	1.06 ± 0.34
NPB	6.75 ± 0.57	7.22 ± 3.26	37.39 ± 16.10	0.48 ± 0.23	4.94 ± 1.00	1.21 ± 0.63
<i>t</i>	-1.422	1.618	0.921	-1.525	1.963	-0.942
<i>p</i>	0.162	0.114	0.363	0.136	0.056	0.353

注:表中数据为染病植株或非染病植物相应数据的平均值。

2.2 硬叶兜兰根际土壤真菌和细菌的分析

2.2.1 土壤细菌和真菌 OTU 水平分析

本项目入选的研究样本共 16 个，其中，染病兜兰（PB）6 个样本，非染病兜兰（NPB）10 个样本。通过 Illumina 高通量测序分别获得 525853 条细菌有效序列和 815500 条真菌 ITS rRNA 基因质控序列。能够反映木论保护区硬叶兜兰土壤微生物群落的真实情况。

2.2.2 土壤微生物门水平群落结构分析

16 个土壤样品中细菌和真菌群落门水平上组成结构和丰度结果见图 1 和图 2。由图 1 可知，在门水平上，土壤优势细菌均为：变形菌门（*Proteobacteria*）、放线菌门（*Actinobacteria*）、绿弯菌门（*Chloroflexi*）、酸杆菌门（*Acidobacteria*），平均丰度都大于 3.81%，其中 PB 组酸杆菌门（*Acidobacteria*，25.48%）显著高于 NPB 组（*Acidobacteria*，15.26%）。从图 2 中可以看出，在染病与非染病硬叶兜兰根际土壤微生物中，真菌主要分布在以下 4 个门：担子菌门（*Basidiomycota*）、子囊菌门（*Ascomycota*）、（*Unspecified_Fungi*）、被孢霉门（*Mortierellomycota*），其中子囊菌门（*Ascomycota*）最为丰富，在 PB 组与 NPB 组中的丰度分别为 53.13 % 和 54.38 %。PB 组与 NPB 组真菌门水平上未出现显著差异，表明 PB 与 NPB 的硬叶兜兰根际土壤真菌群落分布较为相似。

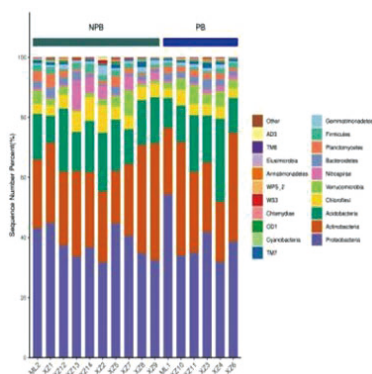


图 1 土壤细菌门水平物种差异

Figure 1 Species differences at
phylum level of soil bacteria

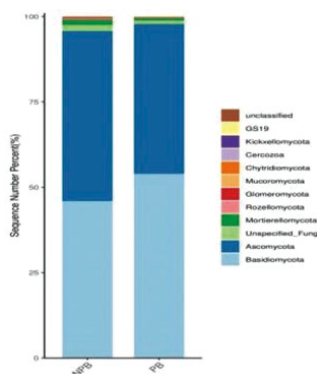


图 2 土壤真菌门水平物种差异

Figure 2 Species differences at
phylum level of soil fungi

2.2.3 土壤微生物群落结构分析

(1) Alpha 多样性分析

利用独立样本 *t* 检验（双侧）对所有样本有效序列的群落丰富度指数和群落多样性指数进行比较分析，包括：Observed species、Shannon 和 Simpson 等 3 个指数。从表 4 和表 5 可以看出：染病的硬叶兜兰（PB）和非染病的硬叶兜兰（NPB）样本对于 observed-otus, shannon, simpson 全部均不会表现出显著性（ $p>0.05$ ），均表现出一致性，没有差异性。

表 4 染病组（细菌）和对照组 α 多样性参数的比较

Table 4 Comparison of α diversity parameters between the infected group (bacteria) and the control group

	NPB	PB	<i>t</i>	<i>p</i>
observed_otus	1011.10 ± 183.69	1042.67 ± 96.16	-0.387	0.705
chao	1011.43 ± 183.55	1042.91 ± 96.29	-0.386	0.705
shannon	9.29 ± 0.26	9.22 ± 0.16	0.630	0.539

表 5 染病组（真菌）和对照组 α 多样性参数的比较

Table 5 Comparison of α diversity parameters between the infected group (fungus) and the control group

	NPB	PB	<i>t</i>	<i>p</i>
shannon	5.32 ± 1.43	4.40 ± 2.02	1.074	0.301
observed_otus	348.10 ± 255.31	328.50 ± 218.53	0.156	0.878
simpson	0.90 ± 0.08	0.74 ± 0.27	1.373	0.223

(2) Beta 多样性分析

采用 unweighted UniFrac 指数衡量 β 多样性，在利用该指数得到的分析图（图 3、图 4）中，距离越大表示样本间的差异越大。除个别样本存在偏差，PB 组和对照组（NPB）基本呈现在相同区域。如图 5、图 6 所示，除个别样本存在偏差外（ $p>0.05$ ），染病兜兰（PB 组）和正常兜兰（NPB 组）大部分呈现在不同区域。

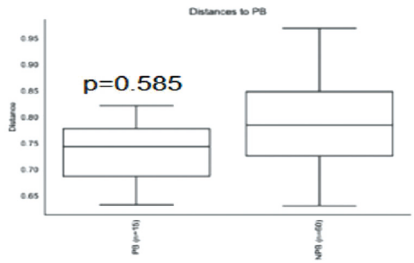


图3 土壤微生物真菌群落显著图
Figure 3 Significant map of soil
fungal communities

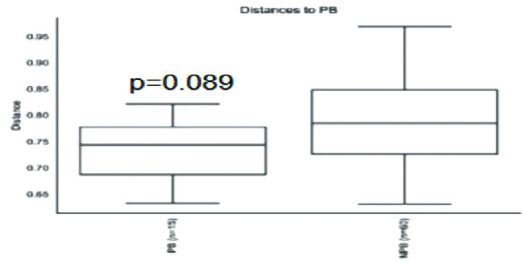


图4 土壤微生物细菌群落显著图
Figure 4 Significant map of soil bacterial
communities

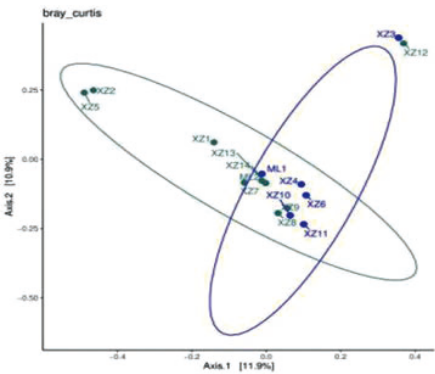


图5 基于 bray-curtis 的 PCoA 分析坐标
图 (真菌)
Figure 5 PCoA analysis coordinate map
based on bray-curtis (fungi)

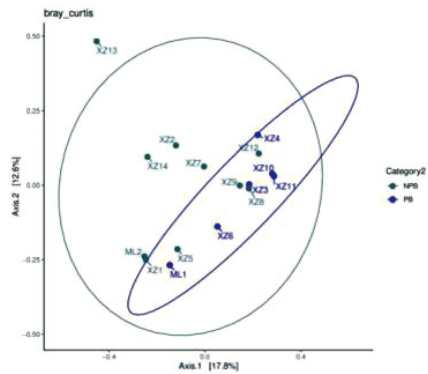


图6 基于 bray-curtis 的 PCoA 分
析坐标图 (细菌)
Figure 6 PCoA analysis coordinate
map based on bray-curtis (bacterial)

2.2.4 土壤环境因子与微生物的相关性

为了说明不同环境因子对硬叶兜兰根际土壤微生物的影响,可对其相关性进行比较分析,结果见图7和图8。由此可知,海拔高度及全钾含量对硬叶兜兰根际土壤真菌的影响最大,海拔高度及土壤有机质含量对硬叶兜兰根际土壤细菌的影响最大。

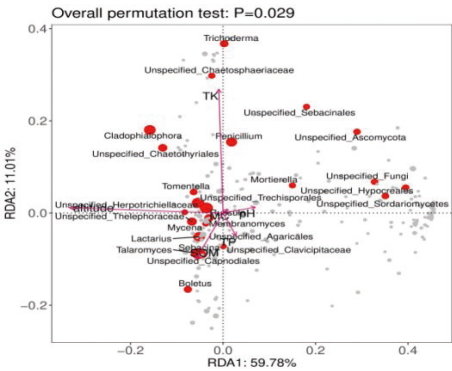


图7 不同环境因子与土壤真菌的相关性比较

Figure 7 Comparison of correlation between different environmental factors and soil fungi

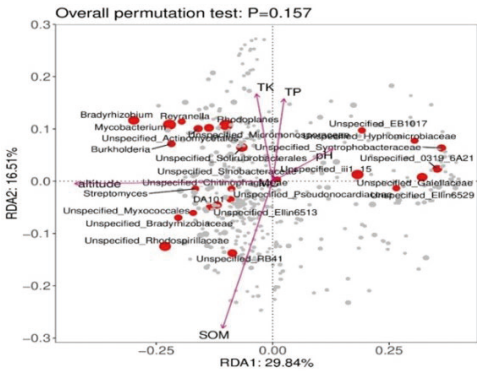


图8 不同环境因子与土壤细菌的相关性比较

Figure 8 Comparison of correlation between different environmental factors and soil bacterial

2.2.5 硬叶兜兰细菌菌群功能预测分析

利用构建在 LAMP 平台上的 DIGAP 数据库对 16S 测序样本中可能存在的各级 KEGG 通路及丰度值进行预测，共富集到 33 个功能通路，其中 PB 组有 2 条通路相对于 NPB 组差异显著 ($p<0.05$)，结果见表 6。

表 6 可能存在的各级 KEGG 通路及丰度值预测

Table 6 Possible KEGG pathways at all levels and prediction of abundance values

		PB						NPB						t 检验				
Target028	K01637	5867	5256	4053	8559	6551	5954	4794	4526	4988	1464	3259	3730	4718	5141	5131	5746	0.03
Target045	K01467	18458	20870	20493	26203	25197	24212	16428	14400	21819	7891	14989	19597	17194	22191	19786	26194	0.04

2.2.6 硬叶兜兰根际土微生物真菌的预测分析

根据 Lefse 分析 PB 组与 NPB 组真菌菌群差异和真菌属分类水平相互作用，结果见图 9 和图 10。该分析结果显示：*Cladophialophora* 显著富集于

染病组，*Cladophialophora* 和 *Clonostachys rosea* 呈现负相关，由此推测，*Cladophialophora* 疑似为致病菌。

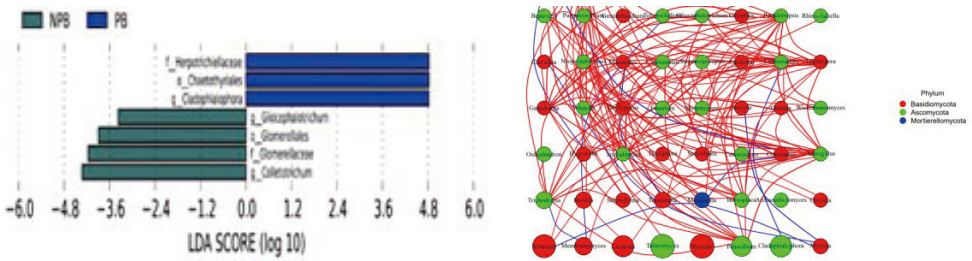


图 9 Lefse 分析 PB 组与 NPB 组真菌菌群差异图

Figure 9 Differences of fungal flora between PB group and NPB group by Lefse analysis

图 10 属分类水平微生物真菌相互作用网络图

Figure 10 Fungal interaction network diagram at level of genus classification

3 讨论

从实验的结果分析可知，虽然不同采样点硬叶兜兰的土壤理化性质具有显著差异，但染病植株与正常植株根际土壤的各项理化指标差异并不显著，说明土壤理化背景可能不是硬叶兜兰染病的主要影响因素。

根际微生物是土壤与植物根系间微生态系统的重要组成部分，通过分解有机质、转化养分物质等影响植物的生长发育，微生物的群落结构、功能多样性及稳定性等可由微生物多样性来反映^[25]。本文利用高通量焦磷酸测序，研究了硬叶兜兰根际土壤微生物多样性、群落组成和结构以及菌群功能的预测,实验结果表明:在根际土壤微生物整体指标上，是否染病的硬叶兜兰植株，其细菌和真菌群落的多样性指数具有显著差异，而在群落丰富度指数上，真菌和细菌则没有显著差异 ($p<0.05$)；在门水平上，染病兜兰根际土壤细菌中的酸杆菌门相对丰度 (25.48%) 明显高于非染病兜兰 (15.26%)。基于 KEGG^[26] 对比染病兜兰与非染病兜兰根际土壤中的植物致病功能基因分类，发现 K01637 与 K01467 这两个通路在染病兜兰样品中丰度显著提高 ($p<0.05$)，表明这些功能通路可能是致病菌对野生兜兰

的入侵途径；两条通路功能^[27]分别是催化异柠檬酸裂解生成琥珀酸和乙醛酸，从而改变碳源的流向，有利于碳源的积累，为结核菌在以脂肪酸或乙酸为碳源的环境下生长提供了有利条件；抑制细菌细胞壁中肽聚糖的形成。说明野生兜兰染病（如叶片出现白斑等）可能与这些通路的功能异常有关，这些功能通路可能是致病菌对野生兜兰的入侵途径。Lefse 分析显示，*Cladophialophora* 显著富集于染病组，且 *Cladophialophora* 是 Keisuke Obase 等人^[28]在美国佛罗里达森林土壤中从土生孢子菌中分离出的新种。*Cladophialophora borelli* 是一种无性的黑色真菌，其特征是产生排列一致的疏水性分生孢子，带有透明分生孢子痕的支链和半大孢子状的分生孢子团。*Cladophialophora yegresii* 是与人类病原 *C. carrionii* 最接近的物种，已从仙人掌中分离出内生植物。只有一种被认为是可能的真菌寄生。粉红粘帚霉（*Clonostachys rosea*）^[29]是一种重寄生菌，其生长速度快，寄生能力强且范围广，拮抗机制多样等优点。根据属分类水平微生物真菌相互作用网络图可知，*Cladophialophora* 和 *Clonostachys rosea* 呈现负相关，这可能存在拮抗的作用。根据上述分析，*Cladophialophora* 有可能是硬叶兜兰的致病菌，但还需要更多的实验结果进一步验证。

4 结论

根据以上实验数据及分析讨论，可以初步得到以下结论：

（1）土壤理化背景和土壤养分的差异，可能不是硬叶兜兰染病的主要影响因素；

（2）硬叶兜兰的致病原因比较复杂，细菌和真菌均有可能是致病菌，具体病因有待进一步研究；

（3）虽然木论自然保护区硬叶兜兰的致病原因尚不明了，但是，该致病菌若在野生兜兰分布点中大面积感染，势必会对该保护区珍稀野生植物的保护带来重大危害，因此，值得对此进行深入调查研究。

参考文献

[1] 陈新军，熊春玲. 广西雅长兰科植物国家级自然保护区兰科植物生境恢复

- 优化的探索[J]. 内蒙古林业调查设计, 2016, 39(5): 69-71+75.
- [2] 程浩, 徐玉凤, 王文晓, 等. 中国硬叶兜兰主要分布区居群表型多样性分析[J]. 园艺学报, 2020, 47(6): 1098-1110.
- [3] 张毓, 王苗苗, 张雪, 等. 中国华北和东北地区杓兰属植物的数量分类研究[J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 933-942.
- [4] 曾宋君, 陈之林, 吴坤林, 等. 国产兜兰属植物的引种和栽培[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(2): 53-58.
- [5] 洪霞, 米敏, 刘也楠, 等. 国兰组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(24): 20-22.
- [6] 胡会强, 余泽平, 王国兵, 等. 江西兰科药用植物资源调查[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21): 148-154.
- [7] 郑颖吾. 木论喀斯特林区概论[M]. 北京: 中国科学出版社, 1999.
- [8] 谭卫宁. 广西木论国家级自然保护区兜兰属(兰科)植物资源现状与保护对策[J]. 广西林业科学, 2009, 38(3): 187-189+196.
- [9] 张立群. 土壤有机质快速测定方法研究[J]. 科学技术创新, 2017(30): 101-102.
- [10] 刘征捷. 土壤有机质两种测定方法对比分析[J]. 农村经济与科技, 2016, 27(12): 42+45.
- [11] 季天委. 重铬酸钾容量法中不同加热方式测定土壤有机质的比较研究[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(5): 311-313.
- [12] 张薇, 付昀, 李季芳, 等. 基于凯氏定氮法与杜马斯燃烧法测定土壤全氮的比较研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(35): 172-175.
- [13] 王琳. 凯氏法测定土壤全氮的方法改进[J]. 环境监控与预警, 2013, 5(3): 33-37.
- [14] 王志增. 辽东地区土壤全氮含量的测定及其分析[J]. 鞍山师范学院学报, 2008, 10(6): 48-49.
- [15] 陈新萍. 土壤中全磷测定方法的改进试验[J]. 塔里木大学学报, 2005, 27(2): 96-98.

- [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] 赵立红, 刘亚丽. 两种酸介质与国标方法测定土壤全磷的对比[J]. 光谱实验室, 2009, 26(2): 320-323.
- [18] 王敏. 碱熔—火焰光度法测定土壤全钾应注意的问题[J]. 辽宁林业科技, 2016(6): 75-76.
- [19] 吴秀玲, 陈惠娟, 孙媛. 氢氧化钠熔融法测定土壤中全磷、全钾及氟化物实验[J]. 宁夏农林科技, 2017, 58(7): 44-45.
- [20] 高飞, 李昌伟, 于跃跃, 等. 改进电位法测定土壤 pH 方法的探讨[J]. 中国农技推广, 2014, 30(7): 41-43.
- [21] 汪焱, 张英, 苏贝贝, 等. 高寒区不同地域燕麦根际土壤微生物多样性研究[J]. 草地学报, 2020, 28(2): 358-366.
- [22] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nat Methods, 2016, 13(7): 581-583.
- [23] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.
- [24] Jiang Y, Song H, Lei Y, et al. Distinct co-occurrence patterns and driving forces of rare and abundant bacterial subcommunities following a glacial retreat in the eastern Tibetan Plateau[J]. Biology and Fertility of Soils, 2019, 55(4): 351-364.
- [25] 贺纪正, 王军涛. 土壤微生物群落构建理论与时空演变特征[J]. 生态学报, 2015, 35(20): 6575-6583.
- [26] 高娜. 植物致病菌基因组重新注释及数据库构建[D]. 山东理工大学, 2009.
- [27] 李宁. 大肠杆菌利用甘油生产 C4- 二羧酸类物质的代谢工程研究[D]. 天津大学, 2014.

- [28] Obase K, Douhan G W, Matsuda Y, et al. *Cladophialophora floridana* and *Cladophialophora tortuosa*, new species isolated from sclerotia of *Cenococcum geophilum* in forest soils of Florida, USA [J] . Mycoscience, 2016, 57 (1) : 26–34.
- [29] Iqbal M, Broberg M, Haarith D, et al. Natural variation of root lesion nematode antagonism in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* and identification of biocontrol factors through genome – wide association mapping [J] . Evolutionary Applications, 2020, 13 (9) : 2264–2283.

Analysis of the Harm and Potential Risk of Pathogenic Bacteria to Wild *Paphiopedilum* in Mulun Nature Reserve

Zheng Lingling Yang Jingjing Lin Hanye

Zhong Qixuan Chen Le Qin Yongrong

School of Chemistry and Biological Engineering, Yizhou

Abstract: In order to illustrate the harm of pathogens to rare wild orchid plants in karst areas, so as to better protect them, based on field investigations, Illumina high-throughput sequencing was used to study the microbial diversity in the rhizosphere soil of *Paphiopedilum micranthum*, and predict the function of the flora. The results showed that the soil physical and chemical properties of *P. micranthum* at different sampling points and different distribution points were significantly different, but the differences in the physical and chemical properties of the rhizosphere soil between infected and non-infected plants were

not significant; except for individual plants, infected plants and non-infected plants there is a significant difference in the diversity index of the soil bacterial and fungal communities in the rhizosphere of the plant, while the richness index of the fungus and bacterial communities is not significantly different; at the phylum level, the relative abundance of the acid bacteria in the rhizosphere soil bacteria of the diseased *Paphiopedilum* (25.48%) was significantly higher than that of non-infected *Paphiopedilum* (15.26%); based on KEGG to compare the phytopathogenic functional gene classification of infected *Paphiopedilum* and non-infected *Paphiopedilum* rhizosphere soil, it was found that the two pathways K01637 and K01467 were infecting *Paphiopedilum*. The abundance in the samples increased significantly ($p < 0.05$), indicating that these functional pathways may be the pathways for pathogenic bacteria to invade wild *Paphiopedilum*; Lefse analysis showed that *Cladophialophora* was significantly enriched in the infected group, suspected of pathogenic bacteria. It can be inferred from this that the differences in soil physical and chemical background and soil nutrients may not be the main factors affecting *P. micranthum*. The causes of *P. micranthum* are more complicated. Bacteria and fungi may be the cause of *P. micranthum*. Bacteria, but the specific cause remains to be determined by further research.

Key words: Mulun nature reserve; Wild *paphiopedilum*; Pathogen damage; Potential risks