

DOI:10.13718/j.cnki.zwys.2021.01.008

辣椒青枯病罹病与健康植株根际 土壤微生物群落多样性研究^①

刘烈花¹, 董 鹏², 况 觅²,
李 姍蓉², 袁国明³, 丁 伟¹

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715;
2. 重庆市农业技术推广总站, 重庆 401121;
3. 重庆安邦农业发展有限公司, 重庆 400030

摘 要: 系统研究和分析辣椒青枯病常发地发病与健康植株土壤微生物群落结构特征, 为辣椒青枯病的绿色防治提供理论依据。基于16S rDNA基因高通量测序技术, 对辣椒青枯病发病和健康植株根际土壤微生物群落结构和组成进行分析, 同时采用biologgyeco平板培养技术研究其土壤微生物群落代谢多样性和功能多样性的特征。结果表明, 辣椒青枯病发病和健康植株根际土壤微生物群落组成之间存在显著差异, 辣椒青枯病发病土壤的OTU为4 566个, 辣椒青枯病健康土壤的OTU为4 167个。依据OTU所属细菌物种信息对土壤细菌群落结构进行分析, 变形菌门在发病和健康土壤中均为优势细菌类群, 其次为放线菌门类群。其中健康植株根际土壤中芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、装甲菌门(Armatimonadetes)的相对丰度比发病植株的分别高出了4.37, 3.87倍, 而发病植株根际土壤中厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度比健康植株的高出了3.87倍。辣椒青枯病发病土壤和健康土壤的土壤微生物代谢多样性也存在显著差异, 同时, 健康土壤中其微生物群落代谢得到显著增强, 特别是对酚类化合物的利用显著增多, 对辣椒抗病性存在显著的影响。研究表明, 辣椒青枯病发病和健康植株根际土壤微生物群落组成和结构之间存在显著差异, 并且健康土壤的微生物群落对酚类化合物的利用显著增强。

关键词: 辣椒青枯病; 高通量测序; 微生物群落; 根际土壤

中图分类号: S436.418.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1067(2021)01-0041-07

重庆市石柱县辣椒闻名全国, 其拥有较高的产量且品种多样^[1]。2004年, 石柱的辣椒产业统一注册集体商标为“石柱红”, 因具特有的良好品质使其成为重庆名片的重要输出成员。辣椒青枯病是由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种土传性病害, 严重制约着辣椒产业产质量的发展。目前, 抗性品种、化学防治和作物轮作对辣椒青枯病的防治效果均表现较差。而研究表明, 通过高效拮抗菌剂与有机肥复配既能改善土壤结构又能提高作物抗病性^[2], 辣椒青枯病的防治逐渐转向农业生物防治为主的综合防治策略。同时大量研究表明, 青枯雷尔氏菌侵染植物后, 其植物感病部位微生物群落结构和多样性发生了明显变化^[3]。青枯菌通常存在于土壤中, 一旦从茎基部等位置侵染植株后, 将迅速向茎秆等地上部分扩散^[3]。因此探究植物周围根部周围的微生物群落组成及其结构特征, 从而为探索根际微生物群落在维护辣椒健康、防御病原物侵染上所扮演的角色奠定基础^[4]。本研究为了进一步揭示辣椒青枯病植株和健康植株根际土壤

① 收稿日期: 2020-12-16

基金项目: 重庆市科委技术创新与应用示范项目(cstc2018jscx-mszdX0047); 重庆市农业农村委调味品产业技术体系项目[2019(7)号]。

作者简介: 刘烈花, 硕士研究生, 主要从事天然产物农药研究。E-mail: llh199510@email.swu.edu.cn

微生物的群落特征,在重庆市石柱县常年连作的辣椒种植区,采集辣椒青枯病发生严重的罹病植株和健康植株的根际土壤,通过对细菌 16S rDNA 的高通量测序技术,分析发病和健康植株根际土壤中细菌群落结构组成差异特征,揭示根际土壤微生物群落在维护植物健康中所发挥的重要作用.本研究结果对于深入理解辣椒青枯病发生的根际微生态机制以及研发其综合防控技术具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 样品收集

采样地位于重庆市石柱县三河镇,该区属中亚热带湿润季风气候.采样地块较为平整,辣椒种植密度为每 667 m² 2 000~2 200 窝;辣椒连作 10 年以上,且辣椒青枯病高发,每个基点选择 3 块地,每块地用五点取样法采集病株和健康株各 1 株的根际土壤,分别混合均匀作为 1 个样品.将各样品分为 2 份,1 份用作土壤微生物群落特征分析,1 份用作根际土壤理化性质测定.病株和健康株根际土壤的采集方法是:将植物连根拔起,稍加抖动后取附着在根部上的土壤放入自封袋中,置于 4 ℃ 短暂冷藏保存后带回研究室,均再过 2 mm 筛后,根际土壤保存于-80 ℃ 超低温冰箱中暂存.其土壤理化性质情况如表 1 所示.

表 1 辣椒青枯病发病和健康植物根际土壤的理化性质

土壤样本	pH 值	有机质/ g · kg ⁻¹	全氮/ g · kg ⁻¹	全磷/ g · kg ⁻¹	全钾/ g · kg ⁻¹	碱解氮/ mg · kg ⁻¹	有效磷/ mg · kg ⁻¹	速效钾/ mg · kg ⁻¹
健康土壤	5.83±0.15	13.71±3.13	1.17±0.16	0.42±0.04	17.7±0.67	137.79±5.85	47.82±8.94	297.33±120.13
发病土壤	4.93±0.38	14.39±2.44	1.18±0.13	0.46±0.05	20.6±0.74	142.26±10.73	66.5±10.68	228.83±58.19

1.2 辣椒根际土壤微生物 DNA 提取

根据 FastDNA SPIK Kit 土壤试剂盒 (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) 说明书进行总 DNA 抽提, DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop 2000 进行检测,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量;细菌扩增引物为 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),根据引物对可变区进行 PCR 扩增.扩增程序为:95 ℃ 预变性 3 min, 27 个循环(95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s),最后 72 ℃ 延伸 10 min (PCR 仪:ABI GeneAmp® 9700 型).扩增体系为 20 μL, 4 μL 5 × FastPfu 缓冲液, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μL 引物(5 μmol/L), 0.4 μL FastPfu 聚合酶; 10 ng DNA 模板.使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测.将纯化质量合格的 PCR 产物用于 DNA 文库构建,委托上海美吉医药生物有限公司执行建库及测序工作.

1.3 数据处理和统计分析

原始 Illumina fastq 文件采用 QIIME v1.7.0(微生物生态学定量分析)进行多路分解、质量过滤和分析.操作分类单元(OTUs)的阈值为 97% 的成对识别.高可信度 OTUs 的识别标准是:任何样本的总体丰度大于 20 个读取片段.按最小采样序列个数进行子采样.利用基于 taxa 的 OTUs 计算细菌和真菌各门的相对丰度,比较发病和健康植株根际土壤中微生物的总体分布.凭借 OTU 数据进行 Alpha 多样性和 Beta 多样性分析.微生物群落 α 多样性采用 Ace 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数表示, Ace 指数和 Chao1 指数用来估量样本内微生物的丰富度, Shannon 指数是涵盖物种丰富度及物种个体分布均匀度 2 个方面的多样性指标,这 3 个指数越高,代表样本内物种丰富度和多样性越高.微生物群落 β 多样性采用 PCoA 分析并基于 Bray_curtis 矩阵进行作图.以上分析均在上海美吉生物医药科技有限公司 I-Sanger 生信云网站平台 (<http://www.isanger.com/project/index.html>) 完成.

1.4 Biolog-Eco 分析

将所有发病土壤和健康土壤分别混合均匀后,并分别称取 5 g 新鲜土样,加入到盛有 45 mL 0.85% NaCl 无菌溶液的三角瓶中,封口膜固定后在摇床(170 r · min⁻¹)上震荡 30 min,使土样与 0.85% NaCl 无

菌溶液充分混匀,再放置常温静置 30 min,然后加样于 Biolog-Eco 微孔板中,每孔加入 150 μ L. 随后恒温 28 $^{\circ}$ C 黑暗培养 7 d,每隔 24 h 进行 Biolog-Eco 微生物分析系统读取 590 nm 波长的光密度值,连续测定 168 h. 采用培养 96 h 的数据进行土壤微生物碳源利用分析和主成分分析.

1.5 微生物群落功能多样性的计算

土壤微生物群落利用碳源的整体能力用平均吸光值(AWCD)表示,其计算公式为: $AWCD = \sum(C_i - R)/n$. 式中: C_i 为所测定的 31 个碳源孔的吸光值; R 为对照孔的吸光值; n 为培养基碳源总数(本研究中为 31).

1.6 数据处理

采用 Excel 2016 软件进行数据收集统计,并用 SPSS 19.0 进行相关试验数据处理与统计分析.

2 结果与分析

2.1 辣椒根际土壤微生物测序深度评估

通过 16S rDNA 高通量测序分析,6 份样品共获得细菌 635 151 个有效序列读取数和 8 093 个 OTUs. 平均读取长度为 256 bp 稀疏曲线(图 1),表明测序数量基本合理,其深度足以进行下游分析.

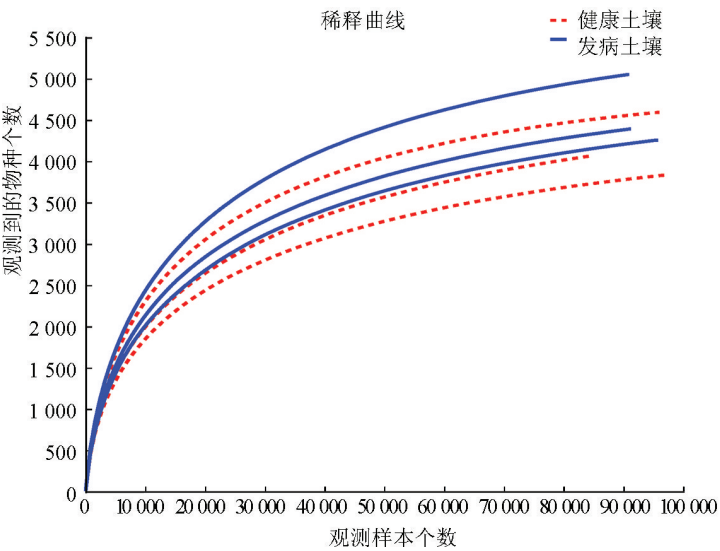


图 1 根际土壤样本稀释曲线

2.2 土壤微生物 Alpha 多样性分析

健康植株和罹病植株根际土壤测定的细菌覆盖率分别为 99.17%和 99.06%,表明该数据足以代表根际土壤细菌的多样性,并反映出真实环境中土壤微生物的群落结构. 对辣椒青枯病发病株和健康株的根际土壤微生物群落进行 α -多样性分析(见表 2)发现,发病株的 Shannon 指数、Ace 指数、Chao1 指数均高于健康株,表明发病株根际细菌的土壤多样性较高,同时其微生物群落的丰富度也较高,但均未达到显著性水平,说明辣椒青枯病发病与健株的根际微生物群落多样性和丰富度大体相似,但微生物群落之间的相互作用还有待研究.

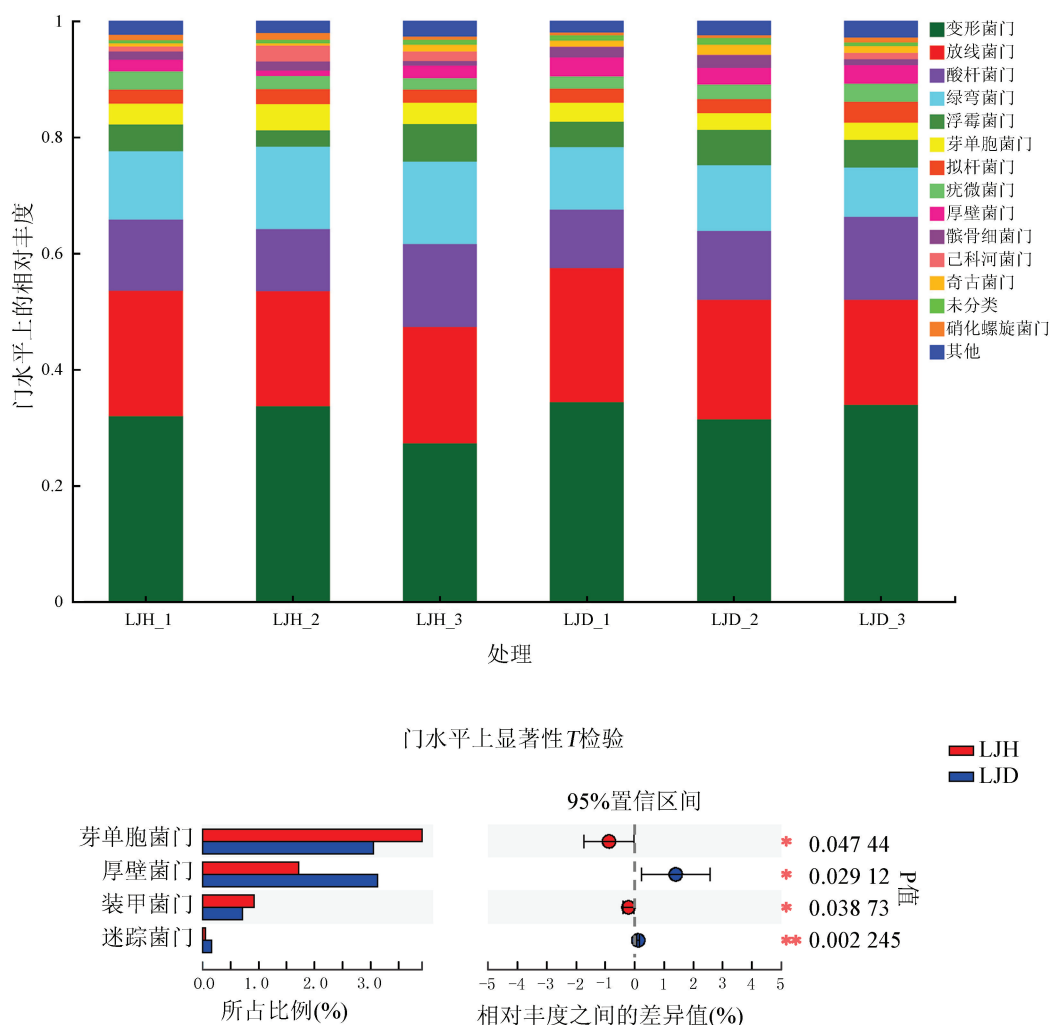
表 2 青枯病发病和健康植株根际土壤 α -多样性指数

多样性指数 index	发病植株土壤	健康植株土壤
OTU 指数	4 566.3 $\pm$ 425.98	4 166.7 $\pm$ 386.56
Shannon 指数	6.962 6 $\pm$ 0.214 44	6.917 1 $\pm$ 0.230 93
Ace 指数	5 164.4 $\pm$ 432.32	4 702.6 $\pm$ 292.63
Chao 1 指数	5 105.1 $\pm$ 421.32	4 632 $\pm$ 288.52
覆盖率 coverage(%)	99.06	99.17

注:表中数据为 X $\pm$ SE, N=3.

2.3 土壤微生物群落组成分析

从辣椒植株根际土壤中检测出的细菌隶属于 39 个门, 111 个纲, 282 个目, 473 个科, 912 个属. 植株健康的土壤样本中, 其主要细菌门(相对丰度 $\geq 5\%$)包括: 变形菌门(Proteobacteria), 占 30.92%; 放线菌门(Actinobacteria), 占 20.46%; 酸杆菌门(Acidobacteria), 占 12.4%; 绿弯菌门(Chloroflexi), 占 13.47%. 植株发病的土壤样本中, 其主要细菌门(相对丰度 $\geq 5\%$)包括: 变形菌门(Proteobacteria), 占 33.26%; 放线菌门(Actinobacteria), 占 20.62%; 酸杆菌门(Acidobacteria), 占 12.03%; 绿弯菌门(Chloroflexi), 占 10.21%; 浮霉菌门(Planctomycetes). 对辣椒青枯病发病植株和健康植株根际土壤细菌进行门水平的比较(图 2)发现, 健康植株根际土壤中芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的相对丰度比发病植株的高出了 4.37 倍, 健康植株根际土壤中装甲菌门(Armatimonadetes)的相对丰度比发病植株的高出了 3.87 倍, 而发病植株根际土壤中厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度比健康植株的高出了 3.87 倍.



LJH 为健康土壤, LJD 为发病土壤. 图 3 至图 6 同.

图 2 发病植株(D)与健康植株(H)根际土壤微生物群落在门水平上的组成

2.4 土壤微生物 Beta 多样性分析

辣椒青枯病病株和健株根际土壤中细菌和真菌群落的主坐标分析(PCoA)如图 3 所示. 其中细菌群落第 1,2 主坐标的贡献率分别为 57.43% 和 22.41%. 健株根际土壤的各采样点主要分布在 1,3 象限, 较为分散, 而病株根际土壤的各采样点主要分布在 2,4 象限, 较为集中. 这说明各采样点健株根际土壤的微生物群落, 其结构大体相似, 而病株根际土壤微生物群落结构差异较大, 并也说明发病植株与健康植株的根际土壤微生物群落结构显著不同.

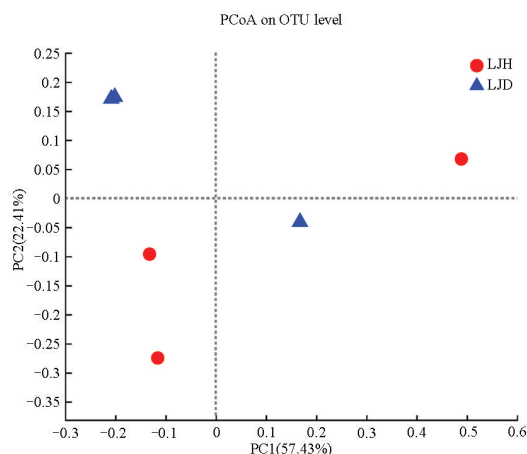


图 3 发病植株(D)与健康植株(H)基于 bray-curtis 距离的土壤微生物群落 Beta 多样性分析

2.5 土壤微生物功能多样性比较

平均颜色变化率(AWCD)是反映土壤微生物活性,即利用单一碳源能力的一个重要指标,在一定程度上反映了土壤中微生物种群的数量和结构特征. AWCD 值越大,活性越高;反之,活性越低. 从图 4 可知,辣椒青枯病发病与健康土壤的 AWCD 值随时间延长而增加,这表明土壤微生物群落利用碳源量逐渐增加,代谢活性增强. AWCD 在 24 h 之后急剧上升,120 h 之后 AWCD 值变化趋减缓,但仍呈上升趋势. 总得看来,辣椒青枯病发病与健康土壤中的微生物对碳源的代谢活性不同,表明辣椒健康植株的土壤微生物群落对碳源的代谢活性高于青枯病发病植株土壤的微生物群落.

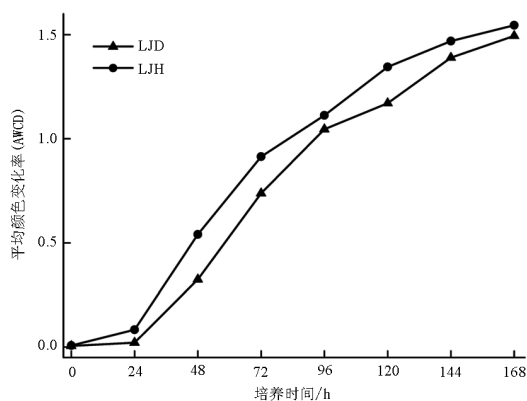


图 4 辣椒茎基腐病土壤微生物 AWCD 对培养时间的变化

通过主成分分析可以在降维后的主元向量空间中,用点的位置直观地反映出不同土壤微生物群落功能多样性变化. 采用培养 96 h 的 AWCD 值对辣椒青枯病健康和发病土壤的土壤微生物利用单一碳源特性进行主成分分析,其中第 1 主成分(PC1)的方差贡献率为 39.77%,第 2 主成分(PC2)为 24.35%. 由图 5 可以看出,各处理间的碳源利用得分差异明显,位于不同象限各处理的在第 1,2 主成分得分值差异较大,说明辣椒青枯病健康和发病土壤土壤微生物碳代谢功能群结构存在较大差异.

对辣椒青枯病发病与健康土壤微生物群落对碳源利用如图 6 所示,健康土壤微生物群落对氨基酸类、胺类、酚类化合物的利用均值都高于发病土壤微生物群落,且对酚类化合物的利用显著增高,发病土壤微生物群落对羧酸类化合物的利用均值显著高于健康土壤微生物群落,对其他 3 类碳源的利用不具有显著性差异.

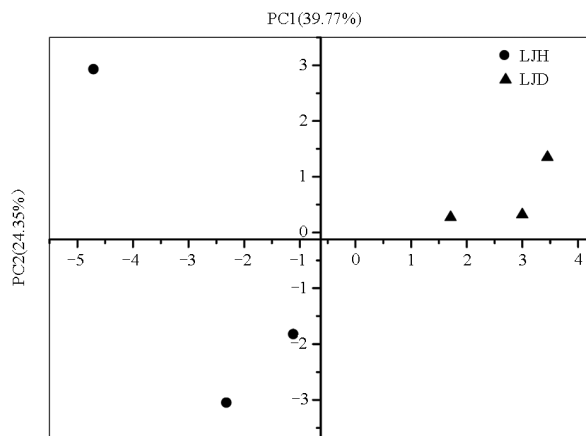


图 5 土壤微生物群落碳源利用的主成分(96 h)

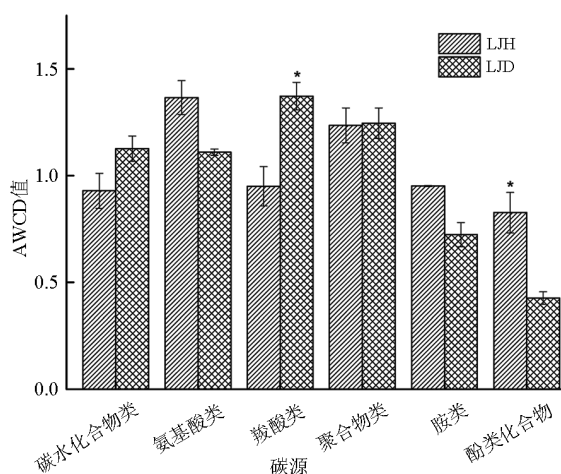


图 6 土壤微生物群落碳源利用的主成分(96 h)

3 讨论

根际土壤是一个特殊的环境, 栖居着含有各种功能结构的微生物群落. 这些微生物对土壤有机物转化, 植物养分吸收、生长发育及抗病能力均具有一定的影响^[5]. 辣椒青枯病是一种典型的系统性侵染性土传病害, 其中土传病害的发生与传播与植物根系中土壤微生物的群落结构密切相关^[6]. Kerri 等^[7]指出土壤微生物群落组成和其多样性变化反映了土壤环境质量状况, 其微生物群落特征可作为生物指标可指示土壤质量. 有研究表明, 当土壤微生物群落结构越丰富, 物种越均匀, 多样性越高时, 土壤质量越好, 对病原菌的防控能力越强^[8]. 本研究也表明, 辣椒青枯病发病和健康根际土壤微生物群落组成与结构显著不同, 特别是健康根际土壤微生物群落对酚类化合物的利用显著增多, 大量研究表明, 土壤酚类物质与植物抗病能力密切相关^[9-11]. 研究报道, 酚类化合物能在体外影响尖镰孢菌、丁香假单胞菌的生长^[12-13], 而也有研究表明, 酚类化合物在适宜的浓度下能促进土壤中土著微生物的生长^[14], 进而促进植物生长和提高植物抗病性. 但由于土壤环境的复杂性, 土壤酚类化合物对土壤微生物的影响仍需继续探讨.

参考文献:

- [1] 邢玉晓, 刘方菁, 丁涌波, 等. 石柱主栽朝天红辣椒腌制加工适性研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 113-121.
- [2] 江欢欢, 程 凯, 杨兴明, 等. 辣椒青枯病拮抗菌的筛选及其生物防治效应 [J]. 土壤学报, 2010, 47(6): 1225-1231.
- [3] 向立刚, 周 浩, 汪汉成, 等. 健康与感染青枯病烟株根际土壤与茎秆细菌群落结构与多样性 [J]. 微生物学报, 2019, 59(10): 1984-1999.
- [4] 丁 伟, 刘晓姣. 植物医学的新概念——生物屏障 [J]. 植物医生, 2019, 32(1): 1-6.
- [5] MIHO S, NAKAJIMA Y, MMASUYA K, et al. Comparison of Phospholipid Fatty Acid Composition in Percolating Water, Floodwater, and the Plow Layer Soil During the Rice Cultivation Period in a Japanese Paddy Field [J]. Soil Sci-

- ence and Plant Nutrition, 2002, 48(4): 595-600.
- [6] 郑雪芳, 刘 波, 朱育菁. 青枯病植物疫苗对番茄根系土壤微生物群落结构的影响 [J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 385-393.
- [7] KERRI L S, JACKSON L E, CALDERON F J, et al. Soil Microbial Community Composition and Land Use History in Cultivated and Grassland Ecosystems of Coastal California [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34(11): 1599-1611.
- [8] 蔡燕飞, 廖宗文, 章家恩, 等. 生态有机肥对番茄青枯病及土壤微生物多样性的影响 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(3): 349-353.
- [9] 马云华, 魏 珉, 王秀峰. 日光温室连作土壤酚类物质变化及其对黄瓜根系抗病性相关酶的影响 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(1): 79-82.
- [10] 林开敏, 叶发茂, 林 艳, 等. 酚类物质对土壤和植物的作用机制研究进展 [J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(5): 1130-1137.
- [11] 韩树全. 酚类物质抗香蕉枯萎病的作用机理 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [12] HARSH PB, PRITHIVIRAJ B, JHA A K, et al. Mediation of Pathogen Resistance by Exudation of Antimicrobials from Roots [J]. Nature, 2005, 434(7030): 217-221.
- [13] LANOUE A, BURLATV, HENKESG J, et al. De Novo Biosynthesis of Defense Root Exudates in Response to Fusarium Attack in Barley [J]. The New Phytologist, 2010, 185(2): 577-588.
- [14] ZHOU X, WU F. p-Coumaric Acid Influenced Cucumber Rhizosphere Soil Microbial Communities and the Growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* Owen [J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e48288.

Diversity Analysis of Soil Microbial Community in the Rhizosphere Soil of Bacterial Wilt-Diseased and Healthy Pepper Plants

LIU Lie-hua¹, DONG Peng², KUANG Mi²,
LI Shan-rong², YUAN Guo-ming³, DING Wei¹

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing General Station of Agricultural Technology Extension, Chongqing 401121, China;

3. Chongqing Anbang Agricultural Development Co., Ltd, Chongqing 400030, China

Abstract: In order to provide a theoretical basis for the green control of pepper bacterial wilt, a study was made in which the characteristics of soil microbial community structure of pepper bacterial wilt-affected and healthy pepper plants in the areas where this disease frequently occurs were systematically analyzed. Based on the 16S rDNA gene high-throughput sequencing technology, the structure and composition of the soil microbial community in the rhizosphere of pepper bacterial wilt-diseased and healthy plants were compared, and the biology eco plate culture technology was used to study the characteristics of metabolic diversity and function diversity of the soil microbial community. A significant difference was detected between diseased plants and healthy plants in the composition of rhizosphere soil microbial community, the OTU (operational taxonomic unit) of the soil affected by pepper bacterial wilt being 4 566, and that of the healthy soil being 4 167. According to the bacterial species information of OTU, the soil bacterial community structure was analyzed. Proteobacteria were found to be the dominant bacterial groups in diseased and healthy soil, followed by Actinomycetes. Among them, the relative abundance of Gemmatimonadetes and Armatimonadetes in the rhizosphere soil of healthy plants was 4.37 and 3.87 times higher than that of diseased plants, respectively, while the relative abundance of Firmicutes was 3.87 times higher in the rhizosphere soil of diseased plants than that of healthy plants. Significant differences also existed in the diversity of soil microbial metabolism between pepper bacterial wilt-affected soil and healthy soil. At the same time, the metabolism of the microbial community in healthy soil was found to be significantly enhanced, especially the use of phenolic compounds increased significantly, which had a significant impact on disease resistance of pepper plants.

Key words: pepper bacterial wilt; high-throughput sequencing; microbial community; rhizosphere soil