

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2022.06.005

不同烟草青枯病抗感品种 根际土壤细菌群落结构特征分析

田明慧¹, 滕凯¹, 田峰¹, 巢进¹,
张胜¹, 皮静², 扈雪琴², 丁伟²

1. 湖南省烟草公司 湘西自治州公司, 湖南 湘西 416000;

2. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715

摘要: 本研究以烟草青枯病不同抗性烤烟品种“云烟 87”“HN2146”“K326”和“GZ36”为试验材料, 在湖南省湘西土家族苗族自治州进行田间试验, 采用 16SrDNA 高通量测序方法, 分析了 4 个烟草品种根际土壤细菌群落结构特征。结果表明, 感病品种“云烟 87”与抗病品种“GZ36”和“HN2146”在微生物群落结构上差异显著, 感病品种“云烟 87”根际中主要以变形菌门为主, 抗病品种“K326”和“HN2146”主要以酸杆菌门和芽单胞菌门为主。在抗病品种“K326”和“HN2146”中, 与抗病相关的细菌类群如芽单胞菌门相对丰度分别为 5.43% 和 4.80%, 显著高于“云烟 87”相对丰度 4.16%。此外, 抗病品种“GZ36”“K326”和“HN2146”中的劳尔氏菌属(*Ralstonia*)的相对丰度分别为 0.002%, 0.009% 和 0.005%, 显著低于“云烟 87”的 0.12%。研究结果表明, 抗病品种根部能够富集有益微生物种群, 可抑制 *Ralstonia* 属种群丰度, 提高自身抗病性。本研究解析了烟草青枯病不同抗感品种根际土壤细菌群落结构的差异, 为烟株抗青枯病的微生态机理和今后青枯病的防控提供了理论支撑。

关键词: 烟草青枯病; 烟草品种;

细菌群落多样性; 高通量测序

中图分类号: S572

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2022)06-0042-08

Analysis of Bacterial Community Structure Characteristics in Rhizosphere Soil of Different Tobacco Bacterial Wilt Resistant and Susceptible Varieties

TIAN Minghui¹, TENG Kai¹, TIAN Feng¹, CHAO Jin¹,

收稿日期: 2022-08-10

基金项目: 湘西烟区主要烤烟品种抗性评价及根茎病害绿色防控技术集成应用(2020433100200183)。

作者简介: 田明慧, 高级农艺师, 主要从事烟草生产栽培研究。

通信作者: 丁伟, 教授。

ZHANG Sheng¹, PI Jing², HU Xueqing², DING Wei²

1. Xiangxi Branch of Hunan Tobacco Company, Xiangxi Hunan 416000, China;

2. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In this study, field experiments were conducted in Xiangxi, Hunan Province, using tobacco varieties ‘Yunyan 87’, ‘HN2146’, ‘K326’ and ‘GZ36’ with different resistance to tobacco bacterial wilt as materials. 16S rDNA was used to analyze the characteristics of rhizosphere soil bacterial community structure of four varieties by high-throughput sequencing method. The results showed that there were significant differences in microbial community structure between susceptible variety ‘Yunyan 87’ and resistant varieties ‘GZ36’ and ‘HN2146’. The rhizosphere of susceptible variety ‘Yunyan 87’ was mainly dominated by *Proteobacteria*, while resistant varieties ‘K326’ and ‘HN2146’ were mainly dominated by *Acidobacteriota* and *Gemmatimonadota*. In resistant varieties ‘K326’ and ‘HN2146’, the relative abundances of disease resistant bacterial groups such as *Gemmatimonadota* were 5.43% and 4.80%, respectively, which were significantly higher than that of ‘Yunyan 87’ (4.16%). In addition, the relative abundance of *Ralstonia* in resistant varieties ‘GZ36’, ‘K326’ and ‘HN2146’ was 0.002%, 0.009% and 0.005%, respectively, which was significantly lower than 0.12% of ‘Yunyan 87’. It shows that the roots of disease resistant varieties can enrich beneficial microbial populations, inhibit the population abundance of *Ralstonia*, and improve their own disease resistance. This study analyzed the differences of rhizosphere soil bacterial community structure of different tobacco bacterial wilt resistant and susceptible varieties, and provided theoretical support for the microecological mechanism of tobacco plant resistance to bacterial wilt, and the prevention and control of bacterial wilt in the future.

Key words: tobacco bacterial wilt; tobacco varieties; bacterial community diversity; high throughput sequencing

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌(*Ralstoniasolanacearum*)引起的毁灭性细菌性土传病害,每年因青枯病危害引起的损失巨大,严重制约烟叶生产的发展,由于其侵染呈现出早期潜伏、后期集中爆发、蔓延、死烟严重等特点,因此难以取得理想的防治效果. 培育抗病品种是防治烟草青枯病最经济有效的方法^[1]. 然而,目前现有抗病品种随着种植年限的增加抗性逐渐减弱,培育新的抗病品种耗时较长,亟需新的方法防治青枯病,利用有益微生物防治烟草青枯病成为热门方向. 研究表明,烟草品种对青枯病的抗性与其根际微生态环境有密切关系,抗病品种根际会富集更多的有益微生物,这些微生物对于控制青枯病具有重要的应用价值^[2-3]. 本研究对4个不同抗感烟草品种根际微生物群落的结构进行了解析,了解了抗病品种和感病品种根际细菌微生物群落的差异,筛选出烟草品种抗青枯病的关键微生物菌群,这将有利于阐释抗性品种抗病的微生物机制,以及为有益微生物资源的挖掘与应用提供理论支撑.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用烟草品种为中国烟草青州研究所的“云烟 87”、中国烟草青州研究所的“K326”、中国烟草总公司湖南省烟草公司的“HN2146”和贵州烟草研究院的“GZ36”,均采用漂浮育苗,移栽时间为4月28日,按相关技术标准进行统一大田管理.

1.2 试验地情况

试验地位于湖南省湘西土家族苗族自治州花垣县道二乡湘西金叶科技园,海拔530 m,北

纬 28°15'38.8", 东经 109°15'32.5", 地势平坦, 田块规整地块较为平整, 土壤 pH 值为 6.27, 有机质含量为 18.02 g/kg, 全氮含量为 1.33 g/kg, 全磷含量为 1.16 g/kg, 全钾含量为 18.78 g/kg, 有效磷含量为 12.62 mg/kg, 土壤中的水解氮含量为 328.20 mg/kg, 速效钾含量平均为 227.40 mg/kg.

1.3 试验设计

试验采取随机排列, 每个品种设置 4 个小区, 每个小区约 800 株烟, 烟草种植密度为行距 120 cm, 株距 55 cm, 设置保护行, 小区随机分布, 按照每 667 m² 移栽 1 100 株烟苗的种植, 大约 1 hm².

1.4 试验方法

1.4.1 土壤样本收集

参照沈宗专等^[4]研究中的方法, 本试验采取五点取样法, 在每个小区选择各个品种健康植株 2 株, 拔出烟株, 抖落块土, 用毛刷刷下根际 0~5 mm 土壤, 每 2 株混合均匀后用采样袋装好, 置于冰盒, -80 °C 冰箱保存备用.

1.4.2 根际土壤样品 DNA 提取和文库构建

采用土壤微生物 DNA 快速提取试剂盒 (FastDNA Spin Kit, MP Biomedicals, United States) 对土壤样品微生物总 DNA 进行提取, 将提取的土壤微生物总 DNA 进行 PCR 扩增建立测序文库. 针对细菌 16S rRNA 特异性 V3~V4 可变区进行扩增, 引物为 515F(5'-GTGCCAGC-MGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[5]. 参照刘烈花等^[6]研究中的方法, 进行 PCR 扩增, 扩增结束后, 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 产物委托上海美吉医药生物有限公司进行文库构建及上机测序工作.

1.5 数据处理与统计学分析

采用 Illumina MiSeq PE300 平台进行测序分析, 通过 Fastp(v0.19.6), FLASH(v1.2.7) 和 Qiime2(v2022.2) 对样本的原始测序数据、拼接质控以及序列降噪之后的数据信息进行统一的管理. 从原始测序数据获得样本中真实的序列信息 ASVs (Amplicon Sequence Variant), 基于 ASVs 代表序列信息和丰度信息, 进行后续的物种分类学分析、群落多样性分析、物种组成分析. 利用 Excel 2016 进行数据整理; 使用 Mothur-1.30 计算 Alpha 多样性指数, 群落丰富度指数 (ACE 指数、Chao 指数和 Sobs 指数) 和群落多样性指数 Shannon 指数, 基于 Kruskal-Wallis 秩和检验进行多组比较, 基于 Bray-Curtis 距离进行主成分分析 (Principalco-Ordinatesanalysis, PCoA). IBM SPSS 17.0 和 R 语言软件用于计算多重比较和独立样本 *t* 检验; 使用 Graphpad Prism 9.0 和 Python-2.7 进行绘图.

2 结果与分析

2.1 不同烟草品种根际土壤细菌测序深度评估

通过细菌 16S rDNA 高通量测序, 对原始测序数据进行拼接质控之后的优化数据进行分析, 4 个品种共 12 份土壤样品测序共获得细菌 3 615 032 条优化序列, 平均碱基长度为 256 bp, 样本抽平后保留 188 344 个读数进行分析, 检测出 20 302 个 ASVs, 归类到 2 609 个种, 1 200 个属, 590 个科, 358 个目, 148 个纲, 50 个门.

2.2 不同烟草品种根际土壤细菌群落多样性指数差异分析

为反映群落丰富度,对 4 个烟草品种根际土壤微生物多样性指数 ACE 指数、Chao 指数和 Sobs 指数进行分析发现,4 个品种根际微生物 ACE 指数、Chao 指数和 Sobs 指数由高到低依次为“K326”“GZ36”“HN2146”“云烟 87”(表 1)。其中,“K326”品种根际土壤细菌群落的 ACE 指数、Chao 指数和 Sobs 指数表现最高。此外,在 Shannon 指数方面,由高到低依次为“GZ36”“HN2146”“K326”“云烟 87”。4 个品种 ACE 指数、Chao 指数、Sobs 指数和 Shannon 指数比较,差异无统计学意义($p>0.05$)。

表 1 不同烟草品种根际土壤细菌群落多样性指数

相关指数	GZ36	HN2146	K326	云烟 87
ACE	5 139±401.3a	4 829±295.5a	5 960±1 222a	4 712±782.6a
Chao	5 131±401.3a	4 826±292.2a	5 953±1 217a	4 704±780.6a
Sobs	5 106±378.2a	4 820±284a	5 810±1 014a	4 687±780.7a
Shannon	7.281±0.01a	7.255±0.012a	7.252±0.024a	7.053±0.43a

注:表中小写字母不同表示差异具有统计学意义($p<0.05$)。

2.3 不同烟草品种根际土壤细菌群落 PCoA 分析

不同烟草品种根际土壤细菌群落结构基于 ASV 分类水平的 PCoA 分析,结果表明,感病品种“云烟 87”根际土壤细菌微生物群落明显区别于抗病品种“GZ36”“HN2146”和“K326”根际土壤,不同烟草品种根际土壤细菌群落第 1、2 主坐标的贡献率分别为 28.54%和 15.08%，“云烟 87”根际土壤样本主要分布在 1、4 象限,而“GZ36”和“HN2146”主要分布在第 2、3 象限,差异具有统计学意义(图 1)。

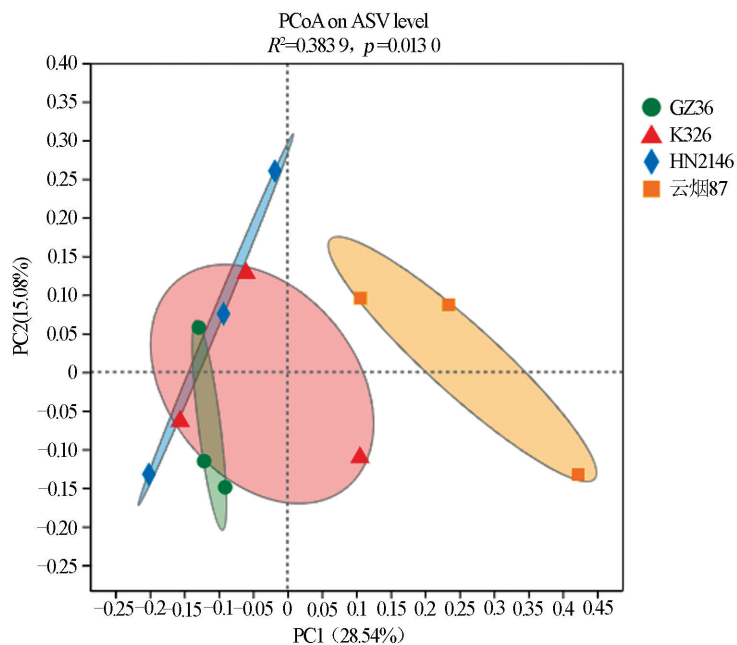


图 1 基于 Bray-Curtis 距离的土壤细菌群落结构分析

2.4 不同烟草品种根际土壤细菌群落结构组成与差异分析

对不同品种根际土壤细菌群落门水平上的组成特征进行分析,发现放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和酸杆菌门(Acidobacteriota)是相对丰度最高的 4 个门,共占比超过细菌门水平类群的 70%,其次为芽单胞菌门(Gemmatimonadota)、浮霉菌门(Planctomycetota)、泉古菌门(Crenarchaeote)、厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度约为 1.52%~6.44%(图 2)。

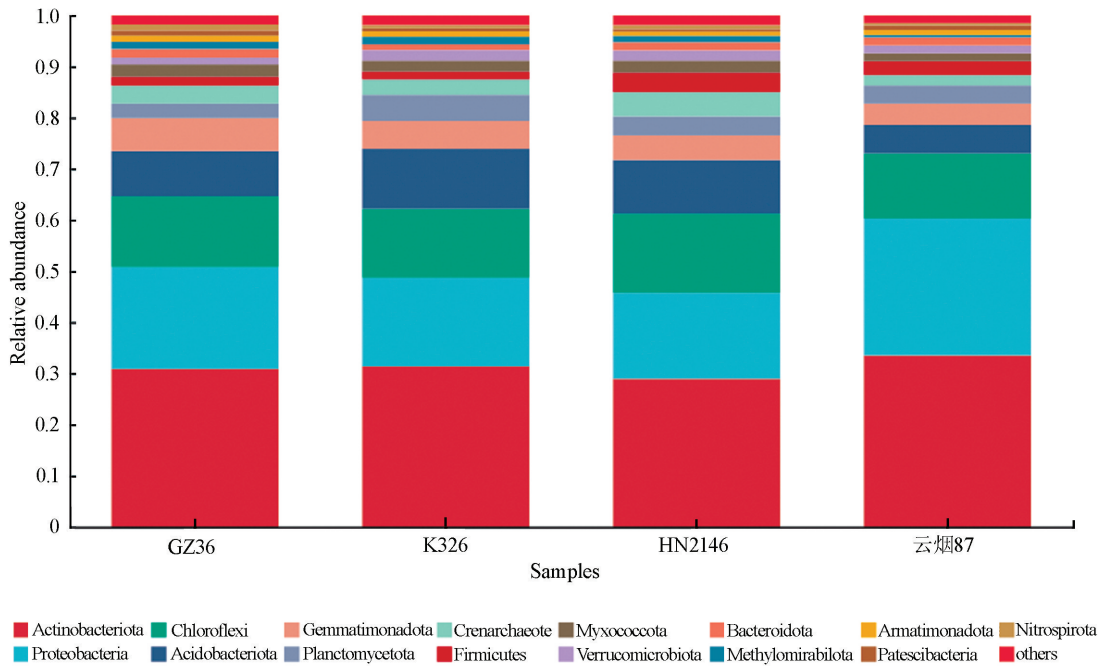


图 2 不同烟草品种根际土壤细菌微生物群落在门水平上的分布

“云烟 87”变形菌门的相对丰度为 26.75%,显著高于“K326”和“HN2146”的相对丰度(17.35%和 16.79%),“云烟 87”酸杆菌门和芽单胞菌门的相对丰度分别为 5.55%和 4.16%,显著低于“K326”(11.72%和 5.43%)和“HN2146”(10.49%和 4.80%)的相对丰度(图 3)。

在属水平上,4 个品种根际细菌中共有菌属 676 个,“云烟 87”“K326”“HN2146”“GZ36”分别特有菌属 60 个、57 个、67 个、49 个。此外,在细菌群落中,相对丰度显著不同的属有 44 个,在感病品种“云烟 87”根际土壤中 *norank_f__norank_o__Vicinamibacterales* 属、*norank_f__norank_o__norank_c__MB-A2-108* 属、*norank_f__norank_o__11-24* 属、*Roseisolibacter* 属的相对丰度低于抗病品种,而 *norank_f__JG30-KF-AS9* 属、*Acidothermus* 属、*Novosphingobium* 属、*unclassified_f__Oxalobacteraceae* 属、*unclassified_o__Bacillales* 属、*Methylobacterium-Methylorubrum* 属和 *Ralstonia* 属的相对丰度较抗病品种高。细菌群落中,相对丰度均大于 1%的属有 2 个,分别是 *norank_f__norank_o__Vicinamibacterales* 属和 *norank_f__JG30-KF-AS9* 属。值得注意的是,在“云烟 87”根际土壤中相对丰度显著高于抗病品种的变形菌门中,青枯病致病菌所在的青枯菌属(*Ralstonia*)的相对丰度为 0.12%,高于“GZ36”的 0.002%、“K326”的 0.009%和“HN2146”的 0.005%,差异均具有统计学意义。此外,一些未分类的细菌的相对丰度在抗病品种间也存在显著差异,如 *norank_f__norank_o__Vicinami-*

bacterales, 其在“云烟 87”中的相对丰度为 1.209%, 低于“GZ36”“K326”和“HN2146”的 2.674%, 3.305%和 3.805%.

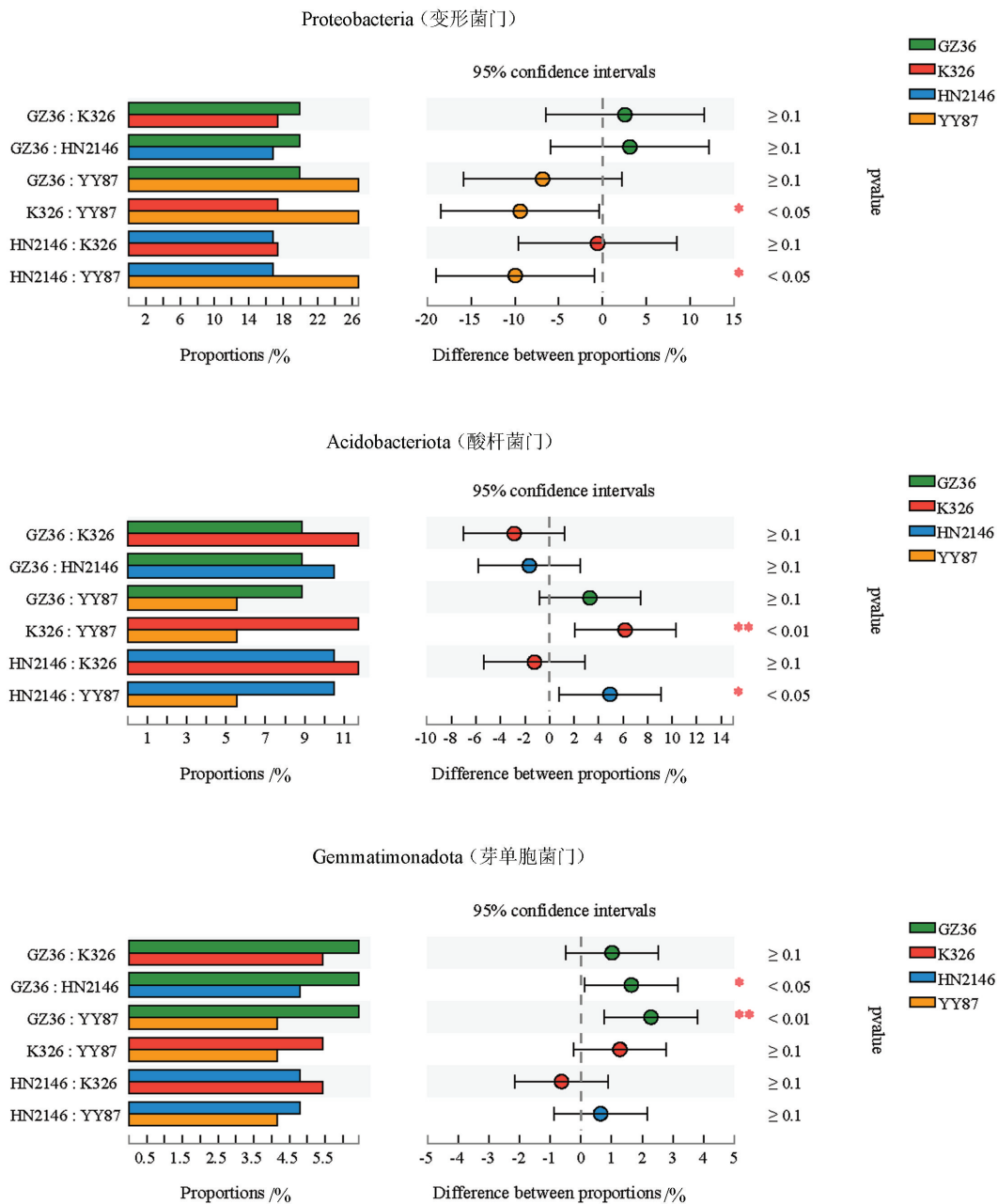


图 3 不同烟草品种根际土壤细菌门水平上存在显著差异的门

3 结论与讨论

不同植物品种根际微生物存在差异且与品种抗性密切相关, 影响着土传病害的发生^[7]. 烟草青枯病是一种毁灭性的土传细菌病害, 培育抗病品种是防治其最经济有效的方法, 筛选拮抗土壤微生物进行生物防治也是行之有效的方法之一^[8-9]. 本研究利用高通量测序技术, 以烟草青枯病感病品种“云烟 87”, 抗病品种“K326”“HN2146”和“GZ36”为研究对象, 分析了抗感品种根

际土壤细菌群落结构特征,以期从抗感品种差异微生物中找到解决烟草青枯病的核心微生物,为烟草青枯病的防治提供新思路.结果表明,4个品种根际细菌群落 Alpha 多样性指数 ACE 指数、Chao 指数、Sobs 指数和 Shannon 指数比较差异无统计学意义,但 PCoA 分析表明感病品种“云烟 87”根际土壤细菌微生物群落和抗病品种“GZ36”“HN2146”和“K326”根际土壤细菌群落明显不同.根际是植物-土壤-微生物和微生物-微生物相互作用的热点,微生物及其相互作用可以在很大程度上抑制病原菌的生长并加强植物的抗病能力^[10-11].近年来的研究表明,一些抗病作物品种在根际富集了特定的细菌种类以抑制病原体^[12-13].杨俊等^[14]的研究发现,水稻抗感细菌性条斑病品种的根际土壤可培养细菌群落结构存在很大的差异,抗病品种细菌属存在更多生防菌;涂娜娜等^[15]发现抗感桑树品种在属水平上丰度存在不同,抗性品种根际检测到丰度更高的可能与其抗性有关的淡紫尼青霉属和丛枝菌根球霉菌目.本研究也发现,抗感烟草品种根际土壤细菌群落结构不同,抗病品种“K326”和“HN2146”可能与抗性相关的芽单胞菌门的相对丰度显著高于感病品种“云烟 87”的相对丰度.此外,在属水平上,4个品种相对丰度显著不同的属有 44 个,感病品种“云烟 87”根际土壤中青枯菌属(*Ralstonia*)显著高于抗病品种.目前,有研究通过微生物组学技术筛选出可抑制青枯病发生的细菌指标,如 *Kaistobacter* 属^[16],进一步筛选到拮抗微生物作为防治烟草病害的手段,如暹罗芽孢杆菌防治烟草赤星病^[17],木霉菌防治烟草黑胫病和根腐病^[18-19],多粘类芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌防治烟草青枯病^[20-21]等.本研究在细菌中筛选出相对丰度显著不同的属 44 个,其中,感病品种“云烟 87”根际土壤中区别于抗病品种根际土壤的常见的细菌属有新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)和甲基杆菌属(*Methylbacterium-Methylorubrum*)和青枯菌属(*Ralstonia*),这 3 个属或许在青枯菌侵染植株上起着辅助作用,而 *norank_f__norank_o__Vicinamibacterales* 属和 *norank_f__JG30-KF-AS9* 属将作为烟草青枯病拮抗菌的筛选对象.

参考文献:

- [1] 刘勇,范江,李永平.烟草抗青枯病育种研究进展[J].中国烟草学报,2012,18(6):93-99.
- [2] 王戈,杨焕文,赵正雄,等.不同抗性烤烟品种根际微生物数量及多样性差异研究[J].植物营养与肥料学报,2012,18(2):451-458.
- [3] 刘晓姣.烟草根际抑病土壤有益微生物的组学特征及对青枯病的拮抗作用研究[D].重庆:西南大学,2018.
- [4] 沈宗专,黄炎,操一凡,等.健康与罹患青枯病的番茄土壤细菌群落特征比较[J].土壤,2021,53(1):5-12.
- [5] BERGMANN T, BATES S T, EILERSK G, et al. The Under-Recognized Dominance of Verrucomicrobia in Soil Bacterial Communities[J].Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(7): 1450-1455.
- [6] 刘烈花,龚杰,皮静,等.榨菜根肿病常发地根际土壤微生物群落特征研究[J].西南师范大学学报(自然科学版),2022,47(4):63-72.
- [7] 李俊领,马晓寒,张豫丹,等.土壤微生物与烟草青枯病发生关系的研究进展[J].生物技术通报,2020,36(9):88-99.
- [8] 雷丽萍,郭荣君,缪作清,等.微生物在烟草生产中应用研究进展[J].中国烟草学报,2006,12(4):47-51.
- [9] 王丽丽,石俊雄,袁赛飞,等.微生物有机肥结合土壤改良剂防治烟草青枯病[J].土壤学报,2013,50(1):150-156.
- [10] DURÁN P, THIERGART T, GARRIDO-OTER R, et al. Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote Arabidopsis Survival[J]. Cell, 2018, 175(4): 973-983.

- [11] LIUH W, LIJ Y, CARVALHAIS L C, et al. Evidence for the Plant Recruitment of Beneficial Microbes to Suppress Soil-Borne Pathogens[J]. *The New Phytologist*, 2021, 229(5): 2873-2885.
- [12] MENDES L W, RAAIJMAKERS J M, DE HOLLANDER M, et al. Influence of Resistance Breeding in Common Bean on Rhizosphere Microbiome Composition and Function[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(1): 212-224.
- [13] KWAK M J, KONG H G, CHOI K, et al. Rhizosphere Microbiome Structure Alters to Enable Wilt Resistance in Tomato[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(11): 1100-1109.
- [14] 杨俊, 王星, 付丽娜, 等. 水稻条斑病抗感品种根际微生物群落结构和功能分析[J]. *生态科学*, 2019, 38(1): 17-25.
- [15] 涂娜娜, 武华周, 娄德钊, 等. 海南青枯病抗、感桑品种根际土壤真菌群落多样性分析[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(12): 3671-3677.
- [16] LIUX J, ZHANGS T, JIANGQ P, et al. Using Community Analysis to Explore Bacterial Indicators for Disease Suppression of Tobacco Bacterial Wilt[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36773.
- [17] 谢中玉. 暹罗芽孢杆菌 LZ88 对烟草赤星病的防治效果和作用机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [18] 王革, 李梅云, 段玉琪, 等. 木霉菌对烟草黑胫病菌的拮抗机制及其生物防治研究[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2001, 23(3): 222-226.
- [19] 陈小均, 喻会平, 顾怀胜, 等. 木霉菌防治烟草根腐病及其土壤优势微生物的相互作用[J]. *贵州农业科学*, 2007, 35(5): 57-59.
- [20] 拓阳阳, 江其朋, 江连强, 等. 不同微生物菌剂对烟草青枯病的协同防控效果研究[J]. *植物医生*, 2021, 34(2): 13-17.
- [21] 刘丹, 李爱华, 石方斌, 等. 枯草芽孢杆菌防治十堰市烟草青枯病研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(2): 198-199.

责任编辑 苏荣艳