

氧化钙对西瓜枯萎病及根际细菌群落的调控

田程¹, 邱婷¹, 朱菲莹², 肖姬玲², 魏林³, 梁志怀^{1,2*}

(1.湖南大学研究生院隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2.湖南省农业生物技术研究, 湖南 长沙 410125; 3.湖南省植物保护研究所, 湖南 长沙 410125)

摘 要: 测定连作 5 年和施加氧化钙的西瓜植株定植 40 d 后的枯萎病发生率, 利用 Illumina Hiseq 高通量测序方法, 对土壤进行 16S rDNA 测序, 比较施加氧化钙后西瓜根际土壤的细菌种群特征。结果显示: 连作 5 年土壤的西瓜枯萎病发病率为 87.5%, 施加氧化钙的发病率为 35.4%, 氧化钙对西瓜枯萎病的相对防效达 59.5%; 施加氧化钙的连作土壤细菌多样性指数和细菌丰富度都大于连作的; 连作与施加氧化钙都使得土壤的优势菌群发生变化; 在属水平上相对丰度排名前 30 的土壤细菌中, 与发病率呈显著正相关的有 *Mizugakiibacter*、*Crenotalea*、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、不动杆菌属(*Acidibacter*)、戴氏菌属(*Dyella*)和 *Bryobacter*, 呈显著负相关的有黄色土壤菌属(*Flavisolibacter*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、出芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、丰收神菌属(*Opiritutus*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)。

关 键 词: 西瓜; 枯萎病; 氧化钙; 土壤细菌多样性; 高通量测序

中图分类号: Q436.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)06-0620-05

Calcium oxide regulation of fusarium wilt and rhizosphere bacterial community

TIAN Cheng¹, QIU Ting¹, ZHU Feiying², XIAO Jiling², WEI Lin³, LIANG Zhihui^{1,2*}

(1.Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 2.Hunan Agricultural Biotechnology Research Institute, Changsha, Hunan 410125, China; 3.Institute of Plant Protection of Hunan Province, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: In order to observe the occurrence of fusarium wilt in watermelon plants after colonization for 40 days in 5-year watermelon continuous cropping soil with and without calcium oxide, 16S rDNA sequencing was carried out on the soil by Illumina Hiseq high-throughput assay and the bacterial population characteristics of rhizosphere soils with and without calcium oxide were compared. The results showed that in continuous cropping soil without calcium oxide, the incidence of Fusarium wilt in watermelon was 87.5%, while the incidence of fusarium wilt in continuous cropping soil with calcium oxide was 35.4%, and the relative control effect of watermelon wilt was 59.5%. The bacterial diversity index and bacterial richness of continuous cropping soil with calcium oxide were higher than those of continuous cropping soil without calcium oxide. The dominant flora of soil was changed by continuous cropping with calcium oxide application. Among the top 30 soil bacteria with relative high abundance at the generic level, *Mizugakiibacter*, *Crenotalea*, *Rhodanobacter*, *Acinetobacter*, *Dyella* and *Bryobacter* showed significant positive correlations whereas *Flavisolibacter*, *sphingomonas*, *Gemmatimonas*, *Opiritutus* and *Devosia* showed significant negative correlations with fusarium wilt disease incidence.

Keywords: watermelon; fusarium wilt; calcium oxide; bacterial diversity in soil; high-throughput sequencing

西瓜枯萎病是导致西瓜减产的原因之一^[1-2]。实际生产中常施用石灰(CaO)来预防西瓜枯萎病的发生^[3-4]。有关石灰防治作物病害机理的研究主要集中在影响病原菌生长及侵染等方面^[5-8]。近年来有文献报道,氧化钙可调控土壤中细菌的多样性和丰富度^[9],改善土壤微生物环境^[10-11]。邱婷等^[8]的研究表明,施加 1.34 g/kg 氧化钙对西瓜枯萎病的防控效果较好。笔者进一步对连作 5 年西瓜的土壤进行高通量测序,比较分析与施加氧化钙土壤的细菌群落结构的差异性,以期探明氧化钙对西瓜枯萎病及根际土壤细菌群落结构的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

西瓜品种早佳 8424,购自新农人公司。氧化钙购自长沙泰思德生物公司。供试土壤取自湖南省农业科学院高桥试验基地连作 5 年西瓜大棚。土壤有机质 27.3 g/kg、全氮 1.98 g/kg、全钾 22.7 g/kg、全磷 0.83 g/kg、碱解氮 0.16 g/kg、有效钾 0.16 g/kg、有效磷 0.12 g/kg, pH 5.3。

1.2 方法

将连作 5 年土壤充分混匀,按每盆 15 kg 标准分装,试验组添加 1.34 g/kg 氧化钙,对照组不添加氧化钙,每处理 5 次重复,每重复播种 30 粒西瓜种子。至西瓜定植 40 d 时,统计西瓜枯萎病的发生情况,计算发病率及氧化钙对西瓜枯萎病的防效。同时,采用多点取样法,取 5~10 cm 处西瓜根际土样,各处理充分混匀后过孔径 0.85 mm 土样筛,采用 Illumina Hiseq 高通量测序技术检测细菌群落结

构及多样性。高通量测序由北京诺禾致源生物有限公司完成。

1.3 数据处理

使用 FLASH 对测序得到的原始数据进行拼接、过滤,得到有效数据。利用 Uparse 软件对有效数据进行 OTUs 聚类,默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs,筛选出频率最高的序列作为 OTUs 的代表序列。利用 Qiime 软件(Version 1.9.1)与 Unit 数据库进行物种注释分析,计算出各处理的香农指数、Chao1 指数、ACE 指数。

运用 SPSS 19.0 软件分析细菌多样性与枯萎病发病率之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 氧化钙对西瓜枯萎病的防控效果

西瓜定植 40 d 后,施加氧化钙试验组的西瓜枯萎病发病率为 35.4%,显著低于对照组植株发病率(87.5%),相对防效达到 59.5%。

2.2 施加氧化钙对土壤细菌多样性的影响

2.2.1 土壤细菌丰富度与多样性指数

统计结果(表 1)显示,氧化钙处理试验组土壤细菌多样性大于对照组,差异显著,说明土壤中施加氧化钙能显著提高土壤细菌多样性。氧化钙处理试验组土壤细菌丰富度 Chao1、ACE 指数大于对照组,差异显著。施加氧化钙能显著提高土壤细菌丰富度,结合植株发病降低,说明植株发病率与土壤细菌多样性存在相关性,土壤细菌多样性越高,植株发病率越低。

表1 土壤细菌多样性和丰富度指数
Table 1 Soil bacteria diversity and richness index

处理	OTU	香农指数	Chao1 指数	ACE 指数
对照	2 486a	8.414b	2 781.207b	2 827.744b
氧化钙	2 403b	8.469a	2 851.663a	2 856.464a

2.2.2 土壤的细菌群落结构

如图 1 所示,对照组土壤中细菌群落门水平主要有变形菌门(Proteobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、

Saccharibacteria、浮霉菌门,其优势菌门为变形菌门、酸杆菌门,其次为绿弯菌门和浮霉菌门。施用氧化钙试验组土壤中主要细菌群落门水平上与对照组无异,但是其优势菌门为芽单胞菌门、拟杆菌门,其次为放线菌门、厚壁菌门,表明施加氧化钙能提高土壤中芽单胞菌门、拟杆菌门等的丰度,显

著降低酸杆菌门、变形菌门等的丰度。

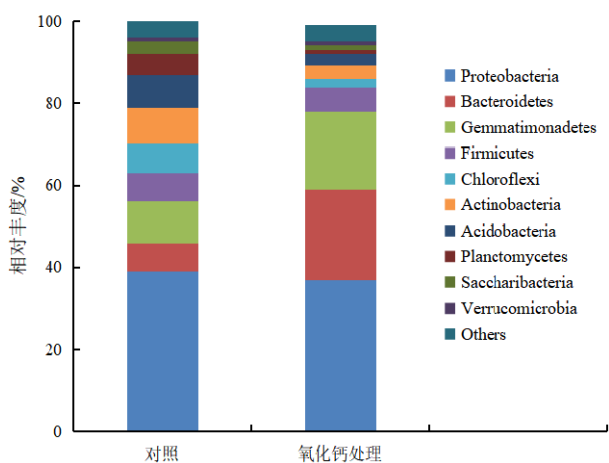


图1 门水平上的土壤细菌群落的相对丰度

Fig1 The relative abundance of bacteria community at phylum level

2.2.3 土壤细菌与西瓜枯萎病的相关性

通过皮尔森相关系数分析得出，土壤中细菌多样性与枯萎病发病率呈极显著负相关，相关系数为-0.716。在相对丰度排名前30的菌属中，对照与氧化钙处理的土壤共有的优势菌属为鞘氨醇单胞菌属

(*Sphingomonas*)和出芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)；对照土壤主要优势菌属还有 *Mizugakiibacter*、罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、*Gemmatirosa*，氧化钙处理土壤主要优势菌群另有黄色土源菌属(*Flavisolibacter*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*unidentified_Gemmatimonadaceae*；对照土壤最优势菌属为 *Mizugakiibacter*，而氧化钙处理土壤最优势菌属为黄色土源菌属，说明施加氧化钙影响了西瓜根际土壤细菌群落的结构。另外，未归类到任何种属的其他(others)占细菌总量的一半以上，表明该序列较小，无法获得其分类学信息，需要采取其他方法进行鉴定分类。

在属水平相对丰度排名前30(表2)的土壤细菌中，黄色土源菌属、鞘氨醇单胞菌属、出芽单胞菌属等13个菌属与枯萎病发病率呈负相关，其中黄色土源菌属、鞘氨醇单胞菌属、出芽单胞菌属等6个菌属与枯萎病发病率呈极显著负相关，其余均与枯萎病发病率呈正相关，其中 *Mizugakiibacter*、*Crenotalea*、罗河杆菌属等6个菌属与枯萎病呈极显著正相关。

表2 属水平相对丰度排名前30的土壤细菌丰度与枯萎病发病率的相关系数

Table 2 Line regression coefficient of top 30 most abundant bacterial genera and *Fusarium* wilt disease incidence

细菌属	丰度/%		与发病率 相关系数	细菌属	丰度/%		与发病率 相关系数
	对照	氧化钙处理			对照	氧化钙处理	
<i>Mizugakiibacter</i>	13.89	0.79	0.879**	<i>Ruminococcaceae_UCG-014</i>	0.46	0.80	0.048
黄色土源菌属	0.55	8.51	-0.940**	弗拉托菌属	0.41	0.23	0.386
鞘氨醇单胞菌属	2.24	8.17	-0.953**	<i>Crenotalea</i>	0.85	0.02	0.672*
罗河杆菌属	4.49	0.50	0.904*	<i>Alistipes</i>	0.53	0.60	-0.249
乳杆菌属	0.67	1.32	0.395	丰收神菌属	0.12	0.93	-0.605*
<i>Roseateles</i>	0.03	0.04	0.648	<i>Alicyclobacillus</i>	0.31	0.10	0.561
<i>Gemmatimonadaceae</i>	1.99	4.01	0.623	<i>Unidentified_Chloroplast</i>	0.17	0.16	-0.437
出芽单胞菌属	1.43	2.52	-0.768**	<i>unidentified_Chitinophagaceae</i>	0.42	0.07	-0.364
<i>Gemmatirosa</i>	1.55	0.27	0.816**	<i>Acidibacter</i>	0.74	0.15	0.842**
鞘氨醇菌属	0.01	0.17	-0.380	戴氏菌属	0.42	0.14	0.714**
假单胞菌属	0.10	0.61	-0.450	<i>Bryobacter</i>	0.41	0.15	0.861**
假黄色单胞菌属	0.40	0.26	0.379	毛球菌属	0.48	0.02	0.432
<i>[Polyangium]_brachysporum</i>	0.07	0.17	0.201	产黄菌属	0.01	0.63	-0.492
<i>Turicibacter</i>	0.27	0.22	0.061	寡养单胞菌属	0.06	0.03	-0.292
不动杆菌属	0.03	0.04	-0.018	德沃斯氏菌属	0.14	0.59	-0.882**

“*”表示在 0.05 的水平显著相关；“**”表示在 0.01 的水平显著相关。

3 结论与讨论

试验结果表明，施加氧化钙可显著降低西瓜枯萎病发病率，高通量测序分析表明，氧化钙能提高西瓜

根际土壤中细菌群落的多样性及丰富度，改变土壤中的细菌结构，增加有益细菌的数量，而这些增加的新的细菌群落多具有抗病、促进植物生长的功能，有一定的生防潜力，有望成为新的生防菌群。

PHILIPPOT 等^[12]研究指出,土壤微生物群落结构多样性是反映土壤健康状态的重要指标,土壤微生物群落是土壤生态系统持续发挥作用的重要媒介。土壤中的微生物与植物病害存在着密切的联系,细菌作为土壤微生物中最大的组分,是影响土壤微生态变化的主要因子,细菌群落结构的变化可能导致植物病害的发生。本研究通过比较试验组与对照组细菌群落结构发现,施加氧化钙能显著提高土壤细菌的多样性及丰富度,与王礼等^[5]的研究结果相一致。前人研究发现,根际土壤细菌群落结构与丰度是影响西瓜枯萎病发生的主要原因之一^[13]。本研究结合西瓜枯萎病发病情况,发现根际土壤细菌多样性的变化与发病率呈显著负相关,说明土壤中细菌群落越丰富、数量越多,西瓜枯萎病的发生概率越小。

分析属水平上相对丰度排名前 30 的土壤细菌与枯萎病发病率之间的相关性,发现与西瓜枯萎病发病率呈极显著正相关的细菌菌属中,有部分是对照中的主要优势菌属,而与西瓜枯萎病呈极显著负相关的细菌菌属中,有部分则是氧化钙处理的主要优势菌属,这说明施加氧化钙不仅能调控细菌群落的多样性,还能调控细菌菌属的丰度,减少与枯萎病发病率呈正相关的细菌菌属,增加与枯萎病发病率呈负相关的细菌菌属,因而提高对西瓜枯萎病的防效,氧化钙影响这些菌属丰度变化的作用机制还有待进一步研究。

与西瓜枯萎病发病率呈正相关的菌群多用于污泥处理^[14]、衡量重金属污染指标^[15],能降解茈、菲、柴油等土壤污染物^[16-18],有的菌群还用于矿物风化^[19]。其中部分菌群对植物生长有利,如 *Rhodanobacter* 具有氧化酶和过氧化氢酶活性,对根腐病原菌具有一定的生防活性^[20];乳杆菌属能抑制植物真菌病原菌的生长,其代谢产物还能促进植株生长^[21]。这些菌群与西瓜枯萎病发病率呈正相关,可能是其对西瓜枯萎病病原菌无生防效果,或效果不明显;也可能是因为这类菌群多用于解决环境污染问题,无生防作用;亦或者这类菌群同多囊菌属一样,其分泌物能够直接致动植物患病^[22],在降解有害物质的同时,产生某种易于西瓜枯萎病病原菌侵染植株的物质,促使西瓜枯萎病的发生,其真正原因还有待查验。

另外,与西瓜枯萎病发病率呈负相关的菌群多能降解除草剂、杀虫剂等化学残留物^[23-24],改善土壤环境;能够分泌多种抗生素^[25]、糖类^[26]、铁载体^[27]等物质,产生过氧化氢酶、氧化酶和 β -葡萄糖苷酶^[28],帮助植物对氮、糖等营养物质的吸收利用^[29],促进植物长高及干重增加^[30],促进植物生长;还能通过感染的方式侵入植物体内(类似于根瘤菌),激活植物免疫系统,促进植物抵抗多种病原菌,或者直接抑制植物病原菌的生长^[31]。其中有些菌群还能改善西瓜根区环境,有效缓解西瓜连作障碍,促进西瓜植株的生长。与西瓜枯萎病发病率呈负相关的这类菌群可能因为其多具有降解土壤中有害物质、促进植物生长发育、直接或间接抑制植物病原菌生长的能力,从而对西瓜枯萎病具有良好的防控效果,但其对西瓜枯萎病的防治机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LING N, DENG K, SONG Y, et al. Variation of rhizosphere bacterial community in watermelon continuous mono-cropping soil by long-term application of a novel bioorganic fertilizer[J]. Microbiological Research, 2014, 169(7/8): 570.
- [2] ZHANG Z, ZHANG J, WANG Y, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249(1): 39-47.
- [3] LOLLATO R P, EDWARDS J T, ZHANG H L. Effect of alternative soil acidity amelioration strategies on soil pH distribution and wheat agronomic response[J]. Soil Science Society of America Journal, 2013, 77(5): 1831-1841.
- [4] RABOIN L M, RABARY B, DUSSERRE J, et al. Improving the fertility of tropical acid soils: liming versus biochar application? A long term comparison in the highlands of madagascar[J]. Field Crops Research, 2016, 199: 99-108.
- [5] 王礼. 石灰氮对土壤微生物种群及黄瓜枯萎病病原菌影响的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [6] 贲海燕. 氰氨化钙防治黄瓜根腐病及对土壤微生物种群效应的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- [7] 魏光. 土壤施用氧化钙防治水稻旱育秧立枯病作用及对育秧质量的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [8] 邱婷, 张屹, 肖姬玲, 等. 土壤施加氧化钙对西瓜枯萎病的影响及其机理初探[J]. 植物保护, 2017, 43(6): 11-16.
- [9] 张苗苗, 王伯仁, 李冬初, 等. 长期施加氮肥及氧化

- 钙调节对酸性土壤硝化作用及氨氧化微生物的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(19): 6362–6370.
- [10] 敖俊华, 黄振瑞, 江永, 等. 石灰施用对酸性土壤养分状况和甘蔗生长的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 266–269.
- [11] 蔡东, 肖文芳, 李国怀. 施用石灰改良酸性土壤的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 206–213.
- [12] PHILIPPOT L, RAAIJMAKERS J M, LEMANCEAU P, et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(11): 789–799.
- [13] 朱菲莹, 李基光, 张屹, 等. 西瓜根际土壤细菌群落多样性对枯萎病发生的影响[J]. 中国农学通报, 2018, 34(17): 69–76.
- [14] WANG R, YANG C, ZHANG M, et al. Chemoauto-trophic denitrification based on ferrous iron oxidation: reactor performance and sludge characteristics[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 313(1): 693–701.
- [15] GUO H, NASIR M, LYU J, et al. Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 144: 300–306.
- [16] KLANKEO P, NOPCHAROENKUL W, PINYAKONG O. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2009, 108(6): 488.
- [17] NOPCHAROENKUL W, NETSAKULNEE P, PINYAKONG O. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402[J]. Biodegradation, 2013, 24(3): 387–397.
- [18] WANG G, ZHAO Y, HAO G, et al. Co-metabolic biodegradation of acetamiprid by *Pseudoxanthomonas* sp. AAP-7 isolated from a long-term acetamiprid-polluted soil[J]. Bioresource Technology, 2013, 150(3): 259–265.
- [19] 包远远. 矿物风化细菌的生物学特性和 *Dyella jiangningensis* SBZ3-12 全基因组分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [20] DE C D, Van T S, CLEENWERCK I, et al. *Rhodanobacter spathiphylli* sp. nov. a gammaproteobacterium isolated from the roots of *Spathiphyllum* plants grown in a compost-amended potting mix[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(8): 1755–1759.
- [21] 赵旭. 乳酸菌及其代谢产物在紫花苜蓿种植中的应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [22] SCHELLENBERG B, BIGLER L, DUDLER R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(7): 1640.
- [23] SINGH A, LAL R. *Sphingobium ummariense* sp. nov. a hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium, isolated from HCH-contaminated soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 618–623.
- [24] GUO P, WANG B, HANG B J, et al. Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2009, 63(8): 1107–1112.
- [25] 杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 158–161.
- [26] TAKEUCHI M, SAKANE T, YANAGI M, et al. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov. and *Sphingomonas mali* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(3): 180–183.
- [27] 许煜泉, 高虹, 童耕雷, 等. 假单胞菌株 JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌[J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 180–183.
- [28] LEE J J, KANG M S, KIM G S, et al. *Flavisolibacter tropicus* sp. nov. isolated from tropical soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(9): 3413–3419.
- [29] BERG G, BALLIN G. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb[J]. Journal of Phytopathology, 2010, 141(1): 99–110.
- [30] ADHIKARI T B, JOSEPH C M, YANG G P, et al. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(10): 916–924.
- [31] 胡杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431–437.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维