



枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) Tpb55灌根与烟草根围细菌多样性变化的相关性

韩腾¹, 张立猛², 高加明³, 孔凡玉¹, 冯超¹, 王静¹, 张成省^{1*}

¹ 中国农业科学院烟草研究所/烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室, 山东 青岛 266101

² 云南省烟草公司玉溪市公司, 云南 玉溪 653100

³ 湖北省烟草公司, 湖北 武汉 430000

摘要: 【目的】利用454高通量测序技术分析生防菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) Tpb55对烟草根围土壤细菌群落的影响; 同时测定施加Tpb55处理对烟草黑胫病的大田防效。【方法】试验设置Tpb55菌剂 10^8 CFU/mL灌根和空白对照2个处理, 分别在处理0、10、22 d采集烟草根围土壤, 提取土壤细菌总DNA, 扩增细菌16S rDNA V1-V3区, 对扩增产物进行454高通量测序, 使用Qiime软件分析不同处理的细菌群落结构。【结果】对照和处理样品测序后共获得了41207个优质序列, 鉴定属于细菌的25个门。所有样品中优势菌群均为放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria)。在病情发展过程中, 放线菌门的细菌丰度逐渐下降, 变形菌门含量呈上升趋势。施用Tpb55后, 酸杆菌门含量明显上升并高于对照。对照中芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 和多样性指示菌草酸杆菌科 (Oxalobacteraceae) 的细菌丰度均明显下降, Tpb55处理的样品中芽孢杆菌科含量不断上升, 草酸杆菌科含量相对稳定。Chao 1、ACE和Shannon指数分析表明, Tpb55处理的样品中细菌多样性和丰富度不断提高且高于对照。Tpb55处理后10 d和22 d, OTU序列数据库中与Tpb55 16S rDNA V1-V3区PCR产物高度同源OTU数目分别为31和45。Tpb55处理的烟草黑胫病病情指数 (5.29)显著低于对照 (38.52)。【结论】施用Tpb55可以提高根围土壤细菌多样性和群落结构稳定性, 这可能是其发挥良好生防作用的重要机制之一。

关键词: 454焦磷酸测序, 细菌群落, 枯草芽孢杆菌, 烟草

由烟草疫霉 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起的烟草黑胫病是我国烟草生产上最具破坏性的土传病害之一^[1], 每年造成巨额经济

损失^[2]。目前生产上该病害的防治主要依赖甲霜灵、霜霉威等化学农药, 由于可供选择药剂品种少、主用药剂使用年限长, 易产生病原菌抗药

基金项目: 国家自然科学基金 (31000878)

*通信作者。Tel: +86-532-88702115; Fax: +86-532-88701030; E-mail: zhangchengsheng@caas.cn

收稿日期: 2015-07-27; 修回日期: 2015-12-03; 网络出版日期: 2016-01-11

性^[3-4]、农药残留及环境污染等负面效应。相对于化学防治,生物防治通常被认为环境友好,成为现代、绿色农业的首选方法^[5],成为近年来研究的热点领域。

细菌是土壤中的主要微生物类群,在土壤的物质和能量代谢方面发挥重要作用,土壤细菌的多样性和群落结构与植物生长发育及病害防治紧密相关^[6]。因此,有益细菌成为人们研究和应用最为广泛的生防因子。为获得更佳防治效果,将大量生防细菌引入局部区域,这种外来生物入侵会对土壤中原有的微生物群落造成明显影响,有时甚至会严重破坏微生态平衡^[7]。因此,对生防细菌的微生物生态效应评价非常重要。最早,人们用生物培养法来测定生防细菌对土壤微生物群落的影响^[8],但土壤中可培养微生物十分有限^[9],这种方法不能真实反应土壤微生物群落结构。随着分子生物学技术的发展,以PCR为核心技术的PCR-DGGE、RFLP和RAPD等分子生物学研究方法,使微生物多样性研究有了长足发展。但上述方法存在操作复杂、实验周期长、痕量微生物检测困难等弊端,无法达到深入分析的目的。近年来发展的高通量测序技术,使高效、全面认识土壤微生物成为可能。其中,454测序技术因序列读长较长,已经被广泛应用于土壤细菌多样性的分析^[10-12]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是重要的生防细菌,由于能产生芽孢以及生防机制多样性,被广泛用于植物病害的生物防治^[13-14]。本实验室前期研究获得1株枯草芽孢杆菌Tpb55菌株,该菌株对烟草黑胫病菌表现出了良好的生防潜力^[15-17]。游偲等^[18]采用限制性片段长度多态性分析(ARDRA)方法,研究了Tpb55菌株对烟草根围细菌群落的影响。然而,ARDRA方法检测的细菌种群有限,只能检测到土壤中的优势菌群和易扩增菌群。为了更深入分析枯草芽孢杆菌对烟草根围土壤细菌种群的影响,本研究以未施药的烟草根围土壤作

为对照,采用454高通量测序技术,分析枯草芽孢杆菌对烟草根围细菌群落的影响,以期对烟草黑胫病的生物防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验处理

田间试验在山东即墨市中国农业科学院烟草研究所试验站黑胫病病圃地进行,土壤类型为壤土^[18]。供试烟草品种为感黑胫病烟草品种小黄金1025。供试药剂: 4.1×10^{10} CFU/g枯草芽孢杆菌粉剂(烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室制备)。2014年3月8日播种,5月17日移栽,行距100 cm,株距30 cm,所有试验小区的栽培条件一致。试验共设2个处理:处理: 4.1×10^{10} CFU/g枯草芽孢杆菌粉剂稀释成 10^8 CFU/mL灌根,每株100 mL;对照:清水。每个处理重复3次,每个小区3行,每行15株烟。7月7日进行灌根处理。7月7日(灌根前),7月17日、7月29日分别进行取样。每个小区随机选3株烟,根围土采集方法参照Zhang等方法^[19],每株烟取根围土100 g混匀,取100 g为1个小区的样品。将3个试验小区土样组成混合样,取100 g为1个处理的终样品,并按处理和取样时间进行编号(表1)。取样完成后,立即用无菌封口袋包扎密封,置于冰盒中带回实验室 -80°C 保存备用。分别于7月17日、7月24日、8月1日和8月11日进行烟草黑胫病病情指数的统计。

1.2 土壤细菌总DNA的提取与纯化

取0.50 g土样,用土壤DNA提取试剂盒(Ultra Clean DNA Isolation kit, MOBIO)提取土壤细菌总DNA,提取的粗DNA用DNA纯化试剂盒进行纯化,提取和纯化方法均按照操作说明进行。

1.3 16S rDNA PCR扩增

将纯化后的基因组DNA作为PCR扩增模板,扩增细菌16S rDNA V1-V3区,使用通用引物27F

表1. 不同样品测序数据统计
Table 1. Sequence data statistics of different samples

Time	Sample codes	Effective sequence	High quality sequence	Percent/%	Observed OTUs	Coverage	Richness index		Diversity index Shannon
							Chao 1	ACE	
7 July	707T	12556	7129	57	2732	0.8754	2665	2605	6.9186
	707CK	11582	6563	57	2491	0.8702	2618	2501	6.8628
17 July	717T	12337	6920	56	2671	0.8731	2729	2566	6.9531
	717CK	13242	7236	55	2699	0.8865	2585	2422	6.9166
29 July	729T	12593	7099	56	2844	0.8633	2848	2798	7.0199
	729CK	11412	6260	55	2351	0.8796	2263	2179	6.6889

T: Tpb55 treatment; CK: control.

(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和533R (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), 合成融合引物 F (5'-454adapter-mid-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3')和R (5'-454adapter-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), 由上海派森诺生物科技有限公司合成。样品稀释至20 ng/ μ L作为PCR模板, 反应体系包括: 灭菌超纯水16.375 μ L, Buffer (10x) 2.50 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.00 μ L, 模板(20 ng/ μ L) 2.00 μ L, 引物F (10 μ mol/L) 1.00 μ L, 引物R (10 μ mol/L) 1.00 μ L, TaKaRa Pyrobest 酶(5 U/ μ L) 0.125 μ L, 总量25.00 μ L。PCR循环梯度反应参数: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 28个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min, 保持10 $^{\circ}$ C直到反应完成。

1.4 PCR扩增提纯和焦磷酸测序

取5 μ L PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。使用AMPure Beads对PCR产物进行纯化, 除去扩增引物和缓冲液; 纯化后, 使用分光光度计确定DNA的浓度, 将所有扩增产物等量(100 ng)混合于1个管中。扩增产物在上海派森诺生物科技有限公司使用454 GS-FLX (454 Life Sciences/Roche Diagnostics, CT, USA)测序, 读长为400 bp。

1.5 Tpb55菌株16S rDNA V1-V3测序

使用细菌基因组提取试剂盒(Sangon Biotech)提取Tpb55菌株基因组DNA, 以Tpb55基因组作为

PCR扩增模板, 参照1.3方法PCR扩增Tpb55 16S rDNA V1-V3区, 测序工作由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.6 序列数据分析

通过Qiime^[20]和Mothur^[21]软件中uchime^[22]的方法对原始序列进行过滤和去除嵌合体。去除的序列包括: (1) 5'端引物错配碱基数大于1的序列; (2) 模糊碱基或单碱基高重复区大于6的序列; (3) 平均质量分数小于25; (4) 长度小于等于200 bp或者长度大约等于1000 bp的序列; (5) 嵌合体。

在Qiime中调用uclust^[23]的方法对优质序列按相似度0.97进行聚类, 选取每个类最长的序列为代表序列。同时采用BLAST的方法对序列数据库^[24]进行比对, 获得每个OTU分类学信息。使用稀释曲线^[25]和Chao 1指数和ACE指数表示物种的丰富度^[26], Mothur程序得出OTU维恩图^[27]和物种多样性Shannon指数^[26]。以Tpb55 16S rDNA V1-V3区扩增序列为参照, 采用BLAST的方法对OTU序列数据库进行比对, 获取与Tpb55菌株16S rDNA V1-V3区序列同源的OTU。

1.7 样品群落组成分析

对OTU表利用Qiime生成不同分类水平上(门、纲、目、科、属)的物种丰度表和多样物种分布图^[28]。

2 结果和分析

2.1 测序信息

通过对土壤细菌16S rDNA的高度变异区V1-V3区的测序分析,共检测了3个时间点6个土壤样品,对原始序列整理和过滤后,6个样品一共获得73722条有效序列,其中优质序列为41207条,占有有效序列55.90%(表1)。每个样品包括11412–13242条有效序列,优质序列范围在6260–7236之间。处理和对照优质序列长度分别集中于361–421和445–520之间,所有样品中有效序列和优质序列最高的为7月17日对照土壤样品,最低的为7月29日的对照样品。

2.2 细菌群落的丰富度和多样性

处理和对照丰富度指数呈相反的变化趋势。处理的丰富度指数逐渐增加,Chao 1和ACE处理前分别为2665和2605,处理后22 d分别增加到2848和2798,增幅分别为6.87%和7.41%。对照丰富度指数逐渐降低,Chao 1和ACE分别由7月7日的2618和2501下降到7月29日的2263和2179,降幅分别达13.56%和12.87%。类似地,处理和对照的Shannon指数也呈不同的变化趋势。处理的Shannon指数逐渐增加,7月7日Shannon指数6.92,7月17日和7月29日分别增加到6.95和7.02。对照的Shannon指数则由7月7日的6.86,小幅上升至7月17日的6.91,然后快速下降至7月29日的6.69。

在相似度97%下将获得的序列聚类为OUT (Operational Taxonomic Units),统计每个采样时间点不同样品的OTU数目(表1),各样品OTU数目分布在2351–2844之间,数目最多的样品编号是7月29日处理样品,最少的是7月29日的对照样品。处理前、处理后10 d和处理后22 d,处理和对照间特有的OTU数目分别为2081、2044、2230和1840、2072、1737(图1),共有的OTU数目分别为651、627和614。不同处理的土壤样品OTUs数量变化有明显差异(图1)。处理的OTUs数量先下降

后上升,但波动范围较窄(2671–2844)。对照的OTUs在处理10 d由2491上升至2699,处理后22 d下降到2351,波动较大(2351–2699)。

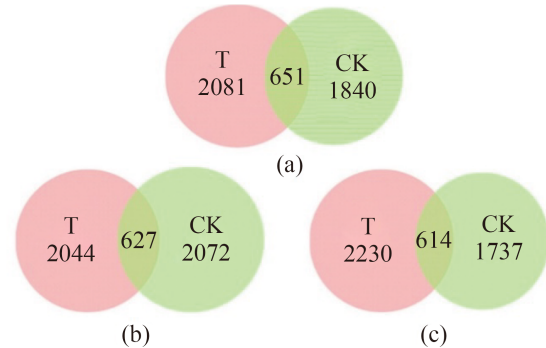


图 1. 0.97相似度下不同采样时间点样品间venn图

Figure 1. Venn diagrams between the treated and control samples under 0.97 sequence similarity level at different time. T: Tpb55 treatment; CK: control.

将每个样品测序获得的优质序列(6260–7236)用于评价细菌多样性。如图2所示,6个样品的稀释曲线趋于平缓,但均未达到饱和,OTU数目分别达到Chao 1和ACE指数估计数目的95.1%–104.4%和99.6%–111.4%,说明测序深度基本能完整反映细菌群落多样性。

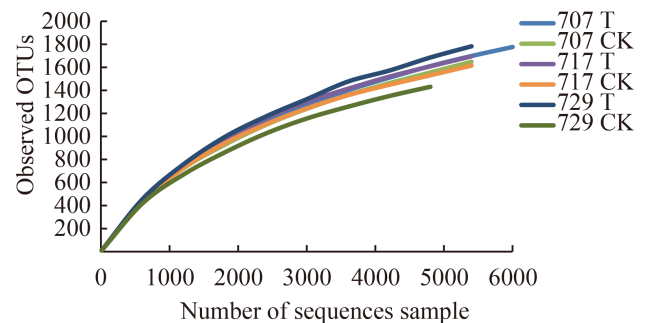


图 2. 不同样品的稀释曲线

Figure 2. The rarefaction curves of different samples. T: Tpb55 treatment; CK: control.

2.3 细菌群落分布和组成

41207优质序列共归属细菌的25个门,83个纲,155个目,237个科,351个属。图3显示了3个采样时间点处理和对照细菌在门的分类水平上的相对

丰度。各个样品中百分含量均大于1%的细菌类群有放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、

芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)。

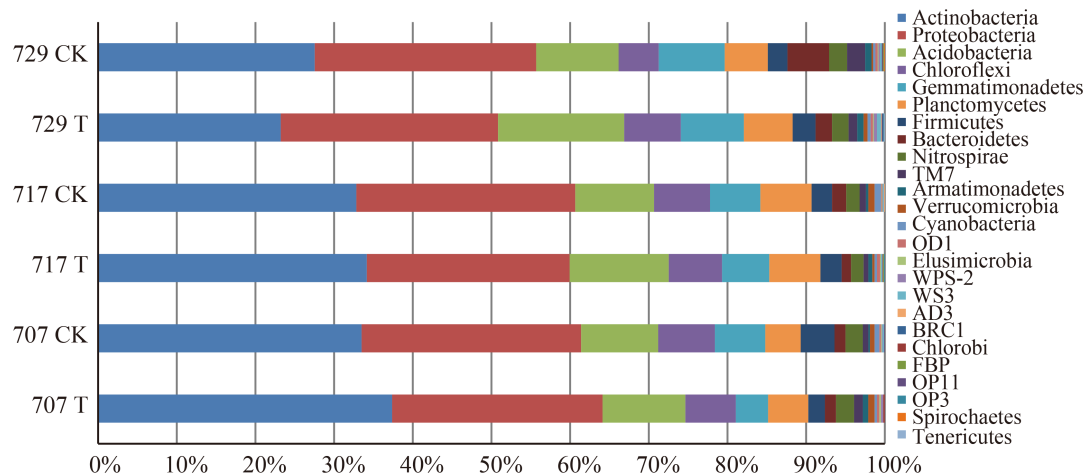


图 3. 门分类水平下不同样品中细菌分布图

Figure 3. The distribution of bacteria at phylum level in different samples. T: Tpb55 treatment; CK: control.

不同取样时间点各样品细菌类群所占比例有较大差别。7月7日，处理和对照的优势菌群分别为放线菌门、变形菌门和酸杆菌门，其中放线菌门为第一优势菌群，在处理和对照中所占比例分别为37.3%和33.5%。随后，放线菌门含量不断下降，至7月29日取样时，放线菌门比例分别下降至23.2% (处理)和27.6% (对照)，以处理的下降幅度最大(-14.1%)。变形菌门在处理和对照中含量均呈小幅上升趋势，分别从25.8%上升至27.6%和从27.8%上升至28.2%，并取代放线菌门成为第一优势菌群。酸杆菌门含量在Tpb55处理中变化明显，其所占比例不断上升，由7月7日的10.5%增加至7月29日的16%；而对照中酸杆菌门比例则相对稳定(9.8%–10.5%)。前10大菌群中，处理的绿弯菌门、厚壁菌门比例逐渐增加，而对照相反；芽单胞菌门、拟杆菌门比例在处理和对照中变化趋势一致，均逐渐增加，但对照拟杆菌门比例增加幅度(由1.4%增加至5.3%)显著高于处理(由1.4%增加至2.1%)；处理和对照中浮霉菌门和硝化螺旋菌门比例则均相对稳定。

在科的水平上，所有的序列分为237个科，表2列出了占比排在前14位的科。7月7日，处理和对照丰富度最大的科均为小单孢菌科(Micromonosporaceae) (大于5%)；7月17日，Gaiellaceae成为处理优势菌群；7月29日，处理和对照丰富度最大的科分别为Koribacteraceae和Gaiellaceae。对照中，随病害发展，Koribacteraceae和鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)丰富度呈上升趋势，其中以Koribacteraceae上升最为明显(1.50%至3.8%)；慢生根瘤菌科(Bradyrhizobiaceae)、弗兰克氏菌科(Frankiaceae)、草酸杆菌科(Oxalobacteraceae)和芽孢杆菌科(Bacillaceae)丰富度均呈下降趋势，其中以芽孢杆菌下降最为明显，从3.2%下降到1.5%；链霉菌科(Streptomyetaceae)含量呈先上升后下降的趋势，3个时间点百分含量分别为1.2%、1.6%和1.2%。T中，小单孢菌科、类诺卡氏菌科(Nocardioideaceae)、地嗜皮菌科(Geodermatophilaceae)、链霉菌科和弗兰克氏菌科丰富度呈下降趋势，以小单孢菌科下降最为明显；生丝微菌科(Hyphomicrobiaceae)、鞘脂单胞

表2. 不同时间点科分类水平下前14个优势群落统计
Table 2. Relative abundance (%) of 14 most abundant family presented at different time

Family	7 July <i>B. subtilis</i>	Control	17 July <i>B. subtilis</i>	Control	29 July <i>B. subtilis</i>	Control
Micromonosporaceae	5.80	3.10	3.10	6.20	2.50	2.10
Gaiellaceae	5.30	4.60	5.60	3.80	4.50	5.00
Nocardiodiaceae	3.60	4.00	3.10	2.80	2.00	3.20
Geodermatophilaceae	3.30	2.40	2.40	1.60	1.70	2.70
Koribacteraceae	3.30	1.50	2.60	2.30	4.90	3.80
Rhodospirillaceae	3.10	2.20	2.30	3.20	2.60	1.50
Streptomycetaceae	2.70	1.20	1.90	1.60	1.20	1.20
Hyphomicrobiaceae	2.60	4.00	2.70	2.10	2.80	2.50
Nitrospiraceae	2.30	1.80	1.50	1.60	2.00	2.30
Sphingomonadaceae	2.10	3.60	2.30	3.90	2.70	4.00
Bradyrhizobiaceae	2.00	2.00	1.10	1.70	1.50	1.30
Frankiaceae	2.00	1.50	1.20	1.30	0.90	1.20
Oxalobacteraceae	1.90	2.80	1.80	2.00	1.70	1.40
Bacillaceae	1.80	3.20	2.20	2.10	2.30	1.50

菌科和芽孢杆菌科呈上升趋势，草酸杆菌科相对稳定(波动范围1.7%–1.9%)。

2.4 不同时间黑胫病病情指数统计

对照和处理样品黑胫病病情指数如表3所示，对照烟田7月24日开始出现烟草病株，随后病情快速发展，至8月11日，病情指数达38.52。10⁸ CFU/mL 枯草芽孢杆菌Tpb55处理烟田8月1日开始发病，且病情发展缓慢，至8月11日病情指数为5.29，显著低于对照烟田的病情指数，表明枯草芽孢杆菌Tpb55菌剂对烟草黑胫病有良好的防治效果。

表3. 不同时间黑胫病病情指数统计
Table 3. Black shank disease index of different treatments

Treatment	17 July	29 July	1 August	11 August
CK	0a	1.73a	20.26a	38.52a
T	0a	0b	0.90b	5.29b

T: Tpb55 treatment; CK: control. Different small letters in the same column meant significant difference at 0.05 lever ($P < 0.05$).

2.5 Tpb55菌株16S rDNA V1-V3区扩增产物同源OTU序列

Tpb55 16S rDNA V1-V3区PCR产物获得516 bp片段，以该PCR产物为参照，使用BLAST 2.2.31+软件在OTU序列数据库中进行序列相似性比对，共获得76个高度同源OTU ($E < 10^{-10}$)。其中，枯草芽孢杆菌Tpb55菌株7月17日处理OTU数目为31，7月29日处理OTU数目为45，呈增加趋势。

3 讨论

高通量测序具有测序通量高、实验过程简化、速度快、准确率高等技术优点^[29]。本实验室前期采用的ARDRA方法分析枯草芽孢杆菌Tpb55施用50 d后对烟草根围土壤微生物多样性的影响^[18]，每个样品平均获得74.5个OTU，划分为12个细菌门。而本研究在病情发展过程中设置3个取样时间点，分别从施用Tpb55菌剂0 d、10 d和22 d后

深入分析细菌群落变化。通过高通量测序获得了更多的原始序列, 平均每个样品OTU数为2631, 划分为25个门, 83个纲, 155个目, 237个科, 351个属, 数据更为精确全面。此外, 序列比对发现, 处理后10 d和22 d的OTU序列数据库中与Tpb55 16S rDNA V1-V3区PCR产物的高度同源OTU数目分别为31和45, 间接证明Tpb55能在烟草根际定殖, 这与盆栽试验结果一致^[30]。

本试验中各样品优势菌群(含量大约9%)均为放线菌门、变形菌门、酸杆菌门, 但是其比例有较大差异。这与前人^[31-33]研究结果一致, 其分别报道了放线菌门、变形菌门、酸杆菌门为不同土壤类型的优势菌群。放线菌门是土壤细菌含量相对较大的菌门。放线菌是抗生素的主要产生菌, 土壤中放线菌数量及拮抗放线菌的比例, 对调整土壤微生物生态平衡起着至关重要的作用^[34]。对照和处理中放线菌门比例均明显下降, 但在处理中的放线菌门降幅更大, 有可能是Tpb55分泌抗菌物质对放线菌门具有抑制作用。特定的细菌, 如变形菌门和酸杆菌门, 可以用作土壤养分状况的指示菌^[26]。酸杆菌在土壤中普遍存在^[35-36], 多存活于营养贫乏的土壤的环境中^[37], 其丰富度与碳可用性呈负相关^[38]。枯草芽孢杆菌Tpb55处理导致酸杆菌门比例明显上升, 反映出土壤中有效营养物质下降, 表明Tpb55对该种群有促进作用。变形菌门已被认为是世界上最普遍的菌门^[39]。之前报道的大部分变形菌门与碳的利用性有关^[38]。处理和对照中的变形菌门比例变化幅度较小, 说明Tpb55处理对变形菌门相对丰度无明显影响。枯草芽孢杆菌Tpb55有利于烟草根围土壤厚壁菌门丰富度增加, 处理中芽孢杆菌科呈现不断上升趋势, 可能与枯草芽孢杆菌Tpb55在烟草根围定殖有关。此外, 草酸杆菌科^[40]是一类土壤生态多样性的重要指示菌, 处理中草酸杆菌科比例较为稳定(波动范围在1.7%–1.9%), 而对照比例急剧下

降, 这表明Tpb55促进了土壤细菌群落结构的相对稳定。

OTU的丰度可以初步反应不同样品的物种丰富度^[32], 丰富度指数和多样性指数则显示了群落结构的变化。随着时间的推移, 处理的Chao 1指数在不断的增长, 而对照不断下降。处理的Shannon指数同样也显示出了和Chao 1指数一样的趋势, 从最初的6.9186增长到最后的7.0199。对照的Shannon指数在7月17日有小幅增加, 随后大幅下降到6.6889。以上结果表明, 施用枯草芽孢杆菌Tpb55明显提高烟草根围土壤细菌的丰富度和多样性, 这一研究结果与游偲等^[18]、Sang等^[41]研究结果一致。

土壤微生物多样性对维持土壤健康和抑制植物病害非常重要^[42-43]。已有研究表明, 微生物多样性的降低是土传病害发生的重要原因^[44]。同样地, 本研究中随着烟草黑胫病病情的逐渐发展, 对照的Shannon指数也逐渐降低。大量研究表明, 添加外源生防微生物能提高植物根围土壤微生物种群多样性和丰富度, 从而抑制病害的发生和发展。谭兆赞等^[45]发现向土壤中施入复合菌剂, 提高了土壤微生物群落的多样性, 并延缓了青枯病发病时间, 降低发病率。有研究表明青枯病病原菌很难在土壤微生物多样性高的土壤中繁殖^[46], 说明微生物多样性的提高可能是生防菌的重要作用机制。本研究中, 施用枯草芽孢杆菌Tpb55对烟草黑胫病有较好的防治效果, 能减轻发病程度, 延迟发病时间(表3)。与上述研究结果一致, Tpb55处理后, 烟草根围细菌丰富度、多样性和群落结构稳定性均明显提高, 暗示这可能是其重要生防作用机制。

参考文献

- [1] Zhang WY, Liu M, Yin FQ, Zhao YF, Liu CK. Study on the cultural characteristics of *Phytophthora parasitica* var.

- nicotianae*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2013, (19): 135–136. (in Chinese)
- 张文友, 刘铭, 尹福强, 赵云飞, 刘朝科. 烟草黑胫病菌培养特性的研究. *现代农业科技*, 2013, (19): 135–136.
- [2] Chen RT, Zhu XC, Wang ZF, Guo ZY, Dong HS, Wang LZ, Liu YR, Shi JK. A report of investigating and studying tobacco infectious diseases of 16 main tobacco producing provinces (regions) in China. *Chinese Tobacco Science*, 1997, (4): 1–7. (in Chinese)
- 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 郭振业, 董汉松, 王兰珍, 刘延荣, 石金开. 全国16个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告. *中国烟草科学*, 1997, (4): 1–7.
- [3] Wang HC, Li WH, Feng YG, Shi JX. History and current status of chemical control of tobacco black shank. *Acta Tabacaria Sinica*, 2011, 17(5): 96–102. (in Chinese)
- 汪汉成, 李文红, 冯勇刚, 石俊雄. 烟草黑胫病化学防治的历史与现状. *中国烟草学报*, 2011, 17(5): 96–102.
- [4] Meng JY, Wang HC, Jia MA, Cao Y, Shang SH, Zhao Y. Resistance of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* to metalaxyl in Guizhou province. *Plant Protection*, 2014, 40(5): 168–171. (in Chinese)
- 孟建玉, 汪汉成, 贾蒙鹭, 曹毅, 商胜华, 赵阳. 贵州省烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗药性. *植物保护*, 2014, 40(5): 168–171.
- [5] Ge YH, Zhao YH, Chen LJ, Miu J, Wen L. Autoinduction of pyoluteorin and correlation between phenazine-1-carboxylic acid and pyoluteorin in *Pseudomonas* sp. M18. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 441–446. (in Chinese)
- 葛宜和, 赵彦宏, 陈丽娟, 缪静, 温鲁. 藤黄绿脓菌的自诱导及假单胞菌M18抗生物物质代谢相关性初步分析. *微生物学报*, 2007, 47(3): 441–446.
- [6] Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1999, 74(1/3): 65–76.
- [7] Huang HJ, Ye WH. Exotic invasion and species diversity. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(2): 121–126. (in Chinese)
- 黄红娟, 叶万辉. 外来种入侵与物种多样性. *生态学杂志*, 2004, 23(2): 121–126.
- [8] Yao XH. Advancement of methods in studying soil microbial diversity. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 2008, 27(S1): 84–88. (in Chinese)
- 姚晓华. 土壤微生物群落多样性研究方法及其进展. *广西农业生物科学*, 2008, 27(S1): 84–88.
- [9] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143–169.
- [10] Liu ZZ, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD, Knight R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(18): e120.
- [11] Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *The ISME Journal*, 2009, 3(4): 442–453.
- [12] Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 2009, 184(2): 449–456.
- [13] Zhao QY, Ran W, Wang H, Li X, Shen QR, Shen SY, Xu YC. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. *BioControl*, 2013, 58(2): 283–292.
- [14] Cao GQ, Zhang XH, Zhong L, Lu ZX. A modified electrotransformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(5): 1047–1051.
- [15] Zhang CS, Kong FY, Liu CK, Wang FL, Zhang L, Qian YM. Anti-TMV activity of *Bacillus subtilis* strain Tpb55. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24(S1): 50–54. (in Chinese)
- 张成省, 孔凡玉, 刘朝科, 王凤龙, 张林, 钱玉梅. 枯草芽孢杆菌Tpb55抗烟草普通花叶病毒活性研究. *中国生物防治*, 2008, 24(S1): 50–54.
- [16] Zhang CS, Kong FY, Liu CK, Du WM, Li WG, Wang J. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* Tpb55 strain on *Alternaria alternata* growth and the colonization of the strain on tobacco leaf. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(6): 1178–1181. (in Chinese)
- 张成省, 孔凡玉, 刘朝科, 杜卫民, 李文刚, 王静. Tpb55菌株对烟草赤星病菌的影响及其在烟草叶表的定殖. *生态学杂志*, 2009, 28(6): 1178–1181.
- [17] 关小红. 枯草芽孢杆菌Tpb55抗菌物质纯化及特性的初步研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2008.
- [18] You C, Zhang LM, Ji SG, Gao JM, Zhang CS, Kong FY. Impact of biocontrol agent *Bacillus subtilis* on bacterial

- communities in tobacco rhizospheric soil. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(11): 3323–3330. (in Chinese)
- 游偲, 张立猛, 计思贵, 高加明, 张成省, 孔凡玉. 枯草芽孢杆菌菌剂对烟草根际土壤细菌群落的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(11): 3323–3330.
- [19] Zhang CS, Kong FY. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, 2014, 82: 18–25.
- [20] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [21] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537–7541.
- [22] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194–2200.
- [23] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [24] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403–410.
- [25] Amato KR, Yeoman CJ, Kent A, Righini N, Carbonero F, Estrada A, Gaskins HR, Stumpf RM, Yildirim S, Torralba M, Gillis M, Wilson BA, Nelson KE, White BA, Leigh SR. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1344–1353.
- [26] Sun H, Terhonen E, Koskinen K, Paulin L, Kasanen R, Asiegbu FO. The impacts of treatment with biocontrol fungus (*Phlebiopsis gigantea*) on bacterial diversity in Norway spruce stumps. *Biological Control*, 2013, 64(3): 238–246.
- [27] Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1935–1943.
- [28] Oberauer L, Zachow C, Lackner S, Högenauer C, Smolle KH, Berg G. The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing. *Scientific Reports*, 2013, 3: 1413.
- [29] Yang J, Zhou GY, Tian YY, Liu QL, Liu CF, Yang Q, Zhou JC. Differential analysis of soil bacteria diversity in different mixed forests of *Dalbergia odorifera*. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(24): 8117–8127. (in Chinese)
- 杨菁, 周国英, 田媛媛, 刘倩丽, 刘成锋, 杨权, 周洁尘. 降香黄檀不同混交林土壤细菌多样性差异分析. *生态学报*, 2015, 35(24): 8117–8127.
- [30] Han T, You C, Zhang LM, Feng C, Zhang CS, Wang J, Kong FY. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *BioControl*, 2015, DOI: 10.1007/s10526-015-9705-0.
- [31] Zhao G, Ma F, Sun T, Li SB, You K, Zhao Z. Analysis of microbial community in a full-scale biogas digester of cold region using high-throughput sequencing technology. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2014, 46(4): 36–42. (in Chinese)
- 赵光, 马放, 孙婷, 李树本, 游空, 赵贞. 基于高通量测序的寒地沼气池微生物群落解析. *哈尔滨工业大学学报*, 2014, 46(4): 36–42.
- [32] 李桥. 基于高通量测序技术下土壤微生物群落结构的研究. 山东师范大学硕士学位论文, 2014.
- [33] Han YF, Yi WH, Wang WB, Wang YP, Wang HT. Soil bacteria diversity in continuous cropping poplar plantation by high throughput sequencing. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, 2014, 49(5): 1–6. (in Chinese)
- 韩亚飞, 伊文慧, 王文波, 王延平, 王华田. 基于高通量测序技术的连作杨树人工林土壤细菌多样性研究. *山东大学学报(理学版)*, 2014, 49(5): 1–6.
- [34] Zhang HY, Xue QH, Tang M, Wang LN, Duan CM. Study on actinomycetic ecology in soil with the different cultivating years of ginseng. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2010, 38(8): 151–159. (in Chinese)
- 张鸿雁, 薛泉宏, 唐明, 王玲娜, 段春梅. 不同种植年限人参地

- 土壤放线菌生态研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(8): 151–159.
- [35] Neufeld JD, Mohn WW. Unexpectedly high bacterial diversity in arctic tundra relative to boreal forest soils, revealed by serial analysis of ribosomal sequence tags. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 5710–5718.
- [36] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 2007, 1(4): 283–290.
- [37] Dion P. Extreme views on prokaryote evolution//Dion P, Nautiyal C S. *Microbiology of Extreme Soils*. Berlin Heidelberg: Springer, 2008.
- [38] Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354–1364.
- [39] Spain AM, Krumholz LR, Elshahed MS. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *The ISME Journal*, 2009, 3(8): 992–1000.
- [40] Ofek M, Hadar Y, Minz D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae). *PLoS One*, 2012, 7(7): e40117.
- [41] Sang MK, Kim KD. Plant growth-promoting rhizobacteria suppressive to *Phytophthora* blight affect microbial activities and communities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum* L.) in the field. *Applied Soil Ecology*, 2012, 62: 88–97.
- [42] Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42(1): 243–270.
- [43] Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëgne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 2009, 321(1/2): 341–361.
- [44] Mazzola M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42(1): 35–59.
- [45] Tan ZZ, Xu GM, Liu KX, Liao ZW. Effects of different composts on control of Tomato Bacterial Wilt and soil microbial functional diversity. *Journal of South China Agricultural University*, 2009, 30(2): 10–14. (in Chinese)
谭兆赞, 徐广美, 刘可星, 廖宗文. 不同堆肥对番茄青枯病的防病效果及土壤微生物群落功能多样性的影响. 华南农业大学学报, 2009, 30(2): 10–14.
- [46] Shiomi Y, Nishiyama M, Onizuka T, Marumoto T. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3996–4001.

Correlation between root irrigation of *Bacillus subtilis* Tpb55 and variation of bacterial diversity in tobacco rhizosphere

Teng Han¹, Limeng Zhang², Jiaming Gao³, Fanyu Kong¹, Chao Feng¹, Jing Wang¹, Chengsheng Zhang^{1*}

¹ Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring & Integrated Management, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China

² Yunnan Tobacco Company in Yuxi, Yuxi 653100, Yunnan Province, China

³ Hubei Tobacco Company, Wuhan 430000, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] The impact of inoculation with the biocontrol agent *Bacillus subtilis* on bacterial communities in rhizospheric soil of *Nicotiana tabacum* was assessed by using 454 pyrosequencing technology. The control effect of Tpb55 on tobacco black shank was also studied. [Methods] Two treatments were done as follows: irrigating root with *Bacillus subtilis* strain Tpb55 inoculants (10^8 CFU/mL) and the control. Soil samples from tobacco rhizosphere were collected at 0d, 10d and 22 d after the treatment. Genomic DNA of soil samples was extracted and amplified for the 16S rDNA V1–V3 tags, and then the tags were sequenced by 454 sequencing. Qiime was used to analyze soil bacterial diversities. [Results] A total of 41207 high quality sequences were obtained from all samples, which were classified into 25 phyla. The dominant bacteriophyta were Actinobacteria, Proteobacteria and Acidobacteria in all samples. The content of Actinobacteria was decreased gradually in the development of disease, whereas Proteobacteria showed an opposite tendency. Acidobacteria revealed a marked increase and exceeded control in content after inoculation with Tpb55. The control showed a significant decline in Bacillaceae, as well as Oxalobacteraceae which was known as an indicator for bacterial diversity. However, Bacillaceae showed an increasing tendency and Oxalobacteraceae was relatively constant in Tpb55 treatment. The Chao 1, ACE and Shannon index of treatment showed a constant improvement of variety and richness. In 10 d and 22 d after Tpb55 inoculation, the number of sequences with high homology of V1–V3 regions of Tpb55 16S rDNA was 31 and 45, respectively. The disease index of tobacco black shank in inoculated tobacco (5.29) was significantly lower than the control (38.52). [Conclusion] Tpb55 could improve the diversity of soil bacterial community and ecosystem stability, which presented a possible reason for its biocontrol efficacy on tobacco black shank.

Keywords: 454 pyrosequencing, bacterial community, *Bacillus subtilis*, tobacco

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000878)

*Corresponding author. Tel: +86-532-88702115; Fax: +86-532-88701030; E-mail: zhangchengsheng@caas.cn

Received: 27 July 2015; Revised: 3 December 2015; Published online: 11 January 2016