



水肥菌一体化番茄基质栽培系统青枯病病株和健株根际微生物群落结构的差异

郑雪芳, 陈燕萍, 肖荣凤, 刘欣, 江城, 王阶平*, 刘波*

福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003

郑雪芳, 陈燕萍, 肖荣凤, 刘欣, 江城, 王阶平, 刘波. 水肥菌一体化番茄基质栽培系统青枯病病株和健株根际微生物群落结构的差异. 微生物学报, 2022, 62(4): 1524–1535.

Zheng Xuefang, Chen Yanping, Xiao Rongfeng, Liu Xin, Jiang Cheng, Wang Jieping, Liu Bo. Difference of rhizobacterial community structure between bacterial wilt infected and healthy tomato plants in a substrate culture system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1524–1535.

摘要:【目的】探究水肥菌一体化基质栽培系统番茄青枯病害发生与根际群落结构的相互关系。【方法】通过田间病情调查, 统计番茄青枯病发病率和病情指数, 进而利用高通量测序技术比较分析感染青枯病和健康番茄植株根际基质细菌群落结构多样性和组成。【结果】番茄植株在生殖生长期(移栽后 60 d)的发病率(6.17%)和病情指数(5.11)均大于营养生长期(移栽后 30 d) (分别为 2.5%和 1.25)。青枯雷尔氏菌在发病初期(1 级和 2 级)植株根际分布数量显著大于发病后期(3 级和 4 级)。病株根际基质 Chao1 指数和 Shannon 指数均显著低于健株根际基质。与健株根际基质相比, 病株根际基质中变形菌门(*Proteobacteria*)的相对含量极显著增加, 放线菌门(*Acidobacteria*)和蓝细菌门(*Cyanobacteria*)的相对含量极显著降低($P < 0.01$), 罗纳杆菌属(*Rhodanobacter*)和病原菌所在雷尔氏菌属(*Ralstonia*)相对含量显著增高, 冗余分析(redundancy analysis, RDA)显示其与青枯雷尔氏菌的分布数量呈正相关, 而慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、粒状胞菌属(*Granulicella*)、海管菌属(*Haliangium*)和德沃斯氏菌属(*Devosia*)含量显著降低($P < 0.05$), RDA 分析显示其与青枯雷尔氏菌的分布数量呈负相关。【结论】番茄感染青枯病后根

基金项目: 福建省自然科学基金(2019J01117); 福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2021R1034003); 福建省农业科学院对外合作项目(DWHZ2021-07)

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2019J01117), by the Special Fund for Scientific Research Institutes in the Public Interest of Fujian Province (2021R1034003) and by the Foreign Cooperation Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (DWHZ2021-07)

*Corresponding authors. Tax: +86-591-87303675; E-mail: WANG Jieping, wangjpf@foxmail.com, LIU Bo, laeptb@163.com

Received: 20 August 2021; Revised: 1 November 2021; Published online: 14 December 2021

际基质微生物多样性和有益菌群数量显著降低, 因此, 可以通过添加有益菌, 调控土壤微生物群落组成来抵御土传青枯病害。

关键词: 番茄青枯病; 青枯雷尔氏菌; 根际; 根际细菌群落结构; 高通量测序

Difference of rhizobacterial community structure between bacterial wilt infected and healthy tomato plants in a substrate culture system

ZHENG Xuefang, CHEN Yanping, XIAO Rongfeng, LIU Xin, JIANG Cheng, WANG Jieping*, LIU Bo*

Agricultural Bio-Resources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China

Abstract: [Objective] To investigate the relationship between rhizobacterial community structure and bacterial wilt occurrence of tomato plants in a substrate culture system with the integration of water, fertilizers, and biocontrol agents. [Methods] After the field survey, the disease incidence (DI) and disease severity index (DSI) of bacterial wilt were calculated. Furthermore, the high-throughput sequencing technology was adopted to compare the rhizobacterial diversity and composition between infected and healthy tomato plants. [Results] The DI (6.17%) and DSI (5.11) of tomato plants at the reproductive stage were significantly higher than those at the vegetative stage (DI of 2.5% and DSI of 1.25, respectively). The number of *Ralstonia solanacearum* in the rhizosphere of diseased tomato plants at the early infection stage (grades 1 and 2) was much higher than that at the later infection stage (grades 3 and 4). Both Chao 1 and Shannon indexes of bacteria in the rhizosphere of diseased tomato plants were significantly lower than those in the rhizosphere of health plants. Compared with that in the rhizosphere of healthy plants, the relative abundance of *Proteobacteria* increased while that of *Acidobacteriota* and *Cyanobacteria* decreased ($P < 0.01$); the relative abundance of *Rhodanobacter* and *Ralstonia* significantly increased, which was positively correlated with the number of *R. solanacearum* as demonstrated by redundancy analysis; the relative abundance of *Bradyrhizobium*, *Granulicella*, *Haliangium*, and *Devosia* significantly decreased ($P < 0.05$), which was negatively correlated with the number of *R. solanacearum*. [Conclusion] Compared with those in the rhizosphere of healthy plants, the bacterial diversity and beneficial bacteria in the rhizosphere of tomato plants infected with bacterial wilt significantly reduced. Therefore, the addition of beneficial bacteria to change rhizobacterial community structure would be an efficient method to control tomato bacterial wilt.

Keywords: tomato bacterial wilt; *Ralstonia solanacearum*; rhizosphere; rhizobacterial community structure; high-throughput sequencing

设施土壤栽培, 由于多年连作, 土壤板结、土传病害发生严重, 如番茄的连茬种植使得青枯病原菌在土壤中的数量不断积累, 导致青枯

病的大面积爆发^[1]。连作障碍的防控技术主要包括轮作换茬、伴生、土壤消毒、土壤改良等^[2-3], 这些方法取得了一定成效, 但不能从根

本上解决连作障碍。无土栽培是解决土壤连作障碍最有效的方法之一^[4]。水肥菌一体化基质栽培系统是利用物联网技术设计的水肥菌一体化装备,根据地理气候、作物种类和生长阶段进行施肥灌溉,获得作物高产,已成为我国现代农业发展的趋势^[5]。

番茄青枯病是由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种毁灭性的土传病害,该病害堪称“植物癌症”,一旦发病就难以控制^[6]。病原青枯雷尔氏菌主要通过土壤侵染作物根系,其在土壤中存活能力强,因此防治极为困难。目前,对该病害的一些防治措施主要包括农业防治(如嫁接、抗病育种、土壤改良、轮作套种等)、化学防治、生物防治(如芽胞杆菌、链霉菌等生防菌的利用)等^[7]。其中,抗病育种是防治番茄青枯病的理想途径,但由于青枯病原菌寄主范围广,国内外育种专家虽做了大量工作,但能供生产上使用的抗病品种不多^[8];化学防治见效快,但污染环境且危害人类健康,因此,有必要开辟更多的防治途径。

根际是受植物根分泌物影响、紧靠根部的狭小土壤区域,是土壤微生态系统的重要组成部分^[9]。根际庞大而复杂的微生物群落被称为作物的第二基因组,主要包括细菌、真菌、卵菌、线虫、原生动物、藻类、病毒、古生菌、节肢动物等^[10]。作为植物-土壤互作的热点区域,根际栖息着较土体土壤更丰富的微生物群落,是土传病原物入侵作物根系的必经之路^[11]。近年来,随着根际微生物组的深入研究,科学家提出通过调节土壤原著微生物群落增强土壤自身的免疫能力,以实现土传病害的控制^[11-12]。

本研究调查水肥菌一体化基质栽培系统番茄的生长状况,采集感染青枯病和健康的番茄植株根际基质土,采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,比较分析病株和健株根际基质细菌

群落结构组成及多样性,为番茄青枯病的有效控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

水肥菌一体化装备由福建大丰收灌溉科技有限公司生产,包括了增压装备、过滤装备、控制装备、五桶菌肥装备等;番茄(*Solanum lycopersicum* L. cv. Beiyong)种苗购自厦门如意种苗高科技股份有限公司;栽培基质购自厦门江平生物基质技术股份有限公司。盛绿佳农微生物菌肥购自河北田佳力有限公司。

青枯雷尔氏菌 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)固体培养基^[13]: 10 g 蛋白胨, 1 g 酪朊水解物, 5 g 葡萄糖, 17 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水, pH 7.4, 121 °C 灭菌 20 min。灭菌后冷却至 55 °C 左右加入已灭菌的 1% 的 TTC 水溶液,其终浓度为 0.005%。青枯雷尔氏菌 SP (sucrose peptone) 液体培养基: 5 g 蛋白胨, 20 g 蔗糖, 0.5 g KH_2PO_4 , 0.25 g MgSO_4 , 1 000 mL 蒸馏水, pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验地点

田间试验选址在福建福州宦溪镇降虎村(北纬 25°15', 东经 118°08', 海拔 600 m)属南亚热带季风性湿润气候,年平均温度 19 °C,年平均降雨量达 1 500 mm。

1.3 试验设计

设计了水肥菌一体化基质栽培系统,包括了设施大棚、水肥菌一体化装备、栽培架设施等。大棚面积 266.67 m²,选取相邻 3 个大棚(编号 1[#]、2[#]、3[#])为试验田块,2021 年 5 月 15 日种植,采用基质栽培模式,即将 10 kg 栽培基质装置于 50 cm (长)×35 cm (宽)×27 cm (高)的塑料框中,每框种植 2 株番茄苗,每大棚种植 400 株。移栽后,每周施肥配方如下:营养元

素和微生物菌剂的五桶配制系统(每个桶 200 kg 水): A 桶: 硝酸钙 7.0 kg, 硝酸铵 3.9 kg; B 桶: 磷酸二氢钾 1.9 kg; C 桶: 硫酸镁 4.5 kg, 硼酸 45.76 g, 钼酸铵 0.32 g; D 桶: 螯合铁 320 g, 螯合锰 25.83 g, 螯合锌 3.5 g, 螯合铜 1.28 g; E 桶: 盛绿佳农微生物菌肥 2.0 kg; 通过水肥菌一体机滴灌施肥水。

1.4 田间病害调查及样本采集

分别于 2021 年 6 月 15 日(营养生长期)和 2021 年 7 月 15 日(生殖生长期)调查 3 个试验大棚青枯病发病情况, 根据病情程度可分为 5 个级别^[14]: 健株(0 级); 植株有 1–2 个枝条出现萎蔫症状(1 级); 植株有 3–5 个枝条出现萎蔫症状(2 级); 植株整体出现枯萎状态, 植株中 1–2 个叶片干枯、退绿、变黄(3 级); 植株全部叶片萎蔫、退绿, 茎秆干枯退绿, 植株茎部无法正常挺直(4 级)。统计青枯病发病率(disease incidence, DI)和病情指数(disease severity index, DSI)(公式 1–2)。

$$DI(\%) = \frac{\text{发病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100 \quad (\text{公式 1})$$

$$DSI = \frac{\sum(\text{病级数} \times \text{发病株数}) \times 100}{\text{最高级} \times \text{总株数}} \quad (\text{公式 2})$$

采集生殖生长期番茄根际基质样本, 每个试验大棚随机选取不同发病级别植株各 5 株, 将整株挖出, 抖去松散基质, 收集附着根上的基质为小样, 再将相同大棚采集相同发病等级植株根际基质小样分别混合、拌匀、去砂砾和植物残体, 过 2 mm 筛后, 于 4 °C 冰箱保存, 用于青枯病原菌分离鉴定; 另将病株(1、2、3、4 发病等级)根际土样混合, 3 个大棚病株根际基质样本分别编号 D1[#]、D2[#]和 D3[#], 健株(0 级)根际基质样本编号 H1[#]、H2[#]和 H3[#], 用于高通量测序。

1.5 番茄根际基质青枯病原菌分离与鉴定

称取 10 g 基质样本, 用无菌水进行 10×梯度稀释后, 取 200 μL 稀释液涂布于 TTC 培养

基上进行青枯病原菌的分离。每个处理重复 3 次, 置于(30±1) °C 人工气候箱内培养 48 h 后, 观察菌落的形态, 计算活菌数及每克基质青枯雷尔氏菌数量。

分离的青枯雷尔氏菌采用水煮法提取 DNA^[15]。采用青枯雷尔氏菌的特异性检测引物 *pehA#6* 和 *pehA#3* 对分离的菌株进行分子检测, 引物设计参见文献[16], 以 GMI1000 为参比菌株(阳性对照)。25 μL 的 PCR 反应体系中包括: 10×Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, ddH₂O 18.7 μL 和 10 mmol/L 引物对各 1 μL, 2.5 U *Taq* 酶, 25 ng DNA 模板。PCR 反应程序为: 96 °C 预变性 1 min; 96 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 1 min, 重复 2 个循环; 94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 1 min, 重复 33 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物的检测: PCR 产物点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶, 以 100 bp DNA Ladder Marker 作为标准分子量, 80 V 电压、1 倍 TAE 缓冲液中电泳 1 h, EB 染色后, 在自动凝胶成像分析系统上观察、拍照。

1.6 16S rRNA 基因高通量测序

供试基质微生物多样性检测, 由北京奥维森基因科技有限公司完成。选取细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区, 利用 Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台测序, 16S rRNA 基因引物为 520 F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') 和 806 R (5'-TAC NVG GGTATCTAATCC-3')。PCR 反应体系为 (25 μL): 12.5 μL KAPA 2G Robust Hot Start Ready Mix, 上下游引物(5 μmol/L)各 1 μL, 2 μL 模板 DNA 和 8.5 μL 无菌水。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 复性 45 s, 28 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.7 数据处理

通过 Illumina MiSeq 平台进行 paired-end

测序,下机数据经过 QIIME (v1.8.0)软件过滤、拼接、去除嵌合体,去除打分低于 20、碱基模糊、引物错配或测序长度小于 150 bp 的序列。根据 barcodes 归类各处理组序列信息聚类为用于物种分类的 OTU (operational taxonomic units), OTU 相似性设置为 97%。对比 silva 数据库,得到每个 OTU 对应的物种分类信息。再利用 Mothur 软件(v1.31.2)进行 α 多样分析(包括 Shannon、Simpson 和 Chao1 等)。使用 Canoco 5.0 软件进行冗余分析(redundancy analysis, RDA),用于辨别番茄根际微生物群落组成与青枯雷尔氏菌分布数量的相关性。试验数据采用 Excel 2007 和 DPS 7.05 软件进行系统处理和统计分析, LSD 法检验 $P=0.05$ 水平的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 番茄田间青枯病发病率与病情指数分析

番茄田间青枯病病情调查结果如表 1 所示,营养生长期植株的发病率为 2.50%,病情指数是 1.25,生殖生长期植株的发病率为 6.17%,病情指数为 5.11,随着番茄的生长发病率逐渐提高;番茄植株在生殖生长期的发病率和病情指数均大于营养生长期,且 3 级和 4 级的发病植株数量分别是营养生长期的 4.55 倍和 14.00 倍。

2.2 番茄青枯病病株与健株根际基质青枯雷尔氏菌的分布特征

2.2.1 青枯雷尔氏菌的鉴定

从番茄青枯病病株与健株根际基质共分

离到 44 株经形态鉴定为青枯雷尔氏菌的菌株,且均为强致病力菌株的形态特征,即菌落呈不规则形状或近圆形,流动性强,中间为粉红色,白边较宽,菌落表面湿润(图 1A);进一步进行分子鉴定,43 株供试菌株与阳性对照 GMI1000 经青枯雷尔氏菌特异检测引物 *pehA#6/pehA#3* 的 PCR 扩增出一条约 500 bp 的特异性靶带,1 株供试菌株与阴性对照(不加 DNA 样品)没有扩增出相应条带(图 1B),表明 44 株分离菌株中有 43 株确认为青枯雷尔氏菌,占比 97.73%。

2.2.2 青枯雷尔氏菌分布特征

青枯雷尔氏菌在不同发病级别番茄植株根际基质的分布数量不同(图 2)。不同发病级别植株根际基质均有青枯雷尔氏菌的分布,分布数量为 $6.67 \times 10^3 - 7.13 \times 10^6$ CFU/g,发病级别 2 的番茄根际基质分布的青枯雷尔氏菌最多,为 7.13×10^6 CFU/g,显著大于其他发病级别和健株的青枯雷尔氏菌分布数量($P < 0.05$)。3 级和 4 级植株根际基质青枯雷尔氏菌分布数量相当,显著低于 1 级和 2 级发病植株根际基质($P < 0.05$)。健株根际基质青枯雷尔氏菌分布数量最低,为 6.67×10^3 CFU/g,比其他发病级别植株根际基质土降低约 1 000 倍。表明健株根际基质青枯雷尔氏菌数量低于 10^4 CFU/g,病株根际基质青枯雷尔氏菌数量高于 10^6 CFU/g,且随着病情发展,1 级到 2 级青枯雷尔氏菌数量增加,2 级到 3-4 级数量下降。

表 1 3 个试验大棚的番茄青枯病发病率和病情指数

Table 1 Disease incidence and disease severity index of tomato bacterial wilt in the three test greenhouses

Growth stage	Percentage of plants with different disease grades (average \pm SD)/%					DI/%	DSI
	0 grade	1 st grade	2 nd grade	3 rd grade	4 th grade		
Vegetative stage	97.50 \pm 0.90	1.00 \pm 0.87	0.92 \pm 0.29	0.33 \pm 0.14	0.25 \pm 0.01	2.50 \pm 0.90	1.25 \pm 0.23
Reproductive stage	93.83 \pm 0.58	0.42 \pm 0.14	0.75 \pm 0.25	1.50 \pm 0.50	3.50 \pm 0.87	6.17 \pm 0.58	5.11 \pm 0.60

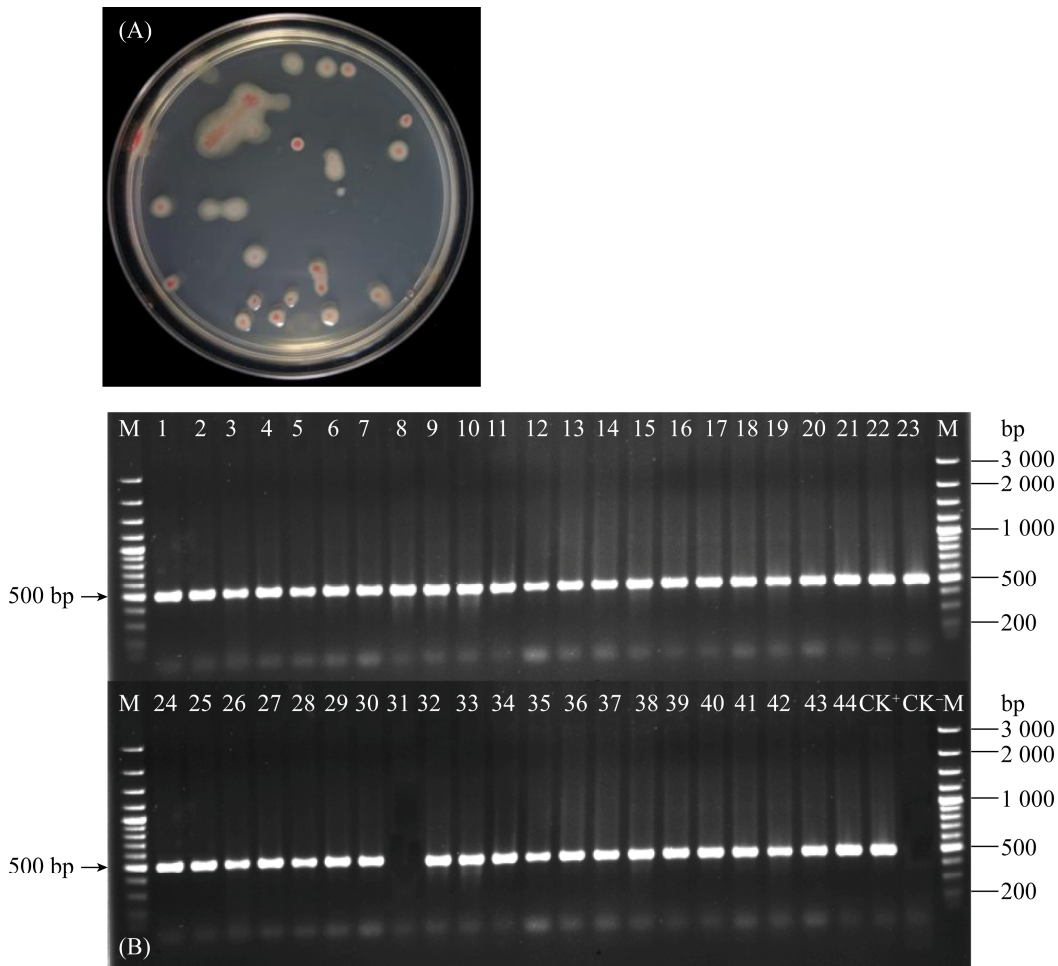


图 1 青枯雷尔氏菌的形态鉴定(A)和分子鉴定(B)

Figure 1 Morphological (A) and molecular identification (B) of *Ralstonia solanacearum*. M: DNA marker; lane 1–44: the tested isolates; CK⁺: positive control GMI1000 template; CK⁻: negative control distilled water.

2.3 番茄青枯病病株与健株根际基质细菌群落丰富度及多样性指数差异

稀释曲线能反映样品文库测序数据量的合理性。供试 6 个基质样品的稀释曲线均平缓, 表明当前测序深度已足够反映样本所包含微生物多样性。Chao 1 指数能够体现微生物的群落丰富度, 而 Shannon 和 Simpson 指数主要体现微生物的群落多样性。病株根际基质 Chao 1 指数 (1 954.82) 和 Shannon (8.72) 指数均显著低于健株根际 (分别为 2 181.67 和 9.36), 而 Simpson 在病株和健株基质样本中差异不显著 (表 2), 表

明番茄植株感染青枯病后, 根际微生物丰富度 (Chao 1) 和多样性指数 (Shannon) 均降低, 微生物丰富度 (Chao 1) 的病健比达 0.98 (Chao 1_病/Chao 1_健), 微生物多样性指数 (Shannon) 病健比达 0.93, 番茄发病。

2.4 番茄青枯病病株与健株根际基质细菌群落组成结构的差异

番茄青枯病病株与健株根际基质相对含量高的前 5 个细菌门均为变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、酸杆菌门 (*Acidobacteriota*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*) 和疣微菌门

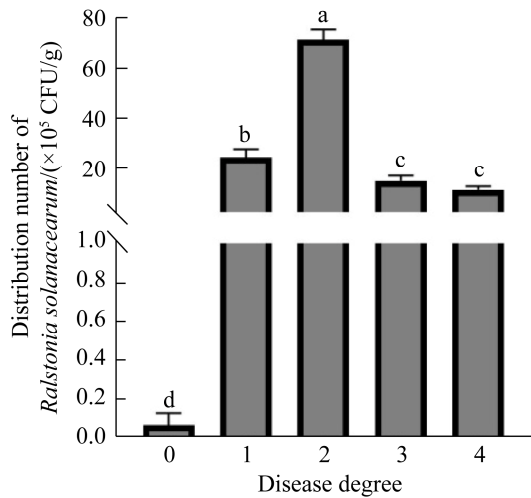


图 2 青枯病不同发病级别植株根际基质青枯雷尔氏菌的分布数量

Figure 2 Distribution number of *R. solanacearum* in the rhizosphere substrate of tomato plants with different disease degree. Different letters above each bar indicate significant difference at $P < 0.05$ level by LSD test.

(*Verrucomicrobiota*), 这 5 个门在病株和健株根际基质的相对总含量分别为 83.77%和 81.86% (图 3)。变形菌门在病株根际基质的相对含量 (56.89%)极显著高于其在健株根际基质的相对含量 (47.64%) ($P < 0.01$), 放线菌门和蓝细菌门 (*Cyanobacteria*)在病株根际基质的相对含量 (3.29%和 0.93%)极显著低于其在健株根际基质的相对含量 (5.53%和 4.10%) ($P < 0.01$); 表明青枯病的发生与根际优势微生物含量变化相关, 与变形菌门含量成正比, 与放线菌门和蓝细菌门含量成反比。

番茄健株根际基质共检测到 448 个属, 病

株根际基质共检测到 398 个属, 其中有 392 个属共同存在于病株和健株根际基质中。在共有的相对丰度最高的前 20 个属中, 罗纳杆菌属 (*Rhodanobacter*)在病株根际基质的相对含量显著高于健株 ($P < 0.05$), 海管菌属 (*Haliangium*)、德沃斯氏菌属 (*Devosia*)和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)在病株根际基质的相对含量显著低于健株 ($P < 0.05$), 粒状胞菌属 (*Granulicella*)在病株根际基质的相对含量极显著低于健株 ($P < 0.01$) (图 4)。此外, 青枯病原菌所在属 *Ralstonia* 在病株根际基质的相对含量为 0.3%, 极显著高于其在健株根际基质的相对含量 (0.004%) ($P < 0.01$)。

土源杆菌属 (*Chthonobacter*)、沙单胞菌属 (*Arenimonas*)、食螯合剂菌属 (*Chelativorans*)、粉色单胞菌属 (*Roseomonas*)、候选属 UBA6140、根瘤菌科未分类的 1 属 uncultured *Rhizobiaceae bacterium*、鼎湖山杆菌属 (*Dinghuibacter*)、金色线菌属 (*Chryseolinea*)、特吕珀菌属 (*Truepera*)、脂环酸芽胞杆菌属 (*Alicyclobacillus*)为病株根际基质特有的细菌属, 这 10 个属中 6 个归类于变形菌门 (*Proteobacteria*)、2 个归类于拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、1 个归类于异常球菌门 (*Deinococcota*)和 1 个归类于厚壁菌门 (*Firmicutes*); 候选属 *Candidatus Captivus*、候选属 *Candidatus Omnitrophus*和未培养的厌氧氨氧化细菌属 uncultured *anaerobic ammoniumoxidizing bacterium* 为健株根际基质特有的细菌属, 这 3 个属分别归类于变形菌门 (*Proteobacteria*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*)和绿弯菌门 (*Chloroflexi*)。

表 2 病株与健株根际基质细菌群落 alpha 多样性指数

Table 2 Alpha diversity of rhizosphere substrate sample from bacterial wilt infected and healthy tomato plants

Samples	Chao1	Simpson	Shannon
Rhizosphere substrate of diseased tomato plants	1 954.82±96.55 b	0.99±0.00 b	8.72±0.14 b
Rhizosphere substrate of healthy tomato plants	2 181.67±85.83 a	0.10±0.01 a	9.36±0.21 a

Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by LSD test.

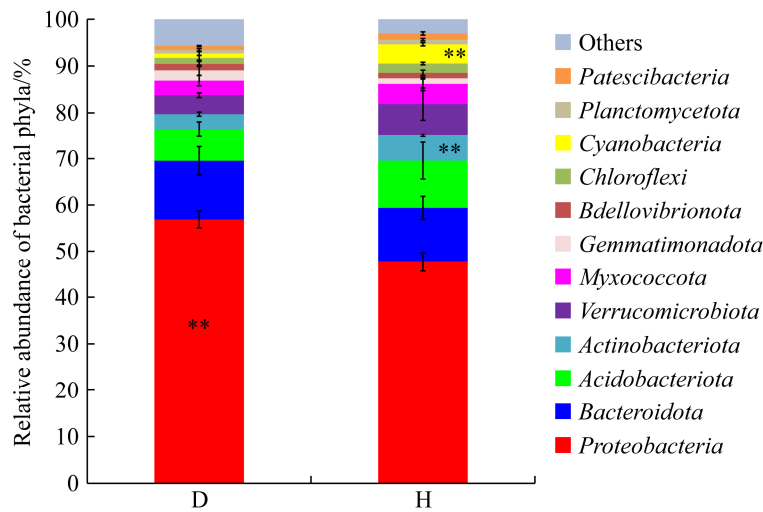


图 3 番茄青枯病病株与健株根际基质细菌门的相对丰度

Figure 3 Relative abundances of bacterial phyla in the rhizosphere substrate of bacterial wilt infected and healthy tomato plants. D: rhizosphere substrate sample from bacterial wilt infected tomato plant; H: rhizosphere substrate sample from healthy tomato plant. ** $P < 0.01$.

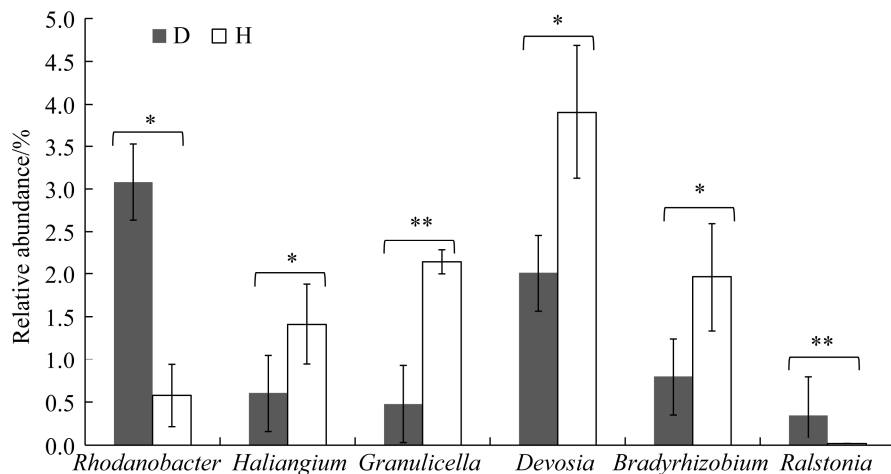


图 4 番茄青枯病病株与健株根际基质差异显著关键属的相对丰度

Figure 4 Relative abundance of some key bacterial genera with significant difference in rhizosphere substrate from bacterial wilt infected and healthy tomato plants. D: rhizosphere substrate sample from bacterial wilt infected tomato plant; H: rhizosphere substrate sample from healthy tomato plant. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

2.5 番茄根际细菌群落与青枯雷尔氏菌分布的关系

通过对番茄根际细菌群落与青枯雷尔氏菌分布数量进行冗余分析(redundancy analysis, RDA)可以看出(图 5), 第一主成分和第二主成

分对细菌群落结构变化总解释率为 69.79%。罗纳杆菌属(*Rhodanobacter*)和雷尔氏菌属(*Ralstonia*)的相对含量与青枯雷尔氏菌分布数量呈较大正相关, 相关系数(r^2)分别为 0.77 和 0.84, 表明这 2 个属的细菌相对含量增加会促进青枯雷尔氏

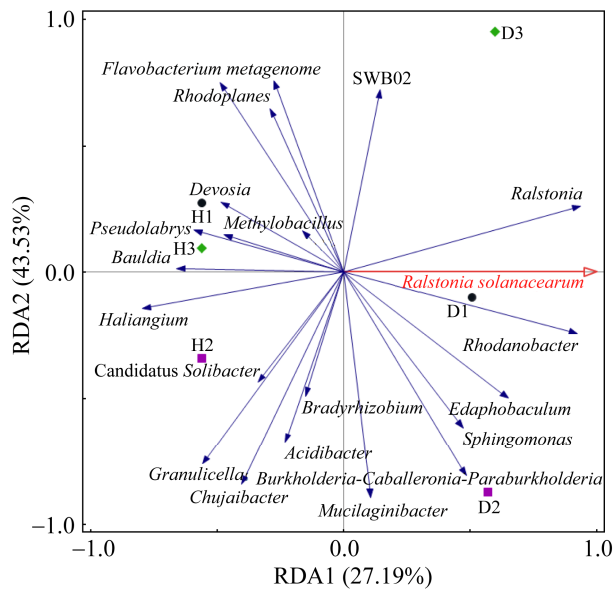


图 5 番茄根际基质细菌群落组成(属水平)与青枯雷尔氏菌分布数量的冗余分析

Figure 5 Redundancy analysis (RDA) of bacterial community composition (at the genus level) and the distribution number of *R. solanacearum*.

菌的生长。德沃斯氏菌属(*Devosia*)、甲基芽胞杆菌属(*Methylobacillus*)、假双头斧形菌属(*Pseudolabrys*)、鲍尔德氏菌属(*Bauldia*)和海管菌属(*Haliangium*)呈较大负相关, r^2 值分别为-0.26、-0.37、-0.71、-0.88 和-0.94, 表明这些属的菌相对含量增加会抑制青枯雷尔氏菌的生长。

3 讨论与结论

本研究发现, 水肥菌一体化基质栽培系统中番茄仍有一些植株感染青枯病(营养生长期和生殖生长期发病率分别为 2.50%和 6.17%), 推测可能种苗带有青枯病原菌。研究发现, 番茄青枯病发病植株, 不同发病等级的番茄植株根际基质土均含有一定数量的青枯雷尔氏菌, 且均为强致病力菌株。健康根际基质也检测到青枯雷尔氏菌, 但分布量低(6.67×10^3 CFU/g), 其数量可能尚未达到青枯病症状出现的阈值;

葛慈斌等^[17]认为, 青枯雷尔氏菌浓度对青枯病病程的潜伏期有一定的影响, 浓度越低潜伏期越长。2 级病株根际基质土中青枯雷尔氏菌分布数量最多, 其次是 1 级植株根际。随着病情加重(3 级、4 级), 植株根际基质土的病原菌数量反而降低, 说明番茄植株根际基质病原菌的数量和病害严重程度并非成正相关性, 此结果与刘波等^[18]和 Zheng 等^[19]的研究结果一致, 刘波等比较了青枯雷尔氏菌在不同寄主、不同发病状态以及不同生育期植株体内的分布, 结果发现青枯雷尔氏菌在寄主植株体内呈现出明显的生态位分化的特征, 随着病害严重程度的增加, 青枯雷尔氏菌的数量下降, 但同时致病力加强。

许多研究表明, 植物根际土壤群落结构的 alpha 多样性与植株健康呈正相关^[20-21], alpha 多样性高的土壤比多样性低的土壤更能抵御病原菌的侵染^[22-23], 健康植株比病株根际土壤具有更高的微生物丰度和多样性^[24-25]。Garbeva 等^[26]指出, 根际土壤细菌多样性高能抑制土传病害的发生, 本研究同样发现基质栽培系统的番茄健康根际基质的 Chao1 和 Shannon 多样性指数显著高于感染青枯病植株的根际基质, 证实了细菌多样性与生态系统生产力之间存在的正相关关系^[25]。

土传病害的发生与土壤环境, 特别是微生物群落结构密切相关^[27]。Raaijmakers 等^[12]指出, 土壤微生物群落结构及组成对于番茄抵御青枯病菌的侵染有重要影响。沈宗专等^[25]研究表明, 与健康番茄根际土壤相比, 病株番茄根际土壤变形菌门的相对丰度显著增高而拟杆菌门相对丰度显著降低。向立刚等^[28]研究表明, 感染青枯病烟株根际土壤较健康烟株根际土壤变形菌门增加 4.47%、酸杆菌门增加 1.48%、放线菌门降低 6.42%, 感染青枯病茎秆较健康烟株茎秆中变形菌门增加 28.60%、蓝细菌门降低

34.49%。本研究结果与前人研究结果相一致, 感染青枯病植株的根际基质土中变形菌门相对丰度极显著高于健株, 而放线菌门和蓝细菌门则极显著低于健株。变形菌门细菌是最为普遍的细菌种类^[29], 在碳、氮、硫循环中起重要作用^[30]。本研究中感染青枯病和健康的番茄根际基质土中变形菌门均为优势细菌门, 病株根际基质土变形菌门相对丰度增加可能与青枯雷尔氏菌的侵染有关^[28]。放线菌门和蓝细菌门细菌含量通常代表土壤的健康状况^[31], 本研究证实健康的番茄根际放线菌门和蓝细菌门相对含量显著高于感染青枯病番茄植株的根际基质土。

本研究发现, 与健株根际相比, 病株根际罗纳杆菌属(*Rhodanobacter*)相对含量显著增高, 而慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、粒状胞菌属(*Granulicella*)、海管菌属(*Haliangium*)和德沃斯氏菌属(*Devosia*)含量显著降低。RDA 显示, 罗纳杆菌属相对含量与番茄根际青枯雷尔氏菌分布数量呈正相关, 慢生根瘤菌属、粒状胞菌属、海管菌属和德沃斯氏菌属相对含量均与番茄根际青枯雷尔氏菌分布数量呈负相关。罗纳杆菌属具有氨氧化、亚硝酸氧化和反硝化功能^[32], 是土壤氮转化的主要参与者^[33]。赖宝春等^[34]研究发现患枯萎病辣椒植株根际产黄杆菌属的相对丰度比健株根际增加 3.56%。根瘤菌和寄主植株产生互利共生关系, 具有固氮作用, 能有效促进植物生长^[35]; 根瘤菌分类上目前有 17 个属, 其中慢生根瘤菌属细菌是常见的土壤微生物, 因其缓慢的生长速度而得名^[36]。粒状胞菌属和嗜盐囊菌属都是土壤中有益细菌, 在健株根际基质土中的相对含量高于病株^[37-38]。此外, 本研究中青枯病原菌所在雷尔氏菌属(*Ralstonia*)在病株根际基质的相对含量极显著高于健株, 与向立刚等^[28]、沈宗专等^[25]的研究结果相吻合。

本研究只是对生殖生长期感染青枯病番茄

植株与健株根际微生物群落组成及多样性进行了初步比较分析。然而, 番茄根际微生物的群落结构与植株健康状况、土壤类型、根际养分和作物生长发育时期等密切相关^[26,39]。因此, 在后续研究中将对不同生长期、不同发病程度及不同基质类型栽培番茄根际微生物区系展开研究, 以期更深入揭示番茄青枯病害发生与微生物区系之间的关系。

参考文献

- [1] Yadessa GB, Van Bruggen AHC, Ocho FL. Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92(2): 439–450.
- [2] Renaud M, Chelinho S, Alvarenga P, Mourinha C, Palma P, Sousa JP, Natal-da-Luz T. Organic wastes as soil amendments-effects assessment towards soil invertebrates. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 330: 149–156.
- [3] 孟天竹, 郭德杰, 王光飞, 马艳. 土壤消毒结合施用生物有机肥对西瓜病土改良效果的影响. *土壤*, 2020, 52(3): 494–502.
Meng TZ, Guo DJ, Wang GF, Ma Y. Effect of combination of soil disinfection and bioorganic fertilizer application on improving watermelon diseased soil. *Soils*, 2020, 52(3): 494–502. (in Chinese)
- [4] 毛丽萍, 赵婧, 仪泽会. 设施番茄简易基质栽培技术. *现代园艺*, 2019, 42(17): 65–66.
Mao LP, Zhao J, Yi ZH. Simplified cultivation of greenhouse tomato using substrates. *Xiandai Horticulture*, 2019, 42(17): 65–66. (in Chinese)
- [5] 曹少娜, 李建设, 高艳明, 吴素萍, 刘梦锦, 李娟. 水分传感器埋设位置对温室基质栽培番茄生长特性的影响. *浙江农业学报*, 2017, 29(6): 933–942.
Cao SN, Li JS, Gao YM, Wu SP, Liu MJ, Li J. Effects of embedding position of moisture sensors on growth characteristics of tomato in substrate culture in greenhouse. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(6): 933–942. (in Chinese)
- [6] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 1991, 29: 65–87.
- [7] Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM, Jones JB. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum*

- population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease*, 2003, 87(4): 423–427.
- [8] 汪国平, 林明宝, 吴定华. 番茄青枯病抗性遗传研究进展. *园艺学报*, 2004, 31(3): 403–407.
Wang GP, Lin MB, Wu DH. Classical and molecular genetics of bacterial wilt resistance in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(3): 403–407. (in Chinese)
- [9] Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van Der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(11): 789–799.
- [10] Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 634–663.
- [11] 韦中, 沈宗专, 杨天杰, 王孝芳, 李荣, 徐阳春, 沈其荣. 从抑病土壤到根际免疫: 概念提出与发展思考. *土壤学报*, 2021, 58(4): 814–824.
Wei Z, Shen ZZ, Yang TJ, Wang XF, Li R, Xu YC, Shen QR. From suppressive soil to rhizosphere immunity: towards an ecosystem thinking for soil-borne pathogen control. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(4): 814–824. (in Chinese)
- [12] 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.
- [13] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 1954, 44: 693–695.
- [14] Roberts DP, Denny TP, Schell MA. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(4): 1445–1451.
- [15] 程本亮, 车建美, 刘波. 青枯雷尔氏菌 Tn5 转座子无致病力突变株构建及其生物学特性. *农业生物技术学报*, 2011, 19(1): 26–35.
Cheng BL, Che JM, Liu B. Construction of avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* by Tn5 transposon and analysis of its biological characteristics. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(1): 26–35. (in Chinese)
- [16] Gillings M, Fahy P, Davies C. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Letters in Applied Microbiology*, 1993, 17(1): 44–48.
- [17] 葛慈斌, 刘波, 朱育菁, 林营志, 肖荣凤. 青枯雷尔氏菌致病力的番茄组培苗鉴定方法研究. *武夷科学*, 2004, 20: 13–16.
Ge CB, Liu B, Zhu YJ, Lin YZ, Xiao RF. Study on the methods on identifying the virulence of *Ralstonia solanacearum* using tissue cultured tomatoes. *Wuyi Science Journal*, 2004, 20: 13–16. (in Chinese)
- [18] 刘波, 朱育菁, 林抗美, 肖荣凤, 葛慈斌, 蓝江林, 冒乃和. 青枯雷尔氏菌在植株体内分布及其致病力的异质性研究. *中国农业科学*, 2007, 40(7): 1559–1566.
Liu B, Zhu YJ, Lin KM, Xiao RF, Ge CB, Lan JL, Mao NH. Study on numerical and pathogenic variations of *Ralstonia solanacearum* distributed within the tissue of host plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(7): 1559–1566. (in Chinese)
- [19] Zheng XF, Zhu YJ, Liu B, Zhou Y, Che JM, Lin NQ. Relationship between *Ralstonia solanacearum* diversity and severity of bacterial wilt disease in tomato fields in China. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162(9): 607–616.
- [20] Luan FG, Zhang LL, Lou YY, Wang L, Liu YN, Zhang HY. Analysis of microbial diversity and niche in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton at the flowering stage in southern Xinjiang. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 1602–1611.
- [21] Poudel R, Jumpponen A, Schlatter DC, Paulitz TC, Gardener BBM, Kinkel LL, Garrett KA. Microbiome networks: a systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management. *Phytopathology*, 2016, 106(10): 1083–1096.
- [22] Fargione JE, Tilman D. Diversity decreases invasion via both sampling and complementarity effects. *Ecology Letters*, 2005, 8(6): 604–611.
- [23] Van Elsas JD, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottova D, Kristufek V, Salles JF. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(4): 1159–1164.
- [24] Zheng XF, Liu B, Zhu YJ, Wang JP, Zhang HF, Wang ZR. Bacterial community diversity associated with the severity of bacterial wilt disease in tomato fields in southeast China. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(7): 538–549.
- [25] 沈宗专, 黄炎, 操一凡, 王东升, 刘红军, 李荣, 沈其荣. 健康与罹患青枯病的番茄土壤细菌群落特征比较. *土壤*, 2021, 53(1): 5–12.
Shen ZZ, Huang Y, Cao YF, Wang DS, Liu HJ, Li R, Shen QR. Comparison of bacterial communities in bulk

- and rhizosphere soils of healthy and diseased tomato infected by bacterial wilt. *Soils*, 2021, 53(1): 5–12. (in Chinese)
- [26] Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 243–270.
- [27] 史普酉, 杨成翠, 贾孟, 白羽祥, 刘棋, 朱宣全, 程亚东, 张金峰, 王润玲, 谭小兵, 杨焕文, 王戈. 不同黑胫病发病程度下植烟根际土壤酶活性及细菌群落结构差异比较. *中国土壤与肥料*, 2020(1): 179–187.
Shi PY, Yang CC, Jia M, Bai YX, Liu Q, Zhu XQ, Cheng YD, Zhang JF, Wang RL, Tan XB, Yang HW, Wang G. Comparison of soil enzyme activity and bacterial community structure in tobacco-growing rhizosphere under different incidence of black shank disease. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(1): 179–187. (in Chinese)
- [28] 向立刚, 周浩, 汪汉成, 李震, 陈乾丽, 余知和. 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. *微生物学报*, 2019, 59(10): 1984–1999.
Xiang LG, Zhou H, Wang HC, Li Z, Chen QL, Yu ZH. Bacterial community structure and diversity of rhizosphere soil and stem of healthy and bacterial wilt tobacco plants. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(10): 1984–1999. (in Chinese)
- [29] Spain AM, Krumholz LR, Elshahed MS. Abundance, composition, diversity and novelty of soil *Proteobacteria*. *The ISME Journal*, 2009, 3(8): 992–1000.
- [30] Rampelotto PH, De Siqueira Ferreira A, Barboza ADM, Roesch LFW. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian savanna under different land use systems. *Microbial Ecology*, 2013, 66(3): 593–607.
- [31] Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. *Actinomycetes* benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 458–467.
- [32] Gao Y, Xie YW, Zhang Q, Wang AL, Yu YX, Yang LY. Intensified nitrate and phosphorus removal in an electrolysis-integrated horizontal subsurface-flow constructed wetland. *Water Research*, 2017, 108: 39–45.
- [33] 李卫平, 张少康, 李晓光, 王凡, 李国文, 郝禹, 张列宇. 低剂量硝酸钙联合低氧曝气对黑臭底泥的修复探究. *环境科学研究*, 2020, 33(4): 940–948.
Li WP, Zhang SK, Li XG, Wang F, Li GW, Hao Y, Zhang LY. Restoration of black-odorous sediment by low-dosage calcium nitrate combined with hypoxic aeration. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(4): 940–948. (in Chinese)
- [34] 赖宝春, 戴瑞卿, 吴振强, 李丰, 林德峰, 王家瑞. 辣椒健康植株与患枯萎病植株根际土壤细菌群落多样性的比较研究. *福建农业学报*, 2019, 34(9): 1073–1080.
Lai BC, Dai RQ, Wu ZQ, Li F, Lin DF, Wang JR. Bacterial diversities in rhizosphere soils at sites of healthy and *Fusarium* wilt infected Chili plants. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 34(9): 1073–1080. (in Chinese)
- [35] 张维, 张利平, 杨润蕾, 吕志堂. 几株弗兰克氏菌的固氮活性. *河北大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(1): 21–24.
Zhang W, Zhang LP, Yang RL, Lü ZT. Nitrogen fixation activity of *Frankia* sp. strains. *Journal of Hebei University: Natural Science Edition*, 2006, 26(1): 21–24. (in Chinese)
- [36] Menna P, Barcellos FG, Hungria M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 12): 2934–2950.
- [37] 熊大维, 金丹凤, 顾斌涛, 黄国昌, 黄筱萍, 刘兰. 柑橘黄龙病赣南脐橙内生菌种群结构分析. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 631–638.
Xiong DW, Jin DF, Gu BT, Huang GC, Huang XP, Liu L. Endophytic bacterial community in Gannan navel orange affected by huanglongbing. *Microbiology China*, 2017, 44(3): 631–638. (in Chinese)
- [38] Kwak MJ, Kong HG, Choi K, Kwon SK, Song JY, Lee J, Lee PA, Choi SY, Seo M, Lee HJ, Jung EJ, Park H, Roy N, Kim H, Lee MM, Rubin EM, Lee SW, Kim JF. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(11): 1100–1109.
- [39] 吴凤芝, 安美君. 西瓜枯萎病抗性及其嫁接对根际土壤微生物数量及群落结构的影响. *中国农业科学*, 2011, 44(22): 4636–4644
Wu FZ, An MJ. Effects of watermelon cultivars with different resistances to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and grafting on rhizosphere soil microorganism population and community structure. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(22): 4636–4644. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)