

抗感枯萎病西瓜根际细菌群落多样性比较

雷娟利 寿伟松 董文其 徐志豪* 张成浩

(浙江省农业科学院蔬菜研究所 杭州 310021)

摘要: 本文通过传统微生物培养方法, 结合现代分子生物学技术对抗感枯萎病西瓜根际可培养细菌群落进行了比较研究。结果表明, 抗病西瓜根际可培养细菌的多样性要高于感病西瓜, 且细菌分布的均匀度也高于感病西瓜。表现为抗病西瓜根际可培养细菌的多样性指数 H' (1.29)和 $1/D$ (30.28)分别高于感病西瓜的 H' (1.12)和 $1/D$ (2.482)。抗病西瓜根际可培养细菌的均匀度指数 E (0.72)也高于感病西瓜的 E (0.69)。抗感西瓜根际分别具有不同的可培养优势群落, 抗病西瓜根际可培养优势基因型为基因型 1, 占 51.1%, 感病西瓜根际可培养优势基因型为基因型 7, 占 58.7%。
关键词: 西瓜根际细菌, 培养, 16S PCR-RFLP, 多样性指数

Comparison of Rhizosphere Bacteria Diversity Between Fusarium Wilt Resistant and Susceptible Watermelon

LEI Juan-Li SHOU Wei-Song DONG Wen-Qi XU Zhi-Hao* ZHANG Cheng-Hao

(Institute of Vegetable, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: The traditional culture methods and the molecular biology methods were used to study the rhizosphere bacterial diversity between fusarium wilt resistant and susceptible watermelon. The results showed that the diversity and the equality of cultured rhizosphere bacteria of resistant watermelon were higher than those of the susceptible watermelon. The reason was that the cultured rhizosphere bacterial diversity index H' and $1/D$ of the resistant watermelon were higher than those of the susceptible watermelon and that the cultured rhizosphere bacterial equality index E of the resistant watermelon were higher than those of the susceptible watermelon. The dominant cultured bacterial genotypes were different between resistant and susceptible watermelon. The genotype 1 is the dominant genotype of resistant watermelon, consists 51.1%. The genotype 7 is the dominant genotype of susceptible watermelon, consists 58.7%.

Keywords: Rhizosphere bacteria of watermelon, Culture, 16S PCR-RFLP, Diversity index

西瓜枯萎病是一种分布较广、危害严重、防治困难的典型的土传病害, 西瓜枯萎病病原菌 (*Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum*) 可在土壤中存活多年, 自身也会不断变异而产生新种群, 目前还没有十分有效的防治方法^[1]。根际微生物群落结构与

土传病害的发生有一定的内在联系, 植物土传病害的发生在一定程度上是根际土壤微生物群体相互作用的结果, 土壤环境中的生物多样性是影响土传病害发生的重要因素^[2,3]。Yoshitaka等^[4]在研究抑病土与诱病土番茄根表及非根际青枯病菌群体的比较时

发现,青枯病菌在抑病土非根际土壤中要比在诱病土非根际土壤中容易存活,而青枯病菌在诱病土番茄根表则比在抑病土番茄根表更容易繁殖。因此得出,抑制病原菌在根表的繁殖是抑病土番茄青枯病发病率比较低的原因之一。而在其随后的研究中发现,在抑病土与诱病土中,番茄根表细菌群落存在显著差异。在诱病土番茄根表中,有一个细菌群体占有绝大多数的比率(73.1%),而在抑病土番茄根表,则细菌群落的分布相对均匀。

目前对于枯萎病抗性的研究大多是从基因水平及生理角度来研究,而未见从微生物种群分布方面来进行的相关研究。因此,本研究拟通过微生物分子生态学的方法,对抗感枯萎病西瓜根际的可培养细菌群落进行比较研究,以期从微生物学角度来阐明枯萎病抗性的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

抗病材料为“Calhoun Gray (卡红)”,感病材料为“sugar baby”。

1.2 取样方法

抗病材料和感病材料分别播种于装有炭化稻壳的育苗盘中,待子叶展开后移植于10 cm × 10 cm的营养钵中,幼苗长至3~4片真叶时进行移栽。移栽后30 d取样,根际土壤的取样方法为,将根系挖出,抖落大土块,收集附着在根系上的土壤作为根际土壤。每6株西瓜根际土壤混合为1个小样,每个处理取3个平行样,分别装入保鲜袋中供测试用。

1.3 微生物的培养及细菌基因组DNA的提取

细菌培养采用牛肉膏蛋白胨培养基^[5]。抗感各取60个左右单克隆进行纯化培养,纯化培养的单克隆经LB培养基扩大培养后,采用CTAB法进行细菌基因组的提取。

1.4 PCR-RFLP 分析

采用引物27F/1492r(表1)^[6]扩增细菌16S rDNA的近全长片段,产物构建克隆。提取质粒鉴定含16S rDNA片段的阳性克隆,用M13±通用引物重新PCR扩增后,产物用Hinf 内切酶进行酶切,酶切完成后,用1.8%琼脂糖凝胶电泳对图谱进行鉴定,对于条带数目与位置相同的,认为其来源于同一细菌16S rDNA PCR-RFLP基因型。对同一基因型的克隆数进行统计,并计算其基因型频率。

1.5 多样性指数计算

香农多样性指数(Shannon diversity index)和辛普森指数(Simpson's index)的计算通过biodap (Bio-diversity Data Analysis Package)软件进行分析。

表 1 用于本研究的引物 Table 1 Primers used in this study	
引物名 Primers	序列 Sequences (5'-3')
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492r	5'-TACGGHTACCTTACGACTT-3'

1.6 测序与序列分析

委托上海生工对主要基因型代表克隆进行测序,所测序列用NCBI的Blast软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列同源性分析,用sequence match 软件(Ribosomal Database Project II-Release 9 website)进行系统分类分析。

2 结果分析

2.1 细菌基因组提取的结果

从图1可以看出,采用CTAB法成功地得到了细菌的基因组DNA,且DNA的纯度也足以达到后续PCR-RFLP分析的要求。

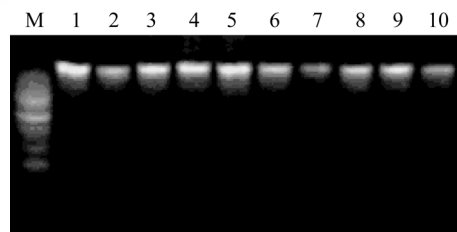


图1 部分细菌基因组DNA

Fig.1 Genomic DNA of some bacterial clone

M: DNA marker; 1-9: Sample DNA

2.2 PCR-RFLP 的结果

利用27F/1492r进行PCR扩增,得到了大小相同的PCR片段。对PCR片段进行Hinf 酶切后,可将片段相同的PCR产物区分开来,如图2所示。

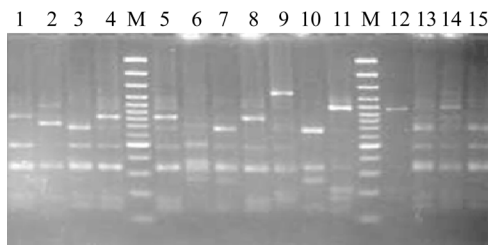


图2 部分RFLP结果

Fig.2 Some RFLP results

M: DNA 标记; 1-15: 酶切产物

M: DNA marker; 1-15: Digested products

2.3 抗感枯萎病西瓜根际可培养细菌群落比较

通过对根际可培养细菌进行 PCR-RFLP 分析, 研究比较了抗感枯萎病西瓜品种根际可培养细菌群落结构的一些特征。如表 2、图 3 所示, 抗病西瓜根际共分析了 45 个细菌克隆, 经 16S rDNA PCR-RFLP 分析后共有 6 种基因型; 感病西瓜根际共分析了 46 个细菌克隆, 经 16S rDNA PCR-RFLP 分析后共有 5 种基因型。在抗病品种中, 基因型 1 的频率最高为 51.1%, 约占总克隆数的一半。基因型频率超过 10% 的还有 2 个, 分别为基因型 3 (22.2%) 和基因型 6 (17.8%), 其余 3 个基因型的频率均小于 5%。在感病品种中, 基因型 7 的频率最高为 58.7%, 约占总克隆数 1/2 还要多。其次超过 10% 的还有基因型 5, 频率为 10.9%, 和基因型 6, 频率为 23.9%。

表 2 抗感枯萎病西瓜根际可培养细菌群落结构比较			
Table 2 Comparison of cultivable rhizosphere bacterial community structure of susceptible and resistant watermelon			
16S rDNA 基因型		抗病品种	感病品种
16S rDNA genotypes		Susceptible cultivar	Resistant cultivar
克隆总数		45	46
Number of clones			
基因型数		6	5
Number of genotypes			
Shannon diversity index	H'	1.29	1.12
	E	0.72	0.69
	VarH'	0.01425	0.01459
Simpson's index(D)	D	0.33	0.403
	1/D	3.028	2.482

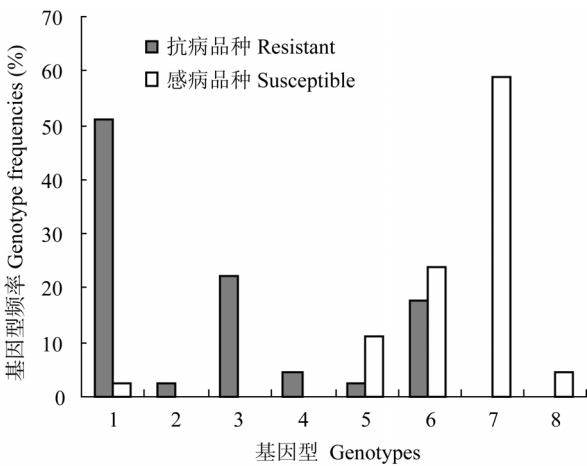


图 3 抗感枯萎病西瓜根际可培养细菌 16S rDNA 基因型频率

Fig. 3 Cultivable rhizosphere bacterial 16S rDNA genotypes frequencies of resistant and susceptible watermelon plants

从香农多样性指数 E 来看(表 2), 抗病品种根表细菌群落分布的均匀度高于感病品种; 从香农多样性指数 H' 和辛普森指数 1/D 来看(表 2), 抗病品种根表细菌群落的多样性也高于感病品种; 另外抗病品种根表的的基因型数(6)也多于感病品种(5)(表 2)。

2.4 抗感青枯病番茄根表细菌类群分析

为了获得更多的系统多样性的信息, 我们对部分基因型的代表共 7 个克隆进行了测序, 测序结果见表 3。将本研究所测序列与 GenBank 数据库中发表的序列进行同源性比对, 同源性在 98% 到 100% 之间, 具有较高的同源性。通过 Ribosomal Database Project II website (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) 的“classifier”程序进行类群推测, 这些序列大多数为 Gammaproteobacteria, 少数为 Alphaproteobacteria 和 Flavobacteria(表 3)。

3 讨论

根际(表)微生物群落结构会影响植物的生长状况, Yoshitaka 等^[4]在比较抑病土与诱病土番茄根表及非根际青枯病菌群体时发现, 抑制病原菌在根表的繁殖是抑病土番茄青枯病发病率比较低的原因之一。在抑病土中番茄根表细菌群落的多样性显著高于在诱病土中番茄根表细菌群落。研究发现, 连续种植 4~5 年抗病西瓜品种的田块, 对病原菌有相当的抑制能力, 相比之下, 连续种植感病西瓜品种的田块则没有这种能力^[7]。不同抗性茄子、棉花品种根分泌物与枯萎病、黄萎病关系的研究结果显示, 抗病品种根分泌物对病菌的孢子萌发、菌丝生长有一定的抑制作用, 而感病品种根分泌物则能刺激病菌生长^[8-10]。从 15 种蔬菜根际上分离出大量对立枯丝核菌有拮抗作用的微生物表明, 其中细菌最多, 放线菌次之, 真菌最少^[11]。对棉花黄萎病抗性与根际微生物的关系研究表明, 棉花对黄萎病的抗性与根际真菌和放线菌数量呈正相关, 与根际线虫数量呈负相关, 与根际细菌数量无显著相关性, 抗病品种根际微生物多于感病品种, 区系组成更为复杂^[12]。这些研究表明, 一方面, 根际(表)微生物群落结构可以影响植物的抗病性, 根际(表)微生物群落越丰富, 病原菌越难存活; 另一方面植物又通过根系分泌物直接对病原菌产生影响或者通过改变根际微生物群落结构来间接对病原菌产生影响, 表现为

表 3 所测 16S rDNA 片段序列
Table 3 Bacterial 16S rDNA fragments sequenced in this study

Sequenced genotype (Clone number)	Sequenced fragments length(bp)	GenBank submission number	The strains or clones which have the highest identify from NCBI (Sequence similarity)	Putative Phylum
R2-2	908	EU407182	Enterobacteriaceae bacterium MB6-1 16S ribosomal RNA gene (DQ436917, 99%) <i>Providencia</i> sp. H2-3 16S ribosomal RNA gene (EF061136, 99%)	Gammaproteobacteria
R4-1	888	EU407183	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene (AJ487027, 99%) <i>Morganella morganii</i> gene for 16S rRNA(AB089246,98%)	Gammaproteobacteria
R12-2	868	EU407184	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. R-24339 partial 16S rRNA gene, strain R-24339(AM231052, 100%) <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> strain AMX 26B 16S ribosomal RNA gene (AF273082, 100%)	Gammaproteobacteria
R17-2	881	EU407185	<i>Myroides odoratimimus</i> partial 16S rRNA gene, type strain CCUG 39352T(AJ854059, 98%) Unidentified bacterium 16S rRNA gene, isolate SS1(AJ223454, 98%)	Flavobacteria
S2-1	901	EU407186	<i>Pseudomonas</i> sp. MAC12A 16S ribosomal RNA gene (EF198249, 99%) <i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-9 16S ribosomal RNA gene (DQ200852, 99%)	Gammaproteobacteria
S27-1	909	EU407187	Uncultured <i>Agrobacterium</i> sp. clone TM9_3 16S ribosomal RNA gene (DQ303314, 99%) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 16S ribosomal RNA gene (DQ468100, 99%)	Alphaproteobacteria
S27-4	919	EU407188	Uncultured <i>Agrobacterium</i> sp. clone TM9_3 16S ribosomal RNA gene (DQ303314, 100%) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 16S ribosomal RNA gene (DQ468100, 99%)	Alphaproteobacteria

抗病品种根际微生物多样性高于感病品种。在本研究中,我们发现,西瓜品种的抗枯萎病性与根际可培养微生物存在着相关性,这表现为:1)抗病品种根际可培养细菌群落分布的均匀度、细菌群落多样性及细菌基因型数均高于感病品种(表 2);2)抗病品种与感病品种分别具有不同的优势基因型,抗病品种的优势基因型是基因型 1,占 51.1%,感病品种的优势基因型是基因型 7,占 58.7%(图 3)。

参 考 文 献

[1] 谢兴刚,王果萍,周小梅,等.西瓜枯萎病防治现状与展望.山西农业科学,2007,35(4):64-67.
[2] Van Veen JA, Van Overbeek LS, Van Elsas JD. Fate and activity of microorganisms introduced into soil microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(2): 121-135.
[3] 蔡燕飞,廖宗文,董春,等.番茄青枯病的土壤微生物防治研究.农业环境保护,2002,21(5):417-420.
[4] Yoshitaka S, Masaya N, Tomoko O, *et al.* Comparison of bacterial community structures in the rhizosphere of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3996-4001.

[5] 赵斌,何绍江.微生物学实验.北京:科学出版社,2002.
[6] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2354-2359.
[7] Larkin RP. Effect of successive watermelon plantings on *Fusarium oxysporum* and other microorganisms in soils suppressive and conducive to *Fusarium* Wilt of watermelon. *Phytopathology*, 1993, 83(10): 1097-1104.
[8] 周宝利,姜荷.不同砧木嫁接茄子抗黄萎病特性及其与根系分泌物关系.沈阳农业大学学报,2001,32(6):414-417.
[9] 刘素萍,王汝贤,张荣,等.根系分泌物中糖和氨基酸对棉花枯萎菌的影响.西北农业大学学报,1998,12(6):30-35.
[10] 袁虹霞,李洪连,王烨,等.棉花不同抗性品种根系分泌物分析及其对黄萎病菌的影响.植物病理学报,2002,5(2):127-131.
[11] 周新根,陈玫.根际微生物对蔬菜苗期立枯丝核菌的生物防治作用.植物保护学报,1994,21(3):200-214.
[12] 李洪连,袁虹霞,王烨,等.根际微生物多样性与棉花品种对黄萎病抗性关系研究,根际微生物数量与棉花品种对黄萎病抗性的关系.植物病理学报,1998,28(4):341-345.