



研究报告

施用 *Streptomyces alfalfae* XY25^T 对根肿病土壤性质及微生物群落的影响

柳凯^{1,2} 季倩茹¹ 陈静¹ 梁运祥¹ 胡咏梅¹ 胡远亮^{*1,2}

1 华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070

2 湖北师范大学生命科学学院 食用野生植物保育与利用湖北省重点实验室 湖北 黄石 435002

摘要:【背景】根肿病是一种世界性土传病害，鄂西高山不少田块大白菜发病率高达 60%，严重制约了当地蔬菜产业的发展。【目的】揭示 *Streptomyces alfalfae* XY25^T 防治过程中土壤理化性质的变化规律及其对根际土壤微生物群落的影响。【方法】大白菜幼苗移栽至病区土壤盆栽中，处理组施用 *S. alfalfae* XY25^T，并设置对照组。移栽后第 7、14、21、28、35 天采集土壤样本，测定根际土壤酶活力和土壤肥力；第 35 天提取土壤 DNA，采用高通量测序技术，结合生物信息学分析，解析大白菜根际土壤细菌和真菌群落结构组成及多样性。【结果】施用 *S. alfalfae* XY25^T 提高了土壤 pH 值、有机质、碱解氮、速效钾和速效磷的含量，比例分别为 10.0%、13.7%、12.0%、41.1% 和 8.71%；增加了蔗糖酶、脲酶、过氧化氢酶和碱性磷酸酶活力，比例分别是 333%、204%、36.1% 和 142%；提高了 *Ascomycota*、*Zygomycota* 及 *Actinobacteria* 菌门的相对丰度，比例分别为 54.1%、22.8% 和 10.7%；降低了 *Acidobacteria* 的相对丰度，比例是 7.59%；提高了 *Penicillium*、*Mortierella*、*Mucor* 和 *Streptomyces* 等菌属的相对丰度，比例分别为 25.5%、14.6%、8.20% 和 7.24%。【结论】施用 *S. alfalfae* XY25^T 改善了土壤理化性质，改变了根际土壤微生物群落结构和多样性。

关键词：根肿病，大白菜，高通量测序，细菌群落，真菌群落

Effect of *Streptomyces alfalfae* XY25^T application on physicochemical properties and microflora in clubroot-diseased soil

LIU Kai^{1,2} JI Qian-Ru¹ CHEN Jing¹ LIANG Yun-Xiang¹ HU Yong-Mei¹
HU Yuan-Liang^{*1,2}

1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

2 Hubei Key Laboratory of Edible Wild Plants Conservation and Utilization, College of Life Sciences, Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, China

Abstract: [Background] Clubroot, one of the most important soil-borne diseases in the world, is posing a

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41601257); Postdoctoral Science Foundation of China (2015M580653)

*Corresponding author: Tel: 86-27-87281040; E-mail: yuanlianghu@yeah.net

Received: 26-03-2019; Accepted: 05-06-2019; Published online: 19-06-2019

基金项目：国家自然科学基金(41601257)；中国博士后科学基金(2015M580653)

*通信作者：Tel: 027-87281040; E-mail: yuanlianghu@yeah.net

收稿日期：2019-03-26; 接受日期：2019-06-05; 网络首发日期：2019-06-19

serious threat to the vegetable farming in the Northwest of Hubei, leading to an incidence rate as high as 60% for Chinese cabbage in many fields. **[Objective]** To study the effects of *Streptomyces alfalfae* XY25^T application on physicochemical properties and microbial community in rhizosphere soil. **[Methods]** Pot experiments of Chinese cabbage were done in greenhouse, using the diseased soil with *S. alfalfae* XY25^T application as the treatment group and the diseased soil without *S. alfalfae* XY25^T application as the control group. On day 7, 14, 21, 28 and 35 after seedling transplantation, soil samples were collected for analysis of the variations in the enzyme activity and nutrient content in the rhizosphere soil. On day 35, the total DNA was extracted from soil samples. The composition and diversity of bacterial and fungal communities were investigated by using high-throughput sequencing technology combined with bioinformatics analysis. **[Results]** Compared with the control, the application of *S. alfalfae* XY25^T increased pH value, content of organic matter, alkali-hydrolysable nitrogen, available potassium, and available phosphorus in the soil by 10.0%, 13.7%, 12.0%, 41.1%, and 8.71%, respectively. It also increased the soil enzyme activity, with an increase of 333%, 204%, and 36.1%, 142% in the soil invertase activity, urease activity, catalase activity, and alkaline phosphatase activity. Moreover, *S. alfalfae* XY25^T application improved the soil microbial community structure and diversity, leading to an increase of 54.1%, 22.8%, and 10.7% in the relative abundance of *Ascomycota*, *Zygomycota*, and *Actinobacteria*, in contrast to a 7.59% decrease in the relative abundance of *Acidobacteria*. Furthermore, *S. alfalfae* XY25^T application also increased the relative abundance of *Penicillium*, *Mortierella*, *Mucor*, and *Streptomyces* by 25.5%, 14.6%, 8.20%, and 7.24%, respectively. **[Conclusion]** The application of *S. alfalfae* XY25^T not only improved the soil quality but also significantly altered the microbial community structure and diversity in rhizosphere soil.

Keywords: Clubroot, Chinese cabbage, High-throughput sequencing, Bacterial community, Fungal community

十字花科植物在全世界范围内有 300 多属 3 000 多种, 其中, 我国有 100 多属 400 多种, 包括白菜、萝卜、甘蓝、油菜等种植广泛的经济作物^[1]。芸薹根肿菌 (*Plasmiodiophora brassicae* Woronin) 是一种专性寄生于十字花科植物导致根肿病发生的病原菌, 其传播迅速, 影响广泛^[2]。2003 年, 根肿病在湖北省长阳县火烧坪乡暴发, 5 年内不少田块大白菜根肿病发生率超过 60%, 造成农户损失惨重^[3]。目前, 我国对根肿病的防治以抗性品种和化学制剂为主, 然而根肿菌致病力强, 在长阳地区抗性品种抗病力表现较弱, 连续耕作抗性易失效^[4]。化学制剂防治效果明显, 但是过度使用会污染环境, 造成土壤状况的持续恶化^[5]。因此, 亟需研究一种环境友好型根肿病防治方法。

链霉菌 *Streptomyces alfalfae* XY25^T 是本实验室命名的一个新种, 基因组分析预测表明, 其具有分泌抗菌物质等多种功能的基因^[6]。此外, 研究发

现 *S. alfalfae* XY25^T 可以改善连作障碍, 促进作物生长^[7]。通过高通量测序技术的大量数据对宏基因组进行分析, 是研究复杂环境中微生物组成和相对丰度的重要工具^[8], 已被广泛应用于土壤^[9]、海洋^[10]等环境微生物群落研究, 然而通过生物防治及高通量测序技术分析微生物群落结构研究根肿病的报道较少。本文以湖北长阳根肿病重灾区的土壤为研究对象, 分析施用 *S. alfalfae* XY25^T 后土壤肥力、土壤根际微生物的多样性和群落结构的动态变化, 以期对根肿病的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大白菜为“北京新三号”来自北京市农林科学院蔬菜研究中心。菌株 *S. alfalfae* XY25^T 保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC AA2015019T)。

1.2 主要试剂和仪器

土壤基因组提取试剂盒 (E.Z.N.A.[®] Soil DNA

Kit), MP Biomedicals 公司; 测序建库试剂盒 (NEBNext[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina[®]), Illumina 公司。NanoDrop 2000 紫外可见分光光度计、高速冷冻离心机、小型台式离心机、PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; DNA 定量仪和 MiSeq 测序仪, Illumina 公司。

1.3 实验设计与样品采集

大白菜种子置于苗盘中育苗, 生长成 4 叶幼苗, 将长势一致的幼苗进行盆栽, 土壤采自湖北省长阳县火烧坪乡根肿病重灾区耕作层, 花盆长 50 cm 宽 20 cm 高 13 cm, 共 20 盆, 每盆 10 株, 每盆植株 5×2 排列。移栽 7 d, 将 20 盆植株随机分成处理组和对照组, 每组 10 盆进行标记, 每盆各取一植株, 采用抖根法收取根际土壤, 以后每隔 7 d 采集一次。每次取样结束, 处理组(treatment group, 简称 S)植株用 10 mL *S. alfalfae* XY25^T 菌液灌根, 对照组(control group, 简称 C)用 10 mL 水灌根。采集的土壤样品立即液氮速冻, -80 °C 冰箱保存备用。

1.4 土壤理化指标和酶活力测定

土壤 pH 值的测定: 将去离子水和风干土壤样品按体积比 2.5:1 溶解混合, 搅拌 1 min, 用 pH 计测定; 土壤有机质采用外加热重铬酸钾氧化-容量法测定; 土壤碱解氮采用碱解扩散法测定; 土壤速效磷采用氟化铵-氯化氢法-分光光度法测定; 速效钾采用 NH₄OAc 浸提-火焰光度法测定^[11]。土壤蔗糖酶用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定; 脲酶采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定; 过氧化氢酶采用高锰酸钾滴定法测定; 碱性磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法测定^[12]。

1.5 样品总 DNA 提取、PCR 扩增及产物纯化

采用土壤基因组提取试剂盒提取土壤 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, NanoDrop 2000 检测分析 DNA 的浓度和纯度。以各土壤样品微生物总 DNA 为模板, 利用细菌 V3-V4 区引物对 (341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3') 和真菌 ITS1 区引物对 (ITS5-1737F: 5'-GGAAGTAAAAGTCGT

AACAAGG-3'; ITS2-2043R: 5'-GCTGCGTTCTTC ATCGATGC-3') 进行 PCR。PCR 反应体系 (50 μL): 2×Premix Taq (1.25 U/μL) 25 μL, 模板 (20 ng/μL) 3 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 无核酸酶水 20 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 Illumina MiSeq 测序平台对 PCR 扩增产物进行双端测序分析, 测序委托广州美格生物科技有限公司完成。

1.6 MiSeq 文库构建、测序与拼接

按照测序建库试剂盒标准流程构建文库。采用 Illumina HiSeq2500 平台对构建的扩增子文库进行 PE250 测序。根据 PE reads 之间的 Overlap 关系将 MiSeq 测序得到的 PE reads 进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 根据序列首尾两端的 Barcode 和引物信息区分样品得到有效的序列, 校正序列方向, 使用软件 FLASH 和 Trimmomatic 得到优化序列。

1.7 数据分析

土壤理化性质和土壤酶活性数据采用 Origin 和 SPSS 软件进行数据整理和图表制作, 用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。采用 Usearch 软件进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类分析。对于 99% 相似水平下的 OTU 进行生物信息统计分析, 每个 OTU 代表一个物种。基于 OTU 聚类分析及各个分类水平下的物种比对结果, 利用 QIIME 软件对 OTU 进行多种多样性指数分析。基于分类学信息, 在各个分类水平上进行群落结构的统计分析并统计各样品组成。细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区采用 Greengenes 细菌数据库和 RDP Classifier 比对法进行比对; 真菌 ITS1 区采用 Unite 真菌数据库和 BLAST 比对法进行比对。采用 QIIME 平台软件进行物种注释和丰度分析^[13]。

2 结果与分析

2.1 对土壤 pH 的影响

连作导致土壤酸化, pH 值降低是导致根肿病

暴发的主要原因之一^[14]。如图 1 所示,施用 *S. alfalfae* XY25^T后,土壤 pH 值呈缓慢上升趋势,而对照组的 pH 值呈现下降的趋势。实验第 35 天,处理组的 pH 值显著高于对照组,提高 10.0%。时间和不同处理对土壤理化性质影响的双因素方差分析表明,在整个大白菜生长期, *S. alfalfae* XY25^T 处理($P=0.001<0.05$)对土壤 pH 影响显著(表 1),说明 *S. alfalfae* XY25^T能在一定范围内缓解土壤酸化,而且效果显著。

2.2 对土壤养分的影响

由图 2 可知,大白菜生长期处理组与对照组的土壤肥力变化趋势基本一致,土壤有机质、速效磷和速效钾含量缓慢升高,土壤碱解氮含量缓

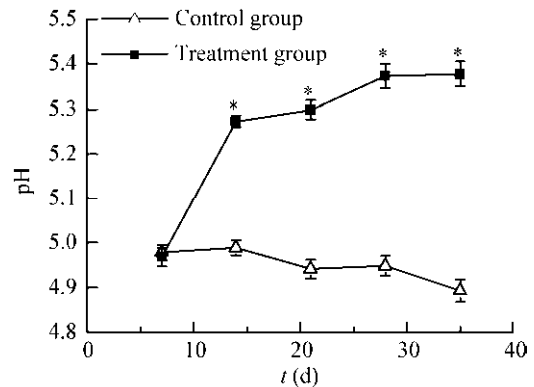


图 1 *S. alfalfae* XY25^T对土壤 pH 的影响

Figure 1 Effect of *S. alfalfae* XY25^T application on soil pH

注: *: $P<0.05$, $n=10$.

Note: *: Significant differences at $P<0.05$ level; Each sample has 10 replicates.

表 1 对土壤理化性质的双因素方差分析

Table 1 Two-factor variance analysis of soil physicochemical properties

理化指标	参数	平方和	自由度	均方	F	P
Physicochemical properties	Parameter	SS	df	MS		
pH	Time	0.028	4	0.007	1.497	0.210
	Treatment	2.850	1	2.850	604.910	0
	Interaction	0.079	3	0.026	5.603	0.001
	Error	0.429	91	0.005		
有机质 Content of organic matter	Time	19 183.599	4	4 795.900	235.575	0
	Treatment	721.127	1	721.127	35.422	0
	Interaction	84.264	3	28.088	1.380	0.254
碱解氮 Alkali-hydrolyzable nitrogen	Error	1 852.603	91	20.358		
	Time	12 883.053	4	3 220.763	3.908	0.006
	Treatment	5 633.046	1	5 633.046	6.836	0.010
	Interaction	3 992.048	3	1 330.683	1.615	0.191
速效磷 Available phosphorus	Error	74 990.335	91	824.070		
	Time	11 205.971	4	2 801.493	109.491	0
	Treatment	803.417	1	803.417	31.400	0
	Interaction	88.035	3	29.345	1.147	0.335
速效钾 Available kalium	Error	2 328.374	91	25.587		
	Time	59 143.958	4	14 785.990	22.199	0
	Treatment	123 413.047	1	123 413.047	185.288	0
	Interaction	6 035.327	3	2 011.776	3.020	0.034
蔗糖酶 Invertase activity	Error	60 611.582	91	666.061		
	Time	627.552	4	156.888	3.431	0.012
	Treatment	7 591.535	1	7 591.535	166.028	0
	Interaction	1 592.894	3	530.965	11.612	0
脲酶 Urease activity	Error	4 160.922	91	45.724		
	Time	1.598	4	0.400	3.496	0.011
	Treatment	14.792	1	14.792	129.395	0
	Interaction	0.959	3	0.320	2.795	0.045
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	Error	10.403	91	0.114		
	Time	731 386.891	4	182 846.723	44.883	0
	Treatment	412 948.376	1	412 948.376	101.367	0
	Interaction	183 344.162	3	61 114.721	15.002	0
过氧化氢酶 Catalase	Error	0.422	4	0.106	17.239	0
	Time	0.554	1	0.554	90.583	0
	Treatment	0.060	3	0.020	3.285	0.024
	Interaction	0.557	91	0.006		

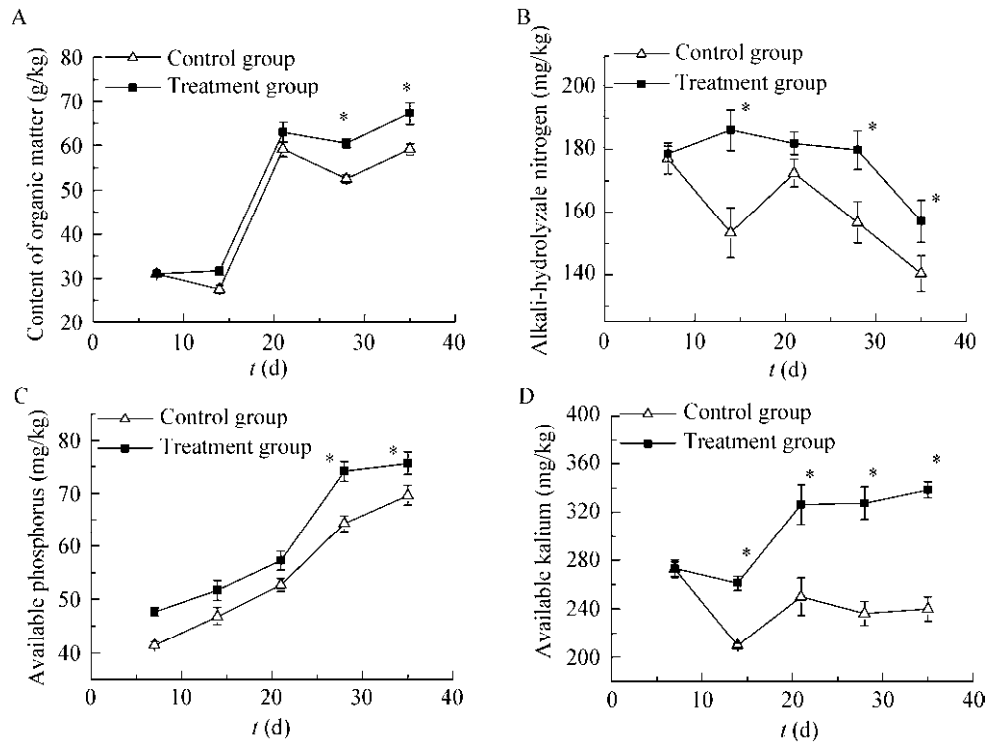


图 2 *S. alfalfae* XY25^T 对土壤养分的影响

Figure 2 Effect of *S. alfalfae* XY25^T application on soil nutrient content

注: A: 有机质; B: 碱解氮; C: 速效磷; D: 速效钾. *: $P < 0.05$, $n = 10$.

Note: A: Organic matter; B: Alkali-hydrolyzable nitrogen; C: Available phosphorus; D: Available potassium. *: Significant differences at $P < 0.05$ level; Each sample has 10 replicates.

慢下降。实验第 35 天, 处理组的土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾含量分别显著提高 13.7%、12.0%、8.71% 和 41.1%。由表 1 双因素方差分析结果可知, 在大白菜整个生长期, *S. alfalfae* XY25^T 处理对土壤有机质、碱解氮、速效磷和速效钾的影响显著。结果表明, 施用 *S. alfalfae* XY25^T 增强了营养元素的释放和循环能力, 提高了土壤肥力。

2.3 对土壤酶活性的影响

图 3 结果表明, 大白菜生长期间处理组与对照组的土壤酶活性变化趋势基本一致。施用 *S. alfalfae* XY25^T 后蔗糖酶活力迅速上升, 移栽 21 d 达最大值, 随后缓慢下降; 脲酶活力上升至 14 d, 随后缓慢下降; 碱性磷酸酶活力缓慢上升; 过氧化氢酶活力整体呈上升趋势。实验第 35 天, 与对照组相比, 处理组土壤蔗糖酶、脲酶、碱性磷酸酶和过氧化氢酶的酶活力显著提高, 幅度分别为 333%、204%、

142% 和 36.1%。双因素方差分析表明, *S. alfalfae* XY25^T 处理对 4 种土壤酶的影响极其显著(表 1)。土壤酶活性的变化对土壤有机质的形成和养分的循环等造成土壤肥力变化的因素有重要的影响^[14]。施用 *S. alfalfae* XY25^T 造成了土壤 pH 和微生物活动的变化, 进一步显著影响了土壤酶活性。

2.4 对根际土壤微生物的影响

2.4.1 测序数据统计及 α 多样性分析

实验第 35 天, 对土壤样品的真菌群落和细菌群落进行高通量测序分析, 结果见表 2。Chao1 指数通常用来估算生态学中的物种总数, Shannon 指数通常用来估算生态学中微生物的多样性。一般来说, 这些指数值越大, 说明样品中物种总数越多、样品群落多样性越高。由表 2 可知, 处理组和对照组的 Chao1 指数和 Shannon 指数均较高, 可知大白菜根际土壤的微生物物种的多样性均较高。

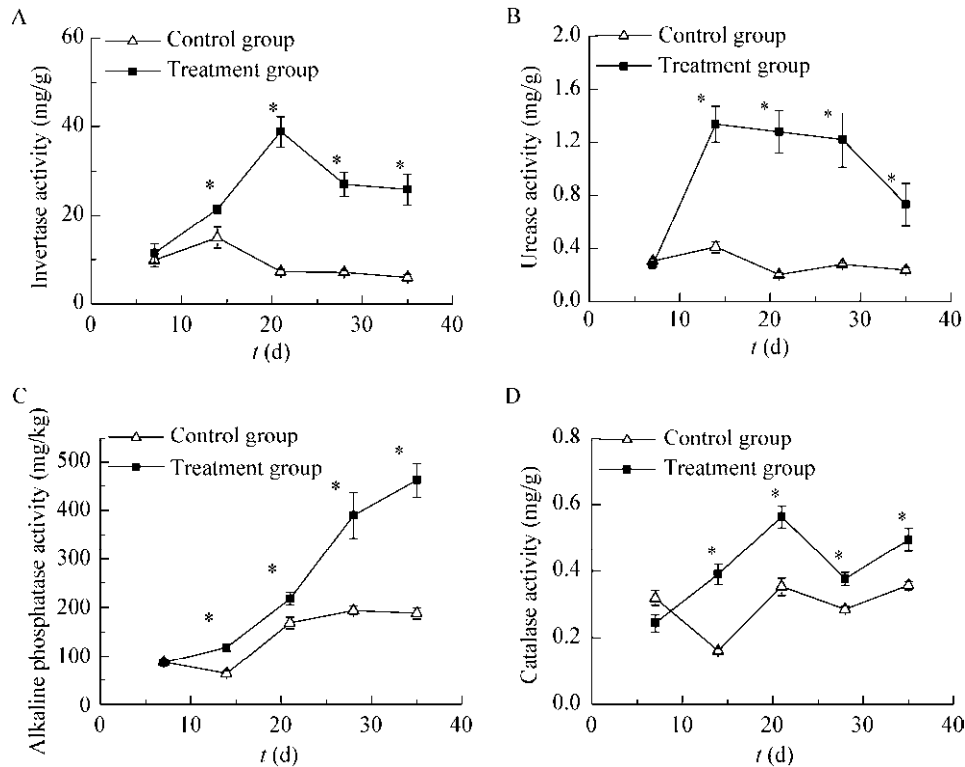


图 3 *S. alfalfae* XY25^T 对土壤酶活力的影响

Figure 3 Effect of *S. alfalfae* XY25^T application on soil enzyme activity

注: A: 蔗糖酶; B: 脲酶; C: 碱性磷酸酶; D: 过氧化氢酶. *: $P < 0.05$, $n = 10$.

Note: A: Invertase; B: Urease; C: Alkaline phosphatase; D: Catalase. *: Significant differences at $P < 0.05$ level; Each sample has 10 replicates.

表 2 α 多样性指数分析

Table 2 The analysis of alpha diversity index

样品名称	有效序列	平均长度	Chao1 指数	Shannon 指数
Sample	Clean tags	Average length (bp)	Chao1 index	Shannon index
对照组 ITS	51 336	373	765	2.80
Control group ITS				
处理组 ITS	42 241	373	754	4.45
Treatment group ITS				
对照组 16S rDNA	72 980	349	2 316	7.24
Control group 16S rDNA				
处理组 16S rDNA	56 730	332	1 851	6.27
Treatment group 16S rDNA				

2.4.2 样品间 β 多样性分析

对样本进行主坐标分析, 研究样本的相似性和差异性。在样本真菌分析中(图 4A), 主成分 1 (PC1)和主成分 2 (PC2)占比分别为 52.98%和 24.56%, 处理组和对照组差异显著, 处理组组内相似性较高, 对照组组内相似性较低, 说明在自

然条件下真菌群落的分散性较大, 施用 *S. alfalfae* XY25^T 可以稳定真菌群落结构。在细菌样本中(图 4B), 主成分 1 (PC1)和主成分 2 (PC2)占比分别为 60.83%和 22.33%, 处理组与对照组显著差异, 其中处理组和对照组的细菌样本组内相似性均较低。

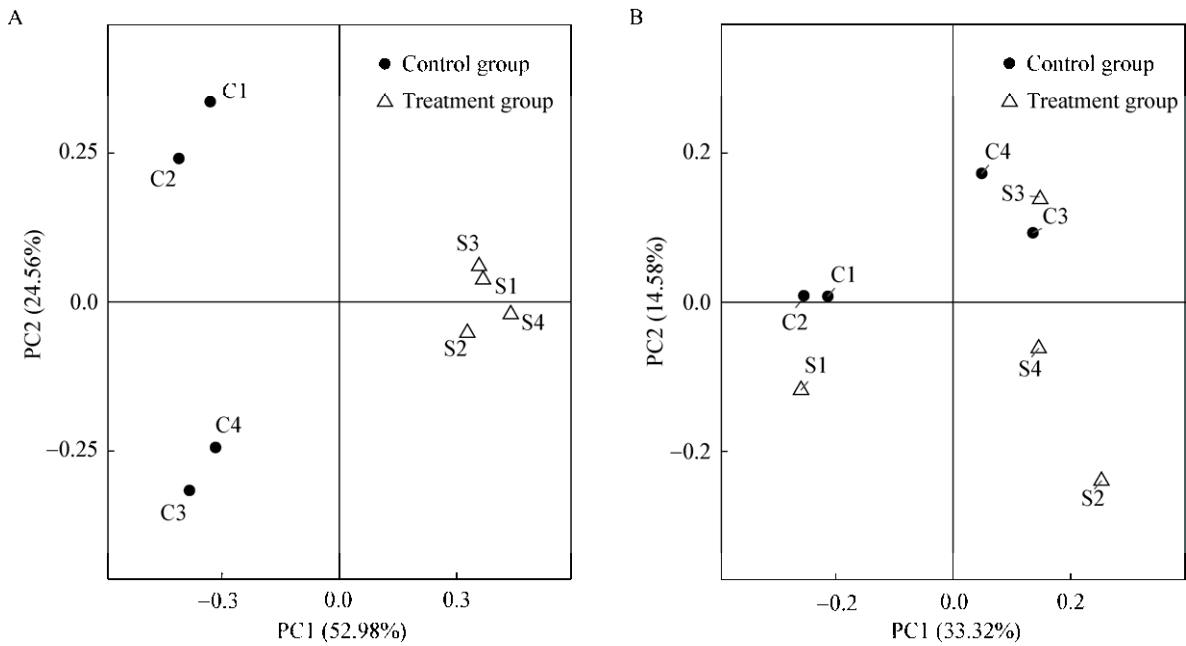


图 4 主坐标分析

Figure 4 The principal component analysis

注: A: 真菌样品; B: 细菌样品.

Note: A: Fungal samples; B: Bacterial samples.

2.4.3 微生物群落结构分析

在微生物群落门水平中(图 5A), 真菌主要有 *Ascomycota*、*Basidiomycota* 和 *Zygomycota*, 处理组分别为 59.7%、7.59%和 23.8%, 对照组分别为 5.59%、11.0%和 1.01%。细菌菌门主要有 *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Acidobacteria*、*Chloroflexi* 和 *Gemmatimonadetes*, 优势菌门是 *Proteobacteria*、

Bacteroidetes、*Acidobacteria* 和 *Actinobacteria*, 处理组分别为 55.8%、11.4%、4.28%和 15.9%, 而对照组分别为 50.5%、14.6%、11.9%和 5.2% (图 5B)。比较分析可知, 施用 *S. alfalfae* XY25^T 提高了 *Ascomycota*、*Zygomycota* 及 *Actinobacteria* 等菌门的相对丰度, 比例分别为 54.1%、22.8%和 10.7%; 降低了 *Acidobacteria* 的相对丰度, 比例是 7.59%。

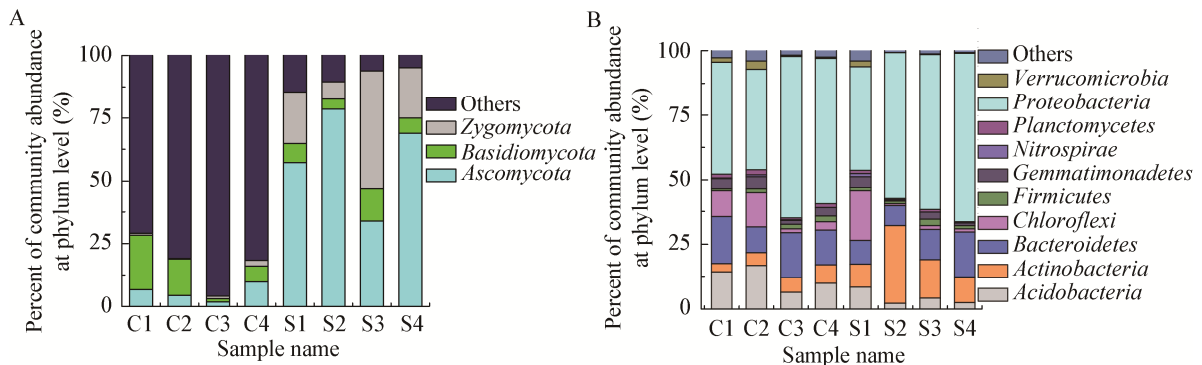


图 5 门水平群落组成分析

Figure 5 The community abundance analysis at the phylum level

注: A: 真菌样品; B: 细菌样品.

Note: A: Fungal samples; B: Bacterial samples.

在微生物群落属水平中,根际土壤真菌菌属主要有 *Fusarium*、*Mortierella*、*Mucor* 和 *Penicillium* 等(图 6A)。其中, *Penicillium* 在处理组与对照组的相对丰度分别是 26.71% 和 1.24%, *Fusarium* 分别是 2.27% 和 0.37%, *Mortierella* 分别是 15.37% 和 0.79%, *Mucor* 分别是 8.34% 和 0.14%。如图 6B 所示,大白菜根际土壤中含有大于 0.01% 的细菌菌属有 17 种。处理组与对照组具有显著性差异的有 *Arthrobacter*、*Bacillus*、*Kaistobacter*、*Paenibacillus*、*Pseudomonas* 和 *Streptomyces*, 这些菌属在处理组中的含量分别是 3.21%、0.94%、2.65%、0.06%、0.76% 和 8.35%, 在对照组中的含量分别是 0.61%、0.19%、4.98%、0.71%、0.37% 和 1.11%。比较分析可知,施用 *S. alfalfae* XY25^T 提高了 *Penicillium*、*Mortierella*、*Mucor* 和 *Streptomyces* 等菌属的相对丰度,比例分别为 25.5%、14.6%、8.20% 和 7.24%。

2.4.4 土壤的生理生化性质与微生物群落的关系

图 7A 是土壤因子和细菌菌属热图分析。由图 7 可知,有机质含量与 *Flavisolibacter*、*Kaistobacter*、*Paenibacillus*、*Rhodanobacter*、*Thiobacillus* 等菌属含量呈正相关。土壤 pH、碱解氮、速效磷、速效钾、蔗糖酶和脲酶含量与 *Arthrobacter*、*Bacillus*、

Streptomyces、*Denitrobacter*、*Pseudomonas* 等细菌菌属含量呈明显正相关。土壤 pH、碱解氮、速效磷、速效钾、蔗糖酶和脲酶含量与 *Anaerolinea*、*Kaistobacter*、*Paenibacillus* 和 *Rhodoplanes* 等细菌菌属含量呈明显负相关。

图 7B 是土壤因子和真菌菌属热图分析。由图 7 可知,有机质含量与 *Monographella* 含量呈正相关,与 *Guehomyces*、*Mortierella*、*Mucor*、*Pseudogymnoascus* 等菌属呈负相关。土壤碱解氮含量与 *Guehomyces*、*Mortierella*、*Mucor*、*Penicillium*、*Pseudogymnoascus*、*Trichoderma* 等菌属呈正相关。土壤 pH、速效磷、速效钾、蔗糖酶和脲酶含量与 *Didymella*、*Fusarium*、*Guehomyces*、*Monographella*、*Mortierella*、*Mucor*、*Penicillium*、*Pseudogymnoascus*、*Trichocladium*、*Trichoderma* 等菌属呈明显正相关。

图 8 是物种组成与土壤因子的冗余分析(redundancy analysis, RDA)。由图 8A 可知,对细菌物种组成影响最大的是土壤蔗糖酶含量,其次是 pH 值、速效磷、速效钾和脲酶含量,而有机质和碱解氮含量的影响较小。同时,在对细菌物种组成的影响中,土壤有机质与碱解氮含量呈明显正相关关系,土壤 pH、速效磷、速效钾、蔗

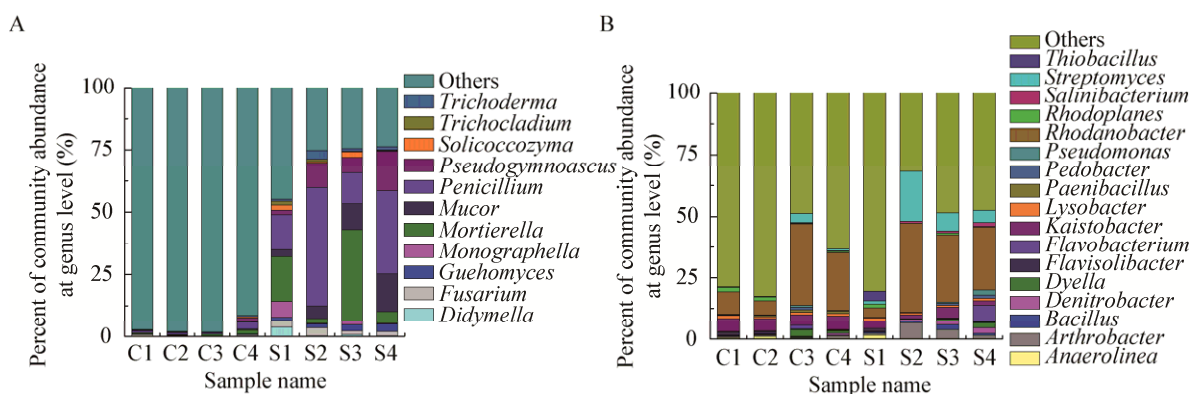


图 6 属水平群落组成分析

Figure 6 The community abundance analysis at the genus level

注: A: 真菌样品; B: 细菌样品。

Note: A: Fungal samples; B: Bacterial samples.

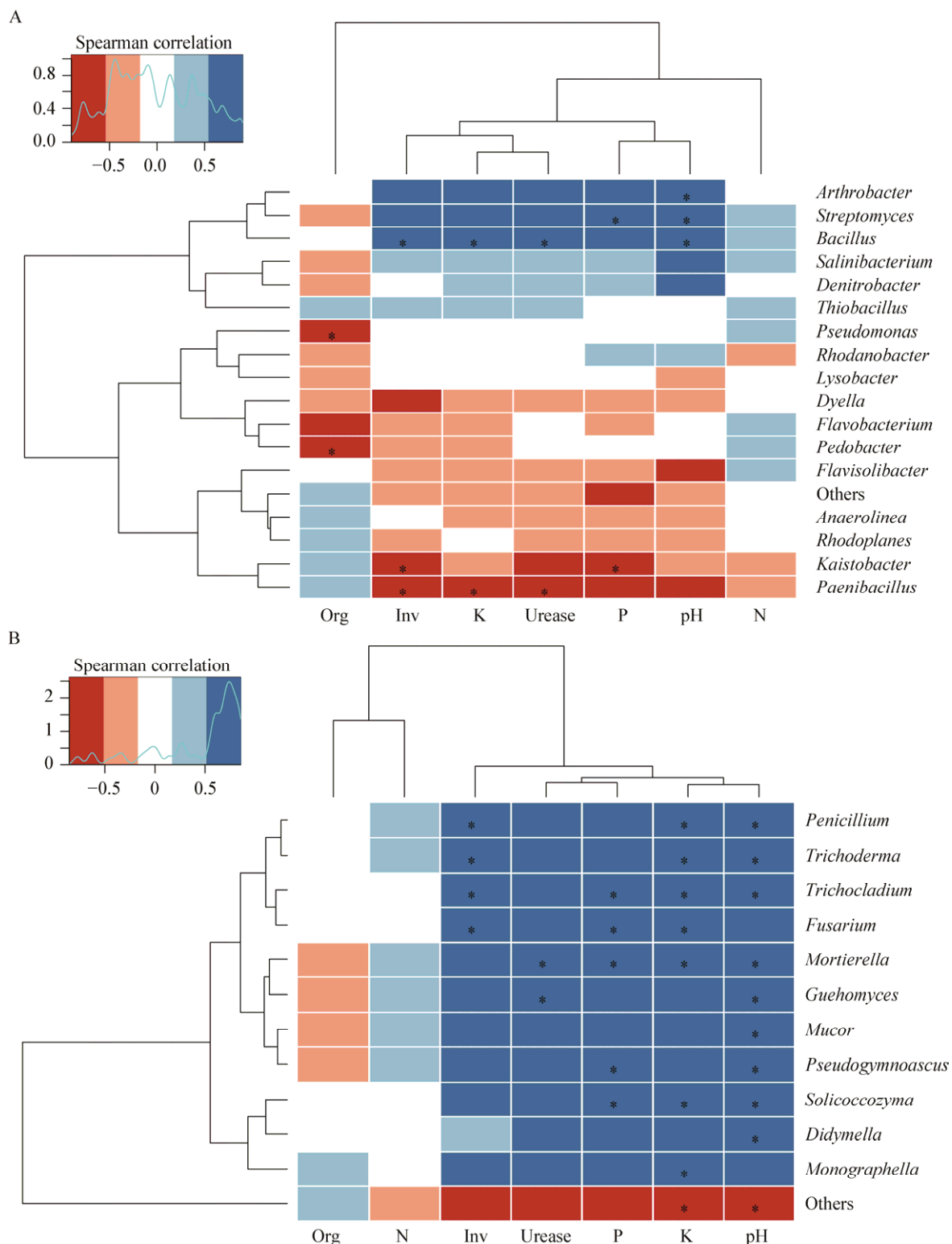


图 7 土壤理化性质和主要菌属聚类分析

Figure 7 Clustering analysis of dominant genera and chemical and physical properties of soil

注: A: 细菌样品; B: 真菌样品。Org: 有机质; Inv: 蔗糖酶活性。

Note: A: Bacterial samples; B: Fungal samples. Org: Organic materil; Inv: Invertase activity.

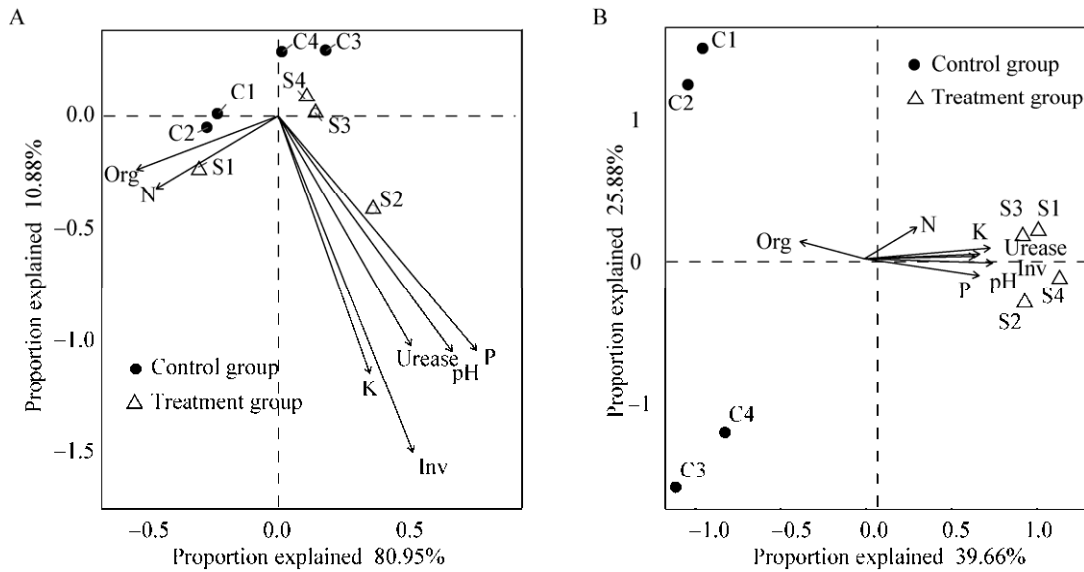


图 8 土壤理化性质与微生物群落的 RDA 分析

Figure 8 RDA analysis of microbial communities and chemical and physical properties of soil

注: A: 细菌样品; B: 真菌样品。

Note: A: Bacterial samples; B: Fungal samples.

糖酶和脲酶这 5 种土壤因子之间也呈明显正相关关系。真菌分析(图 8B)表明对物种组成影响最大的是 pH 值, 其次是蔗糖酶、速效磷、速效钾和脲酶含量, 而有机质和碱解氮含量的影响较小。在对真菌物种组成的影响中, 土壤有机质与土壤 pH、碱解氮、速效磷、速效钾、蔗糖酶和脲酶等 6 种土壤因子呈负相关, 而土壤 pH、碱解氮、速效磷、速效钾、蔗糖酶和脲酶这 6 种土壤因子之间呈正相关关系。

3 讨论与结论

多年来国内外学者对土传病害的形成机理进行了深入的研究, 认为土传病害的产生是作物与土壤两个系统间相互作用的综合表现, 涉及土壤微生物群落多样性变化、化感物质积累、土壤养分失衡以及土壤理化性质的退化等^[15-16]。这些变化互相影响、共同作用, 最终导致土传病害的发生。本研究表明, *S. alfalfae* XY25^T 菌剂具有显著促进土壤氮、磷、钾转化的效果, 同时提高了土壤 pH。土壤酶活性和土壤肥力具有良好的相关性^[17], 脲酶催化尿素水解生成氨, 因此被认为是土壤健

康的重要指标^[18]。施用 *S. alfalfae* XY25^T 菌剂, 土壤的蔗糖酶和脲酶活性得到提高, 说明该菌肥可以增强根系微生物的活动, 提高土壤肥力, 在一定程度上缓解了连作带来的负面影响。

一般而言, 土壤肥力通常与土壤微生物群落结构中真菌含量降低、细菌含量上升呈正相关^[19]。高通量测序技术结合生物信息学研究方法, 可用于研究土壤肥力与微生物群落结构的关系^[20]。在本研究中, 土壤肥力与细菌物种组成呈明显正相关, 而与真菌的物种组成呈负相关, 表明土壤肥力的上升与微生物群落中细菌的含量及物种组成变化存在相关性。此外本研究表明, *Streptomyces*、*Bacillus*、*Pseudomonas* 等细菌菌属与土壤肥力呈正相关。*Streptomyces*、*Bacillus*、*Pseudomonas* 等菌属中很多物种是植物促生菌^[21], 土壤肥力的变化可能就是来源于此。

引入外来生防菌, 可与特定的病原菌竞争营养和空间, 或产生抗生素等直接作用于病原菌, 消减病原菌的数量及其对植株的感染^[22]。同时, 加入外来生防菌会对微生物群落结构造成影响^[23-24]。由本

研究结果可知, 在样本主坐标分析中, 施用 *S. alfalfae* XY25^T 菌剂处理组与对照组的细菌和真菌的样本组间存在显著差异, 说明加入菌剂改变了微生物群落结构, 国内外其他研究也表明运用高通量测序的方法能够研究菌剂对微生物群落结构的影响^[25]。

微生物群落结构分析表明, 施用 *S. alfalfae* XY25^T 显著提高了土壤中 *Ascomycota*、*Zygomycota* 和 *Actinobacteria* 的相对丰度, 降低了土壤中 *Acidobacteria* 的相对丰度。*Ascomycota* 中的肉座菌属是木霉菌的有性阶段, 木霉可以抑制多种土传病害的病原菌, 是重要的生防真菌, 曾在根肿病防治方面取得了较好的抑病效果^[26]。研究表明土壤中 *Acidobacteria* 的丰富度与土壤 pH 具有显著负相关^[27], 施用 *S. alfalfae* XY25^T 后土壤 pH 及土壤中 *Penicillium*、*Mortierella*、*Mucor* 和 *Streptomyces* 的相对丰度得到显著提高。土壤 pH 的提高可能与 *Acidobacteria* 的相对丰度降低有关。*Penicillium* 和 *Mucor* 作为土传病害的生防菌有较明显的效果^[26,28]。施用的 *S. alfalfae* XY25^T 是一种链霉菌, 使土壤细菌中 *Actinobacteria* 和 *Streptomyces* 的相对丰度显著提高。本研究结果表明加入 *S. alfalfae* XY25^T 后土壤微生物群落结构在门和属等水平发生了明显变化, 且变化是朝着有益的方向发展。

综上所述, 施用 *S. alfalfae* XY25^T 能显著改变作物根际微生物的群落结构, 提高土壤肥力。*S. alfalfae* XY25^T 菌剂安全可靠, 在土壤中施用符合绿色农业理念。本研究结果为根肿病的防治提供理论依据, 还为其他土传病害的防控提供了新思路。

REFERENCES

- [1] Zhang XJ, Fan SJ, Sun ZY, et al. A summary on phylogenetic classification of brassicaceae from China[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2003, 21(3): 267-272 (in Chinese)
张学杰, 樊守金, 孙稚颖, 等. 中国十字花科植物系统分类近期研究进展[J]. 植物科学学报, 2003, 21(3): 267-272
- [2] Luo HC, Chen GK, Liu CP, et al. An improved culture solution technique for *Plasmodiophora brassicae* infection and the dynamic infection in the root hair[J]. Australasian Plant Pathology, 2014, 43(1): 53-60
- [3] Wang WH, Yu YJ, Ding YH, et al. Physiological race identification of clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor) from Changyang County, Hubei Province and resistant resource screening for Chinese cabbage breeding[J]. China Vegetables, 2013(12): 55-60 (in Chinese)
汪维红, 余阳俊, 丁云花, 等. 湖北省长阳县十字花科蔬菜根肿病菌生理小种鉴定及抗源筛选[J]. 中国蔬菜, 2013(12): 55-60
- [4] Gan CX, Yu YJ, Yuan WL, et al. Performance of domestic major cruciferous vegetable varieties resistant to clubroot in Hubei Regions[J]. China Vegetables, 2016(6): 53-58 (in Chinese)
甘彩霞, 余阳俊, 袁伟玲, 等. 国内主要十字花科抗根肿病品种在湖北病区的表现[J]. 中国蔬菜, 2016(6): 53-58
- [5] Asano T, Kodama A, Kageyama K. Susceptibility of hairy root lines of *Brassica* species to *Plasmodiophora brassicae* and in an *in vitro* subculture system[J]. Journal of General Plant Pathology, 2006, 72(2): 85-91
- [6] She WQ, Sun ZF, Yi L, et al. *Streptomyces alfalfae* sp. nov. and comparisons with its closest taxa *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces flavofungini* and *Streptomyces intermedius*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(1): 44-49
- [7] Hu LK, Hu YL, Hu YM, et al. Effects of 5406 antibiotic fertilizer on greenhouse of continuous cropping *Capsicum annum*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(3): 61-65 (in Chinese)
胡丽可, 胡远亮, 胡咏梅, 等. 连作辣椒大棚施用 5406 抗生菌肥的效果[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 61-65
- [8] Nam YD, Lee SY, Lim SI. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1/2): 36-42
- [9] Lauber CL, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5111-5120
- [10] Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere[J]. Science, 2007, 318(5847): 97-100
- [11] Xie XM. Soil and Plant Nutrition Experiment[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2014: 70-182 (in Chinese)
谢晓梅. 土壤与植物营养学实验[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2014: 70-182
- [12] Shao WS, Li GQ. Research progress of soil enzymes function and its determination method[J]. Northern Horticulture, 2016(9): 188-193 (in Chinese)
邵文山, 李国旗. 土壤酶功能及测定方法研究进展[J]. 北

- 方园艺, 2016(9): 188-193
- [13] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200
- [14] Liu L, Huang BJ, Sun J, et al. Relationship between soil microbial quantity, enzyme activity and soil fertility in hot pepper greenhouse soils of different continuous cropping years[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2013(2): 5-10 (in Chinese)
刘来, 黄保健, 孙锦, 等. 大棚辣椒连作土壤微生物数量、酶活性与土壤肥力的关系[J]. *中国土壤与肥料*, 2013(2): 5-10
- [15] Hou H, Dong K, Yang ZX, et al. Advance in mechanism of continuous cropping obstacle[J]. *Soils*, 2016, 48(6): 1068-1076 (in Chinese)
侯慧, 董坤, 杨智仙, 等. 连作障碍发生机理研究进展[J]. *土壤*, 2016, 48(6): 1068-1076
- [16] Wu YE, Yao HL, Lin HL, et al. Review on continuous cropping obstacle in vegetables in protected cultivation[J]. *Chinese Horticulture Abstracts*, 2013, 29(3): 46-48 (in Chinese)
吴玉娥, 姚怀莲, 林惠莲, 等. 设施蔬菜作物连作障碍研究进展[J]. *中国园艺文摘*, 2013, 29(3): 46-48
- [17] Qi RM, Li J, Lin ZA, et al. Temperature effects on soil organic carbon, soil labile organic carbon fractions, and soil enzyme activities under long-term fertilization regimes[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 102: 36-45
- [18] Qian X, Gu J, Sun W, et al. Changes in the soil nutrient levels, enzyme activities, microbial community function, and structure during apple orchard maturation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 77: 18-25
- [19] Suzuki C, Kunito T, Aono T, et al. Microbial indices of soil fertility[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5): 1062-1074
- [20] Peruzzi E, Franke-Whittle IH, Kelderer M, et al. Microbial indication of soil health in apple orchards affected by replant disease[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 119: 115-127
- [21] Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC, Govindappa M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, 22(8): 855-872
- [22] Qiu MH, Zhang RF, Xue C, et al. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(7): 807-816
- [23] Liu WX, Niu HB, Wan FH, et al. Effects of leachates of the invasive plant, *Ageratina adenophora* (Sprengel) on soil microbial community[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(4): 196-200
- [24] Averill C, Hawkes CV. Ectomycorrhizal fungi slow soil carbon cycling[J]. *Ecology Letters*, 2016, 19(8): 937-947
- [25] Yue HW, Wang MM, Wang SP, et al. The microbe-mediated mechanisms affecting topsoil carbon stock in Tibetan grasslands[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(9): 2012-2020
- [26] Yang LF. Preparation of compost and biocontrol of oilseed rape sclerotinia stem rot and club root with *Trichoderma atroviride*[D]. Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2010 (in Chinese)
杨力凡. 深绿木霉 *Trichoderma atroviride* 生物菌肥的研制及对油菜菌核病、根肿病的生物防治[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 2010
- [27] Tripathi BM, Kim M, Lai-Hoe A, et al. pH dominates variation in tropical soil archaeal diversity and community structure[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 86(2): 303-311
- [28] Sabuquillo P, de Cal A, Melgarejo P. Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions[J]. *Biological Control*, 2006, 37(3): 256-265