

炭疽病发病草莓与健康草莓根际 细菌群落结构及功能差异

王庆峰¹, 周德平^{1*}, 褚长彬¹, 赵 峥¹, 杨乾罡², 吴淑杭^{1*}

(1. 上海市农业科学院生态环境保护研究所, 上海 201403; 2. 杭州锦江集团有限公司, 浙江杭州 310005)

摘要:【目的】比较研究炭疽病不同发病程度草莓根际微生物群落结构并开展基因功能预测分析, 为指导农田管理及筛选草莓炭疽病拮抗菌提供理论依据和参考。【方法】采集设施栽培大棚中健康和不同发病程度的草莓植株根际土壤, 利用 Illumina Miseq 测序比较分析不同发病程度对草莓根际细菌多样性, 根际细菌门、属水平群落组成特征的影响。

【结果】发病植株根际细菌多样性显著低于健康植株, 其中轻度发病草莓根际细菌丰富度 ACE 降低了 7.2%, 而中度发病草莓根际细菌丰富度降低了 11%。草莓根际土壤的优势菌群为变形菌门、放线菌门和拟杆菌门, 不同发病程度的草莓根际土壤的细菌群落结构发生了显著改变, 其中发病草莓显著提高了根际土壤中芽孢菌属和亚栖热菌属的相对丰度, 而降低了与促生功能相关的黄杆菌属和伯克氏菌属的相对丰度。PICRUST2 分析表明, 炭疽病显著提高草莓根际细菌的细胞交流、细胞传递和分解, 转录以及循环等功能, 而降低了脂质代谢和消化功能。【结论】本研究表明炭疽病显著降低草莓根际细菌多样性, 并改变细菌群落结构, 降低了促进草莓营养吸收细菌种类的相对丰度, 改变了根际细菌功能特征, 研究结果为指导草莓生产管理和筛选抗病微生物提供参考。

关键词: 草莓; 炭疽病; 根际细菌; PICRUST2; 群落结构

中图分类号: S154.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 0564-3945(2022)06-1404-09

DOI: 10.19336/j.cnki.trtb.2021110906

王庆峰, 周德平, 褚长彬, 赵 峥, 杨乾罡, 吴淑杭. 炭疽病发病草莓与健康草莓根际细菌群落结构及功能差异 [J]. 土壤通报, 2022, 53(6): 1404-1412

WANG Qing-feng, ZHOU De-ping, CHU Chang-bin, ZHAO Zheng, YANG Qian-gang, WU Shu-hang. Differences in Structure and Function of Rhizosphere Bacterial Communities between Anthracnose-infected and Healthy Strawberries[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022, 53(6): 1404-1412

【研究意义】草莓是多年生常绿草本植物, 属于蔷薇科草莓属, 是一种营养价值和经济价值极高的水果。近年来, 中国草莓种植面积和产量不断增加。据统计, 2017 年中国草莓种植面积达到 13.37 万 hm², 总产量达 372.46 万 t^[1], 种植面积和产量稳居世界第一^[2]。然而, 在草莓生产过程中受到多种病害的威胁, 严重制约着草莓的可持续种植。其中, 炭疽病已成为全世界草莓产业发展的主要病害之一。该病可感染草莓叶片、茎秆、花以及果实等, 可造成草莓减产达 25%~30%^[3], 极大影响草莓的产量和品质。【前人研究进展】植物根际是植物根系与土壤生态系统物质、信息交换的活跃界面, 是根系活动和代谢对土壤生物化学性质影响最直接、最强烈的区域^[4], 并且在植物根系的作用下植物根际土壤物理、化学以及生物性质与土体(非根际土壤)相比

有很大的差异^[5]。植物根际微生物是生活在植物根际区域, 在促进植物的生长、发育以及抗逆境等方面发挥重要作用。植物通过分泌根系分泌物、次级代谢产物等招募功能土壤微生物富集到植物根际区域, 从而影响根际微生物群落结构^[6]。反过来, 植物根际微生物可以提高植物根际区域营养物质转化, 促进植物生长发育, 调节植物免疫系统以及协助植物抵抗病原菌的入侵等^[7]。在植物受到病原菌侵染时, 植物根系分泌一系列的抗菌性根系分泌物, 如迷迭香酸、咖啡酸酯等物质, 并改变植物根际微生物群落结构^[8-9]。另外, 植物地上部受到病原菌侵染时, 也会影响植物根际微生物的群落结构。如 Rudrappa 等^[10]研究发现拟南芥叶片被病原菌丁香假单胞杆菌侵染时会改变其根际微生物群落结构, 且植物根际具有抗病性的枯草芽孢杆菌数量显著升高。Yuan

收稿日期: 2021-11-21; 修订日期: 2022-04-08

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划(20YF1442600)和上海市科委农业领域重点攻关项目(18391902600)资助

作者简介: 王庆峰(1988-), 男, 山东临沂人, 博士, 助理研究员, 环境微生物与农业生态。E-mail: wqfcool@126.com

*通讯作者: E-mail: zhudeping@saas.sh.cn; E-mail: wushuhang88@163.com

等^[6]研究也发现植物叶片感染病原菌后对植物根际微生物群落结构以及土壤的抗病性都具有明显影响。目前,防治草莓炭疽病主要以化学防治为主。化学防治虽然能在短时间内达到很好的防治效果,但会造成环境污染、农药残留以及加速病原菌产生抗药性等一系列问题^[11-12]。据报道,草莓炭疽病病原菌已经对多种化学药剂产生了抗药性^[13-14]。生物防治因为具有绿色、环保、作用时间长、病原菌不易产生抗药性等一系列优点而受到人们的关注,但是也存在一些缺点和不足,如药效发挥慢、防治效果和稳定性差等。究其原因可能是炭疽病是由于多种复杂病原菌引起的,最近的研究表明,暹罗炭疽菌(*C. siamense*)、果生炭疽菌(*C. fructicola*)、隐秘炭疽菌(*C. aenigma*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、睡莲炭疽菌(*C. nymphaeae*)和昌平炭疽菌(*C. changpingense*)一种或多种均可侵染草莓引起植物发病^[2]。单一生防菌株可能仅对其中一种病原菌具有抗病作用,而很难对多种病原菌同时产生拮抗作用。另外,微生物功能发挥在维持植物健康方面同样发挥重要作用。然而以平板培养的方法仅能够研究生长迅速、好氧且能够被培养的微生物功能,大量未被培养的微生物的功能无法得到研究^[15]。利用 PICRUSt 可以通过基因功能分析的方法研究未被培养微生物的功能,且有研究表明其准确率可达到 85~90%^[16]。Wu 等^[17]研究发现健康植物根际土壤中可能会提高与次级代谢相关功能,而降低与细胞运动、膜转运等的相关功能。然而,目前关于草莓发病植株根际微生物功能还有待进一步研究。【本研究切入点】尽管已有研究表明发病草莓根际微生物群落结构发生改变,并且发病草莓土壤的假单胞菌属丰度显著降低,而气单胞菌属丰度显著提高^[18]。然而,该研究结果仅比较了发病和健康草莓根际土壤,未对不同发病程度的草莓根际土壤以及功能等进行系统分析。目前关于炭疽病不同发病程度草莓和健康草莓根际细菌群落多样性还缺乏进一步了解。因此,了解炭疽病与草莓根际细菌群落结构的联系,并预测发病后草莓根际细菌功能特征能够为综合防治草莓炭疽病提供依据。【拟解决的问题】本研究通过选取同一地块中不同发病程度和健康植株的根际土壤,通过 Illumina Miseq 测序对根际土壤细菌多样性群落结构进行分析,并进行相关的基因功能预测。研究结果对于阐明发病植株对

微生物结构和功能的影响具有重要意义,为快速筛选草莓炭疽病拮抗菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于上海市金山区廊下镇中华村上海市农业科学院金山果树试验站内(30°46'N, 121°11'E),海拔 7 m,年降水量和年平均温度分别为 1200 mm 和 16 °C。土壤类型为青紫泥。该试验站建于 2004 年,占地面积 13.33 hm²,试验前该地 0~20 cm 土壤基本理化性状为 pH 6.4,有机质 32 g kg⁻¹,土壤电导率为 600 μs cm⁻¹,土壤碱解氮、有效磷和速效钾含量分别为 514、112 和 1286 mg kg⁻¹。

1.2 实验设计与样品采集

草莓种植始于 2018 年,样品采集于 2019 年 12 月 11 日。试验设置三组处理分别为健康植株(T0)、轻度炭疽病发病植株(T1)和重度炭疽病发病植株(T2)。健康草莓是指植株生长健壮、叶色正常无发病、枯萎、周围也无发病植株;轻度发病草莓是指植株叶片出现轻度枯萎的草莓;中度发病草莓是指植株叶片中度枯萎的草莓。供试草莓品种为“红颜”,农业管理措施主要包括:每年夏季高温时将设施栽培大棚中的土壤进行原位消毒(在土壤含水量为 60%~70%的条件下添加氯化苦(150 L hm⁻²),随后将土壤用薄膜覆盖,并保持 15 d),九月底进行起垄并种植草莓,每垄种植两行。浇水和施肥采用水肥一体化,通过管道运输至草莓种植垄上(两行草莓之间)。大棚长 50 m,宽 8 m,共 3 个草莓种植棚。在草莓处于旺盛生长期时采集草莓根际土壤,以确保根际效应已经对根际微生物产生影响^[19]。具体采集方法为:在三个草莓棚中分别按照 S 型,并按照处理标准,采集不同发病程度的草莓植株,每个大棚每种发病程度的草莓采集 3 株。因此,三个大棚每种发病程度的草莓采集 9 株,共 27 株草莓,选定的草莓连根挖出,装入自封袋中,带回实验室。根际土壤收集按照 Ai 等^[20]的方法。具体为:①将草莓根系揉松散,并将附着于草莓根系附近松散的土壤抖掉。②利用灭菌毛刷将紧密附着于草莓根系表面的土壤刷进自封袋中。分别收集每种发病程度的根际土壤 9 份,并随机将同种发病状态的 3 份根际土壤混合形成一个混合土壤,得到每种发病程度的根际混合土壤 3 份,共三个处理,因此共收集 9 个

土壤样品（3 种发病程度的草莓根际混合土壤，每种发病程度的草莓根际土壤三个重复）。草莓根际土壤保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，用于提取土壤 DNA。

1.3 土壤总 DNA 提取与高通量测序

土壤总 DNA 提取采用 Power Max Soil DNA Isolation Kit 试剂盒（MOBIO, USA），每个样品称取 0.25 g 土壤，按照试剂盒说明步骤进行。提取的土壤总 DNA 分别经过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nano Drop 测定 DNA 完整性，纯度和浓度。土壤细菌的扩增引物为 515F（GTGCCAGCMGCCGCGGTAA）和 806R（GGACTACVSGGGTATCTAAT）^[4]。扩增引物连接接头 A、B 和样品识别序列。扩增区域为 V4 可变区域，扩增体系为 5 μL 10 \times Pyrobest 缓冲液，4 μL dNTPs（2.5 mmol L^{-1} ），上下游引物各 2 μL （10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ），0.75 U Pyrobest DNA 聚合酶（TaKaRa, Japan）和 30 ng 模板 DNA。使用 ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪进行扩增，扩增程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，27 个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min^[21]。全部 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，并使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒（AXYGEN, USA）切胶回收 PCR 产物。制备 Amplicon 文库后，应用 Illumina MiSeq PE250 平台进行测序。

1.4 数据处理和分析

通过 Illumina Miseq 平台测序所得的下机数据经过 QIIME（v1.8.0）软件进行质量控制^[22]。具体过程为：1）过滤掉 reads 尾部质量值 20 以下的碱基，设置 50 bp 的窗口，如果窗口内的平均质量值低于 20，从窗口开始截去后端碱基，过滤质控后长度低于 50 bp 的 reads，去除含 N 碱基的 reads；2）根据 PE reads 之间的 overlap 关系，将成对 reads 拼接（merge）成一条序列，最小 overlap 长度为 10 bp，最大错配比率为 0.2；3）根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品，并调整序列方向，barcode 允许的错配数

为 0，最大引物错配数为 2；去除引物序列，并根据 GenBank 数据库检测并去除嵌合体，获得高质量序列^[23]。利用 CROP 软件将核苷酸相似度大于 97% 的序列作为一个分类操作单元（OTU）^[24]，利用 GenBank 数据库对物种进行注释，并去所有处理中只有一条序列的 OTU，将所有样品按最小样本序列数（31892）进行抽平（Subsample）。利用 Mothur 软件（V1.31.2）计算样品 α 多样性^[25]。

利用 SPSS 24 中单因素方差分析（ANOVA, Tukey's test）分析不同发病程度草莓根际细菌 α 多样性、不同分类水平下细菌相对丰度以及功能变化差异^[21]。基于 weighted Fast UniFrac 距离矩阵，利用 R 语言“vegan”和“ape”功能包（version 3.6.0）对不同发病程度草莓根际细菌 β 多样性进行主坐标分析（Principal coordinates analysis, PCoA），并利用 ANOSIM 分析不同发病程度对根际细菌组成的差异。利用 PICRUST2 预测草莓根际细菌群落功能变化^[16]。

2 结果与分析

2.1 草莓根际细菌多样性分析

9 个样品共获得 550,744 条高质量序列，平均每个样品 61,194 条。按 97% 相似度，所有序列共划分为 6,375 个 OTU（去除所有样品中只有一条序列的 OTU），所有样品的测序覆盖度 $> 97\%$ ，表明测序深度达到分析要求。草莓根际细菌 α 多样性在发病状态时（T1 和 T2）显著低于健康状态（T0）（ $P < 0.05$, Tukey's test）（表 1）。其中多样性指数 Shannon 在健康草莓根际土壤为 6.92 ± 0.07 显著（ $P < 0.05$, Tukey's test）高于发病状态 T1（ 6.74 ± 0.10 ）和 T2（ 6.74 ± 0.08 ）。丰富的指数同样在健康草莓根际土壤显著（ $P < 0.05$, Tukey's test）高于发病草莓根际土壤，其中发病状态 ACE 指数分别比健康草莓根际土壤低 7.2%（T1）和 11.0%（T2）。

表 1 健康及不同发病程度草莓根际细菌多样性

Table 1 Effects of healthy and different infected stage strawberry on rhizosphere bacterial α diversity

处理代号 Code	OTUs	Shannon	ACE	Chao1
T0	4194 \pm 276 a	6.92 \pm 0.07 a	5492 \pm 238 a	5502 \pm 191 a
T1	3842 \pm 352 ab	6.74 \pm 0.10 b	5092 \pm 346 b	5109 \pm 325 b
T2	3639 \pm 289 b	6.74 \pm 0.08 b	4890 \pm 335 b	4915 \pm 367 b

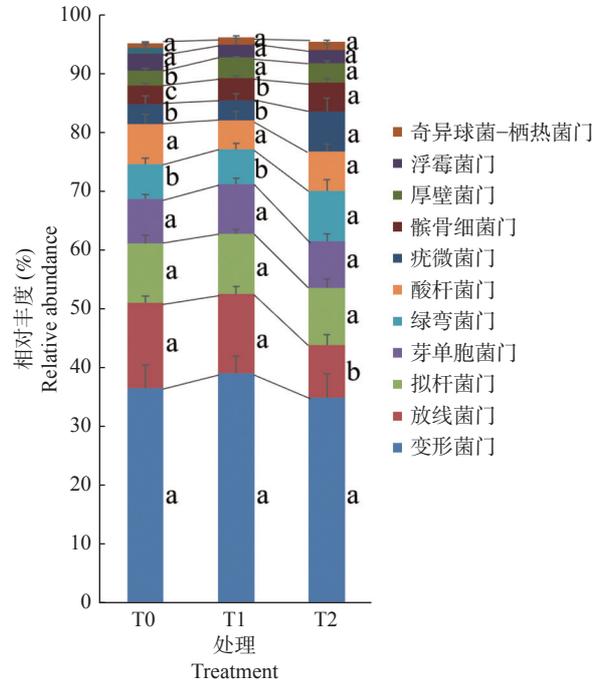
注：表中数据为平均值 \pm 标准差，同列不同字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。T0 健康草莓根际土壤，T1 初始发病状态草莓根际土壤，T2 发病中期草莓根际土壤。

2.2 草莓根际细菌群落组成

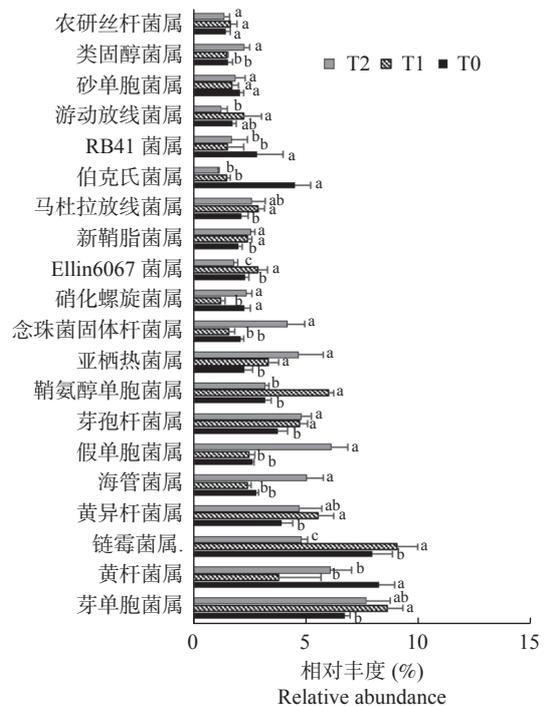
不同发病状态的草莓根际细菌主要（每个处理相对丰度 > 1%）包括变形菌门（Proteobacteria）（相对丰度 34.89% ~ 39.07%），其次为放线菌门（Actinobacteria）（8.97% ~ 14.44%），拟杆菌门（Bacteroidetes）（9.74% ~ 10.24%），芽单胞菌门（Gemmatimonadetes）（7.56% ~ 8.47%），绿弯菌门（Chloroflexi）（5.88% ~ 8.61%），酸杆菌门（Acidobacteria）（4.95% ~ 6.80%），疣微菌门（Verrucomicrobia）（3.42% ~ 6.87%），髌骨细菌门（Patescibacteria）（3.16% ~ 4.86%），厚壁菌门（Firmicutes）（2.53% ~ 3.47%），浮霉菌门（Planctomycetes）（2.23% ~ 2.82%）。

不同发病状态显著（ $P < 0.05$, Tukey's test）改变了草莓根际土壤中放线菌门、绿弯菌门、疣微菌门、Patescibacteria 和厚壁菌门的相对丰度（图 1）。健康草莓根际土壤 T0 中放线菌门的相对丰度为 14.44%，而轻度发病 T1 的相对丰度降低为 13.48%，中度发病草莓根际土壤中的相对丰度为 8.97%。绿弯菌门、疣微菌门、Patescibacteria 和厚壁菌门在草莓根际土壤中的相对丰度随着草莓炭疽病发病程度的升高而升高。在属水平上，我们分析了相对丰度在前 20 的种类发现，患炭疽病草莓根际土壤中芽孢杆菌属（*Bacillus*），亚栖热菌属（*Meiothermus*）两个菌属的相对丰度显著提高，而黄杆菌属（*Flavobacterium*），伯克氏菌属（*Burkholderia*）和 RB41 菌属的相对丰度显著降低。另外，研究结果表明有些菌属在轻度发病程度下相对丰度显著提高，而在中等发病程度下其相对丰度会降低，如芽单胞菌属（*Gemmatimonas*），链霉菌属（*Streptomyces*），鞘氨醇单胞菌（*Sphingomonas*），黄色土源菌（*Flavisolibacter*）和马杜拉放线菌属（*Actinomadura*）。还有一些菌属在轻度发病程度下相对丰度降低，而在中等发病程度下相对丰度升高，如硝化螺旋菌属（*Nitrospira*）（图 2）。基于 weight-Unifrac 矩阵的主坐标分析分析表明，健康草莓根际细菌群落结构不同于发病草莓根际细菌群落结构，并且健康草莓根际细菌群落结构与发病初期草莓根际细菌群落结构相似性高于发病中期草莓根际细菌群落结构（图 3）。同样，ANOSIM 分析也表明健康草莓根际细菌群落结构显著不同于发病草莓，且健康草莓根际细菌群落结构与轻度发病草莓根际群

落结构的相似性高于中度发病草莓根际细菌群落结构（表 2）。



注:每组处理柱旁不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey's test)
 图 1 健康及不同发病程度草莓根际细菌组成(门水平)
 Fig.1 Relative average abundances of bacteria in healthy and infected strawberries (at phylum level)



注:每组处理柱上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Tukey's test)
 图 2 健康及不同发病程度草莓根际细菌组成(属水平)
 Fig.2 Relative average abundances of bacteria in healthy and infected strawberry (at genus level)

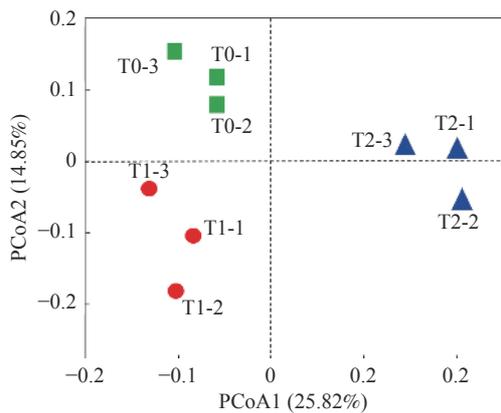


图 3 健康及不同发病程度草莓根际细菌 PCoA 分析(OTU 水平)
Fig.3 Results of PCoA analysis based on weighted Fast UniFrac distance at OTU level

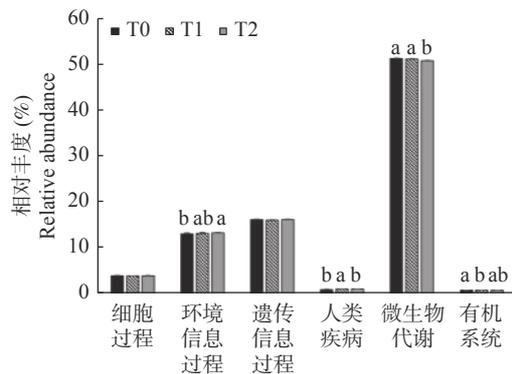


图 4 不同发病程度草莓根际细菌功能变化分析(一级功能层)
Fig.4 Changes of bacterial function profiles of different samples examined using changes of bacterial function profiles of different samples examined using PICRUST2 (hierarchy level 1)

表 2 不同处理间细菌群落差异性分析
Table 2 The bacterial composition difference among different treatments under long-term fertilization

组别 Group	差异性 Difference	
	系数 Coefficient (R)	显著性 Significance (P)
T0 vs T1 vs T2	0.6393	0.001
T0 vs T1	0.5037	0.003
T0 vs T2	0.6198	0.003
T1 vs T2	0.5651	0.003

2.3 不同发病状态草莓根际功能变化分析

为了初步探究不同发病状态对土壤细菌功能变化的影响,本研究采用 PICRUST2 对草莓根际细菌群落功能变化进行分析。基于 KEGG 数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 预测结果表明 (图 4): 草莓根际土壤中微生物代谢 (metabolism) 功能占 50.80%~51.24%, 环境信息过程 (environmental information Processing) 占 13.10%~13.30%, 遗传信息过程 (Genetic Information Processing) 占 16.09%~16.21%, 细胞过程 (Cellular Processes) 占 3.92%~3.98%, 有机系统 (Organismal Systems) 占 0.81%~0.82%。不同发病状态显著改变了土壤微生物代谢功能和有机系统, 而显著提高了环境信息过程。

同时对预测基因二级功能层进行分析, 发现其由信号传导 (Signal Transduction), 膜运输 (Membrane Transport), 遗传物质复制与修复 (Replication and Repair), 氨基酸代谢 (Amino Acid Metabolism), 糖代谢 (Carbohydrate Metabolism) 等 36 个子功能组成 (图 5)。

炭疽病显著提高了草莓根际微生物的细胞交流

(Cell Communication), 细胞传递和分解 (Transport and Catabolism), 转录 (Transcription) 以及循环 (Circulatory) 等过程。同时, 发病也降低了脂质代谢 (Lipid Metabolism), 消化系统 (Digestive System) 等功能。我们发现初始发病状态的草莓根际微生物细胞生长和死亡 (Cell Growth and Death) 功能显著提高, 而酶系统代谢 (Enzyme Families), 聚糖生物合成和代谢 (Glycan Biosynthesis and Metabolism), 辅助因子和维他命代谢 (Metabolism of Cofactors and Vitamins), 环境适应性 (Environmental Adaptation) 等显著降低

3 讨论

在草莓生产过程中, 往往在同一地块, 同样的水肥管理措施下, 有的植株发病, 有的植株健康生长。发病植株枯萎, 影响光合作用、水分吸收、根系分泌等过程, 必然影响植物根际微生物群落结构。在本研究中, 基于 OTUs、Shannon、ACE 和 Chao1 指数的 α -多样性在发病植株的草莓根际土壤中显著低于健康植株。该研究结果与肖蓉等^[18]的研究结果一致。另外在其他植物包括香蕉^[26]、马铃薯^[27]、黄瓜^[28]等发病植株土壤微生物 α -多样性显著低于健康植株一致。究其原因可能是染病植物根系分泌物在数量和组成发生改变, 从而改变了根际微生物的多样性^[6]。另外, 根际微生物因为与植物根系具有密切关系, 在维持植物营养、抗病性等方面发挥重要作用, 植物根际微生物多样性的改变可能导致植物根际环境进一步恶化, 从而进一步影响植物健康。

PCoA 和 ANOSIM 分析表明不同发病程度草莓

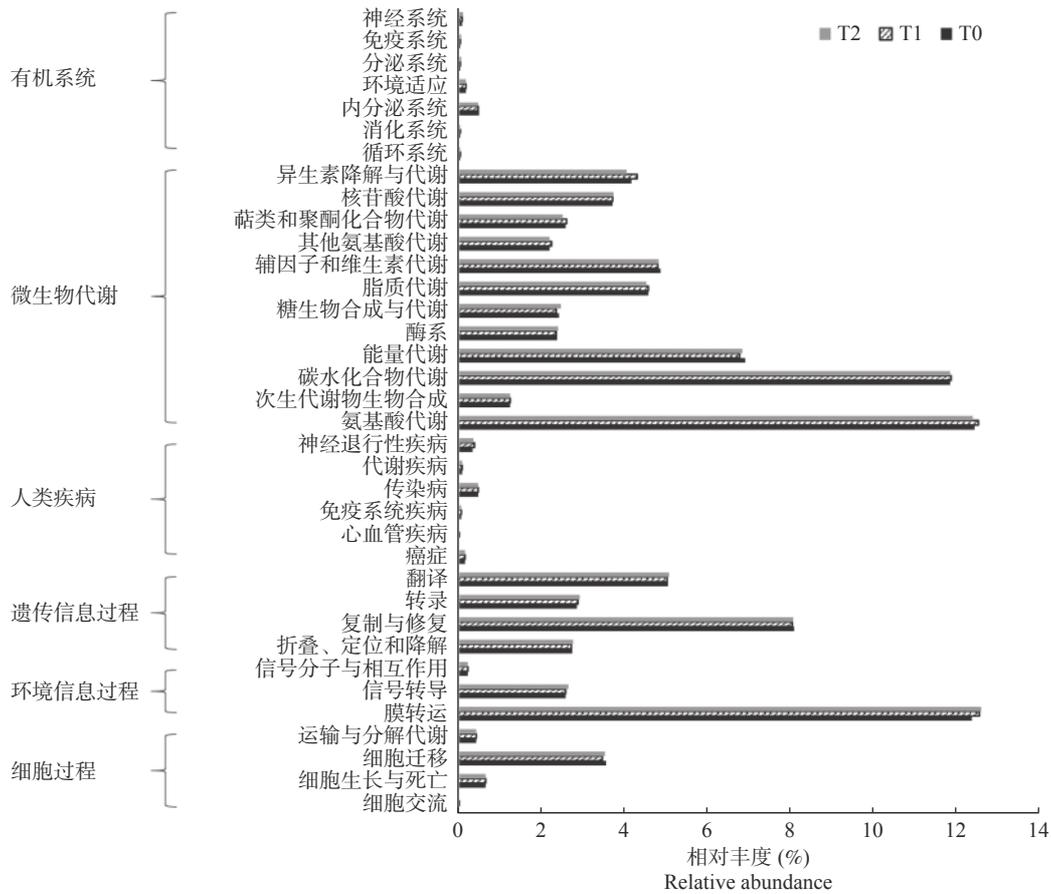


图5 不同发病程度草莓根际细菌功能变化分析(二级功能层)

Fig.5 Changes of bacterial function profiles of different samples examined using PIRCUSt2 (Hierarchy level 2)

显著改变了草莓根际细菌群落结构，并且健康草莓根际细菌群落结构与轻度发病草莓根际细菌群落结构相似性高于中度发病草莓根际细菌群落结构。在门水平上，放线菌门、绿弯菌门、疣微菌门、酸杆菌门和厚壁菌门的相对丰度发生了显著改变，其中放线菌门的相对丰度在发病植株根际土壤中显著低于健康植株。研究已经表明放线菌门的很多种类能够产生抗生素，并保护植株免受病原菌的侵袭^[29]，且放线菌门丰度的改变对植物健康状况具有直接的影响^[30]。该研究结果表明发病草莓根际细菌中有益细菌丰度降低，草莓抵抗炭疽病的能力降低。然而，与放线菌门相反，绿弯菌门的相对丰度随着草莓发病程度的增加而升高。许多研究表明绿弯菌门属于寡营养菌，更适合在营养贫瘠的土壤中生长^[31-33]。发病程度提高使草莓根际绿弯菌门丰度升高可能与发病植株根系分泌物增加有关^[6]。另外，厚壁菌门的相对丰度也随着发病程度的增加而提高。以前的研究发现厚壁菌门的丰度与根系分泌物中有机酸的含量

呈显著正相关，此研究结果表明草莓根系分泌物中有机酸含量可能随着发病程度的提高而增加。

大量的研究表明，芽孢杆菌属中很多物种具有抗病促生功能，如解淀粉芽孢杆菌能够促进黄瓜、番茄和草莓等的生长，同时解淀粉芽孢杆菌可以提高植物对于病害的抗性，而有研究表明亚栖热菌属具有形成生物膜抵抗病原菌侵染的作用^[34]。然而，在本研究中发病程度高的草莓根际芽孢杆菌属和亚栖热菌属相对丰度高于健康植株。许多研究已经表明，植物在受到病原菌侵染时，能够通过改变植物根系分泌物的种类和数量以招募富集植物有益微生物^[8,35-36]，以抵抗病原菌的侵染。例如，Liu 等^[37]研究发现在植物受到病原菌侵染时，植物可以促进解淀粉芽孢杆菌在根际富集并定殖在植物根系，促进植物的抗病性。在草莓根际土壤中黄杆菌属和伯克氏菌属的相对丰度在发病草莓根际土壤中显著低于健康草莓根际土壤。Menon 等^[38]从水稻根际土壤中筛选出 9 株菌并且鉴定为黄杆菌属 (*Flavobacterium. spp*)，并

且发现其具有促进作物生长的功能。另外, 伯克氏菌属也可以通过提高土壤中植物可利用营养物质含量来促进植物生长^[39-40]。这些研究结果表明, 在属水平上, 感染炭疽病的草莓根际可能富集抗病微生物, 但是降低活化土壤营养物质、促进植物生长的微生物相对丰度。

土壤微生物基因功能以及代谢过程的改变反映了微生物对环境的适应性和应激性的变化^[41]。植株染病后会直接或间接影响植物在吸收水分、养分以及营养物质的活性, 其根系分泌物产生的速度和物质组成也会发生改变^[6]。在本研究中, 我们发现草莓发病后根际细菌中细胞交流功能显著提高。该研究结果与 Wu 等^[17]的研究结果一致, 这可能是因为发病植株分泌更多的根系分泌物促进细胞富集抵抗病原菌的侵染, 如通过富集能够形成生物膜的亚栖热菌属等。发病植株根际细菌除了细胞交流功能升高外, 还提高了细胞传递和分解, 转录以及循环等过程, 该研究结果表明发病植株提高了根际细菌在相互作用、细胞更新等方面的作用。另外, 在发病草莓根际细菌显著降低的功能有脂质代谢和消化等方面的作用, 说明发病草莓对根际细菌的脂质代谢和消化等方面具有抑制作用。

4 结论

患炭疽病草莓根际细菌多样性显著降低, 且随着发病程度加重多样性降低幅度加大。与健康草莓根际相比, 发病草莓根际细菌群落结构发生了显著改变, 其中发病植株根际芽孢杆菌属和亚栖热菌属显著增加, 而能够促进土壤养分转化的黄杆菌属和伯克氏菌属的丰度显著降低。发病植株根际土壤中脂质代谢功能降低而细胞交流功能升高。研究结果为指导草莓田间管理、有目的地筛选抗炭疽病功能微生物提供了依据。

参考文献:

- [1] World Health Organization. The state of food security and nutrition in the world 2018: building climate resilience for food security and nutrition[M]. Food & Agriculture Org., 2018.
- [2] 韩永超, 曾祥国, 向发云, 等. 草莓属植物种质资源对炭疽病抗性的离体评价[J]. 中国农业科学, 2019, (20): 3585 - 3594.
- [3] 赵玳琳, 何海永, 吴石平, 等. 棘孢木霉GYSW-6m1对草莓炭疽病的生防机制及其防病促生作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2020, (4): 587 - 595.
- [4] Wang Q F, Jiang X, Guan D W, et al. Long-term fertilization changes bacterial diversity and bacterial communities in the maize rhizosphere of Chinese Mollisols[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 125: 88 - 96.
- [5] 董利苹, 曹靖, 李先婷, 等. 不同耐盐植物根际土壤盐分的动态变化[J]. 生态学报, 2011, 31: 2813 - 2821.
- [6] Yuan J, Zhao J, Wen T, et al. Root exudates drive the soil-borne legacy of aboveground pathogen infection[J]. *Microbiome*, 2018, 6: 1 - 12.
- [7] Wang Q F, Ma M C, Jiang X, et al. Impact of 36 years of nitrogen fertilization on microbial community composition and soil carbon cycling-related enzyme activities in rhizospheres and bulk soils in northeast China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 136: 148 - 157.
- [8] Berendsen R L, Pieterse C M, Bakker P A. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in plant science*, 2012, 17: 478 - 486.
- [9] Li C, Tian Q, Rahman M K, et al. Effect of anti-fungal compound phytoalexin in wheat root exudates on the rhizosphere soil microbial community of watermelon[J]. *Plant and Soil*, 2020, 456: 223 - 240.
- [10] Rudrappa T, Czymmek K J, Paré P W, et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. *Plant physiology*, 2008, 148: 1547 - 1556.
- [11] 吴祥, 吉沐祥, 陈宏州, 等. 句容地区草莓炭疽病病原菌的鉴定及防治药剂筛选[J]. 江苏农业学报, 2013, (6): 1510 - 1513.
- [12] 韩国兴, 礼茜, 孙飞洲, 等. 杭州地区草莓炭疽病病原鉴定及其对多菌灵和乙霉威的抗药性[J]. 浙江农业科学, 2009, 6: 1169 - 1172.
- [13] 谷春艳, 王学峰, 苏贤岩, 等. 解淀粉芽孢杆菌WH1G与氟啶胺协同防治草莓灰霉病[J]. 农药, 2017, (12): 932 - 936.
- [14] Han Y C, Zeng X G, Xiang F Y, et al. Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17: 1391 - 1400.
- [15] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, et al. Microbial diversity and soil functions[J]. *European journal of soil science*, 2003, 54: 655 - 670.
- [16] Langille M G, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31: 814 - 821.
- [17] Wu Z, Hao Z, Sun Y, et al. Comparison on the structure and function of the rhizosphere microbial community between healthy and root-rot *Panax notoginseng*[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 107: 99 - 107.
- [18] 肖蓉, 曹秋芬, 聂园军, 等. 基于高通量测序患炭疽病草莓根际与健康草莓根际细菌群落的比较研究[J]. 中国农学通报, 2017, (11): 14 - 20.
- [19] Cheng W, Johnson D W, Fu S. Rhizosphere effects on decomposition: controls of plant species, phenology, and fertilization[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2003, 67:

- 1418 – 1427.
- [20] Ai C, Liang G, Sun J, et al. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57: 30 – 42.
- [21] Zhou J, Jiang X, Zhou B K, et al. Thirty four years of nitrogen fertilization decreases fungal diversity and alters fungal community composition in black soil in northeast China[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 95: 135 – 143.
- [22] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7: 335 – 336.
- [23] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2194 – 2200.
- [24] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature methods*, 2013, 10: 996 – 998.
- [25] Schlöter M, Nannipieri P, Sørensen S J, et al. Microbial indicators for soil quality[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54: 1 – 10.
- [26] 邓 晓, 李勤奋, 武春媛, 等. 健康香蕉(*Musa paradisiaca*)植株与枯萎病患植株根区土壤细菌多样性的比较研究[J]. *生态环境学报*, 2015, (3): 402 – 408.
- [27] Gorissen A, van Overbeek L, van Elsas J. Pig slurry reduces the survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in soil[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50: 587 – 593.
- [28] Qiu M, Zhang R, 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: 807 – 816.
- [29] Berdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. *The Journal of antibiotics*, 2005, 58: 1 – 26.
- [30] Lee S M, Kong H G, Song G C, et al. Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15: 330 – 347.
- [31] Xun W, Zhao J, Xue C, et al. Significant alteration of soil bacterial communities and organic carbon decomposition by different long-term fertilization management conditions of extremely low-productivity arable soil in South China[J]. *Environmental microbiology*, 2016, 18: 1907 – 1917.
- [32] Dai H, Zang H, Zhao Y, et al. Linking bacterial community to aggregate fractions with organic amendments in a sandy soil[J]. *Land Degradation & Development*, 2019, 30: 1828 – 1839.
- [33] Xu P, Liu Y, Zhu J, et al. Influence mechanisms of long-term fertilizations on the mineralization of organic matter in Ultisol[J]. *Soil and Tillage Research*, 2020, 201: 104594.
- [34] Li N, Li X, Zhang H J, et al. Microbial community and antibiotic resistance genes of biofilm on pipes and their interactions in domestic hot water system[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 767: 144364.
- [35] Huang X, Zhou X, Zhang J, et al. Highly connected taxa located in the microbial network are prevalent in the rhizosphere soil of healthy plant[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2019, 55: 299 – 312.
- [36] Stringlis I A, Yu K, Feussner K, et al. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115: E5213 – E5222.
- [37] Liu Y, Zhang N, Qiu M, et al. Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection[J]. *FEMS microbiology letters*, 2014, 353: 49 – 56.
- [38] Menon R R, Kumari S, Viver T, et al. *Flavobacterium pokkali* sp. nov., a novel plant growth promoting native rhizobacteria isolated from pokkali rice grown in coastal saline affected agricultural regions of southern India, Kerala[J]. *Microbiological Research*, 2020, 240: 126533.
- [39] Wang C, Huang Y, Yang X, et al. *Burkholderia* sp. Y4 inhibits cadmium accumulation in rice by increasing essential nutrient uptake and preferentially absorbing cadmium[J]. *Chemosphere*, 2020, 252: 126603.
- [40] You M, Fang S, Macdonald J, et al. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth[J]. *Microbiological Research*, 2020, 233: 126395.
- [41] Liu D, Keiblinger K M, Schindlbacher A, et al. Microbial functionality as affected by experimental warming of a temperate mountain forest soil—A metaproteomics survey[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 117: 196 – 202.

Differences in Structure and Function of Rhizosphere Bacterial Communities between Anthracnose-infected and Healthy Strawberries

WANG Qing-feng¹, ZHOU De-ping^{1*}, CHU Chang-bin¹, ZHAO Zheng¹,
YANG Qian-gang², WU Shu-hang^{1*}

(1. Eco-Environmental Protection Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, 201403, China;

2. Hangzhou Jinjiang Group Co., Ltd., Hangzhou 310005, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to compare the rhizosphere microbial community structure and function of strawberry among difference degrees of anthracnose, which is crucial for guiding farmland management and screening useful strawberry anthracnose antagonistic resource. [Method] The strawberry rhizosphere soil among difference degrees of anthracnose in the same field was collected in a greenhouse for studying the rhizosphere bacterial diversity and richness at phylum and genus levels by using Illumina sequencing and PICRUSt2. [Result] The results showed that anthracnose decreased rhizosphere bacterial diversity, with the mild degrees of anthracnose decreased 7.2% (ACE) and the middle decreased 11%. The phyla Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes dominated in all strawberry rhizosphere soil. The different degrees of anthracnose changed rhizosphere soil bacterial composition, with an increase of *Bacillus*. spp and *Meiothermus*. Spp, while a decreased of *Flavobacterium* and *Burkholderia*. The PICRUSt2 analysis showed that the occurrence of anthracnose disease increased cell communication, transport and catabolism, transcription, but decreased lipid metabolism and digestive system. [Conclusion] The strawberry anthracnose change rhizosphere bacterial composition, functional traits and decrease diversity. In addition, the strawberry anthracnose also decreases the relative abundance of bacterial taxa and enhances plant nutrient absorption.

Key words: Strawberry; Anthracnose; Rhizosphere bacteria; PICRUSt2; Community composition

[责任编辑: 刘轶飞]