

DOI: 10. 11686/cyxb2024255

<http://cyxb.magtech.com.cn>

李雪萍, 许世洋, 李建军, 等. 青稞根腐病根际土壤细菌多样性及群落结构变化规律. 草业学报, 2025, 34(5): 118—129.

LI Xue-ping, XU Shi-yang, LI Jian-jun, *et al.* Bacterial diversity and community structural changes in rhizosphere soil of naked barley disturbed by root rot. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(5): 118—129.

青稞根腐病根际土壤细菌多样性及群落结构变化规律

李雪萍¹, 许世洋², 李建军¹, 漆永红^{1*}

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 青稞根腐病危害严重, 其发生、蔓延与其根际土壤细菌群落动态密切相关。为明确青稞根腐病的发生对其根际土壤细菌多样性及群落结构的影响, 本研究通过对甘肃甘南藏族自治州青稞种植区的根腐病进行系统调查, 采集不同发病率青稞根际土壤样品, 采用高通量测序获得其根际土壤细菌群落遗传信息, 分析其多样性及演替规律, 并通过 COG 基因库注释其基因功能。结果发现, 青稞根际土壤细菌物种组成丰富, 均匀程度高, 能全面反映样品细菌群落结构。健康样品与发病率为 5% 青稞根际土壤细菌群落距离最近, 发病率越高, 则与健康样品的距离越大。随青稞根腐病发病率升高, 不同发病样本特有物种数呈先增高后降低趋势; 变形菌门相对丰度先升高后降低, 与绿弯菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、放线菌门和芽单胞菌门变化相反; 芽孢杆菌目、硝化螺旋菌目, 芽单胞菌科、芽孢杆菌科、硝化螺旋菌科及对应的芽单胞菌属、芽孢杆菌属、硝化螺旋菌属相对丰度先升高后降低, 简单芽孢杆菌相对丰度先升高后降低, 而醋酸钙不动杆菌、嗜根寡养单胞菌等相对丰度先降低后升高。青稞根际土壤细菌氨基酸转运代谢、转录、脂肪转运代谢及翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白等功能基因的丰度因根腐病的发生而降低, 信号转导机制、能量生成和转换等功能基因的丰度则升高。

关键词: 青稞; 根腐病; 群落结构; 物种多样性; 高通量

Bacterial diversity and community structural changes in rhizosphere soil of naked barley disturbed by root rot

LI Xue-ping¹, XU Shi-yang², LI Jian-jun¹, QI Yong-hong^{1*}

1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China; 2. College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: The occurrence and spread of naked barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*) root rot are known to be closely related to the dynamics of the rhizosphere soil bacterial community. This study systematically investigated naked barley root rot in fields of the Tibetan Gannan Autonomous Prefecture, Gansu Province, to clarify the influences on the diversity and structure of the rhizosphere soil bacterial community disturbed by naked barley root rot. Rhizosphere soil samples with different root rot incidences were collected, and genetic characterization of the bacterial community was obtained by high-throughput sequencing. The structural dynamics and the diversity of the bacterial community were thus analyzed. Additionally, the various bacterial functional genes were annotated using COG databases. The results revealed a rich and evenly distributed bacterial species composition in the rhizosphere soil of naked barley, which comprehensively mirrors the bacterial community structure of the samples. The bacterial

收稿日期: 2024-07-02; 改回日期: 2024-09-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060037) 和甘肃省农业科学院重点研发计划 (2023GAAS22) 资助。

作者简介: 李雪萍 (1989—), 女, 甘肃镇原人, 副研究员, 博士。E-mail: lixueping@gsagr.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: qiyonghong920@gsagr.cn

community of healthy samples was closest to samples with 5% incidence of root rot. Additionally, as the incidence rate of root rot increased, the bacterial communities diverged more significantly from those of healthy samples. The number of bacterial species in diseased rhizosphere soil samples increased initially and then decreased, as the root rot incidence increased. Also, the relative abundance of Proteobacteria initially increased and then decreased with increased root rot, incidence, while a contrasting trend was observed for Chloroflexi, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Gemmatimonadetes. Similarly, the relative abundance of Bacillales, Nitrospirales, and their commonly-present families Gemmatimonadaceae, Bacillaceae, Nitrospiraceae, as well as the genera *Gemmatimonas*, *Bacillus*, and *Nitrospira*, including *Bacillus simplex*, showed an initial increase followed by a decrease. Conversely, the relative abundance of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Stenotrophomonas rhizophila* initially decreased and then increased. The abundance of functional genes related to bacterial amino acid transport and metabolism, transcription, lipid transport and metabolism, posttranslational modification, protein turnover, chaperones in the rhizosphere soil of naked barley decreased due to the occurrence of root rot, while the abundance of genes involved in signal transduction mechanisms and energy production and conversion increased.

Key words: naked barley; root rot; community structure; species diversity; high-throughput

青稞(*Hordeum vulgare* var. *nudum*)是我国青藏高原地区(以下简称“藏区”)粮、经、饲、草兼用的主产优势作物之一,其耐寒耐旱、用途广泛、营养价值丰富,深受种植者、加工者和消费者喜爱,种植面积 26.67 万 hm^2 ^[1-3]。由于集约化生产经营和青稞长期连作等因素,以根腐病为主的土传病害在藏区发生范围不断扩大、危害愈发严重^[4]。其中,青稞根腐病发病率为 5%~20%,患病植株品质、产量衰退明显,严重威胁着藏区粮食安全和青稞产业的高质量可持续发展^[5-6]。但限于藏区极端的气候条件、较为脆弱的生态环境及青稞根腐病的隐蔽性、根际病原类群的复杂性等,传统的化学和农艺防治方法防效差、高抗品种和优良的生防资源仍较为匮乏^[7-9]。

根际土壤微生物群落结构、多样性及功能与植物健康联系紧密,细菌是根际土壤微生物中多样性和丰富度最高、最为活跃的组分,与病原菌的侵染流行息息相关^[10-11]。随着宏基因组概念的提出与测序技术的迭代更新,高通量测序技术在研究植物土传病害与根际微生物互作中优势日益凸显、应用不断拓展,为研究根际细菌群落演替规律提供了重要支撑^[12]。诸多研究发现,植物根腐病发生后,其根际土壤细菌群落结构及多样性均发生显著变化,甚至导致根际土壤微生态失衡,从而加重病害的发生^[13]。目前,针对青稞根腐病,仅许世洋等^[14]报道揭示了苗期青稞根腐病根际土壤细菌群落结构的演化规律,但同一作物不同生育时期的根际微生物动态存在很大差异^[15]。鉴于此,本研究针对成株期不同根腐病发病率的青稞田块,采集其根际土壤,通过高通量测序的方法获得其根际土壤细菌群落信息,分析其群落结构演化规律及多样性,为精准、高效防治青稞根腐病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 采样区概况

采样区位于甘肃省甘南藏族自治州临潭县、卓尼县及其交错地带,平均海拔 2855 m,属高寒干旱区,寒冷、阴湿、四季不分明,年均气温 4.2℃,年均降水量为 480.2 mm,地貌以高山丘陵为主,青稞为该区域主产作物。

1.2 不同发病青稞根际土壤样品采集

于 2022 年 8 月,参考《植病研究方法》^[16]统计采样区成株期青稞田块内的根腐病发病率,最终选取无根腐病发生和发病率分别为 5%、10%、15%、20% 的典型样地。采用五点取样法^[14]分别采集健康青稞和典型根腐病青稞植株根际土壤样品各 10 份,低温运输至实验室。按照发病率,将不同地块样品充分混匀,分别为:健康青稞根际土壤样品(AH)、发病率为 5% 样品(AR₁)、发病率为 10% 样品(AR₂)、发病率为 15% 样品(AR₃)、发病率为 20% 样品(AR₄)备用,每个处理 3 次重复。

1.3 土壤总DNA提取与测序

采用土壤DNA提取试剂盒(soil DNA kit, Omega Bio-tek, 美国),按照说明书步骤提取各土壤样品总DNA,检测其浓度与纯度后,送至上海欧易生物医学科技有限公司,委托其使用引物343F(5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCA-3')和798R(5'-AGGGTATCTAATCCT-3')对细菌16S rRNA V3~V4区域进行PCR扩增,并进行纯化、定量后,使用Illumina Miseq平台进行高通量测序。

1.4 测序数据质控

采用Trimmomatic(v. 0. 35)软件中的滑动窗口法^[17]对Illumina MiSeq测序生成的原始双端序列(raw data)进行扫描,切掉碱基质量平均值低于阈值的滑窗,并去除长度小于50 bp的序列。得到合格的双端序列后,使用Flash(v. 1. 2. 11)^[18]软件拼接(overlap $\leq$ 200 bp)得到完整的paired end序列,并使用QIIME中的split_libraries(v. 1. 8)^[19]软件去除含N碱基、单碱基重复大于8、长度小于200 bp的序列,得到clean tags序列。使用UCHIME(v. 2. 4. 2)^[20]软件去除clean tags中的嵌合体,得到valid tags。

1.5 OTU分类及注释

使用Vsearch(v. 2. 4. 2)^[21]软件,按照97%的相似度对valid tags形成操作分类单元(operational taxonomic units, OTU),选取各OTU中丰度最大的序列作为代表序列,采用RDP classifier Naive Bayesian分类算法^[22]将其与Greengenes数据库^[23]比对,得到OTU中物种分类地位注释信息。根据不同样本中各个OTU包含的序列数构建相应的丰度矩阵文件,并绘制Venn图,比对各样本间OTUs的分布差异。

1.6 青稞根际土壤细菌多样性评估

通过谱系多样性、丰富度估计量指数、测序深度指数、种类丰富度维度、香浓指数、辛普森指数等多样性指数评估样本测序量是否合理,比较样本间物种丰富度的差异。同时,根据Specaccum物种累积曲线判断抽样量充分性、估计物种丰富度,利用rank abundance分析物种丰富度和均匀程度。最后基于Binary jaccard distance算法^[24]得到的距离矩阵,进行不同样本间层级聚类,以比较不同样本群落遗传差异。

1.7 青稞根际土壤细菌群落结构分析

根据OTU注释结果对样本在门、纲、目、科、属、种不同分类层级的注释信息进行汇总,并根据其相对丰度排序绘制热图、聚类分析热图及Circos圈图。

1.8 青稞根际土壤细菌群落功能预测

基于Greengenes数据库注释的16S rRNA测序结果,通过PICRUSt软件^[25]比对COG数据库(Clusters of Orthologous Groups of proteins, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog/>)预测不同样本中功能基因相对丰度,采用Kruskal-Wallis检验进行差异分析并排序且绘制热图。

1.9 数据处理

以上数据均通过Excel 2016整理,使用RStudio(v. 4. 1. 3)进行绘图:Venn图通过ggplot2包绘制,Specaccum物种累积曲线通过vegan包绘制,调用BiodiversityR、ggplot2包进行Rank Abundance分析,物种多样性指数通过vegan包计算,样本间层级聚类、热图、聚类分析热图及Circos圈图均通过ggplot2包绘制。

2 结果与分析

2.1 不同发病青稞根际土壤细菌OTU丰度

共注释得到2143个OTUs,各样本OTU个数为1516~1858,5个样本共有OTU数量为1502个(图1)。

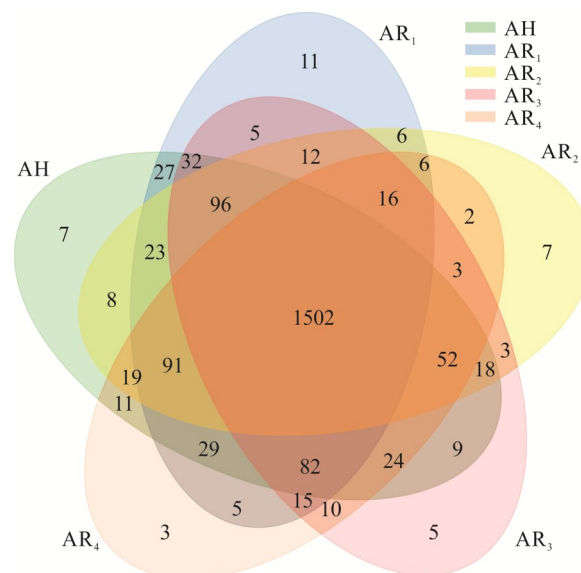


图1 青稞根际土壤细菌 OTUs

Fig. 1 Bacterial OTUs in naked barley rhizosphere soil

健康青稞根际土壤样品(AH)、发病率为 5% 样品(AR₁)、发病率为 10% 样品(AR₂)、发病率为 15% 样品(AR₃)、发病率为 20% 样品(AR₄)特有 OTUs 数量分别为 7、11、7、5、3 个;随青稞根腐病发病率增高,特有 OTUs 数量呈先增高后降低趋势,且发病率越高,特有 OTUs 越少。

2.2 不同发病青稞根际土壤细菌多样性

2.2.1 多样性指数 与健康样品(AH)相比,根腐病的发生使谱系多样性、丰富度估计量指数总体呈下降趋势,香浓指数升高,辛普森指数没有差异。发病样品内,当发病率为 15% 时(AR₃),谱系多样性、丰富度估计量指数达到最高;种类丰富度维度、香浓指数总体表现为随发病率升高呈增长趋势(表 1)。

表 1 不同发病青稞根际土壤细菌多样性指数

Table 1 Bacterial diversity indexes in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences						
样本 Samples	谱系多样性 PD_whole_tree	丰富度估计量指数 Chao1	测序深度指数 Goods_coverage	种类丰富度维度 Observed_species	香浓指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
AH	54.95	1975.18	0.96	1598.00	9.25	0.99
AR ₁	54.70	1892.30	0.97	1598.60	9.32	0.99
AR ₂	54.52	1889.42	0.97	1597.20	9.26	0.99
AR ₃	55.62	1933.35	0.96	1607.00	9.32	0.99
AR ₄	54.67	1926.21	0.97	1608.90	9.37	0.99

2.2.2 物种丰富度及均匀度 随测序样本量的增加,Specaccum 物种累积曲线趋于平缓,样本中被检测到物种数量趋于稳定(图 2a),说明本研究测序抽样充分,所得数据能反映物种丰富性程度。随着 OTU 分布数不断增加,相对丰度曲线在横轴上的映射长度不断加大,达到 2000 后不再有波动(图 2b),说明本研究所测序的样品物种组成丰富,均匀程度高。在纵轴上的跨度也不断增加,说明不同物种数量分异越来越大。

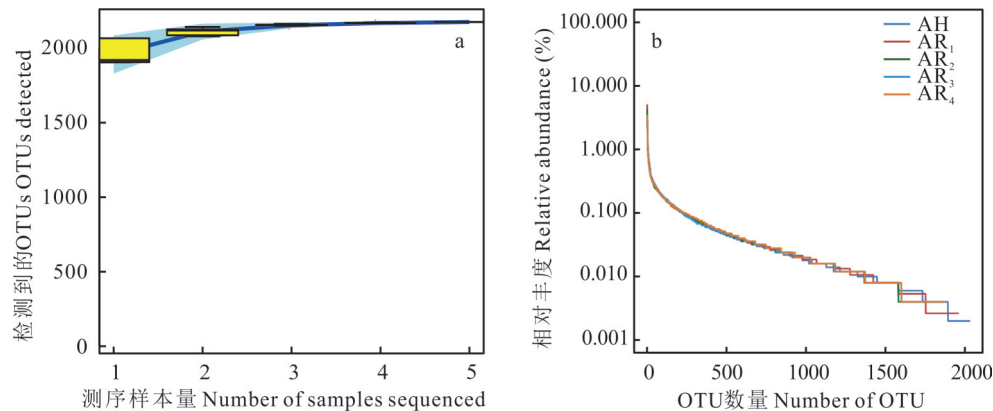


图 2 不同发病青稞根际土壤细菌物种丰富度及均匀度

Fig. 2 Bacterial species richness and evenness in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

2.2.3 群落遗传多样性 由聚类分析(图 3)可知,健康样本(AH)与发病率为 5% 样本(AR₁)距离最近,Binary jaccard 距离为 0.11,其次是发病率为 10% 样本(AR₂),随发病率升高,与健康样品距离愈远,发病率为 20% 样本(AR₄)与健康样品的 Binary jaccard 距离达 0.14。此外,4 组发病样本 AR₁、AR₂、AR₃、AR₄ 两两之间的 Binary jaccard 距离均在 0.15 以上,说明青稞根腐病的发生对其根际土壤细菌群落结构的影响较大。

2.3 不同发病青稞不同分类水平根际土壤细菌群落结构演化规律

2.3.1 门水平 在门水平上(图 4a),优势菌变形菌门(Proteobacteria)在发病率为 5% 时相对丰度最高,之后

随发病率升高不断降低,当发病率为20%(AR₄)时,其相对丰度有所回升,但低于健康(AH)样品和发病率为5%(AR₁)的样品丰度。酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)则呈相反的变化趋势。放线菌门(Actinobacteria)在发病率为5%时丰度有所降低,10%时丰度回升,之后随发病率的增加持续降低。拟杆菌门(Bacteroidetes)在发病率为0%~15%(AH, AR₁~AR₃)时,其丰度随发病率的升高而降低。

2.3.2 纲水平 在纲水平上(图4b),发病率为0%~15%时,拟杆菌纲(Bacteroidia)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)相对丰度均呈先升高后降低的趋势,当发病率升至20%时,其相对丰度有所回升。而Acidobacteria_Subgroup_6、放线菌纲(Actinobacteria)和Blastocatellia_Subgroup_4则呈相反的变化规律。

2.3.3 目水平 在目水平上(图5a),鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)相对丰度最高。随发病率的增加,噬几丁质菌目(Chitinophagales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、黄单胞菌目(Xanthomonadales)、Pyrinomonadales、微球菌目(Micrococcales)、鞘氨醇杆菌目(Sphingobacteriales)、Longimicrobiales和柄杆菌目(Caulobacterales)相对丰度先降低后升高,但变化趋势转折点对应发病率有所差异。Solibacterales、芽孢杆菌目(Bacillales)及硝化螺旋菌目(Nitrospirales)的相对丰度先增加后降低,分别在10%、5%、15%的样本中相对丰度最高。

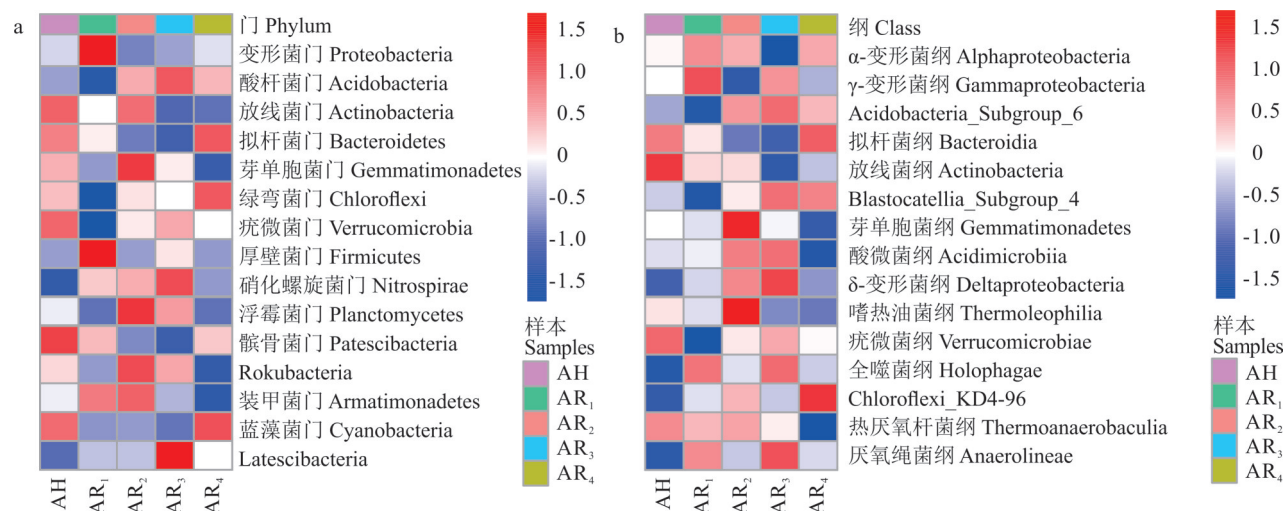


图4 门、纲水平不同发病青稞根际土壤细菌群落结构

Fig. 4 Bacterial community structure at phylum and class level in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

2.3.4 科水平 在科水平上(图5b),鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)相对丰度最高。噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)、Pyrinomonadaceae、黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、Longimicrobiaceae、柄杆菌科(Caulobacteraceae)相对丰度随发病率升高先降低后升高。其中,除Pyrinomonadaceae、Longimicrobiaceae外,其他科相对丰度在发病率为15%的样本中最低,在健康植株样本中

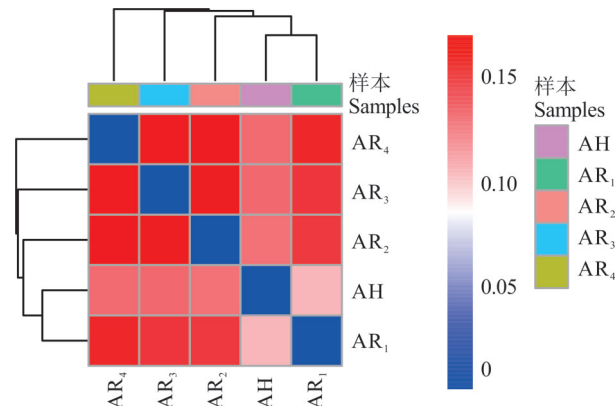


图3 不同发病青稞根际土壤细菌群落遗传聚类分析

Fig. 3 Bacterial genetic cluster analysis in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

相对丰度最高。芽单胞菌科 (Gemmatimonadaceae)、微颤蓝细菌科 (Microscillaceae)、黄色杆菌科 (Xanthobacteraceae)、Solibacteraceae_Subgroup_3、Solirubrobacteraceae、Ilumatobacteraceae、Haliangiaceae、芽孢杆菌科 (Bacillaceae)、硝化螺旋菌科 (Nitrospiraceae) 相对丰度随发病率增加先升高后降低。

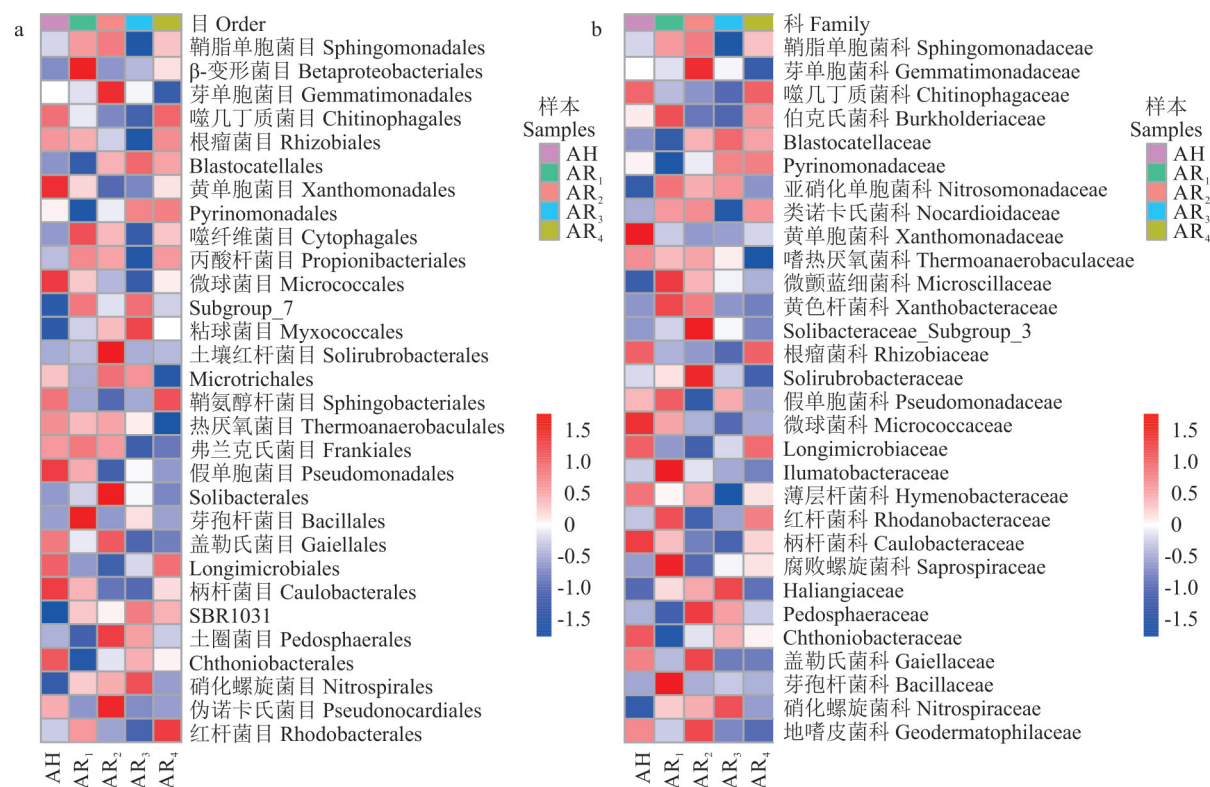


图5 目、科水平不同发病青稞根际土壤细菌群落结构
Fig. 5 Community structure of bacteria at order and family level in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

2.3.5 属水平 在属水平上 (图 6a), 鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*) 相对丰度最高。芽单胞菌属 (*Gemmatimonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*) 相对丰度随发病率升高整体呈先升高后降低的变化趋势。发病率为 5% 时, 芽单胞菌属、芽孢杆菌属相对丰度最高。属间相关性聚类分析结果发现 (图 6b), 硝化螺旋菌属与 *Haliangium* 相对丰度呈极显著正相关 ($P < 0.01$), 且二者均与 *Flavisolibacter*、鞘脂杆菌属 (*Pedobacter*) 呈负相关, *Flavisolibacter* 与鞘脂杆菌属显著正相关 ($P < 0.05$)。芽孢杆菌属与芽单胞菌属、*Ferruginibacter*、根瘤杆菌属 (*Rhizobacter*) 正相关 ($P < 0.05$)。

2.3.6 种水平 在种水平上, 醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、简单芽孢杆菌 (*Bacillus simplex*) 和嗜根寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas rhizophila*) 相对丰度较高。醋酸钙不动杆菌、嗜根寡养单胞菌在健康样品 (AH) 中分布较广, 随发病率增高, 其相对丰度呈先降低后上升的变化趋势。简单芽孢杆菌在发病率为 5% 样品 (AR₁) 中分布最广, 其丰度随发病率的增高而降低 (图 7)。

2.4 不同发病青稞根际土壤细菌基因功能

通过 COG 基因库注释不同发病青稞根际土壤细菌基因功能发现 (图 8), 与氨基酸转运代谢 (E)、转录 (K)、脂肪转运代谢 (I) 功能相关基因丰度随根腐病发病率增高而降低, 与信号转导机制 (T) 相关的功能基因丰度随根腐病发病率增高而升高。当发病率达到 20% 时, 与能量生成和转换 (C) 相关基因丰度升高, 与翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白 (O) 相关功能基因降低。

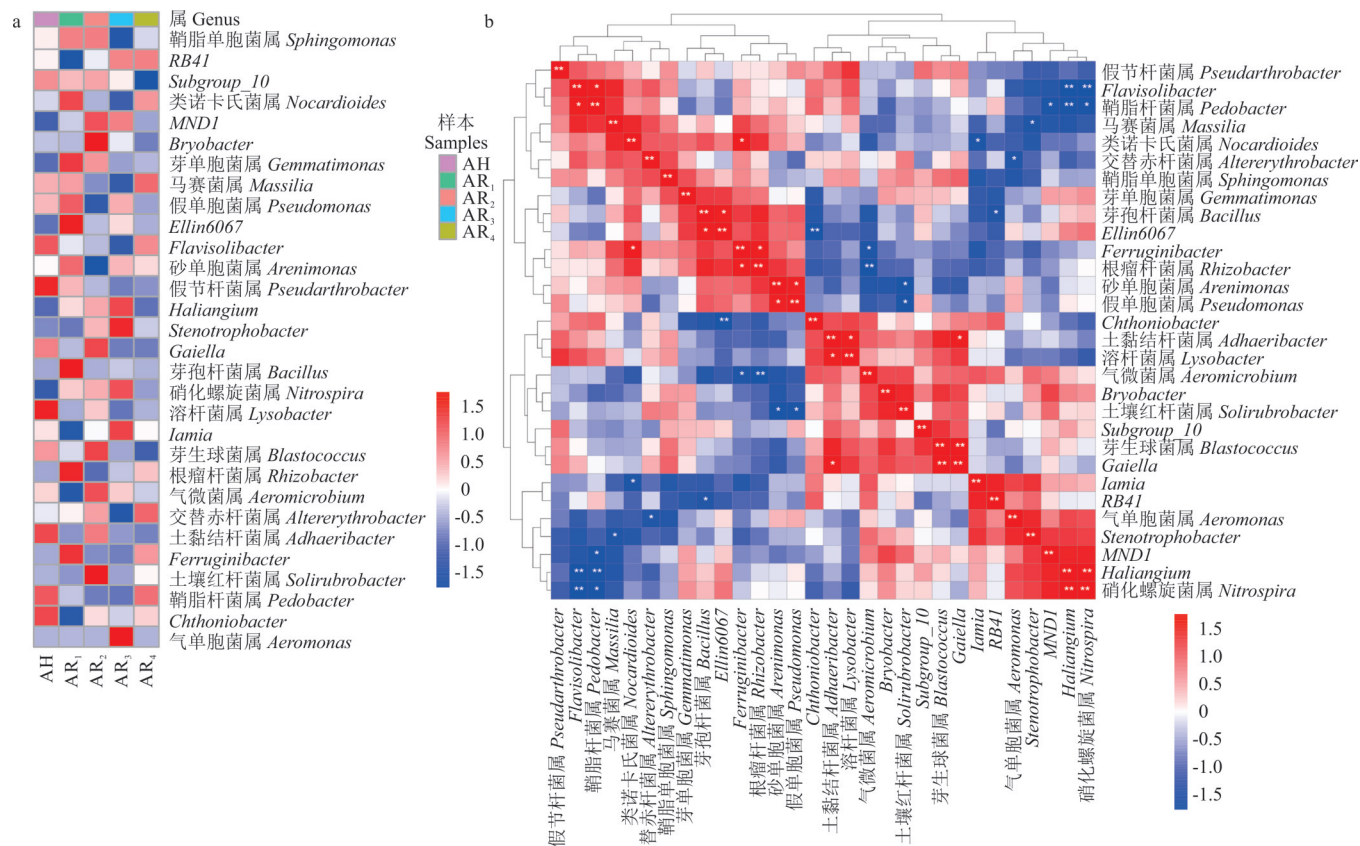


图6 属水平不同发病青稞根际土壤细菌群落结构及相关性

Fig. 6 Bacterial community structure and correlation analysis at genus level in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

**：不同属间相关性极显著 ($P < 0.01$) The correlations among different genera are extremely significant ($P < 0.01$); *：不同属间相关性显著 ($P < 0.05$) The correlations among different genera are significant ($P < 0.05$).

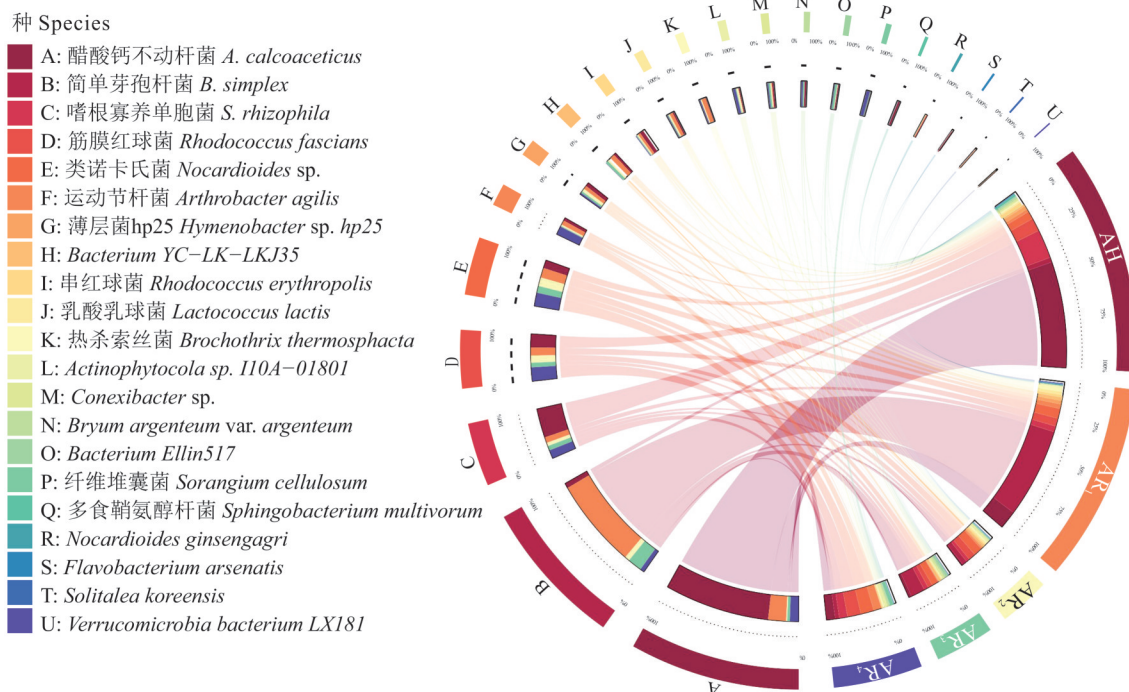


图7 种水平不同发病青稞根际土壤细菌群落结构

Fig. 7 Bacterial community structure at species level in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

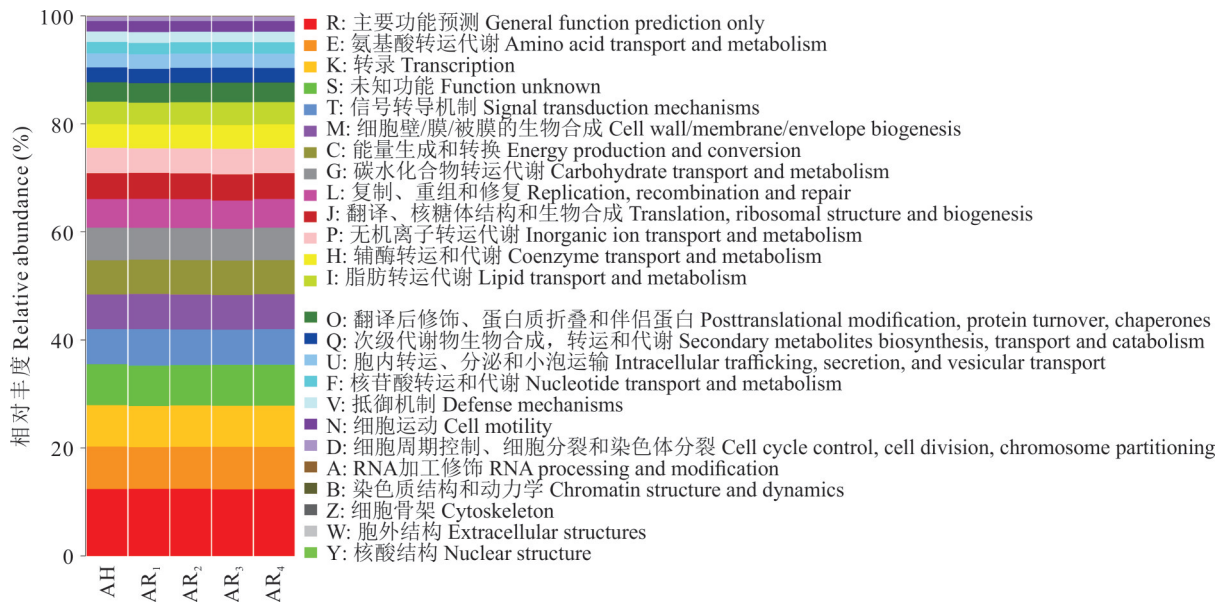


图 8 不同发病青稞根际土壤细菌基因功能
Fig. 8 Functions of the annotated bacterial genes in rhizosphere soil of naked barley with different root rot incidences

3 讨论

植物根际微生物多样性及群落结构影响着土传病害的发生与发展进程,一般表现为根际微生物多样性越丰富、群落结构越复杂,则植株根际生态的健康维稳能力越突出^[10]。本研究发现青稞根腐病发生、蔓延过程中,土壤细菌群落 OTUs 随发病率的升高呈先增高后降低趋势。究其原因,当根腐病发病程度较轻,病原侵染后会触发青稞根际防病细菌的防御机制,促使招募更多的土壤细菌以增加微生物群落结构的复杂性和物种多样性,进而抵御病原侵袭^[26]。但不同细菌类群抗病能力不一,部分抗病菌群随病害蔓延被逐渐击溃,根际土壤生态失衡,致使细菌群落多样性降低、结构失衡^[27-28]。变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)广泛分布于各种生境,在植株根际土壤养分周转和能量代谢中发挥着重要作用,还能够降解土壤有机物残体,但丰度过高会导致土壤生态失衡^[29-32]。放线菌门(Actinobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)中多数细菌类群具有抑制土传病原生存、传播,诱导、增强植物抗病性的作用^[33-34]。本研究发现,变形菌门相对丰度随根腐病发病率升高先增高后降低,而绿弯菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、放线菌门和芽单胞菌门相对丰度变化相反。其机理可能为:在病原侵染初期,病原为完成定殖大量掠夺植物养分,加之植株自身为抵御病原侵染新陈代谢加快等,变形菌门作为主要富集功能菌群以提供物质和能量支持。随后,病原侵染有效诱导了植株根际招募放线菌门拮抗细菌,放线菌门、芽单胞菌门大量繁殖以抑制病原侵染、增强植株抗病性^[34],绿弯菌门、酸杆菌门、拟杆菌门作为供能菌群作用凸显。但放线菌门、芽单胞菌门细菌拮抗能力有限,其丰度随病害蔓延加重而降低。植株残体随病害蔓延不断积累,发病率至 20% 时变形菌门、绿弯菌门再次富集以分解病株残体,使得放线菌门得到足够养分供应,故丰度有所回升。而酸杆菌门、拟杆菌门和芽单胞菌门相对丰度表现规律相反的原因可能由于病害蔓延严重时:1)变形菌门、绿弯菌门与酸杆菌门、拟杆菌门之间,放线菌门与芽单胞菌门之间存有一定竞争作用,变形菌门、绿弯菌门和放线菌门之间及酸杆菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门之间存有一定互惠共生效应。2)病害蔓延、侵染严重时,根际土壤环境更利于变形菌门、绿弯菌门分解、转化和利用,进而维持放线菌门生存、繁殖^[29-34]。

本研究发现青稞根际土壤中鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)相对丰度均为最高,这可能是因为其具有高效的代谢调控机制和基因调控能力,在青稞根际土壤细菌群落演化中占有主导地位,同时也说明其生态适应和抗逆能力极强,既能适应藏区极端的生态条件,还可耐受根际土壤生态中病原的扩张与繁殖^[35]。大量芽孢杆菌目(Bacillales)和假单胞菌目(Pseudomonadales)

细菌具有招募有益微生物、抑制病原菌生长、改良土壤及缓解土壤非生物胁迫等效能^[36-37]。本研究中芽孢杆菌目和假单胞菌目在不同发病青稞根际土壤中相对丰度变化基本一致,植株受到病原侵染、根腐病发生后其丰度才有所上升,但其相对丰度随发病率升高不断波动,可能由于其在青稞根腐病根际土壤细菌群落结构的演化中只起到辅助主导菌群调整的效用。另一方面,有研究发现芽孢杆菌目和假单胞菌目中部分菌群对植物生长发育还存有负面效应,部分还能引起植物根腐病的发生,故也可能是其中有益菌群与有害菌群间不断动态平衡以适应发病新环境的结果^[38]。芽单胞菌科(Gemmatimonadaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、硝化螺旋菌科(Nitrospiraceae)既包含对植物生长发育、抵御病害侵袭具有正面效应的有益菌属,也有起负面效应的有害菌属^[36,39-40]。与上述科一一对应的芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)的细菌多具有拮抗根腐病原、促进土壤氮素周转等效应。本研究发现上述科、属等随发病率升高相对丰度变化趋势一致,先升高后降低,说明青稞根腐病的发生主要促使其根际土壤中有益菌群的富集,使其丰度升高。而引发藏区青稞根腐病的主要病原类群为镰孢菌属真菌^[4-6],当病害蔓延富集至一定程度后导致土壤氮素的大量累积,氮素累积过程增加了病原真菌多样性^[41],进而导致根际土壤细菌群落演化方向改变,丰度降低。

醋酸钙不动杆菌、嗜根寡养单胞菌和简单芽孢杆菌多具有促进植物生长的作用,且简单芽孢杆菌还具有防治作物根腐病的功效^[42-44],整体来看,本研究中醋酸钙不动杆菌、嗜根寡养单胞菌和简单芽孢杆菌是青稞根腐病根际土壤中丰度较高的菌群,醋酸钙不动杆菌、嗜根寡养单胞菌相对丰度随发病率增高先降低后上升,与简单芽孢杆菌变化相反,这可能由于青稞根腐病的发生有效诱导了简单芽孢杆菌等具有病害防治效应菌株的富集以应对病害,是根际土壤微生态向健康方向演化应激的结果。但随发病率升高,病害的不断蔓延最终导致其向不健康方向演化,故简单芽孢杆菌等有益菌种相对丰度降低。由此可见,从青稞根腐病发病率较低田块病株的根际土壤中更易筛选得到具有高效防病促生作用的功能菌株;同时通过施用该类菌株制备而成的菌剂可能对青稞根际土壤微生态向健康方向演化,防治青稞根腐病发生、蔓延具有突出效果,具体仍需进一步研究验证。

4 结论

青稞根腐病的发生使其根际土壤细菌多样性及群落结构均发生了不同程度的变化,其演化规律总体表现为:发病率越高,与健康样品的差异越大。其中,变形菌门(Proteobacteria)和芽孢杆菌目(Bacillales)、硝化螺旋菌目(Nitrospirales),芽单胞菌科(Gemmatimonadaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)、硝化螺旋菌科(Nitrospiraceae),芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira*),简单芽孢杆菌等相对丰度随发病率升高呈先升高后降低的规律;绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)及醋酸钙不动杆菌、嗜根寡养单胞菌等相对丰度则呈先降低后升高的演化规律。青稞根际土壤细菌氨基酸转运代谢、转录、脂肪转运代谢及翻译后修饰、蛋白质折叠和伴侣蛋白等功能基因的丰度因根腐病的发生而降低,信号转导机制、能量生成和转换等功能基因的丰度则升高。该研究为青稞根腐病的防治策略研究可奠定理论基础。

参考文献 References:

- [1] Li X P. Naked barley root rot diseases and influence on its rhizosphere microecology in Qinghai-tibet plateau, China. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017: 1—3.
李雪萍. 青藏高原青稞根腐类病害及其对根际土壤微生态的影响. 兰州: 甘肃农业大学, 2017: 1—3.
- [2] Li M J, Shan L, Tong L T, *et al.* Effect of pearling on composition, microstructure, water migration and cooking quality of highland barley (*Hordeum vulgare* var. *Coeleste linnaeus*). Food Chemistry, 2022, 395: 133581.
- [3] Gong W F, Wei L P, Du J, *et al.* Structure and diversity of the bacterial community in the rhizosphere of highland barley in Xizang. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 4034—4050.
巩文峰, 魏丽萍, 杜娟, 等. 西藏青稞根际细菌群落结构及多样性. 微生物学报, 2023, 63(10): 4034—4050.
- [4] Li X P, Xu S Y, Wang X M, *et al.* Field survey and pathogen identification of naked barley root rot in Qinghai Province. Journal of Plant Protection, 2021, 48(4): 757—765.

- 李雪萍, 许世洋, 汪学苗, 等. 青海省青稞根腐病调查及病原菌鉴定. 植物保护学报, 2021, 48(4): 757—765.
- [5] Li X P, Liu M J, Xu S Y, *et al.* Investigation and pathogen identification of common root rot of Qingke barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*). Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(7): 190—198.
- 李雪萍, 刘梅金, 许世洋, 等. 青稞普通根腐病的调查与病原鉴定. 草业学报, 2021, 30(7): 190—198.
- [6] Li X P, Li M Q, Xu S Y, *et al.* Pathogens identification and pathogenicity analysis of *Fusarium* root rot on naked barley. Journal of Triticeae Crops, 2022, 42(9): 1149—1161.
- 李雪萍, 李敏权, 许世洋, 等. 青稞镰孢根腐病病原鉴定及致病性分析. 麦类作物学报, 2022, 42(9): 1149—1161.
- [7] Xu S Y, Li X P, Liu M J, *et al.* Study on the screening of disease prevention pesticides for naked barley root rot. Journal of Cold-Arid Agricultural Sciences, 2023, 2(5): 458—463.
- 许世洋, 李雪萍, 刘梅金, 等. 青稞根腐病防治药剂筛选研究. 寒旱农业科学, 2023, 2(5): 458—463.
- [8] Xu S Y, Li M Q, Liu M J, *et al.* Screening of highland barley root rot resistant varieties. Gansu Agricultural Science and Technology, 2022, 53(3): 25—30.
- 许世洋, 李敏权, 刘梅金, 等. 青稞根腐病抗性品种筛选. 甘肃农业科技, 2022, 53(3): 25—30.
- [9] Xu S Y, Li M Q, Liu M J, *et al.* Screening of bacteria with biocontrol effects against naked barley root rot accompany with plant growth-promoting properties and the biocontrol effects of the bacterial inoculant. Microbiology China, 2022, 49(7): 2575—2586.
- 许世洋, 李敏权, 刘梅金, 等. 青稞根腐病防病促生细菌的筛选及其菌剂防效. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2575—2586.
- [10] Yang Z, Dai C C, Wang X X, *et al.* Advance in research on rhizosphere microbial mechanisms of crop soil-borne fungal diseases. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56(1): 12—22.
- 杨珍, 戴传超, 王兴祥, 等. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展. 土壤学报, 2019, 56(1): 12—22.
- [11] Ling N, Wang T, Kuzyakov Y. Rhizosphere bacteriome structure and functions. Nature Communications, 2022, 13(1): 836.
- [12] De Corato U. Soil microbiota manipulation and its role in suppressing soil-borne plant pathogens in organic farming systems under the light of microbiome-assisted strategies. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2020, 7(1): 17.
- [13] Liu J W, Li X Z, Yao M J. Research progress on assembly of plant rhizosphere microbial community. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(2): 231—246.
- 刘京伟, 李香真, 姚敏杰. 植物根际微生物群落构建的研究进展. 微生物学报, 2021, 61(2): 231—246.
- [14] Xu S Y, Li X P, Li M Q, *et al.* Effects of root rot disease at seedling stage on bacterial community structure in the rhizosphere soil of naked barley. Grassland and Turf, 2023, 43(5): 120—128.
- 许世洋, 李雪萍, 李敏权, 等. 青稞苗期根腐病对根际土壤细菌群落结构的影响. 草原与草坪, 2023, 43(5): 120—128.
- [15] Shi X, Zhao Y, Xu M, *et al.* Insights into plant-microbe interactions in the rhizosphere to promote sustainable agriculture in the new crops era. New Crops, 2024, 1: 1—17.
- [16] Fang Z D. Research methods of plant pathology. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 6—18.
- 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998: 6—18.
- [17] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114—2120.
- [18] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957—2963.
- [19] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods, 2010, 7(5): 335—336.
- [20] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194—2200.
- [21] Rognes T, Flouri T, Nichols B, *et al.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ, 2016, 4: e2584.
- [22] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261—5267.
- [23] Desantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Applied & Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 5069—5072.
- [24] Langille M G, Zaneveld J, Caporaso J G, *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker

- gene sequences. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814–821.
- [25] Zhang J, Wei Z, Chen J. A distance-based approach for testing the mediation effect of the human microbiome. *Bioinformatics*, 2018, 34(11): 1875–1883.
- [26] Santoyo G. How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of Advanced Research*, 2022, 40: 45–58.
- [27] Qi Y H, Cao S F, Li X P, *et al.* Study on the relationship between root rot disease and nutrient content, enzyme activity and microbial quantity in rhizosphere soil of naked barley in Lintan County, Gannan State. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, 26(4): 877–884.
- 漆永红, 曹素芳, 李雪萍, 等. 甘南州临潭县青稞根际土壤养分含量、酶活性和微生物数量与根腐病的关系研究. *草地学报*, 2018, 26(4): 877–884.
- [28] Liu H, Dong Y H, Shen M C, *et al.* Characteristics of rhizosphere microbial communities in a disease suppressive soil of tomato bacterial wilt and its disease-suppressive transmission mechanism. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(4): 1125–1135.
- 刘洪, 董元华, 申民翀, 等. 番茄青枯病抑病土壤根际微生物群落特征及其抑制性传递机制. *土壤学报*, 2022, 59(4): 1125–1135.
- [29] Sharma V, Vashishtha A, Jos A L M, *et al.* Phylogenomics of the phylum Proteobacteria: Resolving the complex relationships. *Current Microbiology*, 2022, 79(8): 224.
- [30] Xian W D, Zhang X T, Li W J. Research status and prospect on bacterial phylum Chloroflexi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1801–1820.
- 鲜文东, 张潇瑾, 李文均. 绿弯菌的研究现状及展望. *微生物学报*, 2020, 60(9): 1801–1820.
- [31] Wang G H, Liu J J, Yu Z H, *et al.* Research progress of Acidobacteria ecology in soils. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(2): 14–20.
- 王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(2): 14–20.
- [32] Pan X, Raaijmakers J M, Carrión V J. Importance of bacteroidetes in host-microbe interactions and ecosystem functioning. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(9): 959–971.
- [33] Yang Y, Li H L, Ma K L, *et al.* Actinomycetes and their metabolites: visual analysis based on CiteSpace. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3825–3843.
- 杨阳, 李海亮, 马凯丽, 等. 放线菌及其代谢产物研究进展—基于 CiteSpace 可视化分析. *微生物学报*, 2022, 62(10): 3825–3843.
- [34] Mujakić I, Piwosz K, Kobližek M. Phylum Gemmatimonadota and its role in the environment. *Microorganisms*, 2022, 10(1): 151.
- [35] Liu H, Wei L L, Zhu L F, *et al.* Research progress of *Sphingomonas*. *Microbiology China*, 2023, 50(6): 2738–2752.
- 刘辉, 韦璐璐, 朱龙发, 等. 鞘氨醇单胞菌的研究进展. *微生物学通报*, 2023, 50(6): 2738–2752.
- [36] Liu G H, Liu B, Wang J P, *et al.* Advances in taxonomy and application of *Bacillus*. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 949–958.
- 刘国红, 刘波, 王阶平, 等. 芽胞杆菌分类与应用研究进展. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 949–958.
- [37] Zhou Y F, Bai Y S, Yue T, *et al.* Research progress on the growth-promoting characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology China*, 2023, 50(2): 644–666.
- 周益帆, 白寅霜, 岳童, 等. 植物根际促生菌促生特性研究进展. *微生物学通报*, 2023, 50(2): 644–666.
- [38] Wu H M, Sha B C, Zhang J Y, *et al.* Effects of bacterial root rot on photosynthetic characteristics in *Panax notoginseng*. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2020, 28(11): 1739–1752.
- 武洪敏, 沙本才, 张金燕, 等. 细菌性根腐病对三七光合特性的影响. *中国生态农业学报*, 2020, 28(11): 1739–1752.
- [39] Boussageon R, Sportes A, Lemaitre J P, *et al.* A bacillaceae consortium positively impacts arbuscular mycorrhizal fungus colonisation, plant phosphate nutrition, and tuber yield in *Solanum tuberosum* cv. Jazzy. *Symbiosis*, 2023, 89(2): 235–250.
- [40] Daims H, Lebedeva E, Pjevac P, *et al.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 2015(528): 504–509.
- [41] Sun Y, Wang M, Mur L A J, *et al.* Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 572.
- [42] Huang C, Jiang L, Liang Y P, *et al.* *Acinetobacter calcoaceticus* promotes the seedling growth of *Lespedeza daurica* under

saline-alkaline stress. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(8): 3264—3278.

黄臣, 蒋霖, 梁银萍, 等. 醋酸钙不动杆菌对盐碱胁迫下达乌里胡枝子促生效应研究. *微生物学报*, 2023, 63(8): 3264—3278.

- [43] Wu W, Zhang P F, Zhang G P, *et al.* Screening, identification and growth promoting characteristics of high efficient organic phosphate-mineralizing bacterium from rhizosphere soils of *Forsythia suspensa*. *Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences)*, 2018, 38(3): 93—100.

吴伟, 张鹏飞, 张桂萍, 等. 连翘根际高效解有机磷细菌的筛选鉴定及促生长特性研究. *西南林业大学学报(自然科学)*, 2018, 38(3): 93—100.

- [44] Song M, Yun H Y, Kim Y H. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. *Journal of Ginseng Research*, 2014, 38(2): 136—145.