

周银丽,郭建伟,杨伟,等. 间作桃树对石榴园枯萎病土壤碳代谢多样性的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):106-109.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.025

间作桃树对石榴园枯萎病土壤碳代谢多样性的影响

周银丽¹, 郭建伟¹, 杨伟², 胡先奇³

(1. 红河学院/云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661100; 2. 红河学院商学院, 云南蒙自 661100;

3. 云南农业大学/农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要:采用 Biolog ECO 微孔板法研究健康石榴根际土壤、枯萎病石榴根际土壤、栽种桃树修复 6 年的枯萎病土壤、栽种桃树修复 8 年的枯萎病土壤、石榴园裸地土壤等 5 种类型土壤中微生物碳代谢的多样性。结果表明,根际微生物群落碳源代谢能力在这 5 种类型土壤中存在差异,栽种桃树修复 8 年的枯萎病土壤微生物碳代谢活性最高。健康石榴根际土壤与枯萎病石榴根际土壤微生物代谢过程中对 Biolog-Eco 板中 13 种碳源的利用程度差异显著;各类型根际土壤微生物碳代谢多样性的偏最小二乘法判别分析结果表明,栽种桃树修复 6 年的石榴枯萎病害土壤,其微生物碳代谢活性与健康石榴根际土壤的微生物碳代谢活性最接近。研究表明,栽种桃树提高了石榴枯萎病害土壤的微生物群落碳源代谢能力,对石榴枯萎病害土壤有一定的修复作用。

关键词:石榴;枯萎病土壤;微生物群落;碳源代谢;功能多样性;土壤修复

中图分类号: S432.2⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)14-0106-04

云南省蒙自市拥有“中国石榴之乡”的美誉^[1],然而随着石榴栽培的集约化和树龄的增长,各种石榴病害也日益严重,其中被果农称为石榴癌症的枯萎病尤其严重。作为土传真菌病害的石榴枯萎病,其病原菌甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* Ellis. and Halsted)分布广泛,在我国主要引起芋头黑腐病、甘薯黑斑病、石榴枯萎病等^[2-4]。根部伤口是石榴枯萎病菌的主要入侵通道^[5-6],病害果园再植石榴难以成活,石榴园面积在不断减少,主要原因是多年生果园连作障碍、土壤中有病原菌的增加及根际微生物区系失衡关系密切。

根际微生态是植物-土壤-微生物及其环境相互作用的特殊系统,因此,协调三者之间的关系可能是解决连作障碍的关键问题。而有益根际微生物可促进植物生长,对植物健康生长起着关键作用。研究根际微生物多样性的方法较多,其中 Biolog ECO 微孔板法通过检测微生物细胞利用不同碳源进行呼吸代谢过程中产生的氧化还原物质与显色物质发生反应而导致的颜色变化,即用吸光度的变化来反映不同类型土壤细菌群落的代谢特征及微生物群落的功能多样性。Biolog ECO 微孔板法简便、快速、灵敏度高、分辨力强,现已被大量用于土壤微生物多样性的研究。

本研究利用 Biolog ECO 微孔板法,分别选取枯萎病石榴

根际土壤、健康石榴根际土壤、栽种桃树修复 6 年的枯萎病土壤、栽种桃树修复 8 年的枯萎病土壤、裸地土壤,分析 5 种土壤微生物群落对 31 种碳源利用的代谢能力,以期阐明不同类型土壤微生物群落碳代谢多样性的变化规律,从微生物群落碳代谢多样性角度解析生物多样性修复石榴园连作障碍土壤的可能性。

1 材料与方法

1.1 根际土壤样品的采集

石榴根际土壤样品于 2015 年在云南省蒙自市新安所镇石榴园内采集,分别选取石榴枯萎病根际土壤、健康石榴树根际土壤、桃树修复枯萎病土壤、裸地土壤(表 1),采集根系周围 1 cm 左右的根际土壤,每种土壤分别在 5 棵树根际各取 1 份土壤,然后将其混合作为 1 个样品,每种样品均设 3 个重复,将土壤样品置于 2~8℃ 冷藏箱中保存,用于 Biolog ECO 微孔板法分析的土壤,收集后置于 4℃ 冰箱保存,并及时进行试验分析。

1.2 Biolog ECO 板的碳源种类

Biolog ECO 微孔板共有 32 个孔,第 1 孔为对照,加入灭菌水,其余 31 孔加入了不同的碳源分别是丙酮酸甲酯(A1)、吐温 40(A2)、吐温 80(A3)、环糊精(A4)、肝糖(A5)、D-纤维二糖(A6)、 α -D-乳糖(A7)、 β -甲基-D-葡萄糖苷(A8)、D-木糖(A9)、I-赤藻糖醇(A10)、D-甘露醇(A11)、N-乙酰-D-葡萄糖氨(A12)、D-葡糖胺(A13)、I-磷酸葡萄糖(A14)、D,L- α -甘油磷酸(A15)、D-半乳糖酸- γ -内酯(A16)、D-半乳糖醛酸(A17)、2-羟基苯甲酸(A18)、4-羟基苯甲酸(A19)、 γ -羟丁酸(A20)、衣康酸(A21)、 α -丁酮酸(A22)、D-苹果酸(A23)、L-精氨酸(A24)、L-天门冬酰胺(A25)、L-苯丙氨酸(A26)、L-丝氨酸(A27)、L-苏氨酸(A28)、甘氨酸-L-谷氨酸(A29)、苯乙胺(A30)、腐胺(A31)。Biolog ECO 微孔板

收稿日期:2017-08-29

基金项目:云南省应用基础研究项目(编号:2013FZ125);红河学院科研基金博士专项(编号:XJ17B10);红河学院中青年学术骨干人才计划项目(编号:2015GG0206);红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介:周银丽(1976—),女,云南祥云人,博士,副教授,主要从事植物病害及植物病害复合侵染等研究。E-mail: zyl_biology2@126.com。

通信作者:胡先奇,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病理学及植物线虫学研究。E-mail: xqhoo@126.com。

表 1 土壤样品的详细信息

编号	采集地点	状态描述	编号	采集地点	状态描述
HPS2-1	三角地	健康石榴根际土壤	RPS7-1	龙滩	桃树修复 6 年的枯萎病土壤
HPS2-2	三角地	健康石榴根际土壤	RPS7-2	龙滩	桃树修复 6 年的枯萎病土壤
HPS2-3	三角地	健康石榴根际土壤	RPS7-3	龙滩	桃树修复 6 年的枯萎病土壤
DPS3-1	草坝	枯萎病石榴根际土壤	RPS9-1	小黑地	桃树修复 8 年的枯萎病土壤
DPS3-2	草坝	枯萎病石榴根际土壤	RPS9-2	小黑地	桃树修复 8 年的枯萎病土壤
DPS3-3	草坝	枯萎病石榴根际土壤	RPS9-3	小黑地	桃树修复 8 年的枯萎病土壤
DPS4-1	水井凹	枯萎病石榴根际土壤	BLS14-1	罗家沟	石榴园裸地土壤
DPS4-2	水井凹	枯萎病石榴根际土壤	BLS14-2	罗家沟	石榴园裸地土壤
DPS4-3	水井凹	枯萎病石榴根际土壤	BLS14-3	罗家沟	石榴园裸地土壤

的碳源均由美国 ABI 公司提供,已加在 Biolog ECO 微孔板的孔内。

1.3 土壤微生物菌悬液的制备方法

1.3.1 土壤微生物菌悬液的制备 称取 10 g 根际土壤加入已灭菌的 250 mL 三角瓶中,在三角瓶中加入 90 mL 无菌 0.85% NaCl 稀释液,封口,于 260 r/min 摇床上振荡 30 min,静置 10 min,取 2 mL 上清液加入 18 mL 已灭菌的 0.85% NaCl 稀释液中混匀,依次稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 土壤微生物菌悬液,混匀。

1.3.2 菌悬液接种上板 将 Biolog ECO 微孔板从冰箱内取出,预热到 25 ℃,用八道移液器将 10^{-3} 土壤微生物菌悬液分别接种在 Biolog ECO 微孔板的各孔中,每孔 150 μ L,每个样品 32 孔,每块板 3 个重复;将加好样品的 Biolog ECO 微孔板盖好盖子,置于保湿饭盒中,于 25 ℃ 培养过程中分别在 4、24、48、72、96、120、144、168、192 h 时进行读数,记录在 590 nm 波长处的吸光度。

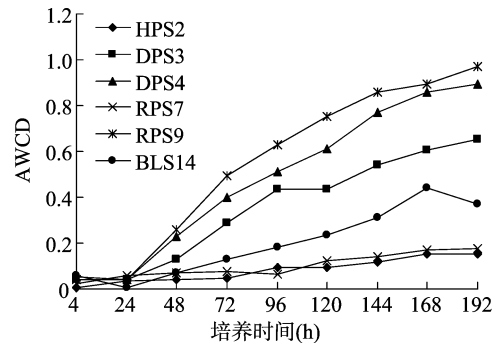
1.4 数据分析

Biolog ECO 微孔板反应一般采用每孔颜色平均变化率 (average well color development,简称 AWCD) 来描述,其计算公式为 $AWCD = \sum (D_{590\text{ nm}} - D_{CK}) / 31$,其中, $D_{590\text{ nm}}$ 是除对照孔外各孔吸光度, D_{CK} 是对照孔 (加入灭菌水) 吸光度。使用软件 Cancoco 4.5 (Micro-computer Power, Ithaca, USA) 及 Prcord 进行聚类分析及主成分分析。为更直观地得到各样品碳代谢多样性之间的关系,对各样品的碳代谢多样性数据进行偏小二乘法判别分析 (partial least squares discrimination analysis,简称 PLS-DA)。

2 结果与分析

2.1 各类型土壤根际微生物群落利用碳源能力的特征及规律

检测根际微生物利用不同碳源进行呼吸代谢过程中产生的氧化还原物质与显色物质发生反应而导致的颜色变化,即可知微生物利用碳源的能力。每种土壤的 AWCD 最大值可表示各类型土壤微生物群落的整体碳代谢活性,由图 1 可知,桃树修复 8 年的枯萎病土壤根际微生物群落碳源代谢活性最强 (0.927),桃树修复 6 年的枯萎病土壤 (0.178) 与健康石榴根际土壤 (0.153) 的根际微生物群落碳源代谢活性接近,其中石榴园裸地土壤的微生物群落碳源代谢活性偏高 (0.441),这可能与农户为提高单位面积产出,在石榴园间作套种其他作物有关。



HPS2 为健康石榴根际土壤; DPS3、DPS4 为枯萎病石榴根际土壤; RPS7 为栽种桃树修复 6 年的枯萎病土壤; RPS9 为栽种桃树修复 8 年的枯萎病土壤; BLS14 为石榴园裸地土壤

图 1 不同类型根际土壤微生物碳利用趋势

2.2 各类型根际土壤微生物单一碳源代谢能力及聚类分析

根据所有土壤样品微生物碳代谢能力信息及丰度信息,用碳代谢能力信息及在每个样品中的丰度信息绘制热图,并从分类信息和样品间差异 2 个层面进行聚类。

由图 2 可知, DPS4-2 土壤根际微生物对碳源 2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、苯乙胺等的利用能力较强,对 D-半乳糖醛酸、 γ -羟丁酸、 α -丁酮酸等的利用能力较弱。DPS4-1 土壤根际微生物对碳源 1-磷酸葡萄糖、4-羟基苯甲酸、腐胺等的利用能力较强,对 α -D-乳糖、D-甘露醇、 α -丁酮酸等的利用能力较弱。DPS4-3 土壤根际微生物对碳源衣康酸、L-天门冬酰胺、苯乙胺等的利用能力较强,对 D-葡萄糖胺酸、 γ -羟丁酸、L-苯丙氨酸等的利用能力较弱。DPS3-2 土壤根际微生物对碳源吐温 80、D-葡萄糖胺酸、腐胺等的利用能力较强,对 α -D-乳糖、衣康酸、D-苹果酸等的利用能力较弱。DPS3-1 土壤根际微生物对碳源吐温 40、D-葡萄糖胺酸等的利用能力较强,对 D-苹果酸、L-苯丙氨酸、L-苏氨酸等的利用能力较弱。DPS3-3 土壤根际微生物对碳源 I-赤藻糖醇、D-葡萄糖胺酸、甘氨酸-L-谷氨酸等的利用能力较强,对苯乙胺、1-磷酸葡萄糖、衣康酸等的利用能力较弱。RPS9-3 土壤根际微生物对碳源丙酮酸甲酯、 β -甲基-D-葡萄糖苷、1-磷酸葡萄糖等的利用能力较强,对 D-木糖、2-羟基苯甲酸、苯乙胺等的利用能力较弱。RPS9-2 土壤根际微生物对碳源环糊精、L-精氨酸、N-乙酰-D-葡萄糖氨等的利用能力较强,对 I-赤藻糖醇、2-羟基苯甲酸、苯乙胺等的利用能力较弱。RPS9-1 土壤根际微生物对碳源 D-纤维二糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、 α -丁酮酸等的利用能力较

强,对 2-羟基苯甲酸、衣康酸、苯乙胺等的利用能力较弱。RPS7-3 土壤根际微生物对碳源肝糖、L-苯丙氨酸、L-苏氨酸等的利用能力较强,对丙酮酸甲酯、D-甘露醇、甘氨酸、L-谷氨酸等的利用能力较弱。RPS7-2 土壤根际微生物对碳源肝糖、D-木糖、L-苯丙氨酸等的利用能力较强,对丙酮酸甲酯、L-天门冬酰胺、腐胺等的利用能力较弱。RPS7-1 土壤根际微生物对碳源 2-羟基苯甲酸、 α -丁酮酸、L-苏氨酸等的利用能力较强,对吐温 40、吐温 80、D-甘露醇等的利用能力较弱。HPS2-3 土壤根际微生物对碳源甘氨酸-L-谷氨酸的利用能力较强,对吐温 40、L-天门冬酰胺、 γ -羟丁酸的利用能力较弱。HPS2-1 土壤根际微生物对碳源 α -D-乳糖、D-木糖、 γ -羟丁酸等的利用能力较强,对 D-甘

露醇、甘氨酸-L-谷氨酸、L-天门冬酰胺等的利用能力较弱。HPS2-2 土壤根际微生物对碳源 D-甘露醇、D、L- α -甘油磷酸、4-羟基苯甲酸等的利用能力较强,对丙酮酸甲酯、腐胺、甘氨酸-L-谷氨酸等的利用能力较弱。BLS14-3 土壤根际微生物对碳源吐温 40、N-乙酰-D-葡萄糖氨、D-半乳糖酸- γ -内酯等的利用能力较强,对吐温 80、4-羟基苯甲酸、L-天门冬酰胺等的利用能力较弱。BLS14-2 土壤根际微生物对碳源 γ -羟丁酸、D-苹果酸、苯乙胺等的利用能力较强,对 L-天门冬酰胺、D-半乳糖酸- γ -内酯、腐胺等的利用能力较弱。BLS14-1 土壤根际微生物对碳源丙酮酸甲酯、吐温 40、D-半乳糖酸- γ -内酯等的利用能力较强,对 γ -羟丁酸、吐温 80、腐胺等的利用能力较弱。

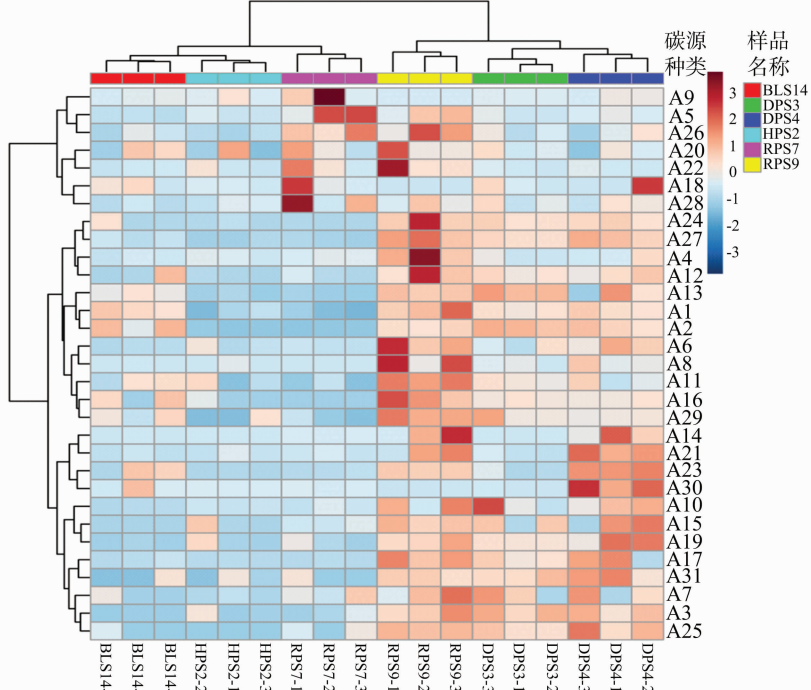


图2 不同类型土壤根际微生物单一碳源代谢能力分析结果

2.3 健康石榴根际土壤与枯萎病石榴根际土壤微生物单一碳源代谢能力差异显著性分析

对云南省蒙自市健康石榴根际土壤与枯萎病石榴根际土壤微生物代谢过程中,对碳源的利用种类及程度进行差异显著性分析。由图 3 可知,这 2 种土壤环境中微生物对 13 种碳源的利用程度差异显著 ($P < 0.05$),这 13 种碳源分别是丙酮酸甲酯(A1)、吐温 40(A2)、吐温 80(A3)、N-乙酰-D-葡萄糖氨(A12)、D-葡萄糖胺(A13)、D-半乳糖酸- γ -内酯(A16)、衣康酸(A21)、D-苹果酸(A23)、L-精氨酸(A24)、L-天门冬酰胺(A25)、L-丝氨酸(A27)、苯乙胺(A30)、腐胺(A31)。健康石榴根际土壤与枯萎病石榴根际土壤中的微生物代谢过程对另外 18 种碳源的利用程度是相似的。

2.4 各类型根际土壤微生物碳代谢多样性的 PLS-DA 分析
为更直观地得到各样品碳代谢多样性之间的关系,运用 PLS-DA 对各样品的碳代谢多样性数据进行分析。由图 4

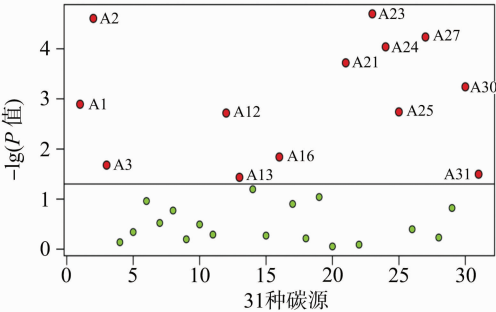


图3 健康与枯萎病石榴根际土壤微生物利用 31 种碳源的差异性分析结果

可知,所有石榴枯萎病病害土壤(DPS3、DPS4)聚在一起,与石榴园裸地土壤(BLS14)的距离较近,说明石榴园裸地土壤中的微生物碳代谢多样性与石榴枯萎病病害土壤的微生物碳代谢多样性较接近;栽种桃树修复 6 年的石榴枯萎病土壤

(RPS7)与健康石榴根际土壤(HPS2)距离较近,表明栽种桃树修复6年的石榴枯萎病病害土壤,其微生物碳代谢多样性与健康石榴根际土壤的微生物碳代谢多样性较接近;栽种桃树修复8年的石榴枯萎病土壤(RPS9)单独聚在一起,表明经过栽种桃树修复8年的石榴枯萎病土壤,其微生物碳代谢多样性与其他土壤有一定的差异。

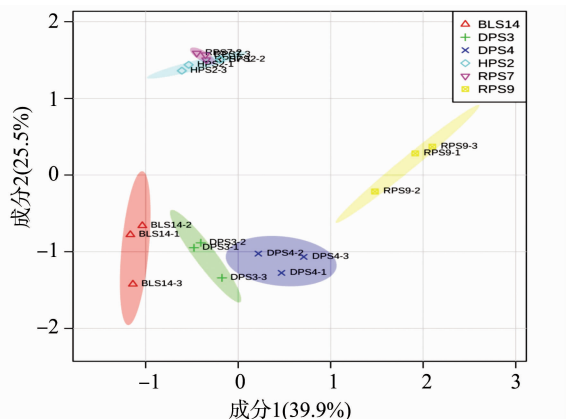


图4 不同土壤样品微生物碳源代谢多样性能力的2D聚类分析

3 结论与讨论

用Biolog ECO微孔板分析方法研究了健康石榴根际土壤、枯萎病石榴根际土壤、栽种桃树修复的枯萎病土壤及石榴园裸地土壤中微生物碳代谢的多样性,结果表明,云南省蒙自市健康石榴根际土壤与枯萎病石榴根际土壤中的微生物对Biolog ECO微孔板中13种碳源的利用率差异显著,分别是丙酮酸甲酯、吐温40、吐温80、N-乙酰-D-葡萄糖氨、D-葡萄糖胺、D-半乳糖酸-γ-内酯、衣康酸、D-苹果酸、L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸、苯乙胺、腐胺。根际微生物群落碳源代谢能力以栽种桃树修复8年枯萎病土壤最大,栽种桃树可以提高石榴枯萎病病害土壤的微生物群落碳源代谢能力,对石榴枯萎病病害土壤有一定的修复作用。

使用Biolog ECO微孔板法分析根际微生物多样性的报道较多^[7-8]。余贤美等用Biolog ECO微孔板法剖析土壤功能多样性受枯草芽孢杆菌Bs-15的影响^[9]。张志红等采用Biolog ECO微孔板方法探究了生物复混肥、堆肥、生物有机肥的促生、枯萎病防病效果及对土壤微生物功能多样性的影响^[10]。孙凤霞等用Biolog ECO微孔板技术探究红壤长期定位施肥19年的微生物碳源利用率,结果表明,微生物碳源利用率在化肥配合应用或只施有机肥19年后均显著提高^[11]。张杰等用Biolog ECO微孔板技术对鄱阳湖围垦水稻田、自然湿地、退田还湖退耕地的表层土壤微生物单一碳源运用能力状况进行了探究^[12]。张丽娟等用Biolog ECO微孔板技术探究健康大蒜与根腐型病害大蒜根际土壤微生物功能多样性的差异^[13]。董艳等研究了3个小麦品种与蚕豆间作对根际微生物代谢功能多样性、枯萎病发生和枯萎病病原菌尖孢镰刀

菌数量的影响,结果表明,蚕豆与小麦间作提升了蚕豆根际微生物的碳源利用能力^[14]。柳红娟等利用木薯茎叶还田改善土壤微生物种群,可以降低香蕉枯萎病的发病率^[15]。在本研究中,基于在枯萎病病害石榴果园中再植石榴树难以成活,用栽种桃树的方法对石榴枯萎病病害土壤进行修复,结果表明,栽种桃树修复6年的石榴枯萎病土壤,其微生物碳代谢多样性与健康石榴根际土壤的微生物碳代谢多样性接近,栽种桃树修复8年的石榴枯萎病土壤根际微生物群落碳源代谢多样性最高,研究表明栽种桃树可以逐步改善石榴枯萎病病害土壤的微生物多样性,对石榴枯萎病病害土壤有一定的修复效果。

参考文献:

- [1] 中国南方果树信息中心. 蒙自县荣获中国石榴之乡称号[J]. 果业快讯, 2004(4): 31.
- [2] Huang Q, Zhu Y Y, Chen H R, et al. First report of pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Yunnan, China [J]. Plant Disease, 2003, 87(9): 1150.
- [3] Xu B, Zheng X H, Guo W X, et al. First report of pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Sichuan Province [J]. New Disease Reports, 2011, 95(6): 776-777.
- [4] 郭建伟, 郭娟, 杨建, 等. 石榴枯萎病、芋头黑腐病病原拮抗真菌的筛选与鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(4): 772-775, 781.
- [5] 周银丽, 胡先奇, 王卫疆, 等. 根结线虫在云南石榴枯萎病发生过程中的作用初探[J]. 江苏农业科学, 2010(1): 149-150.
- [6] 周银丽, 杨艳丽, 袁绍杰, 等. 石榴枯萎病菌拮抗放线菌对南方根结线虫的毒力[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 58-64.
- [7] 杨炜迪, 高婷, 朱建宁, 等. 几种牧草根际土壤微生物功能多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 360-364.
- [8] 孙丽静, 蒋益成. 岭南不同园林植物根区土壤微生物功能多样性季节动态变化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 478-483.
- [9] 余贤美, 安森, 王海荣, 等. 枯草芽孢杆菌Bs-15对板栗土壤微生物种群数量及功能多样性的影响[J]. 生态环境学报, 2014, 23(4): 598-602.
- [10] 张志红, 冯宏, 肖相政, 等. 生物肥防治香蕉枯萎病及对土壤微生物多样性的影响[J]. 果树学报, 2010, 27(4): 575-579.
- [11] 孙凤霞, 张伟华, 徐明岗, 等. 长期施肥对红壤微生物生物量碳氮和微生物碳源利用的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2792-2798.
- [12] 张杰, 胡维, 刘以珍, 等. 鄱阳湖湿地不同土地利用方式下土壤微生物群落功能多样性[J]. 生态学报, 2015, 35(4): 965-971.
- [13] 张丽娟, 茆军, 张志东, 等. 新疆大蒜根腐型病害根际土壤微生物群落多样性初探[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(11): 2109-2117.
- [14] 董艳, 董坤, 郑毅, 等. 不同品种小麦与蚕豆间作对蚕豆枯萎病的防治及其机理[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 1979-1987.
- [15] 柳红娟, 刘子凡, 黄洁, 等. 木薯茎叶还田对香蕉枯萎病的防控效果研究[J]. 中国南方果树, 2017, 46(1): 75-77, 82.