

应用 RAPD 分析技术研究生姜青 枯病的土壤防治

陆 合^{1*} 张碧波²

(1. 重庆医科大学微生物教研室 重庆 400016)

(2. 重庆文理学院生命科学系 重庆 402168)

摘要: 利用随机扩增多态性技术(RAPD)研究生姜连作地、施加有机肥后的生姜连作地及新开地中土壤微生物多样性与生姜青枯病的关系, 结果发现, 连作地的青枯病发病率为 100%, 新开地没有发病, 而施加有机肥的连作地生姜青枯病发病率降至 37%。发现施加有机肥连作地的真菌、放线菌数量增加, 平板上不同菌落形态的真菌、细菌、放线菌增加明显。多样性指数分析发现 Shannon 指数、Simpson 指数等均显著增加。随机扩增条带出现连作地的条带丰富度较少、新开地的条带最多、施加有机肥连作地的 RAPD 条带明显多于连作地, 接近新开地, 并出现了一些连作地没有的特异条带。结果表明, 施加有机肥可以改善土壤微生物群落结构。

关键词: 生姜青枯病, RAPD, 微生物多样性

Controlling Ginger Bacterial Wilt of Soil by Using RAPD Analysis

LU He^{1*} ZHANG Bi-Bo²

(1. Department of Microbiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(2. College of Life Sciences, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402168, China)

Abstract: Relationship between bacterial wilt of ginger with its soil biodiversity of freshly plowed soil, continuous cropping soil of ginger and continuous cropping soil receiving ecologically organic fertilizer (EOF) was studied by Random Amplification polymorphic DNA (RAPD) method. The results showed that ginger wilt did not occur in freshly plowed soil, while the ratio of ginger wilt was 100% in continuous cropping soil, and reduced to 37% when the continuous cropping soil receiving ecologically organic fertilizer. The soil microbial number of Fungi, Actinomyce is increased in continuous cropping soil receiving EOF, but a few changes of bacteria were found, as the varieties of strains in vitro were increased obviously. The simpson index, Shannon index all greatly increased after adding the EOF, which was similar to those in freshly plowed soil. The DNA sequence diversity of soil microbial communities was affected by EOF. The band of random amplification analysis showed a lot of amplification DNA bands in continuous cropping soil receiving EOF, and the distinctness that didn't exist in continuous cropping soil emerged. The results of study

suggest that applying EOF can enrich or decrease some microbial species in soil. It may also increase soil biodiversity and exhibit beneficial to suppress soil – borne pathogens on ecological level.

Keywords: Bacterial wilt of Ginger, RAPD, Microbial diversity

生姜是种植较为广泛的经济作物, 生产中最大的危害是生姜萎蔫青枯病, 俗称“姜瘟疫”或“姜瘟”。此病属细菌性病害, 其致病菌是青枯假单胞杆菌(*Ralstonia solanacearum*), 是一种世界性的土传细菌病害。虽然不同学者利用多种方法对生姜的青枯病进行了防治, 但目前还没有理想的防治方法。影响生姜发病的因子中除青枯菌外, Masaya Nishiyama等^[1-3]认为土壤环境中微生物群落多样性的高低与青枯病的发生在一定条件下呈负相关, 向土壤中追加有机肥(基质)不仅能改变土壤的物理、化学性状, 而且能够使土壤中的微生物群落与数量发生一定的变化, 称为“基质-菌株”效应; Ritchie等^[4]认为土壤中有机的多少同土壤微生物群落的多样性关系密切; Yoshitaka Shiomi等人^[5]发现, 病原微生物很难在微生物群落多样性高的土壤中滋生。Hansel^[6]等人认为土壤中 Fe^{3+} 的多少会影响微生物群落的变化。

传统的微生物培养方法仅能分析土壤微生物总数的0.1%至10%, 更无法测定微生物群落结构和功能特征。近年来发展的核酸分析法, 如DNA随机扩增多态性技术(RAPD)等, 为土壤微生物多样性的研究提供了新的手段, 与传统培养技术相比较, 它具有快速、直接、全面而准确等优点^[7]。应用该技术就能迅速估计土壤微生态系统的健康程度、进而测定植物发病的几率和防治的效果。

1 材料和方法

1.1 试验地点

生姜青枯病防治试验在重庆荣昌县内试验场地进行, 1号地为红壤土, 因多年种植生姜, 青枯病发生严重, pH值5.8, 有机质含量为28.2 g/kg, 2号地为未经耕作的新开地, 植被为杂草, pH值6.6, 有机质为27.3 g/kg。

1.2 试验材料

供试姜种为易患病生姜品种; 有机肥: 由酒糟、牛粪、秸秆等工农业废物直接经多株菌株共同发酵加工改性而成, 有腐殖土味, 有机质含量26.64%, N 0.76%, P_2O_5 0.69%, K_2O 0.25%, CaO 34.66%,

MgO 4.63%。

1.3 试验设计

设计不同的生姜处理4个, 每个处理重复3次, 共12个小区, 每小区种植生姜苗30株, 随机区组排列。处理1: 在连作地上施自制有机肥, 用量为 0.5 kg/m^2 , 在生姜苗移栽前10天撒施自制有机肥在土壤中, 淋水、翻耕土壤; 处理2: 在连作地上施自制有机肥, 用量为 1 kg/m^2 , 其他同处理1; 处理3: 直接将生姜苗移栽在连作地上, 不施有机肥; 处理4: 新开地, 将生姜苗移栽到新开地上, 不施加有机肥。4个处理的其它田间管理措施相同。

1.4 病株的调查方法

生姜揭膜后开始每天调查所有植株。当一个处理的任意一个小区出现病株后, 开始记录发病时间; 青枯病发病率采用直接计数, 即通过调查青枯病发病植株的数目与调查植株总数的比值, 求得发病百分率, 植株其它病害和生理死亡不计在内。

1.5 测定方法

1.5.1 土壤中细菌、真菌、放线菌总数测定: 采用平板计数法。各培养基均采用选择培养基, 其中真菌培养基采用Martin培养基, 细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基, 放线菌培养采用高氏一号培养基。

1.5.2 RAPD反应: 土壤中微生物总DNA的提取参照陈灏^[8]的方法进行。土壤采样时天气晴朗, 在每个处理的4个角落和中心取样, 取0~10 cm表层土壤, 过20目筛后, 5个点的土样等量混合后, 进行土壤总DNA的提取。实验采用单随机引物和双随机引物进行RAPD反应, 选用的13条10 bp随机引物是参考国内外有关微生物的RAPD研究文献从100条引物中挑选出的^[9,10], 它们都具有针对微生物基因的DNA片段多态性和特异性好的特点。10 bp的随机引物购自上海生工公司, PCR引物序列见表1。实验所用的Taq酶购自上海生工, PCR反应总体积为25 μL , 各组成成分如下: $10\times\text{Buffer}$ (含15 mmol/L $MgCl_2$) 2.0 μL , dNTPs(10 mmol/L) 0.3 μL , Taq酶3 U, Mg^{2+} (10 mmol/L) 0.3 μL , 随机引物(5 pmol/ μL) 1.0 μL 和40 ng模板DNA。PCR反应程序为: 94°C预变性5 min; 94°C变性1 min, 37°C退火1 min, 72°C延伸

1.5 min, 40 个循环; 72°C 延伸 8 min。PCR 结束后, 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 用 Vilber lovermlat 公司凝胶成像系统照相。用双随机引物时两引物分别加 0.75 μ L。所有 RAPD 图谱均重复 3 次。

表 1 RAPD 所用引物及其序列
Table 1 Sequences of primers occupied in RAPD

引物 Primers	核苷酸顺序 Nucleotide sequences	引物 Primers	核苷酸顺序 Nucleotide sequences
S1	GATGAACGCC	S8	AACGAGTCCG
S2	GCAAGTCGCC	O1	TGGGCCGGTG
S3	AATCGTCCCC	O2	CTGACCAGCC
S4	ATCCGCCACC	O3	GCTGGTCAAG
S5	GAGCGAGGCT	O4	CGGGTCGTTC
S6	AAGCGCGAGG	O5	ACAGGTGCGC
S7	GTGGTCCGCC		

1.5.3 土壤微生物宏 DNA 序列多样性分析: 实验利用土壤宏基因组进行随机扩增, 所以扩增的条带和量能在一定程度上反映土壤微生物的多样性, 因所扩增的量与条带的亮度呈正比, 利用凝胶成像系统分析扩增带的亮度表示^[11-13]。

1.5.4 微生物群落 DNA 序列相似系数分析与聚类: 将每个条带都看作一个性状, 在样品中出现赋值“1”, 不出现赋值“0”, 组成“0-1”数据表。将所得数据输入 DPS 数据处理系统, 采用 Nei-Li(Czekanows)聚类距离中的类平均法(UPGMA)进行聚类, 自动生成遗传聚类图和相似系数表。

$$\text{相似系数: } a = n_{xy} / (n_x + n_y)$$

n_x 、 n_y 分别代表处理 x 和处理 y 经 RAPD 扩增反应产生的条带数, n_{xy} 为处理 x 和处理 y 经 RAPD 扩增产生的共有条带数。

2 结果

2.1 青枯病防治效果

由表 2 所示可以看出, 在处理 4 新开垦地上生姜未发生任何病害; 而处理 3 生姜连作地于 6 月 16 日开始发病, 到 7 月 26 日其发病率已达 100%; 处理 1、2 施加有机肥的生姜连作地初现发病时间比不施有机肥的连作地推迟 8 d 发生, 到 7 月 26 日最终发病率分别为 38%、37%。

2.2 土壤中微生物数量与种类的比较

平板计数法表明各个处理中真菌、细菌和放线菌的数量均表现为: 施有机肥连作地 > 新开地 > 不

表 2 不同处理的田间病株初见期及最终发病率
Table 2 Comparison of development bacterial wilt on different treatments

处 理 Treatment	生 姜 Ginger	
	初见病株时间 Stem rot	发病率(%) Incidence stem rot
连作地施用有机肥 1 Use ecological organic fertilizer 1	6 月 24 日	38
连作地施用有机肥 2 Use ecological organic fertilizer 2	6 月 25 日	37
连作地(不施有机肥) Without ecological organic fertilizer	6 月 16 日	100
新开地 Assart		0

施加有机肥连作地。与不施有机肥的连作地相比, 施用有机肥后, 3 种微生物的数量均有不同程度的增加, 但细菌数量增加幅度不大(5.56%), 而真菌和放线菌的数量却分别增加了 14.8% 和 18.3%。虽然 3 种微生物在数量上都没有出现数量级的变化, 但从土壤最高稀释度平板上获得的具有不同菌落形态的真菌、细菌和放线菌的菌落数均出现明显增多。

表 3 不同处理的生姜地土壤中微生物的数量
Table 3 Comparison of development soil microbial population between different treatments

处理 Treatment	不同形态的 真菌菌落数 (个)	不同形态的 细菌菌落数 (个)	不同形态的 放线菌菌落 数(个)
	Dissimilarity fungi	Dissimilarity bacteria	Dissimilarity bacteria
施有机肥连作地 1 Use ecological organic fertilizer 1	7	6	3
施有机肥连作地 2 Use ecological organic fertilizer 2	8	7	3
不施有机肥连作地 Without ecological organic fertilizer	2	2	1
新开地 Assart	5	4	3

2.3 土壤微生物基因组的 RAPD 分析

用筛选出的 13 个引物对 4 种不同处理土壤的微生物宏基因组 DNA 进行 RAPD 扩增(重复 3 次), 4 个不同处理均扩增出了带, 其中大多数条带的片段大小在 0.2 kb~3 kb 之间, 也扩增出了一些大于 5 kb 的多态性片段, 清晰可见的条带共有 276 条。其中非多态性条带 36 条, 占 13%, 多态性条带 240 条, 占 87%。各处理 RAPD 扩增出的总条带数呈现出新开地大于施加有机肥的连作地大于连作地的现象。

这说明在添加有机肥后, 土壤中微生物的群落发生了较大的改变, 从条带的亮度可以看出可能是同一类微生物的数量也同样发生了变化。图 1 的 A、B、C 是其中的 3 张 RAPD 扩增产物电泳图谱。A 为连作地、B 为施加有机肥的连作地、C 为新开地。在 3 张图中的第 9 道可以看到新开地没有相应的条带, 这可能是有关青枯菌的特异条带。而施加有机肥的连作地的第 6 道、第 8 道都出现其他两种处理没有的带, 这可能是抗青枯菌的特异微生物, 相关的条带已回收测序。

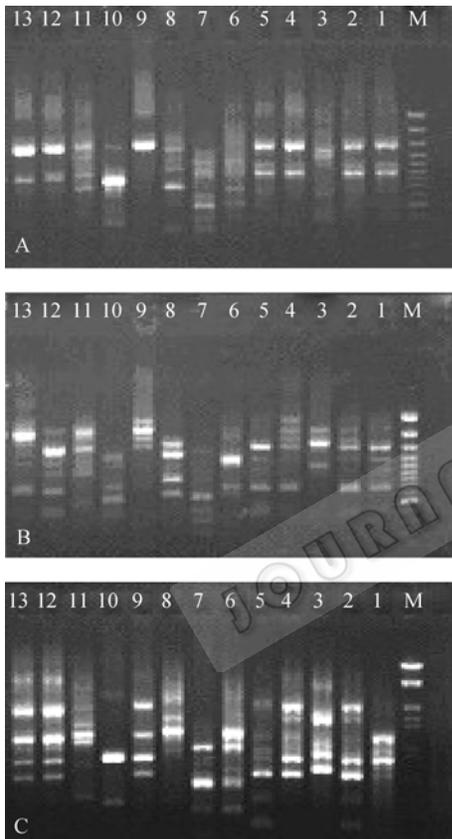


图 1 分别为 13 条引物对处理 1、2、3 的 RAPD 扩增产物电泳图谱
 Fig. 1 RAPD patterns amplified of treatment one, two, three by primers of 13 respectively

2.3 土壤微生物 DNA 多样性分析

由于 RAPD 采用随机引物, 对微生物的 DNA 没有特异性, 因此利用土壤微生物宏基因组随机扩增的条带能间接反映不同处理后微生物群落 DNA 组成的差异。计算土壤微生物群落多样性指数发现(表 4), 施加有机肥的生姜连作地, 其群落功能多样性指数中的 Shannon 指数、Simpson 指数、PIE 相遇几

表 4 生姜土壤中微生物群落功能多样性
 Table 4 Diversity and evenness indices for soil microbial communities

处 理 Treatment	Shannon index	Simpson index	PIE
不施有机肥连作地 Without ecological organic fertilizer	1.10B	7.21B	1.008
施有机肥连作地 1 Use ecological organic fertilizer 1	1.38A	8.76A	1.002
施有机肥连作地 2 Use ecological organic fertilizer 2	1.38A	8.76A	1.002
新开地 Assart	1.92A	8.87A	1.004

率与新开地十分接近, 相互间差异不显著。但二者与不施有机肥的处理相比, 除 PIE 相遇几率外, 其余各项指数均高于不施有机肥的连作地, 且相互间差异达极显著水平。这说明由于施加有机肥使连作地土壤中的微生物群落和数量发生了较大的改变, 土壤微生物群落的多样性在有机肥的帮助下得到了较大的恢复。

2.4 不同处理间的相似系数与聚类

相似系数是评价群落间遗传变异水平的重要参数。两个微生物群落间的亲缘关系越近, 在所有位点上的等位基因频率就相差越小, 相似系数就越接近 1; 相反, 相似系数就越接近 0。各处理分离物间的相似系数在 0.42~1 之间(见表 5), 不施加有机肥连作地与施有机肥连作地、新开地处理间的相似系数较小, 施有机肥连作地、新开地处理间的相似系数

表 5 18 个分离物在 DNA 水平上的相似系数
 Table 5 Dissimilarity coefficient of 18 isolates at DNA level

处 理 Treatment	不施有机肥连作地 Without ecological organic fertilizer	施有机肥连作地 1 Use ecological organic fertilizer	施有机肥连作地 2 Use ecological organic fertilizer	新开地 Assart
不施有机肥连作地 Without ecological organic fertilizer	1.00			
施有机肥连作地 1 Use ecological organic fertilizer 1	0.56	1.00		
施有机肥连作地 2 Use ecological organic fertilizer 2	0.56	1.00	1.00	
新开地 Assart	0.42	0.87	0.87	1.00

较大,表明施加有机肥确实能在一定程度上改变土壤微生物的群落结构,长期连作也同样会改变土壤微生物群落的结构。

利用 13 条随机引物,对所处理土壤微生物的宏基因组 DNA 进行随机扩增,并把扩增图谱进行聚类分析可将 3 个供试分离物聚为 2 个群体。其中施有机肥连作地与新开地在一个群体中,不施加有机肥连作地为一个群体。这说明施加有机肥后的土壤微生物群落接近新开地。连作地由于青枯菌是优势菌群,多样性小而聚为另一类。

3 讨论

生姜连作地经逐年累计,在土壤中残留大量的青枯病病原菌,为青枯病的发生创造了条件。因此,减少土壤中病原菌的数量或比例,使其恢复土壤原有的微生态平衡是控制青枯病发生的有效方法。在生姜连作地中施加有机肥,一方面可导致土壤中微生物群落数量增加,进而有效降低了连作地中青枯病病原菌在微生物群落中所占的比例,降低青枯病菌的优势菌种地位,其中真菌、放线菌的数量分别增加了 14.8%和 18.3%;另一方面可致微生物群落发生改变,最大稀释度平板培养基上不同形态的菌落数出现了明显的增加,导致微生物间的种间生存竞争增强,最终在一定程度上控制和降低了青枯病的发生。RAPD 分析表现出:相同引物扩增添加有机肥的连作地要比不施有机肥的连作地的扩增条带多,连作地的扩增条带最少,这说明添加有机肥,土壤中新出现了一些微生物群落。添加有机肥连作地的多样性指数接近新开地,与不施有机肥的连作地有较大差异。说明添加有机肥改变了土壤原有的微生态群落结构,使一些有益微生物得到了生长,特别是真菌和放线菌的增加,进而抑制了病害的发生。不同处理间的相似性系数表明,施加有机肥后能使土壤微生物群落的结构发生较大的变化,出现了许多连作地没有的多态性条带,而同新开地共有的非多态性条带增加。同时研究也发现增加有机肥的施肥量后,平板计数法统计出真菌和细菌菌落有增加但不明显,而放线菌菌落没有变化,RAPD 反应没有在处理 1、2 间扩增出多态性条带,这说明单纯增加有机肥的施加量对改善土壤微生物群落结构效果不明显。

土壤经过一定处理后,土壤中微生物群落的多样

性发生了变化,如何准确反映土壤中微生物的多样性,一直是广大研究者的努力方向^[14]。采用培养的方法往往使一些不易培养的微生物落掉,而微平板测定群落多样性指数更多的是针对细菌,分子生物学的发展给土壤微生物多样性的测定带来了新的方法与手段^[15]。RAPD 分子标记技术最早应用于鉴定植物基因多态性,它作为一种快速而灵敏的方法可用来检测相似或相同基因的极小差异。本文用 RAPD 分子标记技术来研究不同处理土壤中微生物群落的分子多样性分析,有效避免传统富集、培养等过程所造成的微生物丢失、种群变化较大等错误,能可靠地反映微生物群落的变化,更能利用此方法找到特异的杀灭病原菌的微生物。

虽然利用 RAPD 分子技术能较灵敏和较快地分析出土壤微生物群落的多样性,避免了其它技术的一些缺陷,但分析中提取宏 DNA 组的好坏直接影响到后续的分析^[16],同时不能明显地区分出细菌、真菌等微生物群落的具体数量,而无法将土壤微生物的群落结构与其功能联系起来,这些不足有待于分子生物技术的进一步发展解决。

参考文献

- [1] Masaya N, Yoshitaka S, Sea S. Suppression of growth of *Ralstonia solanacearum*, tomato bacterial wilt agent, on/in tomato seedlings cultivated in a suppressive soil. *Soil Sci Plant Nutr*, 1999, **45**(1): 79-87.
- [2] 蔡燕飞, 廖宗文, 章家恩, 等. 番茄青枯病的土壤微生物防治研究. *农业环境保护*, 2002, **10**(1): 106-109.
- [3] Shiomi Y, Nishiyama M, Onizuka T, et al. Comparison of bacterial community structures in the rhizosphere of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied Environmental Microbiol*, 1999, **65**(9): 3996-4001.
- [4] Ritchie NJ, Schutter ME, Dick RP, et al. Use of length heterogeneity PCR, and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiol*, 2000, **66**: 1668-1675.
- [5] Sun SK, Huang JW. Formulated soil amendment for controlling fusarium wilt and other soilborne disease. *Plant Disease*, 1985, **69**: 917-920.
- [6] Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM, et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(5): 1620-1633.
- [7] Bakri Y, Arabi MI, Jawhar M. RAPD technique is a useful

- tool to distinguish *Penicillium* species. *Pol J Microbiol*, 2007, **56**(4): 273–276.
- [8] 陈 灏, 唐小树, 林 浩, 等. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究. *微生物学报*, 2002, **42**: 478–483.
- [9] Borie B, Jacquot L, Jamaux-Despreaux I, *et al*. Genetic diversity in populations of the fungi *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine in France. *Plant Pathology*, 2002, **51**: 85–96.
- [10] Mahuku GS, Jara C, Cuasquer JB, *et al*. Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from central America and its implication for resistance to breeding of common bean. *Plant Pathology*, 2002, **51**: 594–604.
- [11] 骆世明, 彭少麟. 农业生态系统分析. 广州: 广东科技出版社, 1996.
- [12] Howard PJA. Analysis of inter-sample distances from BIOLOG plate data in Euclidean and simplex spaces. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**: 1323–1330.
- [13] 姚 建, 杨永华, 沈晓蓉, 等. 农用化学品污染对土壤微生物群落 DNA 序列多样性影响研究. *生态学报*, 2000, **20** (6): 1021–1027.
- [14] Torsvik VL, Goksoyr J, Daae FL. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Apply Environ Microbial*, 1990, **56**: 776–781.
- [15] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. *土壤*, 2004, **36** (4): 346–350.
- [16] Xia X, Bo llinger J, Ogram A. Molecular genetic analysis of response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol Ecol*, 1995, **4**: 17–28.



2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1 月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫, 病毒及药理学学会(SNIP)年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4 月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009 国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5 月 29-31 日	400	北京	www.fungalinfection.cn/ isham2009 何苗苗 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7 月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8 月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8 月 17-19 日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8 月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9 月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8 月 20-25 日	600	上海	白林泉 021-62932418

(下转 p.740)