

# 嫁接对西瓜根际微生物种群数量及群落结构的影响

雷娟利<sup>1</sup> 寿伟松<sup>1</sup> 董文其<sup>1</sup> 张成浩<sup>1</sup> 徐志豪<sup>1</sup> 周艳虹<sup>2</sup> 喻景权<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>浙江省农业科学院蔬菜研究所, 浙江杭州 310021; <sup>2</sup>浙江大学园艺系, 浙江杭州 310029)

**摘要:** 分别采用微生物培养的方法、16S rDNA PCR-RFLP 方法和 *phl D* 基因 PCR-RFLP 方法研究了嫁接对西瓜根际微生物种群数量、细菌群落结构及拮抗菌(2, 4-DAPG 产生菌)群落结构的影响。结果表明: ①嫁接西瓜根际细菌和真菌数量有所提高, 而放线菌数量则有所减少。②嫁接西瓜与自根西瓜具有 1 个相同的主要根际细菌基因型; 不同砧木嫁接的西瓜与自根西瓜也分别具有不同基因型的细菌。③嫁接西瓜具有与自根西瓜不同的主要根际拮抗菌基因型。

**关键词:** 西瓜嫁接; 根际微生物; 细菌; 群落结构; 2, 4-DAPG 产生菌

**中图分类号:** S436.5    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-6346 (2011) 02-0062-05

## Effects of Grafting on Rhizosphere Microorganisms Quantity and Community Structure of Watermelon

LEI Juan-li<sup>1</sup>, SHOU Wei-song<sup>1</sup>, DONG Wen-qi<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-hao<sup>1</sup>, XU Zhi-hao<sup>1</sup>, ZHOU Yan-hong<sup>2</sup>, YU Jing-quan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Vegetable Institute of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China; <sup>2</sup>Horticulture Department of Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

**Abstract:** The changes of microorganisms population, bacterial community structure and 2, 4-DAPG producers community structure in rhizosphere soil of grafted watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] plants were studied using the methods of microorganism culture, 16S rDNA PCR-RFLP and *phl D* gene PCR-RFLP, respectively. The results showed that the bacterial and fungal population in rhizosphere soil of grafted watermelon was increased and that of the actinomycetes population was decreased; the grafted watermelon had one similar main 16S rDNA genotype in rhizosphere soil with the non-grafted watermelon, although the grafted watermelon with different stock had their unique 16S rDNA genotypes different from non-grafted watermelon; the grafted watermelon had different main 2, 4-DAPG producers *phl D* genotypes from non-grafted watermelon.

**Key words:** Grafted watermelon; Rhizosphere microorganism; Bacteria; Community structure; 2, 4-DAPG producers

西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] 是我国主要经济作物, 全国各地常形成连片种植的西瓜种植区域和特色基地。由于市场需求和有限耕地面积的矛盾, 以及栽培习惯和经

收稿日期: 2010-08-06; 接受日期: 2010-11-03

基金项目: 国家科技支撑计划 (2008BADA6B02), 浙江省自然科学基金 (Y3100003)

作者简介: 雷娟利, 博士, 副研究员, 专业方向: 蔬菜病原微生物及蔬菜生物技术, E-mail: juanli@126.com

济利益的影响, 连作现象普遍, 造成连作障碍与枯萎病等病害发生十分严重。西瓜枯萎病是一种分布较广、危害严重、防治困难的一种典型土传病害。嫁接作为克服土传病害, 消除连作障碍的一项有效技术措施, 在西瓜生产上已得到广泛应用(韩志平 等, 2006)。根际微生物群落结构与土传病害的发生有一定的内在联系, 植物土传病害的发生在一定程度上是根际微生物群体相互作用的结果。研究表明嫁接改变了茄子根际微生物种群数量和群落结构, 增加了有益菌数量, 进而增强了茄子的抗病性(尹玉玲 等, 2008)。然而对于嫁接西瓜根际微生物与土传病害关系方面的研究报道较少。本试验通过对嫁接西瓜根际细菌、真菌、放线菌、种群数量变化及根际细菌与拮抗菌(2, 4-DAPG产生菌)群落结构变化的研究, 阐明嫁接西瓜根际微生物种群结构与土传病害的关系, 旨在从根际微生物角度进一步揭示嫁接西瓜的抗病机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

接穗为早佳8424西瓜(商品种), 砧木分别为南瓜(*Cucurbita moschata* Duch.)砧明秀(商品种)和葫芦(*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.)砧PH1/PH16, 均由浙江省农业科学院蔬菜研究所提供。西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)生理小种1(Race 1)作为接种源。牛肉膏蛋白胨培养基用于细菌的分离和培养, 马丁-孟加拉红培养基用于真菌的分离和培养, 高氏1号培养基用于放线菌的分离和培养(赵斌和何绍江, 2002)。

### 1.2 取样方法

根际土壤的取样方法: 将根系挖出, 抖落大土块, 收集附着在根系上的土壤作为根际土壤。每6株植株根际土壤混合为一个小样, 每个处理取3个平行样, 分别装入保鲜袋中备用。微生物的分离采用土壤稀释分离法, 每种微生物稀释浓度均分离3皿(即3次重复)。土壤含水量采用烘干法测定。最后计算每克干土中根际微生物的数量。

### 1.3 嫁接西瓜对西瓜枯萎病的抗性鉴定

本试验于2008年在浙江省农业科学院水培基地进行, 采用插接法嫁接, 种植土壤采自基地试验田。采用盆栽试验, 自根西瓜、南瓜砧嫁接西瓜和葫芦砧嫁接西瓜, 分别种30盆, 每盆1株, 采用灌根法(张学炜 等, 1991)进行西瓜枯萎病抗性鉴定, 接种后30 d左右调查发病率。

### 1.4 根际微生物总基因组DNA提取

根际微生物总基因组DNA的提取采用UltraClean Soil DNA isolation Kit(Mo Bio Laboratories, Solana Beach Calif, USA), 具体操作方法见说明书。提取的DNA大小和质量通过0.8%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.5 根际细菌PCR-RFLP分析

根据Martin-Laurent等(2001)设计细菌16S rDNA全长引物(表1), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。扩增反应在50 μL体系中进行, 其中含1 μL(约20 ng)DNA样品, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>正反向引物, 400 μmol·L<sup>-1</sup>dNTPs, 1 U Taq DNA聚合酶及1倍的反应缓冲液。反应程序为: 94 °C变性3 min, 94 °C变性1 min, 55 °C退火1 min, 72 °C延伸1.5 min, 共30个循环, 最后72 °C延伸5 min。PCR产物长约1.5 kb。PCR反应结束后, 扩增产物通过1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。将特异性的目的片段用北京鼎国昌盛生物技术有限公司的试剂盒进行切胶纯化。纯化后的PCR产物与PMD19-T vector(Takara公司)连接过夜, 然后转化TG1感受态细胞, 挑取白斑筛选阳性克隆。将筛选到的阳性克隆质粒DNA, 取0.5 μL为模板, 采用M13引物再进行PCR扩增, 所得PCR产物用Hinf I和Hae III两种限制性内切酶37 °C, 4 h进行酶切, 酶切完成后用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 即获得限制性片段长度多态

性图谱。对于条带数目与位置相同的，认为其来源于同一细菌 16S rDNA PCR-RFLP 基因型。对同一基因型的克隆数进行统计，并计算其基因型频率。

### 1.6 根际抗生素 2,4-二乙酰基藤黄酚 (2,4-DAPG) 产生菌 PCR-RFLP 分析

根据 McSpadden Gardener 等 (2001) 设计 2,4-DAPG 产生菌的 *phlD* 基因引物 B2BF/BPR4。PCR 退火温度为 60 °C，扩增产物长约 600 bp。其余操作同 1.5。

### 1.7 多样性指数计算

香农多样性指数 (Shannon diversity index) 和辛普森指数 (Simpson's index) 是广泛应用于生态学研究的参数，本试验也采用这两个参数来分析根际样品的细菌群落多样性。多样性指数的计算通过 Biodap (Biodiversity data analysis package) 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 嫁接西瓜抗枯萎病的鉴定结果

通过抗病性鉴定表明 (表 2)，自根西瓜的发病率为 98%，而南瓜砧嫁接西瓜和葫芦砧嫁接西瓜的发病率则均为 0，抗病效果达到了 100%，说明嫁接西瓜具有对西瓜枯萎病菌 Race1 免疫的效果。

### 2.2 嫁接对西瓜根际微生物种群数量的影响

通过对嫁接西瓜根际微生物种群数量的分析表明，嫁接西瓜根际细菌和真菌数量有所提高，而放线菌数量则有所减少 (表 3)。

### 2.3 嫁接对西瓜根际细菌群落结构的影响

嫁接西瓜根际细菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析表明 (图 1)，自根西瓜和嫁接西瓜根际共检测到 18 个细菌基因型，嫁接西瓜与自根西瓜具有 1 个共同的根际主要细菌基因型，为基因型 2，基因型频率均达到或超过 70%。不同砧木嫁接的西瓜与自根西瓜也分别具有不同基因型的细菌，如自根西瓜具有 8 个特有的基因型；南瓜砧嫁接西瓜具有 3 个特有的基因型；葫芦砧嫁接西瓜具有 1 个特有的基因型。从基因型数来看，自根

表 1 PCR-RFLP 分析所用引物

引物名称	序列 (5' - 3')
27F	5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'
1492r	5' -TAC GGH TAC CTT ACG ACT T-3'
B2BF	5' -AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'
BPR4	5' -TACGGHTACCTTACGACTT-3'

表 2 嫁接西瓜抗枯萎病鉴定结果

处理	发病率/%	抗病效果/%
自根西瓜	98	0
南瓜砧嫁接西瓜	0	100
葫芦砧嫁接西瓜	0	100

表 3 嫁接对西瓜根际主要微生物

处理	种群数量的影响 (DW)		
	细菌数量 cfu · g <sup>-1</sup>	真菌数量 cfu · g <sup>-1</sup>	放线菌数量 cfu · g <sup>-1</sup>
自根西瓜	1.71 × 10 <sup>8</sup>	2.66 × 10 <sup>6</sup>	6.08 × 10 <sup>7</sup>
南瓜砧嫁接西瓜	1.99 × 10 <sup>8</sup>	3.14 × 10 <sup>6</sup>	5.23 × 10 <sup>7</sup>
葫芦砧嫁接西瓜	2.23 × 10 <sup>8</sup>	3.79 × 10 <sup>6</sup>	5.79 × 10 <sup>7</sup>

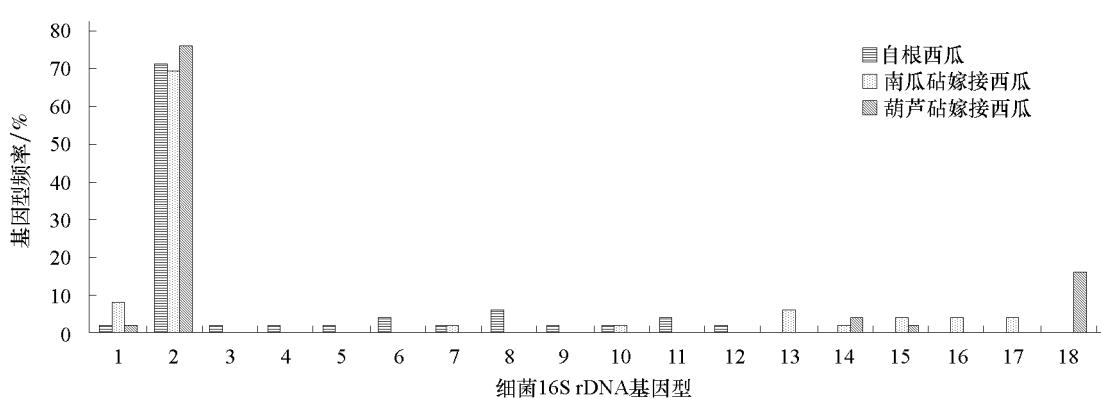


图 1 不同砧木嫁接西瓜根际细菌 16S rDNA 基因型及其频率

西瓜的根际细菌基因型数最多为 12, 而南瓜砧和葫芦砧嫁接西瓜的基因型数则分别为 9 和 5。从多样性指数来看, 南瓜砧嫁接西瓜与自根西瓜的根际细菌多样性较高, 而葫芦砧嫁接西瓜的较低(表 4)。

#### 2.4 嫁接对西瓜根际 2, 4-DAPG 产生菌群落结构的影响

##### 嫁接西瓜根际 2, 4-DAPG 产生菌 *phl D* 基因型频率

因 PCR-RFLP 分析表明(图 2), 共检测到 12 个抗生菌基因型, 嫁接西瓜与自根西瓜具有不同的主要根际抗生菌基因型, 自根西瓜根际抗生菌主要基因型为基因型 2, 基因型频率为 65%; 而南瓜砧和葫芦砧嫁接西瓜根际抗生菌的主要基因型均为基因型 9, 基因型频率分别为 61% 和 82%。自根西瓜与嫁接西瓜共有的抗生菌基因型仅有 2 个, 基因型 2(自根西瓜与葫芦砧嫁接西瓜共有), 基因型 6(自根西瓜与南瓜砧嫁接西瓜共有)。自根西瓜特有的基因型有 5 个, 南瓜砧与葫芦砧嫁接西瓜共有的基因型有 4 个, 南瓜砧嫁接西瓜特有的基因型有 1 个, 而葫芦砧嫁接西瓜未检测到特有的基因型(图 2)。从基因型数来看, 自根西瓜的抗生菌基因型数最多为 7, 而南瓜砧和葫芦砧嫁接西瓜的抗生菌基因型数则分别为 6 和 5。从多样性指数来看(表 5), 南瓜砧嫁接西瓜与自根西瓜的根际抗生菌多样性较高, 而葫芦砧嫁接西瓜的较低。这一结果与根际细菌多样性的结果相似。

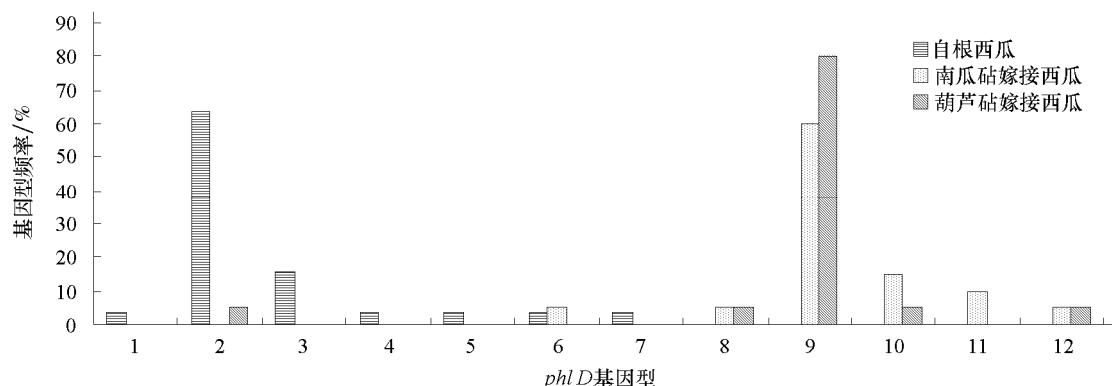


图 2 不同砧木嫁接西瓜根际 2, 4-DAPG 产生菌 *phl D* 基因型及其频率

### 3 结论与讨论

根际微生物与植物生长有着密切的关系, 对植物生长具有十分重要的作用(Smith & Goodman, 1999)。根际微生物群落结构与土传病害的发生也存在着一定的内在联系, 植物土

传病害的发生在一定程度上是根际微生物群体相互作用的结果。其中, 根际细菌与植物的关系最为密切, 对植物的影响作用也最大。有研究表明嫁接茄和自根茄根系分泌物中氨基酸和酚酸在数量和组成上存在差异, 进而影响茄子根际微生物的区系组成, 而且嫁接茄子根际微生物总量也有所增加(朱丽霞等, 2003)。本试验发现, 嫁接西瓜根际细菌和真菌数量有所提高, 而放线菌数量则有所减少。通过根际细菌 16S rDNA RFLP 分析发现, 嫁接也可引起西瓜根际细菌群落发生轻

表 4 嫁接对根际细菌多样性的影响

处理	克隆数	基因型数	香农多样性指数			辛普森指数
			H'	E	Var H'	
自根西瓜	52	12	1.27	0.51	0.4070	0.506 1.976
南瓜砧嫁接西瓜	52	9	1.22	0.56	0.3206	0.484 2.065
葫芦砧嫁接西瓜	50	5	0.79	0.49	0.01964	0.598 1.673

注: H'—多样性指数, E—均匀度指数, Var H'—变异性指数, D 和 1/D—优势度指数; 下表同。

表 5 嫁接对根际 2, 4-DAPG 产生菌多样性的影响

处理	克隆数	基因型数	香农多样性指数			辛普森指数
			H'	E	Var H'	
自根西瓜	25	7	1.22	0.63	0.04729	0.420 2.381
南瓜砧嫁接西瓜	20	6	1.27	0.71	0.04478	0.368 2.714
葫芦砧嫁接西瓜	20	5	0.78	0.48	0.05900	0.632 1.583

微改变。

许多研究表明, 抑制病害发生的土壤与荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 有一定的关系 (Weller et al., 2007)。荧光假单胞杆菌是一类普遍存在于土壤中的微生物, 是一类重要的根围和叶围细菌。其中, 产生 2, 4-DAPG 的荧光假单胞杆菌对抑制各类土传病害起着重要的作用 (Raaijmakers et al., 2002)。既然 2, 4-DAPG 产生菌在土壤中广泛存在, 且在抑制土传病害方面起着重要的作用, 因此 2, 4-DAPG 产生菌的基因型及基因型多样性也被广泛研究 (de La Fuente et al., 2006)。*Phl D* 基因是许多参与 DAPG 合成的基因中最重要的一个, 它对 DAPG 前体的合成很重要 (Bangera & Thomashow, 1999)。研究发现, *phl D* 基因在所发现的 2, 4-DAPG 产生菌中具有保守性, 同时也具有一定的多态性, 很适合作为基因型多样性研究 (Bergsma-Vlami et al., 2005)。本试验通过 *phl D* 基因的 PCR-RFLP 技术, 对嫁接西瓜根际 2, 4-DAPG 产生菌的基因型多样性进行了分析, 嫁接对西瓜根际 2, 4-DAPG 产生菌的基因型多样性影响显著, 嫁接西瓜具有与自根西瓜截然不同的根际主要 2, 4-DAPG 产生菌的基因型, 据试验结果推测嫁接西瓜具有不同的主要 2, 4-DAPG 产生菌的基因型可能与嫁接西瓜的抗枯萎病相关, 当然确切的结论还有待进一步研究。

#### 参考文献

- 韩志平, 郭世荣, 朱国荣, 欧阳认勇. 2006. 砧木对嫁接西瓜生长发育、产量和品质的影响. 中国蔬菜, (2): 22-23.
- 尹玉玲, 周宝利, 李云鹏, 付亚文. 2008. 嫁接对茄子根际土壤微生物种群的化感效应. 园艺学报, 35(8): 1131-1136.
- 张学炜, 钱笑丽, 古勤生. 1991. 西瓜抗枯萎病鉴定方法研究. 果树科学, 8(4): 219-224.
- 赵斌, 何绍江. 2002. 微生物学实验. 北京: 科学出版社.
- 朱丽霞, 章家恩, 刘文高. 2003. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述. 生态环境, 12(1): 102-105.
- Bangera M G, Thomashow L S. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketides antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Journal of Bacteriology, 181: 3155-3163.
- Bergsma-Vlami M, Prins M E, Staats M, Raaijmakers J M. 2005. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71: 993-1003.
- de La Fuente L, Mavrodi D V, Landa B B, Thomashow L S, Weller D M. 2006. *phl D*-based genetic diversity and detection of genotypes of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiology Ecology, 56(1): 64-78.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon J C, Soulard G, Catroux G. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. Applied and Environmental Microbiology, 67(5): 2354-2359.
- McSpadden Gardener B B, Mavrodi D V, Thomashow L S, Weller D M. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. Phytopathology, 91: 44-54.
- Raaijmakers J M, Vlami M, de Souza J T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Van Leeuwenhoek, 81: 537-547.
- Smith K P, Goodman R M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. Annual Review of Phytopathology, 37: 473-491.
- Weller D M, Landa B B, Mavrodi O V, Schroeder K L, de La Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall R F, Mavrodi D V, Thomashow L S. 2007. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biol (Stuttgart), 9(1): 4-20.