

青稞苗期根腐病对根际土壤细菌群落结构的影响

许世洋¹,李雪萍^{1,2*},李敏权²,郭致杰²,漆永红²,李建军²,荆卓琼²

(1. 甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070;2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所,甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】明确青稞根腐病对根际土壤微生物细菌群落结构的影响。【方法】采集苗期健康青稞及根腐病发病率分别为5%、10%、15%、20%等不同发病率青稞根际土壤样品,采用Illumina MiSeq高通量测序技术测定各样品16S rDNA序列,并进行多样性分析。【结果】苗期青稞根际土壤细菌优势种属多,群落结构组成丰富,多样性及均匀性程度高。对不同分类水平下优势菌群分析发现,门水平下,根腐病的发生使变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度升高,使酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)丰度降低;目水平下,微球菌目(Micrococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)和丙酸杆菌目(Propionibacteriales)的丰度降低,芽孢杆菌目(Bacillales)和鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)的丰度升高;属水平下,鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)的丰度升高,*Pseudarthrobacter*属丰度降低;种水平下,普城沙雷菌(*Serratia plymuthica*)丰度增加,简单芽孢杆菌(*Bacillus simple*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)及嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)的丰度降低。聚类分析发现,根腐病的发生使青稞根际土壤细菌群落结构发生了变化,且总体呈现出发病率越高,与健康样品的距离越远,差异越大的规律。通过COG数据库注释得到青稞根际土壤细菌多个功能基因。【结论】青稞苗期根腐病的发生使根际土壤细菌群落结构发生了变化,这一研究为青稞根腐病的防控及预测预警技术的建立提供了理论依据。

关键词:青稞;根腐病;高通量测序;土壤细菌;群落结构

中图分类号:S572.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2023)05-0120-09

DOI:10.13817/j.cnki.cycp.2023.05.016



青稞(*Hordeum vulgare*)是我国青藏高原地区对多棱裸粒大麦的统称,属于禾本科小麦族大麦属普通大麦种,是栽培大麦(*Hordeum vulgare*)的变种^[1]。青稞具有耐寒性强、成熟期短等特点^[2],主要分布在西

藏、青海、甘肃、云南、四川等高海拔省区,在藏区总种植面积高达 $25.58 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 左右^[3],是高寒、高海拔(>4 200 m)地区唯一能够正常成熟的谷物^[4]。且青稞营养价值高^[5],保健功能强^[6],在食品加工中亦被广泛应用^[7]。青稞秸秆是优质饲草,对促进藏区畜牧业发展具有重要贡献^[8]。因此,青稞产业的发展关乎我国藏区粮食安全、经济发展和社会安定等民生大计^[9]。

然而,随着青稞市场需求不断增高,种植面积不断扩大^[10],导致连作现象严重,根腐病等农作物病害相继发生,严重阻碍了藏区农牧业的可持续发展和生

收稿日期:2022-03-03;**修回日期:**2022-04-26

基金项目:国家自然科学基金项目(32060037);兰州市科技计划项目(2021-1-174)

作者简介:许世洋(2000-),男,河南方城人。

E-mail:xushiyang715@163.com

*通信作者。E-mail:lixueping@gsagr.ac.cn

态稳定^[11]。调查显示,根腐病在全球范围内普遍发生,严重时导致大麦类作物减产近 10%^[12]。我国青海省、甘肃省青稞根腐病发生率高达 20%^[13-14]。但由于受区域自然条件、专业人才、科技和经济条件等限制,青稞根腐病受重视程度相对较低,对其发病机理的研究很少。

微生物是土壤生态系统不可缺少的组成部分,植物根际土壤存在着大量微生物,这些微生物在植物生长、养分运输、能量转化和物质循环等过程中发挥着重要作用,是衡量土壤质量和健康的重要指标^[15]。研究表明^[16],植物及其根际土壤微生物相互作用构成的有机体与特定区域内的生态系统健康密切相关,根际土壤微生物多样性及群落组成对维持植物病害的过程起着重要作用。根腐病是一种土传病害,主要发生在植物的根及根茎部位并最终导致植物枯死,其发生与根际土壤微生态系统健康与否关系密切^[17]。高通量测序技术高效快速,在与根腐病等与土壤微生态相关的研究中应用越来越广泛^[18]。如 Liao 等^[19]采用高通量测序技术快速鉴定黄连根腐病相关病原的拮抗菌;Tian 等^[20]利用高通量测序技术明确了西洋参根腐病对其根际土壤理化性质及真菌群落结构的影响;谢玉清等^[21]研究发现大蒜根系腐烂改变了植株的根围环境,导致了土壤真菌多样性降低和群落结构的改变。但关于青稞根腐病对根际土壤细菌群落结构的影响研究较少。

鉴于此,本研究以不同根腐病发病率的苗期青稞根际土壤为研究对象,通过对不同发病率根腐病青稞根际土壤细菌进行高通量测序,分析其多样性,明确青稞根腐病对根际土壤细菌群落结构的影响,为探讨青稞根腐病的发生机制、青稞根际土壤微生态改良及青稞根腐病的有效防控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究区概况

研究区位于甘肃省甘南藏族自治州临潭县、卓尼县,域内地貌以高原丘陵为主,地形西高东低,海拔 2 532~3 926 m,属高寒干旱区气候,年均气温 4.8℃,年均降水量 480.2 mm,年均无霜期 100 d,寒冷阴湿、四季不分明。研究区内农作物种植面积约 0.91 万 hm²,玉米、小麦等常规农作物的种植面积和营养品质

均较低,青稞为该区域内主要的农作物之一,种植面积约占 48.5%。

1.2 样品采集

参考《植病研究法》^[22]对该研究区内青稞根腐病的发病率进行调查统计,并采用五点取样法分别将青稞根腐病发病特征典型及健康植株拔出,收集其根部土壤,共采集得到健康样品、发病率分别为 5%、10%、15%、20% 的样品各 10 份,低温运输至实验室。

1.3 土壤总 DNA 的提取与检测

土壤总 DNA 用 OMEGA 的 Soil DNA Kit,按照说明书步骤进行。提取后的 DNA 分别使用 UV-1200 紫外分光光度计(上海美谱达公司)和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度与纯度,并按照根腐病田间发病率将样品混合,混合后共有健康(HS)、根腐病发生率 5%(RS1)、根腐病发生率 10%(RS2)、根腐病发生率 15%(RS3)、根腐病发生率 20%(RS4)等 5 个样品,每个样品 5 个重复,最后直接干冰运送到上海欧易生物医学科技有限公司进行高通量测序,鉴定区域为 16S V3-V4 区,引物为 343F (5'-TACGGRAGGCA GCAG - 3') 和 798R (5'-AGGGTATCTAATCCT-3')。

1.4 数据预处理与 OTU 分类

使用 Trimmomatic (version 0.35) 软件^[23]对 Illumina Miseq 平台测序生成的原始双端测序数据进行去杂,使用 Flash (version 1.2.11) 软件^[24]对合格的原始双端序列进行拼接,使用 Qiime 中的 split libraries (version 1.8.0) 软件^[25]去除 paired end 序列中含有 N 碱基的、单碱基重复大于 8、长度小于 200 bp 的序列,得到 clean tags,最后使用 Uchime (version 2.4.2) 软件^[26]去除 clean tags 中的嵌合体,得到用于 OTU 划分的 valid tags。然后按照 97% 的相似度使用 Vsearch (version 2.4.2) 软件^[27]对质控得到的优质序列进行 OTU 分类,选取每个 OTU 中丰度最大的序列作为该 OTU 的代表序列,采用 RDP classifier Naive Bayesian 分类算法^[28]将代表序列与数据库进行比对注释,得到 OTU 的注释信息,根据每个 OTU 在各个样本中包含的序列数,构建 OTU 在各个样本中的丰度矩阵文件,同时采用 Pynast (v 0.1) 软件^[29]构建 OTU 代表序列系统发育树,明确其进化关系。

1.5 Alpha 多样性分析

对测序所得的序列进行随机抽样,以最小样本 tags 数深度为基础构建 alpha 指数稀释曲线。同时在统一抽样深度下生成新的 OTU 矩阵文件,以矫正测序深度不同引起的多样性差异,并在该统一深度下计算不同样本的多样性指数,根据各样品的 OTU 丰度和排序绘制 Rank-Abundance 曲线。

1.6 Beta 多样性分析

1.6.1 群落结构分布 对样本在门纲目科属等各个不同的分类层级,进行注释以及汇总,其中包含绝对丰度和相对丰度结果。根据分类学水平门、纲、目、科、属、种,选取各个分类水平下丰度排序 TOP30 物种,并绘制成柱状图。

1.6.2 聚类分析 采用 Weighted unifracs 距离算法得到的距离矩阵,对矩阵进行层级聚类。

1.7 微生物群落功能基因预测

使用 PICRUSt 软件^[30],预测微生物基因功能的构成,统计不同样本和分组之间在功能上的差异。对预测的 COG 结果差异进行统计,选取差异结果中 Top30 做图。

2 结果与分析

2.1 OTU 分类与注释

对注释得到的 100 个优势属做系统发育树(图 1),

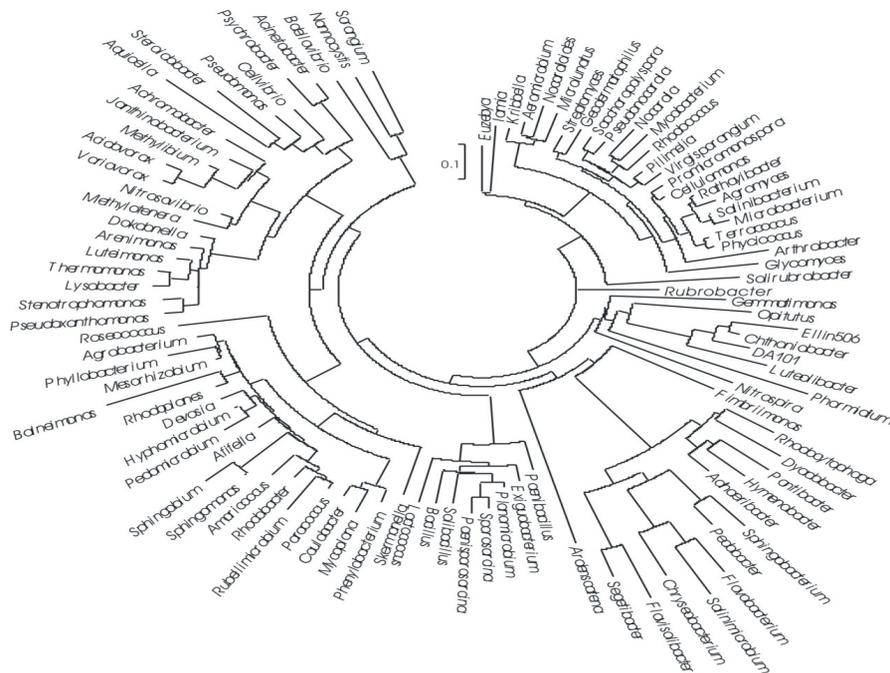


图 1 青稞苗期根际土壤优势细菌系统发育进化树

Fig. 1 The rhizosphere soil dominant bacteria phylogenetic evolutionary tree of seedling naked barley

青稞苗期根际土壤优势细菌主要有金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、微杆菌属(*Exiguobacterium*)、纤维弧菌属(*Cellvibrio*)、动性微杆菌属(*Planomicrobium*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土微菌属(*Pedomicrobium*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、苯基杆菌属(*Phenylbacterium*)、枝动杆菌属(*Mycoplana*)、副球菌属(*Paracoccus*)、食酸菌属(*Acidovorax*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)、乳酸乳球菌属(*Lactococcus*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、玫瑰球菌属(*Roseococcus*)、假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)、热单胞菌属(*Thermomonas*)、弧菌属(*Nitrosovibrio*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、堆囊菌属(*Sorangium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、侏囊菌属(*Nannocystis*)、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)等。

2.2 Alpha 多样性

Alpha 多样性分析反映了青稞根际土壤细菌群落的丰富度和多样性。各样本的稀释曲线 Observed species 及 Chao 指数均随着测序序列的增加而增加,最

终趋于平缓,说明本研究测序量足够大,可以反应青稞根际土壤细菌群落的丰富度。Shannon 指数、PD whole tree 指数和 Simpson 指数曲线最终也趋于平缓,不再随样本序列数的增加而增加,则证明本研究中各

样品的细菌群落多样性高,能全面反应物种信息、群落进化及物种多样性程度等信息。Goods coverage 指数曲线也最终趋于平缓则说明测序覆盖度好,各样本序列完测出度高(图 2)。

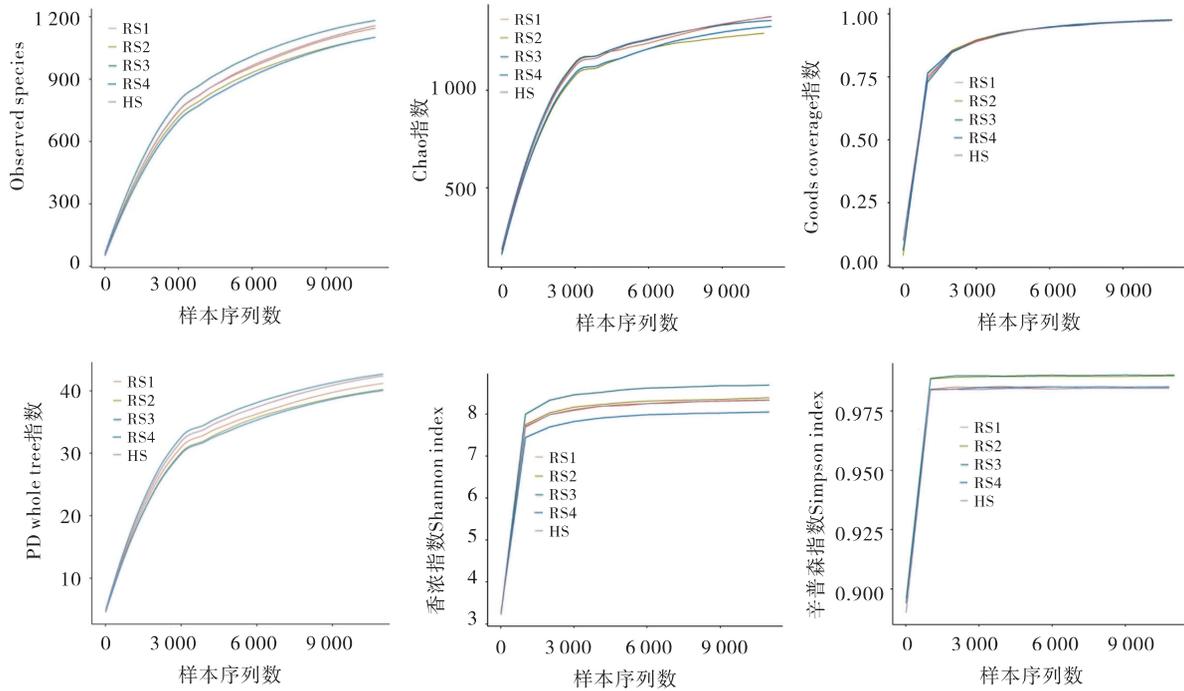


图 2 青稞苗期根际土壤细菌群落的各 alpha 多样性指数

Fig. 2 The rhizosphere soil bacterial communities' alpha diversity indices of seedling naked barley

Rank-Abundance 曲线可以反应青稞根际土壤细菌群落组成丰富性和均匀度,根据各样品的 OTU 相对丰度和排列数得到的 Rank-Abundance 曲线发现(图 3),随着 OTU 排列数的增加,各样品的相对丰度降低,当 OTU 排列数达到 1200 时,其不再梯度性降低,趋于平缓,且横轴曲线趋于较宽,说明样本组中的细菌组成丰富,均匀程度高。

2.3 Beta 多样性分析

2.3.1 群落结构分布 根据分类学水平,选取门、目、属、种各个分类水平下丰度排序 TOP30 物种,绘制成柱状图。在门的水平下,变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为 5 个样品组所共有的优势菌群。青稞苗期根腐病的发生使根际土壤中变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的丰度升高,酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)的丰度降低,且呈现出发病率越高,丰度越低的趋势(图 4)。

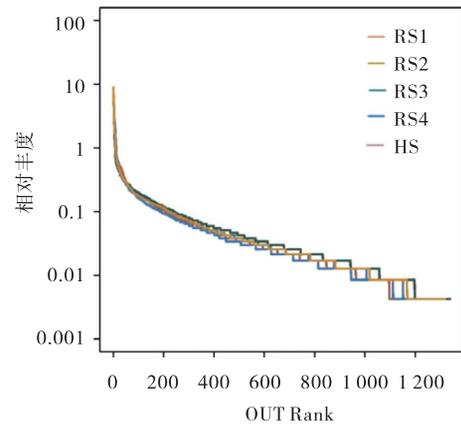


图 3 青稞苗期根际土壤中细菌 RankAbundance 曲线

Fig. 3 The rhizosphere soil bacterial RankAbundance curve of seedling naked barley

在目的水平下,青稞苗期根腐病的发生使其根际土壤中微球菌目(Micrococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)的丰度降低,且随发病率的升高,呈先降低再升高的趋势;芽孢杆菌目(Bacillales)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、曼噬甲壳菌目(Chitinophagales)丰度增加,且

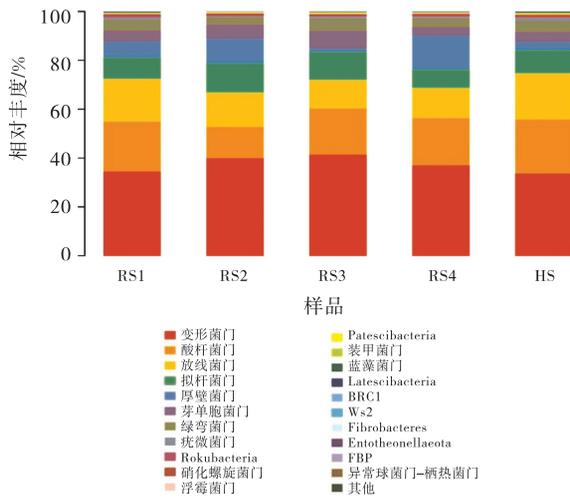


图4 不同根腐病发病率青稞根际土壤细菌门水平群落组成
 Fig. 4 The bacterial phylum community compositions in rhizosphere soil of naked barley with different incidences of root rot

随发病率的升高,呈先升高再降低的趋势;对黄单胞菌目(Xanthomonadales)和根瘤菌目(Rhizobiales)的丰度水平影响则不大(图5)。

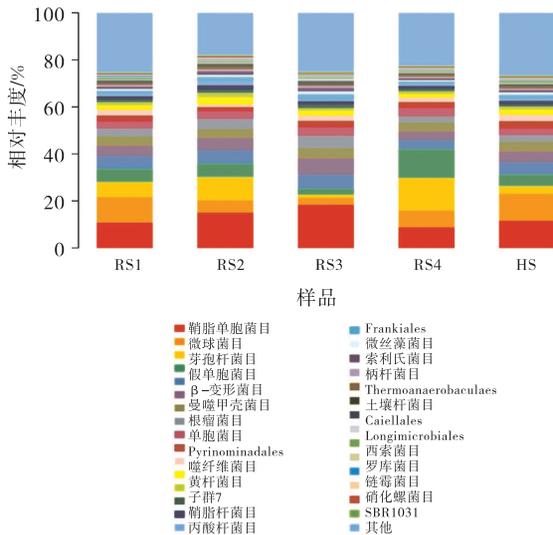


图5 不同根腐病发病率青稞根际土壤细菌目水平群落组成
 Fig. 5 The bacterial orders community compositions in rhizosphere soil of naked barley with different incidences of root rot

在属的水平下,青稞苗期根腐病的发生使其根际土壤中鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)的丰度升高,*Pseudarthrobacter*的丰度降低。但随着发病率增加,鞘脂单胞菌属丰度呈降低的趋势,芽孢杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)的丰度则呈先升高、后降低、再升高的趋势(图6)。

势(图6)。

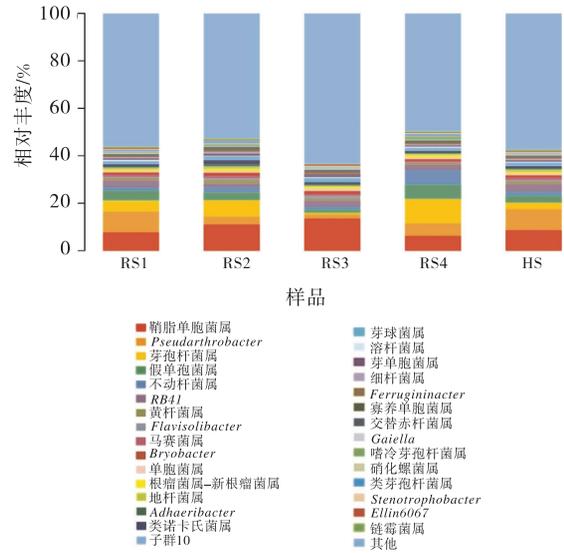


图6 不同根腐病发病率青稞根际土壤细菌属水平群落组成
 Fig. 6 The bacterial genus community compositions in rhizosphere soil of naked barley with different incidences of root rot

在种的水平下,普城沙雷菌(*Serratia plymuthica*)、简单芽孢杆菌(*Bacillus simple*)和醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)为5个样品组共有的优势种,整体而言,青稞苗期根腐病的发生使其根际土壤中简单芽孢杆菌、醋酸钙不动杆菌及嗜根寡养单胞菌丰度升高,且随着着发病率的升高呈现出升高、降低、再升高的趋势,普城沙雷菌的总体丰度降低,随着发病率的升高,呈降低、升高、再降低的趋势(图7)。

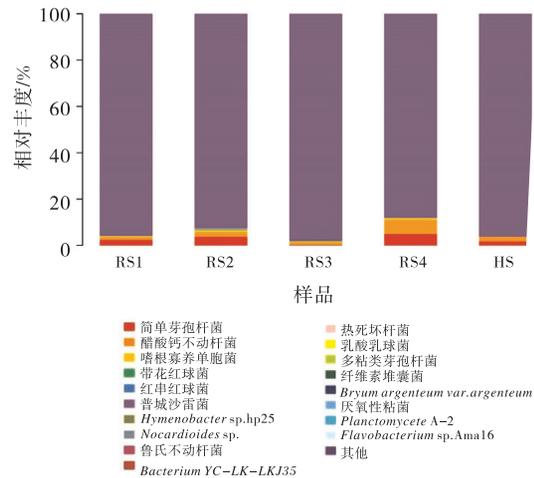


图7 不同根腐病发病率青稞根际土壤细菌种水平群落组成
 Fig. 7 The bacteria species community composition in rhizosphere soil of naked barley with different incidences of root rot

2.3.2 聚类分析 通过对不同发病率青稞根际土壤细菌群落聚类分析发现,青稞苗期根腐病的发生使其根际土壤细菌群落结构发生了变化,且发病率越高,与健康样品距离越远,差异越大。健康样品(HS)和根腐病发生率 5%(RS1)的样品距离最近,发病率为 10%(RS2)和 15%(RS3)的距离最近,和健康样品(HS)的距离最远(图 8)。

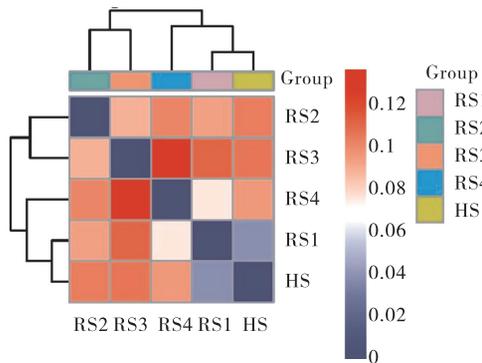


图 8 不同发病率青稞根际土壤细菌群落聚类分析
Fig. 8 The rhizosphere soil bacterial community cluster analysis of naked barley with different incidences

2.4 微生物群落功能基因预测

基于 16S rDNA 对青稞根际土壤细菌基因进行 COG(Clusters of Orthologous Groups of proteins)注释发现:青稞根际土壤细菌功能基因中一般功能基因丰度最高,依次为氨基酸转运与代谢相关的基因,未知功能基因,转录相关基因,细胞壁膜生物合成基因,能量生产和转化基因,糖类运输和代谢基因,信号传导机制基因,复制、重组和修补基因,翻译、核糖体结构和生物合成基因,无机离子运输和代谢基因,辅酶运输和代谢基因,脂类运输和代谢基因,次生代谢合成运输和代谢基因,细胞内交通分泌及囊泡运输基因,核苷酸运输和新陈代谢基因,防御机制基因等多个功能基因,且青稞苗期根腐病的发生对各功能基因的丰度影响不大(图 9)。

3 讨论

研究表明^[31],植物根际土壤细菌群落结构能灵敏反映土壤质量及微生态的变化情况。目前已有众多研究采用高通量测序的方法研究根际土壤细菌群落结构与土壤理化因子、环境条件及病害发生的关系^[32-33]。本研究通过在不同分类水平的注释发现,变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放

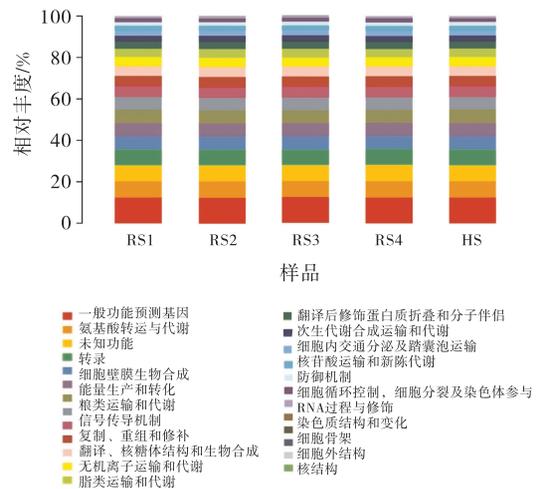


图 9 不同发病率青稞根际土壤细菌功能基因 COG 注释
Fig. 9 The rhizosphere soil bacteria functional genes COG annotation of naked barley with different incidences

线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为青稞根际土壤细菌优势菌门,与王小玲等^[34]对冬小麦土壤细菌群落的研究结果一致。其中,酸杆菌门和放线菌门因根腐病的发生而丰度降低,与 Li 等^[35]对槟榔根腐病根际细菌群落结构的研究结果一致。而放线菌门和酸杆菌门往往包含大量植物防病促生菌等益生菌群^[36-37],说明根腐病的发生可能对青稞根际益生菌群产生了不良影响,从而使根腐病进一步加重。

本研究发现,青稞根际土壤细菌种群丰度随发病率的变化是一个动态的变化过程,并不是一味地降低或升高,如在目水平下,微球菌目(Micrococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)随发病率的升高呈现先降低后升高的趋势,芽孢杆菌目(Bacillales)随发病率的升高呈现先升高后降低的趋势;在属和种的水平下也存在相同的动态变化过程,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)丰度随发病率的增加均呈升高、降低、再升高的趋势。而这个动态的变化可能是因维持其根际土壤群落结构稳定的一个反应过程,如芽孢杆菌目中有大量的植物防病促生菌群^[38],芽孢杆菌属和假单胞菌属的多种菌对根腐病的病原有良好的拮抗作用,理论上与不良的环境或病害发生时其生长受到影响丰度应该降低^[39],但出现了短暂的升高过程,原因可能为:根腐病的发生使其根际土壤中病原物增加,青稞根际土壤微生态为维持原有平衡结构,使芽孢杆菌目大量繁殖抵御不良环境而产生的效应。因此,这

—动态变化过程可能与对不良环境的抵御效应有关,与Khabbaz等研究结果及观点一致^[40],除此之外,本研究还发现,青稞根腐病发病率为15%的样品RS3是动态变化过程的转折点,无论多样性还是各分类水平下菌群组成丰度,均会在此转折点打破规律,发生转折,聚类分析也表明RS3与其他样品的距离最远,差异最大,这也可能是达到了类似生物多样性中度干扰的节点规律^[41],从而说明青稞根腐病发生率超过15%则可能较难防治,但具体的动态规律及成因还需要进一步研究说明。

4 结论

青稞苗期根际土壤细菌优势种属多,群落结构组成丰富,多样性及均匀性程度高。青稞根腐病的发生使其根际土壤细菌群落结构发生了变化,且总体呈现出发病率越高,与健康样品差异越大的规律;使变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽孢杆菌目(Bacillales)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、普城沙雷菌(*Serratia plymuthica*)的丰度升高;使酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、微球菌目(Micrococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)、*Pseudarthrobacter*属、简单芽孢杆菌(*Bacillus simple*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)的丰度降低。

参考文献:

- [1] 姚晓华,吴昆仑. PEG 预处理对青稞种子萌发和幼苗生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2012,32(7):1403—1411.
- [2] Diao X. Production and genetic improvement of minor cereals in China[J]. The Crop Journal,2017,5(2):103—114.
- [3] 白羿雄,姚晓华,姚有华,等. 青稞抗倒伏性状的基因型差异[J]. 中国农业科学,2019,52(2):228—238.
- [4] 李雪萍,漆永红,李敏权,等. 青稞根腐病对根际土壤微生物及酶活性的影响[J]. 生态学报,2017,37(17):5640—5649.
- [5] Gu X D, Li P U, Lei P, et al. Optimization of formula of matsutake highland barley biscuit by response surface methodology [J]. Asian Agricultural Research, 2017, 9 (11):48—53.
- [6] 王梦倩,孙颖,邵丹青,等. 青稞的营养价值和功效作用研究现状[J]. 食品研究与开发,2020,41(23):206—211.
- [7] 侯殿志,沈群. 我国29种青稞的营养及功能组分分析[J]. 中国食品学报,2020,20(2):289—298.
- [8] 刘新春,赖运平,余毅,等. 青稞籽粒饲草性状遗传特征[J]. 草业科学,2018,35(6):1425—1434.
- [9] 朱桂丽,洪名勇. 农村产业融合对欠发达地区农户收入的影响—基于西藏532户青稞种植户的调查[J]. 干旱区资源与环境,2021,35(1):14—20.
- [10] 马宇,巴图,吕二锁,等. 大麦育种与栽培技术研究现状分析[J]. 北方农业学报,2020,48(5):21—25.
- [11] Li X P, Xu S Y, Li J J, et al. First report of root rot on naked barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f.) caused by *Clonostachys rosea* in Qinghai—tibet plateau [J]. China. Microbiology China, <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.21054>
- [12] Zhong S B, Ali S, Leng Y Q, et al. Brachypodium distachyon—*Cochliobolus sativus* pathosystem is a new model for studying plant—fungal interactions in cereal crops. Phytopathology,2015,105(4):482—489.
- [13] 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[J]. 草业学报,2021,30(7):190—198.
- [14] 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[J]. 植物保护学报,2021,48(4):757—765.
- [15] Jin Y H, Zhang Y J, Xu Z W, et al. Soil microbial community and enzyme activity responses to herbaceous plant expansion in the changbai mountains tundra, China[J]. Chinese Geographical Science,2019,29(6):985—1000.
- [16] Wei Z, Friman V P, Pommier T, et al. Rhizosphere immunity: targeting the underground for sustainable plant health management[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering. 2020,7(3):317—328.
- [17] Wu C, Zhang R, Han Z, et al. Strawberry root diseases and control measures[J]. Plant Diseases and Pests,2020,11(1):10—12.
- [18] Wei X, Wang X, Cao P, et al. Microbial community changes in the rhizosphere soil of healthy and rusty panax ginseng and discovery of pivotal fungal genera associated with rusty roots [J]. BioMed Research International, 2020:1—13.

- [19] Liao H, Huang L, Li N, et al. Auxiliary rapid identification of pathogenic and antagonistic microorganisms associated with *Coptis chinensis* root rot by high-throughput sequencing[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11141–11141.
- [20] Tian L X, Ou J R, Sun X, et al. The discovery of pivotal fungus and major determinant factor shaping soil microbial community composition associated with rot root of American ginseng[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2021, 16(11): 1–11.
- [21] 谢玉清, 茆军, 王玮, 等. 大蒜根腐病根际土壤真菌群落结构及多样性分析[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(13): 145–153.
- [22] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [23] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [24] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*. 2011, 27(21): 2957–2963.
- [25] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [26] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194–2200.
- [27] Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al. Vsearch: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4(10): e2584.
- [28] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [29] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, et al. Pynast: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2009, 26(2): 266–267.
- [30] 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(9): 814–821.
- [31] Cycoń M, Borymski S, Orlewska K, et al. An Analysis of the Effects of Vancomycin and/or Vancomycin-Resistant *Citrobacter freundii* Exposure on the Microbial Community Structure in Soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1015.
- [32] Zhou J H, Xia F, Che S C, et al. Microbial Diversity in Rhizosphere Soil of *Cotinus coggygia* Based on High Throughput Sequencing[J]. *Plant Diseases and Pests*, 2019, 10(Z1): 11–15, 23.
- [33] 孙建平, 刘雅辉, 左永梅, 等. 盐地碱蓬根际土壤细菌群落结构及其功能[J]. *中国生态农业学报*, 2020, 28(10): 1618–1629.
- [34] 王小玲, 马琨, 伏云珍, 等. 冬小麦免耕覆盖与生物有机肥施用对土壤细菌群落的影响[J]. *生态学报*, 2020, 40(19): 7030–7043.
- [35] Li H, Ma X, Tang Y Q, et al. Integrated analysis reveals an association between the rhizosphere microbiome and root rot of arecanut palm[J]. *Pedosphere*, 2021, 31(5): 725–735.
- [36] Song Q, Song X S, Deng X, et al. Effects of plant growth promoting Rhizobacteria microbial on the growth, rhizosphere soil properties, and bacterial community of var seedlings[J]. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2021, 36(4): 249–262.
- [37] Sadaf K, Subha N D, Anirban B, et al. Population densities of indigenous Acidobacteria change in the presence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in rhizosphere[J]. *J Basic Microbiol*, 2017, 57(5): 376–385.
- [38] Anzalone A, Di G M, Bella P, et al. Bioprospecting of Beneficial Bacteria Traits Associated With Tomato Root in Greenhouse Environment Reveals That Sampling Sites Impact More Than the Root Compartment[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 1–17.
- [39] 黄文茂, 詹永发, 王欢, 等. PGPR 菌剂对辣椒的促生效应及根际土壤细菌的响应研究[J]. *中国土壤与肥料*, 2020, (5): 152–160.
- [40] Khabbaz S E, Zhang L, Cáceres L A, et al. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot disease[J]. *Annals of Applied Biology*, 2015, 166(3): 456–471.
- [41] 李世雄, 王彦龙, 王玉琴, 等. 土壤细菌群落特征对高寒草甸退化的响应[J]. *生物多样性*, 2021, 29(1): 53–64.

Effects of root rot disease at seedling stage on bacterial community structure in the rhizosphere soil of naked barley

XU Shi-yang¹, LI Xue-ping^{1,2*}, LI Min-quan², GUO Zhi-jie², QI Yong-hong², LI Jian-jun², JING Zhuo-qiong²

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: **[Objective]** The aim of this study was to investigate the effects of naked barley root rot disease on the bacterial community structure of rhizosphere soil. **[Method]** The rhizosphere soil samples of healthy naked barley at seedling stage were collected with 5%, 10%, 15% and 20% incidence of root rot, and then the 16S rDNA gene of every sample was determined by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology. Furthermore, the diversity of rhizosphere bacterial species was analyzed. **[Result]** The results illustrated that there were many dominant bacterial species in the rhizosphere soil of naked barley in the seedling stage, and the community structure was rich with high diversity and uniformity. Further more, through the analysis of the dominant bacteria at different classification levels, different rules were revealed. Firstly, at the phylum level, the occurrence of root rot increased the abundance of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, while the abundance of *Acidobacteria* and *Actinobacteria* decreased. Secondly, at the objective level, the occurrence of root rot reduced the abundance of *Micrococcales*, *Pseudomonadales* and *Propionibacteriales*, but the abundance of *Bacillales* and *Sphingomonadales* increased. Thirdly, at the level of genus, the abundance of *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* raised, whereas the abundance of *Pseudarthrobacter* dropped down. Finally, at the species level, the abundance of *Serratia plymuthica* had grown much as the incidence increased. However, there was an opposite trend on the abundance of *Bacillus Simple*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Stenotrophomonas rhizophila*. Cluster analysis showed that the occurrence of root rot caused changes in the structure of the rhizosphere soil bacterial community of naked barley, and the overall law showed that the higher the incidence, the farther the distance from the healthy samples, the greater the difference. Besides, several functional genes of naked barley rhizosphere soil bacteria were obtained by COG database annotation. **[Conclusion]** Therefore, it's obviously that the occurrence of naked barley root rot at seedling stage changed the bacterial community structure in the rhizosphere soil. This study provides theoretical basis for the prevention and control of naked barley root rot and the establishment of prediction and early warning technology.

Key words: naked barley; root rot; high-throughput sequencing; soil bacteria; community structure