

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2019 年第 9 期, 总第 79 期)

主办: 西南大学植物保护学院, 重庆烟草科学研究所

主编: 丁伟

2019 年 9 月 30 日

工作动态

根茎病害研究项目组召开 2019 年基地工作交流会

9 月 15 日, 根茎病害研究项目组成员组织召开 2019 年基地工作交流会, 对本年度各基地单元工作开展情况进行总结汇报。会议重点探讨了田间试验和示范开展过程中取得的初步成果及存在的问题, 旨在促进基础研究成果的提升、深入和转化, 明确下一阶段的研究方向和重点。本次会议由丁伟教授主持, 重庆、四川、贵州的 10 个基地单元的 12 名驻点人员进行了汇报, 研究室李石力博士后、博士研究生及硕士研究生参加了本次会议。

15 日上午, 根茎病害研究项目组成员齐聚一堂, 聚精会神地聆听驻点人员对本年度基地研究工作的汇报, 本次交流会汇报内容涉及烟草病虫害绿色防控材料筛选、技术研发、产品物化、烟草根际健康维护、烟草病虫害防控的药剂精准使用等, 重庆彭水、酉阳、巫山、石柱, 贵州遵义以及四川冕宁、会理、攀枝花、宜宾、泸州的驻点人员从研究背景、工作开展情况、田间试验成果、示范区建设成效、存在的问题以及心得体会等方面展开, 重点就土壤酸化改良、基质拌菌技术防控根际病害的效果进行总结汇报, 参会研究生与汇报人就研究内容进行了讨论, 对研究中可能存在的问题以及改进建议进行了交流。

交流会最后, 丁伟教授表示, 本次交流会旨在促进各驻点人员各自研究成果的提升和转化、探讨研究室下一步的研究方向和重点。各驻点人员要理论和实践相结合, 及时总结提升, 积极撰写基地报告, 必要时补充室内试验, 提升研究水平和深度, 尽快形成研究成果。



图1 项目组成员聆听汇报

基质拌菌技术防治榨菜根茎病害育苗工作圆满完成

以烟草基质拌菌技术防治根茎病害为依托，西南大学天然产物农药研究室开展利用育苗基质拌菌技术防治榨菜根茎病害工作，9月份已完成基质拌菌育苗工作。

9月9日上午，项目组成员刘烈花、丁光浦、李进博一行前往重庆市涪陵区百胜镇葛亮村和齐曲村，调研并确定了榨菜根茎病害的示范地以及试验地。齐曲村彭福明队长、葛亮村况敬川村长积极协助前期准备工作，并对项目的一些基本工作内容进行了协调顺利完成百胜镇项目示范区及试验地对接工作后，大家便赶往罗云榨菜育苗点开展基质拌菌工作。9月10日下午，在黄四清社长和当地菜农的协助下，大家顺利完成百胜镇10亩地的基质拌菌育苗工作。9月21日下午，项目组成员赴涪陵区百胜镇齐曲村观察田间榨菜发芽及生长情况，发现经过拌菌的榨菜苗个体长势良好，生长均匀。随后与当地菜农进行工作对接，确认物资分发情况，以确保项目的顺利实施，并在当地菜农的协助下划分出试验区及对照区。9月22日上午，在黄四清社长和当地菜农的协助下，育苗棚间苗工作也都顺利完成。

通过基质拌菌技术，能促进有益菌的早期定殖，维护植物根际健康，尤其在抵御植物病害上发挥着重要作用。基质拌菌技术在防治烟草根茎病害上已取得了良好的效果，通过研究基质拌菌对榨菜根茎病害防治的效果，将基质拌菌技术防治根茎病害上进行更大范围推广。



图2 项目组成员参与基质拌菌工作

基质中添加不同浓度微生物对烟草生长的影响

植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是指自由生活在土壤或附生于植物根际的一类可促进植物生长、防治病害、增加作物产量的有益菌类。自 1978 年首次报道植物根际促生菌后, 现已发现荧光假单胞杆菌、芽孢杆菌、根瘤菌、沙雷氏菌属等 20 多个种属的根际微生物具有防病促生的潜能, 最多的是假单胞菌属, 属其次为芽孢杆菌属、农杆菌属等。植物根际促生菌可以通过诱导植物产生生长激素、产嗜铁素提高土壤铁活性、溶磷菌提高土壤可溶性磷、增强植物对病原菌和环境胁迫的抗性和忍耐力等方式达到促进植物生长的作用。但是对植物生长来说并不是根际促生菌的数量越多效果越好, 根际促生菌与植物存在互惠互利的关系。根际促生菌发挥促进植物生长的首要条件是其能在植物根际定植能力和根际附近生存。根际促生菌依赖植物分泌的根际沉积物而活, 根际沉积物约占光合作用净碳的 11%, 占植物总氮的 10-16%。同时有研究表明: 根际微生物从植物根部消耗了多达 40% 的植物光合产物。吴亚胜研究发现在育苗基质中添加丛枝菌根真菌菌剂, 能够显著促进辣椒幼苗的生长, 提高辣椒幼苗的菌根侵染率, 且该方法省工高效, 显著提高了育苗基质的使用效果, 因此我们结合烟草漂浮育苗的特点, 在育苗基质中加入农业上常用的有益微生物(多粘类芽孢杆菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和哈茨木霉), 探究有益微生物促进烟草生长的最佳施用浓度。

试验浓度为 10^9 cfu/g 干基质、 10^8 cfu/g 干基质和 10^7 cfu/g 干基质, 在播种 10 天后, 测定烟株的发芽率。在温室培养 75 d 后, 测定株高、最大根长和茎围等生理生化指标。

由表 1 可知, 有益微生物的不同浓度对烟株发芽率无显著性影响。在有益微生物的浓度为 10^9 cfu/g 干基质和 10^8 cfu/g 干基质下(图 3 和图 4), 烟草生长与对照组无显著性差异, 但是枯草芽孢杆菌在地上和地下部分干重均优于对照组。在有益微生物的浓度为 10^7 cfu/g 干基质下(图 5 和图 6), 多粘类芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌处理的烟草株高、茎围、最大根长和地上地下部分的干重均显著优于对照组, 其中枯草芽孢杆菌对烟草生长的促进效果最好, 其处理的烟草株高、茎围、最大根长和地上地下部分的干重较对照组分别增加了 49.44%、12.94%、23.43%、47.31%和 86.96%。从叶片叶绿素含量来看(图 7): 不同浓度的有益微生物在一定程度上提高了叶片叶绿素含量, 在有益微生物的浓度为 10^7 cfu/g 干基质下, 枯草芽孢杆菌处理烟草的叶片中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量分别是对照组的 1.18 和 1.23 倍, 显著优于对照组。综上所述: 多粘类芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌以 10^7 cfu/g 干基质浓度添加到育苗基质中, 可以促进烟草根系发育和提高烟草叶片中叶绿素的含量, 提高光合作用, 显著促进烟草生长。

表 1 有益微生物不同浓度对烟株发芽率的影响

处理 (10 ⁷ cfu/g 干基质)	发芽率 (%)	处理 (10 ⁸ cfu/g 干基质)	发芽率 (%)	处理 (10 ⁹ cfu/g 干基质)	发芽率 (%)
CK	66.66±8.38 a	CK	71.10±6.18 a	CK	71.10±6.75 a
Pf	62.22±9.69 a	Pf	68.88±3.51 a	Pf	61.12±6.75 a
Bp	62.22±4.01 a	Bp	69.99±7.69 a	Bp	62.21±9.11 a
Bs	64.44±2.94 a	Bs	69.99±8.81 a	Bs	68.90±8.69 a
Ba	81.12±2.95 a	Ba	63.32±7.17 a	Ba	73.33±8.82 a
Th	73.33±5.40 a	Th	68.88±8.67 a	Th	71.10±6.75 a

注: Pf: 荧光假单胞杆菌; Bp: 多粘类芽孢杆菌; Bs: 枯草芽孢杆菌; Ba: 解淀粉芽孢杆菌; Th: 哈茨木霉; 下同

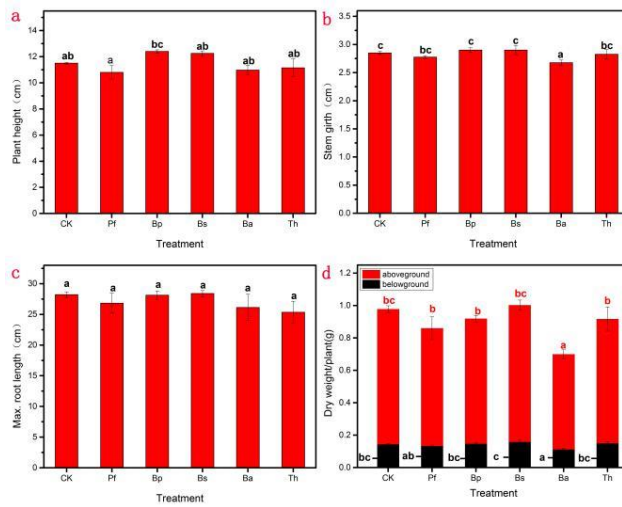


图 3 10⁹ cfu/g 干基质浓度下各处理的株高 (a)、茎围 (b)、最大根长 (c) 和地上地下部分干重 (d)

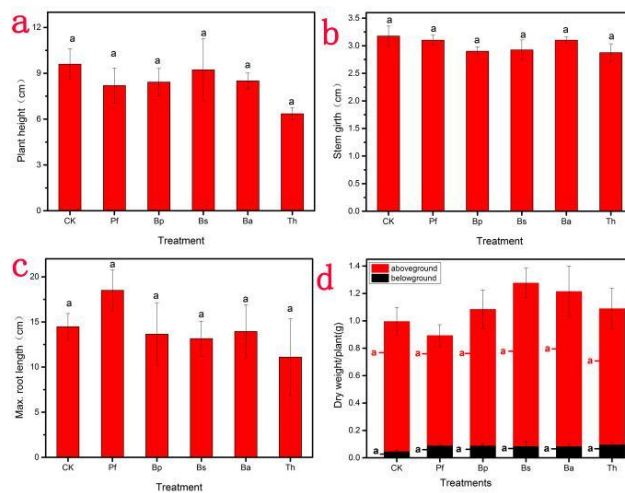


图 4 10⁸ cfu/g 干基质浓度下各处理的株高 (a)、茎围 (b)、最大根长 (c) 和地上地下部分干重 (d)

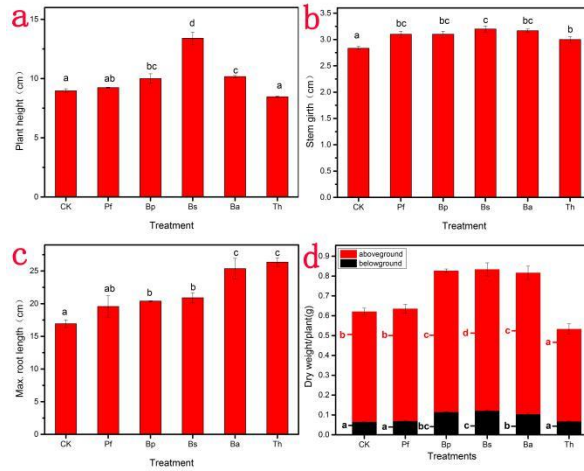


图 5 10⁷ cfu/g 干基质浓度下各处理的株高 (a)、茎围 (b)、最大根长 (c) 和地上地下部分干重 (d)



图 6 10⁷ cfu/g 干基质浓度下的烟株长势

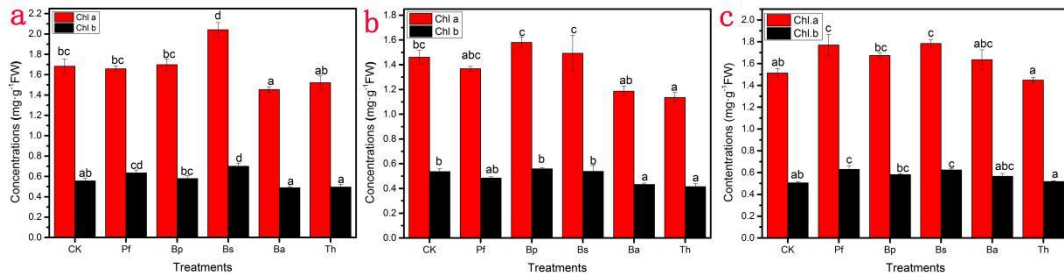


图 7 不同浓度有益微生物对烟株叶绿素的影响。a 为 10⁹cfu/g 干基质下各处理对烟株叶绿素的影响；b 为 10⁸cfu/g 干基质下各处理对烟株叶绿素的影响；c 为 10⁷cfu/g 干基质下各处理对烟株叶绿素的影响

(杨会款 供稿)

铝离子对青枯雷尔氏菌生物特性的影响

土壤酸化可造成土壤中铝离子的释放，铝离子是酸性土壤中作物产量的主要制约因素，前期研究表明，土壤酸化可加剧烟草青枯病的发生，探究铝离子对青枯菌生物特性的影响，为明确酸化影响青枯病发生提供理论支撑。研究表明，150 mg/L~250 mg/L 硫酸铝处理，对青枯菌的生长有促进作用，硫酸铝浓度大于 300 mg/L 可显著抑制青枯菌的生长（图 8）。对青枯菌的生物膜形成特性进行评价 250 mg/L 硫酸铝对青枯菌生物膜形成有促进作用，300 mg/L 硫酸铝可显著增加青枯菌生物膜的形成（图 9），且培养 72 小时内，200~250 mg/L 硫酸铝处理可显著增加青枯菌的运动性，硫酸铝浓度大于 350 mg/L 可显著抑制青枯菌的运动性（图 10）。细菌生物膜在植物与病原物互作的动态过程中发挥重要作用，且细菌的运动性

是影响其根际定殖的关键因素之一，研究表明，250 mg/L 硫酸铝对青枯菌的生长、生物膜形成以及运动性均有促进作用，说明铝离子在酸化土壤青枯病的发生过程中起着重要的作用。

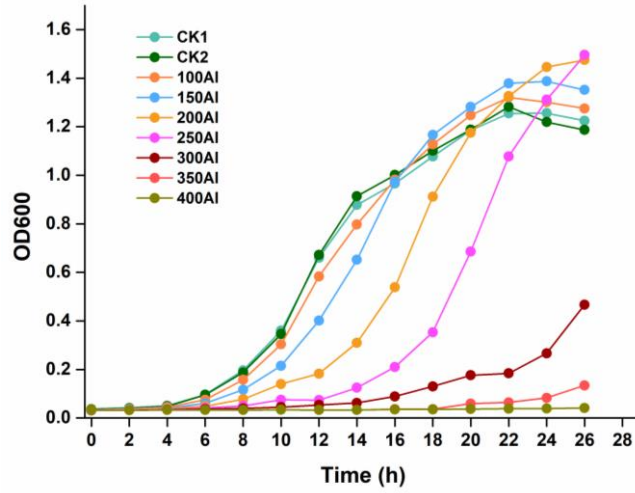


图 8 铝离子对青枯菌生长的影响

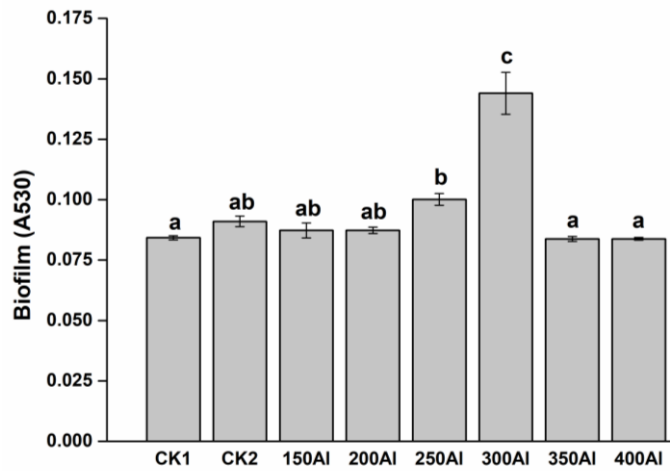


图 9 铝离子对青枯菌生物膜的影响

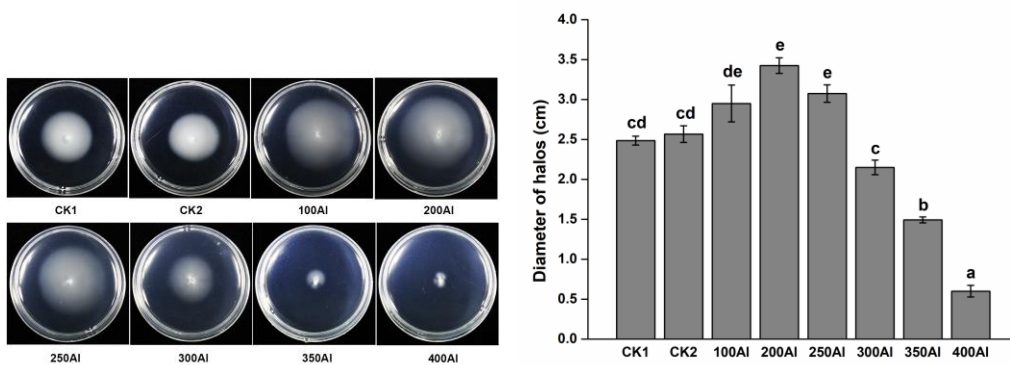


图 10 铝离子对青枯菌运动性的影响

(张淑婷 供稿)

植物内生细菌的多样性以及功能

内生菌(Endophyte)的概念首次提出是德国科学家 De Bary 在 1866 年为区分生活在表面的细菌而提出的,植物内生菌是指通过植物根系的皮层、伤口或缝隙以及气孔进入植物体内定植,在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的真菌或细菌,被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在症状^[1]。可以把植物内生菌理解为植物组织内的正常菌群,是植物微生态系统中的天然组成成分,它们不仅包括了互惠共利的和中性的内共生微生物,也包括了那些潜伏在宿主体内的病原微生物。

与植物相互作用的微生物包括原核生物和真核生物类群,可以在宿主的表面或内部定植。内生细菌可以在表面上健康的植物宿主组织中检测到,且这些细菌没有外部感染的迹象,也没有对宿主产生负面影响,在地球上现存的近 30 万种植物中,每一种植物都有一种或多种内生细菌^[2]。内生细菌具有与植物病原菌相似的生态位,适合作为生物防治制剂。

1 植物内生细菌的多样性

内生细菌在多种植物中均被检测到,表明几乎所有高等植物中都存在内生细菌^[3],这些内生细菌的群落结构取决于影响细菌存活的土壤生物和非生物因素,允许定殖的宿主因子和影响内生菌在植物宿主中存活和竞争能力的微生物决定因素^[4]。微生物可通过多种途径进入植物体内,例如土壤、降水或灌溉水、大气尘埃或风的沉降作用、携带微生物的动物、种子、不同地域的植物迁移以及植物残体等^[5-7]。此外,种子内生菌在植物繁殖过程中可以一代一代地垂直传代^[8]。

新一代测序技术等研究植物内生菌群落组成的新工具的应用让我们对植物内生菌的群落组成有了更加深入的了解。Hardoim et al.构建并分析了目前所有属于内生细菌的 16S rDNA 序列数据库,包括可培养和不可培养的微生物,研究结果表明,虽然这些序列属于 23 个不同的细菌门,但是其中变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)占了内生原核细菌序列的 96%,而且变形菌门的序列数据占了 50%以上,从 γ -变形菌亚纲分离出来的细菌是最常见的内生菌,包括假单胞菌属(*Pseudomonas*),肠杆菌属(*Enterobacter*),泛菌属(*Pantoea*),寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*),不动杆菌属(*Acinetobacter*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)。另一方面,链霉菌属(*Streptomyces*),微细菌属(*Microbacterium*),分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、属于放线菌门的节杆菌属(*Arthrobacter*)及芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和属于厚壁菌门的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)在内生微生物中也占有主要作用^[9]。由于所有这些属的物种在土壤中都很常见,因此,内生细菌可以看成是根际细菌的一个亚种群^[10]。

3 植物内生菌的功能

3.1 植物内生细菌可作为生物防治剂

植物内生细菌可以系统地分布于植物组织内, 并有足够的碳源和氮源, 而且受到植物组织的保护, 比暴露于恶劣环境(强烈的日光、紫外线、暴风雨等)的附生细菌更具有稳定的生存环境, 更易于发挥作用。

3.1.1 作为外源基因的载体

因内生菌具有在植物体内定殖、繁殖、转移的特点, 将某些抗病虫基因导入到内生菌中, 能提高植物的抗病虫能力, 而植物本身的基因并未发生改变, 这样可以保持植物的天然性状。Kostaka 发现从百慕大草(*Cynodon dactylon*)中分离的木质棍状杆菌犬齿亚种(*Clavbacter xyli* subsp. *.cynodontis*)接种到某些植物上后可以很快转移到整个植物体中, 利用这一特点将苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的伴胞晶体编码基因转移到这种内生细菌中, 实现了对欧洲玉米螟(*Qstrinia .nubilalis*)的生物防治^[11]。将苏云金杆菌基因转入蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)内, 实现了对两种鳞翅目昆虫的防治^[12]。

3.1.2 提升植物抗性

根际微生物包括在根内定殖的微生物能诱导植物产生一种抗性, 这种抗性不同于传统的系统获得性抗性(Systemic Acquired Resistance, SAR), 命名为诱导系统抗性(Induced Systemic Resistance, ISR), ISR 表型与病菌诱导的 SAR 相似, 都能诱导植物产生对病菌的广谱抗性, 但 ISR 中所包含的抗性机制没有病程相关蛋白(PR)的产生; 目前对 ISR 的抗性机制知道得不如 SAR 的抗性机制清楚, 一般认为 ISR 的抗性与植保素水平的提高和酚类物质积累有关^[13,14]。内生细菌诱导 ISR 的成分有鞭毛、脂多糖、铁蛋白、抗生素和群体感应分子^[15], 各种基因诱导系统反应(ISR)调控的发展, 有助于增强宿主的细胞壁强度, 改变宿主的生理或代谢反应, 增强植物防御的形成, 以及促进与病原相关的蛋白酶的合成等^[16]。同时内生菌能诱导植物产生一些结构方面的抗性, Benhamou 等^[17]用内生菌 *Bacillus pumilus* strain SE34 预接种基因转化豌豆, 然后接种病菌, 如果病菌的生长限制在木栓层和外皮层内, 在病菌企图侵入部位, 通过木质和酚类物质的大量沉积, 这些细胞的胞壁得到加厚, 有效阻止了病菌的侵入。

3.1.3 产生抗生素类物质

抗生素是一类异源小分子化合物, 在低浓度下可以对微生物的生长或代谢产生影响。在植物病害的生物防治中, 根部定殖的微生物产生的抗生素起着重要的作用, 这可以用抗生素产生突变体获得证明。内生菌产生的抗生素类物质存在植物体内, 在植物体内转运, 利于发挥防病作用。根际内生菌产生的抗生素物质包括 2,4-二乙酰藤黄酚(PHL)、吩嗪羧酸(PCA)、

藤黄绿脓菌素(pyoluterin, PLT)、硝吡咯菌素(pyrrolnitrin, PRN)、脓青素(PYO)、HCN 和一类丁酰内酯(butyrolactones)^[18]。根际内生菌 *Pseudomonas* spp. 产生的一类鼠李糖脂生物表面活性剂(rhamnolipid biosurfactants)物质, 破坏腐霉菌(Pythium)卵孢子的原生质膜, 引起卵孢子细胞壁的水解破裂^[19]。Lugtenberg 和 Kamilova 研究发现内生假单胞菌 (*Pseudomonas*) 可以产生 HCN、PLT、PHL、2,4-二乙酰间苯三酚和吩嗪类等杀菌物质^[20]。

3.2 植物内生细菌的促生作用

植物内生细菌可从以下几方面促进植物生长: ①改善营养形态促进吸收; ②增强对冷、热、干旱等胁迫的耐受性; ③产生或(协同)调节植物激素; ④通过拮抗、竞争、诱导或启动植物的系统抗性来增强植物的抗病性^[21]。研究表明, 固氮 *Klebsiella pneumonia* strain 342 与小麦存在互利共生的关系, 与未接种的对照或接种了敲除 *nifH* 的 *K. pneumonia* 342 突变菌株的小麦相比, 其根部和根上部的总氮含量提高了 300%以上^[22]。假单胞菌属、肠杆菌属、葡萄球菌属、固氮菌属以及固氮螺菌属等内生细菌的一些菌株也可产生植物生长调节物质如乙烯、生长素、细胞激动素, 对宿主植物的生长起促进作用^[23]。

参考文献

- [1] J. Hallmann, Quadthallmann A., Mahaffee W. F., et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43(10): 895-914.
- [2] Strobel G, U Daisy B, Castillo J, Harper J. Natural products from endophytic microorganisms [Review] [J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(2): 257.
- [3] Luo Shenglian, Taoying Xu, Liang Chen, et al. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18 [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2012, 93(4): 1745-1753.
- [4] Gaiero Jonathan R, Crystal A McCall, Karen A Thompson, et al. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion [J]. *American Journal of Botany*, 2013, 100(9): 1738-1750.
- [5] Villate Laure, Elisa Morin, Gérard Demangeat, et al. Control of *Xiphinema* index populations by fallow plants under greenhouse and field conditions [J]. *Phytopathology*, 2012, 102(6): 627-634.
- [6] Sascha Truyens, Weyens Nele, Cuypers Ann, et al. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(1): 40-50.
- [7] Johann Leplat. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2013, 33(1): 97-111.

- [8] Yvan Moënne-Loccoz, Mavingui Patrick, Combes Claude, et al. Microorganisms and Biotic Interactions [M]. 2015.
- [9] Pablo R Hardoim, Overbeek Leonard S, Van, Gabriele Berg, et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes [J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* Mmbr, 2015, 79(3): 293.
- [10] Gustavo Santoyo, Moreno-Hagelsieb Gabriel, Orozco-Mosqueda Ma. Del Carmen, et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes [J]. *Microbiological Research*, 2016, 183(5): 92-99.
- [11] ANDREWSJ.H. Biological control in the phyllosphere [J]. 1992:
- [12] A Navon, Katan J, Aharonson N, et al. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects [J]. *Crop Protection*, 2000, 19(8): 669-676.
- [13] Loon Lc Vanbakker Pahm, Cmj Pieterse, van Loon L. C., et al. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36(1): 453.
- [14] S. C. Van Wees, Pieterse C. M., Trijssenaar A, et al. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria [J]. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 1997, 10(6): 716.
- [15] L. C. Van Loon. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 119(3): 243-254.
- [16] Niu DD, HX Liu, CH Jiang, et al. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011, 24(5): 533-542.
- [17] N Benhamou, Kloepper J. W., Quadt-Hallman A, et al. Induction of Defense-Related Ultrastructural Modifications in Pea Root Tissues Inoculated with Endophytic Bacteria [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 919-929.
- [18] H. Buchenauer. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria / Biologische Bekämpfung von bodenbürtigen Krankheiten durch Rhizobakterien [J]. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, 1998, 105(4): 329-348.
- [19] Malcolm Muir. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production [J]. *Plant Pathology*, 2010, 44(1): 40-50.
- [20] B. Lugtenberg, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 2009(1): 541-556.
- [21] Stéphane Compant, Clément Christophe, Sessitsch Angela. Plant growth-promoting

bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42(5): 669-678.

[22] A. L. Iniguez, Dong Y., Triplett E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342 [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17(10): 1078-1085.

[23] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展 [J]. *生态学报*, 2006, 26(7): 2395-2401.

(张淑婷 供稿)