

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2018 年第 2 期, 总第 60 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

2018 年 2 月 27 日

研究进展

不同连作年限烟草不发病土壤微生物结构特征

通过 16S 高通量测序技术对不同连作年限的巫山健康土壤样品进行细菌群落描述, 测序结果 3 月, 7 月和 9 月共有 7348 个 OTU, 在进行质控和最小读数抽平后, 筛选出 4788 个高质量的 OTU 进行后续分析。

由图 1 可知, 变形菌门 (Proteobacteria) 在不同连作年限的巫山烟草培育过程中一直是相对丰度最高的, 在 7 月与 9 月的根际土壤中, 变形菌门的相对丰度差异很小, 但第一年种植烟草土壤的变形菌门在 3 月比 7 月少了 13.95%。放线菌门 (Actinobacteria) 的相对丰度排列第二位, 且表现出在 3 月烟草移栽前期的块土中多于在后期的根际土中。此外, 厚壁菌门 (Firmicutes) 的相对丰度在连作了 10-15 年土壤培育烟草 7 月份时, 有一个大幅度的上升, 但这种相对丰度在 9 月份却未见持续。

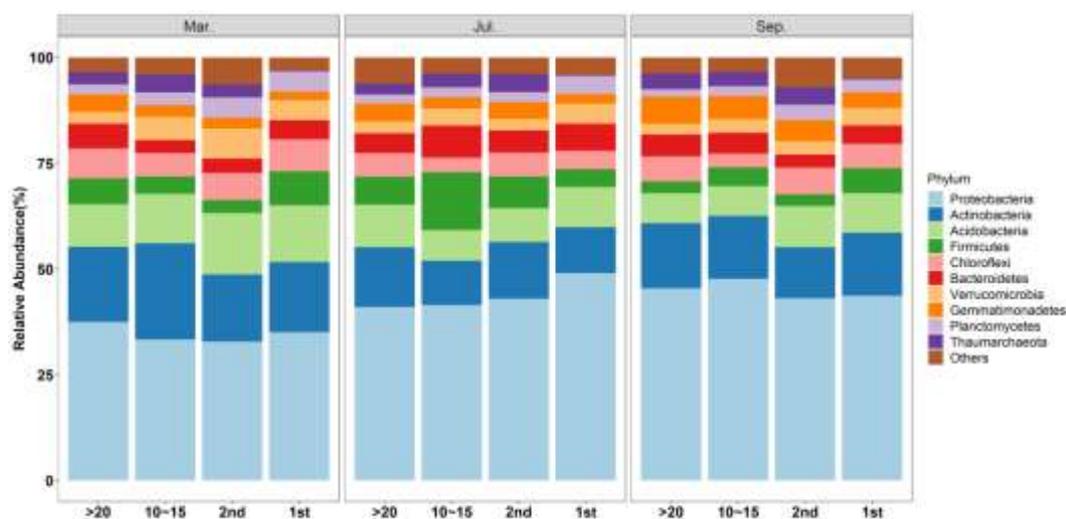
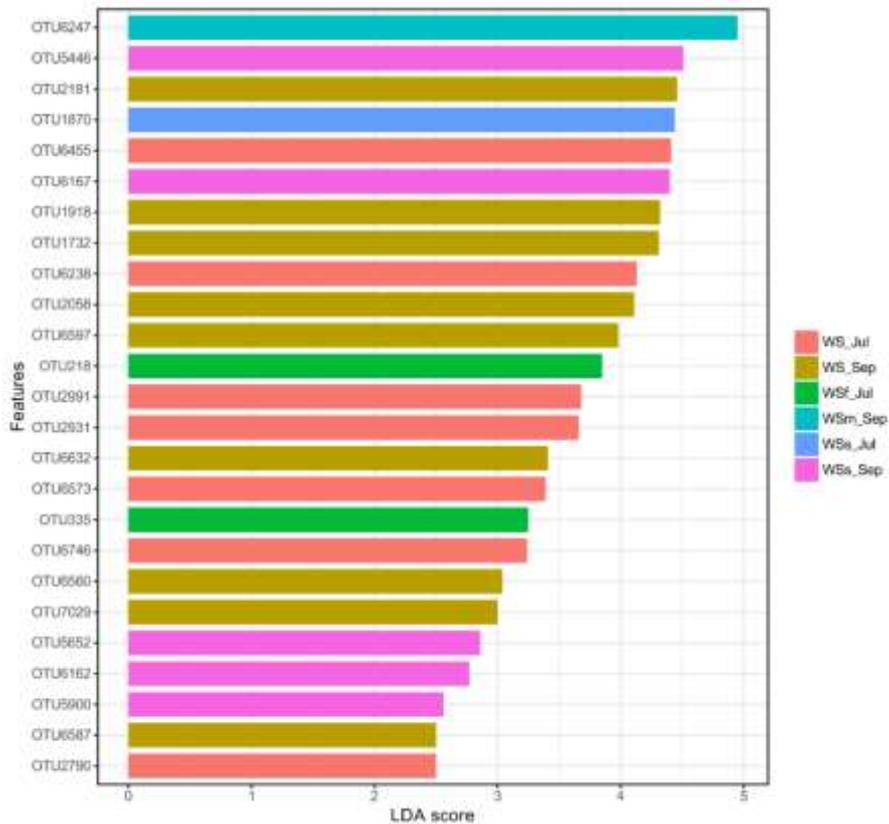


图 1 烟草采样地土壤细菌门分类水平上的相对丰度

Figure 1 The relative abundance of bacterial composition at phylum level in the different sampling sites

对各时间点采集的土壤样本 OTU 进行 LEfSe 分析，通过设定 LDA 对数值为 2.0，调整后的 p 值为 0.05，筛选出各组间特异的指示微生物 (biomarker) 共 500 个 OTUs。

在 LDA 分数排列前 25 的 OTU 分类信息中，共有 4 个 OTU 被鉴定到芽单胞菌科 (Gemmatimonadaceae)，3 个 OTU 被鉴定到鞘脂杆菌科 (Sphingobacteriaceae)。在巫山连作 10-15 年土壤 9 月份采集地样品中，OTU6247 为细菌指示菌，其分类水平达芽单胞菌科，LDA 分数最高，为 4.95，在巫山连作 10-15 年细菌群落的平均相对丰度为 1.85%。在巫山连作 20 年以上的土壤 7 月份样品中，LDA 分数排列前 25 的共有 7 个 OTU，其中有 3 个 OTU 均来自 Parcubacteria 门，LDA 分数最高的为分类水平到科的丝状菌 (Chitinophagaceae)，LDA 分数为 4.41，在连作 20 年以上的整体细菌群落中占 0.51%；在 9 月份，LDA 分数排列前 25 的共有 9 个 OTU，其中有 3 个来自变形菌门，有 3 个来自拟杆菌门 (Bacteroidetes)，2 个来自芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)，1 个来自绿湾菌门 (Chloroflexi)，OTU2181 的 LDA 分数最高为 4.46，占整体细菌群落的 0.57%，而 OTU6597 和 OTU6560 被鉴定到属的水平，分别为芽单胞菌科的 bacterium WWH24 和鞘脂杆菌科的 *Sphingobacterium* sp. 21。在巫山第二年栽种烟草的土壤中 7 月份采集的样品，OTU1870 (*Sphingobium chungbukense*) 为指示菌，而 9 月份 LDA 排列前 25 的共有 5 个 OTU，分别为 OTU5446 (*Nitrospira japonica*)、OTU6167 (*Haliangium*)、OTU5652 (uncultured *Litorilinea* sp.)、OTU6162 (*Sandaracinus*)、OTU5900 (Candidatus *Berkelbacteria*)。在巫山第一年开垦土壤 7 月采集的样品中，LDA 排列前 25 的共有 2 个 OTU，分别为 OTU218 (Zoogloea *resiniphila*) 和 OTU335 (*Flavobacterium*)。



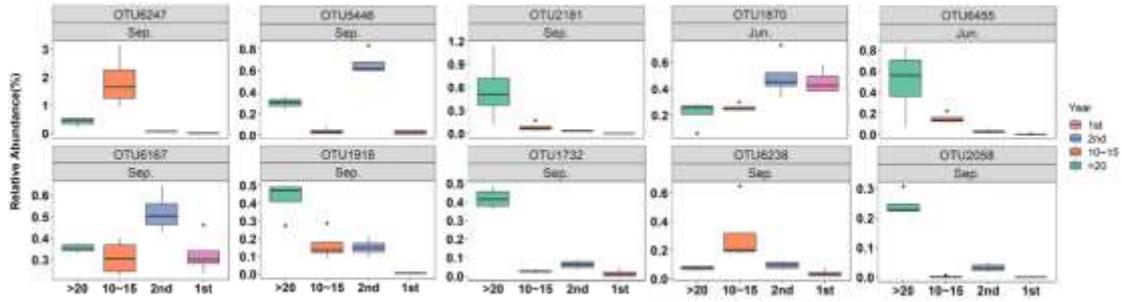


图 2 LefSe 分析中 LDA 分数前 10 的 OTUs 在各采样点的相对丰度分布情况

Figure 2 The relative abundance of top 10 significant OTUs in LefSe analysis of bacterial biomarkers in the different sampling sites

(刘晓姣 供稿)

羟基香豆素类化合物对烟草青枯病的防控效果研究

植物次生代谢产物在植物防病过程中发挥重要作用，其中香豆素类化合物作为一类重要的植物次生代谢产物，已经证实对医学病原菌如金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌等抑菌效果明显，同时也报道对植物病原菌如辣椒疫霉病菌、白粉病菌、番茄灰霉病菌有效。西南大学植物青枯病研究团队系统评价了羟基香豆素类化合物（Hydroxycoumarins, Hycs）对青枯雷尔氏菌的抑菌活性和烟草青枯病的防控效果。在固体培养基上，Hycs 能够显著抑制青枯菌的生长，其中伞形花内酯（UM）、秦皮乙素（ES）和瑞香素（DA）对青枯菌的最小抑菌浓度分别为 325 mg/L、125 mg/L 和 75 mg/L（图 1）。通过室内盆栽试验，我们发现提前 24h 使用 100 mg/L Hycs 对烟草青枯病具有较好的防控效果，其中瑞香素的相对防效最佳，在接菌后 6d, 8d, 10d, 12d, 14d 和 16d 的相对防效分别达到 80.03%、69.83%、59.19%、45.49%、44.12%和 38.27%，显著由于对照药剂噻菌铜（图 2）。同时，我们进行了接菌后 24h 药剂灌根处理，发现 Hycs 对烟草青枯病的相对防效低于提前药剂处理。随后，我们还测定了根部和茎部含菌量变化，发现 Hycs 能够显著降低青枯病在烟草根部和茎基部的定殖 ($P < 0.05$)（图 3）。综上所述，我们发现了一类用于防治烟草青枯病的新型化合物，并通过室内研究证实了 Hycs 对青枯雷尔氏菌具有抑菌活性，同时能够降低青枯菌在烟草根部和茎基部的定殖，主要通过提前在烟草根部聚集，起到保护烟草根部免受青枯菌的侵染，继而起到一定的防控效果（图 4）。

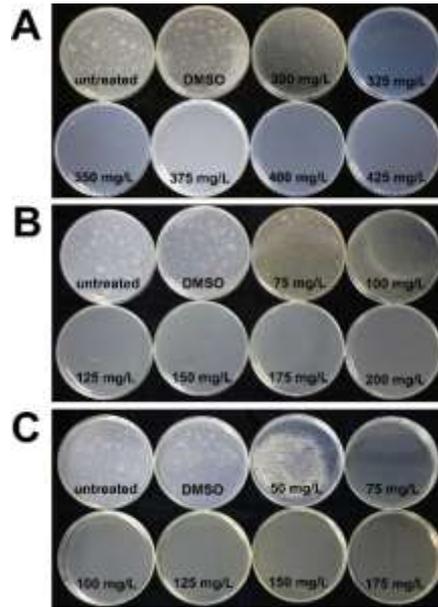


图 1 Hycs 对青枯菌的抑菌效果

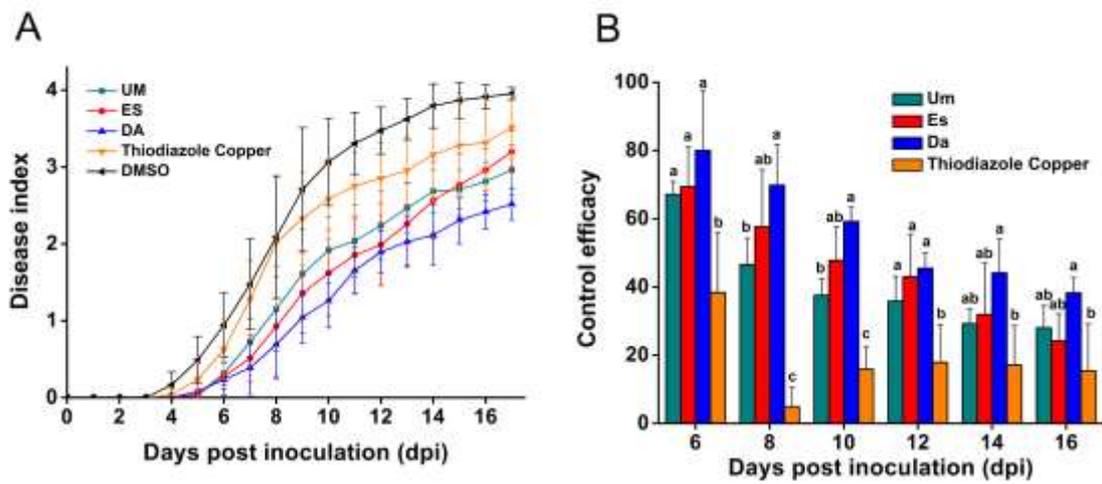


图 2 Hycs 对烟草青枯病病情指数和相对防效的影响

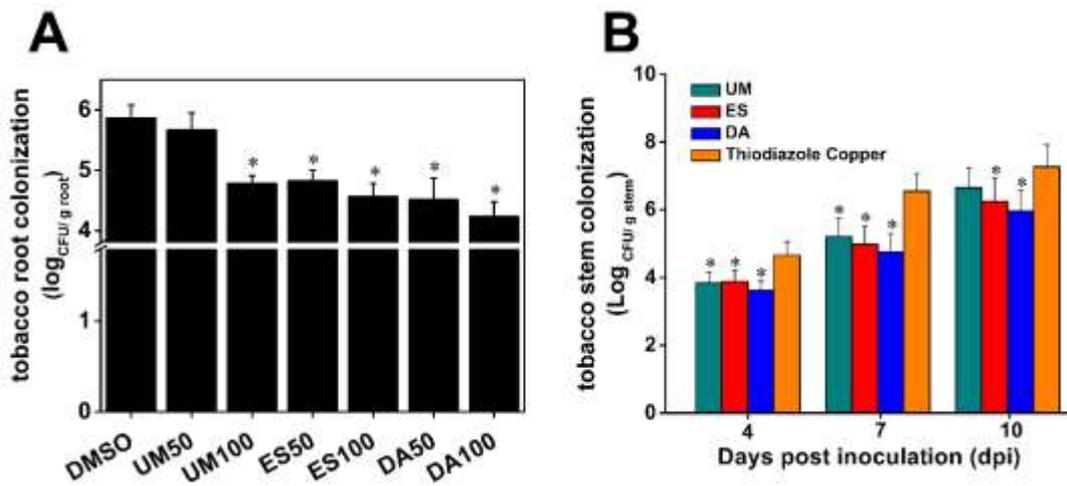


图 3 Hycs 对烟草青枯病侵染力的影响

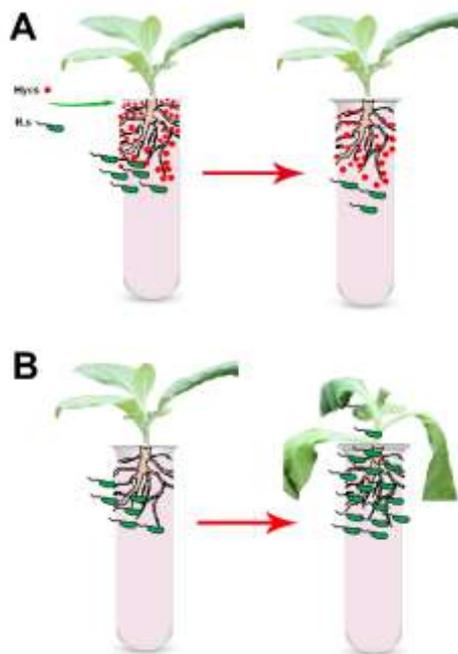


图 4 Hyys 在防控烟草青枯病过程中发挥保护性作用

(杨亮 供稿)

烟草根腐病病原镰刀菌拮抗微生物的筛选及防治效果研究

镰刀菌是子囊菌门肉座菌目镰刀菌属真菌的统称，可侵染至少 300 余种植物。近年来，由镰刀菌引起的烟草根腐病在河南、山东、福建、重庆等烟区危害逐渐加重，已经由次要病害上升为主要病害。镰刀菌种类繁多、种内生理分化非常明显，且引起烟草根腐病的病原菌种类较多，不同地区、不同时期分离的镰刀菌种类也不同，这就给该病的研究与防治造成较大困难。

西南大学烟草植保研究团队从河南烟田根腐病病株中分离出一株镰刀菌，经科赫氏法则验证以及 ITS 扩增比对后鉴定为茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*)。采用多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*, DN)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*, JDF)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, KC)、荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*, YG-1/YG-2) 以及哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*, SN-2) 对分离出的茄病镰刀菌进行平板拮抗试验，72 小时后测量茄病镰刀菌菌落直径，并计算相对抑制率。结果表明，平板拮抗以哈茨木霉菌表现最好，72 小时抑制率达 89.47%，其次是多粘类芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌，分别为 48.78% 和 43.75%，解淀粉芽孢杆菌抑制效果较差，为 12.82%，而两株荧光假单胞杆菌相对抑制率为 0，没有抑制效果。

培养茄病镰刀菌和各生防菌的孢子悬液，用无菌水将镰刀菌孢子稀释至 10^6 cfu/ml，将生防菌悬液稀释至 10^8 cfu/ml，进行室内盆栽试验。接种病原菌后每两天调查发病情况，并计算发病率、病情指数和相对防效。结果表明，施用多粘类芽孢杆菌的处理发病最轻，接

种第 8 天的发病率为 55.56%，病情指数为 1.33，相对防效 58.33%；其次是哈茨木霉菌处理，接种第 8 天的发病率为 61.11%，病情指数为 2.33，相对防效为 16.67%。

整体而言，哈茨木霉对病原镰刀菌的拮抗效果最好，但室内盆栽则以多粘类芽孢杆菌最为突出，哈茨木霉对病原菌的防控可能是抢先占据定殖位点，而多粘类芽孢杆菌则是以分泌次生代谢物质来抑制病原菌生长。

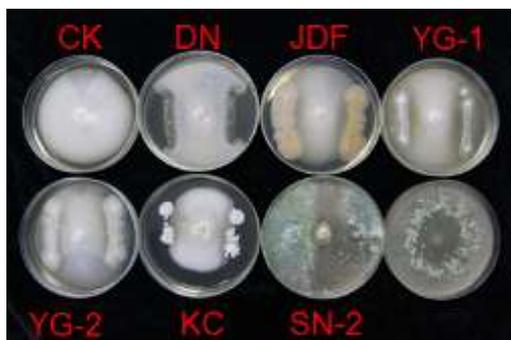


图 1 72h 平板拮抗效果

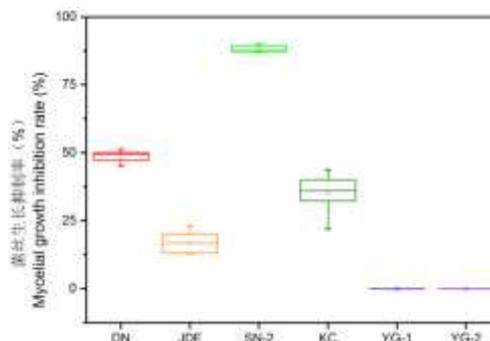


图 2 72h 菌丝生长抑制率



图 3 接种第 8 天发病情况

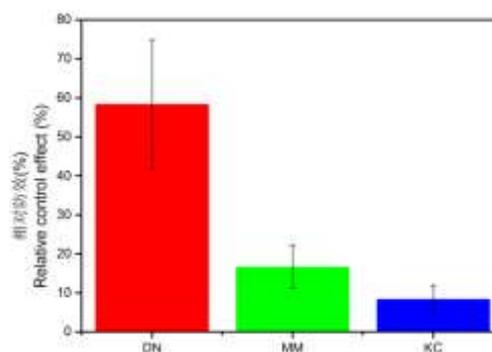


图 4 接种后第 8 天相对防效

(姚晓远 供稿)

知识窗

借助 III 型分泌系统 (T3SS) 抑制剂来控制植物青枯病

寻找预防和控制细菌性疾病的化合物是作物生产的基础。传统的化学药剂防治附带了巨大的负面效应，这也引发了当前作物生产上防控病害的技术改革。细菌毒力抑制剂，因其具有对环境友好且细菌不易产生抗性等特点，是传统抗菌药剂最具潜力的替代品。在大多数动植物细菌病原体中，其主要毒力决定因素是 III 型分泌系统 (T3SS)。筛选安全有效的 T3SS 抑制剂是目前研究热点。在最新的研究报道中^[1]，研究者们利用青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的发光报告菌株来筛选有效的植物源化合物等。研究结果表明，由于发光报

告基因的高灵敏度,利用发光报告菌株能非常有效的筛选出相应的抑制剂。同时,实验发现,3种水杨醛酰基酰肼(salicylidene acylhydrazide)衍生物引起的抑制作用导致病原菌分泌能力显著降低,并且可以限制病原青枯菌在植物中的增殖,此外,这些物质还可以保护番茄植株免受丁香假单胞菌番茄变种引起的细菌斑点病的侵害。而在利用 T3SS 抑制剂进行有效防控时,提前处理植物可保护植物免受病原体侵害。

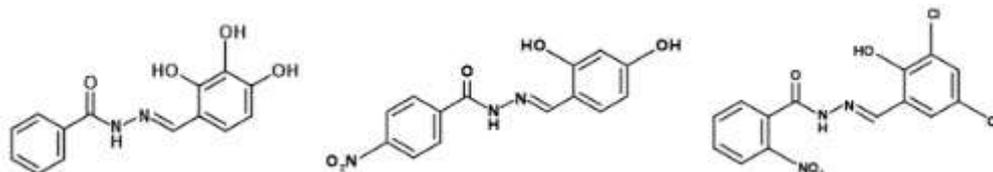


图 1 3 种水杨醛酰基酰肼 (salicylidene acylhydrazide) 衍生物的分子式

参考文献:

[1] Puigvert M, Solé M, López-García B, et al. Type III secretion inhibitors for management of bacterial plant diseases[J]. Molecular plant pathology, 2018.

(刘颖 供稿)

作物生长和健康与土壤微生物互作的关系

土壤是陆地生态环境中最活跃的生境,而这种活性大小取决于土壤中繁复的生物与非生物因子之间的互作^[1]。在众多互作之中,土壤微生物之间或与作物之间的互作尤为突出,这将直接或间接地影响作物的生长与健康。

1. 作物生长和健康与根际土壤微生物互作的关系

根际是指受植物根分泌物影响的紧靠根部的狭小的土壤区域,作物根际庞大而复杂的微生物群落被称作作物的第二基因组,主要包括细菌、真菌、卵菌、线虫、原生动、藻类、病毒、古生菌、节肢动物等^[1]。在争夺作物释放的营养物质的食物网中,根际微生物组占有绝对的数量优势。有科学家推测,作物是通过其根际的营养沉积物(如根系分泌物、根冠边缘细胞等)有选择性地构建一个能促进作物生长和健康的根际微生物组^[2]。但也有研究者提出异议,认为这些营养物质的释放是作物自然地溢出,或者说是作物的废弃物,并非故意而为^[3]。虽然针对根际微生物的形成与作物之间的关系是“crying for help”(作物主动筛选根际微生物组成)还是“just crying”(作物无意识地形成根际微生物),科学家们的意见仍未达成一致,但是随着根际微生物组学的深入研究,根际微生物的互作能直接或间接地影响作物生长和病害防控的概念被广泛科学家认可(见图 1)^[2]。

植物生长促进的根际微生物(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)能显著影响作物的营养状态,其中最著名的例子应是根际固氮菌和调节磷吸收的菌根真菌。近年来,除了

根瘤菌以外，在根际有大量的固氮细菌被鉴定出来。Guimarães 通过温室试验和 16S 测序技术鉴定出，在豇豆根际有慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium*)、伯克氏菌 (*Burkholderia*)、无色杆菌 (*Achromobacter*) 能使豇豆结瘤，从而能有效地形成生物固氮，促进豇豆的生长^[4]。菌根真菌与植物作为共生体也能通过转化土壤中的营养和矿物质供作物生长，改善土壤物理结构使土壤产生稳定的土壤团聚体，抑制土壤中的病原微生物使作物健康^[5]。

作物根际微生物的数量、活性与作物病害的发生密切相关。根际微生物组的部分微生物具有拮抗土壤病原菌的功能，而这种功能主要发生在病原入侵前或感染初期，以及在根部组织间的二次传播时期^[1]。在有敏感寄主存在的条件下，土壤带菌量和青枯病的发生为简单的正相关，即含菌量大的土壤一般青枯病发生严重^[6]。Toyota Koki 等^[7]发现当青枯雷尔氏菌和其他细菌同时加入无菌土时，土壤能更好的抑制青枯雷尔氏菌的生长。有研究表明，根际微生物的活动影响番茄青枯雷尔氏菌的侵染，氨化细菌的数量与番茄青枯病抗性呈正相关；随着不同季节温度和其他气候条件的变化，其根际土壤微生物种群数量和结构也随着变化，根际细菌中氨化细菌、硝化细菌、好气纤维素分解细菌、固氮细菌和反硫化细菌等数量均表现为夏季高于冬季，而厌氧纤维素分解细菌和硫化细菌的数量则表现为冬季高于夏季^[8]。

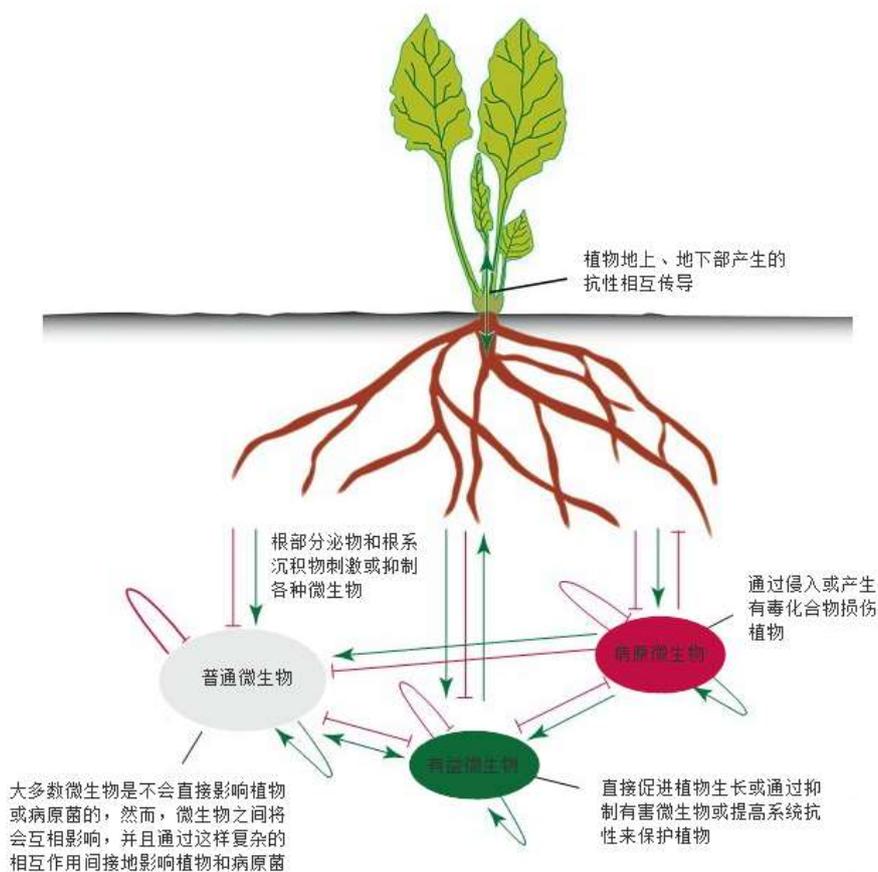


图 1 作物根际土壤微生物的相互作用 (仿 Berendsen ^[2])

2. 作物生长和健康与根部微生物群落的关系

根部微生物包含了生活在根内部 (Endosphere) 和根表面 (Rhizoplane) 的微生物 (见

图 2)。根部微生物的形成主要有两个因素：一个是根际土壤微生物，而根际土壤微生物是土壤微生物主要受根部沉积物的影响而聚集在植物根部的，因而根际土壤微生物可以被看作是土壤微生物的子集，而根部微生物可以被看作是根际微生物的子集^[9,10]；另一个因素是寄主植物，不同的寄主植物会根据其具有的基因型对根部微生物进行进一步筛选，而通常这种筛选即可发生在利用不同根际分泌物召集土壤中的微生物，也可发生在根际微生物通过根表的细胞进入根内^[3,11]。此外，通过种子发芽生根的过程，一小部分的根内微生物的可能获得其母代植株的微生物，但是 Geisen 通过大规模的种子与成苗试验发现，在作物生长后期，根内菌与种子微生物基本没有相同的^[12]。

在根部生境活动的微生物对作物的生长和健康状态也有着强烈的影响作用^[13, 14]。根内菌既有作为有益菌促进作物生长的，也有作为致病菌导致作物死亡的，或者两者兼具的。细菌性内生菌因其具有与病原菌繁殖相似的生态位点而被开发为抑制病害发生的生防菌剂^[15]。但是，有研究发现轮状镰刀菌（*Fusarium verticillioides*）在玉米根部即可表现为病原菌又可表现为有益菌^[16]。

根内菌可以诱导作物产生系统抗性从而对病原菌产生更高的耐受性，这种抗性被称为诱导系统抗性（induced systemic resistance, ISR）。有研究表明，在作物与有益菌互作的初始阶段，有益菌会触发作物产生免疫反应，而这样的免疫反应与作物在对抗病原菌时所需要产生的免疫反应是相似的，随后有益菌通过作物识别后能够躲避寄主的免疫效应，进而在作物根部成功定殖，而随之增强的作物免疫系统在作物对抗病原菌入侵时，便能起到提前预防的作用^[17]。而假单胞菌属（*Pseudomonas*）和芽孢杆菌属（*Bacillus*）通常被认为是诱导作物产生系统抗性的指示性微生物，但值得指出的是并不是这两个属的所有微生物均能诱导作物产生系统抗性^[18]。

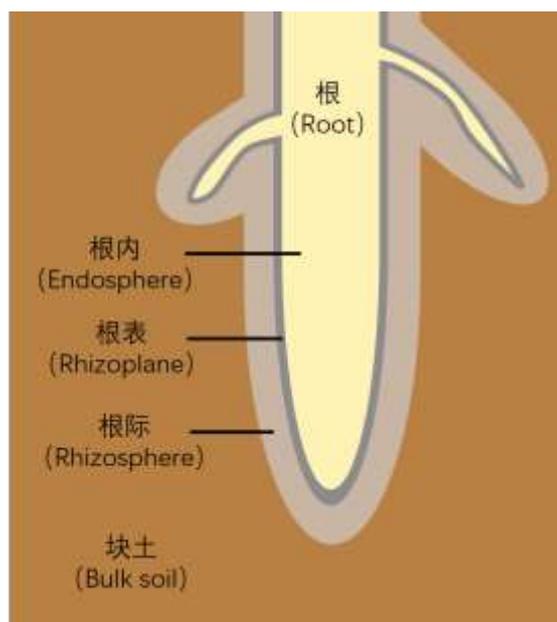


图 2 作物根部与土壤不同区域示例

参考文献:

- [1] Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers J M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms [J]. *Fems Microbiol Rev*, 2013, 37(5): 634-663.
- [2] Berendsen R L, Pieterse C M, Bakker P A. The rhizosphere microbiome and plant health [J]. *Trends in plant science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [3] Hartmann A, Schmid M, Van Tuinen D, Berg G. Plant-driven selection of microbes [J]. *Plant and Soil*, 2009, 321(1-2): 235-257.
- [4] Azarias G A, Duque Jaramillo P M, Simão A N R, Florentino L A, Barroso S K, Fm D S M. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6726.
- [5] Johnson N C. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning [J]. *Plant & Soil*, 2013, 363(1-2): 411-419.
- [6] Sugden A M. ECOLOGY: Diversity & Ecosystem Resilience [J]. *Science*, 2000, 290(5490):
- [7] Toyota K, Kimura M. Growth of the bacterial wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum* introduced into soil colonized by individual soil bacteria [J]. *Soil Biol Biochem*, 1996, 28(28): 1489-1494.
- [8] 冯杭, 谭秀明, 李艳嫦, 曾冬根, 刘琼光. 青枯病抗性不同的番茄土壤细菌生理群的数量变化 [J]. *华南农业大学学报*, 2010, 31(1): 30-33.
- [9] de Ridder-Duine A S, Kowalchuk G A, Klein Gunnewiek P J A, Smant W, van Veen J A, de Boer W. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(2): 349-357.
- [10] Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere [J]. *Fems Microbiol Ecol*, 2009, 68(1): 1-13.
- [11] van der Heijden M G, Schlaeppi K. Root surface as a frontier for plant microbiome research [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(8): 2299-2300.
- [12] Geisen S, Kostenko O, Cnossen M C, Ten Hooven F C, Vres B, van der Putten W H. Seed and Root Endophytic Fungi in a Range Expanding and a Related Plant Species [J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8(1645).
- [13] Kristin A, Miranda H. The root microbiota—a fingerprint in the soil? [J]. *Plant and Soil*, 2013, 370(1-2): 671-686.
- [14] Reinhold-Hurek B, Bunger W, Burbano C S, Sabale M, Hurek T. Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2015, 53(403-424).
- [15] Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization [J]. *Soil Biol Biochem*, 2010, 42(5): 669-678.
- [16] Bacon C W, Glenn A E, Yates I E. *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation [J]. *Toxin Rev*, 2008, 27(3-4): 411-446.
- [17] Zamioudis C, Pieterse C M. Modulation of host immunity by beneficial microbes [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25(2): 139-150.
- [18] Chanway C P. Bacterial endophytes: Ecological and practical implications [J]. *Sydowia -Horn-*, 1998, 50(2): 149-170.

(刘晓姣 供稿)