

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2018 年第 9 期, 总第 67 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 9 月 27 日

研究进展

烟草根腐病土壤微生物群落组成分析

土壤微生物之间的相互作用在抑制土传病害中发挥着重要作用, 但对烟草根腐病发生相关的微生物知之甚少。于烟草发病初期采集不同连作年限下镰刀菌根腐病发病与无病根际土, 运用高通量测序技术, 对不同连作年限下镰刀菌根腐病发病与无病根际土壤微生物进行群落组成分析。

通过 16S rRNA 基因和 ITS 基因的高通量测序分析从 12 个样中本共读取 435573 个有效细菌序列和 454804 个有效真菌序列, 并分为 2757 个细菌操作分类单元 (OTU) 和 891 个真菌 OTU。2757 个细菌 OTUs 被分配到 27 个不同的门, 2C、2S、5S 文库均含有 26 个门, 而 5C 文库含有 25 个门; 变形菌门 (*Proteobacteria*) 是所有土壤样本中的主要细菌门, 其次是放线菌门 (*Actinobacteria*) 和绿弯菌门 (*Chloroflexi*), 三者占总丰度的约 60% 以上 (图 1a)。891 个真菌 OTUs 被分配到 7 个真菌菌门, 2C、2S 文库含有 7 个门, 5C、S2 文库含有 6 个门; 子囊菌门 (*Ascomycota*) 是所有土壤样本中的主要真菌门, 其次是担子菌门 (*Basidiomycota*) 和接合菌 (*Zygomycota*), 三者占总丰度的约 95% 以上 (图 1b)。随着连作年限的增加, 发病土壤中烟草镰刀菌根腐病的病原减少, 但差异性不显著。

随着连作年限的增加, 样本中细菌和真菌的丰富度和多样性指数降低 (表 1)。连作 2 年的发病与无病土壤样本在 OUT 数量、Chao 指数和 Shannon 指数上差异均不显著; 而连作 5 年的发病与无病土壤样本在 Chao 指数和 Shannon 指数上存在显著性差异。随着连作年限的增加, 发病与无病土的微生物丰度差异逐渐显著。

运用不同的 β 多样性统计分析来确定不同连作年限下发病与无病土壤之间的关系。在 OTU 水平上, 运用 bray-curtis 进行聚类分析, 充分考虑样本微生物群落结构及丰度, 结果显示, 连作 2 年发病土与无病土的土壤微生物群落之间无法区分, 而连作 5 年发病土与无病

土的土壤微生物群落可以明显区分出来（图 2a,图 2d）。在 OUT 水平，运用基于 weighted unifracs 的 PCoA 分析，只考虑样本微生物丰度，结果显示，所有样本均不能被分离开（图 2b, 图 2e）；而运用基于 unweighted unifracs 的 PCoA 分析，只考虑样本微生物结构，2 年连作发病与无病土壤微生物结构差异不明显，但可以将 5 年连作发病与无病样本明显的区分开（图 2c, 图 2f）。

综上，土壤微生物丰度不是影响镰刀菌根腐病发病的关键因素；连作 2 年发病与无病土壤微生物结构在整体不存在明显差异，但 5 年连作发病与无病土壤微生物结构有明显的区分。

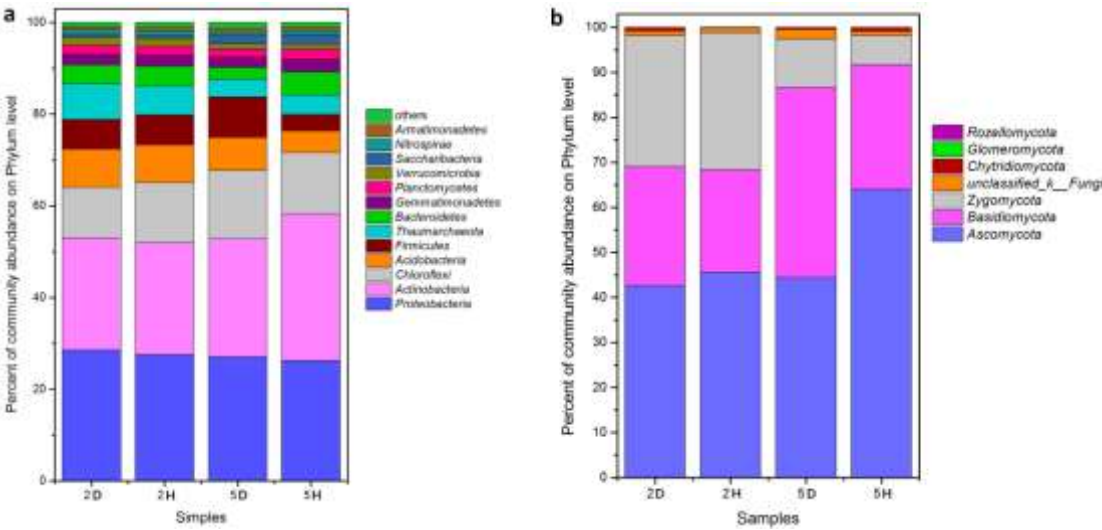


图 1 各处理微生物基本组成

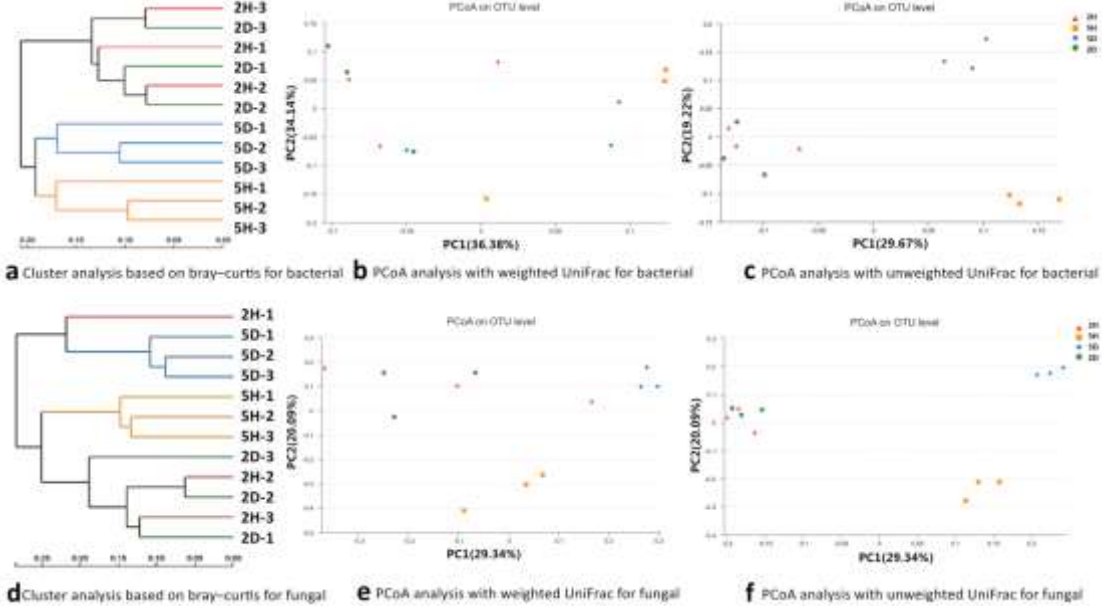


图 2 各土壤样本微生物 β 多样性分析

表 1 不同样本的细菌和真菌 α 多样性指数

	样本	OUT 数 (97%)	Chao 指数	Shannon 指数
细菌	2C	2100.00±67.52ab	2343.86±41.03ab	6.288±0.05b
	2S	2114.00±77.57b	2376.29±45.53b	6.324±0.028b
	5C	1929.33±54.11ab	2268.5±62.75ab	6.218±0.068ab
	5S	1891.33±48.64a	2178.7±43.88a	6.089±0.056a
真菌	2C	400.00±23.07b	470.9±19.52bc	2.955±0.235b
	2S	395.00±14.18ab	511.09±7.27c	2.995±0.139b
	5C	384.00±24.68ab	433±23.05b	3.232±0.153b
	5S	329.33±15.45a	378.31±7.59a	2.372±0.169a

(姚晓远 供稿)

生物炭对土壤 pH 垂直方向调控效果研究

研究报道指出，生物炭具有良好的物理特性，如酸碱度呈碱性、吸附性强，空隙多，比表面积大等，能改善土壤团粒结构，消除板结，提高保水保肥能力，改善土壤环境，提高烟草抗性，对根茎病害具有较好的防控效果。而研究表明，土壤酸化会导致土壤微生态失衡，是诱发根茎病害发生的关键因子。因此，本试验选择了生物炭为土壤酸化改良材料，采用室内和田间试验结合的方式，评估了生物炭对土壤 pH 的影响以及其在田间不同土层施用对土壤垂直方向 pH 的影响。

室内实验结果显示，本实验选用生物炭呈碱性，pH 为 9.66，酸化发病土壤 pH 为 5.31，生物炭与酸化土壤以 1:10 比例混合后，混合物 pH 上调为 6.96，随生物炭比例提高，混合物 pH 也升高，当两者等质量混合时，混合物 pH 提高至 8.20。结果表明生物炭对酸化土壤具有较好的改良效果，可明显提升土壤 pH。

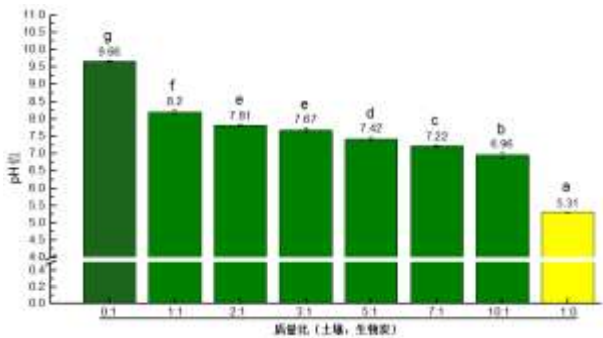


图 1 不同土壤与生物炭质量比混合对土壤 pH 的影响

对田间青枯病发病土壤不同深度土壤 pH 进行测定，结果显示，0-10 cm、10-20 cm 和 20-30 cm 土层深度土壤 pH 分别为 5.49、5.44 和 5.32，随土层深度增加，土壤 pH 呈降低趋势(图 2)。

在不同土层深度施用生物炭对土壤 pH 进行调理，结果表明，施用生物炭后对应土层土

壤 pH 可显著提升,0-10 cm、10-20cm 和 20-30 cm 施用生物炭后土壤 pH 分别显著提高 0.65、0.46 和 0.51 ($p=0.05$)。20-30 cm 土层深度受 0-10 cm 和 10-20 cm 土层施用影响较大,土壤 pH 分别显著提高 0.20 和 0.23 ($p=0.05$), 0-10 cm 施用生物炭对 10-20 cm 土层 pH 也有一定影响,土壤 pH 提高 0.19,但没有达到显著性水平(图 3)。

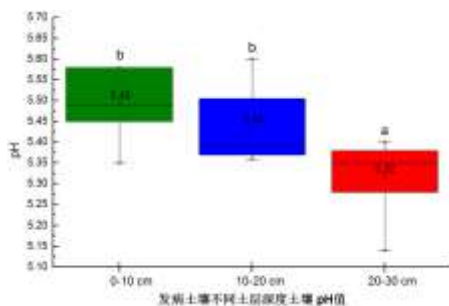


图 2 发病土壤不同土层深度土壤 pH

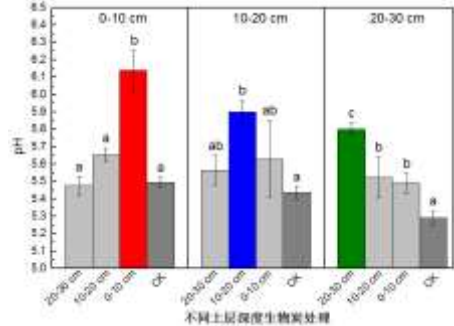


图 3 不同土层深度施用生物炭对土壤 pH 的影响

综上所述,生物炭施用对土壤 pH 具有明显提升作用。同时,表层土壤(0-10 cm 和 10-20 cm)施用生物炭对土壤整体 pH (0-10 cm, 10-20 cm 和 20-30 cm) 的提升效果较佳。

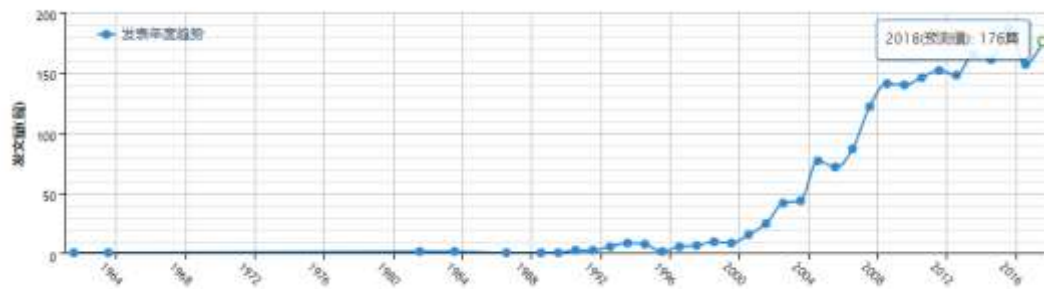
(江其朋 供稿)

知识窗

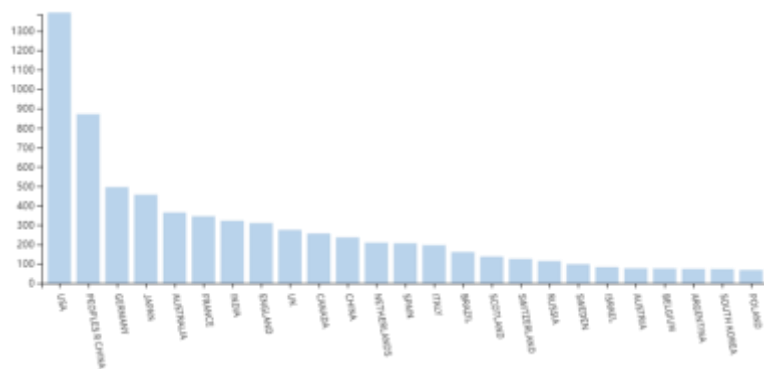
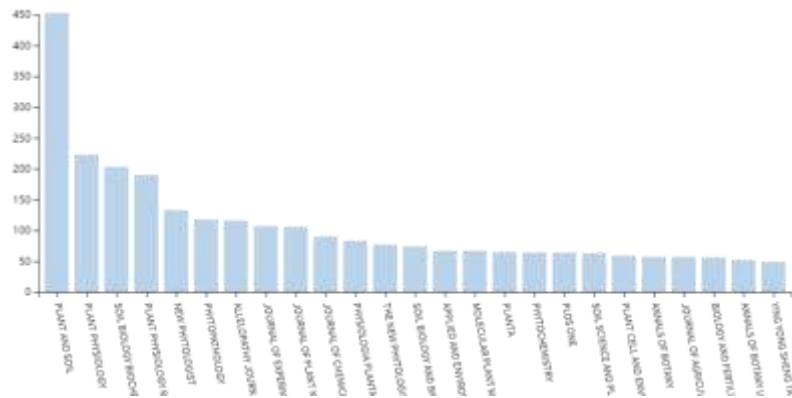
根系分泌物国内与国际研究态势分析

根系分泌物是植物在其生长过程中由根部向其生长四周释放的一组复杂的混合物,而这些混合物在活跃的根际生态环境中,具有重要的生态功能,介导着植物与微生物之间的互作。近年来的相关研究表明,根系分泌物是保持根际微域生态系统活力的关键因素,也是根际微生态系统中物质迁移和调控的重要组成部分。因此,近年来根系分泌物逐渐进入科学研究者的视野与研究范围,成为研究土壤生态环境中研究的热点。

通过对中文数据库的信息挖掘与统计,从文章的发表数量分析,以根系分泌物从 2004 年开始受到研究者的关注,文章发表数量达到 80 余篇,而相对于往年增加 1 倍;且 2008 年之后显著上升,逐渐成为研究热点,文章发表数量稳定在 140 余篇以上,并且在 2018 年预测发表 176 篇(图 1)。此外,以根系分泌物为关键研究对象,目前国内学者重点关注了根系分泌物的种类、分泌检测以及带来的土壤化感作用,其中主要在大豆、水稻、玉米、小麦、黄瓜等作物中研究较多,而根系分泌物的化感活性,自毒活性,以及连作与连作障碍关注的较多,在部分复杂的根系分泌物中,有机酸以及酚酸物质成为研究的焦点。与此同时,近年来,根际微生物、根际环境与根系分泌物之间的关系也成为重要的研究分支(图 2)。



对根系分泌物研究的国外研究情况进行统计与分析,其中目前根系分泌物的主要领域集中于植物科学、农业、土壤环境、植物生理、生物化学以及微生物等方面,其中在植物科学领域发表文章数量已经达到 5000 余篇,而农业资源与环境次之为 4500 余篇左右(图 3);目前关于根系分泌物文章的发表主要 plant and soil、plant physiology、soil biology biochemistry、new phytologist、phytopatholog、journal of experimental botany 等一区 top 期刊,其中在 plant and soil 期刊发表论文数量最高,达到 450 余篇(图 4)。此外,不同地区在研究根系分泌物方面存在显著差异,其中以发表论文数量为参考标准,美国、中国、德国、日本、澳大利亚、法国等地区最多,美国与中国论文的发表数量分别在 1400 余篇与 850 余篇以上。



(李石力 供稿)

芽孢杆菌的生物防治作用机理研究进展

芽孢杆菌是一类应用最为广泛和具有应用前景的植物病害生防菌。枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 用于防治植物病原真细菌在国内外已有不少研究,其中一些种类独立与其他微生物菌株混合开发成为生防制剂,用于土传病害的防治。Murakam 等从发病田块分离到枯草芽孢杆菌 NB22 菌株能减轻根肿病。研究芽孢杆菌作用机理,在防治土传病害发生与防控过程中具有重要意义。目前有关芽孢杆菌的防病促生作用机制,国内外学者均进行了大量研究。主要取得的成果分为以下几个方面:

营养和空间位点竞争

芽孢杆菌能否在应用的生态环境中定殖、繁殖和扩展是其发挥生防作用的关键。营养和空间位点竞争指存在于同一微生态环境中的两种或两种以上微生物之间对空间、营养、氧气等进行竞争的现象。营养竞争是生防芽孢杆菌在微生态环境中与其他微生物(包括病原菌)在其定殖部位争夺可利用营养物质, 这些物质包括微生物生长发育必需的氨基酸、无机盐、碳水化合物、维生素等。XF-1 能在大白菜根部长时间定殖, 通过占据有利生态位点, 抑制根

肿病菌(*Plasmodio phoromycetes*)的繁殖。

分泌抗菌物质

生防芽孢杆菌产生的抗菌活性物质大多为小分子量的蛋白质或多肽类化合物等次生代谢产物，包括脂肽类抗生素、聚酮类化合物以及环肽类物质等。同时 Arima 等首次发现枯草芽孢杆菌所产生的晶状表面活性剂，即表面活性素，通过与生物膜的主要成分磷脂双层分子相互作用形成离子通道，破坏脂膜结构，使细胞内容物释放，引起细胞死亡；同时表面活性素能有效降低植物根部表面张力，有利于生防菌的游动性和生物膜的形成，生物膜能有效保护植物根部免受病原菌的入侵。邢介帅等研究发现，分离纯化的枯草芽孢杆菌 T2 所产生的蛋白酶，对棉花枯萎病菌菌丝生长具有抑制作用，推测可能是蛋白酶降解了枯萎病菌细菌壁中的蛋白质，造成细菌壁缺损，在膨胀压的作用下使菌体发生变形。FZB24 菌株在液体培养液中可产生伊枯草菌素等脂肽类抗生素，可防治镰刀菌、丝核菌引起的根腐病和枯萎病。

溶菌作用

生防微生物通过吸附在病原真菌的菌丝上，随着菌丝生长而生长，而后产生溶菌物质溶解菌丝体，使菌丝发生断裂、解体、细胞质消解等；或者产生次生代谢产物对病原菌孢子的细胞壁产生溶解作用，导致细胞壁穿孔、畸形等现象。林福呈等报道了 *B. subtilis* S9 能分泌某些溶菌物质，对立枯丝核菌(*R. solani*)、终极腐霉(*P. ultimum*)及西瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)有不同程度的溶菌作用，能有效控制青枯病 (*R.solani*) 引起的番茄苗期病害。孢子的细胞壁产生溶解作用，致使细胞壁产生穿孔、畸形等现象。*B. subtilis* PRS5 菌株的代谢产物可使 *R.solani* 菌丝分隔增多、隔间变短、胞内原生质消解、胞壁大量穿孔或不规则消解、菌丝缩短、断裂、原生质外溢解体而失活。

诱导植物抗病性

研究表明生防芽孢杆菌能激发植物的诱导抗病性(ISR)信号通路，提高植株抗病能力。其作用机制主要是通过组织木质化增强细胞机械屏障和产生植保素，该过程涉及 POD、PPO、PAL 与 SOD 的活性变化。它们共同作用可抵抗真菌、细菌和病毒，保护植物免受病原菌的危害，降低损失，显著减少病害程度，并能促进作物生长。FZB24(r)可产生与植物抗性蛋白合成基因表达相关的信号蛋白来诱导植物产生抗性，也可通过分泌相关蛋白如丝氨酸专性肽链内切酶直接诱导植物产生抗性。

(刘烈花 供稿)

青枯雷尔氏菌的侵染过程和茄科植物木质部环境

大多数细菌已经适应了间歇或不断流动的液体环境，流动的微生物的栖息地范围从动物肠道微生物到土壤，生物反应器到深海通风口^[1]。流动的液体会阻碍细菌的运动性，稀释可扩散的胞外信号分子和阻碍细菌吸附。然而，流动性有利于细菌获得营养物质、排出废物和

促进其他的吸附机制^[2]。植物的木质部导管的主要功能是将根部的水分和矿质元素运输到根上部分，是多种内生微生物的栖息地，包括多种良性共生和有益微生物，同样也包括一些通过破坏正常吸水杀死植物的病原菌^[3-4]。

其中的病原菌之一， β -变形菌门的青枯雷尔氏菌，可在极其广泛的寄主范围造成青枯病。被侵染的植株在出现症状前，往往会发育不正常和发黄，直到整株植物的枯死。模式植物番茄出现发病症状后，茎含菌量可达到 10^8 CFU/g^[5]。在发病过程中，病原菌可以在木质部流液中生长到极限浓度 10^{10} CFU/ml。有趣的是，青枯菌也可在抗病品种的木质部导管中生长到中等浓度（ 10^4 CFU 到 10^7 CFU/g），但不引起植物发生症状^[6-8]。

青枯菌是一种土传性病原菌，利用鞭毛运动性感知和趋化根系分泌物，成功在寄主根部定殖^[9-11]。青枯菌最初与植物表面互动通过多糖、粘附素蛋白和细胞表面附属物如鞭毛，形成可逆或不可逆附着。青枯菌附上植物根部，通过 IV 型鞭毛以极性方式在根伸长区和侧根出现位置形成微菌落^[10, 12-17]。青枯菌通过伤口或自然孔口侵入到寄主根部，迁移到发育的木质部中，在侵染 24 h 内就能抵达敏感番茄根部的木质部导管中^[14, 18]。在侵入木质部导管后，青枯菌就会迅速扩散到寄主整体。一些青枯雷尔氏菌在木质部流液中是浮游生物，而其他的青枯菌通过颤搐运动沿着木质部导管壁移动^[19]。最终病原菌会在生物膜中生长成聚集体，可以填充整个导管并可能阻碍水流^[14, 20]（Fig. 1）。

（摘自 Lowe-Power Tiffany M, Khokhani Devanshi, Allen Caitilyn. Trends Microbiol. 2018.）

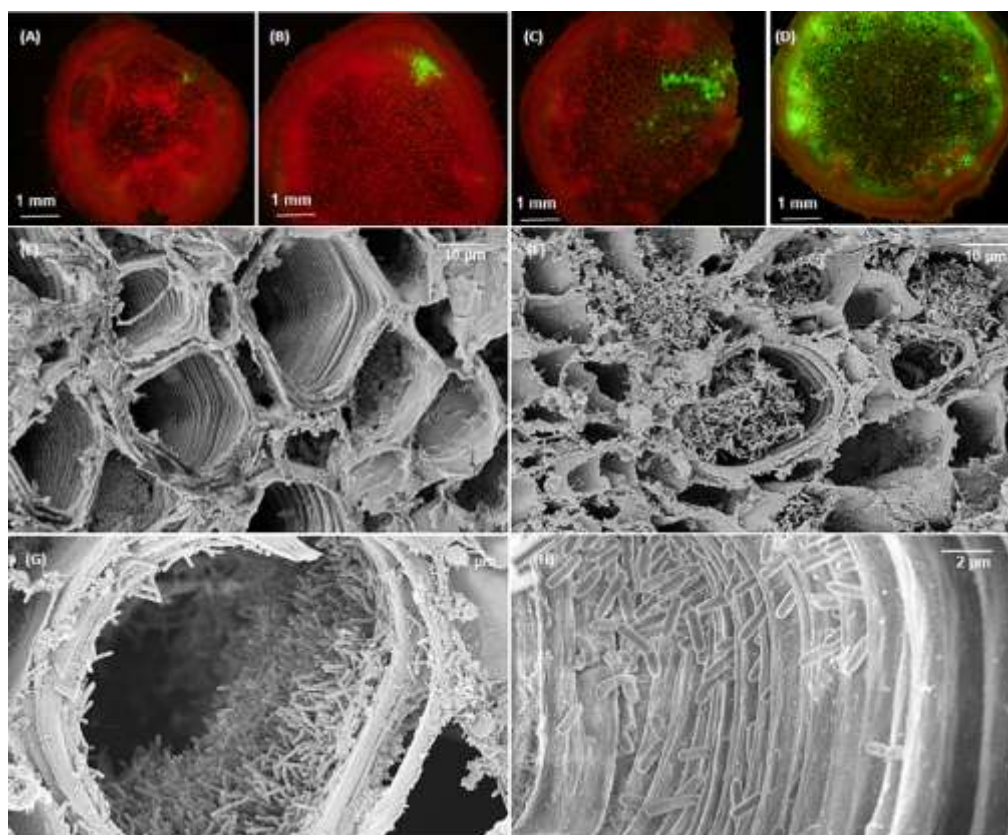


Figure 1. Colonization of Tomato Xylem by *Ralstonia solanacearum*. (A–D) GFP-tagged *R. solanacearum* in

tomato mid-stem cross-sections 48 h after soil-soak inoculation. Red is plant autofluorescence (image: Connor G. Hendrich). (E–H) Scanning electron microscopy of tomato xylem from (E) healthy tomato plants or (F– H) mid-stems of soil-inoculated plants showing first symptoms.

参考文献:

- [1] Rusconi Roberto, Stocker Roman. Microbes in flow [J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 25: 1-8.
- [2] Persat Alexandre, Nadell Carey D, Kim Minyoung Kevin et al. The mechanical world of bacteria [J]. Cell, 2015, 161(5): 988-997.
- [3] Yadeta Koste A, J Thomma Bart P H. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens [J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 97.
- [4] Hardoim Pablo R, van Overbeek Leonard S, Berg Gabriele et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2015, 79(3): 293-320.
- [5] Huang Q, Allen C. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants[J]. Physiological and molecular plant pathology, 2000, 57(2): 77-83.
- [6] Grimault V, Prior P. Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*[J]. Plant Pathology, 1993, 42(4): 589-594.
- [7] Graham J, Jones D A, Lloyd A B. Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers[J]. Phytopathology, 1979, 69(10): 1100-1103.
- [8] Weibel J, Tran T M, Bocsanczy A M, et al. A *Ralstonia solanacearum* strain from Guatemala infects diverse flower crops, including new asymptomatic hosts vinca and sutera, and causes symptoms in geranium, mandevilla vine, and new host African daisy (*Osteospermum ecklonis*)[J]. Plant Health Progress, 2016, 17(2): 114-121.
- [9] Tans-Kersten J, Huang H, Allen C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato[J]. Journal of bacteriology, 2001, 183(12): 3597-3605.
- [10] Yao J, Allen C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of bacteriology, 2006, 188(10): 3697-3708.
- [11] Hida A, Oku S, Kawasaki T, et al. Identification of the *mcpA* and *mcpM* genes, encoding methyl-accepting proteins involved in amino acid and l-malate chemotaxis, and involvement of *McpM*-mediated chemotaxis in plant infection by *Ralstonia pseudosolanacearum* (formerly *Ralstonia solanacearum* phylotypes I and III)[J]. Applied and environmental microbiology, 2015, 81(21): 7420-7430.
- [12] Hoffman M D, Zucker L I, Brown P J B, et al. Timescales and frequencies of reversible and irreversible adhesion events of single bacterial cells[J]. Analytical chemistry, 2015, 87(24): 12032-12039.
- [13] Vasse J, Frey P, Trigalet A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*[J]. MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions, 1995, 8(2): 241-251.
- [14] Caldwell D, Kim B S, Iyer-Pascuzzi A S. *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants[J]. Phytopathology, 2017, 107(5): 528-536.
- [15] Kang Y, Liu H, Genin S, et al. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence[J]. Molecular microbiology, 2002, 46(2): 427-437.
- [16] Kühne S A, Hawes W S, La Ragione R M, et al. Isolation of recombinant antibodies against *EspA* and intimin of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Journal of clinical microbiology, 2004, 42(7): 2966-2976.
- [17] Hawes M, Allen C, Turgeon B G, et al. Root border cells and their role in plant defense[J]. Annual review of phytopathology, 2016, 54: 143-161. [19]

- [18] McGarvey J A, Denny T P, Schell M A. Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars[J]. Phytopathology, 1999, 89(12): 1233-1239.
- [19] Liu H, Kang Y, Genin S, et al. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system[J]. Microbiology, 2001, 147(12): 3215-3229.
- [20] Minh Tran T, MacIntyre A, Khokhani D, et al. Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence[J]. Environmental microbiology, 2016, 18(11): 4103-4117.

(杨亮 供稿)