

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2018 年第 10 期, 总第 68 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 10 月 28 日

研究进展

土壤微生物挥发性有机物对青枯雷尔氏菌生长的影响

对在土壤挥发性有机物装置中培养了 48 h 的青枯雷尔氏菌进行计数, 巫山健康土壤微生物挥发性有机物对青枯菌生长的个数有明显的抑制作用, 其青枯菌个数最少, 平均 97.5 个/皿, 显著低于灭菌后的巫山土壤处理与无土对照处理。混合了 10% 和 20% 的巫山健康土壤挥发性有机物对青枯菌的生长个数也较无土对照有显著抑制作用, 分别为 121.2 个/皿和 121.6 个/皿 (见图 1、2)。

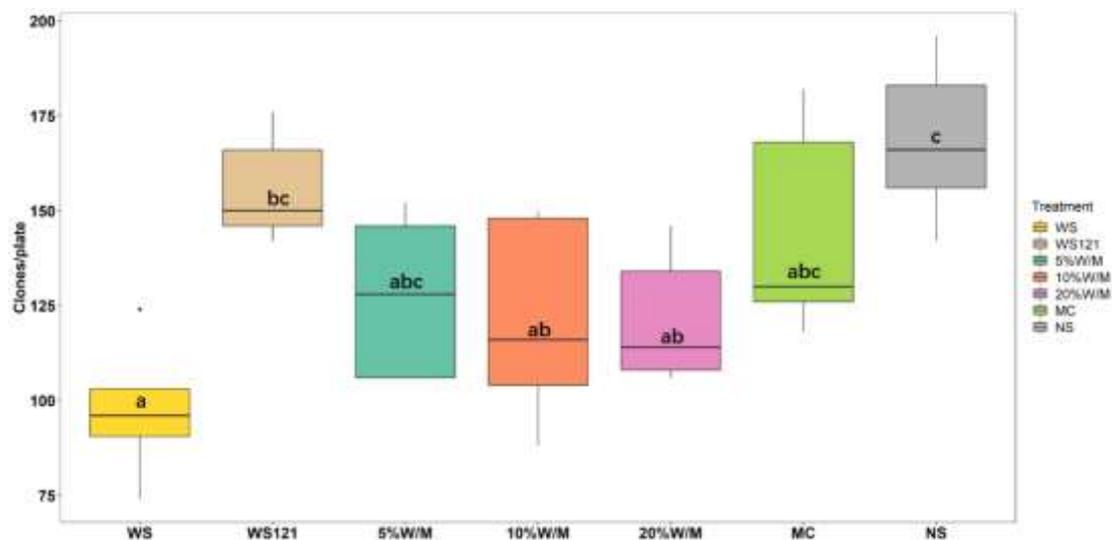


图 1 计数法检测土壤微生物挥发性有机物对青枯雷尔氏菌生长的影响

Figure 1 the effect of soil microbial organic volatiles on the growth of *Ralstonia solanacearum* by counting the numbers

注: 处理 WS、WS121、5%W/M、10%W/M、20%W/M、MC、NS 信息见表 5-5; 小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

表 5-5 试验具体处理信息

Table 5-5 Basic information for each treatment

序号 No.	处理 Treatments	试验缩写 Abbr.
1	巫山连作健康土	WS
2	巫山连作健康土 121℃ 灭菌	WS121
3	5% 巫山连作健康土 + 混合发病土	5%W/M
4	10% 巫山连作健康土 + 混合发病土	10%W/M
5	20% 巫山连作健康土 + 混合发病土	20%W/M
6	混合发病土	MC
7	无土对照	NS

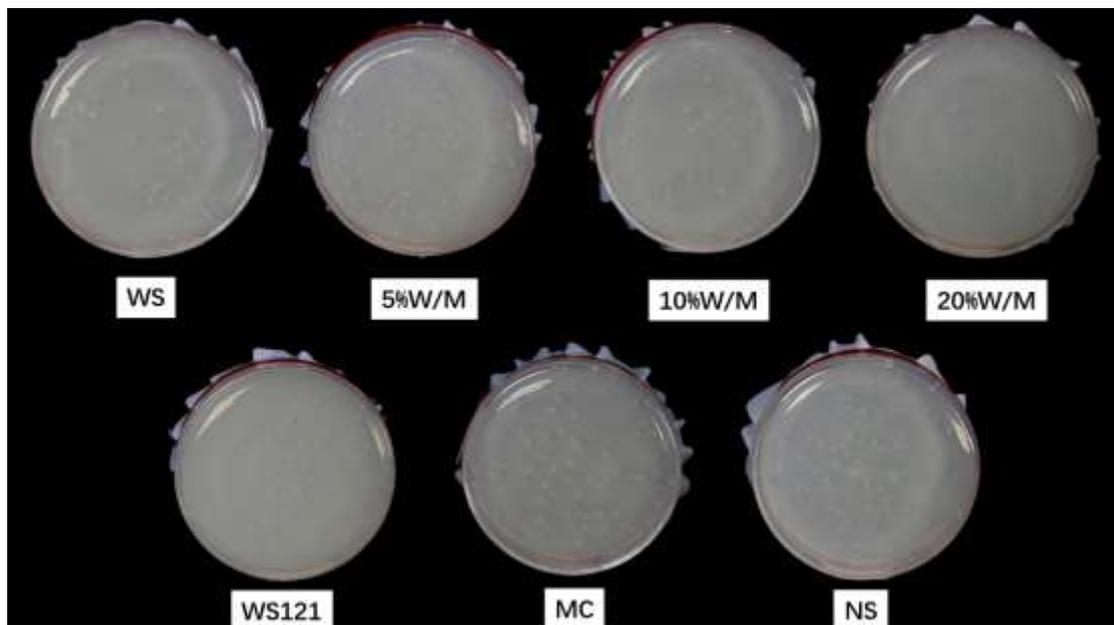


图 2 各处理在检测装置中培养 36 h 后的青枯雷尔氏菌生长示例

Figure 2 the samples of experimental set-up for the growth of *Ralstonia solanacearum* from different treatments after 36 h incubation

对在土壤挥发性有机物装置中培养了 48 h 的青枯雷尔氏菌进行浊度检测，巫山健康土壤微生物挥发性有机物影响下的青枯菌浊度最低，其 OD_{600} 值为 2.02，比灭菌后的巫山健康土和无土对照影响下的青枯菌 OD_{600} 均值低了 0.46，但是各处理间的差异并未达显著水平（见图 3）。由箱式图还可以看出，灭菌后的巫山土与发病土两个处理内部的青枯菌生长浊度差异较大， OD_{600} 值的波动范围较广。

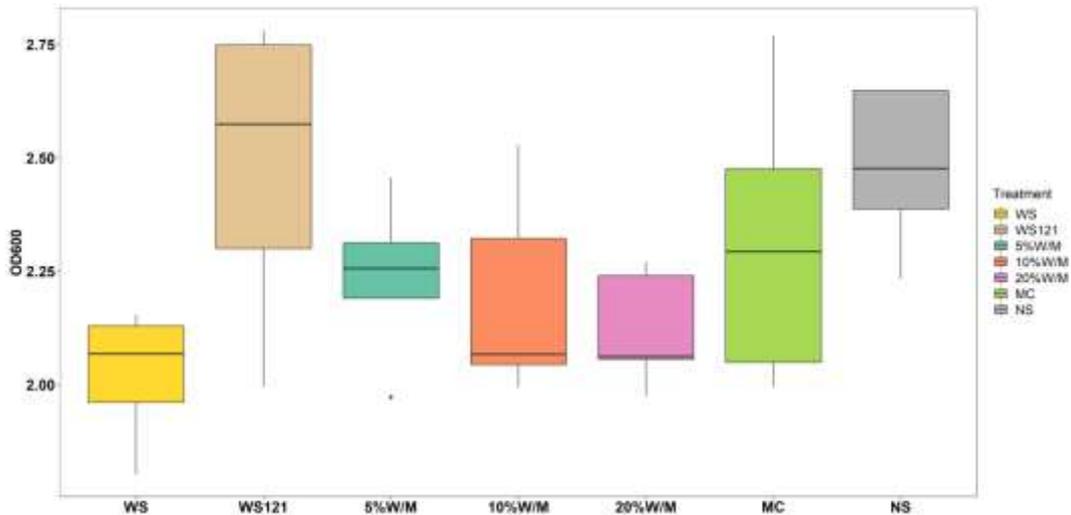


图3 浊度法检测土壤微生物挥发性有机物对青枯雷尔氏菌生长的影响

Figure 3 the effect of soil microbial organic volatiles on the growth of *Ralstonia solanacearum* by measuring the turbidity

(刘晓娇 供稿)

长期翻压覆盖植物对烟草青枯病及土壤微生物代谢多样性的影响

已有多篇文献研究表明长期施用有机物料可以抑制土传病害,微生物之间的营养竞争或拮抗作用通常与其抑病性密切相关。大田实验研究发现,在烟草青枯病发病土壤中短期翻压覆盖植物可以在一定程度上降低烟草青枯病的发生,但效果不稳定。因此,本研究通过温室试验探究长期翻压覆盖植物对烟草青枯病的影响,并从土壤微生物代谢多样性的角度初步解释其机制。

土壤抑病性检测结果表明(图1),烟草青枯病发病率和病情指数均表现为黑麦草<油菜<紫云英<空白对照,说明长期翻压覆盖植物可以显著地降低烟草青枯病的发生。在接菌第26天时,黑麦草、油菜和紫云英的发病率较空白对照分别降低了41.67%、25.00%、16.67%,且黑麦草、油菜和紫云英的病情指数较空白对照分别降低了45.83%、25.00%、16.67%。

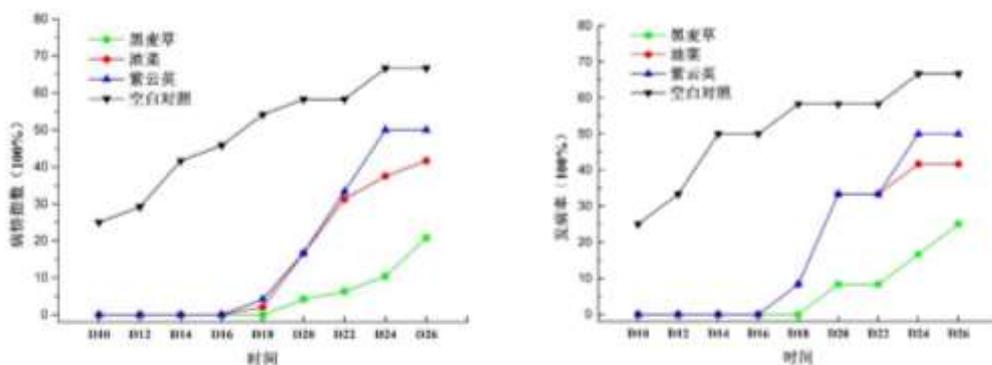


图1. 长期不同覆盖植物翻压后烟草青枯病发病率和病情指数图 (A 发病率; B 病情指数)

平均颜色变化率（AWCD）作为微生物整体活性的有效指标，反映了土壤微生物群落对碳源的利用情况。AWCD 值越大，活性越高；反之，活性越低。图 2 表明不同处理的土壤微生物群落 AWCD 值均随着时间的增加而增加，整体上表现为油菜>紫云英=黑麦草>空白对照。结果表明长期翻压覆盖植物后显著增加了土壤微生物活性，增加了土壤微生物对碳源的利用能力。

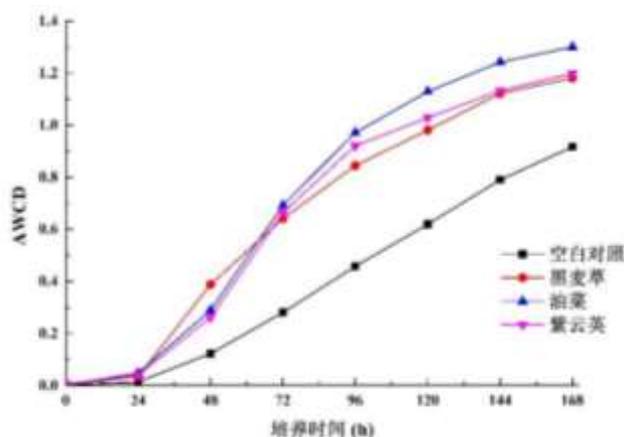


图 2. 土壤微生物群落 AWCD 随着培养时间的变化

采用培养 96 h 的 AWCD 值对不同处理的土壤微生物利用单一碳源特性进行主成分分析，选取方差贡献率最高的前两个主成分 PC1（第 1 主成分）和 PC2（第 2 主成分）进行微生物群落功能多样性分析。主成分分析结果（图 3）表明，不同处理碳源利用在 PC 轴上差异显著，在 PC1 轴上，油菜、紫云英和黑麦草处理分布在正方向上，而空白对照分布在负方向上；在 PC2 轴上，黑麦草分布在正方向上，而油菜和紫云英处理分布在负方向上。长期覆盖植物处理与对照存在明显的分布差异，这表明长期覆盖植物处理在生物群落功能性方面与空白对照具有明显差异，长期翻压覆盖植物能显著增强土壤中微生物群落的功能性。

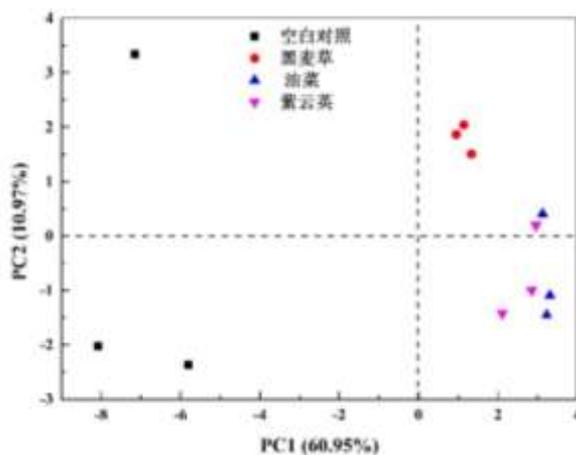


图 3. 土壤微生物群落碳源利用的主成分分析

然而本研究只是从土壤微生物代谢多样性的角度初步解释了长期覆盖植物防治烟草青枯病的机制，下一步将通过高通量测序数据分析长期覆盖植物翻压后土壤微生物的具体类群的变化情

况并结合土壤理化性质数据解释其微生态机制。

(沈桂花 供稿)

知识窗

csp22 肽链是一种青枯菌-植物互作的病原体相关分子模式 (PAMPs)

植物可以表达模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 来识别被称为病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 的微生物保守特征, 并在识别时激活免疫应答反应, 该过程叫做模式触发免疫 (pattern-triggered immunity, PTI) [1]。已经证实, 在感病寄主中异位表达 PRRs 是一种有前景的防治策略。例如, 有研究表明, 拟南芥的 EFR 受体 elf18 (EF-Tu 的表位) 在马铃薯和番茄中的表达能显著降低其对青枯雷尔氏菌的敏感性^[2,3]。但是, 被证实的青枯菌的 PAMPs 数目仍还有限, 这也限制了我们对青枯菌-植物互作的理解。Eckshtain-Levi 等^[4]利用计算 Tajima's D 的方法对植物病原体基因组中编码 PAMP 和其他毒力相关的基因进行了鉴定, 在对 37 个青枯菌基因组中保守的 3003 个基因进行分析时, 共筛选了 49 个非中性进化基因, 不仅包括 EF-Tu, 还包括编码 PAMP csp22 的冷休克蛋白 C 基因 (cold shock protein C, cspC)。Wei 等^[5]的研究也证实, 青枯雷尔氏菌的 csp22 多肽 (csp22^{Rsol}) 确实能够在本氏烟和番茄中引发免疫应答, 而不能在拟南芥中引发: csp22^{Rsol} 处理番茄使其对青枯菌的抗性增加; 另外, 表达番茄 csp22 受体 (SICORE) 的转基因拟南芥植物获得了对 csp22^{Rsol} 响应的能力并且对青枯菌的感染具有更强的抗性。以上研究均说明, 冷休克蛋白不仅是在青枯菌适应温度的过程中扮演了重要角色, 在与植物互作过程中也具有重要作用。

参考文献:

- [1] Jones J D, Dangl J L. The plant immune system [J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.
- [2] Boschi F, Schwartzman C, Murchio S, Ferreira V, Siri M I, Galvan G A, Smoker M, Stransfeld L, Zipfel C, Vilaro F L, Dalla-Rizza M. Enhanced Bacterial Wilt Resistance in Potato Through Expression of Arabidopsis EFR and Introgression of Quantitative Resistance from *Solanum commersonii* [J]. Frontiers in plant science, 2017, 8(
- [3] Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse H P, Smoker M, Rallapalli G, Thomma B P H J, Staskawicz B, Jones J D G, Zipfel C. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(4): 365-U394.
- [4] Eckshtain-Levi N, Weisberg A J, Vinatzer B A. The population genetic test Tajima's D identifies genes encoding pathogen-associated molecular patterns and other virulence-related genes in *Ralstonia*

solanacearum [J]. Mol Plant Pathol, 2018, 19(9): 2187-2192.

- [5] Wei Y L, Caceres-Moreno C, Jimenez-Gongora T, Wang K K, Sang Y Y, Lozano-Duran R, Macho A P. The *Ralstonia solanacearum* csp22 peptide, but not flagellin-derived peptides, is perceived by plants from the Solanaceae family [J]. Plant Biotechnol J, 2018, 16(7): 1349-1362.

(刘颖 供稿)

植物根结线虫病害的生物防治研究进展

植物寄生线虫的生防因子包含天敌(真菌、细菌、病毒、立克氏体、捕食性线虫、涡虫、鳃类、昆虫和原生动物等)。据统计,关于线虫生物防治的文献中,以真菌为材料的占76%,捕食性线虫占7%,细菌和放线菌占5%左右,其余在3%以下。近年来,国内外对真菌和细菌的种类、作用机制、生物制剂及对植物线虫的防治等方面都进行相关研究,并取得了重要的进展。目前,国内外发现的线虫生防因子主要包括以下几种类型。

利用真菌防治植物根结线虫

真菌作为植物病原线虫的重要天敌,是自然界中控制、平衡和调节线虫种群数量的重要生物因子,利用线虫天敌真菌进行植物病原线虫的防治是非常有潜力的生防途径。

1 利用淡紫拟青霉(*Pililacinus*)防治植物根结线虫

淡紫拟青霉对植物根结线虫的寄生作用是秘鲁国际马铃薯研究中心 Jatala 首先发现的,并在1979年首次报道,该菌是南方根结线虫与胞囊线虫卵的有效寄生菌。一般认为淡紫拟青霉防治线虫的机制是与线虫的孢囊或卵接触后,在菌丝机械压力及其分泌水解酶的作用下使卵壳表皮破裂,随后穿入并寄生在早期胚胎发育的卵中,最终致使整个胚胎被菌丝体取代、卵的内容物被破坏而致死。

2 利用厚垣孢普可尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)防治线虫

厚垣孢普可尼亚菌是根结线虫和胞囊线虫卵及雌虫的寄生菌,是引起燕麦胞囊线虫(*H.avenae*)自然衰退的主要根结线虫拮抗真菌之一,也是最有希望用于线虫生物防治的真菌。这些菌在自然条件下对植物寄生线虫的控制起着重要作用。

防治根结线虫的细菌

根结线虫天敌细菌目前研究较深入的,报道较多的主要是巴氏杆菌属(*Pasteuria*)及根际细菌(*Rhizobaacteria*)两类。

1 巴氏杆菌属

侵染植物根结线虫的穿刺巴氏杆菌(*Pasteuria*)是研究最多的线虫天敌细菌。虽然许多试验表明穿刺巴氏杆菌是一种非常有希望的植物根结线虫病的生防因子,但由于该细菌至今不能在人工培养基上进行商业化培养,而用活体线虫进行繁殖的成本较高,效率很低,限制了

在生产中的大规模应用。

2 根际细菌

目前,在温室和田间对植物寄生线虫有防效的根际细菌有:荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)及致金色假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*),而有些有效根际细菌尚未鉴定。

防治根结线虫的其它天敌

根结线虫的天敌生物除真菌和细菌外,还有捕食性线虫、螨类、原生动物、病毒、立克次氏体和放线菌等。在以拮抗或毒杀方式作用于线虫的天敌生物中,除食线虫真菌和细菌外,还包括一些链霉菌,他们能够产生具有抗生和杀线虫特性的化合物。病毒作为植物寄生线虫的天敌因子研究甚少。利用立克次氏体进行植物寄生线虫的生物防治至今未见报道。

参考文献:

- [1] Kim J, Yang R, Chang C, et al. The root-knot nematode *Meloidogyne incognita* produces a functional mimic of the *Arabidopsis* inflorescence deficient in abscission signaling peptide[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(12):3009-3021.
- [2] Zhou L, Yuen G, Wang Y, et al. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato[J]. *Crop Protection*, 2016, 84:8-13.
- [3] Williamson V M, Hussey R S. Nematode pathogenesis and resistance in plants.[J]. *Plant Cell*, 1996, 8(10):1735-1745.
- [4] 郑云峰, 李建生, 邱美强. 根结线虫生防菌研究进展[J]. *农学学报*, 2006(11):62-65.
- [5] 金娜, 刘倩, 简恒. 植物寄生线虫生物防治研究新进展[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5):789-800.
- [6] Sharon E, Bareyal M, Chet I, et al. Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(7):687-93.
- [7] 陈泽斌, 夏振远, 徐胜光, 等. 烟草抗根结线虫内生细菌的筛选及防效研究[J]. *中国烟草学报*, 2015, 21(6):71-75.
- [8] Zhao D, Zhao H, Zhao D, et al. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease[J]. *Biological Control*, 2018, 119:12-19.
- [9] Baldwin J G, Nadler S A, Adams B J. Evolution of plant parasitism among nematodes.[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42(1):83-105.
- [10] Chinheya C C, Yobo K S, Laing M D. Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica*, (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean[J]. *Biological Control*, 2017, 109.
- [11] 黄金玲, 刘志明, 刘纪霜, 等. 植物寄生线虫生防细菌的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2008, 27(3):288-293.
- [12] 郭永霞, 金永玲. 蔬菜根结线虫综合防治研究进展[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(3):376-379.
- [13] Chitwood D J. Phytochemical based strategies for nematode control.[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40(1):221-249.
- [14] Mojtahedi H, Santo G S, Hang A N, et al. Suppression of Root-knot Nematode Populations with Selected Rapeseed Cultivars as Green Manure.[J]. *Journal of Nematology*, 1991, 23(2):170-4.

(黄阔 供稿)

植物体内草酸的合成和分解代谢途径

1 草酸的合成途径

叶片被认为是草酸合成的主要场所，李宝盛同时检测烟草根和叶中的草酸含量，通过对二者的相关性分析表明二者呈极显著正相关，说明草酸主要是来自于叶片合成，由叶片输送到根部，再分泌到根际。但草酸在叶片的合成路径仍有很大的争议，但根据前人的研究结果可以总结出 3 条植物草酸合成的途径，即与光呼吸有关的乙醛酸/乙醇酸途径、抗坏血酸途径、草酰乙酸途径。

1.1 光呼吸乙醇酸途径

氧化光呼吸途径中的乙醛酸/乙醇酸一直被认为是合成草酸的有效前体，即通过乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase, GO)氧化乙醛酸生成草酸，但该途径是否是合成草酸的有效途径在植物中仍然具有很大的争论。如前期的研究表明植物中草酸的合成积累受到光合作用的影响，而最近的研究证明草酸的积累与光合作用没有直接的相关性。另外早期的同位素示踪显示 ^{18}O 标记的乙醛酸并不能转化为草酸，浮萍中草酸还可以在没有任何 GO/光呼吸的黑暗或愈伤组织中积累，但用 ^{14}C 标记的乙醛酸却能在浮萍中转化为草酸钙晶体。最新的研究还表明在水稻中草酸的积累并不依赖于光呼吸，但光呼吸途径中的乙醛酸确实是草酸合成的有效前体物质。有报道证明乙醛酸循环途径中的异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase, ICL)与草酸的合成相关，在水稻中超量表达 ICL 可以显著提高转基因水稻中的草酸含量。另外，GO 是位于过氧化物酶体中的光呼吸途径的关键基因，在水稻中 GO 基因主要在调控光合作用中起重要作用，而对草酸的积累没有贡献，这说明可能存在一种不依赖于光呼吸的乙醛酸途径用于合成草酸，如乙醛酸循环和 TCA 循环等。

1.2 抗坏血酸途径

有研究表明抗坏血酸也是草酸合成的前体物质，在浮萍、丝兰和大藻中，利用同位素 ^{14}C 标记的抗坏血酸(1 和 2 位 C)可以导致草酸含量的升高，并且以同位素 ^{14}C 标记的抗坏血酸合成前体(1 位 C)也可以导致草酸含量的升高，认为抗坏血酸通过 C2/C3 裂解形成草酸，且该过程可能发生在植物特化晶体异细胞的液泡中；抗坏血酸的氧化产物脱氢抗坏血酸可以进一步氧化生成环草酰 L-蔗糖酸，最终水解产生草酸和 L-蔗糖酸。而在菠菜刚展开的叶片中同位素标记的抗坏血酸合成草酸的效率并不高；在水稻和荞麦中饲喂外源抗坏血酸后叶片中草酸含量提高不显著，这些结果表明在不同的植物中抗坏血酸做为草酸的合成前体可能有不同的合成效果，或在不同的植物中草酸合成的主导途径可能不尽相同。在蒺藜苜蓿中筛选鉴定出 4 个草酸钙相关的突变体，mod1、mod2、mod3 和 mod4，这四个突变体中草酸含量都高于野生型，并且突变体中抗坏血酸的含量明显低于野生型。对突变体幼苗饲喂抗坏血酸可以明显增加突变体中草酸的含量，这些表明抗坏血酸可能是草酸合成的有效前体物质。目前关于抗坏血酸对草酸合成的贡献尚未定论，相关的酶基因仍没有鉴定，但在水稻中干涉抗坏血酸合成途径最后一步酶 L-半乳糖-1,4-内酯脱氢酶基因显著降低了水稻中的抗坏血酸含

量,却并没有引起草酸含量的下降,因此植物中是否存在抗坏血酸合成草酸的代谢途径尚需进一步研究。

1.3 草酰乙酸裂解途径

植物中第三条草酸合成途径是通过草酰裂解形成草酸,该反应主要由草酰乙酸裂解酶催化完成,但该途径仅在甜菜根和菠菜粗提取物中报道过,并没有后续的研究文献。另外在生菜中还提出了一个利用乳酸脱氢酶歧化乙醛酸生成草酸和乙醇酸的途径,随后的研究表明该途径在菠菜中并不存在。尽管有关植物草酸合成的途径仍没有定论,但越来越多的研究表明在不同的物种中甚至是不同的组织器官中可能存在不同的草酸主要生物合成途径。

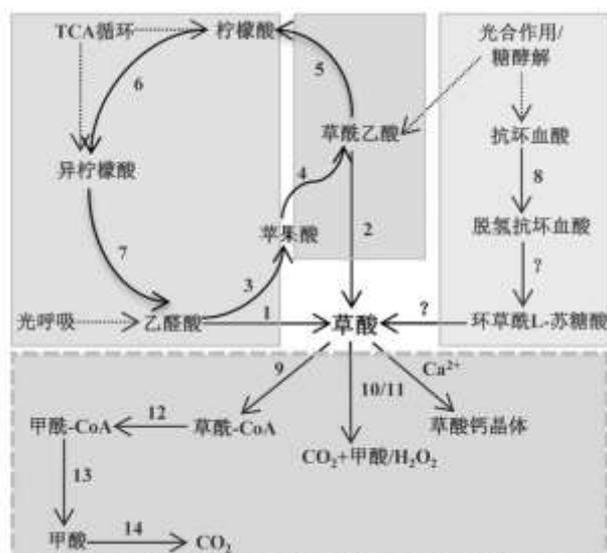


图1 植物中草酸合成与分解途径简图

2 草酸的分解代谢途径

草酸的分解也有3种不同的方式,即:氧化、脱羧和乙酰化(图1)。草酸在草酸氧化酶作用下被氧化为 CO_2 和 H_2O_2 ,而被草酸脱羧酶催化直接生成甲酸和 CO_2 ;草酸也可以在草酰-CoA合成酶作用下生成草酰-CoA,然后再经过草酰-CoA脱羧酶、甲酰-CoA水解酶和甲酰-CoA脱氢酶3步酶促反应最终降解为 CO_2 。另外草酸还可以结合植物体内的 Ca^{2+} 形成草酸钙晶体。草酸氧化酶是降解草酸的重要酶类,可有效的解除病原菌诱导产生的草酸毒害和延缓其侵染,在植物的生长发育和防御反应中起重要作用。草酸脱羧酶是另一种降解草酸的酶类,超量表达真菌草酸脱羧酶可以显著降低番茄果实中草酸的含量,并提高果实中的矿质营养元素的含量;还可以增强对病原菌的抗性。草酰-CoA合成酶是第三种降解草酸的酶类,拟南芥草酰-CoA合成酶突变体显示,在突变体中草酸不能降解生成 CO_2 ,并且突变体中草酸的含量是正常植株的2~3倍左右,而超量表达草酰-CoA合成酶基因显著降低转基因拟南芥中的草酸含量。这些结果也说明利用草酸分解途径降低植物中的草酸含量是一种行之有效的方式。

(王姣 供稿)