

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2018 年第 12 期, 总第 70 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 12 月 30 日

研究进展

纳米氧化铜对烟草疫霉的抑菌活性

由于纳米材料具有优越的物化特性, 被广泛应用于医疗、化工、电器、农业等领域。纳米氧化铜 (CuO NPs) 是被广泛应用的一种抗菌材料之一。我们研究发现, CuO NPs 的抑菌活性远远优于普通的粉末状 CuO (MCuO)。具体表现在抑制菌丝体生长、孢子囊形成以及游动孢子萌发等方面。

1.1 抗菌性试验

从图 1 可知, 氧化铜对烟草疫霉具有一定的抑菌活性。在燕麦培养基上培养 3 以后, 对菌丝生长直径进行测量, 生长在 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 CuONPs 上, 烟草疫霉的生长直径分别为 6.23、6.18、5.65、4.06、0 cm; 生长在 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 MCuO 上, 烟草疫霉的生长直径分别为 6.27、6.13、6.06、6.15、4.99 cm; 未添加 CuONPs 和 MCuO 的培养基中烟草疫霉的生长直径为 6.64。CuO NPs 对烟草疫霉的抑菌活性好于 MCuO。其中 25、50、100 mg/L 的 CuONPs 对烟草疫霉的抑制率分别为 14.84%、38.87%、100%, 25、50、100 mg/L 的 MCuO 对烟草疫霉的抑制率分别为 8.68%、7.33%、24.78%, 且在 25-100 mg/L 这个浓度范围内, CuONPs 对烟草疫霉的抑制率显著性高于 MCuO ($p < 0.05$)。

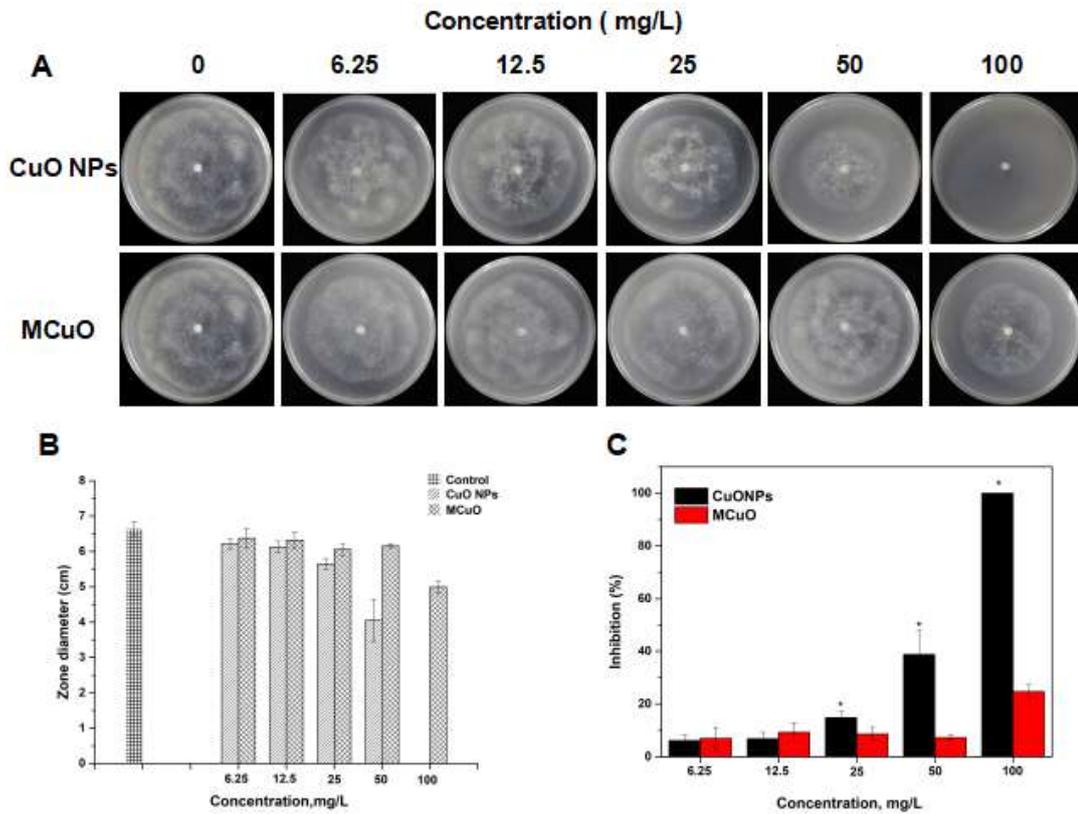


Fig 1. Comparative antifungal effects of CuONPs and MCuO against *P. nicotianae*. (A) mycelium radial growth of *P. nicotianae* with different concentrations (0-100mg/L) of CuONPs and MCuO on OA plate. (B) reduction in radial growth (means of zone diameter \pm standard deviation) among *P. nicotianae* strain. (C) inhibition of *P. nicotianae* with different concentrations (6.25-100mg/L) of CuONPs and MCuO at 3 days post incubation. Percent inhibition was calculated based on the mycelium growth without CuONPs and MCuO.

1.2 孢子囊产生的影响

孢子囊是烟草疫霉生命史中重要的一个环节。一方面孢子囊能够直接萌发，产生菌丝体；另一方面，孢子囊通过释放游动孢子，游动孢子迅速萌发产生新的菌丝体完成生活史。据统计，一个孢子囊可释放大约 8-20 个游动孢子。我们测定了不同浓度 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 CuONPs 和 MCuO 对菌丝体产生孢子囊的影响，分别统计了 6 个视野下孢子囊的平均个数。研究结果发现，6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 CuONPs 处理后，菌丝体产生的孢子囊个数分别为 140、44、25、5、0 个，对孢子囊产生的抑制率分别为 42.61%、76.70%、86.78%、97.04%、100%；而 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 MCuO 处理后，菌丝体产生的孢子囊个数分别为 150、161、109、88、45 个，对孢子囊产生的抑制率分别为 8.22%、15.57%、42.72%、53.48%、76.47%；而未添加 CuONPs 和 MCuO，菌丝体产生的孢子囊个数为 158 个。

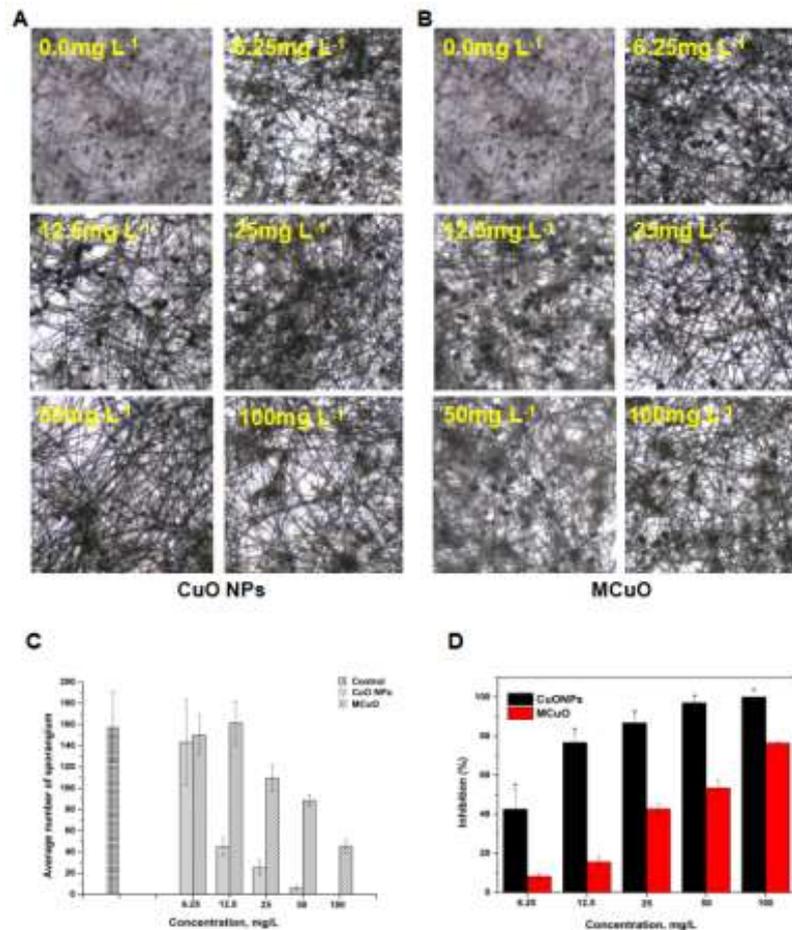


Fig 2. Effect of CuONPs and MCuO on sporangium generation of *P.nicotianae*. (A) effect of CuONPs on sporangium generation. (B) effect of MCuO on sporangium generation. (C) average number of sporangium (means of number of sporangium±standard deviation) among *P.nicotianae* strain. (D)inhibition rate of CuONPs and MCuO on sporangium

1.3 孢子萌发的影响

游动孢子的萌发是卵菌纲重要的生活史。我们测定了不同浓度 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 CuONPs 和 MCuO 对游动孢子的萌发，发现不同浓度的 CuONPs：6.25、12.5、25、50、100 mg/L 处理后，孢子的萌发率分别为 85.62%、78.29%、11.59%、9.29%、3.85%；不同浓度的 MCuO：6.25、12.5、25、50、100 mg/L 处理后，孢子的萌发率分别为 82.04%、74.49%、73.94%、62.64%、37.74%。未经过 CuONPs 和 MCuO 处理的孢子，其萌发率为 89.20%。

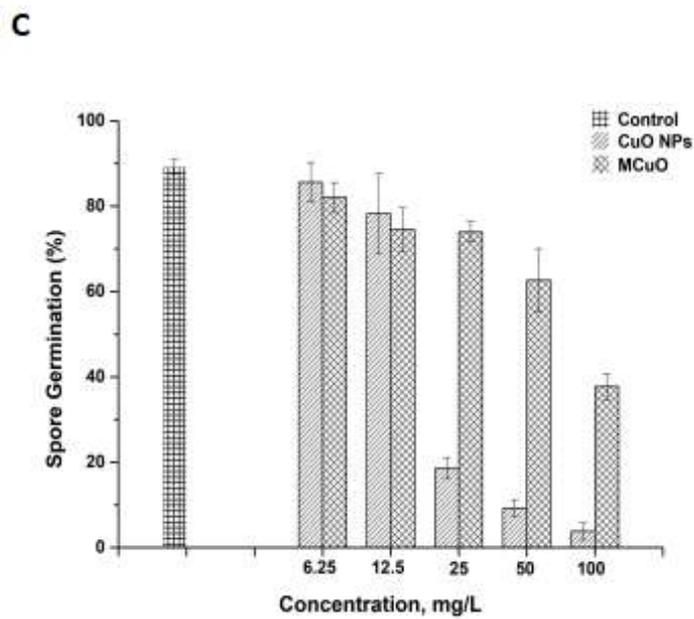
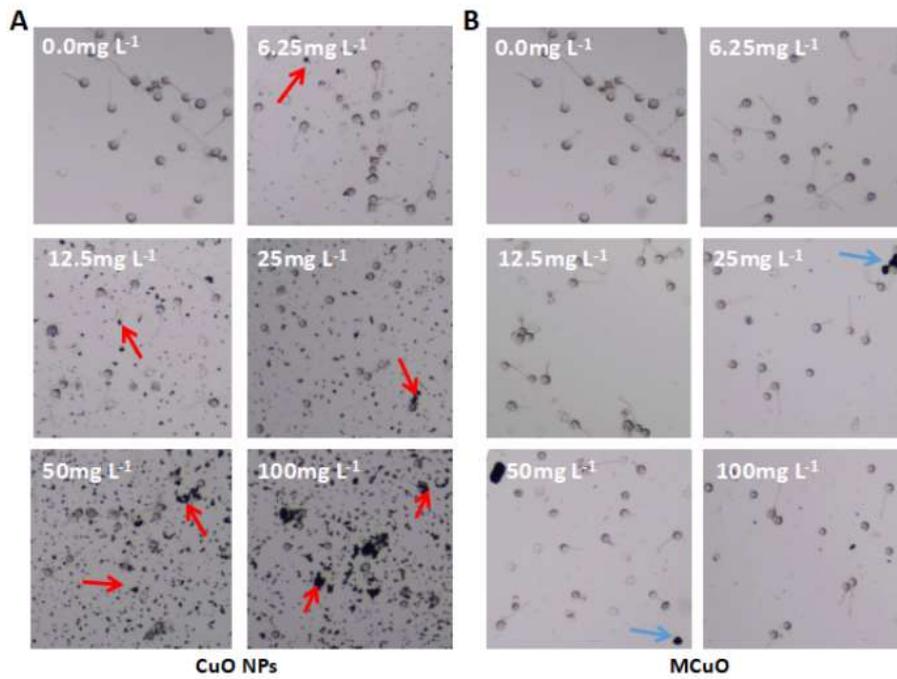


Fig 3. Effect of CuONPs and MCuO on spore germination of *Pnicotianae* spores.(A) effect of CuONPs (red arrow) on spore germination. (B)effect of MCuO (blue arrow) on spore germination. (C) the spore germination of CuONPs、 MCuO and blank control.

(武陵通 供稿)

酸沉降与氮肥影响土壤酸化的机制

土壤酸化是影响我国农业系统集约化的主要问题，尤其在我国南方地区，土壤酸化问题严重影响了农业产量，引起民众、政府部门和科研人员的高度关注。土壤酸化本是一个较为缓慢的自然过程，但近几十年来由于高强度人为活动的影响，土壤酸化的进程大大加速。研究表明，土壤氮循环每公顷每年可释放 20-221 kmol H⁺，碱基阳离子的吸收每公顷每年可进一步释放 15-20 kmol H⁺，是造成中国土壤酸化的主要原因，而酸雨造成的酸沉降每公顷每年只释放 0.4-2.0 kmol H⁺，在中国土壤酸化中起着较小的作用。因此，氮肥的大量施用，直接或间接的影响着土壤酸化。

1、酸沉降对土壤酸化的影响

当降雨量大于蒸发量时，土壤中可以发生淋溶过程，即进入土壤中的水带着土壤中的可溶性物质沿剖面向下迁移进入地下水，或随地表径流进入地表水。由于 H⁺ 的性质非常活泼，当降雨中含有 H⁺ 或土壤中有 H⁺ 产生时，这些 H⁺ 很容易与土壤发生反应而消耗土壤中的碱性物质。另一方面，土壤中的碱性物质也可在淋溶过程中随水分迁移。这两个过程使土壤中的碱性物质不断消耗，土壤的酸-碱平衡被破坏，土壤逐渐呈酸性反应。土壤自然酸化的早期，土壤中碳酸盐的溶解和硅酸盐矿物的风化消耗 H⁺，导致土壤 pH 逐渐下降；随后强烈的淋溶作用使土壤表面交换位上的盐基阳离子逐渐淋失，交换性酸(交换性氢和交换性铝)逐渐形成，土壤呈酸性或强酸性反应。

土壤中的盐基阳离子指正二价的钙和镁及正一价的钾和钠 (Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺、Na⁺)，它们大部分通过静电吸引作用吸附于土壤固相表面，这也使得带负电荷的土壤表面保持电中性状态，这部分盐基阳离子称为交换性盐基阳离子。小部分盐基阳离子存在于土壤溶液中，使盐基阳离子在固/液之间保持吸附与解吸平衡。多雨条件下，土壤溶液中的盐基阳离子会随地表径流流失或沿土壤剖面向下迁移进入地下水。这一过程打破了盐基阳离子在固/液相之间的吸附-解吸平衡，原先吸附在土壤固相表面的部分交换性盐基阳离子释放到土壤溶液中，空缺的吸附位(也叫阳离子交换位)被氢离子(H⁺)占据，产生交换性 H⁺，土壤发生酸化(图 1)

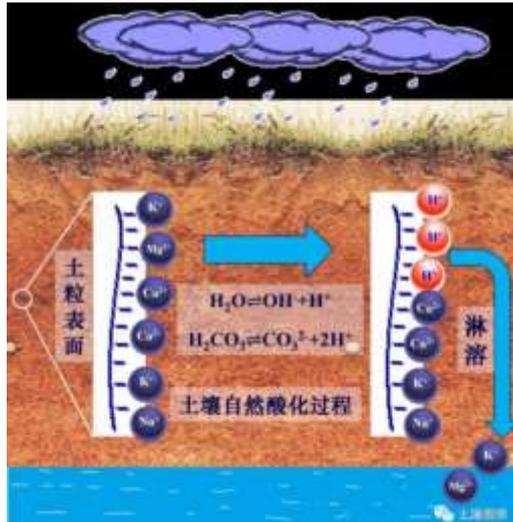


图1 土壤中交换性盐基阳离子淋失和交换性 H⁺的产生过程示意图

2、氮肥对土壤酸化的影响

铵态氮肥对土壤酸化影响的大小涉及铵态氮的硝化反应、作物对氮素的吸收以及氮的淋溶损失等几个方面。铵态氮肥施入土壤后会很快发生硝化反应，其方程式为： $\text{NH}_4^+ + 2\text{O}_2 = 2\text{H}^+ + \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$ 。可以看出，1份铵离子经硝化反应产生1份硝酸根和2份H⁺，如果硝化产生的硝酸根全部被植物吸收，植物根系会释放等比例的OH⁻，中和掉一半的H⁺，另一半H⁺留在土壤中。但如果硝化产生的硝酸根随降雨淋失掉，那么2份H⁺均留在土壤中，酸化土壤。H⁺的反应活性高，一旦产生会很快与土壤发生反应，它随降雨的淋失很少。而硝酸根为阴离子，带负电荷的土壤表面对其的静电排斥作用使它很容易从土壤中淋失（图2）。

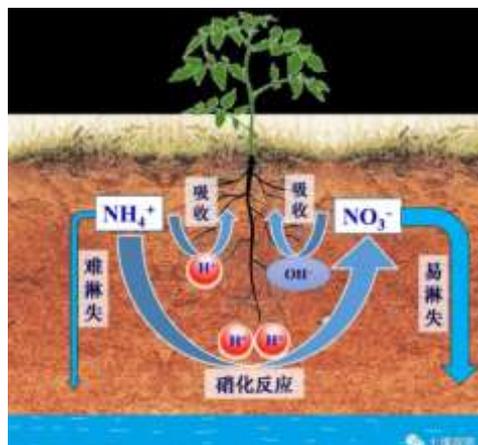


图2 植物对铵态氮和硝态氮的吸收、硝化反应、硝态氮淋失与土壤酸化关系示意图

3、土壤中酸的主要存在形态

当外源H⁺进入土壤，如果土壤固相含碳酸盐，H⁺将优先与碳酸盐反应而消耗掉，土壤pH下降会很慢；但如果H⁺进入酸性土壤，H⁺将与土壤交换性盐基阳离子发生离子交换反应，释放部分交换性盐基阳离子到土壤溶液中，同时产生交换性H⁺。由于H⁺的反应活性很高，交换性H⁺不稳定，这部分H⁺的大部分会与土壤粘土矿物反应，释放土壤铝硅酸盐矿物结构中的铝，并产生交换性Al³⁺。交换性铝与交换性H⁺的总和为交换性酸，当达到反应平衡时，

土壤的交换性酸主要以交换性铝存在（图 3）。因此，铝毒害是土壤酸化影响植物生长的主要原因。

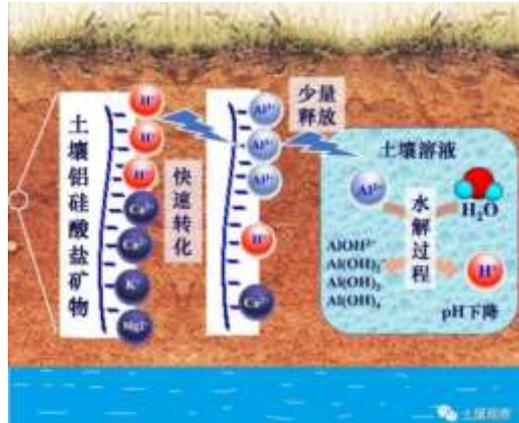


图 3 交换性 H^+ 转化为交换性铝及交换性铝释放、水解和产 H^+ 的过程示意图

Guo J H, Liu X J, Zhang Y, et al. Significant acidification in major Chinese croplands.[J]. Science, 2010, 327(5968):1008-1010.

整理自徐仁扣、时仁勇“土壤与农业可持续发展国家重点实验室网站（2018年6月20日）”文章

（张淑婷 供稿）

抑病型土壤微生物抑制土传病害的机理

土壤微生物的研究在很长一段时间以来被认为是土壤这个“黑匣子”里最难以解读的部分，尤其对于超过 90% 的不可培养微生物的功能更是知之甚少。通过文献整理发现^[1-4]，对抑病型土壤的抑病机理研究多数还是处于未知或未被证实，但其中也有对某些特定病害的抑病型土壤的主要抑病机理进行揭示的，在此可归纳为微生物之间竞争作用、寄生作用、捕食作用、拮抗作用和微生物诱导作物产生系统抗性的作用。

1. 竞争作用

土壤环境通常是营养贫瘠的，因而会导致微生物间对营养物质和微量元素的竞争。而有研究显示，当与感病土壤相比时，抑病型土壤拥有更高的微生物生物量（microbial biomass），因而在与病原菌竞争中能处于更有利的地位^[5]。

碳源类营养物质是微生物竞争的主要能源物质，不仅仅是普通抑病型的土壤微生物与碳源竞争密切相关，专性抑病型土壤微生物对碳源的利用也一定程度预示着其抑病性的大小。Alabouvette^[6]等在研究镰刀菌枯萎病的抑病土时发现，土壤中无致病性的尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）在对碳水化合物类物质的竞争力要强于致病性的尖孢镰刀菌。马铃薯疮痂病的致病菌 *Streptomyces scabies* 对碳源物质的利用也比抑病土中无致病的链霉菌（*Streptomyces sp.*）要弱^[7]。针对病原菌与土壤中原有的微生物之间对碳源物质的竞争与互

作, 有研究发现, 通过添加额外的碳源物质 (例如, 葡萄糖) 进入抑病土, 病原菌的孢子因获得额外的能源物质而大量萌发, 进而导致了病害发生的可能性^[8]。

除了对能源物质的竞争外, 对根部侵染位点的竞争也是导致抑制病害发生的关键机理。病原菌能成功入侵作物根部与病原菌和根之间成功建立寄生关系密不可分, 因而土著微生物与病原菌竞争可供入侵的空间便显得尤为重要。Davis^[9]发现在根部增加无致病性的 *Fusarium equiseti* 菌株定殖后, 由 *Verticillium dahliae* 引起的马铃薯早死病能得到明显缓解。在马铃薯疮痂病的研究中, 根部侵染位点占领策略也被认为是抑病土发挥抑病性的主要机理之一。此外, 菌根真菌在竞争根部侵染位点时, 除了通过物理的占有根部位点外, 还能通过分泌化学物质抵抗病原菌的入侵。例如, Takakura^[10]就发现外生菌根真菌 *Tricholoma matsutake* 能通过其子实体产生的过氧化氢物质抑制植物病原真菌 *Rhizoctonia solani* 的生长。

2. 拮抗作用

微生物与微生物之间的拮抗作用是科研工作者广为研究的机理之一。在抑病型土壤研究中相关的抗菌物质应数 2,4-DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 和 PCA (phenazine-1-carboxylic acid) 研究最为广泛。在小麦全蚀病 (take-all disease) 的抑病土壤中, 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescent*) 释放的 2,4-DAPG 和 PCA 与土壤抑病性紧密相关^[11], 因而假单胞菌群释放这些化学物质的浓度与多样性被认为是区分土壤抑病与感病的重要指标之一。此外, Latz^[12]发现 *phlD* 和 *prnD* 分别作为假单胞菌编码 2,4-DAPG 和吡咯菌素 (pyrrolnitrin) 基因, 其数量与土壤对 *Rhizoctonia solani* 引起的病害抑制性呈正相关性。

挥发性有机物质 (volatile organic compounds, VOCs) 在抑病土壤中微生物之间的拮抗作用中扮演着重要的角色。在土壤中大约有 30-60% 的分离菌群能释放抗真菌的挥发性有机物^[13], 而这些具有强烈抗真菌的挥发性有机物 (如二甲基二硫醚、二甲基三硫化物、S-甲基硫代乙酸和苜蓿等) 却被报道与拮抗病原细菌没有直接关系^[14], 且关于抗细菌挥发性有机物的报道明显少于抗真菌的。其中, 微生物产生的 γ -丁内酯便是一种能广谱抑制革兰氏阴性和阳性细菌的挥发性物质^[15]。Dandurishvili^[16]也发现荧光假单胞菌和沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica*) 能产生挥发性有机物使细菌性病原菌根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和葡萄土壤杆菌 (*Agrobacterium vitis*) 的生长受阻。虽然关于拮抗细菌性挥发有机物的作用机理尚未明确, 但是有研究指出其与这些挥发物质的疏水性有关。挥发性有机物的疏水性使它们能够在细胞膜的脂质层进行划分, 使细胞膜更具渗透性, 导致膜渗透性的改变和细胞内化合物的泄露^[15]。

3. 诱导作物产生系统抗性

植物本身是具有防御系统去抵御病原菌入侵的, 但是病原菌也具有绕过这些防御屏障的能力, 因而导致植物病害的发生。被病原菌激活的植物防御反应被称为是系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR), 而植物的防御反应也可在病原菌入侵之前由一些非致病性的根际细菌引起, 这样的抗性被称为是系统诱导抗性 (induced systemic resistance, ISR)

[17]。系统诱导抗性使植物优于病原菌入侵前产生抗性，进而当病原菌入侵时，能增加植物的抵抗能力。

不同的植物具有的诱导抗性会有所区别，但是植物激素水杨酸（phytohormones salicylic acid, SA）和茉莉酸（jasmonic acid, JA）却是被公认与植物抗性有关的重要调节物。它们能在很大程度上影响根际微生物的富集，水杨酸通过对活体营养的病原菌识别后调节植物的免疫系统，而茉莉酸主要对死体营养型的病原菌识别^[18]。

4. 寄生作用

在土壤环境中，病原真菌的繁殖体包括了孢子、分生孢子、孢子囊等，它们与土壤中其他的微生物有着密切的关系。而微生物寄生在这些繁殖体后，通过阻止其生长、减弱病原物侵染密度的作用，进而减轻病害的发生^[19]。病原真菌能够被细菌、真菌、病毒等微生物寄生，而关于病原细菌被微生物寄生的报道较少。真菌被细菌寄生时，病原真菌的孢子萌发数与致病性会有所下降，主要的机理是通过分泌水解酶，如几丁质酶和蛋白酶。在 *Collimonas* 属的细菌已经被证实能通过分泌几丁质酶使 *Chaetomium globosum*、*Fusarium culmorum*、*Mucor hiemalis* 等真菌的生长受阻^[20]。除了酶的作用，寄生的细菌也会产生挥发性有机物质抑制真菌的生长^[21]。但尽管寄生作用是一个很有力的控制植物病原菌的机理，可是在抑病土中关于寄生作用的研究却十分有限。

5. 捕食作用

捕食作用在土壤微环境中的研究主要集中于变形虫、线虫、小型节肢动物等微生物对植物病原真菌的抑制，对病原细菌的研究极少。Geisen^[22]研究发现土壤变形虫属于 *Cercomonas*、*Leptomyxa*、*Matorella*、*Thecamoeba* 属的均能捕食 *Fusarium culmorum* 的孢子。而燕麦真滑刃线虫（*Aphelenchus avenae*）能有效地抑制真菌病原菌 *Rhizoconia solani* 和 *Fusarium solani* 在苜蓿引起的病害^[23]。

参考文献：

- [1] Cook R J, Baker K F. The nature and practice of biological control of plant pathogens [M]. American Phytopathological Society, 1983.
- [2] Abadie C, Edel V, Alabouvette C. Soil suppressiveness to Fusarium wilt: influence of a cover-plant on density and diversity of Fusarium populations [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(5): 643-649.
- [3] Mazzola M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81(1-4): 557-564.
- [4] Raaijmakers J M, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria [J]. Annu Rev Phytopathol, 2012, 50(403-424).
- [5] Lemanceau P, Maron P-A, Mazurier S, Mougé C, Pivato B, Plassart P, Ranjard L, Revellin C, Tardy V, Wipf D. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology [J]. Agron Sustain Dev, 2014, 35(1): 67-81.
- [6] Alabouvette C. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils [J]. Australas Plant Path, 1999, 28(1): 57-64.
- [7] Neeno-Eckwall E C, Kinkel L L, Schottel J L. Competition and antibiosis in the biological control of potato

- scab [J]. *Can J Microbiol*, 2001, 47(4): 332-340.
- [8] Alabouvette C. Fusarium-Wilt Suppressive Soils from the Châteaurenard Region - Review of a 10-Year Study [J]. *Agronomie*, 1986, 6(3): 273-284.
- [9] Davis J R, Huisman O C, Everson D O, Nolte P, Sorensen L H, Schneider A T. Ecological relationships of *Verticillium* wilt suppression of potato by green manures [J]. *Am J Potato Res*, 2010, 87(4): 315-326.
- [10] Takakura Y. *Tricholoma matsutake* fruit bodies secrete hydrogen peroxide as a potent inhibitor of fungal growth [J]. *Can J Microbiol*, 2015, 61(6): 1-4.
- [11] Raaijmakers J M, Weller D M. Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(2): 144-152.
- [12] Latz E, Eisenhauer N, Rall B C, Allan E, Roscher C, Scheu S, Jousset A. Plant diversity improves protection against soil-borne pathogens by fostering antagonistic bacterial communities [J]. *J Ecol*, 2012, 100(3): 597-604.
- [13] Garbeva P, Hol W H G, Termorshuizen A J, Kowalchuk G A, de Boer W. Fungistasis and general soil biostasis – A new synthesis [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(3): 469-477.
- [14] Garbeva P, Hordijk C, Gerards S, De Boer W. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas* [J]. *FEMS microbiology ecology*, 2014, 87(3): 639-649.
- [15] Schmidt R, Cordovez V, de Boer W, Raaijmakers J, Garbeva P. Volatile affairs in microbial interactions [J]. *Isme J*, 2015, 9(11): 2329-2335.
- [16] Dandurishvili N, Toklikishvili N, Ovadis M, Eliashvili P, Giorgobiani N, Keshelava R, Tediashvili M, Vainstein A, Khmel I, Szegedi E, Chernin L. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants [J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 110(1): 341-352.
- [17] Pieterse C M J, de Jonge R, Berendsen R L. The Soil-Borne Supremacy [J]. *Trends Plant Sci*, 2016, 21(3): 171-173.
- [18] Bakker P A, Doornbos R F, Zamioudis C, Berendsen R L, Pieterse C M. Induced Systemic Resistance and the Rhizosphere Microbiome [J]. *Plant Pathol J*, 2013, 29(2): 136-143.
- [19] Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum* [J]. *New Phytol*, 2009, 184(3): 529-544.
- [20] de Boer W, Hundscheid M P, Klein Gunnewiek P J, de Ridder-Duine A S, Thion C, van Veen J A, van der Wal A. Antifungal Rhizosphere Bacteria Can increase as Response to the Presence of Saprotrophic Fungi [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137988.
- [21] Mela F, Fritsche K, Boer W D, Veen J A V, Graaff L H D, Berg M V D, Leveau J H J. Dual transcriptional profiling of a bacterial[soil]fungal confrontation: *Collimonas fungivorans* versus *Aspergillus niger* [J]. *Isme Journal*, 2011, 5(9): 1494.
- [22] Geisen S, Koller R, Hünninghaus M, Dumack K, Urich T, Bonkowski M. The soil food web revisited: Diverse and widespread mycophagous soil protists [J]. *Soil Biol Biochem*, 2016, 94(10-18).
- [23] Lee K E, Pankhurst C E, Lee K E, Pankhurst C E. Soil organisms and sustainable productivity [J]. *Soil Research*, 1992, 30(6): 855-892.

(刘晓姣 供稿)