

# 四种作物根系分泌物对烟草疫霉的抑菌活性分析

孟玉芳, 焦永鸽, 张立猛\*

(云南省烟草公司玉溪市公司, 烟草行业病虫害生物防治工程研究中心, 玉溪 653100)

**摘要** 通过分析玉米、大蒜、茴香和油菜 4 种作物根系分泌物对烟草疫霉的抑菌活性, 发现这 4 种作物根系表现出很强的化感作用, 根系分泌物能在短时间内迅速地杀死烟草疫霉的游动孢子, 抑制其萌发。其中, 玉米根系分泌物在最高浓度 2.59 mg/mL 时, 对疫霉休止孢萌发的抑制率高达 100%; 大蒜根系分泌物浓度为 0.1 mg/mL 时, 20 min 内能完全抑制游动孢子的游动。分析 4 种作物根系对游动孢子的趋化作用发现, 茴香、油菜对疫霉游动孢子的吸引活性最强,  $T_0$  最高分别为 76.3、68.7, 玉米、大蒜次之。以上结果为建立“以生物多样性为基础, 克服烟草土传病害连作障碍”的病害防治新模式提供有力的理论支撑。

**关键词** 根系分泌物; 烟草疫霉; 烟草黑胫病

**中图分类号:** S 435.72 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017444

## Inhibitory activity of root exudates from four crops against *Phytophthora nicotianae*

MENG Yufang, JIAO Yongge, ZHANG Limeng

(Yunnan Tobacco Company, Yuxi Branch, Biological Control for Tobacco Diseases and Insect Pests Engineering Research Center of China Tobacco, Yuxi 653100, China)

**Abstract** Root exudates from four species of crops, including maize, garlic, fennel and canola, were used to test the inhibitory activity against *Phytophthora nicotianae*. The results indicated that the four crops root exudates showed inhibitory activity against the release of zoospores from sporangia, the germination of cystospore. At the highest concentration of 2.59 mg/mL, the maize root exudates, could inhibit the germination of the resting spores with the inhibition rate of 100%. At 0.1 mg/mL of the garlic root exudates, the germination of zoospores was totally stopped in 20 min. The chemotactic activities analysis revealed that the four crop roots could attract a large number of zoospores of *P. nicotianae* from especially the fennel and canola root, with the highest  $T_0$  values of 76.3 and 68.7 respectively, followed by maize and garlic. On the basis of biological diversity, these results are useful for us to rotate maize, garlic, fennel and canola with tobacco for tobacco black shank control.

**Key words** root exudate; *Phytophthora nicotianae*; tobacco black shank

烟草黑胫病是烟草的毁灭性病害, 由寄生疫霉烟草变种 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* 引起。19 世纪末 van Breda de Haan 在印度尼西亚的爪哇对黑胫病进行了首次报道<sup>[1]</sup>。烟草黑胫病具有分布广、发病率高、危害重、防治难等特点, 现已遍布全国, 成为我国烟草上最严重的病害之一。烟草黑胫病菌的游动孢子形成速度快且数量大, 侵染烟株后潜育期短、发病快, 在一个生长季节可以发生多次再侵染, 此外, 该病有时还与其他病害混合发生, 防治难度较大。长期以来, 对该病害采取种植抗病

品种和化学防治为主、栽培措施为辅的综合防治方法。但随着连作烟田面积扩大以及连作年限的增长, 加之化学药剂的长期不合理使用, 抗病品种抗性的丧失, 病原菌的变异分化以及抗药性的产生, 烟草黑胫病普遍具有加重流行的趋势。

目前, 生产上为了减轻该病造成的损失, 不断尝试综合运用化学防治、农业防治、抗病育种、生物防治等多种方法控制烟草黑胫病, 其中化学药剂的依赖程度依然较高, 但由于其所用药剂作用机制和作用位点相近, 很容易产生耐药性, 生产上急需替代药

收稿日期: 2017-11-21 修订日期: 2018-03-10

基金项目: 中国烟草总公司 2012 年度重点科技项目(110201202017); 中国烟草总公司云南省公司科技计划项目(2017YN17, 2015YN13)

\* 通信作者 E-mail: zlm.d@163.com

剂。由于生物防治相较于化学药剂防治,具有无污染、无残留等优点,已成为黑胫病防治研究的热点之一,目前大量研究集中在细菌、放线菌类生防菌对烟草黑胫病的防治作用<sup>[2]</sup>。

根系分泌物是植物根系释放到根际环境中的有机物质的总称,对土壤结构形成、土壤养分转化、植物养分吸收、土壤微生物分布、环境胁迫缓解等方面都具有重要作用<sup>[3]</sup>。同时,研究也发现黄瓜、大豆、烟草等忌连作作物的连作障碍现象与根系分泌物中的化感物质密切相关,根系分泌的抑菌物质对土壤中非寄主病原菌的抑制是减轻病害的主要原因之一,在生产实践上间作和轮作也是减轻土传病害的途径之一<sup>[4]</sup>。张立猛等研究报道玉米在生长过程中可以通过根系源源不断地分泌苯并噻类化合物到根际土壤中抑制烟草疫霉菌的生长<sup>[5]</sup>。廖静静等报道大蒜类似根缘细胞水培液对辣椒疫霉菌游动孢子游动和孢子囊释放都具有显著的抑制活性<sup>[6]</sup>。

但是,由于土壤中微生物对根系分泌物的吸收、利用以及根系分泌物本身组分复杂、含量低,种类和数量随植物类型、根际环境而异<sup>[7]</sup>等特点,使得根系分泌物难以有效提取,目前已报道的收集根系分泌物的方法按不同的分类方法有多种划分<sup>[8]</sup>。本研究选择的收集方法为连续性根系分泌物收集系统<sup>[9]</sup>,能够在现实栽培中,对根系不造成伤害的情况下,实时、连续、准确地收集根系分泌物。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

(1)大蒜 *Allium sativum* 品种为‘呈贡白蒜’,购于市场,蒜瓣于移栽前 7 d 放于室内让其自然露芽备用;

(2)玉米‘海禾 1 号’种子购于市场;

(3)油菜‘云油杂 2 号’种子购于市场;

(4)茴香种子为云南玉溪当地品种,购于市场。

供试菌株:寄生疫霉烟草变种 *P. parasitica* var. *nicotianae*,由本实验室分离自田间发病植株。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 根系分泌物收集、提取

大蒜、玉米、油菜和茴香根系分泌物的收集主要采用自动循环装置法。首先将玻璃棉、石英砂用 2 mol/L 的 HCl 浸泡 24 h,用自来水冲洗至 pH 约为 7,161℃干热灭菌 4 h 后装入无底玻璃瓶中。其

次,在石英砂中加入 0.5 倍 Hoagland 营养液至饱和,种入大蒜蒜瓣或已发芽玉米种子(蒜瓣和玉米种子用 2.5% 次氯酸钠分别浸泡 15 min 和 5 min,无菌水冲洗 3 次),每个无底玻璃瓶中种植 5 株,每种设置 8 个重复。然后用锡箔纸将无底玻璃瓶及瓶口包裹,待大蒜和玉米发芽之后,在对应位置扎小孔让其穿出锡箔纸生长;由于油菜和茴香前期生长较大蒜和玉米缓慢所以要先进行育苗,待长成 4 叶 1 心时再对根系进行清洗及移栽至根系分泌物收集装置中进行收集。

大蒜和玉米生长过程中,从第二周开始每周补充 1 次 Hoagland 营养液至饱和,期间补充蒸馏水保持水分。待大蒜和玉米约生长至 10~15 cm;油菜和茴香长至 4 叶 1 心时,放尽玻璃瓶中营养液,用自来水冲洗干净残余营养液后用无菌水冲洗 3 次在玻璃瓶底部接上树脂柱(XAD-4 中性交换树脂用甲醇、乙醚、甲醇分别浸泡 24 h 后无菌水冲洗干净)及其他组件,打开阀门和泵连续收集 5 d。

#### 1.2.2 根系分泌物对疫霉菌抑菌活性研究

##### 1.2.2.1 玉米、大蒜根系分泌物对游动孢子游动的影响

取配制好的游动孢子悬浮液(浓度:  $1 \times 10^6$  个/mL)和玉米根系分泌物(0.52、0.26、0.05、0.03 mg/mL)各 20  $\mu$ L,同时滴加到凹玻片上,在 20℃ 黑暗条件下保湿培养,分别在 1、2、5、10、15、20 min 后在显微镜下观察游动孢子生成休止孢的情况,以 0.001 mg/mL 25% 啉菌酯悬浮剂作为农药对照,每个浓度重复 4 次,观察游动孢子游动和静止的情况,计算游动孢子的休止率。

取配制好的游动孢子悬浮液(浓度:  $1 \times 10^6$  个/mL)和大蒜系列浓度根系分泌物(0.1、0.02、0.01、0.002、0.001、0.0002 mg/mL)各 20  $\mu$ L,同时滴加到凹玻片上,在 20℃ 黑暗条件下保湿培养,分别在 1、5、20、40、60、80、100、120 和 140 min 后在显微镜下观察游动孢子生成休止孢的情况,以 0.001 mg/mL 25% 啉菌酯悬浮剂作为农药对照,每个浓度重复 4 次,观察游动孢子游动和静止的情况,计算游动孢子的休止率。

##### 1.2.2.2 玉米、大蒜根系分泌物对休止孢萌发的影响

将配制好的游动孢子悬浮液(浓度:  $1 \times 10^6$  个/mL)在涡旋仪上振荡 10 min,取游动孢子悬浮液和玉米根系分泌物(2.59、0.52、0.26、0.05、0.03 mg/mL)、大蒜系列浓度根系分泌物(0.001、0.006、0.01、0.06、0.1 mg/mL)

各 20  $\mu\text{L}$  同时滴加到凹玻片上,在 20 $^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下保湿培养,3 h 后在显微镜下观察萌发休止孢的数量,每个浓度重复 4 次,每重复计算 100 个休止孢的萌发率。

### 1.2.3 4 种作物根系对疫霉菌游动孢子的化感趋化作用

在直径 9 cm 的培养皿中放置已湿热灭菌的滤纸,将 4 种作物种子用 2.5% 次氯酸钠浸泡 5 min,无菌水冲洗 3 次,放置在无菌水润湿的滤纸片上,保湿培养至根系伸长约 20~30 mm。将植物根系放置在 U 型槽中,在槽中加入疫霉菌游动孢子悬浮液(浓度:  $1 \times 10^6$  个/mL),在 0、5、10、15、20 min 观察游动孢子对各种植物根系的趋化活性,并拍照统计。

不同作物根尖对疫霉菌游动孢子的化感趋化作用可根据不同时间孢子聚集的数量,按照下列公式计算出 CR 和  $T_0$ ,用 CR 和  $T_0$  表示疫霉菌孢子的趋化性<sup>[10]</sup>,即根系对疫霉菌孢子的吸引能力。CR>1 表示为吸引增多趋势;CR<1 表示为排斥减少趋势。

$T_0 > 0$  表示为吸引增多趋势; $T_0 < 0$  表示为排斥减少趋势。

CR=处理孢子总量/对照孢子总量;

$T_0 = (\text{处理孢子总量} - \text{对照孢子总量}) / (\text{处理孢子总量} + \text{对照孢子总量}) \times 100$ 。

### 1.3 数据统计与分析

针对不同处理的试验数据,采用 SPSS 数据分析软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米根系分泌物对游动孢子游动和休止孢萌发的影响

玉米根系分泌物对游动孢子游动和休止孢萌发都具有较强的抑制作用。玉米根系分泌物在最高浓度时,对疫霉菌休止孢萌发的抑制率高达 100%,而对游动孢子的游动,根系分泌物的抑菌活性高于 0.001 mg/mL 的 25% 啞菌酯 SC(表 1~2)。

表 1 玉米根系分泌物对疫霉菌游动孢子游动的影响<sup>1)</sup>

Table 1 Effect of maize root exudates on the zoospore of *Phytophthora nicotianae*

时间/min Time	根系分泌物浓度/mg · mL <sup>-1</sup> Concentration				CK	
	0.52	0.26	0.05	0.03	1% 甲醇 1% Methanol	0.001 mg/mL 25% 啞菌酯 SC 0.001 mg/mL azoxystrobin 25% SC
1	++	+++	+++	++++	++++	++++
2	++	++	+++	+++	++++	++++
5	+	+	++	++	++++	+++
10	-	-	+	+	++++	+++
15	-	-	-	-	++++	++
20	-	-	-	-	++++	+

1) 全部游动孢子静止为一;70%以上游动孢子静止为+;30%~70%的游动孢子静止为++;30%以下的游动孢子静止为+++;没有游动孢子静止为++++。

“-” indicates all zoospores stationary. “+” indicates more than 70% of the zoospore stationary. “++” indicates 30%–70% of the zoospore stationary. “+++” indicates less than 30% of the zoospore stationary. “++++” indicates no rest zoospores stationary.

表 2 玉米根系分泌物对疫霉菌休止孢萌发的影响<sup>1)</sup>

Table 2 Effect of maize root exudates on the germination of cystospore of *Phytophthora nicotianae*

浓度/mg · mL <sup>-1</sup> Concentration	芽管长度/ $\mu\text{m}$ Length of germ tube	抑制率/% Inhibition rate
CK	106.21 $\pm$ 11.69	-
2.59	0.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
0.52	6.57 $\pm$ 1.63	93.81 $\pm$ 1.53
0.26	12.01 $\pm$ 2.67	88.69 $\pm$ 2.52
0.05	57.64 $\pm$ 1.59	45.73 $\pm$ 14.97
0.03	71.63 $\pm$ 2.01	32.56 $\pm$ 18.95
回归方程	Y=1.443 0X+6.864 7	
EC <sub>50</sub> /mg · mL <sup>-1</sup>	0.051 0	

1) 表中数据为平均值 $\pm$ 标准差。

Data in the table are average $\pm$ SD.

### 2.2 大蒜根系分泌物对疫霉菌游动孢子游动和休止孢萌发影响

大蒜根系分泌物对疫霉菌游动孢子游动和休止孢萌发都具有很强的抑制作用。浓度 0.1 mg/mL 时,在 20 min 内能完全抑制游动孢子的游动,对休止孢萌发的抑制率达到了 70.45%(表 3~4)。

### 2.3 4 种作物根系对疫霉菌游动孢子的化感趋化作用

试验结果表明,玉米和大蒜根能吸引大量的游动孢子,且游动孢子在靠近玉米和大蒜根系之后停止游动,最终裂解(图 1)。茴香根、油菜根也表现出很强的吸引作用(图 2)。

表3 大蒜根系分泌物对疫霉菌游动孢子游动的影响<sup>1)</sup>

Table 3 Effect of garlic root exudates on the zoospore of *Phytophthora nicotianae*

时间/min	根系分泌物浓度/mg · mL <sup>-1</sup> Concentration						
	CK	0.0002	0.001	0.002	0.01	0.02	0.1
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
20	+++	+++	+++	+++	++	++	—
40	+++	+++	+++	+++	++	++	—
60	+++	+++	+++	+++	++	++	—
80	+++	+++	+++	++	++	+	—
100	+++	+++	++	++	++	+	—
120	+++	+++	++	++	++	—	—
140	+++	+++	++	++	++	—	—

1) 全部游动孢子静止为一; 70%以上游动孢子静止为+; 30%~70%的游动孢子静止为++; 30%以下的游动孢子静止为+++; 没有游动孢子静止为++++。

“—” indicates all zoospores stationary. “+” indicates more than 70% of the zoospore stationary. “++” indicates 30%—70% of the zoospore stationary. “+++” indicates less than 30% of the zoospore stationary. “++++” indicates no rest zoospores stationary.

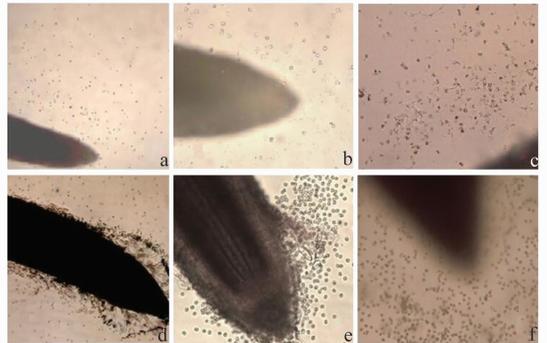
表4 大蒜根系分泌物对疫霉菌休止孢萌发的影响<sup>1)</sup>

Table 4 Effect of garlic root exudates on the germination of cystospore of *Phytophthora nicotianae*

根系分泌物浓度/mg · mL <sup>-1</sup> Concentration	萌发率/% Germination rate	抑制率/% Inhibition rate
CK	(89.00±9.05)a	—
0.001	(88.75±10.01)a	0.25±0.43
0.006	(82.23±6.05)b	7.60±3.99
0.01	(80.75±7.59)b	9.27±4.04
0.06	(68.38±4.78)c	23.17±5.26
0.1	(26.30±5.02)d	70.45±5.54

1) 表中数据为平均值±标准差, 同列不同小写字母表示不同处理之间在0.05水平存在显著差异(n=4)。

Data in the table are the means±SD, The different small letters in the same column indicate significant difference among treatments at 0.05 level (n=4).



a~c: 大蒜; d~f: 玉米  
a~c: Garlic; d~f: Maize

图1 玉米和大蒜根系对疫霉菌游动孢子化感趋化作用  
Fig. 1 Chemotaxis effect of corn and garlic root system on zoospores of *Phytophthora nicotianae*

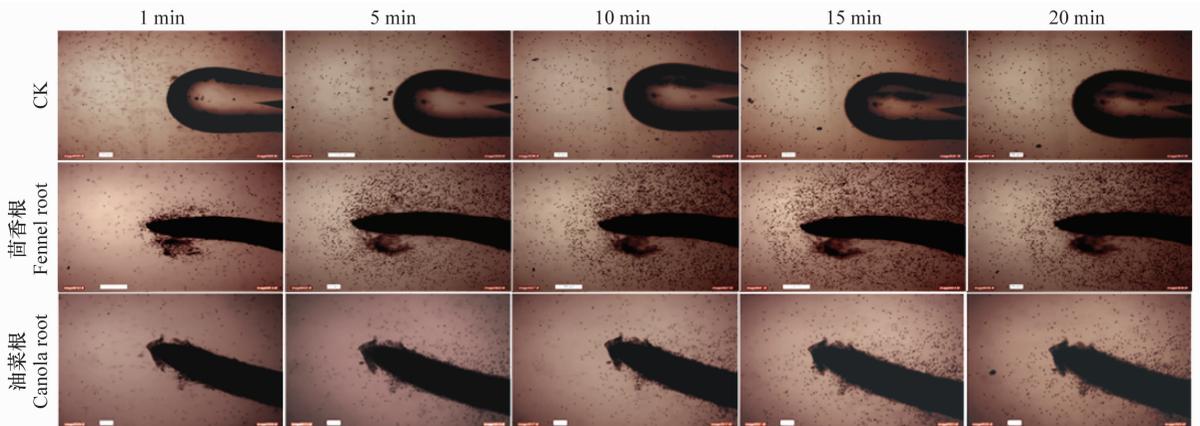


图2 茴香和油菜根系对疫霉菌游动孢子化感趋化作用

Fig. 2 Chemotaxis effect of fennel and canola root system on zoospores of *Phytophthora nicotianae*

通过比较4种作物根系周围游动孢子数目与对照的差异, 定量分析根系对游动孢子的趋化作用。结果表明, 茴香根系在处理10 min时, 油菜根系在

处理5 min时对疫霉菌游动孢子的吸引活性最强,  $T_0$  最高分别为76.3、68.7(表5)。其次, 大蒜、玉米对游动孢子的吸引活性较弱。

表5 不同作物根系对疫霉菌游动孢子的化感趋化活性

Table 5 Chemotactic activities of different roots against zoospores of *Phytophthora nicotianae*

时间/min Time	玉米 Maize		大蒜 Garlic		茴香 Fennel		油菜 Canola	
	CR 值	T <sub>0</sub> 值	CR 值	T <sub>0</sub> 值	CR 值	T <sub>0</sub> 值	CR 值	T <sub>0</sub> 值
1	0.9±0.1	-6.3±3.5	1.0±0.0	0.0±0.0	2.3±0.4	38.9±6.8	3.9±1.9	59.4±16.8
5	1.0±0.0	-0.9±0.6	1.4±0.3	15.6±11.7	4.8±1.3	65.4±7.8	5.4±1.7	68.7±7.4
10	1.1±0.0	5.5±2.1	1.7±0.5	23.5±14.2	7.4±2.9	76.3±6.6	3.4±4.2	54.5±18.6
15	1.3±0.1	13.7±4.4	1.7±0.5	24.6±14.3	6.7±2.0	74.2±6.5	—	—
20	1.4±0.1	16.6±4.7	1.7±0.5	25.4±14.2	5.9±2.7	70.9±9.0	—	—

### 3 讨论

#### 3.1 根系分泌物与烟草疫霉菌的化感效应

植物根系分泌物的产生是植物根部长长期进化的结果,是适应环境的一种体现,不是一个完全被动的过程,根系分泌物介导的植物-微生物互作关系变化对于土壤肥力、健康状况,以及植物生长发育有着极其重要的作用,植物的他感作用、连作障碍、连作促进或是间套作增产等都是由其根系分泌物介导的植物与特异微生物共同作用的结果<sup>[11]</sup>。文献研究报道利用 HPLC-MS 在玉米组织和根系分泌物中均检测到苯并噁类化合物丁布及其降解产物门布的存在,并证明门布对烟草疫霉的菌丝生长也具有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>;大蒜品种的根系分泌物对黄瓜枯萎病菌和西瓜枯萎病菌菌丝生长及孢子萌发均表现出抑制作用<sup>[12]</sup>;油菜根系分泌物对不同作物及不同生长特性的化感效应具有不同的选择性,合理搭配油菜作物的间、套、轮作是其取得优质、高产栽培的关键技术<sup>[13]</sup>。

本文以烤烟种植易感黑胫病为重点,通过对玉米、大蒜、油菜和茴香的根系分泌物对烟草疫霉的抑菌活性分析研究,发现4种作物根系的分泌物对游动孢子游动和休止孢萌发都有不同程度的抑制特性;观察4种作物根系对疫霉菌游动孢子的化感趋化作用,发现4种作物均能吸引大量的游动孢子,且游动孢子在靠近根系之后停止游动,最终裂解,其中茴香、油菜对疫霉菌游动孢子的吸引活性最强。

#### 3.2 作物多样性种植模式对病害的控制应用

本文对多种植物轮作控病原理进行研究,玉米、大蒜、油菜和茴香根系分泌物均能有效地杀灭土壤中病原菌,减少烤烟种植期间病原菌的初侵染来源,有效地控制黑胫病的危害。而利用作物根系能分泌化感物质的特性进行合理的轮作或间作,对实现烤烟病害的生态防控起到积极的推动作用。如在烤烟种植过程中,可采用烤烟—油菜(小春)—烤烟轮作、烤烟—玉米(大春)—油菜(小春)—烤烟轮作等模式,或开展烤烟—玉米(大春)—油菜(小春)—烤烟

轮作模式,来降低黑胫病的危害,提高烟叶的品质和产量,达到控病增产的效果。

本研究为建立“以生物多样性为基础,克服烟草土传病害连作障碍”的病害防治提供了探索的新模式,而利用生物多样性模式的长效控病机制,最终形成简便、有效的克服烟草土传病害的生物多样性综合防病措施将是未来绿色农业发展的重要方向。

### 参考文献

- [1] JACOB VAN BREDA DE HAAN. de Bibitziekte in de Deli-Tabak: Veroorzaakt Door *Phytophthora nicotianae* [M]. Batavia-'s Gravenhage, G. Kolff & Co., 1896.
- [2] 简忠龙,郭怡卿,浦勇,等. 病虫害生物防治技术最新研究进展[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(2): 90-94.
- [3] 李汛,段增强. 植物根系分泌物的研究方法[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 540-547.
- [4] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报, 2014, 38(3): 298-310.
- [5] 张立猛,方玉婷,计思贵,等. 玉米根系分泌物对烟草黑胫病菌的抑制活性及其抑菌物质分析[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(1): 115-122.
- [6] 廖静静,张立猛,张潇丹,等. 大蒜类似根缘细胞生物学特性及其对辣椒疫霉菌的抑制活性[J]. 植物保护, 2015, 41(5): 39-45.
- [7] 涂书新,孙锦荷,郭智芬,等. 植物根系分泌物与根际营养关系评述[J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 64-67.
- [8] NEUMANN G, GEORGE T S, PLASSARD C. Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox [J]. Plant and Soil, 2009, 321(1/2): 431-456.
- [9] TANG C S, YOUNG C C. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of big-alta limpograss (*Hemarthria altissima*) [J]. Plant Physiology, 1982, 69(1): 155-160.
- [10] 朱书生,杨敏,邓维萍,等. 一种利用玉米根系与疫霉菌相克原理生态控制作物疫病蔓延的方法:CN104429479A [P]. 2015-03-25.
- [11] EISENHAUER N, SCHEU S, JOUSSET A. Bacterial diversity stabilizes community productivity [J]. PLoS ONE, 2012, 7(3): e34517.
- [12] 周艳丽,王艳. 大蒜根系分泌物的化感作用[J]. 应用生态学报, 2011, 22(5): 1368-1372.
- [13] 杨瑞吉. 油菜根系分泌物对不同作物幼苗生长的化感效应[J]. 生态环境, 2006, 15(5): 1062-1066.