

研究报告

AM 真菌对青枯菌的抑制和对酚类物质的影响

朱红惠¹ 姚青² 李浩华¹ 羊宋贞¹(广东省微生物研究所 广州 510070)¹ (华南农业大学园艺学院 广州 510642)²

摘要:以青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 为供试病原菌,研究接种 AM 真菌 *Glomus versiforme* 后根系酚类物质含量的变化及其对病原菌数量的影响。结果表明,在接种 *R. solanacearum* 前4周接种 *G. versiforme* 可以抑制病原菌,降低根际、根面和木质部中病原菌的数量,降幅分别达到26.7%、79.3%和81.7%。*G. versiforme* 降低 *R. solanacearum* 数量与根系酚类物质含量的变化有关,单独接种 *G. versiforme* 或 *R. solanacearum* 可以提高可溶性酚和壁结合态酚的含量,但是前者的可溶性酚增加幅度大于后者,而壁结合态酚增加幅度小于后者。

关键词: AM 真菌, 青枯菌, 酚类物质

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0001-05

INHIBITION OF RALSTONIA SOLANACEARUM BY AM FUNGUS GLOMUS VERSIFORME AND THEIR EFFECT ON PHENOLS IN ROOT

ZHU Hong-Hui¹ YAO Qing² LI Hao-Hua¹ YANG Song-Zhen¹(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)¹(South China Agricultural University, Guangzhou 510642)²

Abstract: With *Ralstonia solanacearum* as pathogen, the change of phenols in root and their effect on the pathogen population after inoculation of an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus, *Glomus versiforme* Berch., was investigated. Results indicated that *G. versiforme* inoculation, 4 weeks before pathogen inoculation, significantly decreased the pathogen population in the rhizosphere, on the root surface and in the xylem, by 26.7%, 79.3% and 81.7%, respectively. It was suggested that the inhibition of *R. solanacearum* was contributed to the increased phenols in root. Inoculation of both *G. versiforme* and *R. solanacearum* promoted the soluble phenols and the cell wall-bound phenols contents. Compared with the pathogen inoculation, AM fungal inoculation increased the soluble phenols content at a higher magnitude, while increased the cell wall-bound phenols content at a lower magnitude.

Key words: *Glomus versiforme*, *Ralstonia solanacearum*, Phenols

AM 真菌是一类土壤共生真菌,能够与绝大多数的陆地植物结成共生体—AM 菌根^[1]。许多研究已经证实了 AM 真菌能够显著促进宿主植物对土壤养分的吸收,进而促进植物生长发育,即 AM 菌根的营养效应。近 20 年来,随着研究范围的扩大,AM 菌根的非营养效应越来越引起关注,尤其是 AM 真菌与其他土壤微生物的关系成为研究热点,其中的大量研究涉及了 AM 真菌与病原菌之间的互作。

刘润进等人^[2]发现,AM 真菌侵染可以激发宿主植物根系产生病程相关蛋白

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30000006)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30000006)

收稿日期: 2003-01-20, 修回日期: 2003-03-01

(PRs), 从而有可能抑制病原菌; 胡正嘉等人^[3]的研究发现, 接种 AM 真菌能够改变植物根际微生物群落及几丁质酶活性, 抑制病原微生物。上述研究表明, AM 真菌通过影响宿主植物根系生理生化过程或根际微生态环境而影响病原菌。Folion 等人^[4]利用 Ri T-DNA 转化胡萝卜根双重培养技术研究了 AM 真菌外生菌丝与根际微生物的直接互动, 发现 *Glomus intraradices* 外生菌丝的分泌物能够促进 *Trichoderma harzianum* 的分生孢子萌发和 *Pseudomonas chlororaphis* 的增殖, 抑制 *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* 的分生孢子萌发, 而对 *Clavibacter michiganensis* 没有影响, 很有意思的是 *T. harzianum* 与 *P. chlororaphis* 恰恰是土壤益菌, 而 *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* 恰恰是病原菌。由此可见, AM 真菌不仅对微生物有间接作用, 还有直接的互动, 而这种互动可能抑制病原菌。本研究以青枯菌为对象, 研究 AM 真菌对其种群数量和根系酚类物质的影响, 探讨 AM 真菌诱导的根系酚类物质变化在病原菌种群数量变化中的作用, 为利用 AM 真菌控制植物病原菌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料: 选用番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 为供试植物。

1.1.2 AM 真菌: 以 *Glomus versiforme* Berch. 为供试菌根真菌, 该菌种在玉米植株上共生保存和增殖。所用的接种剂为土壤基质、菌丝、孢子和侵染根段的混合物。

1.1.3 青枯菌: *Ralstonia solanacearum* 由华南农业大学提供, 进行利福平抗性诱导后用于试验。

1.2 方法

1.2.1 植株培养: 番茄种子用 10% H_2O_2 灭菌 15min, 在滤纸上 28℃ 催芽 24h 后播于育苗盘中。小苗长至 2 片真叶时移栽, 每盆 2 株, 栽培介质为红壤、菇泥和河沙的混合物 (体积比为 1: 1: 1), 每盆装 860g。

设对照 (CK)、接种青枯菌 (R)、接种 AM 真菌 (M)、接种青枯菌和 AM 真菌 (R + M) 4 个处理, 每个处理设 3 次重复。接种 AM 真菌的两个处理在移栽时进行, 接种剂量为栽培介质重量的 5%; 接种青枯菌的两个处理在移栽后 4 周进行, 用 20mL 青枯菌悬液 (1 (108 CFU/mL) 灌根。植株生长在网室中, 接受自然光照, 生长期间温度在 25℃ ~ 32℃ 之间。为了排除 AM 真菌的养分效应对植株生长和病原抑制所造成的差异, 未接种 AM 真菌的两个处理不定期浇 Hoagland 完全营养液, 共 10 次, 每次 20mL。移栽后 6 周取样测定。

1.2.2 取样方法: 用 70% 乙醇擦拭茎基部进行灭菌, 以灭菌的安全刀片从茎基部处取 1cm 长茎段, 削去表皮后加无菌水充分研磨, 在利福平选择性培养基上测定青枯菌数量; 根面和根际青枯菌数量按常规方法取样, 在利福平选择性培养基上测定青枯菌数量。

1.2.3 测定方法: 植株地上部烘干至恒重后测定生物量。取出根系后洗净, 部分根样染色后用方格交叉法测定菌根侵染率^[5]。按宋凤鸣等^[6]的方法, 取 1.0g 根, 用无水乙醇和三氯乙酸匀浆后冰浴 24h, 14,000 r/min 离心 10min, 上清液用三氯乙酸定容 50mL, 以没食子酸为标样计算可溶性酚含量; 取 0.25g 烘干根样, 3% (W/V) SDS 匀浆, 4,000r/min 离心 5min 后用乙醇、丙酮和乙醚洗涤各 1 次, 样品风干后用 3mL 0.5 mol/L

NaOH 水解 16h, 加水至 5mL 后 10,000 r/min 离心 5min, 沉淀加 4mL 0.5 mol/L NaOH 在 80℃ 水浴中水解 16h, 离心后取上清液 1.6mL, 用 2.5N HCl 调节 pH 至 8, 再加水至 2.5mL (A 液), 另取 0.5mL 上清液, 加 2.5mL 0.06N NaOH (B 液), 以 B 液为参比测定 A 液的 OD₂₄₅ 和 OD₃₄₀, 分别表示壁结合态简单酚和壁结合态酚聚合物的含量。

2 结果与分析

2.1 各处理的菌根侵染率和生物量

由于气候条件不适宜, 接种青枯菌的两个处理并未出现青枯病症状。与之相对, 接种 AM 真菌的两个处理中植株均有菌根侵染, 单独接种 AM 真菌的植株根系侵染率为 34.9%, 而 AM 真菌和青枯菌双重接种的植株根系侵染率较高, 达到 47.5% (表 1)。这表明, 接种青枯菌可能增加了 AM 真菌的侵染点或者在皮层内的扩展。

为了排除 AM 真菌促进根系吸收养分而引起处理间植株生长的差异, 本试验对不接种 AM 真菌的处理施用营养液。表 1 中各处理植株的地上部干重没有显著差异, 表明营养液确实排除了生长差异, 从而保证了 AM 真菌对病原菌的抑制不是其养分效应引起的。

2.2 AM 真菌对青枯菌种群数量的影响

为了明确接种 AM 真菌是否对青枯菌的种群数量产生影响, 本研究利用利福平选择性培养基测定了番茄根际、根面和茎基部木质部中的青枯菌数量。表 2 的数据表明, 没有接种青枯菌的 CK 和 M 两个处理中均未检测到抗利福平的青枯菌存在, 而接种青枯菌的两个处理 R 和 R+M 中都发现青枯菌。在两个接种青枯菌的处理中, 根面的青枯菌数量最多, 根际土壤中的青枯菌数量次之, 木质部中青枯菌数量最少; 与 R 处理相比, R+M 处理中根面和木质部的青枯菌数量均显著降低, 根际青枯菌略有降低。根面的青枯菌数量由 4.75×10^6 CFU/g 降至 1.41×10^6 CFU/g, 降幅达 70.3%; 木质部中的青枯菌数量由 11.67×10^3 CFU/cm 降至 2.13×10^3 CFU/cm, 降幅为 81.7%。这表明 AM 真菌对青枯菌有拮抗作用, 接种 AM 真菌能够减少根面和木质部中的青枯菌种群数量, 为减轻病害奠定基础。

2.3 AM 真菌对根系酚类物质含量的影响

接种青枯菌或 AM 真菌均引起番茄根系的苯丙烷代谢的变化, 使得根系中各种酚类物质含量发生改变。由表 3 可以发现, 根系的可溶性酚、细胞壁结合态酚的含量都因接种青枯菌或 AM 真菌而增加。对于可溶性酚而言, R 处理的含量稍有增加, 这是植物对病原菌作出的防护反应; M 处理的含量则大幅度增加, 表明番茄植株对接种 AM 真菌也产生防护性反应; R+M 处理的含量介于两者之间, 表明接种青枯菌和 AM 真菌没有产生累加效应, 而是出现负互作, 降低了单独接种 AM 真菌而激发的高含量可溶性酚。

表 1 各处理中植株的菌根侵染率和地上部干重

处理	菌根侵染率 (%)	地上部干重 (g)
CK	0	5.76a
R	0	5.60a
M	34.9a	5.63a
R+M	47.5a	6.12a

注: 同列 4 个处理中具有相同字母的数据差异不显著
($P=0.05$ LSD)

表 2 接种 AM 真菌对青枯菌种群数量的影响

处理	木质部 ($\times 10^3$ cfu/cm)	根面 ($\times 10^6$ cfu/g FW)	根际 ($\times 10^5$ cfu/g FW)
CK	0	0	0
R	11.67b	4.75b	10.1a
M	0	0	0
R+M	2.13a	1.41a	7.4a
降幅	81.7%	70.3%	26.7%

注: 同列 4 个处理中具有相同字母的数据差异不显著
($P=0.05$ LSD)

显然，可溶性酚含量的增加是抑制青枯菌种群数量的重要因子之一。

表 3 接种 AM 真菌对根系中细胞壁结合态酚含量的影响

处理	可溶性酚		简单酚		酚聚合物	
	含量 (mg/g FW)	增加 幅度	含量 (OD ₂₄₅ /mg DW)	增加 幅度	含量 (OD ₃₄₀ /mg DW)	增加 幅度
CK	0.890 a	—	0.106 a	—	0.045 a	—
R	1.012 a	13.5%	0.182 b	71.7%	0.067 b	48.9%
M	1.631 b	83.1%	0.132 a	20.8%	0.053 a	17.8%
R + M	1.466 b	65.2%	0.161 ab	51.9%	0.061 ab	35.6%

注：同列 4 个处理中具有相同字母的数据差异不显著（ $P=0.05$, LSD）

根系细胞壁中的结合态酚也因接种 AM 真菌或青枯菌而在不同处理间产生差异。由表 3 可见，细胞壁中的简单酚和酚聚合物含量具有相同的趋势，4 种处理根系中简单酚和酚聚合物的含量排序为：R > M + R > M > CK，表明接种 AM 真菌或青枯菌不同程度地细胞壁中酚类物质的累积，有利于限制外来侵染的进一步扩展。接种 AM 真菌的根系中简单酚含量显著地高于对照根系，但接种 AM 真菌和青枯菌的根系中简单酚含量却略低于接种青枯菌的根系；酚聚合物的情况也是如此。与根系的可溶性酚相似，接种 AM 真菌和接种青枯菌两种处理也没有出现加性效应，而是产生负的互作，使得 R + M 处理的根系细胞壁结合态酚含量低于 R 处理的根系。

表 3 的数据表明，接种 AM 真菌和接种青枯菌对根系中可溶性酚和壁结合态酚的影响并不一致。接种青枯菌使得壁结合态酚大幅度增加，可溶性酚增加的幅度较小；而接种 AM 真菌正相反，使得可溶性酚大幅度增加，壁结合态酚的增加幅度较小。这暗示着病原菌与共生菌在激发植物防御反应上的差异。

3 讨论

AM 真菌抑制病原菌的作用机理很多，促进植物对土壤中矿质营养，尤其是磷的吸收，改善植株的生长发育状况是其中的一个主要原因。Reuveni 等^[7]曾经报道了玉米叶面喷施 KH_2PO_4 诱导植株对 *Puccinia sorghi* 产生系统抗性，并促进植株的生长发育。在本研究中，我们用补充营养液的措施来排除接种和不接种 AM 真菌两种处理的植株间营养水平差异，使得植株的生长状况基本一致（表 1），从而排除了植株营养状况对病原菌数量的影响。

在本试验对根际、根面和茎基部处木质部中 *R. solonacearum* 数量的测定结果表明，AM 真菌能够显著降低病原菌的数量，但是其降低幅度在不同部位存在差异。木质部中 *R. solonacearum* 的降低幅度最大，根面次之，根际的降低幅度最小，这可能与 *G. versiforme* 在不同部位对 *R. solonacearum* 的抑制机理不同有关。在根际，AM 真菌可能通过改变根际微生物群落结构、分泌抑制物质等途径起作用，由于根际环境的复杂性而有所削弱；在根内，则是通过酚类物质^[8]、PRs^[2]等抗菌物质的诱导途径起作用，且是 *R. solonacearum* 进入导管的必经之地，因而抑制效果明显。St-Arnaud 等人^[9]在病原真菌上也发现类似现象，*Glomus intraradices* 使根际 *Pythium ultimum* 的数量降低 10 倍，而且证实磷营养并未起到任何抑制作用。这些结果表明，AM 真菌可以通过非营养效应途径来抑制病原菌。

植株在受到病原菌的侵染后会产生一系列的生理生化反应，以控制病原菌的进一步侵染，其中酚类物质的累积是其中一种较为普遍的反应。本研究表明，接种 *G. ver-*

siforme 或 *R. solonacearum* 能够引起植株根系酚类物质含量的改变。接种 *R. solonacearum* 后, 根系中可溶性酚和细胞壁结合态酚的含量显著增加, 与这一普遍规律相吻合; 接种 *G. versiforme* 也能够显著地提高根系中可溶性酚和细胞壁结合态酚的含量, 这应该是本试验中接种 *G. versiforme* 抑制 *R. solonacearum* 的主要原因。Grandmaison 等人^[8]对 *G. versiforme* 诱导的洋葱根系中酚类物质进行了鉴定, 发现可溶性酚和壁结合态酚主要包括阿魏酸、芥子酸、香豆酸、阿魏酰酉各胺及其糖苷化合物。比较植株对接种病原菌或 AM 真菌的反应可以发现, 病原菌处理的根系中可溶性酚含量高于 AM 真菌处理的根系, 而细胞壁结合态酚含量则低于 AM 真菌处理的根系, 这种差异是否具有普遍性有待于进一步研究。由于细胞壁结合态酚, 尤其是酚聚合物, 可以促进细胞壁木质化、木栓化, 降低了细胞壁多糖对病原菌分泌的降解酶的敏感性^[10], 而可溶性酚则对病原菌具有较强的毒害作用, 因此, 接种 AM 真菌所引起的酚类物质含量变化必然导致病原菌数量降低。与此相对应, 作为植物根系的共生真菌, AM 真菌具有一系列克服根系防御系统的机制, 使得自身能够在根系生长。在同时双接种处理中, 由于先接种 *G. versiforme*, 4 周后再接种 *R. solonacearum*, 因此, *G. versiforme* 所引起的酚类物质含量变化大大降低了 *R. solonacearum* 的数量, 使得细胞壁结合态酚的含量低于青枯菌处理。本研究同时表明, 在病原菌侵染之前接种 AM 真菌是获得良好防效的前提。本研究明确表明接种 AM 真菌能够引起酚类物质含量的变化, 这种诱导效应是局域性的还是系统性的; 如果是系统性的, 那么信号物质是什么等问题, 仍然需要深入研究。

参 考 文 献

- [1] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed. London: Academic Press, 1997, 22 ~ 32.
- [2] 刘润进, 沈崇尧, 李怀方, 等. 植物病理学报, 1993, 23 (2): 162 ~ 167.
- [3] 胡正嘉, 王 平. 土壤学报, 1994, 31 (增刊): 212 ~ 217.
- [4] Filion M, St-Arnaud M, Fortin J A. New Phytologist, 1999, 141: 525 ~ 533.
- [5] Yao Q, Li X L, Feng G, et al. Plant and Soil, 2001, 230: 279 ~ 285.
- [6] 宋凤鸣, 郑 重, 葛秀春. 应用与环境生物学报, 1997, 3 (1): 71 ~ 75.
- [7] Reuveni R, Agapov V, Reuveni M. Plant Pathology, 1994, 43: 245 ~ 250.
- [8] Grandmaison J, Olah G M, Calsteren M R V, et al. Mycorrhiza, 1993, 3: 155 ~ 164.
- [9] St-Arnaud M, Hamel M, Caron M, et al. Canadian Journal of Plant Pathology, 1994, 16: 187 ~ 194.
- [10] Modafar C E, Tantaoui A, Boustani E E. Journal of Phytopathology, 2000, 148: 405 ~ 411.