

研究报告

丛枝菌根真菌与深色有隔内生真菌对姜瘟病的防效及抗病机理初探

汪茜¹, 覃晓娟², 陈廷速¹, 周生茂^{*3}, 宋娟^{*1}

1 广西农业科学院微生物研究所, 广西 南宁 530007

2 广西农业科学院, 广西 南宁 530007

3 广西农业科学院蔬菜研究所, 广西 南宁 530007

汪茜, 覃晓娟, 陈廷速, 周生茂, 宋娟. 丛枝菌根真菌与深色有隔内生真菌对姜瘟病的防效及抗病机理初探[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 788-801.

WANG Qian, QIN Xiaojuan, CHEN Tingsu, ZHOU Shengmao, SONG Juan. Preventive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes on ginger and the anti-disease mechanism[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 788-801.

摘要:【背景】青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, R.S)引发的姜瘟病是生姜产业发展的瓶颈问题。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, AMF)与深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE)是两类重要的共生微生物。【目的】前期研究发现, AMF 与 DSE 可提高生姜对姜瘟病的抗性, 但其抗病机制尚不清楚, 极大地限制了利用这两类共生真菌对该病的防治。【方法】在温室条件下做盆栽试验, 以生姜组培苗为材料, 设立接种 AMF、DSE 和不接种 AMF、DSE 的对照(CK)处理, 并在上述处理下的植物生长 4 周后淋入病原菌液, 病原菌接种 1 周后, 通过测定菌根侵染率、发病率、叶绿素含量、光合指标、磷(P)含量、防御性酶活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 研究 AMF 和 DSE 互作对病原菌侵染后生姜生长和生理生化指标的影响。【结果】AMF 和 DSE 分别使姜瘟病发病率降低了 45.27%和 52.04% ($P<0.05$)。AMF+DSE 组合处理抑病效果更好, 发病率较对照降低 60.87% ($P<0.05$)。AMF、DSE 及二者共同作用的防效分别为 62.54%、59.02%和 68.50%。植物防御性酶活性表明, AMF 显著提高了生姜超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性, 分别提高 10.87%、1.15%、13.26%和 0.14%; DSE 显著提高 SOD、POD、CAT 和 PPO 活性, 分别提高 9.85%、17.47%、3.64%和 0.67%; AMF 与 DSE 互作显著提高 SOD、POD、CAT 和 PPO 活性, 分别提高 15.76%、18.19%、18.11%和 14.93% ($P<0.05$); MDA 含量在 AMF、DSE 和二者互作条件

资助项目: 广西壮族自治区科技基地和人才专项(桂科 AD20159001); 广西壮族自治区科技计划项目(桂科 AB21238002); 广西农业科学院科技发展基金(桂农科 2022JM59)

This work was supported by the Science and Technology Base and Talent Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AD20159001), the Science and Technology Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AB21238002), and the Guangxi Academy of Agricultural Science and Technology Development Fund (2022JM59).

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Shengmao, maomaozhou70@gxaas.net; SONG Juan, songjuan@gxaas.net

Received: 2022-08-17; Accepted: 2022-09-08; Published online: 2022-10-19

下分别显著降低了 3.38%、9.31%和 25.79% ($P<0.05$)。【结论】AMF 和 DSE 对姜瘟病有较好的防效, 不仅能提高生姜幼苗的抗病能力, 还能促进其生长, 且二者共存时效果最好。

关键词: 生姜; 青枯劳尔氏菌; 丛枝菌根真菌; 深色有隔内生真菌

Preventive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes on ginger and the anti-disease mechanism

WANG Qian¹, QIN Xiaojuan², CHEN Tingsu¹, ZHOU Shengmao^{*3}, SONG Juan^{*1}

1 Microbiology Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

2 Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

3 Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: [Background] Ginger wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (R.S) is a bottleneck in the development of the ginger industry. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and dark septate endophytes (DSE) are two kinds of important symbiotic microorganisms. [Objective] To explore the mechanism of AMF and DSE against ginger wilt. The previous study found that AMF and DSE could improve the resistance of ginger wilt, however, the synergic functioning mechanism was unclear, which limited the application of the two kinds of fungi to control the disease. [Methods] The pot experiments were carried out at room temperature with ginger-cultured seedlings as the material. The control (CK) treatment inoculated with AMF and DSE and without AMF and DSE were set up. After 4 weeks of growth under the above treatment, the plants were eluted with pathogen solution. One week after pathogen inoculation, the effects of AMF and DSE on the ginger growth and physiological and biochemical indexes infected with the pathogen were studied by determining the mycorrhizal infection rate, incidence, chlorophyll content, photosynthetic index, phosphorus (P) content, defensive enzyme activity, and malondialdehyde (MDA) content. [Results] AMF and DSE reduced the incidence of ginger wilt in ginger by 45.27% and 52.04%, respectively ($P<0.05$). AMF+DSE had a better effect on the prevention and control of this disease, and the incidence was reduced by 60.87% as compared with the control ($P<0.05$). The preventive effects of AMF, DSE, and AMF+DSE were 62.54%, 59.02%, and 68.50%, respectively. The activity of plant defensive enzymes indicated that AMF significantly increased the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and polyphenol oxidase (PPO) by 10.87%, 1.15%, 13.26%, and 0.14%, respectively. DSE significantly increased the activities of SOD, POD, CAT, and PPO by 9.85%, 17.47%, 3.64%, and 0.67%, respectively. AMF+DSE significantly increased the activities of SOD, POD, CAT, and PPO by 15.76%, 18.19%, 18.11%, and 14.93%, respectively ($P<0.05$). AMF, DSE, and AMF+DSE significantly decreased the content of MDA by 3.38%, 9.31%, and 25.79%, respectively ($P<0.05$). [Conclusion] AMF and DSE have preventive effects on ginger wilt, which improve the disease resistance of ginger seedlings and promotes their growth, and

the combination of AMF and DSE manifests the optimal effect.

Keywords: ginger; *Ralstonia solanacearum*; arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); dark septate endophytes (DSE)

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是我国重要的经济作物,随着种植面积的不断扩大,姜瘟病的发生也日趋严重。姜瘟病也叫青枯病,是生姜生产中最为严重的病害之一,其病原菌为青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*),是一种很严重的土传病害,能广泛侵染 200 多种寄主植物^[1],在全球大部分地区造成作物损失,尤其对我国生姜产业造成严重损失,常年减产达 30%–40%,重症田高达 90%以上甚至绝产,种姜全部腐烂^[2–4]。截至目前尚无针对这种病害的有效防治方法,如田间管理、抗病育种和杀菌剂的应用等仍然存在缺陷^[5–6]。实践证明,田间管理难以有效控制青枯病发生,抗病品种也很难做到,因为几乎 85%的生姜种植区均受到病原菌的侵染,并且尚无对这些病原菌具有抗性的生姜品种,而化学杀菌剂的使用会对环境产生负面影响,且长期使用易使病原菌产生抗药性。使用安全的生物制品是大势所趋。因此,利用有益微生物替代有害化学物质的过度使用已引起人们极大的关注^[7–8]。丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)能与大多数作物形成共生关系,是土壤微生物群落的重要组成部分,能够改善植物矿质营养^[9]、拮抗病原物、诱导植物抗病性^[10–11]、增强植物抗逆性和促进作物高产稳产^[12–13]。深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE)是广泛定殖于植物根细胞内或细胞间隙的小型土壤真菌,其特征是存在深色的有隔菌丝和微菌核结构,由于它们与 AMF 共存并保护植物免受不同胁迫的影响而越来越受到关注。一方面, DSE 能够促进寄主植物对矿质养分和有机养分的吸收^[14–15],甚至可以为寄主植物分解不溶性

的 P 元素^[16];另一方面,也能提高植物的抗逆和抗病能力^[17]。

关于 AMF 或 DSE 的生态功能已有广泛的研究和报道^[18],但对二者共同侵染作物后对作物的生长以及在病原菌胁迫下产生的一系列生理生化反应,目前还缺乏深入的研究。前期我们在开展生姜根系 AMF 侵染与姜瘟病关系研究中,观察到同一生姜根系内同时具有 AMF 和 DSE 结构,而且与青枯菌的发生发展可能存在一定关联。本研究旨在通过盆栽试验在根部对生姜接种青枯菌,探究生姜 AMF 和 DSE 与病原菌互作中 AMF 与 DSE 对生姜的生长以及对姜瘟病的抗病能力、根系侵染率、光合速率、防御酶活性的变化及丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度的影响,以期为进一步深入研究 AMF 与 DSE 的协同抗病机制,以及生姜复合微生物菌剂的研制和开发提供技术基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

生姜组培苗由广西农业科学院微生物研究所土壤微生物实验室提供。

供试病原菌青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*) Gg14,由广西大学袁高庆副教授惠赠。

供试 AMF 菌株网状球囊霉(*Glomus reticulatum*) LC39-10,菌株保藏号 CGMCC 10732,由广西农业科学院微生物研究所土壤微生物实验室分离保存。以三叶草为宿主扩大繁殖 4 个月,得到 AMF 侵染根段、菌丝、孢子及根外菌丝的沙土混合物作为菌剂,孢子密度约为 65 个孢子/g。

供试 DSE 菌株球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) FGJ-1, 由广西农业科学院微生物研究所土壤微生物实验室分离保存。菌株 FGJ-1 接种于马铃薯葡萄糖肉汤(potato glucose broth, PDB)培养液中, 25 °C、120 r/min 发酵培养 15 d, 将培养好的菌丝体用筛子(230 目, 63 μm)滤除发酵液, 并用无菌水冲洗 3 遍, 将冲洗干净的菌丝体置于搅拌机中, 加入 500 mL 无菌水破碎 40 s 制作菌丝悬浮液。

供试基质采用自然土, 土壤取自广西农业科学院试验田。

1.2 试验设计

试验处理包括单接种、双接种和三接种组合, 分别为 AMF (单接种 AMF 菌剂)、DSE (单接种 DSE 菌剂)、AMF+DSE (同时接种 AMF 菌剂和 DSE 菌剂)、CK (接入灭菌的 AMF 菌剂和 DSE 菌剂)、AMF+R.S (先接 AMF 菌剂, 4 周后接青枯菌菌液)、DSE+R.S (先接 DSE 菌剂, 4 周后接青枯菌菌液)、AMF+DSE+R.S (先接 AMF 菌剂和 DSE 菌剂, 4 周后接入青枯菌菌液)、R.S (单接种青枯菌菌液), 共 8 个处理组, 每个处理 6 个重复, 共 48 盆。

生长条件: 置于温室条件(温度范围为 20–26 °C, 相对湿度 65%–90%, 自然光照)中, 每隔 1 d 浇一次水。为减少外界因素干扰, 48 盆生姜在温室随机摆放, 隔天随机调换盆栽苗的位置。

接种方法^[19]: 在花盆内底部垫上和其底部大小一致的圆形塑料纸后, 放入大约 1/3 的灭菌基质, 然后每盆移栽 3 株生姜种苗; 在生姜根系附近放入 25 g/盆的 AMF 菌剂后(须保证生姜根系与 AMF 菌剂相接触), 继续往花盆倒入灭菌基质至花盆的 3/4, 保证培养基质没过生姜根系; 然后采用灌根的方法接种 DSE 菌剂 50 mL/盆; 植株在温室生长 4 周后, 将上述各处理接种青枯菌。灌根法接种, 每盆接种 50 mL 浓度为 10⁸ CFU/mL

的菌液; 不接种病原菌的处理以 50 mL 无菌水作为对照。将各处理姜苗套上塑料袋保湿 24 h。一周后测定生姜发病率、叶绿素含量、光合速率, 收获后测定根系侵染率、生物量及生理生化指标。

1.3 测定指标和方法

1.3.1 根系侵染率

将生姜根系反复用清水清洗干净后剪成长度为 2 cm 的根段, 然后加入 20% KOH 溶液使根系完全浸泡, 90 °C 水浴锅消解 10 min, 冷却后倒出 KOH 溶液, 用蒸馏水轻轻冲洗 3 次。再用碱性 H₂O₂ 脱色 60 min 后用蒸馏水冲洗 3 次。用 5% 的盐酸酸化 5 min 后倒出盐酸, 用蒸馏水清洗 3 次。再用 5% 的墨水醋酸液(Quink 牌纯黑墨水)在水浴锅里 66 °C 染色 30 min 后, 用蒸馏水浸泡 12 h。用蒸馏水冲洗后放在脱色液中脱色, 压片在显微镜下镜检、拍照^[4]。用根段观测法和网格十字交叉法进行观察和计数或脱色后根系转入方格培养皿中, 解剖镜下网格交叉法计数。

1.3.2 接种 AMF 和 DSE 对生姜生长发育的影响

以常规方法分别测定株高、叶片数、地上部分鲜重、地上部分干重和姜块质量。

1.3.3 生姜青枯病发病率和防效测定

生姜青枯病的病情分级标准^[20]见表 1。计算发病率、病情指数和防效的公式为:

发病率(%)=发病株数/调查总株数×100;

病情指数=[Σ(各病级株数×对应各级代表值)/(调查总株数×青枯菌最高级代表值)]×100;

防效(%)=[(对照病情指数 - 处理病情指数)/对照病情指数]×100。

1.3.4 接种 AMF 和 DSE 对生姜青枯菌数量的影响

小心取出根系, 收集附着在根系表面的土壤作为根际土, 土壤青枯病病原菌数量采用利福平选择性培养基(M-SMSA)培养计数^[21], 每克根际土中青枯菌数量的计算公式为:

表 1 生姜青枯病病情分级标准

Table 1 Ginger bacterial wilt disease classification standard

病情分级标准	症状表现
Grading standard	Symptom manifestation
0 级 Grade 0	全株无病 Whole plant disease-free
1 级 Grade 1	10%的叶片轻微变黄, 肉质茎无明显症状 10% leaves slightly yellowish, fleshy stems without obvious symptoms
3 级 Grade 3	11%–30%叶片变黄, 叶缘稍卷, 肉质茎出现水渍状斑 11%–30% yellow leaves, slightly rolled leaf margin, fleshy stems appear watery spots
5 级 Grade 5	31%–50%叶片变黄, 叶缘卷曲, 植株矮化, 肉质茎部分腐烂 31%–50% leaves yellowed, leaf margin curly, plant dwarf, fleshy stem partially rotten
7 级 Grade 7	51%以上叶片枯黄, 植株萎蔫, 肉质茎大部分腐烂 More than 51% leaves withered, plants withered, fleshy stems mostly rotted
9 级 Grade 9	植株枯死, 肉质茎腐烂或仅留丝状维管束 Plants dead, fleshy stems rot or only filamentous vascular bundles

青枯菌数(CFU/g)=同一稀释度 3 次重复的平均菌落数×稀释倍数/样品体积。

1.3.5 相关指标测定

叶绿素含量、光合速率和蒸腾速率测定^[22]: 收获前, 选择天气晴朗的上午 9–11 点, 从每盆植株中随机选取一株, 并选取该株植物中上部成熟叶片置于液氮罐中带回实验室。叶绿素含量测定采用丙酮乙醇混合液法; 光合速率等测定用光合分析仪。收获后采用常规方法测定植株含 P 量^[23]。

防御酶活性测定: 采样部位为从生姜植株顶端向下数第 3 片完全展开叶, 叶片清洗干浄后用于酶活性测定。采用氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 用紫外吸收法测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活性, 用愈创木酚法测定过氧化物酶(peroxidase, POD)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性^[24]。采用硫代巴比妥酸比色法^[25]测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。统计学分析采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)和 Fisher's 最小显著性差异(least significant difference, LSD)检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计

学意义。所有结果均以平均值±标准差(standard deviation, SD)表示。

2 结果与分析

2.1 姜瘟病发病率

接种病原菌 5 d 后, 姜瘟病显示典型的症状, 叶片凋萎, 叶色淡黄, 边缘卷曲, 最后死亡, 茎部染病, 呈暗紫色, 内部组织变褐腐烂(图 1), 平均发病率和病情指数分别为 47.26%和 34.33%。AMF 和 DSE 处理均不同程度地降低了姜瘟病发病率, 与对照 CK 相比, 接种 AMF、DSE 及二者共同作用使姜瘟病发病率分别降低 45.27%、52.04%和 68.50%, 降低病情指数分别为 62.54%、59.02%、60.87% ($P<0.05$) (图 2)。AMF、DSE 和二者共同作用对姜瘟病的防效分别为 62.54%、59.02%和 68.50%。

2.2 生姜根内 AMF 和 DSE 的定殖状况

显微观察测定结果表明, AMF、DSE 和 AMF+DSE 组合均能够侵染生姜根系, 但是不同处理对生姜根系的侵染率表现出一定的差异。AMF+DSE 处理的定殖率显著高于单独接种 AMF 或 DSE 处理, 表明 AMF 与 DSE 能够相互促进侵染发育(表 2)。

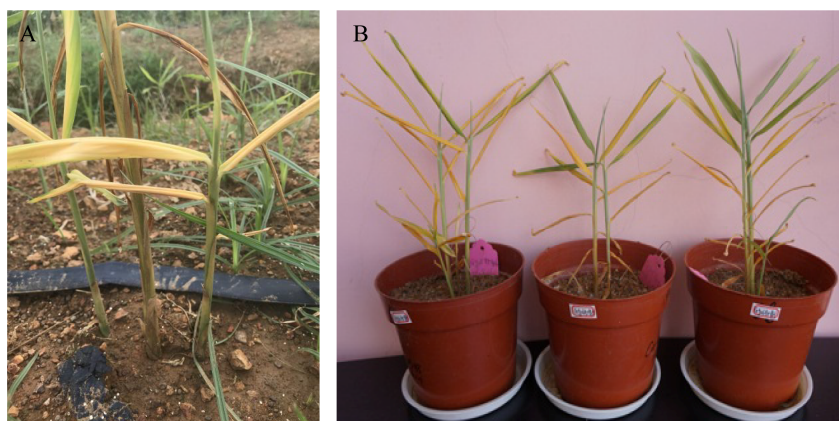


图 1 姜瘟病田间发病症状(A)及盆栽发病症状(B)

Figure 1 Field disease symptoms (A) and symptoms of potted disease (B) of ginger wilt.

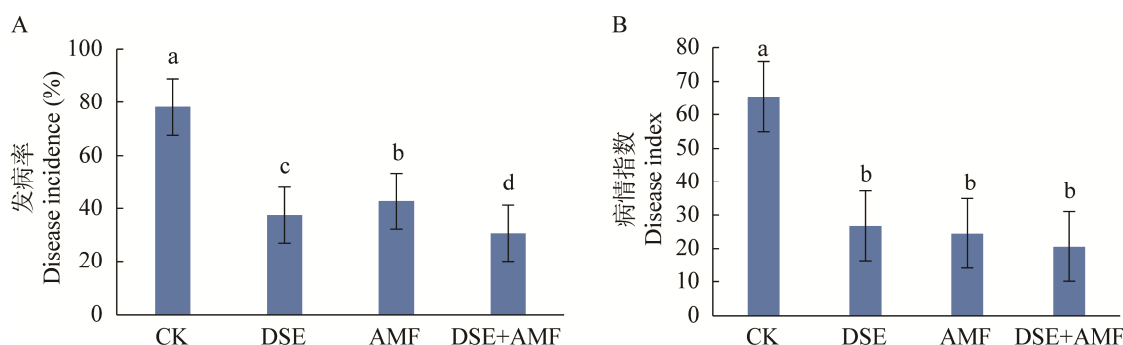
图 2 姜瘟病的发病率(A)和病情指数(B) 图中不同小写字母表示各处理差异显著($P<0.05$). 数值为平均值 \pm 标准差Figure 2 Disease incidence (A) and disease index (B) of ginger wilt. Different lowercase letters above the columns indicate significant differences at $P<0.05$. Values are means \pm SD.

表 2 不同处理对生姜根内 AMF 和 DSE 定殖的影响

Table 2 AMF and DSE colonization in ginger roots

处理 Treatment	AMF 定殖率 AMF colonization (%)	DSE 定殖率 DSE colonization (%)
CK	0	0
AMF (<i>Glomus reticulatum</i>)	40.50 \pm 6.85	0
DSE (<i>Chaetomium globosum</i>)	0	21.50 \pm 5.78
AMF+DSE (<i>G. reticulatum</i> + <i>C. globosum</i>)	55.10 \pm 5.27	24.60 \pm 3.33

2.3 接种 AMF 和 DSE 对生姜生长发育的影响

无论是单接种 AMF、DSE 还是都接种 AMF 和 DSE 后, 生姜株高、叶片数、地上鲜重、地上干重和姜块质量均有一定增加, 其

中, 株高分别较对照增加了 13.72%、10.04% 和 24.21% ($P<0.05$), 姜块质量分别较对照增加了 23.49%、19.11%和 49.19% ($P<0.05$) (表 3), 而且 AMF+DSE 组合处理的植株各项指标均显著高于对照。

表 3 不同处理对生姜生长发育的影响

Table 3 Effects of different treatments on ginger growth

处理	株高	叶片数	地上鲜重	地上干重	姜块质量
Treatment	Plant height	Leaf number	Aboveground fresh biomass	Overground dry weight	Tuber weight for ginger
CK	28.67±2.57b	8.33±0.58b	30.60±3.82c	8.71±0.72bc	26.45±3.48c
AMF	33.23±5.17ab	10.67±2.08ab	38.86±5.26ab	10.24±1.08b	34.57±9.00b
DSE	31.87±2.90ab	10.25±1.32ab	36.46±9.96bc	9.63±3.06bc	32.70±6.67b
AMF+DSE	37.83±2.33a	11.33±1.53a	47.65±2.20a	14.80±2.62a	52.06±10.25a

同列数据中不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$.

2.4 青枯菌对 AMF 和 DSE 定殖率的影响

由图 3 和表 4 可以看出, AMF 处理的侵染率为 35.5%, 根系中有大量 AMF 的菌丝、孢囊和孢子结构; DSE 处理的侵染率为 15.8%, 根系中

也发现 DSE 典型的有隔菌丝及微菌核结构; AMF+DSE 混合处理的侵染率为 67.7%, 根系中有 AMF 和 DSE 共同侵染的结构。AMF 与 DSE 共同侵染的定殖率显著高于其他处理(图 3, 表 4)。

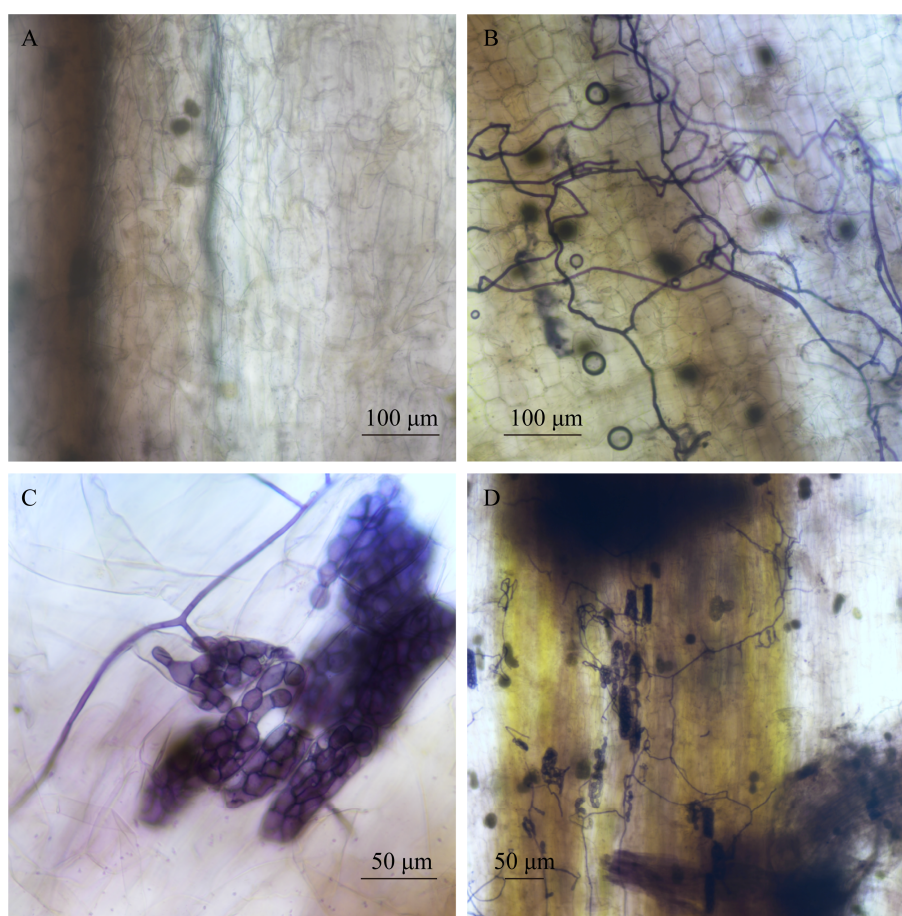


图 3 生姜根系侵染情况

Figure 3 The infection of AMF and DSE in ginger roots. A: R.S. B: AMF+R.S. C: DSE+R.S. D: AMF+DSE+R.S.

表4 接种青枯菌对 AMF 和 DSE 定殖生姜根系的影响

Table 4 Effect of *Ralstonia solanacearum* inoculation on roots of ginger colonized by AMF and DSE

处理	AMF 定殖率	DSE 定殖率
Treatment	AMF colonization (%)	DSE colonization (%)
R.S	0	0
AMF+R.S	35.50±4.36	0
DSE+R.S	0	15.80±5.65
AMF+DSE+R.S	46.10±5.27	21.60±3.43

2.5 AMF+DSE 组合对青枯菌繁殖的影响

平板培养计数结果表明, 接种 AMF、DSE 对生姜根际的青枯菌数量产生明显影响。AMF+R.S、DSE+R.S、AMF+DSE+R.S 处理的青枯菌种群数量显著低于只接种青枯菌(R.S)的植株(图 4), AMF+DSE 处理的根际青枯菌数量比对照低 88.2%, 表明接种 AMF 和 DSE 均能够抑制青枯菌在根际的定殖, 其中以 AMF+DSE 组合处理抑制青枯菌定殖的效果最好。

2.6 生姜抗病相关酶活性

由图 5-9 可以看出, 接种病原菌的生姜叶片 SOD、POD、CAT、PAL 和 PPO 活性均不同

程度地高于不接病原菌的处理。由图 10 可以看出, 病害显著增加生姜 MDA 浓度 28.68% ($P<0.05$)。

在不接种病原菌处理下, AMF、DSE 和二者互作分别提高生姜 SOD 活性 22.57%、11.89% 和 24.98% (图 5); 提高 POD 活性 17.28%、13.72% 和 35.43% (图 6); 提高 CAT 活性 21.54%、10.53% 和 22.43% (图 7); 提高 PAL 活性 8.57%、8.92% 和 18.26% (图 8); 提高 PPO 活性 4.14%、2.55% 和 5.74% (图 9); 降低 MDA 浓度, 降幅分别为 23.41%、21.04% 和 23.73%。

在接种病原菌的处理下, AMF、DSE 和二者互作分别提高生姜 SOD 活性 10.87%、9.85% 和 15.76% (图 5); 提高 POD 活性 1.15%、17.47% 和 18.19% (图 6); 提高 CAT 活性 13.26%、3.64% 和 18.11% (图 7); 提高 PAL 活性 13.01%、12.56% 和 23.64% (图 8); 提高 PPO 活性 0.14%、0.67% 和 14.93% (图 9)。降低生姜 MDA 浓度的降幅分别为 3.38%、9.31% 和 25.79% (图 10)。

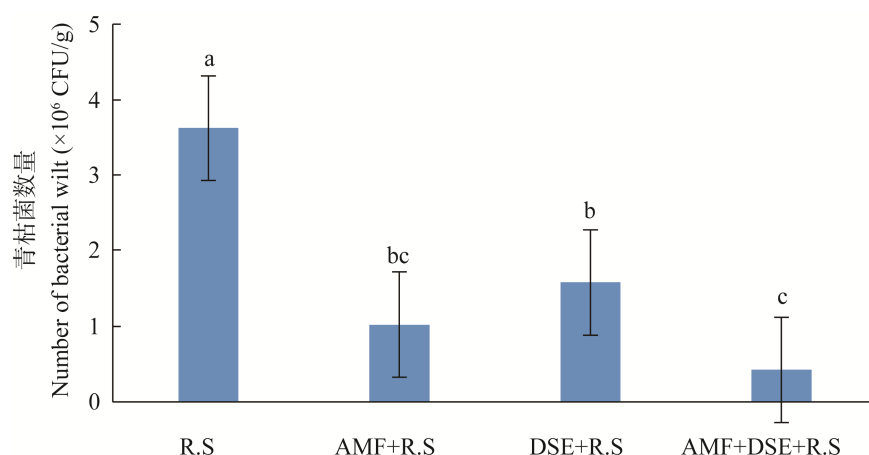


图4 生姜根际土壤中青枯菌的种群数量 图中不同小写字母表示各处理差异显著($P<0.05$), 下同

Figure 4 *Ralstonia solanacearum* population in rhizosphere soil of ginger plants. Different lowercase letters above the columns indicate significant differences at $P<0.05$, the same below.

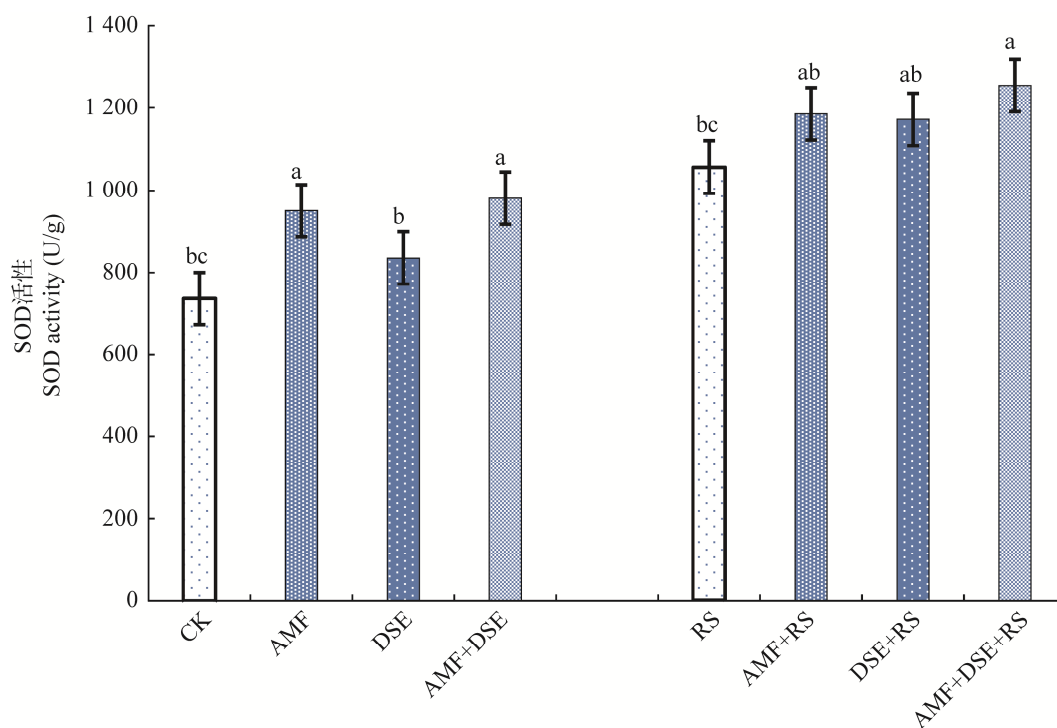


图 5 不同处理下生姜 SOD 活性

Figure 5 SOD activity of ginger under different treatments.

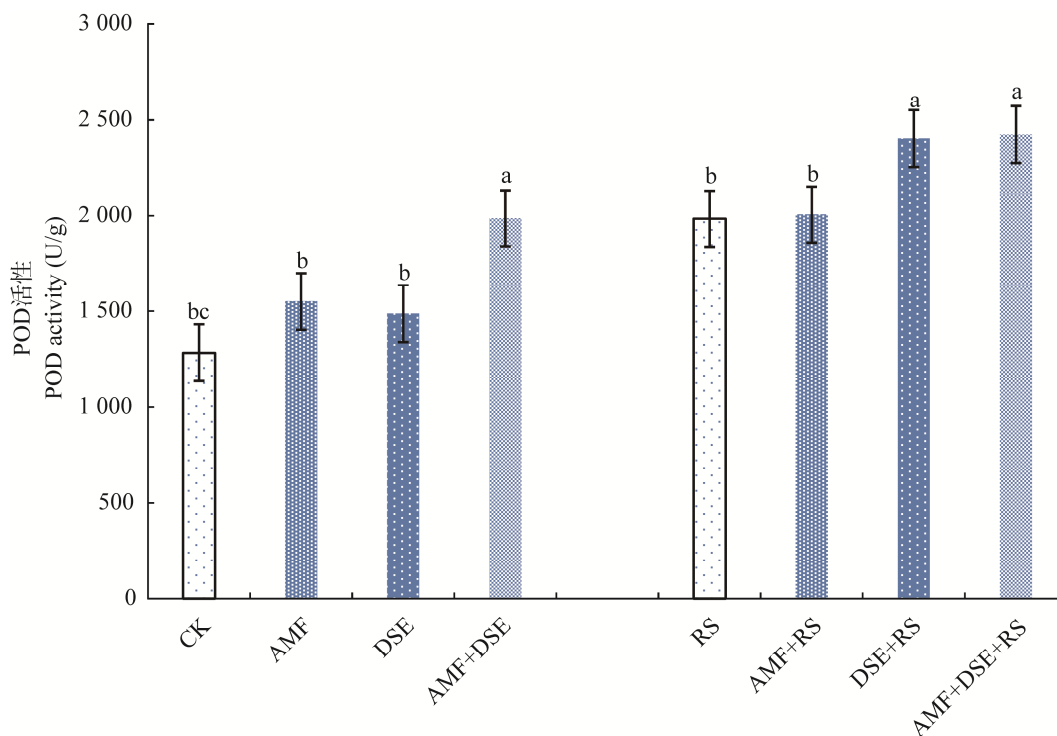


图 6 不同处理下生姜 POD 活性

Figure 6 POD activity of ginger under different treatments.

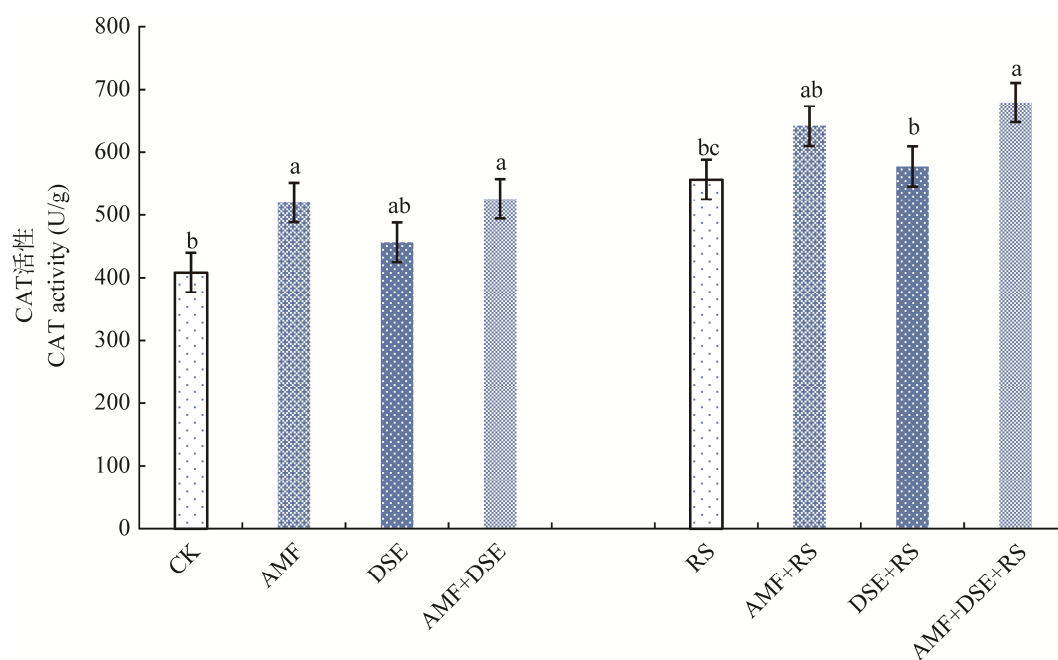


图 7 不同处理下生姜 CAT 活性

Figure 7 CAT activity of ginger under different treatments.

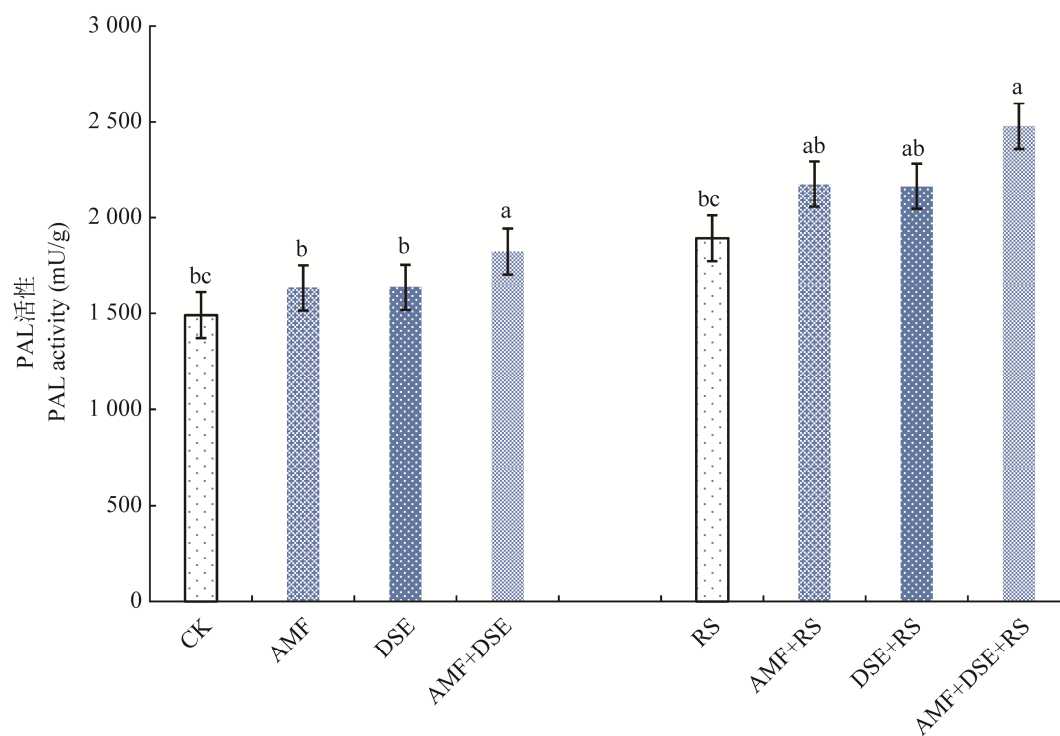


图 8 不同处理下生姜 PAL 活性

Figure 8 PAL activity of ginger under different treatments.

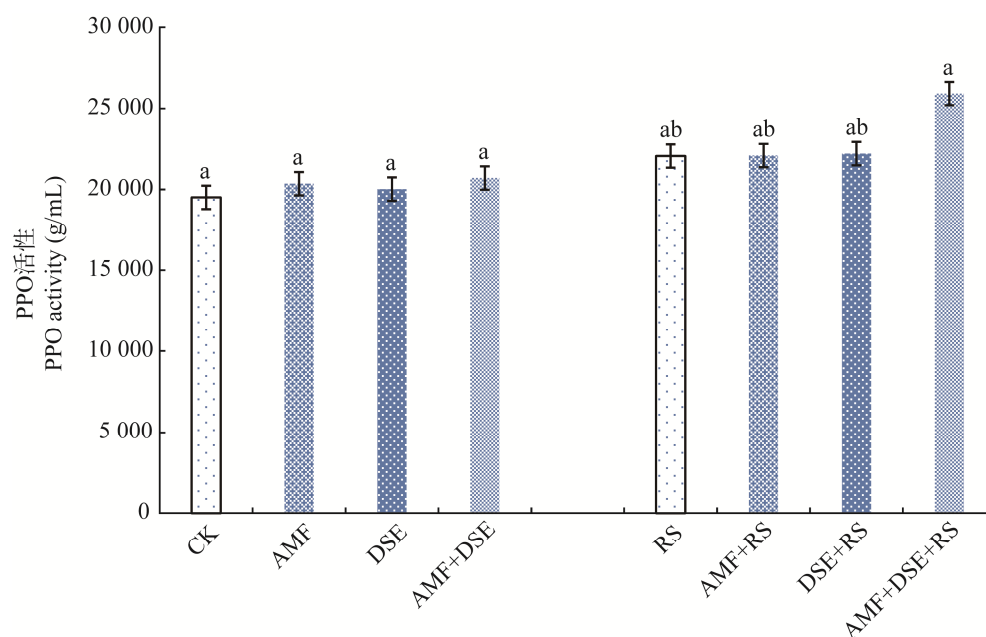


图 9 不同处理下生姜 PPO 活性

Figure 9 PPO activity of ginger under different treatments.

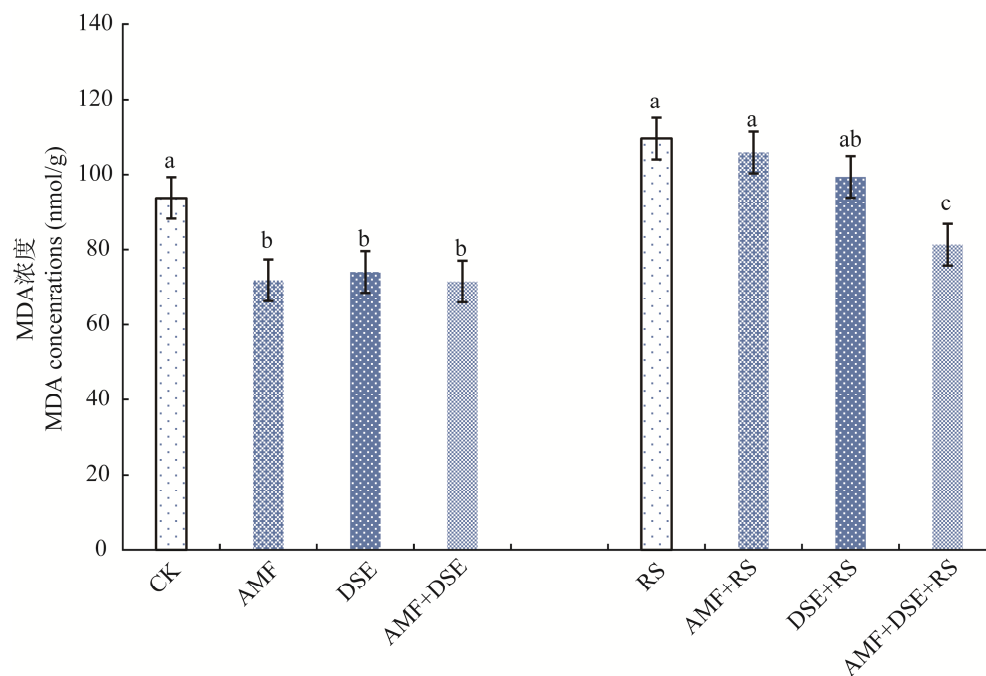


图 10 不同处理下生姜 MDA 浓度

Figure 10 MDA concentration of ginger under different treatments.

2.7 AMF-DSE 对生姜叶绿素含量、光合速率等的影响

由表 5 可以看出, 接种病原菌条件下, AMF 和 DSE 共同作用的植株其叶片的叶绿素

含量、净光合速率、气孔导度和总含 P 量均显著高于对照, AMF 和 DSE 单接种的叶绿素含量和总含 P 量无显著差异, 净光合速率和气孔导度差异显著。

表 5 接种 AMF 和 DSE 对生姜叶绿素含量、光合速率等的影响

Table 5 Effects of AMF and DSE on chlorophyll content, photosynthetic rate of ginger

处理	叶绿素含量	净光合速率	总含 P 量	气孔导度
Treatment	Chlorophyll content (mg/m ²)	Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)	Total P content (mg/pot)	Stomatal conductivity ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)
R.S	1 516±66.72c	4.85±1.23d	14.3±2.08c	0.031 4±1.38d
DSE+R.S	1 723±102.13b	5.93±1.63c	15.2±2.58bc	0.042 5±0.59c
AMF+R.S	1 738±59.65b	8.82±0.96b	16.8±1.22b	0.056 2±2.25b
AMF+DSE+R.S	2 026±93.42a	11.34±1.38a	20.5±0.82a	0.069 4±1.24a

同列数据中不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Data followed by different lowercase letters in the same column are significantly different at $P<0.05$.

3 讨论与结论

前期我们在对广西壮族自治区百色生姜根际土壤丛枝菌根真菌资源调查时发现,设施栽培条件下,生姜在同一根段的不同皮层细胞中具有 AMF 和 DSE 结构的双重定殖^[26]。本研究通过盆栽试验人工接种 AMF 和 DSE,在显微镜下能够明显观察到生姜根内同时具有典型的 AMF 菌丝、孢子、泡囊、丛枝结构,以及 DSE 典型的有隔菌丝和微菌核结构,表明 AMF 和 DSE 能够共同生长并同时定殖于生姜根系,形成联合的潜在共生结构^[27]。本研究比较了在温室可控条件下 AMF 和 DSE 的发育特点,证明了 AMF (*Glomus reticulatum*)和 DSE (*Chaetomium globosum*)组合菌剂能够通过相互促进对方的侵染与定殖促进生姜生长发育,并且能够抑制青枯菌的繁殖,降低姜瘟病的发病率。

本试验探究了 AMF 和 DSE 协同作用对生姜根部接种病原菌的植株生长、抗病能力、叶绿素含量、光合速率、P 吸收、防御酶活性及 MDA 浓度的影响。结果表明接种病原菌后,AMF、DSE 及二者共同作用均能在一定程度上促进生姜生长,促进 P 吸收和光合作用的进行,使防御酶活性增强,降低 MDA 浓度,减少发病率,其中以 AMF+DSE 组合处理的效果最为明显。这说明 AMF 和 DSE 协同作用能够提

高植物对病害的抗性,这可能是 AMF 和 DSE 协同帮助植物更好地从土壤中吸收养分,同时协同抑制青枯菌繁殖的结果^[23]。有研究表明,植物在受到病原菌侵染时,抗氧化酶活性在病原菌的诱导下活性迅速增强,以保护植物免受病原菌的损伤,维持本身正常的生理代谢^[22]。本研究结果显示,AMF 和 DSE 的存在均可增加 SOD、POD、CAT 和 PPO 活性,降低 MDA 浓度,而且二者同时存在时 SOD、POD、CAT 和 PPO 活性最高、MDA 浓度最低。说明病原菌入侵时,AMF 和 DSE 能诱导生姜植株叶片内防御酶 SOD、POD、CAT、PPO 和 PAL 的活性提高,增强植株的抗病性。在植物遭遇逆境时,两种微生物间存在协同作用。这表明 AMF (*Glomus reticulatum*) + DSE (*Chaetomium globosum*)是适宜生姜生长的优良组合,可以相互协同作用抑制姜瘟病的发生,具备促生防病的双重作用。

本研究在温室条件下首次探究了接种 AMF 和 DSE 对姜瘟病影响的生理生化机制,在姜瘟病的生物防治研究中具有一定的参考价值。然而也存在一些不足,本试验只是在盆栽条件下获得了 AMF+DSE 的组合菌剂,也仅用了一种 AMF (*Glomus reticulatum*)和一种 DSE (*Chaetomium globosum*),虽然可以有效抑制姜瘟病的发生,具有一定的生防潜力,但是研究结果未在田间验

证。温室条件与大田环境存在较大差异,有必要进一步在田间条件下开展试验加以验证和进一步筛选,并研发该二元生物药肥制剂。另外,本试验主要集中在生理生化水平,对于接种 AMF 和 DSE 是否引起生姜体内相关抗病基因的表达等一系列分子过程还未可知,下一步拟深入开展分子机制的研究,采用转录组技术分析 AMF 与 DSE 诱导的植物抗病防御差异表达基因,并利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)等生物技术对抗病基因进行功能验证,探讨 AMF 与 DSE 提高植物抗姜瘟病的分子机制,并结合转基因技术将抗病基因应用于实际生产中。

REFERENCES

- [1] HORITA M, YANO K, TSUCHIYA K. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 strains[J]. Journal of General Plant Pathology, 2004, 70(5): 278-283.
- [2] 朱丽, 高淑萍, 张杰, 王清路, 赵乃听. 姜瘟致病菌青枯罗尔斯顿氏菌的分离鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(7): 1997-1999.
- ZHU L, GAO SP, ZHANG J, WANG QL, ZHAO NX. The isolation and identification of ginger blast pathogen *Pseudomonas solanacearum*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(7): 1997-1999 (in Chinese).
- [3] 张瑞华, 刘振龙, 王承香, 田洪霞, 丁美丽, 王效华. 不同时期用药对姜瘟病的防治效果[J]. 现代农业科技, 2021(4): 94-95, 103.
- ZHANG RH, LIU ZL, WANG CX, TIAN HX, DING ML, WANG XH. Control effect of drugs in different periods on ginger pest[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2021(4): 94-95, 103 (in Chinese).
- [4] 汪茜, 李冬萍, 覃晓娟, 车江旅, 宋娟, 陈廷速. 姜瘟病生防菌幼套近明球囊霉 N62 的筛选鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 267-274.
- WANG Q, LI DP, QIN XJ, CHE JL, SONG J, CHEN TS. Screening and identification of biocontrol strain *Claroideoglomus etunicatum* N62 against ginger wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 267-274 (in Chinese).
- [5] THOMAS P, UPRETI R. Testing of bacterial endophytes from non-host sources as potential antagonistic agents against tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Advances in Microbiology, 2014, 4(10): 656-666.
- [6] OHIKE T, MAKUNI K, OKANAMI M, ANO T. Screening of endophytic bacteria against fungal plant pathogens[J]. Journal of Environmental Sciences, 2013, 25: S122-S126.
- [7] GUO JH, QI HY, GUO YH, GE HL, GONG LY, ZHANG LX, SUN PH. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biological Control, 2004, 29(1): 66-72.
- [8] KWON J W, KIM S D. Characterization of an antibiotic produced by *Bacillus subtilis* JW-1 that suppresses *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(1): 13-18.
- [9] XIEXY, WENG BS, CAI BP, DONG YR, YAN CL. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth and nutrient uptake of *Kandelia obovata* (Sheue, Liu & Yong) seedlings in autoclaved soil[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 75: 162-171.
- [10] LIU RJ, DAI M, WU X, LI M, LIU XZ. Suppression of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood) on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Mycorrhiza, 2012, 22(4): 289-296.
- [11] VOS C, SCHOUTEDEN N, van TD, CHATAGNIER O, ELSEN A, de WAELE D, PANIS B, GIANINAZZI PV. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 60: 45-54.
- [12] 孙吉庆, 刘润进, 李敏. 丛枝菌根真菌提高植物抗逆性的效应及其机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2012, 48(9): 845-852.
- SUN JQ, LIU RJ, LI M. Advances in the study of increasing plant stress resistance and mechanisms by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(9): 845-852 (in Chinese).
- [13] BATI C B, SANTILLI E, LOMBARDO L. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and on micronutrient and macronutrient uptake and allocation in olive plantlets growing under high total Mn levels[J]. Mycorrhiza, 2015, 25(2): 97-108.
- [14] 刘茂军, 张兴涛, 赵之伟. 深色有隔内生真菌(DSE)

- 研究进展[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 888-894.
- LIU MJ, ZHANG XT, ZHAO ZW. Advances in the research of dark septate endophytes[J]. Mycosystema, 2009, 28(6): 888-894 (in Chinese).
- [15] RODRIGUEZ R J, WHITE J F JR, ARNOLD A E, REDMAN R S. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. The New Phytologist, 2009, 182(2): 314-330.
- [16] NEWSHAM KK. *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*[J]. New Phytol, 1999(144): 517-524.
- [17] ANDRADE-LINARES D R, GROSCH R, RESTREPO S, KRUMBEIN A, FRANKEN P. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance[J]. Mycorrhiza, 2011, 21(5): 413-422.
- [18] WU LQ, LU YL, MENG ZX, CHEN J, GUO SX. The promoting role of an isolate of dark-septate fungus on its host plant *Saussurea involucreata* Kar. et Kir[J]. Mycorrhiza, 2010, 20(2): 127-135.
- [19] 汪茜, 包涵, 张金莲, 宋娟, 刘增亮, 黄京华, 陈廷速. 不同丛枝菌根真菌种类对生姜生长的影响[J]. 热带作物学报, 2019, 40(7): 1272-1277.
- WANG Q, BAO H, ZHANG JL, SONG J, LIU ZL, HUANG JH, CHEN TS. Effects of different arbuscular mycorrhizal fungi species on the growth of ginger[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(7): 1272-1277 (in Chinese).
- [20] 中华人民共和国农业部. 农药田间药效试验准则 第31部分: 杀菌剂防治生姜姜瘟病: NY/T 1464.31—2010[S]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Pesticide Guidelines for the Field Efficacy Trials—Part 31: Fungicides against Ginger Blast of Ginger: NY/T 1464.31—2010[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2010 (in Chinese).
- [21] 方树民, 唐莉娜, 陈顺辉, 顾钢, 陈玉森. 作物轮作对土壤中烟草青枯菌数量及发病的影响[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2): 377-382.
- FANG SM, TANG LN, CHEN SH, GU G, CHEN YS. Influence of crop rotation on tobacco bacterial wilt number and pathogenesis[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2011, 19(2): 377-382 (in Chinese).
- [22] 邓杰, 李芳, 段廷玉. 温室条件下 AM 真菌和禾草内生真菌对根腐离蠕孢侵染黑麦草的影响[J]. 草业学报, 2019, 28(12): 103-113.
- DENG J, LI F, DUAN TY. Effects of AM fungus and grass endophyte on the infection of *Lolium perenne* by the pathogen *Bipolaris sorokinianum* in a greenhouse[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(12): 103-113 (in Chinese).
- [23] 王维华, 李敏, 刘润进, 李晓林. AM 真菌对生姜某些生理指标的影响[J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(3): 175-177.
- WANG WH, LI M, LIU RJ, LI XL. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on some physiological index of *Zingiber officinale* rosc[J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 2003, 20(3): 175-177 (in Chinese).
- [24] 李芳, 邓杰, 郭艳娥, 高萍, 李彦忠, 段廷玉. 禾草内生真菌与丛枝菌根互作对多年生黑麦草生长及叶斑病的影响[J]. 植物保护学报, 2019, 46(2): 352-361.
- LI F, DENG J, GUO YE, GAO P, LI YZ, DUAN TY. Influence of interactions between grass endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and leaf spot disease of perennial ryegrass[J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46(2): 352-361 (in Chinese).
- [25] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- LI HS. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese).
- [26] 宋娟, 李冬萍, 覃晓娟, 汪茜, 车江旅, 陈廷速, 夏子涵. 广西百色生姜根际土壤丛枝菌根真菌资源调查[J]. 南方农业学报, 2021, 52(11): 2994-3002.
- SONG J, LI DP, QIN XJ, WANG Q, CHE JL, CHEN TS, XIA ZH. Resources of arbuscular mycorrhizal fungi in ginger rhizosphere soil of Baise, Guangxi[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(11): 2994-3002 (in Chinese).
- [27] 刘润进, 田蜜, 刘宁, 李晴. 植物根系复合共生体研究进展[J]. 菌物研究, 2014, 12(1): 1-7.
- LIU RJ, TIAN M, LIU N, LI Q. Advances in the study of dual symbionts formed on plant roots[J]. Journal of Fungal Research, 2014, 12(1): 1-7 (in Chinese).