

文章编号:1003-8701(2005)02-0039-04

土传病害生物防治研究进展

徐美娜^{1,2},王光华¹,靳学慧²

(1.中国科学院东北地理与农业生态研究所,哈尔滨 150040; 2.黑龙江八一农垦大学植物科技学院)

摘要:从土传病害生防微生物的种类、制约土传病害生防微生物发挥作用的因素以及采用遗传改良手段提高生防微生物的生防和适应能力等方面综述了国内外土传病害生物防治研究进展,并指出土传病害生防中存在的问题及今后研究方向。

关键词:土传病害;生防微生物;生物防治

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

土传病害是以土壤为媒介进行传播的植物病害统称。对土传病害生物防治的研究一直是一个热点和难点的课题。土壤中,特别是植物根际栖息着许多具有生防潜力的微生物资源,虽然它们的作用发挥受内在和外在因素影响很大,但利用微生物繁殖速度快的特点,大量人工繁殖后施入土壤中,可以调节根部微生态环境、限制土传病原真菌的繁殖和抑制土传病害的发生发展,显示出巨大的应用潜力。

1 土传病害生防微生物的种类

1.1 细菌

常见的对土传病害具有生物防治作用的细菌主要有两大类群:假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)。

1.1.1 假单胞菌(*Pseudomonas*)

假单胞菌广泛存在于植物根际,具有突出的防病增产的作用,其中以 *P. fluorescens* 等细菌的不同菌株研究最为广泛。假单胞菌属许多细菌菌株,可以有效地抑制 *Pythium spp.*、*Gaeumannomyces graminis var. tritici*、*Sclerotium rolfsii*、*Fusarium*、*Erwinia carotovora* 等多种真菌和细菌引起的根部病害(表1)。对假单胞菌生防机制研究表明,不同种的防病机制是不同的,这些机制包括拮抗、诱导抗病、营养竞争和寄生等。

表1 在土传病害生防研究中一些有代表性的生防假单胞菌

生防菌	目标病菌/病害	机制
<i>P. fluorescens</i> CHAO	<i>Thielabiopsis basicola</i> <i>Pythium ultimum</i>	拮抗(Pyoluteorin)
<i>P. aureofaciens</i> 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	拮抗(Phenazin)
<i>P. fluorescens</i> Hv37a	<i>Pythium ultimum</i>	拮抗(Oomycin A)
<i>P. fluorescens</i> F113	<i>Erwinia carotovora</i> subsp	拮抗(DAPG)
<i>P. fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium spp.</i> <i>Dianth</i>	诱导抗性(脂多糖)
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Fusarium oxysporum f.sp. redolens</i>	诱导抗性
<i>P. putida</i>	<i>Pythium ultimum</i>	竞争
<i>P. aeruginosa</i> TNSK2	<i>Pythium</i>	竞争和诱导抗性
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	寄生/捕食
<i>P. fluorescens</i> SS101	<i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i>	拮抗(表面活性剂)

收稿日期:2004-05-31

基金项目:哈尔滨市青年科学基金(2003AFQYJ002)和中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-19-4-03)资助

作者简介:徐美娜(1979-),女,黑龙江省巴彦人,在读硕士,主要从事植物病理学研究。

1.1.2 芽孢杆菌(*Bacillus*)

虽然芽孢杆菌在生物防治方面受到的关注比假单胞菌少,但鉴于它们具有内生芽孢、抗逆性强、繁殖速度快、营养要求简单和易于在植物根圈定殖的特点,在生防中也被广泛地研究和应用。目前用于生防的芽孢杆菌种类有:枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)等(表 2)。

表 2 在植病生防研究中一些有代表性生防芽孢杆菌

拮抗菌	目标病菌/病害	作用方式
<i>B. subtilis</i> CB03	<i>Fusarium</i> spp, <i>Rhizoctonia</i> spp	
<i>B. subtilis</i> UW85	苜蓿猝倒病	Zwittermycin A
<i>B. subtilis</i> B-903	棉花枯萎病; 菠菜枯萎病	溶菌
<i>B. subtilis</i> TG-26	瓜果腐霉	抗菌环肽
<i>B. cepacia</i> B37w	<i>Fusarium sambucinum</i>	Pyrolnitrin
<i>B. cepacia</i> BC11	<i>Rhizoctonia solani</i>	AFC-BC11
<i>B. cereus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	几丁质酶
<i>B. megaterium</i> B1301	茄伯克氏菌(生姜青枯病)	抗生物质及位点竞争
BRF-1	大豆根腐病	抗菌肽

1.2 真菌

许多真菌资源对土传病害具有很好的生防作用。木霉(*Tichoderma* spp)是一类分布广、繁殖快、具有较高生防价值的真菌。Wenindling(1932)发现,在离体条件下木素木霉(*Tichoderma lignorum*)与立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)共培养时,木素木霉的菌丝缠绕着立枯丝核菌,使其菌丝原生质凝结、细胞液泡消失及菌丝解体。毛壳菌(*Chaetomium* spp)通常存在于土壤和有机肥中,可以有效降解纤维素和有机物,并对土壤中的某些微生物产生抑制作用。Martin 和 Moore(1954 年)发现,巴西的各品种燕麦的种子被 *Chaetomium globosum*(球毛壳)和 *Chaetomium cochlildes*(螺卷毛壳)侵染后,则对维多利亚长蠕孢毒素的作用产生了抵抗力,从而使其幼苗免受 *Fusarium* spp 或 *Drechslem sorbkiniana* 的侵染。近年来,利用非致病镰刀菌菌株的交叉保护作用防治由镰刀菌引起的土传病害也得到广泛的重视。马平等(2001)从棉花铃内部分离到两株非致病镰刀菌 VL-1 和 VL-2,通过空间竞争和营养竞争有效地抑制黄萎病菌的生长,对棉花黄萎病的相对防效分别达到 87.9%和 66.4%。最近,也有关于淡紫拟青霉、厚壁孢子轮枝菌、小盾壳霉和菌根真菌具有生防作用的报道。

1.3 放线菌

放线菌广泛存在于土壤和植物根际等环境中,作为生防菌已在生产上被成功的应用。如 70 年代澳大利亚 Kerr 从土壤中分离到土壤放线杆菌 *Agrobacterium radiobacter* K84,利用其活菌制剂及其产生的抗生素 Agrocina84 可有效防治桃树根癌病;最近,王琦等(2003)从菜丛根病株根面和根内分离 3 株链霉菌(*Streptomyces*),该菌的代谢液能够抑制甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)的传毒介体甜菜多粘菌(*Plymyxa betae*)的休眠孢子萌发,使游动孢子泳动减缓。酶联免疫检测表明,拮抗菌处理的根系内 BNYVV 数量低于对照。

2 制约土传病害生防微生物发挥作用的因素

虽然大量的具有生防潜力的微生物被研究报道,但只有少数生防菌株作为商业化制剂生产,大部分仍停滞在实验室研究开发阶段,不能大面积推广应用。这主要与生防菌在土壤中定殖过程中受诸多因素影响,使其适应能力、定殖能力、拮抗物质的产生能力以及与拮抗作用相关基因表达功能下降等有关。

2.1 环境因素

土传病害生防菌生存的环境-植物根际是每时都发生着剧烈变化的微环境。某些因素,如下雨或日照引起盐浓度、土壤 pH、渗透性、水分及土壤粒子结构的变化以及植株根的增长、季节变化、化肥和农药的施入等均能改变根际微环境^[27],从而也将导致根际微生物种类组成结构的改变。这样势必引起

释放在土壤中生防菌的数量发生波动,最终导致其生防能力的改变。对不同理化性质土壤的适应性,将导致菌株生防作用的区域局限性。

2.2 生物因素

植物的活动也会影响生防菌株的生防作用,某些植物根系分泌物可能支持或诱导生防菌来抑制病原菌,而其它一些植物则可能表现出排斥反应。*Pseudomonas fluorescens* 在不同植物品种根际生防能力不同,原因与其抗生素合成基因的诱导表达程度不同有关。

Keel 等(2002)首次阐明了噬菌体具有削弱释放到自然土壤环境中有益细菌生防能力的作用。他们分离到一株溶解性噬菌体 phiGP100,它能专一地影响生防菌 *Pseudomonas fluorescens* CHA0 及一些相近的假单胞菌。研究表明,phiGP100 在 25℃ 以上对 *P. fluorescens* CHA0-Rif 的数量及生防活性影响很大,它的存在使土壤中和黄瓜根部的 *P. fluorescens* CHA0-Rif 的数量减少 100 倍以上,由此抵御由终极腐霉引起的黄瓜根部病害的能力完全丧失。

2.3 营养因素

生长在含不同的碳源或氮源的环境中,生防菌株的生防能力也会有所变化。Siddiqui 和 Shaukat (2004)研究证明,生长在化学成分配比合适的培养液中的荧光假单胞菌 IE-6S⁺和 CHA0 菌株的培养滤液能导致试管中线虫 *Meloidogyne javanica* 幼虫死亡,并且在培养液中补充甘油(碳源)、丙酸酯(脂肪酸前体)、L-赖氨酸(氮源)能提高其杀线虫活性,而补充葡萄糖(C 源)、L-缬氨酸(氮源)和磷时却大大地抑制了这两个菌株的杀线虫活性。由于不同地区土壤营养物质成分不同,生防菌株的应用范围可能受到限制。

2.4 生防菌自身特性

细胞表面特征影响菌株对根的附着,因而也影响了菌株在根际的定殖。无鞭毛突变株 *Pseudomonas fluorescens* WCS374 相对于野生型在马铃薯较深根部的定殖能力被削弱。Vesper(1987)也证实 *Pseudomonas fluorescens* 2-79 菌株表面爪哇苦杏仁的存在与该菌株在玉米根部的附着能力相关。

许多 *Pseudomonas spp* 抗生素的产生在与其它根际微生物的竞争中起着重要作用,生防菌抗生素的积累程度受到影响,其定殖能力也会受到影响。荧光假单胞菌株 2-79 和 30-84 通过 Tn5 诱变丧失了吩嗪合成能力,相对于野生型菌株在根际的定殖数量明显降低。

生防菌生防作用发生改变与其自身的分子生物学特征也有一定的关系。对桃树根癌病有显著的防治作用的放线土壤杆菌 K84,经过多年应用,该菌株防治效果大大下降。研究发现,K84 菌株含有 3 个质粒,其中最小的质粒上除含有抗菌素合成基因外,还带有一段控制质粒转移的 tra 基因。由于 tra 基因的作用,导致整个质粒通过接合作用向作为防治对象的根癌杆菌中转移,使同时携带致癌的 Ti 质粒和抗菌素合成基因质粒的病菌便不再对抗菌素敏感。

生防菌在应用过程中很可能受到以上某一因素或同时受到多种因素制约而降低或丧失生防能力,菌株如果对土壤不具广泛的适应性、不能有效利用土壤中各种营养、在变化的环境中不能正常的产生代谢产物和易发生基因型的改变等,很难大面积推广应用。

3 土传病害生防菌株的遗传改良

鉴于以上诸多制约因素,人们开始求助于分子生物学及分子遗传学的手段进行生防微生物的遗传改良,改善它们对环境条件的适应性、扩大应用范围。

针对放线土壤杆菌 K84 质粒上的 tra 基因向病原菌转移现象,对 tra 基因作了缺失处理,但依然保留抗菌素合成基因片段,构建了工程菌 K1026。试验证明,K1026 保留了 K84 合成 agrocirn84 的能力,却遏止了抗菌素合成基因向根癌菌的传递,应用效果更加安全有效。

用 Tn5 载体将 Phenazine-1-carboxylic acid (PCA)合成基因导入植物促生菌荧光假单胞菌中。经修饰表达,PCA 的产生显著地提高了野生型荧光假单胞菌对 *Pythium ultimum* 引起的梨幼苗猝倒病的控制,甚至在氧气稀少的根际中 PCA 产量比在养分充足的培养基中还多。*Pseudomonas fluorescens*

WCS374 生防效果较低,在接受 *Pseudomonas putida* WCS358 的嗜铁素受体——PupA 蛋白合成基因簇后,基因工程衍生菌株 *P. fluorescens* WCS357/PupA 竞争铁能力明显提高,种群密度增加,生防作用增强。因此,外源抗生素合成基因及嗜铁素受体的引入是改良生防菌株的有效方法。

几丁质酶和几丁质二糖酶能将几丁质降解成几丁质寡糖和单糖,从而破坏真菌细胞壁起到防病效果。杨合同等(2003)将几丁质酶编码基因整合到菌株 B1301 染色体上,创造的重组生防菌 B13011 和 B13012 在盆栽条件下对小麦全蚀病、小麦纹枯病、棉花立枯病和棉花枯萎病 4 种真菌病害的防效比受体菌 B1301 明显增强。

生防微生物与化学杀菌剂共同应用是防治土传病害发生发展的有效途径之一,但由于大多数生防微生物对化学杀菌剂敏感,杀菌剂在杀死病原微生物的同时,也不可避免地伤害到生防微生物的生存,给土传病害的综合防治带来困难。为此,哈工大杨谦领导的研究组在国内率先将抗多菌灵的 β -微管蛋白基因导入木霉菌和毛壳菌中,解决了生防微生物与化学杀菌剂共同应用的问题。

4 问题与展望

生防微生物产业化进程发展较慢。生防菌剂发展滞后的原因不仅与生防菌的作用发挥受诸多因素制约有关,而且也与某些生防菌剂成本高,难于推广有关。因此,在致力于生防菌的遗传改良的同时,也应考虑生防菌剂的成本。另外,可以考虑将多种生防菌混和使用,这样就能够实现多种生防机制(拮抗、竞争、诱导抗性、寄生)同时起作用,避免单一生防菌应用而引起的病原微生物产生抗性,但混用的前提要保证这些生防菌互不排斥,而且作用结果最好是协同或加性效应。

生防菌的遗传学研究已相当广泛和深入,但也存在一些不足。例如:重组微生物可能会发生基因任意扩散,因此,需进一步完善对基因工程微生物安全性的评价和完善基因环境释放的监测方法。由质粒控制的异源基因与染色体修饰的异源基因相比稳定性较差,易向土著微生物转移,因此,生防菌的遗传改良要从质粒转入染色体修饰研究。

植物内微生物是近年来发展起来的很有应用前景的一类有益微生物,它们与植物在进化过程中建立了一种和谐的关系,可以提供植物所需要的营养物质如 N 源及一些激素,参与植物的防卫功能。而内生细菌可以从植物体内获得充分的生长营养,受到植物的保护,使其免遭外部恶劣环境的影响。由于内生细菌系统地存在于植物的细胞间隙或细胞内,相对于其它生防因子而言,有很大的优势。若能将生防菌的抗生素合成基因导入某些内生菌内,借助内生细菌与植物建立的紧密联系,生防基因可以在植物内部发生作用,效应更为直接,免去了转基因植物研究的复杂程序,将是很有应用前景的研究课题。

参考文献:

- [1] Keel C, et al. Suppression of root diseases of by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant-Microbe Interac*, 1992, 5: 4-13.
- [2] Pierson III L S, et al. Phenazin antibiotic production in *P. aureofaciens*: Role in Rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 136: 101-108.
- [3] Gutterson N I, et al. Molecular cloning and genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. *Bacteriol*, 1996, 165: 696-703.
- [4] Cronin D, et al. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23: 95-106.
- [5] Van P R, et al. Lopopolycaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* spp. Strain WCS417r in carnation to Fusarium wilt. *Appl. Microbiol*, 1992, 13: 60-71.
- [6] 黄大旷. 农业微生物基因工程[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [7] Buysens S, et al. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 865-871.
- [8] Souza J T. Distribution, diversity, and activity of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2002.

(以下 30 条参考文献略)