

不同渗透压及pH环境对烟草青枯病菌致病力的影响

汪汉成^{1,2} 郭 华^{1,3} 蔡 琳¹ 余 婧² 蔡刘体² 丁 伟^{1*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 2. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081;

3. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004)

摘要: 为探究不同渗透压和pH环境对烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 致病力的影响, 用Biolog PM 9~10代谢板中96种渗透压和96种pH环境培养烟草青枯病菌, 并采用穿刺法接种于烟草离体叶片, 测定不同环境下烟草青枯病菌对烟草的致病情况。结果表明, 烟草青枯病菌可致病的渗透压范围包括1%~2%氯化钠、2%~3%硫酸钠、5%~20%乙二醇、1%甲酸钠、2%尿素、1%乳酸钠、20~100 mmol/L磷酸钠、10~100 mmol/L硫酸铵、10~100 mmol/L硝酸钠及10~20 mmol/L亚硝酸钠。可致病pH范围为5.0~8.0; 当pH 4.5时, 烟草青枯病菌在分别与L-正缬氨酸和5-羟色氨酸共培养时均可致病, 与其余33种氨基酸共培养时则均不能致病; 当pH 9.5时, 烟草青枯病菌在与所有35种供试氨基酸共培养时均不能致病; 烟草青枯病菌在葡萄糖苷、辛酸盐、半乳糖苷等10种化合物培养下均可致病。表明渗透压和pH环境会严重影响烟草青枯病菌的生长和致病力。

关键词: 烟草青枯病菌; 渗透压; 致病力; pH

Effects of different osmolality and pH conditions on the pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* in tobacco leaves

Wang Hancheng^{1,2} Guo Hua^{1,3} Cai Lin¹ Yu Jing² Cai Liuti² Ding Wei^{1*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, Guizhou Province, China; 3. Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, Guizhou Province, China)

Abstract: In order to investigate the effect of different osmolality and pH conditions on the pathogenicity of *Ralstonia solanacearum*, the bacterium *R. solanacearum* was incubated in Biolog PM 9–10 microplates with 96 different osmolality conditions and 96 pH values. The pathogenicity of this pathogen under different osmolality and pH conditions was investigated by stab inoculation on the detached leaves of tobacco. The results showed that the pathogenic osmolality conditions included 1%–2% sodium chloride, 2%–3% sodium sulfate, 5%–20% ethylene glycol, 1% sodium formate, 2% urea, 1% sodium lactate, 20–100 mmol/L sodium phosphate, 10–100 mmol/L ammonium sulfate, 10–100 mmol/L sodium nitrate, and 10–20 mmol/L sodium nitrite. The pH values for pathogenicity ranged from 5.0–8.0. At the pH 4.5, *R. solanacearum* still exhibited pathogenicity to tobacco leaves when combined with amino acids L-norvaline and 5-hydroxytryptophan, but no pathogenicity was observed with other 33 amino acids. At the

基金项目: 中国博士后科学基金(2017M610585), 中国烟草总公司科技项目(110201601025(LS-05)), 贵州省科技厅优秀青年人才培养计划(黔科合平台人才[2017]5619)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: dwing818@163.com

收稿日期: 2018-04-28

pH 9.5, the pathogen showed no pathogenicity when combined with all 35 amino acids tested. Additionally, *R. solanacearum* showed pathogenicity when combined with other ten compounds, including glucoside, *X*-caprylate, galactoside, etc. The results indicated that osmolality and pH conditions could significantly affect the growth and pathogenicity of *R. solanacearum*.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; osmolality; pathogenicity; pH

由茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的烟草青枯病是一种世界性土传细菌病害, 该病害是典型的维管束病害, 可侵染烟草根、茎、叶等多个部位, 主要危害烟草的根和茎, 病株侧根常变黑腐烂, 茎部可见黑色条斑 (Robertson et al., 2004; Qian et al., 2013)。该病害自 1864 年在印度尼西亚首次发现以来, 迅速扩散至主要产烟国家并成为制约烟草生产的重要病害 (Hayward, 1991; 2000)。烟草青枯病菌的寄主范围广、遗传变异能力强、环境适应能力强, 可在不同土壤类型、pH 环境、干旱环境下引起烟草发病。不同生态环境中土壤的离子浓度、渗透压及 pH 环境并不相同, 烟草青枯病菌在这些环境下的致病力是否存在差异目前尚不清楚。

烟草青枯病的发生是烟草、病原菌、环境共同作用的结果, 也与病原菌的致病力密切相关。引起我国烟草青枯病的茄科雷尔氏菌主要为 1 号小种 3 号生化型 (R1Bv3) (Wang et al., 2015)。研究表明, 30℃ 的环境温度和 81.42% 以上的相对湿度比较有利于烟草青枯病的发生 (李想等, 2016), 同时温度也会影响烟草品种对青枯病的抗性 (Bittner et al., 2016); 接菌浓度为 $10^2 \sim 10^{10}$ CFU/mL 时均会引起番茄青枯病的发生 (Singh et al., 2014)。笔者前期研究发现, 源自贵州省的烟草青枯病菌 R1Bv3 菌株致病力的关键因子为温度和 pH, 病原菌的数量和环境湿度并不影响其致病力 (汪汉成等, 2017a), 且烟草青枯病菌具有较强的渗透压和 pH 环境适应能力 (Chen et al., 2016)。而关于不同渗透压和 pH 环境是否会影响烟草青枯病菌致病力的研究尚未见相关报道。基于此, 本研究拟系统检测不同渗透压和 pH 环境下生长的烟草青枯病菌致病力, 明确渗透压和 pH 环境对烟草青枯病菌致病力的影响, 以期了解烟草青枯病的发生机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株与烟株: 烟草青枯病菌 R1Bv 菌株由

贵州省烟草科学研究院微生物实验室提供。烟草 *Nicotiana tabacum* 品种为云烟 87, 将其种植于室内温室, 自然条件下生长, 采用 8 叶期烟草的中下部相同叶位叶片用于致病力测定。

培养基: 营养琼脂 (nutrition agar, NA) 培养基: 蛋白胨 10 g/L、牛肉粉 3 g/L、氯化钠 5 g/L、琼脂 15 g/L (汪汉成等, 2016); BUG+B 培养基 (货号: 71102) (Bochner, 2003), 美国 Biolog 公司。

试剂及仪器: Biolog PM 9 (货号: 12161) 和 PM 10 代谢板 (货号: 12162)、染料 Mix A (货号: 74221)、接种液 IF-10b GN/GP (货号: 72266), OmniLog PM 系统 (货号: 91171)、浊度测定仪 (货号: 3531) 及 8 多通道电动移液器 (货号: 3501A), 美国 Biolog 公司。

1.2 方法

1.2.1 不同渗透压和 pH 下烟草青枯病菌的生长情况

参照 Biolog 革兰氏阴性细菌的代谢表型分析的标准程序 (Bochner, 2003), 在 96 种不同渗透压环境 (PM 9 代谢板) 和 96 种 pH 环境 (PM 10 代谢板) 下对烟草青枯病菌进行培养。PM 9 代谢板和 PM 10 代谢板均为 12 列×8 行, 各 96 个接种孔, 每孔各为 1 个渗透环境或 pH 环境。

将烟草青枯病菌在 BUG+B 平板上活化, 将 0.1 mL 染料 Mix A 添加至 24 mL IF-10b GN/GP 液中配制 PM 9、PM10 代谢板的接种液, 同时制备烟草青枯病菌悬浮液, 将烟草青枯病菌悬浮液的浓度调为 85%T (T 为 Biolog 标准浓度单位)。吸取 600 μ L 的烟草青枯病菌悬浮液添加至 22.24 mL 的 PM 9 和 PM 10 代谢板的接种液中, 混合均匀, 制备混合接种液并将混合接种液加入代谢板中。将准备好的代谢板置于 OmniLog PM 系统培养箱中, 30℃ 培养 48 h, 设置 OmniLog PM 系统, 采用 Biolog D5E_OKA_data.exe 软件收集烟草青枯病菌生长过程中各个代谢板孔内颜色变化值, 采用 Biolog OL_FM_1.2.exe 软件进行颜色值转换。以峰面积 Area 为指标, 采用 Biolog OL_PR_1.2.exe 软件评价烟草青枯病菌的生

长情况,峰面积越大则表明烟草青枯病菌的生长情况越好(汪汉成等,2017b)。

1.2.2 不同渗透压和pH下烟草青枯病菌的致病力

为便于控制单因素试验条件,采用穿刺接种离体叶片的方法测定不同渗透压和pH环境下烟草青枯病菌的致病力。分别从PM 9和PM 10代谢板的各孔内吸取0.1 mL恒温培养48 h后的85%T烟草青枯病菌悬浮液,将菌液注射至8叶期烟草离体叶片,在叶片半边随机注射15 μ L菌液,每张叶片注射6点,每孔菌液注射4片叶片,以在另一半叶片的相同部位注射15 μ L无菌水处理为对照。接菌后将叶片置于30℃、相对湿度80%、16 h黑暗和8 h光

照交替的环境下培养,72 h后观察叶片发病情况,测量病斑的直径并计算发病叶片面积(汪汉成等,2017b),以发病叶片面积评价青枯病菌的致病力,面积越大说明致病力越强。

2 结果与分析

2.1 不同渗透压和pH下烟草青枯病菌的生长情况

采用Biolog PM 9和PM 10代谢板进行烟草青枯病菌的培养,48 h后烟草青枯病菌的生长结果显示,病原菌在不同渗透压和pH环境下的生长面积间存在较大差异(图1)。

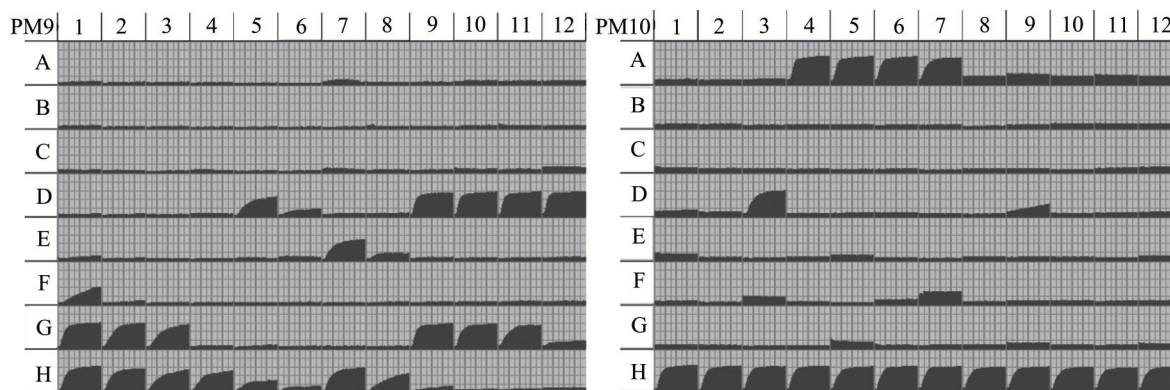


图1 烟草青枯病菌在Biolog PM 9和PM 10代谢板上的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *Ralstonia solanacearum* on Biolog phenotype microarray PM 9–10 plates

黑色部分为烟草青枯病菌的生长曲线,图中1~12和A~H为Biolog PM板相应孔的分布。Black indicates growth curve of *R. solanacearum*. 1–12 and A–H are the well layout of Biolog PM MicroPlate.

能使烟草青枯病菌能高效生长的渗透压物质有20种,包括:2%硫酸钠、5%~20%乙二醇、2%尿素、1%乳酸钠、20~100 mmol/L磷酸钠(pH 7)、10~50 mmol/L硫酸铵(pH 8)、10~80 mmol/L硝酸钠、10~20 mmol/L亚硝酸钠(表1)。

能使烟草青枯病菌高效生长的pH条件有17种,包括:范围为5.0~7.0的pH环境、L-正缬氨酸协同下的pH 4.5环境、辛酸盐、葡萄糖苷、半乳糖苷、葡糖苷酸、氨基葡萄糖苷、氨基半乳糖苷、甘露糖苷、磷酸盐和硫酸盐等环境(表2)。

2.2 不同渗透压和pH下烟草青枯病菌的致病力

不同渗透压环境下烟草青枯病菌的致病力测定结果显示,试验范围内烟草青枯病菌的可致病渗透压范围为1%~2%氯化钠、2%~3%硫酸钠、5%~20%乙二醇、1%甲酸钠、2%尿素、1%乳酸钠、20~100 mmol/L磷酸钠、10~100 mmol/L硫酸铵、10~

100 mmol/L硝酸钠及10~20 mmol/L亚硝酸钠;PM 9代谢板其余孔内烟草青枯菌液接种叶片未见明显青枯病斑(表1)。5%乙二醇处理时的发病叶片面积最大,为0.98 cm²;2%氯化钠处理时的发病叶片面积最小,为0.18 cm²。

不同pH环境下烟草青枯病菌的致病力测定结果显示,试验范围内烟草青枯病菌的可致病pH范围为5.0~8.0;pH 4.5时,烟草青枯病菌在分别与L-正缬氨酸和5-羟色氨酸共培养时均可致病,而与其余33种氨基酸共培养时均不能致病;pH 9.5时,烟草青枯病菌在与所有35种供试氨基酸共培养时均不能致病;烟草青枯病菌在辛酸盐、葡萄糖苷、半乳糖苷、葡糖苷酸、氨基葡萄糖苷、氨基半乳糖苷、甘露糖苷、磷酸盐和硫酸盐等10种化合物培养下均可致病(表2)。pH 6.0时的病斑面积最大,为1.41 cm²;pH 4.5+5-羟色氨酸时的病斑面积最小,为0.24 cm²。

表1 烟草青枯病菌在不同渗透压下的生长情况与致病力

Table 1 The growth and pathogenicity ability of *Ralstonia solanacearum* under different osmolality conditions

孔	底物	生长	PA	孔	底物	生长	PA
Well	Substrate	Growth	(cm ²)	Well	Substrate	Growth	(cm ²)
A1	1% 氯化钠 1% NaCl	—	0.64	E1	1% 甲酸钠 1% sodium formate	—	0.57
A2	2% 氯化钠 2% NaCl	—	0.18	E2	2% 甲酸钠 2% sodium formate	—	0.00
A3	3% 氯化钠 3% NaCl	—	0.00	E3	3% 甲酸钠 3% sodium formate	—	0.00
A4	4% 氯化钠 4% NaCl	—	0.00	E4	4% 甲酸钠 4% sodium formate	—	0.00
A5	5% 氯化钠 5% NaCl	—	0.00	E5	5% 甲酸钠 5% sodium formate	—	0.00
A6	5.5% 氯化钠 5.5% NaCl	—	0.00	E6	6% 甲酸钠 6% sodium formate	—	0.00
A7	6% 氯化钠 6% NaCl	—	0.00	E7	2% 尿素 2% urea	++	0.70
A8	6.5% 氯化钠 6.5% NaCl	—	0.00	E8	3% 尿素 3% urea	—	0.00
A9	7% 氯化钠 7% NaCl	—	0.00	E9	4% 尿素 4% urea	—	0.00
A10	8% 氯化钠 8% NaCl	—	0.00	E10	5% 尿素 5% urea	—	0.00
A11	9% 氯化钠 9% NaCl	—	0.00	E11	6% 尿素 6% urea	—	0.00
A12	10% 氯化钠 10% NaCl	—	0.00	E12	7% 尿素 7% urea	—	0.00
B1	6% 氯化钠 6% NaCl	—	0.00	F1	1% 乳酸钠 1% sodium lactate	++	0.61
B2	6% 氯化钠+甜菜碱 6% NaCl+betaine	—	0.00	F2	2% 乳酸钠 2% sodium lactate	—	0.00
B3	6% 氯化钠+N-N二甲基甘氨酸 6% NaCl+N-N dimethyl glycine	—	0.00	F3	3% 乳酸钠 3% sodium lactate	—	0.00
B4	6% 氯化钠+肌氨酸 6% NaCl+sarcosine	—	0.00	F4	4% 乳酸钠 4% sodium lactate	—	0.00
B5	6% 氯化钠+二甲基磺酰基丙酸盐 6% NaCl+dimethyl sulphonyl propionate	—	0.00	F5	5% 乳酸钠 5% sodium lactate	—	0.00
B6	6% 氯化钠+丙磺酸 6% NaCl+MOPS	—	0.00	F6	6% 乳酸钠 6% sodium lactate	—	0.00
B7	6% 氯化钠+四氢嘧啶 6% NaCl+ectoine	—	0.00	F7	7% 乳酸钠 7% sodium lactate	—	0.00
B8	6% 氯化钠+胆碱 6% NaCl+choline	—	0.00	F8	8% 乳酸钠 8% sodium lactate	—	0.00
B9	6% 氯化钠+磷酸胆碱 6% NaCl+phosphoryl choline	—	0.00	F9	9% 乳酸钠 9% sodium lactate	—	0.00
B10	6% 氯化钠+肌酸 6% NaCl+creatine	—	0.00	F10	10% 乳酸钠 10% sodium lactate	—	0.00
B11	6% 氯化钠+肌酐 6% NaCl+creatinine	—	0.00	F11	11% 乳酸钠 11% sodium lactate	—	0.00
B12	6% 氯化钠+左旋肉碱 6% NaCl+L-carnitine	—	0.00	F12	12% 乳酸钠 12% sodium lactate	—	0.00
C1	6% 氯化钠+氯化钾 6% NaCl+KCl	—	0.00	G1	pH 7.0, 20 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0, 20 mmol/L sodium phosphate	+++	0.79
C2	6% 氯化钠+L-脯氨酸 6% NaCl+L-proline	—	0.00	G2	pH 7.0, 50 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0, 50 mmol/L sodium phosphate	+++	0.79
C3	6% 氯化钠+N-乙酰基-L 谷酰胺 6% NaCl+N-acethyl L-glutamine	—	0.00	G3	pH 7.0, 100 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0, 100 mmol/L sodium phosphate	+++	0.87
C4	6% 氯化钠+β-谷氨酸 6% NaCl+β-glutamic acid	—	0.00	G4	pH 7.0, 200 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0, 200 mmol/L sodium phosphate	—	0.00
C5	6% 氯化钠+γ-氨基-N-丁酸 6% NaCl+γ-amino-N-butyrlic acid	—	0.00	G5	pH 5.2, 20 mmol/L 苯甲酸钠 pH 5.2, 20 mmol/L sodium benzoate	—	0.00
C6	6% 氯化钠+谷光氨肽 6% NaCl+glutathione	—	0.00	G6	pH 5.2, 50 mmol/L 苯甲酸钠 pH 5.2, 50 mmol/L sodium benzoate	—	0.00
C7	6% 氯化钠+甘油 6% NaCl+glycerol	—	0.00	G7	pH 5.2, 100 mmol/L 苯甲酸钠 pH 5.2, 100 mmol/L sodium benzoate	—	0.00
C8	6% 氯化钠+海藻糖 6% NaCl+trehalose	—	0.00	G8	pH 5.2, 200 mmol/L 苯甲酸钠 pH 5.2, 200 mmol/L sodium benzoate	—	0.00
C9	6% 氯化钠+三甲胺-N-甲氧氮芥 6% NaCl+trimethylamine-N-oxide	—	0.00	G9	pH 8.0, 10 mmol/L 硫酸铵 pH 8.0, 10 mmol/L ammonium sulfate	+++	0.64
C10	6% 氯化钠+三甲胺 6% NaCl+trimethylamine	—	0.00	G10	pH 8.0, 20 mmol/L 硫酸铵 pH 8.0, 20 mmol/L ammonium sulfate	+++	0.64
C11	6% 氯化钠+章鱼碱 6% NaCl+octopine	—	0.00	G11	pH 8, 50 mmol/L 硫酸铵 pH 8, 50 mmol/L ammonium sulfate	+++	0.64

续表 1 Continued

孔	底物	生长	PA	孔	底物	生长	PA
Well	Substrate	Growth	(cm ²)	Well	Substrate	Growth	(cm ²)
C12	6% 氯化钠+葫芦巴碱 6% NaCl+trigonelline	-	0.00	G12	pH 8.0, 100 mmol/L 硫酸铵 pH 8.0, 100 mmol/L ammonium sulfate	+	0.45
D1	3% 氯化钾 3% potassium chloride	-	0.00	H1	10 mmol/L 硝酸钠 10 mmol/L sodium nitrate	+++	0.79
D2	4% 氯化钾 4% potassium chloride	-	0.00	H2	20 mmol/L 硝酸钠 20 mmol/L sodium nitrate	+++	0.79
D3	5% 氯化钾 5% potassium chloride	-	0.00	H3	40 mmol/L 硝酸钠 40 mmol/L sodium nitrate	+++	0.64
D4	6% 氯化钾 6% potassium chloride	-	0.00	H4	60 mmol/L 硝酸钠 60 mmol/L sodium nitrate	+++	0.79
D5	2% 硫酸钠 2% sodium sulfate	++	0.47	H5	80 mmol/L 硝酸钠 80 mmol/L sodium nitrate	++	0.38
D6	3% 硫酸钠 3% sodium sulfate	+	0.22	H6	100 mmol/L 硝酸钠 100 mmol/L sodium nitrate	+	0.87
D7	4% 硫酸钠 4% sodium sulfate	-	0.00	H7	10 mmol/L 亚硝酸钠 10 mmol/L sodium nitrite	++	0.71
D8	5% 硫酸钠 5% sodium sulfate	-	0.00	H8	20 mmol/L 亚硝酸钠 20 mmol/L sodium nitrite	++	0.64
D9	5% 乙二醇 5% ethylene glycol	+++	0.98	H9	40 mmol/L 亚硝酸钠 40 mmol/L sodium nitrite	-	0.00
D10	10% 乙二醇 10% ethylene glycol	+++	0.90	H10	60 mmol/L 亚硝酸钠 60 mmol/L sodium nitrite	-	0.00
D11	15% 乙二醇 15% ethylene glycol	+++	0.88	H11	80 mmol/L 亚硝酸钠 80 mmol/L sodium nitrite	-	0.00
D12	20% 乙二醇 20% ethylene glycol	+++	0.84	H12	100 mmol/L 亚硝酸钠 100 mmol/L sodium nitrite	-	0.00

PA: 发病叶片面积。-、+、++及+++分别表示烟草青枯病菌在 Biolog PM 9 代谢板中不能生长、生长一般、较好及好。
PA: Pathogenic area; -, +, ++ and +++ indicate that *R. solanacearum* can not grow in the tested substrates, grow poorly, moderately or effectively, respectively, in Biolog PM 9 microplate.

表 2 烟草青枯病菌在不同 pH 环境下的生长情况与致病力
Table 2 The growth and pathogenicity ability of *Ralstonia solanacearum* under different pH values

孔	底物	生长	PA	孔	底物	生长	PA
Well	Substrate	Growth	(cm ²)	Well	Substrate	Growth	(cm ²)
A1	pH 3.5	-	0.00	E1	pH 9.5	-	0.00
A2	pH 4.0	-	0.00	E2	pH 9.5+L-丙氨酸 pH 9.5+L-phenylalanine	-	0.00
A3	pH 4.5	-	0.00	E3	pH 9.5+L-精氨酸 pH 9.5+L-arginine	-	0.00
A4	pH 5.0	+++	0.81	E4	pH 9.5+L-天门冬酰胺 pH 9.5+L-asparagine	-	0.00
A5	pH 5.5	+++	0.93	E5	pH 9.5+L-天冬氨酸 pH 9.5+L-aspartic acid	-	0.00
A6	pH 6.0	+++	1.41	E6	pH 9.5+L-谷氨酸 pH 9.5+L-glutamic acid	-	0.00
A7	pH 7.0	+++	0.94	E7	pH 9.5+L-谷酰胺 pH9.5+L-glutamine	-	0.00
A8	pH 8.0	+	0.80	E8	pH 9.5+L-甘氨酸 pH 9.5+L-glycine	-	0.00
A9	pH 8.5	-	0.00	E9	pH 9.5+L-组氨酸 pH 9.5+L-histidine	-	0.00
A10	pH 9.0	-	0.00	E10	pH 9.5+L-异亮氨酸 pH 9.5+L-isoleucine	-	0.00
A11	pH 9.5	-	0.00	E11	pH 9.5+L-蛋氨酸 pH 9.5+L-leucine	-	0.00
A12	pH 10.0	-	0.00	E12	pH 9.5+L-赖氨酸 pH 9.5+L-lysine	-	0.00
B1	pH 4.5	-	0.00	F1	pH 9.5+L-蛋氨酸 pH 9.5+L-methionine	-	0.00
B2	pH 4.5+L-丙氨酸 pH 4.5+L-alanine	-	0.00	F2	pH 9.5+L-苯基丙氨酸 pH 9.5+L-phenylalanine	-	0.00
B3	pH 4.5+L-精氨酸 pH 4.5+L-arginine	-	0.00	F3	pH 9.5+L-脯氨酸 pH 9.5+L-proline	-	0.00
B4	pH 4.5+L-天门冬酰胺 pH 4.5+L-asparagine	-	0.00	F4	pH 9.5+L-丝氨酸 pH 9.5+L-serine	-	0.00
B5	pH 4.5+L-天冬氨酸 pH 4.5+L-aspartic acid	-	0.00	F5	pH 9.5+L-苏氨酸 pH 9.5+L-threonine	-	0.00
B6	pH 4.5+L-谷氨酸 pH 4.5+L-glutamic acid	-	0.00	F6	pH 9.5+L-色氨酸 pH 9.5+L-tryptophan	-	0.00
B7	pH 4.5+L-谷酰胺 pH4.5+L-glutamine	-	0.00	F7	pH 9.5+L-酪氨酸 pH 9.5+L-tyrosine	-	0.00
B8	pH 4.5+L-甘氨酸 pH 4.5+L-glycine	-	0.00	F8	pH 9.5+L-缬氨酸 pH 9.5+L-valine	-	0.00
B9	pH 4.5+L-组氨酸 pH 4.5+L-histidine	-	0.00	F9	pH 9.5+L-羟基脯氨酸 pH 9.5+hydroxy-L-proline	-	0.00

续表 2 Continued

孔 Well	底物 Substrate	生长 Growth	PA (cm ²)	孔 Well	底物 Substrate	生长 Growth	PA (cm ²)
B10	pH 4.5+L-异亮氨酸 pH 4.5+L-isoleucine	-	0.00	F10	pH 9.5+L-鸟氨酸 pH 9.5+L-ornithine	-	0.00
B11	pH 4.5+L-亮氨酸 pH 4.5+L-leucine	-	0.00	F11	pH 9.5+L-高精氨酸 pH 9.5+L-homoarginine	-	0.00
B12	pH 4.5+L-赖氨酸 pH 4.5+L-lysine	-	0.00	F12	pH 9.5+L-高丝氨酸 pH 9.5+L-homoserine	-	0.00
C1	pH 4.5+L-蛋氨酸 pH 4.5+L-methionine	-	0.00	G1	pH 9.5+邻氨基苯甲酸 pH 9.5+anthranilic acid	-	0.00
C2	pH 4.5+L-苯基丙氨酸 pH 4.5+L-phenylalanine	-	0.00	G2	pH 9.5+L-正亮氨酸 pH 9.5+L-norleucine	-	0.00
C3	pH 4.5+L-脯氨酸 pH 4.5+L-proline	-	0.00	G3	pH 9.5+L-戊氨酸 pH 9.5+L-norvaline	-	0.00
C4	pH 4.5+L-丝氨酸 pH 4.5+L-serine	-	0.00	G4	pH 9.5+胍基丁胺 pH 9.5+agmatine	-	0.00
C5	pH 4.5+L-苏氨酸 pH 4.5+L-threonine	-	0.00	G5	pH 9.5+尸胺 pH 9.5+cadaverine	-	0.00
C6	pH 4.5+L-色氨酸 pH 4.5+L-tryptophan	-	0.00	G6	pH 9.5+腐胺 pH 9.5+putrescine	-	0.00
C7	pH 4.5+L-酪氨酸 pH 4.5+L-tyrosine	-	0.00	G7	pH 9.5+组胺 pH 9.5+histamine	-	0.00
C8	pH 4.5+L-缬氨酸 pH 4.5+L-valine	-	0.00	G8	pH 9.5+苯乙胺 pH 9.5+phenylethylamine	-	0.00
C9	pH 4.5+羟基脯氨酸 pH 4.5+hydroxy-L-proline	-	0.00	G9	pH 9.5+酪胺 pH 9.5+tyramine	-	0.00
C10	pH 4.5+L-鸟氨酸 pH 4.5+L-ornithine	-	0.00	G10	pH 9.5+色胺 pH 9.5+creatine	-	0.00
C11	pH 4.5+L-高精氨酸 pH 4.5+L-homoarginine	-	0.00	G11	pH 9.5+三甲胺甲氧氮芥 pH 9.5+trimethyl amine- <i>N</i> -oxide	-	0.00
C12	pH 4.5+L-高丝氨酸 pH 4.5+L-homoserine	-	0.00	G12	pH 9.5+尿素 pH 9.5+urea	-	0.00
D1	pH 4.5+邻氨基苯甲酸 pH 4.5+anthranilic acid	-	0.00	H1	辛酸盐 <i>X</i> -caprylate	+++	0.64
D2	pH 4.5+L-正亮氨酸 pH 4.5+L-norleucine	-	0.00	H2	<i>X</i> - α -D-葡萄糖苷 <i>X</i> - α -D-glucoside	+++	0.64
D3	pH 4.5+L-正缬氨酸 pH 4.5+L-norvaline	++	0.50	H3	<i>X</i> - β -D-葡萄糖苷 <i>X</i> - β -D-glucoside	+++	0.71
D4	pH 4.5+ α -氨基- <i>N</i> -丁酸 pH 4.5+ α -amino- <i>N</i> -butyric acid	-	0.00	H4	<i>X</i> - α -D-半乳糖苷 <i>X</i> - α -D-galactoside	+++	0.50
D5	pH 4.5+ <i>p</i> -氨基苯甲酸 pH 4.5+ <i>p</i> -aminobenzoate	-	0.00	H5	<i>X</i> - β -D-半乳糖苷 <i>X</i> - β -D-galactoside	+++	0.64
D6	pH 4.5+L-磺基丙氨酸 pH 4.5+L-cysteic acid	-	0.00	H6	<i>X</i> - α -D-葡萄糖苷酸 <i>X</i> - α -D-glucuronide	+++	0.50
D7	pH 4.5+D-赖氨酸 pH 4.5+D-lysine	-	0.00	H7	<i>X</i> - β -D-葡萄糖苷酸 <i>X</i> - β -D-glucuronide	+++	0.50
D8	pH 4.5+5-羟赖氨酸 pH 4.5+5-hydroxy lysine	-	0.00	H8	<i>X</i> - β -D-氨基葡萄糖苷 <i>X</i> - β -D-glucosaminide	+++	0.57
D9	pH 4.5+5-羟色氨酸 pH 4.5+5-hydroxy tryptophan	+	0.24	H9	<i>X</i> - β -D-氨基半乳糖苷 <i>X</i> - β -D-galactosaminide	+++	0.33
D10	pH 4.5+D,L二氨基-庚氨酸 pH 4.5+D,L-diamino pimelic acid	-	0.00	H10	<i>X</i> - α -D-甘露糖苷 <i>X</i> - α -D-mannoside	+++	0.44
D11	pH 4.5+三甲胺- <i>N</i> -甲氧氮芥 pH 4.5+trimethyl amine- <i>N</i> -oxide	-	0.00	H11	磷酸盐 <i>X</i> -PO ₄	+++	0.44
D12	pH 4.5+尿素 pH 4.5+urea	-	0.00	H12	硫酸盐 <i>X</i> -SO ₄	+++	0.57

PA：发病叶片面积。-、+、++及+++分别表示烟草青枯病菌在Biolog PM 10代谢板中不能生长、生长一般、较好及好；PA：Pathogenic area. -, +, ++ and +++ indicate that *R. solanacearum* can not grow in the tested substrate, grow poorly, moderately and effectively, respectively, in Biolog PM 10 microplate.

3 讨论

渗透压是生态环境中影响微生物生长和定殖的重要因子,也会影响病原菌的致病力。不同类型土

壤因所含盐的种类和含量的差异而表现出不同的渗透压,土壤含水量、降雨及施肥等农事管理均会引起土壤渗透压的变化。本研究采用Biolog PM 9代谢

板进行烟草青枯病菌在不同渗透压环境下的培养,该代谢板中含有不同浓度的氯化钠、氯化钾、乙二醇、尿素、硝酸盐、亚硝酸盐等多种渗透压物质,所含96种渗透压环境基本能够代表大部分不同渗透压环境下的土壤,能简便、快速、高效地反应烟草青枯病菌在不同渗透压土壤下的生长情况。该技术被广泛用于烟草多种病原微生物的研究,与同为烟草土传病原菌的烟草黑胫病菌 *Phytophthora parasitica* 相比,烟草青枯病菌适应的渗透压范围较烟草黑胫病菌小(Wang et al., 2015);与同为烟草细菌性病原菌的烟草野火病菌 *Pseudomonas syringae* 相比,其适应的渗透压范围较烟草野火病菌广(Guo et al., 2017);此外,与烟草叶部真菌灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 相比,烟草青枯病菌适应的渗透压范围也较灰霉病菌小(Wang et al., 2018)。本研究发现,烟草青枯病菌在氯化钠含量>2%的环境中不能生长,也无致病力。生产上出现长期连作而不发病的土壤,其不发生烟草青枯病的原因可能与该类土壤中盐类物质的含量有关,相关假设还有待进一步研究与验证;同时,今后烤烟的种植可以考虑选择施用氯化钾等不利于烟草青枯病菌致病的钾肥来提高土壤渗透压,进而减轻青枯病的危害。此外,硝酸盐、亚硝酸盐、尿素等氮类化合物是农业生产上常用的氮肥,青枯病菌对这类化合物的适应能力较强,这些盐在本研究测试范围内均可使烟草叶片致病;为此,生产上氮肥的施用可能会有利于烟草青枯病的发生,氮肥的种类和含量对烟草青枯病发生与危害的影响有待下一步深入研究。

除盐类渗透压物质外,土壤pH也会影响病原菌的生长与定殖,同时还会影响病害的发生与危害。据报道烟草青枯病菌菌株可存活的pH范围为5.0~9.5(Chen et al., 2016),在偏酸和偏碱条件下生长均较好(谭军等, 2014)。本试验中,PM 10代谢板在30℃时所测得的烟草青枯病菌表现出显著生长曲线的pH范围为5.0~8.0,研究结果与上述报道基本一致。Michel & Mew(1998)报道了土壤中不同pH处理措施对烟草青枯病病情指数的影响,发现烟草青枯病的危害与土壤pH密切相关。尽管本研究所用方法不同,是以离体叶片作为接种材料,但结果也证实pH影响着烟草青枯病的病斑面积。此外,pH<7.0时的致病叶片面积较pH 8.0时大,证实了酸性环境更有利于烟草青枯病的发生与危害,研究结果与Wang et al.(2010)和Macagnan et al.(2017)的报道基

本一致。生产上通常采用施用生石灰来调节土壤pH,尽管生石灰很难将土壤pH调至>8.0的环境,但土壤pH的升高对烟草青枯病的危害起到缓解作用(Liu et al., 2016),本研究发现在pH 5.5~8.0时烟草离体叶片发病面积逐渐减少,研究结果基本反映了pH的变化与烟草青枯病危害间的关系;与其余33种测试氨基酸相比,L-正缬氨酸和5-羟色氨酸单独协同下,pH 4.5时烟草青枯病菌仍能生长且可致病,产生这种现象的原因并不清楚,有待下一步深入研究。

烟草青枯病菌是世界性的土传病原细菌,分布广,适应力强,难以防治。本试验以中抗品种云烟87为材料,采用单因子试验开展了渗透压和pH环境对烟草青枯病菌R1Bv3小种致病力影响的研究,获得了烟草青枯病菌致病的渗透压和pH条件,同时也获得了其不能致病的渗透压和pH条件。然而,烟草青枯病菌的致病能力与危害程度通常是pH、渗透压、温度、湿度、土壤类型、微生物、寄主抗性等多种因素共同决定的,今后还有待开展多种因素互作模式下烟草青枯病菌致病力影响因子的研究。

参 考 文 献 (References)

- Bittner RJ, Arellano C, Mila AL. 2016. Effect of temperature and resistance of tobacco cultivars to the progression of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Soil*, 408(1/2): 299–310
- Bochner BR. 2003. New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics*, 4(4): 309–314
- Chen XJ, Li LC, Wang HC, Huang YF, Wang MS, Zhang CQ. 2016. Phenotypic fingerprints of *Ralstonia solanacearum* under various osmolytes and pH environments. *Plant Pathology Journal*, 15(3): 102–107
- Guo YS, Su XK, Cai LT, Wang HC. 2017. Phenotypic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, the causal agent of tobacco wildfire. *Journal of Plant Pathology*, 99(2): 499–504
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29(1): 65–87
- Hayward AC. 2000. *Ralstonia solanacearum*. *Encyclopedia of Microbiology*, 4: 32–42
- Li X, Liu YX, Cai LT, Zhang H, Shi JX. 2016. Colonization of *Ralstonia solanacearum* on tobacco roots and factors affecting virulence. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 796–804 (in Chinese) [李想, 刘艳霞, 蔡刘体, 张恒, 石俊雄. 2016. 烟草青枯病菌在烟草根际的定殖及最适发病条件. *植物保护学报*, 43(5): 796–804]
- Liu LJ, Sun CL, Liu XX, He XL, Liu M, Wu H, Tang CX, Jin CW, Zhang YS. 2016. Effect of calcium cyanamide, ammonium bicarbonate and lime mixture, and ammonia water on survival of *Ralstonia solanacearum* and microbial community. *Scientific Reports*, 6:19037

- Macagnan KL, Alves MI, Rodrigues AA, Furlan L, da Silva RR, de Oliveira PD, Vendruscolo CT, da Silveira MA. 2017. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production. PLoS ONE, 12(7): e0180563
- Michel VV, Mew TW. 1998. Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. Phytopathology, 88(4): 300–305
- Qian YL, Wang XS, Wang DZ, Zhang LN, Zu CL, Gao ZL, Zhang HJ, Wang ZY, Sun XY, Yao DN. 2013. The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). Euphytica, 192(2): 259–266
- Robertson AE, Wechter WP, Denny TP, Fortnum BA, Kluepfel DA. 2004. Relationship between a virulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17(12): 1376–1384
- Singh D, Yadav DK, Sinha S, Choudhary G. 2014. Effect of temperature, cultivars, injury of root and inoculum load of *Ralstonia solanacearum* to cause bacterial wilt of tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(13): 1574–1583
- Tan J, Liu YH, Liu Y, Sa S, Wang R, Zhao XY. 2014. Effects of different conditions on growth of tobacco *Ralstonia solanacearum*. Chinese Tobacco Science, 35(1): 85–88 (in Chinese) [谭军, 刘雨虹, 刘影, 萨爽, 王瑞, 赵秀云. 2014. 不同条件对烟草青枯雷尔氏菌生长的影响. 中国烟草科学, 35(1): 85–88]
- Wang HC, Huang YF, Long MJ, Shang SH, Shi CH. 2017b. Analysis of the difference in metabolic phenotypes between *Ralstonia solanacearum* from tobacco and its antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Plant Protection, 44(5): 753–762 (in Chinese) [汪汉成, 黄艳飞, 龙明锦, 商胜华, 史彩华. 2017b. 烟草青枯病菌与其拮抗菌解淀粉芽孢杆菌的代谢表型差异分析. 植物保护学报, 44(5): 753–762]
- Wang HC, Huang YF, Wang J, Wang MS, Xia HQ, Lu HX. 2015. Phenotypic fingerprints of *Ralstonia solanacearum* Biovar 3 strains from tobacco and tomato in China assessed by phenotype microarray analysis. Plant Pathology Journal, 14(1): 38–43
- Wang HC, Li LC, Cai B, Cai LT, Chen XJ, Yu ZH, Zhang CQ. 2018. Metabolic phenotype characterization of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. Frontiers in Microbiology, 9: 470
- Wang HC, Wang MS, Huang YF, Wang J, Shang SH, Zhang CQ. 2016. Isolation, identification and phenotype microarrays analysis of an antagonistic bacterial strain X-60 against tobacco bacterial wilt. Acta Phytopathologica Sinica, 46(3): 409–419 (in Chinese) [汪汉成, 王茂胜, 黄艳飞, 王进, 商胜华, 张长青. 2016. 烟草青枯病菌拮抗菌株 X-60 的分离鉴定及其表型组学分析. 植物病理学报, 46(3): 409–419]
- Wang HC, Yu J, Cai LT, Lu N. 2017a. Effect of temperature, relative humidity, inoculum amount and pH on pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* on tobacco. Chinese Tobacco Science, 38(5): 8–12 (in Chinese) [汪汉成, 余婧, 蔡刘体, 陆宁. 2017a. 温度、湿度、接菌量及pH对烟草青枯病菌致病力的影响. 中国烟草科学, 38(5): 8–12]
- Wang MS, Wang HC, Huang YF, Wang J, Zhang CQ, Lu HX. 2015. Phenotypic analysis of *Phytophthora parasitica* by using high throughput phenotypic microarray. Acta Microbiologica Sinica, 55(10): 1356–1363
- Wang SK, Wang J, Kang LH, Xu DP. 2010. Influences of temperatures, pH values and inoculum concentrations on the adsorption and ingress of *Ralstonia solanacearum* to *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* seedling root. Scientia Silvae Sinicae, 46(12): 80–85

(责任编辑:王璇)