

黄玉凤,李 菲,汪汉成,等.烟草镰刀菌根腐病病原生物学特性及其优势种的代谢表型特征[J].江苏农业科学,2024,52(7):124-132.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.07.017

烟草镰刀菌根腐病病原生物学特性 及其优势种的代谢表型特征

黄玉凤^{1,2},李 菲¹,汪汉成²,蔡刘体²,陈兴江²,邱学柏²

(1. 贵州师范大学生命科学学院/西南喀斯特山地生物多样性保护国家林业和草原局重点实验室,贵州贵阳 550001;

2. 贵州省烟草科学研究院,贵州贵阳 550081)

摘要:为明确烟草镰刀菌根腐病(tobacco *Fusarium* root rot)病原生物学特性和代谢表型特征,采用菌丝生长速率法和活体接种法分别测定了3种烟草镰刀菌根腐病病原[腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、木贼镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)]在不同温度、光照条件下的生长速率和致病力,同时采用Biolog代谢表型技术测定其优势种腐皮镰刀菌的碳氮源、渗透压和pH值下的代谢表型。结果表明,3种病原菌菌丝生长适宜温度均为25~30℃,木贼镰刀菌M417菌丝生长速率最快,可达10.71 mm/d;腐皮镰刀菌F421产孢量最高,可达 9.15×10^6 个/cm²;连续黑暗条件均有利于菌丝生长和产孢。尖孢镰刀菌J419和腐皮镰刀菌F503致病力较强,7 d时的病斑面积分别为1.05 cm²和1.35 cm²。代谢表型结果表明,腐皮镰刀菌碳氮源代谢能力强,可高效代谢丙三醇、D-甘露醇、D-松二糖等54种碳源,以及L-鸟氨酸、α-氨基-N-戊酸、L-鸟氨酸等大部分氮源;其pH值适应范围为3.5~8.5,最适pH值为6,表现出强脱羧酶活性和弱脱氨酶活性;在1%~5.5% NaCl、5%~10%乙二醇、1%甲酸钠、2%~3%尿素、7%~9%乳酸钠、10~50 mmol/L硫酸铵(pH值=8)、10~100 mmol/L硝酸钠、10~40 mmol/L亚硝酸钠等环境下均可正常生长。研究结果揭示了3种镰刀菌属根腐病病原的生物学特性,发现优势种腐皮镰刀菌的营养需求广、具有较强的渗透压和pH值环境适应能力,为镰刀菌根腐病灾变规律的研究提供了参考。

关键词:烟草根腐病;镰刀菌属;生物学特性;代谢表型

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)07-0124-09

烟草是我国重要的经济作物,被广泛种植并用于生产香烟、雪茄等烟草制品^[1]。然而,烟草种植过程中常常受到多种病害的威胁,其中一种真菌性土传病害——镰刀菌根腐病(tobacco *Fusarium* root rot)较为常见^[2]。该病害由镰刀菌属(*Fusarium* sp.)真菌感染引起,被报道的致病菌有尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)等^[3-4]。该

病主要发生于烟草大田期,典型症状有烟株矮小、底部叶片叶尖黄化蜷缩焦干。近年来,随着气候条件与种植方式的变化,该病害在我国贵州烟区的发生范围及危害程度呈现上升、加重趋势,给烟农造成严重经济损失^[5],亟须对其病原的生物学特性加强研究,以期掌握该病害的灾变规律。

温度、光照等环境因子影响着植物病原菌的生长^[6]。已有少量烟草根腐病病原菌生物学特性的报道,赵杰研究表明,烟草根腐病病原尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌在10~35℃温度范围内均可生长,最适生长温度为30℃^[7]。陈高航对烟草尖孢镰刀菌研究发现,其致死温度为60℃,且环境适应性强^[8]。汪汉成等研究发现,烟草腐烂病病原菌九州镰刀菌(*F. kyushuense*)在完全黑暗、完全光照、光暗交替环境下菌丝生长速率无显著性差异^[9]。此外,碳氮源营养、渗透压等环境因子也影响着病原菌的生物活性,病原菌对不同营养因子的代谢表型特征可反映其对环境的适应力。文增叶等研究发现,三七根腐病病原尖孢镰刀菌可有效利用淀粉、乳糖等

收稿日期:2024-01-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:32160522、31960550);贵州省科技基金(编号:黔科合基础-ZK[2021]重点036);中国烟草总公司科技项目[编号:110202101048(LS-08)、110202001035(LS-04)];贵州省“百层次”创新型人才项目(编号:黔科合平台人才-GCC[2022]028-1);贵州省科技创新人才团队项目“茄科叶用经济作物病害绿色防控科技创新人才团队建设”。

作者简介:黄玉凤(1998—),女,贵州遵义人,硕士研究生,主要从事病原微生物学研究工作。E-mail:397521401@qq.com。

通信作者:汪汉成,研究员,主要从事烟草植保及微生态研究, E-mail:xiaobaiyang126@hotmail.com;李 菲,教授,主要从事植物根际微生态研究, E-mail:ifei00987@outlook.com。

多种碳源和硝酸铵等氮源^[10]。杨静美等研究发现,番木瓜腐皮镰刀菌(*Fusarium solani* f. sp. *glycine*) 在 pH 值 3~10 范围内均可生长,最适 pH 值为 7~10^[11]。相较而言,作为严重危害烟叶生产的根腐病,其病原菌的生物学特性和环境适应力却缺乏了解。

为此,本研究采用菌丝生长速率法分别测定镰刀菌根腐病病原在不同温度、光照条件下的生长速率,利用活体接种法测定不同种的致病力,同时采用 Biolog 代谢表型技术研究其在不同碳氮源、渗透压和 pH 值下的代谢表型,旨在明确其生物学特性和环境适应力,为烟草根腐病的灾变规律研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验概况及材料

试验于 2023 年 6—11 月在贵州省贵阳市观山湖区贵州省烟草科学研究院进行。烟草镰刀菌根腐病病原腐皮镰刀菌(*F. solani*) 菌株 F421、F506、F503,木贼镰刀菌(*F. equiseti*) 菌株 M417、M423、M16,尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) 菌株 J419、J3、J210,均由贵州省烟草科学研究院真菌实验室提供。供试烟草品种为云烟 87,待烟叶长至 7~8 叶时备用。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;燕麦琼脂(OA)培养基:燕麦片 30 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 L;烷基酯琼脂培养基(AEA)培养基:酵母提取粉 5 g、琼脂 20 g、丙三醇 20 mL、硝酸钠 6 g、磷酸氢二钾 1.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.25 g;绿豆汤培养基:新鲜绿豆 20 g,洗净,放入 1 000 mL 纯净水中煮沸 20 min,过滤去除豆渣,滤液加水补足 1 000 mL,加入琼脂粉 20 g,搅拌均匀,分装,121 ℃ 湿热灭菌 20 min。

Biolog 代谢板 FF(货号:94545)、PM3(货号:12121)、PM9(货号:12161)、PM10(货号:12162)和接种液 FF-IF(filamentous fungi-inoculating fluid)(货号:72106),均由美国 Biolog 公司生产;*D*-葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸钠等,购自美国 Sigma 公司;酵母氮源,购自美国 Difco 公司;Omnilog PM 高通量微生物细胞表型芯片测定系统,由美国 Biolog 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 烟草镰刀菌根腐病病原的生物学特性

(1)温度对菌丝生长和产孢量的影响:用菌丝生长速率法测定腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌在不同温度范围的菌丝生长速率。用直径 6 mm 打孔器制取培养 7 d 的根腐病菌菌碟,置于 PDA 培养基上,于 5、10、15、20、25、30、35 ℃ 黑暗条件下培养,每处理设 3 次重复,接种 7 d 后采用“十字交叉法”测量菌落直径,并计算生长速率。平板测定完后,用 10 mL 无菌水洗涤平板,制成孢子悬浮液,在显微镜下利用血球计数板测定单位面积(cm^2)的产孢量。(2)光照条件对菌丝生长和产孢量的影响:采用菌丝生长速率法测定不同光照条件下菌丝生长速率。使用无菌打孔器在 PDA 培养基上制取直径为 6 mm 的培养 7 d 的根腐病菌菌碟,将其接种到新的 PDA 培养基中,置于温度均为 28 ℃、光照条件分别为连续光照、连续黑暗、光—暗周期为 12 h—12 h 的生化培养箱,每个处理设置 3 次重复,接种 7 d 后采用“十字交叉法”测量菌落直径,并计算生长速率。随后用 10 mL 无菌水洗涤平板,制成孢子悬浮液,在显微镜下利用血球计数板测定单位面积(cm^2)的产孢量。(3)菌丝致死温度的测定:随机选取 3 株菌株(尖孢镰刀菌 J419、腐皮镰刀菌 F503、木贼镰刀菌 M16)进行菌丝致死温度测定。在 PDA 培养基上制取直径为 6 mm 的菌碟,将其置于盛有 5 mL 灭菌水的无菌试管中,分别置于 35、40、45、50、55 ℃ 恒温水浴锅中水浴 10 min,同时缓慢摇动试管使之受热均匀,取出试管冷却至室温,将处理后的菌饼接种到 PDA 平板中央,并置于 28 ℃ 培养箱中黑暗培养,6 d 后观察菌丝生长情况以确定致死温度范围。每个处理重复 3 次。(4)不同培养基对菌丝生长的影响:参照上述方法制备腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌直径 6 mm 的菌碟,分别置于 PDA、OA、AEA、绿豆汤培养基上,接菌后所有平板均置于温度为 28 ℃ 黑暗条件下的培养箱中培养。每处理重复 3 次,7 d 后测量菌落直径。

1.2.2 烟草镰刀菌根腐病病原的致病力测定 随机选取尖孢镰刀菌菌株 J419、腐皮镰刀菌菌株 F503、木贼镰刀菌菌株 M16 进行病原菌致病力测定。烟草茎部和根部的致病力测定参照毕武等的方法^[12],叶部致病力的测定参照汪汉成等的方法^[8]。将 6 mm 菌饼分别接种到刺伤和无刺伤的烟苗组织上,接种后菌碟和烟株组织采用浸有无菌水的脱脂棉保湿,随后放在 28 ℃ 黑暗条件下的人工气候箱中培养,对照组接种无菌丝的 PDA 菌碟。接种

7 d 后,采用“十字交叉法”测量病斑直径,每个菌株重复 3 次。

1.2.3 代谢表型测定 由“1.2.1”节测定结果可知腐皮镰刀菌 F421 产孢能力较强,选择此菌株进行测定。使用 Biolog 系统测定其代谢表型。将烟草根腐病菌接种到 PDA 培养基上,于 28 ℃、黑暗条件下培养 7 d,至产生大量分生孢子。无菌棉签蘸用 FF 接种液(FF-IF)浸湿,在菌落表面旋转,接着将棉签浸入 20 mL 的 FF-IF 接种液中制备 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液。碳源代谢表型测定:将孢子悬浮液依次加入 FF 代谢板微孔中(100 μ L/孔);氮源代谢表型测定:取 10.025 mL 孢子悬浮液、D-葡萄糖溶液 0.375 mL、酵母氮源溶液 1 mL 与无菌水 0.6 mL 均匀混合加入到 PM3 代谢板中;渗透压和 pH 值环境下代谢表型测定:取孢子悬浮液 20.05 mL、D-葡萄糖溶液 0.75 mL、酵母氮源溶液 2 mL、无菌水 1.2 mL 均匀混合,加入 PM9 和 PM10 代谢板中;按照 Biolog PM 微生物细胞表型流程将各测定板放于 Biolog 培养箱 28 ℃培养,设置 OmniLog 工作软件,每 15 min 收集 1 次数据。根据动力学曲线,分析其代谢表型特征。

1.2.4 数据分析 使用 Excel 2010 和 SPSS 24.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,应用 LSD (least significant difference)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 烟草镰刀菌根腐病病原的生物学特性

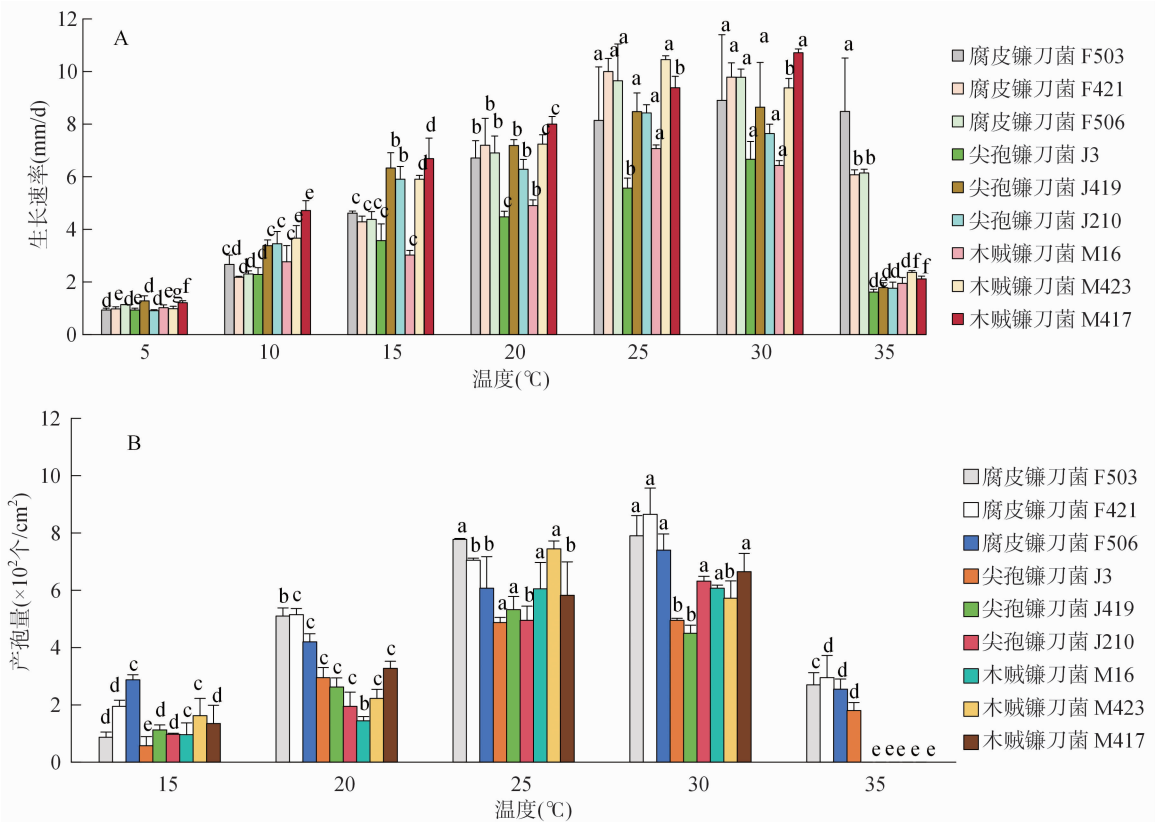
2.1.1 温度对菌丝生长速率的影响 在不同温度下,腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌的菌丝生长速率各不相同,且存在显著性差异。在 5 ~ 30 ℃ 条件下,所测尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌和木贼镰刀菌菌株均能生长。随着温度的升高,菌丝生长速率均呈现先增加后减小的趋势。在 25 ~ 30 ℃ 时,9 株菌株的菌丝生长速度均较快。在 25 ℃ 时,木贼镰刀菌 M16、木贼镰刀菌 M423、腐皮镰刀菌 F421、尖孢镰刀菌 J210 的菌丝生长速率较快,分别为 7.07、10.45、8.43、10.00 mm/d;在 30 ℃ 时,木贼镰刀菌 M417、腐皮镰刀菌 F506、腐皮镰刀菌 F503、尖孢镰刀菌 J419、尖孢镰刀菌 J3 的菌丝生长速率最快,分别达到 10.71、9.78、8.90、8.64、6.67 mm/d。25 ℃ 和 30 ℃ 的生长速度显著高于其他温度处理 ($P < 0.05$) (图 1-A)。9 株菌株菌丝生长的适宜温度为 25 ~ 30 ℃,低于 15 ℃ 或高于 30 ℃ 菌丝生长

缓慢。

2.1.2 温度对产孢量的影响 在不同温度下,烟草镰刀菌属根腐病菌产孢量之间存在差异。随着温度升高,腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌的产孢量呈现先增加后减小的趋势。在 15 ~ 35 ℃ 温度范围内均可产孢,在 25 ~ 30 ℃ 时产孢量最多。在 25 ℃ 时,木贼镰刀菌 M423、尖孢镰刀菌 J419、尖孢镰刀菌 J210 产孢量最多,分别为 7.45×10^6 、 5.33×10^6 、 4.95×10^6 个/cm²;在 30 ℃ 时,腐皮镰刀菌 F421、腐皮镰刀菌 F506 产孢量最多,分别为 8.65×10^6 、 7.40×10^6 个/cm²;而腐皮镰刀菌 F503、尖孢镰刀菌 J3、木贼镰刀菌 M16、木贼镰刀菌 M417 在这 2 个温度范围内的产孢量无显著性差异。在 35 ℃,产孢量呈下降趋势,尖孢镰刀菌 J3、尖孢镰刀菌 J419、木贼镰刀菌 M16、木贼镰刀菌 M417、木贼镰刀菌 M423 在此温度范围不产孢(图 1-B)。总之,9 株镰刀菌产孢的适宜温度为 25 ~ 30 ℃,低于 15 ℃ 或高于 30 ℃ 时产孢量少甚至不产孢。

2.1.3 光照对菌丝生长的影响 腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌在连续光照、连续黑暗和 12 h—12 h 光暗交替条件下,均可正常生长。在 3 种光照条件下,木贼镰刀菌 M16 在连续黑暗条件和 12 h—12 h 光暗交替条件下的菌丝生长速率分别为 4.45、4.33 mm/d,两者之间无显著性差异,但显著高于连续光照条件;尖孢镰刀菌 J3 在连续黑暗和连续光照条件下的菌丝生长速率分别为 4.18、4.02 mm/d,两者之间无显著性差异,但显著高于 12 h—12 h 光暗处理条件;尖孢镰刀菌 J210 在连续光照条件和 12 h—12 h 光暗交替条件下的菌丝生长速率分别为 9.19、9.57 mm/d,两者之间无显著性差异,但显著低于连续黑暗条件。在 3 种光照测试条件下,腐皮镰刀菌 F503 的菌丝生长速率范围为 4.07 ~ 4.76 mm/d,尖孢镰刀菌 J419 的菌丝生长速率为 9.24 ~ 10.02 mm/d,相同菌种的不同菌株间均无显著性差异;在黑暗条件下,木贼镰刀菌 M417、木贼镰刀菌 M423、腐皮镰刀菌 F421、腐皮镰刀菌 F506 的菌丝生长速率均最快,显著高于其他 2 个光照条件处理 ($P < 0.05$, 图 2-A)。因此,连续黑暗条件为腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌菌丝生长的最适光照条件。

2.1.4 光照对产孢量的影响 在不同光照条件下,所有腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌菌株均可产孢,且产孢量在不同光照条件下存在差异性。



同色柱上不同小写字母表示经 *LSD* 法检验差异显著($P<0.05$)。图 2 同
图1 不同温度对烟草根腐病菌生长速率(A)及产孢量(B)的影响

由图 2 - B 可知,9 株镰刀菌属根腐病菌在黑暗条件下的产孢量最多,例如腐皮镰刀菌 F421 的产孢量为 7.05×10^6 个/ cm^2 ,尖孢镰刀菌 J3 的产孢量为

4.88×10^6 个/ cm^2 。连续光照条件下,产孢量均最少。为此,连续黑暗条件有利于腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌 9 株镰刀菌的产孢。

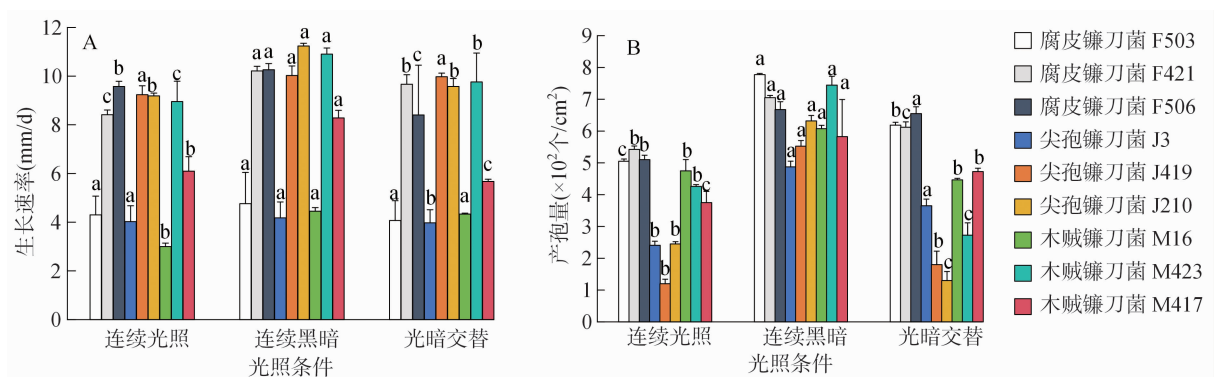


图2 不同光照条件对烟草根腐病菌生长速率(A)及产孢量(B)的影响

2.1.5 菌丝的致死温度 腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌在 35、40 ℃ 水浴处理 10 min 后,重新置于 28 ℃ 黑暗条件下的人工气候箱中培养均可生长,而在 45、50、55 ℃ 条件下水浴处理后不能生长(表 1)。为此,3 株镰刀菌的致死温度均为 45 ℃。

2.1.6 不同培养基对镰刀菌属根腐病原菌丝生长速率的影响 结果表明,在 PDA 培养基、OA 培养

表 1 不同温度下 3 株菌株的生长能力					
菌株	各温度下的生长能力				
	35 ℃	40 ℃	45 ℃	50 ℃	55 ℃
木贼镰刀菌 M16	+	+	-	-	-
尖孢镰刀菌 J419	+	+	-	-	-
腐皮镰刀菌 F506	+	+	-	-	-

注: + 表示能生长; - 表示不能生长。

基、AEA 培养基、绿豆汤培养基上,腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌的菌丝生长速率存在差异(表 2)。在相同条件下,木贼镰刀菌 M16、尖孢镰刀菌 J210、腐皮镰刀菌 F506 在 AEA 培养基上的菌丝生长速率最大,分别为 10.19、11.36、10.07 mm/d,OA 培养基和绿豆汤培养基的菌丝生长速率差异不显著,而 PDA 培养基的菌丝生长速率最慢。尖孢镰刀菌 J3 和腐皮镰刀菌 F503 在 AEA 培养基上的菌丝生长速率最快,分别为 9.72、9.95 mm/d,在 PDA 培养基和绿豆汤培养基的菌丝生长速率无显著性差异。木贼镰刀菌 M417 在 AEA 培养基上的菌丝

生长速率最大,达到 11.09 mm/d,在 OA 培养基和 PDA 培养基上的菌丝生长速率无显著性差异。木贼镰刀菌 M423 在 PDA 培养基、AEA 培养基、绿豆汤培养基上的菌丝生长速率分别 4.29、5.24、4.36 mm/d,三者之间无显著性差异。尖孢镰刀菌 J419 在 AEA 培养基上和绿豆汤培养基上的菌丝生长速率分别为 9.36、8.88 mm/d,两者之间无显著性差异。腐皮镰刀菌 F421 在 AEA 培养基上的菌丝生长速率最大,达到 10.21 mm/d,而在 PDA 培养基上的菌丝生长速率最小。为此,3 种镰刀菌菌丝生长的最适培养基均为 AEA 培养基。

表 2 不同培养基对镰刀菌属根腐病菌丝生长速率的影响

菌株	菌丝生长速率(mm/d)			
	PDA 培养基	AEA 培养基	OA 培养基	绿豆汤培养基
木贼镰刀菌 M16	3.74 ± 0.18c	10.19 ± 0.44a	9.50 ± 0.14b	9.36 ± 0.14b
木贼镰刀菌 M417	5.71 ± 0.22c	11.09 ± 0.36a	6.60 ± 0.18c	7.76 ± 0.65b
木贼镰刀菌 M423	4.29 ± 0.79ab	5.24 ± 0.22a	3.79 ± 0.64b	4.36 ± 0.33ab
尖孢镰刀菌 J419	6.17 ± 0.14b	9.36 ± 0.33a	6.60 ± 0.15b	8.88 ± .18a
尖孢镰刀菌 J210	7.69 ± 0.39c	11.36 ± 0.12a	9.90 ± 0.17b	10.19 ± 0.15b
尖孢镰刀菌 J3	6.57 ± 0.29c	9.72 ± 0.29a	7.48 ± 0.30b	9.33 ± 0.17c
腐皮镰刀菌 F421	5.36 ± 0.66d	10.21 ± 0.14a	8.02 ± 0.18c	9.14 ± 0.07b
腐皮镰刀菌 F506	4.52 ± 0.21c	10.07 ± 0.47a	8.50 ± 0.12b	8.26 ± 0.32b
腐皮镰刀菌 F503	4.00 ± 0.29c	9.95 ± 0.08a	8.93 ± 0.07b	4.43 ± 0.12c

注:同行数据后不同小写字母表示经 LSD 法检验差异显著($P < 0.05$)。

2.2 烟草镰刀菌根腐病病原的致病力

致病力试验结果表明,3 株腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌菌株刺伤、无刺伤接种,烟草叶片 7 d 后均出现明显的发病症状,且刺伤接种的尖孢镰刀菌 J419、腐皮镰刀菌 F506 的致病力较强,病斑面积分别为 1.35 cm² 和 1.05 cm²;木贼镰刀菌 M16 的致病力较弱。3 菌种在叶部均形成褐色病斑,病斑周围有黄褐色晕圈,3 个种在叶片上的致病力强弱顺序依次为尖孢镰刀菌 > 腐皮镰刀菌 > 木贼镰刀菌。腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌和尖孢镰刀菌在接种茎部后,茎部均出现白色菌丝体,随后病斑逐渐扩大直至整株死亡,3 个种在茎上的致病力强弱顺序依次为尖孢镰刀菌 > 腐皮镰刀菌 > 木贼镰刀菌。根部接种 3 种病原菌后,烟株叶部均发现不同程度的萎蔫黄化,根系破碎,须根减少(图 3)。

2.3 腐皮镰刀菌的代谢表型特征

2.3.1 碳源代谢表型 由图 4 可见,腐皮镰刀菌对 Biolog FF 板上的所有碳源都能代谢,不同碳源间的代谢强度存在差异。其中可高效代谢的碳源约有

54 种,包括 D - 阿拉伯糖醇、丙三醇、D - 甘露醇、D - 松二糖、L - 焦谷氨酸等,但对 α - D - 乳糖、γ - 羟基丁酸等 5 种碳源的代谢能力相对较弱。

2.3.2 氮源代谢表型 由图 4 可见,腐皮镰刀菌对 Biolog PM3 板上的所有氮源都能代谢。其中,能够高效代谢的氮源包括 Met - Ala、α - 氨基 - N - 戊酸、L - 鸟氨酸等 6 种氮源;对 8 种氮源的代谢能力相对较弱,包括羟胺、甲胺、正戊胺、ε - 氨基 - N - 己酸、谷胱甘肽等;相较而言,腐皮镰刀菌对谷胱甘肽的利用能力最弱。

2.3.3 渗透压和 pH 值代谢表型特征 由图 5 可知,腐皮镰刀菌具有较强的渗透压适应能力,可代谢 10 ~ 40 mmol/L 亚硝酸钠、1% ~ 5.5% 硫酸钠、1% 甲酸钠、1% 和 7% ~ 9% 的乳酸钠、5% ~ 10% 乙二醇、2% ~ 3% 的尿素、10 ~ 100 mmol/L 硝酸钠、10 ~ 40 mmol/L 亚硝酸钠,而对 6.5%、8% 的氯化钠、20 ~ 200 mmol/L 苯甲酸钠(pH 值 5.2)、60 ~ 80 mmol/L 亚硝酸钠、7% 的尿素的代谢较弱。在 6% 氯化钠与不同渗透压物质协同下,腐皮镰刀可

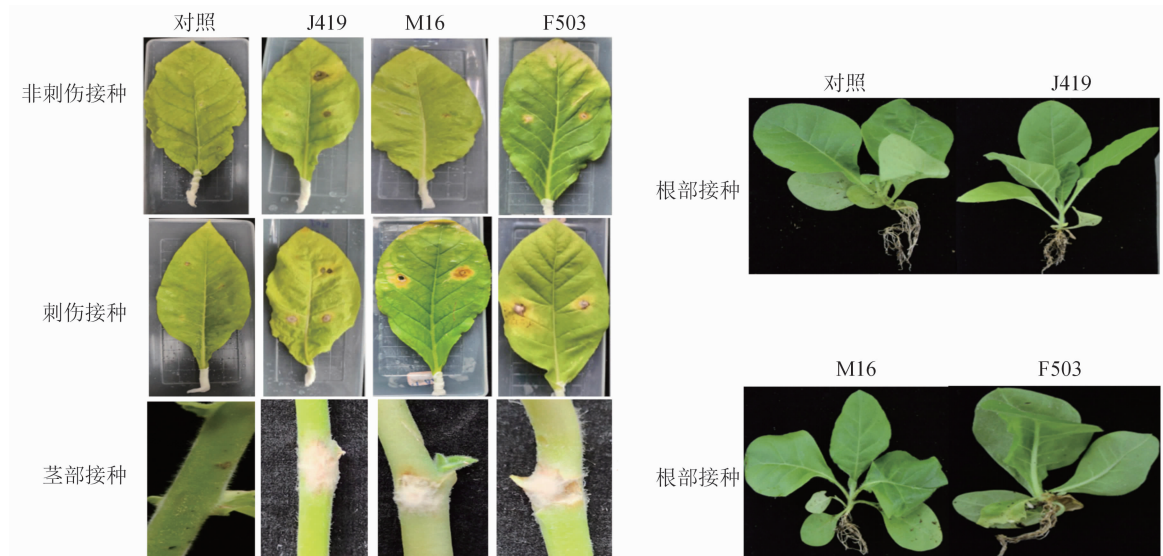


图3 3株烟草镰刀菌属根腐病病原菌菌株在叶部、茎部、根部上的致病力

代谢渗透压物质,但对甜菜碱、四氢嘧啶、肌酸、 γ -氨基-N-丁酸的代谢较弱。腐皮镰刀菌可进行代谢的 pH 值范围为 3.5 ~ 8.5,最适 pH 值为 6。当 pH 值 4.5 胁迫与不同氨基酸混合时,腐皮镰刀菌可高效代谢大部分基质,例如 *L*-谷氨酸、*L*-天冬氨酸、*L*-丝氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-组氨酸、*L*-天门冬酰胺等,但不能代谢邻氨基苯甲酸。当 pH 值 9.5 胁迫与不同氨基酸混合时,腐皮镰刀菌可代谢大部分基质,如 *L*-谷氨酸、*L*-组氨酸、*L*-丙氨酸、腐胺、胍基丁胺、酪胺等,而对 *L*-酪氨酸的代谢较弱。此外,还可高效代谢 *X*- β -D-氨基葡萄糖苷、*X*- β -D-氨基半乳糖苷、*X*-氨基磷酸酶、*X*-芳基硫酸酯酶、*X*-SO₄ 等基质。在 pH 值分别为 4.5 和 9.5 的不同氨基酸胁迫下,分别测定了 B1 ~ D12 和 E1 ~ G12 孔中 PM10 的脱羧酶和脱氨酶活性。结果反映该病原菌的脱羧酶活性较高,但脱氨酶活性较差。

3 讨论

烟草镰刀菌根腐病是发生在烟草上的真菌性土传病害,在我国各种植烟区均有发生,其危害于烟草根部,对烟草的经济效益造成重大损失^[13-14]。温度和光照条件能显著影响病原菌的生长。本研究发现腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌、尖孢镰刀菌在 10 ~ 35 ℃ 条件下均可生长,25 ~ 30 ℃ 温度范围内菌丝生长速率最大、产孢量最多,这与赵杰报道的结果^[7]基本一致。本研究发现烟草镰刀菌根腐病病原菌生长的适温范围与同为烟草土传病害的烟草黑

胫病菌 *Phytophthora parasitica* (21 ~ 35 ℃)^[15] 类似,这可能是烟草田间病害镰刀菌根腐病与黑胫病常常混发、难以防治的原因之一。汪汉成等报道九州镰刀菌光照处理对菌丝生长没有明显影响,光暗交替更利于其产孢^[16];而本研究发现尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌在黑暗条件下更利于菌丝生长和产孢,其差异可能是不同种镰刀菌的生物学特性不同造成的。本研究发现烟草镰刀菌属根腐病原菌尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、木贼镰刀菌均可致烟草叶部、茎部和根部发病,结果与姚健等研究认为的烟草根腐病病原菌尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌可致烟草发病的结论^[17]一致,进一步验证了本研究结果的可靠性。王立国等研究报道,广金钱草根腐病原腐皮镰刀菌在 PDA 和 OA 培养基上的菌丝生长差异不显著^[18],而本研究发现腐皮镰刀菌菌丝在 OA 培养基上比 PDA 培养基上生长更快,说明同种菌菌株间在不同培养基的生长速度间存在差异。

营养元素是病原菌生长的必要条件,碳源和氮源的利用是其生长最重要的两大营养元素。病原菌对不同碳氮源利用的种类和强度存在差异性,如汪汉成等^[19]研究报道烟草赤星病菌可高效代谢的碳源有 *L*-果胶糖、*D*-半乳糖等 34 种,氮源有 *L*-谷氨酸、*L*-赖氨酸等 60 余种。本研究采用 Biolog FF 碳源代谢板进行测试,FF 板大部分碳源为真菌可代谢碳源,能反映腐皮镰刀菌对大部分碳源的需求。本研究发现腐皮镰刀菌可高效代谢大部分碳源,如 *D*-阿拉伯糖醇、丙三醇等,推测这些碳源有助于根腐病菌的生长。通过 Biolog PM3 氮源代谢板

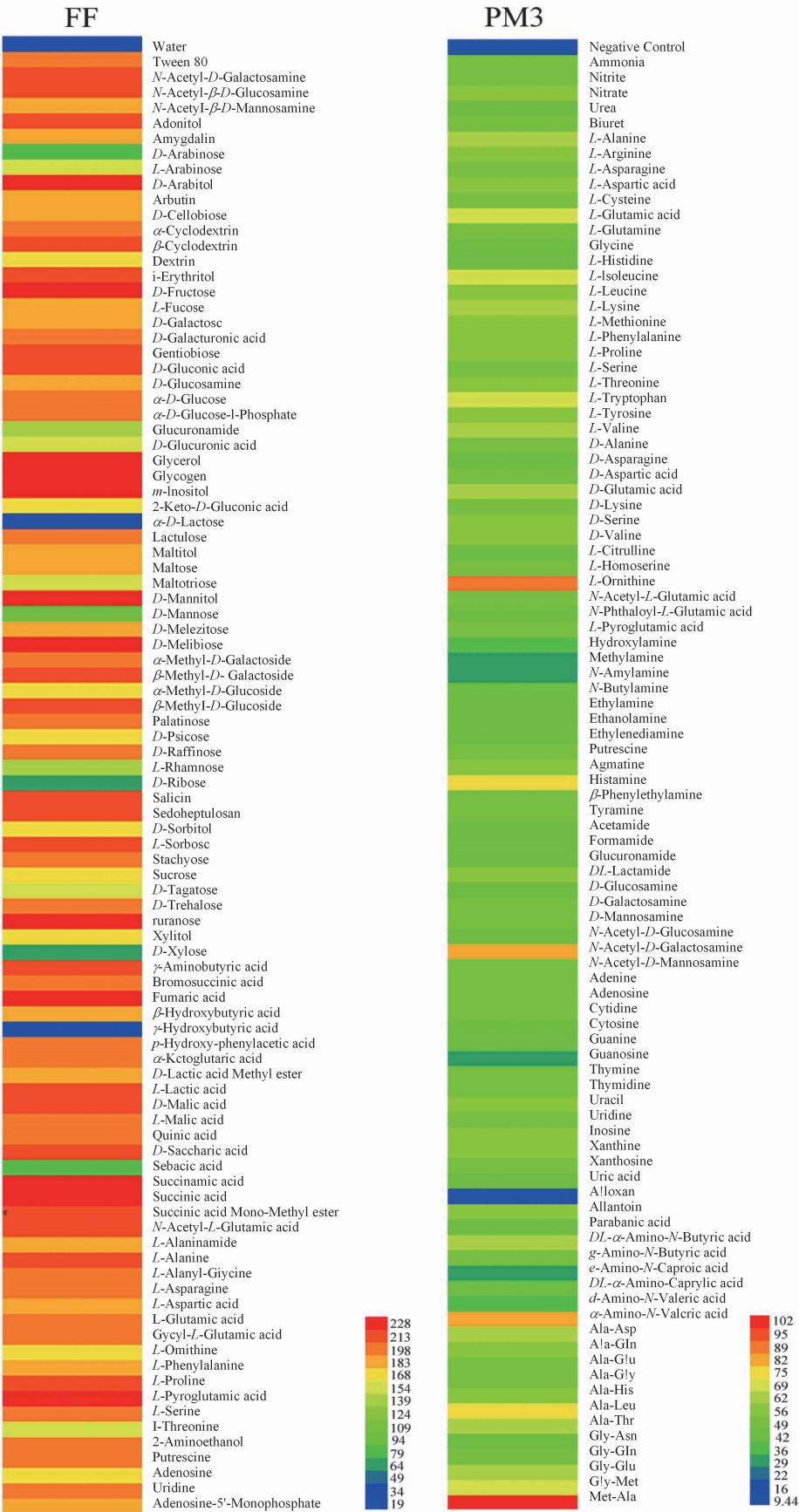


图4 烟草根腐病菌腐皮镰刀菌在 FF、PM3 代谢板上的代谢特征

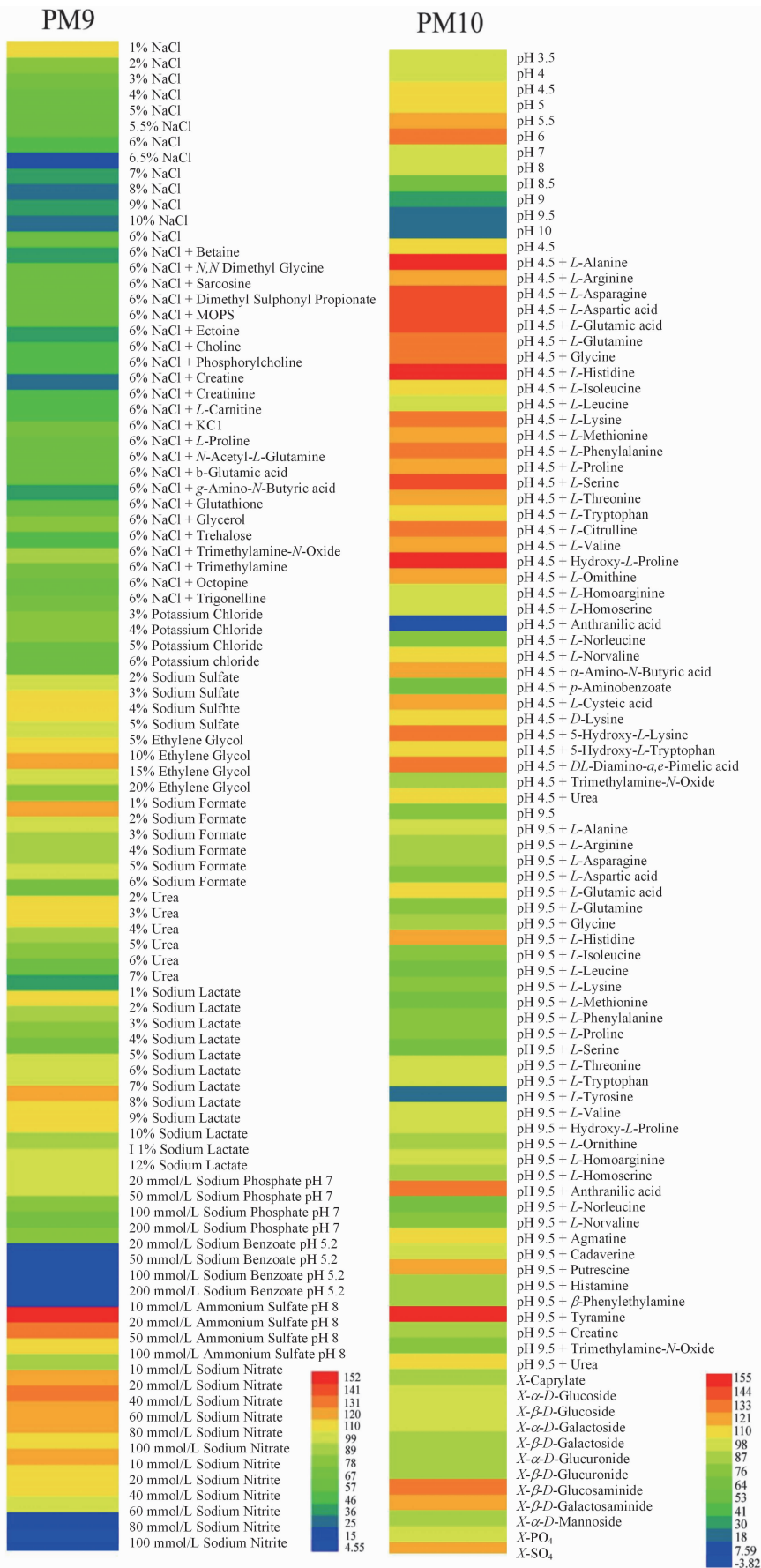


图5 烟草根腐病菌腐皮镰刀菌在 PM9、PM10 代谢板上的代谢特征

可知腐皮镰刀菌对大部分氮源的代谢能力一般,且对谷胱甘肽的代谢能力最弱,推测这类氮源可抑制根腐病菌的生长。

渗透压和 pH 值等环境因子对病原菌的生长与危害具有重要影响^[19],病原菌在不同环境中的代谢能力变化,可反映其对环境的耐受性。本研究基于 Biolog 表型技术测定了烟草镰刀菌属根腐病菌腐皮镰刀菌生长的最适 pH 值为 6。当 pH 值为 4.5 时,腐皮镰刀菌可代谢大部分氨基酸;当 pH 值为 9.5 时,烟草根腐病菌腐皮镰刀菌对氨基酸代谢活性相对较弱;该结果反映腐皮镰刀菌的脱羧酶活性较高,但脱氨酶活性较差。烟草根腐病菌与烟草其他病原菌相比,其 pH 值适应范围与烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* (pH 值 5.0 ~ 10)^[20]、烟草黑胫病菌 (pH 值 3.5 ~ 10)^[15] 相似。病原菌在烟草上的 pH 值范围不同可能是其脱羧酶活性和脱氨酶活性的差异造成的。病原菌对不同渗透压物质的代谢活性不同,可反映其在不同逆境中的耐受力。烟草腐皮镰刀菌对 20 ~ 200 mmol/L 苯甲酸钠 (pH 值 5.2)、60 ~ 80 mmol/L 亚硝酸钠、甜菜碱、四氢嘧啶等部分物质的代谢较弱,因此可使用不同浓度的渗透压物质来减轻该病害的危害,这需进一步深入研究。本研究获得的烟草腐皮镰刀菌的代谢表型组学信息为镰刀菌属其他病原菌的代谢表型研究提供了借鉴。

参考文献:

- [1] 刘茜,李义婷,蔡刘体,等. 烟草根茎部病原真菌的分离与鉴定[J]. 中国烟草科学,2022,43(6):45-52.
- [2] 刘利佳,李芳芳,何雷,等. 烟草镰刀菌根腐病原菌的鉴定及其对 5 种杀菌剂的敏感性分析[J]. 河南农业科学,2021,50(7):101-109.
- [3] 邱睿,白静科,李成军,等. 河南烟草镰刀菌的分子鉴定及致病性分析[J]. 中国烟草学报,2018,24(2):129-134.
- [4] 邱睿,李小杰,李娟,等. 河南烟区烟草镰刀菌根腐病原菌鉴定及侵染烟草根系观察[J]. 烟草科技,2023,56(7):17-24.
- [5] 盖晓彤,卢灿华,户艳霞,等. 云南省烟草镰刀菌根腐病原菌鉴定[J]. 中国烟草学报,2023,29(3):74-83.
- [6] 胡吉凤,姜于兰. 温度和光照对烟草青枯病菌生长的影响[J]. 山地农业生物学报,2015,34(6):46-49.
- [7] 赵杰. 山东省烟草镰刀菌根腐病原及生物学特性的研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013:18-19.
- [8] 陈高航. 烟草根腐病原菌鉴定及其生物学特性观察[D]. 武汉:华中农业大学,2013:19-22.
- [9] 汪汉成,王进,李文红,等. 烤烟苗期茎部腐烂病原菌九州镰孢菌的生物学特性[J]. 中国烟草学报,2014,20(1):65-70.
- [10] 文增叶,李定华,代梦瑶,等. 三七根腐病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性分析[J]. 中药材,2019,42(9):1978-1984.
- [11] 杨静美,陈健,罗金棠,等. 番木瓜茄病镰刀菌的生物学特性研究[J]. 中国热带农业,2011,38(1):56-58.
- [12] 毕武,陈娟,焦晓琳,等. 北京地区西洋参根腐病原菌鉴定及其致病性[J]. 植物保护,2011,37(5):135-138.
- [13] 孙会忠,王洁琼,郝浩浩,等. 两株异源生防菌的鉴定及其对烟草根腐病的协防增效[J]. 河南大学学报(自然科学版),2023,53(5):575-583.
- [14] 白茂军,高正锋,张元力,等. 烟草青枯病发病程度与土壤环境间的响应关系[J]. 江苏农业学报,2023,39(6):1294-1302.
- [15] 刘畅,向立刚,汪汉成,等. 温度对烟草黑胫病菌致病力及代谢表型的影响[J]. 植物保护学报,2021,48(3):669-678.
- [16] 汪汉成,王进,李文红,等. 烤烟苗期茎部腐烂病原菌九州镰孢菌的生物学特性[J]. 中国烟草学报,2014,20(1):65-70.
- [17] 姚健,刘玉珍,李建华,等. 许昌烟草根腐病的分子鉴定及致病性分析[J]. 江西农业学报,2020,32(3):99-103.
- [18] 王利国,王晓英,翁伟华,等. 广金钱草根腐病原菌生物学特性研究[J]. 中华中医药学刊,2008,3(1):147-149.
- [19] 汪汉成,黄艳飞,陈兴江,等. 烟草赤星病菌噬菌酯敏感与抗性菌株的代谢表型差异分析[J]. 植物病理学报,2018,48(6):822-832.
- [20] Chen X J, Li L C, Wang H C et al. Phenotypic fingerprints of *Ralstonia solanacearum* under various osmolytes and pH environments[J]. Plant Pathology Journal,2016,15(3):102-107.