

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2017 年第 5 期, 总第 51 期)

主办: 西南大学植物保护学院, 重庆烟草科学研究所

主编: 丁伟

2017 年 5 月 31 日

工作动态

全国烟草根茎病害根际微生态特征调研与取样——江西、福建、广东、湖南行

根据国家局烟草绿色生态防控重大专项关键技术研发相关内容要求,为系统分析各地烟草青枯病的发生情况,找到影响青枯病发生的关键因子,青枯病绿色防控关键技术研究团队西南大学植物保护学院天然产物农药研究室成员袁国明、刘志永、刘颖、张淑婷于 5 月 15 日--23 日前往江西、福建、广东、湖南主要植烟区调查当地青枯病发生情况,并采集青枯病烟株以及发病烟株根际样品。

本次调研分别去了江西省赣州市石城县、信丰县、瑞金市,抚州市广昌县;福建省三明市建宁县、泰宁县、宁化县、永安县,南平市建阳县、邵武市,龙岩市永定县、武平县;广东省梅州市蕉岭县、五华县,韶关市南雄市以及湖南省郴州市桂阳县,总里程五千公里,共采集青枯病烟株 60 余份,土壤样品 120 余份。发病烟株采集旨在分离、鉴定并完善全国青枯雷尔氏菌株库,分析不同区域青枯雷尔氏菌致病力是否存在差异;土样采集分为根围土与根际土采集两部分,根围土主要分析不同地区发病土壤的理化性质差异,根际土主要用于根际微生物的分析,旨在找出影响青枯病发生的关键因子。

调研发现,由于今年前期气温偏低,大部分地区的青枯病发生并不严重。2017 年青枯病绿色防控技术研究团队将完成全国主要植烟区的病株以及土壤样品的采集工作,后续将跟踪报道。



图 1 项目组成员袁国明采集菌株



图 2 项目组成员采集土壤样品

项目组张永强副教授一行赴攀枝花、广元调研

5月14-15日，西南大学项目组成员副教授张永强、讲师陈娟妮等一行赴攀枝花平地基地单元及广元剑门关基地进行调研。

攀枝花平地基地单元驻点人员武霖通同学带领项目组成员查看了烟草根茎病害绿色防控暨烟草精准用药示范地情况，并汇报了示范区烟苗移栽及成活情况，了解到移栽烟苗长势基本良好，但由于近期持续高温，部分烟苗出现晒伤、晒死等情况。针对这些问题，张永强副教授叮嘱驻点人员及时与烟农沟通，督促他们补苗。

针对示范区烟地存在的各种问题，项目组成员因地制宜地提出以下解决办法：一、立即进行封窝处理，封窝可以达到防病、防烧叶、除垄内杂草的效果；二、针对田间蚜虫要马上采取有效措施，因为蚜虫与烟草花叶病有着密切的联系。鉴于目前田间蚜虫较少，建议立刻施药，以达到最好的灭蚜效果同时减少化学药害；三、鉴于田间卫生的紧迫情况，项目组推荐最好使用中耕除草，这样不仅能达到除草的目的，同时对烟草后期生长有利；四、处理田间病苗，对于已发生病害的烟苗要立即进行清除，加强周围烟苗的防病措施，防止病害范围扩大。对于发病的烟苗要立即补救，减少病害损失。

临走之际，张永强副教授嘱咐驻点人员要及时反馈试验过程中的问题，严格管理自己的作息时间，妥善处理周围的人际关系，不耻下问，发挥实验室“三个特别”精神！



图 3 张永强副教授查看试验烟苗



图 4 张永强副教授指导正确农用措施

项目组丁伟教授一行赴彭水润溪及贵州正安等地调研

5月28-29日，国家烟草专卖局绿色防控重大专项首席专家西南大学丁伟教授一行赴重庆彭水润溪基地单元及贵州省遵义市正安县进行考察调研。

彭水润溪基地单元，包括白果坪示范区、炮台示范区、大厂示范区在内的烟苗移栽工作已完成，补苗工作也已进入尾声。目前，大部分地区烟苗已过了缓苗期，进入定根生长。由于彭水海拔较高，昼夜温差较大，部分地区烟苗出现气候斑和野火病，针对该情况，丁伟教授建议采用荧光假单胞杆菌灌根处理，平衡烟草根际微生态，在一定程度上控制野火病的发生蔓延。同时，丁伟教授就润溪井窖式移栽不到位出现的高脚苗现象提出了小培土保苗壮苗的技术措施，通过膜下细湿土对烟苗的固定保护，促进烟苗根系生长，通过适当扩大地膜移栽口，促进膜下热气的释放以减少对烟苗的热烫伤。

在正安县，丁教授一行实地查看了柿坪乡的《基于拮抗菌剂的青枯病/黑胫病绿色防控技术研究与应用》项目示范区大田培土情况，与烟站领导、烟区客户经理及烟农深入沟通，为示范区培土技术措施提供了建设性意见，并为示范区虫害综合防控建言献策。为保障烟株健康成长，结合生产实效与经验，丁教授为烟株“量身定制”了适宜的小培土技术：破膜后用手将垄体细土汇拢至烟株根部，使土壤有效围绕烟株，在烟株周围形成一圈环槽，以供后续施药施肥。该技术措施可有效保障烟株根系活力，且利于后期追肥。为有效落实该技术实施，丁教授认真为示范区烟农及客户经理讲解，并亲手示范操作细节。丁教授指出，项目示范区根茎病害防控按“三步”走：第一步生石灰调节酸碱度，第二步底肥施用拮抗菌肥，第三步分期灌施拮抗菌剂，三步一定要落实到位。



图5 丁伟教授一行在润溪田间视察



图6 丁伟教授示范小培土关键技术细节

研究进展

NtWRKY7 正调控烟草对青枯病的抗性

植物生长发育过程中会受到外来生物及非生物的干扰，对病原菌入侵的抗病方式常见的有 PTI 和 ETI 两种，而这两种反应联系着一系列复杂的抗病途径，包括多种抗病相关基因

的表达。研究表明，大量转录调控因子如 WRKY 超级基因家族与植物抗病密切相关，在植物抗病过程中起重要作用。本实验室前期研究发现在青枯病抗性品种 PVH2254 烟株中 *NtWRKY7* 的转录水平高于感病品种云烟 87，因此我们对 *NtWRKY7* 在烟草抗病性中的作用进行探究。我们成功地构建了 *NtWRKY7* 过表达株系，通过 RT-qPCR 验证得到 6 株过表达植株，其中 *NtWRKY7-OE7* 表达最高（图 7），后期实验选择株系 *NtWRKY7-OE5* 和 *NtWRKY7-OE7* 进行。通过叶片两点注射青枯菌发现 7 天时野生型云烟 87 叶片大部分发生萎蔫，而 *NtWRKY7-OE7* 过表达植株叶片除注射部位明显坏死其余部位表现正常（图 8），由此可见 *NtWRKY7-OE7* 过表达植株通过加强过敏性坏死反应抑制青枯病大发生。盆栽接菌实验发现，接菌后 *NtWRKY7-OE7* 转基因烟草能显著降低青枯病病情，病情指数仅为野生型烟株的 50%（图 9）。我们虽然已明确了 *NtWRKY7* 能正调控烟草对青枯病的抗性，但具体调控机制还有待进一步研究。

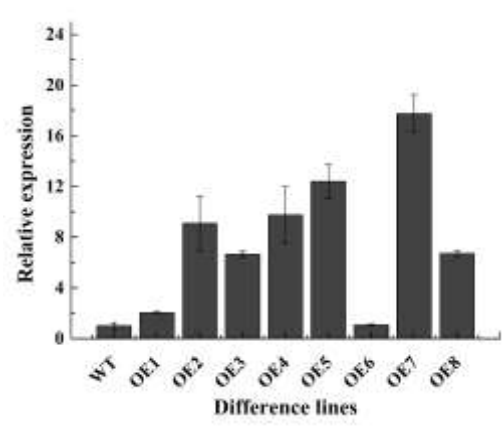


图 7 *NtWRKY7* 过表达植株 qRT-PCR 验证

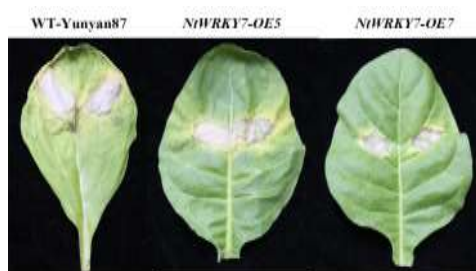


图 8 注射接菌 7 天烟草叶片表型

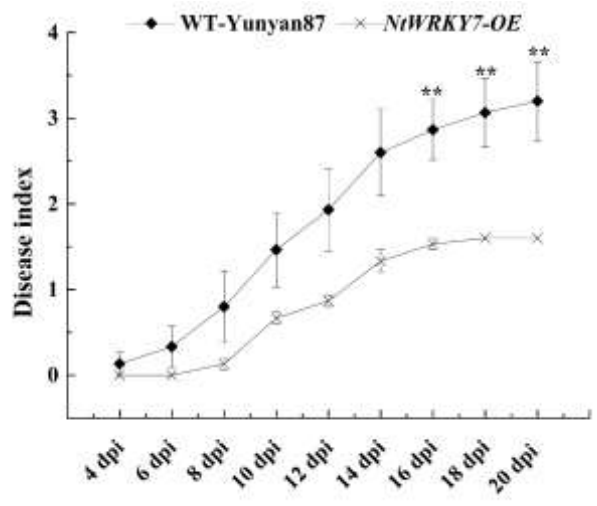


图 9 *NtWRKY7-OE* 烟草对青枯菌的抗病性

(唐元满 供稿)

系统诱导抗性的化学信号运输

植物利用诱导的防御反应和预先形成的物理屏障如角质层和细胞壁共同抵抗病原体和害虫，角质层和细胞壁都是复合结构，它们除了作为结构性阻碍外，还可以在植物防御中发挥信号作用。同样，病原体感染后细胞壁的降解释放出碳水化合物，激活宿主的防御反应。防御系统诱导抗性（SAR）是响应局部感染的广谱抗性形式，其保护未侵染部位免受相关或不相关病原体的继发性侵染。SAR 信号需要两个平行的分枝，一个由水杨酸调节，另一个由壬二酸（AzA）和甘油-3-磷酸（G3P）调节。AzA 和 G3P 在自由基一氧化氮（NO）和活性氧（ROS）的下游发挥作用。在 SAR 期间，受感染的叶中 SA，AzA 和 G3P 积累，但只有一小部分转运到远端未感染的部位。SA 优先通过原生质体传输，而韧皮部装载 AzA 和 G3P 通过共质体发生。AzA 和 G3P 的共质体运输受到胞间连丝（PD）通道的调节。PD 定位蛋白 PDL1 和 PDL5 通过调节 PD 通道以及 SAR 相关蛋白的亚细胞分区来调节 SAR。

病原体感染植物引起水杨酸和自由基 NO 和 ROS 的积累。半乳糖脂二半乳糖二酰基丙三醇（DGDG）与未知信号（由 X 表示）一起作用以诱导 SA 和 NO 的生物合成。ROS 与 NO 形成反馈回路，催化存在于半乳糖脂单糖基二酰基丙三醇（MGDG）和 DGDG 上的 C18Δ9 上的 C9 的氧化解离形成壬二酸（AzA）。AzA 通过诱导甘油-3-磷酸（G3P）的生物合成赋予 SAR。SA 通过质外体输送到远端叶片，而 AzA 和 G3P 通过胞间连丝（PD）传输。PD 定位蛋白（PDL5）的水平调节 PD 渗透性；过表达 PDL5 的植物显示受损的转运体是 AzA 和 G3P 而不是 SA。PDL1 和 PDL5 蛋白质相互作用，是 SAR 所必需的。这些 PDL 蛋白质也有助于质体和细胞质之间的脂质转移蛋白 AZI1 的分配。

植物 SAR 的信号运输途径的解析对我们正确理解植物对病原菌的抗性有重要意义。我们可以以此为思路，探究植物抗性产生的原因，解释一些生物学现象的意义，如植物受病原菌侵染后 ROS 的积累，SA 的产生等。

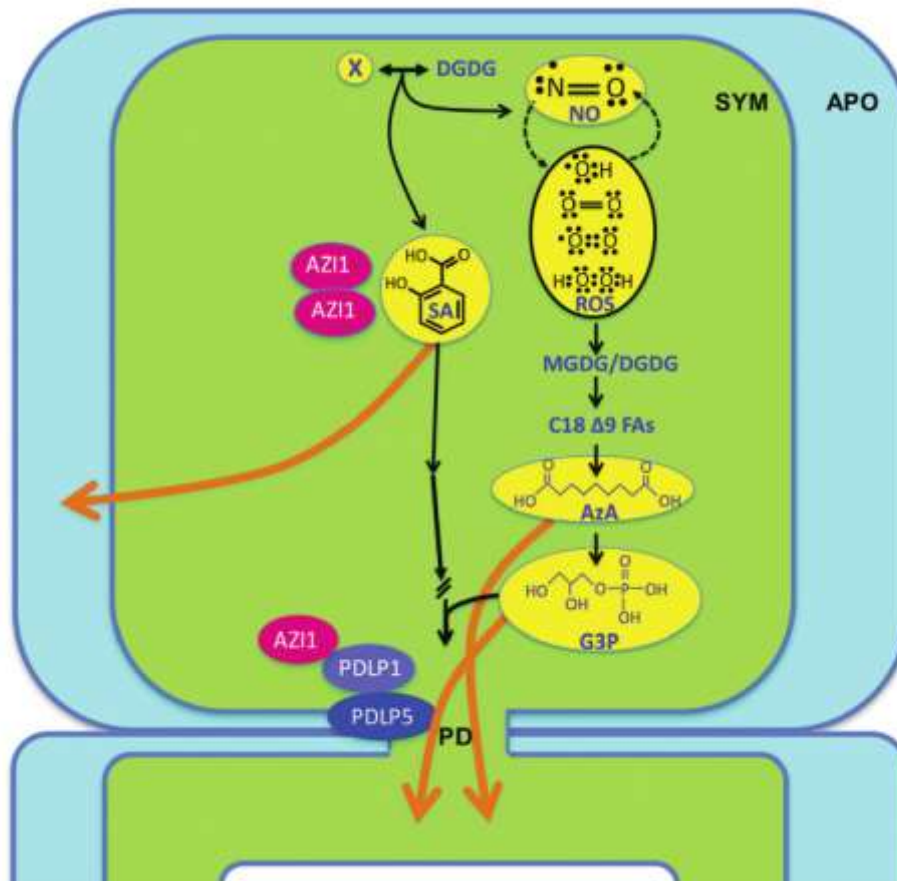


图 10 涉及系统信号的化学物质和蛋白及其运输路线模型

注：APO 和 SYM 分别表明质外体和共质体。

（唐元满 供稿）

最新主要参考文献

1. Chen D, Bo L, Zhu Y, et al. Complete genome sequence of *Ralstonia solanacearum* FJAT-1458, a potential biocontrol agent for tomato wilt[J]. Genome Announcements, 2017, 5(14).
2. Heshan Du, Bin Chen, Xiaofen Zhang, et al. Evaluation of *Ralstonia solanacearum* Infection Dynamics in Resistant and Susceptible Pepper Lines Using Bioluminescence Imaging[J]. Plant Disease, 2017, Vol. 101(2): 272-278.
3. Iyer-Pascuzzi A. Getting to the Root of Bacterial Wilt Resistance in Tomato[C]//Plant and Animal Genome XXV Conference. Plant and Animal Genome, 2017.
4. Avinash Prakasha, I. Darren Grice, K.S. Vinay Kumar, et al. Extracellular polysaccharide from *Ralstonia solanacearum*; A strong inducer of eggplant defense against bacterial wilt[J]. Biological Control, 2017, Vol. 110: 107-116
5. Niu J, Chao J, Xiao Y, et al. Insight into the effects of different cropping systems on soil bacterial community and tobacco bacterial wilt rate[J]. Journal of Basic Microbiology, 2017,

57(1): 3-11.

6. Tahir H A S, Gu Q, Wu H, et al. Bacillus volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt[J]. Scientific reports, 2017, 7.
7. Sinha R, Gupta A, Senthilkumar M. Concurrent drought stress and vascular pathogen infection induce common and distinct transcriptomic responses in *Chickpea*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8.
8. Li X, Liu Y, Cai L, et al. Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots[J]. Plant Pathology, 2017.
9. Oliveira W S, Coelho I L, Oliveira J R S, et al. Biological control of the bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* by bioprotector with fungi chitosan from *Cunninghamella elegans* on tomatoes[J]. African Journal of Agricultural Research, 2017, 12(1): 42-49.
10. Mao Y, Jiang B, Peng Q, et al. Cloning and characterization of WRKY gene homologs in Chieh-qua (*Benincasa hispida* Cogn. var. Chieh-qua How) and their expression in response to fusaric acid treatment[J]. 3 Biotech, 2017, Vol.7(1): 86.
11. Lee C G, Iida T, Inoue Y, et al. Prokaryotic communities at different depths between soils with and without tomato bacterial wilt but pathogen-present in a single greenhouse[J]. Microbes & Environments, 2017.
12. Patil V U, Girimalla V, Sagar V, et al. Genome sequencing of four strains of Phylotype I, II and IV of *Ralstonia solanacearum* that cause potato bacterial wilt in India[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(2): 193-195.
13. Sotoyama K, Akutsu K, Nakajima M. Suppression of bacterial wilt of tomato by soil amendment with mushroom compost containing *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7[J]. Journal of General Plant Pathology, 2017, 83(1): 51-55.

（唐元满 供稿）