

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2017 年第 12 期, 总第 58 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 12 月 30 日

工作动态

“针对烟草青枯病的根际微生态调控防治机制及关键技术研究”2017 年终评审会顺利召开

近期, 由重庆烟草科学研究所组织的 2017 年在研科研项目的年终评审会在重庆北碚缙云山召开, 西南大学丁伟教授所承担的中国烟草总公司重点项目“针对烟草青枯病的根际微生态调控防治机制及关键技术研究”参加了此次评审会。重庆市烟草科学研究所徐宸, 西南大学唐章林教授为项目主评审专家, 重庆市烟草公司丰都、彭水、涪陵、巫山、巫溪分公司副经理马啸、代先强、冉茂、曹安全、向永光为评审专家。

12 月 12 日上午, 会议在缙云山天香苑会议室举行, 徐宸副所长主持了此次会议, 受项目负责人丁伟教授委托, 项目组成员李石力博士就 2017 年项目的总体目标与任务完成情况进行了详细汇报, 指出“2017 年项目组按照项目合同任务目标, 全面分析研究了青枯病发病与健康烟田土壤微生物差异特征、酶活性差异特征、微生物生物量等方面的机制探究, 明确了青枯病发生后对土壤生态活性的影响机制, 筛选并找到了其中影响青枯病发生的关键的微生物类群, 并对相应的类群进行实质性的验证, 此外研究了青枯病的相关微生态调控机制, 取得了良好的示范效果”。通过 2017 年的工作的开展, 项目组顺利完成了预期的任务与考核指标, 在微生态机制的阐述以及关键技术的研发方面均取得了突出的成果。

随后, 评审专家唐章林教授高度评价了项目的整体进展, 并对后期的项目的开展提出了意见与建议, 如在基本的机理与现象明确后, 要进一步加大开展验证性的工作; 各区县分管经理也提出, 要确实找到能够指示土壤健康的微生物种类, 提出针对性的技术措施。

通过一年的研究, 丁伟教授研究团队也取得了显著的研究成果, 发表 SCI 论文 3 篇, 总影响因子达到 10.8 以上, 这将为后期的研究奠定良好的基础。



（李石力 供稿）

研究成果

新的一年、新的台阶、新的收获——西南大学植物青枯病研究团队在 2017 年取得丰硕成果

2017 年西南大学植物青枯研究团队在丁伟教授的带领下，围绕“科学研究出成果、人才培养出成效、服务地方经济建设”的宗旨，发扬“特别能吃苦、特别能坚持、特别能创新”的精神，致力于青枯病致病机理、生态调控以及系统控制等研究，取得了一系列丰硕的成果。

一、科学研究出成果

在科学研究方面，研究团队聚焦根际微生态，分别从病原菌的致病机理遗传进化关系、植物响应青枯病菌侵染的机制变化、影响青枯病发生的关键因子分析、青枯病的调控技术研发等方面进行系统的研究。

（1）青枯菌遗传分化及致病机理研究

经过 2013-2017 年连续 5 年对全国的烟草青枯病菌株以及美国烟草青枯菌菌株进行采集分离保存，已经建立了世界范围内较为完善的菌株库。通过基因组的重测序，研究团队已经对不同地区菌株之间的进化关系进行了初步的解析，明确了其中的进化关系。并且在 2017 年首次分析报道了重庆地区烟草植株内分离的青枯菌 CQPS-1 全基因组信息，重点分析并明确了高海拔烟区青枯病菌的基因分子特性，为下步阐释青枯病菌在我国向高海拔、高纬度迁移奠定了基础。

（2）植物响应青枯病菌侵染的机制变化

在前期的研究中，通过对烟草抗性基因的转录组基因生物信息学分析，并结合后续的相关的基因验证，2017 年研究团队找到了响应青枯病侵染的特异性表达基因与转录因子。明确了 NtWRKY40 基因以及 PR1A, PR1Q 在烟草与青枯病互作过程中扮演重要角色。其过表达可显著提高植株抗青枯病的能力，是通过上调乙烯表达，增加活性氧物质和胍脂质沉淀来

实现的。此外，NtWRKY40 可受到多种激素和冷热盐等非生物胁迫的诱导，说明 NtWRKY40 不仅在抗病方面发挥功能，在植物抵抗各种外界环境方面同样起到一定作用。这说明当病原菌感染后，能不能严重发病，互作基因的表达不仅取决于病原菌也取决于外界因子。

（3）影响青枯病发生的关键因子分析

2017 年主要分析了酸碱度对青枯病发生的影响。首次报道了土壤酸化与青枯病发生的关系；证明了土壤酸化范围在 4.5-5.5 时，容易导致青枯病的发生，且从植物与细菌互作角度，pH 低于 5.5 时有利于病原菌的致病力而降低植物的抗病性，从大田试验也证明了通过改良土壤酸碱度能够显著的降低青枯病的发生。本论文为青枯病的防治提供了酸碱度理论，也提出调酸在控制青枯病中的重要性。

（4）青枯病的调控技术研发

系统的评价了自然界存在的天然活性化合物香豆素类化合物对青枯病的调控作用，研究发现香豆素类化合物能够抑制生物膜大量形成，以及青枯菌三型分泌系统相关通路基因，系统的阐释了香豆素化合物中的伞形花内酯对青枯菌的抑制机理，该研究也为后期青枯病防治药剂的筛选提供了基础。

系统的评价了纳米材料氧化镁对青枯菌抑制机理，明确了纳米氧化镁在控制病害方面具体特性，通过大田试验验证，也初步证实了该材料在控制青枯病方面具有良好的应用前景。

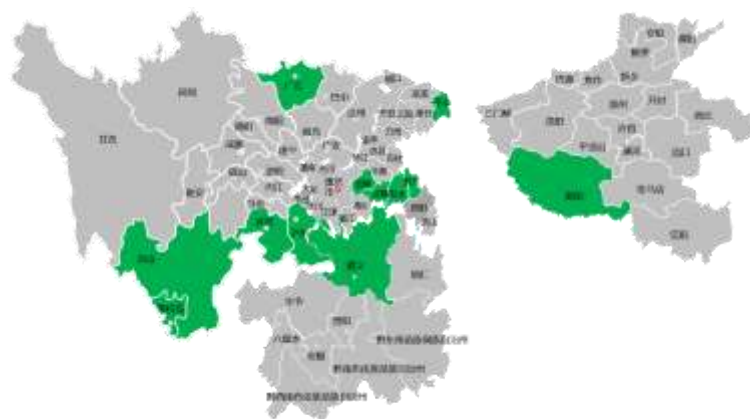
研究了烟草根系分泌物有机酸物质对青枯病发生的影响，找到了以肉桂酸为主的有机酸在青枯病发生过程中作用显著，提出了调控有机酸降低青枯病发生的技术。

二、人才培养出成效

2017 年课题组培养了一大批优秀的硕士、博士研究生。其中共毕业 6 名硕士研究生，2 名博士研究生，出站博士后 1 名。课题组为社会的发展输送了一批批优秀的科技人才，一定程度上促进了社会进步。

三、服务地方经济建设

本课题组在室内机理探究的同时，强化应用研究。真正的将研究与实践应用相结合，服务于地方经济建设。2017 年课题组在 4 个省重庆彭水、贵州遵义、河南南阳、四川攀枝花、凉山等 13 个区县共开展 50 余项小区试验，建立了 13 个技术集成示范区，派驻 30 余人参与项目研究。通过示范区的建立与技术措施的指导落实，挽回了大量的经济损失，提高了烟农的经济收益，产生了良好的社会效益。



2017 年课题组发表论文与获得成果

- [1] Yang L, Li S, Qin X, et al. Exposure to Umbelliferone Reduces *Ralstonia solanacearum* Biofilm Formation, Transcription of Type III Secretion System Regulators and Effectors and Virulence on Tobacco[J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8: 1234. (IF=4.165)
- [2] Liu Y, Tang Y, Qin X, et al. Genome Sequencing of *Ralstonia solanacearum* CQPS-1, a Phylotype I Strain Collected from a Highland Area with Continuous Cropping of Tobacco[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8. (IF=4.165)
- [3] Liu Q, Liu Y, Tang Y, et al. Overexpression of NtWRKY50 Increases Resistance to *Ralstonia solanacearum* and Alters Salicylic Acid and Jasmonic Acid Production in Tobacco[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1710. (IF=4.298)
- [4] Li S, Zhang S, Ding W, et al. Soil Acidification Aggravates the Occurrence of Bacterial Wilt in South China [J]. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8. (IF: 4.165)
- [5] Tang Y, Liu Q, Ding W, et al. Overexpression of NtPR-Q Up-Regulates Multiple Defense-Related Genes in *Nicotiana tabacum* and Enhances Plant Resistance to *Ralstonia solanacearum* [J]. *Frontiers in plant science*, 2017. (IF:4.289)
- [6] Zhang S, Liu X, Ding W, et al. Legacy effects of continuous chloropicrin-fumigation for 3-years on soil microbial community composition and metabolic activity [J]. *AMB Expr*, 2017, 7:178. (IF: 1.85)
- [1] 《茄青枯病菌与烟草互作分子机制及其调控技术研究》 2016-2017 年度中国烟草总公司科技进步二等奖
- [2] 《茄青枯病的关键调控技术研发及集成应用》 2016-2017 年度 中华农业科学技术进步奖三等奖
- [3] 《茄科作物青枯病绿色生态防控技术研究与应用》 2016-2017 年度 中国产学研合作创新成果奖二等奖

(李石力 供稿)

环境压力下青枯菌的 qRT-PCR 内参基因选择

Quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) 是一种定量检测基因表达的常用方法，其准确性很大程度上取决于合适的内参基因。青枯菌的侵染范围广泛，可以侵染 54 个科，450 余种植物，在全球均有分布。在我国，烟草青枯病主要分布在南方种植区，包括云南、四川、贵州、重庆、广州、湖南、湖北、福建、江西等地。青枯菌对不同环境条件，如高海拔、低温、土壤酸化、营养富集等，表现出极强的适应能力。为了更好地研究青枯菌的环境适应性，西南大学植物保护学院青枯菌研究团队针对不同环境压力（温度、营养、药剂胁迫、生长阶段），采用 ΔC_t method、*GeNorm*、*NormFinder*、*BestKeeper*、*RefFinder* 等方法系统评价了 7 个内参基因（*PGK*、*GAPDH*、*16S*、*ftsZ*、*gyrA*、*rplM*、*serC*）的稳定性。结果表明，在不同生长阶段，内参基因 *gyrA* 和 *serC* 最为稳定；在温度胁迫条件下，*serC*、*gyrA* 和 *ftsZ* 最为稳定；在药剂胁迫下应选择 *gyrA*、*ftsZ* 和 *16S* 作为内参基因，而在营养胁迫下，*serC* 和 *16S* 的稳定性最佳。总体而言，*serC* 和 *gyrA* 可作为青枯菌 CQPS-1 适应环境压力过程中基因表达研究的稳定内参基因。本项研究为青枯菌适应环境压力的靶标基因研究提供了理论支撑。

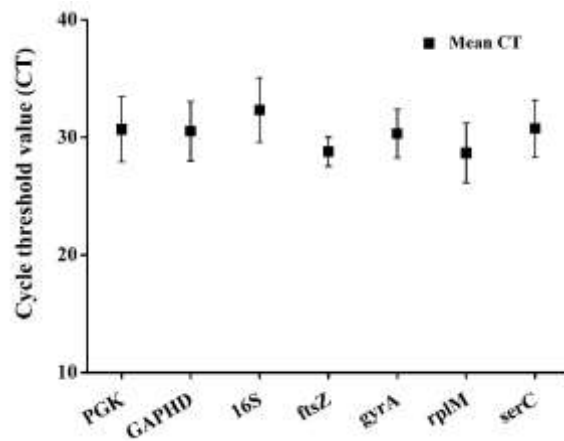


Figure 1. Expression profiles of candidate reference genes in *R. solanacearum* CQPS-1 adapted to different environment stress.

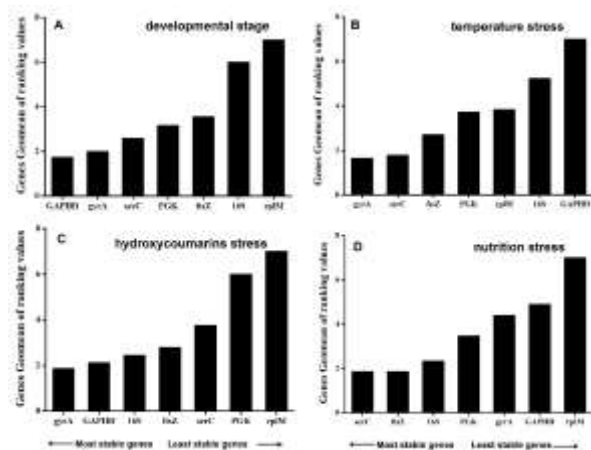


Figure 2. Expression stability of seven candidate reference genes of *R. solanacearum* adapted to different environment stress calculated by *RefFinder*.

（杨亮 供稿）

烟草根系分泌物中草酸的检测

植物在其生长过程中,可以通过根系向周围环境分泌大量的光合产物来影响根际微生物的生存环境和基因表达。研究指出两种模式植株可以通过其各自的根系分泌物来形成其自身根际特定的真菌群落。根际细菌不仅会受到植株种类的调控,也会受到同种植株不同品种的影响。草酸是植物根系分泌物中最简单的二元羧酸,普遍存在于植物组织中,被认为是植物代谢的最终惰性产物。已有研究表明,草酸可以促进青枯菌的生长及生物膜的形成,并加重青枯病的发生。那么不同抗感品种的烟草其草酸的分泌是否有差异?

通过水培法来收集不同品种的分泌物,选择云烟 87、云烟 85、PVH1452 三个烟草不同抗感品种,置于纯水中培养 72h 后,将培养液置于真空冷冻干燥机中冻干、浓缩,最后用无菌双蒸水溶解,并用 0.22 μm 滤膜除菌,最后将样品放置-80℃冰箱中保存待用。采用高效液相色谱(HPLC, Agilent 1260, USA)来检测烟草根系分泌物中的草酸,流动相为乙腈: 0.1% 磷酸=2:98,色谱柱为 Odysill-C18 柱(4.6×250 mm),流速为 1 ml/min,紫外检测波长为 220 nm,柱温为 35℃,进样量为 20 μL 。经检测,草酸的标准曲线方程: $y = 5.2631x + 29.213$, $R^2 = 0.9997$,检测限为 5 ppm,不同品种的草酸含量依次为: 云烟 87 > 云烟 85 > PVH1452,由实验结果可得,根系分泌物中的草酸含量由于品种的不同而不同,表现为感病品种中的草酸含量高于抗病品种,草酸调控烟草青枯病发生的作用机理还未经报道,有待进行下一步研究。

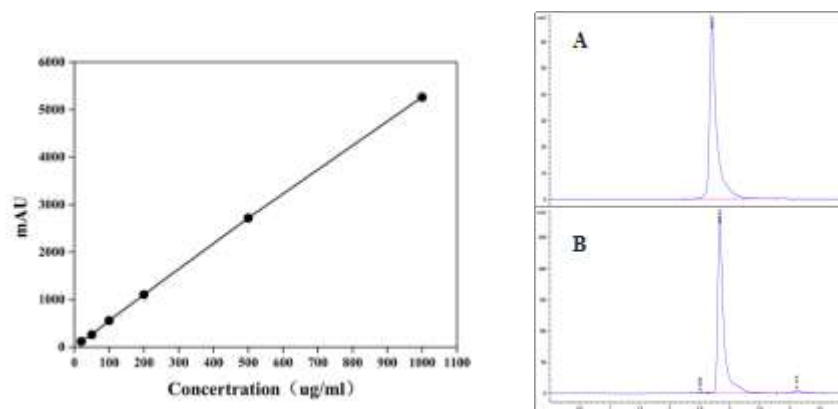


图 1 草酸的标准曲线 图 2 草酸标样(A)，云烟 87 根系分泌物(B)的液相色谱图

(王姣 供稿)

最新参考文献

- [1] Gu Y, Hou Y, Huang D, et al. Application of biochar reduces *Ralstonia solanacearum* infection via effects on pathogen chemotaxis, swarming motility, and root exudate adsorption[J]. *Plant and Soil*, 2017, 415(1-2): 269-281.
- [2] Witzel K, Strehmel N, Baldermann S, et al. *Arabidopsis thaliana* root and root exudate metabolism is altered by the growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* DSM 16656T[J]. *Plant and Soil*, 2017, 419(1-2): 557-573.
- [3] Eisenhauer N, Lanoue A, Strecker T, et al. Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7.
- [4] Balendres M A, Nichols D S, Tegg R S, et al. Potato Root Exudation and Release of *Spongopora subterranea* Resting Spore Germination Stimulants are Affected by Plant and Environmental Conditions[J]. *Journal of Phytopathology*, 2017, 165(1): 64-72.
- [5] Di T, Afzal M R, Yoshihashi T, et al. Further insights into underlying mechanisms for the release of biological nitrification inhibitors from sorghum roots[J]. *Plant and Soil*, 2017: 1-12.
- [6] Tsuno Y, Fujimatsu T, Endo K, et al. Soyasaponins, a new class of root exudates in soybean (*Glycine max*)[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2017.
- [7] Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome?[J]. *Trends in plant science*, 2017.

- [8] Ziegler J, Schmidt S, Strehmel N, et al. Arabidopsis Transporter ABCG37/PDR9 contributes primarily highly oxygenated Coumarins to Root Exudation[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 3704.
- [9] Chen Y T, Wang Y, Yeh K C. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance[J]. Current opinion in plant biology, 2017, 39: 66-72.
- [10] Chen Y T, Wang Y, Yeh K C. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance[J]. Current opinion in plant biology, 2017, 39: 66-72.
- [11] Tsunoda T, van Dam N M. Root chemical traits and their roles in belowground biotic interactions[J]. Pedobiologia, 2017.
- [12] Tückmantel T, Leuschner C, Preusser S, et al. Root exudation patterns in a beech forest: dependence on soil depth, root morphology, and environment[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 107: 188-197.
- [13] Jiao Y, Wang E, Chen W, et al. Complex interactions in legume/cereal intercropping system: role of root exudates in root-to-root communication[J]. bioRxiv, 2017: 097584.
- [14] Oyserman B O, Medema M H, Raaijmakers J M. Road MAPs to engineer host microbiomes[J]. Current opinion in microbiology, 2018, 43: 46-54.
- [15] Liu Y, Chen L, Wu G, et al. Identification of Root-Secreted Compounds Involved in the Communication Between Cucumber, the Beneficial *Bacillus amyloliquefaciens*, and the Soil-Borne Pathogen *Fusarium oxysporum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 30(1): 53-62.
- [16] Das S, Chou M L, Jean J S, et al. Arsenic-enrichment enhanced root exudates and altered rhizosphere microbial communities and activities in hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. Journal of hazardous materials, 2017, 325: 279-287.
- [17] Fernández E, Trillas M I, Segarra G. Increased rhizosphere populations of *Trichoderma asperellum* strain T34 caused by secretion pattern of root exudates in tomato plants inoculated with *Botrytis cinerea*[J]. Plant Pathology, 2017.