

不同 pH 下胞外多糖和脂多糖对烟草青枯菌根部定殖的影响

王贻鸿^{1,2}, 赵云峰³, 孔凡玉¹, 王新伟¹, 王振华⁴, 张晓阳⁴, 彭德元⁴, 王静^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业病虫害监测与综合治理重点开放实验室, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 青岛农业大学, 青岛 266109; 4. 湖南省烟草公司张家界市公司, 湖南 张家界 427000)

摘要: 通过设定不同 pH 梯度, 研究烟草青枯菌胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS) 和脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 分泌量的差异及其对烟草根部吸附青枯菌数量的影响。结果表明, pH 为 6.5 时 EPS 单产量和总产量均最大, 分别达到 3.27×10^{-12} 和 50.12×10^{-2} g, pH 8.0 时总产量和单产量最小。pH 7.0 时, LPS 的总产量最大, 为 9.41×10^{-3} g, pH 7.5 时单产量最大, 为 17.51×10^{-15} g。同一 pH 梯度的 EPS 单产量远大于 LPS 单产量。EPS 促进烟株根部吸附和侵入青枯菌, 而 LPS 起抑制作用, 且相同浓度下 EPS 促进作用占主导。当 pH 为 6.6 时, 添加 EPS 的菌液处理的烟株根表吸附和根内侵入青枯菌数量最大, 分别达到 15.43×10^8 和 10.73×10^9 cfu/g; 堆积在根表的杆状青枯菌菌体及导管横切面堵塞的青枯菌及其分泌物的数量最多, 根尖畸形严重。因此, 偏酸性条件下, 青枯病菌 EPS 分泌量增多, 促进青枯菌与烟草根部的识别和吸附, 进一步提高病害发生程度, 而中性和偏碱性条件有利于 LPS 分泌, 降低病害发生。

关键词: pH; 胞外多糖; 脂多糖; 烟草青枯菌; 定殖

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119 (2017) 05-0024-08

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2017.05.005

Effect of Exopolysaccharides and Lipopolysaccharide on Colonization of Tobacco Roots by *Ralstonia solanacearum* at Different pH Values

WANG Yihong^{1,2}, ZHAO Yunfeng³, KONG Fanyu¹, WANG Xinwei¹, WANG Zhenhua⁴, ZHANG Xiaoyang⁴, PENG Deyuan⁴, WANG Jing^{1*}

(1. Tobacco Research Institute, CAAS, Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring Controlling & Integrated Management, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China; 3. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 4. Zhangjiajie Company of Hunan Tobacco Company, Zhangjiajie, Hunan 427000, China)

Abstract: In this study, the difference of the secretion of exopolysaccharides and lipopolysaccharide of *R. solanacearum* and their effects on the number of *R. solanacearum* adsorbed in tobacco roots were studied at different pH values. The results showed that the maximum single and total yield of EPS were 3.27×10^{-12} and 50.12×10^{-2} g at pH 6.5, respectively. While the minimum single and total yield of EPS were at pH 8.0. The maximum total yield of LPS was 9.41×10^{-3} g at pH 7.0, and the maximum single yield was 17.51×10^{-15} g at pH 7.5; In addition, the single yield of EPS was much higher than LPS at the same pH value. EPS had a promotive effect on the adsorption and invasion of *R. solanacearum* in tobacco roots, while LPS had a suppressive effect, and the promotive effect of EPS played a major role at the same concentration. When added EPS under the pH 6.6, the number of *R. solanacearum* adsorbed and invaded in the root surface were the maximum, reaching 15.43×10^8 and 10.73×10^9 cfu/g *m_f* (fresh matter) respectively, and the bacterial number of *R. solanacearum* deposited on the root surface and clogged in the cross section with its secretion were the most, and root tip deformed seriously. Therefore, EPS secretion was increased under acidic conditions, which promoted the identification and adsorption of *R. solanacearum* on tobacco roots, and the degree of disease occurrence was further improved. LPS secretion was increased under neutral and alkaline conditions, which reduced disease occurrence.

Keywords: pH; EPS; LPS; *Ralstonia solanacearum*; colonization

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (ASTIP-TRIC04); 湖南省烟草公司张家界市公司科技项目“张家界烟区重要土传病害发生的微生态基础与调控技术研究” (201503); 四川省烟草公司科技项目“烟草主要病虫害绿色防控技术研究与应用” (SCYC201604)

作者简介: 王贻鸿 (1990-), 男, 在读硕士, 研究方向为烟草病害防治。E-mail: wyhbeyond666@163.com。*通信作者, E-mail: wjing323@163.com

收稿日期: 2016-12-13

修回日期: 2017-05-10

烟草青枯病是由茄科劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的一种毁灭性维管束病害,一直是威胁烟草生产的主要根部病害之一^[1],尤其在我国南方烟区大面积发生。影响烟草青枯病发生的因素很多,其中土壤环境最为重要,包括如土壤类型、酸碱度、微量元素含量等^[2]。近年来,烟草大面积连作、环境污染、酸性肥料施用等因素导致我国植烟土壤酸化现象日趋严重^[3],加重了土传病害包括烟草青枯病的发生,制约烟草产量和质量^[4]。

青枯菌对寄主根表的吸附和根内侵入是其成功侵染的必要条件, EPS 和 LPS 在病原与寄主的识别中发挥重要作用^[5]。青枯菌通常可从烟草根部、茎部或导管受伤部位侵入,在导管中生长时产生大量胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS), EPS 阻碍植物体内水分的运输,从而引起植物萎蔫^[6]。研究表明, EPS 能促进细菌在寄主体内的扩散和定殖, EPSI 缺陷突变型细菌在番茄茎杆内移动速度大大降低^[7-9]。脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是青枯菌外膜一种多糖,能占据植物细胞的结合位点,抑制了含 EPS 细菌在接种时的吸附识别过程^[10]。

目前,尚未见 pH 对烟株根表吸附和根内侵入青枯菌影响的研究报道,因此,本文通过设定不同 pH 梯度,研究 EPS 和 LPS 对烟株根表吸附及根内侵入青枯菌数量的影响,明确不同 pH 条件下 EPS 和 LPS 与青枯病发生的关系,为探明酸性土壤中烟草青枯菌与根部的识别机制及改善农业防控措施提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试烤烟品种为 K326(大十字期)。供试菌株: *R. solanacearum*, 分离自湖南张家界市慈利县江垭镇烟草病株,经鉴定为 1 号生理小种生物型 III。供试培养基和试剂:营养琼脂培养基 (NA)、营养肉汤培养基 (NB) 及 2,3,5-氯化三苯基四氮培养基 (TTC) 的制备参照文献^[11]。酸碱缓冲液制备参照文献^[12]。LPS 提取试剂盒购自 iNtRON 公司。戊二醛、95%乙醇、氯仿、正丁醇均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 pH 对青枯菌分泌 EPS 和 LPS 的影响 取 100 μL 浓度为 10^8 cfu/mL 标准菌液加入到 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 NB 培养基中振荡培养,每处理 3 次重复。32 h 后,各取 1 mL 培养液经梯度稀释后涂布于 TTC 平板计数并计算菌液浓度,公式如下:

细菌浓度 (cfu/mL) = 菌落数 (cfu) \times 稀释倍数 / 涂板菌液量 (mL)^[13]

同时,各 pH 处理另取 100 mL 青枯菌培养液,5000 r/min 离心 5 min,取上清液用于 EPS 及 LPS 的提取。HUSAIN 酒精沉淀法^[14]结合 SEVAG^[15]脱蛋白法提取 EPS; WESTERMAN 热酚水法^[16]结合酶解法和醇沉法^[17]提取 LPS,分别称量 EPS 和 LPS 干质量,结合菌液的浓度计算各自的单产量和总产量^[18]。

1.2.2 不同 pH 条件下, EPS 和 LPS 对根部吸附识别和侵入青枯菌的影响 采用菌悬液浸根接种的方法进行测定。试验共设 5 组处理,菌悬液浓度为 3×10^8 cfu/mL,处理 1 组为 pH 分别为 5.2、5.9、6.6、7.3 的标准菌液中各加浓度为 8 mg/mL 的 EPS;处理 2 组为上述各 pH 的标准菌液加入 8 mg/mL 的 LPS;处理 3 组为上述各 pH 的标准菌液加入 8 mg/mL 的 EPS 和 LPS;CK 组为上述各 pH 的标准菌液;CK0 组为上述各 pH 的无菌酸性缓冲液。烟苗幼根经表面消毒后,浸入上述各处理的菌液中,并置于昼夜温度为 32 $^{\circ}\text{C}$ /30 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 75% 的人工气候室内接种培养,每处理 15 株,3 次重复。分别于接种后 1 h、24 h 和 48 h 取样,每次每处理取 1 株烟苗的完整须根,截取根尖处长度为 2 cm 的根于无菌水中充分涂荡后,取适量含菌液于 TTC 平板涂板计数,即为青枯菌的根表吸附量;取出的根尖再经 70% 酒精表面消毒 30 s、无菌水冲洗 3 次并在无菌状态下吹干水分、称量后研磨,取适量研磨液于 TTC 平板涂板计数,即为青枯菌的根部侵入量。菌量计算公式如下:

细菌浓度 (cfu/mL) = 菌落数 (cfu) \times 稀释倍数 / 涂板菌液量 (mL)

吸附或侵入菌量(cfu/g)=细菌浓度(cfu/mL)×分离用水量(mL)/根鲜质量(g)

1.2.3 根部吸附和侵入青枯菌的扫描电镜观察 青枯菌根部的接种与取样方法同 1.2.2,取接种 24 h 的样品观察根冠和根冠后区域(伸长区和根毛区)根表吸附青枯菌的数量和致畸程度,取接种 48 h 的样品观察根尖横切面导管中青枯菌分泌物量及致畸程度。电镜样品处理方法如下:取样后,将样品浸泡于 4%的戊二醛溶液中,4 ℃冰箱保存,参照文献[19-20]的方法对根尖细胞及根尖横切面细胞进行扫描电镜(XL-3, Philips company, Holland)观察。

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 对数据进行基本处理,DPS 9.50 统计软件 Duncan 新复极差法进行多重比较。

2 结果

2.1 pH 对 EPS 与 LPS 产量的影响

由图 1 可见,以不同 pH 条件培养的青枯菌分泌的 EPS 单产量和总产量差异较大。振荡培养至 32 h 时,pH 6.5 的 EPS 单产量和总产量最大,pH 8.0 的单产量和总产量最小,即 pH 6.5 时 EPS 单产量

和总产量大于 pH 7.0 的中性条件及 pH 7.5、8.0 的碱性条件。LPS 总产量在 pH 7.0 时最大,其次是 pH 6.5,再次是 pH 7.5 的碱性环境,LPS 单产量在 pH 7.5 时最大,pH 8.0 次之,中性和酸性条件下偏小。另外,在试验所设 pH 范围内,青枯菌每个菌落形成单位分泌的 EPS 质量远大于 LPS 分泌量,二者之间相差 10^3 倍。

2.2 不同 pH 条件下 EPS 和 LPS 对根表吸附和根内侵入青枯菌数量的影响

2.2.1 对烟株根表吸附青枯菌的影响 结果如表 1 所示,接种后 1 h,各处理的根表吸附青枯菌量与 CK 组相当;青枯菌液接种后 24 h 的根表吸附菌量,pH 6.6 最大,其次为 pH 7.3,pH 5.9 和 5.2 最低;EPS 和 LPS 对 pH 5.9、6.6 和 7.3 处理的根表吸附量分别表现为显著促进和抑制作用,与 CK 差异显著,而 pH 5.2 条件下 EPS 的促进作用和 LPS 的抑制作用与 CK 组差异不显著。除此之外,上述 3 个 pH 处理同时加入等浓度的 LPS 和 EPS 时,根表吸附量与 CK 组差异显著;因此,相对于 LPS 的抑制作用,EPS 对根表吸附量的促进作用占主导。无菌酸性缓冲液处理组(CK0)烟苗根表未检测到青枯菌。

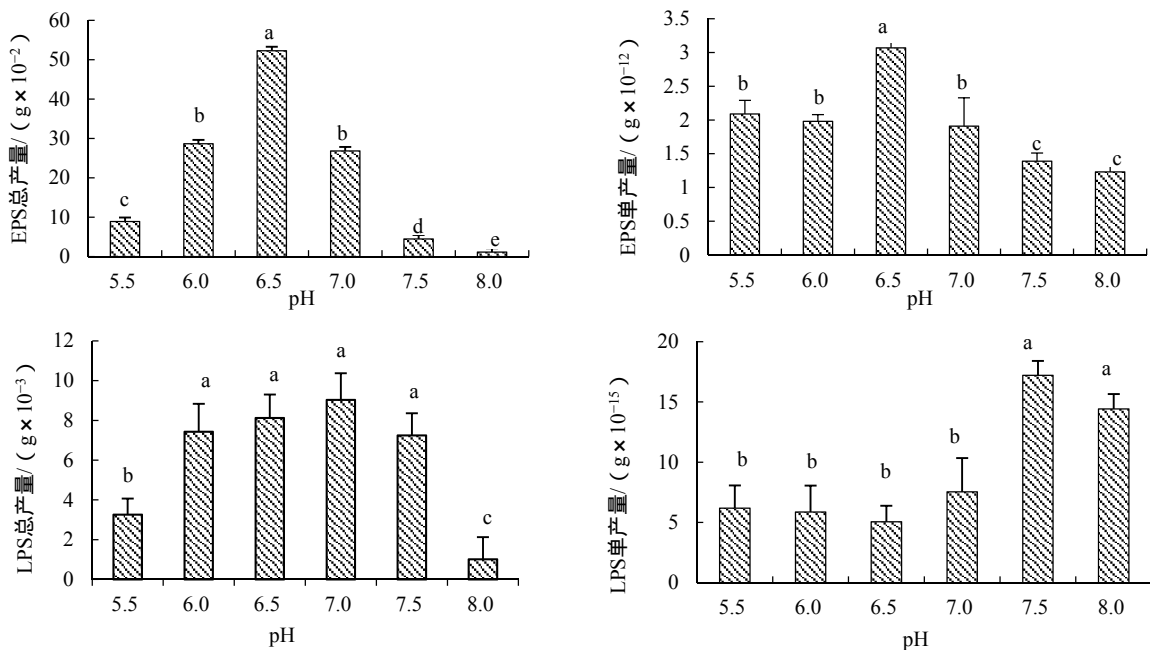


图 1 不同 pH 值条件下青枯菌 EPS 与 LPS 产量

Fig. 1 The production of EPS and LPS of *R. solanacearum* at different pH values

表 1 不同 pH 条件下 EPS 与 LPS 对烟株根表吸附青枯菌量的影响
Table 1 Effects of EPS and LPS on the amounts of *R. solanacearum* adsorbed onto surface of tobacco roots at different pH values

处理	pH 5.2		pH 5.9		pH 6.6		pH 7.3	
	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
	青枯菌菌液+EPS	2.00±0.26a	6.60±0.79a	2.40±0.49a	11.20±0.66a	4.20±0.9a	15.43±0.78a	4.50±0.70 a
青枯菌菌液+LPS	2.00± 0.46a	6.1± 1.25a	2.23±0.35a	4.97±0.49c	2.67±0.38a	8.93±0.96c	2.57±0.51 b	6.77±0.55c
青枯菌菌液+LPS+EPS	2.10±0.30a	6.40±0.80a	2.40±0.3a	9.80±0.61a	3.80±0.7a	14.20±0.61a	3.90±0.50 a	12.10±1.1a
青枯菌菌液(CK)	2.23±0.21a	6.50±0.98a	2.33±0.26a	7.53±1.00b	2.87±0.15a	11.60±1.21b	2.80±0.40 b	10.80±1.42b
pH6.6 缓冲液(CK0)	0.00± 0.00b	0.00± 0.00b	0.00± 0.00b	0.00± 0.00d	0.00± 0.00b	0.00± 0.00c	0.00± 0.00c	0.00± 0.00d

注: 同列数据后字母不同代表差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

2.2.2 对烟株根内侵入青枯菌量的影响 结果如表 2 所示, 接种后第 48 小时, pH 6.6 的青枯菌液 CK 处理的根内侵入菌量最大, 其次为 pH 7.3, pH 5.9 和 5.2 的侵入量最低, 即 pH 6.6 的根内侵入量大于 pH 7.3; EPS 和 LPS 对 pH 5.9、6.6 和 7.3 三个处理的根内侵入量分别表现为显著的促进和抑制

作用, 与 CK 差异显著, 而 pH 5.2 条件下 EPS 的促进作用和 LPS 的抑制作用与对照组差异不显著。上述 3 个 pH 处理同时加入等浓度的 LPS 和 EPS 时, 根表吸附量与 CK 差异显著, 因此, 相对于 LPS 的抑制作用, EPS 对根内侵入量的促进作用占主导。无菌酸性缓冲液处理组烟苗根内未检测到青枯菌。

表 2 不同 pH 条件下 EPS 与 LPS 对烟株根内青枯菌侵入量的影响
Table 2 Effects of EPS and LPS on the amounts of *R. solanacearum* invading into tobacco roots at different pH

处理	pH 5.2		pH 5.9		pH 6.6		pH 7.3	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	青枯菌菌液+EPS	5.77±0.45a	5.80±0.4a	6.42±0.31a	6.71±0.47a	10.47±0.61a	10.73±0.47a	9.67±0.51a
青枯菌菌液+LPS	5.03±0.42a	5.01±0.25a	4.90±0.38c	4.41±0.67c	6.73±0.63c	7.40±0.61c	6.10± 0.1c	6.63±0.36c
青枯菌菌液+LPS+EPS	5.31±0.3a	5.61±0.12a	6.30±0.31a	6.12±0.11 a	9.83±0.34 a	10.10±0.36a	8.91±0.3 a	9.40±0.48a
青枯菌菌液(CK)	5.20±0.46a	5.11±0.57a	5.71±0.28b	5.90±0.47 b	8.43±0.59 b	8.53±0.59b	7.97±0.25b	7.83±0.42b
pH6.6 缓冲液(CK0)	0.00± 0.00b	0.00± 0.00b	0.00± 0.00d	0.00± 0.00d	0.00± 0.00c	0.00± 0.00d	0.00± 0.00d	0.00± 0.00d

2.3 根尖表面吸附青枯菌的扫描电镜观察

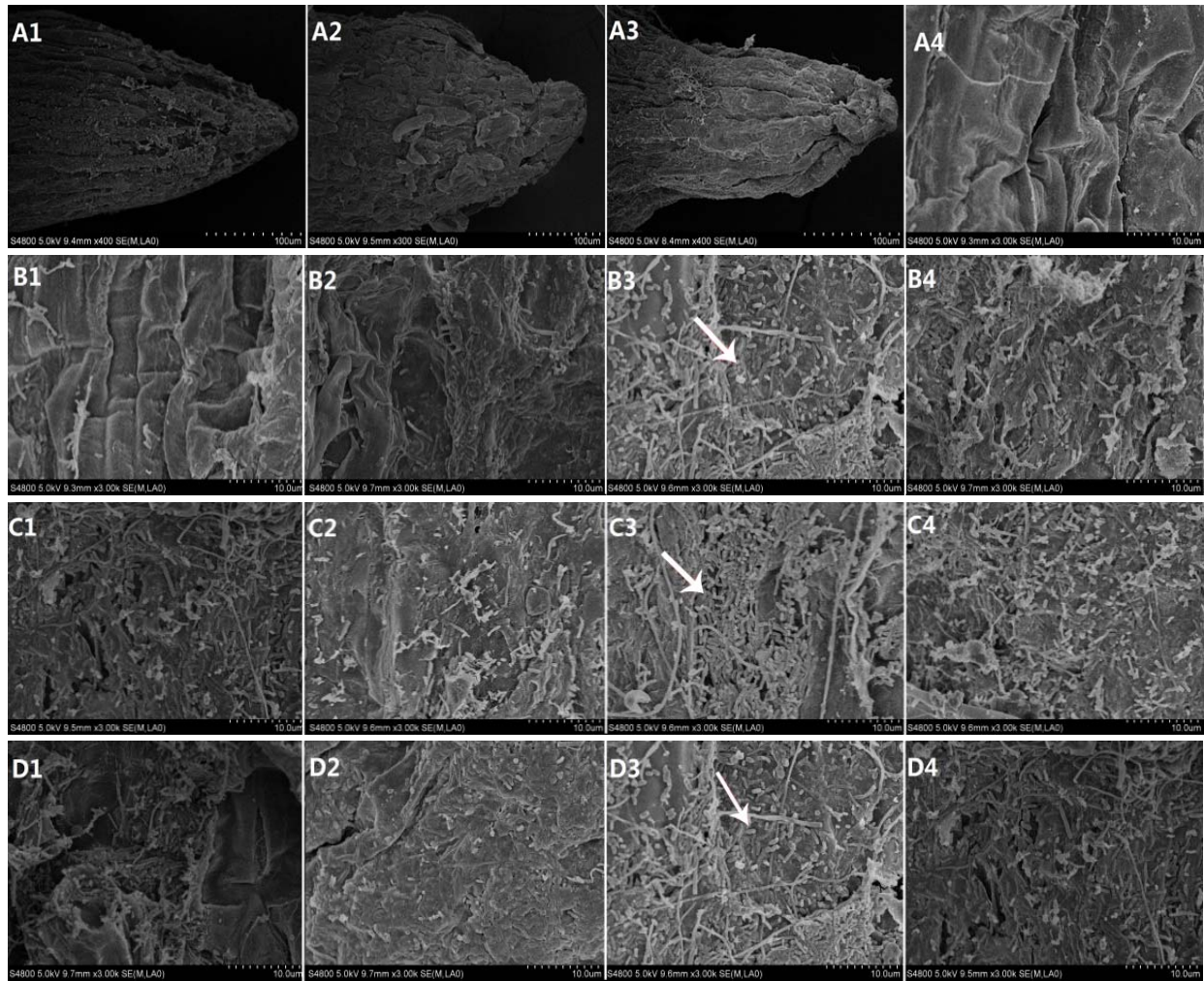
浸根接种后第 24 小时, 无菌酸性缓冲液处理的根尖细胞排列紧密整齐, 根冠生长正常(图 2-A1), 且根冠后区域细胞表面干净, 未见青枯菌分布(图 2-A4); pH 5.2 和 6.6 的青枯菌液处理的根尖外皮层细胞被破坏, 肿胀、变形、排列混乱, 根冠整体膨大畸形(图 2-A2、A3)。青枯菌液处理根冠后区域表面吸附的青枯菌量, pH 6.6 时最大(图 2-B3), 其次是 pH 7.3 的碱性条件(图 2-B4), 再次为 pH 5.9(图 2-B2), pH 5.2 时最小(图 2-B1)。与 CK 处理比较, 外加 EPS 的各处理根尖表皮细胞分布的青枯菌数量更多, 且表皮细胞排列混乱、根组织被破坏程度加重。同样是外加 EPS 的处理, pH 6.6 条件下的根冠后区域吸附菌量(图 2-C3)明显高于其他 3 个 pH 处理, 其次为 pH 7.3(图 2-C4), 略大于 pH 5.9

(图 2-C2) 及 pH 5.2(图 2-C1); 而外加 LPS 的各 pH 菌悬液处理的根表吸附菌量及表皮细胞的破坏程度(图 2-D1、D2、D3、D4) 低于 CK 处理。

2.4 根尖横切面的扫描电镜观察

浸根接种后 48 h, 无菌酸性缓冲液处理的根尖横切面维管束细胞(包括木质部细胞和韧皮部细胞)间脉络清晰、形状规则, 排列整齐(图 3-A1), 然而不同 pH 青枯菌液各处理的根组织均有细菌定殖, 细菌主要堆积于维管束, 且维管束细胞遭到不同程度的破坏(图 3-B1, 2, 3, 4), 其中, pH 6.6 处理横切面有大量青枯菌和其分泌的白色胞外混和物堆积在维管束内并破坏组织细胞, 导致该部位畸形严重(图 3-B3), 且 pH 6.6 处理的维管束分布的白色物质数量多于其他几个 pH 的菌液处理。

与不同 pH 菌悬液处理比较, 加 EPS 处理的各



注：A1-A3 为根冠区域，400 \times 。A1，无菌磷酸缓冲液，pH6.6；A2，青枯菌菌液，pH 5.2；A3，青枯菌菌液，pH 6.6。A4-D4 为根冠后区域，3000 \times 。A4，无菌磷酸缓冲液，pH6.6；B1，青枯菌菌液，pH 5.2；B2，青枯菌菌液，pH 5.9；B3，青枯菌菌液，pH 6.6；B4，青枯菌菌液，pH 7.3；C1，青枯菌菌液+EPS，pH 5.2；C2，青枯菌菌液+EPS，pH 5.9；C3，青枯菌菌液+EPS，pH 6.6；C4，青枯菌菌液+EPS，pH 7.3；D1，青枯菌菌液+LPS，pH 5.2；D2，青枯菌菌液+LPS，pH 5.9；D3，青枯菌菌液+LPS，pH 6.6；D4，青枯菌菌液+LPS，pH 7.3。

图2 烟株根表吸附青枯菌的扫描电镜观察

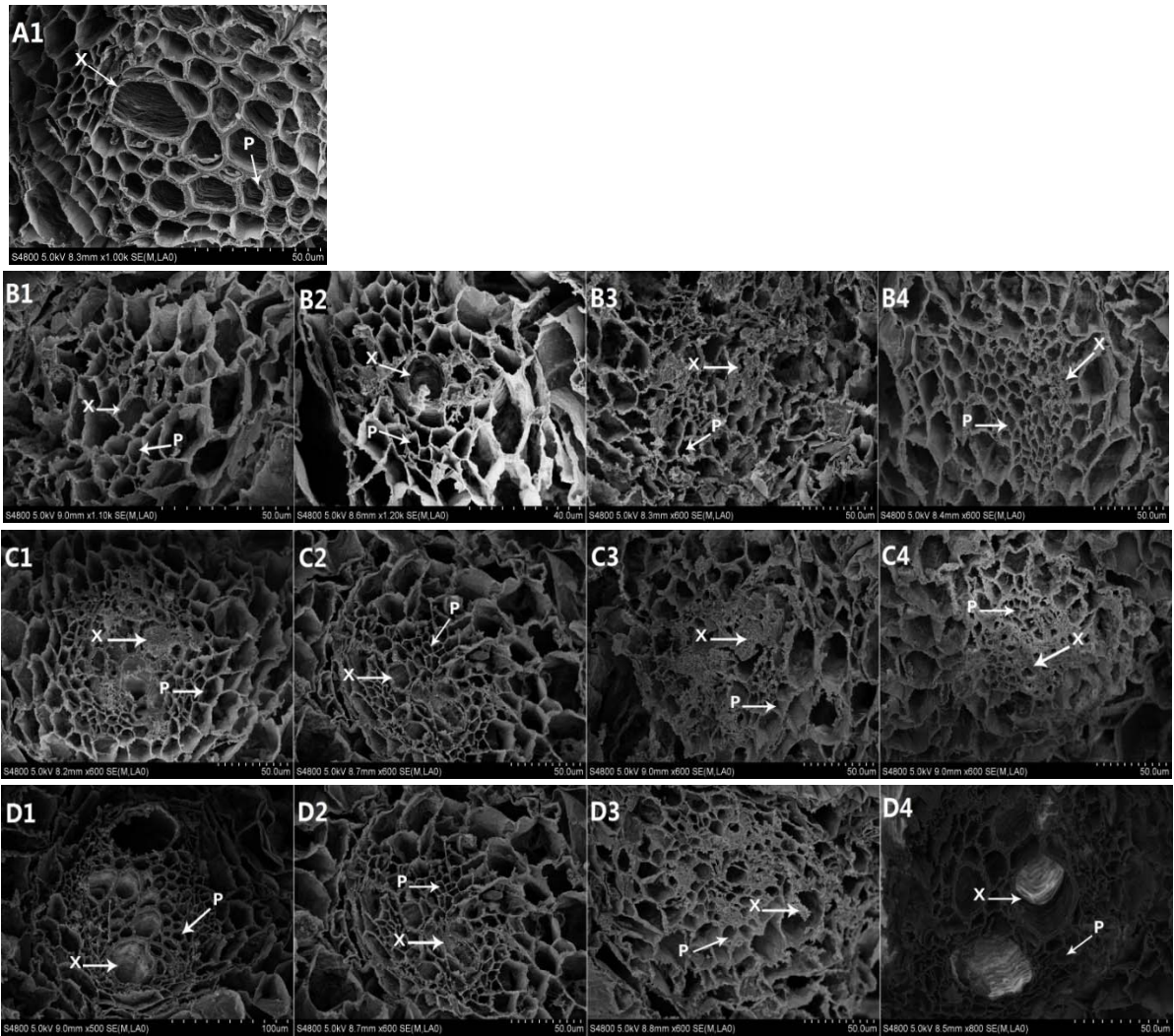
Fig. 2 Observation on the adsorption of *R. solanacearum* onto tobacco roots surface by scanning electron microscopy

根尖横切面，有更多的菌体及其分泌混和物堆积于维管束内，其堵塞程度及对细胞的破坏程度更强（图 3-C1、C2、C3、C4），且 pH 6.6 处理的细胞间散布的菌体混和物及其对组织的畸形程度最大（图 3-C3）；而加 LPS 的各 pH 处理的根尖横切面白色物质数量及对细胞的破坏程度（图 3-D1、D2、D3、D4）明显低于青枯菌液处理。

3 讨论

目前研究表明，土壤酸化与烟草青枯病的发生密切相关。EPS 和 LPS 作为主要识别子在青枯菌与寄主吸附识别中发挥重要作用^[21]。LPS 作为一种膜

外多糖，容易被寄主植物识别，从而引起较强的防卫反应^[22]。EPS 能保护青枯菌免受寄主植物的抗病防御^[23]，保护鞭毛和 LPS 免受寄主的识别与攻击^[24]，从而促进了青枯菌与烟株根表细胞的吸附识别。本试验结果显示，pH 6.0、6.5 时单个青枯菌分泌的 EPS 量高于 pH 7.0 的中性和 pH 7.5、8.0 的碱性条件，从而促进病原与寄主的吸附识别，加重青枯病的发生；pH 7.0 的中性和 pH 7.5 碱性条件下，LPS 单产量与总产量高于酸性条件，其对吸附识别过程的抑制作用较强，而 pH 8.0 时青枯菌的数量最少，LPS 总产量最低，单产量仅次于 pH 7.5；因此，土壤环境的酸碱度可以通过作用于 EPS 和 LPS 识别



注：A1，无菌磷酸缓冲液，pH 6.6。B1-B4，青枯菌菌液。B1，pH 5.2；B2，pH 5.9；B3，pH 6.6；B4，pH 7.3。C1-C4，青枯菌菌液+EPS。C1，pH 5.2；C2，pH 5.9；C3，pH 6.6；C4，pH 7.3。D1-D4，青枯菌菌液+LPS。D1，pH 5.2；D2，pH 5.9；D3，pH 6.6；D4，pH 7.3。A1，1000×，B1-D4，600×。X 表示木质部细胞（vascular tissue cell），P 代表韧皮部（phloem cell）。

图 3 烟株根尖横切面维管束细胞的扫描电镜观察

Fig. 3 Observation on the transverse section of vascular cells in tobacco root tips with scanning electron microscopy

子的分泌量来影响吸附识别过程进而控制青枯病的发生程度。

通过试验进一步发现，EPS 促进青枯菌在烟株根部的吸附和侵入，而 LPS 则表现为一定程度的抑制作用，与王胜坤等^[25]研究结果基本一致，说明 EPS 和 LPS 对青枯菌在桉树和烟草根部定殖过程的作用是相同的。本研究同时还测定了不同 pH 条件 EPS 和 LPS 对烟株根表吸附和根内侵入青枯菌数量的影响，扫描电镜观察显示，接种 24 h 时，根表吸附的青枯菌对根组织已经造成严重的破坏，根冠后区域肿胀变形；接种 48 h 时，根内侵入的青枯菌迅速繁殖并堆积于维管束，维管束壁细胞破裂，堵塞

导管，从而堵塞发达的疏导系统，影响水分和养分的运输，造成烟株萎蔫。等浓度的 EPS 和 LPS 菌液处理中，EPS 的促进作用占主导，再加上同条件下 EPS 单产量远大于 LPS 单产量，EPS 对烟株根表吸附及根内侵入的促进作用在吸附识别中发挥主要作用。因此，不同 pH 条件 EPS 及 LPS 分泌量及其在吸附识别中的作用是影响烟草青枯病发生的重要原因之一，为揭示酸性土壤中烟草青枯菌与根部的识别机制以及改善农业防控措施提供理论依据。

研究表明^[26]，pH 6.5 的酸性土壤适宜烟草生长。而本试验结果表明，pH 6.6 的酸性条件下，烟草青

枯菌分泌的 EPS 单产量和总产量均最大,烟株根表识别吸附青枯菌量最大,根尖及根冠后区域细胞破损程度和对烟株维管束的阻塞程度最严重,最有利于青枯病发病。适宜青枯病发病的 pH 条件恰与烟草宜生长的土壤 pH 条件接近,使得通过调节土壤 pH 的方法降低青枯病发病率的可行性降低。而土壤中微生物群落对烟株根表识别吸附青枯菌量存在一定影响,因此在生产中有可能通过增施耐酸性有益菌来提高土壤微生物活性、筛选耐酸拮抗菌等防治酸性土壤中烟草青枯病的发生^[27]。

另外值得注意的是,对湖南张家界市慈利县烟区 100 份病株根际土样 pH 进行测定,结果显示, pH 6.0 ~ 6.6 范围内的土样数量的百分比为 52%,而 pH < 6.0 的土样的百分比为 38%,此 pH 范围并不适宜青枯菌的生长,分析其导致青枯病发生的原因,其一可能是 pH 较低的土壤的烟株自身抗病能力减弱^[28],其二可能是根际微生物菌群结构与丰度变差,有益微生物减少,微生物群落间相互抑制的作用小^[29],使得青枯菌能长期生存并在较小的浓度下持续侵染,因此应进一步围绕酸性土壤中烟株的抗病能力及其微生物群落结构多样性开展相关研究。

4 结 论

pH 与烟草根部吸附和侵入青枯菌过程密切相关。青枯菌的 EPS 在酸性条件下分泌旺盛, LPS 在中性和碱性条件下分泌旺盛,但 EPS 分泌量远大于 LPS 分泌量。EPS 促进青枯菌在烟草根部吸附和侵入,促进青枯菌对根表皮细胞及导管细胞的致畸程度, LPS 抑制青枯菌在根部的吸附和侵入。与 LPS 的抑制作用相比, EPS 的促进作用占主导,且在 pH 6.6 时促进作用最明显。pH 7.0 的中性和 pH 7.5 的碱性条件下,不利于青枯病发生。

参考文献

- [1] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annual review of phytopathology, 1991, 29(1): 65- 87.
- [2] 张东, 扈强, 杜咏梅, 等. 植烟土壤酸化及改良技术研究进展[J]. 中国烟草科学, 2013, 34 (5) : 113-118.
- [3] 魏国胜, 周恒, 朱杰, 等. 土壤 pH 值对烟草根茎部病

害的影响[J]. 江苏农业科学, 2011 (1) : 140-143.

- [4] SEO S, GOMI K, KAKU H, et al. Identification of natural diterpenes that inhibit bacterial wilt disease in tobacco, tomato and Arabidopsis[J]. Plant and cell physiology, 2012,53(8): 1432-1444.
- [5] 董汉松, 王金生, 方中达. 菌体脂多糖在大白菜软腐欧文氏菌对寄主根表吸附中的作用[J]. 微生物学报, 1993, 33 (2) : 144-150.
- [6] KAO C C, SEQUEIRA L. A Gene Cluster Required for Coordinated Biosynthesis of Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide Also Affects Virulence of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Journal of bacteriology, 173(24): 7841-7847.
- [7] DENNY T P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis[J]. Annual review of phytopathology, 1995, 33: 173-197.
- [8] DENNY T P. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in *phytopathogenic* bacteria[J]. European journal of plant pathology, 1999, 105: 417-430.
- [9] SCHELL M A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network[J]. Annual review of phytopathology, 2000, 38: 263-292.
- [10] RAZOU I A, VASSE J, MONTROZIER H, et al. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato roots infection and vascular colonization[J]. European journal of plant pathology, 1998, 104: 795-809.
- [11] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998 : 122-125.
- [12] 史敏晶, 陈月异, 田维敏. pH 值对巴西橡胶树胶乳 β -1, 3-葡聚糖酶结合黄色体膜的影响[J], 热带作物学报, 2009, 30 (7) : 891-895.
- [13] VALDAMERI G, KOKOT T B, PEDROSA F O, et al. Rapid quantification of rice roots-associated bacteria by flow cytometry[J]. Applied microbiology, 2015, 60(3): 237-241.
- [14] HUSAIN A, KELMAN A. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Phytopathology 1958, 48(7): 377-386.
- [15] PENG Y, ZHANG L, ZENG F, et al. Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium[J]. Carbohydrate polymers, 2003,54: 297.
- [16] WESTERMAN R B, HE S, KEEN E, et al. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for the Lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157[J]. Journal of clinical microbiology, 1997, 35(3): 679-684.
- [17] 刘红亮, 陈学忠, 李克生, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157 H7 脂多糖抗原的提取鉴定及间接 ELISA 法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27 (7) : 637-644.
- [18] 李洪. CaCO₃ 对青枯菌生长的影响及土壤中青枯菌的定量 PCR[D]. 重庆: 西南大学, 2012.

- [19] 王丽,汪矛,杨世杰. 青枯菌侵染番茄幼根的扫描电镜观察[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 157-162.
- [20] 李剑平. 扫描电子显微镜对样品的要求及样品的制备[J]. 分析测试技术与仪器, 2007, 13(1): 74-77.
- [21] 叶淑春,罗焕亮,王军. 木麻黄青枯菌的致病性与其对寄主根表吸附的关系研究[J]. 广东林业科技, 1999, 15(4): 39-43.
- [22] SEO S, MATTHEWS K R. Influence of the Plant Defense Response to *Escherichia coli* O157: H7 cell surface structures on survival of that enteric pathogen on plant surfaces[J]. Applied and environmental microbiology, 2012, 78(16): 5882-5889.
- [23] SCHOUTEN H J. A possible role in pathogenesis for the swelling of extracellular slime of *Erwinia amylovora* at increasing water potential[J]. Netherlands journal of plant pathology, 1989, 95: 169-174.
- [24] 罗焕亮,王军,邵志芳,等. 木麻黄青枯菌的根表吸附及根内增殖与其致病性关系[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 21-27.
- [25] 王胜坤,王军,徐大平. 胞外多糖和脂多糖在青枯菌对尾巨桉根部吸附和侵入过程中的作用研究[J]. 林业科学研究, 2007, 20(2): 176-180.
- [26] 刘国顺. 烟草栽培学[M]. 北京:中国农业出版社, 2009: 122-125.
- [27] 袁英英,李敏清,胡伟,等. 生物有机肥对番茄青枯病的防效及对土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(7): 1344-1350.
- [28] WANG L, CAI K Z, CHEN Y T, et al. Silicon-mediated tomato resistance against *Ralstonia solanacearum* is associated with modification of soil microbial community structure and activity[J]. Biological trace element research, 2013, 152(2): 275-283.
- [29] HÖGBERG M N, HÖGBERG P, MYROLD D D. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? [J]. Ecosystem ecology, 2007, 150(1): 590-601.



(上接第17页)

- [6] 匡传富,雷成建,江浩. 几种内生菌防治烟草青枯病药效研究[J]. 现代农业科技, 2012(20): 125-133.
- [7] 李艳嫦,程飞白,陈泽鹏,等. 拮抗烟草青枯病菌的内生细菌筛选、鉴定及定殖研究[J]. 中国烟草学报, 2011(5): 74-80.
- [8] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains.[J]. Applied environmental microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [9] JI S H, GURURANI M A, CHUN S C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars[J]. Microbiological research, 2013, 169(1): 83-98.
- [10] ABDALLAH R A B, JABNOUN-KHIAREDDINE H, NEFZI A, et al. Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *solanum elaeagnifolium*, Stems[J]. Biological control, 2016, 97: 80-88.
- [11] SOARES M A, LI H Y, BERGEN M, et al. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens*, in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix*, L.)[J]. Plant & soil, 2015: 1-17.
- [12] 周岗泉,张建华,陈泽鹏,等. 烟草内生细菌及其对烟草青枯病的生物防治研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 29(2): 31-34.
- [13] 冯吉,黎妍妍,程玲,等. 烟草青枯病的生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016(1): 203-205.
- [14] 许大风,倪海军,季学军,等. 烟草青枯病拮抗菌的筛选及发酵条件试验[J]. 烟草科技, 2016(3): 24-29.
- [15] 夏艳,徐茜,董瑜,等. 烟草青枯病菌拮抗菌的筛选、鉴定及生防特性研究[J]. 中国生态农业学报, 2014(2): 201-207.
- [16] MENG Q X, JIANG H, HAO J J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth[J]. Biological Control, 2016, 98:18-26.
- [17] LIU X Y, REN B, CHEN M, et al. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3[J]. Applied microbiology & biotechnology, 2010, 87(5):1881-1893.
- [18] 翟秋倩,刘丽,李俊峰. 芽胞杆菌防治烟草病虫害的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2016(3): 7-11.
- [19] 刘洋,朱天辉,郑磊,等. 一株内生拮抗细菌的分离鉴定及其抗菌机理研究[J]. 植物保护, 2016(1): 33-39.
- [20] 王静,赵廷昌,李玉高,等. SH7对烟草青枯病的抑菌、防病作用及其抑菌物质的初步研究[J]. 中国烟草科学, 2007, 28(2): 41-44.