



烟草青枯病劳尔氏菌与拮抗菌对根系分泌物的竞争作用

刘艳霞¹, 沈宏³, 李想^{1*}, 张恒¹, 邹焱¹, 朱经伟¹, 向阳²

¹贵州省烟草科学研究所, 土肥植保研究中心, 贵州 贵阳 550081

²贵州省烟草公司金沙县分公司, 贵州 金沙 551800

³中国烟草总公司贵州省分公司, 贵州 贵阳 550000

摘要:【目的】研究青枯病病原菌与拮抗菌的营养特性及其对烟草根系分泌物的响应差异, 对提高拮抗菌定殖能力、有效生物防控烟草青枯病具有非常重要的意义。【方法】本研究通过筛选与鉴定贵州烟区青枯病病原菌株及拮抗菌株, 通过 Biolog 表型芯片技术分别检测病原菌与拮抗菌的特征性碳、氮源, 利用气质联用(GC-MS)检测烟草主栽品种 K326 根系分泌物的主要物质, 在此基础上进行病原菌与拮抗菌对其利用能力、利用强度以及共培养的研究。【结果】经鉴定, 分离、筛选到的病原菌株和拮抗菌株分别为青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 在含量为 0.01 μg/mL 以上的根系分泌物中, 12 种物质的含量从高到低排序为: 果胶>葡萄糖>木糖>阿拉伯糖>半乳糖>核糖>蔗糖>苯甲酸>果糖=D-甘露醇>棕榈酸>富马酸, 果胶含量最高且明显高于其他物质; 拮抗菌(LX4)对碳源利用能力高于病原菌(Rs)的碳源有阿拉伯糖、木糖和核糖, 分别是病原菌利用能力的 1.22、1.95 和 2.17 倍; 前 12 h 拮抗菌利用果糖强度高于病原菌, 不同碳源共培养 24 h 后 LX4 对 *gfp-Rs* (绿色荧光蛋白标记后的青枯病病原菌)抑制率为 18.34% (阿拉伯糖)、53.23% (木糖)、63.53% (核糖)和 52.09% (果糖)。【结论】拮抗菌对烟草根系分泌物的利用不及病原菌, 但在特定碳源条件下拮抗菌能够利用根系分泌物中的某些碳源产生某种拮抗物质抑制病原菌, 拮抗菌与病原菌之间同时存在利用性竞争和干扰性竞争关系, 研究结果为进一步研究烟草青枯病的生物防控提供了新的理论依据。

关键词: 青枯劳尔氏菌, 枯草芽孢杆菌, 烟草, 根系分泌物, 竞争与病害生物防治

烟草青枯病是由青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)引起的一种重要土传病害, 严重制约世界上主要产烟国家的烟草生产, 其在我国南方烟区普遍发生, 特别在湖南、贵州、福建、广东、四

基金项目: 国家自然科学基金(31860597); 贵州省科技计划(黔科合支撑[2018]2345); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(201808, 201905, 201703); 贵州省烟草公司毕节市公司项目(毕烟科 201752050024101)

*通信作者。E-mail: newcool1361214@163.com

收稿日期: 2019-04-10; 修回日期: 2019-08-01; 网络出版日期: 2019-11-12

川、重庆等省发生较为严重^[1], 仅 2015 年烟草青枯病对贵州产区造成的产量损失率就高达 1%。

微生物群落重组、装配、共存、运动和进化的重要手段就是竞争^[2-3]。在复杂的自然微生物群落中, 微生物群落通常会发生两种形式的竞争, 一种是通过产生抗生素来相互拮抗(干扰性竞争), 而另一种则是争夺共享的有限资源(利用性竞争)^[4]。干扰性竞争是指当 2 种或 2 种以上的微生物共同生长时, 一种微生物在生长过程中产生分泌某种次级代谢产物, 改变其所生存的环境, 抑制其他微生物生长的现象^[5]。利用性竞争是指微生物营养竞争和空间位点竞争, 营养和空间位点的竞争是指存在于同一微小生物环境中的 2 种或多种微生物之间争夺这一环境内的空间、营养、氧气等现象^[6]。复杂的竞争关系不仅受群落结构的影响, 还受到权衡表达(trade-offs)和外界环境的限制^[7]。大多数细菌会选择性地使用资源, 对某些资源的偏爱会影响其他分解代谢系统的表达和活性, 从而抑制抗生素的表达, 导致生长-产抗生素权衡^[8], 当资源成为限制因子时, 资源的丰富度决定了微生物生长和次生代谢之间的代谢成本^[9-10]。

根系分泌物不仅为根际微生物提供所需的能源, 而且不同根系分泌物直接影响着根际微生物的数量和种群结构。Darrah^[11]模拟了可溶性碳同根际微生物量及死亡量的水平和垂直分布, 结果表明, 根际微生物的分布与沿根的可溶性碳的分布与沿根的可溶性碳的分布距离有关, 微生物生物量的积累依赖于根系分泌物的释放。分泌物越多, 微生物生长越旺盛; 而根系分泌物的种类则决定根际微生物的种类, 这就是不同植物根际发育着不同微生物的原因。当然根系分泌物除了对根际微生物数量和种类产生影响外, 还对微生物的代谢及生长发育有一定的影响, 其影响有时起促进作用, 有时起抑制

作用。前期研究表明, 烟草根系分泌物对青枯病病原菌的促进作用要明显高于拮抗菌^[12]。

表型芯片技术(Phenotype Microassays, PMs)是由美国 Biolog 公司根据其多年对全自动微生物鉴定系统相关技术的积累, 开发的一种全新的专利技术^[13-14]。PMs 可用于测定微生物细胞的表型, 根据 96 孔板每孔颜色变化度可以快速、准确地反映微生物在不同 C、N、P、S 源板上的代谢情况以及在渗透压、pH、化学药物等基质条件下微生物表型特征差异^[15]。PMs 芯片技术在微生物领域中, 用来评估某些基因敲除后突变体的表型特征^[16-21]或微生物的趋化应答反应^[22]; 还有研究针对环境变化比如温度、抗生素或其他逆境因素导致的微生物表型变化等^[23-25], 多用于药理方面的研究。近年来也有一些研究将 PMs 板应用于环境微生物, 特别是环境中厌氧和嗜热微生物群落的表型分析^[26]。

对烟草青枯病病原菌和拮抗菌表型分析及其对根系分泌物的响应差异研究具有非常重要的作用。探索病原菌与拮抗菌间特征性碳、氮源的差异, 其利用能力、强度关系到生物防控的效果, 可以有针对性地优化二次发酵有机肥的营养结构, 从而抑制病原菌生长, 减少土传病害的发生, 为今后的绿色生防提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

试剂 IF-0a GN/GP Base inoculating fluid (1.2×)、Biolog Redox Dye mix A (100×)、Biolog Redox Dye mix F (100×)等购自于 Biolog 公司; 琥珀酸钠(sodium succinate)、柠檬酸铁(ferric citrate)、丙酮酸钠(sodium pyruvate)、丙三羧酸(tricarballic acid)、氯化镁(magnesium chloride, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)、氯化钙

(calcium chloride, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、L-精氨酸(L-arginine)、L-谷氨酸(L-glutamic acid)、L-胱氨酸(L-cystine)、尿苷酸二钠(uridine-5'-monophosphate, 2Na)、吐温 80(Tween 80)、D-葡萄糖(D-glucose)等均购自于 Sigma 公司; 酵母粉(yeast extract)等购自于 Oxoid 公司。

仪器采用的是 Biolog 公司的 OmniLog Phenotype MicroArray Software Release 系 1.2 系统和 GN、GP 数据库(USA), 包括浊度仪(Turbidimeter)和多孔道电动移液枪(Multichannel Pipetter)等。

1.2 主要培养基

1.2.1 NA 培养基(g/L): 葡萄糖 10、蛋白胨 5、酵母浸膏 3、酵母粉 0.5, 调节 pH 7.2–7.4, 115 °C 高压灭菌 30 min。用于培养拮抗细菌。

1.2.2 TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 15、大豆蛋白胨 5、氯化钠 5, 调节 pH 7.2–7.4, 121 °C 高压灭菌 20 min。用于菌种特征性碳源预处理试验。

1.2.3 TSA 培养基(g/L): TSB 培养基加 1.5% 琼脂粉, 121 °C 高压灭菌 20 min。用于菌种特征性碳源预处理试验。

1.2.4 TZC 培养基(g/L): 葡萄糖 10、蛋白胨 5、牛肉膏 3、酵母粉 0.5、琼脂 16, 115 °C 灭菌 30 min, 待培养基温度下降至 50 °C 时, 每升加入 1% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 5 mL。主要用于培养青枯劳尔氏菌。

1.2.5 SMSA 培养基(g/L): 琼脂 16、蛋白胨 10、酸水解酪蛋白 1, 甘油 5 mL, 1% 多粘菌素 10 mL, 1% 结晶紫 0.5 mL, 1% TTC 5 mL, 1% 杆菌肽 2.5 mL, 青霉素 0.5 mL, 1% 氯霉素 10 mL, 1% 放线菌酮 10 mL, 121 °C 度灭菌 20 min。用于土壤中分离青枯劳尔氏菌。

1.2.6 羊血培养基(g/L): Biolog BUG 57、琼脂

16, 121 °C 灭菌 20 min, 待培养及冷却至室温, 加入 10 mL 冻干脱纤维羊血, 冻干脱纤维羊血用 0.9% 的氯化钠溶解。用于 Biolog 表型芯片预处理生长菌株。

1.2.7 OS 无机盐培养基(g/L): Na_2HPO_4 7.00、 KH_2PO_4 6.80、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.19、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1、 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.80×10^{-2} 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.00×10^{-3} 、 Na-EDTA 2.50×10^{-3} 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.54×10^{-3} 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.90×10^{-4} 、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1.80×10^{-4} 。用于菌种特征性碳源试验。

1.3 试验方法

1.3.1 烟草青枯病菌和拮抗菌的分离与纯化: 采集贵州省福泉市烟草青枯病发病严重烟田中发病烟株和健康烟草根系及根际土壤, 采集根际土壤时将烟株慢慢连根拔起, 轻轻振荡掉附着的土块, 将根连同根上振荡不掉的土壤置于 10 mL 灭菌水中, 超声波振荡 15 min 后得到的土壤即为根际土壤^[27]。采用 SMSA 选择性培养基^[28]分离青枯劳尔氏菌 Rs。对拮抗菌的离体分离、筛选根据 Liu 等^[29]的实验方法进行, 根据其拮抗能力和拮抗稳定性等特性筛选拮抗菌备用。将筛选到的病原菌和拮抗菌分别在 TZC 培养基和 NA 培养基上以划线法纯化 3–5 代后保存待用。

1.3.2 病原菌与拮抗菌的 16S rDNA 鉴定: 病原菌和拮抗菌菌株 DNA 用 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit (TaKaRa) 试剂盒提取, PCR 扩增按照 Zhang 等^[30]方法进行, 引物采用 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', PCR 采用 50 μL 的反应体系: *Premix Ex Taq*[®] 25 μL 、前引物 27F 1 μL 、后引物 1541R 1 μL 、DNA 模板 2 μL 、超纯水(ddH_2O) 21 μL 。

PCR 反应条件: 在 94 °C 条件下预变性 5 min, 进入热循环: 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 循环。PCR 产物送上海捷瑞生物工程技术有限公司纯化及鉴定, 核酸序列 NCBI 数据库进行比对分析。

1.3.3 病原菌与拮抗菌的特征性 C、N 源检测与分析: 烟草青枯病病原菌 Rs 是革兰氏阴性菌, 采用 Biolog 革兰氏阴性细菌表型芯片分析方法检测特征性 C、N 源(图 1); 拮抗菌是革兰氏阳性菌, 采用 Biolog 革兰氏阳性细菌表型芯片分析方法检测拮抗菌(图 2)。用 PM01、PM02A 测定病原菌和拮抗菌的特征性碳源, 用 PM03B、PM06、PM07 和 PM08 测定病原菌和拮抗菌的特征性氮源。在同一 PM 板中, 以病原菌为参照菌株, 标记为红色, 以拮抗菌为检测菌种, 标记为绿色, 用 OL_PR_1.2.exe 软件进行数据对比分析, 选择 Area/Inflection 为对比参数, 其中 Area 表示菌株反应曲线下的峰面积,

Inflection 表示反应曲线的拐点时间, 峰面积越大, 拐点时间越小, Area/Inflection 值越大, 说明微生物对此营养源的代谢越强, 病原菌与拮抗菌代谢能力相同的区域标记为黄色。

1.3.4 烟草根系分泌物的收集与纯化: 烟草根系分泌物在贵州省烟草科学研究院人工气候室收集。先用自来水浸泡蛭石 12 h, 然后用去离子水冲洗 3 次。烟草专用育苗盘用去离子水冲洗 3 次后装满蛭石。供试烟种为主栽品种 K326 (*Nicotiana tabacum* L.), 从贵州省烟草科学研究院获得。烟草种子用 1% 次氯酸钠溶液进行表面消毒 5 min 后用灭菌去离子水漂洗 3 次, 放于苗盘中发芽。将烟草专用育苗盘浮于水上培养, 待新芽长出后, 苗盘放于 25–28 °C、75% 相对湿度的人工气候室中培育 45 d。在培育阶段, 不断向水中加入霍格兰营养液和阿农微量元素营养液以维持烟苗正常生长, 并通过电磁泵向营养液中补充氧气。

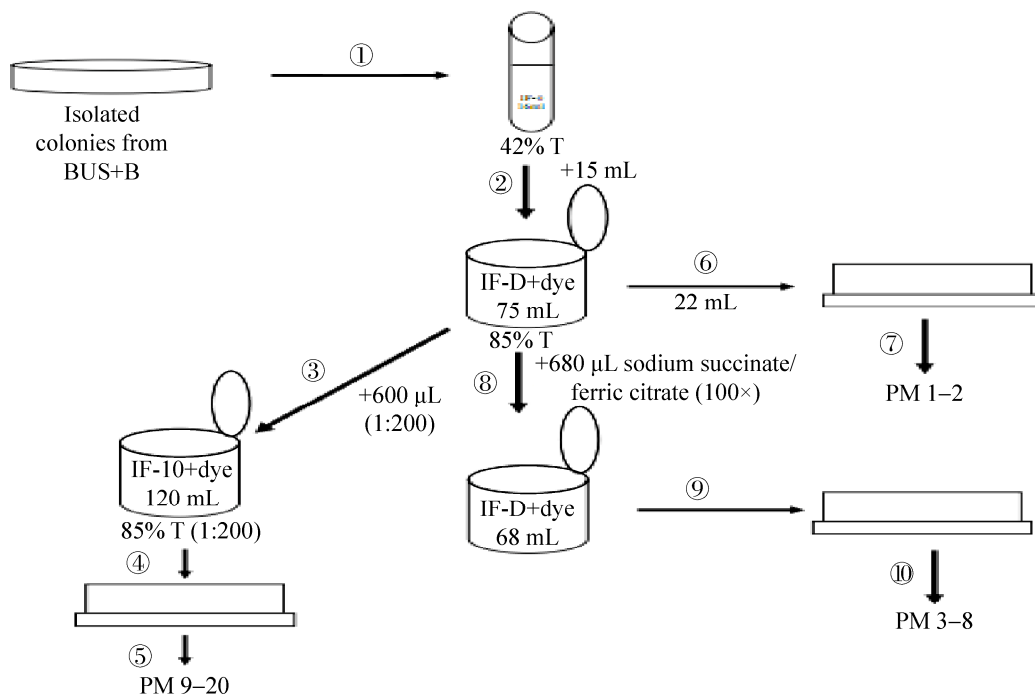


图 1. 革兰氏阴性菌 PM 操作步骤显示图

Figure 1. Biolog PM procedures for *E. coli* and other GN bacteria.

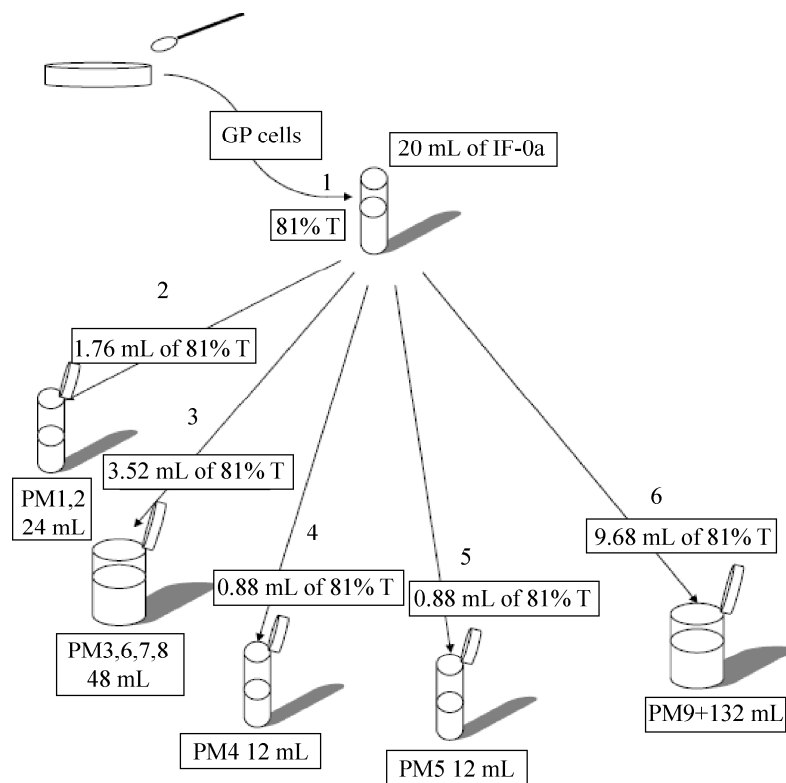


图 2. 革兰氏阳性菌 PM 操作步骤显示图

Figure 2. Biolog PM procedures for *B. subtilis* and other GP bacteria.

在培育 45 d 后,先用自来水冲洗烟苗根系 5 次,再用去离子水冲洗 5 次。烟草根系浸泡在 6 L 超纯水中于恒温恒湿人工气候室中培育 36 h,期间用电磁泵向水中补充氧气以维持烟株正常生长。根系分泌物收集液经 0.45 μm 微孔过滤膜过滤后立即冻干浓缩并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下。根系分泌物冻干粉未溶解于灭菌去离子水中,分别配成 0.01 g/mL, root DW 用于生物测定及 1 g/mL, root DW 用于分析成分。

1.3.5 烟草根系分泌物中主要物质检测: 用正己烷、氯仿和少量乙醇超声提取,得滤液用于 GC-MS 气质联用仪检测和分析两个烟草品种的根系分泌物主要碳源。

GSMS 仪器设置的条件如下:色谱柱:HP 125 m \times 0.2 mm \times 0.33 μm 石英毛细管柱;载气:氦气(流速

1.0 mL/min);程序升温:50–330 $^{\circ}\text{C}$,进样口温度 330 $^{\circ}\text{C}$,分流比 100:1;质谱条件:离子源温度 290 $^{\circ}\text{C}$,离子源为 EI (电子轰击源);进样量:2.0 μL ;四级杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$;倍增器电压 1341 V;发射电流 34.6 A。

1.3.6 病原菌与拮抗菌对根系分泌物的响应差异检测: 烟草根系分泌物中含量高于 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 物质为主要物质,将病原菌与拮抗菌的特征性 C、N 源利用情况与烟草根系分泌物中主要物质进行比对分析,获得病原菌与拮抗菌对根系分泌物的响应差异。

1.3.7 拮抗菌 LX4 和病原菌 Rs 对烟草根系分泌物中不同碳源的利用程度: 分别将 NA 培养基上活化的拮抗菌 LX4 和 TZC 培养基上活化的 Rs 菌株转接到 TSA 固体培养基上划线,30 $^{\circ}\text{C}$ 连续培养 24 h,挑取 TSA 平板上的单菌落转接到 1/10 TSB 液体培

培养基, 30 °C, 170 r/min 培养 24 h, 至 OD_{600} 为 1.0 左右。

由于 TSA 和 TSB 培养基不含碳源, 菌株在 TSA 和 TSB 培养基上培养一段时间可以消耗细菌本身的内生碳源^[31]。将 1/10 TSB 培养基上培养的新鲜菌液 4500 r/min 常温离心 5 min, 收集菌体, 用无菌的生理盐水(0.95% NaCl)洗涤菌体, 具体步骤为: 用生理盐水重悬菌体, 4500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 重复 3 次洗涤过程以除去残留的培养, 最后用无菌生理盐水调节 $OD_{600}=0.5$ 。

为检测 LX4 与 Rs 对单一碳源的利用强度, 在 96 孔细胞培养板(Costar)中加入根系分泌物中拮抗菌利用率高于或者等于病原菌的单一碳源 OS 培养基, 单一碳源的终浓度为 10 mmol/L, 接种配置好的菌悬液使初始菌 OD_{600} 值为 0.05。96 孔细胞培养板(Costar)置于 30 °C, 170 r/min 培养, 每隔一段时间在酶标仪上检测菌液 OD_{600} 值。

以在单一碳源条件下细菌生长的最大生长速率表征细菌对该种碳源的利用强度。瞬时生长速率计算公式为: $\mu=(\ln X_t2-\ln X_t1)/(t2-t1)$, 其中 μ 、 X 、 t 分别指的是瞬时生长速率、某时刻细菌细胞密度(OD_{600})、时间(h)。

1.3.8 烟草根系分泌物中不同碳源拮抗菌与病原菌共培养: 本课题组对 Rs 进行绿色蛋白荧光标记(gfp), 标记后青枯劳尔氏菌为 gfp-Rs 方法, 进而运用荧光定量 PCR 法测定 gfp-Rs 的数量^[32]。

选取根系分泌物 LX4 中能够利用的碳源用于本试验。在 96 孔细胞培养板(WHB-96)中加入含 10 mmol/L D-海藻糖的 OS 培养基(通过病原菌与拮抗菌的特征性 C、N 源检测与分析的结果, 发现 D-海藻糖是一种能够被 gfp-Rs 利用而不能被 LX4 利用的碳源, 在 OS 培养基中加入 10 mmol/L

的 D-海藻糖以保证 gfp-Rs 的生长不受碳源竞争的影响), 保证各小孔中添加浓度为 5 g/L 的各碳源的无机盐培养基^[7]。

96 孔细胞培养板(WHB-96)中同时接入配好的菌悬液 LX4 和 gfp-Rs, 同时 gfp-Rs 接种量为 LX4 的 1%, 微孔板于 30 °C、170 r/min 振荡培养, 每隔一段时间测定 gfp-Rs 的数量。

1.4 数据分析

试验数据用采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 拮抗菌和病原菌对碳源利用能力、强度和共培养试验中的数据采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果和分析

2.1 病原菌与拮抗菌的鉴定

经 16S rDNA 鉴定, 分离筛选到的菌株分别为烟草青枯病病原菌青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)和拮抗菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) LX4 (图 3), 保存于贵州省烟草科学研究所微生物实验室。其中, 病原菌 GenBank 中的序列号为 KC888020; 筛选到的高效拮抗细菌对病原菌的拮抗圈达到 15 mm (图 4), 经中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(CGMCC No.8265)。

2.2 病原菌与拮抗菌的碳、氮源特征性图谱

病原菌 Rs 和拮抗菌 LX4 在不同表型芯片板中能够利用的碳、氮源如表 1、图 5 所示。在 PM01 表型芯片中, 有 90 种物质青枯菌利用能力优于拮抗菌, 仅有 4 种物质拮抗菌利用能力优于病原菌; 在 PM02A 表型芯片中, 有 73 种物质青枯菌利用能力优于拮抗菌, 仅有 18 种物质是拮抗菌利用能力

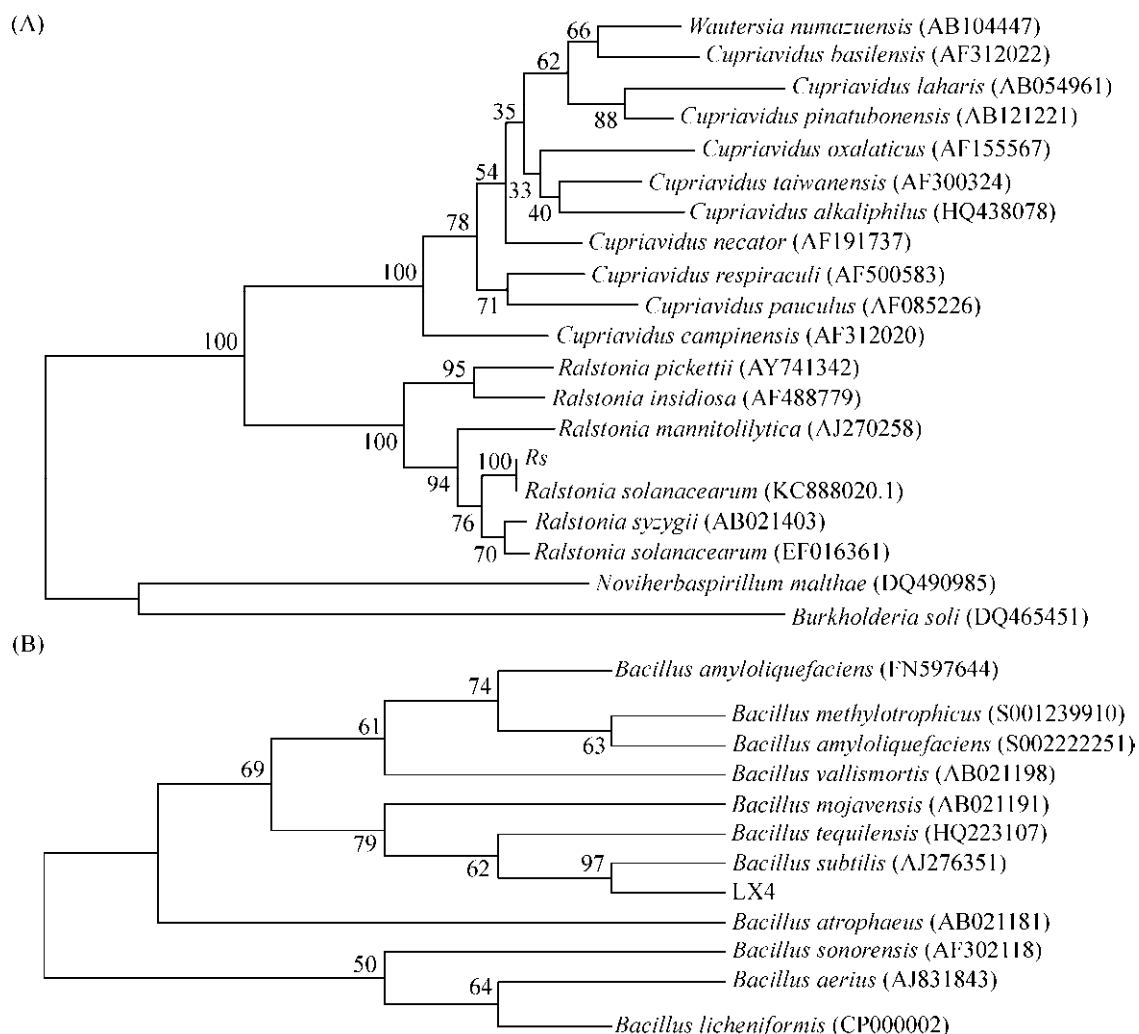


图 3. 用邻接法构建的基于病原菌和拮抗菌 16S rDNA 的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of pathogen and antagonistic bacterium its relative strains based on neighbor-joining method. A: pathogen; B: antagonistic bacterium. In the phylogenetic tree, the numbers in brackets are serial numbers of strains in microbiological culture collection center. The numbers in branch point indicate genetic distance between strains.

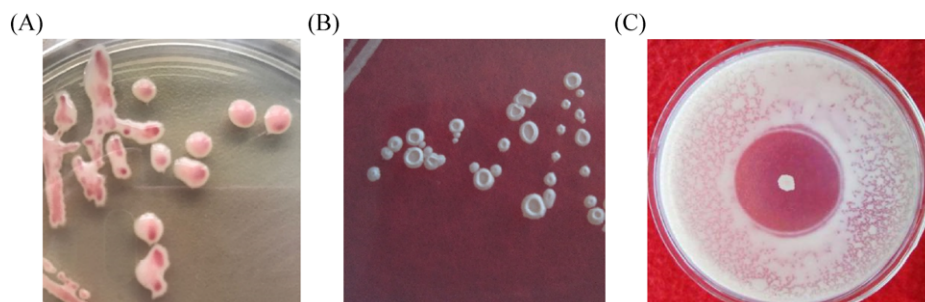


图 4. 青枯劳尔氏菌(A)、拮抗菌枯草芽孢杆菌(B)的菌落形态及拮抗效果(C)

Figure 4. The colony morphology of *R. solanacearum* (A), antagonistic activity of *Bacillus subtilis* (B) and antagonistic effect (C).

表 1. 病原菌与拮抗菌的特征性碳、氮源种类差异

Table 1. The difference of characteristic carbon and nitrogen sources between pathogen and antagonist

Phenotype	Variety of carbon and nitrogen pathogen used better than antagonist	Variety of carbon and nitrogen antagonist used better than pathogen
PM01	91	4
PM02A	73	18
PM03B	60	32
PM06	72	17
PM07	74	21
PM08	84	1



图 5. 病原菌与拮抗菌对不同碳、氮源的代谢差异

Figure 5. The metabolic differences of carbon and nitrogen of the pathogen and antagonist. In the same PM plate, carbon or nitrogen used by pathogen was marked as red while carbon or nitrogen used by antagonist was marked as green. Carbon or nitrogen was used by both pathogen and antagonist was marked as yellow.

优于青枯菌；在 PM03B 表型芯片中，有 60 种物质青枯菌利用能力优于拮抗菌，仅有 31 种物质是拮抗菌利用能力优于青枯菌；在 PM06 表型芯片中，有 72 种物质青枯菌利用能力优于拮抗菌，仅有 17 种物质是拮抗菌利用能力优于青枯菌；在 PM07 表型芯片中，有 74 种物质青枯菌利用能力优

于拮抗菌，仅有 21 种物质是拮抗菌利用能力优于青枯菌；在 PM08 表型芯片中，有 84 种物质青枯菌利用能力优于拮抗菌，仅有 1 种物质是拮抗菌利用能力优于青枯菌。

2.3 烟草根系分泌物中主要物质组成

根据根系分泌物出峰时间长短,从图 6 和表 2

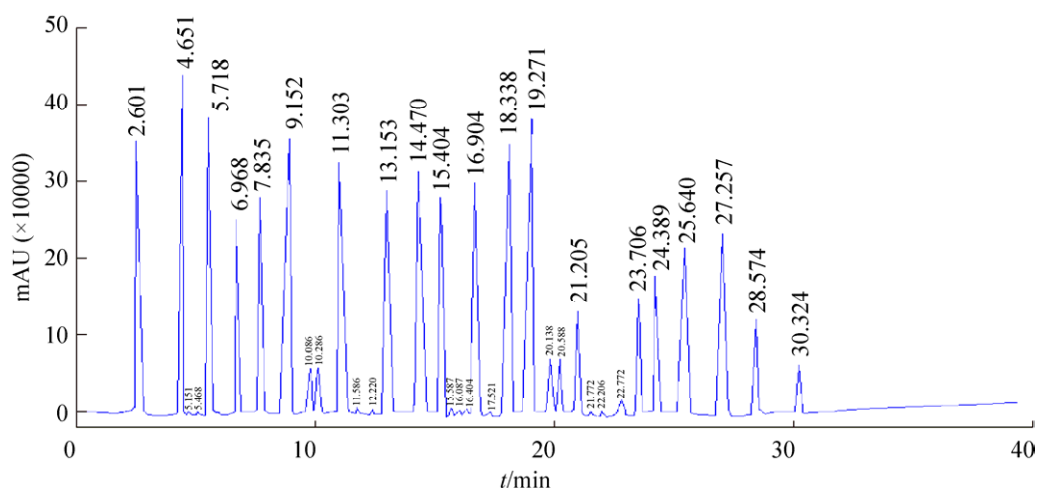


图 6. 根系分泌物中物质气质联用图谱

Figure 6. GC-MS of main substance in tobacco root exudates. A: reference; B: root exudates of K326.

表 2. K326 烟草根系分泌物中主要物质组成

Table 2. Main substance in K326 root exudates (>0.01 mg/kg)

Substance classification	Component type	Content/(μg/mL)	Chemical abstracts service No.	Formula	Content sort order
Acids	Fumaric acid	0.48	110-17-8	C ₄ H ₄ O ₄	12
	Benzoic acid	4.8	65-85-0	C ₇ H ₆ O ₂	8
	Palmitic acid	1.9	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	11
Saccharides	Fructose	2.2	7660-25-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	9
	Pectin	183.4	9000-69-5	C ₆ H ₁₂ O ₆	1
	Glucose	48.9	50-99-7	C ₆ H ₁₂ O ₆	2
	Sucrose	6.3	57-50-1	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	7
	Arabinose	22.4	205-699-8	C ₅ H ₁₀ O ₅	3
	Galactose	8.4	381716-33-2	C ₂₀ H ₃₁ N ₃ O ₁₂	5
	Xylose	30.2	41247-05-06	C ₅ H ₁₀ O ₅	4
	Ribose	8.3	50-69-1	C ₅ H ₁₀ O ₅	6
Alcohols	D-Mannitol	2.2	76779-67-4	C ₁₈ H ₃₀ O ₆	9

中可以看出,在浓度大于 0.01 mg/kg 的物质组成中,含量最高的为果胶 183.4 mg/kg,含量最低的为棕榈酸有 1.9 mg/kg,氨基酸、酚酸、有机酸、肌醇、茄尼酮、烟碱等物质的含量均小于 0.01 mg/kg,糖类物质的含量较高,其次是酚酸和有机酸类物质。

2.4 病原菌和拮抗菌对根系分泌物主要物质响应差异

在根系分泌物中>0.01 mg/kg 浓度的主要物质中,拮抗菌 LX4 对碳源能力高于病原菌 Rs 的碳源有阿拉伯糖、木糖和核糖,分别是病原菌利用能力的 1.22、1.95 和 2.17 倍(图 7);拮抗菌 LX4 利用能力低于病原菌 Rs 的物质有富马酸、苯甲酸、棕榈酸、半乳糖和 D-甘露醇,分别是病原菌能力的 49.33%、63.37%、16.21%、76.69%和 74.48%。葡萄糖、果糖、果胶和蔗糖的利用能力两者无显著差异。整体来说,病原菌 Rs 在酸和醇的利用上明显优于拮抗菌 LX4,在糖的利用上,拮抗菌 LX4 除对阿拉伯糖、木糖和核糖的利用优于病原菌 Rs 外,其他糖类利用能力均为病原菌 Rs 较强。

2.5 拮抗菌和病原菌对根系分泌物的利用强度差异

以微生物在单一碳源条件下的生长速率来表

征微生物对这种碳源的利用强度。拮抗菌 LX4 和病原菌 Rs 均能利用烟草根系分泌物中的碳源,但其利用碳源的强度有所差异。如表 3 所示,对于拮抗菌 LX4 对碳源能力高于病原菌 Rs 的阿拉伯糖、木糖和核糖,拮抗菌 30 h 内的利用强度均高于病原菌,对于阿拉伯糖拮抗菌在 6 h 即达到最大,是病原菌最大利用强度的 1.25 倍,对于木糖拮抗菌在 18 h 达到最大,是病原菌最大利用强度的 1.70 倍,对于核糖拮抗菌 12 h 达到最大,是病原菌最大利用强度的 1.72 倍。对于葡萄糖、果糖、果胶和蔗糖的利用能力两者无显著差异,但在不同时间点利用强度明显不同,对于果糖前 12 h 拮抗菌利用强度高于病原菌,果胶和蔗糖前 12 h 病原菌利用强度高于拮抗菌,对于葡萄糖前 24 h 病原菌利用强度均保持较高的强度,明显高于拮抗菌。

2.6 拮抗菌 LX4 在不同碳源条件下抑制病原菌生长的能力

虽然 LX4 对烟草根系分泌物中大部分碳源利用数量和强度都较病原菌 *gfp-Rs* 小,但在某些碳源条件下,LX4 和 *gfp-Rs* 共培养能够显著抑制病原菌 *gfp-Rs* 的生长(表 4)。在单一碳源条件下,LX4 与 *gfp-Rs* 共培养 24 h 后,碳源为阿拉伯糖,LX4

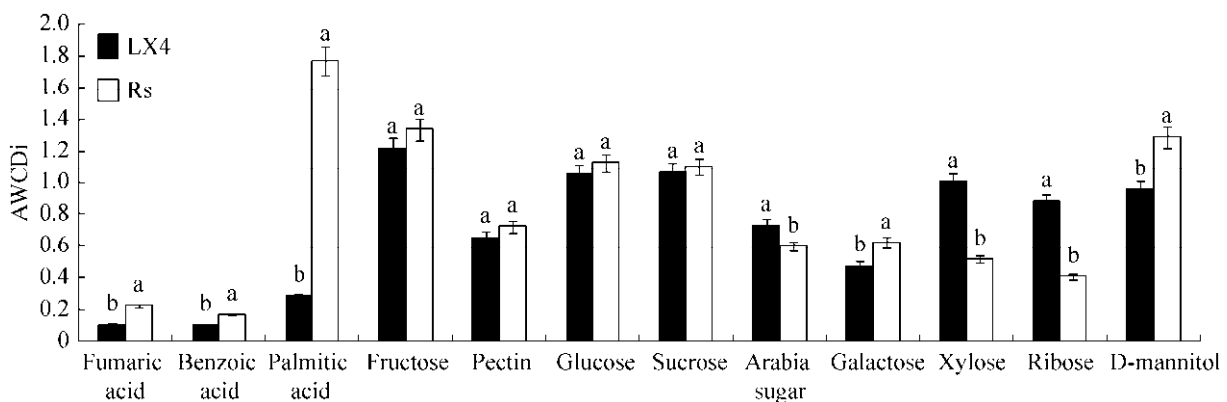


图 7. 病原菌与拮抗菌对根系分泌物中主要物质响应差异

Figure 7. The response of pathogen and antagonist to dominant substance in root exudates.

表 3. LX4 和 Rs 的单一碳源最大生长速率

Table 3. The maximum growth rate of LX4 and Rs in the single carbon source

Carbon sources	6 h		12 h		18 h		24 h		30 h	
	LX4	<i>gfp-Rs</i>	LX4	<i>gfp-Rs</i>	LX4	<i>gfp-Rs</i>	LX4	<i>gfp-Rs</i>	LX4	<i>gfp-Rs</i>
Arabinose	1.654	1.322	1.535	1.018	1.407	0.872	1.245	0.612	1.002	0.358
Xylose	1.224	0.231	1.306	0.794	1.519	0.894	1.253	0.774	0.953	0.656
Ribose	1.701	1.287	2.216	1.112	1.369	0.991	0.985	0.427	0.426	0.156
Fructose	1.753	1.641	2.223	1.965	1.641	1.788	1.624	1.771	1.342	1.588
Pectin	0.477	1.011	1.132	1.251	1.148	0.884	0.578	0.471	0.337	0.166
Glucose	2.891	3.430	3.547	4.308	3.266	4.089	2.497	2.934	2.886	1.383
Sucrose	0.421	1.829	0.622	1.535	0.848	0.515	1.227	0.324	1.689	0.227

表 4. *gfp-Rs* 在不同碳源培养下的单一培养与共同培养数量Table 4. The *gfp-Rs* population under the single and co-cultured quantities under different carbon source cultures

Carbon sources	Counts of <i>gfp-Rs</i> /(CFU/mL)		Suppress efficiency/%
	Independent culture	Co-culture	
Arabinose	6.38±0.28 a	5.21±0.75 a	18.34
Xylose	6.03±0.13 a	2.82±0.83 b	53.23
Ribose	7.98±0.18 a	2.91±0.56 b	63.53
Fructose	7.43±0.14 a	3.56±0.44 b	52.09

Data in the table are mean±SD. Different letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

对 *gfp-Rs* 抑制率仅为 18.34%；为木糖则对 *gfp-Rs* 抑制率达 53.23%；为核糖对 *gfp-Rs* 抑制率达 63.53%；为果糖对 *gfp-Rs* 抑制率达 52.09%。

3 讨论

目前国内对 Biolog 的应用多集中在使用 Biolog 鉴定板对微生物种属进行鉴定^[33]、使用 Biolog-ECO 板检测根际土壤微生物功能多样性^[34]等, 而利用 Biolog-PM 表型芯片技术确定微生物特征性碳、氮源的研究尚少。一方面由于 Biolog-PM 表型芯片技术要求 Biolog 鉴定系统装载独立的检

测模块, 另一方面 PM 板价格相对较高。然而, 对特定的功能微生物, 特别是对重要的病原菌和拮抗菌进行特征性碳、氮源的研究具有较重要的意义。微生物特征性碳、氮源是快速、准确反映微生物群体水平和群落结构的有效特征。弄清烟草青枯病病原菌与拮抗菌代谢营养差异性, 不但能够弄清烟草连作导致土传病害发生的原因, 而且还可以通过有效调控措施提高拮抗菌在土壤中的定殖能力。

在本研究测试的 190 种碳源和 380 种氮源中, 烟草青枯菌优先利用的碳、氮源种类显著多于拮抗

菌；青枯菌能更好地利用有机酸类、氨基酸类、糖类、酰胺类和糖苷类物质，而拮抗菌株能更好地利用无机氮盐、嘧啶类和胺类物质。其中病原菌对 L-苏氨酸、葡罗酰胺和 L-鸟氨酸三种物质在碳源板中代谢能力优于拮抗菌，而在氮源板中拮抗菌对这三种物质的代谢能力却高于病原菌。生态位重叠指数(Niche Overlap Index, NOI)用于表示非病原微生物与病原菌共同可利用的碳源与病原菌可利用碳源的比值。非病原微生物与病原菌的 NOI 越高，其与病原菌的竞争能力越强，它能获取大部分病原菌能利用的碳源^[2]，本试验中拮抗菌 LX4 与病原菌 Rs 共同可以利用的碳源数量有 69 种，两者之间的生态位重叠指数为 0.44，说明二者存在潜在营养竞争。在 PM01 和 PM02A 板中，孔中的物质作为微生物唯一碳源物质。而在氮源板上，由于操作过程中还需补充一定的碳源类物质，例如对革兰氏阴性菌还需添加琥珀酸钠和柠檬酸铁，对革兰氏阳性菌还要添加丙三酸、D-葡萄糖和丙酮酸钠，因此细菌对于碳源板上某些碳源可能产生不同的代谢效果。

从以上研究结果还可以看出，烟草青枯病原菌对 Biolog-PM 表型芯片上代谢的碳、氮源种类显著多于拮抗菌。病原菌株对有机酸类、氨基酸类、糖类、酰胺类和糖苷类物质的代谢能力强于拮抗菌，而拮抗菌株能更好地利用无机氮盐、嘧啶类和胺类物质。目前研究发现烟草根系分泌物中主要物质为水溶性有机酸、酚酸类、糖类、氨基酸、多肽、嘌呤和核苷等^[35]。由于不同烟草品种分泌物的种类和含量不相同，因此对病原菌和拮抗菌生长的作用不同^[36]。于会泳等^[37]研究发现，K326 和 NC89 两个烤烟品种根系分泌物中含量从高到低的物质皆为有机酸、酯类、酰胺类和烷烃类。烟草青枯劳

尔氏杆菌对这些物质的代谢能力较强，长期烟草连作有利于病原菌的生长定殖，使之成为烟草根际的优势菌群。另外，不同种类的氨基酸对病原菌和拮抗菌的作用也不相同。郝文雅等^[38]研究证明，水稻和西瓜根系分泌物中的丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸可促进西瓜专化型尖孢镰刀菌孢子萌发，而丝氨酸主要抑制此病原菌的生长。在本研究中，病原菌对脯氨酸-亮氨酸、丝氨酸-酪氨酸等代谢能力较强，而拮抗菌对蛋氨酸-蛋氨酸和甘氨酸-半胱氨酸等代谢能力较强。这种营养代谢差异直接导致病原菌在烟草根系中比拮抗菌更易定殖，可能是导致烟草青枯病害发生的主要生理原因之一。

根际微生物群落一般被认为受植物的根系分泌物影响最大^[39-41]，根分泌物使得根际土壤成为特殊的微生态环境，根际分泌物对细菌的影响程度一般大于对真菌和放线菌的影响，这是由于细菌个体相对较小，繁殖快，对环境变化响应快，所以其数量变化较大^[42]。本研究发现含量在 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的根系分泌物中，被测试物质含量由高到低的排序依次为果胶>葡萄糖>木糖>阿拉伯糖>半乳糖>核糖>蔗糖>苯甲酸>果糖=D-甘露醇>棕榈酸>富马酸，拮抗菌 LX4 利用苯甲酸能力低于病原菌 Rs，仅为 63.37%，这与我们前期研究结果相符，即土壤外源添加酚酸类物质中苯甲酸 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时土壤病原菌数量增加而拮抗菌数量减少，合理解释了田间实际生产中，烟株正常分泌的苯甲酸对病原菌具有正趋向作用，而对拮抗菌却具有排斥作用^[11]。

前人研究发现在限制营养的平板上共培养条件下，其他 3 株菌株对假单胞菌菌株 Pf0-1 的生长有不同程度的影响，进而推测土壤中微生物存在干扰性竞争关系，是微环境中在养分限制条件下存活的关键^[43]。Ji 等^[31]发现，拮抗菌与病原菌生态位重

叠指数越高, 生防菌的生防效率越高, 生防菌与病原菌的利用性竞争能力显著影响生防菌的生防效率。本研究在根系分泌物中 >0.01 mg/kg 浓度的主要物质中, 拮抗菌 LX4 对碳源能力高于病原菌 Rs 的碳源有阿拉伯糖、木糖和核糖, 拮抗菌 LX4 利用能力低于病原菌 Rs 的物质有富马酸、苯甲酸、棕榈酸、半乳糖和 D-甘露醇, 两者对葡萄糖、果糖、果胶和蔗糖的利用能力无显著差异。本研究发现病原菌能够快速利用烟草根系分泌物中的大部分碳源, 并且青枯菌具有游动性, 对根系分泌物具有很强的趋化性等特征, 病原菌能在植物根际迅速定殖, 抢占生态位, 进而能够成功侵染植株^[44], 但我们发现拮抗菌在前 12 h 利用果糖强度上具有相对优势, 可能存在对病原菌的利用性竞争, 当拮抗菌 LX4 与病原菌共培养时, 病原菌的生长被迅速抑制, 尤其在果糖作为唯一碳源条件下, 即 LX4 能够利用果糖产生某种拮抗物质抑制病原菌的生长以获取更有利的条件, 表明拮抗菌和病原菌既存在干扰性竞争, 也存在利用性竞争。在植物根际营养限制条件下, 拮抗菌能否利用植物根系分泌物产生拮抗物质而抑制或杀死病原菌, 与病原菌竞争营养与定殖位点, 对于拮抗菌能否在植物根际生存和防控病害都有重要的作用^[45], 也是今后我们进行利用拮抗菌生物植物病害的防控研究的重点内容。

4 结论

拮抗菌对烟草根系分泌物的利用不及病原菌, 但在不同碳源条件下拮抗菌能够利用根系分泌物中的某些碳源而产生某种拮抗物质抑制病原菌, 拮抗菌与病原菌之间同时存在利用性竞争和干扰性竞争。

参考文献

- [1] Huo QJ, Zhang S, Wang RY. Advance and control of tobacco bacterial wilt disease. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(8): 364–368. (in Chinese)
霍沁建, 张深, 王若焱. 烟草青枯病研究进展. *中国农学通报*, 2007, 23(8): 364–368.
- [2] Mallon CA, Le Roux X, Van Doorn GS, Dini-Andreote F, Poly F, Salles JF. The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. *The ISME Journal*, 2018, 12(3): 728–741.
- [3] Mumford R, Friman VP. Bacterial competition and quorum-sensing signalling shape the eco-evolutionary outcomes of model *in vitro* phage therapy. *Evolutionary Applications*, 2017, 10(2): 161–169.
- [4] Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(1): 15–25.
- [5] Huang X, Xu LL, Huang RS, Huang SS. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Bulletin*, 2010, (1): 24–29. (in Chinese)
黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 黄庶识. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展. *生物技术通报*, 2010, (1): 24–29.
- [6] Janvier C, Villeneuve F, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Mateille T, Steinberg C. Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(1): 1–23.
- [7] Yang CL, Dong Y, Friman VP, Jousset A, Wei Z, Xu YC, Shen QR. Carbon resource richness shapes bacterial competitive interactions by alleviating growth-antibiosis trade-off. *Functional Ecology*, 2019, 33(5): 868–875.
- [8] Schlatter DC, Kinkel LL. Do tradeoffs structure antibiotic inhibition, resistance, and resource use among soil-borne *Streptomyces*? *BMC Evolutionary Biology*, 2015, 15: 186.
- [9] Händel N, Schuurmans JM, Brul S, ter Kuile BH. Compensation of the metabolic costs of antibiotic resistance by physiological adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(8): 3752–3762.
- [10] Takeuchi K, Kiefer P, Reimann C, Keel C, Dubuis C, Rolli J, Vorholt JA, Haas D. Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(50): 34976–34985.
- [11] Darrah PR. Measuring the diffusion coefficients or

- rhizosphere exudates in soil. II. The diffusion of sorbing compounds. *European Journal of Soil Science*, 1991, 42(3): 421–434.
- [12] Liu YX, Li X, Cai LT, Zhang H, Shi JX. Identification of phenolic acids in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2016, 22(2): 418–428. (in Chinese)
刘艳霞, 李想, 蔡刘体, 张恒, 石俊雄. 烟草根系分泌物酚酸类物质的鉴定及其对根际微生物的影响. *植物营养与肥料学报*, 2016, 22(2): 418–428.
- [13] Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research*, 2001, 11(7): 1246–1255.
- [14] Bochner B. Innovations: new technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(4): 309–314.
- [15] Bochner B, Gomez V, Ziman M, Yang SH, Brown SD. Phenotype microarray profiling of *Zymomonas mobilis* ZM4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 161(1/8): 116–123.
- [16] Atanasova L, Druzhinina IS. Global nutrient profiling by Phenotype MicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. *Journal of Zhejiang University Science B: Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 11(3): 151–168.
- [17] Bender KS, Yen HCB, Hemme CL, Yang ZM, He ZL, He Q, Zhou JZ, Huang KH, Alm EJ, Hazen TC, Arkin AP, Wall JD. Analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(17): 5389–5400.
- [18] Johnson DA, Tetu SG, Phillippy K, Chen J, Ren QH, Paulsen IT. High-throughput phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* membrane transport genes. *PLoS Genetics*, 2008, 4(10): e1000211.
- [19] Perkins AE, Nicholson WL. Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotype profiling of rifampin-resistant *rpoB* mutants. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 807–814.
- [20] Viti C, Decorosi F, Mini A, Tatti E, Giovannetti L. Involvement of the *oscA* gene in the sulphur starvation response and in Cr(VI) resistance in *Pseudomonas corrugata* 28. *Microbiology*, 2009, 155(1): 95–105.
- [21] Von Eiff C, McNamara P, Becker K, Bates D, Lei XH, Ziman M, Bochner BR, Peters G, Proctor RA. Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus* *menD* and *hemB* mutants with the small-colony-variant phenotype. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(2): 687–693.
- [22] Armitano J, Baraquet C, Michotey V, Méjean V, Jourlin-Castelli C. The chemical-in-μwell: a high-throughput technique for identifying solutes eliciting a chemotactic response in motile bacteria. *Research in Microbiology*, 2011, 162(9): 934–938.
- [23] Decorosi F, Santopolo L, Mora D, Viti C, Giovannetti L. The improvement of a phenotype microarray protocol for the chemical sensitivity analysis of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(2): 258–261.
- [24] Line JE, Hiatt KL, Guard-Bouldin J, Seal BS. Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 80(2): 198–202.
- [25] Stolyar S, He Q, Joachimiak MP, He ZL, Yang ZK, Borglin SE, Joyner DC, Huang K, Alm E, Hazen TC, Zhou JZ, Wall JD, Arkin AP, Stahl DA. Response of *Desulfovibrio vulgaris* to alkaline stress. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(24): 8944–8952.
- [26] Borglin S, Joyner D, DeAngelis KM, Khudyakov J, D'haeseleer P, Joachimiak MP, Hazen T. Application of phenotypic microarrays to environmental microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(1): 41–48.
- [27] Liu YX, Li X, Zou Y, Zhang H, Cai LT, Meng L, Shi JX. Investigation and analysis of microbial information in tobacco-planted soil from different ecological regions in the Guizhou Province. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(9): 3145–3454. (in Chinese)
刘艳霞, 李想, 邹焱, 张恒, 蔡刘体, 孟琳, 石俊雄. 贵州省典型植烟生态区域根际土壤微生物群落多样性. *生态学报*, 2018, 38(9): 3145–3154.
- [28] Engelbrecht MC. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter*, 1994, (10): 3–5.
- [29] Liu YX, Shi JX, Feng YG, Yang XM, Li X, Shen QR. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(4): 447–464.
- [30] Zhang H, Yu ZL, Huang Q, Xiao X, Wang X, Zhang FY, Wang XQ, Liu YD, Hu CX. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22

- against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologica*, 2011, 41(1): 70–77.
- [31] Ji PW, Wilson M. Assessment of the importance of similarity in carbon source utilization profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4383–4389.
- [32] Li X, Liu Y, Cai L, Zhang H, Shi J, Yuan Y. Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots. *Plant Pathology*, 2017, 66(8): 1345–1356.
- [33] Zhang AJ, Hao JA, Yang B, Zhang XQ, Jiang TX, Du J, Zhang YS. Isolation and identification of petroleum degrading marine bacteria and its activity. *Chemical Industry and Engineering*, 2015, 32(1): 31–36. (in Chinese)
张爱君, 郝建安, 杨波, 张晓青, 姜天翔, 杜瑾, 张雨山. 海洋石油降解菌的筛选、鉴定及降解活性. *化学工业与工程*, 2015, 32(1): 31–36.
- [34] Zhang ZM, Xu YL, Han XZ, Li XH. Effects of continuous fertilization on microbial functional diversity in black soil under cropland. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(3): 647–651. (in Chinese)
张志明, 许艳丽, 韩晓增, 李晓慧. 连续施肥对农田黑土微生物功能多样性的影响. *生态学杂志*, 2012, 31(3): 647–651.
- [35] Gao XX, Yu HY, Zhang JG, Liu SS, Shi P, Wang JS, Shen GM. Identification of chemical compositions of root exudates from flue-cured tobacco and their influence to seed germination. *Chinese Tobacco Science*, 2012, 33(3): 87–91. (in Chinese)
高欣欣, 于会泳, 张继光, 刘帅帅, 时鹏, 王树键, 申国明. 烤烟根系分泌物的分离鉴定及对种子萌发的影响. *中国烟草科学*, 2012, 33(3): 87–91.
- [36] 邱文龙. 不同品种烟草根系分泌物的组分分析与抗黑胫病的关系. 山东农业大学硕士学位论文, 2014.
- [37] Yu HY, Shen GM, Gao XX. Determination of tobacco root exudates by GC-MS. *Acta Tabacaria Sinica*, 2013, 19(4): 64–72. (in Chinese)
- 于会泳, 申国明, 高欣欣. 烟草根系分泌物的 GC-MS 检测. *中国烟草学报*, 2013, 19(4): 64–72.
- [38] Hao WY, Shen QR, Ran W, Xu YC, Ren LX. The effects of sugars and amino acids in watermelon and rice root exudates on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(3): 77–82. (in Chinese)
郝文雅, 沈其荣, 冉炜, 徐阳春, 任丽轩. 西瓜和水稻根系分泌物中糖和氨基酸对西瓜枯萎病病原菌生长的影响. *南京农业大学学报*, 2011, 34(3): 77–82.
- [39] Buyer JS, Teasdale JR, Roberts DP, Zasada IA, Maul JE. Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(5): 831–841.
- [40] Baetz U, Martinoia E. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(2): 90–98.
- [41] Liu YX, Li X, Cai K, Cai LT, Lu N, Shi JX. Identification of benzoic acid and 3-phenylpropanoic acid in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 2015, 93: 78–87.
- [42] Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(6): 642–650.
- [43] Garbeva P, Silby MW, Raaijmakers JM, Levy SB, De Boer W. Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 973–985.
- [44] Yao J, Allen C. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(10): 3697–3708.
- [45] Nihorimbere V, Cawoy H, Seyer A, Brunelle A, Thonart P, Ongena M. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(1): 176–191.

Competitive use of plant root exudates by *Ralstonia solanacearum* causing tobacco bacterial wilt and its antagonistic bacterium LX4

Yanxia Liu¹, Hong Shen³, Xiang Li^{1*}, Heng Zhang¹, Yan Zou¹, Jingwei Zhu¹, Yang Xiang²

¹ Soil Fertilizer and Plant Protection Research Centre, Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, Guizhou Province, China

² Jinsha Branch of Guizhou Tobacco Corporation, Jinsha 551800, Guizhou Province, China

³ Guizhou Branch of China National Tobacco Corporation, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Abstract: [Objective] It is important to study the nutrition relationship between tobacco bacterial wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*, Rs) and its antagonistic bacterial isolate LX4. The difference in their use of secreted chemicals from tobacco root plays a crucial role for increasing the colonization of antagonist and efficiently bio-controlling tobacco bacterial wilt. [Methods] Pathogen Rs and the antagonistic strain LX4 from tobacco field soil were isolated and identified. We examined the use of characteristic carbon and nitrogen sources in tobacco root exudates by Rs and LX4. Main chemicals in root exudates were identified with a gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). We compared and analyzed the capacity and intensity of utilizing the major nutrients by Rs and strain LX4 by co-culturing the two microorganisms. [Results] The isolated pathogen was identified as *R. solanacearum* and isolate LX4 was identified as *Bacillus subtilis* via phylogenetic tree analysis based on their 16S rDNA sequences. In the exudates of tobacco roots, the substances with contents of >0.01 µg/mL were ordered descendingly as pectin>glucose>xylose>arabinose>galactose>ribose>sucrose>benzoic acid>fructose=D-mannitol>cetyllic acid>fumaric acid. The content of pectin was the highest and significantly higher than all the other substances. Strain LX4 could use arabinose, xylose and ribose significantly better than *R. solanacearum*. The usage capacity of the former was 1.22, 1.95 and 2.17 times of those of the latter, respectively. Besides, the fructose usage by LX4 was higher than that by *R. solanacearum* in the first 12 h. After 24 h of co-culturing them on different substrates of carbon sources, the suppression rates of strain LX4 to *R. solanacearum* marked by green fluorescent protein were 18.34% (arabinose), 53.23% (xylose), 63.53% (ribose) and 52.09% (fructose). [Conclusion] In conclusion, the capacity of root exudates from LX4 was lower than that from Rs, which suggested the antagonist had disadvantage in its nutrition competition with the pathogen. However, the antagonist took the advantage of certain carbon substances secreted from tobacco roots to produce antagonistic substances, which were suppressive or toxic to the pathogen. There were both exploitation and interference competitions between the antagonist and pathogen. These results provide some theoretical evidences for the bio-control of tobacco bacterial wilt caused by *R. solanacearum* in the near future.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus subtilis*, tobacco, main biochemicals in root exudates, competition and biocontrol

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860597), by the Guizhou Provincial Science and Technology Project (Qiankehe Support [2018]2345), by the Guizhou Provincial Company Science and Technology Project of China National Tobacco Corporation (201808, 201905, 201703) and by the Bijie City Company Project of Guizhou Tobacco Company (Bi Yanke 201752050024101)

*Corresponding author. E-mail: newcool1361214@163.com

Received: 10 April 2019; Revised: 1 August 2019; Published online: 12 November 2019