

烟草赤星病菌啞菌酯敏感与抗性菌株的代谢表型差异分析

汪汉成^{1*}, 黄艳飞², 陈兴江¹, 陈乾丽³, 李忠^{3*}

(¹贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081; ²成都农业科技职业技术学院, 成都 611130; ³贵州大学农学院, 贵阳 550025)

摘要:为了解烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)啞菌酯抗性菌株与敏感菌株在代谢表型上的差异,采用 Biolog 代谢表型技术比较了抗性菌株(6-5 和 6-11)和敏感菌株(J6)的 950 种代谢表型。结果表明,抗性菌株和敏感菌株在代谢表型上基本一致,2 个抗性菌株均不能代谢糖酵解中的氮源 D-甘露糖胺,抗性菌株 6-11 还不能代谢尿素循环中的氮源 L-鸟氨酸。烟草赤星病菌能代谢 24.74%、85.26%、97.14%、89.83% 的供试碳、氮、硫、磷源;具有广泛渗透压和 pH 适应能力;具有脱羧酶活性而无脱氨酶活性;能在高达 10% 氯化钠、6% 氯化钾、5% 硫酸钠、20% 乙二醇、6% 甲酸钠、6% 尿素、12% 乳酸钠、200 mmol·L⁻¹ 磷酸钠、100 mmol·L⁻¹ 硫酸铵、100 mmol·L⁻¹ 硝酸钠和 20 mmol·L⁻¹ 亚硝酸钠的渗透液中正常代谢,不能在 20~200 mmol·L⁻¹ 的苯甲酸钠渗透液中代谢;其 pH 适应范围为 3.5~10.0,最适约为 6.0。研究结果有助于了解烟草赤星病菌的营养需求特性、渗透压和 pH 环境适应力,同时从代谢表型上揭示了赤星病菌对啞菌酯抗性的潜在机理。

关键词:烟草赤星病菌;啞菌酯;杀菌剂抗性;表型芯片

Difference analysis between azoxystrobin-sensitive and -resistant isolates of *Alternaria alternata* causing tobacco brown spot in metabolic phenotypic characterization

WANG Han-cheng^{1*}, HUANG Yan-fei², CHEN Xing-jiang¹, CHEN Qian-li³, LI Zhong^{3*}

(¹Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China; ²Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China;

³College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to assess the metabolic phenotype difference of azoxystrobin-sensitive and -resistant isolates of *Alternaria alternata*, the pathogen of tobacco brown spot, 950 metabolic phenotypes of both resistant isolates (6-5 and 6-11) and sensitive isolate (J6) were compared using Biolog phenotype microassay technology. Results showed that the metabolic fingerprints of the two resistant isolates were nearly the same as that of the sensitive isolate J6. However, the two resistant isolates could not metabolize nitrogen substrate D-mannosamine that metabolized in glycolysis, while isolate 6-11 could not metabolize nitrogen substrate L-ornithine that metabolized in urea cycle. *A. alternata* was able to metabolize 24.74%, 85.26%, 97.14% and 89.83% of the tested carbon, nitrogen, sulfur and phosphorus sources, respectively. It showed decarboxylase activity, while no deaminase activity. It could metabolize in various hyperosmolytic solutions, including up to 10% sodium chloride, 6% potassium chloride, 5% sodium sulfate, 20% ethylene glycol, 6% sodium formate, 6% urea, 12% sodium lactate, 200 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, 100 mmol·L⁻¹ ammonium sulfate, 100 mmol·L⁻¹ sodium nitrate or 20 mmol·L⁻¹ sodium nitrite, but not metabolize in 20-200 mmol·L⁻¹ sodium benzoate osmolytic solution. It was able to grow in pH 3.5 to 10.0, with optimal pH around 6.0. These findings help to know the nutritional requirements

收稿日期: 2018-01-23; 修回日期: 2018-04-24; 网络出版时间: 2018-05-04

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20180504.1657.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31360448, 31501679); 贵州省科技厅优秀青年人才培养计划(黔科合平台人才[2017]5619); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(201402, 201603, 201711, 201714)

共同通讯作者: 汪汉成, 博士, 研究员, 主要从事烟草植物保护和微生物学研究; E-mail: xiaobaiyang126@hotmail.com

李忠, 博士, 教授, 主要从事植物保护方面的教学和研究; E-mail: zhongzhongligzu@163.com.

of *A. alternata*, and its adaptabilities to different osmolytes and pH environments, and help to understand the potential resistance mechanism of *A. alternata* to azoxystrobin.

Key words: *Alternaria alternata*; azoxystrobin; fungicide resistance; phenotype microassays

中图分类号: S481.4;435.72

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)06-0822-11

咪菌酯(azoxystrobin)是一种高效、广谱的甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,被广泛用于马铃薯、番茄、百里香、卷心菜、胡萝卜、开心果等多种作物链格孢属(*Alternaria*)真菌病害的防治^[1~4]。该药剂通过与细胞色素 bcl 复合物中 Qo 位点结合,切断呼吸链中的电子传递,抑制真菌细胞能量产生,干扰呼吸,从而抑制菌丝生长和孢子萌发^[5~7]。多年的研究发现,咪菌酯属中等至高等抗药性风险的杀菌剂^[8]。目前,已报道对甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂产生抗性的链格孢属病原菌有链格孢(*A. alternata*)、极细链格孢(*A. tenuissima*)、茄链格孢(*A. solani*)和苹果链格孢(*A. mali*)。已报道的抗药性分子机理包括细胞色素 b 基因(*cyt b*)143 位氨基酸的点突变(丙氨酸取代甘氨酸,即 G143A)^[4]、129 位点突变(亮氨酸取代苯丙氨酸,即 F129L)^[9]以及 137 位点突变(精氨酸取代甘氨酸,即 G137R)等^[10]。病原菌对咪菌酯产生抗性后,通常表现为对药剂的敏感性下降,在生物学特性上通常与敏感菌株不同,在分子生物学水平上通常表现为基因的突变或者过量表达,在蛋白质水平上通常出现蛋白结构变异而与药剂结合能力下降等。然而,抗药性菌株与敏感菌株在代谢表型上的差异如何,目前还不清楚。

代谢表型包括对碳、氮、磷、硫源的代谢利用能力,同时也包括对渗透压及 pH 等的适应能力。美国 Biolog 公司开发的微生物细胞表型芯片技术(phenotype microassays,简称 PMs)可用于微生物

多种细胞代谢表型的测定,它是并列于基因组学和蛋白组学的全新技术^[11,12]。在 96 孔微孔板(PM 平板)的每个孔里固定一种干化的细胞培养基质和显色物质,通过加入微生物细胞悬液并培养后,细胞代谢表型就可以通过颜色变化表现出来,最后得到表型反应的动力学图,从而定量测定表型反应的强弱。各种不同的 PM 平板上包被了多种活体细胞生长需要依赖的基质,可以进行不同生长条件下的测试,用于分析微生物因基因突变而发生的代谢表型的变化。该技术被广泛用于多种微生物的研究^[13,14]。

笔者前期通过紫外线诱变获得了烟草赤星病菌咪菌酯室内抗性菌株,本文采用 Biolog 细胞代谢表型技术对赤星病菌咪菌酯敏感和抗性菌株的代谢表型进行分析,寻找两者在代谢表型上的异同点,以期从代谢表型上了解赤星病菌对咪菌酯的抗性机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)咪菌酯敏感菌株 J6、抗性菌株 6-5 和 6-11,均由贵州省烟草科学研究院微生物实验室前期研究中获得。3 个菌株对咪菌酯的敏感性及 *cyt b* 基因的突变情况如表 1 所示。抗性菌株 6-5 的抗性倍数为 25.28, *cyt b* 基因未发生突变;抗性菌株 6-11

Table 1 Conidial germination sensitivity of both azoxystrobin-sensitive and -resistant isolates of *Alternaria alternata* to azoxystrobin and the mutation sites of *cyt b* gene

Isolate	EC ₅₀ value/mg·L ⁻¹		Resistance ratio	<i>cyt b</i> mutation site
	-SHAM	+SHAM		
J6	5.66	0.22	-	No mutation
6-5	445.55	5.56	25.28	No mutation
6-11	239.77	11.64	52.91	Mutation at L244F and V259A

的抗性倍数为 52.91, *cyt b* 基因的 244 位苯丙氨酸突变为亮氨酸(L244F)、259 位丙氨酸突变为缬氨酸(V259A)。

1.1.2 供试培养基与试剂 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)用于烟草赤星病菌的培养。PM1~10 代谢板(货号:#12111、#12112、#12121、#12131、#12141、#12181、#12182、#12183、#12161、#12162), 无菌加样槽(#3002), FF-IF(#72106)接种液, 美国 Biolog 公司产品; D-葡萄糖(#G5400)、磷酸二氢钾(#P5376)、硫酸钠(#S9627), Sigma 公司产品; 酵母氮源(#239210), Difco 公司产品。OmniLog PM 系统(#91171)、浊度测定仪(#3531)、8 通道电动移液器(#3501A), 美国 Biolog 公司产品。

1.2 方法

参照 Biolog 标准程序^[11]对烟草赤星病菌噬菌酯敏感和抗性菌株进行表型分析。将供试菌株分别在 PDA 平板上 25℃ 培养 9 d, 直至产生大量分生孢子。用无菌水润湿的无菌棉签在菌落表面旋转蘸取分生孢子, 将其定容至 12 mL 的 FF-IF 接种液中, 并将孢子悬浮液浓度调至 62% T(T 为 Biolog 标准浓度单位)。按照要求配制 PM1~10 的接种液, 准备代谢表型测定板。

1.2.1 碳代谢表型分析 将 0.05 mL 孢子悬浮液添加至 23.95 mL 的 PM1 和 PM2 接种液中, 混合均匀, 用 8 通道电动移液器将混匀后的孢子悬浮液添加至 PM1 和 PM2 代谢板中, 每孔 100 μ L。将准备好的表型测定板置于 OmniLog 恒温培养箱中, 25℃ 培养 8 d, 设置 OmniLog 工作软件, 收集数据。根据各菌株代谢的动力学曲线, 分析其碳代谢表型。

1.2.2 氮代谢表型分析 将 0.12 mL 的孢子悬浮液添加至 59.88 mL 的 PM3、PM5、PM6、PM7 和 PM8 接种液中, 混合均匀, 参照上述方法将孢子悬浮液加入代谢板中, 同上进行培养与收集数据。根据各菌株代谢的动力学曲线, 分析其氮代谢表型。

1.2.3 磷和硫代谢表型分析 将 0.02 mL 的孢子悬浮液添加至 11.98 mL 的 PM4 接种液中, 混合均匀, 参照上述方法将孢子悬浮液加入代谢板中, 同上进行培养与收集数据。根据各菌株代谢的动力学曲线, 分析其磷和硫代谢表型。

1.2.4 渗透压和 pH 代谢表型分析 将 0.05 mL 的

孢子悬浮液添加至 23.95 mL 的 PM9 和 PM10 接种液中, 混合均匀, 参照上述方法将孢子悬浮液加入代谢板中, 同上进行培养与收集数据。根据各菌株代谢的动力学曲线, 分析其渗透压和 pH 代谢表型。

1.2.5 数据处理与代谢表型差异分析 采用 Biolog D5E_OKA_data.exe 软件收集各菌株的代谢表型数据, 并采用 Biolog OL_FM_1.2.exe 软件进行数据转换。在 Biolog 同块 PM 板中, 以敏感菌株的代谢为对照, 标记为绿色; 以抗性菌株为靶标, 标记为红色; 采用 Biolog OL_PR_1.2.exe 软件将 2 组数据进行比对分析, 选择峰面积 Area 为对比参数, 峰面积越大, 说明菌株对被检测营养物质的代谢越强; 敏感菌株与抗性菌株共同代谢的区域标记为黄色。根据代谢孔颜色面积的大小来分析 2 个抗性菌株与敏感菌株的代谢表型差异。

2 结果与分析

2.1 碳代谢表型差异分析

代谢表型组学分析共获得敏感菌株 J6 和抗性菌株(6-5、6-11)各 190 种碳源代谢表型信息, 3 个菌株均能够代谢 24.74% 的测试碳源(26/95 PM1 板和 21/95 PM2 板), 高效代谢的碳源约有 34 种, 包括 L-果胶糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖、D-甘露醇、D-果糖等(图 1、图 2 和表 2)。抗性菌株的碳源代谢图谱与敏感菌株基本一致, 抗性菌株 6-5 对核糖醇(PM1-E9)的代谢效率较敏感菌株强(图 1)。

2.2 氮代谢表型差异分析

共获得烟草赤星病菌敏感菌株 J6 和抗性菌株(6-5、6-11)各 380 种氮源代谢表型信息(PM3、PM6-8)(图 1 和图 2), 3 个菌株的氮源利用率分别为 85.26%(67/95 PM3 板、95/95 PM6 板、80/95 PM7 板、82/95 PM8 板)、83.16%(59/95 PM3 板、95/95 PM6 板、80/95 PM7 板、82/95 PM8 板)和 82.90%(58/95 PM3 板、95/95 PM6 板、80/95 PM7 板、82/95 PM8 板)。PM3 板代谢表明, 抗性菌株 6-5 和 6-11 对大部分氨基酸类氮源的代谢指纹图谱基本类似; PM6-8 的代谢表明, 抗性菌株 6-5 和 6-11 与敏感菌株的代谢指纹图谱基本相同, 均呈现一致的氮源代谢特征。3 个菌株均高效代谢的氮源约有 60 多种, 包括 L-谷氨酸(PM3-A12)、L-赖氨酸(PM3-B6)、D-谷氨酸(PM3-C6)等(表 2)。

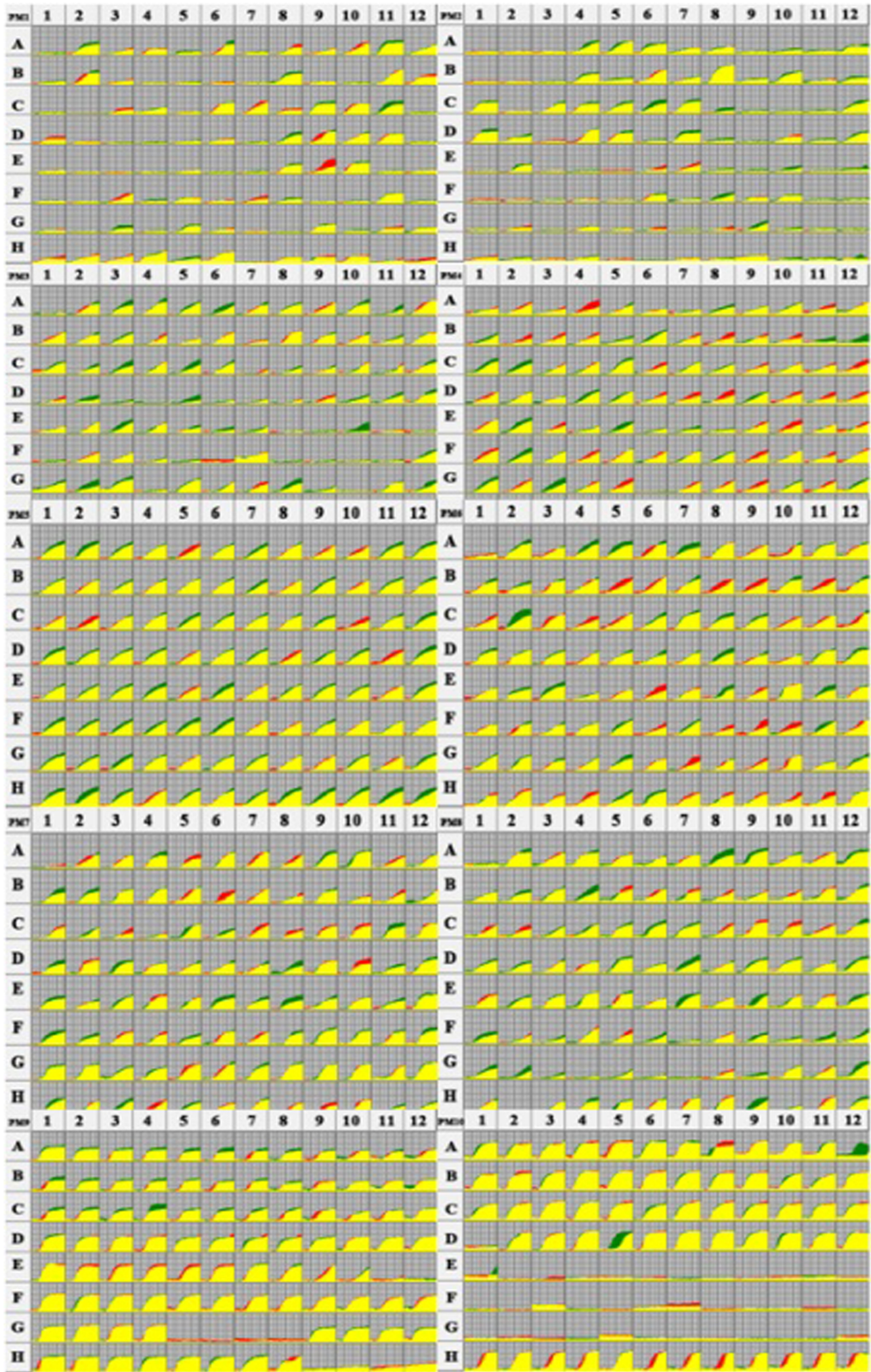


Fig. 1 Metabolic fingerprint comparison between azoxystrobin-resistant isolate 6-5 and -sensitive isolate J6 of *Alteraria alternata*

Green represents metabolic fingerprint of isolate J6; Red represents that of resistant isolate 6-5; Yellow represents common fingerprints between J6 and 6-5. Horizontal axis of 1 to 12 and vertical axis of A to H are the layout of Biolog PM MicroPlate.

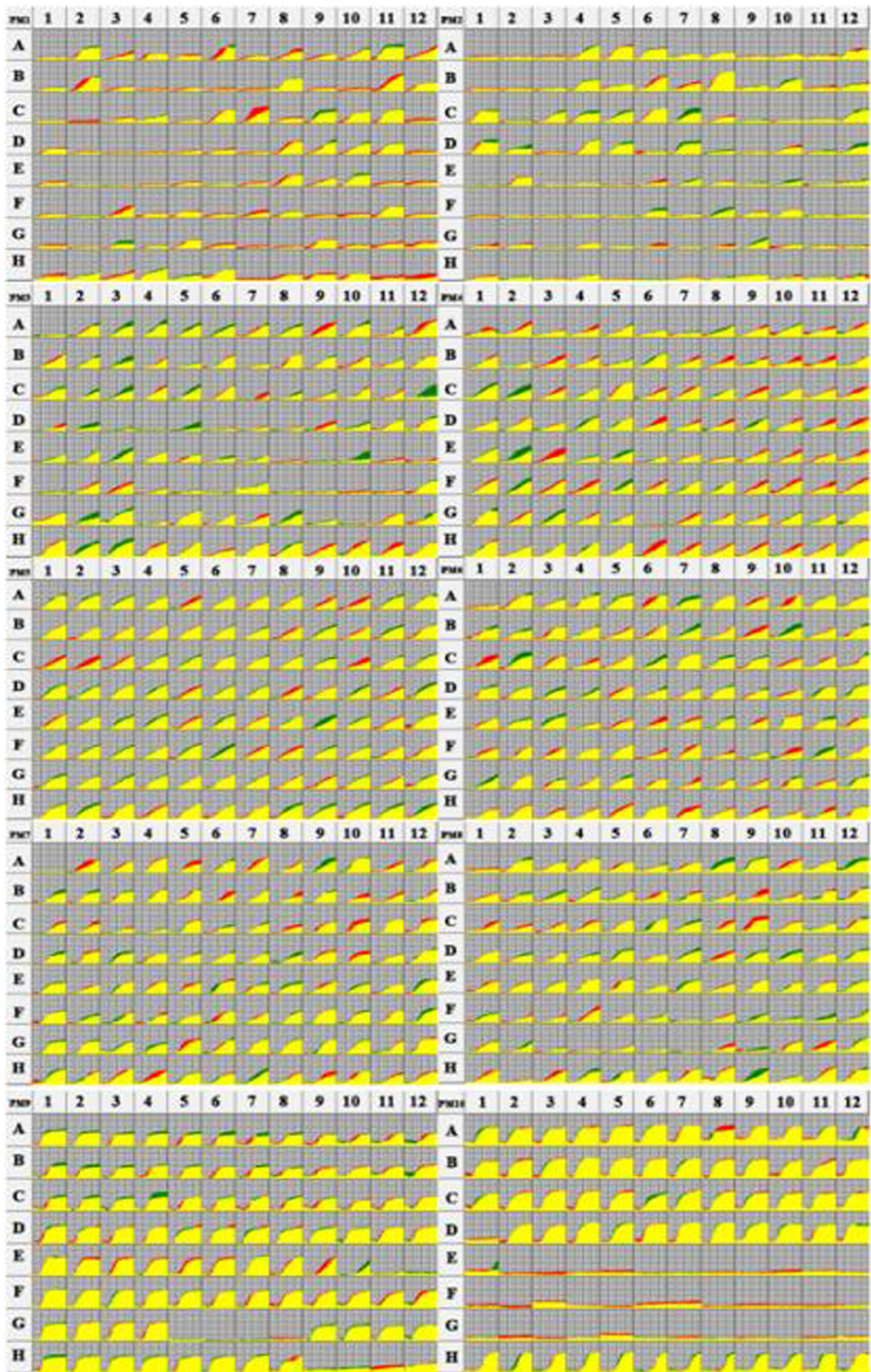


Fig. 2 Metabolic fingerprint comparison between azoxystrobin-resistant isolate 6-11 and -sensitive isolate J6 of *Alteraria alternata*

Green represents metabolic fingerprint of isolate J6; Red represents that of resistant isolate 6-11; Yellow represents common fingerprints between 6-11 and J6. Horizontal axis of 1 to 12 and vertical axis of A to H are the layout of Biolog PM MicroPlate.

Table 2 Carbon and nitrogen substrates efficiently metabolized by both azoxystrobin-sensitive and -resistant isolates of *Alternaria alternata*

Category	Well	Substrate	Well	Substrate	Well	Substrate	
Carbon	1-A2	L-arabinose	1-B11	D-mannitol	1-D9	α -D-lactose	
	1-A6	D-galactose	1-C6	L-rhamnose	1-D10	Lactulose	
	1-A10	D-trehalose	1-C7	D-fructose	1-D11	Sucrose	
	1-A11	D-mannose	1-C9	α -D-glucose	1-E8	β -methyl-D-glucoside	
	1-B2	D-sorbitol	1-C10	Maltose	1-E10	Maltotriose	
	1-B8	D-xylose	1-C11	D-melibiose	1-F11	D-cellobiose	
	2-A5	γ -cyclodextrin	2-B12	3-0- β -D-galactopyranosyl-D-arabinose	2-C12	Palatinose	
	2-A6	Dextrin	2-C1	Gentiobiose	2-D1	D-raffinose	
	2-B4	Amygdalin	2-C3	D-lactitol	2-D5	Stachyose	
	2-B6	D-arabitol	2-C4	D-melezitose	2-F6	Quinic acid	
	2-B8	Arbutin	2-C6	α -methyl-D-glucoside			
	2-B10	i-erythritol	2-C7	β -methyl-D-galactoside			
	Nitrogen	3-A12	L-glutamic acid	3-G10	D, L- α -amino-caprylic acid	3-H11	Gly-Met
		3-B6	L-lysine	3-G11	δ -amino-N-valeric acid	3-H12	Met-Ala
		3-C6	D-glutamic acid	3-H3	Ala-Glu	6-A6	Ala-Glu

2.3 磷硫源、生物合成途径代谢表型差异分析

共获得烟草赤星病菌敏感菌株 J6 和抗性菌株 (6-5、6-11) 各 59 种磷源、35 种硫源及 94 种生物合成途径代谢表型 (图 1 和图 2)。结果表明,敏感菌株能分别代谢 97.14%、89.83% 的供试硫源及磷源; 2 个抗性菌株在磷硫源、生物合成途径上的代谢图谱与敏感菌株基本一致,无显著差异。3 个菌株在无磷源 (PM4-A1) 和无硫源 (PM4-F1) 下均能正常生长;抗性菌株 6-5 对 3,5-环磷酸鸟苷 (PM4-B12) 的代谢能力较敏感菌株弱;3 个菌株均能代谢除 D, L-乙硫氨酸 (PM4-G6) 外的所有硫源。烟草赤星病菌高效代谢的磷源包括 D-2-磷酸-甘油酸 (PM4-B6)、2-脱氧-D-葡萄糖-6-磷酸 (PM4-C5)、D-甘露糖-1-磷酸 (PM4-D1) 等,高效代谢的硫源包括二硫化磷酸盐 (PM4-F6)、L-半胱氨酸 (PM4-F7) 等。

2.4 渗透压代谢表型差异分析

共获得烟草赤星病菌敏感菌株 J6 和 2 个抗性菌株 (6-5、6-11) 各 96 种渗透压代谢表型。结果表明,2 个抗性菌株在渗透压代谢表型上与敏感菌株基本一致,不存在差异 (图 1 和图 2)。赤星病菌能代谢 10% 氯化钠、6% 氯化钾、5% 硫酸钠、20% 乙二醇、6% 甲酸钠、6% 尿素、12% 乳酸钠、200 mmol·L⁻¹

磷酸钠 (pH 7.0)、100 mmol·L⁻¹ 硫酸铵 (pH 8.0)、100 mmol·L⁻¹ 硝酸钠和 20 mmol·L⁻¹ 亚硝酸钠,但不能代谢 20~200 mmol·L⁻¹ 的苯甲酸钠 (pH 5.2)。在 6% 氯化钠协同下,赤星病菌在其他各种渗透压物质下仍能正常生长 (PM9, 孔 B1-B12、C1-C12) (表 3)。

2.5 pH 代谢表型差异分析

共获得烟草赤星病菌敏感菌株 J6 和 2 个抗性菌株 (6-5、6-11) 各 96 种 pH 代谢表型。结果表明,2 个抗性菌株与敏感菌株在渗透压代谢表型基本一致,不存在差异 (图 1 和图 2)。赤星病菌可生长的 pH 范围为 3.5~10.0,最适 pH 约为 6.0。在 pH 4.5 环境下,赤星病菌能在除邻氨基苯甲酸 (PM10-D1) 外的所有氨基酸中正常生长。相比而言,在 pH 9.5 环境下,赤星病菌在所测试氨基酸中均不能正常生长。PM10 板孔 B1-D12 和 E1-G12 为分别测试微生物在 pH 4.5 和 9.5 的条件下氨基酸脱羧酶和脱氨酶活性。结果表明,赤星病菌在大部分氨基酸的作用下仅表现出脱羧酶活性,而无脱氨酶活性。此外,赤星病菌还能代谢 PM10 板中的辛酸盐、葡萄糖苷、半乳糖苷、葡糖苷酸、氨基葡萄糖苷、氨基半乳糖苷、甘露糖苷、磷酸盐和硫酸盐 (表 4)。

Table 3 Metabolic profiling of *Alternaria alternata* on Biolog PM9 plate

Well	Substrate	Effect	Well	Substrate	Effect	Well	Substrate	Effect	Well	Substrate	Effect
A1	NaCl 1%	+	C1	NaCl 6%+KCl	+	E1	Sodium formate 1%	+	G1	pH7.0 Sodium phosphate pH7.0 20 mmol·L ⁻¹	+
A2	NaCl 2%	+	C2	NaCl 6%+L-proline	+	E2	Sodium formate 2%	+	G2	pH7.0 Sodium phosphate pH7.0 50 mmol·L ⁻¹	+
A3	NaCl 3%	+	C3	NaCl 6%+N-Acetyl L-glutamine	+	E3	Sodium formate 3%	+	G3	pH7.0 Sodium phosphate pH 7.0 100 mmol·L ⁻¹	+
A4	NaCl 4%	+	C4	NaCl 6%+β- Glutamic acid	+	E4	Sodium formate 4%	+	G4	pH7.0 Sodium phosphate pH 7.0 200 mmol·L ⁻¹	+
A5	NaCl 5%	+	C5	NaCl 6%+γ- amino-N-butyric acid	+	E5	Sodium formate 5%	+	G5	pH5.2 Sodium benzoate pH5.2 20 mmol·L ⁻¹	-
A6	NaCl 5.5%	+	C6	NaCl 6%+Glutathione	+	E6	Sodium formate 6%	+	G6	pH5.2 Sodium benzoate pH5.2 50 mmol·L ⁻¹	-
A7	NaCl 6%	+	C7	NaCl 6%+Glycerol	+	E7	Urea 2%	+	G7	pH5.2 Sodium benzoate pH5.2 100 mmol·L ⁻¹	-
A8	NaCl 6.5%	+	C8	NaCl 6%+Trehalose	+	E8	Urea 3%	+	G8	pH5.2 Sodium benzoate pH5.2 200 mmol·L ⁻¹	-
A9	NaCl 7%	+	C9	NaCl 6%+ Trimethylamine-N-oxide	+	E9	Urea 4%	+	G9	pH8.0 Ammonium sulfate pH8.0 10 mmol·L ⁻¹	+
A10	NaCl 8%	+	C10	NaCl 6%+Trimethylamine	+	E10	Urea 5%	+	G10	pH8.0 Ammonium sulfate pH8.0 20 mmol·L ⁻¹	+
A11	NaCl 9%	+	C11	NaCl 6%+Octopine	+	E11	Urea 6%	+	G11	pH8.0 Ammonium sulfate pH8.0 50 mmol·L ⁻¹	+
A12	NaCl 10%	+	C12	NaCl 6%+Trigonelline	+	E12	Urea 7%	-	G12	pH8.0 Ammonium sulfate pH8.0 100 mmol·L ⁻¹	+
B1	NaCl 6%	+	D1	Potassium chloride 3%	+	F1	Sodium lactate 1%	+	H1	Sodium nitrate 10 mmol·L ⁻¹	+
B2	NaCl 6%+Betaine	+	D2	Potassium chloride 4%	+	F2	Sodium lactate 2%	+	H2	Sodium nitrate 20 mmol·L ⁻¹	+
B3	NaCl 6%+N=N	+	D3	Potassium chloride 5%	+	F3	Sodium lactate 3%	+	H3	Sodium nitrate 40 mmol·L ⁻¹	+
B4	NaCl 6%+Sarcosine	+	D4	Potassium chloride 6%	+	F4	Sodium lactate 4%	+	H4	Sodium nitrate 60 mmol·L ⁻¹	+
B5	NaCl 6%+Dimethyl sulphonyl propionate	+	D5	Sodium sulfate 2%	+	F5	Sodium lactate 5%	+	H5	Sodium nitrate 80 mmol·L ⁻¹	+
B6	NaCl 6%+MOPS	+	D6	Sodium sulfate 3%	+	F6	Sodium lactate 6%	+	H6	Sodium nitrate 100 mmol·L ⁻¹	+
B7	NaCl 6%+Ectoine	+	D7	Sodium sulfate 4%	+	F7	Sodium lactate 7%	+	H7	Sodium nitrite 10 mmol·L ⁻¹	+
B8	NaCl 6%+Choline	+	D8	Sodium sulfate 5%	+	F8	Sodium lactate 8%	+	H8	Sodium nitrite 20 mmol·L ⁻¹	+
B9	NaCl 6%+ Phosphoryl choline	+	D9	Ethylene glycol 5%	+	F9	Sodium lactate 9%	+	H9	Sodium nitrite 40 mmol·L ⁻¹	-
B10	NaCl 6%+Creatine	+	D10	Ethylene glycol 10%	+	F10	Sodium lactate 10%	+	H10	Sodium nitrite 60 mmol·L ⁻¹	-
B11	NaCl 6%+Creatinine	+	D11	Ethylene glycol 15%	+	F11	Sodium lactate 11%	+	H11	Sodium nitrite 80 mmol·L ⁻¹	-
B12	NaCl 6%+L-carnitine	+	D12	Ethylene glycol 20%	+	F12	Sodium lactate 12%	+	H12	Sodium nitrite 100 mmol·L ⁻¹	-

“+” or “-”: Substrate is metabolized or not metabolized by the tested fungus *A. alternata*, respectively.

Table 4 Metabolic profiling of *Alternaria alternata* on Biolog PM10 plate

Well	Substrate	Effect	Well	Substrate	Effect	Well	Substrate	Effect
A1	pH3.5	+	C1	pH4.5+L-methionine	+	E1	pH9.5	-
A2	pH4.0	+	C2	pH4.5+L-phenylalanine	+	E2	pH9.5+L-phenylalanine	-
A3	pH4.5	+	C3	pH4.5+L-proline	+	E3	pH9.5+L-arginine	-
A4	pH5.0	+	C4	pH4.5+L-serine	+	E4	pH9.5+L-asparagine	-
A5	pH5.5	+	C5	pH4.5+L-threonine	+	E5	pH9.5+L-aspartic acid	-
A6	pH6.0	+	C6	pH4.5+L-tryptophan	+	E6	pH9.5+L-glutamic acid	-
A7	pH7.0	+	C7	pH4.5+L-tyrosine	+	E7	pH9.5+L-glutamine	-
A8	pH8.0	+	C8	pH4.5+L-valine	+	E8	pH9.5+Glycine	-
A9	pH8.5	+	C9	pH4.5+Hydroxy-L-proline	+	E9	pH9.5+L-histidine	-
A10	pH9.0	+	C10	pH4.5+L-ornithine	+	E10	pH9.5+L-isoleucine	-
A11	pH9.5	+	C11	pH4.5+L-homoarginine	+	E11	pH9.5+L-leucine	-
A12	pH10.0	+	C12	pH4.5+L-homoserine	+	E12	pH9.5+L-lysine	-
B1	pH4.5	+	D1	pH4.5+Anthranilic acid	-	F1	pH9.5+L-methionine	-
B2	pH4.5+L-alanine	+	D2	pH4.5+L-norleucine	+	F2	pH9.5+L-phenylalanine	-
B3	pH4.5+L-arginine	+	D3	pH4.5+L-norvaline	+	F3	pH9.5+L-proline	-
B4	pH4.5+L-asparagine	+	D4	pH4.5+ α -amino-N-butyric acid	+	F4	pH9.5+L-serine	-
B5	pH4.5+L-aspartic acid	+	D5	pH4.5+p-aminobenzoate	-	F5	pH9.5+L-threonine	-
B6	pH4.5+L-glutamic acid	+	D6	pH4.5+L-cysteic acid	+	F6	pH9.5+L-tryptophan	-
B7	pH4.5+L-glutamine	+	D7	pH4.5+D-lysine	+	F7	pH9.5+L-tyrosine	-
B8	pH 4.5+Glycine	+	D8	pH4.5+5-hydroxy lysine	+	F8	pH9.5+L-valine	-
B9	pH4.5+L-histidine	+	D9	pH4.5+5-hydroxy tryptophan	+	F9	pH9.5+Hydroxy-L-proline	-
B10	pH4.5+L-isoleucine	+	D10	pH4.5+D,L-diamino pimelic acid	+	F10	pH9.5+L-ornithine	-
B11	pH4.5+L-leucine	+	D11	pH4.5+Trimethyl amine-N-oxide	+	F11	pH9.5+L-homoarginine	-
B12	pH 4.5+L-lysine	+	D12	pH4.5+Urea	+	F12	pH9.5+L-homoserine	-

“+” or “-”; Substrate is metabolized or not metabolized by the tested fungus *A. alternata*, respectively.

3 讨论

植物病原菌对啞菌酯产生抗性后,通常会在药剂敏感性、生物学特性、基因组学、转录组学、蛋白组学等方面发生变化。本研究借助 Biolog 高通量代谢表型技术,分析烟草赤星病菌的代谢表型组学,同时对烟草赤星病菌啞菌酯敏感及抗性菌株的代谢表型进行了比较分析。该技术具有高通量、速度快、准确性高、还能动态反应微生物细胞代谢的生化过程等优点,在国外被广泛应用于微生物领域的研究^[14-16]。

已报道的病原菌对啞菌酯产生抗药性的靶标基因为 *cyt b* 基因。本研究所选择的赤星病菌啞菌酯抗性菌株具有 2 个不同的抗性水平,抗性倍数分别为 25.28 和 52.91 倍。抗性菌株 6-5 的 *cyt b* 基因未发生突变,抗性菌株 6-11 的 *cyt b* 基因有 2 处发生了点突变。烟草赤星病菌 2 个抗性菌株与敏感菌株在代谢表型上存在较少的差异;此外,不同突变位点的 2 个抗性菌株间的代谢表型差异也较少。这可能与突变位点有关,其突变位点基因的变化影响了病原菌与啞菌酯的结合,进而引起敏感性的变化;但基因的变化并不影响病原菌的生命活动,以致代谢表型上不存在显著差异。与敏感菌株相比,2 个抗性菌株均不能代谢氮源 D-甘露糖胺,这可能与 2 个抗性菌株产生了共同的突变位点有关,进而引起了 D-甘露糖胺代谢能力的变化;此外,抗性菌株 6-11 还不能代谢氮源 L-鸟氨酸,这可能与该抗性菌株还存在其他的突变位点有关,而抗性菌株 6-5 在该位点上没有突变,以致 2 个抗性菌株在代谢表型上存在差异。已有的研究发现,甘露糖胺属于己糖,其代谢发生在糖酵解过程中^[17],鸟氨酸是一种重要的非蛋白质组成氨基酸,以游离的形式存在于组织和细胞中,其代谢发生在尿素循环途径中^[18]。甘露糖胺和鸟氨酸的代谢均发生在线粒体外,即发生在 ATP 产生的三羧酸循环之前。本研究中的烟草赤星病菌对啞菌酯产生抗性后,会继续进行三羧酸循环产生 ATP,同时还会引起甘露糖胺和鸟氨酸代谢途径的改变,其代谢途径改变的原因还不清楚,有待下一步从生物化学角度继续深入研究。此外,抗性菌株 6-5 的 *cyt b* 基因并未发生突变,对啞菌酯产生抗性可能还存在其他新的机制,也有待继续研究。

烟草赤星病菌通常侵染近成熟的烟草叶片,在烟草生产中后期造成危害。烟草叶片在生产前期几乎不被赤星病菌侵染,而在成熟期烟株所有地上部分均可被严重侵染^[19-21]。本研究对代谢表型的分析获得了赤星病菌的碳、氮、磷、硫源的营养代谢表型特征。大部分氮、磷、硫源可以被赤星病菌利用,相比而言,仅有较少的碳源被其代谢。碳源是微生物生命活动中最为重要的营养元素。烟草赤星病菌较小范围种类的代谢碳源可能与该病原菌仅在烟草生产中后期危害有关。中后期烟叶逐渐开始成熟,内部化学成分或者叶片表面分泌物可能含有某些特有的碳源,这些碳源有利于赤星病菌的生长和繁殖,进而引起赤星病的发生与危害;而这些特有碳源不存在于早期叶片中,以致赤星病菌不能危害早期烟草叶片。这可能是赤星病菌在烟草近成熟期侵染烟草的重要原因之一。不同的碳水化合物分别调控着植物叶片的生长发育^[22],乙烯的形成等^[23],有部分仅存在于叶片表面^[24],一些碳水化合物的生化代谢仅发生在叶片成熟过程中^[25]。下一步有待对不同成熟期烟草叶片的碳源及其叶片分泌物进行深入研究,以期了解是否有特有碳源参与了赤星病菌的侵染与危害。

此外,本研究对代谢表型的分析还发现了烟草赤星病菌具有较强的渗透压和 pH 环境适应能力,这有利于该病原菌度过诸多不利环境。较强的渗透压适应能力可能与赤星病菌在自然界进化过程中,适应了不同的干旱、雨水、温湿度气候有关。与烟草的其他病原菌相比,赤星病菌的 pH 适应范围与烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica*) 相同 (3.5 ~ 10.0)^[26],较烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) (5.0 ~ 10.0)^[27]、烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae*) (5.5 ~ 6.0)^[28] 及烟草灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) (3.5 ~ 8.5) (未发表数据) 的适应范围广。烟草不同病原菌在 pH 适应范围上的差异可能与病原菌的脱羧酶活性和脱氨酶活性的差异有关。本文获得的赤星病菌的代谢表型组学信息对了解链格孢属其他病原菌代谢表型的研究提供了参考。

参考文献

- [1] Wang H C, Huang Y F, Wang J, et al. Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria al-*

- ternata* and their control efficacy [J]. Crop Protection, 2016, 90: 54-58.
- [2] Pasche J S, Wharam C M, Gudmestad N C. Shift in sensitivity of *Alternaria solani* (potato early blight) to strobilurin fungicides [A]. Proceedings of the BCPC Conference: Pests and Disease [C]. Brighton: British Crop Protection Council, 2002: 841-846.
- [3] Ma Z, Felts D, Michailides T J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2003, 77: 66-74.
- [4] Ma Z, Michailides T J. An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152: 118-121.
- [5] Brandt U, Schagger H, von Jagow G. Characterization of binding of the methoxyacrylate inhibitors mitochondrial cytochrome c reductase [J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 173(3): 499-506.
- [6] Hellwig V, Dasenbrock J, Klostermeyer D. New benzodioxepin type strobilurins from basidiomycetes structural revision and determination of the absolute configuration of strobilurin D and related methoxyacrylate antibiotics [J]. Tetrahedron, 1999, 55 (33): 10101-10118.
- [7] Becker W F, von Jagow G, Anke T, et al. Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the Bcl segment of the respiratory chain with an E- β -methoxyacrylate system as common structural element [J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1981, 132(2): 329-333.
- [8] Wang H C, Wang J, Chen Q Y, et al. Metabolic effects of azoxystrobin and kresoxim-methyl against *Fusarium kyushense* examined using the Biolog FF MicroPlate [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2016, 130: 52-58.
- [9] Pasche J S, Piche L M, Gudmestad N C. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration [J]. Plant Disease, 2005, 89: 269-278.
- [10] Sierotzki H, Frey R, Wullschlegel J, et al. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance [J]. Pest Management Science, 2007, 63: 225-233.
- [11] Bochner B R. New technologies to assess genotype-phenotype relationships [J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4: 309-314.
- [12] Bochner B R, Gadzinski P, Panomitros E. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function [J]. Genome Research, 2001, 11:1246-1255.
- [13] Li W, Lu C D. Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(15): 5413-5420.
- [14] Mols M, de Been M, Zwietering M H, et al. Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9 (12): 2933-2944.
- [15] Oh Y K, Palsson B O, Park S M, et al. Genome-scale reconstruction of metabolic network in *Bacillus subtilis* based on high-throughput phenotyping and gene essentiality data [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282: 28791-28799.
- [16] Rico A, Preston G M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2008, 21(2): 269-282.
- [17] Azzouz N, de Macedo C S, Ferguson M A J, et al. Mannosamine can replace glucosamine in glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* in vitro [J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 2005, 142: 12-24.
- [18] Wu C G, Tian J L, Liu R, et al. Ornithine decarboxylase mediated production of putrescine influences ganoderic acid biosynthesis via the regulation of ROS in *Ganoderma lucidum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(20): e01289-17.
- [19] Ramm C V, Lucas G B. Epiphytology of tobacco brown spot caused by *Alternaria longipes* [J]. Phytopathology, 1963, 53: 450-455.

- [20] Stavelly J R, Slana L J. Relation of leaf age to the reaction of tobacco to *Alternaria alternata* [J]. Phytopathology, 1970, 61: 73-78.
- [21] Tong Z, Jiao T, Wang F, *et al.* Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to brown spot in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Plant Breeding, 2012, 131: 335-339.
- [22] Miller A, Schlagnhauser C, Spalding M, *et al.* Carbohydrate regulation of leaf development: prolongation of leaf senescence in Rubisco antisense mutants of tobacco [J]. Photosynthesis Research, 2000, 63: 1-8.
- [23] Philosoph-Hadas P S, Meir S, Aharoni N. Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf discs: II. Sites of stimulation in the ethylene biosynthesis pathway [J]. Plant Physiology, 1985, 78: 139-143.
- [24] Menetrez M L, Spurr J H W, Danehower D A, *et al.* Influence of tobacco leaf surface chemicals on germination of *Peronospora tabacina* asexual sporangia [J]. Journal of Chemical Ecology, 1990, 16:1565-1576.
- [25] Crafts-Brandner S J. Nonstructural carbohydrate metabolism during leaf ageing in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Physiologia Plantarum, 1991, 82:299-305.
- [26] Wang M S, Wang H C, Huang Y F, *et al.* Phenotypic analysis of *Phytophthora parasitica* by using high throughput phenotypic microarray (in Chinese) [J]. Acta Microbiologica Sinica (微生物学报), 2015, 55 (10): 1356-1363.
- [27] Wang H C, Huang Y F, Long M J, *et al.* Analysis of the difference in metabolic phenotypes between *Ralstonia solanacearum* from tobacco and its antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* (in Chinese) [J]. Journal of Plant Protection (植物保护学报), 2017, 44(5): 753-762.
- [28] Guo Y S, Su X K, Cai L T, *et al.* Phenotypic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, the causal agent of tobacco wildfire [J]. Journal of Plant Pathology, 2017, 99(2): 499-504.

责任编辑:张国珍