

基于 Biolog 表型芯片的立枯丝核菌菌核形成所需代谢底物分析

向立刚^{1,2}, 汪汉成^{1*}, 蔡刘体¹, 陈丽莉¹, 张文建², 王军², 孟建玉¹,
杨靓³, 温明霞²

1 贵州省烟草科学研究院, 贵州 贵阳

2 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州 遵义

3 福建农林大学, 植物病毒研究所, 福建 福州

向立刚, 汪汉成, 蔡刘体, 陈丽莉, 张文建, 王军, 孟建玉, 杨靓, 温明霞. 基于 Biolog 表型芯片的立枯丝核菌菌核形成所需代谢底物分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2190-2200.

XIANG Ligang, WANG Hancheng, CAI Liuti, CHEN Lili, ZHANG Wenjian, WANG Jun, MENG Jianyu, YANG Liang, WEN Mingxia. Biolog phenotypic microarray reveals the metabolic substrates required for sclerotial formation of *Rhizoctonia solani*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 2190-2200.

摘要:【目的】分析立枯丝核菌菌核形成所需的代谢底物, 旨在了解营养元素和环境因子对其菌核形成的影响规律。【方法】基于 Biolog 表型芯片技术测定 663 种营养物质、96 种渗透压和 96 种 pH 环境下立枯丝核菌的菌核形成能力。【结果】在供试的营养物质及环境条件中, 分别有 19/95 的碳源、21/95 的氮源、16/94 的磷硫源、69/94 的营养补充物、61/282 的肽类氮源、28/96 的渗透压环境以及 40/96 的 pH 环境可以诱导立枯丝核菌形成菌核; 其中, N-乙酰-D-氨基葡萄糖、尿苷 3'-单磷酸盐、磷酸胆碱和 5 种二肽(Arg-Trp、Met-Arg、Pro-Phe、Val-Tyr、Val-Met), 以及 10 mmol/L、20 mmol/L 硫酸铵(pH 8.0)和 pH 4.5+L-脯氨酸 3 种环境条件可显著促进立枯丝核菌菌核的形成; 立枯丝核菌在 pH 4.0–10.0 范围内均能形成菌核; KEGG 分析显示, 诱导菌核形成的物质主要参与了代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物生物合成和 D-氨基酸代谢等通路。【结论】营养限制和环境胁迫是诱导立枯丝核菌菌核形成的关键因素。在营养受限的条件下, 适宜立枯丝核菌形成菌核的物质包括 D-山梨醇、D-木糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、D-阿拉伯糖和 D-松

资助项目: 国家自然科学基金(31960550, 32460698, 32070177); 贵州省科技项目(黔科合平台人才-CXTD[2023]021, ZK[2021]Key036, GCC[2022]028-1); 中国烟草总公司项目[110202101048(LS-08), 110202001035(LS-04)]; 中国烟草总公司贵州省公司项目(2024XM06)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960550, 32460698, 32070177), the Science and Technology Project of Guizhou Province (Qiankehe Talent Platform-CXTD[2023]021, ZK[2021]Key036, GCC[2022]028-1), the China National Tobacco Corporation Project (110202101048(LS-08), 110202001035(LS-04)), and the China National Tobacco Corporation Guizhou Company Project (2024XM06).

*Corresponding author. E-mail: xiaobaiyang126@hotmail.com

Received: 2024-12-03; Accepted: 2024-12-23; Published online: 2025-02-25

三糖等 5 种碳源; N-乙酰-D-氨基葡萄糖、腺苷和胸腺嘧啶等 3 种氮源; 尿苷 3'-单磷酸盐和磷酸胆碱等 2 种磷源; 吐温-80 等 1 种营养补充物; 以及 Arg-Trp、Met-Arg、Pro-Phe、Val-Tyr 和 Val-Met 等 5 种肽类氮源。适宜的渗透压环境为 10 mmol/L、20 mmol/L 硫酸铵(pH 8.0), 适宜的 pH 环境为 pH 4.0–4.5 和 pH 9.5–10.0。本研究结果为立枯丝核菌菌核形成机制的研究奠定了基础。

关键词: 立枯丝核菌; 菌核; 物质代谢; 表型芯片; KEGG 通路

Biolog phenotypic microarray reveals the metabolic substrates required for sclerotial formation of *Rhizoctonia solani*

XIANG Ligang^{1,2}, WANG Hancheng^{1*}, CAI Liuti¹, CHEN Lili¹, ZHANG Wenjian², WANG Jun², MENG Jianyu¹, YANG Liang³, WEN Mingxia²

1 Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang, Guizhou, China

2 Guizhou Tobacco Company Zunyi Company, Zunyi, Guizhou, China

3 Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

Abstract: [Objective] To analyze the metabolic substrates required for the sclerotial formation of *Rhizoctonia solani* and understand the influence of nutritional elements and environmental factors on this process. **[Methods]** Biolog phenotypic microarray was used to study the effects of 663 nutritional substances, 96 osmotic environments, and 96 pH environments on the sclerotial formation of *R. solani*. **[Results]** Among the tested nutritional substances and environmental conditions, 19/95 carbon sources, 21/95 nitrogen sources, 16/94 phosphorus and sulfur sources, 69/94 nutritional supplements, 61/282 peptide nitrogen sources, 28/96 osmotic environments, and 40/96 pH environments induced the sclerotial formation of *R. solani*. Notably, N-acetyl-D-glucosamine, uridine 3'-monophosphate, phosphoryl choline, and five dipeptides (Arg-Trp, Met-Arg, Pro-Phe, Val-Tyr, and Val-Met), as well as three environmental conditions of 10 mmol/L and 20 mmol/L ammonium sulfate at pH 8.0, and pH 4.5+L-proline, significantly induced the sclerotial formation of *R. solani*. *R. solani* formed sclerotia in the environments with a broad range of pH 4.0–10.0. The KEGG analysis indicated that the substances inducing sclerotial formation were primarily involved in metabolic pathways, ABC transporters, secondary metabolite biosynthesis, and D-amino acid metabolism. **[Conclusion]** Nutrient limitation and environmental stress are key factors inducing the sclerotial formation of *R. solani*. Under nutrient-restricted conditions, the suitable substances for inducing sclerotial formation include five carbon sources (D-sorbitol, D-xylose, N-acetyl-D-galactosamine, D-arabinose, and D-melezitose), three nitrogen sources (N-acetyl-D-glucosamine, adenosine, and thymidine), two phosphorus sources (uridine 3'-monophosphate and phosphoryl choline), one nutritional supplement (Tween-80), and five peptide nitrogen sources (Arg-Trp, Met-Arg, Pro-Phe, Val-Tyr, and Val-Met). The suitable osmotic environments were 10 mmol/L and 20 mmol/L ammonium sulfate at pH 8.0, and the suitable pH environments were pH 4.0–4.5 and pH 9.5–10.0. These findings provide a foundation for understanding

the sclerotial formation mechanism of *R. solani*.

Keywords: *Rhizoctonia solani*; sclerotium; material metabolism; phenotypic microarray; KEGG pathway

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn), 隶属于担子菌门(*Basidiomycota*), 最早由 Kühn 于 1858 年在马铃薯上发现^[1]。目前, 立枯丝核菌可分为 14 个融合群(anastomosis groups, AGs)^[2], 部分融合群又根据其形态、寄主范围以及 DNA 序列的差异被细分为不同亚群^[3-4]。作为一种典型的土传真菌, 该菌能够侵染包括绝大多数谷类作物、蔬菜、水果(或果树)以及观赏植物在内的广泛寄主, 引起种腐、根腐、冠腐、茎腐、纹枯和立枯等多种病症^[5]。立枯丝核菌因其广泛的寄主范围和多样的病害类型, 已成为农业生产中影响最广的病原菌之一。

菌核是部分真菌在生长条件受限或受到不良环境胁迫时, 由营养菌丝聚集形成的一种特殊休眠体结构, 其形态多样, 能在环境条件适宜时萌发, 形成无性或有性繁殖结构^[6]。立枯丝核菌的菌核形状不规则, 表面粗糙坚硬, 多呈浅褐色至黑褐色, 且内外颜色一致。由于菌核的存在, 立枯丝核菌可以适应多种极端环境, 并抵御杀菌剂的胁迫, 从而增加菌株的抗药性^[7-8]。据报道菌核可在土壤或植物残体中存活多年, 待环境条件适宜时又能迅速萌发, 成为初侵染源侵染植物^[9-10]。菌核的存在无疑为农业生产中立枯丝核菌所引发的病害防治带来了巨大挑战。

虽然菌核能够抵御多种不良环境, 但其形成也受温度、光照、pH、活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及营养物质等环境因子的影响^[11-14]。Biolog 表型芯片技术是一种与基因组学和蛋白组学并列的技术, 能够同时测定微生物在 190 种碳源、95 种氮源、282 种肽类、94 种磷硫源、94 种营养补充物, 以及 96 种渗透压和 96 种 pH 环境下的代谢情况。因此, 本研究利用 Biolog 表型芯片技术分析立枯丝核菌

菌核形成过程中所需的代谢底物, 旨在了解营养元素和环境因子对其菌核形成的影响, 并为通过抑制菌核形成来进行病害防控技术的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试立枯丝核菌 LK4 菌株分离自贵州省遵义市染病烟苗。D-葡萄糖、无水磷酸二氢钾和硫酸钠均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 酵母氮源购自 BD 医疗器械有限公司; 0.2 μm 注射器过滤膜购自颇尔生命科学有限公司; OmniLog PM 高通量微生物细胞表型测定系统、浊度计、FF-IF 接种液和表型微阵列(Phenotype MicroArray, PM)微孔板 PM1、PM2A、PM3B、PM4A、PM5、PM6、PM7、PM8、PM9、PM10 均购自 Biolog 公司。

1.2 试剂及菌丝悬浮液制备

D-葡萄糖溶液: 准确称量 57.664 g D-葡萄糖用灭菌水溶解并定容至 100 mL。PM (3B、5、6、7、8)添加液: 称取 0.816 6 g 无水磷酸二氢钾和 0.341 g 硫酸钠用灭菌水溶解定容至 100 mL。PM (9、10)添加液: 称取 8.04 g 酵母提取物用灭菌水溶解并定容至 100 mL。将 D-葡萄糖溶液和 2 种 PM 添加液分别使用 0.2 μm 过滤膜过滤除菌。立枯丝核菌菌丝片段的制备: 将 PDB 中静置培养 72 h 的立枯丝核菌菌丝用无菌纱布过滤, 去除菌丝包裹的菌膜后, 用灭菌蒸馏水冲洗菌丝去除其携带的培养基, 反复冲洗 3 遍后将菌丝置于灭菌研钵中, 加入适量灭菌水充分研磨以制成菌丝片段悬浮液。最后使用浊度仪测量并调节悬浮液浊度至 62%。

1.3 微孔板接种及孵育

各微孔板接种成分如表 1 所示, PM1 和 PM2A 微孔板接种成分相同, PM3B、PM5、PM6、PM7 和 PM8 微孔板接种成分相同, PM9 和 PM10 微孔板接种成分相同, PM4A 微孔板与其他微孔板不同。采用 8 通道移液器将配制好的混合接种液加入到相应微孔板中, 每孔 100 μ L。微孔板完成接种并经封口膜封闭后, 置于 OmniLog PM 系统中 28 $^{\circ}$ C 孵育 240 h。

表1 各微孔板中添加的物质成分及用量

Table 1 Composition and dosage of substances added to each microplate

Solutions	PM1, 2A	PM3B, 5, 6, 7, 8	PM4A	PM9, 10
FF-IF inoculum (mL)	20.00	50.00	10.00	20.00
D-glucose (mL)	–	1.88	0.38	0.75
PM additive solution (mL)	–	5.00	–	2.00
Mycelial fragment suspension (mL)	0.50	1.25	0.25	0.50
Sterile water (mL)	3.50	1.88	1.38	0.75
Total volume (mL)	24.00	60.00	12.00	24.00

–: Indicates that the corresponding substance has not been added to the solution.

1.4 菌核形成能力评估

培养结束后, 综合评估各微孔中菌核的数量及体积大小, 以评价菌核的形成情况。菌核形成能力等级划分如下: +++++表示极强; +++表示强; ++表示一般; +表示弱。

2 结果与分析

2.1 碳源对立枯丝核菌菌核形成的影响

在 95 种供试碳源中共有 19 种可以诱导立枯丝核菌形成菌核, 其中在 D-山梨醇(D-sorbitol)、D-木糖(D-xylose)、N-乙酰-D-半乳糖胺(N-acetyl-D-galactosamine)、D-阿拉伯糖(D-

arabinose)和 D-松三糖(D-melezitose)诱导下菌核形成能力一般; 而在其余 14 种碳源诱导下, 菌核形成能力较弱(表 2)。KEGG 分析结果表明, 诱导菌核形成的碳源主要参与的代谢通路包括代谢途径(metabolic pathways)、ABC 转运蛋白(ABC transporters)、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化(pentose and glucuronate interconversions)、半乳糖代谢(galactose metabolism)和次生代谢物生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)等(原始数据存储在国家微生物科学数据中心, 网址为 <http://nmdc.cn>, 编号为 NMDCX0001772)。

2.2 氮源对立枯丝核菌菌核形成的影响

立枯丝核菌在 PM3B 微孔板中的产核情况表明, 22% 的供试氮源(21/95)可诱导菌核形成, 其中 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(N-acetyl-D-

表2 诱导立枯丝核菌菌核形成的碳源

Table 2 The carbon source promotes the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani*

Microplate	Well	Substrate	Sclerotial formation
PM1	B02	D-sorbitol	++
	B03	Glycerol	+
	B08	D-xylose	++
	C03	D,L-malic acid	+
	C08	Acetic acid	+
	D05	Tween-40	+
	D10	Lactulose	+
	E07	α -hydroxybutyric acid	+
	F05	Fumaric acid	+
	H06	L-lyxose	+
PM2A	B01	N-acetyl-D-galactosamine	++
	B05	D-arabinose	++
	C01	Gentiobiose	+
	C04	D-melezitose	++
	C12	Palatinose	+
	D01	D-raffinose	+
	D04	L-sorbose	+
	D07	Turanose	+
	G12	L-methionine	+

glucosamine)诱导下的菌核形成能力最强,腺苷(adenosine)和胸腺嘧啶(thymidine)次之(表3)。KEGG 分析结果表明,N-乙酰-D-氨基葡萄糖参与氨基糖和核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、代谢途径、核苷酸糖的生物合成(biosynthesis of nucleotide sugars)、ABC 转运蛋白和磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS) 5 条代谢通路。诱导菌核形成的氮源主要参与的代谢通路包括代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物生物合成和 D-氨基酸代谢(D-amino acid metabolism)等(编号为 NMDCX0001772)。

表3 PM3B微孔板中诱导立枯丝核菌菌核形成的氮源

Table 3 The nitrogen source promotes the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani* on PM3B microplate

Well	Substrate	Sclerotial formation
A04	Nitrate	+
A10	L-aspartic acid	++
A12	L-glutamic acid	+
B01	L-glutamine	++
B10	L-serine	+
C01	L-tyrosine	+
C05	D-aspartic acid	+
C08	D-serine	+
D04	Hydroxylamine	+
D06	N-amylamine	+
D12	Agmatine	+
E08	D-glucosamine	+
E11	N-acetyl-D-glucosamine	++++
F03	Adenosine	+++
F04	Cytidine	+
F08	Thymine	+
F09	Thymidine	+++
H03	Ala-Glu	+
H04	Ala-Gly	+
H05	Ala-His	+
H10	Gly-Glu	++

2.3 磷、硫源对立枯丝核菌菌核形成的影响

磷、硫作为细胞结构的组成成分以及酶活性的参与者,在 94 种供试磷、硫源中仅有 16 种能够诱导立枯丝核菌产生菌核(表4)。其中,立枯丝核菌在尿苷 3'-单磷酸盐(uridine 3'-monophosphate)和磷酸胆碱(phosphoryl choline)诱导下的菌核形成能力极强。KEGG 分析显示,尿苷 3'-单磷酸盐参与的代谢通路包括代谢途径和嘧啶代谢(pyrimidine metabolism),而磷酸胆碱参与的代谢通路包括壁聚糖酸生物合成(teichoic acid biosynthesis)、甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)、代谢途径和癌症中的胆碱代谢(choline metabolism in cancer)(编号为 NMDCX0001772)。

表4 PM4A微孔板中诱导立枯丝核菌菌核形成的磷、硫源

Table 4 The phosphorus and sulfur source promote the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani* on PM4A microplate

Well	Substrate	Sclerotial formation
A09	Adenosine 3'-monophosphate	+
B09	Guanosine 3'-monophosphate	+
C04	D-glucose-6-phosphate	++
D04	Phospho-L-arginine	+
D07	O-phospho-L-threonine	+
D09	Uridine 3'-monophosphate	++++
E04	Phosphoryl choline	++++
E11	Inositol hexaphosphate	+
F06	Dithiophosphate	+
G12	L-methionine sulfone	+
H02	Thiourea	+
H03	1-thio-β-D-glucose	+
H05	Taurocholic acid	+
H06	Taurine	+
H09	Butane sulfonic acid	+
H11	Methane sulfonic acid	+

2.4 营养补充物质对立枯丝核菌菌核形成的影响

在 PM5 微孔板中可诱导立枯丝核菌形成菌核的物质数量最多, 占供试营养补充物的 73%

(69/94), 但其诱导菌核形成的能力大多为一般或较弱(表 5)。KEGG 分析显示, 诱导菌核形成的营养补充物质主要参与的代谢通路包括代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物生物合成、辅

表5 PM5微孔板中诱导立枯丝核菌菌核形成的营养补充物质

Table 5 The nutrient supplement source promotes the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani* on PM5 microplate

Well	Substrate	Sclerotial formation	Well	Substrate	Sclerotial formation
A06	L-aspartic acid	+	E07	β -alanine	+
A08	L-glutamic acid	+	E08	D-pantothenic acid	+
A10	Adenine	+	E09	Orotic acid	+
A11	Adenosine	++	E11	Uridine	+
A12	2'-deoxyadenosine	+	E12	2'-deoxyuridine	+
B01	L-glutamine	+	F01	Quinolinic acid	+
B02	Glycine	+	F02	Nicotinic acid	+
B04	L-isoleucine	+	F03	Nicotinamide	++
B06	L-lysine	+	F04	β -nicotinamide adenine dinucleotide	+
B08	L-phenylalanine	+	F05	δ -amino-levulinic acid	+
B09	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	+	F06	Hematin	+
B10	Guanine	+	F07	Deferoxamine	+
B11	Guanosine	+	F08	α -D-glucose	+
B12	2'-deoxyguanosine	+	F09	N-acetyl-D-glucosamine	+
C01	L-proline	+	F10	Thymine	+
C03	L-threonine	+	F11	Glutathione	+
C06	L-valine	+	F12	Thymidine	+
C07	L-isoleucine+L-valine	+	G01	Oxaloacetic acid	+
C08	Hydroxy-L-proline	++	G03	Cyanocobalamin	+
C09	(5)4-amino-imidazole-4(5)-carboxamide	+	G04	ρ -amino-benzoic acid	+
C10	Hypoxanthine	+	G05	Folic acid	+
C11	Inosine	+	G06	Inosine+thiamine	+
C12	2'-deoxyinosine	+	G08	Thiamine pyrophosphate	+
D02	L-citrulline	+	G10	Pyrrolo-quinoline quinone	+
D03	Chorismic acid	+	G12	Myo-inositol	++
D04	(-)-Shikimic acid	+	H01	Butyric acid	+
D05	L-homoserine lactone	+	H03	α -ketobutyric acid	+
D07	D-aspartic acid	++	H04	Caprylic acid	+
D08	D-glutamic acid	+	H06	D,L-mevalonic acid	+
D10	Cytosine	+	H07	D,L-carnitine	+
D11	Cytidine	+	H08	Choline	++
D12	2'-deoxycytidine	+	H10	Tween-40	+
E01	Putrescine	+	H11	Tween-60	+
E02	Spermidine	+	H12	Tween-80	+++
E03	Spermine	+			

因子生物合成(biosynthesis of cofactors)、核苷酸代谢(nucleotide metabolism)和氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids)等(编号为NMDCX0001772)。

2.5 肽类氮源对立枯丝核菌菌核形成的影响

PM6、PM7 和 PM8 微孔板用于检测肽类氮

源对立枯丝核菌菌核形成的影响。结果表明,在 282 种供试肽类氮源中,共有 61 种可诱导立枯丝核菌形成菌核,其中 Arg-Trp、Met-Arg、Pro-Phe、Val-Tyr 和 Val-Met 等 5 种肽类氮源诱导菌核形成的能力极强;Ala-Leu、Ile-Phe、Ile-Tyr、Phe-Pro、Ala-Val 和 γ -Glu-Gly 等 6 种肽类氮源诱导菌核形成的能力较强(表 6)。

表6 诱导立枯丝核菌菌核形成的肽类氮源

Table 6 The peptide nitrogen source promotes the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani*

Microplate	Well	Substrate	Sclerotial formation	Microplate	Well	Substrate	Sclerotial formation
PM6	A05	Ala-Asn	+	PM7	D01	Phe-Pro	+++
	A06	Ala-Glu	+		D10	Pro-Phe	++++
	A09	Ala-Leu	+++		E04	Ser-Leu	+
	A11	Ala-Phe	+		E06	Ser-Phe	+
	B01	Ala-Ser	+		F04	Thr-Met	+
	B02	Ala-Thr	+		F06	Trp-Ala	+
	B05	Arg-Ala	+		G02	Trp-Ser	+
	B07	Arg-Asp	++		H03	Val-Arg	++
	B08	Arg-Gln	+		H04	Val-Asn	+
	C02	Arg-Phe	++		H10	Val-Tyr	++++
	C04	Arg-Trp	++++	PM8	A03	Ala-Asp	++
	C07	Asn-Glu	+		A07	Ala-Val	+++
	D05	Gln-Gln	+		A10	Asp-Gly	+
	D06	Gln-Gly	++		A11	Glu-Ala	+
	D07	Glu-Asp	+		A12	Gly-Asn	+
	D08	Glu-Glu	+		B01	Gly-Asp	++
	D09	Glu-Gly	+		B02	Gly-Ile	+
	D10	Glu-Ser	+		C11	Pro-Arg	+
	E01	Glu-Val	+		D07	Ser-Asn	+
	E04	Gly-Cys	+		D08	Ser-Asp	+
	E11	Gly-Pro	+		D10	Ser-Glu	+
	F07	His-Leu	+		E02	Thr-Ser	++
	G04	Ile-Arg	+		E08	Val-Glu	+
	G05	Ile-Gln	+		E10	Val-Met	++++
	G10	Ile-Phe	+++		F07	D-Ala-D-Ala	+
	H02	Ile-Tyr	+++		G01	γ -Glu-Gly	+++
PM7	A02	L-glutamine	+		G03	Gly-D-Ala	++
	B04	Lys-Trp	+		G04	Gly-D-Asp	+
	B07	Met-Arg	++++		H04	Gly-Gly-Ile	+
	C03	Met-Lys	+		H12	Tyr-Gly-Gly	+
	C09	Phe-Ala	+				

2.6 渗透压环境对立枯丝核菌菌核形成的影响

在 96 种渗透压环境中, 共有 28 种可诱导立枯丝核菌产生菌核, 其中 10 mmol/L 和 20 mmol/L 硫酸铵(ammonium sulfate)诱导菌核形成能力最强, 其次是 60 mmol/L 硝酸钠(sodium nitrate) (表 7)。KEGG 分析表明, 在 28 种渗透压环境中, 仅磷酸钠(sodium phosphate)、苯甲酸钠(sodium benzoate)、乙二醇(ethylene glycol)和尿素(urea)参与了代谢通路, 参与数量分别为

表7 PM9微孔板中诱导立枯丝核菌菌核形成的渗透压环境

Table 7 The osmotic pressure environment promotes the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani* on PM9 microplate

Well	Substrate	Sclerotial formation
D01	3% Potassium chloride	+
D02	4% Potassium chloride	+
D05	2% Sodium sulfate	+
D06	3% Sodium sulfate	++
D07	4% Sodium sulfate	+
D08	5% Sodium sulfate	++
D09	5% Ethylene glycol	+
D10	10% Ethylene glycol	++
D11	15% Ethylene glycol	+
D12	20% Ethylene glycol	++
E07	2% Urea	+
F01	1% Sodium lactate	++
F02	2% Sodium lactate	++
F11	11% Sodium lactate	+
G01	20 mmol/L Sodium phosphate pH 7.0	++
G02	50 mmol/L Sodium phosphate pH 7.0	+
G04	200 mmol/L Sodium phosphate pH 7.0	++
G05	20 mmol/L Sodium benzoate pH 5.2	++
G09	10 mmol/L Ammonium sulfate pH 8.0	++++
G10	20 mmol/L Ammonium sulfate pH 8.0	++++
G11	50 mmol/L Ammonium sulfate pH 8.0	++
G12	100 mmol/L Ammonium sulfate pH 8.0	++
H01	10 mmol/L Sodium nitrate	++
H02	20 mmol/L Sodium nitrate	+
H03	40 mmol/L Sodium nitrate	++
H04	60 mmol/L Sodium nitrate	+++
H05	80 mmol/L Sodium nitrate	++
H06	100 mmol/L Sodium nitrate	++

10、10、4 和 11 (编号为 NMDCX0001772)。

2.7 pH 环境对立枯丝核菌菌核形成的影响

如表 8 所示, 立枯丝核菌在 pH 4.0–10.0 的范围内均能产生菌核, 且在 pH 4.0、4.5、9.5 和 10.0 时, 菌核形成能力较强; 在 pH 5.0–9.0 时,

表8 PM10微孔板中诱导立枯丝核菌菌核形成的pH环境

Table 8 The pH environment promotes the development of sclerotia in *Rhizoctonia solani* on PM10 microplate

Well	Substrate	Sclerotial formation
A02	pH 4.0	+++
A03	pH 4.5	+++
A04	pH 5.0	++
A05	pH 5.5	++
A06	pH 6.0	+
A07	pH 7.0	+
A10	pH 9.0	++
A11	pH 9.5	+++
A12	pH 10.0	+++
B01	pH 4.5	+++
B02	pH 4.5+L-alanine	+
B03	pH 4.5+L-arginine	++
B04	pH 4.5+L-asparagine	++
B06	pH 4.5+L-glutamic acid	+
B07	pH 4.5+L-glutamine	+++
B08	pH 4.5+Glycine	+
B09	pH 4.5+L-histidine	+
C02	pH 4.5+L-phenylalanine	++
C03	pH 4.5+L-proline	++++
C04	pH 4.5+L-serine	++
C05	pH 4.5+L-threonine	+
C07	pH 4.5+L-citrulline	++
C08	pH 4.5+L-valine	+++
C09	pH 4.5+Hydroxy-L-proline	++
C10	pH 4.5+L-ornithine	++
C11	pH 4.5+L-homoarginine	++
C12	pH 4.5+L-homoserine	+
D02	pH 4.5+L-norleucine	++
D11	pH 4.5+Trimethylamine-N-oxide	+
E10	pH 9.5+L-isoleucine	++
F12	pH 9.5+L-homoserine	+
G03	pH 9.5+L-norvaline	++
H01	X-caprylate	+++
H05	X-β-D-galactoside	+
H06	X-α-D-glucuronide	+
H07	X-β-D-glucuronide	++
H08	X-β-D-glucosaminide	++
H09	X-β-D-galactosaminide	++
H10	X-α-D-mannoside	++
H12	X-SO ₄	++

菌核形成能力一般或较弱。此外,在 pH 4.5+L-脯氨酸(L-proline)环境下立枯丝核菌的菌核形成能力最强(图 1)。在诱导菌核形成的 pH 环境中,共有 18 种底物参与了代谢通路,主要包括代谢途径、氨基酸生物合成、次生代谢物生物合成、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)、ABC 转运蛋白和氨酰基 tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)等(编号为 NMDCX0001772)。

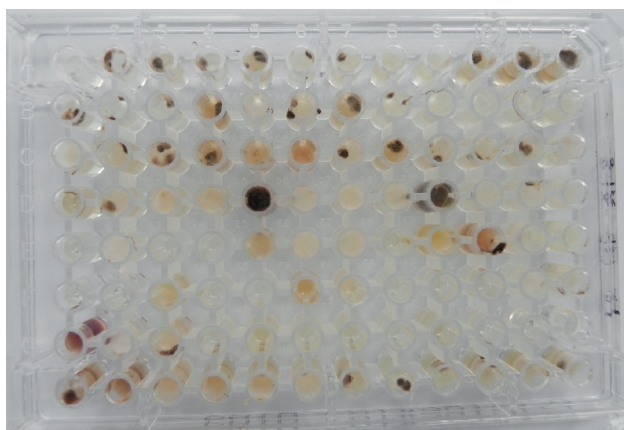


图1 立枯丝核菌在代表性微孔板PM10中菌核的形成情况

Figure 1 Sclerotial formation of *Rhizoctonia solani* in representative microplate PM10.

3 讨论

营养限制是诱导菌核形成的重要因素^[15]。Christias 等^[16]发现,在营养充足的条件下,核盘菌的菌丝体得以持续生长,但菌核形成时间显著推迟。Cooke 等^[17]研究表明,在营养受限的条件下,菌株会优先将有限的营养物质集中于菌核的形成,以增强其抵御不良环境的能力。在本研究中,微孔板各孔中预先填充了极少量的营养物质,接种 100 μ L 接种液后,立枯丝核菌即处于营养受限状态。因此,能够在该条件下诱导菌核形成的物质,必定在菌核形成过程中发挥重要作用。N-乙酰-D-氨基葡萄糖、尿苷 3'-单磷酸盐、磷酸胆碱和 5 种二肽(Arg-Trp、

Met-Arg、Pro-Phe、Val-Tyr、Val-Met)已被证实,在营养受限的微孔环境中显著诱导立枯丝核菌的菌核形成。此外,其他 178 种物质也可诱导立枯丝核菌菌核形成,但诱导能力存在差异。KEGG 分析表明,这些物质主要参与了代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物生物合成和 D-氨基酸代谢等常规代谢通路。相比之下,显著诱导菌核形成的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖、尿苷 3'-单磷酸盐和磷酸胆碱还参与了氨基糖和核苷酸糖代谢、核苷酸糖的生物合成、磷酸转移酶系统、嘧啶代谢、壁聚糖酸生物合成和甘油磷脂代谢等特有代谢通路。

ROS 在菌核形成过程中起着关键作用。它们在真核生物的正常新陈代谢中产生,并在生物体内维持低浓度以避免对细胞造成损害^[18]。研究表明,菌丝向菌核分化时 ROS 产量增加,其积累可能诱导菌核形成,同时菌核形成消耗 ROS 以保护细胞免受其毒性影响^[19-20]。渗透压环境的改变往往会引起微生物的氧化应激反应,导致细胞内氧化还原失衡,ROS 增加。本研究发现,PM9 微孔板中 28 种渗透压环境可诱导菌核形成,其中硫酸铵、硝酸钠和乳酸钠诱导菌核的能力随浓度增加先强后弱。这可能是由于高浓度情况下产生的 ROS 超过了细胞消耗的阈值,导致细胞受损,最终影响菌核的形成。至于磷酸钠、氯化钾、硫酸钠和乙二醇诱导菌核形成能力不受其浓度影响的原因尚待进一步研究。

对于环境 pH,普遍认为偏酸性环境有利于菌核形成,而中性或碱性环境会抑制其形成。然而,本研究发现立枯丝核菌在 pH 4.0–10.0 的范围内均能形成菌核,这可能是由于菌株通过代谢活动改变了培养环境的 pH 值。具体而言,在中等碱性环境(pH 8.0–9.0)中菌株可降低培养基的 pH 值,创造适宜的酸性环境以促进菌核形成^[12,21]。在 PM10 微孔板中,立枯丝核菌在 pH 4.5 且添加脯氨酸的环境中菌核形成能力最强,这可能归因于 2 个因素:(1) pH 4.5 提供了

适宜的酸性环境,有利于立枯丝核菌菌核形成;(2)脯氨酸在微生物抵御不良环境中具有多重功能,包括作为渗透压调节物质维持细胞水平平衡、与蛋白质结合形成保护膜以保护生物大分子的结构与活性,以及减少 ROS 的积累,降低氧化应激对细胞的伤害。这些功能共同促进了立枯丝核菌的菌核形成。

4 结论

本研究通过 Biolog 表型芯片技术,深入分析了立枯丝核菌菌核形成过程中对不同物质成分以及渗透压和 pH 环境的代谢响应。结果显示,在供试的物质及环境中分别有 19/95 的碳源、21/95 的氮源、16/94 的磷硫源、69/94 的营养补充物、61/282 的肽类氮源、28/96 的渗透压环境以及 40/96 的 pH 环境(pH 4.0–10.0)可诱导立枯丝核菌形成菌核。适宜菌核形成的碳源包括 D-山梨醇、D-木糖、N-乙酰-D-半乳糖胺、D-阿拉伯糖和 D-松三糖;氮源包括 N-乙酰-D-氨基葡萄糖、腺苷和胸腺嘧啶,磷源包括尿苷 3'-单磷酸盐和磷酸胆碱;营养补充物质包括吐温-80;肽类氮源包括 Arg-Trp、Met-Arg、Pro-Phe、Val-Tyr 和 Val-Met;适宜的渗透压环境为 10 mmol/L 和 20 mmol/L 硫酸铵(pH 8.0);适宜的 pH 环境为 pH 4.0–4.5 和 pH 9.5–10.0。可诱导立枯丝核菌形成菌核的物质主要参与的代谢通路包括代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物生物合成和 D-氨基酸代谢等。

作者贡献声明

向立刚:实验设计、实施,论文初稿撰写;汪汉成:研究方案制定,论文修订;蔡刘体:实验实施,数据统计;陈丽莉:实验实施,数据统计;张文建:实验指导,论文修订;王军:实验指导,论文修订;孟建玉:实验指导,论文修订;杨靓:论文修订;温明霞:实验实施,数据统计。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] KÜHN J. Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung[M]. Berlin, Germany: Gustav Bosselmann, 1858.
- [2] SNEH B, BURPEE L, OGOSHI A. Identification of *Rhizoctonia* Species[M]. Saint Paul, The United States of America: American Phytopathological Society, 1991.
- [3] OGOSHI A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn[J]. Annual Review of Phytopathology, 1987, 25: 125-143.
- [4] SHARON M, KUNINAGA S, HYAKUMACHI M, NAITO S, SNEH B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping[J]. Mycoscience, 2008, 49(2): 93-114.
- [5] AJAYI-OYETUNDE OO, BRADLEY CA. Identification and characterization of *Rhizoctonia* species associated with soybean seedling disease[J]. Plant Disease, 2017, 101(4): 520-533.
- [6] 陈彩霞,王泽昊,FENG Jie,梁月.植物病原真菌的菌核研究进展[J].微生物学通报,2018,45(12): 2762-2768. CHEN CX, WANG ZH, FENG J, LIANG Y. Sclerotia of plant pathogenic fungi[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2762-2768 (in Chinese).
- [7] KWON YS, KIM SG, CHUNG WS, BAE H, JEONG SW, SHIN SC, JEONG MJ, PARK SC, KWAK YS, BAE DW, LEE YB. Proteomic analysis of *Rhizoctonia solani* AG-1 sclerotia maturation[J]. Fungal Biology, 2014, 118(5/6): 433-443.
- [8] HSIANG T, CHASTAGNER GA. Production and viability of sclerotia from fungicide-resistant and fungicide-sensitive isolates of *Botrytis cinerea*, *B. elliptica* and *B. tulipae*[J]. Plant Pathology, 1992, 41(5): 600-605.
- [9] WANG C, PI L, JIANG SF, YANG M, SHU CW, ZHOU EX. ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA[J]. Fungal Biology, 2018, 122(5): 322-332.
- [10] WIBBERG D, JELONEK L, RUPP O, KRÖBER M, GOESMANN A, GROSCH R, PÜHLER A, SCHLÜTER A. Transcriptome analysis of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB 7/3/14 applying high-throughput sequencing of expressed sequence tags (ESTs)[J]. Fungal Biology, 2014, 118(9/10): 800-813.
- [11] RITCHIE F, BAIN R, McQUILKEN M. Effects of nutrient status, temperature and pH on mycelial growth, sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani* from potato[J]. Journal of Plant Pathology, 2009,

- 91(3): 589-596.
- [12] PATHAK S, DUTTA S, ROYBARMAN A, RAY K, BHARATI DRS, SEN K, RAY SK. Effect of temperature and pH on growth and sclerotial production of *Rhizoctonia solani*[J]. *Journal of Mycopathological Research*, 2021, 59(2): 161-164.
- [13] LIU Y, BELL-PEDERSEN D. Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(8): 1184-1193.
- [14] TOWNSEND BB. Nutritional factors influencing the production of sclerotia by certain fungi[J]. *Annals of Botany*, 1957, 21(1): 153-166.
- [15] SMOLIŃSKA U, KOWALSKA B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*: a review[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2018, 100(1): 1-12.
- [16] CHRISTIAS C, LOCKWOOD JL. Conservation of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient-deprived conditions[J]. *Phytopathology*, 1973, 63(5): 602-605.
- [17] COOKE RC. Physiology of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* during growth and maturation[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1971, 56(1): 51-59.
- [18] GEORGIU CD, TAIRIS N, SOTIROPOULOU A. Hydroxyl radical scavengers inhibit sclerotial differentiation and growth in *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*[J]. *Mycological Research*, 2000, 104(10): 1191-1196.
- [19] FANG GC, HANAU RM, VAILLANCOURT LJ. The *SOD2* gene, encoding a manganese-type superoxide dismutase, is up-regulated during conidiogenesis in the plant-pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 36(2): 155-165.
- [20] LARA-ORTÍZ T, RIVEROS-ROSAS H, AGUIRRE J. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(4): 1241-1255.
- [21] ROLLINS JA, DICKMAN MB. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 75-81.