

蜡状芽孢杆菌对番茄青枯雷尔氏菌致病性的影响

李柏青¹, 朱育菁², 张赛群^{1*}, 周涵韬^{1*}, 刘 波²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建省农业科学院生物技术中心, 福建 福州 350002)

摘要: 青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*) 从其致病性上可分为能使植株发病的强致病力菌株和不能使植株发病的弱致病力菌株. 利用蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 与致病性稳定的青枯雷尔氏菌强致病力菌株进行共培养, 处理后的青枯雷尔氏菌在 TTC 平板上表现为弱毒株的菌落特征, 出现了致弱现象. 经过 16S rDNA 基因序列测定, 证明了用蜡状芽孢杆菌处理前后的菌株为青枯雷尔氏菌, 并非是其它的污染菌株. 通过回接番茄盆栽苗发现致弱前的青枯雷尔氏菌能有效引起番茄发生青枯病, 而致弱后的菌株丧失致病力, 不能引起番茄发病.

关键词: 蜡状芽孢杆菌; 青枯雷尔氏菌; 致弱; 16S rDNA 基因序列

中图分类号: Q 939. 95

文献标识码: A

文章编号: 0438 0479(2007)04 0574 04

细菌性青枯病是一种由青枯雷尔氏菌引起的毁灭性土传病害, 主要分布在热带和温带地区, 世界各地许多地区都有广泛报道. 青枯雷尔氏菌可危害 44 科的 300 多种植物, 其中, 对茄科植物的危害甚为严重. 对于番茄青枯病的防治, 多年来国内外一直予以高度重视. 目前, 采用化学农药的方法防治效果不够理想, 抗病育种工作难度较大, 农业措施亦有较大的局限性, 因此, 采用生物防治将是一条有效的途径. 芽孢杆菌具有易培养、易保存、有效期长等特性, 因而有较好的生防应用前景, 我们利用蜡状芽孢杆菌处理青枯雷尔氏菌强致病力菌株使其丧失致病力, 从而达到防治青枯病的目的, 为青枯雷尔氏菌的生物防治寻找出路.

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试菌株 番茄青枯雷尔氏菌致病性稳定的强致病力菌株 RS-F052、蜡状芽孢杆菌 ANT-F8098A 菌株由福建省农科院生物技术中心提供.

酶及主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 等购自大连宝生物有限公司; TTC(2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑)、酶水解酪素购自厦门泰京生物技术有限公司.

培养基 TTC 培养基: 葡萄糖 0. 5%; 蛋白胨

1%; 酶水解酪素 0. 1%; 1% TTC 0. 5 mL; 琼脂 1. 8%; pH 7. 2^[1]. SPA 培养基: 蔗糖 2%, 蛋白胨 0. 5%, K₂HPO₄ 0. 05%, MgSO₄ 0. 025%; pH 7. 2. NA 培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0. 3%, NaCl 0. 5%, 葡萄糖 0. 1%, 琼脂粉 2%; pH 7. 2.

引物合成由上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)完成.

番茄种子购买自厦门种子公司.

1.2 实验方法

(1) 蜡状芽孢杆菌与青枯雷尔氏菌强致病力菌株进行共培养

从 TTC 平板上挑取 RS-F052 单菌落, 接种到 50 mL SPA 液体培养基中, 200 r/min、30℃培养 48 h. 同时, 从斜面上挑取 ANT-F8098A 到 50 mL NA 液体培养基中, 200 r/min、30℃培养 48 h. 48 h 后将两种发酵液各取 10 mL 混合在一起, 另以 10 mL RS-F052 发酵液和 10 mL 无菌水混合在一起作为对照, 静置 24 h. 由于 ANT-F8098A 在 TTC 平板上并不能生长, 所以 24 h 后将对照组和处理组分别稀释并涂布到 TTC 平板上, 30℃培养 3 d 后观察平板上长出的青枯雷尔氏菌的菌落形态^[2]. 在对照组平板上随机挑取两个青枯雷尔氏菌单菌落分别命名为 RS-F052A、RS-F052B, 在处理组的平板上挑取两个具有明显弱化特征的青枯雷尔氏菌单菌落分别命名为 RS-F523A、RS-F523B.

(2) 致弱前后青枯雷尔氏菌的 16S rDNA 基因序列测定与分析

参照《精编分子生物学实验指南》^[3], 提取 RS-F052A、RS-F052B、RS-F523A、RS-F523B 的基因组

收稿日期: 2006-10-31

基金项目: 福建省科技重点项目(2005N045), 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金资助

* 通讯作者: saicun-zh@163.com; htzhou@xmu.edu.cn



图 1 稀释后的对照组和处理组发酵液在 TTC 平板上的菌落形态

A: 对照组发酵液在 TTC 平板上的菌落形态; B: 处理组发酵液在 TTC 平板上的菌落形态

Fig. 1 The colony of control group and treatment group on the TTC medium

DNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量。

引物为细菌 16S rDNA 通用引物, 其上游引物为 5'-GA GAGTTT GATCCT GGCT CA G-3'; 下游引物为 5'-AA GGAGGT GATCCAGCCG CA-3'; 以提取的基因组 DNA 作为模板, 按照如下体系进行 PCR 扩增: *Taq* 酶 0.2 μ L; 10 $\times$ buffer (含 Mg^{2+}) 2 μ L; dNTP 2 μ L; 引物 (5 μ mol/L) 2 μ L; 模板 10 ng; 灭菌双蒸水补足至 20 μ L. PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 复性 57 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 35 个循环. 额外延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 采用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化, 将所获得的特异性扩增片段与 PCR 克隆载体 pMD-18T 连接, 构建重组质粒. 然后将该重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 经氨苄青霉素抗性筛选, 获得含插入片段的克隆子. 对阳性克隆中的重组质粒外源插入片段进行测序^[4].

(3) 回接番茄盆栽苗观察发病情况

分别挑取致弱前后的青枯雷尔氏菌单菌落到 NA 液体培养基中, 过夜培养. 将发酵液用无菌水稀释到 $OD_{600} = 1.0$, 以 5~8 叶期的番茄盆栽苗作为供试作物. 用灭菌手术刀在各株番茄盆栽苗根部一侧划两刀, 而后在划刀处注入 2 mL 菌液. 致弱后青枯雷尔氏菌 RS-F523A、RS-F523B、分别回接 20 株番茄盆栽苗, 另以致弱前的强致病力菌株 RS-F052A、RS-F052B 分别回接 20 株番茄盆栽苗作为对照, 将盆栽苗放入恒温光照培养箱中培养, 28 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 逐天观察发病情况.

2 实验结果

2.1 蜡状芽孢杆菌处理青枯雷尔氏菌强致病力菌株结果

青枯雷尔氏菌在 TTC 培养基上培养 48 h 后, 可出现两种菌落: (a) 菌落呈不规则形或近圆形, 具有较宽的白边, 流动性强, 中心呈粉红色或浅红色稀液状, 这是致病性强的野生菌落. (b) 菌落为圆形, 干燥而较扁平, 菌落白边很窄, 中心呈暗红色, 这是致病性弱或丧失致病力的变异型菌株^[5].

10 mL 发酵 48 h 的 RS-F052 发酵液与 10 mL 发酵 48 h 的 ANTF-8098A 发酵液混合静置 24 h, 以清水处理 RS-F052 为对照, 而后分别稀释涂板, 可以观察到用 ANTF-8098A 处理的青枯雷尔氏菌的平板上出现了许多弱化菌株, 而对照组的平板上并无具有明显弱化特征的菌株(图 1).

2.2 致弱前后青枯雷尔氏菌的 16S rDNA 基因序列测定与分析结果

利用细菌 16S rDNA 通用引物扩增致弱前后青枯雷尔氏菌的 16S rDNA 基因序列, 得到 4 条长度约为 1 500 bp 的扩增片段(图 2).

以 pMD18-T 的通用引物 RV-P 和 M13-20 为测序引物, 分别对阳性克隆子 RS-F052AY、RS-F052BY、RS-F523AY、RS-F523BY 进行双向测序, 通过 BLAST 检索程序, 对其核苷酸序列进行同源性比对, 从 GenBank 中选取同源性最近的青枯雷尔氏菌菌株 (*Ralstonia solanacearum* GMI1000), 利用 DNAMAN 软件绘制同源树, 结果如图 3 所示, 致弱前后的青枯雷尔氏菌与所选取的青枯雷尔氏菌标准菌株 GMI1000 的同源性接近 100%. 由此证明了致弱前后的菌株均为青枯雷尔氏菌, 并非是其它的污染菌株.

2.3 致弱前后的青枯雷尔氏菌回接番茄盆栽苗发病情况

处理组 RS-F523A、RS-F523B 回接的番茄盆栽苗 7 d 后均未发病, 且生长状况良好. 而对照组 RS-

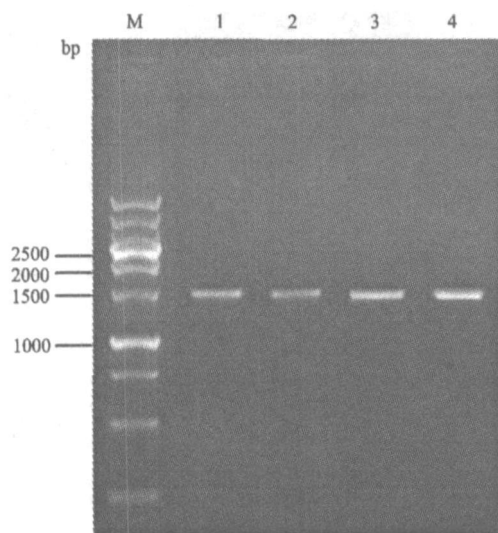


图2 16S rDNA PCR 扩增产物电泳分析

1~ 4: 青枯雷尔氏菌 RS-F052A、RS-F052B、RS-F523A、RS-F523B 的 16S rDNA PCR 扩增产物

Fig.2 Agrose gel electrophoresis analysis of 16S rDNA

F052A、RS-F052B 回接的番茄盆栽苗发病数量从第 3 天开始逐天增加, 到第 7 天全部发病(图 4)。可见, 致弱后的青枯雷尔氏菌为丧失了致病力的弱毒株。

3 讨论

应用蜡状芽孢杆菌 ANT-8098A 处理致病性稳定的青枯雷尔氏菌强致病力菌株, 处理后的菌株在 TTC 平板上的单菌落有一部分表现出了明显的弱化特征。为了排除 TTC 平板上单菌落为其它污染的菌株的可能性, 且确定致弱后的青枯雷尔氏菌为无致病力的弱化菌株, 本研究对致弱前后的菌株做了 16S rDNA 基因序列测定与分析, 并以致弱前后的青枯雷尔氏菌分别回接番茄盆栽苗观察发病情况。结果表明, 应用蜡状芽孢杆菌 ANT-8098A 处理后的青枯雷尔氏菌强致病力菌株 RS-F052 发生了致弱现象, 致弱后的菌株仍为青枯雷尔氏菌, 其菌落形态也表现出了明



图3 青枯雷尔氏菌 RS-F052A、RS-F052B、GMI1000、RS-F523A、RS-F523B 同源树图

Fig.3 The homology tree of *Ralstonia solanacearum* RS-F052A, RS-F052B, GMI1000, RS-F523A and RS-F523B

显的弱菌株特征, 回接番茄盆栽苗并不能引起番茄发病。可见, 蜡状芽孢杆菌 ANT-8098A 对青枯雷尔氏菌强致病力菌株 RS-F052 具有较强的致弱特性。

青枯雷尔氏菌的致病机理有过许多研究。青枯雷尔氏菌致病过程中的病原性因子包括: 外多聚糖 I 及胞外蛋白。外多聚糖 I 的释放可能会造成导管堵塞, 或引起过高的静水力学压力, 导致导管破裂, 进而引起植株萎焉。青枯雷尔氏菌合成大概 10 种主要的胞外蛋白, 它们可能不是引起发病所必需的, 但却能促进定殖和增强侵染力^[6]。青枯病的防治方法包括农业防治、化学防治及生物防治, 其中生物防治是解决植物细菌性青枯病的一条极有希望的途径。从 20 世纪 70 年代开始, 国内外对青枯病的防治研究重点已经转向以开发生物农药为主的综合防治, 并且取得了较大进展。叶云峰和黎起秦研究了芽孢杆菌 B₄₇ 菌株对番茄青枯病的防治作用^[7]; 郭坚华等筛选出的防治辣椒青枯病的生防菌株 BB11^[8]; 徐玲和王伟研究了多粘类芽孢杆菌 HY962 对番茄青枯病的防治作用^[9]。



A



B

图4 番茄盆栽苗对照组和处理组的发病情况

A: 处理组番茄盆栽苗的发病情况; B: 对照组番茄盆栽苗的发病情况

Fig.4 The growth status of tomato of control group and treatment group

芽孢杆菌使青枯雷尔氏菌强致病力菌株致弱的机理可以从微生态选择和生理生化选择来理解. 在微生态选择中, 可能由于野生型青枯雷尔氏菌菌落中不同致病性个体对芽孢杆菌的敏感性差异, 使得强致病力菌株个体的生长得到抑制, 无致病力菌株个体的生长得到发挥, 表现出菌株的致弱现象. 在生理生化选择中, 由于芽孢杆菌的处理, 使得野生型青枯雷尔氏菌菌落中不同致病性个体生理生化特性发生变化, 使之丧失致病性, 表现出致弱现象. 关于芽孢杆菌使青枯雷尔氏菌强致病力菌株致弱的确切机理还有待于进一步研究^[2].

参考文献:

- [1] 孔德英, 肖崇刚. 氨基寡糖素对番茄青枯病防治作用[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(3): 327–330.
- [2] 刘波, 林营志, 朱育菁, 等. 生防菌对青枯雷尔氏菌的致弱特性[J]. 农业生物技术学报, 2004, 3(3): 322–329.
- [3] 奥斯伯, 金斯顿, 塞德曼, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [4] 刘东波, 刘建, 李雁. 一株生孢噬纤维细菌的 16S rDNA 基因序列分析[J]. 长春理工大学学报, 2005, 28(4): 123–125.
- [5] 刘波, 林营志, 朱育菁, 等. 青枯雷尔氏菌多态性研究[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2005.
- [6] Denny T P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1995, 33: 173–197.
- [7] 叶云峰, 黎起秦, 何洪鸿, 等. 芽孢杆菌 B₄₇ 菌株对番茄青枯病的防治作用[J]. 广西植保, 2005, 18(3): 1–4.
- [8] 郭坚华, 龚龙英, 祁红英, 等. 三个拮抗菌株对辣椒青枯病的作用机制[J]. 中国生物防治, 2003, 19(1): 6–10.
- [9] 徐玲, 王伟, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽孢杆菌 HY96-2 对番茄青枯病的防治作用[J]. 中国生物防治, 2006, 22(3): 216–220.

Effect of *Bacillus cereus* on Virulence of *Ralstonia solanacearum* for Tomato Bacterial Wilt

LI Bo-qing¹, ZHU Yu-jing², ZHANG Sai-qun^{1*}, ZHOU Hai-tao^{1*}, LIU Bo²

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Biotech. Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Ralstonia solanacearum* is divided into two strains from its pathogenicity, one is virulent strain which can induce plants disease, and the other is avirulent strain which can not. After cocultivated with *Bacillus cereus*, the virulent strain of *Ralstonia solanacearum* was attenuated and showed the characters of weak pathogenicity strain on the TTC medium. It is improved that the strains before and after cocultivated with *Bacillus cereus* are *Ralstonia solanacearum*, not other pollutional bacteria, by sequencing the 16S rDNA. The results showed that the original *Ralstonia solanacearum* could induce bacterial wilt when inoculated to tomato and the attenuate strain can not.

Key words: *Bacillus cereus*; *Ralstonia solanacearum*; attenuation; 16S rDNA sequence