

植物青枯菌的血清分型研究

刘琼光 曾宪铭 董春

(华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

摘要 以代表不同生化型的 4 个青枯假单胞菌的膜蛋白为免疫原制备了 4 个相应的抗血清, 对我国植物青枯菌的血清分型进行了研究。琼脂双扩散试验结果表明: 来自我国 6 个省(区)的 19 种寄主植物的 212 个青枯菌株可分为 8 个血清型, 其中血清型 I 为优势类群, 包括了主要茄科植物等 13 种寄主的 147 个菌株, 占全部供试菌株的 69%。8 个血清型代表菌株膜蛋白 SDS-聚丙稀酰胺凝胶电泳结果表明, 它们间存在不同程度上的差异。

关键词 青枯假单胞菌; 血清型

中图分类号 S 432.22

青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)是一种世界性的重要植物病原细菌, 侵染几十个科的 400 多种植物, 由该菌引起的植物青枯病, 分布面广, 为害严重。我国华南地区气候高温多湿, 青枯病发生尤为严重, 对农业生产造成极大威胁。

青枯菌是一个复杂群体, 关于它的种下分类, 国内外研究较多, 主要以 Buddenhagen 等(1962)的小种和 Hayward(1964)的生化型为主, 有关青枯菌的血清分型研究较少。Schaad 等(19798)用青枯菌膜蛋白为免疫原将巴西 6 种作物 19 个青枯菌株分为 5 个血清型; 许东等(1986)用桑青枯菌的糖蛋白制备的抗血清将广东 5 种作物的 24 个青枯菌株分为 8 个血清型。但两者的研究所用菌株数量太少, 寄主种类不多, 代表性远远不够; 而且他们研究的侧重点也各不相同, Schaad 等(1978)主要研究茄科和香蕉菌株, 许东等(1986)则以桑菌株为主。为了比较全面、客观地反映植物青枯菌的血清关系, 以期为研究青枯病的病原学、生态学、流行病学以及病害的检测和防治提供依据, 本文进行了这方面的研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株主要来自广东、广西、海南、湖南、浙江等 6 个省(区)的烟草(*Nicotiana tabavum* L.)菌株 66 个, 番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)菌株 85 个, 马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)菌株 9 个, 桑(*Morus alba* L.)菌株 12 个, 辣椒(*Capsicum frutescens* L.)菌株 9 个, 甘薯(*Ipomoea batatas* Lam)菌株 7 个, 花生(*Arachis hypogaea* L.)菌株 4 个, 姜(*Zingiber officinale* Roso)菌株 5 个, 茄子(*Solanum melongena* L.)菌株 3 个, 广霍香(*Pogostemon cablin* Bence)菌株 2 个, 刚果桉(*Eucalyptus* RABL)菌株 2 个, 以及金光菊(*Rudbeckia laciniata* L.), 排草(*Lysimachia capillipes* Hemsl), 木棉(*Bombax maliabaricum* Dc.), 木麻黄(*Casuarina equisetifolia* L.), 白豆蔻(*Amomum kravanh* Pirre ex Gagnep), 小花龙葵(*Solanum nigrum* L. var. *pauciflorum* Lion), 沙姜(*kanempferia galanga* L.), 菜豆(*Phase-*

olus vulgaris L.)等菌株各1个,共计19种植物上的212个青枯菌株。甘薯2个菌株由福建农业大学植保系提供,沙姜、刚果桉、白豆蔻、小花友葵、广霍香(海南)等6个菌株由海南热带作物学院植保系提供,其它菌株均由华南农业大学植物细菌室提供。

参加试验的还有5个常见植物病原细菌属的代表菌株:根癌野杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、胡萝卜软腐欧氏菌软腐亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、密执安棒杆菌环腐亚种(*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)和丁香假单胞菌黍致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *panici*)。

1.2 免疫原提取

选用代表不同生化型的4个菌株:烟草菌株(Tb32,生化型III)、番茄菌株(Tm58,生化型IV)、马铃薯菌株(Po4,生化型II)、桑菌株(M8,生化型II-2)分别在含有2,3,5-三苯基四唑化氯(TZC)的培养基上划线复活,挑取毒性菌落扩大培养。供试菌株在523培养液中28~30℃振荡培养48h后,按Frash等(1974)的方法提膜蛋白。

1.3 抗血清制备

以Tb32, Tm58, Po4, M8 4个菌株的膜蛋白为免疫原,分别免疫2~2.5 kg重的新西兰白兔。蛋白抗原和福氏不完全佐剂等量混合,肌肉和皮下注射,免疫3次,每次间隔10 d,各次免疫的蛋白量分别为0.5、2和3 mg,末次免疫10 d采血,用试管凝集试验测抗体效价。

1.4 血清反应

采用琼脂双扩散法,按常规法进行。参试菌株的菌体经0.2 mol/L LiCl溶液45℃处理2 h作为抗原参加反应,5个常见植物细菌属的代表菌株同时参加试验,重复3次。

2 试验结果

2.1 抗血清及其效价

4个代表菌株膜蛋白经免疫后得到4种抗血清,分别为AsTb32, AsTm 58, AsPo4 和 AsM8,效价达1:6400。

2.2 琼脂双扩散(ODD)试验

2.2.1 抗血清与5个常见植物细菌属代表菌株的ODD试验 抗血清与相应的同源抗原之间至少产生2条沉淀带,近抗原孔一端带更清晰。根癌野杆菌、胡萝卜软腐欧氏菌软腐亚种、密执安棒杆菌环腐亚种、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种和丁香假单胞菌黍致病变种等5个属的菌株与4个抗血清之间都不产生沉淀带,表明膜蛋白具有种的特异性。

2.2.2 抗血清与所有青枯菌株的ODD试验 4个抗血清与所有青枯菌株ODD反应,同源菌株在近抗原孔产生1条清晰沉淀带,但M8抗血清(AsM8)形成一细一粗2条紧邻的带,而异源菌株有的有这条带(AsM8含2条带),且相连情况各异,有的菌株则没有这条带,在此带(AsM8含2条带)之后有另一条带为所有青枯菌所共有,且多吻合相连。除此之外,抗血清与异源菌株反应还产生0~2条强弱不同的沉淀带。这一结果表明,近抗原孔一端的那条清晰的沉淀带(AsM8含2条带)具有种下特异性。因此把它作为血清分型的依据,根据该带的有无及交叉情况,将212个青枯菌株分为8个血清型(见图1)。各血清型的菌株来源、菌株数及所占比例见表1。

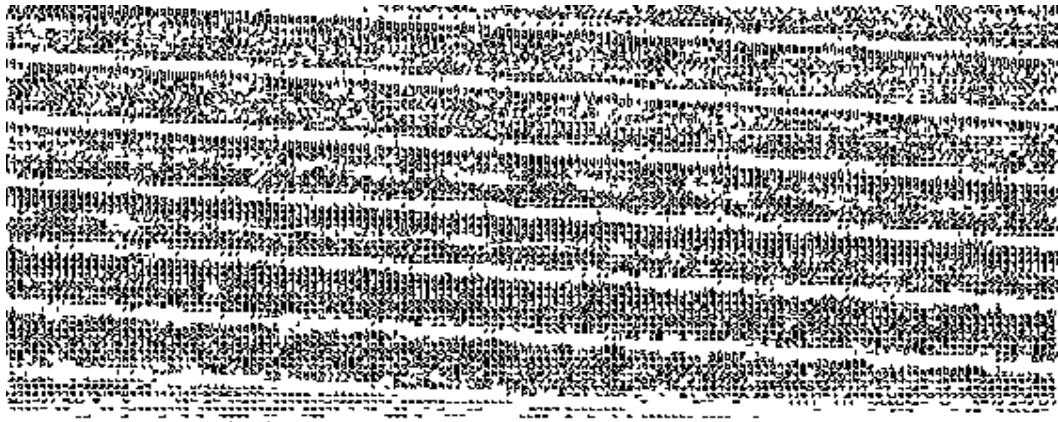


图 1 8 个血清型 ODD 反应沉淀带

中央孔为抗血清: A, E) AsTb32, B, F) AsTm58, C, G) AsPo4, D, H) AsM8
外围孔为抗原: A: 1, 2, 4) Tb32, 3) Tm58, 5) M8, 6) Po4; E: 1, 4) Tb32, 2) M2, 3) Pel, 5) Tm62, 6) Tb20; B: 1, 3, 4) Tm58, 2) Tb32, 5) M8, 6) Po4; F: 1, 4) Tm58, 2) M2, 3) Pel, 5) Tm62, 6) Tb20; C: 1, 4) Po4, 2) Tb32, 3) Tm58, 5) M8, Tm62, 6) Tb20

表 1 不同血清型菌株寄主、菌株数及所占比例

血清型	菌株寄主(菌株数)	各血清型菌株总数	占供试菌株百分比/(%)
I	烟草(63), 番茄(59), 辣椒(8), 花生(3), 茄子(3), 马铃薯(2), 姜(3), 菜豆(1), 排草(1) 广霍香(1), 白豆蔻(1), 金光菊(1), 小花龙葵(1)	147	69
II	番茄(8), 甘薯(7)	15	7.1
III	番茄(1), 马铃薯(8)	7	3.3
IV	桑(9)	9	4.2
V	烟草(3), 木棉(1)	4	1.9
VI	番茄(17)	17	8.0
VII	桑(2), 刚果桉(2), 木麻黄(1), 姜(1) 花生(1), 沙姜(1), 姜(1), 辣椒(1), 广霍香(1), 马铃薯(1)	6 7	2.8 3.3
VIII	薯(1), 桑(1)		

2.3 膜蛋白 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)试验

8 个血清型代表菌株的膜蛋白 SDS—PAGE 电泳结果表明, 它们间的蛋白图谱有差异, Pel 谱带最少, Po4 最多。各菌株都含有相对分子质量为 39 000 和 24 000 的多肽。除 Po4 菌株外, 其它菌株还有一条相对分子质量为 26 000 多肽, 相对分子质量 42 000 和 12 000 多肽分别为 Po4 和 M8 菌株特有, 各菌株所含多肽情况见扫描图(图 2)。

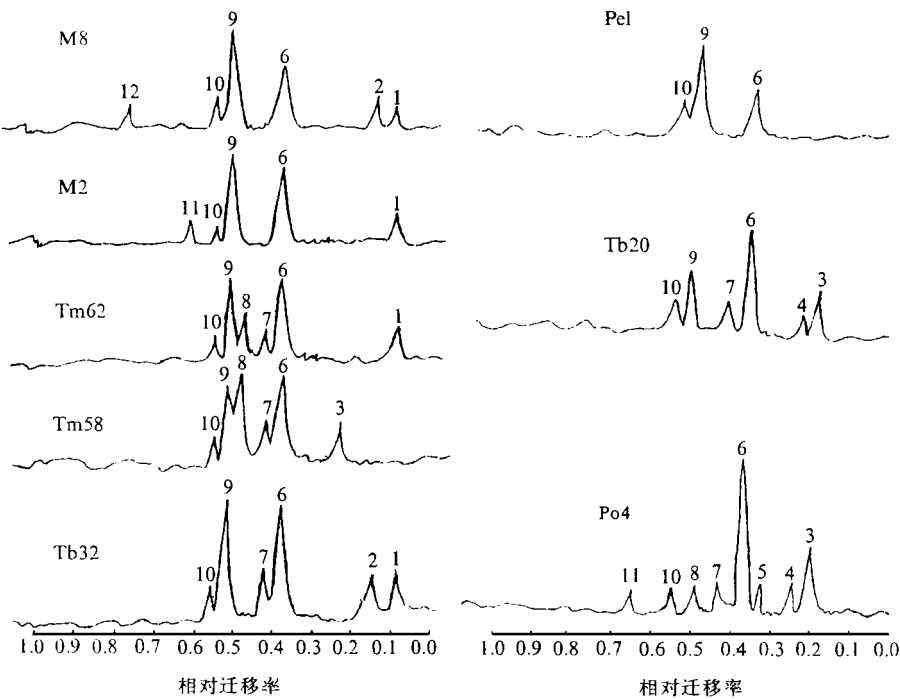


图 2 不同血型代表菌株膜蛋白 SDS—PAGE 电泳扫描图

相对分子质量 1 为 95 000, 2 为 76 000, 3 为 60 000, 4 为 56 000, 5 为 42 000, 6 为 39 000, 7 为 35 000, 8 为 28 000, 9 为 26 000, 10 为 24 000, 11 为 20 000, 12 为 12 000

3 讨论

根据 ODD 反应产生的特异带, 将来自我国 6 个省(区)19 种寄主植物的 212 个青枯菌株分为 8 个血清型, 血清型 I 为优势类群, 包括主要茄科植物等 13 种寄主的 147 个菌株, 占参试菌株的 69%。

Schaad 等(1978)用 6 个青枯菌的膜蛋白抗血清, 根据 ODD 反应产生的特异带, 将来自巴西的番茄(2 个菌株)、马铃薯(6 个菌株)、香蕉(7 个菌株)、烟草(2 个菌株)、辣椒(1 个菌株)、茄子(1 个菌株)等 6 种植物上的 19 个青枯菌株分为 5 个血清型; 许东等(1986)用 3 个桑青枯菌株的粗制糖蛋白抗血清, 根据 ODD 反应产生沉淀带的数目及其相交情况, 将来自广东的桑(20 个菌株)、花生(1 个菌株)、蕃茄(1 个菌株)、马铃薯(1 个菌株)、木麻黄(1 个菌株)等 5 种植物上的 24 个青枯菌株分为 8 个血清型。两者所用的菌株数量不足, 寄主种类少, 难以客观反映青枯菌这一庞大菌系群之间的亲缘关系。本研究选用了 4 个代表不同生化型的青枯菌株膜蛋白为免疫原, 参加试验的菌株数量大, 寄主种类多, 地理区域广, 代表性更充分, 可以较准确而客观地反映出植物青枯菌之间的血清学关系, 进一步充实了前人的研究。

许东等(1986)提出青枯菌的种下划分以血清型更能反映它们之间的亲缘关系。本研究结果表明, 所有供试菌株都有共同的沉淀带, 据此, 基本同意许东等人的观点。但本研究还观察到, 在同一血清型中不同菌株之间 ODD 反应所形成的沉淀带数目、位置以及交叉情况有差异, 如血清型中的 2 个生化型 IV 的马铃薯菌株和 3 个姜菌株就有不同。如果考虑特异

带以外的沉淀带数目、位置以及交叉情况,并借助于计算机处理,将使青枯菌的血清分型更趋完善。

不同血清型代表菌株的膜蛋白 SDS—PAGE 图谱表明各菌株都有相对分子质量为 39 000 和 24 000 多肽,这和 Dristig 等(1990)报道的来自巴西的 56 个青枯菌株膜蛋白电泳结果有相同之处。除 Po4 菌株外,其它菌株还有相对分子质量为 26 000 多肽,相对分子质量 42 000 和 12 000 分别为 Po4 和 M8 菌株特有的多肽,其它菌株的电泳图谱也存在不同程度的差异。究竟哪一条多肽是某一血清型的专化抗原,需要进一步转移到硝酸纤维素膜上免疫印迹后才能证实,此项工作有待于进一步研究。

本文报道了国内植物青枯菌的血清分型,这将为植物青枯病的病原学、生态学、流行病学以及病害的检测和鉴定提供有用的参考。

参 考 文 献

- 许 东,赖文姜,范怀忠. 1986. 桑青枯菌血清型与其他分型的比较. 植物病理学报, 16(1): 29~36
- Buddenhagen I W, Sequeira L, Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 52: 726
- Dristig M C G, Dianese J C. 1990. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membrane protein patterns. Phytopathology, 80: 641~646
- Frasch C E, Gotschoich E C. 1974. An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. J Exp Med, 140: 87~104
- Hayward A C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J Appl Bact, 27(2): 265~277
- Schaad N W, Takatsu T, Dianese J C. 1978. Serological identification of Strains of *Pseudomonas solanacearum* in Brazil. In: Anon ed Proc. 4th int. Conf. Plant Pathol Bacterial. Angers [s. n], 295~300

THE SEROTYPES OF BACTERIAL WILT PATHOGEN (*Pseudomonas solanacearum*) IN PLANTS

Liu Qiongguang Zeng Xianming Dong Chun

(College of Natural REsources & Environment, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

A study was conducted to determine the serological relationships between strains of *Pseudomonas solanacearum* in China. Four corresponding antisera were prepared to a kind of membrane protein extracted from cells of four strains representing different biotypes of *P. solanacearum* respectively. By using Ouchterlong double diffusion tests, 212 isolates from nineteen different hosts in six provinces and cities could be grouped into eight serotypes. It was demonstrated that 147 isolates of them belonged to serotype I which was the predominant one (69%) including thirteen various hosts. SDS-PAGE profiles of membrane proteins extracted from strains representing eight serotypes of *P. solanacearum* showed that there were some differences between serotypes.

Key words *Pseudomonas solanacearum*; serotype