

农作物青枯病菌产细菌素能力的测定*

董春¹ 王金生² 范怀忠¹

(1 华南农业大学资源环境学院, 广州, 510642; 2 南京农业大学植保系)

摘要 对来自 15 种寄主植物的 135 个青枯菌株 (*Ralstonia solanacearum*) 的产细菌素能力进行了测定, 3 种指示菌分别为对番茄、烟草和桑树有强致病力的青枯菌株 Tm46、Tb32 和 M1。测定结果表明, 在 135 个试验菌株中, 能产生细菌素的菌株有 59 个, 占总数的 43.7%。这些菌株产生的细菌素的专化性不同, 它们分别对 3 种、2 种和 1 种指示菌有抑菌作用。

关键词 细菌素; 青枯菌; 生物防治

中图分类号 S 432.22

细菌素 (Bacteriocin) 是一种由细菌产生的、对同种或近缘种细菌的不同菌株具有特异性拮抗作用的、含有蛋白质的抑菌物质 (王金生, 1985)。大多数植物病原细菌如根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、棒形杆菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*)、软腐欧氏杆菌 (*Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 等都具有产生细菌素的能力 (吴健胜等, 1996)。细菌素在细菌的分类、快速鉴定、病害流行和生物防治方面均有潜在的应用前景 (王金生, 1985)。

青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 是热带、亚热带和温带地区普遍发生的植物青枯病的病原菌, Okabe (1954) 首次发现青枯菌株间的拮抗作用及其产生抑菌物质的能力; 这种抗菌物质被证实为一种含蛋白质的细菌素 (Cupples, 1978); 对青枯菌细菌素的产生及性质也进行了研究 (张建华, 1987; 1991; 章健, 1993; 谢道昕, 1989; Arwiyanto et al, 1993); 利用无致病力产细菌素青枯菌株防治番茄和烟草青枯病具有一定的效果 (任欣正等, 1993; Arwiyanto et al, 1994; Chen et al, 1984)。

华南农业大学植物细菌和杀菌剂研究室在对青枯病菌的致病型、生化型和血清型进行系统研究的过程中, 收集了近 200 个青枯菌株。为了对青枯菌细菌素进行深入研究, 并探索利用青枯菌细菌素防治青枯病的可能性, 作者对这些青枯菌株的产细菌素能力进行了测定。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

用于测试的青枯菌株分别采自广东省不同地区的 15 种植物, 共 135 个。其中番茄菌株 (Tm) 53 个, 烟草菌株 (Tb) 50 个, 马铃薯菌株 (Po) 5 个, 辣椒菌株 (Pep) 5 个, 生姜菌株 (G) 4 个, 甘薯菌株 (Spo) 4 个, 桑树菌株 (M) 5 个, 广霍香菌株 (Pog) 2 个, 茄 (E)、花生 (Pe)、桉树 (Eu)、木

1998-12-30 收稿 董春, 男, 33 岁, 讲师, 硕士, 在职博士生

* 广东省自然科学基金 (940360) 资助项目

麻黄(Ca)、木棉(Bo)、小花龙葵(Sol)、爪哇白豆蔻(Am)菌株各1个.3种代表性的指示菌是番茄青枯菌株 Tm46、烟草青枯菌株 Tb32 和桑青枯菌株 M1,它们分别对番茄、烟草和桑树具有强致病力.

1.2 培养基

PSA 培养基,配方为:牛肉浸膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,酵母膏 3.0 g,蔗糖 20.0 g,琼脂 15 g, KHPO_4 2.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.25 g. PSB 培养液配方为 PSA 不加琼脂. TZC 培养基配方为:甘油 5 mL,蛋白胨 10.0 g,水解酪蛋白 1.0 g, φ 为 1% 三苯基四氮唑(TZC) 10 mL.

1.3 供试菌株和指示菌的培养

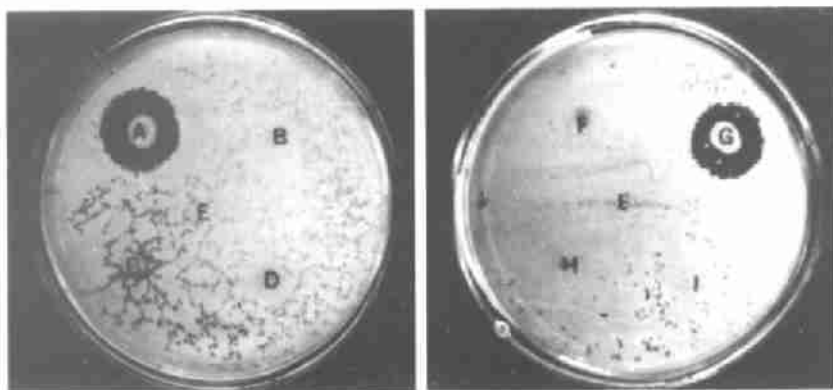
从原菌种管中将待测菌株移入 PSA 平板上 30 °C 活化培养 72 h,再移入 PSA 斜面上 30 °C 培养 48 h. 取 3 种指示菌 Tm46、Tb32 和 M1 在 TZC 培养基上检测致病性后,分别接种于 100 mL PSB 液体培养基的三角瓶中,在控温摇床上振荡培养(28 ~ 30 °C、120 r/min)48 h.

1.4 产细菌素的测定

采用喷雾测定法:制好 PSA 平板,将待测试菌株点接到平板上,每皿接 4 ~ 5 个菌株,每菌株 3 次重复. 将指示菌配成细胞数密度为 10^9 CFU/mL 的菌悬液,用灭菌的医用猴头喷雾器把指示菌喷到平板上,每皿喷雾 0.2 mL. 放置在培养箱中 28 °C 培养,48 h 后调查各菌株产细菌素情况并测量抑菌圈大小.

2 结果与分析

使用 3 种强致病力青枯菌株 Tm46、Tb32 和 M1 作为指示菌,在被测定的 135 个菌株中,有 59 个能产生细菌素,占总数的 43.7%,这些菌株在指示菌平板上形成明显的抑菌圈(图 1).



A、B、C、D、F、G、H、I 分别为青枯菌株 Tb30、Tm8、Tm49、Tm24、Tm10、Eu1、Tm61、Tb50. E 为指示菌株 Tb32,可以看出 Tb30 和 Eu1 能产生细菌素

图 1 喷雾法测定青枯菌细菌素的产生(示抑菌圈)

根据细菌素的抑菌范围,将 135 个菌株分为 A、B、C、D 四种类型. 其中 A 型菌株共有 8 个,对 3 种指示菌都有抑菌作用;B 型菌株共有 15 个,分别对 2 种指示菌有抑菌作用;C 型菌株共有 36 个,分别对 1 种指示菌有抑菌作用;D 型菌株共有 79 个,对指示菌不产生抑菌作用(表 1).

表1 135个青枯菌株产细菌素的能力测定¹⁾

产细菌素 类型	抑菌类型			测定菌株及数量									
	Tm46	Tb32	M1										
A	+	+	+	Tb30	Tm3	Tm41	Tm71	Eu1	Bo1	Am1	G2(共8株)		
B	+	+	-	Tb27	Tb29	Tb64	Tm45(共4株)						
	+	-	+	Tb20	Tb35	Tb66	M3	M7	M8	M12(共7株)			
C	-	+	+	Tb15	Tb24	Tm35	Po9(共4株)						
	+	-	-	Tb1	Tb14	Tb54	Tb60	Tm9	Tm23	Tm51	Tm61	Tm62	Tm65
				Tm72	Tm82	M1	M10(共14株)						
D	-	+	-	Tb3	Tb37	Tb46	Tb73	Tm44	Pep4	Po5	So2	Pog2(共9株)	
	-	-	+	Tb22	Tb63	Tb19	Tm5	Tm12	Tm22	Tm28	Tm36	Tm48	
				Tm77	PeP2	Po8	So1(共13株)						
D	-	-	-	(共79株 菌株编号略)									

1) “+”表示指示菌敏感,“-”表示指示菌不敏感

在59个产细菌素菌株中,大多数菌株的抑菌圈 $d < 10.0$ mm;有3个菌株的抑菌圈 $d > 20.0$ mm,其中 Tm3 对3种指示菌的 $d_{\text{抑菌}}$ 都达 30.0 mm(表2).

表2 3种类型产细菌素青枯菌株的抑菌范围

$d_{\text{抑菌圈}}/\text{mm}$	菌株数量	菌株及敏感指示菌
> 20.0	6	Tm3(Tb46、Tb32、M1), Tm71(Tb32) Tb30(Tb32、M1), Eu1(Tm46、Tb32), Bo1(Tm46、Tb32、M1)
10.0~20.0	7	Tb20(M1), Tb64(Tb32), Tm12(M1), Tm65(Tm46), M2(M1), M12(M1), Po9(Tb32)
1.0~10.0	46	参见表1中其它产细菌素菌株

3 讨论

张建华等(1991)测试了我国南方主要烟草产区25个青枯菌株的产细菌素特性,结果所有菌株都能产生细菌素.本文在测试的135个青枯菌株中,能产生细菌素的有59个,只占43.7%,这与他们的结果不同.

植物病原细菌产生的细菌素的抑菌范围一般比较窄,但也有例外,如软腐菊欧氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*)产生的细菌素(Echcin)可以抑制其它属的植物病原细菌(王金生等,1988).本文只选用了青枯菌种内的菌株作为指示菌对青枯菌株产细菌素能力进行了测定,结果出现了分别对1种、2种和3种指示菌有抑菌活性的类型.相信随着所用指示菌株数量的增加,将会发现抑菌谱更广的类型.这些抑菌谱较广的菌株,将被优先考虑作为生防菌株.青枯菌细菌素是否对其它种、属病原细菌具广谱性的抑菌作用,值得进一步研究.

用产细菌素菌株对植物细菌病害进行生物防治,一般要求这些菌株是没有致病性的.无毒菌株一方面可以从自然界直接分离得到,另一方面可以从有毒菌株进行诱变或遗传改造.作者筛选到的产细菌素青枯菌株可望在下述几方面获得利用:(1)利用不同寄主来源的产细菌

素菌株进行生物防治;(2)利用产细菌素菌株生产细菌素纯品或粗制品来进行生物防治;(3)克隆青枯菌细菌素基因,获得转细菌素基因抗病植株。

参 考 文 献

- 王金生. 1985. 细菌素在植物细菌素病害生防中的应用. 生物防治通报, 1(2): 36 ~ 40
- 王金生, 何晨阳, 方中达. 1988. 软腐欧氏杆菌产细菌素菌株的筛选和细菌素类型的研究. 生物防治通报, 4(2): 55 ~ 58
- 任欣正, 申道林, 谢贻格. 1993. 番茄青枯病的生物防治. 南京农业大学学报, 16(1): 45 ~ 40
- 吴健胜, 王金生. 1996. 植物病原细菌的细菌素. 微生物学通报, 23(2): 95 ~ 97
- 张建华, 任欣正, 方中达. 1987. 青枯假单胞杆菌产生细菌素的研究. 南京农业大学学报, 10(3): 58 ~ 63
- 张建华. 1991. 我国南方烟区烟草青枯病菌产细菌素特性的研究. 山东农业大学学报, 22(3): 261 ~ 266
- 章 健, 任欣正. 1993. 青枯假单胞菌细菌素的研究. 南京农业大学学报, 16(4): 63 ~ 67
- 谢道昕, 范云六, 何礼远. 1989. 植物青枯菌细菌素的纯化及其性质研究. 微生物学报, 19(4): 284 ~ 292
- Arwiyanto T, Goto M, Takikuwa Y. 1993. Characterization of bacteriocins produced by *Pseudomonas solanacearum*. Ann Phytopathol Soc Japan, 59: 114 ~ 122
- Arwiyanto T, Goto M, Tsuyumu S. 1994. Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Strelitzia reginae*. Ann Phytopathol Soc Japan, 60: 421 ~ 430
- Chen W Y, Echandi E. 1984. Effects of avirulent bacteriocin producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco. Plant Pathol, 33: 245 ~ 253
- Cupples D A, Hanson R S, Kelman A. 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. J Gen Microbiol, 109: 295 ~ 303
- Okabe N. 1954. Studies on *Pseudomonas solanacearum*. V. Antagonism among the strains of *P. solanacearum*. Rep Fac Agric Shizuoka Univ, 4: 37 ~ 40

Detection of Bacteriocin Production Ability of *Ralstonia solanacearum*

Dong Chun¹ Wang Jinsheng² Fan Huaizhong¹

(1 College of Natural Resources & Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Dept. of Plant Protection, Nanjing Agric. Univ.)

Abstract One hundred and thirty five strains of *Ralstonia solanacearum* from 15 different host plants were test for bacteriocin productivity by using strains Tm46, Tb32 and M1 as indicators. Strains Tm46, Tb32 and M1 were highly virulent to tomato, tobacco and mulberry respectively. The results indicated that about 43.7% of the isolates tested were able to produce bacteriocin in PSA agar medium with different specificities. Some strains such as Tm3, Tb30 and Eu1 had relatively wide inhibiting spectrum. These results would be useful to search for biological control agents of plant bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*.

Key words bacteriocin; *Ralstonia solanacearum*; biological control

【责任编辑 张 砾】