

我国植物青枯菌的内生质粒及其与致病性的关系

谢道昕* 范云六

(中国农科院分子生物学研究室, 北京)

何礼远

(中国农科院植物保护研究所, 北京)

检测了来自我国不同地区的龙葵、苜蓿、芝麻、木薯黄、油橄榄、桑、烟草、姜、辣椒、茄、蕃茄、甘薯、花生和马铃薯等 14 种寄主植物的 51 株野生型青枯菌的内生质粒 (Indigenous Plasmid), 并对其中 20 株野生型菌株及其相应的 20 株“突变型”菌株进行了质粒的比较研究。14 株野生型菌株和 10 株“突变型”菌株含有 1 或 2 个质粒, 质粒分子量不一, 最小的在 5Md 以下, 最大的为 120Md。有些野生型菌株 (Ss1、Sn1、E4、Pe2、Tm9、Z2、P3、Po1、Po3、Po14.) 和它们的“突变型”菌株均不含质粒; 另一些野生型菌株 (M5、M6、E1、P9.) 和它们相应的“突变型”菌株却具有电泳迁移率相同的质粒; 这些菌株的致病性与质粒的存在没有关系。但某些野生型菌株 (P7、P8、Z1、Z3、M2、Po41.) 不含质粒, 而它们的“突变型”菌株中却出现了质粒, 这些菌株的致病性的丧失与质粒的形成之间可能有关。

关键词 植物青枯病菌; 内生质粒; 致病性

植物病原细菌的质粒与致病性的关系有过一些研究。如土壤致瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的致瘤性受 Ti 质粒的控制^[1], 齐墩果肿瘤病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*) 的致瘤性是由质粒编码的 IAA 引起的^[2], 菜豆晕斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) 的晕斑毒素也是质粒编码的^[3]。

由植物青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum*) 引起的植物青枯病是一种世界性的重要细菌病害^[4]。植物萎蔫主要是由于青枯菌体围丰富的胞外多糖阻滞了植物维管束组织的水分输导^[5]。青枯菌的致病性是否与质粒有关, 也引起了科学家的广泛兴趣。Rosenberg 等检测了 9 株青枯菌, 8 株中有质粒^[6]。Zischek 等在 12 株中发现 11 株有质粒^[7], 并提示质粒与致病性可能有关。但 Currier 等检测 29 株菌, 只发

现 9 株有质粒^[8], Morales 和 Sequeira 发现 39 株中的 22 株存在质粒^[9], 他们认为, 质粒与致病性无关。

在中国, 青枯菌引起约 20 种植物的青枯病, 危害日趋严重, 尤其是对马铃薯、蕃茄、花生、姜和甘薯的生产造成严重威胁, 我国还发现了一些国外未报道的新寄主 (如桑、油橄榄和聚合草等)^[10,11]。为了进一步了解青枯菌致病性的分子机制, 促进青枯病的防治研究, 我们对 14 种植物的 51 株青枯菌的内生质粒进行了检测, 并对其中 9 种植物的 20 株野生型及其相应的 20 株“突变型”菌株进行了质粒的比较研究, 初步探讨了青枯菌质粒与致病性的关系。

本文于 1986 年 7 月 21 日收到。

* 原系何礼远教授和范云六教授共同指导的硕士研究生。

表 1 我国植物青枯菌菌株及其内生质粒

Table 1 Plasmid content of strains of *pseudomonas solanacearum* from China

菌株 Strain	质粒数 Number of plasmid	质粒分子量 MW (Md)	原寄主 Original host
U1	2	60, ≈ 75	苧蔴 ramie
Ss1	0		芝麻 sesame
Sn1	0		龙葵 black nightshade
C2	1	60	木藤黄 horsetail beefwood
C4	0		木藤黄 horsetail beefwood
E1	1	60	茄 eggplant
E4	0		茄 eggplant
Pe1	0		辣椒 pepper
Pe2	0		辣椒 pepper
Tb2	0		烟草 tobacco
Tb3	0		烟草 tobacco
O1	1	60	油橄榄 olive
O2	1	60	油橄榄 olive
O3	0		油橄榄 olive
Tm1	1	60	蕃茄 tomato
Tm2	0		蕃茄 tomato
Tm6	0		蕃茄 tomato
Tm9	0		蕃茄 tomato
Tm10	0		蕃茄 tomato
B1	0		甘薯 sweet-potato
B2	0		甘薯 sweet-potato
B4	0		甘薯 sweet-potato
B5	0		甘薯 sweet-potato
B6	0		甘薯 sweet-potato
Z1	0		姜 ginger
Z2	0		姜 ginger
Z3	0		姜 ginger
Z5	0		姜 ginger
Z6	0		姜 ginger
M2	0		桑 mulberry
M4	0		桑 mulberry
M5	2	40, 5	桑 mulberry
M6	1	75	桑 mulberry
M7	0		桑 mulberry
P3	0		花生 peanut
P6	2	60, <5	花生 peanut
P7	0		花生 peanut
P8	0		花生 peanut
P9	1	60	花生 peanut
P11	2	60, 120	花生 peanut
P13	2	60, <5	花生 peanut
P14	0		花生 peanut
P16	1	75	花生 peanut
Po1	0		马铃薯 potato
Po3	0		马铃薯 potato

续表 1

菌株 Strain	质粒数 Number of plasmid	质粒分子量 MW (Md)	原寄主 Original host
Po14	0		马铃薯 potato
Po29	0		马铃薯 potato
Po37	1	<25	马铃薯 potato
Po40	0		马铃薯 potato
Po41	0		马铃薯 potato
Po45	0		马铃薯 potato
ASs1	0		Ss1 的“突变株” “mutant” of Ss1
ASn1	0		Sn1 的“突变株” “mutant” of Sn1
AE1	1	60	E1 的“突变株” “mutant” of E1
AE4	0		E4 的“突变株” “mutant” of E4
APe2	0		Pe2 的“突变株” “mutant” of Pe2
ATm9	0		Tm9 的“突变株” “mutant” of Tm9
AZ1	1	60	Z1 的“突变株” “mutant” of Z1
AZ2	0		Z2 的“突变株” “mutant” of Z2
AZ3	1	60	Z3 的“突变株” “mutant” of Z3
AM2	1	40	M2 的“突变株” “mutant” of M2
AM5	2	40, 5	M5 的突变株 “mutant” of M5
AM6	1	75	M6 的“突变株” “mutant” of M6
AP3	0		P3 的“突变株” “mutant” of P3
AP7	1	60	P7 的“突变株” “mutant” of P7
AP8	1	60	P8 的“突变株” “mutant” of P8
APo1	0		Po1 的“突变株” “mutant” of Po1
APo3	0		Po3 的“突变株” “mutant” of Po3
APo14	0		Po14 的“突变株” “mutant” of Po14
APo41	1	60	Po41 的“突变株” “mutant” of Po41
AP9	1	60	P9 的“突变株” “mutant” of P9

材料和方法

(一) 菌株

从我国不同地区 14 种寄主植物上分离到 51 株野生型青枯菌, 将其中 20 株菌 (分属于 9 种寄主) 在 TZC^[12] 平板上筛选, 获得 20 株相应的“突变型”菌株(表 1)。野生型青枯菌具有丰富的胞外多糖, 在 TZC 平板上生长的菌落呈流动状态, 菌落中心呈桃红色; “突变型”青枯菌无丰富的胞外多糖, TZC 平板上的菌落常呈圆形、酪状, 不流动, 菌落为深红色, 周围有浅蓝色窄边^[12, 13]。

(二) 致病性测定

将 6 株野生型菌株及其相应的 6 株“突变型”菌株在马铃薯品种京丰一号上按茎部毛细管滴注法^[14]接种, 植株均放在 30℃ 温室中(夜间为 25—

30℃)生长, 定期观察植株的病情。

(三) 野生型菌株的稳定性

在 TZC 平板上挑选 8 株野生型菌株的典型单菌落, 分别接种在 5ml 1% 蛋白胨培养液中, 30℃ 50r/min 振荡培养。24 小时后取样在 TZC 平板上检测, 计算产生“突变型”菌落的百分率。同时取 0.5ml 菌液接种在 5ml 1% 蛋白胨培养液中培养。24 小时后取样在 TZC 平板上检测“突变型”菌落的百分率, 并取 0.5ml 菌液于新的 5ml 1% 蛋白胨培养液中继续培养。依照同法继代培养, 连续检测 15 次左右。

(四) 质粒检测

1. 采用 Eckhardt 方法^[15]

2. 采用改良的 Kado 方法^[16]: 将细菌接种在 LB 培养液中, 28℃ 60r/min 振荡培养 18 小时左右(浓度约为 10^{10} 细菌/ml), 取 1.5ml 菌液于

Eppendorf 管中, 8,000r/min 离心 3 分钟, 弃上清, 用 200 μ l 0.1% Sarkosyl[®] 悬浮菌体, 离心, 弃上清, 振荡菌体。加 150 μ l 裂解液, 轻摇混匀后置于 60 $^{\circ}$ C 水浴中, 40 分钟后立即置于冰中。加 300 μ l 酚氯仿^[14], 摇晃 10 次左右, 在冰中静置 10 分钟后, 15,000r/min 离心 5 分钟。取 60 μ l 上清液与 10 μ l 溴酚蓝蔗糖溶液(0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖)混匀, 进行琼脂糖凝胶平板电泳。电泳缓冲液为 E (40 mmol/L Tris, 2mmol/L EDTA, 用冰乙酸调至 pH 7.9), 0.4—0.6% 琼脂糖凝胶, 3—5V/cm, 15 小时以后, 将凝胶浸泡在 5 μ g/ml 溴化乙锭溶液中, 40 分钟后在 2537 \AA 紫外灯下观察并拍照。

结果和讨论

(一) 致病性测定

为了探讨青枯菌质粒与致病性的关系, 首先必须确证供试菌株的致病性。根据寄主来源和生化型^[17-19], 选择了具有代表性的青枯菌菌株进行致病性测定。测试了花生菌株 P7、P8, 姜菌株 Z2、Z3 和马铃薯菌株 Po1、Po41, 以及它们相应的“突变型”菌株 AP7、AP8、AZ2、AZ3、APo1、APo41。

接种 10 天后, 6 株野生型菌株均引起马铃薯叶片失水下垂, 甚至整株萎蔫死亡; 而 6 株“突变型”菌株都未引起马铃薯的青枯病, 植株生长正常。因此, 在 TZC 平板上区分为野生型的菌株有致病力, 而区分为“突变型”的菌株无致病力, 与 Kelman 的研究结果一致^[11]。

(二) 野生型菌株的稳定性

野生型菌株的稳定性是以野生型细菌在培养液中继代移植培养后产生的“突变型”细菌占细菌总数的百分比表示。本研究采用了 P7、P8、Z2、Z3、M5、M6、Po1、Po41 等 8 株野生型菌株。培养 5 天后, P7、P8、Z2、M5、M6、Po41 等 6 株菌中产生了 50% 左右的“突变型”细菌; 15 天后,

全部 8 株菌都出现 95% 以上的“突变型”细菌(图 1)。

Kelman 等报道青枯菌在静止培养时能产生无致病性的菌^[20]。文献中常把这种无致病性的菌称为突变型细菌^[7, 12]。但本实验结果表明野生型菌株很不稳定, 以很高的百分比衍生为非致病性菌, 而一般细菌自发突变率为 10^{-6} — 10^{-8} , 因此, 把青枯菌中这种从致病菌产生非致病菌的过程称为突变, 或把这种非致病菌称为突变型细菌, 这还值得商榷。本文仍沿用“突变型”术语, 但加引号以示区别。

(三) 青枯菌的内生质粒

本文采用改良的 Kado 方法和 Eckhardt 方法检测了 51 株野生型菌株和 20 株“突变型”菌株的质粒。Kado 方法是目前检测大质粒时常用的简便有效的方法。Eckhardt 方法直接在电泳凝胶上溶解菌体, 作用条件温和, 最大限度地避免了对质粒的剪切, 也是现在检测大质粒的可靠方法。实验表明, 这两种方法检测供试菌株得到的质粒图谱一致(表 1 和图版 1)

1. 14 株野生型菌株 (U1、C2、E1、O1、O2、Tm1、P6、P9、P11、P13、P16、Po37、M5、M6) 和 10 株“突变型”菌株 (AE1、AZ1、AZ3、AP7、AP8、AP9、APo41、AM2、AM5、M6) 含有 1 或 2 个质粒(表 1), 占测试菌株的 33.8%, 说明不是所有的青枯菌菌株都含有质粒。其中, 27.5% 的野生型菌株含质粒, 50% 的“突变型”菌株中出现质粒, 表明野生型菌株不一定含有质粒, “突变型”菌株不一定含有质粒。

2. 将 20 株野生型菌株与其相应的 20 株“突变型”菌株相比较(表 1), 可以分为三种情况: (1) 野生型菌株及其“突变型”菌株都不含有质粒(如 Ss1、ASs1、Sn1、ASn1、E4、AE4、Pe2、APe2、Tm9、ATm9、Z2、AZ2、P3、AP3、Po1、APo1、Po3、APo3,

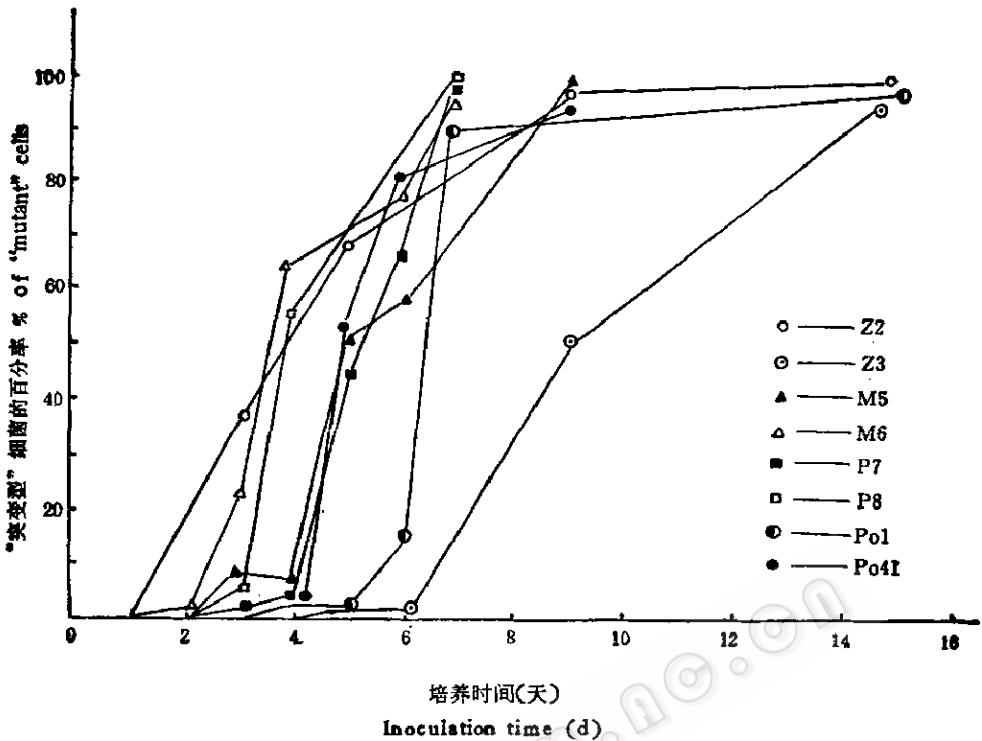


图1 植物青枯菌野生型菌株的稳定性

Fig. 1 Stability of wild strains of *Pseudomonas solanacearum*

Po14、APo14)。(2) 野生型菌株及其“突变型”菌株都含有电泳迁移率相同的质粒(如 M5、AM5, M6、AM6, E1、AE1, P9、AP9)。(3) 野生型菌株不含质粒(如 Po41、P7、P8、Z1、Z3、M2), 而其“突变型”菌株中却出现了质粒(APo41、AP7、AP8、AZ1、AZ3、AM2)。

本文检测了我国不同地区的马铃薯、蕃茄、花生、烟草、茄和桑等植物的青枯菌质粒, 首次报道了木麻黄、苕蕨、芝蕨、龙葵、辣椒、姜、油橄榄和甘薯等植物的青枯菌质粒检测结果, 首次进行了龙葵、芝蕨、辣椒、茄、姜、桑、花生和马铃薯等植物的野生型青枯菌及其相应的“突变型”菌株质粒的比较研究。

实验结果表明, 植物青枯菌的致病性与质粒的关系随菌株不同而异。有些菌株的致病性的丧失伴随着质粒的形成, 另一

些菌株的致病性与质粒没有关系。在植物青枯菌中, 不能简单地根据各菌株中有无质粒来判断致病性与质粒之间的关系。即使有致病性的菌株中出现了质粒, 而自然界存在的无致病性菌中没有质粒, 也不能推断致病性与质粒一定有关。因为只有同一遗传背景上比较有致病性菌株与无致病性菌株的质粒, 然后才可能做出有说服力的推断。本实验的野生型菌株和由它们衍生的相应的“突变型”菌株具有相同的遗传背景。从 20 株野生型菌株与它们相应的 20 株“突变型”菌株的质粒比较研究所区分的三种情况看, (1)和(2)两种情况中的菌株致病性与质粒没有关系, 这与 Carrier 等的研究结果一致^[1]; 但第(3)种情况却不然, 因为这些野生型菌株 (Po41、P7、P8、Z1、Z3、M2) 不含质粒, 而它们的“突变型”菌株 (APo41、AP7、AP8、AZ1、AZ3、

AM2) 中却出现了质粒, 对于这些菌株而言, 致病性的丧失伴随着质粒的形成, 所以, 这些菌株的致病性与质粒不是没有关系的。因这些具有致病性的菌株不含质粒, 则与致病性相关的基因(包括调节基因和结构基因)无疑位于染色体上, 这些菌株衍生的无致病性菌株中出现的质粒可能来源于染色体。我们推测: 质粒 DNA 以某种特定的机制从染色体上切离 (excision), 很可能使染色体失去了部分或全部(以 cis 方式作用)与致病性有关的基因, 因而野生型菌株丧失致病性, 衍生为含有质粒的“突变型”菌株。这种推测与关于非致病性的(抗 AO)青枯菌的染色体缺失了与致病性有关的一段 (>80 kb) DNA 的报道^[43]一致。野生型菌株衍生为“突变型”菌株后新形成的质粒是不是染色体的缺失所引起的, 质粒 DNA 是否来源于染色体, 需要应用分子杂交等技术进行验证。

青枯菌在分离和培养时容易丧失致病性^[11,12,20], 图 1 所示的 8 株青枯菌也很不稳定。第(3)种情况的野生型菌株(如 P7、P8、Po41、Z3)不稳定的原因可能是它们与致病性有关的基因容易从染色体上切离, 而且这些基因可能具有 cis 效应, 因此, 这些菌株容易丧失致病性, 衍生为“突变型”菌株, 切离的 DNA 就形成了质粒。第(1)和(2)两种情况中的野生型菌株(如 Pol、Z2、M5、M6)容易产生“突变型”菌

株的现象, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Van Larebeke, N. et al.: *Nature*, 252: 169, 1974.
- [2] Comai, L. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 128: 2157, 1982.
- [3] Panopoulos, N. J. et al.: *Plasmid of Medical Environmental and Commercial Importance*, (ed. by K. N. Timmis and A. Pühler), Elsevier North-Holland Biomedical Press, p. 365, 1979.
- [4] Kelman, A.: *N. Carolina Agri. Exp. Sta. Tech. Bull.*, 99: 194, 1953.
- [5] Husain, A. et al.: *Phytopath.*, 48: 155, 1958.
- [6] Rosenberg, C. et al.: *J. Bact.*, 150 (1): 402, 1982.
- [7] Zischek, C. et al.: *Proc. Int. Conf. Plant Path. Bact.*, 5: 427, 1981.
- [8] Currier, T. C. et al.: *Proc. Int. Conf. Plant Path. Bact.*, 5: 420, 1981.
- [9] Morales, V. M. et al.: *Phytopath.*, 75 (7): 757, 1985.
- [10] 何礼远等: 植物保护, 9(3): 8, 1983.
- [11] 任欣正等: 植物病理学报, 11(4): 1, 1981.
- [12] Kelman, A.: *Phytopath.*, 44: 693, 1954.
- [13] Morales, V. M. et al.: *Current Communication in Molecular Biology Plant Cell/Cell Interaction*, (ed. by Sussex, A. et al.), Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York Press, p. 89, 1985.
- [14] 华静月等: 马铃薯科学, 1: 1, 1984.
- [15] Eckhardt, T.: *Plasmid*, 1: 584, 1978.
- [16] Kado, C. I. et al.: *J. Bact.*, 145(3): 1365, 1981.
- [17] 华静月等: 植物保护学报, 11(1): 43, 1984.
- [18] He, L. Y. et al.: *Phytopath.*, 72: 936, 1982.
- [19] He, L. Y.: *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific*, (ed. by G. J. Persley), Acinar Australia Press, p. 40, 1985.
- [20] Kelman, A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 76: 177, 1973.

INDIGENOUS PLASMID IN *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* FROM CHINA AND ITS PATHOGENICITY

Xie Daoxin Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

He Liyuan

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Fourteen of fifty-one wild strains of *Pseudomonas solanacearum* and ten of twenty "mutant" strains of *P. solanacearum* carry one or two plasmids of molecular weight from less than five to one hundred and twenty megadaltons. In wild strains Ss1, Sn1, E4, Pe2, Tm9, Z2, P3, Pol, Po3 and Pol4 and their "mutant" strains ASs1, Asn1, AE4, APe2, ATm9, AZ2, AP3, APol, APo3 and APol4 no plasmids harbor. Plasmids of wild strains M5, M6, E1 and P9 have same molecular weight as that of their respective "mutant" strains AM5, AM6, AE1 and AP9. Therefore, there was no relationship between the presence of plasmid and pathogenicity of the mentioned

strains of *P. solanacearum*. However, wild strains P7, P8, Z1, Z3, M2 and Po41 contain no plasmids, plasmids appear in their "mutant" strains AP7, AP8, AZ1, AZ3, AM2 and APo41. In this case, it is likely that plasmid is associated with pathogenicity of the strains. Studies on the homology between plasmid DNA of "mutant" strains (AP7, AP8, AZ1, AZ3, AM2 and APo41) and chromosome DNA of their wild strains are in progress.

Key words

Pseudomonas solanacearum; Indigenous plasmid; Pathogenicity

图 版 说 明

Explanation of plate

质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

大肠杆菌菌株 C83912 含有 1 个质粒 (75 Md); 其余均为植物青枯菌菌株。

P9 有 1 个质粒 (60 Md), P11 有 2 个大质粒 (60, 120 Md), M5 有 2 个质粒 (40, 5 Md)。

Agarose gel electrophoresis of plasmid DNAs extracted by Kado's procedure

Strain C83912 is an *Escherichia coli* harboring a plasmid (75 Md). All the others are strains of *Pseudomonas solanacearum*.

Strain P9 harbors a single plasmid (60 Md), strain P11 harbors two large plasmids (60, 120 Md), strain M5 harbors two plasmids (40, 5 Md).