

文章编号: 1001-1498(2002)01-0021-07

木麻黄青枯菌的根表吸附及根内增殖与其致病性关系

罗焕亮¹, 王 军², 邵志芳³, 张景宁²

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510641; 2. 华南农业大学林学院, 广东 广州 510642;

3. 广东省深圳市莲花山公园管理处, 广东 深圳 518026)

摘要: 对 3 个不同致病的青枯菌菌株和 7 个不同抗病性的木麻黄无性系苗的研究得出, 各菌株对寄主根表吸附量具有显著差异, 吸附量与致病性呈负相关; 各菌株在寄主根内的增殖量差别明显, 增殖量与致病性呈正相关。病菌脂多糖 (LPS) 对幼苗根的预处理, 可使其供体菌的吸附量减少 58.5%~97.3%, 但胞外多糖 (EPS) 对供体菌的吸附量无明显影响。洗去 EPS 和 LPS 的菌体较完整菌体对根表的吸附量减少 63.3%~74.2%。而仅洗去 EPS 的菌体对根表的吸附有所增加, 最高达 19.1%。各菌体 SDS-PAGE 电泳图谱显示出一定差异, 其中强毒菌株 601B 具有 $R_f = 0.35$ 的特异谱带。结果表明青枯菌对木麻黄的致病性与其在寄主根表的吸附情况和在根内的快速增殖具有密切关系。LPS 在此病理系统中, 起着细菌识别因子的作用, EPS 对 LPS 进行掩盖, 二者都是病菌致病性的重要因子。

关键词: 青枯菌; 木麻黄; 致病性; 脂多糖; 胞外多糖

中图分类号: S763.113

文献标识码: A

在木麻黄 (*Casuarina* spp.)-青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) 病理系统中, 病菌菌株的致病性分化已被证实^[1], 但这种分化与菌株致病机理的关系还不清楚。已知青枯菌可从伤口直接进入木麻黄根茎导管引起发病。在农作物上的研究表明, 细菌还可从无伤根表的根冠部位侵入, 随后在皮层蔓延, 最后扩展到维管束引起枯萎^[2]。因此, 病原细菌对植物根表的吸附识别及随后在根内增殖情况是青枯菌致病过程中的两个重要因素。而病原细菌产生的脂多糖 (LPS) 和胞外多糖 (EPS) 与致病作用密切相关: 它们或作为细菌识别因子, 诱发寄主产生一系列防御反应^[3], 或者堵塞导管, 影响水分输送^[4]。然而这些因素和物质在木麻黄-青枯菌病理系统中的作用还有待确定。本研究拟选用多个木麻黄无性系和青枯菌菌株, 定量地揭示病原细菌对寄主根表吸附及根内增殖与病菌致病性的关系, 同时结合 LPS 和 EPS 致病作用的分析, 探讨这一关系的分子学基础。

收稿日期: 2000-11-10

基金项目: 国家教育部归国留学人员专项基金资助(1995-1997年)

作者简介: 罗焕亮(1972-), 男, 广东海丰人, 工程师。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取7个不同抗病性的木麻黄无性系,用小枝水培法繁殖^[5],至苗龄5~6个月,高度30 cm左右时用于接种和其他处理。采用3个不同致病性的青枯菌菌株,其中601B和501B分别取自于601和501病株,SP从短枝木麻黄(*Casuarina equisetifolia* L.) (CK)病菌上分离得到。在病菌TTC培养基上^[6]培养36~48 h,挑取配制成 $1.5 \sim 1.8 \times 10^7$ 个 mL^{-1} 浓度备用。各无性系及3个菌株以接种后平均死亡率(%)作指标所测得的抗病性及致病性水平^[7]列于表1。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌抗利福平标记 用一定量95%酒精配成 $2\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ 利福平溶液,过滤灭菌后,加入肉汁胨培养基;配成含量从 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 到 $700 \mu\text{g mL}^{-1}$ 8个浓度的培养基平板,取0.1 mL细菌悬浮液(1.7×10^8 个 mL^{-1})在各平板上涂板,30℃培养72 h,筛选细菌正常生长的利福平临界浓度,3次重复。

1.2.2 根表及根内菌量检测 按王卉等^[2]的方法。同一处理取2株,截取主根距根尖切口约4 cm长的部位,无菌水冲洗3次后,用手术刀将表皮轻轻撕下,分别称重表皮及留下的根内组织,再于10 mL无菌水内用镊子捣碎,静置25 min,10倍系列稀释,用不同稀释浓度悬浮液0.1 mL在利福平培养基上涂板,30℃培养72 h,记载菌落数并换算成“菌量”(个)/根表或根内(g),换算公式:

$$Y = \frac{A \times n \times B_1}{B_2 \times C}$$

式中:Y:菌量(个)/根表或根内(g),A:菌落(个),n:稀释倍数, B_1 :分离用水量(mL), B_2 :涂板用水量(mL),C:分离用组织量(g)。

1.2.3 LPS的提取 取 1.5×10^8 个 mL^{-1} 浓度细菌悬浮液1 mL加入1 000 mL EG液体培养基,在30℃,10 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 下培养48 h,按Baker等的酚-水法LPS提取^[8]。5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,加入0.85%NaCl溶液洗涤,得约16 g湿质量,然后68℃水浴加入800 mL 90%酚,震荡20 min后冷却至10℃,5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,收集水层,再将酚层加入68℃水80 mL,5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,收集水层,两次收集的水层合并,透析3~4 d,冷干得粗提LPS,将其悬液于50 mL、50℃蒸馏水中,2 500 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心除去不溶物,取上清液。

1.2.4 EPS的提取 按Husain酒精沉淀法^[4]。挑取固体培养菌落,EG液体培养基震荡培养18 h,5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,去除菌体,培养液置55℃真空蒸发干燥至原体积的1/10,浓缩液再5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,去除残存菌体及固体杂质,加入2倍体积的无水乙醇,5℃静置12 h,至形成晶体状沉淀物,5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min收集沉淀物,上清液真空干燥至原体积,加入4倍体积无水乙醇,置5℃静置12 h,5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,收集沉淀物。

1.2.5 吸附抑制试验 参照董汉松等的方法^[9]。取木麻黄接种苗30株,切伤部分须根及主

表1 青枯菌菌株对7个木麻黄无性系接种后的平均死亡率 %

| 无性系 | 各菌株引致死亡率 | | | 平均 |
|-------------------|----------|------|------|------|
| | 601B | 501B | SP | |
| A ₁₃ | 8.0 | 6.1 | 13.6 | 9.2 |
| 601 | 62.0 | 15.0 | 13.0 | 30.0 |
| 106 | 72.0 | 70.0 | 25.2 | 55.7 |
| P ₂₀₄ | 83.6 | 62.1 | 51.3 | 65.7 |
| P ₁₀₃₃ | 89.8 | 98.0 | 28.0 | 71.9 |
| 501 | 86.0 | 98.0 | 91.0 | 91.7 |
| CK | 100.0 | 97.0 | 98.0 | 98.3 |
| 平均 | 71.6 | 63.0 | 40.7 | 60.1 |

根,用各菌株 LPS 和 EPS 分别对幼苗进行浸根处理。25 ℃ 下 30 min 后用细菌悬浮液 (3×10^8 个 mL^{-1}) 接种,以不作预处理的接种为对照。用 0.1 mol L^{-1} NaOH 溶液将菌液 pH 调至 7.0,用水浴锅将菌液温度恒定 31~33 ℃,接种空间温度 25~34 ℃。测定幼苗接种 1 h 和 48 h 后青枯菌对根表的吸附量。吸附抑制效应应以吸附抑制率,即比对照吸附量减少的百分比表示,设 3 个重复,结果取平均值。

1.2.6 无 EPS 及无 LPS 和 EPS 的菌体悬浮液制备 按董汉松等的方法^[9]。用 0.02 mmol , pH7.5 的磷酸缓冲液 (PB) 浸泡菌苔制成细菌悬浮液, 6000 r min^{-1} 离心 30 min,清洗 3 次,最后一次沉降的菌体按等体积加 PB 悬浮液,经旋涡混合器,充分混合后用灭菌玻棒蘸少许浓菌液涂于灭菌滤纸上,滴少许茴香醛——硫酸试剂^[10],直到浸润圈内无颜色反应表示不含 EPS 为止。将洗去 EPS 的菌体沉降物用 LPS 清洗液 (内含 Tris-HCl 10 mmol ; EDTA, Na 1 mmol ; NaCl 的质量浓度 5 g L^{-1})^[11],浸泡 15 min,反复 3 次,用 PB 制成浓菌液,按上述同样方法测定颜色反应,直到涂抹处不显色表示菌体 LPS 为止,洗去 EPS 及 LPS 的菌体最后用 PB 悬浮并调节含菌量,同时经平板生长测定证明菌体存活。

1.2.7 LPS 的 SDS-PAGE 性质 按尹国才等的方法^[12]。胶厚 1 mm,分离浓度为 12%,样品胶浓度为 4.0%,均含 0.1% SDS 和 4 mol 的尿素。取 LPS 溶液 200 μL 加入 100 μL 样品处理液 (62.5 mmol Tris-HCl, pH8.0; 2% SDS; 5% β -巯基乙醇; 10% 甘油; 20% 蔗糖; 0.2% 溴酚兰)。沸水浴 5 min,每样品上样 50 μL ,电泳电流强度 20 mA,待溴酚兰标记在分离胶泳动 10 cm 即可。取出胶板,用银氨染色法染色。3 次重复。

2 结果

2.1 细菌抗利福平标记

各菌株在利福平培养基上的生长情况显示,利福平培养基浓度为 $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 时,3 个菌株都形成较小且分散的菌落 (表 2),故将此浓度培养基上的菌落进行扩大培养并保存,作为抗利福平菌株,并将此浓度作为检测青枯菌量的标准培养基浓度。

表 2 3 个青枯菌菌株在不同浓度的利福平培养基上的生长情况

| 菌株 | 利福平浓度 | | | | | | | $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------|
| | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | |
| 601B | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + | + | - |
| 501B | +++ | +++ | ++ | ++ | + | + | - | - |
| SP | +++ | +++ | ++ | ++ | + | + | - | - |

注:+++ 生长快速,菌落铺满平板,++ 菌落连接成片,+ 菌落分散,较小可计数,- 细菌不生长。

表 3 木麻黄无性系接种青枯菌 1 h 和 48 h 后根表的吸附菌量

| 无性系 | 时间 /h | 各菌株的吸附量/个 g^{-1} | | | |
|-------------------|-------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 601B | 501B | SP | 平均 |
| A ₁₃ | 1 | 3.21×10^6 | 8.65×10^6 | 7.36×10^7 | 2.85×10^7 |
| | 48 | 4.45×10^6 | 1.20×10^7 | 9.75×10^7 | 3.80×10^7 |
| 601 | 1 | 8.65×10^5 | 9.20×10^6 | 1.25×10^8 | 4.50×10^7 |
| | 48 | 4.85×10^6 | 8.55×10^6 | 8.65×10^7 | 3.33×10^7 |
| 106 | 1 | 9.30×10^5 | 1.50×10^7 | 4.63×10^7 | 2.07×10^7 |
| | 48 | 7.85×10^5 | 2.53×10^7 | 7.74×10^7 | 3.45×10^7 |
| P ₂₀₄ | 1 | 6.53×10^5 | 9.80×10^5 | 2.74×10^8 | 9.18×10^7 |
| | 48 | 2.03×10^6 | 6.74×10^6 | 3.50×10^8 | 1.20×10^8 |
| P ₁₀₃₃ | 1 | 4.15×10^5 | 6.31×10^6 | 5.21×10^8 | 1.76×10^8 |
| | 48 | 6.60×10^5 | 8.50×10^6 | 4.06×10^8 | 1.38×10^8 |
| 501 | 1 | 5.41×10^5 | 8.48×10^6 | 5.38×10^8 | 1.82×10^8 |
| | 48 | 7.40×10^5 | 7.35×10^6 | 2.70×10^8 | 9.27×10^7 |
| CK | 1 | 4.42×10^5 | 7.95×10^6 | 8.85×10^8 | 2.98×10^8 |
| | 48 | 8.50×10^5 | 9.48×10^6 | 8.35×10^8 | 2.82×10^8 |
| 平均 | 1 | 1.01×10^6 | 8.08×10^6 | 3.52×10^8 | |
| | 48 | 2.05×10^6 | 1.11×10^7 | 3.03×10^8 | |

2.2 青枯菌对木麻黄根表的吸附

各菌株对木麻黄无性系根表的吸附量列于表3。方差分析显示接种1 h和48 h后的吸附量差异在菌株间分别达到极显著($p < 0.01$)和显著($p < 0.05$)。对各无性系吸附量的平均数值显示,致病性弱的菌株,吸附量大;致病性与吸附量的相关系数(R)在两个测定时间均为-0.95,但吸附量在各无性系之间无明显差异。

2.3 青枯菌在木麻黄根内的增殖

各菌株在木麻黄无性系根内的增殖见表4。接种24 h,3菌株在各无性系的根内菌量已经显示出差别。随着时间的增加,到接种96 h,这种差别进一步扩大,致病性强的菌株的菌量增殖大大快于致病性弱的菌株。601B、501B和SP接种后72 h在所有无性系上的增殖平均值分别为 1.55×10^7 个 $\cdot g^{-1}$ 、 4.4×10^6 个 $\cdot g^{-1}$ 和 2.9×10^5 个 $\cdot g^{-1}$,与致病性呈高度相关($r = 0.90$)。同一菌株在不同无性系上的增殖量不同,在高抗无性系根内的菌量增殖大大低于在高感无性系内的增殖,如501B在CK根内96 h的菌量约为A₁₃根内菌量的700倍。但菌株在各无性系上的增殖模式类似。

2.4 青枯菌LPS和EPS对病菌的吸附抑制效应

LPS预处理木麻黄根系对随后接种菌吸附量的影响如表5所示,除来自501B的LPS预处理601后对501B的吸附量有所提高及自SP的LPS预处理501对SP的吸附量没有明显影响以

表4 木麻黄无性系接种青枯菌24 96 h后在根内增殖的菌量

| 无性系 | 菌株 | 根内菌量/(个 $\cdot g^{-1}$) | | | |
|-------------------|------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| A ₁₃ | 601B | 1.20×10^4 | 2.75×10^4 | 6.60×10^4 | 3.50×10^5 |
| | 501B | 8.50×10^3 | 1.10×10^4 | 2.35×10^4 | 8.60×10^4 |
| | SP | 8.20×10^3 | 9.55×10^3 | 1.35×10^4 | 3.30×10^4 |
| 601 | 601B | 1.75×10^4 | 3.43×10^4 | 1.05×10^5 | 6.55×10^5 |
| | 501B | 7.40×10^3 | 1.20×10^4 | 1.95×10^4 | 1.05×10^5 |
| | SP | 9.74×10^3 | 8.55×10^3 | 2.30×10^4 | 3.75×10^4 |
| P ₁₀₃₃ | 601B | 2.50×10^4 | 7.52×10^4 | 3.75×10^5 | 2.33×10^6 |
| | 501B | 1.32×10^4 | 2.85×10^4 | 8.85×10^4 | 5.35×10^5 |
| | SP | 9.85×10^3 | 1.25×10^4 | 3.50×10^4 | 8.80×10^4 |
| 501 | 601B | 7.35×10^5 | 4.32×10^6 | 3.15×10^7 | 2.65×10^8 |
| | 501B | 8.64×10^4 | 2.66×10^5 | 8.25×10^6 | 3.35×10^7 |
| | SP | 2.24×10^4 | 4.75×10^4 | 2.20×10^5 | 1.53×10^7 |
| CK | 601B | 8.50×10^5 | 5.63×10^6 | 4.55×10^7 | 3.85×10^8 |
| | 501B | 9.35×10^4 | 3.05×10^5 | 1.36×10^7 | 6.34×10^7 |
| | SP | 3.74×10^4 | 8.45×10^4 | 1.16×10^6 | 2.35×10^7 |

表5 LPS预处理过的木麻黄无性系根表对病菌的吸附量

| LPS来源 | 无性系 | LPS供体菌的吸附量/(个 $\cdot g^{-1}$) 吸附抑制率/% | | |
|-------|-----|--|--------------------|--------|
| | | 预处理 | 对照 | 抑制率/% |
| 601B | 601 | 5.49×10^5 | 8.65×10^5 | 73.5 |
| | 501 | 3.64×10^5 | 5.47×10^5 | 33.4 |
| | CK | 3.21×10^5 | 4.42×10^5 | 27.4 |
| 501B | 601 | 1.12×10^7 | 9.20×10^6 | - 21.6 |
| | 501 | 2.29×10^5 | 8.48×10^6 | 97.3 |
| | CK | 4.09×10^6 | 7.95×10^6 | 48.5 |
| SP | 601 | 5.19×10^7 | 1.25×10^8 | 58.5 |
| | 501 | 5.36×10^8 | 5.38×10^8 | 0.0 |
| | CK | 2.80×10^8 | 8.85×10^8 | 68.4 |

表6 青枯菌EPS预处理过的木麻黄根表对病菌的吸附量

| EPS来源 | 无性系 | EPS供体菌的吸附量/(个 $\cdot g^{-1}$) 吸附抑制率/% | | |
|-------|-----|--|--------------------|---------|
| | | 预处理 | 对照 | 抑制率/% |
| 601B | 601 | 7.93×10^5 | 8.65×10^5 | 8.32 |
| | 501 | 6.22×10^5 | 5.47×10^5 | - 13.70 |
| | CK | 4.27×10^5 | 4.42×10^5 | 3.39 |
| 501B | 601 | 8.52×10^6 | 9.20×10^6 | 7.39 |
| | 501 | 8.75×10^5 | 8.48×10^6 | - 3.18 |
| | CK | 6.84×10^6 | 7.95×10^6 | 13.90 |
| SP | 601 | 1.32×10^7 | 1.25×10^8 | - 5.60 |
| | 501 | 4.85×10^8 | 5.38×10^8 | 9.85 |
| | CK | 7.50×10^8 | 8.85×10^8 | 15.30 |

外,其余各组合中 LPS 对根的预处理均使供体病原菌对根表的吸附量明显下降,而且用 LPS 处理其供体菌来源无性系,对该供体菌的吸附抑制效应尤为明显,如 601B 之 LPS 处理 601,对 601B 有 73.5% 的吸附抑制率,501B 之 LPS 预处理 501,对 501B 的吸附抑制更高达 97.3%。但各菌株提取之 EPS 对寄主根系预处理后,对接种菌并无明显的吸附抑制或增强效应(表 6)。

2.5 洗去 EPS 及洗去 EPS 和 LPS 的菌体对木麻黄根表的吸附

各菌株首先洗去 EPS,成为无 EPS(但含 LPS)菌体,进一步洗脱 LPS,便成为 EPS 和 LPS 俱无的菌体。二者相对于完整菌体对木麻黄根表的吸附如表 7 所示。无 EPS 菌体,除了 501B 对 601 和 CK 的吸附量略有下降以外,其余都较完整细菌有不同程度的增加, EPS 和 LPS 都被洗去的菌体对各无性系的吸附量较完整菌体都有大幅度的下降,最多的达到 84.3%。

表 7 无 EPS 和 LPS 的青枯菌菌体对木麻黄无性系根表的吸附量

| 菌株 | 无性系 | 菌体的吸附量/(个 g ⁻¹) | | | 吸附增长率/% | |
|------|-----|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|-------------|
| | | 无 EPS | 无 EPS 和 LPS | 完整菌体 | 无 EPS | 无 EPS 和 LPS |
| 601B | 601 | 1.03 ×10 ⁶ | 2.23 ×10 ⁵ | 8.65 ×10 ⁵ | 19.10 | - 74.20 |
| | 501 | 5.85 ×10 ⁵ | 3.70 ×10 ⁵ | 5.47 ×10 ⁵ | 6.90 | - 32.40 |
| | CK | 5.13 ×10 ⁵ | 3.15 ×10 ⁵ | 4.42 ×10 ⁵ | 16.10 | - 28.70 |
| 501B | 601 | 8.86 ×10 ⁶ | 8.74 ×10 ⁶ | 9.20 ×10 ⁶ | - 3.70 | - 5.00 |
| | 501 | 9.27 ×10 ⁶ | 2.53 ×10 ⁶ | 8.48 ×10 ⁶ | 9.32 | - 70.20 |
| | CK | 7.35 ×10 ⁶ | 2.64 ×10 ⁶ | 7.95 ×10 ⁶ | - 7.55 | - 66.00 |
| SP | 601 | 1.30 ×10 ⁸ | 6.32 ×10 ⁷ | 1.25 ×10 ⁸ | 4.00 | - 49.40 |
| | 501 | 5.43 ×10 ⁸ | 8.47 ×10 ⁷ | 5.38 ×10 ⁸ | 0.93 | - 84.30 |
| | CK | 9.90 ×10 ⁸ | 3.25 ×10 ⁸ | 8.85 ×10 ⁸ | 11.90 | - 63.30 |

注:吸附增长率 = (处理菌体吸附量 - 完整菌体吸附量) / 完整菌体吸附量 ×100%

2.6 LPS 的 SDS-PAGE 性质

对 3 菌株 LPS 的 SDS-PAGE 分析表明,3 种 LPS 均具有 Rf = 0.15 谱带,此谱带宽而色深。同时,还有 Rf = 0.10 谱带。501B 的谱带颜色较深,另外,601B 的 LPS 还产生 Rf = 0.35 的特异谱带,带宽但色浅(图 1)。

3 结论与讨论

(1)青枯菌对木麻黄根表的吸附与其致病性的关系:青枯菌各菌株对木麻黄无性系根表吸附量的显著差异,而无性系间对同一菌株吸附量的无明显区别提示,细菌吸附量的多少主要是由病菌,而不是由寄主决定的。吸附量随菌株致病性的降低而呈上升的态势表明,弱毒菌株对寄主根表有较大面积或较多位点的识别与结合。但这种较强的识别结合所导致的是寄主较低的侵染死亡率,由此可以推测这种识别为非亲和性识别,它诱发出寄主的抗性反应,识别吸附量越大的菌株,所诱发的抵抗反应也越强,因此最终引致的病害严重度也较低,自

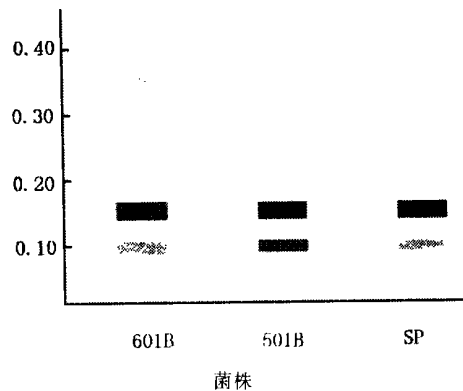


图 1 青枯菌 3 菌株 LPS 的 SDS - PAGE 图谱

身也就成为弱毒菌株。而强毒菌株则相反,其较低的识别吸附诱发不出寄主有效的抵抗,因而致病性可能趋强。当然这一假设还有待实验的进一步验证。

虽然致病性强的菌株吸附量较小,但单以病菌吸附量并不能判断具体菌株与无性系组合所产生的最后病害结果。在本试验中,菌株与无性系组合上的吸附量事实上与病害严重程度是没有相关关系的,也说明单靠吸附量影响的病菌致病性对苗木的最终程度的影响是有限的。

(2) 青枯菌在木麻黄根内的增殖与其致病性的关系:各菌株接种后,其在木麻黄根内组织中的增殖与所产生的苗木死亡率高度相关,这说明病菌侵入后在寄主体内迅速增殖和扩展是其产生较高致病性的重要原因。各菌株与无性系组合中苗木死亡率与病菌增殖量仍呈一定程度的正相关,进一步说明由增殖所贡献的病菌致病性对于苗木最终病害严重度具有较大影响。另外无性系的抗性水平与菌株增殖量呈负相关关系,抗性强的无性系对病菌增殖有较强的抑制能力。

(3) 青枯菌 LPS 及 EPS 与其致病性的关系:LPS 预处理寄主根表后对后来接种菌吸附量的显著抑制,说明 LPS 是青枯菌对木麻黄根表进行识别和吸附的重要物质。它可能预先占据根表特定的结合位点,后来的接种菌便很难再进行吸附。而洗去 LPS 及 EPS 菌体对根表吸附量大幅度降低进一步证明这一结论的可靠性。EPS 则并不起病原菌识别的作用,因为洗去 EPS 但 LPS 菌体的吸附量还有所增加,从另外一个角度看,EPS 对 LPS 的识别吸附还具有掩盖或阻止作用。例如洗去 EPS 的 601B 对 3 个无性系的吸附量较完整菌平均增加了 12%。前述致病性强的菌株对寄主根表吸附量较少的现象,是否是因为其 EPS 对 LPS 的掩盖或阻止作用较强而引起,是值得探究的。由于 EPS 可以削弱 LPS 引起的病菌对寄主的非亲和性识别,如果 3(1) 的假设被证实成立的话,那么就有利于病菌回避寄主的抵抗反应,从而对菌株的致病性是有帮助的。

LPS 对木麻黄无性系的识别还具有一定的寄主选择性。这表现在 LPS 预处理其供体菌来源无性系对供体菌吸附抑制较其他菌株强烈(表 5),洗去 EPS 但保留 LPS 的菌体,对菌体来源无性系的吸附量增加最多,以及洗去 EPS 和 LPS 的菌体(SP 除外)对菌体来源无性系吸附量降低最大(表 7)。这表明各 LPS 的组合或结构可能有一定变异以对应来自各自特定的无性系,3 菌株 LPS SDS-PAGE 图谱初步证实了这一点,其中 601B 的变异较大。这是青枯菌菌株致病性分化的一个物证原因。

需要指出的是本试验仅探讨了 LPS 和 EPS 在青枯菌与木麻黄根表接触期中的吸附变化及其与菌株致病性的关系。进一步研究 LPS 和 EPS 在青枯菌侵入寄主根内后所发生的作用与变化,以及它们与病害严重度的关系有助于更完整地了解 LPS 和 EPS 的致病作用。

参考文献:

- [1] 王军. 木麻黄对青枯菌的水平抗性及垂直抗性研究[J]. 林业科学, 1997, 33(5): 427-431
- [2] 王卉, 任欣正. 青枯菌(*Pseudomonas solanacearum*) 在番茄抗、感病品种根部的吸附、侵入和繁殖[J]. 植物病理学报, 1993, 23(2): 143-150
- [3] Ryan C A, Farmer E E. Gene expression in *Nicotiana tabacum* in response to compatible and incompatible isolates of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annu Rev Plant Physiol Mbl Biol, 1991, 41: 651
- [4] Husain A, Kelman A. Relation of slime production to the mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Phytopathology, 1958, 48: 155-165

- [5] 梁子超,岑炳沾. 木麻黄抗青枯病植株小枝水培繁殖法[J]. 林业科学,1982,18(2):199-202
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1997,371
- [7] 陈炳铨,张景宁. 木麻黄无性系对青枯菌抗性及菌株变异初探[J]. 广东林业科技,1995,11(2):35-36
- [8] Backer C J, Neilson M J, Sequeira L. Chemical characterization of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47(5):1096-1100
- [9] 董汉讼,王金生,方中达. 菌体脂多糖在大白菜软腐病欧文氏菌对寄主根表吸附中的作用[J]. 微生物学报,1993,33(2):144-150
- [10] 张龙翔. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1994.14-15
- [11] Whatley M N, Hunter N, Cantrell M A. Lipopolysaccharide composition of the will pathogen. *Pseudomonas solanacearum* correlation with the hypersensitive response in tobacco[J]. Plant Physio, 1980, 65:557-559
- [12] 尹国才,李俐. 四株不同毒力的土拉弗氏菌脂多糖的 SDS-PAGE 图谱的初步观察[J]. 中国人兽共患杂志,1993,9(6):7-9

The Relationship between Pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* and Its Adsorption on the Root Surfaces and Propagation inside the Roots of *Casuarina* Clone Seedling

LUO Huan-liang¹, WANG Jun², SHAO Zhi-fang³, ZHANG Jing-ning²

(1. Food & Biological College, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong, China;

2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China;

3. Shenzhen Lianhuashan Park, Shenzhen 518026, Guangdong, China)

Abstract: The experiments conducted on 3 isolates of *P. solanacearum* and 7 *Casuarina* clones revealed that the adsorption of bacterial isolates to the host root surfaces differed significantly, a negative correlation between the adsorption amount and the pathogenicity existed; The propagation of 3 isolates within the roots also varied greatly, and a strongly positive correlation existed between the propagation amount and pathogenicity. The pretreated *Casuarina* ramets with LPS sharply reduced the adsorption of subsequently inoculated bacteria by 58.5%–97.3%, but EPS pretreated ramets did not show any apparent change. The bacterial cells free of both EPS and LPS lost their adsorption amount by 63.3%–74.2% in comparison to the intact bacteria. However, the EPS-free only bacteria slightly increased their adsorption up to 19.1%. Electrophoresis pattern of 3 isolates through SDS-PAGE also showed difference with a special Rf = 0.35 band occurred for the most virulent isolate 601B. It is concluded that the pathogenicity of *P. solanacearum* to *Casuarina* is associated with its adsorption amount on the host root surfaces and especially the rapid propagation capacity inside the roots. LPS plays a role of bacterial cognon in the recognition between the pathogen and host while EPS covers or inhibites this process of LPS. Both LPS and EPS are all important factors that affect the pathogenicity of *P. solanacearum*.

Key words: *Pseudomonas solanacearum*; *Casuarina*; pathogenicity; LPS; EPS