

文章编号: 1001-1498(2007)02-0176-05

# 胞外多糖和脂多糖在青枯菌对尾巨桉根部 吸附和侵入过程中的作用研究

王胜坤<sup>1</sup>, 王 军<sup>2</sup>, 徐大平<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 华南农业大学林学院, 广东 广州 510640)

**摘要:**通过测定青枯菌的根表吸附量和根部侵入量,研究了胞外多糖(EPS)和脂多糖(LPS)在青枯菌对尾巨桉根部吸附和侵入过程中的作用。结果表明:在接种青枯菌的6 h内,EPS处理后尾巨桉根部青枯菌GN1和93B的吸附量和侵入量明显升高,而LPS处理后尾巨桉根部GN1和93B的吸附量和侵入量都明显下降;无EPS菌株的根表吸附量和根部侵入量都明显降低,无EPS及LPS菌株的根表吸附量和根部侵入量亦有所下降,但没有无EPS菌株下降明显;EPS具有促进青枯菌对尾巨桉根部吸附和侵入的作用,LPS则具有抑制作用。

**关键词:**青枯菌;胞外多糖;脂多糖;尾巨桉;吸附;侵入

中图分类号: S792.39 文献标识码: A

## Study on the Role of EPS and LPS of *Ralstonia solanacearum* in *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* Root Adsorption and Ingression

WANG Sheng-kun<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, XU Da-ping<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

**Abstract:** In this experiment, the role of extracellular polysaccharides (EPS) and lipopolysaccharides (LPS) were studied by detecting the number of *Ralstonia solanacearum* in *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* root adsorption and ingression. The results showed that the number of GN1 and 93B in adsorption and ingression increased obviously when the roots were treated with EPS, while decreased evidently with LPS in 6 h after inoculation. The number of bacteria washed off EPS decreased evidently in adsorption and ingression to the roots. In comparison, the number of bacteria washed off both EPS and LPS had the same decreasing tendency, but not so evident as the former. These results demonstrated that EPS played a role in enhancing the adsorption and ingression of *R. solanacearum* to the roots of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*, while LPS had inhibitory effect.

**Key words:** *Ralstonia solanacearum*; EPS; LPS; *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*; adsorption; ingression

桉树青枯病是由青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi *et al.*)引起的一种系统性土壤传染病害,给桉树生产带来很大危

害。青枯菌主要从根部侵入,其中,对寄主根部的吸附侵入和根内定殖扩散是其侵染过程的两个重要环节,吸附侵入是其成功侵染的必要条件。前人曾就

收稿日期: 2006-09-22

基金项目: 国家科技攻关项目“南方主要速生阔叶树种新品种选育及栽培技术(2004BA515B02)”;科技部成果转化项目“南方主要速生阔叶树种新品种及高效培育技术中试”;国家自然科学基金“青枯菌对桉树的识别侵染及其生化机制研究(30471395)”

作者简介: 王胜坤(1976—),男,中国林业科学研究院博士生,主要从事植物病理学研究。

\*通讯作者: 徐大平,男,研究员,博士生导师。

青枯菌对番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)<sup>[1,2]</sup>和木麻黄 (*Casuarina* spp.)<sup>[3]</sup>的吸附识别与侵入机制进行了研究,认为胞外多糖 (Extracellular Polysaccharides, EPS)和脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS)等致病因子在病菌与寄主吸附识别过程中发挥着一定的作用,在其它病原与寄主相互识别过程中的作用也有相关报道<sup>[3,4]</sup>;而对桉树青枯病的研究,目前主要集中在病害的发生规律和防治方面<sup>[5~7]</sup>,对病菌的吸附识别和侵染机制及致病因子的作用还少有涉及<sup>[8]</sup>。本文通过测定青枯菌强弱两个菌株接种 EPS 和 LPS 处理尾巨桉苗后的吸附量和侵入量,以及无 EPS 和无 EPS 及 LPS 菌株接种尾巨桉苗的吸附量和侵入量,探讨了 EPS 和 LPS 在青枯菌根部吸附侵入中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌种 选用从桉树分离的强弱两青枯菌菌株 GN1 (强毒菌株)和 93B (弱毒菌株),由华南农业大学林学院提供。

1.1.2 试验用苗 由中国林业科学研究院热带林业研究所组培中心提供的尾巨桉 196 (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake  $\times$  *E. grandis* W. Hill ex Maiden, 感病品种)组培苗,高度约 15~25 cm,除去袋土,水培 15~20 d,待新根长出后使用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种制备 将供试菌株 GN1 和 93B 在 TTC 培养基<sup>[9]</sup>上 30℃ 培养 36~48 h,用无菌水配制成  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的细菌悬浮液,血球计数板计数,备用。

1.2.2 胞外多糖 (EPS)和脂多糖 (LPS)提取 利用培养后的 GN1 和 93B 菌株分别进行 EPS 和 LPS 提取,方法如下:

EPS 提取:从 TTC 平板上挑取单菌落,用无菌水配成浓度为  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的菌悬液,取 5 mL 加入 1 L 营养肉汤中,30℃、150 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 振荡培养 48 h 后,按酒精沉淀法进行 EPS 提取<sup>[10]</sup>,收集沉淀物冻干得 EPS 粗提物。使用时将粗提取的 EPS 溶于 50 mL 蒸馏水中,5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心除去不溶物,取上清液备用。

LPS 提取:从 TTC 平板上挑取单菌落,用无菌水配成浓度为  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的菌悬液,取 5 mL 加入 1 L 营养肉汤中,30℃、150 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 振荡培养 48 h 后,按酚-水法进行 LPS 提取<sup>[11]</sup>,收集沉淀物冻

干得 LPS 粗提物。使用时将粗提取的 LPS 溶于 50 mL 蒸馏水中,5 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心除去不溶物,取上清液备用。

### 1.2.3 无 EPS 和无 EPS 及 LPS 菌体悬浮液制备

无 EPS 菌体悬浮液制备:参考董汉松等<sup>[4]</sup>人的方法。用 0.02 mmol, pH 值 7.5 的磷酸缓冲液 (PB) 洗脱菌苔制成细菌悬浮液,6 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 30 min,清洗 3 次,最后 1 次沉降的菌体按等体积加 PB 缓冲液,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<sup>[12]</sup>,直到浸润圈内无颜色表明菌体不含 EPS 为止,用 PB 悬浮并调节含菌量至  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,备用。

无 EPS 及 LPS 菌体悬浮液制备:将洗去 EPS 的菌体沉降物用 LPS 清洗液 (内含 Tris-HCl 10 mmol, EDTA-2Na 1 mmol, NaCl 5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)<sup>[13]</sup> 浸泡 15 min,反复 3 次,用 PB 制成浓菌液,按上述方法测定颜色反应,直到涂抹处不显色表示菌体无 LPS 为止,洗去 EPS 及 LPS 的菌体最后用 PB 悬浮并调节含菌量至  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,备用,同时经平板生长测定证明菌体存活。

### 1.2.4 接种处理和测定

EPS 和 LPS 处理尾巨桉苗:取尾巨桉水培苗,分别用 EPS 和 LPS 处理尾巨桉根部 0.5 h,以无菌水处理根部作对照,然后用浓度为  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的相应青枯菌悬浮液浸根接种。

无 EPS 和无 EPS 及 LPS 菌体处理尾巨桉苗:取尾巨桉水培苗,分别用浓度为  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的无 EPS 和无 EPS 及 LPS 青枯菌悬浮液浸根接种,以浓度为  $3 \times 10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的未做处理菌株直接接种做对照。

以上处理分别于接种开始后 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 h 取样,同一处理的植株取 5 株,每株取 1 条根,截取 2 cm 左右根尖,测定细菌的根表吸附量和根部侵入量,3 次重复,结果取平均值。

根表吸附量测定:将截取的根尖浸入 10 mL 无菌水中,涤荡 1 min 后,取出根尖,用血球计数板计数悬浮液中的细菌数量,即为青枯菌的根表吸附量。

根部侵入量测定:将吸附悬浮液中取出的根尖,灭菌滤纸吸干,称质量,放入 10 mL 无菌水中,磨碎,用血球计数板计数悬浮液中的细菌数量,即为青枯菌的根部侵入量。

细菌浓度 (个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) = 80 小格内细菌总数 (个) / 80  $\times$  400  $\times$  10 000  $\times$  稀释倍数 (mL)

吸附或侵入量 (个  $\cdot$  g<sup>-1</sup>) = 细菌总数 (个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)  $\times$  分离用水量 (mL) / 根质量 (g)

## 2 结果与分析

### 2.1 EPS对青枯菌根表吸附量和根部侵入量的影响

由图 1、2 可看出:两菌株直接接种尾巨桉苗后, 93B 与 GN1 的根表吸附量没有明显差异, 93B 的根部侵入量略高于 GN1; EPS 处理的尾巨桉苗, 随着接种时间的延长, 93B 和 GN1 的根表吸附量和侵入量总体都呈上升趋势, 93B 的吸附量和侵入量与 GN1 的无太大差异; 在整个测定过程中, 无论强毒弱毒菌株, EPS 处理的尾巨桉苗, 其吸附量和侵入量都高于未经 EPS 处理的尾巨桉苗, 但作用效果有所不同, 93B + EPS 处理的尾巨桉苗, 其吸附量和侵入量略高于对照组, 而 GN1 + EPS 处理的尾巨桉苗, 其吸附量和侵入量都明显高于对照组。由此可见: EPS 可促进青枯菌对根部的吸附和侵入, 而且促进程度会因菌株的不同而有一定差异, 强毒菌株 GN1 的 EPS 对该菌株的吸附、侵入有明显的促进作用, 弱毒菌株 93B 的 EPS 促进作用不及 GN1 的明显。

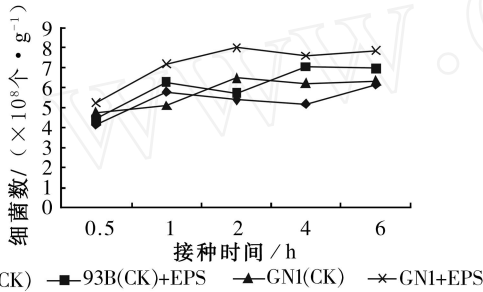


图 1 EPS对青枯菌的根表吸附量的影响

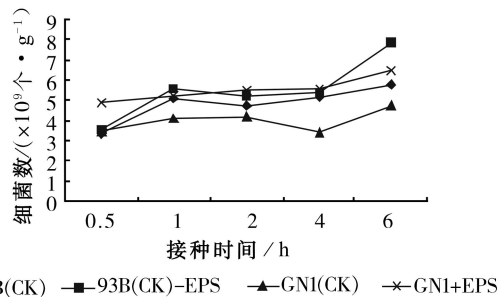


图 2 EPS对青枯菌的根部侵入量的影响

### 2.2 LPS对青枯菌根表吸附量和根部侵入量的影响

由图 3、4 可看出: 两菌株直接接种尾巨桉苗后, 在接种的 60 h 内 93B 的根表吸附量和根部侵入量基本都高于 GN1 的, 而在 20 h 时其吸附量和侵入量略低于 GN1; GN1 + LPS 处理的尾巨桉苗, 吸附量

和侵入量明显低于对照, 93B + LPS 的测定结果与 GN1 的相似; LPS 处理后, 93B 的根表吸附量降低程度大于 GN1 的, 而根部侵入量降低程度不及 GN1 的明显。由此可见: LPS 对青枯菌的根表吸附和根部侵入都有一定的抑制作用, 使其根表吸附量和根部侵入量都有不同程度的下降, 而对不同毒性菌株吸附和侵入的影响有所不同。

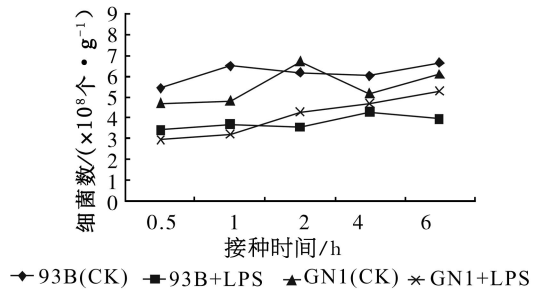


图 3 LPS对青枯菌的根表吸附量的影响

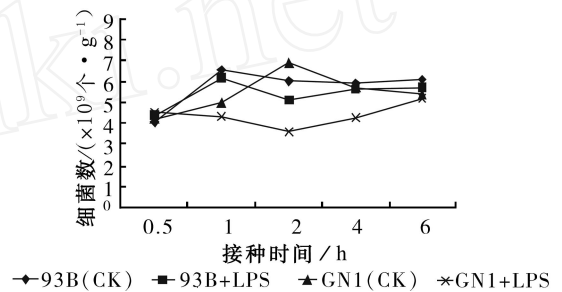


图 4 LPS对青枯菌的根部侵入量的影响

### 2.3 无 EPS 菌株的根表吸附量和根部侵入量

由图 5、6 可看出: 洗去 EPS 的青枯菌菌株接种尾巨桉根部后, 与对照相比, 93B 和 GN1 的吸附量和侵入量都有所下降, 而吸附量下降更明显; 强弱两菌株相比, 93B 的根表吸附量下降程度比 GN1 的明显, 而根部侵入量的下降程度与 GN1 的没有明显区别。可见, 洗去 EPS 后, 青枯菌对尾巨桉根部的吸附和侵入能力都受到一定程度的抑制。

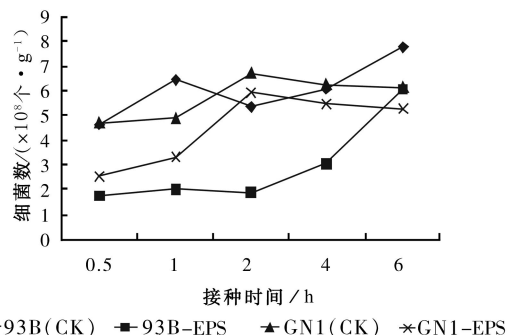


图 5 无 EPS 菌株的根表吸附量

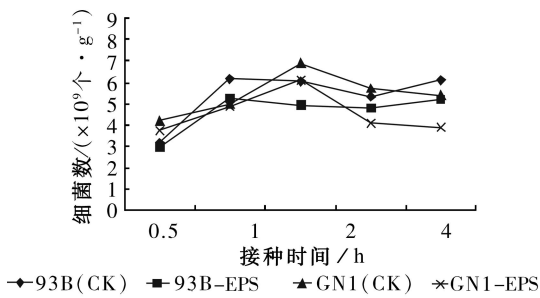


图 6 无 EPS 菌株的根部侵入量

#### 2.4 无 EPS 和 LPS 菌株根表吸附量和根部侵入量

由图 7、8 可看出:无 EPS 和 LPS 菌株接种尾巨桉根部后,与对照相比,强毒菌株 GN1 的根表吸附量略有降低,弱毒菌株 93B 在接种的 20 h 前和 40 h 后吸附量明显低于对照,在 20 h 到 40 h 时间内吸附量下降不明显;两菌株的根部侵入量在接种时间内变化不大。结果表明,洗去 EPS 及 LPS 后,强毒菌株 GN1 的吸附和侵入能力略有降低,弱毒菌株 93B 的吸附能力降低较多,侵入能力基本没有影响。

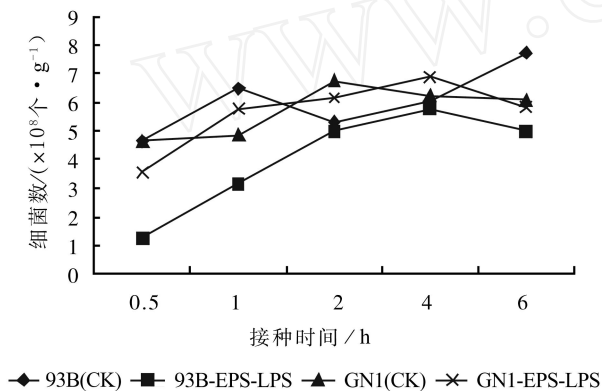


图 7 无 EPS 和 LPS 菌株的根表吸附量

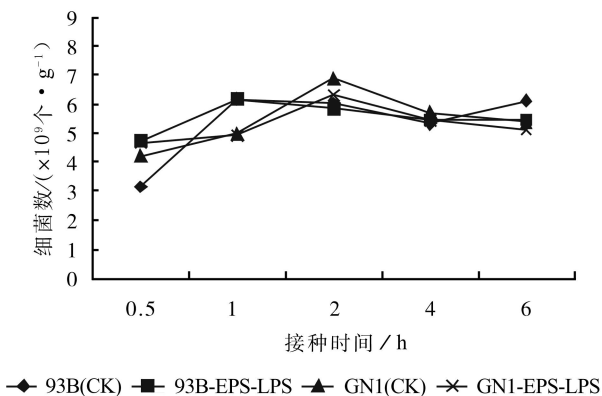


图 8 无 EPS 和 LPS 菌株的根部侵入量

### 3 结论与讨论

EPS 是植物病原细菌产生的多种高分子物质,包被在细菌细胞表面或以可流动的粘液形式存在于细菌周围,它能够促进植物病原细菌对植物细胞表面的吸附,有利于细菌在植物组织中运动;掩盖细菌的 LPS 和鞭毛等表面结构免受寄主防卫机制的识别和进攻<sup>[14~16]</sup>。本研究表明, EPS 可增强青枯菌对尾巨桉的根表吸附和根部侵入能力,尤其是强毒菌株表现更明显, GN1 无论是在平板还是在液体培养基中都能产生比 93B 更多的 EPS,因此 EPS 处理尾巨桉根部后,对 GN1 的吸附和侵入促进作用更为明显;而洗去 EPS 后,强弱毒株的根表吸附量和根部侵入量都有不同程度的下降,进一步验证了 EPS 在青枯菌对尾巨桉根部吸附和侵入过程中的作用。有研究表明,青枯菌 EPS 缺失突变体菌株在番茄根部侵染时,基本失去致病力和侵染力,同时诱导番茄根部组织产生抗病反应;相反,致病力菌株则产生大量的酸性 EPS,既可侵染又可增殖<sup>[16]</sup>。在细菌侵入定殖和系统扩散过程中,青枯菌产生的 EPS 可保护和促进细菌成功侵入,并在寄主组织内大量繁殖,而弱致病力菌株可能是由于 EPS 产生量少而影响了其在寄主组织内侵入和扩展的能力,本试验结果也印证了这一点。

LPS 作为革兰氏阴性细菌外膜不可或缺的一部分,处理植物后,可能占据了植物细胞上的某些结合位点,抑制了再接种的含 LPS 菌体对植物细胞的吸附识别,导致吸附量显著降低<sup>[17]</sup>;也可能是诱导桉树根部组织产生抗性,激发寄主的防卫反应,从而抑制病菌的吸附和扩散。Newman 等<sup>[18]</sup>认为 LPS 能够使细菌避开植物产生的抗菌物质的作用而有利于植物病原细菌对寄主的侵染,相反, LPS 亦可被植物识别而直接引起一些防卫反应,使植物组织对后续植物病原细菌的侵染产生更为敏感或更强的防卫反应<sup>[19]</sup>,使得细菌的吸附和定殖更为困难。本试验结果显示, LPS 处理尾巨桉根部后再接种青枯菌,可明显抑制青枯菌的吸附和侵入,可能是由于 LPS 引起的植物防卫反应造成的;在接种后期, LPS 处理的抑制作用逐渐减弱,强致病性菌株的这种作用减弱更快,可能是细菌本身具有的能够克服因 LPS 被寄主识别而产生防卫反应的机制开始发挥作用,更多的细菌成功吸附和定殖在寄主细胞表面,从而使其成功地侵染寄主成为可能。

用洗去 EPS 的菌株接种尾巨桉苗,强毒和弱毒菌株的根表吸附量和根部侵入量都明显降低,吸附量下

降更明显,其原因可能是由于细菌表面的 EPS 被洗去,失去对菌体的保护作用,LPS 外露而直接与根表细胞发生作用,激发了寄主的防卫反应,使得青枯菌的吸附量和侵入量都明显下降。Schouten<sup>[20]</sup>认为 EPS 可以保护细菌免遭植物的抗病反应,因此,洗去 EPS 的菌株对根部的吸附和侵入能力都受到影响。

用洗去 EPS 和 LPS 的菌株接种尾巨桉苗,弱毒菌株的根表吸附量在接种时间内都有不同程度的降低,强毒菌株变化较小,两菌株的根部侵入量变化都不明显,而洗去 EPS 的菌株的根表吸附量和根部侵入量的降低程度更大,弱毒菌株根表吸附的降低程度比强毒菌株的大,这可能是由于 EPS 和 LPS 在青枯菌侵入寄主过程中二者作用的差异造成的, EPS 可增强致病力,促进其对寄主的吸附和侵入,LPS 则诱导寄主防卫反应,使得植物组织对细菌的侵入更为敏感<sup>[18]</sup>,提高抗病性(反而削弱致病力),洗去 LPS 后,寄主的防卫反应没有产生或产生较微弱,因此,无 EPS 和 LPS 的菌株其吸附量和侵入量的变化反而小于无 EPS 菌株。

本研究中, EPS 和 LPS 的存在与否在青枯菌对桉树根部吸附作用的影响比对侵入作用的影响大,洗去 EPS 和洗去 EPS 及 LPS 的菌株对根部吸附量都有所下降,而侵入量变化相对较小,说明在青枯菌对桉树根部的吸附和侵入过程中, EPS 和 LPS 在吸附过程中发挥着比侵入过程中更为重要的作用,青枯菌一旦侵入根部组织,病菌将与寄主组织发生更为复杂的相互作用,更多的物质参与其中,因此 EPS 和 LPS 的作用就会相对削弱,这种作用的发生机制需要进一步研究。

在桉树—青枯菌这一病理系统中,青枯菌与桉树最初的相互作用决定了其是否能成功侵染,在相互作用的过程中, EPS 和 LPS 两个致病因子发挥着重要的作用, EPS 可以保护细菌逃避寄主的识别,增强细菌的运动能力,促进青枯菌对桉树的吸附和侵入; LPS 可诱导寄主的防卫反应,增强了寄主对细菌的防御能力,使得细菌难以与寄主细胞表面发生作用,抑制了细菌吸附到细胞表面进而侵入组织内部的过程。

#### 参考文献:

[1] 王卉,任欣正. 青枯菌在番茄抗、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  
 [2] 王丽,汪矛,杨世杰. 青枯菌侵染番茄幼根的扫描电镜观察[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 157~160

[3] 罗焕亮,王军,张景宁. 木麻黄青枯菌的致病性与其根表吸附及根内增殖关系的研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 21~27  
 [4] 董汉松,王金生,方中达. 菌体脂多糖在大白菜软腐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  
 [5] 王军,苏海,岑炳沾. 林木青枯病研究综述[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 118~121  
 [6] 向妙莲,冉隆贤. 桉树青枯病研究进展[J]. 中国森林病虫, 2004, 23(1): 37~40  
 [7] 韦爱梅,王军. 我国植物青枯病抗病性研究新进展[J]. 广东林业科技, 2004, 20(4): 46~49  
 [8] 王军. 青枯菌对植物的致病机制及其调节[J]. 林业科学, 2005, 41(3): 142~147  
 [9] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a terrazolum medium[J]. Phytopathology, 1954, 64: 293~295  
 [10] Husain A, Kelman A. Relation of slime production to the mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Phytopathology, 1958, 48: 155~165  
 [11] 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  
 [12] 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  
 [13] Whately M N, Hunter N, Cantrell M A. Lipopolysaccharide composition of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum* correlation with the hypersensitive response in tobacco [J]. Plant Physiology, 1980, 65(3): 557~559  
 [14] Denny T P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis[J]. Annu Rev Phytopathol, 1995, 33: 173~197  
 [15] Denny T P. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria[J]. European Journal of plant pathology, 1999, 105(5): 417~430  
 [16] Schell M A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia Solanacearum* by an elaborate sensory network[J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 263~292  
 [17] Araud-Razou I, Vasse J, Montozie H, et al. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization[J]. European Journal of Plant Pathology, 1998, 104(8): 795~809  
 [18] Pueppke S G. Plant-Microbe Interactions, Molecular and Genetic Perspectives Vol 1[M]. New York: M P C, 1984: 215~261  
 [19] Newman M A, Roepenack E V, Daniels M, et al. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria[J]. Molecular Plant Pathology, 2000, 1(1): 25~31  
 [20] Erbs G, Newman M A. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses[J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4(5): 421~425  
 [21] Schouten H J. A possible role in pathogenesis for the swelling of extracellular slime of *Erwinia amylovora* at increasing water potential [J]. Neth J Plant Pathol, 1989, 95 (Supplement 1): 169~174