

桑青枯病病原 G12-9 内切葡聚糖酶基因的克隆和分类*

苗雪¹, 唐翠明², 党晓群¹, 周泽扬¹, 王林玲¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610)

摘要:桑青枯病是一种土传性细菌病害,从广东省桑园发生青枯病的桑树根部分离得到1株病原菌 G12-9;经鉴定确定该菌为青枯菌(*Ralstonia solanacearum*),该病原菌在 TZC 固体培养基上呈圆形及不规则圆形,菌落中央呈现淡红色,革兰氏染色成阴性。对 G12-9 分离株内切葡聚糖酶基因的克隆、序列测定及聚类分析结果表明,桑青枯菌 G12-9 内切葡聚糖酶属于糖基水解酶家族 12。青枯菌最重要的致病性分泌系统为 II、III、IV 型分泌系统,内切葡聚糖酶属于细菌 II 型分泌系统,内切葡聚糖酶对于青枯菌的定植及寄主植物的致病性有着非常重要的作用,明确该酶在糖基水解酶家族的分类地位对桑青枯病的防治具有重要意义。

关键词:桑青枯病;青枯菌(*Ralstonia solanacearum*);内切葡聚糖酶;分类

中图分类号:Q785;Q939.96

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2014)05-0116-04

桑青枯病是由青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种土传性细菌病害,又称细菌性青枯病、疽桑、瘟桑,是一种典型的维管束病害;它广泛分布于热带、亚热带及温带地区,受之感染的宿主涵盖单子叶植物和双子叶植物,且蔓延速度快,一旦爆发便可造成不可逆转的危害^[1]。该病在中国最早发现于广东省^[2]。青枯菌复合体系具有群体复杂性,菌体能够快速适应环境及新的宿主^[3]。它的致病机制也已经成为当前的研究热点,目前发现内切葡聚糖酶(Endoglucanase)在细菌的致病性中发挥了重要作用,因此在青枯菌复合体系中它也是确定菌种亚分类的一个重要基因^[4]。

内切葡聚糖酶与外切葡聚糖酶及 β -葡萄糖苷酶同属于纤维素酶系统^[5],它们能够分解纤维素最终产生葡萄糖,由于内切葡聚糖酶能够协同其它两类酶发挥重要的生化过程,在食品、中药、纺织等轻工业应用中具有重要地位^[6-7]。内切葡聚糖酶属于糖基水解酶类,糖基水解酶是原核生物及真核生物新陈代谢的关键酶之一,基于氨基酸序列可将糖基水解酶类划分为35个家族,内切葡聚糖酶分属于糖基水解酶的6个家族,这6个家族分别是糖基水解酶家族5、6、7、8、9、12^[8]。

本研究对桑青枯病病原菌株 G12-9 内切葡聚糖酶基因进行了扩增、克隆、序列测定及聚类分析,确定了该酶在糖基水解酶家族中的分类地位,从而为桑青枯菌致病性的研究、青枯病的检疫检测及疾病控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

G12-9 由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供,采集于广东英德。

1.2 病原菌的分离纯化及培养性状观察

利用 TZC 鉴别培养基(蛋白胨 10.0 g、酸水解酪蛋白 1.0 g、TTC 0.05 g、葡萄糖 10.0 g、H₂O 1 L,pH 值为 6.8~7.0)分离青枯菌,28℃下培养 3~4 d 观察性状。TZC 培养基中含有的 TTC 可与青枯菌发生生化反应,使之在该培养基上呈现典型的流动、平滑、带白色晕圈的红色菌落,可特异性区分青枯菌和其它细菌^[9]。

1.3 病原菌的形态观察及检测

细菌染色试验采用革兰氏染色,按结晶紫、蕃红染色法进行^[10]。

* 收稿日期:2014-04-16 修回日期:2014-04-26 网络出版时间:2014-9-17 22:37

资助项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2012AA101301)

作者简介:苗雪,女,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail:mxmiaoxue@126.com;通讯作者:王林玲,E-mail:wanglinling2005@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140917.2237.022.html>

1.4 病原菌的分子检测

1.4.1 桑青枯菌基因组 DNA 的提取 挑取 TZC 板上单菌落接种到 200 mL TZC 培养液中,在 30 °C 的振荡培养箱中,以 150 r/min 振荡培养 16 h,然后 3 000 r/min 离心收集菌体。采用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,用 1% 琼脂糖电泳检测提取的 DNA 质量。

1.4.2 PCR 扩增及产物回收 引物序列及 PCR 反应条件如表 1 所示。PCR 反应在 50 μL 体系中进行,依次加入以下试剂:上游引物及下游引物各 1 μL,DNA 模板 1 μL,10×PCRbuffer 5 μL,dNTPMixture 4 μL,Mg²⁺ 3 μL,Taq 0.5 μL,ddH₂O 34.5 μL。反应程序:94 °C 持续 5 min,94 °C 持续 30 s,58 °C 持续 30 min,72 °C 持续 1 min,共 30 个循环;72 °C 持续 10 min。PCR 后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,符合要求则用 OMEGA 琼脂糖 DNA 回收试剂盒进行目的片段纯化回收。

1.4.3 目的片段克隆,测序和聚类分析 取 3 μL 目的片段连接到 pMD19-TVector 载体上,16 °C 连接过夜,连接产物转化至 *E. coli* DH-5α 感受态细胞中,用含有 Amp(100 μg/mL)、X-Gal(20 mg/mL)的 LB 固培养基上进行蓝白斑筛选,检测为阳性克隆的片段经液体培养基大量培养并提取重组质粒。阳性克隆送至南京金斯瑞生物公司进行序列测定,每个菌株测定 3 个阳性克隆,保证测序结果的可靠性。测序后的序列通过生物分析软件 MA-GA5 用 N-J 法建立系统进化树并进行序列分析。

2 结果

表 1 引物序列

| 引物名称 | 引物序列 | 片段大小/bp | 退火温度/°C |
|------|----------------------------|---------|---------|
| egl | 5'-GACACCACGACCCTGAAGAC-3' | 649 | 59.50 |
| | 5'-GCATCGAATTGGGCTCGTTC-3' | | 57.45 |

2.1 病原菌分离纯化培养性状

分离所得菌株 G12-9 在 TZC 固体培养基上生长,24、48 h 时均没有菌落出现;

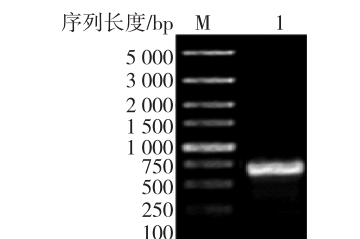
72 h 时出现菌落,菌落较少,呈现白色;培养第 4 d 菌落布满整个 TZC 培养基,生长速度明显加快,菌落呈圆形及不规则圆形,白色,略隆起,菌落中央呈现淡红色周围白色较宽;培养第 5 d 时,随着培养时间的延长菌落红色区域越多,菌落越大,明显隆起(封三彩图 1)。经革兰氏染色在 1 000 倍油镜下观察,G12-9 呈短杆状,菌体并列、堆状或分散排布,偶见短链状排列,经鉴定该菌为青枯菌^[11-12]。

2.2 内切葡聚糖酶基因的克隆测序及聚类分析

2.2.1 PCR 扩增 扩增所得菌株 G12-9 的内切葡聚糖酶基因片段大小为 649 bp,与目的片段大小一致(图 2)。

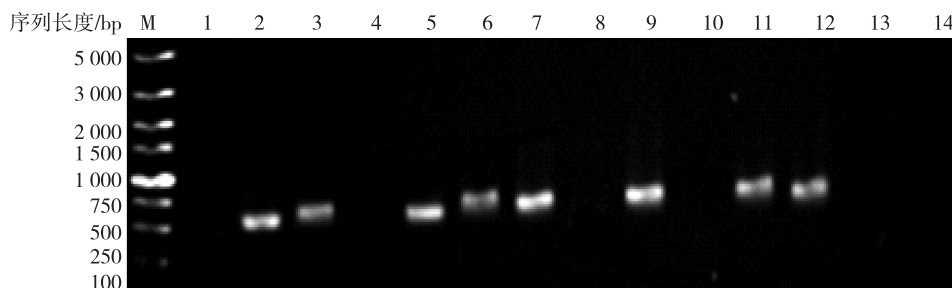
2.2.2 内切葡聚糖酶基因分子克隆 通过蓝白斑筛选,随机挑取 12 个白斑外加阴性对照及空白对照进行 PCR 验证及电泳检测,G12-9 内切葡聚糖酶基因的阳性克隆为:2、3、5、6、7、9、11、12,如图 3 所示。提取质粒并测序。

2.2.3 内切葡聚糖酶的聚类分析 系统进化分析表明桑青枯菌 G12-9 内切葡聚糖酶与其它青枯菌落在同一分支,同时与棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的亲缘关系最近(图 4),属于糖基水解酶家族 12。



注: M: DL5000 DNA marker; 1: G12-9 内切葡聚糖酶基因片段。

图 2 桑树青枯病病原菌 G12-9 内切葡聚糖酶基因的 PCR 扩增产物



注: M: DL5000 DNA marker; 1~12 泳道: 目的片段检测结果; 13: 阴性对照; 14: 空白对照。

图 3 桑树青枯病病原菌 G12-9 内切葡聚糖酶基因克隆菌落 PCR 核酸电泳图

3 讨论

内切葡聚糖酶属于细菌 6 个分泌系统^[13]中的 II 型分泌系统,青枯菌最重要的致病性分泌系统为 II、III、IV 型分泌系统^[3]。II 型分泌途径广泛存在于植物、动物和人类病原细菌中^[14]。它是革兰氏阴性菌中的常规代谢途径,能够向细胞外分泌植物细胞壁降解酶,运动性相关蛋白、附着蛋白,趋氧性传感器、多种纤维素酶及毒力因子等,这些胞外蛋白毒力因子能够破坏宿主细胞、组织系统最终发挥致病性^[3,15]。II 型分泌系统主要以分泌途径转膜蛋白(GSP)基因簇为中心,通过二步转移将蛋白从细胞内运输到细胞外^[16]。越来越多的研究发现 II 型分泌系

统在病原感染宿主及致病过程中发挥着重要作用。导致植物青枯病萎蔫症状的主要因素是胞外多糖(EPS),但内切葡聚糖酶也有助于致病性的产生,该酶的基因突变可导致细菌毒性的丧失或减弱,这也表明内切葡聚糖酶对这些细菌的毒性是至关重要的^[17]。除了青枯菌还包括胡萝卜软腐病菌(*Erwinia carotovora* sp. *carotovora*)、马铃薯黑胫病菌(*Erwinia carotovora* sub sp. *atroseptica*)、玉米细菌性茎腐病菌(*Erwinia chrysanthemi*)、甘蓝黑腐病菌(*Xanthom onas campestris* pv. *campestris*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthom onas oryzae* pv. *oryzae*)等^[16],内切葡聚糖酶在这些病原的侵染和毒力方面都发挥着重要的作用。

桑青枯菌内切葡聚糖酶属于糖基水解酶家族 12,糖基水解酶家族 12 的酶催化的质子供体是 Glu,受体是 Glu,遵循保持机制。蛋白的高级结构常常比氨基酸序列更具有保守性,某些蛋白家族根据结构相似性可以被分为不同氏族,糖基水解酶家族 12 属于氏族 c,典型结构为 β -果冻卷(β -jelly roll)。桑青枯菌内切葡聚糖酶基因开放阅读框均含有信号肽、催化结构域、碳水化合物结合元件和连接区的编码序列。内切葡聚糖酶能够分泌到细胞外,桑青枯菌通过该酶降解植物细胞壁而进入植物。因此,内切葡聚糖酶对于青枯菌的定植及其对寄主植物的致病性有着非常重要的作用,明确桑青枯菌内切葡聚糖酶在糖基水解酶家族的分类地位对该病的防治有着重要意义。

参考文献:

- [1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annu Review Phytopathol,1991,29:65-87.
- [2] 徐丽慧, Kawicha P, 谢关林. 桑青枯病致病性测定新方法[J]. 蚕桑通报,2007,38(1):19.
Xue L H, Kawicha P, Xie G L. Mulberry wilt pathogenicity test new method[J]. Bulletin of Sericulture,2007,38(1):19.
- [3] Peeters N, Guidot A. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era[J]. Molecular Plant Pathology,2013,14(7):651-662.
- [4] Joselito E, Tsuchiya K, Mitsuo H, et al. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex-strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and hrpB gene sequences[J]. Bacterial and Phytoplasma Diseases 2005,71(1):39-46.
- [5] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志,2008,28(1):83-87.
Gu F Y, Chen C Y, Shi J J, et al. Advances in cellulase and its development tendency [J]. Journal of Microbiology, 2008,28(1):83-87.
- [6] 丁少军, 宋美静, 杨红军, 等. 中性内切型纤维素酶在毕赤酵母中高水平表达的研究[J]. 生物工程学报,2006,22(1):71-76.
Ding S J, Song M J, Yang H J, et al. High-level production of neutral endoglucanase 1 in *Pichia pastoris* [J]. Chinese Journal of Biotechnology,2006,22(1):71-76.
- [7] Qu Y B, Zhu M T, Liu K, et al. Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China [J]. Biotechnology Journal,2006,1(11):1235-1240.
- [8] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemistry Journal,1991,280(2):309-316.
- [9] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a terrazolium medium[J]. Phytopathology,1954,44(12):293-295.

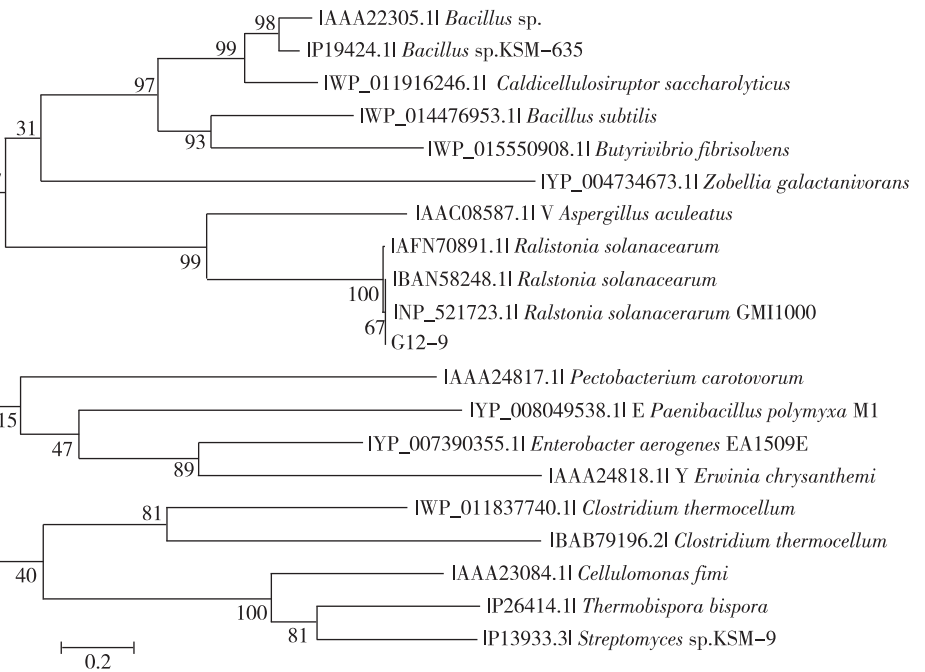


图 4 内切葡聚糖酶蛋白质系统进化树

- [10] 方中达. 植病研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
Fang Z D. Research method of plant pathology[M]. Beijing:China Agriculture Press,1998.
- [11] 赖文姜,曾宪铭,谭炳安,等. 桑青枯病病原细菌的鉴定[J]. 华南农学院学报,1982,3(1):66-73.
Lai W J,Zeng X M,Tan B A,et al. Identification of mulberry bacterial wilt pathogen[J]. Journal of South China Agricultural University,1982,3(1):66-73.
- [12] 赖文姜,谭炳安,陈俊英. 桑青枯病的诊断和青枯菌的分离[J]. 广东蚕业,1982,16(2):1-2.
Lai W J,Tan B A,Chen J Y. Diagnosis of mulberry wilt pathgen and seperation of *R. Solanacearum* [J]. Guangdong Canye,1982,16(2):1-2.
- [13] Andersen C. Channel-tunnel;outer membrane components of type I secretion system and multidrug efflux pumps of Gramnegative bacterial[J]. Rev Physiol Pharmacol,2003,147:122-165.
- [14] de Chial M,Ghysels B,Beatson S A,et al. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudo-*
monas aeruginosa [J]. Microbiology,2003,149(4):821-831.
- [15] Feng J,Liu H L,Kang Y W,et al. Identification of a gsp gene cluster associated with Type II secretion pathways in *Ralstonia solanacearum* [C]//Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress. Beijing:[s. n.],2004:82.
- [16] 冯洁,徐进,许景升,等. II型分泌系统与植物病原细菌致病性的关系[J]. 农业生物技术学报,2007,15(3):365-370.
Feng J,Xue J,Xue J S,et al. Relationship between the Type II secretion system and pathogenicity of plant pathogenic bacteria [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2007,15(3):365-370.
- [17] Saile E,McGarvey J A,Schell M A,et al. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum* [J]. Bacteriology,1997,87(12):1264-1270.

Clone and Classification of Endoglucanase Gene of Mulberry Bacterial Wilt Pathogen G12-9

MIAO Xue¹, TANG Cuiming², DANG Xiaoqun¹, ZHOU Zeyang¹, WANG Linling¹

(1. Department of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Guangdong Academy of Agricultural Science Sericulture and Agricultural Processing Institute, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Mulberry bacterial wilt pathogen is a soilborne bacterial disease, a pathogen G12-9 was isolated from the root of mulberry which was infected bacterial wilt plant disease from mulberry field in Guangdong province. This pathogen on TZC solid medium was rounded or irregular round, the colony center color showed pink. It was a negative Gram strain. By endoglucanase gene within G12-9 isolate cloning, sequencing and cluster analysis, mulberry *Ralstonia solanacearum* G12-9 endoglucanase belonging to glycosyl hydrolase family 12. The most important pathogenicity secretion system in *R. solanacearum* are II, III, IV, endoglucanase belongs to T2S. It plays an important role on colonization and host infection, so it is very significant for the disease prevention and treatment by clearing mulberry *R. solanacearum* endoglucanase position in the classification of glycosyl hydrolase family.

Key words: mulberry bacterial wilt; *Ralstonia solanacearum*; endoglucanase; classification

(责任编辑 方 兴)