

青枯病菌噬菌体P3株系的生物学特性及其应用研究

林志坚¹, 吴秀琴¹, 梁颁捷³, 顾钢^{2*}, 周挺², 胡方平¹, 蔡学清^{1*}

(1. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002; 2. 福建省烟草公司烟草科学研究所, 福州 35003; 3. 福建省烟草公司三明市公司, 三明 365000)

摘要: 作物青枯病是一种土传细菌性维管束病害, 由于作物病害的发生和严重度与土壤中的病原菌数量呈正相关, 因而快速准确测定土壤中的病原菌数量是病害预测及有效防控的前提。本文对筛选获得的一株具有生防潜力的噬菌体 P3 株系进行了生物学特性测定, 并探讨其在检测烟草根际土壤中青枯病菌数量的可行性, 为烟草根际土壤青枯病菌的检测提供一种新方法。研究表明, 噬菌体 P3 株系由一个二十面体的头部和非常短的尾部构成; 裂解谱广, 可裂解烟草、番茄、辣椒、马铃薯和甘薯的青枯病菌; 最佳感染复数为 0.0001; 潜伏期 60 min, 裂解期 80 min, 裂解量 179; 对 1% 氯仿不敏感; 55 °C 以下及 pH 4~12 的环境中保持稳定; 对紫外线敏感, 照射 18 min 失活; 20 °C~28 °C 存放一个月效价稳定。同等条件下, 检测烟草根际土壤中青枯病菌数量, 平板检测法的实测值仅为 1.79×10^4 CFU/g, 而噬菌体检测法实测值为 2.83×10^5 CFU/g, 说明噬菌体检测法的灵敏度较平板检测法高 10 倍。本研究通过噬菌体检测法检测了烟草根际土壤的青枯病菌数量, 可为今后烟草青枯病的预测预报提供技术支持。

关键词: 青枯病菌; 裂解性噬菌体; 生物学特性; 检测

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)04-0611-08

The Biological Characteristics of *Ralstonia* Phage P3 strain and Its Application

LIN Zhijian¹, WU Xiuqin¹, LIANG Banjie, GU Gang^{2*}, ZHOU Ting², HU Fangping¹, CAI Xueqing^{1*}

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Tobacco Science, Fujian Provincial Tobacco Company, Fuzhou 35003, China; 3. Fujian Sanming Tobacco Company, Sanming 365000, China)

Abstract: Plant bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is a serious vascular soil-borne disease. Occurrence and severity of the disease is positively related to the population of bacteria in the soil, therefore rapid and accurate detection of the bacteria population in the soil is the premise of the disease forecasting and effective control. In this study, the biological characteristics of a potential biocontrol *Ralstonia* phage P3 strain were tested, and the feasibility detecting of *R. solanacearum* in soil by the phage strain was also determined. The results showed that phage P3 strain had an icosahedron head and a very short tail under the transmission electron microscopy (TEM). The host range of phage P3 strain was wide, and it could infect the *R. solanacearum* isolated from tobacco, tomato, pepper, potato and sweet potato. Its multiplicity of infection was 0.0001, incubation period was about 60 min, lysis period was about 80 min, and burst size was about 179. Phage P3 strain was not sensitive to chloroform, and it could maintain high activity in the surroundings at less than 55 °C and pH 4—12. It was sensitive to ultraviolet ray and lost activity under UV vertical irradiation for 18 min. The titers of phage P3 strain was stable in one month under the environment of 20 °C—28 °C. Under the same conditions, the sensitivity of detecting the population of *R.*

收稿日期: 2020-03-13

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0201106-02)、中国烟草总公司福建省公司科技计划项目 (闽烟司科[2017]2 号); 福建农林大学科技创新项目 (KFA17541A)

作者简介: 林志坚, 硕士研究生, E-mail: 705250271@qq.com; *通信作者, 蔡学清, 博士, 教授, E-mail: caixq90@163.com; 顾钢, 硕士, 高级农艺师, E-mail: gugang318@163.com

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.04.023

solanacearum in soil by phage was 10 times of the method by the plate culture, the population was 2.83×10^5 CFU/g in soil by the phage test, but the population was only 1.79×10^4 CFU/g by the plate culture. In this study, the population of *R. solanacearum* in tobacco rhizosphere was detected by the phage method, which could provide a technical support for the forecasting of tobacco bacterial wilt disease in the future.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; lytic phage; biological characteristics; detection

作物青枯病是由青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种典型的维管束病害, 该病菌主要在土壤和作物病残体上越冬^[1,2]。利用土壤中病菌数量与病害呈正相关的原理^[3], 快速准确检测土壤中的数量是预测预报的前提。目前, 常用的检测方法有平板划线分离法、血清学方法和分子生物学法。Graham 等^[4]采用半选择性琼脂培养基法 (SMSA), 灵敏度为 10^4 CFU/g 土壤; Janse^[5]建立的间接免疫荧光染色法 (IFAS), 检测灵敏度为 10^4 CFU/mL; 张海燕等^[6]建立的实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测技术, 灵敏度可达 1×10^3 CFU/mL; Notomi 等^[7]的环介导等温扩增 (LAMP) 新技术, 可对靶标序列进行高效扩增; 黄雯等^[8]在此技术上进行了改进, 可通过肉眼观察管内是否产生了白色焦磷酸镁沉淀 (浑浊状) 或者管盖上 SYBR GREEN I 荧光染料是否变绿来判断青枯病菌的有无, 灵敏度较普通 PCR 提高了 10 倍。虽然平板培养法对试验条件要求低, 能检测到活细胞, 但检测时间长、容易受杂菌影响、灵敏度低, 准确性不好把握; PCR 检测法不仅受引物特异性和仪器设备的限制, 而且土壤中众多的微生物极易干扰 DNA 提取, 高纯度的 DNA 难提取, 而且细菌的存活状态难判断。这些瓶颈性问题都制约着土壤中青枯病菌数量的准确测定。

噬菌体对宿主细菌具有很强的跟随现象和寄生专一性, 且不影响其他菌群的正常生长^[9]。因此, 利用噬菌体检测、预测与防治病害成为人们研究的热点。季伯衡等^[10]利用噬菌体检测稻田白叶枯病菌, 许志纲等^[11]和杨定斌等^[12]根据噬菌体“急增期”来预测病害, 当噬菌体数量达 10^3 PFU/mL 即是白叶枯病发生的预兆。莫寅元等^[13]采用噬菌体技术检测土壤中的姜瘟菌 *R. solanacearum*, 检测的灵敏度较高, 当土壤中病菌的菌量在 10^3 CFU/g 时, 回收率为 57.4%, 即使土壤中病菌的活菌数为 10^2 CFU/g 时也能检测到。目前使用噬菌体检测烟草根际土壤中青枯菌的研究未见报道, 本文测定了一株具有较好生防潜力的噬菌体 P3 株系的生物学特性, 并用于测定烟草根际土壤中青枯病菌数量, 试图为土壤青枯病菌的检测提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 青枯病菌 *R. solanacearum* 菌株 TBRS1-TBRS18、PORS19、TMRS20、SWPRS21 和 PPRS22-23 分别分离至烟草、马铃薯、番茄、甘薯和辣椒; 西瓜细菌性果斑病菌 *Acidovorax citrulli* Aac7500、Aac13、Aac1、Aac3, 桃细菌性穿孔病菌 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* Xap10、Xap20, 柑橘溃疡病菌 *X. citri* subsp. *citri* Xac5, 甘蓝黑腐病菌 *X. campestris* pv. *campestris* Xcc4-1, 辣椒疮痂病菌 *X. campestris* pv. *vesicatoria* Xcv1, 小白菜软腐病菌 *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* Ecc04、Ecc2-3, 辣椒软腐病菌 *P. carotovora* subsp. *carotovora* Ecc8, 猕猴桃溃疡病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Ps6-2, 以上菌株以及噬菌体 P3 株系均由本实验室分离鉴定及保存。

1.1.2 供试烟草品种 翠碧 1 号, 由福建省三明市烟草公司提供。

1.1.3 供试培养基与试剂 TTC 固体培养基和 NB 培养基的配方具体参照方中达的方法^[14]。PCCG 选择性培养基的配方参照 Hara 等^[15]方法。SM 缓冲液: 2%明胶 5 mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g, NaCl 5.8 g, 1 mol/mL Tris-HCl pH 7.5 50 mL, 加蒸馏水定容至 1000 mL。

1.2 病原菌及噬菌体的培养

病原菌的培养: 取 -75°C 保存的青枯菌及其他病原菌分别接种于 TTC 和 NB 固体平板培养基上活化培养, 挑取的单菌落接种到 NB 培养基中, 180 r/min、 28°C 培养 24~48 h, 获得的培养液为病原菌菌液, 用于测定噬菌体的裂解谱和效价。

噬菌体的培养:取 4℃ 保存的噬菌体,按 1%的比例加入到青枯菌菌液中,混匀静置 15 min, 28℃、130 r/min 培养至菌液澄清后(24~48 h), 12000 r/min 离心 5 min, 去沉淀,上清液再用 0.45 μm 滤膜抽真空过滤,获得的过滤液为噬菌体原液。

1.3 烟苗培育

参照林志坚等^[16]方法。先将育苗基质铺满整个育苗盘,再将烟苗种子点播至育苗盘内,每穴 1 粒,25℃,16L:8D 培育至 3 片真叶时,移栽至 AB150 型花盆(高压灭菌的 300 g 土壤/盆),备用。烟草育苗基质和育苗盘由福建省三明市烟草公司提供。

1.4 噬菌体的浓缩

参照《分子克隆实验指南》第三版^[17],取噬菌体原液 100 mL,加入 100 μL DNase I (1 mg/mL)和 10 μL RNase A (10 mg/mL),37℃水浴 1 h,加入 5.84 g 氯化钠,溶解混匀,冰上放置 2~3 h,4℃、10000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 10 g PEG8000,溶解混匀,4℃放置隔夜,4℃、14000 r/min 离心 10 min,弃尽上清液;加 2 mL SM 缓冲液轻悬沉淀,使沉淀完全溶解;加入 2 mL 三氯甲烷,温和混匀 30 s,10000 r/min 离心 10 min,回收水相,获得噬菌体粗制颗粒。

1.5 噬菌体电镜观察

参照郭棵棵等^[18]方法。噬菌体粗制颗粒经 2%的磷钨酸复染后,在透射电子显微镜(Hitachi HT7700)下观察噬菌体颗粒形态并拍照。

1.6 噬菌体效价测定

噬菌体效价(plaque-forming unit,缩写 PFU),指每毫升样品中含有侵染性噬菌体的粒子数。采用双层平板法测定,参照方中达^[17]的方法。取噬菌体原液 1 mL,用 SM 液进行连续 10 倍稀释(稀释到 10^9 倍),取 500 μL 稀释液与 500 μL 青枯菌液(1×10^8 CFU/mL)混匀,静置 15 min,加入 6 mL 约 50℃的 CPG 半固体培养基(琼脂浓度 0.7%),混匀,立即倒入 CPG 固体培养基平板上制成双层平板,待上层培养基凝固后,28℃倒置培养 24~48 h 后,观察并统计噬菌斑数,平行重复 3 次。噬菌体效价(PFU/mL)=平均噬菌斑数 $\times 2 \times$ 稀释倍数。

1.7 噬菌体裂解谱测定

参考张文惠^[19]点滴法测定噬菌体裂解谱。取 6 mL 约 45℃的 CPG 半固体培养基,加入已培养好的待测病原菌液(1×10^8 CFU/mL) 1 mL,混匀后立即倒入已制备好的 CPG 固体培养基平板上,待培养基凝固时,再分别点接 1 μL 噬菌体原液(1×10^9 PFU/mL),风干,重复 3 次,28℃倒置培养 24 h,观察噬菌斑的形成情况。

1.8 噬菌体生物学特性测定

1.8.1 最佳感染复数(MOI)测定 在青枯病菌悬浮液中按感染复数为 0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10 的比例加入噬菌体原液(1×10^8 PFU/mL),混匀,静置 15 min,28℃、130 r/min 振荡培养 12 h,参照 1.6 方法测定噬菌体效价。

1.8.2 一步生长曲线测定 噬菌体原液(1×10^9 PFU/mL)与宿主菌液(1×10^8 CFU/mL)(10:1),混合后室温静置 15 min,12000 r/min 离心 1 min,弃上清液留沉淀,重复 2 次;加入 100 mL NB 培养基重悬沉淀,并立即放入 130 r/min、28℃摇床中,开始计时,从 0 时开始取样,每 10 min 取 1 次,共取样 15 次,参照 1.6 方法测定噬菌体效价,并计算裂解量,裂解量=爆发末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度。

1.8.3 1%氯仿敏感性测定 取 990 μL 噬菌体原液(1.2×10^{10} PFU/mL)与 10 μL 氯仿(终浓度为 1%)混匀,28℃、130 r/min 振荡培养 30 min 后,12000 r/min 离心 1 min,取上层清液,参照 1.6 方法测定噬菌体效价,以不加氯仿的噬菌体原液作对照。

1.8.4 酸碱稳定性测定 在 900 μL 不同 pH 值(1~13)的 NB 培养基中分别加入 100 μL 噬菌体原液(3.7×10^{10} PFU/mL),混匀,28℃、130 r/min 振荡培养 1 h,参照 1.6 方法测定噬菌体效价。

1.8.5 紫外线敏感性测定 将噬菌体原液(1.1×10^{10} PFU/mL)在 40 W 的紫外灯下分别垂直(距离 60 cm)照射 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 min 后,参照 1.6 方法测定噬菌体效价。

1.8.6 热稳定性测定 将噬菌体原液 (1.1×10^8 PFU/mL) 分别置于 45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、70 °C、80 °C 和 90 °C 电热恒温水槽中分别水浴 10、60、120 min 后取出, 参照 1.6 方法测定噬菌体效价。

1.8.7 噬菌体贮藏稳定性测定 将噬菌体原液 (4.96×10^{10} PFU/mL) 分别置于在 20 °C、室温 (23 °C \pm 3)、28 °C 和 37 °C 中保存 1 个月, 每隔 5 d 取样, 参照 1.6 方法测定噬菌体效价。

1.9 噬菌体 P3 对土壤中青枯病菌数量的测定

1.9.1 接种 将烟苗移栽至装有经高压灭菌的 300 g 土壤的花盆中, 3~4 d 后, 取长势均匀一致的烟苗, 每 6 株一组, 分别做以下处理: 处理 A: 每盆浇 30 mL 青枯病菌菌液 ($OD_{600}=0.8$, 浓度约 1.83×10^8 CFU/mL); 处理 B: 每盆浇 30 mL 无菌水。将上述烟苗置于温度 30 °C, 光照 16L:8D 的温室内培养。每隔 7 d 取 1 次土样, 直至烟草发病。取样时注意去除表层土壤, 取烟草根际土壤, 并将同一个处理的所有土样混匀, 3 次重复, 取 5g 土壤置于无菌的 100 mL 的三角烧瓶中备用。

1.9.2 平板分离法 将 20 mL 无菌水分别加入装有土样的无菌的三角瓶中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 2 h 制成土壤悬浮液; 土壤悬浮液用无菌水进行连续 10 倍稀释, 取 100 μ L 稀释液均匀涂布于 PCCG 选择性培养基上, 每个稀释梯度 2 个重复; 28 °C 倒置培养 72 h, 统计菌落数。青枯病菌含量 (CFU/g) = 每个平板的平均菌落数 \times 10 \times 稀释倍数/5。

1.9.3 噬菌体法 取接种处理的烟草根际土壤, 作不同处理。处理 1: 加入 20 mL SM 缓冲液, 28 °C、130 r/min 振荡培养 8 h 制成土壤悬浮液, 静置 3 h, 用于测定取样时土壤噬菌体量; 处理 2: 同时加入 20 mL SM 缓冲液和 1 mL 噬菌体 P3 原液 (1×10^9 PFU/mL), 28 °C、130 r/min 振荡 8 h 制成土壤悬浮液, 静置 3 h, 用于测定取样时土壤噬菌体量和加入的噬菌体 P3 利用土壤中的青枯菌为宿主繁殖后的噬菌体量的总和; 处理 3: 将土壤高压灭菌 (121 °C, 30 min) 后, 加入 20 mL SM 缓冲液, 1 mL 噬菌体 P3, 28 °C、130 r/min 振荡 8 h 制成土壤悬浮液, 静置 3 h, 用于测定无宿主存在时噬菌体的量, 作为空白对照。参照 1.6 方法测定各处理的噬菌体效价。

处理 2 的噬菌体效价与处理 3 及处理 1 的噬菌体效价的差值为噬菌体利用土壤中青枯病菌为宿主后繁殖的噬菌体量。通过以下公式换算为土壤中青枯病菌的含量。土壤中青枯病菌含量 (CFU/g) = (处理 2 的噬菌体效价 - 处理 3 的噬菌体效价 - 处理 1 的噬菌体效价) \times 20 / (裂解量 \times 5)。

2 结果与分析

2.1 噬菌体形态观察

透射电子显微镜下观察结果显示 (图 1), 噬菌体 P3 有一个二十面体的头部和非常短的尾部, 头部直径约 75~80 nm, 尾部长约 15~20 nm, 该病毒株系属于尾病毒目 Caudovirales、短尾病毒科 Podoviridae。

2.2 噬菌体 P3 株系裂解谱测定结果

噬菌体 P3 株系对 23 株青枯病菌和 13 株非青枯病菌的裂解情况测定结果表明, 噬菌体 P3 株系对烟草青枯病菌 (菌株 TBR3S、TBR3S6、TBR3S12、TBR3S15、TBR3S16)、马铃薯青枯病菌菌株 TMRS20、甘薯瘟病菌菌株 SWPRS21 和辣椒青枯病菌菌株 PPRS23 有强裂解作用, 平板上能产生清晰、透明的圆形噬菌斑; 对烟草青枯病菌菌株 TBR3S5、TBR3S13 和马铃薯青枯病菌菌株 PORS19 裂解作用较弱, 平板上只产生清晰但不透明的噬菌斑; 对烟草青枯病菌菌株 (TBR3S1、TBR3S2、TBR3S4、TBR3S7、TBR3S8、TBR3S9、TBR3S10、TBR3S11、TBR3S14、TBR3S17、TBR3S18) 和辣椒青枯病菌菌株 PPRS22 以及非青枯病菌病原菌没有裂解作用, 平板上无噬菌斑出现 (表 1)。这表明噬菌体具有高度专一性, 对不同宿主的裂解性存在较大的差异。

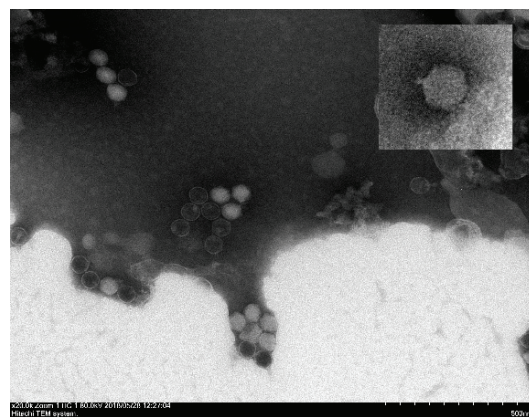


图 1 噬菌体电镜图

Fig. 1 The morphology of phages under electron microscopy

表 1 噬菌体 P3 株系裂解谱测定结果
Table 1 The host range of bacteriophage P3 strain

宿主 Host	噬菌 Plaque	宿主 Host	噬菌斑 Plaque	宿主 Host	噬菌 Plaque	宿主 Host	噬菌 Plaque
TBRs1	-	TBRs10	-	PORS19	+	Aac3	-
TBRs2	-	TBRs11	-	TMRS20	++	Xap10	-
TBRs3	++	TBRs12	++	SWPRS21	++	Xap20	-
TBRs4	-	TBRs13	+	PPRS22	-	Xac5	-
TBRs5	+	TBRs14	-	PPRS23	++	Ecc08	-
TBRs6	++	TBRs15	++	Ecc04	-	Ecc2-3	-
TBRs7	-	TBRs16	++	Aac7500	-	Xcc4-1	-
TBRs8	-	TBRs17	-	Aac 13	-	Psa6-2	-
TBRs9	-	TBRs18	-	Aac1	-	Xcv1	-

注：++表示噬菌斑圆而透明；+表示噬菌斑圆但不透明；-表示无噬菌斑。
Note: ++ indicated the plaque round and transparent; + indicated the plaque round but not transparent; - indicated no plaque.

2.3 噬菌体 P3 株系最佳感染复数和裂解量测定结果

噬菌体 P3 株系的最佳感染复数（表 2），当 MOI 为 0.0001 时，效价最高，为 2.54×10^{10} PFU/mL，说明噬菌体 P3 的最佳感染复数为 0.0001；通过一步生长曲线测定结果表明，噬菌体 P3 的潜伏期约 60 min，裂解期约 80 min，裂解量约 179（图 2）。

表 2 噬菌体 P3 株系最佳感染复数测定结果
Table 2 Determination of the optional multiplicity of infection (MOI) of *Ralstonia* phage P3 strain

初始青枯菌浓度 Concentration (CFU/mL)	感染复数 MOI (PFU/CFU)	初始噬菌体效价 Titer (PFU/mL)	产出噬菌体效价 Titer (PFU/mL)
1×10^8	10	1×10^9	1.96×10^9 e
	1	1×10^8	2.53×10^9 de
	0.1	1×10^7	4.76×10^9 d
	0.01	1×10^6	9.74×10^9 c
	0.001	1×10^5	1.84×10^{10} b
	0.0001	1×10^4	2.54×10^{10} a

注：同列数字后面的不同小写字母表示差异显著（新复极差测验 $P < 0.05$ ），下同。
Note: Values followed by the different letter within a column indicated the significant difference at 0.05 level. The same below.

2.4 噬菌体 P3 株系稳定性测定

2.4.1 噬菌体 P3 株系对 1%氯仿敏感性测定结果
对 1%氯仿的敏感性的测定结果，噬菌体 P3 株系经 1%氯仿处理 30 min 后的效价与对照差异不显著，说明噬菌体 P3 株系对 1%的氯仿不敏感（表 3）。

2.4.2 噬菌体 P3 株系热稳定性测定结果
噬菌体 P3 株系在 45 ℃、50 ℃和 55 ℃的温度下，效价在 2 h 内基本能够维持在 $10^8 \sim 10^9$ PFU/mL。60 ℃处

表 3 噬菌体 P3 株系对 1%氯仿敏感性测定结果
Table 3 The sensitivity of phage P3 strain to chloroform

处理 Treatment	效价 Titer (PFU/mL)
1%氯仿 chloroform	9×10^9 a
CK	1.13×10^{10} a

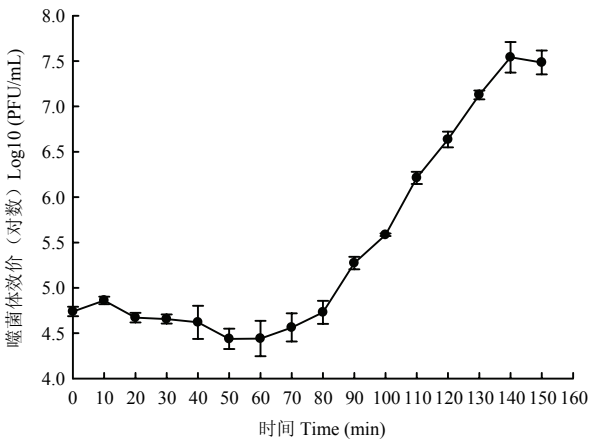


图 2 噬菌体 P3 株系一步生长曲线
Fig. 2 One-step growth curve of phage P3 strain

理 2 h, 效价降至 10^6 PFU/mL, 下降 2 个数量级。70 °C 处理 10 min 后, 效价下降 5 个数量级, 处理 2 h 后效价为 0; 80 °C 和 90 °C 处理 10 min, 噬菌体失活, 这表明噬菌体 P3 株系对温度的耐受性较好, 温度低于 60 °C 能保持较高活性 (图 3)。

2.4.3 噬菌体 P3 株系酸碱稳定性测定结果 噬菌体 P3 株系对酸碱度的敏感性测定结果 (图 4), 酸碱度在 4~12 之间噬菌体均保持较高的活性; 当 $\text{pH} < 4$ 或者 $\text{pH} > 12$ 时, 噬菌体的活性均受到一定的影响; pH 为 1、2、13 时, 噬菌体失活。

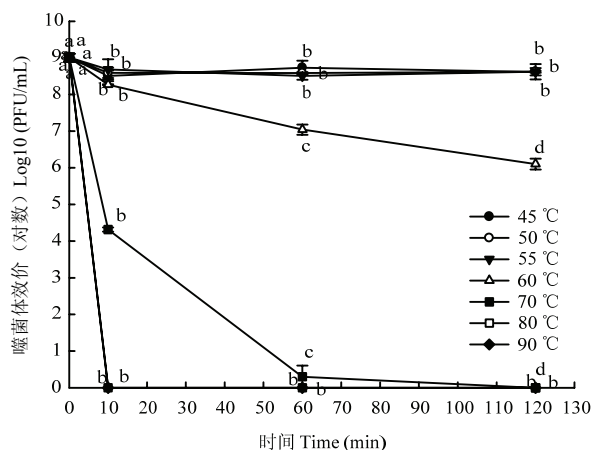


图 3 噬菌体 P3 株系的热稳定性测定结果

Fig. 3 Thermal stability of phages P3 strain

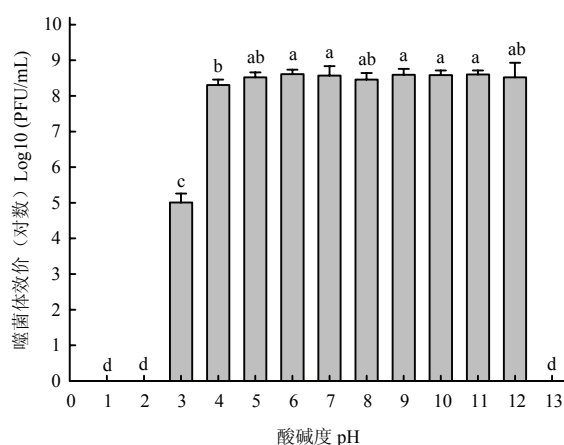


图 4 噬菌体 P3 株系的 pH 耐受性

Fig. 4 Sensitivity of phage P3 strain to pH

2.4.4 噬菌体 P3 株系对紫外线敏感性测定结果 噬菌体 P3 株系对紫外线敏感, 40 W 紫外灯垂直 (距离 60 cm) 照射 18 min, 效价接近 0; 27 min 后, 完全失活 (图 5)。

2.4.5 噬菌体 P3 株系贮藏稳定性测定结果 噬菌体 P3 株系贮藏稳定性测定结果表明, 20 °C、室温 (23 °C ± 3 °C)、28 °C 存放 10 d 效价变化不大, 与初始效价在同一个数量级; 存放 1 个月后效价降为 $10^8 \sim 10^9$ PFU/mL, 下降了 1~2 个数量级; 而 37 °C 存放 5 d 后效价下降明显, 约 2 个数量级, 存放 1 个月, 效价下降 4 个数量级, 约为 10^6 PFU/mL (图 6)。

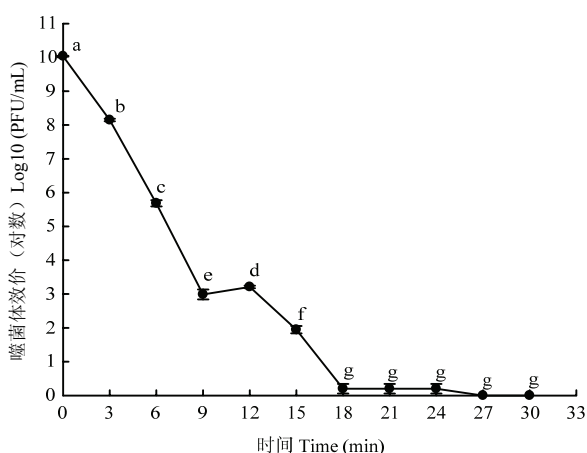


图 5 噬菌体 P3 株系对紫外线的敏感性测定

Fig. 5 Sensitivity of Phage P3 strain to UV

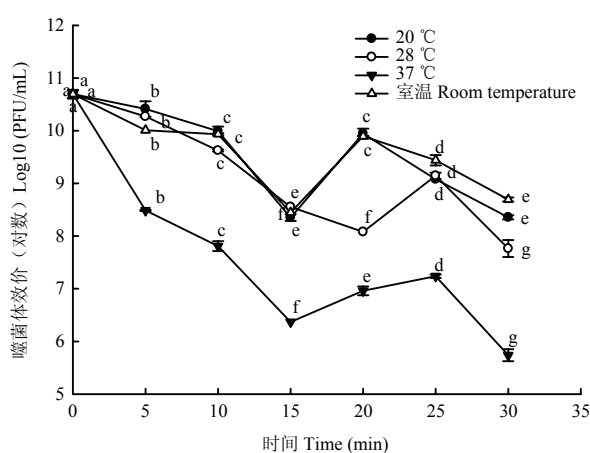


图 6 噬菌体 P3 株系贮藏稳定性测定结果

Fig. 6 The titers of phage P3 strain preserved under different temperatures

2.5 土壤中青枯菌数量测定结果

2.5.1 平板分离培养法测定结果 平板分离法测定土壤中青枯病菌的数量 (表 4)。结果表明, 土壤接种后, 青枯病菌的数量随时间推延渐增, 接种 21 d 后, 烟草叶片始现萎蔫、发黄, 此时土壤青枯病菌的数量

为 1.79×10^4 CFU/g; 28 d 后, 烟株死亡, 此时土壤青枯病菌的数量为 7.23×10^4 CFU/g。

2.5.2 噬菌体法测定结果 噬菌体法检测土壤青枯病菌数量结果表明, 青枯病菌处理 (处理 A) 的土壤中青枯病菌的数量随接种后时间的推移而增加。接种 7 d 后, 土壤中青枯病菌的数量为 1.17×10^5 CFU/g; 14 d 的数量为 2.46×10^5 CFU/g; 21 d 的数量为 2.83×10^5 CFU/g, 此时叶片出现萎焉症状; 28 d 的数量为 21 d 时的 2 倍, 为 5.54×10^5 CFU/g (表 5)。无菌水处理 (处理 B) 未能检测到青枯病菌 (通过噬菌体的裂解量换算后青枯菌的菌量不到 1 个, 忽略不计)。

表 4 平板分离法检测土壤中青枯病菌数量的结果
Table 4 The population of *R. solanacearum* in soil tested by plate separation

处理 Treatment	青枯菌浓度 Concentration of <i>R. solanacearum</i> (CFU/g)			
	7 d	14 d	21 d	28 d
青枯菌 <i>R. solanacearum</i>	9.62×10^3 a	1.37×10^4 a	1.79×10^4 a	7.23×10^4 a
无菌水 Water	0 b	0 b	0 b	0 b

表 5 噬菌体法检测土壤中青枯病菌数量的结果
Table 5 The population of *R. solanacearum* in soil determined by phage P3

处理 Treatment	7 d		14 d		21 d		28 d	
	噬菌体效价 Titer (PFU/g)	青枯菌含量 Population (CFU/g)	噬菌体效价 Titer (PFU/g)	青枯菌含量 Population (CFU/g)	噬菌体效价 Titer (PFU/g)	青枯菌含量 Population (CFU/g)	噬菌体效价 Titer (PFU/g)	青枯菌含量 Population (CFU/g)
青枯病菌 <i>R. solanacearum</i>	2.10×10^7 a	1.17×10^5 a	4.40×10^7 a	2.46×10^5 a	5.23×10^7 a	2.83×10^5 a	9.55×10^7 a	5.54×10^5 a
无菌水 Water	3.40×10 b	0.19 b	6.88×10 b	0.38 b	1.20×10^2 b	0.67 b	1.54×10^2 b	0.86 b

3 讨论

高苗等^[20]对烟草青枯菌噬菌体 \in RS-1 和苏靖芳等^[21]对烟草青枯菌噬菌体 RS-P11-1 的研究表明, 最佳感染复数为 0.01~1, 潜伏期为 10~30 min, 爆发期为 80~100 min, 失活温度为 60 ℃, 其中 \in RS-1 紫外照射 9 min 后杀菌能力降低, pH 3~8 时才有效果。本研究的噬菌体 P3 株系, 失活温度高, 潜伏期长, 最佳感染复数低; 耐碱强, pH 4~12 时仍能稳定发挥作用; 对紫外线的敏感性更弱, 照射 18 min 后才基本失活, 说明噬菌体 P3 株系在自然环境中更稳定。

Ito 等^[22]和吴卫玲等^[23]利用选择性培养基 (PCCG) 进行土壤青枯病菌分离检测时, 发现选择性培养基上生长的很多菌落无法通过 PCR 扩增获得青枯病菌的特异性条带, 即分离后平板生长的菌落只有少数是目标菌株, 这说明选择性培养基平板检测法易受杂菌干扰, 其特异性不高; 本研究用平板分离法的结果与其一致; Saleema 等^[24]建立的荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 检测技术, 虽然能定量检测, 但其成本高且无法区分细菌细胞的存活情况, 且土壤中的腐殖酸、有机质等极易干扰 RNA 提取; 而噬菌体 P3 株系只寄生细菌活细胞, 具有很强的专一性, 即对非青枯病病原菌没有裂解作用, 但其裂解谱比较广, 能裂解烟草青枯病菌、马铃薯青枯病菌、甘薯瘟病菌和辣椒青枯病菌等多种作物的青枯病菌, 因此, 利用它来检测可以提高检测的准确率, 且不需要任何仪器, 也不会受土壤理化性质的影响, 是一种检测土壤青枯病菌活细胞的有效方法。

方树民等^[25]认为大蒜烤烟轮作时, 当土壤中青枯病菌数量达 1.21×10^6 CFU/g 时, 烟苗开始发病, 并随着根系土壤中青枯病菌数量的快速增长, 病情随之陡增^[3,26]。本研究在盆栽条件下, 采用选择性培养基分离法和噬菌体分离法研究了青枯病菌数量与青枯病之间的关系。结果表明当土壤中青枯病菌的数量为 1.79×10^4 CFU/g (选择性培养基分离法) 或 2.83×10^5 CFU/g (噬菌体分离法), 烟草青枯病开始发生, 这说明同样条件下噬菌体法测定的青枯病菌的数量较平板法高 10 倍, 这表明噬菌体法对于土壤青枯病菌检测的灵敏度较平板分离法高, 而且其不易受杂菌的干扰, 特异性高, 因而可用于土壤中青枯病菌数量的检

测。极限检测结果在数量上与方树民等^[25]的结果有所差异,可能与品种、生育期、土壤等有关。因此,这些因素在预测预报中都必须一并加以考虑。

参 考 文 献

- [1] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, *et al.* *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 71(21): 6790-6801.
- [2] 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.
- [3] Kang Y G, Chung Y H, Yu Y H. Relationship between the population of *Ralstonia solanacearum* in soil and the incidence of bacterial wilt in the naturally infested tobacco fields[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2004, 20(4): 289-292.
- [4] Graham J, Lloyd A. Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers[J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1979, 30(3): 489-496.
- [5] Janse J D. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity[J]. *EPPO Bulletin*, 1988, 18(3): 343-351.
- [6] 张海燕, 张小芳, 魏兰芳, 等. 土壤中茄科雷尔氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立与应用[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(14): 17-20.
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): 63-63.
- [8] 黄雯, 徐进, 张昊, 等. 植物青枯菌 LAMP 检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(11): 2093 -2102.
- [9] 解明旭, 叶仕根, 杨晓宇, 噬菌体的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(3): 77-80.
- [10] 季伯衡, 彭刚, 程新霞, 等. 水稻白叶枯病菌噬菌体性状和在细菌定量中应用的研究[J]. *安徽农学院学报*, 1982(2): 60-64, 119.
- [11] 许志纲, 朱家玲, 方中达, 等. 噬菌体技术在水稻白叶枯病预测上的应用[J]. *植物病理学报*, 1980, 10(2): 65-70.
- [12] 杨定斌, 钱汉良, 高家明, 等. 噬菌体技术在江汉稻区水稻白叶枯病预测上的应用[J]. *植物保护学报*, 1996, 23(1): 34-38.
- [13] 莫寅元, 任欣正, 方中达. 噬菌体定量检测青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)方法的研究 II 噬菌体 ZP-2 对土壤含菌量测定的研究[J]. *病毒学杂志*, 1987, 4: 73-78.
- [14] 方中达. 植病研究方法(第3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998, 182-183, 224.
- [15] Hara H, Koga K, Tanaka H. An improved selective medium for quantitative isolation of *Pseudomonas solanacearum* (Abstr.)(J). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1995, 61: 255.
- [16] 林志坚, 夏志辉, 顾钢, 等. 繁殖青枯菌噬菌体的无毒菌株的筛选及其应用[J]. *中国生物防治学报*, 2018, 34(6): 906-913.
- [17] 萨姆布洛克 J, 拉塞尔 D W. 《分子克隆实验指南》(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [18] 郭棵棵, 杨雨卉, 沈伟, 等. 一株感染铜绿假单胞菌的双链 RNA 噬菌体 PaP6 的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 948-954.
- [19] 张文惠, 安小平, 范航, 等. 一株粪肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性研究[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(4): 484-487.
- [20] 高苗, 杨金广, 刘旭, 等. 一株裂解性青枯雷尔氏菌噬菌体的分离及生物学特性分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(7): 1330-1338.
- [21] 苏靖芳, 孙剑萍, 顾刚, 等. 烈性青枯雷尔氏菌噬菌体的分离与生物学特性分析[J]. *烟草科技*, 2017, 50(10): 16-21.
- [22] Ito S, Ushijima Y, Fujii T, *et al.* Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semiselective medium and a PCR technique[J]. *Journal of Phytopathology*, 1998, 146(8/9): 379-384.
- [23] 吴卫玲, 张定贵, 杨水英, 等. 白肋烟栽培土壤中青枯病菌的鉴定与生化型分析[J]. *烟草科技*, 2012, 45(3): 79-82.
- [24] Saleema S L, Shannon K E, Goyer C T, *et al.* Challenges in quantifying microbial gene expression in soil using quantitative reverse transcription real-time PCR[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 85(3): 239-243.
- [25] 方树民, 唐莉娜, 陈顺辉, 等. 作物轮作对土壤中烟草青枯菌数量及发病的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2011, 19(2): 377-382.
- [26] 彭怀俊, 顾钢, 纪成灿, 等. 烤烟根系土壤中青枯病菌动态与田间病害发生发展的关系[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 31(4): 384-387.