

广藿香青枯病菌培养特性的研究

谢建辉, 贺红, 刘丹, 柴婷婷, 徐燃, 杨玉秀

(广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 对青枯菌的培养特性进行研究,为更有效地防治广藿香青枯病提供病原菌基础生物学方面的参考。方法 通过测定悬浮培养菌液的吸光度 A_{600} ,考察青枯菌的生长状态、温度和 pH 值对青枯菌生长的影响,以及菌体对不同碳源和氮源的利用情况。结果 青枯菌的最适生长温度范围为 33 ~ 35 °C,生长的最适初始 pH 值为 6.5;菌株能利用 9 种供试碳源,在果糖、麦芽糖、蔗糖和山梨醇培养基中生长较好,而对葡萄糖的利用相对较差;在有机态氮培养基中比在无机态氮培养基中生长更快,在酵母浸膏培养基中生长最快,在添加 KNO_3 的培养基中生长受到抑制。结论 初步了解广藿香青枯菌的培养特性,为广藿香青枯病的防治奠定基础。

关键词: 广藿香; 青枯菌; 培养特性

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.010

文章编号: 1006-8783(2011)01-0039-05

Cultural characteristics of pathogenic *Ralstonia solanacearum* from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.

XIE Jian-hui, HE Hong, LIU Dan, CHAI Ting-ting, XU Ran, YANG Yu-xiu

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To study on the cultural characteristics of *Ralstonia solanacearum* from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., which might contribute to the effective control and prevention over the disease.

Methods The bacterial growth was determined by A_{600} of bacterial suspension. Effects of temperature and pH on the multiplication of *R. solanacearum*, as well as the utilization of carbon and nitrogen nutrient sources were investigated. **Results** The optimum temperature and pH for bacterial growth was 33 – 35 °C and 6.5, respectively. *R. solanacearum* preferred fructose, maltose, sucrose and sorbitol among the 9 tested carbon sources to glucose. Organic nitrogens were more favorable for *R. solanacearum* than the inorganic ones, of which Yeast extract promoted bacterial proliferation remarkably while KNO_3 was suppressive. **Conclusion** The cultural characteristics of *R. solanacearum* were described, which served for the prevention of *R. solanacearum* in *P. cablin*.

Key words: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; *Ralstonia solanacearum*; cultural characteristics

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物,以干燥地上部位入药,为广东道地药材,具有芳香化浊、和中止呕、发表解暑的功效^[1],是临床上常用中药。广藿香生产中面临青枯病的危害,该病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*, 简称青枯菌) 侵染引起的细菌性病害,一旦发生便迅速蔓延,引起毁灭性灾害^[2],严重影

响广藿香的产量和质量。目前,广藿香青枯病主要以化学防治为主,这虽然能起到一定的防治作用,但难以控制病害的蔓延。本研究从广藿香青枯菌的培养条件和营养需求等方面进行研究,了解青枯菌的生长习性,为从控制病原的角度来进行病害防治奠定基础。

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 国家自然科学基金(30873376)

作者简介: 谢建辉(1986-),男,硕士研究生,Email: xiejianhui123@yahoo.com.cn; 通讯作者: 贺红(1967-),女,研究员,博士生导师,主要从事中药生物技术研究,Email: hehong67@yahoo.com.cn。

网络出版时间: 2011-01-21 16:18 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1618.005.html>

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器 Grant OLS200 线性轨道式水浴摇床 (英国剑桥); 755B 紫外-可见分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); pH S-25 型数显 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); 电子分析天平 (日本东京); 申溢 LDZX-50FBS 立式电热压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); Boxun 净化工作台 (上海博迅实业有限公司)。

1.1.2 供试菌株 试验菌株 HX12 由本实验室采用组织分离法, 从感染了青枯病的广藿香植株的维管束中分离获得, 经鉴定为青枯雷尔氏菌, 于 -20°C 保存备用。

1.1.3 试剂 实验用水为二级反渗透制备水, 所用试剂均为分析纯。

1.1.4 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基 (NA): 牛肉浸膏 3 g, 酵母膏 1 g, 蛋白胨 10 g, 蔗糖 10 g, 琼脂 20 g, dH_2O 1 000 mL, pH 为 7.2。2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑培养基 (TTC): 酸水解酪蛋白 1 g, 蛋白胨 10 g, 蔗糖 5 g, 琼脂 20 g, dH_2O 1 000 mL, pH 7.2。TTC 用 dH_2O 配成 1% (质量浓度) 溶液并用细菌过滤器滤过灭菌, 在培养基倒平板前 (冷却至约 45°C) 每 100 mL 培养基加入 0.5 mL。

1.2 方法

1.2.1 青枯菌的培养 固体培养: 无菌条件下, 用接种环将保存于 -20°C 的青枯菌种 HX12 划线接种至 NA 平板培养基上, 于 30°C 避光条件下活化 24 ~ 48 h 备用。

液体培养: 将经平板活化的菌种 HX12 接种至 NA 培养液中, 于 30°C 、180 r/min 避光条件下进行恒温振荡培养, 得到细菌悬浮液。

1.2.2 青枯菌生长曲线的测定 将细菌悬浮液 1 mL 接种至 100 mL 装液量为 500 mL 的三角瓶中, 于 30°C 下 180 r/min 恒温振荡培养。接种后每隔 8 h 取样, 适当稀释后测定各培养时间菌液的 A 值 (OD_{600}), 以不接菌的 NA 培养液为空白对照, 平行操作 3 次。

1.2.3 青枯菌培养特性试验 根据试验要求, 分别设置不同的培养温度、pH 值以及营养条件对青枯菌 HX12 的培养特性进行考察。

1.2.4 数据处理 文中数据均为同一条件下 3 次重复的平均值, 多组间均数的比较采用 One-way ANOVA Dunnett's T3 法, 数据处理和图表制作由

SPSS Statistics 17.0 和 Microsoft Excel 2003 等软件完成, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 青枯菌 HX12 生长曲线的测定

对青枯菌 HX12 进行液体培养, 每隔 8 h 取样, 测定各培养时间菌液的 A_{600} 。根据张燕玲等^[3]建立的青枯菌活菌数与菌液之间的回归方程, 绘制青枯菌的生长曲线, 见图 1。

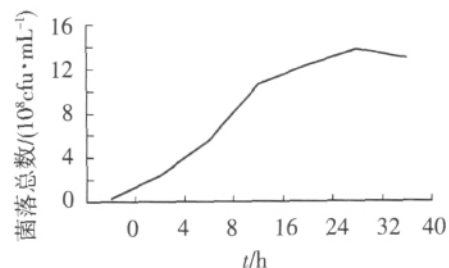


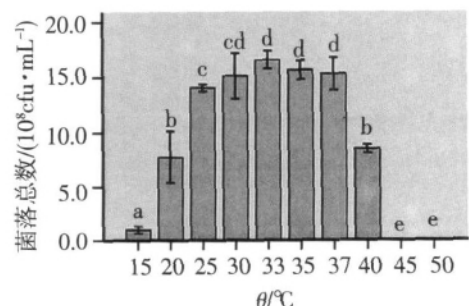
图 1 广藿香青枯菌 HX12 的生长曲线

Figure 1 Growth curve of *R. solanacearum* HX12

结果表明: 培养 1 ~ 4 h 时, 菌株 HX12 处于生长延滞期; 4 ~ 16 h 处于对数生长期, 该时期细胞数目以指数的形式增长, 分裂速度快, 细胞群体在化学和生理性状上较为一致; 接种后 16 ~ 40 h 内处于稳定生长期, 该时期培养基中可利用的营养逐渐减少, 细胞外环境基质发生了较大的变化, 细胞的生长繁殖受到限制, 老细胞死亡数与新细胞增长数接近于平衡状态。

2.2 温度对青枯菌 HX12 生长繁殖的影响

将培养温度分别设置为 15、20、25、30、33、35、37、40、45、 50°C 进行试验, 将处于对数生长期的菌液按 1% 的接种量接种于 20 mL NA 培养液中, 于各温度下 180 r/min 进行恒温振荡培养, 12 h 后测定各培养液的 A_{600} , 试验结果见图 2。



注: 不同字母表示差异有统计学意义 (下同)

图 2 培养温度对广藿香青枯菌 HX12 生长繁殖的影响

Figure 2 Effect of temperature on the multiplication of *R. solanacearum* HX12 from *P. cablin*

结果表明:青枯菌 HX12 在 15 ~ 40 °C 均能生长,为中温型微生物。在低温时生长较缓慢,在 25 ~ 37 °C 生长较快;而最适宜生长温度范围为 33 ~ 35 °C,此时菌体生长速度最快。从酶促反应动力学来看,温度升高,生化反应速率加快,基质消耗和生长代谢加快,但酶本身也很容易因热而丧失活性,当温度超过一定温度(45 °C) 酶很快失去活性,菌体生长也处于停滞状态。

2.3 培养基初始 pH 值对青枯菌 HX12 生长繁殖的影响

将培养基的 pH 值分别设置为 4.0、4.5、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0,将对数生长期的菌液按 1% 的接种量接种于 20 mL NA 培养液中,于 35 °C 下 180 r/min 进行振荡培养,12 h 后测定培养液的 A_{600} ,见图 3。

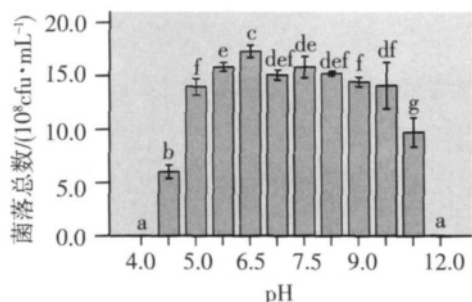


图3 培养基初始 pH 值对青枯菌 HX12 生长繁殖的影响

Figure 3 Effect of initial cultural pH on the multiplication of *R. solanacearum* HX12

结果显示,青枯菌 HX12 对酸碱环境的适应能力较强,在 pH5.0 ~ 10.0 的范围内均能较好生长,为嗜中性菌,最适生长 pH 范围为 6.0 ~ 7.5。当 pH 值低于 5.0 时,随着 pH 值降低,菌株生长速度明显下降;在 pH6.5 时,菌株生长最快,且与其他 pH 条件差异有统计学意义;当 pH 值高于 10.0 时,随着 pH 的升高,菌体生长速度也明显下降。因此,青枯菌 HX12 生长的最适初始 pH 值为 6.5。

2.4 不同碳源对青枯菌 HX12 生长繁殖的影响

以 NA 培养基为基础,分别用等量的经细菌过滤器(0.22 μm)过滤的葡萄糖、果糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖和木糖作为碳源进行试验,将对数生长期的菌液按 1% 的接种量接种于 20 mL NA 培养液中,于 35 °C、180 r/min 进行振荡培养,12 h 后测定培养液的 A_{600} 。以不接菌的 NA 培养液为空白对照,见图 4。

结果显示,青枯菌 HX12 在 9 种供试碳源培养基中均能生长,在果糖、麦芽糖、蔗糖和山梨醇培养

基中生长状况显著优于其他碳源培养基;其次为甘露醇,在葡萄糖培养基上生长最慢,菌株 HX12 在不加碳源的培养基中生长速度也较快。甘露醇和山梨醇为同分异构体,而山梨醇更易被菌株利用,这可能和酶构型与底物构型的互补性有关。菌株在五碳糖和六碳糖,单糖和双糖利用方面没有明显偏好性,而对于一般微生物偏好的葡萄糖则利用相对较少。菌株 HX12 在葡萄糖培养基中培养 12 h 后,培养基 pH 约为 4.3,推测这是菌株氧化利用葡萄糖产酸所致;而强酸性的环境不利于青枯菌株的生长繁殖,因此

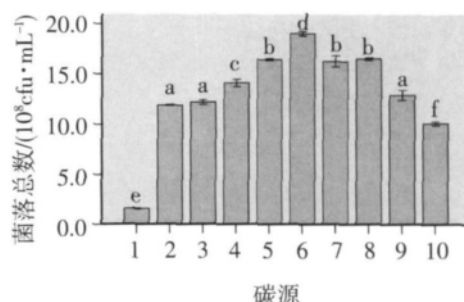


图4 不同碳源对青枯菌 HX12 的影响

Figure 4 Effect of various carbon sources on *R. solanacearum* HX12

2.5 不同氮源对青枯菌 HX12 生长繁殖的影响

以 NA 培养基为基础,分别以等量的牛肉浸膏、酵母膏、蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 KNO_3 替代 NA 培养基中的氮源牛肉浸膏,酵母膏和蛋白胨进行试验,将对数生长期的菌液按 1% 的接种量接种于 20 mL NA 培养液中,于 35 °C 下 180 r/min 进行振荡培养,12 h 后测定培养液的 A_{600} 。以不接菌的 NA 培养液为空白对照,见图 5。

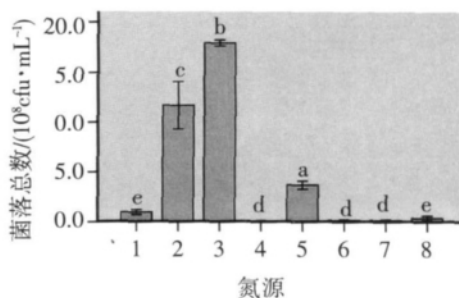


图5 不同氮源对青枯菌 HX12 的影响

Figure 5 Effect of different nitrogen sources on *R. solanacearum* HX12

从图 5 可以看出,青枯菌 HX12 在 7 种供试氮源培养基中生长差异较大,在酵母膏培养基中生长最快,蛋白胨次之,在无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 KNO_3 中生长情况较差,甚至呈现抑制生长的趋势。因此有机态氮比无机态氮更利于青枯菌 HX12 的吸收利用,这可能与有机态氮化合物中还含有其他促进菌体生长的因子(如 B 族维生素等)有关。青枯菌 HX12 对铵态氮和硝态氮的利用较差, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 和 KNO_3 对菌体生长呈抑制作用。对一般植物而言, NH_4NO_3 为生理中性盐, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是生理酸性盐。而青枯菌 HX12 在培养 12 h 后, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 氮源培养基均呈强酸性,可知青枯菌 HX12 对 NH_4NO_3 的利用以 NH_4^+ 为主,对 NO_3^- 则较难利用或者不利用;因此 NH_4NO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 是青枯菌的生理酸性盐,它们对菌体生长的抑制作用可能是通过酸碱性变化而引起的。至于 KNO_3 对青枯菌株 HX12 生长的抑制机理,尚有待于深入研究。

对比碳源空白培养基和氮源空白培养基对菌株生长的影响结果,菌株对氮源的依赖性似乎比碳源的强。但由于氮源空白培养基中的牛肉浸膏、酵母膏和蛋白胨可能含有其他形式的碳源,故结果需要进一步的验证。

3 讨论

植物细菌性青枯病是一种分布很广的植物毁灭性病害,是许多重要农作物生产的主要限制因子,故研究青枯病和寻找有效防治青枯病的方法是当今植物病理学研究的重要课题之一^[4]。广藿香是广东道地药材,广东地处华南亚热带地区,气候温暖、雨量充沛,为青枯病的发生与流行创造了极为有利的条件。本试验从青枯菌的生长状态、温度和 pH 值对青枯菌生长的影响,以及菌体对不同碳源和氮源的利用情况等方面研究了广藿香青枯菌的培养特性,为广藿香青枯病的防治奠定基础。

温度是影响植物细菌性青枯病发生和流行的关键气象因子之一,它通过影响细胞膜的流动性及运输系统的生理活性(酶催化反应等)来影响微生物对营养物质的吸收能力,从而影响细胞的生长繁殖^[5]。研究结果显示,青枯菌的最适生长温度范围为 33~35℃,这与青枯菌在炎热、多雨、潮湿的热带、亚热带和温带地区普遍流行相符合;而广藿香亦喜好温暖湿润气候,这为青枯菌侵染广藿香提供了客观条件。与在其他植物中分离的青枯菌相

比^[6-8],广藿香青枯菌对温度的适应性更强,对高温具有更强的耐受性,因此高温季节有利于广藿香青枯病的发生与蔓延。

已有人在姜等植物中分离出青枯菌,并对其进行了 pH 试验^[6-7],研究结果在最适生长初始 pH 值(6.5)和最低生长速度时 pH 值(4.0)方面与本试验基本一致;而广藿香青枯菌最高耐受 pH 值达到 11.0,表现出对碱性环境更强的适应性。在农业耕作中常通过施加适量生石灰降低土壤酸度的方法来控制青枯病害,但广藿香对栽培土壤的要求较高,土壤 pH 以 4.5~5.5 的微酸性环境为宜,且广藿香青枯菌对碱性环境的适应性较强,因此生石灰的施用难以有效控制广藿香青枯病的危害。农业生产上认为偏酸性土壤有利于青枯病的蔓延^[9],与本试验结果相符,大多数作物生长的土壤以微酸性为宜,而偏酸性的环境也有利于青枯菌的繁殖,因此这种生态重叠也正为青枯菌侵染广泛的寄主植物提供有利的条件。

碳素作为生物细胞的结构骨架,约占细胞干物质的 50%,是细胞的主要元素。大多数微生物是化能异养型的,以有机化合物为碳源;而根据微生物所能产生的酶系不同,不同的微生物可以利用不同的碳源^[5]。许多微生物与寄主植物存在密切的联系,并且从寄主植物中获得碳源和其他养分^[10],其中单糖(葡萄糖和果糖等)是主要的碳源^[11]。微生物可生活在植物体表或体内,而且集中分布在分泌“营养”的部位^[12],这与微生物的趋化性有关。因此病原菌在寄主体内的分布是有规律的,而青枯菌在广藿香体内的分布及其互作机制有待进一步研究。

钾肥在中草药生产中的应用日益广泛,作用越来越重要。它不仅对作物的产量和质量影响很大,而且还影响青枯病的发病程度,如在烟草生产中适当提高钾肥施用量可以减轻病害的发生^[13]。本研究结果表明,在添加 KNO_3 的培养基中,青枯菌生长量低于对照组,表明 KNO_3 对青枯菌的繁殖呈抑制作用。此外,青枯病是典型的维管束病害, KNO_3 可以促进植物维管组织的生长,增强植物的抗逆性。因此,在广藿香生产中适当施加钾肥 KNO_3 将有利于减轻青枯病的危害。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 42.
- [2] 黄宁珍. 茄科植物抗青枯病特性研究及其应用展望 [J]. 广西植物 2002 22(6): 572-576.

- [3] 张燕玲, 贺红, 吴立蓉, 等. 广藿香抗青枯病离体筛选技术的研究[J]. 广西植物, 2009, 29(5): 678-682.
- [4] 林尤剑, 顾钢, 陈顺辉. 作物青枯病防治研究的现状与对策[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(3): 297-303.
- [5] 杨生玉, 王刚, 沈永红. 微生物生理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [6] 承河元, 徐晓明, 黄慧琴, 等. 安徽省姜瘟病菌鉴定[J]. 安徽农学院学报, 1988, (1): 34-40.
- [7] 张广民, 范国强. 山东姜瘟病病原菌的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(4): 418-422.
- [8] 华静月, 张长龄, 何礼远. 我国植物青枯雷尔氏菌的生化型和其他生理差异[J]. 植物保护学报, 1984, 11(1): 43-50.
- [9] 王涛. 罗汉果青枯病病原菌生物学特性研究[D]. 广西: 广西大学, 2008.
- [10] BRENIC A, WINANS S C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria[J]. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, 61(1): 155-194.
- [11] DAVIS C L, BRLANSKY R H. Use of immunogold labeling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(10): 3052-3055.
- [12] WRIGHT C A, BEATTIE G A. *Pseudomonas syringae* pv. Tomato cells encounter inhibitory levels of water stress during the hypersensitive response of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(9): 3269-3274.
- [13] 卢洪兴, 邱志丹, 曾军, 等. 烟草青枯病发生与防治研究[J]. 烟草科技, 1995(5): 42-45.
- (责任编辑: 刘晓涵)

美国 FDA 宣布女性植入硅胶隆胸可能引发间变性大细胞淋巴瘤

美国 FDA 于 2011 年 1 月 26 日宣布, 女性植入硅胶隆胸可能会引起一种非常罕见的癌症, 即间变性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphoma, ALCL)。FDA 掌握的数据显示, 进行过植入性隆胸手术的女性其邻近植入假体的疤痕包膜组织可能会有很小但显著的 ALCL 发病率。

FDA 要求医疗从业人员及时报告进行过的植入性隆胸手术的妇女确诊 ALCL 的病例。并且为了确保植入性隆胸术使用者获悉相关的风险, FDA 将与乳房假体生产厂家一道对产品的标签和说明书进行更新。

FDA 之所以发出这一警告, 是基于对 1997 年 1 月至 2010 年 5 月发表的科学文献所进行的评估, 此外还有来自于其他国际管理机构、科学家及乳房假体生产厂家的信息和数据。科学文献显示, 有 34 名同时注入生理盐水和植入硅胶假体的女性患上了 ALCL。

据美国国立癌症研究院(National Cancer Institute)的研究, ALCL 可发生于身体的不同部位, 包括淋巴结和皮肤。在美国, 每年在约 50 万名女中就会诊断出一例 ALCL; 而在没有植入乳房假体的女性中, 平均 1 亿名女性仅有 3 例会在乳腺组织中产生 ALCL。

据 FDA 掌握的数据, 在全世界范围内, 大约有 60 名进行过植入性隆胸手术的女性患上 ALCL。而且这一数字并不确切, 因为科学文献并不一定对所有的病例都进行了报道, 同时有些病例可能是重复的。据估计, 全世界约有 500 到 1000 万名女性进行过植入性隆胸手术。

FDA 掌握的情况是, 大多数病例是进行过植入手术且伤口愈合后因产生相关后遗症症状如疼痛、出现肿块、肿痛或乳房不对称等情况去寻求治疗时被诊断出 ALCL 的。医生在为患进行检查时, 如果乳房假体周围出现迟发性的持续性皮下积液, 那么应该考虑是不是 ALCL, 此时应对皮下积液进行病理学检查以排除 ALCL 的可能。

已经植入乳房假体的女性无必要改变其日常检查及跟踪检查方式。ALCL 的发病非常罕见, 在进行过植入性隆胸手术的女性中 ALCL 患者的比例非常小。考虑要进行类似手术的女性可向有关医疗专业人士就手术的风险进行咨询。

FDA 在其网站上发表了一篇文献综述, 其题目是“Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) in Women with Breast Implants: Preliminary FDA Findings and Analyses”。

(来源: 美国 FDA 新闻稿 2011-01-26 夏训明编译)