

# 番茄青枯菌分泌物中热稳定成分的毒性研究

汪国平<sup>1</sup> 吴定华<sup>1</sup> 曾宪铭<sup>2</sup>

(1 华南农业大学园艺系, 广州 510642; 2 华南农业大学资源环境学院)

**摘要** 研究了青枯细菌毒性菌株平板培养滤液(PCF)中热稳定性成分对番茄组织培养物的影响。结果表明: PCF中含有一类非酶、非胞外多糖(EPS)的热稳定毒性物质, 它对番茄叶片脱分化过程有抑制作用, 抗病材料较感病材料敏感, 另外, 它对番茄试管苗生根也起抑制作用; EPS没有上述抑制作用。

**关键词** 青枯菌; 毒性成分; 番茄; 组织培养

**中图分类号** S 436.412.15

青枯细菌(*Pseudomonas solanacearum* Smith)引起的青枯病是农作物的一种重要病害, 研究其致病机理对控制该病发生及危害有重要的理论指导意义。寄主植物组织培养为致病机理研究提供了一种较好的方法, 特别是在研究毒素作用机理方面应用更多。组培方法应用于青枯菌致病机理研究国内还不多见。

本文用番茄组织培养物作试材, 对青枯菌毒性菌株分泌物中的热稳定性物质的毒性进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及番茄材料

菌株为从番茄病株上分离的毒性菌株(汪国平等, 1998)。供试番茄材料为: 抗病材料“湘引”、“亚鲜”, 中抗材料“GA26”, 感病材料“苔藓”、“Floradade”(乐素菊等, 1995)。

### 1.2 青枯菌平板培养滤液(PCF)的制备

制备方法见前文(汪国平等, 1998); 制备出的 PCF 液 pH 为 4.25, 使用时用 2 mol/L NaOH 调至 5.8。

### 1.3 胞外多糖(EPS)的提取

EPS 从 PCF 中提取, 提取方法按 Akiyama 等(1986)方法。

### 1.4 PCF、EPS 致萎力测定

PCF、EPS 液设不加热、加热 2 种处理: 以溶液经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤灭菌作不加热处理; 以溶液经过滤灭菌后再经高温高压灭菌(121  $^{\circ}\text{C}$ 、1.1  $\text{kg}/\text{cm}^2$ 、15 min)作为加热处理。PCF 液设 6 种浓度,  $\varphi$ (PCF)分别为 50.00%、25.00%、12.50%、6.25%、3.13%、1.57%, 以  $\varphi=50.00\%$  的液体细菌培养基作对照; EPS 液设 6 种浓度,  $\rho$ (EPS)分别为 5.00、2.50、1.25、0.63、0.32、0.16 g/L, 以蒸馏水作对照。

感病材料“苔藓”用于致萎力测定, 测定方法及萎蔫分级按 Husain 等(1958)的方法。

1.5 PCF、EPS 对番茄叶片脱分化的影响

以 MS+KT(4 mg/L)+IAA(4 mg/L)为脱分化培养基, 高温高压灭菌后再加入经过滤灭菌或高压灭菌的 PCF、EPS, 使最终含量为所需浓度. 将番茄的无菌苗真叶切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 接入培养基, 15 d 后观察叶片脱分化形成愈伤组织的程度.

1.6 PCF、EPS 对番茄试管苗生根的影响

生根培养基为 MS+IBA(0.5 mg/L), 高压灭菌后加入经加热处理的 PCF、EPS, 使其最终含量为所需浓度. 将番茄的无菌实生苗继代 3 次(每隔 2 周继代 1 次), 让维管系统充分发达, 再剪取上部 4 cm, 插入加有 PCF、EPS 的生根培养基, 观察发根情况.

2 结果与分析

2.1 PCF、EPS 对感病材料“苔藓”插条的致萎情况

“苔藓”插条在不加热处理的 PCF 液、EPS 液中出现田间青枯病典型的萎蔫症状, 严重度随浓度升高而增大, 对照组插条不萎蔫, 说明 PCF、EPS 含有青枯菌分泌的致病成分. 加热处理后, EPS 组插条萎蔫级值平均下降 0.2, 说明 EPS 对热具较高的稳定性; PCF 组萎蔫级值平均下降 1.4, 下降较大的原因可能是 PCF 中部分大分子物质受热凝聚沉淀, 不能再进入插条的导管起堵塞作用, 虽然加热后 PCF 致萎力减弱, 但高浓度[ $\varphi(\text{PCF})=50.00\%$ ]时萎蔫级值仍可达 3, 说明加热处理后 PCF 中仍有具致萎能力的热稳定物质, 其中包括 EPS.

在 PCF 组中, 还观察到插条茎部严重干缩现象. 不加热组, 当  $\varphi(\text{PCF})\geq 12.50\%$  时, 叶片及上部茎端先萎蔫, 然后插条的浸没部分慢慢失去膨压状态, 10 h 时完全干缩, 这与 Husain 等(1958)用未加热的液体培养滤液原液试验所得的结果基本相同. 加热处理组, 当  $\varphi(\text{PCF})\geq 25.00\%$  时, 插条也出现干缩现象, 叶缘干焦、内卷, 但叶片不萎垂, 上部茎端直立, 这与 Husain 等(1958)的试验中加热处理后插条无干缩现象结果不同, 不同的原因可能在于两者制备的培养液中热稳定性成分含量不同.

不加热和加热处理的 EPS 液, 即使  $\rho(\text{EPS})$  高达 5.00 g/L, 都不会使插条茎部出现干缩现象.

2.2 PCF、EPS 对番茄叶片脱分化的影响

番茄叶片的脱分化过程明显受 PCF 抑制, 不加热和加热处理的 PCF 液抑制效果相同(表 1), 这说明 PCF 中起抑制作用的物质, 其抑制能力不受高温高压的影响, 具有热稳定性; 而无论是不加热还是加热处理的 EPS, 都不能对番茄叶片脱分化过程起抑制作用.

表 1 不加热和加热处理的 PCF、EPS 毒性比较<sup>1)</sup>

| 致病物质                          | $\varphi(\text{PCF})/\%$ | 处 理 | 基因型  |      | 致病物质                          | $\rho(\text{EPS})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 处 理 | 基因型  |      |
|-------------------------------|--------------------------|-----|------|------|-------------------------------|-------------------------------------------------|-----|------|------|
|                               |                          |     | 湘引   | 苔藓   |                               |                                                 |     | 湘引   | 苔藓   |
| PCF                           | 4.00                     | 不加热 | —    | —    | EPS                           | 2.50                                            | 不加热 | ++++ | ++++ |
|                               |                          | 加热  | —    | —    |                               |                                                 | 加热  | ++++ | ++++ |
|                               | 2.00                     | 不加热 | —    | +    |                               | 1.25                                            | 不加热 | ++++ | ++++ |
|                               |                          | 加热  | —    | +    |                               |                                                 | 加热  | ++++ | ++++ |
| CK <sub>1</sub> <sup>2)</sup> |                          |     | ++++ | ++++ | CK <sub>2</sub> <sup>2)</sup> |                                                 |     | ++++ | ++++ |

1) 表中“—”表示叶片褪绿, 切口处变褐, “+”表示叶片脱分化形成愈伤组织, 个数多少表示程度; 2) CK<sub>1</sub> 加  $\varphi=4.00\%$  的液体细菌培养基; CK<sub>2</sub> 为不加任何成份的空白对照

表 1 中抗、感材料对 PCF 中的热稳定毒性物质反应存在差异, 为作更深入的比较, 作者还试验了加热处理后的 PCF 对 5 种不同抗性材料叶片脱分化过程的影响(表 2), 结果显示: 感病材料对毒性成分的忍耐力强,  $\varphi(\text{PCF})=2.00\%$  才能使“苔藓”, “Floradade”的相对受抑度超过 50%, 而抗病材料相对敏感, “湘引”、“亚鲜”相对受抑度在  $\varphi(\text{PCF})=1.00\%$  时即超过 50%, 甚至在  $\varphi(\text{PCF})=0.50\%$  时生长都受到明显抑制.

表 2 加热处理的 PCF 对不同抗性番茄叶片脱分化的影响<sup>1)</sup>

| 基因型       | 愈伤组织          | $\varphi(\text{PCF})/\%$ |       |       |       |       | CK <sup>2)</sup> |
|-----------|---------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|------------------|
|           |               | 4.00                     | 2.00  | 1.00  | 0.50  | 0.25  |                  |
| 湘引        | <i>m</i> 鲜/ g | 0.018                    | 0.031 | 0.056 | 0.064 | 0.102 | 0.117            |
|           | 相对受抑度/ %      | -84.2                    | -74.1 | -53.1 | -45.2 | -11.9 |                  |
| 亚鲜        | <i>m</i> 鲜/ g | 0.021                    | 0.040 | 0.046 | 0.054 | 0.086 | 0.094            |
|           | 相对受抑度/ %      | -78.3                    | -58.7 | -50.7 | -43.3 | -9.3  |                  |
| GA 26     | <i>m</i> 鲜/ g | 0.022                    | 0.041 | 0.074 | 0.116 | 0.119 | 0.134            |
|           | 相对受抑度/ %      | -84.0                    | -68.8 | -45.3 | -13.2 | -10.9 |                  |
| 苔藓        | <i>m</i> 鲜/ g | 0.021                    | 0.037 | 0.090 | 0.092 | 0.106 | 0.110            |
|           | 相对受抑度/ %      | -79.7                    | -66.3 | -18.1 | -15.9 | -4.1  |                  |
| Floradade | <i>m</i> 鲜/ g | 0.028                    | 0.034 | 0.080 | 0.085 | 0.092 | 0.099            |
|           | 相对受抑度/ %      | -72.2                    | -65.9 | -18.9 | -14.2 | -7.7  |                  |

1) 表中 *m* 鲜 为 20 块培养物鲜质量的平均值; 相对受抑度 = (处理 *m* 鲜 - 对照 *m* 鲜) / 对照 *m* 鲜; 2) CK 为加  $\varphi=4.00\%$  的液体细菌培养基

2.3 PCF、EPS 对番茄试管苗生根的影响

在含 PCF 的培养基中, 无论是抗病材料还是感病材料, 其试管苗的发根时间(*t*<sub>发根</sub>)均推迟、根数(*n*<sub>根</sub>)减少、根长(*l*<sub>根</sub>)缩短; 浓度越高, 这种抑制效果越明显(表 3). 高浓度[  $\varphi(\text{PCF})=9.00\%、6.00\%$  ] 时, 插入培养基内的茎部可见褪绿变白, 最后干缩, 但小苗并不出现萎蔫症状, 可能是试管内湿度大, 小苗蒸腾作用微弱, 缺乏出现萎蔫症状的外部条件. 培养基内的茎部在褪绿变白过程中, 其上不产生根, 而在培养基表面以上的茎部产生不定根(高位生根), 这种高位根在未接触到培养基前生长正常, 一旦接触到培养基, 即明显表现出受毒害症状, 生长点变褐, 根伸长极慢.

表 3 加热处理的 PCF 对番茄试管苗生根的影响<sup>1)</sup>

| 基因型       | $\varphi(\text{PCF})/\%$ |                  |            |             |                  |            |             |            |            | CK <sup>2)</sup> |            |            |
|-----------|--------------------------|------------------|------------|-------------|------------------|------------|-------------|------------|------------|------------------|------------|------------|
|           | 9.00                     |                  |            | 6.00        |                  |            | 3.00        |            |            | <i>t</i> 发根      | <i>n</i> 根 | <i>l</i> 根 |
|           | <i>t</i> 发根              | <i>n</i> 根       | <i>l</i> 根 | <i>t</i> 发根 | <i>n</i> 根       | <i>l</i> 根 | <i>t</i> 发根 | <i>n</i> 根 | <i>l</i> 根 |                  |            |            |
|           | / d                      | / 条              | / cm       | / d         | / 条              | / cm       | / d         | / 条        | / cm       | / d              | / 条        | / cm       |
| 湘引        | 10.7                     | 2.4 <sup>†</sup> | 0.37       | 9.8         | 9.3 <sup>†</sup> | 0.49       | 6.0         | 9.6        | 0.53       | 5.8              | 15.3       | 3.83       |
| 亚鲜        |                          | 0                |            | 12.4        | 2.7              | 0.45       | 11.6        | 2.8        | 1.10       | 6.0              | 19.0       | 5.36       |
| GA 26     | 14.3                     | 4.3 <sup>†</sup> | 0.57       | 10.3        | 9.1 <sup>†</sup> | 0.62       | 5.3         | 12.7       | 0.96       | 5.9              | 42.4       | 2.82       |
| 苔藓        | 9.2                      | 5.7 <sup>†</sup> | 0.91       | 5.1         | 4.8              | 0.59       | 5.2         | 28.3       | 1.28       | 5.0              | 30.8       | 3.50       |
| Floradade | 15.8                     | 2.0 <sup>†</sup> | 0.45       | 14.0        | 0.4 <sup>†</sup> | 1.10       | 7.7         | 3.0        | 0.81       | 6.2              | 23.2       | 2.95       |

1) 以发生肉眼可见根原基计发根天数; 表中数值为 10 株平均值(含非高位根及高位根); 有 <sup>†</sup> 号者为出现高位生根现象; 2) CK 为加  $\varphi=9.00\%$  的液体细菌培养基

表3中的数值因材料不同差别较大,但这难于与材料的抗、感性联系起来,因为不同的基因型,其发根特性及对生根培养基的适应性不同,这从对照组数据可以看出。

在  $\rho(\text{EPS})=2.50, 1.25 \text{ g/L}$  经加热的 EPS 生根培养基上,5 个番茄材料试管苗生根未见推迟,5~6 d 时均发生可见根原基,15 d 时观察,处理组内的试管苗都能诱导出良好根系,形成完整小苗,整个小苗未见任何不正常的生长特征,说明 EPS 对生根不起抑制作用。

### 3 结论与讨论

青枯菌的致病机理十分复杂,目前国内外的研究热点主要集中于青枯菌分泌的各种酶及 EPS(何礼远,1995)。本试验制备的 PCF 包含着青枯菌分泌的各种酶及 EPS,加热处理所用的高温及时间( $121^\circ\text{C}$ , 15 min)足以使酶失活,然而,PCF 仍能使插条出现干缩现象、抑制叶片脱分化形成愈伤组织、抑制试管苗根的生长,但 EPS 却不能起这些作用,这说明,PCF 中存在一类非酶、非 EPS 的热稳定性毒性物质。

从插条茎部失去膨压状态而干缩、诱愈过程中叶片变褐死亡、试管苗插入培养基内的茎部褪绿变白、干缩等症状推断,这类毒性物质很可能与细胞膜透性有关。抗、感材料组织培养物对这类物质都有反应(表1、2、3),但在脱分化过程中抗性材料较感性材料敏感(表2)。

这类物质是否为毒性菌株所特有,它在青枯病发生过程中起何种作用,有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- 乐素菊,吴定华,梁承愈.1995.番茄青枯病的抗性遗传研究.华南农业大学学报,16(4):91~95  
汪国平,吴定华,曾宪铭.1998.番茄愈伤组织对青枯病菌及其培养滤液的抗性研究.华南农业大学学报,1998,19(1):54~57  
何礼远,康耀卫.1995.植物青枯菌致病机理.自然科学进展——国家重点实验室通讯,5(1):7~16  
Akiyama Y,Eda S,Nishikawaji S,et al.1986.Extracellular polysaccharide produced by a virulent strain(U-7) *Pseudomonas solanacearum*.Agric Biol Chem,50(3):747~751  
Husain A,Kelman A.1958.Relation of slime production to the mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*.Phytopathology,48:155~165

### STUDY ON THE TOXICITY OF THE HEAT-STABLE SUBSTANCE EXCRETED BY A VIRULENT STRAIN OF *Pseudomonas solanacearum*

Wang Guoping<sup>1</sup>   Wu Dinghua<sup>1</sup>   Zeng Xianming<sup>2</sup>

(1 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642; 2 College of  
Resources and Environment, South China Agric. Univ.)

#### Abstract

The effects of the heat-stable substance excreted by a virulent strain of *Pseudomonas solanacearum* on tissue cultures of tomatoes were studied. The results showed that there existed a kind of toxic component in the plateoculture filtrate(PCF), which was demonstrated to be neither enzymes nor extracellular polysaccharide (EPS). This substance was toxic to the differentiation of tomato leaf discs and the rooting of shoots, while EPS had not such effect.

**Key words** *Pseudomonas solanacearum*; toxic substance; tomato; tissue culture

[责任编辑 柴 焰]