

植物维管组织的难养菌的分离和培养

史 春 霖

(中国科学院微生物研究所,北京)

多种微生物,包括真菌、细菌、支原体、原生动物和病毒,都能诱发植物维管组织病害。容易培养的真菌和细菌的病原作用早已确立,而难养菌在植物病害中所起的作用却不易阐明。多数情况下,尽管没有任何证据说明染病植物体存在病毒体,却常常把这些病害看成是病毒所致。

1973年, Windsor 等在感染三叶草棒叶病的三叶草和感染柑桔绿化病的柑桔的韧皮部中,发现了一类限于韧皮部的有胞壁的难养菌。同年,美国加利福尼亚州 Goheen 和佛罗里达州 Hopkins 所领导的两个独立的实验室,又在感染葡萄皮尔氏病的葡萄中发现了一类定居于木质部的有胞壁的难养菌。因为它们有光

滑的或波纹状的胞壁,不能在普通细菌培养基上生长,与已知的其他植物病原菌明显不同.利用相差显微镜和电子显微镜容易观察到这两类细菌。

到目前为止,科学工作者发现,难养菌不是限定于木质部就是限定于韧皮部和薄壁组织内生长,还未见同一类难养菌既能在木质部又能在韧皮部生长的报告。

自1973年以来,对难养菌及其引起的植物病害的研究已取得很大进展.因限定于木质部的难养菌已能在体外分离培养,所以比到目前尚不能分离培养的,限定于韧皮部的难养菌研究得深入些。

本文除了对限定于韧皮部的难养菌作简要介绍外,主要介绍限定于木质部的难养菌的体外分离培养。

(一) 限定于韧皮部的菌

限定于韧皮部的菌不规则的分布在维管束中,主要发现在成熟的筛管分子中.细菌直径一般0.2—0.35微米,长1—3微米.此类菌具有双层三片层结构的膜,实际上是一层胞壁和一层胞质膜.光滑的膜质胞壁(8nm厚)和胞质膜(8nm厚)被一电子透明带(5—15nm厚)分隔开.对抑制细菌胞壁合成的青霉素敏感,是这类菌的一个特性。

已发现的限定于韧皮部的菌:

(1) 三叶草棒叶菌:棒状(0.2×2.0 μm),有光滑的胞壁.在有棒叶病状的三叶草中发现。

(2) 柑桔绿化菌:具有光滑胞壁的棒状菌(0.3×3.0 μm).存在于染病柑桔的韧皮筛管分子中。

(3) 马铃薯小叶矮化菌:棒状菌(0.2—0.3×1.0—2.4 μm),具有薄的、光滑的膜质胞壁.存在于染病马铃薯韧皮细胞中。

(4) 葡萄传染性坏死菌:棒状菌(0.25—0.5×1.1—2.4 μm),具有波纹状的细胞壁.此菌在形态上类似皮尔氏病菌,但不能用培养皮尔氏病菌的培养基分离培养,故认为两者是不同的菌。

(5) 三叶草约叶菌:棒状菌(0.25×1—2 μm),具有波纹状胞壁.存在于病株韧皮筛管和韧皮薄壁组织中。

(6) 苹果增生菌:棒状菌(0.35×1.3 μm),在形态和超微结构上类似皮尔氏病菌.存在于韧皮部、管胞和薄壁组织中,偶而在染病苹果树的木质部中观察到。

到目前为止,此类菌还不能分离培养.判断此类菌诱发植物病害的主要根据是:(1)病状表达和植物体中存在病菌之间的高度专一性;(2)用青霉素处理病株后病原消失并伴有病状缓解。

(二) 限定于木质部的菌

限定于木质部的难养菌,全是短的无运动力的棒状菌,大小为0.2—0.5×1.0—4.0 μm .此类菌外壁呈波纹状(厚8nm),内胞质膜(厚8nm),胞壁和胞质膜被一电子透明带(厚10—15nm)分隔开.内部超微结构有核糖体样小粒和类似DNA的丝状物组成的核区。

已发现的限定于木质部的菌:

(1) 洋李焦叶菌:棒状菌(0.35×5 μm),已从感染焦叶病的洋李中分离出,能在人工培养基上培养.野生洋李和樱桃也是该菌的寄主。

(2) 伪桃病菌:棒状菌(0.35×2—5 μm),存在于染病桃树的根中,能分离培养.该菌也感染油桃,并曾在樱桃中发现。

(3) 豚草菌:棒状菌(0.35×2—5 μm),形态上类似洋李焦叶菌和伪桃菌.从邻近柑桔园的不表现病状的豚草茎部分离到,由靠近桃园处采集的石茅高粱的茎中也观察到类似的病菌。

(4) 葡萄皮尔氏菌:棒状菌(0.25—5×1.1—2.3 μm).是第一个体外分离培养成功的难养菌.该菌也能侵染扁桃和苜蓿。

(5) 榆树焦叶菌:棒状菌(0.3—0.4×0.9—2.4 μm),能体外分离培养。

(6) 长春花枯萎菌:棒状菌(0.25—0.4×2—5 μm),形态和生化性质类似洋李焦叶菌,能体外分离培养。

(7) 三叶草枯萎菌：棒状菌 (0.2—0.3 × 1.5—3.0 μm)，由染病的苏门答腊三叶草茎部分离出，能体外培养。

(8) 美国梧桐焦叶菌：棒状菌 (0.3—0.4 × 1—1.8 μm)，能体外分离培养。

(9) 橡树焦叶菌：棒状菌 (0.3—0.4 × 1—2 μm)，能体外分离培养。

(三) 难养菌的分离培养

研究植物病理学、病原菌的分类学和分子生物学的一个重要的步骤是分离病原。1928年，首次分离培养成功了限于木质部的诱发葡萄皮尔氏病的难养菌。此后，限于木质部的许多难养菌都已在体外分离培养。

1. 培养基：因为早期曾把难养菌称作“类立克次氏体”，所以，分离培养难养菌的培养基是参照分离培养五日热罗卡利马氏体菌 (*Rochalimaea quintana*)——立克次体科的一个成员的培养基设计的。培养基中两种主要成分是：氯化血红素和牛血清清蛋白。在生长早期，前者可起防止细菌的过氧化作用。后者是解毒剂，主要功能是吸附分离过程中存在于培养基中的寄主组织中抑制生长的因子。此外，还添加其他成分。

目前，已开发了9种用于分离培养难养菌的培养基。但根据作者所在实验室的经验，在实际工作中，采用 BCYE 和 PW 两种培养基就够了。这两种培养基的组成见表 1, 2，不加琼

表 1 BCYE 培养基的组成

酵母膏	10g
L-半胱氨酸-盐酸 ^a	0.4g
焦磷酸铁 ^a	0.25g
活性炭 (Norit 5G)	2g
ACES 缓冲剂 ^c	10g
琼脂	17g
蒸馏水	100ml
pH6.7	

脂，便可制备液体培养基。

目前所采用的培养基成分较复杂。科学家们正努力对现有培养基进行改进，希望能简化其组成，而能满足难养菌的生长需求。

表 2 PW 培养基的组成

多蛋白胨	5g
谷酰胺	0.4g
氯化血红素 ^b	10mg
磷酸氢二钾	1.2g
磷酸二氢钾	1g
硫酸镁	0.4g
牛血清清蛋白 V	0.6g
酚 红	0.002g
琼 脂	12g
蒸馏水	1000ml
pH6.9	

a. 滤器灭菌，添加到高压灭菌冷却到 50℃ 的基础培养基中。

b. 用 10ml, 0.5N 氢氧化钠溶解。

c. 50℃ 溶在 500ml 水中，然后同 40ml, 0.1N KOH 混合。

2. 分离技术：限于木质部的、革兰氏阴性难养菌的分离，要先将新鲜的染病组织剥去皮，用次亚氯酸钠作表面消毒，无菌蒸馏水冲洗。可采用三种分离方法：

(1) 将木质部汁液涂布在琼脂平板上：染病植物的根、茎或细枝切成 2cm 长的块，去皮，用 1% 次亚氯酸钠 (含 3% 乙醇) 消毒 5 分钟，再用无菌水冲洗。消毒程序要重复 2—4 次，然后将组织块在无菌条件下放入培皿中，切除两端，暴露出新鲜的木质组织。将组织块放在手钳中，缓缓挤压，把榨取出的汁液涂布在琼脂平板上。每一平板用 4—6 块组织榨取液接种。

(2) 制备液体接种物：染病植物的根、茎、叶柄或细枝切成 2cm 长的块，剥皮，表面消毒 (3—5 次) 后转至灭菌的离心管中，加 5—10ml 过滤灭菌的磷酸缓冲生理盐水 (PBS, 0.1mol/L, pH6.6)，20,000 × g 离心 10 分钟，离心后，充分振荡管子，然后取 0.5—1.0ml 含菌的生理盐水接种每一平板。

(3) 研磨浸泡的组织制备接种物：染病组织切成块，剥皮，表面消毒 (3—5 次) 后放入灭菌的研钵中，加 10ml 过滤灭菌的 PBS，将含菌的上清液收集到灭菌的试管中，用 PBS 或无菌蒸馏水作系列的 2 倍稀释，然后用这些稀释物接种平板。

3. 培养条件：难养菌的成功分离培养，需

要注意物理生长条件和菌落或培养物的生长状况。

革兰氏阴性难养菌是需氧菌。所以,在正常大气条件下就能生长。在人工培养基上,要求的温度范围为 20—28℃。

难养菌生长的 pH 范围极狭窄,酸化可抑制菌的生长,一般 pH 范围为 6.6—7.1。

细菌分离物,每 7—30 天,必须在新鲜培养基上划线作继代培养,这要视特定菌系和培养基而定。早期继代中,菌落趋于分散,呈囊状微小菌落,转代时,必须小心地挑取单一菌落。后期继代培养,在琼脂上长出均一的菌丛。

就洋李焦叶菌而言,在 BCYE 琼脂上,25℃ 下,初次继代培养可连续生长 58 天。生长曲线趋向于 S 型。后期继代培养生长较快,7—10 天后便进入静止期。

4. 形态和培养特征: 限于木质部的革兰氏阴性难养菌能在 BCYE 或 PW 培养基上生长。菌落是散生的、乳白色、圆形。有两种类型的菌落: 一类是光滑的乳白色菌落; 另一类是粗糙的乳白色菌落, 此类菌落的边缘常为绿色或红色。

用新鲜材料作分离时,在 BCYE 琼脂平板上长出的光滑菌落主要由密集的缠绕在一起的丝状细胞组成。粗糙菌落则由单一的棒状细胞组成。

液体培养物,一般由散生的单个细胞组成,但有些菌系形成聚集物。用补加 0.05mol/L 甘露糖的 PW 液体培养基培养时,多数菌系的培养物中也可看到长丝。

利用透射或扫描电镜检查所有菌系的负染色制备物,看到两端圆或一端圆一端尖的棒状细胞,胞壁表面有不规则的波纹。

(四) 结语

对来自植物的、难养的、有壁原核生物的研究,仍处在早期发现阶段。科学文献中还不

报导这类同植物病害相关的难养菌。由于这类微生物的难养性,所以在多数情况下,必须克服由特定类型需要复杂营养的菌所造成的特殊问题。

对这类难养的、有壁的原核生物的分类问题,还未得到圆满的解决。关于限于木质部的革兰氏阴性难养菌,分离培养的文章已发表了不少,看来大多培养基成分尚嫌复杂,有待进一步简化。

另外,限于韧皮部的难养菌,体外培养迄今还未成功。所以,有些难养菌工作者正致力于对限于韧皮部难养菌的分离培养工作。只有能在体外容易地培养这类微生物,才能正确地对其进行分类和在分子生物学水平上作深入的研究工作。

参 考 文 献

- [1] Davis, M. J. et al.: *Science*, 199: 75—77, 1978.
- [2] Davis, M. J. et al.: *Science*, 210: 1365—67, 1980.
- [3] Davis, M. J. et al.: *Curr. Microbiol.*, 6: 309—314, 1981.
- [4] Goheen, A. C. et al.: *Phytopathol.*, 63: 341—45, 1973.
- [5] Hearon, S. S. et al.: *Can. J. Bot.*, 58: 1986—93, 1980.
- [6] Hopkins, D. L. et al.: *Science*, 179: 298—300, 1973.
- [7] Hopkins, D. L.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 15: 277—94, 1977.
- [8] Klein, M. et al.: *Phytopathol.*, 66: 564—69, 1976.
- [9] Lee, I. M. et al.: *Annu. Meet. Am. Phytopathol. Soc.* 181, 1981.
- [10] Liao, C. H. et al.: *Phytopathol.*, 71: 1303—1306, 1981.
- [11] Myers, W. F. et al.: *J. Bacteriol.*, 97: 663—66, 1969.
- [12] Nienhaus, F. et al.: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 17: 37—58, 1979.
- [13] Wells, J. M. et al.: *Phytopathol.*, 70: 817—20, 1980.
- [14] Wells, J. M. et al.: *Phytopathol.*, 71: 1156—61, 1981.
- [15] Wells, J. M. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42: 357—63, 1981.
- [16] Windsor, I. M. et al.: *Phytopathol.*, 63: 1139—48, 1973.
- [17] Raju, B. C. et al.: *Phytopathol.*, 72: 1460—66, 1982.