

# 培养条件对青枯雷尔氏菌脂肪酸组成的影响

朱育菁 苏明星 黄素芳 王秋红 刘波\*

(福建省农业科学院农业生物资源研究所 福建 福州 350003)

**摘要:** 应用气相色谱技术测定不同温度、培养时间、pH 值等培养条件下青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)脂肪酸的结果表明: 青枯雷尔氏菌强致病力菌株 Rs-J.1.4-010704-01v 的脂肪酸种类有 14~34 种, 主要特征脂肪酸为 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH(10.644 min), C16:0(10.950 min), C18:1 $\omega$ 7c(14.177 min), 所占总百分比含量为总脂肪酸的 55.66%~75.69%; 该菌脂肪酸的种类与含量随着培养条件的改变而发生变化, 经聚类分析聚成 4 类。在培养温度为 20°C 和 25°C 时, 表现为 C16:0<C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH, 属于过渡性致病力的类群。在 30°C~40°C、24 h~96 h、pH 5~9、4 种培养基(LB、NA、TTC 和 TSB)的条件下, Rs-J.1.4-010704-01v 均表现强致病菌株的脂肪酸特征, 即 C16:0>C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH。但是, 在培养条件分别为 40°C 和 48 h~96 h 时, C16:0 与 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 差值显著地增大, 由 2.35% 上升至 13.23%; 同时, 随着培养时间的延长, 脂肪酸种类也增加至 >30 种。研究表明: 温度和培养时间比 pH 值和培养基种类的影响更显著。

**关键词:** 青枯雷尔氏菌, 脂肪酸, 培养条件

## Effect of Cultural Condition on Fatty Acid Composition of *Ralstonia solanacearum*

ZHU Yu-Jing SU Ming-Xing HUANG Su-Fang WANG Qiu-Hong LIU Bo\*

(Agricultural Bioresource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** Fatty acids of *Ralstonia solanacearum* cultured under different temperatures, times, pH values and cultural media were detected by using gas chromatography (GC) method. Rs-J.1.4-010704-01v, a virulent strain of *R. solanacearum* isolated from ginger was chosen for the experiment. The results showed that the kind of fatty acid of Rs-J.1.4-010704-01v fluctuated from 14 to 33. The contents of its three plentiful fatty acids, C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH, C16:0 and C18:1 $\omega$ 7c (with retain times of 10.644, 10.950 and 14.177 min, respectively), also varied in a range of 55.66% to 75.69%. The diversification of the bacterium's fatty acids at various cultural conditions was clustered into four groups by cluster analysis, according to the kinds and percentage contents of the fatty acids detected. The pathogenicities of Rs-J.1.4-010704-01v under 20°C and 25°C were deduced to be mid-virulent, with C16:0 less than C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH. The bacterium showed as a virulent strain under the other cultural conditions including 30°C~40°C, 24 h~96 h, pH 5~9 and four cultural media (LB, NA, TTC and TSB), with C16:0 more than C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH.

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30871667); 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A211); 福建省发改委重点项目(闽发改投资 No. [2006]781)

\* 通讯作者: Tel: 86-591-87848933; ✉: laeptb@163.com

收稿日期: 2008-11-25; 接受日期: 2009-02-27

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

However, the difference between C16:0 and C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH raised significantly from 2.35 to 13.23 under 40°C and 48 h~96 h. Meanwhile, the kind of fatty acid increased more than 30 as the cultural time increased. It was concluded that temperature and cultural time had more significant effects on the fatty acid composition of *R. solanacearum* than pH value and cultural medium.

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum*, Fatty acid, Cultural condition

细菌性青枯病是一种由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的毁灭性土传病害<sup>[1]</sup>。青枯雷尔氏菌可危害 50 多个科 200 多种植物<sup>[2]</sup>, 在寄主范围、地理分布、致病特征、流行特征、种下分化等方面具有明显的多态性<sup>[3]</sup>。在对寄主植物的侵染和致病过程中, 青枯雷尔氏菌至少要在两种复杂的小生境中进行移植, 即营养物质缺乏、竞争激烈的、可变的、不同种类的土壤环境和竞争不激烈、营养丰富但防御严密的植物体内环境; 此外, 要完成从植物根部组织到茎秆顶端的扩散, 会遇到许多微生境的环境变化<sup>[4,5]</sup>。因此, 青枯雷尔氏菌进化形成了一套复杂的调控网络体系(Regulatory cascade), 能感觉到关键环境信号的变化, 作为反应, 通过基因表达的完全变化引起生理上的剧烈变化<sup>[6]</sup>。例如, 王秋红等(2007)对采自福建省的 40 株青枯雷尔氏菌的检测结果表明: 不同地区同一寄主分离的和不同寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸分布都存在着明显的差异; 同时, 青枯雷尔氏菌的脂肪酸的种类和主要特征脂肪酸(C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH、C16:0 和 C18:1 $\omega$ 7c)与致病性之间存在一定的相关性<sup>[7]</sup>。

脂肪酸是构成生物膜的重要物质, 是有机体代谢所需燃料的贮存形式, 作为细胞表面物质与细胞识别、种族特异性和细胞免疫等有密切关系, 并具有结构多样性和很高的生物学特异性, 是特别有效的生物标记物<sup>[8,9]</sup>。目前, 在微生物脂肪酸方面的研究工作主要集中于利用脂肪酸作为分类依据来鉴定细菌<sup>[10,11]</sup>, 并利用脂肪酸指纹分析环境中微生物群落的组成<sup>[12]</sup>。国外已有培养条件对细菌中脂肪酸变化的研究报道<sup>[13,14]</sup>, 但未见青枯雷尔氏菌在不同培养条件下的脂肪酸变化研究的报道。本试验拟通过分析青枯雷尔氏菌在不同培养条件下的脂肪酸种类与主要特征脂肪酸的变化, 为其致病机理的研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和培养基

青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01v 菌株为 2001 年 7 月从福建永泰生姜青枯病病株上分离获得, 经盆栽苗回接表明为强致病力菌株, -20°C 甘油冰冻保存。试验前先用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)培养基[葡萄糖 5 g、蛋白胨 10 g、水解酪蛋白 1 g、琼脂 18 g、水 1 L, 将上述成分混合灭菌后冷却至 60°C 左右, 加入 TTC, 使其终浓度为 0.005 % (W/V)]活化, 备用。

### 1.2 青枯雷尔氏菌脂肪酸的提取和气相色谱分析

**1.2.1 培养基与脂肪酸提取试剂:** TSBA 培养基: 30 g 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB, 购于 Fisher 公司)+15 g 琼脂+1 L 水。脂肪酸提取试剂: 1) 皂化试剂: 45 g 氢氧化钠+150 mL 甲醇+150 mL 水; 2) 甲基化试剂: 325 mL 6 N 盐酸+275 mL 甲醇; 3) 萃取试剂: 200 mL 正己烷+200 mL 甲基叔丁基乙醚; 4) 洗涤试剂: 10.8 g 氢氧化钠+900 mL 水。配制方法由 MIDI 公司提供。

**1.2.2 脂肪酸的提取:** 1) 细菌培养: TSBA 平板培养基, 四线划线法接种, 置于恒温培养箱中培养; 2) 获菌: 用接种环挑取 3~5 环(约 40 mg 湿重)的菌落置入干燥的有螺旋盖的试管中; 3) 皂化: 加入 1.0 mL $\pm$ 0.1 mL 皂化试剂, 振荡 5 s~10 s, 95°C~100°C 的沸水浴 5 min, 室温冷却, 振荡 5 s~10 s, 再沸水浴 25 min, 室温冷却; 4) 甲基化: 加入 2.0 mL $\pm$ 0.1 mL 甲基化试剂, 振荡 5 s~10 s, 80°C $\pm$ 1°C 水浴 10 min, 快速用流动自来水冷却至室温; 5) 萃取: 加入 1.25 mL $\pm$ 0.1 mL 的萃取试剂, 温和混合旋转 10 min, 用移液管取出下层水相; 6) 基本洗涤: 加入 3.0 mL $\pm$ 0.2 mL 洗涤试剂, 温和混合旋转 5 min, 用移液管移出约 2/3 体积的上层有机相至气相色谱检体小瓶, 用于气相检测。

**1.2.3 脂肪酸的检测:** 气相色谱系统采用的是美国 Agilent 6890N 型, 包括全自动进样装置、石英毛细

管柱(HP-ULTRA 2, 25.0 m × 200 μm × 0.33 μm)及氢火焰离子化检测器;分析软件应用美国 MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定细菌的软件 Sherlock MIS 4.5(Microbial Identification System)和 LGS 4.5(Library Generation Software)。在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本:二阶程序升高柱温,170°C 起始,5°C/min 升至 260°C,而后 40°C/min 升温至 310°C,维持 90 s;汽化室温度 250°C、检测器温度 300°C;载气为氢气(2 mL/min)、尾吹气为氮气(30 mL/min);柱前压 10.0 psi (1 psi=6.895 kPa);进样量 1 μL,进样分流比 100:1。

### 1.3 培养条件对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响

将 Rs-J.1.4-010704-01v 接种于 TSBA 平板培养基(pH 7)上,分别置于 20°C±1°C、25°C±1°C、30°C±1°C、35°C±1°C 和 40°C±1°C 下培养 24 h±2 h,而后按 1.2 的方法进行脂肪酸检测,分析温度对青枯雷尔氏菌的脂肪酸种类与主要脂肪酸含量的影响。将 Rs-J.1.4-010704-01v 接种于 TSBA 平板培养基(pH 7)上,置于 30°C±1°C 下分别培养 24 h±2 h、48 h±2 h、72 h±2 h 和 96 h±2 h,而后按 1.2 的方法进行脂肪酸检测,分析培养时间对青枯雷尔氏菌脂肪酸种类与主要脂肪酸含量的影响。将 Rs-J.1.4-010704-01v 分别接种于 pH 为 5、6、7、8、9 的 TSBA 平板培养基上(灭菌后用 80%乳酸和过饱和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

调节培养基 pH 值),置于 30°C±1°C 下培养 24 h±2 h,而后按 1.2 的方法进行脂肪酸检测,分析 pH 值对青枯雷尔氏菌脂肪酸种类与主要脂肪酸含量的影响。将 Rs-J.1.4-010704-01v 分别接种在 pH 值为 7 的 LB(酵母提取物 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 15 g,水 1 L)、NA(蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,琼脂 15 g,水 1 L)、TTC 和 TSBA 四种平板培养基上,置于 30°C±1°C 下培养 24 h±2 h,而后按 1.2 的方法进行脂肪酸检测,分析培养基对青枯雷尔氏菌脂肪酸种类与主要脂肪酸含量的差异。上述各处理均 3 次重复。

### 1.4 不同培养条件下青枯雷尔氏菌脂肪酸的聚类分析

以上述各不同培养条件下为样本,以青枯雷尔氏菌脂肪酸色谱结果为指标,数据标准化转换,选用欧氏距离为相关尺度,类平均法进行聚类分析,得出系统树图并进行分类,分析聚成的各类的脂肪酸特点及主要差别。

## 2 结果与分析

### 2.1 青枯雷尔氏菌脂肪酸特征指纹图谱

在标准的脂肪酸鉴定的培养条件(TSBA 培养基, pH 7, 30°C±1°C 培养 24 h±2 h)下, Rs-J.1.4-010704-01v 脂肪酸特征指纹图谱见图 1, 鉴定种类

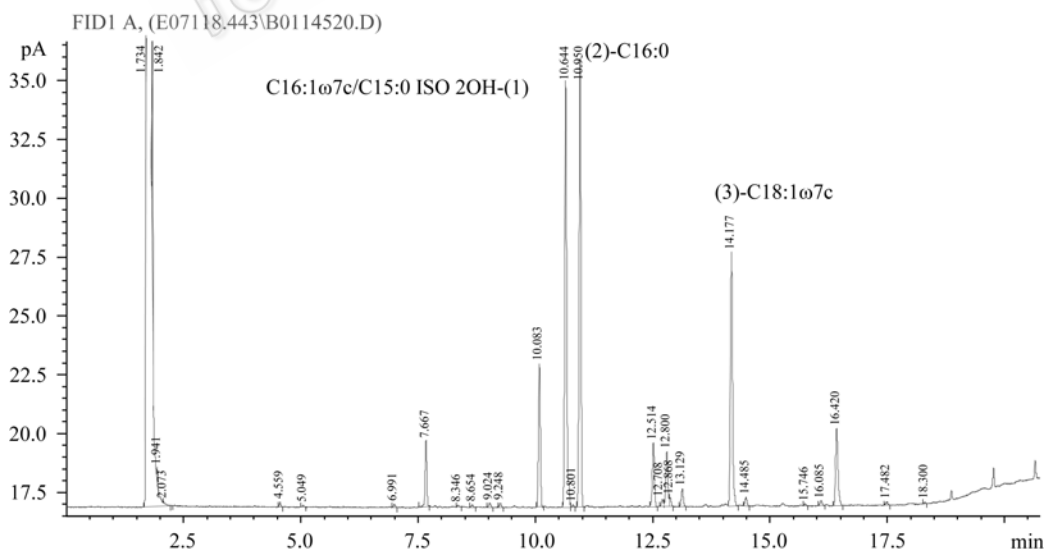


图 1 青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01v 脂肪酸特征性指纹气相色谱图

Fig. 1 Fatty acid gas chromatogram of *Ralstonia solanacearum* Rs-J.1.4-010704-01v

注:横坐标表示色谱分析时间(min),纵坐标表示色谱峰高值;第一个色谱峰为溶剂波峰。

Note: Abscissa represents analyzing time of chromatogram and ordinate shows height of chromatogram peak; the first peak is solvent peak.

表 1 温度对青枯雷尔氏菌 *Rs-J.1.4-010704-01v* 脂肪酸的影响  
Table 1 Effects of temperature on the fatty acids of *Ralstonia solanacearum* *Rs-J.1.4-010704-01v*

温度(°C) Temperature	平均脂肪酸种类 Average kind of fatty acid	主要脂肪酸平均含量 Average percentage of plentiful fatty acid (%)		
		C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH	C16:0	C18:1 $\omega$ 7c
20	17.67 $\pm$ 1.53 b	30.30 $\pm$ 0.67 a	23.44 $\pm$ 0.54 c	23.28 $\pm$ 1.15 a
25	22.00 $\pm$ 2.54 ab	27.66 $\pm$ 2.04 ab	24.19 $\pm$ 1.33 bc	22.51 $\pm$ 0.50 ab
30	21.67 $\pm$ 6.43 ab	25.72 $\pm$ 0.76 b	27.65 $\pm$ 2.92 b	17.75 $\pm$ 3.57 c
35	29.33 $\pm$ 0.58 a	26.45 $\pm$ 1.36 ab	26.91 $\pm$ 1.44 bc	18.52 $\pm$ 1.65 bc
40	21.33 $\pm$ 2.08 ab	19.63 $\pm$ 4.16 c	35.59 $\pm$ 2.88 a	12.12 $\pm$ 3.14 d

注: 数据为 3 次重复测定的平均值, 同一列内相同的字母表示经新复极差检验( $P < 0.05$ ), 平均数没有显著性差异。

Note: The data are means of three replicates. Data followed with same letters within the same volume are not significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT.

为青枯雷尔氏菌(*R. solanacearum*), 鉴定匹配率为 0.807。除第 1 个峰为溶剂峰外, 其余每一个波峰代表 1 种脂肪酸, 脂肪酸种类有 14~34 种。其中, 主要特征脂肪酸有 3 种, 保留时间分别为: (1) C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH, 10.356 min; (2) C16:0, 10.659 min; (3) C18:1 $\omega$ 7c, 13.861 min, 所占的总百分比含量为总脂肪酸的 55.66%~75.69%。

## 2.2 培养条件对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响

**2.2.1 温度对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响:** 3 次重复检测的平均值表明, 在培养温度由 20°C 上升至 35°C 时, *Rs-J.1.4-010704-01v* 脂肪酸种类也由 17.67 增加到 29.33, 至 40°C 时又下降至 21.67。在 3 种主要脂肪酸中, C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C18:1 $\omega$ 7c 含量随着温度的提高而显著减少; C16:0 含量则明显增加, 成为含量最高的脂肪酸(表 1)。

**2.2.2 培养时间对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响:** 随着培养时间的增长, *Rs-J.1.4-010704-01v* 脂肪酸的平均种类由 24 h 的 14.67 增加到 96 h 的 33.33。在不同培养时间下, 3 种主要脂肪酸含量大小均为 C16:0>C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH>C18:1 $\omega$ 7c, 但是

C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C18:1 $\omega$ 7c 含量表现出减少的趋势, C16:0 则含量表现为增加(表 2)。

**2.2.3 pH 值对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响:** 在 pH 值 5~9 的培养条件下, *Rs-J.1.4-010704-01v* 脂肪酸的平均种类未出现显著性变化, 为 19.33~26.67。主要脂肪酸 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 的含量没有表现出明显差异; C16:0 的含量是先由 28.24% 增加至 30.52% 后再减少到 27.99%, C18:1 $\omega$ 7c 的含量则是由 16.92% 减少至 10.94%。在 5 种 pH 值条件下, 3 种主要脂肪酸含量均表现为 C16:0>C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH>C18:1 $\omega$ 7c(表 3)。

**2.2.4 培养基种类对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响:** 在 LB、NA、TTC 和 TSB 四种培养基上, *Rs-J.1.4-010704-01v* 脂肪酸的平均种类为 24.00~26.33, 无显著性差异。主要脂肪酸 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH、C16:0 和 C18:1 $\omega$ 7c 分别在 TSB、NA 和 TTC 上表现为最大含量。在 4 种培养基中, 3 种主要脂肪酸含量均表现为 C16:0>C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH>C18:1 $\omega$ 7c(表 4)。

表 2 培养时间对青枯雷尔氏菌 *Rs-J.1.4-010704-01v* 脂肪酸的影响  
Table 2 Effects of cultural time on the fatty acids of *Ralstonia solanacearum* *Rs-J.1.4-010704-01v*

培养时间 (h) Cultural time	平均脂肪酸种类 Average kind of fatty acid	主要脂肪酸平均含量 Average percentage of plentiful fatty acid (%)		
		C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH	C16:0	C18:1 $\omega$ 7c
24	14.67 $\pm$ 0.58 c	26.93 $\pm$ 0.56 a	27.75 $\pm$ 1.03 b	13.85 $\pm$ 0.52 a
48	21.67 $\pm$ 4.04 b	21.14 $\pm$ 2.02 b	31.64 $\pm$ 0.17 a	11.54 $\pm$ 1.77 b
72	28.33 $\pm$ 2.31 a	16.73 $\pm$ 0.43 c	31.79 $\pm$ 0.11 a	7.14 $\pm$ 0.46 c
96	33.33 $\pm$ 4.04 a	19.30 $\pm$ 0.65 b	28.77 $\pm$ 0.72 b	7.60 $\pm$ 0.35 c

注: 数据为 3 次重复测定的平均值; 同一列内相同的字母表示经新复极差检验( $P < 0.05$ ), 平均数没有显著性差异。

Note: The data are means of three replicates. Data followed with same letters within the same volume are not significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT.

表3 pH值对青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01v 脂肪酸的影响  
Table 3 Effects of pH value on the fatty acids of *Ralstonia solanacearum* Rs-J.1.4-010704-01v

pH 值 pH value	平均脂肪酸种类 Average kind of fatty acid	主要脂肪酸平均含量 Average percentage of plentiful fatty acid (%)		
		C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH	C16:0	C18:1 $\omega$ 7c
5	19.33 $\pm$ 3.21 a	23.92 $\pm$ 1.25 a	28.24 $\pm$ 0.41 b	16.92 $\pm$ 0.73 a
6	26.33 $\pm$ 4.04 a	24.98 $\pm$ 0.56 a	28.71 $\pm$ 0.19 b	16.00 $\pm$ 0.52 a
7	26.67 $\pm$ 4.51 a	25.82 $\pm$ 0.56 a	29.90 $\pm$ 0.41 a	14.51 $\pm$ 0.13 b
8	26.33 $\pm$ 11.02 a	24.89 $\pm$ 2.35 a	30.52 $\pm$ 0.64 a	12.18 $\pm$ 1.02 c
9	26.00 $\pm$ 4.58 a	26.19 $\pm$ 1.27 a	27.99 $\pm$ 0.21 b	10.94 $\pm$ 0.10 d

注: 数据为 3 次重复测定的平均值, 同一列内相同的字母表示经新复极差检验( $P < 0.05$ ), 平均数没有显著性差异。

Note: The data are means of three replicates. Data followed with same letters within the same volume are not significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT.

表4 培养基种类对青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01v 脂肪酸的影响  
Table 4 Effects of cultural media on the fatty acids of *Ralstonia solanacearum* Rs-J.1.4-010704-01v

培养基 Cultural media	平均脂肪酸种类 Average kind of fatty acid	主要脂肪酸平均含量 Average percentage of plentiful fatty acid (%)		
		C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH	C16:0	C18:1 $\omega$ 7c
LB	26.33 $\pm$ 2.29 a	24.18 $\pm$ 1.26 b	24.75 $\pm$ 0.64 bc	16.18 $\pm$ 2.43 ab
NA	25.33 $\pm$ 3.79 a	22.90 $\pm$ 1.01 b	29.04 $\pm$ 3.07 a	13.90 $\pm$ 0.99 b
TTC	24.00 $\pm$ 2.65 a	22.84 $\pm$ 0.42 b	24.26 $\pm$ 1.11 c	18.62 $\pm$ 1.13 a
TSB	24.67 $\pm$ 4.04 a	26.80 $\pm$ 0.76 a	27.85 $\pm$ 0.34 ab	16.00 $\pm$ 0.16 ab

注: 数据为 3 次重复测定的平均值, 同一列内相同的字母表示经新复极差检验( $P < 0.05$ ), 平均数没有显著性差异。

Note: The data are means of three replicates. Data followed with same letters within the same volume are not significantly different at  $P < 0.05$  by DMRT.

### 2.3 不同培养条件下青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性的聚类分析

聚类分析结果见图 2, 当  $\lambda = 3.55$  时, 可将不同培养条件下的青枯雷尔氏菌的脂肪酸分为 4 个类群, 可用 Group I、II、III、IV 表示, 各类群典型脂肪酸色谱图和脂肪酸分布特点分别见图 3 和表 5。

Group I 包含培养温度 20°C 和 25°C, 其特点为平均脂肪酸种类最少(19.84), 3 种主要脂肪酸所占百分比含量最大(75.69%), C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 为含量最高的脂肪酸。Group II 包含 30°C、35°C、24 h、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8、pH 9、LB、NA、TTC 和 TSB, 其特点为平均脂肪酸种类和 3 种主要脂肪酸总含量均为次高, C16:0 为含量最高的脂肪酸, 但是与 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 的含量接近, 二者的差值为 2.35%。Group III 包含 40°C 和 48 h, 其特点为平均脂肪酸种类和 3 种主要脂肪酸总含量均为次低, C16:0 为含量最高的脂肪酸, 但明显地高于 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 的含量, 二者的差值为 13.23%; Group IV 包含 72 h 和 96 h, 其特点为平均脂肪酸种类最多(30.83), 3 种主要脂肪酸所占百分比含量最小(55.67%), C16:0 为含量最高的脂肪酸,

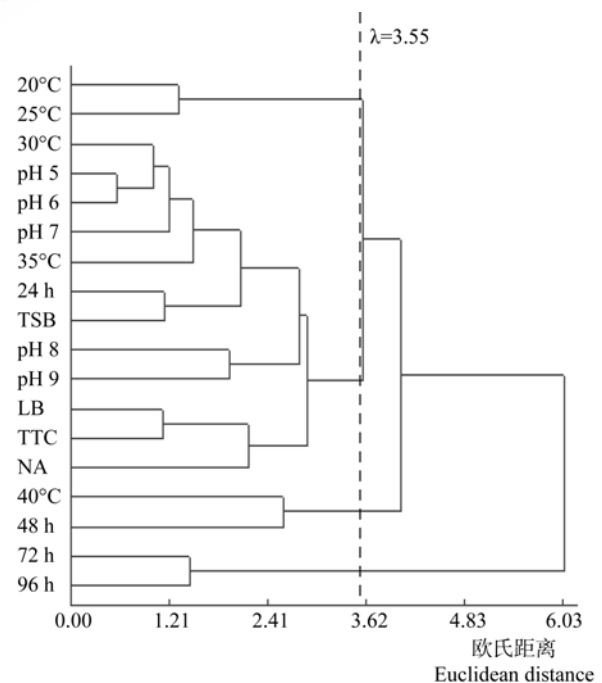


图2 不同培养条件下青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01v 脂肪酸的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis for fatty acids of *Ralstonia solanacearum* Rs-J.1.4-010704-01v under different cultural conditions

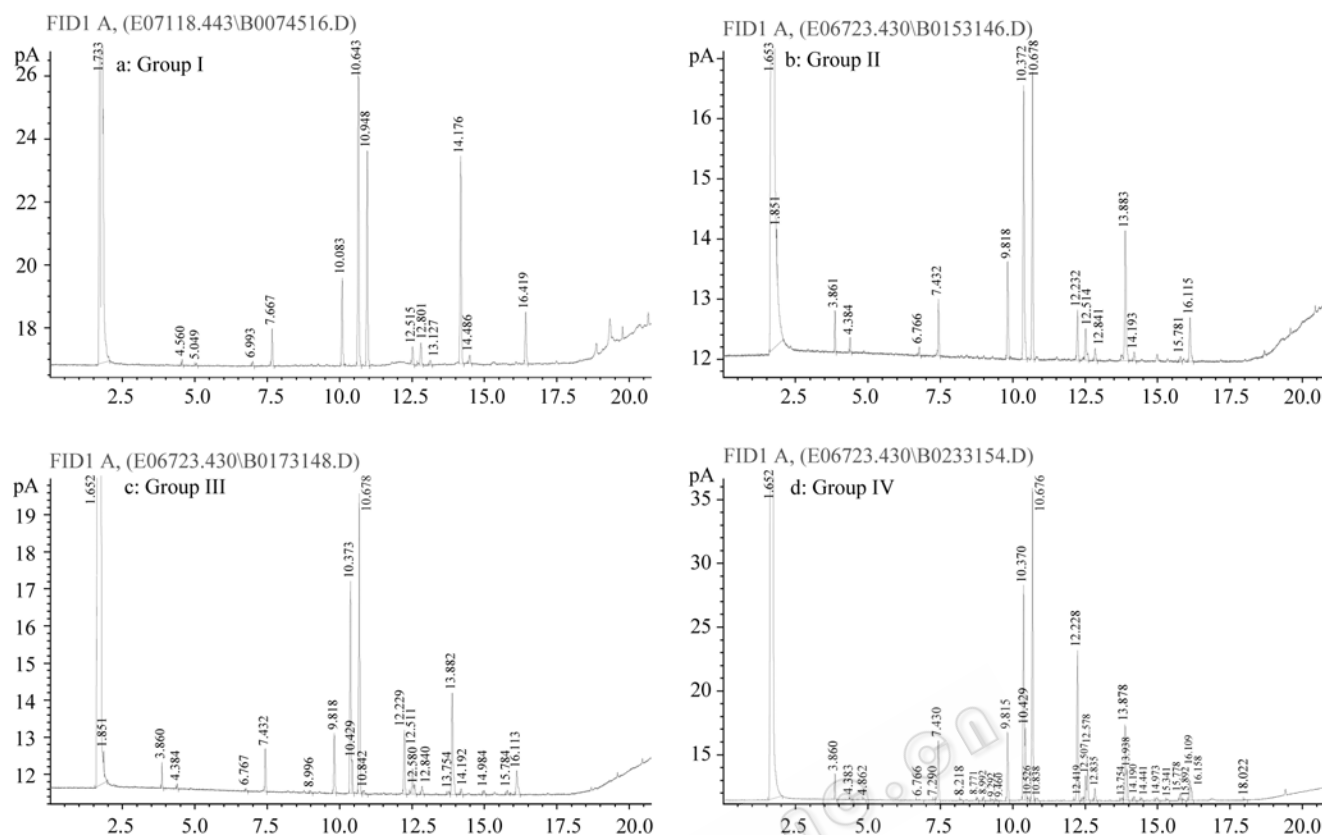


图3 不同培养条件下青枯雷尔氏菌脂肪酸聚类类群的典型色谱图

Fig. 3 Representative fatty acid chromatogram of the clustered groups of *Ralstonia solanacearum* under different cultural conditions表5 脂肪酸类群脂肪酸分布特点  
Table 5 Characteristic of fatty acids of the four groups

脂肪酸类群 Group	平均脂肪酸种类 Average kind of fatty acid	平均主要脂肪酸含量 Average percentage of plentiful fatty acid (%)			主要脂肪酸的 总含量(%) Total percentage of plentiful fatty acid	C16:0与C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH的差值(%) Difference between C16:0 and C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH
		C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH	C16:0	C18:1 $\omega$ 7c		
I	19.84	28.98	23.82	22.90	75.69	-5.16
II	24.22	25.29	27.64	15.45	68.38	2.35
III	21.50	20.39	33.62	11.83	65.83	13.23
IV	30.83	18.02	30.28	7.37	55.67	12.26

但明显高于 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 的含量, 二者的差值为 12.26%。

### 3 小结与讨论

已有报道表明, 细胞膜组成与生长阶段、培养基成分、温度等有关; 由于脂类是细胞膜的重要组成部分, 因此细胞脂肪酸也将受到环境因子等的影响。叶芳挺等(2005)的研究发现温度和碳源会造成海绵附生假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)细菌脂肪酸含量的

差异; 并且聚类分析的结果还显示温度比碳源的影响更明显<sup>[14]</sup>。本试验的结果表明: 青枯雷尔氏菌脂肪酸的种类与含量会受到环境因子的影响, 随着培养条件的改变而变化。在试验的4种培养条件下, 在培养温度为 20°C 和 25°C 时, 表现为 C16:0 < C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH; 在其它各培养温度、时间、pH 值和培养基种类条件下, Rs-J.1.4-010704-01v 的 C16:0 > C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH。其中, 在培养条件分别为 40°C 和 48 h~96 h 时, C16:0 与 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 差值显著地增大, 由

2.35%上升至 13.23%; 同时, 随着培养时间的延长, 脂肪酸种类也增加至>30 种。经聚类分析表明, 温度和培养时间对青枯雷尔氏菌脂肪酸的影响大于 pH 值和培养基。

李宗军(2005)报道了在对数期和稳定期大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞膜脂中不饱和脂肪酸的组成随温度的上升而下降<sup>[15]</sup>。类似的, 与 20°C 和 25°C 相比较, 海绵附生假单胞菌在 30°C 下的不饱和脂肪酸的相对含量急剧减少<sup>[14]</sup>。青枯雷尔氏菌在不同温度条件下表现出与其它细菌相同变化趋势: 温度的上升使得其主要不饱和脂肪酸 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C18:1 $\omega$ 7c 的含量明显减少, 而主要饱和脂肪酸 C16:0 的含量显著增加。细胞膜中不饱和脂肪酸的熔点比饱和脂肪酸的熔点低, 不饱和脂肪酸含量增加会导致细胞膜相变温度的下降, 增大了细胞膜的流动性。细胞膜流动性的增强有助于提高细胞对压力胁迫等的应急反应。生长温度的不同引起的细胞膜脂肪酸组成的变化, 是微生物生命活动对膜流动性的要求<sup>[15]</sup>。

王秋红等<sup>[7]</sup>的研究表明, 根据脂肪酸图谱特征可以区分青枯雷尔氏菌致病性的不同, 将其分为 3 个类群: C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C16:0 之间有一小的色谱峰, 则说明它属于无致病力的 Group I, 否则属于过渡性的 Group II 或强致病力的 Group III; 如果是后者, 再根据它的 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C16:0 两者百分含量的高低进行判断, 若 C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH < C16:0, 则它属于 Group III, 否则属于 Group II(图 4)。强致病力的青枯雷尔氏菌 Rs-J.1.4-010704-01v 的脂肪酸特征性指纹图谱(图 1)与王秋红等报道的强致病力的 Group III 结果一致, C16:0 > C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH。在多数的培养温度、时间、pH 和培养基的条件下, Rs-J.1.4-010704-01v 均表现强致病菌株的脂肪酸特征。但是, 在培养温度为 20°C 和 25°C 时, 则表现为 C16:0 < C16:1 $\omega$ 7c/C15:0 ISO 2OH, 属于过渡性致病力的 Group II(即回接发病率在 6.7%~100%之间变化)。

戴传超等(2003)在研究环境因子对乌桕(*Sapium sebiferum*)内生真菌生长及脂肪酸的影响时发现逆境有利于不饱和脂肪酸相对比例的增加, 在逆境胁迫下膜脂不饱和程度会增加脂肪酸在微生物和植物相互关系中的作用, 菌根菌侵染植物根时会导致植物根系皮层质膜脂肪酸含量及组成发生改变<sup>[16]</sup>。青枯雷尔氏菌的最适生长温度为 30°C~37°C,

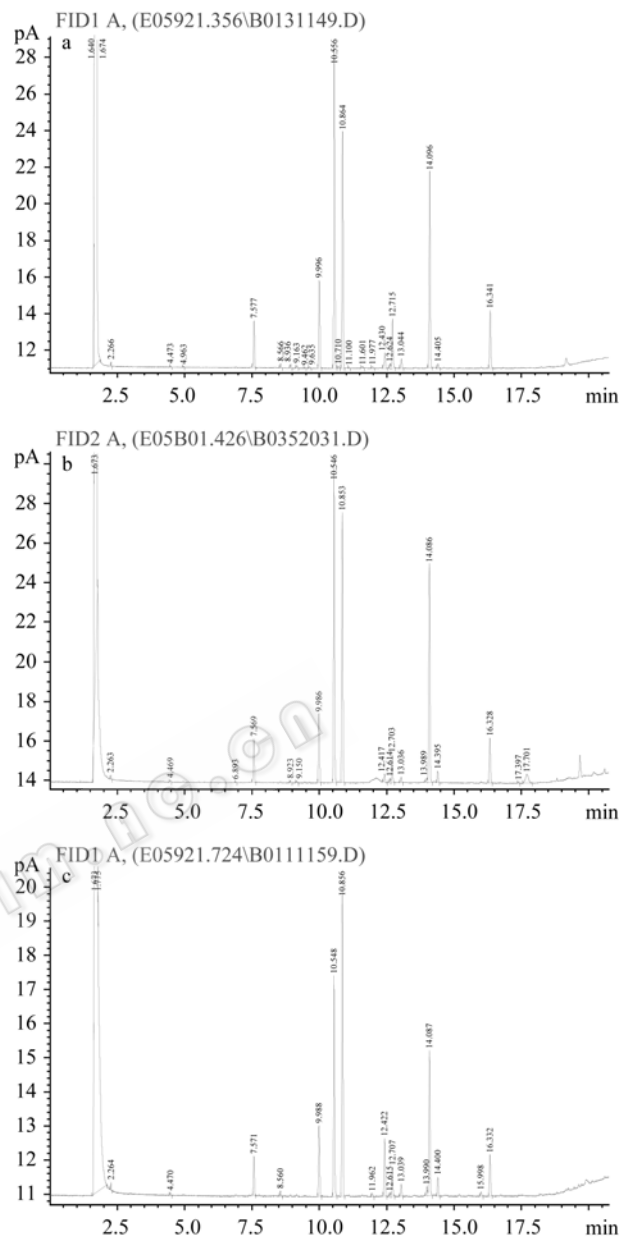


图 4 40 株青枯雷尔氏菌脂肪酸聚类群的典型色谱图 (王秋红等, 2007)

Fig. 4 Representative fatty acid chromatograms of the clustered groups of forty *Ralstonia solanacearum* (Wang et al. 2007)

注: a: Group I, 无致病力菌株; b: Group II, 过渡性菌株; c: Group III, 强致病力菌株。

Note: a: Group I, Avirulent strain; b: Group II, Mid-virulent strain; c: Group III, Virulent strain.

在田间青枯病发生的气温条件为 30°C~35°C<sup>[17]</sup>。那么, 在低温逆境胁迫下, 青枯雷尔氏菌所表现出来的脂肪酸不饱和程度的增大和致病性的变化, 有可能反映出其细胞膜流动性等结构和生理特性的变化, 并在其对寄主植物的侵染和致病过程有着重要的作用, 其详细机理有待于进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Rev Phyto*, 1991, **29**: 65–87.
- [2] Dittapongpich VS, Surat S. Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil and weeds from commercial tomato fields using immunocapture and the polymerase chain reaction. *J Phytopathol*, 2003, **151**: 239–245.
- [3] 何礼远, 康耀卫. 植物青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)致病机理. 自然科学进展—国家重点实验室通讯, 1995, **5**(1): 7–16.
- [4] Seal SE, Jackson LA, Young JPW. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 1587–1594.
- [5] Seal SE, Taghavi M, Fegan N, *et al.* Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathol*, 1999, **48**: 115–120.
- [6] Schell MA. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Ann Rev Phyto*, 2000, **38**: 263–292.
- [7] 王秋红, 陈亮, 林营志, 等. 福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究. 中国农业科学, 2007, **39**(8): 1675–1687.
- [8] Amrit K, Chaudhary A, Amarjeet K, *et al.* Phospholipid fatty acid—a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Cur Sci*, 2005, **89**(7): 1103–1112.
- [9] 刘志辉, 蔡杏珊, 竺碧波, 等. 应用气相色谱技术分子全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌. 中华结核和呼吸杂志, 2005, **28**: 403–406.
- [10] 王秋红, 蓝江林, 朱育菁, 等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用. 福建农业学报, 2007, **22**(2): 212–218.
- [11] 朱育菁, 肖荣凤, 王秋红, 等. 茄科作物青枯病原菌的脂肪酸鉴定. 中国农学通报, 2008, **24**(8): 392–395.
- [12] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究. 土壤学报, 2006, **43**(4): 642–647.
- [13] Konneke M. Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate-reducing bacteria. *Environ Microbiol*, 2003, **5**(11): 1064–1070.
- [14] 叶芳挺, 严小军, 郑立, 等. 培养条件对海洋假单胞菌脂肪酸的影响应用. 生态学报, 2005, **16**(5): 967–970.
- [15] 李宗军. 大肠杆菌生长温度、膜脂肪酸组成和压力抗性之间的关系. 微生物学报, 2005, **45**: 3426–3430.
- [16] 戴传超, 余伯阳, 徐增莱, 等. 环境因子对乌柏内生真菌生长及脂肪酸的影响. 应用生态学报, 2003, **14**(9): 1525–1528.
- [17] Hartman GL. Screening for bacterial wilt resistance in tomato: seedling response to *Pseudomonas solanacearum*. In: Bacterial wilt newsletter. Hayward AC, ed. ACIAR, Canberra, Australia, 1991, pp.1-2.

稿件书写规范

## 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。