

广藿香抗青枯病离体筛选技术的研究

张燕玲, 贺红*, 吴立蓉, 刘星

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510405)

摘要: 以广藿香叶片及带节茎为材料, 研究青枯菌粗毒素不同制备方法、青枯菌不同培养时间及不同菌液浓度对外植体离体再生的影响。结果表明: 过滤灭菌法制备的青枯菌粗毒素致毒性比湿热灭菌法处理更强, 外植体成活率明显降低; 以培养 12 h 的青枯菌粗毒素对外植体有较大的致毒性, 外植体变褐死亡现象较突出, 培养 30 d 后, 叶片及带节茎出芽率分别为 10.33% 及 36.11%; 浓度在 1.41×10^8 cfu/ml 以上的菌液粗毒素对外植体有明显的毒害作用, 大多外植体枯黑死亡, 出芽率较低, 同时在该浓度时, 大多数无根苗难以生根, 植株基部变黑, 叶片变黄, 生长不良。确定了青枯菌粗毒素对广藿香不同离体培养阶段的致毒性, 建立了以青枯菌粗毒素为选择压力的广藿香离体筛选体系。

关键词: 广藿香; 青枯菌粗毒素; 离体培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0678-05

Study on *in vitro* selection of *Pogostemon cablin* resistant to bacterial wilt

ZHANG Yan-Ling, HE Hong*, WU Li-Rong, LIU Xing

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: The leaf segments and nodular stem segments from *Pogostemon cablin* were cultured *in vitro*. The factors connected with the *in vitro* selection, such as the different antiseptic methods of *R. solanacearum* crude toxins, the cultural time and the concentrations of *R. solanacearum* were studied. The results showed that: The survival rate of explants on the media with *R. solanacearum* crude toxin sterilized from filters is lower, which showed the toxicity of the crude toxin sterilized from filter was stronger than that of crude toxin sterilized in hot and damp. The explants on the media with the crude toxin from cultured 12 h bacteria were prominently browning and dead. And after 30 d, the shoot formation rate of leaf segments and nodular stem segments were 10.33% and 36.11% respectively. Crude toxin from bacteria concentration above 1.41×10^8 cfu/ml could inhibit the regeneration of explants obviously, with high death rate and low shoot formation rate. And also, the root formation of the shoots from the explants was difficult at that concentration of crude toxin. The *R. solanacearum* crude toxin had toxicity to the explants and could inhibit the plant regeneration of *P. cablin*. The system of *in vitro* selection of *P. cablin* resistant to bacterial wilt was established

Key words: *Pogostemon cablin*; bacterial wilt crude toxin; *in vitro* culture

广藿香(*Pogostemon cablin*)为唇形科刺蕊草属植物,其干燥地上部分入药,为广东道地药材,“十大广药”之一,是多种著名中成药以及现代中药制剂“抗病毒口服液”的主要原料。目前广藿香生产中面临青枯病的危害(刘东明等,2003),该病由青枯菌

(*Ralstonia solanacearum*)侵染所致,为典型的维管束病害,在广藿香整个生长期均可发生,但以盛夏高温多雨季节发病最盛。青枯菌为土传细菌,一旦有植株感染,便可迅速蔓延,导致大面积死亡。青枯菌可以在土中和病残组织内越冬,连作的土地危害更

收稿日期: 2008-01-28 修回日期: 2008-12-31

基金项目: 国家自然科学基金(30472152)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30472152)]

作者简介: 张燕玲(1982-),女,广东梅州人,硕士研究生,从事药用植物诱变育种研究,(E-mail)echozhangyl@sina.com.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence)

为严重,目前尚无有效的防治方法,迫切需要进行抗病品种的选育(黄宁珍,2002)。青枯菌致病的主要机理在于细菌侵染植物的过程中,细菌所分泌的致病毒素对植物细胞造成伤害。在培养基中加入病原菌的致病毒素进行离体筛选,是培育植物抗病突变体的重要方法,前人在烟草抗野火病、水稻抗白叶枯病等突变体的选育中获得了成功(Carlson 等,1973;曾列先等,1992;敖世恩等,2006)。本研究以广藿香试管苗叶片及带节茎等为材料,探讨青枯菌粗毒素对广藿香离体培养的影响,建立抗青枯病离体筛选的技术体系,为广藿香抗病育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

广藿香(*Pogostemon cablin*)采自广州中医药大学药圃,采取茎尖,经表面消毒,接种至 MT 培养基中培育试管苗。青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)菌株,来源于华南农业大学,将青枯菌在 TZC 培养基上划线,挑取有致病力的菌落,分别进行以下试验。

1.2 方法

1.2.1 青枯菌菌液浓度与 A 值之间关系的测定 将青枯菌接种于 NA 平板培养基上,在 30 °C 条件下培养 24 h 后,在 1 000 mL 锥形瓶中加入 350 mL 液体培养基,取平板培养的青枯菌菌落,接种至准备好的 NA 液体培养基中,30 °C、200 r/min 摇床培养。以 600 nm 作为吸收波长,随时检测摇瓶中菌液 A 值,当 A 值达到接近 0.943 时停止摇床,取 8 个 250 mL 的锥形瓶各加入 50 mL 菌液,用培养基稀释成系列浓度进行以下操作:以原始培养基调零,测定不同稀释度菌液的 A 值;再将每一浓度菌液再梯度稀释(一般至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}),分别吸取 0.1 mL 涂平板(3 次重复),取平均数进行活菌的准确计数。

1.2.2 青枯菌粗毒素的制备方法 湿热灭菌法:将培养了 20 h 的菌液以 20% 体积比加入相应培养基中,然后用高温高压灭菌处理。过滤灭菌法:将培养了 20 h 的菌液离心,取上清液用针筒式细菌过滤器经过 0.22 μm 细菌过滤膜过滤,获得青枯菌粗毒素,于 50~60 °C 在无菌条件下以 20% 体积比加入相应培养基并混匀。

1.2.3 广藿香的离体培养 以广藿香试管苗的叶片及带节茎等为材料,以 MT 为基本培养基,根据不同培养阶段分别附加 BA 0.05 mg/L、IBA 0.2 mg/L

(林小桦等,2007)。每个处理接种外植体数为 10 块,设置 3 次重复。多处理的多重比较采用新复极差测验,显著水平 0.05。

2 结果与分析

2.1 青枯菌菌液浓度与 A 值之间对应关系的建立

以青枯菌粗毒素为选择压力,进行广藿香的离体筛选试验,首先需要建立快速而准确的菌液浓度计算方法。现测定了不同稀释度菌液的 A 值,结合平板计数结果,列出了青枯菌菌数与 A 值关系表(表 1),以 A 值为横坐标,以活菌数为纵坐标,绘制 XY 散点图(图 1)。

表 1 青枯菌菌液浓度与 A 值的关系
Table 1 Relation between *R. solanacearum* concentration and A value

A 值 A value	青枯菌菌液浓度(10^8 个/mL) Concentration of <i>R. solanacearum</i>
0	0
0.277	0.413
0.384	0.673
0.455	0.855
0.541	0.933
0.650	1.123
0.751	1.353
0.829	1.445
0.927	1.777

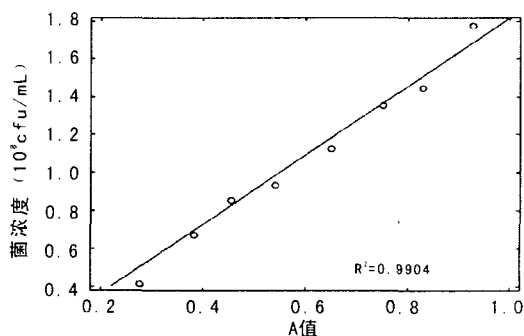


图 1 青枯菌菌液浓度与 A 值关系的 XY 散点图
Fig. 1 XY plot of relation between *R. solanacearum* concentration and A value

利用数理统计中的最小二乘法(童一中,1996),设所求直线为 $y=kx+b$, k 为回归系数, b 是直线在轴上的截距,在波长 600 nm 下,建立青枯菌菌液的 A 值与菌数之间的直线回归方程: $y=1.8662x-0.0458$, $R^2=0.9904$, x : A 值, y : 菌浓度(10^8 cfu/mL)。可见,青枯菌菌液浓度与 A 值之间相关性

强,采用 A 值进行青枯菌菌液浓度的实时检测具有简便、迅速、准确等优点。

2.2 不同方法制备的青枯菌粗毒素对外植体的致毒性

分别采用湿热灭菌法和过滤灭菌法,制备青枯菌粗毒素,以考察不同方法制备的粗毒素对外植体的致毒性。根据 2.1 建立的青枯菌菌液浓度计算法,设置两种不同的浓度。由于粗毒素对寄主细胞的毒害作用,外植体表现为发黄、褐化,甚至死亡。统计培养 15 d 后的成活率(表 2)。由表 2 可知,菌液浓度 13.1×10^8 cfu/mL 时,在加入湿热灭菌处理菌液的培养基中,叶片成活率 85.33%,带节茎为 100%,而加入过滤灭菌处理菌液的培养基中,外植

体成活率大幅度下降,叶片及带节茎成活率分别为 24.67% 和 41.63%;菌液浓度 13.1×10^9 cfu/mL 时,在加入湿热灭菌处理菌液的培养基中,叶片成活率 51.0%,带节茎为 85.33%,而在加入过滤灭菌处理菌液的培养基中,叶片和带节茎的成活率分别为 0 和 12.67%。这表明不同方法制备的青枯菌粗毒素对广藿香外植体培养的影响差别较大,可能的原因是:菌液与培养基一起高温高压湿热灭菌时,过高的温度不仅杀死了细菌,还会使毒素毒力大大减弱,在此培养基上培养的外植体成活率高;而经过滤灭菌的粗毒素,其致毒性较强,外植体成活率较低。故在以下试验中均采用过滤灭菌法。

表 2 不同方法制备的粗毒素对外植体成活的影响

Table 2 Effect of the crude toxins sterilized from different antiseptic methods on the survival rate of explants

菌液浓度 Concentration of <i>R. solanacearum</i> (cfu/mL)	成活率 Survival rate (%)			
	叶片 Leaf segment		带节茎 Nodular stem segment	
	湿热灭菌 Disinfection	过滤灭菌 Percolation	湿热灭菌 Disinfection	过滤灭菌 Percolation
0	100±0	100±0	100±0	100±0
1.31×10^8	85.33±0.58	24.67±0.15	100±0	41.63±1.73
1.31×10^9	51.00±1.00	0	85.33±0.58	12.67±2.52

表 3 不同培养时间的菌液粗毒素对外植体出芽的影响

Table 3 Effect of the crude toxins from the *R. solanacearum* cultured in different times on shoot formation

青枯菌培养时间 Cultural time of <i>R. solanacearum</i> (h)	不同外植体出芽率 Frequency of shoot formation of different explants (%)					
	叶片 Leaf segment			带节茎 Nodular stem segment		
	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d
对照	0	100±0a	100±0a	86.67±2.52a	100±0a	100±0a
4	0	60.00±0.00b	86.67±0.58b	86.67±0.58a	100±0a	100±0a
12	0	0c	10.33±1.53c	10.00±0.00b	36.11±1.92b	36.11±1.92b
24	0	26.67±0.52d	66.67±0.58d	36.67±9.81c	53.33±1.92c	73.33±1.53c
72	0	73.33±1.53e	100±0a	86.67±2.52a	100±0a	100±0a
120	0	73.33±0e	100±0a	80.00±2.52d	100±0a	100±0a

注:用邓肯氏新复极差法进行分析,不同的字母表示差异达 0.05 显著水平。下同。

Note: Analysis with Duncan's multiple-rang test, different letter meant significant of difference at 0.05 level. The same be low.

2.3 不同培养时间菌液粗毒素对外植体出芽的影响

取 NA 平板培养的青枯菌菌落,配制成菌悬液,无菌条件下在 5 份 100 mL 的 NA 液体培养基中分别加入 1 mL 菌悬液,振荡培养 4、12、24、72、120 h,然后分别置备菌液粗毒素,以 20% 体积比加入 MT+BA 0.05 mg/L 培养基中,以未加菌液粗毒素的 MT+BA 0.05 mg/L 培养基为对照,考察不同培养时间的菌液粗毒素对外植体出芽的影响。统计外植体在培养 10、20、30 d 后的出芽率。从表 3 可知,叶片在培养 10 d 后各处理均未出芽;培养 20 d 时,加入培养 12 h 菌液粗毒素的处理仍未出芽,其它处理均有不同程

度的出芽;培养 30 d 时,加入培养 12 h 菌液粗毒素的处理出芽率为 10.33%,其它处理大多数叶片均能出芽,其中加入培养 72、120 h 菌液粗毒素的处理出芽率与对照相同,均为 100%。茎段培养的不同时间内,出芽率均比叶片高,仅培养 12、24 h 的青枯菌粗毒素对出芽有明显的抑制作用,带节茎培养 30 d 时,出芽率分别为 36.11%、73.33%,其它处理出芽率均为 100%。实验还观察到,叶片培养 10 d 后,对照外植体基部膨大,加入培养 4、12、24 h 菌液粗毒素的处理开始变黄,而加入培养 72、120 h 的菌液粗毒素的处理则无明显变化,随着培养时间的延长,部分变黄的

外植体逐渐变褐死亡;外植体再生芽的生长情况,加入培养 12、24 h 的菌液粗毒素的处理,芽较细小,叶色发黄,尤以 12 h 处理更明显。因此,以培养 12 h 的青枯菌粗毒素对外植体有较大的致毒性,外植体变褐死亡现象较突出,出芽率也明显降低;同时,不同外植体对青枯菌粗毒素的耐受性不同,带节茎比叶片抗青枯菌粗毒素的能力更强。培养 12 h 后的菌液粗毒素对出芽的影响力下降,可能是因为青枯菌在 12 h 后随着培养时间的延长,活力逐渐下降,所产生粗毒素的致毒性也逐渐减小。

2.4 不同浓度青枯菌粗毒素对外植体出芽的影响

以培养 12 h 的青枯菌菌液,稀释成不同浓度,分别制备成粗毒素,以 20% 体积比加入 MT+BA0.05 mg/L 培养基中,考察不同浓度青枯菌粗毒素对外植体出芽的影响。从表 4 可知,叶片在培养 10 d 后各

处理均未出芽;培养 20 d 后,对照出芽率已达 100%,菌液浓度为 $3.52 \times 10^7 \sim 7.04 \times 10^7$ cfu/mL 时,有较高的出芽率,均在 59% 以上,随着培养时间的延长,出芽率上升;菌液浓度升至 1.41×10^8 cfu/mL 时,叶片培养 20 d 仍未出芽,至 30 d 后出芽率仅为 23.33%;菌液浓度继续升至 3.52×10^8 cfu/mL,叶片培养 30 d 后,出芽率仍为 0。茎段培养的不同时间内,出芽率均比叶片高,菌液浓度为 $3.52 \times 10^7 \sim 7.04 \times 10^7$ cfu/mL 时,10 d 后达到较高出芽率,且随着培养时间的延长,出芽率上升,30 d 后均达 100%;菌液浓度为 1.41×10^8 cfu/mL 和 3.52×10^8 cfu/mL 时,出芽率明显降低,30 d 后出芽率仅为 36.11% 和 25.00%。结果表明,浓度在 1.41×10^8 cfu/mL 以上的菌液粗毒素对外植体有明显的抑制和毒害作用,大多外植体枯黑死亡。不同外植体出芽率所受影响,并不随着制备粗

表 4 不同浓度青枯菌液制备的粗毒素对外植体出芽的影响

Table 4 Effect of the crude toxins from different concentrations of *R. solanacearum* on shoot formation

制备粗毒素的 菌液浓度 (cfu/mL) Concentration of <i>R. solanacearum</i>	不同外植体出芽率 Frequency of shoot formation of different explants (%)					
	叶片 Leaf segment			带节茎 Nodular stem segment		
	10 d	20 d	30 d	10 d	20 d	30 d
0	0	100±0a	100±0a	86.67±0.58a	100±0a	100±0a
3.52×10^7	0	59.00±8.54b	71.00±1.00b	58.33±0.58b	70.00±1.00b	100±0a
4.69×10^7	0	72.33±9.23c	88.67±2.52c	66.67±0.58c	76.67±0.00c	100±0a
7.04×10^7	0	75.33±1.53c	100±0a	71.11±1.92d	81.11±1.92d	100±0a
1.41×10^8	0	0d	23.33±1.53d	0e	36.11±1.92e	36.11±1.92b
3.52×10^8	0	0d	0e	18.75±0.57f	25.00±0.00f	25.00±0.00c

表 5 不同浓度青枯菌液制备的粗毒素对生根的影响

Table 5 Effect of the crude toxins from different concentrations of *R. solanacearum* on root formation

制备粗毒素的菌液 浓度 (cfu/ml) Concentration of <i>R. solanacearum</i>	生根率 Rooting rate (%)				
	5 d	10 d	15 d	20 d	30 d
0	46.67±5.69a	100±0a	100±0a	100±0a	100±0a
3.52×10^7	50.00±1.00b	100±0a	100±0a	100±0a	100±0a
4.69×10^7	36.11±2.00c	66.67±0.58b	80.00±2.00b	100±0a	100±0a
7.04×10^7	60.00±0.00d	73.33±1.15c	73.33±1.53c	100±0a	100±0a
1.41×10^8	0e	0d	0d	0b	13.33±1.53b
3.52×10^8	0e	0d	0d	0b	0c

毒素菌液浓度的增加而增大,原因可能是粗毒素在一定浓度时,除了外植体的毒害作用外,还有部分类激素作用,出芽率是两者综合表现的结果。陈耀锋等(1997)在研究镰刀菌毒素对小麦组织离体培养的影响时,也得出相似的结果。

2.5 不同浓度青枯菌粗毒素对生根的影响

以培养 12 h 的青枯菌菌液,稀释成不同浓度,分别制备成粗毒素,以 20% 体积比加入 MT +

IBA0.2 mg/L 培养基中,考察青枯菌粗毒素对生根的影响。从表 5 可知,制备粗毒素的菌液浓度为 $0 \sim 7.04 \times 10^7$ (cfu/mL),培养 5 d 时,较多无根苗开始生根,随着培养时间的延长,生根率继续上升,至培养 20 d 时,生根率均达 100%。制备粗毒素的青枯菌浓度升至 1.41×10^8 cfu/ml,无根苗培养 20 d 时还未能生根,培养 30 d 时,生根率仅为 13.33%。菌液浓度继续升高至 3.52×10^8 cfu/mL,生根率为

0. 实验还观察到,制备粗毒素的菌液浓度在 1.41×10^8 cfu/mL 以上时,对无根苗本身具明显的毒害作用,无根苗基部变黑,叶片变黄,生长不良。

3 讨论

植物青枯病是由青枯菌引致的一种植物毁灭性病害,目前还没有有效杀青枯菌的商业化制剂,而栽培措施防治在实施上存在困难,青枯病的防治更依赖于抗病育种(韦爱梅等,2006)。Toyoda 等(1989)以综合性状优良的番茄感病品种作起始材料,通过施加毒素压力,对成千上万个细胞进行选择,得到具有可遗传抗性的抗青枯病突变体。Baruah 等(1995)采用相似方法也获得稳定的番茄抗病突变体。在植物离体培养的培养基中加入适量致病毒素以杀死敏感细胞,选出抗病细胞,即以细菌或真菌等病原菌所产生的致病毒素作为选择压力筛选抗病突变体,是植物抗病育种的重要方法。致病毒素致病的原因可能是其堵塞了导管,也可能是其产生过度流体静压力而使导管破裂等(王军,2005)。导管的堵塞和破裂等都使得营养物质无法输送至各个植物细胞,从而导致外植体的褐变、枯萎甚至死亡,在以致病毒素作为压力进行植物抗病育种离体筛选试验中,常认为外植体的褐变、死亡与毒素的致病力成正比。本试验研究了粗毒素不同制备方法、青枯菌不同培养时间及不同菌液浓度对外植体出芽及生根等的影响,确定了青枯菌粗毒素对广藿香不同离体培养阶段的致毒性,建立了以青枯菌粗毒素为选择压力的广藿香离体筛选体系。

测定细菌菌液浓度的传统方法一般有平板计数法和比浊法,平板计数法虽然结果准确但耗时较长且比较烦琐,比浊法虽然方便迅速但结果不够准确(徐诗伟等,1996)。我们将测定的不同浓度的青枯菌菌液的吸光度(A)值,分别与涂平板计数结果相对应,制作细菌数对 A 值的标准曲线,建立一种实时测定青枯菌菌液浓度的方法。根据朗伯—比尔(Lambert-Beer)定律,对各类低浓度溶液吸光值定量进行测定时,浓度过高或过低都能影响测定结果的准确性(南京大学,1996),因此我们选定 A 值在 0.943 以下菌液进行稀释,保证所有待测样品 A 值

均在分光光度计可信值之内,结果证明在此范围内,青枯菌的吸光度与其浓度之间呈相关性。

参考文献:

- 童一中. 1996. 生物统计法[M]. 长沙:湖南科技出版社
 南京大学《无机及分析化学》编写组. 1996. 无机及分析化学[M]. 北京:高等教育出版社,340—350
 Ao SE(敖世恩), Yang M(杨媚), Zhou EX(周而勋), et al. 2006. Screening of rice somatic mutants resistant to rice sheath blight *in vitro*(水稻抗纹枯病突变体的离体筛选)[J]. *J South China Agric Univ*(华南农业大学学报), 27(1): 47—50
 Baruah SJN, Deka PC. 1995. *In vitro* selection of tomato plants resistant to *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Acta Hort*, 392: 115—121
 Carlson PS. 1973. Methionine-sulfoximine-resistant mutants of tobacco[J]. *Science*, 180: 1 366—1 368
 Chen YF(陈耀锋), Li CL(李春莲), Han DJ(韩德俊), et al. 1997. The hormone-like of fusarium *Graminearum* toxin in wheat tissue culture(镰刀菌毒素在小麦组织离体培养中的类激素活性)[J]. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*(西北农业学报), 6(4): 22—25
 Huang NZ(黄宁珍). 2002. Study on characters of some anti-disease species of Solanaceae and its application prospect(茄科植物抗青枯病特性研究及其应用展望)[J]. *Guihai*(广西植物), 22(6): 572—576
 Liu DM(刘东明), Zeng QW(曾庆文), Chen HF(陈红锋), et al. 2003. Common disease of medicinal plants in South China Botanical Garden(华南植物园药用植物常见病害)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 26(12): 851—853
 Lin XH(林小桦), He H(贺红), Wu LR(吴立蓉), et al. 2007. *In vitro* culture of different explants from *Pogostemon cablin*(广藿香不同外植体离体培养的研究)[J]. *Guihai*(广西植物), 27(4): 685—661
 Toyoda H, Chatani K, et al. 1989. Selection of bacterial wilt-resistant tomato through tissue culture[J]. *Plt Cell Rpt*, 8: 317—320
 Wang J(王军). 2005. The mechanism of pathogenicity and its regulation of *Ralstonia solanacearum* to plants(青枯菌对植物的致病机制及其调节)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), 3(41): 142—147
 Wei AM(韦爱梅), Wang J(王军). 2004. Development on the researches of resistance to *Ralstonia solanacearum* in plants(我国植物青枯病抗病性研究新进展)[J]. *Guangdong Fore Sci Tech*(广东林业科学), 20(4): 47—50
 Xu SW(徐诗伟), Xu Q(徐倩). 1996. The prospect of applying on microorganism transformation in medicine synthesis(微生物转化在药物合成中的应用前景)[J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 27(9): 422—425
 Zeng LX(曾列先), Ma ZR(马镇荣). 1992. The plant regeneration from *in vitro* selection on the media with culture filtrate of rice *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(以水稻白叶枯病原菌培养过滤液离体筛选再生植株)[J]. *Acta Phytophyl Sin*(植物保护学报), 19(3): 231—235