

# 臺灣茄科植物青枯病菌菌系間的細胞外 多醣類之比較<sup>1</sup>

廖英明<sup>2</sup> 徐世典<sup>3</sup>

**摘要：**應用氣液層分析法 (Gas-liquid chromatography) 分析臺灣茄科植物青枯菌 (*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) 之細胞外多醣類 (extracellular polysaccharide) 顯示供試菌系間具有變異性。細胞外多醣類之組成除 64 號菌株較為特殊外，其餘菌系間差異不大，僅在量上具有區別。多醣類係經 HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium broide) 及 KCl 之沉澱抽取後，再經酸水解作用 (acid hydrolysis)，並以 Sigma-Sil-A 處理轉化為 TMS derivatives，再加以分析。細菌培養時間能影響多醣類之產生，以第四天產量為最高。經氣液層分析之結果顯示 *P. solanacearum* 細胞外多醣類之酸水解產物可被測出的包括 D(+) fucose,  $\alpha$  及  $\beta$ -glucose, glucosamine,  $\alpha$ -D(+) mannose,  $\alpha$ -glacturonic acid,  $\beta$ -galactose 及一些未鑑定之化合物，但並不含鼠李糖 (rhamnose)

由 *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith 所引起之青枯病為臺灣蕃茄、煙草、茄子、甜椒等茄科作物重要的病害。<sup>(21)</sup> 本病菌侵入寄主後，蔓延於維管束組織，致使植物萎凋及死亡。*P. solanacearum* 分泌之細胞外多醣類 (extracellular polysaccharide)，被認為是造成萎凋的原因之一<sup>(15,19)</sup>，因此其化學組成之分析，可能有助於致病機構之瞭解。Dudman<sup>(8)</sup> 分析 *P. solanacearum* 之蕃茄生理小種及香蕉生理小種所產生之細胞體外粘液 (slime) 的成份，發現二者之區別在於後者含有鼠李糖 (rhamnose)，而前者則無。臺灣存在的青枯病菌具有不同的菌系 (病原型)<sup>(14)</sup>，氣液層分析法 (Gas-liquid chromatography) 現已被應用於作為微生物之種和菌系分類上的一種基準。筆者即利用此分析法來測定臺灣茄科植物青枯病菌不同菌系間之細胞外多醣類之組成份，以瞭解其間之差異性，以作為區分病原菌系之可行性。

## 材料及方法

一、供試菌株：本研究選用之 *P. solanacearum* 菌株由臺灣各地不同寄主植物之病組織分離而得<sup>(14)</sup>，每一菌株再經 Kelman 氏 TTC 培養基<sup>(16)</sup> 上數次之單菌落分離法篩選出具有毒性流質狀之菌落而純化之。純化後之菌株移植於盛有無菌蒸餾水之有蓋試管中，於室溫保存以維持其毒性。

由保存於有蓋試管中之菌種挑取細菌懸浮液在 TTC 培養基平板上劃線培養，經48小時 (32°C) 後，選取具有毒性之流質狀菌落，移植於 Nutrient agar 斜面上，於 32°C，再經24小時培養後，取一白金耳量之細菌移入裝有 150 ml Husain 及 Kelman 培養液 (HK培養液)<sup>(15)</sup> 之 300 ml 三角瓶內。於 25°C 震盪培養三天後供作多醣類抽取分析用。

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 945 號。
2. 本所植物病理系技佐。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
3. 國立中興大學植物病理系教授。臺灣省 臺中市。

一、細菌之生長與培養液酸鹼度之測定：細菌培養於 HK 培養液後，於不同時間測定其混濁度及 pH 值。混濁度以 Klett-Summerson colorimeter 測定，而 pH 值則以 Beckman Zero matic 酸鹼儀測定。

二、多醣類產量之測定：依照 Fukagawan 等氏<sup>(10)</sup>之方法，將細菌培養於 HK 培養液後之培養液於 5000 rpm 離心 30 分鐘。取上層液加入 1% NaCl (W/V) 及 55% Acetone (V/V)，置於 4°C 過夜，而後再離心 (5000 rpm, 30 分鐘)，收集沉澱物。將此沉澱物溶於 1% NaCl，再加入 4 倍量之丙酮 (Acetone)，離心收集沉澱物。沉澱物以 95% Acetone 洗淨，再經真空抽氣使之乾燥，稱其乾燥重量。

三、多醣類之抽取：依照 Sutton 及 Williams<sup>(23)</sup>二氏之方法，將細菌培養於 HK 培養液三天後，量取 100 ml 細菌培養液作為抽取多醣類用。培養液先經 12,000 Xg 離心 15 分鐘 (三次)。取上層液加入約 2.75g 之 HTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium broide) 及 0.5g 之 KCl 使多醣類沉澱。而後以 10,000 Xg 離心 15 分鐘，收集沉澱部份 (HTAB-polysaccharide complex)。再以含 0.05% 氯化鉀之甲醇 20ml 洗四次，則多醣類呈現淡黃色粘液。將此粗製之多醣類，溶於蒸餾水中，經真空抽氣使之乾燥。乾燥之多醣類以蒸餾水配成 0.2% 溶液，再用酒精處理三次，使多醣類沉澱，乾燥後留作分析用。

四、酸水解作用：由於多醣類均由許多單糖組成，因此在分析前必須將它解離成單糖形式以便分析<sup>(3,22,23,26)</sup>。取 2.5~6.0 mg 試料 (乾燥後之多醣類)，加入 4N HCl 4 ml，置於 100°C 處理 3 小時，而後在 40°C 下減壓濃縮，使之乾燥。再以蒸餾水溶解，並裝於小玻璃管中，經真空抽氣使之乾燥。

五、Trimethylsilization：醣類本身並不具揮發性，因此在打入氣液層次分析儀前，必須加以處理，使其改變結構而具揮發性<sup>(24)</sup>。處理之方法如下：將醣類作成 100mg/ml 之溶液，取該溶液 0.5 ml 加入 0.25 ml 肌糖 1% (inositol) 溶液中。此混合液經減壓抽氣 (40°C) 15 分鐘，使之乾燥。乾燥後之醣類移入小玻璃管中，然後將此玻璃管置於氮氣流 (Nitrogen stream) 下，徐徐加入 Sigma-Sil-A 試劑 (Trimethyl chlorosilane : Hexamethyl disilazane : Pyridine = 1 : 3 : 9) 0.1 ml。在室溫作用 10 分鐘後 (其間至少搖動 1 分鐘以上)，即可得 TMS derivatives。

六、氣液層次分析：以外徑 0.3 公分，長 1 公尺之玻璃管，內裝 6% QF-1 on 80-100 mesh chromosorb W 作為分離管。取 3 微升 ( $\mu$ l) 打入氣液層次分析儀 (Shimazu GC-5A 內裝 H<sub>2</sub>-flame ionization detector) 中。分析條件為氣體流速 N<sub>2</sub> : H<sub>2</sub> : Air = 37 : 40 : 400 (ml/min)，分離管首先在 110°C 維持 4 分鐘，而後以每分鐘 4°C 之速度直線升溫至 210°C，再維持恆溫。

## 結 果

### 一、培養時間對多醣類產生之影響

青枯病菌 (菌株 21) 在培養時間 24 至 72 小時內，多醣類產量變化不大，至 96 小時產量最多，隨後則遞減。細菌之生長則隨著培養時間而增加，但在第三天後則趨於平緩 (圖 1)。培養基之 pH 值在培養過程中亦有顯著變化，培養 24 hrs 時，pH 值微升，隨之下降，迨至 72 hrs 為最低，96 hrs 後又上升。

### 二、各菌株多醣類產生之比較

*P. solanacearum* 在 HK 培養液培養三天後，培養過濾液 (100ml) 所含的細胞外多醣類乾燥重量由 4.0~42.0mg (表 1)。由此可知各菌株細胞外多醣類之產量差異極大。徐氏<sup>(14)</sup>所分類之各種病原型在多醣類之產生上並不一致，而多醣類之產生量與病原型無直接關係存在。

### 三、各菌株所產生的細胞外多醣類組成之比較

各菌株所產生之細胞外多醣類之組成，除菌株 64 外，其餘菌株所產生的多醣類之酸化水解產物均

爲一致，惟有量之區別（表 2）。以菌株 50、64 爲例，所得之分析圖譜示於圖 2。

表 1. *Pseudomonas solanacearum* 各菌株所產生之細胞外多糖類之比較。

Table 1. Comparison of isolates of *Pseudomonas solanacearum* on the production of crude extracellular polysaccharide.

病原型 <sup>a</sup> pathovar	菌株 isolate	多糖類 (mg/100ml) polysaccharide
I	27	14.2
	47	12.8
	50	42.0
II	21	4.0
	66	8.4
III	65	28.4
	69	7.2
IV	11	12.4
	61	10.8
	64	12.2

a. 依照參考文獻 16 之分類 According to reference 16

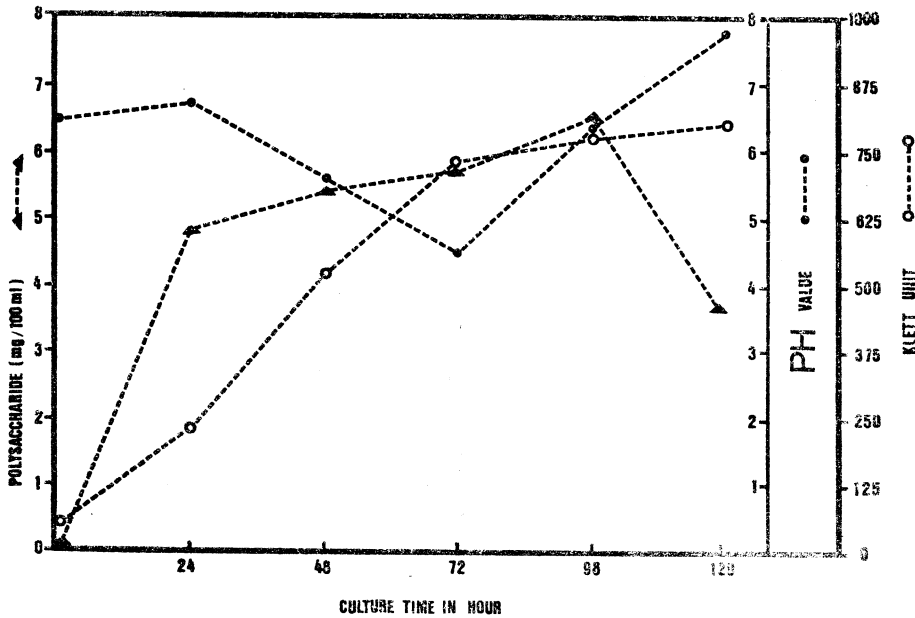


圖 1. 不同培養時間對青枯病 21 號菌株產生多糖類及其培養液 pH 值變化之影響

Fig. 1. Effect of incubation time on pH and extracellular polysaccharide produced by isolate 21 of *Pseudomonas solanacearum* in a liquid medium.

表 2. *Pseudomonas solanacearum* 各菌株細胞外多醣類酸化水解產物之比較<sup>a</sup>

Table 2. Acid hydrolysed products of extracellular polysaccharides produced by isolates of *Pseudomonas solanacearum*

病原型 pathovar	菌 株 isolate	尖 峰 代 號 peak <sup>b</sup>										
		A	B	C	D	E	F	G	X	Y	U	W
I	27	76.5	T	T	T	T	T	T	—	—	—	—
I	47	101.5	55	T	8	10.5	T	15	—	—	—	—
I	50	70	108.5	T	T	56.5	T	77	—	—	—	—
II	66	50	9	T	T	T	28	15	—	—	—	—
III	65	37.5	77	T	5	80	12	129.5	—	—	—	—
IV	11	T	T	T	T	T	T	92	—	—	—	—
IV	61	168	T	T	T	T	T	90	—	—	—	—
IV	64	—	—	—	T	T	8	T	32	T	T	12

a. 表中數字為尖峰面積 (mm<sup>2</sup>)，"T" 表示稀少 (尖峰面積在 5mm<sup>2</sup> 以下者)，"—" 表示無此尖峰。The numerals were peak areas (mm<sup>2</sup>), "T" indicates trace (peak area less 5 mm<sup>2</sup>), "-" indicates absence of the peak.

b. A 之持續時間為 3.10 分 (未鑑定化合物)，B 為 7.65 分 (未鑑定化合物)，C 為 15.0 分 (D(+)) 海藻糖，D 為 17.0 分 (α-D(+)) 甘露糖，E 為 18.1 分 (α-葡萄糖)，F 為 20.3 分 (氨基葡萄糖)，G 為 21.6 分 (β-葡萄糖)，X 為 5.6 分 (未鑑定化合物)，Y 為 14.4 分 (β-D(-)) 果糖，U 為 22.8 分 (α-D(-)) 分解乳糖酸，W 為 19.8 分 (β-分解乳糖)。Retention time for A was 3.10min (unidentified), B 7.65min. (unidentified), C 15.0 min. (D(+)) fucose, D 17.0min. (α-D(+)) mannose, E 18.1 min. (α-glucose), F 20.3 min (glucosamine), G 21.6min. (β-glucose), X 5.6min. (unidentified), Y 14.4min. (β-D(-)) fructose, U 22.8min. (α-D(-)) galacturonic acid, W 19.8min. (β-galactose).

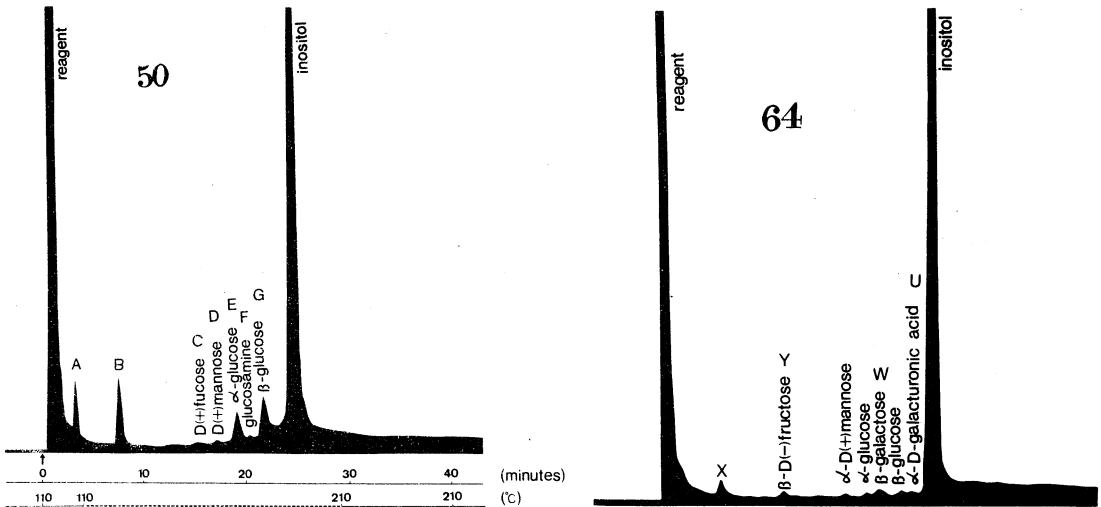


圖 2. *Pseudomonas solanacearum* 二個菌株所產生的體外多醣類酸化水解產物之分析圖譜。Inositol 為內標準物質。

Fig. 2. Gas Chromatograms of acid hydrolysed products of extracellular polysaccharides produced by isolates 50 and 64 of *Pseudomonas solanacearum*. Inositol was internal standard.

## 討 論

病原細菌的病原菌系不易以細菌學上常用於測定其特性的方法而加以區別，因此在其代謝產物組成份及其量上的差別漸為分類學者所注意<sup>(2,7,9,13,20,25)</sup>。在分類上，尤其是關係相近的類羣如 race 或 strain，吾人所採取的區分方法應使區分之誤差減少到最小程度之原則。在本實驗中，由分析細菌外多醣類組成之結果，顯示茄科植物青枯病菌仍存在有變異性。多醣類已知為青枯病菌致病因子之一環，在本質上為造成植物體的萎凋<sup>(4,5,6,11,12,17,18)</sup>。但其組成為何，所知不多，由本研究知，在所分析的不同菌株中，細胞外多醣類的變異性不大，僅 64 號菌株較為特殊（表 2），大多數菌株的細胞外多醣類含有 D(+) fucose,  $\alpha$  及  $\beta$ -glucose,  $\alpha$ -D(+)mannose, glucosamine 及一些未鑑定出之單糖，這些組成份之含量在不同菌株間有差異。本實驗也證實臺灣茄科植物青枯病菌所含之多醣類並無鼠李糖的存在，此與 Dudman 氏<sup>(8)</sup>所稱 tomato race 不存在 rhamnose 之結果相符。根據 Husain 及 Kelman<sup>(15)</sup> 二氏之報告 *P. solanacearum* 細胞外多醣類之產量與其病原性有關；無病原性或病原性弱者所產生的量極少而病原性強者所產生的量多。由本試驗得知不同菌株的細胞外多醣類在產量上有很大的差異（表 1），但這些差異似乎與其病原性無大關係，因為這些菌株在測定前均在 TTC 培養基上選取具毒性之菌落來分析。

本實驗顯示青枯病菌有生化性質的變異性。陳氏<sup>(1)</sup>使用相同的菌株，測定其他生理生化性質的結果，亦發現該細菌有生理變異性，惟陳氏所區分之菌系與本實驗所區分者不相符，這些生理型與徐氏<sup>(14)</sup>所得的病原型也無關係存在。由此可知，*P. solanacearum* 是一複合的種類，由許多的菌系所組成，在其演變過程中，同一生化型的族羣可能已分化成為病原性不同的族羣，或原屬同一病原型的，也可能已分化為生理生化性質相異的族羣，但不失其原有之病原特性。該病菌之生化型與病原型具有關連的則有如 Hayward 所歸類之 biochemical type 2，相當於 Buddenhagen 氏等所歸類之 race 3<sup>(4)</sup>。本研究也證實氣液層分析法可以偵測不同細菌間之差異性及分析其化學的組成份。

## 參 考 文 獻

1. 陳家鈺。1974 臺灣茄科植物青枯病菌生理特性，中興大學植物病理研究所碩士論文。
2. Abel, K., H. De Schemertzing, and J. I. Peterson. 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J. Bacteriol. 85 : 1039-1044.
3. Adams, G. A., T. G. Tornadene and M. Yaguchi. 1969. Cell wall lipopolysaccharides from *Nesseria catarrhalis*. Can. J. Microbiol. 5 : 365-374.
4. Buddenhagen, I. W. and A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial with caused by *Pseudomonas solanacearum* Ann. Re. Phytopathol. 2 : 203-230.
5. Buddenhagen, I. W., K. Kennedy and C. H. Wang. 1966. Comparative carbohydrate catabolism in three strain of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 56 : 888-1002.
6. Buddenhagen, I. W., L. Sequeria and A. Kelman. 1962. Designation of race of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52 : 726 (Abstr.)
7. Dmitricv, B. A., N. A. Hinton, R. W. Lowe and J. K. N. Jones. 1971. Studies on lipopolysaccharide of *Proteus*. Can. J. Microbiol. 10 : 1385-1394.
8. Dudman, W. F. 1959. Comparison of slime from tomato and banana strains of *Pseudomonas solanacearum*. Nature 184 : 1969-1970.
9. Evans, L. R. and A. Linker. 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* J. Bacteriol. 116 : 915-923.
10. Fukagawa, K., H. Yamaguchi, D. Yonezawa and S. Murao 1974. Isolation and characterization of polysaccharide produced by *Rhodotorula glutinis* K-24. Agr. Biol. chem 38 (1) : 29-35.

11. Harris, D. C. 1971. Intra-specific variation in *Pseudomonas solanacearum*. Proceedings of the third international conference on plant pathogenic bacteria, Wageningen 14-21 April. : 289-292.
12. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bact. 27 (2) : 265-277.
13. Henis, Y., J. R. Gould and M. Alexander. 1966. Detection and identification of bacterial ay gas chromatography. Appl. Microbiobiol. 14 : 513-524.
14. Hsu, S. T. 1974. Strains and distribution of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. Proc. Natl. Sci. Council. No. 7. Part 2 : 351-362.
15. Husain, A. and A. Kelman. 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* Phytopathology 48 : 155-165.
16. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytophology 51 : 158-161.
17. Okabe, N. 1937. Studies on the variation of *Bacterium solanacearum* (preliminary report) Ann. Phytopathol. Soc. Japan 7 : 95-104.
18. Okabe, N. and M. Goto. 1953. Studies on *Pseudomonas solanacearum*. Classification of the strains by bacteriophages and virulence of the strains. Shizuoka Univ. Fab. Agr. Repr. 3 : 52-80.
19. Palleroni, N. J. and M. Doudoroff. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 107 : 690-696.
20. Reiner, E. 1967. Studies on differentiation of microorganisms by pyrolysis-gas-liquid chromatography. J. Gas Chromatogr. 5 : 65-67.
21. Sequeira, L, S. Aist and V. Ainslie 1972. Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco by proteinaceous constituents of *Pseudomonas solanacearum*. phytopathology 62 : 536-541.
22. Sloneker, J. H. and Allene Jones. 1962. Extracellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 : part I : constitution. Can. J. Chem. 40 : 2066-2071.
23. Sutton, J. C. and P. H. Williams 1970. Comparison of extracellular polysaccharid of *Xanthomonas campestris* from culture and from infected cabbage leaves. Can. J. Botany 48 : 645-651.
24. Swelley, C. C., R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Oil chem. Soc, 85 : 2497-2507.
25. Wurst, M. V. Vancura and L. Kalachora . 1974. Analysis of the polysaccharides of some soil bacteria by gas chromatography. J. Chromatogr. 91 : 469-474.
26. Watanabe, T. et al. Extracellular polysaccharide from *Escherichia* sp. Strain No. 1768. 1978. J. Ferment. Technol, 51. No. (6) : 415-422.

# Comparison of extracellular polysaccharide from different strains of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan<sup>1</sup>

Ying-ming Liao<sup>2</sup> and Shih-tien Hsu<sup>3</sup>

## Summary

The amount of extracellular polysaccharide produced by strains of *Pseudomonas solanacearum*, the pathogen of bacterial wilt of solanaceous plants found in Taiwan, was variable and was affected by culture age. The composition of the polysaccharide was analyzed by gas-liquid chromatography. The polysaccharides produced in the culture medium precipitated by adding HTAB (hexadecyl trimethyl ammonium broide) and potassium choride, and acid hydrolysed with HCl. The crude polysaccharides were then treated with Sigma-Sil-A to conver them into TMS (Trimethylsilyl) derivatives, and used for gas chromatographic analysis.

The results showed that composition of the extracellular polysaccharides produced by strains of the pathogen, with the exception of isolate 64, was similar. D (+) fucose,  $\alpha$  and  $\beta$ -glucose, glucosamine,  $\alpha$ -D(+) mannose,  $\alpha$ -glacturonic acid,  $\beta$ -galactose, and some unidentified compounds were detected in most strains of the pathogen.

However, the amount of each component contained in the polysaccharides varied among strains. The strains of the pathogen differentiated by pathogenicity test were not correlated with differences in the amount and composition of the extracellular polysaccharides produced by the pathogen.

- 
1. Contribution No. 945 from the Taiwan Agricultural Research Institute.
  2. Assistant pathologist, Department of Plant Pathology, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431. ROC.
  3. Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, 400 ROC.