

烟草青枯病菌分离株 RSXJ-1 的培养性状 及其生物型鉴定

崔朝宇¹, 张超群², 周泽科¹, 蒋军喜^{1*}

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西烟叶科学研究所, 江西 南昌 330025)

摘要: 从江西省峡江县烟区采集呈典型症状的青枯病烟株, 采用平板梯度稀释分离法分离获得一株病原菌分离株, 命名为 RSXJ-1。在完成致病性测定的基础上, 通过分子生物学方法将该菌株鉴定为茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)。本文研究了该菌株在不同培养基上的培养性状, 结果表明该菌株的培养性状与 *R. solanacearum* 的培养性状相一致; 对该菌株进一步进行生物型研究, 结果显示该菌株能利用乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇和山梨醇氧化产酸并能还原硝酸盐; 而不能利用甜醇氧化产酸, 据此将该菌株鉴定为生物型 III-1。

关键词: 烟草青枯病菌; 培养性状; 生物型

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 02-0153-04

Cultural Characteristics and Biotype Identification of Isolate RSXJ-1 of *Ralstonia solanacearum*

CUI Chao-yu¹, ZHANG Chao-qun², ZHOU Ze-ke¹, JIANG Jun-xi^{1*}

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Jiangxi Tobacco Science Research Institute, Nanchang 330025, China)

Abstract: A tobacco plant with typical symptoms of bacterial wilt was collected from Xiajiang county of Jiangxi province. A bacterial isolate was obtained from the plant using gradient dilution isolation method, and it was named RSXJ-1. With completion of its pathogenicity test, the isolate was identified molecularly as *Ralstonia solanacearum*. This paper investigated the cultural characteristics of the bacterial isolate on different media. The results showed that cultural characteristics of the bacterial isolate were consistent with the cultural characteristics of *R. solanacearum*. Experiment of biotype identification of the isolate was also conducted. The results showed that the isolate had the ability of both oxidizing lactose, maltose, cellobiose, mannitol, and sorbitol to produce acid and reducing nitrate. However, it had no ability of oxidizing dulcitol to produce acid. According to the results, the isolate was identified as biotype III-1 of *R. solanacearum*.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; cultural characteristics; biotype

烟草是江西省峡江县重要的经济作物, 在该县广大乡镇有大规模种植, 并带来可观的经济效益, 然而在烟草种植过程中, 各种病害时有发生, 其中

烟草青枯病就是严重危害烟草种植的病之一。烟草青枯病是由茄科劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的细菌性病害, 青枯病菌分布广,

收稿日期: 2012-04-22

基金项目: 江西省烟草专卖局(公司)资助项目(201001021)

作者简介: 崔朝宇, 男, 硕士生, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: cuichaoyu1991@163.com; * 通信作者: 蒋军喜, 男, 教授, 博士, 主要从事植物病害综合治理研究。E-mail: jxjiang64115@yahoo.com.cn。

其菌株间有明显的变异和分化现象。病原菌在自然界中寄主范围十分广泛,包括茄科、豆科、蓼科等 30 余科 200 多种植物,其中烟草、番茄、花生及马铃薯等受害最重^[1-2]。迄今,茄科劳尔氏菌已鉴别出 5 个小种及 5 个生物型,其中侵染烟草的菌株为小种 1 和生物型 I、III、IV^[3-4]。由于烟草青枯病在烟草种植过程中造成严重的危害,对于烟草青枯病的研究也比较完善,其中重庆、湖南、安徽和福建等地烟草青枯病菌生物型及生理小种研究均有报道;王晓丹,林抗美等^[5]对青枯病菌在不同寄主上的生物型也有详尽研究,而在江西烟区尚无烟草青枯病菌生物型系统研究的报道。本文从江西省峡江烟区采集分离得到一株烟草青枯病菌分离株,命名为 RSXJ-1,在完成致病性测定的基础上对菌株在不同培养基上培养性状进行研究;通过测定该菌株对 3 种多糖和 3 种己醇的利用情况以及硝酸盐还原情况,对该菌株进行生物型鉴定。现将结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 培养基及试剂

1.1.1 培养基 (1) NA 液体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2-7.4。(2) NA 固体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g, NaCl 5 g,琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2-7.4。(3) 生物型测定的基本培养基: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 酵母浸膏 1 g, 琼脂 20 g, 1% 溴百里酚蓝水溶液 6 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。(4) 硝酸盐培养基:蛋白胨 10 g, 硝酸钾 1 g, 蒸馏水 1000 mL, 琼脂 3 g, pH 7.2。

1.1.2 试剂 格里斯氏试剂, A 液:对氨基苯磺酸 0.5 g, 稀醋酸(10%左右); B 液: α -萘胺 0.1 g, 蒸馏水 20 mL, 稀醋酸(10%左右) 150 mL。

1.2 样品采集

2011 年 7 月从江西省峡江县马埠镇烟田采集呈典型症状的烟草青枯病烟株,预处理后,样品置于 4℃ 保存备用。

1.3 病原菌分离培养及菌种保存

感病烟株茎部用 70% 的酒精棉球擦拭消毒处理后,在无菌条件下用灭菌的解剖刀切开茎部,切取小块呈褐色的感病维管束组织放入无菌水中,捣碎,静置 10 min,利用培养皿梯度稀释法于 NA 培养基

上分离。30℃ 培养 48 h,待平板上长出菌落后,用灭菌接种环挑取白色流动性菌落移至 NA 斜面培养基上。30℃ 培养 48 h 后用无菌水冲洗斜面菌落,菌种保存于无菌水中,置于 4℃ 保存备用^[6]。

1.4 致病性测定

采用叶腋针刺接种方法接种,将健康的 K326 烟草种子播种于消毒盆土中,每盆 1 株,置于 25℃ 光照培养箱中培养一段时间后,采用针刺方法从烟苗叶片(从上至下第 3 片完全展开叶)叶腋处刺入茎内维管束,然后在伤口处用浓度为 10^8 cfu/mL 的菌液处理,并设 3 次重复,另设灌注无菌水作对照,用消毒脱脂棉球沾菌液保湿 48 h,于 30℃ 温室内保湿诱导发病,并定期观察发病情况。

1.5 形态特征观察

在无菌条件下从培养皿上挑取单菌落分别移植于 NA 平板、NA 斜面、NA 液体培养基中,置于 30℃ 条件下培养 48 h,观察菌株在各条件下的培养特征。

1.6 生物型测定

1.6.1 菌株对糖和醇的利用 将乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇、山梨醇和甜醇均配成 10% 溶液,灭菌后分别加入基本培养基中,最终浓度为 1%,3 种双糖用过滤法灭菌,3 种己醇经 115℃ 蒸汽灭菌 10 min,将待测的菌株分别移植于含不同碳水化合物的 6 种生物型测定培养基上,在 28~30℃ 的恒温培养箱中分别培养 5 d、7 d 和 10 d 时调查,根据各处理菌株生长情况,确定菌株对 3 种糖和 3 种醇的利用能力。

1.6.2 菌株的硝酸盐还原 每支试管分装 5 mL 含 0.1% 的硝酸盐培养基,高压灭菌,每个菌株针刺接种 2 管,分别在 3 d、5 d、7 d 时用格里斯氏试剂测定,每管加试剂 A 和 B 各 1 mL。若呈红色,表明有亚硝酸根产生。

1.6.3 根据 Harward^[7]和何礼远^[8]制定的标准(表 1)确定菌株的生物型

2 结果与分析

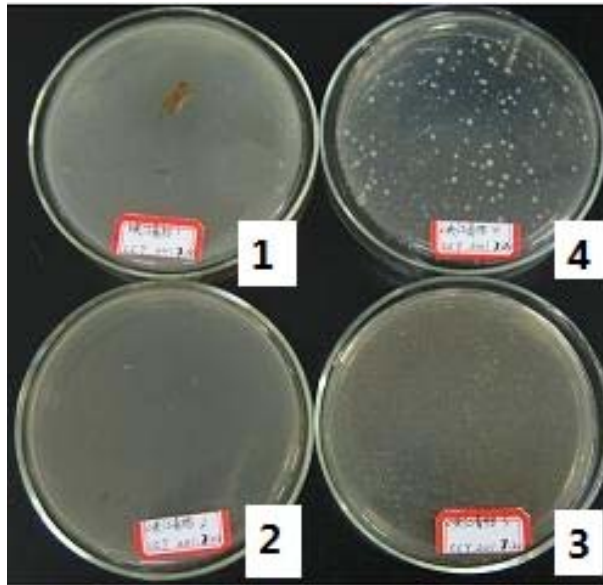
2.1 病原菌分离

病原菌分离采用培养皿梯度稀释分离法,在第四皿中长出单菌落,菌落形态一致,无杂菌污染(见图 1)。

表1 青枯劳尔氏菌生化型划分标准 (Hayward, 1964; 何礼远, 1983)

生化型	乳糖	麦芽糖	纤维二糖	甘露醇	山梨醇	甜醇	硝酸盐还原
生化型 I	-	-	-	-	-	-	+
生化型 II	+	+	+	-	-	-	+
生化型 III	+	+	+	+	+	+	+
生化型 IV	-	-	-	+	+	+	+
生化型 V	+	+	+	+	-	-	+

注：“+”为可产酸或可还原硝酸盐，“-”为不产酸或不能还原硝酸盐



1: 第一皿 2: 第二皿 3: 第三皿 4: 第四皿

图1 烟草青枯病菌峡江分离株RSXJ-1平板稀释分离图

2.2 致病性测定

将RSXJ-1配成浓度为 10^8 cfu/mL的菌液采用叶腋针刺方法分别接种健康烟苗，烟苗均出现萎蔫青枯症状，茎上有明显的褪绿条斑；最后整株死亡，而用无菌水作为对照的烟苗则生长正常。说明分离到的RSXJ-1有致病性。

2.3 病原菌形态观察

2.3.1 NA平板上形态 菌落圆形，直径1.8~2 mm乳白色，有光泽，表面凸起，边缘整齐，质地粘质、半透明，无特殊气味，培养基颜色无明显变化。

2.3.2 NA斜面上形态 菌苔线形，表面光滑，乳白色，质地粘质，半透明，表面发亮，无特殊气味。

2.3.3 NA液体培养基上形态 在培养液中生长迅速，过夜培养即变浑浊，无菌环及菌膜形成，不形成团状的漂浮物，形成云雾状菌团，培养液底部无沉积物，培养液无特殊气味。

2.4 生物型测定

2.4.1 对3种双糖和3种己醇的利用情况 根据不同生化型的青枯菌对3种双糖化合物（麦芽糖、乳糖和纤维二糖）和3种己醇（甘露醇、山梨醇和甜醇）氧化产酸能力不同，实验中每个处理设置了两个重复和一个空白对照（CK），用溴百里香酚蓝作为指示剂，其中指示剂在pH为7.0~7.1的中性培养基中显蓝色，当青枯菌利用或氧化这些物质时，反应产生的酸性物质使培养基的pH值下降，当pH值低于6.0时，培养基显黄色，说明青枯菌已经利用或氧化这些物质，反之亦然。按照Hayward鉴定青枯菌的反应模式，RSXJ-1在生物型鉴定培养基上培养10 d后，生长在含乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇和山梨醇培养基颜色由蓝色变成黄色，说明该RSXJ-1能利用乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇和山梨醇；而生长在含甜醇培养基颜色发生变化，仍然是蓝色，说明RSXJ-1不能利用甜醇。

2.4.2 硝酸盐的还原情况 不同生化型的青枯菌在

硝酸盐培养基生长情况不同,根据青枯菌在硝酸盐培养基上硝酸盐还原情况不同,可以区分不同的生化型。阳性反应的青枯菌在硝酸盐培养上生长会还原硝酸盐从而产生亚硝酸根离子,利用格里斯氏试剂检测亚硝酸根离子的存在,若试剂变成红色,则可证明该青枯菌能还原硝酸盐。RSXJ-1 针刺接种硝酸盐培养基后,置于 30℃ 的恒温培养箱中分别培养 3 d、5 d 和 7d 后,向每管加格里斯氏试剂 A 和 B 各 1 mL,结果各管中试剂均变成红色,可知 RSXJ-1 能还原硝酸盐培养基并产生亚硝酸根离子。

2.4.3 生物型测定结果 根据 2.4.1 及 2.4.2 的实验结果可知,RSXJ-1 能利用乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇和山梨醇氧化产酸并能还原硝酸盐,而不能利用甜醇氧化产酸;并能还原硝酸盐产生亚硝酸根离子。按照 Harward 和何礼远制定的标准划分该菌株的生物型,将 RSXJ-1 鉴定为生物型 III-1。

3 结论与讨论

本文通过对峡江县烟草青枯病一个分离株 RSXJ-1 在不同培养基上培养性状进行研究,结果显示 RSXJ-1 的培养性状与报道的茄科劳尔氏菌(*R. solanacearum*)培养性状相一致。进一步测定了 RSXJ-1 对 3 种双糖和 3 种己醇的氧化能力,以及对硝酸盐的还原能力,结果显示 RSXJ-1 能利用乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇和山梨醇氧化产酸并能还原硝酸盐,而不能利用甜醇氧化产酸。根据测定结果将 RSXJ-1 鉴定为生物型 III-1。

邹阳等^[9]从重庆不同地区采集分离得到烟草青枯病菌菌株 44 个,结果显示 44 个菌株均为生物型 III;王国平等^[10]从湖南地区 12 个县,市采集分离的烟草青枯病菌菌株 56 个,结果判定 56 个生物型分别属于生物型 III, III-1, III-2, III-3, III-4。已知 *R. solanacearum* 已鉴别出 5 个小种及 5 个生物型,侵染烟草的菌株为小种 1 和生物型 I、III、IV,国内烟草青枯病菌以生化型 III 为主^[2-4]。本试验测得结

果与之相一致。

本研究仅是对江西烟草青枯菌生化型测定的一个开始。江西烟草栽培广泛,烟区生态条件复杂,今后有必要对江西烟草青枯病菌生化型进行广泛的测定,以便全面掌握江西烟草青枯病菌的生理分化,最终为江西烟草青枯病抗源筛选、抗病品种选育和利用奠定良好工作基础。

参考文献:

- [1] 浙江农业大学. 农业植物病理学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1978.
- [2] 王金生. 植物病原细菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 371-373.
- [3] 李彩华, 靳学慧. 植物细菌性青枯病研究进展[J]. 中国科技信息, 2005, 23: 97-102.
- [4] 方树民, 纪成灿, 顾钢, 等. 烟草青枯病菌生理分化的研究[J]. 中国烟草学报, 1998, 4(1): 38-43.
- [5] 亢雅娟, 李双双, 赵丽青. 植物不同青枯菌生化型的鉴定[J]. 山西师范大学学报(自然科学版), 2011, 2(22): 71-74.
- [6] 方中达. 植病研究方法第3版[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 47-48, 193-195.
- [7] Hayward AC. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1964, 27: 265-277.
- [8] He L Y, Sequeira L, Kelman A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* form China[J]. Plant Disease, 1983, 67: 1357-1361.
- [9] 邹阳, 肖崇刚, 易龙. 重庆地区烟草青枯病菌的生物型测定[J]. 烟草科技, 2007, 239(6): 62-64.
- [10] 王国平, 周志成. 湖南烟草青枯病菌的致病性及生物型研究[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(4): 371-374.
- [11] 贾春燕. 烟草青枯病菌的分子检测与烟草品种抗病性研究[D]. 山东: 山东农业大学, 2011.