

中图分类号: S532; S435.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2010)01-0038-03

## 马铃薯青枯病菌生化型研究及菌株接种方法的比较

王晓丹, 闵凡祥, 郭梅\*, 胡林双, 魏琪, 董学志, 李学湛

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:** 试验测定了我国山东、广东和广西3省的马铃薯青枯病菌生化型, 结果表明: 被测菌株包含了生化型、和4种生化型, 其中生化型和为优势生化型, 均占被测菌株的40%, 被测菌株中未测定出生化亚型。同时, 比较了通过伤根灌注法和刺茎法这两种方法在番茄幼苗上接种马铃薯青枯病菌的接种效果, 结果表明: 与刺茎法相比较, 伤根灌注法操作简便, 幼苗发病快, 发病级数高, 是理想的青枯病菌接种方法。

**关键词:** 马铃薯; 青枯病菌; 生化型; 接种方法

## A Study on Biotypes of *Ralstonia solanacearum* from Potato Hosts and Comparison of Inoculation Methods

WANG Xiaodan, MIN Fanxiang, GUO Mei, HU Linshuang, WEI Qi, DONG Xuezhi, LI Xuezhao

(Virus-free Seedling Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,  
Harbin, Heilongjiang 150086, China)

**Abstract:** The biotypes of strains of *Ralstonia Solanacearum* obtained from disease potatoes in Shandong, Guangdong and Guangxi province were tested in this study. The tested strains belong to biotype, , and . Biotype and were predominant, and were 40% of the all tested strains respectively. In the study, sub-biotype was not found among the all tested strains. At the same time, two different methods of artificial inoculation on tomato seedling, root-cut and leaf-probe, were used to inoculate *Ralstonia Solanacearum* and were compared. The result showed that comparing to the method of leaf-probe, it was easier to operate, the infection speed was faster, and disease grade was also higher for the method of root-cut inoculation. So the method of root-cut inoculation is suitable to be used to inoculate *Ralstonia Solanacearum* from potato host.

**Key Words:** potato; *Ralstonia Solanacearum*; biotype; inoculation method

马铃薯青枯病是由 *Ralstonia Solanacearum*(RS) 引起的一种世界性的重要细菌性病害, 每年因此造成的产量损失大约为 10%~15%, 发病严重的地块产量损失可达 80%甚至绝产, 给马铃薯生产带来严重威胁。由于青枯病为细菌性病害, 植株感病是系统性侵染, 青枯病的药剂防治十分困难。目前, 防治青枯病最根本有效的方法是采用抗病品种, 但是, 马铃薯品种的抗病性对于不同的青枯菌系是有差异的<sup>[1]</sup>。因此鉴定和研究马铃薯青枯病菌生化型的组成

和分布, 将为加速我国马铃薯抗青枯病育种和病害综合防治的工作进程提供必要的理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试菌株

供试的 10 个菌株分别来自我国山东、广东和广西 3 省。菌株全部从送检至我单位马铃薯青枯病样品中分离纯化获得。菌株来源情况见表 1。用于分离纯化的培养基为 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑干

收稿日期: 2009-10-25

基金项目: 黑龙江省科技厅国际合作项目(WB07A11), 马铃薯产业创新体系(NYCYTX-15), 黑龙江省科技厅重大攻关项目(GA08B102), 农业部 948 项目(2008-Z23)资助。

作者简介: 王晓丹(1979-), 女, 助理研究员, 研究方向为马铃薯病害检测及研究。

\* 通信作者: 郭梅, 副研究员, 研究方向为马铃薯病害研究, E-mail: guo\_plum@yahoo.com。

酪素选择性培养基(简称 TZC)、用于纯培养的培养基是基础培养基(简称 Kelman)<sup>[2]</sup>。

表 1 供试菌株  
Table 1 The tested strains

菌株编号 Number of strain	采集地点 Location	采集时间 (Year) Year collected
SD-1	山东滕州	2006
SD-2	山东滕州	2006
SD-3	山东滕州	2006
SD-4	山东枣庄	2006
GD-1	广东惠州	2006
GD-2	广东惠州	2006
GD-3	广东惠州	2006
GD-4	广东湛江	2007
GD-5	广东湛江	2007
GX-1	广西北海	2007

1.2 生化型鉴定

休和利夫森二氏培养基<sup>[3]</sup>: 蛋白胨 2 g、NaCl 5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g、葡萄糖 10.0 g、琼脂 6.0 g、1% 溴百里酚蓝溶液 3 mL、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2, 分装于试管中, 115℃蒸汽灭菌 20 min。灭菌后, 分装试管, 高度约为 4.5 cm。配置 10%浓度的纤维二糖、乳糖、麦芽糖、己六醇、甘露醇和山梨醇溶液, 分别过滤灭菌, 加入凉至 60℃的休和利夫森二氏培养基中, 终浓度为 1%。

以 18~24 h 幼龄菌种作种子, 穿刺接种至休和利夫森二氏培养基中, 每株 3 支。同时以不接种的 3 管培养基作为阴性对照。30℃培养 1、2、3、7、14 d 后, 观察结果。

1.3 生化型鉴定标准

若接种培养基产酸由橄榄绿变为黄色并且阴性对照不变色的判断为阳性。生化型鉴定参照 1964 年 Hayward<sup>[4]</sup>的划分标准进行, 见表 2。

1.4 青枯菌接种方法

以番茄作为接种植物, 采用伤根灌注法和刺茎法 2 种方法进行人工接种, 并设清水对照, 重复 3 次, 筛选最佳接种方法。

(1) 伤根灌注法: 在温室进行营养穴盘育苗, 在 5~6 片叶时期, 在幼苗的一侧, 距根 1 cm 处用刀造成伤口, 每株番茄苗在伤根部位灌注 50 mL 菌液

表 2 根据对双糖的利用和己醇的氧化产生酸时为阳性(+)对青枯菌分类

Table 2 Classification of *Ralstonia solanacearum* based on the ability to utilize disaccharides and oxidize hexose alcohols producing acid when it is positive(+)

生化型测定 Physiological test		青枯菌生化型 Biotype of <i>Ralstonia solanacearum</i>				
		1	2	3	4	5
双糖的利用 Disaccharide	纤维二糖 Cellobiose	-	+	+	-	+
	乳糖 Lactose	-	+	+	-	+
	麦芽糖 Maltose	-	+	+	-	+
己醇的氧化 Hexose alcohol	己六醇 Dulcitol	-	-	+	+	-
	甘露醇 Mannitol	-	-	+	+	+
	山梨醇 Sorbitol	-	-	+	+	-

(菌液浓度大约为  $1 \times 10^9$  cfu·mL<sup>-1</sup>)。将接种后的番茄苗放入人工气候箱内, 设定温度 30℃, 光照 16 h, 黑暗 8 h, 空气湿度保持在 80%以上, 定期浇水, 保持土壤湿润。若湿度无法达到, 则可以用一个塑料袋包住植株, 植株顶部将塑料袋开一小口, 以保持其湿度, 促进发病。在接种后 7、14、21 d 观察发病情况。

(2) 刺茎法: 将灭好菌的牙签挑取青枯菌菌液若干, 直接插到第 3 节叶腋处, 每 1 株插 1 根, 插牙签时要注意不用插得太深, 以免植株在未发病前就萎蔫死亡。放入人工气候箱培养, 培养条件同上。

在接种后 7、14、21、28 d, 按 Winstead 等<sup>[5]</sup>分级标准进行分级调查, 共分 5 级, 分级标准为: 0 级: 不发病; 1 级: 1 片叶感病; 2 级: 2 或 3 片叶感病; 3 级: 除了顶端 2~3 片叶其余叶片均感病; 4 级: 所有叶片感病; 5 级: 植株完全死亡。

2 结果与分析

2.1 生化型测定

对来源于我国 3 个省份的从马铃薯寄主上分离

的 10 个青枯病菌的生化型鉴定，结果见表 3，测定结果可以看出：生化型 和 为优势种群，均占被测菌株的 40%，生化型 和生化型 分别占 10%。从地域上来看，被检样品中，我国山东省马铃薯青枯病菌生化型有 3 种，分别为生化型 、 和 ；广东省马铃薯青枯病菌生化型有 2 种，分别为生化型 和 ；由于广西省被检样品数量有限，发现 1 种生化型，为生化型 。

2.2 病原菌接种

试验结果表明，利用伤根灌注法接种马铃薯青枯病菌的效果好于刺茎法。前者接种的番茄苗 14 d 内均发病，发病较后者快；伤根灌注法接种的番茄苗发病级数都为 4 级，而刺茎法发病级数为 2~3 级。从操作难易程度来看，伤根灌注法比较简单，而刺茎法操作时要掌握好力度，容易伤及幼苗。因此，综合分析，马铃薯青枯病接种方法以伤根灌注法较好。

表 3 被测菌株生化型测定结果  
Table 3 The classification results of tested strains

编号	纤维二糖	乳糖	麦芽糖	己六醇	甘露醇	山梨醇	生化型
Number	Cellobiose	Lactose	Maltose	Dulcitol	Mannitol	Sorbitol	Biotype
SD-1	+	+	+	+	+	+	BV
SD-2	+	+	+	-	-	-	BV
SD-3	+	+	+	+	+	+	BV
SD-4	-	-	-	+	+	+	BV
GD-1	+	+	+	+	+	+	BV
GD-2	+	+	+	-	-	-	BV
GD-3	+	+	+	+	+	+	BV
GD-4	+	+	+	-	-	-	BV
GD-5	+	+	+	-	-	-	BV
GX-1	-	-	-	-	-	-	BV

3 讨 论

青枯病菌生化型在我国不同地区和不同植物上的分布状况是相当复杂的，据国外资料记载在马铃薯上 4 种生化型都有存在<sup>[2]</sup>。本研究的被测马铃薯青枯病菌菌株包含了上述全部 4 种生化型。1985 年，华静月等<sup>[1]</sup>对我国 8 个省市的 43 个青枯菌菌株测定生化型，结果表明，供试的绝大部分菌株属生化型

，少数属于生化型 和 。本研究中的优势种群为生化型 和 。从地域上看，本研究的被测广东省菌株中，生化型 为优势种群，占 60%。曾宪铭等<sup>[6]</sup>测定广东农作物青枯病菌生化型的结果是其所测青枯病菌在马铃薯寄主上的生化型为 、 和 -2。本研究中山东省马铃薯青枯病菌以生化型 为优势种群，占 50%，与丁爱云等<sup>[7]</sup>报道的山东省马铃薯青枯病菌以生化型 为主的结果一致。

1976 年 Harris<sup>[8]</sup>认为，可以把 Hayward 模式中的生化型进一步划分为亚型，自 1984 年华静月等<sup>[9]</sup>研究报道了我国青枯病菌有生化亚型的存在，之后又有曾宪铭等<sup>[6]</sup>、丁爱云等<sup>[7]</sup>、徐莉莉等<sup>[10]</sup>报道了我国青枯病菌生化亚型的存在。在本研究中没有测定到被测菌株中有生化亚型。

由于本研究的菌株数量有限，特别是广西省收集到的菌株数量很少，因此本研究的结果尚不能代表上述 3 省份的所有马铃薯青枯病菌的生化型种类及优势种群，有待于今后加大菌株的收集量，做更详细地研究。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 华静月, 张长龄, 何礼远. 我国马铃薯青枯菌系和初步研究[J]. 植物病理学报, 1985, 15(3): 181-184.

[ 2 ] French E R, Gutarra L, Aley P, et al. Culture media for *Pseudomonas solanacearum*: Isolation, identification and maintenance [J]. Fito-patologia, 1995, 30: 126-130.

[ 3 ] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[ 4 ] Hayward A C. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Appl Bact, 1964, 27 (2): 265-277.

[ 5 ] Winstead N, Kelman A. Inoculation technique for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum* [J]. Phytopathology, 1952, 42: 628-634.

[ 6 ] 曾宪铭, 董春. 广东农作物青枯病菌的生化型[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(1): 50-53.

[ 7 ] 丁爱云, 郑继发, 时呈奎, 等. 山东省植物青枯菌生化型研究[J]. 山东农业大学学报, 2002, 33(1): 50-52.

[ 8 ] Harris D C. Bacterial wilt in Kenya with particular reference to potatoes[M]//Sequeira L, Kelman A. Proceedings of the first international planning conference and workshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State University, Raleigh, 1976: 84-88.

[ 9 ] 华静月, 张长龄, 何礼远. 我国植物青枯菌的生化型和其他生理差异[J]. 植物保护学报, 1984, 11(1): 43-50.

[ 10 ] 徐莉莉, 尹燕妮, 王勇明, 等. 发生于中国的青枯病菌生化变种研究[J]. 江苏农业科学, 2008(5): 102-10.