

青枯雷尔氏菌致病性生物测定方法的研究

车建美, 刘波, 张彦, 苏明星, 朱育菁, 郑雪芳

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 采用不同浓度的强致病力青枯雷尔氏菌 FJAT-91 处理番茄盆栽苗, 建立青枯雷尔氏菌致病性生物测定方法。结合菌落形态和特异性引物鉴定结果说明所分离得到的菌株均为强致病力青枯雷尔氏菌。当番茄植株培养至第 5 d 时, 4 个不同接种浓度处理的番茄植株苗均出现发病症状。采用 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理的番茄植株在第 4 d 发病, 但到第 8 d, 发病率也达到 90% 左右。随着青枯雷尔氏菌接种浓度的递增, 各处理番茄植株死亡率达到致死中浓度 (LC_{50}) 的时间逐渐缩短。 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的接种浓度效果最佳, 既缩短试验周期, 又保证了番茄青枯病的发生。

关键词: 青枯雷尔氏菌; 强致病力; 生物测定; 番茄

中图分类号: S 436

文献标识码: A

Study on the Bioassay Method for Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum*

CHE Jian-mei, LIU Bo, ZHANG Yan, SU Ming-xing, ZHU Yu-jing, ZHENG Xue-fang

(Agricultural Bio-resource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou,

Fujian 350003, China)

Abstract: The bioassay method of virulent *Ralstonia solanacearum* strain was established on the tomato plants treated by different concentration of virulent *R. solanacearum* strain FJAT-91. The results showed that the *R. solanacearum* strains isolated from wilted tomato plants were virulent strains according to the colony form and test of polymerase chain reaction (PCR) with special primers. The disease symptom of tomato plants treated with different concentrations appeared on the fifth day. The tomato plants began wilting on the fourth day, which were treated with concentration of $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the incidence was reached 90% after 8 days. Time to LC_{50} of tomato plants was shortened along with the increasing of concentration of *R. solanacearum*. Therefore, the concentration of $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ is the optimal one that could shorten test period and make the tomato plant wilt.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; virulent; bioassay; tomato

青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 是植物细菌性青枯病的病原菌, 可危害 44 个科的数百种植物, 其中包括许多重要的经济作物, 对茄科植物的危害尤为严重^[1-3]。由于青枯雷尔氏菌在土壤中存活时间长、传播快, 使用化学药剂防治不能有效地进行控制, 而抗性育种筛选周期较长, 因此对青枯病的生物防治引起了国内外的高度重视^[4-5]。

生防菌的防治效果受到多种因素的影响, 包括环境因素和生防菌施用时间等^[6]。生防菌的施用时间对于其生防效果影响很大, 而生防菌的施用时间往往与植物的发病时间具有一定的相关性, 即在发

病初期施用生防菌, 其生防效果要好于在发病后期施用^[7]。青枯雷尔氏菌浓度的不同对青枯病病程的潜育期有一定影响, 往往浓度越低潜育期越长^[8], 因而, 进行强致病力青枯雷尔氏菌最低接种浓度的测定对生防菌防效的测定至关重要。目前青枯雷尔氏菌致病力的鉴定方法, 大多采用盆栽小苗的剪叶和灌根法接菌等^[9]。本研究主要在前人的研究基础上, 采用 4~5 叶期番茄盆栽苗进行强致病力青枯雷尔氏菌接种浓度的测定, 观察在不同接种浓度条件下番茄植株的发病进程, 初步建立青枯雷尔氏菌致病性生物测定方法, 以期为后续生防菌的防效测

收稿日期: 2011-08-10 初稿; 2011-09-05 修改稿

作者简介: 车建美 (1977-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 生物技术及生物防治 (E-mail: chejm2002@163.com)

通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物生物技术与农业生物农药研究 (E-mail: liubofaas@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871667); 福建省自然科学基金项目 (2008J0054); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技

创新团队建设项目 (STIF-Y03)

定提供数据依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌为强致病力青枯雷尔氏菌菌株 FJAT-91, 于2001年7月分离自福州北峰的番茄青枯病病株。所采用的培养基为TTC培养基: 每升含蛋白胨10.0 g, 水解酪蛋白1.0 g, 葡萄糖5.0 g, TTC(2, 3, 5氯化三苯基四氮唑)0.05 g, pH 7.0~7.2; SPA培养基: 每升含蔗糖20.0 g, 蛋白胨5.0 g, K₂HPO₄0.5 g, MgSO₄0.25 g, pH 7.0~7.2。番茄植株为“裕光401”。

引物 pehA #3:

5'-CAGCAGAACCCGCGCCTGATCCAG-3',

引物 pehA #6:

5'-ATCGGACTTGATGCGCAGGCCGTT-3'。

引物由上海博尚有限公司合成; Marker购自上海英俊生物技术公司。

1.2 试验方法

1.2.1 青枯雷尔氏菌菌液的制备 将强致病力青枯雷尔氏菌 FJAT-91 菌株划线于TTC琼脂平板上, 在30℃条件下培养48 h, 挑取单菌落于装有25 mL SPA培养液的250 mL三角瓶中, 于30℃, 200 r·min⁻¹摇床培养48 h。将菌液混匀, 稀释100倍, 用血球计数板计数, 确定菌液的原始浓度, 数量级为10⁸, 依次稀释到10⁶, 10⁴, 10², 处理1用10² cfu·mL⁻¹浓度处理, 处理2用10⁴ cfu·mL⁻¹浓度处理, 处理3用10⁶ cfu·mL⁻¹浓度处理, 处理4用10⁸ cfu·mL⁻¹浓度处理。

1.2.2 青枯雷尔氏菌的分离与鉴定 采用TTC

培养基分离番茄病株, 并采用水煮法提取所分离得到的青枯雷尔氏菌总DNA^[10]。采用特异性引物 pehA #6 和 pehA #3 进行青枯雷尔氏菌的分子鉴定。PCR 反应程序为: 96℃ 1 min, 96℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 1 min 共2个循环, 之后 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 1 min 共33个循环, 最后 72℃ 延伸5 min。采用1.5%胶浓度, 上样量为6 μL, 电压为100 V进行电泳后, 利用凝胶成像仪观察PCR结果。

1.2.3 青枯雷尔氏菌生物测定浓度的测定 采用75%酒精消毒过的剪刀在番茄植株(4~5叶期)根围剪一下, 用稀释后的不同处理青枯雷尔氏菌菌液灌根番茄盆栽苗, 每盆灌根50 mL菌液, 每个处理10株, 重复3次, 对照采用相同量的水代替菌液。将番茄植株置于30℃, 相对湿度60%~70%的条件下培养, 从第2 d开始统计番茄植株死亡的数量, 计算死亡率。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡植株数量}}{\text{处理总植株数量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 青枯雷尔氏菌的分离与鉴定

从发病番茄植株上分离得到的菌株在TTC培养基上形态为中间红斑较小, 颜色为淡红色, 周围白边较大, 且流动性很强, 初步鉴定为强致病性菌株(图1)。通过特异性引物鉴定青枯雷尔氏菌, 预期片段大小为504 bp(图2), 从番茄植株上分离得到的菌株同青枯雷尔氏菌FJAT-91均在大约500 bp位置扩增出条带, 说明所分离得到的菌株均为强致病力青枯雷尔氏菌。

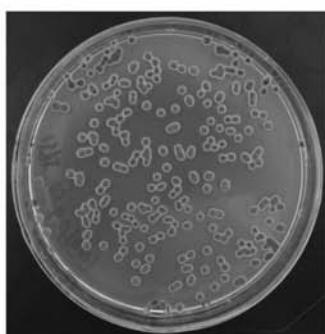


图1 青枯雷尔氏菌的分离

Fig. 1 Isolation of *Ralstonia solanacearum* strains

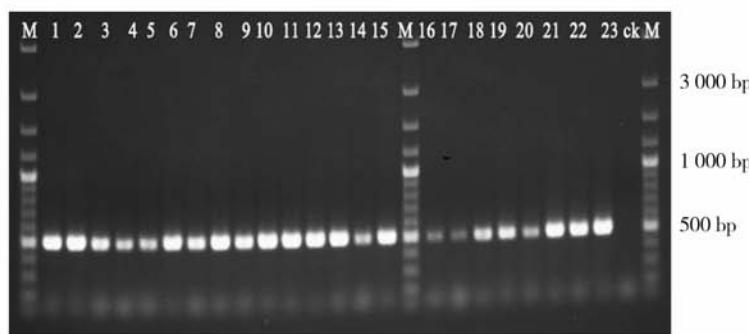


图2 青枯雷尔氏菌的鉴定

Fig. 2 Identification of *Ralstonia solanacearum* strains

注: M: Marker; 1~22: 从番茄植株分离的青枯雷尔氏菌单菌落; 23: FJAT-91; CK: 无菌水

2.2 青枯雷尔氏菌生物测定浓度效应的测定

图 3 可以看出, 不同处理的番茄植株死亡起始时间有所不同。处理 3 的番茄植株最先死亡, 在第 3 d 时开始出现萎蔫; 处理 2 和处理 4 的番茄植株则推迟 1 d, 即第 4 d 开始萎蔫, 到第 8 d, 死亡率与处理 3 一致, 均达到 90% 左右。而处理 1 的番茄植株也会发生青枯病, 但发病较慢且死亡率较低, 在处理第 8 d 后, 死亡率仅为 40% 左右。

2.3 青枯雷尔氏菌生物测定浓度动力学模型的建立

根据番茄植株的死亡时间和死亡率建立青枯雷尔氏菌生物测定浓度动力学模型, 图 4 所示, 处理 1、2、3、4 的动力学模型分别为 $Y=1.2115X^2-3.2843X$, $Y=1.8417X^2+1.0434X$, $Y=0.1961X^2+12.759X$ 和 $Y=0.3081X^2+11.989X$ 。随着青枯雷尔氏菌浓度的递增, 各处理番茄植株死亡率达到 LC_{50} 的时间逐渐缩短, 处理 1 为 8 d, 处理 2

为 5 d, 处理 3 和处理 4 均为 3.8 d。从各处理番茄植株死亡率达到 LC_{50} 的时间上看, 处理 2 的接种浓度效果最佳, 即采用浓度为 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 灌根番茄植株, 可以用于后期生防菌效测定。

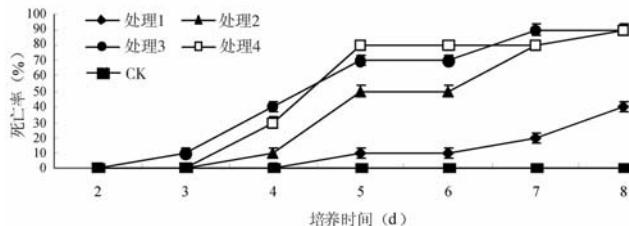


图 3 不同培养时间番茄植株的死亡率

Fig. 3 Incidence of tomato plants treated with different concentrations of *Ralstonia solanacearum*

注: 处理 1: 青枯雷尔氏菌浓度为 $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; 处理 2: 青枯雷尔氏菌浓度为 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; 处理 3: 青枯雷尔氏菌浓度为 $10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; 处理 4: 青枯雷尔氏菌浓度为 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; CK: H_2O 处理

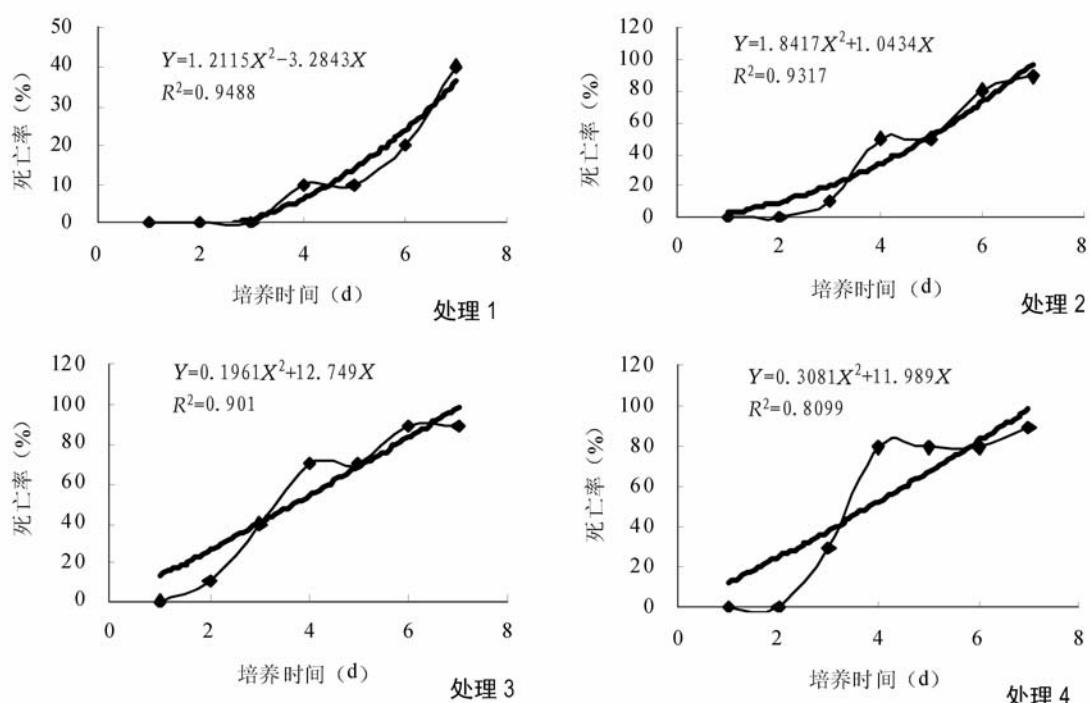


图 4 青枯雷尔氏菌生物测定动力学模型

Fig. 4 Bioassay dynamic model of virulent *Ralstonia solanacearum* strain

3 讨论与结论

青枯雷尔氏菌对寄主植物的侵染受到多种因素的影响, 包括浓度^[8,11-12]、潜伏侵染^[13]、温湿度^[12]以及寄主非寄主作物的影响^[14]。韩美丽等^[12]研究表明, 培养温度对离体番茄枝条青枯病发病率

高低具有较大影响, 温度低于 25℃, 枝条不易发病, 温度 30~33℃ 为发病高峰期。王军等^[14]认为, 青枯雷尔氏菌对感病寄主根表的吸附量多于对抗病寄主和非寄主根表的吸附量, 对感病寄主根部的侵入量多于对抗病寄主但少于对非寄主根部的侵入量。另外, 青枯雷尔氏菌潜伏侵染对花生生长发育

和产量有显著不良影响^[13]。但目前对于青枯雷尔氏菌生物测定方面的研究大都集中在抗性育种上^[15], 未见关于规范的青枯雷尔氏菌致病性生物测定方法研究的报道。

不同浓度青枯雷尔氏菌 FJAT-91 菌液致病试验说明, $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组比 $10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组推迟 1 d, 也就是第 4 d 开始发病, 到第 8 d, 发病率与 10^6 、 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 这 2 个处理组一致, 均达到 90% 左右, 这与韩美丽等^[12]的研究结果相一致, 当青枯雷尔氏菌浓度为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 番茄枝条发病率达到 60% 以上所需要的时间逐渐缩短, 分别为 11、8、5 和 3 d。方树民等^[11]也认为, 烟草青枯菌液浸注接种烟苗叶片后产生枯斑的迟早及扩展程度取决于接种体浓度, 菌液浓度愈高, 烟草枯死就愈快。所不同的是, 本试验中, 高浓度的病原菌液不一定最先导致青枯病的发生, $10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的菌液比 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 更早发病, 有可能浓度过高, 病原菌之间存在激烈的营养和空间竞争。葛慈斌等^[8]认为, 青枯雷尔氏菌浓度的不同对青枯病病程的潜育期有一定影响, 往往浓度越低潜育期越长, 与本研究结果一致, 青枯雷尔氏菌 FJAT-91 菌液浓度为 $10^2 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 虽然也会导致番茄青枯病的发生, 但发病较慢且发病率较低。因此在进行后期生防菌的防治试验中可选择浓度为 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行接种, 既缩短试验周期, 又保证了番茄青枯病的发生, 便于更好地观察生防菌对青枯病的生防效果。

参考文献:

- [1] 康耀卫, 毛国璋, 吕常胜, 等. 利用青枯菌胞外蛋白输出缺失突变体防治番茄青枯病的研究 [J]. 植物保护学报, 1995, 22 (3): 287—288.
- [2] 刘波, 朱育菁, 林抗美, 等. 青枯雷尔氏菌在植株体内分布及其致病力的异质性研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40 (7): 1559—1566.
- [3] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annu Rev Phytopathol, 1991, 29: 65—87.
- [4] 刘波, 林营志, 朱育菁, 等. 生防菌对青枯雷尔氏菌的致弱特性 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12 (3): 322—329.
- [5] 郑雪芳, 车建美, 林营志, 等. 基于 ITS 序列和 RAMS 标记分析青枯雷尔氏菌的遗传多样性 [J]. 农业生物技术学报, 2008, 16 (4): 694—700.
- [6] 葛慈斌, 刘波. ANTI-8098A 在土壤的存活能力测定及其对土壤微生物种群数量的影响 [J]. 福建农业科技, 2009, (4): 69—71.
- [7] 陈永兵, 吴若萍, 兰海姑. 芽孢杆菌可湿性粉剂防治番茄青枯病田间药效研究 [J]. 上海农业科技, 2005, (3): 97—97.
- [8] 葛慈斌, 刘波, 朱育菁, 等. 青枯雷尔氏菌致病力的番茄组培苗鉴定方法研究 [J]. 武夷科学, 2004, (1): 13—16.
- [9] 杨琦凤, 汝学娟, 潘光辉, 等. 重庆番茄青枯病病原菌鉴定及抗源材料筛选 [J]. 西南农业学报, 2004, 17 (1): 57—60.
- [10] 程本亮, 车建美, 刘波. 青枯雷尔氏菌 Tn5 转座子无致病力突变株构建及其生物学特性研究 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19 (1): 26—38.
- [11] 方树民, 陈顺辉, 顾刚, 等. 烟草青枯病菌浸注烟苗的显症反应与对杂草根部带菌检测 [J]. 中国烟草学报, 2006, 12 (3): 31—34.
- [12] 韩美丽, 陆荣生, 霍秀娟. 番茄枝条离体鉴定品种青枯病抗性影响因素研究 [J]. 广西农学报, 2007, 22 (5): 14—17.
- [13] 廖伯寿, 李栋. 青枯菌潜伏浸染对花生的影响 [J]. 中国油料, 1997, 19 (4): 55—58.
- [14] 王军, 韦爱梅, 孙思. 青枯菌对桉树及非寄主树木根部吸附和侵入的比较 [J]. 林业科学, 2007, 43 (7): 51—54.
- [15] 袁宗胜, 胡方平. 离体叶片浸渍法和种子根伸长法快速鉴定花生青枯菌抗性 [J]. 花生学报, 2010, 39 (3): 39—41.

(责任编辑: 柯文辉)