

利福平标记的青枯菌株在姜块中增殖动态研究初报

王长方¹, 游 泳¹, 王 俊¹, 林榜华², 兰成忠¹, 魏维早³

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013; 2. 永泰县赤锡农技站, 福建 永泰 350600;
3. 永泰县城峰农技站, 福建 永泰 350500)

摘要: 利用姜青枯菌Zb01抗利福平霉素标记法, 研究其在姜块表面及块茎组织中的增殖动态, 结果表明: 标记菌株Zb01用 $1 \times 10^2 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浸种姜块6 h或 $1 \times 10^7 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浸种姜块0.5 h, 播种于盆钵1 h即可从姜块表面分离到标记菌株; 菌量为 $1 \times 10^4 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浸种姜块6 h或 $1 \times 10^7 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浸种姜块0.5 h, 播种于盆钵48 h也可从块茎组织中分离到标记菌株, 从姜块表面分离获得的菌落数多于块茎组织。标记菌株在姜块表面呈先降后迅速回升再降低后缓慢增加的消长动态, 在块茎组织中的消长动态基本是: 15 d前缓慢增加, 到20 d后急剧上升。

关键词: 姜; 青枯菌; 增殖

中图分类号: S 432.42

文献标识码: A

Proliferation of *Ralstonia solanacearum* marked with rifampicin on the tuber of ginger

WANG Chang-fang¹, YOU Yong¹, WANG Jun¹, LIN Bang-hua², LAN Cheng-zhong¹, WEI Wei-zao³

(1. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;
2. Agricultural Technology Station of Chixi Township of Yongtai County, Yongtai, Fujian 350600, China;
3. Agricultural Technology Station of Chengfeng Township of Yongtai County, Yongtai, Fujian 350600, China)

Abstract: Proliferation dynamics of rifampicin marked strain of *Ralstonia solanacearum* Zb01^{rf} on the surface and within the tuber of ginger were investigated. The results showed that Zb01^{rf} could colonize on the ginger surface when the ginger was treated with Zb01^{rf} at $10^2 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 6 h or $10^7 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 0.5 h and planted into the soil for 1 h. The Zb01^{rf} could be isolated within the tuber of ginger when the ginger was treated with Zb01^{rf} at $10^4 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 6 h or $10^7 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 0.5 h and planted into soil for 48 h. The population of the Zb01^{rf} on the surface of ginger was higher than that within the ginger. After the ginger was treated with Zb01^{rf} and planted into soil, the population of Zb01 on the surface of ginger declined first, and then increased rapidly and declined slowly in the end. The population of Zb01^{rf} within the ginger increased slowly within 15 days and it increased rapidly after 20 days.

Key words: ginger; *Ralstonia solanacearum*; proliferation

姜既是一种调味品, 又是一种重要的中药材, 是效益较高的出口创汇产品之一^[1]。姜青枯病是由青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种毁灭性病害, 田间株发病率一般为10%~20%, 重病田高达30%~40%, 局部地块甚至绝收^[2]。该病菌随着化学肥料的大量使用和土壤复种指数的提高, 发生逐年加重, 严重影响着姜的产量和质量^[3]。

王占武等报道生防菌、植物促生根际细菌在作物根际的定殖动态^[4~7], 但有关姜致病菌的增殖动态尚未见报道。本研究探讨了抗利福平姜青枯Zb01菌株在姜块表面及块茎组织中的增殖情况和消长规

律, 为预测姜青枯病的发生及其控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试姜品种及菌株

供试姜品种: 梨仔姜(本地种), 由永泰县赤锡和城峰农技站提供, 姜青枯菌Zb01由本实验室从青枯病发病症状典型的姜植株上分离, 并进行致病性测定。分离和鉴定方法参照文献[8~9]。

1.2 菌株Zb01耐利福平水平测定

制备浓度为 $1 \times 10^7 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ Zb01菌体悬浮液, 各取0.1 ml菌体悬浮液分别涂于含有 $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、10

收稿日期: 2005-08-24 初稿; 2006-03-20 修改稿

作者简介: 王长方(1963—), 男, 副研究员, 从事农作物病虫害防治研究。

基金项目: 福州市科技发展基金项目(2002350102000430)

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $75\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 利福平的TTC培养基上^[5,8],3次重复,30℃培养2 d,观察平板上是否有菌落生长,初筛利福平浓度。

1.3 菌株Zb01抗利福平标记

用一定量的95%酒精配成一定浓度的利福平液,过滤灭菌后加入TTC液体培养基中配成一定浓度。将菌株Zb01在TTC培养液中培养24 h后,离心洗脱,用无菌水稀释至 $1\times 10^3\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。取0.5 ml菌液涂于含 $35\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 利福平的TTC培养基在28℃($180\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)条件下振荡培养24 h,取0.5 ml菌液滴入含更高浓度利福平TTC液体培养基中在28℃($180\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)条件下继续培养24 h,依次从低浓度的利福平培养基上生长筛选逐渐向高浓度的利福平上生长筛选,直到诱导Zb01抗利福平浓度为 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 为止,形成抗利福平的标记菌株。

1.4 标记菌株Zb01不同浸种时间在姜块表面及块茎组织增殖测定

用 $1\times 10^7\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 标记菌株Zb01的菌悬液浸种,时间分别为0.5 h、1 h、6 h、12 h和24 h,将处理的姜种播种于装有无菌土的盆钵中,每处理3个重复,分别于1 h、24 h和48 h对姜进行取样,测定标记菌株Zb01在姜块表面和块茎组织的增殖情况。

1.5 标记菌株Zb01不同菌液浓度浸种在姜块表面及块茎组织增殖测定

用菌液浓度分别为 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 $1\times 10^9\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 菌悬液浸种6 h后,将处理的姜播种于装有无菌土的盆钵中,每处理3次重复,分别于1 h、24 h和48 h对姜进行取样,测定标记菌株Zb01在姜块茎表面和块茎组织的增殖情况。

1.6 标记菌株Zb01在姜块表面及块茎组织增殖动态测定

用标记菌株Zb01 $1\times 10^9\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 菌悬液浸种0.5 h,取出晾干,处理后的姜块播种于装有无菌土的盆钵中,常温下按常规栽培管理,3次重复,分别于1 d、3 d、5 d、10 d、15 d和20 d取样,对姜块表面和块茎组织的标记菌株Zb01进行分离,观察标记菌株Zb01在姜块表面和块茎组织的增殖动态。

1.7 标记菌株Zb01增殖测定方法

取各处理姜块,用自来水把表面土壤冲洗干净,增殖进行如下测定:

1.7.1 姜块表面测定 将表面土壤已冲洗干净的姜块晾干、称重,然后置于三角瓶中,加入适量的无菌水,置于 $180\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床上振荡0.5 h,适当稀释后接于含利福平 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的TTC平板

中,48 h后统计各平板的菌落数。

1.7.2 块茎组织增殖测定 将表面土壤已冲洗干净的姜块晾干后称取组织1.0 g,75%酒精表面消毒1.5 min,无菌水冲洗3次,晾干,研磨块茎组织,磨碎后加入10 ml无菌水,静置5 min,10倍稀释后,取不同稀释浓度液体0.25 ml于含有 $500\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 利福平的TTC平板上用涂布棒涂均整个平板,30℃下培养2 d,记载菌落数。

1.7.3 菌量计算 将两处理所统计的菌落数换算成“菌量(个)/鲜克”。

$$\text{菌量(个)/鲜克} = (\text{菌落数} \times \text{稀释倍数} \times \text{分离用水量}) \div (\text{涂板用水量} \times \text{分离用组织重量})$$

2 结果与分析

2.1 姜青枯菌株Zb01耐利福平测定结果

利福平浓度为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 对菌株Zb01生长无影响,超过 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 不能生长,结果表明:姜青枯菌株Zb01耐利福平浓度最高为 $35\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (表1)。

表1 青枯菌Zb01耐利福平水平测定结果

Table 1 Rifampicin endurance of *Ralstonia solanacearum* strain Zb01

菌株	利福平浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)						
	5	10	20	35	50	75	100
Zb01	+++	+++	++	+	-	-	-

注:+++表示菌落生长正常,++表示菌落生长正常、数量减少,+表示菌落可生长,数量明显减少,-表示细菌不生长。

2.2 标记菌株Zb01不同浸种时间在姜块表面及块茎组织增殖结果

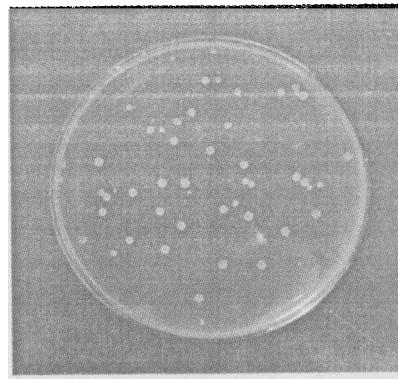
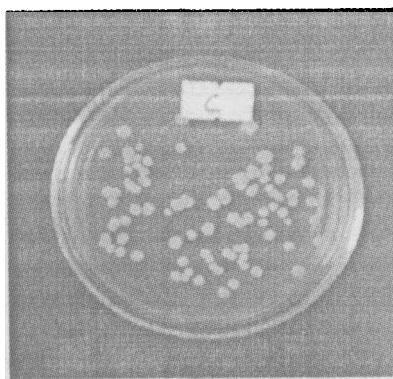
从表2可知:标记菌株Zb01浸泡姜块0.5 h,播种于盆钵1 h后即可从姜块表面分离到标记菌株,在同一处理时间段内,浸泡0.5 h、1 h和6 h分离获得菌落数差别不大,12 h和24 h的菌落数明显多于6 h;不同浸泡时间,播种于盆钵48 h在块茎组织中分离获得标记菌株,24 h之前均未分离出标记菌株。标记菌株不同浸泡时间处理1 h在姜块表面的分离获得菌落数多于24 h,可能是细菌死亡的缘故;处理48 h分离获得的菌落数多于1 h,表明标记菌株48 h增殖明显;在块茎组织中增殖情况与姜块表面结果相似。标记菌株在姜块表面菌落数多于块茎组织(图1),与菌侵染过程有关。

2.3 标记菌株Zb01不同菌液浓度浸种在姜块表面及块茎组织增殖结果

不同浓度标记菌株Zb01浸泡姜块6 h,播于盆

钵后各处理时间段姜块表面均可分离出标记菌株，菌液浓度达 $1\times 10^8\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 菌落数明显多于 $1\times 10^6\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度以下的菌落数量。在姜块茎组织中，各浓度浸泡处理后播于盆钵1 h内均未分离出标记菌株，当菌液浓度达 $1\times 10^8\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 播于盆钵24 h，

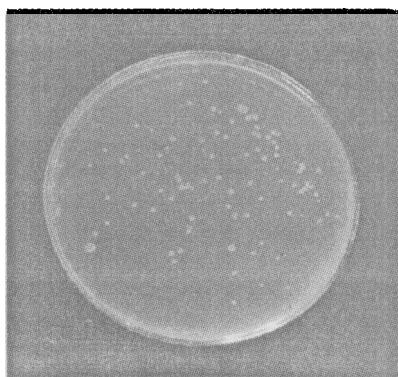
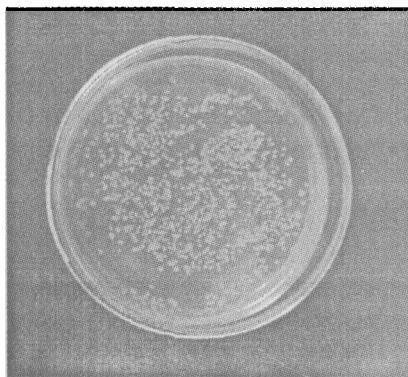
可分离获得标记菌株，而浓度为 $1\times 10^4\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 播于盆钵需48 h可分离到标记菌株（表3）。标记菌株在姜块表面和姜块茎组织中分离获得的菌落数量差异较大（图2），菌浓度达到 $1\times 10^4\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ 才能在姜块茎组织中分离获得，且在48 h增殖明显。



A. 姜块表面分离的菌落数（浸泡0.5 h，处理48 h）；B. 姜块组织分离的菌落数（浸泡24 h，处理48 h）

图1 不同浸种时间处理姜块表面或姜块组织菌株分离情况

Fig. 1 Isolation results of Zb01 on the surface and within the tuber of ginger coated with bacteria by different time



A. 姜块表面分离的菌落数（浓度 $1\times 10^9\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，处理48 h）；B. 姜块组织分离的菌落数（浓度 $1\times 10^9\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，处理48 h）

图2 不同菌液浓度处理姜块表面或姜块组织菌株分离情况

Fig. 2 Isolation results of Zb01 on the surface and within the tuber of ginger coated with bacteria by different concentration

表2 不同浸种时间标记菌株在姜块表面和块茎组织增殖结果

Table 2 Proliferation of strain Zb01 on the surface and within the tuber of ginger coated with bacteria by different time

部位	处理时间 (h)	浸种时间(h)				
		0.5	1	6	12	24
姜块 表面	1	++	++	++	+++	++++
	24	+	+	+	++	++
	48	+++	+++	+++	++++++	++++
块茎 组织	1	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
	48	+	+	+	+	++

注：-表示无菌落，+表示每皿菌落数<10；++表示每皿菌落数为10~49；+++表示每皿菌落数50~99；++++表示每皿菌落数100~200；+++++表示每皿菌落数>200(表3同)。

2.4 标记菌株在姜块茎表面及块茎组织中的增殖动态

图3可看出：标记菌株Zb01在姜块表面的接菌菌量为 $1\times 10^9\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，1 d后菌量为 $1.01\times 10^4\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，3 d达最大为 $3.40\times 10^5\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，5 d下降至 $1.66\times 10^4\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，10 d后缓慢增加($4.67\times 10^4\sim 5.34\times 10^4\text{cfu}\cdot\text{ml}^{-1}$)。标记菌株在姜块表面消长动态呈先降后迅速回升再降后缓慢增加的过程，原因有两种可能，一是部分菌扩散到了土壤中；二是青枯菌在姜块表面有一个亲和的过程，在这过程中有部分菌不适应环境而死亡。标记菌株在块茎组织中的消长动态基本是：15 d前缓慢增加，到20 d后急剧上升的过程，处理后1 d、3 d、5 d、10 d、15 d和20 d菌量分别为： 0.0×10^2 、 1.65

$\times 10^2$ 、 2.26×10^3 、 1.79×10^4 、 1.03×10^4 和 $4.60 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。从块茎组织增殖动态的数据发现，第

15 d 菌量有所下降，可能是因姜种发芽，有部分病菌扩散到了新的组织中的缘故。

表3 标记菌株Zb01不同菌液浓度浸种在姜块表面及块茎组织增殖结果

Table 3 Proliferation of strain Zb01 on the surface and within the tuber of ginger treated with different bacterial concentration

部位	处理时间 (h)	菌液浓度 ($\text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$)						
		1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7	1×10^8
姜块表面	1	+	+	+	++	++	++	+++
	24	+	+	+	+	+	++	++++
	48	+	+	++	++	++	+++	+++++
块茎组织	1	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	+	+
	48	-	-	+	+	+	++	+++

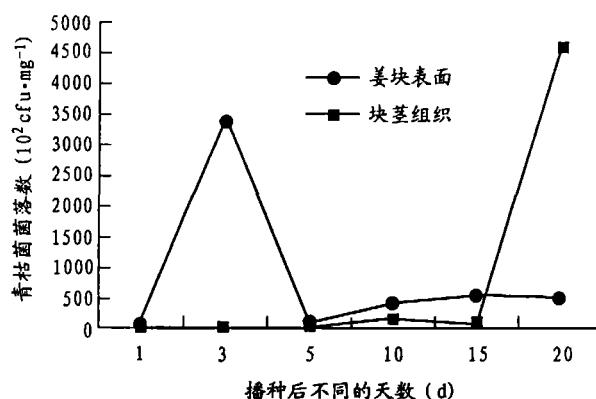


图3 青枯菌标记菌株在姜块表面及块茎组织中的增殖动态

Fig. 3 Proliferating dynamics of Zb01 on the surface and within the tuber of ginger

3 讨论

3.1 姜青枯菌株Zb01在利福平浓度为 $35 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度下具有生长力，表明其具有较高的耐利福平水平，便于诱导产生抗利福平浓度达 $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的标记菌株，用于分离并排除在TZA平板培养基上先产生许多与青枯菌相似其他菌落的干扰^[10]，且采用抗生素抗性作为检测标记具有简便、快速、消耗低、试验结果可以进行统计分析等优点^[7]，为研究其在姜块表面和姜块茎组织中的增殖动态奠定基础。

3.2 标记菌株Zb01采用 $1 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度浸泡姜种块6 h，播于盆钵1 h后即可姜块表面分离出标记菌株，与姚革等报道姜青枯菌分离过程中，在TZA平板培养基上先产生许多其他菌落，而青枯菌在培养48 h后才产生菌落结果不一^[10]，可能与TZA平板培养基上含有利福平及接菌有关。

3.3 试验结果表明：姜青枯菌具有很强的附着及增殖能力，在菌液浓度为 $1.0 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 下，就可在姜块表面附着并增殖，在菌液浓度为 $1.0 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ 下，就能在姜块表面附着并进入块茎组织增殖，其消长动态为：15 d 前缓慢增加，到20 d 后急剧上升，因此，选用药剂防治姜青枯病可根据青枯菌的生物学特性并结合气候条件，做好测报，在姜青枯菌尚未进入姜块茎组织前施药。

参考文献：

- [1] 黄金皋. 农业植物病理学 [M]. 北京：中国农业出版社，2001：444—446.
- [2] 戴俊臣，张敏，刘铭，等. 四川省姜瘟病菌生物型鉴定初报 [J]. 四川农业大学学报，2004，22 (4)：391—393.
- [3] 严金平，泽桑梓，张火云，等. 姜细菌性青枯病病原菌及其防治研究进展 [J]. 河南农业科学，2004 (9)：63—65.
- [4] 王占武，李晓芝，刘彦利，等. 枯草芽孢杆菌B501在草莓根际的增殖及其动态变化 [J]. 植物病理学报，2003，33 (2)：188—189.
- [5] 翁启勇，陈庆河，赵健，等. 利福平标记菌株BSI在番茄、茄子根部及土壤中的增殖动态 [J]. 福建农业学报，2003，18 (2)：87—88.
- [6] 龙良焜，肖崇刚. 内生细菌01—144在番茄根茎内增殖的初步研究 [J]. 微生物学通报，2003，30 (5)：53—56.
- [7] 盛下放. 硅酸盐细菌NBT菌株在小麦根际增殖的初步研究 [J]. 应用生态学报，2003，14 (11)：1914—1916.
- [8] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第3版. 北京：农业出版社，1998.
- [9] 廖薇，向明，杨志荣. 姜瘟病原菌的分离及其抑制物的筛选 [J]. 化学研究与应用，2004，16 (2)：195—197.
- [10] 姚革，彭化贤. 姜瘟病原菌及其潜伏侵染 [J]. 西南农业学报，1993 (增刊)：27—32.

(责任编辑：黄爱萍)