

## 广藿香青枯病菌的分离培养及致病性测定

刘丹, 贺红\*, 黄海波, 谢建辉, 柴婷婷

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:**目的 分离广藿香青枯病病原菌 *Ralstonia solanacearum*, 了解其细菌学性状, 并进行致病性测定, 为广藿香青枯病的防治提供依据。方法 在 TZC 培养基 [蛋白胨 10.0 g、酸水解酪蛋白 1.0 g、TTC (2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑) 0.05 g、葡萄糖 10.0 g、H<sub>2</sub>O 1 L, pH 6.8~7.0] 上划线分离培养广藿香青枯菌; 通过 3 糖 3 醇试验对各菌株的生化型进行划分; 采用伤根浸泡接种法对分离所得菌株进行致病性测定。结果 经分离纯化, 得到在细菌学性状上有明显差异的 7 个青枯菌菌株。其中 HX5、HX7 为生化型 I; HX1、HX6 为生化型 II; HX2、HX4 为生化型 III; HX3 为生化型 V。致病性试验表明, 大部分青枯菌菌株表现较强的致病性, 其中以菌株 HX4 和 HX5 致病力强且致死率高。结论 广藿香青枯病菌存在多个生理小种, 在菌体形态、生化分型和致病性等方面均有一定的差异。

**关键词:** 广藿香; 青枯病菌; 病原菌; TZC 培养基; 致病性测定

中图分类号: R282.22 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1596-04

## Isolation of pathogenic *Ralstonia solanacearum* from *Pogostemon cablin* and determination of its pathogenicity

LIU Dan, HE Hong, HUANG Hai-bo, XIE Jian-hui, CHAI Ting-ting

College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To isolate the pathogenic *Ralstonia solanacearum* from the infected *Pogostemon cablin* plants and to study the bacteria characteristics, so as to lay a foundation for the control of bacterial wilt. **Methods** Pathogenic strains of *R. solanacearum* were isolated from the infected *P. cablin* plants by being streaked on a tetrazolium chloride (TZC) medium. These strains were used for the classification based on oxidative utilization of three kinds of disaccharide (lactose, maltose, and cellobiose) and three kinds of hexy I alcohol (mannitol, dulcitol, and sorbitol). The pathogenicity was tested by the methods of cutting and soaking roots. **Results** Seven strains of pathogenic *R. solanacearum* were isolated from the infected *P. cablin* plants which contain four biotypes. Strains of HX5 and HX7 belong to biotype I, HX1 and HX6 belong to biotype II, HX2 and HX4 belong to biotype III, and HX3 belongs to biotype V. The result of pathogenicity test indicated that the most strains had strong pathogenicity. HX4 and HX5 have more serious virulence and can cause higher plant death rate. **Conclusion** Strains of *R. solanacearum* with different biotypes from the *P. cablin* plants have different pathogenicity.

**Key words:** *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; *Ralstonia solanacearum*. (E. F. Smith) Yabuuchi; pathogens; tetrazolium chloride (TZC) medium; determination of pathogenicity

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 以干燥地上部位入药, 为广东道地药材, 是“十大广药”之一。广藿香原产于菲律宾、马来西亚等国, 自宋代引种至我国<sup>[1-2]</sup>。广藿香在生产上面临青枯病的危害, 此病在整个生长期均可发生, 尤其在高温多雨的夏季发病最盛, 一旦有植株感染, 便迅速蔓延, 导致大面积死亡, 连

作的土地发病更为严重, 是广藿香生产中危害最为严重的病害<sup>[3-4]</sup>。文衍堂等<sup>[5]</sup>初步鉴定广藿香青枯病是由细菌性青枯菌 *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith Yabuuchi *et al*) 引起的。但青枯菌生理小种多样, 不同生理小种的致病性也存在差异, 有关广藿香青枯病菌的研究还未见报道。本研究以感染了青枯病的广藿香植株为材料, 分离培养青枯菌, 并从

收稿日期: 2010-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873376)

作者简介: 刘丹 (1986—), 女, 江西吉安人, 在读硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。Tel: (020)39358544 E-mail: qiudiangong@126.com

\*通讯作者 贺红 Tel: (020)39358067 E-mail: hehong67@yahoo.com.cn

形态学、生化型和致病性等方面进行系统研究,为广藿香的病害防治及抗病育种提供依据。

## 1 材料

### 1.1 供试材料

感染了青枯病的广藿香植株采自广东省高要市广藿香种植地及广州中医药大学药圃,由广州中医药大学药用植物学教研室潘超美教授鉴定为唇形科广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.。

### 1.2 对照菌株

番茄青枯菌 GIMCC (GIM1.70),由广东省微生物研究所提供。番茄青枯菌经广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心鉴定为劳尔氏菌属青枯假单胞杆菌 *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi。

## 2 方法

### 2.1 病原菌的分离培养

采用组织浸泡液划线分离法<sup>[6]</sup>,利用 TZC 培养基 [蛋白胨 10.0 g、酸水解酪蛋白 1.0 g、TTC (2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑) 0.05 g、葡萄糖 10.0 g, H<sub>2</sub>O 1 L, pH 6.8~7.0] 分离青枯菌, TZC 培养基中含有 TTC, 可与青枯菌发生生化反应, 使之在该培养基上呈现典型的流动、平滑、带白色晕圈的红色菌落, 可特异性区分青枯菌和其他细菌<sup>[7]</sup>。

### 2.2 病原菌形态观察

细菌革兰氏染色按结晶紫、番红染色法进行<sup>[6]</sup>, 在光学显微镜 Olympus BX51 (日本奥林巴斯有限公司) 上观察。

### 2.3 生化型试验

将供试菌株和参照菌株活化后, 转接于糖醇发酵基本培养基。在基本培养基中分别加入 3 种 1% 双糖 (麦芽糖、乳糖、纤维二糖) 和 3 种 1% 己醇 (甘露醇、山梨醇、卫矛醇) 化合物, 重复 3 次, 并设不接菌的空白对照。30 °C 恒温培养 15 d, 根据各菌株生长情况, 按青枯菌生化型划分标准<sup>[7]</sup>确定菌株的生化型。

## 2.4 致病性试验

在 TZC 培养基上选取中央凸起, 粉红色或紫红色的单菌落, 转接于 NA 液体培养基中水浴恒温振荡培养 12 h, 稀释至  $7.5 \times 10^7$  cfu/mL 待用。采用伤根浸泡法, 将 7 个代表菌株和参照菌株分别接种于健康的广藿香试管苗植株, 每个处理设置 3 次重复接种, 无菌水为空白对照。

接种后 12 h 开始进行发病调查, 以后每隔 12 h 调查 1 次。病情分级标准: 0 级为健全; 1 级为 1~2 叶片萎垂的植株; 2 级为 3~5 叶片萎蔫的植株; 3 级为大部分萎蔫的植株; 4 级为萎蔫枯死或即将枯死的植株<sup>[8]</sup>。致病性试验结果采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 青枯菌的分离培养

从感染青枯病的广藿香病株的维管束中分离目标细菌, 30 °C 培养 48 h 后检查结果, 可见典型的流动、平滑、带白色晕圈的青枯菌单菌落。经数代纯化后, 得到在细菌学性状上有明显差异的 7 个菌株, 分别编号为: HX1、HX2、HX3、HX4、HX5、HX6 和 HX7。各菌株在 NA 斜面培养基上 4 °C 保存。

### 3.2 青枯菌的显微特征

将分离得到的青枯菌菌株 HX1、HX2、HX3、HX4、HX5、HX6 和 HX7 经革兰氏染色, 在油镜 (1 000 倍) 下观察染色结果和菌体形态, 7 个菌株均为革兰氏阴性菌。不同菌株菌体大小不一, 杆状, 少数呈球形, 菌体并列、堆状或分散排布, 偶见短链状排列。4 种主要的菌体形态见图 1。其中菌株 HX5 菌体呈短杆状, 形态与参照菌株 GIM1.70 相似; 菌株 HX6 菌体形态则为球状, 与任欣正等<sup>[9]</sup>从甘薯中分离得到的青枯菌相似; 菌株 HX7 菌体形态呈细杆状, 与何自福等<sup>[10]</sup>从空心菜中分离得到的青枯菌菌体形态相似。

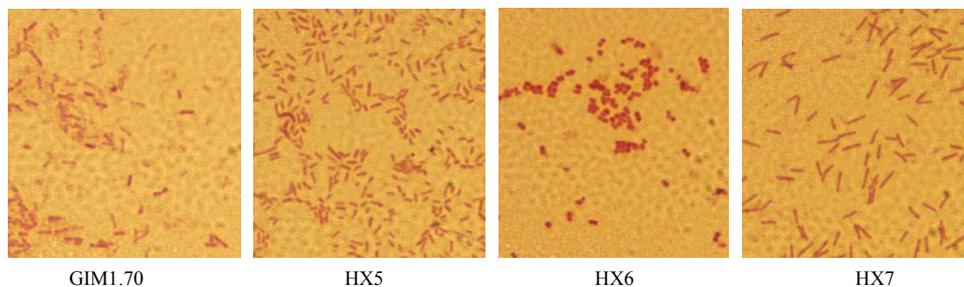


图 1 显微镜下的青枯菌菌体形态

Fig. 1 Shape of *R. solanacearum* strains from infected *P. cablin* plants under optical microscopy

### 3.3 青枯菌生化型确定

关于青枯菌生化分型的标准, Hayward<sup>[11]</sup>将青枯菌划分为 4 种生化型, He 等<sup>[12]</sup>和华静月等<sup>[13]</sup>进行了进一步完善, 根据青枯菌对 3 种双糖(乳糖、麦芽糖、纤维二糖)和 3 种己醇(甘露醇、山梨醇和卫矛醇)的氧化能力差异, 制定了 5 型标准, 即生化

型 I、II、III、IV 和 V。

将分离得到的广藿香青枯菌株及参照菌株, 在糖醇基本培养基上培养 15 d 后, 其对 3 种双糖和 3 种己醇的氧化结果统计见表 1。根据青枯菌生化型划分标准, HX5、HX7 不能氧化 3 糖 3 醇, 应划分为生化型 I; HX1、HX6 和参照菌株能氧化 3 种双

表 1 3 糖 3 醇对菌株的影响

Table 1 Utilization of three carbohydrates and three alcohols of bacteria strains

3 糖 3 醇	菌株							
	HX1	HX2	HX3	HX4	HX5	HX6	HX7	GIM1.70
乳糖	+	+	+	+	-	+	-	+
麦芽糖	+	+	+	+	-	+	-	+
纤维二糖	+	+	+	+	-	+	-	+
甘露醇	-	+	+	+	-	-	-	-
卫矛醇	-	+	-	+	-	-	-	-
山梨醇	-	+	-	+	-	-	-	-

“+”表示阳性 “-”表示阴性

“+” represents positive “-” designates negative

糖而不能氧化 3 种己醇, 属于生化型 II; HX2 和 HX4 能利用 3 种双糖和 3 种己醇, 为生化型 III; HX3 除了能利用 3 种双糖外, 还能氧化甘露醇, 故应划分为生化型 V; 表明广藿香青枯菌存在多个生化型。

### 3.4 不同生化型青枯菌的致病性差异

将从广藿香中分离得到的 7 个青枯菌菌株和番茄青枯菌 GIM1.70 进行液体培养, 分别取对数生长期菌液, 以无菌水稀释菌液浓度至  $7.5 \times 10^7$  cfu/mL, 采用伤根浸泡法对健康广藿香试管苗进行回接试验, 以接种无菌水为对照, 统计植株发病指数。接种初期, 植株基部个别叶片萎垂却仍然能维持绿色, 呈缺水状, 浇水后清晨和傍晚有所恢复, 随着时间的延长, 逐渐扩展至数个叶片, 呈萎垂微卷, 之后整株萎蔫、死亡, 接种青枯菌植株表现的发病症状和过程与田间发病植株相似, 见图 2。

采用 4 级病情分级标准对试管苗进行观察统计, 广藿香健康试管苗接种青枯菌 12 h 后, 大多数植株叶片萎蔫, 表现出明显的缺水状; 24 h 后观察, 部分试管苗病势有轻微加重, 也有一部分植株病情有所缓和, 病级指数有所下降。36 h 后, 接种试管苗叶萎蔫状况明显加重, 表现出严重的缺水症状; 48 h 后, 大部分接种青枯菌的试管苗植株死亡。用 Duncan's 法进行分析, 在同样接种时间内, 对各菌株所处理的试管苗之间的病级指数进行比较, 结果见表 2。从表 2 可见, 接种了无菌水的对照植株保持健康, 菌株 HX2 致病性较弱, 仅少数植株表现发病症状; 其余 6 个菌株致病性均较强, 均明显高于参照菌株 GIM1.70 接种 48 h 后, 病级指数均高于 3.5, 大部分供试植株死亡; 其中菌株 HX4、HX5 在接种 12 h 时, 病级指数即达到 3.0 以上。

## 4 讨论

植物青枯病是由青枯菌引起的一种细菌性病害, 青枯菌的寄主范围广泛, 目前已发现 44 个科的几百种植物可被其侵染, 并且不断有新的寄主被发现, 其中以热带、亚热带地区发病较严重, 给植物生产带来巨大的危害。

青枯菌在遗传上具有多样性, 生理小种多。目前, 有 2 种不同的亚分类系统已为国际上公认。一种是按寄主范围来分, 不同生理小种其寄主范围不同菌株对 3 种双糖和 3 种醇氧化产酸能力的差异将

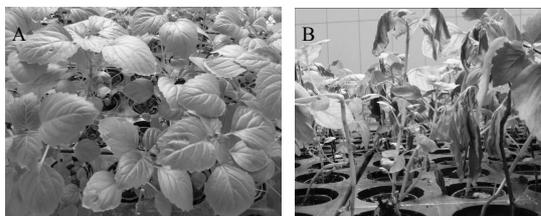


图 2 正常 (A) 和接种青枯菌 (B) 的广藿香植株  
Fig. 2 Healthy plantlet (A) and *P. cablin* test-tube plantlets inoculated with *R. solanacearum* (B)

表 2 不同青枯菌株对广藿香植株的致病性差异 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Pathogenic differences of different strains of *R. solanacearum* to *P. cablin* plantlets ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

菌株	在不同时间内接种青枯菌的广藿香植株的病级指数			
	12 h	24 h	36 h	48 h
HX1	2.22 ± 0.19 b	2.00 ± 0.33 bc	2.00 ± 0.33 b	3.56 ± 0.77 b
HX2	0.22 ± 0.39 d	0.33 ± 0.58 d	0.55 ± 0.69 e	0.44 ± 0.77 a
HX3	2.89 ± 0.51 ab	2.00 ± 0.67 bc	2.89 ± 0.70 bc	3.78 ± 0.39 a
HX4	3.00 ± 0.00 ab	2.78 ± 0.39 ab	3.67 ± 0.58 ab	3.67 ± 0.58 a
HX5	3.56 ± 0.51 a	2.89 ± 0.19 ab	4.00 ± 0.00 a	4.00 ± 0.00 a
HX6	2.67 ± 0.67 b	2.89 ± 0.19 ab	3.56 ± 0.20 ab	3.89 ± 0.19 b
HX7	2.67 ± 0.34 b	3.00 ± 0.00 b	3.67 ± 0.34 ab	3.89 ± 0.19 a
GIM1.70	0.45 ± 0.39 d	1.11 ± 0.84 cd	0.89 ± 0.51 e	2.11 ± 1.50 a
CK	0	0	0	0

不同的字母表示差异达  $P < 0.05$  显著水平

Different letters in same column were significantly different at  $P < 0.05$

同, 可将其分为 5 个生理小种<sup>[10]</sup>; 另一种是根据不其划分为 5 个生物型。研究者还认为, 青枯菌的酪氨酸酶活性、耐盐性、脱氮作用, 对海藻糖和肌醇等碳水化合物的氧化能力, 以及最适温度范围等, 均可作为划分菌系的标准。

有关青枯菌的研究, 学者在农作物和经济作物方面做了较多的工作。任欣正等<sup>[9]</sup>鉴定桑的青枯菌株为生化型 I, 马铃薯菌株为生化型 II, 番茄、茄、花生、油橄榄菌株为生化型 III, 姜、甘薯、木麻黄菌株为生化型 IV; He 等<sup>[12]</sup>研究表明, 分离自桑的 3 个菌株为新的生化型, 并命名为生化型 V; 同时, 梁子超等<sup>[14]</sup>指出烟草、木麻黄、马铃薯等植物上的青枯菌不是单一的生化型, 而是有两种或两种以上生化型存在, 本课题组的研究也表明, 广藿香的青枯菌包括生化型 I、II、III 和 V。不同生化型的菌株, 除了在生理生化表现上的不同, 在致病性方面也存在差异, 目前在这方面的研究报道较少。本课题组分离的不同青枯菌菌株, 其致病性强弱不同, 其中以菌株 HX4 和 HX5 致病力快且致死率高, 它们分别属于生化型 III 和生化型 I。

本课题组从田间感染了青枯病的广藿香植株中分离到青枯菌菌株, 在形态学、生化型和致病性等方面均存在一定的差异, 表明田间感染了青枯病的广藿香植株中, 存在多个生理小种的青枯菌菌株。青枯菌生理小种多样, 表现为致病性、对营养的要求、对环境的敏感度等方面的差异, 这给病害的防治带来较大的困难, 单一化学农药的使用, 由于病原生理小种的差异, 可能表现更高的耐药性。同时, 本研究以从番茄中分离的青枯菌菌株 GIM1.70 为参照菌株, 致病性试验表明, 该菌株对广藿香也有一定的致病性, 说明

其他青枯菌寄主植物的存在, 对广藿香病害的发生和蔓延也有一定的影响。因此, 广藿香青枯病的防治, 需要从寄主植物, 种植环境及病原多样性等方面综合考虑, 才可能取得较好的成效。

参考文献

- [1] 张英, 张金超, 陈瑶, 等. 广藿香生药、化学及药理学研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 786-790.
- [2] 薛漓. 广藿香及其混淆品广防风的鉴别 [J]. 中草药, 2001, 32(5): 460-461.
- [3] 刘东明, 曾庆文, 陈红峰, 等. 华南植物园药用植物常见病害 [J]. 中药材, 2003, 26(12): 851-853.
- [4] 杨春雨, 张争, 魏建河, 等. 海南广藿香青枯病病原菌分布的调查与分析 [J]. 中国药业, 2010, 19(10): 78-79.
- [5] 文衍堂. 海南广藿香、沙姜青枯病病原菌的鉴定 [J]. 热带作物学报, 1984, 5(2): 113-119.
- [6] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [7] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a terrazolum medium [J]. *Phytopathology*, 1954, 44(12): 293-295.
- [8] 方树民, 陈建芳, 顾钢, 等. 烟草品种抗青枯病鉴定中的相关因素分析 [J]. 植物保护学报, 2001, 28(2): 123-128.
- [9] 任欣正, 韦刚, 齐秋锁, 等. 不同寄主植物青枯菌菌株的比较 [J]. 植物病理学报, 1981, 11(4): 1-10.
- [10] 何自福, 余小漫, 虞皓, 等. 空心菜青枯病病原菌的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 120-125.
- [11] Hayward A C. Characteristics of *Pseudomonas Solanacearum* [J]. *Appl Bact*, 1964, 27(2): 265-277.
- [12] He L Y, Sequeira L, Kelman A. Characteristics of strains *Pseudomonas solanacearum* from China [J]. *Phytopathology*, 1982, 72: 936.
- [13] 华静月, 张长龄, 何礼远, 等. 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.
- [14] 梁子超, 陈小华. 木麻黄青枯病菌小种和菌系的鉴定 [J]. 华南农学院学报, 1982, 2(1): 57-65.