

潜山生姜瘟病病原体的分离与鉴定初报

刘小阳¹, 李红侠¹, 王海潮¹, 柏新富²

(1. 宿州学院化学与生命科学系, 安徽宿州 234000; 2. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要 [目的]为潜山县姜瘟病的防治提供资料。[方法]采集潜山县生姜主产区得瘟病的姜苗样本,用常规方法分离其中的病原体,并对病原体进行细菌学和生物型鉴定。[结果]从所采集样本中共分离出16株菌株(QS1、QS2、QS3、QS4、QS5、QS6、QS7、QS8、QS9、QS10、QS11、QS12、QS13、QS14、QS15、QS16),其中菌株QS2、QS6、QS7、QS10、QS14、QS15的感染症状与青枯罗尔氏菌HS028菌株的感染症状一致,6株致病菌株的培养性状和生理生化反应均与HS028菌株一致;6株致病菌株均能利用甘露醇、山梨醇及甜醇,不能利用麦芽糖、乳糖和纤维二糖。[结论]潜山县生姜瘟病的病原体为青枯罗尔氏菌,且其生物型为IV型。

关键词 潜山生姜;青枯罗尔氏菌;生物IV型

中图分类号 S432 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)34-16895-02

Preliminary Report on Isolation and Identification of Pathogens of Ginger Bacterial Wilt in Qianshan County of Anhui Province

LIU Xiao-yang et al (Chemistry and Life Science Department of Suzhou University, Suzhou, Anhui 234000)

Abstract [Objective] The study was to provide the data for control of ginger bacterial wilt in Qianshan County. [Method] The ginger seedlings samples with ginger bacterial wilt in major ginger production area of Qianshan County were collected. The pathogens in the samples were isolated with routine method, and the bacteriological characteristics and biotype of the pathogens were identified. [Result] 16 strains (QS1, QS2, QS3, QS4, QS5, QS6, QS7, QS8, QS9, QS10, QS11, QS12, QS13, QS14, QS15, QS16) were isolated from the samples, and the infection symptom of QS2, QS6, QS7, QS10, QS14 and QS15 were uniform with that of HS028 strain of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, et al., the cultural characters and the physiological and biochemical reaction of the 6 pathogenic strains were all uniform with those of HS028. 6 pathogenic strains could use mannitol, sorbitol and dulcitol, but could not use maltose, lactose and cellobiose. [Conclusion] The pathogens of ginger bacterial wilt in Qianshan County were *R. solanacearum*, and their biotypes was IV.

Key words Ginger; *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, et al.; Biotype IV

据报道,安徽省生姜主产区舒城、桐城、临泉、全椒和铜陵等地姜瘟病的病原体为青枯假单胞杆菌(*Paedomonas solanacearum* Smith.)^[1]。承河元研究发现,青枯假单胞杆菌有生物III型和生物IV型2种生物型,其中生物IV型是所调查姜产区姜瘟病的主要致病型^[2]。陈莉等于2007年研究了铜陵市和临泉县姜瘟病的病原体,初步认定青枯罗尔氏菌(*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, et al)是两地姜瘟病的病原体,且以生物III型为主,其次为生物IV型^[3]。潜山县地处大别山区,具有悠久的种姜历史,是安徽省调味姜和中药用姜的主产区,20世纪90年代以来,该区姜瘟病频繁发生,造成生姜产量和质量大幅度下降,但有关姜瘟病原体的研究至今尚未见报道。鉴于此,笔者深入大别山区潜山县姜主产区五庙乡进行采样研究,以期潜山县姜瘟病的防治提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料 带菌样本采自潜山县生姜主产区五庙乡的山地姜田。选取6处具有代表性的姜田作为采集区,每采集区采3株样本。所采样本姜苗地上部分已出现枯萎症状,叶表面具有明显的枯斑,地下姜块可见腐眼。

已知生姜瘟病病原体青枯罗尔氏菌(*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, et al)由宿州学院化学与生命科学系微生物实验室提供(编号:HS028)。

1.2 方法

1.2.1 病原体的分离。按细菌分离的常规方法^[4]分离样本

中的病原体。

1.2.2 致病性检测。参照文献[2]的方法,将分离得到的各菌株和已知菌HS028配制成浓度为 10^8 cfu/ml的菌悬液,采用叶表皮注射^[5]法注入生姜脱菌脱毒组培苗^[6]中,已知菌株HS028为对照,20~24 h后观察结果。

1.2.3 病原菌鉴定。

1.2.3.1 细菌学性状观察。参照任欣正的方法进行培养观察^[6]。

1.2.3.2 生物型鉴定。参照Hayward的方法,测定所得菌株对三糖和三醇的利用情况^[8]。

2 结果与分析

2.1 病原体分离结果 从所采集的样本中共分离出16株菌株,其中第I、II、III和VI采集区各分离出3株菌株,第IV、V采集区各分离出2株菌株,所有菌株依次编号为:QS1、QS2、QS3、QS4、QS5、QS6、QS7、QS8、QS9、QS10、QS11、QS12、QS13、QS14、QS15和QS16。

2.2 致病性检测结果 将分离到的16株菌株和HS028注入姜组培苗24 h后,观察到感染QS2、QS6、QS7、QS10、QS14和QS15菌株的姜苗叶表皮出现肉眼可见的枯斑,斑点大小不同,但色泽基本相同,其感染症状与HS028菌株感染症状一致;其他菌株感染的姜苗未出现致病症状。可见,QS2、QS6、QS10、QS14和QS15菌株可导致潜山生姜发病,且发病症状与姜瘟病的早期症状一致。

2.3 培养性状和染色观察 将6株致病菌株在NA培养基上28℃培养48 h,菌落呈乳白色,近圆形,微隆起,表面湿润且带有光泽,革兰氏染色呈阴性;显微观察结果显示,菌体呈短杆状;采用西萨-基尔法染色,可观察到鞭毛极生,1~3根,多数为1根;在KB培养基上无荧光色素产生。这些性状与已知HS028菌株的培养性状基本一致。

基金项目 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2007A130ZC)。

作者简介 刘小阳(1964-),男,安徽怀宁人,教授,从事植物生物技术方面的教学与研究工作。

鸣谢 宿州学院化学与生命科学系微生物实验室提供已知菌种,潜山县科协李艳林同志、五庙乡科协程为丰同志帮助采集样本。

收稿日期 2009-07-31

2.4 生理生化反应 将6株致病菌株和HSO28菌株分别接种培养,发现其生理生化反应较一致(表1):MR、VP试验呈

阴性,可还原硝酸盐,产氨但不产硫化氢,不能利用淀粉、液化明胶,不产生吲哚,氧化酶和接触酶反应呈阳性。

表1 致病菌株的生理生化反应试验结果

Table 1 Physiological and biological tests reaction test results of pathogenic strain

菌株 Strain	MR 试验 MR test	VP 试验 VP test	硝酸盐还原 Nitrate reduction	氨产生 Ammonia production	硫化氢产生 H ₂ S production	明胶液化 Gelatine liquefaction	吲哚产生 Indole production	淀粉水解 Starch hydrolyzation	氧化酶 Oxidase	接触酶 Contact enzyme	石蕊牛乳反应 Litmusmilk reaction
QS2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS7	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS10	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS14	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化
QS15	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	脓化

2.5 生物型鉴定 试验中6株致病性菌株均能利用甘露醇、山梨醇和甜醇,但不能利用麦芽糖、乳糖和纤维二糖(表2),按照 Hayward 的分型标准,可确定其生物型为 IV 型。

表2 致病性菌株对三糖和三醇的利用情况

Table 2 Situation of utilizing carbohydrate and other compounds by the pathogenic strain

菌株 Strain	麦芽糖 lactose	乳糖 Maltose	纤维二糖 Cellobiose	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbiol	甜醇 Melampyrite	生物型 Biotype
QS2	-	-	-	+	+	+	VI
QS6	-	-	-	+	+	+	VI
QS7	-	-	-	+	+	+	VI
QS10	-	-	-	+	+	+	VI
QS14	-	-	-	+	+	+	VI
QS15	-	-	-	+	+	+	VI

3 结论与讨论

(1)该试验结果表明,从潜山县生姜瘟病病株中分离到的16株菌株中有6株菌株可致病,且致病症状与姜瘟病病症一致;其培养性状、染色及生理生化反应与已知青枯罗尔氏菌(Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi, et al)的相应性状相同。据此,可初步确定潜山县生姜瘟病的病原体为青枯罗尔氏菌。这与承河元等的研究结果一致^[1,3]。

(2)根据 Hayward 的分型标准和三糖三醇利用试验,确定感染潜山生姜并致瘟病的青枯罗尔氏菌全部为生物 VI 型。这与承河元^[2]、陈莉等^[3]的研究结果不同。其原因可能是:①潜山县五庙乡处于大别山深处,气候(如气温、光照和降水量等)和土壤条件与承河元^[2]、陈莉等^[3]的研究存在较大差异;②近年来,潜山县姜农改变了过去传统的耕作方式,所有姜田均采用隔3年轮作。但生姜生理和进化方面的原因还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 承河元,徐晓明,黄慧琴,等.安徽省姜瘟病菌鉴定[J].安徽农学院学报,1988(1):34-40.

[2] 承河元.安徽省姜青枯假单胞菌生物型鉴定初报[J].安徽农业科学,1992,20(3):276-277.

[3] 陈莉,高智谋,杨自保,等.安徽省姜瘟病病原细菌鉴定及有效药剂筛选[J].安徽农业科学,2007,35(18):5479,5516.

[4] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2007.

[5] 刘小阳,徐德聪,李红侠.潜山生姜脱毒种姜快繁体系的建立[J].安徽农业科学,2009,37(32):15699-15700.

[6] 袁红莉.农业微生物学及实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,2009.

[7] 任欣正.植物病原细菌的分类与鉴定[M].北京:中国农业出版社,1994.

[8] HAYWARD A C. Characteristics of Pseudomonas solanacearum[J]. Appl Bact,1964,27:265-277.

(上接第16862页)

皮下、肌肉、静脉或淋巴结内等不同途径注入抗原进行免疫。颗粒性抗原如细菌、红细胞等,通常不用佐剂注射途径,一般以静脉注射产生抗体为好。该试验中所采用的抗原为全菌颗粒性抗原,所采用的免疫途径为耳缘静脉注射。

参考文献

[1] CASTRO N, TORANZO A E, BARJA J L, et al. Characterization of Edwardsiella tarda strains isolated from turbot, *Psetta maxima* [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(7):541-547.

[2] WAKABAYASHI H, EGUSA S. Edwardsiella tarda associated with pond-culture eel disease [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1973, 39(9):931-936.

[3] PANANGALA V S, VAN SANTEN V L, SHOEMAKER C A, et al. Analysis of 16S-23S intergenic spacer regions of the rRNA operons in Edwardsiella ictaluri and Edwardsiella tarda isolates from fish [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(8):657-669.

[4] 张晓君,战文斌,陈翠珍,等.牙鲈迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究[J].水生生物学报,2005,29(1):31-37.

[5] 朱壮春,史相国,张淑杰,等.牙鲈腹水病病原研究[J].水产科学,2006,25(7):325-329.

[6] J F 麦克法丁.医学细菌生化试验鉴定手册[M].北京:人民卫生出版社,1985:375-376.

[7] 冯仁青,郭振泉,宓捷波.现代抗体技术及其应用[M].北京:北京大学出版社,2006:51-54.

[8] 管远志,王艾琳,李坚.医学微生物学实验技术[M].北京:化学工业出版社,2006:174-179.

[9] 王廷华,李官成,周欣福.抗体理论与技术[M].北京:科学出版社,2005:80-87.

[10] 赵香汝,徐彤,靳喜鹏,等.接种不同剂量的新城疫疫苗对鸡免疫应答的影响[J].中国兽医杂志,2005,41(7):17-19.

[11] 杜玉萍.四种常见食物中毒病菌胶体金免疫渗滤法快速诊断的初步研究[D].广州:第一军医大学,2006:8-10.