

# 青枯雷尔氏菌 多态性研究

刘波 林营志 朱育菁 编著  
曹宜 肖荣凤 葛慈斌

福建科学技术出版社

601783

# 青枯雷尔氏菌多态性研究

刘 波 林营志 朱育菁 著  
曹 宜 肖荣凤 葛慈斌

本研究得到国家 863 计划项目 (2002AA244031) 的资助

福建科学技术出版社

**图书在版编目 (CIP) 数据**

青枯雷尔氏菌多态性研究/刘波等编著. —福州: 福建科学技术出版社, 2005. 6

ISBN 7-5335-2553-1

I. 青… II. 刘… III. 植物-青枯病-病原细菌-研究 IV. S432.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 009646 号

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| 书 名  | 青枯雷尔氏菌多态性研究                        |
| 编 著  | 刘 波 林营志 朱育菁 曹 宜 肖荣凤 葛慈斌            |
| 出版发行 | 福建科学技术出版社 (福州市东水路 76 号, 邮编 350001) |
| 经 销  | 各地新华书店                             |
| 排 版  | 福建科学技术出版社排版室                       |
| 印 刷  | 人民日报社福州印务中心                        |
| 开 本  | 787 毫米×1092 毫米 1/16                |
| 印 张  | 9.75                               |
| 字 数  | 222 千字                             |
| 版 次  | 2005 年 6 月第 1 版                    |
| 印 次  | 2005 年 6 月第 1 次印刷                  |
| 印 数  | 1—1 000                            |
| 书 号  | ISBN 7-5335-2553-1/Q·21            |
| 定 价  | 26.50 元                            |

书中如有印装质量问题, 可直接向本社调换

# 前 言

植物青枯病从发现至今已有 140 多年的历史, 1864 年印度尼西亚首先报道了青枯病对烟草毁灭性危害; 随后美国和澳大利亚也分别报道了马铃薯和番茄的青枯病。到目前, 植物青枯病已成为世界范围内广泛传播、严重危害的重大病害之一。植物青枯病病原菌——青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 可危害 44 个科的 300 多种植物, 被侵染的寄主中有木本植物和草本植物, 有一年生植物和多年生植物, 有裸子植物和被子植物, 有双子叶植物和单子叶植物等, 表现出高度的侵染寄主的多态性。不仅如此, 青枯雷尔氏菌在形态、种下分化、致病性、致病机理等方面也表现出高度的复杂性。这种复杂性揭示了青枯雷尔氏菌与植物、环境相互作用的协同进化。单纯用病理学方法, 已经难以解释青枯雷尔氏菌的多态性。作者应用生态学观点, 以病原、寄主、环境相互作用为研究基础, 在自行试验的基础上, 收集了青枯雷尔氏菌研究国内 1980~2004 年文献资料 410 篇, 国外 1980~2004 年文献资料 9360 篇, 经过精心整理分析, 对青枯雷尔氏菌的多态性进行了研究, 其目的是为了抛砖引玉和交流学术观点。

本书共分十章。第一章绪论, 分别对青枯病的发生与危害, 青枯病原菌的分类地位、形态特征、生理特征、培养特性、运动特性、致害特性、菌株编码, 作物青枯病的农业、化学、生物防治技术进行了概述。第二章青枯雷尔氏菌侵染特性的多态性, 分别描述了青枯雷尔氏菌的侵染寄主、侵染方式、土壤分布、发生因素、流行规律的多态性。第三章青枯雷尔氏菌在植株体内分布的多态性, 分别介绍了青枯雷尔氏菌在番茄、茄子、烟草、姜、花生植株体内分布的多态性。第四章青枯雷尔氏菌形态特征的多态性, 分别对青枯雷尔氏菌的形态特征、同一寄主植物上青枯雷尔氏菌形态的多态性、不同寄主植物上青枯雷尔氏菌形态的多态性、不同致病性青枯雷尔氏菌形态的多态性、同一青枯雷尔氏菌菌株继代培养形态的多态性进行了阐述。第五章青枯雷尔氏菌培养特性的多态性, 在介绍培养特性研究概况和培养过程生长周期划分的基础上, 分析了培养过程菌体数量、含氮量、pH 值、OD 值、发酵参数主成分、培养液光吸收值的变化, 阐明温度对菌落和菌体生长的影响。第六章青枯雷尔氏菌遗传特性的多态性, 对基因技术在青枯雷尔氏菌研究上的应用、聚合酶链式反应 (PCR) 分析的原理和方法、青枯雷尔氏菌的分子检测、青枯雷尔氏菌细胞质粒的多态性、青枯雷尔氏菌 RAPD-PCR 的多态性进行了简述, 第七章青枯雷尔氏菌种下分化的多态性, 分别介绍了青枯雷尔氏菌的亚种、生理小种、生化型、血清型、溶源型、致病型、基因型分化, 以及同一生理小种寄主侵染的多态性和同一生理小种生化型分化的多态性。第八章青枯雷尔氏菌致病性分化的多态性, 介绍了青枯雷尔氏菌弱化指数的建立和青枯雷尔氏菌致病性分化, 阐明了青枯雷尔氏菌不同致病性菌株的生理差异、青枯雷尔氏菌不同致病性菌株的致害差异、青枯雷尔氏菌菌株的后代分离分析了物理因素、化学因素和生物因素对青枯雷尔氏菌致病性的影响。第九章青枯雷尔氏菌致病机理的多态性, 分别阐述了青枯雷尔氏菌致病因子、致病路

径、致病基因调控系统的多态性，深入地探讨了青枯雷尔氏菌的致病机理。第十章青枯雷尔氏菌基因组序列的多态性，分别对模式微生物——青枯雷尔氏菌、双体基因组结构、基因组的 Masaic 结构、与细菌致病性有关的候选基因、依赖Ⅲ型分泌系统的作用因子、毒力的进化、比较基因组、序列测定方法与装配、基因预测与注解等做了介绍。

作者长期从事生物防治技术研究，对于植物病理学研究了解甚少，斗胆试笔，在研究过程中得到了中国农科院何礼远研究员、华中农业大学喻子牛教授、浙江大学谢关林教授、福建农林大学张绍升教授、胡方平教授的指导和帮助；研究得到了国家 863 计划项目（2002AA244031-2），福建省科技厅重大项目（2000Z031）和福建省发改委项目（闽计农经[2002] 48 号）的资助，特此表示由衷的感谢。由于作者水平有限，编写时间仓促，书中定仍存有缺憾。错漏之处，恳切希望读者批评指正。

作者

2005-01-31 福州

# 目 录

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| <b>第一章 绪论</b> .....                | (1)  |
| 1.1 青枯病的发生与危害 .....                | (1)  |
| 1.2 青枯病原菌的分类地位 .....               | (1)  |
| 1.3 青枯雷尔氏菌的形态特征 .....              | (1)  |
| 1.4 青枯雷尔氏菌的生理特征 .....              | (3)  |
| 1.5 青枯雷尔氏菌的培养特性 .....              | (3)  |
| 1.6 青枯雷尔氏菌的运动特性 .....              | (4)  |
| 1.7 青枯雷尔氏菌的致病特性 .....              | (5)  |
| 1.8 青枯雷尔氏菌的菌株编码 .....              | (6)  |
| 1.9 青枯病的农业防治 .....                 | (7)  |
| 1.10 青枯病的化学防治 .....                | (9)  |
| 1.11 青枯病的生物防治 .....                | (10) |
| <b>第二章 青枯雷尔氏菌侵染特性的多态性</b> .....    | (18) |
| 2.1 侵染寄主的多态性 .....                 | (18) |
| 2.2 侵染方式的多态性 .....                 | (19) |
| 2.3 土壤分布的多态性 .....                 | (19) |
| 2.4 发生因素的多态性 .....                 | (20) |
| 2.5 流行规律的多态性 .....                 | (22) |
| <b>第三章 青枯雷尔氏菌在植株体内分布的多态性</b> ..... | (26) |
| 3.1 在番茄体内分布的多态性 .....              | (26) |
| 3.2 在茄子体内分布的多态性 .....              | (28) |
| 3.3 在烟草体内分布的多态性 .....              | (31) |
| 3.4 在姜体内分布的多态性 .....               | (34) |
| 3.5 在花生体内分布的多态性 .....              | (36) |
| <b>第四章 青枯雷尔氏菌形态特征的多态性</b> .....    | (43) |
| 4.1 青枯雷尔氏菌的形态特征 .....              | (43) |
| 4.2 同一寄主植物上青枯雷尔氏菌形态的多态性 .....      | (43) |
| 4.3 不同寄主植物上青枯雷尔氏菌形态的多态性 .....      | (44) |
| 4.4 不同致病性青枯雷尔氏菌形态的多态性 .....        | (45) |

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| 4.5 同一青枯雷尔氏菌菌株继代培养形态的多态性 .....   | (47)        |
| <b>第五章 青枯雷尔氏菌培养特性的多态性 .....</b>  | <b>(51)</b> |
| 5.1 培养特性多态性研究意义 .....            | (51)        |
| 5.2 培养特性的研究方法 .....              | (51)        |
| 5.3 培养过程生长周期的划分 .....            | (53)        |
| 5.4 培养过程菌体数量的变化 .....            | (54)        |
| 5.5 培养过程含氮量的变化 .....             | (55)        |
| 5.6 培养过程 pH 值的变化 .....           | (56)        |
| 5.7 培养过程 OD 值的变化 .....           | (56)        |
| 5.8 培养过程发酵参数分析 .....             | (56)        |
| 5.9 培养过程培养液光吸收值的变化 .....         | (58)        |
| 5.10 温度对菌落生长的影响 .....            | (62)        |
| 5.11 温度对菌体生长的影响 .....            | (63)        |
| <b>第六章 青枯雷尔氏菌遗传特性的多态性 .....</b>  | <b>(65)</b> |
| 6.1 基因技术在青枯雷尔氏菌研究上的应用 .....      | (65)        |
| 6.2 聚合酶链式反应 (PCR) 分析的原理和方法 ..... | (67)        |
| 6.3 青枯雷尔氏菌的分子检测 .....            | (70)        |
| 6.4 青枯雷尔氏菌细胞质粒的多态性 .....         | (73)        |
| 6.5 青枯雷尔氏菌 RAPD-PCR 的多态性 .....   | (76)        |
| <b>第七章 青枯雷尔氏菌种下分化的多态性 .....</b>  | <b>(83)</b> |
| 7.1 青枯雷尔氏菌亚种分化 .....             | (83)        |
| 7.2 青枯雷尔氏菌生理小种分化 .....           | (83)        |
| 7.3 青枯雷尔氏菌生化型分化 .....            | (84)        |
| 7.4 青枯雷尔氏菌血清型分化 .....            | (85)        |
| 7.5 青枯雷尔氏菌溶源型分化 .....            | (85)        |
| 7.6 青枯雷尔氏菌致病型分化 .....            | (86)        |
| 7.7 青枯雷尔氏菌基因型分化 .....            | (86)        |
| 7.8 同一生理小种寄主侵染的多态性 .....         | (88)        |
| 7.9 同一生理小种生化型分化的多态性 .....        | (89)        |
| <b>第八章 青枯雷尔氏菌致病性分化的多态性 .....</b> | <b>(96)</b> |
| 8.1 青枯雷尔氏菌弱化指数的建立 .....          | (96)        |
| 8.2 青枯雷尔氏菌致病性分化 .....            | (98)        |
| 8.3 青枯雷尔氏菌不同致病性菌株的生理差异 .....     | (100)       |
| 8.4 青枯雷尔氏菌不同致病性菌株的致病差异 .....     | (102)       |

---

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| 8.5 青枯雷尔氏菌菌株后代致病性分离 .....        | (103)        |
| 8.6 物理因素对青枯雷尔氏菌致病性的影响 .....      | (105)        |
| 8.7 化学因素对青枯雷尔氏菌致病性的影响 .....      | (105)        |
| 8.8 生物因素对青枯雷尔氏菌致病性的影响 .....      | (106)        |
| <b>第九章 青枯雷尔氏菌致病机理的多态性</b> .....  | <b>(110)</b> |
| 9.1 青枯雷尔氏菌致病因子的多态性 .....         | (110)        |
| 9.2 青枯雷尔氏菌致病路径的多态性 .....         | (112)        |
| 9.3 青枯雷尔氏菌致病基因调控系统的多态性 .....     | (113)        |
| 9.4 青枯雷尔氏菌的致病机理 .....            | (115)        |
| <b>第十章 青枯雷尔氏菌基因组序列的多态性</b> ..... | <b>(134)</b> |
| 10.1 模式微生物——青枯雷尔氏菌 .....         | (134)        |
| 10.2 双体基因组结构 .....               | (134)        |
| 10.3 基因组的镶嵌结构 .....              | (136)        |
| 10.4 与细菌致病性有关的候选基因 .....         | (137)        |
| 10.5 依赖Ⅲ型分泌系统的作用因子 .....         | (139)        |
| 10.6 毒力的进化 .....                 | (140)        |
| 10.7 比较基因组 .....                 | (141)        |
| 10.8 序列测定方法与装配 .....             | (142)        |
| 10.9 基因预测与注解 .....               | (142)        |

# 第一章 绪论

## 1.1 青枯病的发生与危害

青枯病是许多植物的重大病害之一，对茄科植物的危害尤为严重。我国南方各省茄科作物上都有青枯病发生，对南京地区茄科作物青枯病调查结果表明，一般田块发病率为25%~30%，严重的可达80%~100%<sup>[1]</sup>。马铃薯对青枯病十分敏感，通常导致产量损失20%~30%，严重时损失可达75%以上<sup>[2]</sup>。番茄生长过程经常受到青枯病的危害，特别在番茄结果期，适逢高温高湿的雨季，可引起毁灭性的危害<sup>[3]</sup>。福建烟草的青枯病发病率一般为10%~30%，严重的可达100%，以至全田烟草枯死绝收，此病已成为福建烟草生产的主要障碍之一<sup>[4]</sup>。此外，在花生、甘薯、姜等作物上，青枯病发生亦很严重，易感病作物面积近 $6.7 \times 10^4 \text{ hm}^2$ <sup>[5]</sup>。随着研究的进展，青枯病原菌新寄主不断被发现<sup>[6]</sup>。全球气温变暖等因素，在世界范围内，青枯病发生危害越来越严重<sup>[7]</sup>。近年来，我国南方桉树、木麻黄、桑树等林木青枯病害发生爆发，造成林业生产巨大经济损失<sup>[8]</sup>。

## 1.2 青枯病原菌的分类地位

青枯病从发现至今已有140多年的历史，1864年印度尼西亚首先报道了青枯病对烟草造成毁灭性危害；随后美国和澳大利亚也分别报道了马铃薯和番茄的青枯病。美国 Erwin Smith (1986) 将其病原物定名为青枯假单胞杆菌 (*Pseudomonas solanacearum* Smith)。Hayward (1990) 的研究表明，假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*) 分为5个 rRNA 同源群<sup>[9]</sup>，青枯假单胞杆菌包括在 rRNA 同源群II中。Yabuuchi 等 (1992) 根据 DNA-DNA、DNA-RNA 分子杂交，以同源性分析为基础，建议将其列入 *Burkholderia solanacearum* comb. nov.<sup>[10]</sup>。1995年通过对16S rRNA 基因序列测定的聚类分析等大量工作，将此病原菌被列入雷尔氏属 (*Ralstonia*)，与 *Burkholderia pickettii* 和 *Alcaligenes eutrophus* 为同一属，命名为 *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al.<sup>[11, 12]</sup>。青枯病病原菌的中文名称也经历了变化，起初称为青枯假单胞杆菌，随着其分类地位的变化，而后称为青枯雷尔氏菌<sup>[13]</sup>。本书中采用的青枯病病原菌的中文名为青枯雷尔氏菌。

## 1.3 青枯雷尔氏菌的形态特征

青枯雷尔氏菌的菌体呈长椭圆形，近杆状，革兰氏染色阴性，菌体大小为 (0.5~0.8)  $\mu\text{m} \times$  (1.3~2.2)  $\mu\text{m}$ ，极生鞭毛1~4根，不形成荚膜和芽孢，菌体内均有聚- $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒，在显微镜或电子显微镜下显示两极着色较深的特征<sup>[14]</sup>。为好气性细菌，在嫌气下

培养，其毒力迅速丧失。不同寄主上的菌落形态无明显差异，在肉汁胨琼脂平板上，32℃下培养 48h 后，出现直径为 1~4mm 的灰白色不规则或近圆形菌落，边沿光滑。在 TTC 培养基上划线培养，可出现边沿具有不同宽度的白边，中心呈粉红色或浅红色菌落<sup>[15]</sup>。不同地区、不同作物、不同季节分离的青枯雷尔氏菌菌落形态（TTC 培养基）如图 1-1。

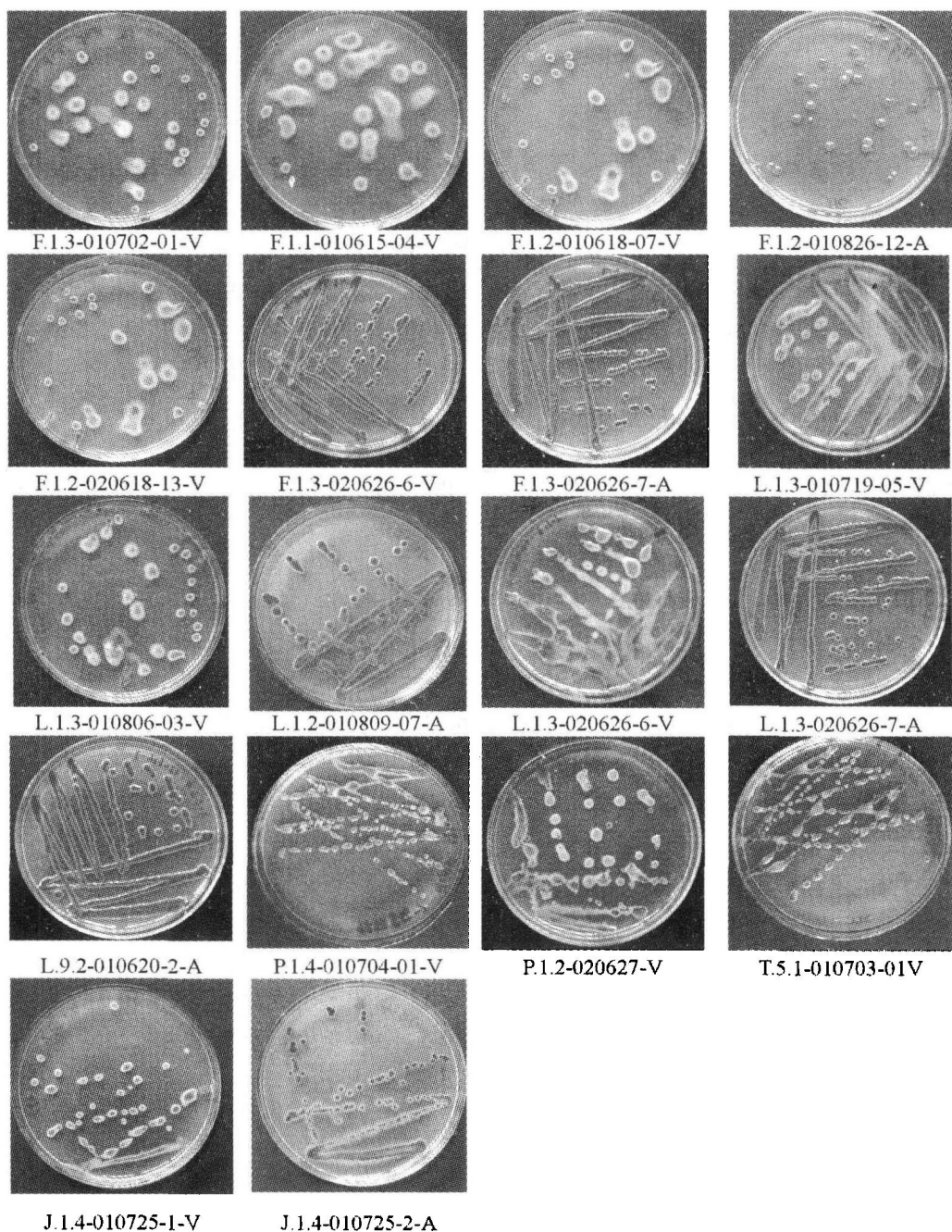


图 1-1 不同地区、不同作物、不同季节分离的青枯雷尔氏菌菌落形态（TTC 培养基）

## 1.4 青枯雷尔氏菌的生理特征

青枯雷尔氏菌在金氏 B 培养基上, 均不产生荧光色素; 在酪氨酸培养基上, 培养 7d 后可产生褐色素使培养基变褐。但产生褐色素快慢和多少, 在不同寄主的菌株和同一寄主的不同菌株之间都有差异: 茄子和辣椒上分离的菌培养 5~10 d, 即可产生大量褐色素, 但番茄和姜分离的菌要在 14d 以后才产生少量褐色素。在 TTC 培养基上培养可出现两种菌落: 一是菌落呈不规则形或近圆形, 具有较宽的白边, 流动性强, 中心呈粉红色或浅红色稀液状, 这是致病性强的野生型菌株 (图 1-2A); 二是菌落为圆形, 干燥而较扁平, 菌落白边很窄, 中心呈玫瑰红色 (暗红色), 这是致病性弱或丧失致病力的突变型菌株 (图 1-2B)<sup>[15, 16]</sup>。

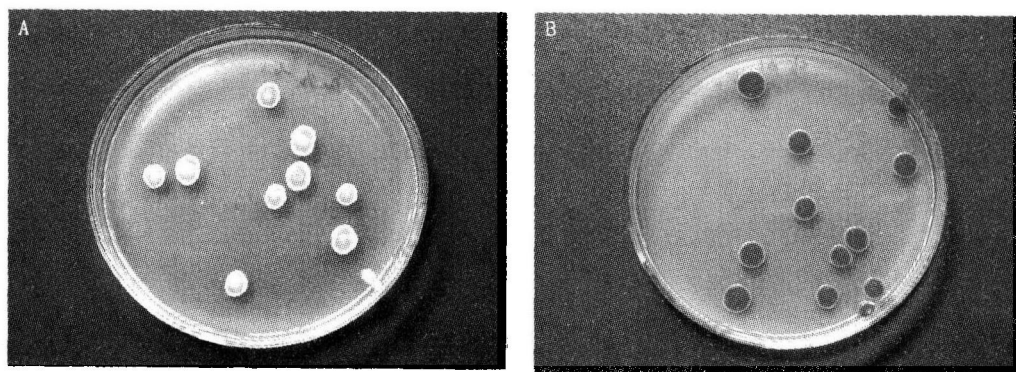


图 1-2 青枯雷尔氏菌强致病力菌株和无致病力菌株在 TTC 培养基上的菌落形态

A. 强致病力菌株 (F. 1. 2-020618-13-V)

B. 无致病力菌株 (F. 1. 3-020626-7-A)

## 1.5 青枯雷尔氏菌的培养特性

在正常营养条件下, 青枯雷尔氏菌生长最适温度为 27~37℃, 41℃ 以上不生长<sup>[17]</sup>; 为好气性细菌, 在嫌气下培养, 其致病力迅速丧失。采自不同寄主的青枯雷尔氏菌的菌落形态无明显差异, 在肉汁琼脂平板上, 32℃ 下培养 48h 后, 出现直径为 1~4mm 的灰白色不规则或近圆形菌落, 边沿光滑<sup>[18]</sup>。

在有限营养条件下 (青枯雷尔氏菌的发酵液用无菌水稀释后在摇床培养箱中进行培养), 随着培养时间的延长, 青枯雷尔氏菌强致病力菌株菌体表现出增长, 而无致病力菌株菌体表现出消减 (表 1-1)。从培养的温度看, 在 15℃、20℃、25℃、30℃ 和 35℃ 条件下, 青枯雷尔氏菌强致病力菌株 (F. 1. 2-020618-13-V) 增长率平均值为 59%~124%, 增长幅度与温度的相关性不显著; 青枯雷尔氏菌无致病力菌株 (F. 1. 3-020626-7-A) 增长率平均值为 -40%~-60%, 表现出温度越高、增长率下降幅度越大的趋势。从培养的时间看, 在培养 24h、48h 和 72h 时, 强致病力菌株的平均增长率分别为 88.09%、115.90% 和 57.74%, 表现出随着时间的延长, 菌落数量波动增长的趋势; 无致病力菌株的平均增长率分别为

−34.09%、−45.33%和−67.62%，表现出随着培养时间的延长，菌体数量下降加速的趋势。

上述结论表明，在有限营养条件下，培养时间和培养温度对青枯雷尔氏菌生长有显著影响，但未造成致病性的变化。强致病力菌株与无致病力菌株增长率的差异，可能与不同致病力的青枯雷尔氏菌对营养的要求差异有关。强致病力菌株对营养的要求较低，能利用剩余的营养继续生长，生长到一定的时间，增长率也下降；而无致病力菌株对营养的要求较高，不能利用剩余的营养继续生长，故一开始就出现菌体增长率下降。青枯雷尔氏菌不同致病力菌株对营养条件的需求有待于进一步的研究。

表 1-1 青枯雷尔氏菌强致病力和无致病力菌株培养特性

| 处理条件   |        | 强致病力菌株 (×10 <sup>8</sup> cfu/mL) |       |         | 无致病力菌株 (×10 <sup>8</sup> cfu/mL) |      |         |
|--------|--------|----------------------------------|-------|---------|----------------------------------|------|---------|
| 时间 (h) | 温度 (℃) | 初始浓度                             | 终结浓度  | 增长率 (%) | 初始浓度                             | 终结浓度 | 增长率 (%) |
| 24     | 15     | 5.9                              | 8.90  | 50.84   | 6.1                              | 5.50 | −9.83   |
|        | 20     | 5.9                              | 12.90 | 118.46  | 6.1                              | 4.80 | −21.31  |
|        | 25     | 5.9                              | 8.90  | 50.84   | 6.1                              | 4.10 | −32.78  |
|        | 30     | 5.9                              | 13.10 | 122.03  | 6.1                              | 2.70 | −55.73  |
|        | 35     | 5.9                              | 11.70 | 98.30   | 6.1                              | 3.00 | −50.81  |
|        | 平均值    |                                  | 11.10 | 88.09   |                                  | 4.02 | −34.09  |
| 48     | 15     | 5.9                              | 10.28 | 74.23   | 6.1                              | 4.00 | −34.42  |
|        | 20     | 5.9                              | 13.70 | 132.20  | 6.1                              | 4.30 | −29.50  |
|        | 25     | 5.9                              | 13.20 | 123.72  | 6.1                              | 3.80 | −37.70  |
|        | 30     | 5.9                              | 14.90 | 152.45  | 6.1                              | 2.80 | −54.09  |
|        | 35     | 5.9                              | 11.60 | 96.91   | 6.1                              | 1.80 | −70.94  |
|        | 平均值    |                                  | 12.73 | 115.90  |                                  | 3.34 | −45.33  |
| 72     | 15     | 5.9                              | 9.13  | 54.74   | 6.1                              | 1.40 | −77.04  |
|        | 20     | 5.9                              | 13.10 | 122.03  | 6.1                              | 1.90 | −68.85  |
|        | 25     | 5.9                              | 10.60 | 79.66   | 6.1                              | 2.20 | −63.93  |
|        | 30     | 5.9                              | 6.70  | 13.55   | 6.1                              | 1.80 | −70.94  |
|        | 35     | 5.9                              | 6.80  | 15.25   | 6.1                              | 2.60 | −57.37  |
|        | 平均值    |                                  | 9.26  | 57.74   |                                  | 1.98 | −67.62  |
| 平均值    | 15     | 5.9                              | 9.43  | 59.93   | 6.1                              | 3.63 | −40.43  |
|        | 20     | 5.9                              | 13.23 | 124.23  | 6.1                              | 3.66 | −39.88  |
|        | 25     | 5.9                              | 10.90 | 84.74   | 6.1                              | 3.36 | −44.80  |
|        | 30     | 5.9                              | 11.56 | 96.01   | 6.1                              | 2.43 | −60.25  |
|        | 35     | 5.9                              | 10.03 | 70.15   | 6.1                              | 2.46 | −59.70  |

1.6 青枯雷尔氏菌的运动特性

Kelman 等 (1973) 调查了 36 株青枯雷尔氏菌的野生型菌株及其自发产生的无毒突变型菌株之后指出：野生型菌株没有运动性，而自发无毒突变型菌株一般都能够运动<sup>[19]</sup>。然而

毛国璋等(1997)检测不同来源的 107 株青枯雷尔氏菌野生型,发现 30 株(含番茄青枯雷尔氏菌  $T_{m1}$ 、 $T_{m4}$ )同时具爬行运动与游泳运动能力,且这种能力靠极生鞭毛发动,并受高温抑制。游泳运动性菌株  $T_{m1}$  接种番茄,12h 后基本停止游动;55d 后对植株菌溢进行检测表明,离体菌株 4d 后开始游动,并逐渐活跃<sup>[20]</sup>。另研究发现,具有运动性的青枯雷尔氏菌株对寄主及部分非寄主植物的根表现强烈趋向性,对茎的趋向性微弱,而对叶不表现趋向性<sup>[21]</sup>。

## 1.7 青枯雷尔氏菌的致害特性

郑继法等(1997)研究指出,青枯雷尔氏菌侵害寄主(特别是茄科寄主)后,寄主植物(如番茄、辣椒、茄子等)在发病时出现青枯症状,即植物的叶子萎蔫下垂,但叶子仍呈绿色。发病初期,部分叶子在阳光下发生萎蔫,在早晚恢复正常;发病中期,大部分叶子在阳光下发生萎蔫,在早晚恢复正常;发病后期,萎蔫的叶子无法恢复,逐渐枯黄。青枯萎蔫作为青枯雷尔氏菌危害寄主植物的重要致害特征。横切病株茎部可见到维管束变褐,用手挤压,有白色菌脓从切口处溢出,此法可作为田间快速诊断青枯病的方法之一<sup>[22]</sup>。番茄、烟草、茄子、辣椒、花生、姜等作物上的青枯病症状特征见图 1-3。

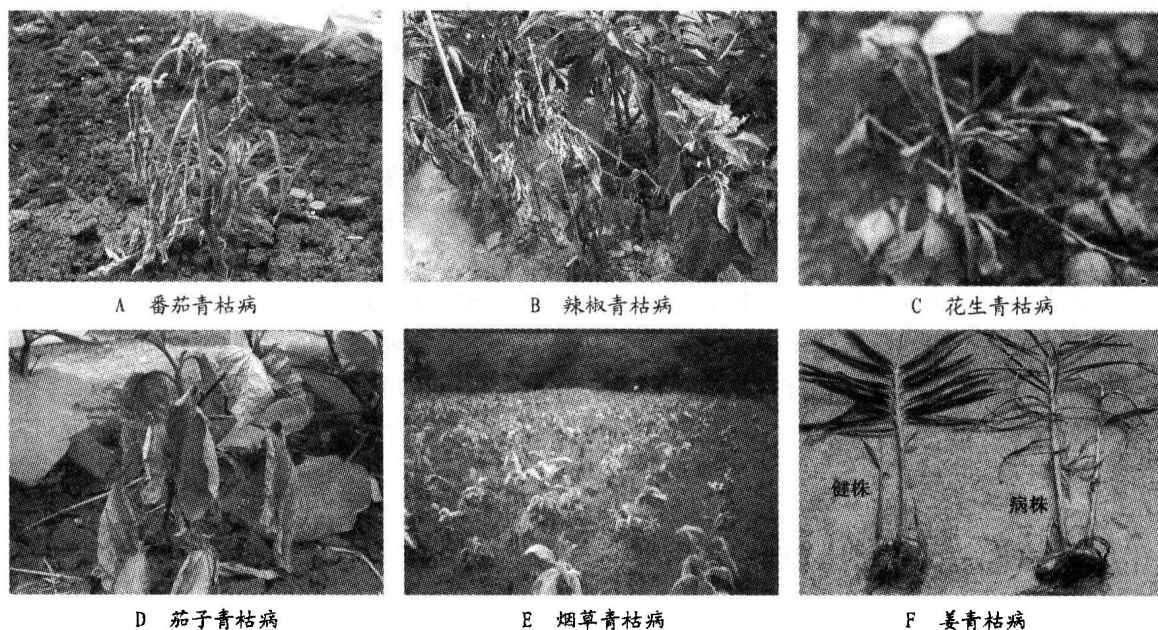


图 1-3 番茄、辣椒、花生、茄子、烟草、姜青枯病症状

在福建,各种作物青枯病发病的时间不尽一致,总体说来,往南发生期越来越早,往北发生期越来越迟。采集青枯病原菌较好时期为:姜 4 月份、番茄 5 月份、辣椒 6 月份、茄子 7 月份、烟草 8 月份、花生 9 月份。结合各地姜、番茄、辣椒、茄子、烟草、花生作物的生长期,在各作物进入生殖生长初期、气温在 28℃ 以上、晴雨交替的日子,青枯病较为多发。

青枯雷尔氏菌可在病残体、有机肥料和田间其他感病寄主上越冬，能在土壤中存活很长时间。越冬的菌源可成为翌年发病的初侵染源。青枯雷尔氏菌主要通过灌溉水、雨水、土壤耕作、线虫和昆虫等在田间传播，从根部的根生长点或茎基部的伤口侵入，在维管束的导管内寄生，并沿导管向上繁殖蔓延，使导管堵塞、褐变，造成植株萎蔫。高温、高湿和多雨是诱发青枯病发生和流行的重要因素，尤其是雨后转晴，太阳暴晒，土温升高，气温达 30~37℃，最有利于青枯病流行。立地方面，如地势低洼、土质黏重、排水条件差、地下害虫多、土壤偏酸、与茄科或其他青枯雷尔氏菌的寄主作物连作，发病均较重。

青枯雷尔氏菌侵染植物，引起植株发生青枯病害，出现萎蔫、枯萎等症状，病株各部位的维管束组织中，一般都有大量的病原菌存在。将病组织置于载玻片和盖玻片之间的清水中会形成溢菌现象，该特点可以用于初步区别细菌引起的植物病害。病株的不同部位，含青枯雷尔氏菌量有所不同，可表现出溢菌现象强弱的不同。观察病株不同部位组织的溢菌，可初步判断各部位组织的青枯雷尔氏菌的存在及含量。进行溢菌检验时，挑选株高不同的茄科青枯病植株（如番茄、茄子、辣椒等），按植株株高的一定比例间隔，顺序从根到末梢切取小块病组织，平放在载玻片上的水滴中，加盖盖玻片，再从旁边滴加水，至盖玻片与载玻片之间充满水为止；静置 5min 后，如果病组织块含有大量细菌存在，便可在组织块的两侧看到溢菌现象。起初溢菌面积较小，然后逐渐呈扇面扩展，最后在盖玻片与载玻片之间充满细菌。含菌量越高，溢菌形成的盖玻片与载玻片之间区域越不透明。

对于番茄，选择不同株高感染青枯病的植株，分别间隔 5cm 取样，进行溢菌试验。结果发现株高在 80cm 以上的番茄，其株高 60% 以下的茎秆，溢菌现象明显；株高 60% 以上的茎秆，溢菌现象不明显。株高在 80cm 以下的番茄植株，全株各部位都有明显的溢菌现象。试验结果表明，株高较高的青枯病植株，只在茎秆的下半段看到有明显的溢菌现象；而株高较矮的植株，整株茎秆的溢菌现象都很明显。这可能是由于植株较矮，青枯雷尔氏菌更容易侵入到植株顶部的缘故。

对于茄子，病株溢菌试验表明，茎基部、中部、顶部依次溢菌现象逐渐减弱。这一现象被王铮敏等（2002）观察的茄子植株体内青枯雷尔氏菌分布所证实<sup>[5]</sup>。他们发现，青枯雷尔氏菌数量的分布随着植株高度的上升而下降，茎基部含菌量  $800 \times 10^8$  cfu/g、中部  $150 \times 10^8$  cfu/g 和顶部  $140 \times 10^8$  cfu/g，由此说明青枯雷尔氏菌的传染是从根部侵入植物，由底部逐渐向顶部弥散的。

## 1.8 青枯雷尔氏菌的菌株编码

对采集的青枯雷尔氏菌菌株进行统一编号，对于青枯雷尔氏菌的研究具有重要意义。从编号上可以反应采集的作物、时间、地点等信息，青枯雷尔氏菌菌株的编号规则为：一个编号对应一个菌株，编号由 5 部分组成，如图 1-4。其中第一部分代表作物，如 F-番茄、T-花生、L-茄子、J-姜、G-烟草、P-辣椒等，第二部分为地区标识，按行政地区编码，福建省 9 个地区编码 1~9，按福建省省邮政编码的地区顺序编码。第三部分为县份标识，按行政区划在邮政编码的顺序编号 1~n，第四部分为时间编码，按年月日编码输入。第五部分为菌株特征编码，如菌株序号、致病性特点等。同一时间、同一地点、同一作物，如分离多株菌

株，进行菌株编号，如果仅 1 株菌可以不编号；在原始菌株的编码后面，可以加入不同处理、不同特性等标识，如-A 表明无致病力菌株，-V 强致病力菌株，-ANTI 经生防菌 AN-TI-8098A 处理后的菌株等。



图 1-4 青枯雷尔氏菌株编码示例

## 1.9 青枯病的农业防治

### 1.9.1 土壤处理

带菌土壤是青枯病最主要的初侵染源，控制土壤中青枯雷尔氏菌的初侵染源数量，则能避免或减少青枯病的发生。施用有机肥和微量元素，可以降低土壤病原菌数量，已成为控制该病害的一种有效措施。袁立和等（1991）发现江西省不少地区存在着番茄青枯病的抑病土壤（白泥土），他们用白泥土和砂壤土进行盆栽和田间试验，发现两种土壤在接种病原菌当年都会引起发病，但经过一个生产周期的间隔期到下一季，则白泥土不再引起番茄发病，砂壤土则严重发病，表明了白泥土的高度抑病效能<sup>[23]</sup>。进一步研究表明，白泥土的抑病性与其土壤微生物无关，而且抑病性还可转移，将这种土移至它处，仍可起到控制病害的作用，抑病土可望成为产品，在生产上得到推广应用。

姚革等（1992~1993）在四川，用一种土壤添加剂对烟草和番茄青枯病进行了小区防治试验，当剂量分别为 75g/株和 100g/株时，防治效果分别达 59.6% 和 78.9%，显著优于同时参试农药。盆栽试验结果显示：添加剂的防病机制主要是能通过增加土壤中有益微生物群体的作用来实现，施用添加剂的土壤比对照土壤中放线菌和芽孢杆菌的数量增加 10~1000 倍<sup>[24]</sup>。使用不带土壤的营养液栽培番茄也可防除番茄青枯病，用氯剂对发病现场进行消毒防止病原菌污染、营养液经 60℃ 5min 加热消毒、pH 控制在 5.0 以下等措施，均能有效防止番茄青枯病的发生<sup>[25]</sup>。对土壤进行曝晒和熏蒸处理，亦能达到减少土壤中病原菌含量的目的。据报道，一种选择透光性强、低密度聚乙烯薄膜覆盖土壤，曝晒 32~49d，可显著降低 15~25cm 土壤深度之内的青枯雷尔氏菌的种群密度<sup>[26]</sup>。

### 1.9.2 轮作套种

作物轮作和套种亦不失为经济、简便、有效的防治作物青枯病措施。Abdullah 和 Sijam（1992）发现：在青枯病发病 2 年以上的田块种植非寄主植物可使青枯雷尔氏菌的种群密度降至一个很低的水平<sup>[27]</sup>。吕成宽等（1991）用番茄套种洋葱防治番茄青枯病，结果发现：

套种洋葱的番茄青枯病发生迟、传播慢，主要表现在发病初期抑制或杀死病原菌，使发病期推迟，发病后期能控制病害的迅速蔓延，到果实成熟时还能保持 86.7% 的健株。套种田的病株率为 13.3%，对照田为 99.2%，相对防治效果 86.6%<sup>[28]</sup>。

### 1.9.3 砧木嫁接

由于番茄的抗青枯病基因遗传是隐性或多基因的，因此以杂交遗传育种方式选育抗病新品种的概率小、难度大，目前尚未见有成功的报道。而通过筛选抗病砧木，以嫁接方式培育抗病嫁接苗，是一条效果显著、方法简便的途径<sup>[29]</sup>。生产实践证明，采用嫁接技术，将红宝石、益农 101 等优质番茄品种与抗性高、亲和力强的砧木品种进行嫁接，培育出的嫁接苗，可以有效地抵抗青枯病的侵染、危害，从而达到高产稳产之目的<sup>[30]</sup>。

### 1.9.4 抗病育种

选育和推广抗病品种是病害防治最经济有效的措施之一，但抗病育种又依赖于品种资源的抗病性鉴定来提供抗源。20 世纪 70 年代以来，从事作物青枯病研究的专家和学者对作物品种抗性鉴定筛选作了大量的研究，利用不同作物的品种资源，选取不同致病力的菌株，采用多种方法，进行大规模抗性筛选测定，从中鉴定出不少的抗性亲本材料，如甘薯品种有韭菜种、蕹菜种、330、R2、R17 等。同时还先后选育出诸多抗病品种，如高抗或中抗青枯病的甘薯良种广薯 709、华北 48、华北 329、汀薯 75-55、金山 1255、福薯 3282 等，抗花生青枯病的品种夏星、汀引等<sup>[31]</sup>，抗烟草青枯病的品种 Nc95、Nc82 和 Oxfod26 等<sup>[32]</sup>。这些抗青枯病作物品种的选育和推广，对推动我国相关农作物生产发展起到了积极作用。

郜刚等（1998）将含有青枯病抗性基因的马铃薯二倍体 *Solanum phureja* 和 *S. vernei* 的原始材料 E 与另外两种材料 C、D 杂交，获得 F<sub>1</sub> 和 BC<sub>1</sub> 两个群体。对其中 140 个基因型做温室苗期人工接种鉴定，结果表明，马铃薯青枯病的群体抗性分离变异范围较大，抗病性表现复杂。主要表现在阻止病原菌苗期入侵、推迟始发病时间、延长潜伏期、减缓发病速度和降低死亡率等 5 个方面<sup>[2]</sup>。

对抗病性相关参数分析表明，马铃薯青枯病抗性受隐性多基因控制。对一些番茄抗病品种进行遗传分析，认为番茄的抗性是由显性多基因或部分主效基因控制的隐性遗传。这种遗传基础必然导致番茄抗性具有复杂性，表现出品系对青枯病抗性的多样性<sup>[33]</sup>。廖伯寿等（1994）分析了几个龙生型抗青枯病花生品种的抗性遗传属性和配合力效应，结果表明，龙生型抗源抗性呈部分显性，存在加性和非加性的遗传效应，抗性的显性程度高于珍珠豆型和多粒型抗源，而且存在明显的细胞质效应<sup>[34]</sup>。唐宝玉等（1995）用 6 个抗青枯病花生品种，分析了株高、总分枝数、总果数、饱果数、百果重、百仁重、出仁率、荚果产量等 8 个性状的遗传变异系数和遗传力。各性状对产量的遗传相关系数和相关选择效果表明，多数性状的遗传变异较小，选择效果不大；各性状的单株遗传力普遍偏低，群体遗传力相对较高。因此，以高产为目标的抗病育种应以集团选择为主<sup>[35]</sup>。

对抗病品种与感病品种植株结构差异的显微观察表明，青枯雷尔氏菌在番茄抗病品种（系）与感病品种（系）的植株根内的扩展差异显著。青枯雷尔氏菌可存在于感病品种（系）主根皮层薄壁细胞及细胞间隙，溶解细胞壁形成溶生腔；而抗病品种（系）组织内青枯雷尔

氏菌多见于内皮层附近的薄壁细胞，对细胞破坏较轻，也不易进入其细胞间隙生长繁殖，更未有溶生腔形成<sup>[36]</sup>。抗病品种（系）的主根皮层及维管束薄壁细胞与青枯雷尔氏菌有明显的粘连现象，对青枯雷尔氏菌菌体在组织内的繁殖与扩展起着减缓与抑制作用，且在维管束组织中的青枯雷尔氏菌被细胞壁所吸附<sup>[37]</sup>。抗病品种（系）主根大导管分支较短，穿孔板相对较多；而感病品种（系）主根大导管分支较长，穿孔板相对较少。穿孔板在导管的输送过程中，都起着过滤或障隔作用，青枯雷尔氏菌在抗病品种（系）导管内扩展（移动）时，所受的障碍要比感病品种（系）多，一定程度上减缓了菌体在导管内的扩展。在同一作物不同品种之间，因植株结构上的差异导致了抗青枯病能力的差异<sup>[38]</sup>。王卉等（1993）采用不同的方法接种和利用扫描透射电镜观察，研究不同致病力的青枯雷尔氏菌对番茄抗病品种和感病品种的吸附、侵入与繁殖过程的影响，发现番茄抗病品种与感病品种植株体内病原菌数量有明显差异，而与青枯雷尔氏菌对番茄根部的吸附关系不显著<sup>[36]</sup>。电镜观察发现：青枯雷尔氏菌强致病力菌株能以游离的形式存在于番茄感病品种根部的细胞间隙中，并能降解植株细胞壁，破坏原生质膜，致使植株发病<sup>[39]</sup>。

抗病品种与感病品种之间存在着生理生化差异。卢同（1990）对甘薯品种抗青枯病的能力与游离氨基酸的关系进行了研究，结果表明甘薯品种的青枯病发病程度与游离氨基酸含量成正相关。甘薯青枯病发病强度越轻的品种，游离氨基酸含量越低，品种的抗青枯雷尔氏菌能力就越强；而发病程度越重的品种，游离氨基酸含量越高，品种的抗青枯雷尔氏菌能力就越弱。在聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳分析中，抗青枯雷尔氏菌能力不同的甘薯品种获得的酯酶同工酶谱由多种酶带以不同的比例构成，抗病、中抗和感病品种各有其特异的酶谱型，酶谱型 6、4 和 5、7 及 10 分别是抗病、中抗和感病品种的特异酶谱型，这一结果作为鉴定甘薯品种抗青枯雷尔氏菌能力的生化指标之一。扫描分析结果：病、健薯苗过氧化物酶同工酶 Pa 区吸光值比的大小，也可以作为鉴定甘薯品种抗青枯雷尔氏菌能力的生化指标之一。郑惠成（1996）对普通木麻黄抗感青枯病无性系与根瘤固氮活性及生物量关系的研究结果表明，对普通木麻黄不同抗病力的无性系植株的根瘤固氮活性、结瘤量、植株含氮量及生物量进行了测定，抗病性强的无性系植株结瘤量、固氮活性比抗病性差的植株高 2~4 倍，抗病无性系植株生长高大，生物量和含氮量明显比感病无性系植株高<sup>[40]</sup>。单志慧等（1997）通过用浸种接种青枯雷尔氏菌的花生进行试验，观察了抗病和感病品种的根系发育和同工酶谱，结果表明，青枯雷尔氏菌均能侵染抗病和感病品种的根系，但在根系发育上有明显的差异；同工酶系统也有显著变化<sup>[41]</sup>。

## 1.10 青枯病的化学防治

青枯病的化学防治，国外广泛采用杀线虫剂或多用途熏蒸剂处理土壤，可杀死线虫和多种病原菌，以减少根的伤口和病菌的侵染机会<sup>[42]</sup>。目前尚无理想的防治青枯病的化学药剂，在应用上常用农用链霉素 200mg/kg 在移栽后灌根 1~2 次，有 60%~70% 的防病效果，但防治成本较高，难以在生产上大面积应用。近年来有试验表明，用 50%DT 杀菌剂 200~400 倍液 and 叶枯净 300 倍液灌根也有较好的防治效果<sup>[43-45]</sup>。黄乃秀（1998）用几种不同抗菌素对培养桉树青枯雷尔氏菌的影响进行了研究，在 Kelman 的液体培养基和固体培养基中加