

番茄细菌性斑疹病病原鉴定及其病害症状鉴别

赵丽涵， 谢关林*， 金扬秀， 安吉明， 郑小军

(浙江大学生物技术研究所，杭州 310029)

摘要 从河北番茄病果样品中分离到的 5 株细菌经致病性、细菌学、Biolog 及脂肪酸测定，被鉴定为 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*。其在果实上的初期症状与番茄细菌溃疡病相似。根据英文名及在番茄果实上的症状，建议使用番茄细菌性斑疹病。

关键词 番茄细菌性斑疹病； 病原鉴定； 症状鉴别

中图分类号 S 432.42

Identification of the pathogen of tomato bacterial speck and differentiation of the symptoms

Zhao Lihan, Xie Guanlin, Jin Yangxiu, An Jiming, Zheng Xiaojun

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Five bacterial strains isolated from the tomato fruit samples in Hebei province were all identified as *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by pathogenicity, bacteriology, Biolog and FAME tests. The initial symptom caused by the pathogen on tomato fruits was similar to that of tomato bacterial canker lesions. Based on the English name (bacterial speck) and the symptom on tomato fruits, it was suggested that the name “bacterial macula” be used as Chinese common name.

Key words tomato bacterial speck; identification of pathogen; differentiation of symptom

丁香假单胞番茄致病变种 [*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie] 引起番茄细菌性斑疹病，除危害番茄外，还能侵染茄子、辣椒、龙葵、白花曼陀罗和毛曼陀罗等植物。该病自 1933 年在美国发现以来，已在欧美等 31 个国家有发生报道，可造成 5%~75% 的产量损失^[1]。我国的台湾和东 3 省曾有发生，据赵廷昌等报道^[2]，1999 年长春郊区不同品种的番茄发病率达到 15%~91%。由于该病危害的严重性和国内分布的局部性，它将被列入我国对外和对内的植物检疫名单。

然而，番茄细菌性斑疹病往往和其他细菌病害混合发生，如细菌性溃疡病，给病害的诊断、病原的检测及防治带来一定的难度，有必要对相似症状的细菌病害作一比较和病原鉴定。2005 年在河北省丰南县应农业部植检处要求送来作番茄细菌性溃疡病标本的样品中发现另一种细菌性病害。本研究拟对分离获得的细菌菌株进行病原菌鉴定及病害的症状鉴别。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与植物

供试 5 株细菌菌株从河北省丰南县送的番茄病株上分离并经纯化后获得；1 株番茄细菌性溃疡菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) 由南京农业大学许志刚教授提供；2 株丁香假单胞菌丁香致病变种 (*P. syringae* pv. *syringae*) 由比利时菌种保藏中心提供。供试致病性测定用番茄品种为合作 903。

1.2 病原菌分离

用灭菌解剖刀切取病健交界部位组织，用 75% 酒精消毒 1 min，经无菌水冲洗 3~5 次后置于无菌培养皿中切碎，加无菌水浸 20 min 左右，然后用接种环蘸取该组织液在 KB 培养基上划线。长出单菌落后用该培养基再次划线使细菌纯化，待致病性测定和病原菌鉴定。

1.3 烟草过敏反应

将纯化的菌株在 KB 培养基上于 28℃ 培养

收稿日期：2006-01-10
基金项目：杭州市重大科技项目(200432239)；国家自然科学基金项目(30370951)
* 通讯作者

24 h, 用无菌水配制成浓度约 1×10^8 cfu/mL 的细菌悬浮液, 采用注射法接种到烟草叶片上, 在 26~28 °C 下保持 24 h, 检查过敏性反应。

1.4 致病性测定

在无菌栽培的合作 903 番茄苗上接种测定致病性, 浓度同过敏反应, 6~7 叶的番茄叶片上喷雾接种, 以无菌水喷雾作对照, 置保湿桶内夜间湿桶 3 d, 5 d 后开始观察病程, 发病后采取病斑重新分离菌株。

1.5 病原细菌鉴定

1.5.1 细菌形态与培养性状

细菌菌体形态观察用 2% 的磷钨酸染色液 (PTA, pH7.2) 负染, 用透射电镜观察细菌形态、鞭毛着生位置及鞭毛数目等。培养性状测定按 Klement 等的方法^[3-4]。

1.5.2 生理生化及测定

参照 Klement 等的方法。

1.5.3 Biolog 测定

对分离的菌株经菌落形态、致病性及生理生化测定后, 用 Biolog 进行证实, 在含 95 个碳源的 Biolog (Biolog Inc., Investment Blvd. 3447, Suite 3 Hayward 94545, USA) 阴性 (GN) 微孔板中, 每孔加入 150 μ L 所测细菌悬浮液 (OD 值 0.25)。在 30 °C 下培养 24 h 后由 Biolog 读数机测得反应结果, 并直接进入 Biolog 专用细菌鉴定程序 (4.01 版本)。具体操作参引谢关林方法^[5-6]。

1.5.4 脂肪酸测定 (FAME)

所有纯化的参试菌株先在 NA 培养基上于 28 °C 生长 24 h 后, 转入含 3% 胰蛋白酶的 TSA 固体培养基上再培养 24 h。然后用直径 4 mm 的无菌塑料接种环挑取一环培养菌放入有螺帽的试管中, 提取脂肪酸^[6]。FAME 的指纹图谱由 5980a 型脂肪酸分析仪分析, 鉴定结果通过专化的微生物鉴定系统软件 (MIS version 4.15) 获得。

2 结果与分析

2.1 病原细菌分离和致病性测定

2.1.1 病原菌分离

从番茄细菌性斑疹病病果上获得纯化的细菌菌株 5 株。

2.1.2 烟草过敏反应及番茄上致病性测定

8 株参试菌株注射的番茄叶片部位均表现过敏性枯斑反应 (HR), 证明它们均具致病作用。番茄上第 6 天始现症状, 15 d 后症状稳定。番茄细菌性

斑疹病叶片感染, 密生不定型大小差异大的深褐色至黑色斑点, 边缘颜色较深, 中间下陷, 斑点周围有黄色晕圈。叶柄和茎秆症状和叶部症状相似, 产生不定型凹陷黑色斑点, 但病斑周围无黄色晕圈, 病斑易连成斑块。发病后再分离获得了原接种的病原细菌。

2.2 病害的症状鉴别

番茄细菌性斑疹病主要为害番茄叶、茎、花、叶柄和果实, 尤以叶缘及未成熟果实最明显。发病时期从苗期开始就有表现, 同一植株叶片先感病, 茎和花后感病。叶片染病, 产生深褐色至黑色斑点, 四周常具黄色晕圈; 叶柄和茎染病, 产生黑色斑点; 花上病斑表现为黑褐色近圆形小点; 幼嫩绿果染病, 初现稍隆起的小斑点, 以后变成暗褐色疮痂状小斑, 果实近成熟时, 围绕斑点的组织仍保持较长时间绿色 (图 1a)。而番茄溃疡病在幼苗期发病, 真叶由下向上萎蔫坏死, 有的在胚轴或叶柄处产生溃疡状凹陷条斑, 维管束变色, 髓部变空, 最后枯死。成株染病, 初下部叶片凋萎或卷缩, 似缺水状, 随后全叶呈青褐色皱缩干枯, 进一步发展在叶柄、侧枝或主茎上形成灰白至灰褐色条状枯斑, 果实发病多由茎扩展至果柄, 使得幼果畸形空瘪, 胎座变小, 停止生长。番茄溃疡病在果实上的典型症状是产生中央暗褐色疮痂状隆起, 边缘乳白色“鸟眼”斑 (图 1b)。

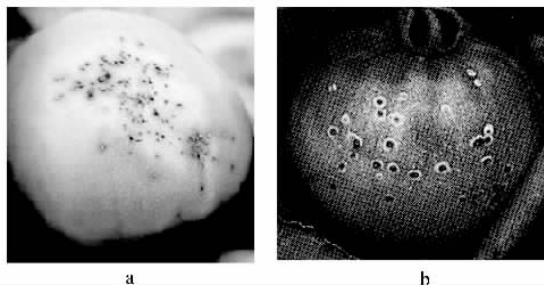


图 1 番茄细菌性斑疹病病果 (a) 和溃疡病病果 (b)

2.3 病原细菌鉴定

2.3.1 病原细菌形态

供试菌株的菌体呈短杆状, 单细胞, 直或微弯, 大小为 $(1.5 \sim 4.0) \mu\text{m} \times (1.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$, 有 1 至数根极生鞭毛, 无荚膜, 无芽孢, 革兰氏染色阴性。

2.3.2 培养性状

供试的菌株在 KB 培养基上 28 °C 培养 2 d, 形成圆形、乳白色、表面光滑、全缘、粘稠状菌落, 菌落直径 2~3 mm。产生绿色荧光。

2.3.3 生理生化性状

5 株分离的番茄细菌性斑疹病菌的生理生化性状测定结果如表 1 所示, 除 DL—乳糖利用外与赵

廷昌等的测定结果基本一致,但与丁香假单胞杆菌对照菌株有显著差别。

表 1 番茄细菌性斑疹病菌主要生理生化性状测定结果

测定项目	5 个分离菌株	丁香假胞对照菌株	参考文献[7]
KB 培养基上产荧光	+	+	+
蔗糖形成果聚糖	+	+	+
氧化酶反应	—	—	—
马铃薯软腐	—	—	—
精氨酸双水解酶反应	—	0 ¹⁾	—
烟草过敏反应	HR	HR	HR
需氧生长	+	+	+
蔗糖利用	—	+	—
DL—乳糖利用	—	+	+
赤藓醇利用	—	+	—
葡萄糖酸氧化	—	—	—
甘露醇利用	+	+	+
山梨醇利用	+	+	+
41℃下生长	—	—	—

1) 未做,没有结果。

2. 3. 4 Biolog 和 FAME 分析鉴定结果

5 株分离的番茄细菌性斑疹病菌经 Biolog 鉴定为 *P. syringae* pv. *tomato*, 其 Biolog 相似性在 0.63~0.74; 脂肪酸分析鉴定与 Biolog 结果相一致, 它们的 FAME 相似性在 0.61~0.71(表 2), 与 2 株丁香假单胞对照菌株有所差别。

表 2 番茄细菌性斑疹病菌的 Biolog 和脂肪酸(FAME)分析鉴定结果¹⁾

菌株编号	原鉴定结果	Biolog 鉴定结果	相似性	脂肪酸分析鉴定结果	相似性
CPS011	无	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.74	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.61
CPS025	无	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.65	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.69
CPS040	无	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.63	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.71
CPS079	无	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.70	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.65
CPS081	无	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.68	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	0.70
LMG 2230	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.46	<i>P. syringae</i>	0.81
LMG 2231	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.66	<i>P. syringae</i>	0.67
CQCM01	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0.69	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0.65

1) *P. syringae*=*Pseudomonas syringae*; *C. michiganensis*=*Clavibacter michiganensis*。

疡病在果实上的初期症状与番茄细菌性斑疹病很相似,但到后期细菌性溃疡病病斑扩大成边缘乳白色的隆起“鸟眼”斑,而番茄细菌性斑疹病斑仍保持深褐色隆起的小点。据国外报道,在番茄上引起斑点的还有 *Xanthomonas campestris* pv. *veccicatora* 和 *P. syringae* pv. *syringae*, 前者英文名称为 bacterial spot, 后者为 bacterial leaf spot 建议分别译为番茄细菌斑点病和番茄细菌性叶斑病。避免由 *P. syringae* pv. *tomato*、*P. syringae* pv. *syringae* 及 *Xanthomonas campestris* pv. *veccicatora* 引起的斑点病在国内番茄细菌性“斑点”病叫法上的混淆。

参考文献

[1] JARDINE D J, STEPHENS C T, FULBRIGHT D W. Poten-

3 结论与讨论

本研究结果表明,从河北省丰南县番茄细菌溃疡病区的病果样本中分离到的 5 个番茄细菌性斑疹病菌是由 *P. syringae* pv. *tomato* 引起,与 2001 年赵廷昌等报道的番茄细菌性斑点病为同一病原,生化反应的唯一不同之处是 DL—乳糖利用反应不同,这可能与赵廷昌等利用乳糖有关。但与引起番茄细菌性叶斑病的 *P. syringae* pv. *syringae* 有明显不同,两者的 LOPAT 测定结果完全一致,即在蔗糖形成果聚糖,氧化酶反应,马铃薯软腐,精氨酸双水解酶反应和烟草过敏反应均表现为+,—,—,—,+反应,表明两者均属丁香假单胞杆菌;*P. syringae* pv. *syringae* 能利用蔗糖、赤藓醇和 DL—乳糖,但 *P. syringae* pv. *tomato* 不能把它们作为碳源利用。Biolog 和 FAME 分析也证实了生理生化的测定结果。

由 *P. syringae* pv. *tomato* 引起的番茄细菌性斑疹病在我国又称番茄细菌性斑点病、番茄细菌性叶斑病、番茄细菌性褐斑病,叫法比较乱,根据其英文名称 bacterial speck 及病原在果实上所引起的症状,作者认为称番茄细菌性斑疹病较为妥当。番茄细菌性溃

tial sources of initial inoculum for bacterial speck in early planted tomato crops in Michigan; debris and volunteers from previous crops [J]. Plant Disease, 1988, 72(2): 246 - 249.

[2] 赵廷昌 于 莉. 番茄细菌性斑疹病及其防治[J]. 植物保护, 1999, 25(4): 56 - 56.

[3] KLEMENT Z, RUDOLPH K, SANDS D C. Methods in phyto bacteriology [M]. Budabest: Akademiai Kiado, 1990: 115 - 286.

[4] NOEL R K. Bergey’s manual of systematic bacterio logy[M]. Baltimo re: William s & Wilk ins, 1984: 170 - 171.

[5] 谢关林. 水稻病原细菌鉴定方法的比较研究[J]. 浙江大学学报 (农业 & 生命科学版), 2004, 26(4): 353 - 358.

[6] 谢关林. 水稻细菌性叶鞘褐腐病研究[J]. 植物保护学报. 2001, 28(2): 97 - 102.

[7] 赵廷昌, 孙福在, 宋文生. 番茄细菌性斑疹病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 37 - 42.