

烟草青枯病菌的田间快速检测

杜桂萍¹, 周建国², 邓金奇¹, 罗宽¹, 刘丹¹, 蔡勇¹, 肖启明^{1*}

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.中国大拇指集团 湖南大鼎置业有限公司, 湖南 长沙 410002)

摘 要: 用平板菌落计数法确定 7 种抗菌素对烟草青枯菌生长和抑制杂菌的最高浓度, 通过正交试验确定药剂的最佳组合: 安必仙 9.996×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$ 、氧氟沙星 9.990×10^{-7} $\mu\text{g/mL}$ 、罗红霉素 2.998×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ 、头孢拉定 3.000×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ 、乙酰螺旋霉素 1.998×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$ 、克拉霉素 2.999×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$ 、阿奇霉素 1.999×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ 。利用以上最佳浓度配比的选择培养基检测湖南湘西、永州、郴州烟田土样中青枯菌, 结果表明: 湘西土样中青枯菌含量较大, 永州次之, 郴州相对较少, 与青枯病发生的严重程度呈正相关, 其中加青枯菌拮抗菌肥土壤中的含菌量明显少于未加菌肥土壤。

关 键 词: 烟草青枯病; 抗菌素; 选择培养基; 检测

中图分类号: S435.72 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)02-0192-04

Rapid detection of tobacco bacterial wilt in the field

DU Gui-ping¹, ZHOU Jian-guo², DENG Jin-qi¹, LUO Kuan¹, LIU Dan¹, CAI Yong¹, XIAO Qi-ming^{1*}

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Thumb Group Company Dading Properties Limited of Hunan, Changsha 410002, China)

Abstract: The highest concentration of seven antibiotics on the growth of tobacco bacterial wilt, the inhabiting fungus and competitive bacterial were chosen with plate culture count. The results showed that ampicillin capsule was 9.996×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$, ofloxacin tablets 9.990×10^{-7} $\mu\text{g/mL}$, roxithromycin tablets 2.998×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$, cefradine capsules 3.000×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$, acetylspiramycin tablets 1.998×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$, clarithromycin dispersible tablets 2.999×10^{-5} $\mu\text{g/mL}$, and azithromycin capsule was 1.999×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$. The selected medium of the optimal concentration ratio of seven antibiotics to detect tobacco bacterial wilt in the soil from different areas was used, and it was found that the number of tobacco bacterial wilt in soil samples in Xiangxi was larger than in Yongzhou, and relatively smaller in Chenzhou. There was a positive correlation between the disease index and the number of bacterial wilt, and the tobacco bacteria in adding antagonistic bacterial fertilizer soil were less than in common soil. The method can be used to detect tobacco bacterial wilt quickly and to predict the occurrence of tobacco wilt as well.

Key words: tobacco bacterial wilt; antibiotic; selected medium; detection

烟草青枯病对烟草的产量和质量影响极大, 是烟草生产上的毁灭性病害^[1-2]。烟草青枯病致病菌烟草青枯罗尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 是土传细菌, 连作烟田中存在大量病原, 易造成严重危害^[3]。目前对青枯病的防治尚无理想药剂和抗病品种^[4-5], 加强土壤中青枯菌的检测可为预防烟草青枯病提

供有效依据。Lee Yung-An等^[6]利用RAPD技术获得青枯病菌特异性片段, 经克隆测序后设计特异性引物进行PCR扩增, 以检测土壤中的青枯病菌, 这种方法能快速检测出样品中的青枯菌, 但不能区分其中的活菌和死菌, 并且检测结果容易出现假阳性。Priou等^[7]利用双抗体夹心ELISA(DAS-ELISA)来检

收稿日期: 2009-12-01

基金项目: 湖南省烟草专卖局重点项目(08-11Aa03)

作者简介: 杜桂萍(1982—), 女, 云南曲靖人, 硕士研究生, 主要从事烟草青枯病生物防治研究; *通讯作者, xqm-xqm@sohu.com

测土壤样品中的青枯菌,结果显示33个国家的273个菌株均可被成功检测.利用ELISA对马铃薯和其他茄科作物作检测,发现多克隆抗体缺乏足够的特异性,不仅能够和目标细菌作用,而且能和与目标菌密切相关的株系、生理小种和生物型作用^[8].土壤中的真菌和腐生细菌较多,增加了土壤中青枯菌检测的难度,所以配制有效的选择培养基来检测土壤中的青枯菌尤为重要.针对青枯菌的选择性培养基,许多学者根据该菌对不同抗菌素的特定抗性研究出各种配方,多数因为菌株抗性的差异或者样品中腐生菌太多而不能广泛推广使用^[8].Granada等^[9]在四唑培养基的基础上作了改进,研制出一种半选择性培养基,这一培养基适合大部分青枯菌生长,但当土壤中腐生细菌较多时有一定的局限性.张新生等^[10]利用加抗菌素的培养基检测土壤中的青枯菌取得了良好的效果.笔者在上述研究的基础上加入一定量的抗菌素,配制出一种可以抑制真菌和绝大多数细菌的选择培养基,可以快速地检测出土壤中青枯菌的活菌数量,现将结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 材料

烟草青枯病菌 V3,由湖南农业大学生物安全科学技术学院植物病理室提供,菌液浓度 6×10^2 cfu/mL.

供试药剂:氨苄西林胶囊(香港联邦制药厂有限公司出品,A),氧氟沙星片(重庆科瑞制药有限责任公司出品,B),罗红霉素片、头孢拉定胶囊、乙酰螺旋霉素片(重庆科瑞制药有限责任公司出品,C,D,E),克拉霉素分散片,阿奇霉素胶囊(宜昌长江药业有限公司出品,F,G).

土样:2009年从湖南郴州、湘西、永州采样各8份(施用菌肥烟田土样4份,未施菌肥对照土样4份),储存于4℃冰箱.

培养基:肉汁冻培养基(NA),参照文献^[11]方法配制.

1.2 方法

1.2.1 烟草青枯病田间发病情况调查

运用五点取样法,选择有代表性的烟株作为定点株,于发病高峰期进行调查,按病情分级标准,记录发病情况,计算病情指数.取样和分级按全国烟草行业烟草病害调查分级标准Yc/T39—1996进行,病情指数计算按烟草病害药效试验方法Yc/T40—1996进行.

1.2.2 7种抗菌素对青枯菌生长无抑制作用的最高浓度的确定

分别将0.25g氨苄西林胶囊、克拉霉素分散片、阿奇霉素胶囊、头孢拉定胶囊和0.1g氧氟沙星片溶于100mL水中,0.15g罗红霉素片和0.1g乙酰螺旋霉素片溶于125mL水中,配制成一定浓度的母液备用(表1).分别取每种药剂1、0.5、0.2mL加入10mL牛肉膏培养基中,混匀冷却后加入0.2mL青枯菌液,各处理重复3次,置30℃恒温箱中培养3d,记录菌落数.

将无菌水和各药剂按10:0.5、10:0.2、10:0.1、10:0.06、10:0.04、10:0.02的体积比稀释(质量浓度见表1),分别取每种稀释药剂0.5mL加入10mL牛肉膏培养基中,混匀冷却后加入0.2mL青枯菌液,各处理重复3次,置30℃恒温箱中培养3d,记录菌落数.

表1 7种抗菌素质量浓度

Table 1 The concentration of seven antibiotics

μg/mL

抗菌素	质量浓度						
	母液($\times 10^{-1}$)	10:0.5($\times 10^{-2}$)	10:0.2($\times 10^{-2}$)	10:0.1($\times 10^{-3}$)	10:0.06($\times 10^{-3}$)	10:0.04($\times 10^{-3}$)	10:0.02($\times 10^{-3}$)
A	9.996	4.998	1.999	9.996	5.998	3.999	1.999
B	9.990	4.995	1.998	9.990	5.994	3.996	1.998
C	9.992	4.996	1.998	9.992	5.994	3.997	1.998
D	9.995	1.999	1.999	9.995	5.995	3.998	1.999
E	9.990	4.995	1.998	9.990	5.994	3.996	1.998
F	9.996	4.998	1.999	9.996	5.998	3.999	1.999
G	9.996	4.998	1.999	9.996	5.998	3.999	1.999

1.2.3 7种药剂对青枯菌无抑制作用的最佳浓度配比的确定

将7种抗菌素随机分为2组,预先测试每种药剂的最佳配比浓度.第一组:氨苄西林胶囊,氧氟沙星片,罗红霉素片,采用正交试验法^[12]选取 $L_9(3^4)$ 正交表,按三因素三水平安排实验;第二组:头孢拉定胶囊、乙酰螺旋霉素片,克拉霉素分散片和阿奇霉素胶囊,选取 $L_9(3^4)$ 正交表,按四因素三水平安排实验.根据所得结果进行7种药剂最佳组合配比试验,选取 $L_{18}(3^7)$ 正交表,按七因素三水平安排实验.采用100 mL肉汁冻培养基加 $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 结晶紫和 $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 红四氮唑作为基本培养基,依次加入正交表中所列抗菌素药量(表3),混匀后取10 mL加入培养皿中,冷却后加入0.2 mL青枯菌液,每种处理重复5次,置 30°C 恒温箱中培养3 d,用未加药剂的肉汁冻培养基做对照,记录菌落数,计算回收率.回收率=(试验平均菌落数/对照平均菌落数) $\times 100\%$.

1.2.4 土壤中青枯菌的检测

分别取土样1 g加入100 mL灭菌水中,作3次10倍梯度稀释,留 10^{-3} 稀释液备用.利用试验得出的最佳抗菌素药量组合制成培养基,培养皿中倒入10 mL,冷却后分别加入各地土壤悬浮液0.2 mL,各处理重复3次, 30°C 恒温培养3 d,记录菌落数,按平板菌落计数法计算土壤中含菌量.每毫升溶液细菌数=平板菌落数 \times 稀释倍数/平板上加菌液的量(mL).计算各地4份土样的青枯病菌平均值.

1.3 数据分析

试验数据用Excel进行处理,用DPS7.05统计软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 不同抗菌素对青枯菌生长无抑制作用的最大浓度

青枯菌在7种不同浓度抗菌素培养基中的生长情况(表2)表明,对青枯菌无抑制作用抗菌素的最大质量浓度为:氨苄西林 $1.999 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (10:0.2),罗红霉素 $9.990 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (10:0.1),头孢拉定 $1.999 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (10:0.2),乙酰螺旋霉素 $4.995 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (10:0.5),克拉霉素 $4.998 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (10:0.5),氧氟沙星 $3.996 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (10:0.04)和阿奇霉素 $5.994 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (10:0.06).

表2 7种不同浓度抗菌素中青枯菌菌落数

Table 2 Tobacco bacterial wilt colonies in seven concentrations of antibiotics

抗菌素	菌落数					
	10:0.5	10:0.2	10:0.1	10:0.06	10:0.04	10:0.02
A	3	64	52*			
B	0	0	0	38	50	69*
C	67	46	55			
D	81	60	78*			
E	57	28	56*			
F	57	61	37			
G	0	0	0	50	41	25
CK	58					

*表示有少量杂菌.

2.2 不同抗菌素对青枯菌无抑制作用的最佳浓度配比

分组预测试验中通过直观分析法得出7种抗菌素的最佳配比为:氧氟沙星 $4.995 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ (5 μL),氨苄西林 $1.999 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ (200 μL),罗红霉素 $9.992 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ (10 μL),阿奇霉素 $2.999 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$ (3 μL),头孢拉定 $1.999 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ (200 μL),乙酰螺旋霉素 $6.993 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ (70 μL),克拉霉素 $4.998 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ (50 μL).根据以上浓度做7因素3水平试验,选取 $L_{18}(3^7)$ 正交表(表3).

从表3中极差R值可知,药剂B和C的R值最大,即B和C对测定结果影响较大,且B和C中 $k_3 > k_2 > k_1$,说明3水平的回收率最好,A、D、E、F、G药剂对试验有影响但不显著,根据k值可知回收率较好的条件为,3水平A,3水平D,3水平E,2水平F,2水平G.对试验结果进一步正交试验方差分析,结果表明, F_B 和 F_C 均大于F临界值,说明B、C对测定结果影响显著,而 F_A 、 F_D 、 F_E 、 F_F 、 F_G 都小于F临界值,说明它们对测定结果影响不显著,与极差分析的结果正好相符.综上所述,选择 $A_3B_3C_3D_3E_3F_2G_2$ 为本试验的最佳条件,即氨苄西林100 μL ($9.996 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$),氧氟沙星1 μL ($9.99 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$),罗红霉素3 μL ($2.998 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$),头孢拉定3 μL ($3.000 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$),乙酰螺旋霉素20

$\mu\text{L}(1.998 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL})$, 克拉霉素 $30 \mu\text{L}(2.998 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL})$, 阿奇霉素胶囊 $2 \mu\text{L}(1.999 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{mL})$.

表 3 正交试验因素水平及结果
Table 3 Factors , levels and results orthogonal experiment

试验号	影响因素							菌量收率/%
	A	B	C	D	E	F	G	
水平 1	200	5	10	100	70	50	3	
水平 2	150	3	7	80	40	30	2	
水平 3	100	1	3	60	20	10	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	1	2	2	2	2	2	2	60.76
3	1	3	3	3	3	3	3	68.16
4	2	1	1	2	2	3	3	0
5	2	2	2	3	3	1	1	51.41
6	2	3	3	1	1	2	2	61.92
7	3	1	2	1	3	2	3	55.31
8	3	2	3	2	1	3	1	56.28
9	3	3	1	3	2	1	2	60.18
10	1	1	3	3	2	2	1	30.48
12	1	2	1	1	3	3	2	9.737
13	1	3	2	2	1	1	3	26.39
13	2	1	2	3	1	3	2	40.70
14	2	2	3	1	2	1	3	33.89
15	2	3	1	2	3	2	1	44.01
16	3	1	3	2	3	1	2	33.30
18	3	2	1	3	1	2	3	38.17
18	3	3	2	1	2	3	1	35.64
k1	195.52	159.79	152.10	196.49	223.47	205.16	217.82	
k2	231.94	250.24	270.21	220.74	220.94	290.65	266.60	
k3	278.87	296.30	284.03	289.09	261.99	210.52	221.91	
R	13.89	22.752	21.99	15.43	6.83	14.25	8.13	

2.3 土壤中青枯菌的检测结果

从表 4 可知：湘西土样中含菌量最多，永州次之，郴州相对较少；加菌肥土样中菌量少于未加菌肥土样中菌量，检测平板中未长出真菌和其他细

菌性杂菌。随着菌量的增加，病情指数也在增加，土壤含菌量与青枯菌发病情况基本呈正相关，可以通过简单的线性回归得方程 $y=23.92x - 1.54$ (y 为病情指数， x 为平皿所测土样中菌量)。

表 4 土样中所含菌量与病情指数

Table 4 The number of strain in soil samples and disease index

土样	菌量 $/(\times 10^8 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1})$	杂菌		病情指数
		真菌	细菌	
郴州菌肥土样	0.07	0	0	1.44
郴州对照土样	0.13	0	0	6.70
永州菌肥土样	1.3	0	0	16.51
永州对照土样	1.7	0	0	22.83
湘西菌肥土样	1.6	0	0	45.10
湘西对照土样	2.1	0	0	63.20

3 讨论

采用平板菌落计数法，在肉汁冻培养基中加入不同浓度抗菌素药剂，以方差分析优化试验条件，得出能抑制真菌和绝大多数细菌而不抑制青枯菌生长的选择培养基，能够快速检测出土壤中青枯菌的菌量，可提前预测青枯病的发病情况，及时采取措施预防青枯病。此方法不需要高端仪器，简便易

(下转第202页)